

TRATAMIENTO DE CONVULSIONES CON FOSFATASA ALCALINA RECOMBINANTE

LISTADO DE SECUENCIAS

- 5 **[0001]** La presente solicitud contiene un Listado de Secuencias la cual se ha presentado electrónicamente en el formato ASCII formato y se incorpora por la presente como referencia en su totalidad. Dicha copia ASCII, creada el 1 de diciembre de 2015, se denomina 0239PCT_SL.txt y su tamaño es de 19,449 bytes.

CAMPO TÉCNICO

- 10 **[0002]** La presente divulgación se refiere al método para tratar las convulsiones en los pacientes con o sin hipofosfatasa (HPP). Más específicamente, la presente divulgación se refiere a la identificación de la subpoblación de pacientes con o sin hipofosfatasa que tienen niveles y/o funciones de al menos uno de los sustratos de fosfatasa alcalina aberrantes
- 15 pero que tienen un fenotipo de mineralización no afectado o normal; y el tratamiento de dicha subpoblación de pacientes con al menos una fosfatasa alcalina recombinante.

ANTECEDENTES

- [0003]** La hipofosfatasa (HPP), es una rara forma hereditaria de raquitismo u
- 20 osteomalacia con una incidencia tan grande como uno por cada 2.500 nacimientos en menonitas canadienses y uno por 100.000 nacimientos en la población general para la forma más grave de la enfermedad. Las formas más leves son más frecuentes. Este "error innato del metabolismo" ocurre debido a la(s) mutación(es) de pérdida de función en el gen (*ALPL*) que codifica la isoenzima de tejido no específico de la fosfatasa alcalina (TNALP; también
- 25 conocida como fosfatasa alcalina (ALP) tipo hígado, hueso, riñón. La característica bioquímica distintiva en la actividad de la ALP en el suero (hipofosfatasemia), lo que conduce a niveles elevados de tres sustratos compuestos de fosfato en la sangre y/o en la orina: el pirofosfato inorgánico (PPi), la fosfoetanolamina (PEA) y el piridoxal-5'-fosfato (PLP).

[0004] La HPP se presenta en las siguientes formas: perinatal, infantil, pediátrica, adulta y odontohipofosfatasa, clasificadas históricamente de acuerdo con la edad de diagnóstico. El fenotipo varía desde la ausencia casi completa de mineralización ósea en el útero con muerte fetal hasta fracturas espontáneas y enfermedades dentales que ocurren primero en la vida adulta. La HPP perinatal letal (HPP perinatal o PL-HPP) se manifiesta en el útero y puede ocasionar muerte fetal. Algunos neonatos sobreviven varios días, pero sufren un creciente compromiso respiratorio debido a las enfermedades hipoplásicas y raquítics del tórax. En la HPP infantil diagnosticada antes de los seis meses de edad, el desarrollo postnatal parece normal hasta el comienzo de una alimentación deficiente, el aumento de peso inadecuado y la aparición de raquitismo. Las características radiológicas son características y muestran la mineralización esquelética deteriorada, a veces con desmineralización esquelética progresiva que conduce a fracturas de costilla y deformidad torácica. La HPP pediátrica tiene una alta manifestación clínica variable. La pérdida prematura de los dientes de leche se debe a la aplasia, hipoplasia o displasia del cemento dental que conecta la raíz del diente con el ligamento periodontal. El raquitismo causa estatura baja y deformidades esqueléticas incluyendo, por ejemplo, las piernas arqueadas, la ampliación de las muñecas, las rodillas y los tobillos como resultado de la metáfisis acampanada. La HPP del adulto se presenta habitualmente durante la edad intermedia, aunque frecuentemente hay una historia de raquitismo y/o pérdida prematura de dientes seguido de una buena salud durante la adolescencia y la vida del adulto joven. Las fracturas recurrentes por estrés de metatarsianos son habituales y la deposición de pirofosfato de calcio dihidratado provoca ataque de artritis y artropatía por pirofosfato. La odontohipofosfatasa se diagnostica cuando la única anormalidad clínica es enfermedad dental y los estudios radiológicos, incluso biopsias óseas, no revelan signos de raquitismo u osteomalacia.

[0005] Las formas clínicas más graves de HPP usualmente se heredan como rasgos recesivos autosómicos mostrando los padres de tales pacientes que niveles subnormales de actividad sérica de FA. Para las formas más leves de HPP, *es decir*, de adulto y odontohipofosfatasa, también se ha documentado un patrón de herencia dominante autosómico.

[0006] Cuando el caso de HPP es poco común, generalmente se falla en diagnosticarla en las primeras etapas de la enfermedad. Además, las mayoría de los síntomas de la HPP, tales como la forma anormal del cráneo, el dolor de espalda, las fracturas óseas, las espuelas óseas (protuberancias alrededor de las articulaciones), las

5 piernas arqueadas, protuberancias en la caja torácica, pérdida de estatura al pasar del tiempo, la estatura baja y el dolor en las coyunturas, son similares a los síntomas causados por otras enfermedades más comunes, tales como la osteogénesis imperfecta, el raquitismo nutricional, la osteoartritis y la osteoporosis. Otros factores que se usan para diagnosticar la HPP, incluye por ejemplo, niveles bajos de fosfatasa alcalina (ALP) en la sangre, niveles

10 más altos de lo normal de calcio en la sangre y en la orina, cambios óseos (incluyendo el arqueado de los huesos en brazos y piernas), crecimiento deficiente, muñecas y tobillos gruesos, ligamentos sueltos, dolor óseo, fracturas, pérdida prematura de dientes, antecedentes familiares de HPP y mutaciones en el gen *ALPL*.

[0007] Como los pacientes de HPP pueden desarrollar síntomas (*es decir*, defectos

15 de mineralización) con diferente severidad, existe una subpoblación de pacientes de HPP indefinida que presentan síntomas menores o no presentan ningún síntoma común de HPP, quienes tradicionalmente han sido erróneamente diagnosticados o se les ha ignorado para seguir un tratamiento (tal como el de la sustitución enzimática con TNALP recombinante). Además, muchos pacientes con HPP presentan síntomas adicionales (como convulsiones)

20 además de sus defectos característicos de mineralización. Por lo tanto, existe la necesidad de identificar tales poblaciones de pacientes no sólo para monitorear (y por lo tanto para el tratamiento temprano) un potencial deterioro de la salud con síntomas de HPP sino también, para tratar otros síntomas distintos de los defectos de mineralización con TNALP recombinante.

RESUMEN DE LA INVENCION

[0008] La presente divulgación proporciona un método para identificar una población de sujetos con mutaciones en el gen de la fosfatasa alcalina (p. ej. *ALPL* en humanos y *Akp2* en ratones). Tal población de sujetos puede ser diagnosticada previamente

30 o puede no ser todavía diagnosticada con HPP. Dichas mutaciones genéticas pueden dar

como resultado niveles reducidos de proteína de fosfatasa alcalina y/o función (es) de proteína [p. ej. funciones enzimáticas hacia PPi, PLP y/o PEA u otros sustratos tales como *para*-nitrofenilfosfato (pNPP)]. Dichas mutaciones genéticas pueden identificarse por métodos bien conocidos en la materia. Después de identificar a esa población, una estrecha

5 vigilancia seguirá la progresión de su enfermedad que presenta convulsiones y/o con otros síntomas de HPP. La fosfatasa alcalina recombinante se suministrará a dicha población para tratar o prevenir convulsiones y/u otros síntomas.

[0009] La presente divulgación en un aspecto proporciona un método para identificar una población de sujetos con mutaciones del gen de la fosfatasa alcalina y al

10 menos un síntoma. En algunas modalidades, los sujetos de dicha población han sido previamente diagnosticados con HPP pero tienen defectos menores de mineralización de hueso y/o dientes, no afectados o indetectables. En otras modalidades, los sujetos en dicha población todavía no han sido diagnosticados con HPP. En una modalidad, los sujetos en dicha población aún no han sido diagnosticados con HPP y no presentan síntomas

15 característicos de HPP (tales como defectos de mineralización de hueso y/o dientes). En algunas modalidades, el al menos un síntoma no HPP es una convulsión. Dicha convulsión puede responder o no responder a la vitamina B6 y/o a otro (s) tratamiento (s) farmacológico (s) anticonvulsivo (s) tradicional (es). El término "indetectable" en la presente divulgación se refiere a un escenario en el que un fenotipo (p. ej., uno de los fenotipos de mineralización

20 de hueso y/o dientes) en un paciente es demasiado pequeño para ser detectable por una persona versada en la materia usando tecnología común conocida en la materia, o a un escenario en el cual tal persona versada en la materia no puede diferenciar el fenotipo sobre ese paciente del fenotipo de una persona común o sana o de un paciente común sin una enfermedad o trastorno en el que el fenotipo es un diagnóstico estándar comúnmente

25 aceptado (p. ej., la HPP). El término "no afectado" en la presente divulgación se refiere a un escenario en el que un fenotipo (p. ej., los fenotipos de mineralización de hueso y/o dientes) en un paciente es indetectable o es detectable pero demasiado pequeño para cumplir con el umbral de diagnóstico comúnmente aceptado, de modo que dicho paciente con el fenotipo es considerado por una persona versada en la materia como un paciente que tiene

una enfermedad o un trastorno en el que el fenotipo es un diagnóstico estándar comúnmente aceptado (p. ej., la HPP).

[0010] La presente divulgación proporciona un método para identificar una subpoblación de sujetos con HPP, que comprende medir el grado de mineralización de los huesos y/o dientes de dichos sujetos y comparar tal grado con aquellos sujetos normales y sanos, en donde dichos sujetos de la subpoblación tienen defectos de mineralización menores, no afectados o indetectables comparado con los sujetos normales y sanos. En algunas modalidades, tales sujetos en la subpoblación tienen síntomas de convulsiones. Dichos síntomas de convulsión pueden responder o no responder a la vitamina B6 y/o a otro (s) tratamiento (s) farmacológico (s) anticonvulsivo (s) tradicional (es).

[0011] La presente divulgación proporciona un método para identificar una subpoblación de sujetos que no han sido diagnosticados con HPP, que comprende medir los niveles de fosfatasa alcalina y/o las funciones enzimáticas en tal subpoblación, en donde dichos sujetos en la subpoblación tienen niveles defectuosos de fosfatasa alcalina y/o funciones enzimáticas comparadas con sujetos normales y sanos. En algunas modalidades, tales sujetos en la subpoblación tienen síntomas de convulsiones. Dichos síntomas de convulsión pueden responder o no responder a la vitamina B6 y/o a otro (s) tratamiento (s) farmacológico (s) anticonvulsivo (s) tradicional (es). La tecnología tradicional en la materia puede aplicarse para medir los niveles de fosfatasa alcalina en estos sujetos. Por ejemplo, se le pueden realizar pruebas a los niveles de ADN/ARN de la fosfatasa alcalina mediante PCR o hibridación (p. ej., los métodos Southern/Northern blot) los cuales se emplean en la detección de genes. Se pueden realizar pruebas a los niveles de proteína de la fosfatasa alcalina a través de electroforesis en gel de poliacrilamida/electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (por sus siglas en inglés, PAGE/SDS-PAGE), Western bolt, ELISA u otros inmunoanálisis que utilizan anticuerpos anti-fosfatasa alcalina. Las funciones enzimáticas de la fosfatasa alcalina se pueden ensayar *in vitro* o *in vivo* utilizando sustratos de fosfatasa alcalina PPi, PLP y/o PEA u otros sustratos tales como *para*-nitrofenilfosfato (pNPP). En una modalidad, dichos sujetos en la subpoblación tienen defectos de mineralización menores, no afectados o indetectables.

[0012] Como un aspecto, la presente divulgación proporciona un método para identificar una población o subpoblación del sujeto como se ha descrito con anterioridad. Como otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para tratar al menos un síntoma en aquellos sujetos en la población o subpoblación identificada con suplementación de ALP recombinante. En algunas modalidades, al menos un dicho síntoma es la convulsión, ya sea que responda o no responda a la vitamina B6 y/o a otro tratamiento (s) farmacológico (s) anticonvulsivo (s).

[0013] En algunas modalidades, la presente divulgación proporciona un método para tratar la convulsión en un sujeto que tiene actividades aberrantes de fosfatasa alcalina que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de al menos una fosfatasa alcalina recombinante al sujeto. Dichas actividades aberrantes de fosfatasa alcalina pueden deberse a los niveles aberrantes de proteína y/o la función de al menos una fosfatasa alcalina en el sujeto. Las actividades de fosfatasa alcalina descritas en la presente, pueden medirse por la actividad enzimática de la al menos una fosfatasa alcalina recombinante en condiciones fisiológicas con respecto a fosfoetanolamina (PEA), pirofosfato inorgánico (PPi) y / o piridoxal-5'-fosfato (PLP) u otros sustratos tales como *para*-nitrofenilfosfato (pNPP). En una modalidad preferida, el al menos un sustrato de fosfatasa alcalina se selecciona del grupo que consiste en PLP, PPi y PEA.

[0014] En algunas modalidades, la presente divulgación proporciona un método para tratar la convulsión en un sujeto que tiene niveles por encima de lo normal de al menos un sustrato de fosfatasa alcalina que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de al menos una fosfatasa alcalina recombinante al sujeto. En una modalidad, el al menos un sustrato de fosfatasa alcalina se selecciona del grupo que consiste en PLP, PPi, PEA y otros sustratos tales como *para*-nitrofenilfosfato (pNPP). En una modalidad preferida, el al menos un sustrato de fosfatasa alcalina se selecciona del grupo que consiste en PLP, PPi y PEA.

[0015] En la presente divulgación, varios términos tales como "por encima de lo normal", "inferior a lo normal", "superior a lo normal" u otros similares se refieren a los niveles y/o a las actividades de al menos una molécula en un sujeto específico (p. ej., un ser humano) que están por encima, inferior o superior a los niveles y/o a las actividades de dicha

al menos una molécula [o su (s) contrapartes endógenas] en un sujeto normal (p. ej., un ser humano normal). El ejemplo más obvio para un ser humano normal es un ser humano que no tiene síntomas de HPP o HPP y no tiene mutaciones o modificaciones en el gen ALPL y en las proteínas ALP que pueden resultar en síntomas relacionados con HPP. En otro

5 escenario que se enfoca en las funciones de ALP, el alcance de un ser humano "normal" en la presente divulgación puede ampliarse para incluir cualquier ser humano que no tenga actividad endógena aberrante de fosfatasa alcalina (que puede ser probada, p. ej., por medio de los niveles de sustrato (PPi, PEA, PLP o pNPP) y se puede comparar con la actividad correspondiente en otros seres humanos normales o saludables].

10 **[0016]** En otras modalidades, la presente divulgación proporciona un método para tratar convulsiones en un sujeto que comprende:

 (i) identificar una subpoblación de sujetos con actividades aberrantes de fosfatasa alcalina (p. ej., debido a niveles aberrantes de proteínas y/o función) quienes sufren o es probable que sufran convulsiones; y

15 (ii) administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de al menos una fosfatasa alcalina recombinante a un sujeto en la subpoblación. Las actividades de fosfatasa alcalina descritas en la presente, pueden medirse por la actividad enzimática de la al menos una fosfatasa alcalina recombinante en condiciones fisiológicas con respecto a fosfoetanolamina (PEA), pirofosfato inorgánico (PPi) y / o piridoxal-5'-fosfato (PLP) u otros sustratos tales

20 como *para*-nitrofenilfosfato (pNPP). En una modalidad preferida, el al menos un sustrato de fosfatasa alcalina se selecciona del grupo que consiste en PLP, PPi y PEA.

[0017] En algunas modalidades, la presente divulgación proporciona un método para tratar convulsiones en un sujeto que comprende:

 (i) identificar una población de sujetos con niveles por encima de lo normal de al

25 menos un sustrato de fosfatasa alcalina, quienes sufren o corren riesgo de sufrir convulsiones; y

 (ii) administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de al menos una fosfatasa alcalina recombinante a un sujeto en la población. En una modalidad, el al menos un sustrato de fosfatasa alcalina se selecciona del grupo que consiste en PLP, PPi, PEA y otros

30 sustratos tales como *para*-nitrofenilfosfato (pNPP). En una modalidad preferida, el al

menos un sustrato de fosfatasa alcalina se selecciona del grupo que consiste en PLP, PPi y PEA.

[0018] Los sujetos de la población o subpoblación descrita en el presente documento pueden ser pacientes con hipofosfatasa (HPP) que tienen defectos menores o indetectables de mineralización de los huesos y/o los dientes, pacientes sin HPP o sujetos que no han sido diagnosticados con HPP.

[0019] Los sujetos de la población o subpoblación descrita en el presente documento pueden haber aumentado el piridoxal 5'-fosfato (PLP) sérico y/o haber reducido el piridoxal-5'-fosfato intracelular (PLP).

[0020] Los sujetos de la población o subpoblación descritos en este documento pueden haber reducido al menos uno de los niveles de ácido Gamma-Aminobutírico (GABA) y de serina en el cerebro y/o en otros tejidos/órganos. Los sujetos de la población o subpoblación descritos en el presente documento pueden tener al menos uno de los niveles aumentados de cistationina en el cerebro y otros tejidos/órganos (p. ej., los detectables en la orina). En una modalidad, el sujeto tiene al menos uno de GABA cerebral reducido y serina cerebral reducida. En otra modalidad, el sujeto tiene al menos una de cistationina cerebral y urinaria aumentada.

[0021] En algunas modalidades, la al menos una fosfatasa alcalina recombinante descrita en el presente documento se administra a los sujetos de la subpoblación continuamente durante al menos una semana, un mes, tres meses, seis meses o un año. Por ejemplo, la al menos una fosfatasa alcalina recombinante se puede administrar diariamente por tres días, una semana, dos semanas, un mes, dos meses, tres meses, cuatro meses, cinco meses, seis meses, siete meses, ocho meses, nueve meses, diez meses, once meses, un año, quince meses, dieciocho meses, dos años, treinta meses, tres años o por un período más largo.

[0022] En una modalidad, la administración de la al menos una fosfatasa alcalina recombinante aumenta los niveles de GABA cerebral y/o los de serina. En otra modalidad, la administración de la al menos una fosfatasa alcalina recombinante disminuye los niveles de cistationina cerebral y/o urinaria.

[0023] En algunas modalidades, se administra una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un agente terapéutico adicional al sujeto de la población o subpoblación descrita en el presente documento en combinación con la al menos una fosfatasa alcalina

recombinante descrita en el presente documento. En una modalidad, dicho al menos un

- 5 agente terapéutico adicional comprende al menos un fármaco anticonvulsivo. Tal al menos un fármaco anticonvulsivo puede ser uno fármaco o más o fármacos, e incluye, pero no se limita a, por ejemplo, la vitamina B6 y sus variantes. Cualquier fármaco anticonvulsivo que bloquea canales de sodio o que mejora la función de ácido γ -aminobutírico (GABA), los receptores GABAA, el transportador de GABA GAT-1, la GABA transaminasa, cualquier
- 10 fármaco anticonvulsivo que bloquea los canales de calcio dependientes de voltaje, la glicoproteína 2A (SV2A) de la vesícula sináptica, los $\alpha 2\delta$ -aldehídos (p. ej., paraldehído, alcoholes alílicos aromáticos (p. ej. El estiripentol), los barbitúricos (p. ej., fenobarbital, metilfenobarbital y barbexaclona), las benzodiazepinas (p. ej., clobazam, clonazepam, clorazepato, diazepam, midazolam, lorazepam, nitrazepam, temazepam y nimetazepam),
- 15 bromuros (p. ej., bromuro de potasio), carbamatos (p. ej., el felbamate), carboxamidas (p. ej., carbamazepina, oxcarbazepina y acetato de eslicarbazepina), ácidos grasos (p. ej., valproatos, vigabatrina, progabida y tiagabina), derivados de fructosa (p. ej., topiramato), análogos de GABA (p. ej., gabapentina y pregabalina), hidantoínas (p. ej., etotoína, fenitoína, mefenitoína y fosfenitoína), oxazolidinonas (p. ej., parametadiona, trimetadiona,
- 20 dimetadiona, y etadiona), propionatos (p. ej., beclamida) pirimidinedionas (p. ej., primidona), pirrolinas (p. ej., brivaracetam, levetiracetam y seletracetam), succinimidas (p. ej., etosuximida, fensuximida, y mesuximida), suflonamidas (p. ej., acetazolamida, sultiam, metazolamida, y zonisamida), triazinas (p. ej., lamotrigina), ureas (p. ej., feneturida y fenacemida), valproilamidas (amida derivada de valproato) (p. ej., valpromuro y
- 25 valnoctamida) u otros (p. ej., perampanel). El término "en combinación con" de la presente divulgación significa que al menos dos acciones (p. ej., al menos dos administraciones de cualquier fosfatasa alcalina recombinante y/o cualquier fármaco anticonvulsivo adicional descrito en el presente documento) ocurren en el mismo punto en tiempo o en espacio, incluyendo pero no limitado a: en la misma formulación para la administración, en
- 30 diferentes formulaciones pero administradas al mismo tiempo, en diferentes formulaciones y

administradas una después de la otra con un intervalo de tiempo lo suficientemente corto para que un experto en la materia lo considere como administrado al mismo tiempo y en formulaciones diferentes y administradas una después de la otra con un intervalo de tiempo de al menos, por ejemplo, treinta minutos, una hora, dos horas, cuatro horas, seis horas, ocho

5 horas, doce horas, dieciocho horas, un día, dos días, tres días, una semana, dos semanas o un tiempo más largo, dado que cualquier experto en la materia considere dicho intervalo como administrado en el mismo punto en tiempo o en espacio pero no en diferentes puntos de tiempos de administración para la terapia.

[0024] Como otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para

10 tratar la convulsión como se describe en el presente documento, que comprende además:

(i) mantener la coadministración del al menos un fármaco anticonvulsivo adicional y la al menos una fosfatasa alcalina recombinante durante un tiempo predeterminado; y

(ii) suspenderle la administración del al menos un fármaco anticonvulsivo

15 adicional pero manteniéndole al sujeto la administración de la al menos una fosfatasa alcalina recombinante.

[0025] En algunas modalidades, el al menos un fármaco anticonvulsivo adicional y la al menos una fosfatasa alcalina recombinante descritos en el presente documento se le coadministran al sujeto durante al menos un mes, al menos seis meses o al menos un año.

20 Por ejemplo, el tiempo predeterminado para la coadministración puede ser de al menos tres días, una semana, dos semanas, un mes, dos meses, tres meses, cuatro meses, cinco meses, seis meses, siete meses, ocho meses, nueve meses, diez meses, once meses, un año, quince meses, dieciocho meses, dos años, treinta meses, tres años, o por un período más largo. En una modalidad, al menos un fármaco anticonvulsivo adicional es al menos uno de vitamina

25 B6 (piridoxina) o sus variantes.

[0026] En algunas modalidades, la al menos una fosfatasa alcalina recombinante para el tratamiento descrita en el presente documento es fisiológicamente activa con respecto a la fosfoetanolamina (PEA), pirofosfato inorgánico (PPi) y/o piridoxal-5'-fosfato (PLP) u otros sustratos tales como para-nitrofenilfosfato pNPP). En algunas modalidades,

30 dicha al menos una fosfatasa alcalina recombinante comprende una fosfatasa alcalina no

específica de tejido (TNALP), una fosfatasa alcalina placentaria (PLAP), una fosfatasa alcalina de células germinales (GCALP), una fosfatasa alcalina intestinal (IALP) o fragmentos funcionales, fusiones o constructos quiméricos de los mismos. En una modalidad, tal al menos una fosfatasa alcalina recombinante es un fragmento soluble de

5 TNALP, PLAP, GCALP o IALP o sus fragmentos funcionales, fusiones o constructos quiméricos de las mismas. En una modalidad, tal al menos una fosfatasa alcalina recombinante es una fusión o proteína quimérica que comprende fragmentos o porciones de al menos una, dos, tres o cuatro tipos diferentes de fosfatasas alcalinas, tales como una construcción quimérica de TNALP-IALP, una construcción quimérica de IALP-PLAP y

10 otras proteínas TNALP quiméricas o de fusión. En una modalidad, la al menos una fosfatasa alcalina recombinante de la presente divulgación comprende una secuencia de aminoácidos como figura en la Secuencia no. 2. En algunas otras modalidades, la al menos una fosfatasa alcalina recombinante de la presente divulgación comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, ,

15 99 % o mayor identidad de secuencia con la Secuencia no. 2. En una modalidad, la al menos una fosfatasa alcalina recombinante de la presente divulgación comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 75 % de identidad de secuencia con la Secuencia no. 2. En otra modalidad, la al menos una fosfatasa alcalina recombinante de la presente divulgación comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 % de

20 identidad de secuencia con la Secuencia no. 2. En otra modalidad, la al menos una fosfatasa alcalina recombinante de la presente divulgación comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 % de identidad de secuencia con la Secuencia no. 2. En otra modalidad, la al menos una fosfatasa alcalina recombinante de la presente divulgación comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad de

25 secuencia con la Secuencia no. 2. En otra modalidad, la al menos una fosfatasa alcalina recombinante de la presente divulgación comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la Secuencia no. 2. En una modalidad, la al menos una fosfatasa alcalina recombinante de la presente divulgación está codificada por una molécula polinucleótida que codifica un polipéptido que comprende una secuencia

30 como figura en la Secuencia no. 2. En algunas otras modalidades, la al menos una fosfatasa

alcalina recombinante del presente documento está codificada por una molécula polinucleótida que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o mayor identidad de secuencia con la Secuencia no. 2. En una modalidad, la al menos una fosfatasa

- 5 alcalina recombinante de la presente divulgación está codificada por una molécula polinucleótida que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 75 % de identidad de secuencia con la Secuencia no. 2. En otra modalidad, la al menos una fosfatasa alcalina recombinante de la presente divulgación está codificada por una molécula polinucleótida que codifica un polipéptido que comprende una
- 10 secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia con la Secuencia no. 2. En otra modalidad, la al menos una fosfatasa alcalina recombinante de la presente divulgación está codificada por una molécula polinucleótida que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85 % de
- 15 identidad de secuencia con la Secuencia no. 2. En otra modalidad, la al menos una fosfatasa alcalina recombinante de la presente divulgación está codificada por una molécula polinucleótida que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con la Secuencia no. 2. En otra
- 20 modalidad, la al menos una fosfatasa alcalina recombinante de la presente divulgación está codificada por una molécula polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con la Secuencia no. 2. En una modalidad, la al menos una fosfatasa alcalina recombinante de la presente divulgación está codificada por una molécula polinucleótida que es hibridable en
- 25 condiciones de alta rigurosidad al menos a una molécula polinucleótida que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 %, 95 %, o una identidad de secuencia mayor con Secuencia no. 2, en donde las condiciones de alta
- 30 rigurosidad comprenden: prehibridación e hibridación en SSC 6X , Denhardt's reagent 5X, SDS 0,5 % y 100mg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado a 68°C; y lavados en SSC 2X y SDS 0,5 % en temperatura ambiente por 10 minutos; en SSC 2X y SDS 0,1 % en temperatura ambiente por 10 minutos; y en SSC 0,1X y SDS 0,5% a 65°C tres veces por 5 minutos.

[0027] En algunas modalidades, la al menos una fosfatasa alcalina recombinante descrita en este documento para el tratamiento es una proteína de fusión. Al menos un enlazador conocido en el arte se puede insertar en dicha proteína de fusión. En algunas modalidades, la al menos una fosfatasa alcalina recombinante se fusiona a una molécula de

5 inmunoglobulina. En una modalidad, la molécula de inmunoglobulina es una región cristalizable de fragmento (Fc). En otra modalidad, la Fc comprende una secuencia de aminoácidos como figura en la Secuencia no. 3. En algunas otras modalidades, la Fc comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o mayor identidad de secuencia con la Secuencia no. 3.

10 En algunas otras modalidades, la Fc está codificada por una molécula polinucleótida que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o mayor identidad de secuencia con la Secuencia no. 3. En una modalidad, la Fc está codificada por una molécula polinucleótida que es hibridable en condiciones de alta rigurosidad al menos a una molécula

15 polinucleótida que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 %, 95 %, o una identidad de secuencia mayor con Secuencia no. 3, en donde las condiciones de alta rigurosidad comprenden: prehibridación e hibridación en SSC 6X, Denhardt's reagent 5X, SDS 0,5 % y 100mg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado a 68°C; y lavados en SSC 2X y SDS 0,5 % en temperatura ambiente por 10

20 minutos; en SSC 2X y SDS 0,1 % en temperatura ambiente por 10 minutos; y en SSC 0,1X y SDS 0,5% a 65°C tres veces por 5 minutos.

[0028] En otras modalidades, la al menos una fosfatasa alcalina recombinante descrita en este documento para tratamiento se fusiona con un péptido cargado de forma negativa. Tal péptido cargado de forma negativa puede incluir poliaspartato o poliglutamato

25 de cualquier longitud, por ejemplo, de 6 a 20 residuos de aminoácidos. En algunas modalidades, el péptido cargado de forma negativa es D10, D8, D16, E10, E8 o E16. En algunas modalidades, el péptido cargado de forma negativa es D10, D16, E10 o E16. En una modalidad preferida, el péptido cargado de forma negativa es D10.

[0029] En algunas modalidades, la al menos una fosfatasa alcalina recombinante

30 descrita aquí comprende una proteína de fusión soluble de ALP (sALP) que comprende una

estructura de sALP-Fc-D10 o una estructura de sALP-Fc, Fc-sALP, Fc-sALP-D10, D10-sALP-Fc, o D10-Fc-sALP. En una modalidad, la al menos una fosfatasa alcalina recombinante descrita en el presente documento comprende una estructura de sALP-Fc-D10. En otra modalidad, la al menos una fosfatasa alcalina recombinante comprende una

- 5 secuencia de aminoácidos como figura en la Secuencia no. 1 o 4. En algunas otras modalidades, la al menos una fosfatasa alcalina recombinante comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, 99 % o mayor identidad de secuencia con la Secuencia no. 1 o 4. En algunas otras modalidades, la al menos una fosfatasa alcalina recombinante está
- 10 codificada por una molécula polinucleótida que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, 99 % o mayor identidad de secuencia con la Secuencia no. 1 o 4. En una modalidad, la al menos una fosfatasa alcalina recombinante está codificada por una molécula polinucleótida que es hibridable en condiciones de alta
- 15 rigurosidad al menos a una molécula polinucleótida que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 %, 95 %, o una identidad de secuencia mayor con Secuencia no. 1 o 4, en donde las condiciones de alta rigurosidad comprenden: prehibridación e hibridación en SSC 6X, Denhardt's reagent 5X, SDS 0,5 % y 100mg/ml de ADN de espermatozoos de salmón desnaturalizado a 68°C; y lavados en SSC 2X y
- 20 SDS 0,5 % en temperatura ambiente por 10 minutos; en SSC 2X y SDS 0,1 % en temperatura ambiente por 10 minutos; y en SSC 0,1X y SDS 0,5% a 65°C tres veces por 5 minutos.

[0030] En algunas modalidades, la al menos una fosfatasa alcalina recombinante descrita en el presente documento puede ser administrada en una dosis de aproximadamente

- 25 0,1 mg/kg/día a aproximadamente 20 mg/kg/día, de aproximadamente 0,1 mg/kg/día a aproximadamente 10 mg/kg/día, de aproximadamente 0,1 mg/kg/día a aproximadamente 8 mg/kg/día, de aproximadamente 0,1 mg/kg/día a aproximadamente 5 mg/kg/día, de aproximadamente 0,1 mg/kg/día a aproximadamente 1 mg/kg/día, de aproximadamente 0,1 mg/kg/día a aproximadamente 0,5 mg/kg/día, de aproximadamente 0,5 mg/kg/día a
- 30 aproximadamente 20 mg/kg/día, de aproximadamente 0,5 mg/kg/día a aproximadamente 10

mg/kg/día, de aproximadamente 0,5 mg/kg/día a aproximadamente 8 mg/kg/día, de aproximadamente 0,5 mg/kg/día a aproximadamente 5 mg/kg/día, de aproximadamente 0,5 mg/kg/día a aproximadamente 1 mg/kg/día, de aproximadamente 1 mg/kg/día a aproximadamente 20 mg/kg/día, de aproximadamente 1 mg/kg/día a aproximadamente 10 mg/kg/día, de aproximadamente 1 mg/kg/día a aproximadamente 8 mg/kg/día, de aproximadamente 1 mg/kg/día a aproximadamente 5 mg/kg/día o una dosis semanal comparable (p. ej., 6 mg/kg/semana se puede comparar con 1 mg/kg/día). La vía de administración para la al menos una fosfatasa alcalina recombinante descrita en el presente documento puede incluir cualquier método conocido en la materia, incluyendo, por lo menos, administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, sublingual, intratecal y/o intradérmica. En una modalidad, la al menos una fosfatasa alcalina recombinante se administra vía intravenosa. En algunas modalidades, la al menos una fosfatasa alcalina recombinante se administra en dosis múltiples a través de una misma o diferentes vías. En otras realizaciones, al menos una fosfatasa alcalina recombinante se administra en dosis múltiples a través de diferentes rutas simultáneamente o secuencialmente. Por ejemplo, la al menos una fosfatasa alcalina recombinante puede administrarse primero por vía intravenosa y luego en dosis posteriores por vía subcutánea. Alternativamente, la administración intravenosa también se puede usar en dosis posteriores para obtener respuestas terapéuticas rápidas. La elección de las vías para las dosis múltiples puede determinarse por un experto en la materia para alcanzar la mayor eficacia, estabilidad (p. ej., la vida media de la al menos una fosfatasa alcalina recombinante y/o el al menos un fármaco anticonvulsivo adicional), eficiencia, y/o metas rentables. Ninguna limitación específica en la elección de vías de administración y/o la aplicación de diferentes vías de administración en diferentes dosis está prevista por la presente divulgación.

[0031] Como otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para tratar la convulsión en un sujeto que tiene actividades aberrantes de fosfatasa alcalina, que comprende administrarle a dicho sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de al menos una fosfatasa alcalina recombinante en el que la al menos una fosfatasa alcalina recombinante comprende una estructura de sALP-Fc-D10. En una modalidad, tal al menos una fosfatasa alcalina recombinante comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al

menos un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, 99 % o mayor identidad de secuencia con la Secuencia no. 2. En otra modalidad tal al menos una fosfatasa alcalina recombinante del presente documento está codificada por una molécula polinucleótida que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o mayor identidad de secuencia con la Secuencia no. 2. En otra modalidad, la al menos una fosfatasa alcalina recombinante está codificada por una molécula polinucleótida que es hibridable en condiciones de alta rigurosidad al menos a una molécula polinucleótida que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 %, 95 %, o una identidad de secuencia mayor con Secuencia no. 2, en donde las condiciones de alta rigurosidad comprenden: prehibridación e hibridación en SSC 6X , Denhardt's reagent 5X, SDS 0,5 % y 100mg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado a 68°C; y lavados en SSC 2X y SDS 0,5 % en temperatura ambiente por 10 minutos; en SSC 2X y SDS 0,1 % en temperatura ambiente por 10 minutos; y en SSC 0,1X y SDS 0,5% a 65°C tres veces por 5 minutos.

[0032] Como otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para tratar la convulsión en un sujeto que tiene niveles de al menos una fosfatasa alcalina por encima de lo normal, que comprende administrarle a dicho sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de al menos una fosfatasa alcalina recombinante en el que la al menos una fosfatasa alcalina recombinante comprende una estructura de sALP-Fc-D10. En una modalidad, tal al menos una fosfatasa alcalina recombinante comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, 99 % o mayor identidad de secuencia con la Secuencia no. 2. En otra modalidad tal al menos una fosfatasa alcalina recombinante del presente documento está codificada por una molécula polinucleótida que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o mayor identidad de secuencia con la Secuencia no. 2. En otra modalidad, la al menos una fosfatasa alcalina recombinante está codificada por una molécula polinucleótida que es hibridable en condiciones de alta rigurosidad al menos a una molécula polinucleótida que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de

aminoácidos que tiene al menos 90 %, 95 %, o una identidad de secuencia mayor con Secuencia no. 2, en donde las condiciones de alta rigurosidad comprenden: prehibridación e hibridación en SSC 6X , Denhardt's reagent 5X, SDS 0,5 % y 100mg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado a 68°C; y lavados en SSC 2X y SDS 0,5 % en

5 temperatura ambiente por 10 minutos; en SSC 2X y SDS 0,1 % en temperatura ambiente por 10 minutos; y en SSC 0,1X y SDS 0,5% a 65°C tres veces por 5 minutos.

[0033] Como otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para tratar convulsiones en un sujeto que comprende:

- (i) identificar una población de sujetos con actividades aberrantes de fosfatasa
- 10 alcalina que sufren o corren el riesgo de sufrir de convulsiones; y
- (ii) administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de al menos una fosfatasa alcalina recombinante a un sujeto en la población,

en donde la al menos una fosfatasa alcalina recombinante comprende una estructura de sALP-Fc-D10. En una modalidad, tal al menos una fosfatasa alcalina recombinante

15 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, 99 % o mayor identidad de secuencia con la Secuencia no. 2. En otra modalidad tal al menos una fosfatasa alcalina recombinante del presente documento está codificada por una molécula polinucleótida que

20 codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o mayor identidad de secuencia con la Secuencia no. 2. En otra modalidad, la al menos una fosfatasa alcalina recombinante está codificada por una molécula polinucleótida que es hibridable en condiciones de alta rigurosidad al menos a una molécula polinucleótida que codifica un polipéptido que

25 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 %, 95 %, o una identidad de secuencia mayor con Secuencia no. 2, en donde las condiciones de alta rigurosidad comprenden: prehibridación e hibridación en SSC 6X , Denhardt's reagent 5X, SDS 0,5 % y 100mg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado a 68°C; y lavados en SSC 2X y SDS 0,5 % en temperatura ambiente por 10 minutos; en SSC 2X y SDS 0,1 % en

30 temperatura ambiente por 10 minutos; y en SSC 0,1X y SDS 0,5% a 65°C tres veces por 5 minutos.

[0034] Como otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para tratar convulsiones en un sujeto que comprende:

(i) identificar una población de sujetos con niveles por encima de lo normal de al menos un sustrato de fosfatasa alcalina, quienes sufren o corren riesgo de sufrir

5 convulsiones; y

(ii) administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de al menos una fosfatasa alcalina recombinante a un sujeto en la población,

en donde la al menos una fosfatasa alcalina recombinante comprende una estructura de sALP-Fc-D10. En una modalidad, tal al menos una fosfatasa alcalina recombinante

10 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, 99 % o mayor identidad de secuencia con la Secuencia no. 2. En otra modalidad tal al menos una fosfatasa alcalina recombinante del presente documento está codificada por una molécula polinucleótida que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70

15 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o mayor identidad de secuencia con la Secuencia no. 2. En otra modalidad, la al menos una fosfatasa alcalina recombinante está codificada por una molécula polinucleótida que es hibridable en condiciones de alta rigurosidad al menos a una molécula polinucleótida que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 %, 95 %, o una identidad

20 de secuencia mayor con Secuencia no. 2, en donde las condiciones de alta rigurosidad comprenden: prehibridación e hibridación en SSC 6X, Denhardt's reagent 5X, SDS 0,5 % y 100mg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado a 68°C; y lavados en SSC 2X y SDS 0,5 % en temperatura ambiente por 10 minutos; en SSC 2X y SDS 0,1 % en temperatura ambiente por 10 minutos; y en SSC 0,1X y SDS 0,5% a 65°C tres veces por 5

25 minutos.

[0035] En algunas realizaciones, el sujeto(s) descrito(s) aquí es un ser humano o un mamífero no humano. En una modalidad, el sujeto(s) es un(os) ser(es) humano(s).

30

BREVE DIVULGACIÓN DE LOS DIBUJOS

[0036] La figura 1 muestra el diseño y la estructura esquemática de la ALP recombinante de la presente divulgación ejemplificada por la proteína de fusión TNALP humana soluble hsTNALP-FcD10. El panel A presenta una representación esquemática del producto completo de traducción primario del gen de la fosfatasa alcalina no específica de tejido (TNALP) que incluye el péptido señal N-terminal y la señal de membrana anclada temporal para adición de GPI. EL panel B presenta el producto de traducción primario de la proteína de fusión. El panel C presenta el producto de traducción primario que carece de la péptida señal de TNALP escindible;

[0037] La figura 2 presenta la secuencia proteica para hsTNALP-FcD10 con la señal peptídica N-terminal (Secuencia no. 1). En esta secuencia, la señal peptídica N-terminal 17-aa se muestra en cursiva y subrayada. La porción hsTNALP (Secuencia no. 2) se encuentra en cursiva pero no subrayada. La porción Fc (Secuencia no. 3) se encuentra subrayada pero no en cursiva. Los residuos de asparagina (N) que corresponden a sitios putativos de N-glicosilación están marcados en negrilla y en letra minúscula. Las letras mayúsculas en negrilla (es decir., LK y DI) corresponden a los enlazadores entre la porción hsTNALP y la porción Fc, y entre la porción Fc y el C-terminal D10 respectivamente. Estos enlazadores se derivan de los sitios de restricción de endonucleasas introducidos durante la ingeniería de ADNc.

[0038] La figura 3 presenta la secuencia proteica para la hsTNALP-FcD10 sin la señal peptídica N-terminal (Secuencia no. 4). La porción hsTNALP (Secuencia no. 2) se encuentra en cursiva pero no subrayada. La porción Fc (Secuencia no. 3) se encuentra subrayada pero no en cursiva. Los residuos de asparagina (N) que corresponden a sitios putativos de N-glicosilación están marcados en negrilla y en letra minúscula. Las letras mayúsculas en negrilla (es decir., LK y DI) corresponden a los enlazadores entre la porción hsTNALP y la porción Fc, y entre la porción Fc y el C-terminal D10 respectivamente.

[0039] La figura 4 presenta imágenes de rayos-X que muestran la mineralización de los huesos de la pierna en ratones de tipo salvaje (WT), *Akp2*^{+/-} ratones heterocigóticos (HET) y *Akp2*^{-/-} ratones homocigóticos (HOM). Se encontraron diferentes grados de defectos de mineralización (de tener fenotipos severos a fenotipos no afectados) entre ratones homocigóticos *Akp2*^{-/-}.

[0040] La figura 5 presenta un resumen de la distribución del fenotipo entre diferentes colonias de ratones homocigóticos $Akp2^{-/-}$ (usando puntuación de imagen radiográfica).

[0041] La figura 6 muestra que los pesos corporales de ratones homocigóticos $Akp2^{-/-}$ (designación de generación: F4) tienen relación con la gravedad de su enfermedad (es decir, que tienen un defecto de mineralización leve o severo o mineralización no afectada/normal). Los ratones de tipo salvaje ($Akp2^{+/+}$) se usaron como control.

[0042] La figura 7 muestra que los pesos corporales de ratones homocigóticos $Akp2^{-/-}$ tienen relación con los fenotipos de mineralización de la gravedad de su enfermedad. Los dos grupos de datos más a la izquierda ($Akp2^{-/-}$) representan datos de todos los ratones homocigóticos $Akp2^{-/-}$ con variedad en la gravedad de su enfermedad (por ejemplo, grave o no afectada). Los ratones de tipo salvaje y los ratones heterocigóticos $Akp2^{+/-}$ se usaron como control.

[0043] La figura 8 muestra que la longitud del hueso (fémur y tibia) de ratones homocigóticos $Akp2^{-/-}$ (designación de generación: F10) tienen relación con la gravedad de su enfermedad. Los grupos de datos más a la izquierda ($Akp2^{-/-}$) representan datos de todos los ratones homocigóticos $Akp2^{-/-}$ con variedad en la gravedad de su enfermedad (por ejemplo, grave o no afectada). Los ratones de tipo salvaje y los ratones heterocigóticos $Akp2^{+/-}$ se usaron como control.

[0044] La figura 9 presenta una comparación del tiempo de vida entre los ratones homocigóticos $Akp2^{-/-}$ que tienen diferentes tipos de fenotipos de mineralización. Todos los ratones homocigóticos $Akp2^{-/-}$ tuvieron un tiempo de vida reducido de manera significativa independientemente de los fenotipos de mineralización.

[0045] La figura 10 muestra que los ratones homocigóticos $Akp2^{-/-}$ tuvieron una concentración reducida de Ácido Gamma-Aminobutírico (GABA) cerebral, que era corregible por el tratamiento diario con ALP (sTNALP-FcD10 o asfotasa alfa). Los ratones de tipo salvaje con o sin tratamiento se usaron como control. Panel izquierdo: Las concentraciones de GABA se midieron en el día 10 para ratones knockout (de izquierda a derecha) tratados con control de vehículo vacío diariamente hasta el día 9 ("GRP 1"), para ratones knockout tratados con sTNALP-FcD10 (8,2 mg/kg) diariamente hasta el día 9

("GRP 2") y para ratones de tipo salvaje sin ningún tratamiento ("GRP 3"). Panel derecho: Las concentraciones de GABA se midieron en el día 48 para ratones knockout (de izquierda a derecha) tratados con sTNALP-FcD10 (8,2 mg/kg) diariamente hasta el día 35 y posteriormente tratados con control de vehículo vacío (es decir, suspensión del tratamiento) diariamente hasta el día 47 ("GRP 1"), ratones knockout tratados con sTNALP-FcD10 diariamente hasta el día 47 ("GRP 2"), ratones de tipo salvaje sin ningún tratamiento ("GRP 3") y ratones tipo salvaje tratados con sTNALP-FcD10 diariamente hasta el día 35 y luego tratados con control de vehículo vacío diariamente hasta el día 47 ("GRP 4").

[0046] La figura 11 muestra que los ratones homocigóticos *Akp2*^{-/-} tuvieron una concentración de cistationina cerebral significativamente elevada, que era corregible por el tratamiento diario con ALP (sTNALP-FcD10 o asfotasa alfa). Los ratones de tipo salvaje con o sin tratamiento se usaron como control. Panel izquierdo: las concentraciones de cistationina se midieron en el día 10 para ratones knockout (de izquierda a derecha) tratados con control de vehículo vacío diariamente hasta el día 9 ("GRP 1"), para ratones knockout tratados con sTNALP-FcD10 (8,2 mg/kg) diariamente hasta el día 9 ("GRP 2") y para ratones de tipo salvaje sin ningún tratamiento ("GRP 3"). Panel derecho: las concentraciones de cistationina se midieron en el día 48 para ratones knockout (de izquierda a derecha) tratados con sTNALP-FcD10 (8,2 mg/kg) diariamente hasta el día 35 y posteriormente se trataron diariamente con control de vehículo vacío hasta el día 47 ("discontinuación") (GRP 1"), para los ratones knockout tratados con sTNALP-FcD10 diariamente hasta el día 47 ("GRP 2"), para ratones de tipo salvaje sin ningún tratamiento ("GRP 3") y para ratones de tipo salvaje tratados con sTNALP-FcD10 diariamente hasta el día 35 y posteriormente tratados diariamente con control de vehículo vacío hasta el día 47 ("GRP 4").

[0047] La figura 12 muestra que los ratones homocigóticos *Akp2*^{-/-} tuvieron una concentración de serina cerebral significativamente reducida, que era corregible por el tratamiento diario con ALP (sTNALP-FcD10 o asfotasa alfa). Los ratones de tipo salvaje con o sin tratamiento se usaron como control. Panel izquierdo: las concentraciones de serina se midieron en el día 10 para ratones knockout (de izquierda a derecha) tratados con control de vehículo vacío diariamente hasta el día 9 ("GRP 1"), para ratones knockout tratados con

sTNALP-FcD10 diariamente hasta el día 9 ("GRP 2") y para ratones de tipo salvaje sin ningún tratamiento ("GRP 3"). Panel derecho: las concentraciones de serina se midieron en el día 48 para ratones knockout (de izquierda a derecha) tratados con sTNALP-FcD10 (8,2 mg/kg) diariamente hasta el día 35 y posteriormente se trataron diariamente con control de vehículo vacío hasta el día 47 ("discontinuación") (GRP 1"), para los ratones knockout tratados con sTNALP-FcD10 diariamente hasta el día 47 ("GRP 2"), para ratones de tipo salvaje sin ningún tratamiento ("GRP 3") y para ratones de tipo salvaje tratados con sTNALP-FcD10 diariamente hasta el día 35 y tratados diariamente con control de vehículo vacío hasta el día 47 ("GRP 4").

[0048] La figura compara el tiempo de vida de ratones homocigóticos *Akp2*^{-/-} que tienen defecto grave de mineralización o mineralización normal) que reciben un suplemento dietario de piridoxina de 325 ppm.

[0049] La figura 14 compara las concentraciones cerebrales de GABA y cistationinade ratones tipo salvaje (WT) o de ratones homocigóticos *Akp2*^{-/-} que tienen un defecto grave de mineralización (KO-grave) o mineralización normal (KO-normal) todos recibiendo 325 ppm de suplemento dietario de piridoxina. El área sombreada se refiere a un perfil en el que los ratones tienen una concentración de GABA cerebral comparativamente baja, pero una concentración de cistationina cerebral comparativamente alta.

DIVULGACIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0050] Muchos pacientes con HPP tienen convulsiones como síntomas adicionales a su defecto característico de mineralización. Los ratones *Akp2*^{-/-} también desarrollan convulsiones que son subsecuentemente fatales. Véase Waymire et al. 1995 *Nature Genetics* 11: 45-51. Como la vitamina B6 (piridoxina) es un tratamiento tradicional para las convulsiones, muchos pacientes con HPP que tienen convulsiones se tratan con vitamina B6 como una terapia profiláctica. Sin embargo, algunos pacientes con HPP no responden al tratamiento con piridoxina. Incluso para aquellos pacientes con HPP que si responden a la piridoxina, con el tiempo, altas dosis de vitamina B6 pueden ser tóxicas y pueden causar daño nervioso o entumecimiento y hormigueo en las extremidades que eventualmente pueden ser irreversibles. Los síntomas más comunes de la toxicidad de la vitamina B6

incluyen, por ejemplo, dolor de cabeza, fatiga severa, cambio de estado de ánimo, cambio en los nervios, etc. De acuerdo con la publicación de seguridad acerca de la vitamina B6 (piridoxina) publicada por *Mayo Clinic Health System* en su sitio web

(<http://www.mayoclinic.org/drugs-supplements/vitamin-b6/safety/hrb-20058788>) el exceso

- 5 de vitamina B6 puede causar ritmos cardíacos aberrantes, acné, reacciones alérgicas, agrandamiento o dolor en los senos, cambios en los niveles de ácido fólico, disminución del tono muscular, somnolencia o sedación, sensación de una hinchazón en la garganta, sensación de hormigueo en la piel, dolor de cabeza, acidez estomacal, pérdida de apetito, náuseas, sarpullido, recurrencia de colitis ulcerativa (trastorno inflamatorio intestinal),
- 10 malestar o dolor estomacal, sensibilidad al sol, vómitos, asma agravada, presión arterial baja, cambios en el nivel de azúcar en la sangre y mayor riesgo de sangrado. La vitamina B6 también puede interferir con otros tratamientos farmacológicos. Por ejemplo, puede reducir la efectividad de la terapia con levodopa, que se usa para tratar la enfermedad de
- 15 Parkinson. Las personas que toman penicilamina, usada para tratar la enfermedad de Wilson, saturnismo, cálculos renales y artritis, deben tomar vitamina B6 sólo bajo la supervisión directa de un médico. Las hierbas y los suplementos estrogénicos, incluyendo píldoras anticonceptivas, pueden interactuar con la vitamina B6.

[0051] La presente divulgación proporciona un método para identificar una población de sujetos que tienen actividad fosfatasa alcalina (ALP) aberrante (p. ej.,

20 deficiente), por ejemplo, que tienen alelo(s) defectuoso(s) del gen *ALPL* en seres humanos o del gen *Akp2* (el ortólogo de *ALPL*) en ratones o niveles aberrantes de genes y/o proteínas de sustratos de ALP (por ejemplo, PPI, PEA, y PLP). Tal como se utiliza en el presente documento, el término "aberrante" significa los niveles de expresión y/o la actividad enzimática de una proteína (p. ej., una ALP), o sus fusiones activas biológicas o fragmentos

25 de las mismas que se desvían de su curso normal, apropiado o esperado. Por ejemplo, un sujeto (p. ej., un ser humano o un animal no humano, que incluye pero no limitado a un ratón) con una actividad de ALP "aberrante" significa que tal sujeto tiene una actividad de ALP anormal, lo cual puede ser debido a, p. ej. la deficiencia o falta de un gen o producto proteico de ALP y/o al defecto o pérdida de función de un gen o producto proteico de ALP,

30 en relación con el nivel de expresión y/o actividad de dicha proteína ALP de un sujeto sano

o un sujeto sin un síntoma de HPP o un estado de enfermedad o trastorno caracterizado por los niveles aberrantes de proteína y/o la actividad de al menos uno de los sustratos de ALP (p. ej., PPi, PLP, y PEA). En particular, los niveles de expresión proteica o la actividad de una ALP son deficientes, carentes o defectuosos cuando tales niveles de expresión o actividad son menores (tales como, menos del 95 %, 90 %, 85 %, 80 %, 75 %, 70 %, 65 %, 60 %, 55 %, 50 %, 45 %, 40 %, 35 %, 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 %, 5 %, 1 % o menos) que el nivel de expresión o actividad de dicha proteína ALP de un sujeto sano o un sujeto sin un síntoma de HPP o un estado de enfermedad o trastorno caracterizado por los niveles aberrantes de proteína y/o la actividad de al menos uno de los sustratos de ALP (p. ej., PPi, PLP, y PEA). La población de sujetos se puede identificar sin importar si han sido previamente diagnosticados con hipofosfatasa (HPP). La población se identifica, por ejemplo, con base en una actividad de ALP reducida debido, por ejemplo, a la falta o a niveles reducidos de la(s) proteína(s) ALP y/o proteínas ALP defectuosas con actividad enzimática reducida o suprimida. Las causas de la actividad de la ALP reducida incluyen, por ejemplo, mutaciones en los genes que codifican las ALPs, lo que conlleva de este modo a alelos defectuosos de dichos genes, defectos en las moléculas de señalización que regulan la expresión de las ALPs, la expresión anormal o regulación de cofactores y/o la expresión aberrante de factores de corriente arriba o corriente abajo que regulan la actividad de las ALPs. Los alelos particulares de *ALPL* pueden dar por resultado, por ejemplo, niveles reducidos de proteína de fosfatasa alcalina y/o función proteica. Dichos alelos pueden identificarse a través de métodos conocidos en la materia. Los miembros de la población identificada se deben monitorear para determinar la progresión de la enfermedad (HPP) y otros síntomas, *p. ej.*, las convulsiones. La fosfatasa alcalina recombinante, por ejemplo, se puede suministrar a la población identificada para tratar o prevenir convulsiones y/u otros síntomas, *p. ej.*, los síntomas relacionados con HPP o la actividad de ALP reducida.

[0052] Los términos "individuo", "sujeto" y "paciente" se usan indistintamente y se refieren a cualquier sujeto para quien se desea el diagnóstico, tratamiento o terapia, particularmente seres humanos. Otros sujetos se pueden incluir, por ejemplo, ganado vacuno, perros, gatos, conejillos de indias, conejos, ratas, ratones, caballos y similares. Tal como se utiliza en el presente documento, un sujeto de "riesgo" es un sujeto que se identifica

como alguien que tiene riesgo de desarrollar una enfermedad, trastorno o síntomas asociados, por ejemplo, la actividad de la ALP aberrante.

[0053] Los pacientes con HPP tradicionalmente se identifican por sus defectos característicos de mineralización ósea y/o dentaria. Sin embargo, los pacientes con HPP

5 varían en cuanto al grado de defecto de la mineralización que va desde muy grave hasta indetectable. Es evidente que aquellos pacientes con HPP con menor o ningún defecto de mineralización son propensos a diagnósticos erróneos y retrasos, si alguno, el tratamiento con fosfatasa alcalina recombinante, por ejemplo. En el presente documento se describen materiales y métodos para identificar una subpoblación de pacientes de HPP con defectos

10 menores, no afectados o indetectables de mineralización ósea y/o dentaria para el tratamiento de sustitución de fosfatasa alcalina. Estos pacientes pueden haber sido previamente diagnosticados con HPP pero, debido a sus defectos menores, no afectados o indetectables de mineralización no han sido tratados con fosfatasa alcalina. La presente divulgación incluye proporcionar materiales y métodos para tratar tales sujetos en la

15 subpoblación, por ejemplo, con fosfatasa alcalina o agente(s) que incrementan la actividad de la fosfatasa alcalina endógena. Dicho tratamiento, por ejemplo, puede tratar o prevenir otros síntomas distintos de los defectos de mineralización y/o prevenir futuros defectos de mineralización debido a la progresión de la enfermedad.

[0054] En el presente documento se describen métodos para identificar una

20 población de sujetos con ALP defectuosa quienes presentan síntomas de HPP y/o relacionados con HPP o quienes tienen el riesgo de desarrollar síntomas de HPP y/o relacionados con HPP. La población identificada puede incluir sujetos quienes hayan sido previamente identificados como sujetos que tienen HPP o síntomas relacionados con HPP o quienes son asintomáticos o sin un diagnóstico previo. Una disminución de la actividad

25 sérica de la ALP conduce, por ejemplo, a un aumento de los niveles de proteínas y/o funciones de al menos uno de los sustratos de fosfatasa alcalina [*p. ej.*, pirofosfato (PPi), piridoxal-5'-fosfato (PLP) o fosfoetanolamina (PEA)]. Los métodos para identificar la población de sujetos incluyen, por ejemplo, la detección de alelos de fosfatasa alcalina defectuosos (ya sean prenatales o después del nacimiento), la medición *in vivo* de los niveles

30 de expresión de proteínas o actividad funcional, la medición de los analitos marcadores

asociados en un muestra u otros métodos conocidos en la materia con el fin de determinar la actividad de ALP.

[0055] La población identificada con actividad aberrante de ALP puede tener síntomas distintos de los defectos de mineralización ósea y dentaria. Sin embargo, debido a su menor o ningún defecto de mineralización, es menos probable que dichos sujetos sean diagnosticados como sujetos de HPP o tratados con, por ejemplo, la fosfatasa alcalina. Se describen por lo tanto en el presente documento, materiales y métodos para identificar y tratar sujetos que están en riesgo de desarrollar una enfermedad, trastorno o síntomas asociados con actividad aberrante de ALP, especialmente, aquellos que no presentan algunos síntomas comunes de la HPP (*p. ej.*, los defectos de mineralización ósea).

[0056] La presente divulgación proporciona una subpoblación de ratones knockout de fosfatasa alcalina (*Akp2*^{-/-}) que tienen defectos de mineralización menores, no afectados o indetectables, pero que aún tienen un tiempo de vida acortado. Los estudios en estos ratones indicaron que la deficiencia de fosfatasa alcalina redujo significativamente los niveles de proteína del ácido gamma-aminobutírico (GABA), un neurotransmisor inhibidor principal en el sistema nervioso central de los mamíferos. La reducción observada en el GABA cerebral se rescató mediante tratamientos con fosfatasa alcalina recombinante. Dado que una población de sujetos tiene fosfatasa alcalina defectuosa, pero no tienen defectos mínimos o ningún defecto de mineralización, hay una población de sujetos en riesgo de sufrir la(s) enfermedad(es), trastorno(s) o síntomas relacionados con ALP, *p. ej.*, las convulsiones, las cuales responden, por ejemplo, a la terapia de reemplazo de fosfatasa alcalina u otras terapias para aumentar la actividad de ALP.

[0057] Agregándole al hecho de que los pacientes a menudo presentan convulsiones, en el presente hay información que muestra que aún en pacientes quienes no presentan algunos de los síntomas más dramáticos de la HPP (*p. ej.*, los defectos de mineralización ósea), una actividad sérica de la ALP reducida o suprimida conduce a las convulsiones. Esta población experimenta o está en riesgo de sufrir convulsiones y otras enfermedades, trastornos o síntomas asociados con actividad de ALP reducida o suprimida (*p. ej.*, en riesgo de desarrollar síntomas de HPP o HPP).

[0058] La convulsión o las convulsiones en la presente divulgación pueden clasificarse ampliamente como convulsiones epilépticas, que implican un breve episodio de signos y/o síntomas debidos a una actividad neuronal anormal excesiva o simultánea en el cerebro y convulsiones no epilépticas, que son eventos paroxismales que imitan una

5 convulsión epiléptica pero no implican descargas rítmicas anormales de las neuronas corticales. El efecto externo de las convulsiones puede variar de un movimiento de sacudidas descontrolado [convulsiones tónico-clónicas (anteriormente conocidas como convulsiones Grand mal); a veces denominadas como "convulsiones") a tan sutil como una pérdida momentánea de conciencia (ausencia de convulsiones). (*Fisher et al., 2005*

10 *Epilepsia* 46:470–2 and *Ricker 2003 Differential Diagnosis in Adult Neuropsychological assessment. Springer Publishing Company. p. 109. ISBN 0-8261-1665-5*). Tal como se utiliza en el presente documento, "ataque epiléptico" o "ataques epilépticos" se refieren a cualquier ataque epiléptico debido a cualquier causa fisiológica o ambiental, incluyendo, pero sin limitarse a, convulsiones epilépticas, convulsiones no epilépticas, convulsiones que

15 responden a la vitamina B6, convulsiones que no responden a la B6, etc. El término "ataque epiléptico" se usa a menudo indistintamente con "convulsión". Las convulsiones ocurren cuando el cuerpo de un sujeto se sacude de manera rápida e incontrolable. Durante las convulsiones, los músculos de la persona se contraen y se relajan rápidamente. Existen muchos tipos de convulsiones. Algunas tienen síntomas leves sin agitación.

20 **[0059]** Los ratones que carecen de la función fosfatasa alcalina (p. ej., *Akp2*^{-/-}) desarrollan convulsiones que son posteriormente fatales (*Waymire 1995*). Las convulsiones son causadas por un defecto en el metabolismo del piridoxal-5'-fosfato (PLP) por la fosfatasa alcalina, similar a la encontrada en los pacientes con HPP. Generalmente la piridoxina (vitamina B6) puede ser absorbida como tres diferentes vitámeros: PLP,

25 piridoxamina-P y glucósido de piridoxina (*Plecko 2009 Can J Neurol Sci* 36: S73-S77). Sin embargo, en el hígado, estos dos últimos se convertirán en el único cofactor activo PLP por piridox(am)ine-5-fosfato oxidasa (PNPO). El PLP en la circulación sanguínea es desfosforilado por la fosfatasa alcalina en el piridoxal (PL) el cual atraviesa libremente la membrana celular y se vuelve a fosforilar por el piridoxal quinasa en el PLP intracelular.

30 EL PLP, una vez está dentro de las células, es un cofactor de diversas reacciones

enzimáticas en el metabolismo de aminoácidos y neurotransmisores, como por ejemplo, la conversión de glutamato en ácido gamma-aminobutírico (GABA), el sistema de escisión de la glicina, dopamina, histamina, D-serina, ácido sulfhídrico y la descarboxilasa de ácido aromático en la síntesis de la serotonina y el ácido homovanílico. En ratones *Akp2*^{-/-},

5 debido a la fosfatasa alcalina defectuosa, no se puede producir el PL a partir del PLP lo que resulta en niveles plasmáticos elevados de PLP pero concentraciones PLP intracelular reducidas. La falta de PLP intracelular cierra el metabolismo corriente abajo incluyendo, por ejemplo, la producción de GABA por el glutamato descarboxilasa (GAD) en el cerebro.

[0060] El GABA actúa en las sinapsis inhibitorias en el cerebro de los vertebrados

10 mediante la unión a receptores transmembrana específicos en la membrana plasmática de ambos procesos neuronales pre y postsinápticos. Esta unión provoca la apertura de canales iónicos para permitir el flujo de iones de cloruro cargados negativamente dentro de la célula o iones de potasio cargados positivamente fuera de la célula. Esta acción produce un cambio negativo en el potencial transmembrana, causando generalmente hiperpolarización.

15 Se conocen dos clases generales de receptores GABA: GABA_A en el que el receptor es parte de un complejo de canales iónicos regulados por ligando, y receptores metabotrópicos GABA_B, que son receptores acoplados a proteína G que abren o cierran canales iónicos a través de intermediarios. Se encontró que los niveles de GABA se redujeron

20 aproximadamente un 50 % en ratones *Akp2*^{-/-} en comparación con los compañeros de control de la misma camada, lo que contribuye a un tiempo de vida acortado para ratones knockout (*Waymire 1995*). Además, al suplementar la vitamina B6 (piridoxal, o PL, pero no PN), el fenotipo de convulsión fue rescatado en aproximadamente 67 % de los ratones *Akp2*^{-/-} con un antecedente genético híbrido, aunque los animales rescatados desarrollaron

25 posteriormente dentición defectuosa. El 33% restante respondió mal a las inyecciones de PL o no respondió. Por el contrario, los ratones *Akp2*^{-/-} con un antecedente genético consanguíneo, no todos responden bien o no responden al suplemento PL.

[0061] Fosfatasa alcalinas (ALPs)

[0062] Hay cuatro isoenzimas conocidas de ALP, a saber, fosfatasa alcalina no
30 específica de tejido (TNALP, ver discusión más adelante), fosfatasa alcalina placentaria

(PALP), [Secuencias de Referencias NCBI (NP_112603) y (NP_001623), fosfatasa alcalina de células germinales (GCALP) (Secuencia de referencia NCBI [P10696]) y fosfatasa alcalina intestinal (IALP) (Secuencia de referencia NCBI [NP_001622]). Estas enzimas poseen estructuras tridimensionales muy similares. Cada uno de sus sitios catalíticos

5 contiene cuatro dominios de unión metálica para iones metálicos (dos Zn^{2+} y uno Mg^{2+}) necesarios para la actividad enzimática. Estas enzimas catalizan la hidrólisis de monoésteres de ácido fosfórico y también catalizan una reacción de transfosforilación en presencia de altas concentraciones de aceptores de fosfato. Por ejemplo, PLAP es fisiológicamente activo con respecto a PEA, PPi y PLP, que son sustratos naturales conocidos para TNALP

10 (*Whyte, 1995; Zhang, 2004*).

[0063] Con base en la similitud estructural entre las ALPs, uno esperaría algunas superposiciones funcionales sobre ellos también. Los humanos y roedores alimentados con una dieta con un alto contenido en grasa, por ejemplo, tuvieron niveles elevados de ALP circulantes originados de IALP (*Langman 1966 y Gould 1944 Biochem. 4:175-181*). Por lo

15 tanto, el aumento de la ingesta puede elevar la IALP y así compensar la función de la TNALP mediante la reducción de PLP circulante en ratones *Akp2^{-/-}*. De forma similar, PLAP expresada en portadores humanos de género femenino de HPP durante el embarazo mostró compensación por TNALP (*Whyte 1995 J. Clin. Invest. 95:1440-1445*).

[0064] La identificación de una población de sujetos con actividad de ALP reducida

20 o suprimida puede tratarse posteriormente, por ejemplo, con una cantidad terapéuticamente efectiva de TNALP recombinante u otras isoenzimas de ALP. Diferentes isoenzimas pueden administrarse solas indistintamente o en combinación. Los sujetos identificados pueden ser tratados, por ejemplo, por TNALP recombinante, PLAP, IALP y/o GCALP. Estas ALP pueden ser proteínas de mamíferos (tales como los seres humanos), proteínas de

25 no mamíferas o proteínas de fusión que comprenden al menos parte de porciones de mamíferos.

[0065] TNALP y Variantes.

[0066] La TNALP es una proteína de membrana unida anclada a través de un

30 glicolípido a su C-terminal (*Swiss-Prot, P05186*). Este anclaje de

glicosilfosfatidilinositol(GPI) se añade de forma post traslacional después de remover un extremo C-terminal hidrófobo, que sirve tanto como un anclaje de membrana temporal y como una señal para la adición del GPI. El TNALP recombinante descrito en el presente documento incluye, por ejemplo, la porción soluble de TNALP. Un ejemplo más específico

5 incluye un TNALP recombinante que comprende un TNALP humano en donde el primer aminoácido de la secuencia C-terminal hidrofóbica, a saber la alanina, se reemplaza por un codón de terminación. El TNALP soluble (denominado aquí como sTNALP) así formado contiene todos los aminoácidos de la forma anclada nativa del TNALP necesaria para la formación del sitio catalítico pero carece del anclaje de membrana GPI. Los TNALP

10 conocidos incluyen, por ejemplo, TNALP humano [Referencia de Secuencias NCBI NP_000469, AAI10910, AAH90861, AAH66116, AAH21289 y AAI26166]; TNALP de mono Rhesus [XP_001109717]; TNALP de rata [NP_037191]; TNALP de perro [AAF64516]; TNALP de cerdo [AAN64273], ratón [NP_031457], bovino [NP_789828, NP_776412, AAM 8209, AAC33858], y gato [NP_001036028]. El término "tipo salvaje" o

15 "secuencia de tipo salvaje" utilizado para TNALP u otros genes o proteínas en la presente divulgación se refiere a la forma típica de tales genes o proteínas como ocurre en la naturaleza en mamíferos humanos, no humanos normales, u otros organismos vivientes. Una secuencia de tipo salvaje puede referirse al alelo "normal" estándar en un locus para un gen o la secuencia de aminoácidos primaria "normal" estándar (opcionalmente con las

20 modificaciones post-trasnacionales "normales" estándar y/o enlaces entre cadenas y/o interacciones entre los residuos de aminoácidos) para un polipéptido o proteína en contraste con la producida por un alelo "mutante" no estándar o una secuencia/modificación/interacción de aminoácidos. Los alelos "mutantes" pueden variar en gran medida, e incluso llegar a ser el tipo salvaje si un cambio genético ocurre dentro de la

25 población. Se puede observar ahora que la mayoría o todos los genes loci (y menos frecuente pero todavía posible para la mayoría de las secuencias polipeptídicas) existen en una variedad de formas alélicas, que varían en frecuencia a lo largo del rango geográfico de una especie y que un tipo salvaje uniforme puede no necesariamente existir. Sin embargo, en general el alelo o secuencia de aminoácidos más prevalente, es decir, el que tiene la

30 frecuencia más alta entre los organismos humanos normales u otros organismos normales, es

el que se considera como tipo salvaje en la presente divulgación. El término "normal" usado para seres humanos u otros organismos en este documento descriptivo se refiere, excepto por lo especificado de otra manera, a un ser humano u otros organismos sin ninguna enfermedad (p. ej., la HPP), trastornos y/o síntomas o consecuencias fisiológicas (p. ej., defectos de mineralización, convulsiones, etc.) causadas por o relacionadas con la actividad aberrante (que puede ser debida, p. ej., a deficiencia o ausencia de producto génico o proteico y/o defecto o pérdida de función del gen o producto proteico) del gen o polipéptido/proteína relevante. El ejemplo más obvio para un ser humano normal es un ser humano que no tiene síntomas de HPP o HPP y no tiene mutaciones o modificaciones en el gen *ALPL* y en las proteínas ALP que pueden resultar en síntomas relacionados con HPP. En otro escenario que se enfoca en las funciones de ALP, el alcance de un ser humano "normal" en la presente divulgación puede ampliarse para incluir cualquier ser humano que no tenga actividad endógena aberrante de fosfatasa alcalina (que puede ser probada, p. ej., por los niveles de sustrato (PPi, PEA Y PLP) y comparado con la actividad correspondiente en otros seres humanos sanos o normales).

[0067] Las TNALP recombinantes descritos en el presente documento pueden incluir secuencias que están sustituidas, ya sea a nivel de nucleótidos o de aminoácidos por secuencias en una o más posiciones de la secuencia TNALP, en dos o más posiciones de la secuencia TNALP, en 3 o más posiciones de la secuencia TNALP, en 5 o más posiciones de la secuencia TNALP, en 10 o más posiciones de la secuencia TNALP, o en 15-20 o más posiciones de la secuencia TNALP. Las sustituciones pueden incluir, por ejemplo, sustituciones conservadoras, sustitución por secuencias ortólogas y/o sustituciones disruptivas. Las secuencias TNALP también pueden tener supresiones o reordenamientos.

[0068] Un experto en la materia reconocerá que pueden realizarse sustituciones conservadoras a nivel de nucleótidos para secuencias codificantes que dan como resultado productos de expresión funcional. Como tal, la secuencia TNALP y los fragmentos (incluyendo opcionalmente exones y secuencias reguladoras) pueden ser secuencias de tipo natural de TNALP, o pueden ser secuencias variantes que comparten una alta homología con secuencias de tipo natural. La divulgación establece, para el uso de secuencias, que haya al menos aproximadamente 70 %, aproximadamente 71 %, aproximadamente 72 %,

aproximadamente 73 %, aproximadamente 74 %, aproximadamente 75 %, aproximadamente 76 %, aproximadamente 77 %, aproximadamente 78 %, aproximadamente 79 % ,
aproximadamente 80 %, aproximadamente 81 %, aproximadamente 82 %, aproximadamente 83 %, aproximadamente 84 %, aproximadamente 85 %, aproximadamente 86 %, 5
aproximadamente 87 %, aproximadamente 88 %, aproximadamente 89 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 91 %, aproximadamente 92 %, aproximadamente 93 %, aproximadamente 94 %, aproximadamente 95 %, aproximadamente 96 %, aproximadamente 97 %, aproximadamente 98 %, aproximadamente 99 %, o aproximadamente 100 % o más de
identidad con las secuencias de tipo salvaje deseadas. Tal como se utiliza en el presente
10 documento, el término "aproximadamente" significa más o menos 10% del valor numérico del número con el que se está usando.

[0069] Los términos "homología" o "identidad" o "similitud" se refieren a relaciones de secuencia entre dos secuencias y se pueden determinar comparando una posición de nucleótido o una posición de aminoácido en cada secuencia cuando se alinean con fines de
15 comparación. El término "homología" se refiere a la relación de dos secuencias de ácido nucleico o aminoácidos. El término "identidad" se refiere al grado en el que las secuencias comparadas son iguales. El término "similitud" se refiere al grado en que las dos secuencias son iguales, pero, incluye nucleótidos degenerados neutros que pueden sustituirse dentro de un codón sin cambiar la identidad del aminoácido del codón.

[0070] Un experto en la materia reconocerá que las sustituciones, supresiones o adiciones individuales a secuencias de un ácido nucleico, péptido, polipéptido o de una proteína que alteran, añaden o suprimen un solo aminoácido o un pequeño porcentaje de aminoácidos en la secuencia codificada es una "variante conservativamente modificada". Dichas variantes pueden ser útiles, por ejemplo, para alterar las propiedades físicas del
20 péptido, *p. ej.*, para aumentar la estabilidad o la eficacia del péptido. Los expertos en la materia conocen las tablas de sustitución conservadoras que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares. Dichas variantes conservativamente modificadas, se adicionan a (y no excluyen) las variantes polimórficas, homólogos interespecies y alelos alternativos. Los siguientes grupos proporcionan ejemplos no limitantes de aminoácidos que pueden ser
25 sustituidos conservativamente entre sí: 1) alanina (A), glicina (G); 2) ácido aspártico (D),
30

ácido glutámico (E); 3) asparagina (N), glutamina (Q); 4) arginina (R), lisina (K); 5) isoleucina (I), leucina (L), metionina (M), valina (V); 6) fenilalanina (F), tirosina (Y), triptófano (W); 7) serina (S), treonina (T); y 8) cisteína (C), metionina (M).

[0071] Sin estar limitado por la teoría, la ALP recombinante descrita en el presente

5 documento abarca secuencias que comprenden una secuencia de consenso derivada del dominio extracelular de ALP de isoenzimas de ALP humana y de ALPs funcionales conocidas (*p. ej.*, ALPs originadas de mamíferos humanos, no humanos, ratones, ratas, ganado vacuno, gatos, perros, cerdos, etc.). Como se usa en el presente documento, la terminología "dominio extracelular" se refiere a cualquier porción extracelular funcional de

10 la proteína nativa (*p. ej.*, sin la señal peptídica). El STNALP recombinante que retiene los aminoácidos originales 1 a 501 (18 a 501 cuando se cuenta el péptido señal secretor) (*Oda et al., J. Biochem* 126: 694-699, 1999), aminoácidos 1 a 504 (18 a 504 cuando se secretan) (*Bernd et al., Patente* US 6.905.689) y los aminoácidos 1 a 505 (18-505 cuando se secretan) (*Tomatsu et al.,* US 2007/0081984), son enzimáticamente activos. Además, un sTNALP

15 recombinante que retiene los aminoácidos 1 a 502 (18 a 502 cuando se secreta) (figura 3) del TNALP original es enzimáticamente activo (véase la publicación PCT No. WO 2008/138131). Esto indica que los residuos de aminoácidos se pueden remover del extremo C-terminal de las fosfatasas alcalinas nativas sin afectar su actividad enzimática. Además, la presente divulgación también incluye cualquier variante de ALP que contenga al menos una

20 sustitución, supresión, adición y/o modificación (*p. ej.*, glicosilación, PEGilación, glutatiónilación, ubiquitinación, acetilación de sialilación, amidación, bloqueo, formilación, hidroxilación del ácido gamma carboxiglutámico, metilación, fosforilación, ácido pirrolidona carboxílico y/o sulfatación) a residuos de aminoácidos de ALP de tipo salvaje. Dichas variantes, que son útiles para la presente divulgación, sólo necesitan retener cierto

25 grado de actividad *in vitro* y/o *in vivo* en comparación con la ALP de tipo salvaje (*p. ej.*, más de o aproximadamente 30 %, aproximadamente 40 %, aproximadamente 50 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 70 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 100 %, aproximadamente 150 %, aproximadamente 200 %, aproximadamente 300 %, o más).

[0072] Proteínas de Fusión que comprenden ALP

[0073] Los métodos descritos en el presente documento pueden utilizar una proteína de fusión de ALP recombinante (*p. ej.*, TNALP) para el tratamiento de la población o poblaciones de sujetos identificadas. Las proteínas de fusión pueden comprender la longitud total o fragmentos de la ALP o variantes descritas en el presente documento y mantener la actividad biológica. Sin estar limitadas por la teoría, las proteínas de fusión pueden comprender otras porciones, tales como cualquier polipéptido, lípido, nucleótido u otras partes, para mantener o mejorar, por ejemplo, las funciones de la fosfatasa alcalina. Por ejemplo, las proteínas de fusión pueden comprender una región cristalizable de fragmento (Fc) u otra longitud completa o fragmentos de inmunoglobulinas para aumentar la estabilidad o el tiempo de retención (*p. ej.*, con una semivida más larga) de ALP *in vivo*. De forma similar, la tecnología de fusión de albúmina puede utilizarse para mejorar la vida media de la ALP circulante (*Schulte 2011 Thromb Res. 128: S9 - 12*). Además, las proteínas de fusión pueden comprender una porción de direccionamiento para dirigir la ALP hacia tejidos, células u órganos específicos.

[0074] La presente divulgación también abarca proteínas de fusión que comprenden proteínas ALP modificadas de forma post traslacional o fragmentos de las mismas, que se modifican, *p. ej.*, por glicosilación, PEGilación, glutatiónilación, ubiquitinación, acetilación de sialilación, amidación, bloqueo, formilación, hidroxilación del ácido gamma carboxiglutámico, metilación, fosforilación, ácido pirrolidona carboxílico y/o sulfatación.

[0075] El término "proteína recombinante" o "polipéptido recombinante" se refiere a una proteína codificada por un ácido nucleico manipulado genéticamente. El ácido nucleico generalmente se coloca dentro de un vector, tal como un plásmido o virus, según sea apropiado para una célula huésped. Aunque las células de ovario de hámster chino (CHO) se han utilizado como huésped para expresar algunas de las proteínas recombinantes descritas en el presente documento, una persona versada en la materia entenderá que una serie de otros huéspedes y sistemas de expresión, *p. ej.*, células CHO modificadas, pero no limitado a CHO DG44 y CHO/dhfr- (también denominadas CHO duk⁻), células HEK293, PerCβ, células de riñón de hámster bebé (BHK), células bacterianas, sistemas *in vitro*, células L, células C127, células 3T3, Células COS-7, etc., se pueden utilizar para producir

proteínas recombinantes. La proteína o polipéptido "escindible recombinante" se refiere a una proteína recombinante que puede ser escindida por una enzima de la célula huésped para producir una actividad modificada, *p.ej.*, transformando la proteína o el polipéptido recombinante en una proteína secretada o soluble.

5

[0076] Fragmentos de la región cristizable de fragmento (Fc)

[0077] Los fragmentos útiles Fc para la presente divulgación incluyen fragmentos Fc de IgG que comprenden la región bisagra (*hinge*, en inglés), los dominios CH₂ y CH₃. por ejemplo, se pueden utilizar IgG-1, IgG-2, IgG-3, IgG-3 e IgG-4. Una secuencia de aminoácidos de ejemplo para el fragmento Fc utilizado en una proteína de fusión con ALP en la presente divulgación se indica en la Secuencia no.: 3. De forma similar otras secuencias de aminoácidos para el fragmento Fc, tales como una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o mayor identidad de secuencia con la Secuencia no 3, se incluyen también en la presente divulgación.

15

[0078] Péptidos cargados negativamente

[0079] Las proteínas de fusión de ALP de la presente divulgación pueden comprender un polipéptido dirigido al hueso, tal como, por ejemplo, un péptido cargado negativamente. El péptido cargado negativamente puede ser un poliaspartato o poliglutamato seleccionado del grupo que consiste en D10, D8, D11, D12, D13, D14, D15, D16, E10, E8, E11, E12, E13, E14, E15 y E16, o cualquier otro formato conocido en la materia, *p. ej.*, como se describen en la publicación PCT no. WO 2008/138131.

20

25 **[0080]** Formación de proteínas de fusión

[0081] La presente divulgación proporciona un constructo de ALP recombinante o una proteína de fusión de ALP para tratar poblaciones de sujetos identificadas y subpoblaciones, *p. ej.*, de pacientes de HPP. Dicho constructo de ALP recombinante o proteína de fusión puede comprender una longitud total o fragmento de una isoenzima soluble de ALP (sALP, *p. ej.*, sTNALP) y un fragmento Fc, además con o sin un péptido

30

cargado negativamente. Estos componentes pueden fusionarse en cualquier secuencia desde el terminal 5' hasta el terminal 3', siempre que la proteína de fusión resultante mantenga o mejore la actividad de la fosfatasa alcalina. Los formatos de ejemplo de proteínas de fusión incluyen, sin limitar, sALP-Fc-D10, sALP-Fc, D10-Fc-sALP, Fc-sALP, D10-sALP-Fc. Fc-sALP-D10, Fc-D10-sALP, etc. En estos formatos, D10 puede ser sustituido opcionalmente por cualquier otro péptido cargado negativamente o por una parte de direccionamiento (*targeting moiety*, en inglés) y el fragmento Fc se puede sustituir por cualquier IgG funcional o inmunoglobulina.

[0082] La presente divulgación proporciona un método para tratar convulsiones con constructos de ALP recombinantes, incluyendo sALP con o sin fusión de Fc y/o marcadores peptídicos cargados negativamente. Aunque se conoce bien en la materia que los marcadores peptídicos cargados negativamente (tales como D10) pueden direccionar la ALP a tejidos óseos (véase, p. ej., la publicación PCT WO 2008/138131), es sorprendente que un sALP-Fc-D10 direccionado al hueso (también conocido como la asfotasa alfa) funcione bien para mejorar la supervivencia de los ratones *Akp2*^{-/-} y mejorar los parámetros fisiológicos relacionados con las convulsiones, tales como restaurar los niveles de GABA y serina, y disminuir los niveles de cistationina en el cerebro.

[0083] Espaciador

[0084] Diferentes componentes (*p. ej.*, fragmentos o porciones) de una proteína de fusión de ALP pueden fusionarse entre sí a través de un enlazador de separación o espaciador. En algunas modalidades, el espaciador puede ser un polipéptido corto que comprende al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más aminoácidos. En una realización, el fragmento Fc en la proteína de fusión sALP (*p. ej.*, sTNALP) actúa como un espaciador que permite que la proteína se plegue de manera más eficiente. Esto fue confirmado por el descubrimiento de que la expresión de sTNALP-Fc-D10 era mayor que la de sTNALP-D10 (Ejemplo 2 de la publicación PCT WO 2008/138131). Aunque no está limitado por la teoría, el fragmento Fc podría actuar para aliviar las fuerzas repulsivas causadas por la presencia de las cargas altamente negativas que la secuencia D10 añade en el C-terminal de la secuencia sALP. Otros espaciadores útiles incluyen, pero no se limitan a, polipéptidos

capaces de aliviar las fuerzas repulsivas causadas por la presencia de la secuencia cargada altamente de forma negativa (*p. ej.*, poliaspartato tal como la D10) añadida a la secuencia sALP.

[0085] El espaciador puede estar diseñado para, por ejemplo, aliviar el impedimento estérico que podría impedir la interacción de dos dominios sALP de dos monómeros sALP. Además, se puede introducir un espaciador entre la porción sALP y la porción Fc si fuese necesario, *p. ej.*, los constructos sTNALP-Fc-D10 como se ilustra en las figuras 2 y 3 tienen espaciadores entre el sTNALP. El Fc y D10 comprenden dos aminoácidos (LK y DI, respectivamente).

[0086] Una sALP direccionada al hueso (*p. ej.*, sTNALP-Fc-D10) puede comprender además opcionalmente uno o más aminoácidos adicionales 1) corriente abajo del poliaspartato o del poliglutamato; y/o 2) entre el poliaspartato y el fragmento Fc; y/o 3) entre el espaciador tal como el fragmento Fc y el fragmento sALP. Por ejemplo, este es el caso, cuando la estrategia de clonación utilizada para producir el conjugado de direccionamiento óseo introduce aminoácidos exógenos en estas ubicaciones. Los aminoácidos exógenos, sin embargo, deben seleccionarse de manera que no proporcionen una señal adicional de anclaje GPI. La probabilidad de que una secuencia diseñada sea escindida por la transamidasa de la célula huésped puede predecirse como lo describe Ikezawa (*Ikezawa 2002 Biol Pharm. Bull. 25(4):409-417*).

[0087] Las condiciones adecuadas para la expresión de sALP o su proteína de fusión pueden optimizarse como sería reconocido por un experto en la materia. Por ejemplo, tales condiciones incluyen el uso de un medio de cultivo que permite la producción de la sALP o su proteína de fusión. Dicho medio se puede preparar con un tampón (*buffer*) que comprende, por ejemplo, bicarbonato y/o HEPES; iones que incluyen, por ejemplo, cloruro, fosfato, calcio, sodio, potasio y/o magnesio; hierro; fuentes de carbono que incluyen, por ejemplo, azúcares simples y/o aminoácidos; lípidos, nucleótidos, vitaminas y/o factores de crecimiento que incluyen, por ejemplo, insulina. Se pueden usar medios comercialmente disponibles como alfa-MEM, DMEM, Ham's-F12 y IMDM suplementados con glutamina-L 4 mM y suero bovino fetal al 5%. Se pueden usar medios libres de proteínas animales disponibles comercialmente como, por ejemplo, Hyclone® SFM4CHO, Sigma CHO DHFR⁻

, Cambrex POWER® CHO CD suplementado con glutamina 2-4 mM. Estos medios se preparan deseablemente sin timidina, hipoxantina y L-glicina para mantener la presión selectiva permitiendo la expresión del producto proteico estable.

[0088] El término "tejido óseo" se utiliza en el presente documento para referirse a tejido sintetizado por osteoblastos compuestos de una matriz orgánica que contiene principalmente colágeno y que es mineralizada por la deposición de cristales de hidroxiapatita.

[0089] Las proteínas de fusión comprendidas en los conjugados de liberación ósea de la presente divulgación son útiles para el tratamiento terapéutico de afecciones óseas defectuosas proporcionando una cantidad efectiva de la proteína de fusión al hueso. Las proteínas de fusión se proporcionan en forma de composiciones farmacéuticas en cualquier vehículo estándar farmacéuticamente aceptable y se administran por cualquier procedimiento estándar, por ejemplo por inyección intravenosa.

[0090] Tal como se utiliza en el presente documento, la terminología "fenotipo HPP" si no se especifica de otro modo, generalmente se refiere a cualquier fenotipo característico de sujetos que tienen HPP, tales como, pero sin limitarse a ningún fenotipo relacionado con defectos de mineralización ósea o dentaria. Los fenotipos de HPP también pueden incluir "síntomas de HPP" además de defectos de mineralización ósea incluyendo, pero por ejemplo, no limitados al raquitismo (defecto en el cartílago de crecimiento), osteomalacia, niveles elevados de PPI inorgánico, PEA o PLP en la sangre y/o en la orina, convulsiones, dolores óseos, deposición de cristales de dihidrato de pirofosfato cálcico (CPPD) en articulaciones que conducen a condrocalcinosis y muerte prematura. Sin ser tan limitado, un fenotipo de HPP puede documentarse por retardo de crecimiento con una disminución de la longitud de huesos largos (tal como, por ejemplo, el fémur, la tibia, el húmero, el radio, el cúbito), una disminución de la densidad promedio total del hueso y una disminución de la mineralización ósea en huesos tales como, por ejemplo, el fémur, la tibia, las costillas, el metatarso y la falange; una disminución de la mineralización dentaria, pérdida prematura de dientes de leche (*p. ej.*, aplasia, hipoplasia o displasia del cemento dental). Sin ser tan limitado, la corrección o prevención de un defecto de mineralización ósea se puede observar por uno o más de los siguientes: un aumento de longitud de huesos

largos, aumento de la mineralización ósea y/o dentaria, corrección del arqueamiento de las piernas, una disminución del dolor óseo y una reducción de la deposición de cristales de CPPD en las articulaciones.

[0091] "Un sujeto que no es HPP" se refiere a cualquier sujeto que 1) todavía no se haya diagnosticado HPP y que no tiene ningún fenotipo HPP; 2) se haya diagnosticado no tener HPP; o 3) no tiene actividad de fosfatasa alcalina aberrante.

[0092] "Tratamiento" se refiere a la administración de un agente terapéutico o a la realización de procedimientos médicos con respecto a un paciente o sujeto, ya sea para la profilaxis (prevención) o para curar o reducir los síntomas de la enfermedad o el padecimiento en el caso en que el paciente esté afligido. La prevención de una enfermedad, trastorno o síntomas asociados con la actividad aberrante de ALP se incluye dentro del alcance del tratamiento. Los métodos y composiciones descritos en el presente documento o identificados a través de métodos descritos aquí, pueden usarse como parte de un régimen terapéutico en cantidades terapéuticamente efectivas. Una "cantidad terapéuticamente efectiva" es una cantidad suficiente para disminuir, prevenir o para mejorarse de los síntomas asociados con una afección médica.

[0093] Otros fármacos anticonvulsivos

[0094] Los fármacos antiepilépticos convencionales pueden bloquear los canales de sodio o mejorar la función del GABA. Además de los canales de sodio dependientes de voltaje y los componentes del sistema GABA, otros objetivos incluyen los receptores GABA_A, el transportador GAT-1 GABA y la GABA transaminasa. Otros objetivos incluyen canales de calcio con voltaje, SV2A y $\alpha 2\delta$. Ejemplos de fármacos anticonvulsivos incluyen, por ejemplo, aldehídos (*p. ej.*, paraldehído), alcoholes alílicos aromáticos (*p. ej.*, el estiripentol), barbitúricos (*p. ej.*, fenobarbital, metilfenobarbital y barbexaclona), benzodiazepinas (*p. ej.*, clobazam, clonazepam, clorazepato, diazepam, midazolam, lorazepam, nitrazepam, temazepam y nimetazepam, bromuros (*p. ej.*, bromuro de potasio) carbamatos (*p. ej.*, felbamato), carboxamidas (*p. ej.*, carbamazepina, oxcarbazepina y acetato de eslicarbazepina), ácidos grasos (*p. ej.*, valproatos, vigabatrina, progabida y tiagabina), derivados de fructosa (*p. ej.*, topiramato), análogos de GABA (*p. ej.*, gabapentina y

pregabalina), hidantoínas (*p. ej.*, etotina, fenitoína, mefenitoína y fosfenitoína), oxazolidinedionas (*p. ej.*, parametadiona, trimetadiona y etadiona), propionatos (*p. ej.*, beclamida), pirimidinedionas (*p. ej.*, primidona), pirrolinas (*p. ej.*, brivaracetam, levetiracetam y seletracetam), succinimidas (*p. ej.*, etosuximida, fensuximida y mesuximida), suflonamidas (*p. ej.*, acetazolamida, sultiame, metazolamida y zonisamida), triazinas (*p. ej.*, lamotrigina), ureas (*p. ej.*, fenetururo y fenacemida), valproilamidas (derivados de amida de valproato) (*p. ej.*, valpromuro y valnoctamida) y otros (*p. ej.*, perampanel).

[0095] Al menos uno de los fármacos anticonvulsivos convencionales puede coadministrarse conjuntamente con una o más ALP recombinantes descritas en el presente documento a un sujeto para tratar o para aliviar los síntomas de las convulsiones. En particular, dicha terapia o terapias de combinación se pueden usar para tratar sujetos que sufren convulsiones resistentes a la vitamina B6 y pueden usarse para tratar una población identificada como se describe en el presente documento cuyos sujetos exhiben actividad de ALP reducida independiente de si tienen otros síntomas similares a los de la HPP. Tales fármacos anticonvulsivos convencionales se pueden administrar con la ALP recombinante al mismo tiempo (durante un periodo de tiempo predeterminado) o antes o después de la administración de ALP.

[0096] Vía de administración

[0097] Los agentes terapéuticos descritos en el presente documento, *p. ej.*, las ALP recombinantes, se pueden administrar, por ejemplo, vía oral, nasal, intravenosa, intramuscular, subcutánea, sublingual, intratecal o intradérmica. La vía de administración puede depender de una variedad de factores tales como el medio ambiente y los objetivos terapéuticos.

[0098] A modo de ejemplo, la composición farmacéutica de la presente divulgación puede estar en forma de un líquido, una solución, una suspensión, una píldora, una cápsula, un comprimido, una cápsula líquida, un polvo, un gel, una pomada, una crema, vapor, vapor atomizado, aerosol o fitosoma. Los suplementos dietarios como se describen aquí pueden contener aditivos farmacéuticamente aceptables tales como agentes de suspensión, agentes

emulsionantes, vehículos no acuosos, conservantes, sales de tampón, agentes aromatizantes, colorantes y endulzantes según sea apropiado. Las preparaciones para administración oral también se pueden formular adecuadamente para dar una liberación controlada de los ingredientes activos.

5

[0099] Dosificación

[0100] Las dosis específicas dependerán de muchos factores incluyendo el modo de administración, la edad y el peso del sujeto. Usualmente, la cantidad de ALP direccionada o no marcada al hueso, contenida dentro de una sola dosis, es una cantidad que efectivamente previene, retrasa o corrige convulsiones sin inducir una toxicidad significativa. Usualmente, las sALP o su proteína de fusión de acuerdo con la presente divulgación se pueden administrar a sujetos en dosis que varían de 0,001 a 500 mg/kg/día y en una modalidad más específica, aproximadamente 0,1 a aproximadamente 100 mg/kg/día y en una modalidad más específica, aproximadamente 0,2 a aproximadamente 20 mg/kg/día. El método de escalado alométrico (*Mahmood et al., 2003 Clin. Pharmacol., 43 (7): 692-7 y Mahmood 2009 J. Pharma. Sci., 98 (10): 3850-3861*) puede usarse para extrapolar la dosis de ratones a seres humanos. La dosis puede ser adaptada por el médico clínico de acuerdo con factores convencionales tales como la extensión de la enfermedad y diferentes parámetros del paciente.

[0101] La cantidad terapéuticamente efectiva de sALP o su proteína de fusión también se pueden medir directamente. La cantidad efectiva se puede suministrar diariamente o semanalmente o fracciones de las mismas. Típicamente, una composición farmacéutica descrita en el presente documento puede administrarse en una cantidad de aproximadamente 0,001 mg hasta aproximadamente 500 mg por kg de peso corporal por día (, p. ej., 0,05, 0,01, 0,1, 0,2, 0,3, 0,5, 0,7, 0,8, 1 mg, 2 mg, 3 mg, 4 mg, 5 mg, 8 mg, 10 mg, 15 mg, 16 mg, 20 mg, 30 mg, 50 mg, 100 mg o 250 mg). Las dosificaciones pueden proporcionarse en un solo o múltiples regímenes de dosificación. Por ejemplo, en algunas modalidades la cantidad efectiva de la sALP o de su proteína de fusión, es una dosis que oscila de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 100 mg/kg/día, de aproximadamente 0,2 mg a aproximadamente 20 mg al día, de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 5 mg al

día, de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 6 mg al día, de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 7 mg al día, de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 8 mg al día, de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 10 mg al día, de aproximadamente 0,7 mg a aproximadamente 210 mg por semana, de aproximadamente 1,4 mg a aproximadamente 140 mg por semana, de aproximadamente 0,3 mg a aproximadamente 300 mg cada tres días, de aproximadamente 0,4 mg a aproximadamente 40 mg cada dos días y de aproximadamente 2 mg a aproximadamente 20 mg cada dos días.

[0102] Estas son simplemente guías ya que la dosis real debe ser cuidadosamente seleccionada y valorada por el médico a cargo del paciente sobre la base de factores clínicos únicos para cada paciente o por un nutricionista. La dosis diaria óptima se determinará por métodos conocidos en la materia y estará influenciada por factores tales como la edad del paciente tal como se ha indicado con anterioridad y por otros factores clínicamente relevantes. Además, los pacientes pueden tomar medicamentos para otras enfermedades o condiciones. Se pueden continuar con los otros medicamentos durante el tiempo que se le administre al paciente la sALP o su proteína de fusión, pero es particularmente aconsejable en estos casos comenzar con dosis bajas para determinar si se experimentan efectos secundarios adversos.

[0103] Vehículos

[0104] Las preparaciones que contienen sALP o su proteína de fusión pueden administrar a pacientes en combinación con suspensiones, emulsiones, disolventes acuosos o no acuosos, estériles y farmacéuticamente aceptables. Ejemplos de disolventes no acuosos son: propilenglicol, polietilenglicol, aceite vegetal, aceite de pescado y ésteres orgánicos inyectables. Los vehículos acuosos incluyen agua, soluciones de agua-alcohol, emulsiones o suspensiones, incluyendo salina y vehículos parenterales médicos tamponados incluyendo solución de cloruro de sodio, solución Ringer con dextrosa, solución de dextrosa más cloruro de sodio, solución Ringer que contiene lactosa o aceites fijos. Los vehículos intravenosos pueden incluir re abastecedores de fluidos y nutrientes, re abastecedores de electrolitos, tales como los basados en dextrosa de Ringer y similares.

[0105] Las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento pueden administrarse en un sistema de liberación controlada. En una realización se pueden usar materiales poliméricos que incluyen ácido poliláctico, poliortoésteres, copolímeros e hidrogeles de bloques anfipáticos reticulados, ácido polihidroxibutírico y polidihidropiranos (ver también *Smolen y Ball, Controlled Drug Bioavailability, Drug product design and performance, 1984, John Wiley & Sons, Ranade and Hollinger, Drug Delivery Systems, pharmacology and toxicology series, 2003, 2nd edition, CRC Press*), en otra modalidad se puede usar una bomba (*Saudek et al., 1989, N. Engl. J. Med. 321: 574*).

[0106] Los agentes terapéuticos de la presente divulgación podrían estar en forma de un polvo liofilizado que utiliza soluciones de excipiente apropiadas como diluyentes (*p. ej., sacarosa*).

[0107] Además, los segmentos de nucleótidos o proteínas de acuerdo con la presente divulgación se pueden introducir en individuos de diferentes maneras. Por ejemplo, los osteoblastos se pueden aislar del individuo afectado, transformarse con un constructo de nucleótidos descrito en este documento y reintroducirse al individuo afectado de varias maneras, incluyendo la inyección intravenosa. Alternativamente, el constructo de nucleótidos puede administrarse directamente al individuo afectado, por ejemplo, mediante inyección. El constructo de nucleótidos también se puede suministrar a través de un vehículo tal como un liposoma, el cual puede diseñarse para que sea direccionado a un tipo de célula específico y diseñarse para administrarse a través de diferentes rutas.

[0108] Las proteínas de fusión de la presente divulgación podrían también administrarse ventajosamente mediante terapia génica. Los métodos de terapia génica útiles incluyen los descritos en la publicación PCT WO 2006/060641, U.S. Patente no. US 7,179,903 y la publicación PCT WO 2001/036620 utilizando, por ejemplo, un vector de adenovirus para la proteína terapéutica y dirigiendo hepatocitos como células productoras de proteínas.

[0109] Un "vehículo de introducción de genes" se define como cualquier molécula que puede llevar polinucleótidos insertados a una célula huésped. Ejemplos de vehículos de introducción de genes son los liposomas, polímeros biocompatibles, que incluyen polímeros naturales y polímeros sintéticos; lipoproteínas; polipéptidos; polisacáridos;

lipopolisacáridos; envolturas víricas artificiales; partículas metálicas; y bacterias o virus, tales como baculovirus, adenovirus y retrovirus, bacteriófago, cósmido, plásmido, vectores fúngicos y otros vehículos de recombinación utilizados usualmente en la materia, que se han descrito para la expresión en una variedad de huéspedes eucariotas y procariotas y pueden ser usados para la terapia génica, así como para la simple expresión proteica. La "introducción de genes", la "transferencia de genes" y similares, tal como se utilizan en el presente documento, son términos que se refieren a la introducción de un polinucleótido exógeno (a veces denominado "transgén") en una célula huésped, independiente del método usado para la introducción. Dichos métodos incluyen una variedad de técnicas tales como, por ejemplo, transferencia de genes mediada por vectores (*p. ej.*, infección/transfección viral u otros complejos de liberación de genes basados en proteínas o lípidos) así como técnicas que facilitan la liberación de polinucleótidos "desnudos" tales como electroporación, suministro por "pistola de genes" y diversas técnicas utilizadas para la introducción de polinucleótidos).

[0110] El polinucleótido introducido puede mantenerse de forma estable o transitoria en la célula huésped. El mantenimiento estable usualmente requiere que el polinucleótido introducido contenga un origen de replicación compatible con la célula huésped o se integre en un replicón de la célula huésped tal como un replicón extra cromosómico (*p. ej.*, un plásmido) o un cromosoma nuclear o mitocondrial. Un número de vectores son capaces de mediar la transferencia de genes a células de mamífero.

[0111] Un "vector viral" se define como un viral o un virus producido de forma recombinante; partícula que comprende un polinucleótido que se libera en una célula huésped. Ejemplos de vectores víricos incluyen vectores retrovirales, vectores de adenovirus, vectores de virus asociados al adeno (*p. ej.*, véase la publicación PCT WO 2006/002203), vectores de alfavirus y similares.

[0112] En aspectos en los que la transferencia de genes está mediada por un vector viral de ADN, tal como un adenovirus (Ad) o un virus asociado al adeno (MV), un constructo de vectores se refiere al polinucleótido que comprende el genoma viral o parte del mismo y un transgén. Los ads son un grupo homogéneo de virus relativamente bien caracterizado, incluyendo más de 50 serotipos (WO 95/27071). Los ads son fáciles de

cultivar y no requieren integración en el genoma de la célula huésped. También se han construido vectores recombinantes derivados de Ad, particularmente aquellos que reducen el potencial de recombinación y la generación de virus de tipo salvaje (WO 95/00655 y WO 95/11984). Los vectores que contienen tanto un promotor como un sitio de clonación en el cual un polinucleótido puede unirse operativamente son conocidos en la técnica. Dichos vectores son capaces de transcribir ARN *in vitro* o *in vivo*. Para optimizar la expresión y/o la transcripción *in vitro*, puede ser necesario remover, añadir o alterar las porciones no traducidas 5' y/o 3' de los clones para eliminar codones de iniciación de traducción alternativa potencialmente inapropiada u otras secuencias que puedan interferir con la expresión o reducirla, ya sea a nivel de transcripción o traducción.

[0113] La sALP o su proteína de fusión de la presente divulgación también se puede usar en combinación con al menos un otro ingrediente activo para corregir un defecto de mineralización ósea u otro síntoma perjudicial de la HPP, *p. ej.*, las convulsiones. También puede usarse en combinación con al menos uno con al menos otro ingrediente activo para corregir el defecto del cemento.

[0114] Kits

[0115] La presente divulgación también se refiere a un kit para identificar una población de sujetos que presentan actividad de ALP reducida y/o para tratar la población identificada. El kit, por ejemplo, puede identificar sujetos que no presentan defectos de mineralización ósea y puede incluir, por ejemplo, agentes terapéuticos y formulaciones para tratar convulsiones (*p. ej.*, convulsiones resistentes a la B6 tratadas, por ejemplo, con una ALP recombinante, *p. ej.*, una TNALP recombinante). El kit puede comprender además instrucciones para administrar la composición o el vector a un sujeto para corregir o prevenir una enfermedad, trastorno o síntomas asociados con actividad de ALP reducida, *p. ej.*, los síntomas asociados a HPP y la HPP.

[0116] Dichos kits pueden comprender además al menos otro agente activo que puede prevenir o corregir un fenotipo del sujeto (tal como otros fármacos anticonvulsivos).

[0117] Además, un kit compartimentado de acuerdo con la presente divulgación incluye cualquier kit en el que los reactivos están contenidos en recipientes separados.

Dichos recipientes incluyen pequeños recipientes de vidrio, recipientes de plástico o tiras de plástico o de papel. Tales recipientes permiten la transferencia eficiente de los reactivos de un compartimiento a otro compartimiento de tal manera que las muestras y los reactivos no presenten contaminación cruzada y los agentes o soluciones de cada recipiente puedan

5 añadirse de manera cuantitativa de un compartimiento a otro.

[0118] Todas las referencias citadas aquí se incorporan al presente documento como referencia en su totalidad y para todos los fines en la misma medida como si cada publicación individual o patente o solicitud de patente fuese indicada de forma específica e individual para ser incorporada por referencia en su totalidad para todos los fines. En la medida en que las publicaciones y patentes o solicitudes de patentes incorporadas por referencia contradigan la divulgación contenida en la memoria descriptiva, la memoria descriptiva tiene la finalidad de reemplazar y/o tener precedencia sobre cualquier material contradictorio.

15 **[0119]** Todas las cifras que expresan cantidades de ingredientes, condiciones de reacción, etc., utilizadas en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones deben entenderse como modificadas en todos los casos por el término "aproximadamente". Por consiguiente, a menos que se indique lo contrario, los parámetros numéricos expuestos en la memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas son aproximaciones que pueden variar dependiendo de las propiedades deseadas que se pretenden obtener mediante la presente divulgación. Como mínimo, y no como un intento de limitar la aplicación de la doctrina de los equivalentes al alcance de las reivindicaciones, cada parámetro numérico debe interpretarse a la luz del número de dígitos significativos y aproximaciones habituales de redondeo.

25

EJEMPLOS

EJEMPLO 1 Expresión y Purificación de la sTNALP-FcD10 Recombinante

[0120] Con el fin de facilitar la expresión y la purificación de la TNALP recombinante, se eliminó la secuencia C-terminal hidrofóbica que especifica la unión de

30

anclaje GPI en TNALP para convertirla en una enzima secretada soluble (Di Mauro et al. 2002 *Journal of Bone and Mineral Research* 17:1383-1391). La secuencia codificadora del ectodominio TNALP también se extendió con la región Fc de la IgG1 humana (γ 1) (Swiss-Prot P01857). Esto permitió una purificación rápida de la enzima recombinante en la

5 cromatografía de Proteína A y sorpresivamente, su expresión aumentada. Además, para direccionar el TNALP recombinante al tejido óseo se unió una secuencia deca-aspartato (D10) al C-terminal de la región Fc. Esta forma quimérica de TNALP, denominada sTNALP-FcD10, retiene la actividad enzimática completa, cuando se ensayó con un pH de 9,8 utilizando el sustrato artificial p-nitrofenilfosfato y cuando se ensayó con un pH de 7,4

10 usando pirofosfato inorgánico (PPi) como sustrato fisiológico. Como en la forma natural de TNALP, la péptida señal N-terminal se escinde durante la translocación co-translacional de la proteína a través del retículo endoplásmico rugoso. Su diseño y estructura se ilustran esquemáticamente en la figura 1. La secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión (incluyendo la péptida señal) se muestra en la figura 2. La secuencia de aminoácidos de la

15 proteína de fusión segregada (es decir, sin el péptido señal) se muestra en la figura 3. Para una descripción completa de un proceso de expresión y características de una proteína de fusión de ejemplo sTNALP-FcD10, véase, por ejemplo, la publicación PCT WO 2008/138131.

20 EJEMPLO 2 Una subpoblación de ratones con HPP no afectada

[0121] Generalmente los ratones *Akp2*^{-/-} presentan manifestaciones similares a las de los seres humanos con HPP. Por ejemplo, dichos ratones pueden 1) tener mucho menos actividad plasmática de la ALP (p. ej., menos del 1 %). 2) aparecer normales al nacer pero desarrollar enfermedad esquelética aparente a los 6 u 11 días de edad (dependiendo del

25 fenotipo); 3) tener niveles plasmáticos elevados de al menos uno de PPi, PLP y PEA; 4) tener cambios raquíuticos progresivos, osteopenia y son propensos a fracturas; 5) tener ataques epilépticos y apnea; 6) tienen alimentación deficiente y/o ganancia de peso inadecuada; 7) y/o morir al día 21 de edad. Sin embargo, los ratones *Akp2*^{-/-} pueden tener diferentes grados de expresión fenotípica. Por ejemplo, en Waymire 1995, ninguno de los

30 ratones *Akp2*^{-/-} tenían defectos de mineralización. Además, el complemento B6 (en forma

de piridoxal, o PL, pero no PN) también rescató el fenotipo convulsivo y promovió la supervivencia en aproximadamente 67 % de los ratones *Akp2*^{-/-} con un historial genético híbrido C57BL / 6,129/Sv (B6129), aunque los animales rescatados desarrollaron posteriormente dentición defectuosa. El 33% restante respondió mal a las inyecciones de PL o no respondió. Sin embargo, todos los ratones *Akp2*^{-/-} con un antecedente genético consanguíneo 129/Sv no respondieron bien a las inyecciones PL o no respondieron.

[0122] La presente divulgación proporciona un grupo de ratones *Akp2*^{-/-} (con el mismo historial genético híbrido como en Waymire 1995, pero de diferentes generaciones) con grados variados en fenotipos de mineralización, pero, con una periodo de vida acortado similar. Curiosamente, el TNALP recombinante rescató a todos los ratones KO y restauró el GABA, la serina y la cistationina a niveles de WT sin suplemento de B6.

[0123] Diferentes subpoblaciones de ratones *Akp2*^{-/-} presentaron fenotipos severos, moderados, leves o incluso no afectados comparándolos con ratones de tipo salvaje de la misma camada. La figura 4 muestra los diferentes defectos de mineralización de ratones *Akp2*^{-/-}. La figura 5 muestra que en varias colonias de ratón con el mismo genotipo hubo una amplia distribución de la gravedad del fenotipo. Alrededor del 30% de los ratones knockout en cada colonia presentaron fenotipos "no afectados" (*p. ej.*, sin defectos significativos de mineralización ósea como se muestra en la figura 4, sin defectos significativos de peso corporal como se muestra en la figura 6 y sin defectos significativos de longitud ósea como se muestra en la figura 8). Sorpresivamente, los ratones knockout con fenotipos "no afectados" (mineralización) aún tenían un periodo de vida significativamente reducido comparable a otros ratones knockout con fenotipos más severos (figura 9; muestra que casi todos los ratones knockout (ratones graves y no afectados) murió alrededor del Día 25 después del nacimiento) murieron alrededor del día 25 después del nacimiento.

[0124] Se analizaron, el impacto del tratamiento profiláctico con TNALP recombinante, y extracción la TNALP recombinante sobre el transporte transmembrana de vitamina B6 en los cerebros de ratones *Akp2*^{-/-}. En el estudio de profilaxis, los ratones *Akp2*^{-/-} con un historial híbrido C57BL/6, 129/Sv (B6129) de la colonia de reproducción HPP-M2h_F4 se les inyectó subcutáneamente un vehículo o TNALP recombinante de 8,2 mg/kg

(también conocida como 8,2 mpk) una vez al día durante 9 días a partir del nacimiento. Los ratones de tipo salvaje en el mismo historial no fueron tratados y sirvieron como controles de referencia. En el estudio de extracción, los ratones *Akp2*^{-/-} con el mismo historial híbrido y la generación de F4 se trataron diariamente desde el nacimiento con una dosis similar de

5 TNALP recombinante durante 35 días seguido de 12 días con el tratamiento de vehículo (extracción) o de TNALP recombinante continuado. Los controles incluyeron tanto ratones de tipo salvaje sin tratamiento como ratones tratados con TNALP recombinante durante los primeros 35 días y luego cambiados a vehículo durante 12 días adicionales. Todos los ratones tenían libre acceso a una dieta certificada comercial de roedores de laboratorio

10 (*Charles River Rodent Diet 5075-US*) que no se suplementaba con piridoxina. En la necropsia, los cerebros fueron recogidos, congelados en nitrógeno líquido y almacenado a -80 ° C.

[0125] Con el tratamiento diario continuo de sTNALP-FcD10, los ratones *Akp2*^{-/-} (incluyendo aquellos que tenían el fenotipo "no afectado") tuvieron una periodo de vida

15 mucho más largo en comparación con ratones no tratados. Como se muestra en las figuras 10-12, paneles a la derecha, dichos ratones KO "no afectados" sobrevivieron al menos hasta el día 48 (cuando todos los ratones se terminaron).

[0126] Este descubrimiento de una subpoblación de ratones "no afectados" *Akp2*^{-/-} es consistente con informes previos de una subpoblación de pacientes con HPP con

20 convulsiones resistentes a la vitamina B6 pero sin deformidades óseas (p. ej., véase de *Roo et al., 2014 Molecular Genetics and Metabolism 111:404-407* y *Baumgartner-Sigl et al., 2007 Bone 40:1655-1661*). Claramente, existe el riesgo de que esta subpoblación de pacientes con HPP no reciba un diagnóstico oportuno y eficaz si los médicos limitan sus métodos de diagnóstico de HPP a la detección tradicional de deformidades óseas o defectos

25 de mineralización. Los pacientes con mineralización ósea normal no deben pasarse por alto por la posibilidad de tener otros síntomas relacionados con la HPP. Si un paciente presenta convulsiones y/o niveles/funciones aberrantes de la proteína ALP (p. ej., con un aumento de los niveles de sustratos de ALP, como PPi, PLP y PEA), se debe determinar y verificar que dicho paciente pertenece a una subpoblación "no afectada" y si el tratamiento con

30 suplemento ALP es recomendado. Generalmente, si un paciente presenta convulsiones,

especialmente convulsiones resistentes a la vitamina B6, se deben tomar efectos adicionales para probar si el paciente tiene una función de ALP defectuosa o niveles aumentados de sustratos de ALP para determinar si un tratamiento de suplemento de ALP es recomendado.

5

EJEMPLO 3 Los ratones *Akp2*^{-/-} han reducido el ácido gamma-aminobutírico cerebral (GABA) corregible por tratamiento diario de sTNALP-FcD10 recombinante

[0127] Las fosfatasa alcalinas, tales como TNALP, PLAP, GALP y IALP, son fisiológicamente activas hacia sus sustratos fosfoetanolamina (PEA), pirofosfato inorgánico (PPi) y piridoxal-5'-fosfato (PLP). La actividad de la fosfatasa alcalina reducida, tal como en un knockout TNALP o sujeto mutante, resulta en la acumulación de PLP y PPi extracelulares. La acumulación de PLP sistémico conduce a una disminución concomitante en el PLP intracelular, ya que el PLP, en su estado fosforilado, no puede atravesar la membrana plasmática para entrar en las células. El PLP es la forma catalíticamente activa de la vitamina B6 y actúa como un cofactor para más de 140 reacciones enzimáticas diferentes implicadas en el metabolismo de aminas y aminoácidos (*Percudani, R. y Peracchi, A., EMBO Rep., 4:850 4, 2003*). Por ejemplo, un PLP intracelular bajo puede conducir a una disminución del GABA SNC, el cual puede conducir además a convulsiones. Además, una alta concentración de PPi puede dar como resultado raquitismo (osteomalacia), craneosinostosis, compromiso respiratorio, nefrocalcinosis o debilidad muscular. En casos graves estas complicaciones pueden resultar en la muerte. El metabolismo anormal de las aminas y aminoácidos, debido a la disminución de la actividad de la fosfatasa alcalina contribuye a la patogénesis y al fenotipo característico de la HPP.

[0128] Para medir las concentraciones de aminoácidos cerebrales, se homogeneizaron cerebros enteros de ratón desde -80°C de almacenamiento en 2,5 µL de solución salina tamponada con fosfato (pH de 7,4, más cóctel inhibidor de proteasa, *Roche Diagnostics Cat # 05892970001*) por miligramo de tejido. Las suspensiones de tejido se sonicaron por 15 segundos y se clarificaron mediante tres centrifugaciones sucesivas a 21.000 x g por 15 minutos a 4°C para eliminar los restos. Los extractos flotantes se

congelaron a -80°C hasta el ensayo. El total de proteína se midió utilizando el ensayo de microplaca *Coomassie Plus Bradford* (Thermo Scientific Cat # PI23236).

[0129] Las concentraciones de aminoácidos se cuantificaron mediante el análisis de aminoácidos Biochrom 30+ (Biochrom Ltd., UK) de acuerdo con un programa de alto

5 rendimiento de litio, utilizando L-norleucina (NORL) (Sigma Cat # N8513) como el estándar interno (ISTD). Los extractos cerebrales se desproteinizaron mediante una dilución 1:4 en una mezcla maestra que contenía NORL-ISTD y dihidrato de ácido 5-sulfosalicílico (SSA) (Sigma Cat # S7422) a concentraciones finales de 250 µmol/L y 2,5%, respectivamente. Los precipitados de proteína se removieron mediante dos centrifugaciones
10 sucesivas a 10.000 x g, 4°C. Una mezcla estándar se preparó añadiendo patrones de aminoácidos ácidos, neutros y básicos (Sigma Cat # A6407 y A6282) así como NORL-ISTD hasta el volumen final de 250 µmol / L (con SSA al 2,5%). Se le inyectaron al analizador 40 µL de mezcla estándar y muestras desproteinizadas y se separaron los aminoácidos como se describe en el "*Accelerated Analysis of Amino Acids in Physiological Samples*",
15 *Biochrom Application Note: 90* (según *Biochrom Ltd.* (Cambridge, Reino Unido) instrucciones del fabricante). Las concentraciones de aminoácidos (µmol/L) se determinaron utilizando el software EZChrom. Las concentraciones finales se expresaron como µmol de aminoácido/gramo de peso húmedo cerebral.

[0130] Como se muestra en el panel izquierdo de la figura 10, los ratones ^{Akp2} -/-
20 presentaron una concentración de GABA disminuida con relación a ratones de tipo salvaje que se corrigió mediante un tratamiento diario continuo de sTNALP-FcD10. El panel derecho de la figura 10 muestra que la restauración del GABA por dicho tratamiento continuo duró al menos hasta el día 48, significativamente más allá de la duración del periodo de vida (25 días) de los ratones knockout. Sin embargo, la suspensión del
25 tratamiento con sTNALP-FcD10 después del Día 35 redujo de nuevo la concentración de GABA en ratones *Akp2* -/-.

[0131] Para investigar adicionalmente la función de sTNALP-FcD10 (Secuencia no. 1) se midieron y se compararon la cistatonina y serina cerebral (ambas de las cuales se sabe que están reguladas por el PLP para su producción) entre ratones *Akp2* -/- y ratones de tipo
30 salvaje. Como se muestra en las figuras 11 y 12 respectivamente, los ratones *Akp2* -/-

tuvieron nivel de serina cerebral significativamente reducida pero, elevaron significativamente el nivel de cistationina cerebral en comparación con los de ratones de tipo salvaje. Sin embargo, el tratamiento continuo con sTNALP-FcD10 elevó los niveles de serina y redujo los niveles de cistationina en aquellos ratones knockout a un nivel comparable con los ratones de tipo salvaje. De forma similar, la suspensión del tratamiento con sTNALP-FcD10 después del día 35 revirtió la corrección por sTNALP-FcD10 (véase los paneles de la derecha de las figuras 11 y 12).

[0132] El tratamiento diario de sTNALP-FcD10 mejoró la función de fosfatasa alcalina *in vivo* y aumentó la concentración de GABA cerebral. Dicho tratamiento reequilibró el metabolismo anormal de aminas y aminoácidos en ratones *Akp2*^{-/-} e indicó la eficacia de dicho tratamiento para los fenotipos relacionados con convulsiones y para las convulsiones.

[0133] Curiosamente, la señal direccionada al hueso D10 en el constructo probado no impidió que sus funciones mejoraran la supervivencia de los ratones knockout y mejoraran los parámetros fisiológicos relacionados con los ataques, tales como restaurar los niveles de GABA y serina y disminuir los niveles de cistationina en el cerebro.

EJEMPLO 4 Mejoramiento de Ensayos Clínicos

[0134] Los ensayos clínicos probaron si el tratamiento con hsTNALP-FcD10 (asfotasa alfa, Secuencia no. 1) mejoró las convulsiones en pacientes con HPP. Todos los pacientes con antecedentes de convulsiones que responden a la vitamina B6 fueron muy afectados por la HPP y dos de ellos murieron después del inicio del tratamiento con hsTNALP-FcD10. Uno de los pacientes tuvo convulsiones al nacer y murió después de varios años de tratamiento con hsTNALP-FcD10. La vitamina B6 se suministró al paciente, pero fue insuficiente para evitar las convulsiones. Luego se administró Clonazepam, pero, el paciente murió después de experimentar convulsiones junto con edema cerebral, fiebre, desequilibrio iónico diferencial y cardiomiopatía potencial.

[0135] Seis pacientes con antecedentes de convulsiones que responden a la vitamina B6 que estaban en un régimen de profilaxis B6 antes del inicio del tratamiento con hsTNALP-FcD10 no experimentaron convulsiones durante el tratamiento con hsTNALP-

FcD10. Otro paciente, que probablemente tenía un historial de convulsiones que respondían a la B6 y que suspendió la profilaxis con B6 inmediatamente después del inicio del tratamiento con hsTNALP-FcD10, experimentó convulsiones que se resolvieron cuando se reanudó la profilaxis con coterapia con B6. Otro paciente con antecedentes de convulsiones que responden a la B6, que mantuvieron la profilaxis con B6 junto con el tratamiento con hsTNALP-FcD10, suspendió la profilaxis con B6 después de un año de co-tratamiento y sólo mantuvo el tratamiento con hsTNALP-FcD10. Este paciente no tuvo experiencia de convulsiones después de la suspensión de la profilaxis con B6.

[0136] Los datos clínicos preliminares mostraron que hsTNALP-FcD10 trató convulsiones en pacientes con HPP. Los datos clínicos mostraron que la monoterapia con hsTNALP-FcD10 fue efectiva y que el suplemento de vitamina B6 no era necesario, al menos después de la coadministración de las dos moléculas durante cierto tiempo (p. ej., un año en un paciente). Se reconoce el efecto terapéutico de hsTNALP-FcD10 posterior a la suspensión de la B6, ya que las convulsiones que responden a la B6 usualmente no se pueden evitar de tódo con el suplemento B6 (p. ej., sólo una porción de ratones *Akp2*^{-/-} puede rescatarse con el suplemento de vitamina B6). Sin embargo, si no hubo etapa de coadministración (de B6 y hsTNALP-FcD10) (p. ej., sin coadministración en un paciente) o, probablemente, si el período de coadministración no duró lo suficiente, el tratamiento solo con hsTNALP-FcD10 no era suficiente para prevenir continuamente la reaparición de los ataques B6-responsivos.

[0137] Los pacientes con HPP fueron evaluados en un estudio retrospectivo de historia natural y dos ensayos clínicos de fase II con tratamiento con asfotasa alfa. Se tomaron y se compararon los datos clínicos de pacientes similares (p. ej., lactantes gravemente afectados y niños pequeños con HPP perinatal o infantil) de diferentes ensayos (seleccionados por tener en común su historial de pecho raquítico, compromiso respiratorio y/o por responder a la vitamina B6), con o sin tratamiento con asfotasa alfa. Con los datos demográficos que se muestran a continuación en la Tabla 1, se identificaron cuarenta y ocho (48) pacientes del estudio de historia natural y se identificaron 37 pacientes de los estudios de asfotasa alfa.

Tabla 1 Datos demográficos para pacientes de estudios clínicos

	Controles Históricos (N=48)	Tratados (N=37)
Edad Registrada Media $\pm$ DS Mediana (mín., máx.)	NA	23 $\pm$ 24 meses 9 (0, 71)
Edad al inicio de HPP Media $\pm$ DS Mediana (mín., máx.)	n=47 1 $\pm$ 2 meses 0 (0, 6)	n=26* 1 $\pm$ 2 meses 1 (0, 6)
Género, % (n) Masculino Femenino	54 % (26) 46 % (22)	43 % (16) 57 % (21)
Raza, % (n) Blanco Asiático Otra	83 % (40) 4 % (2) 13 % (6)	78 % (29) 16 % (6) 5 % (2)
Duración del tratamiento Mediana (mín., máx.)	NA	2 (0,5) años

NA: no aplica *: *:No recogido en un ensayo

5

[0138] Los signos/síntomas de la HPP severa de estos pacientes al comienzo de los estudios (es decir, antes del tratamiento con asfotasa alfa para los pacientes de los estudios de Fase II) se registraron y se resumieron (Tabla 2). Los pacientes de los estudios de historia natural y de los estudios de tratamiento de Fase II ("tratados" en la Tabla 2, por mantener consistencia con la Tabla 1) fueron elegidos con porcentajes similares de los signos/síntomas de HPP severa. Diez de 48 pacientes en los estudios de historia natural y 13 de 37 pacientes en los estudios de tratamiento de Fase II presentaron convulsiones que respondían a la vitamina B6.

10

15

Tabla 2. Resumen del estudio de la población presentando signos de HPP severa

Signos de HPP severa	Controles Históricos (N=48)	"Tratados" (N=37)	Valor-p
-----------------------------	--	------------------------------	----------------

Pecho raquíítico	83 % (40)	81 % (30)	0,78
Compromiso respiratorio	83 % (40)	73 % (27)	0,29
Convulsiones que responden a la vitamina B6.	21% (10)	35% (13)	0,22
Todas las anteriores	17% (8)	22% (8)	0,59

- 5 [0139] Se comparó y se resumió la tasa de supervivencia de los pacientes seleccionados de los estudios de historia natural y del tratamiento con asfotasa alfa de la Fase II. La mayoría de los pacientes (aproximadamente el 58 %) en los estudios de historia natural no sobrevivieron a un año mientras sus tasas continuaron disminuyendo y alcanzaron resultados finales de 27 % entre la edad de un año a tres años y medio. Sin embargo, la
- 10 mayoría de los pacientes (aproximadamente 89 %) tratados con asfotasa alfa sobrevivieron incluso más allá de los cinco años de edad.

Tabla 3. Tasa de supervivencia de pacientes seleccionados de diferentes estudios y edades.

Edad del paciente (años)	Tasa de supervivencia	
	Controles Históricos	Tratados
1	42 %	95 %
3,5	27 %	89 %
5	27 %	89 %

15

- [0140] Los pacientes sobrevivientes de diferentes estudios se analizaron para detectar signos de HPP severa después de alcanzar un año de edad. Como se muestra en la

Tabla 4, de los 48 pacientes del grupo de estudio de historia natural, el 33 % de los pacientes con pecho raquíptico sobrevivió (13 de 40) mientras que el 18 % de los pacientes con compromiso respiratorio sobrevivió (7 de 40). Sin embargo, ni un solo paciente (0 de 10) con convulsiones que responden a la vitamina B6 sobrevivió. Por el contrario, en los grupos de tratamiento de Fase II, el 90 % de los pacientes (27 de 30) con pecho raquíptico sobrevivieron y el 89 % de los pacientes (24 de 27) con compromiso respiratorio sobrevivieron. Específicamente, el 85 % de los pacientes (11 de 13) con convulsiones que responden a la vitamina B6 sobrevivió. De este modo, el tratamiento con asfotasa alfa promovió de forma radical la tasa de supervivencia de los pacientes con convulsiones que responden a la vitamina B6, mientras que la vitamina B6 sola (para los pacientes del grupo de estudio de historia natural) casi nunca mejoró la supervivencia al inhibir las convulsiones.

Tabla 4. Resumen del estudio de la población presentando signos de HPP severa posterior al tratamiento

Signos de HPP severa	Controles Históricos (N = 48)	Tratados (N = 37)
Pecho raquíptico	33 % (13/40)	90 % (27/30)
Compromiso respiratorio	18 % (7/40)	89 % (24/27)
Convulsiones que responden a la vitamina B ₆	0 % (0/10)	85 % (11/13)
Todas las anteriores	0 % (0/8)	88 % (7/8)

[0141] Aunque la supervivencia del paciente se tomó como parámetro primario para el análisis, la supervivencia libre de ventilación invasiva se estableció como parámetro

analítico secundario. De forma similar, en la Tabla 5, sólo 31 % de los pacientes en los estudios de historia natural sobrevivieron sin ventilación invasiva a la edad de un año, mientras que sus tasas de supervivencia libre de ventilación invasiva continuaron disminuyendo y alcanzaron resultado finales de aproximadamente 25% entre la edad de un

5 año a tres años y medio. Sin embargo, la mayoría de los pacientes (aproximadamente 83 %) tratados con asfotasa alfa sobrevivieron incluso más allá de cinco años.

Tabla 5. Tasa de supervivencia libre de ventilación invasiva por edades

Edad del paciente (años)	Tasa de supervivencia libre de ventilación invasiva	
	Controles Históricos	Tratados
1	31%	96%
3.5	25%	83%
5	25%	83%

10

[0142] El tratamiento con asfotasa alfa para infantes afectados severamente por la HPP mejoró significativamente su mineralización esquelética lo cual produjo en promedio tan temprano como a los 3 meses, continuó, y en general se mantuvo durante más de 3 años.

15 Los pacientes mostraron mejores habilidades de motricidad gruesa, habilidades de motricidad finas y habilidades cognitivas.

[0143] En conclusión, en comparación con los controles históricos, el tratamiento con asfotasa alfa ayudó a pacientes gravemente afectados con HPP perinatal e infantil (que estaban en alto riesgo de muerte) a mejorar tanto la tasa de supervivencia global (89 % vs 27

20 %, $P < 0,0001$) y la tasa de supervivencia libre de ventilación invasiva.

EJEMPLO 5 Tratamiento de convulsiones en ratones y seres humanos

[0144] Los Ratones *Akp2*^{-/-} con defectos de mineralización menores, no afectados o indetectables y ratones de tipo salvaje de la misma camada se tratan con un constructo de ALP recombinante soluble (p. ej., sTNALP, sTNALP-Fc, sTNALP-FcD10 u otros constructos de isoenzimas recombinantes). Las convulsiones previas y posteriores al

5 tratamiento se registran mediante cámara de vídeo u otros métodos fisiológicos. Las concentraciones de GABA, serina y cistationina cerebral (también pueden provenir de fuentes de suero u orina) se prueban y se comparan con la metodología conocida. El efecto terapéutico de la ALP recombinante se muestra por las convulsiones reducidas descubiertas y/o la concentración restaurada de GABA/serina después del tratamiento en ratones *Akp2*^{-/-}.

10 Se prueban y comparan diferentes regímenes de dosificación. La vitamina B6 sola o la terapia combinada también se prueban para cualquier efecto sinérgico potencial.

[0145] De forma similar, los pacientes de HPP con defectos de mineralización menores, no afectados o indetectables y voluntarios sanos se tratan con un constructo de ALP recombinante soluble descrito en la presente divulgación. Se notifican y se comparan

15 las convulsiones previas y posteriores al tratamiento. Se miden y registran los parámetros fisiológicos, tales como la cistationina del plasma y/o de la orina (o las concentraciones cerebrales de GABA, serina y/o cistationina). El efecto terapéutico de la ALP recombinante se muestra por las convulsiones reducidas descubiertas y/o la concentración restaurada de cistationina en el plasma/orina después del tratamiento. La vitamina B6 sola o la terapia

20 combinada también se prueban para cualquier efecto sinérgico potencial. Diferentes duraciones de tiempo para la coterapia se someten a prueba para optimizar el proceso de coterapia seguido solamente por la terapia complementaria de ALP.

[0146] Una nueva subpoblación de pacientes no diagnosticados previamente como afectados por la HPP también se identifica mediante cribado genético u otras metodologías

25 conocidas que tienen niveles defectuosos de proteína y/o función de la fosfatasa alcalina. Las convulsiones es un síntoma característico de dicha subpoblación de pacientes, ya sea que responda o no a la vitamina B6. Los pacientes en dicha subpoblación se tratan entonces con constructos de ALP recombinantes descritos en el presente documento, con o sin suplemento B6. Si el suplemento B6 se co-administra, después de cierto tiempo

(determinado por el médico o el administrador del fármaco de acuerdo con la situación individual de cada paciente) se suspenderá, seguido de terapia individual con ALP.

5 EJEMPLO 6 Maximización del tratamiento de convulsiones mediante monitoreo de biomarcadores en pacientes

- [0147] Una subpoblación específica de pacientes que tienen convulsiones se identifica por sus niveles característicos por encima de lo normal de sustratos de fosfatasa alcalina (p. ej., PPi, PEA, y PLP). Tales abundantes niveles de ADN, ARN y/o proteínas de dichos sustratos se detectan mediante metodologías comunes conocidas en la materia, incluyendo, p. ej., PCR cuantitativa, Southern Blot, Northern Blot, PAGE, SDS-PAGE, Western Blot, etc. Después de identificar esta subpoblación de pacientes específicos, se administrarán constructos de ALP recombinantes descritos en el presente documento para aliviar los síntomas de las convulsiones. Opcionalmente, uno o más fármacos anticonvulsivos, tales como vitámeros de vitamina B6, pueden ser co-administrados durante al menos un periodo de tiempo. Para tal terapia individual o combinatoria con reemplazo de ALP, los pacientes son monitoreados de cerca para supervisar sus biomarcadores endógenos antes, durante y después del tratamiento. Por ejemplo, cuando la vitamina B6 se co-administra, los médicos u otras personas que administren los fármacos controlarán los niveles de biomarcadores en los pacientes receptores para determinar, preferiblemente con base en la situación individual de cada paciente, el momento para administrar conjuntamente la vitamina B6, el régimen de dosificación para la B6 y/o la ALP recombinante, la duración del período para la coadministración y el momento para suspender la administración conjunta de la vitamina B6, etc.
- 25 [0148] Los biomarcadores adecuados para monitorear en el presente documento incluyen, al menos, sustratos de fosfatasa alcalina (PPi, PEA y/o PLP) u otros biomarcadores afectados por estos sustratos de fosfatasa alcalina (p. ej., GABA, cistationina, serina, dopamina, serotonina, histamina, D-serina y ácido sulfhídrico, etc.). Dichos biomarcadores se pueden someter a prueba utilizando suero u orina del paciente o mediante otra metodología de ensayo estándar conocida en la materia.
- 30

EJEMPLO 7 Fracaso de la vitamina B6 para tratar la convulsión en ratones *Akp2*^{-/-}

[0149] El tratamiento con vitamina B6 es un tratamiento estándar de convulsiones.

Sin embargo, muchos pacientes con HPP y ratones *Akp2*^{-/-} tienen convulsiones resistentes a la B6, lo cual no es corregible por la administración de la vitamina B6 y puede conducir a la muerte. Se realizó un estudio adicional para confirmar la falta de efecto de la vitamina B6 en ratones *Akp2*^{-/-}. En el estudio, los ratones *Akp2*^{-/-} se trataron con suplemento dietario de vitamina B6 (piridoxina) de 325 ppm. Sin embargo, todavía se observan convulsiones en ratones *Akp2*^{-/-} con mineralización ósea normal o con defectos de mineralización severa.

Ninguno de los ratones knockout con cualquiera de los fenotipos de mineralización sobrevivieron más allá de 25 días (figura 13).

[0150] Para confirmar que los perfiles de biomarcador no se pueden corregir con suplemento de piridoxina en ratones *Akp2*^{-/-}, las concentraciones de aminoácidos cerebrales se midieron usando el mismo método que el descrito en el ejemplo 3, excepto que se utilizó

S-(2-aminoetil)-L-cisteína (AEC) (Sigma Cat # A2636) como estándar interno (ISTD) [en lugar de L-norleucina (NORL)] y finalmente se analizaron 15 µl en vez que 40 µl de mezcla estándar y muestras desproteinizadas. Como se muestra en la figura 14, los ratones de tipo salvaje de 17-19 días de edad que recibieron suplemento dietario de piridoxina tuvieron una concentración de GABA comparativamente alta y una concentración baja de cistationina en el cerebro, mientras que los ratones *Akp2*^{-/-} con defectos severos de mineralización (es decir, el grupo común de la HPP resistente a la vitamina B6, que tienen perfiles de biomarcadores en el área sombreada) que tienen una concentración de GABA comparativamente baja y una concentración alta de cistationina en el cerebro (mostrada en el área sombreada) a pesar de un suplemento dietario de piridoxina de 325 ppm. Para los ratones *Akp2*^{-/-} con

mineralización ósea normal, algunos tuvieron concentraciones de GABA y cistationina corregibles con el suplemento de piridoxina, mientras que también hubo un subgrupo que tuvo aquellos biomarcadores no corregibles con el suplemento de piridoxina (mostrado en el área sombreada).

[0151] En conclusión, se confirmó que un subgrupo de ratones *Akp2*^{-/-} tuvo

mineralización ósea normal pero convulsiones letales resistentes a la vitamina B6.

Consecuentemente, existe una subpoblación similar de pacientes (sean o no diagnosticados como pacientes con HPP) con defectos y convulsiones de ALP pero mineralización ósea normal. Por lo tanto, se sugiere un nuevo protocolo de diagnóstico (con base en funciones de ALP, tales como niveles de PLP / PPi / PEA o biomarcadores como se describen en el presente documento) para identificar tal subpoblación de pacientes con el fin de tratar de forma efectiva sus síntomas de una manera oportuna. Además, se debe administrar suplementos de ALP (tal como la asfotasa alfa) (sola o en combinación con vitamina B6), en lugar de la vitamina B6 sola, para una mejor terapia para esta subpoblación de pacientes.

[0152] Muchas modificaciones y variaciones descritas en el presente documento se pueden hacer sin apartarse de su espíritu y alcance, como resultará evidente para los expertos en la materia. Las modalidades específicas descritas en el presente documento se ofrecen únicamente a modo de ejemplo y no pretenden ser limitativas de ninguna forma. Se pretende que la memoria descriptiva y los ejemplos se consideren solo como ejemplos, con el verdadero alcance y espíritu de la invención indicados por las siguientes reivindicaciones.