

MÉTODOS PARA TRATAR LA CALCIFICACIÓN DE TEJIDOS

SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud Provisional de E.U. No. 62/094,943, presentada el 5 19 de diciembre de 2014 y de la Solicitud Provisional de E.U. No. 62/249,781, presentada el 2 de noviembre de 2015. Todas las enseñanzas de las solicitudes anteriores se incorporan en la presente mediante la referencia.

REFERENCIA AL LISTADO DE SECUENCIAS PRESENTADO 10 ELECTRÓNICAMENTE

El contenido del listado de secuencias presentado electrónicamente en el archivo de texto ASCII (Nombre: 081245-0208_ascii.txt; Tamaño 88,556 bites; y Fecha de Creación: 15 de diciembre de 2015) presentado con la 15 solicitud se incorpora en la presente mediante la referencia en su totalidad.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La calcificación vascular puede caracterizarse por la formación de muy pequeños cristales de hidroxapatita (HA) 20 dispersos y como grandes depósitos calcificados en tejido vascular, tal como las arterias. (Amann, K., *Clin J Am Soc Nephrol* 2008, 3, 1599-605). El pirofosfato extracelular (PPi) es un inhibidor endógeno clave de la calcificación vascular al inhibir la formación de HA. (Lomashvili, K. A. et al., *J* 25 *Am Soc Nephrol* 2004, 15, 1392-1401; Fleisch, H. et al.,

Nature 1966, 212, 901-903).

El ectonucleótido pirofosfatasa pirofosforilasa (NPP1) es una ectoenzima que divide el ATP para producir pirofosfato extracelular (PPi). El pirofosfato es un potente
5 inhibidor de la formación de hidroxapatita y bajo condiciones normales, funciona para inhibir la calcificación vascular.

La deficiencia de NPP1 en humanos da como resultado reducidos niveles de PPi en circulación y se ha implicado en
10 condiciones tales como la calcificación arterial y la calcificación arterial generalizada de la infancia (GACI). (Rutsch, F. et al., *Am J Pathol* 2001,158, 543-554). Cuando se alimentan con una dieta alta en fosfato, los ratones que carecen de NPP1 (*Enpp1*^{-/-}) también tienen niveles de PPi
15 reducidos y exhiben un fenotipo similar al de los humanos deficientes en NPP1. (Harmey, D. et al., *Am J Pathol* 2004, 164, 1199-1209). La calcificación vascular es también una complicación muy reconocida y común en la enfermedad renal crónica (CKD) y en sujetos con enfermedad renal en etapa
20 terminal (ESRD) y se asocia con una incrementada morbilidad y mortalidad. (Giachelli, C. *J Am Soc Nephrol* 2004, 15, 2959-64; Raggi, P. et al., *J Am Coll Cardiol* 2002, 39, 695-701).

La deficiencia del ectonucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasa 1 (NPP1/*ENPP1*/PC-1) es una rara
25 enfermedad causada por mutaciones en NPP1, una glucoproteína

transmembrana tipo II. La NPP1 divide una variedad de sustratos incluyendo los enlaces fosfodiéster de nucleótidos y azúcares de nucleótido y los enlaces pirofosfato de nucleótidos y azúcares de nucleótido. La deficiencia de NPP1
5 se ha asociado con la calcificación arterial infantil idiopática (IIAC), la resistencia a la insulina, el raquitismo hipofosfatémico y la osificación del ligamento longitudinal posterior de la espina.

La IIAC, un raro trastorno autosomal recesivo y
10 casi siempre fatal, se caracteriza por la calcificación de la lámina elástica interna de las arterias musculares y la estenosis debida a la proliferación mioíntimal. Existen más de 160 casos de IIAC que se han reportado alrededor del mundo. Los síntomas de la enfermedad aparecen más
15 frecuentemente en la temprana infancia y la enfermedad es letal para los 6 meses de edad, generalmente debido a cardiomiopatía isquémica y a otras complicaciones de arteriopatía obstructiva incluyendo la estenosis de la arteria renal.

20 Aunque los defectos en la proteína NPP1 han estado implicados en una enfermedad tan seria como IIAC, actualmente no se encuentra disponible ningún tratamiento para aquellos afectados por la enfermedad y otras enfermedades de calcificación causadas por una alta carga corporal total de
25 calcio y fósforo debida a un metabolismo óseo anormal; bajos

niveles de inhibidores en circulación y localmente producidos de productores de fosfato; o excreción renal dañada.

Las opciones terapéuticas actuales para prevenir la calcificación vascular tienen una eficacia limitada e indeseables y/o inaceptables efectos secundarios. Por ejemplo, se necesitan muy grandes cantidades de PPI exógeno para su eficacia y otros inhibidores de la formación de hidroxapatita inhiben la calcificación del hueso y pueden conducir a la osteomalacia. En particular, se descubrió que la administración directa de PPI exógeno evita la calcificación en modelos animales urémicos. (O'Neil, W. C. et al., *Kidney Int* 2011, 79, 512-517; Riser, B. L. et al., *Nephrol Dial Transp* 2011, 26, 3349-3357). Pero, este procedimiento requería altas dosis de PPI, debido a la corta vida media del PPI, y daba como resultado niveles en plasma supra-fisiológicos de PPI conduciendo a la irritación local. Los bisfosfonates, que son análogos no hidrolizables de PPI, se han utilizado para tratar la calcificación vascular, e.g., en modelos animales. (Fleisch, H. et al., *Europ J Clin Invest* 1970, 1, 12-18; Price, P. A. et al., *Arteriosclerosis Throm and Vas Bio* 2001, 21, 817-824; Price, P. A. et al., *Kidney Int* 2006, 70, 1577-1583; Lomashvili, K. A. et al., *Kidney Int* 2009, 75, 617-625). Sin embargo, los bisfosfonatos también inhiben la formación de hueso. Los bisfosfonatos puede retrasar pero no detener la calcificación en sujetos con GACI

(Rutsch, F. *et al.*, *Circ Cardiovasc Genet* 2008, 1, 133-140) y, como en los animales, conducen a la osteomalacia. (Otero, J. E., *et al.*, *J Bone Miner Res* 2013, 28, 419-430).

Braddock, D. *et al.*, (WO 2014/126965 A2) expone composiciones y métodos para tratar la calcificación patológica y la osificación al administrar NPP1. Quinn, A. *et al.*, (WO 2012/125182 A1) expone una proteína de fusión de NPP1 para tratar condiciones que incluyen GACI, calcificación arterial, resistencia a la insulina, raquitismo hipofosfatémico, y osificación del ligamento longitudinal posterior de la espina.

A pesar de la considerable investigación en el campo, existe una necesidad continua de nuevas terapias para inhibir efectivamente la calcificación vascular, preferentemente sin causar osteomalacia. También existe la necesidad de un medicamento efectivo y seguro para el tratamiento de IIAC, calcificación vascular en la enfermedad renal crónica (VCKD), pseudoxantoma elástico (PXE), resistencia a la insulina, raquitismo hipofosfatémico, y osificación del ligamento longitudinal posterior de la espina.

SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a los usos de la NPP1 soluble recombinante humana aislada que carece de dominios citosólicos y transmembrana de terminal N y sus

proteínas de fusión para el tratamiento de la deficiencia de NPP1 u otros trastornos progresivos caracterizados por la acumulación de depósitos de calcio y otros minerales.

Sorprendentemente las proteínas de la invención
5 pueden utilizarse para restaurar la actividad de NPP1 en sangre y para restaurar el nivel normal de pirofosfato en sujetos que tienen deficiencias en la actividad de NPP1 o que exhiben acumulación de depósitos de calcio en los huesos, articulaciones, el corazón, los vasos sanguíneos, los ojos
10 y/o la piel.

Más específicamente, las proteínas NPP1 y las proteínas de fusión NPP1 de la invención pueden utilizarse para tratar sujetos que tienen deficiencia de NPP1 u otras enfermedades o trastornos asociados con bajos niveles de
15 pirofosfato, incluyendo, pero sin limitarse a, la calcificación arterial infantil idiopática (IIAC, también conocida como calcificación arterial general en infantes), la calcificación vascular en enfermedad renal crónica (VCKD), pseudoxantoma elástico (PXE), resistencia a la insulina,
20 raquitismo hipofosfatémico, calcificación en articulaciones, isquemia del miocardio, y osificación del ligamento longitudinal posterior de la espina. Cualquier trastorno progresivo que se caracterice por la acumulación de depósitos de calcio y otros minerales en tejidos arteriales y/o
25 conectivos se encuentra dentro del alcance de la presente

invención.

En algunos aspectos, la invención se refiere a un método para reducir la calcificación de tejidos, preferentemente la calcificación vascular en un sujeto que lo
5 necesita. El método comprende administrar a un sujeto con bajo pirofosfato (PPi) en plasma o elevado fosfato (Pi) inorgánico, dos o más dosis de una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición que comprende un ectonucleótido pirofosfatasa fosfodiesterasa (NPP1) soluble. Cada dosis
10 contiene una cantidad de NPP1 suficiente para lograr un incremento transitorio en PPi en plasma en el sujeto. El incremento transitorio en PPi en plasma se caracteriza por un nivel de PPi pico que es al menos aproximadamente 40% del nivel normal de PPi en plasma y un nivel de PPi de retorno a
15 la línea basal dentro de aproximadamente 48 horas después de la administración de la dosis. El período de tiempo entre dosis es de al menos 2 días.

El incremento transitorio en el PPi en plasma se mantiene durante al menos aproximadamente 4 horas,
20 preferentemente al menos aproximadamente 6 horas, al menos aproximadamente 8 horas, al menos aproximadamente 10 horas o al menos aproximadamente 12 horas.

La calcificación del tejido puede ser una calcificación vascular, tal como una calcificación venosa o
25 arterial, y la calcificación puede ser intimal o media.

El sujeto que necesita la terapia puede tener deficiencia de NPP1, enfermedad renal crónica (CKD), enfermedad renal en etapa terminal (ESRD), calcificación arterial generalizada de la infancia (GACI), trastorno cardiovascular, diabetes mellitus II, aterosclerosis o pseudoxantoma elástico (PXE). Cuando el sujeto tiene bajo PPi en plasma, los niveles pretratamiento del pirofosfato en plasma (PPi) en el sujeto son al menos aproximadamente 40% menores que los niveles normales de PPi en plasma y el sujeto es un humano. Cuando el sujeto tiene altos niveles de Pi, los niveles pretratamiento de Pi en el sujeto son típicamente al menos aproximadamente 110% de los niveles normales de Pi en plasma.

La cantidad de sNPP1 administrada en cada dosis puede ser de aproximadamente 1.0 mg/kg a aproximadamente 5.0 mg/kg de NPP1 o de aproximadamente 1.0 mg/kg a aproximadamente 10.0 mg/kg de NPP1. El período de tiempo entre las dosis de NPP1 es de al menos 2 días y puede ser más largo, por ejemplo, de al menos 3 días, al menos 1 semana, 2 semanas o 1 mes. La sNPP1 puede administrarse de cualquier manera adecuada, tal como de manera intravenosa, subcutánea o intraperitoneal.

En aspectos preferidos, se administra una proteína de fusión NPP1. Las proteínas de fusión preferidas comprenden un componente de NPP1, una región Fc de una inmunoglobulina y

opcionalmente un residuo de dirección. Un residuo de dirección preferido es Asp10. Las proteínas de fusión NPP1 particularmente preferidas para su administración de acuerdo con los métodos expuestos en la presente tienen la secuencia
5 de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 o la SEQ ID NO: 12.

Otras características y ventajas de la invención serán aparentes a partir de la descripción detallada y las reivindicaciones siguientes.

10 **BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS**

La **Figura 1** es la secuencia de aminoácidos de la proteína NPP1 de tipo silvestre (SEQ ID NO: 1). Las regiones citosólicas y transmembrana se encuentran subrayadas. Los sitios potenciales de N-glicosilación están en negrita. El
15 motivo de aminoácido "PSCAKE" (SEQ ID NO: 17) en negrita es el inicio de un NPP1 soluble que incluye la región rica en cisteína.

La **Figura 2** es la secuencia de aminoácidos de un sNPP1 que contiene la región rica en cisteína, la región
20 catalítica y la región de terminal c (SEQ ID NO: 2).

La **Figura 3** es la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión sNPP1-Fc (SEQ ID NO: 3).

La **Figura 4** es la secuencia de aminoácidos de sNPP1-Fc-D10 (SEQ ID NO: 4). La secuencia Fc está subrayada.
25 El residuo de dirección D10 (SEQ ID NO: 18) está en negrita.

La **Figura 5** ilustra los niveles en sangre de pirofosfato en ratones de tipo silvestre después de la administración de sNPP1-Fc o sNPP1-Fc-D10 de manera intravenosa (1 hora después de la inyección) y de manera
5 subcutánea (4 horas después de la inyección).

La **Figura 6** ilustra la prevención de la calcificación aórtica en ratones *Enpp1*^{-/-} con tratamiento de sNPP1-Fc-D10. Los ratones *Enpp1*^{-/-} fueron tratados de manera subcutánea con vehículo o 6 mg/kg de sNPP1-Fc-D10 cada tercer
10 día durante un período de 21 días. Los niveles de calcio aórtico se muestran para machos y hembras.

La **Figura 7** ilustra el PPi en sangre y los niveles de actividad enzimática en ratones *Enpp1*^{-/-} tratados con 6 mg/kg de sNPP1-Fc-D10 de manera intravenosa. El plasma en los
15 puntos de tiempo de 0, 4, 24, 48, y 72 horas, se recolectaron y se analizaron por su actividad de NPP1 (línea interrumpida) y niveles de PPi (línea sólida). Se determinó que el nivel de PPi de tipo silvestre fue de 2.18 µM (datos no mostrados). Las líneas interrumpidas de arriba a abajo muestran los
20 niveles de PPi para ratones *Enpp1*^{+/-} heterocigóticos de tipo silvestre, y *Enpp1*^{-/-} homocigóticos *asj* (Li et. al, 2013). Los perfiles para sNPP1-Fc fueron similares a los de sNPP1-Fc-D10.

La **Figura 8** ilustra el incremento en la
25 supervivencia de ratones homocigóticos macho *Enpp1*^{asj} tratados

con 5 mg/kg de sNPP1-Fc en comparación con ratones tratados con vehículo. Los ratones *Enpp1^{asj}* de tipo silvestre fueron colocados en una dieta alta en fósforo, baja en magnesio comenzando al nacimiento. El vehículo o sNPP1-Fc (5 mg/kg) se dosificó de manera subcutánea cada tercer día comenzando a los 14 días de edad. Las curvas de supervivencia Kaplan-Meier mostraron que >50% de los ratones *asj* murieron antes de 6 semanas, y todos los animales murieron a las 9 semanas. En comparación, 50% de los animales tratados con sNPP1-Fc sobrevivieron después de la semana 7 y estuvieron vivos aun a las 9 semanas.

Las **Figuras 9A y 9B** ilustran el incrementado aumento porcentual del peso corporal de ratones macho *Enpp1^{asj}* tratados con 5 mg/kg de sNPP1-Fc (Figura 9B) en comparación con ratones tratados con vehículo (Figura 9A). Los ratones *Enpp1^{asj}* de tipo silvestre fueron colocados en una dieta alta en fósforo, baja en magnesio comenzando al nacimiento. El vehículo o sNPP1-Fc (5 mg/kg) se inyectó de manera subcutánea cada tercer día comenzando a los 14 días de edad. El aumento porcentual del peso corporal para ratones de tipo silvestre (línea sólida) y *Enpp1^{asj}* (círculos) se trazó a partir de dos a nueve semanas de edad. Todos los animales *Enpp1^{asj}* murieron (círculo abierto) en el grupo de vehículo a las nueve semanas (panel superior). En comparación, cinco ratones *Enpp1^{asj}* vivieron (círculo sólido) y cinco murieron (círculo abierto)

en el grupo de tratamiento con sNPP1-Fc al final de las nueve semanas.

Las **Figuras 10A a 10C** son fotografías de los ratones tipo silvestre (Figura 10A, parte superior), los *Enpp1^{asj}* tratados con vehículo (Figura 10B, parte media) los tratados con sNPP1-Fc (5 mg/kg) los tratados con *Enpp1^{asj}* (Figura 10C, parte inferior).

La **Figura 11** ilustra los niveles del factor de crecimiento de fibroblasto 23 en los ratones de tipo silvestre tratados con vehículo, los *Enpp1^{asj/asj}* tratados con vehículo, y los *Enpp1^{asj}* tratados con sNPP1-Fc (5 mg/Kg).

Las **Figuras 12A a 12H** son las secuencias de aminoácidos de compuestos NPP1 solubles, socios de fusión y proteínas de fusión. La Figura 12A muestra las secuencias de aminoácidos de un NPP1 soluble que contiene los aminoácidos de 107 a 925 de la SEQ ID NO: 1 (SEQ ID NO: 5). La Figura 12B muestra la secuencia de aminoácidos de un NPP1 soluble que contiene los aminoácidos de 187 a 925 de la SEQ ID NO: 1 (SEQ ID NO: 6). La Figura 12C muestra la secuencia de aminoácidos de la región Fc de IgG1 humana incluyendo la región de articulación (SEQ ID NO: 7). La Figura 12D muestra la secuencia de aminoácidos del Fc de IgG1 humana incluyendo una región parcial de articulación (SEQ ID NO: 8). La Figura 12E muestra la secuencia de aminoácidos de una proteína de fusión NPP1-Fc (SEQ ID NO: 9). El componente NPP1 contiene la SEQ ID

NO: 5, y la secuencia Fc incluye la región de articulación. La Figura 12F muestra la secuencia de aminoácidos de una proteína de fusión NPP1-Fc (SEQ ID NO: 10). El NPP1 soluble contiene la SEQ ID NO: 5, y la secuencia Fc incluye la región
5 parcial de articulación. La Figura 12G muestra la secuencia de aminoácidos de una proteína de fusión NPP1-Fc (SEQ ID NO: 11). El NPP1 soluble contiene la SEQ ID NO: 6, y la secuencia Fc incluye la región de articulación. La Figura 12H muestra la secuencia de aminoácidos de una proteína de fusión NPP1-Fc
10 (SEQ ID NO: 12). El NPP1 soluble contiene la SEQ ID NO: 6, y la secuencia Fc incluye la región parcial de articulación.

Las **Figuras 13A a 13C** son auto-radiogramas de cromatogramas de capa delgada que ilustran la actividad de NPP1 recombinante in vitro e in vivo. Figura 13A: 100 nM de
15 ATP incubado con 130 ug/ml de sNPP1-Fc-D10 durante una hora a 37°C. Figura 13B: 100 nM de ATP incubado con plasma de ratones de tipo silvestre (WT), ratones *Enpp1*^{-/-}, y ratones *Enpp1*^{-/-} 2 horas después de la inyección IV de NPP1 recombinante (6 mg/kg). Figura 13C: 100 nM de ATP incubado
20 con aorta de ratones tipo silvestre (WT), ratones *Enpp1*^{-/-}, y ratones *Enpp1*^{-/-} 2 horas después de la inyección IV de NPP1 recombinante (6 mg/kg). Pi: ortofosfato; ATP: trifosfato de adenosina; PPi: pirofosfato.

Las **Figuras 14A y 14B** son histogramas que ilustran
25 el curso de tiempo de la actividad de NPP1 en plasma (Figura

14A, parte superior) y de la concentración de pirofosfato en plasma (Figura 14B, parte inferior) en ratones *Enpp1*^(-/-) después de la inyección subcutánea de NPP1 recombinante (5 mg/kg).

5 La **Figura 15** es un es un diagrama de dispersión que ilustra la relación entre la actividad de NPP1 en plasma y del pirofosfato (PPi) en plasma para ratones *Enpp1*^(-/-) en varios momentos después de la inyección subcutánea de NPP1 recombinante (5 mg/kg) (círculos) y para ratones de tipo
10 silvestre (cuadrados).

Las **Figuras 16A a 16C** son histogramas que ilustran la síntesis de pirofosfato en sangre humana. Figura 16A: sangre heparinizada o plasma obtenido de la misma muestra de sangre. Figura 16B: células sanguíneas centrifugadas con
15 (todas las células) o sin retirar la capa leuco-plaquetaria (eritrocitos), suspendidas en salina amortiguada con HEPES. Figura 16C: leucocitos o plaquetas aislados, suspendidos en salina amortiguada con HEPES. Las muestras se incubaron a 37°C durante 2 horas con o sin NPP1 recombinante (145 ug/ml).

20 La **Figura 17** es un histograma que ilustra el efecto del NPP1 recombinante en la calcificación aórtica en ratones *Enpp1*^(-/-). El NPP1 recombinante se inyectó (6 mg/kg) de manera subcutánea cada 48 horas en ratones alimentados con una dieta alta en fosfato. Cada barra representa un solo
25 animal con la edad en semanas proporcionada abajo. M: par

macho; F: par hembra. La línea interrumpida indica el contenido de calcio promedio de aortas de miembros de una camada de tipo silvestre.

La **Figura 18** es un histograma que ilustra el efecto
5 del NPP1 recombinante en la calcificación aórtica en ratas urémicas con falla renal. Se inyectó sNPP1-Fc-D10 o control (5 mg/kg) de manera subcutánea, 5 dosis por semana durante 21 días en ratas urémicas alimentadas con una dieta alta en adenina. Cada barra representa un solo animal de
10 aproximadamente 4 meses de edad.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Definiciones

A menos que se definan de otra manera, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente
15 tienen el mismo significado comúnmente entendido por el de experiencia ordinaria en la técnica a la cual pertenece esta invención. Aunque puede utilizarse cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en la presente en la práctica o las pruebas de la presente invención, se
20 describen los métodos y materiales preferidos.

"Aproximadamente" como se utiliza en la presente cuando se refiere a un valor medible tal como una cantidad, una duración temporal y lo similar, pretende abarcar variaciones de $\pm 20\%$ o $\pm 10\%$, más preferentemente $\pm 5\%$,
25 incluso más preferentemente $\pm 1\%$ y aún más preferentemente $\pm$

0.1% del valor especificado, dado que tales variaciones son apropiadas para llevar a cabo los métodos expuestos.

El término "proporción P_{Pi}:P_i alterada" se refiere a una proporción de P_{Pi} en plasma a P_i en suero que es al menos 10% o al menos 20% mayor o menor que una proporción de P_{Pi}-P_i normal para ese tipo de sujeto (e.g., un humano). Una proporción P_{Pi}-P_i alterada puede estar presente debido a los niveles menores a los normales de P_{Pi} en plasma o a los niveles mayores que los normales de P_i en suero. La proporción de P_{Pi}:P_i se expresa como $([P_{Pi}]/[P_i]) \times 1000$, y la proporción normal de un humano es de aproximadamente 1.75.

Como se utiliza en la presente, el término "fragmento", con referencia a proteínas NPP1, se refiere a una sub-secuencia del NPP1 de longitud total. Un "fragmento" de una proteína o péptido puede ser de al menos aproximadamente 20 aminoácidos de longitud; por ejemplo, de al menos aproximadamente 50 aminoácidos de longitud; de al menos aproximadamente 100 aminoácidos de longitud; de al menos aproximadamente 200 aminoácidos de longitud; de al menos aproximadamente 300 aminoácidos de longitud; o de al menos aproximadamente 400 aminoácidos de longitud (y cualquier valor entero entre los mismos). Los fragmentos pueden variar en tamaño de cuatro residuos de aminoácido a la secuencia de aminoácidos completa menos un aminoácido. Por tanto, una proteína "que comprende al menos una porción de la

secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1" abarca el NPP1 de longitud total y sus fragmentos.

El término "alto Pi en suero" como se utiliza en la presente se refiere a un nivel de fosfato inorgánico (Pi) en el suero de un sujeto que es al menos 110% del nivel normal de Pi para ese tipo de sujeto (e.g., un humano). Preferentemente, el nivel de Pi en el suero del sujeto es al menos aproximadamente 120%, al menos aproximadamente 150%, al menos aproximadamente 200% o al menos aproximadamente 300% del nivel normal de Pi para ese tipo de sujeto. Se reporta que los niveles normales de Pi para un humano son de 1.5 ± 0.5 milimoles (Rutsch, F. et al., *Circ Cardiovasc Genet* 1:133-140 (2008)).

Una proteína NPP1 soluble "aislada" o "purificada" o un fragmento biológicamente activo o proteína de fusión del mismo se encuentra sustancialmente libre de material celular u otras proteínas contaminantes provenientes de la fuente de células o tejidos de la cual se deriva la proteína NPP1, el fragmento biológicamente activo o la proteína de fusión MPP1, o sustancialmente libre de precursores químicos u otros químicos cuando se sintetiza químicamente. El lenguaje "sustancialmente libre de material celular" incluye preparaciones de proteína NPP1, de fragmento biológicamente activo, o proteína de fusión NPP1 en las cuales la proteína se separa de los componentes celulares de las células a

partir de las cuales se aísla o se produce de manera recombinante. En una modalidad, el lenguaje "sustancialmente libre de material celular" incluye preparaciones de proteína NPP1, de fragmento biológicamente activo, o proteína de fusión NPP1 que tienen menos de aproximadamente 30% (por peso en seco) de proteína no NPP1/fragmento/proteína de fusión (también referida en la presente como una "proteína contaminante"), más preferentemente menos de aproximadamente 20% de proteína/fragmento/proteína de fusión no NPP1, aún más preferentemente menos de aproximadamente 10% de proteína no NPP1/fragmento/proteína de fusión, y de mayor preferencia menos de aproximadamente 5% de proteína no NPP1/fragmento/proteína de fusión. Cuando la proteína NPP1, la proteína de fusión o el fragmento biológicamente activo de la misma se produce de manera recombinante, también se encuentra, preferentemente, sustancialmente libre de medio de cultivo, i.e., el medio de cultivo representa menos de aproximadamente 20%, más preferentemente menos de aproximadamente 10%, y de mayor preferencia menos de aproximadamente 5% del volumen de la preparación de proteína.

El término "bajo PPi en plasma" como se utiliza en la presente se refiere a un nivel de pirofosfato (PPi) en el plasma de un sujeto que es no mayor que 50% del nivel normal de PPi para ese tipo de sujeto (e.g., un humano). Preferentemente, el nivel de PPi en el plasma del sujeto es

de no más de aproximadamente 40%, aproximadamente 30%, aproximadamente 20% o aproximadamente 10% del nivel normal de PPI para ese tipo de sujeto. Se reporta que los niveles normales de PPI para un humano son de 2.63 ± 0.47 micromoles.

5 (O'Neill et al., *Nephrol Dial Transplant* 2010, 25, 187-191). El pirofosfato puede cuantificarse enzimáticamente utilizando métodos conocidos adecuados, tales como el método de uridina-difosfoglucosa (UDPG). (Ryan, L. M. et al., *Arthritis Rheum* 1979, 22, 886-91).

10 Rangos: a través de toda esta exposición, varios aspectos de la invención pueden presentarse en un formato de rangos. Debe entenderse que la descripción en formato de rangos es simplemente por conveniencia y brevedad y no debe interpretarse como una limitación inflexible al alcance de la

15 invención. Por consiguiente, debe considerarse que la descripción de un rango tiene específicamente expuestos todos los sub-rangos posibles así como los valores numéricos individuales dentro de ese rango. Por ejemplo, debe considerarse que la descripción de un rango tal como de 1 a 6

20 tiene sub-rangos específicamente expuestos tales como de 1 a 3, de 1 a 4, de 1 a 5, de 2 a 4, de 2 a 6, de 3 a 6, etc., así como los números individuales dentro de ese rango, por ejemplo, 1, 2, 2.7, 3, 4, 5, 5.3 y 6. Esto se aplica independientemente de la amplitud del rango.

Como se utiliza en la presente, el término "sujeto" abarca mamíferos y no mamíferos. Ejemplos de mamíferos incluyen, pero no se limitan a, humanos, chimpancés, simios, monos, ganado, caballos, ovejas, cabras, cerdos, conejos, 5 perros, gatos, ratas, ratones, conejillos de indias, y lo similar. Ejemplos de no mamíferos incluyen, pero no se limitan a, aves, peces y lo similar.

Como se utiliza en la presente "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a una cantidad no 10 tóxica pero suficiente de un agente (e.g., proteínas sNPP1) que, en comparación con un sujeto correspondiente que no ha recibido tal cantidad, da como resultado un tratamiento, curación, prevención, o disminución mejorados de una enfermedad, trastorno o efecto secundario, o la disminución 15 en la tasa de avance de una enfermedad o trastorno. El término incluye también dentro de su alcance cantidades efectivas para aumentar la función fisiológica normal.

El término "tratar" incluye la aplicación o la administración de las proteínas NPP1, los fragmentos y las 20 proteínas de fusión de la invención a un sujeto, o la aplicación o la administración, de las proteínas NPP1, los fragmentos y las proteínas de fusión de la invención a un sujeto que tiene una enfermedad o trastorno asociado con NPP1 u otra enfermedad o trastorno asociado con bajos niveles de 25 pirofosfato en sangre, u otro trastorno progresivo que se

caracteriza por la acumulación de depósitos de calcio y otros minerales (mineralización), con el propósito de curar, sanar, aliviar, mitigar, alterar, remediar, aminorar, prevenir, mejorar, o afectar la enfermedad o trastorno. El término

5 "tratar" se refiere a cualquier indicio de éxito en el tratamiento o la disminución de un daño, patología o condición, incluyendo cualquier parámetro objetivo o subjetivo tal como abatimiento, remisión, disminución de los síntomas o hacer más tolerable para el sujeto el daño, la

10 patología o la condición; el retraso en la tasa de degeneración o declinación; hacer menos debilitante el punto final de degeneración; o mejorar el bienestar físico o mental del sujeto. El tratamiento puede ser terapéutico o profiláctico. El tratamiento o disminución de los síntomas

15 puede basarse en parámetros objetivos o subjetivos; incluyendo los resultados de un examen físico.

Métodos de Tratamiento

La presente invención se refiere a los usos de un NPP1 soluble recombinante humano aislado ("sNPP1") que carece

20 de una porción de terminal N (i.e., que carece de dominios citosólicos y transmembrana) y sus proteínas de fusión para el tratamiento de enfermedades y trastornos asociados con NPP1. Las proteínas de la invención pueden utilizarse sorprendentemente para incrementar la actividad de NPP1 in

25 vivo e incrementar o restaurar el nivel normal de pirofosfato

(PPi) en sangre en los sujetos. Las proteínas de la invención también pueden utilizarse para prevenir la acumulación de depósitos de calcio en articulaciones, riñón, corazón (e.g., aorta), arterias, vasos sanguíneos, o ligamento longitudinal posterior de la espina.

El sujeto puede ser un paciente humano que tiene deficiencias en la actividad de NPP1 (deficiencia de NPP1) que exhibe bajos niveles de pirofosfato, que sufre de una enfermedad o trastorno asociado con bajos niveles de pirofosfato, o que sufre de un trastorno progresivo caracterizado por la acumulación de depósitos de calcio y otros minerales (mineralización) en fibras elásticas. La mineralización puede presentarse en el corazón, las arterias, los vasos sanguíneos, el riñón, los ligamentos de la espina, la piel, los ojos y el tracto digestivo.

Más específicamente, las proteínas NPP1 y las proteínas de fusión NPP1 de la invención pueden utilizarse para tratar sujetos que tienen enfermedades o trastornos asociados con NPP1, incluyendo, pero sin limitarse a, calcificación arterial infantil idiopática (IIAC), resistencia a la insulina, raquitismo hipofosfatémico, y osificación del ligamento longitudinal posterior de la espina, u otras enfermedades tales como calcificación vascular en enfermedad renal crónica (VCKD), isquemia del miocardio, calcificación de articulaciones, estrías

angioides, y pseudoxantoma elástico (PXE).

Las proteínas NPP1 solubles, fragmentos, y sus proteínas de fusión NPP1 pueden utilizarse para tratar una amplia variedad de condiciones en un sujeto. Por ejemplo, el
5 tratamiento de condiciones que pueden mejorarse reduciendo y/o eliminando una o más estructuras de calcificación y/o evitando la formación de estructuras de calcificación en un sujeto tal como un mamífero, por ejemplo, un paciente humano se encuentra dentro del alcance de la invención.

10 En una modalidad particularmente útil, la condición que va a tratarse es la calcificación arterial generalizada (también conocida como calcificación arterial idiopática de la infancia y calcificación arterial media de la infancia).

En otras modalidades, las condiciones tales como
15 pseudoxantoma elástico, calcificación vascular en enfermedad renal crónica, resistencia a la insulina, raquitismo hipofosfatémico, u osificación del ligamento longitudinal posterior de la espina también pueden tratarse utilizando los métodos descritos en la presente.

20 Generalmente, la dosis de la proteína de fusión administrada a un sujeto variará dependiendo de conocidos factores tales como la edad, la salud y el peso del receptor, el tipo de tratamiento concurrente, la frecuencia del tratamiento, y lo similar. Comúnmente, la dosis del
25 ingrediente activo (i.e., proteína de fusión) puede

encontrarse entre aproximadamente 0.0001 y aproximadamente 50 miligramos por kilogramo del peso corporal. La dosis precisa, la frecuencia de administración y la extensión del tiempo de tratamiento pueden determinarse por el médico experto en la
5 técnica de la administración de proteínas terapéuticas.

Una modalidad preferida de la presente invención implica un método para el tratamiento de una enfermedad asociada con NPP1 u otras enfermedades de calcificación, que incluye la etapa de administrar una cantidad terapéuticamente
10 efectiva de una proteína NPP1 soluble aislada (sNPP1), un fragmento biológicamente activo, o una proteína de fusión NPP1 a un sujeto. Como se define en la presente, una cantidad terapéuticamente efectiva de la proteína (i.e., una dosis efectiva) varía de aproximadamente 0.001 a 50 mg/kg del peso
15 corporal. El técnico experto apreciará que ciertos factores pueden influir en la dosis requerida para tratar de manera efectiva a un sujeto, incluyendo, pero sin limitarse a la severidad de la enfermedad, los tratamientos previos, la salud general y/o la edad del sujeto, y otras enfermedades
20 presentes. Además, el tratamiento de un sujeto con una cantidad terapéuticamente efectiva de la proteína puede incluir un tratamiento único o, preferentemente, puede incluir una serie de tratamientos. También se apreciará que la dosis efectiva de la proteína utilizada para el
25 tratamiento puede incrementarse o disminuirse durante el

curso de un tratamiento particular.

Como se define en la presente, una cantidad terapéuticamente efectiva de la proteína o polipéptido (i.e., una dosis efectiva) varía de aproximadamente 0.001 a 50 mg/kg del peso corporal, preferentemente de aproximadamente 0.01 a 25 mg/kg del peso corporal, más preferentemente de aproximadamente 0.1 a 20 mg/kg del peso corporal, e incluso más preferentemente de aproximadamente 1 a 10 mg/kg, de 2 a 9 mg/kg, de 3 a 8 mg/kg, de 4 a 7 mg/kg, o de 5 a 6 mg/kg del peso corporal. El técnico experto apreciará que ciertos factores pueden influir en la dosis requerida para tratar de manera efectiva a un sujeto, incluyendo, pero sin limitarse a la severidad de la enfermedad o trastorno, los tratamientos previos, la salud general y/o la edad del sujeto, y otras enfermedades presentes. Además, el tratamiento de un sujeto con una cantidad terapéuticamente efectiva de una proteína, polipéptido, o anticuerpo puede incluir un tratamiento único o, preferentemente, puede incluir una serie de tratamientos.

En un ejemplo preferido, en el rango de entre aproximadamente 0.1 a 20 mg/kg del peso corporal, una vez por semana, dos veces por semana, una vez en aproximadamente 10 días, una vez en aproximadamente 12 días, una vez en aproximadamente 14 días, una vez en aproximadamente 17 días, una vez en aproximadamente 20 días, una vez en aproximadamente 25 días, o una vez en aproximadamente 30

días. También se apreciará que la dosis efectiva de la proteína sNPP1 soluble, el fragmento biológicamente activo o la proteína de fusión del mismo utilizada para el tratamiento puede incrementarse o disminuirse durante el curso de un
5 tratamiento particular.

La invención proporciona una dosis terapéuticamente efectiva de sNPP1, el fragmento biológicamente activo o la proteína de fusión del mismo para ser administrada a un paciente entre una vez cada 5 días y una vez cada 30 días
10 durante un período de tiempo determinado por el practicante de experiencia en la técnica de las ciencias médicas. En una modalidad, el período de tiempo será por el resto de la vida del paciente. En una modalidad, la frecuencia de dosificación se encuentra entre una vez cada 5 días y una vez cada 25
15 días. En una modalidad, la frecuencia de dosificación se encuentra entre una vez cada 5 días y una vez cada 21 días. En otra modalidad, la frecuencia de dosificación se encuentra entre una vez cada 7 días y una vez cada 14 días. El sNPP1, el fragmento biológicamente activo o la proteína de fusión
20 del mismo pueden administrarse una vez cada 5 días, una vez cada 6 días, una vez cada 7 días, una vez cada 8 días, una vez cada 9 días, una vez cada 10 días, una vez cada 11 días, una vez cada 12 días, una vez cada 13 días, o una vez cada 14 días. En algunas modalidades, el sNPP1, el fragmento
25 biológicamente activo o la proteína de fusión del mismo se

administra aproximadamente de manera semanal. En otras modalidades, el sNPP1, el fragmento biológicamente activo o la proteína de fusión del mismo se administra aproximadamente cada dos semanas. En una modalidad, la frecuencia de dosificación es una vez aproximadamente cada 30 días.

En una modalidad, el paciente es menor de 2 años de edad. En algunas modalidades, aproximadamente 0.1 mg, aproximadamente 0.2 mg, aproximadamente 0.3 mg, aproximadamente 0.4 mg, aproximadamente 0.5 mg, aproximadamente 1 mg, aproximadamente 2 mg, aproximadamente 3 mg, aproximadamente 5 mg, aproximadamente 10 mg, aproximadamente 15 mg, aproximadamente 20 mg, aproximadamente 25 mg, aproximadamente 30 mg, aproximadamente 35 mg, aproximadamente 40 mg, o aproximadamente 45 mg del sNPP1, el fragmento biológicamente activo o la proteína de fusión se administran al paciente con deficiencia de NPP1 u otra enfermedad de calcificación. En algunas modalidades, de aproximadamente 0.5 a aproximadamente 30 mg, de aproximadamente 0.5 a aproximadamente 20 mg, de aproximadamente 0.5 a aproximadamente 10 mg, o de aproximadamente 0.5 a aproximadamente 5 mg se administran al paciente.

En una modalidad, aproximadamente 1 mg/kg del sNPP1, el fragmento biológicamente activo o la proteína de fusión se administra al paciente una vez por semana. En una

modalidad, aproximadamente 2 mg/kg del sNPP1, el fragmento biológicamente activo o la proteína de fusión se administran al paciente una vez por semana. En una modalidad, aproximadamente 3 mg/kg del sNPP1, el fragmento biológicamente activo o la proteína de fusión se administran al paciente una vez por semana. En una modalidad, aproximadamente 4 mg/kg del sNPP1, el fragmento biológicamente activo o la proteína de fusión se administran al paciente una vez por semana. En una modalidad, aproximadamente 5 mg/kg del sNPP1, el fragmento biológicamente activo o la proteína de fusión se administran al paciente una vez por semana. En una modalidad, aproximadamente 6 mg/kg del sNPP1, el fragmento biológicamente activo o la proteína de fusión se administran al paciente una vez por semana. En una modalidad, aproximadamente 7 mg/kg del sNPP1, el fragmento biológicamente activo o la proteína de fusión se administran al paciente una vez por semana. En una modalidad, aproximadamente 8 mg/kg del sNPP1, el fragmento biológicamente activo o la proteína de fusión se administran al paciente una vez por semana. En una modalidad, aproximadamente 9 mg/kg del sNPP1, el fragmento biológicamente activo o la proteína de fusión se administran al paciente una vez por semana. En una modalidad, aproximadamente 10 mg/kg del sNPP1, el fragmento

biológicamente activo o la proteína de fusión se administran al paciente una vez por semana.

En algunas modalidades, el nivel de PPi en sangre en un paciente antes del tratamiento es aproximadamente 1%,
5 aproximadamente 2%, aproximadamente 3%, aproximadamente 5%,
aproximadamente 10%, aproximadamente 15%, aproximadamente 20%,
aproximadamente 30%, aproximadamente 40%,
aproximadamente 50%, aproximadamente 60%, aproximadamente 70%, o aproximadamente 80% de los niveles normales de PPi
10 observados en un individuo humano normal. En una modalidad, el nivel de PPi en un paciente antes del tratamiento es aproximadamente 50% o menos de los niveles normales de PPi observados en un individuo humano normal. En una modalidad, el nivel de PPi en un paciente antes del tratamiento es
15 aproximadamente 40% o menos de los niveles normales de PPi observados en un individuo humano normal. En algunas modalidades, el nivel de PPi en un paciente antes del tratamiento es aproximadamente 30% o menos de los niveles normales de PPi observados en un individuo humano normal. En
20 algunas modalidades, el nivel de PPi en un paciente antes del tratamiento es aproximadamente 30% o menos de los niveles normales de PPi observados en un individuo humano normal. En algunas modalidades, el nivel de PPi en un paciente antes del tratamiento es aproximadamente 20% o menos de los niveles
25 normales de PPi observados en un individuo humano normal. En

algunas modalidades, el nivel de PPi en un paciente antes del tratamiento es aproximadamente 10% o menos de los niveles normales de PPi observados en un individuo humano normal. En algunas modalidades, el nivel de PPi en un paciente antes del
5 tratamiento es aproximadamente 5% o menos de los niveles normales de PPi observados en un individuo humano normal. En algunas modalidades, el paciente no muestra PPi medible antes del tratamiento.

El sNPP1, el fragmento biológicamente activo o la
10 proteína de fusión pueden administrarse, por ejemplo, mediante inyecciones subcutáneas, inyecciones intramusculares, e infusiones o inyecciones intravenosas (IV).

En una modalidad, el sNPP1, el fragmento
15 biológicamente activo o la proteína de fusión se administran de manera intravenosa mediante infusión IV por cualquier método útil. En un ejemplo, el sNPP1, el fragmento biológicamente activo o la proteína de fusión pueden administrarse mediante infusión intravenosa a través de una
20 línea periférica. En otro ejemplo, el sNPP1, el fragmento biológicamente activo o la proteína de fusión pueden administrarse mediante infusión intravenosa a través de un catéter centra periféricamente insertado.

En otra modalidad, el sNPP1, el fragmento
25 biológicamente activo o la proteína de fusión se administran

de manera intravenosa mediante inyección IV.

En otra modalidad, el sNPP1, el fragmento biológicamente activo o la proteína de fusión pueden administrarse a través de inyección intraperitoneal.

5 En otra modalidad, el sNPP1, el fragmento biológicamente activo o la proteína de fusión pueden administrarse mediante inyecciones subcutáneas.

En otra modalidad, el sNPP1, el fragmento biológicamente activo o la proteína de fusión pueden
10 administrarse mediante inyecciones intramusculares.

Aún en otra modalidad, el sNPP1, el fragmento biológicamente activo o la proteína de fusión se administran a través de una cápsula farmacéuticamente aceptable de la proteína terapéutica. Por ejemplo, la cápsula puede ser una
15 cápsula de gelatina entéricamente recubierta.

En una modalidad, el método implica administrar la proteína NPP1 soluble o una proteína de fusión NPP1 de la invención sola o en combinación con otro(s) agente(s). En una modalidad, el método implica administrar una proteína NPP1 o
20 una proteína de fusión NPP1 de la invención como terapia para compensar la expresión o la actividad reducida o aberrante de NPP1 en el sujeto que tiene una deficiencia de NPP1 u otra enfermedad o trastorno asociado.

En una modalidad, las proteínas sNPP1 aisladas, los
25 fragmentos, y las proteínas de fusión pueden administrarse

antes, después o concurrentemente con el agente o pueden co-administrarse con otras terapias conocidas. La co-administración de las proteínas sNPP1 aisladas, los fragmentos, y las proteínas de fusión de la presente
5 invención con otros agentes terapéuticos puede proporcionar dos agentes que operan a través de diferentes mecanismos que producen un incrementado efecto terapéutico. Tal co-administración puede resolver los problemas debidos al desarrollo de la resistencia a fármacos.

10 En aspectos particulares, esta exposición se refiere a un método para reducir la calcificación vascular en un sujeto que lo necesita. El método se basa en el sorpresivo descubrimiento de que las formas solubles de NPP1 pueden administrarse a animales que tienen bajos niveles de PPI en
15 plasma (un inhibidor de la calcificación en tejidos) o altos niveles de Pi en suero, para causar un incremento transitorio en el PPI en plasma en los animales, y que el incremento transitorio en el PPI en plasma puede inhibir la calcificación vascular en el animal. Debido a que el
20 incremento en el PPI en plasma es transitorio, la terapia puede diseñarse para inhibir la calcificación en tejidos indeseable o patológica, tal como la calcificación vascular, sin inhibir la calcificación ósea o inducir la osteomalacia.

En términos generales, la exposición se refiere a
25 un método para reducir la calcificación en tejidos (e.g.,

calcificación vascular) en un sujeto que lo necesita, administrando al sujeto dos o más dosis de NPP1 soluble (sNPP1). Cada una de las dosis contiene una cantidad de NPP1 soluble suficiente para lograr un incremento transitorio en el PPi en plasma en el sujeto, preferentemente con un nivel de PPi de retorno a la línea basal dentro de aproximadamente 48 horas después de la administración de la dosis. El período de tiempo entre la administración de cada dosis es generalmente de al menos 2 días.

El sujeto que lo necesita puede ser de cualquier edad y género, y preferentemente tiene bajo PPi en plasma o alto Pi en suero (e.g., dando como resultado una proporción de PPi:Pi alterada). El bajo PPi en plasma puede deberse, por ejemplo, a una deficiencia congénita de NPP1 tal como una mutación en el gen que codifica para NPP1 que conduce a una expresión reducida del NPP1 activo o una actividad enzimática reducida (asociada con la deficiencia en NPP1 y el raquitismo hipofosfatémico autosomal-recesivo), y una mutación en el gen que codifica para MRP6 que conduce a una proteína MRP6 ausente o no funcional (asociada con pseudoxantoma elástico). El bajo PPi en plasma o el alto Pi en suero también se observan frecuentemente en pacientes con enfermedad renal crónica, enfermedad/falla renal en etapa terminal, diabetes mellitus y otras condiciones. Por consiguiente, el sujeto que necesita terapia puede tener enfermedad renal crónica (CKD),

enfermedad renal en etapa terminal (ESRD), calcificación arterial generalizada de la infancia (GACI), diabetes mellitus II, raquitismo hipofosfatémico autosomal-recesivo, un trastorno cardiovascular, aterosclerosis y/o
5 pseudoxantoma elástico (PXE). El sujeto es generalmente un humano, pero también puede ser cualquier otro mamífero o no mamífero adecuado.

La calcificación en tejidos es un proceso progresivo y los individuos nacidos con deficiencia congénita
10 de NPP1 pueden no mostrar calcificación de tejidos por varios años. Al iniciar la terapia tan tempranamente como sea posible, es probable que la calcificación pueda reducirse y/o minimizarse en tales sujetos. En los sujetos con bajos niveles de PPi en plasma no causados por una mutación en la
15 línea germinal, o con altos niveles de Pi en suero (e.g., con una proporción de PPi:Pi en plasma alterada), la terapia debe comenzar tan pronto como sea practicable (i.e., poco después del diagnóstico de condiciones, tales como enfermedad renal crónica (CKD) o enfermedad renal en etapa terminal (ESRD)).
20 En ciertas modalidades, el sujeto que va a tratarse puede encontrarse entre 1 mes y 24 meses de edad, menos de 1 año de edad, menos de 2 años de edad, menos de 3 años de edad, menos de 4 años de edad, o menos de 5 años de edad.

Cada dosis de sNPP1 que se administra al sujeto
25 contiene una cantidad de sNPP1 suficiente para lograr un

incremento transitorio en el PPi en plasma. Preferentemente, el incremento transitorio se caracteriza por un nivel de PPi pico que es al menos aproximadamente 40% del nivel normal de PPi en plasma, al menos aproximadamente 50% del nivel normal de PPi en plasma, al menos aproximadamente 60% del nivel normal de PPi en plasma, al menos aproximadamente 70% del nivel normal de PPi en plasma, al menos aproximadamente 80% del nivel normal de PPi en plasma, entre aproximadamente 40% y 100% del nivel normal de PPi en plasma, entre aproximadamente 50% y 100% del nivel normal de PPi en plasma, entre aproximadamente 60% y 100% del nivel normal de PPi en plasma, entre aproximadamente 70% y 100% del nivel normal de PPi en plasma, entre aproximadamente 80% y 100% del nivel normal de PPi en plasma, o entre aproximadamente 100% y 200% del nivel normal de PPi en plasma.

Preferentemente, el incremento transitorio en el PPi en plasma después de la administración de sNPP1 es mantiene durante al menos aproximadamente 4 horas, al menos aproximadamente 6 horas, al menos aproximadamente 8 horas, al menos aproximadamente 10 horas o al menos aproximadamente 12 horas. Adicionalmente, se prefiere que el incremento transitorio en el PPi en plasma regrese a el nivel de PPi de línea basal del sujeto dentro de aproximadamente 48 horas después de la administración de la dosis, dentro de aproximadamente 3 días después de la administración de la

dosis o dentro de aproximadamente 4 días después de la administración de la dosis.

El bajo PPI en plasma en un sujeto antes del tratamiento es aproximadamente 50% o menor, preferentemente 40% o menor que los niveles normales de PPI observados en un sujeto normal (e.g., un humano). En algunos aspectos, el nivel de PPI en un sujeto antes del tratamiento es aproximadamente 30% o menor que los niveles normales de PPI. En otros aspectos, el nivel de PPI en un sujeto antes del tratamiento es aproximadamente 20% o menor que los niveles normales de PPI. En algunos otros aspectos, el nivel de PPI en un sujeto antes del tratamiento es aproximadamente 10% o menor que los niveles normales. En algunos aspectos, el sujeto puede no tener PPI medible antes del tratamiento.

El alto Pi en suero en un sujeto antes del tratamiento es aproximadamente 110% o más, preferentemente 125% o más de los niveles normales de Pi observados en un sujeto normal (e.g., un humano). En algunos aspectos, el nivel de Pi en un sujeto antes del tratamiento es aproximadamente 150% o más de los niveles normales de PPI. En otros aspectos, el nivel de Pi en un sujeto antes del tratamiento es aproximadamente 200% o más de los niveles normales de PPI. En algunos otros aspectos, el nivel de Pi en un sujeto antes del tratamiento es aproximadamente 300% o más de los niveles normales. Sin el deseo de vincularse a una

teoría en particular, se considera que la inducción de un incremento transitorio en PPI en suero puede compensar los elevados niveles de Pi en plasma y restaurar transitoriamente la proporción normal o casi normal de PPI:Pi, inhibiendo así la calcificación en tejidos promovida por niveles de Pi en suero más altos que los normales.

La cantidad de sNPP1 suficiente para lograr el incremento transitorio en el PPI en plasma puede determinarse fácilmente por un médico de experiencia ordinaria, por ejemplo, administrando una dosis que se espera que produzca el incremento transitorio en el PPI en plasma, determinando si el incremento transitorio se presenta y después haciendo los ajustes apropiados a la dosis. La cantidad a administrar estará influenciada por un número de factores convencionales que incluyen la sNPP1 particular utilizada, la edad, la salud y el peso del sujeto, la sensibilidad del sujeto a los fármacos, y otros factores relevantes. Típicamente, la cantidad de sNPP1 que va a administrarse en cada dosis se encuentra entre aproximadamente 0.001 y aproximadamente 50 miligramos por kilogramo del peso corporal, siendo preferido de 1 mg/kg a 5 mg/kg, de 1 mg/kg a 10 mg/kg, de 1 mg/kg a 20 mg/kg, 1 mg/kg, 2 mg/kg, 3 mg/kg, 4 mg/kg, 5 mg/kg, 6 mg/kg, 7 mg/kg, 8 mg/kg, 9 mg/kg, 10 mg/kg, 11 mg/kg, 12 mg/kg, 13 mg/kg, 14 mg/kg, 15 mg/kg, 16 mg/kg, 17 mg/kg, 18 mg/kg, 19 mg/kg, o 20 mg/kg. La dosis precisa, la frecuencia de

administración y la extensión del tiempo de tratamiento pueden determinarse por el médico experto en la técnica de la administración de proteínas terapéuticas.

En algunas modalidades preferidas, cada dosis
5 contiene de aproximadamente 1.0 mg a aproximadamente 5.0 mg de sNPP1 por Kg del peso corporal, de aproximadamente 1.0 mg a aproximadamente 10.0 mg de sNPP1 por Kg del peso corporal o de aproximadamente 1.0 mg a aproximadamente 20.0 mg de sNPP1 por Kg del peso corporal.

10 El período de tiempo entre las dosis se selecciona para permitir que los niveles de PPI en suero del sujeto regresen a los niveles de la línea base, y es de al menos 2 (48 horas) días, pero puede ser más largo según se desee o esté indicado. Por ejemplo, el período de tiempo entre las
15 dosis puede ser de 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, una semana, 10 días, 12 días, dos semanas, tres semanas o aproximadamente 1 mes.

En general, es deseable iniciar la terapia de acuerdo con los métodos descritos en la presente tan pronto
20 como sean practicables después del diagnóstico de bajo PPI en plasma PPI, alto Pi en suero, o deficiencia de NPP1. Los sujetos nacidos con deficiencia congénita de NPP1 pueden no mostrar calcificación de tejidos por varios años. Al iniciar la terapia tan tempranamente como sea posible, es probable
25 que la calcificación pueda reducirse o minimizarse en tales

sujetos. En los sujetos con bajos niveles de PPi en plasma no causados por una mutación en la línea germinal o con alto Pi en suero, la terapia deberá comenzar tan pronto como sea practicable después del diagnóstico de condiciones, tales
5 como enfermedad renal crónica (CKD) o enfermedad renal en etapa terminal (ESRD).

El método proporciona una forma efectiva para reducir la calcificación en tejidos (e.g. calcificación vascular) en un sujeto con bajo PPi en plasma o con alto Pi
10 en suero, incluyendo aquellos con una proporción alterada de PPi a Pi. La calcificación en tejidos es preferentemente calcificación vascular, que es preferentemente una calcificación arterial pero también puede ser calcificación venosa. La calcificación vascular puede ser intimal o media.
15 El sujeto que va a tratarse de acuerdo con los métodos descritos en la presente puede tener deficiencia de NPP1, calcificación arterial generalizada (GACI), también conocida como calcificación arterial idiopática de la infancia y calcificación arterial media de la infancia. El sujeto que va
20 a tratarse también puede tener un trastorno cardiovascular, tal como enfermedad de arteria coronaria y/o aterosclerosis. El sujeto que va a tratarse puede tener enfermedad renal crónica (CKD) o enfermedad renal en etapa terminal (ESRD). El sujeto que va a tratarse puede tener diabetes mellitus
25 (e.g. diabetes tipo II). El sujeto que va a tratarse puede

tener pseudoxantoma elástico (PXE).

La sNPP1 puede administrarse mediante cualquier método o vía de administración adecuada, tal como parenteralmente, oralmente o por inhalación. Se prefiere la
5 administración parenteral, tal como la inyección o infusión intravenosa, la inyección subcutánea, inyecciones intraperitoneales, o inyecciones intramusculares.

Si se desea, la sNPP1 puede administrarse con uno o más agentes co-terapéuticos. Para la co-terapia la sNPP1 y
10 uno o más agentes terapéuticos adicionales se administran de manera que exista una superposición sustancial en sus actividades farmacológicas individuales en el sujeto. Por consiguiente, cualquier agente co-terapéutico puede administrarse antes de, concurrentemente con o subsecuente a
15 la administración de sNPP1. La co-terapia puede proporcionar dos agentes que operan a través de diferentes mecanismos que producen un efecto terapéutico incrementado.

Adicionalmente a causar un incremento transitorio en el PPi en suero, se considera que la administración de la
20 sNPP1 de acuerdo con los métodos descritos en la presente, puede alterar los niveles de ciertas proteínas en el sujeto. Por ejemplo, sin el deseo de vincularse a una teoría en particular, se considera que la administración de la sNPP1 de acuerdo con los métodos descritos en la presente puede
25 disminuir los niveles de osteopontina, osteoprotegerina y

factor de crecimiento de fibroblasto 23 (FGF-23) en el sujeto. Los niveles de estas proteínas pueden por tanto utilizarse también, adicionalmente a los niveles de PPi en plasma y de Pi en suero, para monitorear la terapia y diseñar
5 la dosis.

sNPP1

La presente invención emplea NPP1 soluble que es un dominio de NPP1 biológicamente activo de NPP1 (i.e., componentes de NPP1 que contienen al menos un dominio
10 catalítico extracelular de NPP1 de origen natural para la actividad de pirofosfatasa y/o fosfodiesterasa). Las proteínas NPP1 solubles de la invención comprenden al menos el dominio de NPP1 esencial para llevar a cabo la actividad de pirofosfatasa y/o fosfodiesterasa.

15 En una modalidad, el NPP1 soluble, el fragmento, y las proteínas de fusión del mismo pueden formar homodímeros o monómeros funcionales. En una modalidad preferida, una proteína NPP1 soluble o proteína de fusión NPP1 de la misma puede analizarse por actividad de pirofosfatasa así como por
20 la capacidad para incrementar los niveles de pirofosfato in vivo.

Las proteínas de NPP1 solubles y las proteínas de fusión de NPP1 preferidas de la invención son enzimáticamente activas in vivo (e.g., humanos). En una modalidad, la
25 proteína soluble comprende una secuencia de aminoácidos que

tiene al menos 60, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% de identidad de secuencia a la secuencia siguiente:

```
PSCAKEVKSCCKGRCFERTFGNCRCDAAACVELGNCCLDYQETCIEPEHIWTCNKFRCGEKRL
5  TRSLCACSDDCCKDKGDCCINYSSVCQGEKSWVEEPCESINEPQCPAGFETPPTLLFSLDGF
  RAEYLHTWGGLLPVISKLLKCGTYTKNMRPVYPTKTFPNHYSIVTGLYPESHGIIIDNKMYD
  PKMNASFSLKSKEKFNPEWYKGEPWIWVTAKYQGLKSGTFFWPGSDVEINGIFPDIYKMYNG
  SVPFEERILAVLQWLQLPKDERPHFYTLYLEEPDSSGHSYGPVSSEVIKALQRVDGMVGML
  MDGLKELNLHRCLNLILISDHGMEQGSCCKYIYLNKYLGDVKNIKVIYGAARLRPSDVPD
10 KYYSFNIEGIARNLSCREPNQHFKPYLKHFLPKRLHFAKSDRIEPLTFYLDPQWQLALNPS
  ERKYCGSGFHGSDNVFSNMQALFVGYGPGFKHGIEADTFENIEVYNLMCDLLNLTPAPNNG
  THGSLNHLLKNPVYTPKHPKEVHPLVQCPFTRNPRDNLGCSCNPSILPIEDFQTQFNLTV
  EEKIIKHETLPYGRPRVLQKENTICLLSQHQFMSGYSQDILMPLWTSYTVDRNDSFSTEDF
  SNCLYQDFRIPLSPVHKCSFYKNNTKVSYGFLSPPQLNKNSSGIYSEALLTTNIVPMYQSF
15 QVIWRYFHDTLLRKYAEERNGVNVVSGPVDFDFDYDGRCDLENLRQKRRVIRNQEILIPTH
  FFIVLTSCKDTSQTPLHCENLDTLAFILPHRTDNSESCVHGKHDSSWVEELLMLHRARITD
  VEHITGLSFYQQRKEPVSDILKLKTHLPTFSQED
```

(SEQ ID NO: 2)

Puede utilizarse cualquier forma enzimáticamente

20 activa deseada de NPP1 soluble en los métodos descritos en la presente. La sNPP1 enzimáticamente activa puede incrementar los niveles de PPi en análisis enzimáticos adecuados y puede analizarse por su actividad pirofosfatasa, su actividad fosfodiesterasa, o su actividad pirofosfatasa y

25 fosfodiesterasa. Típicamente, la sNPP1 contiene al menos un

componente de NPP1 que carece de los dominios de terminal N
citósolicos y transmembrana de NPP1 transmembrana de origen
natural. En aspectos preferidos, el componente de NPP1
contiene la región rica en cisteína (aminoácidos 99 a 204 de
5 la SEQ ID NO: 1) y la región catalítica (aminoácidos 205 a
591 de la SEQ ID NO: 1) de NPP1 humana de origen natural.
Típicamente, el componente de NPP1 incluye también la región
de terminal C (aminoácidos 592 a 925 de la SEQ ID NO: 1), y
tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2. Sin
10 embargo, la región de terminal C puede ser truncada si se
desea. Por consiguiente, los componentes de NPP1 preferidos
incluyen la región rica en cisteína y la región catalítica de
la NPP1 humana (aminoácidos 99 a 591 de la SEQ ID NO: 1) o la
región rica en cisteína, la región catalítica y la región de
15 terminal C de la NPP1 humana (SEQ ID NO: 2). Otros
componentes preferidos de NPP1 contienen solamente una
porción del dominio rico en cisteína y tienen la secuencia de
los aminoácidos 107 a 925 de la SEQ ID NO: 1 o de los
aminoácidos 187 a 925 de la SEQ ID NO: 1.

20 La región rica en cisteína de NPP1 (i.e., los
aminoácidos 99 a 204 de la SEQ ID NO: 1) puede facilitar la
dimerización de la sNPP1. La sNPP1, incluyendo las proteínas
de fusión, puede encontrarse en forma de un monómero de
homodímero funcional.

La secuencia de aminoácidos del componente de NPP1 puede ser una variante de la secuencia de NPP1 de origen natural, siempre que el componente de NPP1 sea enzimáticamente activo. Las variantes de NPP1 son

5 enzimáticamente activas y tienen al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95% y más preferentemente al menos 96% de identidad de secuencia de aminoácidos a la porción correspondiente de la NPP1 humana (e.g., sobre la longitud de la región rica en cisteína, la región catalítica, la región

10 de terminal C, la región rica en cisteína más la región catalítica, la región rica en cisteína más la región catalítica más la región de terminal C. Las variantes de NPP1 preferidas tienen al menos 90%, preferentemente al menos 95%, más preferentemente al menos 97% de identidad de secuencia de

15 aminoácidos a (i) la secuencia de aminoácidos de los residuos 205 a 591 de la SEQ ID NO: 1, (ii) la secuencia de aminoácidos de los residuos 99 a 591 de la SEQ ID NO: 1, (iii) la secuencia de aminoácidos de los residuos 99 a 925 de la SEQ ID NO: 1, (iv) la secuencia de aminoácidos de los

20 residuos 107 a 925 de la SEQ ID NO: 1, o (v) la secuencia de aminoácidos de los residuos 187 a 925 de la SEQ ID NO: 1. Las posiciones adecuadas para la variación de aminoácidos son muy conocidas de estudios estructurales de NPP1 y análisis de mutaciones asociadas con la enfermedad en NPP1. Por ejemplo,

25 la sustitución de los siguientes aminoácidos se presenta en

ciertas mutaciones asociadas a la enfermedad que reducen la actividad enzimática de NPP1, y deben evitarse las variaciones de los aminoácidos en estas posiciones: Ser216, Gly242, Pro250, Gly266, Pro305, Arg349, Tyr371, Arg456, Tyr471, His500, Ser504, Tyr513, Asp538, Tyr570, Lys579, Gly586; Tyr659, Glu668, Cys726, Arg774, His777, Asn792, Asp804, Arg821, Arg888, y Tyr901. (Ver, e.g., Jansen, S. *et al.*, Structure 20:1948-1959 (2012)).

En una modalidad, la proteína soluble de NPP1 puede ser una proteína de fusión fusionada de manera recombinante o enlazada químicamente (e.g., enlace covalente, enlace iónico, enlace hidrófobo, y fuerza Van der Waals) a un socio de fusión. En otra modalidad, la proteína de fusión tiene al menos 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, o 99% de identidad de secuencia para la SEQ ID NO: 3 o la SEQ ID NO: 4.

Para determinar la identidad porcentual de dos secuencias de aminoácidos, las secuencias se alinean para propósitos de comparación óptima (e.g., pueden introducirse espacios en una o ambas secuencias primera y segunda de aminoácidos o de ácido nucleico para una alineación óptima y pueden ignorarse las secuencias no homólogas para propósitos de comparación). En una modalidad preferida, la longitud de una secuencia de referencia alineada para propósitos de comparación es al menos 30%, preferentemente al menos 40%,

más preferentemente al menos 50%, incluso más preferentemente al menos 60%, e incluso de mayor preferencia al menos 70%, 80%, o 90% de la longitud de la secuencia de referencia (e.g., la secuencia de aminoácidos de sNPP1 de la SEQ ID NO: 2; los aminoácidos 107 a 925 de la SEQ ID NO: 1 o los aminoácidos 187 a 925 de la SEQ ID NO: 1). Después se comparan los residuos de aminoácido o nucleótidos en las posiciones de aminoácido correspondientes. Cuando una posición en la primera secuencia es ocupada por el mismo residuo de aminoácido o nucleótido como la posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición (como se utiliza en la presente, aminoácido es equivalente a "homología" de aminoácido o ácido nucleico). La identidad porcentual entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias, tomando en cuenta el número de espacios y la longitud de cada espacio, que es necesario introducir para la óptima alineación de las dos secuencias.

La comparación de secuencias y la determinación de la identidad porcentual entre dos secuencias pueden llevarse a cabo utilizando un algoritmo matemático. En una modalidad preferida, la identidad porcentual entre dos secuencias de aminoácidos se determina utilizando el algoritmo de Needleman y Wunsch (*J Mol Biol* 1970, 48, 444-453) que se ha incorporado

en el programa GAP en el paquete de software GCG (disponible en www.gcg.com), utilizando ya sea una matriz Blosum 62 o una matriz PAM250, y un peso de espacio de 16, 14, 12, 10, 8, 6, o 4 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5, o 6. En otra
5 modalidad, la identidad porcentual entre dos aminoácidos se determina utilizando el algoritmo de E. Meyers y W. Miller (CABIOS, 1989, 4, 11-17) que se ha incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0 o 2.0U), utilizando una tabla de residuo de peso PAM120, una penalización de longitud de espacio de 12
10 y una penalización de espacio de 4.

La sNPP1 puede consistir o consiste esencialmente de un componente de NPP1 como se describe en la presente. Alternativamente, la sNPP1 puede encontrarse en forma de una proteína de fusión que contiene un componente de NPP1 y uno o
15 más polipéptidos diferentes, referidos como socios de fusión, opcionalmente a través de un enlazador adecuado en cada caso, o en forma de un conjugado entre un componente de NPP1 y otra molécula (e.g., PEG). Cuando la sNPP1 se encuentra en forma de una proteína de fusión, cada socio de fusión se localiza
20 preferentemente en la terminal c al componente de NPP1. Sin el deseo de vincularse a una teoría en particular, se considera que las proteínas de fusión que contienen un componente de NPP1 que contiene la región rica en cisteína y la región catalítica, y una o más proteínas de fusión que se
25 localizan en la terminal c al componente de NPP1, son

preferidas sobre otras configuraciones de proteínas de fusión NPP1 debido a que pueden expresarse a niveles suficiente y a que son suficientemente estables para utilizarse como proteínas terapéuticas.

5 Puede incluirse cualquier socio de fusión adecuado en la proteína de fusión. Ventajosamente, se conoce en la técnica un número de socios de fusión que pueden proporcionar ciertas ventajas, tales como agregación e inmunogenicidad reducidas, solubilidad incrementada, expresión y/o
10 estabilidad mejoradas, y desempeño mejorado en farmacocinética y/o farmacodinamia. Ver, e.g., Strohl, W.R. *BioDrugs* 29:215-239 (2015). Por ejemplo, se sabe bien que la albúmina, fragmentos de albúmina o variantes de albúmina (e.g., albúmina de suero humano y fragmentos o variantes de
15 la misma) pueden incorporarse en las proteínas de fusión y que tales proteínas de fusión pueden purificarse fácilmente, son estables y tienen una vida media en plasma aumentada. La albúmina, fragmentos de albúmina y variantes de albúmina que pueden utilizarse en las proteínas de fusión sNPP1 se
20 exponen, por ejemplo en la WO 2005/077042A2 y la WO 03/076567A2, de las cuales cada una se incorpora en la presente mediante la referencia en su totalidad. También se sabe que las fusiones a la transferrina humana aumentan la vida media. Ver, e.g., Kim BJ *et al.*, *J Pharmacol Expr Ther*
25 334(3):682-692 (2010); y WO 2000/020746. También pueden

utilizarse los péptidos que enlazan la albúmina o la transferrina, tales como los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo. Ver, e.g., EP 0486525 B1, US 6,267,964 B1, WO 04/001064A2, WO 02/076489A1, WO 01/45746, WO 2006/004603, y
5 WO 2008/028977. De manera similar son muy conocidas las proteínas de fusión de Fc de inmunoglobulina. Ver, e.g., Czajkowsky DM *et al.*, *EMBO Mol Med* 4(10):1015-1028 (2012), Patente de E.U. No. 7,902,151; y Patente de E.U. No. 7,858,297, cuyas enseñanzas completas se incorporan en la
10 presente mediante la referencia en su totalidad. La proteína de fusión también puede incluir una secuencia CTP (ver también, Fares *et al.*, *Endocrinol* 2010, 151, 4410-4417; Fares *et al.*, *Proc Natl Acad Sci* 1992, 89, 4304-4308; y Furuhashi *et al.*, *Mol Endocrinol* 1995, 9, 54-63). Preferentemente, el
15 socio de fusión es el Fc de una inmunoglobulina (e.g., Fc o IgG1 humana). El Fc puede incluir CH1, CH2 y CH3 de IgG1 humana, y opcionalmente la región de articulación de IgG1 humana (EPKSCDKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 13)) o una porción de la
región de articulación de IgG1 humana (e.g., DKTHTCPPCP (SEQ
20 ID NO: 14) o PKSCDKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 15)) si se desea. En algunas proteínas de fusión, el Fc puede incluir CH2 y CH3 de IgG1 humana, o el Fc de IgG2 humana o IgG4 humana, si se desea.

Preferentemente, la proteína de fusión de sNPP1
25 comprende un componente de NPP1 y un péptido que incrementa

la vida media de la proteína de fusión, más preferentemente el Fc de una inmunoglobulina (e.g., Fc o IgG1 humana). Como se utiliza en la presente, una "proteína que incrementa la vida media de la proteína de fusión" se refiere a una
5 proteína que, cuando se fusiona a una NPP1 soluble o fragmento biológicamente activo, incrementa la vida media del polipéptido NPP1 soluble o del fragmento biológicamente activo en comparación con la vida media del polipéptido NPP1 soluble, solo, o del fragmento NPP1 biológicamente activo,
10 solo.

En una modalidad, la vida media de la proteína de fusión NPP1 se incrementa en 50% en comparación con la vida media del polipéptido NPP1 o el fragmento biológicamente activo, solo. En otra modalidad, la vida media de la proteína
15 de fusión NPP1 se incrementa en 60% en comparación con la vida media del polipéptido NPP1 o el fragmento biológicamente activo, solo. En otra modalidad, la vida media de la proteína de fusión NPP1 se incrementa en 70% en comparación con la vida media del polipéptido NPP1 o el fragmento biológicamente
20 activo, solo. En otra modalidad, la vida media de la proteína de fusión NPP1 se incrementa en 80% en comparación con la vida media del polipéptido NPP1 o el fragmento biológicamente activo, solo. En otra modalidad, la vida media de la proteína de fusión NPP1 se incrementa en 90% en comparación con la
25 vida media del polipéptido NPP1 o el fragmento biológicamente

activo, solo.

En otra modalidad, la vida media de la proteína de fusión NPP1 se incrementa en 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, o 10 veces en
5 comparación con la vida media del polipéptido NPP1 o el fragmento biológicamente activo, solo. Los métodos para determinar la vida media de una proteína o proteína de fusión son muy conocidos en la técnica. Por ejemplo, Zhou et al., *Determining Protein Half-Lives, Methods in Molecular Biology*
10 (Determinación de la vida media de proteínas, Métodos en biología molecular) 2004, 284, 67-77 expone numerosos métodos para probar la vida media de una proteína. Si se desea, la proteína de fusión puede conjugarse a polímeros u otros compuestos adecuados que extienden la vida media, tales como
15 polietileno glicol (PEG), que pueden conjugarse a las proteínas de fusión NPP1.

En una modalidad, el péptido que incrementa la vida media de la proteína de fusión es una secuencia CTP (ver también, Fares et al., 2010, *Endocrinol.*, 151(9):4410-4417;
20 Fares et al., 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci*, 89(10):4304-4308; y Furuhashi et al., 1995, *Molec. Endocrinol.*, 9(1):54-63).

En otra modalidad, el péptido que incrementa la vida media de la proteína de fusión es un dominio Fc de una
25 Ig.

También pueden seleccionarse socios de fusión para dirigir la proteína de fusión a los sitios deseados de importancia clínica o biológica (e.g., el sitio de calcificación). Por ejemplo, los péptidos que tienen alta
5 afinidad al hueso se describen en la Patente de E.U. No. 7,323,542, cuyas enseñanzas completas se incorporan en la presente mediante la referencia. Los péptidos que pueden incrementar el direccionamiento de la proteína a los sitios de calcificación pueden contener un estiramiento consecutivo
10 de al menos aproximadamente 4 aminoácidos ácidos, por ejemplo, ácidos glutámicos o ácidos aspárticos. Típicamente, el péptido que dirige la proteína de fusión a los sitios de calcificación comprenderán entre 4 y 20 aminoácidos ácidos consecutivos, por ejemplo 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13,
15 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 aminoácidos consecutivos seleccionados de ácido glutámico y ácido aspártico. El péptido puede consistir únicamente de residuos de ácido glutámico, únicamente de residuos de ácido aspártico o ser una mezcla de residuos de ácido glutámico y ácido aspártico.
20 Un residuo particularmente preferido para dirigirse a sitios de calcificación es Asp10 (SEQ ID NO: 18).

En una modalidad, la proteína de fusión NPP1 de la invención comprende un polipéptido NPP1 y un residuo que incrementa el direccionamiento de la proteína a los sitios de
25 calcificación tales como un estiramiento consecutivo de

aminoácidos acídicos, por ejemplo, ácidos glutámicos o ácidos aspárticos.

Son muy conocidos los enlazadores de péptido adecuados para uso en las proteínas de fusión y típicamente adoptan una conformación extendida flexible y no interfieren con la función del componente de NPP1 o de los socios de fusión. Las secuencias de enlazador de péptido pueden contener residuos Gly, His, Asn y Ser en cualquier combinación. Los enlazadores de péptido útiles incluyen, sin limitación, poly-Gly, poly-His, poly-Asn, o poly-Ser. También pueden utilizarse en la secuencia de enlazador otros aminoácidos casi neutros, tales como Thr y Ala. Las secuencias de aminoácidos que pueden emplearse de manera útil como enlazadores incluyen las expuestas en Maratea *et al.*, *Gene* 1985, 40, 39-46; Murphy *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 1986, 83, 8258-8262; Patente de E.U. No. 4,935,233 y Patente de E.U. No. 4,751,180. Otros enlazadores adecuados pueden obtenerse de proteínas de origen natural, tales como la región de articulación de una inmunoglobulina. Un enlazador sintético preferido es (Gly4Ser)*n*, en donde *n* es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 (SEQ ID NO: 19). Preferentemente, *n* es 3 o 4. Por ejemplo, en algunas modalidades el enlazador es (Gly4Ser)₃ (SEQ ID NO: 16) y la proteína de fusión incluye un enlazador con la secuencia de aminoácidos GlyGlyGlyGlySerGlyGlyGlyGlySerGlyGlyGlyGlySer (SEQ ID NO:

16). Típicamente, el enlazador es de 1 a aproximadamente 50
residuos de aminoácido en longitud, o de 1 a aproximadamente
25 aminoácidos en longitud. Frecuentemente, el enlazador es
de entre aproximadamente 8 y aproximadamente 20 aminoácidos
5 en longitud.

Las proteínas de fusión NPP1 preferidas comprenden
de la terminal N a la terminal C un componente de NPP1,
opcionalmente un enlazador, una región Fc de una
inmunoglobulina (e.g., un Fc de IgG1 humana que incluye
10 opcionalmente una articulación o una porción de la misma),
opcionalmente un segundo enlazador, y opcionalmente un
residuo de objetivo. Por tanto, la región Fc y el residuo de
objetivo opcional, cuando están presentes, se localizan cada
uno en la terminal C al componente NPP1. El componente de
15 NPP1 preferentemente comprende la región rica en cisteína y
el dominio catalítico de NPP1, carece de los dominios de
terminal N citosólicos y transmembrana, y opcionalmente
contiene la región de terminal C.

Una proteína de fusión preferida comprende, de la
20 terminal N a la terminal C, un componente de NPP1 que
comprende el dominio rico en cisteína, el dominio catalítico
y la región de terminal C de la NPP1 humana; y la región Fc,
incluyendo la articulación, de una inmunoglobulina humana.
Preferentemente, la región Fc es de IgG1 humana. En
25 modalidades particulares, la proteína de fusión tiene al

menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, o al menos 99% de identidad de secuencia para la SEQ ID NO: 3. Una proteína de fusión
5 preferida de este tipo tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3.

Otra proteína de fusión preferida comprende, de la terminal N a la terminal C, un componente de NPP1 que comprende el dominio rico en cisteína, el dominio catalítico
10 y la región de terminal C de la NPP1 humana; un enlazador (e.g., (Gly4Ser)₃ (SEQ ID NO: 16)); y la región Fc, incluyendo la articulación, de una inmunoglobulina humana. Preferentemente, la región Fc es de IgG1 humana.

Otra proteína de fusión preferida comprende, de la
15 terminal N a la terminal C, un componente de NPP1 que comprende el dominio rico en cisteína, el dominio catalítico y la región de terminal C de la NPP1 humana; la región Fc, incluyendo la articulación o una porción de la misma, de una inmunoglobulina humana; y un residuo que dirige la proteína
20 de fusión a sitios de calcificación. Preferentemente, la región Fc es de IgG1 humana. Preferentemente, el residuo que dirige la proteína de fusión a sitios de calcificación es Asp10 (SEQ ID NO: 18). Más preferentemente, la región Fc es de IgG1 humana y el residuo que dirige la proteína de fusión
25 a sitios de calcificación es Asp10 (SEQ ID NO: 18). En

modalidades particulares, la proteína de fusión tiene al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, o al menos 99% de identidad de
5 secuencia para la SEQ ID NO:4. Una proteína de fusión preferida de este tipo tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4.

Otra proteína de fusión preferida comprende, de la terminal N a la terminal C, un componente de NPP1 que
10 comprende el dominio rico en cisteína, el dominio catalítico y la región de terminal C de la NPP1 humana; un enlazador (e.g., (Gly4Ser)₃ (SEQ ID NO: 16)); la región Fc, incluyendo la articulación o una porción de la misma, de una inmunoglobulina humana; y un residuo que dirige la proteína
15 de fusión a sitios de calcificación. Preferentemente, la región Fc es de IgG1 humana. Preferentemente, el residuo que dirige la proteína de fusión a sitios de calcificación es Asp10 (SEQ ID NO: 18). Más preferentemente, la región Fc es de IgG1 humana y el residuo que dirige la proteína de fusión
20 a sitios de calcificación es Asp10 (SEQ ID NO: 18).

Otra proteína de fusión preferida comprende, de la terminal N a la terminal C, un componente de NPP1 que comprende una porción del dominio rico en cisteína, el dominio catalítico y la región de terminal C de la NPP1
25 humana; opcionalmente un enlazador (e.g., (Gly4Ser)₃ (SEQ ID

NO: 16)); la región Fc, incluyendo la articulación o una porción de la misma, de una inmunoglobulina humana. Preferentemente, la región Fc es de IgG1 humana. En modalidades particulares, la proteína de fusión tiene al
5 menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, o al menos 99% de identidad de secuencia para la SEQ ID NO: 9, la SEQ ID NO: 10, la SEQ ID NO: 11, o la SEQ ID NO: 12. La proteína de fusión preferida
10 de este tipo tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9, la SEQ ID NO: 10, la SEQ ID NO: 11 o la SEQ ID NO: 12.

En aspectos particularmente preferidos, una proteína de fusión de la SEQ ID NO: 3 se administra de acuerdo con los métodos descritos en la presente. En otro
15 aspecto particularmente preferido, una proteína de fusión de la SEQ ID NO: 4 se administra de acuerdo con los métodos descritos en la presente. En otro aspecto particularmente preferido, una proteína de fusión de la SEQ ID NO: 9 se administra de acuerdo con los métodos descritos en la
20 presente. En otro aspecto particularmente preferido, una proteína de fusión de la SEQ ID NO: 10 se administra de acuerdo con los métodos descritos en la presente. En otro aspecto particularmente preferido, una proteína de fusión de la SEQ ID NO: 11 se administra de acuerdo con los métodos
25 descritos en la presente. En otro aspecto particularmente

preferido, una proteína de fusión de la SEQ ID NO: 12 se administra de acuerdo con los métodos descritos en la presente.

Las proteínas de fusión de la presente invención
5 pueden prepararse utilizando métodos estándar, incluyendo técnicas recombinantes o conjugación química muy conocidos en la técnica. Las técnicas útiles para aislar y caracterizar los ácidos nucleicos y proteínas de la presente invención son muy conocidos para los expertos en la técnica y la biología
10 molecular estándar y los manuales bioquímicos pueden consultarse para seleccionar los protocolos adecuados para su uso sin experimentación indebida. Ver, por ejemplo, Sambrook et al., 1989, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (Clonación molecular: un manual de laboratorio), 2ª edición,
15 Cold Spring Harbor, cuyo contenido se incorpora en la presente mediante la referencia en su totalidad.

La sNPP1 humana recombinante aislada, el fragmento, y las proteínas de fusión del mismo, pueden producirse en cualquier sistema útil de expresión de proteínas incluyendo,
20 sin limitación, cultivo celular (e.g., células CHO, células COS, HEK203), bacterias tales como Escherichia coli (E. coli) y animales transgénicos incluyendo, pero sin limitarse a, mamíferos y aves (e.g., pollos, codornices, patos y pavos). Para la expresión, una estructura que codifica para la sNPP1
25 e incluye una secuencia de señal adecuada (e.g., de la cadena

pesada de Ig humana, NPP2, NPP4, NPP7 o albúmina de suero humana, por ejemplo) en marco con la secuencia de la sNPP1 y operablemente enlazada a elementos de control de expresión adecuados.

5 La sNPP1, que incluye las proteínas de fusión, y sus formas de sal fisiológicamente aceptables se formula típicamente en una composición farmacéutica para su administración de acuerdo con los métodos descritos en la presente. Las composiciones farmacéuticas típicamente
10 incluyen un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. Las composiciones que comprenden tales vehículos, incluyendo moléculas compuestas, se formulan mediante métodos convencionales muy conocidos (ver, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 14^a ed., Mack Publishing Co.,
15 Easton, PA), cuyas enseñanzas completas se incorporan en la presente mediante la referencia. El vehículo puede comprender un diluyente. En una modalidad, el vehículo farmacéutico puede ser un líquido y la proteína de fusión puede encontrarse en forma de una solución. El vehículo
20 farmacéutico puede ser cera, grasa o alcohol. En otra modalidad, el vehículo farmacéuticamente aceptable puede ser un sólido en forma de un polvo, un polvo liofilizado o una tableta. En una modalidad, el vehículo puede comprender un liposoma o una microcápsula. Las composiciones farmacéuticas
25 pueden encontrarse en forma de un polvo liofilizado estéril

para inyección a su reconstitución con un diluyente. El diluyente puede ser agua para inyección, agua bacteriostática, o salina estéril. El polvo liofilizado puede producirse secando por congelación una solución de la
5 proteína de fusión para producir la proteína en forma seca. Como se conoce en la técnica, la proteína liofilizada tiene generalmente estabilidad incrementada y una vida en anaquel más larga que una solución líquida de la proteína.

EJEMPLOS

10 La presente invención se ejemplifica adicionalmente por medio de los siguientes ejemplos. Los ejemplos son solamente para propósitos ilustrativos y no pretenden ser, ni deben interpretarse como limitantes de la invención en modo alguno.

15 Métodos

Animales:

Se utilizaron ratones C57Bl/6J macho tipo silvestre de seis semanas de edad. El peso promedio de estos ratones varió de 21 a 22 g. Los ratones fueron dosificados con sNPP1-
20 Fc [1.04 mg/ml] o sNPP1-Fc-D10 [1.03 mg/ml] mediante inyección subcutánea (SC) o intravenosa (IV) en una concentración de 5 mg/kg.

Tabla 1

5

10

Tabla 1		
ID	Fármaco/Ruta	Tiempo (h)
1	Sin tratamiento	0
2	Sin tratamiento	0
3	sNPP1-Fc/ IV	1
4	sNPP1-Fc/ IV	1
5	sNPP1-FcD10/ IV	1
6	sNPP1-FcD10/ IV	1
7	sNPP1-Fc/ SC	4
8	sNPP1-Fc/ SC	4
9	sNPP1-FcD10/ SC	4
10	sNPP1-FcD10/ SC	4

Se utilizaron dos cepas diferentes de ratones que carecen de NPP1. Los ratones *Enpp1*^{-/-} fueron descritos anteriormente en Lomashvili, K. A. et al., *Kidney Int* 2014, 85, 1351-1356. Para acelerar la calcificación arterial, la dieta se complementó con 1.5% de fosfato (contenido final de fósforo: 2%) utilizando una mezcla de NaH₂PO₄ y Na₂HPO₄ en proporciones para proporcionar un pH neutro como se describió anteriormente. (O'Neill, W. C. et al., *Kidney Int* 2011, 79, 512-517).

Modelo de Enfermedad Renal Crónica (CKD): Se utilizaron ratas Sprague-Dawley tipo silvestre en estudios de modelo de CKD. Se alimentó a las ratas con una dieta

25

conteniendo de 0.25 a 0.75% de adenina y niveles altos de fósforo (0.75% a 0.9% de fósforo contra 0.4% en una comida normal). El exceso de adenina en la dieta satura la trayectoria de salvamento de adenina fosforibosiltransferasa normal y por el contrario se metaboliza a 2,8-dihidroxiadenina, la cual se precipita y forma cristales en los túbulos del riñón debido a su baja solubilidad. Estos cristales causan daño tubular, inflamación, obstrucción y fibrosis en los riñones y conducen a un fenotipo consistente con CKD humana. El daño renal resultante y la disfunción renal conducen a una excreción de fosfato dañada dando como resultado niveles de Pi anormalmente altos en suero y un metabolismo mineral desordenado, tal como la calcificación general de los tejidos blandos. El alto nivel de fósforo en la dieta acelera la calcificación arterial. Las ratas con la dieta alta en adenina desarrollan uremia, hiperfosfatemia, hiperparatiroidismo secundario, osteodistrofia renal, y calcificación vascular.

Preparación de Plasma:

Se recolectó sangre mediante punción cardiaca y se mezcló inmediatamente (9:1 volumen:volumen de sangre para 110 mM de una solución de ácido cítrico). La recolección de suero da como resultado la liberación del exceso de pirofosfato (PPi) de las plaquetas, y la inhibición de coagulación de EDTA puede interferir con el análisis. Los tubos de sangre

citrada se nutaron durante varios minutos y después se hicieron girar a 2,000 xg durante 10 a 15 minutos. La capa superior de plasma se recolectó (100 a 300 µl) y se agregaron aproximadamente 200 µl a un centricon de 10 kDa. Después
5 estos tubos se hicieron girar a 12,000 xg durante 10 minutos para desproteínizar el plasma. Después de los giros, el líquido que fluye a través se recolectó dentro de un nuevo tubo. El plasma y las muestras desproteínizadas se congelaron a -20°C hasta el análisis.

10 *Análisis de PPI fluorométrico:*

Este análisis emplea un sensor de PPI fluorogénico que tiene su intensidad de fluorescencia proporcionalmente dependiente de la concentración de PPI. Se agregaron 10 kDa de muestras filtradas (4 µl) a 46 µl de amortiguador de
15 análisis. Se diluyó una solución de reserva del sensor de PPI (200 X) en amortiguador de análisis y 50 µl de esto se agregaron a la muestra. Después de la incubación a temperatura ambiente durante 20 minutos, se llevó a cabo la lectura de fluorescencia de la placa de 96 pozos negra sólida
20 (Ex/Em = 316/456 nm).

Análisis:

La actividad de NPP1 se midió como se describió anteriormente. (Villa-Bellosta, R. et al., *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2011, 301, H61-H68). Brevemente, se agregó
25 plasma a 20 volúmenes de amortiguador fisiológico conteniendo

200 nM de ATP y 1.5 de uCi [32P] ATP/ml durante 10 minutos a 37°C. Después la reacción se separó mediante cromatografía de capa delgada sobre celulosa de polietilenoimina y la cantidad de PPi producida se determinó mediante densitometría de autoradiogramas. El PPi en plasma se midió como se describió anteriormente (Lomashvili, K. A. et al., *Kidney Int* 2014, 85, 1351-1356), utilizando plasma recientemente filtrado a través de un filtro de corte de 30 kD y un análisis de enzima en base a la conversión de PPi y glucosa-UDP en UTP y glucosa-1-fosfato mediante UDP glucosa pirofosforilasa. Toda el agua utilizada se pre-trató con hidroxapatita para retirar el PPi contaminante. Se midió el calcio aórtico calorimétricamente en extractos de ácido HCl de aortas secas como se describió anteriormente. (Lomashvili, K. A. et al., *Kidney Int* 2014, 85, 1351-1356). El contenido de calcio se normalizó al peso en seco y se determinaron las reducciones fraccionales en la calcificación después de sustraer el contenido de calcio de aortas de ratón normales.

Fraccionamiento de Célula Sanguínea:

Para preparar leucocitos y plaquetas, se centrifugó sangre humana heparinizada recién recolectada a 250 g durante 15 minutos a temperatura ambiente. El plasma se retiró y se centrifugó a 2200 g durante 12 minutos para obtener las plaquetas. El gránulo del primer centrifugado se re-suspendió en salina normal al volumen de sangre original y se agregaron

4 volúmenes de amortiguador de lisis (155 mmol/l de cloruro de amonio; 10 mmol/l de bicarbonato de sodio; 0.1 mmol/l de EDTA, pH 7.4) sobre hielo durante 5 a 10 minutos. Esto se repitió después del centrifugado y el retiro del sobrenadante, proporcionando leucocitos purificados después del centrifugado final.

Análisis Estadístico:

Las variables continuas se expresan en errores estándar promedio $\pm$ con diferencias determinadas por la prueba-t de Student. El contenido de calcio aórtico se analizó después de la transformación logarítmica.

Ejemplo I

Antecedentes: El experimento se llevó a cabo para determinar si existe un incremento en los niveles de PPi de ratones tipo silvestre dosificados con variantes de sNPP1. Para esto, se seleccionó un punto de tiempo de 1 hora para una terapia de única inyección intravenosa y un punto de tiempo de 4 horas para una terapia de única inyección subcutánea. La estimación de los niveles de PPi se determinó mediante el análisis fluorométrico de PPi abcam.

Resultados: Los datos sin procesar a partir de lecturas de 1 minuto (9 lecturas en total) se promediaron y se convirtieron en % de plasma normal (peso). Tabla 2

Tabla 2

	Modelo	Modelo	Amort	Amort	WT1	WT2	IV Fc-1	IV Fc-2	IV D10-1	IV D10-2	Sc Fc-1	Sc Fc-2	Sc D10-1	Sc D10-2
1	0.4	0.4	326	31.1	36.2	40.2	37.9	48.0	51.0	40.6	47.0	45.9	46.3	47.3
2	0.4	0.4	315	30.1	36.3	40.8	37.2	46.7	50.8	39.0	46.5	44.6	46.7	47.3
3	0.4	0.4	315	31.1	35.5	40.8	37.0	45.7	51.0	38.8	46.5	44.1	46.0	46.2
4	0.4	0.4	311	31.3	35.5	40.4	37.0	46.0	49.5	38.8	46.6	45.3	45.6	46.2
5	0.4	0.4	312	29.9	35.5	39.7	35.4	45.7	50.3	38.6	46.3	43.7	46.4	46.4
6	0.3	0.4	310	29.8	35.4	40.2	36.0	44.7	50.9	39.0	45.7	44.2	44.4	44.8
7	0.4	0.4	307	31.2	34.2	39.6	35.1	45.5	50.9	38.6	45.8	43.5	45.5	45.7
8	0.4	0.4	320	29.4	34.9	40.8	35.5	45.4	50.4	37.7	45.0	43.6	46.1	44.5
9	0.4	0.3	310	29.6	34.3	38.9	35.6	45.3	51.3	37.1	45.7	43.4	44.8	45.1
Prom.	0.4	0.4	314	30.4	35.3	40.1	36.3	45.9	50.7	38.7	46.1	44.2	45.7	45.9

La inyección intravenosa o subcutánea de variantes de proteína sNPP1 (5 mg/kg) en los ratones tipo silvestre muestra un aumento en la concentración de PPI por arriba de los niveles normales en plasma como se muestra en la Figura 5. La Figura 5 ilustra el nivel de pirofosfato en sangre en ratones tipo silvestre después de la administración de sNPP1-Fc o sNPP1-Fc-D10 de manera intravenosa (1 hora después de la inyección) y de manera subcutánea (4 horas después de la inyección).

Ejemplo II

Se trataron ratones *Enpp1*(-/-) knock-out de manera subcutánea con vehículo o 6 mg/kg de sNPP1-Fc-D10 cada dos días durante un periodo de 21 días. Los niveles de calcio aórtico se muestran para machos y hembras. La Figura 6 muestra una prevención efectiva de la calcificación aórtica en ratones *Enpp1*(-/-) con tratamiento con sNPP1-Fc-D10.

Ejemplo III

Se trataron ratones *Enpp1*(-/-) knock-out con 6 mg/kg de sNPP1-Fc-D10 de manera intravenosa para determinar los niveles de PPI en sangre y de actividad enzimática. Como se muestra en la Figura 7, el plasma en los puntos de tiempo 0, 4, 24, 48 y 72 horas se recolectó y se analizó por su actividad de NPP1 (línea discontinua) y sus niveles de PPI (línea sólida). Se determinó que el nivel de PPI tipo silvestre fue de 2.18 μ M (datos no mostrados). Las líneas discontinuas de arriba hacia abajo muestran los niveles de PPI para ratones *Enpp1*(+/-) heterocigóticos y *Enpp1*(-/-) homocigóticos tipo silvestre (Li et. Al, 2013). Los perfiles para sNPP1-Fc fueron similares a los de sNPP1-Fc-D10.

Ejemplo IV

Se sometieron ratones tipo silvestre y *Enpp1*^{asj} a una dieta alta en fósforo, baja en magnesio, comenzando en el nacimiento. Se suministró vehículo o sNPP1-Fc (5 mg/kg) de manera subcutánea cada dos días comenzando a los 14 días de edad. Las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier mostraron que >50% de los ratones *asj* murieron antes de las 6 semanas, y todos los animales murieron a las 9 semanas. En comparación, el 50% de los animales tratados con sNPP1-Fc sobrevivieron pasada la semana 7 y siguieron vivos a las 9 semanas. La Figura 8 ilustra la supervivencia aumentada de ratones macho homocigóticos *Enpp1*^{asj} tratados con 5 mg/kg de

sNPP1-Fc en comparación con los ratones tratados con vehículo.

Ejemplo V

Se sometieron ratones tipo silvestre y *Enpp1^{asj}* a una dieta alta en fósforo, baja en magnesio comenzando en el nacimiento y se trataron con vehículo o sNPP1-Fc (5 mg/kg) de manera subcutánea cada dos días comenzando a los 14 días de edad para determinar las tasas de crecimiento. Como se muestra en las Figuras 9A y 9B, el aumento porcentual del peso corporal para ratones tipo silvestre (línea sólida) y ratones *Enpp1^{asj}* (círculos) se trazó desde las dos hasta las nueve semanas de edad. Las Figuras 9A y 9B ilustran el incrementado aumento porcentual del peso corporal de ratones macho *Enpp1^{asj}* tratados con 5 mg/kg de sNPP1-Fc en comparación con los ratones tratados con vehículo. Todos los animales *Enpp1^{asj}* murieron (círculo abierto) en el grupo de vehículo a las nueve semanas (panel superior). En comparación, cinco ratones *Enpp1^{asj}* sobrevivieron (círculo sólido) y cinco murieron (círculo abierto) en el grupo de tratamiento con sNPP1-Fc al término de nueve semanas. Las Figuras 10A a 10C ilustran fotografías de ratones tipo silvestre (Figura 10A, parte superior), *Enpp1^{asj}* tratados con vehículo (Figura 10B, mitad), tratados con sNPP1-Fc (5 mg/kg), tratados con *Enpp1^{asj}* (Figura 10C, parte inferior).

Ejemplo VI

El FGF-23 (factor de crecimiento de fibroblasto 23), un biomarcador para el metabolismo del fosfato, se midió en ratones macho tipo silvestre y *Enpp1^{asj}*. Los ratones tipo silvestre y *Enpp1^{asj}* se sometieron a una dieta alta en fósforo y baja en magnesio (TD.00442, Harlan) comenzando en el nacimiento. Se suministró vehículo o sNPP1-Fc-D10 (5 mg/kg) de manera subcutánea cada dos días comenzando a los 18 días de edad. Se recolectó todo el suero 24 horas después de la dosificación y se analizó utilizando un equipo para ratón FGF-23 ELISA (Kainos Laboratories Inc., Tokio, Japón). Los niveles de FGF-23 se midieron en la línea basal (día 0), antes del comienzo del tratamiento y durante el curso del tratamiento en ratones *Enpp1^{+/+}*-vehículo (líneas negras sólidas), *Enpp1^{asj/asj}*-vehículo (líneas negras punteadas), y *Enpp1^{asj/asj}*-sNPP1-Fc-D10 (líneas grises sólidas).

Los niveles de FGF-23 se elevaron en ratones *Enpp1^{asj/asj}* durante el curso de la progresión de la enfermedad (para el día 9 [27 días de edad]). Sin embargo, los ratones *Enpp1^{asj/asj}* tratados con 5 mg/kg de sNPP1-Fc-D10 mostraron una disminución en el nivel de FGF-23 en comparación con el grupo tratado con vehículo para el día 17 del tratamiento. *, $p < 0.05$ mediante ANOVA unidireccional o prueba-t de Student. La Figura 11 ilustra los niveles en ratones *Enpp1^{asj}* (parte media) tratados con vehículo del factor de crecimiento de

fibroblasto, tratados con sNPP1-Fc (5 mg/kg), tratados con *Enpp1*^{asj} (parte inferior).

Ejemplo VII Actividad in vitro e in vivo

El ATP sNPP1-Fc-D10 totalmente hidrolizado
5 recombinante para PPi in vitro sin hidrólisis del PPi para
ortofosfato como se muestra en la Figura 13A.

La actividad de la enzima en plasma se muestra en
la Figura 13B. Se presentó una actividad sustancial en el
plasma de ratones tipo silvestre, con poco más de un tercio
10 del ATP convertido en PPi en 10 minutos correspondientes a
una actividad de 7.6 ± 1.0 nmol/h/ml. El resto se convirtió
en ortofosfato mediante trifosfatasas de nucleótido. El
plasma de ratones *Enpp1*^{-/-} se encontró esencialmente
desprovisto de NPP1, representando la pequeña cantidad de PPi
15 al PPi contaminante del [32P] ATP. La actividad se incrementó
de forma marcada a 10.3 ± 0.3 nmol/h(ml dos horas después de
la inyección intravenosa de NPP1 (5 mg/kg) y esto fue
acompañado por un incremento en el PPi en plasma de $0.07 \pm$
 0.02 a 1.00 ± 0.14 uM, en comparación con un nivel de $2.39 \pm$
20 0.37 uM en ratones tipo silvestre.

No se detectó actividad NPP1 en aortas de ratones
tipo silvestre ni *Enpp1*^{-/-} y no se incrementó después de la
inyección de NPP1 como se muestra en la Figura 13C. Tampoco
se detectó actividad en el hígado después de la
25 administración de NPP1 recombinante.

El curso de tiempo de la actividad de NPP1 en plasma y la concentración de PPi después de la inyección subcutánea de 5 mg/kg en ratones *Enpp1*^{-/-} se muestra en la Figura 14. La actividad de NPP1 y la concentración de PPi
5 alcanzaron su pico 12 horas después de la inyección, a niveles que fueron de 195% y 41% respectivamente, de aquellos en miembros de la misma camada tipo silvestre. Los niveles descendieron rápidamente y fueron esencialmente indetectables después de 24 horas.

10 La inyección subcutánea de sNPP1-Fc-D10 (5 mg/kg) muestra una correlación entre los niveles de PPi en plasma y la actividad de NPP1 en plasma como se muestra en la Figura 15. La correlación del PPi en plasma con el NPP1 en plasma sugirió que el PPi se generó en la circulación. Esto se
15 examinó mediante la incubación de sangre humana fresca con NPP1 recombinante y después midiendo el PPi en el plasma. Se utilizó sangre humana debido a la cantidad limitada de sangre que puede obtenerse de los ratones. La cantidad de NPP1 agregada a la sangre se calculó de tal manera que se
20 produjeran niveles similares a los logrados después de la inyección en ratones.

La Figura 16A ilustra que la administración de NPP1 recombinante incrementó el PPi en plasma cuando se agregó a sangre completa durante 2 horas pero no cuando se agregó al
25 plasma solo, indicando un requerimiento celular. Para

examinar el papel de los eritrocitos contra otras células, la sangre se centrifugó y se retiró el plasma ya sea con o sin la capa leucocitaria restante. Después se agregó salina amortiguada con HEPES para restablecer el hematocrito original. Como se muestra Figura 16B, la producción se presentó únicamente cuando se retuvo la capa leucocitaria, indicando un requerimiento de leucocitos o plaquetas pero no de eritrocitos. La incubación de leucocitos o plaquetas aisladas en salina amortiguada con HEPES indicó que ambos ya sea liberaron o produjeron PPI pero la síntesis en respuesta al NPP1 exógeno se presentó únicamente con leucocitos como se muestra en la Figura 16C.

Ejemplo VIII Modelos Terapéuticos

A. Deficiencia de NPP1

Se sometió a ratones *Enpp1*^{-/-} maduros a una dieta alta en fosfato y se trataron con vehículo o sNPP1-Fc-D10 (6 mg/kg) de manera subcutánea cada dos días como se muestra en la Figura 17 para determinar el efecto del NPP1 recombinante en la calcificación arterial. Cada ratón tratado se emparejó con un ratón del mismo género y edad similar que había recibido el mismo volumen de vehículo solo. Después de 18 días, el contenido medio de calcio en aorta fue de 61 ± 30 nmol/mg en los ratones tratados con vehículo y de 8.8 ± 1.0 nmol/mg en ratones tratados con NPP1 recombinante ($p=0.016$). El contenido en miembros de la misma camada tipo silvestre

fue de 6.3 ± 3.4 nmol/mg ($n=16$). El contenido se elevó (dos desviaciones estándar por arriba de los miembros de la misma camada tipo silvestre) en 6 de 8 aortas de control (80 ± 37 nmol/mg) y únicamente en una aorta tratada (15 nmol/mg).

- 5 Dentro de los pares en los que la calcificación se encontró presente en aortas de control, éste representó una disminución de $91 \pm 2\%$ en la calcificación.

Para determinar si existe cualquier acumulación de NPP1 después de múltiples inyecciones al paso del tiempo, la
10 actividad de NPP1 y PPI en plasma, se midió en el sacrificio (24 horas después de la inyección), y en ambos fue indetectable. En un juego separado de ratones *Enpp1*^{-/-}, la actividad de NPP1 aórtico fue indetectable después de 3 inyecciones de NPP1 recombinante cada dos días.

15 B. Enfermedad Renal Crónica

Este ejemplo expone la eficacia de sNPP1-Fc-D10 en el tratamiento de enfermedad renal crónica (CKD) en modelos de rata urémica. Para determinar el efecto del NPP1 recombinante en la calcificación arterial en ratas urémicas
20 con disfunción renal, las ratas urémicas se alimentaron con una dieta alta en adenina y fueron inyectadas de forma subcutánea con control o sNPP1-Fc-D10 (5 mg/kg), 5 dosis por semana como se ilustra en la Figura 18. Después de 21 días de tratamiento, el contenido medio de calcio en aorta fue de
25 25.7 ± 4.9 nmol/mg en las ratas tratadas con control y de 7.0

± 1.0 nmol/mg en las ratas tratadas con NPP1 recombinante (p=0.0068). El contenido normal de calcio en aorta fue 5 nmol/mg.

Los ejemplos VII y VIII demuestran la actividad de sNPP1 y el uso efectivo de sNPP1 en modelos de deficiencia de ectonucleótido de pirofosfato pirofosforilasa y de enfermedad renal crónica. Estos ejemplos muestran que un incremento transitorio en el PPi es suficiente para una terapia efectiva de calcificación vascular y deficiencia de NPP1.

10 Equivalentes

Aunque esta invención se ha mostrado y descrito particularmente con referencia a las modalidades ejemplares de la misma, los expertos en la técnica entenderán que pueden llevarse a cabo varios cambios en forma y detalles sin apartarse del alcance de la invención abarcada por las reivindicaciones adjuntas.