POLIPÉPTIDOS DE FOSFATASA ALCALINA Y MÉTODOS DE USO DE LOS MISMOS

Antecedentes

La hipofosfatasia (HPP) es una enfermedad esquelética hereditaria infrecuente con una incidencia de 1 por cada 100 000 nacimientos para las formas más graves de la enfermedad. El trastorno generalmente resulta de mutaciones de pérdida de función en el gen que codifica la fosfatasa alcalina no específica de tejido (TNSALP, por las siglas del inglés *tissue-nonspecific alkaline phosphatase*). La HPP presenta una notable gama de síntomas y gravedad, desde la pérdida prematura de los dientes hasta la ausencia casi completa de mineralización ósea en el útero. La presentación de HPP varía notablemente entre los pacientes y también varía notablemente entre las edades de los mismos. Muchos pacientes con HPP muestran cambios esqueléticos, baja estatura, dolor crónico, dolor en las extremidades inferiores, debilidad muscular, alteración de la marcha y pérdida prematura y atraumática de los dientes.

La asfotasa alfa (STRENSIQ®, Alexion Pharmaceuticals, Inc.), un tratamiento sustitutivo de enzimas (ERT, por las siglas del inglés *enzyme replacement therapy*) producidas de forma recombinante que incluye un fragmento soluble de TNSALP, es el primer ERT disponible para pacientes con HPP. La asfotasa alfa ha mostrado efectos transformadores en la forma más grave de HPP, como se evidencia por las mejoras en la mineralización y la densidad ósea, así como la función respiratoria y motora, el desarrollo cognitivo y la fuerza muscular (Whyte *et al.*, *New Engl. J.Med.* 366:904-913, 2012).

Aunque se han demostrado los beneficios de seguridad y terapéuticos de la asfotasa alfa, el cumplimiento de las pautas de múltiples inyecciones puede ser un desafío, particularmente entre los pacientes pediátricos. Los efectos secundarios más comunes de la administración subcutánea de tres a seis veces a la semana son reacciones en el lugar de la inyección (es decir, prurito, dolor y eritema). Por lo tanto, serían deseables mejoras para mejorar la calidad de vida, por ejemplo, disminuyendo el volumen y la frecuencia de dosificación y aumentar el cumplimiento. Por consiguiente, serían beneficiosas nuevas composiciones y métodos para tratar HPP y trastornos de mineralización ósea relacionados.

SUMARIO DE LA DIVULGACIÓN

En un aspecto, se presenta un polipéptido que incluye una fosfatasa alcalina recombinante que tiene al menos una mutación con respecto a una fosfatasa alcalina de origen natural. La mutación puede mejorar al menos una actividad o propiedad farmacocinética (PK) con respecto a la fosfatasa alcalina de origen natural sin la al menos una mutación.

La fosfatasa alcalina de origen natural puede ser una fosfatasa alcalina no específica de tejido (TNSALP), una fosfatasa alcalina placentaria (PALP), una fosfatasa alcalina de estirpe germinal (GALP) o una fosfatasa alcalina intestinal (IALP). La TNSALP puede ser una TNSALP de mamífero (por ejemplo, TNSALP de ser humano, de gorila, ratón, conejo, chimpancé, macaco cangrejero, macaco de la India, orangután, babuino, rata, de bovino, de cabra o de llama). El polipéptido puede tener al menos un 85 % (por ejemplo, 90 %,

95 %, 97 %, 99 % o 100 %) de identidad de secuencia con los aminoácidos 1-491 de SEQ ID NO: 1.

Al menos una mutación puede seleccionarse del grupo que consiste en E108X, M384X, L385X, N213X y N286X con respecto a SEQ ID NO: 1, y X es cualquier aminoácido. La al menos una mutación puede seleccionarse del grupo que consiste en E108S, E108T, E108Q, E108M, E108K, E108L, M384R, L385T, N213Q y N286Q con respecto a SEQ ID NO: 1. La fosfatasa alcalina recombinante puede tener al menos dos, tres, cuatro o cinco mutaciones seleccionadas del grupo que consiste en E108S, E108T, E108Q, E108M, E108K, E108L, M384R, L385T, N213Q y N286Q con respecto a SEQ ID NO: 1. Por ejemplo, la fosfatasa alcalina recombinante puede tener mutaciones E108M, N213Q y N286Q con respecto a SEQ ID NO: 1. La fosfatasa alcalina recombinante puede no tener una mutación E108A con respecto a SEQ ID NO: 1.

La al menos una mutación en las ALP descritas en el presente documento que mejora al menos una actividad o propiedad farmacocinética (PK) puede estar presente dentro de una región especificada de la enzima. La mutación puede estar presente en el ectodominio de una fosfatasa alcalina. Por ejemplo, la mutación puede estar presente en el dominio corona, el dominio catalítico o el dominio de dimerización. La mutación puede estar presente en el dominio de anclaje GPI, si se incluye. El polipéptido puede incluir una mutación que está presente dentro de los aminoácidos 1-491 o 1-486 de una TNSALP humana o una posición de ALP análoga basada en la alineación y/u homología de secuencia. Por ejemplo, el polipéptido puede tener una mutación dentro de las posiciones 1-491, 1-486, 25-475, 25-240, 50-400, 50-350 y/o 100-300 con

respecto a SEQ ID NO: 1. El polipéptido puede tener una mutación dentro de las posiciones 100-125, 100-110, 200-225, 210-220, 275-300, 280-290, 425-450 y/o 425-435 con respecto a SEQ ID NO: 1. Por ejemplo, el polipéptido puede tener una mutación entre las posiciones 108, 213, 286 y/o 429 con respecto a SEQ ID NO: 1. En determinadas realizaciones, la mutación está dentro de la secuencia de la ALP y la mutación no es un tramo de aminoácidos no naturales presente en el dominio amino o carboxiterminal de la ALP.

La fosfatasa alcalina de origen natural puede ser una IALP (por ejemplo, una IALP de mamífero, tal como IALP de gorila, chimpancé, macaco cangrejero, macaco de la India, rata, de bovino, de cabra, de llama o de ser humano). El polipéptido puede tener al menos un 85 % (por ejemplo, 90 %, 95 %, 97 %, 99 % o 100 %) de identidad de secuencia con los aminoácidos 1-486 de SEQ ID NO: 4. La fosfatasa alcalina recombinante puede tener una mutación W245X con respecto a SEQ ID NO: 4, donde X es cualquier aminoácido conservado de origen natural de una especie diferente. La fosfatasa alcalina recombinante puede tener una mutación W245R con respecto a SEQ ID NO: 4. La fosfatasa alcalina recombinante puede tener una mutación C481X con respecto a SEQ ID NO: 4, donde X es cualquier aminoácido que no contenga tiol. La fosfatasa alcalina recombinante puede tener una mutación C481G con respecto a SEQ ID NO: 4.

La fosfatasa alcalina recombinante puede tener una mutación en un sitio de glucosilación ligada a N de consenso. Un sitio de glucosilación ligada a N de consenso incluye un motivo que tiene la secuencia asparagina-X-Z, donde X es cualquier aminoácido excepto P, y Z es cualquier aminoácido

excepto S o T. El sitio de asparagina puede estar mutado en un residuo de glutamina.

La fosfatasa alcalina recombinante puede tener una mutación seleccionada del grupo que consiste en S429Q, S429H, S429E y S429D con respecto a SEQ ID NO: 4. La fosfatasa alcalina recombinante puede tener una mutación seleccionada del grupo que consta de S428R, S428Q y S428D con respecto a SEQ ID NO: 4.

La fosfatasa alcalina recombinante puede tener al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con al menos 50 (por ejemplo, al menos 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 o más) aminoácidos de la secuencia de una cualquiera de SEQ ID NO: 7-223, 247 y 262-264.

Al menos una actividad mejorada por la mutación puede seleccionarse del grupo que consiste en actividad catalítica aumentada, termoestabilidad aumentada, unión de cinc aumentada, mantenimiento de la actividad en un tampón reducido en cinc, mantenimiento de la actividad a un pH de 5.0 - 7.5, dimerización disminuida, agregación disminuida y capacidad de fabricación aumentada. El aumento de la actividad catalítica puede incluir un aumento de hidrólisis de piridoxal 5-fosfato y/o pirofosfato. La actividad catalítica aumentada puede ser de aproximadamente 2 a aproximadamente 30 veces mejor que la actividad de la fosfatasa alcalina de origen natural. La al menos una propiedad PK mejorada por la mutación puede seleccionarse del grupo que consiste en especificidad de sustrato aumentada, actividad aumentada contra un sustrato natural, actividad aumentada contra un sustrato artificial, Km

disminuida por un sustrato natural y área bajo la curva (ABC) aumentada por dosis. Son sustratos artificiales ilustrativos fosfato de 4-metilumbeliferilo (4-MUP), fosfato de umbeliferona y fosfato de paranitrofenilo (pNPP), y son sustratos naturales ilustrativos piridoxal-5'-fosfato, PLP y PEA.

En algunas realizaciones, el polipéptido puede incluir además una región Y, donde Y es una secuencia de aminoácidos de al menos un aminoácido. Y puede ser una región de fragmento cristalizable (Fc). La región Fc puede incluir IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4, o una quimera de las mismas. Por ejemplo, la región Fc puede incluir una quimera IgG2/4. La región Fc puede incluir la secuencia de SEQ ID NO: 253 o tener al menos un 85 % (por ejemplo, 90 %, 95 %, 97 %, 99 % o 100 %) de identidad de secuencia con la misma.

El polipéptido puede incluir además un resto de dirección al hueso. Un polipéptido que incluye una ALP, un resto de dirección al hueso y una región Y puede tener la estructura Z-ALP-Y-Xn, donde Y es una secuencia de aminoácidos de al menos un aminoácido; Z está ausente o es una secuencia de aminoácidos de al menos un aminoácido; Xn es un resto de dirección al hueso seleccionado del grupo que consiste en poliaspartato (Dn), poliglutamato (En), poli(aspartato-alanina-aspartato) (DAD)n, poli(aspartato-aspartato-serina) (DDS)n, poli (aspartato-serina-serina) (DSS)n, poli(glutamato-glutamato-serina) (EES)n y VHH, y n = 1 a 50; y ALP es la fosfatasa alcalina recombinante.

El polipéptido puede tener la estructura Y-ALP-Z-Xn, o cualquier permutación topológica de la misma (por ejemplo, Xn-Y-ALP-Z e Y-Xn-ALP-Z).

El polipéptido puede incluir o consistir en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85 % (por ejemplo, al menos un 90 %, 95 %, 97 %, 99 % o 100 %) de identidad de secuencia con una cualquiera de SEQ ID NO: 7-223, 247 y 262-264 (por ejemplo, una cualquiera de SEQ ID NO: 72, 123, 155 o 177). Por ejemplo, el polipéptido puede incluir o consistir en la secuencia de una cualquiera de SEQ ID NO: 72, 123, 155 o 177. El polipéptido puede incluir cualquier dominio catalítico de sALP, isotipo de IgG de Fc o resto de dirección al hueso enumerados en la tabla 1, y permutaciones topológicas de los mismos. El polipéptido puede incluir o consistir en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85 % (por ejemplo, al menos un 90 %, 95 %, 97 %, 99 % o 100 %) de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 123. El polipéptido puede incluir o consistir en SEQ ID NO: 123.

El polipéptido puede incluir o consistir en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85 % (por ejemplo, al menos un 90 %, 95 %, 97 %, 99 % o 100 %) de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 177. El polipéptido puede incluir o consistir en SEQ ID NO: 177.

El polipéptido puede incluir o consistir en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85 % (por ejemplo, 90 %, 95 %, 97 %, 99 % o 100 %) de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 260 o 261. El polipéptido puede incluir o consistir en la secuencia de SEQ ID NO: 260. El polipéptido puede incluir o consistir en la secuencia de SEQ ID NO: 261.

El polipéptido puede incluir un péptido señal de secreción. El polipéptido puede incluir o consistir en una

secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85 % (por ejemplo, 90 %, 95 %, 97 %, 99 % o 100 %) de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 263 o 264. El polipéptido puede incluir o consistir en la secuencia de SEQ ID NO: 263. El polipéptido puede incluir o consistir en la secuencia de SEQ ID NO: 264.

En algunas realizaciones, el polipéptido es un dímero. Como alternativa, el polipéptido puede ser un monómero.

También se presenta un polipéptido que incluye una fosfatasa alcalina y una región de fragmento cristalizable (Fc), en donde la región Fc es una quimera IgG2/4. La región Fc puede incluir la secuencia de SEQ ID NO: 253 o tener al menos un 85 % (por ejemplo, 90 %, 95 %, 97 %, 99 % o 100 %) de identidad de secuencia con la misma. La fosfatasa alcalina recombinante puede seleccionarse del grupo que consiste en TNSALP, IALP, fosfatasa alcalina placentaria (PALP) y fosfatasa alcalina de estirpe germinal (GALP). La fosfatasa alcalina recombinante puede ser una fosfatasa alcalina de mamífero (por ejemplo, fosfatasa alcalina de ser humano, de gorila, ratón, conejo, chimpancé, macaco cangrejero, macaco de la India, orangután, babuino, rata, de bovino, de cabra o de llama). La fosfatasa alcalina recombinante puede incluir la secuencia de una cualquiera de SEQ ID NO: 1-6 o un fragmento de la misma. Por ejemplo, la fosfatasa alcalina recombinante puede incluir los aminoácidos 1-491 de SEQ ID NO: 1 o los aminoácidos 1-486 de SEQ ID NO: 4.

En algunas realizaciones de cualquiera de los aspectos anteriores, el polipéptido incluye además un resto de dirección al hueso, Xn, seleccionado del grupo que consiste en Dn, En, (DAD)n, (DDS)n, (DSS)n, (EES)n y VHH, en donde n

= 1 a 50 (por ejemplo, 1 a 30). En algunas realizaciones particulares, el resto de dirección al hueso puede ser Dn donde n = 7 a 10; En donde n = 10 a 15; (DAD)n donde n= 2 a 4; (DDS)n donde n = 2 a 4; (DSS)n donde n = 3; o (EES)n donde n = 3 a 4. Por ejemplo, el resto de dirección al hueso puede incluir $(DAD)_3$ o $(DDS)_3$.

El resto de dirección al hueso VHH puede incluir una o más sustituciones. Por ejemplo, al menos una región determinante de la complementariedad (CDR, *complementary determining region*) (por ejemplo, dos o tres) del VHH puede sustituirse con al menos un residuo de glutamato o aspartato (por ejemplo, de 2 a 30, por ejemplo, 5 o 7).

En algunas realizaciones, los polipéptidos descritos en el presente documento se modifican de forma postraduccional (por ejemplo, se glucosilan o sialilan).

También se presenta un polinucleótido que codifica el polipéptido de cualquiera de los aspectos anteriores, un vector que contiene el polinucleótido y una célula (por ejemplo, una célula de mamífero, tal como una célula CHO o una célula HEK293) que contiene el polinucleótido o el vector. El polinucleótido puede codificar una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85 % (por ejemplo, 90 %, 95 %, 97 %, 99 % o 100 %) de identidad de secuencia con una cualquiera de SEQ ID NO: 7-223, 247 y 262-264 (por ejemplo, una cualquiera de SEQ ID NO: 72, 123, 155 o 177). El polinucleótido puede tener al menos un 85 % (por ejemplo, 90 %, 95 %, 97 %, 99 % o 100 %) de identidad de secuencia con una cualquiera de SEQ ID NO: 265-268. El polinucleótido puede incluir o consistir en una cualquiera de SEQ ID NO: 265-268. El polinucleótido puede incluir o consistir en SEQ

ID NO: 265. El polinucleótido puede incluir o consistir en SEQ ID NO: 266. El polinucleótido puede incluir o consistir en SEQ ID NO: 267. El polinucleótido puede incluir o consistir en SEQ ID NO: 268.

En algunas realizaciones, el polipéptido no es o no incluye la secuencia de SEQ ID NO: 269.

En algunas realizaciones, la fosfatasa alcalina no incluye la fosfatasa alcalina de asfotasa alfa (por ejemplo, aminoácidos 1-485) de SEQ ID NO: 269.

En algunas realizaciones, el polipéptido no es un polipéptido con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 269 y no incluye la fosfatasa alcalina de asfotasa alfa (por ejemplo, aminoácidos 1-485) de SEQ ID NO: 269.

También se presenta un método de producción del polipéptido de cualquiera de los aspectos anteriores, proporcionando una célula (por ejemplo, una célula de mamífero, tal como una célula CHO o una célula HEK293) transformada con el polinucleótido o el vector que codifica el polipéptido, de modo que el polinucleótido se coloca para la expresión en la célula; cultivando la célula transformada en condiciones adecuadas para expresar el polinucleótido, en donde el cultivo da como resultado la expresión del polipéptido; y aislando el polipéptido.

También se presenta una composición farmacéutica que contiene el polipéptido de cualquiera de los aspectos anteriores y un transportador farmacéuticamente aceptable. El transportador farmacéuticamente aceptable puede incluir cloruro de sodio y/o fosfato de sodio. La composición puede incluir cloruro de sodio aproximadamente 150 mM y/o fosfato de sodio aproximadamente 25 mM a un pH de aproximadamente

7.4.

La composición puede formularse a una dosificación de aproximadamente 0.1 mg/ml a aproximadamente 10 mg/ml. La composición puede formularse en un volumen de aproximadamente 0.1 ml a aproximadamente 50 ml (por ejemplo, de aproximadamente 0.1 a aproximadamente 10 ml).

En otro aspecto, se presenta un método de tratamiento de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en hipofosfatasia (HPP), fractura ósea, osteoporosis, esclerosteosis, condrocalcinosis, hipotonía, distrofia muscular de Duchenne, traqueobroncomalacia, convulsiones, neurofibromatosis (por ejemplo, NF-1) y craneosinostosis, o uno o más síntomas de la misma, en un sujeto (por ejemplo, un sujeto humano) que lo necesite administrando al sujeto el polipéptido o la composición farmacéutica de cualquiera de los aspectos anteriores al sujeto. El polipéptido puede administrarse en una cantidad y durante un tiempo suficiente para tratar la enfermedad o para aliviar uno o más síntomas de la misma. El tratamiento puede potenciar la formación de hueso en el sujeto. El polipéptido puede usarse para tratar la debilidad muscular.

El polipéptido puede administrarse a una dosificación de aproximadamente 0.01 mg/kg a aproximadamente 60 mg/kg (por ejemplo, de aproximadamente 0.1 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg, por ejemplo, de aproximadamente 0.1 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg, por ejemplo, de aproximadamente 0.1 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg). El polipéptido puede administrarse una vez al día, a la semana, al mes o al año (por ejemplo, una vez a la semana). El polipéptido puede administrarse a una dosificación de aproximadamente 0.01

mg/kg/semana a aproximadamente 20 mg/kg/semana (por ejemplo, de aproximadamente 0.1 mg/kg/semana a aproximadamente 10 mg/kg/semana). El polipéptido puede administrarse durante al menos un día, una semana, un mes, un año o más.

El polipéptido puede administrarse por vía subcutánea, intravenosa, intramuscular, sublingual, intratecal o intradérmica. En particular, el polipéptido, o una composición que contiene el polipéptido, puede administrarse por administración subcutánea.

El sujeto puede ser un sujeto humano, tal como un neonato, un niño, un adolescente o un adulto.

Antes de la administración del polipéptido recombinante, el sujeto puede caracterizarse por tener una distancia promedio a pie en seis minutos de aproximadamente 350 metros o menor. La administración del polipéptido recombinante puede promover un aumento en la distancia promedio a pie en seis minutos por parte del sujeto de al menos 100 metros o mayor. El sujeto puede presentar una distancia promedio a pie en seis minutos de aproximadamente 500 metros o mayor después de la administración del polipéptido recombinante (por ejemplo, después de un periodo de tiempo de tratamiento de 1 mes a 1 año).

El sujeto puede mostrar menor dependencia de un dispositivo de ayuda a la movilidad (por ejemplo, un andador, una silla de ruedas, dispositivos ortopédicos, muletas y ortesis) después de la administración del polipéptido recombinante.

Antes de la administración del polipéptido recombinante, el sujeto puede caracterizarse por tener una concentración plasmática de PPi de aproximadamente 4.5 mM o

mayor. La administración del polipéptido recombinante puede promover una mediana de disminución en la concentración de PPi en una muestra de plasma del sujeto de al menos aproximadamente 1 mM. El sujeto puede presentar una concentración plasmática de PPi de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 5 mM después de la administración del polipéptido recombinante.

En algunas realizaciones, el sujeto tiene de 0 a 14 días de edad y, antes de la administración del polipéptido recombinante, se caracteriza por tener una concentración plasmática de ALP de aproximadamente 90 U/l o menor; el sujeto tiene de 15 días a menos de 1 año de edad y, antes de la administración del polipéptido recombinante, se caracteriza por tener una concentración plasmática de ALP de aproximadamente 134 U/l o menor; el sujeto tiene de aproximadamente 1 año a menos de 10 años de edad y, antes de la administración del polipéptido recombinante, se caracteriza por tener una concentración plasmática de ALP de aproximadamente 156 U/l o menor; el sujeto tiene de aproximadamente 10 años a aproximadamente 13 años de edad y, antes de la administración del polipéptido recombinante, se caracteriza por tener una concentración plasmática de ALP de aproximadamente 141 U/l o menor; el sujeto es mujer y tiene de aproximadamente 13 años a aproximadamente 15 años de edad y, antes de la administración del polipéptido recombinante, se caracteriza por tener una concentración plasmática de ALP de aproximadamente 62 U/l o menor; el sujeto es hombre y tiene de aproximadamente 13 años a aproximadamente 15 años de edad y, antes de la administración del polipéptido recombinante, se caracteriza por tener una concentración

plasmática de ALP de aproximadamente 127 U/l o menor; el sujeto es mujer y tiene de aproximadamente 15 años a aproximadamente 17 años de edad y, antes de la administración del polipéptido recombinante, se caracteriza por tener una concentración plasmática de ALP de aproximadamente 54 U/l o menor; el sujeto es hombre y tiene de aproximadamente 15 años a aproximadamente 17 años de edad y, antes de la administración del polipéptido recombinante, se caracteriza por tener una concentración plasmática de ALP de aproximadamente 89 U/l o menor; el sujeto tiene aproximadamente 17 años de edad o más y, antes de la administración del polipéptido recombinante, se caracteriza por tener una concentración plasmática de ALP de aproximadamente 48 U/l o menor; o el sujeto tiene aproximadamente 17 años de edad o más y, antes de la administración del polipéptido recombinante, se caracteriza por tener una concentración plasmática de ALP de aproximadamente 59 U/l o menor.

La administración del polipéptido recombinante puede promover una mediana de aumento en la concentración de ALP en una muestra de plasma del sujeto de al menos aproximadamente 100 U/l o mayor.

En algunas realizaciones, el sujeto tiene de 0 a 14 días de edad y, después de la administración del polipéptido recombinante, se caracteriza por tener una concentración plasmática de ALP de aproximadamente 273 U/l o mayor; el sujeto tiene de 15 días a menos de 1 año de edad y, después de la administración del polipéptido recombinante, se caracteriza por tener una concentración plasmática de ALP de aproximadamente 518 U/l o mayor; el sujeto tiene de

aproximadamente 1 año a menos de aproximadamente 10 años de edad y, después de la administración del polipéptido recombinante, se caracteriza por tener una concentración plasmática de ALP de aproximadamente 369 U/l o mayor; el sujeto tiene de aproximadamente 10 años a aproximadamente 13 años de edad y, después de la administración del polipéptido recombinante, se caracteriza por tener una concentración plasmática de ALP de aproximadamente 460 U/l o mayor; el sujeto es mujer y tiene de aproximadamente 13 años a aproximadamente 15 años de edad y, después de la administración del polipéptido recombinante, se caracteriza por tener una concentración plasmática de ALP de aproximadamente 280 U/l o mayor; el sujeto es hombre y tiene de aproximadamente 13 años a aproximadamente 15 años de edad y, después de la administración del polipéptido recombinante, se caracteriza por tener una concentración plasmática de ALP de aproximadamente 517 U/l o mayor; el sujeto es mujer y tiene de aproximadamente 15 años a aproximadamente 17 años de edad y, después de la administración del polipéptido recombinante, se caracteriza por tener una concentración plasmática de ALP de aproximadamente 128 U/l o mayor; el sujeto es hombre y tiene de aproximadamente 15 años a aproximadamente 17 años de edad y, después de la administración del polipéptido recombinante, se caracteriza por tener una concentración plasmática de ALP de aproximadamente 365 U/l o mayor; el sujeto es mujer y tiene aproximadamente 17 años de edad o más y, después de la administración del polipéptido recombinante, se caracteriza por tener una concentración plasmática de ALP de aproximadamente 95 U/l o mayor; o el

sujeto es hombre y tiene aproximadamente 17 años de edad o más y, después de la administración del polipéptido recombinante, se caracteriza por tener una concentración plasmática de ALP de aproximadamente 164 U/l o mayor.

Antes de la administración del polipéptido recombinante, el sujeto puede caracterizarse por tener una puntuación promedio de fuerza en la prueba de competencia motora de Bruininks-Oseretsky (*Bruininks-Oseretsky Test of Motor Proficiency*) 2.ª edición (BOT-2) de aproximadamente 10 o menor. Antes de la administración del polipéptido recombinante, el sujeto puede caracterizarse por tener una puntuación promedio de velocidad de carrera y agilidad en BOT-2 de aproximadamente 5 o menor. La administración del polipéptido recombinante puede dar como resultado una puntuación promedio de fuerza en BOT-2 del sujeto de aproximadamente 10 o mayor. La administración del polipéptido recombinante puede dar como resultado una puntuación promedio de velocidad de carrera y agilidad en BOT-2 del sujeto de aproximadamente 5 o mayor.

Antes de la administración del polipéptido recombinante, el sujeto puede caracterizarse por tener una puntuación promedio en el índice del cuestionario de evaluación de salud infantil (*Childhood Health Assessment Questionnaire* - CHAQ) de aproximadamente 0.8 o mayor. La administración del polipéptido recombinante puede dar como resultado una puntuación promedio en el índice de CHAQ del sujeto de aproximadamente 0.5 o menor.

Antes de la administración del polipéptido recombinante, el sujeto puede caracterizarse por tener una puntuación promedio en el instrumento de recopilación de

datos de resultados pediátricos (*Pediatric Outcomes Data Collection Instrument* - PODCI) de aproximadamente 40 o menor. La administración del polipéptido recombinante puede dar como resultado una puntuación promedio en el PODCI del sujeto de aproximadamente 40 o mayor.

Antes de la administración del polipéptido recombinante, el sujeto puede caracterizarse por tener un promedio del grado de fuerza muscular de menos de aproximadamente 5. La administración del polipéptido recombinante da como resultado un aumento promedio en el grado de fuerza muscular del sujeto de aproximadamente 1 o mayor.

Antes de la administración del polipéptido recombinante, el sujeto puede caracterizarse por tener un valor promedio de dinamometría manual (*Hand Held Dynamometry* - HHD) de menos de aproximadamente un 80 % de un valor de HHD previsto. La administración del polipéptido recombinante puede dar como resultado un valor promedio de HHD del sujeto de aproximadamente un 80 % o mayor de un valor de HHD previsto. El valor de HHD puede representar el fuerza de agarre, flexión de rodilla, extensión de rodilla, flexión de cadera, extensión de cadera o abducción de cadera del sujeto.

En otro aspecto, la invención presenta un método para determinar una actividad (por ejemplo, actividad de unión) de un polipéptido descrito en el presente documento que incluye una sALP o un polipéptido de fusión de sALP (por ejemplo, un polipéptido que tiene la secuencia de una cualquiera de SEQ ID NO: 7-223, 247 y 262-264 o una variante de la misma con al menos un 85 % de identidad de secuencia con la misma y/o al menos una mutación aminoacídica con

respecto a una ALP de origen natural, como se describe en el presente documento). El método puede incluir proporcionar un homogeneizado de hueso, por ejemplo, procedente de un hueso (por ejemplo, un fémur, tal como un hueso de, por ejemplo, un mamífero (por ejemplo, un ratón o un ser humano)). El homogeneizado de hueso puede obtenerse tomando tejido óseo y tratando el tejido, por ejemplo, con una colagenasa para eliminar el tejido conjuntivo. El hueso puede purificarse, por ejemplo, eliminando la médula y/u otros contaminantes. Una vez que el hueso está seco, el hueso puede homogeneizarse, por ejemplo, moliendo, triturando y/o rebanando el hueso, por ejemplo, hasta que el tejido óseo esté homogeneizado. A continuación, el homogeneizado de hueso puede resuspenderse en un líquido, por ejemplo, en PBS, para su uso en un ensayo posterior. Un polipéptido como se describe en el presente documento puede incubarse con el homogeneizado, por ejemplo, durante al menos 1 minuto, 5 minutos, 10 minutos, 15 minutos, 20 minutos, 25 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 5 horas, 6 horas o más. A continuación, la muestra puede someterse a agitación vorticial y/o centrifugarse para obtener una fracción de proteína en el sobrenadante o unida al homogeneizado de hueso. La proporción de proteína unida frente a la no unida puede medirse y cuantificarse posteriormente para determinar la afinidad de unión del polipéptido por el homogeneizado.

Definiciones

El término "un, uno/a" o "pluralidad" antes de un sustantivo, representa uno o más del sustantivo particular.

Por ejemplo, la expresión "una célula de mamífero" representa "una o más células de mamífero".

El término "aproximadamente" pretende justificar variaciones debidas a errores experimentales; en algunas realizaciones "aproximadamente" representa ±10 % del valor indicado. Se entiende que todas las mediciones presentadas en el presente documento están modificadas por el término "aproximadamente", se use el término explícitamente o no, salvo que se indique explícitamente lo contrario.

La expresión "resto de dirección al hueso" significa una secuencia de aminoácidos de al menos 3 residuos aminoacídicos de longitud que tiene una afinidad suficiente por la matriz ósea de modo que el resto de dirección al hueso, tomado en solitario, tiene una afinidad de unión *in vivo* a la matriz ósea que es al menos aproximadamente 1 x 10^{-5} M o mejor (por ejemplo, aproximadamente 10^{-6} M, aproximadamente 10^{-7} M, aproximadamente 10^{-8} M, aproximadamente 10^{-9} M o mejor).

La expresiones "inventario breve del dolor-forma corta" y "BPI-SF" (*Brief Pain Inventory-Short Form*, como se usan indistintamente en el presente documento, se refieren a un método para medir el dolor de los pacientes, en particular, pacientes que tienen HPP (por ejemplo, pacientes de aproximadamente 13 años de edad o más). El BPI-SF es una medida de dolor autoinformada descrita en Cleeland y Ryan (*Ann Acad Med Singapore*, 23(2), 129-138; 1994), incorporado por la presente por referencia en su totalidad. El BPI-SF es un cuestionario diseñado para evaluar la gravedad del dolor y el impacto del dolor en las funciones diarias. El BPI-SF consiste en 11 puntos que utilizan una escala de calificación

numérica para evaluar la gravedad del dolor (4 puntos) y la interferencia del dolor (7 puntos) en las 24 horas previas a la administración del cuestionario. El cuestionario BPI-SF proporciona información sobre la intensidad del dolor y el grado en que el dolor interfiere con las funciones diarias del paciente (por ejemplo, un paciente con HPP de aproximadamente 13 años de edad o más) en una escala de calificación numérica de 0 (sin dolor) a 10 (dolor intenso o interferencia importante provocada por el dolor); puntuaciones más bajas indican mejores resultados de calidad de vida y dolor reducido. Por ejemplo, puntuaciones de BPI-SF de los adolescentes y adultos con HPP son una combinación de 11 evaluaciones del dolor.

Las expresiones "prueba de competencia motora de Bruininks-Oseretsky 2.ª edición" y "BOT-2", como se usa en el presente documento, se refieren a la segunda edición de una prueba estandarizada del funcionamiento motor grueso y fino para un paciente que tiene HPP, por ejemplo, un niño que tiene HPP de aproximadamente 5 años de edad a aproximadamente 12 años de edad, un adolescente que tiene HPP de aproximadamente 13 años de edad a aproximadamente 17 años de edad o un adulto que tiene HPP de más de aproximadamente 18 años de edad o más. Véase Bruininks, R. H. (2005). *Bruininks-Oseretsky Test of Motor Proficiency, (BOT-2)*. Mineápolis, MN: Pearson Assessment, incorporado por la presente por referencia en su totalidad. La BOT-2 se administra individualmente para evaluar las habilidades motoras gruesas y finas de una serie de pacientes. La BOT-2, por ejemplo, puede usarse para evaluar deficiencias físicas y restricciones de movilidad en pacientes que tienen

HPP, por ejemplo, niños que tienen HPP de aproximadamente 5 años de edad a aproximadamente 12 años de edad, adolescentes que tienen HPP de aproximadamente 13 años de edad a aproximadamente 17 años de edad o adultos que tienen HPP de más de aproximadamente 18 años de edad o más. La BOT-2 proporciona puntuaciones combinadas de BOT-2 en las siguientes áreas ilustrativas: fuerza, velocidad de carrera y agilidad, precisión motora fina, integración motora fina, destreza manual, coordinación bilateral, equilibrio y coordinación de las extremidades superiores. Por ejemplo, se puede determinar una puntuación total de fuerza de BOT-2 haciendo que un paciente realice abdominales normales, abdominales en v, salto de longitud de pie, sentadas en la pared y flexiones. Puede determinarse una puntuación total de velocidad de carrera y agilidad haciendo que un paciente pase por encima de una barra de equilibrio o realice una carrera de ida y vuelta, un salto lateral con dos piernas o un salto lateral con una pierna. Tanto la fuerza total de BOT-2 como la velocidad de carrera y las puntuaciones totales de agilidad de BOT-2 varían de 0 a 25, en que una puntuación de aproximadamente 10 a 25 se considera representativa de sujetos sanos.

La expresión "catalíticamente competente", como se usa en el presente documento, se refiere a una sALP que hidroliza pirofosfato inorgánico (PPi) inhibidor de la mineralización ósea para proporcionar fosfato inorgánico (Pi), disminuyendo de ese modo las concentraciones extracelulares de PPi. Por tanto, la sALP catalíticamente competente mejora la mineralización esquelética en el hueso regulando la concentración de PPi.

Las expresiones "cuestionario de evaluación de la salud infantil" y "CHAQ", como se usan en el presente documento, se refieren a un cuestionario que se usa para evaluar el estado de salud (por ejemplo, capacidad de realizar actividades cotidianas (ADL - *activities of daily living*) de pacientes de 1 a 19 años de edad, tales como niños, adolescentes y algunos adultos con HPP. Para obtener una descripción del índice de CHAQ, véase Bruce y Fries (*J. Rheumatol*. 30(1): 167-178, 2003), incorporado por la presente por referencia en su totalidad. El CHAQ puede administrarse mediante entrevista o autoinforme para niños mayores de 8 años de edad. El CHAQ incluye ocho subescalas para vestirse/asearse, levantarse, comer, caminar, higiene, alcanzar cosas, agarrar cosas y actividades. El intervalo de puntuaciones dentro de cada categoría es de 0 a 3, en que una puntuación de 0 indica sin ninguna dificultad; una puntuación de 1 indica con algo de dificultad; una puntuación de 2 indica con mucha dificultad; y una puntuación de 3 indica que el paciente es incapaz de realizar la actividad. El índice de CHAQ también puede usarse para determinar la presencia y la gravedad del dolor.

Las expresiones "cuestionario de cinco dimensiones EuroQol" y "EQ-5D", como se usan en el presente documento, se refieren a un cuestionario que se usa para evaluar el estado de salud (por ejemplo, movilidad, cuidado personal, capacidad para realizar las actividades habituales de la escuela, el trabajo o tareas domésticas, capacidad para realizar ADL (por ejemplo, vestirse, ir al baño y cocinar), experiencia de dolor o malestar y ansiedad o depresión) de pacientes, tales como niños que tienen HPP de aproximadamente

5 años de edad a aproximadamente 12 años de edad, adolescentes que tienen HPP de aproximadamente 13 años de edad a aproximadamente 17 años de edad o adultos que tienen HPP de más de aproximadamente 18 años de edad o más. Para obtener una descripción del índice EQ-5D, véase Reenan y Oppe (guía del usuario de EQ-5D-3L, versión 5.1, 2015), incorporada por la presente por referencia en su totalidad. El EQ-5D puede autoadministrarse, administrarse por un médico o en una entrevista. El cuestionario EQ-5D incluye las siguientes cinco dimensiones que caracterizan el estado de salud del paciente con HPP: movilidad, cuidado persona, capacidad para realizar ADL, incidencia de dolor o malestar y ansiedad o depresión. Como se describe en el presente documento, el EQ-5D puede usarse en combinación con al menos una evaluación física, tal como el 6MWT, para clasificar a un paciente con HPP por tener un estado de salud de nivel I que indica sin problemas con el estado fisiológico, nivel II que indica algunos problemas con el estado fisiológico, nivel III que indica problemas extremos con el estado fisiológico o nivel IV que indica los problemas más extremos del estado fisiológico. El EQ-5D también puede usarse como parte del análisis para evaluar la transición de un paciente con HPP de un estado de salud a otro estado de salud, tal como de un estado de salud de IV a III, de IV a II, de IV a I, de III a II, de III a I o de II a I. El índice de utilidad de salud infantil-9D (CHU-9D - *Child Health Utility Index-9D*) también puede usarse para evaluar el estado de salud en pacientes con HPP. Para obtener una descripción de los índices de CHU-9D y EQ-5D, véase Stevens (*Appl Health Econ Health Policy*. 9(3): 157-69, 2011) y la publicación PCT n.° WO 2018/191254,

incorporada por la presente por referencia en su totalidad.

El término "eficacia" significa el valor de $E_{máx}$ de un compuesto en un ensayo de dosis-respuesta.

El término "Fc" significa una región de fragmento cristalizable de una inmunoglobulina, por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4, incluyendo los dominios CH2 y CH3 de la cadena pesada de la inmunoglobulina. La Fc también puede incluir cualquier parte de la región de bisagra que une las regiones Fab y Fc. La Fc puede obtenerse de cualquier mamífero, incluyendo el ser humano, y puede modificarse de forma postraduccional (por ejemplo, mediante glucosilación o sialilación). En un ejemplo no limitante, la Fc puede ser la región de fragmento cristalizable de IgG1 humana que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 259, o la Fc puede ser la región de fragmento cristalizable de IgG2/4 humana de SEQ ID NO: 253.

Por "fragmento" se entiende una parte de un polipéptido o polinucleótido que contiene, preferentemente, al menos un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de la longitud total del polinucleótido o polipéptido de referencia. Un fragmento puede contener, por ejemplo, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900, 2000, 2100 o más nucleótidos, hasta la longitud total del polinucleótido, o 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180,

190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 400, 500, 600, 700 o más residuos aminoacídicos, hasta la longitud total del polipéptido.

Las expresiones "dinamometría manual" y "HHD", como se usan indistintamente en el presente documento, se refieren a un método para medir el agarre y la fuerza muscular de sujetos, en particular, sujetos que tienen HPP de aproximadamente 13 años de edad o más. Puede usarse un dinamómetro para evaluar la fuerza de agarre, la flexión de la rodilla, la extensión de la rodilla, la flexión de la cadera, la extensión de la cadera y la abducción de la cadera de un sujeto que tiene HPP. Por ejemplo, la flexión y extensión de la rodilla y también la flexión, extensión y abducción de la cadera de un sujeto con HPP de aproximadamente 13 años de edad o más pueden medirse usando, por ejemplo, un dinamómetro MICROFET2TM, mientras que la fuerza de agarre del sujeto puede medirse usando, por ejemplo, un dinamómetro de agarre JAMAR®. En particular, el administrador mantiene estable el dinamómetro y el sujeto ejerce una fuerza máxima contra el dinamómetro. Los datos de fuerza máxima se recopilan en libras y luego se convierten a newton (N). A continuación, se calculan los valores de momento de torsión usando la longitud de la extremidad en N-metros. A continuación, el valor del momento de torsión puede compararse con el valor de, por ejemplo, un sujeto normal de aproximadamente la misma edad, el mismo sexo y/o la misma estatura, y expresarse como un valor porcentual para generar la puntuación de HHD del sujeto.

La expresión "estado de salud", como se usa en el presente documento, se refiere al estado fisiológico

caracterizada de un paciente que tiene HPP, tal como un niño que tiene HPP de aproximadamente 5 años de edad a aproximadamente 12 años de edad, un adolescente que tiene HPP de aproximadamente 13 años de edad a aproximadamente 17 años de edad o un adulto que tiene HPP de más de aproximadamente 18 años de edad o más. El estado de salud del paciente con HPP puede caracterizarse con al menos una evaluación física seleccionada de una o más de los siguientes parámetros: 6MWT, BOT-2, BSID-III y análisis de la marcha, y al menos una evaluación de calidad de vida seleccionada de una o más de los siguientes parámetros: EQ-5D, CHAQ, PODCI, CHU-9D, SF-36, SF-12 y PedsQL. En particular, el estado de salud del paciente con HPP se caracteriza, por ejemplo, por el 6MWT en combinación con el EQ-5D. Después de obtener los resultados de al menos una evaluación física y al menos una evaluación de la calidad de vida seleccionada de los parámetros anteriores, el paciente con HPP puede identificarse por tener un estado de salud de nivel I que indica sin problemas con el estado fisiológico, nivel II que indica algunos problemas con el estado fisiológico, nivel III indica problemas extremos con el estado fisiológico o nivel IV que indica los problemas más extremos del estado fisiológico. El parámetro o parámetros pueden usarse para evaluar la transición del paciente con HPP de un estado de salud a otro estado de salud después de, por ejemplo, tratamiento con una sALP como se describe en el presente documento, tal como una transición de un estado de salud de IV a III, de IV a II, de IV a I, de III a II, de III a I o de II a I después de la administración de la sALP.

Los términos "hipofosfatasia" y "HPP", como se usan en

el presente documento, se refieren a un trastorno esquelético hereditario infrecuente provocado, por ejemplo, por una o más mutaciones de pérdida de función en el gen ALPL (fosfatasa alcalina, hígado/hueso/riñón), que codifica la fosfatasa alcalina no específica de tejido (TNSALP). La HPP puede caracterizarse además como HPP del lactante, HPP infantil, HPP perinatal (por ejemplo, HPP perinatal benigna o HPP perinatal letal), odonto-HPP, HPP en el adolescente o HPP en el adulto. Por ejemplo, "HPP infantil" describe a un paciente que tiene HPP que tiene de aproximadamente 5 años de edad a aproximadamente 12 años, "HPP en el adolescente" describe un paciente que tiene HPP que tiene de aproximadamente 13 años de edad a aproximadamente 17 años y "HPP en el adulto" describe a un paciente que tiene HPP que es tiene aproximadamente 18 años de edad o más. La expresión "HPP en el adulto", como se usa en el presente documento, se refiere a una afección o fenotipo caracterizado por la presencia de uno o más de los siguientes síntomas: niveles elevados de pirofosfato inorgánico (PPi) en sangre y/u orina, hipomineralización, hipercalciuria, una o más deformidades esqueléticas, hipotonía, debilidad muscular, complicaciones reumatoides, marcha miopática, dificultades para caminar, dolor óseo, dolor, fractura ósea, depósito de cristales de pirofosfato de calcio dihidratado, seudogota, artritis, artropatía por pirofosfato, condrocalcinosis, periartritis calcificada y seudofractura. La expresión "HPP en el adolescente", como se usa en el presente documento, se refiere a una afección o fenotipo caracterizado por la presencia de uno o más de los siguientes síntomas: niveles elevados de PPi, PEA o PLP en sangre u orina; osteomalacia,

una o más deformidades esqueléticas, hipotonía, debilidad muscular, complicaciones reumatoides, artritis, seudogota, marcha miopática, dificultades para caminar, dolor óseo, dolor, pérdida prematura de los dientes, hipomineralización, hipoplasia pulmonar, insuficiencia respiratoria, convulsiones, hipercalciuria, baja estatura y retraso del crecimiento. La expresión "HPP infantil", como se usa en el presente documento, se refiere a una afección o fenotipo caracterizado por la presencia de uno o más de los siguientes síntomas: niveles elevados de PPi, PEA o PLP en sangre u orina; raquitismo, raquitismo costal, una o más deformidades esqueléticas, hipotonía, debilidad muscular, complicaciones reumatoides, artritis, seudogota, marcha miopática, dificultades para caminar, dolor óseo, dolor, pérdida prematura de los dientes, hipomineralización, retraso en el desarrollo motor, convulsiones, hipercalciuria, baja estatura, fractura ósea, seudofractura y retraso en el crecimiento.

Las expresiones "escala de función de las extremidades inferiores" y "LEFS" (*Lower Extremity Function Scale*), como se usan indistintamente en el presente documento, se refieren a un método para medir la discapacidad funcional en las extremidades inferiores de los pacientes, en particular, pacientes que tienen HPP (por ejemplo, pacientes de aproximadamente 13 años de edad o más). La LEFS es una medida autoinformada descrita en Binkley *et al*. (*Phys Ther.* 79:371-83, 1999), incorporada por la presente por referencia en su totalidad. Las puntuaciones de LEFS totales varían de 0 a 80, siendo las puntuaciones más altas indicativas de un mejor funcionamiento de las extremidades inferiores. Un cambio en

la puntuación de LEFS de aproximadamente 9 puntos se considera un cambio clínicamente significativo. Un fisioterapeuta con licencia puede administrar el LEFS a pacientes con HPP (por ejemplo, pacientes con HPP de aproximadamente 13 años de edad o más) en formato de entrevista. Puntuaciones de LEFS más altas son indicativas de un mejor funcionamiento de las extremidades inferiores, incluyendo los movimientos de transición (por ejemplo, salir de la bañera o rodar en la cama), locomoción (por ejemplo, caminar o correr sobre terreno irregular), subir escaleras y ponerse en cuclillas. La LEFS puede usarse para evaluar el deterioro funcional de una o ambas extremidades inferiores de un paciente con HPP, incluyendo la capacidad de controlar al paciente a lo largo del tiempo y evaluar la eficacia del tratamiento con asfotasa alfa.

La expresiones "ácido nucleico", "molécula de ácido nucleico" y "polinucleótido" significan una molécula polimérica, por ejemplo, ARN o ADN, que tiene una secuencia de dos o más nucleótidos de origen natural o modificados unidos covalentemente. La molécula de ácido nucleico puede ser, por ejemplo, mono o bicatenaria, y puede incluir nucleótidos modificados o no modificados, o mezclas o combinaciones de los mismos. También se incluyen diversas sales, sales mixtas y formas de ácido libre de moléculas de ácido nucleico.

La expresiones "instrumento de recopilación de datos de resultados pediátricos" y "PODCI", como se usan en el presente documento, se refieren a un cuestionario usado para evaluar la salud general, la incidencia del dolor y la capacidad para realizar ADL de pacientes menores de 19 años

de edad, particularmente en pacientes con trastornos de salud crónicos, tales como pacientes con HPP. Para obtener una descripción del PODCI, véase Plint *et al*. (*J. Pediatr. Orthop.* 23(6): 788-790, 2003), incorporado por la presente por referencia en su totalidad. El cuestionario puede completarlo el paciente o un progenitor/tutor del paciente con conocimiento de la afección del paciente. Las ocho escalas generadas a partir del PODCI incluyen lo siguiente: 1) la escala de la función de las extremidades superiores y física para medir la dificultad que se encuentra al realizar el cuidado personal diario y las actividades de los estudiantes; 2) la escala de transferencia y movilidad básica para medir la dificultad experimentada en la realización de actividades de movilidad y motrices rutinarias en las actividades diarias; 3) la escala de funcionamiento deportivo/físico para medir la dificultad o las limitaciones encontradas al participar en actividades más activas o deportes; 4) la escala de dolor/comodidad para medir el nivel de dolor experimentado durante la última semana; 5) la escala de expectativas de tratamiento para medir las expectativas de tratamiento a largo plazo; 6) la escala de felicidad para medir la satisfacción general con la apariencia personal y el sentido de similitud con amigos y otras personas de la misma edad; 7) la escala de satisfacción con los síntomas para medir la aceptación del paciente de las limitaciones actuales en caso de que este sea un estado de por vida; y 8) la escala de funcionamiento global, que es una escala combinada general calculada a partir de las primeras cuatro escalas enumeradas anteriormente. Las puntuaciones estandarizadas se generan a partir de una serie de preguntas

en el PODCI y se convierten a una escala de 0 a 100, en la que 0 representa una discapacidad significativa y 100 representa una discapacidad menor.

La expresión "proteína recombinante" es conocida en la técnica. Una proteína recombinante puede ser una glucoproteína. Por ejemplo, la proteína recombinante o una variante de proteína recombinante producida en una célula CHO está glucosilada, con los restos glucídicos unidos covalentemente a la proteína, y es una glucoproteína. En resumen, la expresión "proteína recombinante" puede referirse a una proteína que puede fabricarse usando un sistema de cultivo celular. Las células en el sistema de cultivo celular pueden proceder, por ejemplo, de una célula de mamífero, incluyendo una célula humana, una célula CHO, una célula de insecto, una célula de levadura o una célula bacteriana. En general, las células en el cultivo celular contienen un polinucleótido introducido que codifica la proteína recombinante de interés (cuyo polinucleótido puede portarlo un vector, tal como un vector plasmídico). El polinucleótido que codifica la proteína recombinante también puede contener un promotor heterólogo unido de forma funcional a un polinucleótido que codifica la proteína.

Como se usa en el presente documento, "prueba de caminata de seis minutos" y "6MWT" se refieren a una evaluación física que es una prueba estandarizada para evaluar la capacidad de caminar de un paciente que tiene HPP (por ejemplo, un niño que tiene HPP de aproximadamente 5 años de edad a aproximadamente 12 años de edad, un adolescente que tiene HPP de aproximadamente 13 años de edad a aproximadamente 17 años de edad, o un adulto que tiene HPP

de más de aproximadamente 18 años de edad o más). En particular, la capacidad para caminar se refiere a la capacidad del paciente para levantar y apoyar cada pie por turno. Véase la American Thoracic Society statement: guidelines for the six-minute walk test (*Amer. J. of Respiratory and Critical Care Medicine*, 166(1):111-7, 2002, incorporada por la presente por referencia en su totalidad). La 6MWT se determina a partir de la distancia (por ejemplo, en metros) que un paciente camina sobre una superficie plana y dura en un periodo de seis minutos. La distancia de 6MWT se puede comparar con la distancia de 6MWT del paciente al inicio, la distancia de 6MWT de un sujeto no tratado (por ejemplo, un sujeto no tratado de aproximadamente la misma edad, estatura y/o sexo), o la distancia de 6MWT de un sujeto sano (por ejemplo, un sujeto sano de aproximadamente la misma edad, estatura y/o sexo) y expresarse como porcentaje para determinar el valor de 6MWT.

Por "que trata", "tratar" y "tratamiento" se entiende la atención médica de un paciente con la intención de curar, mejorar, estabilizar, reducir la probabilidad de o prevenir una enfermedad, tal como HPP (por ejemplo, niño, adolescente o adulto con HPP), o uno o más síntomas de la misma y/o la atención de un paciente que presenta o es probable que tenga una enfermedad, tal como HPP, por ejemplo, administrando una composición farmacéutica (por ejemplo, una sALP como se describe en el presente documento). Este término incluye el tratamiento activo, es decir, el tratamiento dirigido específicamente a la mejora o asociado con la cura de una enfermedad, afección patológica, trastorno o acontecimiento, y también incluye el tratamiento causal, es decir, el

tratamiento dirigido a la eliminación de la causa de la enfermedad, afección patológica, trastorno o acontecimiento asociado. Además, este término incluye tratamiento paliativo, es decir, tratamiento diseñado para el alivio o mejora de al menos un síntoma en lugar de la cura de la enfermedad, afección patológica, trastorno o acontecimiento; tratamiento sintomático, es decir, tratamiento dirigido a los síntomas generales de la enfermedad, afección patológica, trastorno o acontecimiento asociado; tratamiento preventivo, es decir, tratamiento dirigido a minimizar o inhibir parcial o completamente el desarrollo de la enfermedad, afección patológica, trastorno o acontecimiento asociado, por ejemplo, en un paciente que aún no está enfermo, pero que es susceptible a, o en riesgo de otra manera de una enfermedad, afección patológica, trastorno o acontecimiento particular; y tratamiento de apoyo, es decir, tratamiento empleado para complementar otro tratamiento específico dirigido a la mejora de la enfermedad, afección patológica, trastorno o acontecimiento asociado.

Los términos "péptido", "polipéptido" y "proteína" se usan indistintamente y se refieren a cualquier cadena de dos o más residuos aminoacídicos naturales o no naturales, independientemente de la modificación postraduccional (por ejemplo, glucosilación, sialilación o fosforilación), que constituye todo o parte de un polipéptido o péptido de origen natural o no natural, como se describe en el presente documento.

Las expresiones "ALP", "sALP", "fosfatasa alcalina soluble", "fosfatasa alcalina" y "dominio extracelular de una fosfatasa alcalina" se usan indistintamente (salvo que

el contexto indique lo contrario) y significan una fosfatasa alcalina soluble no unida a membrana o un dominio, fragmento biológicamente activo o variante biológicamente activa de la misma. Las ALP incluyen, por ejemplo, una fosfatasa alcalina que carece de una secuencia señal de GPI carboxiterminal y variantes adicionales y análogos de la misma que conservan la actividad de fosfatasa alcalina, por ejemplo, la capacidad de hidrolizar PPi u otros sustratos naturales o artificiales. Esto incluye los dominios TNSALP, PALP, GALP e IALP, y un fragmento biológicamente activo o una variante biológicamente activa de los mismos, salvo que se especifique lo contrario. Una sALP madura carece del anclaje a membrana de GPI y del péptido señal, que se escinde durante el procesamiento.

La expresión "polipéptido de ALP" significa cualquier secuencia que incluya una secuencia de ALP, como se define en el presente documento. Los polipéptidos de ALP ilustrativos incluyen aquellos que tienen la estructura A-ALP-B, en donde cada uno de A y B están ausentes, o es una secuencia de aminoácidos de al menos un aminoácido (por ejemplo, cualquier polipéptido de fusión de ALP descrito en el presente documento).

El término "aislado" o "purificado" significa separado de otros componentes que lo acompañan de forma natural. Por lo general, un compuesto (por ejemplo, proteína, polipéptido, polinucleótido o molécula pequeña), factor, célula u otro componente se considera aislado cuando está al menos, por ejemplo, un 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o incluso 99 %, en peso, libre de proteínas, anticuerpos, moléculas orgánicas de origen

natural y otros componentes con los que está asociado de forma natural. En algunos casos, el componente es al menos un 75 %, 90 % o incluso 99 %, en peso, puro. Un componente aislado puede obtenerse por síntesis química, separación del factor de fuentes naturales o producción del componente en una célula hospedadora recombinante que no produce el componente de forma natural. Las proteínas y las moléculas pequeñas pueden purificarse por un experto en la materia usando técnicas convencionales tales como las descritas por Ausubel *et al*. (*Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Nueva York, 2000). El componente es preferentemente al menos, por ejemplo, 2, 5 o 10 veces más puro que el material de partida, medido usando, por ejemplo, electroforesis en gel de poliacrilamida, cromatografía en columna, densidad óptica, análisis de HPLC o análisis de Western (Ausubel *et al*., 2000). Métodos ilustrativos de purificación son cromatografía en columna, filtración, inmunoprecipitación y purificación por inmunoafinidad con microesferas magnéticas.

La expresión "transportador farmacéuticamente aceptable" o "excipiente farmacéuticamente aceptable" significa un transportador o excipiente que es fisiológicamente aceptable para el paciente tratado mientras conserva las propiedades terapéuticas del compuesto con el que se administra. Una sustancia de transportador farmacéuticamente aceptable ilustrativa es solución salina fisiológica. Los expertos en la materia conocen otros transportadores fisiológicamente aceptables y sus formulaciones y se describen, por ejemplo, en *Remington* (The Science and Practice of Pharmacy, 22.ª Ed., Allen, Ed. 2012).

La expresión "composición farmacéutica" significa una composición que contiene un polipéptido o polinucleótido como se describe en el presente documento formulado con un excipiente farmacéuticamente aceptable, e incluye aquellos que se fabrican o venden con la aprobación de una autoridad sanitaria gubernamental como parte de una pauta terapéutica para el tratamiento o prevención de una enfermedad o acontecimiento en un paciente. Las composiciones farmacéuticas pueden formularse, por ejemplo, para administración subcutánea, administración intravenosa (por ejemplo, como una solución estéril libre de émbolos de partículas y en un sistema de disolvente adecuado para uso intravenoso), para administración oral (por ejemplo, un comprimido, cápsula, comprimido oblongo, cápsula de gel o jarabe), o cualquier otra formulación descrita en el presente documento, por ejemplo, en forma de dosificación unitaria.

El término "sujeto" o "paciente" significa un mamífero, incluyendo, aunque sin limitación, un ser humano o mamífero no humano, tal como uno bovino, equino, canino, ovino o felino.

La expresión "célula de mamífero" se conoce en la técnica y puede referirse a cualquier célula de cualquier mamífero, o que proceda del mismo, incluyendo, por ejemplo, un ser humano, un hámster, un ratón, un mono verde, una rata, un cerdo, una vaca, un hámster o un conejo. La célula de mamífero puede ser una célula inmortalizada, una célula diferenciada o una célula indiferenciada.

La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" significa una cantidad de un polipéptido o polinucleótido descrito en el presente documento que es suficiente para

tratar, prevenir, retardar, suprimir o detener sustancialmente cualquier síntoma de una enfermedad o afección descrita en el presente documento, particularmente HPP. Una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición descrita en el presente documento puede depender de la gravedad del trastorno que se está tratando y de la situación, peso y estado general del sujeto y puede determinarse por un experto en la materia teniendo en cuenta dichos factores. Una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición descrita en el presente documento puede administrarse a un sujeto en una sola dosis o en múltiples dosis administradas durante un periodo de tiempo.

Como se usa en el presente documento, cuando se hace referencia a una secuencia polipeptídica o de ácido nucleico que tiene "al menos un X % de identidad de secuencia" con una secuencia de referencia, se entiende que al menos un X por ciento de los residuos aminoacídicos o nucleótidos en el polipéptido o ácido nucleico son idénticos a los de la secuencia de referencia cuando las secuencias están alineadas de forma óptima. Una alineación óptima de secuencias puede determinarse de diversas maneras que pertenecen a las habilidades de la técnica, por ejemplo, el algoritmo de alineación de Smith Waterman (Smith *et al.*, *J. Mol. Biol.* 147:195-7, 1981) y BLAST (Basic Local Alignment Search Tool; Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215: 403-10, 1990). Se puede acceder a estos y otros algoritmos de alineación usando un programa informático disponible públicamente, tal como "Best Fit" (Smith y Waterman, *Advances in Applied Mathematics*, 482-489, 1981) incorporado en GeneMatcher Plus™ (Schwarz y Dayhof, *Atlas of Protein*

Sequence and Structure, Dayhoff, MO, Ed., pág. 353-358, 1979), BLAST, BLAST-2, BLAST-P, BLAST-N, BLAST-X, WU-BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2, CLUSTAL o Megalign (DNASTAR). Además, los expertos en la materia pueden determinar los parámetros apropiados para medir la alineación, incluyendo cualquier algoritmo necesario para conseguir una alineación óptima sobre la longitud de las secuencias que se estén comparando.

Las palabras "preferido" y "preferentemente" se refieren a realizaciones de los compuestos, composiciones y métodos divulgados que pueden producir determinados beneficios en determinadas circunstancias. Sin embargo, también pueden preferirse otras realizaciones, en condiciones idénticas o diferentes. Además, la enumeración de una o más realizaciones preferidas no implica que otras realizaciones no sean útiles, y no pretende excluir otras realizaciones del alcance de la descripción.

Para cualquier método descrito en el presente documento que incluya etapas diferenciadas, las etapas pueden llevarse a cabo en cualquier orden factible; además, según lo apropiado, podrá llevarse a cabo simultáneamente cualquier combinación de dos o más etapas.

El sumario anterior no pretende describir cada realización divulgada o cada implementación de compuestos, composiciones y métodos divulgados. La descripción que sigue ejemplifica más particularmente realizaciones ilustrativas. En varios lugares a lo largo de la solicitud, se puede proporcionar orientación a través de listas de ejemplos, cuyos ejemplos pueden usarse en diversas combinaciones. En cada caso, la lista enumerada sirve solo como un grupo representativo y no debe interpretarse como una lista

excluyente.

Todos los encabezados son por conveniencia del lector y no deben usarse para limitar el significado del texto que sigue al encabezado, salvo que así se especifique.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

El archivo de la solicitud contiene al menos un dibujo ejecutado en color. El departamento proporcionará copias de esta patente o solicitud de patente con dibujos en color previa solicitud y pago de la tasa correspondiente.

Las figuras 1A-1D son gráficos que muestran la proteína de fusión a Fc fluorescente (proteínas de fusión diméricas que consisten en secuencias de unión a HA aminoterminales fusionadas a la proteína fluorescente Fc de IgG1 humana-Katushka 2s) que se une a hidroxiapatita (HA) u homogeneizado de hueso. La figura 1A muestra la intensidad fluorescente de las proteínas de fusión a Fc fluorescentes unidas a CAPTAL® HA, normalizada a la muestra de Fc-Katushka 2s no dirigida (FLU002); la figura 1B muestra la intensidad de fluorescencia de las suspensiones de proteína después de incubación con HA durante 2 horas, lo que representa la cantidad total de proteína no unida después de incubación; la figura 1C (unida) y la figura 1D (no unida) muestra una cuantificación análoga de la unión de la fusión a Fc fluorescente al homogeneizado de hueso de fémur murino C56BL/6. N = 2 ± máx./mín. (*p < 0.05 frente a FLU002, ANOVA unidireccional, análisis *a posteriori* de Dunnet).

Las figuras 2A-2B son gráficos que muestran la unión de la fusión dirigida al hueso (ALP-Fc-D_{10}) (ALP031; SEQ ID NO: 31) y no dirigida (ALP-Fc) (ALP086; SEQ ID NO: 222) a

homogeneizado de hueso de ratón medida mediante sonda fluorescente. Las intensidades fluorescentes de las fracciones de proteína unida a homogeneizado de hueso (figura 2A) y no unida (figura 2B) se normalizaron al control negativo no dirigido (ALP-Fc). N = 3 ± DT.

Las figuras 3A-3B son gráficos que muestran la unión de la proteína VHH marcada con fluorescencia al homogeneizado de hueso de ratón. Las intensidades fluorescentes de las fracciones de proteína unida a homogeneizado de hueso (figura 3A) y no unida (figura 3B) se normalizaron al VHH de control negativo no dirigido. N = 3 ± DT.

La figura 4 es un conjunto de imágenes fluorescentes sin procesar representativas del espectro de imágenes *in vivo* (IVIS) de un animal vivo de cuerpo completo longitudinales que representa imágenes de ratones J:NU tratados con ALP-Fc-D_{10} (ALP031; SEQ ID NO: 31) y ALP-Fc (ALP086; SEQ ID NO: 222) a lo largo del tiempo (24 a 432 horas).

Las figuras 5A-5B son gráficos que muestran datos cuantitativos para imágenes IVIS de animales vivos de cuerpo completo longitudinales de ratones tratados con ALP-Fc-D_{10} (ALP031; SEQ ID NO: 31) o ALP-Fc (ALP086; SEQ ID NO: 222). La figura 5A muestra las regiones de interés de cuerpo completo dibujadas y las eficiencias radiantes totales cuantificadas. La figura 5B muestra las eficiencias radiantes totales dentro de las regiones medulares de interés dibujadas y las eficiencias radiantes cuantificadas y representadas longitudinalmente a lo largo del estudio de 18 días. N = 6 ± DT, $*p < 0.05$, $**p < 0.01$ prueba de la *t* de Mann-Whitney para datos independientes, bilateral.

Las figuras 6A-6B son gráficos que muestran la cuantificación fluorescente *ex vivo* de la acumulación de proteína en tejidos seleccionados (columna vertebral, cráneo, fémur, hígado, riñón y bazo) después de 18 días. La figura 6A muestra las eficiencias radiantes totales sin procesar de muestras de tejido de ratones tratados con ALP-Fc-D_{10} (ALP031; SEQ ID NO: 31) y ALP-Fc (ALP086; SEQ ID NO: 222) 18 días después de la administración de una sola dosis. La figura 6B muestra las eficiencias radiantes totales normalizadas por volumen de tejidos óseos *ex vivo* de ratones tratados con ALP-Fc-D_{10} (ALP031; SEQ ID NO: 31). N = 6 ± DT, $^{**}p$ <0.01 prueba de la *t* de Mann-Whitney para datos independientes, bilateral.

La figura 7 es un gráfico que muestra imágenes IVIS fluorescentes 2D representativas de un estudio longitudinal en ratones a los que se les administró una sola dosis IV de compuestos marcados con fluorescencia con VHH no dirigido (SEQ ID NO: 248), VHH001 (SEQ ID NO: 249) o VHH002 (SEQ ID NO: 250).

La figura 8 es un conjunto de imágenes fluorescentes sin procesar que muestran datos cuantitativos del estudio longitudinal de la eficiencia radiante total de ratones a los que se les administró una sola dosis IV de compuestos marcados con fluorescencia con VHH no dirigido (SEQ ID NO: 248), VHH001 (SEQ ID NO: 249) o VHH002 (SEQ ID NO: 250), a partir de imágenes IVIS 2D. Las eficiencias radiantes se obtuvieron a partir de regiones de interés (RDI) de todo el ratón. N = 5 ± DT, **** $p < 0.0001$, ANOVA unidireccional, análisis *a posteriori* de Tukey.

Las figuras 9A-9C son gráficos que muestran la

cuantificación de tejidos óseos *ex vivo* de ratones a los que se les dosificó compuestos marcados con fluorescencia con VHH no dirigido (SEQ ID NO: 248), VHH001 (SEQ ID NO: 249) y VHH002 (SEQ ID NO: 250). La figura 9A muestra columnas vertebrales, la figura 9B muestra las extremidades posteriores y la figura 9C muestra los cráneos, que se recogieron de todos los ratones de todos los grupos de tratamiento siete días (168 horas) después de inyecciones de una sola dosis. Se dibujaron regiones de interés (RDI) equivalentes alrededor de tejidos similares y las eficiencias radiantes totales se normalizaron al volumen del tejido. N = 5 ± DT, *** $p < 0.001$, ANOVA unidireccional, análisis *a posteriori* de Tukey.

Las figuras 10A-10B son gráficos que muestran la unión y disociación de múltiples dosis de proteínas de dirección al hueso *in vitro*. La figura 10A muestra la proteína unida a homogeneizado de hueso para VHH001 (SEQ ID NO: 249), VHH002 (SEQ ID NO: 250) y ALP-Fc-D_{10} (ALP031; SEQ ID NO: 31) y la figura 10B muestra la proteína no unida para VHH001 (SEQ ID NO: 249), VHH002 (SEQ ID NO: 250) y ALP-Fc-D_{10} (ALP031; SEQ ID NO: 31).

La figura 11 es un gráfico que muestra la intensidad de fluorescencia de MUP generada por dieciséis proteínas de fusión marcadas de hueso unidas a homogeneizado de hueso en función del tiempo (ALP031 (ALP-Fc-D10), ALP086 (ALP-Fc) y ALP202-ALP216, correspondientes a SEQ ID NO: 31, 222 y 124-138, respectivamente.

La figura 12 es una serie de imágenes IVIS bidimensionales de ratones tratados con ALP-Fc-D10, ALP031 (SEQ ID NO: 31) (ejemplo 8, N = 6), que muestran unión al

hueso *in vivo* a lo largo del tiempo.

La figura 13 es una serie de imágenes IVIS bidimensionales de ratones tratados con proteína de fusión de ALP-Fc, sin marcar, ALP086, ejemplo 8, N = 6, que muestra unión al hueso *in vivo* a lo largo del tiempo.

La figura 14 es un gráfico que muestra la actividad de unión en sobrenadantes, que compara fracciones unidas y no unidas, para diversas construcciones marcadas (ALP230-ALP239, ALP242, ALP243, ALP247, ALP248, ALP250, ALP2521, ALP253 y ALP254). Una línea discontinua indica la unión al hueso de referencia como control. Las construcciones con un resto de dirección al hueso D_5 o D_6 mostraron componentes unidos (B) y no unidos (U) casi iguales.

Las figuras 15A-15B son gráficos que muestran datos de pK que muestran niveles plasmáticos de proteína en mg/l/dosis [(mg/l)/(mg/kg)] frente a horas después de la administración de la dosis a ratones C57BL/6 macho sanos por vía IV (figura 15A) o vía subcutánea (figura 15B).

La figura 16 es un gráfico que muestra las curvas de supervivencia de Kaplan Meier de ratones con HPP tratados por vía subcutánea con PBS diariamente o ALP201 en pautas de dosificación diarias, en días alternos y semanales. La mediana del tiempo de supervivencia para los animales HOM PBS QD fue de 21.5 días.

La figura 17 es un gráfico que muestra el peso corporal medio en función del tiempo (estudio de 36 días) de ratones con HPP tratados con ALP201 o PBS.

La figura 18 es un gráfico que muestra el índice de mineralización de la pata posterior en el día 11 de ratones con HPP tratados con ALP201 o PBS.

La figura 19 es un gráfico que muestra una curva de progreso ilustrativa de un ensayo de hidrólisis de fosfato de 4-metilumbeliferilo (MUP), con la fluorescencia representada frente al tiempo, usando ALP023 a diversas concentraciones.

La figura 20 es un dibujo esquemático que muestra un dominio VHH ilustrativo. F representa las regiones flanqueantes de VHH y las zonas grises representan las CDR H1, H2 y H3 y los segmentos finales, que pueden usarse para colocar o espaciar las secuencias de dirección al hueso.

La figura 21 es un esquema que muestra una molécula de ALP-Fc-marcador de hueso ilustrativa, con dominios individuales marcados.

La figura 22 es un conjunto de gráficos que muestran curvas de saturación que muestran la relación de los niveles crecientes de pirofosfato (PPi) con la tasa de hidrólisis de pirofosfato por construcciones seleccionadas con la velocidad de reacción representada frente a la concentración de pirofosfato para ALP201, ALP259 y asfotasa alfa (SEQ ID NO: 269).

La figura 23 es un gráfico que muestra una curva de progreso ilustrativa de un ensayo de hidrólisis de PLP acoplado con ALP/TPLDH, con la fluorescencia representada frente al tiempo para ALP201 a 10 ng/ml.

La figura 24 es un conjunto de gráficos que muestran curvas de saturación que muestran la relación de los niveles crecientes de piridoxil 5’-fosfato (PLP) con la tasa de hidrólisis de PLP en el ensayo acoplado con ALP/TPLDH mediante construcciones seleccionadas (ALP201, ALP259 y asfotasa alfa; 10 ng /ml, 10 ng/ml y 12.5 ng/ml,

respectivamente) con la velocidad de reacción representada frente a la concentración de PLP en uM.

La figura 25 es un gráfico que muestra el índice de mineralización de la pata posterior en el día 36/37 de ratones con HPP tratados con ALP201, ALP259, asfotasa alfa o PBS.

La figura 26 es un gráfico que muestra la longitud de la tibia en el día 36/37 de ratones con HPP tratados con ALP201, asfotasa alfa o PBS.

La figura 27 es un gráfico que muestra la longitud del fémur en el día 36/37 de ratones con HPP tratados con ALP201, asfotasa alfa o PBS.

La figura 28 es un gráfico que muestra los niveles de actividad de fosfatasa alcalina en hueso de ratón en el día 36/37 de ratones con HPP tratados con ALP201, asfotasa alfa o PBS.

La figura 29 es un gráfico que muestra los niveles de actividad de fosfatasa alcalina en hueso de ratón en el día 36/37 de ratones Akp2GW con HPP tratados con ALP201 o ALP259.

La figura 30 es un gráfico que muestra una curva de progreso ilustrativa de un ensayo de hidrólisis de 4-MUP realizado en tejido de fémur de ratón con HPP, con la fluorescencia (URF) representada frente al tiempo (s).

La figura 31 es un gráfico que muestra el peso corporal en los días 36/37 de ratones con HPP tratados con ALP201, asfotasa alfa o PBS.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Se presentan polipéptidos que incluyen fosfatasas alcalinas solubles, fragmentos, proteínas de fusión de las

mismas y métodos de uso de las mismas, para tratar trastornos de mineralización ósea, tales como hipofosfatasia (HPP), y síntomas de los mismos. Los polipéptidos incluyen una fosfatasa alcalina soluble (sALP) o un fragmento de la misma, que se obtiene de una fosfatasa alcalina (ALP) de origen natural. Las fosfatasas alcalinas incluyen diversas isoenzimas que se expresan de manera diferencial en diferentes tejidos. Cuatro isoenzimas de ALP principales incluyen fosfatasa alcalina no específica de tejido (TNSALP), fosfatasa alcalina placentaria (PALP), fosfatasa alcalina de estirpe germinal (GALP) y fosfatasa alcalina intestinal (IALP). Por consiguiente, se presentan proteínas obtenidas de estas isoenzimas de ALP.

La HPP es una enfermedad esquelética hereditaria infrecuente con una incidencia de 1 por cada 100 000 nacimientos para las formas más graves de la enfermedad. El trastorno generalmente resulta de mutaciones de pérdida de función en el gen que codifica la TNSALP. La HPP presenta una notable gama de síntomas y gravedad, desde la pérdida prematura de los dientes hasta la ausencia casi completa de mineralización ósea en el útero. La presentación de HPP varía notablemente entre los sujetos y también varía notablemente entre las edades de los sujetos. Muchos sujetos que tienen HPP muestran cambios esqueléticos, baja estatura, dolor crónico, dolor en las extremidades inferiores, alteración de la marcha y pérdida de prematura y atraumática de los dientes. Debido a la mutación de pérdida de función en la TNSALP endógena, un sujeto con HPP requiere actividad de ALP funcional de los polipéptidos descritos en el presente documento para restablecer la actividad de ALP natural y

proporcionar una mineralización normal de la matriz ósea.

Examinamos sistemáticamente la actividad de la proteína, la estabilidad de la proteína y las propiedades farmacocinéticas de los polipéptidos de fosfatasa alcalina y proteínas de fusión de los mismos realizando mutagénesis dirigida al sitio. Variaciones en los polipéptidos de fosfatasa alcalina y proteínas de fusión de las mismas descritas en el presente documento incluyen cambios en residuos aminoacídicos ubicados en y alrededor del sitio activo de la enzima fosfatasa alcalina, en uno o más sitios de glucosilación ligada a N de consenso, en un resto de dirección al hueso, si se incluye, y/o en la región del fragmento cristalizable (Fc), si se incluye. En el presente documento se describen polipéptidos de fosfatasa alcalina y proteínas de fusión de los mismos que contienen uno o más de estos cambios y datos que muestran que el cambio o cambios mejoran una o más de la actividad de la proteína, la estabilidad de la proteína y las propiedades farmacocinéticas. Los polipéptidos de fosfatasa alcalina y proteínas de fusión de los mismos se describen con más detalle en el presente documento.

Fosfatasas alcalinas solubles

Se presentan polipéptidos que contienen ALP, incluyendo ALP de origen natural y fragmentos de las mismas y ALP con una o más mutaciones que mejoran al menos una actividad o propiedad farmacocinética (PK) con respecto a la ALP de origen natural sin la al menos una mutación.

La ALP puede ser un fragmento soluble de TNSALP, PALP, GALP o IALP, o una quimera de las mismas. La ALP puede ser

de cualquier organismo adecuado y puede ser, por ejemplo, una ALP de mamífero. Las ALP de mamífero incluyen, por ejemplo, ALP de ser humano, de gorila, ratón, conejo, chimpancé, macaco cangrejero, macaco de la India, orangután, babuino, rata, de bovino, de cabra y de llama. En algunas realizaciones particulares, la ALP es una ALP humana, tal como TNSALP humana o IALP humana. La ALP puede tener al menos un 70 % (por ejemplo, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 99 % o 100 %) de identidad de secuencia con una cualquiera de SEQ ID NO: 1-6 (por ejemplo, al menos un 85 % de identidad de secuencia con los residuos 1-491 de SEQ ID NO: 1 o los residuos 1-486 de SEQ ID NO: 4). La ALP puede tener al menos un 70 % (por ejemplo, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 99 % o 100 %) de identidad de secuencia con una región de al menos 50 (por ejemplo, al menos 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 o más) aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 1-6.

La TNSALP es una proteína unida a la membrana anclada por un resto glucolípido en el extremo C (Swiss-Prot, P05186). El anclaje de glucolípido (GPI) se añade postraduccionalmente después de la eliminación de un extremo carboxiterminal hidrófobo, que sirve como anclaje de membrana temporal y también como señal para la adición de GPI. Mientras que el anclaje de GPI está ubicado en la membrana celular, las partes restantes de la TNSALP son extracelulares. En particular, la TNSALP (por ejemplo, TNSALP humana (hTNSALP)) puede manipularse para remplazar el primer aminoácido de la secuencia carboxiterminal hidrófoba (una alanina) con un codón de terminación, produciendo de este modo una TNSALP soluble manipulada que contiene todos

los residuos aminoacídicos de la forma anclada natural de TNSALP, pero que carece del anclaje a membrana de GPI. Un experto en la materia apreciará que la posición del anclaje a membrana de GPI variará en diferentes ALP y puede incluir, por ejemplo, los últimos 10, 12, 14, 16, 18, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 45, 50 o más residuos aminoacídicos en el extremo C del polipéptido. Por tanto, el extremo carboxiterminal de la ALP natural puede truncarse mediante determinados aminoácidos sin afectar a la actividad de la ALP.

Además del anclaje de GPI carboxiterminal, la TNSALP también tiene una secuencia de péptido señal aminoterminal. El péptido señal aminoterminal está presente en la proteína cuando se sintetiza, pero se escinde de la TNSALP después de la translocación al retículo endoplásmico. Un péptido señal aminoterminal ilustrativo es MISPFLVLAIGTCLTNS (SEQ ID NO: 251).

Las sALP descritas en el presente documento incluyen formas tanto secretadas (es decir, que carecen de la señal aminoterminal) como no secretadas (es decir, que tienen la señal aminoterminal) de las mismas. Un experto en la materia apreciará que la posición del péptido señal aminoterminal variará en diferentes fosfatasas alcalinas y puede incluir, por ejemplo, los primeros 5, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 27, 30 o más residuos aminoacídicos en el extremo N del polipéptido. Un experto en la materia puede predecir la posición de un sitio de escisión de la secuencia señal, por ejemplo, mediante un algoritmo informático apropiado, tal como el descrito en Bendtsen *et al.* (*J. Mol. Biol.* 340(4):783-795, 2004) y disponible en

www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/.

La ALP puede incluir una o más mutaciones, por ejemplo, una mutación que no es una mutación de origen natural. La una o más mutaciones mejoran preferentemente una característica terapéutica de la fosfatasa alcalina y/o el conjugado de dirección al hueso. Por ejemplo, la una o más mutaciones pueden mejorar la tasa de eliminación, la actividad, la eficacia y/o la solubilidad del conjugado de dirección al hueso. La mutación puede ser una sustitución aminoacídica o la inserción o eliminación de uno o más aminoácidos. La una o más mutaciones pueden mejorar al menos una actividad de la propiedad farmacocinética (PK) con respecto a la ALP de origen natural sin la al menos una mutación. La ALP (por ejemplo, TNSALP humana) puede tener al menos una mutación seleccionada del grupo que consiste en E108X, M384X, L385X, N213X y N286X con respecto a SEQ ID NO: 1, en la que X es cualquier aminoácido. La una o más mutaciones pueden incluir, por ejemplo, E108S, E108T, E108Q, E108M, E108K, E108L, M384R, L385T, N213Q y N286Q con respecto a SEQ ID NO: 1. La ALP puede incluir más de una mutación (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más) en diferentes posiciones aminoacídicas. Por ejemplo, la ALP puede incluir mutaciones E108M, N213Q y N286Q con respecto a SEQ ID NO: 1. La ALP (por ejemplo, IALP humana) puede tener una mutación W245X con respecto a SEQ ID NO: 4, en la que X es cualquier aminoácido. La ALP puede tener una mutación W245R con respecto a SEQ ID NO: 4. La ALP puede tener una mutación C481X con respecto a SEQ ID NO: 4, en la que X es cualquier aminoácido que no contenga tiol (por ejemplo, C481G).

Los polipéptidos descritos en el presente documento

pueden contener una ALP que incluye una mutación con respecto a una ALP de origen natural que está presente dentro de una región específica de la ALP. La mutación puede estar presente en el ectodominio de ALP. Por ejemplo, la mutación puede estar presente en el dominio corona, el dominio catalítico o el dominio de dimerización de la ALP. La mutación puede estar presente en el dominio de anclaje GPI, si se incluye. El polipéptido puede incluir una mutación que está presente dentro de los aminoácidos 1-491 o 1-486 de una TNSALP humana o una posición de ALP análoga basada en la alineación y/u homología de secuencia. Por ejemplo, el polipéptido puede tener una mutación dentro de las posiciones 1-491, 1-486, 25-475, 25-240, 50-400, 50-350 y/o 100-300 con respecto a SEQ ID NO: 1. El polipéptido puede tener una mutación dentro de las posiciones 100-125, 100-110, 200-225, 210-220, 275-300, 280-290, 425-450 y/o 425-435 con respecto a SEQ ID NO: 1. Por ejemplo, el polipéptido puede tener una mutación entre las posiciones 108, 213, 286 y/o 429 con respecto a SEQ ID NO: 1. En determinadas realizaciones, la mutación está dentro de la secuencia de la ALP y la mutación no es un tramo de aminoácidos no naturales presente en el dominio amino o carboxiterminal de la ALP.

La ALP puede tener una mutación en un sitio de glucosilación ligada a N de consenso. Los sitios de glucosilación ligada a N de consenso incluyen motivos de asparagina-X-Z, en los que X es cualquier aminoácido excepto P, y Z es cualquier aminoácido excepto S o T. La asparagina puede estar mutada en una glutamina.

La ALP puede tener una mutación S429X con respecto a SEQ ID NO: 4, en donde X es cualquier aminoácido. Por

ejemplo, la ALP puede tener una mutación S429Q, S429H, S429E o S429D con respecto a SEQ ID NO:4.

La ALP puede tener al menos un 70 % (por ejemplo, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 99 % o 100 %) de identidad de secuencia con una región de al menos 50 (por ejemplo, 100, 150, 200, 250, 350, 400 o más) aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 7-223, 247 y 262-264 y/o pueden incluir una o más de las mutaciones analizadas anteriormente.

La ALP mutante puede proporcionar mejora en al menos una actividad de la propiedad PK con respecto a la ALP de origen natural. Por ejemplo, la mutación puede proporcionar uno o más de actividad catalítica aumentada, termoestabilidad aumentada, unión de cinc aumentada, mantenimiento de la actividad en un tampón reducido en cinc, mantenimiento de la actividad a un pH de 5.0 - 7.5, dimerización disminuida, agregación disminuida y/o capacidad de fabricación aumentada de la ALP. El aumento de la actividad catalítica puede incluir un aumento de hidrólisis de piridoxal 5-fosfato y/o pirofosfato. La actividad catalítica aumentada puede ser al menos 2 veces (por ejemplo, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, por ejemplo, de aproximadamente 2 veces a aproximadamente 30 veces) mejor que la actividad de la ALP de origen natural. La propiedad PK mejorada puede incluir una o más de especificidad de sustrato aumentada, actividad aumentada contra un sustrato natural, actividad aumentada contra un sustrato artificial, Km disminuida por un sustrato natural y área bajo la curva (ABC) aumentada por dosis. Los sustratos de ALP artificial incluyen, por ejemplo, fosfato de

umbeliferilo (por ejemplo, fosfato de 4-metilumbeliferilo (4-MUP)), fosfato de umbeliferona y fosfato de paranitrofenilo (pNPP). Los sustratos naturales incluyen, por ejemplo, piridoxal-5'-fosfato, PLP y PEA.

Las ALP descritas en el presente documento pueden estar en forma dimérica. Como alternativa, las ALP pueden estar en forma monomérica.

Restos de dirección al hueso

Los polipéptidos descritos en el presente documento pueden incluir además un resto de dirección al hueso. Un resto de dirección al hueso es cualquier secuencia de aminoácidos que tenga una afinidad suficiente por el hueso (por ejemplo, la fase mineral de hidroxiapatita del hueso). La fase mineral del hueso contiene regiones cargadas positivamente. Por lo tanto, los aminoácidos cargados negativamente, tales como glutamato o aspartato, pueden dirigir un polipéptido al hueso. El resto de dirección al hueso permite que la sALP se localice en el tejido óseo y permanezca unida hasta que disminuya la actividad de la sALP. Esto permite que la sALP catalice la formación de hueso de hidroxiapatita en la ubicación de la TNSALP natural.

El resto de dirección al hueso se puede colocar en el extremo N o extremo C de la ALP. El resto de dirección al hueso puede incluir poliaspartato (Dn), poliglutamato (En), poli(aspartato-alanina-aspartato) (DAD)n, poli(aspartato-aspartato-serina) (DDS)n, poli(aspartato-serina-serina (DSS)n, poli(glutamato-glutamato-serina) (EES)n. n puede ser cualquier número entero del 1 al 50 (por ejemplo, de 1 a 30, de 3 a 30, de 3 a 20, de 5 a 16, de 10 a 16, por ejemplo, 1,

2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 24, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 y 50). En algunas realizaciones, el resto de dirección al hueso puede incluir la estructura Dn donde n = 7 a 10; En donde n = 10 a 15; (DAD)n donde n = 2 a 4; (DDS)n donde n = 2 a 4; (DSS)n donde n = 3; o (EES)n donde n = 3 a 4.

La secuencia de dirección puede incluir Dn, donde n es, por ejemplo, 3-9, 17-30, 10-16 o 3-30. La secuencia de dirección puede incluir En, donde n es, por ejemplo, 3-9, 17-30, 10-16 o 3-30. El resto de dirección al hueso puede incluir una secuencia que contiene tanto residuos de aspartato como residuos de glutamato.

Opcionalmente, pueden incluirse otros aminoácidos, tales como uno o más de Thr, Gly, Gln, Asn, Lys, Ser y/o Ala, dentro de las secuencias de dirección al hueso Dn o En. Como ejemplo no limitante, el resto de dirección puede incluir (DDS)n, donde n es 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10.

El resto de dirección al hueso puede incluir la totalidad o una parte de una secuencia de dirección al hueso de estaterina, una proteína de la saliva que se sabe que se une al mineral óseo. Un ejemplo de una secuencia de dirección al hueso de estaterina es DDSEEKFLRRIGRFG (SEQ ID NO: 252). La secuencia de dirección al hueso puede incluir una secuencia Dn o En conjugada con una secuencia de dirección al hueso de estaterina.

Opcionalmente, para cualquiera de las realizaciones de conjugados de dirección al hueso descritas en el presente documento, la secuencia de dirección puede estar flanqueada en el extremo N, el extremo C o ambos por un residuo de

cisteína. Puede usarse un residuo de cisteína para la conjugación del polipéptido con otro resto químico.

El resto de dirección al hueso puede incluir un anticuerpo VHH o un fragmento del mismo que incluye una secuencia de dirección al hueso. La secuencia de dirección al hueso puede colocarse dentro y/o en el extremo de un fragmento de anticuerpo VHH para producir una construcción de VHH dirigida al hueso. Un fragmento de anticuerpo VHH incluye la totalidad o una parte del dominio variable (VHH) de una IgG homodimérica de cadena pesada, como se encuentra en camélidos (por ejemplo, llama). Los anticuerpos homodiméricos carecen de cadenas ligeras (VL y CL) así como de la primera región constante de la cadena pesada (CH1) característica de los anticuerpos convencionales. Al igual que el dominio variable de los anticuerpos convencionales, el dominio variable de estos homodímeros de cadena pesada (VHH) tiene tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR), a veces denominadas CDR H1, CDR H2 y CDR H3. La CDR H3 del anticuerpo de llama puede ser hasta tres veces más larga que la CDR3 de ratón comparable. Las secuencias de VHH pueden incluir múltiples regiones flanqueantes (F) que flanquean las tres regiones CDR. Las secuencias de VHH incluyen las que son de origen natural, así como las que se identifican usando presentación en fagos, tales como MA10, MG6 y MG7 (Emelie D. Rodrigues, *Single Domain Antibodies in Tissue Engineering*, Universidad de Twente, Países Bajos, 2014). Puede prepararse una construcción de VHH dirigida al hueso que incluya al menos una secuencia de dirección al hueso, tal como Dn o En, donde n = 1 a 50. La secuencia de dirección al hueso se puede

colocar dentro de una secuencia de CDR del VHH y/o en uno o ambos extremos de la secuencia de VHH (figura 20, esquema). Una, dos o las tres CDR o partes de las mismas del VHH pueden remplazarse con una secuencia de dirección al hueso. Las partes del fragmento VHH que no incluyen una CDR, por ejemplo, las regiones flanqueantes (F), pueden funcionar como una región espaciadora en el resto de dirección al hueso. Opcionalmente, las secuencias de dirección al hueso pueden colocarse dentro de dos o las tres secuencias de CDR. Como se muestra esquemáticamente en la figura 20, F representa las regiones flanqueantes de VHH y las zonas grises incluyen las CDR H1, H2 y H3 y los segmentos finales, que pueden usarse para colocar o espaciar las secuencias de dirección al hueso.

Regiones Fc

Los polipéptidos descritos en el presente documento pueden incluir además una región Fc. Por ejemplo, una sALP puede ser un polipéptido de fusión que incluye una región Fc de una inmunoglobulina, por ejemplo, en el extremo N o extremo C del polipéptido. Una molécula de inmunoglobulina tiene una estructura que es bien conocida en la técnica. Incluye dos cadenas ligeras (~23 kDa cada una) y dos cadenas pesadas (~50-70 kDa cada una) unidas por enlaces disulfuro intercatenarios. Las inmunoglobulinas se escinden proteolíticamente con facilidad (por ejemplo, por escisión con papaína) en Fab (que contiene la cadena ligera y los dominios VH y CH1 de la cadena pesada) y Fc (que contiene los dominios CH2 y CH3 de la cadena pesada, junto con las secuencias adyacentes). Fragmentos Fc útiles como se

describe en el presente documento incluyen el fragmento Fc de cualquier molécula de inmunoglobulina, incluyendo IgG, IgM, IgA, IgD o IgE, y sus diversas subclases (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2), de cualquier mamífero (por ejemplo, ser humano). Por ejemplo, el fragmento Fc puede ser IgG1 humana.

La región Fc puede incluir la totalidad o una parte de un fragmento Fc de una IgG. La IgG puede ser IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4, o quimeras de dos o más IgG, tales como IgG2/4. Las quimeras IgG2/4 se describen, por ejemplo, en la Publicación PCT n.° WO 2007/106585, que se incorpora por la presente por referencia. El fragmento Fc puede aumentar la semivida y el tiempo en circulación del polipéptido después de su administración a un sujeto. Por ejemplo, la semivida del polipéptido puede ser de aproximadamente 10 a aproximadamente 100 horas (por ejemplo, aproximadamente 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 o 90 horas). La semivida puede variar basándose el modo de administración. Los fragmentos Fc pueden incluir, por ejemplo, los dominios CH2 y CH3 de la cadena pesada y cualquier parte de la región de bisagra. La región Fc opcionalmente puede glucosilarse en uno o más residuos aminoacídicos apropiados conocidos por los expertos en la materia. En particular, el fragmento Fc del polipéptido de fusión tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 253 o SEQ ID NO: 259, o tiene al menos un 50 % (por ejemplo, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %) de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 253 o SEQ ID NO: 259. También pueden usarse regiones Fc manipuladas, por ejemplo, que no son de

origen natural (véase, por ejemplo, la publicación de solicitud internacional n.° WO2005/007809, que se incorpora por la presente por referencia). Un fragmento Fc como se describe en el presente documento puede tener 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 50 o más adiciones, eliminaciones o sustituciones con respecto a uno cualquiera de los fragmentos Fc descritos en el presente documento.

Conectores y espaciadores

Los polipéptidos descritos en el presente documento pueden incluir uno o más conectores o espaciadores de uno o más aminoácidos. Los polipéptidos también pueden incluir uno o más residuos terminales ubicados en el extremo N o C del polipéptido. Un conector o espaciador puede incluir una secuencia de uno o más (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500 o más) aminoácidos. Puede omitirse un conector o espaciador de los polipéptidos descritos en el presente documento.

Los conectores pueden incluir cualquier aminoácido adecuado para promover la flexibilidad entre dominios adyacentes o evitar la interferencia estérica entre dominios. Además, pueden usarse conectores o espaciadores para potenciar el plegamiento proteínico, la estabilidad térmica y/o la expresión recombinante del polipéptido.

Se pueden colocar uno o más aminoácidos adicionales en el extremo N, el extremo C y/o como secuencias intermedias entre cualquiera o todos los componentes de los polipéptidos descritos en el presente documento. Por ejemplo, pueden

incluirse aminoácidos adicionales entre una región Fc y el resto de dirección al hueso. Una secuencia intermedia ilustrativa incluye una o más glicinas o serinas, tal como GGGGS (SEQ ID NO: 254), que puede colocarse entre la región Fc y la secuencia del resto de dirección al hueso. Pueden emplearse secuencias intermedias más largas para proporcionar flexibilidad adicional en algunas realizaciones.

En algunas realizaciones, el conector incluye la secuencia de $(GGGGA)_2GGGGS$ (SEQ ID NO: 255), $(GGGGQ)_2GGGGS$ (SEQ ID NO: 256), $(GGGPS)_2GGGGS$ (SEQ ID NO: 257) o $GGGGS(PGGGS)_2$ (SEQ ID NO: 258). En algunas realizaciones, el conector no incluye la secuencia de $(GGGGA)_2GGGGS$ (SEQ ID NO: 255), $(GGGGQ)_2GGGGS$ (SEQ ID NO: 256), $(GGGPS)_2GGGGS$ (SEQ ID NO: 257) o $GGGGS(PGGGS)_2$ (SEQ ID NO: 258).

Topología de los polipéptidos

Los polipéptidos descritos en el presente documento pueden incluir una o más de una sALP, un resto de dirección al hueso, una región Fc, un espaciador y un conector. Los componentes de los polipéptidos descritos en el presente documento pueden incluir cualquier topología adecuada dispuesta desde el extremo N hasta el extremo C que proporciona una función apropiada. Un polipéptido que incluye un resto de dirección al hueso puede denominarse conjugado de dirección al hueso o conjugado de Fc de dirección al hueso.

Por ejemplo, un polipéptido que incluye una sALP y una región Fc puede tener la estructura N-sALP-Fc-C o N-Fc-sALP-C. Opcionalmente, el polipéptido puede incluir además un

conector o espaciador de uno o más (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más) aminoácidos entre uno o más de estos dominios.

Un polipéptido puede incluir una sALP y un resto de dirección al hueso (BTM - *bone targeting moiety*) y tener la estructura N-sALP-BTM-C o N-BTM-sALP-C. Opcionalmente, el polipéptido puede incluir además un conector o espaciador de uno o más (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más) aminoácidos entre uno o más de estos dominios.

Un polipéptido puede incluir una sALP, una región Fc y un BTM. Un polipéptido que incluye los tres componentes puede tener la estructura N-sALP-Fc-BTM-C, N-Fc-BTM-sALP-C, N-BTM-sALP-Fc-C, N-sALP-BTM-Fc-C, N-Fc-sALP-BTM-C o N-BTM-Fc-sALP-C. Opcionalmente, el polipéptido puede incluir además un conector o espaciador de uno o más (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más) aminoácidos entre uno o más de estos dominios.

El polipéptido puede incluir o consistir en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85 % (por ejemplo, 90 %, 95 %, 97 %, 99 % o 100 %) de identidad de secuencia con una cualquiera de SEQ ID NO: 7-223, 247 y 262-264. Por ejemplo, el polipéptido puede incluir o consistir en la secuencia de una cualquiera de SEQ ID NO: 72, 123, 155 o 177. El polipéptido puede incluir o consistir en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85 % (por ejemplo, 90 %, 95 %, 97 %, 99 % o 100 %) de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 123, en el que, opcionalmente, el polipéptido contiene una o más de las siguientes modificaciones: E108M, N213Q y N286Q. El polipéptido puede incluir o consistir en SEQ ID NO: 123. El polipéptido puede

incluir o consistir en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85 % (por ejemplo, al menos un 90 %, 95 %, 97 %, 99 % o 100 %) de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 177. El polipéptido puede incluir o consistir en SEQ ID NO: 177. El polipéptido puede incluir o consistir en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85 % (por ejemplo, 90 %, 95 %, 97 %, 99 % o 100 %) de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 260 o 261. El polipéptido puede incluir o consistir en la secuencia de SEQ ID NO: 260. El polipéptido puede incluir o consistir en la secuencia de SEQ ID NO: 261. El polipéptido puede incluir un péptido señal de secreción. El polipéptido puede incluir o consistir en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85 % (por ejemplo, 90 %, 95 %, 97 %, 99 % o 100 %) de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 263 o 264. El polipéptido puede incluir o consistir en la secuencia de SEQ ID NO: 263. El polipéptido puede incluir o consistir en la secuencia de SEQ ID NO: 264. El polipéptido puede incluir cualquier dominio catalítico de sALP, isotipo IgG de Fc (por ejemplo, Fc de IgG2/4) o resto de dirección al hueso enumerado en la tabla 1, y permutaciones topológicas de los mismos. El polipéptido puede incluir cualquier dominio individual enumerado en la tabla 1.

Tabla 1: Construcciones ilustrativas de sALP

Nombre	**Descripción del dominio catalítico de péptido maduro**	**Isotipo de IgG de Fc**	**Resto de dirección al hueso**	**Identificador de secuencia**
ALP001	TNSALP humana (1-491)	IgG2/4	D10	SEQ ID NO: 7
ALP002	PALP humana (1-486)	IgG2/4	D10	SEQ ID NO: 8
ALP003	GALP humana (1-486)	IgG2/4	D10	SEQ ID NO: 9
ALP004	IALP humana (1-486)	IgG2/4	D10	SEQ ID NO: 10

Nombre	**Descripción del dominio catalítico de péptido maduro**	**Isotipo de IgG de Fc**	**Resto de dirección al hueso**	**Identificador de secuencia**
ALP009	TNSALP de macaco	IgG2/4	D10	SEQ ID NO: 11
ALP010	TNSALP de ratón	IgG2/4	D10	SEQ ID NO: 12
ALP011	TNSALP humana (1-491) N213Q	IgG2/4	D10	SEQ ID NO: 13
ALP012	TNSALP humana (1-491) N286Q	IgG2/4	D10	SEQ ID NO: 14

Nombre	**Descripción del dominio catalítico de péptido maduro**	**Isotipo de IgG de Fc**	**Resto de dirección al hueso**	**Identificador de secuencia**
ALP013	TNSALP humana (1-491) N413Q	IgG2/4	D10	SEQ ID NO: 15
ALP014	PALP humana (1-486) + SS	IgG2/4	D10	SEQ ID NO: 16
ALP015	PALP humana (1-486) + HP	IgG2/4	D10	SEQ ID NO: 17

Nombre	**Descripción del dominio catalítico de péptido maduro**	**Isotipo de IgG de Fc**	**Resto de dirección al hueso**	**Identificador de secuencia**
ALP016	IALP humana (1-486) + SS	IgG2/4	D10	SEQ ID NO: 18
ALP017	IALP humana (1-486) + HP	IgG2/4	D10	SEQ ID NO: 19
ALP018	PALP humana (1-486)	IgG1	D10	SEQ ID NO: 20
ALP019	IALP humana (1-486)	IgG1	D10	SEQ ID NO: 21

Nombre	**Descripción del dominio catalítico de péptido maduro**	**Isotipo de IgG de Fc**	**Resto de dirección al hueso**	**Identificador de secuencia**
ALP021	TNSALP humana + S	IgG2/4	D10	SEQ ID NO: 22
ALP022	TNSALP humana + SS	IgG2/4	D10	SEQ ID NO: 23
ALP023	TNSALP humana (1-491) N213Q, N286Q	IgG2/4	D10	SEQ ID NO: 24
ALP024	IALP humana (1-486) S429E	IgG2/4	D10	SEQ ID NO: 25

Nombre	**Descripción del dominio catalítico de péptido maduro**	**Isotipo de IgG de Fc**	**Resto de dirección al hueso**	**Identificador de secuencia**
ALP025	IALP humana (1-486) W245R	IgG2/4	D10	SEQ ID NO: 26
ALP026	IALP humana (1-486) C481G	IgG2/4	D10	SEQ ID NO: 27
ALP028	TNSALP humana (1-491), N213Q, N286Q + S	IgG2/4	D10	SEQ ID NO: 28

Nombre	**Descripción del dominio catalítico de péptido maduro**	**Isotipo de IgG de Fc**	**Resto de dirección al hueso**	**Identificador de secuencia**
ALP029	TNSALP humana (1-491), N213Q, N286Q + SS	IgG2/4	D10	SEQ ID NO: 29
ALP030	IALP humana (1-486) S429E, C481G	IgG2/4	D10	SEQ ID NO: 30

Nombre	**Descripción del dominio catalítico de péptido maduro**	**Isotipo de IgG de Fc**	**Resto de dirección al hueso**	**Identificador de secuencia**
ALP031	IALP humana (1-486) W245R, S429E, C481G	IgG2/4	D10	SEQ ID NO: 31
ALP032	TNSALP humana (1-491) N123Q, N213Q, N286Q	IgG2/4	D10	SEQ ID NO: 32

Nombre	**Descripción del dominio catalítico de péptido maduro**	**Isotipo de IgG de Fc**	**Resto de dirección al hueso**	**Identificador de secuencia**
ALP033	TNSALP humana (1-491) N213Q, N254Q, N286Q	IgG2/4	D10	SEQ ID NO: 33
ALP034	TNSALP humana (1-491) N213Q, N286Q, N564Q	IgG2/4	D10	SEQ ID NO: 34

Nombre	**Descripción del dominio catalítico de péptido maduro**	**Isotipo de IgG de Fc**	**Resto de dirección al hueso**	**Identificador de secuencia**
ALP035	TNSALP humana (1-491) E108A, N213Q, N286Q	IgG2/4	D10	SEQ ID NO: 35
ALP038	TNSALP humana (1-491) N564Q	IgG2/4	D10	SEQ ID NO: 36
ALP039	TNSALP humana (1-491) E108A	IgG2/4	D10	SEQ ID NO: 37

Nombre	**Descripción del dominio catalítico de péptido maduro**	**Isotipo de IgG de Fc**	**Resto de dirección al hueso**	**Identificador de secuencia**
ALP042	IALP humana (1-486) W245R, S428R, S429E, C481G	IgG2/4	D10	SEQ ID NO: 38
ALP043	IALP humana (1-486) W245R, S429H, C481G	IgG2/4	D10	SEQ ID NO: 39

Nombre	**Descripción del dominio catalítico de péptido maduro**	**Isotipo de IgG de Fc**	**Resto de dirección al hueso**	**Identificador de secuencia**
ALP044	IALP humana (1-486) W245R, S428R, S429H, C481G	IgG2/4	D10	SEQ ID NO: 40
ALP046	IALP humana (1-486) W245R, S429E, C481G, N559Q	IgG2/4	D10	SEQ ID NO: 41

Nombre	**Descripción del dominio catalítico de péptido maduro**	**Isotipo de IgG de Fc**	**Resto de dirección al hueso**	**Identificador de secuencia**
ALP047	IALP humana (1-486) W245R, N410Q, S429E, C481G	IgG2/4	D10	SEQ ID NO: 42
ALP048	IALP humana (1-486) W245R, N249Q, S429E, C481G	IgG2/4	D10	SEQ ID NO: 43

Nombre	**Descripción del dominio catalítico de péptido maduro**	**Isotipo de IgG de Fc**	**Resto de dirección al hueso**	**Identificador de secuencia**
ALP049	IALP humana (1-486) N122Q, W245R, S429E, C481G	IgG2/4	D10	SEQ ID NO: 44
ALP051	IALP humana (1-486) N122Q, W245R, N410Q, S429E, C481G	IgG2/4	D10	SEQ ID NO: 45

Nombre	**Descripción del dominio catalítico de péptido maduro**	**Isotipo de IgG de Fc**	**Resto de dirección al hueso**	**Identificador de secuencia**
ALP052	IALP humana (1-486) N122Q, W245R, S429E, C481G, N559Q	IgG2/4	D10	SEQ ID NO: 46
ALP053	IALP humana (1-486) W245R, N249Q, N410Q, S429E, C481G	IgG2/4	D10	SEQ ID NO: 47

Nombre	**Descripción del dominio catalítico de péptido maduro**	**Isotipo de IgG de Fc**	**Resto de dirección al hueso**	**Identificador de secuencia**
ALP054	IALP humana (1-486) W245R, N249Q, S429E, C481G, N559Q	IgG2/4	D10	SEQ ID NO: 48
ALP055	IALP humana (1-486) W245R, N410Q, S429E, C481G, N559Q	IgG2/4	D10	SEQ ID NO: 49

Nombre	**Descripción del dominio catalítico de péptido maduro**	**Isotipo de IgG de Fc**	**Resto de dirección al hueso**	**Identificador de secuencia**
ALP056	IALP humana (1-486) N122Q, W245R, S428R, S429E, C481G	IgG2/4	D10	SEQ ID NO: 50
ALP057	IALP humana (1-486) W245R, N249Q, S428R, S429E, C481G	IgG2/4	D10	SEQ ID NO: 51

Nombre	**Descripción del dominio catalítico de péptido maduro**	**Isotipo de IgG de Fc**	**Resto de dirección al hueso**	**Identificador de secuencia**
ALP058	IALP humana (1-486) W245R, N410Q, S428R, S429E, C481G	IgG2/4	D10	SEQ ID NO: 52
ALP059	IALP humana (1-486) W245R, S428R, S429E, C481G, N559Q	IgG2/4	D10	SEQ ID NO: 53

Nombre	**Descripción del dominio catalítico de péptido maduro**	**Isotipo de IgG de Fc**	**Resto de dirección al hueso**	**Identificador de secuencia**
ALP060	IALP humana (1-486) N122Q, W245R, S429H, C481G	IgG2/4	D10	SEQ ID NO: 54
ALP061	IALP humana (1-486) W245R, N249Q, S429H, C481G	IgG2/4	D10	SEQ ID NO: 55

Nombre	**Descripción del dominio catalítico de péptido maduro**	**Isotipo de IgG de Fc**	**Resto de dirección al hueso**	**Identificador de secuencia**
ALP062	IALP humana (1-486) W245R, N410Q, S429H, C481G	IgG2/4	D10	SEQ ID NO: 56
ALP063	IALP humana (1-486) W245R, S429H, C481G, N559Q	IgG2/4	D10	SEQ ID NO: 57

Nombre	**Descripción del dominio catalítico de péptido maduro**	**Isotipo de IgG de Fc**	**Resto de dirección al hueso**	**Identificador de secuencia**
ALP089	IALP humana (1-486) N122Q, W245R, N249Q, N410Q, S429E, C481G	IgG2/4	D10	SEQ ID NO: 58

Nombre	**Descripción del dominio catalítico de péptido maduro**	**Isotipo de IgG de Fc**	**Resto de dirección al hueso**	**Identificador de secuencia**
ALP090	IALP humana (1-486) N122Q, W245R, N249Q, S429E, C481G, N559Q	IgG2/4	D10	SEQ ID NO: 59

Nombre	**Descripción del dominio catalítico de péptido maduro**	**Isotipo de IgG de Fc**	**Resto de dirección al hueso**	**Identificador de secuencia**
ALP091	IALP humana (1-486) N122Q, W245R, N410Q, S429E, C481G, N559Q	IgG2/4	D10	SEQ ID NO: 60

Nombre	**Descripción del dominio catalítico de péptido maduro**	**Isotipo de IgG de Fc**	**Resto de dirección al hueso**	**Identificador de secuencia**
ALP092	IALP humana (1-486) W245R, N249Q, N410Q, S429E, C481G, N559Q	IgG2/4	D10	SEQ ID NO: 61

Nombre	**Descripción del dominio catalítico de péptido maduro**	**Isotipo de IgG de Fc**	**Resto de dirección al hueso**	**Identificador de secuencia**
ALP093	IALP humana (1-486) N122Q, W245R, N249Q, N410Q, S429E, C481G, N559Q	IgG2/4	D10	SEQ ID NO: 62
ALP130	TNSALP humana (1-491) E108R	IgG2/4	D10	SEQ ID NO: 63

Nombre	**Descripción del dominio catalítico de péptido maduro**	**Isotipo de IgG de Fc**	**Resto de dirección al hueso**	**Identificador de secuencia**
ALP131	TNSALP humana (1-491) E108N	IgG2/4	D10	SEQ ID NO: 64
ALP132	TNSALP humana (1-491) E108D	IgG2/4	D10	SEQ ID NO: 65
ALP133	TNSALP humana (1-491) E108Q	IgG2/4	D10	SEQ ID NO: 66

Nombre	**Descripción del dominio catalítico de péptido maduro**	**Isotipo de IgG de Fc**	**Resto de dirección al hueso**	**Identificador de secuencia**
ALP134	TNSALP humana (1-491) E108G	IgG2/4	D10	SEQ ID NO: 67
ALP135	TNSALP humana (1-491) E108H	IgG2/4	D10	SEQ ID NO: 68
ALP136	TNSALP humana (1-491) E108I	IgG2/4	D10	SEQ ID NO: 69

Nombre	**Descripción del dominio catalítico de péptido maduro**	**Isotipo de IgG de Fc**	**Resto de dirección al hueso**	**Identificador de secuencia**
ALP137	TNSALP humana (1-491) E108L	IgG2/4	D10	SEQ ID NO: 70
ALP138	TNSALP humana (1-491) E108K	IgG2/4	D10	SEQ ID NO:71
ALP139	TNSALP humana (1-491) E108M	IgG2/4	D10	SEQ ID NO: 72

Nombre	**Descripción del dominio catalítico de péptido maduro**	**Isotipo de IgG de Fc**	**Resto de dirección al hueso**	**Identificador de secuencia**
ALP140	TNSALP humana (1-491) E108F	IgG2/4	D10	SEQ ID NO: 73
ALP141	TNSALP humana (1-491) E108P	IgG2/4	D10	SEQ ID NO: 74
ALP142	TNSALP humana (1-491) E108S	IgG2/4	D10	SEQ ID NO: 75

Nombre	**Descripción del dominio catalítico de péptido maduro**	**Isotipo de IgG de Fc**	**Resto de dirección al hueso**	**Identificador de secuencia**
ALP143	TNSALP humana (1-491) E108T	IgG2/4	D10	SEQ ID NO: 76
ALP144	TNSALP humana (1-491) E108W	IgG2/4	D10	SEQ ID NO: 77
ALP145	TNSALP humana (1-491) E108Y	IgG2/4	D10	SEQ ID NO: 78

Nombre	**Descripción del dominio catalítico de péptido maduro**	**Isotipo de IgG de Fc**	**Resto de dirección al hueso**	**Identificador de secuencia**
ALP146	TNSALP humana (1-491) E108V	IgG2/4	D10	SEQ ID NO: 79
ALP147	TNSALP humana (1-491) M384A	IgG2/4	D10	SEQ ID NO: 80
ALP148	TNSALP humana (1-491) M384R	IgG2/4	D10	SEQ ID NO: 81

Nombre	**Descripción del dominio catalítico de péptido maduro**	**Isotipo de IgG de Fc**	**Resto de dirección al hueso**	**Identificador de secuencia**
ALP149	TNSALP humana (1-491) M384N	IgG2/4	D10	SEQ ID NO: 82
ALP150	TNSALP humana (1-491) M384D	IgG2/4	D10	SEQ ID NO: 83
ALP151	TNSALP humana (1-491) M384Q	IgG2/4	D10	SEQ ID NO: 84

Nombre	**Descripción del dominio catalítico de péptido maduro**	**Isotipo de IgG de Fc**	**Resto de dirección al hueso**	**Identificador de secuencia**
ALP152	TNSALP humana (1-491) M384E	IgG2/4	D10	SEQ ID NO: 85
ALP153	TNSALP humana (1-491) M384G	IgG2/4	D10	SEQ ID NO: 86
ALP154	TNSALP humana (1-491) M384H	IgG2/4	D10	SEQ ID NO: 87

Nombre	**Descripción del dominio catalítico de péptido maduro**	**Isotipo de IgG de Fc**	**Resto de dirección al hueso**	**Identificador de secuencia**
ALP155	TNSALP humana (1-491) M384I	IgG2/4	D10	SEQ ID NO: 88
ALP156	TNSALP humana (1-491) M384L	IgG2/4	D10	SEQ ID NO: 89
ALP157	TNSALP humana (1-491) M384K	IgG2/4	D10	SEQ ID NO: 90

Nombre	**Descripción del dominio catalítico de péptido maduro**	**Isotipo de IgG de Fc**	**Resto de dirección al hueso**	**Identificador de secuencia**
ALP158	TNSALP humana (1-491) M384F	IgG2/4	D10	SEQ ID NO: 91
ALP159	TNSALP humana (1-491) M384S	IgG2/4	D10	SEQ ID NO: 92
ALP160	TNSALP humana (1-491) M384T	IgG2/4	D10	SEQ ID NO: 93

Nombre	**Descripción del dominio catalítico de péptido maduro**	**Isotipo de IgG de Fc**	**Resto de dirección al hueso**	**Identificador de secuencia**
ALP161	TNSALP humana (1-491) M384Y	IgG2/4	D10	SEQ ID NO: 94
ALP162	TNSALP humana (1-491) M384V	IgG2/4	D10	SEQ ID NO: 95
ALP163	TNSALP humana (1-491) L385V	IgG2/4	D10	SEQ ID NO: 96

Nombre	**Descripción del dominio catalítico de péptido maduro**	**Isotipo de IgG de Fc**	**Resto de dirección al hueso**	**Identificador de secuencia**
ALP164	TNSALP humana (1-491) L385K	IgG2/4	D10	SEQ ID NO: 97
ALP165	TNSALP humana (1-491) L385A	IgG2/4	D10	SEQ ID NO: 98
ALP166	TNSALP humana (1-491) L385N	IgG2/4	D10	SEQ ID NO: 99

Nombre	**Descripción del dominio catalítico de péptido maduro**	**Isotipo de IgG de Fc**	**Resto de dirección al hueso**	**Identificador de secuencia**
ALP167	TNSALP humana (1-491) L385H	IgG2/4	D10	SEQ ID NO: 100
ALP168	TNSALP humana (1-491) L385Q	IgG2/4	D10	SEQ ID NO: 101
ALP169	TNSALP humana (1-491) L385S	IgG2/4	D10	SEQ ID NO:102

Nombre	**Descripción del dominio catalítico de péptido maduro**	**Isotipo de IgG de Fc**	**Resto de dirección al hueso**	**Identificador de secuencia**
ALP170	TNSALP humana (1-491) L385T	IgG2/4	D10	SEQ ID NO:103
ALP171	IALP humana (1-486) W245R, S428A, S429H, C481G	IgG2/4	D10	SEQ ID NO: 104

Nombre	**Descripción del dominio catalítico de péptido maduro**	**Isotipo de IgG de Fc**	**Resto de dirección al hueso**	**Identificador de secuencia**
ALP172	IALP humana (1-486) W245R, S428N, S429H, C481G	IgG2/4	D10	SEQ ID NO:105
ALP173	IALP humana (1-486) W245R, S428D, S429H, C481G	IgG2/4	D10	SEQ ID NO: 106

Nombre	**Descripción del dominio catalítico de péptido maduro**	**Isotipo de IgG de Fc**	**Resto de dirección al hueso**	**Identificador de secuencia**
ALP174	IALP humana (1-486) W245R, S428Q, S429H, C481G	IgG2/4	D10	SEQ ID NO: 107
ALP175	IALP humana (1-486) W245R, S428G, S429H, C481G	IgG2/4	D10	SEQ ID NO: 108

Nombre	**Descripción del dominio catalítico de péptido maduro**	**Isotipo de IgG de Fc**	**Resto de dirección al hueso**	**Identificador de secuencia**
ALP176	IALP humana (1-486) W245R, S428H, S429H, C481G	IgG2/4	D10	SEQ ID NO:109
ALP177	IALP humana (1-486) W245R, S428I, S429H, C481G	IgG2/4	D10	SEQ ID NO:110

Nombre	**Descripción del dominio catalítico de péptido maduro**	**Isotipo de IgG de Fc**	**Resto de dirección al hueso**	**Identificador de secuencia**
ALP178	IALP humana (1-486) W245R, S428L, S429H, C481G	IgG2/4	D10	SEQ ID NO: 111
ALP179	IALP humana (1-486) W245R, S428K, S429H, C481G	IgG2/4	D10	SEQ ID NO:112

Nombre	**Descripción del dominio catalítico de péptido maduro**	**Isotipo de IgG de Fc**	**Resto de dirección al hueso**	**Identificador de secuencia**
ALP180	IALP humana (1-486) W245R, S428M, S429H, C481G	IgG2/4	D10	SEQ ID NO: 113
ALP181	IALP humana (1-486) W245R, S428F, S429H, C481G	IgG2/4	D10	SEQ ID NO: 114

Nombre	**Descripción del dominio catalítico de péptido maduro**	**Isotipo de IgG de Fc**	**Resto de dirección al hueso**	**Identificador de secuencia**
ALP182	IALP humana (1-486) W245R, S428T, S429H, C481G	IgG2/4	D10	SEQ ID NO: 115
ALP183	IALP humana (1-486) W245R, S428Y, S429H, C481G	IgG2/4	D10	SEQ ID NO: 116

Nombre	**Descripción del dominio catalítico de péptido maduro**	**Isotipo de IgG de Fc**	**Resto de dirección al hueso**	**Identificador de secuencia**
ALP184	IALP humana (1-486) W245R, S428V, S429H, C481G	IgG2/4	D10	SEQ ID NO: 117
ALP185	IALP humana (1-486) W245R, S428D, S429E, C481G	IgG2/4	D10	SEQ ID NO: 118

Nombre	**Descripción del dominio catalítico de péptido maduro**	**Isotipo de IgG de Fc**	**Resto de dirección al hueso**	**Identificador de secuencia**
ALP186	IALP humana (1-486) W245R, S428E, S429E, C481G	IgG2/4	D10	SEQ ID NO: 119
ALP187	IALP humana (1-486) W245R, S428T, S429E, C481G	IgG2/4	D10	SEQ ID NO: 120

Nombre	**Descripción del dominio catalítico de péptido maduro**	**Isotipo de IgG de Fc**	**Resto de dirección al hueso**	**Identificador de secuencia**
ALP188	IALP humana (1-486) W245R, S428V, S429E, C481G	IgG2/4	D10	SEQ ID NO: 121
ALP200	TNSALP humana (1-491) E108Q, N213Q, N286Q	IgG2/4	D10	SEQ ID NO: 122

Nombre	**Descripción del dominio catalítico de péptido maduro**	**Isotipo de IgG de Fc**	**Resto de dirección al hueso**	**Identificador de secuencia**
ALP201	TNSALP humana (1-491) E108M, N213Q, N286Q	IgG2/4	D10	SEQ ID NO: 123
ALP202	TNSALP humana (1-491) E108L, N213Q, N286Q	IgG2/4	D10	SEQ ID NO: 124

Nombre	**Descripción del dominio catalítico de péptido maduro**	**Isotipo de IgG de Fc**	**Resto de dirección al hueso**	**Identificador de secuencia**
ALP203	TNSALP humana (1-491) E108K, N213Q, N286Q	IgG2/4	D10	SEQ ID NO: 125
ALP204	TNSALP humana (1-491) E108S, N213Q, N286Q	IgG2/4	D10	SEQ ID NO: 126

Nombre	**Descripción del dominio catalítico de péptido maduro**	**Isotipo de IgG de Fc**	**Resto de dirección al hueso**	**Identificador de secuencia**
ALP205	TNSALP humana (1-491) E108T, N213Q, N286Q	IgG2/4	D10	SEQ ID NO: 127
ALP206	IALP humana (1-486) W245R, N410Q, S429H, C481G	IgG2/4	D10	SEQ ID NO: 128

Nombre	**Descripción del dominio catalítico de péptido maduro**	**Isotipo de IgG de Fc**	**Resto de dirección al hueso**	**Identificador de secuencia**
ALP207	IALP humana (1-486) W245R, N249Q, S429H, C481G	IgG2/4	D10	SEQ ID NO: 129
ALP208	IALP humana (1-486) N122Q, W245R, S429H, C481G	IgG2/4	D10	SEQ ID NO: 130

Nombre	**Descripción del dominio catalítico de péptido maduro**	**Isotipo de IgG de Fc**	**Resto de dirección al hueso**	**Identificador de secuencia**
ALP209	IALP humana (1-486) N122Q, W245R, N249Q, S429H, C481G	IgG2/4	D10	SEQ ID NO: 131
ALP210	IALP humana (1-486) N122Q, W245R, N410Q, S429H, C481G	IgG2/4	D10	SEQ ID NO: 132

Nombre	**Descripción del dominio catalítico de péptido maduro**	**Isotipo de IgG de Fc**	**Resto de dirección al hueso**	**Identificador de secuencia**
ALP211	IALP humana (1-486) W245R, N249Q, S429H, C481G, N559Q	IgG2/4	D10	SEQ ID NO: 133
ALP212	IALP humana (1-486) N122Q, W245R, N249Q, N410Q, S429H, C481G	IgG2/4	D10	SEQ ID NO: 134

Nombre	**Descripción del dominio catalítico de péptido maduro**	**Isotipo de IgG de Fc**	**Resto de dirección al hueso**	**Identificador de secuencia**
ALP213	IALP humana (1-486) W245R, N410Q, S428D, S429H, C481G	IgG2/4	D10	SEQ ID NO: 135
ALP214	IALP humana (1-486) W245R, N249Q, S428D, S429H, C481G	IgG2/4	D10	SEQ ID NO: 136

Nombre	**Descripción del dominio catalítico de péptido maduro**	**Isotipo de IgG de Fc**	**Resto de dirección al hueso**	**Identificador de secuencia**
ALP215	IALP humana (1-486) N122Q, W245R, S428D, S429H, C481G	IgG2/4	D10	SEQ ID NO: 137
ALP216	IALP humana (1-486) N122Q, W245R, N249Q, S428D, S429H, C481G	IgG2/4	D10	SEQ ID NO: 138

Nombre	**Descripción del dominio catalítico de péptido maduro**	**Isotipo de IgG de Fc**	**Resto de dirección al hueso**	**Identificador de secuencia**
ALP217	IALP humana (1-486) N122Q, W245R, N410Q, S428D, S429H, C481G	IgG2/4	D10	SEQ ID NO: 139

Nombre	**Descripción del dominio catalítico de péptido maduro**	**Isotipo de IgG de Fc**	**Resto de dirección al hueso**	**Identificador de secuencia**
ALP218	IALP humana (1-486) W245R, N249Q, S428D, S429H, C481G, N559Q	IgG2/4	D10	SEQ ID NO: 140

Nombre	**Descripción del dominio catalítico de péptido maduro**	**Isotipo de IgG de Fc**	**Resto de dirección al hueso**	**Identificador de secuencia**
ALP219	IALP humana (1-486) N122Q, W245R, N249Q, N410Q, S428D, S429H, C481G	IgG2/4	D10	SEQ ID NO: 141

Nombre	**Descripción del dominio catalítico de péptido maduro**	**Isotipo de IgG de Fc**	**Resto de dirección al hueso**	**Identificador de secuencia**
ALP220	IALP humana (1-486) W245R, N410Q, S428Q, S429H, C481G	IgG2/4	D10	SEQ ID NO:142
ALP221	IALP humana (1-486) W245R, N249Q, S428Q, S429H, C481G	IgG2/4	D10	SEQ ID NO: 143

Nombre	**Descripción del dominio catalítico de péptido maduro**	**Isotipo de IgG de Fc**	**Resto de dirección al hueso**	**Identificador de secuencia**
ALP222	IALP humana (1-486) N122Q, W245R, S428Q, S429H, C481G	IgG2/4	D10	SEQ ID NO: 144
ALP223	IALP humana (1-486) N122Q, W245R, N249Q, S428Q, S429H, C481G	IgG2/4	D10	SEQ ID NO: 145

Nombre	**Descripción del dominio catalítico de péptido maduro**	**Isotipo de IgG de Fc**	**Resto de dirección al hueso**	**Identificador de secuencia**
ALP224	IALP humana (1-486) N122Q, W245R, N410Q, S428Q, S429H, C481G	IgG2/4	D10	SEQ ID NO: 146

Nombre	**Descripción del dominio catalítico de péptido maduro**	**Isotipo de IgG de Fc**	**Resto de dirección al hueso**	**Identificador de secuencia**
ALP225	IALP humana (1-486) W245R, N249Q, S428Q, S429H, C481G, N559Q	IgG2/4	D10	SEQ ID NO: 147

Nombre	**Descripción del dominio catalítico de péptido maduro**	**Isotipo de IgG de Fc**	**Resto de dirección al hueso**	**Identificador de secuencia**
ALP226	IALP humana (1-486) N122Q, W245R, N249Q, N410Q, S428Q, S429H, C481G	IgG2/4	D10	SEQ ID NO: 148
ALP229	TNSALP humana (1-491) E108M, N213Q, N286Q	IgG2,4	D1	SEQ ID NO: 149

Nombre	**Descripción del dominio catalítico de péptido maduro**	**Isotipo de IgG de Fc**	**Resto de dirección al hueso**	**Identificador de secuencia**
ALP230	TNSALP humana (1-491) E108M, N213Q, N286Q	IgG2,4	D2	SEQ ID NO: 150
ALP231	TNSALP humana (1-491) E108M, N213Q, N286Q	IgG2,4	D3	SEQ ID NO: 151

Nombre	**Descripción del dominio catalítico de péptido maduro**	**Isotipo de IgG de Fc**	**Resto de dirección al hueso**	**Identificador de secuencia**
ALP232	TNSALP humana (1-491) E108M, N213Q, N286Q	IgG2,4	D4	SEQ ID NO: 152
ALP233	TNSALP humana (1-491) E108M, N213Q, N286Q	IgG2,4	D5	SEQ ID NO: 153

Nombre	**Descripción del dominio catalítico de péptido maduro**	**Isotipo de IgG de Fc**	**Resto de dirección al hueso**	**Identificador de secuencia**
ALP234	TNSALP humana (1-491) E108M, N213Q, N286Q	IgG2,4	D6	SEQ ID NO: 154
ALP235	TNSALP humana (1-491) E108M, N213Q, N286Q	IgG2,4	D7	SEQ ID NO: 155

Nombre	**Descripción del dominio catalítico de péptido maduro**	**Isotipo de IgG de Fc**	**Resto de dirección al hueso**	**Identificador de secuencia**
ALP236	TNSALP humana (1-491) E108M, N213Q, N286Q	IgG2,4	D8	SEQ ID NO: 156
ALP237	TNSALP humana (1-491) E108M, N213Q, N286Q	IgG2,4	D9	SEQ ID NO: 157

Nombre	**Descripción del dominio catalítico de péptido maduro**	**Isotipo de IgG de Fc**	**Resto de dirección al hueso**	**Identificador de secuencia**
ALP238	TNSALP humana (1-491) E108M, N213Q, N286Q	IgG2,4	E1	SEQ ID NO: 158
ALP239	TNSALP humana (1-491) E108M, N213Q, N286Q	IgG2,4	E5	SEQ ID NO: 159

Nombre	**Descripción del dominio catalítico de péptido maduro**	**Isotipo de IgG de Fc**	**Resto de dirección al hueso**	**Identificador de secuencia**
ALP240	TNSALP humana (1-491) E108M, N213Q, N286Q	IgG2,4	E10	SEQ ID NO: 160
ALP241	TNSALP humana (1-491) E108M, N213Q, N286Q	IgG2,4	E15	SEQ ID NO: 161

Nombre	**Descripción del dominio catalítico de péptido maduro**	**Isotipo de IgG de Fc**	**Resto de dirección al hueso**	**Identificador de secuencia**
ALP242	TNSALP humana (1-491) E108M, N213Q, N286Q	IgG2,4	E20	SEQ ID NO: 162
ALP243	TNSALP humana (1-491) E108M, N213Q, N286Q	IgG2,4	DDS	SEQ ID NO: 163

Nombre	**Descripción del dominio catalítico de péptido maduro**	**Isotipo de IgG de Fc**	**Resto de dirección al hueso**	**Identificador de secuencia**
ALP244	TNSALP humana (1-491) E108M, N213Q, N286Q	IgG2,4	DDSDDS	SEQ ID NO: 164
ALP245	TNSALP humana (1-491) E108M, N213Q, N286Q	IgG2,4	DDSDDSDDS	SEQ ID NO: 165

Nombre	**Descripción del dominio catalítico de péptido maduro**	**Isotipo de IgG de Fc**	**Resto de dirección al hueso**	**Identificador de secuencia**
ALP246	TNSALP humana (1-491) E108M, N213Q, N286Q	IgG2,4	EES	SEQ ID NO: 166
ALP247	TNSALP humana (1-491) E108M, N213Q, N286Q	IgG2,4	EESEES	SEQ ID NO: 167

Nombre	**Descripción del dominio catalítico de péptido maduro**	**Isotipo de IgG de Fc**	**Resto de dirección al hueso**	**Identificador de secuencia**
ALP248	TNSALP humana (1-491) E108M, N213Q, N286Q	IgG2,4	EESEESEES	SEQ ID NO: 168
ALP249	TNSALP humana (1-491) E108M, N213Q, N286Q	IgG2,4	DAD	SEQ ID NO: 169

Nombre	**Descripción del dominio catalítico de péptido maduro**	**Isotipo de IgG de Fc**	**Resto de dirección al hueso**	**Identificador de secuencia**
ALP250	TNSALP humana (1-491) E108M, N213Q, N286Q	IgG2,4	DADDAD	SEQ ID NO: 170
ALP251	TNSALP humana (1-491) E108M, N213Q, N286Q	IgG2,4	DADDADDAD	SEQ ID NO: 171

Nombre	**Descripción del dominio catalítico de péptido maduro**	**Isotipo de IgG de Fc**	**Resto de dirección al hueso**	**Identificador de secuencia**
ALP257	TNSALP (1-491) E108M, N213Q, N286Q	IgG2/4	D9	SEQ ID NO: 175
ALP258	TNSALP (1-491) E108M, N213Q, N286Q	IgG2/4	D8	SEQ ID NO: 176

Nombre	**Descripción del dominio catalítico de péptido maduro**	**Isotipo de IgG de Fc**	**Resto de dirección al hueso**	**Identificador de secuencia**
ALP259	TNSALP (1-491) E108M, N213Q, N286Q	IgG2/4	D7	SEQ ID NO: 177
ALP104	TNSALP humana (1-491) N213Q, N286Q	IgG2/4	N-terminal DSSEEKFLRRIGRFGGGGGS	SEQ ID NO: 178
ALP105	TNSALP humana (1-491) N213Q, N286Q	IgG2/4	C-terminal GGGGSDDDEEKFLRRIGRFG	SEQ ID NO: 179

Nombre	**Descripción del dominio catalítico de péptido maduro**	**Isotipo de IgG de Fc**	**Resto de dirección al hueso**	**Identificador de secuencia**
ALP106	TNSALP humana (1-491) N213Q, N286Q	IgG2/4	N-terminal DDDEEKFLRRIGRFGGGGGS	SEQ ID NO: 180
ALP107	TNSALP humana (1-491) N213Q, N286Q	IgG2/4	C-terminal GGGGSDDDDDDDDKFLRRIGRFG	SEQ ID NO: 181
ALP108	TNSALP humana (1-491) N213Q, N286Q	IgG2/4	N-terminal DDDDDDDDKFLRRIGRFGGGGGS	SEQ ID NO: 182

Nombre	**Descripción del dominio catalítico de péptido maduro**	**Isotipo de IgG de Fc**	**Resto de dirección al hueso**	**Identificador de secuencia**
ALP109	TNSALP humana (1-491) N213Q, N286Q	IgG2/4	C-terminal GGGGSDDDDDDDDDDKFLRRIGRFG	SEQ ID NO: 183
ALP110	TNSALP humana (1-491) N213Q, N286Q	IgG2/4	N-terminal DDDDDDDDDDKFLRRIGRFGGGGGS	SEQ ID NO: 184
ALP111	TNSALP humana (1-491) N213Q, N286Q	IgG2/4	C-terminal GGGGSEEEEEEEEKFLRRIGRFG	SEQ ID NO: 185

Nombre	**Descripción del dominio catalítico de péptido maduro**	**Isotipo de IgG de Fc**	**Resto de dirección al hueso**	**Identificador de secuencia**
ALP112	TNSALP humana (1-491) N213Q, N286Q	IgG2/4	N-terminal EEEEEEEEKFLRRIGRFGGGGGS	SEQ ID NO: 186
ALP113	TNSALP humana (1-491) N213Q, N286Q	IgG2/4	C-terminal GGGGSDDDEEEEKFLRRIGRFG	SEQ ID NO: 187
ALP114	TNSALP humana (1-491) N213Q, N286Q	IgG2/4	N-terminal DDDEEEEKFLRRIGRFGGGGGS	SEQ ID NO: 188

Nombre	**Descripción del dominio catalítico de péptido maduro**	**Isotipo de IgG de Fc**	**Resto de dirección al hueso**	**Identificador de secuencia**
ALP115	TNSALP humana (1-491) N213Q, N286Q	IgG2/4	C-terminal GGGGSDDDEEKFFRRFGRFG	SEQ ID NO: 189
ALP116	TNSALP humana (1-491) N213Q, N286Q	IgG2/4	N-terminal DDDEEKFFRRFGRFGGGGGS	SEQ ID NO: 190
ALP117	TNSALP humana (1-491) N213Q, N286Q	IgG2/4	C-terminal GGGGSDDDEEKFLRRIRRFDGRFG	SEQ ID NO: 191

Nombre	**Descripción del dominio catalítico de péptido maduro**	**Isotipo de IgG de Fc**	**Resto de dirección al hueso**	**Identificador de secuencia**
ALP118	TNSALP humana (1-491) N213Q, N286Q	IgG2/4	N-terminal DDDEEKFLRRIRRFDGRFGGGGGS	SEQ ID NO: 192
ALP119	TNSALP humana (1-491) N213Q, N286Q	IgG2/4	C-terminal GGGGSDDDEEKFLRRLRRFDGRYG	SEQ ID NO: 193
ALP120	TNSALP humana (1-491) N213Q, N286Q	IgG2/4	N-terminal DDDEEKFLRRLRRFDGRYGGGGGS	SEQ ID NO: 194

Nombre	**Descripción del dominio catalítico de péptido maduro**	**Isotipo de IgG de Fc**	**Resto de dirección al hueso**	**Identificador de secuencia**
ALP121	TNSALP humana (1-491) N213Q, N286Q	IgG2/4	C-terminal GGGGSDDDEEKFLRRLRRFDEGRYG	SEQ ID NO: 195
ALP122	TNSALP humana (1-491) N213Q, N286Q	IgG2/4	N-terminal DDDEEKFLRRLRRFDEGRYGGGGGS	SEQ ID NO: 196
ALP123	TNSALP humana (1-491) N213Q, N286Q	IgG2/4	C-terminal GGGGSKSDGGYYYTQSDY	SEQ ID NO: 197

Nombre	**Descripción del dominio catalítico de péptido maduro**	**Isotipo de IgG de Fc**	**Resto de dirección al hueso**	**Identificador de secuencia**
ALP124	TNSALP humana (1-491) N213Q, N286Q	IgG2/4	N-terminal KSDGGYYYTQSDY GGGGS	SEQ ID NO: 198
ALP125	TNSALP humana (1-491) N213Q, N286Q	IgG2/4	C-terminal GGGGSTRYSYSTT PEEYDL	SEQ ID NO: 199
ALP126	TNSALP humana (1-491) N213Q, N286Q	IgG2/4	N-terminal TRYSYSTTPEEYD LGGGGS	SEQ ID NO: 200

Nombre	**Descripción del dominio catalítico de péptido maduro**	**Isotipo de IgG de Fc**	**Resto de dirección al hueso**	**Identificador de secuencia**
ALP127	TNSALP humana (1-491) N213Q, N286Q	IgG2/4	C-terminal GGGGSTGGSSPFGGVAGVKDY	SEQ ID NO: 201
ALP128	TNSALP humana (1-491) N213Q, N286Q	IgG2/4	N-terminal TGGSSPFGGVAGVKDYGGGGS	SEQ ID NO: 202
ALP067	TNSALP humana (1-491) N213Q, N286Q	IgG2/4	GGGGSVTKHLNQISQSY	SEQ ID NO: 203

Nombre	**Descripción del dominio catalítico de péptido maduro**	**Isotipo de IgG de Fc**	**Resto de dirección al hueso**	**Identificador de secuencia**
ALP068	TNSALP humana (1-491) N213Q, N286Q	IgG2/4	VTKHLNQISQSY	SEQ ID NO: 204
ALP069	TNSALP humana (1-491) N213Q, N286Q	IgG2/4	GGGGSKPRSVSG	SEQ ID NO: 205
ALP070	TNSALP humana (1-491) N213Q, N286Q	IgG2/4	KPRSVSG	SEQ ID NO: 206

Nombre	**Descripción del dominio catalítico de péptido maduro**	**Isotipo de IgG de Fc**	**Resto de dirección al hueso**	**Identificador de secuencia**
ALP071	TNSALP humana (1-491) N213Q, N286Q	IgG2/4	GGGGSNPYHPTIPQSVH	SEQ ID NO: 207
ALP072	TNSALP humana (1-491) N213Q, N286Q	IgG2/4	NPYHPTIPQSVH	SEQ ID NO: 208
ALP073	TNSALP humana (1-491) N213Q, N286Q	IgG2/4	GGGGSSVSVGMKPSPRP	SEQ ID NO: 209

Nombre	**Descripción del dominio catalítico de péptido maduro**	**Isotipo de IgG de Fc**	**Resto de dirección al hueso**	**Identificador de secuencia**
ALP074	TNSALP humana (1-491) N213Q, N286Q	IgG2/4	SVSVGMKPSPRP	SEQ ID NO: 210
ALP075	TNSALP humana (1-491) N213Q, N286Q	IgG2/4	GGGGS	SEQ ID NO: 211
ALP076	TNSALP humana (1-491) N213Q, N286Q	IgG2/4	ninguno	SEQ ID NO: 212

Nombre	**Descripción del dominio catalítico de péptido maduro**	**Isotipo de IgG de Fc**	**Resto de dirección al hueso**	**Identificador de secuencia**
ALP077	IALP humana (1-486) W245R, S429E, C481G	IgG2/4	GGGGSVTKHLNQISQSY	SEQ ID NO: 213
ALP078	IALP humana (1-486) W245R, S429E, C481G	IgG2/4	VTKHLNQISQSY	SEQ ID NO: 214

Nombre	**Descripción del dominio catalítico de péptido maduro**	**Isotipo de IgG de Fc**	**Resto de dirección al hueso**	**Identificador de secuencia**
ALP079	IALP humana (1-486) W245R, S429E, C481G	IgG2/4	GGGGSKPRSVSG	SEQ ID NO: 215
ALP080	IALP humana (1-486) W245R, S429E, C481G	IgG2/4	KPRSVSG	SEQ ID NO: 216

Nombre	**Descripción del dominio catalítico de péptido maduro**	**Isotipo de IgG de Fc**	**Resto de dirección al hueso**	**Identificador de secuencia**
ALP081	IALP humana (1-486) W245R, S429E, C481G	IgG2/4	GGGGSNPYHPTIPQSVH	SEQ ID NO: 217
ALP082	IALP humana (1-486) W245R, S429E, C481G	IgG2/4	NPYHPTIPQSVH	SEQ ID NO: 218

Nombre	**Descripción del dominio catalítico de péptido maduro**	**Isotipo de IgG de Fc**	**Resto de dirección al hueso**	**Identificador de secuencia**
ALP083	IALP humana (1-486) W245R, S429E, C481G	IgG2/4	GGGGSSVSVGMKPSPRP	SEQ ID NO: 219
ALP084	IALP humana (1-486) W245R, S429E, C481G	IgG2/4	SVSVGMKPSPRP	SEQ ID NO: 220

Nombre	**Descripción del dominio catalítico de péptido maduro**	**Isotipo de IgG de Fc**	**Resto de dirección al hueso**	**Identificador de secuencia**
ALP085	IALP humana (1-486) W245R, S429E, C481G	IgG2/4	GGGGS	SEQ ID NO: 221
ALP086	IALP humana (1-486) W245R, S429E, C481G	IgG2/4	ninguno	SEQ ID NO: 222

Nombre	**Descripción del dominio catalítico de péptido maduro**	**Isotipo de IgG de Fc**	**Resto de dirección al hueso**	**Identificador de secuencia**
ALP088	IALP humana (1-486) W245R, S429E, C481G	IgG2/4	GGGGSDDDDDDDDDD	SEQ ID NO: 223
ALP050	IALP humana (1-486) N122Q, W245R, N249Q, S429E, C481G	IgG2/4	D10	SEQ ID NO: 247

Nombre	**Descripción del dominio catalítico de péptido maduro**	**Isotipo de IgG de Fc**	**Resto de dirección al hueso**	**Identificador de secuencia**
ALP112delG	TNSALP humana (1-491) N213Q, N286Q, delG	IgG2/4	N-terminal EEEEEEEEKFLRR IGRFGGGGGS	SEQ ID NO: 262

Nombre	**Descripción del dominio catalítico de péptido maduro**	**Isotipo de IgG de Fc**	**Resto de dirección al hueso**	**Identificador de secuencia**
ALP201sec	TNSALP humana (1-491) E108M, N213Q, N286Q, con péptido señal de secreción	IgG2/4	D10	SEQ ID NO: 263

Nombre	**Descripción del dominio catalítico de péptido maduro**	**Isotipo de IgG de Fc**	**Resto de dirección al hueso**	**Identificador de secuencia**
ALP259sec	TNSALP humana (1-491) E108M, N213Q, N286Q, con péptido señal de secreción	IgG2/4	D7	SEQ ID NO: 264

Unión ajustable al tejido óseo

Los conjugados de dirección al hueso descritos en el presente documento pueden presentar una unión variable al tejido óseo. Por ejemplo, los conjugados dirigidos al hueso

pueden presentar diferencias en el comportamiento de asociación (unión) y/o disociación con el hueso. Los conjugados de Fc de dirección al hueso que incluyen secuencias de dirección de poliD y poliE, por ejemplo, presentan una alta afinidad de unión al tejido óseo, mientras que determinados conjugados de Fc de dirección al hueso que emplean una secuencia derivada de estaterina o una de VHH como secuencia de dirección pueden presentar una afinidad de unión intermedia al tejido óseo (véanse, por ejemplo, las figuras 1 y 14).

Los conjugados de dirección al hueso pueden presentar diferencias en el comportamiento de disociación incluso si sus afinidades de unión son similares. Por ejemplo, un conjugado de Fc de dirección al hueso tal como ALP-Fc-D_{10} (SEQ ID NO: 31) unido al tejido óseo puede no intercambiarse fácilmente con el conjugado no unido en solución, mientras que una construcción de VHH dirigida al hueso de un solo dominio que contiene secuencias de poliD o poliE dentro de una o más de sus CDR (por ejemplo, SEQ ID NO: 249 y 250) puede presentar más movilidad para unirse y disociarse del tejido óseo en presencia de conjugado no unido (véanse, por ejemplo, las figuras 10A-10B).

Los conjugados de dirección al hueso descritos en el presente documento pueden ajustarse para satisfacer necesidades terapéuticas particulares seleccionando secuencias de dirección y otros componentes para alterar la afinidad de unión, las tasas de disociación, el tiempo de residencia y la movilidad. Por ejemplo, una unión en equilibrio activa a la diana podría garantizar que el polipéptido no bloquee los sitios activos en el hueso como

lo harían las moléculas de unión más fuertes. En particular, las construcciones que se unen con demasiada fuerza al hueso se disociarían más lentamente. Debido a que la actividad catalítica de la ALP depende de los iones de cinc y magnesio, la ALP puede inactivarse con el tiempo por la pérdida de estos iones. Si las construcciones de ALP inactivas permanecen unidas al hueso, impiden el reclutamiento de ALP activa. Por el contrario, la disociación rápida de la ALP activa del hueso reduce la eficacia al evitar que la ALP maximice su actividad enzimática. Por lo tanto, se desea un equilibrio de unión. Pueden realizarse selecciones entre las opciones descritas para la secuencia de dirección (por ejemplo, poliD, poliE, secuencias derivadas de presentación en fagos, secuencias de estaterina completas o parciales, secuencias de VHH completas o parciales, o combinaciones de las mismas), así como las diferentes opciones topológicas (por ejemplo, resto de dirección al hueso en el extremo N o extremo C del conjugado). Esto garantiza una cinética de unión favorable para establecer tiempos de residencia de unión al hueso que aumenten la eficacia y disminuyen la unión a largo plazo de la enzima inactiva. Los tiempos de residencia de unión al hueso pueden presentar un intervalo de aproximadamente 1 segundo a aproximadamente 1 mes (por ejemplo, 2 segundos, 3 segundos, 4 segundos, 5 segundos, 6 segundos, 7 segundos, 8 segundos, 9 segundos, 10 segundos, 20 segundos, 30 segundos, 40 segundos, 50 segundos, 1 minuto, 2 minutos, 2 minutos, 4 minutos, 5 minutos, 6 minutos, 7 minutos, 8 minutos, 9 minutos, 10 minutos, 20 minutos, 30 minutos, 40 minutos, 50 minutos, 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 5 horas, 6 horas, 7 horas, 8 horas, 9 horas, 10

horas, 11 horas, 12 horas, 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 1 mes).

Métodos para someter a prueba las construcciones de sALP

Los polipéptidos descritos en el presente documento (por ejemplo, un polipéptido que tiene la secuencia de una cualquiera de SEQ ID NO: 7-223, 247 y 262-264 o una variante de la misma con al menos un 85 % de identidad de secuencia con la misma y/o al menos una mutación aminoacídica con respecto a una ALP de origen natural, como se describe en el presente documento) puede someterse a prueba usando uno o más ensayos descritos con más detalle a continuación para someter a prueba la actividad catalítica, la capacidad de dirección al hueso y el perfil PK.

Ensayo de unión de hidroxiapatita

Puede usarse HA sintética para sondear la unión de HA por los polipéptidos descritos en el presente documento. En tubos de centrífuga separados, los polipéptidos de dirección al hueso pueden diluirse, por ejemplo, en seroalbúmina bovina (BSA) en solución salina tamponada con fosfato (PBS) pH 7.4 (1 ml de suspensión por tubo). A cada tubo que contiene polipéptido, se le puede añadir 1 mg de HA sintética y los tubos pueden incubarse a temperatura ambiente durante 2 horas con mezcla orbital para evitar que se sedimente la HA. Después de la incubación, las muestras pueden centrifugarse a 16 000 rcf durante 5 minutos para separar la fracción sólida unida a HA de la suspensión de proteína no unida. Las fracciones unidas a HA pueden lavarse posteriormente, por ejemplo, tres veces con PBS, y la fracción final de HA se

suspendió en 100 µl de PBS. Las fracciones unidas a HA suspendidas y las suspensiones de proteína no unida de 100 µl se transfieren a placas negras de 96 pocillos (1 fracción por pocillo), y las concentraciones relativas de proteína pueden determinarse mediante excitación/emisión fluorescente a 488 nm/585 nm usando un lector de placas fluorescentes (Spectromax i3x).

Ensayo de homogeneizado de hueso

Los fémures de ratones C57BL/6 macho pueden almacenarse a -80 °C antes de su uso. Los fémures pueden transferirse a tubos de centrífuga de 2 ml (2 fémures por tubo) con 1 ml de colagenasa de tipo 2 al 0.2 % (p/p) (Worthington) en BS con cóctel inhibidor de serina y cisteína proteasas sin EDTA 1x (COMPLETE™, Roche). Los fémures pueden someterse a agitación vorticial breve e incubarse a 37 °C con agitación (800 rpm) durante 1 hora. El tejido conjuntivo restante puede eliminarse y los fémures pueden colocarse en placas de Petri en hielo. La médula ósea puede enjuagarse con PBS usando aguja y jeringa. El hueso seco se amasa (normalmente 30-50 mg por fémur) y se coloca en batidoras desechables individuales para moler tejido duro preenfriado (PRECELLYS®, Bertin Instruments) con 0.75 ml de PBS con inhibidor de proteasa 1x. Los fémures pueden homogeneizarse usando un homogeneizador de molino de esferas de alto rendimiento (Bullet Blender, 4 °C, velocidad máxima, 4 ciclos de 30 segundos de duración). El homogeneizado puede transferirse a tubos de centrífuga de 1.5 ml y centrifugarse a 12 000 x g durante 15 minutos a 4 °C para separar el homogeneizado de hueso de los restos proteínicos/celulares liberados. Pueden

usarse otros métodos de aislamiento del homogeneizado de hueso, incluyendo el corte en rodajas y otros mecanismos de molienda. A continuación, el homogeneizado de hueso puede resuspenderse en BSA al 0.1 % en PBS para su uso en ensayos de unión.

Los polipéptidos de dirección al hueso pueden diluirse hasta 50 nM en PBS con BSA al 0.1 % e incubarse con 3 mg de homogeneizado de hueso en tubos de centrífuga individuales de 1.5 ml (1 ml por tubo). Las muestras pueden mezclarse a temperatura ambiente durante 2 horas antes de separar las fracciones unida y no unida al homogeneizado de hueso mediante centrifugación. Las fracciones de homogeneizado de hueso pueden lavarse 3 veces con PBS y el sedimento de homogeneizado final puede suspenderse en 100 µl de PBS. El homogeneizado de hueso suspendido y las suspensiones de proteína no unidas de 100 µl pueden cuantificarse para determinar la concentración de fusión de Fc fluorescente relativa usando un lector de placas fluorescentes.

Determinación de la afinidad relativa de la proteína por el homogeneizado de hueso in vitro

Puede desarrollarse un ensayo multidosis para clasificar la afinidad relativa de las proteínas de unión al hueso. Para proteínas que se unen eficientemente al homogeneizado de hueso, se determinaron las tasas relativas de disociación mediante este ensayo de intercambio cinético de proteína en el hueso. Las proteínas pueden evaluarse individualmente (por ejemplo, un tipo de proteína por tubo), incubando concentraciones de saturación (1 µM) de proteína de unión al hueso sin marcar con 5 mg de homogeneizado de

hueso en tubos Eppendorf de 1.5 ml. Después de 24 horas de incubación con proteína no marcada, el homogeneizado de hueso puede centrifugarse (16 000 rcf, 5 minutos) para eliminar el exceso de proteína no unida. El homogeneizado de hueso, saturado con una determinada proteína de unión al hueso, puede resuspenderse en soluciones 0.5 µM de la misma proteína de unión al hueso marcada con sonda fluorescente ALEXA FLUOR® y se dejó incubar durante 1, 2, 4, 8 y 24 horas antes de centrifugar el homogeneizado de hueso, lavarlo 3 veces con PBS y transferirlo a una placa negra de 96 pocillos. El sobrenadante de la primera centrifugación también puede recogerse para cuantificar la cantidad de proteína fluorescente que permaneció en suspensión (sin unir). Puede usarse un lector de placas fluorescentes para cuantificar la cantidad de proteína marcada con fluorescencia unida y no unida en cada punto temporal, lo que permite una representación cinética de la velocidad de disociación de la proteína sin marcar.

Ensayo metabólico para la actividad de ALP (MUP)

Pueden ensayarse muestras de proteína (muestras sobrenadantes, parcialmente purificadas o purificadas en columna) para determinar la actividad de ALP en solución utilizando fosfato de 4-metilumbeliferilo (4-MUP) como sustrato artificial. La hidrólisis del enlace fosfoéster en 4-MUP libera el compuesto fluorescente 4-metilumbeliferona, que se detecta fácilmente mediante un fluorímetro. La cuantificación del producto puede realizarse usando una curva patrón de 4-metilumbeliferona (4-MU) medida en la misma placa, con concentraciones de modelo de 0, 1.25 uM, 2.5 uM,

5 uM, 10 uM y 20 uM. Puede prepararse una solución madre 10 mM de 4-MU en etanol y diluirse en tampón de ensayo [HEPES 50 mM pH 7.4, NaCl 150 mM, MgCl2 1 mM, seroalbúmina bovina 1 mg/ml]. Las muestras de proteína de fusión purificadas pueden prepararse como soluciones de 0.1 mg/ml en tampón de ensayo y diluirse en serie hasta una concentración final apropiada (por ejemplo, 1 nM) para el ensayo en tampón de ensayo. Se prepararon soluciones madre de 4-MUP en tampón de ensayo. Todas las soluciones pueden llevarse hasta 37 °C antes del inicio del ensayo mediante la adición de 4-MUP a la muestra de proteína a una concentración final de 10 uM. La producción de 4-MU puede medirse a una longitud de onda de excitación de 360 nm y una longitud de onda de emisión de 465 nm. Los datos pueden recopilarse en un lector de placas mantenido a 37 °C, cada 40 segundos durante un total de 20 minutos. Las velocidades de reacción se calcularon por regresión lineal en unidades de actividad, donde 1 U = 1 micromol de 4-MUP hidrolizado/minuto. Las actividades específicas pueden calcularse en unidades/mg de proteína ensayada.

Ensayo de hueso en placa

Las fracciones de homogeneizado de hueso pueden ensayarse para determinar la actividad de ALP. Las fracciones de homogeneizado de hueso pueden suspenderse en 100 µl de PBS y transferirse a placas negras de 96 pocillos. También pueden transferirse suspensiones de proteína no unidas de 100 µl a pocillos separados de la placa de 96 pocillos. A cada pocillo, se le pueden añadir 100 µl de solución de detección de ALP (4-MUP 10 µM, BSA al 1 %) y la lectura

fluorescente cinética (a 360/465) se inicia inmediatamente y se ejecuta durante 20 minutos, con emisiones de intensidad fluorescente recopiladas cada 30 segundos. La pendiente de la intensidad de fluorescencia frente al tiempo puede representar la concentración de ALP en cada fracción de muestra.

La actividad de MUP de las fracciones unida y no unida de las construcciones sometidas a prueba puede medirse mediante la pendiente de actividad inicial en los primeros 5 minutos para conservar la linealidad. La proporción de actividad de MUP puede determinarse para cada proteína de fusión, como proporción = (actividad unida)/(actividad no unida).

Actividad de la proteína en ensayo de suero

Pueden diluirse muestras de suero de 100 a 6000 veces en tampón de ensayo (HEPES 50 mM, NaCl 150 mM, $MgCl_2$ 1 mM, pH 7.4 y BSA 1 mg/ml) para determinar el pK. Las muestras diluidas pueden cuantificarse y la curva patrón puede generarse basándose en asfotasa alfa de actividad y concentración conocidas. La pendiente de la intensidad de fluorescencia frente al tiempo puede representar la tasa de producción de 4-MU, que corresponde a la actividad de ALP, en cada fracción de muestra como una función de las unidades/ml de suero.

Imágenes fluorescentes in vivo en ratones

Pueden realizarse estudios semicuantitativos de biodistribución en ratones atímicos usando proteínas y fragmentos de proteína (por ejemplo, VHH) de dirección al

hueso marcados con ALEXA FLUOR® 750. Las proteínas de fusión de ALP-Fc de dirección al hueso y los VHH de dirección al hueso pueden marcarse con fluorescencia con ALEXA FLUOR® 750 usando el kit Invitrogen SAIVI (conjugación covalente mediante ésteres de succinimidilo activados) y purificarse en una resina de exclusión en gel para eliminar el fluoróforo no conjugado. Las proteínas purificadas (suspendidas en PBS) pueden inyectarse en ratones atímicos mediante la vena de la cola en dosis de ~3 mg/kg.

Ratones exogámicos J:NU hembra (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME) pueden recibir 3 mg/kg del artículo de prueba mediante inyección intravenosa en la vena de la cola de 100 µl normalizada al volumen. Para adquisición de imágenes *in vivo*, los sujetos pueden mantenerse en anestesia con isoflurano al 2-3 % en la plataforma de imágenes (IVIS Spectrum Imaging System, PerkinElmer Inc., Waltham, MA). Se usaron configuraciones de exposición automática con campo de visión (CDV) C, F/Stop 2, agrupación media y filtros de emisión de 800 nm/excitación de 750 nm para las adquisiciones de epiiluminación 2D y transiluminación 3D. Las imágenes fluorescentes con epiiluminación 2D de muestras de tejido *ex vivo* pueden adquirirse en condiciones idénticas, excepto que todas las muestras para cada tipo de tejido pueden adquirirse simultáneamente en una sola imagen. Todos los estudios en animales se realizan de acuerdo con las disposiciones de la Ley de Bienestar Animal y los principios de la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio.

El análisis de imágenes fluorescentes puede realizarse usando el programa informático 2D/3D suministrado por el fabricante (Living Image 4.5.1, Perkin Elmer). Las regiones

de interés (RDI) de área uniforme aplicada en cada conjunto de sujetos se colocaron manualmente para tener en cuenta las diferencias en la postura del sujeto. Los intervalos de escala de color de las imágenes *in vivo* longitudinales pueden normalizarse en todos los sujetos y puntos temporales; las escalas de color de las muestras *ex vivo* pueden determinarse individualmente para representar mejor la señal fluorescente para cada conjunto de tejidos.

Ensayo de hidrólisis de pirofosfato

Los polipéptidos descritos en el presente documento se pueden ensayar para determinar su actividad frente al sustrato natural pirofosfato. La hidrólisis del pirofosfato puede medirse mediante la detección del producto, el anión fosfato, usando el reactivo de ensayo PiBlue (BioAssay Systems), que se vuelve verde brillante al unirse al fosfato. La cuantificación de los niveles de fosfato en cada pocillo puede realizarse usando una curva patrón de soluciones de fosfato preparadas en tampón de ensayo que puede leerse en la placa de ensayo. Pueden prepararse soluciones madre de pirofosfato de sodio decahidratado (Sigma Chemicals) en agua pura a una concentración de 10 mM. Las muestras de proteína de fusión purificadas se prepararon como soluciones de 0.1 mg/ml en tampón de ensayo [HEPES 50 mM pH 7.4, NaCl 150 mM, MgCl2 1 mM, seroalbúmina bovina 1 mg/ml] y se diluyeron en serie hasta una concentración final apropiada para el ensayo en tampón de ensayo. Las muestras de pirofosfato para ensayo pueden prepararse por dilución de la solución madre en tampón de ensayo. Todas las soluciones se llevaron a 37 °C antes del inicio de la reacción. Se añadieron soluciones de proteína a placas transparentes de 96 pocillos y las placas

se colocaron en un agitador de placas Jitterbug mantenido a 37 °C. El inicio de la reacción puede realizarse mediante la adición de las soluciones de pirofosfato a la solución de proteína. Normalmente, la reacción de hidrólisis de pirofosfato puede realizarse a concentraciones de pirofosfato de 0 uM, 1.56 uM, 3.12 uM, 6.25 uM, 12.5 uM, 25 uM, 50 uM, 100 uM, 200 uM y 400 uM simultáneamente en la misma placa. Se prepararon ocho pocillos de reacción a cada concentración de pirofosfato, y la reacción puede detenerse mediante la adición del reactivo PiBlue (añadido en un volumen igual al volumen de reacción final) después de que hayan pasado 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 minutos desde la adición de pirofosfato a la placa. La adición del reactivo PiBlue detiene cualquier reacción posterior al reducir el pH del reactivo de detección e inactivar la enzima. Se puede dejar que se desarrolle el color en la placa durante 30 minutos antes de leer la absorbancia a 620 nm. Las velocidades de reacción a cada concentración de pirofosfato pueden calcularse construyendo curvas de progreso a partir de los puntos temporales individuales. Las velocidades de reacción en cada concentración pueden usarse para calcular los valores de Km y Vmáx en el GraphPad Prism, usando un ajuste cinético enzimático de Michaelis-Menten. Los valores de kcat se calcularon mediante: Vmáx/(moles de proteína ensayada) = kcat.

Ensayo de hidrólisis de piridoxil-5'-fosfato

Un segundo sustrato natural de la fosfatasa alcalina es piridoxil-5'-fosfato(PLP). Se puede ensayar la actividad de un polipéptido frente a PLP en un formato de ensayo acoplado,

en el que el piridoxilo, el producto de hidrólisis de PLP, se convierte en la piridoxolactona fluorescente mediante la piridoxilo deshidrogenasa tetramérica de *M. loti* (tPLDH, SEQ ID NO: 246). El gen de tPLDH marcado con 6xHis puede sintetizarse mediante métodos convencionales y clonarse en un plásmido de expresión bacteriano bajo el control del promotor T7. La tPLDH marcada con 6xHis se expresó en células BL21 (DE3) usando protocolos convencionales y se purificó mediante métodos de cromatografía de afinidad convencionales. La proteína puede concentrarse hasta una concentración de 1900 uM usando concentración por centrifugación, es decir, el concentrador Amicon Ultra15 Spin, y puede congelarse a -80 °C hasta usarse en el ensayo. Las muestras de proteína de fusión purificadas pueden prepararse como soluciones de 0.1 mg/ml en tampón de ensayo [HEPES 50 mM pH 7.4, NaCl 150 mM, $MgCl_2$ 1 mM, seroalbúmina bovina 1 mg/ml]. Las muestras finales diluidas en serie pueden colocarse en una placa negra de 96 pocillos, junto con patrones de piridoxolactona (preparados en tampón de ensayo). A las muestras de proteína, se les puede añadir soluciones de NAD^+, tPLDH y PLP (preparadas en tampón de ensayo) para obtener concentraciones finales de NAD+ 3 mM, tPLDH 4 uM y PLP 3 uM y se mezclaron. Todas las soluciones se llevan a 37 °C antes del inicio de la reacción, y la placa de reacción puede incubarse a 37 °C, y detectarse la fluorescencia por excitación a 355 nm y medirse la emisión a 445 nm. La cantidad de producto de piridoxolactona generada puede calcularse usando una curva patrón generada a partir de la fluorescencia medida a partir de los pocillos de piridoxolactona en la placa. Las velocidades de reacción

pueden calcularse mediante regresión lineal de las curvas de progreso en unidades de µmoles de piridoxilo producido/min. Las actividades específicas pueden calcularse dividiendo las velocidades de reacción por la concentración de proteína usada en la reacción de ensayo.

Análisis farmacocinético en un modelo murino

A ratones C57BL/6 (Jackson Labs) macho entre 11-12 semanas de edad se les puede administrar una sola inyección de 4-7 mg/kg, en la vena de la cola o por vía subcutánea, de proteínas de muestra a 1 mg/ml en PBS estéril (sin calcio o magnesio), y hacerse seguimiento durante 14-21 días. Pueden realizarse dos extracciones de sangre intermedias y una extracción de sangre terminal (punción cardiaca, anestesia con CO_2) en cada ratón y estadificarse en la cohorte (4 ratones en cada uno de los 4 grupos, por molécula y por tipo de administración). Las muestras de sangre (100 µl, que producen 50 µl de plasma después de centrifugación) pueden recogerse en tubos Li/heparinizados a las 0.25, 1, 6, 24, 48, 72, 96, 120, 192, 264, 336 y 480 horas. Las muestras de sangre pueden almacenarse a 4 °C hasta que se procesen en plasma. Las muestras de plasma pueden congelarse instantáneamente en N_2 líquido y almacenarse a -80 °C y cuantificarse posteriormente.

Modelos de HPP murinos in vivo

La eficacia puede medirse en un modelo de HPP murino *in vivo*. En este estudio profiláctico, el tratamiento puede iniciarse al nacer y continuarse durante 35 días. Puede administrarse un polipéptido o vehículo (PBS) por vía

subcutánea a ratones *Akp2GW*$^{-/-}$ en la región escapular. Los criterios de valoración de la eficacia que pueden evaluarse al final del tratamiento fueron la supervivencia, los defectos de mineralización ósea y el crecimiento (peso corporal). El peso corporal también puede evaluarse diariamente como indicador del bienestar general de los animales. Los ratones WT tratados con PBS de la misma edad y camada pueden servir como controles de referencia. Los animales pueden recibir una inyección subcutánea diaria de polipéptido hasta el día 24. El día 25, la dosis subcutánea diaria del polipéptido puede reducirse de forma semilogarítmica desde la dosis inicial y mantenerse hasta la última dosis de tratamiento el día 35.

Composiciones farmacéuticas, formulaciones y dosificación

Un polipéptido descrito en el presente documento que incluye una sALP o un polipéptido de fusión de sALP (por ejemplo, un polipéptido que tiene la secuencia de una cualquiera de SEQ ID NO: 7-223, 247 y 262-264 o una variante de la misma con al menos un 85 % de identidad de secuencia con la misma y/o al menos una mutación aminoacídica con respecto a una ALP de origen natural, como se describe en el presente documento) puede formularse como una composición farmacéutica mediante una diversidad de métodos conocidos en la técnica. Como apreciará el experto en la materia, la vía y/o el modo de administración pueden usarse para dictaminar la formulación. La vía de administración puede depender de una diversidad de factores, tales como el entorno y los objetivos terapéuticos. En particular, los polipéptidos y los polipéptidos de fusión descritos en el presente documento

pueden ser una formulación para administración por cualquier vía conocida en la técnica, por ejemplo, subcutánea (por ejemplo, mediante inyección subcutánea), intravenosa, oral, nasal, intramuscular, sublingual, intratecal o intradérmica. A modo de ejemplo, las composiciones farmacéuticas pueden estar en forma de líquido, solución, suspensión, píldora, cápsula, comprimido, cápsula de gel, polvo, gel, pomada, crema, nebulosa, bruma, vapor atomizado, aerosol o fitosoma.

Formulaciones

Las composiciones que incluyen sALP y polipéptidos de fusión de sALP (por ejemplo, un polipéptido que tiene la secuencia de una cualquiera de SEQ ID NO: 7-223, 247 y 262-264 o una variante de la misma con al menos un 85 % de identidad de secuencia con la misma y/o al menos una mutación aminoacídica con respecto a una ALP de origen natural, como se describe en el presente documento) pueden formularse de acuerdo con métodos convencionales. La formulación farmacéutica es una técnica bien establecida y se describe adicionalmente en, por ejemplo, *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 22.ª Ed., Allen, Ed. 2012; Ansel *et al*. (1999) "Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems", 7.ª edición, Lippincott Williams & Wilkins Publishers (ISBN: 0683305727); y Kibbe (2000) "Handbook of Pharmaceutical Excipients American Pharmaceutical Association", 3.ª edición (ISBN: 091733096X). Por ejemplo, una composición de sALP (por ejemplo, un polipéptido que tiene la secuencia de una cualquiera de SEQ ID NO: 7-223, 247 y 262-264 o una variante de la misma con al menos un 85 % de identidad de secuencia con la misma y/o al menos una

mutación aminoacídica con respecto a una ALP de origen natural, como se describe en el presente documento), puede formularse, por ejemplo, como una solución tamponada a una concentración adecuada y adecuada para almacenamiento a 2-8 °C (por ejemplo, 4 °C). También puede formularse una composición para almacenamiento a una temperatura por debajo de 0 °C (por ejemplo, -20 °C o -80 °C). Además, puede formularse una composición para almacenamiento de hasta 2 años (por ejemplo, un mes, dos meses, tres meses, cuatro meses, cinco meses, seis meses, siete meses, ocho meses, nueve meses, 10 meses, 11 meses, 1 año, 1 año y medio o 2 años) a 2-8 °C (por ejemplo, 4 °C). Por tanto, las composiciones descritas en el presente documento pueden ser estables en almacenamiento durante al menos 1 año a 2-8 °C (por ejemplo, 4 °C). Una composición puede formularse en un volumen adecuado, por ejemplo, un volumen de aproximadamente 0.1 ml a aproximadamente 10 ml.

Las composiciones que incluyen sALP y polipéptidos de fusión de sALP (por ejemplo, un polipéptido que tiene la secuencia de una cualquiera de SEQ ID NO: 7-223, 247 y 262-264 o una variante de la misma con al menos un 85 % de identidad de secuencia con la misma y/o al menos una mutación aminoacídica con respecto a una ALP de origen natural, como se describe en el presente documento) pueden estar en una diversidad de formas. Estas formas incluyen, por ejemplo, formas de dosificación líquidas, semisólidas y sólidas, tales como soluciones líquidas (por ejemplo, soluciones inyectables y que pueden administrarse por infusión), dispersiones o suspensiones, comprimidos, píldoras, polvos, liposomas y supositorios. La forma preferida depende, en

parte, del modo previsto de administración y de la aplicación terapéutica.

Por ejemplo, las composiciones destinadas a administración sistémica o local pueden estar en forma de soluciones inyectables o que pueden administrarse por infusión. Por consiguiente, las composiciones (por ejemplo, un polipéptido que tiene la secuencia de una cualquiera de SEQ ID NO: 7-223, 247 y 262-264 o una variante de la misma con al menos un 85 % de identidad de secuencia con la misma y/o al menos una mutación aminoacídica con respecto a una ALP de origen natural, como se describe en el presente documento) pueden formularse para su administración por vía parenteral (por ejemplo, inyección subcutánea, intravenosa, intraperitoneal o intramuscular). "Administración parenteral", "administrado por vía parenteral" y otras expresiones gramaticalmente equivalentes, como se usan en el presente documento, se refieren a modos de administración distintos de administración enteral y tópica, habitualmente por inyección, e incluyen, sin limitación, inyección e infusión subcutánea, intradérmica, intravenosa, intranasal, intraocular, pulmonar, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbitaria, intracardiaca, intradérmica, intrapulmonar, intraperitoneal, transtraqueal, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intrarraquídea, epidural, intracerebral, intracraneal, intracarotídea e intraesternal. Vías de administración en particular incluyen administración intravenosa y subcutánea.

Las composiciones que incluyen sALP y polipéptidos de fusión de sALP (por ejemplo, un polipéptido que tiene la

secuencia de una cualquiera de SEQ ID NO: 7-223, 247 y 262-264 o una variante de la misma con al menos un 85 % de identidad de secuencia con la misma y/o al menos una mutación aminoacídica con respecto a una ALP de origen natural, como se describe en el presente documento) pueden formularse como una solución, microemulsión, dispersión, liposoma u otra estructura ordenada adecuada para almacenamiento estable a alta concentración. Las soluciones inyectables estériles pueden prepararse incorporando una composición descrita en el presente documento en la cantidad requerida en un solvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, según lo necesario, seguido de esterilización por filtración. En general, las dispersiones se preparan incorporando una composición descrita en el presente documento en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los demás ingredientes requeridos entre los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos para la preparación incluyen secado al vacío y liofilización que producen un polvo de una composición descrita en el presente documento más cualquier ingrediente adicional deseado (véase a continuación) a partir de una solución previamente filtrada a esterilidad del mismo. La fluidez apropiada de una solución puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de tensioactivos. Puede conseguirse absorción prolongada de composiciones inyectables incluyendo en la composición un reactivo que retarde la absorción, por

ejemplo, sales de monoestearato y gelatina.

Las composiciones descritas en el presente documento también pueden formularse en composiciones de inmunoliposomas. Dichas formulaciones pueden prepararse mediante métodos conocidos en la técnica tales como, por ejemplo, los métodos descritos en Epstein *et al*. (1985) *Proc Natl Acad Sci USA* 82:3688; Hwang *et al*. (1980) *Proc Natl Acad Sci USA* 77:4030; y las patentes de Estados Unidos n.° 4.485.045 y 4.544.545. Se divulgan liposomas con tiempo en circulación potenciado, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos n.° 5.013.556.

Composiciones que incluyen sALP y polipéptidos de fusión de sALP (por ejemplo, un polipéptido que tiene la secuencia de una cualquiera de SEQ ID NO: 7-223, 247 y 262-264 o una variante de la misma con al menos un 85 % de identidad de secuencia con la misma y/o al menos una mutación aminoacídica con respecto a una ALP de origen natural, como se describe en el presente documento) también pueden formularse con un transportador que protegerá la composición (por ejemplo, un polipéptido de sALP o un polipéptido de fusión de sALP) contra la liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, incluidos implantes y sistemas de administración microencapsulados. Pueden usarse polímeros biodegradables, biocompatibles, tales como acetato de etilenvinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. En la técnica se conocen muchos métodos para la preparación de dichas formulaciones. Véase, por ejemplo, J.R. Robinson (1978) "Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems", Marcel Dekker, Inc., Nueva York.

Una composición que contiene una sALP o polipéptido de fusión de sALP (por ejemplo, un polipéptido que tiene la secuencia de una cualquiera de SEQ ID NO: 7-223, 247 y 262-264 o una variante de la misma con al menos un 85 % de identidad de secuencia con la misma y/o al menos una mutación aminoacídica con respecto a una ALP de origen natural, como se describe en el presente documento) puede formularse como una solución para inyección, que es una solución acuosa transparente, de incolora a ligeramente amarilla, pH 7.4. La sALP o polipéptido de sALP (por ejemplo, un polipéptido que tiene la secuencia de una cualquiera de SEQ ID NO: 7-223, 247 y 262-264 o una variante de la misma con al menos un 85 % de identidad de secuencia con la misma y/o al menos una mutación aminoacídica con respecto a una ALP de origen natural, como se describe en el presente documento) puede formularse a una concentración de 12 mg/0.3 ml, 18 mg/0.45 ml, 28 mg/0.7 ml, 40 mg/1 ml u 80 mg/0.8 ml. La sALP o polipéptido de sALP (por ejemplo, formulado a una concentración de 12 mg/0.3 ml, 18 mg/0.45 ml, 28 mg/0.7 ml, 40 mg/1 ml u 80 mg/0.8 ml) puede formularse con un transportador, como cloruro de sodio y/o fosfato de sodio (por ejemplo, NaCl ~150 mM y/o fosfato de sodio ~25 mM, en particular a un pH de ~7.4). En particular, la composición puede formularse como una solución inyectable de 40 mg/ml, en la que cada ml de solución contiene 40 mg de sALP o polipéptido de sALP (por ejemplo, cada vial contiene 0.3 ml de solución y 12 mg de sALP (40 mg/ml), cada vial contiene 0.45 ml de solución y 18 mg de sALP (40 mg/ml), cada vial contiene 0.7 ml de solución y 28 mg de sALP (40 mg/ml) o cada vial contiene 1.0 ml de solución y 40 mg de sALP o

polipéptido de sALP (40 mg/ml)). Una sALP o polipéptido de sALP (por ejemplo, un polipéptido que tiene la secuencia de una cualquiera de SEQ ID NO: 7-223, 247 y 262-264 o una variante de la misma con al menos un 85 % de identidad de secuencia con la misma y/o al menos una mutación aminoacídica con respecto a una ALP de origen natural, como se describe en el presente documento) puede formularse como una solución para inyección a una concentración de 100 mg/ml, en la que cada 1 ml de solución contiene 100 mg de sALP o polipéptido de sALP (por ejemplo, cada vial contiene 0.8 ml de solución y 80 mg de asfotasa alfa (100 mg/ml)). La sALP puede formularse de modo que estén presentes de aproximadamente 0.1 mg a aproximadamente 500 mg en un volumen de aproximadamente 0.01 ml a aproximadamente 10 ml.

Cuando las composiciones se van a usar en combinación con un segundo agente activo, las composiciones pueden coformularse con el segundo agente, o las composiciones pueden formularse por separado de la formulación del segundo agente. Por ejemplo, las composiciones farmacéuticas respectivas pueden mezclarse, por ejemplo, justo antes de la administración, y administrarse juntas o pueden administrarse por separado, por ejemplo, al mismo tiempo o en momentos diferentes.

Composiciones que incluyen sALP y polipéptidos de fusión de sALP (por ejemplo, un polipéptido que tiene la secuencia de una cualquiera de SEQ ID NO: 7-223, 247 y 262-264 o una variante de la misma con al menos un 85 % de identidad de secuencia con la misma y/o al menos una mutación aminoacídica con respecto a una ALP de origen natural, como se describe en el presente documento) pueden formularse para

su administración a un sujeto o, si se administran a un feto, a una mujer embarazada de dicho feto, junto con tratamiento con gammaglobulina intravenosa (IVIG), plasmaféresis, reposición de plasma o intercambio de plasma.

Transportadores/Vehículos

Preparaciones que contienen una sALP o un polipéptido de fusión de sALP (por ejemplo, un polipéptido que tiene la secuencia de una cualquiera de SEQ ID NO: 7-223, 247 y 262-264 o una variante de la misma con al menos un 85 % de identidad de secuencia con la misma y/o al menos una mutación aminoacídica con respecto a una ALP de origen natural, como se describe en el presente documento) pueden proporcionarse a un sujeto que tiene o que es propenso a un trastorno de mineralización ósea, tal como HPP, en combinación con disolventes, suspensiones o emulsiones acuosas o no acuosas estériles farmacéuticamente aceptables. Ejemplos de disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceite vegetal, aceite de pescado y ésteres orgánicos inyectables. Transportadores acuosos incluyen agua, soluciones, emulsiones o suspensiones hidroalcohólicas, incluyendo solución salina y vehículos parenterales médicos tamponados incluyendo solución de cloruro de sodio, solución de dextrosa de Ringer, solución de dextrosa más cloruro de sodio, solución de Ringer que contiene lactosa o aceites no volátiles. Por ejemplo, el transportador farmacéuticamente aceptable puede incluir cloruro de sodio y/o fosfato de sodio, en el que la composición incluye, por ejemplo, cloruro de sodio aproximadamente 150 mM y/o fosfato de sodio aproximadamente 25 mM, pH 7.4.

Los vehículos intravenosos pueden incluir reponedores de fluidos y nutrientes, reponedores de electrolitos, tales como los basados en solución de dextrosa de Ringer y similares. Pueden incluirse sales farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, sales de ácidos minerales tales como clorhidratos, bromhidratos, fosfatos, sulfatos y similares; y las sales de ácidos orgánicos tales como acetatos, propionatos, malonatos, benzoatos y similares. Adicionalmente, en dichos vehículos pueden estar presentes sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes, sustancias tamponantes del pH y similares. Se dispone de un análisis detallado de transportadores farmacéuticamente aceptables en *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 22.ª Ed., Allen, Ed. 2012.

Dosificación

Los polipéptidos de sALP (por ejemplo, un polipéptido que tiene la secuencia de una cualquiera de SEQ ID NO: 7-223, 247 y 262-264 o una variante de la misma con al menos un 85 % de identidad de secuencia con la misma y/o al menos una mutación aminoacídica con respecto a una ALP de origen natural, como se describe en el presente documento) descritos en el presente documento pueden administrarse a un sujeto que tiene o que es propenso a un trastorno de mineralización ósea, tal como HPP, en dosis individuales que varían, por ejemplo, de 0.01 mg/kg a 500 mg/kg (por ejemplo, de 0.05 mg/kg a 500 mg/kg, de 0.1 mg/kg a 60 mg/kg, de 0.1 mg/kg a 50 mg/kg, de 0.1 mg/kg a 20 mg/kg, de 5 mg/kg a 500 mg/kg, de 0.1 mg/kg a 100 mg/kg, de 10 mg/kg a 100 mg/kg, de 0.1 mg/kg a 50 mg/kg, de 0.5 mg/kg a 25 mg/kg, de 1.0 mg/kg a 10

mg/kg, de 1.5 mg/kg a 5 mg/kg o de 2.0 mg/kg a 3.0 mg/kg) o de 1 µg/kg a 1000 µg/kg (por ejemplo, de 5 µg/kg a 1000 µg/kg, de 1 µg/kg a 750 µg/kg, de 5 µg/kg a 750 µg/kg, de 10 µg/kg a 750 µg/kg, de 1 µg/kg a 500 µg/kg, de 5 µg/kg a 500 µg/kg, de 10 µg/kg a 500 µg/kg, de 1 µg/kg a 100 µg/kg, de 5 µg/kg a 100 µg/kg, de 10 µg/kg a 100 µg/kg, de 1 µg/kg a 50 µg/kg, de 5 µg/kg a 50 µg/kg o de 10 µg/kg a 50 µg/kg).

Ejemplos de dosis de una sALP incluyen, por ejemplo, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 2, 2.5, 5, 10, 20, 25, 50, 100, 125, 150, 200, 250 o 500 mg/kg; o 1, 2, 2.5, 5, 10, 20, 25, 50, 100, 125, 150, 200, 250, 500, 750, 900 o 1000 µg/kg. Para todas las dosificaciones o intervalos enumerados en el presente documento, el término "aproximadamente" puede usarse para modificar estas dosificaciones en ±10 % de los valores enumerados o valores extremos del intervalo. En particular, composiciones (por ejemplo, un polipéptido que tiene la secuencia de una cualquiera de SEQ ID NO: 7-223, 247 y 262-264 o una variante de la misma con al menos un 85 % de identidad de secuencia con la misma y/o al menos una mutación aminoacídica con respecto a una ALP de origen natural, como se describe en el presente documento) de acuerdo con la presente divulgación pueden administrarse a un sujeto en dosis que varían de aproximadamente 0.001 mg/kg/día a aproximadamente 500 mg/kg/día, de aproximadamente 0.01 mg/kg/día a aproximadamente 100 mg/kg/día o de aproximadamente 0.01 mg/kg/día a aproximadamente 20 mg/kg/día. Por ejemplo, las composiciones de sALP (por ejemplo, un polipéptido que tiene la secuencia de una cualquiera de SEQ ID NO: 7-223, 247 y 262-264 o una variante de la misma con al menos un 85 % de identidad de

secuencia con la misma y/o al menos una mutación aminoacídica con respecto a una ALP de origen natural, como se describe en el presente documento) pueden administrarse a un sujeto en una dosificación semanal que varía, por ejemplo, de aproximadamente 0.5 mg/kg/semana a aproximadamente 140 mg/kg/semana, por ejemplo, de aproximadamente 0.8 mg/kg/semana a aproximadamente 50 mg/kg/semana o de aproximadamente 1 mg/kg/semana a aproximadamente 10 mg/kg/semana (por ejemplo, aproximadamente 6 o aproximadamente 9 mg/kg/semana). En particular, la sALP puede administrarse una o más veces a la semana (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o más veces a la semana), una o más veces cada dos semanas, o una o más veces al mes (por ejemplo, una vez cada 14 días, 15 días 16 días, 17 días, 18 días, 19 días, 20 días, 21 días, 22 días, 23 días, 24 días, 25 días, 26 días, 27 días, 28 días, 29 días o 30 días).

En particular, la sALP (por ejemplo, un polipéptido que tiene la secuencia de una cualquiera de SEQ ID NO: 7-223, 247 y 262-264 o una variante de la misma con al menos un 85 % de identidad de secuencia con la misma y/o al menos una mutación aminoacídica con respecto a una ALP de origen natural, como se describe en el presente documento) puede administrarse a una dosificación de 2 mg/kg tres veces a la semana (dosis total de 6 mg/kg/semana), 1 mg/kg seis veces a la semana (dosis total de 6 mg/kg/semana), 3 mg/kg tres veces a la semana (dosis total de 9 mg/kg/semana), 0.5 mg/kg tres veces a la semana (dosis total de 1.5 mg/kg/semana) o 9.3 mg/kg tres veces a la semana (dosis total de 28 mg/kg/semana). El médico puede adaptar la dosificación de acuerdo con factores convencionales tales como el alcance de

la enfermedad y diferentes parámetros del sujeto que tiene o que es propenso a un trastorno de mineralización ósea, tal como HPP. Como alternativa, puede administrarse de 0.1 mg/kg a 9 mg/kg una vez a la semana.

Las dosificaciones de composiciones que incluyen sALP y polipéptidos de fusión de sALP (por ejemplo, un polipéptido que tiene la secuencia de una cualquiera de SEQ ID NO: 7-223, 247 y 262-264 o una variante de la misma con al menos un 85 % de identidad de secuencia con la misma y/o al menos una mutación aminoacídica con respecto a una ALP de origen natural, como se describe en el presente documento) pueden proporcionarse en pautas de una sola dosificación o múltiples dosificaciones. Las dosis pueden administrarse, por ejemplo, cada hora, cada dos horas, diariamente, cada dos días, dos veces a la semana, tres veces a la semana, cuatro veces a la semana, cinco veces a la semana, seis veces a la semana, semanalmente, quincenalmente, mensualmente, bimensualmente o anualmente. Como alternativa, las dosis pueden administrarse, por ejemplo, dos veces, tres veces, cuatro veces, cinco veces, seis veces, siete veces, ocho veces, nueve veces, diez veces, once veces o doce veces al día, a la semana o al mes. En particular, la pauta de dosificación es una vez a la semana. La duración de la pauta de dosificación puede ser, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 días, semanas o meses, o incluso durante el resto de la vida del sujeto que tiene o que es propenso a un trastorno de mineralización ósea, tal como HPP. El médico adaptará la cantidad, frecuencia y duración de la dosificación de acuerdo con factores convencionales

tales como el alcance de la enfermedad y diferentes parámetros del sujeto que tiene o que es propenso a un trastorno de mineralización ósea, tal como HPP.

Por ejemplo, la dosificación de una sALP o polipéptido de fusión de sALP (por ejemplo, un polipéptido que tiene la secuencia de una cualquiera de SEQ ID NO: 7-223, 247 y 262-264 o una variante de la misma con al menos un 85 % de identidad de secuencia con la misma y/o al menos una mutación aminoacídica con respecto a una ALP de origen natural, como se describe en el presente documento) puede ser de aproximadamente 0.1 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal administrada por vía subcutánea o intravenosa una o más veces (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6 o 7) a la semana.

Producción de ácidos nucleicos y polipéptidos

Los polinucleótidos que codifican sALP y polipéptidos de fusión de sALP (por ejemplo, un polipéptido que tiene la secuencia de una cualquiera de SEQ ID NO: 7-223, 247 y 262-264 o una variante de la misma con al menos un 85 % de identidad de secuencia con la misma y/o al menos una mutación aminoacídica con respecto a una ALP de origen natural, como se describe en el presente documento) pueden producirse mediante cualquier método conocido en la técnica. El polinucleótido puede codificar una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85 % (por ejemplo, 90 %, 95 %, 97 %, 99 % o 100 %) de identidad de secuencia con una cualquiera de SEQ ID NO: 7-223, 247 y 262-264 (por ejemplo, una cualquiera de SEQ ID NO: 72, 123, 155 o 177). El polinucleótido puede tener al menos un 85 % (por ejemplo,

90 %, 95 %, 97 %, 99 % o 100 %) de identidad de secuencia con una cualquiera de SEQ ID NO: 265-268. El polinucleótido puede incluir o consistir en una cualquiera de SEQ ID NO: 265-268. El polinucleótido puede incluir o consistir en SEQ ID NO: 265. El polinucleótido puede incluir o consistir en SEQ ID NO: 266. El polinucleótido puede incluir o consistir en SEQ ID NO: 267. El polinucleótido puede incluir o consistir en SEQ ID NO: 268.

Normalmente, un polinucleótido que codifica el polipéptido de fusión deseado se genera usando métodos de clonación molecular y en general se coloca dentro de un vector, tal como un plásmido o virus. El vector se usa para transformar el polinucleótido en una célula hospedadora apropiada para la expresión del polipéptido de fusión. Se describen métodos representativos, por ejemplo, en Maniatis *et al*. (Cold Springs Harbor Laboratory, 1989). Pueden usarse muchos tipos de células como células hospedadoras apropiadas, aunque son preferibles las células de mamífero porque pueden conferir modificaciones postraduccionales apropiadas (por ejemplo, glucosilación o sialilación). Las células hospedadoras de la presente divulgación pueden incluir, por ejemplo, células de ovario de hámster chino (CHO), células L, células C127, células 3T3, células BHK, células COS-7 o cualquier otra célula hospedadora adecuada conocida en la técnica. Por ejemplo, la célula hospedadora es una célula de ovario de hámster chino (CHO) (por ejemplo, una célula CHO-DG44) o una célula HEK293.

Las sALP y polipéptidos de fusión de sALP (por ejemplo, un polipéptido que tiene la secuencia de una cualquiera de SEQ ID NO: 7-223, 247 y 262-264 o una variante de la misma

con al menos un 85 % de identidad de secuencia con la misma y/o al menos una mutación aminoacídica con respecto a una ALP de origen natural, como se describe en el presente documento) pueden producirse en cualquier condición adecuada para lograr la expresión del polipéptido de sALP en la célula hospedadora. Dichas condiciones incluyen la selección adecuada de un medio preparado con componentes tales como un tampón, bicarbonato y/o HEPES, iones como cloruro, fosfato, calcio, sodio, potasio, magnesio, hierro, fuentes de carbono como glúcidos simples, aminoácidos, potencialmente lípidos, nucleótidos, vitaminas y factores de crecimiento como insulina; medios normales disponibles en el mercado como alfa-MEM, DMEM, medio de Ham-F12 e IMDM complementado con L-glutamina 2-4 mM y suero bovino fetal al 5 %; medios normales sin proteína animal disponibles en el mercado como HYCLONE™ SFM4CHO, Sigma CHO DHFR$^-$, Cambrex POWER™ CHO CD complementado con L-glutamina 2-4 mM. Estos medios se preparan deseablemente sin timidina, hipoxantina y L-glicina para mantener la presión selectiva, lo que permite una expresión estable del producto proteínico.

Se describen métodos a gran escala para fabricar proteína a granel, por ejemplo, en las publicaciones PCT n.° WO 2017/031114 y WO 2017/214130, cuyas divulgaciones se incorporan por la presente por referencia en su totalidad.

Métodos de tratamiento

En el presente documento se proporcionan métodos para tratar o mejorar al menos un síntoma de un sujeto con un trastorno de mineralización ósea, tal como HPP. Otras enfermedades o trastornos, tales como fractura ósea,

osteoporosis, esclerosteosis, condrocalcinosis, hipotonía, distrofia muscular de Duchenne, traqueobroncomalacia, convulsiones, neurofibromatosis 1 (NF-1) y la craneosinostosis también pueden tratarse mediante las composiciones y métodos descritos en el presente documento. El sujeto puede tener debilidad muscular. El sujeto puede tener una enfermedad de debilidad muscular, tal como depósito de pirofosfato de calcio (CPPD) o hipofosfatemia familiar. Dicho tratamiento puede incluir administrar una fosfatasa alcalina, o un polipéptido que tenga actividad de fosfatasa alcalina, para disminuir la concentración elevada de PPi en dicho sujeto. Por ejemplo, una fosfatasa alcalina soluble (sALP, por ejemplo, un polipéptido que tiene la secuencia de una cualquiera de SEQ ID NO: 7-223, 247 y 262-264 o una variante de la misma con al menos un 85 % de identidad de secuencia con la misma y/o al menos una mutación aminoacídica con respecto a una ALP de origen natural, como se describe en el presente documento) puede administrarse a recién nacidos, niños, adolescentes o adultos.

Los sujetos pueden diagnosticarse con un trastorno de mineralización ósea (por ejemplo, HPP) antes de la administración de una fosfatasa alcalina o un polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina (por ejemplo, una sALP, por ejemplo, un polipéptido que tiene la secuencia de una cualquiera de SEQ ID NO: 7-223, 247 y 262-264 o una variante de la misma con al menos un 85 % de identidad de secuencia con la misma y/o al menos una mutación aminoacídica con respecto a una ALP de origen natural, como se describe en el presente documento). Además, un sujeto que tiene o que es propenso a tener un trastorno de mineralización ósea, tal

como HPP, puede ser un sujeto nulitratado que no se ha tratado previamente con una sALP (por ejemplo, un polipéptido que tiene la secuencia de una cualquiera de SEQ ID NO: 7-223, 247 y 262-264 o una variante de la misma con al menos un 85 % de identidad de secuencia con la misma y/o al menos una mutación aminoacídica con respecto a una ALP de origen natural, como se describe en el presente documento).

El método incluye administrar una fosfatasa alcalina o un polipéptido que tenga actividad de fosfatasa alcalina (por ejemplo, una sALP, por ejemplo, un polipéptido que tiene la secuencia de una cualquiera de SEQ ID NO: 7-223, 247 y 262-264 o una variante de la misma con al menos un 85 % de identidad de secuencia con la misma y/o al menos una mutación aminoacídica con respecto a una ALP de origen natural, como se describe en el presente documento) a un sujeto que tiene o que es propenso a un trastorno de mineralización ósea, tal como HPP, en una sola dosificación o múltiples dosificaciones durante un periodo de tiempo. En particular, una sALP, tal como un polipéptido que tiene la secuencia de una cualquiera de SEQ ID NO: 7-223, 247 y 262-264, puede administrarse a un sujeto en el que previamente se ha determinado que tiene una concentración elevada de pirofosfato inorgánico (PPi) o al menos un biomarcador/puntuación predeterminada para un síntoma de HPP (por ejemplo, debilidad muscular), como una puntuación promedio de fuerza de BOT-2 de menos de 10, una puntuación promedio de velocidad de carrera y agilidad de BOT-2 de menos de 5, una puntuación promedio del índice de CHAQ mayor de aproximadamente 0.8 y/o una puntuación promedio de PODCI de menos de aproximadamente 40, un promedio de 6MWT de menos de aproximadamente un 80 % del valor de 6MWT

previsto, un grado de fuerza muscular de menos de 5, y/o un valor promedio de HHD (por ejemplo, un valor promedio de HHD muscular o de fuerza de agarre) de, por ejemplo, menos de aproximadamente un 80 % del valor de HHD previsto. Por ejemplo, una sALP puede administrarse a un sujeto en el que previamente se ha determinado que tiene una concentración de PPi en una muestra (por ejemplo, una muestra de plasma) mayor de aproximadamente 5.71 µM para un lactante o niño (por ejemplo, un sujeto de menos de aproximadamente 12 años de edad); mayor que aproximadamente 4.78 µM para un adolescente (por ejemplo, un sujeto de aproximadamente 13 a aproximadamente 18 años de edad); o mayor de aproximadamente 5.82 µM para un adulto (por ejemplo, un sujeto de más de aproximadamente 18 años). En otras realizaciones, el trastorno de mineralización ósea, tal como HPP, descrito en el presente documento está provocado por una concentración elevada de al menos un sustrato de fosfatasa alcalina (por ejemplo, PPi, PLP, PEA, etc.). Como alternativa, una fosfatasa alcalina o un polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina (por ejemplo, una sALP, por ejemplo, un polipéptido que tiene la secuencia de una cualquiera de SEQ ID NO: 7-223, 247 y 262-264 o una variante de la misma con al menos un 85 % de identidad de secuencia con la misma y/o al menos una mutación aminoacídica con respecto a una ALP de origen natural, como se describe en el presente documento) puede administrarse a un sujeto que tiene o que es propenso a un trastorno de mineralización ósea, tal como HPP, antes de la determinación de la puntuación de debilidad muscular (por ejemplo, usando la puntuación de fuerza de BOT-2, la puntuación de velocidad de carrera y agilidad de BOT-2, la

puntuación del índice de CHAQ, la puntuación graduada de BSID-III, la puntuación convencional de PDMS-2, una puntuación de fuerza muscular, un valor de 6MWT y/o un valor de HHD). El tratamiento con una ALP de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento promueve, por ejemplo, un aumento en las actividades de ADL, una disminución del dolor y/o una mejora en el desarrollo motor.

Además, cada una de las puntuaciones descritas (por ejemplo, la puntuación de fuerza de BOT-2, la puntuación de velocidad de carrera y agilidad de BOT-2, la puntuación del índice de CHAQ, la puntuación graduada de BSID-III, la puntuación convencional de PDMS-2, 6MWT, la 12-POMA-G, una evaluación de movilidad orientada al rendimiento modificada (mPOMA-G, tal como la ilustrada en Phillips *et al*. 2015 Bone Abstracts 4:P136) o el valor de HHD) de un sujeto que tiene o que es propenso a un trastorno de mineralización ósea, tal como HPP, descrito en el presente documento puede usarse en solitario o en cualquier combinación para evaluar la eficacia del tratamiento usando una sALP (por ejemplo, un polipéptido que tiene la secuencia de una cualquiera de SEQ ID NO: 7-223, 247 y 262-264 o una variante de la misma con al menos un 85 % de identidad de secuencia con la misma y/o al menos una mutación aminoacídica con respecto a una ALP de origen natural, como se describe en el presente documento), en la que las mejoras con respecto a una determinada puntuación de prueba demuestra que la sALP es eficaz para tratar el trastorno de mineralización ósea, tal como HPP.

Por ejemplo, cuando la administración de una fosfatasa alcalina o un polipéptido con actividad de fosfatasa alcalina (por ejemplo, una sALP, por ejemplo, un polipéptido que tiene

la secuencia de una cualquiera de SEQ ID NO: 7-223, 247 y 262-264 o una variante de la misma con al menos un 85 % de identidad de secuencia con la misma y/o al menos una mutación aminoacídica con respecto a una ALP de origen natural, como se describe en el presente documento) a un sujeto que tiene o que es propenso a un trastorno de mineralización ósea, tal como HPP, da como resultado un aumento promedio en la puntuación de fuerza de BOT-2 hasta aproximadamente 10 o más de aproximadamente 10, en la que el sujeto tenía previamente una puntuación promedio de fuerza de BOT-2 de menos de aproximadamente 10, entonces el tratamiento con fosfatasa alcalina o un polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina es eficaz para tratar, por ejemplo, deficiencias físicas asociadas con un trastorno de mineralización ósea, tal como HPP. Como alternativa, cuando la administración de una sALP no da como resultado un aumento promedio en la puntuación de fuerza de BOT-2 hasta aproximadamente 10 o más de aproximadamente 10, la dosificación y/o la frecuencia de administración de fosfatasa alcalina o un polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina pueden cambiarse para determinar la cantidad eficaz de fosfatasa alcalina o polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina para el sujeto. Por ejemplo, la dosificación de sALP (por ejemplo, un polipéptido que tiene la secuencia de una cualquiera de SEQ ID NO: 7-223, 247 y 262-264 o una variante de la misma con al menos un 85 % de identidad de secuencia con la misma y/o al menos una mutación aminoacídica con respecto a una ALP de origen natural, como se describe en el presente documento) puede aumentarse, por ejemplo, desde aproximadamente 0.5-3 mg/kg/semana hasta aproximadamente 3-

6 mg/kg/semana o desde aproximadamente 3-6 mg/kg/semana hasta aproximadamente 6-9 mg/kg/semana.

Adicionalmente, cuando la administración de una fosfatasa alcalina o un polipéptido con actividad de fosfatasa alcalina (por ejemplo, una sALP, por ejemplo, un polipéptido que tiene la secuencia de una cualquiera de SEQ ID NO: 7-223, 247 y 262-264 o una variante de la misma con al menos un 85 % de identidad de secuencia con la misma y/o al menos una mutación aminoacídica con respecto a una ALP de origen natural, como se describe en el presente documento) a un sujeto que tiene o que es propenso a un trastorno de mineralización ósea, tal como HPP, da como resultado una mejora en la clasificación del grado de fuerza muscular del sujeto de uno o más (por ejemplo, una mejora hasta un grado de fuerza muscular de 1, 2, 3, 4 o 5 de un grado de fuerza muscular anterior más bajo), en la que el sujeto tenía previamente un promedio de grado de fuerza muscular de menos de aproximadamente 5, entonces el tratamiento con fosfatasa alcalina o un polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina es eficaz para tratar, por ejemplo, deficiencias físicas asociadas con un trastorno de mineralización ósea, tal como HPP. Como alternativa, cuando la administración de una sALP no da como resultado una mejora en la clasificación del grado de fuerza muscular del sujeto de uno o más a partir de un grado de fuerza muscular anterior más bajo, la dosificación y/o la frecuencia de administración de fosfatasa alcalina o polipéptido con actividad de fosfatasa alcalina pueden cambiarse (por ejemplo, aumentarse) para determinar la cantidad eficaz de fosfatasa alcalina o polipéptido con actividad de fosfatasa alcalina para el

sujeto. Por ejemplo, la dosificación de sALP (por ejemplo, un polipéptido que tiene la secuencia de una cualquiera de SEQ ID NO: 7-223, 247 y 262-264 o una variante de la misma con al menos un 85 % de identidad de secuencia con la misma y/o al menos una mutación aminoacídica con respecto a una ALP de origen natural, como se describe en el presente documento) puede aumentarse, por ejemplo, desde aproximadamente 0.5-3 mg/kg/semana hasta aproximadamente 3-6 mg/kg/semana o desde aproximadamente 3-6 mg/kg/semana hasta aproximadamente 6-9 mg/kg/semana.

Biomarcadores/criterios de valoración para diagnóstico y/o tratamiento

Una mineralización ósea (tal como HPP incluyendo, por ejemplo, HPP perinatal, HPP del lactante, HPP infantil y odontohipofosfatasia, una enfermedad similar a HPP, CPPD e hipofosfatemia familiar, como se describe en el presente documento) puede tratarse con una fosfatasa alcalina o un polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina (por ejemplo una sALP, por ejemplo, un polipéptido que tiene la secuencia de una cualquiera de SEQ ID NO: 7-223, 247 y 262-264 o una variante de la misma con al menos un 85 % de identidad de secuencia con la misma y/o al menos una mutación aminoacídica con respecto a una ALP de origen natural, como se describe en el presente documento). Los métodos descritos en el presente documento también son útiles para diagnosticar a un sujeto que tiene o que es propenso a un trastorno de mineralización ósea, tal como HPP, identificar a un sujeto que tiene o que es propenso a un trastorno de mineralización ósea, tal como HPP, o someter a prueba la eficacia del

tratamiento de un trastorno de mineralización ósea, tal como HPP. Por ejemplo, puede diagnosticarse que un sujeto tiene o es propenso a un trastorno de mineralización ósea, tal como HPP, si el sujeto se caracteriza por tener determinados biomarcadores característicos o puntuaciones de parámetros. Un sujeto puede tratarse con una fosfatasa alcalina o un polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina (por ejemplo una sALP, por ejemplo, un polipéptido que tiene la secuencia de una cualquiera de SEQ ID NO: 7-223, 247 y 262-264 o una variante de la misma con al menos un 85 % de identidad de secuencia con la misma y/o al menos una mutación aminoacídica con respecto a una ALP de origen natural, como se describe en el presente documento), y la eficacia o los efectos del tratamiento pueden analizarse utilizando los biomarcadores característicos o puntuaciones de parámetros. Dichos biomarcadores pueden incluir, por ejemplo, la concentración elevada de pirofosfato inorgánico (PPi) y/o la fosfatasa alcalina (ALP) disminuida en el suero, los tejidos óseo o muscular, o la orina del sujeto. Los parámetros ilustrativos útiles en los métodos descritos en el presente documento para determinar la eficacia del tratamiento de la debilidad muscular pueden incluir: (1) la prueba de competencia motora de Bruininks-Oseretsky 2.ª edición (BOT-2), (2) el cuestionario de evaluación de la salud infantil (CHAQ), (3) el instrumento de recopilación de datos de resultados pediátricos (PODCI), (4) las escalas de desarrollo de lactantes menores y lactantes mayores de Bayley, 3.ª edición (BSID-III), (5) las escalas motoras de desarrollo de Peabody, 2.ª edición (PDMS-2), (6) la prueba de caminata de seis minutos (6MWT), (7) el grado de fuerza

muscular y (8) la dinamometría manual (HHD), que se describen con más detalle a continuación.

Cicatrización y mineralización ósea

Un sujeto que tiene o que es propenso a un trastorno de mineralización ósea, tal como HPP, puede identificarse para el tratamiento con una fosfatasa alcalina o un polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina (por ejemplo una sALP, por ejemplo, un polipéptido que tiene la secuencia de una cualquiera de SEQ ID NO: 7-223, 247 y 262-264 o una variante de la misma con al menos un 85 % de identidad de secuencia con la misma y/o al menos una mutación aminoacídica con respecto a una ALP de origen natural, como se describe en el presente documento) basándose en el nivel de mineralización ósea. Por ejemplo, la mineralización ósea puede usarse como parámetros para diagnosticar que un paciente tiene un trastorno de mineralización ósea, tal como HPP, o para someter a prueba la eficacia de un polipéptido descrito en el presente documento. En un sujeto con un trastorno de mineralización ósea (por ejemplo, HPP), la administración de sALP da como resultado un aumento en la cicatrización ósea en el sujeto después de un tratamiento exitoso.

Una disminución en la cicatrización ósea da como resultado la pérdida de hueso e incluye mineralización disminuida que da como resultado la desunión de dos o más huesos. La cicatrización ósea y la mineralización disminuida pueden compararse con un hueso de referencia. Los métodos para identificar una disminución en la cicatrización y mineralización ósea son rutinarios e incluyen técnicas no

invasivas tales como radiografía y tomografía computarizada (CT - *computed tomography*). Normalmente, pueden tomarse imágenes de la zona relevante del sujeto antes y en uno o más puntos temporales después del tratamiento con sALP, y las imágenes pueden compararse para evaluar la eficacia del tratamiento. La cicatrización y/o mineralización ósea disminuidas pueden identificarse como opacidad disminuida. Pueden tomarse imágenes en cualquier momento durante el tratamiento con sALP y pueden programarse para que sean, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 o 6 días, semanas, meses o años después del inicio del tratamiento ERT con sALP o cuando se sospeche una disminución de la eficacia. La disminución en la cicatrización y/o mineralización ósea en el sujeto puede volverse detectable al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 semanas o meses después del inicio del periodo de tratamiento con sALP. La disminución de la cicatrización y/o mineralización ósea en el sujeto, en algunos casos, puede mantenerse durante al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 semanas, meses o años después del inicio del periodo de tratamiento ERT con sALP. Un aumento en la cicatrización y mineralización ósea puede usarse para determinar que la eficacia de sALP se restablece y que el trastorno de mineralización ósea (por ejemplo, HPP) se está tratando de manera eficaz después del tratamiento.

Densidad mineral ósea (DMO)

Un sujeto que tiene o que es propenso a un trastorno de mineralización ósea, tal como HPP, puede identificarse para el tratamiento con una fosfatasa alcalina o un polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina (por ejemplo una

sALP, por ejemplo, un polipéptido que tiene la secuencia de una cualquiera de SEQ ID NO: 7-223, 247 y 262-264 o una variante de la misma con al menos un 85 % de identidad de secuencia con la misma y/o al menos una mutación aminoacídica con respecto a una ALP de origen natural, como se describe en el presente documento) basándose en un nivel de DMO. Una reducción en la DMO (por ejemplo, con respecto a un sujeto normal) puede usarse como parámetro para diagnosticar que un paciente tiene un trastorno de mineralización ósea, tal como HPP.

Puede usarse una disminución en la DMO para controlar la eficacia de la sALP (por ejemplo, el polipéptido de una cualquiera de SEQ ID NO: 7-223, 247 y 262-264) durante el ERT. Los métodos para medir la DMO son conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, biopsia ósea, absorciometría de rayos X de energía doble (DXA o DEXA), CT cuantitativa periférica (pQCT), pQCT de alta resolución (HR-pQCT) y ultrasonidos cuantitativos (QUS). Las mediciones pueden hacerse mediante cualquier método de rutina, incluyendo la medición de CT de Hounsfield, y pueden compararse los resultados con una base de datos normativa o un sujeto de control. La DMO a veces se presenta como una puntuación Z o una puntuación T. Los valores de DMO previos al tratamiento pueden medirse en cualquier momento durante el tratamiento ERT con sALP y pueden programarse para que sean 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 días, semanas, meses o años después del inicio de ERT con sALP. El valor de DMO de un punto de referencia después del tratamiento puede disminuir, por ejemplo, en un 0.01 %, 0.05 %, 0.1 %, 0.5 % o 1 %. La disminución en un valor de DMO de un punto de

referencia después del inicio del tratamiento con sALP también puede permanecer inalterado o un cambio es indetectable. Un aumento en la DMO puede usarse para determinar que la eficacia de sALP se restablece y que el trastorno de mineralización ósea (por ejemplo, HPP) se está tratando de manera eficaz después del tratamiento.

Concentraciones plasmáticas de pirofosfato inorgánico (PPi) y fosfatasa alcalina (ALP)

Un sujeto que tiene o que es propenso a un trastorno de mineralización ósea, tal como HPP, puede identificarse para el tratamiento con una fosfatasa alcalina o un polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina (por ejemplo una sALP, por ejemplo, un polipéptido que tiene la secuencia de una cualquiera de SEQ ID NO: 7-223, 247 y 262-264 o una variante de la misma con al menos un 85 % de identidad de secuencia con la misma y/o al menos una mutación aminoacídica con respecto a una ALP de origen natural, como se describe en el presente documento) determinando las concentraciones de pirofosfato inorgánico (PPi) y/o fosfatasa alcalina (ALP) en una muestra, tal como una muestra de plasma o de orina, del sujeto. Puede usarse cualquier método conocido por los expertos en la materia para cuantificar las concentraciones de PPi y/o ALP en una muestra de plasma o, como alternativa, en una muestra de orina, como se describe en detalle en Whyte *et al*., 1995 (J. Clin. Invest 95(4): 1440-1445), incorporado por la presente por referencia en su totalidad. También se describen métodos para cuantificar las concentraciones de PPi en una muestra de plasma u orina en Cheung *et al*., 1977 (Anal. Biochem. 83: 61-63), Cook *et al*., 1978 (Anal. Biochem.

91: 557-565) y Johnson *et al*., 1968 (Anal. Biochem. 26: 137-145), que se incorporan por la presente por referencia en su totalidad.

En particular, una fosfatasa alcalina o un polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina (por ejemplo una sALP, por ejemplo, un polipéptido que tiene la secuencia de una cualquiera de SEQ ID NO: 7-223, 247 y 262-264 o una variante de la misma con al menos un 85 % de identidad de secuencia con la misma y/o al menos una mutación aminoacídica con respecto a una ALP de origen natural, como se describe en el presente documento) puede administrarse a un sujeto que tiene o que es propenso a un trastorno de mineralización ósea, tal como HPP, en el que se ha determinado previamente que tiene una concentración plasmática de PPi de hasta aproximadamente 6 µM (por ejemplo, aproximadamente 4.5 µM, aproximadamente 5 µM o aproximadamente 5.5 µM o una concentración plasmática de PPi dentro del intervalo de aproximadamente 4.5 µM a aproximadamente 6 µM). Por ejemplo, la fosfatasa alcalina o el polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina se administra, por ejemplo, a un lactante o niño (por ejemplo, un sujeto de menos de aproximadamente 12 años de edad) que tiene una concentración plasmática de PPi de aproximadamente 5.71 µM o mayor; un adolescente (por ejemplo, un sujeto de aproximadamente 13 a unos 18 años de edad) que tiene una concentración plasmática de PPi de aproximadamente 4.78 µM o mayor; o un adulto (por ejemplo, un sujeto de más de 18 años de edad) que tiene una concentración plasmática de PPi de aproximadamente 5.82 µM o mayor. Adicionalmente, una fosfatasa alcalina o un polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina puede

administrarse a un sujeto (por ejemplo, un ser humano) que tiene o que es propenso a un trastorno de mineralización ósea, tal como HPP, en el que se ha determinado previamente que tiene una concentración plasmática de ALP de, por ejemplo, aproximadamente 90 U/l o menor para un sujeto de 0 a 14 días de edad; aproximadamente 134 U/l o menor para un sujeto de 15 días de edad a menos de 1 año de edad; aproximadamente 156 U/l o menor para un sujeto de aproximadamente 1 año de edad a menos de 10 años de edad; aproximadamente 141 U/l o menor para un sujeto de aproximadamente 10 años de edad a menos de aproximadamente 13 años de edad; aproximadamente 62 U/l o menor para un sujeto femenino de aproximadamente 13 años de edad a menos de aproximadamente 15 años de edad; aproximadamente 127 U/l o menor para un sujeto masculino de aproximadamente 13 años de edad a menos de aproximadamente 15 años de edad; aproximadamente 54 U/l o menor para un sujeto femenino de aproximadamente 15 años de edad a menos de aproximadamente 17 años de edad; aproximadamente 89 U/l o menor para un sujeto masculino de aproximadamente 15 años de edad a menos de aproximadamente 17 años de edad; aproximadamente 48 U/l o menor para un sujeto femenino de aproximadamente 17 años de edad o más; o aproximadamente 59 U/l o menor para un sujeto masculino de aproximadamente 17 años de edad o más.

La concentración plasmática de PPi y/o la concentración plasmática de ALP de un sujeto (por ejemplo, un ser humano) que tiene o que es propenso a un trastorno de mineralización ósea, tal como HPP, puede compararse con la concentración plasmática de PPi y/o la plasmática de ALP de un sujeto normal para determinar el efecto del tratamiento en el sujeto

al que se le administró una fosfatasa alcalina o un polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina (por ejemplo una sALP, por ejemplo, un polipéptido que tiene la secuencia de una cualquiera de SEQ ID NO: 7-223, 247 y 262-264 o una variante de la misma con al menos un 85 % de identidad de secuencia con la misma y/o al menos una mutación aminoacídica con respecto a una ALP de origen natural, como se describe en el presente documento). En particular, la fosfatasa alcalina o el polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina puede administrarse durante un periodo de tratamiento de al menos un año (por ejemplo, al menos dos años, al menos tres años, al menos cuatro años, al menos cinco años, al menos seis años, al menos siete años, al menos ocho años, al menos nueve años, al menos diez años o más de diez años, tal como durante la vida del sujeto). Como alternativa, los métodos pueden incluir determinar la concentración plasmática de PPi y/o la concentración plasmática de ALP antes de administrar la fosfatasa alcalina o el polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina para evaluar un efecto en el sujeto del tratamiento con la fosfatasa alcalina o el polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina.

Los métodos dan como resultado una disminución en PPi y/o un aumento en la concentración de ALP en una muestra (por ejemplo, una muestra de plasma) de un sujeto (por ejemplo, un sujeto humano) que tiene o que es propenso a un trastorno de mineralización ósea, tal como HPP. Por ejemplo, el tratamiento con una fosfatasa alcalina o un polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina (por ejemplo una sALP, por ejemplo, un polipéptido que tiene la secuencia de

una cualquiera de SEQ ID NO: 7-223, 247 y 262-264 o una variante de la misma con al menos un 85 % de identidad de secuencia con la misma y/o al menos una mutación aminoacídica con respecto a una ALP de origen natural, como se describe en el presente documento) da como resultado una disminución en la concentración de PPi en una muestra (por ejemplo, una muestra de plasma) del sujeto de aproximadamente 1 mM, aproximadamente 1.5 mM, aproximadamente 2 mM, aproximadamente 2.5 mM o aproximadamente 3 mM o un 25 % o más (por ejemplo, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 % o más de un 60 %). Por tanto, el sujeto presenta una concentración plasmática de PPi, por ejemplo, de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 5 mM, de aproximadamente 3 mM a aproximadamente 5 mM, de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 4 mM o de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 3 mM después de la administración de la fosfatasa alcalina o el polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina.

Asimismo, el tratamiento con fosfatasa alcalina o un polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina da como resultado un aumento en la concentración de ALP en una muestra (por ejemplo, una muestra de plasma) de un sujeto (por ejemplo, un ser humano) que tiene o que es propenso a un trastorno de mineralización ósea, tal como HPP, de un 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 % o más de un 60 %, con respecto al sujeto antes de la administración de la fosfatasa alcalina o un polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina. Por ejemplo, la administración de la fosfatasa alcalina o el polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina aumenta la concentración de ALP en una

muestra (por ejemplo, una muestra de plasma) del sujeto hasta, por ejemplo, aproximadamente 273 U/l o mayor para un sujeto de 0 a 14 días de edad; aproximadamente 518 U/l o más para un sujeto de 15 días de edad a menos de 1 año de edad; aproximadamente 369 U/l o mayor para de aproximadamente 1 año de edad a menos de 10 años de edad; aproximadamente 460 U/l o mayor para un sujeto de aproximadamente 10 años de edad a menos de aproximadamente 13 años de edad; aproximadamente 280 U/l o mayor para un sujeto femenino de aproximadamente 13 años de edad a menos de aproximadamente 15 años de edad; aproximadamente 517 U/l o mayor para un sujeto masculino de aproximadamente 13 años de edad a menos de aproximadamente 15 años de edad; aproximadamente 128 U/l o mayor para un sujeto femenino de aproximadamente 15 años de edad a menos de aproximadamente 17 años de edad; aproximadamente 365 U/l o mayor para un sujeto masculino de aproximadamente 15 años de edad a menos de aproximadamente 17 años de edad; aproximadamente 95 U/l o mayor para un sujeto femenino de aproximadamente 17 años de edad o más; o aproximadamente 164 U/l o mayor para un sujeto masculino de aproximadamente 17 años de edad o más.

La disminución en el PPi plasmático y/o el aumento en las concentraciones de ALP del sujeto (por ejemplo, un ser humano) que tiene o que es propenso a un trastorno de mineralización ósea, tal como HPP, puede mantenerse a lo largo de la administración de la fosfatasa alcalina o el polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina (por ejemplo, una sALP, por ejemplo, un polipéptido que tiene la secuencia de una cualquiera de SEQ ID NO: 7-223, 247 y 262-264 o una variante de la misma con al menos un 85 % de

identidad de secuencia con la misma y/o al menos una mutación aminoacídica con respecto a una ALP de origen natural, como se describe en el presente documento). Por ejemplo, la concentración plasmática de PPi disminuye en aproximadamente un 25 % y permanece en ±10 % de la concentración plasmática de PPi disminuida durante el tratamiento con la sALP y/o la concentración plasmática de ALP aumenta en aproximadamente un 50 % y permanece en ±10 % de la concentración plasmática de ALP aumentada durante el tratamiento con la fosfatasa alcalina o el polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina.

Como alternativa, cuando la administración de una fosfatasa alcalina o un polipéptido con actividad de fosfatasa alcalina (por ejemplo, una sALP, por ejemplo, un polipéptido que tiene la secuencia de una cualquiera de SEQ ID NO: 7-223, 247 y 262-264 o una variante de la misma con al menos un 85 % de identidad de secuencia con la misma y/o al menos una mutación aminoacídica con respecto a una ALP de origen natural, como se describe en el presente documento) no da como resultado una disminución promedio en las concentraciones de PPi en una muestra de plasma del sujeto (por ejemplo, un ser humano) que tiene o que es propenso a un trastorno de mineralización ósea, tal como HPP, de aproximadamente un 25 % o más, la dosificación y/o la frecuencia de administración de sALP pueden cambiarse para determinar una cantidad eficaz de sALP para el sujeto. Asimismo, cuando la administración de una fosfatasa alcalina o un polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina no da como resultado un aumento promedio en las concentraciones de ALP en una muestra de plasma del sujeto

de aproximadamente un 50 % o más, la dosificación y/o la frecuencia de administración de fosfatasa alcalina o un polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina puede cambiarse para determinar una cantidad eficaz de la fosfatasa alcalina o un polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina para el sujeto. Por ejemplo, la dosificación de la fosfatasa alcalina o un polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina puede aumentarse, por ejemplo, de aproximadamente 0.5 mg/kg/semana o aproximadamente 3.5 mg/kg/semana hasta aproximadamente 3-6 mg/kg/semana o aproximadamente 6-9 mg/kg/semana.

Prueba de competencia motora de Bruininks-Oseretsky 2.ª edición (BOT-2)

Una prueba ilustrativa de competencia motora de Bruininks-Oseretsky 2.ª edición (BOT-2) se describe en Bruininks, RH (2005). *Bruininks-Oseretsky Test of Motor Proficiency, (BOT-2)*, Mineápolis, MN: Pearson Assessment, incorporado por la presente por referencia en su totalidad. En particular, la BOT-2 puede usarse para evaluar deficiencias físicas y restricciones de movilidad en un sujeto que tiene o que es propenso a un trastorno de mineralización ósea (por ejemplo, HPP) para generar una puntuación de BOT-2 para el sujeto.

La BOT-2 incluye una serie de pruebas para evaluar las deficiencias físicas de un sujeto, que pueden realizarse, por ejemplo, con un kit que incluye las pruebas. La BOT-2 proporciona puntuaciones combinadas de BOT-2 en las siguientes áreas: fuerza, velocidad de carrera y agilidad, precisión motora fina, integración motora fina, destreza

manual, coordinación bilateral, equilibrio y coordinación de las extremidades superiores. Por ejemplo, un sujeto que tiene o que es propenso a un trastorno de mineralización ósea, tal como HPP, puede realizar abdominales normales, abdominales en v, salto de longitud de pie, sentadas en la pared y/o flexiones para determinar la puntuación de fuerza de BOT-2. Un sujeto que tiene o que es propenso a un trastorno de mineralización ósea, tal como HPP, puede pasar sobre una barra de equilibrio y/o realizar una carrera de ida y vuelta, un salto lateral con dos piernas y/o un salto lateral con una pierna para determinar la puntuación de velocidad de carrera y agilidad de BOT-2. Un sujeto que tiene o que es propenso a un trastorno de mineralización ósea, tal como HPP, puede recortar un círculo y/o conectar puntos para determinar la puntuación de precisión motora fina de BOT-2. Un sujeto que tiene o que es propenso a un trastorno de mineralización ósea, tal como HPP, puede copiar una estrella y/o copiar un cuadrado para determinar la puntuación de integración motora fina de BOT-2. Un sujeto que tiene o que es propenso a un trastorno de mineralización ósea, tal como HPP, puede transferir peniques, clasificar tarjetas y/o ensartar bloques para determinar la puntuación de destreza manual. Un sujeto que tiene o que es propenso a un trastorno de mineralización ósea, tal como HPP, puede tocarse el pie y el dedo y/o realizar saltos para determinar la puntuación de coordinación bilateral de BOT-2. Un sujeto que tiene o que es propenso a un trastorno de mineralización ósea, tal como HPP, puede caminar hacia adelante sobre una línea y/o pararse sobre una pierna en una barra de equilibrio para determinar la puntuación de equilibrio de BOT-2. Un sujeto

que tiene o que es propenso a un trastorno de mineralización ósea, tal como HPP, puede lanzar una pelota a un objetivo y/o atrapar una pelota lanzada para determinar la puntuación de coordinación de las extremidades superiores de BOT-2.

Un sujeto que tiene o que es propenso a un trastorno de mineralización ósea, tal como HPP, podría realizar pruebas en una o más de las áreas descritas (fuerza, velocidad de carrera y agilidad, precisión motora fina, integración motora fina, destreza manual, coordinación bilateral, equilibrio y coordinación de las extremidades superiores) para generar una puntuación de BOT-2 indicativa de deficiencias físicas en el sujeto. Dentro de cada área de BOT-2 (fuerza, velocidad de carrera y agilidad, precisión motora fina, integración motora fina, destreza manual, coordinación bilateral, equilibrio y coordinación de las extremidades superiores), dicho sujeto podría realizar una o más pruebas para determinar la puntuación de BOT-2 del sujeto, por ejemplo, el sujeto podría realizar uno o más de abdominales normales, abdominales en v, salto de longitud de pie, sentadas en la pared y flexiones para determinar la puntuación de fuerza de BOT-2. Por tanto, solo puede realizarse una prueba (por ejemplo, una prueba seleccionada del grupo de abdominales normales, abdominales en v, salto de longitud de pie, sentadas en la pared y flexiones) para determinar la puntuación de BOT-2 (por ejemplo, una puntuación de fuerza de BOT-2) de un sujeto que tiene o que es propenso a un trastorno de mineralización ósea, tal como HPP (por ejemplo, una enfermedad similar a HPP).

Cada una de las puntuaciones de BOT-2 (fuerza, velocidad de carrera y agilidad, precisión motora fina, integración

motora fina, destreza manual, coordinación bilateral, equilibrio y coordinación de las extremidades superiores) del sujeto que tiene o que es propenso a un trastorno de mineralización ósea, tal como HPP, puede compararse con la puntuación de BOT-2 de un sujeto sin el trastorno de mineralización ósea, tal como HPP, por ejemplo, para determinar una comparación inicial de la puntuación de BOT-2. Cada una de las puntuaciones de BOT-2 (por ejemplo, fuerza, velocidad de carrera y agilidad, precisión motora fina, integración motora fina, destreza manual, coordinación bilateral, equilibrio y coordinación de las extremidades superiores) del sujeto que tiene o que es propenso a un trastorno de mineralización ósea, tal como HPP, puede compararse con la puntuación de BOT-2 de otros sujetos que tienen o que son propensos al trastorno de mineralización ósea, tal como HPP, por ejemplo, para proporcionar una puntuación de BOT-2 con respecto al sujeto.

Las puntuaciones de BOT-2 (por ejemplo, puntuaciones de fuerza, velocidad de carrera y agilidad, precisión motora fina, integración motora fina, destreza manual, coordinación bilateral, equilibrio y coordinación de las extremidades superiores) varían de aproximadamente 0 a menos de aproximadamente 25, en las que una puntuación de aproximadamente 10 a aproximadamente 20 se considera representativa de un sujeto sano (por ejemplo, un sujeto sin el trastorno de mineralización ósea, tal como HPP). Un sujeto con una puntuación promedio de BOT-2 (por ejemplo, puntuaciones de fuerza, velocidad de carrera y agilidad, precisión motora fina, integración motora fina, destreza manual, coordinación bilateral, equilibrio y coordinación de

las extremidades superiores) de menos de 10 puede tratarse con una fosfatasa alcalina o un polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina, por ejemplo, sALP, por ejemplo, un polipéptido que tiene la secuencia de una cualquiera de SEQ ID NO: 7-223, 247 y 262-264 o una variante de la misma con al menos un 85 % de identidad de secuencia con la misma y/o al menos una mutación aminoacídica con respecto a una ALP de origen natural, como se describe en el presente documento.

Por ejemplo, un sujeto que tiene o que es propenso a un trastorno de mineralización ósea, tal como HPP, con una puntuación de fuerza de BOT-2 de menos de 10 (por ejemplo, aproximadamente 0, aproximadamente 1, aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5, aproximadamente 6, aproximadamente 7, aproximadamente 8, aproximadamente 9 o aproximadamente 10) puede tratarse con una sALP (por ejemplo, un polipéptido que tiene la secuencia de una cualquiera de SEQ ID NO: 7-223, 247 y 262-264 o una variante de la misma con al menos un 85 % de identidad de secuencia con la misma y/o al menos una mutación aminoacídica con respecto a una ALP de origen natural, como se describe en el presente documento) durante un periodo de tiempo, hasta toda la vida del sujeto. Asimismo, un sujeto que tiene o que es propenso a un trastorno de mineralización ósea, tal como HPP, con una puntuación de velocidad de carrera y agilidad de BOT-2 de menos de 10 (por ejemplo, aproximadamente 0, aproximadamente 1, aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5, aproximadamente 6, aproximadamente 7, aproximadamente 8, aproximadamente 9 o aproximadamente 10) puede tratarse con una sALP (por ejemplo,

un polipéptido que tiene la secuencia de una cualquiera de SEQ ID NO: 7-223, 247 y 262-264 o una variante de la misma con al menos un 85 % de identidad de secuencia con la misma y/o al menos una mutación aminoacídica con respecto a una ALP de origen natural, como se describe en el presente documento) durante un periodo de tiempo, hasta toda la vida del sujeto.

Los métodos pueden dar como resultado una mejora en la puntuación de BOT-2 (por ejemplo, puntuación de fuerza, velocidad de carrera y agilidad, precisión motora fina, integración motora fina, destreza manual, coordinación bilateral, equilibrio y/o coordinación de las extremidades superiores) de un sujeto que tiene o que es propenso a un trastorno de mineralización ósea, tal como HPP. Por ejemplo, el tratamiento con una fosfatasa alcalina, o con un polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina, tal como una sALP (por ejemplo, un polipéptido que tiene la secuencia de una cualquiera de SEQ ID NO: 7-223, 247 y 262-264 o una variante de la misma con al menos un 85 % de identidad de secuencia con la misma y/o al menos una mutación aminoacídica con respecto a una ALP de origen natural, como se describe en el presente documento), tal como el tratamiento con una sALP durante un periodo de tiempo, puede dar como resultado un aumento promedio en la puntuación de fuerza de BOT-2 hasta aproximadamente 10 a aproximadamente 20 (por ejemplo, aproximadamente 10, aproximadamente 11, aproximadamente 12, aproximadamente 13, aproximadamente 14, aproximadamente 15, aproximadamente 16, aproximadamente 17, aproximadamente 18, aproximadamente 19 o aproximadamente 20). Adicionalmente, el tratamiento con una sALP (por

ejemplo, un polipéptido que tiene la secuencia de una cualquiera de SEQ ID NO: 7-223, 247 y 262-264 o una variante de la misma con al menos un 85 % de identidad de secuencia con la misma y/o al menos una mutación aminoacídica con respecto a una ALP de origen natural, como se describe en el presente documento) puede dar como resultado un aumento promedio en la puntuación de velocidad de carrera y agilidad de BOT-2 hasta aproximadamente 5 a aproximadamente 20 (por ejemplo, aproximadamente 5, aproximadamente 6, aproximadamente 7, aproximadamente 8, aproximadamente 9, aproximadamente 10, aproximadamente 11, aproximadamente 12, aproximadamente 13, aproximadamente 14, aproximadamente 15, aproximadamente 16, aproximadamente 17, aproximadamente 18, aproximadamente 19 o aproximadamente 20).

El aumento en la puntuación de BOT-2 (por ejemplo, puntuación de fuerza, velocidad de carrera y agilidad, precisión motora fina, integración motora fina, destreza manual, coordinación bilateral, equilibrio y/o coordinación de las extremidades superiores) puede mantenerse durante la administración de la fosfatasa alcalina o el polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina, tal como sALP (por ejemplo, un polipéptido que tiene la secuencia de una cualquiera de SEQ ID NO: 7-223, 247 y 262-264 o una variante de la misma con al menos un 85 % de identidad de secuencia con la misma y/o al menos una mutación aminoacídica con respecto a una ALP de origen natural, como se describe en el presente documento), p ejemplo durante un periodo de tiempo. Asimismo, la disminución de las deficiencias físicas de los músculos después de la administración de la fosfatasa alcalina o el polipéptido que tiene actividad de fosfatasa

alcalina, puede mantenerse durante la administración de la fosfatasa alcalina o el polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina.

Las puntuaciones de BOT-2 (puntuaciones de fuerza, velocidad de carrera y agilidad, precisión motora fina, integración motora fina, destreza manual, coordinación bilateral, equilibrio y coordinación de las extremidades superiores) de un sujeto que tiene o que es propenso a un trastorno de mineralización ósea, tal como HPP, pueden usarse individualmente o en combinación con otros parámetros para evaluar la eficacia del tratamiento usando una fosfatasa alcalina o un polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina, tal como sALP (por ejemplo, un polipéptido que tiene la secuencia de una cualquiera de SEQ ID NO: 7-223, 247 y 262-264 o una variante de la misma con al menos un 85 % de identidad de secuencia con la misma y/o al menos una mutación aminoacídica con respecto a una ALP de origen natural, como se describe en el presente documento), en las que las mejoras con respecto a una determinado puntuación de la prueba demuestran que la fosfatasa alcalina o el polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina, es eficaz para tratar las deficiencias musculares asociadas con el trastorno de mineralización ósea, tal como HPP. Por ejemplo, cuando la administración de una sALP descrita en el presente documento a un sujeto que tiene o que es propenso a un trastorno de mineralización ósea, tal como HPP, da como resultado un aumento promedio en la puntuación de velocidad de carrera y agilidad de BOT-2 hasta aproximadamente 5 o más de aproximadamente 5, en la que el sujeto tenía previamente una puntuación promedio de velocidad de carrera y agilidad

de BOT-2 de menos de aproximadamente 5, entonces se considera que la sALP es eficaz, por ejemplo, para tratar las deficiencias físicas asociadas con un trastorno de mineralización ósea, tal como HPP.

Además, dentro de cada área de BOT-2 (fuerza, velocidad de carrera y agilidad, precisión motora fina, integración motora fina, destreza manual, coordinación bilateral, equilibrio y coordinación de las extremidades superiores), un sujeto que tiene o que es propenso a un trastorno de mineralización ósea, tal como HPP, podría realizar una o más pruebas para determinar la puntuación de BOT-2 del sujeto.

Como alternativa, cuando la administración de una fosfatasa alcalina o un polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina, tal como una sALP descrita en el presente documento, no da como resultado un aumento promedio en la puntuación de velocidad de carrera y agilidad de BOT-2 hasta más de aproximadamente 5, la dosificación y/o la frecuencia de administración pueden cambiarse para determinar la cantidad eficaz de la fosfatasa alcalina o el polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina, para el sujeto que tiene o que es propenso al trastorno de mineralización ósea, tal como HPP. Por ejemplo, la dosificación de sALP (por ejemplo, un polipéptido que tiene la secuencia de una cualquiera de SEQ ID NO: 7-223, 247 y 262-264 o una variante de la misma con al menos un 85 % de identidad de secuencia con la misma y/o al menos una mutación aminoacídica con respecto a una ALP de origen natural, como se describe en el presente documento) puede aumentarse, por ejemplo, desde aproximadamente 0.5-3 mg/kg/semana hasta aproximadamente 3-6 mg/kg/semana o desde aproximadamente 3-6 mg/kg/semana

hasta aproximadamente 6-9 mg/kg/semana.

Cuestionario de evaluación de la salud infantil (CHAQ)

El cuestionario de evaluación de la salud infantil (CHAQ) puede administrarse para evaluar el estado de salud de niños que tienen un trastorno de mineralización ósea, tal como HPP, para generar una puntuación de índice de CHAQ para el niño, como se describe en Bruce y Fries (*J. Rheumatol.* 30(1): 167-178, 2003) y Klepper (*Arthritis & Rheumatism*, 49: S5–S14, 2003), incorporados por la presente por referencia en su totalidad. El CHAQ incluye ocho categorías de preguntas para vestirse/asearse, levantarse, comer, caminar, higiene, alcance, agarre y actividades, en las que un progenitor o tutor registra la cantidad de dificultad que el niño con el trastorno de mineralización ósea, tal como HPP, tiene en el desempeño de las respectivas actividades. El intervalo de puntuaciones dentro de cada categoría es de 0 a 3, en que una puntuación de 0 indica sin ninguna dificultad; una puntuación de 1 indica con algo de dificultad; una puntuación de 2 indica con mucha dificultad; y una puntuación de 3 indica que el niño es incapaz de realizar la actividad.

Niños que tienen o que son propensos a un trastorno de mineralización ósea, tal como HPP, con una puntuación promedio en el índice de CHAQ (por ejemplo, indicativo de discapacidad en actividades cotidianas (ADL) y/o dolor) de más de aproximadamente 0.8 (por ejemplo, aproximadamente 0.8, aproximadamente 1, aproximadamente 1.2, aproximadamente 1.4, aproximadamente 1.6, aproximadamente 1.8, aproximadamente 2.0, aproximadamente 2.2, aproximadamente 2.4, aproximadamente 2.6, aproximadamente 2.8 o

aproximadamente 3.0) pueden tratarse administrando una fosfatasa alcalina o un polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina, tal como sALP (por ejemplo, un polipéptido que tiene la secuencia de una cualquiera de SEQ ID NO: 7-223, 247 y 262-264 o una variante de la misma con al menos un 85 % de identidad de secuencia con la misma y/o al menos una mutación aminoacídica con respecto a una ALP de origen natural, como se describe en el presente documento). Por ejemplo, niños con una puntuación promedio en el índice de CHAQ de más de 0.8 pueden tratarse administrando una fosfatasa alcalina o un polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina, tal como sALP (por ejemplo, un polipéptido que tiene la secuencia de una cualquiera de SEQ ID NO: 7-223, 247 y 262-264 o una variante de la misma con al menos un 85 % de identidad de secuencia con la misma y/o al menos una mutación aminoacídica con respecto a una ALP de origen natural, como se describe en el presente documento) durante un periodo de tiempo, hasta toda la vida del sujeto. Además, a un niño que tiene o que es propenso a un trastorno de mineralización ósea, tal como HPP, divulgado en el presente documento, se le puede hacer una o más preguntas en una o más de las ocho categorías (vestirse/asearse, levantarse, comer, caminar, higiene, alcance, agarre y actividades) para llegar a una puntuación promedio en el índice de CHAQ, y si la puntuación promedio en el índice de CHAQ es de más de aproximadamente 0.8, el niño puede tratarse administrando una fosfatasa alcalina o un polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina, tal como sALP.

La puntuación en el índice de CHAQ de un niño que tiene o que es propenso a un trastorno de mineralización ósea, tal

como HPP, divulgado en el presente documento puede compararse con la puntuación en el índice de CHAQ de niños sin dicho trastorno de mineralización ósea, tal como HPP, por ejemplo, para determinar la desviación típica de la puntuación en el índice de CHAQ. Además, la puntuación en el índice de CHAQ de un niño que tiene o que es propenso a un trastorno de mineralización ósea, tal como HPP, divulgado en el presente documento puede compararse con la puntuación en el índice de CHAQ de otros niños que tienen o que son propensos al trastorno de mineralización ósea, tal como HPP, divulgado en el presente documento, por ejemplo, para determinar la desviación típica de la puntuación en el índice de CHAQ.

Los métodos pueden dar como resultado una mejora en la puntuación en el índice de CHAQ (por ejemplo, indicativo de discapacidad en ADL y/o dolor) del niño que tiene o que es propenso a un trastorno de mineralización ósea, tal como HPP, divulgado en el presente documento. Por ejemplo, el tratamiento con una sALP (por ejemplo, un polipéptido que tiene la secuencia de una cualquiera de SEQ ID NO: 7-223, 247 y 262-264 o una variante de la misma con al menos un 85 % de identidad de secuencia con la misma y/o al menos una mutación aminoacídica con respecto a una ALP de origen natural, como se describe en el presente documento), tal como el tratamiento con una sALP durante un periodo de tiempo, hasta toda la vida del niño, puede dar como resultado una disminución promedio en la puntuación en el índice de CHAQ hasta aproximadamente 0 a igual a o a menos de aproximadamente 0.5 (por ejemplo, aproximadamente 0, aproximadamente 0.1, aproximadamente 0.2, aproximadamente 0.4 o aproximadamente 0.5) en niños con una enfermedad

similar a HPP.

La disminución en la puntuación en el índice de CHAQ del niño que tiene o que es propenso a un trastorno de mineralización ósea, tal como HPP, puede mantenerse durante la administración de la fosfatasa alcalina o el polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina, tal como sALP (por ejemplo, un polipéptido que tiene la secuencia de una cualquiera de SEQ ID NO: 7-223, 247 y 262-264 o una variante de la misma con al menos un 85 % de identidad de secuencia con la misma y/o al menos una mutación aminoacídica con respecto a una ALP de origen natural, como se describe en el presente documento), por ejemplo, durante un periodo de tiempo, hasta toda la vida del niño. Asimismo, el aumento en las ADL y/o la disminución del dolor del niño pueden mantenerse durante la administración de la sALP (por ejemplo, un polipéptido que tiene la secuencia de una cualquiera de SEQ ID NO: 7-223, 247 y 262-264 o una variante de la misma con al menos un 85 % de identidad de secuencia con la misma y/o al menos una mutación aminoacídica con respecto a una ALP de origen natural, como se describe en el presente documento) durante un periodo de tiempo, hasta toda la vida del niño.

La puntuación en el índice de CHAQ de un niño que tiene o que es propenso a un trastorno de mineralización ósea, tal como HPP, puede usarse para evaluar la eficacia del tratamiento usando una fosfatasa alcalina o un polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina, tal como sALP (por ejemplo, un polipéptido que tiene la secuencia de una cualquiera de SEQ ID NO: 7-223, 247 y 262-264 o una variante de la misma con al menos un 85 % de identidad de secuencia

con la misma y/o al menos una mutación aminoacídica con respecto a una ALP de origen natural, como se describe en el presente documento), en la que las mejoras con respecto a una determinada puntuación de la prueba demuestra que la fosfatasa alcalina o el polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina, es eficaz para tratar, por ejemplo, la discapacidad en las actividades cotidianas (ADL) y el dolor asociados con el trastorno de mineralización ósea, tal como HPP. En particular, a un niño que tiene o que es propenso a un trastorno de mineralización ósea, tal como HPP, se le puede hacer una o más preguntas de una o más de las ocho categorías (vestirse/asearse, levantarse, comer, caminar, higiene, alcance, agarre y actividades) para llegar a una puntuación promedio en el índice de CHAQ y para evaluar la eficacia del tratamiento de la administración de sALP. Por ejemplo, cuando la administración de una sALP descrita en el presente documento a un niño que tiene o que es propenso a un trastorno de mineralización ósea, tal como HPP, da como resultado una disminución promedio en la puntuación en el índice de CHAQ hasta igual a o menos de aproximadamente 0.5, en la que el niño tenía previamente una puntuación promedio en el índice de CHAQ de más de aproximadamente 0.8, entonces la sALP es eficaz para tratar, por ejemplo, la discapacidad en las actividades cotidianas (ADL) y el dolor asociados con un trastorno de mineralización ósea, tal como HPP. Como alternativa, cuando la administración de una sALP no da como resultado una disminución promedio en la puntuación en el índice de CHAQ hasta igual a o menos de aproximadamente 0.5, la dosificación y/o la frecuencia de administración de sALP pueden cambiarse para determinar la cantidad eficaz de la

sALP para el niño que tiene o que es propenso a un trastorno de mineralización ósea, tal como HPP. Por ejemplo, la dosificación de sALP (por ejemplo, un polipéptido que tiene la secuencia de una cualquiera de SEQ ID NO: 7-223, 247 y 262-264 o una variante de la misma con al menos un 85 % de identidad de secuencia con la misma y/o al menos una mutación aminoacídica con respecto a una ALP de origen natural, como se describe en el presente documento) puede aumentarse, por ejemplo, desde aproximadamente 0.5-3 mg/kg/semana hasta aproximadamente 3-6 mg/kg/semana o desde aproximadamente 3-6 mg/kg/semana hasta aproximadamente 6-9 mg/kg/semana.

Instrumento de recopilación de datos de resultados pediátricos (PODCI)

Determinados sujetos que tienen o que son propensos a un trastorno de mineralización ósea, tal como HPP, puede identificarse para el tratamiento con una fosfatasa alcalina o un polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina, tal como una sALP (por ejemplo, un polipéptido que tiene la secuencia de una cualquiera de SEQ ID NO: 7-223, 247 y 262-264 o una variante de la misma con al menos un 85 % de identidad de secuencia con la misma y/o al menos una mutación aminoacídica con respecto a una ALP de origen natural, como se describe en el presente documento) usando el instrumento de recopilación de datos de resultados pediátricos (PODCI). El PODCI puede administrarse para evaluar el estado de salud de los niños para generar una puntuación de PODCI para el sujeto, como se describe en Plint *et al*. (*J. Pediatr. Orthop. 23*(6): 788-790, 2003). El PODCI incluye ocho categorías de preguntas que puede completarlas un sujeto que tiene o que

es propenso a un trastorno de mineralización ósea, tal como HPP, o un progenitor/tutor del sujeto. Las categorías que pueden usarse para determinar el PODCI de un sujeto que tiene o que es propenso a un trastorno de mineralización ósea, tal como HPP, incluyen las siguientes: 1) la escala de la función de las extremidades superiores y física para medir la dificultad que se encuentra al realizar el cuidado personal diario y las actividades de los estudiantes; 2) la escala de transferencia y movilidad básica para medir la dificultad experimentada en la realización de actividades de movilidad y motrices rutinarias en las actividades diarias; 3) la escala de funcionamiento deportivo/físico para medir la dificultad o las limitaciones encontradas al participar en actividades más activas o deportes; 4) la escala de dolor/comodidad para medir el nivel de dolor experimentado durante la última semana; 5) la escala de expectativas de tratamiento para medir las expectativas de tratamiento a largo plazo; 6) la escala de felicidad para medir la satisfacción general con la apariencia personal y el sentido de similitud con amigos y otras personas de la misma edad; 7) la escala de satisfacción con los síntomas para medir la aceptación del sujeto de las limitaciones actuales en caso de que este sea un estado de por vida; y 8) la escala de funcionamiento global, que es una escala combinada general calculada a partir de las primeras cuatro escalas enumeradas anteriormente. En cada una de las categorías, se determina una puntuación estandarizada para el sujeto que tiene o que es propenso a un trastorno de mineralización ósea, tal como HPP, y a continuación se convierte a una escala de 0 a 100, en la que 0 representa una discapacidad importante y 100

representa una discapacidad menor.

Un sujeto que tiene o que es propenso a un trastorno de mineralización ósea, tal como HPP, con una puntuación promedio de PODCI (por ejemplo, indicativo de discapacidad en ADL y/o dolor) de menos de aproximadamente 40 (por ejemplo, aproximadamente 5, aproximadamente 10, aproximadamente 15, aproximadamente 20, aproximadamente 25, aproximadamente 30, aproximadamente 35 o aproximadamente 39) puede tratarse administrando una fosfatasa alcalina o un polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina, tal como una sALP (por ejemplo, un polipéptido que tiene la secuencia de una cualquiera de SEQ ID NO: 7-223, 247 y 262-264 o una variante de la misma con al menos un 85 % de identidad de secuencia con la misma y/o al menos una mutación aminoacídica con respecto a una ALP de origen natural, como se describe en el presente documento). Por ejemplo, un sujeto con una puntuación promedio de PODCI de menos de 40 puede tratarse administrando una sALP durante un periodo de tiempo, hasta toda la vida del sujeto. Además, a un sujeto que tiene o que es propenso a un trastorno de mineralización ósea, tal como HPP, se le puede hacer una o más preguntas en una o más de las ocho escalas descritas anteriormente (por ejemplo, transferencia y movilidad básica, deportes/funcionamiento físico y la escala de dolor/comodidad) para llegar a una puntuación promedio de PODCI, y si la puntuación promedio de PODCI es mayor de menos de 40, el sujeto puede tratarse administrando una sALP.

Los métodos descritos en el presente documento pueden dar como resultado un aumento en la puntuación de PODCI (por ejemplo, indicativo de discapacidad en ADL y/o dolor) del

sujeto que tiene o que es propenso a un trastorno de mineralización ósea, tal como HPP. Por ejemplo, el tratamiento con una fosfatasa alcalina, o con un polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina, tal como una sALP (por ejemplo, un polipéptido que tiene la secuencia de una cualquiera de SEQ ID NO: 7-223, 247 y 262-264 o una variante de la misma con al menos un 85 % de identidad de secuencia con la misma y/o al menos una mutación aminoacídica con respecto a una ALP de origen natural, como se describe en el presente documento), tal como el tratamiento con una sALP durante un periodo de tiempo, hasta toda la vida del sujeto, puede dar como resultado un aumento promedio en la puntuación de PODCI hasta aproximadamente 40 a aproximadamente 50 (por ejemplo, aproximadamente 40, aproximadamente 41, aproximadamente 42, aproximadamente 43, aproximadamente 44, aproximadamente 45, aproximadamente 46, aproximadamente 47, aproximadamente 48, aproximadamente 49 o aproximadamente 50).

El aumento en la puntuación de PODCI puede mantenerse durante la administración de la fosfatasa alcalina o el polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina, tal como la sALP (por ejemplo, un polipéptido que tiene la secuencia de una cualquiera de SEQ ID NO: 7-223, 247 y 262-264 o una variante de la misma con al menos un 85 % de identidad de secuencia con la misma y/o al menos una mutación aminoacídica con respecto a una ALP de origen natural, como se describe en el presente documento), por ejemplo, durante un periodo de tiempo, hasta toda la vida del sujeto que tiene o que es propenso a un trastorno de mineralización ósea, tal como HPP. Asimismo, el aumento en las ADL y/o la disminución

del dolor pueden mantenerse durante la administración de la sALP (por ejemplo, un polipéptido que tiene la secuencia de una cualquiera de SEQ ID NO: 7-223, 247 y 262-264 o una variante de la misma con al menos un 85 % de identidad de secuencia con la misma y/o al menos una mutación aminoacídica con respecto a una ALP de origen natural, como se describe en el presente documento) durante un periodo de tiempo, hasta toda la vida del sujeto.

La puntuación de PODCI de un sujeto que tiene o que es propenso a un trastorno de mineralización ósea, tal como HPP, puede usarse para evaluar la eficacia del tratamiento usando una fosfatasa alcalina o un polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina, tal como una sALP (por ejemplo, un polipéptido que tiene la secuencia de una cualquiera de SEQ ID NO: 7-223, 247 y 262-264 o una variante de la misma con al menos un 85 % de identidad de secuencia con la misma y/o al menos una mutación aminoacídica con respecto a una ALP de origen natural, como se describe en el presente documento), en la que las mejoras con respecto a una determinada puntuación de la prueba demuestra que la fosfatasa alcalina o el polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina, es eficaz para tratar, por ejemplo, la discapacidad en las actividades cotidianas (ADL) y el dolor asociados con el trastorno de mineralización ósea, tal como HPP. En particular, a un sujeto que tiene o que es propenso a un trastorno de mineralización ósea, tal como HPP, se le puede hacer una o más preguntas en una o más de las ocho escalas (la escala de función de las extremidades superiores y física, la escala de transferencia y movilidad básica, la escala de funcionamiento deportivo/físico, la escala de

dolor/comodidad, la escala de expectativas de tratamiento, la escala de felicidad, la escala de satisfacción con los síntomas y la escala de funcionamiento global) para llegar a una puntuación promedio de PODCI y para evaluar la eficacia del tratamiento de la administración de sALP.

Por ejemplo, cuando la administración de una sALP descrita en el presente documento a un sujeto que tiene o que es propenso a un trastorno de mineralización ósea, tal como HPP, da como resultado un aumento promedio en la puntuación de PODCI hasta aproximadamente 40 o más de aproximadamente 40, en la que el sujeto tenía previamente una puntuación promedio de PODCI de menos de aproximadamente 40, entonces la sALP es eficaz para tratar, por ejemplo, la discapacidad en las actividades cotidianas (ADL) y el dolor asociados con un trastorno de mineralización ósea, tal como HPP. Como alternativa, cuando la administración de una sALP descrita en el presente documento no da como resultado un aumento promedio en la puntuación de PODCI hasta aproximadamente 40 o más de aproximadamente 40, la dosificación y la frecuencia de administración de sALP pueden cambiarse para determinar la cantidad eficaz de la sALP para el sujeto que tiene o que es propenso a un trastorno de mineralización ósea, tal como HPP. Por ejemplo, la dosificación de sALP (por ejemplo, un polipéptido que tiene la secuencia de una cualquiera de SEQ ID NO: 7-223, 247 y 262-264 o una variante de la misma con al menos un 85 % de identidad de secuencia con la misma y/o al menos una mutación aminoacídica con respecto a una ALP de origen natural, como se describe en el presente documento) puede aumentarse, por ejemplo, desde aproximadamente 0.5-3 mg/kg/semana hasta

aproximadamente 3-6 mg/kg/semana o desde aproximadamente 3-6 mg/kg/semana hasta aproximadamente 6-9 mg/kg/semana.

Escalas de desarrollo de lactantes menores y lactantes mayores de Bayley, 3.ª edición (BSID-III)

Otro criterio de valoración, las escalas de desarrollo de lactantes menores y lactantes mayores de Bayley, 3.ª edición (BSID-III) puede administrarse para evaluar el estado de salud de un sujeto que tiene o que es propenso a un trastorno de mineralización ósea, tal como HPP, desde el nacimiento para generar una puntuación de BSID-III para el sujeto, como se describe en Bayley. (2006). *Bayley scales of infant and toddler development: administration manual*. San Antonio, TX: Harcourt Assessment. Las BSID-III incluyen una serie de tareas de juego de desarrollo que pueden administrarse al sujeto para determinar la puntuación bruta de BSID-III. Por ejemplo, categorías para determinar la puntuación de BSID-III de un sujeto que tiene o que es propenso a un trastorno de mineralización ósea, tal como HPP, (por ejemplo, lactantes de aproximadamente tres años de edad o menos que tienen HPP) pueden incluir prensión, integración perceptivomotora, planificación y velocidad motoras, seguimiento visual, alcance, agarre de objetos, manipulación de objetos, habilidades manuales funcionales, respuestas a la información táctil, movimiento de las extremidades y el torso, posición estática, movimiento dinámico, equilibrio y planificación motora. Las mediciones de BSID-III a continuación se convierten en puntuaciones graduadas de BSID-III, que pueden usarse para determinar el rendimiento del sujeto en comparación con sujetos sanos

ajustados por edad. La puntuación graduada de BSID-III de un sujeto que tiene o que es propenso a un trastorno de mineralización ósea, tal como HPP (por ejemplo, un sujeto con HPP) puede variar de 0 a 14, en la que puntuaciones de aproximadamente 7 a aproximadamente 13 se consideran el intervalo normal para un sujeto sano.

Un sujeto que tiene o que es propenso a un trastorno de mineralización ósea, tal como HPP, podría realizar pruebas en una o más de las categorías descritas (prensión, integración perceptivomotora, planificación y velocidad motoras, seguimiento visual, alcance, agarre de objetos, manipulación de objetos, habilidades manuales funcionales, respuestas a la información táctil, movimiento de las extremidades y el torso, posición estática, movimiento dinámico, equilibrio y planificación motora) como un lactante (por ejemplo, a aproximadamente 3 años de edad o menos de 3 años de edad) para generar una puntuación de BSID-III indicativa de retraso en el desarrollo motor. Un sujeto que tiene o que es propenso a un trastorno de mineralización ósea, tal como HPP, con una puntuación promedio de BSID-III en una o más de las categorías descritas (prensión, integración perceptivomotora, planificación y velocidad motoras, seguimiento visual, alcance, agarre de objetos, manipulación de objetos, habilidades manuales funcionales, respuestas a la información táctil, movimiento de las extremidades y el torso, posición estática, movimiento dinámico, equilibrio y planificación motora) de menos de aproximadamente 2 como un lactante puede tratarse administrando una sALP (por ejemplo, un polipéptido que tiene la secuencia de una cualquiera de SEQ ID NO: 7-223, 247 y

262-264 o una variante de la misma con al menos un 85 % de identidad de secuencia con la misma y/o al menos una mutación aminoacídica con respecto a una ALP de origen natural, como se describe en el presente documento). En particular, un sujeto que tiene o que es propenso a un trastorno de mineralización ósea, tal como HPP, con una puntuación promedio de BSID III de menos de aproximadamente 2 como un lactante puede tratarse administrando una sALP durante un periodo de tiempo, hasta toda la vida del sujeto.

Los métodos pueden dar como resultado una mejora en la puntuación promedio de BSID-III (por ejemplo, indicativo de retraso en el desarrollo motor) del sujeto que tiene o que es propenso a un trastorno de mineralización ósea, tal como HPP. Por ejemplo, el tratamiento con una sALP (por ejemplo, un polipéptido que tiene la secuencia de una cualquiera de SEQ ID NO: 7-223, 247 y 262-264 o una variante de la misma con al menos un 85 % de identidad de secuencia con la misma y/o al menos una mutación aminoacídica con respecto a una ALP de origen natural, como se describe en el presente documento), tal como el tratamiento con una sALP por un periodo de tiempo, hasta toda la vida del sujeto, puede dar como resultado un aumento promedio en la puntuación de BSID-III hasta más de aproximadamente 5 (por ejemplo, aproximadamente 5, aproximadamente 6, aproximadamente 7, aproximadamente 8, aproximadamente 9, aproximadamente 10, aproximadamente 11, aproximadamente 12 o aproximadamente 13).

El aumento en la puntuación de BSID-III puede mantenerse durante la administración de la fosfatasa alcalina o el polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina, tal

como una sALP (por ejemplo, un polipéptido que tiene la secuencia de una cualquiera de SEQ ID NO: 7-223, 247 y 262-264 o una variante de la misma con al menos un 85 % de identidad de secuencia con la misma y/o al menos una mutación aminoacídica con respecto a una ALP de origen natural, como se describe en el presente documento) durante un periodo de tiempo, hasta toda la vida del sujeto que tiene o que es propenso a un trastorno de mineralización ósea, tal como HPP. Asimismo, el aumento en el desarrollo motor puede mantenerse durante la administración de la fosfatasa alcalina o el polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina, tal como una sALP (por ejemplo, un polipéptido que tiene la secuencia de una cualquiera de SEQ ID NO: 7-223, 247 y 262-264 o una variante de la misma con al menos un 85 % de identidad de secuencia con la misma y/o al menos una mutación aminoacídica con respecto a una ALP de origen natural, como se describe en el presente documento), por ejemplo, durante un periodo de tiempo, hasta toda la vida del sujeto.

La puntuación de BSID-III de un sujeto que tiene o que es propenso a un trastorno de mineralización ósea, tal como HPP, puede usarse para evaluar la eficacia del tratamiento usando una fosfatasa alcalina o un polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina, tal como una sALP (por ejemplo, un polipéptido que tiene la secuencia de una cualquiera de SEQ ID NO: 7-223, 247 y 262-264 o una variante de la misma con al menos un 85 % de identidad de secuencia con la misma y/o al menos una mutación aminoacídica con respecto a una ALP de origen natural, como se describe en el presente documento), en las que las mejoras con respecto a

una determinado puntuación de la prueba demuestran que la fosfatasa alcalina o el polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina, es eficaz para tratar, por ejemplo, el retraso en el desarrollo motor asociado con el trastorno de mineralización ósea, tal como HPP. En particular, un sujeto que tiene o que es propenso a un trastorno de mineralización ósea, tal como HPP, podría realizar pruebas en una o más de las categorías descritas (prensión, integración perceptivomotora, planificación y velocidad motoras, seguimiento visual, alcance, agarre de objetos, manipulación de objetos, habilidades manuales funcionales, respuestas a la información táctil, movimiento de las extremidades y el torso, posición estática, movimiento dinámico, equilibrio y planificación motora) como un lactante (por ejemplo, a aproximadamente tres años de edad o menos que tiene HPP) para llegar a una puntuación promedio de BSID-III y para evaluar la eficacia del tratamiento de la administración de sALP.

Por ejemplo, cuando la administración de una sALP a un niño que tiene o que es propenso a un trastorno de mineralización ósea, tal como HPP, da como resultado un aumento promedio en la puntuación graduada de BSID-III hasta más de aproximadamente 5, en la que el niño tenía previamente una puntuación graduada promedio de BSID-III de menos de aproximadamente 2 como un lactante (por ejemplo, a aproximadamente 3 años de edad o menos de 3 años de edad), entonces la sALP es eficaz para tratar, por ejemplo, el retraso en el desarrollo motor asociado con una enfermedad similar a HPP. Como alternativa, cuando la administración de una sALP no da como resultado un aumento promedio en la

puntuación graduada de BSID-III hasta más de aproximadamente 5, la dosificación y/o la frecuencia de administración de sALP pueden cambiarse para determinar la cantidad eficaz de la sALP para el niño que tiene o que es propenso a un trastorno de mineralización ósea, tal como HPP. Por ejemplo, la dosificación de sALP (por ejemplo, un polipéptido que tiene la secuencia de una cualquiera de SEQ ID NO: 7-223, 247 y 262-264 o una variante de la misma con al menos un 85 % de identidad de secuencia con la misma y/o al menos una mutación aminoacídica con respecto a una ALP de origen natural, como se describe en el presente documento) puede aumentarse, por ejemplo, desde aproximadamente 0.5-3 mg/kg/semana hasta aproximadamente 3-6 mg/kg/semana o desde aproximadamente 3-6 mg/kg/semana hasta aproximadamente 6-9 mg/kg/semana.

Escalas motoras de desarrollo de Peabody, 2.ª edición (PDMS-2)

Otro criterio valoración, las escalas motoras de desarrollo de Peabody, 2.ª edición (PDMS-2), puede administrarse para evaluar el estado de salud de un sujeto que tiene o que es propenso a un trastorno de mineralización ósea, tal como HPP, desde el nacimiento para generar una puntuación de PDMS-2 para el sujeto, como se describe en van Hartingsveldt *et al*. (*Occup. Ther. Int.* 12(1): 1-13, 2005). La PDMS-2 incluye seis categorías de subpruebas para medir las habilidades motoras del sujeto, tal como un sujeto que tiene HPP.

En particular, las mediciones de PDMS-2 pueden determinarse a partir de las siguientes subpruebas: 1) la

subprueba locomotora para medir la capacidad de un sujeto de moverse desde un lugar a otro (las mediciones incluyen gatear, caminar, correr, brincar y saltar hacia adelante); 2) la subprueba de reflejos para medir la capacidad de un sujeto de reaccionar automáticamente a los acontecimientos ambientales; 3) la subprueba estable para medir la capacidad de un sujeto de mantener el control del cuerpo dentro del centro de gravedad y mantener el equilibrio; 4) la subprueba de manipulación de objetos para medir la capacidad de un sujeto de manipular un objeto, tal como atrapar, lanzar y patear una pelota; 5) la subprueba de agarre para medir la capacidad de un sujeto de usar sus manos, tal como la capacidad de sostener un objeto con una mano y acciones que impliquen el uso controlado de los dedos de ambas manos; y 6) la subprueba de integración opticomotora para medir la capacidad de un sujeto de usar sus habilidades de percepción visual para realizar tareas complejas de coordinación ojo-mano, tales como alcanzar y agarrar un objeto, construir con bloques y copiar diseños. La medición de PDMS-2 puede determinarse para una o más de estas categorías para un sujeto que tiene o que es propenso a un trastorno de mineralización ósea, tal como HPP, y a continuación se convierte en una puntuación de PDMS-2, tal como la puntuación convencional locomotora de PDMS-2 que varía de 0 a 13, en la que el intervalo de sujetos sanos (por ejemplo, sujetos sin el trastorno de mineralización ósea, tal como HPP) es de aproximadamente 7 a aproximadamente 13.

Un sujeto que tiene o que es propenso a un trastorno de mineralización ósea, tal como HPP, con una puntuación promedio de PDMS (por ejemplo, indicativo de retraso en el

desarrollo motor) puede tratarse administrando una sALP (por ejemplo, un polipéptido que tiene la secuencia de una cualquiera de SEQ ID NO: 7-223, 247 y 262-264 o una variante de la misma con al menos un 85 % de identidad de secuencia con la misma y/o al menos una mutación aminoacídica con respecto a una ALP de origen natural, como se describe en el presente documento).

Los métodos descritos en el presente documento pueden dar como resultado una mejora en la puntuación de PDMS-2 (por ejemplo, indicativo de retraso en el desarrollo motor) del sujeto que tiene o que es propenso a un trastorno de mineralización ósea, tal como HPP. Por ejemplo, el tratamiento con una fosfatasa alcalina, o con un polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina, tal como una sALP (por ejemplo, un polipéptido que tiene la secuencia de una cualquiera de SEQ ID NO: 7-223, 247 y 262-264 o una variante de la misma con al menos un 85 % de identidad de secuencia con la misma y/o al menos una mutación aminoacídica con respecto a una ALP de origen natural, como se describe en el presente documento), puede dar como resultado un aumento promedio en la puntuación de PDMS-2 hasta aproximadamente 7 a aproximadamente 13 (por ejemplo, aproximadamente 7, aproximadamente 8, aproximadamente 9, aproximadamente 10, aproximadamente 11, aproximadamente 12 o aproximadamente 13).

El aumento en la puntuación de PDMS-2 puede mantenerse durante la administración de la fosfatasa alcalina o el polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina, tal como sALP (por ejemplo, un polipéptido que tiene la secuencia de una cualquiera de SEQ ID NO: 7-223, 247 y 262-264 o una

variante de la misma con al menos un 85 % de identidad de secuencia con la misma y/o al menos una mutación aminoacídica con respecto a una ALP de origen natural, como se describe en el presente documento) durante un tiempo prolongado, por ejemplo, durante un periodo de tiempo, hasta toda la vida del sujeto que tiene o que es propenso a un trastorno de mineralización ósea, tal como HPP. Asimismo, el aumento en el desarrollo motor puede mantenerse durante la administración de la sALP (por ejemplo, un polipéptido que tiene la secuencia de una cualquiera de SEQ ID NO: 7-223, 247 y 262-264 o una variante de la misma con al menos un 85 % de identidad de secuencia con la misma y/o al menos una mutación aminoacídica con respecto a una ALP de origen natural, como se describe en el presente documento) durante un periodo de tiempo, hasta toda la vida del sujeto que tiene o que es propenso a un trastorno de mineralización ósea, tal como HPP.

La puntuación de PDMS-2 de un sujeto que tiene o que es propenso a un trastorno de mineralización ósea, tal como HPP, puede usarse para evaluar la eficacia del tratamiento usando una fosfatasa alcalina o un polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina, tal como una sALP (por ejemplo, un polipéptido que tiene la secuencia de una cualquiera de SEQ ID NO: 7-223, 247 y 262-264 o una variante de la misma con al menos un 85 % de identidad de secuencia con la misma y/o al menos una mutación aminoacídica con respecto a una ALP de origen natural, como se describe en el presente documento), en las que las mejoras con respecto a una determinado puntuación de la prueba demuestran que la fosfatasa alcalina o el polipéptido que tiene actividad de

fosfatasa alcalina, es eficaz para tratar, por ejemplo, el retraso en el desarrollo motor asociado con el trastorno de mineralización ósea, tal como HPP. Por ejemplo, un niño que tiene o que es propenso a un trastorno de mineralización ósea, tal como HPP, podría realizar pruebas en una o más de las categorías descritas (locomotora, reflejos, estable, manipulación de objetos, prensión y opticomotora) a aproximadamente 5 años de edad o menos de 5 años de edad para llegar a una puntuación promedio de PDMS-2 y para evaluar la eficacia del tratamiento de la administración de sALP.

Por ejemplo, cuando la administración de una sALP a un niño que tiene o que es propenso a un trastorno de mineralización ósea, tal como HPP, da como resultado un aumento promedio en la puntuación convencional de PDMS-2 hasta aproximadamente 7, en la que el niño tenía previamente una puntuación convencional promedio de PDMS-2 de aproximadamente 5, entonces la sALP es eficaz en el tratamiento, por ejemplo, de retraso en el desarrollo motor asociado con una enfermedad similar a HPP. Como alternativa, cuando la administración de una sALP no da como resultado un aumento promedio en la puntuación convencional de PDMS-2 hasta aproximadamente 7, la dosificación y/o la frecuencia de administración de sALP pueden cambiarse para determinar la cantidad eficaz de la sALP para el niño. Por ejemplo, la dosificación de sALP (por ejemplo, un polipéptido que tiene la secuencia de una cualquiera de SEQ ID NO: 7-223, 247 y 262-264 o una variante de la misma con al menos un 85 % de identidad de secuencia con la misma y/o al menos una mutación aminoacídica con respecto a una ALP de origen natural, como

se describe en el presente documento) puede aumentarse, por ejemplo, desde aproximadamente 0.5-3 mg/kg/semana hasta aproximadamente 3-6 mg/kg/semana o desde aproximadamente 3-6 mg/kg/semana hasta aproximadamente 6-9 mg/kg/semana.

Prueba de caminata de seis minutos (6MWT)

Un sujeto que tiene un trastorno de mineralización ósea, tal como HPP, puede identificarse para el tratamiento con una fosfatasa alcalina o un polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina (por ejemplo una sALP, por ejemplo, un polipéptido que tiene la secuencia de una cualquiera de SEQ ID NO: 7-223, 247 y 262-264 o una variante de la misma con al menos un 85 % de identidad de secuencia con la misma y/o al menos una mutación aminoacídica con respecto a una ALP de origen natural, como se describe en el presente documento) usando la 6MWT. En particular, la 6MWT puede usarse para evaluar la capacidad de caminar en un adulto que tiene un trastorno de mineralización ósea, tal como HPP, para generar un valor de 6MWT para el adulto. La 6MWT puede realizarse en interiores o exteriores usando un corredor plano, recto y cerrado (por ejemplo, de aproximadamente 30 metros de longitud) con una superficie dura. Puede usarse un cronómetro u otro temporizador para supervisar el tiempo y puede usarse un contador mecánico u otro dispositivo para determinar la distancia (por ejemplo, en metros) que camina el sujeto que tiene un trastorno de mineralización ósea, tal como HPP. Por ejemplo, la longitud del corredor puede marcarse cada tres metros para determinar la cantidad de metros caminados por el sujeto que tiene un trastorno de mineralización ósea, tal como HPP, con el punto de giro a los 30 metros y la línea de

salida también marcada. La distancia recorrida por el sujeto que tiene un trastorno de mineralización ósea, tal como HPP, en seis minutos a continuación puede compararse con el número previsto de metros caminados, por ejemplo, por un sujeto normal de aproximadamente la misma edad, el mismo sexo y/o la misma estatura, y expresarse como un valor porcentual para generar el valor de 6MWT del sujeto. El valor de 6MWT del sujeto que tiene un trastorno de mineralización ósea, tal como HPP, puede compararse con el valor de 6MWT al inicio del sujeto. Además, el valor de 6MWT del sujeto que tiene un trastorno de mineralización ósea, tal como HPP, puede compararse con el valor de 6MWT de un sujeto normal.

Un sujeto que tiene un trastorno de mineralización ósea, tal como HPP, con un promedio de 6MWT de menos de aproximadamente un 80 % del valor de 6MWT previsto (por ejemplo, con respecto a un sujeto normal de aproximadamente la misma edad, el mismo sexo y/o la misma estatura) puede tratarse con una fosfatasa alcalina o un polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina (por ejemplo, una sALP, por ejemplo, un polipéptido que tiene la secuencia de una cualquiera de SEQ ID NO: 7-223, 247 y 262-264 o una variante de la misma con al menos un 85 % de identidad de secuencia con la misma y/o al menos una mutación aminoacídica con respecto a una ALP de origen natural, como se describe en el presente documento), tal como administrando una fosfatasa alcalina o un polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina durante un periodo de tratamiento de al menos dos semanas (por ejemplo, al menos tres semanas, al menos cuatro semanas, al menos cinco semanas, al menos seis semanas, al menos siete semanas, al menos ocho semanas, al menos nueve

semanas, al menos diez semanas, al menos tres meses, al menos cuatro meses, al menos cinco meses, al menos seis meses, al menos siete meses, al menos ocho meses, al menos nueve meses, al menos un año, al menos dos años, al menos tres años, al menos cuatro años, al menos cinco años, al menos seis años, al menos siete años, al menos ocho años, al menos nueve años o al menos diez años o toda la vida del sujeto; en particular al menos seis semanas). Por ejemplo, un sujeto que tiene un trastorno de mineralización ósea, tal como HPP, con un promedio de 6MWT de menos de aproximadamente un 80 % del valor de 6MWT previsto (por ejemplo, aproximadamente un 50 %, aproximadamente un 55 %, aproximadamente un 60 %, aproximadamente un 65 %, aproximadamente un 70 % o aproximadamente un 75 % del valor de 6MWT previsto) puede tratarse con una fosfatasa alcalina o un polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina durante un periodo de tratamiento de al menos dos semanas (por ejemplo, al menos tres semanas, al menos cuatro semanas, al menos cinco semanas, al menos seis semanas, al menos siete semanas, al menos ocho semanas, al menos nueve semanas, al menos diez semanas, al menos tres meses, al menos cuatro meses, al menos cinco meses, al menos seis meses, al menos siete meses, al menos ocho meses, al menos nueve meses, al menos un año, al menos dos años, al menos tres años, al menos cuatro años, al menos cinco años, al menos seis años, al menos siete años, al menos ocho años, al menos nueve años o al menos diez años o toda la vida del sujeto; en particular al menos seis semanas).

Los métodos pueden dar como resultado una mejora en el valor de 6MWT de un sujeto que tiene un trastorno de

mineralización ósea, tal como HPP. Por ejemplo, el tratamiento con una fosfatasa alcalina o un polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina (por ejemplo una sALP, por ejemplo, un polipéptido que tiene la secuencia de una cualquiera de SEQ ID NO: 7-223, 247 y 262-264 o una variante de la misma con al menos un 85 % de identidad de secuencia con la misma y/o al menos una mutación aminoacídica con respecto a una ALP de origen natural, como se describe en el presente documento), tal como el tratamiento con una fosfatasa alcalina o un polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina durante un periodo de tratamiento de al menos dos semanas (por ejemplo, al menos tres semanas, al menos cuatro semanas, al menos cinco semanas, al menos seis semanas, al menos siete semanas, al menos ocho semanas, al menos nueve semanas, al menos diez semanas, al menos tres meses, al menos cuatro meses, al menos cinco meses, al menos seis meses, al menos siete meses, al menos ocho meses, al menos nueve meses, al menos un año, al menos dos años, al menos tres años, al menos cuatro años, al menos cinco años, al menos seis años, al menos siete años, al menos ocho años, al menos nueve años o al menos diez años o toda la vida del sujeto; en particular al menos seis semanas), puede dar como resultado un aumento promedio en el valor de 6MWT hasta aproximadamente un 80 % o más del valor de 6MWT previsto del sujeto (por ejemplo, aproximadamente un 82 %, aproximadamente un 84 %, aproximadamente un 86 %, aproximadamente un 88 %, aproximadamente un 90 %, aproximadamente un 92 %, aproximadamente un 94 %, aproximadamente un 96 %, aproximadamente un 98 % o más del valor de 6MWT predictivo).

El aumento en el valor de 6MWT del sujeto que tiene un trastorno de mineralización ósea, tal como HPP, puede mantenerse durante la administración de la fosfatasa alcalina o un polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina (por ejemplo, una sALP, por ejemplo, un polipéptido que tiene la secuencia de una cualquiera de SEQ ID NO: 7-223, 247 y 262-264 o una variante de la misma con al menos un 85 % de identidad de secuencia con la misma y/o al menos una mutación aminoacídica con respecto a una ALP de origen natural, como se describe en el presente documento), por ejemplo, durante un periodo de tratamiento de al menos dos semanas (por ejemplo, al menos tres semanas, al menos cuatro semanas, al menos cinco semanas, al menos seis semanas, al menos siete semanas, al menos ocho semanas, al menos nueve semanas, al menos diez semanas, al menos tres meses, al menos cuatro meses, al menos cinco meses, al menos seis meses, al menos siete meses, al menos ocho meses, al menos nueve meses, al menos un año, al menos dos años, al menos tres años, al menos cuatro años, al menos cinco años, al menos seis años, al menos siete años, al menos ocho años, al menos nueve años o al menos diez años o toda la vida del sujeto; en particular al menos seis semanas). Por ejemplo, el valor de 6MWT aumenta hasta más de un 80 % del valor de 6MWT previsto del sujeto que tiene un trastorno de mineralización ósea, tal como HPP, y se mantiene en ±10 % del valor de 6MWT aumentado durante el tratamiento con la fosfatasa alcalina o un polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina.

Asimismo, la mejora en la capacidad de caminar del sujeto que tiene un trastorno de mineralización ósea, tal como HPP, puede mantenerse durante la administración de la

fosfatasa alcalina o un polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina, por ejemplo, durante un periodo de tratamiento de al menos dos semanas (por ejemplo, al menos tres semanas, al menos cuatro semanas, al menos cinco semanas, al menos seis semanas, al menos siete semanas, al menos ocho semanas, al menos nueve semanas, al menos diez semanas, al menos tres meses, al menos cuatro meses, al menos cinco meses, al menos seis meses, al menos siete meses, al menos ocho meses, al menos nueve meses, al menos un año, al menos dos años, al menos tres años, al menos cuatro años, al menos cinco años, al menos seis años, al menos siete años, al menos ocho años, al menos nueve años o al menos diez años o toda la vida del sujeto; en particular al menos seis semanas). Por ejemplo, el sujeto que tiene un trastorno de mineralización ósea, tal como HPP, muestra una menor dependencia de un dispositivo de ayuda a la movilidad, tal como un andador, una silla de ruedas, dispositivos ortopédicos, muletas u ortesis, durante el tratamiento con la sALP.

Como alternativa, cuando la administración de una fosfatasa alcalina o un polipéptido con actividad de fosfatasa alcalina (por ejemplo, una sALP, por ejemplo, un polipéptido que tiene la secuencia de una cualquiera de SEQ ID NO: 7-223, 247 y 262-264 o una variante de la misma con al menos un 85 % de identidad de secuencia con la misma y/o al menos una mutación aminoacídica con respecto a una ALP de origen natural, como se describe en el presente documento) no da como resultado un aumento promedio en el valor de 6MWT hasta más de un 80 % del valor de 6MWT previsto (por ejemplo, de un sujeto normal de aproximadamente la misma edad, el

mismo sexo y/o estatura), la dosificación y/o la frecuencia de administración de la fosfatasa alcalina o un polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina puede cambiarse para determinar la cantidad eficaz de la fosfatasa alcalina o un polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina para el sujeto que tiene un trastorno de mineralización ósea, tal como HPP. Por ejemplo, la dosificación de la fosfatasa alcalina o un polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina puede aumentarse, por ejemplo, de aproximadamente 0.1-3 mg/kg/semana o aproximadamente 3-6 mg/kg/semana a aproximadamente 3-6 mg/kg/semana o aproximadamente 6-9 mg/kg/semana.

Dinamometría manual (HHD)

El agarre y la fuerza muscular de un sujeto que tiene o que es propenso a un trastorno de mineralización ósea, tal como HPP, puede evaluarse usando dinamometría manual (HHD). Por ejemplo, la flexión y extensión de la rodilla y también la flexión, extensión y abducción de la cadera de un sujeto que tiene o que es propenso a un trastorno de mineralización ósea, tal como HPP, puede medirse usando, por ejemplo, un dinamómetro MICROFET2™, mientras que la fuerza de agarre del sujeto puede medirse usando, por ejemplo, un dinamómetro de agarre Jamar. En particular, el administrador mantiene estable el dinamómetro y el sujeto ejerce una fuerza máxima contra el dinamómetro. Los datos de fuerza máxima se recopilan en libras y luego se convierten a newton (N). A continuación, se calculan los valores de momento de torsión usando la longitud de la extremidad en N-metros. A continuación, el valor del momento de torsión puede

compararse con el valor del momento de torsión de, por ejemplo, un sujeto normal de aproximadamente la misma edad, el mismo sexo y/o la misma estatura, y expresarse como un valor porcentual para generar el valor de HHD del sujeto.

Un sujeto que tiene un trastorno de mineralización ósea, tal como HPP, con un valor promedio de HHD de menos de aproximadamente un 80 % del valor de HHD previsto (por ejemplo, con respecto a un sujeto normal de aproximadamente la misma edad, el mismo sexo y/o la misma estatura) puede tratarse con una fosfatasa alcalina o un polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina (por ejemplo, una sALP, por ejemplo, un polipéptido que tiene la secuencia de una cualquiera de SEQ ID NO: 7-223, 247 y 262-264 o una variante de la misma con al menos un 85 % de identidad de secuencia con la misma y/o al menos una mutación aminoacídica con respecto a una ALP de origen natural, como se describe en el presente documento), tal como administrando una fosfatasa alcalina o un polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina durante un periodo de tratamiento de al menos dos semanas (por ejemplo, al menos tres semanas, al menos cuatro semanas, al menos cinco semanas, al menos seis semanas, al menos siete semanas, al menos ocho semanas, al menos nueve semanas, al menos diez semanas, al menos tres meses, al menos cuatro meses, al menos cinco meses, al menos seis meses, al menos siete meses, al menos ocho meses, al menos nueve meses, al menos un año, al menos dos años, al menos tres años, al menos cuatro años, al menos cinco años, al menos seis años, al menos siete años, al menos ocho años, al menos nueve años o al menos diez años o toda la vida del sujeto; en particular al menos seis semanas). Por ejemplo, un sujeto que tiene un

trastorno de mineralización ósea, tal como HPP, con un valor promedio de HHD de menos de aproximadamente un 80 % del valor de HHD previsto (por ejemplo, aproximadamente un 30 %, aproximadamente un 35 %, aproximadamente un 40 %, aproximadamente un 45 %, aproximadamente un 50 %, aproximadamente un 55 %, aproximadamente un 60 %, aproximadamente un 65 %, aproximadamente un 70 % o aproximadamente un 75 % del valor de HHD previsto) puede tratarse con una fosfatasa alcalina o un polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina durante un periodo de tratamiento de al menos dos semanas (por ejemplo, al menos tres semanas, al menos cuatro semanas, al menos cinco semanas, al menos seis semanas, al menos siete semanas, al menos ocho semanas, al menos nueve semanas, al menos diez semanas, al menos tres meses, al menos cuatro meses, al menos cinco meses, al menos seis meses, al menos siete meses, al menos ocho meses, al menos nueve meses, al menos un año, al menos dos años, al menos tres años, al menos cuatro años, al menos cinco años, al menos seis años, al menos siete años, al menos ocho años, al menos nueve años o al menos diez años o toda la vida del sujeto; en particular al menos seis semanas).

Los métodos pueden dar como resultado una mejora en el valor de HHD de un sujeto que tiene un trastorno de mineralización ósea, tal como HPP. Por ejemplo, el tratamiento con una fosfatasa alcalina o un polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina (por ejemplo una sALP, por ejemplo, un polipéptido que tiene la secuencia de una cualquiera de SEQ ID NO: 7-223, 247 y 262-264 o una variante de la misma con al menos un 85 % de identidad de secuencia

con la misma y/o al menos una mutación aminoacídica con respecto a una ALP de origen natural, como se describe en el presente documento), tal como el tratamiento con una fosfatasa alcalina o un polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina durante un periodo de tratamiento de al menos dos semanas (por ejemplo, al menos tres semanas, al menos cuatro semanas, al menos cinco semanas, al menos seis semanas, al menos siete semanas, al menos ocho semanas, al menos nueve semanas, al menos diez semanas, al menos tres meses, al menos cuatro meses, al menos cinco meses, al menos seis meses, al menos siete meses, al menos ocho meses, al menos nueve meses, al menos un año, al menos dos años, al menos tres años, al menos cuatro años, al menos cinco años, al menos seis años, al menos siete años, al menos ocho años, al menos nueve años o al menos diez años o toda la vida del sujeto; en particular al menos seis semanas), puede dar como resultado un aumento promedio en el valor de HHD hasta aproximadamente un 80 % o más del valor de HHD previsto del sujeto (por ejemplo, aproximadamente un 83%, aproximadamente un 85%, aproximadamente un 87%, aproximadamente un 90%, aproximadamente un 93%, aproximadamente un 95%, aproximadamente un 97% o aproximadamente un 100% o aproximadamente un 100 % del valor de HHD predictivo).

El aumento en el valor de HHD del sujeto que tiene un trastorno de mineralización ósea, tal como HPP, puede mantenerse durante la administración de la fosfatasa alcalina o un polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina (por ejemplo, una sALP, por ejemplo, un polipéptido que tiene la secuencia de una cualquiera de SEQ ID NO: 7-223, 247 y 262-264 o una variante de la misma con al menos

un 85 % de identidad de secuencia con la misma y/o al menos una mutación aminoacídica con respecto a una ALP de origen natural, como se describe en el presente documento), por ejemplo, durante un periodo de tratamiento de al menos dos semanas (por ejemplo, al menos tres semanas, al menos cuatro semanas, al menos cinco semanas, al menos seis semanas, al menos siete semanas, al menos ocho semanas, al menos nueve semanas, al menos diez semanas, al menos tres meses, al menos cuatro meses, al menos cinco meses, al menos seis meses, al menos siete meses, al menos ocho meses, al menos nueve meses, al menos un año, al menos dos años, al menos tres años, al menos cuatro años, al menos cinco años, al menos seis años, al menos siete años, al menos ocho años, al menos nueve años o al menos diez años o toda la vida del sujeto; en particular al menos seis semanas). Por ejemplo, el valor de HHD aumenta hasta más de un 80 % del valor de HHD previsto del sujeto que tiene un trastorno de mineralización ósea, tal como HPP, y se mantiene en ±10 % del valor de HHD aumentado durante el tratamiento con la fosfatasa alcalina o un polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina.

Como alternativa, cuando la administración de una fosfatasa alcalina o un polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina (por ejemplo, una sALP, por ejemplo, un polipéptido que tiene la secuencia de una cualquiera de SEQ ID NO: 7-223, 247 y 262-264 o una variante de la misma con al menos un 85 % de identidad de secuencia con la misma y/o al menos una mutación aminoacídica con respecto a una ALP de origen natural, como se describe en el presente documento) no da como resultado un aumento promedio en el valor de HHD hasta más de un 80 % del valor de HHD previsto (por ejemplo,

de un sujeto que tiene un trastorno de mineralización ósea, tal como HPP, de aproximadamente la misma edad, el mismo sexo y/o estatura), la dosificación y/o la frecuencia de administración de la fosfatasa alcalina o un polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina puede cambiarse para determinar la cantidad eficaz de la fosfatasa alcalina o un polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina para el sujeto que tiene un trastorno de mineralización ósea, tal como HPP. Por ejemplo, la dosificación de la fosfatasa alcalina o un polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina puede aumentarse, por ejemplo, de aproximadamente 0.1-3 mg/kg/semana o aproximadamente 3-6 mg/kg/semana a aproximadamente 3-6 mg/kg/semana o aproximadamente 6-9 mg/kg/semana.

EJEMPLOS

La descripción se ilustra mediante los siguientes ejemplos. Debe entenderse que los ejemplos, materiales, cantidades y procedimientos particulares deben interpretarse en sentido amplio de acuerdo con el alcance y espíritu de la divulgación como se expone en el presente documento.

EJEMPLO 1

Diseño y expresión de proteína

Proteínas de fusión de fosfatasa alcalina.

Para examinar sistemáticamente la actividad de la proteína, la estabilidad de la proteína y las propiedades farmacocinéticas de proteínas de fusión de fosfatasa alcalina, se diseñaron y sometieron a prueba varias construcciones (véase la tabla 1). Algunas construcciones se

generaron mediante técnicas convencionales de síntesis de ADN, y sus secuencias se verificaron mediante secuenciación del ADN de los plásmidos construidos finales. Se generaron construcciones adicionales realizando técnicas convencionales de mutagénesis dirigida al sitio en plásmidos existentes. Las variaciones en las proteínas de fusión de fosfatasa alcalina sometieron a prueba los cambios en residuos ubicados en y alrededor del sitio activo de la enzima, en los sitios de consenso de glucosilación ligada a N, en los restos de dirección al hueso y en el isotipo de la región de fragmento cristalizable (Fc) conectada a la proteína. Estas construcciones se expresaron transfectando de forma transitoria células Expi293F y ExpiCHO como se detalla a continuación.

Fusiones de Fc fluorescentes dirigidas al hueso.

Para comparar sistemáticamente las capacidades de unión a HA y al hueso de las secuencias polipeptídicas y de VHH, se diseñaron fusiones proteínicas que contenían (resto de dirección al hueso aminoterminal - región cristalina (Fc) de IgG1 humana - proteína fluorescente Katushka2s - marca de His carboxiterminal) (SEQ ID NO: 224-245). En la tabla 2 se muestra una lista de proteínas de fusión fluorescentes usadas para dirección. Las proteínas de fusión fluorescentes se transfectaron de forma transitoria usando células Expi293F como se detalla a continuación.

Tabla 2: Sumario de secuencias de dirección de proteína de

fusión de Fc fluorescente de dirección al hueso

Nombre	**Secuencia de dirección al hueso**	**Identificador de secuencia**
FLU001	DDDDDDDDDD (D_{10}, Asp_{10})	SEQ ID NO: 224
FLU002	Nulo	SEQ ID NO: 225
FLU003	EEEEEEEEEE (E_{10})	SEQ ID NO: 226
FLU004	C-D_{10}-C	SEQ ID NO: 227
FLU005	VTKHLNQISQSY	SEQ ID NO: 228
FLU006	NPYHPTIPQSVH	SEQ ID NO: 229
FLU007	CNYPTLKSC	SEQ ID NO: 230
FLU008	CMLPHHGAC	SEQ ID NO: 231
FLU009	SVSVGMKPSPRP	SEQ ID NO: 232
FLU010	KPRSVSG	SEQ ID NO: 233
FLU011	DDSWDTNDANVVCRQLGA	SEQ ID NO: 234
FLU012	KDVVVGVPGGQD	SEQ ID NO: 235
FLU013	EPRREVAEL	SEQ ID NO: 236
FLU014	NPPTRQTKPKRVANTN	SEQ ID NO: 237
FLU015	DSSEEKFLRRIGRFG	SEQ ID NO: 238
FLU016	DDDDDDDDDDKFLRRIGRFG	SEQ ID NO: 239
FLU017	KSDGGYYYTQSDY	SEQ ID NO: 240
FLU018	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTRV MGWFRQAPGKEREFVAAIGRSGTTRYADSV KGRFTISRDNGKNTVYLQMNNLKPEDTAVY YCAAKSDGGYYYTQSDYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO: 241
FLU019	QVKLEESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFS TYSMGWFRRAPGKEREFVAAISWSGGTTRY TNSVKGRFTISKDNFGNTVYLQMNNLKPED TAVYYCATRYSYSTTPEEYDLWGQGNQVTV SS	SEQ ID NO: 242

Nombre	Secuencia de dirección al hueso	Identificador de secuencia
FLU020	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCSASGFSLDIYAIGWFRQAPGKEREGVSCINSSGSSTYYADSVKGRFTISRDNAKNTIYLQMNSLKPEDTAVYYCATGGCSPFGGVAGVKDYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO: 243
FLU027	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTRVMGWFRQAPGKEREFVAAIG*DDDDDDDDDD*TRYADSVKGRFTISRDNGKNTVYLQMNNLKPEDTAVYYCAAKSDGGYYYTQSDYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO: 244
FLU031	*DDDDDDDDDD*QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCSASGFSLDIYAIGWFRQAPGKEREGVSCINSSGSSTYYADSVKGRFTISRDNAKNTIYLQMNSLKPEDTAVYYCATGGCSPFGGVAGVKDYWGQGTQVTVSS	SEQ ID NO: 245

Moléculas sustitutas de ERT biológicamente inactivas (ALP-Fc).

Para modelar las capacidades de dirección al hueso de un ERT clínicamente disponible, se compararon las fusiones de ALP-Fc-$(Asp)_{10}$ con las fusiones de ALP-Fc. La ALP usada para estos estudios se manipuló específicamente para la actividad enzimática hacia un sustrato sintético, fosfato de 4-metilumbeliferilo (4-MUP). La figura 21 muestra un modelo estructural de ALP-Fc-$(Asp)_{10}$. Las proteínas ALP-Fc (SEQ ID NO: 222) y ALP-Fc-$(Asp)_{10}$ (SEQ ID NO: 31) se transfectaron de forma transitoria usando células ExpiCHO como se detalla a continuación.

Cadena pesada variable de un solo dominio de fragmentos de anticuerpo de cadena pesada únicamente (VHH).

Se diseñaron proteínas VHH dirigidas al hueso mediante remplazando regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de moléculas VHH no dirigidas con secuencias de poli(ácido aspártico). La tabla 3 muestra la lista de proteínas VHH cuya unión al hueso se ensayó. Las proteínas VHH se transfectaron de forma transitoria usando células Expi293F como se detalla a continuación.

Tabla 3: Sumario de secuencias de VHH.

Nombre de la construcción	**Secuencia de aminoácidos**	**SEQ ID NO:**
VHH de control	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTRV MGWFRQAPGKEREFVAAIGRSGTTRYADSV KGRFTISRDNGKNTVYLQMNNLKPEDTAVY YCAAKSDGGYYYTQSDYWGQGTQVTVSSGS HHHHHH	SEQ ID NO: 248
VHH001	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTRV MGWFRQAPGKEREFVAAIG*DDDDDDD*TRYA DSVKGRFTISRDNGKNTVYLQMNNLKPEDT AVYYCAAKSDGGYYYTQSDYWGQGTQVTVS SGSHHHHHH	SEQ ID NO: 249
VHH002	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTRV MGWFRQAPGKEREFVAAIG*DDDDDDD*TRYA DSVKGRFTISRDNGKNTVYLQMNNLKPEDT AVYYCAA*DDDDDDDDDDDD*YWGQGTQVTVS	SEQ ID NO: 250

Nombre de la construcción	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:
	SGSHHHHHH	

Transfección transitoria de cultivo celular

Se usó una proporción de 1.0 µg de ADN plasmídico/ml de volumen de cultivo de transfección para todas las transfecciones de Expi293 y una proporción de 0.8 µg de ADN plasmídico/ml de volumen de cultivo de transfección para todas las transfecciones de ExpiCHO. Los cultivos se mantuvieron a 120 RPM en agitadores con un recorrido de 25.4 mm.

Las células Expi293F se cultivaron en medio de expresión Expi293 (Thermo Fisher) en una estufa de incubación humidificada con un 8 % de CO_2 a 37 °C. El día anterior a la transfección, las células se dividieron en 2.5 x 10^6 células/ml. Después de 24 horas, las soluciones madre eran de aproximadamente 4 x 10^6 células/ml y se diluyeron a 2.5 x 10^6 células/ml. Las transfecciones de Expi293 se realizaron de acuerdo con el protocolo del fabricante. El kit del sistema de expresión de Expi293 (Thermo Fisher), que contiene potenciadores de transfección y el reactivo de transfección ExpiFectamine 293, se utilizó para todas las transfecciones de Expi293. Resumiendo, el reactivo de transfección ExpiFectamine 293 y el ADN plasmídico se diluyeron por separado en medio OptiMEM (Thermo Fisher). Se combinaron mezclas de ExpiFectamine 293 y ADN y se incubaron durante

10-20 minutos adicionales. A continuación, se añadió a las células la mezcla de ExpiFectamine 293-ADN-OptiMEM. Se añadieron el potenciador 1 y el potenciador 2 a los cultivos transfectados 16-18 horas después de la transfección.

Las células ExpiCHO-S se cultivaron en medio de expresión de ExpiCHO (Thermo Fisher) en una estufa de incubación humidificado con un 8 % de CO_2 a 37 °C. El día anterior a la transfección, las células se dividieron en 3-4 x 10^6 células/ml. Después de 24 horas, las soluciones madre eran de 7-10 x 10^6 células/ml y se diluyeron a 6 x 10^6 células/ml con la adición de medios frescos. Las transfecciones de ExpiCHO se realizaron usando el kit del sistema de expresión de ExpiCHO (Thermo Fisher) de acuerdo con el protocolo convencional del fabricante. Resumiendo, el reactivo de transfección ExpiFectamine CHO y el ADN plasmídico se diluyeron por separado en OptiPRO SFM (Thermo Fisher). Se combinaron mezclas de ExpiFectamine CHO y ADN inmediatamente y se incubaron durante 1-5 minutos. A continuación, se añadió a las células la mezcla de ExpiFectamine CHO-ADN-OptiPRO. Se añadieron potenciador y alimentación al 30 % v/v 18-22 horas después de la transfección.

Recogida de cultivo celular

Las transfecciones de Expi293 se recogieron el día 4; las transfecciones de ExpiCHO se recogieron el día 5. Los cultivos celulares se centrifugaron a 1900 x g durante 15 minutos y los sobrenadantes se filtraron a esterilidad a través de un filtro de membrana desechable de 0.2 µm (filtro de polietersulfona (PES), Fisher Scientific).

Expresión de proteína a gran escala

ALP201 y ALP213 se expresaron en cultivo celular estable (CHO KS), se cultivaron en biorreactores de 5 l (APPLIKON) desde la siembra inicial con 5.0 x 10^5 células/ml, con controles de temperatura (36.5 °C, con cambio de 33 °C en el día 5), agitación (80 W/m^2) y O_2 (a demanda, de 0 a 0.6 VVM), durante 11 días, de acuerdo con procedimientos convencionales.

Purificación de proteína.

Purificación de VHH y proteínas de fusión de Fc fluorescentes con resina de Ni-NTA. Las proteínas de fusión de Fc fluorescentes, que poseen una marca de His6 carboxiterminal, se purificaron por lotes usando resina de Ni-NTA Superflow (Qiagen). Los sobrenadantes celulares se dializaron frente a tampón de unión a Ni-NTA/de lavado (cloruro de sodio 2.5 M, fosfato de sodio 0.1 M, imidazol 0.1 M, tamponado a pH 7.4 con hidróxido de sodio) durante 48 horas a 4 °C, usando matraces de diálisis (Slide-A -Lyzer™, ThermoFisher). La resina de Ni-NTA Superflow se lavó y se resuspendió en tampón de unión a Ni-NTA/de lavado antes de la incubación con sobrenadantes dializados (~8 mg de proteína por ml de resina) durante 90 minutos con agitación a 4 °C. Las columnas de purificación por gravedad se desinfectaron con hidróxido de sodio 0.1 N durante 1 hora, seguido de aclarado con tampón de unión a Ni-NTA/de lavado antes de la carga/elución de la proteína. Los sobrenadantes dializados que contenían resina de Ni se vertieron en columnas y la suspensión de proteína no unida se dejó fluir a través de la

resina. La proteína unida a la resina se lavó con 40 volúmenes de columna (~200 ml) de tampón de unión a Ni-NTA/de lavado. Las proteínas de fusión de Fc fluorescentes se eluyeron en 3 fracciones añadiendo 5 ml de tampón de elución (fosfato de sodio 20 mM pH 7.0, imidazol 500 mM pH 7.5, cloruro de sodio 500 mM) y permitiendo 5 minutos de incubación del tampón con la resina antes de la elución en tubos cónicos. Se cambió el tampón de las proteínas eluidas a PBS pH 7.4 usando filtros de centrifugación con límite de peso molecular de 30 kDa (Amicon®) y se filtraron las proteínas concentradas finales. Las concentraciones de proteína se cuantificaron usando absorbancia UV/VIS a 280 nm y 558 nm (absorbancia máxima de Katushka 2s) y, posteriormente, se almacenaron a 4 °C protegidas de la luz.

Purificación de fusiones de ALP-Fc con resina de proteína A.

Las fusiones de ALP-Fc se purificaron por lotes usando resina de proteína A (MABSELECT™ SURE™, GE Life Sciences). La resina se lavó minuciosamente y se suspendió en tampón de carga de proteína (fosfato de sodio 50 mM, pH 7.5, cloruro de sodio 100 mM) antes de la incubación durante la noche (a 4 °C) con sobrenadantes celulares que contenían proteínas diana expresadas (~10 mg de proteína por ml de resina). Las columnas de gravedad se desinfectaron con hidróxido de sodio, se aclararon con tampón de carga y se cargaron con resina de proteína A/sobrenadantes. Las proteínas unidas a la resina se lavaron con 40 volúmenes de columna (~200 ml) de tampón de carga antes de la elución con Tris-HCl 50 mM, pH 11. Las proteínas se eluyeron en fracciones de 3 ml y se neutralizaron inmediatamente mediante dilución 1:1 con

tampón de carga. Determinadas muestras se purificaron adicionalmente mediante cromatografía de intercambio aniónico fuerte (CAPTO™ Q IMPRES, columnas de 5 ml; tampón de lavado de columna tampón de fosfato de sodio 20 mM, pH 7.4, tampón A; elución en gradiente entre tampón A y tampón B (fosfato de sodio 20 mM, NaCl 1 M, pH 7.4) en 12 volúmenes de columna, partiendo de un 25 % de tampón B hasta un 100 % de tampón B). Las fracciones que contenían fusiones de ALP-Fc se combinaron y se dializaron en PBS pH 7.4 o se les cambió el tampón a PBS pH 7.4 usando filtros de centrifugación con límite de peso molecular de 30 kDa. Las concentraciones de proteína se determinaron mediante la absorbancia a 280 nm y la pureza se evaluó mediante geles de SDS-PAGE. Las proteínas se filtraron y almacenaron a 4 °C.

Purificación de proteína a gran escala

Las proteínas de la expresión en biorreactor de línea celular estable se purificaron de manera similar a las muestras previas, excepto que la cromatografía de intercambio aniónico fuerte se realizó usando columnas POROS™ 50HQ, con los mismos tampones en un gradiente de un 0 % a un 70-75 % de tampón B sobre 13-15 volúmenes de columna. Las muestras se concentraron mediante UF/DF o se dializaron en PBS, se filtraron a esterilidad y se almacenaron a 4 °C (la concentración de la muestra era normalmente de aproximadamente 4-8 mg/ml).

EJEMPLO 2

Ensayo de actividad proteínica de hidrólisis de fosfato de 4-metilumbeliferilo

La actividad de fosfatasa alcalina se midió de forma rutinaria usando un sustrato artificial, fosfato de 4-metilumbeliferilo (4-MUP). La escisión del enlace fosfoéster en 4-MUP produce un producto fluorescente, 4-metilumbeliferona (4-MU), que puede detectarse a una excitación/emisión de 360 nm/465 nm.

Se ensayaron muestras de proteína (muestras sobrenadantes, parcialmente purificadas o purificadas en columna) para determinar la actividad de ALP en solución utilizando fosfato de 4-metilumbeliferilo (4-MUP) como sustrato artificial. La hidrólisis del enlace fosfoéster en 4-MUP libera el compuesto fluorescente 4-metilumbeliferona, que se detecta fácilmente mediante un fluorímetro. La cuantificación del producto se realizó usando una curva patrón de 4-metilumbeliferona (4-MU) medida en la misma placa, con concentraciones de modelo de 0, 1.25 uM, 2.5 uM, 5 uM, 10 uM y 20 uM. Se preparó una solución madre 10 mM de 4-MU en etanol y diluirse en tampón de ensayo [HEPES 50 mM pH 7.4, NaCl 150 mM, $MgCl_2$ 1 mM, seroalbúmina bovina 1 mg/ml]. Las muestras de proteína de fusión purificadas se prepararon como soluciones de 0.1 mg/ml en tampón de ensayo y diluirse en serie hasta una concentración final apropiada (habitualmente, aproximadamente 1 nM) para el ensayo en tampón de ensayo. Se prepararon soluciones madre de 4-MUP en tampón de ensayo. Todas las soluciones se llevaron hasta 37 °C antes del inicio del ensayo mediante la adición de 4-MUP a la muestra de proteína a una concentración final de 10

uM. La producción de 4-MU se midió a una longitud de onda de excitación de 360 nm y una longitud de onda de emisión de 465 nm. Los datos se recopilaron en un lector de placas mantenido a 37 °C, cada 40 segundos durante un total de 20 minutos. Las velocidades de reacción se calcularon por regresión lineal en unidades de actividad, donde 1 U = 1 micromol de 4-MUP hidrolizado/minuto. Las actividades específicas se calcularon en unidades/mg de proteína ensayada. Las curvas de progreso para el ensayo de hidrólisis de 4-MUP se muestran en la figura 19. Las actividades específicas de la tabla 4 fueron como sigue: < 2 U/mg (-), 2-9.9 U/mg (+), 10-30 U/mg (++) y >30 U/mg (+++).

Tabla 4: Actividad específica para hidrólisis de 4-MUP para proteínas de fusión de fosfatasa alcalina ilustrativas

Construcción	Actividad de MUP
ALP035, ALP039, ALP133, ALP134, ALP136, ALP137, ALP138, ALP139, ALP142, ALP143, ALP187, ALP201, ALP235, ALP259	+++
ALP001, ALP004, ALP011, ALP012, ALP023, ALP031, ALP043, ALP047, ALP048, ALP049, ALP050, ALP051, ALP052, ALP053, ALP054, ALP055, ALP056, ALP057. ALP058, ALP058, ALP059, ALP060, ALP062, ALP063, ALP089, ALP132, ALP144, ALP147, ALP148, ALP151, ALP155, ALP156, ALP157, ALP158, ALP170, ALP173, ALP174, ALP185, ALP186, ALP188, ALP213, ALP214, ALP215	++
ALP002, ALP044, ALP045, ALP130, ALP135, ALP140, ALP145, ALP146, ALP149, ALP150, ALP152, ALP163, ALP169,	+
ALP003, ALP013, ALP040, ALP041, ALP164, ALP165, ALP166, ALP168	-

Ensayo de hueso en placa

Las fracciones de homogeneizado de hueso se ensayaron para determinar la actividad de ALP. Las fracciones de homogeneizado de hueso se suspendieron en 100 µl de PBS y transferirse a placas negras de 96 pocillos. También se

transfirieron suspensiones de proteína no unidas de 100 µl a pocillos separados de la placa de 96 pocillos. A cada pocillo, se le añadieron 100 µl de solución de detección de ALP (4-MUP 10 µM, BSA al 1 %) y la lectura fluorescente cinética (a 360/465) se inició inmediatamente y se ejecutó durante 20 minutos, con emisiones de intensidad fluorescente recopiladas cada 30 segundos. La pendiente de la intensidad de fluorescencia frente al tiempo representó la concentración de ALP en cada fracción de muestra.

La actividad de MUP de las fracciones unida y no unida de 17 construcciones se midió mediante la pendiente de actividad inicial en los primeros 5 minutos para conservar la linealidad. Se determinó la proporción de actividad de MUP para cada proteína de fusión, como proporción = (actividad unida)/(actividad no unida), con los resultados mostrados en la tabla 5 y la figura 14. Las curvas de progreso ilustrativas del ensayo de hidrólisis de MUP realizado sobre homogeneizado de hueso con diversas construcciones se muestran en la figura 11, y la actividad de unión se presenta como tabla en la tabla 5. La actividad de MUP de la tabla 5 se cuantificó como sigue: <0.2 (-); 0.2 a 0.49 (+); 0.5 a 5.0 (++); >5.0 (+++).

Tabla 5: Unión al homogeneizado de hueso

Construcción	**Unión al homogeneizado de hueso – Proporción unida/no unida**
ALP230	–
ALP231	+
ALP233	++
ALP234	++
ALP235	++
ALP236	+++
ALP237	+++
ALP238	–
ALP239	+
ALP242	+++
ALP243	+
ALP247	–
ALP248	–
ALP250	+
ALP251	+
ALP253	+
ALP254	+++

La proporción de actividad de MUP se determinó para cada proteína de fusión, como proporción = (actividad unida)/(actividad no unida). Leyenda: <0.2 (–); 0.2 a 0.49 (+); 0.5 a 5.0 (++); >5.0 (+++)

EJEMPLO 3

Actividad de construcciones de fosfatasa alcalina frente a sustratos naturales

Las propiedades mejoradas de las moléculas de fusión proteínicas descritas en el presente documento se verificaron en diferentes ensayos enzimáticos, midiendo la hidrólisis de sustratos naturales y artificiales. Los sustratos artificiales usados en los ensayos de actividad incluyeron 4-MUP y fosfato de paranitrofenilo (pNPP). Los sustratos naturales usados en los ensayos de actividad incluyeron pirofosfato (PPi) y piridoxil-5'-fosfato (PLP). Los cambios en la actividad sobre la ALP de tipo silvestre variaron desde negativos (actividad enzimática disminuida) hasta aumentos de la actividad enzimática de hasta 9.5 veces (aumento de actividad de un 850 %).

Ensayo de hidrólisis de pirofosfato.

Se ensayó la actividad de determinadas proteínas de fusión de fosfatasa alcalina purificadas frente al sustrato natural pirofosfato. La hidrólisis del pirofosfato se midió mediante la detección del producto, el anión fosfato, usando el reactivo de ensayo PiBlue (BioAssay Systems), que se vuelve verde brillante al unirse al fosfato. La cuantificación de los niveles de fosfato en cada pocillo se realizó usando una curva patrón de soluciones de fosfato preparadas en tampón de ensayo que se leyó en la placa de ensayo. Se prepararon soluciones madre de pirofosfato de sodio decahidratado (Sigma Chemicals) en agua pura a una concentración de 10 mM. Las muestras de proteína de fusión purificadas se prepararon como soluciones de 0.1 mg/ml en

tampón de ensayo [HEPES 50 mM pH 7.4, NaCl 150 mM, MgCl2 1 mM, seroalbúmina bovina 1 mg/ml] y se diluyeron en serie hasta una concentración final apropiada para el ensayo en tampón de ensayo. Las muestras de pirofosfato para ensayo se prepararon por dilución de la solución madre en tampón de ensayo. Todas las soluciones se llevaron a 37 °C antes del inicio de la reacción. Se añadieron soluciones de proteína a placas transparentes de 96 pocillos y las placas se colocaron en un agitador de placas Jitterbug mantenido a 37 °C. El inicio de la reacción se realizó mediante la adición de las soluciones de pirofosfato a la solución de proteína.

Normalmente, la reacción de hidrólisis de pirofosfato se realizó a concentraciones de pirofosfato de 0 uM, 1.56 uM, 3.12 uM, 6.25 uM, 12.5 uM, 25 uM, 50 uM, 100 uM, 200 uM y 400 uM simultáneamente en la misma placa. Se prepararon ocho pocillos de reacción a cada concentración de pirofosfato, y la reacción se detuvo mediante la adición del reactivo PiBlue (añadido en un volumen igual al volumen de reacción final) después de que hayan pasado 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 minutos desde la adición de pirofosfato a la placa. La adición del reactivo PiBlue detiene cualquier reacción adicional porque el pH bajo del reactivo de detección inactiva la enzima. Se deja que se desarrolle el color en la placa durante 30 minutos antes de leer la absorbancia a 620 nm. Las velocidades de reacción a cada concentración de pirofosfato se calculan construyendo curvas de progreso a partir de los puntos temporales individuales. Las velocidades de reacción en cada concentración se usaron para calcular los valores de Km y Vmáx en el GraphPad Prism,

usando un ajuste cinético enzimático de Michaelis-Menten. Los valores de kcat se calcularon a partir de los valores de Vmáx mediante: Vmáx/(moles de proteína ensayada) = kcat. La eficiencia catalítica se define como: Eficiencia catalítica = kcat/Km.

Los gráficos de Michaelis-Menten que detallan la actividad de hidrólisis de pirofosfato de compuestos seleccionados se muestran en la figura 22. Se muestran ALP201 a 10 ng/ml, ALP250 a 10 ng/ml y asfotasa alfa (SEQ ID NO: 269) a 25 ng/ml. Se muestra la desviación típica (barras), N = 3.

Tabla 6: Parámetros de hidrólisis de pirofosfato para proteínas de fusión de fosfatasa alcalina sometidas a prueba

Construcción	kcat (s^{-1})	Eficiencia catalítica (M^{-1} s^{-1})
ALP001	+	+
ALP004	+	-
ALP023	+	+
ALP031	++	-
ALP035	++	+++
ALP039	++	+++
ALP042	+	-
ALP043	++	+
ALP044	+	+
ALP133	+++	++
ALP137	+++	++
ALP138	+++	+++
ALP139	+++	+++
ALP142	++	+
ALP143	+++	++
ALP171	++	+
ALP173	++	+
ALP174	++	-
ALP179	++	-
ALP182	++	-
ALP184	-	-
ALP201	+++	+++
ALP202	+++	+++
ALP203	+++	++
ALP206	+	+
ALP207	++	+

ALP208	++	-
ALP209	++	+
ALP211	++	+
ALP212	++	-
ALP213	++	+
ALP214	++	+
ALP215	++	+
ALP219	+	+
ALP225	++	-
ALP226	++	+
ALP259	+++	+

Para el parámetro de kcat: (+++) > 130 s-1, (++): 130 – 65 s-1, (+): 65 – 33 s-1, (-) < 33 s-1

Para el parámetro de eficiencia catalítica: (+++) > 20 * 10^6 M-1 s-1, (++): 20 * 10^6 – 6 * 10^6 M-1 s-1, (+): 6 * 10^6 – 3*10^6 M-1 s-1, (-) < 3 *10^6 M-1 s-1

Ensayo de hidrólisis de piridoxil-5'-fosfato

Un segundo sustrato natural de la fosfatasa alcalina es piridoxil-5'-fosfato(PLP). Se ensayó la actividad de determinadas proteínas de fusión de fosfatasa alcalina purificadas frente a PLP en un formato de ensayo acoplado, en el que el piridoxilo, el producto de hidrólisis de PLP, se convierte en la piridoxolactona fluorescente mediante la piridoxilo deshidrogenasa tetramérica de *M. loti* (tPLDH, SEQ ID NO: 246). El gen de tPLDH marcado con 6xHis se sintetizó mediante métodos convencionales y clonarse en un plásmido de expresión bacteriano bajo el control del promotor T7. La tPLDH marcada con 6xHis se expresó en células BL21 (DE3) usando protocolos convencionales y se purificó mediante

métodos de cromatografía de afinidad convencionales. La proteína se concentró hasta una concentración de 1900 uM usando un concentrador Amicon Ultra15 Spin y se congeló a -80 °C hasta usarse en el ensayo. Las muestras de proteína de fusión purificadas se prepararon como soluciones de 0.1 mg/ml en tampón de ensayo [HEPES 50 mM pH 7.4, NaCl 150 mM, $MgCl_2$ 1 mM, seroalbúmina bovina 1 mg/ml]. Las muestras finales diluidas en serie se colocan en una placa negra de 96 pocillos, junto con patrones de piridoxolactona (preparados en tampón de ensayo). A las muestras de proteína, se les añaden soluciones de NAD^+, tPLDH y PLP (preparadas en tampón de ensayo) para obtener concentraciones finales de NAD+ 3 mM, tPLDH 4 uM y PLP 3 uM y se mezclaron. Todas las soluciones se llevan a 37 °C antes del inicio de la reacción, y la placa de reacción se incuba a 37 °C, y se detecta la fluorescencia por excitación a 355 nm y se mide la emisión a 445 nm. La cantidad de producto de piridoxolactona generada se calcula usando una curva patrón generada a partir de la fluorescencia medida a partir de los pocillos de piridoxolactona en la placa. Las velocidades de reacción se calculan mediante regresión lineal de las curvas de progreso en unidades de umoles de piridoxilo producido/min. Las actividades específicas se calculan dividiendo las velocidades de reacción por la concentración de proteína usada en la reacción de ensayo. Una curva de progreso ilustrativa de los datos generados por este ensayo para ALP201, 10 ng/ml se muestra en la figura 23. En la figura 24 se muestran gráficos de Michaelis-Menten que detallan la actividad de hidrólisis

de piridoxal-5'-fosfato de ALP201 a 10 ng/ml, ALP250 a 10 ng/ml y asfotasa alfa a 12.5 ng/ml.

Tabla 7: Actividad de hidrólisis PLP medida de proteínas de fusión de fosfatasa alcalina

Construcción	Actividad específica en el ensayo de hidrólisis de PLP (umol/min/mg)
ALP001	+
ALP023	-
ALP039	+
ALP138	-
ALP139	+
ALP200	+
ALP201	+
ALP203	-
ALP043	+
ALP173	++
ALP174	+
ALP0213	++
ALP0214	++
ALP0215	+
ALP0219	+

Leyenda: Actividad <1 umol/min/mg (-), 1-2 umol/min/mg (+), >2 umol/min/mg (++)

EJEMPLO 4

Ensayo de unión de hidroxiapatita

Caracterización de la unión de la fusión de Fc fluorescente a hidroxiapatita (HA).

Se adquirió HA sintética (CAPTAL®) de Plasma-Biotal Ltd. (Derbyshire, Reino Unido). En tubos de centrífuga de 1.5 ml separados, las fusiones de Fc fluorescentes de dirección al hueso se diluyeron a 50 nM en seroalbúmina bovina (BSA) al 0.1 % (p/p) en solución salina tamponada con fosfato (PBS) pH 7.4 (1 ml de suspensión por tubo). A cada tubo que contenía fusión de Fc fluorescente, se le añadió 1 mg de HA sintética y los tubos se incubaron a temperatura ambiente durante 2 horas con mezcla orbital para evitar que se sedimente la HA. Después de la incubación, las muestras se centrifugaron a 16 000 rcf durante 5 minutos para separar la fracción sólida unida a HA de la suspensión de proteína no unida. Las fracciones unidas a HA se lavaron posteriormente tres veces con PBS, y la fracción final de HA se suspendió en 100 µl de PBS. Las fracciones unidas a HA suspendidas y las suspensiones de proteína no unida de 100 µl se transfirieron a placas negras de 96 pocillos (1 fracción por pocillo), y las concentraciones relativas de proteína se determinaron mediante excitación/emisión fluorescente a 488 nm/585 nm usando un lector de placas fluorescentes (Spectromax i3x).

Veinte proteínas de fusión de Fc fluorescentes se expresaron de forma transitoria en células HEK y se purificaron usando resina de Ni-NTA (véase la tabla 1 para los detalles de secuencia). Las proteínas de fusión de Fc fluorescentes diferían únicamente en las secuencias de unión a HA aminoterminales para evaluar sistemáticamente los restos de dirección al hueso *in vitro*. En tubos separados, las proteínas de fusión de Fc fluorescentes se incubaron en suspensión con HA en presencia de BSA para evitar la unión no específica. La figura 1A muestra la intensidad de

fluorescencia de la fracción unida a HA para cada muestra de fusión de Fc fluorescente con respecto a la fusión de Fc fluorescente no dirigida (FLU002). Además, las fracciones de proteína no unida se recogieron inmediatamente después de la incubación con HA (antes del primer lavado de sedimentos de HA). Estas intensidades de fluorescencia también se representan con respecto a FLU002, mostradas en la figura 1B. Para FLU001, 003, 004, 016, 027 y 031, el 100 % de la proteína se unió a HA, ya que ninguna de estas proteínas se detectó por encima del fondo en las fracciones de proteína no unida. Por el contrario, FLU002 mostró 4 veces menos unión a HA en comparación con FLU001 y una señal fluorescente no unida significativa (100 veces mayor que FLU001 o el fondo). FLU005-009, 011-014 y 020 mostraron características de unión a HA similares a FLU002. Curiosamente, dos proteínas (FLU010 y FLU015) mostraron fluorescencia significativa (por encima del control negativo) en la fracción unida a HA, así como en la fracción no unida.

La hidroxiapatita (HA) se ha usado indistintamente para el hueso como sustrato de unión para ensayos de dirección al hueso *in vitro*, sin embargo, se han observado diferencias significativas entre la HA cerámica y el hueso natural, especialmente con respecto a la función del colágeno y otras proteínas de la matriz extracelular sobre la nucleación controlada de cristales *in vivo* (Zhai, Y., *et al*., *J. Crystal Growth*, 202-206, 2006). Se usó específicamente la HA de marca CAPTAL® en este estudio porque se fabricó para que fuera un análogo mineral óseo basado en su proporción de Ca:PO_4 (1.67), contenido de hierro (100 ppm), contenido de magnesio (800-1100 ppm) y red cristalina. Aun así, se observaron

diferencias significativas en la unión de proteína total entre HA CAPTAL® y homogeneizado de hueso. Lo que es más importante, se observó unión no específica para todas las proteínas de fusión de Fc fluorescentes incubadas con HA, incluso en presencia del agente bloqueante BSA. Cuando se incubaron con homogeneizado de hueso, las proteínas de control de fusión de Fc fluorescentes no dirigidas (FLU002) no mostraron señal fluorescente por encima del fondo (homogeneizado de hueso solo). Por tanto, el homogeneizado de hueso fue un sustrato de unión más restrictivo en comparación con HA, que se comportó más como una resina de intercambio iónico típica. Sin embargo, cuando se normalizaron a una proteína de control apropiada (como en las figuras 1A-1D), los datos de unión de HA fueron útiles para identificar proteínas de unión al hueso eficientes, aunque el intervalo dinámico para la detección de proteína de fusión de Fc fluorescente se redujo mucho en los ensayos de unión de HA (en aproximadamente 5 veces). Las proteínas de ALP-Fc mostraron unión no específica a HA incluso mayor, muy probablemente debido a la carga negativa del dominio catalítico de ALP. En algunos casos, esto incluso dio lugar a la identificación falsa de algunas proteínas de ALP-Fc-X con propiedades de unión a HA, lo que no se observó cuando se incubaban con homogeneizado de hueso. Debido a esto, el homogeneizado de hueso se consideró un sustrato superior para el cribado de proteínas de unión al hueso y se usó para todos los estudios *in vitro* posteriores.

EJEMPLO 5

Ensayo de homogeneizado de hueso

Los ensayos de las publicaciones previas se basaron en cortes de hueso u otros sustratos tridimensionales físicamente restringidos. Se necesitaba un ensayo más preciso, más rápido y más eficiente para distinguir y cuantificar la eficacia de la proteína y cuantificar los porcentajes de unión.

Preparación de homogeneizado de hueso.

Los fémures de ratones C57BL/6 macho se almacenaron a -80 °C antes de su uso. Los fémures se transfirieron a tubos de centrífuga de 2 ml (2 fémures por tubo) con 1 ml de colagenasa de tipo 2 al 0.2 % (p/p) (Worthington) en BS con cóctel inhibidor de serina y cisteína proteasas sin EDTA 1x (COMPLETE™, Roche). Los fémures se sometieron a agitación vorticial breve y se incubaron a 37 °C con agitación (800 rpm) durante 1 hora. El tejido conjuntivo restante se eliminó y los fémures se colocaron en placas de Petri en hielo. La médula ósea se enjuagó con PBS usando aguja y jeringa. El hueso seco se amasó (normalmente 30-50 mg por fémur) y se colocó en batidoras desechables individuales para moler tejido duro preenfriado (PRECELLYS®, Bertin Instruments) con 0.75 ml de PBS con inhibidor de proteasa 1x. A continuación, los fémures se homogeneizaron usando un homogeneizador de molino de esferas de alto rendimiento (Bullet Blender, 4 °C, velocidad máxima, 4 ciclos de 30 segundos de duración). El homogeneizado se transfirió a tubos de centrífuga de 1.5 ml y se centrifugó a 12 000 x g durante 15 minutos a 4 °C para separar el homogeneizado de hueso de los restos

proteínicos/celulares liberados. El homogeneizado de hueso se resuspendió en BSA al 0.1 % en PBS para su uso en ensayos de unión.

Unión de fusión de Fc fluorescente a homogeneizado de hueso in vitro.

Las proteínas de fusión de Fc fluorescentes se diluyeron hasta 50 nM en PBS con BSA al 0.1 % y se incubaron con 3 mg de homogeneizado de hueso en tubos de centrífuga individuales de 1.5 ml (1 ml por tubo). Las muestras se mezclaron a temperatura ambiente durante 2 horas antes de separar las fracciones unida y no unida al homogeneizado de hueso mediante centrifugación. Las fracciones de homogeneizado de hueso se lavaron 3 veces con PBS y el sedimento de homogeneizado final se suspendió en 100 µl de PBS. El homogeneizado de hueso suspendido y las suspensiones de proteína no unidas de 100 µl se cuantificaron para determinar la concentración de fusión de Fc fluorescente relativa usando un lector de placas fluorescentes.

Para todas las proteínas de fusión de Fc fluorescentes, la unión al homogeneizado de hueso siguió tendencias similares a las de la unión a HA; sin embargo, hubo una mayor diferencia numérica entre las proteínas de unión al hueso eficientes (por ejemplo, FLU001) y las que no se unen (por ejemplo, FLU002), como se muestra en la figura 1C. En las fracciones unidas al hueso, se observó un aumento de 8 veces en la fluorescencia para FLU001 sobre el control negativo (FLU002), en comparación con el aumento de 4 veces observado en la unión a HA. La unión de FLU010 al homogeneizado de hueso no estuvo significativamente por encima del control

negativo (FLU002); sin embargo, FLU015 todavía mostraba una unión eficaz al homogeneizado de hueso, con una presencia significativa en la fracción no unida. Para garantizar que estos resultados no fueran una anomalía estadística, el experimento se repitió con n = 4 y se observó el mismo resultado para FLU010 y 015.

Es importante destacar que los datos de fluorescencia sin procesar que cuantifican la cantidad total de proteína unida a HA (ejemplo 2) y al homogeneizado de hueso mostraron una unión significativamente mayor de proteínas no dirigidas a una masa equivalente de HA en comparación con el homogeneizado de hueso (en algunos casos, un aumento de hasta 75 veces en la unión a HA), lo que indica algo de unión no específica de proteínas a HA incluso en ausencia de restos de dirección al hueso eficaces. La unión no específica a HA se exacerbó más cuando se eliminó el agente bloqueante de las incubaciones de proteína, lo que demuestra la capacidad de HA de unirse a una diversidad de proteínas, incluyendo aquellas sin restos de unión de HA específicos. Aunque HA fue menos útil para distinguir fusiones de unión moderada a HA de las fusiones no dirigidas, HA fue un sustrato adecuado para determinar proteínas de unión al hueso altamente eficaces. Debido a que el homogeneizado de hueso era un sustrato de unión más restrictivo y no mostraba nada de unión no específica de proteínas no dirigidas (véase la figura 1), todos los ensayos de cribado de unión al hueso posteriores se realizaron usando homogeneizado de hueso murino como sustrato de unión (figuras 2A-2B).

Las intensidades de fluorescencia para las fracciones unida y no unida se normalizaron a proteínas de fusión de Fc

fluorescentes no dirigidas para comparar entre diferentes restos de dirección (figura 3A-3B). Los experimentos de unión *in vitro* se realizaron por duplicado ± desviación típica.

Caracterización de la unión de construcciones al homogeneizado de hueso.

Se usó un modelo *in vitro* para caracterizar la unión al hueso de moléculas similares a ERT antes de dosificación *in vivo*. Para utilizar el ensayo de unión basado en fluorescencia de hidroxiapatita, las proteínas ALP031 (ALP-Fc-D10) y ALP086 (ALP-Fc) se marcaron con fluorescencia con kits de marcaje de anticuerpos disponibles en el mercado (Invitrogen/ThermoFisher). Los tintes Alexa Fluor se activaron previamente con ésteres de succinimidilo o ésteres de tetrafluorofenilo que reaccionan con aminas primarias en proteínas. Por lo tanto, el marcaje fluorescente no estaba dirigido al sitio, y el grado de marcaje estuvo entre 3-5 moles de fluoróforo por mol de anticuerpo. Una vez marcadas y purificadas para eliminar el tinte libre, se prepararon soluciones de proteína 30 nM en BSA al 0.1 % y se realizaron ensayos de unión a homogeneizado de hueso como se describe anteriormente para construcciones de FFC. Los datos ilustrativos para construcciones con afinidades variables por homogeneizado de hueso se muestran en la figura 1C, figura 1D, figura 2 y figura 3.

Ensayo en placa de actividad de ALP en hueso

Las fracciones de homogeneizado de hueso se ensayaron para determinar la actividad de ALP usando 4-MUP. Las fracciones de homogeneizado de hueso se suspendieron en 100

µl de PBS y transferirse a placas negras de 96 pocillos. También se transfirieron suspensiones de proteína no unidas de 100 µl a pocillos separados de la placa de 96 pocillos. A cada pocillo, se le añadieron 100 µl de solución de detección de ALP (4-MUP 10 µM, BSA al 1 %) y la lectura fluorescente cinética (a 360/465) se inició inmediatamente y se ejecutó durante 20 minutos, con emisiones de intensidad fluorescente recopiladas cada 30 segundos. La pendiente de la intensidad de fluorescencia frente al tiempo representó la concentración de ALP en cada fracción de muestra.

La actividad de MUP de las fracciones unida y no unida de múltiples construcciones se midió mediante la pendiente de actividad inicial en los primeros 5 minutos para conservar la linealidad. Se determinó la proporción de actividad de MUP para cada proteína de fusión, como proporción = (actividad unida)/(actividad no unida), con los resultados mostrados en la figura 14. Esta proporción demuestra una respuesta exponencial con la longitud creciente de la marca de dirección al hueso poliácida, lo que da lugar a una unión significativamente más fuerte al homogeneizado de hueso según se añade residuos individuales al péptido poliácido.

Determinación de la afinidad relativa de la proteína por el homogeneizado de hueso in vitro

Se desarrolló un ensayo multidosis para clasificar la afinidad relativa de las proteínas de unión al hueso. Para proteínas que se unen eficientemente al homogeneizado de hueso, se determinaron las tasas relativas de disociación mediante este ensayo de intercambio cinético de proteína en el hueso.

Las proteínas se evaluaron individualmente (por ejemplo, un tipo de proteína por tubo), incubando concentraciones de saturación (1 µM) de proteína de unión al hueso sin marcar con 5 mg de homogeneizado de hueso en tubos Eppendorf de 1.5 ml. Después de 24 horas de incubación con proteína no marcada, el homogeneizado de hueso se centrifugó (16 000 rcf, 5 minutos) para eliminar el exceso de proteína no unida. El homogeneizado de hueso, saturado con una determinada proteína de unión al hueso, se resuspendió en soluciones 0.5 µM de la misma proteína de unión al hueso marcada con sonda fluorescente ALEXA FLUOR® y se dejó incubar durante 1, 2, 4, 8 y 24 h antes de centrifugar el homogeneizado de hueso, lavarlo 3 veces con PBS y transferirlo a una placa negra de 96 pocillos. El sobrenadante de la primera centrifugación también se recogió para cuantificar la cantidad de proteína fluorescente que permaneció en suspensión (sin unir). Se usó un lector de placas fluorescentes para cuantificar la cantidad de proteína marcada con fluorescencia unida y no unida en cada punto temporal, lo que permitió una representación cinética de la velocidad de disociación de la proteína sin marcar.

El homogeneizado de hueso se saturó inicialmente con una proteína dada durante 24 horas, se lavó minuciosamente para eliminar el exceso de proteína no marcada y finalmente se incubó con la misma proteína que contenía un marcador fluorescente para hacer seguimiento del intercambio de la proteína que saturaba la superficie del homogeneizado de hueso con proteína soluble (marcada con fluorescencia). La señal fluorescente se normalizó a las muestras que no se pretrataron durante 24 horas con una concentración de

saturación de proteína sin marcar, lo que representa la unión potencial máxima para las proteínas marcadas con fluorescencia. VHH001 (círculos) mostró un equilibrio inmediato de las concentraciones de proteína unidas y no unida, lo que indica una tasa de intercambio rápida o proteína de unión a homogeneizado de hueso de baja afinidad. VHH002 (cuadrados) mostró un desplazamiento más gradual de la proteína unida con proteína marcada con fluorescencia en solución. ALP031 (triángulos) mostró un desplazamiento mínimo de la proteína unida con la proteína marcada con fluorescencia, lo que indicó una alta afinidad por el hueso una vez unida.

Las curvas cinéticas de acumulación de proteína fluorescente en hueso presaturado mostraron remplazo de proteína no marcada en hueso por proteína marcada (figuras 10A-10B).

Caracterización de la unión de ALP-Fc-(Asp)$_{10}$ y ALP-Fc al homogeneizado de hueso.

Se usó un modelo *in vitro* para caracterizar la unión al hueso de moléculas similares a ERT antes de dosificación *in vivo*. Para utilizar el ensayo de unión basado en fluorescencia de hidroxiapatita, las proteínas de fusión ALP-Fc-(Asp)$_{10}$ ALP-Fc se marcaron con fluorescencia con kits de marcaje de anticuerpos disponibles en el mercado (Invitrogen/ThermoFisher). Los tintes ALEXA FLUOR® se activaron previamente con ésteres de succinimidilo o ésteres de tetrafluorofenilo que reaccionan con aminas primarias en proteínas. Por lo tanto, el marcaje fluorescente no estaba dirigido al sitio, y el grado de marcaje estuvo entre 3-5

moles de fluoróforo por mol de anticuerpo. Una vez marcadas y purificadas para eliminar el tinte libre, se prepararon soluciones de proteína 30 nM en BSA al 0.1 % y se realizaron ensayos de unión a homogeneizado de hueso como se describe.

Las fracciones unidas/no unidas variaron de acuerdo con una distribución gaussiana aproximada en función de la longitud de la marca ósea.

Resultados

La caracterización *in vitro* de la unión a homogeneizado de hueso fue indicativa de la dirección al hueso *in vivo* (véase el ejemplo 5), aunque estudiar la asociación (unión) solo no permitió la diferenciación entre dos restos de dirección al hueso altamente eficaces. Por ejemplo, tanto ALP-Fc-D_{10} (SEQ ID NO: 31) como VHH002 (SEQ ID NO: 250) mostraron unión cuantitativa a homogeneizado de hueso *in vitro* y unión y retención eficaces en hueso *in vivo*. Aunque estas proteínas son casi indistinguibles mediante estos experimentos, poseen afinidades bastante diferentes por el hueso basándose en el comportamiento de disociación. Como se muestra en las figuras 10A-10B, VHH002 unido al hueso puede intercambiarse con VHH002 soluble en exceso marcado con fluorescencia en solución. Por el contrario, ALP-Fc-D_{10} casi no muestra disociación del homogeneizado de hueso una vez unido, incluso en presencia de exceso de ALP-Fc-D_{10} soluble marcado con fluorescencia. Por lo tanto, ALP-Fc-D_{10} mostró una afinidad mucho mayor por el hueso en comparación con VHH002, a pesar de tener tasas de asociación (unión) casi equivalentes. VHH002 y ALP-Fc-D_{10} se localizaron eficientemente en el hueso y permanecieron en el

compartimento óseo más de 7 días, pero quizás el mecanismo de su localización fue bastante diferente. VHH002 demostró la capacidad de disociarse del hueso mientras que ALP-Fc-D_{10} mostró una disociación significativamente más lenta después de la unión. Es posible que las moléculas de ALP-Fc-D_{10} permanezcan más cerca del sitio de unión inicial, mientras que VHH002 tiene más movilidad para unirse y disociarse en todo el tejido óseo.

La comprensión apropiada de los mecanismos de localización ósea y el impacto de los dominios de dirección novedosos sobre la eficacia terapéutica será de gran importancia para desarrollar un tratamiento sustitutivo de enzimas óptimamente eficaz. Además, el ajuste del tiempo de residencia y la movilidad de los tratamientos en el hueso puede usarse para optimizar las construcciones de sALP para su uso en tratamientos de enfermedades, tales como HPP.

EJEMPLO 6

Análisis farmacocinético en un modelo murino

A ratones C57BL/6 (Jackson Labs) macho entre 11-12 semanas de edad se les administró una sola inyección de 4-7 mg/kg, en la vena de la cola o por vía subcutánea, de proteínas de muestra a 1 mg/ml en PBS estéril (sin calcio o magnesio), y se les hizo seguimiento durante 14-21 días. Se realizaron dos extracciones de sangre intermedias y una extracción de sangre terminal (punción cardiaca, anestesia con CO_2) en cada ratón y se estadificaron en la cohorte (4 ratones en cada uno de los 4 grupos, por molécula y por tipo de administración). Las muestras de sangre (100 µl, que producen 50 µl de plasma después de centrifugación) se

recogieron en tubos Li/heparinizados a las 0.25, 1, 6, 24, 48, 72, 96, 120, 192, 264, 336 y 480 horas. Las muestras de sangre se almacenaron a 4 °C hasta que se procesaron en plasma; posteriormente, las muestras de plasma se congelan instantáneamente en N_2 líquido y se almacenaron a -80 °C.

Cuantificación de la actividad enzimática en muestras de plasma de ratón:

El ensayo de 4-MUP usado para determinar la actividad enzimática específica en el ejemplo 2 se modificó ligeramente para medir la actividad en muestras recogidas con una concentración de fosfatasa alcalina desconocida. Se diluyeron muestras de suero de 100 a 6000 veces en tampón de ensayo (HEPES 50 mM, NaCl 150 mM, $MgCl_2$ 1 mM, pH 7.4 y de BSA 1 mg/ml) para determinar la concentración de fosfatasa alcalina activa. Las muestras diluidas se cuantificaron como se describe en el ejemplo 2, excepto que la curva patrón se generó basándose en la actividad observada de una muestra de fosfatasa alcalina convencional de referencia de actividad y concentración conocidas. La pendiente de la intensidad de fluorescencia frente al tiempo representó la tasa de producción de 4-MU, que correspondía a la actividad de ALP, en cada fracción de muestra como un función, pero aquí como unidades/ml de suero. Las curvas PK de ratón ilustrativas para compuestos seleccionados después de administración IV y subcutánea pueden encontrarse en la figura 15A (IV) y figura 15B (subcutánea), y en la tabla 8.

Tabla 8: Valores de pK en plasma de ratón para proteínas de fusión

Molécula/administración	Semivida IV (horas)	Semivida PK subcutánea (horas)
Asfotasa alfa	15.6	31.1
ALP001	40	N/D
ALP002	46	58
ALP018	26	N/D
ALP023	33	N/D
ALP024	41	N/D
ALP031	45	N/D
ALP201	45	62
ALP213	48	69
ALP214	32	N/D
ALP215	31	N/D
ALP219	30	N/D
ALP235	65	67
ALP259	88	68

EJEMPLO 7

Prueba de construcciones de fosfatasa alcalina en un modelo de eficacia de ratón de HPP

Los estudios preclínicos de eficacia de las construcciones de fosfatasa alcalina se realizaron usando el modelo de ratón Akp2GW (-/-) de HPP. Los ratones Akp2GW (-/-) comparten la misma mutación de TNSALP inductora de HPP usada en los ratones Akp2 (-/-) (Narisawa *et al*. 1997) que se usaron previamente en la evaluación preclínica de asfotasa alfa. En estos estudios, las dosis de los artículos de prueba

(ALP201 o vehículo (PBS)) se administraron por vía subcutánea en la región escapular, comenzando el día 1 después del nacimiento hasta el día 35. Los resultados informados incluyeron la supervivencia general, la tasa de crecimiento del peso corporal, la mineralización ósea de los huesos de las patas posteriores el día 36 (o al morir si es antes del final del estudio [EOS - *end-of-study*]) y los niveles mínimos de actividad enzimática plasmática EOS (tomados el día 36 en el grupo de dosis cada día [QD] y cada semana [Q1W], y el día 37 en el grupo de dosis cada 2 días [Q2D]). En algunos estudios, se determinaron las longitudes de fémur y tibia EOS y la actividad de fosfatasa alcalina de fémur de ratón.

El peso corporal también se evaluó diariamente como indicador del bienestar general de los animales. Los ratones WT tratados con PBS de la misma edad y camada sirvieron como controles de referencia. Los animales del grupo 7 recibieron la misma inyección subcutánea diaria de ALP201 que los grupos 3 a 5 hasta el día 24. El día 25, la dosis subcutánea diaria de ALP201 se redujo de forma semilogarítmica desde la dosis inicial y se mantuvo hasta la última dosis de tratamiento el día 35. ALP201 mostró una mejora estadísticamente significativa en la supervivencia y en la mineralización ósea, en comparación con los controles negativos (PBS).

Las curvas de supervivencia se muestran en la figura 16 y el peso corporal medio se representa gráficamente en la figura 17. La corrección del fenotipo de mineralización ósea mediante el índice de mineralización de las patas posteriores en el día 11 se muestra en la figura 18. La presentación como tabla de los grupos de dosis para estos estudios se enumera en la tabla 9.

Tabla 9: Planes de estudio agrupados por dosis para estudios de eficacia de Akp2GW (-/-)

Estudio	Artículo de prueba	Dosis (mg/kg)	Intervalo	Genotipo del ratón
HPP-PoC-01	ALP201	4.8	QD	Akp2GW (-/-)
HPP-PoC-01	ALP201	4.8 (días 1-25) 1.5 (días 26-35)	QD	Akp2GW (-/-)
HPP-PoC-01	ALP201	4.8	Q2D	Akp2GW (-/-)
HPP-PoC-01	ALP201	4.8	Q1W	Akp2GW (-/-)
HPP-PoC-01	asfotasa alfa	9.8	QD	Akp2GW (-/-)
HPP-PoC-01	PBS	-	QD	Akp2GW (-/-)
HPP-PoC-01	PBS	-	QD	Akp2GW (+/+)
HPP-MED-01	ALP201	2	Q2D	Akp2GW (-/-)
HPP-MED-01	ALP201	0.8	Q2D	Akp2GW (-/-)
HPP-MED-01	ALP201	0.3	Q2D	Akp2GW (-/-)
HPP-MED-01	ALP201	0.15	Q2D	Akp2GW (-/-)

HPP-MED-01	asfotasa alfa	2.5	QD	Akp2GW (-/-)
HPP-MED-01	PBS	-	Q2D	Akp2GW (-/-)
HPP-MED-01	PBS	-	Q2D	Akp2GW (+/+)
HPP-PoC-02	ALP201	4.8	Q2D	Akp2GW (-/-)
HPP-PoC-02	ALP259	4.8	Q2D	Akp2GW (-/-)
HPP-PoC-02	PBS	-	Q2D	Akp2GW (-/-)

Abreviaturas: PBS = solución salina tamponada con fosfato; Q1W = una vez a la semana; Q2D = cada 2 días; QD = una vez al día; U MUP = unidades de actividad en hidrólisis de fosfato de 4-metilumbeliferilo.

Resultados de mineralización ósea

Los resultados de mineralización ósea el día 36/37 se determinaron mediante análisis de rayos X de las patas posteriores de ratones Akp2GW (-/-) tratados. La visualización por rayos X de la mineralización ósea de las patas posteriores se comparó con las imágenes de rayos X de referencia del día 36 que ejemplifican 4 categorías de clasificación: No afectado, deficiencia ligera, deficiencia moderada y deficiencia grave. Las descripciones detalladas de estas clasificaciones se encuentran en la tabla 10. Individuos desconocedores del tratamiento asignaron una puntuación a las imágenes de cada ratón y, una vez completadas, las puntuaciones se recopilaron dentro de los

grupos de dosis individuales.

Tabla 10: Clasificación para la puntuación del índice de mineralización ósea de las patas posteriores del día 36

Puntuación	Clasificación de la deficiencia de mineralización ósea	Descripción de la gravedad
1	Grave	Dismorfología profunda y ausencia completa de falanges mediales y distales de los dedos y ausencia completa de centros de osificación secundarios
2	Moderada	Dígitos completamente formados, pero aún sin centros de osificación secundarios aparentes
3	Ligera	Dígitos completamente formados con centros de osificación secundarios variables pero incompletos
4	No afectado	Dedos completamente formados y todos los centros de osificación secundarios presentes

La distribución del índice de mineralización ósea en los estudios de eficacia se presenta como tabla en la tabla 11 y se muestra gráficamente en la figura 25.

Tabla 11: Distribución del índice de mineralización ósea al final del estudio de los huesos de las patas posteriores en

grupos de ratones Akp2GW (-/-) tratados

Grupo de dosis	N.° en el grupo	N.° de no afectados (puntuación = 4)	N.° de deficiencia ligera (puntuación = 3)	N.° de deficiencia moderada (puntuación = 2)	N.° de deficiencia grave (puntuación = 1)
WT PBS	20	20 (100%)	0	0	0
ALP201 4.8 mg/kg QD	25	25 (100%)	0	0	0
ALP201 4.8/1.5 mg/kg QD	17	17 (100%)	0	0	0
ALP201 4.8 mg/kg Q2D	24	24 (100%)	0	0	0
ALP201 2.0 mg/kg Q2D	31	29 (93.5%)	2 (6.5%)	0	0
ALP201 0.8 mg/kg Q2D	29	18 (62.1%)	11 (37.9%)	0	0
ALP201 0.3 mg/kg Q2D	31	18 (58.1%)	10 (32.3%)	1 (3.2%)	2 (6.5%)
ALP201 0.15 mg/kg Q2D	29	14 (48.3%)	9 (31.0%)	6 (20.7%)	0
ALP201 4.8 mg/kg Q1W	19	14 (73.7%)	2 (10.5%)	3 (15.8%)	0
asfotasa alfa 9.8 mg/kg QD	16	16 (100%)	0	0	0
asfotasa alfa 2.5 mg/kg QD	26	22 (84.6%)	4 (15.4%)	0	0

HOM PBS (al morir)	50	7 (14.0%)	12 (24.0%)	24 (48.0%)	7 (14.0%)
ALP259 4.8 mg/kg Q2D	15	15 (100%)	0	0	0

Abreviaturas: HOM = desactivación génica homocigótica, PBS = solución salina tamponada con fosfato; QD = cada día; Q2D = cada 2 días, Q1W = una vez a la semana; WT = de tipo silvestre.

Resultados de supervivencia

Todos los ratones Akp2GW (-/-) tratados con PBS murieron el día 26 de los estudios o antes, con una mediana de tiempo de supervivencia de 20 días. El tratamiento con ALP201 y ALP259 de ratones Akp2GW (-/-) mejoró significativamente las tasas de supervivencia de 36 días en todos los grupos de dosis con respecto al control de vehículo de PBS (figura 16). Todos los grupos de dosificación de ALP201 alcanzaron tasas de supervivencia EOS de al menos un 69 %, y todos los grupos de dosis de intervalo QD y Q2D por encima de una dosis de 0.15 mg/kg/día registraron tasas de supervivencia global de un 88 % o más. Las curvas de supervivencia para el grupo de ALP201 4.8 mg/kg Q1W y el grupo de asfotasa alfa 9.8 mg/kg QD tienen resultados muy similares (tabla 12 y figura 16).

Tabla 12: Sumario del porcentaje de supervivencia de los grupos de ratones Akp2GW (-/-) tratados en estudios de eficacia de 36/37 días

Artículo de prueba	**Dosis (mg/kg)**	**Intervalo**	**Supervivencia al final del estudio (%)**
ALP201	4.8	qd	100
ALP201	4.8/1.5	qd	100
ALP201	4.8	q2d	96
ALP201	2	q2d	94
ALP201	0.8	q2d	97
ALP201	0.3	q2d	88
ALP201	0.15	q2d	69
ALP201	4.8	q1w	83
ALP259	4.8	q2d	100
asfotasa alfa	9.8	qd	81
asfotasa alfa	2.5	qd	96
PBS	NA	NA	0

Determinación y resultados de la actividad plasmática de fosfatasa alcalina al final del estudio

Se recogieron muestras de plasma de ratón y se prepararon al final del estudio: el día 36 en grupos de dosificación diaria (QD) y semanal (Q1W), y el día 37 en grupos de dosificación cada 2 días (Q2D). La actividad de fosfatasa alcalina en las muestras de plasma se ensayó usando el método resumido en el ejemplo 6. Las velocidades de reacción medidas en las muestras de plasma se calcularon usando una curva patrón de actividad enzimática conocida

para obtener valores de actividad plasmática de fosfatasa alcalina en unidades de U/ml. Las muestras se procesaron por duplicado dos veces para recopilar datos para cada punto de muestreo independiente. Los valores en U/ml se convirtieron a unidades de mg/l mediante la relación:
Concentración en mg/l = (valor de actividad medido de U/ml/actividad específica del artículo de prueba en U/mg) * 1000.

La distribución de los niveles de actividad plasmática al final del estudio se muestra en la figura 28, con los valores medios presentados en la tabla 13.

Tabla 13: Concentraciones mínimas medias de enzima activa plasmática al final del estudio agrupadas por dosis

Construcción	Dosis (mg/kg)	Intervalo	Número de dosis en el estudio		Concentración media de enzima activa al final del estudio (ug/ml)	Día recogido
ALP201	4.8	qd	35		48.7	36
ALP201	4.8/1.5	qd	35		21.8	36
ALP201	4.8	q2d	18		19.7	37
ALP201	2	q2d	18		6.4	37
ALP201	0.8	q2d	18		3.6	37
ALP201	0.3	q2d	18		1.5	37
ALP201	0.15	q2d	18		0.6	37
ALP201	4.8	q1w	5		0.6	36

Asfotasa alfa	9.8	qd	35		6.2	36
Asfotasa alfa	2.5	qd	35		1.0	36
ALP259	4.8	q2d	18		51.8	37

Determinación de la actividad de fosfatasa alcalina en tejido óseo al final del estudio

Las muestras de fémur de ratón se recogieron el día 36/37 del estudio, se limpiaron del exceso de tejido, se congelaron instantáneamente y se almacenaron a -80 °C. Antes del análisis, las muestras de fémur se transfirieron a hielo seco, se colocaron en una placa de Petri fría y estéril y se limpiaron para eliminar cualquier tejido conjuntivo residual. Con una tijera para huesos, se cortaron los extremos de los fémures y la diáfisis se transfirió a un tubo de recogida de 0.5 ml (preparado con un solo orificio perforado en el fondo con una aguja de jeringa de calibre 20) en hielo húmedo. Los tubos de recogida se cargaron en tubos de centrífuga de 1.5 ml y se centrifugaron a 4000 rpm durante 30 segundos en una microcentrífuga de sobremesa, drenando eficazmente la médula ósea de los fémures de ratón. Las diáfisis de fémur de ratón preparadas se pesaron y se transfirieron a 90 microlitros de tampón diluyente (HEPES 50 mM pH 7.4, NaCl 150 mM, $MgCl_2$ 1 mM, BSA 1 mg/ml) en una placa de ensayo negra opaca de 96 pocillos. Si la diáfisis del fémur de ratón era demasiado larga para caber en el pocillo de ensayo, la diáfisis del fémur se cortaba por la mitad y ambas mitades se colocaban en el mismo pocillo.

En cada placa de ensayo, los controles incluían diáfisis

de fémur de ratones de tipo silvestre y heterocigóticos AKP2GW (+/-) no tratados que se mantuvieron a 90 °C durante 60 minutos antes del ensayo, destruyendo por calor de manera eficaz la actividad de fosfatasa alcalina en estas muestras de hueso, que sirvieron como controles negativos para el ensayo.

Se generó una curva patrón en cada placa usando una serie de dilución de un patrón de referencia de actividad de fosfatasa alcalina con actividad específica conocida, transferida a la placa de ensayo a concentraciones finales de ensayo de 0, 1.25, 2.5, 5, 10, 20, 35 y 50 ng/ml.

Antes del ensayo, la placa se selló y se calentó hasta 37 °C durante 15 minutos en un agitador de placa calefactora Jitterbug (sin agitación). Una vez calentada hasta 37 °C, 160 ml de solución de sustrato (HEPES 50 mM pH 7.4, NaCl 150 mM, $MgCl_2$ 1 mM, BSA 1 mg/ml, 4-MUP 15.625-156.25 mM). La concentración final de 4-MUP en los pocillos fue de 10-100 uM en un volumen de 250 ul. Las curvas de progreso de la producción de 4-metilumbeliferona se midieron a 37 °C usando un lector de placas i3x de Molecular Devices (ajustado con excitación l = 365 nm y emisión l = 445 nm) o lector de placas Paradigm de Molecular Devices (ajustado con filtro de excitación l = 360 nm y filtro de emisión l = 445 nm).

Las pendientes de actividad para todas las muestras se calcularon usando regresión lineal en un programa de hoja de cálculo comercial (Microsoft Excel). En los casos donde la pendiente de la actividad se volvió visiblemente no lineal durante el transcurso del experimento, se realizó regresión lineal para capturar la velocidad de reacción inicial usando la parte lineal inicial de la curva de progreso para la

muestra. Las pendientes de las curvas de progreso individuales se calcularon en unidades relativas de fluorescencia (URF)/minuto. Un ejemplo de curvas de progreso para este ensayo se muestra en la figura 30, con la distribución de los valores de sujetos individuales representados en la figura 28 y figura 29.

Los fémures de AkpGW (-/-) tratados muestran aumentos claros en la actividad de fosfatasa alcalina (tabla 14), lo que demuestra la capacidad de ALP201 y ALP259 de aportar actividad enzimática al tejido óseo.

Tabla 14: Actividad de fosfatasa alcalina medida al final del estudio en diáfisis de fémur de ratones Akp2GW (-/-) tratados

Construcción	Dosis	Día recogido	Actividad ósea de fosfatasa alcalina (% de unidades/mg de hueso de tipo silvestre)
ALP201	2 mg/kg q2d	37	44
ALP201	0.8 mg/kg q2d	37	34
ALP201	0.3 mg/kg q2d	37	31
ALP201	0.15 mg/kg q2d	37	21
Asfotasa alfa	2.5 mg/kg qd	36	24
ALP201	4.8 mg/kg q2d	37	48

ALP259	4.8 mg/kg q2d	37	67

Resultados de longitud de tibia y fémur

Al final del estudio, se midieron las longitudes de la tibia y el fémur usando el programa informático ImageJ para tomar puntos de análisis, uno en cada extremo de la imagen del hueso capturada por rayos X Faxitron, de modo que la longitud de la parte más larga del hueso se capturó mediante una línea recta que conecta los puntos de análisis (longitud de ImageJ).

La longitud del hueso en milímetros (mm) se calculó usando la fórmula:

$$mm = \frac{(\text{longitud de ImageJ del JPEG con aumento 2X de Faxitron})/2}{210*9.978}$$

En comparación con la dosis diaria de asfotasa alfa de 9.8 mg/kg, los ratones AKP2GW (-/-) que recibieron dosis diarias y Q2D de ALP201 mostraron una mejora estadísticamente significativa en la longitud del fémur y la tibia, es decir, longitud del fémur p = 0.0212 y p = 0.0032, respectivamente, y longitud de la tibia p = 0.0030 y p = 0.0088, respectivamente, después de 36/37 días de tratamiento, en un ANOVA unidireccional: prueba de comparación múltiple de Dunnett con asfotasa alfa (figura 26, tibia y figura 27, fémur).

Resultados de peso corporal

Se controló el peso corporal de todos los ratones en los estudios de eficacia. El peso corporal de ratones Akp2GW (-/-) tratados con ALP201 y ALP259 en todos los grupos de tratamiento fue de forma coherente ligeramente más bajo que el de sus compañeros de camada de tipo silvestre tratados con PBS, pero nunca fue significativamente diferente desde el punto de vista estadístico para ningún grupo en ningún punto temporal durante los estudios (figura 17).

ALP259 mostró una actividad enzimática 2 veces mayor para la hidrólisis de pirofosfato y una semivida *in vivo* 4-5 veces mayor después de administración IV a ratones C57BL/6 que asfotasa alfa. ALP259 demostró una acumulación en plasma aproximadamente 50 veces mayor al final del estudio que asfotasa alfa en el modelo de ratón AKP2GW (-/-) de HPP, y un 140 % de la acumulación de actividad ósea en AKP2GW(-/-) al final del estudio como ALP201. ALP259 demostró una clara eficacia para la mineralización ósea en el modelo de ratón AKP2GW(-/-), teniendo el 100 % de los ratones tratados con 4.8 mg/kg en un intervalo de dosis q2d una mineralización ósea normal, con respecto a <20 % de los ratones no tratados que tenían un fenotipo de mineralización ósea normal.

EJEMPLO 8

Caracterización in vivo de dirección al hueso: imágenes fluorescentes in vivo en ratones

Se realizaron estudios semicuantitativos de biodistribución en ratones atímicos usando proteínas y fragmentos de proteína (VHH) marcados con ALEXA FLUOR® 750. Las proteínas de fusión de ALP-Fc de dirección al hueso y

los VHH de dirección al hueso se marcaron con fluorescencia con ALEXA FLUOR® 750 usando el kit Invitrogen SAIVI (conjugación covalente mediante ésteres de succinimidilo activados) y se purificaron en una resina de exclusión en gel para eliminar el fluoróforo no conjugado. Las proteínas purificadas (suspendidas en PBS) se inyectaron en ratones atímicos mediante la vena de la cola en dosis de ~3 mg/kg.

Ratones exogámicos J:NU hembra (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME) recibieron 3 mg/kg del artículo de prueba mediante inyección intravenosa en la vena de la cola de 100 µl normalizada al volumen. Para adquisición de imágenes *in vivo*, los sujetos se mantuvieron en anestesia con isoflurano al 2-3 % en la plataforma de imágenes (IVIS® Spectrum Imaging System, PerkinElmer Inc., Waltham, MA). Se usaron configuraciones de exposición automática con campo de visión (CDV) C, F/Stop 2, agrupación media y filtros de emisión de 800 nm/excitación de 750 nm para las adquisiciones de epiiluminación 2D y transiluminación 3D. Las imágenes fluorescentes con epiiluminación 2D de muestras de tejido *ex vivo* se adquirieron en condiciones idénticas, excepto que todas las muestras para cada tipo de tejido se adquirieron simultáneamente en una sola imagen. Todos los estudios en animales se realizaron de acuerdo con las disposiciones de la Ley de Bienestar Animal y los principios de la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio.

El análisis de imágenes fluorescentes se realizó usando el programa informático 2D/3D suministrado por el fabricante (Living Image 4.5.1, Perkin Elmer). Las regiones de interés (RDI) de área uniforme aplicada en cada conjunto de sujetos se colocaron manualmente para tener en cuenta las diferencias

en la postura del sujeto. Los intervalos de escala de color de las imágenes *in vivo* longitudinales se normalizaron en todos los sujetos y puntos temporales; las escalas de color de las muestras *ex vivo* se determinaron individualmente para representar mejor la señal fluorescente para cada conjunto de tejidos. Todas las imágenes de las figuras 4, 8, 12 y 13 se representan con los siguientes parámetros aplicados: opacidad = 80, tabla de colores = "azul caliente", suavizado = ninguno, escala logarítmica. También se aplican sustracción de sesgo de lectura sustracción de fondo FL adaptativo y campo plano, correcciones de distorsión cósmica y de lente. La señal de ALEXA FLUOR® 750 se representa como eficiencia radiante $(p/s/cm^2/sr)/(\mu W/cm^2)$.

Se tomaron imágenes individualmente de las muestras de hueso *ex vivo* en un sistema de rayos X de microtomografía computarizada (Quantum FX µCT, PerkinElmer, Inc., Waltham, MA). Se usaron los siguientes parámetros para todas las adquisiciones: voltaje = 90 kV, corriente = 180 µA, CDV = 40 mm y tiempo de adquisición de 17 segundos. La cuantificación de los volúmenes óseos totales (Tt.BV, mm^3) se calculó usando el programa informático suministrado por el fabricante (AccuCT 1.0 Advanced Analysis Software, PerkinElmer, Inc., Waltham, MA) usando el la secuencia de trabajo Bone Growth. La normalización de la señal de ALEXA FLUOR® 750 al volumen óseo se representa como $((p/s/cm^2/sr)/(\mu W/cm^2))/mm^3$. Los análisis estadísticos se realizaron usando un programa informático estadístico disponible en el mercado (GraphPad Prism 7, La Jolla, CA).

Como ALP-Fc-D_{10} (SEQ ID NO: 31) maximizó la posible señal de proteínas de dirección al hueso y ALP-Fc (SEQ ID

NO: 222) no mostró unión al homogeneizado de hueso, estas proteínas se usaron como proteínas de control positivo y negativo para experimentos de dirección al hueso *in vivo*. Se administraron inyecciones intravenosas de ALF-Fc o ALP-Fc-D_{10} marcadas con ALEXA FLUOR® 750 a ratones atímicos adolescentes, y la biodistribución de proteínas se rastreó *in vivo* a lo largo de un estudio de 18 días. Se realizaron imágenes IVIS fluorescentes de animales vivos bidimensionales en todos los ratones en los días 1, 4, 7, 11, 15 y 18. Al final del estudio de 18 días, los ratones se sacrificaron y se realizaron imágenes fluorescentes específicas *ex vivo* en los hígados, riñones, bazos, fémures, cráneos y columnas vertebrales. Las figuras 4 y 5A-5B muestran la eficacia radiante total de la proteína fluorescente detectada dentro de las ventanas de adquisición de las imágenes de cuerpo completo. Cuantitativamente, la eficiencia radiante total promedio de ratones tratados con ALP-Fc-D_{10} dirigida al hueso marcada con fluorescencia fue similar a ratones tratados con ALP-Fc no dirigida durante los primeros 4 días después de la administración. Sin embargo, a partir del día 7, ALP-Fc-D_{10} mostró una eficiencia radiante significativamente mayor que ALP-Fc debido a la acumulación de proteína dirigida en el hueso y la eliminación de proteína no dirigida. La figura 5B muestra la comparación de la eficiencia radiante total de los mismos ratones tratados dentro de la región vertebral de interés. En la región vertebral de interés, pueden observarse diferencias estadísticas entre las fusiones de ALP-Fc dirigidas y no dirigidas dentro de los 4 días, y la diferencia se mantuvo durante los 18 días de duración del estudio. La figura 4

muestra imágenes representativas de cada grupo de tratamiento en cada punto temporal de captura de imágenes, indicando la escala de colores la eficiencia radiante.

El ensayo de cribado de homogeneizado de hueso desarrollado recientemente se validó *in vivo*. Mediante el ensayo de cribado desarrollado, ALP-Fc-D_{10} y ALP-Fc mostraron los dos extremos de las características de unión al hueso, unión cuantitativa de proteína a homogeneizado de hueso y unión no específica a homogeneizado de hueso, respectivamente. Los estudios de biodistribución *in vivo* mostraron una retención prolongada de ALP031 dentro del tejido óseo más allá de dos semanas después de inyecciones i.v. únicas (figura 12, eficiencia radiante mostrada en escala de colores). Por el contrario, ALP086 (ALP-Fc no dirigida) fue indetectable *in vivo* entre 4 y 7 días después de la inyección (figura 13, eficiencia radiante mostrada en escala de colores). Además, la administración intravenosa de ALP031 dio como resultado una distribución equitativa del fármaco por todo el tejido mineralizado en las columnas vertebrales, los cráneos y los fémures de ratón (figuras 6A-6B). Estos resultados verificaron que el ensayo de cribado de homogeneizado de hueso distinguía las proteínas de dirección al hueso de las proteínas no dirigidas.

Además, el estudio *en vivo* de las construcciones de VHH diferenció entre proteínas de unión al hueso altamente eficaces y proteínas de unión intermedia al hueso con menor afinidad (figuras 7, 8, 9A-9C y 10A-10B). Para este propósito, fue ventajoso estudiar las proteínas VHH *in vivo* porque las proteínas VHH no dirigidas se eliminaron rápidamente de la circulación sistémica mediante excreción

renal, lo que limitó la señal de fondo y permitió una diferenciación más temprana de la localización ósea. La figura 8 mostró una señal fluorescente de cuerpo completo aumentada de ratones tratados con VHH001 y VHH002 24 horas después de la inyección en comparación con el control no dirigido, y una señal potenciada de VHH002 en comparación con VHH001. Con el tiempo, la señal de los ratones tratados con VHH001 se acercó a los niveles de referencia del control no dirigido, donde la señal de los ratones tratados con VHH002 permaneció significativamente aumentada durante los 7 días del estudio. Este comportamiento de dirección al hueso se observó en el ensayo de cribado *in vitro* desarrollado, que diferenció las proteínas de control de VHH no dirigidas de la unión intermedia de VHH001 y la unión altamente eficaz de VHH002, lo que indica una correlación verificable entre el cribado y la dirección al hueso *in vivo*.

EJEMPLO 9

Un sujeto masculino adulto presenta una concentración elevada de pirofosfato inorgánico (PPi) de aproximadamente 5.82 µM una puntuación promedio de fuerza de BOT-2 de menos de 10. El sujeto tiene 24 años y experimenta dolor en las extremidades inferiores y alteración de la marcha. El sujeto puede diagnosticarse con HPP y seleccionarse para tratamiento. El sujeto puede someterse a una radiografía y una prueba de densidad mineral ósea, que ambas pueden mostrar una mineralización ósea reducida en las piernas.

Una formulación farmacéutica que contiene el polipéptido de SEQ ID NO: 72 puede formularse a 0.1 mg/ml. La formulación puede inyectarse por vía subcutánea en el

sujeto una vez a la semana durante 8 semanas a una dosificación de 0.1 mg/kg/semana. El sujeto puede evaluarse en cuanto a la eficacia del tratamiento después de la pauta de tratamiento de 8 semanas. El sujeto puede apreciar una reducción en el dolor óseo y una normalización de la marcha. El sujeto puede someterse a radiografías de seguimiento y pruebas de densidad mineral ósea, que pueden mostrar una normalización de la mineralización ósea con respecto a antes del tratamiento. La concentración de PPi del sujeto puede reducirse hasta por debajo de 5 µM, y su puntuación de fuerza de BOT-2 puede mejorar hasta 12, indicativo de un efecto del tratamiento por parte del polipéptido.

EJEMPLO 10

Un sujeto femenino adolescente presenta una concentración elevada de pirofosfato inorgánico (PPi) de aproximadamente 4.78 µM y un 6MWT promedio de menos de un 70 % del valor de 6MWT previsto. El sujeto tiene 14 años y está experimentando pérdida de dientes y dolor crónico. El sujeto puede diagnosticarse con HPP y seleccionarse para tratamiento. El sujeto puede someterse a una radiografía y una prueba de densidad mineral ósea, que ambas pueden mostrar mineralización ósea en sus dientes y fémures.

Una formulación farmacéutica que contiene el polipéptido de SEQ ID NO: 123 puede formularse a 0.5 mg/ml. La formulación puede inyectarse por vía subcutánea en el sujeto una vez a la semana durante 4 semanas a una dosificación de 0.5 mg/kg/semana. El sujeto puede evaluarse en cuanto a la eficacia del tratamiento después de la pauta de tratamiento de 4 semanas. El sujeto puede apreciar una

reducción en el dolor crónico. El sujeto puede someterse a radiografías de seguimiento y pruebas de densidad mineral ósea, que pueden mostrar una normalización de la mineralización ósea en sus fémures con respecto a antes del tratamiento. La concentración de PPi del sujeto puede reducirse hasta por debajo de 4 µM, y su puntuación de 6MWT mejora hasta aproximadamente un 85 % del valor predicho, indicativo de un efecto del tratamiento por parte del polipéptido.

EJEMPLO 11

Un sujeto femenino adolescente presenta una concentración elevada de pirofosfato inorgánico (PPi) de aproximadamente 4.85 µM y un 6MWT promedio de menos de un 65 % del valor de 6MWT previsto. El sujeto tiene 15 años y está experimentando pérdida de dientes y dolor crónico. El sujeto puede diagnosticarse con HPP y seleccionarse para tratamiento. El sujeto puede someterse a una radiografía y una prueba de densidad mineral ósea, que ambas pueden mostrar mineralización ósea en sus dientes y fémures.

Una formulación farmacéutica que contiene el polipéptido de SEQ ID NO: 177 puede formularse a 0.7 mg/ml. La formulación puede inyectarse por vía subcutánea en el sujeto una vez a la semana durante 6 semanas a una dosificación de 0.7 mg/kg/semana. El sujeto puede evaluarse en cuanto a la eficacia del tratamiento después de la pauta de tratamiento de 6 semanas. El sujeto puede apreciar una reducción en el dolor crónico. El sujeto puede someterse a radiografías de seguimiento y pruebas de densidad mineral ósea, que pueden mostrar una normalización de la

mineralización ósea en sus fémures con respecto a antes del tratamiento. La concentración de PPi del sujeto puede reducirse hasta por debajo de 4 µM, y su puntuación de 6MWT mejora hasta aproximadamente un 88 % del valor predicho, indicativo de un efecto del tratamiento por parte del polipéptido.

Otras realizaciones

La descripción detallada y los ejemplos anteriores se han proporcionado por motivos de claridad de comprensión únicamente. No deben entenderse limitaciones innecesarias de ello. La invención no se limita a los detalles exactos mostrados y descritos, se incluirán variaciones evidentes para los expertos en la materia dentro la invención definida por las reivindicaciones.

Salvo que se indique lo contrario, todos los números que expresan cantidades de componentes, pesos moleculares, y así sucesivamente, usados en la memoria descriptiva y las reivindicaciones deben entenderse modificados en todos los casos por el término "aproximadamente". Por consiguiente, salvo que se indique lo contrario, los parámetros numéricos expuestos en la memoria descriptiva y las reivindicaciones son aproximaciones que pueden variar dependiendo de las propiedades deseadas que se pretenden obtener mediante la invención. Como mínimo, y no como un intento de limitar la doctrina de equivalentes al alcance de las reivindicaciones, cada parámetro numérico debe interpretarse al menos a la luz del número de dígitos significativos informados y aplicando técnicas de

redondeo comunes.

A pesar de que los intervalos numéricos y los parámetros que exponen el amplio alcance de la invención son aproximaciones, los valores numéricos expuestos en los ejemplos específicos se informan de la forma más precisa posible. Sin embargo, todos los valores numéricos contienen inherentemente un intervalo que resulta necesariamente de la desviación típica encontrada en sus respectivas mediciones de prueba.

Las divulgaciones completas de todas las patentes, solicitudes de patente, incluyendo solicitudes de patente provisionales, publicaciones, incluyendo publicaciones de patente y publicaciones que no son de patente, y el material disponible electrónicamente (incluyendo, por ejemplo, presentaciones de secuencias de nucleótidos en, por ejemplo, GenBank y RefSeq, y presentaciones de secuencias de aminoácidos en, por ejemplo, SwissProt, PIR, PRF, PDB y las traducciones de las regiones codificantes anotadas en GenBank y RefSeq) citadas en el presente documento se incorporan por referencia. La descripción detallada y los ejemplos anteriores se han proporcionado por motivos de claridad de comprensión únicamente. No deben entenderse limitaciones innecesarias de ello. La divulgación no se limita a los detalles exactos mostrados y descritos, ya que dentro de las realizaciones definidas por las reivindicaciones se incluirán variaciones evidentes para un experto en la materia.

Se hace constar que con relación a esta fecha, el mejor método conocido por la solicitante para llevar a la práctica la citada invención, es el que resulta claro de la presente

descripción de la invención.