

POLIPÉPTIDOS DE FOSFATASA ALCALINA Y MÉTODOS PARA SU USO

LISTADO DE SECUENCIAS

La presente solicitud contiene un Listado de Secuencias que se presentó de forma electrónica en formato ASCII y se incorpora a la presente en su totalidad mediante referencia. Dicha copia ASCII, creada el 4 de febrero de 2022, se denomina 50694-094WO2_Sequence_Listing_2_4_22_ST25 y tiene un tamaño de 27,753 bytes.

ANTECEDENTES

La hipofosfatasa (HPP, por sus siglas en inglés) es una enfermedad esquelética, hereditaria y rara con una incidencia de 1 de cada 100,000 nacimientos para las formas más graves de la enfermedad. El trastorno normalmente es resultado de las mutaciones de pérdida funcional en el gen que codifica la fosfatasa alcalina no específica del tejido (TNSALP, por sus siglas en inglés). La HPP presenta una notable variedad de síntomas y gravedad, desde pérdida de dientes prematura hasta la ausencia casi completa de mineralización ósea en el útero. La presentación de la HPP varía notablemente entre los sujetos y también varía notablemente entre las edades de los sujetos. Muchos sujetos con HPP presentan cambios esqueléticos, baja estatura, dolor crónico, dolor en las extremidades inferiores, alteración de la marcha y pérdida de dientes prematura y atraumática.

La asfotasa alfa (STRENSIQ®, Alexion Pharmaceuticals, Inc.), una terapia de reemplazo enzimático (ERT) producida de forma recombinante que incluye un fragmento soluble de TNSALP, es la primera ERT disponible para sujetos con HPP. La asfotasa alfa ha mostrado efectos transformadores en la forma más grave de HPP, como lo demuestran las mejoras en la mineralización y la densidad ósea, así como en la función motora y respiratoria, el desarrollo cognitivo y la fuerza muscular (Whyte et al., *New Engl. J. Med.* 366:904-913, 2012).

COMPENDIO

Un primer aspecto presenta una composición farmacéutica que contiene un polipéptido de fosfatasa alcalina con al menos un 80 % (por ejemplo, al menos un 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 99 % o 100 %) de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 5 y un portador farmacéuticamente aceptable. El polipéptido puede incluir al menos una mutación seleccionada de E108M, N213Q y N286Q en relación con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 (p. ej., el polipéptido

puede contener dos o las tres de estas mutaciones). Por ejemplo, el polipéptido tiene al menos un 80 % (p. ej., al menos un 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 99 % o 100 %) de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5 y contiene al menos una, dos o las tres mutaciones seleccionadas de E108M, N213Q y N286Q. El portador farmacéuticamente aceptable puede incluir uno o más de fosfato, prolina y sacarosa. Por ejemplo, el polipéptido puede incluir o consistir en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5.

En algunas modalidades, la parte de fosfatasa alcalina del polipéptido tiene al menos un 80 % (por ejemplo, al menos un 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 99 % o 100 %) de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 3. Este polipéptido puede además estar conectado a una región Fc (p. ej., una región Fc de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4) y/o una región de poliaspartato. En algunas modalidades, el polipéptido incluye una región Fc de IgG2/4, p. ej., que tiene al menos un 80 % (p. ej., al menos un 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 99 % o 100 %) de identidad con la SEQ ID NO: 4. El poliaspartato puede incluir, por ejemplo, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 residuos de aspartato. En algunas modalidades, el poliaspartato incluye diez residuos de aspartato (D10).

La composición se puede formular para que contenga una dosificación del polipéptido de fosfatasa alcalina de alrededor de 0,1 mg/mL a alrededor de 200 mg/mL (p. ej., alrededor de 1, 10, 20, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175 o 200 mg/mL. La composición se puede formular en un volumen de alrededor de 0,1 mL a alrededor de 50 mL (p. ej., alrededor de 0,1 a alrededor de 10 mL, p. ej., alrededor de 0,1 mL, 0,2 mL, 0,3 mL, 0,4 mL, 0,5 mL, 0,6 mL, 0,7 mL, 0,8 mL, 0,9 mL o 1,0 mL, p. ej., alrededor de 1 mL a alrededor de 10 mL, p. ej., alrededor de 2 mL, 3 mL, 4 mL, 5 mL, 6 mL, 7 mL, 8 mL, 9 mL o 10 mL). En algunas modalidades, la composición se formula en alrededor de 1 mL). Por ejemplo, la composición puede contener 100 mg/mL de un polipéptido de fosfatasa alcalina con al menos un 80 % (p. ej., al menos un 85 %, 90 %, 95 %, 97 % o 99 %) de identidad de secuencia con, o la secuencia de, la SEQ ID NO: 5 (p. ej., el polipéptido contiene al menos una, dos o las tres mutaciones seleccionadas de E108M, N213Q y N286Q de la SEQ ID NO: 5) y un portador farmacéuticamente aceptable.

La composición puede incluir fosfato (por ejemplo, fosfato de sodio), por ejemplo, en una concentración de alrededor de 1 mM a alrededor de 100 mM, o de alrededor de 5 mM a alrededor de 20 mM, por ejemplo, alrededor de 2 mM, 3 mM, 4 mM, 5 mM, 6 mM, 7 mM, 8 mM, 9 mM, 10 mM, 20 mM, 30 mM, 40 mM, 50 mM, 60 mM, 70 mM, 80 mM, 90 mM o 100 mM, por

ejemplo, alrededor de 10 mM. La composición puede incluir además prolina y/o sacarosa. La composición puede incluir además prolina. La composición puede incluir además sacarosa. Por ejemplo, la composición puede incluir de alrededor de 1 mM a alrededor de 500 mM de prolina, por ejemplo, de alrededor de 70 mM a alrededor de 280 mM, por ejemplo, de alrededor de 50 mM a alrededor de 200 mM, por ejemplo, alrededor de 2 mM, 3 mM, 4 mM, 5 mM, 6 mM, 7 mM, 8 mM, 9 mM, 10 mM, 20 mM, 30 mM, 40 mM, 50 mM, 60 mM, 70 mM, 80 mM, 90 mM, 100 mM, 110 mM, 120 mM, 130 mM, 140 mM, 150 mM, 160 mM, 170 mM, 180 mM, 190 mM, 200 mM, 300 mM, 400 mM o 500 mM, por ejemplo, alrededor de 140 mM de prolina y/o de alrededor de 1 mM a alrededor de 500 mM de sacarosa, p. ej., de alrededor de 70 mM a alrededor de 280 mM, p. ej., de alrededor de 50 mM a alrededor de 200 mM, p. ej., alrededor de 2 mM, 3 mM, 4 mM, 5 mM, 6 mM, 7 mM, 8 mM, 9 mM, 10 mM, 20 mM, 30 mM, 40 mM, 50 mM, 60 mM, 70 mM, 80 mM, 90 mM, 100 mM, 110 mM, 120 mM, 130 mM, 140 mM, 150 mM, 160 mM, 170 mM, 180 mM, 190 mM, 200 mM, 210 mM, 220 mM, 230 mM, 240 mM, 250 mM, 260 mM, 270 mM, 280 mM, 290 mM, 300 mM, 350 mM, 400 mM, 450 mM o 500 mM, por ejemplo, alrededor de 140 mM de sacarosa o alrededor de 210 mM de sacarosa. En algunas modalidades, la composición incluye una relación molar de prolina:sacarosa de alrededor de 1:0 a alrededor de 1:3, por ejemplo, alrededor de 1:1. En algunas modalidades, la formulación incluye de alrededor de 1 mM a alrededor de 500 mM de prolina (p. ej., alrededor de 50 mM a alrededor de 200 mM de prolina, p. ej., alrededor de 140 mM de prolina) y de alrededor de 1 mM a alrededor de 500 mM de sacarosa (p. ej., alrededor de 40 mM a alrededor de 280 mM, por ejemplo, alrededor de 50 mM a alrededor de 200 mM de sacarosa, por ejemplo, alrededor de 140 mM o alrededor de 210 mM de sacarosa). En algunas modalidades, la formulación incluye alrededor de 140 mM de prolina. En algunas modalidades, la formulación incluye alrededor de 140 mM de sacarosa. En algunas modalidades, la formulación incluye alrededor de 210 mM de sacarosa. En algunas modalidades, la formulación incluye alrededor de 210 mM de sacarosa y no incluye prolina. En algunas modalidades, la formulación incluye alrededor de 140 mM de prolina y alrededor de 140 mM de sacarosa. En algunas modalidades, la formulación incluye alrededor de 140 mM de prolina y alrededor de 140 mM de sacarosa y alrededor de 10 mM de fosfato (p. ej., fosfato de sodio). En algunas modalidades, la formulación incluye alrededor de 210 mM de sacarosa y alrededor de 10 mM de fosfato (p. ej., fosfato de sodio). La formulación puede incluir además de alrededor de 0,01 % a alrededor de 0,5 % de monooleato de sorbitán polioxietilenado (20),

por ejemplo, de alrededor de 0,01 % a alrededor de 0,1 % de monooleato de sorbitán polioxietilenado (20), tal como, por ejemplo, alrededor de 0,05 % de monooleato de sorbitán polioxietilenado (20). El monooleato de sorbitán polioxietilenado (20) puede ser, por ejemplo, polisorbato 80 (PS80). En algunas modalidades, la composición se formula a un pH de alrededor de 7,0 a alrededor de pH 7,6 (por ejemplo, alrededor de pH 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5 o 7,6, por ejemplo, alrededor de pH 7,3). En algunas modalidades, la composición incluye alrededor de 10 mM de fosfato, alrededor de 140 mM de prolina, alrededor de 140 mM de sacarosa y alrededor de 0,05 % de monooleato de sorbitán polioxietilenado (20) (por ejemplo, PS80) a un pH de alrededor de 7,3.

10 La composición puede ser una composición farmacéutica formulada como una solución que contiene el polipéptido (p. ej., el polipéptido de la SEQ ID NO: 5 y variantes de este con al menos alrededor de un 85 % de identidad de secuencia con este (p. ej., el polipéptido es uno que contiene una, dos o las tres mutaciones seleccionadas de E108M, N213Q y N286Q de la SEQ ID NO: 5)). La composición farmacéutica puede contener el polipéptido en una cantidad de, por ejemplo, alrededor de 0,1 mg/mL a alrededor de 200 mg/mL, tal como alrededor de 100 mg/mL.

15 La composición farmacéutica se puede formular para administración subcutánea, por ejemplo, a una dosificación del polipéptido de alrededor de 0,1 mg/mL a alrededor de 10 mg/mL. La composición se puede formular en una solución en un volumen de alrededor de 0,1 mL a alrededor de 50 mL (p. ej., alrededor de 0,1 a alrededor de 10 mL, p. ej., alrededor de 0,1 mL, 0,2 mL, 0,3 mL, 0,4 mL, 0,5 mL, 0,6 mL, 0,7 mL, 0,8 mL, 0,9 mL o 1,0 mL, p. ej., alrededor de 1 mL a alrededor de 10 mL, p. ej., alrededor de 2 mL, 3 mL, 4 mL, 5 mL, 6 mL, 7 mL, 8 mL, 9 mL o 10 mL). En algunas modalidades, la composición se formula en alrededor de 1 mL. La composición puede contener alrededor de 10 mM de fosfato, alrededor de 140 mM de prolina, alrededor de 140 mM de sacarosa y alrededor de 0,05 % de monooleato de sorbitán polioxietilenado (20) (por ejemplo, PS80) a un pH de alrededor de 7,3.

25

También se presenta un vial que contiene la composición farmacéutica tal como se describe en la presente. El vial puede contener una solución (p. ej., alrededor de 10 mM de fosfato de sodio, alrededor de 140 mM de prolina, alrededor de 140 mM de sacarosa y monooleato de sorbitán polioxietilenado (20) al 0,05 % (p. ej., PS80) a un pH de alrededor de 7,3) que contiene el polipéptido (p. ej., en una cantidad de alrededor de 0,1 mg a alrededor de 1,0 g (p. ej., de alrededor de 10 mg a alrededor de 200 mg)) en un volumen de, p. ej., de alrededor de 0,1 mL

30

a alrededor de 10 mL (p. ej., alrededor de 1 mL). El vial puede contener el polipéptido en una cantidad de, por ejemplo, alrededor de 0,1 mg/mL a alrededor de 500 mg/mL, alrededor de 1 mg/mL a alrededor de 200 mg/mL, alrededor de 50 mg/mL a alrededor de 150 mg/mL, o alrededor de 100 mg/mL. El polipéptido puede tener la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5 o una variante de esta con al menos 85 % de identidad de secuencia con esta (p. ej., el polipéptido es uno que contiene una, dos o las tres mutaciones seleccionadas de E108M, N213Q y N286Q de la SEQ ID NO: 5).

Un segundo aspecto presenta un método para tratar un trastorno de la mineralización ósea o una enfermedad con manifestaciones óseas (por ejemplo, una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en hipofosfatasa (HPP), fractura ósea, osteoporosis, esclerosteosis, condrocalcinosis, hipotonía, distrofia muscular de Duchenne, traqueobroncomalacia, convulsiones, neurofibromatosis (p. ej., NF-1) y craneosinostosis, o uno o más de sus síntomas, en un sujeto (p. ej., un sujeto humano) que lo necesite mediante la administración al sujeto de la composición farmacéutica del primer aspecto. La composición puede administrarse en una cantidad y duración suficientes para tratar la enfermedad o para aliviar uno o más síntomas de esta. El tratamiento puede mejorar la formación ósea en el sujeto. El polipéptido puede usarse para tratar la debilidad muscular.

El polipéptido o una composición farmacéutica que lo contiene puede administrarse en una dosificación de alrededor de 0,01 mg/kg a alrededor de 60 mg/kg (por ejemplo, de alrededor de 0,1 mg/kg a alrededor de 50 mg/kg, por ejemplo, de alrededor de 0,1 mg/kg a alrededor de 20 mg/kg, o, por ejemplo, de alrededor de 0,1 mg/kg a alrededor de 10 mg/kg). El polipéptido se puede administrar una vez al día, a la semana, al mes o al año (p. ej., una vez por semana). En algunas modalidades, el polipéptido se administra una o más veces cada 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, 30 o 31 días. El polipéptido puede administrarse una vez por semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez cada cuatro semanas o más. El polipéptido puede administrarse en una dosificación de alrededor de 0,01 mg/kg/semana a alrededor de 50 mg/kg/semana (por ejemplo, de alrededor de 0,01 mg/kg/semana a alrededor de 40 mg/kg/semana, por ejemplo, de alrededor de 0,1 mg/kg/semana a alrededor de 20 mg/kg/semana, o, por ejemplo, de alrededor de 0,1 mg/kg/semana a alrededor de 10 mg/kg/semana). El polipéptido se puede administrar durante al menos un día, una semana, un mes, un año o más (por ejemplo, durante la vida del

sujeto).

El polipéptido o una composición farmacéutica que lo contiene 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 vía subcutánea o intravenosa.

En algunas modalidades, la composición farmacéutica se administra por vía subcutánea (p. ej., en el abdomen o el muslo). Por ejemplo, de alrededor de 10 mg a alrededor de 100 mg (por ejemplo, alrededor de 10 mg, 15 mg, 20 mg, 25 mg, 30 mg, 35 mg, 40 mg, 45 mg, 50 mg, 55 mg, 60 mg, 65 mg, 70 mg, 75 mg, 80 mg, 85 mg, 90 mg, 95 mg o 100 mg, por ejemplo, alrededor de 15 mg, 45 mg o 90 mg, como alrededor de 15 mg, 45 mg o 90 mg) pueden administrarse al sujeto por vía subcutánea, p. ej., una o dos veces por semana, p. ej., durante al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más semanas, o durante más tiempo (p. ej., durante la vida del sujeto). La composición se puede administrar en un volumen de, por ejemplo, alrededor de 5 mL o menos (por ejemplo, 4,0 mL, 3,0 mL, 2,0 mL, 1,0 mL, 0,9 mL, 0,8 mL, 0,7 mL, 0,6 mL, 0,5 mL, 0,4 mL, 0,3 mL, 0,2 mL o 0,1 mL, o en un volumen en un intervalo de alrededor de 5 mL a alrededor de 0,1 mL).

En algunas modalidades, la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa (IV). Por ejemplo, de alrededor de 10 mg a alrededor de 100 mg (por ejemplo, alrededor de 10 mg, 15 mg, 20 mg, 25 mg, 30 mg, 35 mg, 40 mg, 45 mg, 50 mg, 55 mg, 60 mg, 65 mg, 70 mg, 75 mg, 80 mg, 85 mg, 90 mg, 95 mg o 100 mg, como, por ejemplo, alrededor de 15 mg, 45 mg o 90 mg) pueden administrarse al sujeto por vía intravenosa, p. ej., una o dos veces por semana, p. ej., durante al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más semanas (por ejemplo, durante 3 semanas), o durante más tiempo (p. ej., durante la vida del sujeto). Por ejemplo, la composición farmacéutica se administra por vía IV en un volumen de alrededor de 5 mL o menos (por ejemplo, 4,0 mL, 3,0 mL, 2,0 mL, 1,0 mL, 0,9 mL, 0,8 mL, 0,7 mL, 0,6 mL, 0,5 mL, 0,4 mL, 0,3 mL, 0,2 mL o 0,1 mL, o en un volumen en un intervalo de alrededor de 5 mL a alrededor de 0,1 mL).

En algunas modalidades, la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa y subcutánea (p. ej., en el abdomen o el muslo). Por ejemplo, la composición farmacéutica se administra en un régimen de tratamiento que combina la administración intravenosa y subcutánea (p. ej., en el abdomen o el muslo). Por ejemplo, la composición puede administrarse

primero a un sujeto por vía intravenosa en una dosis única en una cantidad de alrededor de 10 mg a alrededor de 100 mg (p. ej., alrededor de 10 mg, 15 mg, 20 mg, 25 mg, 30 mg, 35 mg, 40 mg, 45 mg, 50 mg, 55 mg, 60 mg, 65 mg, 70 mg, 75 mg, 80 mg, 85 mg, 90 mg, 95 mg o 100 mg, tal como, por ejemplo, alrededor de 15 mg, 45 mg o 90 mg) seguido de administración subcutánea (p. ej., en el abdomen o el muslo) al sujeto en una o más dosis a lo largo del tiempo. Por ejemplo, la dosis subcutánea puede ser de alrededor de 10 mg a alrededor de 100 mg (por ejemplo, alrededor de 10 mg, 15 mg, 20 mg, 25 mg, 30 mg, 35 mg, 40 mg, 45 mg, 50 mg, 55 mg, 60 mg, 65 mg, 70 mg, 75 mg, 80 mg, 85 mg, 90 mg, 95 mg o 100 mg, por ejemplo, alrededor de 15 mg, 45 mg o 90 mg, como alrededor de 15 mg, 45 mg o 90 mg). Las dosis subcutáneas pueden administrarse, por ejemplo, una o dos veces por semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas o una vez cada cuatro semanas, por ejemplo, durante al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40 o 50 o más semanas, o durante más tiempo (p. ej., durante 1-10 años, o durante la vida del sujeto). Las dosis intravenosas o subcutáneas se pueden administrar en un volumen de, por ejemplo, alrededor de 5 mL o menos (por ejemplo, 4,0 mL, 3,0 mL, 2,0 mL, 1,0 mL, 0,9 mL, 0,8 mL, 0,7 mL, 0,6 mL, 0,5 mL, 0,4 mL, 0,3 mL, 0,2 mL o 0,1 mL, o en un volumen en un intervalo de alrededor de 5 mL a alrededor de 0,1 mL).

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

En algunas modalidades, el TSAC del polipéptido de fosfatasa alcalina recombinante es de alrededor de 1,0 mol/mol a alrededor de 6,0 mol/mol. En algunas modalidades, el TSAC es de alrededor de 1,2 mol/mol a alrededor de 6,0 mol/mol de fosfatasa alcalina recombinante. En algunas modalidades, el TSAC es de alrededor de 1,5 mol/mol a alrededor de 6,0 mol/mol de fosfatasa alcalina recombinante. En algunas modalidades, el TSAC es de alrededor de 3,0 mol/mol a alrededor de 6,0 mol/mol de fosfatasa alcalina recombinante. En algunas modalidades, el TSAC es de alrededor de 3,2 mol/mol a alrededor de 5,9 mol/mol de fosfatasa alcalina recombinante. En algunas modalidades, el TSAC es alrededor de 0,9 mol/mol, alrededor de 1,0 mol/mol, alrededor de 1,1 mol/mol, alrededor de 1,2 mol/mol, alrededor de 1,3 mol/mol, alrededor de 1,4 mol/mol, alrededor de 1,5 mol/mol, alrededor de 1,6 mol/mol, alrededor de 1,7 mol/mol, alrededor de 1,8 mol/mol, alrededor de 1,9 mol/mol, alrededor de 2,0 mol/mol, alrededor de 2,1 mol/mol, alrededor de 2,2 mol/mol, alrededor de 2,3 mol/mol, alrededor de 2,4 mol/mol, alrededor de 2,5 mol/mol, alrededor de 2,6 mol/mol, alrededor de 2,7

mol/mol, alrededor de 2,8 mol/mol, alrededor de 2,9 mol/mol, alrededor de 3,0 mol/mol, alrededor de 3,1 mol/mol, alrededor de 3,2 mol/mol, alrededor de 3,3 mol/mol, alrededor de 3,4 mol/mol, alrededor de 3,5 mol/mol, alrededor de 3,6 mol/mol, alrededor de 3,7 mol/mol, alrededor de 3,8 mol/mol, alrededor de 3,9 mol/mol, alrededor de 4,0 mol/mol, alrededor de 4,1 mol/mol, alrededor de 4,2 mol/mol, alrededor de 4,3 mol/mol, alrededor de 4,4 mol/mol, alrededor de 4,5 mol/mol, alrededor de 4,6 mol/mol, alrededor de 4,7 mol/mol, alrededor de 4,8 mol/mol, alrededor de 4,9 mol /mol, alrededor de 5,0 mol/mol, alrededor de 5,1 mol/mol, alrededor de 5,2 mol/mol, alrededor de 5,3 mol/mol, alrededor de 5,4 mol/mol, alrededor de 5,5 mol/mol, alrededor de 5,6 mol/mol, alrededor de 5,7 mol/mol, alrededor de 5,8 mol/mol, alrededor de 5,9 mol/mol o alrededor de 6,0 mol/mol de fosfatasa alcalina recombinante. En algunas modalidades, el TSAC es alrededor de 3,2 mol/mol de fosfatasa alcalina recombinante. En algunas modalidades, el TSAC es alrededor de 5,0 mol/mol de fosfatasa alcalina recombinante. En algunas modalidades, el TSAC es alrededor de 5,9 mol/mol de fosfatasa alcalina recombinante.

En algunas modalidades, la composición incluye alrededor de 10 mM de fosfato, alrededor de 140 mM de prolina, alrededor de 140 mM de sacarosa, alrededor de 0,05 % de monooleato de sorbitán polioxietilenado (20) (por ejemplo, PS80) a un pH de alrededor de 7,3 y un valor de TSAC de alrededor de 3,0 mol/mol a alrededor de 6,0 mol/mol.

En algunas modalidades, el método produce un AUC_{0-168h} de alrededor de 50 $\mu g \times hora/mL$ a alrededor de 4000 $\mu g \times hora/mL$ en la sangre del sujeto. Por ejemplo, el método puede producir un AUC_{0-168h} de alrededor de 1000 $\mu g \times hora/mL$ a alrededor de 3000 $\mu g \times hora/mL$ en la sangre del sujeto. En algunas modalidades, el método produce una C_{max} de alrededor de 0,5 $\mu g/mL$ a alrededor de 25 $\mu g/mL$ en la sangre del sujeto. Por ejemplo, el método puede producir una C_{max} de alrededor de 0,6 $\mu g/mL$ a alrededor de 20 $\mu g/mL$ en la sangre del sujeto.

Definiciones

El término «alrededor de» significa $\pm 10\%$ del valor indicado. Se entiende que todas las mediciones informadas en este documento están modificadas por la expresión «alrededor de», ya sea que la expresión se use explícitamente o no, a menos que se indique explícitamente lo contrario.

La expresión «resto dirigido al hueso» significa una secuencia de aminoácidos de al menos 3

residuos de aminoácidos de longitud que tiene una afinidad suficiente con la matriz ósea de modo que el resto dirigido al hueso, tomado solo, tiene una afinidad de unión *in vivo* con la matriz ósea que es al menos alrededor de 1×10^{-5} M o mayor, por ejemplo, alrededor de 10^{-6} M, alrededor de 10^{-7} M, alrededor de 10^{-8} M, alrededor de 10^{-9} M, o más).

- 5 La expresión «catalíticamente competente», como se usa aquí, hace referencia a un sALP que hidroliza el inhibidor de la mineralización ósea pirofosfato inorgánico (PPI) para proporcionar fosfato inorgánico (Pi), disminuyendo así las concentraciones extracelulares de PPI. Por lo tanto, un sALP catalíticamente competente mejora la mineralización esquelética al regular la concentración de PPI.
- 10 El término «Fc» significa una región del fragmento cristizable de una inmunoglobulina, por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4, que incluye los dominios CH2 y CH3 de la cadena pesada de inmunoglobulina. El Fc puede incluir también cualquier parte de una región bisagra que une las regiones Fab y Fc. El Fc puede derivarse de cualquier mamífero, incluido el humano, y puede modificarse de forma postraducciona (por ejemplo, mediante glicosilación o sialilación).
- 15 En un ejemplo no taxativo, el Fc puede ser la región del fragmento cristizable de la IgG2/4 humana con la SEQ ID NO: 4.
«Fragmento» significa una parte de un polipéptido o una molécula de ácido nucleico que contiene, preferiblemente, al menos 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de la longitud completa del polipéptido o la
20 molécula de ácido nucleico 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 de la molécula de ácido
25 nucleico, 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 de aminoácidos, hasta la longitud total del polipéptido.
Los términos «hipofosfatasa» o «HPP», tal como se utilizan en la presente, hacen referencia a un trastorno esquelético hereditario raro provocado, por ejemplo, por una o más mutaciones de
30 pérdida funcional en el gen de ALPL (fosfatasa alcalina, hígado/hueso/riñón) que codifica la fosfatasa alcalina no específica del tejido (TNSALP). La HPP se puede caracterizar además

como HPP infantil, HPP de la niñez, HPP perinatal (por ejemplo, HPP perinatal benigna o HPP perinatal letal), u odonto-HPP, HPP del adolescente o HPP del adulto. Por ejemplo, la «HPP infantil» caracteriza a un sujeto que tiene HPP que tiene de alrededor de 5 a alrededor de 12 años de edad, «la HPP del adolescente» caracteriza a un sujeto que tiene HPP que tiene de alrededor de 13 a alrededor de 17 años de edad y «HPP del adulto» caracteriza a un sujeto que tiene HPP que tiene alrededor de 18 años de edad o más. La expresión «HPP del adulto», como se usa en este documento, hace referencia 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 de pato, dificultades ambulatorias, dolor óseo, dolor, fractura ósea, depósito de cristales de pirofosfato de calcio dihidratado, pseudogota, artritis, artropatía por pirofosfato, condrocalcinosis, periartrosis calcificada y pseudofractura. La expresión «HPP del adolescente», como se usa en este documento, hace referencia 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, pseudogota, marcha de pato, dificultades ambulatorias, dolor óseo, dolor, pérdida dental prematura, hipomineralización, hipoplasia pulmonar, insuficiencia respiratoria, convulsiones, hipercalciuria, baja estatura y retraso en el crecimiento.

La expresión «HPP del niño», como se usa en este documento, hace referencia 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, costillas raquílicas, una o más deformidades esqueléticas, hipotonía, debilidad muscular, complicaciones reumatoides, artritis, pseudogota, marcha de pato, dificultades ambulatorias, dolor óseo, dolor, pérdida dental prematura, hipomineralización, retraso en el desarrollo motor, convulsiones, hipercalciuria, baja estatura, fractura ósea, pseudofractura y retraso en el crecimiento.

La expresión «ácido nucleico» o «molécula de ácido nucleico» significa 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, de cadena simple o doble, y puede incluir nucleótidos modificados o no modificados, o mezclas o combinaciones de estos. También se incluyen varias formas de ácido

libre, sales y sales mixtas de moléculas de ácido nucleico.

Por «tratar» y «tratamiento» se entiende el manejo médico de un sujeto con la intención de curar, mejorar, estabilizar, reducir la probabilidad de ocurrencia o prevenir una enfermedad, tal como HPP (p. ej., HPP del niño, adolescente o adulto), o uno o más síntomas de esta y/o el

5 manejo de un sujeto que presenta o es probable que tenga una enfermedad, tal como HPP, por ejemplo, mediante la administración de una composición farmacéutica (por ejemplo, una sALP como se describe en este documento) . Tratar (y las otras formas usadas en la presente) incluye el tratamiento activo, es decir, tratamiento dirigido específicamente a la mejora o que se asocia con la cura de una enfermedad, afección patológica, trastorno o evento, y también incluye el
10 tratamiento causal, es decir, el tratamiento dirigido a retirar la causa de la enfermedad, afección patológica, trastorno o evento asociado. Además, este término incluye el tratamiento paliativo, es decir, el tratamiento destinado a aliviar o mejorar al menos un síntoma en vez de curar la enfermedad, afección patológica, trastorno o evento; el tratamiento sintomático, es decir, el tratamiento dirigido a síntomas inespecíficos de la enfermedad, afección patológica, trastorno o
15 evento asociado; el tratamiento preventivo, es decir, el tratamiento dirigido a minimizar o inhibir parcial o completamente el desarrollo de la enfermedad, afección patológica, trastorno o evento asociado, por ejemplo, en un sujeto que no está enfermo todavía, pero que es susceptible o están en peligro de sufrir una enfermedad, afección patológica, trastorno o evento particular; y el tratamiento de apoyo, es decir, el tratamiento empleado para complementar otra terapia
20 específica dirigida hacia la mejora de la enfermedad, afección patológica, trastorno o evento asociado.

Los términos «péptido», «polipéptido» y «proteína» se utilizan de forma intercambiable y hacen referencia a cualquier cadena de dos o más residuos de aminoácidos naturales o no naturales, independientemente de la modificación postraducciona (por ejemplo, glicosilación, sialilación o
25 fosforilación), que constituye todo o parte del polipéptido o péptido de origen natural o no natural, como se describe en la presente.

Los términos «sALP», «fosfatasa alcalina soluble» y «dominio extracelular de una fosfatasa alcalina» se usan indistintamente (a menos que el contexto indique lo contrario) para referirse a una fosfatasa alcalina soluble no unida a la membrana o un fragmento o variante
30 biológicamente activo de este. Las sALP incluyen, por ejemplo, una fosfatasa alcalina que carece de una secuencia de señal GPI de extremo C, y variantes y análogos adicionales de

esta que retienen la actividad de fosfatasa alcalina, por ejemplo, la capacidad de hidrolizar PPi u otro/s sustrato/s natural/es o artificial/es. Esto incluye fragmentos solubles correspondientes a los dominios extracelulares de TNSALP, PALP, GLALP e IALP y variantes o fragmentos biológicamente activos de estos, a menos que se especifique lo contrario. Un sALP maduro carece del anclaje de membrana GPI y del péptido señal, que se escinde durante el procesamiento.

Los términos «ALP» y «fosfatasa alcalina» hacen referencia a una fosfatasa alcalina de origen natural, como TNSALP, PALP, GLALP e IALP, que es capaz de hidrolizar PPi u otros sustratos naturales o artificiales.

- 10 El término «portador farmacéuticamente aceptable» o «excipiente farmacéuticamente aceptable» significa un portador o excipiente que es fisiológicamente aceptable para el sujeto tratado mientras que conserva las propiedades terapéuticas del compuesto con el cual se administra. Una sustancia portadora farmacéuticamente aceptable de ejemplo es solución salina fisiológica. Los expertos en la técnica conocen otros portadores fisiológicamente aceptables y sus formulaciones, y se describen, por ejemplo, en *Remington's Pharmaceutical Sciences* (Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 22da Ed., Allen, Ed. 2012).

- 15 La expresión «composición farmacéutica» significa una composición que contiene un polipéptido o una molécula de ácido nucleico como se describe en el presente documento formulada con un excipiente farmacéuticamente aceptable, e incluye aquellas que se fabrican o venden con la aprobación de una agencia reguladora gubernamental como parte de un régimen terapéutico para la tratamiento o prevención de una enfermedad o evento en un sujeto. Las composiciones farmacéuticas se pueden formular, por ejemplo, para la administración subcutánea (por ejemplo, en el abdomen o el muslo), administración intravenosa (por ejemplo, como una solución estéril libre de émbolos de particulados y en un sistema de solventes adecuado para uso intravenoso), para la administración oral (por ejemplo, un comprimido, cápsula, pastilla, cápsula de gelatina o jarabe) o cualquier otra formulación descrita en la presente, por ejemplo, en forma de dosificación unitaria.

El término «sujeto» hace referencia a un mamífero, que incluye, de modo no taxativo, un ser humano o un mamífero no humano, tal como un bovino, equino, canino, ovino o felino.

- 30 La expresión «cantidad terapéuticamente eficaz» significa una cantidad de un polipéptido o molécula de ácido nucleico que se describe en la presente que es suficiente para tratar,

prevenir, retrasar, suprimir o detener sustancialmente cualquier síntoma de una enfermedad o afección descrita en la presente, particularmente HPP. Una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición descrita en la presente puede depender de la gravedad del trastorno que se está tratando y las condiciones, peso y estado general del sujeto y el experto en la técnica la puede determinar considerando estos factores. Una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición descrita en la presente se puede administrar a un sujeto en una dosis individual o en múltiples dosis administradas durante un período de tiempo.

Las expresiones «contenido total de ácido siálico» o «TSAC», tal como se usan en la presente, hacen referencia a la cantidad de ácido siálico (un carbohidrato) en una molécula de proteína particular. Se expresa como moles de ácido siálico incorporado por mol de proteína, o «mol/mol». La concentración de TSAC se mide durante el proceso de purificación. Por ejemplo, un método de cuantificación de TSAC es aquel en que el TSAC se libera de la fosfatasa alcalina mediante hidrólisis ácida, y el TSAC liberado se detecta posteriormente mediante detección electroquímica mediante cromatografía de alta resolución de intercambio aniónico con técnica de detección amperométrica pulsada («HPAE-PAD»).

La expresión «ácido siálico» hace referencia generalmente a derivados N- u O-sustituidos del ácido neuramínico, un monosacárido con una cadena principal de nueve carbonos. El ácido siálico también puede hacer referencia específicamente al compuesto ácido N-acetilneuramínico y, a veces, se abrevia como Neu5Ac o NANA. La presencia de ácido siálico puede afectar la absorción, la semivida sérica y la eliminación de glicoproteínas del suero, así como las propiedades físicas, químicas e inmunogénicas de la glicoproteína. En algunas modalidades de la presente descripción, el ácido siálico asociado con fosfatasas alcalinas, por ejemplo, ALP201, afecta la exposición *in vivo* y la semivida de la molécula en condiciones fisiológicas. En algunas modalidades, el control preciso y predecible del contenido total de ácido siálico (TSAC) de una fosfatasa alcalina sirve como atributo de control de calidad.

Tal como se utiliza en la presente, cuando se hace referencia a que un polipéptido o secuencia de ácido nucleico tiene «al menos X % de identidad de secuencia» con respecto a una secuencia de referencia, significa que al menos X porcentaje de los residuos de aminoácidos o nucleótidos en el polipéptido o ácido nucleico son idénticos a aquellos de la secuencia de referencia cuando las secuencias se encuentran óptimamente alineadas. Se puede determinar un alineamiento óptimo de secuencias de varias maneras que están dentro de la experiencia

en la técnica, por ejemplo, el algoritmo de alineamiento 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). Es posible acceder a estos y otros algoritmos de alineación mediante el uso de software informático públicamente disponible tal como «Best Fit» (Smith y Waterman, *Advances in Applied Mathematics*, 482-489, 1981) como se incorpora en GENEMATCHER PLUS™ (Schwarz and Dayhof, *Atlas of Protein Sequence and Structure*, Dayhoff, M. O., Ed., pp 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 técnica pueden determinar los parámetros adecuados para medir la alineación, que incluyen cualquier algoritmo necesario para lograr la alineación óptima a lo largo de la longitud de las secuencias que se comparan.

Las palabras «preferido» y «preferiblemente» hacen referencia a modalidades de los compuestos, composiciones y métodos descritos que pueden proporcionar determinados beneficios, en determinadas circunstancias. Sin embargo, también se pueden preferir otras modalidades, en las mismas u otras circunstancias. Además, la enumeración de una o más modalidades preferidas no implica que otras modalidades no sean útiles, y el uso de este término no pretende excluir otras modalidades del alcance de la descripción.

Para cualquier método descrito en este documento que incluya etapas separadas, las etapas pueden llevarse a cabo en cualquier orden factible; asimismo, según corresponda, podrá realizarse simultáneamente cualquier combinación de dos o más etapas.

No se pretende que el compendio anterior describa cada modalidad descrita o cada implementación de los compuestos, composiciones y métodos descritos. La descripción que sigue ejemplifica más particularmente las modalidades ilustrativas. En varias partes de la solicitud, se proporciona una guía a través de listas de ejemplos que se pueden usar en varias combinaciones. En cada caso, la lista mencionada sirve solo como un grupo representativo y no se debe interpretar como una lista exclusiva.

Todos los títulos son para comodidad del lector y no deben usarse para limitar el significado del texto que los sucede, a menos que se especifique de esa manera.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 es un conjunto de curvas de saturación que muestran la relación de niveles

crecientes de PPI con la velocidad de hidrólisis de PPI para ALP201 (SEQ ID NO: 5; izquierda) y asfotasa alfa (SEQ ID NO: 6; derecha).

La Figura 2 es un conjunto de curvas de saturación que muestran la relación de niveles crecientes de PLP con la velocidad de hidrólisis de PLP para ALP201 (izquierda) y asfotasa alfa (derecha).

La Figura 3 es un gráfico que muestra las concentraciones de enzima fosfatasa alcalina activa en plasma de ratón Akp2GW (-/-) al final del estudio por grupo de dosificación. Abreviaturas: q1w = una vez por semana; q2d = cada 2 días; qd = todos los días.

La Figura 4 es un gráfico que muestra los niveles de actividad de fosfatasa alcalina en tejido de fémur de ratón al final del estudio en los días 36/37. Abreviaturas: q2d = cada 2 días; qd = todos los días.

La Figura 5 es un conjunto de curvas de supervivencia representativas para ratones Akp2GW (-/-) tratados con ALP201 y asfotasa alfa en estudios de eficacia de 36 días. Abreviaturas: MED = dosis mínima eficaz; PBS = solución salina amortiguada con fosfato; q1w = una vez por semana; q2d = cada 2 días; qd = todos los días.

La Figura 6 es un gráfico que muestra una comparación de los resultados del modelo de dosis-respuesta de ALP201 y asfotasa alfa. Abreviaturas: ALP = fosfatasa alcalina; D-R = respuesta a la dosis; MED = dosis mínima eficaz; POC = prueba de concepto.

La Figura 7 es un gráfico que muestra perfiles de concentración-tiempo de ALP201 humana simulada para cada cohorte de primera en humanos (FIH). La región gris representa el intervalo de predicción del 90 %, es decir, el rango del 5 % al 95 %; la línea continua negra es la mediana de los perfiles de concentración-tiempo simulados; LLOQ es la línea discontinua horizontal para el ensayo PK; Abreviaturas: LLOQ=límite inferior de cuantificación (0,15 µg/mL).

Las Figuras 8A y 8B son gráficos que muestran perfiles de concentración plasmática activa media (SD) de ALP201 frente al tiempo después de la administración intravenosa (Figura. 8A) y subcutánea (Figura 8B) a ratones macho C57BL/6.

Las Figuras 9A y 9B son gráficos que muestran perfiles de concentración plasmática activa media (SD) de ALP201 frente al tiempo para ALP201 (lote con TSAC = 5,9) después de la administración intravenosa (Figura 9A) y subcutánea (Figura 9B) a ratones C57Bl/6 macho.

Las Figuras 10A y 10B son gráficos que muestran perfiles de concentración plasmática activa media (SD) de ALP201 frente al tiempo para ALP201 (lote con TSAC = 5,0) después de la

administración intravenosa (Figura 10A) y subcutánea (Figura 10B) a ratones C57Bl/6 macho.

Las Figuras 11A y 11B son gráficos que muestran perfiles de concentración plasmática activa media (SD) de ALP201 frente al tiempo para ALP201 (lote con TSAC = 3,2) después de la administración intravenosa (Figura 11A) y subcutánea (Figura 11B) a ratones C57Bl/6 macho.

- 5 **La Figura 12** es un gráfico que muestra perfiles de concentración plasmática activa media (SD) de ALP201 frente al tiempo para ALP201 TSAC (3,2, 5,0 y 5,9) después de la administración intravenosa a ratones C57BL/6 macho.

- La Figura 13** es un gráfico que muestra perfiles de concentración plasmática activa media (SD) de ALP201 frente al tiempo para variantes de ALP201 TSAC después de la administración subcutánea a ratones C57BL/6 macho.

La Figura 14 es un gráfico que muestra una comparación de los perfiles de concentración plasmática media ($\pm$ SD) de ALP201 y asfotasa alfa frente al tiempo después de la administración única IV y SC en ratas. Abreviaturas: IV intravenosa; SC = subcutánea, SD = desviación estándar. Datos de fuente de asfotasa alfa: sexo agrupado, IV y SC a 3 mg/kg.

- 15 **La Figura 15** es un gráfico que muestra una comparación de los perfiles de concentración plasmática media ($\pm$ SD) de ALP201 y asfotasa alfa frente al tiempo después de la administración única IV y SC en monos.

- La Figura 16** es un gráfico que muestra una comparación de los modelos de dosis-respuesta de ALP201 y asfotasa alfa (STRENSIQ®). Abreviaturas: ALP = fosfatasa alcalina; D-R = respuesta a la dosis; MED = dosis mínima eficaz; POC = prueba de concepto.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

- Se presentan polipéptidos de fosfatasas alcalinas solubles (p. ej., aquellos que tienen la secuencia de la SEQ ID NO: 5 y variantes de estos con hasta un 80 % o más de identidad de secuencia con estos, en los que los polipéptidos contienen una, dos o las tres mutaciones seleccionadas de E108M, N213Q y N286Q de la SEQ ID NO: 5), fragmentos de estos y proteínas de fusión de estos, moléculas de ácido nucleico que los codifican y métodos de uso de los polipéptidos y moléculas de ácido nucleico para tratar una enfermedad, tal como un trastorno de la mineralización ósea, por ejemplo, hipofosfatasa (HPP), o uno o más síntomas de esta. Los polipéptidos incluyen una fosfatasa alcalina soluble (sALP) o un fragmento de esta, que se deriva de una fosfatasa alcalina (ALP) de origen natural. Las fosfatasas alcalinas

incluyen varias isoenzimas que se expresan diferencialmente en diferentes tejidos. Cuatro isoenzimas ALP principales incluyen fosfatasa alcalina no específica de tejido (TNSALP), fosfatasa alcalina placentaria (PALP), fosfatasa alcalina de línea germinal (GLALP) y fosfatasa alcalina intestinal (IALP). En consecuencia, se presentan proteínas derivadas de estas isoenzimas ALP.

Los polipéptidos descritos en el presente documento se formulan en composiciones farmacéuticas que contienen, por ejemplo, uno o más de fosfato, prolina y sacarosa. Estos componentes imparten características beneficiosas para el polipéptido, como estabilidad mejorada, agregación reducida, reducción de productos proteicos truncados y pureza incrementada de los productos proteicos deseados en la formulación.

La HPP es una enfermedad esquelética, hereditaria y rara con una incidencia de 1 de cada 100,000 nacimientos para las formas más graves de la enfermedad. El trastorno normalmente es resultado de las mutaciones de pérdida funcional en el gen que codifica la TNSALP. La HPP presenta una notable variedad de síntomas y gravedad, desde pérdida de dientes prematura hasta la ausencia casi completa de mineralización ósea en el útero. La presentación de la HPP varía notablemente entre los sujetos y también varía notablemente entre las edades de los sujetos. Muchos sujetos con HPP presentan cambios esqueléticos, baja estatura, dolor crónico, dolor en las extremidades inferiores, alteración de la marcha y pérdida de dientes prematura y atraumática. Debido a la mutación de pérdida de función en la TNSALP endógena, un sujeto con HPP requiere actividad ALP funcional de los polipéptidos descritos en este documento para restaurar la actividad ALP nativa y proporcionar una mineralización normal de la matriz ósea.

Polipéptidos de fosfatasa alcalina soluble

Los polipéptidos descritos en el presente documento incluyen una fosfatasa alcalina soluble (sALP), tal como una fosfatasa alcalina no específica de tejido mutante (TNSALP) o un fragmento de esta. La sALP se puede fusionar con una región Fc y un poliaspartato de secuencia n («Dn», en la que n es igual, por ejemplo, a 3-20) (sALP-Fc-Dn). El polipéptido puede incluir una TNSALP humana, tal como un fragmento soluble de una TNSALP humana (p. ej., residuos 1-491 o 1-485 de la SEQ ID NO: 1). El polipéptido puede incluir una, dos o las tres mutaciones E108M, N213Q y/o N286Q con respecto a la SEQ ID NO: 1. Por ejemplo, la sALP

puede tener al menos un 80 % (p. ej., al menos un 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 99 % o 100 %) de identidad con la SEQ ID NO: 2 o 3. La región Fc puede ser una región Fc de IgG2/4. Por ejemplo, la región Fc puede tener al menos un 80 % (p. ej., al menos un 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 99 % o 100 %) de identidad con la SEQ ID NO: 4. El poliaspartato puede incluir, p. ej., 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 residuos de aspartato. En algunas modalidades, el poliaspartato incluye diez residuos de aspartato (D10). En algunas modalidades, el polipéptido tiene al menos un 80 % (p. ej., al menos un 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 99 % o 100 %) de identidad con la SEQ ID NO: 5. Por ejemplo, el polipéptido puede incluir o consistir en el polipéptido de la SEQ ID NO: 5. El polipéptido puede consistir en la SEQ ID NO: 5.

En algunas modalidades, la parte de fosfatasa alcalina del polipéptido tiene al menos un 80 % (por ejemplo, al menos un 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 99 % o 100 %) de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 3. Este polipéptido puede además estar conectado a una región Fc (p. ej., una región Fc de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4) y/o una región de poliaspartato. En algunas modalidades, el polipéptido incluye una región Fc de IgG2/4, p. ej., que tiene al menos un 80 % (p. ej., al menos un 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 99 % o 100 %) de identidad con la SEQ ID NO: 4. El poliaspartato puede incluir, por ejemplo, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 residuos de aspartato. En algunas modalidades, el poliaspartato incluye diez residuos de aspartato (D10).

SEQ ID NO: 1 – TNSALP humana que carece de un péptido señal (UniProt P05186.4)
 LVPEKEKDPKYWRDQAQETLKYALELQKLNTNVAKNVIMFLGDGMGVSTVTAARILKGQLHH
 NPGEETRLEMDKFPFVALSKTYNTNAQVPDSAGTATAYLCGVKANEGTVGVSAATERSRCNT
 TQNEVTSILRWAKDAGKSVGIVTTTRVNHATPSAAYAHSDRDWYSDNEMPPEALSQGCK
 DIAYQLMHNIRDIDVIMGGGRKYMYPKNKTDVEYESDEKARGTRLDGLDLVDTWKSFKPRYK
 HSHFIWNRTTELLTDPHNVDYLLGLFEPGDMQYELNRNNVTDPSLSEMVVVAIQILRKNPKGF
 FLLVEGGRIDHGHHEGKAKQALHEAVEMDRAIGQAGSLTSSEDTLTVVTADHSHVFTFGGYT
 PRGNSIFGLAPMLSDTDKKPFTAILYGNPGYKVVGGERENVSMVDYAHNNYQAQSAVPLRH
 ETHGGEDVAVFSKGPMALLHGVHEQNYVPHVMAYAACIGANLGHCAPASSAGSLAAGPLL
 LALALYPLSVLF

30

SEQ ID NO: 2 – TNSALP humana (1-485; E108M, N213Q, N286Q)

LVPEKEKDPKYWRDQAQETLKYALELQKLNTNVAKNVIMFLGDGMGVSTVTAARILKGQLHH
 NPGEETRLEMDKFPFVALSKTYNTNAQVPDSAGTATAYLCGVKANMGTVGVSAATERSRCN
 TTQGNEVTSILRWAKDAGKSVGIVTTTRVNHATPSAAYAHSADRDWYSDNEMPPEALSQGC
 KDIAYQLMHNIRDIDVIMGGGRKMYMPKQKTDVEYESDEKARGTRLDGLDLVDTWKSFKPRY
 5 KHSHFIWNRTTELLTLDPHNVDYLLGLFEPGDMQYELNRNQVTDPSLSEMVVVAIQILRKNPKG
 FFLLVEGGRIDHGHHEGKAKQALHEAVEMDRAIGQAGSLTSSSEDTLTVVTADHSHVFTFGGY
 TPRGNSIFGLAPMLSDTDKKPFTAILYGNPGYKVVGGERENVSMVDYAHNNYQAQSAVPLR
 HETHGGEDVAVFSKGPMALLHGVHEQNYVPHVMAYAACIGANLGHCAPASS

10 SEQ ID NO: 3 – TNSALP humana (1-491; E108M, N213Q, N286Q)

LVPEKEKDPKYWRDQAQETLKYALELQKLNTNVAKNVIMFLGDGMGVSTVTAARILKGQLHH
 NPGEETRLEMDKFPFVALSKTYNTNAQVPDSAGTATAYLCGVKANMGTVGVSAATERSRCN
 TTQGNEVTSILRWAKDAGKSVGIVTTTRVNHATPSAAYAHSADRDWYSDNEMPPEALSQGC
 KDIAYQLMHNIRDIDVIMGGGRKMYMPKQKTDVEYESDEKARGTRLDGLDLVDTWKSFKPRY
 15 KHSHFIWNRTTELLTLDPHNVDYLLGLFEPGDMQYELNRNQVTDPSLSEMVVVAIQILRKNPKG
 FFLLVEGGRIDHGHHEGKAKQALHEAVEMDRAIGQAGSLTSSSEDTLTVVTADHSHVFTFGGY
 TPRGNSIFGLAPMLSDTDKKPFTAILYGNPGYKVVGGERENVSMVDYAHNNYQAQSAVPLR
 HETHGGEDVAVFSKGPMALLHGVHEQNYVPHVMAYAACIGANLGHCAPASSAGSLAA

20 SEQ ID NO: 4 – Fc de IgG2/4

VECPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHN
 AKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQV
 YTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRL
 TVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK

25

SEQ ID NO: 5 – ALP201

LVPEKEKDPKYWRDQAQETLKYALELQKLNTNVAKNVIMFLGDGMGVSTVTAARILKGQLHH
 NPGEETRLEMDKFPFVALSKTYNTNAQVPDSAGTATAYLCGVKANMGTVGVSAATERSRCN
 TTQGNEVTSILRWAKDAGKSVGIVTTTRVNHATPSAAYAHSADRDWYSDNEMPPEALSQGC
 30 KDIAYQLMHNIRDIDVIMGGGRKMYMPKQKTDVEYESDEKARGTRLDGLDLVDTWKSFKPRY
 KHSHFIWNRTTELLTLDPHNVDYLLGLFEPGDMQYELNRNQVTDPSLSEMVVVAIQILRKNPKG

FFLLVEGGRIDHGHHEGKAKQALHEAVEMDRAIGQAGSLTSS EDTLT VVTADHSHVFTFGGY
 TPRGNSIFGLAPMLS DTDKKPFTAILYGNPGYKVVGGERENVSMVDYAHNNYQAQSAVPLR
 HETHGGEDVAVFSKGPMALLHGVHEQNYVPHVMAYAACIGANLGHCAPASSAGSLAAVEC
 PPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT
 5 KPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTL
 PSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDK
 SRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLKDDDDDDDDDD

SEQ ID NO: 6 – asfotasa alfa

10 LVPEKEKDPKYWRDQAQETLKYALELQKLNTNVAKNVIMFLGDGMGVSTVTAARILKGQLHH
 NPGEETRLEMDKFPFVALSKTYNTNAQVPDSAGTATAYLCGVKANEGTVGVSAATERSRCNT
 TQGNEVTSILRWAKDAGKSVGIVTTTRVNHATPSAAYAHSADRDWYSDNEMPPEALSQGCK
 DIAYQLMHNIRDIDVIMGGGRKYMYPKNKTDVEYESDEKARGTRLDGLDLVDTWKSFKPRYK
 HSHFIWNRTTELLTDPHNVDYLLGLFEPGDMQYELNRNNVTDPSLSEMVVVAIQILRKNPKGF
 15 FLLVEGGRIDHGHHEGKAKQALHEAVEMDRAIGQAGSLTSS EDTLT VVTADHSHVFTFGGYT
 PRGNSIFGLAPMLS DTDKKPFTAILYGNPGYKVVGGERENVSMVDYAHNNYQAQSAVPLRH
 ETHGGEDVAVFSKGPMALLHGVHEQNYVPHVMAYAACIGANLGH
 APASSLKDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
 WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK
 20 AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLD
 DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKDIDDDDDDDDDDD

Contenido total de ácido siálico

25 Como se describe en este documento, el TSAC puede afectar la semivida de la fosfatasa
 alcalina recombinante en condiciones fisiológicas. Por lo tanto, el nivel de TSAC puede servir
 como un atributo de calidad para las fosfatasas alcalinas producidas de forma recombinante
 como, por ejemplo, ALP201. El control del intervalo de TSAC durante la elaboración del
 polipéptido puede mejorar la reproducibilidad lote a lote y puede reducir la heterogeneidad en
 los polipéptidos producidos. En algunas modalidades, el TSAC es de alrededor de 0,8 mol/mol
 30 a alrededor de 8,0 mol/mol de la fosfatasa alcalina recombinante. En algunas modalidades, el
 TSAC es de alrededor de 0,9 mol/mol a alrededor de 7,0 mol/mol de la fosfatasa alcalina

recombinante. En algunas modalidades, el TSAC es de alrededor de 1,0 mol/mol a alrededor de 6,0 mol/mol de la fosfatasa alcalina recombinante. En algunas modalidades, el TSAC es de alrededor de 1,2 mol/mol a alrededor de 6,0 mol/mol de la fosfatasa alcalina recombinante. En algunas modalidades, el TSAC es de alrededor de 1,5 mol/mol a alrededor de 6,0 mol/mol de la fosfatasa alcalina recombinante. En algunas modalidades, el TSAC es de alrededor de 2,0 mol/mol a alrededor de 6,0 mol/mol de la fosfatasa alcalina recombinante. En algunas modalidades, el TSAC es de alrededor de 3,2 mol/mol a alrededor de 5,9 mol/mol de la fosfatasa alcalina recombinante. En algunas modalidades, el TSAC es alrededor de 0,9 mol/mol, alrededor de 1,0 mol/mol, alrededor de 1,1 mol/mol, alrededor de 1,2 mol/mol, alrededor de 1,3 mol/mol, alrededor de 1,4 mol/mol, alrededor de 1,5 mol/mol, alrededor de 1,6 mol/mol, alrededor de 1,7 mol/mol, alrededor de 1,8 mol/mol, alrededor de 1,9 mol/mol, alrededor de 2,0 mol/mol, alrededor de 2,1 mol/mol, alrededor de 2,2 mol/mol, alrededor de 2,3 mol/mol, alrededor de 2,4 mol/mol, alrededor de 2,5 mol/mol, alrededor de 2,6 mol/mol, alrededor de 2,7 mol/mol, alrededor de 2,8 mol/mol, alrededor de 2,9 mol/mol, alrededor de 3,0 mol/mol, alrededor de 3,1 mol/mol, alrededor de 3,2 mol/mol, alrededor de 3,3 mol/mol, alrededor de 3,4 mol/mol, alrededor de 3,5 mol/mol, alrededor de 3,6 mol/mol, alrededor de 3,7 mol/mol, alrededor de 3,8 mol/mol, alrededor de 3,9 mol/mol, alrededor de 4,0 mol/mol, alrededor de 4,1 mol/mol, alrededor de 4,2 mol/mol, alrededor de 4,3 mol/mol, alrededor de 4,4 mol/mol, alrededor de 4,5 mol/mol, alrededor de 4,6 mol/mol, alrededor de 4,7 mol/mol, alrededor de 4,8 mol/mol, alrededor de 4,9 mol/mol, alrededor de 5,0 mol/mol, alrededor de 5,1 mol/mol, alrededor de 5,2 mol/mol, alrededor de 5,3 mol/mol, alrededor de 5,4 mol/mol, alrededor de 5,5 mol/mol, alrededor de 5,6 mol/mol, alrededor de 5,7 mol/mol, alrededor de 5,8 mol/mol, alrededor de 5,9 mol/mol o alrededor de 6,0 mol/mol de la fosfatasa alcalina recombinante. En algunas modalidades, el TSAC es alrededor de 3,2 mol/mol de la fosfatasa alcalina recombinante. En algunas modalidades, el TSAC es alrededor de 5,0 mol/mol de la fosfatasa alcalina recombinante. En algunas modalidades, el TSAC es alrededor de 5,9 mol/mol de la fosfatasa alcalina recombinante.

Composiciones farmacéuticas

Un polipéptido descrito en el presente documento (p. ej., un polipéptido que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 5 o una variante de este con al menos un 85 % de identidad de secuencia

con este (p. ej., un polipéptido que incluye una o más o todas las mutaciones E108M, N213Q, y N286Q con respecto a la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 5)) se puede formular como una composición farmacéutica mediante una variedad de métodos conocidos en la técnica.

La composición puede incluir uno o más, o todos, de fosfato, prolina y sacarosa. La composición puede incluir, por ejemplo, fosfato y sacarosa. Por ejemplo, la composición puede incluir fosfato (por ejemplo, fosfato de sodio), en una concentración, por ejemplo, de alrededor de 1 mM a alrededor de 100 mM, o de alrededor de 5 mM a alrededor de 20 mM de fosfato, por ejemplo, alrededor de 2 mM, 3 mM, 4 mM, 5 mM, 6 mM, 7 mM, 8 mM, 9 mM, 10 mM, 20 mM, 30 mM, 40 mM, 50 mM, 60 mM, 70 mM, 80 mM, 90 mM o 100 mM, por ejemplo, alrededor de 10 mM. La composición puede incluir además prolina y/o sacarosa. La composición puede incluir además prolina. La composición puede incluir además sacarosa. Por ejemplo, la composición puede incluir de alrededor de 1 mM a alrededor de 500 mM de prolina, por ejemplo, de alrededor de 70 mM a alrededor de 280 mM, por ejemplo, de alrededor de 50 mM a alrededor de 200 mM, por ejemplo, alrededor de 2 mM, 3 mM, 4 mM, 5 mM, 6 mM, 7 mM, 8 mM, 9 mM, 10 mM, 20 mM, 30 mM, 40 mM, 50 mM, 60 mM, 70 mM, 80 mM, 90 mM, 100 mM, 110 mM, 120 mM, 130 mM, 140 mM, 150 mM, 160 mM, 170 mM, 180 mM, 190 mM, 200 mM, 300 mM, 400 mM o 500 mM, por ejemplo, alrededor de 140 mM de prolina y/o de alrededor de 1 mM a alrededor de 500 mM de sacarosa, p. ej., de alrededor de 70 mM a alrededor de 280 mM, p. ej., de alrededor de 50 mM a alrededor de 200 mM, p. ej., alrededor de 2 mM, 3 mM, 4 mM, 5 mM, 6 mM, 7 mM, 8 mM, 9 mM, 10 mM, 20 mM, 30 mM, 40 mM, 50 mM, 60 mM, 70 mM, 80 mM, 90 mM, 100 mM, 110 mM, 120 mM, 130 mM, 140 mM, 150 mM, 160 mM, 170 mM, 180 mM, 190 mM, 200 mM, 210 mM, 220 mM, 230 mM, 240 mM, 250 mM, 260 mM, 270 mM, 280 mM, 290 mM, 300 mM, 350 mM, 400 mM, 450 mM o 500 mM, por ejemplo, alrededor de 140 mM de sacarosa o alrededor de 210 mM de sacarosa. En algunas modalidades, la composición incluye una relación molar de prolina:sacarosa de alrededor de 1:0 a alrededor de 1:3, por ejemplo, alrededor de 1:1. En algunas modalidades, la composición incluye alrededor de 140 mM de prolina. En algunas modalidades, la formulación incluye alrededor de 140 mM de sacarosa. En algunas modalidades, la formulación incluye alrededor de 210 mM de sacarosa. En algunas modalidades, la formulación incluye alrededor de 210 mM de sacarosa y no incluye prolina. En algunas modalidades, la composición incluye alrededor de 210 mM de sacarosa y alrededor de 10 mM de fosfato (p. ej., fosfato de sodio). La formulación puede incluir además de alrededor

de 0,01 % a alrededor de 0,5 %, por ejemplo, de alrededor de 0,01 % a alrededor de 0,1 %, por ejemplo, alrededor de 0,05 % de monooleato de sorbitán polioxietilenado (20) (por ejemplo, polisorbato 80 (PS80)). En algunas modalidades, la composición se formula a un pH de alrededor de pH 7,0 a alrededor de pH 7,6 (por ejemplo, alrededor de pH 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5 o 7,6, por ejemplo, alrededor de 7,3). En algunas modalidades, la composición incluye alrededor de 10 mM de fosfato, alrededor de 140 mM de prolina, alrededor de 140 mM de sacarosa y alrededor de 0,05 % de monooleato de sorbitán polioxietilenado (20) (por ejemplo, PS80) a un pH de alrededor de 7,3.

La composición se puede formular como una solución que contiene el polipéptido en una cantidad de, por ejemplo, alrededor de 0,1 mg/mL a alrededor de 200 mg/mL, tal como alrededor de 100 mg/mL. La composición se puede formular para administración intravenosa o subcutánea, por ejemplo, a una dosificación del polipéptido de alrededor de 0,1 mg/mL a alrededor de 10 mg/mL. La composición se puede formular en una solución en un volumen de alrededor de 0,1 mL a alrededor de 50 mL (p. ej., alrededor de 0,1 a alrededor de 10 mL, p. ej., alrededor de 0,1 mL, 0,2 mL, 0,3 mL, 0,4 mL, 0,5 mL, 0,6 mL, 0,7 mL, 0,8 mL, 0,9 mL o 1,0 mL, p. ej., alrededor de 1 mL a alrededor de 10 mL, p. ej., alrededor de 2 mL, 3 mL, 4 mL, 5 mL, 6 mL, 7 mL, 8 mL, 9 mL o 10 mL). En algunas modalidades, la composición se formula en alrededor de 1 mL.

La descripción también presenta un vial que contiene una composición farmacéutica tal como se describe en la presente. El vial puede contener una solución en un volumen, por ejemplo, de alrededor de 0,1 mL a alrededor de 10 mL (por ejemplo, alrededor de 1 mL). El vial puede contener el polipéptido en una cantidad, por ejemplo, de alrededor de 0,1 mg/mL a alrededor de 500 mg/mL, por ejemplo, alrededor de 1 mg/mL a alrededor de 200 mg/mL, por ejemplo, alrededor de 50 mg/mL a alrededor de 150 mg/mL, por ejemplo, alrededor de 100 mg/mL, del polipéptido (por ejemplo, un polipéptido de SEQ ID NO: 5 o una variante que tiene al menos un 85 % de identidad con este).

Por ejemplo, el vial puede contener un volumen de alrededor de 0,25 mL, alrededor de 0,5 mL, alrededor de 0,75 mL o alrededor de 1,0 mL de una solución que contiene el polipéptido de la SEQ ID NO: 5 a una concentración de alrededor de 50 a alrededor de 100 mg/mL, en la que la solución contiene alrededor de 10 mM de fosfato, alrededor de 140 mM de prolina, alrededor de 140 mM de sacarosa y alrededor de 0,05 % de monooleato de sorbitán polioxietilenado (20)

(por ejemplo, PS80) a un pH de alrededor de 7,3.

Formulaciones

Las composiciones que incluyen las sALP y los polipéptidos de fusión de sALP (por ejemplo, un polipéptido que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 5 o una variante de esta con al menos 85 % de identidad de secuencia con esta (p. ej., un polipéptido que incluye una o más o todas las mutaciones E108M, N213Q y N286Q con respecto a la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 5)) se pueden formular de acuerdo con métodos estándar. Por ejemplo, se puede formular la composición de sALP, por ejemplo, como una solución amortiguada a una concentración adecuada y adecuada para el almacenamiento a 2-8 °C (por ejemplo, 4 °C). Además, la composición de sALP se puede formular para su almacenamiento a una temperatura por debajo de 0 °C (por ejemplo, -20 °C o -80 °C). La composición de sALP puede formularse además para almacenamiento durante hasta 2 años (p. ej., un mes, dos meses, tres meses, cuatro meses, cinco meses, seis meses, siete meses, ocho meses, nueve meses, 10 meses, 11 meses, 1 año, 1½ años o 2 años) a 2-8 °C (por ejemplo, 4 °C). Por lo tanto, las composiciones descritas en la presente pueden formularse para su almacenamiento durante al menos 1 año a 2-8 °C (por ejemplo, 4 °C). Se puede formular una composición en un volumen adecuado, por ejemplo, un volumen de alrededor de 0,1 mL a alrededor de 10 mL.

Las composiciones que incluyen las sALP y los polipéptidos de fusión de sALP (por ejemplo, un polipéptido que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 5 o una variante de esta con al menos 85 % de identidad de secuencia con esta (p. ej., un polipéptido que incluye una o más o todas las mutaciones E108M, N213Q y N286Q con respecto a la SEQ ID NO: 1 o 5)) pueden ser en forma líquida.

Por ejemplo, las composiciones previstas para la administración sistémico o local pueden encontrarse en forma de soluciones inyectables o para infusión. Por consiguiente, la composición de sALP (por ejemplo, una composición que contiene un polipéptido que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 5 o una variante de esta con al menos 85 % de identidad de secuencia con esta (p. ej., un polipéptido que incluye una o más o todas las mutaciones E108M, N213Q y N286Q con respecto a la SEQ ID NO: 1 o 5)) pueden formularse para la administración mediante un modo parenteral (por ejemplo, inyección subcutánea, intravenosa, intraperitoneal o intramuscular). «Administración parenteral», «administrado parenteralmente» y otras frases

gramáticamente equivalentes, tal como se utilizan en la presente, hacen referencia a modos de administración distintos a la administración enteral y tópica, usualmente mediante inyección, e incluyen, de modo no taxativo, la inyección e infusión subcutánea, intradérmica, intravenosa, intranasal, intraocular, pulmonar, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardíaca, intradérmica, intrapulmonar, intraperitoneal, transtraqueal, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, epidural, intracerebral, intracraneal, intracarotídea e intraesternal. Las vías de administración particulares incluyen la administración intravenosa y subcutánea.

La composición se puede preparar como una composición liofilizada. La composición se puede rehidratar con una solución (por ejemplo, como se describe en este documento) antes de la administración.

Dosificación

El polipéptido sALP (p. ej., un polipéptido que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 5 o una variante de este con al menos un 85 % de identidad de secuencia con este (p. ej., un polipéptido que incluye una o más o todas las mutaciones E108M, N213Q, y N286Q con respecto a SEQ ID NO: 1)) descrito en el presente documento se puede administrar a un sujeto que tiene o es propenso a un trastorno de la mineralización ósea, como HPP, en dosis individuales que varían, por ejemplo, de 0,01 mg/kg a 500 mg/kg (p. ej., 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, 1,0 mg/kg a 10 mg/kg, 1,5 mg/kg a 5 mg/kg o 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).

Las dosis de ejemplo 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 1,000 µg/kg. Para todas las dosificaciones o intervalos mencionados en la presente, la expresión «alrededor de» se puede utilizar para modificar estas dosificaciones en ± 10 % de los valores o extremos de intervalo mencionados. En particular, las composiciones

(p. ej., un polipéptido que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 5 o una variante de esta con al menos un 85 % de identidad de secuencia con esta (p. ej., un polipéptido que incluye una o más o todas las mutaciones E108M, N213Q , y N286Q con respecto a SEQ ID NO: 1 o 5)) de acuerdo con la presente descripción se puede administrar a un sujeto en dosis que oscilan de

5 alrededor de 0,001 mg/kg/día a alrededor de 500 mg/kg/día, alrededor de 0,01 mg/kg/día a alrededor de 100 mg/kg/día o alrededor de 0,01 mg/kg/día a alrededor de 20 mg/kg/día. Por ejemplo, las composiciones de sALP (por ejemplo, un polipéptido que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 5 o una variante de esta con al menos 85 % de identidad de secuencia con esta (p. ej., un polipéptido que incluye una o más o todas las mutaciones E108M, N213Q y N286Q

10 con respecto a la SEQ ID NO: 1 o 5)) se pueden administrar a un sujeto en una dosificación semanal que varía, por ejemplo, de alrededor de 0,5 mg/kg/semana a alrededor de 140 mg/kg/semana, por ejemplo, de alrededor de 0,8 mg/kg/semana a alrededor de 50 mg/kg/semana o de alrededor de 1 mg/kg/semana a alrededor de 10 mg/kg/semana (por ejemplo, alrededor de 6 o alrededor de 9 mg/kg/semana). En particular, la sALP se puede

15 administrar una o más veces por semana (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o más veces por 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 algunas modalidades, la formulación se administra una vez por semana. En algunas modalidades, la formulación se

20 administra una vez cada dos semanas.

En particular, la sALP (p. ej., un polipéptido que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 5 o una variante de esta con al menos un 85 % de identidad de secuencia con esta (p. ej., un polipéptido que incluye una o más o todas las mutaciones E108M, N213Q y N286Q con respecto a SEQ ID NO: 1 o 5)) se pueden administrar a una dosificación de 2 mg/kg tres veces por semana (dosis

25 total de 6 mg/kg/semana), 1 mg/kg seis veces por semana (dosis total de 6 mg/kg/semana), 3 mg/kg tres veces por semana (dosis total de 9 mg/kg/semana), 0,5 mg/kg tres veces por semana (dosis total de 1,5 mg/kg/semana) o 9,3 mg/kg tres veces por semana (dosis total 28 mg/kg/semana). El médico podrá adaptar la dosificación de acuerdo con los factores convencionales tales como el grado de la enfermedad y diferentes parámetros del sujeto que

30 tiene un trastorno de mineralización ósea, tal como HPP, o es propenso a este. De manera alternativa, se pueden administrar alrededor de 0,1 mg/kg a alrededor de 20 mg/kg (por ejemplo,

alrededor de 0,1 mg/kg a alrededor de 9 mg/kg) una vez por semana o una vez cada dos semanas. La composición de sALP también se puede administrar de 1 a 10 veces (p. ej., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10) por semana o cada dos semanas a una dosis de 1-90 mg por dosis (p. ej., en un volumen de 0,1 mL a 100 mL). En algunas modalidades, la composición de sALP se administra una vez por semana. En algunas modalidades, la composición de sALP se administra una vez cada dos semanas.

Una composición que contiene una sALP o un polipéptido de fusión de sALP (por ejemplo, un polipéptido que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 5 o una variante de esta con al menos 85 % de identidad de secuencia con esta (p. ej., un polipéptido que incluye una o más o todas las mutaciones E108M, N213Q y N286Q con respecto a la SEQ ID NO: 1 o 5)) puede administrarse a un sujeto como un régimen de dosificación individual o un régimen de dosificación múltiple. Las dosis se pueden administrar, por ejemplo, cada hora, cada dos horas, diariamente, dos veces al día, dos veces por semana, tres veces por semana, cuatro veces por semana, cinco veces por semana, seis veces por semana, semanalmente, dos veces por semana, una vez al mes, dos veces al mes o anualmente. De manera alternativa, las dosis se pueden administrar, 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 por día, semana o mes. En particular, el régimen de dosificación es una vez, dos veces o tres veces a la semana. La duración del régimen 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 día/s, semana/s o mes/es, o incluso durante la vida restante del sujeto que tiene un trastorno de la mineralización ósea, como HPP, o es propenso a padecerlo. El médico podrá adaptar la cantidad, frecuencia y duración de la dosificación de acuerdo con los factores convencionales tales como el grado de la enfermedad y diferentes parámetros del sujeto que tiene un trastorno de mineralización ósea, tal como HPP, o es propenso a este.

Por ejemplo, la dosificación de una sALP o un polipéptido de fusión de sALP (p. ej., un polipéptido que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 5 o una variante del esta con al menos un 85 % de identidad de secuencia con esta (p. ej., un polipéptido que incluye uno o más o todas las mutaciones E108M, N213Q y N286Q con respecto a la SEQ ID NO: 1 o 5)) pueden ser de alrededor de 0,1 mg/kg de peso corporal a alrededor de 10 mg/kg de peso corporal administrados por vía subcutánea o intravenosa una o más (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6 o 7) veces

por semana.

En algunas modalidades particulares, el polipéptido (por ejemplo, un polipéptido que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 5 o una variante de esta con al menos 85 % de identidad de secuencia con esta (p. ej., un polipéptido que incluye una o más o todas las mutaciones E108M, N213Q y N286Q con respecto a la SEQ ID NO: 1 o 5)) o una composición farmacéutica que lo contiene puede administrarse en una dosificación de alrededor de 0,01 mg/kg a alrededor de 60 mg/kg (por ejemplo, de alrededor de 0,1 mg/kg a alrededor de 50 mg/kg, por ejemplo, de alrededor de 0,1 mg/kg a alrededor de 20 mg/kg, por ejemplo, de alrededor de 0,1 mg/kg a alrededor de 10 mg/kg). El polipéptido se puede administrar una vez al día, a la semana, al mes o al año (p. ej., una vez por semana). En algunas modalidades, el polipéptido se administra una o más veces cada 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, 30 o 31 días. El polipéptido puede administrarse en una dosificación de alrededor de 0,01 mg/kg/semana a alrededor de 50 mg/kg/semana (por ejemplo, de alrededor de 0,01 mg/kg/semana a alrededor de 40 mg/kg/semana, por ejemplo, de alrededor de 0,1 mg/kg/semana a alrededor de 20 mg/kg/semana, por ejemplo, de alrededor de 0,1 mg/kg/semana a alrededor de 10 mg/kg/semana). El polipéptido se puede administrar durante al menos un día, una semana, un mes, un año o más (por ejemplo, durante 1-5 años o durante la vida del sujeto).

En algunas modalidades, la composición farmacéutica se administra por vía subcutánea. Por ejemplo, de alrededor de 10 mg a alrededor de 100 mg (por ejemplo, alrededor de 10 mg, 15 mg, 20 mg, 25 mg, 30 mg, 35 mg, 40 mg, 45 mg, 50 mg, 55 mg, 60 mg, 65 mg, 70 mg, 75 mg, 80 mg, 85 mg, 90 mg, 95 mg o 100 mg, por ejemplo, alrededor de 15 mg, 45 mg o 90 mg) pueden administrarse al sujeto por vía subcutánea, p. ej., una o dos veces por semana, p. ej., durante al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más semanas.

En algunas modalidades, la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa. Por ejemplo, de alrededor de 10 mg a alrededor de 100 mg (por ejemplo, alrededor de 10 mg, 15 mg, 20 mg, 25 mg, 30 mg, 35 mg, 40 mg, 45 mg, 50 mg, 55 mg, 60 mg, 65 mg, 70 mg, 75 mg, 80 mg, 85 mg, 90 mg, 95 mg o 100 mg, por ejemplo, alrededor de 15 mg, 45 mg o 90 mg) pueden administrarse al sujeto por vía intravenosa, p. ej., una o dos veces por semana, p. ej., durante al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más semanas.

En algunas modalidades, la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa y

subcutánea. En algunas modalidades, la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa y subcutánea al mismo tiempo. En algunas modalidades, la composición se administra por vía intravenosa y luego subcutánea. En algunas modalidades, la composición farmacéutica se administra por vía subcutánea y luego intravenosa. Por ejemplo, la composición farmacéutica se puede administrar por vía intravenosa al sujeto en una o más dosis (por ejemplo, en una dosis individual), por ejemplo, como dosis de carga, y posteriormente administrarse al sujeto una o más veces por vía subcutánea, por ejemplo, como una dosis de mantenimiento (p. ej., cada dosis administrada alrededor de una vez por semana durante la duración de la terapia).

10

Métodos de tratamiento

En la presente se proporcionan métodos para tratar o mejorar al menos un síntoma de un sujeto con un trastorno de la 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 craneosinostosis también pueden tratarse con las composiciones y métodos descritos en este 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 (por ejemplo, una composición farmacéutica que contiene la fosfatasa alcalina) o un polipéptido que tiene actividad de la 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 la SEQ ID NO: 5 o una variante de esta con al menos 85 % de identidad de secuencia con esta (p. ej., un polipéptido que incluye una o más o todas las mutaciones E108M, N213Q y N286Q con respecto a la SEQ ID NO: 1 o 5)) puede administrarse a neonatos, infantes, niños, adolescentes o adultos.

20

25

30

Los sujetos pueden recibir un diagnóstico de trastorno de la 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 la SEQ ID NO: 5 o una variante de esta con al menos 85 % de identidad de secuencia con esta (p. ej., un polipéptido que incluye una o más o todas las mutaciones E108M, N213Q y

N286Q con respecto a la SEQ ID NO: 1 o 5)). De manera adicional, un sujeto que tiene un trastorno de la mineralización ósea, tal como HPP, o es propenso a padecerlo, puede ser un sujeto que no ha sido tratado previamente con un sALP (por ejemplo, un polipéptido que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 5 o una variante de esta con al menos 85 % de identidad de secuencia con esta (p. ej., un polipéptido que incluye una o más o todas las mutaciones E108M, N213Q y N286Q con respecto a la SEQ ID NO: 1 o 5)).

Uno o más síntomas de la enfermedad pueden manifestarse primero en el sujeto como neonato, infante o niño. En otras modalidades, uno o más síntomas de la enfermedad pueden manifestarse primero en el sujeto como adulto. En algunas modalidades, no se desarrollan síntomas detectables de la enfermedad en el sujeto antes de la edad adulta. En algunas modalidades, los síntomas detectables de la enfermedad se desarrollan en el sujeto antes de la edad adulta, pero el estado de enfermedad permanece sin diagnosticarse hasta la edad adulta.

El método incluye administrar 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 la SEQ ID NO: 5 o una variante de esta con al menos 85 % de identidad de secuencia con esta (p. ej., un polipéptido que incluye una o más o todas las mutaciones E108M, N213Q y N286Q con respecto a la SEQ ID NO: 1 o 5)) a un sujeto que tiene un trastorno de la mineralización ósea, tal como HPP, o es propenso a padecerlo, en una dosis individual o múltiples dosificaciones durante un período de tiempo. En particular, una sALP, tal como un polipéptido que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 5, se puede administrar a un sujeto en el que se ha determinado previamente que tiene una concentración elevada de pirofosfato inorgánico (PPi) o al menos un biomarcador/puntuación predeterminado para un síntoma de HPP (por ejemplo, debilidad muscular), como una puntuación media de fuerza BOT-2 inferior a 10, una puntuación media de agilidad y velocidad de agilidad BOT-2 inferior a 5, una puntuación media del índice CHAQ superior a 0,8 y/o una puntuación media de PODCI de menos de alrededor de 40, un promedio de 6MWT de menos de alrededor del 80 % del valor de 6MWT previsto, un grado de fuerza muscular de menos de 5 y/o un valor promedio de HHD (p. ej., un valor promedio de fuerza muscular o de agarre de HHD) de, por ejemplo, menos de alrededor del 80 % del valor de HHD previsto. Por ejemplo, se puede administrar una sALP a un sujeto que se determinó previamente que tiene una concentración de PPi en una muestra (por ejemplo,

una muestra de plasma) de más de alrededor de 5,71 μM para un infante o niño (por ejemplo, un sujeto de alrededor de 12 años de edad o menos); más de alrededor de 4,78 μM para un adolescente (por ejemplo, un sujeto de alrededor de 13 a alrededor de 18 años de edad); o más de alrededor de 5,82 μM para un adulto (por ejemplo, un sujeto de más de alrededor de 18 años de edad). En otras modalidades, el trastorno de la mineralización ósea, tal como HPP, descrito en el presente documento está causado por una concentración elevada de al menos un sustrato de fosfatasa alcalina (p. ej., PPi, PLP, PEA, etc.). De manera 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 la SEQ ID NO: 5 o una variante de esta con al menos 85 % de identidad de secuencia con esta (p. ej., un polipéptido que incluye una o más o todas las mutaciones E108M, N213Q y N286Q con respecto a la SEQ ID NO: 1 o 5)) puede administrarse a un sujeto que tiene un trastorno de la mineralización ósea, tal como HPP, o es propenso a padecerlo, antes de la determinación de la puntuación de debilidad muscular (por ejemplo, la puntuación de fuerza de BOT-2, puntuación de agilidad y velocidad de carrera de BOT-2, la puntuación de índice CHAQ, la puntuación escalar de BSID-III, la puntuación estándar 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 aquí 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 agilidad y velocidad de carrera de BOT-2, la puntuación del índice CHAQ, la puntuación escalar de BSID-III, la puntuación estándar de PDMS-2, 6MWT, el 12- POMA-G, una evaluación de movilidad orientada al rendimiento modificada (mPOMA-G, como la ilustrada en Phillips et al. 2015 Bone Abstracts 4:P136) o el valor HHD) de un sujeto que tiene un trastorno de la mineralización ósea, tal como HPP, o es propenso a padecerlo, descrito en el presente documento se puede usar solo o en cualquier combinación para evaluar la eficacia del tratamiento usando una sALP (p. ej., un polipéptido que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 5 o una variante de esta con al menos un 85 % de identidad de secuencia con esta (por ejemplo, un polipéptido que incluye una o más o todas las mutaciones E108M, N213Q y N286Q con respecto a la SEQ ID NO: 1 o 5)), en el que las mejoras relativas a una determinada puntuación de prueba demuestran que la sALP es eficaz para tratar el trastorno de la mineralización ósea,

tal como HPP.

Por ejemplo, cuando la administración de una fosfatasa alcalina o un polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina (p. ej., una sALP, p. ej., un polipéptido que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 5 o una variante de esta con al menos un 85 % de identidad de secuencia con esta (p. ej., un polipéptido que incluye una o más o todas las mutaciones E108M, N213Q y N286Q relativas a SEQ ID NO: 1 o 5)) a un sujeto que tiene un trastorno de la mineralización ósea, tal como HPP, o es propenso a padecerlo, da como resultado un aumento promedio en la puntuación de fuerza de BOT-2 a alrededor de 10 o superior a alrededor de 10, en el que el sujeto tenía previamente una puntuación de fuerza de BOT-2 promedio de menos de alrededor de 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 la mineralización ósea, tal como HPP. De manera alternativa, cuando la administración de una sALP no da como resultado un aumento promedio en la puntuación de fuerza de BOT-2 a alrededor de 10 o más de alrededor de 10, se puede cambiar la dosificación y/o frecuencia de administración de fosfatasa alcalina o un polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina (p. ej., aumentarse, por ejemplo, por un período indefinido o corto (p. ej., 1-6 meses o hasta un año o más) para determinar la cantidad eficaz de fosfatasa alcalina o un polipéptido con actividad de fosfatasa alcalina para el sujeto. Por ejemplo, la dosificación de la sALP (por ejemplo, un polipéptido que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 5 o una variante de esta con al menos 85 % de identidad de secuencia con esta (p. ej., un polipéptido que incluye una o más o todas las mutaciones E108M, N213Q y N286Q con respecto a la SEQ ID NO: 1 o 5)) puede aumentarse, por ejemplo, de alrededor de 0,1-1 mg/kg/semana a alrededor de 1-2 mg/kg/semana, de alrededor de 0,5-3 mg/kg/semana a alrededor de 3-6 mg/kg/semana o de alrededor de 3-6 mg/kg/semana a alrededor de 6-9 mg/kg/semana. De manera similar, la frecuencia de dosificación se puede aumentar, por ejemplo, de alrededor de una vez cada tres semanas a alrededor de una vez cada dos semanas o de alrededor de una vez cada dos semanas a alrededor de una vez por semana. De manera alternativa, si se logra una mejora en uno de los indicadores descritos en este documento, la dosificación y/o la frecuencia de administración pueden permanecer iguales o disminuir de, por ejemplo, alrededor de 6-9 mg/kg/semana a alrededor de 3-6 mg/kg/semana, de alrededor de 3-6 mg/kg/semana a alrededor de 0,5-3 mg/kg/semana o de alrededor de 0,5-3 mg/kg/semana a alrededor de 0,1-1

mg/kg/semana. De manera similar, la frecuencia de dosificación de administración puede disminuir de alrededor de una vez por semana a alrededor de una vez cada dos semanas o de alrededor de una vez cada dos semanas a alrededor de una vez cada tres semana.

De manera adicional, cuando la administración de una fosfatasa alcalina o un polipéptido que
5 tiene actividad de fosfatasa alcalina, (por ejemplo, una sALP, por ejemplo, un polipéptido que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 5 o una variante de esta con al menos 85 % de identidad de secuencia con esta (p. ej., un polipéptido que incluye una o más o todas las mutaciones E108M, N213Q y N286Q con respecto a la SEQ ID NO: 1 o 5)) a un sujeto que tiene un trastorno de la mineralización ósea, tal como HPP, o es propenso a padecerlo, da como resultado una
10 mejora en la categorización de grados de fuerza muscular del sujeto de uno o más (por ejemplo, una mejora a un grado de fuerza muscular 1, 2, 3, 4 o 5 a partir de un grado de fuerza muscular inferior), en el que el sujeto tuvo previamente un grado de fuerza muscular promedio de menos de alrededor de 5, entonces el tratamiento con la fosfatasa alcalina o con un polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina es eficaz para tratar, por ejemplo, los impedimentos físicos
15 asociados con un trastorno de la mineralización ósea, tal como HPP. De manera alternativa, cuando la administración de una sALP no resulta en una mejora en la categorización de grado de fuerza muscular del sujeto de uno o más a partir de un grado de fuerza muscular inferior anterior, la dosificación y/o frecuencia de administración de la fosfatasa alcalina o un polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina se puede cambiar (por ejemplo, aumentarse) a efectos
20 de determinar la cantidad eficaz de la fosfatasa alcalina o un polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina para el sujeto. Por ejemplo, la dosificación de la sALP (por ejemplo, un polipéptido que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 5 o una variante de esta con al menos 85 % de identidad de secuencia con esta (p. ej., un polipéptido que incluye una o más o todas las mutaciones E108M, N213Q y N286Q con respecto a la SEQ ID NO: 1 o 5)) puede
25 aumentarse, por ejemplo, de alrededor de 0,1-1 mg/kg/semana a alrededor de 1-2 m/kg/semana, de alrededor de 0,5-3 mg/kg/semana a alrededor de 3-6 mg/kg/semana o de alrededor de 3-6 mg/kg/semana a alrededor de 6-9 mg/kg/semana. De manera similar, la frecuencia de dosificación se puede aumentar, por ejemplo, de alrededor de una vez cada tres semanas a alrededor de una vez cada dos semanas o de alrededor de una vez cada dos
30 semanas a alrededor de una vez por semana. De manera alternativa, si se logra una mejora en uno de los indicadores descritas en este documento, la dosificación y/o la frecuencia de

administración pueden permanecer iguales o disminuir de, por ejemplo, alrededor de 6-9 mg/kg/semana a alrededor de 3-6 mg/kg/ semana, de alrededor de 3-6 mg/kg/semana a alrededor de 0,5-3 mg/kg/semana o de alrededor de 0,5-3 mg/kg/semana a alrededor de 0,1-1 mg/kg/semana. De manera similar, la frecuencia de dosificación de administración puede disminuir de alrededor de una vez por semana a alrededor de una vez cada dos semanas o de alrededor de una vez cada dos semanas a alrededor de una vez cada tres semana.

Parámetros farmacocinéticos (PK)

En algunas modalidades, el método de tratamiento produce un AUC_{0-168h} de alrededor de 50 μg x hora/mL a alrededor de 4000 μg x hora/mL en la sangre del sujeto. Por ejemplo, el método puede producir un AUC_{0-168h} de alrededor de 1000 μg x hora/mL a alrededor de 3000 μg x hora/mL en la sangre del sujeto. En algunas modalidades, el método de tratamiento produce una C_{max} de alrededor de 0,5 $\mu g/mL$ a alrededor de 25 $\mu g/mL$ en la sangre del sujeto. Por ejemplo, el método de tratamiento puede producir una C_{max} de alrededor de 0,6 $\mu g/mL$ a alrededor de 20 $\mu g/mL$ en la sangre del sujeto.

EJEMPLOS

La descripción se ilustra mediante los siguientes ejemplos no taxativos. Se ha de comprender que los ejemplos, materiales, cantidades y procedimientos particulares deben interpretarse en sentido amplio de acuerdo con el alcance y el espíritu de la descripción tal como se indica en la presente.

Ejemplo 1

La ALP201 es una proteína de fusión TNSALP-Fc-deca-aspartato recombinante humana. Es una glicoproteína soluble compuesta por dos cadenas polipeptídicas de 724 aminoácidos elaboradas a partir del dominio catalítico de la TNSALP humana (SwissProt, P05186), el dominio Fc de inmunoglobulina (Ig) humana G2/4 (SwissProt, P01859, P01861) (para facilitar la purificación y extender la semivida) y un péptido deca-aspartato (para dirigirse al hueso). La ALP201 es una ERT para abordar la causa subyacente de los trastornos de la mineralización ósea, tal como HPP, al reemplazar una enzima fosfatasa alcalina defectuosa. La ALP201 comparte cierta similitud estructural con la asfotasa alfa, también una ERT de proteína de fusión

TNSALP-Fc-deca-aspartato, que es el único tratamiento aprobado para sujetos con HPP de inicio pediátrico (comercializado bajo el nombre comercial STRENSIQ®).

La ALP201 es una terapia para HPP de última generación con una potencia equivalente y una actividad mejorada en comparación con la asfotasa alfa. La ALP201 también proporciona una mayor exposición debido a una semivida más larga, una eliminación de la fase α reducida y una mayor biodisponibilidad. Estas características mejoradas respaldan dosis más bajas e intervalos de dosificación más prolongados para ALP201, en relación con la asfotasa alfa. Se espera que la experiencia de los sujetos mejore al reducir los volúmenes de inyección y la frecuencia de dosificación, lo que también puede traducirse en menos reacciones en el lugar de la inyección.

ALP201

Características físicas y químicas

La ALP201 es una proteína de fusión Fc soluble con un peso molecular de alrededor de 160 KDa y está compuesta por dos cadenas polipeptídicas unidas covalentemente por dos enlaces disulfuro. Cada cadena polipeptídica contiene 724 aminoácidos y se compone de tres segmentos:

- La región de extremo N del polipéptido, los aminoácidos L1-A491, contiene la enzima TNSALP que es la parte soluble de la enzima fosfatasa alcalina no específica de tejido humano y contiene la función catalítica. Dentro de la región enzimática de cada cadena polipeptídica, se introdujo una mutación puntual única (E108M) para mejorar la actividad enzimática y se eliminaron dos sitios de glicosilación unidos a N (N213Q y N286Q) para mejorar el proceso.
- La segunda parte del polipéptido, los aminoácidos V492-K714, contiene la parte Fc de la inmunoglobulina gamma 2/4 (IgG2/4) humana que contiene los dominios bisagra, CH2 y CH3.
- La región de extremo C del polipéptido, los aminoácidos D715-D724, contiene diez ácidos aspárticos. Esta secuencia peptídica promueve la unión de ALP201 a la fase mineral del hueso.

Cada cadena polipeptídica de ALP201 contiene cuatro sitios de glicosilación (N123, N254, N413 y N564) y once residuos de cisteína (Cys). Cys102 existe como una cisteína libre. Cada cadena polipeptídica contiene cuatro enlaces disulfuro intracatenarios entre Cys122 a Cys184, Cys472 a Cys480, Cys528 a Cys588 y Cys634-Cys692. Las dos cadenas polipeptídicas están

conectadas por dos enlaces disulfuro intercatenarios entre Cys494-Cys494 y Cys497-Cys497. Además de estas características estructurales covalentes, las fosfatasa alcalinas de mamíferos generalmente tienen cuatro sitios de unión a metales en cada cadena polipeptídica, dos sitios para cinc, un sitio para magnesio y un sitio para calcio.

5 Propiedades generales de ALP201

La tabla 1 enumera las propiedades generales de ALP201. La fórmula química teórica y el peso molecular promedio teórico se calcularon asumiendo que todos los residuos de cisteína excepto dos están unidos por enlaces disulfuro.

Tabla 1: Propiedades generales de ALP201

Característica	Resultado
Fórmula prevista	C ₇₀₅₈ H ₁₀₉₂₈ N ₁₉₅₂ O ₂₁₉₈ S ₅₈ (aglicosilado)
Peso molecular previsto	160.154,6 Da (aglicosilado)
Número de aminoácidos	1448
Actividad biológica	Hidrólisis de pirofosfatasa (PPi) y piridoxal 5'-fosfato (PLP), unión a hidroxiapatita.

Producto farmacológico

Vial de ALP201 de 100 mg/mL

El producto farmacológico ALP201 (100 mg/mL) es una solución líquida formulada estéril y sin conservantes de ALP201 y excipientes contenidos en un vial de 2 mL de un solo uso. El producto farmacológico no contiene ningún excipiente nuevo o excipientes de origen animal o humano. Cada vial de 2 mL contiene nominalmente 1,2 mL (sobrellenado) del producto farmacológico para administrar 100 mg de ALP201/vial. El producto farmacológico se llena en un vial de vidrio transparente tipo I de 2 mL con un tapón de clorobutilo de 13 mm con sello de aluminio. La composición cuantitativa del producto farmacológico ALP201 se presenta en la Tabla 2.

Tabla2: Composición del producto farmacológico ALP201 para administración subcutánea o intravenosa

Ingrediente	Cantidad por vial	Función	Estándar
ALP201	100 mg/mL	Ingrediente activo	Estándar interno

Ingrediente	Cantidad por vial	Función	Estándar
Fosfato de sodio monobásico monohidratado	0,4 mg/mL	Agente de amortiguación	Multicompendial
Fosfato de sodio dibásico heptahidratado	1,9 mg/mL	Agente de amortiguación	Multicompendial
L-prolina	16,1 mg/mL	Estabilizador	Multicompendial
Sacarosa	47,9 mg/mL	Estabilizador/modificador de tonicidad	Multicompendial
Polisorbato 80	0,5 mg/mL	Inhibidor de adsorción	Multicompendial
Agua para inyección	Q.S.	Vehículo acuoso	Multicompendial

Abreviaturas: QS = cantidad suficiente.

Estudios *in vivo*

La ALP201 se evaluó mediante estudios *in vivo* para caracterizar su farmacología, PK/toxicocinética (TK), tolerabilidad local y toxicidad sistémica potencial. Los estudios de farmacología realizados incluyen estudios de dosis repetidas en ratones con HPP (ratones Akp2GW (-/-)), para identificar la dosis mínima eficaz de ALP201. Para comprender las propiedades PK de ALP201, se realizaron estudios PK de dosis única en ratones, ratas y monos. Los estudios de toxicología evaluaron la toxicidad sistémica de la administración de ALP201 SC en ratas y monos; estos estudios incluyeron criterios de valoración de farmacología de seguridad (estudio cardiovascular, respiratorio en monos y estudio neurofuncional en ratas), evaluaciones de TK y un período de recuperación para evaluar la reversibilidad de cualquier efecto relacionado con el tratamiento.

En la Tabla 3 se proporciona un resumen de los estudios *in vivo* realizados con ALP201 que respaldan su uso en humanos.

Tabla3: Información general de los estudios *in vivo* de ALP201

Estudio	Sistema de prueba/ Cantidad de animales	Método de administración y dosis (mg/kg)	Número del estudio	Resultados
Estudios de farmacología				
Estudio de eficacia de dosis múltiples de 36 días de ALP201 y asfotasa alfa en ratones con HPP	Ratones Akp2GW(-/-)	SC: 4,8 mg/kg en intervalos de dosificación qd, q2d y q1w SC: 4,8 mg/kg (días 1-24), 1,5 mg/kg (días 25-35)	HPP-PoC-01	La ALP201 demostró eficacia en el índice de mineralización ósea y los criterios de valoración de supervivencia en dosis más bajas e intervalos de dosificación más prolongados que los utilizados para la dosis eficaz de asfotasa alfa.
Ajuste de la dosis de ALP201 para determinar la mineralización ED85 en ratones Akp2GW -/-	Ratones Akp2GW(-/-)	SC: 0,15, 0,3, 0,8 o 2,0 mg/kg/dosis (dosificación q2d)	HPP-MED-01	La ALP201 demostró eficacia en el índice de mineralización ósea, la actividad de la fosfatasa alcalina ósea, la supervivencia y los criterios de valoración del nivel plasmático al final del estudio en dosis mucho más bajas que las utilizadas en HPP-PoC-01. Respuesta a la dosis para el índice de mineralización ósea observado para ALP201 en todas las dosis, en donde la dosis de 2,0 mg/kg q2d tuvo un rendimiento ligeramente mejor que la asfotasa alfa a 2,5 mg/kg qd.
Estudios farmacocinéticos				

Evaluación de la farmacocinética de dosis única de ALP201 después de la administración IV y SC en ratones C57BL/6 macho	Ratones C57BL/6	IV y SC: 4 mg/kg	HPP-PK-01	La semivida terminal después de la administración IV midió 48 horas. La biodisponibilidad absoluta después de la administración SC fue alta en 96 %. Los parámetros PK, incluida la exposición sistémica de ALP201 por AUC, mejoraron significativamente en relación con la asfotasa alfa.
---	-----------------	---------------------	-----------	--

Una evaluación de la farmacocinética de ALP201 después de la administración IV y SC en ratas	Ratas Sprague-Dawley 2M/2F por cohorte	Bolo IV: 1, 3, 9 o 27 mg/kg SC: 2 o 27 mg/kg	20205897	Después de la administración IV o SC, la PK de ALP201 medida por la actividad enzimática fue ligeramente menos que proporcional en el intervalo de dosis estudiado (1 a 27 mg/kg). La semivida terminal promedió alrededor de 2 días. La biodisponibilidad absoluta después de la administración SC fue de 61 % y 54 % para las dosis de 2 y 27 mg/kg, respectivamente. La dosis única de ALP201 administrada IV o SC (de 1 a 27 mg/kg) fue bien tolerada en ratas macho y hembra.
---	--	--	-----------------	--

Una evaluación de la farmacocinética de ALP201 después de la administración IV y SC en NHP	Monos Cynomolgus 3M por cohorte	Bolo IV: 2, 6 o 20 mg/kg SC: 2 o 20 mg/kg	20205899	Después de la administración IV o SC, la PK de ALP201 medida por la actividad enzimática fue cercana a proporcional a la dosis en el intervalo de dosis estudiado (2 a 20 mg/kg). La semivida de eliminación terminal promedió alrededor de 3 días. La biodisponibilidad absoluta después de la administración SC fue de 69,6 % y 86,9 % para las dosis de 2 y 20 mg/kg, respectivamente La dosis única de ALP201 administrada IV o SC (de 2 a 20 mg/kg) fue bien tolerada en primates no humanos macho.
---	---	---	-----------------	--

Estudios de seguridad no clínicos (toxicología y farmacología de seguridad)						
ALP201: un estudio de toxicidad de 28 días en ratas con un período de recuperación de 28 días	GLP	Ratas Sprague-Dawley	Dosis repetida SC: 0, 2, 10 o 30 mg/kg/dosis (q3d; total de 10 dosis) Dosis única IV: 0 o 10 mg/kg/dosis (para evaluar la biodisponibilidad absoluta SC)	Charles River Laboratories	1727-227.	No se observaron hallazgos notables de toxicidad orgánica sistémica o tolerabilidad local en ninguna de las dosis evaluadas en el estudio. No se observaron hallazgos notables de neurotoxicidad en ninguna de las dosis evaluadas en el estudio. Inmunogenicidad: (ADA positivos) se observaron respuestas en todas las dosis evaluadas en el estudio. La dosis alta de 30 mg/kg/dosis evaluada en el estudio es el NOAEL
ALP201: Un estudio de toxicidad de 28 días mediante inyección subcutánea en monos Cynomolgus con un período de recuperación de 28 días	GLP	Monos Cynomolgus	Dosis repetida SC: 0, 1, 5 o 20 mg/kg/dosis (q3d; total de 10 dosis)	Charles River Laboratories	1727-228.	No se observaron hallazgos notables de toxicidad orgánica sistémica o tolerabilidad local en ninguna de las dosis evaluadas en el estudio. No se observaron hallazgos notables cardiovasculares o respiratorios en ninguna de las dosis evaluadas en el estudio. Inmunogenicidad: (ADA positivos) se observaron respuestas en todas las dosis evaluadas en el estudio. La dosis alta de 20 mg/kg/dosis evaluada en el estudio es el NOAEL

Abreviaturas: F = hembra; GLP = Buenas Prácticas de Laboratorio; IV = intravenoso; M = macho; NOAEL = nivel sin efecto adverso observado; qd = una vez al día; q1w = una vez por semana; q2d = cada dos días; SC = subcutáneo; TBD = por determinar.

Farmacología *in vitro*

El pirofosfato (PPi) es un sustrato natural crítico de TNSALP, y los niveles bajos de TNSALP en sujetos con HPP dan como resultado niveles sanguíneos elevados de PPi circulante. Los niveles elevados de pirofosfato impiden la mineralización ósea adecuada y conducen a manifestaciones óseas anómalas observadas en sujetos con HPP. Por lo tanto, el PPi fue visto como un sustrato natural para dirigirse con niveles más altos de actividad enzimática en una molécula de asfotasa alfa de segunda generación modificada genéticamente.

Las curvas de saturación de sustrato para la hidrólisis de pirofosfato por ALP201 y asfotasa alfa se muestran en la Figura 1. La ALP201 conserva un valor de Km similar (47 mM) para el pirofosfato que la asfotasa alfa (53 mM), pero ALP201 opera con un número de recambio significativamente mayor ($k_{cat} = 11,619 \text{ min}^{-1}$ para ALP201 frente a $6,714 \text{ min}^{-1}$ para la asfotasa alfa). Los valores de Km similares para ALP201 y el dominio catalítico de TNSALP de tipo salvaje en la asfotasa alfa sugieren ALP201 no debería tener más probabilidades que la asfotasa alfa de reducir peligrosamente los niveles de PPi circulante cuando está presente en niveles séricos de actividad de fosfatasa alcalina equivalentes.

El piridoxil-5'-fosfato es un segundo sustrato natural de TNSALP con relevancia clínica para la HPP. La TNSALP escinde el PLP para formar piridoxal, el vitámero B6 que los tejidos absorben más fácilmente. Cuando los niveles de fosfatasa alcalina en suero son muy bajos, el metabolismo sistémico de la vitamina B6 puede verse afectado. En la HPP, la deficiencia de PLP en el cerebro se manifiesta como convulsiones, y las deficiencias sistémicas en la hidrólisis de PLP por TNSALP pueden desempeñar un papel en el dolor, la debilidad muscular y la hipotonía que experimentan algunos sujetos con HPP. Por lo tanto, la ERT para el tratamiento de HPP se puede utilizar para proporcionar suficiente actividad de hidrólisis de PLP.

Las curvas de saturación de sustrato para la hidrólisis de PLP por ALP201 y asfotasa alfa se muestran en la Figura 2. ALP201 tiene un valor de Km ligeramente más débil (2,76 mM) para PLP en comparación con la asfotasa alfa (1,71 mM), pero ALP201 opera con un número de recambio significativamente mayor ($k_{cat} = 3,324 \text{ min}^{-1}$ para ALP201 frente a $2,623 \text{ min}^{-1}$ para asfotasa alfa), lo que da como resultado curvas de saturación de actividad de PLP muy similares para las dos moléculas. Los parámetros cinéticos del sustrato se tabulan en la Tabla 4.

Tabla 4: Parámetros cinéticos para la hidrólisis del sustrato por ALP201 y asfotasa alfa

Sustrato	Construcción	Km (μM)	Kcat (min^{-1})
PPi	ALP201	46,8 +/- 5,7	11,619 +/- 449
	asfotasa alfa (Strensiq) STRENSIQ®	53,2 +/- 5,5	6,714 +/- 226
PLP	ALP201	2,76 +/- 0,3	3,324 +/- 97
	asfotasa alfa (Strensiq) STRENSIQ®	1,71 +/- 0,2	2,623 +/- 75

Abreviaturas: PPi = pirofosfato; PLP = piridoxil-5'-fosfato; Km = Constante de Michaelis-Menten: μM = micromolar; Kcat = constante catalítica para la velocidad de recambio; min = minuto.

Farmacología *in vivo*

- 5 Los estudios de eficacia preclínicos de ALP201 se realizaron con el ratón Akp2GW (-/-), que es un modelo animal de HPP humana. Los ratones Akp2GW (-/-) comparten la misma mutación de TNSALP inductora de HPP utilizada en los ratones Akp2 (-/-) que se utilizaron previamente en la evaluación preclínica de la asfotasa alfa. Los estudios de historia natural realizados en Alexion durante el desarrollo de los ratones Akp2GW (-/-) mostraron que los ratones homocigóticos
- 10 Akp2GW (-/-) sin actividad de TNSALP mostraban una mineralización ósea y un fenotipo de supervivencia casi idénticos a los ratones Akp2 (-/-) (Akp2GW -NH-01-02).

En los estudios de eficacia utilizados para evaluar la eficacia de ALP201 utilizando el modelo de ratón Akp2GW (-/-), las dosis de los artículos de prueba se administraron por vía subcutánea, comenzando el día 1 después del nacimiento hasta el día 35. Los resultados informados en

15 todos los estudios incluyeron la supervivencia general, la tasa de crecimiento del peso corporal, la mineralización ósea de los huesos de las patas traseras el día 36 (o al morir si era antes del final del estudio [EOS, por sus siglas en inglés]) y los niveles mínimos de actividad de enzimas en plasma de EOS (obtenidos el día 36 en los grupos de dosis todos los días [qd] y cada semana [q1w], y el día 37 en los grupos de dosis cada 2 días [q2d]). En algunos estudios, se

20 determinaron las longitudes de fémur y tibia EOS y la actividad de fosfatasa alcalina de fémur de ratón.

En estudios previos con ratones Akp2 (-/-), la asfotasa alfa demostró eficacia en ambos criterios de valoración del estudio, mineralización ósea y supervivencia general, a una dosis de 7 - 10 mg/kg/día para preparaciones activas de asfotasa alfa, dependiendo de la actividad específica

25 del artículo de prueba. La dosis mínima eficaz estimada (MED) de asfotasa alfa se definió como

la dosis que resultó en que el 85 % de los ratones medibles en un grupo obtuvieran una puntuación de mineralización ósea normal al final del estudio o al morir, si la muerte se produjo antes del final del estudio. Un análisis de los datos de eficacia situó este valor en aproximadamente 2,0 - 2,5 mg/kg/día, dependiendo de la actividad específica del artículo de prueba.

La eficacia de ALP201 en un modelo murino de HPP se probó en 2 estudios de dosis múltiples en dosis SC e intervalos de dosificación variables en ratones Akp2GW (-/-). En estos estudios, la eficacia de ALP201 se comparó con la eficacia observada en un grupo de control positivo al que se le administró asfotasa alfa por vía SC diariamente.

En un estudio anterior, la asfotasa alfa se dosificó mediante administración SC en su dosis totalmente eficaz de 9,8 mg/kg/día en una pauta de dosificación qd. Se dosificó una dosis de actividad de 4-MUP equivalente de ALP201 mediante administración SC en PBS en intervalos de dosificación qd, q2d y q1w. En un grupo de dosis, la dosis de ALP201 se redujo a la mitad del log después del destete de los ratones el día 25. Se usó la administración subcutánea de PBS en una pauta qd como control negativo. La tabulación de estos grupos de dosificación puede encontrarse en la Tabla 5.

En el estudio HPP-MED-01, la asfotasa alfa se dosificó mediante administración SC en su dosis mínima eficaz de 2,5 mg/kg/día en una pauta de dosificación qd. La ALP201 se administró por vía subcutánea en PBS en una pauta de dosificación q2d en dosis de 2,0, 0,8, 0,3 y 0,15 mg/kg.

Se usó la administración subcutánea de PBS en una pauta q2d como control negativo. La tabulación de estos grupos de dosificación puede encontrarse en la Tabla 5.

Tabla 5: Planes de estudio agrupados por dosis para estudios de eficacia de Akp2GW (-/-)

Estudio	Artículo de prueba	Dosis (mg/kg)	Dosis (actividad U MUP/kg)	Intervalo	Genotipo de ratón
HPP-PoC-01	ALP201	4,8	206	qd	Akp2GW (-/-)
HPP-PoC-01	ALP201	4,8 (días 1-24) 1,5 (días 25-35)	206 (días 1-24) 62 (días 25-35)	qd	Akp2GW (-/-)
HPP-PoC-01	ALP201	4,8	206	q2d	Akp2GW (-/-)
HPP-PoC-01	ALP201	4,8	206	q1w	Akp2GW (-/-)

HPP-PoC-01	asfotasa alfa	9,8	206	qd	Akp2GW (-/-)
HPP-PoC-01	PBS	NA	NA	qd	Akp2GW (-/-)
HPP-PoC-01	PBS	NA	NA	qd	Akp2GW (+/+)
HPP-MED-01	ALP201	2	78	q2d	Akp2GW (-/-)
HPP-MED-01	ALP201	0,8	31	q2d	Akp2GW (-/-)
HPP-MED-01	ALP201	0,3	11,6	q2d	Akp2GW (-/-)
HPP-MED-01	ALP201	0,15	5,8	q2d	Akp2GW (-/-)
HPP-MED-01	asfotasa alfa	2,5	54	qd	Akp2GW (-/-)
HPP-MED-01	PBS	NA	NA	q2d	Akp2GW (-/-)
HPP-MED-01	PBS	NA	NA	q2d	Akp2GW (+/+)

Abreviaturas: PBS = solución salina amortiguada con fosfato; q1w = una vez por semana; q2d = cada 2 días; qd = una vez al día; U MUP = Unidades de actividad en la hidrólisis del fosfato de 4-metilumbeliferil; NA = no aplicable.

5 Resultados de la mineralización ósea

Los resultados de la mineralización ósea del día 36/37 se determinaron mediante análisis de rayos X de las patas traseras de los ratones Akp2GW (-/-) tratados. La visualización de rayos X de la mineralización del hueso de la pata trasera se comparó con las imágenes de rayos X de referencia del día 36 que ejemplifican 4 categorías de clasificación: no afectado, déficit leve, déficit moderado y déficit grave. La descripción detallada de estas clasificaciones se puede encontrar en la Tabla 6. Individuos cegados asignaron una puntuación a las imágenes para cada ratón y, una vez completadas, las puntuaciones se compilaron dentro de los grupos de dosis individuales.

Tabla 6: Clasificación para la puntuación del índice de mineralización ósea de la pata trasera del día 36

Puntuación	Clasificación del déficit de mineralización ósea	Descripción de la gravedad –rayos X 2D de Faxitron	Descripción de la gravedad –rayos X 3D de CT
1	Grave	Dismorfología profunda y ausencia completa de falanges mediales y distales de los dedos y ausencia completa de centros de osificación secundarios	Dismorfología profunda y ausencia completa de falanges proximales y/o mediales y distales de los dedos y ausencia completa de centros de osificación secundarios con formación metatarsiana variable
2	Moderada	Dedos completamente formados, pero aún sin centros de osificación secundarios aparentes	Dedos completamente formados sin centros de osificación secundarios aparentes o centro/s secundario/s emergente/s variable/s, sesamoideos variables y formación metatarsiana variable
3	Leve	Dedos completamente formados, con centros de osificación secundarios variables pero incompletos	Dedos completamente formados con centro/s de osificación secundario/s faltante/s o centro/s con desarrollo variable, sesamoideo/s deformado/s y faltante/s con formación metatarsiana variable
4	Inafectado	Dedos completamente formados y todos los centros de osificación secundarios presentes	Dedos completamente formados con todos los centros de osificación secundarios presentes, todos los sesamoideos presentes con morfología variable y metatarsianos completamente formados.

La distribución de las puntuaciones del índice de mineralización ósea de la pata trasera de EOS observadas para cada grupo de dosificación se puede encontrar en la Tabla 7.

Tabla 7: Distribución del índice de mineralización ósea al final del estudio de los huesos de la pata trasera en grupos de ratones Akp2GW (-/-) tratados

Grupo de dosis	Cantidad en el grupo	Cantidad de no afectados	Cantidad déficit leve	Cantidad déficit moderado	Cantidad déficit grave
-----------------------	-----------------------------	---------------------------------	------------------------------	----------------------------------	-------------------------------

		(Puntuación = 4)	(Puntuación = 3)	(Puntuación = 2)	(Puntuación = 1)
WT PBS	20	20 (100 %)	0	0	0
ALP201 4,8 qd	25	25 (100 %)	0	0	0
ALP201 4,8/1,5 qd	17	17 (100 %)	0	0	0
ALP201 4,8 q2d	24	24 (100 %)	0	0	0
ALP201 2,0 q2d	31	29 (93,5 %)	2 (6,5 %)	0	0
ALP201 0,8 q2d	29	18 (62,1 %)	11 (37,9 %)	0	0
ALP201 0,3 q2d	31	18 (58,1 %)	10 (32,3 %)	1 (3,2 %)	2 (6,5 %)
ALP201 0,15 q2d	29	14 (48,3 %)	9 (31,0 %)	6 (20,7 %)	0
ALP201 4,8 q1w	19	14 (73,7 %)	2 (10,5 %)	3 (15,8 %)	0
asfotasa alfa 9,8 qd	16	16 (100 %)	0	0	0
asfotasa alfa 2,5 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 %)

Abreviaturas: HOM = homocigoto inactivado; PBS = solución salina amortiguada con fosfato; qd = todos los días; q2d = cada 2 días; q1w = una vez por semana; WT = tipo salvaje.

5 El tratamiento de ratones Akp2GW (-/-) con ALP201 mostró una respuesta a la dosis de un porcentaje creciente de ratones con mineralización ósea de la pata trasera no afectada al aumentar la dosis de ALP201 en el intervalo de dosificación Q2D. Todos los grupos de dosis de ALP201 demostraron una mejora estadísticamente significativa con respecto a los controles Akp2GW (-/-) tratados con PBS ($p < 0,001$ mediante análisis ANOVA unidireccional). Estos datos se utilizaron para informar los análisis basados en modelos y las proyecciones de dosis humanas previstas.

Resultados de concentración mínima de enzimas activas en plasma al final del estudio

15 Las concentraciones plasmáticas mínimas de enzima TNSALP activa en plasma se determinaron mediante la medición de los niveles de actividad de TNSALP en las muestras de plasma de los días 36/37. La actividad de TNSALP medida se ajustó a una curva estándar de concentración y actividad enzimática conocida para cuantificar los niveles de enzima activa por unidad de volumen de plasma. La distribución de la concentración mínima de enzima activa en plasma de EOS se muestra en la Figura 3. En la Tabla 8 se resume una tabulación de la concentración mínima media de enzima activa en plasma de EOS por grupo de dosis.

20 **Tabla 8: Niveles de actividad de las enzimas y concentraciones mínimas medias de enzimas activas en plasma al final del estudio agrupados por dosis**

Estudio	Artículo de prueba	Dosis (mg/kg)	Intervalo	Cantidad de dosis en el estudio	Nivel medio de actividad plasmática mínima de EOS (Unidades de hidrólisis de 4-MUP/L)	Concentración media enzimática de EOS (µg/mL)	Día de recolección
HPP-POC-01	ALP201	4,8	qd	35	1805,2 ± 321,9	42,0 ^a	36
HPP-POC-01	ALP201	4,8/1,5	qd	35	805,8 ± 235,0	18,7 ^a	36
HPP-POC-01	ALP201	4,8	q2d	18	728,1 ± 162,4	16,9 ^a	37
HPP-MED-01	ALP201	2	q2d	18	235,4 ± 58,7	6,1 ^c	37
HPP-MED-01	ALP201	0,8	q2d	18	134,9 ± 27,6	3,5 ^c	37
HPP-MED-01	ALP201	0,3	q2d	18	54,5 ± 14,9	1,4 ^c	37
HPP-MED-01	ALP201	0,15	q2d	18	22,6 ± 9,4	0,6 ^c	37
HPP-POC-01	ALP201	4,8	qw	5	21,2 ± 13,7	0,5 ^a	36
HPP-POC-01	asfotasa alfa	9,8	qd	35	129,5 ± 81,9	6,2 ^b	36
HPP-MED-01	asfotasa alfa	2,5	qd	35	20,2 ± 13,9	0,9 ^d	36
HPP-MED-01-WT	PBS - WT	NA	NA	NA	1,7 ± 2,9	NA	36

Nota: Cálculo de la concentración media de enzimas al final del estudio en (µg/mL) = Nivel medio de actividad plasmática mínima de EOS (unidades de hidrólisis de 4-MUP/L) / actividad específica de la proteína (U/mg).

a Actividad específica de ALP201 utilizada en el estudio = 43 U/mg

5 b Actividad específica de asfotasa alfa utilizada en el estudio = 21 U/mg

c Actividad específica en ALP201 utilizada en el estudio = 38,8 U/mg

d Actividad específica de asfotasa alfa utilizada en el estudio = 21,5 U/mg

Abreviaturas: EOS = final del estudio; 4-MUP = fosfato de 4-metilumbeliferil; NA = no aplicable;

PBS = solución salina amortiguada con fosfato; qw = una vez por semana; q2d = cada 2 días;

qd = todos los días; WT = tipo salvaje.

El análisis de la enzima activa en plasma mínima de EOS y los niveles de actividad enzimática correspondientes en ratones Akp2GW (-/-) tratados después de múltiples dosis muestra claramente una mayor acumulación absoluta y una acumulación normalizada por dosis de ALP201 en comparación con la asfotasa alfa, presumiblemente debido al perfil PK superior de ALP201 tras la administración SC.

Niveles de actividad de enzimas óseas de final del estudio en ratón Akp2GW (-/-) tratado en día 36/37

Los niveles de actividad de la fosfatasa alcalina en tejido de fémur de ratón Akp2GW (-/-) tratado se determinaron en un ensayo ex vivo al final del estudio HPP-MED-01, usando 4-MUP como sustrato. En este ensayo, solo se analizó la actividad de la parte mineralizada del fémur para evitar la posible contaminación con sangre o tejido altamente perfundido que aún podría contener niveles altos de ALP201 o asfotasa alfa. La distribución de los niveles de actividad enzimática vinculada a los fémures de ratón Akp2GW (-/-) tratados se muestra en la Figura 4, con datos mostrados en microunidades de actividad de hidrólisis de 4-MUP/mg de tejido de fémur mineralizado.

Tabla 9: Concentraciones medias de enzimas activas del fémur al final del estudio agrupadas por dosis

Estudio	Artículo de prueba	Dosis (mg/kg)	Intervalo	Cantidad de dosis en el estudio	Nivel medio de actividad del fémur de EOS $\pm$ SD (microunidades de hidrólisis de 4-MUP/mg de hueso)	Día de recolección
HPP-MED-01	ALP201	2	q2d	18	26,5 $\pm$ 9,4	37
HPP-MED-01	ALP201	0,8	q2d	18	20,8 $\pm$ 6,6	37
HPP-MED-01	ALP201	0,3	q2d	18	18,6 $\pm$ 6,5	37
HPP-MED-01	ALP201	0,15	q2d	18	13,0 $\pm$ 5,9	37
HPP-MED-01	asfotasa alfa	2,5	qd	35	14,8 $\pm$ 5,3	36
HPP-MED-01	PBS - WT	NA	NA	NA	60,6 $\pm$ 19,6	37

Abreviaturas: 4-MUP = fosfato de 4-metilumbeliferil; PBS = solución salina amortiguada con

fosfato; q1w = una vez por semana; q2d = cada 2 días; qd = todos los días; WT = tipo salvaje; mg = miligramos; SD = desviación estándar; NA = no aplicable

Los datos de actividad ósea mostraron una respuesta a la dosis con aumento de los niveles de actividad del tejido óseo al EOS al aumentar la dosis de ALP201. Al final del estudio, los ratones del grupo de ALP201 de 0,15 mg/kg q2d tenían un 22,6 % de actividad de fosfatasa alcalina de tipo salvaje recuperada, en comparación con el 26,9 % del grupo de asfotasa alfa de 2,5 mg/kg qd. Las dosis de ALP201 de 0,3, 0,8 y 2,0 mg/kg q2d recuperaron el 34,4 %, el 37,6 % y el 44,9 % de la actividad de tipo salvaje, respectivamente. Las diferencias en el nivel de actividad ósea al final del estudio entre las dosis de ALP201 de 0,8 y 2,0 mg/kg q2d fueron estadísticamente significativas con respecto al grupo de asfotasa alfa 2,5 mg/kg q2d cuando se analizó con un ANOVA unidireccional con valores de p ajustados de 0,0048 y <0,0001, respectivamente.

Resultados de supervivencia de ratones Akp2GW (-/-) tratados

Todos los Akp2GW (-/-) tratados con PBS murieron el día 26 de los estudios o antes, con una mediana de supervivencia de 20 días. El tratamiento con ALP201 de ratones Akp2GW (-/-) mejoró significativamente las tasas de supervivencia a los 36 días en todos los grupos de dosis en relación con el control del vehículo PBS (Figura 5 y Tabla 10). Todos los grupos de dosificación de ALP201 alcanzaron tasas de supervivencia al EOS de al menos el 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 general del 88 % o más. Las curvas de supervivencia para el grupo de ALP201 de 4,8 mg/kg q1w y el grupo de asfotasa alfa 9,8 mg/kg qd tienen resultados muy similares.

Tabla 10: Resumen del porcentaje de supervivencia de los grupos de ratones Akp2GW (-/-) tratados en estudios de eficacia de 36 días

Estudio	Artículo de prueba	Dosis (mg/kg)	Intervalo	Supervivencia al final del estudio (%)
HPP-PoC-01	ALP201	4,8	qd	100
HPP-PoC-01	ALP201	4,8/1,5	qd	100
HPP-PoC-01	ALP201	4,8	q2d	96
HPP-MED-01	ALP201	2	q2d	94

HPP-MED-01	ALP201	0,8	q2d	97
HPP-MED-01	ALP201	0,3	q2d	88
HPP-MED-01	ALP201	0,15	q2d	69
HPP-PoC-01	ALP201	4,8	q1w	83
HPP-PoC-01	asfotasa alfa	9,8	qd	81
HPP-MED-01	asfotasa alfa	2,5	qd	96
HPP-PoC-01	PBS	NA	NA	0
HPP-MED-01	PBS	NA	NA	0

Abreviaturas: MED = dosis eficaz mínima; PBS = solución salina amortiguada con fosfato; PoC = prueba de concepto; qd = todos los días; q2d = cada 2 días; q1w = una vez a la semana; NA = no aplicable.

5 Resultados de peso corporal

El peso corporal medio de los ratones Akp2GW (-/-) tratados con ALP201 y asfotasa alfa en todos los grupos fue constantemente más bajo que el de sus compañeros de camada de tipo salvaje tratados con PBS. El peso corporal al final del estudio para todos los grupos de dosificación de ALP201 no fue estadísticamente diferente de los grupos de dosificación de asfotasa alfa.

Farmacología de seguridad

No se realizaron estudios farmacológicos de seguridad independientes para ALP201. Sin embargo, los criterios de valoración cardiovasculares, respiratorios y de presión arterial se midieron como parte del estudio fundamental de toxicidad en monos que cumple con las GLP y los criterios de valoración neurofuncionales se evaluaron como parte del estudio de toxicidad de GLP en ratas. El tratamiento con ALP201 resultó en aumentos en la frecuencia cardíaca (28 % en comparación con el grupo de control) solo en el grupo de dosis baja, con disminuciones asociadas en los intervalos RR, PR, QT y sin cambios notables en la duración del QRS; no se observaron cambios biológicamente significativos en los grupos de dosis media y alta. Por lo tanto, no hubo una relación dosis-respuesta entre los ligeros aumentos en la frecuencia cardíaca y la dosis de ALP201. Dado que los aumentos de la frecuencia cardíaca fueron moderados en magnitud, estos hallazgos no se consideran adversos. Además, no hubo hallazgos relacionados con ALP201 en los parámetros de ECG, presión arterial o respiratorios evaluados en monos después de la administración SC una vez cada 3 días durante 28 días

hasta la dosis más alta, 20 mg/kg, evaluada en el estudio. La ALP201 no tuvo efectos sobre los índices de comportamiento o la actividad motora en ratas después de la administración SC una vez cada 3 días durante 28 días hasta la dosis más alta, 30 mg/kg, evaluada en el estudio.

5 **Farmacocinética y metabolismo del fármaco en animales**

Se realizaron estudios PK de dosis única en ratones, ratas y monos. Los datos de estos estudios se utilizaron para evaluar la disposición (absorción, distribución y eliminación) de ALP201 en especies preclínicas.

10 **Absorción**

La PK de ALP201 se evaluó en la rata Sprague-Dawley y el mono Cynomolgus. En este documento se presentan resúmenes de los estudios GLP y no GLP después de la administración de dosis única y repetida de ALP201.

La biodisponibilidad media fue del 96 %, 58 % y 78 % para ratón, rata y mono, respectivamente.

- 15 El tiempo para alcanzar la concentración máxima (t_{max}) osciló entre 17 y 48 horas después de la dosificación, lo que sugiere una absorción lenta de ALP201 desde el sitio de inyección SC.

Distribución

- 20 Después de la administración intravenosa única en ratones, ratas y monos, el volumen de distribución aparente de ALP201 osciló entre 0,08 y 0,15 L/kg. Este valor fue mucho mayor (> 2 veces) que el volumen plasmático en estas especies, lo que indica la distribución de ALP201 más allá del compartimento intravascular.

Farmacocinética en estudios de dosis única

25

PK de dosis única en ratones C57BL/6 macho (estudio HPP-PK-01)

- 30 La PK de ALP201 se evaluó después de la administración de una dosis única IV o SC a ratones C57BL/6 macho. Dieciséis animales recibieron una única administración IV o SC de ALP201 a una dosis de 4 mg/kg. Para cada vía de administración, los ratones se subdividieron aleatoriamente en 4 cohortes de muestreo de 4 ratones cada una. Las muestras de sangre se recogieron mediante un diseño de muestreo semiserie por hasta 20 días después de la

administración de la dosis. Los Parámetros PK de ALP201 se resumen en la Tabla 11.

Tabla 11: Parámetros PK de ALP201 después de la administración IV y SC en ratones C57BL/6

Vía	Dosis (mg/kg)	C _{max} (µg/mL)	t _{max} (h)	t _{1/2} (h)	AUC _t (µg*h/mL)	AUC _∞ (µg*h/mL)	V _d o V _d /F (L/kg)	CL o CL/F (L/h/kg)	F (%)
IV	4	93,3	1	48,1	2070,1	2114,3	0,13	0,0019	NA
SC	4	15,2	48	85,2	1828,7	2030,3	0,24	0,0020	96

- 5 Abreviaturas: AUC_∞ = área bajo la curva de concentración y tiempo desde el tiempo cero (dosificación) extrapolada al infinito; AUC_t = área bajo la curva de concentración y tiempo desde el tiempo cero (dosificación) hasta la última concentración detectable; CL o CL/F = eliminación total; C_{max} = concentración plasmática máxima observada; F = biodisponibilidad absoluta; IV = intravenoso; NA = no aplicable; SC = subcutáneo; t_{max} = tiempo hasta la concentración plasmática máxima observada; t_{1/2} = semivida de eliminación terminal; V_d o V_d/F = volumen
10 aparente de distribución

Después de la administración IV, el perfil de concentración-tiempo disminuyó de manera multiexponencial. La CL fue de 0,0019 L/h/kg y la t_{1/2} terminal aparente fue de 48 horas (Tabla
15 11

Tabl). El V_d fue de 0,13 L/kg, que es mayor que el volumen plasmático en ratones, lo que indica una distribución de ALP201 más allá del espacio intravascular. Después de la administración SC, el tiempo para alcanzar la concentración máxima (t_{max}) fue de 48 horas después de la dosis, lo que sugiere una absorción relativamente lenta desde el lugar de la inyección SC. La
20 biodisponibilidad absoluta después de la administración SC fue de un 96 %.

Estudio PK de dosis única en ratas

La PK de ALP201 se evaluó después de la administración única IV o SC a ratas. Cuatro
25 animales (2 por sexo/dosis) recibieron una única dosis ascendente IV o SC (bolo IV a dosis de 1, 3, 9 o 27 mg/kg o SC a dosis de 2 o 27 mg/kg) de ALP201. Las concentraciones plasmáticas

de ALP201 fueron cuantificables hasta 28 días después de la dosis. Dado que no se observaron diferencias aparentes específicas del sexo en los parámetros PK de ALP201, se proporcionan valores de ambos sexos agrupados. Las estadísticas descriptivas de los parámetros PK de ALP201 se resumen para los grupos de sexos agrupados en la Tabla 12. Los perfiles de concentración plasmática media de ALP201 frente al tiempo se muestran en la Figura 14; tener en cuenta que los datos históricos de asfotasa alfa se agregan para permitir la comparación.

Tabla 12: Parámetros PK medios ($\pm$ SD) de ALP201 después de la administración IV y SC en ratas

Vía	Dosis (mg/kg)	N	$t_{1/2}$ (h)	t_{max} (h)	C_{max} (μ g/mL)	AUC_t (h $\times$ μ g/mL)	AUC_{∞} (h $\times$ μ g/mL)	V_d o V_d/F (L/kg)	CL o CL/F (L/h/kg)
IV	1	4	66,6 $\pm$ 5,6	0,5 $\pm$ 0,0	22,4 $\pm$ 0,8	716,5 $\pm$ 47,3	802,1 $\pm$ 60,1	0,12 $\pm$ 0,02	0,0012 $\pm$ 0,0001
IV	3	4	58,7 $\pm$ 14,0	0,6 $\pm$ 0,3	65,7 $\pm$ 1,5	1811,2 $\pm$ 142,3	1934,4 $\pm$ 196,0 (10,1)	0,13 $\pm$ 0,04	0,0015 $\pm$ 0,0002
IV	9	4	63,7 $\pm$ 12,6	0,8 $\pm$ 0,3	194,1 $\pm$ 26,7	5299,7 $\pm$ 435,0	5374,1 $\pm$ 442,9	0,15 $\pm$ 0,03	0,0017 $\pm$ 0,0001
IV	27	4	43,6 $\pm$ 12,2	0,5 $\pm$ 0,0	559,1 $\pm$ 25,4	14089,0 $\pm$ 2003,9	14234,3 $\pm$ 2053,1	0,12 $\pm$ 0,03	0,0019 $\pm$ 0,0002
SC	2	4	55,1 $\pm$ 6,7	48,0 $\pm$ 0,0	8,1 $\pm$ 1,9	869,0 $\pm$ 123,4	1007,7 $\pm$ 124,6	0,16 $\pm$ 0,03	0,0020 $\pm$ 0,0002
SC	27	4	38,3 $\pm$ 6,9	30,4 $\pm$ 11,7	82,2 $\pm$ 19,6	7188,2 $\pm$ 1201,9	7674,2 $\pm$ 1406,1	0,19 $\pm$ 0,03	0,0036 $\pm$ 0,0007

10 Abreviaturas: Abreviaturas: AUC_{∞} = área bajo la curva de concentración y tiempo desde el tiempo cero (dosificación) extrapolada al infinito; AUC_t = área bajo la curva de concentración y tiempo desde el tiempo cero (dosificación) hasta la última concentración detectable; CL o CL/F = eliminación total; C_{max} = concentración plasmática máxima observada; IV = intravenoso; SC = subcutáneo; SD = desviación estándar; t_{max} = tiempo hasta la concentración plasmática máxima observada; $t_{1/2}$ = semivida de eliminación terminal; V_d o V_d/F = volumen aparente de distribución.

15

Para la administración IV, la exposición PK de ALP201 ($C_{\max}$ y AUC_{∞}) aumentó de manera ligeramente menor que proporcional a la dosis en el rango de dosis estudiado de 1 mg/kg a 27 mg/kg. La CL media y el V_d de ALP201 se mantuvieron constantes en todas las dosis. Los valores medios de CL oscilaron entre 0,0012 y 0,0019 L/h/kg y los valores medios de V_d oscilaron entre 0,12 y 0,15 L/kg. De manera similar, la $t_{1/2}$ de ALP201, que se mantuvo relativamente similar en todas las dosis IV, promedió alrededor de 2 días. Para la administración SC, los valores de CL/F, V_d/F y $t_{1/2}$ fueron similares a los estimados para la administración IV, excepto para el grupo de dosis SC de 27 mg/kg, que pareció ser un valor atípico. El $t_{\max}$ medio osciló entre 30 y 48 horas después de la dosis, lo que sugiere una absorción relativamente lenta desde el sitio de inyección SC. La biodisponibilidad absoluta después de la administración SC fue de 61 % y 54 % para las dosis de 2 y 27 mg/kg, respectivamente.

Estudio PK de dosis única en monos

La PK de ALP201 se evaluó después de la administración única IV o SC a monos. Tres monos macho recibieron una única dosis ascendente IV o SC (bolo IV a dosis de 2, 6 o 20 mg/kg o SC a dosis de 2 o 20 mg/kg) de ALP201. Las concentraciones plasmáticas de ALP201 fueron cuantificables hasta 28 días después de la dosis. Las estadísticas descriptivas para parámetros PK de ALP201 se resumen en la Tabla 13. Los perfiles de concentración plasmática media de ALP201 frente al tiempo se muestran en la Figura 15. Tener en cuenta que los datos históricos para asfotasa alfa se agregan para permitir la comparación.

Tabla 13: Parámetros PK medios ($\pm$ SD) de ALP201 después de la administración única IV o SC en monos

Vía	Dosis (mg/kg)	N	$T_{\max}$ (h)	$C_{\max}$ (μ g/mL)	$t_{1/2}$ (h)	AUC_t (h $\times$ μ g/mL)	AUC_{∞} (h $\times$ μ g/mL)	V_d o V_d/F (L/kg)	CL o CL/F (L/h/kg)
IV	2	3	0,7 $\pm$ 0,3	48,0 $\pm$ 6,6	68,3 $\pm$ 5,7	2298,4 $\pm$ 212,5	2358,5 $\pm$ 232,5	0,08 $\pm$ 0,00	0,0008 $\pm$ 0,0001
IV	6	3	0,7 $\pm$ 0,3	146,5 $\pm$ 12,6	66,8 $\pm$ 8,4	6394,2 $\pm$ 519,0	6814,7 $\pm$ 885,3	0,09 $\pm$ 0,02	0,0009 $\pm$ 0,0001

IV	20	3	2,4 ± 3,2	416,7 ± 166,6	60,4 ± 20,8	17838,9 ± 2737,0	18248,2 ± 2530,2	0,10 ± 0,03	0,0011 ± 0,0002
SC	2	3	17,4 ± 13,3	13,7 ± 2,4	72,7 ± 5,8	1593,4 ± 168,5	1665,3 ± 187,9	0,13 ± 0,01	0,0012 ± 0,0001
SC	20	3	18,8 ± 10,9	149,9 ± 17,7	62,0 ± 13,2	14064,2 ± 835,3	15662,6 ± 189,0	0,11 ± 0,02	0,0013 ± 0,0

Abreviaturas: Abreviaturas: AUC_{∞} = área bajo la curva de concentración y tiempo desde el tiempo cero (dosificación) extrapolada al infinito; AUC_t = área bajo la curva de concentración y tiempo desde el tiempo cero (dosificación) hasta la última concentración detectable; CL o CL/F = eliminación total; C_{max} = concentración plasmática máxima observada; CV = coeficiente de variación; IV = intravenoso; SC = subcutáneo; SD = desviación estándar; t_{max} = tiempo hasta la concentración plasmática máxima observada; $t_{1/2}$ = semivida de eliminación terminal; V_d o V_d = volumen aparente de distribución.

Para la administración IV, los aumentos en los valores de C_{max} y AUC_{∞} fueron cercanos a proporcionales a la dosis en el rango de dosis estudiado de 2 mg/kg a 20 mg/kg. La CL y el V_d de ALP201 permanecieron constantes en todas las dosis, los valores medios de CL oscilaron entre 0,0008 y 0,0011 L/h/kg y los valores medios de V_d oscilaron entre 0,08 y 0,10 L/kg. La $t_{1/2}$ de ALP201, que también se mantuvo relativamente similar en todas las dosis, promedió alrededor de 3 días. Para la administración SC, los valores medios de CL/F, V_d/F y $t_{1/2}$ fueron congruentes con los estimados después de la administración IV. El t_{max} medio osciló entre 17 y 19 horas después de la dosis, lo que sugiere una absorción relativamente lenta desde el sitio de inyección SC. La biodisponibilidad absoluta fue de 69,6 % y 86,9 % para las dosis de 2 mg/kg y 20 mg/kg, respectivamente.

20 Estudios de toxicocinética de dosis repetidas con ALP201

Administración SC de cuatro semanas en ratas (1727-227): ALP201 se administró por vía SC a ratas a 2, 10 o 30 mg/kg/dosis una vez cada 3 días durante 4 semanas. Además, se administró ALP201 por vía intravenosa a ratas con una dosis única de 10 mg/kg para comparar la biodisponibilidad por vía IV y SC. Los parámetros farmacocinéticos se calcularon utilizando un

análisis no compartimental a partir de las concentraciones plasmáticas compuestas de ALP201 después de la dosificación del día 0 y el día 24 y se muestran en la Tabla 14.

La exposición sistémica a ALP201 pareció ser independiente del sexo luego de la administración SC de ALP201 los días 0 y 24 y luego de una única inyección en bolo IV de ALP201 el día 0. Luego de la administración SC de ALP201 cada 3 días, los valores de C_{max} y $AUC_{0-72 h}$ para ALP201 aumentaron con el aumento de la dosis de una manera ligeramente menor que la proporcional a la dosis en los días 0 y 24. La exposición sistémica (AUC_{0-72h}) a ALP201 pareció disminuir después de la administración SC repetida. La reducción de la exposición pareció ser dependiente de la dosis con una reducción máxima de hasta 2 veces después de la administración SC repetida de 30 mg/kg de ALP201. La biodisponibilidad subcutánea de ALP201 (basada en valores de $AUC_{0-72 h}$ a 10 mg/kg) fue de aproximadamente 44,2 %.

Tabla 14: Parámetros toxicocinéticos después de la administración IV única o SC repetida durante 4 semanas en ratas

Vía	Dosis (mg/kg)	Día	C_{max} (µg/mL)	$C_{max}/dosis$ (µg/mL)/(mg/kg)	T_{max} (h)	$AUC_{0-72 h}$ (h×µg/mL)	$AUC_{0-72 h}/dosis$ (h×µg/mL)/(mg/kg)	$AUC_{0-168 h}$ (h×µg/mL)	R^a	F^b (%)
SC	2	0	7,94	3,97	48	429	214	1320	NA	NA
SC	2	24	6,13	3,06	24	338	169	841	0,789	NA
SC	10	0	30,4	3,04	24	1630	163	4810	NA	44,2
SC	10	24	22,5	2,25	24	1200	120	2760	0,735	NA
SC	30	0	79,9	2,66	24	4150	138	11600	NA	NA
SC	30	24	43,9	1,46	24	2120	70,7	4380	0,512	NA
IV	10	0	195	19,5	2	3690	4720	NA	NA	NA

^a: $R = AUC_{0-72 h} \text{ día 24} / AUC_{0-72 h} \text{ día 0}$.

^b: $F = AUC_{0-72 h} \text{ del grupo de dosis SC de 10 mg/kg día 0} / AUC_{0-72 h} \text{ grupo de dosis IV de 10 mg/kg día 0} * 100$

Abreviaturas: $AUC_{0-72 h}$ = Área bajo la curva de concentración plasmática-tiempo de 0 a 72 horas;

$AUC_{0-168\text{ h}}$ = Área bajo la curva de concentración plasmática-tiempo de 0 a 168 horas; C_{max} = concentración plasmática máxima observada; IV = intravenosa; SC = subcutánea; NA = no aplicable; T_{max} = tiempo hasta la concentración plasmática máxima observada.

- 5 Administración SC durante cuatro semanas en monos: ALP201 se administró por vía SC a monos a 1, 5 o 20 mg/kg/dosis una vez cada 3 días durante 4 semanas. Los parámetros PK se calcularon utilizando un análisis no compartimental a partir de las concentraciones plasmáticas de ALP201 después de la dosificación del día 1 y el día 24 y se muestran en la Tabla 15.

Tabla 15: Parámetros toxicocinéticos de ALP201 después de la administración SC repetida durante 4 semanas en monos

Dosis (mg/kg)	Día	C_{max} (µg/mL)	$C_{\text{max}}/\text{dosis}$ (µg/mL)/(mg/kg)	T_{max}^a (h)	$AUC_{0-72\text{ h}}$ (h×µg/mL)	$AUC_{0-72\text{ h}}/\text{dosis}$ (h×µg/mL)/(mg/kg)	$AUC_{0-168\text{ h}}$ (h×µg/mL)	R^b
1	0	6,73	6,73	48	391	391	1440	NA
1	24	10,9	10,9	NA	787	787	2200	2,12
5	0	29,2	5,85	48	1720	345	6030	NA
5	24	38,1	7,62	24	2870	575	6970	1,83
20	0	125	6,25	48	7310	366	27900	NA
20	24	254	12,7	24	15400	772	36800	2,15

a: Mediana (mínimo – máximo), el valor de la mediana solo se informa si hay un intervalo de recopilación real

b: $R = AUC_{0-72\text{ h}} \text{ día } 24 / AUC_{0-72\text{ h}} \text{ día } 0$.

Abreviaturas: $AUC_{0-72\text{ h}}$ = Área bajo la curva de concentración plasmática-tiempo de 0 a 72 horas;

- 15 $AUC_{0-168\text{ h}}$ = Área bajo la curva de concentración plasmática-tiempo de 0 a 168 horas; C_{max} = concentración plasmática máxima observada; IV = intravenosa; NA = no aplicable; SC = subcutánea; T_{max} = tiempo hasta la concentración plasmática máxima observada.

- 20 La exposición sistémica a ALP201 pareció ser independiente del sexo luego de la administración SC de ALP201 en los días 0 y 24. Después de la administración subcutánea de ALP201 cada 3 días, los valores de C_{max} y $AUC_{0-72\text{ h}}$ para ALP201 aumentaron con el aumento de la dosis de manera aproximadamente proporcional a la dosis en los días 0 y 24. La exposición sistémica (valores de $AUC_{0-72\text{ h}}$) a ALP201 pareció aumentar después de la administración subcutánea repetida de ALP201 el día 24.

Farmacocinética, farmacodinámica e inmunogenicidad en estudios de dosis repetida

Estudio de toxicidad de 28 días en ratas con un período de recuperación de 28 días

La TK/ADA de ALP201 se evaluó en ratas macho y hembra después de la administración SC de 2, 10 o 30 mg/kg una vez cada tres días (10/sexo/grupo de dosis, 5/sexo/punto temporal) durante 4 semanas (un total de 10 dosis) y una única dosis IV de 10 mg/kg (total de 1 dosis). Se recolectaron muestras de sangre para el análisis de TK durante un período de 72 horas de todos los animales a partir de los días 0 y 24. Los Parámetros PK de ALP201 se resumen en la Tabla 16.

Tabla 16 Parámetros PK medios de ALP201 el día 0 y día 24 después de la administración SC repetida o IV única en ratas

Vía	Dosis (mg/kg)	Día	C _{max} (µg/mL)	t _{max} (h)	AUC _{72 h} (h×µg/mL)	AUC _{168h} ^a (h×µg/mL)	R ^b	F ^c (%)
SC	2	0	7,94	48	429	1320	NA	NA
SC	2	24	6,13	24	338	841	0,789	NA
SC	10	0	30,4	24	1630	4810	NA	44,2
SC	10	24	22,5	24	1200	2760	0,735	NA
SC	30	0	79,9	24	4150	11600	NA	NA
SC	30	24	43,9	24	2120	4380	0,512	NA
IV	10	0	195	2	3690	NA	NA	NA

^aLos valores de AUC_{168 h} se calcularon el día 0 y el día 18

^bR = AUC_{72 h} día 24/AUC_{72 h} día 0.

^cF = AUC_{72 h} a partir de grupo de dosis SC de 10 mg/kg día 0/AUC_{72 h} grupo de dosis IV de 10 mg/kg día 0 * 100

Abreviaturas: AUC_{72 h}= área bajo la curva de concentración plasmática-tiempo de 0 a 72 horas; AUC_{168 h}= área bajo la curva de concentración plasmática-tiempo de 0 a 168 horas; C_{max}= concentración plasmática máxima observada; F = biodisponibilidad; IV = intravenosa; SC = subcutánea; NA = no aplicable; t_{max}= tiempo hasta la concentración plasmática máxima observada; R= cociente de acumulación

La exposición sistémica a ALP201 pareció ser independiente del sexo luego de la administración SC repetida de ALP201 y después de una única inyección en bolo IV de ALP201.

Por lo tanto, los resultados de sexo agrupados se incluyeron en la Tabla 16. Después de la

administración SC de ALP201 cada 3 días (q3d), la exposición a ALP201 ($C_{\max}$ y $AUC_{72\text{ h}}$) aumentaron con el aumento de la dosis de manera levemente menor a proporcional a la dosis en los días 0 y 24. La exposición sistémica ($C_{\max}$ y $AUC_{72\text{ h}}$) el día 24 pareció disminuir después de la administración SC repetida. La reducción de la exposición pareció ser dependiente de la dosis con una reducción máxima de hasta 60 % después de la administración SC repetida de 30 mg/kg de ALP201. La biodisponibilidad subcutánea para ALP201 fue de aproximadamente un 44,2 %.

La respuesta del ADA fue negativa para todas las muestras previas a la dosis. La tasa de incidencia de ADA fue del 58 % y el 90 % para las muestras de ADA posteriores a la dosis D28 y D56, respectivamente. La reducción de la exposición el día 24 (60 %) para la dosis de 30 mg/kg probablemente se debió a la respuesta de inmunogenicidad.

Estudio de toxicidad de 28 días en monos con un período de recuperación de 28 días

La TK/ADA de ALP201 se evaluó en monos macho y hembra después de la administración SC de 1, 5 o 20 mg/kg una vez cada tres días (5/sexo/grupo de dosis) durante 4 semanas (un total de 10 dosis). Las muestras de sangre para análisis TK se recogieron los días 0 y 24. Las estadísticas descriptivas para parámetros PK de ALP201 se resumen en la Tabla 17.

Tabla 17: Parámetros PK medios ($\pm$ SD) de ALP201 el día 0 y día 24 después de la administración SC repetida en monos

Dosis (mg/kg)	Día	Estadística	$C_{\max}$ ($\mu\text{g/mL}$)	$t_{\max}^a$ (h)	$AUC_{72\text{ h}}$ ($\text{h}\cdot\mu\text{g/mL}$)	$AUC_{168\text{ h}}^b$ ($\text{h}\cdot\mu\text{g/mL}$)	R^c
1	0	N	10	10	10	10	NA
		Media $\pm$ SD	6,73 $\pm$ 1,44	48 (24-48)	391 $\pm$ 99,9	1440 $\pm$ 298	NA
1	24	N	10	10	8	7	8
		Media $\pm$ SD	10,9 $\pm$ 7,48	NA (8-24)	787 $\pm$ 346	2200 $\pm$ 320	2,12 $\pm$ 1,11
5	0	N	10	10	10	10	NA
		Media $\pm$ SD	29,2 $\pm$ 4,44	48 (24-48)	1720 $\pm$ 317	6030 $\pm$ 723	NA
5	24	N	10	10	8	8	8
		Media $\pm$ SD	38,1 $\pm$ 24,2	24 (8-24)	2870 $\pm$ 1140	6970 $\pm$ 2600	1,83 $\pm$ 0,805
20	0	N	10	10	10	10	NA

		Media $\pm$ SD	125 $\pm$ 29,4	48 (24-48)	7310 $\pm$ 1760	27900 $\pm$ 5130	NA
20	24	N	10	10	8	10	8
		Media $\pm$ SD	254 $\pm$ 62	24 (8-24)	15400 $\pm$ 4420	36800 $\pm$ 12300	2,15 $\pm$ 0,59

^aMediana (mínimo – máximo), el valor de la mediana solo se informa si hay un intervalo de recopilación real

^bLos valores de AUC_{0-168 h} se calcularon el día 0 y el día 18

^cR = AUC_{72 h} día 24/AUC_{72 h} día 0.

- 5 Abreviaturas: AUC_{72 h}= área bajo la curva de concentración plasmática-tiempo de 0 a 72 horas; AUC_{168 h}= área bajo la curva de concentración plasmática-tiempo de 0 a 168 horas; C_{max}= concentración plasmática máxima observada; NA = no aplicable; t_{max}= tiempo hasta la concentración plasmática máxima observada; R= cociente de acumulación.
- 10 No hubo diferencias por sexo en la exposición sistémica a ALP201 en los días 0 y 24. Por lo tanto, los resultados de sexo agrupados se incluyeron en la Tabla 17. Después de la administración subcutánea de ALP201 una vez cada 3 días, ALP201 (C_{max} y AUC_{72 h}) aumentó con el aumento de la dosis de manera aproximadamente proporcional a la dosis en los días 0 y 24. La exposición sistémica (valores de AUC_{72 h}) a ALP201 pareció aumentar después de la
- 15 administración subcutánea repetida de ALP201 en el Day 24, con cocientes AUC_{72h} de acumulación medios de 2,12, 1,83 y 2,15 a 1, 5 y 20 mg/kg, respectivamente.
- La respuesta del ADA fue negativa para las muestras previas a la dosis. La tasa de incidencia de ADA fue del 23 % y el 92 % para las muestras de ADA posteriores a la dosis D28 y D56, respectivamente. Aunque no se pudo establecer una correlación directa entre las respuestas
- 20 positivas de ADA y los perfiles de concentración-tiempo de exposición sistémica, ya que las muestras de ADA no se tomaron en los días de recolección de TK, después de múltiples dosis, los perfiles de concentración-tiempo anormales para algunos de los animales a ≤ 5 mg/kg parecieron estar afectados por los anticuerpos anti ALP201.
- 25 **Análisis basados en modelos y regímenes de dosis previstos en humanos**

Modelado de ALP201

Modelo de farmacocinética poblacional (Pop-PK)

Para pronosticar la exposición a ALP201 en humanos dados los resultados de dosis-respuesta en ratones, se desarrolló un modelo Pop-PK utilizando escalas alométricas basadas en el peso corporal y agrupando datos de PK de ratones, ratas y monos para predecir estimaciones de parámetros PK humanos. Los datos PK en ratones incluyeron un estudio de dosis única en ratones de tipo salvaje (HPP-PK-01) y mediciones de $C_{\text{mínima}}$ únicas (D36/D37) de 2 estudios de eficacia en ratones Akp2GW (-/-) de dosis múltiples (HPP-PoC-01 y HPP-MED-01). Para ratas y monos, también se incluyeron estudios de búsqueda de intervalo de dosis de dosis única en ratas y monos cynomolgus, y estudios de toxicología de GLP de 4 semanas de dosis múltiples en ratas y monos cynomolgus.

El modelo Pop-PK actual se desarrolló utilizando el programa de software NONMEM, versión 7.2 (ICON solutions) para analizar simultáneamente los datos de PK IV y SC de 3 especies animales teniendo en cuenta las diferencias de peso corporal mediante el uso de principios alométricos, en donde el peso corporal del animal se centró en 70 kg y los exponentes alométricos se fijaron en 0,75 para los parámetros de eliminación y en 1,0 para los parámetros del volumen de distribución. El impacto de ADA en la PK se evaluó en la CL según la TK de 4 semanas que mostró que las ratas y, en menor grado, los monos parecían tener concentraciones de ALP201 más bajas para los animales ADA+. El mejor modelo Pop-PK actual es un modelo de dos compartimentos con eliminación lineal. La prueba del impacto de ADA+ en las concentraciones de ALP201 no fue concluyente. La biodisponibilidad estimada en humanos fue ~75 % y la semivida efectiva calculada para humanos fue de 7 a 9 días. Las simulaciones de PK humanas utilizaron la variabilidad estimada del modelo humano Pop-PK de asfotasa alfa y la media (y la desviación estándar) de los pesos corporales iniciales de adultos de los sujetos con HPP que participaron en los ensayos clínicos que evaluaron la asfotasa alfa como tratamiento para HPP.

Modelo de dosis-respuesta

El modelo de dosis-respuesta desarrollado se seleccionó probando modelos de la familia E_{max} . La mayoría de las relaciones dosis-respuesta se pueden describir mediante una de las parametrizaciones del modelo E_{max} . La mejor caracterización actual de dosis-respuesta es mediante el uso de un modelo $E_{\text{max}}+E_0$ (inicial). El criterio de valoración de la eficacia, la

mineralización ósea, fue una evaluación radiográfica que se seleccionó porque compartía la misma definición clínica de eficacia que la utilizada para la evaluación no clínica de dosis-respuesta para asfotasa alfa. La mineralización ósea después del tratamiento con asfotasa alfa o ALP201 de 2 estudios de eficacia (HPP-PoC-01 y HPP-MED-01) se graficó en función de la dosis (Figura 6). Los datos de asfotasa alfa del estudio de eficacia anterior se incluyeron para la comparación. El eje y se expresó como %Normal, que se definió como el porcentaje de ratones en un grupo de dosis con puntuaciones de mineralización ósea de 4. El eje x se expresó como dosis normalizada en mg/kg/día. La dosis que produce la mineralización normal en el 85 % de la población tratada (ED85) se eligió como la dosis efectiva objetivo.

Traducción de dosis de ratón a humano y dosis iniciales propuestas para humanos

Se aplicó una escala alométrica a la dosis efectiva objetivo de ratón (ED85) para determinar una dosis humana. La ecuación utilizada para predecir a partir de la ED85 de ratón la dosis equivalente en humanos (HED, mg/kg/día) fue $ED85 \times (0,025 \text{ kg ratón}/70 \text{ kg humano})^{0,25}$. La HED se tradujo en una dosis fija semanal de 45 mg/semana y se utilizará como dosis para la cohorte 2 del estudio FIH (tanto IV como SC). La cohorte 3 (IV y SC) utilizará 90 mg/semana. La cohorte 1 utilizará una dosis inicial basada en NOAEL de 15 mg/semana (tanto IV como SC).

Márgenes PK de seguridad y exposición previstos en humanos para ALP201

El modelo Pop-PK se usó para simular perfiles PK ricos basados en dosis escaladas alométricamente a humanos (Figuras 7). Usando los datos de PK simulados, se calcularon los indicadores de exposición C_{max} y AUC.

Las exposiciones humanas previstas (C_{max} y $AUC_{168 \text{ h}}$) y los márgenes PK de seguridad esperados para las dosis de ALP201 de FIH propuestas se muestran en la Tabla 18. Los márgenes PK de seguridad se calcularon para las dosis de ALP201 de FIH propuestas utilizando la exposición humana prevista y la exposición NOAEL observada del estudio de toxicología en monos de GLP de 4 semanas (dosis NOAEL de 20 mg/kg/Q3D administrada SC).

Tabla 18: Exposición PK de ALP201 prevista, margen de seguridad y % de respuesta de mineralización normalizada

Cohorte	N	Dosis	AUC _{168 h} prevista ($\mu\text{g} \times \text{hora/mL}$)	C _{max} prevista ($\mu\text{g/mL}$)	Margen de seguridad esperado para AUC _{168 h} *	Margen de seguridad esperado para C _{max} *	% de respuesta de mineralización normal en el modelo de HPP de ratón
1	4	15 mg IV	325	4,3	113	59	NA
		15 mg SC dos veces por semana $\times 3$	441	3,2	83	79	66
2	4	45 mg IV	1084	13,0	38	20	NA
		45 mg SC dos veces por semana $\times 3$	1318	9,6	28	26	85
3	4	90 mg IV	1951	26	19	10	NA
		90 mg SC dos veces por semana $\times 3$	2645	19	14	13	91

Abreviaturas: AUC_{168 h} = el área bajo la curva de concentración-tiempo desde el tiempo cero hasta la hora 168; C_{max} = la concentración máxima observada medida después de la dosificación; HPP = hipofosfatasa; IV = intravenosa; N = número de sujetos; SC = subcutánea; NA = no disponible

- 5 *NOAEL de 20 mg/kg/q3d del estudio de toxicología SC de 4 semanas en monos.

Estudios de toxicología

- 10 Se realizaron estudios de seguridad no clínicos en ratas y monos para evaluar la tolerabilidad local, la toxicidad sistémica y los parámetros farmacológicos de seguridad después de la administración SC de ALP201 durante un máximo de 28 días. La evaluación de seguridad no clínica de la administración IV de una dosis única de ALP201 también se evaluó en un estudio

de toxicidad de 28 días en ratas para caracterizar la biodisponibilidad de ALP201 SC.

Estudio de toxicología de dosis única

5 No se realizaron estudios independientes de tolerabilidad de dosis única para ALP201. Sin embargo, la tolerabilidad de ALP201 en ratas y monos se evaluó como parte de estudios PK de dosis única. La tolerabilidad de ALP201 se evaluó mediante observaciones clínicas, incluidas las reacciones en el lugar de la inyección y los datos de patología clínica. No se observaron reacciones notables en el lugar de la inyección, observaciones clínicas ni observaciones de patología clínica relacionadas con ALP201 en estudios PK de dosis única en ratas o monos. En
10 resumen, las dosis únicas de ALP201 fueron bien toleradas cuando se administraron por vía IV o SC en ratas hasta 27 mg/kg y en monos hasta 20 mg/kg. Las dosis para los estudios de toxicología de dosis repetidas de ALP201 definitivos (GLP) se seleccionaron en función de los datos de tolerabilidad y patología clínica obtenidos.

15 Estudios de toxicología de dosis repetida

Se realizaron estudios de toxicidad de 28 días definitivos o que cumplieron con las GLP en ratas Sprague-Dawley y monos Cynomolgus. En un estudio de toxicidad de 28 días en ratas, la administración de ALP201 mediante inyección subcutánea una vez cada 3 días durante 28 días (días 1, 4, 7, 10, 13, 16, 19, 22, 25 y 28) para un total de 10 dosis a ratas CD® macho y hembra
20 fue bien tolerada hasta 30 mg/kg/dosis, la dosis SC más alta evaluada en este estudio. Además, la administración de ALP201 a 10 mg/kg IV también fue bien tolerada después de una única inyección. No hubo cambios relacionados con ALP201 en las observaciones clínicas, pesos corporales, aumentos de peso corporal, consumo cuantitativo de alimentos, oftalmología, batería de observación funcional, hematología, análisis de orina, anatomía patológica
25 macroscópica y peso de los órganos. Al final de la fase de dosificación, hubo aumentos relacionados con la dosis en la actividad de la fosfatasa alcalina (ALP) (efecto farmacológico anticipado) a ≥ 2 mg/kg/dosis de ALP201 SC que se resolvieron por completo después de un período de recuperación de 28 días. Los cambios microscópicos no adversos se relacionaron con los procedimientos de inyección con cambios reactivos asociados en los ganglios linfáticos
30 de drenaje. No hubo alteración perceptible asociada con ALP201 en la incidencia, gravedad o carácter microscópico de los cambios en los sitios de inyección o en los ganglios linfáticos de

drenaje. Los cambios microscópicos en los sitios de inyección y los ganglios linfáticos de drenaje de los animales de recuperación fueron similares a los observados en los animales de necropsia terminal, aunque menos pronunciados en los animales del grupo de recuperación. En conclusión, el nivel de dosis de 30 mg/kg/dosis se considera el nivel sin efecto adverso observado (NOAEL) para la administración subcutánea; esto corresponde a un valor de C_{max} combinado de macho y hembra del día 24 de 43,9 $\mu\text{g/mL}$ y un valor de $AUC_{0-72\text{ h}}$ de 2120 $\text{h}\cdot\mu\text{g/mL}$.

Después de una única inyección en bolo IV de 10 mg/kg de ALP2-1 en ratas, se obtuvo un $AUC_{0-72\text{ h}}$ de 3690 $\text{h}\cdot\mu\text{g/mL}$. La biodisponibilidad SC de ALP201 (en función de los valores de $AUC_{0-72\text{ h}}$ SC a 10 mg/kg/dosis) en ratas fue de aproximadamente 44,2 %.

En un estudio de toxicidad de 28 días en monos, la administración de ALP201 mediante inyección SC una vez cada 3 días durante 28 días (un total de 10 días en los días 1, 4, 7, 10, 13, 16, 19, 22, 25 y 28), a dosis de 1 mg/kg, 5 mg/kg o 20 mg/kg a monos cynomolgus macho y hembra fue bien tolerada hasta 20 mg/kg/dosis, la dosis más alta evaluada en este estudio.

No hubo cambios relacionados con ALP201 en las reacciones en el lugar de la inyección (puntuación dérmica), peso corporal, aumento de peso corporal, consumo cualitativo de alimentos, oftalmología, frecuencia respiratoria manual, presión arterial indirecta, electrocardiografía cualitativa, hematología, análisis de orina, anatomía patológica macroscópica y peso de los órganos. Al final de la fase de dosificación, hubo aumentos relacionados con la dosis en la actividad de la fosfatasa alcalina (ALP) (efecto farmacológico anticipado), que se resolvieron por completo (1 mg/kg/dosis) o en su mayoría (≥ 5 mg/kg/dosis) después de un período de recuperación de 28 días. Los cambios microscópicos no adversos relacionados con ALP201 se limitaron a los sitios de inyección e incluyeron degeneración/necrosis mínima a leve, mineralización e inflamación/infiltración de células mixtas. Se observó una recuperación parcial de la degeneración/necrosis y la inflamación/infiltración de células mixtas del sitio de inyección dentro de los grupos de recuperación, mientras que persistió una mineralización de mínima a leve en los machos en recuperación con ≥ 1 mg/kg/dosis y las hembras con 20 mg/kg/dosis. Se observaron aumentos de la frecuencia cardíaca en todos los animales con 1 mg/kg/dosis y en algunos de los animales con ≥ 5 mg/kg/dosis. Estos aumentos de la frecuencia cardíaca no se consideraron adversos porque, además de la incongruencia con los datos de exposición sistémica, la frecuencia

cardíaca y los valores de ECG permanecieron dentro del intervalo normal de variación biológica para los monos de esta edad. En conclusión, el nivel de dosis de 20 mg/kg/dosis se considera el nivel sin efecto adverso observado (NOAEL); esto corresponde a un valor de $C_{\max}$ medio combinado de macho y hembra del día 24 de 254 $\mu\text{g/mL}$ y un valor de $\text{AUC}_{0-72 \text{ h}}$ medio de 15400 $\text{h} \cdot \mu\text{g/mL}$, respectivamente.

Tolerancia local

No se realizaron estudios no clínicos independientes para evaluar la tolerabilidad local. Sin embargo, la evaluación de los sitios de inyección se realizó en los estudios de toxicología general de ALP201 SC en ratas y monos y en el estudio de toxicología general de ALP201 IV en ratas. Las administraciones subcutáneas e IV de ALP201 fueron bien toleradas localmente en monos, sin que se observaran resultados adversos en los sitios de inyección.

Resumen de observaciones no clínicas pertinentes para los estudios clínicos de ALP201

Evaluación de seguridad

No hubo cambios relacionados con ALP201 en las observaciones clínicas, pesos corporales, aumentos de peso corporal, consumo cuantitativo de alimentos, oftalmología, observaciones de batería de observación funcional (CNS), criterios de valoración cardiovasculares, criterios de valoración respiratorios, hematología, análisis de orina, anatomía patológica macroscópica y peso de los órganos en los estudios de toxicología de 28 días. Al final de la fase de dosificación, hubo aumentos significativos relacionados con la dosis en la actividad de la fosfatasa alcalina (ALP), un efecto farmacológico anticipado en ratas o monos. No se observaron toxicidades orgánicas sistémicas notables en ratas o monos en ninguna de las dosis evaluadas en el estudio.

ALP201 fue bien tolerado localmente luego de la administración SC a ratas y monos. Los cambios microscópicos no adversos relacionados con ALP201 en el estudio en monos se limitaron a los sitios de inyección e incluyeron degeneración/necrosis mínima a leve en machos y hembras. La degeneración/necrosis y la inflamación/infiltración de células mixtas de los sitios de inyección fueron de menor incidencia y gravedad o tenían características de cronicidad (mineralización) dentro del grupo de recuperación, lo que indica una recuperación parcial. Los

cambios microscópicos no adversos en el estudio en ratas se limitaron a los procedimientos de inyección con cambios reactivos asociados en los ganglios linfáticos de drenaje. No hubo alteración perceptible asociada con ALP201 en la incidencia, gravedad o carácter microscópico de los cambios en los sitios de inyección o en los ganglios linfáticos de drenaje. Los cambios microscópicos en los sitios de inyección y los ganglios linfáticos de drenaje de los animales de recuperación fueron similares a los observados en los animales de necropsia terminal, aunque menos pronunciados en los animales del grupo de recuperación.

La exposición observada del NOAEL a 20 mg/kg/dosis del estudio de toxicidad GLP SC en monos es aproximadamente $113 \times$ (para IV) y $83 \times$ (para SC) mayor que la exposición AUC proyectada de la dosis única inicial propuesta en humanos de 15 mg IV o 15 mg qw x 3 SC (Tabla 18). Dado el margen de seguridad y la falta de hallazgos de toxicidad sistémica o tolerabilidad local en los estudios de toxicología de 28 días en ratas y monos con ALP201, el riesgo de seguridad para los seres humanos con la dosis inicial de 15 mg es muy bajo.

15 Inmunogenicidad

El potencial de inmunogenicidad de ALP201 se evaluó midiendo los anticuerpos contra el fármaco (ADA) de ALP201 en suero recolectados de los estudios de toxicología de 28 días de GLP en ratas y monos.

En el estudio de toxicidad en ratas, las respuestas de ADA fueron positivas con la administración SC en 9 de 20 (6 machos, 3 hembras) animales del grupo de control, 10 de 19 (6 machos, 4 hembras) animales a 2 mg/kg/dosis, 12 de 20 animales (7 machos, 5 hembras) a 10 mg/kg/dosis y 12 de 20 animales (6 machos, 6 hembras) a 30 mg/kg/dosis en el día 28 de PK. Además, las respuestas de ADA fueron positivas con la administración de una dosis única IV de ALP201 en 14 de 20 animales (8 machos; 6 hembras) a 10 mg/kg en el día 28 de PK. La respuesta positiva de ADA no pareció tener un impacto constante en los perfiles plasmáticos compuestos de concentración-tiempo de los grupos de dosis SC de 2 y 10 mg/kg/dosis en el día 24, aunque la ADA puede haber contribuido a la disminución aparente de la exposición sistémica a 30 mg/kg/dosis el día 24. Es poco probable que las respuestas positivas de ADA en los animales de control se deban a una falta de dosificación de ALP201 según la investigación realizada. Se observó un aumento dependiente de la dosis en ALP, un efecto farmacológico esperado de ALP201, para los grupos de dosis SC de ≥ 2 mg/kg antes de la necropsia terminal, que se

resolvió en la necropsia de recuperación. Los resultados de ALP de los animales en los grupos de control fueron similares antes de la necropsia terminal y de recuperación. Además, no hubo hallazgos en vida relacionados con ALP201 durante la fase de dosificación y recuperación. Por lo tanto, tomadas en conjunto, las respuestas positivas de ADA observadas en los animales de control en los días 28 y 56 de PK (fechas de estudio día 29 y día 57) probablemente se debieron a una contaminación de la extracción de sangre y no se consideró que tuvieran un impacto en el estudio.

En el estudio de toxicidad en monos, las respuestas de anticuerpos anti-ALP201 fueron negativas para todas las muestras previas a la dosis en el día 0. Las respuestas de ADA fueron positivas en 4 de 10 animales a 1 mg/kg/dosis, 6 de 10 animales a 5 mg/kg/dosis y 5 de 10 animales a 20 mg/kg/dosis el día 28. Aunque no se pudo establecer una correlación directa entre las respuestas positivas de ADA y los perfiles de concentración-tiempo de exposición sistémica, ya que las muestras de ADA no se tomaron en los días de recolección de TK, después de múltiples dosis, los perfiles de concentración-tiempo para algunos de los animales a ≤ 5 mg/kg parecieron estar afectados por los anticuerpos anti-ALP201. Los animales afectados por anticuerpos anti-ALP201 fueron 3 animales (2 machos y 1 hembra) a 1 mg/kg/dosis, y 3 animales a 5 mg/kg/dosis (3 hembras), y los días de impacto en los perfiles de concentración-tiempo van desde el día 18 hasta el día 24 para estos animales.

Ejemplo 2

El perfil farmacocinético de la asfotasa alfa en múltiples especies sugiere que una combinación de biodisponibilidad absoluta y semivida reducidas requiere una dosificación frecuente. El dominio catalítico de TNSALP humana es una molécula altamente glicosilada. La presencia de glicanos asialilados conduce a la eliminación a través del receptor de asialoglicoproteína (ASGPR) en el hígado.

ALP201 se desarrolló como una ERT de fosfatasa alcalina de última generación teniendo en cuenta estas consideraciones. ALP201 conserva la arquitectura TNSALP-IgG Fc-D10 utilizada en la asfotasa alfa e incorpora la eliminación de dos glucanos unidos a N no esenciales, un cambio en el isotipo Fc humano a IgG2/4 y numerosas mejoras de proceso en la expresión de la molécula que conducen a una mayor incorporación de TSAC. En este informe, presentamos los parámetros farmacocinéticos de ALP201 determinados en estudios de dosis única de

ratones C57BL/ 6 macho mediante administración intravenosa y subcutánea. También informamos los parámetros PK de múltiples lotes de ALP201 expresada y purificada con niveles variables de incorporación de TSAC para ayudar a determinar qué parámetros PK se ven más afectados por la eliminación de glicanos asialilados.

5

Materiales y métodos

Cepa animal

Para mantener la coherencia entre estos estudios y los estudios farmacocinéticos previos realizados con asfotasa alfa, este estudio se realizó con ratones C57BL/6 macho de alrededor de 11-12 semanas de edad en el momento de la dosificación. La información para las moléculas de prueba se muestra en la Tabla 19.

Tabla 19: Artículos de prueba

Molécula	N.º de lote	Actividad específica*	Contenido total de ácido siálico (mol/monómero)	Concentración (mg/mL)	Formulación
ALP201	1	36,9	5,9	8,35	PBS
ALP201	2	32,8	5,9	9,15	PBS
ALP201	3	40,3	5,0	3,09	PBS
ALP201	4	39,1	3,2	6,54	PBS

* Actividad específica indicada en U/mg de hidrólisis de 4-MUP, donde 1 U = enzima necesaria para hidrolizar 1 micromol de 4-MUP en 1 minuto en condiciones de solución amortiguadora de ensayo a 37°C.

Dosificación animal y muestreo de sangre

Los animales de 11-12 semanas de edad se aleatorizaron por peso corporal y se asignaron a 4 grupos. Se administró una dosis de 4 mg/kg de ALP201 a 16 ratones/grupo el día 0 por vía intravenosa (IV) (Grupo 1) o por vía subcutánea (SC) (Grupo 2). Se administró un volumen equivalente ajustado por peso de PBS el día 0 a 4 ratones/grupo por vía IV (Grupo 3) o SC (Grupo 4). La dosificación IV se administró a través de la vena de la cola. La dosificación SC en

bolo se administró en la región escapular por encima de los hombros.

Se utilizó un diseño de muestreo semiserie, con 4 cohortes por grupo y n=4/por cohorte + 1 ratón adicional por grupo. En el estudio realizado en Alexion, se extrajo sangre de cada ratón 3 veces, incluido el sangrado terminal. Los puntos temporales (horas posteriores a la dosis) se muestran en la Tabla 20 a continuación para cada cohorte.

Para las extracciones no terminales, se recogieron 100 mL de sangre completa mediante recolección submandibular en tubos prerrecubiertos heparinizados con litio para recolectar al menos 50 µL de plasma por punto temporal para cada animal. En el sangrado terminal, se recolectó la mayor cantidad de sangre posible a través de una punción cardíaca en tubos de recolección heparinizados con litio. La sangre se mantuvo a 4°C y se procesó para obtener plasma por centrifugación tan pronto como fue posible después de la recolección. Cada muestra de plasma se dividió en 2 alícuotas de igual volumen antes de la congelación instantánea en CO₂/etanol y el almacenamiento a -80°C.

Tabla 20: Grupos, dosis, vía de administración y cronograma de muestreo de sangre de tratamiento experimental para el estudio interno

Grupo	Cant. de ratones	Artículo de prueba	Vía	Dosis (mg/kg)	Conc. de dosis (mg/mL)	Dosis (mL/kg)	Vehículo
1	16+1 ^a	ALP201	Bolo IV	4	1	4	PBS-sin Ca/Mg
2	16+1 ^a	ALP201	Bolo SC	4	1	4	PBS-sin Ca/Mg
3	4	PBS	Bolo IV	-	-	-	-
4	4	PBS	Bolo SC	-	-	-	-

^aN = 16 por grupo + 1 adicional, que se utiliza como animal de reemplazo en caso de muerte de un animal o dosis incorrecta

Tabla 21: Cronograma de muestreo de sangre para estudio interno, cohortes de los grupos 1 y 2

Cohorte	0,25 h	1 h	6 h	24 h (D1)	48 h (D2)	72 h (D3)	96 h (D4)	120 h (D5)	192 h (D8)	264 h (D11)	336 h (D14)	480 h (D21)
1	X				X				X			

2		X				X				X		
3			X				X				X	
4				X				X				X

Tabla 22: Cronograma de muestreo de sangre para estudio interno, grupos 3 y 4

Grupo	0,25 h	1 h	6 h	24 h (D1)	48 h (D2)	72 h (D3)	96 h (D4)	120 h (D5)	192 h (D8)	264 h (D11)	336 h (D14)	480 h (D21)
3	X								X			
4	X								X			

Para los lotes 2, 3 y 4, se formaron grupos de 32 ratones para cada vía de administración en 8 cohortes de 4 animales/punto temporal. En los grupos con administración IV, se extrajo sangre de cada cohorte dos veces (el primer punto temporal como recolección de supervivencia y el segundo de forma terminal) aproximadamente 0,5, 1, 3, 8, 12, 21, 26, 32, 45, 49, 72, 96, 120, 192, 264 y 336 horas después de la dosis. En los grupos de administración SC, se extrajo sangre de cada cohorte dos veces (la primera como recolección de supervivencia y la segunda de forma terminal) aproximadamente 1, 3, 6, 8, 12, 21, 26, 32, 45, 49, 72, 96, 120, 192, 264 y 336 horas después de la dosis.

Determinación de la concentración de ALP201 activa en plasma

Se analizó la actividad de la fosfatasa alcalina en muestras de plasma utilizando fosfato de 4-metilumbeliferil (4-MUP) como sustrato artificial. La hidrólisis del enlace fosfoéster en 4-MUP libera el compuesto fluorescente 4-metilumbeliferona (4-MU), que se detecta fácilmente con un fluorímetro. La cuantificación de la actividad se realizó a través de una curva estándar de actividad enzimática.

20 Análisis de muestra para estudio PK interno

La cuantificación de la actividad se realizó a través de una curva estándar de actividad enzimática creada usando diluciones en serie de un estándar de referencia de proteína asfotasa alfa con actividad conocida en el ensayo 4-MUP en la misma placa. Las muestras de plasma descongelado se diluyeron de 100 a 2000 veces en solución amortiguadora de ensayo (HEPES 50 mM, NaCl 150 mM, MgCl₂ 1 mM, pH 7,4 y BSA 1 mg/mL) y se analizaron para determinar la concentración de enzima ALP201 activa. El intervalo estándar de proteína final en cada placa fue de 4 – 80 ng/mL.

Las muestras diluidas se cuantificaron de la siguiente manera: todas las muestras diluidas se llevaron a 37°C antes del inicio del ensayo mediante la adición de 4-MUP a la muestra de proteína, dando como resultado una concentración final de 4-MUP de 10 mM. La producción de 4-MU se midió a una longitud de onda de excitación 360 nm y una longitud de onda de emisión de 465 nm. Los datos se recogieron en un lector de placas mantenido a 37°C, con lectura de la placa cada 40 segundos durante un total de 20 minutos. Las velocidades de reacción para las muestras estándar y de plasma se calcularon mediante regresión lineal de la pendiente de reacción utilizando Microsoft Excel en unidades de unidades relativas de fluorescencia (RFU) por minuto. Las velocidades de reacción de las muestras estándar se usaron para construir unidades de curva estándar lineal en RFU/min/U. La comparación de las velocidades de reacción medidas en muestras de plasma se comparó con la curva estándar para determinar la actividad plasmática de ALP201 en U/mL. Las actividades de la muestra en unidades/mL se convirtieron a unidades de masa de mg/L dividiendo las actividades de la muestra por la actividad específica de la muestra de proteína analizada (en U/mg). Las muestras se analizaron por duplicado dos veces para recopilar datos para cada punto de muestreo independiente.

Análisis de muestra para estudios PK

Se realizó el mismo ensayo de hidrólisis de 4-MUP. El día del ensayo, los estándares, los controles de calidad (QC), los controles de dilución (DC) y los blancos se diluyeron 250 veces en solución amortiguadora de ensayo. Los estándares, QC, DC y blancos se diluyeron adicionalmente 2 veces con el sustrato, fosfato de 4-metilumbeliferil (4-MUP), para la dilución mínima requerida (MRD, por sus siglas en inglés) total de 500 veces. Antes de realizar la MRD, el DC se diluyó 200 veces en plasma de ratón. ALP201 se cuantificó en función del producto fluorescente metilumbeliferona, que resulta de la hidrólisis del sustrato 4-MUP utilizado en el

ensayo. La placa se colocó en un lector de placas y se leyó una vez cada 60 segundos con configuraciones de fluorescencia cinética a 360 nm (excitación), 455 nm (corte) y 465 nm (emisión) durante 25 minutos a 37 °C. La actividad enzimática fue directamente proporcional a la velocidad de la reacción del sustrato. La Vmax (tasa de intensidad de fluorescencia/min) se determinó a partir de una línea de mejor ajuste a través de los datos. El blanco no se incluyó en el ajuste de la curva. Los resultados se informaron en mg/L. Los valores se corrigieron por las diferencias en la actividad específica entre el artículo de prueba y el estándar de actividad proteica.

10 **Análisis farmacocinético**

El análisis PK se llevó a cabo utilizando Phoenix WinNonlin v8.0 (Certara). Los parámetros farmacocinéticos se calcularon usando un análisis no compartimental.

Se calcularon los siguientes parámetros PK no compartimentales: área bajo la curva de concentración-tiempo desde el tiempo cero (dosificación) hasta la última concentración detectable (AUC_t), área bajo la curva de concentración-tiempo normalizada por dosis desde el tiempo cero (dosificación) hasta la última concentración detectable ($AUC_t/dosis$), área bajo la curva concentración-tiempo desde el tiempo cero (dosificación) extrapolada hasta el infinito (AUC_{inf}), área bajo la curva concentración-tiempo normalizada por dosis desde el tiempo cero (dosificación) extrapolada hasta el infinito ($AUC_{inf}/dosis$), concentración plasmática máxima observada (C_{max}), concentración plasmática máxima observada normalizada por dosis ($C_{max}/dosis$), tiempo de concentración plasmática máxima observada (T_{max}), semivida de eliminación terminal ($t_{1/2}$), eliminación total (CL), volumen de distribución aparente (V_d) y biodisponibilidad (F). Se utilizaron tiempos reales de recolección de muestras para calcular los parámetros PK. Las dosis reales se usaron para calcular los parámetros PK normalizados por dosis.

Resultados y exposición

Parámetros farmacocinéticos de ALP201 después de la administración IV y SC en ratones

La PK de ALP201 se evaluó después de una única administración IV o SC a ratones C57BL/6 macho. Se administraron dosis a 16 ratones en cada grupo, y se recolectó sangre de cohortes

subdivididas de 4 ratones dentro de cada grupo en los siguientes puntos temporales después de la administración: 0,25, 1, 6, 24, 48, 72, 96, 120, 192, 264, 336 y 480 horas.

Las concentraciones plasmáticas de ALP201 se midieron usando un ensayo de actividad enzimática, que midió la actividad catalítica de fosfatasa alcalina de ALP201. La actividad enzimática de ALP201 luego se convirtió a unidad de masa (mg/L) para el informe.

Los perfiles de concentración plasmática media de ALP201 activa frente al tiempo después de la administración IV y SC se presentan en una escala semilogarítmica en las Figuras 8A y 8B.

Los parámetros PK de ALP201 se resumen en las Tabla 7 y 11 que anteceden.

Los perfiles individuales de actividad plasmática de ratón de algunos ratones en el grupo IV parecen sugerir que parte de la dosis puede haberse administrado por vía subcutánea, lo que puede explicar la variabilidad relativamente alta observada en los puntos temporales tempranos del perfil de dosificación IV. Si esto ocurrió, el valor calculado de C_{max} para el grupo de dosis IV también podría ser artificialmente bajo. Después de la administración IV, el perfil de concentración-tiempo disminuyó de manera multiexponencial (Figuras 8A y 8B). La CL fue de 0,0019 L/h/kg y la $t_{1/2}$ terminal aparente fue de 48 horas. Después de la administración SC, el tiempo para alcanzar la concentración máxima (t_{max}) fue de 48 horas después de la dosis, lo que sugiere una absorción relativamente lenta desde el lugar de la inyección SC. La biodisponibilidad absoluta después de la administración SC fue de un 96 %.

Parámetros farmacocinéticos de lotes de ALP201 con valores variables de contenido total de ácido siálico en ratones

Tres lotes separados de ALP201, purificados con valores de TSAC medidos de 5,9, 5,0 y 3,2 moles de ácido siálico/mol de monómero de proteína, se dosificaron mediante administración IV y SC en 32 ratones. Se recolectó sangre de cohortes subdivididas de 4 ratones dentro de cada grupo de administración en los siguientes puntos temporales después de la administración: 0,5, 1, 3, 8, 12, 21, 26, 32, 45, 49, 72, 96, 120, 192, 264 y 336 horas después de la dosis para la administración IV; y 1, 3, 6, 8, 12, 21, 26, 32, 45, 49, 72, 96, 120, 192, 264 y 336 horas después de la dosis para la administración SC donde se extrajo sangre de cada ratón dos veces.

Las concentraciones plasmáticas de ALP201 se midieron usando un ensayo, que midió la actividad catalítica de fosfatasa alcalina de ALP201. La actividad enzimática de ALP201 fue

informada en unidades de masa (mg/L) por Charles River.

Los perfiles de concentración plasmática media de ALP201 activa frente al tiempo después de la administración IV y SC para cada lote de proteína se presentan en escala semilogarítmica en las Figuras 9A y 9B, 10A y 10B, y 11A y 11B. En la Figura 12 se presenta una recopilación de los perfiles de concentración plasmática frente al tiempo para la administración IV de las variantes de valor TSAC. Una recopilación de los perfiles de concentración plasmática frente al tiempo para administración SC se presenta en la Figura 13. Los resúmenes tabulados de los parámetros PK medios y los parámetros PK medios normalizados por dosis después de la administración IV y SC se pueden encontrar en las tablas 21 y 22 respectivamente.

Tabla 23: Resumen de los parámetros farmacocinéticos de ALP201 para las variantes del valor TSAC después de la administración subcutánea en ratones C57BL/6 macho

TSAC (mol/mol)	Vía	Dosis (mg/kg)	C _{max} (mg/L)	t _{max} (h)	t _{1/2} (h)	AUC _t (mg*h/L)	AUC _∞ (mg*h/L)	V _d o V _d /F (L/kg)	CL o CL/F (L/h/kg)	F (%)
5,9	IV	4	105,3	0,5	29,9	2060,5	2063,8	0,08	0,0019	NA
5,9	SC	4	23,3	21	33,4	1480,3	1487,6	0,13	0,0027	72,1
5,0	IV	4	57,3	0,5	31,4	1319,6	1322,4	0,14	0,0030	NA
5,0	SC	4	22,4	12	34,9	1316,5	1351,4	0,15	0,0030	102,2
3,2	IV	4	61,4	0,5	32,8	1308,1	1330,4	0,14	0,0030	NA
3,2	SC	4	19,7	12	35,6	1058,7	1081,5	0,19	0,0037	81,3

Abreviaturas: AUC_∞ = área bajo la curva de concentración y tiempo desde el tiempo cero (dosificación) extrapolada al infinito; AUC_t = área bajo la curva de concentración y tiempo desde el tiempo cero (dosificación) hasta la última concentración detectable; CL o CL/F = eliminación total; C_{max} = concentración plasmática máxima observada; F = biodisponibilidad absoluta; IV = intravenoso; NA = no aplicable; SC = subcutáneo; TSAC = contenido total de ácido siálico; t_{max} = tiempo hasta la concentración plasmática máxima observada; t_{1/2} = semivida de eliminación terminal; V_d o V_d/F = volumen aparente de distribución.

Tabla 24: Resumen de los parámetros farmacocinéticos de ALP201 normalizados por dosis para las variantes del valor TSAC después de la administración subcutánea en

ratones C57BL/6 macho

TSAC (mol/mol)	Vía	C_{max} / dosis [(mg/L)/(mg/kg)]	AUC_t / dosis [(mg*h/L)/(mg/kg)]	AUC_∞ / dosis [(mg*h/L) / (mg/kg)]
5,9	IV	26,3	515,1	516,0
5,9	SC	5,8	371,1	371,9
5,0	IV	14,3	329,9	330,6
5,0	SC	5,6	329,1	337,9
3,2	IV	15,4	327,0	332,6
3,2	SC	4,9	264,7	270,4

Abreviaturas: AUC_{inf} /dosis = área bajo la curva de concentración tiempo normalizada por dosis desde el tiempo cero (dosificación) extrapolada al infinito; AUC_t/dosis = área bajo la curva de concentración tiempo normalizada por dosis desde el tiempo cero (dosificación) hasta la última concentración detectable; C_{max}/dosis = concentración plasmática máxima observada normalizada por dosis; IV = intravenoso; SC = subcutáneo; TSAC = contenido total de ácido siálico

Los lotes de proteína ALP201 con valores de TSAC de 5,9, 5,0 y 3,2 mol/mol corresponden a 1,48, 1,25 y 0,80 moles de ácido siálico por sitio de glicano unido a N de consenso, y los perfiles PK de todos los lotes (tanto para administración IV como SC) tenían una forma similar, con valores similares de T_{max} y t_{1/2}.

Con el aumento del valor de TSAC, la eliminación disminuyó ligeramente, la C_{max} y el AUC por vía IV y SC aumentó y el volumen de distribución disminuyó. Todos estos cambios son consistentes con la idea de que los valores más bajos de TSAC conducen a niveles más altos de glicanos unidos a N inmaduros, que pueden eliminarse rápidamente por receptores celulares como ASGPR y causar una mayor eliminación, una C_{max} más baja y una AUC más baja para una muestra de proteína. Los cambios en estos parámetros son relativamente pequeños y difieren como máximo en 2 veces.

Comparación de los parámetros PK de ALP201 en ratones con los parámetros PK de asfotasa alfa en ratones

Como ERT de fosfatasa alcalina de segunda generación, ALP201 se diseñó para mejorar los

parámetros PK de la asfotasa alfa, que se probó previamente en estudios PK en ratones con ratones C57BL/6 macho. En la Tabla 25 se presenta un resumen de los parámetros PK para asfotasa alfa.

5 **Tabla 25: Parámetros farmacocinéticos de asfotasa alfa determinados previamente en ratones C57BL/6 después de una administración única IV o SC de 2 mg/kg**

Vía	C _{max} (mg/L)	C _{max} /dosis [(mg/L)/(mg/kg)]	t _{1/2} (h)	AUC _{t (0-49)} (mg*h/L)	AUC _∞ (mg*h/L)	AUC _∞ /dosis [(mg*h/L)/(mg/kg)]	CL (L/h/kg)	F (%)
IV	26,4	13,2	15,6	258	286	143	0,007	NA
SC	3,07	1,54	31,1	100	161	81	ND	38,8

Abreviaturas: AUC_∞= área bajo la curva de concentración y tiempo desde el tiempo cero (dosificación) extrapolada al infinito; AUC_t = área bajo la curva de concentración y tiempo desde el tiempo cero (dosificación) hasta la última concentración detectable; CL = eliminación total;
 10 C_{max}= concentración plasmática máxima observada; F = biodisponibilidad absoluta; IV = intravenoso; SC = subcutáneo; t_{1/2}= semivida de eliminación terminal;

En todos los conjuntos de datos PK recopilados para ALP201 en ratones C57BL/6 macho, ALP201 demuestra una semivida in vivo superior (medida por t_{1/2}), exposición in vivo (medida por C_{max} y AUC) y biodisponibilidad. Para todas las muestras analizadas, ALP201 también
 15 demuestra una eliminación significativamente menor en ratones que la asfotasa alfa.

Debido a que las especificaciones de liberación de asfotasa alfa limitan la molécula a valores TSAC de 1,2 – 3,0 mol/mol y la molécula tiene 6 sitios de glicosilación unidos a N por monómero, la incorporación de ácido siálico para asfotasa alfa es solo de 0,20 – 0,50 moles de ácido
 20 siálico/glicano. Esto indica que muchos glicanos en asfotasa alfa no contienen restos de ácido siálico y podrían ser sustratos eficientes para la eliminación de ASPGR. Esto podría explicar la mayor eliminación y la C_{max} y AUC normalizados por dosis más bajos observados para la asfotasa alfa en relación con ALP201.

Todas estas muestras de ALP201 tienen una biodisponibilidad mucho mayor que la asfotasa
 25 alfa, y la muestra menos biodisponible de ALP201 tiene alrededor del doble de la biodisponibilidad observada de la asfotasa alfa (72,1 % frente a 38,8 %). Las diferencias en el isotipo del dominio Fc de la IgG humana entre las dos construcciones pueden ser la causa de

esta observación. Hemos demostrado que el dominio Fc de IgG2/4 de ALP201 no se une a un panel de receptores Fcg comunes, pero el dominio Fc de IgG1 de asfotasa alfa se une fuertemente a al menos dos de ellos (Fuente: Informe técnico de investigación 036). Si estos receptores Fcg están presentes en el espacio subcutáneo, la asfotasa alfa puede eliminarse incluso antes de que ingrese a la circulación sistémica, lo que reduce la biodisponibilidad y la exposición.

Conclusión

Los resultados de estos estudios indican que ALP201 tiene un perfil farmacocinético ajustado a la dosis significativamente mejorado en ratones en relación con la asfotasa alfa después de la administración IV o SC, con una biodisponibilidad, una C_{max} normalizada por dosis y una exposición normalizada por dosis más elevadas. Estudios PK adicionales que utilizaron muestras de ALP201 con niveles variables de incorporación de TSAC indicaron pequeños aumentos en la C_{max} y la exposición in vivo con niveles de TSAC aumentados. La semivida de eliminación, el T_{max} y la biodisponibilidad parecían no verse afectados relativamente por los cambios en los valores de TSAC.

Ejemplo 3

Descripción general de los estudios PK de dosis única con ALP201

Se realizaron dos estudios PK de dosis única como parte del programa de desarrollo no clínico de asfotasa alfa, en ratas Sprague-Dawley y monos Cynomolgus, respectivamente (Tabla 26). Estos estudios respaldaron los estudios de dosis única de ALP201.

Tabla 26: Estudios PK de dosis única realizados con asfotasa alfa

Nombre del estudio	Duración	Especie	Vía de administración	Formulación
PK de dosis única	3 días	Rata	IV, SC	Fosfato de sodio 25 mM pH 7,4, Cloruro de sodio 150 mM

Nombre del estudio	Duración	Especie	Vía de administración	Formulación
PK de dosis única	3 días	Mono	IV, SC	Fosfato de sodio 25 mM pH 7,4, Cloruro de sodio 150 mM

Nota: A menos que se indique lo contrario, los parámetros PK/TK se caracterizaron mediante el método de análisis no compartimental (NCA, por sus siglas en inglés).

Abreviaturas: IV = intravenoso; PK = farmacocinética; SC = subcutáneo; TK = toxicocinética.

- 5 Luego de la administración IV de una dosis única, la eliminación sistémica (CL) de asfotasa alfa osciló entre 0,0193 - 0,0492 L/h/kg con una semivida aparente que oscila entre 27 - 34 horas. El volumen de distribución en estado estacionario (V_{ss}) osciló entre 0,432 - 1,39 L/kg. Después de la administración única SC a ratas y monos, el tiempo para alcanzar la concentración máxima (T_{max}) osciló entre 10 - 32 horas después de la dosificación, lo que sugiere una absorción lenta de asfotasa alfa desde el sitio de inyección SC. La biodisponibilidad estimada para la vía de administración SC osciló entre el 26 % - 35 % en ratas y monos.

Conclusiones de los estudios PK de dosis única

- 15 ALP201 ha sido diseñado para mejorar las características del producto aprobado, asfotasa alfa, con eficacia/actividad, exposición sistémica, biodisponibilidad absoluta y semivida mejoradas. El isotipo del dominio Fc de Ig en ALP201 es G2/4 en lugar del dominio Fc de IgG1 presente en la asfotasa alfa. Esta alteración está diseñada para mejorar las propiedades farmacocinéticas de ALP201, incluida la exposición PK sistémica, la semivida y la biodisponibilidad.
- 20 Los datos preclínicos de 3 especies animales (ratón, rata y mono) brindan evidencia de que se lograron estos objetivos. En comparación con la asfotasa alfa, ALP201 ha demostrado una mejora significativa en la exposición PK (> 10 veces), la biodisponibilidad absoluta (2 veces) y la semivida (2 veces) después de la administración IV/SC en 3 especies animales. El modelo preclínico de PK poblacional también predice que se espera que las propiedades PK mejoradas de ALP201 se extrapolen a los humanos, lo que facilitará el tratamiento de pacientes con un volumen de inyección reducido, una administración menos frecuente y una cantidad total más

baja anualmente, lo que reducirá la carga del tratamiento para los pacientes.

Estudios de seguridad no clínicos

5 Resumen de los estudios de toxicología para respaldar el primer estudio en humanos

No se realizaron estudios independientes de toxicología/tolerabilidad de dosis única para ALP201. Las dosis de ALP201 para estudios toxicológicos definitivos (GLP) de dosis repetidas se seleccionaron en función de los datos obtenidos de los estudios PK de dosis única IV y SC de ALP201 en ratas y monos. La tolerabilidad de ALP201 se evaluó en los estudios PK de dosis única IV y SC en ratas y monos mediante observaciones clínicas, que incluyeron reacciones en el sitio de inyección y datos de anatomía patológica clínica. En resumen, ALP201 se toleró bien cuando se administró una única dosis por vía IV o SC en ratas hasta 27 mg/kg y en monos hasta 20 mg/kg.

Los estudios de toxicidad de 28 días de ALP201 definitivos que cumplen con las GLP en monos cynomolgus y ratas Sprague-Dawley están en curso. La parte en vida de los estudios con ratas y monos, incluidas las fases de recuperación, está completa y se están preparando los informes. Aunque los informes preliminares auditados de estos estudios aún no están disponibles, todos los datos de ambos estudios, excepto los datos del ADA, están disponibles y los hallazgos se resumen en la Tabla 27. En resumen, los resultados de los estudios de toxicidad de 28 días de ALP201 en ratas y monos indican que el tratamiento con ALP201 no produjo ningún efecto adverso destacable/biológicamente significativo relacionado con el tratamiento de ninguno de los criterios de valoración de toxicidad evaluados en ambos estudios, incluidos los criterios de valoración de farmacología de seguridad.

25 Tabla 27: Comparación de los hallazgos de los estudios de toxicidad de ALP201 de GLP de 28 días en ratas y monos

	Estudio de toxicidad de ALP201 de GLP en mono ^a	Estudio de toxicidad de ALP201 de GLP en rata ^a
Edad de los animales	Aproximadamente 2-3 años	Aproximadamente 7-8 semanas

	Estudio de toxicidad de ALP201 de GLP en mono ^a	Estudio de toxicidad de ALP201 de GLP en rata ^a
Duración del estudio	28 días	28 días
Período de recuperación	28 días	28 días
Vía de administración	Inyección subcutánea	Inyección subcutánea ^b
Frecuencia de administración	Una vez cada 3 días (Q3D)	Una vez cada 3 días (Q3D)
Cantidad total de dosis administradas	10 dosis	10 dosis
Dosis administradas	0, 1, 5 o 20 mg/kg/dosis	0, 2, 10 o 30 mg/kg/dosis
NOAEL	20 mg/kg/dosis	30 mg/kg/dosis
AUC_{0-t}^c en NOAEL	Día 1: 27, 900 µg·h/mL Día 24: 36, 800 µg·h/mL	Día 1: 11, 600 µg·h/mL Día 24: 4, 380 µg·h/mL
C_{max} en NOAEL^c	Día 1: 125 µg/mL Día 24: 254 µg/mL	Día 1: 79,9 µg/mL Día 24: 43,9 µg/mL
Mortalidad	Sin mortalidad	Sin mortalidad
Observaciones clínicas	Sin observaciones clínicas relacionadas con el tratamiento	Sin observaciones clínicas relacionadas con el tratamiento
Peso corporal	Sin hallazgos relacionados con el tratamiento	Sin hallazgos relacionados con el tratamiento
Consumo de alimentos	Sin hallazgos relacionados con el tratamiento	Sin hallazgos relacionados con el tratamiento

	Estudio de toxicidad de ALP201 de GLP en mono ^a	Estudio de toxicidad de ALP201 de GLP en rata ^a
Oftalmología	Sin hallazgos relacionados con el tratamiento	Sin hallazgos relacionados con el tratamiento
Observaciones dérmicas	Sin hallazgos relacionados con el tratamiento en el lugar de la inyección	Sin hallazgos relacionados con el tratamiento en el lugar de la inyección
ECG	Sin hallazgos relacionados con el tratamiento basados en parámetros cuantitativos (frecuencia cardíaca, intervalo RR, intervalo PR, duración QRS, intervalo QT e intervalo QTc) y la revisión cualitativa del ECG	NA
Presión sanguínea	Sin hallazgos relacionados con el tratamiento	NA
Respiratorio	Sin hallazgos relacionados con el tratamiento	Sin hallazgos relacionados con el tratamiento
CNS	NA	Sin hallazgos relacionados con el tratamiento
Parámetros de anatomía patológica clínica		
Hematología	Sin hallazgos relacionados con el tratamiento	Sin hallazgos relacionados con el tratamiento
Coagulación	Sin hallazgos relacionados con el tratamiento	Sin hallazgos relacionados con el tratamiento

	Estudio de toxicidad de ALP201 de GLP en mono ^a	Estudio de toxicidad de ALP201 de GLP en rata ^a
Química Clínica	Sin hallazgos relacionados con el tratamiento aparte de los aumentos dependientes de la dosis en los niveles de ALP, un efecto farmacológico esperado	Sin hallazgos relacionados con el tratamiento aparte de los aumentos dependientes de la dosis en los niveles de ALP, un efecto farmacológico esperado
Análisis de orina	Sin hallazgos relacionados con el tratamiento	Sin hallazgos relacionados con el tratamiento
Peso de los órganos	Sin hallazgos relacionados con el tratamiento	Sin hallazgos relacionados con el tratamiento
Hallazgos macroscópicos	Sin hallazgos relacionados con el tratamiento	Sin hallazgos relacionados con el tratamiento
Anatomía patológica	Se observó una ligera degeneración/necrosis y mineralización de los sitios de inyección; pero se concluyó que no eran adversos. Estos hallazgos se recuperaron parcialmente al final de la recuperación. No se notaron otras observaciones micro o macroscópicas en el estudio.	Hallazgos esporádicos en el lugar de la inyección con cambios reactivos asociados en los ganglios linfáticos de drenaje; estos hallazgos no fueron dependientes de la dosis y se concluyó que no eran adversos; estos hallazgos se revirtieron parcialmente al final de la recuperación. No se notaron otras observaciones micro o macroscópicas en el estudio.
Inmunogenicidad	Datos aún no disponibles	Datos aún no disponibles

^a Los estudios de toxicidad de 28 días en ratas y monos se encuentran en la fase de informe.

^b En un estudio con ratas, se administró una dosis única de ALP201 a 10 mg/kg por vía intravenosa a los animales del Grupo 5, para determinar la biodisponibilidad absoluta de ALP201 después de la administración SC.

- 5 ^c Se notifican los valores medios de exposición sistémica combinados por género. Los valores de AUC para los estudios IV y SC se informan como AUC_{0-24,5} y AUC₀₋₁₆₈, respectivamente. Abreviaturas: ALP = fosfatasa alcalina; AUC = área bajo la curva de concentración-tiempo; C_{max} = concentración plasmática máxima observada; CNS = sistema nervioso central; ECG =

electrocardiograma; GLP = buenas prácticas de laboratorio; IV = intravenoso; NOAEL = nivel sin efecto adverso observado; Q3D = cada 3 días SC = subcutáneo.

Estrategia de seguridad no clínica para el desarrollo clínico de última etapa de ALP201

- 5 ALP201 es una ERT mejorada en relación con el producto de ERT comercializado por Alexion, asfotasa alfa (STRENSIQ®). El dominio catalítico de TNSALP humana de ALP201 incluye cambios diseñados racionalmente en 3 posiciones para conferir una mayor actividad enzimática. La parte Fc de ALP201 es una inmunoglobulina humana gamma 2/4 (IgG2/4), mientras que la parte Fc de la asfotasa alfa es una inmunoglobulina humana IgG1. Las regiones
10 de extremo C de ALP201 y asfotasa alfa, que se dirigen al hueso, son idénticas.

Los hallazgos disponibles de ALP201 y estudios seleccionados de asfotasa alfa son los siguientes:

1. Los hallazgos de toxicidad de los estudios de toxicología de 28 días de GLP de ALP201 en ratas y monos son muy similares (Tabla 31)
- 15 2. Los hallazgos de toxicidad de los estudios de toxicología de ALP201 y asfotasa alfa de duración similar (4 semanas/28 días) en monos y ratas son muy similares (Tabla 32 y Tabla 33, respectivamente)
3. Los hallazgos de toxicidad del paquete completo de seguridad no clínica de asfotasa alfa se limitan en gran medida a hallazgos transitorios de tolerabilidad local en ratas, sin otros
20 hallazgos adversos notables relacionados con el tratamiento con asfotasa alfa.

Estrategia de estudios de toxicología general crónica/ 6 meses de ALP201

- Una estrategia de estudio de toxicología crónica de una sola especie está respaldada por las
25 siguientes observaciones:

4. No se observaron hallazgos notables de toxicidad sistémica y/o tolerabilidad local en estudios de toxicología de GLP de 28 días en ratas y monos, después de 10 administraciones repetidas de ALP201 SC una vez cada 3 días (Q3D), aunque las exposiciones sistémicas de ALP201 fueron significativamente más altas en comparación con la asfotasa alfa. Las
30 exposiciones sistémicas se resumen en las Tablas 31 y 32
5. Los hallazgos de toxicidad de los estudios de toxicología de GLP de 28 días de ALP201

en rata y mono fueron muy similares. Los hallazgos de estos estudios se resumen en la Tabla 28.

6. Si los hallazgos toxicológicos de los estudios de toxicología general a corto plazo son similares, los estudios de toxicidad general a más largo plazo en 1 especie suelen considerarse suficientes.
7. La rata es la especie preferida para el estudio de toxicidad crónica con ALP201. Además, la rata es la especie preferida cuando solo se utiliza una especie para realizar estudios de toxicidad general a más largo plazo.

Tabla 28: Comparación de hallazgos de estudios de toxicidad de asfotasa alfa y ALP201 de GLP en mono

	Estudio de toxicidad de asfotasa alfa de GLP en mono	Estudio de toxicidad de asfotasa alfa de GLP en mono	Estudio de toxicidad de ALP201 de GLP en mono
Edad de los animales	Aproximadamente 1 año (monos jóvenes)	Aproximadamente 1 año (monos jóvenes)	Aproximadamente 2-3 años
Duración del estudio	4 semanas	6 meses (26 semanas)	4 semanas
Período de recuperación	28 días	28 días	28 días
Vía de administración	Inyección intravenosa	Inyección subcutánea	Inyección subcutánea
Frecuencia de administración	Una vez a la semana	Una vez al día	Una vez cada 3 días (Q3D)
Cantidad total de dosis administradas	4 dosis (días 1, 8, 15 y 22)	182 dosis	10 dosis
Dosis administradas	0, 5, 15 o 45 mg/kg/dosis	0, 0,43, 2,14 o 10 mg/kg/día	0, 1, 5 o 20 mg/kg/dosis
NOAEL	45 mg/kg/dosis	10 mg/kg/día	20 mg/kg/dosis
AUC_{0-168 h} en NOAEL	Día 1: 3,190 µg·h/mL Día 22: 2,670 µg·h/mL	Día 1: 50 µg·h/mL ^a Semana 26: 124 µg·h/mL ^a	Día 1: 27,900 µg·h/mL Día 24: 36,800 µg·h/mL
C_{max} en NOAEL	Día 1: 726 µg/mL Día 22: 691 µg/mL	Día 1: 2,66 µg/mL Semana 26: 6,68 µg/mL	Día 1: 125 µg/mL Día 24: 254 µg/mL

	Estudio de toxicidad de asfotasa alfa de GLP en mono	Estudio de toxicidad de asfotasa alfa de GLP en mono	Estudio de toxicidad de ALP201 de GLP en mono
Mortalidad	Sin mortalidad	Sin mortalidad	Sin mortalidad
Observaciones clínicas	Sin observaciones clínicas relacionadas con el tratamiento	Sin observaciones clínicas relacionadas con el tratamiento	Sin observaciones clínicas relacionadas con el tratamiento
Peso corporal	Sin hallazgos relacionados con el tratamiento	Sin hallazgos relacionados con el tratamiento	Sin hallazgos relacionados con el tratamiento
Consumo de alimentos	Sin hallazgos relacionados con el tratamiento	Sin hallazgos relacionados con el tratamiento	Sin hallazgos relacionados con el tratamiento
Oftalmología	Sin hallazgos relacionados con el tratamiento	Sin hallazgos relacionados con el tratamiento	Sin hallazgos relacionados con el tratamiento
Observaciones dérmicas	Sin hallazgos relacionados con el tratamiento	La reacción en el lugar de la inyección en todas las dosis incluye costras en la piel, piel seca y/o enrojecida	Sin hallazgos relacionados con el tratamiento en el lugar de la inyección

	Estudio de toxicidad de asfotasa alfa de GLP en mono	Estudio de toxicidad de asfotasa alfa de GLP en mono	Estudio de toxicidad de ALP201 de GLP en mono
ECG	Sin hallazgos relacionados con el tratamiento basados en parámetros cuantitativos (frecuencia cardíaca, intervalo RR, intervalo PR, duración QRS, intervalo QT e intervalo QTc) y la revisión cualitativa del ECG	Sin hallazgos relacionados con el tratamiento basados en parámetros cuantitativos (frecuencia cardíaca, intervalo RR, intervalo PR, duración QRS, intervalo QT e intervalo QTc) y la revisión cualitativa del ECG	Sin hallazgos relacionados con el tratamiento basados en parámetros cuantitativos (frecuencia cardíaca, intervalo RR, intervalo PR, duración QRS, intervalo QT e intervalo QTc) y la revisión cualitativa del ECG
Presión sanguínea	Sin hallazgos relacionados con el tratamiento	Sin hallazgos relacionados con el tratamiento	Sin hallazgos relacionados con el tratamiento
Anatomía patológica clínica			
Hematología	Sin hallazgos relacionados con el tratamiento	Sin hallazgos relacionados con el tratamiento	Sin hallazgos relacionados con el tratamiento
Coagulación	Sin hallazgos relacionados con el tratamiento	Sin hallazgos relacionados con el tratamiento	Sin hallazgos relacionados con el tratamiento

	Estudio de toxicidad de asfotasa alfa de GLP en mono	Estudio de toxicidad de asfotasa alfa de GLP en mono	Estudio de toxicidad de ALP201 de GLP en mono
Química clínica	Sin hallazgos relacionados con el tratamiento aparte de los aumentos dependientes de la dosis en los niveles de ALP, un efecto farmacológico.	Sin hallazgos relacionados con el tratamiento aparte de los aumentos dependientes de la dosis en los niveles de ALP, un efecto farmacológico.	Sin hallazgos relacionados con el tratamiento aparte de los aumentos dependientes de la dosis en los niveles de ALP, un efecto farmacológico.
Análisis de orina	Sin hallazgos relacionados con el tratamiento	Sin hallazgos relacionados con el tratamiento	Sin hallazgos relacionados con el tratamiento
Peso de los órganos	Sin hallazgos relacionados con el tratamiento	Sin hallazgos relacionados con el tratamiento	Sin hallazgos relacionados con el tratamiento
Hallazgos macroscópicos	Sin hallazgos relacionados con el tratamiento	Sin hallazgos relacionados con el tratamiento	Sin hallazgos relacionados con el tratamiento

	Estudio de toxicidad de asfotasa alfa de GLP en mono	Estudio de toxicidad de asfotasa alfa de GLP en mono	Estudio de toxicidad de ALP201 de GLP en mono
Anatomía patológica	Sin hallazgos relacionados con el tratamiento	Los sitios de inyección tenían inflamación granulomatosa focal e infiltración mononuclear a dosis $\geq 0,43$ mg/kg/dosis que se recuperó parcial o completamente al final del período de recuperación; Ligera degeneración o necrosis del músculo debajo del lugar de inyección en un mono macho a 2,14 mg/kg/dosis	Se observó una ligera degeneración/necrosis y mineralización de los sitios de inyección; pero se concluyó como no adversos. Estos hallazgos se recuperaron parcialmente al final de la recuperación. No se notaron otras observaciones micro o macroscópicas en el estudio.

^a Los valores de AUC para el Estudio 670338 se informan como AUC_{0-24 h}

Abreviaturas: ALP = fosfatasa alcalina; AUC = área bajo la curva de concentración-tiempo; ADA= Anticuerpo antifármaco; C_{max} = concentración en plasma observada máxima; ECG = electrocardiograma; GLP = buenas prácticas de laboratorio; NOAEL = nivel sin efecto adverso observado; Q3D = cada 3 días.

Tabla 29: Comparación de hallazgos de estudios de toxicidad de asfotasa alfa y ALP201 de GLP en rata

	Estudio de toxicidad de asfotasa alfa de GLP en rata	Estudio de toxicidad de asfotasa alfa de GLP en rata	Estudio de toxicidad de ALP201 de GLP en rata
Edad de los animales	Aproximadamente 21-24 días (ratas jóvenes)	Aproximadamente 21 días (ratas jóvenes)	Aproximadamente 7-8 semanas
Duración del estudio	4 semanas	6 meses	4 semanas
Período de recuperación	28 días	28 días	28 días
Vía de administración	Inyección intravenosa	Inyección intravenosa	Inyección subcutánea
Frecuencia de administración	Una vez a la semana	Una vez al día	Una vez cada 3 días (q3d)
Cantidad total de dosis administradas	4 dosis (días 1, 8, 15 y 22)	182 dosis	10 dosis
Dosis administradas	0, 3, 30 o 90 mg/kg/dosis (dosis nominales) 0, 2,6, 26 o 77 mg/kg/dosis (dosis medidas reales)	0, 1, 3 o 13 mg/kg/día	0, 2, 10 o 30 mg/kg/dosis
NOAEL	26 mg/kg/dosis	13 mg/kg/día	30 mg/kg/dosis

	Estudio de toxicidad de asfotasa alfa de GLP en rata	Estudio de toxicidad de asfotasa alfa de GLP en rata	Estudio de toxicidad de ALP201 de GLP en rata
AUC₀₋₁₆₈^a en NOAEL	Día 23: NA	Semana 1: 364 µg·h/mL Semana 26: 379 µg·h/mL	Día 1: 11, 600 µg·h/mL Día 24: 4, 380 µg·h/mL
C_{max} en NOAEL	Día 23: 3,79 µg/mL	Semana 1: 115 µg/mL Semana 26: 281 µg/mL	Día 1: 79,9 µg/mL Día 24: 43,9 µg/mL
Mortalidad	1 rata (se concluyó que no estuvo relacionada con el tratamiento)	9 ratas (se concluyó que las 9 muertes no estuvieron relacionadas con el tratamiento)	Sin mortalidad
Observaciones clínicas	Reacciones a la inyección agudas/transitorias (hasta 60 minutos después de la dosis) en todas las dosis; no se observaron reacciones a la inyección durante el período de recuperación en todos los grupos o en el grupo de control del vehículo durante el período de tratamiento	Hinchazón aguda dependiente de la dosis de las extremidades (patas delanteras y traseras y hocico); esta hinchazón disminuyó en < 24 horas después de la dosis	Sin observaciones clínicas relacionadas con el tratamiento

	Estudio de toxicidad de asfotasa alfa de GLP en rata	Estudio de toxicidad de asfotasa alfa de GLP en rata	Estudio de toxicidad de ALP201 de GLP en rata
Peso corporal	Ligeras disminuciones dependientes de la dosis (7,4-12,1 %) en el aumento de peso corporal medio en machos durante el período de recuperación	Sin hallazgos relacionados con el tratamiento	Sin hallazgos relacionados con el tratamiento
Consumo de alimentos	Ligeras disminuciones dependientes de la dosis en el consumo de alimentos en los machos que se correlacionan con disminuciones en los aumentos de peso corporal	Sin hallazgos relacionados con el tratamiento	Sin hallazgos relacionados con el tratamiento
Oftalmología	Sin hallazgos relacionados con el tratamiento	Sin hallazgos relacionados con el tratamiento	Sin hallazgos relacionados con el tratamiento
Observaciones dérmicas	Sin hallazgos relacionados con el tratamiento	La reacción en el lugar de la inyección en todas las dosis incluye costras en la piel, piel seca y/o enrojecida	Sin hallazgos relacionados con el tratamiento en el lugar de la inyección

	Estudio de toxicidad de asfotasa alfa de GLP en rata	Estudio de toxicidad de asfotasa alfa de GLP en rata	Estudio de toxicidad de ALP201 de GLP en rata
CNS	Sin hallazgos relacionados con el tratamiento	Sin hallazgos relacionados con el tratamiento	Sin hallazgos relacionados con el tratamiento
Ciclo estral	Sin hallazgos relacionados con el tratamiento	Sin hallazgos relacionados con el tratamiento	Sin hallazgos relacionados con el tratamiento
Anatomía patológica clínica			
Hematología	A dosis altas, ligeras disminuciones de neutrófilos, monocitos y eosinófilos; ligeros aumentos en linfocitos, plaquetas y reticulocitos en relación con el grupo de control	Sin hallazgos relacionados con el tratamiento	Sin hallazgos relacionados con el tratamiento
Coagulación	Sin hallazgos relacionados con el tratamiento	Sin hallazgos relacionados con el tratamiento	Sin hallazgos relacionados con el tratamiento
Química clínica	Sin hallazgos relacionados con el tratamiento aparte de los aumentos dependientes de la dosis en los niveles de ALP, un efecto farmacológico deseado.	Sin hallazgos relacionados con el tratamiento aparte de los aumentos dependientes de la dosis en los niveles de ALP, un efecto farmacológico deseado.	Sin hallazgos relacionados con el tratamiento aparte de los aumentos dependientes de la dosis en los niveles de ALP, un efecto farmacológico deseado.

	Estudio de toxicidad de asfotasa alfa de GLP en rata	Estudio de toxicidad de asfotasa alfa de GLP en rata	Estudio de toxicidad de ALP201 de GLP en rata
Análisis de orina	Sin hallazgos relacionados con el tratamiento	Sin hallazgos relacionados con el tratamiento	Sin hallazgos relacionados con el tratamiento
Peso de los órganos	Sin hallazgos relacionados con el tratamiento	Sin hallazgos relacionados con el tratamiento	Sin hallazgos relacionados con el tratamiento
Hallazgos macroscópicos	Sin hallazgos relacionados con el tratamiento	Sin hallazgos relacionados con el tratamiento	Sin hallazgos relacionados con el tratamiento
Anatomía patológica	Sin hallazgos relacionados con el tratamiento	Sin hallazgos relacionados con el tratamiento	Hallazgos esporádicos en el lugar de la inyección con cambios reactivos asociados en los ganglios linfáticos de drenaje; estos hallazgos no fueron dependientes de la dosis y se concluyó que no eran adversos; estos hallazgos se revirtieron parcialmente al final de la recuperación. No se notaron otras observaciones micro o macroscópicas en el estudio.

	Estudio de toxicidad de asfotasa alfa de GLP en rata	Estudio de toxicidad de asfotasa alfa de GLP en rata	Estudio de toxicidad de ALP201 de GLP en rata
Inmunogenicidad	El ensayo de detección de ADA demostró ADA en todos los grupos de dosis, incluidos los grupos de vehículo (día 1 67 % y día 28 100 %) y tratamiento (día 1 56 a 89 % y día 28 100 %); no se realizó ningún ensayo ADA confirmatorio debido a la baja disponibilidad de volumen de muestra.	No se observó una respuesta notable de ADA	Datos aún no disponibles

^a Se notifican los valores medios de exposición sistémica combinados por género. Los valores de AUC se informan como AUC₀₋

168

Abreviaturas: ALP = fosfatasa alcalina; AUC = área bajo la curva de concentración-tiempo; ADA= anticuerpo antifármaco; C_{max} = concentración en plasma observada máxima; CNS = sistema nervioso central; GLP = buenas prácticas de laboratorio; IV = intravenoso; MTD = dosis máxima tolerada; NOAEL = nivel sin efecto adverso observado; Q3D = cada 3 días; SC = subcutáneo.

Análisis basados en modelos y regímenes de dosis previstos en humanos

Modelado de ALP201

5 Datos utilizados en los modelos actuales

Para realizar la extrapolación de dosis de ratón (especie modelo de la enfermedad) a humanos, se requiere un análisis PK suficiente para simular exposiciones humanas a partir de dosis escaladas de forma alométrica. Estaban disponibles limitados datos PK de ratón; un estudio de dosis única en ratones de tipo salvaje (HPP-PK-01) y mediciones de $C_{\text{mínima}}$ únicas (D36/D37) de 2 estudios de eficacia en ratones Akp2GW -/- de dosis múltiples (HPP-PoC-01 y HPP-MED-01). Para crear una caracterización PK sólida de ALP201, los datos de ratón se enriquecieron con datos PK de estudios de búsqueda de intervalo de dosis en ratas y monos cynomolgus. La Tabla 30 muestra los datos (47 animales y 387 concentraciones PK), hasta la fecha, analizados utilizando un enfoque de modelado de farmacocinética poblacional (Pop-PK). Para el modelo de dosis-respuesta, se utilizaron datos de eficacia (mineralización ósea) de 2 estudios de eficacia en ratones Akp2GW -/- (HPP-PoC-01 y HPP-MED-01).

Tabla 30: Datos PK de dosis única de ALP201 utilizados para desarrollar el modelo Pop-PK

		Dosis única de ALP201, mg/kg; N (mediciones)								
Especie	Vía	1	2	3	4	6	9	20	27	Total
Ratón	IV	.	.	.	4 (30)	.	.	.	.	.
	SC	.	.	.	4 (37)	.	.	.	.	.
Rata	IV	4 (33)	.	4 (33)	.	.	4 (36)	.	4 (35)	.
	SC	.	4 (24)	.	.	.	.	.	4 (35)	.
Mono	IV	.	3 (27)	.	.	3 (26)	.	3 (24)	.	.
	SC	.	3 (24)	.	.	.	.	3 (24)	.	.
Total		.	.	.	.	.	.	.	.	47 (387)

20 Abreviaturas: IV = intravenoso; N = cantidad de animales; PK = farmacocinética; Pop-

PK = farmacocinética poblacional; SC = subcutáneo.

Modelo Pop-PK actual

El modelo Pop-PK actual se desarrolló utilizando el programa de software NONMEM, versión 5 7.2 (ICON solutions) para analizar simultáneamente los datos PK de 3 especies animales teniendo en cuenta las diferencias en la disposición PK mediante el uso de principios alométricos basados en el peso corporal, en donde el peso corporal del animal se centró en 70 kg y los exponentes alométricos se fijaron en 0,75 para los parámetros de eliminación y en 1,0 para los parámetros del volumen de distribución. Los datos IV y SC también se ajustaron 10 simultáneamente para estimar los parámetros extravasculares, por ejemplo, la biodisponibilidad absoluta, después de la inyección SC. El modelo actual es un modelo de dos compartimentos con eliminación lineal y las estimaciones de los parámetros del modelo se encuentran en la Tabla 31.

15 **Tabla 31: Estimaciones de parámetros para el modelo Pop-PK provisional**

Parámetro, Unidades	Valor típico	RSE (%)	BSV (%)	RSE (%)	Contracción (%)
Eliminación, CL, L/h/70 kg	0,025	5	27	24	10
Volumen Central, V2, L/70 kg	3,48	5	.	.	.
Volumen periférico, V3, L/70 kg	2,71	13	.	.	.
CL periférica, Q, L/ h/70 kg	0,027	36	.	.	.
Tasa de absorción, Ka, 1/h	0,031	25	86	41	40
Biodisponibilidad, F, %	74,6	11	76	76	59
Error residual proporcional; RATA, %	24,6	38	.	.	7
Error residual aditivo; RATA, ug/mL	0,707	29	.	.	7
Error residual proporcional; CYNO, %	30,4	36	.	.	7

Parámetro, Unidades	Valor típico	RSE (%)	BSV (%)	RSE (%)	Contracción (%)
Error residual proporcional; RATÓN, %	47	31	.	.	5

Abreviaturas: BSV=variabilidad entre sujetos; RSE = error estándar relativo (precisión del parámetro de la etapa \$COV)

El valor típico o las estimaciones de los parámetros medios para los parámetros PK se estimaron suficientemente. La variabilidad (BSV) para CL fue aceptable y bien estimada; sin embargo, la variabilidad de Ka y F fue grande (86 % y 76 %, respectivamente) y no se estimó bien. La contracción es una evaluación de cómo los datos informaron la estimación de los parámetros PK con un valor de <30 % como bueno. Dados los altos valores de contracción de Ka y F (40 % y 59 %, respectivamente), los datos adicionales de los estudios toxicológicos de GLP de 4 semanas deberían mejorar la estimación de los parámetros Ka y F. En general, el modelo Pop-PK actual debería proporcionar simulaciones de dosis razonables dadas las buenas estimaciones de parámetros medios; aunque, la región de variabilidad puede ser demasiado amplia.

Modelo actual de dosis-respuesta

El modelo de dosis-respuesta desarrollado se seleccionó probando modelos de la familia $E_{\max}$. La mayoría de las relaciones dosis-respuesta se pueden describir mediante una de las parametrizaciones del modelo $E_{\max}$. La mejor caracterización actual de dosis-respuesta es mediante el uso de un modelo $E_{\max}+E_0$ (inicial). El criterio de valoración de la eficacia, la mineralización ósea, fue una evaluación radiográfica, y se seleccionó porque compartía la misma definición clínica de eficacia que la utilizada para la evaluación no clínica de dosis-respuesta para asfotasa alfa. La mineralización ósea después del tratamiento con asfotasa alfa o ALP201 de 2 estudios de eficacia (HPP-PoC-01 y HPP-MED-01) se graficó en función de la dosis (Figura 16). Los datos de asfotasa alfa del estudio de eficacia anterior ALP-PT-12 se incluyeron para la comparación. El eje y se expresó como %Normal, que se definió como el porcentaje de ratones en un grupo de dosis con puntuaciones de mineralización ósea de 4. El eje x se expresó como dosis normalizada en mg/kg/día. La dosis que produce la mineralización normal en el 85 % de la población tratada (ED85) se eligió como la dosis efectiva objetivo.

Traducción de dosis de ratón a humano y dosis iniciales propuestas para humanos

Se aplicó una escala alométrica a la dosis efectiva objetivo de ratón (ED85) para determinar una dosis humana. La ecuación para predecir a partir de la ED85 de ratón la dosis equivalente en humanos (HED, mg/kg/día) fue $ED85 \times (0,025 \text{ kg ratón}/70 \text{ kg humano})^{0,25}$. La HED se tradujo en una dosis fija semanal de 45 mg/semana y se utilizó como dosis inicial para el grupo MAD del estudio FIH. La dosis inicial máxima recomendada (MRSD) para el grupo SAD se seleccionó después de considerar los resultados de los métodos NOAEL y MABEL. Se decidió que la dosis estudiada que produjera la respuesta farmacológica mínima dentro del objetivo sería seleccionada y traducida a una dosis humana fija (5 mg).

Otras modalidades

La descripción detallada y los ejemplos que anteceden se han proporcionado con el único fin de una comprensión clara. No se deben interpretar limitaciones innecesarias a partir de estos. La descripción no se limita a los datos exactos que se muestran y se describen, ya que variaciones evidentes para el experto en la técnica quedarán incluidas dentro del alcance definido por las reivindicaciones.

A menos que se indique lo contrario, se debe comprender que todas las cifras que expresan cantidades de componentes, pesos moleculares, etc. utilizados en la memoria descriptiva y las reivindicaciones se encuentran modificadas en todos los casos por la expresión «alrededor de». Por consiguiente, a menos que se indique lo contrario, los parámetros numéricos que se indican en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones son aproximaciones que pueden variar dependiendo de las propiedades deseadas que se busque obtener. Como mínimo, y no como un intento de limitar la doctrina de equivalentes al alcance de las reivindicaciones, cada parámetro numérico se debería interpretar al menos en vista de la cantidad de dígitos significativos indicados y mediante la aplicación de técnicas de redondeo comunes.

A pesar de que los intervalos numéricos y los parámetros que establecen el amplio alcance de la descripción son aproximaciones, los valores numéricos establecidos en los ejemplos específicos se informan con la mayor precisión posible. Sin embargo, todos los valores numéricos contienen inherentemente un intervalo que resulta necesariamente de la desviación

estándar que se encuentra en sus mediciones de prueba respectivas.

Las descripciones completas de todas las patentes, las solicitudes de patentes, incluidas las solicitudes de patentes provisionales, las publicaciones, incluidas las publicaciones de patentes y las publicaciones que no son de patentes, y el material disponible electrónicamente (incluidas, 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 regiones codificantes anotadas en GenBank y RefSeq) citadas en el presente documento se incorporan mediante referencia. La descripción detallada y los ejemplos que anteceden se han proporcionado con el único fin de una compresión clara. No se deben interpretar limitaciones innecesarias a partir de estos. La descripción no se limita a los datos exactos que se muestran y se describen, ya que variaciones evidentes para el experto en la técnica quedarán incluidas dentro de las modalidades definidas por las reivindicaciones.