

TRATAMIENTO DE LA DEBILIDAD MUSCULAR CON FOSFATASAS

ALCALINAS

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reivindica la prioridad a, y el beneficio de, la solicitud provisional de los EE. UU. núm. 63/463.539, presentada el 2 de mayo de 2023, cuyo contenido completo se incorpora en la presente como referencia.

LISTADO DE SECUENCIAS

La solicitud inmediata contiene un Listado de secuencias que se ha presentado electrónicamente en formato de archivo XML y se incorpora en la presente como referencia en su totalidad. Dicho ejemplar XML, creado el 22 de marzo de 2024, se denomina 0467WO_SL.xml y tiene un tamaño de 31.813 bytes.

ANTECEDENTES

Las enfermedades similares a la hipofosfatasia (HPP, por sus siglas en inglés) son causadas por etiologías desconocidas y dan lugar a una notable gama de síntomas y gravedad, desde raquitismo (osteomalacia) hasta ausencia casi completa de mineralización ósea en el

útero. La mayoría de los sujetos exhiben características de alteraciones esqueléticas, baja estatura, dolor en las extremidades inferiores, alteración de la marcha y pérdida prematura de dientes. Además, estos sujetos exhiben debilidad muscular e hipotonía, que disminuye severamente su calidad de vida debido a las deficiencias físicas que este tipo de enfermedades imparten a diario.

SUMARIO

Se presenta un método para tratar o reducir el riesgo de desarrollar debilidad muscular en un sujeto que tiene o está en riesgo de tener una enfermedad de debilidad muscular administrando al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de al menos un polipéptido recombinante que tiene actividad de fosfatasa alcalina, en donde el sujeto exhibe una concentración reducida de fosfatasa alcalina inespecífica de tejido (TNSALP, por sus siglas en inglés), y en donde el sujeto no tiene una mutación anuladora en un gen *ALPL*.

La concentración reducida de TNSALP puede causarse por una transcripción reducida de *ALPL*, traducción reducida del ARNm de *ALPL*, modificación postraducciona l elevada o reducida de TNSALP, o reducción de la actividad enzimática de TNSALP. La transcripción reducida de *ALPL*, la traducción reducida del ARNm de

ALPL, la modificación postraducciona elevada o reducida de *TNSALP*, o la reducción de la actividad enzimática de *TNSALP* pueden medirse en relación con un sujeto normal.

El sujeto puede tener una mutación en una región no traducida 3' (UTR, por sus siglas en inglés), una UTR 5' o una región intrónica del gen *ALPL*. El sujeto puede tener una mutación en uno o más de *ATP1A3*, *ANKH*, *ENPP1*, *FGFR3*, *PHOSPHO1*, *PTH1R*, *PTH2R*, *SPP1*, *TNFRSF11A*, *TNFRSF11B*, *COL1A1*, *COL1A2*, *SOX9*, *PDXP*, *AOX1*, *PNPO*, *PDXK*, *ADCK3*, *MTRNR2*, y *S1PR1*. El sujeto puede tener una variante *ATP1A3* c.357+1G>A. El sujeto puede tener una variante *ADCK3* m.1665G>A. El sujeto puede tener una variante *MTRNR2* m.1836A>G.

Un músculo (p. ej., un músculo de la pierna, tal como un músculo sóleo o un músculo extensor digitorum longus (EDL, por sus siglas en inglés)) de dicho sujeto no es significativamente diferente de un músculo de un sujeto normal sin dicha enfermedad de debilidad muscular en al menos una propiedad seleccionada de la proporción de tipo de fibra muscular y propiedades contráctiles de la fibra.

La enfermedad de debilidad muscular puede causarse por una actividad reducida de fosfatasa alcalina. El sujeto puede tener una concentración sérica elevada de pirofosfato (PPi), y/o la enfermedad de debilidad muscular puede causarse por la concentración elevada de PPi. La

concentración elevada de pirofosfato (PPi) puede potenciar la debilidad muscular en dicho sujeto. La administración del polipéptido recombinante reduce la concentración de PPi en el sujeto (p. ej., en 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, o 100 %) en relación con un sujeto no tratado.

El polipéptido recombinante puede administrarse al sujeto diariamente durante al menos una semana, un mes, tres meses, seis meses o un año. El polipéptido recombinante puede administrarse por vía subcutánea, intravenosa, intramuscular, sublingual, intratecal o intradérmica.

El polipéptido recombinante puede incluir al menos una de una fosfatasa alcalina inespecífica de tejido (TNALP, por sus siglas en inglés), una fosfatasa alcalina placentaria (PALP, por sus siglas en inglés), una fosfatasa alcalina de células germinales (GCALP, por sus siglas en inglés), una fosfatasa alcalina intestinal (IALP, por sus siglas en inglés), y fragmentos biológicamente funcionales, fusiones, o constructos quiméricos de estos. El polipéptido recombinante puede incluir al menos uno de un fragmento soluble de TNALP, PALP, GCALP e IALP. La fosfatasa alcalina inespecífica de tejido (TNALP) puede contener aminoácidos 1-485 de la sec. con núm. de ident.: 1.

El polipéptido recombinante puede ser una proteína de fusión. El polipéptido recombinante puede incluir una molécula de inmunoglobulina, tal como una región de fragmento cristalizante (Fc). El Fc puede tener una secuencia de aminoácidos de la sec. con. núm. de ident.: 20. El polipéptido recombinante puede incluir un péptido cargado negativamente. El polipéptido cargado negativamente puede incluir de uno a cincuenta aminoácidos cargados negativamente, tales como un ácido aspártico o ácido glutámico. El péptido cargado negativamente puede incluir al menos uno de D₁₀, D₁₆, E₁₀, y E₁₆.

El polipéptido recombinante puede incluir una fosfatasa alcalina dirigida al hueso que tiene la estructura:

Z-sALP-Y-espaciador-X-W_n-V,

en donde sALP es el dominio extracelular de la fosfatasa alcalina;

V está ausente o es una secuencia de aminoácidos de al menos un aminoácido;

X está ausente o es una secuencia de aminoácidos de al menos un aminoácido;

Y está ausente o es una secuencia de aminoácidos de al menos un aminoácido;

Z está ausente o es una secuencia de aminoácidos de al menos un aminoácido; y

W_n es un poliaspartato o un poliglutamato en donde $n=10$ a 16 .

El espaciador puede incluir una región Fc (p. ej., un FC que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 20). El polipéptido recombinante puede incluir la estructura de sALP-Fc-D₁₀.

El polipéptido recombinante puede administrarse a una dosificación de aproximadamente $0,1$ mg/kg/día a aproximadamente 20 mg/kg/día (p. ej., aproximadamente $0,5$ mg/kg/día a aproximadamente 20 mg/kg/día, aproximadamente $0,5$ mg/kg/día a aproximadamente 10 mg/kg/día, aproximadamente 1 mg/kg/día a aproximadamente 10 mg/kg/día, p. ej., aproximadamente 6 mg/kg/semana), o una dosificación semanal comparable. El polipéptido recombinante puede administrarse a una dosificación de aproximadamente 1 mg/kg 6 veces por semana, aproximadamente 2 mg/kg 3 veces por semana, o 3 mg/kg 2 veces por semana.

Antes de la administración del polipéptido recombinante, el sujeto puede caracterizarse por tener una distancia promedio de caminata en seis minutos de aproximadamente 350 metros o menos. La administración del polipéptido recombinante puede promover un aumento en una distancia promedio de caminata en seis minutos por el sujeto de al menos 100 metros o más. El sujeto puede exhibir una distancia promedio de caminata en seis

minutos de aproximadamente 500 metros o más después de la administración del polipéptido recombinante. El sujeto puede exhibir una menor dependencia de un dispositivo de asistencia para la movilidad (p. ej., un andador, una silla de ruedas, aparatos ortéticos, muletas y órtesis) después de la administración del polipéptido recombinante.

Antes de la administración del polipéptido recombinante, el sujeto puede caracterizarse por tener una concentración plasmática de PPI de aproximadamente 4,5 μM o mayor. La administración del polipéptido recombinante puede promover una disminución media en la concentración de PPI en una muestra de plasma del sujeto de al menos aproximadamente 1 μM . El sujeto puede exhibir una concentración plasmática de PPI de aproximadamente 2 μM a aproximadamente 5 μM después de la administración del polipéptido recombinante.

En algunas modalidades,

- i) el sujeto tiene 0 a 14 días de edad y, antes de la administración del polipéptido recombinante, se caracteriza por tener una concentración plasmática de ALP de aproximadamente 90 U/l o menos;
- ii) el sujeto tiene 15 días a menos de 1 año de edad y, antes de la administración del

- polipéptido recombinante, se caracteriza por tener una concentración plasmática de ALP de aproximadamente 134 U/l o menos;
- iii) el sujeto tiene aproximadamente 1 año a menos de 10 años de edad y, antes de la administración del polipéptido recombinante, se caracteriza por tener una concentración plasmática de ALP de aproximadamente 156 U/l o menos;
- iv) el sujeto tiene aproximadamente 10 años a aproximadamente 13 años de edad y, antes de la administración del polipéptido recombinante, se caracteriza por tener una concentración plasmática de ALP de aproximadamente 141 U/l o menos;
- v) el sujeto es femenino y de aproximadamente 13 años a aproximadamente 15 años de edad y, antes de la administración del polipéptido recombinante, se caracteriza por tener una concentración plasmática de ALP de aproximadamente 62 U/l o menos;
- vi) el sujeto es masculino y de aproximadamente 13 años a aproximadamente 15 años de edad y, antes de la administración del polipéptido

recombinante, se caracteriza por tener una concentración plasmática de ALP de aproximadamente 127 U/l o menos;

vii) el sujeto es femenino y de aproximadamente 15 años a aproximadamente 17 años de edad y, antes de la administración del polipéptido recombinante, se caracteriza por tener una concentración plasmática de ALP de aproximadamente 54 U/l o menos;

viii) el sujeto es masculino y de aproximadamente 15 años a aproximadamente 17 años de edad y, antes de la administración del polipéptido recombinante, se caracteriza por tener una concentración plasmática de ALP de aproximadamente 89 U/l o menos;

ix) el sujeto tiene aproximadamente 17 años de edad o más y, antes de la administración del polipéptido recombinante, se caracteriza por tener una concentración plasmática de ALP de aproximadamente 48 U/l o menos; o

x) el sujeto tiene aproximadamente 17 años de edad o más y, antes de la administración del polipéptido recombinante, se

caracteriza por tener una concentración plasmática de ALP de aproximadamente 59 U/l o menos.

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

En algunas modalidades,

- i) el sujeto tiene 0 a 14 días de edad y, después de la administración del polipéptido recombinante, se caracteriza por tener una concentración plasmática de ALP de aproximadamente 273 U/l o mayor;
- ii) el sujeto tiene 15 días a menos de 1 año de edad y, después de la administración del polipéptido recombinante, se caracteriza por tener una concentración plasmática de ALP de aproximadamente 518 U/l o mayor;
- iii) el sujeto tiene aproximadamente 1 año a menos de aproximadamente 10 años de edad y, después de la administración del polipéptido recombinante, se caracteriza por tener una concentración plasmática de ALP de aproximadamente 369 U/l o mayor;

- iv) el sujeto tiene aproximadamente 10 años a aproximadamente 13 años de edad y, después de la administración del polipéptido recombinante, se caracteriza por tener una concentración plasmática de ALP de aproximadamente 460 U/l o mayor;
- v) el sujeto es femenino y de aproximadamente 13 años a aproximadamente 15 años de edad y, después de la administración del polipéptido recombinante, se caracteriza por tener una concentración plasmática de ALP de aproximadamente 280 U/l o mayor;
- vi) el sujeto es masculino y de aproximadamente 13 años a aproximadamente 15 años de edad y, después de la administración del polipéptido recombinante, se caracteriza por tener una concentración plasmática de ALP de aproximadamente 517 U/l o mayor;
- vii) el sujeto es femenino y de aproximadamente 15 años a aproximadamente 17 años de edad y, después de la administración del polipéptido recombinante, se caracteriza por tener

una concentración plasmática de ALP de aproximadamente 128 U/l o mayor;

viii) el sujeto es masculino y de aproximadamente 15 años a aproximadamente 17 años de edad y, después de la administración del polipéptido recombinante, se caracteriza por tener una concentración plasmática de ALP de aproximadamente 365 U/l o mayor;

ix) el sujeto es femenino y MTRNR2 de aproximadamente 17 años de edad o más y, después de la administración del polipéptido recombinante, se caracteriza por tener una concentración plasmática de ALP de aproximadamente 95 U/l o mayor; o

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

Antes de la administración del polipéptido recombinante, el sujeto puede caracterizarse por tener una puntuación promedio de fuerza de la prueba Bruininks-Oseretsky de competencia motora 2.^a Edición (BOT-2) de aproximadamente 10 o menos. Antes de la administración del

polipéptido recombinante, el sujeto puede caracterizarse por tener una puntuación promedio de la velocidad de carrera y agilidad de la BOT-2 de aproximadamente 5 o menos. La administración del polipéptido recombinante puede dar lugar a una puntuación promedio de fuerza de la BOT-2 del sujeto de aproximadamente 10 o más. La administración del polipéptido recombinante puede dar lugar a una puntuación promedio de la velocidad de carrera y agilidad de la BOT-2 del sujeto de aproximadamente 5 o más.

Antes de la administración del polipéptido recombinante, el sujeto puede caracterizarse por tener una puntuación promedio del índice del cuestionario de evaluación de la salud infantil (CHAQ, por sus siglas en inglés) de aproximadamente 0,8 o más. La administración del polipéptido recombinante puede dar lugar a una puntuación promedio del índice CHAQ del sujeto de aproximadamente 0,5 o menos.

Antes de la administración del polipéptido recombinante, el sujeto puede caracterizarse por tener una puntuación promedio del Instrumento de recolección de datos de resultados pediátricos (PODCI, por sus siglas en inglés) de aproximadamente 40 o menos. La administración del polipéptido recombinante puede dar lugar a una puntuación promedio del PODCI del sujeto de aproximadamente 40 o más.

Antes de la administración del polipéptido recombinante, el sujeto puede caracterizarse por tener un

grado de fuerza muscular promedio de menos de aproximadamente 5. La administración del polipéptido recombinante puede dar lugar a un aumento promedio en un grado de fuerza muscular del sujeto de aproximadamente 1 o más.

Antes de la administración del polipéptido recombinante, el sujeto puede caracterizarse por tener un valor promedio de dinamometría de mano (HHD, por sus siglas en inglés) de menos de aproximadamente 80 % de un valor previsto de HHD. La administración del polipéptido recombinante puede dar lugar a un valor promedio de HHD del sujeto de aproximadamente 80 % o más de un valor previsto de HHD. El valor de HHD puede representar la fuerza de agarre, flexión de rodilla, extensión de rodilla, flexión de cadera, extensión de cadera o abducción de cadera del sujeto.

El sujeto puede tener una enfermedad de debilidad muscular seleccionada de distrofia muscular, miastenia gravis, y enfermedad por depósito de pirofosfato de calcio (CPPD, por sus siglas en inglés), esclerosis lateral amiotrófica (ALS, por sus siglas en inglés), miositis, distrofia miotónica, miotonía, síndrome de Guillain-Barre, distrofia muscular de Duchenne (DMD, por sus siglas en inglés) y síndrome miasténico de Lambert-Eaton.

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos de tratamiento y/o diagnóstico descritos en la

presente se excluye explícitamente a los sujetos con hipofosfatemia familiar (p. ej., ADHR, raquitismo hipofosfatémico autosómico recesivo, raquitismo hipofosfatémico ligado al X y XLH) o con enfermedad por depósito de pirofosfato de calcio (CPPD, por sus siglas en inglés).

Definiciones

Como se usa en la presente, “un” o “una” significa “al menos uno” o “uno o más” a menos que se indique de cualquier otra manera. Además, las formas singulares “un”, “una” y “el/la” incluyen las referencias plurales a menos que el contexto lo indique claramente de cualquier otra manera.

Como se usa en la presente, “aproximadamente” se relaciona con una cantidad que es $\pm 10\%$ del valor mencionado y es preferentemente $\pm 5\%$ del valor mencionado, o con mayor preferencia $\pm 2\%$ del valor mencionado.

Por “asfotasa alfa” se entiende una proteína de fusión de TNALP humana (hTNALP, por su siglas en inglés) que incluye una glicoproteína soluble de dos cadenas polipeptídicas idénticas, en la que cada cadena polipeptídica incluye los residuos de aminoácidos 1-726 de la sec. con núm. de ident.: 1. La estructura de cada

cadena polipeptídica incluye el dominio catalítico de hTNALP, el dominio Fc de la inmunoglobulina G₁ humana, y un péptido deca-aspartato usado como dominio dirigido al hueso (la estructura hTNALP-Fc-D₁₀). Las dos cadenas polipeptídicas se unen covalentemente mediante dos enlaces disulfuro. La asfotasa alfa se ha aprobado bajo el nombre comercial STRENSIQ® (Alexion Pharmaceuticals, Inc., Boston, MA) en los Estados Unidos, Europa, Japón, Canadá, Israel, Australia y Corea para el tratamiento de sujetos con HPP.

Los términos “individuo”, “sujeto” y “paciente” se usan indistintamente y se refieren a cualquier sujeto para quien se desea un diagnóstico, tratamiento o terapia, particularmente a humanos. Como se usa en la presente, un sujeto “en riesgo” o un sujeto que “es propenso a” una enfermedad es un sujeto que se identifica como que tiene un riesgo de desarrollar una enfermedad, trastorno o síntomas asociados con una enfermedad de debilidad muscular.

Como se usa en la presente, “promedio” se refiere a un valor numérico que expresa la media o mediana de un conjunto de datos. La media de un conjunto de datos se calcula mediante la división de la suma de los valores en el conjunto de datos por su número. La mediana de un conjunto de datos se calcula mediante la determinación del valor medio en una lista de datos de números impares o mediante la determinación de la media

de los dos valores de datos en el medio en una lista de números pares.

El término “silvestre” “o “secuencia silvestre” usado para TNALP u otros genes o proteínas en la presente descripción se refiere a la forma típica de tales genes o proteínas que se encuentran en la naturaleza en humanos normales, mamíferos no humanos u otros organismos vivos. Una secuencia silvestre puede referirse al alelo “normal” estándar en un locus para un gen o a la secuencia de aminoácidos primaria “normal” estándar (opcionalmente con las modificaciones postraduccionales “normales” estándar y/o enlaces entre cadenas y/o interacciones entre residuos de aminoácidos) para un polipéptido o proteína, en contraste con la producida por un alelo “mutante” no estándar o secuencia/modificación/interacción de aminoácidos. Los alelos “mutantes” pueden variar en gran medida, e incluso convertirse en silvestre si se produce un cambio genético dentro de una población. Ahora se aprecia que la mayoría o todos los loci de genes (y con menor frecuencia, pero aún posible, para la mayoría de las secuencias polipeptídicas) existen en una variedad de formas alélicas, que varían en frecuencia a lo largo del rango geográfico de una especie, y que un silvestre uniforme puede no existir necesariamente. Generalmente, sin embargo, el alelo o secuencia de aminoácidos más

prevalentes —es decir, el uno con la frecuencia más alta entre los humanos individuales normales u otros organismos— es el uno considerado silvestre en la presente descripción.

El término “sujeto normal” como se usa en la presente, se refiere a, salvo que se especifique de cualquier otra manera, a un sujeto, p. ej., un humano, sin ninguna evidencia de una enfermedad de debilidad muscular y/o síntomas o consecuencias fisiológicas de esta causada por o relacionada con, por ejemplo, una actividad anómala de la fosfatasa alcalina (que puede deberse a, p. ej., deficiencia o carencia de expresión génica o de niveles de proteínas y/o mutaciones anuladoras del gen o de la proteína). Un ejemplo de un sujeto normal es un humano que carece de debilidad muscular o síntomas de debilidad muscular y quien no exhibe mutaciones o modificaciones en los genes o proteínas de la fosfatasa alcalina (p. ej., TNSALP) que puedan dar lugar a una debilidad muscular relacionada con la HPP. Un sujeto normal también puede ser uno que no exhiba actividad de fosfatasa alcalina endógena anómala (que puede probarse, p. ej., evaluando los niveles de PPi, PEA y PLP en relación con un control sano).

Como se usa en la presente, una concentración “elevada” o “aumentada” se refiere a una concentración de una molécula (p. ej., un sustrato de TNSALP, tal como PPi)

en un sujeto que tiene o es propenso a una enfermedad de debilidad muscular descrita en la presente que es mayor que la concentración de la molécula en un sujeto normal, tal como un sujeto sin la enfermedad de debilidad muscular, o en el mismo sujeto en un punto de tiempo en que el sujeto no tiene síntomas aparentes de una enfermedad de debilidad muscular (p. ej., después del tratamiento). Se puede determinar una “concentración elevada” de la molécula en una célula, tejido u órgano del sujeto, tal como en la sangre o suero del sujeto.

Los términos “Escala Bayley de desarrollo del lactante y del niño pequeño, 3.^a Edición” o “BSID-III” como se usan en la presente se refieren a una serie estandarizada de mediciones usadas para evaluar el desarrollo motor (fino y grueso), lenguaje (receptivo y expresivo), y cognitivo de los sujetos. Ver Bayley, (2006). *Bayley scales of infant and toddler development: administration manual*. San Antonio, TX: Harcourt Assessment, incorporado en la presente como referencia en su totalidad. Las mediciones de la BSID-III incluyen una serie de tareas lúdicas de desarrollo para administrarse al sujeto. Las puntuaciones brutas de los elementos completados con éxito se convierten en puntuaciones escaladas. Después, las puntuaciones escaladas se usan para determinar el desempeño del sujeto en comparación con sujetos sanos y emparejados por edad. La BSID-III también

puede incluir el Cuestionario de conducta adaptativa social-emocional, el cual es completado por el padre/tutor, para establecer el rango de conductas adaptativas del sujeto. Por ejemplo, las mediciones para determinar la puntuación de la BSID-III (p. ej., la puntuación de función motora gruesa de la BSID-III) pueden incluir prensión, integración perceptual-motora, planificación y velocidad motora, seguimiento visual, alcance, prensión de objetos, manipulación de objetos, habilidades funcionales de la mano, respuestas a la información táctil, movimiento de las extremidades y del torso, posicionamiento estático, movimiento dinámico, equilibrio y planificación motora. Después, estas mediciones de sujetos se convierten en una puntuación escalada de la BSID-III (p. ej., la puntuación escalada de función motora gruesa de la BSID-III) que varía de 0 a 14, en la que las puntuaciones de aproximadamente 7 a aproximadamente 13 se consideran el rango normal de sujetos sanos.

El término “entidad dirigida al hueso”, como se usa en la presente, se refiere a una secuencia de aminoácidos de entre 1 y 50 residuos de aminoácidos de longitud que tiene una afinidad suficiente con la matriz ósea, de tal manera que la entidad dirigida al hueso, singularmente, tiene una afinidad de unión *in vivo* a la matriz ósea de aproximadamente 10^{-6} M a aproximadamente 10^{-15}

M (p. ej., 10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M, 10^{-10} M, 10^{-11} M, 10^{-12} M, 10^{-13} M, 10^{-14} M, o 10^{-15} M).

Los términos “Prueba Bruininks-Oseretsky de competencia motora 2.^a Edición” o “BOT-2”, como se usan en la presente, se refieren a la segunda edición de una prueba estandarizada de rendimiento motor grueso y fino para sujetos, p. ej., de aproximadamente 4 a aproximadamente 21 años de edad. Ver Bruininks, R. H. (2005). *Bruininks-Oseretsky Test of Motor Proficiency, (BOT-2)*. Minneapolis, MN: Pearson Assessment, incorporado en la presente como referencia en su totalidad. La BOT-2 se administra individualmente para evaluar las habilidades motoras gruesas y finas de una variedad de sujetos. En particular, la BOT-2 se puede usar para evaluar deficiencias físicas y restricciones de movilidad en sujetos que tienen HPP. La BOT-2 proporciona puntuaciones de la BOT-2 compuestas en las siguientes áreas: fuerza, velocidad de carrera y agilidad, precisión motora fina, integración motora fina, destreza manual, coordinación bilateral, equilibrio y coordinación de extremidades altas. Por ejemplo, una puntuación de fuerza de la BOT-2 puede determinarse haciendo que un sujeto realice abdominales, elevaciones de tronco y piernas, salto de longitud sin impulso, sentadilla estática y flexiones de brazos. Un promedio de la velocidad de carrera y agilidad puede determinarse haciendo que un sujeto pise sobre una

viga de equilibrio o realice una carrera de ida y vuelta, un salto lateral a dos piernas o un salto lateral a una pierna. Tanto la fuerza de la BOT-2 como las puntuaciones de velocidad de carrera y agilidad de la BOT-2 varían de 0 a 25, en los que una puntuación de aproximadamente 10 a 20 se considera representativa de sujetos sanos.

Los términos “Cuestionario de evaluación de la salud infantil” o “CHAQ”, como se usan en la presente, se refieren a un cuestionario que se usa para evaluar el estado de la salud (p. ej., la capacidad para realizar actividades de la vida diaria (ADL) e incidencia de dolor) de sujetos de 1 a 19 años de edad, tales como sujetos con una enfermedad similar a la HPP. Para una descripción del índice CHAQ, ver Bruce y Fries (*J. Rheumatol.* 30(1): 167-178, 2003), incorporado en la presente descripción como referencia en su totalidad. El CHAQ puede administrarse mediante entrevista o autorreporte para niños mayores de 8 años de edad. El CHAQ incluye ocho subescalas para vestirse/acicalarse, levantarse, comer, caminar, higiene, alcance, prensión y actividades. El rango de puntuaciones dentro de cada categoría es de 0 a 3, en el que una puntuación de 0 indica sin ninguna dificultad; una puntuación de 1 indica con cierta dificultad; una puntuación de 2 indica con mucha dificultad; y una puntuación de 3 indica que el sujeto es incapaz de realizar

la actividad. El índice CHAQ también puede usarse para determinar la presencia y gravedad del dolor.

Por “dominio extracelular” se entiende una porción extracelular de una proteína nativa, p. ej., fosfatasa alcalina. En particular, el dominio extracelular carece de un péptido señal.

Por “Fc” se entiende una región de fragmento cristalizante de una inmunoglobulina, p. ej., IgG-1, IgG-2, IgG-3, IgG-3, o IgG-4, que incluye los dominios CH2 y CH3 de la cadena pesada de inmunoglobulina. El Fc también puede incluir cualquier porción de la región bisagra que une las regiones Fab y Fc. El Fc puede ser de cualquier mamífero, incluido humano, y puede modificarse postraduccionalmente (p. ej., por glicosilación). En un ejemplo no limitante, Fc puede ser la región de fragmento cristalizante de IgG-1 humana que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 20.

Por “fragmento” se entiende una porción de un polipéptido o molécula de ácido nucleico que contiene, preferentemente, al menos 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o más de la longitud total de la molécula o polipéptido de ácido nucleico de referencia. Un fragmento puede contener, p. ej., 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 toda la longitud del polipéptido. Los fragmentos de fosfatasa alcalina soluble (sALP, por sus siglas en inglés) ilustrativos tienen residuos de aminoácidos 18-498, 18-499, 18-500, 18-501, 18-502, 18-503, 18-504, 18-505, 18-506, 18-507, 18-508, 18-509, 18-510, 18-511, o 18-512 de una ALP (p. ej., las sec. con núms. de ident.: 2-6), y pueden incluir porciones C-terminales y/o N-terminales adicionales.

Los términos “dinamometría de mano” y “HHD”, como se usan indistintamente en la presente, se refieren a un método para medir la prensión y la fuerza muscular de un sujeto, en particular, un sujeto que tiene o es propenso a una enfermedad de debilidad muscular. Se puede usar un dinamómetro para evaluar la fuerza de prensión, flexión de rodilla, extensión de rodilla, flexión de cadera, extensión de cadera y abducción de cadera de un sujeto (p. ej., un sujeto que tiene o es propenso a una enfermedad de debilidad muscular). Por ejemplo, la flexión y extensión de la rodilla y también la flexión, extensión y abducción de cadera de un sujeto que tiene o es propenso a una enfermedad de debilidad muscular se pueden medir usando, p. ej., un dinamómetro MICROFET2TM, mientras que la fuerza de prensión del sujeto se puede medir usando, p. ej., un dinamómetro de prensión Jamar. En particular, el administrador mantiene fijo el dinamómetro, y el sujeto

ejerce una fuerza máxima contra el dinamómetro. Los datos de fuerza máxima se recopilan en libras, después se convierten a newtons (N). Los valores de torque se calculan entonces usando la longitud de la extremidad en N-metros. El valor de torque puede entonces compararse con el valor de, p. ej., un sujeto normal de aproximadamente la misma edad, el mismo sexo y/o la misma altura, y expresarse como un valor porcentual para generar el valor de HHD del sujeto.

Los términos “hipofosfatasia” o “HPP”, como se usan en la presente, se refieren a un trastorno esquelético hereditario poco frecuente causado por, p. ej., una o más mutaciones anuladoras en el gen *ALPL* (fosfatasa alcalina, hepática/ósea/renal), que codifica la fosfatasa alcalina inespecífica de tejido (TNALP). La HPP puede caracterizarse además como HPP infantil, HPP de la infancia, HPP perinatal (p. ej., HPP perinatal benigna o HPP perinatal letal) u odonto-HPP.

Los términos “enfermedad similar a la hipofosfatasia” o “enfermedad similar a la HPP”, como se usan en la presente, se refieren a enfermedades que presentan síntomas similares a los de HPP, pero que no son causadas por una mutación anuladora en el gen *ALPL*.

Por “paciente sin tratamiento previo” o “sujeto sin tratamiento previo” se entiende un paciente o sujeto

que tiene una enfermedad de debilidad muscular descrita en la presente que nunca ha recibido tratamiento con una fosfatasa alcalina, o un polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina, tal como una sALP (p. ej., TNALP, p. ej., el polipéptido sALP de la sec. con núm. de ident.: 1 o una variante polipeptídica que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de la sec. con núm. de ident.: 1, p. ej. asfotasa alfa).

Por “dolor” como se usa en la presente se refiere al sufrimiento físico o malestar causado por una enfermedad de debilidad muscular descrita en la presente, tal como dolor muscular. Por ejemplo, los síntomas de dolor pueden incluir, p. ej., dolor, tensión o rigidez. La gravedad del dolor puede variar entre los sujetos (p. ej., dolor crónico o dolor agudo). En particular, el dolor crónico se refiere al dolor que dura más de tres a seis meses o dolor que se extiende más allá del período esperado de curación. En contraste, el dolor agudo se refiere al dolor que típicamente dura menos de tres a seis meses. Como se describe en la presente, las composiciones terapéuticas (p. ej., que incluyen una sALP, tal como asfotasa alfa) pueden administrarse a un sujeto que sufre de dolor (p. ej., dolor muscular) en una cantidad suficiente para aliviar o al menos aliviar parcialmente los síntomas del dolor (p. ej., malestar, dolor, tensión o rigidez) y sus complicaciones (p. ej.,

fatiga, insomnio, sistema inmunológico debilitado, depresión, ansiedad, estrés, irritabilidad o discapacidad).

Los términos “péptido”, “polipéptido” y “proteína” se usan indistintamente y se refieren a cualquier cadena de dos o más residuos de aminoácidos naturales o no naturales, independientemente de la modificación postraducciona (p. ej., glicosilación o fosforilación), que constituye todo o parte de un polipéptido o péptido de origen natural o no natural, como se describe en la presente.

Por “portador farmacéuticamente aceptable” o “excipiente farmacéuticamente aceptable” se entiende por lo menos un portador o excipiente, respectivamente, que es fisiológicamente aceptable para un sujeto (p. ej., un humano) y que conserva las propiedades terapéuticas de una molécula con la que se administra. Una sustancia portadora farmacéuticamente aceptable ilustrativa es la solución salina fisiológica. Por ejemplo, el portador farmacéuticamente aceptable puede incluir cloruro de sodio (p. ej., 150 mM de cloruro de sodio) y fosfato de sodio (p. ej., 25 mM de fosfato de sodio). Otros portadores fisiológicamente aceptables y sus formulaciones son conocidos por los expertos en la técnica y se describen, p. ej., en Remington's Pharmaceutical Sciences (Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 22.^a Ed., Allen, Ed. 2012).

Por “composición farmacéutica” se entiende una composición que contiene un polipéptido o molécula de ácido nucleico como se describe en la presente formulado con al menos un excipiente, diluyente o portador farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica puede elaborarse o venderse con la aprobación de una agencia reguladora gubernamental como parte de un régimen terapéutico para el tratamiento o prevención de la enfermedad o evento en un sujeto. Las composiciones farmacéuticas pueden formularse, por ejemplo, para la administración subcutánea, administración intravenosa (p. ej., como una solución estéril libre de embolias particuladas y en un sistema solvente adecuado para uso intravenoso), para administración oral (p. ej., una tableta, cápsula, comprimido en forma de cápsula, cápsula de gelatina o jarabe), o cualquier otra formulación descrita en la presente, p. ej., en forma de dosificación unitaria. En una modalidad, la composición farmacéutica de la presente descripción se administra por vía subcutánea o se formula para la administración subcutánea.

El término “deficiencias físicas”, como se usa en la presente, se refiere a una condición fisiológica, tal como enfermedades de debilidad ósea y de debilidad muscular descritas en la presente que pueden restringir o eliminar, p. ej., la ambulación, la resistencia funcional y la

capacidad para realizar actividades de la vida diaria (ADL) de un sujeto. En particular, las deficiencias físicas pueden restringir o eliminar la capacidad de un sujeto para realizar ADL, que son actividades rutinarias que los sujetos sanos realizan a diario sin requerir asistencia, tal como movilidad funcional o traslado (p. ej., caminar), bañarse y ducharse, vestirse, autoalimentarse e higiene y acicalamiento personal. Como se describe en la presente, las composiciones terapéuticas (p. ej., composiciones que incluyen una sALP, tal como asfotasa alfa) pueden administrarse a un sujeto para disminuir la gravedad y/o frecuencia de las deficiencias físicas asociadas con la debilidad muscular.

Los términos “instrumento de recolección de datos de resultados pediátricos” o “PODCI”, como se usan en la presente, se refieren a un cuestionario usado para evaluar la salud general, la incidencia del dolor y la capacidad de realizar las ADL de sujetos menores de 19 años de edad, particularmente en sujetos con trastornos crónicos de salud, tal como un sujeto con una enfermedad similar a la HPP. Para una descripción del PODCI, ver Plint et al. (*J. Pediatr. Orthop.* 23(6): 788-790, 2003), incorporado en la presente en la presente descripción como referencia en su totalidad. El cuestionario puede completarse por el sujeto o por un padre/tutor del sujeto con conocimiento del estado del sujeto. Las ocho escalas

generadas a partir del PODCI incluyen las siguientes: 1) la escala de función física y de las extremidades superiores para medir la dificultad que se encuentra al realizar actividades de cuidado personal diarias y actividades estudiantiles; 2) la escala de transferencia y movilidad básica para medir la dificultad experimentada al realizar actividades de movimientos rutinarios y motoras en las actividades diarias; 3) la escala de funcionamiento físico/deportivo para medir la dificultad o limitaciones encontradas al participar en actividades o deportes más activos; 4) la escala de dolor/confort para medir el nivel de dolor experimentado durante la semana anterior; 5) la escala de expectativas de tratamiento para medir las expectativas a largo plazo del tratamiento; 6) la escala de felicidad para medir la satisfacción general con la apariencia personal y el sentido de similitud con amigos y otras personas de su edad; 7) la escala de satisfacción con los síntomas para medir la aceptación del sujeto de las limitaciones actuales en caso de que este sea un estado de por vida; y 8) la escala de funcionamiento global, que es una escala general combinada calculada a partir de las cuatro primeras escalas mencionadas anteriormente. Las puntuaciones estandarizadas se generan a partir de una serie de preguntas en el PODCI y se convierten a una

escala de 0 a 100, en la que 0 representa discapacidad significativa y 100 representa menor discapacidad.

Los términos “Escala Peabody de desarrollo motor, 2.^a Edición” o “PDMS-2”, como se usan en la presente, se refieren a un programa de desarrollo motor de la primera infancia que proporciona una evaluación de las habilidades motoras gruesas y finas en sujetos desde el nacimiento a lo largo de la infancia (p. ej., lactantes y niños). Para una descripción de las escalas de la PDMS-2, ver van Hartingsveldt et al. (*Occup. Ther. Int.* 12(1): 1-13, 2005), incorporado en la presente en la presente descripción como referencia en su totalidad. La PDMS-2 está compuesta por seis subpruebas que miden las capacidades motoras interrelacionadas del desarrollo temprano. Las seis subpruebas incluyen las siguientes: 1) la subprueba locomotora para medir la capacidad de un sujeto para moverse de un lugar a otro (las medidas incluyen gatear, caminar, correr, saltar y saltar hacia adelante); 2) la subprueba de reflejos para medir la capacidad de un sujeto para reaccionar automáticamente a los eventos medio ambientales; 3) la subprueba de equilibrio estático para medir la capacidad de un sujeto para mantener el control de su cuerpo dentro del centro de gravedad y mantener el equilibrio; 4) la subprueba de manipulación de objetos para medir la capacidad de un sujeto para manipular un objeto, tal como atrapar, lanzar y patear una pelota; 5) la

subprueba de prensión para medir la capacidad de un sujeto para usar sus manos, tal como la capacidad de sostener un objeto con una mano y acciones que implican el uso controlado de los dedos de ambas manos; y 6) la subprueba de integración visual-motora para medir la capacidad de un sujeto para usar sus habilidades perceptivas visuales para realizar tareas complejas de coordinación ojo-mano, tales como alcanzar y agarrar un objeto, construir con bloques y copiar diseños. Las mediciones de la PDMS-2 para cada subprueba se convierten en una puntuación de la PDMS-2, tal como la puntuación estándar locomotora de la PDMS-2 que varía de 0 a 13, en la que el rango de un sujeto sano es de aproximadamente 7 a aproximadamente 13.

Los términos “sALP”, “fosfatasa alcalina soluble” y “dominio extracelular de una fosfatasa alcalina” se usan indistintamente y se refieren a una fosfatasa alcalina soluble, no unida a la membrana o un dominio, fragmento biológicamente activo, o variante biológicamente activa de esta. Las sALP incluyen, por ejemplo, una fosfatasa alcalina que carece de un anclaje glicolípido C-terminal (secuencia señal GPI, p. ej., polipéptidos que incluyen o que consisten en los residuos de aminoácidos 18-502 de una TNALP humana (sec. con núm. de ident.: 2, 3, 4, 5 o 6)). En particular, una TNALP puede incluir, p. ej., un polipéptido que incluye o consiste en residuos de aminoácidos 1-485 de la sec. con núm. de ident.: 1, tal

como asfotasa alfa, o una variante polipeptídica que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con los residuos de aminoácido 1-485 de la sec. con núm. de ident.: 1 (sec. con núm. de ident.: 21 tiene 95,8 % de identidad de secuencia con la sec. con núm. de ident.: 1 y la sec. con núm. de ident.: 22 tiene 96,08 % de identidad de secuencia con la sec. con núm. de ident.: 1). Las sALP incluyen además, por ejemplo, ortólogos de mamíferos de TNALP humana, tales como una TNALP Rhesus (sec. con núm. de ident.: 7), una TNALP de rata (sec. con núm. de ident.: 8), una TNALP canina (sec. con núm. de ident.: 9), una TNALP porcina (sec. con núm. de ident.: 10), una TNALP murina (sec. con núm. de ident.: 11), una TNALP bovina (sec. con núms. de ident.: 12-14) o una TNALP felina (sec. con núm. de ident.: 15). Las sALP también incluyen formas solubles no unidas a la membrana de PALP humana (p. ej., polipéptidos que incluyen o consisten en residuos de aminoácidos 18-502 de la sec. con núms. de ident.: 16 o 17), GCALP (p. ej., polipéptidos que incluyen o que consisten en residuos de aminoácidos 18-502 de la sec. con núm. de ident.: 18), e IALP (p. ej., polipéptidos que incluyen o consisten en residuos de aminoácidos 18-502 de la sec. con núm. de ident.: 19), y variantes y análogos adicionales de estos que conservan la actividad de fosfatasa alcalina, p. ej., la capacidad de hidrolizar PPi. Una sALP, en particular,

carece del péptido señal N-terminal (p. ej., aa 1-17 de la sec. con núms. de ident.: 2-6, 8, 11-13, o 15 o aa 1-25 de la sec. con núm. de ident.: 7).

Por “polipéptido sALP” se entiende un polipéptido que tiene la estructura A-sALP-B, en donde sALP es como se define en la presente y cada uno de A y B está ausente o es una secuencia de aminoácidos de al menos un aminoácido. Un polipéptido sALP ilustrativo tiene una secuencia de aminoácidos que comprende o consiste en los aminoácidos 1-485 de la sec. con núm. de ident.: 1. Otros polipéptidos de sALP ilustrativos incluyen cualesquiera polipéptidos de fusión de sALP descritos en la presente (por ejemplo, el polipéptido de fusión sALP de la sec. con núm. de ident.: 1 o una variante polipeptídica que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de la sec. con núm. de ident.: 1, p. ej., asfotasa alfa).

Por “péptido señal” se entiende un péptido corto (5-30 aminoácidos de longitud) en el extremo N-terminal de un polipéptido que dirige un polipéptido hacia la trayectoria secretora (p. ej., el espacio extracelular). El péptido señal se escinde típicamente durante la secreción del polipéptido. La secuencia señal puede dirigir el polipéptido a un compartimento intracelular u orgánulo, p. ej., el aparato de Golgi. Una secuencia señal puede identificarse por homología, o actividad biológica, con un

péptido con la función conocida de dirigirse un polipéptido a una región particular de la célula. Un experto en la técnica puede identificar un péptido señal usando un software fácilmente disponible (p. ej., paquete de software de análisis de secuencias del Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Avenue, Madison, Wis. 53705, BLAST, o programas PILEUP/PRETTYBOX). Un péptido señal puede ser uno que es, por ejemplo, sustancialmente idéntico a los residuos de aminoácidos 1-17 de las sec. con núms. de ident.: 2-6 o los residuos de aminoácidos 1-25 de la sec. con núm. de ident.: 7.

Como se usa en la presente, cuando se hace referencia a un polipéptido o secuencia de ácido nucleico que tiene “al menos un X % de identidad de secuencia” con respecto a una secuencia de referencia, en donde “X” es un número real, se entiende que al menos X por ciento de los residuos de aminoácidos o nucleótidos en el polipéptido o ácido nucleico son idénticos a los de la secuencia de referencia cuando las secuencias se alinean de manera óptima. Una alineación óptima de secuencias puede determinarse de diversas maneras que están dentro de la habilidad en la técnica, por ejemplo, el algoritmo de alineación de Smith Waterman (Smith et al., *J. Mol. Biol.* 147:195-7, 1981) y BLAST (Basic Local Alignment Search Tool; Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215: 403-10, 1990).

Estos y otros algoritmos de alineación son accesibles usando el software de computador disponible públicamente tal como "Best Fit" (Smith y Waterman, *Advances in Applied Mathematics*, 482-489, 1981) como se incorpora en GeneMatcher Plus (Schwarz y Dayhoff, *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, Megalign (DNASTAR) u otro software/hardware para alineación. Además, los expertos en la técnica pueden determinar parámetros apropiados para alinear secuencias, que incluyen cualesquiera algoritmos necesarios para lograr una alineación óptima en toda la longitud de las secuencias que se comparan.

Por "cantidad terapéuticamente efectiva" se entiende una cantidad de un polipéptido o molécula de ácido nucleico descrita en la presente que es suficiente para mejorar sustancialmente, tratar, prevenir, retrasar, suprimir o detener al menos un síntoma de debilidad muscular. Una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición descrita en la presente puede depender de la gravedad del trastorno que se está tratando y de la condición, peso y estado general del sujeto y puede determinarse por un experto en la técnica teniendo en cuenta tales factores. Una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición descrita en la presente puede administrarse a un sujeto en una dosis única o en

múltiples dosis administradas durante un periodo de tiempo.

Por “que trata”, “tratar” o “tratamiento” se entiende el manejo médico de un sujeto con la intención de curar, aminorar, estabilizar, reducir la probabilidad de, o prevenir una enfermedad de debilidad muscular (p. ej., en un sujeto con hipotonía) y/o el manejo de un sujeto que exhibe o es probable que tenga una enfermedad de debilidad muscular (p. ej., en un sujeto con hipotonía), p. ej., mediante la administración de una composición farmacéutica (p. ej., una sALP, tal como asfotasa alfa).

Este término incluye el tratamiento activo, es decir, el tratamiento dirigido específicamente hacia la mejora o asociado con la cura de una enfermedad, condición patológica, trastorno o evento, y también incluye tratamiento causal, es decir, tratamiento dirigido hacia la eliminación de la causa de la enfermedad asociada, condición patológica, trastorno o evento. Además, este término incluye el tratamiento paliativo, es decir, el tratamiento diseñado para el alivio o mejora de al menos un síntoma en lugar de la curación de la enfermedad, condición patológica, trastorno o evento; tratamiento sintomático, es decir, tratamiento dirigido hacia síntomas constitucionales de la enfermedad, condición patológica, trastorno o evento asociado; tratamiento preventivo, es

decir, tratamiento dirigido para minimizar o inhibir parcial o completamente el desarrollo de la enfermedad, condición patológica, trastorno o evento asociado, p. ej., en un sujeto que aún no está enfermo, pero que es susceptible a, o de cualquier otra manera en riesgo de, una enfermedad, condición patológica, trastorno o evento particular; y tratamiento de apoyo, es decir, tratamiento empleado para complementar otra terapia específica dirigida a la mejora de la enfermedad, condición patológica, trastorno o evento asociado.

Como se usa en la presente, “capacidad para caminar” se refiere a la capacidad de un sujeto (p. ej., un sujeto que tiene una enfermedad de debilidad muscular descrita en la presente) para levantar y posar cada pie alternadamente. La capacidad de caminar se puede evaluar mediante pruebas, en particular, la prueba de caminata de seis minutos (6MWT, por sus siglas en inglés). Ver la declaración de la American Thoracic Society: directrices para la prueba de caminata de seis minutos (*American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 166(1):111-7, 2002), incorporado en la presente como referencia en su totalidad.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La **Figura 1** es una gráfico que muestra los resultados de secuenciación de ARN de las transcripciones ATP1A3. El eje x representa la posición en la transcripción y el eje y es el número de lecturas. Se muestran los resultados para la paciente A, madre, padre y tres hermanos (Sib).

La **Figura 2A** es una gráfico que muestra la transcripción ALPL de la paciente A (caso índice), madre, padre y tres hermanos. La transcripción se mide en transcripciones por millón (TPM).

La **Figura 2B** es una gráfico de un Western Blot que muestra la traducción de TNAP de la paciente A (caso índice), madre, padre y tres hermanos. La vinculina se usa como un estándar.

La **Figura 3** ilustra la prueba Seahorse de esfuerzo respiratorio mitocondrial de fibras musculares del extensor digitorum longus (EDL) de ratones HPP y WT apareados por edad y sexo.

La **Figura 4** ilustra la capacidad respiratoria de reserva en el músculo de ratones HPP después del tratamiento in vivo con vehículo o la sec. con núm. de ident.: 21

La **Figura 5** ilustra un trayecto para los aminoácidos de cadena ramificada (BCAA, por sus siglas en inglés) en la producción de trifosfato de adenosina (ATP, por sus siglas en inglés) a través de la cadena de

transporte de electrones (ETC, por sus siglas en inglés) y la fosforilación oxidante (Ox-Phos);

La **Figura 6**, la **Figura 7** y la **Figura 8** ilustran los niveles de valina, leucina e isoleucina de los BCAA, respectivamente, en el músculo tibial de ratones con eliminación del gen (ratones Akp2-/- (KO)) de la fosfatasa alcalina inespecífica de tejido (TNSALP) tratados con la sec. con núm. de ident.: 1 durante 35 días seguidos del vehículo durante 12 días (sec. con núm. de ident.: 1 retirada), o tratados continuamente con la sec. con núm. de ident.: 1 durante 47 días, así como ratones silvestres, sin tratar.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La debilidad muscular es un síntoma prominente de varias enfermedades y trastornos. Una tal enfermedad es la hipofosfatasia (HPP), un defecto congénito causado por mutaciones anuladoras en el gen *ALPL*, que codifica la fosfatasa alcalina inespecífica de tejido (TNSALP). La asfotasa alfa (STRENSIQ®, Alexion Pharmaceuticals, Inc.), una proteína de fusión TNSALP, es el primer y único tratamiento disponible para sujetos diagnosticados con HPP. Sorprendentemente, descubrimos que los sujetos que no tienen una mutación anuladora en el gen *ALPL*, pero exhiben síntomas similares como los de la HPP, que incluye debilidad muscular (p. ej., hipotonía), también responden al tratamiento con asfotasa alfa. En consecuencia, se presentan métodos para tratar la debilidad muscular en un sujeto sin una mutación anuladora en *ALPL* que se caracteriza por tener una concentración reducida de TNSALP (p. ej., en su suero) mediante la administración de un polipéptido recombinante que tiene actividad de fosfatasa alcalina (p. ej., asfotasa alfa).

Sujetos que pueden tratarse usando las composiciones y métodos descritos en la presente

Se presentan métodos de tratamiento para la debilidad muscular en un sujeto con niveles reducidos de TNSALP mediante la administración de un polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina. El sujeto es uno que no tiene una mutación anuladora en *ALPL*, pero puede tener una mutación en regiones no codificantes del gen *ALPL*. El nivel reducido de TNSALP puede causarse por uno o más factores, tales como transcripción reducida (p. ej., reducida en 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, o 100 %) de *ALPL*, traducción reducida (p. ej., reducida en 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, o 100 %) del ARNm de *ALPL*, modificación postraducciona l elevada (p. ej., elevada en 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, o 100 %) o reducida (p. ej., reducida en 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, o 100 %) de TNSALP, y/o actividad enzimática reducida (p. ej., reducida en 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, o 100 %) de TNSALP. La transcripción reducida de *ALPL*, la traducción reducida del ARNm de *ALPL*, la modificación postraducciona l elevada o reducida de TNSALP y/o la actividad enzimática reducida de TNSALP pueden medirse con respecto a un promedio, un valor normalizado, un valor de referencia, un valor sujeto antes del inicio de la enfermedad, o un sujeto sano.

Las mutaciones anuladoras en *ALPL* son conocidas en la técnica y se describen, p. ej., en la publicación

PCT WO2011134084, cuya descripción se incorpora en la presente como referencia en su totalidad. En consecuencia, se presentan métodos para tratar sujetos con debilidad muscular que no tienen una de las mutaciones descritas en este o conocidas de cualquier otra manera. Una mutación que no es anuladora, p. ej., una mutación en regiones reguladoras, UTR 3' o 5', potenciadores, promotores o regiones intrónicas de *ALPL*, puede contribuir a un nivel reducido de TNSALP. Alternativamente, o además, el sujeto puede tener una mutación (p. ej., polimorfismo(s) de un único nucleótido (SNP, por sus siglas en inglés)) en cualquier parte de sus genomas, tal como en las regiones reguladoras, UTR 3' o 5', potenciadores, promotores o regiones intrónicas de genes no *ALPL*.

El sujeto puede tener una o más variantes estructurales en su genoma que producen una actividad reducida de TNSALP que conduce a debilidad muscular. Los ejemplos de variantes estructurales incluyen variantes de número de copias, inserciones, duplicaciones, inversión, translocaciones y puntos de ruptura. El sujeto puede tener una mutación o variante estructural en una región(es) codificante(s) para una proteína, enzima o ARN regulador (p. ej., ARN no codificante) que no sea TNSALP. Por ejemplo, otras proteínas o ARN que interactúan con TNSALP o el gen *ALPL* que modulan directa o indirectamente

la función, actividad y/o expresión de TNSALP pueden tener una mutación o variante estructural que imparte un efecto corriente abajo que reduce el nivel de TNSALP. Por ejemplo, el sujeto puede tener una mutación o variante estructural en uno o más de los genes *ATP1A3*, *ANKH*, *ENPP1*, *FGFR3*, *PHOSPHO1*, *PTH1R*, *PTH2R*, *SPP1*, *TNFRSF11A*, *TNFRSF11B*, *COL1A1*, *COL1A2*, *SOX9*, *PDXP*, *AOX1*, *PNPO*, *PDXK*, *ADCK3*, *MTRNR2*, o *S1PR1*. La mutación o variante estructural puede estar en una región codificante, 5' UTR, 3'UTR, o una secuencia intrónica. El sujeto puede tener una variante *ATP1A3* c.357+1G>A. El sujeto puede tener una variante *ADCK3* m.1665G>A. El sujeto puede tener una variante *MTRNR2* m.1836A>G.

El gen *ATP1A3* codifica una subunidad alfa de la bomba Na⁺/K⁺ ATPasa que usa energía del ATP para transportar iones dentro y fuera de las células para mantener el gradiente electroquímico. También desempeña un papel en la función neuronal, la contracción muscular, y la recaptación de neurotransmisores en el sistema nervioso central. Todas las mutaciones *ATP1A3* perjudiciales reportadas muestran un modo dominante de herencia con penetrancia variable. Además, las mutaciones perjudiciales se asocian con un fenotipo de distonía-parkinsonismo de inicio rápido caracterizado por retraso motor y ataxia y hemiplejía alternante de la infancia, y problemas cognitivos. El fenotipo puede variar en los niños y puede

incluir hipotonía, ataxia, dificultad para hablar y habla arrastrada. Los sujetos con mutaciones en *ATP1A3* pueden exhibir niveles disminuidos de ALP o síntomas asociados con estos como se describe en la presente. Un sujeto con una mutación en *ATP1A3* que tiene debilidad muscular puede beneficiarse del tratamiento con un polipéptido que tiene actividad fosfatasa alcalina de acuerdo con los métodos descritos en la presente.

El gen *ADCK3* codifica una proteína mitocondrial, que funciona en un complejo proteico de membrana de transferencia de electrones en la cadena respiratoria. Las mutaciones en este gen perjudica la producción de coenzima Q10. El PLP también es un cofactor requerido para las enzimas en la vía de biosíntesis de la Q10. Las mutaciones en el gen *ADCK3* están asociadas con ataxias cerebelosas autosómicas recesivas. Los sujetos con mutaciones en *ADCK3* pueden exhibir niveles disminuidos de ALP o síntomas asociados con estos como se describe en la presente. Un sujeto con una mutación en *ATP1A3* que tiene debilidad muscular puede beneficiarse del tratamiento con un polipéptido que tiene actividad fosfatasa alcalina de acuerdo con los métodos descritos en la presente.

Un sujeto tratado de acuerdo con los métodos descritos en la presente puede caracterizarse por tener uno o más de los siguientes: una concentración elevada de PPi, concentración y/o actividad disminuida de la

fosfatasa alcalina, una puntuación promedio de fuerza de la BOT-2 de, p. ej., menor que 10, una puntuación promedio de la velocidad de carrera y agilidad de la BOT-2 de, p. ej., menor que 5, una puntuación promedio del índice CHAQ de, p. ej., mayor que aproximadamente 0,8, o una puntuación promedio del PODCI de, p. ej., menor que aproximadamente 40, un promedio de 6MWT de, p. ej., menor que aproximadamente 80 % del valor de 6MWT previsto (p. ej., en el que el valor de 6MWT previsto es el valor de 6MWT de un sujeto normal emparejado por edad y/o emparejado por sexo), un grado de fuerza muscular de, p. ej., menor que 5, y/o un valor promedio de HHD (p. ej., un valor promedio de fuerza muscular o de prensión de HHD) de, p. ej., menor que aproximadamente 50 % del valor previsto de HHD (p. ej., en el que el valor previsto de HHD es el valor de HHD de un sujeto normal emparejado por edad y/o emparejado por sexo). En particular, el sujeto puede ser uno que se ha identificado como que tiene o es propenso a una debilidad muscular.

El sujeto puede identificarse como que requiere de tratamiento. Por ejemplo, los sujetos identificados como que tienen o son propensos a una enfermedad de debilidad muscular (p. ej., una enfermedad no causada por una mutación anuladora en *ALPL* pero caracterizada por, p. ej., niveles o actividad reducidos de ALP o niveles de sustrato aumentados de ALP). Tal sujeto puede tratarse

mediante la administración de un polipéptido recombinante que tiene actividad de fosfatasa alcalina (tal como TNALP, por ejemplo, el polipéptido sALP de la sec. con núm. de ident.: 1 o una variante polipeptídica que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de la sec. con núm. de ident.: 1, p. ej., asfotasa alfa). El sujeto puede caracterizarse por tener una concentración elevada de PPi, una concentración disminuida de ALP, una puntuación promedio de fuerza de la BOT-2 de, p. ej., menor que 10, una puntuación promedio de la velocidad de carrera y agilidad de la BOT-2 de, p. ej., menor que 5, una puntuación promedio del índice CHAQ de, p. ej., mayor que aproximadamente 0,8, una puntuación promedio del PODCI de, p. ej., menor que aproximadamente 40, un promedio de 6MWT de, p. ej., menor que aproximadamente 80 % del valor previsto de 6MWT, un grado de fuerza muscular de, p. ej., menor que 5, y/o un valor promedio de HHD (p. ej., un valor promedio de fuerza muscular o de prensión de HHD) de, p. ej., menor que aproximadamente 80 % del valor previsto de HHD. Por ejemplo, una concentración elevada de PPi en una muestra (p. ej., una muestra de plasma) de un lactante o niño (p. ej., un sujeto menor que aproximadamente 12 años de edad) de aproximadamente 5,71 μM o mayor, una concentración elevada de PPi en una muestra (p. ej., una muestra de plasma) de un adolescente (p. ej., un sujeto de

aproximadamente 13 a aproximadamente 18 años de edad) de aproximadamente 4,78 μm o mayor; y una concentración elevada de PPI en una muestra (p. ej., una muestra de plasma) de un adulto (p. ej., un sujeto mayor que aproximadamente 18 años de edad) de aproximadamente 5,82 μm o mayor se puede usar para identificar a estos sujetos como que requieren de tratamiento. En particular, una concentración disminuida de ALP en una muestra (p. ej., una muestra de plasma) del sujeto de, p. ej., aproximadamente 90 U/l o menos para un sujeto de 0 a 14 días de edad; aproximadamente 134 U/l o menos para un sujeto de 15 días de edad a menos de 1 año de edad; aproximadamente 156 U/l o menos para un sujeto de aproximadamente 1 año de edad a menos de 10 años de edad; aproximadamente 141 U/l o menos para un sujeto de aproximadamente 10 años de edad a menos de aproximadamente 13 años de edad; aproximadamente 62 U/l o menos para un sujeto femenino de aproximadamente 13 años de edad a menos de aproximadamente 15 años de edad; aproximadamente 127 U/l o menos para un sujeto masculino de aproximadamente 13 años de edad a menos de aproximadamente 15 años de edad; aproximadamente 54 U/l o menos para un sujeto femenino de aproximadamente 15 años de edad a menos de aproximadamente 17 años de edad; aproximadamente 89 U/l o menos para un sujeto masculino de aproximadamente 15 años de edad a menos de

aproximadamente 17 años de edad; aproximadamente 48 U/l o menos para una mujer de aproximadamente 17 años de edad o más; o aproximadamente 59 U/l o menos para un sujeto masculino de aproximadamente 17 años de edad o más pueden usarse para identificar a estos sujetos como que requieren de tratamiento.

El sujeto que tiene o es propenso a una enfermedad de debilidad muscular (p. ej., sujetos sin una mutación anuladora en *ALPL*) puede identificarse por una concentración elevada de P*Pi*, una concentración disminuida de fosfatasa alcalina y/o una fuerza muscular o de prensión disminuida (p. ej., como se evalúa usando la BOT-2, 6MWT, CHAQ, PODCI, el grado de fuerza muscular y/o la HHD). El sujeto puede tener transcripción reducida de *ALPL*, traducción reducida del ARNm de *ALPL*, modificación postraducciona*l* elevada o reducida de TNSALP y/o actividad enzimática reducida de TNSALP, p. ej., en relación con un promedio, un valor normalizado, un valor de referencia, un valor del sujeto antes del inicio de la enfermedad, o un sujeto sano.

También se presentan métodos para identificar a un sujeto que tiene o es propenso a una enfermedad de debilidad muscular, en la que el sujeto tiene concentraciones elevadas de P*Pi*, concentraciones disminuida de ALP, y/o una fuerza muscular o de prensión disminuida; y después tratar, aminorar o reducir el riesgo de al menos un

síntoma de la enfermedad de debilidad muscular en el sujeto, p. ej., mediante la administración de una ALP (p. ej., asfotasa alfa).

El sujeto puede identificarse independientemente de si previamente ha sido diagnosticado con hipofosfatasia (HPP), enfermedad por depósito de pirofosfato de calcio (CPPD) o hipofosfatemia familiar (tal como raquitismo hipofosfatémico autosómico dominante (ADHR, por sus siglas en inglés), raquitismo hipofosfatémico autosómico recesivo, raquitismo hipofosfatémico ligado al X, hipofosfatemia ligada al X (XLH, por sus siglas en inglés), etc.). El sujeto se identifica, por ejemplo, basado en una concentración elevada de PPi. Las causas de la concentración elevada de PPi incluyen, por ejemplo, los defectos en las moléculas de señalización, o mutaciones en genes que codifican tales moléculas de señalización, que regulan la producción, degradación, o la estabilidad de PPi. Por ejemplo, los defectos o mutaciones en las moléculas de señalización pueden dar lugar a una sobreexpresión de PPi o una disminución de la degradación o hidrólisis de PPi. Los defectos en las moléculas de señalización también incluyen defectos en los cofactores u otras moléculas que facilitan la función de las moléculas de señalización. Por ejemplo, en la CPPD, una deficiencia de Mg, que actúa como cofactor para diversas fosfatasas, conduce a niveles elevados de PPi.

Enfermedades diana de debilidad muscular

La debilidad muscular, miopatías y miastenia que pueden tratarse por los métodos descritos en la presente incluyen cualquier enfermedad o trastorno que causa, se debe a, o se relaciona con al menos un síntoma de debilidad muscular. Los términos “debilidad muscular, “miopatía” y “miastenia”, u otras expresiones similares en esta descripción, se refieren a una condición relacionada con un estado alterado de la función muscular, tal como una falta o defecto de fuerza muscular, en comparación con otros sujetos que carecen de la condición o en relación con el mismo sujeto en el punto de tiempo previo a tener la condición. La debilidad muscular se puede dividir en condiciones que tienen debilidad muscular verdadera o percibida. La debilidad muscular verdadera puede incluir una condición donde la fuerza ejercida por los músculos es menor de lo que se esperaría. Por ejemplo, la debilidad muscular verdadera incluye una variedad de enfermedades del músculo esquelético, que incluye distrofia muscular y miopatía inflamatoria. Otros ejemplos incluyen trastornos de la unión neuromuscular, tal como miastenia gravis. La debilidad muscular también puede causarse por niveles bajos de potasio y otros electrolitos dentro de las células musculares, donde la fuerza ejercida por los músculos es menor de lo que se esperaría. La debilidad muscular

percibida (o debilidad no neuromuscular) describe una condición donde un sujeto siente más esfuerzo de lo normal (es decir, en comparación con otros sujetos que carecen de la condición o con el mismo sujeto en el punto de tiempo previo a tener la condición) se requiere ejercer una cierta cantidad de fuerza pero la fuerza muscular real es normal, por ejemplo el síndrome de fatiga crónica.

En algunas condiciones, tal como la miastenia gravis, la fuerza muscular es normal cuando descansa, pero la debilidad verdadera se produce después de que el músculo se ha sometido al ejercicio. Esto también es cierto para algunos casos de síndrome de fatiga crónica, donde se ha medido la debilidad muscular objetiva posesfuerzo con tiempo de recuperación retrasado y es una característica de algunas de las definiciones publicadas. Estas enfermedades o trastornos también son ejemplos de una “enfermedad de debilidad muscular” dentro del alcance de esta descripción.

La debilidad muscular también se puede clasificar como “proximal” o “distal” en función de la ubicación de los músculos que afecta. La debilidad muscular proximal afecta a los músculos más cercanos a la línea media del cuerpo, mientras que la debilidad muscular distal afecta a los músculos más alejados de las extremidades. La debilidad muscular proximal se puede observar en el síndrome de Cushing y el hipertiroidismo.

En la práctica existen otras categorías de debilidad muscular. Por ejemplo, la fatiga neuromuscular puede clasificarse como “central” o “periférica” dependiendo de su causa. La fatiga muscular central se manifiesta como una sensación general de privación de energía, mientras que la fatiga muscular periférica se manifiesta como una incapacidad local específica del músculo para hacer el trabajo

La gravedad de la debilidad muscular se puede clasificar en diferentes “grados” basado en los siguientes criterios ilustrativos:

Grado 0: Sin contracción ni movimiento muscular.

Grado 1: Trazas de contracción, pero sin movimiento en la articulación.

Grado 2: Movimiento en la articulación con gravedad eliminada.

Grado 3: Movimiento contra la gravedad, pero no contra la resistencia añadida.

Grado 4: Movimiento contra la resistencia externa con menos fuerza de lo habitual.

Grado 5: Fuerza normal.

Un sujeto clasificado como que tiene un trastorno de debilidad muscular dentro de cualquiera de los Grados 0-4 puede tratarse de acuerdo con los métodos descritos en la presente.

Hipofosfatasia (HPP) y debilidad muscular

La hipofosfatasia (HPP) es el trastorno metabólico hereditario poco frecuente resultante de la(s) mutación(es) anuladora(s) en el gen de la fosfatasa alcalina inespecífica de tejido (TNSALP). Se ha identificado un subconjunto de sujetos que se diagnosticaron con HPP pero, tras el análisis de secuenciación, no exhibieron una mutación anuladora en *ALPL*, que codifica TNSALP. Por lo tanto, algún otro mecanismo se contribuye a la aparición de síntomas similares a los de HPP. Un sello bioquímico en estos sujetos es la actividad subnormal de ALP en suero (hipofosfatasemia), que conduce a niveles elevados en sangre y/u orina de tres sustratos fosfocompuestos: pirofosfato inorgánico (PPi), fosfoetanolamina (PEA) y piridoxal 5'-fosfato (PLP). La deficiencia de TNSALP puede causar un espectro de secuelas que incluyen pérdida prematura de los dientes primarios, raquitismo, crecimiento deficiente, debilidad muscular, función física comprometida y dolor. El tratamiento con asfotasa alfa mejora dramáticamente la mineralización ósea en sujetos con HPP, sin embargo, se desconoce si sería eficaz en el tratamiento de la debilidad muscular. Como se describe en la presente, se ha descubierto que la asfotasa alfa tiene un efecto terapéutico sobre los músculos de un sujeto (p. ej., un sujeto que tiene una

enfermedad de debilidad muscular, tal como debilidad muscular en un sujeto que tiene una enfermedad similar a la HPP), incluso en sujetos sin una mutación anuladora en *ALPL*.

Enfermedad por depósito de pirofosfato de calcio (CPPD o CPDD) y debilidad muscular

La enfermedad por depósito de pirofosfato de calcio (CPPD o CPDD), o enfermedad por depósito de cristales de pirofosfato de calcio dihidratado, es una artropatía metabólica causada por el depósito de cristales dihidratados de pirofosfato de calcio en y alrededor de las articulaciones, especialmente en el cartílago articular y el fibrocartílago. Estas enfermedades pueden presentarse en un sujeto sin una mutación anuladora en *ALPL* y que exhibe un nivel reducido de TNSALP. Aunque la CPPD frecuentemente es asintomática, solo se observan cambios radiográficos (es decir, condrocalcinosis), pueden producirse diversas manifestaciones clínicas, que incluye artritis aguda (pseudogota) y crónica. Los depósitos de cristal provocan inflamación en la articulación, lo que puede provocar que el cartílago articular se rompa. La enfermedad puede tomar algunas formas diferentes relacionadas con la artritis: osteoartritis, una artritis reumatoide crónica (RA, por sus siglas en inglés) similar a la artritis

inflamatoria, o una condición inflamatoria agudamente dolorosa llamada pseudogota. El nombre pseudogota proviene del hecho de que se asemeja a otra condición agudamente dolorosa llamada gota. La principal diferencia es el tipo de cristales involucrados en la inflamación y el daño. Casi cualquier articulación puede verse afectada por la CPPD, aunque las rodillas, las muñecas y las caderas son frecuentemente las más afectadas. Esta condición es la causa más común de la osteoartritis metabólica secundaria. Un sujeto con CPPD puede experimentar una morbilidad significativa debido al dolor de un ataque agudo de pseudogota o a los síntomas de artropatía crónica. El tratamiento de la CPPD sintomática es importante para prevenir un daño adicional en los órganos terminales, pero no puede revertir la enfermedad articular.

El mecanismo exacto para el desarrollo de la CPPD permanece sin esclarecerse. A partir del envejecimiento, factores genéticos, o ambos, los sujetos tienen un aumento en la descomposición del trifosfato de adenosina lo que resulta en una mayor concentración de pirofosfato inorgánico en las articulaciones. Los cambios en la matriz del cartílago pueden desempeñar un papel importante en la promoción del depósito de cristales de pirofosfato de calcio dihidratado. Se ha observado sobreactividad de enzimas que descomponen los trifosfatos,

tales como el nucleósido trifosfato pirofosfohidrolasa, en el cartílago de sujetos con CPPD. Por lo tanto, el pirofosfato inorgánico puede unirse al calcio, lo que conduce al depósito en el cartílago y la sinovia. El cartílago hialino se ve afectado con mayor frecuencia, pero el fibrocartílago, tal como el cartílago meniscal de la rodilla, también puede involucrarse (Pritzker et al., 1988 J Rheumatol. 15(5):828-835).

Otras enfermedades y debilidad muscular

Similarmente a HPP y CPPD (o CPDD), otras enfermedades o trastornos pueden incluir al menos un síntoma de debilidad muscular. Entre ellas, algunos tipos de enfermedades de debilidad muscular tienen una concentración elevada característica de pirofosfato inorgánico (PPi). Estas enfermedades de debilidad muscular con concentración elevada de PPi también son dianas para el tratamiento con asfotasa alfa en la presente descripción.

Por ejemplo, los sujetos diagnosticados con hipofosfatemia familiar (tal como raquitismo hipofosfatémico autosómico dominante (ADHR), raquitismo hipofosfatémico autosómico recesivo, raquitismo hipofosfatémico ligado al X, e hipofosfatemia ligada al X (XLH), etc.) se caracterizan típicamente por tener un fenotipo de debilidad muscular. La hipofosfatemia, o

raquitismo hipofosfatémico, es una forma de raquitismo que se caracteriza por los niveles bajos de fosfato sérico y resistencia al tratamiento con radiación ultravioleta o ingestión de vitamina D. La hipofosfatemia ligada al X (XLH) es un trastorno dominante y representa más del 80 % de toda la hipofosfatemia familiar. Se considera que XLH es un trastorno sistémico, a partir de la mutación del gen regulador de fosfato homólogo a las endopeptidasas en el cromosoma X (PHEX, por sus siglas en inglés). Los sujetos XLH demuestran una concentración sérica normal o baja de 1,25-dihidroxitamina D₃, sugestiva de formación inadecuada de este metabolito de vitamina D. El 20 % restante de los sujetos con hipofosfatemia familiar tienen raquitismo hipofosfatémico autosómico dominante por ganancia de función, raquitismo hipofosfatémico autosómico recesivo y raquitismo hipofosfatémico hereditario con hipercalciuria.

Otras enfermedades caracterizadas por enfermedad de debilidad que pueden tratarse de acuerdo con los métodos descritos en la presente incluyen, por ejemplo, miastenia gravis, esclerosis lateral amiotrófica (ALS), miositis, distrofia miotónica, miotonía, síndrome de Guillain-Barre, distrofia muscular de Duchenne (DMD) y síndrome miasténico de Lambert-Eaton.

Métodos de tratamiento

En la presente se proporcionan métodos para tratar o aminorar al menos un síntoma de un sujeto (p. ej., un niño, un adolescente o un adulto, p. ej., un sujeto que no tiene una mutación anuladora en *ALPL* y tiene un nivel reducido de TNSALP) que tiene o es propenso a una enfermedad de debilidad muscular. Tal tratamiento puede incluir administrar una fosfatasa alcalina, o un polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina, para disminuir la concentración elevada de PPI en tal sujeto. Por ejemplo, una fosfatasa alcalina soluble (sALP, tal como TNALP, por ejemplo, el polipéptido sALP de la sec. con núm. de ident.: 1 o una variante polipeptídica que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de la sec. con núm. de ident.: 1, p. ej., asfotasa alfa) puede administrarse a niños, adolescentes o adultos.

Los sujetos pueden ser diagnosticados con una enfermedad de debilidad muscular (tal como HPP o enfermedad similar a la HPP, la CPPD, la hipofosfatemia familiar descrita en la presente, etc.) antes de la administración de una fosfatasa alcalina, o un polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina, (p. ej., una sALP, tal como TNALP, por ejemplo, el polipéptido sALP de la sec. con núm. de ident.: 1 o una variante polipeptídica que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de la sec. con núm. de ident.: 1, p. ej., asfotasa alfa).

Adicionalmente, un sujeto que tiene o es propenso a una enfermedad de debilidad muscular puede ser un sujeto sin tratamiento previo que no ha sido tratado previamente con una sALP (tal como TNALP, por ejemplo, el polipéptido sALP de la sec. con núm. de ident.: 1 o una variante polipeptídica que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de la sec. con núm. de ident.: 1, p. ej., asfotasa alfa). El sujeto puede tener una enfermedad de debilidad muscular distinta de HPP, CPPD, o hipofosfatemia familiar.

El método incluye administrar una fosfatasa alcalina o un polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina (p. ej., una sALP, tal como TNALP, por ejemplo, el polipéptido sALP de la sec. con núm. de ident.: 1 o una variante polipeptídica que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de la sec. con núm. de ident.: 1, p. ej., asfotasa alfa) a un sujeto que tiene o es propenso a una enfermedad de debilidad muscular en una única o múltiples dosificaciones durante un período de tiempo. En particular, se puede administrar una sALP, tal como asfotasa alfa, a un sujeto previamente determinado que tiene una concentración elevada de pirofosfato inorgánico (PPi) o al menos un biomarcador/puntuación predeterminado para la debilidad muscular, tal como una puntuación promedio de fuerza de la BOT-2 de menos de 10, una puntuación promedio de la

velocidad de carrera y agilidad de la BOT-2 de menos de 5, una puntuación promedio del índice CHAQ menor que aproximadamente 0,8 y/o una puntuación promedio del PODCI de menos de aproximadamente 40, un promedio de 6MWT de menos de aproximadamente 80 % del valor previsto de 6MWT, 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 presión de HHD) de, p. ej., menor que aproximadamente 80 % del valor previsto de HHD. Por ejemplo, se puede administrar una sALP a un sujeto previamente determinado que tiene una concentración de PPI en una muestra (p. ej., una muestra de plasma) de mayor que aproximadamente 5,71 μm para un lactante o un niño (p. ej., un sujeto menor que aproximadamente 12 años de edad); mayor que aproximadamente 4,78 μm para un adolescente (p. ej., un sujeto de aproximadamente 13 a aproximadamente 18 años de edad); o mayor que aproximadamente 5,82 μm para un adulto (p. ej., un sujeto mayor de aproximadamente 18 años de edad). En otras modalidades, la enfermedad de debilidad muscular descrita en la presente es causada por una concentración elevada de al menos un sustrato de fosfatasa alcalina (p. ej., PPI, PLP, PEA, etc.). Alternativamente, una fosfatasa alcalina, o un polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina, (p. ej., una sALP, tal como TNALP, por ejemplo, el polipéptido sALP de la sec. con núm. de ident.: 1 o una variante polipeptídica que

tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de la sec. con núm. de ident.: 1, p. ej., asfotasa alfa) puede administrarse a un sujeto que tiene o es propenso a una enfermedad de debilidad muscular antes de la determinación de la puntuación de debilidad muscular (p. ej., usando la puntuación de fuerza de la BOT-2, la puntuación de la velocidad de carrera y agilidad de la BOT-2, la puntuación del índice CHAQ, la puntuación escalada de la BSID-III, la puntuación estándar de la PDMS-2, una puntuación de fuerza muscular, un valor de 6MWT y/o un valor de HHD). El tratamiento con una ALP de acuerdo con los métodos descritos en la presente promueve, p. ej., un aumento en las actividades de ADL, una disminución del dolor y/o una mejora en el desarrollo motor.

Adicionalmente, cada una de las puntuaciones descritas (p. ej., la puntuación de fuerza de la BOT-2, la puntuación de la velocidad de carrera y agilidad de la BOT-2, la puntuación del índice CHAQ, la puntuación escalada de la BSID-III, la puntuación estándar de la PDMS-2, 6MWT, la 12- POMA-G, una evaluación de movilidad orientada al rendimiento modificada (mPOMA-G, tal como la una ilustrada en Phillips et al. 2015 Bone Abstracts 4:P136), o el valor de HHD) de un sujeto que tiene o es propenso a una enfermedad de debilidad muscular descrita en la presente se puede usar individualmente o en

cualquier combinación para evaluar la eficacia del tratamiento usando una sALP (tal como TNALP, por ejemplo, el polipéptido sALP de la sec. con núm. de ident.: 1 o una variante polipeptídica que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de la sec. con núm. de ident.: 1, p. ej., asfotasa alfa), en la que las mejora en relación con una determinada puntuación de prueba demuestran que la sALP es efectiva para tratar la enfermedad de debilidad muscular.

Por ejemplo, cuando la administración de una fosfatasa alcalina o un polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina (p. ej., una sALP, tal como TNALP, por ejemplo, el polipéptido sALP de la sec. con núm. de ident.: 1 o una variante polipeptídica que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de la sec. con núm. de ident.: 1, p. ej., asfotasa alfa) a un sujeto que tiene o es propenso a una enfermedad de debilidad muscular da lugar a un aumento promedio en la puntuación de fuerza de la BOT-2 a aproximadamente 10 o mayor que aproximadamente 10, en el que el sujeto previamente tuvo una puntuación promedio de fuerza de la BOT-2 de menos de aproximadamente 10, entonces el tratamiento con fosfatasa alcalina o un polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina es efectiva para tratar, p. ej., las deficiencias físicas asociadas con una enfermedad de debilidad muscular. Alternativamente,

cuando la administración de una sALP no da lugar a un aumento promedio en la puntuación de fuerza de la BOT-2 a aproximadamente 10 o mayor que aproximadamente 10, la dosificación y/o frecuencia de administración de la fosfatasa alcalina o un polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina se puede cambiar para determinar la cantidad efectiva de la fosfatasa alcalina o un polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina para el sujeto. Por ejemplo, la dosificación de la sALP (tal como TNALP, por ejemplo, el polipéptido sALP de la sec. con núm. de ident.: 1 o una variante polipeptídica que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de la sec. con núm. de ident.: 1, p. ej., asfotasa alfa) puede aumentarse de, p. ej., aproximadamente 3 mg/kg/semana a aproximadamente 6 mg/kg/semana o aproximadamente 6 mg/kg/semana a aproximadamente 9 mg/kg/semana.

Adicionalmente, cuando la administración de una fosfatasa alcalina o un polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina (p. ej., una sALP, tal como TNALP, por ejemplo, el polipéptido sALP de la sec. con núm. de ident.: 1 o una variante polipeptídica que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de la sec. con núm. de ident.: 1, p. ej., asfotasa alfa) a un sujeto que tiene o es propenso a una enfermedad de debilidad muscular da lugar a una mejora en la categorización del

grado de fuerza muscular del sujeto de uno o más (p. ej., una mejora a un grado de fuerza muscular de 1, 2, 3, 4 o 5 de un grado de fuerza muscular previo, inferior), en el que el sujeto previamente tuvo un grado de fuerza muscular promedio de menos de aproximadamente 5, entonces el tratamiento con fosfatasa alcalina o un polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina es efectiva para tratar, p. ej., las deficiencias físicas asociadas con una enfermedad de debilidad muscular. Alternativamente, cuando la administración de una sALP no da lugar a una mejora en la categorización del grado de fuerza muscular del sujeto de uno o más de un grado de fuerza muscular previo, anterior, la dosificación y/o frecuencia de administración de la fosfatasa alcalina o un polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina se puede cambiar (p. ej., aumentar) para determinar la cantidad efectiva de la fosfatasa alcalina o un polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina para el sujeto. Por ejemplo, la dosificación de la sALP (tal como TNALP, por ejemplo, el polipéptido sALP de la sec. con núm. de ident.: 1 o una variante polipeptídica que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de la sec. con núm. de ident.: 1, p. ej., asfotasa alfa) puede aumentarse de, p. ej., aproximadamente 3 mg/kg/semana a aproximadamente 6 mg/kg/semana o aproximadamente 6 mg/kg/semana a aproximadamente 9 mg/kg/semana.

Biomarcadores/puntos finales para el diagnóstico y/o
tratamiento de enfermedades de debilidad muscular

Una enfermedad de debilidad muscular (tal como HPP que incluye, p. ej., HPP perinatal, HPP infantil, HPP de la niñez y odontohipofosfatasia, una enfermedad similar a la HPP, la CPPD y la hipofosfatemia familiar, como se describe en la presente) puede tratarse con una fosfatasa alcalina, o un polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina, (p. ej., una sALP, tal como TNALP, por ejemplo, el polipéptido sALP de la sec. con núm. de ident.: 1 o una variante polipeptídica que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de la sec. con núm. de ident.: 1, p. ej., asfotasa alfa). Los métodos descritos en la presente también son útiles para diagnosticar un sujeto que tiene o es propenso a una enfermedad de debilidad muscular, identificar a un sujeto que tiene o es propenso a una enfermedad de debilidad muscular, o probar la eficacia del tratamiento de una enfermedad de debilidad muscular. Por ejemplo, un sujeto puede diagnosticarse como que tiene o es propenso a una enfermedad de debilidad muscular si el sujeto se caracteriza por tener ciertos biomarcadores característicos o puntuaciones métricas. Un sujeto puede tratarse con una fosfatasa alcalina, o un polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina (p. ej., una sALP,

tal como TNALP, por ejemplo, el polipéptido sALP de la sec. con núm. de ident.: 1 o una variante polipeptídica que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de la sec. con núm. de ident.: 1, p. ej., asfotasa alfa), y la eficacia o efectos del tratamiento pueden analizarse usando los biomarcadores característicos o puntuaciones métricas. Tales biomarcadores pueden incluir, p. ej., la concentración elevada de pirofosfato inorgánico (PPi) y/o la disminución de la fosfatasa alcalina (ALP) en el suero, los tejidos óseos o musculares, o la orina del sujeto. Las métricas ilustrativas útiles en los métodos descritos en la presente para determinar la eficacia del tratamiento de la debilidad muscular pueden incluir: (1) la prueba Bruininks-Oseretsky de competencia motora 2.^a Edición (BOT-2), (2) el cuestionario de evaluación de la salud infantil (CHAQ), (3) el instrumento de recolección de datos de resultados pediátricos (PODCI), (4) las escalas Bayley de desarrollo del lactante y del niño pequeño, 3.^a Edición (BSID-III), (5) las escalas Peabody de desarrollo motor, 2.^a Edición (PDMS-2), (6) la prueba de caminata de seis minutos (6MWT), (7) el grado de fuerza muscular, y (8) la dinamometría de mano (HHD), que se describen con más detalle a continuación.

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

Un sujeto que tiene o es propenso a una enfermedad de debilidad muscular puede identificarse para el tratamiento con una fosfatasa alcalina o un polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina (p. ej., una sALP, tal como TNALP, por ejemplo, el polipéptido sALP de la sec. con núm. de ident.: 1 o una variante polipeptídica que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de la sec. con núm. de ident.: 1, p. ej., asfotasa alfa) mediante la determinación de las concentraciones de pirofosfato inorgánico (PPi) y/o fosfatasa alcalina (ALP) en una muestra, tal como una muestra de plasma u orina, del sujeto. Cualquier método conocido por los expertos en la técnica puede usarse para cuantificar las concentraciones de PPi y/o ALP en una muestra de plasma o alternativamente en una muestra de orina, como se describe en detalle en Whyte et al., 1995 (J. Clin. Invest. 95(4): 1440-1445), incorporado en la presente como referencia en su totalidad. También se describen métodos para cuantificar las concentraciones de PPi en una muestra de plasma u orina en Cheung et al., 1977 (Anal. Biochem. 83: 61-63), Cook et al., 1978 (Anal. Biochem. 91: 557-565), y Johnson et al., 1968 (Anal.

Biochem. 26: 137-145), cada uno de los cuales se incorpora en la presente como referencia en su totalidad.

En particular, una fosfatasa alcalina o un polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina (p. ej., una sALP, tal como TNALP, por ejemplo, el polipéptido sALP de la sec. con núm. de ident.: 1 o una variante polipeptídica que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de la sec. con núm. de ident.: 1, p. ej., asfotasa alfa) se puede administrar a un sujeto (p. ej., un sujeto sin una mutación anuladora en *ALPL*) que tiene o es propenso a una enfermedad de debilidad muscular previamente determinada que tiene una concentración plasmática de PPi de hasta aproximadamente 6 μm (p. ej., aproximadamente 4,5 μm , aproximadamente 5 μm , o aproximadamente 5,5 μm o una concentración plasmática de PPi dentro del rango de aproximadamente 4,5 μm a aproximadamente 6 μm). Por ejemplo, la fosfatasa alcalina o el polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina se administra a, p. ej., un lactante o niño (p. ej., un sujeto menor que aproximadamente 12 años de edad) que tiene una concentración plasmática de PPi de aproximadamente 5,71 μm o mayor; un adolescente (p. ej., un sujeto de aproximadamente 13 a aproximadamente 18 años de edad) que tiene una concentración plasmática de PPi de aproximadamente 4,78 μm o mayor; o un adulto (p. ej., un

sujeto mayor de mayor que aproximadamente 18 años de edad) que tiene una concentración plasmática de PPI de aproximadamente 5,82 μm o mayor. Adicionalmente, una fosfatasa alcalina o un polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina puede administrarse a un sujeto (p. ej., un humano) que tiene o es propenso a una enfermedad de debilidad muscular previamente determinada que tiene una concentración plasmática de ALP de, p. ej., aproximadamente 90 U/l o menos para un sujeto de 0 a 14 días de edad; aproximadamente 134 U/l o menos para un sujeto de 15 días de edad a menos de 1 año de edad; aproximadamente 156 U/l o menos para un sujeto de aproximadamente 1 año de edad a menos de 10 años de edad; aproximadamente 141 U/l o menos para un sujeto de aproximadamente 10 años de edad a menos de aproximadamente 13 años de edad; aproximadamente 62 U/l o menos para un sujeto femenino de aproximadamente 13 años de edad a menos de aproximadamente 15 años de edad; aproximadamente 127 U/l o menos para un sujeto masculino de aproximadamente 13 años de edad a menos de aproximadamente 15 años de edad; aproximadamente 54 U/l o menos para un sujeto femenino de aproximadamente 15 años de edad a menos de aproximadamente 17 años de edad; aproximadamente 89 U/l o menos para un sujeto masculino de aproximadamente 15 años de edad a menos de aproximadamente 17 años de edad; aproximadamente 48 U/l o

menos para una mujer de aproximadamente 17 años de edad o más; o aproximadamente 59 U/l o menos para un sujeto masculino de aproximadamente 17 años de edad o más.

La concentración plasmática de PPi y/o la concentración plasmática de ALP de un sujeto (p. ej., un humano) que tiene o es propenso a una enfermedad de debilidad muscular puede compararse con la concentración plasmática de PPi y/o plasmática de ALP de un sujeto normal para determinar un efecto de tratamiento en el sujeto que se administra una fosfatasa alcalina o un polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina (p. ej., una sALP, tal como TNALP, por ejemplo, el polipéptido sALP de la sec. con núm. de ident.: 1 o una variante polipeptídica que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de la sec. con núm. de ident.: 1, p. ej., asfotasa alfa). En particular, la fosfatasa alcalina o el polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina puede administrarse durante un periodo de tratamiento de al menos un año (p. ej., al menos dos años, al menos tres años, al menos cuatro años, al menos cinco años, al menos seis años, al menos siete años, al menos ocho años, al menos nueve años, al menos diez años, o más de diez años, tal como durante la vida útil del sujeto). Alternativamente, los métodos pueden incluir determinar la concentración plasmática de PPi y/o la concentración de plasmática de

ALP antes de administrar la fosfatasa alcalina o el polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina para evaluar un efecto en el sujeto de tratamiento con la fosfatasa alcalina o el polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina.

Los métodos dan como resultado una disminución en PPI y/o un aumento en la concentración de ALP en una muestra (p. ej., una muestra de plasma) de un sujeto (p. ej., un sujeto humano, p. ej., un sujeto humano sin una mutación anuladora en *ALPL*) que tiene o es propenso a una enfermedad de debilidad muscular. Por ejemplo, el tratamiento con una fosfatasa alcalina o un polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina (p. ej., una sALP, tal como TNALP, por ejemplo, el polipéptido sALP de la sec. con núm. de ident.: 1 o una variante polipeptídica que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de la sec. con núm. de ident.: 1, p. ej., asfotasa alfa) da lugar a una disminución en la concentración de PPI en una muestra (p. ej., una muestra de plasma) del sujeto de aproximadamente 1 μM , aproximadamente 1,5 μM , aproximadamente 2 μM , aproximadamente 2,5 μM , o aproximadamente 3 μM o 25 % o mayor (p. ej., 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, o más que 60 %). Por lo tanto, el sujeto exhibe una concentración plasmática de PPI de, p. ej.,

aproximadamente 2 μM a aproximadamente 5 μM ,
aproximadamente 3 μM a aproximadamente 5 μM ,
aproximadamente 2 μM a aproximadamente 4 μM , o
aproximadamente 2 μM a aproximadamente 3 μM después de la
administración de la fosfatasa alcalina o el polipéptido
que tiene actividad de fosfatasa alcalina.

De la misma manera, el tratamiento con
fosfatasa alcalina o un polipéptido que tiene actividad
de fosfatasa alcalina da lugar a un aumento en la
concentración de ALP en una muestra (p. ej., una muestra
de plasma) de un sujeto (p. ej., un humano) que tiene o
es propenso a una enfermedad de debilidad muscular de
30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, o más que 60 %,
en relación con el sujeto antes de la administración de
la fosfatasa alcalina o un polipéptido que tiene
actividad de fosfatasa alcalina. Por ejemplo, la
administración de la fosfatasa alcalina o el polipéptido
que tiene actividad de fosfatasa alcalina aumenta la
concentración de ALP en una muestra (p. ej., una muestra
de plasma) del sujeto a, p. ej., aproximadamente 273 U/l
o mayor para un sujeto de 0 a 14 días de edad;
aproximadamente 518 U/l o mayor para un sujeto de 15 días
de edad a menos de 1 año de edad; aproximadamente 369 U/l
o mayor para una de aproximadamente 1 año a menos de 10
años de edad; aproximadamente 460 U/l o mayor para un

sujeto de aproximadamente 10 años de edad a menos de aproximadamente 13 años de edad; aproximadamente 280 U/l o mayor para un sujeto femenino de aproximadamente 13 años de edad a menos de aproximadamente 15 años de edad; aproximadamente 517 U/l o mayor para un sujeto masculino de aproximadamente 13 años de edad a menos de aproximadamente 15 años de edad; aproximadamente 128 U/l o mayor para un sujeto femenino de aproximadamente 15 años de edad a menos de aproximadamente 17 años de edad; aproximadamente 365 U/l o mayor para un sujeto masculino de aproximadamente 15 años de edad a menos de aproximadamente 17 años de edad; aproximadamente 95 U/l o mayor para un sujeto femenino de aproximadamente 17 años de edad o más; o aproximadamente 164 U/l o mayor para un sujeto masculino de aproximadamente 17 años de edad o más.

La disminución en las concentraciones plasmáticas de PPI y/o el aumento en la concentraciones de ALP del sujeto (p. ej., un humano) que tiene o es propenso a una enfermedad de debilidad muscular puede mantenerse a lo largo de la administración de la fosfatasa alcalina o el polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina (p. ej., una sALP, tal como TNALP, por ejemplo, el polipéptido sALP de la sec. con núm. de ident.: 1 o una variante polipeptídica que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de la sec. con núm. de ident.:

1, p. ej., asfotasa alfa). Por ejemplo, la concentración plasmática de PPI disminuye en aproximadamente 25 % y permanece en ± 10 % de la concentración plasmática disminuida de PPI durante el tratamiento con la sALP y/o la concentración plasmática de ALP aumenta en aproximadamente 50 % y permanece en ± 10 % de la concentración plasmática aumentada de ALP durante el tratamiento con la fosfatasa alcalina o el polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina.

Alternativamente, cuando la administración de una fosfatasa alcalina o un polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina (p. ej., una sALP, tal como TNALP, por ejemplo, el polipéptido sALP de la sec. con núm. de ident.: 1 o una variante polipeptídica que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de la sec. con núm. de ident.: 1, p. ej., asfotasa alfa) no da lugar a una disminución promedio en las concentraciones de PPI en una muestra de plasma del sujeto (p. ej., un humano) que tiene o es propenso a una enfermedad de debilidad muscular en aproximadamente un 25 % o mayor, la dosificación y/o frecuencia de administración de sALP se puede cambiar para determinar una cantidad efectiva de la sALP para el sujeto. De la misma manera, cuando la administración de una fosfatasa alcalina o un polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina no da lugar a un aumento promedio de las concentraciones de ALP en una muestra de plasma del sujeto

en aproximadamente 50 % o mayor, la dosificación y/o frecuencia de administración de la fosfatasa alcalina o un polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina se puede cambiar para determinar una cantidad efectiva de la fosfatasa alcalina o un polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina para el sujeto. Por ejemplo, la dosificación de la fosfatasa alcalina o un polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina puede aumentarse de, p. ej., aproximadamente 2,1 mg/kg/semana o aproximadamente 3,5 mg/kg/semana a aproximadamente 6 mg/kg/semana o aproximadamente 9 mg/kg/semana.

Ensayos para identificar un sujeto con concentración reducida de fosfatasa alcalina (ALP)

Se pueden usar ensayos bioquímicos y de diagnóstico para identificar a un sujeto con concentración reducida de ALP, que puede causarse por una transcripción reducida de *ALPL*, una traducción reducida del ARNm de *ALPL*, una modificación postraduccional elevada o reducida de TNSALP, y/o una actividad enzimática reducida de TNSALP. El sujeto puede tener mutación(es) (p. ej., polimorfismos de un único nucleótido (SNP)) en sus genomas, p. ej., en regiones reguladoras tales como promotores, marcos abiertos de lectura corriente arriba (uORF, por sus siglas en inglés), ORFS corriente abajo, regiones no traducidas 3' o 5' de *ALPL* u otros genes que se relacionan (p. ej.,

interactúan directa o indirectamente con *ALPL* o TNSALP) o no se relacionan con *ALPL* o TNSALP. El sujeto puede tener una mutación en una región codificante para una proteína o enzima que no es TNSALP. Por ejemplo, otra proteína que interactúa con TNSALP o modula directa o indirectamente la función, actividad y/o expresión de TNSALP puede tener una mutación que imparte un efecto corriente abajo sobre la concentración de TNSALP. El genoma de un sujeto con debilidad muscular puede secuenciarse (p. ej., con secuenciación del genoma completo (WGS, por sus siglas en inglés), secuenciación de intrones o secuenciación de exones) para identificar la(s) mutación(es) relevante(s) fuera de las regiones codificantes del gen *ALPL* que contribuyen a o causan los síntomas de debilidad muscular descritos en la presente.

Los ensayos para medir la transcripción de *ALPL*, la traducción del ARNm de *ALPL*, la modificación postraduccionales de TNSALP y/o la actividad enzimática reducida de TNSALP son conocidos por un experto en la técnica. Por ejemplo, los ensayos para medir la transcripción incluyen, por ejemplo, PCR cuantitativa (qPCR), RT-PCR, sec. de ARN. y secuenciación de próxima generación (NGS, por sus siglas en inglés). Estos ensayos pueden generar información con respecto a la desregulación de la transcripción de *ALPL* u otros genes. Los ensayos para medir la traducción incluyen, por

ejemplo, análisis de Western Blot, ELISA, ensayo Bradford y perfilado de polisomas. Estos ensayos se pueden usar para cuantificar los niveles de proteína. Los ensayos para medir las modificaciones postraduccionales (p. ej., fosforilación o glicosilación, p. ej., ligado a N o ligado a O) de TNSALP incluyen, por ejemplo, análisis de Western Blot o ensayos ELISA, p. ej., usando anticuerpos que se unen al TNSALP modificado postraduccionalmente. Los ensayos que miden la actividad de TNSALP son bien conocidos en la técnica y se describen, p. ej., en la Publicación PCT núm. WO2005103263, que se incorpora en la presente como referencia en su totalidad. Los ensayos que miden la actividad TNSALP incluyen ensayos enzimáticos basados en la fluorescencia y la unión de hidroxipatita. También, se pueden usar ensayos de localización TNSALP para revelar si TNSALP está presente en la membrana celular. Además, el análisis bioquímico que mide los niveles de sustrato sérico de ALP (p. ej., PPI, PLP y PEA) se puede usar como salida para medir la actividad de TNSALP.

Prueba Bruininks-Oseretsky de competencia motora 2.^a

Edición (BOT-2)

En Bruininks, R. H. (2005) se describe una prueba ilustrativa de Bruininks-Oseretsky de competencia motora 2.^a Edición (BOT-2). *Prueba Bruininks-Oseretsky de*

competencia motora, (BOT-2), Minneapolis, MN: Pearson Assessment, incorporado en la presente como referencia en su totalidad. En particular, la BOT-2 puede usarse para evaluar deficiencias físicas y restricciones de movilidad en un sujeto que tiene o es propenso a una enfermedad de debilidad muscular (p. ej., enfermedad similar a la HPP) para generar una puntuación de la BOT-2 para el sujeto.

La BOT-2 incluye una serie de pruebas para evaluar las deficiencias físicas de un sujeto, que se pueden realizar con, p. ej., un kit que incluye las pruebas. La BOT-2 proporciona puntuaciones de la BOT-2 compuestas en las siguientes áreas: fuerza, velocidad de carrera y agilidad, precisión motora fina, integración motora fina, destreza manual, coordinación bilateral, equilibrio y coordinación de extremidades altas. Por ejemplo, un sujeto que tiene o es propenso a una enfermedad de debilidad muscular puede realizar abdominales, elevaciones de tronco y piernas, salto de longitud sin impulso, sentadilla estática y/o flexiones de brazos para determinar la puntuación de fuerza de la BOT-2. Un sujeto que tiene o es propenso a una enfermedad de debilidad muscular puede pisar sobre una viga de equilibrio y/o realizar una carrera de ida y vuelta, un salto lateral a dos piernas y/o un salto lateral a una pierna para determinar la puntuación de la velocidad de carrera y agilidad de la BOT-2. Un sujeto que tiene o es

propenso a una enfermedad de debilidad muscular puede cortar un círculo y/o conectar puntos para determinar la puntuación de precisión motora fina de la BOT-2. Un sujeto que tiene o es propenso a una enfermedad de debilidad muscular puede copiar una estrella y/o copiar un cuadrado para determinar la puntuación de integración motora fina de la BOT-2. Un sujeto que tiene o es propenso a una enfermedad de debilidad muscular puede transferir monedas, clasificar tarjetas y/o ensartar bloques para determinar la puntuación de destreza manual. Un sujeto que tiene o es propenso a una enfermedad de debilidad muscular puede golpear con el pie y con el dedo y/o realizar saltos de tijera para determinar la puntuación de coordinación bilateral de la BOT-2. Un sujeto que tiene o es propenso a una enfermedad de debilidad muscular puede caminar hacia adelante en una línea y/o pararse sobre una pierna en una viga de equilibrio para determinar la puntuación de equilibrio de la BOT-2. Un sujeto que tiene o es propenso a una enfermedad de debilidad muscular puede lanzar una pelota a un objetivo y/o atrapar una pelota lanzada para determinar la puntuación de coordinación de la extremidad superior de la BOT-2.

Un sujeto que tiene o es propenso a una enfermedad de debilidad muscular (p. ej., una enfermedad similar a la HPP) podría realizar pruebas en una o más de las áreas descritas (fuerza, velocidad de carrera y

agilidad, precisión motora fina, integración motora fina, destreza manual, coordinación bilateral, equilibrio y coordinación de extremidades superiores) para generar una puntuación de la BOT-2 indicativa de deficiencias físicas en el sujeto. Dentro de cada área de la BOT-2 (fuerza, velocidad de carrera y agilidad, precisión motora fina, integración motora fina, destreza manual, coordinación bilateral, equilibrio y coordinación de extremidades superiores), tal sujeto podría realizar una o más pruebas para determinar la puntuación de la BOT-2 del sujeto, p. ej., el sujeto podría realizar una o más de abdominales, elevaciones de tronco y piernas, salto de longitud sin impulso, sentadilla estática y/o flexiones de brazos para determinar la puntuación de fuerza de la BOT-2. Por lo tanto, solo se puede realizar una prueba (p. ej., una prueba seleccionada del grupo de abdominales, elevaciones de tronco y piernas, salto de longitud sin impulso, sentadilla estática y/o flexiones de brazos) para determinar la puntuación de la BOT-2 (p. ej., una puntuación de fuerza de la BOT-2) de un sujeto que tiene o es propenso a una enfermedad de debilidad muscular (p. ej., una enfermedad similar a la HPP).

Cada una de las puntuaciones de la BOT-2 (fuerza, velocidad de carrera y agilidad, precisión motora fina, integración motora fina, destreza manual, coordinación bilateral, equilibrio y coordinación de las

extremidades altas) del sujeto que tiene o es propenso a una enfermedad de debilidad muscular (p. ej., una enfermedad similar a la HPP) se puede comparar con la puntuación de la BOT-2 de un sujeto sin la enfermedad de debilidad muscular (p. ej., una enfermedad similar a la HPP) para, p. ej., determinar una comparación de valor de referencia de la puntuación de la BOT-2. Cada una de las puntuaciones de la BOT-2 (p. ej., fuerza, velocidad de carrera y agilidad, precisión motora fina, integración motora fina, destreza manual, coordinación bilateral, equilibrio y coordinación de las extremidades superiores) del sujeto que tiene o es propenso a una enfermedad de debilidad muscular (p. ej., una enfermedad similar a la HPP) se puede comparar con la puntuación de la BOT-2 de otros sujetos que tienen o son propensos a la enfermedad de debilidad muscular (p. ej., una enfermedad similar a la HPP) para, p. ej., proporcionar una puntuación relativa de la BOT-2 para el sujeto.

Las puntuaciones de la BOT-2 (p. ej., fuerza, velocidad de carrera y agilidad, precisión motora fina, integración motora fina, destreza manual, coordinación bilateral, equilibrio y puntuaciones de coordinación de extremidades superiores) varían de aproximadamente 0 a igual o menor que aproximadamente 25, en las que una puntuación de aproximadamente 10 a aproximadamente 20 se considera representativa de un sujeto sano (p. ej., un

sujeto sin la enfermedad de debilidad muscular (p. ej., una enfermedad similar a la HPP)). Un sujeto con una puntuación promedio de la BOT-2 (p. ej., fuerza, velocidad de carrera y agilidad, precisión motora fina, integración motora fina, destreza manual, coordinación bilateral, equilibrio y puntuaciones de coordinación de extremidades superiores) de menos de aproximadamente 10 puede tratarse con una fosfatasa alcalina, o un polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina, p. ej., sALP, tal como TNALP, por ejemplo, el polipéptido sALP de la sec. con núm. de ident.: 1 o una variante polipeptídica que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de la sec. con núm. de ident.: 1, p. ej., asfotasa alfa.

Por ejemplo, un sujeto que tiene o es propenso a una enfermedad de debilidad muscular con una puntuación de fuerza de la BOT-2 de menos de 10 (p. ej., aproximadamente 0, aproximadamente 1, aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5, aproximadamente 6, aproximadamente 7, aproximadamente 8, aproximadamente 9 o aproximadamente 10) puede tratarse con una sALP (tal como TNALP, por ejemplo, el polipéptido sALP de la sec. con núm. de ident.: 1 o una variante polipeptídica que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de la sec. con núm. de ident.: 1, p. ej., asfotasa alfa) durante un periodo de tiempo, hasta el tiempo de vida del sujeto.

De la misma manera, un sujeto que tiene o es propenso a una enfermedad de debilidad muscular con una promedio de la velocidad de carrera y agilidad de la BOT-2 de menos de 10 (p. ej., aproximadamente 0, aproximadamente 1, aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5, aproximadamente 6, aproximadamente 7, aproximadamente 8, aproximadamente 9, o aproximadamente 10) puede entonces tratarse con una sALP (tal como TNALP, por ejemplo, el polipéptido sALP de la sec. con núm. de ident.: 1 o una variante polipeptídica que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de la sec. con núm. de ident.: 1, p. ej., asfotasa alfa) durante un periodo de tiempo, hasta el tiempo de vida del sujeto.

Los métodos pueden dar lugar a una mejora en la puntuación de la BOT-2 (p. ej., fuerza, velocidad de carrera y agilidad, precisión motora fina, integración motora fina, destreza manual, coordinación bilateral, equilibrio y/o puntuación de coordinación de extremidades superiores) de un sujeto que tiene o es propenso a una enfermedad de debilidad muscular (p. ej., una enfermedad similar a la HPP). Por ejemplo, el tratamiento con una fosfatasa alcalina, o un polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina, tal como una sALP (p. ej., TNALP, por ejemplo, el polipéptido sALP de la sec. con núm. de ident.: 1 o una variante polipeptídica que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de la sec. con núm.

de ident.: 1, p. ej., asfotasa alfa), tal como el tratamiento con una sALP durante un período de tiempo, puede dar lugar a un aumento promedio en la puntuación de fuerza de la BOT-2 de aproximadamente 10 a aproximadamente 20 (p. ej., aproximadamente 10, aproximadamente 11, aproximadamente 12, aproximadamente 13, aproximadamente 14, aproximadamente 15, aproximadamente 16, aproximadamente 17, aproximadamente 18, aproximadamente 19, o aproximadamente 20). Adicionalmente, el tratamiento con una sALP (tal como TNALP, por ejemplo, el polipéptido sALP de la sec. con núm. de ident.: 1 o una variante polipeptídica que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de la sec. con núm. de ident.: 1, p. ej., asfotasa alfa) puede dar lugar a un aumento promedio en la puntuación de la velocidad de carrera y agilidad de la BOT-2 de aproximadamente 5 a aproximadamente 20 (p. ej., aproximadamente 5, aproximadamente 6, aproximadamente 7, aproximadamente 8, aproximadamente 9, aproximadamente 10, aproximadamente 11, aproximadamente 12, aproximadamente 13, aproximadamente 14, aproximadamente 15, aproximadamente 16, aproximadamente 17, aproximadamente 18, aproximadamente 19, o aproximadamente 20).

El aumento en la puntuación de la BOT-2 (p. ej., fuerza, velocidad de carrera y agilidad, precisión motora fina, integración motora fina, destreza manual, coordinación bilateral, equilibrio y/o puntuación de

coordinación de extremidades superiores) se puede mantener a lo largo de la administración de la fosfatasa alcalina, o el polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina, tal como sALP (p. ej., TNALP, por ejemplo, el polipéptido sALP de la sec. con núm. de ident.: 1 o una variante polipeptídica que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de la sec. con núm. de ident.: 1, p. ej., asfotasa alfa), p. ej., durante un periodo de tiempo. De la misma manera, la disminución de las deficiencias físicas de los músculos después de la administración de la fosfatasa alcalina, o el polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina, puede mantenerse a lo largo de la administración de la fosfatasa alcalina, o el polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina.

Las puntuaciones de la BOT-2 (fuerza, velocidad de carrera y agilidad, precisión motora fina, integración motora fina, destreza manual, coordinación bilateral, equilibrio y puntuaciones de coordinación de extremidades superiores) de un sujeto que tiene o es propenso a una enfermedad de debilidad muscular (tal como, HPP) se pueden usar individualmente o en combinación con otras métricas para evaluar la eficacia del tratamiento usando una fosfatasa alcalina, o un polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina, tal como sALP (p. ej., TNALP, por ejemplo, el polipéptido sALP de la sec. con

núm. de ident.: 1 o una variante polipeptídica que tiene al menos 95 % identidad de secuencia con la secuencia de la sec. con núm. de ident.: 1, p. ej., asfotasa alfa), en la que las mejoras en relación con una cierta puntuación de prueba demuestran que la fosfatasa alcalina, o el polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina, es efectiva para tratar las deficiencias musculares asociadas con la enfermedad de debilidad muscular. Por ejemplo, cuando la administración de una sALP a un sujeto que tiene o es propenso a una enfermedad de debilidad muscular da lugar a un aumento promedio en la puntuación de la velocidad de carrera y agilidad de la BOT-2 a aproximadamente 5 o mayor que aproximadamente 5, en el que el sujeto previamente tuvo una puntuación promedio de la velocidad de carrera y agilidad de la BOT-2 de menos de aproximadamente 5, entonces el sALP se considera efectivo para, p. ej., tratar las deficiencias físicas asociadas con una enfermedad de debilidad muscular.

Adicionalmente, dentro de cada área de la BOT-2 (fuerza, velocidad de carrera y agilidad, precisión motora fina, integración motora fina, destreza manual, coordinación bilateral, equilibrio y coordinación de extremidades superiores), un sujeto que tiene o es propenso a una enfermedad de debilidad muscular (p. ej., una enfermedad similar a la HPP, la CPPD, la hipofosfatemia familiar descrita en la presente, etc.) podría realizar una

o más pruebas para determinar la puntuación de la BOT-2 del sujeto.

Alternativamente, cuando la administración de una fosfatasa alcalina, o un polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina, tal como una sALP, no da lugar a un aumento promedio en la puntuación de la velocidad de carrera y agilidad de la BOT-2 a mayor que aproximadamente 5, la dosificación y/o frecuencia de administración se puede cambiar para determinar la cantidad efectiva de la fosfatasa alcalina, o el polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina, para el sujeto que tiene o es propenso a la enfermedad de debilidad muscular (p. ej., una enfermedad similar a la HPP). Por ejemplo, la dosificación de la sALP (tal como TNALP, por ejemplo, el polipéptido sALP de la sec. con núm. de ident.: 1 o una variante polipeptídica que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de la sec. con núm. de ident.: 1, p. ej., asfotasa alfa) puede aumentarse de, p. ej., aproximadamente 3 mg/kg/semana a aproximadamente 6 mg/kg/semana o aproximadamente 6 mg/kg/semana a aproximadamente 9 mg/kg/semana.

Cuestionario de evaluación de la salud infantil (CHAQ)

El cuestionario de evaluación de la salud infantil (CHAQ) se puede administrar para evaluar el estado de salud de los niños que tienen una enfermedad de

debilidad muscular (p. ej., una enfermedad similar a la HPP) para generar una puntuación del índice CHAQ para el niño, como se describe en Bruce y Fries (*J. Rheumatol.* 30(1): 167-178, 2003) y Klepper (*Arthritis y Rheumatism*, 49: S5-S14, 2003), incorporado en la presente en la presente descripción como referencia en su totalidad. El CHAQ incluye ocho categorías de preguntas para vestirse/acicalarse, levantarse, comer, caminar, higiene, alcance, prensión y actividades, en las que un padre o tutor registra la cantidad de dificultad que tiene el niño con la enfermedad de debilidad muscular (p. ej., una enfermedad similar a la HPP) para realizar las actividades respectivas. El rango de puntuaciones dentro de cada categoría es de 0 a 3, en el que una puntuación de 0 indica sin ninguna dificultad; una puntuación de 1 indica con cierta dificultad; una puntuación de 2 indica con mucha dificultad; y una puntuación de 3 indica que el niño es incapaz de realizar la actividad.

Los niños que tienen o son propensos a una enfermedad de debilidad muscular con una puntuación promedio del índice CHAQ (p. ej., indicativo de discapacidad en las actividades de la vida diaria (ADL) y/o dolor) mayor que aproximadamente 0,8 (p. ej., aproximadamente 0,8, aproximadamente 1, aproximadamente 1,2, aproximadamente 1,4, aproximadamente 1,6, aproximadamente 1,8, aproximadamente 2,0, aproximadamente

2,2, aproximadamente 2,4, aproximadamente 2,6, aproximadamente 2,8 o aproximadamente 3,0) pueden tratarse administrando una fosfatasa alcalina, o un polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina, tal como sALP (p. ej., TNALP, por ejemplo, el polipéptido sALP de la sec. con núm. de ident.: 1 o una variante polipeptídica que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de la sec. con núm. de ident.: 1, p. ej., asfotasa alfa). Por ejemplo, los niños con una puntuación promedio del índice CHAQ mayor que aproximadamente 0,8 pueden tratarse administrando una fosfatasa alcalina, o un polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina, tal como sALP (p. ej., TNALP, por ejemplo, el polipéptido sALP de la sec. con núm. de ident.: 1 o una variante polipeptídica que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de la sec. con núm. de ident.: 1, p. ej., asfotasa alfa) durante un período de tiempo, hasta el tiempo de vida del sujeto. Además, a un niño que tiene o es propenso a una enfermedad de debilidad muscular descrita en la presente se le podrían hacer una o más preguntas en una o más de las ocho categorías (vestirse/acicalarse, levantarse, comer, caminar, higiene, alcance, prensión y actividades) para llegar a una puntuación promedio del índice CHAQ, y si la puntuación promedio del índice CHAQ es mayor que aproximadamente 0,8, el niño puede tratarse mediante la administración de una fosfatasa alcalina, o un polipéptido

que tiene actividad de fosfatasa alcalina, tal como una sALP.

La puntuación del índice CHAQ de un niño que tiene o es propenso a una enfermedad de debilidad muscular descrita en la presente puede compararse con la puntuación del índice CHAQ de niños sin tal enfermedad de debilidad muscular para, p. ej., determinar la desviación estándar de la puntuación del índice CHAQ. Adicionalmente, la puntuación del índice CHAQ de un niño que tiene o es propenso a una enfermedad de debilidad muscular descrita en la presente puede compararse con la puntuación del índice CHAQ de otros niños que tienen o son propensos a la enfermedad de debilidad muscular descrita en la presente para, p. ej., determinar la desviación estándar de la puntuación del índice CHAQ.

Los métodos pueden dar lugar a una mejora en la puntuación del índice CHAQ (p. ej., indicativo de discapacidad en ADL y/o dolor) del niño que tiene o es propenso a una enfermedad de debilidad muscular descrita en la presente. Por ejemplo, el tratamiento con una sALP (tal como TNALP, por ejemplo, el polipéptido sALP de la sec. con núm. de ident.: 1 o una variante polipeptídica que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de la sec. con núm. de ident.: 1, p. ej., asfotasa alfa), tal como el tratamiento con una sALP durante un período de tiempo, hasta el tiempo de vida del niño, puede dar lugar a

una disminución promedio en la puntuación del índice CHAQ de aproximadamente 0 a igual o menor que aproximadamente 0,5 (p. ej., aproximadamente 0, aproximadamente 0,1, aproximadamente 0,2, aproximadamente 0,4 o aproximadamente 0,5) en niños con una enfermedad similar a la HPP.

La disminución en la puntuación del índice CHAQ del niño que tiene o es propenso a una enfermedad de debilidad muscular (p. ej., una enfermedad similar a la HPP) se puede mantener a lo largo de la administración de la fosfatasa alcalina, o el polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina, tal como sALP (p. ej., TNALP, por ejemplo, el polipéptido sALP de la sec. con núm. de ident.: 1 o una variante polipeptídica que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de la sec. con núm. de ident.: 1, p. ej., asfotasa alfa), p. ej., durante un período de tiempo, hasta el tiempo de vida del niño. De la misma manera, el aumento en ADL y/o disminución del dolor del niño puede mantenerse a lo largo de la administración de la sALP (tal como TNALP, por ejemplo el polipéptido sALP de la sec. con núm. de ident.: 1 o una variante polipeptídica que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de la sec. con núm. de ident.: 1, p. ej., asfotasa alfa), durante un periodo de tiempo, hasta el tiempo de vida del niño.

La puntuación del índice CHAQ de un niño que tiene o es propenso a una enfermedad de debilidad

muscular (p. ej., una enfermedad similar a la HPP) se puede usar para evaluar la eficacia del tratamiento usando una fosfatasa alcalina, o un polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina, tal como sALP (p. ej., TNALP, por ejemplo, el polipéptido sALP de la sec. con núm. de ident.: 1 o una variante polipeptídica que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de la sec. con núm. de ident.: 1, p. ej. asfotasa alfa), en la que las mejoras en relación con una cierta puntuación de prueba demuestran que la fosfatasa alcalina, o el un polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina, es efectiva para tratar, p. ej., la discapacidad en las actividades de la vida diaria (ADL) y el dolor asociado con la enfermedad de debilidad muscular. En particular, a un niño que tiene o es propenso a una enfermedad de debilidad muscular se le podría hacer una o más preguntas en una o más de las ocho categorías (vestirse/acicalarse, levantarse, comer, caminar, higiene, alcance, prensión y actividades) para llegar a una puntuación promedio del índice CHAQ y evaluar la eficacia del tratamiento de la administración de sALP. Por ejemplo, cuando la administración de una sALP a un niño que tiene o es propenso a una enfermedad de debilidad muscular resulta en una disminución promedio en la puntuación del índice CHAQ igual o menor que aproximadamente 0,5, en la que el niño previamente tuvo

una puntuación promedio del índice CHAQ mayor que aproximadamente 0,8, entonces la sALP es efectiva para tratar, p. ej., la discapacidad en las actividades de la vida diaria (ADL) y el dolor asociado con una enfermedad de debilidad muscular. Alternativamente, cuando la administración de una sALP no da lugar a una disminución promedio en la puntuación del índice CHAQ igual o menor que aproximadamente 0,5, la dosificación y/o frecuencia de administración de sALP se puede cambiar para determinar la cantidad efectiva de la sALP para el niño que tiene o es propenso a una enfermedad de debilidad muscular. Por ejemplo, la dosificación de la sALP (tal como TNALP, por ejemplo, el polipéptido sALP de la sec. con núm. de ident.: 1 o una variante polipeptídica que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de la sec. con núm. de ident.: 1, p. ej., asfotasa alfa) puede aumentarse de, p. ej., aproximadamente 3 mg/kg/semana a aproximadamente 6 mg/kg/semana o aproximadamente 6 mg/kg/semana a aproximadamente 9 mg/kg/semana.

Instrumento de recolección de datos de resultados
pediátricos (PODCI)

Ciertos sujetos que tienen o son propensos a una enfermedad de debilidad muscular (p. ej., una enfermedad similar a la HPP) pueden identificarse para el

tratamiento con una fosfatasa alcalina, o un polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina, tal como sALP (p. ej., TNALP, el polipéptido sALP de la sec. con núm. de ident.: 1 o una variante polipeptídica que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de la sec. con núm. de ident.: 1, p. ej., asfotasa alfa) usando el instrumento de recolección de datos de resultados pediátricos (PODCI). El PODCI puede administrarse para evaluar el estado de salud de los niños para generar una puntuación PODCI para el sujeto, como se describe en Plint et al. (*J. Pediatr. Orthop.* 23(6): 788-790, 2003). EL PODCI incluye ocho categorías de preguntas que pueden ser completadas por un sujeto que tiene o es propenso a una enfermedad de debilidad muscular (p. ej., una enfermedad similar a la HPP) o por un padre/tutor del sujeto. Las categorías que se pueden usar para determinar el PODCI de un sujeto que tiene o es propenso a una enfermedad de debilidad muscular incluyen las siguientes: 1) la escala de función física y de las extremidades superiores para medir la dificultad que se encuentra al realizar actividades de cuidado personal diarias y actividades estudiantiles; 2) la escala de transferencia y movilidad básica para medir la dificultad experimentada al realizar actividades de movimientos rutinarios y motoras en las actividades diarias; 3) la escala de funcionamiento físico/deportivo para medir la

dificultad o limitaciones encontradas al participar en actividades o deportes más activos; 4) la escala de dolor/confort para medir el nivel de dolor experimentado durante la semana anterior; 5) la escala de expectativas de tratamiento para medir las expectativas a largo plazo del tratamiento; 6) la escala de felicidad para medir la satisfacción general con la apariencia personal y el sentido de similitud con amigos y otras personas de su edad; 7) la escala de satisfacción con los síntomas para medir la aceptación del sujeto de las limitaciones actuales en caso de que este sea un estado de por vida; y 8) la escala de funcionamiento global, que es una escala general combinada calculada a partir de las cuatro primeras escalas mencionadas anteriormente. En cada una de las categorías, se determina una puntuación estandarizada para el sujeto que tiene o es propenso a una enfermedad de debilidad muscular y después se convierte a una escala de 0 a 100, en la que 0 representa discapacidad significativa y 100 representa menos discapacidad.

Un sujeto que tiene o es propenso a una enfermedad de debilidad muscular (p. ej., una enfermedad similar a la HPP) con una puntuación promedio del PODCI (p. ej., indicativa de discapacidad en ADL y/o dolor) menor que aproximadamente 40 (p. ej., aproximadamente 5, aproximadamente 10, aproximadamente 15, aproximadamente

20, aproximadamente 25, aproximadamente 30, aproximadamente 35 o aproximadamente 39) puede tratarse administrando una fosfatasa alcalina, o un polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina, tal como sALP (p. ej., TNALP, por ejemplo, el polipéptido sALP de la sec. con núm. de ident.: 1 o una variante polipeptídica que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de la sec. con núm. de ident.: 1, p. ej. asfotasa alfa). Por ejemplo, un sujeto con una puntuación promedio del PODCI de menos de 40 se puede tratar administrando una sALP durante un periodo de tiempo, hasta el tiempo de vida del sujeto. Además, a un sujeto que tiene o es propenso a una enfermedad de debilidad muscular se le podrían hacer una o más preguntas en una o más de las ocho escalas descritas anteriormente (p. ej., transferencia y movilidad básica, funcionamiento físico/deportivo, y la escala de dolor/confort) para llegar a una puntuación promedio del PODCI, y si la puntuación promedio del PODCI es mayor que 40, el sujeto se puede tratar administrando una sALP.

Los métodos descritos en la presente pueden dar lugar a un aumento en la puntuación PODCI (p. ej., indicativo de discapacidad en ADL y/o dolor) del sujeto que tiene o es propenso a una enfermedad de debilidad muscular. Por ejemplo, el tratamiento con una fosfatasa alcalina, o un polipéptido que tiene actividad de

fosfatasa alcalina, tal como una sALP (p. ej., TNALP, por ejemplo, el polipéptido sALP de la sec. con núm. de ident.: 1 o una variante polipeptídica que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de la sec. con núm. de ident.: 1, p. ej., asfotasa alfa), tal como el tratamiento con una sALP durante un período de tiempo, hasta el tiempo de vida del sujeto, puede dar como resultado un aumento promedio en la puntuación PODCI de aproximadamente 40 a aproximadamente 50 (p. ej., aproximadamente 40, aproximadamente 41, aproximadamente 42, aproximadamente 43, aproximadamente 44, aproximadamente 45, aproximadamente 46, aproximadamente 47, aproximadamente 48, aproximadamente 49, o aproximadamente 50).

El aumento en la puntuación PODCI puede mantenerse a lo largo de la administración de la fosfatasa alcalina, o el polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina, tal como la sALP (p. ej., TNALP, por ejemplo, el polipéptido sALP de la sec. con núm. de ident.: 1 o una variante polipeptídica que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de la sec. con núm. de ident.: 1, p. ej., asfotasa alfa), p. ej., durante un período de tiempo, hasta el tiempo de vida del sujeto que tiene o es propenso a una enfermedad de debilidad muscular. De la misma manera, el aumento en ADL y/o disminución del dolor puede mantenerse a lo largo de

la administración de la sALP (tal como TNALP, por ejemplo el polipéptido sALP de la sec. con núm. de ident.: 1 o una variante polipeptídica que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de la sec. con núm. de ident.: 1, p. ej., asfotasa alfa), durante un periodo de tiempo, hasta el tiempo de vida del sujeto.

La puntuación del PODCI de un sujeto que tiene o es propenso a una enfermedad de debilidad muscular (p. ej., una enfermedad similar a la HPP) puede usarse para evaluar la eficacia del tratamiento usando una fosfatasa alcalina, o un polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina, tal como una sALP (p. ej., TNALP, por ejemplo, el polipéptido sALP de la sec. con núm. de ident.: 1 o una variante polipeptídica que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de la sec. con núm. de ident.: 1, p. ej. asfotasa alfa), en la que las mejoras en relación con una cierta puntuación de prueba demuestran que la fosfatasa alcalina, o el polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina, es efectiva para tratar, p. ej., la discapacidad en las actividades de la vida diaria (ADL) y el dolor asociado con la enfermedad de debilidad muscular. En particular, a un sujeto que tiene o es propenso a una enfermedad de debilidad muscular se le podrían hacer una o más preguntas en una o más de las ocho escalas (la escala de extremidad superior y función física, la escala de

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

Por ejemplo, cuando la administración de una sALP a un sujeto que tiene o es propenso a una enfermedad de debilidad muscular da lugar a un aumento promedio en la puntuación PODCI a aproximadamente 40 o mayor que aproximadamente 40, en el que el sujeto previamente tuvo una puntuación promedio del PODCI de menos de aproximadamente 40, entonces la sALP es efectiva para tratar, p. ej., la discapacidad en las actividades de la vida diaria (ADL) y el dolor asociado con una enfermedad de debilidad muscular. Alternativamente, cuando la administración de una sALP no da lugar a un aumento promedio en la puntuación PODCI a aproximadamente 40 o mayor que aproximadamente 40, la dosificación y la frecuencia de administración de sALP se pueden cambiar para determinar la cantidad efectiva de la sALP para el sujeto que tiene o es propenso a una enfermedad de debilidad muscular. Por ejemplo, la dosificación de la sALP (tal como TNALP, por ejemplo, el polipéptido sALP de la sec. con núm. de ident.: 1 o una variante polipeptídica que tiene al

menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de la sec. con núm. de ident.: 1, p. ej., asfotasa alfa) puede aumentarse de, p. ej., aproximadamente 3 mg/kg/semana a aproximadamente 6 mg/kg/semana o aproximadamente 6 mg/kg/semana a aproximadamente 9 mg/kg/semana.

Escalas Bayley de desarrollo del lactante y del niño pequeño, 3.^a Edición (BSID-III)

Otro punto final, las escalas Bayley de desarrollo del lactante y del niño pequeño, 3.^a Edición (BSID-III) se pueden administrar para evaluar el estado de salud de un sujeto que tiene o es propenso a una enfermedad de debilidad muscular (p. ej., una enfermedad similar a la HPP) desde el nacimiento para generar una puntuación de la BSID-III para el sujeto, como se describe en Bayley. (2006). *Bayley scales of infant and toddler development: administration manual*. San Antonio, TX: Harcourt Assessment. La BSID-III incluye una serie de tareas lúdicas de desarrollo que se pueden administrar al sujeto para determinar la puntuación bruta de la BSID-III. Por ejemplo, las categorías para determinar la puntuación de la BSID-III de un sujeto que tiene o es propenso a una enfermedad de debilidad muscular (p. ej., lactantes de aproximadamente tres años de edad o menos, que tienen HPP) pueden incluir prensión, integración perceptual-motora, planificación motora y velocidad, seguimiento visual,

alcance, prensión de objetos, manipulación de objetos, habilidades funcionales de la mano, respuestas a la información táctil, movimiento de las extremidades y del torso, posicionamiento estático, movimiento dinámico, equilibrio, y planificación motora. Después, las mediciones de la BSID-III se convierten en puntuaciones escaladas de la BSID-III, que pueden usarse para determinar el desempeño del sujeto en comparación con los sujetos sanos y emparejados por edad. La puntuación escalada de la BSID-III de un sujeto que tiene o es propenso a una enfermedad de debilidad muscular (p. ej., un sujeto con una enfermedad similar a la HPP) puede variar de 0 a 14, en el que las puntuaciones de aproximadamente 7 a aproximadamente 13 se consideran el rango normal para un sujeto sano.

Un sujeto que tiene o es propenso a una enfermedad de debilidad muscular podría realizar pruebas en una o más de las categorías descritas (prensión, integración perceptual-motora, planificación motora y velocidad, seguimiento visual, alcance, prensión de objetos, manipulación de objetos, habilidades funcionales de la mano, respuestas a la información táctil, movimiento de las extremidades y del torso, posicionamiento estático, movimiento dinámico, equilibrio y planificación motora) como un lactante (p. ej., aproximadamente a los 3 años de edad o menos de 3 años de edad) para generar una puntuación

de la BSID-III indicativa de desarrollo moto retrasado. Un sujeto que tiene o es propenso a una enfermedad de debilidad muscular con una puntuación promedio de la BSID-III en una o más de las categorías descritas (prensión, integración perceptual-motora, planificación motora y velocidad, seguimiento visual, alcance, prensión de objetos, manipulación de objetos, habilidades funcionales de la mano, respuestas a la información táctil, movimiento de las extremidades y del torso, posicionamiento estático, movimiento dinámico, equilibrio y planificación motora) menor que aproximadamente 2 como un lactante se puede tratar administrando una sALP (tal como TNALP, por ejemplo, el polipéptido sALP de la sec. con núm. de ident.: 1 o un variante polipeptídica que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de la sec. con núm. de ident.: 1, p. ej., asfotasa alfa). En particular, un sujeto que tiene o es propenso a una enfermedad de debilidad muscular con una puntuación promedio de la BSID-III menor que aproximadamente 2 como un lactante se puede tratar administrando una sALP durante un periodo de tiempo, hasta el tiempo de vida del sujeto.

Los métodos pueden dar lugar a una mejora en la puntuación promedio de la BSID-III (p. ej., indicativa de desarrollo motor retrasado) del sujeto que tiene o es propenso a una enfermedad de debilidad muscular. Por ejemplo, el tratamiento con una sALP (tal como TNALP, por

ejemplo, el polipéptido sALP de la sec. con núm. de ident.: 1 o una variante polipeptídica que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de la sec. con núm. de ident.: 1, p. ej., asfotasa alfa), tal como el tratamiento con una sALP durante un período de tiempo, hasta el tiempo de vida del sujeto, puede dar lugar a un aumento promedio en la puntuación de la BSID-III a mayor que aproximadamente 5 (p. ej., aproximadamente 5, aproximadamente 6, aproximadamente 7, aproximadamente 8, aproximadamente 9, aproximadamente 10, aproximadamente 11, aproximadamente 12, o aproximadamente 13).

El aumento en la puntuación de la BSID-III se puede mantener a lo largo de la administración de la fosfatasa alcalina, o el polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina, tal como una sALP (p. ej., TNALP, por ejemplo, el polipéptido sALP de la sec. con núm. de ident.: 1 o una variante polipeptídica que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de la sec. con núm. de ident.: 1, p. ej., asfotasa alfa), durante un período de tiempo, hasta el tiempo de vida del sujeto que tiene o es propenso a una enfermedad de debilidad muscular. De la misma manera, el aumento en el desarrollo motor puede mantenerse a lo largo de la administración de la fosfatasa alcalina, o el polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina, tal como una

sALP (p. ej., TNALP, el polipéptido sALP de la sec. con núm. de ident.: 1 o una variante polipeptídica que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de la sec. con núm. de ident.: 1, p. ej., asfotasa alfa), p. ej., durante un período de tiempo, hasta el tiempo de vida del sujeto.

La puntuación de la BSID-III de un sujeto que tiene o es propenso a una enfermedad de debilidad muscular (p. ej., una enfermedad similar a la HPP) se puede usar para evaluar la eficacia del tratamiento usando una fosfatasa alcalina, o un polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina, tal como una sALP (p. ej., TNALP, por ejemplo, el polipéptido sALP de la sec. con núm. de ident.: 1 o una variante polipeptídica que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de la sec. con núm. de ident.: 1, p. ej., asfotasa alfa), en la que las mejoras en relación con una cierta puntuación de prueba demuestran que la fosfatasa alcalina, o el polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina, es efectiva para tratar, p. ej., el desarrollo motor atrasado asociado con la enfermedad de debilidad muscular. En particular, un sujeto que tiene o es propenso a una enfermedad de debilidad muscular podría realizar pruebas en una o más de las categorías descritas (prensión, integración perceptual-motora, planificación motora y velocidad, seguimiento visual, alcance, prensión

de objetos, manipulación de objetos, habilidades funcionales de la mano, respuestas a la información táctil, movimiento de las extremidades y del torso, posicionamiento estático, movimiento dinámico, equilibrio y planificación motora) como un lactante (p. ej., aproximadamente a los tres años de edad o menos, que tiene HPP) para llegar a una puntuación promedio de la BSID-III y para evaluar la eficacia del tratamiento de la administración de sALP.

Por ejemplo, cuando la administración de una sALP a un niño que tiene o es propenso a una enfermedad de debilidad muscular da lugar a un aumento promedio en la puntuación escalada de la BSID-III a mayor que aproximadamente 5, en la que el niño previamente tuvo una puntuación promedio escalada de la BSID-III de menos de aproximadamente 2 con un lactante (p. ej., a aproximadamente a los 3 años de edad o menos de 3 años de edad), entonces la sALP es efectiva para tratar, p. ej., el desarrollo motor retrasado asociado a una enfermedad similar a la HPP. Alternativamente, cuando la administración de una sALP no da lugar a un aumento promedio en la puntuación escalada de la BSID-III a mayor que aproximadamente 5, la dosificación y/o frecuencia de administración de sALP se puede cambiar para determinar la cantidad efectiva de la sALP para el niño que tiene o es propenso a una enfermedad de debilidad muscular. Por

ejemplo, la dosificación de la sALP (tal como TNALP, por ejemplo, el polipéptido sALP de la sec. con núm. de ident.: 1 o una variante polipeptídica que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de la sec. con núm. de ident.: 1, p. ej., asfotasa alfa) puede aumentarse de, p. ej., aproximadamente 3 mg/kg/semana a aproximadamente 6 mg/kg/semana o aproximadamente 6 mg/kg/semana a aproximadamente 9 mg/kg/semana.

Escalas Peabody de desarrollo motor, 2.^a Edición (PDMS-2)

Otros puntos finales, las escalas Peabody de desarrollo motor, 2.^a Edición (PDMS-2), pueden administrarse para evaluar el estado de salud de un sujeto que tiene o es propenso a una enfermedad de debilidad muscular (p. ej., una enfermedad similar a la HPP) desde el nacimiento para generar una puntuación de la PDMS-2 para el sujeto, como se describe en van Hartingsveldt et al. (*Occup. Ther. Int.* 12(1): 1-13, 2005). La PDMS-2 incluye seis categorías de subpruebas para medir habilidades motoras del sujeto, tal como un sujeto que tiene HPP.

En particular, las mediciones de la PDMS-2 se pueden determinar a partir de las siguientes subpruebas: 1) la subprueba locomotora para medir la capacidad de un sujeto para moverse de un lugar a otro (las mediciones incluyen gatear, caminar, correr, saltar y saltar hacia

adelante); 2) la subprueba de reflejos para medir la capacidad de un sujeto para reaccionar automáticamente a los eventos medio ambientales; 3) la subprueba de equilibrio estático para medir la capacidad de un sujeto para mantener el control corporal dentro del centro de gravedad y retener el equilibrio; 4) la subprueba de manipulación de objetos para medir la capacidad de un sujeto para manipular un objeto, tal como atrapar, lanzar y patear una pelota; 5) la subprueba de prensión para medir la capacidad de un sujeto para usar sus manos, tal como la capacidad de sostener un objeto con una mano y acciones que implican el uso controlado de los dedos de ambas manos; y 6) la subprueba de integración visual-motora para medir la capacidad de un sujeto para usar sus habilidades perceptivas visuales para realizar tareas complejas de coordinación ojo-mano, tales como alcanzar y agarrar un objeto, construir con bloques y copiar diseños. La medición de la PDMS-2 puede determinarse para una o más de estas categorías para un sujeto que tiene o es propenso a una enfermedad de debilidad muscular (p. ej., una enfermedad similar a la HPP) y después convertirse en una puntuación de la PDMS-2, tal como la puntuación estándar locomotora de la PDMS-2 que varía de 0 a 13, en la que el rango de sujetos sanos (p. ej., sujetos sin la enfermedad de debilidad muscular) es de aproximadamente 7 a aproximadamente 13.

Un sujeto que tiene o es propenso a una enfermedad de debilidad muscular con una puntuación promedio del PDMS (p. ej., indicativa de desarrollo motor retrasado) se puede tratar administrando una sALP (tal como TNALP, por ejemplo, el polipéptido sALP de la sec. con núm. de ident.: 1 o una variante polipeptídica que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de la sec. con núm. de ident.: 1, p. ej., asfotasa alfa).

Los métodos descritos en la presente pueden dar lugar a una mejora en la puntuación de la PDMS-2 (p. ej., indicativa de desarrollo motor retrasado) del sujeto que tiene o es propenso a una enfermedad de debilidad muscular. Por ejemplo, el tratamiento con una fosfatasa alcalina, o un polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina, tal como una sALP (p. ej., TNALP, por ejemplo, el polipéptido sALP de la sec. con núm. de ident.: 1 o una variante polipeptídica que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de la sec. con núm. de ident.: 1, p. ej., asfotasa alfa), puede dar lugar a un aumento promedio en la puntuación de la PDMS-2 de aproximadamente 7 a aproximadamente 13 (p. ej., aproximadamente, 7, aproximadamente 8, aproximadamente 9, aproximadamente 10, aproximadamente 11, aproximadamente 12, o aproximadamente 13).

El aumento en la puntuación de la PDMS-2 puede mantenerse a lo largo de la administración de la

fosfatasa alcalina, o el polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina, tal como sALP (p. ej., TNALP, por ejemplo, el polipéptido sALP de la sec. con núm. de ident.: 1 o una variante polipeptídica que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de la sec. con núm. de ident.: 1, p. ej., asfotasa alfa), durante un tiempo alargado, p. ej., durante un período de tiempo, hasta el tiempo de vida del sujeto que tiene o es propenso a una enfermedad de debilidad muscular. De la misma manera, el aumento en el desarrollo motor puede mantenerse a lo largo de la administración de la sALP (tal como TNALP, por ejemplo el polipéptido sALP de la sec. con núm. de ident.: 1 o una variante polipeptídica que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de la sec. con núm. de ident.: 1, p. ej., asfotasa alfa) durante un periodo de tiempo, hasta el tiempo de vida del sujeto que tiene o es propenso a una enfermedad de debilidad muscular.

La puntuación de la PDMS-2 de un sujeto que tiene o es propenso a una enfermedad de debilidad muscular (p. ej., una enfermedad similar a la HPP) se puede usar para evaluar la eficacia del tratamiento usando una fosfatasa alcalina, o un polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina, tal como una sALP (p. ej., TNALP, por ejemplo, el polipéptido sALP de la sec. con núm. de ident.: 1 o una variante polipeptídica que tiene al menos 95 % de identidad

de secuencia con la secuencia de la sec. con núm. de ident.: 1, p. ej., asfotasa alfa), en la que las mejoras en relación con una cierta puntuación de prueba demuestran que la fosfatasa alcalina, o el polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina, es efectiva para tratar, p. ej., el desarrollo motor retrasado asociado con la enfermedad de debilidad muscular. Por ejemplo, un niño que tiene o es propenso a una enfermedad de debilidad muscular podría realizar pruebas en una o más de las categorías descritas (locomotora, reflejos, equilibrio estático, manipulación de objetos, prensión y visual-motora) a aproximadamente a los 5 años de edad o menos de 5 años de edad para llegar a una puntuación promedio de la PDMS-2 y evaluar la eficacia del tratamiento de la administración de sALP.

Por ejemplo, cuando la administración de una sALP a un niño que tiene o es propenso a una enfermedad de debilidad muscular da lugar a un aumento promedio en la puntuación estándar de la PDMS-2 a aproximadamente 7, en la que el niño previamente tuvo una puntuación estándar promedio de la PDMS-2 de aproximadamente 5, entonces la sALP es efectiva para tratar, p. ej., el desarrollo motor retrasado asociado con una enfermedad similar a la HPP. Alternativamente, cuando la administración de una sALP no da lugar a un aumento promedio en la puntuación estándar de la PDMS-2 a aproximadamente 7, la dosificación y/o frecuencia de

administración de sALP se puede cambiar para determinar la cantidad efectiva de la sALP para el niño. Por ejemplo, la dosificación de la sALP (tal como TNALP, por ejemplo, el polipéptido sALP de la sec. con núm. de ident.: 1 o una variante polipeptídica que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de la sec. con núm. de ident.: 1, p. ej., asfotasa alfa) puede aumentarse de, p. ej., aproximadamente 3 mg/kg/semana a aproximadamente 6 mg/kg/semana o aproximadamente 6 mg/kg/semana a aproximadamente 9 mg/kg/semana.

Prueba de caminata de seis minutos (6MWT)

Un sujeto que tiene una enfermedad de debilidad muscular puede identificarse para el tratamiento con una fosfatasa alcalina o un polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina (p. ej., una sALP, tal como TNALP, por ejemplo, el polipéptido sALP de la sec. con núm. de ident.: 1 o una variante polipeptídica que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de la sec. con núm. de ident.: 1, p. ej., asfotasa alfa) usando la 6MWT. En particular, la 6MWT se puede usar para evaluar la capacidad de caminar en un adulto que tiene una enfermedad de debilidad muscular para generar un valor de 6MWT para el adulto. La 6MWT se puede realizar en interiores o exteriores usando un corredor plano, recto y cerrado (p. ej., de aproximadamente 30 metros de

longitud) con una superficie dura. Se puede usar un cronómetro u otro temporizador para registrar el tiempo y se puede usar un contador mecánico u otro dispositivo para determinar la distancia (p. ej., en metros) que camina el sujeto que tiene una enfermedad de debilidad muscular. Por ejemplo, la longitud del corredor se puede marcar cada tres metros para determinar el número de metros caminados por el sujeto que tiene una enfermedad de debilidad muscular, con el punto de retorno a 30 metros y la línea de inicio también marcada. La distancia recorrida por el sujeto que tiene una enfermedad de debilidad muscular en seis minutos puede entonces compararse con el número previsto de metros caminados, p. ej., por un sujeto normal de aproximadamente la misma edad, el mismo sexo, y/o la misma altura, y expresarse como un valor porcentual para generar el valor de 6MWT del sujeto. El valor de 6MWT del sujeto que tiene una enfermedad de debilidad muscular puede compararse con el valor de 6MWT al valor de referencia del sujeto. Adicionalmente, el valor de 6MWT del sujeto que tiene una enfermedad de debilidad muscular puede compararse con el valor de 6MWT de un sujeto normal.

Un sujeto que tiene una enfermedad de debilidad muscular con un promedio de 6MWT de menos de aproximadamente 80 % del valor previsto de 6MWT (p. ej., en relación con un sujeto normal de aproximadamente la

misma edad, el mismo sexo y/o la misma altura) se puede tratar con una fosfatasa alcalina o un polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina (p. ej., una sALP, tal como TNALP, por ejemplo, el polipéptido sALP de la sec. con núm. de ident.: 1 o una variante polipeptídica que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de la sec. con núm. de ident.: 1, p. ej., asfotasa alfa), tal como administrando una fosfatasa alcalina o un polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina durante un período de tratamiento de al menos dos semanas (p. ej., al menos tres semanas, al menos cuatro semanas, al menos cinco semanas, al menos seis semanas, al menos siete semanas, al menos ocho semanas, al menos nueve semanas, al menos diez semanas, al menos tres meses, al menos cuatro meses, al menos cinco meses, al menos seis meses, al menos siete meses, al menos ocho meses, al menos nueve meses, al menos un año, al menos dos años, al menos tres años, al menos cuatro años, al menos cinco años, al menos seis años, al menos siete años, al menos ocho años, al menos nueve años, o al menos diez años, o el tiempo de vida del sujeto; particularmente por lo menos seis semanas). Por ejemplo, un sujeto que tiene una enfermedad de debilidad muscular con un promedio de 6MWT de menos de aproximadamente 80 % del valor previsto de 6MWT (p. ej., aproximadamente 50 %, aproximadamente 55 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 65 %,

aproximadamente 70 %, o aproximadamente 75 % del valor previsto de 6MWT) se puede tratar con una fosfatasa alcalina o un polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina durante un período de tratamiento de al menos dos semanas (p. ej., al menos tres semanas, al menos cuatro semanas, al menos cinco semanas, al menos seis semanas, al menos siete semanas, al menos ocho semanas, al menos nueve semanas, al menos diez semanas, al menos tres meses, al menos cuatro meses, al menos cinco meses, al menos seis meses, al menos siete meses, al menos ocho meses, al menos nueve meses, al menos un año, al menos dos años, al menos tres años, al menos cuatro años, al menos cinco años, al menos seis años, al menos siete años, al menos ocho años, al menos nueve años, o al menos diez años, o el tiempo de vida del sujeto; particularmente por lo menos seis semanas).

Los métodos pueden dar lugar a una mejora en el valor de 6MWT de un sujeto que tiene una enfermedad de debilidad muscular. Por ejemplo, el tratamiento con una fosfatasa alcalina o un polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina (p. ej., una sALP, tal como TNALP, por ejemplo, el polipéptido sALP de la sec. con núm. de ident.: 1 o una variante polipeptídica que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de la sec. con núm. de ident.: 1, p. ej., asfotasa alfa), tal como tratamiento con una fosfatasa alcalina o un

polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina durante un período de tratamiento de al menos dos semanas (p. ej., al menos tres semanas, al menos cuatro semanas, al menos cinco semanas, al menos seis semanas, al menos siete semanas, al menos ocho semanas, al menos nueve semanas, al menos diez semanas, al menos tres meses, al menos cuatro meses, al menos cinco meses, al menos seis meses, al menos siete meses, al menos ocho meses, al menos nueve meses, al menos un año, al menos dos años, al menos tres años, al menos cuatro años, al menos cinco años, al menos seis años, al menos siete años, al menos ocho años, al menos nueve años, o al menos diez años, o el tiempo de vida del sujeto; particularmente al menos seis semanas), puede dar lugar a un aumento promedio en el valor de 6MWT a aproximadamente 80 % o mayor que el valor previsto de 6MWT del sujeto (p. ej., aproximadamente 82 %, aproximadamente 84 %, aproximadamente 86 %, aproximadamente 88 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 92 %, aproximadamente 94 %, aproximadamente 96 %, aproximadamente 98 %, o más del valor previsto de 6MWT).

El aumento en el valor de 6MWT del sujeto que tiene una enfermedad de debilidad muscular puede mantenerse a lo largo de la administración de la fosfatasa alcalina o un polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina (p. ej., una sALP, tal como TNALP,

por ejemplo, el polipéptido SALP de la sec. con núm. de ident.: 1 o una variante polipeptídica que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de la sec. con núm. de ident.: 1, p. ej., asfotasa alfa), p. ej., durante un período de tratamiento de al menos dos semanas (p. ej., al menos tres semanas, al menos cuatro semanas, al menos cinco semanas, al menos seis semanas, al menos siete semanas, al menos ocho semanas, al menos nueve semanas, al menos diez semanas, al menos tres meses, al menos cuatro meses, al menos cinco meses, al menos seis meses, al menos siete meses, al menos ocho meses, al menos nueve meses, al menos un año, al menos dos años, al menos tres años, al menos cuatro años, al menos cinco años, al menos seis años, al menos siete años, al menos ocho años, al menos nueve años, o al menos diez años, o el tiempo de vida del sujeto; particularmente por lo menos seis semanas). Por ejemplo, el valor de 6MWT aumenta a mayor que aproximadamente 80 % del valor previsto de 6MWT del sujeto que tiene una enfermedad de debilidad muscular y permanece en ± 10 % del valor aumentado de 6MWT durante el tratamiento con la fosfatasa alcalina o un polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina.

De la misma manera, la mejora en la capacidad de caminar del sujeto que tiene una enfermedad de debilidad muscular puede mantenerse a lo largo de la administración

de la fosfatasa alcalina o un polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina, p. ej., durante un periodo de tratamiento de al menos dos semanas (p. ej., al menos tres semanas, al menos cuatro semanas, al menos cinco semanas, al menos seis semanas, al menos siete semanas, al menos ocho semanas, al menos nueve semanas, al menos diez semanas, al menos tres meses, al menos cuatro meses, al menos cinco meses, al menos seis meses, al menos siete meses, al menos ocho meses, al menos nueve meses, al menos un año, al menos dos años, al menos tres años, al menos cuatro años, al menos cinco años, al menos seis años, al menos siete años, al menos ocho años, al menos nueve años, o al menos diez años, o el tiempo de vida del sujeto; particularmente por lo menos seis semanas). Por ejemplo, el sujeto que tiene una enfermedad de debilidad muscular exhibe una menor dependencia de un dispositivo de asistencia de movilidad, tal como un andador, una silla de ruedas, aparatos ortéticos, muletas u órtesis, durante el tratamiento con la sALP.

Alternativamente, cuando la administración de una fosfatasa alcalina o un polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina (p. ej., una sALP, tal como TNALP, por ejemplo, el polipéptido sALP de la sec. con núm. de ident.: 1 o una variante polipeptídica que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de la sec. con núm. de ident.: 1, p. ej.,

asfotasa alfa) no da lugar a un aumento promedio en el valor de 6MWT a mayor que 80 % del valor previsto de 6MWT (p. ej., de un sujeto normal de aproximadamente la misma edad, mismo sexo y/o altura), la dosificación y/o frecuencia de administración de la fosfatasa alcalina o un polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina se puede cambiar para determinar la cantidad efectiva de la fosfatasa alcalina o un polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina para el sujeto que tiene una enfermedad de debilidad muscular. Por ejemplo, la dosificación de la fosfatasa alcalina o un polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina puede aumentarse de, p. ej., aproximadamente 2,1 mg/kg/semana o aproximadamente 3,5 mg/kg/semana a aproximadamente 6 mg/kg/semana o aproximadamente 9 mg/kg/semana.

Dinamometría de mano (HHD)

La prensión y la fuerza muscular de un sujeto que tiene o es propenso a una enfermedad de debilidad muscular se puede evaluar usando dinamometría de mano (HHD). Por ejemplo, la flexión y extensión de la rodilla y también la flexión, extensión y abducción de cadera de un sujeto que tiene o es propenso a una enfermedad de debilidad muscular se pueden medir usando, p. ej., un dinamómetro MICROFET2TM, mientras que la fuerza de prensión del sujeto se puede medir usando, p. ej., un

dinamómetro de prensión Jamar. En particular, el administrador mantiene fijo el dinamómetro, y el sujeto ejerce una fuerza máxima contra el dinamómetro. Los datos de fuerza máxima se recopilan en libras, después se convierten a newtons (N). Los valores de torque se calculan entonces usando la longitud de la extremidad en N-metros. El valor de torque puede compararse entonces con el valor de torque de, p. ej., un sujeto normal de aproximadamente la misma edad, el mismo sexo y/o la misma altura, y expresarse como un valor porcentual para generar el valor de HHD del sujeto.

Un sujeto que tiene una enfermedad de debilidad muscular con un valor promedio de HHD de menos de aproximadamente 80 % del valor previsto de HHD (p. ej., en relación con un sujeto normal de aproximadamente la misma edad, el mismo sexo y/o la misma altura) se puede tratar con una fosfatasa alcalina o un polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina (p. ej., una sALP, tal como TNALP, por ejemplo, el polipéptido sALP de la sec. con núm. de ident.: 1 o una variante polipeptídica que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de la sec. con núm. de ident.: 1, p. ej., asfotasa alfa), tal como administrando una fosfatasa alcalina o un polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina durante un período de tratamiento de al menos dos semanas (p. ej., al menos tres semanas, al menos

cuatro semanas, al menos cinco semanas, al menos seis semanas, al menos siete semanas, al menos ocho semanas, al menos nueve semanas, al menos diez semanas, al menos tres meses, al menos cuatro meses, al menos cinco meses, al menos seis meses, al menos siete meses, al menos ocho meses, al menos nueve meses, al menos un año, al menos dos años, al menos tres años, al menos cuatro años, al menos cinco años, al menos seis años, al menos siete años, al menos ocho años, al menos nueve años, o al menos diez años, o el tiempo de vida del sujeto; particularmente por lo menos seis semanas). Por ejemplo, un sujeto que tiene una enfermedad de debilidad muscular con un promedio de HHD de menos de aproximadamente 80 % del valor previsto de HHD (p. ej., aproximadamente 30 %, aproximadamente 35 %, aproximadamente 40 %, aproximadamente 45 %, aproximadamente 50 %, aproximadamente 55 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 65 %, aproximadamente 70 %, o aproximadamente 75 % del valor previsto de HHD) se puede tratar con una fosfatasa alcalina o un polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina durante un período de tratamiento de al menos dos semanas (p. ej., al menos tres semanas, al menos cuatro semanas, al menos cinco semanas, al menos seis semanas, al menos siete semanas, al menos ocho semanas, al menos nueve semanas, al menos diez semanas, al menos tres meses, al menos cuatro meses, al menos cinco meses, al menos seis

meses, al menos siete meses, al menos ocho meses, al menos nueve meses, al menos un año, al menos dos años, al menos tres años, al menos cuatro años, al menos cinco años, al menos seis años, al menos siete años, al menos ocho años, al menos nueve años, o al menos diez años, o el tiempo de vida del sujeto; particularmente por lo menos seis semanas).

Los métodos pueden dar lugar a una mejora en el valor de HHD de un sujeto que tiene una enfermedad de debilidad muscular. Por ejemplo, el tratamiento con una fosfatasa alcalina o un polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina (p. ej., una sALP, tal como TNALP, por ejemplo, el polipéptido sALP de la sec. con núm. de ident.: 1 o una variante polipeptídica que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de la sec. con núm. de ident.: 1, p. ej., asfotasa alfa), tal como tratamiento con una fosfatasa alcalina o un polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina durante un período de tratamiento de al menos dos semanas (p. ej., al menos tres semanas, al menos cuatro semanas, al menos cinco semanas, al menos seis semanas, al menos siete semanas, al menos ocho semanas, al menos nueve semanas, al menos diez semanas, al menos tres meses, al menos cuatro meses, al menos cinco meses, al menos seis meses, al menos siete meses, al menos ocho meses, al menos nueve meses, al menos un año, al menos dos años, al menos tres años, al menos

cuatro años, al menos cinco años, al menos seis años, al menos siete años, al menos ocho años, al menos nueve años, o al menos diez años, o el tiempo de vida del sujeto; particularmente al menos seis semanas), puede dar lugar a un aumento promedio en el valor de HHD a aproximadamente 80 % o mayor que el valor previsto de HHD del sujeto (p. ej., aproximadamente 83 %, aproximadamente 85 %, aproximadamente 87 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 93 %, aproximadamente 95 %, aproximadamente 97 %, o aproximadamente 100 %, o aproximadamente 100 % del valor previsto de HHD).

El aumento en el valor de HHD del sujeto que tiene una enfermedad de debilidad muscular se puede mantener a lo largo de la administración de la fosfatasa alcalina o un polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina (p. ej., una sALP, tal como TNALP, por ejemplo, el polipéptido sALP de la sec. con núm. de ident.: 1 o una variante polipeptídica que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de la sec. con núm. de ident.: 1, p. ej., asfotasa alfa), p. ej., durante un período de tratamiento de a al menos dos semanas (p. ej., al menos tres semanas, al menos cuatro semanas, al menos cinco semanas, al menos seis semanas, al menos siete semanas, al menos ocho semanas, al menos nueve semanas, al menos diez semanas, al menos tres meses, al menos cuatro meses, al menos cinco meses, al menos seis meses, al menos

siete meses, al menos ocho meses, al menos nueve meses, al menos un año, al menos dos años, al menos tres años, al menos cuatro años, al menos cinco años, al menos seis años, al menos siete años, al menos ocho años, al menos nueve años, o al menos diez años, o el tiempo de vida del sujeto; particularmente por lo menos seis semanas). Por ejemplo, el valor de HHD aumenta a mayor que aproximadamente 80 % del valor previsto de HHD del sujeto que tiene una enfermedad de debilidad muscular y permanece en ± 10 % del valor aumentado de HHD durante el tratamiento con la fosfatasa alcalina o un polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina.

Alternativamente, cuando la administración de una fosfatasa alcalina o un polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina (p. ej., una sALP, tal como TNALP, por ejemplo, el polipéptido sALP de la sec. con núm. de ident.: 1 o una variante polipeptídica que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de la sec. con núm. de ident.: 1, p. ej., asfotasa alfa) no da lugar a un aumento promedio en el valor de HHD a mayor que 80 % del valor previsto de HHD (p. ej., de un sujeto que tiene una enfermedad de debilidad muscular de aproximadamente la misma edad, mismo sexo y/o altura), la dosificación y/o frecuencia de administración de la fosfatasa alcalina o un polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina se puede cambiar para determinar la cantidad efectiva de la

fosfatasa alcalina o un polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina para el sujeto que tiene una enfermedad de debilidad muscular. Por ejemplo, la dosificación de la fosfatasa alcalina o un polipéptido que tiene actividad de fosfatasa alcalina puede aumentarse de, p. ej., aproximadamente 2,1 mg/kg/semana o aproximadamente 3,5 mg/kg/semana a aproximadamente 6 mg/kg/semana o aproximadamente 9 mg/kg/semana.

Fosfatasa alcalina

La asfotasa alfa es una TNALP humana (hTNALP; sec. con núm. de ident.: 1) proteína de fusión formulada para el tratamiento de HPP. En particular, la asfotasa alfa (sec. con núm. de ident.: 1) se puede usar efectivamente para tratar la hipofosfatasia (HPP), sus síntomas y las deficiencias físicas asociadas con esta en un sujeto que tiene o es propenso a una enfermedad de debilidad muscular durante un período prolongado de tiempo (p. ej., al menos un día, al menos una semana, al menos dos semanas, al menos tres semanas, al menos un mes, al menos tres meses, al menos seis meses, al menos un año, al menos dos años, al menos tres años, al menos cuatro años, al menos cinco años, al menos seis años, al menos siete años, al menos ocho años, al menos nueve años, al menos diez años, o más de diez años (p. ej., durante el tiempo de vida del sujeto)).

Dados los resultados descritos en la presente, la presente no se limita a una secuencia particular de fosfatasa alcalina (ALP) o de ácido nucleico que codifica una ALP. Las fosfatasas alcalinas abarcan un grupo de enzimas que catalizan la escisión de una entidad fosfato (p. ej., la hidrólisis de pirofosfato, PP_i). Existen cuatro isoenzimas conocidas de la fosfatasa alcalina (ALP) en mamíferos: la fosfatasa alcalina inespecífica de tejido (TNALP; descrita más adelante), la fosfatasa alcalina placentaria (PLALP, por sus siglas en inglés) (p. ej., números de acceso P05187, NP_112603 y NP_001623), la fosfatasa alcalina de células germinales (GALP, por sus siglas en inglés) (p. ej., el número de acceso P10696), y la fosfatasa alcalina intestinal (IALP, por su siglas en inglés) (p. ej., números de acceso P09923 y NP_001622). Además de los ALP ilustrativos discutidos anteriormente, esta descripción también proporciona cualquier polipéptido que tenga la estructura de sitio catalítico idéntica o similar y/o actividad enzimática de ALP para tratar a un sujeto que tiene o es propenso a una enfermedad de debilidad muscular. Los conjugados de suministro óseo que incluyen sALP se describen además en las publicaciones PCT núms.: WO 2005/103263 y WO 2008/138131.

Las TNALP que se pueden usar de acuerdo con los métodos descritos en la presente incluyen, p. ej., TNALP humana (números de acceso NP_000469, AAI10910, AAH90861,

AAH66116, AAH21289, y AAI26166); TNALP de Rhesus (número de acceso XP_01109717); TNALP de rata (número de acceso NP_037191); TNALP de perro (número de acceso AAF64516); TNALP de cerdo (número de acceso AAN64273), de ratón (número de acceso NP_031457), TNALP de vaca (números de acceso NP_789828, NP_776412, AAM 8209 y AAC33858), y TNALP de gato (número de acceso NP_001036028). En particular, TNALP puede ser una TNALP humana recombinante (p. ej., *sec. con núm. de ident.: 1*, asfotasa alfa; ver las patentes de los Estados Unidos núms. 7.763.712 y 7.960.529, incorporadas en la presente como referencia en su totalidad) usadas para el tratamiento de un sujeto que tiene o es propenso a una enfermedad de debilidad muscular. La TNALP también puede ser una que exhiba al menos aproximadamente 95 % de identidad de secuencia con el polipéptido o secuencia de ácido nucleico de las TNALP anteriormente mencionadas.

Fosfatasa alcalina soluble

Las ALP de la presente invención incluyen formas solubles (p. ej., extracelulares o no unidas a la membrana) de cualquiera de las fosfatasas alcalinas descritas en la presente. La sALP puede ser, por ejemplo, una forma soluble de fosfatasa alcalina inespecífica de tejido humana (TNALP humana (hTNALP)). La presente descripción no se limita a una sALP particular y puede incluir cualquier polipéptido

sALP que es fisiológicamente activo hacia, p. ej., fosfoetanolamina (PEA), pirofosfato inorgánico (PPi) y piridoxal 5'-fosfato (PLP). En particular, una sALP de la presente invención es catalíticamente competente para mejorar la mineralización esquelética en el hueso. La presente incluye además ácidos nucleicos que codifican las sALP descritas en la presente que se pueden usar para tratar condiciones de debilidad muscular descritas en la presente, que incluyen, p. ej., enfermedad similar a la HPP, la CPPD, la hipofosfatemia familiar (tal como raquitismo hipofosfatémico autosómico dominante (ADHR), raquitismo hipofosfatémico autosómico recesivo, raquitismo hipofosfatémico ligado al X, hipofosfatemia ligada al X (XLH), etc.), etc.

La TNALP es una proteína unida a una membrana anclada por una entidad de glicolípido en el C-terminal (Swiss-Prot, P05186). Este anclaje de glicolípido (GPI, por sus siglas en inglés) se añade postraduccionalmente después de la eliminación de un extremo C-terminal hidrófoba, que sirve tanto como un anclaje de membrana temporal como una señal para la adición del GPI. Mientras que el anclaje GPI se ubica en la membrana celular, las porciones restantes de TNALP son extracelulares. En particular, TNALP (p. ej., TNALP humana (hTNALP)) puede diseñarse por ingeniería para reemplazar el primer aminoácido de la secuencia C-terminal hidrófoba (una

alanina) con un codón de terminación, que produce de esta manera una hTNALP diseñada por ingeniería que contiene todos los residuos de aminoácidos de la forma anclada nativa de la TNALP y carece del anclaje de membrana GPI. Un experto en la técnica apreciará que la posición del anclaje de membrana GPI variará en diferentes ALP y puede incluir, p. ej., los últimos 10, 12, 14, 16, 18, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 45, 50, o más residuos de aminoácidos en el extremo C-terminal del polipéptido. La sTNALP recombinante puede incluir, p. ej., los aminoácidos 1 a 502 (18 a 502 cuando se secretan), los aminoácidos 1 a 501 (18 a 501 cuando se secretan), los aminoácidos 1 a 504 (18 a 504 cuando se secretan), los aminoácidos 1 a 505 (18-505 cuando se secretan), o los aminoácidos 1 a 502. Por lo tanto, el extremo C-terminal de la ALP nativa se puede truncar por ciertos aminoácidos sin afectar la actividad de ALP.

Además del anclaje GPI del extremo C-terminal, TNALP también tiene una secuencia de péptido señal N-terminal. El péptido señal N-terminal está presente en la proteína sintetizada cuando se sintetiza, pero se escinde de TNALP después de la translocación al ER. Las SALP incluyen formas tanto secretadas (es decir, carentes de la señal N-terminal) como no secretadas (es decir, que tienen la señal N-terminal) de estas. Un experto en la técnica apreciará que la posición del péptido señal N-

terminal variará en diferentes fosfatasas alcalinas y puede incluir, por ejemplo, las primeras 5, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 27, 30, o más residuos de aminoácidos en el extremo N-terminal del polipéptido. Un experto en la técnica puede predecir la posición de un sitio de escisión de secuencia de señal, p. ej., mediante un algoritmo informático apropiado tal como el descrito en Bendtsen et al. (*J. Mol. Biol.* 340(4):783-795, 2004) y disponible en la Web en www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/.

La presente invención también incluye secuencias de consenso de sALP derivadas del dominio extracelular de isoenzimas ALP (p. ej., TNALP, PALP, GCALP, IALP, etc.). Por lo tanto, de manera similar a sTNALP descrito anteriormente, la presente descripción también proporciona otras isoenzimas ALP humanas solubles, es decir, sin la señal peptídica, que comprende preferentemente el dominio extracelular de las ALP. Las sALP también incluyen secuencias polipeptídicas que satisfacen una secuencia de consenso derivada del dominio extracelular de ALP de las isoenzimas ALP humanas y de los ortólogos de TNALP de mamíferos (humano, ratón, rata, vaca, gato y perro) o una de consenso derivada únicamente del dominio extracelular de ALP de los ortólogos de TNALP de mamíferos (humano, ratón, rata, vaca, gato y perro). Las sALP también incluyen aquellas que satisfacen

secuencias de consenso similares derivadas de diversas combinaciones de estos ortólogos de TNALP o isoenzimas ALP humanas. Tales secuencias de consenso se dan, por ejemplo, en WO 2008/138131.

Las SALP de la presente invención pueden incluir no solo la secuencia silvestre de las sALP descritas anteriormente, sino cualquier polipéptido que tiene al menos 50 % (p. ej., 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o más) de identidad de secuencia con estas fosfatasas alcalinas (p. ej., sec. con núms. de ident.: 1-24; por ejemplo, el polipéptido sALP de la sec. con núm. de ident.: 1 o una variante polipeptídica que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de la sec. con núm. de ident.: 1, p. ej., asfotasa alfa). Los ejemplos de mutaciones que pueden introducirse en una secuencia de ALP se describen en la Publicación de los Estados Unidos núm. 2013/0323244, incorporada en la presente como referencia en su totalidad. Una sALP puede opcionalmente glicosilarse en cualquiera de los uno o más residuos de aminoácidos apropiados. Además, una sALP puede tener al menos 50 % (p. ej., 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o más) de identidad de secuencia con cualquiera de

las sALP descritas en la presente (tal como TNALP, por ejemplo el polipéptido sALP de la sec. con núm. de ident.: 1 o una variante polipeptídica que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de la sec. con núm. de ident.: 1, p. ej., asfotasa alfa). Una sALP puede tener 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más adiciones, deleciones o sustituciones en relación con cualquiera de las sALP descritas en la presente (tal como TNALP, por ejemplo, el polipéptido sALP de la sec. con núm. de ident.: 1 o una variante polipeptídica que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de la sec. con núm. de ident.: 1, p. ej., asfotasa alfa).

Polipéptidos de fusión sALP

Cualesquiera de las sALP y enlazadores descritos en la presente pueden combinarse en un polipéptido sALP, p. ej., un polipéptido sALP de A-sALP-B, en donde cada uno de A y B está ausente o es una secuencia de aminoácidos de al menos un aminoácido (tal como TNALP, por ejemplo, el polipéptido sALP de la sec. con núm. de ident.: 1 o una variante polipeptídica que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de la sec. con núm. de ident.: 1, p. ej., asfotasa alfa). Cuando están presentes, A y/o B pueden ser cualquier enlazador descrito en la presente. En algunos polipéptidos sALP, A está ausente, B está

ausente, o A y B están ambos ausentes. Los polipéptidos sALP pueden incluir opcionalmente una región Fc para proporcionar un polipéptido de fusión de sALP, como se describe en la presente. El polipéptido sALP puede incluir opcionalmente una entidad dirigida al hueso, como se describe en la presente. En algunos polipéptidos sALP, se puede incluir un enlazador, p. ej., un enlazador flexible, entre la entidad dirigida al hueso y la sALP, tal como una secuencia de dipéptido (p. ej., leucina-lisina o ácido aspártico-isoleucina). A continuación se describen regiones Fc, enlazadores y entidades dirigidas al hueso adicionales ilustrativos.

Cualesquiera de las sALP, enlazadores y regiones Fc descritas en la presente pueden combinarse en un polipéptido de fusión, p. ej., un polipéptido de fusión recombinante, que incluye la estructura Z-sALP-Y-espaciador-X-W_n-V, Z-W_n-X-espaciador-Y-sALP-V, Z-sALP-Y-W_n-X-espaciador-V, y Z-W_n-X-sALP-Y-espaciador-V (tal como TNALP, por ejemplo el polipéptido sALP de la sec. con núm. de ident.: 1 o una variante polipeptídica que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de la sec. con núm. de ident.: 1, p. ej., asfotasa alfa). En particular, la estructura puede ser Z-sALP-Y-espaciador-X-W_n-V o Z-W_n-X-espaciador-Y-sALP-V. La sALP puede ser los fragmentos funcionales o de longitud completa de las ALP, tales como el dominio extracelular soluble de la ALP, como

se describe en la presente (p. ej., TNALP, PALP, GCALP e IALP). Una cualquiera de X, Y, Z y V y/o el espaciador puede estar ausente o una secuencia de aminoácidos de al menos un aminoácido. W_n puede ser una entidad dirigida al hueso, p. ej., que tiene una serie de residuos Asp o Glu consecutivos, en los que $n = 1$ a 50, p. ej., $n = 3-30$, p. ej., 5-15, p. ej., 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, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 36, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, o 50. La entidad dirigida al hueso, si está presente, puede colocarse en cualquier lugar del polipéptido de fusión, p. ej., en o cerca del extremo N-terminal o C-terminal, y/o en la región enlazadora. Por ejemplo, la entidad dirigida al hueso está en el extremo C-terminal. Los polipéptidos sALP y los polipéptidos de fusión también pueden carecer de una entidad dirigida al hueso.

Los polipéptidos de fusión de sALP pueden tener la estructura hTNALP-Fc-D₁₀. En particular, los polipéptidos de fusión sALP pueden incluir una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 1 o una variante polipeptídica que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de la sec. con núm. de ident.: 1, p. ej., asfotasa alfa.

Los polipéptidos de fusión sALP pueden tener un polipéptido cargado negativamente que incluye de uno a

cincuenta (p. ej., 6-10, 10-15, 10-16, p. ej., 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 19, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, o 50) aminoácidos cargados negativamente, tales como un ácido aspártico o residuos de ácido glutámico. El péptido cargado negativamente puede consistir o incluir al menos uno de D₁₀, D₁₆, E₁₀ y E₁₆.

Los espaciadores útiles incluyen, pero no se limitan a, polipéptidos que comprenden un Fc, y polipéptidos hidrófilos y flexibles capaces de aliviar las fuerzas repulsivas causadas por la presencia del péptido terminal altamente cargado negativamente (p. ej., W_n). Por ejemplo, una sALP puede ser un polipéptido de fusión que incluye una región Fc de una inmunoglobulina en el dominio N-terminal o C-terminal. Una molécula de inmunoglobulina tiene una estructura que es bien conocida en la técnica. Incluye dos cadenas ligeras (~23 kD cada una) y dos cadenas pesadas (~50-70 kD cada una) unidas por enlaces disulfuro entre cadenas. Las inmunoglobulinas se escinden fácilmente proteolíticamente (p. ej., por escisión de papaína) en Fab (que contiene la cadena ligera y los dominios VH y CH1 de la cadena pesada) y Fc (que contiene los dominios CH2 y CH3 de la cadena pesada, junto con las secuencias adyacentes). Los fragmentos Fc útiles como se describen en la presente incluyen el fragmento Fc de cualquier molécula de inmunoglobulina, que incluye IgG, IgM, IgA, IgD, o IgE, y sus diversas

subclases (p. ej., IgG-1, IgG-2, IgG-3, IgG-4, IgA-1, IgA-2), de cualquier mamífero (p. ej., humano). Por ejemplo, el fragmento Fc es IgG-1 humano. Los fragmentos Fc pueden incluir, por ejemplo, los dominios CH2 y CH3 de la cadena pesada y cualquier porción de la región bisagra. La región Fc puede opcionalmente glicosilarse en cualquier de uno o más residuos de aminoácidos apropiados conocidos por los expertos en la técnica. En particular, el fragmento Fc del polipéptido de fusión tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 20, o tiene al menos 50 % (p. ej., 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o más) de identidad de secuencia con la sec. con núm. de ident.: 20. También se pueden usar regiones Fc diseñadas por ingeniería, p. ej., de origen no natural (ver, p. ej., International Application Pub. núm. WO2005/007809, que se incorpora en la presente como referencia). Un fragmento Fc como se describe en la presente puede tener 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 50, o más adiciones, deleciones o sustituciones en relación con cualquiera de los fragmentos Fc descritos en la presente.

Los polipéptidos de fusión sALP descritos en la presente (tales como TNALP, por ejemplo, el polipéptido sALP de la sec. con núm. de ident.: 1 o una variante

polipeptídica que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de la sec. con núm. de ident.: 1, p. ej., asfotasa alfa) pueden incluir una región enlazadora peptídica entre el fragmento Fc. Además, se puede incluir una región enlazadora peptídica entre el fragmento Fc y la entidad dirigida al hueso opcional. La región enlazadora puede ser de cualquier secuencia y longitud que permita que la sALP permanezca biológicamente activa, p. ej., no estéricamente obstaculizada. Las longitudes de enlazador ilustrativas están entre 1 y 200 residuos de aminoácidos, p. ej., 1-5, 6-10, 11-15, 16-20, 21-25, 26-30, 31-35, 36-40, 41-45, 46-50, 51-55, 56-60, 61-65, 66-70, 71-75, 76-80, 81-85, 86-90, 91-95, 96-100, 101-110, 111-120, 121-130, 131-140, 141-150, 151-160, 161-170, 171-180, 181-190, o 191-200 residuos de aminoácidos. Por ejemplo, los enlazadores incluyen o consisten en porciones flexibles, p. ej., regiones sin estructura secundaria o terciaria fija significativa. Los enlazadores flexibles ilustrativos son enlazadores ricos en glicina, p. ej., que contienen al menos 50 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, o incluso 100 % de residuos de glicina. Los enlazadores también pueden contener, p. ej., residuos de serina. En algunos casos, la secuencia de aminoácidos de los enlazadores consiste únicamente en residuos de glicina y serina. Un enlazador puede opcionalmente

glicosilarse en cualquier de uno o más residuos de aminoácidos apropiados. Adicionalmente, un enlazador como se describe en la presente puede incluir cualquier otra secuencia o entidad, unida covalentemente o no covalentemente. El enlazador también puede estar ausente, en el que el fragmento Fc y la sALP se fusionan directamente, sin residuos intermedios. Ciertos polipéptidos de fusión Fc-SALP o sALP-Fc pueden observarse, de acuerdo con la presente descripción, ya sea como 1) que no tienen enlazador, o como 2) que tienen un enlazador que corresponde a una porción de la sALP. Por ejemplo, el Fc fusionado directamente a hstNALP (1-502) puede observarse, p. ej., ya sea como que no tiene enlazador, en el que la hstNALP es aminoácidos 1-502, o como que tiene un enlazador de 17 aminoácidos, en el que la hstNALP (18-502).

Las sALP y los polipéptidos de fusión sALP (tales como TNALP, por ejemplo, el polipéptido sALP de la sec. con núm. de ident.: 1 o una variante polipeptídica que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de la sec. con núm. de ident.: 1, p. ej., asfotasa alfa) pueden asociarse en dímeros o tetrámeros. Por ejemplo, dos monómeros de sALP-Fc pueden unirse covalentemente a través de dos enlaces disulfuro ubicados en las regiones bisagra de los fragmentos Fc. Adicionalmente, el polipéptido o polipéptido de fusión

(p. ej., un polipéptido sALP o polipéptido de fusión) puede glicosilarse o PEGilarse.

Producción de ácidos nucleicos y polipéptidos

Los ácidos nucleicos que codifican las sALP y los polipéptidos de fusión sALP (tales como TNALP, por ejemplo el polipéptido sALP de la sec. con núm. de ident.: 1 o una variante polipeptídica que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de la sec. con núm. de ident.: 1, p. ej., asfotasa alfa) pueden producirse por cualquier método conocido en la técnica. Típicamente, un ácido nucleico que codifica el polipéptido de fusión deseado se genera usando métodos de clonación molecular, y generalmente se coloca dentro de un vector, tal como un plásmido o virus. El vector se usa para transformar el ácido nucleico en una célula huésped apropiada para la expresión del polipéptido de fusión. Los métodos representativos se describen, por ejemplo, en Maniatis et al. (Cold Springs Harbor Laboratory, 1989). Se pueden usar muchos tipos de células como células huésped apropiadas, aunque las células de mamífero se prefieren porque son capaces de conferir modificaciones postraduccionales apropiadas. Las células huésped de la presente invención pueden incluir, p. ej., célula de ovario de hámster chino (CHO), célula L, célula C127, célula 3T3, célula BHK, célula COS-7 o cualquier otra

célula huésped adecuada conocida en la técnica. Por ejemplo, la célula huésped es una célula de ovario de hámster chino (CHO) (p. ej., una célula CHO-DG44).

Las sALP y los polipéptidos de fusión sALP (tales como TNALP, por ejemplo, el polipéptido sALP de la sec. con núm. de ident.: 1 o una variante polipeptídica que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de la sec. con núm. de ident.: 1, p. ej., asfotasa alfa) pueden producirse bajo cualquier condición adecuada para efectuar la expresión del polipéptido sALP en la célula huésped. Tales condiciones incluyen la selección apropiada de un medio preparado con componentes tales como un regulador, bicarbonato y/o HEPES, iones como cloruro, fosfato, calcio, sodio, potasio, magnesio, hierro, fuentes de carbono como azúcares simples, aminoácidos, potencialmente lípidos, nucleótidos, vitaminas y factores de crecimiento como la insulina; medios regulares disponibles comercialmente como alfa-MEM, DMEM, Ham's-F12 e IMDM suplementados con 2-4 mM de L-glutamina y 5 % de suero fetal bovino; medios regulares libres de proteína animal disponibles comercialmente como Hyclone™ SFM4CHO, Sigma CHO DHFR⁻, Cambrex POWER™ CHO CD suplementados con 2-4 mM de L-glutamina. Estos medios se preparan de manera deseable sin timidina, hipoxantina y L-glicina para mantener la presión selectiva, que permite una expresión proteína-producto estable.

Composiciones farmacéuticas, formulaciones y dosificación

Una composición de la descripción que contiene una sALP o polipéptido de fusión sALP (tal como, p. ej., TNALP, por ejemplo, el polipéptido sALP de la sec. con núm. de ident.: 1 o una variante polipeptídica que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de la sec. con núm. de ident.: 1, p. ej., asfotasa alfa) puede formularse mediante una variedad de métodos conocidos en la técnica. Como apreciará el experto en la técnica, la vía y/o el modo de administración pueden usarse para dictar la formulación. La vía de administración puede depender de una variedad de factores, tales como el medio ambiente y los objetivos terapéuticos. En particular, los polipéptidos y polipéptidos de fusión descritos en la presente pueden formularse para la administración por cualquier vía conocida en la técnica, p. ej., subcutánea (p. ej., mediante inyección subcutánea), intravenosa, oral, nasal, intramuscular, sublingual, intratecal o intradérmica. A manera de ejemplo, las composiciones farmacéuticas pueden estar en forma de un líquido, solución, suspensión, píldora, cápsula, tableta, cápsula de gelatina, polvo, gel, ungüento, crema, nebulización, rocío, vapor atomizado, aerosol o fitosoma.

Formulaciones

Las composiciones que incluyen sALP y polipéptidos de fusión sALP (tales como TNALP, por ejemplo, el polipéptido sALP de la sec. con núm. de ident.: 1 o una variante polipeptídica que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de la sec. con núm. de ident.: 1, p. ej., asfotasa alfa) pueden formularse de acuerdo con métodos estándar. La formulación farmacéutica es una técnica bien establecida, y se describe además en, p. ej., Gennaro (2000) "Remington: The Science and Practice of Pharmacy," 20th Edition, Lippincott, Williams & Wilkins (ISBN: 0683306472); Ansel et al. (1999) "Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems," 7th Edition, Lippincott Williams & Wilkins Publishers (ISBN: 0683305727); y Kibbe (2000) "Handbook of Pharmaceutical Excipients American Pharmaceutical Association," 3rd Edition (ISBN: 091733096X). Por ejemplo, una composición de sALP (tal como TNALP, por ejemplo, el polipéptido sALP de la sec. con núm. de ident.: 1 o una variante polipeptídica que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de la sec. con núm. de ident.: 1, p. ej., asfotasa alfa) puede formularse, por ejemplo, como una solución reguladora a una concentración adecuada y adecuada para el almacenamiento a 2-8 °C (p. ej., 4 °C). También se puede formular una composición para su almacenamiento a una temperatura inferior a 0 °C (p. ej., -20 °C u -80 °C). Una

composición puede formularse además para almacenarse hasta por 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 año o 2 años) a 2-8 °C (p. ej., 4 °C). Por lo tanto, las composiciones descritas en la presente son estables en almacenamiento durante al menos 1 año a 2-8 °C (p. ej., 4 °C).

Las composiciones que incluyen sALP y polipéptidos de fusión sALP (tales como TNALP, por ejemplo, el polipéptido sALP de la sec. con núm. de ident.: 1 o una variante polipeptídica que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de la sec. con núm. de ident.: 1, p. ej., asfotasa alfa) pueden estar en una variedad de formas. Estas formas incluyen, p. ej., formas de dosificación líquidas, semisólidas y sólidas, tales como soluciones líquidas (p. ej., soluciones inyectables e infusibles), dispersiones o suspensiones, tabletas, píldoras, polvos, liposomas y supositorios. La forma preferida depende, en parte, del modo de administración pretendido y de la aplicación terapéutica.

Por ejemplo, las composiciones previstas para el suministro sistémico o local pueden estar en forma de soluciones inyectables o infusibles. En consecuencia, las composiciones (tales como TNALP, por ejemplo, el polipéptido sALP de la sec. con núm. de ident.: 1 o una

variante polipeptídica que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de la sec. con núm. de ident.: 1, p. ej., asfotasa alfa) pueden formularse para administrarse por un modo parenteral (p. ej., inyección subcutánea, intravenosa, intraperitoneal o intramuscular). “Administración parenteral”, “administrado parenteralmente” y otras frases gramaticalmente equivalentes, como se usan en la presente, se refieren a modos de administración distintos de la administración enteral y tópica, usualmente por inyección, e incluyen, sin limitarse a, inyección e infusión subcutánea, intradérmica, intravenosa, intranasal, intraocular, pulmonar, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intrapulmonar, intraperitoneal, transtraqueal, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, epidural, intracerebral, intracraneal, intracarótida e intraesternal.

Las composiciones que incluyen las sALP y polipéptidos de fusión sALP (tales como TNALP, por ejemplo, el polipéptido sALP de la sec. con núm. de ident.: 1 o una variante polipeptídica que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de la sec. con núm. de ident.: 1, p. ej., asfotasa alfa) pueden formularse como una solución, microemulsión, dispersión, liposoma u otra estructura ordenada adecuada para

almacenamiento estable a alta concentración. Las soluciones inyectables estériles pueden prepararse incorporando una composición descrita en la presente en la cantidad requerida en un solvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización por filtro. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando una composición descrita en la presente en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos para la preparación incluyen secado al vacío y liofilización que producen un polvo de una composición descrita en la presente más cualquier ingrediente adicional deseado (ver más adelante) a partir de una solución previamente esterilizada por filtración de esta. La fluidez adecuada de una solución puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como la lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones, y mediante el uso de surfactantes. La adsorción prolongada de una composición inyectable puede lograrse mediante la inclusión en la composición de un reactivo que retrasa la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina.

Las composiciones descritas en la presente también pueden formularse en composiciones de inmunoliposomas. Tales formulaciones pueden prepararse mediante métodos conocidos en la técnica tales como, p. ej., los métodos descritos en Epstein et al. (1985) *Proc Natl Acad Sci USA* 82:3688; Hwang et al. (1980) *Proc Natl Acad Sci USA* 77:4030; y las patentes de los EE. UU. núms. 4.485.045 y 4.544.545. Los liposomas con tiempo de circulación mejorado se describen en, p. ej., la patente de los EE. UU. núm. 5.013.556.

Las composiciones que incluyen las sALP y los polipéptidos de fusión sALP (tales como TNALP, por ejemplo, el polipéptido sALP de la sec. con núm. de ident.: 1 o una variante polipeptídica que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de la sec. con núm. de ident.: 1, p. ej., asfotasa alfa) también pueden formularse con un portador que protegerá la composición (p. ej., un polipéptido sALP o polipéptido de fusión sALP) contra la liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, que incluye implantes y sistemas de suministro microencapsulados. Se pueden usar polímeros biodegradables, biocompatibles, tales como acetato de etileno y vinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Diversos métodos para la preparación de tales formulaciones son bien conocidos en la técnica.

Ver, p. ej., J.R. Robinson (1978) "Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems", Marcel Dekker, Inc., Nueva York.

Una composición que contiene una sALP o polipéptido de fusión sALP (tal como TNALP, por ejemplo, el polipéptido sALP de la sec. con núm. de ident.: 1 o una variante polipeptídica que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de la sec. con núm. de ident.: 1, p. ej., asfotasa alfa) se puede formular como una solución inyectable, que es una solución acuosa transparente, incolora a ligeramente amarilla, pH 7,4. La sALP o polipéptido sALP (tal como TNALP, por ejemplo, el polipéptido sALP de la sec. con núm. de ident.: 1 o una variante polipeptídica que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de la sec. con núm. de ident.: 1, p. ej., asfotasa alfa) se puede formular a una concentración de 12 mg/0,3 ml, 18 mg/0,45 ml, 28 mg/0,7 ml, 40 mg/1 ml, u 80 mg/0,8 ml. La sALP o polipéptido sALP (p. ej., formulado a una concentración de 12 mg/0,3 ml, 18 mg/0,45 ml, 28 mg/0,7 ml, 40 mg/1 ml, u 80 mg/0,8 ml) se puede formular con un portador, tal como cloruro de sodio y/o fosfato de sodio (p. ej., ~150 mM de NaCl y/o ~ 25 mM de fosfato de sodio, en particular a un pH de ~7,4). En particular, la composición se puede formular como una solución inyectable de 40 mg/ml, en la que cada ml de solución contiene 40 mg de sALP o polipéptido sALP (p. ej.,

cada vial contiene 0,3 ml de solución y 12 mg de sALP (40 mg/ml), cada vial contiene 0,45 ml de solución y 18 mg de sALP (40 mg/ml), cada vial contiene 0,7 ml de solución y 28 mg de sALP (40 mg/ml), o cada vial contiene 1,0 ml de solución y 40 mg de asfotasa alfa (40 mg/ml)). La sALP o polipéptido sALP (tal como TNALP, por ejemplo, el polipéptido sALP de la sec. con núm. de ident.: 1 o una variante polipeptídica que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de la sec. con núm. de ident.: 1, p. ej., asfotasa alfa) se puede formular como una solución inyectable a una concentración de 100 mg/ml, en la que cada 1 ml de solución contiene 100 mg de sALP o polipéptido sALP (p. ej., cada vial contiene 0,8 ml de solución y 80 mg de asfotasa alfa (100 mg/ml)).

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

Las composiciones que incluyen sALP y polipéptidos de fusión sALP (tales como TNALP, por ejemplo, el polipéptido sALP de la sec. con núm. de

ident.: 1 o una variante polipeptídica que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de la sec. con núm. de ident.: 1, p. ej., asfotasa alfa) se pueden formular para administrarse a un sujeto o, si se administra a un feto, a una mujer portadora de tal feto, junto con la terapia de gammaglobulina intravenosa (IVIG, por sus siglas en inglés), plasmaféresis, reemplazo de plasma o intercambio de plasma.

Portadores/vehículos

Las preparaciones que contienen una sALP o polipéptido de fusión sALP (tal como TNALP, por ejemplo, el polipéptido sALP de la sec. con núm. de ident.: 1 o una variante polipeptídica que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de la sec. con núm. de ident.: 1, p. ej., asfotasa alfa) se pueden proporcionar a un sujeto que tiene o es propenso a una enfermedad de debilidad muscular, en combinación con solventes, suspensiones o emulsiones acuosas o no acuosas estériles farmacéuticamente aceptables. Los ejemplos de solventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceite vegetal, aceite de pescado y ésteres orgánicos inyectables. Los portadores acuosos incluyen agua, soluciones de agua-alcohol, emulsiones o suspensiones, que incluye salino y vehículos médicos parenterales reguladores que incluyen solución de cloruro de sodio, solución de dextrosa de

Ringer, solución de dextrosa más cloruro de sodio, solución de Ringer que contiene lactosa o aceites fijos. Por ejemplo, el portador farmacéuticamente aceptable puede incluir cloruro de sodio y/o fosfato de sodio, en el que la composición incluye, p. ej., aproximadamente 150 mM de cloruro de sodio y/o aproximadamente 25 mM de fosfato de sodio, pH 7,4.

Los vehículos intravenosos pueden incluir fluidos y reconstituyentes de nutrientes, reconstituyentes de electrolitos, tales como aquellos basados en dextrosa de Ringer, y lo similar. Se pueden incluir sales farmacéuticamente aceptables en estos, por ejemplo, sales de ácidos minerales tales como clorhidratos, hidrobromuros, fosfatos, sulfatos y lo similar; y las sales de ácidos orgánicos tales como acetatos, propionatos, malonatos, benzoatos, y lo similar. Adicionalmente, las sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes, sustancias reguladores del pH, y lo similar, pueden estar presentes en tales vehículos. Una descripción exhaustiva sobre los portadores farmacéuticamente aceptables se encuentran disponibles en Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Pub. Co., N.J. 1991).

Dosificación

Los polipéptidos sALP (tales como TNALP, por ejemplo, el polipéptido sALP de la sec. con núm. de ident.:

1 o una variante polipeptídica que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de la sec. con núm. de ident.: 1, p. ej., asfotasa alfa), y/o las proteínas de fusión de la sec. con núm. de ident.: 21 o la sec. con núm. de ident.: 22, o una variante que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de la sec. con núm. de ident.: 21 o la sec. con núm. de ident.: 22 descritas en la presente, se pueden administrar a un sujeto que tiene o es propenso a una enfermedad de debilidad muscular, en dosis individuales que varían, p. ej., 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 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, 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 1.000 µg/kg (p. ej., de 5 µg/kg a 1.000 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 ilustrativas de una sALP incluyen, p. ej., 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 rangos

citados en la presente, el término “aproximadamente” se puede usar para modificar estas dosificaciones en $\pm 10\%$ de los valores citados o puntos finales del rango. En particular, las composiciones (p. ej., que incluyen sALP (tal como TNALP, por ejemplo, el polipéptido sALP de la sec. con núm. de ident.: 1 o una variante polipeptídica que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de la sec. con núm. de ident.: 1, p. ej., asfotasa alfa)) de acuerdo con la presente descripción se pueden administrar a un sujeto en dosis que varían de aproximadamente 0,001 mg/kg/día a aproximadamente 500 mg/kg/día, aproximadamente 0,01 mg/kg/día a aproximadamente 100 mg/kg/día, o aproximadamente de 0,01 mg/kg/día a aproximadamente 20 mg/kg/día. Por ejemplo, las composiciones de sALP (tales como TNALP, por ejemplo, el polipéptido sALP de la sec. con núm. de ident.: 1 o una variante polipeptídica que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de la sec. con núm. de ident.: 1, p. ej., asfotasa alfa) se pueden administrar a un sujeto en una dosificación semanal que varía, p. ej., de aproximadamente 0,5 mg/kg/semana a aproximadamente 140 mg/kg/semana, p. ej., de aproximadamente 0,8 mg/kg/semana a aproximadamente 50 mg/kg/semana, o aproximadamente 1 mg/kg/semana a aproximadamente 10 mg/kg/semana (p. ej., aproximadamente 6 o aproximadamente 9 mg/kg/semana). En

particular, la sALP (tal como TNALP, por ejemplo, el polipéptido sALP de la sec. con núm. de ident.: 1 o una variante polipeptídica que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de la sec. con núm. de ident.: 1, p. ej., asfotasa alfa) se puede administrar a una dosificación de 2 mg/kg tres veces a la semana (dosis total 6 mg/kg/semana), 1 mg/kg seis veces a la semana (dosis total 6 mg/kg/semana), 3 mg/kg tres veces a la semana (dosis total 9 mg/kg/semana), 0,5 mg/kg tres veces a la semana (dosis total de 1,5 mg/kg/semana), o 9,3 mg/kg tres veces a la semana (dosis total 28 mg/kg/semana). La dosificación se adaptará por el clínico de acuerdo con los factores convencionales tales como la extensión de la enfermedad y diferentes parámetros del sujeto que tiene o es propenso a una enfermedad de debilidad muscular.

Las dosificaciones de las composiciones que incluyen sALP y polipéptidos de fusión sALP (tales como TNALP, por ejemplo, el polipéptido sALP de la sec. con núm. de ident.: 1 o una variante polipeptídica que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de la sec. con núm. de ident.: 1, p. ej., asfotasa alfa), y/o las proteínas de fusión de la sec. con núm. de ident.: 21 o la sec. con núm. de ident.: 22, o una variante que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de la sec. con núm. de ident.:

21 o la sec. con núm. de ident.: 22 se pueden proporcionar tanto en regímenes de dosificación única o múltiple. Las dosis se pueden administrar, p. ej., cada hora, cada dos horas, diariamente, cada dos días, dos veces a la semana, tres veces a la semana, cuatro veces a la semana, cinco veces a la semana, seis veces a la semana, semanalmente, cada dos semanas, mensualmente, cada dos meses o anualmente. Alternativamente, las dosis se pueden administrar, p. ej., dos, tres veces, cuatro veces, cinco veces, seis veces, siete veces, ocho veces, nueve veces, 10 veces, 11 veces, o 12 veces al día. En particular, el régimen de dosificación es una vez a la semana. La duración del régimen de dosificación puede ser, p. ej., 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 el tiempo de vida restante del sujeto que tiene o es propenso a una enfermedad de debilidad muscular. La cantidad, frecuencia y duración de la dosificación se adaptarán por el clínico de acuerdo con los factores convencionales tales como la extensión de la enfermedad y diferentes parámetros del sujeto que tiene o es propenso a una enfermedad de debilidad muscular.

Por ejemplo, la dosificación recomendada de una sALP o polipéptido de fusión sALP ((tal como TNALP, por ejemplo, el polipéptido sALP de la sec. con núm. de

ident.: 1 o una variante polipeptídica que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de la sec. con núm. de ident.: 1, p. ej., asfotasa alfa) es 2 mg/kg de peso corporal administrado por vía subcutánea tres veces por semana, o un régimen de dosificación de 1 mg/kg de peso corporal administrado por vía subcutánea seis veces por semana. A continuación se proporciona información adicional de dosificación (**Tabla 1**).

Tabla 1. Dosificación de asfotasa alfa

Peso corporal (kg)	Si se inyecta 3 veces por semana			Si se inyecta 6 veces por semana		
	Dosis a inyectar	Volumen a inyectar	Tipo de vial usado para la inyección	Dosis a inyectar	Volumen a inyectar	Tipo de vial usado para la inyección
3	6 mg	0,15 ml	0,3 ml			
4	8 mg	0,20 ml	0,3 ml			
	10 mg	0,25 ml	0,3 ml			
6	12 mg	0,30 ml	0,3 ml	6 mg	0,15 ml	0,3 ml
7	14 mg	0,35 ml	0,45 ml	7 mg	0,18 ml	0,3 ml
8	16 mg	0,40 ml	0,45 ml	8 mg	0,20 ml	0,3 ml
9	18 mg	0,45 ml	0,45 ml	9 mg	0,23 ml	0,3 ml
10	20 mg	0 50 ml	0,7 ml	10 mg	0,25 ml	0 3 ml
11	22 mg	0,55 ml	0,7 ml	11 mg	0,28 ml	0,3 ml
12	24 mg	0,60 ml	0,7 ml	12 mg	0,30 ml	0,3 ml
13	26 mg	0,65 ml	0,7 ml	13 mg	0,33 ml	0,45 ml
14	28 mg	0,70 ml	0,7 ml	14 mg	0,35 ml	0,45 ml
15	30 mg	0,75 ml	1 ml	15 mg	0,38 ml	0,45 ml
16	32 mg	0,80 ml	1 ml	16 mg	0,40 ml	0,45 ml
17	34 mg	0,85 ml	1 ml	17 mg	0,43 ml	0,45 ml
18	36 mg	0,90 ml	1 ml	18 mg	0,45 ml	0,45 ml
19	38 mg	0,95 ml	1 ml	19 mg	0,48 ml	0,7 ml

20	40 mg	1,00 ml	1 ml	20 mg	0,50 ml	0,7 ml
25	50 mg	0,50 ml	0,8 ml	25 mg	0,63 ml	0,7 ml
30	60 mg	0,60 ml	0,8 ml	30 mg	0,75 ml	1 ml
35	70 mg	0,70 ml	0,8 ml	35 mg	0,88 ml	1 ml
40	80 mg	0,80 ml	0,8 ml	40 mg	1,00 ml	1 ml
50				50 mg	0,50 ml	0,8 ml
60				60 mg	0,60 ml	0,8 ml
70				70 mg	0,70 ml	0,8 ml
80				80 mg	0,80 ml	0,8 ml
90				90 mg	0,90 ml	0,8 ml (x2)
100				100 mg	1,00 ml	0,8 ml (x2)

Los siguientes ejemplos pretenden ilustrar, en lugar de limitar, la descripción.

Ejemplos

Ejemplo 1. Hipotonía en un sujeto con una enfermedad similar a la HPP sin mutaciones anuladoras en *ALPL*

La paciente A fue diagnosticada con HPP a los 5 años y 9 meses cuando se presentó para la evaluación de la disminución de la densidad mineral ósea asociada con hipotonía grave. Se encontró que tenía un nivel bajo de fosfatasa alcalina a 149 U/l (150-420), PLP elevado a 172,4 (20-125) y un nivel urinario de PEA elevado a 190 mg/dl (0-106). Las imágenes esqueléticas mostraron que los rayos X de las muñecas eran normales pero los rayos X de las rodillas mostraron densidad mineral ósea disminuida, huesos gráciles y epífisis tibiales

anormales. La exploración DXA mostró baja densidad mineral ósea (puntuaciones Z de -4,6 y -3,3 para la columna lumbar y para el cuerpo total menos la cabeza, respectivamente). No ha tenido ninguna fractura. Se le realizó la secuenciación del gen *ALPL* que incluye estudios de delección y duplicación y no se identificaron mutaciones en el gen *ALPL*.

Previo a su diagnóstico de HPP, la Paciente A se sometió a extensas pruebas moleculares en un esfuerzo por identificar la causa de su hipotonía grave que comenzó en la infancia. Durante su primer año de vida, las evaluaciones de atrofia muscular espinal, biopsias musculares, un estudio de nervios y electromiografía (EMG, por sus siglas en inglés) no arrojaron una explicación específica para su hipotonía persistente y debilidad muscular. Las pruebas del gen *SMA* revelaron que no se encontraron mutaciones causantes de enfermedad. La biopsia muscular reveló una miopatía crónica y en curso que mostraba características de desproporción de tipos de fibra. La interpretación del EMG reveló una posible anomalía leve de la transmisión neuromuscular. La MRI del cerebro reveló pérdida de volumen/hipoplasia que involucra la porción inferior del vermis cerebeloso con una leve pérdida de volumen cerebeloso bilateral.

Posteriormente, se realizaron pruebas genéticas extensas, pero no arrojaron una explicación definitiva del

cuadro clínico complejo de la paciente A. Se realizó el panel de análisis integral de ADN mitocondrial (ADNmt) en el Baylor College of Medicine y se reportó una variante rara de significado desconocido en el gen *MTRNR2* (m.1836A>G). También se realizó el panel de deficiencia de coenzima Q10 en Baylor College of Medicine y se reportó una variante rara de significado desconocido en el gen *ADCK3* (c.1665G>A). Se realizó una secuenciación del exoma completo (WES, por sus siglas en inglés) en GeneDx que reveló dos variantes, pero ninguna explicó su fenotipo. Una variante fue la variante conocida *ADCK3* identificada previamente por el panel de deficiencia de coenzima Q10 de Baylor. Si bien esta variante es probablemente patógena, se asocia con una deficiencia autosómica recesiva de CoQ10. Esta no es una explicación significativa ya que la Paciente A sólo porta una mutación materna. La segunda variante fue una variante heredada paternalmente en el gen *ATP1A3*. Esta variante (c.357+1G>A) se clasifica como probablemente patógena, pero su padre tiene la misma variante y no se ve afectado. Por lo tanto, el estado no afectado del padre de la Paciente A parece ser evidencia de que tener la variante c.357+1G>A en el gen *ATP1A3* no es causante de su fenotipo clínico. La variante c.357+1G>A se encuentra entre los exones 4 y 5 y puede afectar el empalme de estos dos exones. La madre no porta esta variante y exhibió una unión de empalme bien definida entre los exones 4 y 5 en relación

con otros miembros de la familia. Otros miembros de la familia mostraron diversos grados de “fuga” entre los exones 4 y 5, con la paciente A que exhibe el mayor número de lecturas mapeadas al intrón entre los exones 4 y 5, lo que sugiere un empalme menos eficiente del intrón (**Figura 1**). No obstante, ATP1A3 se expresa a niveles muy bajos en PBMC y las lecturas mapeadas al intrón afectado fueron bajas.

Ejemplo 2. Cuantificación de la transcripción y traducción de *ALPL*

Posteriormente, la Paciente A fue examinada por un deterioro en la expresión del gen *ALPL* debido a la desregulación de la transcripción de *ALPL* a nivel de ARN y/o de proteína, mediante secuenciación de ARN del transcrito de *ALPL* y análisis Western de la proteína *ALPL*, respectivamente. La secuenciación de ARN mostró que el nivel del transcrito de *ALPL* era normal en la Paciente A así como en la madre, padre y tres hermanos de la paciente A (**Figura 2A**). Se usó el análisis de Western blot para identificar la traducción de *ALPL*. El análisis confirmó que la proteína TNAP se produjo en la Paciente A así como en la madre, padre y tres hermanos de la Paciente A (**Figura 2B**). Se realizará análisis confirmatorio usando un control positivo y análisis cuantitativo.

Ejemplo 3. Cuantificación de la traducción de *ALPL*

El análisis de Western blot de *ALPL* se puede realizar usando una muestra de la Paciente A para determinar si la proteína *ALPL* se produce a niveles normales y en el peso molecular correcto. Una determinación de que la proteína no está presente a concentraciones normales, a pesar de que la Paciente A exhibe niveles normales del transcrito, indica un defecto probable en la traducción de *ALPL*.

Posteriormente, la paciente A puede ser analizada junto con sus padres y tres hermanos para obtener un perfil genético completo. El estudio incluirá el consentimiento/asentimiento informado, la recolección de una muestra de sangre (20 ml) de la Paciente A, sus padres y sus tres hermanos para el análisis de Western blot, análisis RT-PCR, o sec. de ARN del transcrito de *ALPL* y análisis de Western Blot de la proteína *ALPL*. Además, se recolectará sangre (7 ml) para una determinación de PLP, Vitamina D2+D3, panel metabólico integral, y mediciones de PEA en orina de los padres y hermanos. También se realizará un cuestionario de historia clínica y revisión antropométrica de registros médicos.

Ejemplo 4. Tratar la hipotonía con asfotasa alfa

Una mujer de 12 años con duplicación cromosómica 22q11.21q11.22, retraso del desarrollo, trastorno del espectro autista (síndrome de Asperger), fatiga extrema, dolor que la despierta por la noche (hombros, espalda, piernas) así como hallazgos consistentes con HPP (ALP baja, PLP y PEA elevados, y disminución de la mineralización ósea) fue diagnosticada inicialmente con HPP. Posteriormente se descubrió que la paciente no presentaba mutaciones en *ALPL*. A los pocos meses de iniciar STRENSIQ®, la fuerza, la agilidad y la resistencia de la paciente femenina mejoraron. Su 6MWT mejoró de 320 metros a 597 metros (la norma de edad/sexo es 672±55). En general, exhibió menos dolor (2 de cada 10 en lugar de 5 de cada 10 reportados durante la visita previa) y una mejor movilidad.

Ejemplo 5. Los tratamientos pueden abordar la debilidad muscular, medida por un SRC reducido, que es independiente del estado de mineralización ósea

Se realizaron experimentos para analizar los efectos de las proteínas de fusión sobre la debilidad muscular, medidos por un SRC reducido, que es independiente del estado de mineralización ósea. Para el contexto, se consideraron proteínas de fusión de dos variantes de la sec. con núm. de ident.: 1, que incluye

la sec. con núm. de ident.: 21, y la sec. con núm. de ident.: 22. En la **Tabla 2** se muestra una comparación de las tres estructuras proteicas de fusión, y las secuencias exactas se ilustran en las **Tablas 3, 4 y 5**. A continuación se incluyen datos adicionales para el tratamiento con la proteína de fusión de la sec. con núm. de ident.: 21.

Tabla 2: Comparaciones de proteínas de fusión

	Sec. con núm. de ident.: 1 (726 aminoácidos)	Sec. con núm. de ident.: 21 (724 aminoácidos)	Sec. con núm. de ident.: 22 (721 aminoácidos)
Dominio catalítico	Tipo silvestre	E108M/N213Q/N286Q	E108M
Región Fc	IgG1 truncada	IgG2/4 truncada	IgG2/4 truncada
Etiqueta de poliaspartato	D10	D10	D7

Tabla 3: Sec. con núm. de ident.: 1 (726 aminoácidos)

LVPEKEKDPKYWRDQAQETLKYALELQKLNTNVAKNVIMFLGDGMGVSTVTAARILKGQLHHNPGEETR LEMDKFPFVALSKTYNTNAQVPDSAGTATAYLCGVKANEGTVGVSAATERSRCNTTQGNEVTSILRWAK DAGKSVGIVTTTRVNHATPSAAYAHSAARDWYSDNEMPPEALSQGCKDIAYQLMHNIRDIDVIMGGGRK YMYPKNKTDVEYESDEKARGTRLDGLDLVDTWKSFKPRYKHSFHWNRTELLTLDPHNVLDYLLGLFEPG DMQYELNRNNVTDPSLSEMVVVAIQILRKNPKGFFLLVEGGRIDHGHHEGKAKQALHEAVEMDRAIGQA GSLTSSDITLTVVTADHSHVFTFGGYTPRGNSIFGLAPMLSDTDKKPFTAILYGNGPGYKVVGGERENV SMVDYAHNNYQAQSAVPLRHETHGGEDVAVFSKGPMALLHGVHEQNYVPHVMAYAACIGANLGHCAPA SSLKDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKDIDDDDDDDDDDD
--

Tabla 4: Sec. con núm. de ident.: 21 (724 AA) E108M,
N213Q, N286Q

LVPEKEKDPKYWRDQAQETLKYALELQKLNTNVAKNVIMFLGDGMGVSTVTAARILKGQLHHNPGEETR LEMDKFPFVALSKTYNTNAQVPDSAGTATAYLCGVKANMGTVGVSAATERSRCNTTQGNEVTSILRWAK DAGKSVGIVTTTRVNHATPSAAYAHSAADRWDWYSDNEMPPEALSQGCKDIAYQLMHNIRDIDVIMGGGRK YMPKQKTDVEYESDEKARGTRLDGLDLVDTWKSFKPRYKHSFIWNRTLLTDPHNVDYLLGLFEPG DMQYELNRNQVTDPSLSEMVVVAIQILRKNPKGFFLLVEGGRIDHGHHEGKAKQALHEAVEMDRAIGQA GSLTSSDRTLTVVTADHSHVFTFGGYTPRGNSIFGLAPMLSDTDKKPFTAILYGNGPGYKVVGGERENV SMVDYAHNNYQAQSAVPLRHETHGGEDVAVFSKGPMALLHGVHEQNYVPHVMAYAACIGANLGHCAPA SSAGSLAAVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS QEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLKDDDDDDDDDDDD

Tabla 5: Sec. con núm. de ident.: 22 (721 AA) E108M,
IgG2/4, D7

LVPEKEKDPKYWRDQAQETLKYALELQKLNTNVAKNVIMFLGDGMGVSTVTAARILKGQL HHNPGEETRLEMDKFPFVALSKTYNTNAQVPDSAGTATAYLCGVKANMGTVGVSAATERS RCNTTQGNEVTSILRWAKDAGKSVGIVTTTRVNHATPSAAYAHSAADRWDWYSDNEMPPEAL SQGCKDIAYQLMHNIRDIDVIMGGGRKYMYPKNTDVEYESDEKARGTRLDGLDLVDTWK SFKPRYKHSFIWNRTLLTDPHNVDYLLGLFEPGDMQYELNRNNVTDPSLSEMVVVAI QILRKNPKGFFLLVEGGRIDHGHHEGKAKQALHEAVEMDRAIGQAGSLTSSDRTLTVVTA DHSVFTFGGYTPRGNSIFGLAPMLSDTDKKPFTAILYGNGPGYKVVGGERENVSMVDYA HNNYQAQSAVPLRHETHGGEDVAVFSKGPMALLHGVHEQNYVPHVMAYAACIGANLGH APASSAGSLAAVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVVSQEDPEV QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLKDDDDDDDD

La **Figura 3** ilustra el perfil representativo de la tasa de consumo de oxígeno (OCR, por sus siglas en inglés) normalizada al número de fibra muscular esquelética del extensor digitorum longus (EDL) de una hembra de ratón HPP de 20 días posnatales y de su homóloga hembra WT de la misma camada, que demuestra que las fibras musculares EDL de ratón HPP pueden ser deficientes en

capacidad respiratoria de reserva en comparación con las WT emparejadas por edad u sexo. Estos datos sugieren que las tasas reducidas de producción de energía mitocondrial contribuyen a la debilidad muscular en la HPP. Las abreviaturas de la **Figura 3** son: ATP = trifosfato de adenosina; EDL= extensor digitorum longus; FCCP= cianuro de carbonilo-ptrifluorometoxi fenilhidrazona; HPP = hipofosfatasia; OCR= tasa de consumo de oxígeno; WT= silvestre.

La capacidad respiratoria de reserva (SRC, por sus siglas en inglés) expresada como porcentaje de WT se evaluó comparativamente en ratones tratados con PBS y en ratones HPP tratados con la proteína de fusión para la sec. con núm. de ident.: 21 (**Figura 4** y **Tabla 6**). Las abreviaturas de la **Tabla 6** son: Abreviaturas: HPP = hipofosfatasia; PBS = solución salina regulada con fosfato; SRC = capacidad respiratoria de reserva; WT = silvestre.

Tabla 6: Capacidad respiratoria de reserva (SRC) expresada como porcentaje de WT

Tratamiento	SRC muscular de HPP (porcentaje de WT) Media $\pm$ SD	Fenotipo óseo de HPP Porcentaje no afectado
PBS	29,65 $\pm$ 37,44	22
Sec. con núm. de ident.: 21	107,48 $\pm$ 87,36	84

La SRC de ratones HPP tratados con la proteína de fusión de la sec. con núm. de ident.: 21, expresada como porcentaje de WT, se incrementó significativamente en comparación con ratones HPP tratados con PBS solo ($p = 0,0008$ usando una prueba de Mann Whitney de una cola). Estos datos demuestran la capacidad del tratamiento con la proteína de fusión de la sec. con núm. de ident.: 21 para mejorar la bioenergética mitocondrial en fibras musculares esqueléticas de ratones HPP. El fenotipo óseo de los ratones control tratados con PBS reveló hueso no afectado en 2 de 9 ratones HPP (22 %), a pesar de que estos ratones tenían menor que 50 % de la SRC de WT emparejado. Los ratones HPP pueden tener debilidad muscular, medidos por SRC reducido, que es independiente del estado de mineralización ósea. Estos datos sugieren que los pacientes con HPP que sufren debilidad muscular sin manifestaciones esqueléticas podrían beneficiarse del tratamiento con proteína de fusión de la sec. con núm. de ident.: 21. El tratamiento con proteína de fusión de la sec. con núm. de ident.: 21 rescató el fenotipo óseo en todos menos 3 de 19 ratones HPP (84 %). Estos 3 ratones recibieron 8, 9 o 13 dosis, que es menor que las 18 dosis de 2 mg/kg de la proteína de fusión de la sec. con núm. de ident.: 21 que normalizaron el fenotipo de mineralización ósea en 94 % de los ratones HPP.

A partir de los datos del **Ejemplo 5**, se encuentra apoyo para un método para tratar o reducir el riesgo de desarrollar debilidad muscular en un sujeto que tiene o está en riesgo de tener una enfermedad de debilidad muscular que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de al menos un polipéptido recombinante que tiene actividad de fosfatasa alcalina, en donde el sujeto exhibe una concentración reducida de fosfatasa alcalina inespecífica de tejido (TNSALP), y en donde el sujeto no tiene una mutación anuladora en un gen *ALPL*. En modalidades específicas, el método comprende una proteína de fusión que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende al menos 95 % de identidad de secuencia con la sec. con núm. de ident.: 21 o la sec. con núm. de ident.: 22 (o en donde el polipéptido recombinante comprende una proteína de fusión que comprende un aminoácido de la sec. con núm. de ident.: 21 o la sec. con núm. de ident.: 22). En modalidades específicas, el polipéptido recombinante del método comprende una molécula de inmunoglobulina, la molécula de inmunoglobulina es una región de fragmento cristalizable (Fc) de IgG2/4, y el Fc comprende una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 21. La administración de la cantidad terapéuticamente efectiva en modalidades específicas es cada dos semanas, y puede comprender de aproximadamente 0,1 mg/kg a

aproximadamente 20 mg/kg. En modalidades específicas, el método de la reivindicación 66, en donde la enfermedad de debilidad muscular comprende: distrofia muscular, miastenia gravis, y enfermedad por depósito de pirofosfato de calcio (CPPD), esclerosis lateral amiotrófica (ALS), miositis, distrofia miotónica, miotonía, síndrome de Guillain-Barre, distrofia muscular de Duchenne (DMD), o síndrome miasténico de Lambert-Eaton. La administración del método puede mejorar la bioenergética mitocondrial en las fibras musculares esqueléticas.

Ejemplo 6. La sec. con núm. de ident.: 1 restaura la actividad de la BCAT dependiente de fosfato de piridoxal (PLP) para permitir la producción de trifosfato de adenosina a partir de las transferasas de aminoácidos de cadena ramificada

En ausencia del tratamiento continuo con la sec. con núm. de ident.: 1, los aminoácidos de cadena ramificada (BCAA) (valina, leucina e isoleucina) se elevan en el músculo esquelético de ratones HPP (con eliminación del gen TNSALP) debido a la insuficiencia de fosfato de piridoxal (PLP) intracelular para el catabolismo dependiente de PLP de la transferasa de aminoácidos de cadena ramificada (BCAT) de los BCAA a cetoácidos de cadena ramificada (BCKA, por su siglas en inglés). (Los BCKA se catabolizan (serie

de etapas secuenciales) para generar acetil-CoA o succinil-CoA que pueden ingresar al ciclo de ácido tricarboxílico (TCA) mitocondrial para producir trifosfato de adenosina (ATP) a través de la fosforilación oxidante del difosfato de adenosina (ADP)). La trayectoria se muestra en la **Figura 5**.

La sec. con núm. de ident.: 1 El tratamiento de ratones HPP restaura la actividad de la BCAT dependiente de PLP para normalizar los BCAA en el músculo esquelético (hace que los BCAA estén disponibles para la producción de energía). Esto se muestra en las **FIGS 6, 7 y 8** donde el tratamiento continuo con la sec. con núm. de ident.: 1 normaliza los niveles de BCAA en el músculo esquelético de ratones HPP (sin diferencia significativa en comparación con el silvestre), que proporciona evidencia indirecta de que la actividad de la BCAT dependiente de PLP se restaura, permitiendo la producción de ATP a partir de los BCAA. La interrupción (retirada) del tratamiento con la sec. con núm. de ident.: 1 en ratones con eliminación del gen TNSALP aumenta significativamente los niveles de valina, leucina e isoleucina en el músculo tibial en comparación con los ratones silvestre, que proporciona evidencia indirecta de que la actividad de la BCAT dependiente de PLP se reduce, limitando de esta manera la producción de ATP a partir de los BCAA.

Otras modalidades

Todas las publicaciones, patentes y solicitudes de patente mencionadas en la memoria descriptiva anterior se incorporan en la presente como referencia en la misma medida que si cada publicación, patente o solicitud de patente individual se indicaba específica e individualmente para incorporarse como referencia en su totalidad. Diversas modificaciones y variaciones de los métodos, composiciones farmacéuticas, y kits descritos resultarán evidentes para los expertos en la técnica sin apartarse del alcance y el espíritu de la invención reivindicada. Aunque la descripción se ha descrito en relación con las modalidades específicas, debe entenderse que es susceptible de modificaciones adicionales y que la invención como se reivindica no debe limitarse indebidamente a tales modalidades específicas.