

## **TRATAMIENTO DE LA DEFICIENCIA DE ENPP1 Y LA DEFICIENCIA DE ABCC6 EN NIÑOS**

### **Referencia cruzada a solicitudes relacionadas**

La presente solicitud reivindica la prioridad de la solicitud de patente provisional de Estados Unidos núm. **63/578.137** titulada “*TRATAMIENTO DE LA DEFICIENCIA DE ENPP1 Y DE LA DEFICIENCIA DE ABCC6 EN NIÑOS*” presentada el 22 de agosto de 2023 (núm. de expediente del abogado 4427-12501), que se incorpora en la presente como referencia en su totalidad.

### **CAMPO**

El campo de la invención se refiere al tratamiento de la deficiencia de ENPP1 y la deficiencia de ABCC6 por reemplazo enzimático.

### **LISTADO DE SECUENCIAS**

Esta solicitud contiene un Listado de secuencias que se ha presentado electrónicamente como un archivo XML ST.26 estándar de la WIPO a través del Centro de patentes, creado el 21 de agosto de 2024, se denomina “4427-12502.xml” y tiene un tamaño de 126 KB. El listado de secuencias se incorpora en la presente como referencia en su totalidad.

### **ANTECEDENTES**

La calcificación en sistemas biológicos es un proceso complejo mediante el cual las sales de calcio se mantienen en concentraciones más altas en matrices no circulantes que en humores de circulación regional u otros fluidos móviles.

Algunos ejemplos frecuentes de estados de enfermedad de calcificación patológica incluyen, entre otros, cálculos renales y vesicales, cálculos de la pulpa dental, cálculos biliares, cálculos en las glándulas salivales, prostatitis calculosa crónica, microlitos testiculares, calcificación en pacientes en hemodiálisis,

aterosclerosis, malacoplasia, esclerodermia (esclerosis sistémica), calcinosis cutis, estenosis aórtica calcificada, sinovitis y artritis, hiperostosis esquelética intersticial difusa, dermatomiositis juvenil, calcificación arterial generalizada del lactante (GACI), osificación del ligamento longitudinal posterior (OPLL), raquitismo hipofosfatémico, artrosis, calcificación de placas ateroscleróticas, enfermedad renal crónica (CKD), enfermedad renal en etapa terminal (ESRD), pseudoxantoma elástico (PXE), espondilitis anquilosante, endurecimiento de las arterias, calcifilaxia, y el lupus sistémico erimatoso.

La deficiencia de ENPP1 es un trastorno genético raro causado por mutaciones inactivadoras en el gen *ENPP1* que codifica la enzima ENPP1. ENPP1 es una proteína transmembranaria integral cuyos dominios extracelulares portan actividades de pirofosfatasa y fosfodiesterasa. ENPP1 convierte el ATP extracelular en pirofosfato inorgánico (PPi) y AMP.

La deficiencia de ENPP1 causa hipopirofosfatemia e hipoadenosinemia que, a su vez, conduce a la calcificación ectópica (especialmente arterial) (descrita en la bibliografía como Calcificación arterial generalizada de los lactantes [Generalized Arterial Calcification of Infancy, GACI]), disfunción esquelética secundaria al raquitismo y osteomalacia (descrita en la bibliografía como Raquitismo autosómico recesivo hipofosfatémico 2 [ARHR2]) y proliferación neointimal oclusiva. Más allá de las intervenciones sintomáticas y paliativas, no existe terapia dirigida para esta enfermedad. Por lo tanto, la deficiencia de ENPP1 tiene una gran necesidad médica insatisfecha. Los lactantes con deficiencia de ENPP1 tienen una alta mortalidad en los primeros 0 a 6 meses de vida, y los niños y adultos con deficiencia de ENPP1 experimentan un riesgo continuo de calcificación y disfunción de órganos, raquitismo debilitante que progresa a osteomalacia en la edad adulta con dolor óseo y articular grave, fatiga, debilidad muscular y fracturas óseas repetidas, todos síntomas que

conducen a una mala calidad de vida y funcionalidad.

La deficiencia de ABCC6 es un error genético innato, hereditario y poco frecuente del metabolismo causado por mutaciones en el gen ABCC6. La deficiencia de ABCC6 se hereda como un rasgo recesivo en el que las mutaciones genéticas provocan una actividad disminuida o ausente de la proteína ABCC6 (también conocida como MRP6 (proteína de resistencia a múltiples fármacos 6), miembro 6 de la subfamilia C de casetes de unión al ATP (ABCC6) y el transportador multiespecífico de aniones orgánicos E (MOAT-E)). La deficiencia conduce a niveles plasmáticos bajos de PPI y se asocia con la mineralización patológica en los vasos sanguíneos y los tejidos blandos de todo el cuerpo, lo que provoca una morbilidad significativa, incluida la ceguera, complicaciones cardiovasculares potencialmente mortales y calcificación de la piel en todo el cuerpo, lo que provoca una morbilidad significativa, incluida la ceguera, complicaciones cardiovasculares potencialmente mortales y calcificación de la piel. La mineralización patológica asociada con la deficiencia de ABCC6 es el resultado de la calcificación ectópica en fibras elásticas, un componente del tejido conjuntivo, que proporciona fuerza y flexibilidad a las estructuras de todo el cuerpo. La calcificación ectópica puede afectar la actividad de las fibras elásticas en los ojos, los vasos sanguíneos y la piel, y con menos frecuencia en otras áreas, como el tracto digestivo.

Las mutaciones en ABCC6 causan pseudoxantoma elástico (PXE). Las mutaciones más frecuentes, R1141X y 23-29del, representan aproximadamente el 25 % de las mutaciones identificadas. Le Saux O, et al. (2001). "*A spectrum of ABCC6 mutations is responsible for pseudoxanthoma elasticum*". Am. J. Hum. Genet. 69 (4): 749–64. Pfendner EG, et al. (2007). "*Mutation Detection in the ABCC6 Gene and Genotype-Phenotype Analysis in a Large International Case Series Affected by Pseudoxanthoma Elasticum*". Journal of Medical Genetics. 44 (10): 621–8. La

aterosclerosis prematura también se asocia con mutaciones en el gen ABCC6 ,incluso en aquellos sin PXE. Trip MD, et al. (2002). “La mutación frecuente en el gen ABCC6 (R1141X) se asocia con un fuerte aumento en la prevalencia de la enfermedad de las arterias coronarias”. *Circulation*. 106 (7): 773–5. La deficiencia de ABCC6 en modelos de isquemia en ratones conduce a infartos extensos, que pueden ser rescatados por la sobreexpresión de ABCC6. Mungrue IN, et al. (2011). “*La deficiencia de ABCC6 provoca un aumento del tamaño del infarto y apoptosis en un modelo de isquemia-reperfusión cardíaca en ratones*”. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 31 (12): 2806–12.

Se ha demostrado que los polipéptidos ENPP1 son efectivos en el tratamiento de determinadas enfermedades de calcificación del tejido ectópico. Se ha demostrado que la ENPP1-Fc reduce las calcificaciones arteriales generalizadas en un modelo de ratón para CAGI (calcificación arterial generalizada en infantes), que es una enfermedad grave que se produce en infantes y que implica la calcificación arterial extensa (Albright, *et al.*, 2015, *Nature Comm*. 10006). Las proteínas de fusión de ENPP1 también se han descrito para tratar enfermedades de calcificación tisular grave (véase, por ejemplo, la publicación de solicitud de PCT núms. WO 2014/126965 y WO 2016/187408), y una proteína de fusión de ENPP1 que comprende un dominio dirigido al hueso cargado negativamente se ha descrito para tratar CAGI (publicación de solicitud PCT núm. WO 2011/113027 y WO 2012/125182).

Actualmente, no existen tratamientos aprobados clínicamente para estas enfermedades genéticas, crónicas, progresivas y potencialmente mortales ultrarraras, tales como deficiencia de ENPP1 y/o deficiencia de ABCC6 en las que los pacientes, en especial, niños, experimentan efectos devastadores en múltiples sistemas del cuerpo, lo que provoca complicaciones potencialmente mortales o debilitantes.

## **COMPENDIO**

La descripción se refiere a la administración de un agente de ENPP1 a un

sujeto a una dosis de aproximadamente 2,4 mg por kilogramo del sujeto.

En un aspecto, la descripción se refiere a administrar a un sujeto que tiene una deficiencia de ENPP1 o a un sujeto que tiene una deficiencia de ABCC6, un agente de ENPP1 a una dosis de aproximadamente 2,4 mg por kilogramo del sujeto para restaurar un nivel fisiológico de proteína ENPP1 y/o actividad en el plasma o tejidos del sujeto. Un nivel fisiológico de actividad de ENPP1 en el plasma o los tejidos, como se usa en la presente, es una cantidad o concentración de actividad de ENPP1 suficiente para lograr y mantener un nivel fisiológico de PPI en suero humano.

En un aspecto, la descripción se refiere a administrar a un sujeto que tiene una deficiencia de ENPP1 o a un sujeto que tiene una deficiencia de ABCC6, un agente de ENPP1 a una dosis de aproximadamente 2,4 mg por kilogramo del sujeto para restaurar un nivel fisiológico de Pi y/o PPI en el plasma del sujeto. El nivel fisiológico de Pi y PPI en el suero humano (y en los mamíferos en general) es de 1-3 mM y 2-3  $\mu$ M, respectivamente.

En un aspecto, la descripción se refiere a un método para prevenir el avance o reducir la calcificación vascular en un sujeto con deficiencia de ENPP1 o en un sujeto que tiene una deficiencia de ABCC6, el método comprende: para evitar el avance o reducir la calcificación vascular en el sujeto, el método comprende: administrar al sujeto un agente de ENPP1 a una dosis de aproximadamente 2,4 mg por kilogramo del sujeto, para evitar el avance o reducir la calcificación vascular en el sujeto.

En un aspecto, la descripción se refiere a un método para prevenir el avance o reducir la calcificación patológica en un sujeto con deficiencia de ENPP1 o en un sujeto que tiene una deficiencia de ABCC6, el método comprende: administrar al sujeto un agente de ENPP1 a una dosis de aproximadamente 2,4 mg por kilogramo del sujeto, para evitar el avance o reducir la calcificación vascular en el sujeto.

En un aspecto, la descripción se refiere a un método para prevenir el avance o

reducir la calcificación tisular en un sujeto con deficiencia de ENPP1 o en un sujeto que tiene una deficiencia de ABCC6, el método comprende: administrar al sujeto un agente de ENPP1 a una dosis de aproximadamente 2,4 mg por kilogramo del sujeto, para evitar el avance o reducir la calcificación tisular en el sujeto.

En un aspecto, la descripción se refiere a un método para prevenir el avance o reducir la osificación patológica en un sujeto con deficiencia de ENPP1 o en un sujeto que tiene una deficiencia de ABCC6, el método comprende: administrar al sujeto un agente de ENPP1 a una dosis de aproximadamente 2,4 mg por kilogramo del sujeto, para evitar el avance o reducir la calcificación tisular en el sujeto.

En un aspecto, la descripción se refiere a un método para aumentar el pirofosfato circulante (PPi) en un sujeto con deficiencia de ENPP1 o en un sujeto que tiene una deficiencia de ABCC6, el método comprende: administrar al sujeto un agente de ENPP1 a una dosis de aproximadamente 2,4 mg por kilogramo del sujeto, para aumentar de ese modo el PPi circulante en el sujeto.

En un aspecto, la descripción se refiere a un método para aumentar la actividad de pirofosfatasa en un sujeto con deficiencia de ENPP1 o en un sujeto que tiene una deficiencia de ABCC6, el método comprende: administrar al sujeto un agente de ENPP1 a una dosis de aproximadamente 2,4 mg por kilogramo del sujeto, para aumentar de ese modo el PPi circulante en el sujeto.

En un aspecto, la descripción se refiere a un método para aliviar uno o más síntomas de la deficiencia de ENPP1 en un sujeto o uno o más síntomas de la deficiencia de ABCC6 en un sujeto, el método comprende: administrar al sujeto un agente de ENPP1 a una dosis de aproximadamente 2,4 mg por kilogramo del sujeto, para aliviar de ese modo uno o más síntomas de la deficiencia de ENPP1 o uno o más síntomas de la deficiencia de ABCC6 en el sujeto.

En un aspecto, la descripción se refiere a un método para tratar a un sujeto con

deficiencia de ENPP1 o a un sujeto que tiene una deficiencia de ABCC6, el método comprende: administrar al sujeto un agente de ENPP1 a una dosis de aproximadamente 2,4 mg por kilogramo del sujeto, para tratar de ese modo al sujeto.

En un aspecto, la descripción se refiere a métodos en los que la dosis administrada es aproximadamente 2,4 mg por kilogramo del sujeto.

En algunas modalidades, la descripción se refiere a métodos en los que la dosis administrada es 2,4 ( $\pm$  1-10 %) mg por kilogramo del sujeto. Por ejemplo, la dosis puede ser de 2,64 mg/kg (2,4 +10 % mg/kg), o 2,16 mg/kg (2,4-10 % mg/kg), o 2,52 mg/kg (2,4 + 5 % mg/kg), o 2,28 mg/kg (2,4-5 % mg/kg) o 2,424 mg/kg (2,4 + 1 % mg/kg) o 2,376 mg/kg (2,4 -1 % mg/kg) del sujeto.

En incluso otro aspecto, la descripción se refiere a un método para tratar a un sujeto con deficiencia de ENPP1 o a un sujeto con deficiencia de ABCC6, el método comprende administrar al sujeto un agente de ENPP1 en una cantidad eficaz para tratar, o de cualquier otra manera aliviar uno o más síntomas asociados con la deficiencia de ENPP1 del sujeto o la deficiencia de ABCC6 del sujeto.

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente, el sujeto puede ser, p. ej., uno que ha discontinuado (p. ej., al menos 14 días antes del tratamiento con el agente de ENPP1) el tratamiento con (o no está recibiendo en el momento del tratamiento con el agente de ENPP1) uno o más (o todos) de los siguientes: un bifosfonato, un anticuerpo anti-FGF23 o antagonista de FGF23, un calcimimético, un antiácido, un corticoide, o un supresor de PTH.

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente, el sujeto es uno que se ha tratado previamente con una o más estatinas y/o uno o más inhibidores de la proproteína convertasa subtilisina/kexina tipo 9 (PCSK9). Preferentemente, dicho pretratamiento incluye una dosificación y frecuencia coherentes de la una o más estatinas y/o uno o más inhibidores de PCSK9 durante 3 o

más años antes del tratamiento de acuerdo con los métodos descritos en la presente.

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente, al sujeto no se le ha diagnosticado una neoplasia maligna dentro de los 5 años previos al tratamiento de acuerdo con los métodos descritos en la presente, con la excepción de cánceres de piel no melanómicos y/o carcinoma cervical in situ.

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente, el agente de ENPP1 se administra al sujeto al menos una vez por semana.

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente, el agente de ENPP1 se administra al sujeto al menos dos veces por semana.

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente, el agente de ENPP1 se administra al sujeto una vez cada dos semanas.

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente, el agente de ENPP1 se administra al sujeto una vez cada tres semanas.

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente, el agente de ENPP1 se administra al sujeto una vez por mes.

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente, el agente de ENPP1 se administra al sujeto dos veces por mes o cada dos meses. En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente, el agente de ENPP1 se administra al sujeto al menos dos veces por semana después de una dosis inicial.

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente, el agente de ENPP1 se administra por vía subcutánea al sujeto.

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente, el agente de ENPP1 se autoadministra.

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la

presente, el agente de ENPP1 se administra al sujeto bajo un régimen de dosificación que comprende: (a) una dosis inicial de aproximadamente 2,4 mg por kilogramo del sujeto.

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente, la dosis inicial del agente de ENPP1 y la dosis de mantenimiento del agente de ENPP1 son la misma cantidad.

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente, el agente de ENPP1 administrado comprende el dominio catalítico de ENPP1.

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente, el agente de ENPP1 administrado comprende el dominio de nucleasa de ENPP1.

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente, el agente de ENPP1 administrado comprende el dominio extracelular de ENPP1.

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente, el agente de ENPP1 comprende los dominios catalíticos y de nucleasa de ENPP1.

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente, el agente de ENPP1 administrado comprende un resto heterólogo; el resto heterólogo puede ser un polipéptido.

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente, el resto heterólogo aumenta la semivida en circulación del agente de ENPP1 con relación a la semivida en circulación del agente de ENPP1 que carece del resto heterólogo.

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la

presente, el resto heterólogo comprende la región Fc de una molécula de inmunoglobulina; las moléculas de inmunoglobulina pueden ser una molécula de inmunoglobulina humana; la molécula de inmunoglobulina puede ser una IgG1.

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente, el resto heterólogo comprende albúmina; el resto heterólogo comprende albúmina sérica; el resto heterólogo comprende albúmina sérica humana.

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente, el agente de ENPP1 que comprende residuos de aminoácidos 99 (**PSCAKE**) a 925(**QED**) de SEQ ID NO:1.

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente, el agente de ENPP1 que comprende los residuos de aminoácidos 1 (**FTAGLKPS****CAKE**) a 833 (**QED**) de SEQ ID NO:3.

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente, el agente de ENPP1 que comprende la secuencia de aminoácidos ilustrada en la SEQ ID NO:2.

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente, el agente de ENPP1 que comprende la secuencia de aminoácidos ilustrada en la SEQ ID NO:3.

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente, el agente de ENPP1 que comprende la secuencia de aminoácidos ilustrada en la SEQ ID NO:4.

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente, el agente de ENPP1 que comprende la secuencia de aminoácidos ilustrada en la SEQ ID NO:5.

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente, el sujeto tiene o se sospecha que tiene calcificación arterial generalizada de

los lactantes (GACI).

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente, el sujeto tiene o se sospecha que tiene raquitismo hipofosfatémico autosómico recesivo tipo 2 (ARHR2).

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente, el sujeto tiene o se sospecha que tiene Pseudoxantoma elástico (PXE).

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente, el sujeto que tiene deficiencia de ABCC6 y presenta síntomas similares a un sujeto que tiene raquitismo hipofosfatémico autosómico recesivo tipo 2 (ARHR2) o calcificación arterial generalizada de los lactantes (GACI).

En un aspecto, la descripción se refiere a administrar a un sujeto que tiene calcificación patológica un agente de ENPP1 a una dosis de aproximadamente 2,4 mg por kilogramo del sujeto para restaurar un nivel fisiológico de Pi y/o PPi en el plasma del sujeto. El nivel fisiológico de Pi y PPi en el suero humano (y en los mamíferos en general) es de 1-3 mM y 2-3  $\mu$ M, respectivamente.

En un aspecto, la descripción se refiere a un método para prevenir el avance o reducir la calcificación vascular en un sujeto con calcificación patológica, el método comprende: para evitar el avance o reducir la calcificación vascular en el sujeto, el método comprende: administrar al sujeto un agente de ENPP1 a una dosis de aproximadamente 2,4 mg por kilogramo del sujeto, para evitar de ese modo el avance o reducir la calcificación vascular en el sujeto.

En un aspecto, la descripción se refiere a un método para prevenir el avance o reducir la calcificación patológica en un sujeto, el método comprende: administrar al sujeto un agente de ENPP1 a una dosis de aproximadamente 2,4 mg por kilogramo del sujeto, para evitar de ese modo el avance o reducir la calcificación patológica en el sujeto.

En un aspecto, la descripción se refiere a un método para prevenir el avance o reducir la calcificación tisular en un sujeto, el método comprende: administrar al sujeto un agente de ENPP1 a una dosis de aproximadamente 2,4 mg por kilogramo del sujeto, para evitar de ese modo el avance o reducir la calcificación tisular en el sujeto.

En un aspecto, la descripción se refiere a un método para prevenir el avance o reducir la osificación patológica en un sujeto, el método comprende: administrar al sujeto un agente de ENPP1 a una dosis de aproximadamente 2,4 mg por kilogramo del sujeto, para evitar de ese modo el avance o reducir la calcificación tisular en el sujeto.

En un aspecto, la descripción se refiere a un método para aumentar el pirofosfato circulante (PPI) en un sujeto con calcificación patológica, el método comprende: administrar al sujeto un agente de ENPP1 a una dosis de aproximadamente 2,4 mg por kilogramo del sujeto, para aumentar de ese modo el PPI circulante en el sujeto.

En un aspecto, la descripción se refiere a un método para aumentar la actividad de pirofosfatasa en un sujeto con calcificación patológica, el método comprende: administrar al sujeto un agente de ENPP1 a una dosis de aproximadamente 2,4 mg por kilogramo del sujeto, para aumentar de ese modo el PPI circulante en el sujeto.

En un aspecto, la descripción se refiere a un método para aliviar uno o más síntomas de la calcificación patológica en un sujeto, el método comprende: administrar al sujeto un agente de ENPP1 a una dosis de aproximadamente 2,4 mg por kilogramo del sujeto, para aliviar de ese modo uno o más síntomas de la calcificación patológica en el sujeto.

En un aspecto, la descripción se refiere a un método para tratar a un sujeto con calcificación patológica, el método comprende: administrar al sujeto un agente de

ENPP1 a una dosis de aproximadamente 2,4 mg por kilogramo del sujeto, para tratar de ese modo al sujeto.

En algunas modalidades, la descripción se refiere a métodos en los que la dosis administrada es 2,4 ( $\pm$  1-10 %) mg por kilogramo del sujeto. Por ejemplo, la dosis puede ser de 2,64 mg/kg (2,4 +10 % mg/kg), o 2,16 mg/kg (2,4-10 % mg/kg), o 2,52 mg/kg (2,4 + 5 % mg/kg), o 2,28 mg/kg (2,4-5 % mg/kg) o 2,424 mg/kg (2,4 + 1 % mg/kg) o 2,376 mg/kg (2,4 -1 % mg/kg) del sujeto.

En incluso otro aspecto, la descripción se refiere a un método para tratar a un sujeto con calcificación patológica, el método comprende administrar al sujeto un agente de ENPP1 en una cantidad eficaz para tratar, o de otro modo aliviar uno o más síntomas asociados con la calcificación patológica del sujeto.

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente, el sujeto puede ser, p. ej., uno que ha discontinuado (p. ej., al menos 14 días antes del tratamiento con el agente de ENPP1) el tratamiento con (o no está recibiendo en el momento del tratamiento con el agente de ENPP1) uno o más (o todos) de los siguientes: un bifosfonato, un anticuerpo anti-FGF23 o antagonista de FGF23, un calcimimético, un antiácido, un corticoide, o un supresor de PTH.

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente, el agente de ENPP1 se administra al sujeto al menos una vez por semana.

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente, el agente de ENPP1 se administra al sujeto al menos dos veces por semana.

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente, el agente de ENPP1 se administra al sujeto al menos una vez por mes.

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente, el agente de ENPP1 se administra al sujeto al menos dos veces por mes o

cada dos semanas.

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente, el agente de ENPP1 se administra al sujeto al menos tres veces por mes.

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente, el agente de ENPP1 se administra al sujeto al menos dos veces por semana después de una dosis inicial.

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente, el agente de ENPP1 se administra por vía subcutánea al sujeto.

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente, el agente de ENPP1 se autoadministra.

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente, el agente de ENPP1 se administra al sujeto bajo un régimen de dosificación que comprende: (a) una dosis inicial de aproximadamente 2,4 mg por kilogramo del sujeto y (b) aproximadamente siete días después de la dosis inicial, administración dos veces por semana de dosis de mantenimiento del agente de ENPP1 de aproximadamente 2,4 mg por kilogramo del sujeto.

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente, la dosis inicial del agente de ENPP1 y la dosis de mantenimiento del agente de ENPP1 son la misma cantidad.

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente, el agente de ENPP1 administrado comprende el dominio catalítico de ENPP1.

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente, el agente de ENPP1 administrado comprende el dominio de nucleasa de ENPP1.

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la

presente, el agente de ENPP1 administrado comprende el dominio extracelular de ENPP1.

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente, el agente de ENPP1 comprende los dominios catalíticos y de nucleasa de ENPP1.

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente, el agente de ENPP1 administrado comprende un resto heterólogo; el resto heterólogo puede ser un polipéptido.

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente, el resto heterólogo aumenta la semivida en circulación del agente de ENPP1 con relación a la semivida en circulación del agente de ENPP1 que carece del resto heterólogo.

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente, el resto heterólogo comprende la región Fc de una molécula de inmunoglobulina; las moléculas de inmunoglobulina pueden ser una molécula de inmunoglobulina humana; la molécula de inmunoglobulina puede ser una IgG1.

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente, el resto heterólogo comprende albúmina; el resto heterólogo comprende albúmina sérica; el resto heterólogo comprende albúmina sérica humana.

En un aspecto, el agente de ENPP1 descrito y los métodos de su uso se refieren a un agente de ENPP1 que comprende los residuos de aminoácidos 99 (PSCAKE) a 925 (QED) de la SEQ ID NO:1.

En un aspecto, el agente de ENPP1 descrito y los métodos de su uso se refieren a un agente de ENPP1 que comprende los residuos de aminoácidos 1 (FTAGLKPSAKE) a 833 (QED) de la SEQ ID NO:3.

En un aspecto, el agente de ENPP1 descrito y los métodos de su uso se

refieren a un agente de ENPP1 que comprende la secuencia de aminoácidos ilustrada en la SEQ ID NO:2.

En un aspecto, el agente de ENPP1 descrito y los métodos de su uso se refieren a un agente de ENPP1 que comprende la secuencia de aminoácidos ilustrada en la SEQ ID NO:3.

En un aspecto, el agente de ENPP1 descrito y los métodos de su uso se refieren a un agente de ENPP1 que comprende la secuencia de aminoácidos ilustrada en la SEQ ID NO:4.

En un aspecto, el agente de ENPP1 descrito y los métodos de su uso se refieren a un agente de ENPP1 que comprende la secuencia de aminoácidos ilustrada en la SEQ ID NO:5.

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente, el sujeto tiene o se sospecha que tiene enfermedades de calcificación patológica que no son la calcificación arterial generalizada de los lactantes (GACI).

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente, el sujeto tiene o se sospecha que tiene enfermedades de calcificación patológica que no son el raquitismo hipofosfatémico autosómico recesivo tipo 2 (ARHR2).

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente, el sujeto tiene o se sospecha que tiene enfermedades de calcificación patológica que no son pseudoxantoma elástico (PXE).

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente, el sujeto tiene o se sospecha que tiene uno o más de cálculos renales y vesicales, cálculos de la pulpa dental, cálculos biliares, cálculos en las glándulas salivales, prostatitis calculosa crónica, microlitos testiculares, calcificación en pacientes en hemodiálisis, aterosclerosis, malacoplasia, esclerodermia (esclerosis sistémica),

ARHR2, calcinosis cutis, estenosis aórtica calcificada, sinovitis y artritis, hiperostosis esquelética intersticial difusa, dermatomiositis juvenil, calcificación arterial generalizada del lactante (GACI), osificación del ligamento longitudinal posterior (OPLL), raquitismo hipofosfatémico, artrosis, calcificación de placas ateroscleróticas, enfermedad renal crónica (CKD), enfermedad renal en etapa terminal (ESRD), pseudoxantoma elástico (PXE), espondilitis anquilosante, endurecimiento de las arterias, calcifilaxia, y el lupus sistémico erimatoso.

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente, el sujeto se caracteriza por uno o más de los criterios de inclusión descritos en la presente. Por ejemplo, un sujeto descrito en la presente descripción puede tener una concentración de PPI en plasma de menos de aproximadamente 1300nM, p. ej., antes del tratamiento con un agente de ENPP1. En algunas modalidades, el sujeto no se caracteriza por ninguno de los criterios de exclusión descritos en la presente. Por ejemplo, el sujeto puede ser uno que no tenga enfermedad ocular avanzada antes del tratamiento con un agente de ENPP1 o durante este. En algunas modalidades, el sujeto no tiene enfermedad ocular avanzada que requiere tratamiento anti-VEGF (por ejemplo) antes o durante el tratamiento con un agente de ENPP1.

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente, el sujeto no presenta eventos adversos después de la administración de dicha dosis. En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente, el sujeto presenta niveles bajos de anticuerpo antifármaco (ADA) después de la administración de dicha dosis. En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente, el sujeto, después de la administración de dicha dosis, presenta niveles de PPI que son iguales o mayores que los niveles de PPI de un individuo sano.

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la

presente, el sujeto es humano.

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente, el sujeto es un niño de 1-12 años.

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente, el sujeto es un niño que tiene una edad que es mayor o igual a 1 pero menor que 13.

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente, el sujeto no es un lactante.

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente, el sujeto no es un adulto.

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente, el sujeto no es un niño de menos de 1 año.

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente, el sujeto no se diagnosticó con deficiencia de ENPP1.

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente, el sujeto no se diagnosticó con deficiencia de ABCC6.

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente, el sujeto se diagnosticó con deficiencia de ENPP1.

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente, el sujeto se diagnosticó con deficiencia de ABCC6.

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente, el sujeto tiene una de deficiencia de ENPP1 o deficiencia de ABCC6.

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos descritos en la presente, el sujeto no tiene deficiencia de ENPP1 ni deficiencia de ABCC6.

## **DESCRIPCIÓN**

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

El archivo de solicitud o patente contiene al menos un dibujo en color. La Oficina proporcionará copias de esta patente o publicación de solicitud de patente con dibujos a color a pedido y mediante el pago de la tarifa necesaria.

La **Figura 1** presenta una descripción general esquemática de la deficiencia de ENPP1.

La **Figura 2** muestra la secuencia completa de aminoácidos sin procesar de la proteína precursora de ENPP1 natural (SEQ ID NO: 1). Las regiones citosólica y transmembrana están subrayadas. Los posibles sitios de N-glucosilación están en negrita. PSCAKE (residuos 99-104; en recuadro) es el inicio de la porción de proteína ENPP1 soluble que incluye SMB1 (residuos 104-144) y SMB2 (residuos 145-189).

La **Figura 3** ilustra determinados dominios de ENPP1 humana.

La **Figura 4** muestra la secuencia de aminoácidos de un polipéptido ENPP1 natural soluble (SEQ ID NO: 2).

La **Figura 5A** y la **Figura 5B** muestran una alineación de secuencias múltiples de varios polipéptidos ENPP1 solubles en vertebrados y polipéptido ENPP1 soluble humano (SEQ ID NO: 1 y 7-10). Los diversos polipéptidos ENPP1 solubles corresponden a las siguientes especies y representan regiones del número de registro del NCBI específico: Ratón (registro NCBI NP\_001295256.1; SEQ ID NO:7), Vaca (registro NCBI NP\_001193141; SEQ ID NO: 8), Conejo (registro NCBI NP\_001162404.1; SEQ ID NO:9), Humano (registro NCBI NP\_006199.2; SEQ ID NO: 1) y babuino (registro NCBI NP\_001076211.2, SEQ ID NO: 10).

La **Figura 6** presenta una descripción general esquemática de la deficiencia de ABCC6.

## DEFINICIONES

Los términos usados en esta descripción generalmente tienen sus significados

ordinarios en la técnica, dentro del contexto de esta descripción y en el contexto específico donde se usa cada término. Ciertos términos se discuten más adelante o en cualquier otra parte en la descripción, para proporcionar orientación adicional al profesional en la descripción de las composiciones y métodos de la descripción y cómo fabricarlos y usarlos. El alcance o significado de cualquier uso de un término será evidente a partir del contexto específico en el que se utiliza el término.

Una “*deficiencia de ENPP1*” se caracteriza por un nivel reducido de actividad enzimática de ENPP1 en suero o plasma de un sujeto. La deficiencia de ENPP1 es un trastorno genético raro causado por mutaciones inactivadoras en el gen *ENPP1* que codifica la enzima ENPP1. ENPP1 es una proteína transmembranaria integral cuyos dominios extracelulares portan actividades de pirofosfatasa y fosfodiesterasa. ENPP1 convierte el ATP extracelular en pirofosfato inorgánico (PPi) y AMP. La deficiencia de ENPP1 es un trastorno genético ultrarraro con una incidencia de 1 en 64.000 embarazos.

La deficiencia de ENPP1 causa hipopirofosfatemia e hipoadenosinemia que, a su vez, conduce a la calcificación ectópica (especialmente arterial) (descrita en la bibliografía como Calcificación arterial generalizada de los lactantes [Generalized Arterial Calcification of Infancy, GACI]), disfunción esquelética secundaria al raquitismo y osteomalacia (descrita en la bibliografía como Raquitismo autosómico recesivo hipofosfatémico 2 [ARHR2]) y proliferación neointimal oclusiva. Más allá de las intervenciones sintomáticas y paliativas, no existe terapia dirigida para esta enfermedad. Por lo tanto, la deficiencia de ENPP1 tiene una gran necesidad médica insatisfecha. Los lactantes con deficiencia de ENPP1 tienen una alta mortalidad en los primeros 0 a 6 meses de vida, y los niños de 1-12 años y adultos con deficiencia de ENPP1 experimentan un riesgo continuo de calcificación y disfunción de órganos, raquitismo debilitante que progresa a osteomalacia en la edad adulta con dolor óseo y

articular grave, fatiga, debilidad muscular y fracturas óseas repetidas, todos síntomas que conducen a una mala calidad de vida y funcionalidad. La hipopirofosfatemia provoca un aumento reactivo en el factor de crecimiento de fibroblastos 23 (FGF23) que provoca hiperfosfaturia (el “eje bioquímico” de la deficiencia de ENPP1), una característica esencial en la patofisiología de la deficiencia de ENPP1.

La deficiencia de ENPP1 se caracteriza bioquímicamente por niveles bajos de PPi en plasma y se caracteriza clínicamente por la calcificación vascular en lactantes (fenotipo tipo GACI) y raquitismo (fenotipo ARHR2) después de la lactancia y la proliferación de la íntima. GACI (calcificación arterial generalizada en lactantes), es una enfermedad grave que se produce en infantes y que implica la calcificación arterial extensiva (*Albright, et al., 2015, Nature Comm. 10006*).

La actividad enzimática reducida de la ENPP1 puede producirse a través de una reducción en la cantidad de enzima ENPP1 presente en suero o plasma de un sujeto en relación con la cantidad de enzima ENPP1 presente en suero o plasma de un sujeto normal. y/o una reducción en el nivel de actividad enzimática de la ENPP1 detectada en suero o plasma de un sujeto en relación con el nivel de actividad enzimática de la ENPP1 detectada en un sujeto normal, y/o a través de un defecto en la expresión del gen ENPP1 en los niveles transcripcionales (ARN y/o ARNm) o traduccionales, por ejemplo, a través de un defecto en el gen ENPP1 o un elemento de control que afecta la expresión del gen ENPP1, en relación con la expresión normal del gen ENPP1 en un sujeto. La actividad enzimática de ENPP1 se define a continuación.

“*Enzimáticamente activo*” con respecto a un polipéptido de ENPP1 o, como se usa en la presente, “actividad enzimática” con respecto a un polipéptido de ENPP1, se define por poseer actividad hidrolítica de ATP hacia AMP y PPi y/o hidrólisis de AP3a a ATP. NPP1 hidroliza fácilmente el ATP en AMP y PPi. Las constantes enzimáticas de

Michaelis-Menten en estado estacionario de NPP1 se determinan utilizando ATP como sustrato. Se puede demostrar que NPP1 escinde el ATP mediante el análisis por HPLC de la reacción enzimática, y la identidad de los sustratos y productos de la reacción se confirman mediante el uso de estándares de ATP, AMP y ADP. El sustrato de ATP se degrada con el tiempo en presencia de NPP1, con la acumulación del producto enzimático AMP. Usando concentraciones variables de sustrato de ATP, las velocidades iniciales del NPP1 se derivan en presencia de ATP, y los datos se ajustan a una curva para derivar las constantes de velocidad enzimática. A un pH fisiológico, las constantes de velocidad cinética de NPP1 son  $K_m=144 \mu\text{M}$  y  $k_{cat}=7,8 \text{ s}^{-1}$ .

Como se usa en la presente, el término “*niveles de pirofosfato en plasma (PPi)*” se refiere a la cantidad de pirofosfato presente en el plasma de animales. En determinadas modalidades, los animales incluyen ratas, ratones, gatos, perros, humanos, vacas y caballos. Es necesario medir el PPi en el plasma en lugar de en el suero debido a la liberación desde las plaquetas. Existen varias formas de medir el PPi, una de ellas es mediante un ensayo enzimático utilizando pirofosforilasa de uridina-difosfoglucosa (UDPG, por sus siglas en inglés) (*Lust & Seegmiller, 1976, Clin. Chim. Acta 66:241-249; Cheung & Suhadolnik, 1977, Anal. Biochem. 83:61-63*) con modificaciones.

Por lo general, los niveles de PPi en plasma en sujetos humanos sanos oscilan entre aproximadamente  $1 \mu\text{M}$  y aproximadamente  $3 \mu\text{M}$ , en algunos casos entre  $1-2 \mu\text{M}$ . Un nivel normal de ENPP1 en plasma se refiere a la cantidad de proteína ENPP1 necesaria para mantener un nivel normal de pirofosfato en plasma (PPi) en un sujeto sano. Un nivel normal de PPi en seres humanos sanos corresponde a  $2-3 \mu\text{M}$ . Los sujetos con deficiencia de ENPP1 presentan niveles bajos de PPi que oscilan entre al menos 10 % por debajo de los niveles normales, al menos 20 % por debajo de los niveles normales, al menos 30 % por debajo de los niveles normales, al menos 40 %

por debajo de los niveles normales, al menos 50 % por debajo de los niveles normales, al menos 60 % por debajo de los niveles normales, al menos 70 % por debajo de los niveles normales, al menos 80 % por debajo de los niveles normales y combinaciones de estos. En los pacientes afectados por GACI, se observa que los niveles de PPI son inferiores a 1  $\mu\text{m}$  y, en algunos casos, se encuentran por debajo de un nivel detectable. En pacientes afectados por PXE, los niveles de PPI están por debajo de 0,5  $\mu\text{m}$ . (*Arterioscler Thromb Vasc Biol. Septiembre de 2014;34(9):1985-9; Braddock et al., Nat Commun. 2015; 6: 10006.*)

Una “deficiencia de ABCC6” puede indicarse de varias maneras, por ejemplo, por una reducción de los niveles de expresión de la enzima ABCC6 en un sujeto. Los sujetos con deficiencia de ABCC6 pueden identificarse por la presencia de uno o más síntomas fisiológicos tales como calcificación ocular, calcificación de la piel, pápulas amarillas, estrías angioides, deterioro visual, calcificación de tejidos conjuntivos blandos, incluido el sistema cardiovascular, y/o la presencia de mutaciones de ABCC6 que afectan la actividad y la expresión de la proteína ABCC6. Los detalles sobre el diagnóstico y la clasificación de las mutaciones de ABCC6 se conocen en la técnica. (*Expert Opin Orphan Drugs. 2014 Jun 1; 2(6): 567–577*).

La deficiencia de ABCC6 puede provocar PXE. La actividad enzimática reducida de la ABCC6 puede producirse a través de una reducción en la cantidad de enzima ABCC6 presente en un sujeto en relación con la cantidad de enzima ABCC6 presente en un sujeto normal. y/o una reducción en el nivel de actividad enzimática de la ABCC6 en un sujeto en relación con el nivel de actividad enzimática de la ABCC6 detectada en un sujeto normal, y/o a través de un defecto en la expresión del gen ABCC6 en los niveles transcripcionales (ARN y/o ARNm) o traduccionales, por ejemplo, a través de un defecto en el gen ABCC6 o un elemento de control que afecta la expresión del gen ABCC6, en relación con la expresión normal del gen ABCC6 en

un sujeto.

Un sujeto con deficiencia de ABCC6 puede identificarse mediante cribado de mutaciones del gen ABCC6. Varios métodos para detectar mutaciones genéticas se conocen en la técnica. Por ejemplo, la detección de la mutación en los genes ABCC6 puede realizarse siguiendo los protocolos descritos en J Med Genet. Octubre de 2007; 44(10): 621-628. (*Mutation detection in the ABCC6 gene and genotype–phenotype analysis in a large international case series affected by pseudoxanthoma elasticum, Ellen G Pfendner, et al*)

*“Paciente con deficiencia de ABCC6”* o *“sujeto con deficiencia de ABCC6”* como se usa en la presente, se refiere a un paciente que tiene al menos una mutación patogénica en el gen ABCC6 que afecta la actividad y/o expresión de la proteína ABC66.

*“Calcificación patológica”*: Como se usa en la presente, el término se refiere al depósito anormal de sales de calcio en tejidos blandos, pasajes secretores y excretores del cuerpo que los hacen endurecerse. Hay dos tipos: la calcificación distrófica que se produce en el tejido moribundo y muerto, y la calcificación metastásica, que eleva los niveles extracelulares de calcio (hipercalcemia), excediendo la capacidad homeostática de las células y los tejidos. La calcificación puede involucrar células, así como componentes de la matriz extracelular, como el colágeno, en las membranas basales y las fibras elásticas en las paredes arteriales. Algunos ejemplos de tejidos propensos a la calcificación incluyen: mucosa gástrica: el recubrimiento epitelial interno del estómago, los riñones y los pulmones, la córnea, las arterias sistémicas y las venas pulmonares.

*“Osificación patológica”*: Como se usa en la presente, el término se refiere a una afección patológica en la que surgen huesos en tejidos que no están en el sistema óseo y en tejidos conjuntivos que generalmente no manifiestan propiedades

osteogénicas. La osificación se clasifica en tres tipos dependiendo de la naturaleza del tejido u órgano afectado, la osificación endocondral es la osificación que se produce en el cartílago y lo reemplaza. La osificación intramembranosa es la osificación del hueso que se produce en el tejido conjuntivo y lo reemplaza. La osificación metaplásica es el desarrollo de una sustancia ósea en estructuras corporales normalmente blandas, también denominada osificación heterotrófica.

Una “*deficiencia*” de NPP1 se refiere a una afección en la que el sujeto tiene un nivel menor o igual a 5 %-10 % de los niveles normales de NPP1 en el plasma sanguíneo. Los niveles normales de NPP1 en sujetos humanos sanos son de aproximadamente entre 10 y 30 ng/ml. (Am J Pathol. 2001 Feb; 158(2): 543–554.)

Una “*deficiencia*” de ABCC6 se refiere a una afección en la que el sujeto tiene un nivel menor o igual a 5 %-10 % de los niveles normales de expresión de ABCC6. La proteína ABCC6 se expresa en el hígado y los niveles de la proteína ABCC6 se pueden medir mediante biopsia hepática.

Un nivel “bajo” de PPI se refiere a una afección en la que el sujeto tiene un nivel menor o igual a 2 %-5 % de los niveles normales de pirofosfato en plasma (PPI). Los niveles normales de PPI en plasma en sujetos humanos sanos son de aproximadamente 1,8 a 2,6  $\mu\text{M}$ . (Arthritis and Rheumatism, Vol. 22, Núm. 8 (Agosto de 1979))

“*Calcificación ectópica*” se refiere a una afección caracterizada por un depósito patológico de sales de calcio en tejidos o crecimiento óseo en tejidos blandos.

“*Calcificación ectópica de tejidos blandos*” se refiere a la biomineralización inadecuada, compuesta típicamente de fosfato de calcio, hidroxapatita, oxalatos de calcio y fosfatos de octacalcio que ocurren en tejidos blandos, lo que conduce a la pérdida de endurecimiento de tejidos blandos. La “calcificación arterial” se refiere a la calcificación ectópica que se produce en las arterias y las válvulas cardíacas, que

provoca el endurecimiento o el estrechamiento de las arterias. La calcificación en las arterias se correlaciona con la carga de placa aterosclerótica y el aumento del riesgo de infarto de miocardio, el aumento de episodios isquémicos en la enfermedad vascular periférica y el aumento del riesgo de disección después de la angioplastia.

“*Calcificación venosa*” se refiere a la calcificación ectópica que se produce en las venas que reduce la elasticidad de las venas y restringe el flujo sanguíneo que puede entonces llevar a un aumento de la presión arterial y defectos coronarios.

“*Calcificación vascular*” se refiere al depósito patológico de minerales en el sistema vascular. Tiene una variedad de formas, incluida la calcificación de la íntima y la calcificación medial, pero también puede encontrarse en las válvulas del corazón. La calcificación vascular se asocia con la aterosclerosis, la diabetes, ciertas afecciones hereditarias y la enfermedad renal, especialmente la nefropatía crónica. Los pacientes con calcificación vascular tienen un mayor riesgo de sufrir eventos cardiovasculares adversos. La calcificación vascular afecta a una amplia variedad de pacientes. La calcificación arterial infantil idiopática es una forma poco frecuente de calcificación vascular en la que las arterias de los neonatos se calcifican.

“*Calcificación del cerebro*” (BC, por sus siglas en inglés) se refiere a una neuropatología no específica en donde se produce el depósito de calcio y otros minerales en las paredes de los vasos sanguíneos y el parénquima tisular y conduce a la muerte neuronal y la gliosis. La calcificación del cerebro se asocia a menudo con varios trastornos cerebrales crónicos y agudos, incluido el síndrome de Down, la demencia con cuerpos de Lewy, la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la demencia vascular, los tumores cerebrales y varias afecciones endocrinológicas.

La calcificación del tejido cardíaco se refiere a la acumulación de depósitos de calcio (posiblemente incluidos otros minerales) en los tejidos del corazón, como el

tejido de la aorta y el tejido coronario.

*“Enfermedad renal crónica (CKD)”*. Como se usa en la presente, el término se refiere a anomalías de la estructura o función del riñón que persisten durante más de tres meses con implicaciones para la salud. En general, las funciones excretoras, endocrinas y metabólicas disminuyen juntas en la mayoría de las enfermedades renales crónicas. La enfermedad cardiovascular es la causa más frecuente de muerte en pacientes con enfermedad renal crónica (CKD) y la calcificación vascular es uno de los factores de predicción más fuertes del riesgo cardiovascular. Con la disminución de la función renal, la prevalencia de la calcificación vascular aumenta y la calcificación ocurre años antes en pacientes con CKD que en la población general. La prevención, reducción y/o reversión de la calcificación vascular puede aumentar la supervivencia de los pacientes con CKD.

Los síntomas clínicos de las enfermedades renales crónicas incluyen picazón, calambres musculares, náuseas, falta de apetito, hinchazón de los pies y tobillos, falta de sueño y dificultad para respirar. La enfermedad renal crónica, si no se trata, tiende a avanzar a enfermedad renal en etapa terminal (ESRD). Los síntomas frecuentes de la ESRD incluyen incapacidad para orinar, fatiga, malestar general, pérdida de peso, dolor óseo, cambios en el color de la piel, formación frecuente de hematomas y edema de las extremidades externas, como los dedos de las manos, los de pies, las manos y las piernas. La calcifilaxia o la arteriopatía urémica calcificada (CUA) es una afección que provoca la acumulación de calcio dentro de los vasos sanguíneos de la grasa y la piel. Una subpoblación de pacientes con ESRD también puede desarrollar calcifilaxia. Los síntomas frecuentes de la calcifilaxia incluyen grandes patrones similares a una red morada en la piel, bultos profundos y dolorosos que se ulceran y crean úlceras abiertas con costras de color marrón-negro que no cicatrizan, lesiones en la piel de las extremidades inferiores o áreas con mayor contenido de grasa, como muslos, senos,

glúteos y abdomen. Una persona con calcifilaxis puede tener niveles de calcio (hipercalcemia) y fosfato (hiperfosfatemia) más altos de lo normal en la sangre. También pueden tener síntomas de hiperparatiroidismo. El hiperparatiroidismo se produce cuando las glándulas paratiroides producen un exceso de hormona paratiroidea (PTH). La reducción de los niveles de pirofosfato en plasma (PPI) también está presente en la calcificación vascular asociada con la enfermedad renal en etapa terminal (ESRD).

Las calcificaciones vasculares asociadas con la ESRD contribuyen a resultados deficientes al aumentar la presión del pulso, causar o exacerbar la hipertensión e inducir o intensificar infartos de miocardio y accidentes cerebrovasculares. La mayoría de los pacientes con ESRD no mueren por insuficiencia renal, sino por complicaciones cardiovasculares de la ESRD, y es importante destacar que muchos pacientes muy jóvenes con ESRD en diálisis tienen calcificaciones de la arteria coronaria. El subtipo histológico de calcificación vascular asociado con la CKD se conoce como esclerosis de Mönckeberg, que es una forma de endurecimiento de los vasos en la que se encuentran depósitos de calcio en las capas musculares de la pared vascular media. Esta forma de calcificación es histológicamente distinta de la calcificación de la pared vascular intimal o neointimal que se observa comúnmente en la aterosclerosis, pero idéntica a las calcificaciones vasculares observadas en pacientes humanos con CKD, y en los modelos en roedores de la enfermedad descrita en la presente.

*“Calcificación arterial generalizada en lactantes (GACI)” (también conocida como IACI)”,* como se usa en la presente, se refiere a un trastorno que afecta el sistema circulatorio que se hace evidente antes del nacimiento o dentro de los primeros meses de vida. Se caracteriza por la acumulación anómala de calcio mineral (calcificación) en las paredes de los vasos sanguíneos que transportan sangre desde el corazón al resto del cuerpo (las arterias). La calcificación suele producirse junto con

el engrosamiento del revestimiento de las paredes arteriales (la íntima). Estos cambios provocan el estrechamiento (estenosis) y la rigidez de las arterias, lo que fuerza al corazón a trabajar más para bombear sangre. Como resultado, la insuficiencia cardíaca puede desarrollarse en personas afectadas, con signos y síntomas que incluyen dificultad para respirar, acumulación de líquido (edema) en las extremidades, aspecto azulado de la piel o los labios (cianosis), presión arterial alta grave (hipertensión) y agrandamiento del corazón (cardiomegalia). Las personas con GACI también pueden tener calcificación en otros órganos y tejidos, especialmente alrededor de las articulaciones. Además, pueden tener pérdida de la audición o ablandamiento y debilitamiento de los huesos, lo que se conoce como raquitismo.

Calcificación arterial general (GACI) o Calcificación arterial infantil idiopática (IIAC) caracterizada por la acumulación anormal del calcio mineral (calcificación) en las paredes de los vasos sanguíneos que transportan sangre desde el corazón al resto del cuerpo (las arterias). La calcificación suele producirse junto con el engrosamiento del revestimiento de las paredes arteriales (la íntima). Estos cambios provocan el estrechamiento (estenosis) y la rigidez de las arterias, lo que fuerza al corazón a trabajar más para bombear sangre. Como resultado, la insuficiencia cardíaca puede desarrollarse en personas afectadas, con signos y síntomas que incluyen dificultad para respirar, acumulación de líquido (edema) en las extremidades, aspecto azulado de la piel o los labios (cianosis), presión arterial alta grave (hipertensión) y agrandamiento del corazón (cardiomegalia).

El término “*lactante*” como se usa en la presente se refiere a un niño humano en su primer año de vida. Por lo general, la etapa infantil se refiere a la edad entre los 0 y los 12 meses.

“*Calcificación arterial*” o “*Calcificación vascular*” o “*endurecimiento de las arterias*”, como se usa en la presente, el término se refiere a un proceso caracterizado

por engrosamiento y pérdida de elasticidad de las paredes de las arterias musculares. El engrosamiento y la pérdida de elasticidad se producen en dos sitios distintos, las capas íntima y media de las vasculaturas (calcificación vascular media). La calcificación de la íntima se asocia con placas ateroscleróticas, y la calcificación media se caracteriza por rigidez vascular y arteriosclerosis. Esto provoca una reducción de la elasticidad arterial y una mayor propensión a la morbilidad y mortalidad debido al deterioro de la hemodinámica del sistema cardiovascular.

*“Trastornos del hueso mineral (MBD)”*, como se usa en la presente, el término se refiere a un trastorno caracterizado por niveles hormonales anormales que provocan que los niveles de calcio y fósforo en la sangre de una persona estén desbalanceados. El trastorno mineral y óseo suele producirse en personas con CKD y afecta a la mayoría de las personas con insuficiencia renal que reciben diálisis.

La osteopenia es una afección ósea que se caracteriza por una disminución de la densidad ósea, lo que provoca un debilitamiento óseo y un mayor riesgo de fracturas óseas. La osteomalacia es un trastorno óseo caracterizado por una disminución de la mineralización del hueso recién formado. La osteomalacia es causada por una deficiencia grave de vitamina D (que puede ser nutricional o causada por un síndrome hereditario) y por afecciones que causan niveles muy bajos de fosfato en sangre. Tanto la osteomalacia como la osteopenia aumentan el riesgo de fractura de hueso. Los síntomas de la osteomalacia incluyen dolor óseo y debilidad muscular, sensibilidad ósea, dificultad para caminar y espasmos musculares.

*“Osteopenia relacionada con la edad”*, como se usa en la presente, se refiere a una afección en la que la densidad mineral ósea es inferior a la normal. En general, los pacientes con osteopenia tienen un puntaje T de densidad mineral ósea de entre -1,0 y -2,5. La osteopenia, si no se trata, avanza hacia la osteoporosis, donde los huesos se vuelven frágiles y son extremadamente propensos a fracturas.

*“Osificación del ligamento longitudinal posterior (OPLL)”*, como se usa en la presente, el término se refiere a una afección hiperostótica (crecimiento óseo excesivo) que da como resultado la calcificación ectópica del ligamento longitudinal posterior. El ligamento longitudinal posterior conecta y estabiliza los huesos de la columna vertebral. El ligamento engrosado o calcificado puede comprimir la médula espinal y producir mielopatía. Los síntomas de la mielopatía incluyen dificultad para caminar y dificultad para controlar el intestino y la vejiga. La OPLL también puede causar radiculopatía o compresión de una raíz nerviosa. Los síntomas de la radiculopatía cervical incluyen dolor, hormigueo o adormecimiento en el cuello, el hombro, el brazo o la mano.

Los signos y síntomas clínicos causados por OPLL se categorizan como: (1) mielopatía, o una lesión de la médula espinal con alteraciones motoras y sensoriales de las extremidades superiores e inferiores, espasticidad y disfunción vesical; (2) radiculopatía cervical, con dolor y alteraciones sensoriales de las extremidades superiores; y (3) molestia axial, con dolor y rigidez alrededor del cuello. Los síntomas más frecuentes en las primeras etapas de OPLL incluyen disestesia y sensación de hormigueo en las manos, y torpeza. Con el avance de los déficits neurológicos, pueden aparecer síntomas en las extremidades inferiores, como alteraciones de la marcha. La OPLL se detecta en las radiografías simples laterales, y el diagnóstico y los detalles morfológicos de la OPLL cervical se han demostrado claramente mediante resonancia magnética (RM) y tomografía computarizada (TC).

*“Pseudoxantoma elástico (PXE)”*, como se usa en la presente, el término se refiere a un trastorno progresivo que se caracteriza por la acumulación de depósitos de calcio y otros minerales (mineralización) en fibras elásticas. Las fibras elásticas son un componente del tejido conjuntivo, que proporciona fuerza y flexibilidad a las estructuras de todo el cuerpo. En el PXE, la mineralización puede afectar las fibras

elásticas de la piel, los ojos y los vasos sanguíneos, y con menos frecuencia en otras áreas, como el tracto digestivo. Las personas con PXE pueden tener protuberancias amarillentas llamadas pápulas en el cuello, las axilas y otras áreas de la piel que se tocan cuando una articulación se dobla. La mineralización de los vasos sanguíneos que transportan sangre desde el corazón al resto del cuerpo (arterias) puede causar otros signos y síntomas de PXE. Por ejemplo, las personas con esta afección pueden desarrollar un estrechamiento de las arterias (arteriosclerosis) o una afección llamada claudicación que se caracteriza por calambres y dolor durante el ejercicio debido a la disminución del flujo sanguíneo a los brazos y las piernas.

El pseudoxantoma elástico (PXE), también conocido como síndrome de Grönblad-Strandberg, es una enfermedad genética que causa fragmentación y mineralización de fibras elásticas en algunos tejidos. Los problemas más frecuentes surgen en la piel y los ojos, y más adelante en los vasos sanguíneos en forma de aterosclerosis prematura. El PXE es causado por mutaciones autosómicas recesivas en el gen ABCC6 en el brazo corto del cromosoma 16 (16p13.1). En algunos casos, una parte de los lactantes sobrevive al GACI y termina desarrollando pseudoxantoma elástico (PXE) cuando crecen hasta convertirse en adultos. El PXE se caracteriza por la acumulación de calcio y otros minerales (mineralización) en las fibras elásticas, que son un componente del tejido conjuntivo. El tejido conjuntivo proporciona fuerza y flexibilidad a las estructuras de todo el cuerpo. Las características del PXE que también se producen en GACI incluyen protuberancias amarillentas llamadas pápulas en las axilas y otras áreas de la piel que se tocan cuando una articulación se dobla (áreas flexoras), estenosis arterial y anomalías llamadas estrías angioides que afectan el tejido de la parte posterior del ojo (hemorragia retiniana), que se detecta durante un examen ocular.

*“Enfermedad renal en etapa terminal (ESRD), como se usa en la presente, el*

término se refiere a una etapa avanzada de la enfermedad renal crónica donde los riñones del paciente ya no son funcionales. Los síntomas frecuentes incluyen fatiga asociada con anemia (bajo nivel de hierro en sangre), disminución del apetito, náuseas, vómitos, valores de laboratorio anormales que incluyen aumento del potasio, anomalías en las hormonas relacionadas con la salud ósea, aumento del fósforo y/o disminución del calcio, presión arterial alta (hipertensión), hinchazón de las manos/las piernas/los ojos/la parte inferior de la espalda (sacro) y falta de aire.

*“Arteriopatía urémica calcificada (CUA)” o “Calcifilaxis”,* como se usa en la presente, se refiere a una afección con alta morbilidad y mortalidad observada en pacientes con enfermedad renal, especialmente en aquellos con enfermedad renal en etapa terminal (ESRD). Se caracteriza por la calcificación de los vasos sanguíneos pequeños ubicados dentro del tejido adiposo y las capas más profundas de la piel que provocan coágulos de sangre, y la muerte de las células de la piel debido a la reducción del flujo sanguíneo causada por la calcificación excesiva.

*“Riaquitismo hipofosfatémico”,* como se usa en la presente, se refiere a un trastorno en el que los huesos se vuelven blandos y se doblan fácilmente, debido a los bajos niveles de fosfato en la sangre. Los síntomas generalmente comienzan en la primera infancia y pueden variar en gravedad, desde arqueamiento de las piernas, deformidades óseas, dolor óseo, dolor articular, crecimiento óseo deficiente y estatura baja.

*“Raquitismo hipofosfatémico hereditario”* como se usa en la presente se refiere a un trastorno relacionado con niveles bajos de fosfato en la sangre (hipofosfatemia). El fosfato es un mineral esencial para la formación normal de huesos y dientes. Con mayor frecuencia, es causado por una mutación en el gen PHEX. Otros genes que pueden ser responsables de la afección incluyen los genes CLCN5, DMP1, ENPP1, FGF23 y SLC34A3. Otros signos y síntomas del *raquitismo hipofosfatémico hereditario*

pueden incluir la fusión prematura de los huesos del cráneo (cranosinostosis) y anomalías dentales. El trastorno también puede causar un crecimiento óseo anómalo donde los ligamentos y los tendones se unen a las articulaciones (entesopatía). En los adultos, la hipofosfatemia se caracteriza por un ablandamiento de los huesos conocido como osteomalacia. Otro tipo raro de trastorno se conoce como *raquitismo hipofosfatémico hereditario con hipercalciuria (HHRH)* en donde, además de la hipofosfatemia, esta afección se caracteriza por la excreción de altos niveles de calcio en la orina (hipercalciuria).

*“Hipofosfatemia ligada al cromosoma X (XLH)”*, como se usa en la presente, el término hipofosfatemia ligada al cromosoma X (XLH), también denominada raquitismo hipofosfatémico dominante ligado al cromosoma X, u raquitismo resistente a la vitamina D ligado al cromosoma X, es una forma dominante ligada al cromosoma X de raquitismo (u osteomalacia) que difiere de la mayoría de los casos de raquitismo en que el suplemento de vitamina D no lo cura. Puede causar deformidades óseas, como estatura baja y rodilla vara (piernas arqueadas). Se asocia con una mutación en la secuencia del gen PHEX (Xp.22) y la posterior inactividad de la proteína PHEX.

*“Raquitismo hipofosfatémico autosómico recesivo tipo 2 (ARHR2)”*, como se usa en la presente, el término se refiere a un trastorno hereditario de disminución de fosfato renal caracterizado por hipofosfatemia, raquitismo y/u osteomalacia y crecimiento lento. El raquitismo hipofosfatémico autosómico recesivo de tipo 2 (ARHR2) es causado por una mutación de pérdida de función homocigota en el gen ENPP1.

*“Raquitismo hipofosfatémico autosómico dominante (ADHR)”*, como se usa en la presente, se refiere a una enfermedad hereditaria poco frecuente en la que la pérdida excesiva de fosfato en la orina conduce a huesos mal formados (raquitismo), dolor óseo, y abscesos dentales. ADHR es causada por una mutación en el factor de

crecimiento de fibroblastos 23 (FGF23). ADHR se caracteriza por una mineralización deficiente del hueso, el raquitismo y/o la osteomalacia, niveles suprimidos de calcitriol (1, 25-dihidroxitamina D3), disminución de fosfato renal y bajo nivel de fosfato en suero. Las mutaciones en el FGF23 hacen que la proteína sea más estable y no escindible por las proteasas, lo que aumenta la bioactividad del FGF23. La actividad aumentada de los mutantes del FGF23 reduce la expresión de los cotransportadores de sodio-fosfato, NPT2a y NPT2c, en la superficie apical de las células de los túbulos renales proximales, lo que provoca la disminución del fosfato renal.

El raquitismo hipofosfatémico (anteriormente denominado raquitismo resistente a la vitamina D) es un trastorno en el que los huesos se vuelven dolorosamente blandos y se doblan con facilidad, debido a los bajos niveles de fosfato en la sangre. Los síntomas pueden incluir arqueamiento de las piernas y otras deformidades óseas, dolor óseo, dolor articular, crecimiento óseo deficiente y estatura baja. En algunos bebés afectados, el espacio entre los huesos del cráneo se cierra demasiado pronto, lo que provoca craneosinostosis. La mayoría de los pacientes muestran anomalías en el metabolismo del calcio-fosfato, anomalías en el esmalte dental, erupción tardía de los dientes y cabeza larga y estrecha (dolicocefalia).

*“Tratamiento previo”*, como se usa en la presente, significa tratamiento antes del inicio de un método de tratamiento descrito en la presente.

*“Inhibidor de PCSK9”* como se usa en la presente, el término se refiere a un inhibidor que bloquea la enzima PCSK9. La proproteína convertasa subtilisina/kexina tipo 9 (PCSK9) es una enzima que se une a los receptores de lipoproteínas de baja densidad (receptores de LDL), lo que detiene la eliminación de LDL de la sangre, lo que provoca un aumento de los niveles de LDL en sangre. El inhibidor de PCSK9 bloquea la enzima PCSK9, lo que genera más receptores de LDL disponibles para eliminar la LDL de la sangre, lo que produce una disminución en los niveles de LDL en

sangre. Los inhibidores de PCSK9 comúnmente conocidos incluyen, entre otros, Repatha (evolocumab), Praluent (alirocumab). Ver “Inhibidores de PCSK9: *A new era of lipid lowering therapy*”, Chaudhary et al., World J Cardiol. 26 de febrero de 2017; 9(2): 76–91.

“*Estatinas*”, como se usa en la presente, el término se refiere a una clase de medicamentos reductores de lípidos que reducen la enfermedad y la mortalidad en aquellos que tienen un alto riesgo de enfermedad cardiovascular. Disminuyen el nivel de colesterol en la sangre al reducir la producción de colesterol en el hígado. Ejemplo de estatinas conocidas comúnmente incluyen, entre otras, atorvastatina (Lipitor), lovastatina (Altoprev), pitavastatina (Livalo, Zypitamag), pravastatina (Pravachol), rosuvastatina (Crestor, Ezallor) y simvastatina (Zocor).

“*Neoplasia maligna*”, como se usa en la presente, se refiere a la presencia de células cancerosas que tienen la capacidad de diseminarse a otros sitios en el cuerpo (metastatizar) o de invadir tejidos cercanos (localmente) y destruirlos. Las células malignas tienden a tener un crecimiento rápido y descontrolado, y no mueren normalmente debido a cambios en su composición genética. Existen varios tipos principales de neoplasias malignas. El carcinoma es una neoplasia maligna que comienza en la piel o en los tejidos que recubren o cubren los órganos internos. El sarcoma es una neoplasia maligna que comienza en el hueso, el cartílago, la grasa, los músculos, los vasos sanguíneos u otro tejido conjuntivo o de apoyo. La leucemia es una neoplasia maligna que comienza en el tejido formador de sangre, como la médula ósea, y hace que se produzcan demasiados glóbulos sanguíneos anómalos. El linfoma y el mieloma múltiple son neoplasias malignas que comienzan en las células del sistema inmunitario. Los cánceres del sistema nervioso central son neoplasias malignas que comienzan en los tejidos del cerebro y la médula espinal.

“*Cáncer de piel no melanómico*”, como se usa en la presente, se refiere a

cualquier cáncer que se forma en las células basales, escamosas o Merkel de la piel.

El melanoma es un cáncer que se desarrolla en los melanocitos de la piel.

*“Patrocinador del estudio”*, tal como se usa en la presente, se refiere a una persona, institución, compañía u organización (por ejemplo, una organización de investigación por contrato) que asume la responsabilidad de iniciar, administrar o financiar el ensayo clínico, pero que en realidad no lleva a cabo la investigación.

El término *“sujeto”*, tal como se usa en la presente, se refiere a un individuo, tal como un mamífero, tal como un ser humano, un primate no humano (por ejemplo, chimpancés y otros monos y especies de monos), un animal de granja (por ejemplo, pájaros, peces, ganado, ovejas, cerdos, cabras, y caballos), un mamífero doméstico (por ejemplo, perros y gatos), o un animal de laboratorio (p. ej., roedores, tales como ratones, ratas, y cobayos). El término incluye a un sujeto de cualquier edad o sexo. En otra modalidad, el sujeto es un mamífero, preferentemente un ser humano. Con mayor preferencia, el sujeto es un niño de 1 a 12 años.

El término *“lactante”* como se usa en la presente se refiere a un ser humano en su primer año de vida. Por lo general, la etapa infantil se refiere a la edad desde el nacimiento hasta menos de 1 año. Menor de 1 año es igual a menor de 12 meses. Por lo tanto, un lactante, como se usa en la presente, se refiere a una edad que incluye las primeras horas y el primer día de vida hasta la edad de 11 meses, pero no incluye los 12 meses de edad.

El término *“niños”* o *“niño”* como se usa en la presente se refiere a un niño humano y se refiere a una etapa de vida de una edad mayor de o igual a un año pero menor de 13 años de edad (es decir, las edades de 1-12).

Una enfermedad o trastorno se *“alivia”* si se reduce la gravedad de un síntoma de la enfermedad o trastorno, la frecuencia con la que dicho síntoma es experimentado por un paciente, o ambos.

Como se usa en la presente, los términos “*alteración*”, “*defecto*”, “*variación*” o “*mutación*” se refieren a una mutación en un gen en una célula que afecta la función, actividad, expresión (transcripción o traducción) o conformación del polipéptido que codifica, que incluye mutaciones de sentido erróneo y sin sentido, inserciones, deleciones, cambio de marco de lectura y terminaciones prematuras.

Una “*enfermedad*” es un estado de salud de un animal en donde el animal no puede mantener la homeostasis, y en donde si la enfermedad no se mejora entonces la salud del animal sigue deteriorándose.

Un “*trastorno*” en un animal es un estado de salud en el que el animal puede mantener la homeostasis, pero en el que el estado de salud del animal es menos favorable de lo que sería en ausencia del trastorno. Si no se trata, un trastorno no necesariamente provoca una disminución adicional en el estado de salud del animal.

Como se usa en la presente, el término “*respuesta inmunitaria*” o “*reacción inmunitaria*” se refiere al sistema inmunitario del huésped contra el antígeno en un organismo patógeno invasor (infección), o a la introducción o expresión de una proteína extraña. La respuesta inmunitaria generalmente es humoral y local; los anticuerpos producidos por los linfocitos B se combinan con el antígeno en un complejo antígeno-anticuerpo para inactivar o neutralizar el antígeno. La respuesta inmunitaria a menudo se observa cuando se inyectan proteínas humanas en sistemas de modelos de ratones. En general, el sistema de modelo de ratón se vuelve inmunotolerante al inyectar inmunosupresores antes de la introducción de un antígeno extraño para garantizar una mejor viabilidad.

Como se usa en la presente, el término “*inmunosupresión*” es una reducción deliberada de la activación o eficacia del sistema inmunitario del huésped mediante el uso de fármacos inmunosupresores para facilitar la tolerancia inmunitaria a antígenos extraños tales como proteínas extrañas, trasplantes de órganos, trasplante de médula

ósea y tejido. Los ejemplos no limitantes de fármacos inmunosupresores incluyen anticuerpo anti-CD4(GK1.5), ciclofosfamida, azatioprina (Imuran), micofenolato de mofetilo (Cellcept), ciclosporina (Neoral, Sandimmune, Gengraf), metotrexato (Rheumatrex), leflunomida (Aracept), ciclofosfosfamida (Cytosan) y clorambucil (Leukeran).

Como se usa en la presente, el término “*ENPP*” o “*NPP*” se refiere a ectonucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasa.

Como se usa en la presente, el término “proteína ENPP1” o “polipéptido ENPP1” se refiere a la proteína ectonucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasa-1 codificada por el gen ENPP1. La proteína codificada es una glucoproteína transmembrana de tipo II y escinde una variedad de sustratos, incluidos los enlaces de fosfodiéster de nucleótidos y azúcares de nucleótidos y enlaces de pirofosfato de nucleótidos y azúcares de nucleótidos. La proteína ENPP1 tiene un dominio transmembrana y un dominio extracelular soluble. El dominio extracelular se subdivide además en el dominio de somatomedina B, el dominio catalítico (residuos 186 a 586 de la SEQ ID NO: 1) y el dominio de nucleasa (residuos 524 a 885 de la SEQ ID NO: 1). La secuencia y la estructura de la ENPP1 de tipo silvestre se describe en detalle en la publicación de solicitud PCT núm. WO 2014/126965 de Braddock, et al., que se incorpora en la presente en su totalidad como referencia.

Polipéptidos ENPP1 de mamíferos, mutantes, o fragmentos mutantes de estos, se han descrito anteriormente en las publicaciones de solicitudes PCT internacionales núms. WO/2014/126965- *Braddock et al.*, WO/2016/187408-*Braddock et al.*, WO/2017/087936-*Braddock et al.*, y WO2018/027024-*Braddock et al.*, que se incorporan todas como referencia en sus totalidades a la presente descripción.

Como se usa en la presente, el término “*proteína precursora de ENPP1*” se refiere a ENPP1 con su secuencia de péptido señal en el extremo N-terminal de

ENPP1. Tras la proteólisis, la secuencia de señal se escinde de ENPP1 para proporcionar la proteína ENPP1. Las secuencias de péptidos señal útiles dentro de la invención incluyen, pero no se limitan a, secuencia de señal de albúmina, secuencia de señal de azurocidina, secuencia de péptido señal ENPP1, secuencia de péptido señal ENPP2, secuencia de péptido señal ENPP7, y/o secuencia de péptido señal ENPP5.

Como se usa en la presente, el término “*construcción ENPP1-Fc*” se refiere a ENPP1 fusionada de manera recombinante y/o conjugada químicamente (que incluye tanto conjugaciones covalentes como no covalentes) a un dominio de unión a FcR de una molécula de IgG (preferentemente, una IgG humana). En determinadas modalidades, el extremo C-terminal de ENPP1 se fusiona o conjuga al extremo N-terminal del dominio de unión a FcR.

Como se usa en la presente, el término “*Fc*” se refiere a un dominio Fc de IgG (inmunoglobulina) humana. Se contempla el uso de subtipos de IgG tales como IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 como dominios Fc.

Como se usa en la presente, la “*región Fc o polipéptido Fc*” es la porción de una molécula de IgG que se correlaciona con un fragmento cristizable obtenido por la digestión de papaína de una molécula de IgG. La región Fc comprende la mitad del extremo C-terminal de las dos cadenas pesadas de una molécula de IgG que están unidas por enlaces disulfuro. No tiene actividad de unión a antígenos, pero contiene el resto de carbohidrato y los sitios de unión para complementos y receptores Fc, incluido el receptor FcRn. El fragmento Fc contiene todo el segundo dominio constante CH2 (residuos 231-340 de IgG1 humana, de acuerdo con el sistema de numeración Kabat) y el tercer dominio constante CH3 (residuos 341-447). El término “*región Fc-bisagra de IgG*” o “*fragmento Fc-bisagra*” se refiere a una región de una molécula de IgG que consiste en la región Fc (residuos 231-447) y una región bisagra (residuos 216-230)

que se extiende desde el extremo N-terminal de la región Fc. El término “dominio constante” se refiere a la porción de una molécula de inmunoglobulina que tiene una secuencia de aminoácidos más conservada con relación a la otra porción de la inmunoglobulina, el dominio variable contiene el sitio de unión a antígenos. El dominio constante contiene los dominios CH1, CH2 y CH3 de la cadena pesada y el dominio CHL de la cadena ligera.

Como se usa en la presente, el término “*fragmento*”, tal como se aplica a un ácido nucleico, se refiere a una subsecuencia de un ácido nucleico más grande. Un “fragmento” de un ácido nucleico puede ser al menos aproximadamente 15, 50-100, 100-500, 500-1000, 1000-1500 nucleótidos, 1500-2500, o 2500 nucleótidos (y cualquier valor entero intermedio). Como se usa en la presente, el término “fragmento”, tal como se aplica a una proteína o péptido, se refiere a una subsecuencia de una proteína o péptido más grande, y puede tener al menos aproximadamente 20, 50, 100, 200, 300 o 400 aminoácidos de longitud (y cualquier valor entero intermedio).

“*Aislado*” significa alterado o desplazado del estado natural. Por ejemplo, un ácido nucleico o un polipéptido presentes naturalmente en un animal vivo no está “aislado”, pero el mismo ácido nucleico o polipéptido parcial o completamente separado de los materiales coexistentes de su estado natural está “aislado”. Un ácido nucleico o proteína aislados pueden existir en forma sustancialmente purificada o pueden existir en un entorno no natural tal como, por ejemplo, una célula huésped.

Como se usa en la presente, el término “*sujeto*”, “*individuo*” o “*paciente*” se refiere a un humano. Preferentemente, el paciente o individuo o sujeto es un niño de 1 a 12 años.

Como se usa en la presente, el término “*composición farmacéutica*” o “*composición*” se refiere a una mezcla de al menos un compuesto útil dentro de la

invención con un portador farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica facilita la administración del compuesto a un paciente. Existen múltiples técnicas para administrar un compuesto en la técnica que incluyen, pero no se limitan a, administración subcutánea, intravenosa, oral, en aerosol, por inhalación, rectal, vaginal, transdérmica, intranasal, bucal, sublingual, parenteral, intratecal, intragástrica, oftálmica, pulmonar y tópica.

Como se usa en la presente, el término “*farmacéuticamente aceptable*” se refiere a un material, tal como un portador o diluyente, que no anula la actividad biológica o las propiedades del compuesto, y es relativamente no tóxico, es decir, el material puede administrarse a un individuo sin causar efectos biológicos no deseados o interactuar de manera nociva con cualquiera de los componentes de la composición en la que se encuentra contenido; por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato (PBS, por sus siglas en inglés).

Como se usa en la presente, el término “*niveles de pirofosfato en plasma (PPi)*” se refiere a la cantidad de pirofosfato presente en el plasma de animales. En determinadas modalidades, los animales incluyen ratas, ratones, gatos, perros, humanos, vacas y caballos. Es necesario medir el PPi en plasma en lugar de en el suero debido a la liberación desde las plaquetas. Existen varias formas de medir el PPi, una de ellas es mediante un ensayo enzimático utilizando pirofosforilasa de uridina-difosfoglucosa (UDPG, por sus siglas en inglés) (*Lust & Seegmiller, 1976, Clin. Chim. Acta 66:241-249; Cheung & Suhadolnik, 1977, Anal. Biochem. 83:61-63*) con modificaciones. Por lo general, los niveles de PPi normales en sujetos sanos oscilan entre aproximadamente 1  $\mu\text{M}$  y aproximadamente 3  $\mu\text{M}$ , en algunos casos entre 1-2  $\mu\text{M}$ . Los sujetos con expresión defectuosa de ENPP1 tienden a mostrar niveles bajos de PPi que oscilan entre al menos 10 % por debajo de los niveles normales, al menos 20 % por debajo de los niveles normales, al menos 30 % por debajo de los niveles

normales, al menos 40 % por debajo de los niveles normales, al menos 50 % por debajo de los niveles normales, al menos 60 % por debajo de los niveles normales, al menos 70 % por debajo de los niveles normales, al menos 80 % por debajo de los niveles normales y combinaciones de estos. En los pacientes afectados por GACI, se observa que los niveles de PPI son inferiores a 1  $\mu\text{m}$  y, en algunos casos, se encuentran por debajo de un nivel detectable. En pacientes afectados por PXE, los niveles de PPI están por debajo de 0,5  $\mu\text{m}$ . (*Arterioescler Thromb Vasc Biol. Septiembre de 2014;34(9):1985-9; Braddock et al., Nat Commun. 2015; 6: 10006.*)

Como se usa en la presente, el término “*polipéptido*” se refiere a un polímero compuesto por residuos de aminoácidos, variantes estructurales de origen natural relacionadas, y análogos sintéticos de origen no natural de estos unidos a través de enlaces peptídicos.

Como se usa en la presente, el término “*PPi*” se refiere a pirofosfato.

Como se usa en la presente, los términos “*prevenir*” o “*prevención*” significan que no se desarrolla ningún trastorno o enfermedad si no se había producido, o que no se desarrolla adicionalmente ningún trastorno o enfermedad si ya se había producido el trastorno o la enfermedad. También se considera la capacidad de uno de prevenir algunos o todos los síntomas asociados con el trastorno o la enfermedad.

“*Muestra*” o “*muestra biológica*” como se usa en la presente significa un material biológico aislado de un sujeto. La muestra biológica puede contener cualquier material biológico adecuado para detectar un ARNm, polipéptido u otro marcador de un proceso fisiológico o patológico en un sujeto, y puede comprender un líquido, tejido, material celular y/o no celular obtenido del individuo.

Como se usa en la presente, “*sustancialmente purificado*” se refiere a estar esencialmente libre de otros componentes. Por ejemplo, un polipéptido sustancialmente purificado es un polipéptido que se ha separado de otros

componentes con los que se asocia normalmente en su estado natural. Las modalidades no limitantes incluyen 95 % de pureza, 99 % de pureza, 99,5 % de pureza, 99,9 % de pureza y 100 % de pureza.

Como se usa en la presente, el término “*tratamiento*” o “*tratar*” se define como la aplicación o administración de un agente terapéutico, es decir, un compuesto útil dentro de la invención (solo o en combinación con otro agente farmacéutico), a un paciente, o aplicación o administración de un agente terapéutico a un tejido aislado o estirpe celular de un paciente (p. ej., para diagnóstico o aplicaciones *ex vivo*), que tiene una enfermedad o trastorno, un síntoma de una enfermedad o trastorno o la posibilidad de desarrollar una enfermedad o trastorno, con el propósito de curar, aliviar, calmar, alterar, remediar, mejorar, o afectar la enfermedad o el trastorno, los síntomas de la enfermedad o el trastorno, o la posibilidad de desarrollar la enfermedad o el trastorno. Dichos tratamientos pueden adaptarse o modificarse específicamente, en función del conocimiento obtenido del campo de la farmacogenómica.

Los términos “*prevenir*” y “*prevención*”, como se usan en la presente, se refieren a inhibir el inicio o disminuir la aparición de una enfermedad en un sujeto. La prevención puede ser completa (p. ej., ausencia total de células patológicas en un sujeto) o parcial. La prevención también se refiere a una susceptibilidad reducida a una afección clínica.

Como se usa en la presente, el término “*de tipo silvestre*” se refiere a un gen o producto génico aislado de una fuente de origen natural. Un gen de tipo silvestre se observa con mayor frecuencia en una población y, por lo tanto, está diseñado arbitrariamente como la forma “normal” o “de tipo silvestre” de los genes NPP1. Por el contrario, el término “*funcionalmente equivalente*” se refiere a un gen NPP1 o producto génico que presenta modificaciones en la secuencia y/o propiedades funcionales (es decir, características alteradas) cuando se compara con el gen o producto génico de

tipo silvestre. Los mutantes de origen natural pueden aislarse; estos se identifican por el hecho de que tienen características alteradas (que incluyen secuencias de ácidos nucleicos alteradas) cuando se comparan con el gen o el producto génico de tipo silvestre.

El término “*variante funcionalmente equivalente*” se refiere a un polipéptido sustancialmente homólogo a las secuencias de ENPP1 (definidas anteriormente) y que conserva las actividades enzimáticas y biológicas de ENPP1. Los métodos para determinar si una variante conserva la actividad biológica de la ENPP1 naturales son ampliamente conocidos por un experto en la técnica e incluyen cualquiera de los ensayos usados en la parte experimental de dicha solicitud. Particularmente, las variantes funcionalmente equivalentes de ENPP1 administradas por vectores víricos están abarcadas por la presente invención.

Las variantes funcionalmente equivalentes de ENPP1 son polipéptidos sustancialmente homólogos a la ENPP1 natural. La expresión “sustancialmente homólogo” se refiere a una secuencia de proteínas cuando dicha secuencia de proteínas tiene un grado de identidad con respecto a las secuencias de ENPP1 descritas anteriormente de al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 %, respectivamente.

El grado de identidad entre dos polipéptidos se determina mediante el uso de algoritmos informáticos y métodos que son ampliamente conocidos para los expertos en la técnica. La identidad entre dos secuencias de aminoácidos se determina preferentemente mediante el uso del algoritmo BLASTP (*BLAST Manual, Altschul, S., et al., NCBI NLM NIH Bethesda, Md. 20894, Altschul, S., et al., J. Mol. Biol. 215: 403-410 (1990)*), aunque también se pueden usar otros algoritmos similares. BLAST y BLAST 2.0 se usan, con los parámetros descritos en la presente, para determinar el

porcentaje de identidad de secuencia. El software para realizar los análisis BLAST está disponible públicamente a través del Centro Nacional de Información Biotecnológica (*National Center for Biotechnology Information*).

Las “*variantes funcionalmente equivalentes*” de ENPP1 pueden obtenerse reemplazando los nucleótidos dentro del polinucleótido que causan la preferencia de codones en la célula huésped que se va a usar para producir la ENPP1 respectivamente. Tal “optimización de codones” puede determinarse a través de algoritmos informáticos que incorporan tablas de frecuencia de codones tales como “Human high.cod” para la preferencia de codones proporcionada en la Versión 9.0 del paquete de la Universidad de Wisconsin, Genetics Computer Group, Madison, Wis.

“*Aproximadamente*” como se usa en la presente cuando se refiere a un valor medible tal como una cantidad, una duración temporal, y similares, pretende abarcar variaciones de  $\pm 10\%$  o  $\pm 5\%$ , en determinadas modalidades  $\pm 1-5\%$ , en determinadas modalidades  $\pm 5\%$ , en determinadas modalidades  $\pm 4\%$ , en determinadas modalidades  $\pm 4\%$ , en determinadas modalidades  $\pm 3\%$ , en determinadas modalidades  $\pm 2\%$ , y en determinadas modalidades  $\pm 1\%$ , del valor especificado (2,4 mg/kg), como tales variaciones son adecuadas para realizar los métodos descritos.

La descripción proporciona un ejemplo representativo de secuencias de proteínas. Las secuencias de proteínas descritas pueden convertirse en secuencias de ácidos nucleicos mediante la realización de la traducción inversa y la optimización de codones. Hay varias herramientas disponibles en la técnica, como Expasy (<https://www.expasy.org/>) y servidores de bioinformática (<http://www.bioinformatics.org>) que permiten dichas conversiones.

*Rangos:* en esta descripción, varios aspectos de acuerdo con la invención pueden presentarse en un formato de rango. Debe entenderse que la descripción en formato de intervalo es meramente por conveniencia y brevedad y no debe

interpretarse como una limitación inflexible en el alcance de acuerdo con la invención. En consecuencia, se debe considerar que la descripción de un intervalo describe específicamente todos los subintervalos posibles, así como los valores numéricos individuales dentro de ese intervalo. Por ejemplo, se debe considerar que la descripción de un rango tal como de 1 a 6 tiene específicamente subrangos descritos tales como de 1 a 3, de 1 a 4, de 1 a 5, de 2 a 4, de 2 a 6, de 3 a 6, etc., así como números individuales dentro de ese rango, por ejemplo, 1, 2, 2,7, 3, 4, 5, 5,3 y 6. Esto se aplica independientemente de la amplitud del intervalo.

En la presente se describen métodos y materiales preferidos, aunque los métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente también pueden usarse en la práctica o evaluación de los métodos y composiciones descritos en la presente. Todas las publicaciones, solicitudes de patentes, patentes y otras referencias mencionadas en la presente se incorporan como referencia en su totalidad.

#### Detección de mutaciones de ABCC6

El ADN genómico se aísla de muestras de sangre periférica de sujetos con sospecha de deficiencia de ABC66 usando kits de aislamiento de ADN disponibles comercialmente. (*Puregene DNA Isolation Kit; Gentra Systems, Minneapolis, Minnesota, USA*). El ADN genómico de control se obtiene de la estirpe celular humana linfoblastoide K562 (*American Type Culture Collection, Manassas, Virginia, EE. UU.*). Todas las muestras de ADN se ajustan con agua a una concentración de 10 ng/μl.

La estrategia de detección de mutaciones se basa en: (1) identificación de las mutaciones recurrentes R1141X y del23–29 mediante digestión de la enzima de restricción; (2) optimización de la cromatografía de líquidos de alto rendimiento desnaturalizante (dHPLC) de productos de PCR correspondientes a todos los exones en sujetos en los que las dos mutaciones recurrentes no se identifican en ambos alelos, seguido de (3) secuenciación de exones con patrones de dHPLC alterados; y

(4) confirmación de mutaciones nuevas por digestión o resecuenciación.

El cribado para detectar las mutaciones recurrentes R1141X y del23–29 se realiza como se describió anteriormente. (*Compound heterozygosity for a recurrent 16,5-kb Alu-mediated deletion mutation and single-base-pair substitutions in the ABCC6 gene results in pseudoxanthoma elasticum. Ringpfeil F, Nakano A, Uitto J, Pulkkinen L, Am J Hum Genet. 2001 Mar; 68(3):642-52.*) Las condiciones y los cebadores para generar productos de PCR que abarcan todos los exones de las regiones codificantes y las secuencias intrónicas flanqueantes del gen ABCC6 se identifican para el cribado óptimo de la dHPLC en la tabla complementaria (*J Med Genet. Octubre de 2007; 44(10): 621–628.*).

Estos cebadores están diseñados para excluir los pseudogenes homólogos a los exones 1–4 y 1–931 y para asociar dentro de las bases ~50 de los extremos 5' y 3' del exón y para excluir polimorfismos intrónicos conocidos cuando sea posible. La PCR para el análisis de dHPLC se realiza usando polimerasa Taq de 1,5 U (Qiagen Inc., Valencia, California, EE. UU.) mezclada con polimerasa Optimase Taq de 5 U (Transgenomic, Gaithersburg, Maryland, EE. UU.) y amortiguador Q (Qiagen), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las reacciones de PCR contenían 200 ng de ADN como plantilla y 20 ng de cada cebador en un volumen final de 50 µl. Las condiciones de ciclado para todos los pares de cebadores fueron de 94 °C durante 5 min, seguido de 41 ciclos de 94 °C durante 1 min, temperatura de asociación para un par de cebadores particular (rango 55–60 °C) durante 1 min y 72 °C durante 1 min, con una etapa final a 72 °C durante 5 min.

Los productos de PCR generados usando pacientes con ADN de PXE como plantilla pueden formar heterodúplex con un volumen igual de un producto de PCR del mismo exón amplificado a partir del ADN de plantilla de la estirpe celular de control linfoblastoide K562. Para este fin, los productos de PCR se mezclaron en una relación

1:1 y se desnaturalizaron a 94 °C durante 10 min, seguido de una reasociación a 65 °C durante 15 min y 37 °C durante 15 min. Los productos de PCR se cribaron después mediante dHPLC (*WAVE; Transgenomic, Gaithersburg, Maryland, EE. UU.*) usando métodos diseñados para potenciar la desnaturalización parcial de los productos de PCR que contienen bases con errores de emparejamiento (ver la tabla complementaria 1 de J Med Genet. Octubre de 2007; 44(10): 621–628.). En la mayoría de los casos, los productos de PCR que muestran cambios de patrón se secuencian en ambas direcciones. La secuenciación de ADN se realiza en un secuenciador automático (ABI Prism 377 o ABI 3100; Perkin-Elmer-Cetus, Foster City, California, EE. UU.). Las presuntas mutaciones se confirman mediante digestión con enzima de restricción seguida de electroforesis en gel de agarosa o mediante la resecuenciación de un nuevo producto de PCR cuando no había disponible una enzima de restricción adecuada. Luego, los sujetos se identifican como sujetos con mutaciones de ABCC6 si se descubrió que contenían mutaciones conocidas en los genes de ABCC6 que afectan la actividad y/o el nivel de expresión de la proteína ABCC6 .

## **DESCRIPCIÓN DETALLADA**

### **1. Información general**

La descripción proporciona el tratamiento, la prevención o la reducción de la tasa de avance y/o la gravedad de la calcificación y/o la osificación patológica o una o más complicaciones de la calcificación y/u osificación patológica mediante la administración subcutánea (SC) de ENPP1-Fc a un sujeto a una dosis de aproximadamente 2,4 mg/kg. Con respecto a una dosis mencionada de ENPP1-Fc, “aproximadamente” significa un grado de error dada la naturaleza o precisión de las mediciones dentro del  $\pm 5$  % (%),  $\pm 4$  %,  $\pm 3$  % o  $\pm 2$  % o  $\pm 1$  % de la dosis mencionada en mg de ENPP1-Fc/kg de peso corporal del sujeto.

### **2. Dosis administrada del agente de ENPP1**

Se administra un agente de ENPP1 a una dosis de aproximadamente 2,4 mg/kg. Un médico seleccionará cuál de estas dosis se administra a un sujeto determinado y puede guiarse por los niveles de PPi en suero de un sujeto, siendo la dosis seleccionada suficiente para restaurar el PPi a niveles normales en el sujeto.

### **3. Agente de ENPP1**

Un agente de ENPP1 es un polipéptido de ENPP1. Los polipéptidos ENPP1 descritos en la presente incluyen polipéptidos de origen natural de la familia ENPP1, así como también cualquier variante de estos (incluidos mutantes, fragmentos, fusiones, y formas peptidomiméticas) que retienen una actividad biológica. Los términos “ENPP1” o “polipéptido ENPP1” se refieren a proteínas ectonucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasa 1 (NPP1/ENPP1/PC-1) y proteínas relacionadas con ENPP1, derivadas de cualquier especie. La proteína ENPP1 comprende una glucoproteína transmembrana de tipo II que forma un homodímero. Cada monómero de la proteína ENPP1 comprende un dominio de extremo N intracelular corto involucrado en el direccionamiento a la membrana plasmática, un dominio transmembrana, y una región extracelular grande que comprende varios dominios. La gran región extracelular comprende los dominios SMB1 y SMB2, que se ha informado que participan en la dimerización de ENPP1 (*R. Gijssbers, H. et al., Biochem. J. 371; 2003: 321-330*). Específicamente, los dominios de SMB contienen ocho residuos de cisteína, cada uno dispuesto en cuatro enlaces disulfuro, y se ha demostrado que median la homodimerización de ENPP1 a través de enlaces inter e intramoleculares de cistina covalente. La proteína escinde una variedad de sustratos, incluidos los enlaces de fosfodiéster de nucleótidos y azúcares de nucleótidos y enlaces de pirofosfato de nucleótidos y azúcares de nucleótidos. La proteína ENPP1 funciona para hidrolizar la trifosfatasa 5' de nucleósido a monofosfatos correspondientes y

también hidroliza polifosfatos de diadenosina. Las proteínas ENPP1 desempeñan un papel en la señalización purinérgica que participa en la regulación de las funciones cardiovascular, neurológica, inmunitaria, musculoesquelética, hormonal y hematológica. Una secuencia de aminoácidos ilustrativa de la proteína precursora de ENPP1 humana (registro NCBI NP\_006199) se muestra en la Figura 2 (SEQ ID NO: 1). La proteína precursora de la ENPP1 humana incluye una secuencia del péptido señal de la ENPP1 endógena en el extremo N de la ENPP1. La numeración de aminoácidos para todos los polipéptidos relacionados con ENPP1 descritos en la presente se basa en la numeración de la secuencia de proteína precursora de ENPP1 humana proporcionada en la Figura 2, a menos que se designe específicamente de otra manera. En determinadas modalidades, la proteína precursora de ENPP1 comprende además una secuencia de péptidos señalizadores endógena o heteróloga. Tras la proteólisis, la secuencia de péptido señal se escinde de la proteína precursora ENPP1 para proporcionar la proteína ENPP1 madura. Véase, p. ej., Jansen S, et al. J Cell Sci. 2005;118(Pt 14):3081-9. Las secuencias de péptidos señalizadores ilustrativas que pueden usarse con los polipéptidos descritos en la presente incluyen, entre otros, secuencia de péptido señal ENPP1, secuencia de péptido señal ENPP2, secuencia de péptido señal ENPP7, y/o secuencia de péptido señal ENPP5. La secuencia del polipéptido ENPP1 extracelular procesado (maduro) se muestra en la Figura 4 (SEQ ID NO: 2).

Se conoce generalmente en la técnica que la ENPP1 está bien conservada entre los vertebrados, con grandes extensiones del dominio extracelular sustancialmente conservadas. Por ejemplo, la Figura 5A y la Figura 5B ilustran una alineación multisequencia de un dominio extracelular de ENPP1 humano en comparación con varios ortólogos de ENPP1. La unión de ENPP1 a varios trifosfatos de nucleótidos (p. ej., ATP, UTP, GTP, TTP, y CTP), pNP-TMP, 3',5'-cAMP, y 2'-3'-

cGAMP también es altamente conservada (véase, p. ej., Kato K. et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 2012;109(42):16876-81 y Mackenzie NC, et al. *Bone*. 2012;51(5):961-8). En consecuencia, a partir de estas alineaciones, es posible predecir las posiciones de aminoácidos clave con el dominio extracelular que son importantes para las actividades normales de ENPP1, así como también predecir las posiciones de aminoácidos que probablemente sean tolerantes a la sustitución sin alterar significativamente las actividades normales de ENPP1. Por lo tanto, un polipéptido de ENPP1 humano, enzimáticamente activo útil de acuerdo con las composiciones descritas en la presente puede incluir uno o más aminoácidos en las posiciones correspondientes de la secuencia de otra ENPP1 de vertebrado, o puede incluir un residuo que es similar al de las secuencias humanas o de otros vertebrados. Las sustituciones de uno o más aminoácidos en las posiciones correspondientes pueden incluir variaciones o sustituciones conservadoras que probablemente no cambien la forma de la cadena de polipéptidos o alteren las actividades normales de ENPP1. Los ejemplos de variaciones conservadoras, o sustituciones, incluyen el reemplazo de un residuo hidrófobo tal como isoleucina, valina, leucina o metionina por otro, o la sustitución de un residuo polar por otro, tal como la sustitución de arginina por lisina, ácido glutámico por ácido aspártico, o glutamina por asparagina. Por ejemplo, los polipéptidos ENPP1 incluyen polipéptidos derivados de la secuencia de cualquier polipéptido de ENPP1 conocido que tiene una secuencia al menos aproximadamente 80 % idéntica a la secuencia de un polipéptido de ENPP1, y preferentemente al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o mayor identidad.

#### **4. Actividad enzimática de ENPP1**

Las proteínas ENPP1 se han caracterizado en la técnica en términos de

características estructurales y biológicas. En determinadas modalidades, las proteínas ENPP1 solubles descritas en la presente comprenden actividad de pirofosfatasa y/o fosfodiesterasa. Por ejemplo, en algunas modalidades, la proteína ENPP1 se une a trifosfatos de nucleótidos (por ejemplo, ATP, UTP, GTP, TTP, y CTP), pNP-TMP, 3',5'-cAMP, y 2'-3'-cGAMP; y convierte trifosfatos de nucleótidos en pirofosfato inorgánico [véase, p. ej., Kato K. *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA. 2012;109(42):16876-81; Li L, *et al.* Nat Chem Biol. 2014;10(12):1043-8; Jansen S, *et al.* Structure. 2012;20(11):1948-59; and Onyedibe KI, *et al.* Molecules. 2019;24(22)].

Los polipéptidos ENPP1 “enzimáticamente activos” o “biológicamente activos” presentan actividad de pirofosfatasa y/o fosfodiesterasa (p. ej., es capaz de unirse y/o hidrolizar ATP en AMP y PPi y/o AP3a en ATP). Por ejemplo, el dominio de pirofosfatasa/fosfodiesterasa de una proteína ENPP1 hidroliza trifosfatos de nucleótidos extracelulares para producir pirofosfatos inorgánicos (PPi) y es generalmente soluble. Esta actividad puede medirse usando un ensayo de pNP- TMP como se describió anteriormente (Saunders, *et al.*, 2008, *Mol. Cancer Ther.* 7(10):3352-62; Albright, *et al.*, 2015, *Nat Comm.* 6:10006). En determinadas modalidades, el polipéptido ENPP1 soluble tiene un valor  $k_{cat}$  para el sustrato ATP mayor o igual a aproximadamente 3,4 ( $\pm 0,4$ ) s<sup>-1</sup> enzima<sup>-1</sup>, en donde el  $k_{cat}$  se determina midiendo la velocidad de hidrólisis de ATP para el polipéptido. En determinadas modalidades, el polipéptido ENPP1 soluble tiene un valor  $K_M$  para el sustrato ATP menor o igual a aproximadamente 2  $\mu$ M, en donde el  $K_M$  se determina midiendo la velocidad de hidrólisis de ATP para el polipéptido. Además de las enseñanzas en la presente, estas referencias proporcionan una amplia guía sobre cómo generar proteínas ENPP1 solubles que retienen una o más actividades biológicas (por ejemplo, conversión de nucleótidos en pirofosfato inorgánico).

## 5. ENPP1 soluble

En una modalidad, la descripción se refiere a polipéptidos ENPP1 solubles. Como se describe en la presente, el término polipéptido de ENPP1 soluble incluye cualquier dominio extracelular de origen natural de una proteína ENPP1 así como también cualquier variante de esta (que incluye mutantes, fragmentos y formas peptidomiméticas) que retienen una actividad biológica (p. ej., enzimáticamente activa). Los ejemplos de polipéptidos ENPP1 solubles incluyen, por ejemplo, un dominio extracelular de ENPP1 (SEQ ID NO: 2) como se muestra en la Figura 4. En determinadas modalidades, los polipéptidos ENPP1 solubles comprenden además una secuencia de señal además del dominio extracelular de un polipéptido ENPP1. Las secuencias de señal ilustrativas incluyen la secuencia de señal natural de un polipéptido ENPP1, o una secuencia de señal de otra proteína, tal como una secuencia de señal hENPP7 o secuencia de señal de azurocidina. Se proporcionan ejemplos de variantes de polipéptidos ENPP1 solubles en las publicaciones de solicitudes de patentes internacionales núms. *WO 2012/125182*, *WO 2014/126965*, *WO 2016/187408*, *WO 2018/027024*, *WO 2020206302* y *WO 2020/047520*, todos los cuales se incorporan en la presente como referencia en su totalidad.

## **6. Proteínas de fusión ENPP1**

En algunas modalidades, el polipéptido de ENPP1 es una proteína de fusión que comprende un dominio de polipéptido ENPP1 y una o más porciones de proteína heteróloga (es decir, dominios de polipéptidos heterólogos a ENPP1). Se entiende que una secuencia de aminoácidos es heteróloga a ENPP1 si no se encuentra exclusivamente en la forma de ENPP1 representada por la SEQ ID NO: 1. En algunas modalidades, la porción de proteína heteróloga comprende un dominio Fc de una inmunoglobulina. En algunas modalidades, el dominio Fc de la inmunoglobulina es un dominio Fc de una inmunoglobulina IgG1. En determinadas modalidades, el

polipéptido ENPP1 soluble se fusiona en el extremo C al dominio Fc de la inmunoglobulina humana 1 (IgG1), la inmunoglobulina humana 2 (IgG2), la inmunoglobulina humana 3 (IgG3), y/o la inmunoglobulina humana 4 (IgG4). En otras modalidades, el polipéptido de ENPP1 soluble se fusiona en el extremo N al dominio Fc de la inmunoglobulina humana 1 (IgG1), la inmunoglobulina humana 2 (IgG2), la inmunoglobulina humana 3 (IgG3), y/o la inmunoglobulina humana 4 (IgG4). En algunas modalidades, la presencia de un dominio Fc mejora la semivida, la solubilidad, reduce la inmunogenia y aumenta la actividad del polipéptido ENPP1 soluble. En determinadas modalidades, las porciones de las proteínas IgG humanas naturales (IgG1, IgG2, IgG3, e IgG4), pueden usarse para la porción Fc (p. ej., ENPP1-Fc). Por ejemplo, la presente descripción proporciona proteínas de fusión que comprenden ENPP1 fusionadas a un polipéptido que comprende un dominio constante de una inmunoglobulina, tal como un dominio CH1, CH2, o CH3 derivado de IgG1, IgG2, IgG3, y/o IgG4 humana. El fragmento Fc puede comprender regiones de la IgG natural tal como la región bisagra (residuos 216-230 de IgG1 humana, de acuerdo con el sistema de numeración Rabat), todo el segundo dominio constante CH2 (residuos 231-340), y el tercer dominio constante CH3 (residuos 341-447). Como se usa en la presente, el término “*construcción ENPP1-Fc*” se refiere a una forma soluble de ENPP1 (p. ej., el dominio extracelular de un polipéptido ENPP1) fusionada de manera recombinante y/o conjugada químicamente (que incluye tanto conjugaciones covalentes como no covalentes) a un dominio de unión a FcR de una molécula de IgG (preferentemente, una IgG humana). En determinadas modalidades, el extremo C-terminal de ENPP1 se fusiona o conjuga al extremo N-terminal del dominio de unión a FcR.

Un ejemplo de una secuencia de aminoácidos que puede usarse para la porción Fc de IgG1 humana (G1Fc) es la SEQ ID NO: 6 (Tabla 1). En parte, la

descripción proporciona polipéptidos que comprenden, que consisten esencialmente, o consisten en secuencias de aminoácidos con 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % de identidad con la SEQ ID NO: 6.

En algunas modalidades, la porción de proteína heteróloga comprende uno o más dominios seleccionados del grupo que consiste en polihistidina, etiqueta FLAG, Glu-Glu, glutatión S-transferasa (GST), tiorredoxina, proteína A, proteína G, una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina (Fc), proteína de unión a maltosa (MBP, por sus siglas en inglés), o albúmina sérica humana. Un dominio de fusión puede seleccionarse para conferir una propiedad deseada. Por ejemplo, algunos dominios de fusión son particularmente útiles para el aislamiento de las proteínas de fusión mediante cromatografía de afinidad. Para fines de purificación de afinidad, se utilizan matrices relevantes para cromatografía de afinidad, tales como resinas conjugadas con glutatión, amilasa y níquel o cobalto. Muchas de estas matrices están disponibles en forma de “kit”, tal como el sistema de purificación Pharmacia GST y el sistema QIAexpress™ (Qiagen) útil con compañeros de fusión (HIS<sub>6</sub>). A modo de otro ejemplo, puede seleccionarse un dominio de fusión para facilitar la detección del polipéptido ENPP1. Los ejemplos de tales dominios de detección incluyen las diversas proteínas fluorescentes (p. ej., GFP) así como también “etiquetas de epítipo”, que son generalmente secuencias de péptidos cortas para las cuales está disponible un anticuerpo específico. Las etiquetas de epítipos bien conocidas para las cuales se dispone fácilmente de anticuerpos monoclonales específicos incluyen FLAG, hemaglutinina (HA) del virus de la influenza y etiquetas de c-myc. En algunos casos, los dominios de fusión tienen un sitio de escisión de la proteasa, tal como para el Factor Xa o la trombina, que permite que la proteasa relevante digiera parcialmente las proteínas de fusión y, por lo tanto, libere las proteínas recombinantes de estas. Las

proteínas liberadas pueden aislarse después del dominio de fusión mediante la posterior separación cromatográfica.

## **7. Enlazadores**

En algunas modalidades, la proteína de fusión ENPP1 comprende además un enlazador posicionado entre el dominio de polipéptido ENPP1 y la una o más porciones de proteína heteróloga (p. ej., un dominio de inmunoglobulina Fc). En determinadas modalidades, el polipéptido ENPP1 soluble se fusiona directa o indirectamente al dominio Fc. En algunas modalidades, la proteína de fusión de ENPP1 soluble comprende un enlazador entre el dominio Fc y el polipéptido ENPP1. En algunas modalidades, un enlazador puede ser un espaciador de aminoácidos que incluye 1-200 aminoácidos. Los espaciadores peptídicos adecuados se conocen en la técnica, e incluyen, por ejemplo, enlazadores peptídicos que contienen residuos de aminoácidos flexibles tales como glicina, alanina, y serina. En algunas modalidades, el enlazador comprende un enlazador de poliglicina o un enlazador Gly-Ser. En algunas modalidades, un espaciador puede contener motivos, p. ej., motivos múltiples o repetidos, de GA (SEQ ID NO: 21), GS (SEQ ID NO: 22), GG (SEQ ID NO: 23), GGA (SEQ ID NO: 24), GGS (SEQ ID NO: 25), GGG (SEQ ID NO: 26), GGGA (SEQ ID NO: 27), GGGS (SEQ ID NO: 28), GGGG (SEQ ID NO: 29), GGGGA (SEQ ID NO: 30), GGGGS (SEQ ID NO: 31), GGGGG (SEQ ID NO: 32), GGAG (SEQ ID NO: 33), GGSG (SEQ ID NO: 34), AGGG (SEQ ID NO: 35), SGGGG (SEQ ID NO: 36), o SGGG (SEQ ID NO: 37). En algunas modalidades, un espaciador puede contener de 2 a 12 aminoácidos que incluyen motivos de GA o GS, p. ej., GA, GS, GAGA (SEQ ID NO: 38), GSGS (SEQ ID NO: 39), GAGAGA (SEQ ID NO: 40), GSGSGS (SEQ ID NO: 41), GAGAGAGA (SEQ ID NO: 42), GSGSGSGS (SEQ ID NO: 43), GAGAGAGAGA (SEQ ID NO: 44), GSGSGSGSGS (SEQ ID NO: 45), GAGAGAGAGAGA (SEQ ID NO: 46), y

GSGSGSGSGSGS (SEQ ID NO: 47). En algunas modalidades, un espaciador puede contener de 3 a 12 aminoácidos que incluyen motivos de GGA o GGS, p. ej., GGA, GGS, GGAGGA (SEQ ID NO: 48), GGS GGS (SEQ ID NO: 49), GGAGGAGGA (SEQ ID NO: 50), GGS GGS GGS (SEQ ID NO: 51), GGAGGAGGAGGA (SEQ ID NO: 52), y GGS GGS GGS GGS (SEQ ID NO: 53). En aun algunas modalidades, un espaciador puede contener de 4 a 12 aminoácidos que incluyen motivos de GGAG (SEQ ID NO: 54), GGS G (SEQ ID NO: 55), p. ej., GGAG (SEQ ID NO: 56), GGS G (SEQ ID NO: 57), GGAGGGAG (SEQ ID NO: 58), GGS GGG G (SEQ ID NO: 59), GGAGGGAGGGAG (SEQ ID NO: 60), y GGS GGG GGG G (SEQ ID NO: 61). En algunas modalidades, un espaciador puede contener motivos de GGGGA (SEQ ID NO: 62) o GGGGS (SEQ ID NO: 63), p. ej., GGGGAGGGGAGGGGA (SEQ ID NO: 64) y GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 65). En algunas modalidades de la invención, un espaciador de aminoácidos entre una porción de proteína heteróloga (p. ej., un monómero del dominio Fc, un dominio Fc natural, un dominio Fc con sustituciones de aminoácidos (p. ej., una o más sustituciones que reducen la dimerización), un péptido de unión a la albúmina, un dominio de fibronectina, o una albúmina de suero humano) y un polipéptido ENPP1 soluble puede ser GGG, GGGA (SEQ ID NO: 27), GGGG (SEQ ID NO: 29), GGGAG (SEQ ID NO: 66), GGGAGG (SEQ ID NO: 67), o GGGAGGG (SEQ ID NO: 68).

En algunas modalidades, un espaciador también puede contener aminoácidos que no sean glicina, alanina y serina, LIN (SEQ ID NO: 69), TGGGG (SEQ ID NO: 70), AAAL (SEQ ID NO: 71), AAAK (SEQ ID NO: 72), AAAR (SEQ ID NO: 73), EGKSSGSGSESKST (SEQ ID NO: 74), GSAGSAAGSGEF (SEQ ID NO: 75), AEAAAKEAAKA (SEQ ID NO: 76), KESGSVSSEQLAQFRSLD (SEQ ID NO: 77), GENLYFQSGG (SEQ ID NO: 78), SACYCELS (SEQ ID NO: 79), RSIAT (SEQ ID NO: 80), RPACKIPNDLKQKVMNH (SEQ ID NO: 81),

GGSAGGSGSGSSGGSSGASGTGTAGGTGSGSGTGSG (SEQ ID NO: 82),  
 AAANSSIDLISVPVDSR (SEQ ID NO: 83),  
 GGSGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 84), NSS  
 (SEQ ID NO: 87), ESS (SEQ ID NO: 88), RQQ (SEQ ID NO: 89), KR (SEQ ID NO: 90),  
 (R)<sub>m</sub>; m=0-15 (SEQ ID NO: 91), DSSSEEKFLRRIGRFG (SEQ ID NO: 92),  
 EEEEEEPRGDT (SEQ ID NO: 93), APWHLSSQYSRT (SEQ ID NO: 94),  
 STLPIPHEFSRE (SEQ ID NO: 95), VTKHLNQISQSY (SEQ ID NO: 96), (E)<sub>m</sub>; m=1-15  
 (SEQ ID NO: 97), RSGSGGS (SEQ ID NO: 98), (D)<sub>m</sub>; m=1-15 (SEQ ID NO: 99),  
 LVIMSLGLGLGLRLK (SEQ ID NO: 100), VIMSLGLGLGLRLK (SEQ ID NO: 101),  
 IMSLGLGLGLRLK (SEQ ID NO: 102), MSLGLGLGLRLK (SEQ ID NO: 103),  
 SLGLGLGLRLK (SEQ ID NO: 104), LGLGLGLRLK (SEQ ID NO: 105),  
 GLGLGLRLK (SEQ ID NO: 106), LGLGLRLK (SEQ ID NO: 107), GLGLRLK (SEQ  
 ID NO: 108), LGLRLK (SEQ ID NO: 109), GLRLK (SEQ ID NO: 110), LRLK (SEQ  
 ID NO: 111), GLRK (SEQ ID NO: 112), LRK (SEQ ID NO: 113), RK (SEQ ID NO: 114),  
 o (K)<sub>m</sub>; m=1-15 (SEQ ID NO: 115). En algunas modalidades, un espaciador puede  
 contener motivos, p. ej., motivos múltiples o repetidos, de EAAAK (SEQ ID NO: 85). En  
 algunas modalidades, un espaciador puede contener motivos, p. ej., motivos múltiples  
 o repetidos, de secuencias ricas en prolina tales como (XP)<sub>n</sub>, en las que X puede ser  
 cualquier aminoácido (p. ej., A, K, o E) y n es de 1-5, y PAPAP (SEQ ID NO: 86).

La longitud del péptido espaciador y los aminoácidos usados pueden ajustarse  
 en dependencia de las dos proteínas involucradas y el grado de flexibilidad deseado  
 en el polipéptido de fusión de proteínas final. La longitud del espaciador puede  
 ajustarse para garantizar un plegamiento adecuado de la proteína y evitar la formación  
 de agregados.

En algunas modalidades, diferentes elementos de las proteínas de fusión (p.  
 ej., proteínas de fusión Fc de inmunoglobulina) pueden disponerse de cualquier

manera que sea coherente con la funcionalidad deseada. Por ejemplo, un dominio de polipéptido ENPP1 soluble puede colocarse en el extremo C a una porción de proteína heteróloga, o alternatively, una porción de proteína heteróloga puede colocarse en el extremo C a un dominio de polipéptido ENPP1 soluble. El dominio de polipéptido ENPP1 soluble y la porción de proteína heteróloga pueden enlazarse directa o indirectamente en una proteína de fusión, y los dominios o secuencias de aminoácidos adicionales pueden incluirse en el extremo C o N a cualquiera de los dominios o entre los dominios. Las proteínas de fusión preferidas comprenden la secuencia de aminoácidos que se expone en una cualquiera de las SEQ ID NO: 3-5.

En algunas modalidades, los polipéptidos ENPP1 solubles de la presente descripción contienen uno o más restos heterólogos. Opcionalmente, un polipéptido ENPP1 soluble incluye uno o más restos heterólogos seleccionados de: un aminoácido glucosilado, un aminoácido PEGilado, un aminoácido farnesilado, un aminoácido acetilado, un aminoácido biotinilado, un aminoácido conjugado a un resto lipídico, y un aminoácido conjugado a un agente derivatizante orgánico. En algunas modalidades, un polipéptido ENPP1 soluble descrito en la presente se modifica adicionalmente. Tales modificaciones incluyen, pero no se limitan a, acetilación, carboxilación, glucosilación, fosforilación, lipidación, y acilación. Como resultado, el polipéptido ENPP1 soluble puede contener elementos no aminoácido, tales como polietilenglicoles, lípidos, polisacáridos o monosacáridos, y fosfatos. Los efectos de tales elementos no aminoácidos en la funcionalidad de un polipéptido ENPP1 soluble pueden evaluarse como se describe en la presente para otros polipéptidos ENPP1 solubles. Cuando un polipéptido de la descripción se produce en células al escindir una forma incipiente del polipéptido, el procesamiento postraduccional también puede ser importante para el plegamiento y/o función correcta de la proteína. Diferentes células (p. ej., CHO, HeLa, MDCK, 293, WI38, NIH-3T3 o HEK293) tienen maquinaria

celular específica y mecanismos característicos para tales actividades postraduccionales y pueden elegirse para garantizar la modificación y el procesamiento correctos de los polipéptidos ENPP1 solubles.

Como se usa en la presente, el porcentaje de “*identidad*” entre una secuencia de polipéptidos y una secuencia de referencia se define como el porcentaje de residuos de aminoácidos en la secuencia de polipéptidos que son idénticos a los residuos de aminoácidos en la secuencia de referencia, después de alinear las secuencias e introducir brechas, si es necesario, para lograr el porcentaje máximo de identidad de secuencia. La alineación a los fines de determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos puede lograrse de varias maneras que están dentro de la técnica, por ejemplo, mediante el uso de software informático disponible públicamente tal como software BLAST, BLAST-2, ALIGN, MEGALIGN (DNASTAR), CLUSTALW, o CLUSTAL OMEGA. En algunas modalidades, la alineación se realiza mediante el uso del software CLUSTAL OMEGA. Los expertos en la técnica pueden determinar los parámetros adecuados para alinear secuencias, que incluyen cualquier algoritmo necesario para lograr la alineación máxima a lo largo de toda la longitud de las secuencias que se comparan.

## **8. Determinación de la solubilidad**

En algunas modalidades, la actividad de los polipéptidos ENPP1 solubles también puede probarse en un ensayo basado en células o *in vivo*. Por ejemplo, puede medirse el efecto de un polipéptido de ENPP1 soluble en la producción de pirofosfatos inorgánicos (PPi). Específicamente, el dominio de pirofosfatasa/fosfodiesterasa de una proteína ENPP1 hidroliza trifosfatos de nucleótidos extracelulares para producir pirofosfatos inorgánicos (PPi) y es generalmente soluble. Esta actividad puede medirse mediante el uso de un ensayo de

pNP-TMP así como también un ensayo de hidrólisis de ATP basado en HPLC, como se describió anteriormente (Saunders, et al., 2008, *Mol. Cancer Ther.* 7(10):3352-62; Albright, et al., 2015, *Nat Comm.* 6:10006). Puede evaluarse el efecto de los polipéptidos ENPP1 solubles en la expresión de genes involucrados en enfermedades asociadas con ENPP1 tales como ARHR2 (p. ej., transcripción del factor de crecimiento de fibroblastos 23 en osteoblastos y osteoclastos). Esto puede realizarse, según sea necesario, en presencia de uno o más trifosfatos de nucleótidos u otros sustratos de ENPP1, y las células pueden transfectarse para producir un polipéptido ENPP1 soluble. Igualmente, un polipéptido de ENPP1 soluble puede administrarse a un ratón u otro animal y los efectos sobre las enfermedades asociadas a ENPP1 pueden evaluarse mediante el uso de métodos reconocidos en la técnica.

En algunas modalidades, los polipéptidos ENPP1 que se usan de acuerdo con los métodos descritos en la presente son polipéptidos aislados. Como se usa en la presente, una proteína o polipéptido aislado es uno que se ha separado de un componente de su entorno natural. En algunas modalidades, un polipéptido de la descripción se purifica a una pureza mayor que 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % según lo determinado por, por ejemplo, análisis electroforéticos (p. ej., SDS-PAGE, isoelectroenfoque (IEF), electroforesis capilar) o cromatográficos (p. ej., intercambio iónico o HPLC de fase inversa). Los métodos de evaluación de la pureza se conocen bien en la técnica [véase, p. ej., Flatman et al., (2007) *J. Chromatogr. B* 848:79-87]. En algunas modalidades, los polipéptidos ENPP1 solubles que se usarán de acuerdo con los métodos descritos en la presente son polipéptidos recombinantes.

## **9. Producción de ENPP1**

Los polipéptidos ENPP1 de la descripción pueden producirse mediante una variedad de técnicas conocidas en la técnica. Por ejemplo, los polipéptidos de la

descripción pueden sintetizarse mediante el uso de técnicas de química de proteínas estándar tales como las descritas en *Bodansky, M. Principles of Peptide Synthesis, Springer Verlag, Berlin (1993)* y *Grant G. A (ed.), Synthetic Peptides: A User's Guide, W. H. Freeman and Company, Nueva York (1992)*. Además, los sintetizadores de péptidos automáticos están disponibles comercialmente (p. ej., *Advanced ChemTech Model 396; Milligen/Bioscience 9600*). Alternativamente, los polipéptidos de la descripción, que incluyen fragmentos o variantes de estos, pueden producirse de manera recombinante mediante el uso de varios sistemas de expresión [p. ej., *E. coli*, células de ovario de hámster chino (CHO), células COS, baculovirus, levadura *Pichia*] como se conoce bien en la técnica. La proteína puede producirse en células adherentes o en suspensión. En algunas modalidades, la proteína de fusión se expresa en células CHO. Para establecer líneas celulares estables, la secuencia de ácido nucleico que codifica las construcciones de ENPP1 se clona en un vector adecuado para la producción de proteínas a gran escala. En una modalidad adicional, los polipéptidos modificados o no modificados de la descripción pueden producirse por digestión de polipéptidos ENPP1 de longitud completa producidos recombinantemente mediante el uso, por ejemplo, de una proteasa, p. ej., tripsina, termolisina, quimotripsina, pepsina, o enzima convertidora de aminoácidos básica pareada (PACE). El análisis informático (mediante el uso de software disponible comercialmente, p. ej., MacVector, Omega, PCGene, Molecular Simulation, Inc.) puede usarse para identificar sitios de escisión proteolítica. Alternativamente, tales polipéptidos pueden producirse a partir de polipéptidos ENPP1 de longitud completa generados recombinantemente mediante el uso de escisión química (p. ej., bromuro de cianógeno, hidroxilamina, etc.).

## **10. Sistemas de expresión**

Se conocen muchos sistemas de expresión que pueden usarse para la producción de la proteína de fusión ENPP1, que incluye bacterias (por ejemplo, *E. coli* y *Bacillus subtilis*), levaduras (por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis* y *Pichia pastoris*), hongos filamentosos (por ejemplo, *Aspergillus*), células vegetales, células animales y células de insectos. La proteína deseada puede producirse de maneras convencionales, por ejemplo a partir de una secuencia codificante insertada en el cromosoma hospedador o en un plásmido libre.

Las levaduras pueden transformarse con una secuencia codificante para la proteína deseada en cualquiera de las formas habituales (p. ej., electroporación). Los métodos para la transformación de la levadura mediante electroporación se describen en *Becker & Guarente, 1990, Methods Enzymol. 194: 182*. Las células transformadas exitosamente, es decir, las células que contienen una construcción de ADN de la presente descripción, pueden identificarse mediante técnicas conocidas. Por ejemplo, las células que resultan de la introducción de una construcción de expresión pueden cultivarse para producir un polipéptido ENPP1. Las células pueden recolectarse y lisarse y su contenido de ADN puede examinarse para detectar la presencia del ADN mediante el uso de un método, tal como el descrito por Southern, 1975, *J. Mol. Biol.*, 98:503 y/o Berent, et al., 1985, *Biotech 3:208*. Alternativamente, la presencia de la proteína en el sobrenadante puede detectarse mediante el uso de anticuerpos.

Los vectores útiles de plásmidos de levadura incluyen pRS403-406 y pRS413-416 y son generalmente disponibles por Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA, USA. Plasmids pRS403, pRS404, pRS405 y pRS406 son plásmidos integradores de levadura (Yips, por sus siglas en inglés) e incorporan los marcadores seleccionables de levadura I-11S3, TRP1, LEU2 y 1JRA3. Los plásmidos pRS413-416 son plásmidos de levadura centromérica (YCps, por sus siglas en inglés).

Se ha desarrollado una variedad de métodos para enlazar operativamente el

ADN a vectores a través de terminales cohesivos complementarios. Por ejemplo, el tracto de homopolímero complementario puede añadirse al segmento de ADN que se va a insertar en el ADN del vector. El vector y el segmento de ADN se unen después mediante enlace de hidrógeno entre las colas homopoliméricas complementarias para formar moléculas de ADN recombinante.

Los enlazadores sintéticos que contienen uno o más sitios de restricción proporcionan un método alternativo para unir el segmento de ADN a los vectores. El segmento de ADN, generado por la digestión de restricción de endonucleasas, se trata con polimerasa de ADN T4 de bacteriófago o polimerasa I de ADN de *E. coli*, que son enzimas que eliminan los extremos de 3' monocatenarios protuberantes con sus actividades de 3'-5' -exonucleolíticas, y llenan los extremos de 3' huecos con sus actividades polimerizantes.

Por lo tanto, la combinación de estas actividades genera segmentos de ADN de extremo romo. Los segmentos de extremo romo se incuban después con un exceso molar grande de moléculas enlazadoras en presencia de una enzima que es capaz de catalizar la ligadura de moléculas de ADN de extremo romo, tal como la ligasa de ADN T4 de bacteriófago. Como resultado, los productos de la reacción son segmentos de ADN que portan secuencias enlazadoras poliméricas en sus extremos. Estos segmentos de ADN pueden escindirse con una enzima de restricción adecuada y ligarse a un vector de expresión que se ha escindido con una enzima que produce extremos compatibles con los del segmento de ADN.

Luego, se establecen y se seleccionan los clones de células únicas transfectadas de manera estable para obtener clones de alta expresión de la proteína de fusión ENPP1 deseada. El cribado de los clones de células únicas para la expresión de la proteína ENPP1 puede realizarse con alto rendimiento en placas de 96 pocillos mediante el uso del sustrato enzimático sintético pNP-TMP como se

describió anteriormente (*Albright, et al, 2015, Nat Commun. 6:10006*). Tras la identificación de clones de alta expresión a través del cribado, la producción de proteínas puede lograrse en matraces de agitación o biorreactores descritos anteriormente en *Albright, et al, 2015, Nat. Commun. 6:10006*.

## **11. Purificación de ENPP1**

La purificación de polipéptidos ENPP1 puede lograrse mediante el uso de una combinación de técnicas de purificación estándar conocidas en la técnica. Después de la purificación, ENPP1-Fc se dializó en PBS suplementada con Zn<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup> (PBSplus) concentrada a entre 5 y 7 mg/mL, y se congeló a -80 °C en alícuotas de 200-500 µl. Las alícuotas pueden descongelarse inmediatamente antes de su uso y la actividad específica de la solución puede ajustarse a 31,25 au/ml (o aproximadamente 0,7 mg/ml dependiendo de la preparación) mediante dilución en PBSplus.

## **12. Vía y frecuencia de administración**

El polipéptido puede administrarse de manera aguda o crónica al sujeto. En determinadas modalidades, una segunda dosificación de un polipéptido ENPP1 soluble o polipéptido de fusión ENPP1 descrito en la presente se administra después de un intervalo de tiempo adecuado de aproximadamente después de dos días, después de cuatro días, después de una semana, o después de un mes al sujeto o incluso con menos frecuencia, tal como una vez cada varios meses o incluso una vez al año o menos. La frecuencia de la dosis resultará evidente para el experto en la técnica y depende de una serie de factores, tales como, pero sin limitarse a, el tipo y gravedad de la enfermedad que se está tratando, y el tipo y edad del paciente.

Se puede seleccionar una cantidad o frecuencia de dosis de manera que el nivel de estado estacionario de PPI en plasma se mantenga a un nivel constante o de

estado estacionario, y/o para lograr un nivel continuo de PPI en plasma que esté cerca del nivel normal (2-3  $\mu\text{M}$ ) o por encima (30-50 % más alto que) de los niveles normales de PPI y no regrese al nivel inferior de PPI que el sujeto tenía antes de la administración de la primera dosificación de construcciones descrita en la presente.

Alternativamente, el agente de ENPP1 puede administrarse en intervalos de tiempo adecuados de cada 2 días, o cada 4 días, una vez por semana o dos veces por semana o una vez cada tres semanas o una vez por mes para lograr un nivel constante de actividad enzimática de ENPP1.

Alternativamente, un agente de ENPP1 de acuerdo con la descripción se administra en un intervalo de tiempo adecuado de cada 2 días, o cada 4 días, o cada semana o cada dos semanas o una vez cada tres semanas o una vez por mes mediante el control de uno o más síntomas de una enfermedad o trastorno de un sujeto.

Sin pretender limitarse por la teoría, se cree que mantener una concentración en estado estacionario de PPI en plasma a niveles normales reduce y/o evita el avance de la calcificación patológica de los sujetos.

En determinadas modalidades, el polipéptido se administra local, regional, parenteral o sistémicamente al sujeto. En algunas modalidades, el polipéptido se administra por vía subcutánea.

Como se usa en la presente, la “*administración parenteral*” de una formulación incluye cualquier vía de administración caracterizada por la ruptura física de un tejido de un sujeto y la administración del agente de ENPP1 a través de la ruptura en el tejido. Por lo tanto, la administración parenteral incluye, pero no se limita a, la administración de un agente de ENPP1 mediante inyección de la composición, mediante la aplicación de la composición a través de una incisión quirúrgica, mediante la aplicación de la composición a través de una herida no quirúrgica que penetra un

tejido, y similares. En particular, se contempla que la administración parenteral incluye, pero no se limita a, técnicas subcutánea, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, inyección intraesternal, e infusión dialítica renal.

El régimen de administración puede afectar lo que constituye una cantidad eficaz. Por ejemplo, varias dosis divididas, así como dosis escalonadas, pueden administrarse en un período de tiempo dado (diariamente) o secuencialmente, o la dosis puede infundirse continuamente, o puede ser una inyección en bolo. Además, la selección de una dosis mencionada de un agente de ENPP1 puede estar indicada por las exigencias de la situación terapéutica o profiláctica.

La administración de las composiciones de la presente descripción (p. ej., polipéptidos ENPP1 solubles y proteínas de fusión de estos) a un paciente, tal como un mamífero, (es decir, un humano), puede llevarse a cabo mediante el uso de procedimientos conocidos, a dosificaciones y durante períodos de tiempo efectivos para tratar una enfermedad o trastorno en el paciente. Una cantidad eficaz de las dosis mencionadas de un agente de ENPP1 necesarias para lograr un efecto terapéutico puede variar de acuerdo con factores tales como la actividad del compuesto particular empleado; el momento de la administración; la tasa de excreción del compuesto; la duración del tratamiento; otros fármacos, compuestos o materiales usados en combinación con el compuesto; el estado de la enfermedad o trastorno, la edad, el sexo, el peso, la condición, la salud general y los antecedentes médicos del paciente que recibe tratamiento, y factores similares conocidos en la ciencia médica. Los regímenes de dosificación pueden ajustarse para proporcionar una respuesta terapéutica óptima. Una dosis seleccionada se determina en función de la actividad biológica del compuesto terapéutico que, a su vez, depende de la semivida y del área bajo la curva de tiempo en plasma del compuesto terapéutico.

### **13. Administración profiláctica**

Armado con la descripción en la presente, un experto en la técnica apreciaría así que la prevención de una enfermedad o trastorno en un sujeto abarca administrar a un sujeto un polipéptido ENPP1 como una medida preventiva contra la enfermedad o trastorno.

Las cantidades relativas del ingrediente activo (p. ej., polipéptidos ENPP1 solubles y proteínas de fusión de estos), el portador farmacéuticamente aceptable, y cualquier ingrediente adicional en una formulación descrita en la presente variarán, dependiendo de la identidad, tamaño, y condición del sujeto tratado y además dependiendo de la vía por la cual se administrará la composición. A modo de ejemplo, la composición puede comprender entre aproximadamente 0,1 % y aproximadamente 100 % (p/p) de ingrediente activo.

#### **14. Enfermedades relacionadas con el PPI bajo**

En algunas modalidades, la descripción contempla métodos para reducir o evitar el avance de enfermedades causadas por niveles más bajos de PPI en plasma en un sujeto que lo necesita, el método comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de los polipéptidos descritos en la presente para aumentar el PPI plasmático de los sujetos a niveles normales (2-3  $\mu\text{M}$ ) o superior (30-50 % superiores a) a los niveles normales y luego para mantener el PPI plasmático a un nivel normal constante o superior a lo normal a partir de entonces. El método comprende además administrar cantidades terapéuticas efectivas adicionales a intervalos de dos días, tres días, una semana o un mes para mantener el PPI plasmático del sujeto a un nivel normal constante o superior a lo normal para reducir o evitar el avance de la calcificación patológica u osificación. En determinadas modalidades, un polipéptido ENPP1 soluble o polipéptido de fusión ENPP1 descrito en la presente puede usarse para elevar los niveles de pirofosfato (PPI) en un sujeto que

tiene un nivel de PPI inferior al nivel normal (que es alrededor de 2 $\mu$ M). En otras modalidades, un polipéptido ENPP1 soluble o polipéptido de fusión ENPP1 descrito en la presente puede usarse para reducir o evitar el avance de la calcificación patológica u osificación en un sujeto que tiene niveles de PPI inferiores a un nivel normal. En algunas modalidades, un polipéptido ENPP1 soluble o polipéptido de fusión ENPP1 descrito en la presente puede usarse para tratar la deficiencia de ENPP1 (p. ej., CAGI y ARHR2) manifestada por una reducción de la concentración de PPI extracelular en un sujeto. En determinadas modalidades, el nivel en estado estacionario de PPI en plasma logrado después de la administración de una primera dosificación de un polipéptido ENPP1 soluble o polipéptido de fusión ENPP1 descrito en la presente se mantiene durante un período de tiempo de al menos 2 días, al menos 4 días, al menos una semana o al menos un mes.

En algunas modalidades, la descripción contempla métodos para reducir o evitar el avance de una enfermedad causada por niveles más bajos de lo normal de PPI en plasma en un sujeto que lo necesita, el método comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un polipéptido ENPP1 soluble o polipéptido de fusión ENPP1 descritos en la presente (p. ej., SEQ ID NO: 3-5) para aumentar y/o mantener el PPI en plasma de los sujetos a un nivel que sea de aproximadamente 90 %, 95 %, 100 %, 105 %, 110 %, 120 %, 130 %, 140 %, o 150 % del nivel normal de PPI. En determinadas modalidades, el método comprende además la administración adicional del polipéptido descrito en la presente cada dos días, tres días, una semana, o un mes para mantener los niveles de PPI en plasma a un nivel que es aproximadamente 90 %, 95 %, 100 %, 105 %, 110 %, 120 %, 130 %, 140 %, o 150 % del nivel de PPI normal, evitando así la progresión de la calcificación patológica u osificación.

## **15. Tratamiento/Indicaciones**

Las dosificaciones mencionadas de un agente de ENPP1 descrito en la presente pueden usarse en métodos para tratar, revertir, o prevenir el avance de enfermedades asociadas con una deficiencia de ENPP1 o una deficiencia de ABCC6 como se describe en la presente.

En un aspecto, la descripción se refiere a administrar a un sujeto que tiene una deficiencia de ENPP1 o una deficiencia de ABCC6 ,un agente de ENPP1 a una dosis de aproximadamente 2,4 mg por kilogramo del sujeto para restaurar un nivel fisiológico de ENPP1 en el plasma o tejidos del sujeto.

En un aspecto, la descripción se refiere a administrar a un sujeto que tiene una deficiencia de ENPP1 o una deficiencia de ABCC6 ,un agente de ENPP1 a una dosis de aproximadamente 2,4 mg por kilogramo del sujeto para restaurar un nivel fisiológico de Pi y/o PPI en el plasma del sujeto. El nivel fisiológico de Pi y PPI en el suero humano (y en los mamíferos en general) es de 1-3 mM y 2-3  $\mu$ M, respectivamente.

En un aspecto, la descripción se refiere a un método para prevenir el avance o reducir la calcificación vascular en un sujeto con deficiencia de ENPP1 o con deficiencia de ABCC6, el método comprende: para evitar el avance o reducir la calcificación vascular en el sujeto, el método comprende: administrar al sujeto un agente de ENPP1 a una dosis de aproximadamente 2,4 mg por kilogramo del sujeto, para evitar el avance o reducir la calcificación vascular en el sujeto.

En un aspecto, la descripción se refiere a un método para prevenir el avance o reducir la calcificación patológica en un sujeto con deficiencia de ENPP1 o con deficiencia de ABCC6, el método comprende: administrar al sujeto un agente de ENPP1 a una dosis de aproximadamente 2,4 mg por kilogramo del sujeto, para evitar el avance o reducir la calcificación vascular en el sujeto.

Las dosificaciones mencionadas de un agente de ENPP1 descrito en la presente pueden usarse en métodos para tratar, revertir, o prevenir el avance de

enfermedades asociadas con la calcificación patológica como se describe en la presente.

En un aspecto, la descripción se refiere a administrar a un sujeto que tiene calcificación patológica un agente de ENPP1 a una dosis de aproximadamente 2,4 mg por kilogramo del sujeto para restaurar un nivel fisiológico de ENPP1 en el plasma de los tejidos del sujeto.

En un aspecto, la descripción se refiere a administrar a un sujeto que tiene calcificación patológica un agente de ENPP1 a una dosis de aproximadamente 2,4 mg por kilogramo del sujeto para restaurar un nivel fisiológico de Pi y/o PPI en el plasma del sujeto. El nivel fisiológico de Pi y PPI en el suero humano (y en los mamíferos en general) es de 1-3 mM y 2-3  $\mu$ M, respectivamente.

En un aspecto, la descripción se refiere a un método para prevenir el avance o reducir la calcificación vascular en un sujeto, el método comprende: para evitar el avance o reducir la calcificación vascular en el sujeto, el método comprende: administrar al sujeto un agente de ENPP1 a una dosis de aproximadamente 2,4 mg por kilogramo del sujeto, para evitar el avance o reducir la calcificación vascular en el sujeto.

En un aspecto, la descripción se refiere a un método para prevenir el avance o reducir la calcificación patológica en un sujeto, el método comprende: administrar al sujeto un agente de ENPP1 a una dosis de aproximadamente 2,4 mg por kilogramo del sujeto, para evitar de ese modo el avance o reducir la calcificación patológica en el sujeto.

En un aspecto, la descripción se refiere a un método para prevenir el avance o reducir la calcificación tisular en un sujeto, el método comprende: administrar al sujeto un agente de ENPP1 a una dosis de aproximadamente 2,4 mg por kilogramo del sujeto, para evitar de ese modo el avance o reducir la calcificación tisular en el sujeto.

En un aspecto, la descripción se refiere a un método para prevenir el avance o reducir la osificación patológica en un sujeto, el método comprende: administrar al sujeto un agente de ENPP1 a una dosis de aproximadamente 2,4 mg por kilogramo del sujeto, para evitar de ese modo el avance o reducir la calcificación tisular en el sujeto.

En un aspecto, la descripción se refiere a un método para prevenir el avance o reducir la calcificación tisular en un sujeto con deficiencia de ENPP1 o con deficiencia de ABCC6, el método comprende: administrar al sujeto un agente de ENPP1 a una dosis de aproximadamente 2,4 mg por kilogramo del sujeto, para evitar el avance o reducir la calcificación tisular en el sujeto.

En un aspecto, la descripción se refiere a un método para prevenir el avance o reducir la osificación patológica en un sujeto con deficiencia de ENPP1 o con deficiencia de ABCC6, el método comprende: administrar al sujeto un agente de ENPP1 a una dosis de aproximadamente 2,4 mg por kilogramo del sujeto, para evitar el avance o reducir la calcificación tisular en el sujeto.

En un aspecto, la descripción se refiere a un método para aumentar el pirofosfato circulante (PPi) en un sujeto con deficiencia de ENPP1 o con deficiencia de ABCC6, el método comprende: administrar al sujeto un agente de ENPP1 a una dosis de aproximadamente 2,4 mg por kilogramo del sujeto, para aumentar de ese modo el PPi circulante en el sujeto.

En un aspecto, la descripción se refiere a un método para aumentar la actividad de pirofosfatasa en un sujeto con deficiencia de ENPP1 o con deficiencia de ABCC6, el método comprende: administrar al sujeto un agente de ENPP1 a una dosis de aproximadamente 2,4 mg por kilogramo del sujeto, para aumentar de ese modo el PPi circulante en el sujeto.

En un aspecto, la descripción se refiere a un método para aliviar uno o más

síntomas de la deficiencia de ENPP1 o la deficiencia de ABCC6 en un sujeto, el método comprende: administrar al sujeto un agente de ENPP1 a una dosis de aproximadamente 2,4 mg por kilogramo del sujeto, para aliviar de ese modo uno o más síntomas de la deficiencia de ENPP1 o uno o más síntomas de la deficiencia de ABCC6 en el sujeto.

En un aspecto, la descripción se refiere a un método para tratar a un sujeto con deficiencia de ENPP1 o con deficiencia de ABCC6, el método comprende: administrar al sujeto un agente de ENPP1 a una dosis de aproximadamente 2,4 mg por kilogramo del sujeto, para tratar de ese modo al sujeto.

En determinados aspectos, la presente descripción se refiere al uso de un agente de ENPP1, tal como un polipéptido que tiene secuencias de aminoácidos como se expone en, p. ej., las SEQ ID NO: 2, 3, 4, y 5.

En determinadas modalidades, la calcificación patológica se selecciona del grupo que consiste en cálculos renales y vesicales, cálculos de la pulpa dental, cálculos biliares, cálculos en las glándulas salivales, prostatitis calculosa crónica, microlitos testiculares, calcificación en pacientes en hemodiálisis, aterosclerosis, malacoplasia, esclerodermia (esclerosis sistémica), calcinosis cutis, estenosis aórtica calcificada, sinovitis y artritis, hiperostosis esquelética intersticial difusa, dermatomiositis juvenil, calcificación arterial generalizada del lactante (GACI), osificación del ligamento longitudinal posterior (OPLL), raquitismo hipofosfatémico, raquitismo hipofosfatémico autosómico (ARHR2), artrosis, calcificación de placas ateroscleróticas, enfermedad renal crónica (CKD), enfermedad renal en etapa terminal (ESRD), pseudoxantoma elástico (PXE), espondilitis anquilosante, endurecimiento de las arterias, calcifilaxia, y lupus sistémico erimatoso.

En determinadas modalidades, la calcificación patológica se selecciona del grupo que consiste en pseudoxantoma elástico (PXE) y calcificación de placas

ateroscleróticas.

En determinadas modalidades, la calcificación patológica se selecciona del grupo que consiste en calcificación de la arteria idiopática infantil (CAII) y calcificación de placas ateroscleróticas.

En algunas modalidades, la descripción contempla métodos para reducir, revertir o evitar el avance de la calcificación ectópica de tejido blando, que incluye reducir, mejorar, o evitar la calcificación vascular en un sujeto que lo necesita, el método comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un polipéptido ENPP1 soluble o polipéptido de fusión ENPP1 descritos en la presente.

En algunas modalidades, la descripción contempla métodos para reducir o prevenir el avance de enfermedades causadas por una deficiencia de ENPP1 (por ejemplo, GACI y ARHR2), el método comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido ENPP1 soluble o proteína de fusión ENPP1 descrita en la presente (por ejemplo, SEQ ID NO: 2, 3, 4, y 5). En algunas modalidades, la deficiencia de ENPP1 es CAGI. En algunas modalidades, la deficiencia de ENPP1 es ARHR2.

En algunas modalidades, la descripción contempla métodos para reducir o prevenir el avance de enfermedades causadas por una deficiencia de ABCC6 (por ejemplo, PXE), el método comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido ENPP1 soluble o proteína de fusión ENPP1 descrita en la presente (por ejemplo, SEQ ID NO: 2, 3, 4, y 5). En algunas modalidades, la deficiencia de ABCC6 es PXE. En algunas modalidades, los sujetos que tienen deficiencia de ABCC6 presentan síntomas similares a los de una persona diagnosticada con GACI o ARHR2.

En algunas modalidades, la descripción contempla métodos para reducir o prevenir el avance de enfermedades causadas por calcificación patológica (por

ejemplo, GACI y ARHR2), el método comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido ENPP1 soluble o proteína de fusión ENPP1 descrita en la presente (por ejemplo, SEQ ID NO: 2, 9, 10, y 11). En algunas modalidades, el sujeto que presenta calcificación patológica tiene deficiencia de ENPP1. En algunas modalidades, el sujeto que presenta calcificación patológica tiene deficiencia de ABCC6.

En determinadas modalidades, el polipéptido es un producto secretado de una proteína precursora de ENPP1 expresada en una célula de mamífero. En otras modalidades, la proteína precursora de ENPP1 comprende una secuencia de péptido señal y un polipéptido ENPP1, en donde la proteína precursora de ENPP1 se somete a procesamiento proteolítico al polipéptido descrito en la presente. En algunas modalidades, en la proteína precursora de ENPP1, la secuencia de péptido señal se conjuga al extremo N del polipéptido ENPP1. Tras la proteólisis, la secuencia de señal se escinde de la proteína precursora de ENPP1 para proporcionar el polipéptido ENPP1. En determinadas modalidades, la secuencia de péptido señal se selecciona del grupo que consiste en secuencia de péptido señal de ENPP1, secuencia de péptido señal de ENPP2, secuencia de péptido señal de ENPP7, y secuencia de péptido señal de ENPP5.

Un experto en la técnica apreciará, cuando se arme con la presente descripción que incluye los métodos detallados en la presente, que la descripción no se limita al tratamiento de una enfermedad o trastorno una vez establecida. Particularmente, los síntomas de la enfermedad o trastorno no necesitan haberse manifestado al punto de perjuicio para el sujeto; de hecho, la enfermedad o trastorno no necesita detectarse en un sujeto antes de que se administre el tratamiento. Es decir, no es necesario que ocurra una patología significativa de la enfermedad o trastorno antes de que los polipéptidos ENPP1 de la presente puedan proporcionar un

beneficio.

En determinados aspectos, la descripción se refiere a métodos para prevenir enfermedades y trastornos en un sujeto, en que un polipéptido ENPP1 o polipéptido de fusión ENPP1, descritos en la presente, pueden administrarse a un sujeto antes de la aparición de la enfermedad o trastorno, evitando de esta manera que la enfermedad o trastorno se desarrolle. Por lo tanto, la descripción se refiere a métodos para prevenir o retrasar el inicio, o reducir el avance o crecimiento, de una enfermedad o trastorno en un sujeto, que comprende administrar un polipéptido ENPP1 a un sujeto antes de la detección de la enfermedad o trastorno. En determinadas modalidades, el polipéptido ENPP1 se administra a un sujeto con una fuerte historia familiar de la enfermedad o trastorno, lo que previene o demora de esta manera el inicio o la progresión de la enfermedad o trastorno.

## 16. Secuencias de polipéptidos ENPP1

Tabla 1: Secuencias

| SEQ<br>ID<br>NO | Secuencia                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | Descripción                                                                                  |
|-----------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------|
|                 | 1 MERDGCAGGG SRGEGGRAP REGPAGNGRD RGRSHAAEAP GDPQAAASLL<br>51 APMDVGEEPL EKAARARTAK DPNTYKVLSSL VLSVCVLTIT LGCIFGLKPS<br>101 CAKEVKSCCKG RCFERTFGNC RCDAACVELG NCCLDYQETC IEPEHIWTCN<br>151 KFRCEGEKRLT RSLCACSDDC KDKGDCCINY SSVQCQGEKSW VEEPCESINE<br>201 PQCPAGFETP PTLFLSLDGF RAEYLHTWGG LLPVISKLKK CGTYTKNMRP<br>251 VYPTKTFFPNH YSIVTGLYPE SHGIIDNKMY DPKMNASFSL KSKEKFNPEW<br>301 YKGEPIWVTA KYQGLKSGTF FWPGSDVEIN GIFPDIYKMY NGSVPFEERI<br>351 LAVLQWLQLP KDERPHFYTL YLEEPDSSGH SYGPVSSEVI KALQRVDGMV<br>401 GMLMDGLKEL NLHRCLNLIL ISDHGMEQGS CKKIYILNKY LGDVKNIKVI<br>451 YGPAARLRPS DVPDKYYSFN YEGIARNLSC REPQHFHKPY LKHFLPKRLH<br>501 FAKSDRIEPL TFYLDPQWQL ALNPSEKRYC GSGFHGSDNV FSNMQALFVG<br>551 YGPGFKHGIE ADTFENIEVY NLMCDLLNLT PAPNNGTHGS LNHLKKNFVY<br>601 TPKHPKEVHP LVQCPFTRNP RDNLGCSNCP SILPIEDFQT QFNLTVAEEK<br>651 IIKHETLPYG RPRVLQKENT ICLLSQHQM SGYSQDILMP LWTSTVDRN<br>701 DSFSTEDFSN CLYQDFRIPL SPVHKCSFYK NNTKVSYGFL SPPQLKNKSS<br>751 GIYSEALLTT NIVPMYQSFQ VIWRYFHDTL LRKYAEERNG VNVVSGPVFD<br>801 FDYDGRCDL ENLRQKRRVI RNQEILIPTH FFIVLTSCKD TSQTPLHCEN<br>851 LDTLAFILPH RTDNSESCVH GKHDSSWVEE LLMLHRARIT DVEHITGLSF<br>901 YQQRKEPVSD ILKLKTHLPT FSQED | La secuencia completa de aminoácidos sin procesar de la proteína precursora de ENPP1 natural |
|                 | 1 PSCAKEVKSC KGRCFERTFG NCRCDAAACVE LGNCCLDYQE TCIEPEHIWT<br>51 CNKFRCEGEK LTRSLCACSD DCKDKGDCCI NYSSVCQGEK SWVEEPCESI<br>101 NEPQCAGFE TPPTLLFSLD GFRAEYLHTW GGLLPVISKL KCKGTYTKNM<br>151 RPVYPTKTFP NHYSIVTGLY PESHGIIDNK MYDPKMNASF SLKSKEKFN<br>201 EWYKGEPIW TAKYQGLKSG TFFWPGSDVE INGIFPDIYK MYNGSVPFEE<br>251 RILAVLQWLQ LPKDERPHFY TLYLEEDPSS GHSYGPVSSE VIKALQRVDG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | La secuencia del polipéptido ENPP1                                                           |

|     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                                                              |
|-----|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|
|     | <p>301 MVGMLMDGLK ELNLHRCNL ILISDHGMEQ GSCCKYIYLN KYLGDVKNIK</p> <p>351 VIYGPAARLR PSDVPDKYYS FNYEGIARNL SCREPNQHFK PYLKHFLPKR</p> <p>401 LHFASDRIE PLTFYLDPOW QLALNPSEK YCGSGFHGSD NVFSNMQALF</p> <p>451 VGYGPGFKHG IEADTFENIE VYNLMCDLLN LTPAPNNGTH GSNHLLKNP</p> <p>501 VYTPKHPKEV HPLVQCPFTN NPRDNLGCSN NPSILPIEDF QTQFNLTVAE</p> <p>551 EKIKHETLP YGRPRVLQKE NTICLLSQHQ FMSGYSQDIL MPLWTSYTV</p> <p>601 RNDSSFSTEDF SNCLYQDFRI PLSPVHKCSF YKNNTKVSYG FLSPPLNKN</p> <p>651 SSGIYSEALL TTNIVPMYQS FQVIWRYFHD TLLRKYAEER NGVNVVSGPV</p> <p>701 FDFDYDGRCD SLENLRQKRR VIRNQEILIP THFFIVLTSC KDTSTQPLHC</p> <p>751 ENLDTLAFIL PHRTDNSESC VHGHKDDSWV EELLMLHRAR ITDVEHITGL</p> <p>801 SFYQQRKEPV SDILKLKTHL PTFSQED</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | <p>extracelular procesado</p> <p>(maduro)</p>                |
|     | <p>FTAGLKPSCAKEVKSCKGRCFERTFGNCRCDAAACVELGNCCLDYQETCIEPE</p> <p>HIWTCNKFRCGEKRLTRSLCACSDCKDKGDCINYSVCQGEKSWVEEPCESINEPQCPA</p> <p>GFETPPPTLLFSLDGFRAEYLHTWGGLLPVISKLKCGTYTKNMRPVYPTKTFPNHYSIVTG</p> <p>LYPESHGIDNKMYPDKMNASFSLKSKEKFNPEWYKGEPIWVTAKYQGLKSGTFFWPGSDV</p> <p>EINGIFPDIYKMYNGSVPFEEERILAVLQWLQLPKDERPHFYTYLLEEDSSGHSYGPVSSE</p> <p>VIKALQRVDGMVGMMLDGLKELNLHRCNLNLILISDHGMEQSGCKKYIYLNKYLGVDVKNIKV</p> <p>YGPAAARLRPSDVPDKYYSFNYEGIARNLSCREPNQHFKPYLKHFLPKRLHFAKSDRIEPL</p> <p>TFYLDPOWQLALNPSEKRYCGSGFHGSDNVFSNMQALFVGYGPGFKHGIEADTFENIEVYN</p> <p>LMCDLLNLTAPNNGTHGSLNHLKNPVYTPKHPKEVHPLVQCPFTNPRDNLGCSNPSI</p> <p>LPIEDFQTQFNLTVAEEKIKHETLPYGRPRVLQKENTICLLSQHQFMSGYSQDILMPLWT</p> <p>SYTVDRNDSFSTEDFSNCLYQDFRIPLSPVHKCSFYKNNTKVSYGFLSPPLNKNSSGIYS</p> <p>EALLTTNIVPMYQSFQVIWRYFHDITLLRKYAEERNVNVVSGPVDFDYDGRCDSENLRQ</p> <p>KRRVIRNQEILIPTHFFIVLTSCDTSQTPHLCENLDTLAFILPHRTDNSESCVHGHKDDSW</p> <p>WVEELLMLHRARITDVEHITGLSFYQQRKEPVSDILKLKTHLPTFSQEDLINDKTHTCPPC</p> <p>PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK</p> <p>PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL</p> <p>PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD</p> <p>KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p> | <p>Construcción Fc</p> <p>ENPP1-lenlazador-</p> <p>hIgG1</p> |
|     | <p>GLKPSCAKEVKSCKGRCFERTFGNCRCDAAACVELGNCCLDYQETCIEPEHIW</p> <p>TCNKFRCGEKRLTRSLCACSDCKDKGDCINYSVCQGEKSWVEEPCESINEPQCPAGFE</p> <p>TPPTLLFSLDGFRAEYLHTWGGLLPVISKLKCGTYTKNMRPVYPTKTFPNHYSIVTGLYP</p> <p>ESHGIDNKMYPDKMNASFSLKSKEKFNPEWYKGEPIWVTAKYQGLKSGTFFWPGSDVEIN</p> <p>GIFPDIYKMYNGSVPFEEERILAVLQWLQLPKDERPHFYTYLLEEDSSGHSYGPVSSEVIK</p> <p>ALQVRVDGMVGMMLDGLKELNLHRCNLNLILISDHGMEQSGCKKYIYLNKYLGVDVKNIKVIY</p> <p>PAARLRPSDVPDKYYSFNYEGIARNLSCREPNQHFKPYLKHFLPKRLHFAKSDRIEPLTFY</p> <p>LDPOWQLALNPSEKRYCGSGFHGSDNVFSNMQALFVGYGPGFKHGIEADTFENIEVYNLMC</p> <p>DLNLTAPNNGTHGSLNHLKNPVYTPKHPKEVHPLVQCPFTNPRDNLGCSNPSILPI</p> <p>EDFQTQFNLTVAEEKIKHETLPYGRPRVLQKENTICLLSQHQFMSGYSQDILMPLWTSYT</p> <p>VDRNDSFSTEDFSNCLYQDFRIPLSPVHKCSFYKNNTKVSYGFLSPPLNKNSSGIYSEAL</p> <p>LTTNIVPMYQSFQVIWRYFHDITLLRKYAEERNVNVVSGPVDFDYDGRCDSENLRQKRR</p> <p>VIRNQEILIPTHFFIVLTSCDTSQTPHLCENLDTLAFILPHRTDNSESCVHGHKDDSWVE</p> <p>ELLMLHRARITDVEHITGLSFYQQRKEPVSDILKLKTHLPTFSQEDLINDKTHTCPPCPAP</p> <p>ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE</p> <p>EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS</p> <p>REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK</p> <p>SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>       | <p>Construcción Fc</p> <p>ENPP1-lenlazador-</p> <p>hIgG1</p> |
|     | <p>PSCAKEVKSCKGRCFERTFGNCRCDAAACVELGNCCLDYQETCIEPEHIWTCN</p> <p>KFRCEKRLTRSLCACSDCKDKGDCINYSVCQGEKSWVEEPCESINEPQCPAGFETPP</p> <p>TLLFSLDGFRAEYLHTWGGLLPVISKLKCGTYTKNMRPVYPTKTFPNHYSIVTGLYPESH</p> <p>GIDNKMYPDKMNASFSLKSKEKFNPEWYKGEPIWVTAKYQGLKSGTFFWPGSDVEINGIF</p> <p>PDIYKMYNGSVPFEEERILAVLQWLQLPKDERPHFYTYLLEEDSSGHSYGPVSSEVIKALQ</p> <p>RVDGMVGMMLDGLKELNLHRCNLNLILISDHGMEQSGCKKYIYLNKYLGVDVKNIKVIYGPAA</p> <p>RLRPSDVPDKYYSFNYEGIARNLSCREPNQHFKPYLKHFLPKRLHFAKSDRIEPLTFYLD</p> <p>QWQLALNPSEKRYCGSGFHGSDNVFSNMQALFVGYGPGFKHGIEADTFENIEVYNLMCDLL</p> <p>NLTAPNNGTHGSLNHLKNPVYTPKHPKEVHPLVQCPFTNPRDNLGCSNPSILPIEDF</p> <p>QTQFNLTVAEEKIKHETLPYGRPRVLQKENTICLLSQHQFMSGYSQDILMPLWTSYTVDR</p> <p>NDSFSTEDFSNCLYQDFRIPLSPVHKCSFYKNNTKVSYGFLSPPLNKNSSGIYSEALLTT</p> <p>NIVPMYQSFQVIWRYFHDITLLRKYAEERNVNVVSGPVDFDYDGRCDSENLRQKRRVIR</p> <p>NQEILIPTHFFIVLTSCDTSQTPHLCENLDTLAFILPHRTDNSESCVHGHKDDSWVEELL</p> <p>MLHRARITDVEHITGLSFYQQRKEPVSDILKLKTHLPTFSQEDLINDKTHTCPPCPAPELL</p> <p>GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY</p> <p>NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE</p> <p>MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ</p> <p>QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>           | <p>Construcción Fc</p> <p>ENPP1-lenlazador-</p> <p>hIgG1</p> |
|     | <p>DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE</p> <p>VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE</p> <p>KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT</p> <p>PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | <p>Fc de IgG1 humana</p>                                     |
| 116 | <p>APSCAKEVKSCKGRCFERTFGNCRCDAAACVELGNCCLDYQETCIEPEHIWTC</p> <p>NKFRCEKRLTRSLCACSDCKDKGDCINYSVCQGEKSWVEEPCESINEPQCPAGFETP</p> <p>PTLLFSLDGFRAEYLHTWGGLLPVISKLKCGTYTKNMRPVYPTKTFPNHYSIVTGLYPES</p> <p>HGIDNKMYPDKMNASFSLKSKEKFNPEWYKGEPIWVTAKYQGLKSGTFFWPGSDVEINGI</p> <p>FPDIYKMYNGSVPFEEERILAVLQWLQLPKDERPHFYTYLLEEDSSGHSYGPVSSEVIKAL</p> <p>QRVDGMVGMMLDGLKELNLHRCNLNLILISDHGMEQSGCKKYIYLNKYLGVDVKNIKVIYGPAA</p> <p>ARLRPSDVPDKYYSFNYEGIARNLSCREPNQHFKPYLKHFLPKRLHFAKSDRIEPLTFYLD</p> <p>PQWQLALNPSEKRYCGSGFHGSDNVFSNMQALFVGYGPGFKHGIEADTFENIEVYNLMCDL</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | <p>Construcción Fc</p> <p>ENPP1-lenlazador-</p>              |

|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |       |
|--|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
|  | <p> <u>LNLTPAPNNGTHGSLNHLKKNPVYTPKHPKEVHPLVQCPFTRNPRDNLGCSCNPSILPIED</u><br/> <u>FQTQFNLTVAEEKIKHETLPYGRPRVLQKENTICLLSQHQFMSGYSQDILMPLWTSYTV</u><br/> <u>RNDSESTEDFSNCLYQDFRIPLSPVHKCSFYKNNTKVSYGFLSPPQLNKNSSGIYSEALLT</u><br/> <u>TNIVPMYQSFQVIWRYFHDTLRLKYAEERNGVNVVSGPVDFDYDGRCDSENLRQKRRVI</u><br/> <u>RNQEILIPTHFFIVLTSCKDTSQTPHLCENLDTLAFILPHRTDNSESCVHGKHDSSWVEEL</u><br/> <u>LMLHRARITDVEHITGLSFYQQRKEPVSDILKLTHTLPTFSQEDLINDKTHTCPPCPAPEL</u><br/> <u>LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ</u><br/> <u>YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE</u><br/> <u>EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW</u><br/> <u>QQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQKSLSLSPGK</u> </p> | hlgG1 |
|--|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|

### SEQ ID NO: 7 (Ratón NPP1- registro NCBI NP\_001295256.1)

1 MERDGDQAGH GPRHGSAGNG RELESPAAAS LLAPMDLGEE PLEKAERARP AKDPNTYKVL  
 61 SILVSVCVLT TILGCIFGLK PSCAKEVKSC KGRCFERTFS NCRDAACVS LGNCCLDFQE  
 121 TCVEPTHIWT CNKFRCEKEK LSRFVCSCAD DCKTHNDCCI NYSSVCQDKK SWVEETCESI  
 181 DTPECPAEFE SPPTLLFSLD GFRAEYLHTW GGLLPVISKL KNCGYTKNM RPMYPTKTFP  
 241 NHYSIVTGLY PESHGIIDNK MYDPKMNASF SLKSKEKFNP LWYKGQPIWV TANHQEVKSG  
 301 TYFWPGSDVE IDGILPDIYK VYNGSVPFEE RILAVLEWLQ LPSHERPHFY TLYLEEDPSS  
 361 GHSHGPVSSE VIKALQKVDR LVGMLMDGLK DLGLDKCLNL ILISDHGMEQ GSCKKYVYLN  
 421 KYLGDVNNVK VVYGPAARLR PTDVPETYYS FNYEALAKNL SCREPNQHFR PYLKPFLPKR  
 481 LHFAKSDRIE PLTFYLDPQW QLALNPSEK YCGSGFHGSD NLFSNMQALF IGYGPAFKHG  
 541 AEVDSFENIE VYNLMCDLLG LIPAPNNGSH GSLNHLKKP IYNPSHPKEE GFLSQCPKIS  
 601 TSNDLGCTCD PWIVPIKDFE KQLNLTTEDV DDIYHMTVPY GRPRILLKQH RVCLLQQQQF  
 661 LTGYSLDLLM PLWASYTFLS NDQFSRDDFS NCLYQDLRIP LSPVHKCSY KSNKLSYGF  
 721 LTPPRLNRVS NHIYSEALLT SNIVPMYQSF QVIWHYLHDT LLQRYAHERN GINVVSGPVF  
 781 DFDYDGRYDS LEILKQNSRV IRSQEILIPT HFFIVLTSCK QLSETPLECS ALESSAYILP  
 841 HRPDNIESCT HGKRESSWE ELLTLHRARV TDVELITGLS FYQDRQESVS ELLRLKTHLP  
 901 IFSQED

### SEQ ID NO: 8 (Vaca NPP1- registro NCBI NP\_001193141.1)

1 MERDSCAGGG SRGEGGGRGP REGLAGNRD PGPGRAAEAS GEPQAAASLL APMDLGEEPL  
 61 ERAARARPAK DPNTYKVLST VLSVCVLTIT LGCIFGLKPS CAKEIKSCKG RCFERTFGNC  
 121 RCDAACVDLG NCCLDYQETC IEPERIWTCT KFRCEKRLS RSLCSCSDDC KDKGDCCINH  
 181 GSVCERGEKSW AEEECDSIDE PQCPAGFETP PTLLFSLDGF RAEYLHTWGG LLPVISKLKT  
 241 CGTYTKNMRP VYPTKTFPNH YSIVTGLYPE SHGIIDNNIY DPQMNAFAL KNKEKFNPEW  
 301 YKGEPWLTA KYQGLKTGTF FWPGSDVKIN GIFPDIYKIY NVSVPFEERI LAILKWLQLP

361 KDERPHFYTL YLEEPDSSGH SYGPVSSEVI RALQRVDNMV GMLMDGLKEL NLHRCLNLIL  
 421 ISDHGMEQGS CKKYVYLNKY LGDTKDYKVV YGPAARLRPS DVPDKYYSFD YEGIAKNLSC  
 481 QEPNQHFHPY LKHFLPKRLH FAKNDRIERL TFYLDPQWQL ALNPSEKRYC GGGFHGSDNT  
 541 FLNMQALFIG YGPGFKHSTE VDSFENIEVY NLMCDLLNLT PAPNNGTHGS LNHLLSNPVY  
 601 TPKHPKEVRP LVQCPFTRAP RESLDCSCDP SILPIVDFQT QLNLTMAEEK TIKRGALPYG  
 661 RPRVLQNSTV CLLYQHGFVS GYSRDILMPL WTSYTIGRND SFSTEDFSNC LYQDLRIPLS  
 721 PVHKCSFYKN NAKLSYGLLS PPQLHKGSSQ VYSEALLTTN IVPYQSFQV IWHYLGHTLL  
 781 QRYAEERNGL NVVSGPVFDS DYDGRYDSLE TLKQNSKIIR NLEVLIPTHF FLVLTSCNT  
 841 SQTPLQCENL DAMAFILPHK TDNSESCHAG KHESLWVEEL LKLHTARITD VEHITGLSFY  
 901 QERKEPISDI LKLKTHLPTF NQED

**SEQ ID NO: 9** (*Conejo NPP1- registro NCBI NP\_001162404.1*)

1 MERDGCAGGG SRGGEGGRAP REGPAGNSRD PGRSHAAEAP GNPQAAASLL APMDVGEEPL  
 61 EKAARARTAK DPNTYKVLST VLSVCVLTTI LGCIFGLKPS CAKEVKSCKG RCFERTFGNC  
 121 RCDAACVELG NCCLDYQETC IEPEHIWTCN KFRCEGEKRLT RSLCACSDDC KDQGDCCINY  
 181 SSVQCQGEKSW VEEPCESEINE PQCPAGFETP PTLLFSLDGF RAEYLHTWGG LLPVISKLKK  
 241 CGTYTKNMRP VYPTKTFPNH YSIVTGLYPE SHGIIDNKMY DPKMNASFSL KSKEKFNPEW  
 301 YKGEPWIWTA KYQGLKSGTF FWPGSDVEIN GIFPDIYKMY NGSVPFEERI LAVLQWLQLP  
 361 KDERPHFYTL YLEEPDSSGH SYGPVSSEVI KALQRVDNMV GMLMDGLKEL NLHRCLNLIL  
 421 VSDHGMEQGS CKKYIYLNKY LGDVKNIKVI YGPAARLRPS DVPDKYYSFN YEGIARNLSC  
 481 REPNQHFHPY LKHFLPKRLH FAKSDRIEPL TFYLDPQWQL ALNPSEKRYC GSGFHGSDNI  
 541 FSNMQALFVG YGPGFKHGIE VDTFENIEVY NLMCDLLNLT PAPNNGTHGS LNHLKPNVY  
 601 TPKHPKEVHP LIQCPFTRNP RDNLCSCNP SILPIEDFQT QFNLTVAEEK NIKHETLPYG  
 661 RPRVLQKKNT ICLLSQHGFQ SGYSQDILMP LWTSYTVDRN DSFSTEDFSN CLYQDFRISL  
 721 SPVHKCSFYK NNTKVSYGFL SPPQLNKNSR GIYSEALLTT NIVPMYQSFQ VIWRYFHDTL  
 781 LRKYAEERNGL NVVSGPVFDFDYDGRYDSL EILRQKRRVI RNQEILIPTH FFIVLTSCKD  
 841 ASQTPLHCEN LDTLAFILPH RTDNSESLCH GKHESSWVEE LLMLHRARIT DVEHITGLSF  
 901 YQQRKEPVSD ILKLKTHLPT FSQED

**SEQ ID NO: 10** (*Babuino NPP1- registro NCBI NP\_001076211.2*)

1 MERDGCAGGG SQGGGKGGRG PREGLAGNGR DPSHGQASEA PGDPQAAASL LAPMDLGEEP

61 LEKAAGARPA KDPNTYKVLS LVLSVCVLTT ILGCIFGLKP SCAKEVKSCK GRCFERTFGN  
 121 CRCDVACVDL GNCCLDYQET CIEPERIWTC NKFRGCEKRL SRSLCACSDS CKERGDCIN  
 181 YSAVCQGEKS WVEETCENIN EPQCPEGFEM PPTLLFSLDG FRAEYLHTWG GLLPVISKLL  
 241 KCGTYAKNMR PVYPTKTFPN HYSIVTGLYP ESHGIIDNKM YDPKMNASFS LKSKEKFNPE  
 301 WYKGEPWLIT AKYQGLRSGT FFWPGSDVKI NGIFPDYKI YNGSVPFEEER ILAILKWLRL  
 361 PKDERPHFYT LYLEEPDSSG HSYGVSSEV IKALQVRDNM VGMLMDGLKE LNLHQCLNLI  
 421 LISDHGMEQG SCKKYIYLNK YLGDTKNIV IYGPAARLRP SDVPEKYYSF NYENIARNLS  
 481 CREPNQHFKEP YLKHFLPKRL HFAKSDRIEP LTFYLDPQWQ LALSPSERKY CGSGFHGSDN  
 541 VFSNMQALFV GYGPGFQHG I EVDSFENIEV YNLMCDLLNL TPAPNNGTHG SLNHLLKNPI  
 601 YTPKHPKEVQ PSVQCPLAGS PRDSLGCSCN PSILPIVDFQ TQFNLTAAE KNINRASLPY  
 661 GRPRLLQKKS SVCLLYQHGF VSGYSHDVLN PLWTSYTVNR NDSFSTEDFS NCLYQDLRIS  
 721 FSPIHNCIFY KNNAKLSYGF LSPPQLSKDS SQIYSEALLT SNIVPMYQSF QVIWRYFHDT  
 781 LLQRYAEERN SINVVSGPVF DSDYDGRYDS SEALKRNRV IRNQEILIPT HFFIVITSCK  
 841 NTSQTPLQCD NLDPLAFILP HRSDNSESCV HEKRESSWIE ELLMMHRARI MDVEHITGLS  
 901 FYQERKEPVS DILKLKTHLP TVSQED

## 17. Protocolos de tratamiento

Los siguientes protocolos se pueden utilizar como guía para la terapia de reemplazo enzimático de ENPP1 en las dosis mencionadas del agente de ENPP1, según lo considere adecuado el médico. Los protocolos de tratamiento establecidos en la presente se basan en el uso de términos abreviados, cuyos nombres completos se exponen en la Tabla 2.

### a. Grupos e intervenciones

| Grupos                                                                                                           | Intervenciones asignadas                                                                                    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Experimental: Agente de ENPP1<br><br>A los sujetos aleatorizados al grupo de ENPP1 se les administrará un agente | Fármaco: Agente de ENPP1<br><br>Proteína de fusión recombinante que contiene los dominios extracelulares de |

|                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| de 2,4 mg/kg de ENPP1, tal como la dosis semanal de ENPP1-Fc, mediante inyección subcutánea (SC) durante el período de tratamiento aleatorizado de 52 semanas y el período de extensión abierto.                                                                           | ENPP1 humana acoplada con un fragmento Fc de un anticuerpo de inmunoglobulina gamma-1 (IgG1)                                                                                                                                                                                                   |
| Comparador activo: Grupo de control (terapia convencional) Los sujetos aleatorizados al grupo de control continuarán recibiendo su terapia convencional según lo indicado clínicamente por su médico tratante durante el período de tratamiento aleatorizado de 52 semanas | Fármaco: Grupo de control (terapia convencional) La terapia convencional se define como suplementos orales de fosfato y calcitriol u otras formas activas de vitamina D3 (o análogos). No se permite ningún otro agente para el tratamiento de la deficiencia de ENPP1 en el grupo de control. |

### Diseño del estudio

El estudio es un estudio de fase 3, multicéntrico, aleatorizado, controlado, abierto, para evaluar la eficacia y la seguridad del agente de ENPP1 como ENPP1-Fc en niños con deficiencia de ENPP1.

Tipo de estudio: Intervencionista

Propósito principal: Tratamiento

Fase del estudio: Fase 3

Modelo de estudio intervencionista: Asignación de grupo único

Cantidad de grupos: 2

Enmascaramiento: Ninguno (etiqueta abierta)

Asignación: Aleatorizado

Tamaño: 33 sujetos

**b. Elegibilidad y medicamentos o tratamientos prohibidos\*\***

Criterios de elegibilidad

1. Edad mínima: 1 año
2. Edad máxima: 12 años
3. Sexo: Todos
4. Basado en el género: NO
5. Acepta voluntarios sanos: NO

Criterios de inclusión

Los participantes del estudio deben cumplir con todos los siguientes criterios de inclusión:

1. Consentimiento informado por escrito o electrónico del cuidador después de que se haya explicado la naturaleza del estudio y antes de cualquier procedimiento relacionado con la investigación, según las Buenas prácticas clínicas (GCP) de la Conferencia Internacional de Armonización (ICH).
2. Consentimiento del participante del estudio de acuerdo con las reglamentaciones locales
3. Un diagnóstico genético molecular posnatal confirmado de deficiencia de ENPP1 con mutaciones bialélicas (es decir, homocigoto o heterocigoto compuesto) realizado por un laboratorio certificado por el Colegio de Patólogos Estadounidenses/Enmiendas de Mejora de Laboratorios Clínicos (CAP/CLIA) o equivalente regional

4. Hombres y mujeres  $\geq 1$  año y  $< 13$  años de edad el día 1 del estudio
5. Placas de crecimiento abiertas del fémur distal y la tibia proximal en ambas piernas
6. Concentración plasmática de PPI de  $< 1400$  nM en el cribado
7. Niveles de 25-hidroxivitamina D (25[OH]D) de  $\geq 12$  ng/mL en el cribado
8. Evidencia radiográfica de anomalías esqueléticas según una RSS  $\geq 2$
9. Las participantes de sexo femenino con capacidad de gestar deben tener una prueba de embarazo en suero negativa en el cribado y no deben estar en período de lactancia.
10. Los participantes del estudio con capacidad de gestar que sean sexualmente activos deben aceptar usar un método anticonceptivo altamente eficaz de acuerdo con las directrices del Grupo de facilitación y coordinación de ensayos clínicos (CTFG) y las directrices locales durante todo el estudio.
11. En la opinión del investigador, ser capaz de completar todos los aspectos del estudio

#### Criterios de exclusión

Los participantes del estudio que cumplan con cualquiera de los siguientes criterios de exclusión no serán elegibles para participar en el estudio:

1. En la opinión del investigador, tiene una enfermedad o anomalía de laboratorio clínicamente significativa no asociada con la deficiencia de ENPP1 que impedirá la participación en el estudio y/o puede confundir la interpretación de los resultados del estudio.
2. Si recibe cualquiera de los siguientes medicamentos prohibidos según se indica en el protocolo: corticoesteroides sistémicos ( $> 5$  mg de equivalente de prednisona por día), factor de crecimiento antifibroblastos 23 (FGF23) y bifosfonatos orales y/o IV.

3. Incapaz o no está dispuesto a interrumpir el calcitriol u otras formas activas de vitamina D3 (o análogos) dentro de los 7 días previos al día 1 del estudio y/o suplementos orales de fosfato dentro de las 36 horas previas al día 1 del estudio si es aleatorizado al grupo de ENPP1-Fc.

4. Cirugía ortopédica planificada que puede confundir la interpretación de los resultados del estudio durante el período de tratamiento aleatorizado de 52 semanas.

5. Intolerancia conocida a ENPP1-Fc o a cualquiera de sus excipientes.

6. Un resultado positivo en la prueba de COVID-19 dentro de los 5 días previos a la aleatorización, solo si es necesario según las reglamentaciones locales o la política institucional.

7. Tratamiento previo con ENPP1-Fc.

8. Participación concomitante en otro estudio clínico de intervención y/o haber recibido un fármaco en investigación dentro de las 5 semividas de la última dosis o dentro de las 4 semanas previas a la aleatorización, lo que sea más prolongado, o el uso de un dispositivo en investigación.

#### Medicamentos prohibidos

Un paciente sujeto a tratamiento con un agente de ENPP1 debe interrumpir el uso de fosfato oral y vitamina D3 o análogos antes de la primera dosis de un agente de ENPP1 (p. ej., al menos 14 días antes de la primera dosis) y el uso está prohibido durante todo el período de tratamiento. El tratamiento con fosfato oral puede reducirse gradualmente para evitar la hipercalciuria. Los metabolitos o análogos de la vitamina D pueden interrumpirse sin ajuste de la dosis. Los bifosfonatos orales deben retirarse 6 meses antes de la primera dosis.

Los medicamentos prohibidos adicionales durante todo el período de tratamiento son los siguientes:

- bifosfonatos
- anti-FGF23 (p. ej., burosumab)
- calcimiméticos
- antiácidos
- corticoides sistémicos
- Supresores de PTH

### **c. Frecuencia del tratamiento**

Se administra un agente de ENPP1 al menos una o dos veces por mes, al menos una o dos veces por mes, tres veces por mes, al menos una o dos veces por semana.

En algunas modalidades, el agente de ENPP1 se administra una vez por semana. En algunas modalidades, el agente de ENPP1 se administra dos veces por semana. En algunas modalidades, el agente de ENPP1 se administra una vez cada dos semanas. En algunas modalidades, el agente de ENPP1 se administra una vez cada tres semanas. En algunas modalidades, el agente de ENPP1 se administra una vez por mes. En algunas modalidades, el agente de ENPP1 se administra una vez cada cinco semanas. En algunas modalidades, el agente de ENPP1 se administra una vez cada seis semanas. En algunas modalidades, el agente de ENPP1 se administra una vez cada siete semanas. En algunas modalidades, el agente de ENPP1 se administra una vez cada dos meses. En algunas modalidades, el agente de ENPP1 se administra una vez cada nueve semanas. En algunas modalidades, el agente de ENPP1 se administra una vez cada diez semanas. En algunas modalidades, el agente de ENPP1 se administra una vez cada once semanas. En algunas modalidades, el agente de ENPP1 se administra una vez cada tres meses.

En algunas modalidades, la primera dosis de un agente de ENPP1 puede administrarse el día 1. Los días 8 a 29 y en adelante, el agente de ENPP1 se administra a un sujeto a una dosis seleccionada (por ejemplo, 2,4 mg/kg) del agente de ENPP1 en dosis de mg/kg dos veces por semana.

En algunas modalidades, el estudio consiste en un período de cribado de hasta 52 días (que incluye un período de reposo farmacológico de hasta 7 días para medicamentos prohibidos después de la aleatorización) y un período de tratamiento aleatorizado (ENPP1-Fc o control) de 52 semanas, seguido de un período de extensión abierto durante el cual todos los participantes del estudio pueden recibir ENPP1-Fc, y una visita de fin del estudio (EOS) de seguridad 30 días después de la última dosis de ENPP1-Fc.

La primera dosis puede administrarse el día 1 después del período de cribado de 52 días, y las dosis posteriores hasta las 52 semanas siguientes pueden administrarse una vez por semana o dos veces por semana. Preferentemente, la dosis se administra una vez por semana.

La dosis se puede administrar aproximadamente a la misma hora en cada día de administración de la dosis. El lugar de la inyección se alterna, sin ningún lugar a menos de 2 pulgadas de cualquier lugar de inyección anterior dentro de las 2 semanas previas.

Se administra una dosis seleccionada de un agente de ENPP1 de 2,4 mg/kg por vía SC durante un período de tiempo determinado por un médico especializado en el campo de la terapia de reemplazo de ENPP1. La primera dosis de un agente de ENPP1 puede administrarse el día 1. Después de la primera dosis, se podrá observar a un sujeto durante 7 días para controlar la seguridad y obtener muestras PK. Los días 8 a 29, un sujeto recibe una dosis seleccionada dos veces por semana o una vez por semana. La administración de un agente de ENPP1 a una dosis seleccionada continúa

según lo considere apropiado el profesional médico.

Un sujeto puede recibir 4 dosis de un agente de ENPP1 durante un período de 29 días, si la dosis se administra una vez a la semana, lo que da como resultado una exposición de aproximadamente 9,94 mg/kg de dosis total, para cantidades de dosis de 2,4 mg/kg.

Un sujeto puede recibir 8 dosis de un agente de ENPP1 durante el transcurso de un período de 29 días, si la dosis se administra dos veces por semana, lo que da como resultado una exposición de aproximadamente 19,2 mg/kg de dosis total, para cantidades de dosis de 2,4 mg/kg.

Un sujeto puede recibir 52 dosis de un agente de ENPP1 durante el transcurso de un período de 52 semanas, si la dosis se administra una vez por semana, lo que da como resultado una exposición de aproximadamente 124,8 mg/kg de dosis total, para cantidades de dosis de 2,4 mg/kg.

Un sujeto puede recibir 104 dosis de un agente de ENPP1 durante el transcurso de un período de 52 semanas, si la dosis se administra dos veces por semana, lo que da como resultado una exposición de aproximadamente 249,6 mg/kg de dosis total, para cantidades de dosis de 2,4 mg/kg.

Al igual que la enzima ENPP1 endógena, un agente de ENPP1 escinde el ATP para generar AMP y PPi, lo que aumenta los niveles de PPi en plasma y en AMP que el CD73 convierte rápidamente en adenosina. El reemplazo de la enzima humana endógena está destinado a corregir la deficiencia inherente y permitir una mejor salud y mitigar las complicaciones clínicas asociadas con la deficiencia de ENPP1. Por lo tanto, la administración del agente de ENPP1 (ENPP1-Fc) tiene como objetivo tratar, prevenir o reducir la gravedad de una o más enfermedades, incluidas, entre otras, la deficiencia de pirofosfatasa/fosfodiesterasa 1 de ectonucleótidos, hipopirofosfatemia, raquitismos hipofosfatémicos autosómicos recesivos (ARHR-2), pseudoxantoma

elástico (PXE) y la calcificación arterial generalizada de la infancia (GACI).

#### **d. Evaluación del tratamiento**

##### Criterio de valoración principal:

1. Cambio con respecto al inicio en la concentración plasmática de pirofosfato inorgánico (PPI) hasta la semana 52. Para cada sujeto, el PPI en plasma se medirá mediante una serie de muestras de sangre obtenidas durante todo el estudio, comparando el valor inicial del sujeto a lo largo del tiempo.

[Marco de tiempo: 52 semanas (desde el inicio hasta la semana 52)]

##### Criterio de valoración secundario:

2. Cambio con respecto al inicio en las anomalías esqueléticas según lo medido por el puntaje global de la impresión global radiográfica de cambio (RGI-C) hasta la semana 52.

La RGI-C es un puntaje radiográfico general que se puede usar para monitorear la respuesta a una intervención terapéutica comparando los puntajes de 2 puntos temporales. Una determinación de la cicatrización en una escala de 0 a +3 en la que 0 significa sin cambios o con cicatrización y +3 significa cicatrización completa; el empeoramiento también se mide en una escala de 0 a -3 en la que 0 significa sin cambios y -3 significa empeoramiento grave.

[Marco de tiempo: Inicio, semana 26, semana 52]

3. Cambio con respecto al inicio en el raquitismo según lo medido por el puntaje total del puntaje de gravedad del raquitismo (RSS) hasta la semana 52. El RSS evalúa la gravedad del raquitismo mediante un sistema de puntuación que utiliza una escala de 0 a 4 para las muñecas y de 0 a 6 para las rodillas, para generar una puntuación total de 0 a 10, donde 0 es normal y 10 es la peor puntuación posible, es decir, las anomalías esqueléticas más graves observadas radiográficamente.

[Marco de tiempo: Inicio, semana 26, semana 52]

4. Cambio con respecto al inicio en el puntaje Z del crecimiento (estatura/longitud y peso corporal) hasta la semana 52. Una puntuación Z representa el grado en que esa medición particular para esa persona difiere del valor de referencia en la población general (estatura/longitud y peso corporal) hasta la semana 52.

[Marco de tiempo: inicio, día 29, semana 8, semana 13, semana 26, semana 39, semana 52]

5. Área bajo la curva de concentración plasmática frente al tiempo (ABC) de ENPP1-Fc. Para cada sujeto, la variación de concentración de ENPP1-Fc en plasma se medirá mediante una serie de muestras de sangre obtenidas durante todo el estudio, comparando el valor inicial del sujeto a lo largo del tiempo.

#### **(i) Farmacocinética**

- Perfiles de concentración plasmática-tiempo del agente de ENPP1 y determinación de los parámetros PK no compartimentales (incluidos T<sub>máx</sub>, C<sub>máx</sub>, ABC<sub>últ</sub>, ABC<sub>tau</sub>, ABC<sub>inf</sub>, T<sub>1/2</sub>, C<sub>mín</sub>, Cl/F y V/F)
- Evaluar la linealidad entre las dosis SC ascendentes del agente de ENPP1 y los parámetros PK.

#### **(ii) Farmacodinámica**

- Cambio con respecto al inicio en los niveles de PPI en plasma, fosfato en suero, niveles de FGF23 intacto en plasma, TmP/GFR (ajustado a la depuración de creatinina)
- Evaluar la linealidad entre las dosis SC ascendentes del agente de ENPP1 y los parámetros PD
- Correlacionar los cambios en el PPI con los cambios en el FGF23
- Correlacionar los cambios en el PPI con los cambios en TmP/TFG
- Correlacionar los cambios en el FGF23 con los cambios en TmP/TFG

- Exploración de la presencia y cambios en los biomarcadores en sangre y orina
  - Creatinina en plasma y orina (utilizada para calcular la depuración renal del fosfato)
  - 1,25(OH)<sub>2</sub>D en suero, calcio total e ionizado en plasma, hormona paratiroidea
  - Biomarcadores óseos: fosfatasa alcalina (ALP) sérica, ALP específica del hueso (BALP), telopéptido carboxiterminal reticulado de colágeno tipo I (CTX) y propéptido N-terminal de procolágeno tipo 1 (P1NP)

### **(iii) Eficacia**

Para evaluar la eficacia del tratamiento, se puede determinar uno o más de los siguientes parámetros físicos antes y durante el tratamiento.

- Valor inicial óseo
  - Densidad ósea usando DEXA
  - Na<sup>18</sup>F-TEP/HR-pQCT (o TC-AR)
- Valor inicial de calcificación de órganos y arterial
  - Na<sup>18</sup>F-TEP/HR-pQCT (o TC-AR)
  - Ecocardiograma
- Valor inicial de función de reactividad cardiovascular y vascular periférica
  - Ecocardiografía Doppler de esfuerzo
  - ECG
  - Índice tobillo-brazo
  - Velocidad de onda de pulso
  - Tonometría arterial periférica (PAT)

- HRpQCT (o TC-AR) con y sin contraste
- Valor inicial de función neurológica
- Puntaje para accidentes cerebrovasculares NIH
- Examen neurológico
- Valor inicial de función pulmonar
- Prueba de función pulmonar estándar
- Resultados de desempeño iniciales
- 2MWT, 6MWT
- Dinamometría manual, fuerza de agarre, rango de movimiento
- - Pruebas de audición: Examen físico y otoscopia, audiometría de inmitancia (timpanometría), audiometría de tono puro (PTA), audiometría de alta frecuencia (HFA)
- Resultados iniciales para el paciente, el médico y el cuidador
- Impresión global del cambio por parte del paciente y del médico (CGI-C y CGI-S)
- Sistema de clasificación de la función motora gruesa - Ampliado y revisado
- Interferencia del dolor e intensidad del dolor según PROMIS
- Fatiga, movilidad, impacto cognitivo, extremidad superior según PROMIS
- Puntaje de rigidez del índice de artrosis de la Universidad Western Ontario y McMaster (WOMAC)
- Calcificación renal inicial medida mediante ultrasonido renal
- Histomorfometría ósea inicial mediante biopsia ósea (opcional)
- Tomografía de coherencia óptica inicial de aorta, arterias coronarias, arterias carótidas y arterias renales y lechos vasculares.

#### (iv) Seguridad e inmunogenia

Las evaluaciones de seguridad se pueden resumir al inicio y en cada punto cronológico observado. Las variables de seguridad incluyen:

- Incidencia, frecuencia y gravedad de los eventos adversos (EA), EA relacionados con el tratamiento y eventos adversos graves (EAG)
- Signos vitales y peso
- Exámenes físicos
- Tasa de filtración glomerular estimada (eGFR)
- Análisis de laboratorio que incluyen bioquímica, hematología y análisis de orina, incluidos los parámetros bioquímicos adicionales de interés
- Prueba de anticuerpos anti-ENPP1-FC y toxicidades limitantes de la dosis (DLT)
- Incidencia de cualquier anticuerpo antifármaco (AAF)
- Incidencia de EAET asociados con reacciones de hipersensibilidad
- Medicamentos concomitantes
- Electrocardiograma (ECG)

**Tabla 2**

|       |                                                          |
|-------|----------------------------------------------------------|
| 2MWT  | Prueba de caminata de 2 minutos                          |
| 6MWT  | Prueba de caminata de 6 minutos                          |
| ADA   | anticuerpos antifármaco                                  |
| AE    | evento adverso                                           |
| ALP   | fosfatasa alcalina                                       |
| AMP   | monofosfato de adenosina                                 |
| ARHR2 | raquitismo hipofosfatémico autosómico recesivo de tipo 2 |
| ATP   | adenosina trifosfato                                     |

|             |                                                                                                                                     |
|-------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| AUC0-t      | Área bajo la curva de concentración plasmática-tiempo desde el momento cero hasta el momento de la última concentración medible     |
| AUCinf      | Área bajo la curva de concentración plasmática-tiempo desde el momento cero hasta el infinito                                       |
| AUCtau      | Área bajo la curva de concentración-tiempo durante el intervalo de administración de la dosis                                       |
| BALP        | fosfatasa alcalina específica del hueso                                                                                             |
| CaGI        | Impresión global del cuidador                                                                                                       |
| CGI-C       | Impresión global del médico clínico sobre el cambio                                                                                 |
| CL/F        | depuración después de la administración extravascular del fármaco                                                                   |
| Cmáx        | Concentración plasmática máxima                                                                                                     |
| CTx         | telopéptido carboxiterminal reticulado de colágeno tipo I                                                                           |
| DSMB        | Junta de Control de Seguridad de los Datos                                                                                          |
| ECG         | Electrocardiograma                                                                                                                  |
| eCRF        | formulario de informe de caso electrónico                                                                                           |
| ENPP1       | ectonucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasa 1                                                                                      |
| EudraCT     | Ensayos clínicos con autoridades reguladoras de fármacos de la Unión Europea                                                        |
| ERT         | terapia de reemplazo enzimático                                                                                                     |
| FDA         | Administración de Alimentos y Medicamentos                                                                                          |
| FGF23       | factor de crecimiento de fibroblastos 23                                                                                            |
| FIH         | primero en seres humanos                                                                                                            |
| FIP         | primero en el paciente                                                                                                              |
| GACI        | Calcificación arterial generalizada de los lactantes                                                                                |
| GCP         | Buenas prácticas clínicas                                                                                                           |
| GLP         | Buenas prácticas de laboratorio                                                                                                     |
| GMFCS-E y R | Sistema de clasificación de la función motora gruesa - Ampliado y revisado                                                          |
| HRqCT       | tomografía computada cuantitativa de alta resolución                                                                                |
| IB          | Manual del investigador                                                                                                             |
| ICF         | Formulario de consentimiento informado                                                                                              |
| ICH         | Conferencia Internacional sobre armonización de los requisitos técnicos para el registro de productos farmacéuticos para uso humano |
| ICH E6      | Guía tripartita armonizada de la ICH: Pautas para las buenas prácticas clínicas E6                                                  |
| IEC         | Comité de ética institucional                                                                                                       |

|         |                                                                                                      |
|---------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| IND     | Fármaco nuevo en investigación (aplicación)                                                          |
| INZ-701 | ectonucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasa 1 humano recombinante fusionado al fragmento Fc de IgG1 |
| IRB     | Junta de Revisión Institucional                                                                      |
| MAD     | dosis múltiples ascendentes                                                                          |
| MTD     | dosis máxima tolerada                                                                                |
| NOAEL   | nivel sin efectos adversos observados                                                                |
| PD      | farmacodinámica(s)                                                                                   |
| PK      | farmacocinética(s)                                                                                   |
| PPI     | pirofosfato inorgánico                                                                               |
| PROMIS  | Sistema de información de medición de resultados informados por el paciente                          |
| PTH     | hormona paratiroidea                                                                                 |
| SAE     | evento adverso grave                                                                                 |
| SAP     | Plan de análisis estadístico                                                                         |
| SC      | Subcutáneo                                                                                           |
| T1/2    | semivida de eliminación                                                                              |
| Tmax    | tiempo hasta la concentración plasmática máxima                                                      |
| TEAE    | eventos adversos causados por el tratamiento                                                         |
| TmP/GFR | tasa de re absorción tubular máxima de fosfato ajustada para la tasa de filtración glomerular        |
| V/F     | volumen de distribución aparente después de la administración extravascular del fármaco              |
| WOCBP   | mujeres en edad fértil                                                                               |
| WOMAC   | Índice de artrosis de la Universidad Western Ontario y McMaster                                      |

## EJEMPLIFICACIÓN

La invención que ahora se describe de manera general, se comprenderá más fácilmente mediante referencia a los siguientes ejemplos, que se incluyen meramente con fines ilustrativos de determinadas modalidades y modalidades de la presente invención, y no pretenden limitar la invención.

### ***Ejemplo 1. Generación de proteínas de fusión de ENPP1***

Un ejemplo de un agente de ENPP1 es la proteína de fusión ENPP1, preferentemente, la proteína de fusión ENPP1 es ENPP1-Fc. Sin embargo, la

ejemplificación de ENPP1-Fc puede aplicarse a otras proteínas de fusión de ENPP1 como se expone en la presente.

ENPP1-Fc es una proteína de fusión recombinante que contiene los dominios extracelulares de ENPP1 humana (ENPP1 soluble) acoplada con un fragmento Fc de IgG1 (rhENPP1-Fc). Los dominios extracelulares recombinantes de ENPP1-Fc contienen su actividad catalítica y son idénticos a la enzima ENPP1 natural. ENPP1-Fc es una proteína humana recombinante producida en células CHO a través de un proceso de cultivo celular de lote alimentado que está libre de componentes derivados de animales. El peso molecular del dímero ENPP1-Fc es de aproximadamente 290 kDa; ENPP1-Fc es altamente glucosilado y tiene un pI de aproximadamente 6,0. Al igual que ENPP1 endógena, el sustrato principal de ENPP1-Fc es el ATP, que se escinde en AMP y PPi.

En una modalidad específica, la proteína ENPP1 soluble se fusionó a un dominio Fc humano con un enlazador a través de un enlazador (que comprende una leucina, isoleucina, y asparagina). En la Tabla 1 se muestran cuatro construcciones ENPP1-Fc como SEQ ID NO: 3, 4, 5 y 116 purificadas a partir de células CHO.

La purificación de ENPP1-Fc podría lograrse mediante una serie de pasos de cromatografía en columna, que incluyen, por ejemplo, tres o más de los siguientes, en cualquier orden: cromatografía de proteína A, cromatografía de Q sefarosa, cromatografía de fenilsefarosa, cromatografía de exclusión de tamaño y cromatografía de intercambio catiónico. La purificación podría completarse con filtración vírica e intercambio de amortiguador. Después de la purificación de la proteína, la actividad catalítica de la proteína ENPP1-Fc podría evaluarse usando pNP-TMP como un sustrato cromogénico.

### ***Ejemplo 2: Tratamiento***

ENPP1-Fc se administra a 2,4 mg/kg. La administración es subcutánea (SC) al

menos una o dos veces por mes, al menos una o dos veces por mes, tres veces por mes, al menos una o dos veces por semana.

La primera dosis de ENPP1-Fc se puede administrar el día 1. En los días 8 y en adelante, un agente de ENPP1 (ENPP1-Fc) se administra a un sujeto a una dosis seleccionada de 2,4 mg/kg una vez o dos veces por semana. La dosis se puede administrar aproximadamente a la misma hora en cada día de administración de la dosis. El lugar de la inyección se alterna, sin ningún lugar a menos de 2 pulgadas de cualquier lugar de inyección anterior dentro de las 2 semanas previas.

Una dosis seleccionada de ENPP1-Fc es de 2,4 mg/kg y se administra por vía subcutánea (SC). La primera dosis de ENPP1-Fc se puede administrar el día 1. Después de la primera dosis, se podrá observar a un sujeto durante 7 días para controlar la seguridad y obtener muestras PK. Los días 8 y en adelante, un sujeto recibe una dosis seleccionada dos veces por semana. En algunas modalidades, los días 8 y en adelante, un sujeto recibe una dosis seleccionada una vez por semana. La administración de ENPP1-Fc a una dosis seleccionada continúa según lo considere apropiado el profesional médico.

Un sujeto puede recibir 4 dosis de ENPP1-Fc durante el transcurso de un período de tiempo de 29 días, por ejemplo, lo que da como resultado una exposición total de 9,6 mg por 29 días a una dosis de una vez por semana o un sujeto puede recibir 8 dosis de ENPP1-Fc durante el transcurso de un período de 29 días, por ejemplo, lo que da como resultado una exposición total de 19,2 mg por 29 días a una dosis de dos veces a la semana para cantidades de dosis en mg/kg respectivamente. O bien, un sujeto puede recibir más o menos de 8 dosis, según lo considere adecuado un profesional médico.

Al igual que la enzima ENPP1 endógena, ENPP1-FC escinde el ATP para generar AMP y PPi, lo que aumenta los niveles de PPi en plasma y en AMP que el

CD73 convierte rápidamente en adenosina. El reemplazo de la enzima humana endógena está destinado a corregir la deficiencia inherente y permitir una mejor salud y mitigar las complicaciones clínicas asociadas con los resultados iniciales de ENPP1 en pacientes, médicos y cuidadores.

**Ejemplo 3: Tratamiento de un paciente pediátrico** con deficiencia de ENPP1

Enpp1-Fc se administra a un sujeto (paciente pediátrico) identificado con una deficiencia de ENPP1 mediante inyección subcutánea el día 1 y una o dos veces por semana a partir del día 8 a 2,4 mg/kg.

La ENPP1-Fc se administra a una dosis seleccionada de ENPP1-FC de 2,4 mg/kg SC al menos una vez o dos veces por semana durante un período determinado por el profesional médico. La respuesta del paciente al reemplazo enzimático se controla según corresponda, según lo determinado por el profesional médico, p. ej., mediante el seguimiento de una reducción en uno o más síntomas de deficiencia de ENPP1, y/o usando la orientación proporcionada en la presente. En algunos casos, el período de estudio para evaluar la eficacia del tratamiento de la deficiencia de ENPP1 usando ENPP1-Fc en diferentes dosis es de 32 días (fase I). En algunos casos, el período de estudio para evaluar la eficacia del tratamiento de la deficiencia de ENPP1 usando ENPP1-Fc en diferentes dosis es un período de estudio extendido de 338 días (fase II) o 364 días o 52 semanas (fase III).

Los siguientes ejemplos, en el contexto de toda la descripción, proporcionan orientación para determinar los protocolos de tratamiento y la eficacia.

**Ejemplo 4: Tratamiento de un paciente pediátrico** diagnosticado con GACI

La deficiencia de Enpp1 puede enmascarse como GACI. GACI es una enfermedad poco frecuente que se produce en lactantes y que implica la calcificación arterial extensiva (Albright, et al., 2015, Nature Comm. 10006).

El agente de ENPP1 (ENPP1-Fc) se administra a un sujeto (paciente

pediátrico) a una dosis seleccionada de 2,4 mg/kg SC al menos una o dos veces por semana durante un período determinado por el profesional médico. La respuesta del paciente con GACI al reemplazo enzimático se controla según corresponda, según lo determinado por el profesional médico, p. ej., mediante el seguimiento de una reducción en uno o más síntomas de GACI, y/o usando la orientación proporcionada en la presente.

Los siguientes ejemplos, en el contexto de toda la descripción, proporcionan orientación para determinar los protocolos de tratamiento y la eficacia.

***Ejemplo 5: Tratamiento de un paciente pediátrico diagnosticado con ARHR2***

La deficiencia de Enpp1 puede enmascarse como ARHR2. ARHR2 es un trastorno esquelético poco frecuente caracterizado por bajos niveles de PPI en plasma y fosfato en suero, lo que puede provocar raquitismo, fracturas repetidas de los huesos largos, deformidades esqueléticas raquíticas y alteración del crecimiento y el desarrollo (*Ferreira et al. 2014, Moran 1975, Rutsch et al. 2008*).

El agente de ENPP1 (ENPP1-Fc) se administra a un sujeto (paciente pediátrico) a una dosis seleccionada de 2,4 mg/kg SC al menos una o dos veces por semana durante un período determinado por el profesional médico. La respuesta del paciente con ARHR2 al reemplazo enzimático se controla según corresponda, según lo determinado por el profesional médico, p. ej., mediante el seguimiento de una reducción en uno o más síntomas de ARHR2, usando la orientación proporcionada en la presente.

Los siguientes ejemplos, en el contexto de toda la descripción, proporcionan orientación para determinar los protocolos de tratamiento y la eficacia.

***Ejemplo 6: Tratamiento de un paciente pediátrico con deficiencia de ABCC6***

El agente de ENPP1 (Enpp1-Fc) se administra a un sujeto (paciente pediátrico) identificado con una deficiencia de ABCC6 mediante inyección subcutánea el día 1 y

dos veces por semana a partir del día 8 usando una dosis seleccionada de 2,4 mg/kg.

ENPP1-Fc se administra a un sujeto ( paciente pediátrico) a una dosis seleccionada de ENPP1-Fc de 2,4 mg/kg SC al menos una o dos veces por semana durante un período determinado por el profesional médico. La respuesta del paciente al reemplazo enzimático se controla según corresponda, según lo determinado por el profesional médico, p. ej., mediante el seguimiento de una reducción en uno o más síntomas de deficiencia de ABCC6, y/o usando la orientación proporcionada en la presente.

Los siguientes ejemplos, en el contexto de toda la descripción, proporcionan orientación para determinar los protocolos de tratamiento y la eficacia.

***Ejemplo 7: Tratamiento de pacientes pediátricos (mujeres y hombres) diagnosticados con PXE con deficiencia de ABCC6***

Se realiza un estudio en fase III, abierto, de dosis múltiples ascendentes en niños de 1-12 años para evaluar la seguridad, tolerabilidad, farmacocinética y farmacodinámica de INZ-701. A esto le sigue un período de extensión abierto a largo plazo en niños de 1-12 años con deficiencia de ABCC6 que manifiestan pseudoxantoma elástico (PXE).

| Grupo                                                                                                                                                                              | Intervención/tratamiento                                                                                                                                                            |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Experimental: INZ-701<br>El diseño del estudio es un MAD 3+3 con cohortes de dosis. Las dosis planificadas serán de 2,4 mg/kg administrados mediante inyección una vez por semana. | Fármaco: INZ-701<br>Proteína de fusión recombinante que los dominios extracelulares de ENPP1 humana acoplada a un fragmento de un anticuerpo de inmunoglobulina (IgG1) (rhENPP1-Fc) |

**Criterios de valoración**

Las medidas de los resultados primarios y secundarios son las siguientes.

Criterio de valoración principal:

1. Número de eventos adversos emergentes del tratamiento (EAET)

[Marco de tiempo: 32 días (Período de evaluación de la dosis)]

Los EA surgidos durante el tratamiento se definen como cualquier EA que se produzca desde la primera dosis de INZ-701 hasta 30 días después de la última dosis de INZ-701.

2. Cantidad de eventos adversos emergentes del tratamiento (EAET)

[Marco de tiempo: 52 semanas (Día 1 hasta la visita de seguimiento de seguridad)]

Los EA surgidos durante el tratamiento se definen como cualquier EA que se produzca desde la primera dosis de INZ-701 hasta 30 días después de la última dosis de INZ-701.

Criterios de valoración secundarios:

1. Incidencia de anticuerpos antifármaco (AAF) [Marco de tiempo: 32 días

(Período de evaluación de la dosis)]

Se evaluará la presencia de AAF y, si está presente, se realizarán más evaluaciones para determinar la especificidad y los subtipos.

2. Incidencia de anticuerpos antifármaco (AAF) [Marco de tiempo: 52

semanas (Día 1 hasta la visita de seguimiento de seguridad)]

Se evaluará la presencia de AAF y, si está presente, se realizarán más evaluaciones para determinar la especificidad y los subtipos.

3. Área bajo la curva de concentración plasmática frente al tiempo (ABC)

de INZ-701 [Marco de tiempo: 32 días (Período de evaluación de la dosis)]

Para cada sujeto, la variación de concentración de INZ-701 en plasma se medirá mediante una serie de muestras de sangre obtenidas durante todo el estudio, comparando el valor inicial del sujeto a lo largo del tiempo.

4. Concentración plasmática máxima (C<sub>máx.</sub>) de INZ-701 [Marco de

tiempo: 32 días (Período de evaluación de la dosis)]

Para cada sujeto, la concentración máxima de INZ-701 en plasma se medirá mediante una serie de muestras de sangre obtenidas durante todo el estudio, comparando el valor inicial del sujeto a lo largo del tiempo.

5. Depuración sistémica de INZ-701 [marco de tiempo: 32 días (período de evaluación de la dosis)]

Para cada sujeto, la depuración de INZ-701 del cuerpo se medirá mediante una serie de muestras de sangre obtenidas durante todo el estudio, comparando el valor inicial del sujeto a lo largo del tiempo.

6. Cambio con respecto al inicio en los niveles de pirofosfato inorgánico en plasma (PPi) [marco de tiempo: 32 días (Período de evaluación de la dosis)]

Para cada sujeto, el PPi en plasma se medirá mediante una serie de muestras de sangre obtenidas durante todo el estudio, comparando el valor inicial del sujeto a lo largo del tiempo.

7. Cambio con respecto al inicio en los niveles de pirofosfato inorgánico en plasma (PPi) [marco de tiempo: 52 semanas (desde el inicio hasta la visita de seguimiento de seguridad)].

Para cada sujeto, el PPi en plasma se medirá mediante una serie de muestras de sangre obtenidas durante todo el estudio, comparando el valor inicial del sujeto a lo largo del tiempo.

### **Criterios de elegibilidad**

Edades elegibles para el estudio: 1 año a 12 años

Sexos elegibles para el estudio: Todos

Basado en el género: NO

Acepta voluntarios sanos: NO

## **Criterios de inclusión y exclusión**

Los criterios de inclusión y exclusión son los siguientes.

### Criterios de inclusión:

1. Debe proporcionar un consentimiento por escrito o electrónico después de que se haya explicado la naturaleza del estudio y antes de cualquier procedimiento relacionado con la investigación, según ICH GCP
2. Diagnóstico clínico de PXE respaldado por la identificación genética previa de mutaciones bialélicas de ABCC6
3. Hombres o mujeres, de 1 a <12 años de edad en el cribado
4. PPI en plasma <1300nM en el cribado
5. Los sujetos tratados con estatinas o inhibidores de la proproteína convertasa subtilisina/kexina tipo 9 (PCSK9) deben haber recibido dosis estables durante 3 años antes de la inscripción hasta el final del estudio, a menos que el investigador considere, en consulta con el patrocinador, que el cambio no confundirá la interpretación de los datos del estudio
6. Los sujetos en edad fértil (MEF) deben tener un resultado negativo en la prueba de embarazo en suero en el cribado
7. Los varones sexualmente activos deben aceptar usar condones desde el período posterior a la primera dosis de INZ-701 hasta 30 días después de la última dosis de INZ-701. Los varones también deben aceptar no donar esperma desde el período posterior a la primera dosis de INZ-701 hasta 30 días después de la última dosis de INZ-701.
8. En la opinión del investigador, debe estar dispuesto y ser capaz de completar todos los aspectos del estudio
9. Aceptar proporcionar acceso a los registros médicos relevantes

### Criterios de exclusión:

1. En la opinión del investigador, la presencia de cualquier enfermedad clínicamente significativa (fuera de aquellas consideradas asociadas con el diagnóstico de deficiencia de ABCC6) que impida la participación en el estudio o que pueda confundir la interpretación de los resultados del estudio, incluida la enfermedad tiroidea no controlada conocida o la enfermedad del tejido conjuntivo, óseo, mineral, oftalmológica o muscular no relacionada
2. Enfermedad ocular avanzada que requiere tratamiento anti-VEGF en el cribado
3. Resultado de laboratorio anómalo clínicamente significativo en el cribado.
4. Resultados de laboratorio en el cribado que demuestren aumentos de los niveles de aspartato aminotransferasa, alanina aminotransferasa, bilirrubina (a menos que se deba al trastorno de Gilbert), eGFR >60, 25-hidroxivitamina D (25[OH]D) <20 ng/ml, hormona paratiroidea (PTH) >40 % por encima del límite superior de lo normal, o hiper o hipocalcemia significativa. Nota: Se permite la repetición del cribado para determinadas evaluaciones según se describe en el protocolo.
5. Infección fúngica, bacteriana y/o vírica activa conocida, incluido el virus de inmunodeficiencia humana, el virus de la hepatitis B, el virus de la hepatitis C o el virus de la COVID-19. Se requiere un resultado negativo en la prueba de la COVID-19 dentro de los 5 días previos a la primera dosis de INZ-701.
6. Neoplasia maligna en los últimos 5 años, excepto cánceres de piel no melanómicos o carcinoma cervical in situ.
7. Intolerancia conocida a INZ-701 o a cualquiera de sus excipientes.
8. Incapaz o no dispuesto a interrumpir el uso de cualquier medicamento prohibido (los ejemplos incluyen bifosfonatos, calcimiméticos, antiácidos, corticoides

sistémicos, medicamentos que contienen pirofosfato) según lo dispuesto en el protocolo. La interrupción se debe realizar solo si se considera que no es perjudicial y está indicada por el médico tratante del sujeto.

9. Recepción de cualquier otro fármaco nuevo en investigación dentro de las 5 semividas de la última dosis del otro producto en investigación o desde 4 semanas antes de la primera dosis de INZ-701, lo que sea más prolongado, o el uso de un dispositivo en investigación, hasta la finalización de la participación en el estudio.

10. Últimos síntomas de una vacunación contra la COVID-19 dentro de los 14 días previos a la primera dosis de INZ-701 o según se describe en el Documento guía de la vacuna Inozyme contra la COVID-19.

***Ejemplo 8: Tratamiento de un paciente pediátrico diagnosticado con GACI con deficiencia de ABCC6***

La deficiencia de ABCC6 puede enmascarse como GACI. GACI es una enfermedad poco frecuente que se produce en lactantes y que implica la calcificación arterial extensiva (*Albright, et al., 2015, Nature Comm. 10006*). Se cree que GACI se produce debido a una proteína ENPP1 defectuosa. Sorprendentemente, en algunos casos, el fenotipo GACI se observa incluso cuando el sujeto tiene deficiencia de ABCC6. Los pacientes con deficiencia de ABCC6 pueden identificarse usando muestras de ADN aisladas usando los protocolos descritos en *J Med Genet. Octubre de 2007; 44(10): 621-628. (Mutation detection in the ABCC6 gene and genotype–phenotype analysis in a large international case series affected by pseudoxanthoma elasticum, Ellen G Pfendner, et al)*

El agente de ENPP1 (ENPP1-Fc) se administra a un sujeto (paciente pediátrico) a una dosis seleccionada de 2,4 mg/kg SC al menos una o dos veces por semana durante un período determinado por el profesional médico. La respuesta del

paciente con GACI (con deficiencia de ABCC6) al reemplazo enzimático se controla según corresponda, según lo determinado por el profesional médico, p. ej., mediante el seguimiento de una reducción en uno o más síntomas de GACI, y/o usando la orientación proporcionada en la presente.

Los siguientes ejemplos, en el contexto de toda la descripción, proporcionan orientación para determinar los protocolos de tratamiento y la eficacia.

**Ejemplo 9: Tratamiento de un paciente pediátrico** diagnosticado con ARHR2 con deficiencia de ABCC6

La deficiencia de ABCC6 puede enmascarar los síntomas de ARHR2. ARHR2 es un trastorno esquelético poco frecuente caracterizado por bajos niveles de PPI en plasma y fosfato en suero, lo que puede provocar raquitismo, fracturas repetidas de los huesos largos, deformidades esqueléticas raquíticas y alteración del crecimiento y el desarrollo (*Ferreira et al. 2014, Moran 1975, Rutsch et al. 2008*). En algunos sujetos, el fenotipo ARHR2 se observa cuando el sujeto tiene deficiencia de ABCC6. Los pacientes con deficiencia de ABCC6 pueden identificarse siguiendo el procedimiento del Ejemplo 4.

El agente de ENPP1 (ENPP1-Fc) se administra a un sujeto (paciente pediátrico) a una dosis seleccionada de 2,4 mg/kg SC al menos dos veces por semana durante un período determinado por el profesional médico. La respuesta del paciente con ARHR2 al reemplazo enzimático se controla según corresponda, según lo determinado por el profesional médico, p. ej., mediante el seguimiento de una reducción en uno o más síntomas de ARHR2, usando la orientación proporcionada en la presente.

Los siguientes ejemplos, en el contexto de toda la descripción, proporcionan orientación para determinar los protocolos de tratamiento y la eficacia.

**Ejemplo 10: Tratamiento de un paciente pediátrico diagnosticado** con

enfermedad renal crónica (CKD)

La calcificación patológica puede manifestarse como otra enfermedad denominada CKD. Los síntomas clínicos de las enfermedades renales crónicas incluyen picazón, calambres musculares, náuseas, falta de apetito, hinchazón de los pies y tobillos, falta de sueño y dificultad para respirar. La enfermedad renal crónica, si no se trata, tiende a avanzar a enfermedad renal en etapa terminal (ESRD). (*Chronic Kidney Disease Diagnosis and Management: A Review, Chen TK, Knicely DH, Grams ME. Chronic Kidney Disease Diagnosis and Management: A Review. JAMA. 2019 Oct 1;322(13):1294-1304.*)

El agente de ENPP1 (ENPP1-Fc) se administra a un sujeto a una dosis seleccionada de 2,4 mg/kg SC al menos una o dos veces por semana durante un período determinado por el profesional médico. La respuesta del paciente con CDK al reemplazo enzimático se controla según corresponda, según lo determinado por el profesional médico, p. ej., mediante el seguimiento de una reducción en uno o más síntomas de CKD, usando la orientación proporcionada en la presente.

Los siguientes ejemplos, en el contexto de toda la descripción, proporcionan orientación para determinar los protocolos de tratamiento y la eficacia.

***Ejemplo 11: Tratamiento de un paciente pediátrico diagnosticado con osificación del ligamento longitudinal posterior (OPLL)***

La calcificación patológica puede manifestarse como otra enfermedad denominada OPLL. Los signos y síntomas clínicos causados por OPLL se categorizan como: (1) mielopatía, o una lesión de la médula espinal con alteraciones motoras y sensoriales de las extremidades superiores e inferiores, espasticidad y disfunción vesical; (2) radiculopatía cervical, con dolor y alteraciones sensoriales de las extremidades superiores; y (3) molestia axial, con dolor y rigidez alrededor del cuello. Los síntomas más frecuentes en las primeras etapas de OPLL incluyen disestesia y

sensación de hormigueo en las manos, y torpeza. (Wu JC, Chen YC, Huang WC. *Ossification of the Posterior Longitudinal Ligament in Cervical Spine: Prevalence, Management, and Prognosis. Neurospine. 2018 Mar;15(1):33-41.*)

El agente de ENPP1 (ENPP1-Fc) se administra a un sujeto (paciente pediátrico) a una dosis seleccionada de ENPP1-Fc de 2,4 mg/kg SC al menos una o dos veces por semana durante un período determinado por el profesional médico. La respuesta del paciente con OPLL al reemplazo enzimático se controla según corresponda, según lo determinado por el profesional médico, p. ej., mediante el seguimiento de una reducción en uno o más síntomas de OPLL, usando la orientación proporcionada en la presente.

Los siguientes ejemplos, en el contexto de toda la descripción, proporcionan orientación para determinar los protocolos de tratamiento y la eficacia.

**Ejemplo 12: Tratamiento de un paciente pediátrico** con raquitismo hipofosfatémico hereditario

La calcificación patológica puede manifestarse como otro estado patológico denominado Raquitismo hipofosfatémico hereditario (HHR). Los signos y síntomas clínicos causados por HHR se categorizan como: (1) mielopatía, o una lesión de la médula espinal con alteraciones motoras y sensoriales de las extremidades superiores e inferiores, espasticidad y disfunción vesical; (2) radiculopatía cervical, con dolor y alteraciones sensoriales de las extremidades superiores; y (3) molestia axial, con dolor y rigidez alrededor del cuello. Los síntomas más frecuentes de HHR incluyen la fusión prematura de los huesos del cráneo (cranosinostosis) y anomalías dentales. El trastorno también puede causar un crecimiento óseo anómalo donde los ligamentos y los tendones se unen a las articulaciones (entesopatía). En los adultos, la hipofosfatemia se caracteriza por un ablandamiento de los huesos conocido como osteomalacia. (Cho HY, Lee BH, Kang JH, Ha IS, Cheong HI, Choi Y. *A clinical and*

*molecular genetic study of hypophosphatemic rickets in children. Pediatr Res. 2005 Aug;58(2):329-33.)*

El agente de ENPP1 (ENPP1-Fc) se administra a un sujeto (paciente pediátrico) a una dosis seleccionada de 2,4 mg/kg SC al menos una o dos veces por semana durante un período determinado por el profesional médico. La respuesta del paciente con HHR al reemplazo enzimático se controla según corresponda, según lo determinado por el profesional médico, p. ej., mediante el seguimiento de una reducción en uno o más síntomas de HHR, usando la orientación proporcionada en la presente.

Los siguientes ejemplos, en el contexto de toda la descripción, proporcionan orientación para determinar los protocolos de tratamiento y la eficacia.

**Ejemplo 13: Tratamiento de un paciente pediátrico** diagnosticado con hipofosfatemia ligada al cromosoma X (XLH)

La calcificación patológica puede manifestarse como otra enfermedad denominada como hipofosfatemia ligada al cromosoma X (XLH). Raquitismo hipofosfatémico dominante ligado al cromosoma X, u raquitismo resistente a la vitamina D ligado al cromosoma X, es una forma dominante ligada al cromosoma X de raquitismo (u osteomalacia) que difiere de la mayoría de los casos de raquitismo en que el suplemento de vitamina D no lo cura. Puede causar deformidades óseas, como estatura baja y rodilla vara (piernas arqueadas). Se asocia con una mutación en la secuencia del gen PHEX (Xp.22) y la posterior inactividad de la proteína PHEX. (Carpenter TO, Imel EA, Holm IA, Jan de Beur SM, Insogna KL. *A clinician's guide to X-linked hypophosphatemia. J Bone Miner Res. 2011 Jul;26(7):1381-8. doi: 10.1002/jbmr.340. Epub 2011 May 2. Erratum in: J Bone Miner Res. 2015 Feb;30(2):394*)

El agente de ENPP1 (ENPP1-Fc) se administra a un sujeto (paciente

pediátrico) a una dosis seleccionada de 2,4 mg/kg SC al menos dos veces por semana durante un período determinado por el profesional médico. La respuesta del paciente con XLH al reemplazo enzimático se controla según corresponda, según lo determinado por el profesional médico, p. ej., mediante el seguimiento de una reducción en uno o más síntomas de XLH, usando la orientación proporcionada en la presente.

Los siguientes ejemplos, en el contexto de toda la descripción, proporcionan orientación para determinar los protocolos de tratamiento y la eficacia.

**Ejemplo 14: Tratamiento de un paciente pediátrico diagnosticado** con raquitismo hipofosfatémico autosómico dominante (ADHR)

La calcificación patológica puede manifestarse como otro estado patológico denominado Raquitismo hipofosfatémico autosómico dominante (ADHR). Signos y síntomas clínicos causados por ADHR en huesos mal formados (raquitismo), dolor óseo y abscesos dentales. ADHR es causada por una mutación en el factor de crecimiento de fibroblastos 23 (FGF23). ADHR se caracteriza por una mineralización deficiente del hueso, el raquitismo y/o la osteomalacia, niveles suprimidos de calcitriol (1, 25-dihidroxitamina D3), disminución de fosfato renal y bajo nivel de fosfato en suero. Las mutaciones en el FGF23 hacen que la proteína sea más estable y no escindible por las proteasas, lo que aumenta la bioactividad del FGF23. La actividad aumentada de los mutantes del FGF23 reduce la expresión de los cotransportadores de sodio-fosfato, NPT2a y NPT2c, en la superficie apical de las células de los túbulos renales proximales, lo que provoca la disminución del fosfato renal. (Rowe PS. *The wrickkened pathways of FGF23, MEPE and PHEX. Crit Rev Oral Biol Med. 2004 Sep 1;15(5):264-81.*)

El agente de ENPP1 (ENPP1-Fc) se administra a un sujeto (paciente pediátrico) a una dosis seleccionada de 2,4 mg/kg SC al menos una o dos veces por

semana durante un período determinado por el profesional médico. La respuesta del paciente con ADHR al reemplazo enzimático se controla según corresponda, según lo determinado por el profesional médico, p. ej., mediante el seguimiento de una reducción en uno o más síntomas de ADHR, usando la orientación proporcionada en la presente.

Los siguientes ejemplos, en el contexto de toda la descripción, proporcionan orientación para determinar los protocolos de tratamiento y la eficacia.

***Ejemplo 15: Medición del pirofosfato inorgánico en plasma***

Los niveles bajos de PPI en plasma son una característica de la deficiencia de ENPP1 y se utilizan como indicador de la eficacia del tratamiento. ENPP1-Fc escinde específicamente ATP para generar AMP y PPI. El objetivo terapéutico de ENPP1 ERT es normalizar los niveles de PPI extracelular y corregir las anomalías clínicas asociadas con la deficiencia de ENPP1.

El PPI se mide mediante la obtención de muestras de plasma del paciente. Los datos de PPI determinados se pueden usar para ajustar los niveles de la dosis. Los niveles de PPI también pueden servir como el marcador de PD principal para el análisis de PK/PD.

La concentración de Pi y PPI en mamíferos es de 1-3 mM y 2-3  $\mu$ M, respectivamente.

***Ejemplo 16: Marcadores biológicos asociados con la salud ósea***

Además de bajo PPI en plasma, los pacientes con deficiencia de ENPP1 se caracterizan bioquímicamente por bajo fosfato en suero, alto fosfato en orina, bajo TmP/GFR renal, calcio normal (Ca), Ca en orina de bajo a normal, 25-hidroxi vitamina D (25 OH D) normal, 1,25(OH)<sub>2</sub>D bajo a normal, BAP alto, FGF23 alto intacto y PTH normal (IOF 2019).

Los biomarcadores que pueden usarse como determinantes adicionales de la

salud ósea de un paciente tratado se exponen en la Tabla 3.

**Tabla 3: Intermedios clínicos y biomarcadores**

|                                             | <b>Analito de</b>    | <b>Tipo de</b>                                         |
|---------------------------------------------|----------------------|--------------------------------------------------------|
| Marcadores<br>farmacodinámicos<br>primarios | Pirofosfato (PPi)    | plasma                                                 |
|                                             | Fosfato inorgánico   | suero                                                  |
|                                             | FGF23 (intacto)      | Plasma                                                 |
|                                             | TmP/TFG              | creatinina sérica, fosfato<br>sérico, fosfato en orina |
|                                             | ALP, BALP, CTx, P1NP | suero, plasma, orina                                   |

**Ejemplo 17: Eficacia del tratamiento con ENPP1-Fc**

La eficacia del tratamiento puede evaluarse midiendo el PPi en plasma, así como también midiendo otros analitos en plasma, tales como FGF23, Pi, FGF23, Pi, TmP/GFR, fosfatasa alcalina (ALP) en suero, ALP específica del hueso (BALP), telopéptido carboxiterminal reticulado de colágeno tipo I (CTx) y propéptido N-terminal del procolágeno tipo 1 (P1NP). Estas mediciones de analitos pueden usarse como marcadores PD asociados con la deficiencia de ENPP1 para determinar la eficacia de ENPP1-Fc. Los cambios en estos analitos pueden describirse como cambios con respecto al inicio y de manera dependiente del tiempo durante el transcurso del tratamiento. También se puede evaluar la linealidad de la dosis de los parámetros PK y PD.

Los cambios con respecto al inicio en los niveles de PPi en plasma, los niveles de FGF23 y la excreción urinaria de fósforo por depuración de creatinina pueden analizarse mediante una prueba t de diferencias pareadas para evaluar la hipótesis nula de que el cambio desde el valor inicial de los niveles de PPi es igual a cero.

**Ejemplo 18: Mediciones de la concentración del fármaco**

Además, se pueden obtener muestras de sangre de un paciente para medir la

concentración de ENPP1-Fc en plasma y la posterior determinación de los parámetros PK después de la primera dosis (es decir, dosis única) y en/después de dosis múltiples (es decir, en estado estacionario).

***Ejemplo 19: Inmunogenia (anticuerpos antifármaco)***

Si se desea, la inmunogenia a ENPP1-Fc puede medirse utilizando anticuerpos antifármaco (AAF). Las pruebas de inmunogenia pueden utilizar un enfoque de varios niveles; si se detectan AAF en el cribado inicial, se puede realizar una prueba confirmatoria para determinar la especificidad. Las muestras también pueden usarse para evaluar y establecer ensayos adicionales para la confirmación de la especificidad (es decir, título) y anticuerpos neutralizantes.

***Ejemplo 20: Análisis farmacocinéticos, farmacodinámicos y exploratorios de biomarcadores***

El análisis farmacocinético puede realizarse en la población PK, y los parámetros PK de ENPP1-Fc pueden resumirse por tratamiento con estadísticas descriptivas. También se puede evaluar la linealidad de la dosis de los parámetros PK y PD. Se pueden determinar los análisis de PK/PD, los análisis de inmunogenia y los análisis exploratorios de biomarcadores.

***Ejemplo 21: Determinadores de eficacia adicionales***

Si bien restaurar un nivel normal de PPI es el indicador principal de la eficacia del tratamiento con NEPP1-Fc, también se pueden usar otras mediciones físicas, si se desea, para ayudar a determinar la eficacia del tratamiento. Estos incluyen uno o más de los siguientes.

**1. Radiografía e imágenes**

**Rayos X para la gravedad ósea.** Pueden tomarse radiografías estándar para detectar deformidades raquílicas óseas. Puede obtenerse una radiografía, por

ejemplo, de las muñecas y las rodillas.

**Exploración DEXA.** Las exploraciones DEXA pueden usarse para evaluar los cambios en la densidad ósea.

**Tomografía por emisión de positrones: tomografía computarizada.**

Na<sup>18</sup>F-TEP/HRpQCT (o TCAR) inicial puede ser una exploración de cuerpo completo realizada en el plazo de 1 mes de la primera dosis de ENPP1-Fc para medir la calcificación de las arterias y los órganos y las anomalías esqueléticas al inicio y para futuras evaluaciones de intervención. La Na<sup>18</sup>F-TEP mide el recambio óseo y la microcalcificación de las arterias. La tomografía computada cuantitativa de alta resolución (TCCAR) o la TC-AR pueden determinar la microestructura ósea en el radio distal y la tibia no dominantes. Se calculan los parámetros geométricos óseos estándar.

**Ecocardiograma Doppler.** Se puede obtener un ecocardiograma inicial dentro de los 3 días previos a la primera dosis de ENPP1-Fc. El EcoDoppler puede usarse para medir la actividad cardíaca (LVEF, flujo sanguíneo), la calcificación del corazón y las válvulas, y la rigidez arterial.

**Tomografía de coherencia óptica.** La tomografía de coherencia óptica puede usarse para visualizar la proliferación neointimal.

**Tonometría arterial periférica.** La tonometría arterial periférica (PAT) se puede utilizar para evaluar la amplitud de la onda de pulso digital (PWA), que corresponde a la variación del volumen digital.

**Ecografía renal.** Se puede utilizar la ecografía renal, por ejemplo, en el plazo de 1 semana de comenzar el tratamiento con ENPP1-Fc, para medir la calcificación renal.

**Histomorfología ósea y biopsia ósea.** La biopsia ósea se puede realizar como medición inicial. Se prefiere la carga de tetraciclina durante 10 días antes de la

biopsia ósea.

**2. Capacidad para caminar.** Las pruebas de caminata se pueden utilizar como una medición submáxima del ejercicio para medir la capacidad funcional en pacientes ambulatorios que combinan funciones cardiopulmonares, neuromusculares y musculoesqueléticas. La prueba de caminata de 6 minutos (6MWT) se desarrolló originalmente por la American Thoracic Society (ATS 2002) para usar en poblaciones pediátricas (*Mylius et al. 2016*), y con niños con enfermedades neuromusculares, como atrofia muscular espinal (Montes et al. 2018), distrofia muscular de Duchenne (*McDonald et al. 2013*), y enfermedad de Pompe de aparición infantil (*van der Meijden et al 2018*). La prueba de caminata de 2 minutos (2MWT) se incluye en NIH Toolbox y se utiliza cada vez más para medir las mismas propiedades.

La 6MWT y la 2MWT pueden administrarse al paciente antes y durante el tratamiento, a discreción del proveedor de atención médica. Si un sujeto no puede completar al menos la 2MWT al inicio, las evaluaciones adicionales durante el tratamiento pueden dejarse a discreción de un proveedor de atención médica. La frecuencia cardíaca en reposo se obtiene antes de la prueba y después de la prueba. Se puede registrar la distancia recorrida en los primeros 2 minutos de la 6MWT y los 6 minutos completos. Las distancias caminadas en 2 minutos y 6 minutos pueden compararse con los datos normativos emparejados por edad y sexo (valores previstos porcentuales).

**3. Dinamometría.** La fuerza puede evaluarse mediante dinamometría antes y/o durante el tratamiento, a discreción del proveedor de atención médica. La dinamometría manual es una medición directa de la fuerza que se usa comúnmente tanto en niños como en adultos. Los grupos musculares que pueden evaluarse incluyen: abducción del hombro, flexión del hombro, flexión del codo, extensión del

codo, abducción de la cadera, flexión de la cadera, extensión de la cadera y extensión de la rodilla. Cada grupo muscular puede medirse 2 veces bilateralmente.

**Fuerza de agarre.** La fuerza de agarre puede medirse utilizando un dinamómetro de fuerza de agarre antes y/o durante el tratamiento, a discreción del proveedor de atención médica. Las instrucciones del equipo y del asesor pueden estandarizarse en todos los centros. El agarre puede evaluarse bilateralmente con 1 práctica y 1 medida de fuerza máxima tomada para cada mano y los resultados pueden compararse con los datos normativos emparejados por edad y sexo (cuando estén disponibles).

**Rango de movimiento.** El rango de movimiento puede evaluarse mediante un goniómetro, un instrumento que evalúa el ángulo de las articulaciones y mide el grado de movimiento en una articulación. El brazo fijo del goniómetro está alineado con el punto de referencia óseo especificado en el segmento del cuerpo fijo, y el brazo móvil del goniómetro está alineado con el punto de referencia óseo especificado del miembro que se está moviendo. El fulcro del goniómetro se especifica para cada movimiento medido utilizando el eje de movimiento y los puntos de referencia óseos. El rango de movimiento puede evaluarse para uno o más de los siguientes: abducción del hombro, flexión del hombro, flexión del codo, extensión del codo, abducción de la cadera, flexión de la cadera, extensión de la cadera y extensión de la rodilla.

**4. Pruebas de audición.** La hipoacusia moderada se ha asociado con ARHR2 (*Brachet et al 2014, Steichen-Gersdorf et al 2015*). La audición inicial puede ser determinada por uno o más de los siguientes: Examen físico y otoscopia, audiometría de inmitancia (comúnmente llamada timpanometría), audiometría de tono puro (PTA) con frecuencias de hasta 8 kHz, si es posible. (Si hay un umbral de PTA

>15 dB, el sujeto también debe someterse a pruebas de conducción ósea), audiometría de alta frecuencia (HFA), con frecuencias de hasta 16 kHz.

**5. Escalas de impresión clínica global.** Las escalas de impresión clínica global (CGI-S) se desarrollaron para su uso en estudios clínicos patrocinados por el Instituto Nacional de Salud Mental para proporcionar una evaluación breve e independiente del punto de vista del médico sobre el funcionamiento global del paciente antes y después de iniciar un medicamento del estudio (Guy 1976).

| Unidad | Impresión                                              |
|--------|--------------------------------------------------------|
| -3     | Mucho peor que el valor inicial                        |
| -2     | Peor que el valor inicial                              |
| -1     | Mínimamente peor que el valor inicial                  |
| 0      | Sin cambios en comparación con el valor inicial        |
| 1      | Mejóro mínimamente en comparación con el valor inicial |
| 2      | Mejóro en comparación con el valor inicial             |
| 3      | Mejóro mucho en comparación con el valor inicial       |

La CGI proporciona una medida resumida general determinada clínicamente que considera toda la información disponible, incluido el conocimiento de los antecedentes del paciente, las circunstancias psicosociales, los síntomas, el comportamiento y el impacto de los síntomas en la capacidad de funcionamiento del paciente. La CGI-S se puede administrar antes y/o durante el tratamiento, a discreción del proveedor de atención médica, y proporciona una evaluación global del cambio utilizando una escala de siete puntos que oscila entre -3 (empeoramiento grave) y +3

(mejora significativa). La tabla a continuación muestra la escala y la impresión correspondiente, que es un indicador de la salud general del paciente en comparación con un valor inicial, como aquel de una persona sana, o la salud de un paciente antes del régimen de dosificación. (Ver Guy, W. Clinical global impressions (CGI) scale. Handbook of Psychiatric Measures. Washington, DC: American Psychiatric Association. 2000:100-102.)

**6. Sistema de clasificación de la función motora gruesa – Ampliado y revisado.** El sistema de clasificación de la función motora gruesa, expandido y revisado (GMFCS - E y R) se puede administrar antes y/o durante el tratamiento, a discreción del proveedor de atención médica. El GMFCS – E y R clasifica el movimiento iniciado por el paciente con énfasis en la movilidad en una escala del 1 al 5.

**7. Sistemas de información de medición de resultados informados por el paciente.** Los sistemas de información de medición de resultados informados por el paciente (Patient Reported Outcomes Measurement Information Systems, PROMIS) constan de una variedad de cuestionarios desarrollados por los Institutos Nacionales de Salud (NIH) para evaluar el bienestar físico, mental y social desde la perspectiva del paciente (<http://www.healthmeasures.net>). Estos cuestionarios se han utilizado en estudios clínicos en personas con afecciones de salud crónicas, como hipofosfatemia ligada al cromosoma X, artritis, esclerosis múltiple y neurofibromatosis. Cada cuestionario contiene de 8 a 10 ítems que el participante califica en una escala de Likert de 5 puntos que varía de 1 (nunca) a 5 (siempre). Los puntajes se suman para cada cuestionario, y los puntajes altos indican más del dominio que se mide (p. ej., más fatiga, más actividad física). Los puntajes brutos se convierten en puntajes T en función de una media de 50 y una desviación estándar de 10, lo que permite la comparación de la muestra del estudio con la población general. Las escalas de PROMIS pueden incluir la interferencia del dolor (formulario abreviado 8a), intensidad

del dolor (versión 3a), función física: extremidad superior (formulario abreviado personalizado), función física: movilidad (formulario abreviado 13a, fatiga de FACIT), fatiga (formulario abreviado) e impacto cognitivo (formulario abreviado 8a) y pueden administrarse antes y/o durante el tratamiento a discreción del proveedor de atención médica. El sujeto debe completar estas evaluaciones sin ayuda.

**8. Escalas de impresión global del cuidador.** La impresión global del estado por parte del cuidador puede administrarse al cuidador del paciente antes y/o durante el tratamiento, a discreción del proveedor de atención médica. La Impresión global del cambio por parte del cuidador proporciona una evaluación global del cambio utilizando una escala de siete puntos que oscila entre -3 (empeoramiento grave) y +3 (mejora significativa).

**9. Índice de artrosis de la Universidad Western Ontario y McMaster.** WOMAC es un resultado informado por el paciente que se usa para evaluar las actividades de la vida diaria, la movilidad funcional, la marcha, la salud general, el dolor y la calidad de vida en pacientes con dolor de cadera o rodilla ([www.sralab.org](http://www.sralab.org)). La evaluación consta de 24 ítems y lleva aproximadamente 12 minutos administrarla. WOMAC se puede administrar antes y/o durante el tratamiento a discreción del proveedor de atención médica. El sujeto puede completar la evaluación sin ayuda.

## **REFERENCIAS**

ATS. American Thoracic Society Statement: Guidelines for the six-minute walk test. AmJRespir, CritCare Med. 2002 2002;166(1):111-7.

Brachet C, Mansbach AL, Clerckx A, Deltenre P, Heinrichs C. Hearing loss is part of the clinical picture of ENPP1 loss of function mutation. Horm Res Paediatr. 2014;81(1):63-6.

CTFG. Recommendations related to contraception and pregnancy testing in clinical trials. 2014 [19 May 2020]; Disponible de:

[http://www.hma.eu/fileadmin/dateien/Human\\_Medicines/01-](http://www.hma.eu/fileadmin/dateien/Human_Medicines/01-)

[About HMA/Working Groups/CTFG/2014 09 HMA CTFG Contraception.pdf.](#)

Ferreira C, Ziegler S, Gahl W. Generalized Arterial Calcification of Infancy. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Stephens K, et al., editors. GeneReviews((R)). Seattle (WA)2014.

Guy W. The Clinical Global Impression Scale. In: Rush Jr AJ, First MB, Blacker D, editors. Handbook of Psychiatric Measures, 2008. Washington, DC: American Psychiatric Publishing, Inc; 1976. p. 90-2.

IOF. Autosomal Recessive Hypophosphatemic Rickets Type 2 (ARHR2). 2019 [19 May 2020]; Disponible de: <https://www.iofbonehealth.org/osteoporosis-musculoskeletal-disorders/skeletal-rare-disorders/autosomal-recessive-hypophosphatemi-0>.

Mackenzie NC, Huesa C, Rutsch F, MacRae VE. New insights into NPP1 function: lessons from clinical and animal studies. Bone. 2012 Nov;51(5):961-8.

McDonald CM, Henricson EK, Abresch RT, Florence JM, Eagle M, Gappmaier E, et al. The 6-minute walk test and other endpoints in Duchenne muscular dystrophy: longitudinal natural history observations over 48 weeks from a multicenter study. Muscle Nerve. 2013 Sep;48(3):343-56.

Montes J, McDermott MP, Mirek E, Mazzone ES, Main M, Glanzman AM, et al. Ambulatory function in spinal muscular atrophy: Age-related patterns of progression. PLoS One. 2018;13(6): e0199657.

Moran JJ. Idiopathic arterial calcification of infancy: a clinicopathologic study. Pathol Annu. 1975; 10:393-417.

Mylius CF, Paap D, Takken T. Reference value for the 6-minute walk test in children and adolescents: a systematic review. Expert Rev Respir Med. 2016 Dec;10(12):1335-52.

NCI. National Cancer Institute Division of Cancer Treatment and Diagnosis (DCTD), National Cancer Institute (NCI), National Institutes of Health (NIH), Department of Health and Human Services (DHHS). Common Terminology Criteria for Adverse Events V5.0 (CTCAE). Publicado: 27 de noviembre, 2017. Disponible en [https://ctep.cancer.gov/protocoldevelopment/electronic\\_applications/docs/ctcae\\_v5\\_quick\\_reference\\_8.5x11.pdf](https://ctep.cancer.gov/protocoldevelopment/electronic_applications/docs/ctcae_v5_quick_reference_8.5x11.pdf). 2017.

Orriss IR, Arnett TR, Russell RG. Pyrophosphate: a key inhibitor of mineralisation. *Curr Opin Pharmacol*. 2016 Jun; 28:57-68.

Rutsch F, Boyer P, Nitschke Y, Ruf N, Lorenz-Depierreux B, Wittkamp T, et al. Hypophosphatemia, hyperphosphaturia, and bisphosphonate treatment are associated with survival beyond infancy in generalized arterial calcification of infancy. *Circ Cardiovasc Genet*. 2008 Dec;1(2):133-40.

Steichen-Gersdorf E, Lorenz-Depierreux B, Strom TM, Shaw NJ. Early onset hearing loss in autosomal recessive hypophosphatemic rickets caused by loss of function mutation in ENPP1. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2015 Jul;28(7-8):967-70.

van der Meijden JC, Kruijshaar ME, Harlaar L, Rizopoulos D, van der Beek N, van der Ploeg AT. Long-term follow-up of 17 patients with childhood Pompe disease treated with enzyme replacement therapy. *J Inherit Metab Dis*. 2018 Nov;41(6):1205-14.

## **MODALIDADES ADICIONALES**

- 1 Un método para prevenir el avance o reducir la calcificación vascular en un sujeto con deficiencia de ENPP1, el método comprende: administrar al sujeto un agente de ENPP1 a una dosis de aproximadamente 2,4 mg por kilogramo del sujeto, para evitar de ese modo el avance o reducir la calcificación vascular en el sujeto.
2. Un método para prevenir el avance o reducir la calcificación patológica en un sujeto con deficiencia de ENPP1, el método comprende: administrar al sujeto un

agente de ENPP1 a una dosis de aproximadamente 2,4 mg por kilogramo del sujeto, para evitar de ese modo el avance o reducir la calcificación patológica en el sujeto.

3. Un método para prevenir el avance o reducir la calcificación tisular en un sujeto con deficiencia de ENPP1, el método comprende: administrar al sujeto un agente de ENPP1 a una dosis de aproximadamente 2,4 mg por kilogramo del sujeto, para evitar de ese modo el avance o reducir la calcificación tisular en el sujeto.

4. Un método para prevenir el avance o reducir la osificación patológica en un sujeto con deficiencia de ENPP1, el método comprende: administrar al sujeto un agente de ENPP1 a una dosis de aproximadamente 2,4 mg por kilogramo del sujeto, para evitar de ese modo el avance o reducir la calcificación tisular en el sujeto.

5. Un método para aumentar el pirofosfato circulante (PPi) en un sujeto con deficiencia de ENPP1, el método comprende: administrar al sujeto un agente de ENPP1 a una dosis de aproximadamente 2,4 mg por kilogramo del sujeto, para aumentar de ese modo el PPi circulante en el sujeto.

6. Un método para aumentar la actividad de pirofosfatasa en un sujeto con deficiencia de ENPP1, el método comprende: administrar al sujeto un agente de ENPP1 a una dosis de aproximadamente 2,4 mg por kilogramo del sujeto, para aumentar de ese modo el PPi circulante en el sujeto.

7. Un método para aliviar uno o más síntomas de la deficiencia de ENPP1 en un sujeto, el método comprende: administrar al sujeto un agente de ENPP1 a una dosis de aproximadamente 2,4 mg por kilogramo del sujeto, para aliviar de ese modo uno o más síntomas de la deficiencia de ENPP1 en el sujeto.

8. Un método para tratar a un sujeto con deficiencia de ENPP1, el método comprende: administrar al sujeto un agente de ENPP1 a una dosis de aproximadamente 2,4 mg por kilogramo del sujeto, para tratar de ese modo al sujeto.

9. Un método para prevenir el avance o reducir la calcificación vascular en un

sujeto con calcificación patológica, el método comprende: administrar al sujeto un agente de ENPP1 a una dosis de aproximadamente 2,4 mg por kilogramo del sujeto, para evitar de ese modo el avance o reducir la calcificación vascular en el sujeto.

10. Un método para prevenir el avance o reducir la calcificación patológica en un sujeto con calcificación patológica, el método comprende: administrar al sujeto un agente de ENPP1 a una dosis de aproximadamente 2,4 mg por kilogramo del sujeto, para evitar de ese modo el avance o reducir la calcificación patológica en el sujeto.

11. Un método para prevenir el avance o reducir la calcificación tisular en un sujeto con calcificación patológica, el método comprende: administrar al sujeto un agente de ENPP1 a una dosis de aproximadamente 2,4 mg por kilogramo del sujeto, para evitar de ese modo el avance o reducir la calcificación tisular en el sujeto.

12. Un método para prevenir el avance o reducir la osificación patológica en un sujeto, el método comprende: administrar al sujeto un agente de ENPP1 a una dosis de aproximadamente 2,4 mg por kilogramo del sujeto, para evitar de ese modo el avance o reducir la calcificación tisular en el sujeto.

13. Un método para aumentar el pirofosfato circulante (PPi) en un sujeto con calcificación patológica, el método comprende: administrar al sujeto un agente de ENPP1 a una dosis de aproximadamente 2,4 mg por kilogramo del sujeto, para aumentar de ese modo el PPi circulante en el sujeto.

14. Un método para aumentar el pirofosfato circulante (PPi) en un sujeto con calcificación patológica, el método comprende: administrar al sujeto un agente de ENPP1 a una dosis de aproximadamente 2,4 mg por kilogramo del sujeto, para aumentar de ese modo el PPi circulante en el sujeto.

15. Un método para aliviar uno o más síntomas de la calcificación patológica en un sujeto, el método comprende: administrar al sujeto un agente de ENPP1 a una dosis de aproximadamente 2,4 mg por kilogramo del sujeto, para aliviar de ese modo uno o

más síntomas de la calcificación patológica en el sujeto.

16. Un método para tratar a un sujeto con calcificación patológica, el método comprende: administrar al sujeto un agente de ENPP1 a una dosis de aproximadamente 2,4 mg por kilogramo del sujeto, para tratar de ese modo al sujeto.

17. Un método para prevenir el avance o reducir la calcificación vascular en un sujeto con deficiencia de ABCC6 o sujeto deficiente en ABCC6, el método comprende: administrar al sujeto un agente de ENPP1 a una dosis de aproximadamente 2,4 mg por kilogramo del sujeto, para evitar de ese modo el avance o reducir la calcificación vascular en el sujeto.

18. Un método para prevenir el avance o reducir la calcificación patológica en un sujeto con deficiencia de ABCC6 o sujeto deficiente en ABCC6, el método comprende: administrar al sujeto un agente de ENPP1 a una dosis de aproximadamente 2,4 mg por kilogramo del sujeto, para evitar de ese modo el avance o reducir la calcificación patológica en el sujeto.

19. Un método para prevenir el avance o reducir la calcificación tisular en un sujeto con deficiencia de ABCC6 o sujeto deficiente en ABCC6, el método comprende: administrar al sujeto un agente de ENPP1 a una dosis de aproximadamente 2,4 mg por kilogramo del sujeto, para evitar de ese modo el avance o reducir la calcificación tisular en el sujeto.

20. Un método para prevenir el avance o reducir la osificación patológica en un sujeto con deficiencia de ABCC6 o sujeto deficiente en ABCC6, el método comprende: administrar al sujeto un agente de ENPP1 a una dosis de aproximadamente 2,4 mg por kilogramo del sujeto, para evitar de ese modo el avance o reducir la osificación patológica en el sujeto.

21. Un método para aumentar el pirofosfato circulante (PPi) en un sujeto con deficiencia de ABCC6 o sujeto deficiente en ABCC6, el método comprende:

administrar al sujeto un agente de ENPP1 a una dosis de aproximadamente 2,4 mg por kilogramo del sujeto, para aumentar de ese modo el PPI circulante en el sujeto.

22. Un método para aumentar la actividad de pirofosfatasa en un sujeto deficiente en ABCC6 o un sujeto con deficiencia de ABCC6, el método comprende: administrar al sujeto un agente de ENPP1 a una dosis de aproximadamente 2,4 mg por kilogramo del sujeto, para aumentar de ese modo la actividad de pirofosfatasa en el sujeto.

23. Un método para aliviar uno o más síntomas del sujeto deficiente en ABCC6 o la deficiencia de ABCC6 en un sujeto, el método comprende: administrar al sujeto un agente de ENPP1 a una dosis de aproximadamente 2,4 mg por kilogramo del sujeto, para aliviar de ese modo uno o más síntomas de la deficiencia de ABCC6 en el sujeto.

24. Un método para tratar a un sujeto deficiente en ABCC6 o a un sujeto con deficiencia de ABCC6, el método comprende: administrar al sujeto un agente de ENPP1 a una dosis de aproximadamente 2,4 mg por kilogramo del sujeto, para tratar de ese modo al sujeto.

25. Un método para tratar a un sujeto con uno o más síntomas de PXE, el método comprende: administrar al sujeto un agente de ENPP1 a una dosis de aproximadamente 2,4 mg por kilogramo del sujeto, para tratar de ese modo a dicho sujeto.

26. Un método para tratar a un sujeto que es lactante y presenta calcificación vascular anómala y/o uno o más síntomas de deficiencia de ENPP1, y/o GACI, el método comprende: administrar al sujeto un agente de ENPP1 a una dosis de aproximadamente 2,4 mg por kilogramo del sujeto, para tratar de ese modo a dicho sujeto.

27. El método de cualquiera de las innovaciones 1-26, en donde la dosis es aproximadamente 2,4 mg por kilogramo del sujeto.

28. El método de cualquiera de las innovaciones 1-27, en donde dicho sujeto es

humano.

29. El método de innovación 28, en donde dicho sujeto es un niño de 1-12 años.

30. El método de cualquiera de las innovaciones 1-29, en donde el agente de ENPP1 se administra al menos una vez por semana.

31. El método de cualquiera de las innovaciones 1-30, en donde el agente de ENPP1 se administra al menos dos veces por semana.

32. El método de cualquiera de las innovaciones 1-30, en donde el agente de ENPP1 se administra al sujeto al menos dos veces por semana después de una dosis inicial.

33. El método de cualquiera de las innovaciones 1-32, en donde el agente de ENPP1 se administra por vía subcutánea.

34. El método de cualquiera de las innovaciones 1-33, en donde el agente de ENPP1 se autoadministra.

35. El método de cualquiera de las innovaciones 1-34, en donde el agente de ENPP1 se administra con un régimen de dosificación que comprende: (a) una dosis inicial de aproximadamente 2,4 mg por kilogramo del sujeto y (b) aproximadamente siete días después de la dosis inicial. administración dos veces por semana de dosis de mantenimiento del agente de ENPP1 de aproximadamente 2,4 mg por kilogramo del sujeto.

36. El método de la innovación 35, en donde la dosis inicial y las dosis de mantenimiento son las mismas.

37. El método de cualquiera de las innovaciones 1-34, en donde el agente de ENPP1 comprende el dominio catalítico de ENPP1.

38. El método de cualquiera de las innovaciones 1-37, en donde el agente de ENPP1 comprende el dominio nucleasa de ENPP1.

39. El método de cualquiera de las innovaciones 1-38, en donde el agente de

ENPP1 comprende el dominio extracelular de ENPP1.

40. El método de cualquiera de las innovaciones 1-39, en donde el agente de ENPP1 comprende un resto heterólogo.

41. El método de la innovación 40, en donde el resto heterólogo es un polipéptido.

42. El método de la innovación 40 o 41, en donde el resto heterólogo aumenta la semivida en circulación del agente de ENPP1 con relación a la semivida en circulación del agente de ENPP1 que carece del resto heterólogo.

43. El método de la innovación 41 o 42, en donde el resto heterólogo comprende la región Fc de una molécula de inmunoglobulina.

44. El método de la innovación 43, en donde la molécula de inmunoglobulina es una molécula de inmunoglobulina humana.

45. El método de la innovación 43 o 44, en donde la molécula de inmunoglobulina es una IgG1.

46. El método de la innovación 41 o 42, en donde el resto heterólogo comprende albúmina.

47. El método de cualquiera de las innovaciones 1-35, en donde el agente de ENPP1 comprende residuos de aminoácidos 99 (PSCAKE) a 925 (QED) de la SEQ ID NO:1 [ENPP1 ECD].

48. El método de cualquiera de las innovaciones 1-35, en donde el agente de ENPP1 comprende los residuos de aminoácidos 1 (FTAGLKPSCAKE) a 833 (QED) de la SEQ ID NO:3.

49. El método de cualquiera de las innovaciones 1-35, en donde el agente de ENPP1 comprende la secuencia de aminoácidos ilustrada en la SEQ ID NO:5

50. El método de cualquiera de las innovaciones 1-35, en donde el agente de ENPP1 comprende la secuencia de aminoácidos ilustrada en la SEQ ID NO:3.

51. El método de cualquiera de las innovaciones 1-35, en donde el agente de

ENPP1 comprende la secuencia de aminoácidos ilustrada en la SEQ ID NO:2.

52. El método de cualquiera de las innovaciones 1-35, en donde el agente de ENPP1 comprende la secuencia de aminoácidos ilustrada en la SEQ ID NO:3 o 4 o 5.

53. El método de cualquiera de las innovaciones 1-35, en donde el sujeto tiene o se sospecha que tiene calcificación arterial generalizada de los lactantes (GACI).

54. El método de cualquiera de las innovaciones 1-35, en donde el sujeto tiene o se sospecha que tiene raquitismo hipofosfatémico autosómico recesivo tipo 2 (ARHR2).

55. El método de cualquiera de las innovaciones 1-35, en donde la composición farmacéutica contiene como el único ingrediente activo alrededor de 2,4 mg de ENPP1-Fc por kg de peso del sujeto.

56. El método de cualquiera de las innovaciones 1-35, en donde el sujeto ha sido tratado con una o más estatinas y/o uno o más inhibidores de la proproteína convertasa subtilisina/kexina tipo 9 (PCSK9) antes de dicha administración de dicho agente de ENPP1.

57. El método de cualquiera de las innovaciones 1-35, en donde el sujeto ha sido tratado con una dosis seleccionada o dosis seleccionadas de una o más estatinas y/o uno o más inhibidores de PCSK9 durante 3 o más años antes de la administración de dicho agente de ENPP1.

58. El método de cualquiera de las innovaciones 1-35, en donde al sujeto no se le ha diagnosticado una neoplasia maligna antes de dicha administración de dicho agente de ENPP1.

59. El método de cualquiera de las innovaciones 1-35, en donde al sujeto no se le ha diagnosticado una neoplasia maligna dentro de los 5 años previos a dicha administración de dicho agente de ENPP1.

60. El método de la innovación 58, en donde dicha neoplasia maligna excluye los

cánceres de piel no melanómicos y el carcinoma cervical *in situ*.

61. El método de cualquiera de las innovaciones 1-52, en donde el sujeto tiene o se sospecha que tiene pseudoxantoma elástico (PXE).

62. El método de cualquiera de las innovaciones 1-52, en donde el sujeto presenta síntomas similares a una persona que tiene raquitismo hipofosfatémico autosómico recesivo tipo 2 (ARHR2) o calcificación arterial generalizada de los lactantes (GACI).

63. El método de cualquiera de las innovaciones 1-35, en donde la composición farmacéutica contiene como el único ingrediente activo alrededor de 2,4 mg/kg de peso del sujeto.

64. El método de cualquiera de las innovaciones 1-52, en donde el sujeto tiene o se sospecha que tiene uno o más de cálculos renales y vesicales, cálculos de la pulpa dental, cálculos biliares, cálculos en las glándulas salivales, prostatitis calculosa crónica, microlitos testiculares, calcificación en pacientes en hemodiálisis, aterosclerosis, malacoplasia, esclerodermia (esclerosis sistémica), calcinosis cutis, estenosis aórtica calcificada, sinovitis y artritis, hiperostosis esquelética intersticial difusa, dermatomiositis juvenil, calcificación arterial generalizada del lactante (GACI), osificación del ligamento longitudinal posterior (OPLL), raquitismo hipofosfatémico autosómico (ARHR2), artrosis, calcificación de placas ateroscleróticas, enfermedad renal crónica (CKD), enfermedad renal en etapa terminal (ESRD), pseudoxantoma elástico (PXE), espondilitis anquilosante, endurecimiento de las arterias, calcifilaxia, y el lupus sistémico erimatoso.

65. El método de cualquiera de las innovaciones 1-52, en donde dicho sujeto presenta calcificación de tejidos conjuntivos blandos.

66. El método de la innovación 65, en donde dicho sujeto presenta acumulación de depósitos de calcio y otros minerales (mineralización) en fibras elásticas de tejidos conjuntivos.

67. El método de la innovación 65, en donde dicho sujeto presenta calcificación en los ojos, el sistema cardiovascular, y/o la piel.
68. El método de la innovación 67, en donde dicho sujeto presenta estrechamiento de las arterias y/o arteriosclerosis.
69. El método para tratar un sujeto de acuerdo con una cualquiera de las innovaciones 1-52, en donde dicho sujeto presenta calcificación ectópica y/o estrechamiento de los vasos sanguíneos en las extremidades inferiores, y/o claudicación.
70. El método para tratar a un sujeto de acuerdo con una cualquiera de las innovaciones 1-52, en donde dicho sujeto presenta anomalías en los ojos.
71. El método de la innovación 70, en donde dichas anomalías oculares comprenden pigmentación anormal de células de la retina, y/o estrías angioides, y/o anomalías en la membrana elástica debajo de la retina.
72. El método para tratar a un sujeto de acuerdo con una cualquiera de las innovaciones 1-52, en donde dicho sujeto presenta neovascularización coroidea.
73. El método para tratar a un sujeto de acuerdo con una cualquiera de las innovaciones 1-52, en donde dicho sujeto presenta deterioro visual, pérdida de la visión, y/o ceguera y también presenta uno o más síntomas de calcificación de tejido blando.

### **INCORPORACIÓN MEDIANTE REFERENCIA**

Todas las publicaciones y patentes mencionadas en la presente se incorporan en la presente mediante referencia en su totalidad en la misma medida que si se indicara específica e individualmente que se incorpora cada publicación o patente individual mediante referencia.

## **OTRAS MODALIDADES**

Si bien se han descrito modalidades específicas de la materia, la descripción anterior es ilustrativa y no restrictiva. Muchas variaciones serán evidentes para los expertos en la técnica al revisar esta descripción y las reivindicaciones a continuación. El alcance completo de la invención debe determinarse mediante referencia a las reivindicaciones, junto con su alcance completo de equivalentes, y la descripción, junto con dichas variaciones.