

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 983 910**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/17** (2006.01)  
**C12N 9/96** (2006.01)  
**C12N 15/85** (2006.01)  
**C12N 15/63** (2006.01)  
**C12N 15/00** (2006.01)  
**C12N 15/52** (2006.01)  
**A61P 9/10** (2006.01)  
**A61P 13/12** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.05.2016** **PCT/US2016/033236**  
87 Fecha y número de publicación internacional: **24.11.2016** **WO16187408**  
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.05.2016** **E 16797290 (0)**  
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.04.2024** **EP 3298140**

54 Título: **Composiciones para tratar afecciones patológicas de calcificación y métodos que usan las mismas**

30 Prioridad:

**19.05.2015 US 201562163500 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**28.10.2024**

73 Titular/es:

**YALE UNIVERSITY (100.0%)**  
**Two Whitney Avenue**  
**New Haven CT 06510, US**

72 Inventor/es:

**BRADDOCK, DEMETRIOS y**  
**ALBRIGHT, RONALD**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 983 910 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Composiciones para tratar afecciones patológicas de calcificación y métodos que usan las mismas

## 5 Referencia a solicitudes relacionadas

La presente solicitud reivindica prioridad a tenor de 35 U.S.C. § 119(e) de la Solicitud de patente provisional de los EE.UU. N.º 62/163.500, presentada el 19 de mayo de 2015.

## 10 Antecedentes de la invención

La calcificación arterial generalizada de la infancia (CAGI) es una enfermedad neonatal muy rara caracterizada por la aparición infantil de calcificaciones arteriales generalizadas en vasos grandes y medianos que provocan colapso cardiovascular y muerte en el período neonatal. La enfermedad se presenta clínicamente con insuficiencia cardíaca, dificultad respiratoria, hipertensión, cianosis y cardiomegalia. El pronóstico es grave, con publicaciones más antiguas de una tasa de mortalidad del 85 % a los seis meses, mientras que recientemente el tratamiento intensivo con bifosfonatos ha reducido la mortalidad al 55 % a los seis meses. Este aparente progreso se ve atenuado por la grave toxicidad esquelética asociada al uso prolongado de etridronato en pacientes con CAGI, la observación de que los limitados datos disponibles dificultan la determinación de si el tratamiento con bifosfonatos es realmente protector o refleja la historia natural de la enfermedad en los pacientes menos afectados y la ineficacia de los bifosfonatos para prevenir la mortalidad en algunos pacientes, incluso cuando se instauran precozmente.

La incidencia general de la CAGI es rara, con 200 casos publicados en la literatura médica y una frecuencia de enfermedad de uno en 391.000. Aunque la enfermedad fue descrita por primera vez por Bryant y White en 1901, no fue hasta el año 2000 que Rutsch y sus colegas observaron que los niveles séricos de PPi y la actividad enzimática de ENPP1 estaban significativamente alterados en pacientes con CAGI. ENPP1 (también conocida como NPP1 o PC-1) es un miembro de la familia de enzimas ectonucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasa (también conocida como ENPP o NPP), que se caracterizan por la actividad fosfodiesterasa, y es una glicoproteína unida a la membrana extracelular de tipo II ubicada en las vesículas de la matriz de depósito de minerales de los osteoblastos y los condrocitos, así como la superficie vascular de los capilares cerebrales. ENPP1 cataboliza la degradación del ATP extracelular en AMP y PPi. PPi inhibe la mineralización tisular ectópica, presumiblemente ocupando algunos de los sitios de Pi en la superficie de cristales de hidroxapatita (HA) nacientes o en crecimiento, creando de este modo irregularidades que ralentizan o interrumpen la propagación del crecimiento cristalino. Las mutaciones inactivadoras en ENPP1 representan el 75 % de los pacientes con CAGI, y una fracción considerable de los pacientes restantes son resultado de mutaciones inactivadoras en el transportador de membrana dependiente de ATP MRP6, codificado por el gen *abcc6*. Las mutaciones en *abcc6* se han relacionado con la disminución de las concentraciones extracelulares de nucleósidos trifosfatos, limitando de este modo el metabolismo de ENPP1 del ATP en PPi extracelular.

Los riñones son esenciales para el mantenimiento del metabolismo óseo y mineral normal, incluyendo la excreción de fosfato. Los pacientes con insuficiencia renal son incapaces de regular adecuadamente el equilibrio mineral sérico y tienden a conservar el fosfato que se absorbe de los diversos componentes de la dieta. Un nivel sérico elevado de fosfato se asocia a una secreción excesiva de hormona paratiroidea y a una tendencia a la calcificación de los tejidos blandos, incluyendo los vasos sanguíneos.

En pacientes con insuficiencia renal, puede producirse la eliminación excesiva de aniones fosfato y pirofosfato durante la hemodiálisis o la diálisis peritoneal. El agotamiento de estos aniones de los tejidos y el plasma conduce a trastornos del metabolismo óseo y mineral, incluyendo osteomalacia y calcificación de tejidos blandos y enfermedades óseas. La deficiencia de pirofosfato puede ser un factor de riesgo para la deposición de calcio en los pequeños vasos de la piel, provocando una vasculitis inflamatoria denominada calcifilaxis que puede conducir a la gangrena de la piel y los tejidos subyacentes, dando como resultado dolor crónico grave. La calcifilaxis puede requerir la amputación del miembro afectado y suele ser mortal, sin tratamiento eficaz para esta afección. La calcificación ectópica, si no se trata, da como resultado un aumento de la morbilidad y la mortalidad. Es importante regular la cantidad de pirofosfato en el sistema y reducir la aparición de calcifilaxis en los pacientes.

En 2003, 19,5 millones de adultos estadounidenses padecían enfermedad renal crónica (ERC) y 13,6 millones estaban en el estadio 2-5 de la ERC, según la definición de la Iniciativa para la Calidad de los Resultados de la Enfermedad Renal de la Fundación Nacional del Riñón (NKF/DOQI, por sus siglas en inglés). Con frecuencia, los efectos adversos de la enfermedad renal crónica pueden prevenirse o retrasarse mediante la detección y el tratamiento precoces.

La prevalencia de la enfermedad renal terminal (ERT) está aumentando a un ritmo alarmante. En el año 2000, la enfermedad renal terminal se desarrolló en más de 90.000 personas en los EE.UU. La población de pacientes en terapia de diálisis o que necesitaban un trasplante era de 380.000 en 2003, y pasó a ser de 651.000 pacientes en 2010. La atención a los pacientes con ERT consume ya más de 18.000 millones de dólares al año en los EE.UU., una carga sustancial para el sistema sanitario.

La arteriopatía urémica calcificante (también conocida como AUC) es una enfermedad mortal que se observa en

pacientes con enfermedad renal crónica (ERC) en diálisis. La calcificación de las arterias pequeñas provoca la isquemia de los tejidos y la piel, infarto y trombosis, con una mortalidad de los pacientes cercana al 80 %. Actualmente hay 450.000 pacientes en diálisis en los EE.UU. que corren el riesgo de contraer AUC, y no hay tratamientos aprobados por la FDA para la enfermedad. La AUC presenta características similares a la CAGI y otros trastornos de la calcificación al presentar niveles bajos de PPI y niveles elevados del factor de crecimiento de fibroblastos 23 (o FGF23). En pacientes con ERT que requieren diálisis, este proceso de calcificación se acelera aún más, con una esperanza de vida promedio de 5-6 años.

El pseudoxantoma elástico (PXE) es un trastorno hereditario caracterizado por la mineralización de las fibras elásticas de la piel, las arterias y la retina, que da como resultado lesiones dérmicas con laxitud y pérdida de elasticidad asociadas, insuficiencia arterial, enfermedades cardiovasculares y hemorragias retinianas que conducen a la degeneración macular. Las mutaciones asociadas al PXE también se ubican en el gen *abcc6*. Las manifestaciones cutáneas se encuentran entre las características más comunes del PXE, pero los síntomas oculares y cardiovasculares son los responsables de la morbilidad de la enfermedad. Las lesiones cutáneas características (pápulas y placas amarillentas y laxitud con pérdida de elasticidad, normalmente observadas en las áreas de la cara, cuello, axilas, fosa antecubital, fosa poplíteas, ingles y periumbilical) son generalmente un signo precoz de PXE y dan como resultado una acumulación de fibras elásticas mineralizadas anormales en la dermis media y por lo general se detectan durante la infancia o la adolescencia y progresan lentamente y con frecuencia de forma imprevisible. El diagnóstico de PXE puede confirmarse mediante una biopsia cutánea que muestre calcificación de fibras elásticas fragmentadas en la dermis media e inferior.

Las complicaciones cardiovasculares comunes de la PXE se deben a la presencia de fibras elásticas calcificadas anormales en la lámina elástica interna de las arterias de tamaño medio. El amplio espectro de fenotipos incluye cambios ateroscleróticos prematuros, fibroplasia de la íntima causante de angina o claudicación intermitente o ambas, infarto de miocardio precoz e hipertensión. El engrosamiento fibroso del endocardio y de las válvulas auriculoventriculares también puede dar como resultado una miocardiopatía restrictiva. Aproximadamente el 10 % de los pacientes con PXE también desarrollan hemorragias gastrointestinales y complicaciones del sistema nervioso central (tales como ictus y demencia) como consecuencia de la mineralización sistémica de la pared arterial. Además, en los pacientes con PXE puede observarse hipertensión renovascular y aneurisma del tabique auricular.

Las condiciones en las que los niveles séricos de fosfato están reducidos o elevados se denominan hipofosfatemia e hiperfosfatemia, respectivamente. La hipofosfatemia, que con frecuencia da como resultado una pérdida renal de fosfato, está provocada por una serie de trastornos genéticos, incluyendo el raquitismo hipofosfatémico ligado al cromosoma X (HLX), el raquitismo hipofosfatémico hereditario con hipercalcia (RHH), la enfermedad ósea hipofosfatémica (EOH) y el raquitismo hipofosfatémico autosómico dominante (RHAD). Los mecanismos moleculares exactos por los que se mantienen las concentraciones adecuadas de fosfato sérico no se conocen bien, pero es crucial mantener los niveles séricos de fosfato para aliviar los síntomas de dichas enfermedades.

Por lo tanto, existe una necesidad en la técnica de composiciones y métodos novedosos para tratar enfermedades y trastornos asociados a la calcificación patológica y/o la osificación patológica. Dichas composiciones y métodos no deben perturbar indeseablemente otros procesos fisiológicos. La presente invención satisface esta necesidad.

### Breve resumen de la invención

El alcance de la presente invención se define a través de las reivindicaciones. Las realizaciones de la descripción relativas a los métodos de tratamiento no están cubiertas por las reivindicaciones. Cualquier realización o ejemplo que se divulgue en la descripción, pero que no esté cubierto por las reivindicaciones, debe considerarse presentado únicamente con fines ilustrativos. La invención proporciona:

1. Un polipéptido ecto-nucleótido pirofosfato/fosfodiesterasa-1 (NPP1) soluble de fórmula: PROTEÍNA-Z-DOMINIO, en donde

la PROTEÍNA comprende el dominio enzimático NPP1 de una proteína NPP1 humana, en donde la proteína NPP1 humana comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 1 ausente en los dominios citosólico y transmembrana;

en donde el DOMINIO comprende el dominio Fc de la IgG1 humana;

en donde Z es la secuencia de aminoácidos LIN; y

el polipéptido carece de un dominio dirigido al hueso con carga negativa.

2. El polipéptido de acuerdo con el punto 1, en donde PROTEÍNA-Z-DOMINIO comprende:

la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16 que comienza con FTAGLKPSCAKE como se indica por \*\* en la SEQ ID NO: 16 donde F es el resto número 93, o

la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 18 que comienza con GLKPSCAKE como se indica por el doble subrayado en la SEQ ID NO: 18 donde G es el resto número 23, o

la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 20 que comienza con PSCAKE como se indica por el doble subrayado en la SEQ ID NO: 20 donde P es el resto número 23.

3. Una composición que comprende un polipéptido de fusión ecto-nucleótido pirofosfato/fosfodiesterasa-1 (NPP1) - fc de IgG1 soluble que comprende:

NPP1-LIN-Fc soluble como se expone en la SEQ ID NO: 16, donde la escisión en la posición indicada \*\* con respecto a la SEQ ID NO: 16 identifica el extremo N del polipéptido de fusión; o

NPP1-LIN-Fc soluble como se expone en la SEQ ID NO: 18, donde la secuencia líder identificada como restos 1-MRGPVLLTV ALATLLAPGA GA de la SEQ ID NO: 18 está ausente; o

NPP1-LIN-Fc soluble como se expone en la SEQ ID NO: 20, donde la secuencia líder identificada como 1-MRGPVLLTV ALATLLAPGA GA de la SEQ ID NO: 20 está ausente;

y en donde el polipéptido de fusión NPP1-Fc carece de un dominio dirigido al hueso con carga negativa.

4. Una composición que comprende células de mamífero transfectadas de forma estable que comprenden una secuencia nucleotídica que codifica el polipéptido de uno cualquiera de los puntos 1-3.

5. Una composición que comprende células de mamífero transfectadas de forma estable que comprenden una secuencia nucleotídica que codifica un polipéptido de fusión ecto-nucleótido pirofosfato/fosfodiesterasa-1 (NPP1) -Fc de fórmula:

PROTEÍNA-Z-DOMINIO que comprende la SEQ ID NO: 16 y expresa una forma soluble del polipéptido de fusión que tiene un extremo N que comienza con FTAGLKPSKAKE y se genera mediante escisión en la posición indicada \*\* con respecto a la SEQ ID NO: 16, o

PROTEÍNA-Z-DOMINIO que comprende la SEQ ID NO: 18 y que expresa una forma soluble del polipéptido de fusión que tiene un extremo N que comienza con GLKPSKAKE como resultado de la escisión para eliminar la secuencia líder identificada como 1-MRGPVLLTV ALATLLAPGA GA de la SEQ ID NO: 18, o

PROTEÍNA-Z-DOMINIO que comprende la SEQ ID NO: 20 y expresa una forma soluble del polipéptido de fusión que tiene un extremo N que comienza con PSKAKE como resultado de la escisión para eliminar la secuencia líder identificada como 1-MRGPVLLTV ALATLLAPGA GA de la SEQ ID NO: 20,

y en donde el polipéptido de fusión NPP1-Fc carece de un dominio dirigido al hueso con carga negativa.

6. La composición de cualquiera de los puntos 4-5, en donde dichas células de mamífero son células HEK293.

7. Un método de expresión de un polipéptido ecto-nucleótido pirofosfato/fosfodiesterasa-1 (NPP1) soluble, comprendiendo el método cultivar la composición de acuerdo con el punto 5 o 6 en condiciones que permiten la expresión del polipéptido codificado por la secuencia nucleotídica.

8. El método del punto 7, que comprende además purificar el polipéptido del sobrenadante de las células de mamífero cultivadas.

9. El polipéptido NPP1 soluble purificado mediante el método del punto 8.

10. Una composición farmacéutica que comprende el polipéptido de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1-3 o el punto 9 y un portador farmacéuticamente aceptable.

11. El polipéptido de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1-3 o 9 o la composición farmacéutica del punto 10 para su uso en el tratamiento de al menos una de entre Calcificación arterial generalizada de la infancia (CAGI), Enfermedad renal crónica (ERC), Enfermedad renal terminal (ERT), Calcificación arterial infantil idiopática (CAII), Osificación del ligamento longitudinal posterior (OLLP), raquitismo hipofosfatémico, calcificación de las placas ateroscleróticas, Pseudoxantoma elástico (PXE), formas hereditarias y no hereditarias de osteoartritis, espondilitis anquilosante, endurecimiento de las arterias que se produce con el envejecimiento y calcifilaxis.

12. El polipéptido de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1-3 o 9 o la composición farmacéutica de acuerdo con el punto 10 para su uso en el tratamiento de la Calcificación arterial generalizada de la infancia (CAGI) o el Pseudoxantoma elástico (PXE).

13. El polipéptido de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1-3 o 9 o la composición farmacéutica de acuerdo con el punto 10 para su uso en el tratamiento de un sujeto que tiene una mutación de pérdida de función en ENPP1.

14. El polipéptido de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1-3 o 9 o la composición farmacéutica de acuerdo con el punto 10 para su uso en el tratamiento de un sujeto que tiene una mutación de pérdida de función en ABCC6.

En el presente documento se divulga un compuesto de fórmula (I), o una sal o solvato del mismo y su uso en un método de tratamiento o prevención de una enfermedad o un trastorno asociados a la calcificación patológica u osificación patológica en un sujeto que lo necesite, así como su uso en un método de reducción o prevención de calcificaciones cardíacas, calcificaciones arteriales y/o mineralizaciones de fibras elásticas en un lactante aquejado de al menos una enfermedad o un trastorno seleccionados del grupo que consiste en CAGI y PXE.

En determinados aspectos de la divulgación, el compuesto de fórmula (I) es PROTEÍNA-Z-DOMINIO-X-Y (I), en donde en (I): la PROTEÍNA se selecciona del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 15, la SEQ ID NO: 17, la SEQ ID NO: 19 y la SEQ ID NO: 24; el DOMINIO se selecciona del grupo que consiste en un dominio Fc de IgG humana (también denominado Fc), proteína albúmina sérica humana (también denominada ALB) y un fragmento de la misma; X y Z están independientemente ausentes o son un polipéptido que comprende 1-20 aminoácidos; e, Y está ausente o es una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: (DSS)<sub>n</sub> (SEQ ID NO: 4), (ESS)<sub>n</sub> (SEQ ID NO: 5), (RQQ)<sub>n</sub> (SEQ ID NO: 6), (KR)<sub>n</sub> (SEQ ID NO: 7), R<sub>m</sub> (SEQ ID NO: 8), DSSSEKFLRRIGRFG (SEQ ID NO: 9), EEEEEPRGDT (SEQ ID NO: 10), APWHLSSQYSRT (SEQ ID NO: 11), STLPPIHEFSRE (SEQ ID NO: 12), VTKHLNQISQSY (SEQ ID NO: 13) y E<sub>m</sub> (SEQ ID NO: 14), en donde m es un número entero que varía de 1 a 15, y en donde n es un número entero que varía de 1 a 10.

En determinados aspectos de la divulgación, el DOMINIO es un Fc o fragmento del mismo. En otras realizaciones, el DOMINIO es una ALB o fragmento de la misma.

En determinados aspectos de la divulgación, Y está ausente y el compuesto carece de una secuencia dirigida al hueso

con carga negativa.

En determinados aspectos de la divulgación, la PROTEÍNA tiene una mutación en al menos una posición seleccionada del grupo que consiste en Ser 532, Tyr 529, Tyr 451, Ile 450, Ser 381, Tyr 382, Ser 377, Phe 346, Gly 531, Ser 289, Ser 287, Ala 454, Gly 452, Gln 519, Glu 526, Lys 448, Glu 508, Arg 456, Asp 276, Tyr 434, Gln 519, Ser 525, Gly 342, Ser 343 y Gly 536, con respecto a la SEQ ID NO: 1. En otras realizaciones, el dominio nucleasa de la PROTEÍNA o mutante de la misma está ausente. Incluso en otras realizaciones, el dominio nucleasa de aproximadamente el resto 524 a aproximadamente el resto 885 con respecto a la SEQ: 1 está ausente en la PROTEÍNA o mutante de la misma. Incluso en otras realizaciones, un segmento de la región extracelular de NNP2 que contiene un sitio de escisión de furina o péptido señal está, o no está, sustituido en la PROTEÍNA o mutante de la misma.

En determinados aspectos de la divulgación, el DOMINIO es un Fc o fragmento del mismo, y en donde PROTEÍNA-Z-DOMINIO comprende (SEQ ID NO: 15)-Z-(Fc o fragmento del mismo), (SEQ ID NO: 17)-Z-(Fc o fragmento del mismo), (SEQ ID NO: 19)-Z-(Fc o fragmento del mismo), (SEQ ID NO: 24)-Z-(Fc o fragmento del mismo), o un mutante de los mismos que comprende al menos una posición seleccionada del grupo que consiste en Ser 532, Tyr 529, Tyr 451, Ile 450, Ser 381, Tyr 382, Ser 377, Phe 346, Gly 531, Ser 289, Ser 287, Ala 454, Gly 452, Gln 519, Glu 526, Lys 448, Glu 508, Arg 456, Asp 276, Tyr 434, Gln 519, Ser 525, Gly 342, Ser 343 y Gly 536, con respecto a la SEQ ID NO: 1.

En determinados aspectos de la divulgación, PROTEÍNA-Z-DOMINIO comprende la SEQ ID NO: 16, la SEQ ID NO: 18, la SEQ ID NO: 20, (SEQ ID NO: 24)-Z-(SEQ ID NO: 26), o un mutante de los mismos que comprende al menos una mutación en al menos una posición seleccionada del grupo que consiste en Ser 532, Tyr 529, Tyr 451, Ile 450, Ser 381, Tyr 382, Ser 377, Phe 346, Gly 531, Ser 289, Ser 287, Ala 454, Gly 452, Gln 519, Glu 526, Lys 448, Glu 508, Arg 456, Asp 276, Tyr 434, Gln 519, Ser 525, Gly 342, Ser 343 y Gly 536, con respecto a la SEQ ID NO: 1.

En determinados aspectos de la divulgación, DOMINIO es una ALB o fragmento de la misma, y en donde PROTEÍNA-Z-DOMINIO comprende (SEQ ID NO: 15)-Z-(ALB o fragmento de la misma), (SEQ ID NO: 17)-Z-(ALB o fragmento de la misma), (SEQ ID NO: 19)-Z-(ALB o fragmento de la misma), (SEQ ID NO: 24)-Z-(ALB o fragmento de la misma), o un mutante de los mismos que comprende al menos una mutación en al menos una posición seleccionada del grupo que consiste en Ser 532, Tyr 529, Tyr 451, Ile 450, Ser 381, Tyr 382, Ser 377, Phe 346, Gly 531, Ser 289, Ser 287, Ala 454, Gly 452, Gln 519, Glu 526, Lys 448, Glu 508, Arg 456, Asp 276, Tyr 434, Gln 519, Ser 525, Gly 342, Ser 343 y Gly 536, con respecto a la SEQ ID NO: 1.

En determinados aspectos de la divulgación, PROTEÍNA-Z-DOMINIO comprende la SEQ ID NO: 21, (SEQ ID NO: 17)-Z-(SEQ ID NO: 27), la SEQ ID NO: 22, la SEQ ID NO: 25, o un mutante de los mismos que comprende al menos una mutación en al menos una posición seleccionada del grupo que consiste en Ser 532, Tyr 529, Tyr 451, Ile 450, Ser 381, Tyr 382, Ser 377, Phe 346, Gly 531, Ser 289, Ser 287, Ala 454, Gly 452, Gln 519, Glu 526, Lys 448, Glu 508, Arg 456, Asp 276, Tyr 434, Gln 519, Ser 525, Gly 342, Ser 343 y Gly 536, con respecto a la SEQ ID NO: 1.

En determinados aspectos de la divulgación, el compuesto tiene un valor de  $k_{cat}$  mayor o igual a aproximadamente 3,4 ( $\pm 0,4$ )  $s^{-1}$  enzima<sup>-1</sup>, en donde la  $k_{cat}$  se determina midiendo la tasa de hidrólisis de ATP del compuesto.

En determinados aspectos de la divulgación, el compuesto tiene un valor de  $K_M$  inferior a o igual a aproximadamente 2  $\mu M$ , en donde la  $K_M$  se determina midiendo la tasa de hidrólisis de ATP del compuesto.

En determinados aspectos de la divulgación, el polipéptido NPP1 es un producto de escisión de un polipéptido NPP1 precursor que comprende un dominio transmembrana ecto-nucleótido pirofosfato/fosfodiesterasa-2 (NPP2).

En determinados aspectos de la divulgación, el dominio transmembrana de NPP2 son los restos 12-30 del N.º de registro del NCBI NP\_001124335 (SEQ ID NO: 2), que corresponde a la SEQ ID NO: 23.

En determinados aspectos de la divulgación, el método comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un compuesto descrito en el presente documento.

En determinados aspectos de la divulgación, la enfermedad comprende al menos una seleccionada del grupo que consiste en Calcificación arterial generalizada de la infancia (CAGI), Calcificación arterial infantil idiopática (CAII), Osificación del ligamento longitudinal posterior (OLLF), raquitismo hipofosfatémico, osteoartritis y calcificación de las placas ateroscleróticas.

En determinados aspectos de la divulgación, la enfermedad comprende al menos una seleccionada del grupo que consiste en PXE, formas hereditarias y no hereditarias de osteoartritis, espondilitis anquilosante, endurecimiento de las arterias que se produce con el envejecimiento, calcifilaxis resultado de la enfermedad renal terminal y progeria.

En determinados aspectos de la divulgación, Y está ausente y el compuesto carece de una secuencia dirigida al hueso con carga negativa.

En determinados aspectos de la divulgación, el método comprende administrar al lactante una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido dado que comprende un polipéptido ecto-nucleótido pirofosfato/fosfodiesterasa-1 (NPP1) y un dominio Fc de IgG, en donde el polipéptido dado carece de un dominio de ácido poliaspártico, por lo que la administración del polipéptido dado aumenta las concentraciones extracelulares de pirofosfato (PPi) en el lactante.

En determinados aspectos de la divulgación, el método comprende administrar al lactante una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido dado que comprende un polipéptido ecto-nucleótido pirofosfato/fosfodiesterasa-1 (NPP1) y una ALB, en donde el polipéptido dado carece de un dominio de ácido poliaspártico, por lo que la administración del polipéptido dado aumenta las concentraciones extracelulares de pirofosfato (PPi) en el lactante.

En determinados aspectos de la divulgación, la administración es al menos una seleccionada del grupo que consiste en por inhalación, oral, nasal, rectal, parenteral, sublingual, transdérmica, transmucosa (por ejemplo, sublingual, lingual, (trans)bucal, (trans)uretral, vaginal (por ejemplo, por vía trans y perivaginal), (intra)nasal y (trans)rectal), intravesical, intrapulmonar, intraduodenal, intragástrica, intratecal, subcutánea, intramuscular, intradérmica, intraarterial, intravenosa, intrabronquial, por inhalación y tópica. En otras realizaciones, la administración es subcutánea.

En determinados aspectos de la divulgación, la administración restablece las concentraciones extracelulares de pirofosfato del lactante a un nivel dentro del intervalo descubierto en un lactante no aquejado de CAGI y/o PXE.

En determinados aspectos de la divulgación, el lactante presenta y/o es diagnosticado con "retraso del crecimiento" antes de la administración.

#### Breve descripción de los dibujos

La siguiente descripción detallada de realizaciones ilustrativas se entenderá mejor cuando se lea junto con los dibujos adjuntos. Con el fin de ilustrar la invención, en los dibujos se muestran realizaciones específicas.

Las FIG. 1A-1G comprenden un conjunto de imágenes y gráficos que ilustran un estudio de historia natural. FIG. 1A: Pesos diarios promedio de las parejas de hermanos ENPP1-asj/asj y ENPP1-WT con dieta de aceleración (WT es tipo silvestre, por sus siglas en inglés). Pesos diarios de ratones ENPP1-WT (cuadrados de color cian) y ENPP1-asj/asj (círculos de color verde) con la dieta de aceleración durante un período de 70 días. Se observa un punto de retraso del crecimiento en la cohorte de ENPP1-asj/asj el día 26, cuando los pesos divergen de ENPP1-WT. Los eventos de muerte están marcados con flechas rojas. FIG. 1B: Curvas de supervivencia, Estudio de historia natural. La supervivencia media de ENPP1-asj/asj fue de 58 días. No se observaron muertes en la cohorte de ENPP1-WT. FIG. 1C: Micro-TC representativa e histología, Estudio de historia natural. Algunos animales asj/asj mostraron calcificaciones drásticas en corazón y aorta visibles en E). Las aortas de los ratones ENPP1-asj/asj presentaban calcificaciones casi circunferenciales y generalizadas en las paredes vasculares, como ilustra la tinción roja de Alzarían de las aortas. FIG. 1F: Histología de ratones asj/asj, Ventrículo izquierdo (40x). Extensas calcificaciones rodeadas de tejido cicatricial que revelan la presencia de antiguos infartos de miocardio repetidos curados. FIG. 1G: Histología de ratones asj/asj, Septo (100X). Más normalmente, los ratones asj mostraron pequeños focos de calcificaciones con tejido cicatricial circundante, como se observa en este caso en el septo miocárdico, también diagnóstico de infartos de miocardio previos.

Las FIG. 2A-2E comprenden un conjunto de imágenes y gráficos que ilustran una vía metabólica, así como el diseño, la estabilidad y las propiedades cinéticas de una proteína terapéutica de la invención. FIG. 2A: Esquema de la vía metabólica del metabolismo purinérgico relacionada con la calcificación ectópica. ENPP1 convierte el ATP extracelular en AMP y PPi, TNAP convierte PPi en Pi, y CD73 convierte AMP en adenosina y Pi. El gen *abcc6* codifica MRP6, un transportador de membrana que aumenta la concentración extracelular de ATP. Las mutaciones de pérdida de función en TNAP dan como resultado la hipofosfatasa familiar. Las mutaciones de pérdida de función en ENPP1 dan como resultado CAGI, las mutaciones de pérdida de función en MRP6 dan lugar a PXE y las mutaciones de pérdida de función en CD73 dan lugar a una enfermedad de calcificación arterial y articular denominada "ACDC". FIG. 2B: Diseño de la proteína terapéutica ENPP1. Para producir una proteína recombinante soluble, se sustituyó en ENPP1 un segmento de la región extracelular de NPP2 que contenía un sitio de escisión de furina, como se ha descrito anteriormente, y la proteína se fusionó por el extremo C con el dominio Fc de inmunoglobulina humana 1 (IgG1). FIG. 2C: Estabilidad de ENPP1 terapéutica. Se observó que la actividad Ap3A de ENPP1-Fc era estable al ciclo de congelación-descongelación en PBS después de su almacenamiento a -80 °C. FIG. 2D-2E: Cinética en estado estacionario de hENPP1-Fc. FIG. 2D: Cursos temporales de formación de AMP medidos mediante análisis por HPLC después de la adición de hNPP1-Fc 10 nM a (de abajo a arriba) ATP 1,0, 2,0, 7,8, 125 y 250 μM. Las curvas suaves a pesar de los datos son ajustes obtenidos mediante el análisis no lineal del curso temporal cinético. La inserción muestra los cursos temporales de [ATP] inferior en el Panel A, (de abajo a arriba) ATP 1,0, 2,0, 7,8 μM. El curso temporal de ATP 1,0 μM muestra que el ATP se agotó totalmente después de 1 minuto y, por lo tanto, no se pudo determinar la velocidad. FIG. 2E: Velocidad inicial de hidrólisis de ATP dependiente de la concentración de ATP por enzima. Las velocidades iniciales después de 7,8 μM son esencialmente las mismas con  $k_{cat}$  (el promedio) = 3,4 (±0,4)

$s^{-1}$  enzima $^{-1}$ . La velocidad inicial a una concentración de ATP de 2,0  $\mu$ M es aproximadamente la mitad del valor de  $k_{cat}$ , por lo que se estima  $K_M \sim 2 \mu$ M para la hidrólisis de ATP por la proteína hNPP1-Fc.

Las FIG. 3A-3D comprenden un conjunto de imágenes y gráficos que ilustran un estudio de prueba de concepto. FIG. 3A: Peso diario de los animales. Pesos diarios promedio de las parejas de hermanos ENPP1-WT y ENPP1-asj/asj dosificadas con vehículo (inyecciones diarias de PBS complementadas con GK 1,5 semanal) en comparación con las parejas de hermanos ENPP1-asj/asj dosificadas a diario con ENPP1-Fc de ratón (mENPP1-Fc) a 500 ua/kg C.D. en PBS e inmunosupresión GK1,5 semanal. La dosificación y el pesaje comenzaron el día 14. Las muertes en la cohorte de ENPP1 -asj/asj + vehículo se indican con flechas rojas el día de la muerte. No se observaron muertes en la cohorte de ENPP1-WT + vehículo o ENPP1-asj/asj + ENPP1-Fc. FIG. 3B: Curvas de supervivencia, Estudio de prueba de concepto. FIG. 3C: Histología del ventrículo izquierdo, (40x, HyE), ratón asj/asj sin tratar que muestra un gran foco de calcificaciones y microinfartos en la pared libre. FIG. 3D: Histología del ventrículo izquierdo, (40x, HyE), ratón asj/asj tratado. Ninguno de los ratones ENPP1-asj tratados mostró una histología ventricular izquierda anormal.

Las FIG. 4A-4G comprenden un conjunto de imágenes que ilustran la histología representativa y un estudio de prueba de concepto. Fig 4A-4B: Aorta (40x, rojo alzariano). Los ratones ENPP1-asj sin tratar (FIG. 4A) mostraron calcificaciones aórticas casi circunferenciales, mientras que los ratones ENPP1-asj tratados (FIG. 4B), no. FIG. 4C: Ratones ENPP1-asj/asj sin tratar, Ventrículo derecho (40x, HyE). Dos ratones ENPP1-asj sin tratar tenían grandes infartos de miocardio confluentes en la pared libre del Ventrículo Derecho. FIG. 4D: Ratones ENPP1-asj/asj tratados, Ventrículo derecho (40x, HyE). Todos los ratones ENPP1-asj tratados mostraron un miocardio del Ventrículo Derecho normal. FIG. 4E: Ratones ENPP1-asj/asj sin tratar, Arterias coronarias (100x, HyE). Todos los ratones ENPP1-asj/asj sin tratar tenían calcificaciones coronarias, mostrando la mayoría calcificaciones circunferenciales en arterias coronarias rodeadas de tejido cicatricial, diagnóstico de isquemia e infarto de miocardio. FIG. 4F: Ratones ENPP1-asj/asj sin tratar, Septo miocárdico (100x, HyE). Casi todos los animales (77 %) mostraron calcificaciones intracardiacas rodeadas de tejido cicatricial, como se demostró en este animal en el septo miocárdico. FIG. 4G: Comparación fenotípica, ratones ENPP1-asj/asj tratados y sin tratar. Existe una diferencia drástica de tamaño entre los animales tratados y sin tratar, y una marcada diferencia en la movilidad y la salud de los animales, que se observa mejor en la película presentada en los datos complementarios.

Las FIG. 5A-5F comprenden un conjunto de imágenes y gráficos que ilustran los biomarcadores de respuesta a la enfermedad. FIG. 5A: Las exploraciones de micro-TC de alta resolución postmortem revelaron calcificaciones extensas en los ratones ENPP1-asj/asj sin tratar en los corazones, las arterias coronarias y las aortas ascendente y descendente, pero absolutamente ninguna calcificación en estos órganos en la cohorte de ENPP1-asj/asj tratados o en ratones ENPP1-WT. FIG. 5B: La [PPI] plasmática en animales ENPP1-WT y ENPP1-asj/asj tratados y sin tratar reveló que el tratamiento con ENPP1-FC aumentó la [PPI] en ratones ENPP1-asj/asj por encima de los niveles WT, y muy por encima de los niveles casi indetectables presentes en ratones ENPP1-asj/asj sin tratar. FIG. 5C-5D: Porcentaje de captación de  $^{99m}$ PYP inyectado en cabezas de animales WT y asj/asj. El % de captación de  $^{99m}$ PYP en las cabezas de los animales del estudio de historia natural se registró semanalmente en los animales WT y asj/asj con la dieta de aceleración, demostrando que la captación de  $^{99m}$ PYP permanece casi constante durante un período de 80 días tras el nacimiento, pero difiere notablemente entre los dos grupos experimentales. FIG. 5D: En el estudio de historia natural, la captación de  $^{99m}$ PYP promedio en las cabezas de los animales WT fue de aproximadamente el 15 % de la dosis inyectada durante el período de 80 días, mientras que la captación de PYP en los animales asj/asj fue de aproximadamente el 20 % ( $p < 0,001$ , ensayo T de Student de 2 vías). FIG. 5E-5F: Porcentaje de captación de  $^{99m}$ PYP de la dosis inyectada en las cabezas de ratones WT, y asj/asj tratados y sin tratar. La captación de  $^{99m}$ PYP se registró a mitad del estudio (día 30-35), (FIG. 5e)) y al final del estudio (día 50-65, FIG. 5F) en los grupos experimentales. Los animales WT y asj/asj tratados tenían un porcentaje de captación en los cráneos de aproximadamente el 15 %, mientras que la cohorte de ENPP1-asj/asj sin tratar fue del 20 % o superior. La diferencia entre los ratones ENPP1-asj tratados y sin tratar fue estadísticamente significativa ( $p < 0,001$ , ensayo T de Student de 2 vías), mientras que la diferencia entre los ratones WT y ENPP1-asj tratados, no.

La FIG. 6, que comprende los paneles a-h, ilustra determinadas construcciones no limitantes de proteínas de fusión de NPP1. X e Y son péptidos opcionales en algunas realizaciones. Z es un enlazador opcional que conecta el dominio Fc o el dominio HSA al extremo C de la proteína NPP1. Las regiones terminales N y C de la proteína NPP1 se representan como N y C en la FIG. 6. Los paneles a-d ilustran proteínas de fusión que comprenden el dominio transmembrana de NPP2 (marcado como \*\*) y NPP1 (marcado como \*\*\*) junto con el dominio enzimático de NPP1. El dominio enzimático de NPP1 comienza con la secuencia de aminoácidos PSCAKE y termina con la secuencia de aminoácidos QED. Los paneles e-h ilustran proteínas de fusión que comprenden el péptido señal de NPP2 (marcado como \*\*) y el dominio transmembrana de NPP1 (marcado como \*\*\*) junto con el dominio enzimático de NPP1.

La FIG. 7 es un gráfico que ilustra los niveles plasmáticos medidos de PPI en ratones tratados con ENPP1-Fc como se describe en el Ejemplo 1.

La FIG. 8 es una ilustración esquemática de un plásmido utilizado para expresar la SEQ ID NO: 22.

La FIG. 9 es una ilustración esquemática de un plásmido utilizado para expresar la SEQ ID NO: 25.

La FIG. 10 es una imagen que ilustra una imagen de tinción con plata de construcciones NPP1-Fc purificadas humanas y de ratón.

## Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere al descubrimiento de que determinados polipéptidos que contienen NPP1, mutantes, o fragmentos de mutantes de los mismos, son útiles para el tratamiento de enfermedades y trastornos que implican un desequilibrio del pirofosfato plasmático, calcificación patológica y/u osificación patológica. Las enfermedades y trastornos que implican calcificación patológica y/u osificación patológica tratables mediante las composiciones y métodos de la invención, incluyen, pero sin limitación, Calcificación arterial generalizada de la infancia (CAGI), Enfermedad renal crónica (ERC), Enfermedad renal terminal (ERT), Calcificación arterial infantil idiopática (CAII), Osificación del ligamento longitudinal posterior (OLLP), raquitismo hipofosfatémico, calcificación de las placas ateroscleróticas, Pseudoxantoma elástico (PXE), formas hereditarias y no hereditarias de osteoartritis, espondilitis anquilosante, endurecimiento de las arterias que se produce con el envejecimiento, calcifilaxis (tal como resultado de la enfermedad renal terminal) y progeria.

Dichas enfermedades son el resultado de innumerables causas: algunas son mutaciones genéticas y otras son complicaciones derivadas de la diabetes, la insuficiencia cardiaca o la diálisis extensa. Sin embargo, en determinadas realizaciones, tienen en común el síntoma del desequilibrio del pirofosfato plasmático y/o una calcificación extensa.

## Definiciones

A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado comúnmente entendido por un experto habitual en la materia a la que pertenece la presente invención. Aunque en la práctica o ensayo de la presente invención pueden usarse cualesquiera métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento, se describen métodos y materiales ilustrativos.

Como se usan en el presente documento, cada uno de los siguientes términos tiene el significado que se le atribuye en esta sección.

Los artículos "un" y "una" se usan en el presente documento para referirse a uno o más de uno (es decir, al menos uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, "un elemento" significa un elemento o más de un elemento.

"Aproximadamente", como se usa en el presente documento, cuando se refiere a un valor medible tal como una cantidad, una duración temporal, y similares, pretende abarcar variaciones del  $\pm 20\%$  o  $\pm 10\%$ , en determinadas realizaciones  $\pm 5\%$ , en determinadas realizaciones  $\pm 1\%$ , en determinadas realizaciones  $\pm 0,1\%$  del valor determinado, ya que dichas variaciones son adecuadas para realizar los métodos divulgados.

El término "anómalo" cuando se usa en el contexto de los organismos, tejidos, células o componentes de los mismos, se refiere a esos organismos, tejidos, células o componentes de los mismos que difieren en al menos una característica observable o detectable (por ejemplo, edad, tratamiento, hora del día, etc.) de los organismos, tejidos, células o componentes de los mismos que muestran la característica respectiva "normal" (esperada). Las características que son normales o esperadas para un tipo de célula o tejido, pueden ser anómalas para un tipo de célula o tejido diferente.

Como se usan en el presente documento, el término "ALB" se refiere a una proteína albúmina sérica humana.

Una enfermedad o trastorno se "alivia" si la gravedad de un síntoma de la enfermedad o trastorno, la frecuencia con la que el paciente experimenta dichos síntomas, o ambas, se reducen.

Como se usan en el presente documento, los términos "alteración", "defecto", "variación" o "mutación" se refieren a una mutación en un gen de una célula que afecta a la función, actividad, expresión (transcripción o traducción) o conformación del polipéptido que codifica. Las mutaciones contempladas en la presente divulgación pueden ser cualquier mutación de un gen en una célula que dé como resultado el aumento o la interrupción de la función, actividad, expresión o conformación del polipéptido codificado, incluyendo la ausencia total de expresión de la proteína codificada y pueden incluir, por ejemplo, mutaciones de sentido erróneo y sin sentido, inserciones, supresiones, desplazamientos de marco de lectura y terminaciones prematuras. Sin estar tan limitadas, las mutaciones incluidas en la presente divulgación pueden alterar el corte y empalme del ARNm (mutación del sitio de corte y empalme) o provocar un desplazamiento del marco de lectura (desplazamiento del marco de lectura).

La expresión "variante de secuencia de aminoácidos" se refiere a polipéptidos que tienen secuencias de aminoácidos que difieren en cierta medida de un polipéptido de secuencia nativa. Habitualmente, las variantes de secuencias de aminoácidos poseen al menos aproximadamente un 70 % de homología, al menos aproximadamente un 80 % de homología, al menos aproximadamente un 90 % de homología o al menos aproximadamente un 95 % de homología con el polipéptido nativo. Las variantes de secuencias de aminoácidos poseen sustituciones, supresiones y/o inserciones en determinadas posiciones dentro de la secuencia de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos nativa.



El término "anticuerpo" como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula de inmunoglobulina capaz de unirse específicamente a un epítipo específico de un antígeno. Los anticuerpos pueden ser inmunoglobulinas intactas derivadas de fuentes naturales o de fuentes recombinantes y pueden ser porciones inmunorreactivas de inmunoglobulinas intactas. Los anticuerpos de la presente divulgación pueden existir en una diversidad de formas, incluyendo, por ejemplo, anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, anticuerpos intracelulares ("intracuerpos"), Fv, Fab y F(ab)<sub>2</sub>, así como anticuerpos monocatenarios (scFv), anticuerpos de cadena pesada, tales como anticuerpos de camélidos, anticuerpos de síntesis, anticuerpos quiméricos y anticuerpos humanizados (Harlow, *et al.*, 1999, *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY; Harlow, *et al.*, 1989, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, Nueva York; Houston, *et al.*, 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883; Bird, *et al.*, 1988, *Science* 242:423-426).

Como se usan en el presente documento, el término "Ap3P" se refiere a la adenosina-(5')-trifosfo-(5')-adenosina o a una sal de la misma.

Como se usan en el presente documento, los términos "niño" y "lactante" se usan indistintamente.

La expresión "secuencia codificante" como se usa en el presente documento, significa una secuencia de un ácido nucleico o su complemento, o una parte de los mismos, que puede transcribirse y/o traducirse para producir el ARNm y/o el polipéptido o un fragmento de los mismos. Las secuencias codificantes incluyen exones en un ADN genómico o transcritos primarios inmaduros de ARN, que se unen mediante la maquinaria bioquímica de la célula para proporcionar un ARNm maduro. La cadena antisentido es el complemento de dicho ácido nucleico, y la secuencia codificante puede deducirse de la misma. Por el contrario, la expresión "secuencia no codificante" como se usa en el presente documento, significa una secuencia de un ácido nucleico o su complemento, o una parte de los mismos, que no se traduce en aminoácido *in vivo*, o donde el ARNt no interactúa para colocar o intentar colocar un aminoácido. Las secuencias no codificantes incluyen secuencias intrónicas en ADN genómico o transcritos primarios inmaduros de ARN, como secuencias asociadas a genes tales como promotores, potenciadores, silenciadores y similares.

Como se usan en el presente documento, los términos "complementario" o "complementariedad" se usan en referencia a polinucleótidos (es decir, una secuencia de nucleótidos) relacionados por las reglas de apareamiento de bases.

Por ejemplo, la secuencia "A-G-T" es complementaria a la secuencia "T-C-A". La complementariedad puede ser "parcial", en la que sólo algunas de las bases de los ácidos nucleicos se emparejan de acuerdo con las reglas de apareamiento de bases. O, puede haber complementariedad "completa" o "total" entre los ácidos nucleicos. El grado de complementariedad entre las cadenas de ácido nucleico tiene efectos significativos sobre la eficiencia y la fuerza de la hibridación entre las cadenas de ácido nucleico. Esto es particularmente importante en las reacciones de amplificación, así como métodos de detección que dependen de la unión entre ácidos nucleicos.

Como se usan en el presente documento, las expresiones "variación conservadora" o "sustitución conservadora", como se usan en el presente documento, se refieren al reemplazo de un resto de aminoácido por otro resto biológicamente similar. No es probable que las variaciones o sustituciones conservadoras cambien forma de la cadena peptídica. Los ejemplos de variaciones o sustituciones conservadoras, incluyen el reemplazo de un resto hidrófobo tal como isoleucina, valina, leucina o metionina por otro, o la sustitución de un resto polar por otro, tal como la sustitución de lisina por arginina, ácido aspártico por glutámico o asparagina por glutamina.

Una "enfermedad" es el estado de salud de un animal en donde el animal no puede mantener la homeostasis y en donde si la enfermedad no mejora, la salud del animal continúa 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 provoca necesariamente una disminución adicional en el estado de salud del animal.

Como se usan en el presente documento, el término "dominio" se refiere a una parte de una molécula o estructura que comparte características fisicoquímicas comunes, tales como, pero sin limitación, dominios o propiedades hidrófobas, polares, globulares y helicoidales. Los ejemplos específicos de dominios de unión incluyen, pero sin limitación, dominios de unión a ADN y dominios de unión a ATP.

Como se usan en el presente documento, las expresiones "cantidad eficaz", "cantidad farmacéuticamente eficaz" y "cantidad terapéuticamente eficaz", se refieren a una cantidad no tóxica pero suficiente de un agente para proporcionar el resultado biológico deseado. Ese resultado puede ser la reducción y/o el alivio de los signos, síntomas o causas de una enfermedad, o cualquier otra alteración deseada de un sistema biológico. Un experto habitual en la materia puede determinar una cantidad terapéutica adecuada en cualquier caso individual usando experimentación de rutina.

"Codificación" se refiere a la propiedad inherente de secuencias específicas de nucleótidos en un polinucleótido, tal como un gen, un ADNc o un ARNm, que se sirven de moldes para la síntesis de otros polímeros y macromoléculas en procesos biológicos que tienen una secuencia definida de nucleótidos (es decir, ARNr, ARNt y ARNm) o una

secuencia definida de aminoácidos y las propiedades biológicas resultantes. Por lo tanto, un gen codifica una proteína si la transcripción y la traducción del ARNm correspondiente a ese gen producen la proteína en una célula u otro sistema biológico. Tanto la cadena codificante, cuya secuencia de nucleótidos es idéntica a la secuencia del ARNm y que por lo general se proporciona en los listados de secuencias, y la cadena no codificante, utilizada como molde para la transcripción de un gen o ADNc, pueden denominarse codificantes de la proteína u otro producto de ese gen o ADNc.

Como se usan en el presente documento, el término "Fc" se refiere a un dominio Fc de IgG humana.

Como se usan en el presente documento, la expresión "retraso del crecimiento" se refiere a un niño o lactante cuyo peso actual o índice de aumento de peso es inferior al de otros niños de edad y sexo similares. La situación en la que un niño o lactante "tiene un retraso del crecimiento" puede identificarse consultando a un especialista médico y/o comparando el peso o el índice de aumento de peso del niño o lactante con los datos conocidos sobre el promedio de peso o índice de aumento de peso por edad.

Como se usa en el presente documento, el término "fragmento", aplicado a un ácido nucleico, se refiere a una subsecuencia de un ácido nucleico mayor. Un "fragmento" de un ácido nucleico puede tener al menos aproximadamente 15 nucleótidos de longitud; por ejemplo, al menos de aproximadamente 50 nucleótidos a aproximadamente 100 nucleótidos; al menos de aproximadamente 100 a aproximadamente 500 nucleótidos, al menos de aproximadamente 500 a aproximadamente 1000 nucleótidos; al menos de aproximadamente 1000 nucleótidos a aproximadamente 1500 nucleótidos; de aproximadamente 1500 nucleótidos a aproximadamente 2500 nucleótidos; o aproximadamente 2500 nucleótidos (y cualquier valor entero intermedio). Como se usa en el presente documento, el término "fragmento", aplicado a una proteína o péptido, se refiere a una subsecuencia de una proteína o péptido mayor. Un "fragmento" de una proteína o péptido puede tener al menos aproximadamente 20 aminoácidos de longitud; por ejemplo, al menos aproximadamente 50 aminoácidos de longitud; al menos aproximadamente 100 aminoácidos de longitud; al menos aproximadamente 200 aminoácidos de longitud; al menos aproximadamente 300 aminoácidos de longitud; o al menos aproximadamente 400 aminoácidos de longitud (y cualquier valor entero intermedio).

"Homólogo" se refiere a la similitud de secuencia o identidad de secuencia entre dos polipéptidos o entre dos moléculas de ácido nucleico. Cuando una posición en ambas secuencias comparadas está ocupada por la misma base o subunidad de monómero de aminoácido, por ejemplo, si una posición en cada una de las dos moléculas de ADN está ocupada por adenina, entonces las moléculas son homólogas en esa posición. El porcentaje de homología entre dos secuencias es una función del número de posiciones coincidentes u homólogas compartidas por las dos secuencias divididas por el número de posiciones comparadas X 100. Por ejemplo, si 6 de 10 de las posiciones en dos secuencias son coincidentes u homólogas, entonces las dos secuencias son un 60 % homólogas. A modo de ejemplo, las secuencias de ADN ATTGCC y TATGGC comparten un 50 % de homología. Generalmente, se realiza una comparación cuando se alinean dos secuencias para proporcionar la homología máxima.

Como se usa en el presente documento, un "inmunoensayo" se refiere a cualquier ensayo de unión que usa un anticuerpo capaz de unirse específicamente a una molécula diana para detectar y cuantificar la molécula diana.

El término "inmunoglobulina" o "Ig", como se usa en el presente documento se define como una clase de proteínas, que actúan como anticuerpos. Los anticuerpos expresados por los linfocitos B se denominan en ocasiones BCR (receptor de linfocitos B) o receptor de antígenos. Los cinco miembros incluidos en esta clase de proteínas son IgA, IgG, IgM, IgD e IgE. La IgA es el principal anticuerpo presente en las secreciones corporales, tales como saliva, lágrimas, leche materna, secreciones gastrointestinales y secreciones mucosas de las vías respiratorias y genitourinarias. La IgG es el anticuerpo circulante más común. La IgM es la principal inmunoglobulina producida en la respuesta inmunitaria primaria en la mayoría de los sujetos. Es la inmunoglobulina más eficiente en la aglutinación, la fijación del complemento y otras respuestas de anticuerpos, y es importante en la defensa contra bacterias y virus. La IgD es la inmunoglobulina que no tiene función de anticuerpo conocida, pero puede servir como receptor de antígenos. La IgE es la inmunoglobulina que media la hipersensibilidad inmediata provocando la liberación de mediadores de los mastocitos y basófilos tras la exposición al alérgeno.

"Material didáctico", como se usa esta expresión en el presente documento, incluye una publicación, una grabación, un diagrama o cualquier otro medio de expresión que pueda usarse para comunicar la utilidad del ácido nucleico, péptido y/o compuesto de la divulgación en el kit para identificar o aliviar o tratar las diversas enfermedades o trastornos citados en el presente documento. Opcionalmente, o como alternativa, el material didáctico puede describir uno o más métodos para identificar o aliviar las enfermedades o trastornos en una célula o un tejido de un sujeto. El material didáctico del kit puede, por ejemplo, fijarse a un recipiente que contenga el ácido nucleico, polipéptido y/o compuesto de la divulgación o enviarse junto con un recipiente que contenga el ácido nucleico, polipéptido y/o compuesto. Como alternativa, el material didáctico puede enviarse separado del recipiente con la intención de que el destinatario use el material didáctico y el compuesto de forma cooperativa.

"Aislado" significa alterado o alejado del estado natural. Por ejemplo, un ácido nucleico o un polipéptido presente de forma natural en un animal vivo no está "aislado", pero el mismo ácido nucleico o polipéptido parcial o totalmente 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 medio no nativo tal como, por ejemplo, una célula hospedadora.

Un "ácido nucleico aislado" se refiere a un segmento o fragmento de ácido nucleico que se ha separado de las secuencias que lo flanquean en un estado de origen natural, por ejemplo, un fragmento de ADN que se ha separado de las secuencias normalmente adyacentes al fragmento, por ejemplo, las secuencias adyacentes al fragmento en un genoma en el que se encuentra de forma natural. La expresión también se aplica a los ácidos nucleicos que se han purificado sustancialmente de otros componentes que acompañan de forma natural al ácido nucleico, por ejemplo, ARN o ADN o proteínas, que lo acompañan de forma natural en la célula. Por lo tanto, la expresión incluye, por ejemplo, un ADN recombinante que se incorpora en un vector, en un plásmido o virus que se replica de forma autónoma, o en el ADN genómico de un procariota o eucariota, o que existe como una molécula distinta (por ejemplo, como un ADNc o un fragmento genómico o de ADNc producido mediante PCR o mediante digestión con enzimas de restricción) independiente de otras secuencias. También incluye un ADN recombinante que forma parte de un gen híbrido que codifica una secuencia polipeptídica adicional.

Como se usan en el presente documento, el término "NPP" o "ENPP" se refiere a ectonucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasa.

Un "ácido nucleico" se refiere a un polinucleótido e incluye polirribonucleótidos y polidesoxirribonucleótidos. Los ácidos nucleicos de acuerdo con la presente divulgación pueden incluir cualquier polímero u oligómero de bases de pirimidina y purina, preferentemente citosina, timina, y uracilo, y adenina y guanina, respectivamente. Véase Albert L. Lehninger, *Principles of Biochemistry*, en 793-800 (Worth Pub. 1982). De hecho, la presente divulgación contempla cualquier desoxirribonucleótido, ribonucleótido o componente de ácido nucleico peptídico, y cualesquier variantes químicas de los mismos, tales como las formas metiladas, hidroximetiladas o glucosiladas de estas bases, y similares. Los polímeros u oligómeros pueden tener una composición heterogénea u homogénea, y pueden aislarse de fuentes de origen natural o producirse artificial o sintéticamente. Además, los ácidos nucleicos pueden ser ADN o ARN, o una mezcla de los mismos, y pueden existir de forma permanente o transitoria en forma monocatenaria o bicatenaria, incluyendo homodúplex, heterodúplex y estados híbridos.

Un "oligonucleótido" o "polinucleótido" es un ácido nucleico que varía de al menos 2, en determinadas realizaciones al menos 8, 15 o 25 nucleótidos de longitud, pero puede tener hasta 50, 100, 1000 o 5000 nucleótidos de longitud o un compuesto que se hibrida específicamente con un polinucleótido. Los polinucleótidos incluyen secuencias de ácido desoxirribonucleico (ADN) o ácido ribonucleico (ARN) o miméticos de los mismos que pueden aislarse de fuentes naturales, producirse de forma recombinante o sintetizarse artificialmente. Otro ejemplo de polinucleótido de la presente divulgación puede ser un ácido nucleico peptídico (PNA). (Véase la Patente de los EE.UU. N.º 6.156.501) La divulgación también abarca situaciones en las que existe un apareamiento de bases no tradicional tal como el apareamiento de bases de Hoogsteen que se ha identificado en determinadas moléculas de ARNt y se ha postulado que existe en una triple hélice. "Polinucleótido" y "oligonucleótido" se usan indistintamente en el presente documento. Se entiende que cuando una secuencia de nucleótidos está representada en el presente documento por una secuencia de ADN (por ejemplo, A, T, G y C), esto incluye también la secuencia de ARN correspondiente (por ejemplo, A, U, G, C) en la que "U" reemplaza a "T".

Como se usan en el presente documento, el término "paciente", "individuo" o "sujeto" se refiere a un ser humano o a un mamífero no humano. Los mamíferos no humanos incluyen, por ejemplo, ganado y animales domésticos, tales como los mamíferos ovinos, bovinos, porcinos, caninos, felinos y murinos. En determinadas realizaciones, el paciente, individuo o sujeto es humano.

Como se usan en el presente documento, el término "prevenir" o "prevención" significa que no se produzca el desarrollo de un trastorno o enfermedad si no se ha producido ninguno, o que no se produzca el desarrollo de un trastorno o enfermedad si ya se ha producido el desarrollo del trastorno o enfermedad. También se tiene en cuenta la capacidad de prevenir algunos o todos los síntomas asociados al trastorno o la enfermedad.

Como se usan en el presente documento, la expresión "composición farmacéutica" o "composición" se refiere a una mezcla de al menos un compuesto útil dentro de la divulgación con un portador farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica facilita la administración del compuesto a un paciente. En la técnica existen múltiples técnicas de administración de un compuesto, incluyendo, pero sin limitación, la administración intravenosa, oral, en aerosol, por inhalación, rectal, vaginal, transdérmica, intranasal, bucal, sublingual, parenteral, intratecal, intragástrica, oftálmica, pulmonar y tópica.

Como se usan en el presente documento, la expresión "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 provocar efectos biológicos no deseables o interactuar de manera perjudicial con cualquiera de los componentes de la composición en la que está contenido.

Como se usan en el presente documento, la expresión "portador farmacéuticamente aceptable" designa un material, composición o portador farmacéuticamente aceptable, tal como una carga, un estabilizante, un agente dispersante,

un agente de suspensión, un diluyente, un excipiente, un agente espesante, un disolvente o un material de encapsulación líquidos o sólidos, implicados en llevar o transportar un compuesto útil dentro de la divulgación dentro o hacia el paciente de manera que pueda realizar su función prevista. Normalmente, dichas construcciones son llevadas o transportadas desde un órgano, o porción del cuerpo, a otro órgano o porción del cuerpo. Cada portador debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con los demás ingredientes de la formulación, incluyendo el compuesto útil dentro de la divulgación, y no perjudicial para el paciente. Algunos ejemplos de materiales que pueden servir como portadores farmacéuticamente aceptables incluyen: azúcares, tales como la lactosa, glucosa y sacarosa; almidones, tales como el almidón de maíz y la fécula de patata; celulosa y sus derivados, tales como carboximetilcelulosa de sodio, etilcelulosa y acetato de celulosa; tragacanto en polvo; malta; gelatina; talco; excipientes, tales como manteca de cacao y ceras para supositorios; aceites, tales como aceite de cacahuete, aceite de algodón, aceite de cártamo, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soja; glicoles, tales como propilenglicol; polioles, tales como glicerina, sorbitol, manitol y polietilenglicol; ésteres, tales como oleato de etilo y laurato de etilo; agar; agentes tamponantes, tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; agentes tensioactivos; ácido alginico; agua apirógena; solución salina isotónica; solución de Ringer; alcohol etílico; soluciones tampón de fosfato; y otras sustancias compatibles no tóxicas empleadas en formulaciones farmacéuticas. Como se usa en el presente documento, "portador farmacéuticamente aceptable" también incluye todos y cada uno de los recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, y agentes retardantes de la absorción, y similares que son compatibles con la actividad del compuesto útil dentro de la divulgación, y son fisiológicamente aceptables para el paciente. También pueden incorporarse en las composiciones compuestos activos complementarios. El "portador farmacéuticamente aceptable" puede incluir además una sal farmacéuticamente aceptable del compuesto útil dentro de la divulgación. Se conocen en la técnica otros ingredientes adicionales que pueden incluirse en las composiciones farmacéuticas utilizadas en la práctica de la divulgación y se describen, por ejemplo, en *Remington's Pharmaceutical Sciences* (Genaro, Ed., Mack Publishing Co., 1985, Easton, PA).

Como se usa en el presente documento, la expresión "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sal del compuesto administrado preparada a partir de ácidos y bases no tóxicos farmacéuticamente aceptables, incluyendo ácidos inorgánicos, bases inorgánicas, ácidos orgánicos, bases inorgánicas, solvatados, hidratos y clatratos de los mismos. Las sales de adición de ácidos farmacéuticamente aceptables adecuadas pueden prepararse a partir de un ácido inorgánico o de un ácido orgánico. Los ejemplos de ácidos inorgánicos incluyen el sulfato, el sulfato de hidrógeno, los ácidos clorhídrico, bromhídrico, hidriódico, nítrico, carbónico, sulfúrico y fosfórico (incluyendo el fosfato de hidrógeno y el fosfato de dihidrógeno). Los ácidos orgánicos apropiados pueden seleccionarse de las clases de ácidos orgánicos alifáticos, cicloalifáticos, aromáticos, aralifáticos, heterocíclicos, carboxílicos y sulfónicos, ejemplos de los cuales incluyen el ácido fórmico, acético, propiónico, succínico, glicólico, glucónico, láctico, málico, tartárico, cítrico, ascórbico, glucurónico, maleico, fumárico, pirúvico, aspártico, glutámico, benzoico, antranílico, 4-hidroxibenzoico, fenilacético, mandélico, embónico (pamoico), metanosulfónico, etanosulfónico, bencenosulfónico, pantoténico, trifluorometanosulfónico, 2-hidroxietanosulfónico, p-toluenosulfónico, sulfanílico, ciclohexilaminosulfónico, esteárico, alginico,  $\beta$ -hidroxibutírico, salicílico, galactárico y galacturónico. Las sales de adición de bases farmacéuticamente aceptables de los compuestos de la divulgación incluyen, por ejemplo, sales metálicas que incluyen sales de metales alcalinos, de metales alcalinotérreos y de metales de transición tales como, por ejemplo, sales de calcio, magnesio, potasio, sodio y cinc. Las sales de adición de bases farmacéuticamente aceptables también incluyen sales orgánicas hechas de aminas básicas tales como, por ejemplo, N,N'-dibencileno-diamina, cloroprocaina, colina, dietanolamina, etilendiamina, meglumina (N-metilglucamina) y procaina. Todas estas sales pueden prepararse a partir del compuesto correspondiente haciendo reaccionar, por ejemplo, el ácido o la base adecuados con el compuesto.

Como se usan en el presente documento, "polinucleótido" incluye ADNc, ARN, híbrido de ADN/ARN, ARN antisentido, ribozima, ADN genómico, formas sintéticas y polímeros mixtos, cadenas tanto sentido como antisentido, y pueden estar modificados química o bioquímicamente para contener bases nucleotídicas no naturales o derivatizadas, de síntesis o semisintéticas. Además, se contemplan las alteraciones de un gen de tipo silvestre o sintético, incluyendo, pero sin limitación, la supresión, inserción, sustitución de uno o más nucleótidos, o fusión con otras secuencias polinucleotídicas.

Como se usan en el presente documento, el término "polipéptido" se refiere a un polímero compuesto por restos de aminoácidos, variantes estructurales relacionadas de origen natural, y análogos sintéticos de los mismos de origen no natural unidos mediante enlaces peptídicos. Los polipéptidos sintéticos pueden sintetizarse, por ejemplo, usando un sintetizador automatizado de polipéptidos. Como se usan en el presente documento, el término "proteína" se refiere normalmente a polipéptidos de gran tamaño. Como se usa en el presente documento, el término "péptido" normalmente se refiere a polipéptidos cortos. En el presente documento se usa la notación convencional para representar secuencias polipeptídicas: el extremo izquierdo de una secuencia de polipéptidos es el extremo amino, y el extremo derecho de una secuencia de polipéptidos es el extremo carboxilo.

Como se usan en el presente documento, los aminoácidos se representan con el nombre completo de los mismos, por el código de tres letras correspondiente o por el código de una letra correspondiente, como se indica a continuación: Ácido aspártico (Asp/D); Ácido glutámico (Glu/E); Lisina (Lys/K); Arginina (Arg/R); Histidina (His/H); Tirosina (Tyr/Y); Cisteína (Cys/C); Asparagina (Asn/N); Glutamina (Gln/Q); Serina (Ser/S); Treonina (Thr/T); Glicina (Gly/G); Alanina (Ala/A); Valina (Val/V); Leucina (Leu/L); Isoleucina (Ile /I); Metionina (Met/M); Prolina (Pro/P);

Fenilalanina (Phe/L); Triptófano (Trp/W).

"Muestra" o "muestra biológica", como se usa en el presente documento, 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 fluido, tejido, material celular y/o no celular obtenido del individuo.

Por la expresión "se une específicamente", como se usa en el presente documento con respecto a un anticuerpo, se entiende un anticuerpo que reconoce un antígeno específico, pero no reconoce ni se une sustancialmente a otras moléculas de una muestra. Por ejemplo, un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno de una especie también puede unirse a ese antígeno de una o más especies. Pero, dicha reactividad entre especies no altera por sí misma la clasificación de un anticuerpo como específico. En otro ejemplo, un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno también puede unirse a diferentes formas alélicas del antígeno. Sin embargo, dicha reactividad cruzada no altera por sí misma la clasificación de un anticuerpo como específico. En algunos casos, las expresiones "unión específica" o "que se une específicamente", pueden usarse en referencia a la interacción de un anticuerpo, una proteína o un péptido con una segunda especie química, para expresar que la interacción depende de la presencia de una estructura particular (por ejemplo, un determinante antigénico o epítipo) en la especie química; por ejemplo, un anticuerpo reconoce y se une a una estructura proteínica específica y no a las proteínas en general. Si un anticuerpo es específico para el epítipo "A", la presencia de una molécula que contenga el epítipo A (o A libre, sin marcar), en una reacción que contenga "A" marcado y el anticuerpo, reducirá la cantidad de A marcado unido al anticuerpo.

Como se usan en el presente documento, "sustancialmente purificado" se refiere a estar esencialmente exento de otros componentes. Por ejemplo, un polipéptido sustancialmente purificado es un polipéptido que se ha separado de otros componentes con los que normalmente está asociado en su estado natural.

Como se usan en el presente documento, el término "tratamiento" o "tratar" se define como la aplicación o administración de un agente terapéutico, es decir, un compuesto útil dentro de la divulgación (solo o en combinación con otro agente farmacéutico), a un paciente, o la aplicación o administración de un agente terapéutico a un tejido o estirpe celular aislado de un paciente (por ejemplo, para diagnóstico o aplicaciones *ex vivo*), que tiene una enfermedad o trastorno, un síntoma de una enfermedad o un trastorno o el potencial de desarrollar una enfermedad o un trastorno, con el fin de curar, sanar, aliviar, mitigar, alterar, remediar, recuperar, mejorar o afectar a la enfermedad o trastorno, los síntomas de la enfermedad o trastorno o el potencial de desarrollar la enfermedad o trastorno. Dichos tratamientos pueden adaptarse o modificarse específicamente, basándose en los conocimientos obtenidos en el campo de la farmacogenómica.

Como se usan en el presente documento, la expresión "de tipo silvestre" se refiere a un gen o producto génico aislado de una fuente de origen natural. Un gen de tipo silvestre es el que se observa con más frecuencia en una población y, por lo tanto, se designa arbitrariamente como la forma "normal" o "de tipo silvestre" del gen. Por el contrario, el término "modificado" o "mutante" se refiere a un gen o producto génico que muestra modificaciones en la secuencia y/o propiedades funcionales (es decir, características alteradas) en comparación 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 (incluidas secuencias de ácido nucleico alteradas) en comparación con el gen o producto genético de tipo silvestre.

Intervalos: a lo largo de la presente divulgación, diversos aspectos de la divulgación pueden presentarse en un formato de intervalo. En consecuencia, debe considerarse que la descripción de un intervalo ha divulgado específicamente todos los posibles subintervalos, así como valores numéricos individuales en ese intervalo. Por ejemplo, debería considerarse que la descripción de un intervalo, tal como de 1 a 6, tiene subintervalos específicamente divulgados 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 intervalo, por ejemplo, 1, 2, 2,7, 3, 4, 5, 5,3 y 6. Esto es aplicable independientemente de la amplitud del intervalo.

## Descripción

La ENPP1 es la principal fuente de PPI extracelular del organismo. A pesar de las múltiples etiologías genéticas y la naturaleza multifactorial de la expresión, la progresión y la gravedad de la CAGI, los presentes resultados demuestran que la alteración del metabolismo purinérgico extracelular de NPP1 es responsable de la secuela patológica y la mortalidad asociadas a la CAGI, y la terapia de reemplazo enzimático con ENPP1 es un enfoque terapéutico abordable. Esto se demostró usando el modelo en ratón ENPP1-asj de CAGI con la "dieta de aceleración".

Las enfermedades de calcificación tisular ectópica varían desde las enfermedades muy raras, tales como la CAGI, a enfermedades casi ubicuas en la población de edad avanzada, tales como el endurecimiento de las arterias y la osteoartritis. La etiología genética de la CAGI humana sugiere que las calcificaciones arteriales letales dan como resultado una alteración del metabolismo purinérgico extracelular, ya sea por mutaciones de pérdida de función en ENPP1 o por reducciones corriente arriba de los nucleótido trifosfatos metabolizados por ENPP1 en PPI extracelular. Como se demuestra en el presente documento, la suplementación subcutánea con ENPP1 no dirigido o ENPP1-Fc no dirigido aumenta las concentraciones extracelulares de PPI lo suficiente como para eliminar la mortalidad, así como

las calcificaciones cardíacas y arteriales en modelos animales de CAGI. Estos resultados indican que el tratamiento de reemplazo enzimático no dirigido puede ser eficaz en la CAGI y otras enfermedades dando como resultado una calcificación vascular incontrolada.

- 5 Los presentes resultados son sorprendentes a la luz de estudios previos sobre el tratamiento de la hipofosfatasa hereditaria (HPP), que reivindicaban la necesidad de un motivo dirigido al hueso para la eficacia. La HPP es una enfermedad similar al raquitismo de mineralización ósea reducida/ausente, y el tratamiento con TNAP recombinante invocó la necesidad del direccionamiento óseo para conseguir un efecto clínico (Millan, *et al.*, 2008, *J. Bone Mineral Res.* 23:777-787; Whyte, *et al.*, 2012, *New Engl. J. Med.* 366:904-913). Los ensayos clínicos que intentaron tratar la
- 10 HPP con suero enriquecido con TNAP no dirigido fracasaron (Whyte, *et al.*, 1982, *J. Pediatrics* 101:379-386; Whyte, *et al.*, 1984, *J. Pediatrics* 105:926-933; Weninger, *et al.*, 1989, *Acta Paediatrica Scandinavica* Supl. 360:154-160). Además, la bibliografía en el momento de la invención indicaba que la NPP1 no dirigida no mostraba eficacia con ensayos de calcificación *in vitro* (documento WO 2012/125182 de Quinn, *et al.*, tal como, pero sin limitación, la Figura 23), lo que indica que el direccionamiento óseo era esencial para la actividad biológica *in vivo* de un producto biológico
- 15 que contiene NPP1. Sin embargo, en determinadas realizaciones, los presentes resultados indican que el direccionamiento óseo no es necesario para la eficacia terapéutica.

- Las calcificaciones arteriales de la CAGI pueden ir acompañadas de calcificaciones extravasculares en la piel y la retina que tipifican una segunda enfermedad rara, el PXE. El PXE está estrechamente relacionado con CAGI, pero da
- 20 como resultado una mineralización tisular ectópica de las fibras elásticas que afectan a la piel, los ojos y el sistema cardiovascular. El PXE tiene un inicio más tardío, una progresión más lenta y es relativamente más frecuente que la CAGI, con una incidencia de 1/25.000 a 1/75.000. Las manifestaciones clínicas comienzan en la piel con el desarrollo de pequeñas pápulas amarillentas que confluyen en grandes placas de piel correosa seguidas de estrías angioides en el ojo que provocan hemorragias, cicatrices, neovascularización, pérdida progresiva de la agudeza visual y ceguera.
- 25 El sistema cardiovascular también puede verse afectado por la mineralización progresiva de los vasos sanguíneos arteriales de tamaño medio, dando como resultado hipertensión, claudicación, hemorragias ocasionales de las arterias intestinales y (raramente) infarto prematuro de miocardio. La base genética del PXE son las mutaciones de pérdida de función en el gen *abcc6*, dando como resultado una función alterada de la proteína MRP6, que reduce las concentraciones extracelulares de nucleotridifosfato (NTP) *in vitro* e *in vivo*. Esto reduce las concentraciones de sustrato
- 30 de ENPP1 y, por lo tanto, limita la producción extracelular de PPI.

- El modelo de ratón NPP1-asj de CAGI posee tanto la etiología genética como las características patológicas de la CAGI humana, pero los ratones también desarrollan calcificaciones periarticulares no características de la CAGI, pero que recuerdan a enfermedades humanas de calcificación periarticular desregulada tales como la osteoartritis y la
- 35 osificación del ligamento longitudinal posterior (OLLP). Los ratones que poseen una mutación de sentido erróneo en ENPP1 (V246D) se describieron inicialmente como ratones "asj" por "asociados a articulaciones rígidas" (del inglés *associated with stiffened joints*), reflejando el desarrollo de calcificaciones periarticulares progresivas en las patas delanteras de los ratones. Las mutaciones de ENPP1 en ratones se usan para modelar calcificaciones paraespinales en ratones *ttw/ttw* para proporcionar una visión de la OLLP, pero la identificación de mutaciones de ENPP1 en CAGI
- 40 condujo a reevaluar la presencia de calcificaciones vasculares en estos animales y Uitto y colaboradores observaron que los ratones NPP1-asj, cuando se les alimentó con una dieta especial alta en  $\text{Ca}^{+2}$  y baja en  $\text{Mg}^{+2}$ , recapitulaban muchas de las características esenciales de la CAGI humana. Los niveles de proteína ENPP1 se correlacionan inversamente con la gravedad de la calcificación del cartílago y la osteoartritis en seres humanos, y las variantes genéticas de ENPP1 son responsables de una fracción sustancial de la osteoartritis de la mano en poblaciones de
- 45 pacientes predispuestas a formas hereditarias de la enfermedad. En determinadas realizaciones, la terapia de reemplazo enzimático de ENPP1 es una estrategia de tratamiento viable para las formas de osteoartritis resultado de una deficiencia de ENPP1 y/o una reducción de la concentración extracelular de PPI. Dichas afecciones incluyen, pero sin limitación, PXE, formas hereditarias y no hereditarias de osteoartritis, espondilitis anquilosante, endurecimiento de las arterias que se produce con el envejecimiento y calcifilaxis resultado de la insuficiencia renal terminal.

## 50 Composiciones

- En determinados aspectos de la divulgación, las composiciones descritas en el presente documento comprenden al menos un compuesto de fórmula (I), o un solvato o sal (tal como una sal farmacéuticamente aceptable) del mismo:

- 55 PROTEÍNA-Z-DOMINIO-X-Y (I), en donde en (I)
- la PROTEÍNA es al menos una seleccionada del grupo que consiste en NPP121 (SEQ ID NO: 15), NPP71 (SEQ ID NO: 17), NPP71 que carece de GLK del extremo N de NPP1 (SEQ ID NO: 19) y NPP51 (SEQ ID NO: 24); el DOMINIO es al menos uno seleccionado del grupo que consiste en un dominio Fc de IgG humana (Fc), proteína
- 60 albúmina sérica humana (ALB) y un fragmento de la misma;
- X y Z están independientemente ausentes o son un polipéptido que comprende 1-20 aminoácidos; e,
- Y está ausente o es una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: (DSS)<sub>n</sub> (SEQ ID NO: 4), (ESS)<sub>n</sub> (SEQ ID NO: 5), (RQQ)<sub>n</sub> (SEQ ID NO: 6), (KR)<sub>n</sub> (SEQ ID NO: 7), R<sub>m</sub> (SEQ ID NO: 8), DSSSEKFLRRIGRFG (SEQ ID NO: 9), EEEEEPRGDT (SEQ ID NO: 10), APWHLSSQYSRT (SEQ ID NO: 11), STLPIPEFSRE (SEQ ID NO: 12), VTKHLNQISQSY (SEQ ID NO: 13) y E<sub>m</sub> (SEQ ID NO: 14) en donde m es un número entero que varía de 1 a
- 65 15, y en donde n es un número entero que varía de 1 a 10.

En determinados aspectos de la divulgación, las composiciones descritas en el presente documento comprenden al menos un compuesto de fórmula (II), o una sal farmacéutica del mismo:

PROTEÍNA-Z-DOMINIO-X-Y (II), en donde en (II)

la PROTEÍNA es al menos una seleccionada del grupo que consiste en NPP121 (SEQ ID NO: 15), NPP71 (SEQ ID NO: 17), NPP71 que carece de GLK del extremo N de NPP1 (SEQ ID NO: 19) y NPP51 (SEQ ID NO: 24);

el DOMINIO es al menos uno seleccionado del grupo que consiste en un dominio IgGfc humano (Fc), proteína albúmina sérica humana (ALB) y un fragmento de la misma;

X y Z están independientemente ausentes o son un polipéptido que comprende 1-20 aminoácidos; e, Y es una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: (DSS)<sub>n</sub> (SEQ ID NO: 4), (ESS)<sub>n</sub> (SEQ ID NO: 5), (RQQ)<sub>n</sub> (SEQ ID NO: 6), (KR)<sub>n</sub> (SEQ ID NO: 7), R<sub>m</sub> (SEQ ID NO: 8), DSSSEKFLRRIGRFG (SEQ ID NO: 9), EEEEEEEPRGDT (SEQ ID NO: 10), APWHLSSQYSRT (SEQ ID NO: 11), STLPIPEFSRE (SEQ ID NO: 12), VTKHLNQISQSY (SEQ ID NO: 13) y E<sub>m</sub> (SEQ ID NO: 14), en donde m es un número entero que varía de 1 a 15, y en donde n es un número entero que varía de 1 a 10.

En determinados aspectos de la divulgación, el DOMINIO comprende un dominio Fc de IgG humana o fragmento del mismo. En otras realizaciones, el DOMINIO consiste esencialmente en un dominio Fc de IgG humana o fragmento del mismo. En otros aspectos más de la divulgación, el DOMINIO consiste en un dominio Fc de IgG humana o fragmento del mismo.

En determinados aspectos de la divulgación, el DOMINIO comprende una proteína albúmina sérica humana o un fragmento de la misma. En otros aspectos de la divulgación, el DOMINIO consiste esencialmente en una proteína albúmina sérica humana o un fragmento de la misma. En otros aspectos más de la divulgación, el DOMINIO consiste en una proteína albúmina sérica humana o un fragmento de la misma.

En determinados aspectos de la divulgación, Y es una secuencia dirigida al hueso con carga negativa. En determinados aspectos de la divulgación, Y está ausente. En determinados aspectos de la divulgación, Y está ausente y el compuesto de fórmula (I) o (II) carece de una secuencia dirigida al hueso con carga negativa. En otros aspectos más de la divulgación, un dominio de ácido poliaspártico y las SEQ ID NO: 4-14 son ejemplos no limitantes de una secuencia dirigida al hueso con carga negativa.

En determinados aspectos de la divulgación, la PROTEÍNA tiene una mutación en al menos una posición seleccionada del grupo que consiste en Ser 532, Tyr 529, Tyr 451, Ile 450, Ser 381, Tyr 382, Ser 377, Phe 346, Gly 531, Ser 289, Ser 287, Ala 454, Gly 452, Gln 519, Glu 526, Lys 448, Glu 508, Arg 456, Asp 276, Tyr 434, Gln 519, Ser 525, Gly 342, Ser 343 y Gly 536, con respecto a la SEQ ID NO: 1. En otros aspectos de la divulgación, la PROTEÍNA o mutante de la misma está truncada para eliminar el dominio nucleasa. Incluso en otras realizaciones, la PROTEÍNA o mutante de la misma está truncada para eliminar el dominio nucleasa de aproximadamente el resto 524 a aproximadamente el resto 885 con respecto a la SEQ ID NO: 1, dejando únicamente el dominio catalítico de aproximadamente el resto 186 a aproximadamente el resto 586 con respecto a la SEQ ID NO: 1, que sirve para conservar la actividad catalítica de la proteína.

En determinados aspectos de la divulgación, en (I) o (II) PROTEÍNA-Z-DOMINIO comprende (SEQ ID NO: 15)-Z-(Fc o fragmento del mismo), o un mutante del mismo que comprende al menos una mutación en al menos una posición seleccionada del grupo que consiste en Ser 532, Tyr 529, Tyr 451, Ile 450, Ser 381, Tyr 382, Ser 377, Phe 346, Gly 531, Ser 289, Ser 287, Ala 454, Gly 452, Gln 519, Glu 526, Lys 448, Glu 508, Arg 456, Asp 276, Tyr 434, Gln 519, Ser 525, Gly 342, Ser 343 y Gly 536, con respecto a la SEQ ID NO: 1. En otros aspectos de la divulgación, Z es un triptéptido. En otros aspectos más de la divulgación, Z es LIN. En otros aspectos más de la divulgación, en (I) o (II) PROTEÍNA-Z-DOMINIO comprende la SEQ ID NO: 16, o un mutante de la misma que comprende al menos una mutación en al menos una posición seleccionada del grupo que consiste en Ser 532, Tyr 529, Tyr 451, Ile 450, Ser 381, Tyr 382, Ser 377, Phe 346, Gly 531, Ser 289, Ser 287, Ala 454, Gly 452, Gln 519, Glu 526, Lys 448, Glu 508, Arg 456, Asp 276, Tyr 434, Gln 519, Ser 525, Gly 342, Ser 343 y Gly 536, con respecto a la SEQ ID NO: 1.

En determinados aspectos de la divulgación, en (I) o (II) PROTEÍNA-Z-DOMINIO comprende (SEQ ID NO: 17)-Z-(Fc o fragmento del mismo), o un mutante del mismo que comprende al menos una mutación en al menos una posición seleccionada del grupo que consiste en Ser 532, Tyr 529, Tyr 451, Ile 450, Ser 381, Tyr 382, Ser 377, Phe 346, Gly 531, Ser 289, Ser 287, Ala 454, Gly 452, Gln 519, Glu 526, Lys 448, Glu 508, Arg 456, Asp 276, Tyr 434, Gln 519, Ser 525, Gly 342, Ser 343 y Gly 536, con respecto a la SEQ ID NO: 1. En otros aspectos de la divulgación, Z es un triptéptido. En otros aspectos más de la divulgación, Z es LIN. En otros aspectos más de la divulgación, en (I) o (II) PROTEÍNA-Z-DOMINIO comprende la SEQ ID NO: 18, o un mutante de la misma que comprende al menos una mutación en al menos una posición seleccionada del grupo que consiste en Ser 532, Tyr 529, Tyr 451, Ile 450, Ser 381, Tyr 382, Ser 377, Phe 346, Gly 531, Ser 289, Ser 287, Ala 454, Gly 452, Gln 519, Glu 526, Lys 448, Glu 508, Arg 456, Asp 276, Tyr 434, Gln 519, Ser 525, Gly 342, Ser 343 y Gly 536, con respecto a la SEQ ID NO: 1.

En determinados aspectos de la divulgación, en (I) o (II) PROTEÍNA-Z-DOMINIO comprende (SEQ ID NO: 19)-Z-(Fc o fragmento del mismo), o un mutante del mismo que comprende al menos una mutación en al menos una posición seleccionada del grupo que consiste en Ser 532, Tyr 529, Tyr 451, Ile 450, Ser 381, Tyr 382, Ser 377, Phe 346, Gly 531, Ser 289, Ser 287, Ala 454, Gly 452, Gln 519, Glu 526, Lys 448, Glu 508, Arg 456, Asp 276, Tyr 434, Gln 519, Ser





consiste en Ser 532, Tyr 529, Tyr 451, Ile 450, Ser 381, Tyr 382, Ser 377, Phe 346, Gly 531, Ser 289, Ser 287, Ala 454, Gly 452, Gln 519, Glu 526, Lys 448, Glu 508, Arg 456, Asp 276, Tyr 434, Gln 519, Ser 525, Gly 342, Ser 343 y Gly 536, con respecto a la SEQ ID NO: 1.

5 En determinados aspectos de la divulgación, X y Z están independientemente ausentes o son un polipéptido que comprende 1-18 aminoácidos. En otros aspectos de la divulgación, X y Z están independientemente ausentes o son un polipéptido que comprende 1-16 aminoácidos. En otros aspectos más de la divulgación, X y Z están independientemente ausentes o son un polipéptido que comprende 1-14 aminoácidos. En otros aspectos más de la divulgación, X y Z están independientemente ausentes o son un polipéptido que comprende 1-12 aminoácidos. En  
10 otros aspectos más de la divulgación, X y Z están independientemente ausentes o son un polipéptido que comprende 1-10 aminoácidos. En otros aspectos más de la divulgación, X y Z están independientemente ausentes o son un polipéptido que comprende 1-8 aminoácidos. En otros aspectos más de la divulgación, X y Z están independientemente ausentes o son un polipéptido que comprende 1-6 aminoácidos. En otros aspectos más de la divulgación, X y Z están independientemente ausentes o son un polipéptido que comprende 1-5 aminoácidos. En otros aspectos más de la divulgación, X y Z están independientemente ausentes o son un polipéptido que comprende 1-4 aminoácidos. En otros  
15 aspectos más de la divulgación, X y Z están independientemente ausentes o son un polipéptido que comprende 1-3 aminoácidos. En otros aspectos más de la divulgación, X y Z están independientemente ausentes o son un polipéptido que comprende 1-2 aminoácidos. En otros aspectos más de la divulgación, X y Z están independientemente ausentes o son un único aminoácido.

20 En determinados aspectos de la divulgación, m es 1. En otros aspectos de la divulgación, m es 2. En otros aspectos más de la divulgación, m es 3. En otros aspectos más de la divulgación, m es 4. En otros aspectos más de la divulgación, m es 5. En otros aspectos más de la divulgación, m es 6. En otros aspectos más de la divulgación, m es 7. En otros aspectos más de la divulgación, m es 8. En otros aspectos más de la divulgación, m es 9. En otros aspectos  
25 más de la divulgación, m es 10. En otros aspectos más de la divulgación, m es 11. En otros aspectos más de la divulgación, m es 12. En otros aspectos más de la divulgación, m es 13. En otros aspectos más de la divulgación, m es 14. En otros aspectos más de la divulgación, m es 15. En otros aspectos más de la divulgación, cada aparición de m se selecciona independientemente del grupo que consiste en un número entero que varía de 1 a 15, de 2 a 15, de 3 a 15, de 4 a 15, de 5 a 15, de 6 a 15, de 7 a 15, de 8 a 15, de 9 a 15, de 10 a 15, de 11 a 15, de 12 a 15, de 13 a 15,  
30 de 14 a 15, de 1 a 14, de 2 a 14, de 3 a 14, de 4 a 14, de 5 a 14, de 6 a 14, de 7 a 14, de 8 a 14, de 9 a 14, de 10 a 14, de 11 a 14, de 12 a 14, de 13 a 14, de 1 a 13, de 2 a 13, de 3 a 13, de 4 a 13, de 5 a 13, de 6 a 13, de 7 a 13, de 8 a 13, de 9 a 13, de 10 a 13, de 11 a 13, de 12 a 13, de 1 a 12, de 2 a 12, de 3 a 12, de 4 a 12, de 5 a 12, de 6 a 12, de 7 a 12, de 8 a 12, de 9 a 12, de 10 a 12, de 11 a 12, de 1 a 11, de 2 a 11, de 3 a 11, de 4 a 11, de 5 a 11, de 6 a 11, de 7 a 11, de 8 a 11, de 9 a 11, de 10 a 11, de 1 a 10, de 2 a 10, de 3 a 10, de 4 a 10, de 5 a 10, de 6 a 10, de 7 a 10, de 8 a 10, de 9 a 10, de 1 a 9, de 2 a 9, de 3 a 9, de 4 a 9, de 5 a 9, de 6 a 9, de 7 a 9, de 8 a 9, de 1 a 8, de 2 a 8, de 3 a 8, de 4 a 8, de 5 a 8, de 6 a 8, de 7 a 8, de 1 a 7, de 2 a 7, de 3 a 7, de 4 a 7, de 5 a 7, de 6 a 7, de 1 a 6, de 2 a 6, de 3 a 6, de 4 a 6, de 5 a 6, de 1 a 5, de 2 a 5, de 3 a 5, de 4 a 5, de 1 a 4, de 2 a 4, de 3 a 4, de 1 a 3, de 2 a 3 y de 1 al 2.

40 En determinados aspectos de la divulgación, n es 1. En otros aspectos de la divulgación, n es 2. En otros aspectos más de la divulgación, n es 3. En otros aspectos más de la divulgación, n es 4. En otros aspectos más de la divulgación, n es 5. En otros aspectos más de la divulgación, n es 6. En otros aspectos más de la divulgación, n es 7. En otros aspectos más de la divulgación, n es 8. En otros aspectos más de la divulgación, n es 9. En otros aspectos más de la divulgación, n es 10. En otros aspectos más de la divulgación, cada aparición de n se selecciona independientemente  
45 del grupo que consiste en un número entero que varía de 1 a 10, de 2 a 10, de 3 a 10, de 4 a 10, de 5 a 10, de 6 a 10, de 7 a 10, de 8 a 10, de 9 a 10, de 1 a 9, de 2 a 9, de 3 a 9, de 4 a 9, de 5 a 9, de 6 a 9, de 7 a 9, de 8 a 9, de 1 a 8, de 2 a 8, de 3 a 8, de 4 a 8, de 5 a 8, de 6 a 8, de 7 a 8, de 1 a 7, de 2 a 7, de 3 a 7, de 4 a 7, de 5 a 7, de 6 a 7, de 1 a 6, de 2 a 6, de 3 a 6, de 4 a 6, de 5 a 6, de 1 a 5, de 2 a 5, de 3 a 5, de 4 a 5, de 1 a 4, de 2 a 4, de 3 a 4, de 1 a 3, de 2 a 3 y de 1 al 2.

50 En determinados aspectos de la divulgación, la PROTEÍNA o mutante de la misma se modifica con un segmento de la región extracelular de NPP2 que contiene un sitio de escisión de furina, en comparación con la SEQ ID NO: 1. En otros aspectos de la divulgación, la PROTEÍNA o mutante de la misma no se modifica con un segmento de la región extracelular de NPP2 que contiene un sitio de escisión de furina, en comparación con la SEQ ID NO: 1.

55 En determinados aspectos de la divulgación, la PROTEÍNA o mutante de la misma se modifica con un segmento de la región extracelular de NPP2 que contiene un sitio de escisión de peptidasa señal, en comparación con la SEQ ID NO: 1. En otros aspectos de la divulgación, la PROTEÍNA o mutante de la misma no se modifica con un segmento de la región extracelular de NPP2 que contiene un sitio de escisión de peptidasa señal, en comparación con la SEQ ID  
60 NO: 1

En determinados aspectos de la divulgación, el compuesto de fórmula (I) o (II) es soluble. En otros aspectos de la divulgación, el compuesto de fórmula (I) o (II) es un polipéptido recombinante. En otros aspectos más de la divulgación, el compuesto de fórmula (I) o (II) incluye un polipéptido NPP1 o un mutante del mismo que carece del dominio transmembrana de NPP1. En otros aspectos más de la divulgación, el compuesto de fórmula (I) o (II) incluye un polipéptido NPP1 o un mutante del mismo, en donde el dominio transmembrana de NPP1 o mutante del mismo se ha

eliminado (y/o truncado) y reemplazado con el dominio transmembrana de otro polipéptido, tal como, a modo de ejemplo no limitante, NPP2.

5 En determinados aspectos de la divulgación, el compuesto de fórmula (I) o (II) comprende un polipéptido NPP1 o mutante del mismo que comprende además más de un dominio transmembrana.

En determinados aspectos de la divulgación, NPP1 se fusiona por el extremo C con el dominio Fc de la inmunoglobulina 1 humana (IgG1).

10 En determinados aspectos de la divulgación, NPP1 se fusiona por el extremo C con albúmina sérica humana.

En determinados aspectos de la divulgación, un fragmento y/o variante de NPP1 se fusiona con albúmina sérica humana o variantes y/o fragmentos de la misma. La albúmina sérica humana puede conjugarse con la proteína NPP1 mediante un enlazador químico, incluyendo, pero sin limitación, enlaces disulfuro de origen natural o manipulados, o mediante fusión genética con NPP1, o un fragmento y/o variante del mismo.

En determinada realización, el compuesto de fórmula (I) o (II) comprende un polipéptido NPP1 o mutante del mismo que comprende dominios transmembrana de NPP1 y otro polipéptido, tal como, a modo de ejemplo no limitante, NPP2.

20 En determinados aspectos de la divulgación, el compuesto de fórmula (I) tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 21, 22 y 25.

En determinados aspectos de la divulgación, el compuesto de fórmula (I) tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 21, 22, 25 y (SEQ ID NO: 17)-Z-(SEQ ID NO: 27).

25 En determinados aspectos de la divulgación, el compuesto de fórmula (I) tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 16, 18, 20 y (SEQ ID NO: 24)-Z-(SEQ ID NO: 26).

30 En determinados aspectos de la divulgación, los compuestos de la divulgación tienen más de un dominio transmembrana. En otros aspectos de la divulgación, los compuestos de la divulgación están además pegilados. En otros aspectos más de la divulgación, los compuestos de la divulgación tienen más de un dominio transmembrana y están además pegilados.

35 En determinados aspectos de la divulgación, el compuesto de fórmula (I) o (II) tiene un valor de  $k_{cat}$  superior o igual a aproximadamente  $3,4 (\pm 0,4) \text{ s}^{-1} \text{ enzima}^{-1}$ , en donde el valor de  $k_{cat}$  se determina midiendo la velocidad de hidrólisis de ATP para el compuesto.

40 En determinados aspectos de la divulgación, el compuesto el compuesto de fórmula (I) o (II) tiene un valor de  $K_M$  inferior a o igual a aproximadamente  $2 \mu\text{M}$ , en donde el  $K_M$  se determina midiendo la velocidad de hidrólisis de ATP para el compuesto.

En determinados aspectos de la divulgación, el compuesto de fórmula (I) o (II) se formula como una formulación líquida.

45 La divulgación proporciona además una forma de producto seco de una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéutica de un compuesto de fórmula (I) o (II), por lo que el producto seco es reconstituible a una solución del compuesto en forma líquida.

## Métodos

50 La divulgación proporciona métodos de tratamiento o prevención de trastornos y enfermedades en un sujeto en el que se es deseable un aumento de la actividad o el nivel del polipéptido NPP1, fragmento, derivado, mutante o fragmento de mutante del mismo. En determinados aspectos de la divulgación, se administra al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un compuesto descrito en el presente documento.

55 En el presente documento se divulga además un método de tratamiento o prevención de una enfermedad o un trastorno asociados a la calcificación patológica o la osificación patológica en un sujeto que lo necesite, comprendiendo el método administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un compuesto de fórmula (I) o (II), en donde la enfermedad comprende CAGI, CAII, OLLP, raquitismo hipofosfatémico, osteoartritis y calcificación de las placas ateroscleróticas.

60 La divulgación proporciona además un método de tratamiento o prevención de una enfermedad o un trastorno asociados a la calcificación patológica o la osificación patológica en un sujeto que lo necesite, comprendiendo el método administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un compuesto de fórmula (I) o (II), en donde la enfermedad comprende PXE, formas hereditarias y no hereditarias de osteoartritis, espondilitis anquilosante, endurecimiento de las arterias que se produce con el envejecimiento o calcifilaxis resultado de la insuficiencia renal terminal.

- La divulgación proporciona además un método de reducción o prevención de calcificaciones cardíacas y/o arteriales en un lactante aquejado de calcificación arterial generalizada de la infancia (CAGI). En determinados aspectos de la divulgación, el método comprende administrar al lactante una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto que comprende (o que consiste en) un polipéptido ecto-nucleótido pirofosfato/fosfodiesterasa-1 (NPP1) que comprende (o está fusionado con) un dominio Fc de IgG, en donde el compuesto carece de un dominio de ácido poliaspártico, por lo que la administración del compuesto aumenta las concentraciones extracelulares de pirofosfato (PPI), reduciendo o previniendo de este modo las calcificaciones cardíacas y/o arteriales en el lactante.
- La divulgación proporciona además un método de reducción o prevención de calcificaciones cardíacas y/o arteriales en un lactante aquejado de calcificación arterial generalizada de la infancia (CAGI). En determinados aspectos de la divulgación, el método comprende administrar al lactante una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto que comprende (o consiste en) un polipéptido ecto-nucleótido pirofosfato/fosfodiesterasa-1 (NPP1) que comprende (o está fusionado con) un dominio de albúmina sérica humana o fragmento del mismo, en donde el compuesto carece de un dominio de ácido poliaspártico, por lo que la administración aumenta las concentraciones extracelulares de pirofosfato (PPI), reduciendo o previniendo de este modo las calcificaciones cardíacas y/o arteriales en el lactante.
- En determinados aspectos de la divulgación, los trastornos y enfermedades comprenden al menos uno seleccionado del grupo que consiste en CAGI, CAII, OLLP, raquitismo hipofosfatémico, osteoartritis, progeria y calcificación de las placas ateroscleróticas. En otros aspectos, los trastornos o enfermedades comprenden al menos uno seleccionado del grupo que consiste en PXE, formas hereditarias y no hereditarias de osteoartritis, espondilitis anquilosante, endurecimiento de las arterias que se produce con el envejecimiento, progeria y calcifilaxis resultado de la enfermedad renal terminal.
- En determinados aspectos de la divulgación, el compuesto se administra de forma aguda o crónica al sujeto. En otros aspectos de la divulgación, el compuesto se administra por vía local, regional o sistémicamente al sujeto. En otros aspectos más de la divulgación, la administración es subcutánea. En otros aspectos más de la divulgación, el sujeto es un mamífero. En otros aspectos más de la divulgación, el mamífero es humano.
- En determinados aspectos de la divulgación, el compuesto de fórmula (I) o (II), fragmento o mutante del mismo tiene una actividad hidrolítica Ap3A inferior en comparación con el correspondiente polipéptido NPP1 de tipo silvestre o fragmento del mismo. En otros aspectos de la divulgación, el compuesto de fórmula (I) o (II), fragmento o mutante del mismo tiene sustancialmente la misma actividad hidrolítica de ATP que el correspondiente polipéptido NPP1 de tipo silvestre o fragmento del mismo. En otros aspectos más de la divulgación, el compuesto de fórmula (I) o (II), fragmento o mutante del mismo tiene menor actividad hidrolítica Ap3A y sustancialmente la misma actividad hidrolítica de ATP en comparación con el correspondiente polipéptido NPP1 de tipo silvestre o fragmento del mismo.
- En determinados aspectos de la divulgación, el polipéptido NPP1 comprende un producto de escisión de un polipéptido NPP1 precursor que comprende un dominio transmembrana de NPP2.
- En determinados aspectos de la divulgación, el dominio transmembrana de NPP2 comprende los restos 12-30 del N.º de registro del NCBI NP\_001124335 (SEQ ID NO: 2), que corresponde a IISFFTFAGVNICFGFTA (SEQ ID NO: 23).
- En determinados aspectos de la divulgación, la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz comprende aproximadamente 3-15 mg/kg C.D. del polipéptido NPP1-Fc.
- En determinados aspectos de la divulgación, la administración da como resultado la reducción de las concentraciones extracelulares de pirofosfato del lactante a un nivel que está dentro del intervalo que se encuentra en un lactante no aquejado de CAGI. En determinados aspectos de la divulgación, el lactante presenta y/o es diagnosticado de "retraso del crecimiento" antes de la administración.
- Un experto en la materia, basándose en la divulgación proporcionada en el presente documento, entendería que la divulgación es útil en sujetos que, en su totalidad (por ejemplo, por vía sistémica) o en parte (por ejemplo, por vía local, de tejido, de órgano), están siendo tratados, o serán tratados, para calcificación u osificación patológica. En determinados aspectos de la divulgación, la divulgación es útil en el tratamiento o la prevención de la calcificación u osificación patológica. El técnico experto apreciará, basándose en las enseñanzas proporcionadas en el presente documento, que las enfermedades y trastornos tratables mediante las composiciones y métodos descritos en el presente documento abarcan cualquier enfermedad o trastorno en el que una disminución de la calcificación o la osificación promueve un resultado terapéutico positivo.
- Un experto en la materia apreciará, una vez disponga de la presente divulgación, incluyendo los métodos detallados en el presente documento, que la divulgación no se limita al tratamiento de una enfermedad o trastorno una vez establecido. En particular, no es necesario que los síntomas de la enfermedad o trastorno se hayan manifestado hasta el punto de perjudicar al sujeto; de hecho, no es necesario detectar la enfermedad o trastorno en un sujeto antes de administrar el tratamiento. Es decir, no es necesario que se produzca una patología significativa a partir de la enfermedad o trastorno para que la presente divulgación pueda proporcionar beneficios. Por lo tanto, la presente

divulgación, como se describe con más detalle en el presente documento, incluye un método para prevenir enfermedades y trastornos en un sujeto, en el que un compuesto de fórmula (I) o (II), o un mutante del mismo, como se analiza en otra parte del presente documento, puede administrarse a un sujeto antes del inicio de la enfermedad o trastorno, evitando de este modo que se desarrolle la enfermedad o el trastorno.

5 Un experto en la materia, cuando disponga de la divulgación del presente documento, apreciaría que la prevención de una enfermedad o trastorno en un sujeto abarca la administración a un sujeto de un compuesto de fórmula (I) o (II), o un mutante del mismo como medida preventiva contra una enfermedad o trastorno.

10 La divulgación abarca la administración de un compuesto de fórmula (I) o (II), o un mutante del mismo para poner en práctica los métodos de la divulgación; el técnico experto apreciaría, basándose en la divulgación proporcionada en el presente documento, cómo formular y administrar el compuesto de fórmula (I) o (II), o un mutante del mismo a un sujeto. Sin embargo, la presente divulgación no se limita a ningún método particular de administración o pauta de tratamiento. Esto es especialmente cierto en los casos en que un experto en la materia podría apreciar, una vez  
15 disponga de la divulgación proporcionada en el presente documento, incluyendo la reducción a la práctica usando un modelo de calcificación u osificación patológica reconocido por la técnica, que los métodos de administración de un compuesto de la divulgación pueden ser determinados por un experto en las técnicas farmacológicas.

### Composiciones y formulaciones farmacéuticas

20 En el presente documento se divulgan composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto de fórmula (I) o (II) dentro de los métodos que se describen en el presente documento.

25 Dicha composición farmacéutica está en una forma adecuada para su administración a un sujeto, o la composición farmacéutica puede comprender además uno o más portadores farmacéuticamente aceptables, uno o más principios adicionales, o alguna combinación de los mismos. Los diversos componentes de la composición farmacéutica pueden estar presentes en forma de una sal fisiológicamente aceptable, tal como en combinación con un catión o anión fisiológicamente aceptable, como es bien sabido en la técnica.

30 En un aspecto, las composiciones farmacéuticas útiles para poner en práctica el método de la divulgación pueden administrarse para suministrar una dosis de entre 1 ng/kg/día y 100 mg/kg/día. En otros aspectos, las composiciones farmacéuticas útiles para poner en práctica la divulgación pueden administrarse para suministrar una dosis de entre 1 ng/kg/día y 500 mg/kg/día.

35 Las cantidades relativas del principio activo, el portador farmacéuticamente aceptable, y cualesquier ingredientes adicionales en una composición farmacéutica de la divulgación variará, dependiendo de la identidad, el tamaño y el estado del sujeto tratado y, además, dependiendo de la vía por la que se ha de administrar la composición. A modo de ejemplo, la composición puede comprender entre aproximadamente el 0,1 % y aproximadamente el 100 % (p/p) de principio activo.

40 Las composiciones farmacéuticas que son útiles en los métodos de la divulgación pueden desarrollarse adecuadamente para la administración inhalatoria, oral, rectal, vaginal, parenteral, tópica, transdérmica, pulmonar, intranasal, bucal, oftálmica, intratecal, intravenosa u otra vía de administración. Otras formulaciones contempladas incluyen nanopartículas proyectadas, preparaciones liposómicas, eritrocitos resellados que contienen el principio  
45 activo y formulaciones de base inmunitaria. La(s) vía(s) de administración es (son) muy obvia(s) para el experto en la materia y depende(n) de diversos factores, incluido el tipo y la gravedad de la enfermedad que se esté tratando, del tipo y de la edad del paciente veterinario o humano que se esté tratando, y de factores similares.

50 Las formulaciones de las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento pueden prepararse mediante cualquier método conocido o desarrollado en el futuro en la técnica de la farmacología. En general, dichos métodos preparatorios incluyen la etapa de asociar el principio activo con un transportador o con uno o más principios auxiliares, y después, si fuese necesario o si se desea, conformar el producto, o envasarlo, en una unidad mono o multidosis deseada.

55 Como se usan en el presente documento, una "dosis unitaria" es una cantidad individual de la composición farmacéutica que comprende una cantidad predeterminada del principio activo. La cantidad del principio activo es generalmente igual a la dosis del principio activo que se administraría a un sujeto o una fracción conveniente de una dosis de este tipo tal como, por ejemplo, la mitad o un tercio de una dosis de este tipo. La forma farmacéutica unitaria puede ser para una dosis única diaria o una de las múltiples dosis diarias (por ejemplo, aproximadamente de 1 a 4 o  
60 más veces al día). Cuando se usan múltiples dosis diarias, la forma farmacéutica unitaria puede ser la misma o diferente para cada dosis.

Aunque las descripciones de las composiciones farmacéuticas proporcionadas en el presente documento se dirigen principalmente a composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración ética a seres humanos, el experto  
65 entiende que dichas composiciones son generalmente adecuadas para la administración a animales de todo tipo. La modificación de composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración a seres humanos con el fin de hacer

que las composiciones sean adecuadas para la administración a diversos animales se entiende bien, y el farmacólogo veterinario experto habitual puede diseñar y realizar dicha modificación con una experimentación meramente habitual, en su caso. Los sujetos para los que se contempla la administración de las composiciones farmacéuticas de la divulgación incluyen, pero sin limitación, seres humanos y otros primates, mamíferos incluyendo mamíferos comercialmente relevantes tales como vacas, cerdos, caballos, ovejas, gatos y perros.

En determinados aspectos de la divulgación, las composiciones se formulan usando uno o más excipientes o portadores farmacéuticamente aceptables. En determinados aspectos de la divulgación, las composiciones farmacéuticas comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz del agente activo y un portador farmacéuticamente aceptable. Los portadores farmacéuticamente aceptables, que son útiles, incluyen, pero sin limitación, glicerol, agua, solución salina, etanol y otras soluciones salinas farmacéuticamente aceptables tales como fosfatos y sales de ácidos orgánicos. Se describen ejemplos de estos y otros portadores farmacéuticamente aceptables en *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 1991, Mack Publication Co., Nueva Jersey.

El portador puede ser un disolvente o un medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de los mismos, y aceites vegetales. Puede mantenerse la fluidez adecuada, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en caso de dispersión y usando tensioactivos. La prevención de la acción de los microorganismos puede conseguirse mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal y similares. En muchos casos, se usan en la composición agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, cloruro de sodio, o polialcoholes tales como manitol y sorbitol. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede facilitarse incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio o gelatina.

Las formulaciones pueden emplearse en mezclas con excipientes convencionales, es decir, sustancias portadoras orgánicas o inorgánicas farmacéuticamente aceptables aptas para la administración oral, parenteral, nasal, intravenosa, subcutánea, enteral, o cualquier otro modo de administración adecuado, conocido en la técnica. Las preparaciones farmacéuticas pueden esterilizarse y, si se desea, mezclarse con agentes auxiliares, por ejemplo, lubricantes, conservantes, estabilizadores, agentes humectantes, emulsionantes, sales para influir en los tampones de presión osmótica, sustancias colorantes, aromatizantes y/o saborizantes y similares. También pueden combinarse, si se desea, con otros agentes activos, por ejemplo, otros agentes analgésicos.

Como se usan en el presente documento, "ingredientes adicionales" incluyen, pero sin limitación, uno o más de los siguientes: excipientes; agentes tensioactivos; agentes dispersantes; diluyentes inertes; agentes granulantes y disgregantes; agentes aglutinantes; agentes lubricantes; edulcorantes; aromatizantes; colorantes; conservantes; composiciones fisiológicamente degradables tales como gelatina; vehículos y disolventes acuosos; vehículos y disolventes oleosos; agentes de suspensión; agentes de dispersión o humectantes; agentes emulsionantes, emolientes; tampones; sales; agentes espesantes; cargas; agentes emulsionantes; antioxidantes; antibióticos; agentes antifúngicos; agentes estabilizantes; y materiales poliméricos o hidrófobos farmacéuticamente aceptables. Se conocen en la técnica otros "ingredientes adicionales" que pueden incluirse en las composiciones farmacéuticas de la divulgación y se describen, por ejemplo, en Genaro, ed., 1985, *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Co., Easton, PA.

La composición de la divulgación puede comprender un conservante de aproximadamente el 0,005 % al 2,0 % en peso total de la composición. El conservante se usa para evitar el deterioro en caso de exposición a contaminantes en el entorno. Los ejemplos de conservantes útiles en conformidad con la divulgación incluyen, pero no se limitan a, los seleccionados del grupo que consiste en alcohol bencílico, ácido sórbico, parabenos, imidurea y combinaciones de los mismos. Un conservante particular es una combinación de aproximadamente el 0,5 % al 2,0 % de alcohol bencílico y del 0,05 % al 0,5 % de ácido sórbico.

La composición puede incluir un antioxidante y un agente quelante, que inhiben la degradación del compuesto. Los antioxidantes preferidos para algunos compuestos son BHT, BHA, alfa-tocoferol y ácido ascórbico en el intervalo ilustrativo de aproximadamente el 0,01 % al 0,3 %, por ejemplo, el BHT en el intervalo del 0,03 % al 0,1 % en peso del peso total de la composición. El agente quelante puede estar presente en una cantidad que varía del 0,01 % al 0,5 % en peso del peso total de la composición. Los agentes quelantes ilustrativos incluyen sales de edetato (por ejemplo, edetato disódico) y ácido cítrico en un intervalo de peso de aproximadamente el 0,01 % al 0,20 %, por ejemplo, en el intervalo del 0,02 % al 0,10 % en peso del peso total de la composición. El agente quelante es útil para quelar iones metálicos en la composición, que pueden ser perjudiciales para la vida útil de la formulación. Mientras que el BHT y el edetato disódico son antioxidantes ilustrativos y agentes quelantes respectivamente para algunos compuestos, pueden sustituirse por otros antioxidantes y agentes quelantes adecuados y equivalentes, como saben los expertos en la materia.

Pueden prepararse suspensiones líquidas usando métodos convencionales para conseguir la suspensión del principio activo en un vehículo acuoso u oleoso. Los vehículos acuosos incluyen, por ejemplo, agua y solución salina isotónica. Los vehículos oleosos incluyen, por ejemplo, aceite de almendras, ésteres oleosos, alcohol etílico, aceites vegetales tales como aceite de cacahuete, oliva, sésamo o coco, aceites vegetales fraccionados y aceites minerales tales como

la parafina líquida. Las suspensiones líquidas pueden incluir además uno o más ingredientes adicionales, incluyendo, pero sin limitación, agentes de suspensión, agentes dispersantes o humectantes, agentes emulsionantes, emolientes, conservantes, tampones, sales, aromatizantes, agentes colorantes y agentes edulcorantes. Las suspensiones oleosas pueden contener además un agente espesante. Los agentes de suspensión conocidos incluyen, pero sin limitación,

metilcelulosa). Los agentes dispersantes o humectantes conocidos incluyen, pero sin limitación, fosfátidos de origen natural tales como la lecitina, productos de condensación de un óxido de alquileo con un ácido graso, con un alcohol alifático de cadena larga, con un éster parcial derivado de un ácido graso y un hexitol, o con un éster parcial derivado de un ácido graso y un anhídrido de hexitol (por ejemplo, estearato de polioxietileno, heptadecaetilenooxicetanol, monooleato de sorbitol polioxietilenado y monooleato de sorbitano polioxietilenado, respectivamente). Los agentes emulsionantes conocidos incluyen, pero sin limitación, lecitina y goma arábica. Los conservantes conocidos incluyen, pero sin limitación, metil, etil o n-propil-para-hidroxibenzoatos, ácido ascórbico y ácido sórbico. Los agentes edulcorantes conocidos incluyen, por ejemplo, glicerol, propilenglicol, sorbitol, sacarosa y sacarina. Los agentes espesantes conocidos para suspensiones oleosas incluyen, por ejemplo, cera de abejas, parafina dura y alcohol cetílico.

Las soluciones líquidas del principio activo en disolventes acuosos u oleosos pueden prepararse sustancialmente del mismo modo que las suspensiones líquidas, siendo la principal diferencia que el principio activo se disuelve, en lugar de suspenderse en el disolvente. Como se usan en el presente documento, un líquido "oleoso" es aquel que comprende una molécula líquida que contiene carbono y que presenta un carácter menos polar que el agua. Las soluciones líquidas de la composición farmacéutica de la divulgación pueden comprender cada uno de los componentes descritos con respecto a las suspensiones líquidas, quedando entendido que los agentes de suspensión no necesariamente ayudarán a la disolución del principio activo en el disolvente. Los disolventes acuosos incluyen, por ejemplo, agua y solución salina isotónica. Los disolventes oleosos incluyen, por ejemplo, aceite de almendras, ésteres oleosos, alcohol etílico, aceites vegetales tales como aceite de cacahuete, oliva, sésamo o coco, aceites vegetales fraccionados y aceites minerales tales como la parafina líquida.

Las formulaciones en polvo y granulares de una preparación farmacéutica de la divulgación pueden prepararse usando métodos conocidos. Dichas formulaciones pueden administrarse directamente a un sujeto, utilizadas, por ejemplo, para formar comprimidos, para rellenar cápsulas, o para preparar una suspensión o solución acuosa u oleosa mediante la adición de un vehículo acuoso u oleoso a las mismas. Cada una de estas formulaciones puede comprender además uno o más agentes dispersantes o humectantes, un agente de suspensión y un conservante. También pueden incluirse en estas formulaciones excipientes adicionales, tales como cargas y edulcorantes, aromatizantes o colorantes.

Una composición farmacéutica de la divulgación también puede prepararse, envasarse o comercializarse en forma de emulsión de aceite en agua o de agua en aceite. La fase oleosa puede ser un aceite vegetal tal como el aceite de oliva o el de cacahuete, un aceite mineral tal como parafina líquida, o una combinación de los mismos. Dichas composiciones pueden comprender además uno o más agentes emulsionantes tales como gomas de origen natural tales como goma arábica o goma tragacanto, fosfátidos de origen natural tales como el fosfátido de soja o de lecitina, ésteres o ésteres parciales derivados de combinaciones de ácidos grasos y anhídridos de hexitol tales como monooleato de sorbitán, y productos de condensación de tales ésteres parciales con óxido de etileno tales como monooleato de polioxietilensorbitán. Estas emulsiones también pueden contener ingredientes adicionales, incluyendo, por ejemplo, agentes edulcorantes o aromatizantes.

Se conocen en la técnica métodos para impregnar o recubrir un material con una composición química, e incluyen, pero sin limitación, métodos de depósito o unión de una composición química sobre una superficie, métodos de incorporación de una composición química en la estructura de un material durante la síntesis del material (es decir, tal como con un material fisiológicamente degradable), y métodos de absorción de una solución o suspensión acuosa u oleosa en un material absorbente, con o sin secado posterior.

### **Administración/dosificación**

El régimen de administración puede afectar a lo que constituye una cantidad eficaz. Por ejemplo, varias dosis divididas, así como las dosis escalonadas, pueden administrarse diaria o secuencialmente, o la dosis puede infundirse continuamente, o puede ser una inyección en embolada. Además, las dosis de las formulaciones terapéuticas pueden aumentarse o disminuirse proporcionalmente según lo indiquen las exigencias de la situación terapéutica o profiláctica.

La administración de las composiciones de la presente divulgación a un paciente, tal como un mamífero, tal como un ser humano, puede realizarse usando procedimientos conocidos, a dosis y durante períodos de tiempo eficaces para tratar una enfermedad o trastorno en el paciente. Una cantidad eficaz del compuesto terapéutico, necesaria para lograr un efecto terapéutico, puede variar de acuerdo con factores tales como la actividad del compuesto particular empleado; el tiempo de administración; la velocidad de excreción del compuesto; la duración del tratamiento; otros fármacos, compuestos o materiales utilizados junto con el compuesto; el estado de la enfermedad o trastorno, la edad, el género, el peso, la afección, la salud general e historial médicos anterior del paciente que se está tratando, y factores similares

bien conocidos en el campo de la medicina. Las pautas posológicas pueden ajustarse para proporcionar una respuesta terapéutica óptima. Por ejemplo, pueden administrarse varias dosis divididas al día o la dosis puede reducirse proporcionalmente en función de las exigencias de la situación terapéutica. Un ejemplo no limitante de un intervalo de dosis eficaz para un compuesto terapéutico de la divulgación es de aproximadamente 0,01 y 50 mg/kg de peso corporal/por día. Un experto habitual en la materia sería capaz de estudiar los factores pertinentes y determinar la cantidad eficaz del compuesto terapéutico sin experimentación excesiva.

El compuesto puede administrarse a un animal con tanta frecuencia como varias veces al día, o puede administrarse con menos frecuencia, tal como una vez al día, una vez a la semana, una vez cada dos semanas, una vez al mes, o incluso con menos frecuencia, tal como una vez cada varios meses o incluso una vez al año o menos. Se entiende que la cantidad de compuesto dosificado al día puede administrarse, en ejemplos no limitantes, cada día, en días alternos, cada 2 días, cada 3 días, cada 4 días o cada 5 días. Por ejemplo, con la administración en días alternos, se puede iniciar una dosis de 5 mg al día el lunes con una primera dosis posterior de 5 mg al día administrada el miércoles, una segunda dosis posterior de 5 mg al día se puede administrar el viernes, etc. La frecuencia de la dosis es muy obvia para el experto en la materia y depende de diversos factores, tales como, pero sin limitación, el tipo y la gravedad de la enfermedad que se está tratando, y el tipo y la edad del animal.

Los niveles de dosificación reales de los principios activos en las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación pueden variarse para obtener una cantidad del principio activo que sea eficaz para conseguir la respuesta terapéutica deseada para un paciente, composición y modo de administración particular, sin ser tóxicos para el paciente.

Un médico, por ejemplo, médico o veterinario, que sea un experto habitual en la materia puede determinar fácilmente y prescribir la cantidad eficaz de la composición farmacéutica requerida. Por ejemplo, el médico o veterinario podría comenzar las dosis de los compuestos de la divulgación empleados en la composición farmacéutica a niveles inferiores a los requeridos para lograr el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosis hasta que se logre el efecto deseado.

En aspectos particulares de la divulgación, es especialmente ventajoso formular el compuesto en una forma farmacéutica unitaria para facilitar la administración y la uniformidad de la dosificación. Como se usa en el presente documento, la forma farmacéutica se refiere a unidades físicamente individuales adecuadas como dosis unitarias para los pacientes que se trata; conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de compuesto terapéutico calculada para producir el efecto terapéutico deseado junto con el vehículo farmacéutico necesario. Las formas farmacéuticas unitarias de la divulgación vienen dictaminadas por, y dependen directamente de, (a) las características únicas del compuesto terapéutico y del efecto terapéutico o profiláctico particular que se vaya a lograr y (b) las limitaciones intrínsecas en la técnica de formar compuestos/formular dicho compuesto terapéutico para el tratamiento de una enfermedad o un trastorno en un paciente.

En determinados aspectos de la divulgación, las composiciones de la divulgación deben administrarse al paciente en dosis que varían de una a cinco veces por día o más. En otros aspectos de la divulgación, las composiciones de la divulgación han de administrarse al paciente en intervalos de dosis que incluyen, pero sin limitación, una vez al día, cada dos días, cada tres días a una vez a la semana, y una vez cada dos semanas. Resulta evidente para un experto en la materia que la frecuencia de administración de las diversas composiciones de combinación de la divulgación varía de un individuo a otro dependiendo de muchos factores, entre los que se incluyen, pero sin limitación, edad, enfermedad o trastorno que se trata, género, salud general y otros factores. Por lo tanto, la divulgación no debe interpretarse como limitada a ningún régimen de dosificación particular y la dosificación exacta y la composición que se administrará a cualquier paciente, las determinará el médico tratante teniendo en cuenta los restantes factores sobre el paciente.

Para su administración, los compuestos de la divulgación pueden estar en el intervalo de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 7.500 mg, de aproximadamente 20 µg a aproximadamente 7.000 mg, de aproximadamente 40 µg a aproximadamente 6.500 mg, de aproximadamente 80 µg a aproximadamente 6.000 mg, de aproximadamente 100 µg a aproximadamente 5.500 mg, de aproximadamente 200 µg a aproximadamente 5.000 mg, de aproximadamente 400 µg a aproximadamente 4.000 mg, de aproximadamente 800 µg a aproximadamente 3.000 mg, de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 2.500 mg, de aproximadamente 2 mg a aproximadamente 2.000 mg, de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 1.000 mg, de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 750 mg, de aproximadamente 20 mg a aproximadamente 600 mg, de aproximadamente 30 mg a aproximadamente 500 mg, de aproximadamente 40 mg a aproximadamente 400 mg, de aproximadamente 50 mg a aproximadamente 300 mg, de aproximadamente 60 mg a aproximadamente 250 mg, de aproximadamente 70 mg a aproximadamente 200 mg, de aproximadamente 80 mg a aproximadamente 150 mg, y todos y cada uno de los incrementos totales o parciales entre ellos.

En algunos aspectos de la divulgación, la dosis de un compuesto de la divulgación es de aproximadamente 0,5 µg y aproximadamente 5.000 mg. En algunos aspectos de la divulgación, una dosis de un compuesto de la divulgación utilizada en las composiciones descritas en el presente documento es menor de aproximadamente 5.000 mg, o menor de aproximadamente 4.000 mg, o menor de aproximadamente 3.000 mg, o menor de aproximadamente 2.000 mg, o

menor de aproximadamente 1.000 mg, o menor de aproximadamente 800 mg, o menor de aproximadamente 600 mg, o menor de aproximadamente 500 mg, o menor de aproximadamente 200 mg, o menor de aproximadamente 50 mg. De modo similar, en algunos aspectos de la divulgación, una dosis de un segundo compuesto como se describe en el presente documento es menor de aproximadamente 1.000 mg, o menor de aproximadamente 800 mg, o menor de aproximadamente 600 mg, o menor de aproximadamente 500 mg, o menor de aproximadamente 400 mg, o menor de aproximadamente 300 mg, o menor de aproximadamente 200 mg, o menor de aproximadamente 100 mg, o menor de aproximadamente 50 mg, o menor de aproximadamente 40 mg, o menor de aproximadamente 30 mg, o menor de aproximadamente 25 mg, o menor de aproximadamente 20 mg, o menor de aproximadamente 15 mg, o menor de aproximadamente 10 mg, o menor de aproximadamente 5 mg, o menor de aproximadamente 2 mg, o menor de aproximadamente 1 mg, o menor de aproximadamente 0,5 mg, y todos y cada uno de sus incrementos totales o parciales.

En determinados aspectos de la divulgación, la presente divulgación se refiere a una composición farmacéutica envasada que comprende un recipiente que contiene una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la divulgación, solo o en combinación con un segundo agente farmacéutico; e instrucciones para usar el compuesto para tratar, prevenir o reducir uno o más síntomas de una enfermedad o trastorno en un paciente.

El término "recipiente" incluye cualquier receptáculo para contener la composición farmacéutica. Por ejemplo, En determinados aspectos de la divulgación, el recipiente es el envase que contiene la composición farmacéutica. En otros aspectos de la divulgación, el recipiente no es el envase que contiene la composición farmacéutica, es decir, el recipiente es un receptáculo, tal como una caja o vial que contiene la composición farmacéutica envasada o la composición farmacéutica no envasada y las instrucciones para el uso de la composición farmacéutica. Por otra parte, las técnicas de envasado son bien conocidas en la técnica. Debe entenderse que las instrucciones de uso de la composición farmacéutica pueden estar contenidas en el envase que contiene la composición farmacéutica y, como tales, dichas instrucciones forman una relación funcional aumentada con el producto envasado. Sin embargo, debe entenderse que las instrucciones pueden contener información relacionada con la capacidad del compuesto para realizar su función prevista, por ejemplo, tratar, prevenir o reducir una enfermedad o trastorno en un paciente.

#### ***Vías de administración***

Las vías de administración de cualquiera de las composiciones de la divulgación incluyen la administración por inhalación, oral, nasal, rectal, parenteral, sublingual, transdérmica, transmucosa (por ejemplo, sublingual, lingual, (trans)bucal, (trans)uretral, vaginal (por ejemplo, por vía trans y perivaginal), (intra)nasal y (trans)rectal), intravesical, intrapulmonar, intraduodenal, intragástrica, intratecal, subcutánea, intramuscular, intradérmica, intraarterial, intravenosa, intrabronquial, inhalación y tópica.

Las composiciones y formas farmacéuticas adecuadas incluyen, por ejemplo, comprimidos, cápsulas, comprimidos oblongos, píldoras, cápsulas de gel, trociscos, dispersiones, suspensiones, soluciones, jarabes, gránulos, perlas, parches transdérmicos, geles, polvos, microgránulos, magmas, pastillas para chupar, cremas, pastas, apósitos, lociones, discos, supositorios, aerosoles líquidos para la administración nasal u oral, polvo seco o formulaciones aerosolizadas para inhalación, composiciones y formulaciones para la administración intravesical y similares. Debe entenderse que las formulaciones y composiciones que serían útiles en la presente divulgación no se limitan a las formulaciones y composiciones particulares que se describen en el presente documento.

#### ***Administración oral***

Para la aplicación oral, son particularmente adecuados los comprimidos, grageas, líquidos, gotas, supositorios o cápsulas, comprimidos oblongos y cápsulas de gelatina. Otras formulaciones adecuadas para la administración oral incluyen, pero sin limitación, una formulación en polvo o granular, una suspensión acuosa u oleaginosa, una solución acuosa u oleaginosa, una pasta, un gel, pasta de dientes, un colutorio, un recubrimiento, un enjuague bucal o una emulsión. Las composiciones destinadas a su uso oral pueden prepararse de acuerdo con cualquier método conocido en la técnica y dichas composiciones pueden contener uno o más agentes seleccionados del grupo que consiste en excipientes farmacéuticos no tóxicos inertes adecuados para la fabricación de comprimidos. Dichos excipientes incluyen, por ejemplo, un diluyente inerte tal como lactosa; agentes granulantes y disgregantes tales como almidón de maíz; aglutinantes tales como almidón; y agentes lubricantes tales como estearato de magnesio.

Los comprimidos pueden no estar recubiertos o pueden recubrirse usando métodos conocidos para conseguir una disgregación retardada en el tracto gastrointestinal de un sujeto, proporcionando de este modo una liberación y absorción sostenidas del principio activo. A modo de ejemplo, puede usarse un material tal como monoestearato de glicerilo o el diestearato de glicerilo para recubrir comprimidos. Además, a modo de ejemplo, los comprimidos pueden recubrirse usando los métodos descritos en las Patentes de los EE.UU. N.º 4.256.108; 4.160.452; y 4.265.874 para formar comprimidos de liberación osmótica controlada. Los comprimidos pueden contener además un edulcorante, un agente aromatizante, un agente colorante, un conservante o alguna combinación de éstos, con el fin de proporcionar una preparación farmacéuticamente elegante y palatable.

Las cápsulas duras que contienen el principio activo pueden fabricarse usando una composición fisiológicamente



degradable, tal como gelatina. Dichas cápsulas duras incluyen el principio activo y, además, pueden incluir ingredientes adicionales, incluyendo, por ejemplo, un diluyente sólido inerte tal como carbonato de calcio, fosfato de calcio o caolín.

- 5 Las cápsulas de gelatina blanda que contienen el principio activo pueden fabricarse usando una composición fisiológicamente degradable, tal como gelatina. Dichas cápsulas blandas contienen el principio activo, que puede mezclarse con agua o con un medio oleoso tales como el aceite de cacahuete, parafina líquida o aceite de oliva.

- 10 Para la administración oral, los compuestos de la divulgación pueden presentarse en forma de comprimidos o cápsulas preparados por medios convencionales con excipientes farmacéuticamente aceptables tales como agentes aglutinantes; cargas; lubricantes; disgregantes; o agentes humectantes. Si se desea, los comprimidos pueden recubrirse usando métodos y materiales de recubrimiento adecuados tales como los sistemas de recubrimiento pelicular OPADRY™ disponibles en Colorcon, West Point, Pa. (por ejemplo, OPADRY™ Tipo OY Type, Tipo OYC, Tipo OY-P orgánico entérico, Tipo OY-A acuoso entérico, Tipo OY-PM y OPADRY™ Blanco, 32K18400).

- 15 La preparación líquida para la administración oral puede presentarse en forma de soluciones, jarabes o suspensiones. Las preparaciones líquidas pueden prepararse por medios convencionales con aditivos farmacéuticamente aceptables tales como agentes de suspensión (por ejemplo, jarabe de sorbitol, metilcelulosa o grasas comestibles hidrogenadas); agente emulsionante (por ejemplo, lecitina o acacia); vehículos no acuosos (por ejemplo, aceite de almendras, ésteres oleosos o alcohol etílico); y conservantes (por ejemplo, parahidroxibenzoatos de metilo o propilo o ácido sórbico).  
20 Pueden prepararse formulaciones líquidas de una composición farmacéutica de la divulgación que sean adecuadas para la administración oral, envasarse y comercializarse en forma líquida o en forma de producto seco destinado a ser reconstituido con agua u otro vehículo adecuado antes de su uso.

- 25 Un comprimido que contenga el principio activo puede fabricarse, por ejemplo, comprimiendo o moldeando el principio activo, opcionalmente con uno o más ingredientes adicionales. Los comprimidos pueden prepararse mediante compresión, en un dispositivo adecuado, del principio activo en forma fluida, tal como polvo o preparación granular, mezclado opcionalmente con uno o más de un aglutinante, un lubricante, un excipiente, un agente tensioactivo y un agente dispersante.

- 30 Los comprimidos moldeados pueden fabricarse moldeando, en un dispositivo adecuado, una mezcla del principio activo, un portador farmacéuticamente aceptable, y al menos suficiente líquido para humedecer la mezcla. Los excipientes farmacéuticamente aceptables utilizados en la fabricación de comprimidos incluyen, pero sin limitación, diluyentes inertes, agentes granulantes y disgregantes, agentes aglutinantes y agentes lubricantes. Los agentes  
35 dispersantes conocidos incluyen, pero sin limitación, fécula de patata y almidón glicolato de sodio. Los agentes tensioactivos conocidos incluyen, pero sin limitación, laurilsulfato de sodio. Los diluyentes conocidos incluyen, pero sin limitación, carbonato de calcio, carbonato de sodio, lactosa, celulosa microcristalina, fosfato de calcio, hidrogenofosfato de calcio y fosfato de sodio. Los agentes granulantes y disgregantes conocidos incluyen, pero sin limitación, almidón de maíz y ácido algínico. Los aglutinantes conocidos incluyen, pero sin limitación, gelatina, goma arábiga, almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona e hidroxipropilmetilcelulosa. Los agentes lubricantes  
40 conocidos incluyen, pero sin limitación, estearato de magnesio, ácido esteárico, sílice y talco.

- Las técnicas de granulación son bien conocidas en la técnica farmacéutica para modificar los polvos de partida u otros materiales particulados de un principio activo. Normalmente, los polvos se mezclan con un material aglutinante para  
45 formar aglomerados o gránulos permanentes más grandes que fluyen libremente, lo que se conoce como "granulación". Por ejemplo, los procesos de granulación "en húmedo" que usan disolventes se caracterizan generalmente porque los polvos se combinan con un material aglutinante y se humedecen con agua o un disolvente orgánico en condiciones que dan como resultado la formación de una masa granulada húmeda de la que después debe evaporarse el disolvente.

- 50 La granulación por fusión consiste generalmente en usar materiales sólidos o semisólidos a temperatura ambiente (es decir, que tienen un intervalo de puntos de reblandecimiento o fusión relativamente bajo) para favorecer la granulación de materiales en polvo o de otro tipo, esencialmente en ausencia de agua añadida u otros disolventes líquidos. Los sólidos de baja fusión, cuando se calientan a una temperatura en el intervalo del punto de fusión, se licuan para actuar  
55 como aglutinante o medio de granulación. El sólido licuado se extiende sobre la superficie de los materiales en polvo con los que se pone en contacto y, al enfriarse, forma una masa granulada sólida en la que los materiales iniciales se unen entre sí. La granulación en estado fundido resultante se puede transferir a una prensa de comprimidos o se puede encapsular para preparar la forma farmacéutica oral. La granulación en estado fundido mejora la velocidad de disolución y la biodisponibilidad de un principio activo (es decir, fármaco) formando una dispersión sólida o solución  
60 sólida.

- La Patente de los EE.UU. N.º 5.169.645 divulga gránulos que contienen cera directamente comprimibles que tienen propiedades de flujo mejoradas. Los gránulos se obtienen cuando las ceras se mezclan en la masa fundida con  
65 determinados aditivos que mejoran la fluidez, seguido de enfriamiento y granulación de la mezcla. En determinados aspectos de la divulgación, solo la propia cera se funde en la combinación fundida de la(s) cera(s) y aditivos(s) y, en otros casos, tanto la(s) cera(s) como el aditivo(s) se fundirán.

La presente divulgación también incluye un comprimido multicapa que incluye una capa que proporciona la liberación retardada de uno o más compuestos útiles dentro de los métodos de la divulgación, y otra capa que proporciona la liberación inmediata de uno o más compuestos útiles dentro de los métodos de la divulgación. Usando una mezcla de cera/polímero sensible al pH, puede obtenerse una composición insoluble gástrica en la que queda atrapado el principio activo, garantizando su liberación retrasada.

### **Administración parenteral**

Como se usan en el presente documento, la "administración parenteral" de una composición farmacéutica incluye cualquier vía de administración caracterizada por la alteración física de un tejido de un sujeto y la administración de la composición farmacéutica a través dicha alteración en el tejido.

La administración parenteral incluye, por tanto, pero sin limitación, la administración de una composición farmacéutica 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 penetrante en el tejido, y similares. En particular, se contempla que la administración parenteral incluya, pero sin limitación, técnicas de inyección subcutánea, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intraesternal y de infusión renal dialítica.

Las formulaciones de una composición farmacéutica adecuada para la administración parenteral comprenden el principio activo combinado con un portador farmacéuticamente aceptable, tal como agua estéril o solución salina isotónica estéril. Dichas formulaciones pueden prepararse, envasarse o comercializarse en una forma adecuada para la administración en embolada o para la administración continua. Las formulaciones inyectables pueden prepararse, envasarse o comercializarse en forma farmacéutica unitaria, tal como en ampollas o en envases multidosis que contienen un conservante. Las formulaciones para administración parenteral incluyen, pero sin limitación, suspensiones, soluciones, emulsiones en vehículos oleaginosos o acuosos, pastas y formulaciones implantables de liberación sostenida o biodegradables. Dichas formulaciones pueden incluir además uno o más ingredientes adicionales, incluyendo, pero sin limitación, agentes de suspensión, estabilización o dispersión. En una realización de una formulación para la administración parenteral, el principio activo se proporciona en forma seca (es decir, polvo o granulado) para su reconstitución con un vehículo adecuado (por ejemplo, agua estéril apirógena) antes de la administración parenteral de la composición reconstituida.

Las composiciones farmacéuticas pueden prepararse, envasarse o comercializarse en forma de suspensión o solución acuosa u oleosa inyectable estéril. Esta suspensión o solución puede formularse de acuerdo con la técnica conocida, y puede comprender, además del principio activo, ingredientes adicionales tales como los agentes dispersantes, agentes humectantes o agentes de suspensión descritos en el presente documento. Dichas formulaciones inyectables estériles pueden prepararse usando un diluyente o disolvente no tóxico y aceptable por vía parenteral, tal como agua o 1,3-butanodiol, por ejemplo. Otros diluyentes y disolventes aceptables incluyen, pero sin limitación, solución de Ringer, solución isotónica de cloruro de sodio y aceites no volátiles tales como mono o diglicéridos de síntesis. Otras formulaciones que pueden administrarse por vía parenteral y que son útiles incluyen aquellas que comprenden el principio activo en forma microcristalina, en una preparación liposómica, o como componente de un sistema polimérico biodegradable. Las composiciones para liberación sostenida o implantación pueden comprender materiales poliméricos o hidrófobos farmacéuticamente aceptables tales como una emulsión, una resina de intercambio iónico, un polímero poco soluble o una sal poco soluble.

### **Formas de administración adicionales**

Las formas farmacéuticas adicionales de la presente divulgación incluyen formas farmacéuticas como las descritas en las patentes de los EE.UU. N.º 6.340.475, 6.488.962, 6.451.808, 5.972.389, 5.582.837 y 5.007.790. Las formas farmacéuticas adicionales de la presente divulgación también incluyen formas farmacéuticas como las descritas en las solicitudes de patente de los EE.UU. N.º 20030147952, 20030104062, 20030104053, 20030044466, 20030039688 y 20020051820. Las formas farmacéuticas adicionales de la presente divulgación también incluyen formas farmacéuticas como las descritas en las solicitudes PCT N.º WO 03/35041, WO 03/35040, WO 03/35029, WO 03/35177, WO 03/35039, WO 02/96404, WO 02/32416, WO 01/97783, WO 01/56544, WO 01/32217, WO 98/55107, WO 98/11879, WO 97/47285, WO 93/18755 y WO 90/11757.

### **Formulaciones de liberación controlada y sistemas de suministro de fármacos**

Las formulaciones de liberación controlada o sostenida de una composición farmacéutica de la divulgación pueden fabricarse usando tecnología convencional. En algunos casos, las formas farmacéuticas que han de usarse pueden proporcionarse como de liberación lenta o controlada de uno o más principios activos de las mismas usando, por ejemplo, hidropropilmetilcelulosa, otras matrices poliméricas, geles, membranas permeables, sistemas osmóticos, recubrimientos multicapa, micropartículas, liposomas, o microesferas o una combinación de los mismos para proporcionar el perfil de liberación deseado en proporciones variables. Pueden seleccionarse fácilmente formulaciones adecuadas de liberación controlada conocidas por los expertos habituales en la materia, incluyendo las descritas en el presente documento, para su uso con las composiciones farmacéuticas de la divulgación. Por lo tanto, las formas

farmacéuticas unitarias adecuadas para la administración oral, tales como comprimidos, cápsulas, cápsulas de gel y comprimidos oblongos, que están adaptados para la liberación controlada se incluyen en la presente divulgación.

La mayoría de los productos de liberación controlada tienen el objetivo común de mejorar la terapia farmacológica con respecto a la que se consigue con sus equivalentes no controlados. Idealmente, el uso de una preparación de liberación controlada diseñada de manera óptima en el tratamiento médico se caracteriza porque se va a emplear un mínimo de sustancia farmacológica para curar o controlar la afección en una mínima cantidad de tiempo. Las ventajas de las fórmulas de liberación controlada incluyen la prolongación de la actividad del fármaco, la reducción de la frecuencia de las dosis y mayor cumplimiento por parte del paciente. Además, las formulaciones de liberación controlada pueden usarse para influir en el tiempo de inicio de la acción u otras características, tales como el nivel sanguíneo del fármaco y, por lo tanto, pueden afectar a la aparición de efectos secundarios.

La mayoría de las formulaciones de liberación controlada se diseñan para liberar inicialmente una cantidad de fármaco que produzca inmediatamente el efecto terapéutico deseado, y que liberen gradual y continuamente otras cantidades de fármaco para mantener este nivel de efecto terapéutico durante un período de tiempo prolongado. Con el fin de mantener este nivel constante del fármaco en el cuerpo, el fármaco debe liberarse desde la forma de dosificación con una velocidad que remplace la cantidad de fármaco que se metabolice y excrete del cuerpo.

La liberación controlada de un principio activo puede estimularse mediante distintos inductores, por ejemplo, pH, temperatura, enzimas, agua u otras condiciones o compuestos fisiológicos. La expresión "componente de liberación controlada" en el contexto de la presente divulgación se define en el presente documento como un compuesto o compuestos, incluyendo, pero sin limitación, polímeros, matrices poliméricas, geles, membranas permeables, liposomas o microesferas o una combinación de los mismos que facilitan la liberación controlada del principio activo.

En determinados aspectos de la divulgación, las formulaciones de la presente divulgación pueden ser, pero sin limitación, formulaciones de corta duración, de liberación rápida, así como controladas, por ejemplo, de liberación sostenida, de liberación retardada y de liberación pulsátil.

La expresión liberación sostenida se usa en su sentido convencional para referirse a una formulación de fármaco que proporciona la liberación gradual de un fármaco durante un período de tiempo prolongado y que puede dar como resultado, aunque no necesariamente, niveles sanguíneos sustancialmente constantes de un fármaco durante un período de tiempo prolongado. El período de tiempo puede ser de hasta un mes o más y debe ser una liberación que sea más larga que la misma cantidad de agente administrado en forma de bolo. Para la liberación sostenida, los compuestos pueden formularse con un polímero adecuado o material hidrófobo que proporcione propiedades de liberación sostenida a los compuestos. Como tales, para su uso en el método de la divulgación, los compuestos pueden administrarse en forma de micropartículas, por ejemplo, mediante inyección o en forma de obleas o discos por implantación. En determinados aspectos de la divulgación, los compuestos de la divulgación se administran a un paciente, solos o en combinación con otro agente farmacéutico, usando una formulación de liberación sostenida.

La expresión liberación retardada se usa en el presente documento en su sentido convencional para referirse a una formulación de fármaco que proporciona una liberación inicial del fármaco después de cierto retraso tras la administración del fármaco y que, aunque no necesariamente, incluye un retraso de aproximadamente 10 minutos hasta aproximadamente 12 horas. La expresión liberación pulsátil se usa en el presente documento en su sentido convencional para referirse a una formulación de fármaco que proporciona la liberación del fármaco de tal manera que produce perfiles plasmáticos pulsátiles del fármaco después de la administración del fármaco. La expresión liberación inmediata se usa en su sentido convencional para referirse a una formulación de fármaco que proporciona la liberación del fármaco inmediatamente después de la administración del fármaco.

Como se usan en el presente documento, a corto plazo se refiere a cualquier período de tiempo de hasta e incluyendo aproximadamente 8 horas, aproximadamente 7 horas, aproximadamente 6 horas, aproximadamente 5 horas, aproximadamente 4 horas, aproximadamente 3 horas, aproximadamente 2 horas, aproximadamente 1 hora, aproximadamente 40 minutos, aproximadamente 20 minutos o aproximadamente 10 minutos y todos y cada uno de los incrementos completos o parciales de los mismos después de la administración del fármaco.

Como se usan en el presente documento, de compensación rápida se refiere a cualquier período de tiempo de hasta e incluyendo aproximadamente 8 horas, aproximadamente 7 horas, aproximadamente 6 horas, aproximadamente 5 horas, aproximadamente 4 horas, aproximadamente 3 horas, aproximadamente 2 horas, aproximadamente 1 hora, aproximadamente 40 minutos, aproximadamente 20 minutos, o aproximadamente 10 minutos y todos y cada uno de los incrementos completos o parciales de los mismos después de la administración del fármaco.

Los siguientes ejemplos ilustran más aspectos de la presente invención. Sin embargo, de ninguna manera son una limitación de las enseñanzas o la divulgación de la presente invención como se establece en el presente documento.

## Ejemplos

La invención se describe ahora con referencia a los siguientes Ejemplos. Estos Ejemplos se proporcionan sólo con

finés ilustrativos, y la invención no se limita a estos Ejemplos, sino que más bien abarca todas las variaciones que sean evidentes como resultado de las enseñanzas proporcionadas en el presente documento.

## Métodos y materiales:

### *Modelo en ratón de CAGI ENPP1-asj:*

Las parejas reproductoras heterocigotas ENPP1-asj/+ se mantuvieron con la "dieta de aceleración" (TD00.442, Laboratorios Harlan, Madison WI) durante todo el experimento para generar parejas de hermanos ENPP1-WT y ENPP1-asj/asj que habían sido expuestos a la dieta de aceleración en el útero. Las camadas se genotiparon el día 8 y se destetaron el día 21. Tras el destete, las parejas de hermanos se dividieron en cohortes experimentales y todos los animales experimentales se mantuvieron con la dieta de aceleración hasta la finalización del estudio.

### *Diseño de ENPP1-Fc:*

NPP1 modificada humana y de ratón (Humana: Registro del NCBI NP\_006199; Ratón: Registro del NCBI NP\_03839) modificada para expresar proteína recombinante soluble, se fusionó con IgG1 mediante subclonación en plásmidos pFUSE-hlgG1-Fc1 o pFUSE-mlgG1-Fc1 (InvivoGen, San Diego CA), respectivamente.

### *Producción de proteínas:*

**Matraces agitadores:** Se establecieron transfecciones estables del ENPP1-Fc en células HEK293 con selección con zeocina, y se adaptaron células HEK293 adherentes para su crecimiento en suspensión. Las células adaptadas se usaron para sembrar cultivos líquidos en medio FreeStyle (Gibco N.º 12338-018) en matraces agitadores a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub>, agitado a 120 rpm con alta humedad. El cultivo se amplió gradualmente hasta alcanzar el volumen diana deseado y después se mantuvo durante otros 12 días para acumular proteínas extracelulares. Durante la fase de mantenimiento, los cultivos se complementaron con CD EfficientFeed C AGT (Gibco N.º A13275-05) para aumentar la producción de proteínas.

**Biorreactor:** Las células se propagaron en un biorreactor de 10 litros equipado con oxígeno disuelto y control de pH. El oxígeno disuelto se mantuvo al 40 % de saturación de aire suministrando al cultivo una mezcla de aire y oxígeno no superior a 3 litros por minuto a una velocidad de agitación de 80 RPM. El pH se controló a 7,4 inyectando CO<sub>2</sub> cuando el pH era superior a 7,4. El crecimiento del cultivo se siguió midiendo el número de células, la viabilidad celular, las concentraciones de glucosa y lactato. El rendimiento final de ambos métodos de producción fue de aproximadamente 5 mg de ENPP1-Fc purificado por litro de cultivo.

### *Purificación de proteínas:*

Los cultivos líquidos se centrifugaron a 4300 x g durante 15 min y los sobrenadantes se filtraron a través de una membrana de 0,2 µm y se concentraron mediante flujo tangencial usando un casete Pellicon®3 0,11 m<sup>2</sup> Ultracell® 30 kD (Millipore, Billerica MA). Después, el sobrenadante concentrado se purificó mediante una combinación de técnicas cromatográficas en un proceso de varias etapas. Estas técnicas se realizan secuencialmente y pueden incluir cualquiera de las siguientes: cromatografía de afinidad con proteína A o proteína G, cromatografía de intercambio catiónico, cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía de intercambio hidrófobo, cromatografía líquida de alta presión (HPLC), etapas de precipitación, etapas de extracción, etapas de liofilización y/o etapas de cristalización. Usando una cualquiera de estas etapas en serie, una persona versada en la materia de la química de proteínas puede purificar las composiciones de la materia descrita hasta una homogeneidad de manera que no haya bandas de proteínas contaminantes en un gel teñido con plata (en una ejemplificación no limitante, FIG. 10). Las muestras de proteínas resultantes se sometieron después a ensayo con el kit de cuantificación de endotoxinas Pierce LAL Chromogenic Endotoxin Quantitation Kit (cat. 88282) para verificar que todas estaban exentas de endotoxinas.

### *Enzimología:*

La hidrólisis de ATP en estado estacionario por NPP1 humana se determinó mediante HPLC. Brevemente, las reacciones enzimáticas se iniciaron añadiendo NPP1 10 nM a concentraciones variables de ATP en el tampón de reacción que contenía Tris 20 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, KCl 4,5 mM, ZnCl<sub>2</sub> 14 µM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM y CaCl<sub>2</sub> 1 mM. En diversos puntos temporales, se extrajeron 50 µl de solución de reacción y se enfriaron con un volumen igual de ácido fórmico 3 M. La solución de reacción enfriada se cargó en una columna C-18 (5 µm 250 X 4,6 mm) (Higgins Analytical) equilibrada en una solución de acetato de amonio 15 mM (pH 6,0) y se eluyó con un gradiente de metanol del 0 % al 20 %. El sustrato y los productos se controlaron mediante absorbancia UV a 259 nm y se cuantificaron de acuerdo con la integración de sus correspondientes picos y curvas patrón.

### *Vehículo:*

mENPP1-Fc se formuló en vehículo de manera que el volumen de vehículo suministrado fue de 16 µl de

vehículo/gramo de peso corporal. El vehículo consistía en americanBio 10X PBS (Solución madre N.º AB 11072) diluido a 1 x con agua exenta de endotoxinas y complementado con  $\text{CaCl}_2$  14  $\mu\text{M}$  y  $\text{ZnCl}_2$  14  $\mu\text{M}$ .

#### **Dosificación:**

Los animales se dosificaron con vehículo o con ENPP1-Fc de ratón (mENPP1-Fc) formulado en vehículo. Los ratones se dosificaron con inyecciones subcutáneas diarias a partir del día 14 a niveles de dosis de 500 ua/kg de mENPP1-Fc.

#### **Actividad enzimática.**

En determinados aspectos, las enzimas útiles dentro de la divulgación tienen actividad enzimática con las constantes de Michaelis Menton descritas en Albright, *et al.*, 2015, *Nature Comm.* 6:10006 ( $K_M \sim 2 \mu\text{M}$  para hidrólisis de ATP;  $k_{cat}$  de 3,46 ( $\pm 0,44$ )  $\text{s}^{-1}$ ).

#### **Cuantificación de PPi plasmático:**

Los animales ENPP1-WT y ENPP1-asj/asj dosificados se desangraron retro-orbitalmente usando micropipetas heparinizadas, y la sangre se dispuso inmediatamente en tubos Eppendorf tratados con heparina y se colocó en hielo húmedo. Las muestras se centrifugaron en una microcentrífuga preenfriada a 4 °C a 4000 rpm durante 5 minutos, y el plasma se recogió y diluyó en un volumen de Tris-Acetato 50 mM pH=8,0 y se congeló a -80 °C. La cuantificación del PPi sérico se realizó usando los métodos descritos anteriormente (Cheung y Suhadolnik, 1977, *Anal Biochem* 83:61-63).

#### **Exploraciones de Micro-TC:**

**Formación de imágenes con  $^{99\text{m}}\text{PYP}$  in vivo:** El agente de formación de imágenes óseas  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -pirofosfato (Pharmalucence, Inc) se evaluó en cohortes de animales usando un sistema de formación de imágenes híbrido microSPECT/TC preclínico con colimadores duales de poro de 1 mm (X-SPECT, Gamma Medica-Ideas). A cada animal se le inyectó por vía intravenosa 2-5 mCi del trazador radiomarcado y se le tomaron imágenes 1-1,5 horas después de la inyección. Se obtuvo una exploración de TC (512 proyecciones a 50 kVp, 800 uA y un factor de aumento de 1,25) para la co-localización anatómica con la imagen SPECT. Las imágenes de SPECT se obtuvieron con 180° por cabezal de colimador en rotación antihoraria, 32 proyecciones, 60 segundos por proyección con un ROR de 7,0 cm, FOV de 8,95 cm y una ventana de energía de 140 keV  $\pm$  20. Las imágenes de TC se reconstruyeron con el software FLEX X-O CT (Gamma Medica-Ideas) usando un algoritmo de retroproyección filtrado. Las imágenes de SPECT se reconstruyeron usando el software FLEX SPECT (5 iteraciones, 4 subconjuntos) y posteriormente se fusionaron con las imágenes de TC y se analizaron usando el software AMIRA y un programa interno fuera de línea. Los datos se corrigieron en función de la desintegración y la dosis inyectada para conseguir el % de dosis inyectada (% de DI).

**Cuantificación de la captación de  $^{99\text{m}}\text{PYP}$ :** Para las exploraciones murinas con  $^{99\text{m}}\text{PYP}$ , se tomaron imágenes de los animales dos horas después de la inyección. Las exploraciones de SPECT resultantes se importaron en el software de procesamiento de imágenes ImageJ del NIH y se trazaron ROI alrededor de la cabeza (órgano diana) y de todo el cuerpo de cada animal. El porcentaje de actividad inyectada (PAI), con frecuencia denominado "porcentaje de dosis inyectada" (% de DI), se calculó comparando la relación de recuentos en la cabeza con los recuentos en todo el cuerpo, y se expresó como el % de DI para proporcionar una medida de la afinidad con la que el radioindicador es captado por la ROI (cabeza). Los recuentos totales en cada exploración se tomaron como medida de la dosis inyectada en todo el cuerpo.

#### **Secuencias:**

##### **Secuencia de aminoácidos de NPP1 (Registro del NCBI NP\_006199) (SEQ ID NO: 1)**

```
MERDGCAGGSGRGEGGRAPREGPAGNGRDRGRSHAAEAPGDPQAAASLLAPMDVGEEPLEKAARAR
TAKDPNTYKVLSTVLVSVCLTTILGCI FGLKPSCAKEVKSCKGRCFERTFGNCRCDAAACVELGNCC
DYQETCIEPEHIWTCNKFRCEKRLTRSLCACSDCKDKGDCCINYSVCQGEKSWVEEPCESINEP
QCPAGFETPPTLLFSLDGFRAEYLHTWGGLLPVISKLLKCGTYTKNMRPVYPTKTFPNHYSIVTGLY
```

PESHGIIDNKMYPKMNASFSLSKSEKFNPEWYKGEPIWVTAKYQGLKSGTFFWPGSDVEINGIFPD  
IYKMYNGSVPFEEERILAVLQWLQLPKDERPHFYTLYLEEDSSGHSYGPVSSEVIKALQRVDGMVGM  
LMDGLKELNLHRCNLILISDHGMEQGSCKKYIYLNKYLGDVKNIKVIYGPAARLRPSDVPDKYYSF  
NYEGIARNLSCREPNQHFKPYLKHFLPKRLHFAKSDRIEPLTFYLDPQWQLALNPSEKRYCGSGFHG  
SDNVFSNMQALFVGYPGFGKHGIEADTFENIEVYNLMCDLLNLTPAPNNGTHGSLNHLKPNVYTPK  
HPKEVHPLVQCPFTRNPRDNLGCSCNPSILPIEDFQTQFNLTVAEEKI IKHETLPYGRPRVLQKENT  
ICLLSQHQFMSGYSQDILMPLWTSYTVDRNDSFSTEDFSNCLYQDFRIPLSPVHKCSFYKNNTKVS  
YGFSLPQNLKNSSGIYSEALLTTNIVPMYQS FQVIWRYFHDTLLRKYAEERNGVNVVSGPVFDFDYD  
GRCDLENLRQKRRVIRNQEILIPTHFFIVLTSCKDTSQTPLHCENLDTLAFILPHRTDNSESCVHG  
KHDSSWVEELMLHRARITDVEHITGLSFYQQRKEPVSDILKLKTHLPTFSQED

**Secuencia de aminoácidos de NPP2 (Registro del NCBI NP\_001124335) (SEQ ID NO: 2)**

MARRSSFQSCQIISLFTFAVGVNICLGFTAHRICKRAEGWEEGPPTVLSDS PWTNISGSCKGRCFELQ  
EAGPPDCRCDNLCKSYTSCCHDFDELCLKTARGWECTKDRCGEVRNEENACHCSEDCLARGDCCTNY  
QVVCKGESHVWDDDC EEIKAAECPAGFVRPPLII FSV DGF RAS YMKKGSKVMPNIEKLRSCGTHSPY  
MRPVYPTKTFFPNLYTLATGLYPESHGIVGNSMYDPVFDATFHLRGREKFNHRWWGGQPLWITATKQG  
VKAGTFFWSVVI PHERRILTILQWLTL PDHERPSVYAFYSEQPDFSGHKYGPFGPEMTNPLREIDKI  
VGQLMDGLKQLKLHRCVNI FVG DHG MEDVTCD RTEFLSNYLTNVDDITLVP GTLGRIRSKFSNNAK  
YDPKAI IANLTCKKPDQHF KPYLKQHL PKRLHYANNRRIED IHL LVERRWHVARKPLDVYKKPSGKC  
FFQGDHGF DNKVN SMQTVFVG YGSTFKYKTKVPPFENIELYNVMCDLLGLKPAPNNGTHGSLNHLRL  
TNTFRPTMPEEVTRPNYPGIMYLQSDFDLGCTCDDKVEPKNKLDELNKR LHTKGSTEAETRKFGRSR  
NENKENINGNFEP RKRHLLYGRPAVLRYTRYDILYHTDFESGYSEIFLMPLWTSYTVSKQAEVSSV  
PDHLTSCVRPDVRVSPSFSQNC LAYKNDKQMSYGLFPPYLSSSPEAKYDAFLVTNMVPMYPAFKRV  
WNYFQRVLVKKYASERNGVNVISGPIFDYDYDGLHDTEDKIKQYVEGSSIPVPTHYYSIITSCLDFT  
QPADKCDGPLSVSSFILPHRPDNEESCNSSEDESKWVEELMKMHTARVRDIEHLTSLDFFRKTSRSY  
PEILTLKTYLHTYESEI

5

**Secuencia de aminoácidos de NPP4 (Registro del NCBI AAH18054.1) (SEQ ID NO: 3)**

MKLLVILLFSG LITGFRSDSSSSLPKLLLVSFDGFRADYLNKYEFPHLQNF IKEGVLVEHVKNVFI  
TKTFPNHYSIVTGLYEESHGIVANS MYDAVTKKHFSDSNDKDPFWWNEAVPIWVTNQLQENRSSAAA  
MWPGTDVFIHDTISSYFMNYNSSVSFEERLNNITMWLNNSNPPVTFATLYWEEP DASGHKYG PEDKE  
NMSRVLKKIDDLIGDLVQRLKMLGLWENLNVIITSDHGMTQCSQDRLINLDSCIDHSYYTLIDLSPV  
AAILPKINRTEVYNKLKNCS PHMNVYLKEDI PNRFY YQHNDRIQPIILVADEGWTIVLNESSQKLGD  
HGYDNSLSPSMHPFLAAHGPAFHKG YKHSTINIVDIYPM MCHILGLKPHPNNGTFGHTKCLLV DQWCI  
NLPEAIAIVIGSLLVLTMLTCLIIIMQNRLSVPRPFSRLQLQEDDDDPLIG

10

(DSS), (SEQ ID NO: 4), en donde n es un número entero que varía de 1 a 10  
(ESS), (SEQ ID NO: 5), en donde n es un número entero que varía de 1 a 10  
(RQQ), (SEQ ID NO: 6), en donde n es un número entero que varía de 1 a 10  
15 (KR), (SEQ ID NO: 7), en donde n es un número entero que varía de 1 a 10  
R<sub>m</sub> (SEQ ID NO: 8), en donde m es un número entero que varía de 1 a 15  
DSSSEKFLRRIGRFG (SEQ ID NO: 9)  
EEEEEEPRGDT (SEQ ID NO: 10)  
APWHLSSQYSRT (SEQ ID NO: 11)

STLPIPHFSRE (SEQ ID NO: 12)

VTKHLNQISQSY (SEQ ID NO: 13)

 $E_m$  (SEQ ID NO: 14), en donde m es un número entero que varía de 1 a 15

## 5 Secuencia de aminoácidos de NPP121 (SEQ ID NO: 15)

1	M	E	R	D	G	C	A	G	G	G	S	R	G	G	E	G	G	R	A	P
21	R	E	G	P	A	G	N	G	R	D	R	G	R	S	H	A	A	E	A	P
41	G	D	P	Q	A	A	A	S	L	L	A	P	M	D	V	G	E	E	P	L
61	E	K	A	A	R	A	R	T	A	K	D	P	N	T	Y	K	I	I	S	<u>L</u>
81	<u>F</u>	<u>T</u>	<u>F</u>	<u>A</u>	<u>V</u>	<u>G</u>	<u>V</u>	<u>N</u>	<u>I</u>	<u>C</u>	<u>L</u>	<u>G**F</u>	<u>T</u>	<u>A</u>	<u>G</u>	<u>L</u>	<u>K</u>	P	S	
101	C	A	K	E	V	K	S	C	K	G	R	C	F	E	R	T	F	G	N	C
121	R	C	D	A	A	C	V	E	L	G	N	C	C	L	D	Y	Q	E	T	C
141	I	E	P	E	H	I	W	T	C	N	K	F	R	C	G	E	K	R	L	T
161	R	S	L	C	A	C	S	D	D	C	K	D	K	G	D	C	C	I	N	Y
181	S	S	V	C	Q	G	E	K	S	W	V	E	E	P	C	E	S	I	N	E
201	P	Q	C	P	A	G	F	E	T	P	P	T	L	L	F	S	L	D	G	F
221	R	A	E	Y	L	H	T	W	G	G	L	L	P	V	I	S	K	L	K	K
241	C	G	T	Y	T	K	N	M	R	P	V	Y	P	T	K	T	F	P	N	H
261	Y	S	I	V	T	G	L	Y	P	E	S	H	G	I	I	D	N	K	M	Y
281	D	P	K	M	N	A	S	F	S	L	K	S	K	E	K	F	N	P	E	W
301	Y	K	G	E	P	I	W	V	T	A	K	Y	Q	G	L	K	S	G	T	F
321	F	W	P	G	S	D	V	E	I	N	G	I	F	P	D	I	Y	K	M	Y

## ES 2 983 910 T3

```

341  N G S V P F E E R I L A V L Q W L Q L P
361  K D E R P H F Y T L Y L E E P D S S G H
381  S Y G P V S S E V I K A L Q R V D G M V
401  G M L M D G L K E L N L H R C L N L I L
421  I S D H G M E Q G S C K K Y I Y L N K Y
441  L G D V K N I K V I Y G P A A R L R P S
461  D V P D K Y Y S F N Y E G I A R N L S C
481  R E P N Q H F K P Y L K H F L P K R L H
501  F A K S D R I E P L T F Y L D P Q W Q L
521  A L N P S E R K Y C G S G F H G S D N V
541  F S N M Q A L F V G Y G P G F K H G I E
561  A D T F E N I E V Y N L M C D L L N L T
581  P A P N N G T H G S L N H L L K N P V Y
601  T P K H P K E V H P L V Q C P F T R N P
621  R D N L G C S C N P S I L P I E D F Q T
641  Q F N L T V A E E K I I K H E T L P Y G
661  R P R V L Q K E N T I C L L S Q H Q F M
681  S G Y S Q D I L M P L W T S Y T V D R N
701  D S F S T E D F S N C L Y Q D F R I P L
721  S P V H K C S F Y K N N T K V S Y G F L
741  S P P Q L N K N S S G I Y S E A L L T T
761  N I V P M Y Q S F Q V I W R Y F H D T L
781  L R K Y A E E R N G V N V V S G P V F D
801  F D Y D G R C D S L E N L R Q K R R V I
821  R N Q E I L I P T H F F I V L T S C K D
841  T S Q T P L H C E N L D T L A F I L P H
861  R T D N S E S C V H G K H D S S W V E E
881  L L M L H R A R I T D V E H I T G L S F
901  Y Q Q R K E P V S D I L K L K T H L P T
921  F S Q E D

```

Subrayado con una línea: restos intercambiados con los restos 1-27 de NPP2 para proporcionar la escisión en la posición de transición (\*\*); Subrayado con dos líneas: Proteína NPP1 (principio y fin).

5

**Secuencia de aminoácidos de NPP121-Fc (SEQ ID NO: 16)**



# ES 2 983 910 T3

1 M E R D G C A G G G S R G G E G G R A P  
 21 R E G P A G N G R D R G R S H A A E A P  
 41 G D P Q A A A S L L A P M D V G E E P L  
 61 E K A A R A R T A K D P N T Y K I I S L  
 81 F T F A V G V N I C L G\*\*F T A G L K P S  
 101 C A K E V K S C K G R C F E R T F G N C  
 121 R C D A A C V E L G N C C L D Y Q E T C  
 141 I E P E H I W T C N K F R C G E K R L T  
 161 R S L C A C S D D C K D K G D C C I N Y  
 181 S S V C Q G E K S W V E E P C E S I N E  
 201 P Q C P A G F E T P P T L L F S L D G F  
 221 R A E Y L H T W G G L L P V I S K L K K  
 241 C G T Y T K N M R P V Y P T K T F P N H  
 261 Y S I V T G L Y P E S H G I I D N K M Y  
 281 D P K M N A S F S L K S K E K F N P E W  
 301 Y K G E P I W V T A K Y Q G L K S G T F  
 321 F W P G S D V E I N G I F P D I Y K M Y  
 341 N G S V P F E E R I L A V L Q W L Q L P  
 361 K D E R P H F Y T L Y L E E P D S S G H  
 381 S Y G P V S S E V I K A L Q R V D G M V  
 401 G M L M D G L K E L N L H R C L N L I L  
 421 I S D H G M E Q G S C K K Y I Y L N K Y  
 441 L G D V K N I K V I Y G P A A R L R P S  
 461 D V P D K Y Y S F N Y E G I A R N L S C  
 481 R E P N Q H F K P Y L K H F L P K R L H  
 501 F A K S D R I E P L T F Y L D P Q W Q L  
 521 A L N P S E R K Y C G S G F H G S D N V  
 541 F S N M Q A L F V G Y G P G F K H G I E  
 561 A D T F E N I E V Y N L M C D L L N L T  
 581 P A P N N G T H G S L N H L L K N P V Y  
 601 T P K H P K E V H P L V Q C P F T R N P  
 621 R D N L G C S C N P S I L P I E D F Q T

641 Q F N L T V A E E K I I K H E T L P Y G  
 661 R P R V L Q K E N T I C L L S Q H Q F M  
 681 S G Y S Q D I L M P L W T S Y T V D R N  
 701 D S F S T E D F S N C L Y Q D F R I P L  
 721 S P V H K C S F Y K N N T K V S Y G F L  
 741 S P P Q L N K N S S G I Y S E A L L T T  
 761 N I V P M Y Q S F Q V I W R Y F H D T L  
 781 L R K Y A E E R N G V N V V S G P V F D  
 801 F D Y D G R C D S L E N L R Q K R R V I  
 821 R N Q E I L I P T H F F I V L T S C K D  
 841 T S Q T P L H C E N L D T L A F I L P H  
 861 R T D N S E S C V H G K H D S S W V E E  
 881 L L M L H R A R I T D V E H I T G L S F  
 901 Y Q Q R K E P V S D I L K L K T H L P T  
 921 F S Q E D L I N D K T H T C P P C P A P  
**941 E L L G G P S V F L F P P K P K D T L M**  
**961 I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E**  
**981 V K F N W Y V D G V E V H N A K T K P R**  
**1001 E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D**  
**1021 W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I**  
**1041 E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P**  
**1061 P S R E E M T K N Q V S L T C L V K G F**  
**1081 Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K**  
**1101 T T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V**  
**1121 D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L**  
**1141 H N H Y T Q K S L S L S P G K**

Subrayado con una línea: restos intercambiados con los restos 1-27 de NPP2 para proporcionar la escisión en la posición de transición (\*\*); Subrayado con dos líneas: Proteína NPP1 (inicio y fin); **Negrita**: hlgG1 (Fc)

5

#### Secuencia de aminoácidos de NPP71 (SEQ ID NO: 17)

1      MRGPAVLLTV ALATLLAPGA GAGLKPSCAK      EVKSCKGRCF ERTFGNCRCD  
 51      AACVELGNCC LDYQETCIEP EHIWTCNKFR      CGEKRLTRSL CACSDDCKDK  
 101      GDCCINYSSV CQGEKSWVEE PCESINEPQC      PAGFETPPTL LFSLDGFRAE

## ES 2 983 910 T3

```

151  YLHTWGGLLP VISKLKCCGT YTKNMRPVYP TKTFPNHYSI VTGLYPESHG
201  IIDNKMYDPK MNASFSLKSK EKFNPEWYKG EPIWVTAKYQ GLKSGTFFWP
251  GSDVEINGIF PDIYKMYNGS VPFEERILAV LQWLQLPKDE RPHFYTLYLE
301  EPDSSGHSYG PVSSEVIKAL QRVDGMVGML MDGLKELNLH RCLNLILISD
351  HGMEQGSCKK YIYLNKYLGD VKNIKVIYGP AARLRPSDVP DKYYSFNYEG
401  IARNLSCREP NQHFKPYLKH FLPKRLHFAK SDRIEPLTFY LDPQWQLALN
451  PSEKRYCGSG FHGSDNVFSN MQALFVGYPG GFKHGIEADT FENIEVYNLM
501  CDLLNLTPAP NNGTHGSLNH LLKNPVYTPK HPKEVHPLVQ CPFTRNPRDN
551  LGCSCNPSIL PIEDFQTQFN LTVAEEKIIK HETLPYGRPR VLQKENTICL
601  LSQHQFMSGY SQDILMPLWT SYTVDRNDSF STEDFSNCLY QDFRIPLSPV
651  HKCSFYKNNT KVSYGFLSPP QLNKNSSGIY SEALLTTNIV PMYQSFQVIW
701  RYFHDTLLRK YAEERNGVNV VSGPVDFDFY DGRCDLENL RQKRRVIRNQ
751  EILIPTHFFI VLTSCKDTSQ TPLHCENLDT LAFILPHRTD NSESCVHGKH
801  DSSWVEELLM LHRARITDVE HITGLSFYQQ RKEPVSDILK LKTHLPTFSQ
851  ED

```

Subrayado con una línea: NPP7; Subrayado con dos líneas: Proteína NPP1 (principio y fin).

### 5 Secuencia de aminoácidos de NPP71-Fc (SEQ ID NO: 18)

```

1    MRGPAVLLTV ALATLLAPGA GAGLKPSCAK EVKSCKGRCF ERTFGNCRCD
51   AACVELGNCC LDYQETCIEP EHIWTCNKFR CGEKRLTRSL CACSDDCKDK
101  GDCCINYSSV CQGEKSWVEE PCESINEPQC PAGFETPPTL LFSLDGFRAE
151  YLHTWGGLLP VISKLKCCGT YTKNMRPVYP TKTFPNHYSI VTGLYPESHG
201  IIDNKMYDPK MNASFSLKSK EKFNPEWYKG EPIWVTAKYQ GLKSGTFFWP
251  GSDVEINGIF PDIYKMYNGS VPFEERILAV LQWLQLPKDE RPHFYTLYLE
301  EPDSSGHSYG PVSSEVIKAL QRVDGMVGML MDGLKELNLH RCLNLILISD
351  HGMEQGSCKK YIYLNKYLGD VKNIKVIYGP AARLRPSDVP DKYYSFNYEG
401  IARNLSCREP NQHFKPYLKH FLPKRLHFAK SDRIEPLTFY LDPQWQLALN
451  PSEKRYCGSG FHGSDNVFSN MQALFVGYPG GFKHGIEADT FENIEVYNLM
501  CDLLNLTPAP NNGTHGSLNH LLKNPVYTPK HPKEVHPLVQ CPFTRNPRDN
551  LGCSCNPSIL PIEDFQTQFN LTVAEEKIIK HETLPYGRPR VLQKENTICL
601  LSQHQFMSGY SQDILMPLWT SYTVDRNDSF STEDFSNCLY QDFRIPLSPV
651  HKCSFYKNNT KVSYGFLSPP QLNKNSSGIY SEALLTTNIV PMYQSFQVIW
701  RYFHDTLLRK YAEERNGVNV VSGPVDFDFY DGRCDLENL RQKRRVIRNQ

```

751 EILIPTHFFI VLTSCKDTSQ TPLHCENLDT LAFILPHRTD NSESCVHGKH  
 801 DSSWVEELLM LHRARITDVE HITGLSFYQQ RKEPVSDILK LKTHLPTFSQ  
 851 EDLINDKTHT **CPPCPAPELL** GGPSVFLFPP **KPKDTLMISR** TPEVTCVVVD  
 901 **VSHEDPEVKF** NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN  
 951 **GKEYKCKVSN** KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL  
 1001 **TCLVKGFYPS** DIAVEWESNG QPENNYKTP PVLDSDGSFF LYSKLTVDKS  
 1051 **RWQQGNVFSC** SVMHEALHNH YTQKSLSLSP GK

Subrayado con una línea: NPP7; Subrayado con dos líneas: Proteína NPP1 (inicio y fin); **Negrita**: hlgG1 (Fc).

5 **Secuencia de aminoácidos de (NPP71 que carece de GLK N-Terminal de NPP1) (SEQ ID NO: 19)**

1 MRGPAVLLTV ALATLLAPGA GA PSCAK EVKSCKGRCF ERTFGNCRCD  
 51 AACVELGNCC LDYQETCIEP EHIWTCNKFR CGEKRLTRSL CACSDDCKDK  
 101 GDCCINYSSV CQGEKSWVEE PCESINEPQC PAGFETPPTL LFSLDGFRAE  
 151 YLHTWGGLLP VISKLKCCGT YTKNMRPVYP TKTFPNHYSI VTGLYPESHG  
 201 IIDNKMYDPK MNASFSLKSK EKFNPEWYKG EPIWVTAKYQ GLKSGTFFWP  
 251 GSDVEINGIF PDIYKMYNGS VPFEERILAV LQWLQLPKDE RPHFYTYLYE  
 301 EPDSSGHSYG PVSSEVIKAL QRVDGMVGML MDGLKELNLH RCLNLILISD  
 351 HGMEQGSCKK YIYLNKYLGDK VKNIKVIYGP AARLRPSDVP DKYYSFNYEG  
 401 IARNLSCREP NQHFKPYLKH FLPKRLHFAK SDRIEPLTFY LDPQWQLALN  
 451 PSERKYCGSG FHGSDNVFSN MQALFVGYP GFKHGIEADT FENIEVYNLM  
 501 CDLLNLTPAP NNGTHGSLNH LLKNPVYTPK HPKEVHPLVQ CPFTRNPRDN  
 551 LGCSCNPSIL PIEDFQTQFN LTVAEEKIHK HETLPYGRPR VLQKENTICL  
 601 LSQHQFMSGY SQDILMPLWT SYTVDRNDSF STEDFSNCLY QDFRIPLSPV  
 651 HKCSFYKNNT KVSYGFLSPP QLKNKSSGIY SEALLTTNIV PMYQS FQVIW  
 701 RYFHDTLRLK YAEERNGVNV VSGPVFDFDY DGRCDLENL RQKRRVIRNQ  
 751 EILIPTHFFI VLTSCKDTSQ TPLHCENLDT LAFILPHRTD NSESCVHGKH  
 801 DSSWVEELLM LHRARITDVE HITGLSFYQQ RKEPVSDILK LKTHLPTFSQ  
 851 ED

Subrayado con una línea: NPP7; Subrayado con dos líneas: Proteína NPP1 (inicio y fin) (los 3 primeros aminoácidos del extremo N de NPP1, GLK, se omiten).

**Secuencia de aminoácidos de (NPP71 que carece de GLK N-terminal de NPP1)-Fc (SEQ ID NO: 20)**

1     MRGPAVLLTV ALATLLAPGA GA     PSCAK   EVKSCKGRCF ERTFGNCRCD  
 51     AACVELGNCC LDYQETCIEP EHIWTCNKFR   CGEKRLTRSL CACSDDCCKDK  
 101    GDCCINYSSV CQGEKSWVEE PCESINEPQC   PAGFETPPTL LFSLDGFRAE  
 151    YLHTWGGLLP VISKLKKCGT YTKNMRPVYP   TKTFPNHYSI VTGLYPESHG  
 201    IIDNKMYDPK MNASFSLKSK EKFNPEWYKG   EPIWVTAKYQ GLKSGTFFWP  
 251    GSDVEINGIF PDIYKMYNGS VPFEERILAV   LQWLQLPKDE RPHFYTTYLYE  
 301    EPDSSGHSYG PVSSEVIKAL QRVDGMVGML   MDGLKELNLH RCLNLILISD  
 351    HGMEQGSCKK YIYLNKYLGD VKNIKVIYGP   AARLRPSDVP DKYYSFNYEG  
 401    IARNLSCREP NQHFKPYLKH FLPKRLHFAK   SDRIEPLTFY LDPQWQLALN  
 451    PSEKRYCGSG FHGSDNVFSN MQALFVGYP   GFKHGIEADT FENIEVYNLM  
 501    CDLLNLTPAP NNGTHGSLNH LLKNPVYTPK   HPKEVHPLVQ CPFTRNPRDN  
 551    LGCSCNPSIL PIEDFQTQFN LTVAEEKIIK   HETLPYGRPR VLQKENTICL  
 601    LSQHQMMSGY SQDILMPLWT SYTVDRNDSF   STEDFSNCLY QDFRIPLSPV  
 651    HKCSFYKNNT KVSYGFLSPP QLNKNSSGIY   SEALLTTNIV PMYQSFQVIW  
 701    RYFHDTLRLK YAEERNGVNV VSGPVDFDFY   DGRCDLENL RQKRRVIRNQ  
 751    EILIPTHFFI VLTSCKDTSQ TPLHCENLDT   LAFILPHRTD NSESCVHGKH  
 801    DSSWVEELLM LHRARITDVE HITGLSFYQQ   RKEPVSDILK LKTHLPTFSQ  
 851    EDLINDKTHT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD  
 901    VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ   YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN  
 951    GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE   PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL  
 1001   TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTP   PVLDSGDSFF LYSKLTVDKS  
 1051   RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTQKSLSLSP   GK

Subrayado con una línea: NPP7; Subrayado con dos líneas: Proteína NPP1 (inicio y fin) (los 3 primeros aminoácidos del extremo N de NPP1 se omiten); **Negrita:** hlgG1 (Fc).

5

#### Secuencia de aminoácidos de NPP121-ALB (SEQ ID NO: 21)

**MERDGCAGGSRGGEGGRAPREGPAGNGRDRGRSHAAEAPGDPQAAASLLAPMDVGEEPLEKAARAR**  
**TAKDPNTYKIIS**LFTFAVGVNICLG**\*\*F**TAGLKPSCAKEVKSCKGRCFERTFGNCRCDAAACVELGNC  
 CLDYQETCIEPEHIWTCNKFRFCGEKRLTRSLCACSDDCCKDKGDCCINYSSVCQGEKSWVEEPCESIN  
 EPQCPAGFETPPTLLFSLDGFRAEYLHTWGGLLPVISKLKKCGTYTKNMRPVYPTKTFPNHYSIVTG  
 LYPESHGIIDNKMYDPKMNASFSLKSKEKFNPEWYKGEPWVTAKYQGLKSGTFFWP  
 GSDVEINGIFPDIYKMYNGSVVPFEERILAVLQWLQLPKDERPHFYTTYLYE  
 EPDSSGHSYGPVSSEVIKALQRVDGMVGMLMDGLKELNLHRCLNLILISDHGMEQGSCKKYIYLNKYLGDVKNIKVIYGP  
 AARLRPSDVPDKYY

SFNYEGIARNLSCREPNQHFKPYLKHFLPKRLHFAKSDRIEPLTFYLDPQWQLALNPSEKCYCGSGF  
 HGSDNVFSNMQUALFVGYPGPGFKHGIEADTFENIEVYNLMCDLLNLTPAPNNGTHGSLNHLLKNPVYT  
 PKHPKEVHPLVQCPFTRNPRDNLGCSCNPSILPIEDFQTQFNLTVAEEKI IKHETLPYGRPRVLQKE  
 NTICLLSQHQFMSGYSQDILMPLWTSYTVDRNDSFSTEDFSNCLYQDFRIPLSPVHKCSFYKNNTKV  
 SYGFLSPPQLNKNSSGIYSEALLTTNIVPMYQSFQVIWRYFHDTLRLKYAEERNGVNVVSGPVDFDFD  
 YDGRCDLENLRQKRRVIRNQEILIPTHFFIVLTSCKDTSQTPHLCENLDTLAFILPHRTDNSESCV  
 HGKHDSSWVEELMLHRARITDVEHITGLSFYQQRKEPVSDILKLKTHLPTFSQED**RS****SGSGGSMKWV**  
**TFL****LL****LFVSGSAF****SRGVFR****REAHKSEIAHRYNDLGEQHFKGLVLI****AF****SQYLQKCSYDEHAKLVQ****EV****T**  
**DFAKT****CVADESA****ANCDKSLHTLFGDKLCAIPNLRENYGELADCCTKQEP****ERNECFLQHKDDNPSLPP**  
**FERPEAEAMCTSF****KENPTTFM****GHYLHEVARRHPYFYAPELLYYAEQYNEILTQCCAEADKESCLTPK**  
**LDGVKEKALVSSVRQRMKSSMQK****GERAFKAWAVARLSQTFPNADFAEITKLATDLTKVNKECCHG**  
**DLLECADDRAELAKYMCENQATISSKLQTC****CDKPLLKKAHCLSEVEHDTMPADLPAIAADFVEDQEV**  
**CKNYAEAKDVFLGTFLYEYSRRHPDYSVSL****LLRLAKKYEATLEKCCAEANPPACYGTVLAEFQPLVE**  
**EPKNLVKTNC****DLYEKLGEYGFQNA****ILVRYTQKAPQVSTPTLVEAARNLGRVGTKCCTLPEDQRLPCV**  
**EDYLSAILNRVCLLHEKTPVSEHVTKCCSGSLVERRPCFSALTVD****ETYVPKEFKAETFTFHSDICTL**  
**PEKEKQIKKQ****TALAE****LVKHKPKATAEQ****LKTVMDFAQFLDTCCKAADKDTCFSTEGPNLVTRCKDAL**  
**ARSWSH****PQFEK**

**Negrita en cursiva.** NPP1 citoplásmica y transmembrana; Subrayado con una línea: Restos intercambiados con los  
 5 restos 1-27 de NPP2 para proporcionar escisión en la posición de transición (\*\*); Subrayado con dos líneas: NPP1  
 transmembrana; Sin formato: Dominio extracelular de NPP1; **Subrayado en negrita:** Enlazador; **Negrita:** Albúmina

#### Secuencia de aminoácidos de (NPP71 que carece de GLK N-terminal de NPP1)-ALB (SEQ ID NO: 22)

MRGPAVLLTVALATLLAPGAGAPSCAKEVKSCKGRCFERTFGNCRCDAACVELGNCCLDYQETCIEP  
 EHIWTCNKFRGCEKRLTRSLCACSDDCDKDKGCCINYSVCQGEKSWVEEPCESINEPQCPAGFETP  
 PTLFLSLDGFRAEYLHTWGGLLPVISKLKCGTYTKNMRPVYPTKTFPNHYSIVTGLYPESHGII DN  
 KMYDPKMNASFSLKSKEKFNPEWYKGEPIWVTAKYQGLKSGTFFWPGSDVEINGIFPDIYKMYNGSV  
 PFEERILAVLQWLQLPKDERPHFYTLYLEEPDSSGHSYGPVSSEVIKALQRV DGMVGM LMDGLKELN  
 LHRCLNLILISDHGMEQGSCKKIYLNKYLGDVKNIKVIYGPAA RL RPSDVPDKYYSFNYEGIARNL  
 SCREPNQHFKPYLKHFLPKRLHFAKSDRIEPLTFYLDPQWQLALNPSEKCYCGSGFHGSDNVFSNMQ  
 ALFVGYPGPGFKHGIEADTFENIEVYNLMCDLLNLTPAPNNGTHGSLNHLLKNPVYTPKHPKEVHPLV  
 QCPFTRNPRDNLGCSCNPSILPIEDFQTQFNLTVAEEKI IKHETLPYGRPRVLQKENTICLLSQHQF  
 MSGYSQDILMPLWTSYTVDRNDSFSTEDFSNCLYQDFRIPLSPVHKCSFYKNNTKVSYGFLSPPQLN  
 KNSSGIYSEALLTTNIVPMYQSFQVIWRYFHDTLRLKYAEERNGVNVVSGPVDFDFDYDGRCDLENL

RQKRRVIRNQEILIPTHFFIVLTSCKDTSQTPHLCENLDTLAFILPHRTDNSESCVHGKHDSSWVEE  
 LLMLHRARITDVEHITGLSFYQQRKEPVSDILKLKTHLPTFSQED**RS****SGSGGS**SMKWVTFLLLLFVSGS  
 AFSRGVFRREAHKSEIAHRYNDLGEQHFKGLVLIAFSQYLQKCSYDEHAKLVQEVTDFAKTCVADES  
 AANCDKSLHTLFGDKLCAIPNLRENYGELADCCTKQEPERNECFLQHKDDNPSLPPFERPEAEAMCT  
 SFKENPTTFMGHYLHEVARRHPYFYAPELLYYAEQYNEILTQCCAEADKESCLTPKLDGVKEKALVS  
 SVRQRMKCS SMQKFGERAFAKAWAVARLSQTFPNADFAEITKLATDLTKVNKECCHGDLLECADDRAE  
 LAKYMCENQATISSKLQTCCKPPLLKKAHCLSEVEHDTMPADLPAIAADFVEDQEVCKNYAEAKDVF  
 LGTFLYEYSRRHPDYSVSLLLRLAKKYEATLEKCCAEANFPACYGTVLAEFQPLVEEPKKNLVKTNCD  
 LYEKLGEYGFQNAILVRYTQKAPQVSTPTLVEAARNLGRVGTKCCTLPEDQRLPCVEDYLSAILNRV  
 CLLHEKTPVSEHVTKCCSGSLVERRPCFSALTVDETYVPKEFKAETFTFHS DICTLPEKEKQIKKQT  
 ALAELVKHKPKATAEQLKTVMD DFAQFLDTCKKAADKDTCFSTEGPNLVTRCKDALARSWSHPQFEK

Subrayado con dos líneas: NPP7; Texto sin formato: NPP1; **Negrita**: secuencia espaciadora; Subrayado con una línea: albúmina

5

#### IISLFFAVGVNICLGFTA (SEQ ID NO: 23)

#### Secuencia de aminoácidos de NPP51 (SEQ ID NO: 24)

MTSKFLLVS FILAALS LSTTFSLQPS CAKEVKSC KGRCFERTFSNCRCDAA CVSLGNCCLDFQETCV  
 EPTHIWTCNKFRGCKRLSRFVCSCADDCKTHNDCCINYS SVCQDKKSWEETCES IDTPECPAEFE  
 SPPTLLFSLDGFRAEYLHTWGGLLPVISKLKNC GTYTKNMRMPYPTKT FPNHYSIVTGLYPESHGII  
 DNKMYDPKMNASFSLKSKEKFNPLWYKGQPIWVTANH QEVKSGTYFWPGSDVEIDGILPDIYKVYNG  
 SVPFEERILAVLEWLQLPSHERPHFYTLYLEEPDSSGHSHG PVSSEVIKALQKVDRLVGM LMDGLKD  
 LGLDKCLNLILISDHGMEQGSCKKYVYLNKYLGDVNNV KVVYGPAARLRPTDVPETYYSFNYEALAK  
 NLSCREPNQHFRPYLKPFLPKRLHFAKSDRIEPLTFYLD PQWQLALNP SERKYCGSGFHGSDNLFSN  
 MQALFIGYGPAFKHGAEVDSFENIEVYNLMCDLLGLI PAPNNGSHGSLNHLLKKPIYNPSHPKEEGF  
 LSQCPIKSTSNLDGCTCDPWIVPIKDFEKQLNLTTEDVDDI YHMTVPYGRPRILLKQHRVCLLQQQQ  
 FLTGYSLDLLMPLWASYTFLSNDQFSRDDFSNCLYQDLRI PLSPVHKCSYYKSNSKLSYGFLT PPRL  
 NRVSNNHIYSEALLTSNIVPMYQS FQVIWHYLHDTLLQRYAHERNGIN VVSGPVFDFDYDGRYDSLEI  
 LKQNSRVIRSQEILIPTHFFIVLTSCKQLSETPLECSA LESSAYILPHRPDNIESCTHGKRESSWVE  
 ELLTLHRARVTDVELITGLSFYQDRQESVSELLRLKTHLPIFSQED

10

Subrayado: NPP5; Sin formato: NPP1

#### Secuencia de aminoácidos de NPP51-ALB (SEQ ID NO: 25)

15

MTSKFLLVSFILAALSLSLSTTFSLQPSCAKEVKSCCKGRCFERTFSNCRCDAAACVSLGNCCLDFQETCV  
 EPTHIWTCNKFRGCEKRLSRFVCSCADDCKTHNDCCINYSVCQDKKSWEETCESIDTPECPAEFE  
 SPPTLLFSLDGFRAEYLHTWGGLLPVISKLKNCGYTKNMRMPYPTKTFFPNHYSIVTGLYPESHGII  
 DNKMYDPKMNASFSLKSKEKFNPLWYKGQPIWVTANHQEVKSGTYFWPGSDVEIDGILPDIYKVYNG  
 SVPFEEERILAVLEWLQLPSHERPHFYTLYLEEPDSSGSHSGPVSSEVIKALQKVDRLVGMLMDGLKD  
 LGLDKCLNLILISDHGMEQGSCKKYVYLNKYLGDVNNVKVVGPAARLRPTDVPETYYSFNYEALAK  
 NLSCREPNQHFRPYLKPFLPKRLHFAKSDRIEPLTFYLDPQWQLALNPSEKRYCGSGFHGSDNLFNS  
 MQALFIGYGPAPFKHGAEVDSFENIEVYNLMCDLLGLIPAPNNGSHGSLNHLKKPIYNPSHPKEEGF  
 LSQCPIKSTSNLDGCTCDPWIVPIKDFEKQLNLTTEDVDDIYHMTVPYGRPRILLKQHRVCLLQQQQ  
 FLTGYSLDLLMPLWASYTFLSNDQFSRDDFSNCLYQDLRIPLSPVHKCSYYSKNSKLSYGFLTPPRL  
 NRVSNIHYSEALLTSNIVPMYQSFQVIWHYLHDTLLQRYAHERNGINVVSGPVDFDFYDGRYDSLEI  
 LKQNSRVIRSQEILIPTHFFIVLTSCKQLSETPLECSALESSAYILPHRPDNIESCTHKGRESSWE  
 ELLTLHRARVTDVELITGLSFYQDRQESVSELLRLKTHLPIFSQED**GSGSGS**MKWVTFLLLLFVSGS  
AFSRGVFRREAHKSEIAHRYNDLGEQHFKGLVLIAFSQYLQKCSYDEHAKLVQEVTDFAKTCVADES  
AANCDKSLHTLFGDKLCAIPNLRENYGELADCCTKQEPERNECFLQHKDDNPSLPPFERPEAEAMCT  
SFKENPTTFMGHYLHEVARRHPYFYAPELLYYAEQYNEILTQCCAEADKESCLTPKLDGVKEKALVS  
SVRQRMKCSSMQKFGERAFAKAWAVARLSQTFPNADFAEITKLATDLTKVNKECCHGDLLLECADDRAE  
LAKYMCENQATISSKLQTCCKPPLLKKAHCLSEVEHDTMPADLPAIAADFVEDQEVCKNYAEAKDVF  
LGTFLYEYSRRHPDYSVSLLLRLAKKYEATLEKCCAEANPPACYGTVLAEFQPLVEEPKNLVKTNCD  
LYEKLGEYGFQNAILVRYTQKAPQVSTPTLVEAARNLGRVGTKCCTLPEDQRLPCVEDYLSAILNRV  
CLLHEKTPVSEHVTKCCSGSLVERRPCFSALTVDETYVPKEFKAETFTFHSDICTLPEKEKQIKKQT  
ALAEVLKHKPKATAEQLKTMDDFAQFLDTCCKAADKDTCFSTEGPNLVTRCKDALARSWSHPPQFEK

Subrayado con dos líneas: NPP5; Sin formato: NPP1; **Negrita**: Espaciador; Subrayado con una línea: Albúmina

5 **Dominio Fc de IgG humana, Fc (SEQ ID NO: 26)**

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA  
 KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS  
 REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN  
 VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

**ALB (SEQ ID NO: 27)**

10

MKWVTFLLLLFVSGSAFSRGVFRREAHKSEIAHRYNDLGEQHFKGLVLIAFSQYLQKCSYDEHAKLV  
 QEVTDFAKTCVADESAANCDKSLHTLFGDKLCAIPNLRENYGELADCCTKQEPERNECFLQHKDDNP



SLPPFERPEAEAMCTSFKENPTTFMGHYLHEVARRHPYFYAPELLYYAEQYNEILTQCCAEADKESC  
 LTPKLDGVKEKALVSSVRQRMKCSSMQKFGERAFAKAWAVARLSQTFPNADFAEITKLATDLTKVNKE  
 CCHGDLLECAADDRALAKYMCENQATISSKLQTCCKPLLKHAHCLSEVEHDTMPADLPAIAADFVE  
 DQEVCKNYAEAKDVFLGTFLYEYSRRHPDYSVSLLLRLAKKYEATLEKCCAEANPPACYGTVLAEFQ  
 PLVEEPKNLVKTNCPLYEKLGEYGFQNAILVRYTQKAPQVSTPTLVEAARNLGRVGTKCCTLPEDQR  
 LPCVEDYLSAILNRVCLLHEKTPVSEHVTKCCSGSLVERRPCFSALTVDETYVPKEFKAETFTFHSD  
 ICTLPEKEKQIKKQTALAEVLVHKHPKATAEQLKTMDDFAQFLDTCKAADKDTCFSTEGPNLVTRC  
 KDALARSWSHPPQFEK

LIN (SEQ ID NO: 28)

GGSGGS (SEQ ID NO: 29)

5 RSGSGGS (SEQ ID NO: 30)

#### Ejemplo 1: Modelo en ratón de PXE de ENPP1-asj

10 Determinados polipéptidos de la invención (tales como ENPP1-Fc) se sometieron a ensayo en modelos de ratón de PXE y osteoartritis (OA). Los ratones con PXE presentan la mutación de pérdida de función en el transportador de membrana de paso múltiple ABCC6, de forma similar a los seres humanos con PXE. Se usaron ratones ANK como modelo de mamífero para la OA.

15 Las parejas reproductoras heterocigotas ENPP1-asj/+ se mantuvieron con la "dieta de aceleración" (TD00.442, Laboratorios Harlan, Madison WI) durante todo el experimento para generar parejas de hermanos ENPP1-WT y ENPP1-asj/asj que habían sido expuestos a la dieta de aceleración en el útero. Las camadas se genotiparon el día 8 y se destetaron el día 21. Tras el destete, las parejas de hermanos se dividieron en cohortes experimentales y todos los animales experimentales se mantuvieron con la dieta de aceleración hasta la finalización del estudio. Se administraron polipéptidos seleccionados de la invención a animales de estudio, como se describe en el presente  
 20 documento, y se analizan los huesos.

Como se ilustra en la FIG. 7, tanto los ratones con PXE como ANK tienen inicialmente un PPI bajo, un biomarcador que, según se publica en la bibliografía, explica la patogenia del PXE (Jansen, *et al.*, 2014, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 34:1985-1989).  
 25

Dos ratones con PXE se dosificaron durante una semana con ENPP1-Fc, y el PPI plasmático medio en estos animales aumentó hasta aproximadamente 4  $\mu$ M. Esto indica que la administración de los polipéptidos de la invención a mamíferos eleva sus niveles extracelulares de PPI y trata el PXE.

30 No se esperaba la capacidad del polipéptido para elevar el PPI, porque se pensaba que el mecanismo biológico del PPI bajo estaba asociado a las bajas concentraciones de ATP (Jansen, *et al.*, 2013, *PNAS USA* 110(50):20206-20211). De hecho, se propuso en la técnica anterior que la corrección del PPI plasmático en el PXE es suficiente para tratar la enfermedad (Jansen, *et al.*, 2013, *PNAS USA* 110(50):20206-20211). Basándose en la técnica anterior en el momento de la invención, un experto en la materia contemplaría que la enzima ENPP1 no es capaz de generar PPI en el contexto  
 35 del PXE debido a la falta de sustrato suficiente en el espacio extracelular. Como se demuestra en el presente documento, está claro que no es el caso.

#### Ejemplo 2:

40 Cuando se alimentan con una dieta de aceleración, los pesos diarios de los ratones ENPP1-asj/asj divergieron de los pares de hermanos WT el día 26, cuando los ratones ENPP1-asj/asj experimentaron un episodio de "retraso del crecimiento" y empezaron a perder peso (FIG. 1 A). Después del día 26, los animales ENPP1-asj/asj mostraron rigidez progresiva y reducciones de la actividad física. Todos los animales ENPP1-asj/asj murieron entre los días 35-71, con una mediana de esperanza de vida de 58 días (FIG. 1G). La presencia de calcificaciones en los ratones ENPP1-asj/asj  
 45 y ENPP1-WT se evaluó postmortem mediante exploraciones de micro-TC y secciones histológicas tomadas del corazón, aorta y riñones. Aproximadamente un tercio de los ratones ENPP1-asj/asj tenían calcificaciones visibles en el corazón y dos tercios tenían calcificaciones visibles en la aorta, mediante micro-TC (Tabla 2). Estos porcentajes aumentaron al 100 % tras el examen histológico, que también mostró que muchos de los animales tenían calcificaciones casi circunferenciales drásticas en sus paredes aórticas (FIG. 1D-1E). El examen histológico también  
 50 reveló que el 100 % de las arterias coronarias presentaban calcificaciones de la pared arterial y que el 70 % de los animales tenían zonas focales o confluentes de necrosis miocárdica compatibles con infarto de miocardio (FIG. 1F-1G). Por el contrario, los ratones ENPP1-WT no mostraron ninguna de estas anomalías. Estos resultados demuestran que el modelo animal recapitula la CAGI en seres humanos, que se caracteriza por calcificaciones prominentes de las

arterias grandes y medianas y un fallecimiento cardíaco.

Para producir ENPP1 recombinante soluble para su uso *in vivo*, se fusionó ENPP1 con el dominio Fc de IgG1 (en lo sucesivo en el presente documento denominado ENPP1-Fc, FIG. 2B) y la proteína de fusión se expresó en estirpes celulares estables de mamíferos (HEK293). El efecto combinado de cambiar la expresión de la proteína de células de insecto a células de mamífero y la fusión de ENPP1 con el dominio Fc de la IgG1 alteró la cinética de Michaelis-Menten al aumentar la afinidad de ENPP1 por el sustrato ATP en más de dos órdenes de magnitud, reduciendo al mismo tiempo la  $K_{cat}$  en un factor de 3-4 (FIG. 2C-2E). Se observó que la actividad de la ENPP1-Fc disminuía durante un período de 30 días cuando se almacenaba a 4 °C, pero la enzima podía congelarse a -80 °C y conservar una actividad casi completa tras descongelarse (FIG. 2C). Por lo tanto, la enzima se almacenó como solución madre congelada después de la purificación hasta que se necesitó.

Tras la purificación, ENPP1-Fc se dializó en PBS complementado con Zn y Mg (PBS<sub>plus</sub>) concentrado a entre 5 y 7 mg/ml, y se congeló a -80 °C en alícuotas de 200-500 µl. Las alícuotas se descongelaron inmediatamente antes de su uso y la actividad específica de la solución se ajustó a 31,25 ua/ml (o aproximadamente 0,7 mg/ml dependiendo de la preparación) mediante dilución en PBS<sub>plus</sub>.

La dosificación se realizó de acuerdo con las unidades de actividad (ua) por kg de peso del animal para tener en cuenta las variaciones de la actividad específica en las diferentes preparaciones de proteínas. La actividad específica de la enzima varió con cada preparación proteínica, y debido a que se observó que la respuesta clínica dependía en gran medida de la actividad específica de la enzima, se rechazaron las preparaciones de proteínas con actividades específicas inferiores a 40 ua/mg. Para establecer los niveles iniciales de dosificación para el estudio de prueba de concepto, los ensayos de escalado de dosis se realizaron en un número limitado de animales (1-2 por nivel de dosis). Se usaron tanto la versión humana como la de ratón de ENPP1 en los ensayos de escalado de dosis, el estudio de prueba de concepto se realizó con la isoforma de ratón de ENPP1-Fc (mENPP1-Fc). Se dosificaron ratones ENPP1-asj/asj a diario en el 14.º día de vida con inyecciones subcutáneas de mENPP1-Fc y semanalmente con inyecciones intraperitoneales (I.P.) de GK 1,5, este último añadido para minimizar el rechazo inmunitario de la proteína recombinante. Las dosis subcutáneas de mEnpp1-Fc a 500 ua/kg C.D. demostraron una fuerte respuesta temprana en el peso con una ausencia de la crisis de "retraso de crecimiento" observada en los animales ENPP1-asj/asj no dosificados.

Basándose en los resultados de los ensayos de escalado de dosis, una cohorte de 8 animales NPP1 -asj/asj se dosificó con mNPP1-Fc a 500 ua/kg C.D. e inyecciones semanales IP con GK1,5 (FIG. 3). Un grupo de control (NPP1-WT + vehículo y NPP1-asj/asj + vehículo) se dosificó a diario con vehículo y semanalmente con GK1,5 de forma idéntica a la cohorte dosificada, y la duración del estudio se acortó a 55 días. Los 8 animales ENPP1-asj/asj tratados sobrevivieron los 55 días del ensayo, con una respuesta clínica espectacular observada en los tratados, mientras que la mediana de esperanza de vida de los animales NPP1 asj/asj sin tratar disminuyó de 58 a 37 días en el ensayo terapéutico, quizás como resultado las inyecciones semanales IP del inmunosupresor GK1,5. Los animales ENPP1-asj/asj sin tratar también experimentaron un retraso de crecimiento el día 26 de crisis, caracterizado por pérdida de peso y limitación de la movilidad que progresa de forma variable hasta la parálisis y la muerte en los 30 días siguientes. Todos los animales ENPP1-asj/asj sin tratar, excepto uno, murieron a lo largo de los 55 días del ensayo, mientras que, por el contrario, todos los ratones ENPP1-asj/asj tratados ganaron un peso comparable al de los ratones ENPP1-WT y no mostraron signos de movilidad o rigidez reducidas.

Al finalizar el estudio, el 100 % de los ratones ENPP1 -asj/asj tratados con vehículo mostraron calcificaciones en el corazón, aortas y arterias coronarias, y el 77 % de los animales mostraron evidencia histológica de infracción miocárdica (Tabla 1). En la mayoría de los casos, esto adoptó la forma de pequeñas áreas de necrosis celular miocárdica y desprendimiento en las proximidades de las calcificaciones cardíacas (FIG. 3C-3D, FIG. 4C-4E), pero en dos animales (22 %) se produjeron grandes infartos de miocardio de grosor total en la pared libre del ventrículo derecho (FIG. 4C-4D).

La fibrosis miocárdica en el tejido miocárdico adyacente a las calcificaciones de las arterias coronarias fue un hallazgo común (FIG. 4E), lo que ilustra que la isquemia debida a la calcificación de las arterias coronarias probablemente sea la causa de la enfermedad miocárdica. Por el contrario, ninguno de los animales ENPP1-asj/asj tratados con ENPP1-Fc mostró signos cardíacos, arteriales o calcificación aórtica en la histología o micro-TC postmortem (Tabla 1 y FIG. 3D y 4D).

Además de la supervivencia, los pesos diarios de los animales y la histología terminal, también se evaluó la respuesta al tratamiento mediante exploraciones de micro-TC de alta resolución postmortem para obtener imágenes de las calcificaciones vasculares, concentraciones plasmáticas de [PpI] y captación de Tc99 PpI (<sup>99m</sup>PYP) (FIG. 5 y Tabla 1). La respuesta bioquímica y fisiológica fue completa según se midió mediante todos estos parámetros. En ninguno de los animales WT o ENPP1-asj/asj tratados se observaron calcificaciones vasculares mediante micro-TC, a diferencia de las calcificaciones drásticas observadas en las aortas, las arterias coronarias y los corazones de la cohorte de ENPP1-asj/asj sin tratar (FIG. 5 A.). Además, las concentraciones séricas de PpI de los animales ENPP1-asj/asj tratados se elevaron por encima de las de los animales WT (aproximadamente 30 µM en los ENPP1-asj/asj tratados frente a aproximadamente 10 µM en los WT), y muy por encima de los niveles de los ENPP1-asj/asj sin tratar (<

0,5  $\mu\text{M}$ ) (FIG. 5B). Además, las concentraciones séricas de PPI de los animales ENPP1-asj/asj tratados (aproximadamente 30  $\mu\text{M}$ ) se elevaron muy por encima de los niveles de ENPP1-asj/asj sin tratar ( $< 0,5 \mu\text{M}$ ), y por encima de los de los animales WT (aproximadamente 10  $\mu\text{M}$ ) (FIG. 5B).

- 5 Se usó  $^{99\text{m}}\text{PYP}$ , un agente de formación de imágenes normalmente empleado en la formación de imágenes cardíacas y el remodelado óseo, como marcador de la respuesta al tratamiento porque cabría esperar que la captación de  $^{99\text{m}}\text{PYP}$  en animales que carecen de ENPP1 funcional aumentara, ya que se esperaba que tuvieran menos [PPI] plasmático y más sitios de unión de PPI "abiertos" en los sitios de mineralización ectópica.
- 10 Para someter a ensayo esta hipótesis, se realizaron la formación de imágenes de  $^{99\text{m}}\text{PYP}$  *in vivo* semanalmente en animales ENPP1-WT y ENPP1-asj/asj sin dosificar para detectar diferencias en la captación de PYP entre los pares de hermanos (FIG. 5C-5D). El análisis de la captación de  $^{99\text{m}}\text{PYP}$  se limitó a la cabeza, que se compone tanto de hueso endocranial (cráneo) como de tejido blando (vibrisas), que son lugares conocidos de calcificación ectópica en modelos de ratón de esta CAGI. Además, el análisis se limitó a la cabeza para simplificar la recogida de datos, ya que la cabeza no se solapa con órganos internos que muestren una captación transitoria de  $^{99\text{m}}\text{PYP}$  (tales como la vejiga, el corazón y el diafragma) durante la rotación de  $180^\circ$  de la cámara que se produce durante la recogida de datos.

- Las formaciones de imágenes en serie semanales de animales ENPP1-WT y ENPP1-asj/asj sin tratar demostraron que el porcentaje de captación de la dosis inyectada de  $^{99\text{m}}\text{PYP}$  en los cráneos era mayor en los animales ENPP1-asj/asj que en los ENPP1-WT y que los cambios en la captación de  $^{99\text{m}}\text{PYP}$  dentro de los grupos experimentales no variaron significativamente a lo largo del estudio (FIG. 5C-5D). La captación de  $^{99\text{m}}\text{PYP}$  en animales ENPP1-asj/asj tratados y sin tratar se comparó en dos momentos: los días 30-35 y al final del estudio (días 50-65). La comparación de estos grupos experimentales demuestra que el tratamiento con ENPP1-Fc devolvió la captación de  $^{99\text{m}}\text{PYP}$  en ratones CAGI a los niveles WT (FIG. 5E-5F), lo que sugiere que el tratamiento con ENPP1-Fc es capaz de anular la mineralización tisular y craneal desregulada en ratones ENPP1-asj/asj saturando los sitios de unión de PPI abiertos con PPI "frío", que presumiblemente tiene su origen en el aumento de las concentraciones plasmáticas de PPI inducidas por el agente terapéutico.

**Tabla 1: Patología Cardiovascular, Estudio de prueba de concepto**

	WT+Vehículo	asj/asj+vehículo	asj/asj+mENPP1-Fc
Calcificaciones del corazón (TC/Histología)	0/0	55 %/100 %	0/0
Calcificaciones de la aorta (TC/Histología)	0/0	66 %/100 %	0/0
Calcificaciones en arterias coronarias (TC/histología)	0/0	43 %/100 %	0/0
% de infarto de miocardio (Histología)	0/0	77 %	0

**Tabla 2: Patología Cardiovascular, Estudio de historia natural**

	WT	asj/asj
% de calcificaciones en el corazón (TC/histología)	0/0	37 %/100 %
Calcificaciones en la aorta (TC/histología)	0/0	62 %/100 %
Calcificaciones en arterias coronarias (Histología)	0/0	100 %
% de infarto de miocardio (Histología)	0	70 %

### Ejemplo 3: Expresión de la proteína de fusión de albúmina

- 35 La albúmina sérica humana (HSA), una proteína de 585 aminoácidos, es responsable de una proporción importante de la presión osmótica del suero y también actúa como portador de ligandos endógenos y exógenos. En la actualidad, la HSA para uso clínico se produce por extracción de sangre humana. La producción de HSA recombinante (rHSA) en microorganismos se ha divulgado en los documentos EP 0 330 451 y EP 0 361 991.
- 40 La función de la albúmina como molécula portadora y su naturaleza inerte son propiedades deseables para su uso como estabilizador y transportador de polipéptidos. El uso de la albúmina como componente de una proteína de fusión para estabilizar otras proteínas se ha divulgado en los documentos WO 93/15199, WO 93/15200 y EP 0 413 622. También se ha divulgado el uso de fragmentos N-terminales de HSA para fusiones a polipéptidos (documento EP 0 399 666). La fusión con el polipéptido se consigue mediante manipulación genética, de manera que el ADN que codifica la HSA, o un fragmento del mismo, se une al ADN que codifica el polipéptido. Después, un hospedador adecuado se transforma o transfecta con las secuencias de nucleótidos fusionadas, dispuestas en un plásmido adecuado para

expresar un polipéptido de fusión. Nomura, *et al.*, 1995, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 59(3): 532-4 intentaron expresar la apolipoproteína E humana en *S. cerevisiae* como proteína de fusión con HSA o fragmentos de HSA, usando la presecuencia de HSA para dirigir la secreción. Mientras que la fusión con HSA de longitud completa dio como resultado la secreción de niveles bajos de la proteína en el medio (rendimiento máximo de 6,3 mg por litro), la fusión con HSA (1-198) o HSA (1-390) no dio como resultado la secreción en el medio.

La albúmina sérica humana puede ser una variante de la HSA normal (denominada en lo sucesivo "HSA"). Como se usan en el presente documento, las "variantes" incluyen inserciones, supresiones y sustituciones, conservadoras o no conservadoras, cuando dichos cambios no alteran sustancialmente una o más de las propiedades oncóticas, de unión a ligandos útiles y no inmunogénicas de la albúmina. En particular, "variantes" incluye variantes polimórficas de origen natural de la albúmina humana y fragmentos de albúmina humana, por ejemplo, aquellos fragmentos divulgados en el documento EP 0 322 094 (en concreto, HA (1-n), donde n es de 369 a 419). La albúmina o la hormona del crecimiento (GH) pueden proceder de cualquier vertebrado, especialmente cualquier mamífero, por ejemplo, ser humano, vaca, oveja, cerdo, gallina o salmón. Las partes de albúmina y GH de la fusión pueden proceder de distintos animales.

Por "sustituciones conservadoras" se entiende intercambios dentro de grupos tales como Gly/Ala; Val/Ile/Leu; Asp/Glu; Asn/Gln; Ser/Thr; Lys/Arg; y Phe/Tyr. La variante tiene por lo general al menos un 75 % (tal como al menos un 80 %, 90 %, 95 % o 99 %) de identidad de secuencia con una longitud de HSA normal que tenga la misma longitud que la variante y que sea más idéntica a ésta que cualquier otra longitud de HSA normal, una vez que se permitieron las supresiones e inserciones habituales en esta técnica. En general, una variante de HSA tiene una longitud mínima de 100 aminoácidos, en algunos aspectos de la divulgación al menos 150 aminoácidos de longitud. La variante de HSA puede consistir en o consistir en al menos un dominio completo de HSA, por ejemplo, los dominios 1 (1-194), 2 (195-387), 3 (388-585), 1+2 (1-387), 2+3 (195-585) o 1+3 (1-194,+388-585). Cada dominio se compone a su vez de dos subdominios homólogos, en concreto, 1-105, 120-194, 195-291, 316-387, 388-491 y 512-585, con regiones enlazadoras flexibles entre subdominios que comprenden los restos Lys106 a Glu199, Glu292 a Val315 y Glu492 a Ala511. En algunos aspectos de la divulgación, la parte de HSA de la fusión de NPP1 comprende al menos un subdominio o dominio de HA o modificaciones conservadoras de los mismos.

Se conocen muchos sistemas de expresión, incluyendo 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 forma convencional, 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 de cualquiera de las formas habituales, por ejemplo, electroporación. Se divulgan métodos de transformación de levaduras por electroporación en Becker y Guarente, 1990, *Methods Enzymol.* 194:182. Las células transformadas con éxito, es decir, las células que contienen una construcción de ADN de la presente invención, pueden identificarse mediante técnicas bien conocidas. Por ejemplo, las células resultantes de la introducción de una construcción de expresión pueden cultivarse para producir el polipéptido deseado. Las células pueden recogerse y lisadas y su contenido de ADN puede examinarse para determinar para la presencia del ADN usando un método, tal como el descrito por Southern, 1975, *J. Mol. Biol.* 98:503 y/o Berent, *et al.*, 1985, *Biotech* 3:208. Como alternativa, la presencia de la proteína en el sobrenadante puede detectarse usando anticuerpos.

Los vectores plasmídicos de levadura útiles incluyen pRS403-406 y pRS413-416, que generalmente están disponibles en Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA, EE.UU. Los plásmidos pRS403, pRS404, pRS405 y pRS406 son plásmidos integradores de levadura (Yip) e incorporan los marcadores seleccionables de levadura HIS3, TRP1, LEU2 y URA3. Los plásmidos pRS413-416 son plásmidos de centrómero de levadura (YCp).

Se ha desarrollado una diversidad de métodos para unir operativamente el ADN a los vectores mediante extremos cohesivos complementarios. Por ejemplo, pueden añadirse tractos homopoliméricos complementarios al segmento de ADN que se ha de insertar en el ADN vectorial. Después, el vector y el segmento de ADN se unen mediante enlaces 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 mediante digestión de restricción por endonucleasas, se trata con ADN polimerasa del bacteriófago T4 o ADN polimerasa I de *E. coli*, que son enzimas que eliminan las protuberancias, extremos 3' monocatenarios con sus actividades 3'-5'-exonucleolíticas, y rellenan los extremos 3' rebajados con sus actividades polimerizadoras.

Por lo tanto, la combinación de estas actividades genera segmentos de ADN romos. Después, los segmentos romos se incuban con un gran exceso molar de moléculas enlazadoras en presencia de una enzima capaz de catalizar la ligadura de moléculas de ADN romas, tal como la ADN ligasa del bacteriófago T4. Por lo tanto, los productos de la reacción son segmentos de ADN que llevan secuencias enlazadoras poliméricas en sus extremos. Estos segmentos de ADN se escinden después con la enzima de restricción adecuada y se ligan a un vector de expresión que se ha

escindido con una enzima que produce extremos compatibles con los del segmento de ADN.

Existen enlazadores sintéticos que contienen una diversidad de sitios de endonucleasas de restricción disponibles en el mercado en diversas fuentes, incluyendo International Biotechnologies Inc, New Haven, CT, EE.UU.

Una forma deseable de modificar el ADN de acuerdo con la invención, si, por ejemplo, se han de preparar variantes de HA, es usar la reacción en cadena de la polimerasa como divulgó Saiki, *et al.*, 1988, *Science* 239:487-491. En este método, el ADN que ha de amplificarse enzimáticamente está flanqueado por dos cebadores oligonucleotídicos específicos que se incorporan al ADN amplificado. Los cebadores específicos pueden contener sitios de reconocimiento de endonucleasas de restricción que pueden usarse para clonar en vectores de expresión usando métodos conocidos en la técnica.

#### ***Diseño de ENPP1-ALB:***

NPP1 modificada humana y de ratón (Humana: Registro del NCBI NP\_006199; Ratón: Registro del NCBI NP\_03839) modificada para expresar proteína recombinante soluble, se fusiona con albúmina sérica humana (HSA) mediante subclonación en plásmidos pFUSE (InvivoGen, San Diego CA), respectivamente.

#### ***Producción de proteínas:***

**Matraces agitadores:** Se establecen transfecciones estables del ENPP1-ALB en células HEK293 con selección con zeocina, y se pueden adaptar células HEK293 adherentes para su crecimiento en suspensión. Las células adaptadas se usan para sembrar cultivos líquidos en medio FreeStyle (Gibco N.º 12338-018) en matraces agitadores a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub>, agitado a 120 rpm con alta humedad. El cultivo se amplía gradualmente hasta alcanzar el volumen diana deseado y después se mantiene durante otros 12 días para acumular proteínas extracelulares. Durante la fase de mantenimiento, los cultivos se complementan con CD EfficientFeed C AGT (Gibco N.º A13275-05) para aumentar la producción de proteínas.

**Biorreactor.** Las células se propagan en un biorreactor de 10 litros equipado con oxígeno disuelto y control de pH. El oxígeno disuelto se mantiene al 40 % de saturación de aire suministrando al cultivo una mezcla de aire y oxígeno no superior a 3 litros por minuto a una velocidad de agitación de 80 RPM. El pH se controla a 7,4 inyectando CO<sub>2</sub> cuando el pH es superior a 7,4. El crecimiento del cultivo se sigue midiendo el número de células, la viabilidad celular, las concentraciones de glucosa y lactato.

#### ***Purificación de proteínas:***

Los cultivos líquidos se centrifugan a 4300 x g durante 15 min y los sobrenadantes se filtran a través de una membrana de 0,2 µm y se concentran mediante flujo tangencial usando un casete Pellicon®3 0,11 m<sup>2</sup> Ultracell® 30 kD (Millipore, Billerica MA). El sobrenadante concentrado se carga en una columna de proteína-AG y puede eluirse con un tampón que comprende citrato de sodio 50 mM, NaCl 150 mM, ZnCl<sub>2</sub> 3 mM, CaCl<sub>2</sub> 3 mM, pH=3,5. Las fracciones que contienen actividad enzimática se agrupan y se dializan con tampón IX PBS pH 7,4, ZnCl<sub>2</sub> 11 µM, CaCl<sub>2</sub> 20 µM, después se concentran a 6 mg/ml, se distribuyen en pequeñas alícuotas y se almacenan a -80 °C.

Las muestras de proteínas resultantes se someten a ensayo con el kit de cuantificación de endotoxinas Pierce LAL Chromogenic Endotoxin Quantitation Kit (cat. 88282) para verificar que todas están exentas de endotoxinas.

#### ***Enzimología***

La proteína de fusión NPP1-albúmina después de la purificación se caracteriza siguiendo los protocolos experimentales analizados en los Ejemplos 1 y 2, descritos en otra parte del presente documento.

## REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido ecto-nucleótido pirofosfato/fosfodiesterasa-1 (NPP1) soluble de fórmula:  
PROTEÍNA-Z-DOMINIO,  
5 en donde  
la PROTEÍNA comprende el dominio enzimático NPP1 de una proteína NPP1 humana, en donde la proteína NPP1 humana comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 1 ausente en los dominios citosólico y transmembrana;  
en donde el DOMINIO comprende el dominio Fc de la IgG1 humana;  
10 en donde Z es la secuencia de aminoácidos LIN; y  
el polipéptido carece de un dominio dirigido al hueso con carga negativa.
2. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1, en donde PROTEÍNA-Z-DOMINIO comprende:  
la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16 que comienza con FTAGLKPSCAKE como se indica por \*\* en la SEQ ID NO: 16 donde F es el resto número 93, o  
15 la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 18 que comienza con GLKPSCAKE como se indica por el doble subrayado en la SEQ ID NO: 18 donde G es el resto número 23, o  
la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 20 que comienza con PSCAKE como se indica por el doble subrayado en la SEQ ID NO: 20 donde P es el resto número 23.
3. Una composición que comprende un polipéptido de fusión ecto-nucleótido pirofosfato/fosfodiesterasa-1 (NPP1) -Fc de IgG1 soluble que comprende:  
NPP1-LIN-Fc soluble como se expone en la SEQ ID NO: 16, donde la escisión en la posición indicada \*\* con respecto a la SEQ ID NO: 16 identifica el extremo N del polipéptido de fusión; o  
25 NPP1-LIN-Fc soluble como se expone en la SEQ ID NO: 18, donde la secuencia líder identificada como restos 1-MRGPVLLTV ALATLLAPGA GA de la SEQ ID NO: 18 está ausente; o  
NPP1-LIN-Fc soluble como se expone en la SEQ ID NO: 20, donde la secuencia líder identificada como 1-MRGPVLLTV ALATLLAPGA GA de la SEQ ID NO: 20 está ausente;  
y en donde el polipéptido de fusión NPP1-Fc carece de un dominio dirigido al hueso con carga negativa.
- 30 4. Una composición que comprende células de mamífero transfectadas de forma estable que comprenden una secuencia nucleotídica que codifica el polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3.
5. Una composición que comprende células de mamífero transfectadas de forma estable que comprenden una secuencia nucleotídica que codifica un polipéptido de fusión ecto-nucleótido pirofosfato/fosfodiesterasa-1 (NPP1) -Fc de fórmula:  
PROTEÍNA-Z-DOMINIO que comprende la SEQ ID NO: 16 y expresa una forma soluble del polipéptido de fusión que tiene un extremo N que comienza con FTAGLKPSCAKE y se genera mediante escisión en la posición indicada \*\* con respecto a la SEQ ID NO: 16, o  
40 PROTEÍNA-Z-DOMINIO que comprende la SEQ ID NO: 18 y que expresa una forma soluble del polipéptido de fusión que tiene un extremo N que comienza con GLKPSCAKE como resultado de la escisión para eliminar la secuencia líder identificada como 1-MRGPVLLTV ALATLLAPGA GA de la SEQ ID NO: 18, o  
PROTEÍNA-Z-DOMINIO que comprende la SEQ ID NO: 20 y expresa una forma soluble del polipéptido de fusión que tiene un extremo N que comienza con PSCAKE como resultado de la escisión para eliminar la secuencia líder identificada como 1-MRGPVLLTV ALATLLAPGA GA de la SEQ ID NO: 20,  
45 y en donde el polipéptido de fusión NPP1-Fc carece de un dominio dirigido al hueso con carga negativa.
6. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 4-5, en donde dichas células de mamífero son células HEK293.
- 50 7. Un método de expresión de un polipéptido ecto-nucleótido pirofosfato/fosfodiesterasa-1 (NPP1) soluble, comprendiendo el método cultivar la composición de acuerdo con la reivindicación 5 o 6 en condiciones que permiten la expresión del polipéptido codificado por la secuencia nucleotídica.
8. El método de la reivindicación 7, que comprende además purificar el polipéptido del sobrenadante de las células de mamífero cultivadas.
- 55 9. El polipéptido NPP1 soluble purificado mediante el método de la reivindicación 8.
10. Una composición farmacéutica que comprende el polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 o la reivindicación 9 y un portador farmacéuticamente aceptable.
- 60 11. El polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 o 9 o la composición farmacéutica de la reivindicación 10 para su uso en el tratamiento de al menos una de entre Calcificación arterial generalizada de la infancia (CAGI), Enfermedad renal crónica (ERC), Enfermedad renal terminal (ERT), Calcificación arterial infantil idiopática (CAII), Osificación del ligamento longitudinal posterior (OLLP), raquitismo hipofosfatémico, calcificación de las placas ateroscleróticas, Pseudoxantoma elástico (PXE), formas hereditarias y no hereditarias de osteoartritis,
- 65

espondilitis anquilosante, endurecimiento de las arterias que se produce con el envejecimiento y calcifilaxis.

5 12. El polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 o 9 o la composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 10 para su uso en el tratamiento de la Calcificación arterial generalizada de la infancia (CAGI) o el Pseudoxantoma elástico (PXE).

10 13. El polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 o 9 o la composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 10 para su uso en el tratamiento de un sujeto que tiene una mutación de pérdida de función en ENPP1.

14. El polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 o 9 o la composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 10 para su uso en el tratamiento de un sujeto que tiene una mutación de pérdida de función en ABCC6.

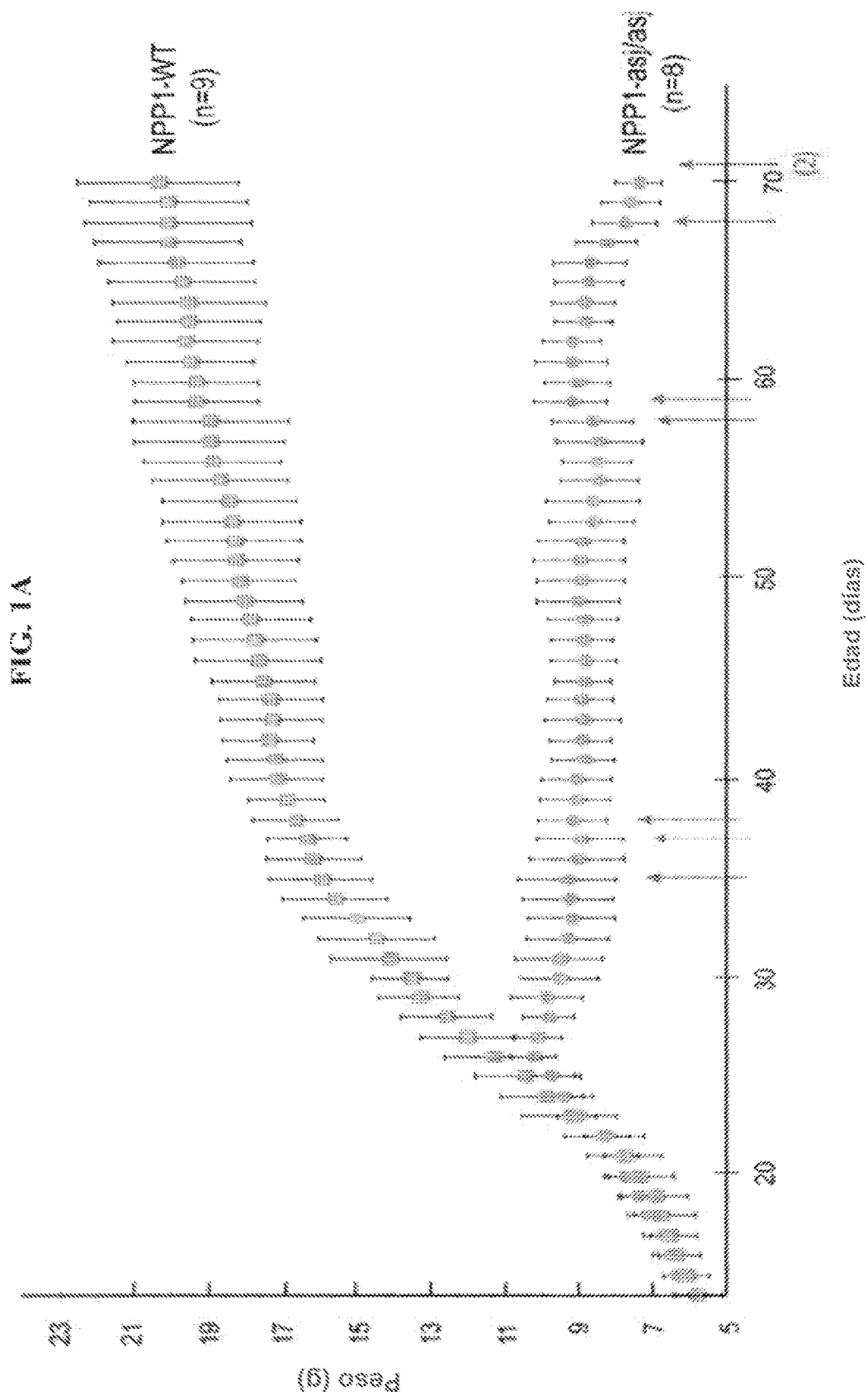




FIG. 1B

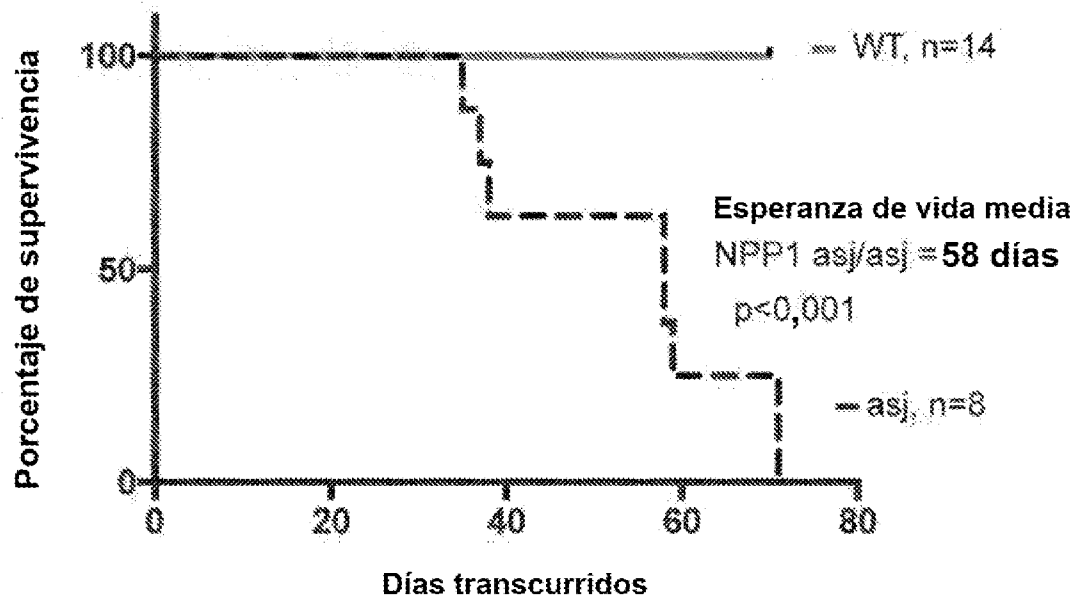


FIG. 1C

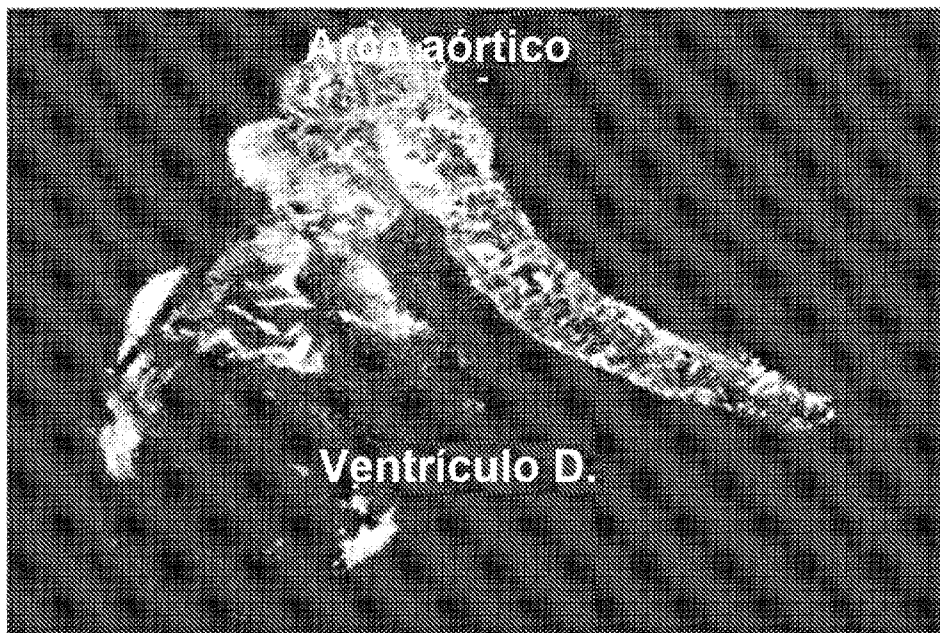


FIG. 1D

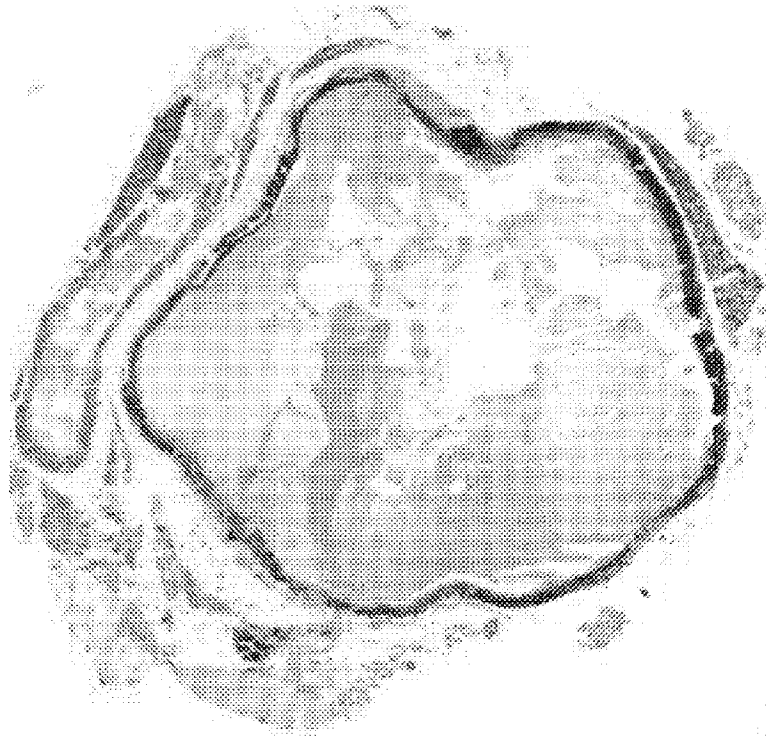


FIG. 1E

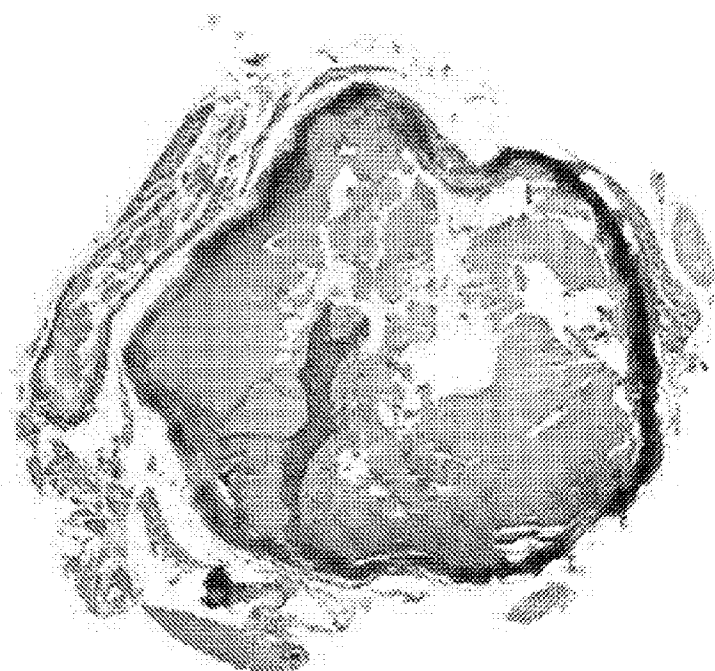
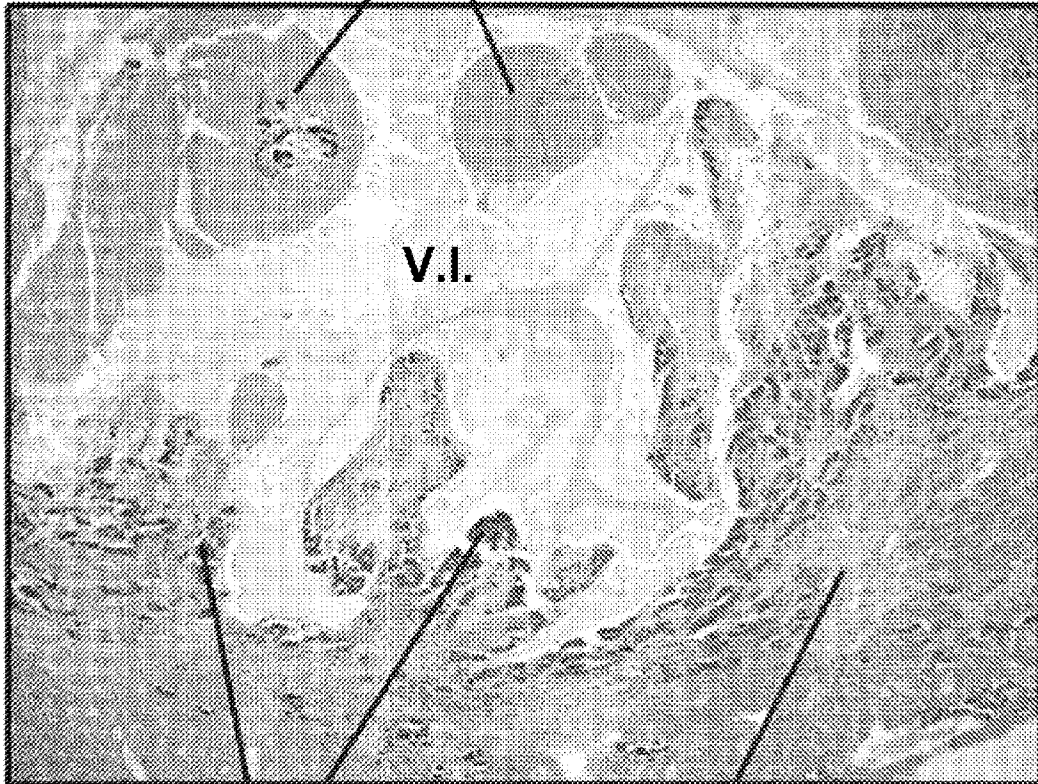


FIG. 1F

**Músculo papilar**



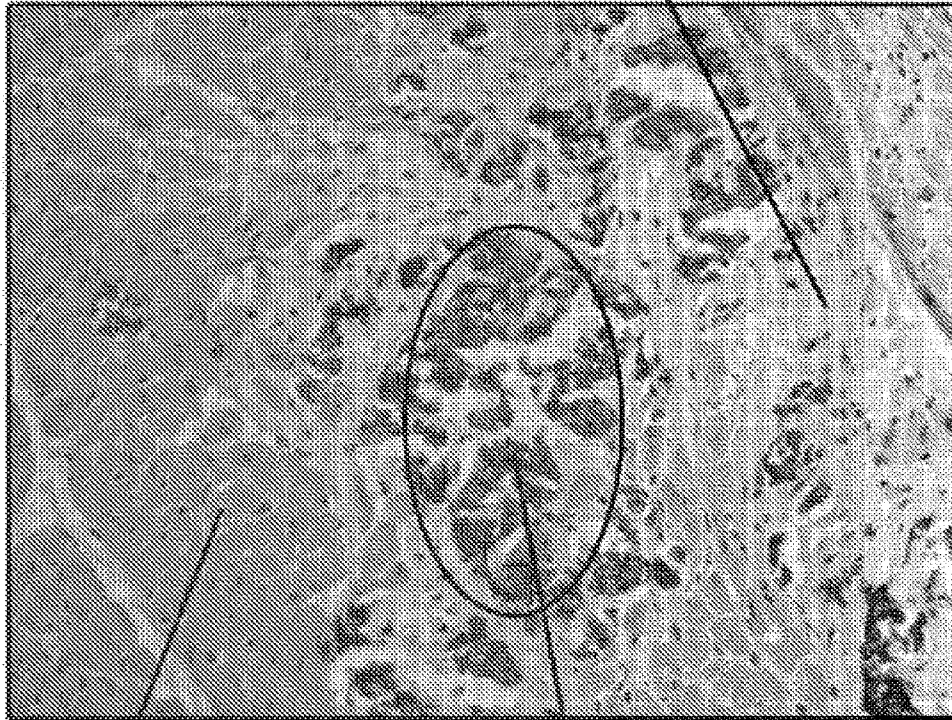
**V.I.**

**Calcificaciones**

**Tejido cicatricial**

FIG. 1G

**Tejido cicatricial**



**Miocardio  
normal**

**Calcificaciones**

FIG. 2A

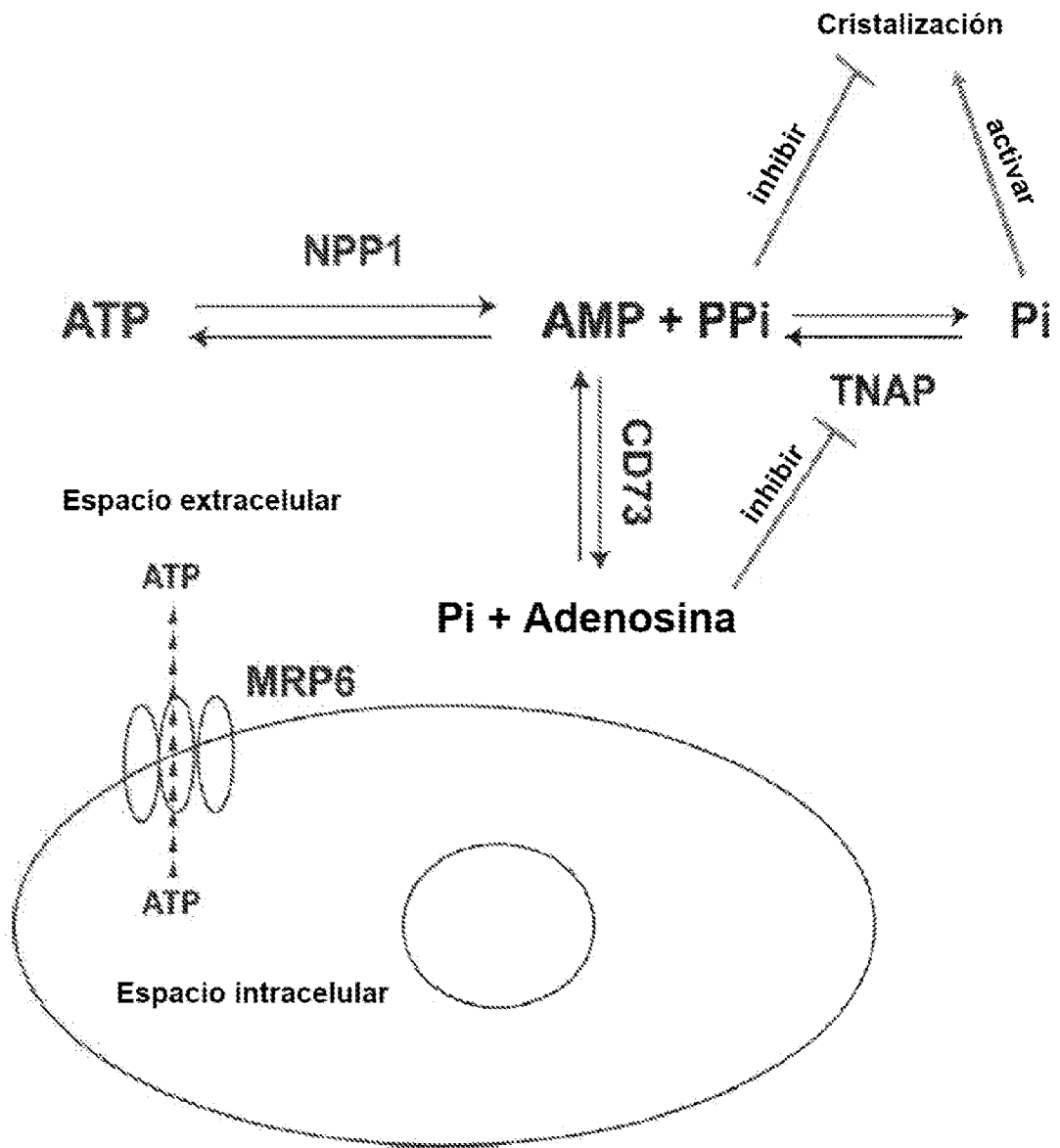


FIG. 2B

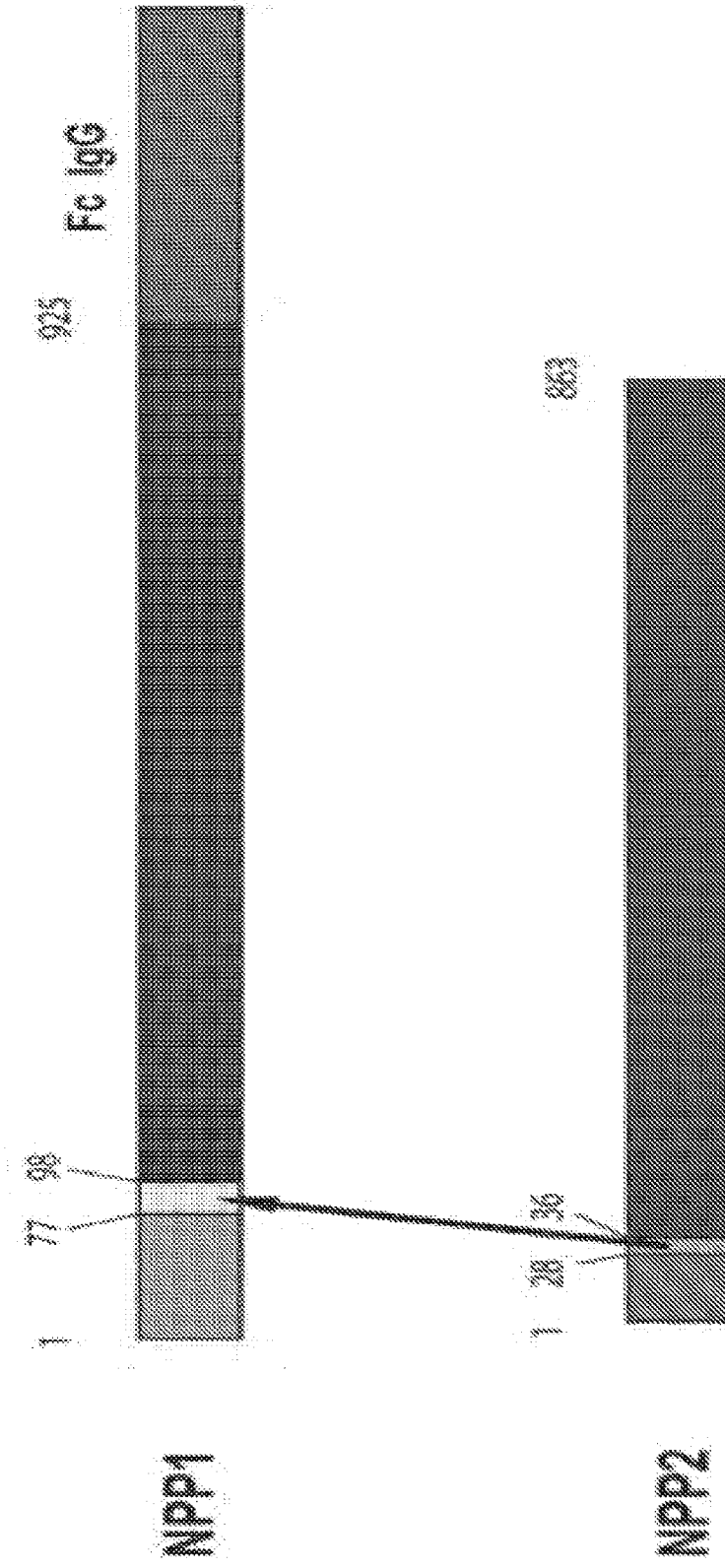


FIG. 2C

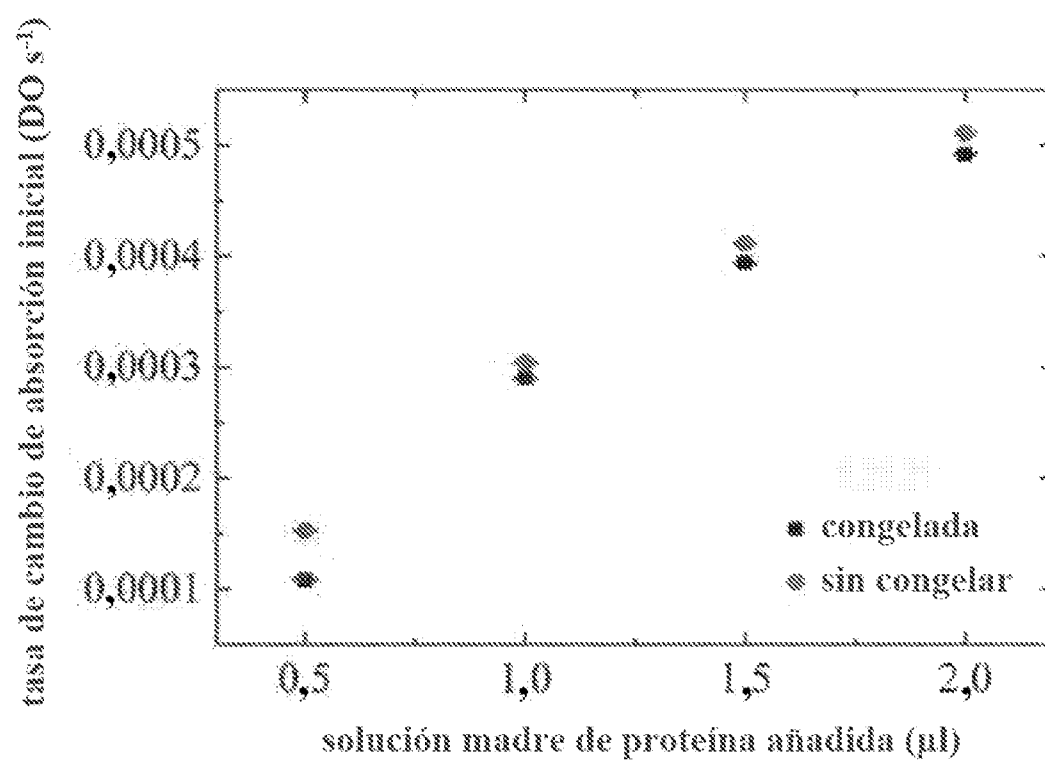


FIG. 2D

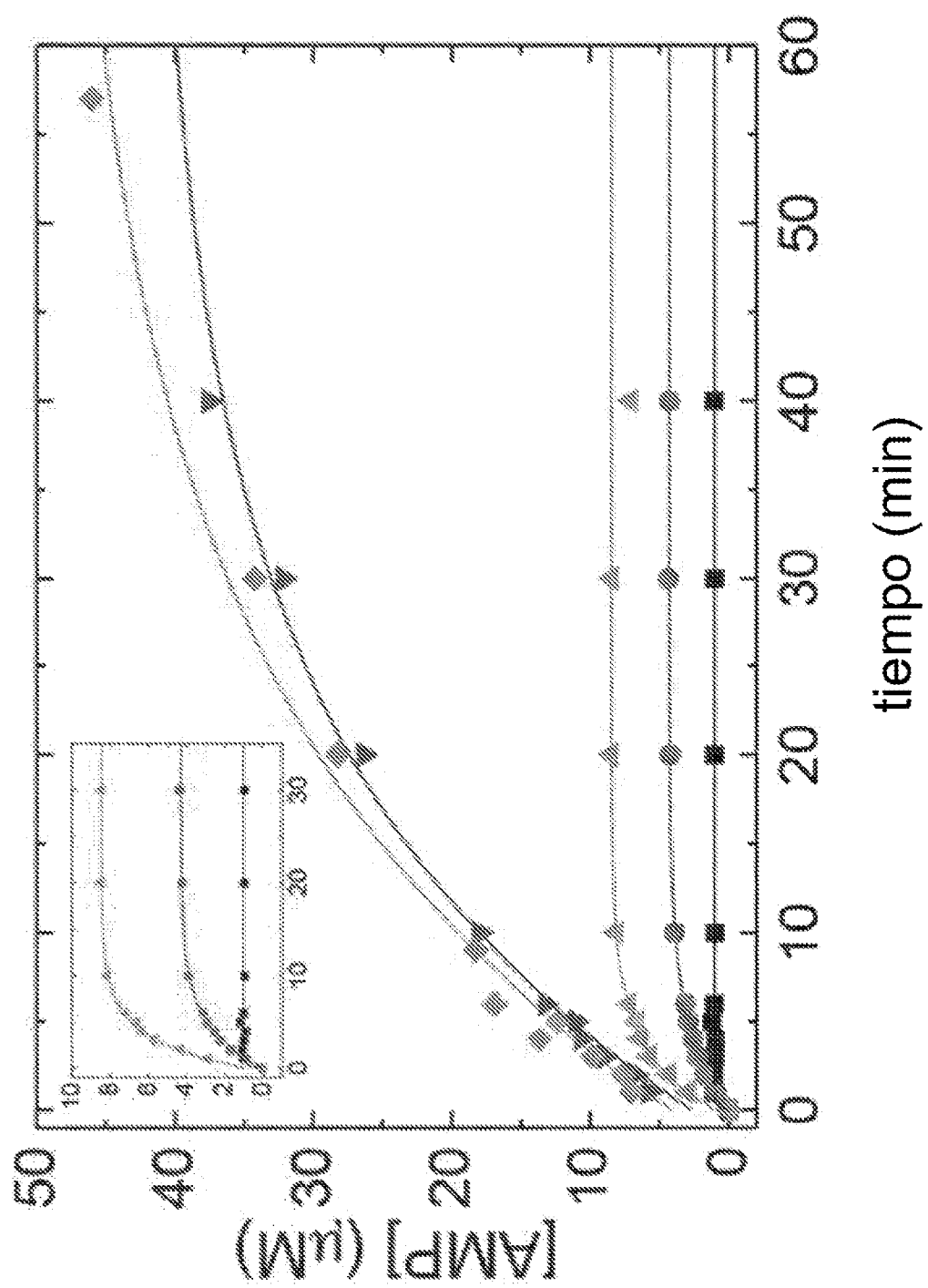




FIG. 2E

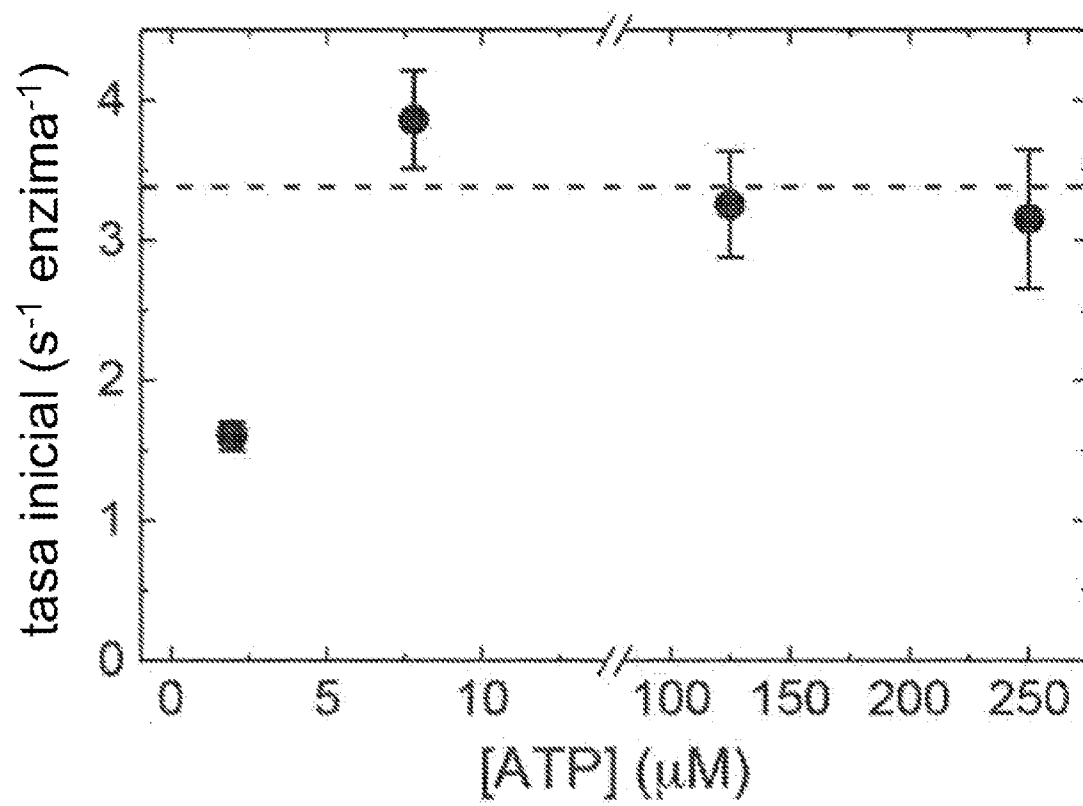


FIG. 3A

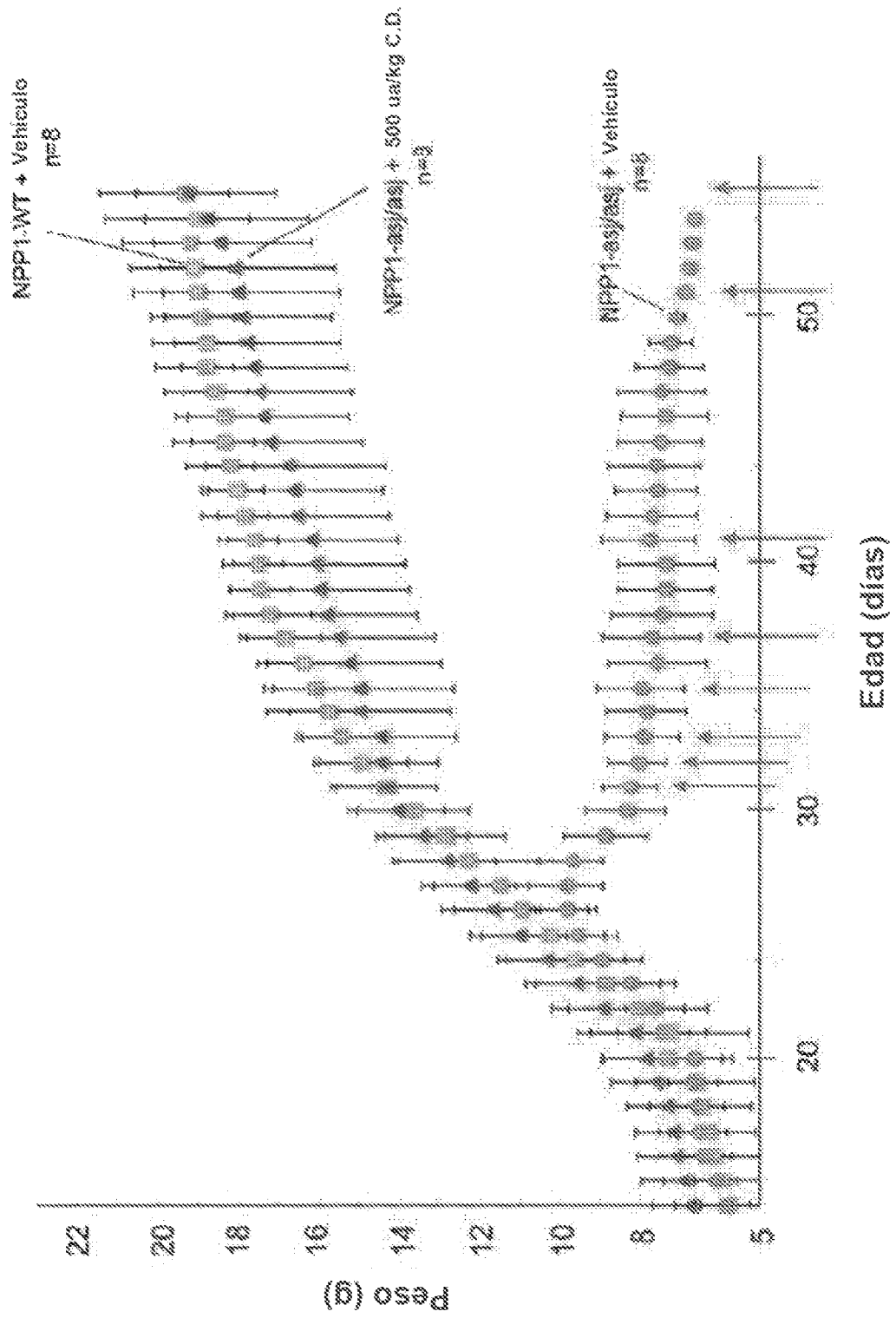


FIG. 3B

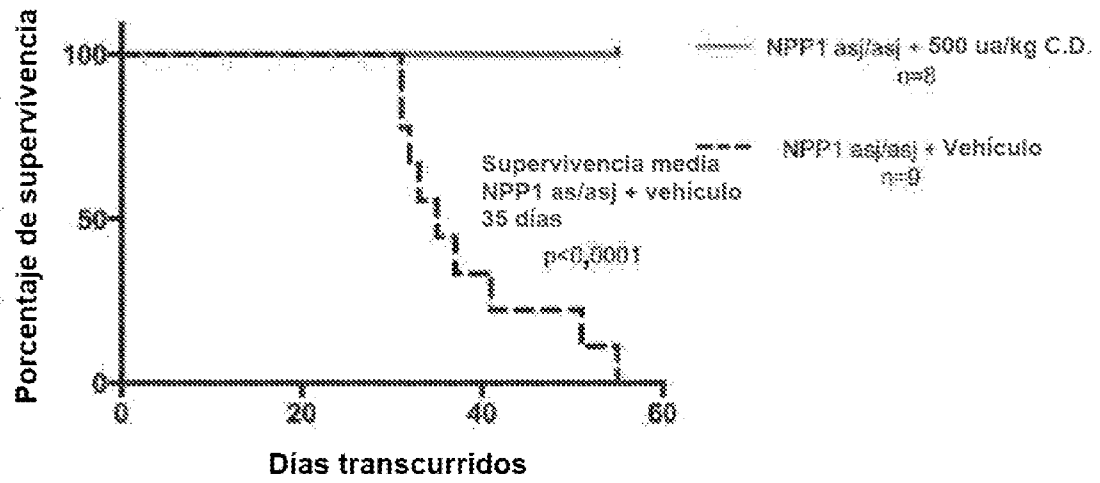


FIG. 3C

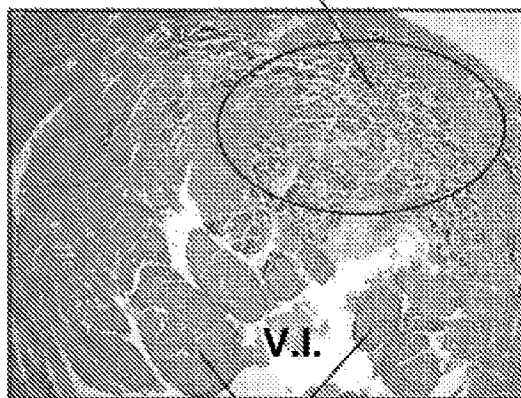


FIG. 3D

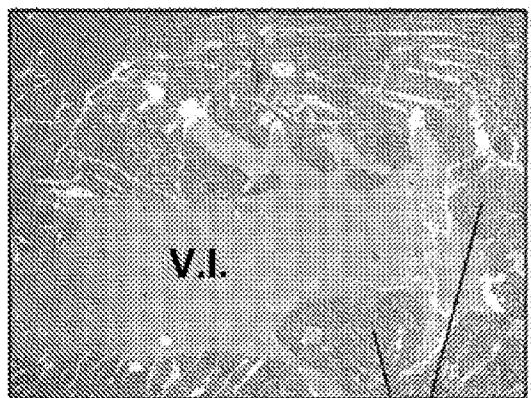


FIG. 4A

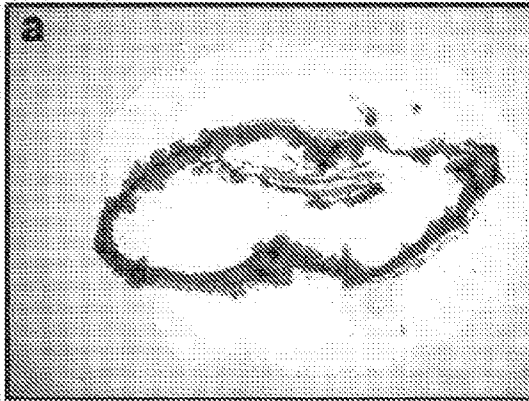


FIG. 4B

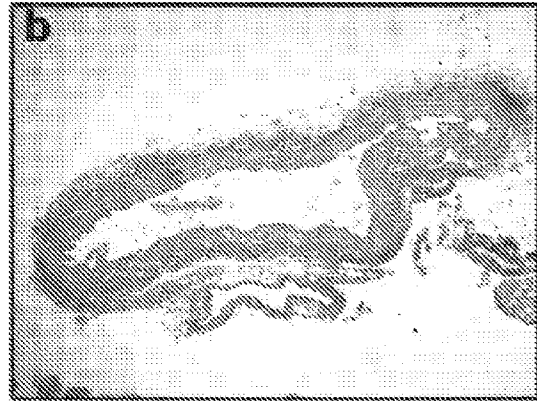


FIG. 4C

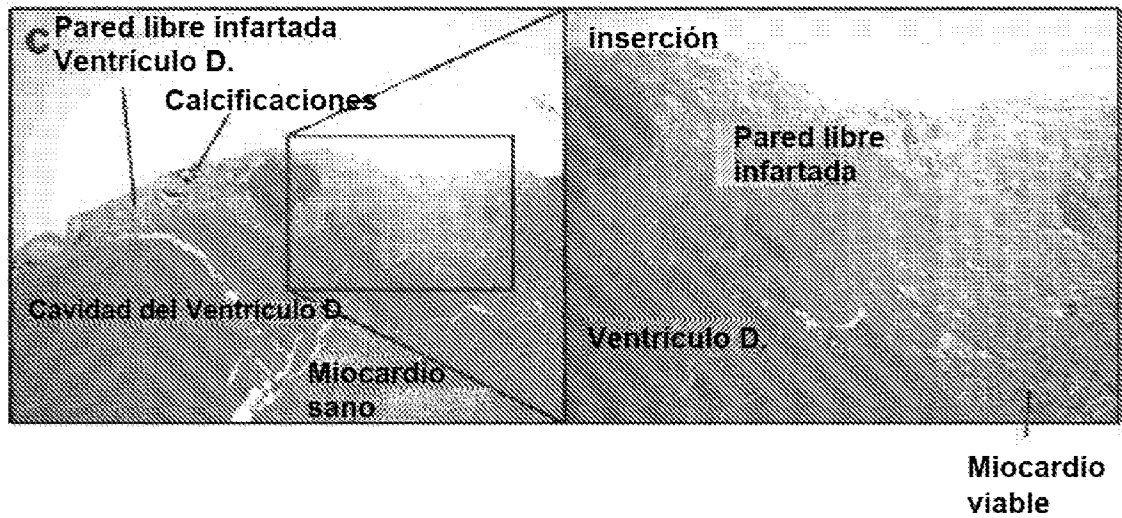


FIG. 4D



FIG. 4E

**Vasos intracardíacos  
calcificados**

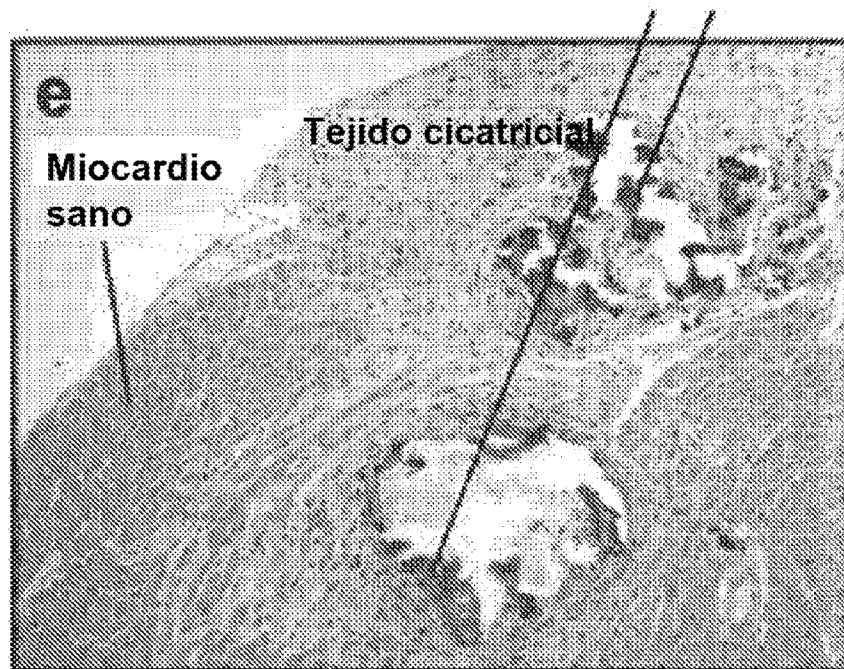


FIG. 4F

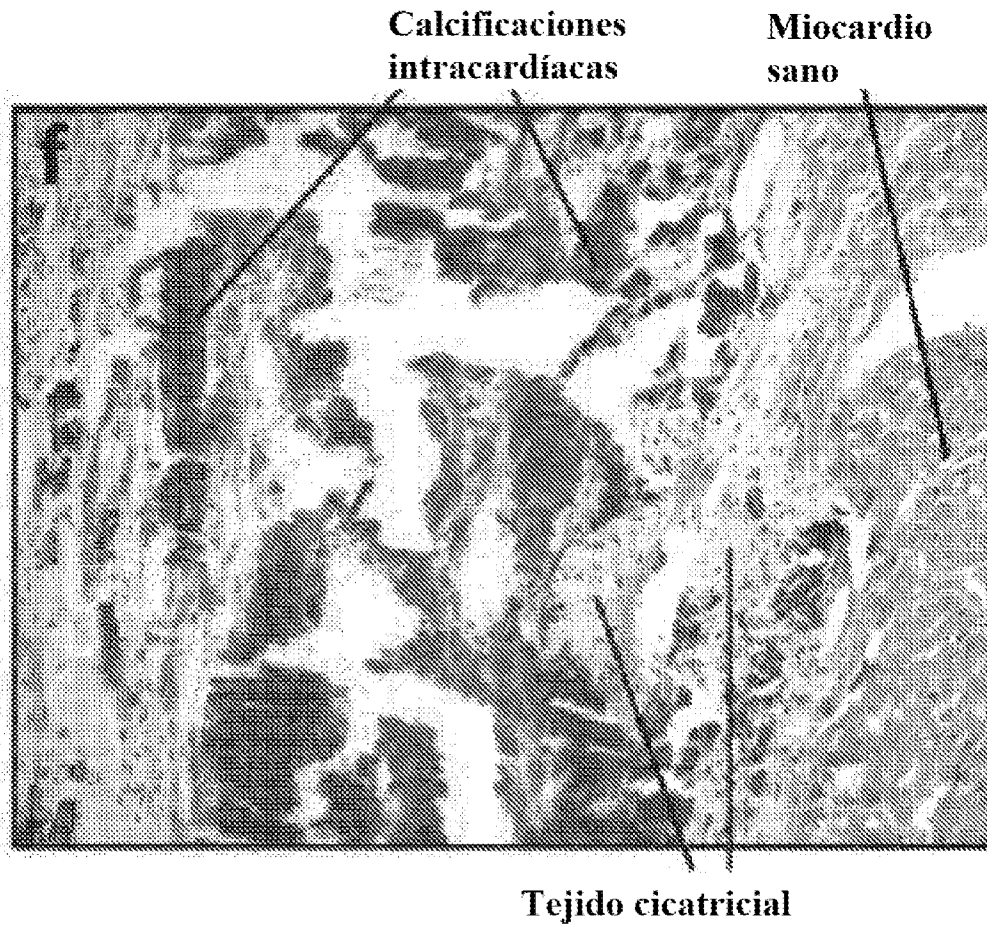


FIG. 4G

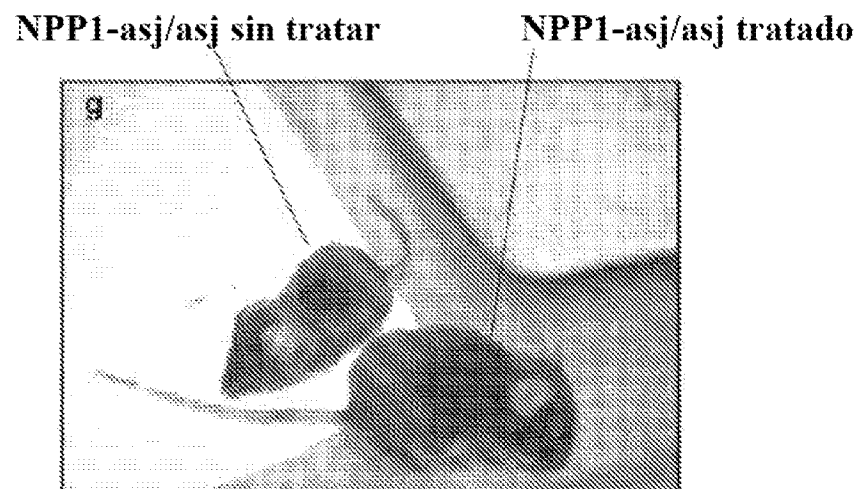


FIG. 5A

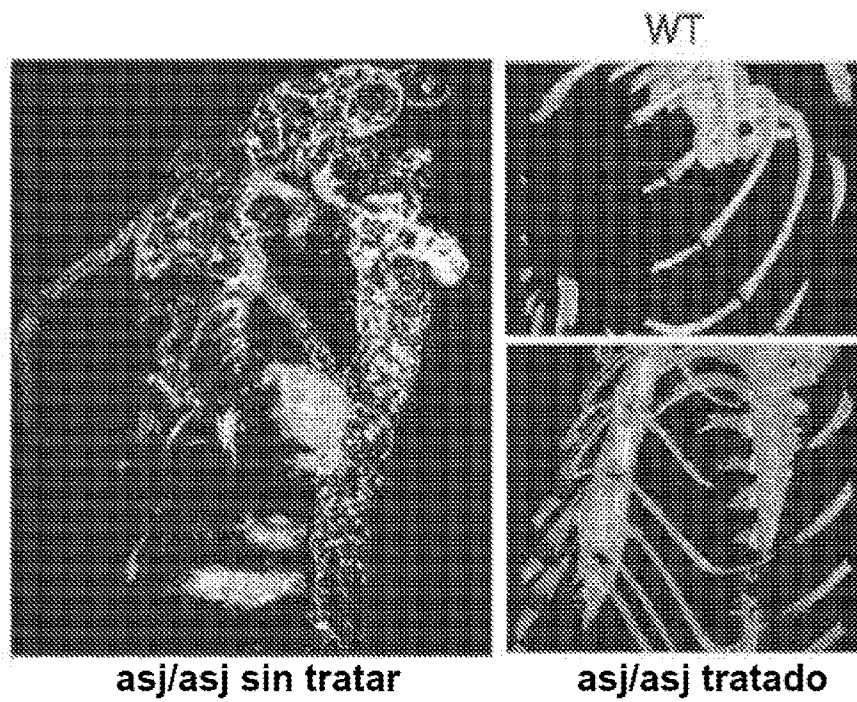


FIG. 5B

Pi en plasma

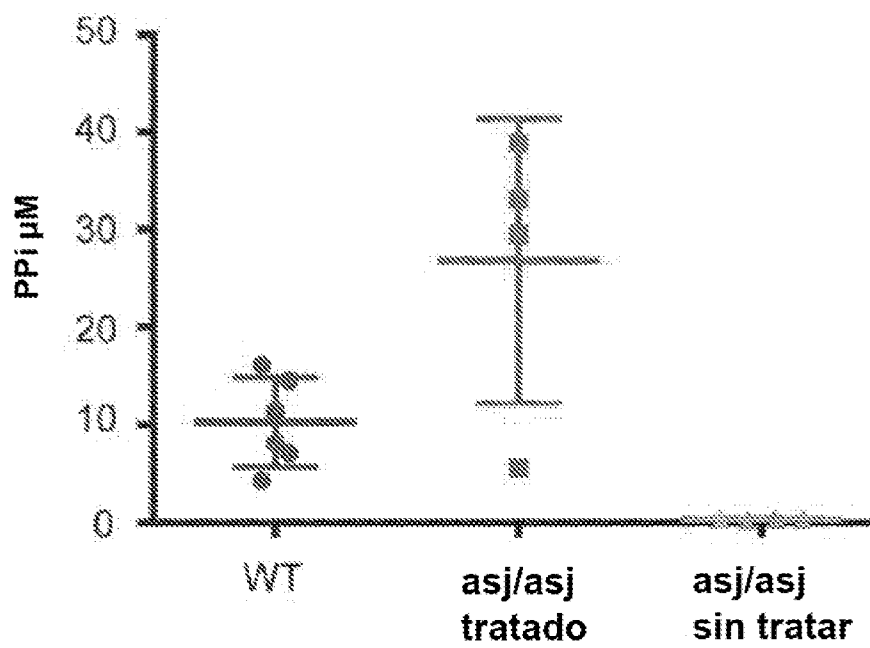


FIG. 5C

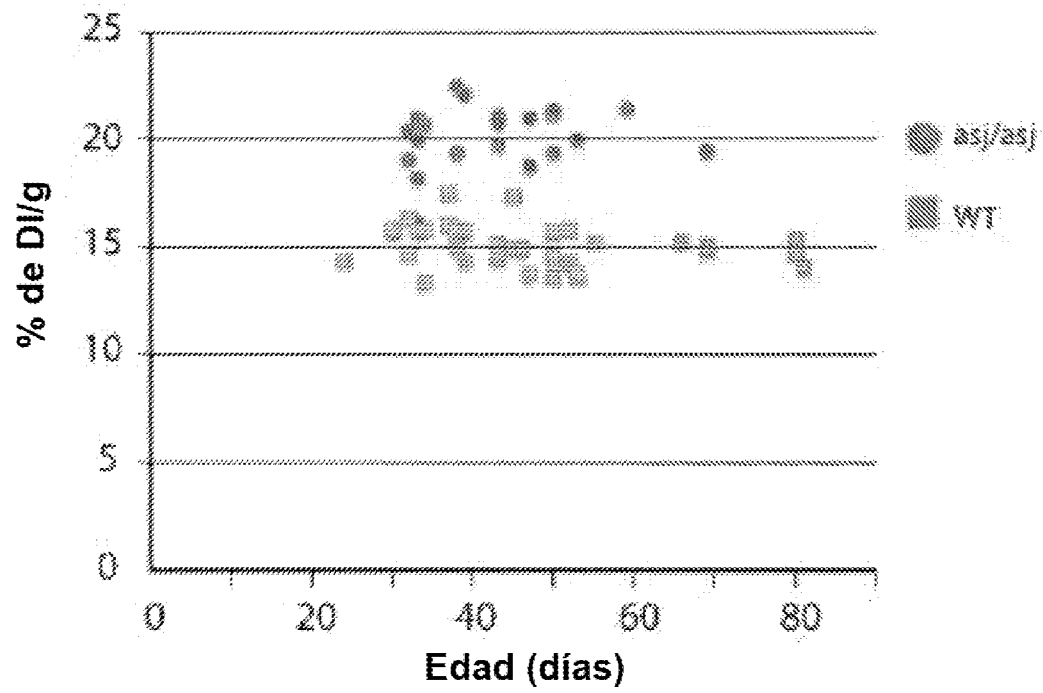


FIG. 5D

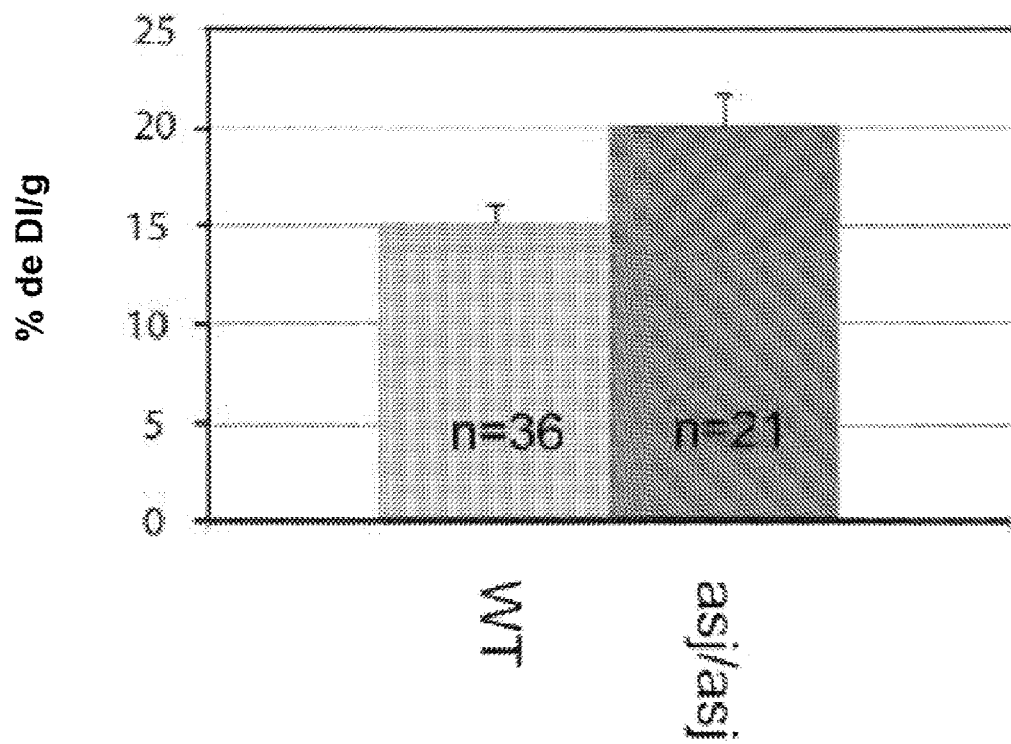




FIG. 5E

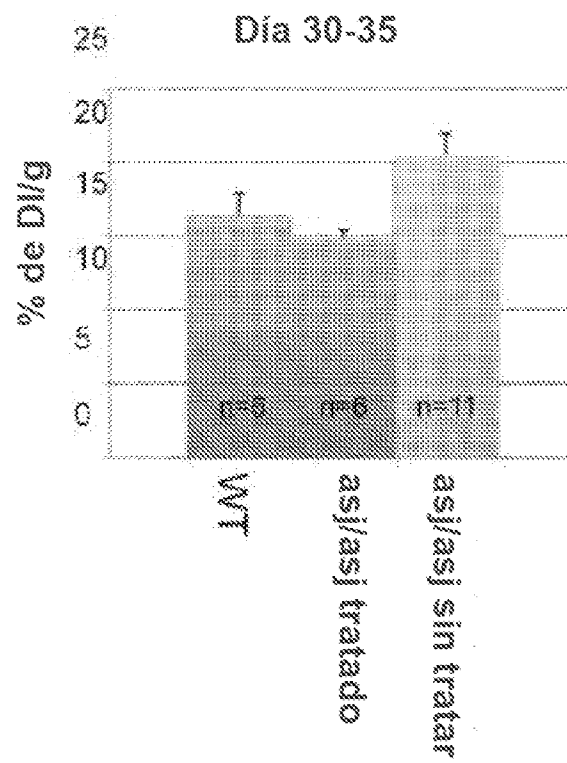


FIG. 5F

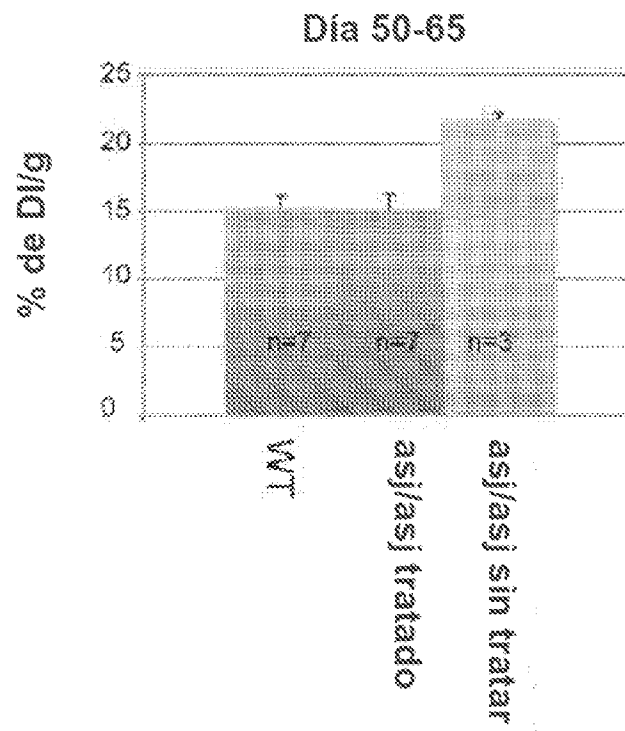


FIG. 6

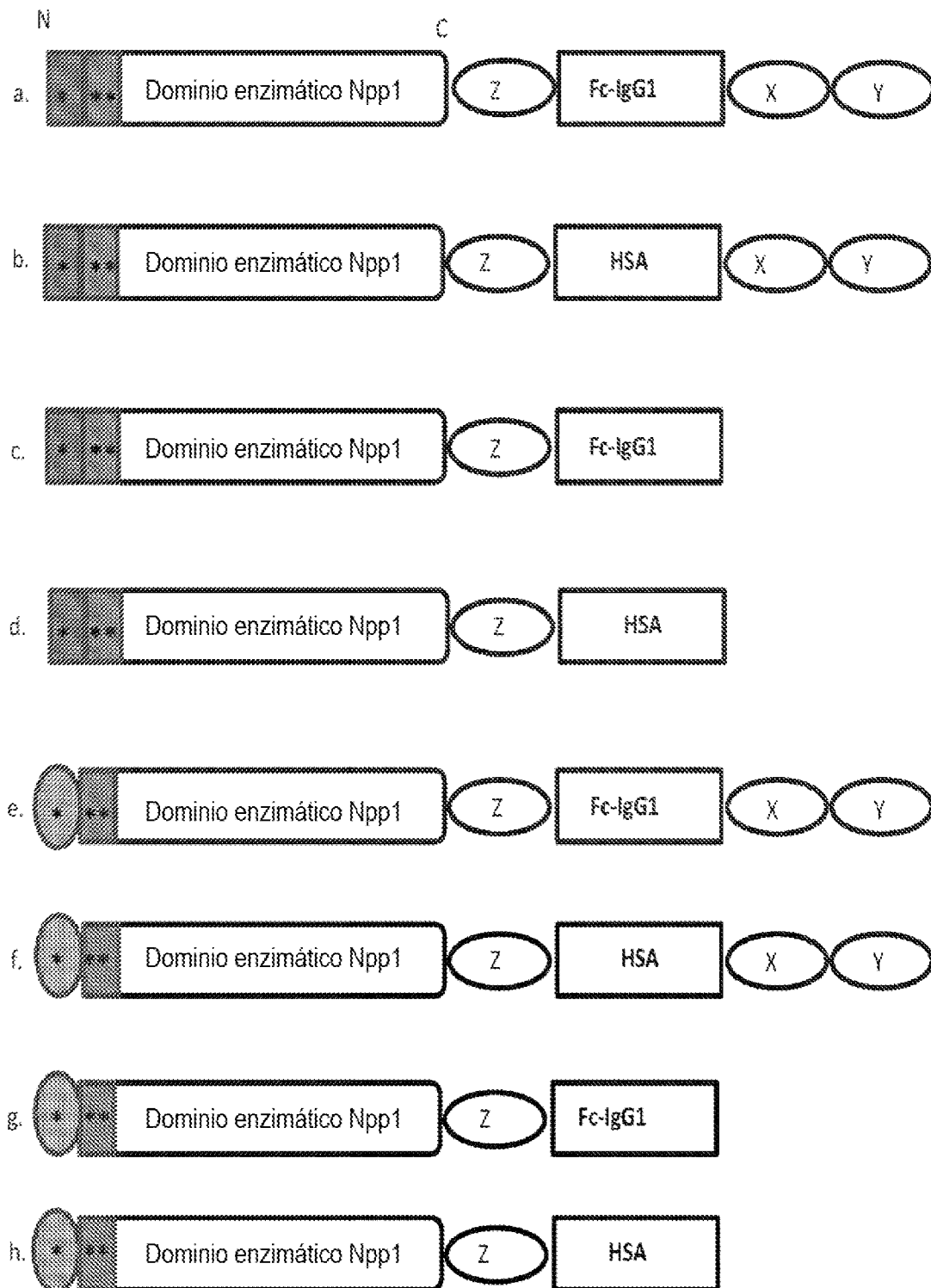


FIG. 7

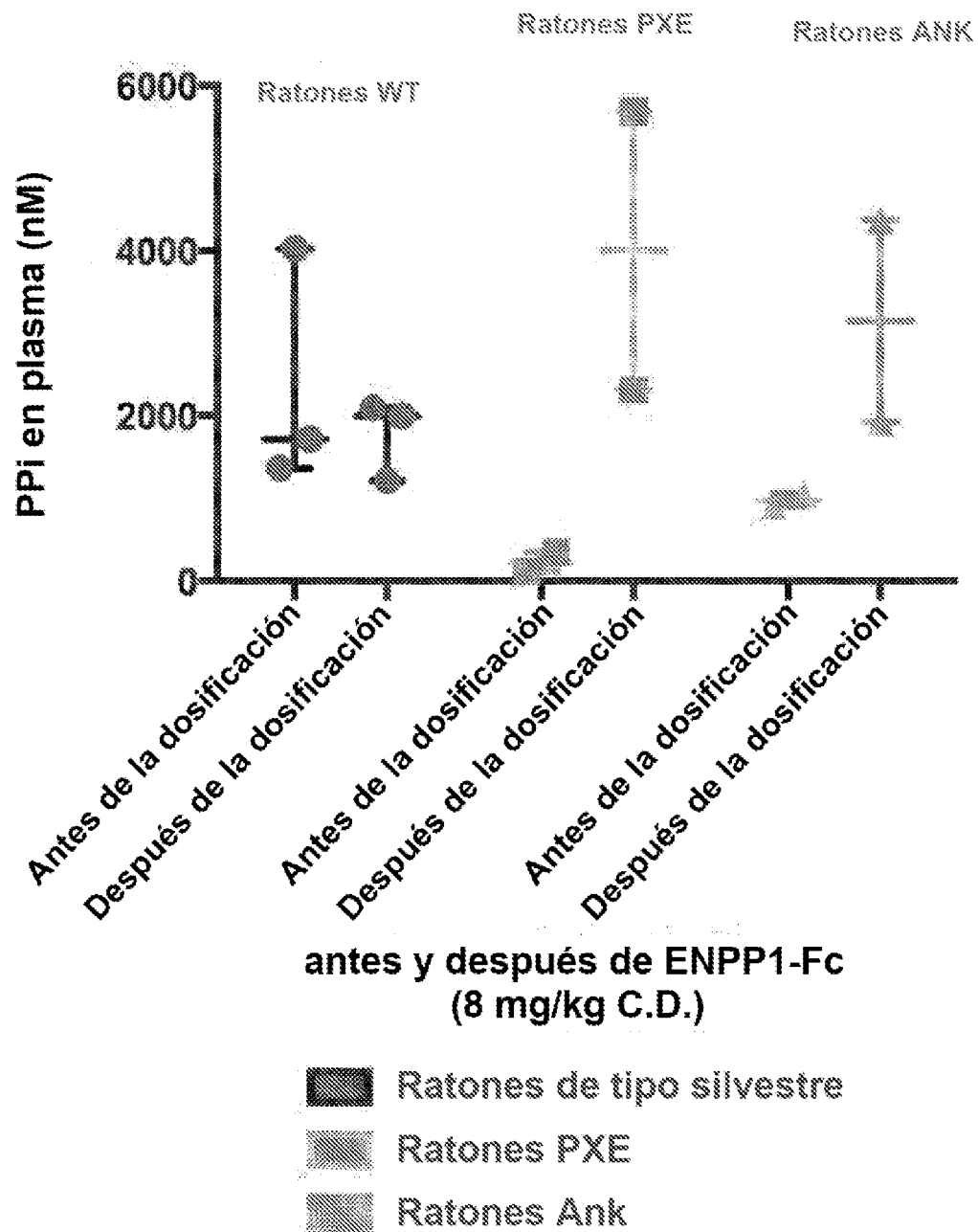


FIG. 8

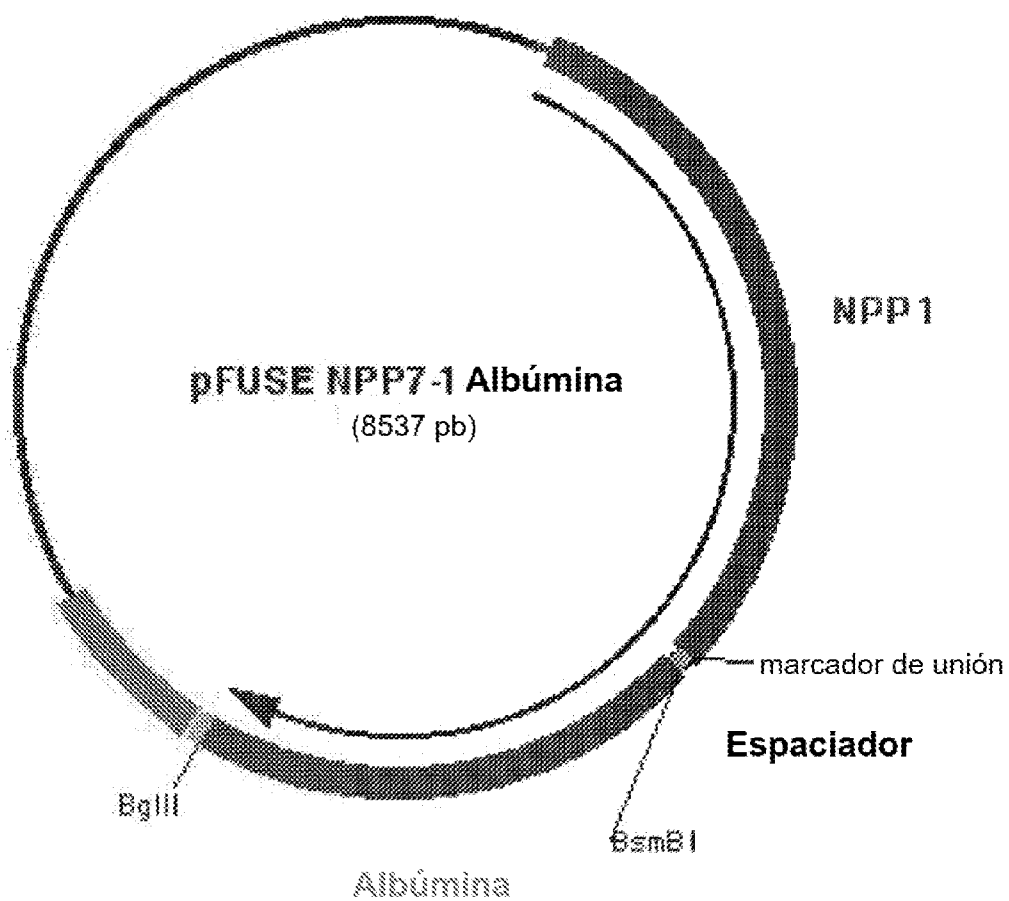


FIG. 9

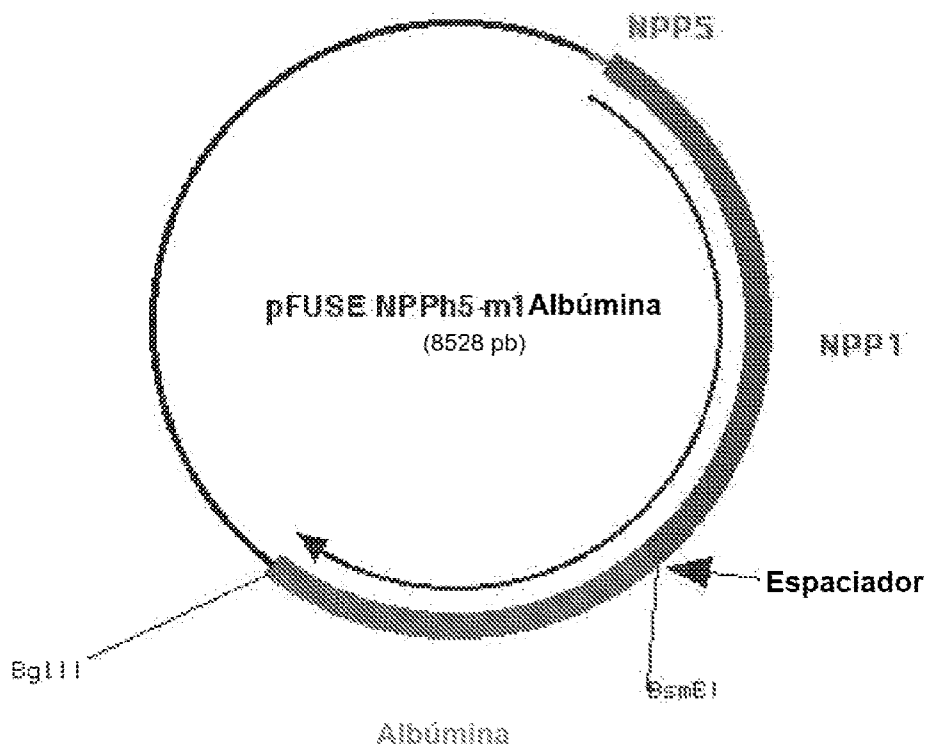


FIG. 10

