

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 981 606**

51 Int. Cl.:

A61K 38/46	(2006.01)
C12N 9/14	(2006.01)
C12N 9/16	(2006.01)
A61P 9/00	(2006.01)
A61P 3/00	(2006.01)
A61P 13/12	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.12.2015 E 21192925 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.03.2024 EP 3967755**

54 Título: **NPP1 soluble para su uso en un método para el tratamiento del pseudoxantoma elástico**

30 Prioridad:

19.12.2014 US 201462094943 P
02.11.2015 US 201562249781 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.10.2024

73 Titular/es:

INOZYME PHARMA, INC. (100.0%)
321 Summer Street, Suite 400
Boston, MA 02210, US

72 Inventor/es:

QUINN, ANTHONY;
HSIA, NELSON;
ASKEW, KIM LYNETTE;
GRABOWSKI, GREGORY;
O'NEILL, W. CHARLES;
KHAN, TAYEBA y
CHENG, ZHILIANG

74 Agente/Representante:

FERNÁNDEZ POU, Felipe

Observaciones:

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

ES 2 981 606 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

NPP1 soluble para su uso en un método para el tratamiento del pseudoxantoma elástico

5 Campo técnico de la descripción

Esta descripción se refiere a un ectonucleótido pirofosfatasa fosfodiesterasa (NPP1) soluble para su uso en un método para tratar a un sujeto que tiene Pseudoxantoma elástico (PXE).

10 Antecedentes

La calcificación vascular puede caracterizarse por la formación de cristales dispersos muy pequeños de hidroxiapatita (HA) y como depósitos calcificados grandes en el tejido vascular, tales como arterias. (Amann, K. Clin J Am Soc Nephrol 2008, 3, 1599-605). El pirofosfato extracelular (PPI) es un inhibidor endógeno clave de la calcificación vascular mediante la inhibición de la formación de HA. (Lomashvili, K. A. y otros, J Am Soc Nephrol 2004, 15, 1392-1401; Fleisch, H. y otros, Nature 1966, 212, 901-903).

La ectonucleótido pirofosfatasa pirofosforilasa (NPP1) es una ectoenzima que escinde el ATP para producir pirofosfato extracelular (PPI). El pirofosfato es un inhibidor potente de la formación de hidroxiapatita y, en condiciones normales, funciona para inhibir la calcificación vascular.

La deficiencia de NPP1 en seres humanos da como resultado niveles reducidos de PPI circulante y se ha implicado en afecciones tales como la calcificación arterial y la calcificación arterial generalizada de la lactancia (GACI). (Rutsch, F. y otros, Am J Pathol 2001, 158, 543-554). Cuando los ratones que carecen de NPP1 (*Enpp1*^{-/-}) se alimentan con una dieta con alto contenido de fosfato también tienen niveles de PPI reducidos y exhiben un fenotipo similar al de los seres humanos con deficiencia de NPP1. (Harmey, D. y otros, Am J Pathol 2004, 164, 1199-1209). La calcificación vascular también es una complicación muy reconocida y frecuente en sujetos con enfermedad renal crónica (CKD) y enfermedad renal en etapa terminal (ESRD), y se asocia con un aumento de la morbilidad y la mortalidad. (Giachelli, C. J Am Soc Nephrol 2004, 15, 2959-64; Raggi, P. y otros, J Am Coll Cardiol 2002, 39, 695-701).

La deficiencia de ectonucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasa 1 (NPP1/ENPP1/PC-1) es una enfermedad rara causada por mutaciones en NPP1, una glicoproteína transmembrana de tipo II. NPP1 escinde una variedad de sustratos, que incluyen enlaces fosfodiéster de nucleótidos y azúcares de nucleótidos y enlaces pirofosfato de nucleótidos y azúcares de nucleótidos. La deficiencia de NPP1 se ha asociado con calcificación arterial infantil idiopática (IIAC), resistencia a la insulina, raquitismo hipofosfatémico y osificación del ligamento longitudinal posterior de la columna.

La IIAC, un trastorno raro autosómico recesivo y casi siempre mortal, se caracteriza por la calcificación de la lámina elástica interna de las arterias musculares y la estenosis debido a la proliferación en la mioíntima. Hay más de 160 casos de IIAC que se han notificado en todo el mundo. Los síntomas de la enfermedad aparecen con mayor frecuencia en la lactancia temprana, y la enfermedad es letal a los 6 meses de edad, generalmente debido a cardiomiopatía isquémica y otras complicaciones de arteriopatía obstructiva, que incluye la estenosis de las arterias renales.

Aunque los defectos en la proteína NPP1 se han implicado en una enfermedad tan grave como la IIAC, actualmente no existe ningún tratamiento disponible para aquellos que se ven afectados por la enfermedad y otras enfermedades de calcificación causadas por una alta carga corporal total de calcio y fósforo debido a un metabolismo óseo anormal; bajos niveles de inhibidores de productores de fosfato circulantes y producidos localmente; o alteración de la excreción renal.

Las opciones terapéuticas actuales para prevenir la calcificación vascular tienen una eficacia limitada y efectos secundarios no deseados y/o inaceptables. Por ejemplo, se necesitan cantidades muy grandes de PPI exógeno para la eficacia y otros inhibidores de la formación de hidroxiapatita inhiben la calcificación del hueso y pueden conducir a osteomalacia. En particular, se encontró que la administración directa de PPI exógeno previene la calcificación en modelos animales urémicos. (O'Neil, W. C. y otros, Kidney Int 2011, 79, 512-517; Riser, B. L. y otros, Nephrol Dial Transp 2011, 26, 3349-3357). Pero este enfoque requirió dosis altas de PPI, debido a la corta semivida de PPI, y dio como resultado niveles plasmáticos suprafisiológicos de PPI que provocan irritación local. Los bifosfonatos, que son análogos no hidrolizables de PPI, se han usado para tratar la calcificación vascular, por ejemplo, en modelos animales. (Fleisch, H. y otros, Europ J Clin Invest 1970, 1, 12-18; Price, P. A. y otros, Arteriosclerosis Throm and Vas Bio 2001, 21, 817-824; Price, P. A. y otros, Kidney Int 2006, 70, 1577-1583; Lomashvili, K. A. y otros, Kidney Int 2009, 75, 617-625). Sin embargo, los bifosfonatos también inhiben la formación ósea. Los bifosfonatos pueden retrasar pero no detener la calcificación en sujetos con GACI (Rutsch, F. y otros, Circ Cardiovasc Genet 2008, 1, 133-140) y, como en animales, conducen a osteomalacia. (Otero, J. E., y otros, J Bone Miner Res 2013, 28, 419-430).

Braddock, D. y otros, (WO 2014/126965A2) describen composiciones y métodos para tratar la calcificación y osificación patológicas mediante la administración de NPP1. Quinn, A. y otros, (WO 2012/125182A1) describen una proteína de fusión a NPP1 para tratar afecciones que incluyen GACI, calcificación arterial, resistencia a la insulina,

raquitismo hipofosfatémico y osificación del ligamento longitudinal posterior de la columna.

A pesar de una investigación considerable en el campo, existe una necesidad continua de nuevas terapias para inhibir eficazmente la calcificación vascular, preferentemente sin causar osteomalacia. Además, existe la necesidad de un medicamento efectivo y seguro para el tratamiento de IIAC, calcificación vascular en la enfermedad renal crónica (VCKD), pseudoxantoma elástico (PXE), resistencia a la insulina, raquitismo hipofosfatémico y osificación del ligamento longitudinal posterior de la columna.

Resumen

La invención se expone en las reivindicaciones adjuntas. La invención proporciona un eutonucleótido pirofosfatasa fosfodiesterasa (NPP1) soluble para su uso en un método para tratar a un sujeto que tiene Pseudoxantoma elástico (PXE) que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de eutonucleótido pirofosfatasa fosfodiesterasa soluble (sNPP1), o proteína de fusión de esta, en donde dicha sNPP1 tiene actividad pirofosfatasa, actividad fosfodiesterasa, o actividad pirofosfatasa y fosfodiesterasa. Las modalidades de la invención se exponen en las reivindicaciones adjuntas.

Cualquier referencia en esta descripción a métodos para tratar una enfermedad, debe interpretarse como referencias a compuestos, agentes o composiciones (como se describe en la presente descripción) para su uso en esos métodos.

La presente descripción y la invención se refieren a usos de NPP1 soluble humana recombinante aislada que carece de dominios citosólicos y transmembrana N-terminales y proteínas de fusión de esta para el tratamiento de la deficiencia de NPP1 u otros trastornos progresivos caracterizados por la acumulación de depósitos de calcio y otros minerales.

Las proteínas de la invención pueden usarse sorprendentemente para restaurar la actividad de NPP1 en sangre y restaurar el nivel normal de pirofosfato en sujetos que tienen deficiencias en la actividad de NPP1 o que muestran acumulación de depósitos de calcio en los huesos, las articulaciones, el corazón, los vasos sanguíneos, los ojos y/o la piel.

Más específicamente, las proteínas NPP1 y las proteínas de fusión a NPP1 de la invención (como se establece en las reivindicaciones adjuntas) o la descripción puede usarse para tratar sujetos que tienen deficiencia de NPP1 u otras enfermedades o trastornos asociados con bajos niveles de pirofosfato, que incluyen, pero no se limitan a, calcificación arterial infantil idiopática (IIAC, también conocida como calcificación arterial general en niños), calcificación vascular en enfermedad renal crónica (VCKD), pseudoxantoma elástico (PXE), resistencia a la insulina, raquitismo hipofosfatémico, calcificación articular, isquemia miocárdica, y osificación del ligamento longitudinal posterior de la columna. Cualquier trastorno progresivo que se caracteriza por la acumulación de depósitos de calcio y otros minerales en tejidos arteriales y/o conectivos está dentro del alcance de la presente descripción.

En algunos aspectos, la descripción se refiere a un método para reducir la calcificación tisular, preferentemente la calcificación vascular en un sujeto que lo necesita. El método comprende administrar a un sujeto con bajo contenido de pirofosfato en plasma (PPi) o fosfato inorgánico elevado (Pi), dos o más dosis de una cantidad con eficacia terapéutica de una composición que comprende un eutonucleótido pirofosfatasa fosfodiesterasa (NPP1) soluble. Cada dosis contiene una cantidad de NPP1 soluble que es suficiente para lograr un aumento transitorio de PPi en plasma en el sujeto. El aumento transitorio de PPi en plasma se caracteriza por un nivel máximo de PPi que es al menos aproximadamente 40 % del nivel normal de PPi en plasma y un regreso al nivel de PPi inicial dentro de aproximadamente 48 horas después de la administración de la dosis. El período de tiempo entre dosis es de al menos 2 días.

El aumento transitorio de PPi en plasma se mantiene durante al menos aproximadamente 4 horas, preferentemente, al menos aproximadamente 6 horas, al menos aproximadamente 8 horas, al menos aproximadamente 10 horas o al menos aproximadamente 12 horas.

La calcificación de tejidos puede ser calcificación vascular, tal como calcificación venosa o arterial, y la calcificación puede ser de la capa íntima o media.

El sujeto que necesita tratamiento puede tener deficiencia de NPP1, enfermedad renal crónica (CKD), enfermedad renal en etapa terminal (ESRD), calcificación arterial generalizada de la lactancia (GACI), trastorno cardiovascular, diabetes mellitus II, aterosclerosis o pseudoxantoma elástico (PXE). Cuando el sujeto tiene un contenido bajo de PPi en plasma, los niveles previos al tratamiento de pirofosfato en plasma (PPi) en el sujeto son al menos aproximadamente 40 % inferiores a los niveles normales de PPi en plasma y el sujeto es un ser humano. Cuando el sujeto tiene niveles altos de Pi, los niveles de Pi previos al tratamiento en el sujeto son típicamente al menos aproximadamente 110 % de los niveles normales de Pi en plasma.

La cantidad de sNPP1 que se administra en cada dosis puede ser NPP1 a aproximadamente 1,0 mg/kg a aproximadamente 5,0 mg/kg o NPP1 a aproximadamente 1,0 mg/kg a aproximadamente 10,0 mg/kg. El período de

tiempo entre dosis de NPP1 es al menos 2 días y puede ser más largo, por ejemplo al menos 3 días, al menos 1 semana, 2 semanas o 1 mes. La sNPP1 puede administrarse de cualquier manera adecuada, tal como por vía intravenosa, subcutánea o intraperitoneal.

5 En aspectos preferidos, se administra una proteína de fusión a NPP1. Las proteínas de fusión preferidas comprenden y el componente de NPP1 una región Fc de una inmunoglobulina y opcionalmente un resto de direccionamiento. Un resto de direccionamiento preferido es Asp₁₀. Las proteínas de fusión a NPP1 particularmente preferidas para la administración de acuerdo con los métodos descritos en la presente descripción tienen la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 o SEQ ID NO: 12.

10 Otras características y ventajas de la descripción y/o la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y las reivindicaciones.

Breve descripción de las figuras

15 La Figura 1 es la secuencia de aminoácidos de la proteína NPP1 de tipo silvestre (SEQ ID NO: 1). Las regiones citosólica y transmembrana están subrayadas. Los posibles sitios de N-glicosilación están en negrita. El motivo de aminoácidos "PSCAKE" (SEQ ID NO: 17) en negrita es el inicio de una NPP1 soluble que incluye la región rica en cisteína.

20 La Figura 2 es la secuencia de aminoácidos de una sNPP1 que contiene la región rica en cisteína, la región catalítica y la región C-terminal (SEQ ID NO: 2).

La Figura 3 es la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión sNPP1-Fc (SEQ ID NO: 3).

25 La Figura 4 es la secuencia de aminoácidos de sNPP1-Fc-D10 (SEQ ID NO: 4). La secuencia Fc está subrayada. El resto de direccionamiento D10 (SEQ ID NO: 18) está en negrita.

30 La Figura 5 ilustra los niveles de pirofosfato en sangre en ratones de tipo silvestre después de la administración de sNPP1-Fc o sNPP1-Fc-D10 por vía intravenosa (1 hora después de la inyección) y subcutánea (4 horas después de la inyección).

35 La Figura 6 ilustra la prevención de la calcificación aórtica en ratones *Enpp1(-/-)* con tratamiento de sNPP1-Fc-D10. Los ratones *Enpp1(-/-)* se trataron por vía subcutánea con vehículo o sNPP1-Fc-D10 a 6 mg/kg cada dos días durante un período de 21 días. Se muestran los niveles de calcio aórtico para machos y hembras.

40 La Figura 7 ilustra los niveles de PPI y actividad enzimática en sangre en ratones *Enpp1(-/-)* tratados con sNPP1-Fc-D10 a 6 mg/kg por vía intravenosa. Se recolectó plasma en los puntos de tiempo de 0, 4, 24, 48 y 72 horas y se analizó la actividad de NPP1 (línea discontinua) y los niveles de PPI (línea continua). Se determinó que el nivel de PPI de tipo silvestre era de 2,18 mM (datos no mostrados). Las líneas discontinuas de arriba a abajo muestran los niveles de PPI para ratones *Enpp1(+/-)* heterocigotos de tipo silvestre y *Enpp1(-/-) asj* homocigotos (Li y otros, 2013). Los perfiles de sNPP1-Fc fueron similares a los de sNPP1-Fc-D10.

45 La Figura 8 ilustra el aumento de la supervivencia de ratones macho *homocigóticos Enpp1^{asj}* tratados con sNPP1-Fc a 5 mg/kg en comparación con los ratones tratados con vehículo. Los ratones de tipo silvestre y *Enpp1^{asj}* se sometieron a una dieta con alto contenido de fósforo y bajo contenido de magnesio desde el nacimiento. El vehículo o sNPP1-Fc (5 mg/kg) se administró por vía subcutánea cada dos días a partir de los 14 días de edad. Las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier mostraron que >50 % de los ratones *asj* murieron antes de las 6 semanas, y todos los animales murieron hacia las 9 semanas. En comparación, el 50 % de los animales tratados con sNPP1-Fc sobrevivieron más de 7 semanas y continúan vivos a las 9 semanas.

50 Las Figuras 9A y 9B ilustran un aumento del por ciento de ganancia de peso corporal de ratones macho *Enpp1^{asj}* tratados con sNPP1-Fc a 5 mg/kg (Figura 9B) en comparación con los ratones tratados con vehículo (Figura 9A). Los ratones de tipo silvestre y *Enpp1^{asj}* se sometieron a una dieta con alto contenido de fósforo y bajo contenido de magnesio desde el nacimiento. Se inyectó vehículo o sNPP1-Fc (5 mg/kg) por vía subcutánea cada dos días a partir de los 14 días de edad. El por ciento de ganancia de peso corporal para ratones de tipo silvestre (línea continua) y *Enpp1^{asj}* (círculos) se representó gráficamente desde las dos a las nueve semanas de edad. Todos los animales *Enpp1^{asj}* murieron (círculo vacío) en el grupo con vehículo a las nueve semanas (panel superior). En comparación, cinco ratones *Enpp1^{asj}* estaban vivos (círculo relleno) y cinco estaban muertos (círculo vacío) en el grupo de tratamiento con sNPP1-Fc al final de nueve semanas.

Las Figuras 10A-10C son fotografías de ratones de tipo silvestre (Figura 10A, superior), *Enpp1^{asj}* tratados con vehículo (Figura 10B, medio), *Enpp1^{asj}* tratados con sNPP1-Fc (5 mg/Kg) (Figura 10C, parte inferior).

65 La Figura 11 ilustra los niveles del factor de crecimiento de fibroblastos 23 en ratones de tipo silvestre tratados con vehículo, *Enpp1^{asj/asj}* tratados con vehículo, y *Enpp1^{asj/asj}* tratados con sNPP1-Fc (5 mg/Kg).

Las Figuras 12A-12H son las secuencias de aminoácidos de compuestos NPP1 solubles, parejas de fusión y proteínas de fusión. La Figura 12A muestra las secuencias de aminoácidos de una NPP1 soluble que contiene los aminoácidos de 107 a 925 de la SEQ ID NO: 1 (SEQ ID NO: 5). La Figura 12B muestra la secuencia de aminoácidos de una NPP1 soluble que contiene los aminoácidos de 187 a 925 de la SEQ ID NO: 1 (SEQ ID NO: 6). La Figura 12C muestra la secuencia de aminoácidos de la región Fc de la IgG1 humana que incluye la región bisagra (SEQ ID NO: 7). La Figura 12D muestra la secuencia de aminoácidos del Fc de la IgG1 humana que incluye una región bisagra parcial (SEQ ID NO: 8). La Figura 12E muestra la secuencia de aminoácidos de una proteína de fusión a NPP1-Fc (SEQ ID NO: 9). El componente de NPP1 contiene la SEQ ID NO:5, y la secuencia Fc incluye la región bisagra. La Figura 12F muestra la secuencia de aminoácidos de una proteína de fusión a NPP1-Fc (SEQ ID NO: 10). La NPP1 soluble contiene la SEQ ID NO:5, y la secuencia Fc incluye la región bisagra parcial. La Figura 12G muestra la secuencia de aminoácidos de una proteína de fusión a NPP1-Fc (SEQ ID NO: 11). La NPP1 soluble contiene la SEQ ID NO: 6, y la secuencia Fc incluye la región bisagra. La Figura 12H muestra la secuencia de aminoácidos de una proteína de fusión a NPP1-Fc (SEQ ID NO: 12). La NPP1 soluble contiene la SEQ ID NO:6, y la secuencia Fc incluye la región bisagra parcial.

Las Figuras 13A-13C son autorradiogramas de cromatogramas de capa fina que ilustran la actividad de NPP1 recombinante in vitro e in vivo. Figura 13A: ATP 100 nM incubado con sNPP1-Fc-D10 130 ug/ml durante una hora a 37 °C. Figura 13B: ATP 100 nM incubado con plasma de ratones de tipo silvestre (WT), ratones *Enpp1*^{-/-} y ratones *Enpp1*^{-/-} 2 horas después de la inyección IV de NPP1 recombinante (6 mg/kg). Figura 13C: ATP 100 nM incubado con aorta de ratones de tipo silvestre (WT), ratones *Enpp1*^{-/-} y ratones *Enpp1*^{-/-} 2 horas después de la inyección IV de NPP1 recombinante (6 mg/kg). Pi: ortofosfato; ATP: Trifosfato de adenosina; PPI: pirofosfato.

Las Figuras 14A y 14B son histogramas que ilustran el curso temporal de la actividad de NPP1 en plasma (Figura 14A, superior) y la concentración plasmática de pirofosfato (Figura 14B, parte inferior) en ratones *Enpp1*^(-/-) después de la inyección subcutánea de NPP1 recombinante (5 mg/kg).

La Figura 15 es un diagrama de dispersión que ilustra la relación entre la actividad de NPP1 en plasma y el pirofosfato en plasma (PPi) para ratones *Enpp1*^(-/-) en varios puntos de tiempo después de la inyección subcutánea de NPP1 recombinante (5 mg/kg) (círculos) y para ratones de tipo silvestre (cuadrados).

Las Figuras 16A-16C son histogramas que ilustran la síntesis de pirofosfato en sangre humana. Figura 16A: Sangre heparinizada o plasma obtenido de la misma muestra de sangre. Figura 16B: Células sanguíneas centrifugadas con (todas las células) o sin capa leucocitaria (eritrocitos) eliminada, suspendidas en solución salina tamponada con HEPES. Figura 16C: Leucocitos o plaquetas aislados, suspendidos en solución salina tamponada con HEPES. Las muestras se incubaron a 37 °C durante 2 horas con o sin NPP1 recombinante (145 ug/ml).

La Figura 17 es un histograma que ilustra el efecto de la NPP1 recombinante sobre la calcificación aórtica en ratones *Enpp1*^(-/-). La NPP1 recombinante se inyectó (6 mg/kg) por vía subcutánea cada 48 horas en ratones alimentados con una dieta con alto contenido de fosfato. Cada barra representa un solo animal donde la edad se presenta en semanas debajo. M: par macho; F: par hembra. La línea discontinua indica el contenido medio de calcio de las aortas de las camadas de tipo silvestre.

La Figura 18 es un histograma que ilustra el efecto de NPP1 recombinante sobre la calcificación aórtica en ratas urémicas con insuficiencia renal. Se inyectó sNPP1-Fc-D10 o control (5 mg/kg) por vía subcutánea, 5 dosis por semana durante 21 días en ratas urémicas alimentadas con una dieta con alto contenido de adenina. Cada barra representa un solo animal de aproximadamente 4 meses de edad.

Descripción detallada

Definiciones

A menos que se defina de cualquier otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente descripción tienen el mismo significado que el que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece esta descripción y la invención. Aunque cualquier método y material similares o equivalentes a los descritos en la presente descripción puede usarse en la práctica o prueba de la presente descripción e invención, se describen los métodos y materiales preferidos.

"Aproximadamente" como se usa en la presente descripción cuando se refiere a un valor medible tal como una cantidad, una duración temporal, y similares, pretende abarcar variaciones de $\pm 20\%$ o $\pm 10\%$, con mayor preferencia $\pm 5\%$, aún con mayor preferencia $\pm 1\%$, y aún con mayor preferencia $\pm 0,1\%$ del valor especificado, ya que tales variaciones son apropiadas para realizar los métodos descritos.

El término "relación PPI:Pi alterada" se refiere a una relación de PPI en plasma a Pi en suero que es al menos 10 % o al menos 20 % mayor o menor que una relación PPI:Pi normal para ese tipo de sujeto (por ejemplo, un ser humano). Puede presentarse una relación PPI:Pi alterada debido a niveles más bajos de PPI en plasma de lo normal o niveles más altos de Pi en suero de lo normal. La relación de PPI:Pi se expresa como $([PPI]/[PI]) * 1000$, y la relación normal

de un ser humano es de aproximadamente 1,75.

Como se usa en la presente descripción, el término "fragmento", con respecto a las proteínas NPP1, se refiere a una subsecuencia de la NPP1 de longitud completa. 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 entre estos). Los fragmentos pueden variar en tamaño de cuatro residuos de aminoácidos a toda la secuencia de aminoácidos menos un aminoácido. Por lo tanto, una proteína "que comprende al menos una porción de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1" abarca la NPP1 de longitud completa y fragmentos de esta.

El término "alto contenido de Pi en suero" como se usa en la presente descripción se refiere a un nivel de fosfato inorgánico (Pi) en el suero de un sujeto que es al menos el 110 % del nivel normal de Pi para ese tipo de sujeto (por ejemplo, un ser humano). Preferentemente, el nivel de Pi en el suero del sujeto es de al menos aproximadamente 120 %, al menos aproximadamente 150 %, al menos aproximadamente 200 % o al menos aproximadamente 300 % del nivel normal de Pi para ese tipo de sujeto. Se informa que los niveles normales de Pi para un ser humano son $1,5 \pm 0,5$ milimolares (Rutsch, F. y otros, *Circ Cardiovasc Genet* 1:133-140 (2008)).

Una proteína NPP1 soluble "aislada" o "purificada" o fragmento biológicamente activo o proteína de fusión de esta está sustancialmente libre de material celular u otras proteínas contaminantes de la célula o fuente tisular de la que se deriva la proteína NPP1, fragmento biológicamente activo o proteína de fusión a NPP1, o sustancialmente libre de precursores químicos u otros compuestos químicos cuando se sintetiza químicamente. La frase "sustancialmente libre de material celular" incluye preparaciones de proteína NPP1, fragmento biológicamente activo, o proteína de fusión a NPP1 en la que la proteína se separa de los componentes celulares de las células de las que se aísla o se produce de manera recombinante. En una modalidad, la frase "sustancialmente libre de material celular" incluye preparaciones de proteína NPP1, fragmento biológicamente activo o proteína de fusión a NPP1 que tiene menos de aproximadamente 30 % (en peso en seco) de proteína diferente de NPP1/fragmento/proteína de fusión (también denominada en la presente descripción como una "proteína contaminante"), con mayor preferencia menos de aproximadamente 20 % de proteína diferente de NPP1/fragmento/proteína de fusión, aún con mayor preferencia menos de aproximadamente 10 % de proteína diferente de NPP1/fragmento/proteína de fusión, y con la máxima preferencia menos de aproximadamente 5 % de proteína diferente de NPP1/fragmento/proteína de fusión. Cuando la proteína NPP1, proteína de fusión, o fragmento biológicamente activo de esta se produce de manera recombinante, también preferentemente está sustancialmente libre de medio de cultivo, es decir, el medio de cultivo representa menos de aproximadamente 20 %, con mayor preferencia menos de aproximadamente 10 %, y con la máxima preferencia menos de aproximadamente 5 % del volumen de la preparación de proteínas.

El término "bajo contenido de PPI en plasma", como se usa en la presente descripción, se refiere a un nivel de pirofosfato (PPI) en el plasma de un sujeto que no es superior al 50 % del nivel normal de PPI para ese tipo de sujeto (por ejemplo, un ser humano). Preferentemente, el nivel de PPI en el plasma del sujeto no más de aproximadamente 40 %, aproximadamente 30 %, aproximadamente 20 % o aproximadamente 10 % del nivel normal de PPI para ese tipo de sujeto. Se informa que los niveles normales de PPI para un ser humano son de $2,63 \pm 0,47$ micromolares. (O'Neill y otros, *Nephrol Dial Transplant* 2010, 25, 187-191). El pirofosfato puede cuantificarse enzimáticamente mediante el uso de métodos conocidos adecuados, tales como el método de uridina-difosfoglucosa (UDPG). (Ryan, L. M. y otros, *Arthritis Rheum* 1979, 22, 886-91).

Intervalos: a lo largo de esta descripción, varios aspectos de la descripción y la invención pueden presentarse en un formato de intervalo. Debe entenderse que la descripción en formato de intervalo es solamente por conveniencia y brevedad y no debe interpretarse como una limitación inflexible en el alcance de la descripción y la invención. En consecuencia, la descripción de un intervalo debe considerarse que ha descrito específicamente todos los posibles subintervalos así como también valores numéricos individuales dentro de ese intervalo. Por ejemplo, la descripción de un intervalo tal como de 1 a 6 debe considerarse que tiene subintervalos descritos específicamente 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 también los números individuales dentro de ese intervalo, por ejemplo, 1, 2, 2,7, 3, 4, 5, 5,3 y 6. Esto se aplica independientemente de la amplitud del intervalo.

Como se usa en la presente descripción, el término "sujeto" abarca mamíferos y no mamíferos. Los ejemplos de mamíferos incluyen, pero no se limitan a, seres humanos, chimpancés, monos simios, ganado, caballos, ovejas, cabras, cerdos, conejos, perros, gatos, ratas, ratones, cobayos y similares. Los ejemplos de no mamíferos incluyen, pero no se limitan a, aves, peces y similares.

Como se usa en la presente descripción, el término "cantidad con eficacia terapéutica" se refiere a una cantidad no tóxica pero suficiente de un agente (por ejemplo, proteínas sNPP1) que, en comparación con un sujeto correspondiente que no ha recibido dicha cantidad, da como resultado una mejora del tratamiento, curación, prevención o mejora de una enfermedad, trastorno o efecto secundario, o una disminución en la velocidad de progresión de una enfermedad o trastorno. El término también incluye dentro de su alcance cantidades efectivas para mejorar la función fisiológica normal.

El término "tratar" incluye la aplicación o administración de las proteínas NPP1, fragmentos y proteínas de fusión de la descripción e invención a un sujeto, o aplicación o administración de proteínas NPP1, fragmentos y proteínas de fusión de la descripción e invención a un sujeto que tiene una enfermedad o trastorno asociado a NPP1 u otra enfermedad o trastorno asociado con niveles bajos de pirofosfato en sangre, u otro trastorno progresivo que se caracteriza por la acumulación de depósitos de calcio y otros minerales (mineralización), con el propósito de tratar, curar, aliviar, mitigar, alterar, remediar, mejorar, evitar, mejorar, o afectar la enfermedad o trastorno. El término "tratar" se refiere a cualquier indicio de éxito en el tratamiento o mejora de una lesión, patología o afección, que incluye cualquier parámetro objetivo o subjetivo tal como aplacamiento; remisión; disminución de los síntomas o hacer que la lesión, patología o afección sea más tolerable para el sujeto; ralentización en la velocidad de degeneración o deterioro; hacer que el punto final de la degeneración sea menos debilitante; o mejorar el bienestar físico o mental de un sujeto. El tratamiento puede ser terapéutico o profiláctico. El tratamiento o mejora de los síntomas puede basarse en parámetros objetivos o subjetivos, que incluyen los resultados de una exploración física.

Métodos de tratamiento

La presente invención se refiere a los usos de una NPP1 soluble humana recombinante aislada ("sNPP1") que carece de una porción N-terminal (es decir, que carece de dominios citosólicos y transmembrana) y proteínas de fusión de esta para el tratamiento de enfermedades y trastornos asociados a NPP1. Las proteínas de la invención pueden usarse sorprendentemente para aumentar la actividad de NPP1 in vivo y aumentar o restaurar el nivel normal de pirofosfato en sangre (PPi) en los sujetos. Las proteínas de la invención también pueden usarse para evitar la acumulación de depósitos de calcio en articulaciones, riñón, corazón (por ejemplo, aorta), arterias, vasos sanguíneos o ligamento longitudinal posterior de la columna.

El sujeto puede ser un paciente humano que tiene deficiencias en la actividad de NPP1 (deficiencia de NPP1) que muestra bajos niveles de pirofosfato, que padece de una enfermedad o trastorno asociado con bajos niveles de pirofosfato, o que padece de un trastorno progresivo que se caracteriza por la acumulación de depósitos de calcio y otros minerales (mineralización) en fibras elásticas. La mineralización puede producirse en el corazón, las arterias, los vasos sanguíneos, el riñón, los ligamentos de la columna, la piel, los ojos y el tubo digestivo.

Más específicamente, las proteínas NPP1 y las proteínas de fusión a NPP1 de la descripción y la invención pueden usarse para tratar a sujetos que tienen enfermedades o trastornos asociados a NPP1, que incluyen, pero no se limitan a, calcificación arterial infantil idiopática (IIAC), resistencia a la insulina, raquitismo hipofosfatémico, y osificación del ligamento longitudinal posterior de la columna, u otras enfermedades tales como la calcificación vascular en la enfermedad renal crónica (VCKD), isquemia miocárdica, calcificación articular, estrías angioides, y pseudoxantoma elástico (PXE).

Las proteínas NPP1 solubles, fragmentos de estas y proteínas de fusión a estas NPP1 pueden usarse para tratar una amplia variedad de afecciones en un sujeto. Por ejemplo, el tratamiento de afecciones que pueden mejorarse al reducir y/o eliminar una o más estructuras de calcificación y/o evitar que se formen estructuras de calcificación en un sujeto tal como un mamífero, por ejemplo, un paciente humano está dentro del alcance de la invención y la descripción.

En un aspecto particularmente útil, la afección a tratar es la calcificación arterial generalizada (también conocida como calcificación arterial idiopática de la lactancia y calcificación de la media arterial en la lactancia).

En otras modalidades, las afecciones tales como pseudoxantoma elástico, calcificación vascular en enfermedad renal crónica, resistencia a la insulina, raquitismo hipofosfatémico u osificación del ligamento longitudinal posterior de la columna también pueden tratarse mediante el uso de los métodos descritos en la presente descripción.

Generalmente, la dosificación de la proteína de fusión que se administra a un sujeto variará en dependencia de factores conocidos tales como la edad, la salud y el peso del receptor, el tipo de tratamiento concurrente, la frecuencia del tratamiento y similares. Usualmente, una dosificación de ingrediente activo (es decir, proteína de fusión) puede estar entre aproximadamente 0,0001 y aproximadamente 50 miligramos por kilogramo de peso corporal. La dosificación precisa, la frecuencia de administración y la duración del tratamiento pueden determinarse por un médico experto en la técnica de administración de proteínas terapéuticas.

Una modalidad preferida de la presente invención implica una ectonucleótido pirofosfatasa fosfodiesterasa soluble (NPP1) para su uso en un método para el tratamiento de una enfermedad asociada a NPP1 u otras enfermedades de calcificación, que incluye la etapa de administrar una cantidad con eficacia terapéutica de una proteína NPP1 soluble aislada (sNPP1), fragmento biológicamente activo o proteína de fusión a NPP1 a un sujeto. Como se define en la presente descripción, una cantidad con eficacia terapéutica de proteína (es decir, una dosificación eficaz) varía de aproximadamente 0,001 a 50 mg/kg de peso corporal. El experto en la técnica apreciará que ciertos factores pueden influir en la dosificación requerida para tratar eficazmente a un sujeto, que incluyen pero no se limita a la gravedad de la enfermedad, los tratamientos previos, la salud general y/o la edad del sujeto, y otras enfermedades presentes. Además, el tratamiento de un sujeto con una cantidad con eficacia terapéutica de proteína puede incluir un único tratamiento o, preferentemente, puede incluir una serie de tratamientos. Además, se apreciará que la dosificación eficaz de proteína usada para el tratamiento puede aumentar o disminuir a lo largo de un tratamiento particular.

Como se define en la presente descripción, una cantidad con eficacia terapéutica de proteína o polipéptido (*es decir*, una dosificación eficaz) varía de aproximadamente 0,001 a 50 mg/kg de peso corporal, preferentemente de aproximadamente 0,01 a 25 mg/kg de peso corporal, con mayor preferencia de aproximadamente 0,1 a 20 mg/kg de peso corporal, y aún con mayor preferencia de aproximadamente 1 a 10 mg/kg, de 2 a 9 mg/kg, de 3 a 8 mg/kg, de 4 a 7 mg/kg, o de 5 a 6 mg/kg de peso corporal. El experto en la técnica apreciará que ciertos factores pueden influir en la dosificación requerida para tratar eficazmente a un sujeto, que incluyen pero no se limita a la gravedad de la enfermedad o trastorno, tratamientos previos, la salud general y/o la edad del sujeto, y otras enfermedades presentes. Además, el tratamiento de un sujeto con una cantidad con eficacia terapéutica de una proteína, polipéptido, o anticuerpo puede incluir un único tratamiento o, preferentemente, puede incluir una serie de tratamientos.

En un ejemplo preferido, en el intervalo de entre aproximadamente 0,1 a 20 mg/kg de peso corporal, una vez por semana, dos veces por semana, una vez en aproximadamente 10 días, una vez en aproximadamente 12 días, una vez en aproximadamente 14 días, una vez en aproximadamente 17 días, una vez en aproximadamente 20 días, una vez en aproximadamente 25 días o una vez en aproximadamente 30 días. Además, se apreciará que la dosificación eficaz de la proteína sNPP1 soluble, fragmento biológicamente activo o proteína de fusión de esta, que se usa para el tratamiento puede aumentar o disminuir durante el curso de un tratamiento particular.

La invención y descripción proporcionan una dosis con eficacia terapéutica de sNPP1, fragmento biológicamente activo o proteína de fusión de esta para administrarse a un paciente entre una vez cada 5 días y una vez cada 30 días durante un período de tiempo determinado por un experto en la técnica de las ciencias médicas. En una modalidad, el período de tiempo será el resto de la vida del paciente. En una modalidad, la frecuencia de dosificación está entre una vez cada 5 días y una vez cada 25 días. En una modalidad, la frecuencia de dosificación está entre una vez cada 5 días y una vez cada 21 días. En otra modalidad, la frecuencia de dosificación está entre una vez cada 7 días y una vez cada 14 días. sNPP1, fragmento biológicamente activo o proteína de fusión de esta puede administrarse una vez cada 5 días, una vez cada 6 días, una vez cada 7 días, una vez cada 8 días, una vez cada 9 días, una vez cada 10 días, una vez cada 11 días, una vez cada 12 días, una vez cada 13 días o una vez cada 14 días. En algunas modalidades, sNPP1, fragmento biológicamente activo o proteína de fusión de esta se administra aproximadamente una vez por semana. En otras modalidades, sNPP1, fragmento biológicamente activo o proteína de fusión de esta se administra aproximadamente cada dos semanas. En una modalidad, la frecuencia de dosificación es una vez aproximadamente 30 días.

En una modalidad, el paciente tiene menos de 2 años de edad. En algunas modalidades, aproximadamente 0,1 mg, aproximadamente 0,2 mg, aproximadamente 0,3 mg, aproximadamente 0,4 mg, aproximadamente 0,5 mg, aproximadamente 1 mg, aproximadamente 2 mg, aproximadamente 3 mg, aproximadamente 5 mg, aproximadamente 10 mg, aproximadamente 15 mg, aproximadamente 20 mg, aproximadamente 25 mg, aproximadamente 30 mg, aproximadamente 35 mg, aproximadamente 40 mg o aproximadamente 45 mg de sNPP1, fragmento biológicamente activo o proteína de fusión se administra al paciente con deficiencia de NPP1 u otra enfermedad de calcificación. En algunas modalidades, se administran al paciente de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 30 mg, de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 20 mg, de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 10 mg, o de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 5 mg.

En una modalidad, aproximadamente 1 mg/kg de sNPP1, fragmento biológicamente activo o proteína de fusión se administra al paciente una vez a la semana. En una modalidad, aproximadamente 2 mg/kg de sNPP1, fragmento biológicamente activo o proteína de fusión se administra al paciente una vez a la semana. En una modalidad, aproximadamente 3 mg/kg de sNPP1, fragmento biológicamente activo o proteína de fusión se administra al paciente una vez a la semana. En una modalidad, aproximadamente 4 mg/kg de sNPP1, fragmento biológicamente activo o proteína de fusión se administra al paciente una vez a la semana. En una modalidad, aproximadamente 5 mg/kg de sNPP1, fragmento biológicamente activo o proteína de fusión se administra al paciente una vez a la semana. En una modalidad, aproximadamente 6 mg/kg de sNPP1, fragmento biológicamente activo o proteína de fusión se administra al paciente una vez a la semana. En una modalidad, aproximadamente 7 mg/kg de sNPP1, fragmento biológicamente activo o proteína de fusión se administra al paciente una vez a la semana. En una modalidad, aproximadamente 8 mg/kg de sNPP1, fragmento biológicamente activo o proteína de fusión se administra al paciente una vez a la semana. En una modalidad, aproximadamente 9 mg/kg de sNPP1, fragmento biológicamente activo o proteína de fusión se administra al paciente una vez a la semana. En una modalidad, aproximadamente 10 mg/kg de sNPP1, fragmento biológicamente activo o proteína de fusión se administra al paciente una vez a la semana.

En algunas modalidades, el nivel de PPI en sangre en un paciente antes del tratamiento es aproximadamente 1 %, aproximadamente 2 %, aproximadamente 3 %, aproximadamente 5 %, aproximadamente 10 %, aproximadamente 15 %, aproximadamente 20 %, aproximadamente 30 %, aproximadamente 40 %, aproximadamente 50 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 70 % u aproximadamente 80 % de los niveles normales de PPI observados en un individuo humano normal. En una modalidad, el nivel de PPI en un paciente antes del tratamiento es aproximadamente 50 % o menos de los niveles normales de PPI observados en un individuo humano normal. En una modalidad, el nivel de PPI en un paciente antes del tratamiento es aproximadamente 40 % o menos de los niveles normales de PPI observados en un individuo humano normal. En algunas modalidades, el nivel de PPI en un paciente antes del tratamiento es aproximadamente 30 % o menos de los niveles normales de PPI observados en un individuo humano normal. En algunas modalidades, el nivel de PPI en un paciente antes del tratamiento es aproximadamente

30 % o menos de los niveles normales de PPI observados en un individuo humano normal. En algunas modalidades, el nivel de PPI en un paciente antes del tratamiento es aproximadamente 20 % o menos de los niveles normales de PPI observados en un individuo humano normal. En algunas modalidades, el nivel de PPI en un paciente antes del tratamiento es aproximadamente 10 % o menos de los niveles normales de PPI observados en un individuo humano normal. En algunas modalidades, el nivel de PPI en un paciente antes del tratamiento es aproximadamente 5 % o menos de los niveles normales de PPI observados en un individuo humano normal. En algunas modalidades, un paciente no muestra PPI medible antes del tratamiento.

La sNPP1, el fragmento biológicamente activo o la proteína de fusión pueden administrarse mediante, por ejemplo, inyecciones subcutáneas, inyecciones intramusculares e infusiones o inyecciones intravenosas (IV).

En una modalidad, sNPP1, fragmento biológicamente activo o proteína de fusión se administra por vía intravenosa mediante infusión IV mediante cualquier método útil. En un ejemplo, sNPP1, fragmento biológicamente activo o proteína de fusión puede administrarse mediante infusión intravenosa a través de una línea periférica. En otro ejemplo, sNPP1, fragmento biológicamente activo o proteína de fusión puede administrarse mediante infusión intravenosa a través de un catéter central insertado periféricamente.

En otra modalidad, sNPP1, fragmento biológicamente activo o proteína de fusión se administra por vía intravenosa mediante inyección IV.

En otra modalidad, sNPP1, fragmento biológicamente activo o proteína de fusión puede administrarse mediante inyección intraperitoneal.

En otra modalidad, sNPP1, fragmento biológicamente activo o proteína de fusión puede administrarse mediante inyecciones subcutáneas.

En otra modalidad, sNPP1, fragmento biológicamente activo o proteína de fusión puede administrarse mediante inyecciones intramusculares.

En aún otra modalidad, sNPP1, fragmento biológicamente activo o proteína de fusión se administra mediante una cápsula farmacéuticamente aceptable de la proteína terapéutica. Por ejemplo, la cápsula puede ser una cápsula de gelatina con revestimiento entérico.

En una modalidad de la invención o aspecto de la descripción, la ectonucleótido pirofosfatasa fosfodiesterasa soluble (NPP1) para su uso en el método implica administrar la proteína NPP1 soluble o la proteína de fusión a NPP1 de la invención sola, o en combinación con otro(s) agente(s). En una modalidad de la invención o aspecto de la descripción, la sNPP1 para su uso en el método implica administrar una proteína NPP1 o una proteína de fusión a NPP1 de la invención como terapia para compensar la expresión o actividad reducida o aberrante de NPP1 en el sujeto que tiene una deficiencia de NPP1 u otra enfermedad o trastorno asociado.

En una modalidad, las proteínas sNPP1, sus fragmentos y proteínas de fusión aisladas pueden administrarse antes, después o simultáneamente con el agente o pueden administrarse conjuntamente con otras terapias conocidas. La administración conjunta de las proteínas sNPP1, sus fragmentos y proteínas de fusión aisladas de la presente invención con otros agentes terapéuticos puede proporcionar dos agentes que funcionan a través de diferentes mecanismos, lo que produce un mayor efecto terapéutico. Dicha administración conjunta puede resolver problemas debido al desarrollo de resistencia a los fármacos.

En aspectos particulares, esta descripción se refiere a un método para reducir la calcificación vascular en un sujeto que lo necesita. El método se basa en el hallazgo sorprendente de que las formas solubles de NPP1 pueden administrarse a animales que tienen niveles bajos de PPI en plasma (un inhibidor o calcificación tisular) o niveles altos de Pi en suero, para provocar un aumento transitorio de PPI en plasma en los animales, y que el aumento transitorio de PPI en plasma puede inhibir la calcificación vascular en el animal. Dado que el aumento de PPI en plasma es transitorio, la terapia puede adaptarse para inhibir la calcificación tisular no deseada o patológica, tal como la calcificación vascular, sin inhibir la calcificación ósea ni inducir osteomalacia.

En términos generales, la descripción se refiere a un método para reducir la calcificación tisular (por ejemplo, calcificación vascular) en un sujeto que lo necesita, mediante la administración al sujeto de dos o más dosis de NPP1 soluble (sNPP1). Cada una de las dosis contiene una cantidad de NPP1 soluble que es suficiente para lograr un aumento transitorio de PPI en plasma en el sujeto, preferentemente con un regreso al nivel de PPI inicial dentro de aproximadamente 48 horas después de la administración de la dosis. El período de tiempo entre la administración de cada dosis es generalmente al menos 2 días.

El sujeto que lo necesita puede ser de cualquier edad y género, y preferentemente tiene un contenido bajo de PPI en plasma o alto de Pi en suero (por ejemplo, lo que da como resultado una relación PPI:Pi alterada). El bajo contenido de PPI en plasma puede deberse, por ejemplo, a deficiencia congénita de NPP1 tal como mutación en el gen que codifica NPP1 que conduce a una expresión reducida de NPP1 activa o actividad enzimática reducida (asociada a la

deficiencia de NPP1 y raquitismo hipofosfatémico autosómico recesivo) y mutación en el gen que codifica MRP6 que conduce a una proteína MRP6 ausente o no funcional (asociada a pseudoxantoma elástico). Además, se observa con frecuencia bajo contenido de PPi en plasma o alto contenido de Pi en suero en pacientes con enfermedad renal crónica, enfermedad/insuficiencia renal en etapa terminal, diabetes mellitus y otras afecciones. En consecuencia, el sujeto que necesita terapia puede tener enfermedad renal crónica (CKD), enfermedad renal en etapa terminal (ESRD), calcificación arterial generalizada de la lactancia (GACI), diabetes mellitus II, raquitismo hipofosfatémico autosómico recesivo, un trastorno cardiovascular, aterosclerosis y/o pseudoxantoma elástico (PXE). El sujeto es generalmente un ser humano, pero también puede ser cualquier otro mamífero o no mamífero adecuado.

La calcificación tisular es un proceso progresivo y las personas nacidas con deficiencia congénita de NPP1 pueden no mostrar calcificación de los tejidos durante varios años. Al iniciar la terapia lo antes posible, es probable que la calcificación pueda reducirse y/o minimizarse en tales sujetos. En sujetos con niveles bajos de PPi en plasma no causados por la mutación de la línea germinal, o con niveles altos de Pi en suero (por ejemplo, con una relación PPi:Pi en plasma alterada), la terapia debe comenzar lo antes posible (es decir, poco después del diagnóstico de las afecciones, tales como enfermedad renal crónica (CKD) o enfermedad renal en etapa terminal (ESRD)). En determinadas modalidades, el sujeto a tratar puede tener entre 1 mes y 24 meses de edad, menos de 1 año de edad, menos de 2 años de edad, menos de 3 años de edad, menos de 4 años de edad o menos de 5 años de edad.

Cada dosis de sNPP1 que se administra al sujeto contiene una cantidad de sNPP1 suficiente para lograr un aumento transitorio de PPi en plasma. Preferentemente, el aumento transitorio se caracteriza por un nivel máximo de PPi que es al menos aproximadamente 40 % del nivel normal de PPi en plasma, al menos aproximadamente 50 % del nivel normal de PPi en plasma, al menos aproximadamente 60 % del nivel normal de PPi en plasma, al menos aproximadamente 70 % del nivel normal de PPi en plasma, entre aproximadamente 40 % y 100 % del nivel normal de PPi en plasma, entre aproximadamente 50 % y 100 % del nivel normal de PPi en plasma, entre aproximadamente 60 % y 100 % del nivel normal de PPi en plasma, entre aproximadamente 70 % y 100 % del nivel normal de PPi en plasma, entre aproximadamente 80 % y 100 % del nivel normal de PPi en plasma, o entre aproximadamente 100 % y 200 % del nivel normal de PPi en plasma.

Preferentemente, el aumento transitorio de PPi en plasma después de la administración de sNPP1 se mantiene durante al menos aproximadamente 4 horas, al menos aproximadamente 6 horas, al menos aproximadamente 8 horas, al menos aproximadamente 10 horas o al menos aproximadamente 12 horas. Además, se prefiere que el aumento transitorio de PPi en plasma regrese al nivel de PPi inicial del sujeto dentro de aproximadamente 48 horas después de la administración de la dosis, dentro de aproximadamente 3 días después de la administración de la dosis o dentro de aproximadamente 4 días después de la administración de la dosis.

El bajo contenido de PPi en plasma en un sujeto antes del tratamiento es aproximadamente 50 % o menos, preferentemente 40 % o menos de los niveles normales de PPi observados en un sujeto normal (por ejemplo, un ser humano). En algunos aspectos, el nivel de PPi en un sujeto antes del tratamiento es aproximadamente 30 % o menos de los niveles normales de PPi. En otros aspectos, el nivel de PPi en un sujeto antes del tratamiento es aproximadamente 20 % o menos de los niveles normales de PPi. En algunos otros aspectos, el nivel de PPi en un sujeto antes del tratamiento es aproximadamente 10 % o menos de los niveles normales. En algunos aspectos, un sujeto puede no tener PPi medible antes del tratamiento.

El contenido alto de Pi en suero en un sujeto antes del tratamiento es aproximadamente 110 % o más, preferentemente 125 % o más de los niveles normales de Pi observados en un sujeto normal (por ejemplo, un ser humano). En algunos aspectos, el nivel de Pi en un sujeto antes del tratamiento es aproximadamente 150 % o más de los niveles normales de PPi. En otros aspectos, el nivel de Pi en un sujeto antes del tratamiento es aproximadamente 200 % o más de los niveles normales de PPi. En algunos otros aspectos, el nivel de Pi en un sujeto antes del tratamiento es aproximadamente 300 % o más de los niveles normales. Sin desear limitarse a ninguna teoría particular, se cree que inducir un aumento transitorio de PPi en suero puede compensar los niveles elevados de Pi en plasma y restaurar transitoriamente la relación PPi:Pi normal o casi normal, para inhibir de esta manera la calcificación tisular que promueven los niveles más altos que los normales de Pi en suero.

La cantidad de sNPP1 suficiente para lograr el aumento transitorio de PPi en plasma puede determinarse fácilmente por un médico con conocimientos ordinarios, por ejemplo, mediante la administración de una dosis que se espera que produzca el aumento transitorio de PPi en plasma, determinación de si se produce el aumento transitorio y después la realización de los ajustes adecuados a la dosis. La cantidad a administrar se verá influenciada por una serie de factores convencionales, que incluyen la sNPP1 particular utilizada, la edad, la salud y el peso del sujeto, la sensibilidad del sujeto a los fármacos y otros factores relevantes. Típicamente, la cantidad de sNPP1 que se administrará en cada dosis está entre aproximadamente 0,001 y aproximadamente 50 miligramos por kilogramo de peso corporal, donde se prefiere 1 mg/kg a 5 mg/kg, 1 mg/kg a 10 mg/kg, 1mg/kg a 20 mg/kg, 1 mg/kg, 2 mg/kg, 3 mg/kg, 4 mg/kg, 5 mg/kg, 6 mg/kg, 7 mg/kg, 8 mg/kg, 9 mg/kg, 10 mg/kg, 11 mg/kg, 12 mg/kg, 13 mg/kg, 14 mg/kg, 15 mg/kg, 16 mg/kg, 17 mg/kg, 18 mg/kg, 19 mg/kg, o 20 mg/kg. La dosificación precisa, la frecuencia de administración y la duración del tratamiento pueden determinarse por un médico experto en la técnica de administración de proteínas terapéuticas.

En algunas modalidades preferidas, cada dosis contiene aproximadamente 1,0 mg a aproximadamente 5,0 mg de

sNPP1 por Kg de peso corporal, aproximadamente 1,0 mg a aproximadamente 10,0 mg de sNPP1 por Kg de peso corporal o aproximadamente 1,0 mg a aproximadamente 20,0 mg de sNPP1 por Kg de peso corporal.

5 El período de tiempo entre dosis se selecciona para permitir que los niveles de PPI en suero del sujeto vuelvan a los niveles iniciales, y sea de al menos 2 (48 horas) días, pero puede ser más largo según se desee o se indique. Por ejemplo, el período de tiempo entre dosis puede ser de 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, una semana, 10 días, 12 días, dos semanas, tres semanas o aproximadamente 1 mes.

10 En general, es conveniente iniciar la terapia de acuerdo con los métodos descritos en la presente descripción lo antes posible después del diagnóstico de bajo contenido de PPI en plasma, alto contenido de Pi en suero o deficiencia de NPP1. Los sujetos que nacen con deficiencia congénita de NPP1 pueden no mostrar calcificación de los tejidos durante varios años. Al iniciar la terapia lo antes posible, es probable que la calcificación pueda reducirse y/o minimizarse en tales sujetos. En sujetos con niveles bajos de PPI en plasma no causados por la mutación de la línea germinal o con alto contenido de Pi en suero, la terapia debe comenzar lo antes posible después del diagnóstico de afecciones, como enfermedad renal crónica (CKD) o enfermedad renal en etapa terminal (ESRD).

15 El método proporciona una forma efectiva de reducir la calcificación tisular (por ejemplo, calcificación vascular) en un sujeto con bajo contenido de PPI en plasma o con alto contenido de Pi en suero, que incluye aquellos con una relación alterada de PPI a Pi. La calcificación tisular es preferentemente calcificación vascular, que es preferentemente calcificación arterial pero también puede ser calcificación venosa. La calcificación vascular puede ser de la capa íntima o media. El sujeto a tratar de acuerdo con los métodos descritos en la presente descripción puede tener deficiencia de NPP1, calcificación arterial generalizada (GACI), también conocida como calcificación arterial idiopática de la lactancia y calcificación de la media arterial de la lactancia. El sujeto a tratar también puede tener un trastorno cardiovascular, tal como enfermedad coronaria arterial y/o aterosclerosis. El sujeto que se va a tratar puede tener enfermedad renal crónica (CKD) o enfermedad renal en etapa terminal (ESRD). El sujeto a tratar puede tener diabetes mellitus (por ejemplo, diabetes tipo II). El sujeto a tratar puede tener pseudoxantoma elástico (PXE).

20 La sNPP1 puede administrarse mediante cualquier método o vía de administración adecuada, tal como parenteral, oral o por inhalación. Se prefiere la administración parenteral, tal como inyección o infusión intravenosa, inyección subcutánea, inyecciones intraperitoneales o inyecciones intramusculares.

25 Si se desea, la sNPP1 puede administrarse con uno o más agentes coterapéuticos. Para la terapia conjunta, la sNPP1 y uno o más agentes terapéuticos adicionales se administran de manera que existe un solapamiento sustancial en sus actividades farmacológicas individuales en el sujeto. En consecuencia, cualquier agente coterapéutico puede administrarse antes, simultáneamente con o después de la administración de sNPP1. La terapia conjunta puede proporcionar dos agentes que funcionan a través de diferentes mecanismos que producen un mayor efecto terapéutico.

30 Además de provocar un aumento transitorio de PPI en suero, se cree que administrar sNPP1 de acuerdo con los métodos descritos en la presente descripción puede alterar los niveles de ciertas proteínas en el sujeto. Por ejemplo, sin desear limitarse a ninguna teoría particular, se cree que administrar sNPP1 de acuerdo con los métodos descritos en la presente descripción puede disminuir los niveles de osteopontina, osteoprotegerina y factor de crecimiento de fibroblastos 23 (FGF-23) en el sujeto. Los niveles de estas proteínas también pueden usarse, además de los niveles de PPI en plasma y Pi en suero, para monitorear la terapia y adaptar la dosificación.

35 sNPP1

40 La presente invención emplea NPP1 soluble que tiene un dominio biológicamente activo de NPP1 (*es decir*, componentes de NPP1 que contienen al menos un dominio catalítico extracelular de NPP1 de origen natural para la actividad pirofosfatasa y/o fosfodiesterasa). Las proteínas NPP1 solubles de la invención comprenden al menos el dominio de NPP1 esencial para llevar a cabo la actividad pirofosfatasa y/o fosfodiesterasa.

45 En una modalidad, la NPP1 soluble, fragmento y proteínas de fusión de estos pueden formar homodímeros o monómeros funcionales. En una modalidad preferida, una proteína NPP1 soluble o una proteína de fusión a esta NPP1 pueden analizarse para determinar la actividad pirofosfatasa así como también la capacidad de aumentar los niveles de pirofosfato in vivo.

50 Las proteínas NPP1 solubles preferidas y las proteínas de fusión a NPP1 de la invención son enzimáticamente activas *in vivo* (por ejemplo, en el ser humano). En una modalidad, la proteína soluble comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 60, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 % de identidad de secuencia con la siguiente secuencia:

55

PSCAKEVKSCCKGRFCERTFGNCRCDAAACVELGNCCLDYQETCIEPEHIWTCNKF
 RCGEKRLTRSLCACSDDCCKDKGDCCINYSVVCQGEKSWVEEPCESINEPQCPAG
 FETPPTLLFSLDGFRAEYLHTWGGLLPVISKLLKCGTYTKNMRPVYPTKTFPNH
 5 YSIVTGLYPESHGHIIDNKMYDPKMNASFSLKSKKEKFNPEWYKGEPIWVTAKYQ
 GLKSGTFFWPGSDVEINGIFPDIYKMYNGSVPFEEERILAVLQWLQLPKDERPHFY
 TLYLEEPDSSGHSYGPVSSEVIKALQQRVDGMVGMMLMDGLKELNLHRCNLILIS
 10 DHGMEQGSCKKYIYLNKYLGDVKNIKVIYGPAARLRPSDVPDKYYSFNIEGIA
 RNLSCREPNQHFKPYLKHFLPKRLHF AKSDRIEPLTFYLDPQWQLALNPSEKRY
 CGSGFHGSDNVFSNMQALFVGYGPGFKHGIEADTFENIEVYNLMCDLLNLTPA
 PNNGTHGSLNHLLKNPVYTPKHPKEVHPLVQCPFTRNPRDNLGCSCNPSILPIED
 15 FQTQFNLTVAEEKIHKHETLPYGRPRVLQKENTICLLSQHQFMSGYSQDILMPLW
 TSYTVDRNDSFSTEDFSNCLYQDFRIPLSPVHKCSFYKNNTKVSYGFLSPPQLNK
 NSSGIYSEALLTTNIVPMYQSFQVIWRYFHDTLLRKYAEERNGVNVVSGPVDFD
 DYDGRCDLENLRQKRRVIRNQEILIPTHFFIVLTSCKDTSQTPLHCENLDTLAFI
 20 LPHRTDNSESCVHGKHDSWVEELLMLHRARITDVEHITGLSFYQQRKEPVSDI
 LKLKTHLPTFSQED
 (SEQ ID NO:2)

25 Cualquier forma enzimáticamente activa deseada de NPP1 soluble puede usarse en los métodos descritos en la presente descripción. La sNPP1 enzimáticamente activa puede aumentar los niveles de PPI en ensayos enzimáticos adecuados, y puede analizarse para determinar la actividad pirofosfatasa, la actividad fosfodiesterasa o la actividad pirofosfatasa y fosfodiesterasa. Típicamente, la sNPP1 contiene al menos un componente de NPP1 que carece de los dominios citosólico N-terminal y transmembrana de la NPP1 transmembrana de origen natural. En aspectos preferidos, el componente de NPP1 contiene la región rica en cisteína (aminoácidos 99-204 de la SEQ ID NO:1) y la región catalítica (aminoácidos 205-591 de la SEQ ID NO:1) de la NPP1 humana de origen natural. Típicamente, el componente de NPP1 también incluye la región C-terminal (aminoácidos 592 a 925 de la SEQ ID NO:1), y tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:2. Sin embargo, la región C-terminal puede truncarse si se desea. En consecuencia, los componentes de NPP1 preferidos incluyen la región rica en cisteína y la región catalítica de NPP1 humana (aminoácidos 99-591 de la SEQ ID NO:1) o la región rica en cisteína, la región catalítica y la región C-terminal de NPP1 humana (SEQ ID NO:2). Otros componentes de NPP1 preferidos contienen solo una porción del dominio rico en cisteína y tienen la secuencia de aminoácidos 107 a 925 de la SEQ ID NO: 1 o los aminoácidos 187 a 925 de la SEQ ID NO: 1.

40 La región rica en cisteína de NPP1 (es decir, los aminoácidos 99 a 204 de la SEQ ID NO: 1) puede facilitar la dimerización de la sNPP1. La sNPP1, que incluye proteínas de fusión, puede estar en la forma de un monómero de homodímero funcional.

45 La secuencia de aminoácidos del componente de NPP1 puede ser una variante de la secuencia de NPP1 de origen natural, siempre y cuando el componente de NPP1 sea enzimáticamente activo. Las variantes de NPP1 son enzimáticamente activas y tienen al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 % y con mayor preferencia al menos 96 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la porción correspondiente de NPP1 humana (por ejemplo, en la longitud de la región rica en cisteína, la región catalítica, la región C-terminal, la región rica en cisteína más la región catalítica, la región rica en cisteína más la región catalítica más la región C-terminal. Las variantes de NPP1 preferidas tienen al menos 90 %, preferentemente al menos 95 %, con mayor preferencia al menos 97 % de identidad de secuencia de aminoácidos con (i) la secuencia de aminoácidos de los residuos 205-591 de la SEQ ID NO: 1, (ii) la secuencia de aminoácidos de los residuos 99-591 de la SEQ ID NO: 1, (iii) la secuencia de aminoácidos de los residuos 99-925 de la SEQ ID NO: 1, (iv) la secuencia de aminoácidos de los residuos 107-925 de la SEQ ID NO: 1, o (v) la secuencia de aminoácidos de los residuos 187-925 de la SEQ ID NO: 1. Las posiciones adecuadas para la variación de aminoácidos se conocen bien a partir de estudios estructurales de NPP1 y análisis de mutaciones en NPP1 asociadas a la enfermedad. Por ejemplo, la sustitución de los siguientes aminoácidos ocurre en ciertas mutaciones asociadas a enfermedad que reducen la actividad enzimática de NPP1, y deben evitarse las variaciones de los aminoácidos en estas posiciones: Ser216, Gly242, Pro250, Gly266, Pro305, Arg349, Tyr371, Arg456, Tyr471, His500, Ser504, Tyr513, Asp538, Tyr570, Lys579, Gly586; Tyr659, Glu668, Cys726, Arg774, His777, Asn792, Asp804, Arg821, Arg888, y Tyr901 (ver, por ejemplo, Jansen, S. y otros, Structure 20:1948-1959 (2012)).

60 En una modalidad, la proteína NPP1 soluble puede ser una proteína de fusión que se fusiona de manera recombinante o se une de manera química (por ejemplo, enlace covalente, enlace iónico, enlace hidrófobo y fuerzas de Van der Waals) a una pareja de fusión. En otra modalidad, la proteína de fusión tiene al menos 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 3 o la SEQ ID NO: 4.

Para determinar el por ciento de identidad de dos secuencias de aminoácidos, las secuencias se alinean para propósitos de comparación óptimos (por ejemplo, pueden introducirse espacios en una o ambas de una primera y una segunda secuencias de aminoácidos o ácido nucleico para alcanzar una alineación óptima y las secuencias no homólogas pueden ignorarse para los propósitos de comparación). En una modalidad preferida, la longitud de una secuencia de referencia alineada con fines de comparación es al menos 30 %, preferentemente al menos 40 %, con mayor preferencia al menos 50 %, aún con mayor preferencia al menos 60 %, y aún con mayor preferencia al menos 70 %, 80 % o 90 % de la longitud de la secuencia de referencia (por ejemplo, secuencia de aminoácidos de sNPP1 de la SEQ ID NO:2; aminoácidos 107-925 de la SEQ ID NO:1 o aminoácidos 187-925 de la SEQ ID NO:1). Después, se comparan los residuos de aminoácidos o nucleótidos en las posiciones de aminoácidos correspondientes. Cuando una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo residuo de aminoácido o nucleótido que la posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición (como se usa en la presente descripción, el aminoácido es equivalente al aminoácido y "homología" de ácido nucleico). El por ciento de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias, teniendo en cuenta el número de espacios, y la longitud de cada espacio, que necesitan introducirse para una alineación óptima de las dos secuencias.

La comparación de secuencias y la determinación del por ciento de identidad entre dos secuencias pueden lograrse mediante el uso de un algoritmo matemático. En un aspecto preferido, el por ciento de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se determina mediante el uso del algoritmo Needleman y Wunsch (J Mol Biol 1970, 48, 444-453) que se ha incorporado al programa GAP en el paquete de software GCG (disponible en www.gcg.com), mediante el uso de una matriz Blossum 62 o una matriz PAM250, y un peso del espacio de 16, 14, 12, 10, 8, 6 o 4 y un peso de la longitud de 1, 2, 3, 4, 5 o 6. En otra modalidad, el por ciento de identidad entre dos aminoácidos se determina mediante el uso del algoritmo de E. Meyers y W. Miller (CABIOS, 1989, 4, 11-17) que se ha incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0 o 2.0U), mediante el uso de una tabla de residuos y peso PAM120, una penalización por longitud del espacio de 12 y una penalización por espacio de 4.

La sNPP1 puede consistir o consistir esencialmente en un componente de NPP1 como se describe en la presente descripción. Alternativamente, la sNPP1 puede tener la forma de una proteína de fusión que contiene un componente de NPP1 y uno o más de otros polipéptidos, denominados parejas de fusión, opcionalmente a través de un enlazador adecuado en cada caso, o en la forma de un conjugado entre un componente de NPP1 y otra molécula (por ejemplo, PEG). Cuando la sNPP1 tiene forma de una proteína de fusión, cada pareja de fusión se localiza preferentemente en el extremo C-terminal respecto al componente de NPP1. Sin desear unirse a ninguna teoría particular, se cree que las proteínas de fusión que contienen un componente de NPP1 que contiene la región rica en cisteína y la región catalítica, y una o más proteínas de fusión que se ubican en el extremo C-terminal respecto al componente de NPP1, se prefieren sobre otras configuraciones de proteínas de fusión a NPP1 porque pueden expresarse a niveles suficientes y son suficientemente estables para usarse como proteínas terapéuticas.

La proteína de fusión puede incluir cualquier pareja de fusión adecuada. Ventajosamente, en la técnica se conocen bien una serie de parejas de fusión que pueden proporcionar ciertas ventajas, tales como agregación e inmunogenicidad reducidas, aumento de la solubilidad, expresión y/o estabilidad mejoradas, y rendimiento farmacocinético y/o farmacodinámico mejorado. Véase, por ejemplo, Strohl, W.R. BioDrugs 29:215-239 (2015). Por ejemplo, se conoce bien que la albúmina, los fragmentos de albúmina o las variantes de albúmina (por ejemplo, albúmina sérica humana y fragmentos o variantes de esta) pueden incorporarse en las proteínas de fusión y que tales proteínas de fusión pueden purificarse fácilmente, ser estables y tener una semivida plasmática mejorada. Se describen albúmina, fragmentos de albúmina y variantes de albúmina adecuadas que pueden usarse en las proteínas de fusión a sNPP1, por ejemplo en los documentos WO 2005/077042A2 y WO 03/076567A2. Además, se sabe que las fusiones a transferrina humana mejoran la semivida. Véase, por ejemplo, Kim BJ y otros, J Pharmacol Expr Ther 334(3):682-692 (2010); y documento WO 2000/020746. Además, pueden usarse péptidos que se unen a albúmina o transferrina, tales como anticuerpos o fragmentos de anticuerpos. Ver, por ejemplo, los documentos EP 0486525 B1, US 6,267,964 B1, WO 04/001064A2, WO 02/076489A1, WO 01/45746, WO 2006/004603, y WO 2008/028977. De manera similar, las proteínas de fusión a Fc de inmunoglobulina se conocen bien. Ver, por ejemplo, Czajkowsky DM y otros, EMBO Mol Med 4(10): 1015-1028 (2012), patente de EE. UU. núm. 7,902,151; y patente de EE. UU. núm. 7,858,297. La proteína de fusión también puede incluir una secuencia CTP (véase además, Fares y otros, Endocrinol 2010, 151, 4410-4417; Fares y otros, Proc Natl Acad Sci 1992, 89, 4304-4308; y Furuhashi y otros, Mol Endocrinol 1995, 9, 54-63). Preferentemente, la pareja de fusión es el Fc de una inmunoglobulina (por ejemplo, Fc o IgG1 humana). El Fc puede incluir CH1, CH2 y CH3 de IgG1 humana y opcionalmente la región bisagra de IgG1 humana (EPKSCD-KTHTCPPCP (SEQ ID NO:13)) o una porción de la región bisagra de IgG1 humana (por ejemplo, DKHTHTCPPCP (SEQ ID NO:14) o PKSCDKTHTCPPCP (SEQ ID NO:15)) si se desea. En algunas proteínas de fusión, el Fc puede incluir CH2 y CH3 de IgG1 humana, o el Fc de IgG2 humana o IgG4 humana, si se desea.

Preferentemente, la proteína de fusión a sNPP1 comprende un componente de NPP1 y un péptido que aumenta la semivida de la proteína de fusión, con la máxima preferencia el Fc de una inmunoglobulina (por ejemplo, Fc o IgG1 humana). Como se usa en la presente descripción, una "proteína que aumenta la semivida de la proteína de fusión" se refiere a una proteína que, cuando se fusiona con una NPP1 soluble o un fragmento biológicamente activo, aumenta la semivida del polipéptido de NPP1 soluble o fragmento biológicamente activo en comparación con la semivida del polipéptido de NPP1 soluble, solo, o el fragmento biológicamente activo de NPP1, solo.

En una modalidad, la semivida de la proteína de fusión a NPP1 aumenta un 50 % en comparación con la semivida del polipéptido de NPP1 o fragmento biológicamente activo, solo. En otra modalidad, la semivida de la proteína de fusión a NPP1 aumenta un 60 % en comparación con la semivida del polipéptido de NPP1 o fragmento biológicamente activo, solo. En otra modalidad, la semivida de la proteína de fusión a NPP1 aumenta un 70 % en comparación con la semivida del polipéptido de NPP1 o fragmento biológicamente activo, solo. En otra modalidad, la semivida de la proteína de fusión a NPP1 aumenta un 80 % en comparación con la semivida del polipéptido de NPP1 o fragmento biológicamente activo, solo. En otra modalidad, la semivida de la proteína de fusión a NPP1 aumenta un 90 % en comparación con la semivida del polipéptido de NPP1 o fragmento biológicamente activo, solo.

En otra modalidad, la semivida de la proteína de fusión a NPP1 aumenta 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces o 10 veces en comparación con la semivida del polipéptido de NPP1 o fragmento biológicamente activo, solo. Los métodos para determinar la semivida de una proteína o proteína de fusión se conocen bien en la técnica. Por ejemplo, Zhou y otros, *Determining Protein Half-Lives, Methods in Molecular Biology* 2004, 284, 67-77 describen numerosos métodos para probar la semivida de una proteína. Si se desea, la proteína de fusión puede conjugarse con polímeros u otros compuestos adecuados que extienden la semivida, tal como polietilenglicol (PEG), puede conjugarse con las proteínas de fusión a NPP1.

En una modalidad, el péptido que aumenta la vida media de la proteína de fusión es una secuencia CTP (véase, además, Fares y otros, 2010, *Endocrinol.*, 151(9):4410-4417; Fares y otros, 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 89(10):4304-4308; y Furuhashi y otros, 1995, *Molec. Endocrinol.*, 9(1):54-63).

En otra modalidad, el péptido que aumenta la semivida de la proteína de fusión es un dominio Fc de una Ig.

Las parejas de fusión también pueden seleccionarse para dirigir la proteína de fusión a los sitios deseados de importancia clínica o biológica (por ejemplo, sitio de calcificación). Por ejemplo, los péptidos que tienen alta afinidad por el hueso se describen en la patente de Estados Unidos núm. 7,323,542. Los péptidos que pueden aumentar el direccionamiento de proteínas a sitios de calcificación pueden contener un tramo consecutivo de al menos aproximadamente 4 aminoácidos ácidos, por ejemplo, ácidos glutámicos o ácidos aspárticos. Típicamente, el péptido que dirige la proteína de fusión a los sitios de calcificación comprenderá entre 4 y 20 aminoácidos ácidos consecutivos, por ejemplo 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 aminoácidos consecutivos seleccionados de ácido glutámico y ácido aspártico. El péptido puede consistir únicamente en residuos de ácido glutámico, únicamente en residuos de ácido aspártico, o ser una mezcla de residuos de ácido glutámico y ácido aspártico. Un resto particularmente preferido para dirigirse a la calcificación es Asp₁₀ (SEQ ID NO: 18).

En una modalidad, la proteína de fusión a NPP1 de la invención comprende un polipéptido de NPP1 y un resto que aumenta el direccionamiento de la proteína a sitios de calcificación tales como un segmento consecutivo de aminoácidos ácidos, por ejemplo, ácidos glutámicos o ácidos aspárticos.

Los enlazadores peptídicos adecuados para su uso en proteínas de fusión se conocen bien y típicamente adoptan una conformación extendida flexible y no interfieren con la función del componente de NPP1 o las parejas de fusión. Las secuencias enlazadoras peptídicas pueden contener residuos de Gly, His, Asn y Ser en cualquier combinación. Los enlazadores peptídicos útiles incluyen, sin limitación, poli-Gly, poli-His, poli-Asn o poli-Ser. Otros aminoácidos casi neutros, tales como Thr y Ala también pueden usarse en la secuencia enlazadora. Las secuencias de aminoácidos que pueden emplearse útilmente como enlazadores incluyen las descritas en Maratea y otros, *Gene* 1985, 40, 39-46; Murphy y otros, *Proc Natl Acad Sci USA* 1986, 83, 8258-8262; patente de EE. UU. núm. 4,935,233 y patente de EE. UU. núm. 4,751,180. Otros enlazadores adecuados pueden obtenerse a partir de proteínas de origen natural, tales como la región bisagra de una inmunoglobulina. Un enlazador sintético preferido es (Gly₄Ser)_n, donde n es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 (SEQ ID NO: 19). Preferentemente, n es 3 o 4. Por ejemplo, en algunas modalidades, el enlazador es (Gly₄Ser)₃ (SEQ ID NO:16) y la proteína de fusión incluye un enlazador con la secuencia de aminoácidos GlyGlyGlyGlySerGlyGlyGlyGlySerGlyGlyGlyGlySer (SEQ ID NO:16). Típicamente, el enlazador es de 1 a aproximadamente 50 residuos de aminoácidos de longitud, o de 1 a aproximadamente 25 aminoácidos de longitud. Frecuentemente, el enlazador tiene entre aproximadamente 8 y aproximadamente 20 aminoácidos de longitud.

Las proteínas de fusión a NPP1 preferidas comprenden desde el extremo N al extremo C-terminal un componente de NPP1, opcionalmente un enlazador, una región Fc de una inmunoglobulina (por ejemplo, Fc de IgG1 humana que incluye opcionalmente una bisagra o una porción de esta), opcionalmente un segundo revestimiento, y opcionalmente un resto de direccionamiento. Por lo tanto, la región Fc y el resto de direccionamiento opcional, cuando están presentes, se ubican cada una de manera C-terminal respecto al componente de NPP1. El componente de NPP1 comprende preferentemente la región rica en cisteína y el dominio catalítico de NPP1, carece de los dominios citosólico N-terminal y transmembrana, y opcionalmente contiene la región C-terminal.

Una proteína de fusión preferida comprende, desde el extremo N-terminal hasta el extremo C-terminal, un componente de NPP1 que comprende el dominio rico en cisteína, el dominio catalítico y la región C-terminal de NPP1 humana; y la región Fc, que incluye la bisagra, de una inmunoglobulina humana. Preferentemente, la región Fc es de IgG1 humana. En modalidades particulares, la proteína de fusión tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al

menos 98 % o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:3. Una proteína de fusión preferida de este tipo tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3.

5 Otra proteína de fusión preferida comprende, desde el extremo N-terminal hasta el extremo C-terminal, un componente de NPP1 que comprende el dominio rico en cisteína, el dominio catalítico y la región C-terminal de NPP1 humana; un enlazador (por ejemplo, (Gly₄Ser)₃(SEQ ID NO: 16)); y la región Fc, que incluye la bisagra, de una inmunoglobulina humana. Preferentemente, la región Fc es de IgG1 humana.

10 Otra proteína de fusión preferida comprende, desde el extremo N-terminal hasta el extremo C-terminal, un componente de NPP1 que comprende el dominio rico en cisteína, el dominio catalítico y la región C-terminal de NPP1 humana; la región Fc, que incluye la bisagra o una porción de esta, de una inmunoglobulina humana; y un resto que dirige la proteína de fusión a sitios de calcificación. Preferentemente, la región Fc es de IgG1 humana. Preferentemente, el resto que dirige la proteína de fusión a los sitios de calcificación es Asp₁₀(SEQ ID NO: 18). Con mayor preferencia, la región Fc es de IgG1 humana y el resto que dirige la proteína de fusión a los sitios de calcificación es Asp₁₀(SEQ ID NO: 18). En modalidades particulares, la proteína de fusión tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:4. Una proteína de fusión preferida de este tipo tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4.

20 Otra proteína de fusión preferida comprende, desde el extremo N-terminal hasta el extremo C-terminal, un componente de NPP1 que comprende el dominio rico en cisteína, el dominio catalítico y la región C-terminal de NPP1 humana; un enlazador (por ejemplo, (Gly₄Ser)₃(SEQ ID NO: 16)); la región Fc, que incluye la bisagra o una porción de esta, de una inmunoglobulina humana; y un resto que dirige la proteína de fusión a sitios de calcificación. Preferentemente, la región Fc es de IgG1 humana. Preferentemente, el resto que dirige la proteína de fusión a los sitios de calcificación es Asp₁₀(SEQ ID NO: 18). Con mayor preferencia, la región Fc es de IgG1 humana y el resto que dirige la proteína de fusión a los sitios de calcificación es Asp₁₀(SEQ ID NO: 18).

30 Otra proteína de fusión preferida comprende, desde el extremo N-terminal hasta el extremo C-terminal, un componente de NPP1 que comprende una porción del dominio rico en cisteína, el dominio catalítico y la región C-terminal de NPP1 humana; opcionalmente un enlazador (por ejemplo, (Gly₄Ser)₃(SEQ ID NO:16)); la región Fc, que incluye la bisagra o una porción de esta, de una inmunoglobulina humana. Preferentemente, la región Fc es de IgG1 humana. En modalidades particulares, la proteína de fusión tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:9, la SEQ ID NO:10, la SEQ ID NO:11 o la SEQ ID NO:12. La proteína de fusión preferida de este tipo tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 o SEQ ID NO: 12.

40 En aspectos particularmente preferidos, una proteína de fusión de SEQ ID NO:3 se administra de acuerdo con los métodos descritos en la presente descripción. En otro aspecto particularmente preferido, se administra una proteína de fusión de SEQ ID NO:4 de acuerdo con los métodos descritos en la presente descripción. En otro aspecto particularmente preferido, se administra una proteína de fusión de SEQ ID NO:9 de acuerdo con los métodos descritos en la presente descripción. En otro aspecto particularmente preferido, se administra una proteína de fusión de SEQ ID NO:10 de acuerdo con los métodos descritos en la presente descripción. En otro aspecto particularmente preferido, se administra una proteína de fusión de SEQ ID NO:11 de acuerdo con los métodos descritos en la presente descripción. En otro aspecto particularmente preferido, se administra una proteína de fusión de SEQ ID NO: 12 de acuerdo con los métodos descritos en la presente descripción.

50 Las proteínas de fusión de la presente invención pueden prepararse mediante el uso de métodos estándar, que incluyen técnicas recombinantes o conjugación química bien conocidas en la técnica. Las técnicas útiles para aislar y caracterizar los ácidos nucleicos y proteínas de la presente invención se conocen bien por los expertos en la técnica y pueden consultarse manuales bioquímicos y biología molecular estándar para seleccionar protocolos adecuados para su uso sin experimentación indebida. Véase, por ejemplo, Sambrook y otros, 1989, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 2a ed., Cold Spring Harbor.

55 La sNPP1 humana recombinante, fragmentos y proteínas de fusión de esta, aislados, pueden producirse en cualquier sistema de expresión de proteínas útil que incluye, pero no se limita a, cultivo celular (por ejemplo, células CHO, células COS, HEK203), bacterias tales como Escherichia coli (E. coli) y animales transgénicos, que incluyen, pero no se limitan a, mamíferos y aves (por ejemplo, pollos, codorniz, pato y pavo). Para la expresión, una construcción que codifica la sNPP1 e incluye una secuencia señal adecuada (por ejemplo, de la cadena pesada de Ig humana, NPP2, NPP4, NPP7 o albúmina sérica humana, por ejemplo) en marco con la secuencia de la sNPP1 y unida operativamente a elementos de control de expresión adecuados.

65 La sNPP1, que incluye las proteínas de fusión, y las formas de sales fisiológicamente aceptables de estas se formulan típicamente en una composición farmacéutica para su administración de acuerdo con los métodos descritos en la presente descripción. Las composiciones farmacéuticas incluyen típicamente un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable. Las composiciones que comprenden tales portadores, que incluyen moléculas

compuestas, se formulan mediante métodos convencionales bien conocidos (ver, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 14a ed., Mack Publishing Co., Easton, PA). El portador puede comprender un diluyente. En un aspecto, el portador farmacéutico puede ser un líquido y la proteína de fusión puede tener la forma de una solución. El portador farmacéutico puede ser cera, grasa o alcohol. En otra modalidad, el portador farmacéuticamente aceptable puede ser un sólido en forma de un polvo, un polvo liofilizado, o un comprimido. En una modalidad, el portador puede comprender un liposoma o una microcápsula. Las composiciones farmacéuticas pueden estar en forma de un polvo liofilizado estéril para inyección tras la reconstitución con un diluyente. El diluyente puede ser agua para inyección, agua bacteriostática para inyección o solución salina estéril. El polvo liofilizado puede producirse mediante el secado por congelación de una solución de la proteína de fusión para producir la proteína en forma seca. Como se conoce en la técnica, la proteína liofilizada generalmente tiene un aumento de la estabilidad y una vida útil más larga que una solución líquida de la proteína.

Ejemplos

La presente invención se ejemplifica además mediante los siguientes ejemplos. Los ejemplos son solo con propósito ilustrativo y no pretenden, ni deben interpretarse como limitantes de la invención de ninguna manera.

Métodos

Animales:

Se usaron ratones machos C57Bl/6J de seis semanas de edad. El peso promedio de estos ratones varió de 21-22 g. Los ratones se administraron con sNPP1-Fc [1,04 mg/ml]o sNPP1-Fc-D10 [1,03 mg/ml]mediante inyección subcutánea (SC) o intravenosa (IV) a una concentración de 5 mg/kg. Tabla 1.

Tabla 1		
ID	Fármaco/vía	Tiempo (h)
1	Sin tratamiento	0
2	Sin tratamiento	0
3	sNPP1-Fc/IV	1
4	sNPP1-Fc/IV	1
5	sNPP1-FcD10/IV	1
6	sNPP1-FcD10/IV	1
7	sNPP1-Fc/SC	4
8	sNPP1-Fc/SC	4
9	sNPP1-FcD10/SC	4
10	sNPP1-FcD10/SC	4

Se usaron dos cepas diferentes de ratones que carecen de NPP1. Los ratones *Enpp1^{-/-}* se describieron previamente en Lomashvili, K. A. y otros, *Kidney Int* 2014, 85, 1351-1356. Para acelerar la calcificación arterial, la dieta se complementó con fosfato al 1,5 % (contenido final de fósforo: 2 %) mediante el uso de una mezcla de NaH₂PO₄ y Na₂HPO₄ en proporciones para producir un pH neutro como se describió anteriormente. (O'Neill, W. C. y otros, *Kidney Int* 2011, 79, 512-517).

Modelo de enfermedad renal crónica (CKD): Se usaron ratas Sprague dawley de tipo silvestre en estudios con modelo de CKD. Las ratas se alimentaron con una dieta que contenía 0,25-0,75 % de adenina y altos niveles de fósforo (0,75-0,9 % de fósforo frente a 0,4 % en pienso normal). El exceso dietético de adenina satura la vía normal de rescate de la adenina fosforribosiltransferasa y, en su lugar, se metaboliza a 2,8-dihidroxiadenina, que precipita y forma cristales en los túbulos renales debido a su baja solubilidad. Estos cristales provocan lesiones tubulares, inflamación, obstrucción y fibrosis en los riñones y provocan un fenotipo coherente con la CKD humana. El daño renal resultante y la insuficiencia renal conducen a una alteración de la excreción de fosfato, lo que resulta en niveles anormalmente altos de Pi en suero y metabolismo alterado de los minerales, tal como la calcificación general de los tejidos blandos. El alto nivel de fósforo en la dieta acelera la calcificación arterial. Las ratas con dieta alta en adenina desarrollan uremia, hiperfosfatemia, hiperparatiroidismo secundario, osteodistrofia renal y calcificación vascular.

Preparación de plasma:

La sangre se extrajo mediante punción cardíaca y se mezcló inmediatamente (9:1 vol:vol de sangre respecto a una

solución de ácido cítrico 110 mM). La obtención del suero da como resultado la liberación del exceso de pirofosfato (PPi) de las plaquetas, y la inhibición del EDTA de la coagulación puede interferir con el ensayo. Los tubos de sangre con citrato se agitaron mediante oscilación durante varios minutos y después se centrifugaron a 2000 xg durante 10-15 min. La capa superior de plasma se recolectó (100-300 µl) y se añadieron aproximadamente 200 µl a un equipo Centricon de 10 kDa. Estos tubos se centrifugan después a 12 000 xg durante 10 min para desproteinizar el plasma. Después de la centrifugación, el líquido fluido se recogió en un nuevo tubo. Las muestras de plasma y desproteinizadas se congelan a -20 °C hasta su análisis.

Ensayo fluorométrico de PPi:

: Este ensayo emplea un sensor fluorogénico de PPi cuya intensidad de fluorescencia depende proporcionalmente de la concentración de PPi. Se añadieron muestras filtradas a 10 kDa (4 µl) a 46 µl de tampón de ensayo. La solución madre del sensor de PPi (200X) se diluyó en tampón de ensayo y se añadieron 50 µl de esta a la muestra. Después de la incubación a temperatura ambiente durante 20 min, se leyó la fluorescencia de la placa negra sólida de 96 pocillos (Ex/Em=316/456 nm).

Ensayos:

La actividad de NPP1 se midió como se describió anteriormente. (Villa-Bellosta, R. y otros, Am J Physiol Heart Circ Physiol 2011, 301, H61-H68). Brevemente, se añadió plasma a 20 volúmenes de tampón fisiológico que contenía ATP 200 nM y ATP 1,5 uCi [³²P]/ml durante 10 minutos a 37 °C. La reacción se separó después mediante cromatografía de capa delgada en polietilenimida celulosa y la cantidad de PPi producida se determinó por densitometría de autorradiogramas. El PPi en plasma se midió como se describió anteriormente (Lomashvili, K. A. y otros, Kidney Int 2014, 85, 1351-1356), mediante el uso de plasma recién filtrado a través de un filtro de corte de 30 kD y un ensayo enzimático basado en la conversión de PPi y UDP-glucosa en UTP y glucosa-1-fosfato por la UDPglucosa pirofosforilasa. Toda el agua usada se trató previamente con hidroxapatita para eliminar PPi contaminantes. El calcio aórtico se midió calorimétricamente en extractos con ácido HCl de aortas secas como se describió anteriormente. (Lomashvili, K. A. y otros, Kidney Int 2014, 85, 1351-1356). El contenido de calcio se normalizó respecto al peso en seco y las reducciones fraccionarias en la calcificación se determinaron después de restar el contenido de calcio de las aortas de ratón normales.

Fracción de células sanguíneas:

Para preparar leucocitos y plaquetas, se centrifugó sangre humana recién extraída y heparinizada a 250 g durante 15 minutos a temperatura ambiente. El plasma se retiró y se centrifugó a 2200 g durante 12 minutos para obtener las plaquetas. El sedimento de la primera centrifugación se resuspendió en solución salina normal al volumen sanguíneo original y se añadieron 4 volúmenes de tampón de lisis (cloruro de amonio 155 mmol/l; bicarbonato de sodio 10 mmol/l; EDTA 0,1 mmol/l, pH 7,4) en hielo durante 5-10 minutos. Esto se repitió después de la centrifugación y eliminación del sobrenadante, lo que produjo leucocitos purificados después de una centrifugación final.

Análisis estadístico:

Las variables continuas se expresan como medias ± errores estándar con diferencias determinadas por la prueba t de Student. El contenido de calcio aórtico se analizó después de la transformación logarítmica.

Ejemplo I

Antecedentes: El experimento se realizó para determinar si hay un aumento en los niveles de PPi de ratones de tipo silvestre que se administran con variantes de sNPP1. Para ello, se seleccionó un punto de tiempo de 1 hora para una terapia de una única inyección intravenosa y un punto de tiempo de 4 horas para una terapia de una única inyección subcutánea. La estimación de los niveles de PPi se determinó mediante el ensayo fluorométrico de PPi de Abcam.

Resultados: Los datos sin procesar de las lecturas en 1 min (9 lecturas totales) se promediaron y se convirtieron en % de plasma normal (WT). Tabla 2

Tabla 2

	Blanco	Blanco	Tampón	Tampón	WT1	WT2	Fc-1 IV	Fc-2 IV	D10-1 IV	D10-2 IV	Fc-1 sc	Fc-2 sc	D10-1 sc	D10-2 sc
1	0,4	0,4	32,6	31,1	36,2	40,2	37,9	48,0	51,0	40,6	47,0	45,9	46,3	47,3
2	0,4	0,4	31,5	30,1	36,3	40,8	37,2	46,7	50,8	39,0	46,5	44,6	46,7	47,3
3	0,4	0,4	31,5	31,1	35,5	40,8	37,0	45,7	51,0	38,8	46,2	44,1	46,0	46,2
4	0,4	0,4	31,1	31,3	35,5	40,4	37,0	46,0	49,5	38,8	46,6	45,3	45,6	46,2
5	0,4	0,4	31,2	29,9	35,5	39,7	35,4	45,7	50,3	38,6	46,3	43,7	46,4	46,4
6	0,3	0,4	31,0	29,8	35,4	40,2	36,0	44,7	50,9	39,0	45,7	44,2	44,4	44,8
7	0,4	0,4	30,7	31,2	34,2	39,6	35,1	45,5	50,9	38,6	45,8	43,5	45,5	45,7
8	0,4	0,4	32,0	29,4	34,9	40,8	35,5	45,4	50,4	37,7	45,0	43,6	46,1	44,5
9	0,4	0,3	31,0	29,6	34,3	38,9	35,6	45,3	51,3	37,1	45,7	43,4	44,8	45,1
prom	0,4	0,4	31,4	30,4	35,3	40,1	36,3	45,9	50,7	38,7	46,1	44,2	45,7	45,9

La inyección intravenosa o subcutánea de variantes de la proteína sNPP1 (5 mg/kg) en los ratones de tipo silvestre muestra un aumento de la concentración de PPI por encima de los niveles plasmáticos normales como se muestra en la Figura 5. La Figura 5 ilustra el nivel de pirofosfato en sangre en ratones de tipo silvestre después de la administración de sNPP1-Fc o sNPP1-Fc-D10 por vía intravenosa (1 hora después de la inyección) y subcutánea (4 horas después de la inyección).

Ejemplo II

Los ratones con desactivación de *Enpp1(-/-)* se trataron por vía subcutánea con vehículo o sNPP1-Fc-D10 6 mg/kg cada dos días durante un período de 21 días. Se muestran los niveles de calcio aórtico para machos y hembras. La Figura 6 muestra la prevención efectiva de la calcificación aórtica en ratones *Enpp1(-/-)* con tratamiento de sNPP1-Fc-D10.

Ejemplo III

Los ratones con desactivación de *Enpp1(-/-)* se trataron con sNPP1-Fc-D10 a 6 mg/kg por vía intravenosa para determinar los niveles de PPI y actividad enzimática en sangre. Como se muestra en la Figura 7, el plasma se obtuvo en los puntos de tiempo de 0, 4, 24, 48 y 72 horas y se analizó para determinar la actividad de NPP1 (líneas discontinuas) y los niveles de PPI (líneas continuas). Se determinó que el nivel de PPI de tipo silvestre era de 2,18 mM (datos no mostrados). Las líneas discontinuas de arriba a abajo muestran los niveles de PPI para ratones de tipo silvestre, *Enpp1(+/-)* heterocigotos y *Enpp1(-/-)* homocigotos (Li y otros, 2013). Los perfiles de sNPP1-Fc fueron similares a los de sNPP1-Fc-D10.

Ejemplo IV

Los ratones de tipo silvestre y *Enpp1^{asj}* se sometieron a una dieta con alto contenido de fósforo y bajo contenido de magnesio desde el nacimiento. El vehículo o sNPP1-Fc (5 mg/kg) se administró por vía subcutánea cada dos días a partir de los 14 días de edad. Las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier mostraron que >50 % de los ratones *asj* murieron antes de las 6 semanas, y todos los animales murieron hacia las 9 semanas. En comparación, el 50 % de los animales tratados con sNPP1-Fc sobrevivieron más de 7 semanas y continúan vivos a las 9 semanas. La Figura 8 ilustra el aumento de la supervivencia de ratones macho homocigóticos *Enpp1^{asj}* tratados con sNPP1-Fc a 5 mg/kg en comparación con los ratones tratados con vehículo.

Ejemplo V

Los ratones de tipo silvestre y *Enpp1^{asj}* se sometieron a una dieta con alto contenido de fósforo y bajo contenido de magnesio desde el nacimiento y se trataron con vehículo o sNPP1-Fc (5 mg/kg) por vía subcutánea cada dos días a partir de los 14 días de edad para determinar las tasas de crecimiento. Como se muestra en las Figuras 9A y 9B, el por ciento de ganancia de peso corporal para los ratones de tipo silvestre (línea continua) y *Enpp1^{asj}* (círculos) se representó gráficamente desde las dos a las nueve semanas de edad. Las Figuras 9A y 9B ilustran el aumento del por ciento de ganancia de peso corporal de los ratones macho *Enpp1^{asj}* tratados con sNPP1-Fc a 5 mg/kg en comparación con los ratones tratados con vehículo. Todos los animales *Enpp1^{asj}* murieron (círculo vacío) en el grupo con vehículo a las nueve semanas (panel superior). En comparación, cinco ratones *Enpp1^{asj}* estaban vivos (círculo relleno) y cinco estaban muertos (círculo vacío) en el grupo de tratamiento con sNPP1-Fc al final de nueve semanas. Las Figuras 10A-10C ilustran imágenes de ratones de tipo silvestre (Figura 10A, superior), *Enpp1^{asj}* tratados con vehículo (Figura 10B, medio), *Enpp1^{asj}* tratados con sNPP1-Fc (5 mg/Kg) (Figura 10C, parte inferior).

Ejemplo VI

El FGF-23 (factor de crecimiento de fibroblastos 23), un biomarcador del metabolismo del fosfato, se midió en ratones machos de tipo silvestre y *Enpp1^{asj}*. Los ratones de tipo silvestre y *Enpp1^{asj}* se sometieron a una dieta con alto contenido de fósforo y bajo contenido de magnesio (TD,00442, Harlan) desde el nacimiento. El vehículo o sNPP1-Fc-D10 (5 mg/kg) se administró por vía subcutánea cada dos días a partir de los 18 días de edad. Todo el suero se recolectó 24 horas después de la administración y se analizó mediante el uso de un kit ELISA para FGF-23 de ratón (Kainos Laboratories Inc., Tokio, Japón). Los niveles de FGF-23 se midieron al inicio (día 0), antes del inicio del tratamiento y durante el curso del tratamiento en ratones *Enpp1^{+/+}*- Vehículo (negro continuo), *Enpp1^{asj/asj}*- Vehículo (negro discontinuo) y *Enpp1^{asj/asj}*- sNPP1-Fc-D10 (gris continuo).

Los niveles de FGF-23 se elevaron en ratones *Enpp1^{asj/asj}* durante el curso de la progresión de la enfermedad (hacia el día 9 [27 días de edad]). Sin embargo, los ratones *Enpp1^{asj/asj}* tratados con sNPP1-Fc-D10 a 5 mg/kg mostraron un nivel disminuido de FGF-23 en comparación con el grupo tratado con vehículo en el día 17 del tratamiento. *, p<0,05 mediante ANOVA unidireccional o prueba t de Student. La Figura 11 ilustra los niveles del factor de crecimiento de fibroblastos de ratones *Enpp1^{asj}* tratados con vehículo (medio), *Enpp1^{asj}* tratados con sNPP1-Fc (5 mg/Kg) (parte inferior).

Ejemplo VII Actividad in vitro e in vivo

sNPP1-Fc-D10 recombinante hidrolizó completamente el ATP a PPi in vitro sin hidrólisis del PPi a ortofosfato como se muestra en la Figura 13A.

La actividad enzimática en plasma se muestra en la Figura 13B. Hubo una actividad sustancial presente en el plasma de ratones de tipo silvestre, donde ligeramente más de un tercio del ATP se convirtió en PPi en 10 minutos lo que corresponde a una actividad de $7,6 \pm 1,0$ nmol/h/ml. El resto se convirtió a ortofosfato mediante nucleótido trifosfatasas. El plasma de los ratones *Enpp1*^{-/-} estaba esencialmente desprovisto de NPP1, donde la pequeña cantidad de PPi representa el PPi que contamina el ATP [32P]. La actividad aumentó notablemente a $10,3 \pm 0,3$ nmol/h/ml dos horas después de la inyección intravenosa de NPP1 (5 mg/kg) y esto se acompañó de un aumento en PPi en plasma de $0,07 \pm 0,02$ a $1,00 \pm 0,14$ uM, en comparación con un nivel de $2,39 \pm 0,37$ uM en ratones de tipo silvestre.

La actividad de NPP1 no fue detectable en aortas de ratones de tipo silvestre o *Enpp1*^{-/-} y no aumentó después de la inyección de NPP1 como se muestra en la Figura 13C. Tampoco se detectó actividad en el hígado después de la administración de NPP1 recombinante.

El curso temporal de la actividad plasmática de NPP1 y la concentración de PPi después de la inyección subcutánea de 5 mg/kg en ratones *Enpp1*^{-/-} se muestra en la Figura 14. La actividad de NPP1 y la concentración de PPi alcanzaron su máximo 12 horas después de la inyección a niveles que fueron del 195 % y del 41 %, respectivamente, de los de camadas de tipo silvestre. Los niveles disminuyeron rápidamente y fueron esencialmente indetectables después de 24 horas.

La inyección subcutánea de sNPP1-Fc-D10 (5 mg/kg) muestra una correlación entre los niveles de PPi en plasma y la actividad de NPP1 en plasma como se muestra en la Figura 15. La correlación de PPi en plasma con NPP1 en plasma sugiere que el PPi se generó en la circulación. Esto se examinó mediante la incubación de sangre humana fresca con NPP1 recombinante y después la medición de PPi en el plasma. Se usó sangre humana debido a la cantidad limitada de sangre que se puede obtener de ratones. La cantidad de NPP1 añadido a la sangre se calculó para producir niveles similares a los alcanzados después de la inyección en ratones.

La Figura 16A ilustra que la administración de NPP1 recombinante aumentó el PPi en plasma cuando se añadió a sangre completa durante 2 horas pero no cuando se añadió a plasma solo, lo que indica un requisito celular. Para examinar el papel de los eritrocitos frente a otras células, se centrifugó la sangre y se eliminó el plasma ya sea con o sin la capa leucocitaria restante. Después se añadió solución salina tamponada con HEPES para restaurar el hematocrito original. Como se muestra en la Figura 16B, la producción solo se produjo cuando se retuvo la capa leucocitaria, lo que indica un requisito de leucocitos o plaquetas pero no eritrocitos. La incubación de leucocitos o plaquetas aislados en solución salina tamponada con HEPES indicó que tanto la liberación como la producción de PPi, pero esa síntesis en respuesta a NPP1 exógeno, se produjo solo con leucocitos como se muestra en la Figura 16C.

Ejemplo VIII Modelos terapéuticos

A. Deficiencia de NPP1

Los ratones *Enpp1*^{-/-} envejecidos se sometieron a una dieta con alto contenido de fosfato y se trataron con vehículo o sNPP1-Fc-D10 (6 mg/kg) por vía subcutánea cada dos días como se muestra en la Figura 17 para determinar el efecto de NPP1 recombinante sobre la calcificación arterial. Cada ratón tratado se hace corresponder con un ratón del mismo género y una edad similar que recibió el mismo volumen de vehículo solo. Después de 18 días, el contenido medio de calcio aórtico fue de 61 ± 30 nmol/mg en los ratones tratados con vehículo y de $8,8 \pm 1,0$ nmol/mg en los ratones tratados con NPP1 recombinante ($p=0,016$). El contenido en camadas de tipo silvestre fue de $6,3 \pm 3,4$ nmol/mg ($n=16$). El contenido se elevó (dos desviaciones estándar por encima de las camadas de tipo silvestre) en 6 de 8 aortas control (80 ± 37 nmol/mg) y en una sola aorta tratada (15 nmol/mg). Dentro de los pares en los que estaba presente la calcificación en las aortas control, esto representó una disminución del 91 ± 2 % en la calcificación.

Para determinar si existe alguna acumulación de NPP1 después de múltiples inyecciones a lo largo del tiempo, la actividad de NPP1 en plasma y PPi se midieron en el momento del sacrificio (24 horas después de la inyección), y ambos fueron indetectables. En un conjunto separado de ratones *Enpp1*^{-/-}, la actividad de NPP1 aórtica fue indetectable después de 3 inyecciones de NPP1 recombinante cada dos días.

B. Enfermedad renal crónica

Este ejemplo describe la eficacia de sNPP1-Fc-D10 en el tratamiento de la enfermedad renal crónica (CKD) en modelos de ratas urémicas. Para determinar el efecto de NPP1 recombinante sobre la calcificación arterial en ratas urémicas con insuficiencia renal, las ratas urémicas se alimentaron con una dieta alta en adenina y se inyectaron por vía subcutánea con control o sNPP1-Fc-D10 (5 mg/kg), 5 dosis por semana como se ilustra en la Figura 18. Después de 21 días de tratamiento, el contenido medio de calcio aórtico fue de $25,7 \pm 4,9$ nmol/mg en la rata tratada con control y de $7,0 \pm 1,0$ nmol/mg en la rata tratada con NPP1 recombinante ($p=0,0068$). El contenido normal de calcio aórtico fue de 5 nmol/mg.

Los ejemplos VII y VIII demuestran la actividad de sNPP1 y el uso efectivo de sNPP1 en modelos de deficiencia de ectonucleótido pirofosfato pirofosforilasa y enfermedad renal crónica. Estos ejemplos muestran que un aumento transitorio de PPI es suficiente para una terapia efectiva de la calcificación vascular y deficiencia de NPP1.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una ectonucleótido pirofosfatasa fosfodiesterasa (NPP1) soluble para su uso en un método para tratar a un sujeto que tiene Pseudoxantoma elástico (PXE) que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de ectonucleótido pirofosfatasa fosfodiesterasa soluble (sNPP1), o una proteína de fusión de esta, en donde dicha sNPP1 tiene actividad pirofosfatasa, actividad fosfodiesterasa, o actividad pirofosfatasa y fosfodiesterasa.
- 10 2. La NPP1 soluble para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el sujeto es un ser humano.
- 15 3. La NPP1 soluble para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en donde dicha cantidad eficaz comprende de 0,1 mg/kg a 10 mg/kg de sNPP1, opcionalmente en donde dicha cantidad eficaz comprende de 1,0 a 10,0 mg/kg de sNPP1.
- 20 4. La NPP1 soluble para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en donde dicha cantidad eficaz comprende aproximadamente 0,5 mg/kg, aproximadamente 1 mg/kg, aproximadamente 5,0 mg/kg o aproximadamente 10 mg/kg de sNPP 1.
- 25 5. La NPP1 soluble para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde la administración es intravenosa, subcutánea o intraperitoneal.
- 30 6. La NPP1 soluble para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde la sNPP1 comprende una sNPP1 humana recombinante aislada.
- 35 7. La NPP1 soluble para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde la sNPP1 es una proteína de fusión que comprende a) un componente de NPP1 que carece de los dominios citosólico N-terminal y transmembrana, y b) una pareja de fusión ubicada de manera C-terminal respecto al componente de NPP1.
- 40 8. La NPP1 soluble para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, en donde la proteína de fusión comprende además un resto de direccionamiento.
- 45 9. La NPP1 soluble para su uso de acuerdo con la reivindicación 7 o la reivindicación 8, en donde la proteína de fusión comprende la región Fc de una inmunoglobulina.
- 50 10. La NPP1 soluble para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7-9, en donde la proteína de fusión comprende además un enlazador, un péptido que dirige la proteína de fusión a sitios de calcificación, o un enlazador y un péptido que dirige la proteína de fusión a sitios de calcificación.
11. La NPP1 soluble para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde la sNPP1 es una proteína de fusión que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 o SEQ ID NO: 12.
12. La NPP1 soluble para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en donde dicha administración es semanal, quincenal o mensual.
13. La NPP1 soluble para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en donde dicha administración es intravenosa, o en donde dicha administración es subcutánea.

NPP1 (longitud completa de tipo silvestre)

MERDGCAGGGSRGGEGGRAPREGPAGNGRDRGRSHAAEAPGDPQAAAASLLAPMDVGEEPLEKAARA
RTAKDPNTYKVLVLSVLCVLTITLGCIFGLK**PSCAKE**VKSCKGRCFERTFGNCRCDAAACVELGNCCLDYQET
 CIEPEHIWTCNKFRFCGEKRLTRSLCACSDDCCKDKGDCCINYSVCQGEKSWVEEPCESINEPQCP**AGFETP**
 PTLFSLDGFRAEYLHTWGGLLPVISKLKKCGTYTKNMRPVYPTKTFPNHYSIVTGLYPESHGIIDNKMYDP
 KM**M**ASFSLSKEKFNPEWYKGEPIWVTAKYQGLKSGTFFWPGSDVEINGIFPDIYKMY**NG**SVPFEEERILAV
 LQWLQLPKDERPHFYTYLLEEDSSGHSYGPVSSEVIKALQRV DGMVGMMLMDGLKELNLHRCLNLILISD
 HGMEQGSCKKYIYLNKYLGDVKNIKVIYGAARLRPSDVPDKYYSFNYESGIARNLSCREPNQHFKPYLKHF
 LPKRLHFAKSDRIEPLTFYLDPQWQLAL**LN**PSERKYCGSGFHGSDNVFSNMQALFVGYGPGFKHGIEADTF
 ENIEVYNLMCDLL**NL**TPAP**NG**THGSLNHLLKNPVYTPKHPKEVHPLVQCPFTRNPRDNLGCSC**N**PSILPI
 EDFQTQFNLTVAEEKIHKHETLPYGRPRVLQKENTICLLSQHQFMSGYSQDILMPLWTSYTVDR**N**DSFSTE
 DFSNCLYQDFRIPLSPVHKCSFYK**N**NTKVSYGFLSPPQLN**KNS**SGIYSEALLTTNIVPMYQSFQVIWRYFHD
 TLLRKYAEERNGVNVVSGPVDFDYDGRCDLENLRQRRVIRNQEILIPTHFFIVLTSCKDTSQTPLHCENL
 DTLAFILPHRTDNSESCVHGKHDSSWVEELMLHRARITDVEHITGLSFYQQRKEPVSDILKCLKTHLPTFSQ
 ED
 (SEQ ID NO: 1)

Figura 1

sNPP1

PSCAKEVKSCCKGRCFERTFGNCRCDAAACVELGNCCLDYQETCIEPEHIWTCNKFRFCGEKRLTRSLCACSD
 DCKDKGDCCINYSVCQGEKSWVEEPCESINEPQCPAGFETPPTLLFSLDGFRAEYLHTWGGLLPVISKL
 KCGTYTKNMRPVYPTKTFPNHYSIVTGLYPESHGIIDNKMYDPKMNASFSLSKEKFNPEWYKGEPIWVT
 AKYQGLKSGTFFWPGSDVEINGIFPDIYKMYNGSVPFEEERILAVLQWLQLPKDERPHFYTYLLEEDSSG
 SYGPVSSEVIKALQRV DGMVGMMLMDGLKELNLHRCLNLILISDHGMEQGSCKKYIYLNKYLGDVKNIKVI
 YGAARLRPSDVPDKYYSFNYESGIARNLSCREPNQHFKPYLKHF LPKRLHFAKSDRIEPLTFYLDPQWQLA
 LNPSERKYCGSGFHGSDNVFSNMQALFVGYGPGFKHGIEADTFENIEVYNLMCDLL**NL**TPAP**NG**THG
 LNHLKNPVYTPKHPKEVHPLVQCPFTRNPRDNLGCSC**N**PSILPIEDFQTQFNLTVAEEKIHKHETLPYGR
 RVLQKENTICLLSQHQFMSGYSQDILMPLWTSYTVDRNDSFSTEDFSNCLYQDFRIPLSPVHKCSFYK**N**
 TKVSYGFLSPPQLN**KNS**SGIYSEALLTTNIVPMYQSFQVIWRYFHDTLLRKYAEERNGVNVVSGPVDFDY
 DGRCDLENLRQRRVIRNQEILIPTHFFIVLTSCKDTSQTPLHCENLDTLAFILPHRTDNSESCVHGKHDSS
 WVEELMLHRARITDVEHITGLSFYQQRKEPVSDILKCLKTHLPTFSQED
 (SEQ ID NO: 2)

Figura 2

NPP1-Fc

PSCAKEVKSCCKGRFCFERTFGNCRCDAAACVELGNCCLDYQETCIEPEHIWTCNKFRFCGEKRLTRSLCACSD
 DCKDKGDCCINYSSVCQGEKSWVEEPCESINEPQCPAGFETPPTLLFSLDGFRAEYLHTWGGLLPVISKLK
 KCGTYTKNMRPVYPTKTFPNHYSIVTGLYPESHGIIDNKMYDPKMNASFSLKSKEKFNPEWYKGEPIWVT
 AKYQGLKSGTFFWPGSDVEINGIFPDIYKMYNGSVPFEERILAVLQWLQLPKDERPHFYTLYLEEPDSSGH
 SYGPVSSEVIKALQRVDGMVGMMLMDGLKELNLHRCLNLILISDHGMEQGSCKKYIYLNKYLGDVKNIKVI
 YGPAARLRPSDVPDKYYSFNIEGIARNLSCREPNQHFKPYLKHFLPKRLHFAKSDRIEPLTFYLDPQWQLA
 LNPSEKCYCGSGFHGSDNVFSNMQALFVGYGPGFKHGIEADTFENIEVYNLMCDLLNLTAPNNGTHGS
 LNHLLKNPVYTPKHPKEVHPLVQCPFTRNPRDNLGCSCNPSILPIEDFQTQFNLTVAEEKIIKHETLPYGRP
 RVLQKENTICLLSQHQFMSGYSQDILMPLWTSYTVDRNDSFSTEDFSNCLYQDFRIPLSPVHKCSFYKNN
 TKVSYGFLSPPQLNKNSSGIYSEALLTTNIVPMYQSFQVIWRYFHDTLLRKYAEERNGVNVVSGPVDFDY
 DGRCDLENLRQKRRVIRNQEILIPTHFFIVLTSCKDTSQTPLHCENLDTLAFILPHRTDNSESCVHGKHDS
 WVEELMLHRARITDVEHITGLSFYQQRKEPVSDILKLTHTLPTFSQEDPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGAP
SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV
LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
EWESNGOPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

(SEQ ID NO: 3)

Figura 3

NPP1-Fc-D10

PSCAKEVKSCCKGRFCFERTFGNCRCDAAACVELGNCCLDYQETCIEPEHIWTCNKFRFCGEKRLTRSLCACSD
DCKDKGDCCINYSSVCQGEKSWVEEPCESINEPQCPAGFETPPTLLFSLDGFRAEYLHTWGGLLPVISKLK
KCGTYTKNMRPVYPTKTFPNHYSIVTGLYPESHGIIDNKMYDPKMNASFSLKSKEKFNPEWYKGEPIWVT
AKYQGLKSGTFFWPGSDVEINGIFPDIYKMYNGSVPFEERILAVLQWLQLPKDERPHFYTLYLEEPDSSGH
SYGPPVSSEVIKALQRVDGMVGMMLMDGLKELNLHRCNLNLILSDHGMEQGSCKKYIYLNKYLGDVKNIKVI
YGPAARLRPSDVPDKYYSFNYEGIARNLSCREPQHFKPYLKHFLPKRLHFAKSDRIEPLTFYLDPQWQLA
LNPSEKRYCGSGFHGSDNVFSNMQALFVGYGPGFKHGIEADTFENIEVYNLMCDLLNLTPAPNNGTHGS
LNHLLKNPVYTPKHPKEVHPLVQCPFTRNPRONLGCSCNPSILPIEDFQTQFNLTVAEEKIHKHETLPYGRP
RVLQKENTICLLSQHQFM5GYSQDILMPLWTSYTVDRNDSFSTEDFSNCLYQDFRIPLSPVHKCSFYKNN
TKVSYGFLSPPQLNKNSSGIYSEALLTTNIVPMYQSFQVIWRYFHDTLLRKYAEERNGVNVVSGPVDFDY
DGRCD5LENLRQKRRVIRNQEILIPTHFFIVLT5CKDTSQTPLHCENLDTLAFILPHRTDN5ESCVHGKHDS
WVEELLMLHRARITDVEHITGLSFYQORKEPVSDILKLT5LPTFSQEDPK5CDKTH5CPPCPAPEAAGAP
SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV
LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

DDDDDDDDDD

(SEQ ID NO: 4)

Figura 4

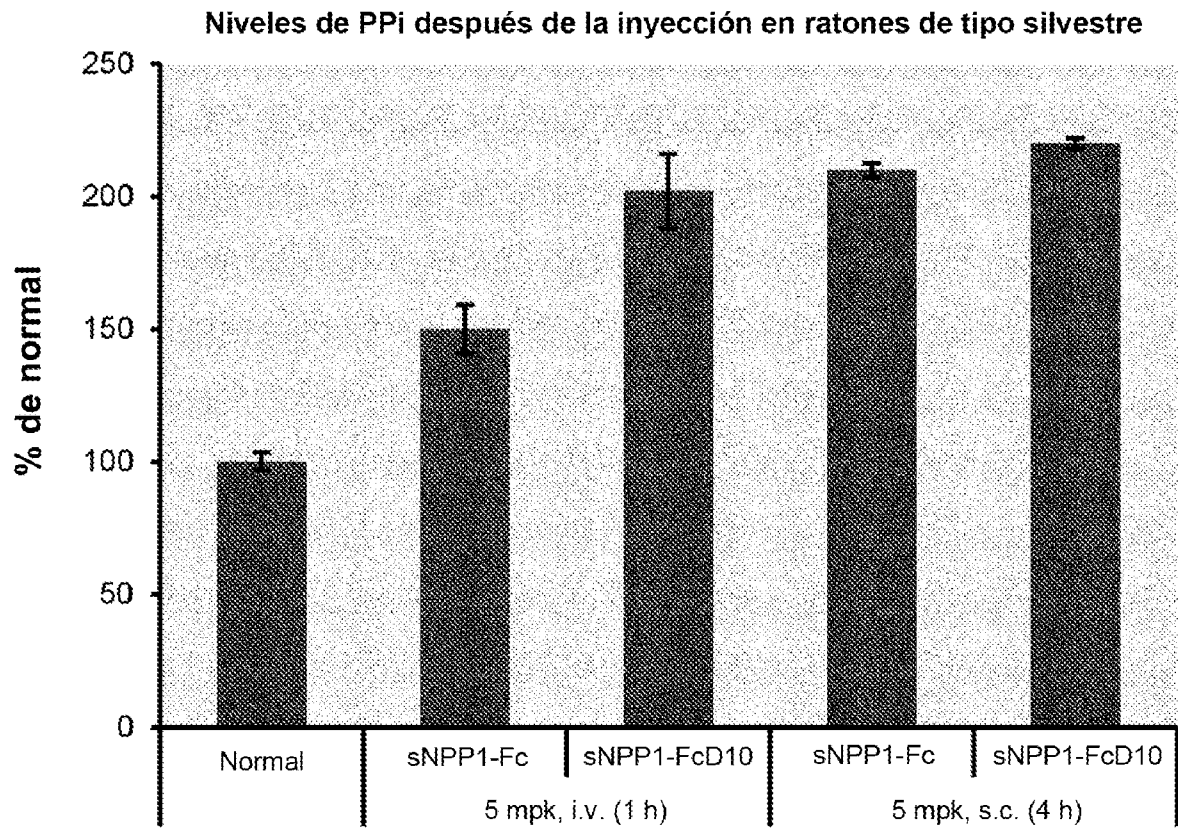


Figura 5

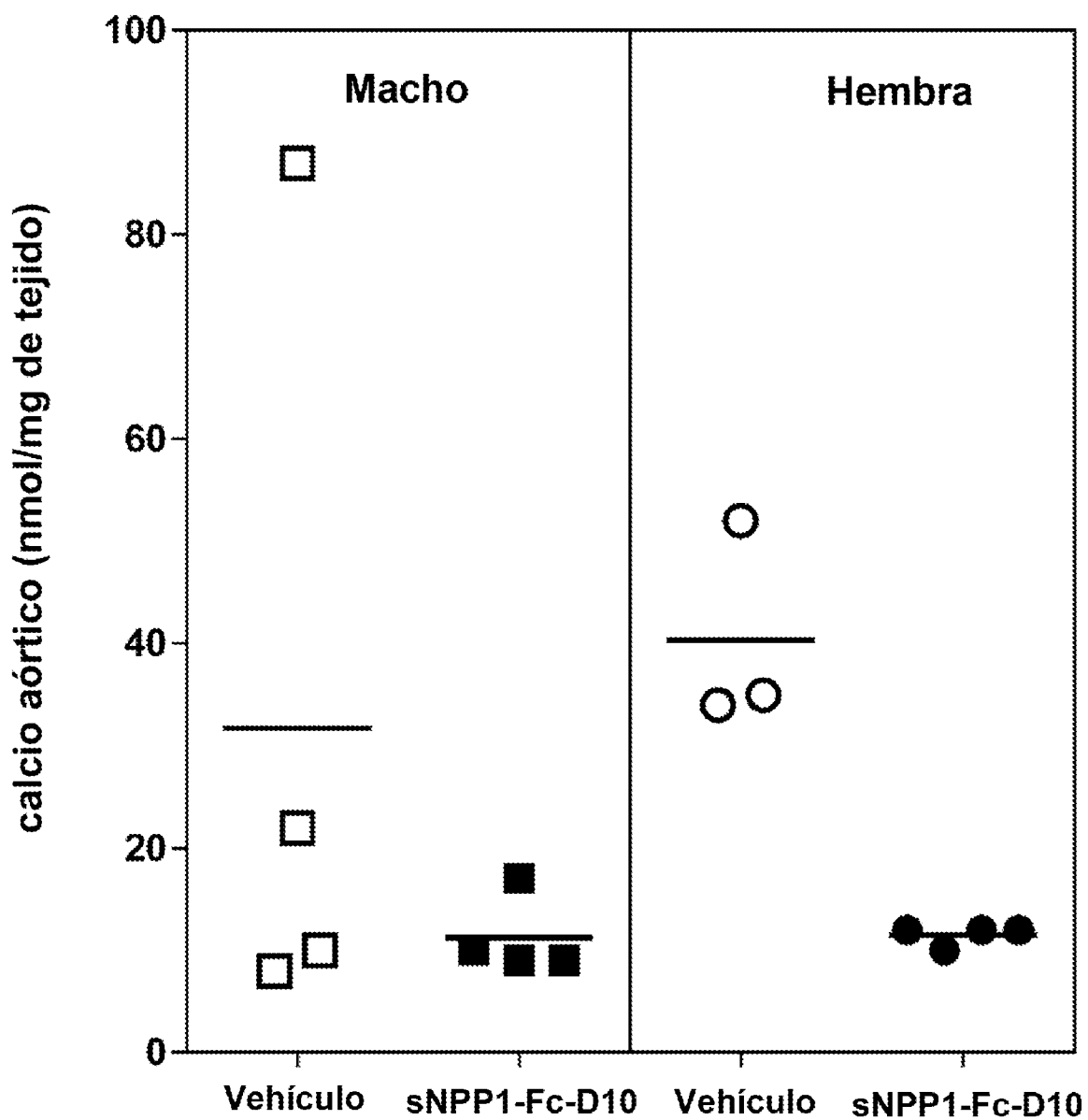


Figura 6

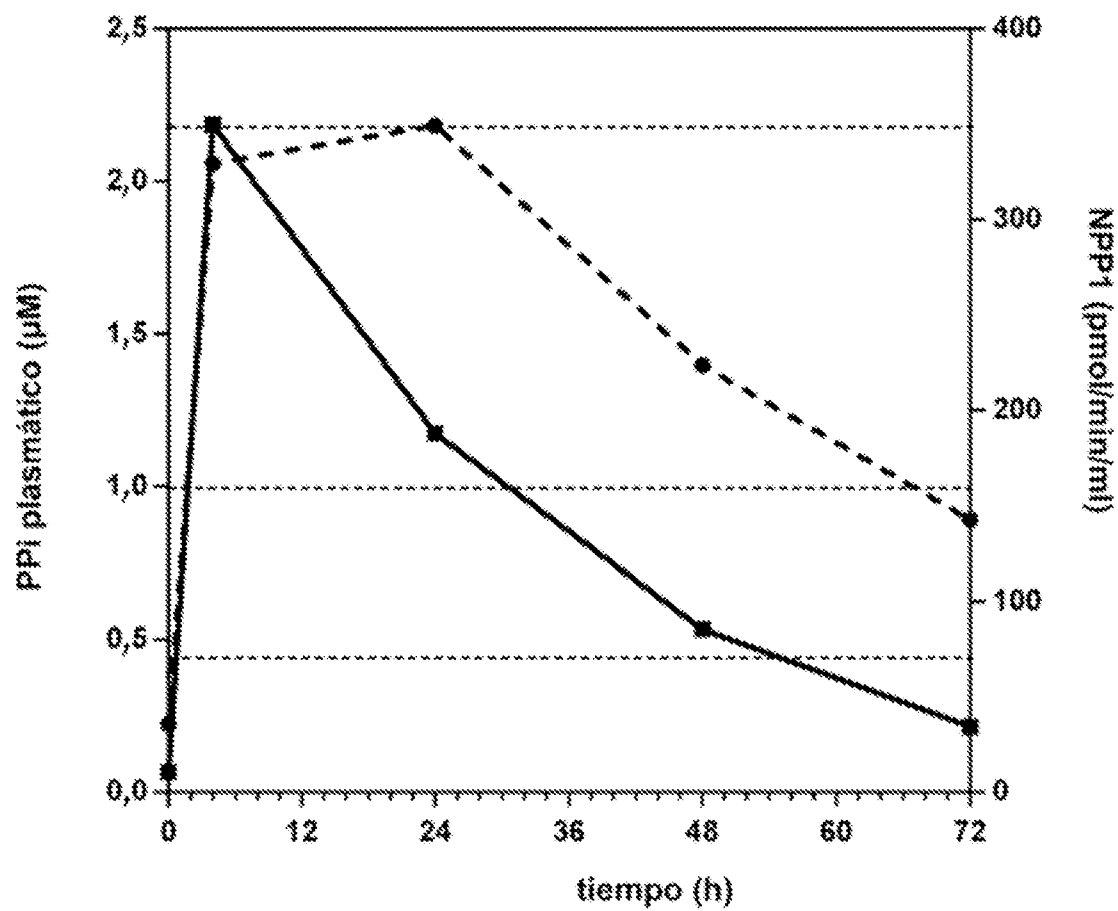


Figura 7

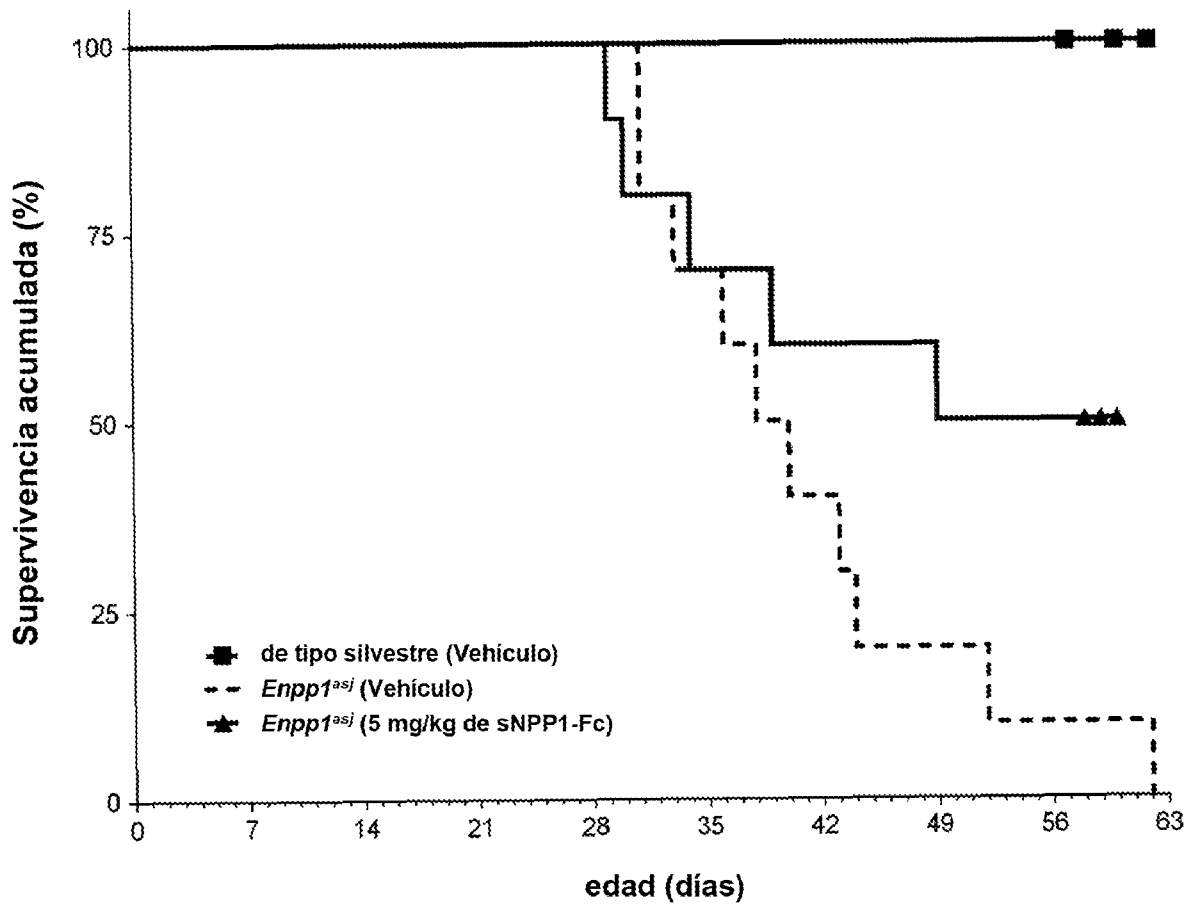
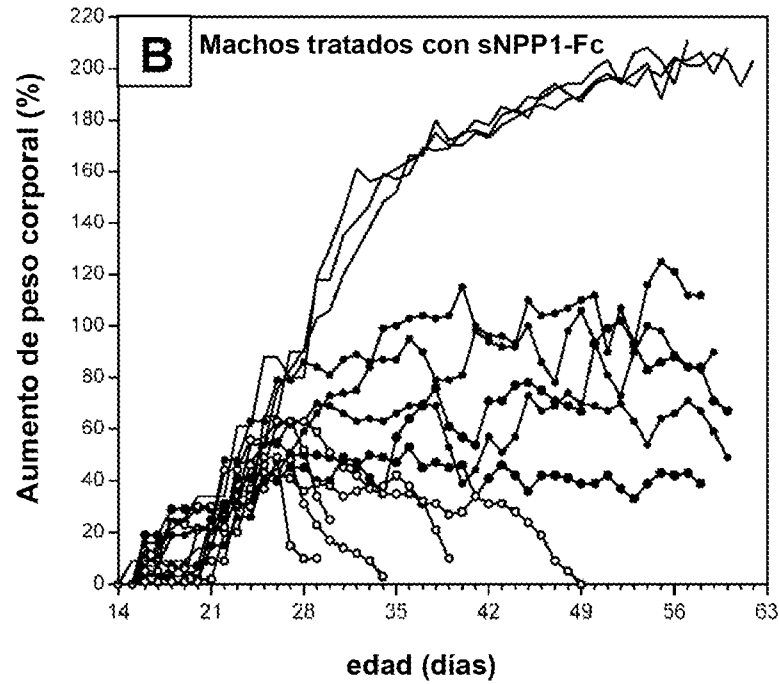
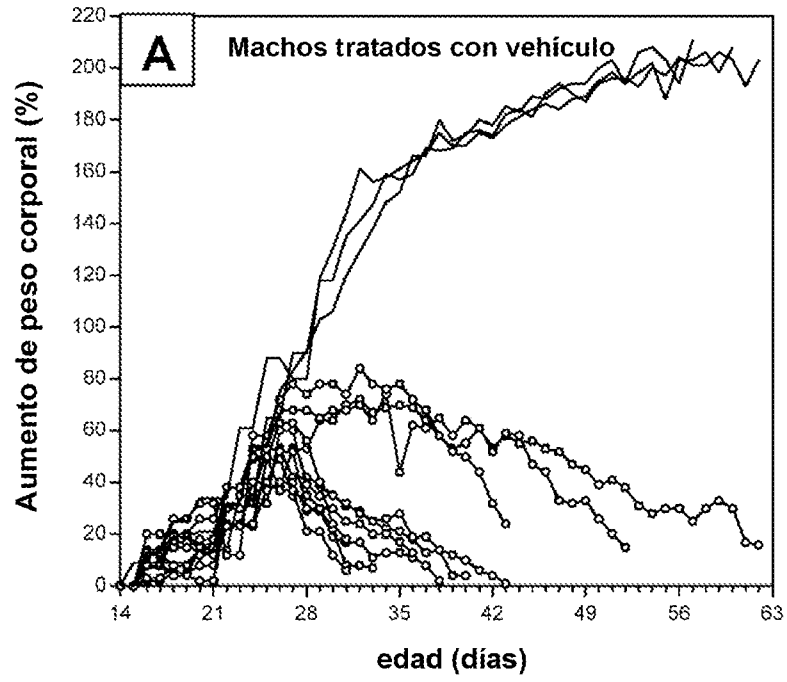
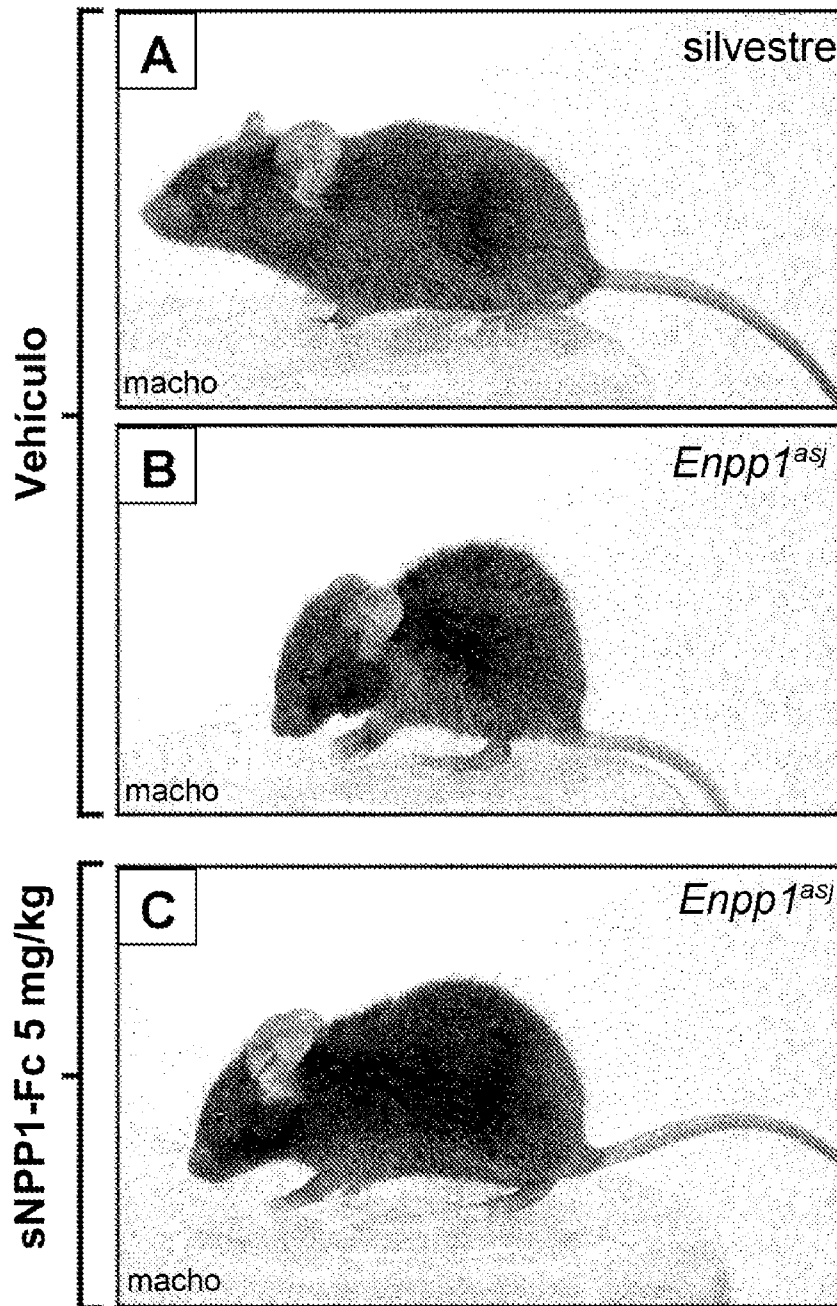


Figura 8



Figuras 9A, 9B



Figuras 10A-10C

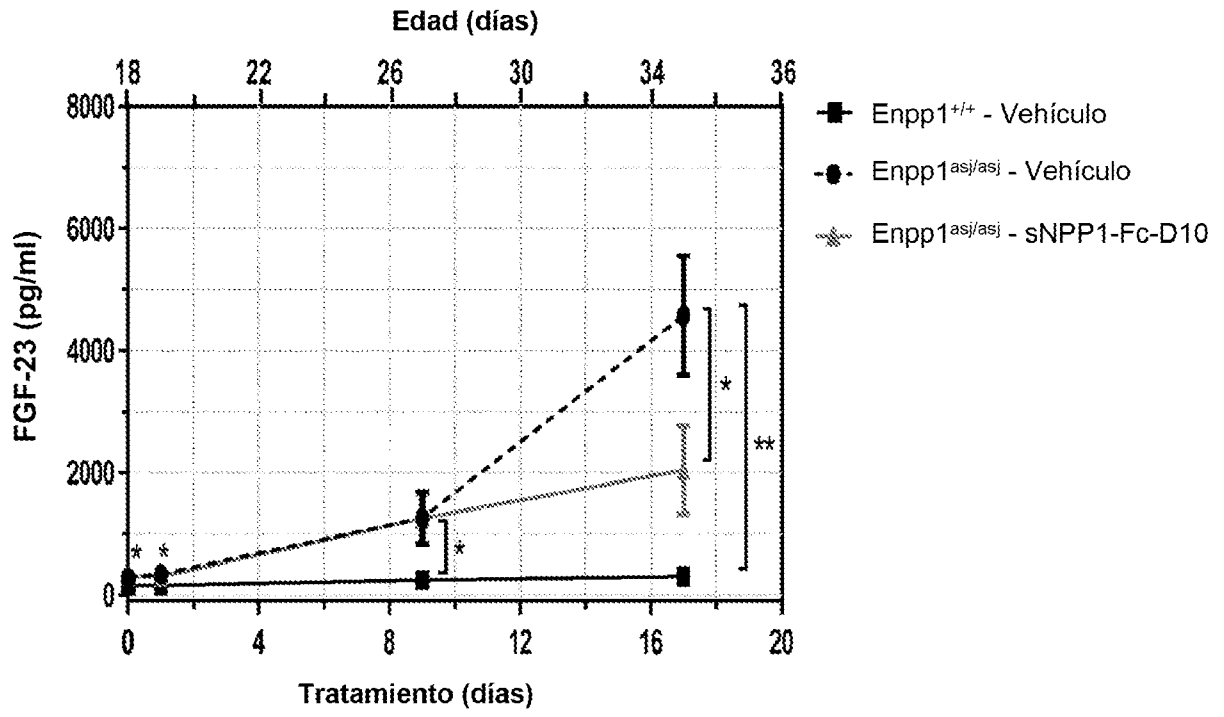


Figura 11

SCKGRCFERTFGNCRCDAAACVELGNCCLDYQETCIEPEHIWTCNKFRCGEKRLTRSLCACSDDCCKDKGDCC
INYSSVCQGEKSWVEEPCESINEPQCPAGFETPPTLLFSLDGFRAEYLHTWGGLLPVISKLKKCGTYTKNM
RPVYPTKTFPNHYSIVTGLYPESHGIIDNKMYDPKMNASFSLKSKEKFNPEWYKGEPIWVTAKYQGLKSGT
FFWPGSDVEINGIFPDIYKMYNGSVPFEERILAVLQWLQLPKDERPHFYTYLLEEDSSGHSYGPVSSEVIK
ALQRVDGMVGMMLMDGLKELNLHRCLNLILISDHGMEQGSCKKIYLNKYLGDVKNIKVIYGPAARLRPSD
VPDKYYSFNIEGIARNLSCREPNQHFKPYLKHFLPKRLHFAKSDRIEPLTFYLDPQWQLALNPSEKCYCGSG
FHGSDNVFSNMQALFVGYGPGFKHGIEADTFENIEVYNLMCDLLNLTAPNNGTHGSLNHLLKKNPVYTP
KHPKEVHPLVQCPFTRNPRDNLGCSCNPSILPIEDFQTQFNLTVAEEKIHKHETLPYGRPRVLQKENTICLLS
QHQMMSGYSQDILMPLWTSYTVDRNDSFSTEDFSNCLYQDFRIPLSPVHKCSFYKNNTKVSYGFLSPPQL
NKNSSGIYSEALLTTNIVPMYQSFQVIWRYFHDTLLRKYAEERNGVNVVSGPVDFDFDYDGRCDLENLRQ
KRRVIRNQEILIPTHFFIVLTSCKDTSQTPLHCENLDTLAFILPHRTDNSESCVHGKHDSSWVEELMLHRA
RITDVEHITGLSFYQQRKEPVSDILKCLKTHLPTFSQED

(SEQ ID NO: 5)

Figura 12A

EKSWVEEPCESINEPQCPAGFETPPTLLFSLDGFRAEYLHTWGGLLPVISKLKKCGTYTKNMRPVYPTKTF
PNHYSIVTGLYPESHGIIDNKMYDPKMNASFSLKSKEKFNPEWYKGEPIWVTAKYQGLKSGTFFWPGSD
VEINGIFPDIYKMYNGSVPFEERILAVLQWLQLPKDERPHFYTYLLEEDSSGHSYGPVSSEVIKALQRVDG
MVGMLMDGLKELNLHRCLNLILISDHGMEQGSCKKIYLNKYLGDVKNIKVIYGPAARLRPSDVPDKYYS
FNIEGIARNLSCREPNQHFKPYLKHFLPKRLHFAKSDRIEPLTFYLDPQWQLALNPSEKCYCGSGFHGSDN
VFSNMQALFVGYGPGFKHGIEADTFENIEVYNLMCDLLNLTAPNNGTHGSLNHLLKKNPVYTPKHPKEV
HPLVQCPFTRNPRDNLGCSCNPSILPIEDFQTQFNLTVAEEKIHKHETLPYGRPRVLQKENTICLLS
QHQMMSGYSQDILMPLWTSYTVDRNDSFSTEDFSNCLYQDFRIPLSPVHKCSFYKNNTKVSYGFLSPPQL
NKNSSGIYSEALLTTNIVPMYQSFQVIWRYFHDTLLRKYAEERNGVNVVSGPVDFDFDYDGRCDLENLRQ
KRRVIRNQEILIPTHFFIVLTSCKDTSQTPLHCENLDTLAFILPHRTDNSESCVHGKHDSSWVEELMLHRA
RITDVEHITGLSFYQQRKEPVSDILKCLKTHLPTFSQED

(SEQ ID NO: 6)

Figura 12B

Fc (incluida la región bisagra)

**EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE
EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC
SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK**

(SEQ ID NO: 7)

Figura 12C

Fc (Fc de bisagra parcial)

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT
KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM
HEALHNHYTQKSLSLSPGK

(SEQ ID NO: 8)

Figura 12D

(107-925)-Fc

SCKGRFCFERTFGNCRCDAAACVELGNCCLDYQETCIEPEHIWTCNKFRCGEKRLTRSLCACSDDCCKDKGDCC
INYSSVCQGEKSWVEEPCESINEPQCPAGFETPPTLLFSLDGFRAEYLHTWGGLLPVISKLKKCGTYTKNM
RPVYPTKTFPNHYSIVTGLYPESHGII DNKMYDPKMNASFSLKSKEKFNPEWYKGEPIWVTAKYQGLKSGT
FFWPGSDVEINGIFPDIYKMYNGSVPFEERILAVLQWLQLPKDERPHFYTLYLEEPDSSGHSYGPVSSEVIK
ALQRVDGMVGMMLMDGLKELNLHRCNLILISDHGMEQGSCKKYIYLNKYLGDVKNIKVIYGPAARLRPSD
VPDKYYSFNVEGIARNLSCREPNQHFKPYLKHFLPKRLHFAKSDRIEPLTFYLDPQWQLALNPSEKRYCGSG
FHGSDNVFSNMQALFVGYGPGFKHGIEADTFENIEVYNLMCDLLNLTAPNNGTHGSLNHLLKNPVYTP
KHPKEVHPLVQCPFTRNPRDNLGCSCNPSILPIEDFQTQFNLTVAEEKIHKHETLPYGRPRVLQKENTICLLS
QHQMMSGYSQDILMPLWTSYTVDRNDSFSTEDFSNCLYQDFRIPLSPVHKCSFYKNNTKVSYGFLSPPQL
NKNSSGIYSEALLTTNIVPMYQSFQVIWRYFHDTLLRKYAEERNGVNVVSGPVFDFDYDGRCDSENLRQ
KRRVIRNQEILIPTHFFIVLTSCKDTSQTPLHCENLDTLAFILPHRTDNSESCVHGKHDSWVEELLMLHRA
RITDVEHITGLSFYQQRKEPVSDILKLTHTLPTFSQEDEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT
LMIKRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN
NYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSVHEALHNHYTQKSLSLSPGK

(SEQ ID NO: 9)

Figura 12E

(107-925)-Fc de bisagra parcial

SCKGRCFERTFGNCRCDAAACVELGNCCLDYQETCIEPEHIWTCNKFRFCGEKRLTRSLCACSDDCCKDKGDCC
 INYSSVCQGEKSWVEEPCESINEPQCPAGFETPPTLLFSLDGFRAEYLHTWGGLLPVISKLKKCGTYTKNM
 RPYVPTKTFPNHYSIVTGLYPEESHGIIDNKMYDPKMNASFSLKSKEKFNPEWYKGEPIWVTAKYQGLKSGT
 FFWPGSDVEINGIFPDIYKMYNGSVPFEEERILAVLQWLQLPKDERPHFYTLYLEEPDSSGHSYGPVSSEVIK
 ALQRVDGMVGMMLMDGLKELNLHRCLNLILSDHGMEEQGSCKKIYLNKYLGDVKNIKVIYGPAARLRPSD
 VPDKYYSFNYEGIARNLSCREPNQHFYPYLKHFPLPKRLHFAKSDRIEPLTFYLDPQWQLALNPSEKCYCGSG
 FHGSDNVFSNMQUALFVGYGPGFKHGIEADTFENIEVYNLMCDLLNLTAPNNGTHGSLNHLLKNPVYTP
 KHPKEVHPLVQCPFTRNPRDNLGCSCNPSILPIEDFQTQFNLTVAEEKIHKHETLPYGRPRVLQKENTICLLS
 QHQFMSGYSQDILMPLWTSYTVDRNDSFSTEDFSNCLYQDFRIPLSPVHKCSFYKNNTKVSYGFLSPPQL
 NKNSSGIYSEALLTTNIVPMYQSFQVIWRYFHDTLRKYAEEERNGVNVVSGPVDFDYDGRCDSENLRQ
 KRRVIRNQEILIPTHFFIVLTSCKDTSQTPLHCENLDTLAFILPHRTDNSESCVHGKHDSSWVEELLMLHRA
 RITDVEHITGLSFYQQRKEPVSDILKLTLPFTFSQEDDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR
 TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
 SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
 PPVLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

(SEQ ID NO: 10)

Figura 12F

(187-925)-Fc

EKSWVEEPCESINEPQCPAGFETPPTLLFSLDGFRAEYLHTWGGLLPVISKLKKCGTYTKNMRPVYPTKTF
PNHYSIVTGLYPESHGIIIDNKMYDPKMNASFSLKSKEKFNPEWYKGEPIWVTAKYQGLKSGTFFWPGSD
VEINGIFPDIYKMYNGSVPFEERILAVLQWLQLPKDERPHFYTYLLEEDS5GHSYGPVSSEVIKALQRVDG
MVGMLMDGLKELNLHRCLNLILISDHGMEQGSCKKYIYLNKYLGDVKNIKVIYGPAARLRPSDVPDKYYS
FNYEGIARNLSCREPNQHFKPYLKHFLPKRLHFAKSDRIEPLTFYLDPQWQLALNPSEKCYCGSGFHGSDN
VFSNMQALFVGYGPGFKHGIEADTFENIEVYNLMCDLLNLTAPNNGTHGSLNHLLKNPVYTPKHPKEV
HPLVQCPFTRNPRDNLGCSCNPSILPIEDFQTFNLTVAEEKIHKHETLPYGRPRVLQKENTICLLSQHQFM
SGYSQDILMPLWTSYTVDRNDSFSTEDFSNCLYQDFRIPLSPVHKCSFYKNNTKVSYGFLSPPQLNKNSSG
IYSEALLTTNIVPMYQSFQVIWRYFHDTLLRKYAEERNGVNVVSGPVDFDYDGRCDLENLRQKRRVIR
NQEILIPTHFFIVLTSCKDTSQTPLHCENLDTLAFILPHRTDNSESCVHGKHDS5WVEELMLHRARITDVE
HITGLSFYQQRKEPVSDILKIKTHLPTFSQEDPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVCSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK

(SEQ ID NO: 11)

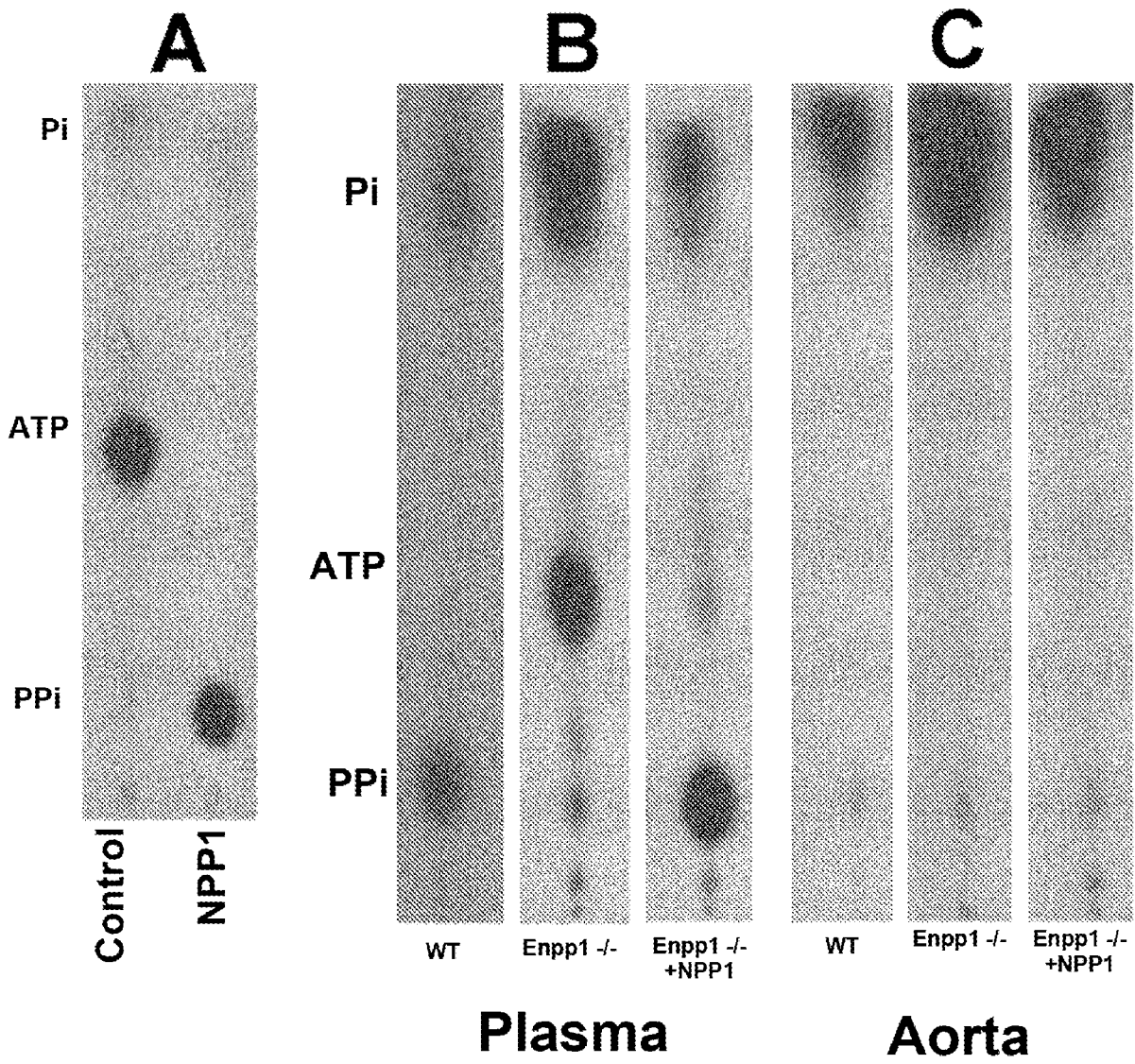
Figura 12G

(187-925)-Fc de bisagra parcial

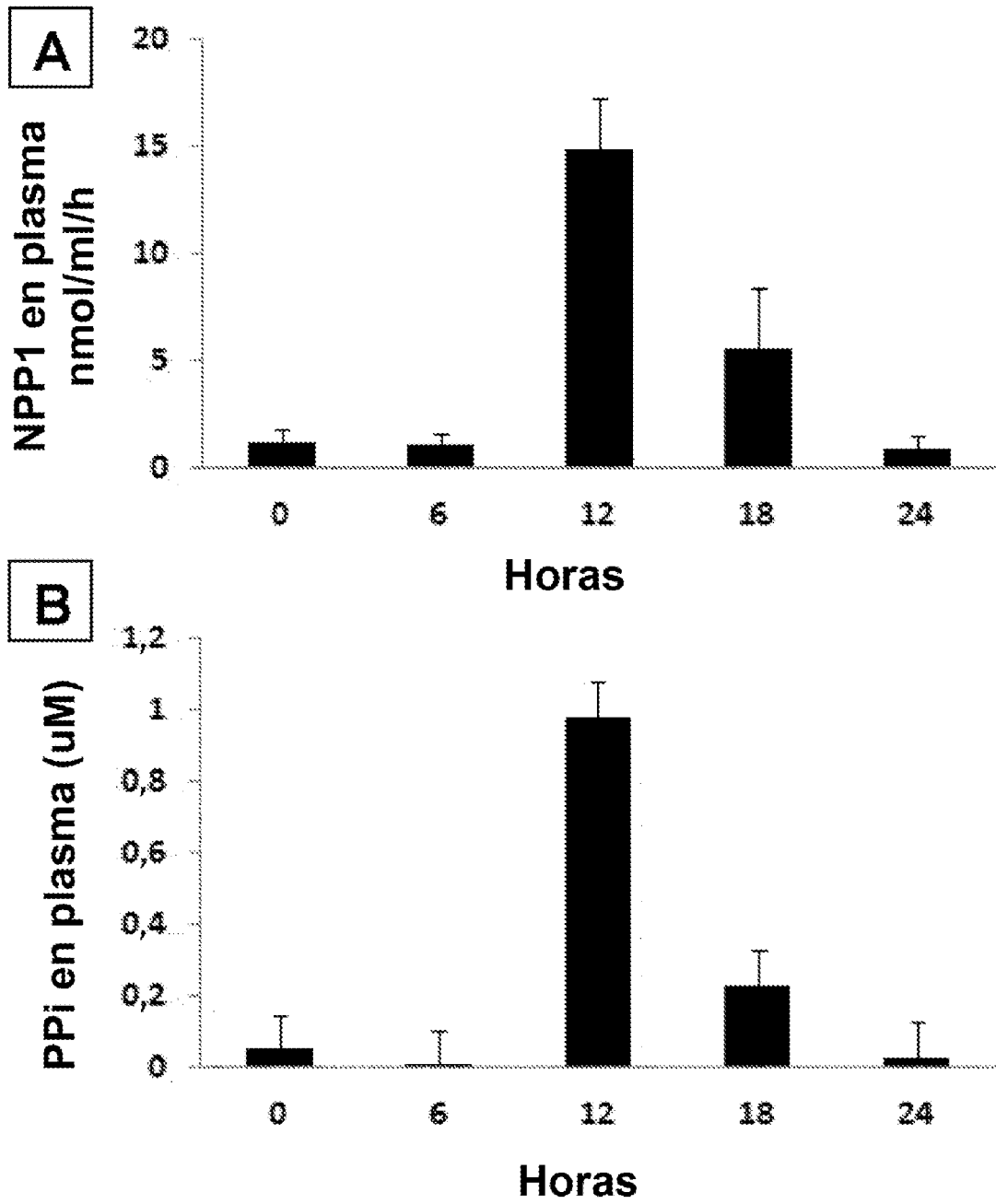
EKSWVEEPCESINEPQCPAGFETPPTLLFSLDGFRAEYLHTWGGLLPVISKLKKCGTYTKNMRPVYPTKTF
PNHYSIVTGLYPESHGIIIDNKMYDPKMNASFSLKSKEKFNPEWYKGEPIWVTAKYQGLKSGTFFWPGSD
VEINGIFPDIYKMYNGSVPFEERILAVLQWLQLPKDERPHFYTYLLEEDS5GHSYGPVSSEVIKALQRVDG
MVGMLMDGLKELNLHRCLNLILISDHGMEQGSCKKYIYLNKYLGDVKNIKVIYGPAARLRPSDVPDKYYS
FNYEGIARNLSCREPNQHFKPYLKHFLPKRLHFAKSDRIEPLTFYLDPQWQLALNPSEKCYCGSGFHGSDN
VFSNMQALFVGYGPGFKHGIEADTFENIEVYNLMCDLLNLTAPNNGTHGSLNHLLKNPVYTPKHPKEV
HPLVQCPFTRNPRDNLGCSCNPSILPIEDFQTFNLTVAEEKIHKHETLPYGRPRVLQKENTICLLSQHQFM
SGYSQDILMPLWTSYTVDRNDSFSTEDFSNCLYQDFRIPLSPVHKCSFYKNNTKVSYGFLSPPQLNKNSSG
IYSEALLTTNIVPMYQSFQVIWRYFHDTLLRKYAEERNGVNVVSGPVDFDYDGRCDLENLRQKRRVIR
NQEILIPTHFFIVLTSCKDTSQTPLHCENLDTLAFILPHRTDNSESCVHGKHDS5WVEELMLHRARITDVE
HITGLSFYQQRKEPVSDILKIKTHLPTFSQEDDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC
VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVCSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK

(SEQ ID NO: 12)

Figura 12H



Figuras 13A-13C



Figuras 14A, 14B

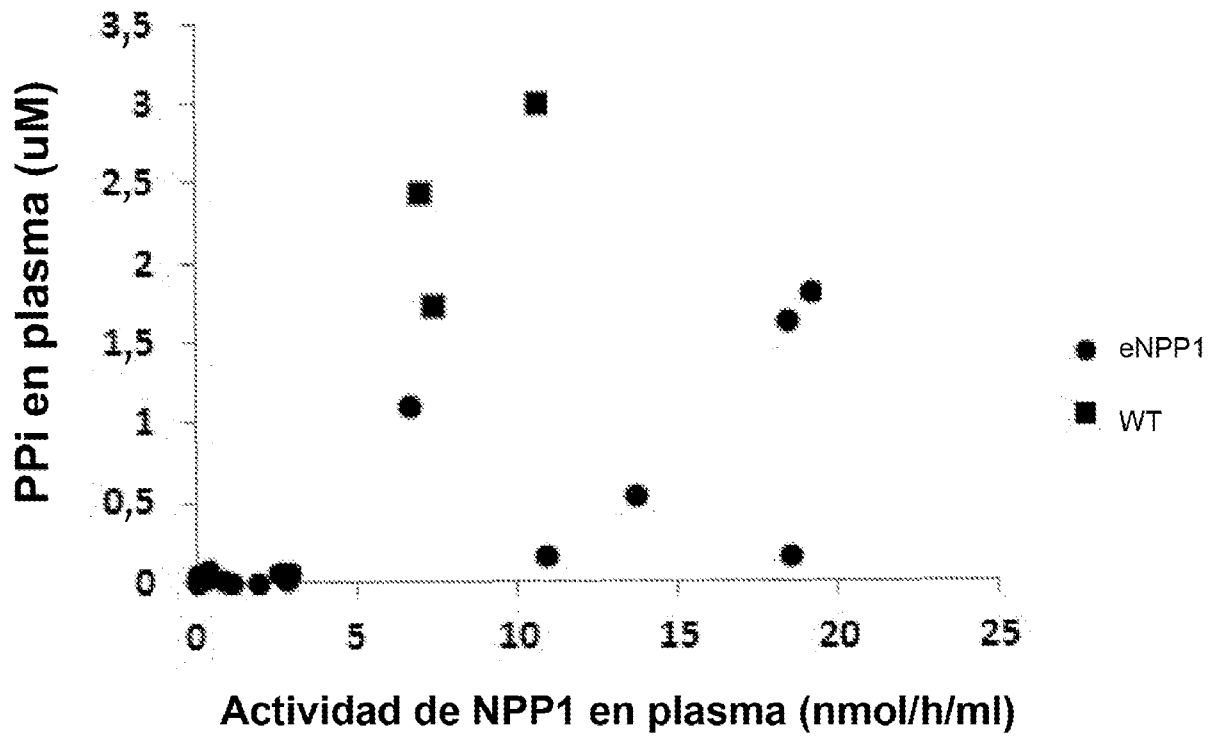
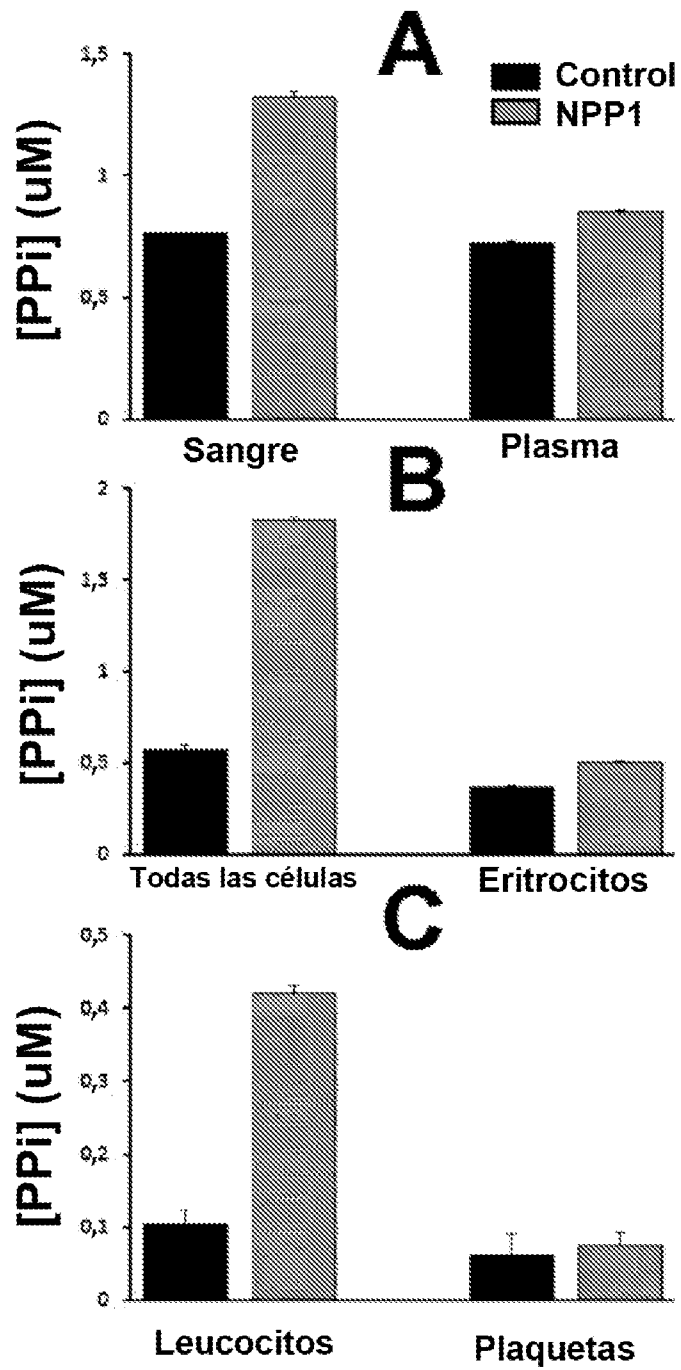


Figura 15



Figuras 16A-16C

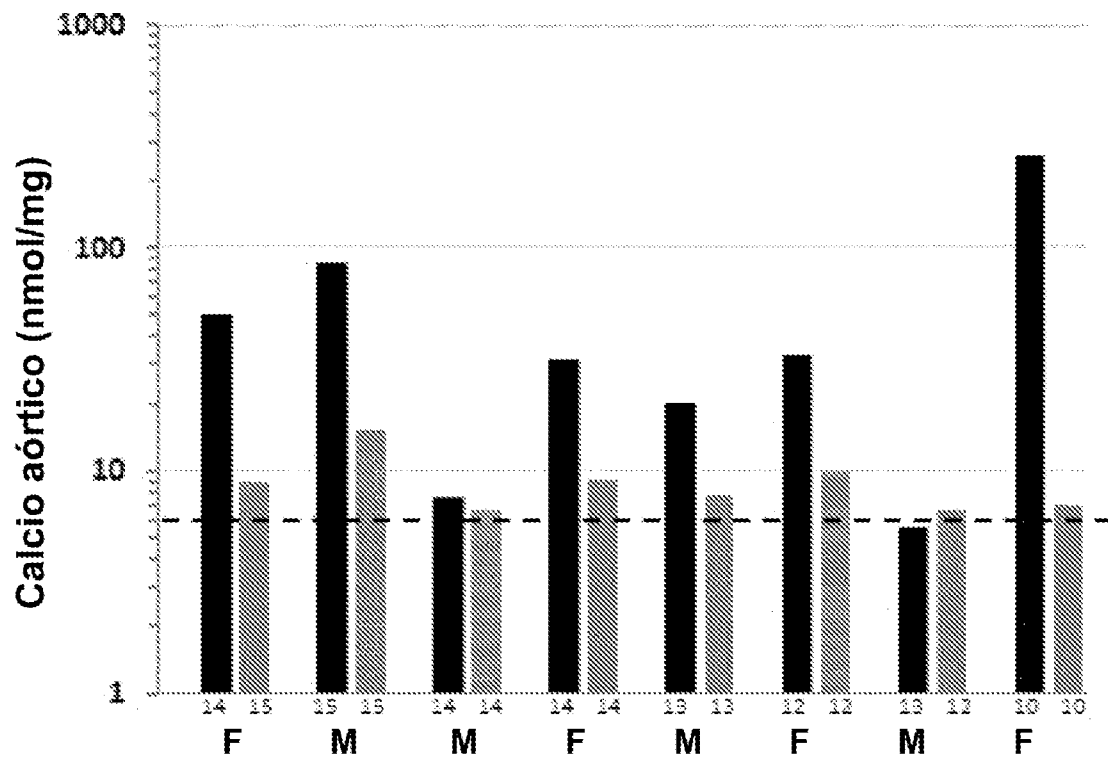


Figura 17

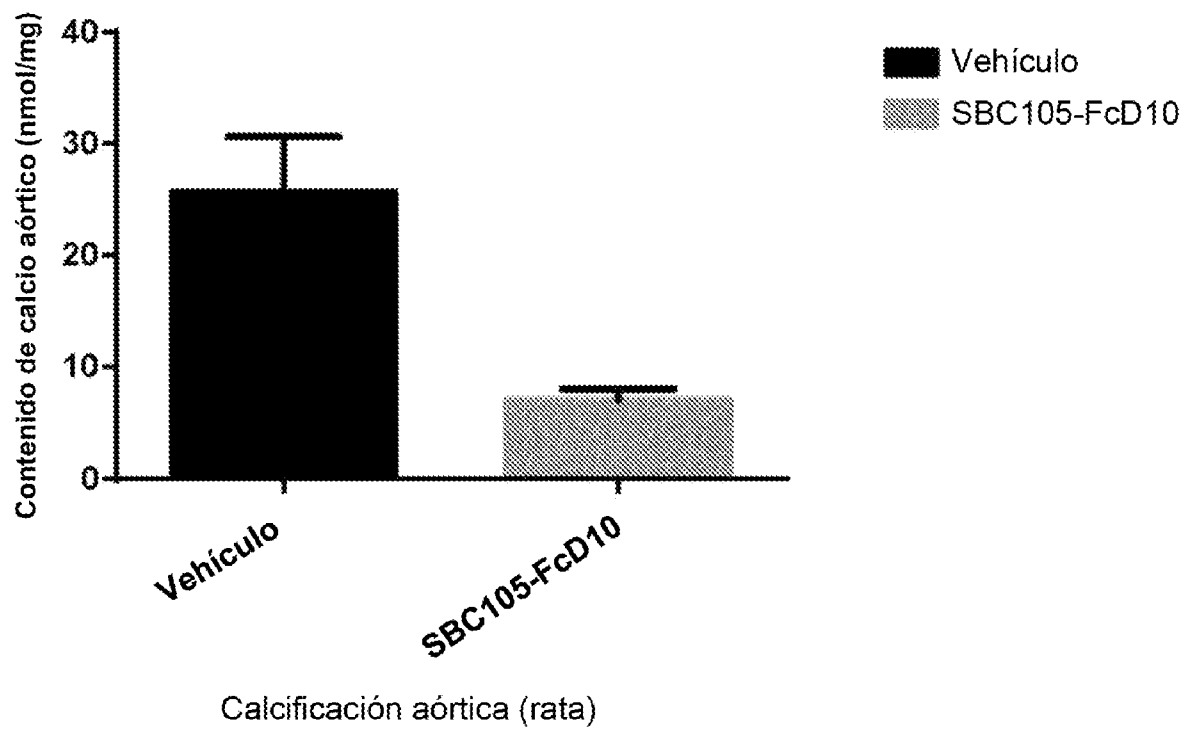


Figura 18