

HIPOFOSFATASIA: PERSPECTIVA PRECLÍNICA DE SU FISIOPATOLOGÍA Y TRATAMIENTO

Millán, José Luis 

Sanford Burnham Prebys Medical Discovery Institute, 10901 North Torrey Pines Road, La Jolla, CA 92037, USA

INFO DEL ARTÍCULO

Palabras clave:

hipofosfatasia, displasia esquelética, terapia de reemplazo enzimático, terapia génica, inhibidores, terapia celular, ensayos preclínicos.

RESUMEN

La hipofosfatasia (HPP) es el trastorno genético causado por mutaciones de pérdida de función en el gen *ALPL* que codifica la fosfatasa alcalina no específica de tejido (TNAP), una enzima esencial para la mineralización esquelética y dental. La gravedad de la enfermedad varía desde las formas perinatales e infantiles potencialmente mortales hasta las formas más leves de aparición tardía, que se manifiestan en la edad adulta o solo afectan la dentición. La terapia de reemplazo enzimático basada en la fosfatasa alcalina recombinante dirigida al mineral óseo (asfotasa alfa) ha sido aprobada en el ámbito multinacional desde 2015 para el tratamiento de la HPP de inicio pediátrico, aumentando notablemente la sobrevivencia, la condición esquelética de los pacientes tratados y su calidad de vida. Sin embargo, los síntomas no esqueléticos siguen siendo preocupaciones clínicas importantes. Una mejor comprensión de las células que expresan TNAP fisiológicamente, las vías metabólicas involucradas y los sustratos naturales de TNAP en cada tejido ayudará a diseñar mejores terapias y/o alternativas para prevenir/corregir manifestaciones no esqueléticas de la HPP, ya sean conocidas o aún por descubrir. Esta revisión recapitula el contenido de mi conferencia en memoria de Louis V. Avioli presentada durante la reunión anual de la *American Society for Bone and Mineral Research* (ASBMR), en septiembre de 2025, en Seattle, WA, donde enfoco los sustratos naturales de la TNAP (el pirofosfato inorgánico, el piridoxalfosfato, el adenosil trifosfato, la fosfocreatina, la fosfocolina y fosfoetanolamina, las endotoxinas bacterianas, la osteopontina fosforilada y la tau fosforilada) y discuto cómo su alteración puede ocasionar trastornos observados en diversos modelos de HPP de ratón. También resumo el estado actual del desarrollo de tratamientos alternativos para la HPP.

Recibido: 14 de enero de 2026

Aceptado: 13 de febrero de 2026

Parte del contenido de esta revisión ha sido publicado previamente en inglés en el *J Bone Miner Res* [1].

Autor de correspondencia: Millán, José Luis. millan@sbsdsccovery.org

Doi: 10.65640/r60hqp49 Copyright © 2025 FASEN - CC-BY-NC 4.0

HYPOPHOSPHATASIA – A PRECLINICAL PERSPECTIVE OF ITS PATHOPHYSIOLOGY AND TREATMENT

ARTICLE INFO

Keywords:

skeletal dysplasia, metabolic disease, enzyme replacement therapy, gene therapy, small molecule inhibitors, cell therapy, mouse models, preclinical studies.

Received: January 14, 2026

Accepted: February 13, 2026

ABSTRACT

Hypophosphatasia (HPP) is the genetic disorder caused by loss-of-function mutations in the *ALPL* gene that encodes the tissue-nonspecific alkaline phosphatase (TNAP), an enzyme essential for physiological skeletal and dental mineralization. The severity of the disease varies from the life-threatening perinatal and infantile forms to the milder later-onset forms that manifest in adulthood or only affect the dentition. Enzyme replacement therapy based on recombinant mineral-targeted alkaline phosphatase (asfotase alfa) has been approved multinationally since 2015 for the treatment of pediatric-onset HPP, remarkably increasing the lifespan, their skeletal condition and the quality of life of patients affected by the severe forms of HPP. However, non-skeletal symptoms remain important clinical concerns. A better understanding of the cells that express TNAP physiologically, the metabolic pathways involved and the natural substrates of TNAP in each tissue will help design better therapies and/or alternatives to prevent/correct non-skeletal manifestations of HPP. This review recapitulates the content of my Louis V Avioli memorial lecture presented during the annual meeting of the American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR) in September 2025 in Seattle, WA, where I focus on the natural substrates of TNAP (inorganic pyrophosphate, pyridoxal 5' phosphate, adenosyl triphosphate, phosphocreatine, phosphocholine and phosphoethanolamine, bacterial endotoxins, phosphorylated osteopontin and phosphorylated tau) and discuss how their alteration can cause the disorders observed in mouse models of HPP. I also summarize the current state of development of alternative treatments for HPP.

INTRODUCCIÓN

La hipofosfatasa (*hypophosphatasia* y su abreviatura HPP en inglés) es el trastorno genético causado por mutaciones de pérdida de función en el gen *ALPL* que codifica la fosfatasa alcalina no específica de tejido (*tissue-nonspecific alkaline phosphatase*; TNAP, su abreviatura en inglés), una enzima esencial para la mineralización esquelética y dental [1]. La HPP se puede presentar con un nivel de gravedad extraordinariamente amplio [2], pero todos los pacientes son portadores de una o dos variantes de pérdida de función en sus alelos *ALPL*.

Un artículo reciente [3] resumió las características de la HPP en las poblaciones de pacientes pediátricos y adultos, destacando algunas características en común entre los dos grupos. Las complicaciones enumeradas como específicas de las formas perinatales-infantiles-juveniles de HPP fueron retraso del crecimiento, escaso aumento de peso, raquitismo, pérdida prematura de dientes primarios (con la raíz intacta), convulsiones que responden a la vitamina B6, tórax inestable y espones osteocondrales. Las complicaciones enumeradas como específicas para las for-

mas adultas son las fracturas osteomalácicas (metatársicas o femorales), osteoartritis, pérdida de dientes secundarios, condrocalcinosis y pseudogota. Sin embargo, vale destacar que una gran variedad de las manifestaciones es compartida por los grupos pediátricos y de adultos incluyendo la osteomalacia, deformidades en arco, fracturas, escoliosis, craneosinostosis, dolor óseo, debilidad muscular, dentición anormal, insuficiencia renal, pérdida de audición, depresión/ansiedad, dolores de cabeza y fatiga.

Claramente, la HPP es un error innato del metabolismo que afecta directa o indirectamente a múltiples sistemas y órganos. Podemos explicar muchas de esas manifestaciones, pero no todas, y –como describiré más adelante en esta perspectiva– se pueden prevenir o mejorar algunas de esas manifestaciones con los tratamientos actuales y en desarrollo, pero no todas. A medida que continuamos avanzando con el desarrollo de nuevos tratamientos, también debemos comprender las consecuencias a largo plazo de los déficits no resueltos en órganos no esqueléticos que requieren TNAP para funciones fisiológicas y que las terapias actuales y en desarrollo no están abordando.

Repaso de la estructura de la TNAP

Gran parte de lo que sabemos sobre la estructura de la TNAP se basa en estudios de homología realizados modelando la secuencia de aminoácidos de la TNAP sobre las coordenadas cristalográficas de la estructura de la isoenzima placentaria [4]. Aquí describiré brevemente las principales características estructurales que pueden verse afectadas por mutaciones y que llevan al desarrollo de HPP. Para una descripción en profundidad de la estructura de las fosfatasa alcalinas de mamíferos en general, remito al lector a mi tratado anterior sobre el tema y a las referencias allí contenidas [5].

TNAP, como todas las fosfatasa alcalinas de mamíferos, es un dímero obligatorio, ya que los monómeros no son estables y no pueden mediar catálisis. La interfaz monómero-monó-

mero muestra un fuerte carácter hidrofóbico y es crucial para la estabilidad y la función enzimática del dímero [6]. Una secuencia de superficie flexible llamada “corona” contiene residuos importantes para estabilizar la unión de inhibidores de comportamiento cinético no competitivo, y también alberga una secuencia de baja afinidad al colágeno [7]. La hélice alfa N-terminal de cada subunidad monomérica alcanza el sitio activo de la subunidad contralateral [8] y, por lo tanto, junto con los residuos de la corona, ayuda a estabilizar la estructura dimérica confiriendo propiedades alostéricas a la enzima [9]. Estas características estructurales y funcionales explican por qué una única variante de *ALPL* heredada de uno de los padres puede, en algunos casos, comprometer las propiedades cinéticas de todo el dímero (una variante dominante negativa), lo que lleva a la insuficiencia de TNAP y a la herencia de generación a generación de HPP (herencia dominante). Esto se observa predominantemente en los casos de HPP en adultos [10]. La mayoría de los otros casos de HPP evidencian la presencia de dos alelos hipomórficos que contribuyen a afectar la función enzimática del dímero (herencia recesiva y, con mayor frecuencia, heterocigotas compuestos). Sin embargo, otros genes modificadores y efectos epigenéticos pueden contribuir a afectar la expresividad y la penetrancia del fenotipo HPP. Tres sitios de unión a metales (dos iones Zn^{2+} y un ion Mg^{2+}) que rodean la serina catalítica son esenciales para la actividad enzimática de la TNAP [11]. Un sitio adicional de unión de metales, ocupado por Ca^{2+} , tiene propiedades estructurales [12].

Hasta la fecha se han catalogado ~480 variantes del gen *ALPL* en la “Base de datos de variantes del gen *ALPL*” (<https://alplmutation-database.jku.at/>), lo que proporciona una plataforma valiosa para intentar comprender las asociaciones genotipo-fenotipo. Las variantes de *ALPL* que alteran los residuos en la interfaz monómero-monómero, la corona, el brazo N-terminal y los sitios de unión de cationes divalentes pueden causar HPP [13]. Además, la TNAP sufre importantes modificaciones pos-

traduccionales. La TNAP se asocia a la superficie de las membranas plasmáticas y de las vesículas de la matriz a través de un anclaje de glicosilfosfatidilinositol (*glycosylphosphatidylinositol* o su abreviatura GPI en inglés) que permite el movimiento de la enzima al mejorar la fluidez de la membrana. Este anclaje GPI puede escindirse mediante la acción enzimática de las fosfolipasas presentes en las membranas plasmáticas, lo que explica en parte cómo se libera la TNAP a la sangre y a otros fluidos biológicos. Además, la TNAP contiene cinco sitios de glicosilación, en la asparagina 140, 230, 271, 303 y 430, y algunos son necesarios para la actividad catalítica [14]. El grado de glicosilación en estos sitios explica en gran medida las diferentes propiedades biofísicas y cinéticas de las isoformas de la TNAP producidas por el hueso, el hígado, el riñón, las células vasculares y otras [15].

Recientemente se publicaron las coordenadas cristalográficas de la TNAP [16]. La estructura del dímero confirmó características previamente predichas y ya resumidas; sin embargo, los autores también describieron una arquitectura octamérica generada por la tetramerización de dímeros de la TNAP. Es difícil visualizar cómo un octámero de este tipo podría estar anclado vía GPI en la membrana celular y de las vesículas de la matriz. Los autores sugieren que dicha disposición multimérica podría potencialmente estabilizar la TNAP en la circulación, aunque no proporcionaron evidencia de la existencia de dicho octámero en sangre. Los autores también mapearon algunas variantes de *ALPL* asociadas con HPP en las interfases dímero-dímero del octámero, pero no está claro cómo –afectando la formación de dichos multímeros– podría contribuir a causar HPP. Recientemente se han determinado dos estructuras más de la TNAP. El grupo de David Magne (Lyon, Francia) confirmó la estructura tridimensional dimérica de la TNAP y mapeó cómo la fosfocolina (un sustrato recientemente descubierto al cual me referiré luego) se une en una orientación opuesta a la del pirofosfato que interactúa con diferentes aminoácidos en el sitio activo de la TNAP [17].

El grupo de Lawrence Kazak (Universidad McGill, Montreal, Canadá) también ha determinado la estructura tridimensional de la TNAP con fosfocreatina (otro de sus sustratos) unida al sitio activo y también ha confirmado la estructura dimérica de la enzima. Este grupo también identificó por primera vez un activador alostérico fisiológico de la TNAP y mapeó algunas variantes de *ALPL* causantes de HPP en ese sitio alostérico (comunicación personal-manuscrito en revisión).

Diversos modelos de HPP de ratón

La generación y caracterización de modelos de HPP en ratones resultó indispensable para el estudio de las vías bioquímicas que involucran la función de la TNAP y las pruebas preclínicas necesarias para la optimización de tratamientos potenciales para la HPP [18].

Los alelos (*Alpl*^{tm1Sor} y *Alpl*^{tm1Jlm}) desarrollados en la década de 1990 han sido los más utilizados para examinar las consecuencias fisiológicas de una ablación global de la TNAP [19]. Estos ratones *Alpl*^{-/-}, también llamados *knockout* (en inglés), recapitulan fielmente la fisiopatología de HPP infantil, presentando retraso del crecimiento, esqueleto gravemente hipomineralizado [20], dentina hipomineralizada [21] y defectos en el esmalte [22], falta de cemento acelular [23] y muerte antes del destete con convulsiones graves [24,25].

El alelo *Alpl* flojado nos permitió producir y caracterizar modelos de inicio tardío de la HPP, al inactivar condicionalmente la TNAP bajo el control del promotor de colágeno 1 (*Alpl*^{Col1/Col1}), afectando la mineralización en todo el esqueleto y los dientes o el gen *Prx1* en las células madre mesenquimales de las extremidades (*Alpl*^{Prx1/Prx1}), afectando principalmente al esqueleto apendicular [26]. Es este modelo *Alpl*^{Prx1/Prx1} el que hemos utilizado consistentemente para estudiar la eficacia de la administración de un vector adenoviral para el reemplazo enzimático (véase más adelante), pero también hemos utilizado un modelo *Alpl*^{-/-Prx1} donde un alelo *Alpl* está inactivado globalmente y el otro está inactivado condicionalmente. Este modelo es algo más severo y fa-

cilitó la evaluación de la mejoría esquelética cuando utilizamos la inhibición de la enzima ectonucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasa 1 (ENPP1) para reducir los niveles altos de pirofosfato (véase más adelante) o cuando examinamos las consecuencias de superponer la enfermedad renal crónica como comorbilidad a la HPP [27] (manuscrito en revisión).

Nuestros primeros intentos de desarrollar un modelo de ratón con enfermedad exclusivamente dental (*odonto-HPP* en inglés) mediante la introducción de una variante *ALPL* negativa dominante (A116T), derivaron en un fenotipo decepcionantemente leve [28], y en consecuencia no hemos utilizado este modelo para ningún estudio de tratamiento. Sin embargo, recientemente publicamos la generación de eliminación condicional de la TNAP específicamente en la cresta neural mediante la cruce de ratones con el alelo flojado con ratones *Wnt1^{Cre2}* para eliminar condicionalmente la TNAP en células ectomesenquimales que producen dentina, cemento, ligamento periodontal y hueso alveolar, pero sin causar ningún cambio en el esqueleto apendicular [29]. Se observaron defectos en la sincondrosis interesfenoidal derivada de la cresta neural de la base craneal y el cóndilo mandibular de ratones *Alpl^{Wnt1/Wnt1}*; la extracción de molares maxilares demostró profundos defectos de curación del hueso alveolar que fueron parcialmente rescatados mediante reemplazo enzimático. Continuaremos utilizando este modelo para probar nuevas terapias enfocadas en las formas dentales de HPP.

Sustratos fisiológicos de la TNAP

Se sabe que algunos sustratos fisiológicos están patológicamente elevados en la HPP. Otros se han identificado recientemente en estudios preclínicos.

El **pirofosfato inorgánico extracelular** (*inorganic pyrophosphate*, PP_i) es un potente inhibidor de la mineralización y se considera el agente antiincrustante natural del cuerpo [30], ya que previene eficazmente la calcificación inadecuada de los tejidos blandos. En

la sangre, las concentraciones de PP_i están en el rango μM , mientras que los niveles de fosfato inorgánico (P_i) están en el rango mM y, como resultado, pequeños cambios en la relación PP_i/P_i tienen profundas implicaciones para el control de la calcificación de los tejidos blandos. La TNAP desempeña el papel crucial de restringir la concentración de PP_i extracelular para mantener un coeficiente PP_i/P_i permisivo para la mineralización ósea normal, y ya he descrito este mecanismo en detalle en una revisión anterior [31]. Parafraseando esa revisión, la incapacidad de los huesos HPP para calcificarse resulta de dos eventos bioquímicos: a) un bloqueo en la propagación de hidroxiapatita en la matriz extracelular debido a los niveles acumulados de PP_i por la falta de la función pirofosfatasa de la TNAP, y b) generación local inadecuada de P_i a partir de ATP en el entorno de las vesículas de la matriz extracelular. Los pacientes con HPP y los ratones *Alpl^{-/-}* conservan la capacidad de iniciar la formación de minerales intravesiculares debido a la presencia de fosfoetanolamina/fosfocolina fosfatasa 1 (*PHOSPHO1* en inglés) que genera P_i dentro de las vesículas de la matriz extracelular [32]. Los ratones *Phospho1^{-/-}* muestran anomalías en la placa de crecimiento, fracturas espontáneas, huesos largos arqueados, osteomalacia y escoliosis en los primeros años de vida, lo que coincide con un fenotipo similar al de la HPP [33]. En un experimento genético muy revelador, descubrimos que las crías doblemente *knockout* deficientes en TNAP y PHOSPHO1 eran letales en el estadio embrionario con una ausencia total de mineralización esquelética a pesar de la normofosfatemia/hiperfosfatemia, respectivamente, manifestada por las cepas *knockout* individuales [34]. Esto indicó firmemente que la disponibilidad de P_i circulante no es suficiente para iniciar la mineralización y que la TNAP debe participar en la generación de P_i en la superficie y periferia de las vesículas de la matriz extracelular. De hecho, la función de generar P_i fue propuesta desde su descubrimiento en el hueso por Robison en 1923 [35] y la capacidad de TNAP para hi-

drolizar ATP para generar P_i ahora está bien documentada [36,37]. Casi un siglo más tarde creo que comenzamos a comprender mejor la doble acción de la TNAP como pirofosfatasa restringiendo la concentración de PP_i , y como ATPasa generando P_i en el entorno vesicular y de esa manera regulando el coeficiente PP_i/P_i controlando la mineralización esquelética y dental fisiológica.

ATP/ADP/AMP (efectos sistémicos): la alta actividad ATPasa de la TNAP demuestra que, además de generar P_i para mineralización, también es capaz de generar progresivamente ADP, AMP y adenosina [36]. La desfosforilación del ATP que es proinflamatorio y la producción de adenosina que es antiinflamatoria por la alta actividad plasmática de TNAP en los neonatos contribuyen a mejorar el perfil del metabolismo de las purinas antiinflamatorias en la sangre del recién nacido [38]. Además, TNAP es una de las tres enzimas implicadas en el metabolismo de las purinas, que aporta adenosina antinociceptiva a las neuronas de los ganglios somatosensoriales de la raíz dorsal y a la médula espinal dorsal [39] y reduce los niveles de ATP extracelular para permitir el crecimiento axonal en las neuronas del hipocampo [40]. La señalización purinérgica alterada en ratones *Alpl*^{-/-} debido a alteraciones del coeficiente ATP/adenosina puede contribuir a las convulsiones, hiperalgia y alodinas observadas en los ratones *knockout* y podría en parte explicar el mecanismo de dolor experimentado por pacientes con HPP.

El **piridoxalfosfato** (*pyridoxal-5' phosphate*, PLP) es otro sustrato natural de la TNAP descrito muy tempranamente durante el estudio de la HPP [41]. La vitamina B6, mediada por sus diversos vitámeros (piridoxal, piridoxamina y piridoxina), es un cofactor en más de 160 reacciones bioquímicas intracelulares [42], y más específicamente una coenzima en el catabolismo de varios aminoácidos y en las descarboxilaciones necesarias para la generación de neurotransmisores incluyendo dopamina, serotonina, histamina, taurina

y ácido gamma-aminobutírico. Como se resumió anteriormente [18], la desfosforilación de PLP a piridoxal es una función importante de la TNAP, ya que solo los vitámeros no fosforilados pueden ingresar en las células y, una vez dentro de las células, estos vitámeros no fosforilados se convierten nuevamente en PLP para ser usados como coenzima en varias vías metabólicas. La deficiencia de la TNAP conduce a un aumento de los niveles plasmáticos de PLP, pero a niveles bajos de PLP en el sistema nervioso central en pacientes con HPP, lo que lleva a una disminución de las concentraciones de serotonina y ácido gamma-aminobutírico, lo que explica en parte las convulsiones graves horas antes o inmediatamente antes de la muerte prematura de los ratones *Alpl*^{-/-} [24, 25]. Otro experimento genético muy revelador demostró que la ablación del gen del receptor purinérgico *P2rx7* en ratones *Alpl*^{-/-} resultaba en ratones *knockout* dobles con vida extendida por algunos días para luego sucumbir, pero sin experimentar convulsiones [43]. Los autores descubrieron que el PLP bloquea la función del *P2rx7*, un receptor conocido por responder a altos niveles de ATP. La interpretación de esos datos sugiere que las convulsiones en los ratones *Alpl*^{-/-} se deben a dos cambios bioquímicos principales: a) una acumulación de ATP, resultante de una actividad TNAP deficiente, que estimula la actividad del receptor *P2rx7*, y b) un bloqueo reducido de la actividad de *P2rx7* por la disminución de las concentraciones de PLP en el sistema nervioso central. Esto implica que medicamentos destinados a modular la actividad del receptor *P2rx7* podrían potencialmente ser útiles para controlar las convulsiones en bebés con HPP grave.

La TNAP se expresa tanto en el tubo neural en desarrollo como en ciertas áreas del cerebro maduro [44] y los ratones *Alpl*^{-/-} muestran una disminución significativa de la sustancia blanca de la médula espinal con evidencia ultraestructural de degradación celular alrededor de las regiones paranodales y una disminución de la proporción y el diámetro de los axones mielinizados [45,46]. Algunas de estas

características se reproducen en animales de tipo salvaje alimentados con una dieta deficiente en vitamina B6, mientras que, a la inversa, mejoran en ratones *Alpl*^{-/-} alimentados con una dieta rica en piridoxal [45]. ¿Podrían estos defectos de mielinización contribuir al/los mecanismo/s del dolor en la HPP?

Fosfocreatina (*phosphocreatine*, PCr) (termogénesis-función mitocondrial). Si bien es sabido que la TNAP está presente en la membrana citoplasmática de las células y en la superficie externa de las vesículas de la matriz durante la biomineralización, un hallazgo inesperado describió la localización de la TNAP en las mitocondrias de las células grasas marrones, donde actúa como una potente fosfatasa usando fosfocreatina como sustrato [47]. El artículo describe que la expresión de la TNAP se induce poderosamente cuando los ratones se exponen a condiciones de frío, y que la inhibición de la TNAP en mitocondrias aisladas conduce a una pérdida del ciclo de la creatina afectando la termogénesis. Los datos indicaron que, a pesar de la ausencia de cualquier secuencia de direccionamiento mitocondrial identificable, la TNAP estaba unida a las membranas mitocondriales a través de un anclaje GPI y estaba localizado en la membrana mitocondrial interna y en el espacio intermembrana. Además, la ablación genética de la TNAP en adipocitos redujo el gasto energético de todo el cuerpo y provocó una obesidad de aparición rápida en ratones, sin cambios en la actividad o el comportamiento alimentario. ¿Sugiere este mecanismo mediado por la fosfocreatina y descubierto en ratones, que podrían ocurrir problemas de adaptación al frío en pacientes con HPP? En la literatura científica no se mencionan cambios en la temperatura corporal en pacientes con HPP, pero algunos relatos anecdóticos de pacientes con HPP sugieren dificultades en la adaptación al frío. Si se demuestra que la dificultad de adaptación al frío es parte de la presentación sistémica de la HPP, ¿se corrige con la terapia de reemplazo enzimático?

Otro problema relacionado con el posible deterioro de la función mitocondrial parece ser la debilidad muscular que experimentan los pacientes con HPP, y que se resuelve o mejora con el tratamiento con reemplazo enzimático [48]. Anteriormente se había descrito la presencia de la TNAP en el retículo endoplásmico del sarcómero cardíaco en ratones [49], pero hasta la fecha no hay informes de que la TNAP se exprese en el músculo esquelético. Sin embargo, un artículo ha documentado una reducción significativa en la longitud muscular, la masa y el área de la sección transversal del músculo extensor largo de los dígitos de ratones *Alpl*^{-/-} de 14 días de edad, y los estudios histológicos revelaron una alteración en la composición del tipo de fibra muscular con un aumento de las fibras musculares tipo II y una disminución de las fibras musculares tipo I en el músculo gastrocnemio [50]. En otro estudio también se realizaron pruebas de fuerza muscular y coordinación motora en las cuales se documentó una reducción significativa en la relación entre fuerza de agarre/peso corporal y deficiencias en la coordinación motora en los ratones *knockout* [51]. Los ratones *knockout* de *Alpl* también manifiestan una capacidad respiratoria mitocondrial reducida, que se revierte mediante un tratamiento de reemplazo enzimático [52]. Lo más probable es que la rápida mejora de la función muscular se deba a la normalización de la concentración de uno o varios de los sustratos solubles de TNAP. Los candidatos probables son PP_i, ATP o PLP. La toxicidad del PP_i es una posibilidad que será necesario investigar. También debería considerarse el papel interdependiente de ATP y *P2rx7*. Pero, dado que un tercio de todas las enzimas dependientes de PLP están localizadas en las mitocondrias [53], en mi opinión es más probable que los efectos de la deficiencia de TNAP y culpable del fenotipo de debilidad muscular sea la disminución de PLP en las mitocondrias. Por lo tanto, se podría esperar que el tratamiento con asfotasa alfa, así como resuelve las convulsiones perinatales asociadas a PLP en ratones *Alpl*^{-/-} y pacientes con HPP graves, corrija también la deficiencia in-

tracitoplasmática e intramitocondrial de PLP, ayudando a resolver el fenotipo muscular.

La **fosfoetanolamina** (*phosphoethanolamine*, PEA) y la **fosfocolina** (*phosphocholine*, PC). La PEA se ha considerado durante mucho tiempo un sustrato y un marcador bioquímico de la HPP, aunque su origen fisiológico no se conocía. En el año 1980 pudimos documentar que los niveles plasmáticos de PEA se correlacionaban inversamente con los niveles sanguíneos del hígado, pero no con la isoforma ósea de TNAP, lo que sugirió un posible origen hepático de este analito [54]. Recientemente, hemos demostrado que los ratones *Alpl*^{-/-} presentan esteatosis hepática y niveles reducidos de triglicéridos séricos, debido a una deficiencia intrahepática de colina que es necesaria para la formación de fosfatidilcolina y las lipoproteínas [55]. Además de la colina, los hepatocitos pueden también utilizar etanolamina para producir fosfatidiletanolamina, que posteriormente se metila para formar fosfatidilcolina, en una vía auxiliar y parcialmente compensatoria. Una fuente adicional o alternativa de PEA podría reflejar una actividad disminuida de la O-fosforiletanolaminafosfoliasa hepática, la enzima que hidroliza la fosfoetanolamina utilizando PLP como cofactor [56]. Es importante considerar la función de la TNAP hidrolizando la fosfocolina y la fosfoetanolamina en el hígado en personas con HPP. El tratamiento con asfotasa alfa hace que los pacientes con HPP pasen de hipofosfatemia a hiperfosfatemia, lo que puede aliviar la deficiencia hepática de colina. La rareza de la HPP, combinada con su presentación moderada en casos adultos, dificulta determinar si los pacientes con HPP pueden ser más proclives a desarrollar esteatosis hepática en comparación con la población general. Sin embargo, medir sus niveles séricos de colina podría revelar valores subnormales en pacientes con HPP, lo que tal vez justifique la suplementación con colina como medida profiláctica. Dados estos recientes estudios preclínicos que vinculan la función de la TNAP con el metabolismo de la fosfocolina en el hí-

gado y el transporte de triglicéridos desde el hígado al torrente sanguíneo, puede también ser interesante examinar el perfil de lipoproteínas en pacientes con HPP al inicio del estudio y cómo ese perfil puede cambiar con el reemplazo enzimático.

Endotoxinas bacterianas. La TNAP es una nucleotidasa antiinflamatoria [57,58], que además de hidrolizar y establecer el coeficiente ATP/adenosina discutida anteriormente, tiene también la capacidad de desfosforilar el lipopolisacárido bacteriano (*lipopolysaccharide*, LPS) [59]. El LPS es sintetizado por bacterias gramnegativas y sus efectos proinflamatorios dependen de los grupos fosfato en la región lipídica A. En la sangre, la TNAP participa en la desfosforilación de LPS y otras endotoxinas bacterianas [59], y en el hígado la actividad de la TNAP se incrementa durante la fibrosis como un mecanismo protector [60]. LPS también induce la expresión de la TNAP en el glomérulo renal [61]. Esta función desintoxicante de la TNAP puede ser importante para comprender la nefrocalcinosis en la HPP. La presencia de actividad de la TNAP en el riñón es interesante, ya que la TNAP hidroliza PP_i , un potente inhibidor de la mineralización que se encuentra frecuentemente en los cálculos de hidroxapatita. Durante nuestros estudios preclínicos observamos que en ratones *Alpl*^{-/-} tratados con asfotasa alfa o con administración de vectores virales de la TNAP dirigidos a minerales (AAV8-TNAP-D₁₀), el reemplazo enzimático previno los déficits esqueléticos y dentales, acompañado de la normalización del PP_i plasmático, pero el PP_i urinario permaneció anormalmente alto [62,63]. Estos datos sugieren que la mayor fuente de PP_i en el riñón es la generación local y que el PP_i urinario es un compartimento distinto no necesariamente influenciado por la homeostasis del PP_i plasmático. ¿Por qué los riñones HPP se calcificarían en presencia de altas concentraciones de PP_i urinario? Como hemos analizado, además de actuar como pirofosfatasa, la TNAP también desempeña un papel como molécula antiinflamatoria capaz de desfosforilar progre-

sivamente ATP (una molécula proinflamatoria) a adenosina (una molécula antiinflamatoria) y desintoxicar el LPS bacteriano. La propia TNAP está regulada positivamente por TNF- α , IL1- β e IL-6 [57,58]. El daño tisular causado por la inflamación, debido a la acumulación de ATP y/o LPS bacteriano, actuaría como un nido para el depósito ectópico de mineral en el parénquima renal en HPP que no es superado por las altas concentraciones urinarias de PP_i. Valdría la pena probar esta hipótesis y contrastarla con la explicación más sencilla de que la nefrocalcinosis es causada simplemente por una alteración de la homeostasis mineral.

Osteopontina fosforilada (OPN) y Tau fosforilada (Tau). Finalmente, la TNAP también puede actuar sobre las fosfoproteínas, y se ha demostrado que al menos dos de ellas, la osteopontina fosforilada y la Tau fosforilada, se comportan como sustratos naturales de la TNAP. La OPN es una glicoproteína altamente fosforilada, y esta fosforilación es importante porque la OPN fosforilada pero no la desfosforilada inhibe la mineralización, y los altos niveles plasmáticos de OPN fosforilada acompañan el aumento de los niveles extracelulares de PP_i en ratones *Alpl*^{-/-}. La ablación del gen *OPN* (*Spp1*) en los ratones *Alpl*^{-/-} condujo a una mejora parcial del estado de hipomineralización [64] y pudimos identificar al menos dos péptidos OPN fosforilados como dianas para la TNAP [65].

La TNAP también desfosforila la Tau extracelular hiperfosforilada en el cerebro promoviendo la activación de los receptores muscarínicos [66]. Curiosamente, la sobreexpresión condicional de la TNAP provoca hiperfosforilación y agregación intracelular de Tau en células vecinas a aquellas que sobreexpresan la enzima. Por el contrario, la ablación genética de la TNAP redujo la desfosforilación de Tau extracelular y disminuyó la hiperactividad neuronal, la atrofia cerebral y la muerte neuronal del hipocampo en un modelo de tauopatías en ratones, disminuyendo el comportamiento similar a la ansiedad, la deficiencia motora

y aumentando la capacidad de memoria y la esperanza de vida [66]. Si bien estos estudios preclínicos parecen apuntar a un efecto protector de tener una baja actividad neuronal de TNAP en lo que respecta a las tauopatías, hay mucho aún que comprender sobre qué manifestaciones del sistema nervioso central podrían encontrarse en pacientes con HPP.

Tratamientos actuales y en desarrollo

Terapias de reemplazo enzimático

TNAP dirigida al mineral óseo (Asfotase alfa): la TNAP dirigida a mineral óseo o hidroxiapatita (conocida como asfotasa alfa) es una proteína terapéutica diseñada para prevenir y tratar las manifestaciones clínicas de la HPP. La asfotasa alfa consiste en el polipéptido de la TNAP, desprovisto de su dominio de anclaje GPI que fue reemplazado por la región Fc de inmunoglobulina humana gamma 1 seguida de una secuencia de 10 residuos de ácido aspártico (D₁₀), para conferir propiedades de focalización mineral debido a la alta afinidad de D₁₀ por la hidroxiapatita [62,67]. En el año 2008 demostramos que las inyecciones subcutáneas diarias de asfotasa alfa en ratones *Alpl*^{-/-} desde el nacimiento previenen la enfermedad infantil [62], y también previenen los defectos dentales extensos, incluidos dentina [21,23], cemento acelular [68] y defectos del esmalte [22]. En 2012 se demostró que la asfotasa alfa es eficaz en bebés y niños con HPP grave y potencialmente letal [69], y este producto biológico fue aprobado en el ámbito multinacional para la HPP de inicio pediátrico en 2015 con el nombre de Strensiq®. El tratamiento de reemplazo enzimático mejora notablemente el fenotipo esquelético, la función motora y el pronóstico y calidad de vida de los pacientes con HPP. Sin embargo, actualmente requiere de 3 a 6 inyecciones del este producto biológico por semana, lo que a menudo conduce a reacciones en el sitio de inyección lo suficientemente graves como para forzar la interrupción del tratamiento [70,71] y también es muy costoso [72]. La efzimotase alfa (también conocida como ALXN1850) es una proteína recombinante de segunda ge-

neración, donde se introdujo una mutación puntual (E108M) en la molécula de TNAP para aumentar su actividad enzimática y se eliminaron 2 de los 5 sitios de glicosilación ligados a asparaginas (N213Q y N286Q) para mejorar las propiedades farmacocinéticas de la enzima quimérica [73]. La región Fc también se cambió de la IgG1 humana a la IgG2/4 humana que contiene los dominios bisagra, CH2 y CH3. La enzima TNAP parece tener una tolerabilidad y perfil farmacocinético aceptables y lograr una mayor exposición corporal en comparación con la asfotasa alfa, lo que permitiría reducir la frecuencia de inyecciones. Los ensayos clínicos están en curso.

Una colaboración con el grupo del profesor Shimada que comenzó en 2007 en la reunión de Hypophosphatasia Europe en Huningue, Francia, cuando presentamos nuestros primeros estudios preclínicos de eficacia de la asfotasa alfa, nos motivó a examinar la posibilidad de utilizar vectores virales para administrar la TNAP dirigida al mineral óseo en nuestros modelos de ratones con HPP. Experimentamos con varios tipos de vectores virales (lentivirus y adenovirus) expresando TNAP-D₁₀ y demostramos la utilidad de estos vectores en prolongar la vida, prevenir las convulsiones y mejorar el fenotipo esquelético de los ratones *Alpl*^{-/-} después de una sola inyección [74-78]. Recientemente se logró un refinamiento de este principio terapéutico utilizando una única administración intramuscular de un virus adenoasociado 8 (AAV8) que codifica TNAP-D₁₀ para extender la vida y mejorar los fenotipos esquelético y dentoalveolar en ratones *Alpl*^{-/-}, obviando al mismo tiempo la necesidad de múltiples inyecciones semanales en este modelo de ratón de HPP infantil [63,79]. Este mismo vector demostró ser eficaz para mejorar la osteomalacia en el modelo *Alpl*^{Prx1/Prx1} de HPP [80] de aparición tardía y un modelo de enfermedad similar a HPP causada por deficiencia de *Phospho1*, que presenta escoliosis de aparición temprana, niveles plasmáticos reducidos de TNAP, osteomalacia y problemas dentales. Nuestros últimos estudios permitieron definir la dosis viral óptima tanto en

modelos de ratones HPP infantiles como de aparición tardía [81] y el profesor Miyake está actualmente realizando estudios con primates no humanos en Japón con la intención de iniciar ensayos clínicos en breve.

Debido a que la TNAP dirigida al mineral óseo fue diseñada para unirse específicamente a la hidroxiapatita, es ineludible que también tenga el potencial de unirse a sitios de calcificación ectópica y hemos demostrado que la asfotasa alfa marcada con fluorescencia administrada *in vivo* se dirige no solo a sitios de mineralización esquelética y dental, sino también a zonas calcificadas en el corazón, la aorta y la arteria renal en modelos de ratón [82]. Esto es preocupante, porque hemos demostrado que la sobreexpresión de la TNAP, sea en la capa media [83] como íntima [84,85], en la vasculatura conduce a un serio compromiso cardiovascular. Dado que los pacientes con HPP sometidos a tratamiento de por vida con asfotasa alfa pueden desarrollar comorbilidades asociadas con la calcificación vascular como la diabetes, la enfermedad renal crónica o aterosclerosis, será importante evaluar periódicamente la función cardiovascular en estos casos clínicos. En nuestro laboratorio, hemos examinado la eficacia de la asfotasa alfa en ratones con HPP tardía en los cuales sobreimpusimos enfermedad crónica renal. Nuestros hallazgos revelan que la presencia de enfermedad crónica renal compromete la eficacia del tratamiento en curso con asfotasa alfa y conlleva una calcificación vascular agravada (manuscrito en revisión). Estos datos ejemplifican la necesidad de evaluar cuidadosamente la dosificación del tratamiento y observar las manifestaciones extraesqueléticas. Esto también ilustra la necesidad de desarrollar estrategias terapéuticas alternativas no dirigidas a minerales para la HPP.

Ilofotasa alfa (una forma quimérica no dirigida al hueso). En uno de nuestros trabajos con adenovirus, observamos que el uso de una TNAP natural sin D₁₀ [75] también prolongaría la vida, prevendría convulsiones y mejoraría el fenotipo esquelético de los ratones *Alpl*^{-/-}. Esto nos estimuló a probar una forma quimérica no

dirigida de fosfatasa alcalina que se estaba desarrollando para el tratamiento de las lesiones renales agudas. ChimAP (ahora llamada ilofotasa alfa) consiste en la molécula de fosfatasa alcalina intestinal humana pero que posee la corona de la isoenzima placentaria que tiene propiedades catalíticas distintas de las de la TNAP recombinante y una especificidad de sustrato más estrecha con selectividad para LPS [86]. Las inyecciones diarias de 16 mg/kg/día de ChimAP en ratones *Alpl*^{-/-} prolongaron la vida, previnieron las convulsiones y mejoraron el fenotipo esquelético y dental [80], aunque la resolución de la osteomalacia no fue tan profunda como la lograda con la asofatasa alfa [87]. Recientemente, la ilofotasa fue evaluada clínicamente en cuanto a sus propiedades farmacodinámicas en pacientes con HPP [88].

Inhibición de la ENPP1

El principal productor de PP_i es la ectonucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasa 1 (ENPP1), que hidroliza el ATP a AMP y PP_i. La deficiencia de ENPP1 conduce a la osificación del ligamento longitudinal posterior de la columna, a la calcificación arterial generalizada de la infancia, pero también puede manifestar cambios fenotípicos característicos del pseudoxantoma elástico que usualmente son causados por una deficiencia en el transportador ABCC6 [89-91]. Los ratones *Enpp1*^{-/-} tienen niveles casi indetectables de PP_i plasmático, lo que conduce a una deposición inadecuada de hidroxapatita en los tejidos blandos [92]. Diversos estudios genéticos anteriores realizados por nuestro grupo demostraron que la doble ablación de los genes *Alpl* y *Enpp1* en ratones condujo a la normalización de las concentraciones plasmáticas de PP_i y mejoras en la mineralización esquelética [93], aunque la mejor fue más evidente en el esqueleto axial que en el apendicular [94]. Por lo tanto, recientemente probamos la eficacia potencial de utilizar la inhibición de ENPP1 para disminuir las concentraciones de PP_i en el modelo de ratón *Alpl*^{-/-Prx1} de HPP de aparición tardía donde justamente la patología es más evidente en el esqueleto apendicular [95]. Los datos indican

que la administración oral de un inhibidor de ENPP1 puede ser una terapia útil en pacientes con HPP de aparición tardía, en quienes la asofatasa alfa no ha sido aprobada.

Terapias celulares

Algunos estudios han informado acerca de terapia basada en células para la HPP. El trabajo pionero de Michael P. Whyte demostró una mejoría en dos bebés no emparentados afectados por HPP potencialmente letal utilizando células de médula ósea, así como osteoblastos cultivados junto con fragmentos óseos [96]. Una niña de 8 meses con HPP infantil se sometió a citorreducción y su hermana le administró médula haploidentica empobrecida en células T. Se logró el injerto, pero se necesitó médula enriquecida con células madre mesenquimales después de 6 meses. Se observó una mejoría prolongada de su condición esquelética, pero permaneció pequeña. La segunda niña, una niña de 9 meses con HPP infantil, recibió una combinación de médula ósea, fragmentos óseos injertados del padre y osteoblastos de los fragmentos óseos [97]. Cuatro meses después, las radiografías demostraron una mejor mineralización esquelética. Esta paciente, 7 años después del trasplante, se encontraba activa y en crecimiento, y presentaba el fenotipo clínico de la forma infantil más leve de HPP. Posteriormente, dos pacientes (un niño de 8 meses y una niña de 14 meses) con HPP grave se sometieron a un trasplante de médula ósea después de un acondicionamiento mieloablativo seguido de múltiples infusiones de células madre mesenquimales alogénicas expandidas *ex vivo* [98]. Los donantes eran familiares asintomáticos que albergaban variantes heterocigotas del gen *ALPL*. Se observaron mejoras en la mineralización ósea, la masa muscular, la función respiratoria y el desarrollo mental, lo que dio como resultado que los pacientes estuvieran vivos a la edad de 3 años. Sin embargo, la restauración de la actividad fosfatásica fue limitada y no se pudo lograr una arquitectura ósea normal.

También existe cierta experiencia documentada de terapias basadas en células que utilizan los ratones *Alpl^{-/-}* empleando células de médula ósea transducidas con un lentivirus que expresan TNAP-D₁₀ [77]. Los ratones tratados tenían una apariencia normal y no experimentaron convulsiones durante el período experimental. Las células transducidas injertaron y suministraron TNAP-D₁₀ de manera eficaz de forma continua a un nivel terapéutico durante al menos 3 meses.

Observaciones finales

Si bien los principales signos clínicos, síntomas y complicaciones de la HPP están relacionados con una mineralización ósea y dental defectuosa, los pacientes gravemente afectados ahora pueden sobrevivir a su enfermedad gracias a la asfotasa alfa, pero aún quedan formas pediátricas y adultas más leves de HPP para las cuales no contamos con una terapia aprobada. A medida que se conciben e implementan nuevas terapias, es crucial reconocer qué aspectos de la sintomatología de la HPP aún no estamos mejorando para abordar con mayor eficiencia

esas manifestaciones y ser conscientes de las posibles consecuencias de convertir ciertos tipos de células y órganos en fábricas de un producto terapéutico. Comprender qué papel fisiológico tiene la TNAP en esos órganos ayudará sin duda al diseño racional de nuevas terapias.

Conflictos de interés

El autor declara no presentar conflictos de intereses.

Financiamiento

Esta investigación no recibió ninguna subvención específica de agencias de financiación de los sectores público, comercial o sin fines de lucro.

Contribuciones de los autores

El autor conceptualizó y escribió el manuscrito en su totalidad, basado en el contenido de su conferencia en memoria de Louis V. Avioli, presentada el 6 de septiembre de 2025 durante la reunión anual de la *American Society for Bone and Mineral Research* (ASBMR) en Seattle, WA, USA. Gran parte del contenido de esta revisión ha sido ya publicado en inglés en el *Journal of Bone and Mineral Research* [1].

REFERENCIAS

1. Millán JL. Hypophosphatasia - Pathophysiological understanding, preclinical data looking beyond the skeleton, and upcoming treatments. *J Bone Miner Res.* 2025; zjaf141. doi: 10.1093/jbmr/zjaf141.
2. Whyte MP. Hypophosphatasia - aetiology, nosology, pathogenesis, diagnosis and treatment. *Nat Rev Endocrinol.* 2016; 12:233-46. doi: 10.1038/nrendo.2016.14.
3. Khan AA, Brandi ML, Rush ET, Ali DS, Al-Alwani H, Almonaei K, et al. Hypophosphatasia diagnosis: current state of the art and proposed diagnostic criteria for children and adults. *Osteoporos Int.* 2024; 35(3):431-8. doi: 10.1007/s00198-023-06844-1.
4. Le Du MH, Stigbrand T, Taussig MJ, Menez A, Stura EA. Crystal structure of alkaline phosphatase from human placenta at 1.8 Å resolution. Implication for a substrate specificity. *J Biol Chem.* 2001; 276(12):9158-65. doi: 10.1074/jbc.M009250200.
5. Millán JL. Mammalian alkaline phosphatases: from biology to applications in medicine and biotechnology. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons; 2006.
6. Le Du MH, Millán JL. Structural evidence of functional divergence in human alkaline phosphatases. *J Biol Chem.* 2002; 277(51):49808-14. doi: 10.1074/jbc.M207394200.
7. Bossi M, Hoylaerts MF, Millán JL. Modifications in a flexible surface loop modulate the isozyme-specific properties of mammalian alkaline phosphatases. *J Biol Chem.* 1993; 268(34):25409-16.
8. Hoylaerts MF, Ding L, Narisawa S, Van Kerckhoven S, Millán JL. Mammalian alkaline phosphatase catalysis requires active site structure stabilization via the N-terminal amino acid microenvironment. *Biochemistry.* 2006; 45(32):9756-66. doi: 10.1021/bi052471+.

9. Hoylaerts MF, Manes T, Millán JL. Mammalian alkaline phosphatases are allosteric enzymes. *J Biol Chem.* 1997; 272(36):22781-7. doi: 10.1074/jbc.272.36.22781.
10. Mornet E, Taillandier A, Domingues C, Dufour A, Benaloun E, Lavaud N, et al. Hypophosphatasia: a genetic-based nosology and new insights in genotype-phenotype correlation. *Eur J Hum Genet.* 2021; 29(2):289-99. doi: 10.1038/s41431-020-00732-6.
11. Kozlenkov A, Manes T, Hoylaerts MF, Millán JL. Function assignment to conserved residues in mammalian alkaline phosphatases. *J Biol Chem.* 2002; 277(25):22992-9. doi: 10.1074/jbc.M202298200.
12. Hoylaerts MF, Van Kerckhoven S, Kiffer-Moreira T, Sheen C, Narisawa S, Millán JL. Functional significance of calcium binding to tissue-nonspecific alkaline phosphatase. *PLoS One.* 2015; 10(3):e0119874. doi: 10.1371/journal.pone.0119874.
13. Mornet E, Stura E, Lia-Baldini AS, Stigbrand T, Ménez A, Le Du MH. Structural evidence for a functional role of human tissue nonspecific alkaline phosphatase in bone mineralization. *J Biol Chem.* 2001; 276(33):31171-8. doi:10.1074/jbc.M102788200.
14. Atanasova D, Kusay AS, Moparthi L, Koch S, Haarhaus M, Narisawa S, et al. N-linked glycosylation plays an essential role in the stability and function of tissue-nonspecific alkaline phosphatase. *J Biol Chem.* 2025; 111092. doi: 10.1016/j.jbc.2025.111092.
15. Bartlett CL, Ralefatane MG, Cave EM, Crowther NJ, Ferris WF. Differential glycosylation of tissue non-specific alkaline phosphatase in mesenchymal stromal cells differentiated into either an osteoblastic or adipocytic phenotype. *Exp Cell Res.* 2022; 421(1):113372. doi: 10.1016/j.yexcr.2022.113372.
16. Yu Y, Rong K, Yao D, Zhang Q, Cao X, Rao B, et al. The structural pathology for hypophosphatasia caused by malfunctional tissue non-specific alkaline phosphatase. *Nat Commun.* 2023; 14(1):4048. doi: 10.1038/s41467-023-39833-3.
17. Drevet Mulard E, Imam I, Coureux PD, Briolay A, Bessueille L, Tarby A, et al. TNAP dephosphorylates phosphocholine and phosphoethanolamine and participates in triglyceride transport from the liver to the bloodstream. *Commun Biol.* 2025; 8(1):1501. doi: 10.1038/s42003-025-08901-3.
18. Millán JL, Whyte MP. Alkaline Phosphatase and Hypophosphatasia. *Calcif Tissue Int.* 2016; 98(4):398-416. doi: 10.1007/s00223-015-0079-1.
19. Fedde KN, Blair L, Silverstein J, Coburn SP, Ryan LM, Weinstein RS, et al. Alkaline phosphatase knock-out mice recapitulate the metabolic and skeletal defects of infantile hypophosphatasia. *J Bone Miner Res.* 1999; 14(12):2015-26. doi: 10.1359/jbmr.1999.14.12.2015.
20. Anderson HC, Sipe JB, Hesse L, Dhanyamraju R, Atti E, Camacho NP, et al. Impaired calcification around matrix vesicles of growth plate and bone in alkaline phosphatase-deficient mice. *Am J Pathol.* 2004; 164(3):841-7. doi: 10.1016/s0002-9440(10)63172-0.
21. Foster BL, Nagatomo KJ, Tso HW, Tran AB, Nociti FH, Jr., Narisawa S, et al. Tooth root dentin mineralization defects in a mouse model of hypophosphatasia. *J Bone Miner Res.* 2013; 28(2):271-82. doi: 10.1002/jbmr.1767.
22. Yadav MC, de Oliveira RC, Foster BL, Fong H, Cory E, Narisawa S, et al. Enzyme replacement prevents enamel defects in hypophosphatasia mice. *J Bone Miner Res.* 2012; 27(8):1722-34. doi: 10.1002/jbmr.1619.
23. McKee MD, Nakano Y, Masica DL, Gray JJ, Lemire I, Heft R, et al. Enzyme replacement therapy prevents dental defects in a model of hypophosphatasia. *J Dent Res.* 2011; 90(4):470-6. doi: 10.1177/0022034510393517.
24. Waymire KG, Mahuren JD, Jaje JM, Guilarte TR, Coburn SP, MacGregor GR. Mice lacking tissue non-specific alkaline phosphatase die from seizures due to defective metabolism of vitamin B-6. *Nat Genet.* 1995; 11(1):45-51. doi: 10.1038/ng0995-45.
25. Narisawa S, Frohlander N, Millán JL. Inactivation of two mouse alkaline phosphatase genes and establishment of a model of infantile hypophosphatasia. *Dev Dyn.* 1997; 208(3):432-46. doi: 10.1002/(SICI)1097-0177(199703)208:3<432::AID-AJA13>3.0.CO;2-1.
26. Foster BL, Kuss P, Yadav MC, Kolli TN, Narisawa S, Lukashova L, et al. Conditional Alpl Ablation Phenocopies Dental Defects of Hypophosphatasia. *J Dent Res.* 2017; 96(1):81-91. doi: 10.1177/0022034516663633.
27. al CTe. Asfotase alfa treatment in a mouse model of later-onset HPP with comorbid chronic kidney disease. *JBMR.* 2025; 40:10402.
28. Foster BL, Sheen CR, Hatch NE, Liu J, Cory E, Narisawa S, et al. Periodontal Defects in the A116T

- Knock-in Murine Model of Odontohypophosphatasia. *J Dent Res.* 2015; 94(5):706-14. doi: 10.1177/0022034515573273.
29. Mohamed FF, Phanrungsuwan A, de Oliveira FA, Millán JL, Foster BL. Dentoalveolar defects and impaired alveolar bone healing in a neural crest directed conditional knockout mouse model of hypophosphatasia. *Bone.* 2025; 198:117538. doi: 10.1016/j.bone.2025.117538.
30. Orriss IR. Extracellular pyrophosphate: The body's "water softener". *Bone.* 2020; 134:115243. doi: 10.1016/j.bone.2020.115243.
31. Millán JL. The role of phosphatases in the initiation of skeletal mineralization. *Calcif Tissue Int.* 2013; 93(4):299-306. doi: 10.1007/s00223-012-9672-8.
32. Roberts S, Narisawa S, Harmey D, Millán JL, Farquharson C. Functional involvement of PHOSPHO1 in matrix vesicle-mediated skeletal mineralization. *J Bone Miner Res.* 2007; 22(4):617-27. doi: 10.1359/jbmr.070108.
33. Mohamed FF, Chávez MB, de Oliveira FA, Narisawa S, Farquharson C, Millán JL, et al. Perspective on Dentoalveolar Manifestations Resulting From PHOSPHO1 Loss-of-Function: A Form of Pseudohypophosphatasia? *Front Dent Med.* 2022;3. doi: 10.3389/fdmed.2022.826387.
34. Yadav MC, Simão AM, Narisawa S, Huesa C, McKee MD, Farquharson C, et al. Loss of skeletal mineralization by the simultaneous ablation of PHOSPHO1 and alkaline phosphatase function: a unified model of the mechanisms of initiation of skeletal calcification. *J Bone Miner Res.* 2011; 26(2):286-97. doi: 10.1002/jbmr.195.
35. Robison R. The Possible Significance of Hexosephosphoric Esters in Ossification. *Biochem J.* 1923; 17(2):286-93. doi: 10.1042/bj0170286.
36. Simão AM, Yadav MC, Ciancaglini P, Millán JL. Proteoliposomes as matrix vesicles' biomimetics to study the initiation of skeletal mineralization. *Braz J Med Biol Res.* 2010; 43(3):234-41. doi: 10.1590/s0100-879x2010007500008.
37. Ciancaglini P, Yadav MC, Simão AM, Narisawa S, Pizaurro JM, Farquharson C, et al. Kinetic analysis of substrate utilization by native and TNAP-, NPP1-, or PHOSPHO1-deficient matrix vesicles. *J Bone Miner Res.* 2010; 25(4):716-23. doi: 10.1359/jbmr.091023.
38. Pettengill M, Robson S, Tresenriter M, Millán JL, Usheva A, Bingham T, et al. Soluble ecto-5'-nucleotidase (5'-NT), alkaline phosphatase, and adenosine deaminase (ADA1) activities in neonatal blood favor elevated extracellular adenosine. *J Biol Chem.* 2013; 288(38):27315-26. doi: 10.1074/jbc.M113.484212.
39. Street SE, Kramer NJ, Walsh PL, Taylor-Blake B, Yadav MC, King IF, et al. Tissue-nonspecific alkaline phosphatase acts redundantly with PAP and NT5E to generate adenosine in the dorsal spinal cord. *J Neurosci.* 2013; 33(27):11314-22. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0133-13.2013.
40. Díez-Zaera M, Díaz-Hernández JI, Hernández-Álvarez E, Zimmermann H, Díaz-Hernández M, Miras-Portugal MT. Tissue-nonspecific alkaline phosphatase promotes axonal growth of hippocampal neurons. *Mol Biol Cell.* 2011; 22(7):1014-24. doi: 10.1091/mbc.E10-09-0740.
41. Whyte MP, Mahuren JD, Vrabell LA, Coburn SP. Markedly increased circulating pyridoxal-5'-phosphate levels in hypophosphatasia. Alkaline phosphatase acts in vitamin B6 metabolism. *J Clin Invest.* 1985; 76(2):752-6. doi: 10.1172/JCI112031.
42. Percudani R, Peracchi A. The B6 database: a tool for the description and classification of vitamin B6-dependent enzymatic activities and of the corresponding protein families. *BMC Bioinformatics.* 2009; 10:273. doi: 10.1186/1471-2105-10-273.
43. Sebastián-Serrano A, Engel T, de Diego-García L, Olivós-Ore LA, Arribas-Blázquez M, Martínez-Frailes C, et al. Neurodevelopmental alterations and seizures developed by mouse model of infantile hypophosphatasia are associated with purinergic signalling deregulation. *Hum Mol Genet.* 2016; 25(19):4143-56. doi: 10.1093/hmg/ddw248.
44. Narisawa S, Hasegawa H, Watanabe K, Millán JL. Stage-specific expression of alkaline phosphatase during neural development in the mouse. *Dev Dyn.* 1994; 201(3):227-35. doi: 10.1002/aja.1002010306.
45. Narisawa S, Wennberg C, Millán JL. Abnormal vitamin B6 metabolism in alkaline phosphatase knock-out mice causes multiple abnormalities, but not the impaired bone mineralization. *J Pathol.* 2001; 193(1):125-33. doi: 10.1002/1096-9896(2000)9999:9999::AID-PATH722>3.0.CO;2-Y.
46. Hanics J, Barna J, Xiao J, Millán JL, Fonta C, Negyessy L. Ablation of TNAP function compromises myelination and synaptogenesis in the mouse brain.

- Cell Tissue Res. 2012; 349(2):459-71. doi: 10.1007/s00441-012-1455-z.
47. Sun YZ, Rahbani JF, Jedrychowski MP, Riley CL, Vidoni S, Bogoslavski D, et al. Mitochondrial TNAP controls thermogenesis by hydrolysis of phosphocreatine. *Nature*. 2021; 593(7860):580-5. doi: 10.1038/s41586-021-03533-z.
48. Kishnani PS, Rockman-Greenberg C, Rauch F, Bhatti MT, Moseley S, Denker AE, et al. Five-year efficacy and safety of asfotase alfa therapy for adults and adolescents with hypophosphatasia. *Bone*. 2019; 121:149-62. doi: 10.1016/j.bone.2018.12.011.
49. Wang Y, Bishop NM, Taatjes DJ, Narisawa S, Millan JL, Palmer BM. Sex-dependent, zinc-induced dephosphorylation of phospholamban by tissue-nonspecific alkaline phosphatase in the cardiac sarcomere. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2014; 307(6):H933-8. doi: 10.1152/ajpheart.00374.2014.
50. Pendleton EG, Nichenko AS, McFaline-Figueroa J, Raymond-Pope CJ, Schifino AG, Pigg TM, et al. Compromised Muscle Properties in a Severe Hypophosphatasia Murine Model. *Int J Mol Sci*. 2023; 24(21):15905.. doi: 10.3390/ijms242115905.
51. Zhang Z, Nam HK, Crouch S, Hatch NE. Tissue Nonspecific Alkaline Phosphatase Function in Bone and Muscle Progenitor Cells: Control of Mitochondrial Respiration and ATP Production. *Int J Mol Sci*. 2021; 22(3):1140. doi: 10.3390/ijms22031140.
52. Devore D, Ruanova J, Voegtli W, Dunn D, Decker J, Mazzantini M, et al. Efzimfotase Alfa Improves Respiratory Capacity in Muscle Tissue From a Mouse Model of HPP. *JIMD Rep*. 2026; 67(1):e70057. doi: 10.1002/jmd2.70057.
53. Ciapaitė J, van Roermund CWT, Bosma M, Gerrits J, Houten SM, L IJ, et al. Maintenance of cellular vitamin B(6) levels and mitochondrial oxidative function depend on pyridoxal 5'-phosphate homeostasis protein. *J Biol Chem*. 2023; 299(9):105047. doi: 10.1016/j.jbc.2023.105047.
54. Millán JL, Whyte MP, Avioli LV, Fishman WH. Hypophosphatasia (adult form): quantitation of serum alkaline phosphatase isoenzyme activity in a large kindred. *Clin Chem*. 1980; 26(7):840-5.
55. Mulard ED II, Coureux PD, Briolay A, Bessueille L, Tarby A, Balayssac S, et al. TNAP dephosphorylates phosphocholine and phosphoethanolamine and participates in triglyceride transport from the liver to the bloodstream. *Commun Biol*. 2025; 8(1):1501. doi: 10.1038/s42003-025-08901-3.
56. Fleshood HL, Pitot HC. O-phosphorylethanolamine ammonia lyase, a new pyridoxal phosphate-dependent enzyme. *Biochem Biophys Res Commun*. 1969; 36(1):110-8. doi: 10.1016/0006-291x(69)90656-1.
57. Bessueille L, Briolay A, Como J, Mebarek S, Mansouri C, Gleizes M, et al. Tissue-nonspecific alkaline phosphatase is an anti-inflammatory nucleotidase. *Bone*. 2020; 133:115262. doi: 10.1016/j.bone.2020.115262.
58. Goettsch C, Strzelecka-Kiliszek A, Bessueille L, Quillard T, Mechtouff L, Pikula S, et al. TNAP as a therapeutic target for cardiovascular calcification: a discussion of its pleiotropic functions in the body. *Cardiovasc Res*. 2022; 118(1):84-96. doi: 10.1093/cvr/cvaa299.
59. Pettengill M, Matute JD, Tresenriter M, Hibbert J, Burgner D, Richmond P, et al. Human alkaline phosphatase dephosphorylates microbial products and is elevated in preterm neonates with a history of late-onset sepsis. *PLoS One*. 2017; 12(4):e0175936. doi: 10.1371/journal.pone.0175936.
60. Schippers M, Post E, Eichhorn I, Langeland J, Beljaars L, Malo MS, et al. Phosphate Groups in the Lipid A Moiety Determine the Effects of LPS on Hepatic Stellate Cells: A Role for LPS-Dephosphorylating Activity in Liver Fibrosis. *Cells*. 2020; 9(12):2708. doi: 10.3390/cells9122708.
61. Kapojos JJ, Poelstra K, Borghuis T, Van Den Berg A, Baelde HJ, Klok PA, et al. Induction of glomerular alkaline phosphatase after challenge with lipopolysaccharide. *Int J Exp Pathol*. 2003; 84(3):135-44. doi: 10.1046/j.1365-2613.2003.00345.x.
62. Millán JL, Narisawa S, Lemire I, Loisel TP, Boileau G, Leonard P, et al. Enzyme replacement therapy for murine hypophosphatasia. *J Bone Miner Res*. 2008; 23(6):777-87. doi: 10.1359/jbmr.071213.
63. Kinoshita Y, Mohamed FF, Amadeu de Oliveira F, Narisawa S, Miyake K, Foster BL, et al. Gene Therapy Using Adeno-Associated Virus Serotype 8 Encoding TNAP-D10 Improves the Skeletal and Dentoalveolar Phenotypes in *Alp*(-/-) Mice. *J Bone Miner Res*. 2021; 36(9):1835-49. doi: 10.1002/jbmr.4382.
64. Harmey D, Johnson KA, Zelken J, Camacho NP, Hoylaerts MF, Noda M, et al. Elevated skeletal osteopontin levels contribute to the

- hypophosphatasia phenotype in Akp2(-/-) mice. *J Bone Miner Res.* 2006; 21(9):1377-86. doi: 10.1359/jbmr.060619.
65. Narisawa S, Yadav MC, Millán JL. In vivo overexpression of tissue-nonspecific alkaline phosphatase increases skeletal mineralization and affects the phosphorylation status of osteopontin. *J Bone Miner Res.* 2013; 28(7):1587-98. doi: 10.1002/jbmr.1901.
66. Sebastián-Serrano A, Merchan-Rubira J, Di Lauro C, Bianchi C, Soria-Tobar L, Narisawa S, et al. TNAP upregulation is a critical factor in Tauopathies and its blockade ameliorates neurotoxicity and increases life-expectancy. *Neurobiol Dis.* 2022; 165:105632. doi: 10.1016/j.nbd.2022.105632.
67. Millán JL. Bone-targeted alkaline phosphatase. In: Schmidt S, editor. *Fusion Protein Technologies for Biopharmaceuticals: Applications and Challenges*. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons; 2013. pp. 429-39.
68. Foster BL, Nagatomo KJ, Nociti FH, Jr., Fong H, Dunn D, Tran AB, et al. Central role of pyrophosphate in acellular cementum formation. *PLoS One.* 2012; 7(6):e38393. doi: 10.1371/journal.pone.0038393.
69. Whyte MP, Greenberg CR, Salman NJ, Bober MB, McAlister WH, Wenkert D, et al. Enzyme-replacement therapy in life-threatening hypophosphatasia. *N Engl J Med.* 2012; 366(10):904-13. doi: 10.1056/NEJMoa1106173.
70. Kishnani PS, Rush ET, Arundel P, Bishop N, Dahir K, Fraser W, et al. Monitoring guidance for patients with hypophosphatasia treated with asfotase alfa. *Molecular Genetics and Metabolism.* 2017; 122(1):4-17. doi: 10.1016/j.ymgme.2017.07.010.
71. Seefried L, Kishnani PS, Moseley S, Denker AE, Watsky E, Whyte MP, et al. Pharmacodynamics of asfotase alfa in adults with pediatric-onset hypophosphatasia. *Bone.* 2021; 142:115664. doi: 10.1016/j.bone.2020.115664.
72. Canadian Agency for D, Technologies in H. Asfotase alfa (Strensiq) Table 4: Cost Comparison Table for Pediatric-Onset Hypophosphatasia. 2017; (Appendix 1, COST COMPARISON - Bookshelf ID: NBK476055).
73. Dahir KM, Shannon A, Dunn D, Voegtli W, Dong Q, Hasan J, et al. Safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of efzimfotase alfa, a second-generation enzyme replacement therapy: phase 1, dose-escalation study in adults with hypophosphatasia. *J Bone Miner Res.* 2024; 39(10):1412-23. doi: 10.1093/jbmr/zjae128.
74. Yamamoto S, Orimo H, Matsumoto T, Iijima O, Narisawa S, Maeda T, et al. Prolonged survival and phenotypic correction of Akp2(-/-) hypophosphatasia mice by lentiviral gene therapy. *J Bone Miner Res.* 2011; 26(1):135-42. doi: 10.1002/jbmr.201.
75. Matsumoto T, Miyake K, Yamamoto S, Orimo H, Miyake N, Odagaki Y, et al. Rescue of severe infantile hypophosphatasia mice by AAV-mediated sustained expression of soluble alkaline phosphatase. *Hum Gene Ther.* 2011; 22(11):1355-64. doi: 10.1089/hum.2010.210.
76. Sugano H, Matsumoto T, Miyake K, Watanabe A, Iijima O, Migita M, et al. Successful gene therapy in utero for lethal murine hypophosphatasia. *Hum Gene Ther.* 2012; 23(4):399-406. doi: 10.1089/hum.2011.148.
77. Iijima O, Miyake K, Watanabe A, Miyake N, Igarashi T, Kanokoda C, et al. Prevention of Lethal Murine Hypophosphatasia by Neonatal Ex Vivo Gene Therapy Using Lentivirally Transduced Bone Marrow Cells. *Hum Gene Ther.* 2015; 26(12):801-12. doi: 10.1089/hum.2015.078.
78. Nakamura-Takahashi A, Miyake K, Watanabe A, Hirai Y, Iijima O, Miyake N, et al. Treatment of hypophosphatasia by muscle-directed expression of bone-targeted alkaline phosphatase via self-complementary AAV8 vector. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2016; 3:15059. doi: 10.1038/mtm.2015.59.
79. Matsumoto T, Miyake K, Miyake N, Iijima O, Adachi K, Narisawa S, et al. Treatment with bone maturation and average lifespan of HPP model mice by AAV8-mediated neonatal gene therapy via single muscle injection. *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development.* 2021; 22:330-7. doi: 10.1016/j.omtm.2021.06.006.
80. Amadeu de Oliveira F, Mohamed FF, Kinoshita Y, Narisawa S, Farquharson C, Miyake K, et al. Gene Therapy Using Recombinant AAV Type 8 Vector Encoding TNAP-D(10) Improves the Skeletal Phenotypes in Murine Models of Osteomalacia. *JBMR Plus.* 2023; 7(1):e10709. doi: 10.1002/jbm4.10709.
81. de Oliveira FA, Tokuhara CK, Mohamed FF, Narisawa S, Lira Dos Santos EJ, Andras NL, et al. Preclinical evaluation of the efficacy and safety of adeno-associated virus 8-tissue-nonspecific alkaline phosphatase-D10 in Alpl-/- and AlplPrx1/Prx1 mouse models for the treatment of early and late-

- onset hypophosphatasia. *J Bone Miner Res.* 2025; 40(4):463-77. doi: 10.1093/jbmr/zjaf005.
82. Amadeu de Oliveira F, Narisawa S, Bottini M, Millán JL. Visualization of Mineral-Targeted Alkaline Phosphatase Binding to Sites of Calcification In Vivo. *J Bone Miner Res.* 2020; 35(9):1765-71. doi: 10.1002/jbmr.4038.
83. Sheen CR, Kuss P, Narisawa S, Yadav MC, Nigro J, Wang W, et al. Pathophysiological role of vascular smooth muscle alkaline phosphatase in medial artery calcification. *J Bone Miner Res.* 2015; 30(5):824-36. doi: 10.1002/jbmr.2420.
84. Savinov AY, Salehi M, Yadav MC, Radichev I, Millán JL, Savinova OV. Transgenic Overexpression of Tissue-Nonspecific Alkaline Phosphatase (TNAP) in Vascular Endothelium Results in Generalized Arterial Calcification. *J Am Heart Assoc.* 2015; 4(12):e002499. doi: 10.1161/JAHA.115.002499.
85. Romanelli F, Corbo A, Salehi M, Yadav MC, Salman S, Petrosian D, et al. Overexpression of tissue-nonspecific alkaline phosphatase (TNAP) in endothelial cells accelerates coronary artery disease in a mouse model of familial hypercholesterolemia. *PLoS One.* 2017; 12(10):e0186426. doi: 10.1371/journal.pone.0186426.
86. Kiffer-Moreira T, Sheen CR, Gasque KC, Bolean M, Ciancaglini P, van Elsland A, et al. Catalytic signature of a heat-stable, chimeric human alkaline phosphatase with therapeutic potential. *PLoS One.* 2014; 9(2):e89374. doi:10.1371/journal.pone.0089374.
87. Gasque KC, Foster BL, Kuss P, Yadav MC, Liu J, Kiffer-Moreira T, et al. Improvement of the skeletal and dental hypophosphatasia phenotype in *Alpl*^{-/-} mice by administration of soluble (non-targeted) chimeric alkaline phosphatase. *Bone.* 2015; 72:137-47. doi: 10.1016/j.bone.2014.11.017.
88. Seefried L, Bernholz J, Kraan M, Nitschke Y, Rutsch F, Mallek M, et al. A randomized Phase 1b trial evaluating the pharmacodynamics of ilofotase alfa in adults with hypophosphatasia. *J Bone Miner Res.* 2025;zjaf185. doi: 10.1093/jbmr/zjaf185.
89. Ferreira CR, Carpenter TO, Braddock DT. ENPP1 in Blood and Bone: Skeletal and Soft Tissue Diseases Induced by ENPP1 Deficiency. *Annu Rev Pathol.* 2024; 19:507-40. doi: 10.1146/annurev-pathmechdis-051222-121126.
90. Ferreira CR, Hackbarth ME, Nitschke Y, Botschen U, Gafni RI, Mughal MZ, et al. Phenotypic characterization of ENPP1 deficiency: generalized arterial calcification of infancy and autosomal recessive hypophosphatemic rickets type 2. *JBM R Plus.* 2025; 9(5):zjaf019. doi: 10.1093/jbmrpl/zjaf019.
91. Ferreira CR, Kintzinger K, Hackbarth ME, Botschen U, Nitschke Y, Mughal MZ, et al. Ectopic Calcification and Hypophosphatemic Rickets: Natural History of ENPP1 and ABCC6 Deficiencies. *J Bone Miner Res.* 2021; 36(11):2193-202. doi: 10.1002/jbmr.4418.
92. Rutsch F, Ruf N, Vaingankar S, Toliat MR, Suk A, Hohne W, et al. Mutations in ENPP1 are associated with 'idiopathic' infantile arterial calcification. *Nat Genet.* 2003; 34(4):379-81. doi: 10.1038/ng1221.
93. Hessle L, Johnson KA, Anderson HC, Narisawa S, Sali A, Goding JW, et al. Tissue-nonspecific alkaline phosphatase and plasma cell membrane glycoprotein-1 are central antagonistic regulators of bone mineralization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002; 99(14):9445-9. doi: 10.1073/pnas.142063399.
94. Anderson HC, Harmey D, Camacho NP, Garimella R, Sipe JB, Tague S, et al. Sustained osteomalacia of long bones despite major improvement in other hypophosphatasia-related mineral deficits in tissue nonspecific alkaline phosphatase/nucleotide pyrophosphatase phosphodiesterase 1 double-deficient mice. *Am J Pathol.* 2005; 166(6):1711-20. doi: 10.1016/S0002-9440(10)62481-9.
95. Narisawa S, de Oliveira FA, Tokuhara CK, Lira Dos Santos EJ, Fonfria E, Batson J, et al. ENPP1 inhibition as a therapeutic approach for later-onset hypophosphatasia. *J Bone Miner Res.* 2025;zjaf136. doi: 10.1093/jbmr/zjaf136.
96. Whyte MP, Kurtzberg J, McAlister WH, Mumm S, Podgornik MN, Coburn SP, et al. Marrow cell transplantation for infantile hypophosphatasia. *J Bone Miner Res.* 2003; 18(4):624-36. doi: 10.1359/jbmr.2003.18.4.624.
97. Cahill RA, Wenkert D, Perlman SA, Steele A, Coburn SP, McAlister WH, et al. Infantile hypophosphatasia: transplantation therapy trial using bone fragments and cultured osteoblasts. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007; 92(8):2923-30. doi: 10.1210/jc.2006-2131.
98. Taketani T, Oyama C, Mihara A, Tanabe Y, Abe M, Hirade T, et al. Ex Vivo Expanded Allogeneic Mesenchymal Stem Cells With Bone Marrow Transplantation Improved Osteogenesis in Infants With Severe Hypophosphatasia. *Cell Transplant.* 2015; 24(10):1931-43. doi: 10.3727/096368914X685410.