



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118215507 A

(43) 申请公布日 2024. 06. 18

(21) 申请号 202280074276.7
(22) 申请日 2022.09.23
(30) 优先权数据
63/248,303 2021.09.24 US
(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2024.05.08
(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2022/076969 2022.09.23
(87) PCT国际申请的公布数据
W02023/049864 EN 2023.03.30
(71) 申请人 依诺兹梅制药公司
地址 美国
(72) 发明人 S·朱格尔斯

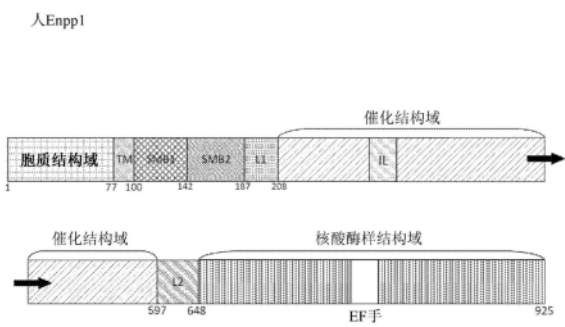
(74) 专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所
有限公司 11038
专利代理师 陈晓娜

(51) Int.Cl.
A61K 48/00 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
C12Q 1/6883 (2006.01)

权利要求书15页 说明书69页
序列表（电子公布） 附图23页

(54) 发明名称
冻干ENPP1多肽制剂及其用途

(57) 摘要
在某些方面,本发明提供了ENPP1多肽的新型冻干制剂,以及使用此类ENPP1的冻干制剂和复原制剂来治疗与ENPP1缺乏症相关联的适应症的方法。本文提供的制剂和方法可用于治疗与ENPP1缺乏症相关联的疾病,如病理性钙化或病理性骨化。



1. 一种冻干多肽制剂,其中所述制剂包括:(a) ENPP1多肽和(b) 缓冲剂、稳定剂、盐和表面活性剂中的一种或多种。
2. 根据权利要求1所述的制剂,其中所述制剂包括缓冲剂。
3. 根据权利要求2所述的制剂,其中所述缓冲剂在溶液中复原时维持范围为pH 6-7的pH。
4. 根据权利要求2所述的制剂,其中所述缓冲剂在溶液中复原时维持范围为pH 7-8的pH。
5. 根据权利要求3或4所述的制剂,其中所述缓冲剂选自由以下组成的组:琥珀酸盐、柠檬酸盐、碳酸氢盐、磷酸盐、tris或双甘氨酸。
6. 根据权利要求5所述的制剂,其中所述缓冲剂是琥珀酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐。
7. 根据权利要求6所述的制剂,其中所述缓冲剂是柠檬酸盐。
8. 根据权利要求6所述的制剂,其中所述缓冲剂是琥珀酸盐。
9. 根据权利要求6所述的制剂,其中所述缓冲剂是磷酸盐。
10. 根据权利要求2至9所述的制剂,其中所述缓冲剂在溶液中复原时包括范围为5mM至100mM的浓度。
11. 根据权利要求2至10中任一项所述的制剂,其中所述缓冲剂提高聚集体形成的起始温度。
12. 根据权利要求2至11中任一项所述的制剂,其中所述缓冲剂将所述聚集体形成的起始温度提高至少2℃。
13. 根据权利要求2至12中任一项所述的制剂,其中所述缓冲剂减少高分子量物种的形成。
14. 根据权利要求2至13中任一项所述的制剂,其中所述缓冲剂将高分子量物种的形成减少至少10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%。
15. 根据权利要求1至12中任一项所述的制剂,其中所述制剂包括一种或多种药学上可接受的添加剂。
16. 根据权利要求15所述的制剂,其中所述一种或多种药学上可接受的添加剂包括稳定剂、氨基酸、盐、金属离子和表面活性剂。
17. 根据权利要求15或16所述的制剂,其中所述稳定剂是糖、碳水化合物或多糖。
18. 根据权利要求17所述的制剂,其中所述糖选自由以下组成的组:蔗糖、海藻糖、甘露糖、麦芽糖、乳糖、葡萄糖、棉子糖、纤维二糖、龙胆二糖、异麦芽糖、阿拉伯糖、葡糖胺、果糖、甘露糖醇或山梨糖醇。
19. 根据权利要求15所述的制剂,其中所述一种或多种药学上可接受的添加剂是甘露糖醇。
20. 根据权利要求15所述的制剂,其中所述一种或多种药学上可接受的添加剂是蔗糖。
21. 根据权利要求15所述的制剂,其中所述药学上可接受的添加剂是氨基酸。
22. 根据权利要求21所述的制剂,其中所述氨基酸选自由以下组成的组:甘氨酸、精氨酸、组氨酸、丙氨酸、脯氨酸、丝氨酸和谷氨酸。
23. 根据权利要求15所述的制剂,其中所述一种或多种药学上可接受的添加剂是精氨酸。

24. 根据权利要求15所述的制剂,其中所述药学上可接受的添加剂是盐。
25. 根据权利要求24所述的制剂,其中所述盐选自自由以下组成的组:氯化钠(NaCl)、氯化钙(CaCl_2)、氯化锌(ZnCl_2)和/或氯化镁(MgCl_2)。
26. 根据权利要求15所述的制剂,其中所述一种或多种药学上可接受的添加剂是氯化钙(CaCl_2)。
27. 根据权利要求15所述的制剂,其中所述药学上可接受的添加剂是表面活性剂。
28. 根据权利要求27所述的制剂,其中所述表面活性剂选自自由以下组成的组:聚山梨醇酯、泊洛沙姆、曲拉通(triton)、十二烷基硫酸钠、月桂基硫酸钠、辛基糖苷钠、月桂基磺基甜菜碱、肉豆蔻基-磺基甜菜碱、亚油酰基-磺基甜菜碱、硬脂基-磺基甜菜碱、月桂基肌氨酸、肉豆蔻基-肌氨酸、亚油酰基-肌氨酸、硬脂基-肌氨酸、亚油酰基-甜菜碱、肉豆蔻基-甜菜碱、鲸蜡基-甜菜碱、月桂酰胺基丙基-甜菜碱、椰油酰胺基丙基-甜菜碱、亚油酰胺基丙基-甜菜碱、肉豆蔻酰胺基丙基-甜菜碱、棕榈酰胺基丙基-甜菜碱、异硬脂酰胺基丙基-甜菜碱、肉豆蔻酰胺基丙基-二甲胺、棕榈酰胺基丙基二甲胺、异硬脂酰胺基丙基-二甲胺、甲基椰油酰基-牛磺酸钠、甲基油酰基-牛磺酸二钠、二羟丙基PEG 5亚油基氯化铵、聚乙二醇、聚丙二醇、聚山梨醇酯20、聚山梨醇酯21、聚山梨醇酯40、聚山梨醇酯60、聚山梨醇酯61、聚山梨醇酯65、聚山梨醇酯80、聚山梨醇酯81、聚山梨醇酯85、聚山梨醇酯188、PEG3350及其混合物。
29. 根据权利要求27所述的制剂,其中所述表面活性剂选自自由以下组成的组:聚山梨醇酯20(PS20)、聚山梨醇酯80(PS80)或聚山梨醇酯188(PS188)。
30. 根据权利要求29所述的制剂,其中所述表面活性剂是聚山梨醇酯20(PS20)。
31. 根据权利要求1至30中任一项所述的制剂,其中所述制剂包括缓冲剂、稳定剂、盐、氨基酸和表面活性剂。
32. 根据权利要求31所述的制剂,其中所述缓冲剂是柠檬酸盐或琥珀酸盐,所述稳定剂是蔗糖或甘露糖醇,所述盐是氯化钙(CaCl_2),并且所述表面活性剂是PS20。
33. 根据权利要求1至32所述的制剂,其中所述制剂的pH是pH 6.2至pH 6.5。
34. 根据权利要求1至32所述的制剂,其中所述制剂包括15至25mM的柠檬酸盐。
35. 根据权利要求32至34所述的制剂,其中所述制剂包括75mM至95mM的蔗糖、甘露糖醇或其组合中的每一种。
36. 根据权利要求1至35所述的制剂,其中所述制剂包括100mM至300mM的蔗糖。
37. 根据权利要求1至36所述的制剂,其中所述制剂包括1mM至3mM的氯化钙。
38. 根据权利要求1至37所述的制剂,其中所述制剂包括0.005%至0.1% (w/v)的PS20。
39. 根据权利要求15至38中任一项所述的制剂,其中所述一种或多种药学上可接受的添加剂在溶液中复原时以范围为5mM至300mM的浓度存在。
40. 根据权利要求15至39中任一项所述的制剂,其中所述一种或多种药学上可接受的添加剂减少高分子量物种的形成。
41. 根据权利要求40所述的制剂,其中所述一种或多种药学上可接受的添加剂将高分子量物种的形成减少至少10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%。
42. 根据权利要求1至41中任一项所述的制剂,其中所述制剂包括ENPP1多肽辅因子。
43. 根据权利要求42所述的制剂,其中所述ENPP1多肽辅因子包括钙、锌和/或单磷酸腺

苷。

44. 根据权利要求42或43所述的制剂,其中所述ENPP1多肽辅因子是 CaCl_2 、 CaSO_4 、 ZnCl_2 、 ZnSO_4 和/或单磷酸腺苷。

45. 根据权利要求42或43所述的制剂,其中所述ENPP1多肽辅因子是 CaCl_2 和/或单磷酸腺苷。

46. 根据权利要求42至45中任一项所述的制剂,其中所述ENPP1多肽辅因子在溶液中复原时以范围为1mM至10mM的浓度存在。

47. 根据权利要求42至45中任一项所述的制剂,其中所述ENPP1多肽辅因子将高分子量物种的形成减少至少10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%。

48. 根据权利要求1至47中任一项所述的制剂,其中所述制剂包括表面活性剂。

49. 根据权利要求48所述的制剂,其中所述表面活性剂包括PS20、PS80或PS188。

50. 根据权利要求48或49所述的制剂,其中所述表面活性剂包括PS20。

51. 根据权利要求48至50中任一项所述的制剂,其中所述表面活性剂在溶液中复原时以范围为0.02%至0.10% (w/v) 的浓度存在。

52. 根据权利要求48至51中任一项所述的制剂,其中所述表面活性剂增加对物理应力的抗性。

53. 根据权利要求1至52中任一项所述的制剂,其中所述制剂包括均匀的粒度。

54. 根据权利要求1至53中任一项所述的制剂,其中所述制剂包括较大尺寸颗粒的两倍、三倍、四倍、五倍、六倍、七倍、八倍、九倍或十倍减少,如通过微流成像分析所确定的。

55. 根据前述权利要求中任一项所述的制剂,其中所述ENPP1多肽包括与包括SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:15的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。

56. 根据前述权利要求中任一项所述的制剂,其中所述ENPP1多肽包括与包括SEQ ID NO:2的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。

57. 根据权利要求1至56中任一项所述的制剂,其中所述ENPP1多肽是包括可溶性ENPP1多肽结构域和一个或多个异源蛋白质部分的融合蛋白。

58. 根据权利要求1至57所述的制剂,其中所述异源蛋白质部分增加所述可溶性ENPP1多肽在哺乳动物中的循环半衰期。

59. 根据权利要求57或58所述的制剂,其中所述异源蛋白质部分包括Fc结构域。

60. 根据权利要求59所述的制剂,其中所述Fc结构域包括与SEQ ID NO:12的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多相同的氨基酸序列。

61. 根据权利要求59或60所述的制剂,其中所述ENPP1多肽是ENPP1-Fc融合蛋白。

62. 根据权利要求1至60中任一项所述的制剂,其中所述ENPP1多肽进一步包括异源部分。

63. 根据权利要求62所述的制剂,其中所述异源部分选自自由以下组成的组:糖基化氨基酸、聚乙二醇化氨基酸、法尼基化氨基酸、乙酰化氨基酸、生物素化氨基酸和脂质部分。

64. 根据前述权利要求中任一项所述的制剂,其中所述ENPP1多肽包括与包括SEQ ID

N0:13的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。

65.根据权利要求1至64中任一项所述的制剂,其中所述ENPP1多肽与SEQ ID NO:13至少90%相同。

66.根据权利要求1至64中任一项所述的制剂,其中所述ENPP1多肽与SEQ ID NO:13至少95%相同。

67.根据权利要求1至64中任一项所述的制剂,其中所述ENPP1多肽与SEQ ID NO:13至少99%相同。

68.根据权利要求1至67中任一项所述的制剂,其中所述ENPP1多肽包括SEQ ID NO:13。

69.根据权利要求1至67中任一项所述的制剂,其中所述ENPP1多肽由SEQ ID NO:13组成。

70.根据前述权利要求中任一项所述的制剂,其中所述ENPP1多肽包括与包括SEQ ID NO:14的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。

71.根据权利要求1至64中任一项所述的制剂,其中所述ENPP1多肽与SEQ ID NO:14至少90%相同。

72.根据权利要求1至64中任一项所述的制剂,其中所述ENPP1多肽与SEQ ID NO:14至少95%相同。

73.根据权利要求1至64中任一项所述的制剂,其中所述ENPP1多肽与SEQ ID NO:14至少99%相同。

74.根据权利要求1至64中任一项所述的制剂,其中所述ENPP1多肽包括SEQ ID NO:14。

75.根据权利要求1至64中任一项所述的制剂,其中所述ENPP1多肽由SEQ ID NO:14组成。

76.根据前述权利要求中任一项所述的制剂,其中所述ENPP1多肽包括与包括SEQ ID NO:15的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。

77.根据权利要求1至64中任一项所述的制剂,其中所述ENPP1多肽与SEQ ID NO:15至少90%相同。

78.根据权利要求1至64中任一项所述的制剂,其中所述ENPP1多肽与SEQ ID NO:15至少95%相同。

79.根据权利要求1至64中任一项所述的制剂,其中所述ENPP1多肽与SEQ ID NO:15至少99%相同。

80.根据权利要求1至64中任一项所述的制剂,其中所述ENPP1多肽包括SEQ ID NO:15。

81.根据权利要求1至64中任一项所述的制剂,其中所述ENPP1多肽由SEQ ID NO:15组成。

82.根据权利要求1至81中任一项所述的制剂,其中所述制剂包括ENPP1多肽、缓冲剂、药学上可接受的盐、稳定剂、表面活性剂和一种或多种药学上可接受的添加剂。

83.根据权利要求82所述的制剂,其中所述缓冲剂是柠檬酸盐缓冲剂。

84.根据权利要求82或83所述的制剂,其中所述柠檬酸盐缓冲剂是柠檬酸三钠二水合

物。

85. 根据权利要求82至84中任一项所述的制剂,其中所述药学上可接受的盐是氯化钙。

86. 根据权利要求82至85中任一项所述的制剂,其中所述稳定剂是糖。

87. 根据权利要求86所述的制剂,其中所述稳定剂是蔗糖。

88. 根据权利要求82至87中任一项所述的制剂,其中所述一种或多种药学上可接受的添加剂包括甘露糖醇。

89. 根据权利要求82至87中任一项所述的制剂,其中所述制剂包括:ENPP1多肽、柠檬酸盐缓冲剂、氯化钙、蔗糖和聚山梨醇酯。

90. 根据权利要求82至87中任一项所述的制剂,其中所述制剂包括:ENPP1多肽、柠檬酸三钠二水合物、氯化钙二水合物、蔗糖和聚山梨醇酯20。

91. 根据权利要求82至87中任一项所述的制剂,其中所述制剂包括:ENPP1多肽、柠檬酸盐缓冲剂、氯化钙、蔗糖、甘露糖醇和聚山梨醇酯。

92. 根据权利要求82至87中任一项所述的制剂,其中所述制剂包括:ENPP1多肽、柠檬酸三钠二水合物、氯化钙二水合物、蔗糖、D(-)甘露糖醇和聚山梨醇酯20。

93. 根据权利要求82至87中任一项所述的制剂,其中所述制剂包括每0.5ml最终复原体积:约25mg的ENPP1多肽、约2.94mg的柠檬酸三钠二水合物、约0.15mg的氯化钙二水合物、约30mg的蔗糖、约7.5mg的D(-)甘露糖醇和约0.25mg的聚山梨醇酯。

94. 根据权利要求82至93中任一项所述的制剂,其中所述ENPP1多肽包括SEQ ID NO: 13。

95. 根据权利要求82至93中任一项所述的制剂,其中所述ENPP1多肽由SEQ ID NO:13组成。

96. 根据权利要求82至93中任一项所述的制剂,其中所述ENPP1多肽包括SEQ ID NO: 14。

97. 根据权利要求82至93中任一项所述的制剂,其中所述ENPP1多肽由SEQ ID NO:14组成。

98. 根据权利要求82至93中任一项所述的制剂,其中所述ENPP1多肽包括SEQ ID NO: 15。

99. 根据权利要求82至93中任一项所述的制剂,其中所述ENPP1多肽由SEQ ID NO:15组成。

100. 根据权利要求82至99中任一项所述的制剂,其中所述ENPP1多肽进一步包括Fc结构域。

101. 根据权利要求100所述的制剂,其中所述Fc结构域包括SEQ ID NO:12中所描绘的氨基酸序列或由其组成。

102. 根据权利要求100或101所述的制剂,其中所述ENPP1多肽包括连接所述ENPP1多肽部分和所述Fc结构域的接头氨基酸序列。

103. 根据权利要求82至101中任一项所述的制剂,其中所述接头氨基酸序列包括氨基酸序列LIN或由其组成。

104. 根据权利要求82至103中任一项所述的制剂,其中所述ENPP1多肽包括SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:11或由其组成。

105. 根据权利要求1至104中任一项所述的制剂,其中所述制剂在无菌可注射溶液中复原。

106. 根据权利要求105所述的制剂,其中所述制剂在复原溶液或无菌水中复原。

107. 根据权利要求106所述的制剂,其中所述复原溶液包括药学上可接受的载体和/或添加剂。

108. 根据权利要求107所述的制剂,其中所述药学上可接受的载体选自盐水溶液、纯化水或无菌注射用水。

109. 根据权利要求105至108中任一项所述的制剂,其中所述制剂在小于100秒、80秒、70秒、68秒、65秒或60秒的时段内完全复原。

110. 根据权利要求105至109中任一项所述的制剂,其中所述复原制剂包括:至少或约50mg/mL的所述ENPP1多肽、约20mM的约pH 6.3的柠檬酸盐、约2mM的氯化钙、约175mM的蔗糖、约82mM的甘露糖醇和约0.05%w/v的聚山梨醇酯20。

111. 根据权利要求105至109中任一项所述的制剂,其中所述复原制剂包括:至少或约50mg/mL的所述ENPP1多肽、约20mM的约pH 6.3的柠檬酸盐、约2mM的氯化钙、约175mM的蔗糖、约82mM的(D)甘露糖醇和约0.05%w/v的聚山梨醇酯20。

112. 根据权利要求105至109中任一项所述的制剂,其中所述复原制剂包括:至少或约50mg/mL的所述ENPP1多肽、约20mM的约pH 6.3的柠檬酸盐、约88mM的蔗糖、约82mM的甘露糖醇、约2mM的氯化钙和约0.05%的聚山梨醇酯20。

113. 根据权利要求105至109中任一项所述的制剂,其中所述复原制剂包括:至少或约50mg/mL的所述ENPP1多肽、约20mM的约pH 6.3的柠檬酸盐、约263mM的蔗糖、约2mM的氯化钙和约0.05%的聚山梨醇酯20。

114. 根据权利要求1至113中任一项所述的制剂,其中所述制剂在-80℃至40℃下表现出长期稳定性。

115. 根据权利要求114所述的制剂,其中所述制剂具有至少3、6、12、24、36、48或60个月的保质期。

116. 根据权利要求105至115中任一项所述的制剂,其中所述复原制剂具有至少1、2、3、4、5、6、12、18、24、48或60小时的保质期。

117. 一种用于生成包括ENPP1多肽的药物溶液的方法,所述方法包括使根据权利要求1至104中任一项所述的冻干多肽制剂与无菌复原溶液或无菌水接触,由此生成包括所述ENPP1多肽的复原溶液。

118. 根据权利要求117所述的方法,其中所述复原溶液包括药学上可接受的载体和/或添加剂。

119. 根据权利要求118所述的方法,其中所述药学上可接受的载体选自盐水溶液、纯化水或无菌注射用水。

120. 根据权利要求117至119中任一项所述的方法,其中所述制剂在小于100秒、80秒、70秒、68秒、65秒或60秒的时段内完全复原。

121. 根据权利要求117至120中任一项所述的方法,其中所述复原制剂包括:至少或约50mg/mL的所述ENPP1多肽、约20mM的约pH 6.3的柠檬酸盐、约2mM的氯化钙、约175mM的蔗糖、约82mM的甘露糖醇和约0.05%w/v的聚山梨醇酯。

122. 根据权利要求117至120中任一项所述的方法, 其中所述复原制剂包括: 至少或约50mg/mL的所述ENPP1多肽、约20mM的约pH 6.3的柠檬酸盐、约2mM的氯化钙、约175mM的蔗糖、约82mM的(D) 甘露糖醇和约0.05% w/v的聚山梨醇酯20。

123. 根据权利要求117至120中任一项所述的方法, 其中所述复原制剂包括: 至少或约50mg/mL的所述ENPP1多肽、约20mM的约pH 6.3的柠檬酸盐、约88mM的蔗糖、约82mM的甘露糖醇、约2mM的氯化钙和约0.05%的聚山梨醇酯20。

124. 根据权利要求117至120中任一项所述的方法, 其中所述复原制剂包括: 至少或约50mg/mL的所述ENPP1多肽、约20mM的约pH 6.3的柠檬酸盐、约263mM的蔗糖、约2mM的氯化钙和约0.05%的聚山梨醇酯20。

125. 通过根据权利要求117至124中任一项所述的方法制备的复原溶液。

126. 一种用于预防有此需要的受试者的血管钙化进展或减少所述受试者的血管钙化的方法, 所述方法包括: 向所述受试者施用有效量的根据权利要求105至116或125中任一项所述的复原制剂, 由此预防所述受试者的血管钙化进展或减少所述受试者的血管钙化。

127. 一种用于预防患有ENPP1缺乏症的受试者的病理性钙化进展或减少所述受试者的病理性钙化的方法, 所述方法包括: 向所述受试者施用有效量的根据权利要求105至116或125中任一项所述的复原制剂, 由此预防所述受试者的病理性钙化进展或减少所述受试者的病理性钙化。

128. 一种用于预防有此需要的受试者的组织钙化进展或减少所述受试者的组织钙化的方法, 所述方法包括: 向所述受试者施用有效量的根据权利要求105至116或125中任一项所述的复原制剂, 由此预防所述受试者的组织钙化进展或减少所述受试者的组织钙化。

129. 一种用于预防有此需要的受试者的病理性骨化进展或减少所述受试者的病理性骨化的方法, 所述方法包括: 向所述受试者施用有效量的根据权利要求105至116或125中任一项所述的复原制剂, 由此预防所述受试者的组织钙化进展或减少所述受试者的组织钙化。

130. 一种用于增加有此需要的受试者的循环焦磷酸盐 (PPi) 的方法, 所述方法包括: 向所述受试者施用有效量的根据权利要求105至116或125中任一项所述的复原制剂, 由此增加所述受试者中的循环PPi。

131. 一种用于增加有此需要的受试者的焦磷酸酶活性的方法, 所述方法包括: 向所述受试者施用有效量的根据权利要求105至116或125中任一项所述的复原制剂, 由此增加所述受试者中的循环PPi。

132. 根据权利要求126至131中任一项所述的方法, 其中所述受试者患有ENPP1缺乏症。

133. 根据权利要求126至131中任一项所述的方法, 其中所述受试者患有ABCC6缺乏症。

134. 根据权利要求133所述的方法, 其中所述ABCC6缺乏症是弹性假黄瘤。

135. 根据权利要求126至131中任一项所述的方法, 其中所述受试者患有涉及病理性钙化的病症。

136. 根据权利要求126至131中任一项所述的方法, 其中所述受试者患有涉及病理性骨化的病症。

137. 根据权利要求126至131中任一项所述的方法, 其中所述受试者患有以下病症或处于发展以下病症的风险中: 病理性软组织钙化、动脉钙化、血管钙化、慢性肾脏疾病 (CKD)、

终末期肾脏疾病 (ESRD)、钙化性尿毒症性小动脉病 (CUA)、钙化防御、后纵韧带骨化症 (OPLL) 或低磷性佝偻病。

138. 一种用于改善受试者的ENPP1缺乏症的一种或多种症状的方法,所述方法包括:向所述受试者施用有效量的根据权利要求105至116或125中任一项所述的复原制剂,由此改善所述受试者中ENPP1缺乏症的一种或多种症状。

139. 一种用于治疗患有ENPP1缺乏症的受试者的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的根据权利要求105至116或125中任一项所述的复原制剂,由此治疗所述受试者。

140. 一种用于改善受试者的ABCC6缺乏症的一种或多种症状的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的根据权利要求105至116或125中任一项所述的复原制剂,由此改善所述受试者中ABCC6缺乏症的一种或多种症状。

141. 一种用于治疗患有ABCC6缺乏症的受试者的方法,所述方法包括:向所述受试者施用有效量的根据权利要求105至116或125中任一项所述的复原制剂,由此治疗所述受试者。

142. 根据权利要求126至141中任一项所述的方法,其中所述复原制剂肠胃外施用。

143. 根据权利要求126至141中任一项所述的方法,其中所述复原制剂经由皮下注射施用。

144. 根据权利要求126至141中任一项所述的方法,其中所述复原制剂经由静脉内注射施用。

145. 根据权利要求126至141中任一项所述的方法,其中所述复原制剂经由皮内注射施用。

146. 根据权利要求126至141中任一项所述的方法,其中所述复原制剂经由肌肉注射施用。

147. 根据权利要求126至146中任一项所述的方法,其中所述复原制剂是自施用的。

148. 根据权利要求126至147中任一项所述的方法,其中所述制剂每天、每两天、三天、一周或一个月施用若干次。

149. 根据权利要求148所述的制剂,其中所述制剂的第二剂量在至少两天后、四天后、一周后或一个月后的合适时间间隔之后施用。

150. 根据权利要求1至116中任一项所述的制剂,其中所述冻干制剂包括治疗有效剂量。

151. 根据权利要求105至116或125中任一项所述的制剂,其中所述复原制剂包括治疗有效剂量。

152. 一种制剂,其包括溶液中浓度为5-100mM的复原冻干ENPP1,其中所述制剂包括缓冲剂、一种或多种药学上可接受的添加剂中的一种或多种。

153. 根据权利要求152所述的制剂,其中所述缓冲剂在溶液中复原时维持范围为pH 6-7的pH。

154. 根据权利要求152至153中任一项所述的制剂,其中所述缓冲剂在溶液中复原时维持范围为pH 7-8的pH。

155. 根据权利要求152至154中任一项所述的制剂,其中所述缓冲剂选自以下组成的组:琥珀酸盐、柠檬酸盐、碳酸氢盐、磷酸盐、tris或双甘氨酸。

156. 根据权利要求152至155中任一项所述的制剂,其中所述缓冲剂是琥珀酸盐、柠檬

酸盐或磷酸盐。

157. 根据权利要求152至156中任一项所述的制剂,其中所述缓冲剂是柠檬酸盐。

158. 根据权利要求152至157中任一项所述的制剂,其中所述缓冲剂是琥珀酸盐。

159. 根据权利要求152至158中任一项所述的制剂,其中所述缓冲剂是磷酸盐。

160. 根据权利要求152至159中任一项所述的制剂,其中所述缓冲剂提高聚集体形成的起始温度。

161. 根据权利要求152至160中任一项所述的制剂,其中所述缓冲剂将所述聚集体形成的起始温度提高至少2℃。

162. 根据权利要求152至161中任一项所述的制剂,其中所述缓冲剂减少高分子量物种的形成。

163. 根据权利要求152至162中任一项所述的制剂,其中所述缓冲剂将高分子量物种的形成减少至少10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%。

164. 根据权利要求152至163中任一项所述的制剂,其中所述一种或多种药学上可接受的添加剂包括稳定剂、氨基酸、盐、金属离子和表面活性剂。

165. 根据权利要求152至164中任一项所述的制剂,其中所述稳定剂是糖、碳水化合物或多糖。

166. 根据权利要求152至165中任一项所述的制剂,其中所述糖选自由以下组成的组:蔗糖、海藻糖、甘露糖、麦芽糖、乳糖、葡萄糖、棉子糖、纤维二糖、龙胆二糖、异麦芽糖、阿拉伯糖、葡糖胺、果糖、甘露糖醇或山梨糖醇。

167. 根据权利要求152至166中任一项所述的制剂,其中所述一种或多种药学上可接受的添加剂是甘露糖醇。

168. 根据权利要求152至167中任一项所述的制剂,其中所述一种或多种药学上可接受的添加剂是蔗糖。

169. 根据权利要求152至168中任一项所述的制剂,其中所述药学上可接受的添加剂是氨基酸。

170. 根据权利要求152至169中任一项所述的制剂,其中所述氨基酸选自由以下组成的组:甘氨酸、精氨酸、组氨酸、丙氨酸、脯氨酸、丝氨酸和谷氨酸。

171. 根据权利要求152至170中任一项所述的制剂,其中所述一种或多种药学上可接受的添加剂是精氨酸。

172. 根据权利要求152至171中任一项所述的制剂,其中所述药学上可接受的添加剂是盐。

173. 根据权利要求152至172中任一项所述的制剂,其中所述盐选自由以下组成的组:氯化钠(NaCl)、氯化钙(CaCl₂)、氯化锌(ZnCl₂)和/或氯化镁(MgCl₂)。

174. 根据权利要求152至173中任一项所述的制剂,其中所述一种或多种药学上可接受的添加剂是氯化钙(CaCl₂)。

175. 根据权利要求152至174中任一项所述的制剂,其中所述药学上可接受的添加剂是表面活性剂。

176. 根据权利要求152至175中任一项所述的制剂,其中所述表面活性剂选自由以下组成的组:聚山梨醇酯、泊洛沙姆、曲拉通、十二烷基硫酸钠、月桂基硫酸钠、辛基糖苷钠、月桂

基磺基甜菜碱、肉豆蔻基-磺基甜菜碱、亚油酰基-磺基甜菜碱、硬脂基-磺基甜菜碱、月桂基肌氨酸、肉豆蔻基-肌氨酸、亚油酰基-肌氨酸、硬脂基-肌氨酸、亚油酰基-甜菜碱、肉豆蔻基-甜菜碱、鲸蜡基-甜菜碱、月桂酰胺基丙基-甜菜碱、椰油酰胺基丙基-甜菜碱、亚油酰胺基丙基-甜菜碱、肉豆蔻酰胺基丙基-甜菜碱、棕榈酰胺基丙基-甜菜碱、异硬脂酰胺基丙基-甜菜碱、肉豆蔻酰胺基丙基-二甲胺、棕榈酰胺基丙基二甲胺、异硬脂酰胺基丙基-二甲胺、甲基椰油酰基-牛磺酸钠、甲基油酰基-牛磺酸二钠、二羟丙基PEG 5亚油基氯化铵、聚乙二醇、聚丙二醇、聚山梨醇酯20、聚山梨醇酯21、聚山梨醇酯40、聚山梨醇酯60、聚山梨醇酯61、聚山梨醇酯65、聚山梨醇酯80、聚山梨醇酯81、聚山梨醇酯85、聚山梨醇酯188、PEG3350及其混合物。

177. 根据权利要求152至176中任一项所述的制剂,所述表面活性剂选自自由以下组成的组:聚山梨醇酯20(PS20)、聚山梨醇酯80(PS80)或聚山梨醇酯188(PS188)。

178. 根据权利要求152至177中任一项所述的制剂,其中所述表面活性剂是聚山梨醇酯20(PS20)。

179. 根据权利要求152至178中任一项所述的制剂,其中所述制剂包括缓冲剂、稳定剂、盐、氨基酸和表面活性剂。

180. 根据权利要求152至179中任一项所述的制剂,其中所述缓冲剂是柠檬酸盐或琥珀酸盐,所述稳定剂是蔗糖或甘露糖醇,所述盐是氯化钙(CaCl_2),并且所述表面活性剂是PS20。

181. 根据权利要求152至180中任一项所述的制剂,其中所述制剂的pH是pH 6.2至pH 6.5。

182. 根据权利要求152至181中任一项所述的制剂,其中所述制剂包括15至25mM的柠檬酸盐。

183. 根据权利要求152至182中任一项所述的制剂,其中所述制剂包括75mM至95mM的蔗糖、甘露糖醇或其组合中的每一种。

184. 根据权利要求152至183中任一项所述的制剂,其中所述制剂包括100mM至300mM的蔗糖。

185. 根据权利要求152至184中任一项所述的制剂,其中所述制剂包括1mM至3mM的氯化钙。

186. 根据权利要求152至185中任一项所述的制剂,其中所述制剂包括0.005%至0.1%(w/v)的PS20。

187. 根据权利要求152至186中任一项所述的制剂,其中所述一种或多种药学上可接受的添加剂在溶液中复原时以范围为5mM至300mM的浓度存在。

188. 根据权利要求152至187中任一项所述的制剂,其中所述一种或多种药学上可接受的添加剂减少高分子量物种的形成。

189. 根据权利要求152至188中任一项所述的制剂,其中所述一种或多种药学上可接受的添加剂将高分子量物种的形成减少至少10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%。

190. 根据权利要求152至189中任一项所述的制剂,其中所述制剂包括ENPP1多肽辅因子。

191. 根据权利要求152至190中任一项所述的制剂,其中所述ENPP1多肽辅因子包括钙、锌和/或单磷酸腺苷。

192. 根据权利要求152至191中任一项所述的制剂,其中所述ENPP1多肽辅因子是CaCl₂、CaSO₄、ZnCl₂、ZnSO₄和/或单磷酸腺苷。

193. 根据权利要求152至192中任一项所述的制剂,其中所述ENPP1多肽辅因子是CaCl₂和/或单磷酸腺苷。

194. 根据权利要求152至193中任一项所述的制剂,其中所述ENPP1多肽辅因子在溶液中复原时以范围为1mM至10mM的浓度存在。

195. 根据权利要求152至194中任一项所述的制剂,其中所述ENPP1多肽辅因子将高分子量物种的形成减少至少10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%。

196. 根据权利要求152至195中任一项所述的制剂,其中所述制剂包括表面活性剂。

197. 根据权利要求152至196中任一项所述的制剂,其中所述表面活性剂包括PS20、PS80或PS188。

198. 根据权利要求152至197中任一项所述的制剂,其中所述表面活性剂包括PS20。

199. 根据权利要求152至198中任一项所述的制剂,其中所述表面活性剂在溶液中复原时以范围为0.02%至0.10% (w/v)的浓度存在。

200. 根据权利要求152至199中任一项所述的制剂,其中所述表面活性剂增加对物理应力的抗性。

201. 根据权利要求152至200中任一项所述的制剂,其中所述制剂包括均匀的粒度。

202. 根据权利要求152至201中任一项所述的制剂,其中所述制剂包括较大尺寸颗粒的两倍、三倍、四倍、五倍、六倍、七倍、八倍、九倍或十倍减少,如通过微流成像分析所确定的。

203. 根据权利要求152至202中任一项所述的制剂,其中所述ENPP1多肽包括与包括SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:15的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。

204. 根据权利要求152至203中任一项所述的制剂,其中所述ENPP1多肽包括与包括SEQ ID NO:2的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。

205. 根据权利要求152至204中任一项所述的制剂,其中所述ENPP1多肽是包括可溶性ENPP1多肽结构域和一个或多个异源蛋白质部分的融合蛋白。

206. 根据权利要求152至205中任一项所述的制剂,其中所述异源蛋白质部分增加所述可溶性ENPP1多肽在哺乳动物中的循环半衰期。

207. 根据权利要求152至206中任一项所述的制剂,其中所述异源蛋白质部分包括Fc结构域。

208. 根据权利要求152至207中任一项所述的制剂,其中所述Fc结构域包括与SEQ ID NO:12的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多相同的氨基酸序列。

209. 根据权利要求152至208中任一项所述的制剂,其中所述ENPP1多肽是ENPP1-Fc融合蛋白。

210. 根据权利要求152至209中任一项所述的制剂,其中所述异源部分选自由以下组成

的组：糖基化氨基酸、聚乙二醇化氨基酸、法尼基化氨基酸、乙酰化氨基酸、生物素化氨基酸和脂质部分。

211. 根据权利要求152至210中任一项所述的制剂，其中所述ENPP1多肽包括与包括SEQ ID NO:13的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。

212. 根据权利要求152至211中任一项所述的制剂，其中所述ENPP1多肽包括与包括SEQ ID NO:14的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。

213. 根据权利要求152至212中任一项所述的制剂，其中所述ENPP1多肽包括与包括SEQ ID NO:15的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。

214. 根据权利要求152至213中任一项所述的制剂，其中所述制剂包括ENPP1多肽、缓冲剂、药学上可接受的盐、稳定剂、表面活性剂和一种或多种药学上可接受的添加剂。

215. 根据权利要求152至214中任一项所述的制剂，其中所述缓冲剂是柠檬酸盐缓冲剂。

216. 根据权利要求152至215中任一项所述的制剂，其中所述柠檬酸盐缓冲剂是柠檬酸三钠二水合物。

217. 根据权利要求152至216中任一项所述的制剂，其中所述药学上可接受的盐是氯化钙。

218. 根据权利要求152至217中任一项所述的制剂，其中所述稳定剂是糖。

219. 根据权利要求152至218中任一项所述的制剂，其中所述稳定剂是蔗糖。

220. 根据权利要求152至219中任一项所述的制剂，其中所述一种或多种药学上可接受的添加剂包括甘露糖醇。

221. 根据权利要求152至220中任一项所述的制剂，其中所述制剂包括：ENPP1多肽、柠檬酸盐缓冲剂、氯化钙、蔗糖和聚山梨醇酯。

222. 根据权利要求152至221中任一项所述的制剂，其中所述制剂包括：ENPP1多肽、柠檬酸三钠二水合物、氯化钙二水合物、蔗糖和聚山梨醇酯20。

223. 根据权利要求152至222中任一项所述的制剂，其中所述制剂包括：ENPP1多肽、柠檬酸盐缓冲剂、氯化钙、蔗糖、甘露糖醇和聚山梨醇酯。

224. 根据权利要求152至223中任一项所述的制剂，其中所述制剂包括：ENPP1多肽、柠檬酸三钠二水合物、氯化钙二水合物、蔗糖、D(-)甘露糖醇和聚山梨醇酯20。

225. 根据权利要求152至224中任一项所述的制剂，其中所述制剂包括每0.5ml最终复原体积：约25mg的ENPP1多肽、约2.94mg的柠檬酸三钠二水合物、约0.15mg的氯化钙二水合物、约30mg的蔗糖、约7.5mg的D(-)甘露糖醇和约0.25mg的聚山梨糖醇。

226. 根据权利要求152至225中任一项所述的制剂，其中所述制剂具有至少1、2、3、4、5、6、12、18、24、48或60小时的保质期。

227. 根据权利要求152至226中任一项所述的制剂，其中所述ENPP1多肽包括连接所述ENPP1多肽部分和所述Fc结构域的接头氨基酸序列。

228. 根据权利要求152至227中任一项所述的制剂，其中所述ENPP1多肽包括连接所述

ENPP1多肽部分和所述Fc结构域的接头氨基酸序列。

229. 根据权利要求152至228中任一项所述的制剂,其中所述接头氨基酸序列包括氨基酸序列LIN或由其组成。

230. 根据权利要求152至229中任一项所述的制剂,其中所述ENPP1多肽包括SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:11或由其组成。

231. 根据权利要求152至230中任一项所述的制剂,其中所述制剂是无菌可注射溶液。

232. 根据权利要求152至231中任一项所述的制剂,其中所述复原溶液包括药学上可接受的载体和/或添加剂。

233. 根据权利要求152至232中任一项所述的制剂,其中所述药学上可接受的载体选自盐水溶液、纯化水或无菌注射用水。

234. 根据权利要求152至233中任一项所述的制剂,其中所述制剂在小于100秒、80秒、70秒、68秒、65秒或60秒的时段内完全复原。

235. 根据权利要求152至234中任一项所述的制剂,其中所述制剂包括:至少或约50mg/mL的所述ENPP1多肽、约20mM的约pH 6.3的柠檬酸盐、约2mM的氯化钙、约175mM的蔗糖、约82mM的甘露糖醇和约0.05%w/v的聚山梨醇酯。

236. 根据权利要求152至235中任一项所述的制剂,其中所述复原制剂包括:至少或约50mg/mL的所述ENPP1多肽、约20mM的约pH 6.3的柠檬酸盐、约2mM的氯化钙、约175mM的蔗糖、约82mM的(D)甘露糖醇和约0.05%w/v的聚山梨醇酯20。

237. 根据权利要求152至236中任一项所述的制剂,其中所述复原制剂包括:至少或约50mg/mL的所述ENPP1多肽、约20mM的约pH 6.3的柠檬酸盐、约88mM的蔗糖、约82mM的甘露糖醇、约2mM的氯化钙和约0.05%的聚山梨醇酯20。

238. 根据权利要求152至237中任一项所述的制剂,其中所述复原制剂包括:至少或约50mg/mL的所述ENPP1多肽、约20mM的约pH 6.3的柠檬酸盐、约263mM的蔗糖、约2mM的氯化钙和约0.05%的聚山梨醇酯20。

239. 根据权利要求152至238中任一项所述的制剂,其中所述复原制剂具有至少1、2、3、4、5、6、12、18、24、48或60小时的保质期。

240. 一种小瓶,其包括根据权利要求1至116中任一项所述的冻干制剂。

241. 一种小瓶,其包括根据权利要求155至239中任一项所述的复原制剂。

242. 一种注射器,其包括根据权利要求1至116中任一项所述的冻干制剂。

243. 一种注射器,其包括根据权利要求115至239中任一项所述的复原制剂。

244. 根据权利要求152至239中任一项所述的制剂,其用于治疗病理性钙化或骨化疾病。

245. 根据权利要求152至239中任一项所述的制剂,其用于预防有此需要的受试者的血管钙化进展或减少所述受试者的血管钙化。

246. 根据权利要求152至239中任一项所述的制剂,其用于预防患有ENPP1缺乏症的受试者的病理性钙化进展或减少所述受试者的病理性钙化。

247. 根据权利要求152至239中任一项所述的制剂,其用于预防有此需要的受试者的组织钙化进展或减少所述受试者的组织钙化。

248. 根据权利要求152至239中任一项所述的制剂,其用于增加有此需要的受试者的循

环焦磷酸盐 (PPi)。

249. 根据权利要求152至239中任一项所述的制剂,其用于增加有此需要的受试者的焦磷酸酶活性。

250. 根据权利要求249所述的制剂,其中所述受试者患有以下病症或处于发展以下病症的风险中:病理性软组织钙化、动脉钙化、血管钙化、慢性肾脏疾病 (CKD)、终末期肾脏疾病 (ESRD)、钙化性尿毒症性小动脉病 (CUA)、钙化防御、后纵韧带骨化症 (OPLL) 或低磷性佝偻病。

251. 根据权利要求152至239中任一项所述的制剂,其用于改善ENPP1缺乏症的一种或多种症状。

252. 根据权利要求152至239中任一项所述的制剂,其用于治疗患有ENPP1缺乏症的受试者。

253. 根据权利要求152至239中任一项所述的制剂,其用于改善ABCC6缺乏症的一种或多种症状。

254. 根据权利要求152至239中任一项所述的制剂,其用于改善PXE的一种或多种症状。

255. 根据权利要求152至239中任一项所述的制剂,其用于治疗患有病理性骨化的受试者。

256. 根据权利要求240至241中任一项所述的小瓶,其用于治疗病理性钙化或骨化疾病。

257. 根据权利要求240至241中任一项所述的小瓶,其用于预防有此需要的受试者的血管钙化进展或减少所述受试者的血管钙化。

258. 根据权利要求240至241中任一项所述的小瓶,其用于预防患有ENPP1缺乏症的受试者的病理性钙化进展或减少所述受试者的病理性钙化。

259. 根据权利要求240至241中任一项所述的小瓶,其用于预防有此需要的受试者的组织钙化进展或减少所述受试者的组织钙化。

260. 根据权利要求240至241中任一项所述的小瓶,其用于增加有此需要的受试者的循环焦磷酸盐 (PPi)。

261. 根据权利要求240至241中任一项所述的小瓶,其用于增加有此需要的受试者的焦磷酸酶活性。

262. 根据权利要求261所述的小瓶,其中所述受试者患有以下病症或处于发展以下病症的风险中:病理性软组织钙化、动脉钙化、血管钙化、慢性肾脏疾病 (CKD)、终末期肾脏疾病 (ESRD)、钙化性尿毒症性小动脉病 (CUA)、钙化防御、后纵韧带骨化症 (OPLL) 或低磷性佝偻病。

263. 根据权利要求240至241中任一项所述的小瓶,其用于改善ENPP1缺乏症的一种或多种症状。

264. 根据权利要求240至241中任一项所述的小瓶,其用于治疗患有ENPP1缺乏症的受试者。

265. 根据权利要求240至241中任一项所述的小瓶,其用于改善ABCC6缺乏症的一种或多种症状。

266. 根据权利要求240至241中任一项所述的小瓶,其用于改善PXE的一种或多种症状。

267. 根据权利要求242至243中任一项所述的注射器,其用于治疗病理性钙化或骨化疾病。

268. 根据权利要求242至243中任一项所述的注射器,其用于预防有此需要的受试者的血管钙化进展或减少所述受试者的血管钙化。

269. 根据权利要求242至243中任一项所述的注射器,其用于预防患有ENPP1缺乏症的受试者的病理性钙化进展或减少所述受试者的病理性钙化。

270. 根据权利要求242至243中任一项所述的注射器,其用于预防有此需要的受试者的组织钙化进展或减少所述受试者的组织钙化。

271. 根据权利要求242至243中任一项所述的注射器,其用于增加有此需要的受试者的循环焦磷酸盐 (PPi)。

272. 根据权利要求242至243中任一项所述的注射器,其用于增加有此需要的受试者的焦磷酸酶活性。

273. 根据权利要求272所述的注射器,其中所述受试者患有以下病症或处于发展以下病症的风险中:病理性软组织钙化、动脉钙化、血管钙化、慢性肾脏疾病 (CKD)、终末期肾脏疾病 (ESRD)、钙化性尿毒症性小动脉病 (CUA)、钙化防御、后纵韧带骨化症 (OPLL) 或低磷性佝偻病。

274. 根据权利要求242至243中任一项所述的注射器,其用于改善ENPP1缺乏症的一种或多种症状。

275. 根据权利要求242至243中任一项所述的注射器,其用于治疗患有ENPP1缺乏症的受试者。

276. 根据权利要求242至243中任一项所述的注射器,其用于改善ABCC6缺乏症的一种或多种症状。

277. 根据权利要求242至243中任一项所述的注射器,其用于改善PXE的一种或多种症状。

冻干ENPP1多肽制剂及其用途

[0001] 相关申请交叉引用

[0002] 本申请要求于2021年9月24日提交的美国临时专利申请第63/248,303号的优先权,所述专利申请的内容通过引用以其整体并入本文。

[0003] 序列表

[0004] 本申请含有已经以xml.格式电子提交并且特此通过引用以其整体并入的序列表。所述xml.副本创建于2022年9月23日,命名为4427-11902_sequence.txt,并且大小为137KB。

背景技术

[0005] 人胞外核苷酸焦磷酸酶 (ENPP) 蛋白家族包括水解磷酸二酯键的七个细胞外的糖基化蛋白 (即ENPP1-ENPP7)。除了ENPP2,ENPP是细胞表面酶,其被输出到质膜,但被弗林蛋白酶切割并释放到细胞外液中。ENPP酶具有高度的序列和结构同源性,但表现出涵盖核苷酸与脂质的不同底物特异性。

[0006] ENPP1 (也被称为PC-1) 和ENPP3是2型细胞外膜结合糖蛋白,其位于成骨细胞和软骨细胞的矿物质沉积基质囊泡上,并将细胞外核苷酸 (主要是ATP) 水解成单磷酸腺苷 (AMP) 和无机焦磷酸盐 (PPi)。PPi通过与新生羟基磷灰石 (HA) 晶体结合而充当异位组织矿化的强效抑制剂,从而防止这些晶体的未来生长。ENPP1经由核苷酸三磷酸盐 (NTP) 的水解生成PPi。

[0007] 异位组织矿化与许多人类疾病相关联,包含慢性关节疾病和急性致死性新生儿综合征。为了防止不需要的组织钙化,促进和抑制组织矿化的因素必须保持紧密平衡。细胞外无机焦磷酸盐 (PPi) 和磷酸盐 (Pi) 的平衡是异位组织矿化的重要调节因子。

发明内容

[0008] 本公开的特征尤其在于包括ENPP1多肽的冻干制剂。此类制剂的特征尤其在于在广泛温度范围下的显著稳定性。因此,在一个方面,本公开的特征在于一种冻干多肽制剂,其中所述制剂包括ENPP1多肽。

[0009] 在一些实施例中,本文所述的制剂包括缓冲剂。在一些实施例中,缓冲剂在溶液中复原时维持范围为pH 6-7的pH。在一些实施例中,缓冲剂在溶液中复原时维持范围为pH 7-8的pH。在一些实施例中,缓冲剂在溶液中复原时维持范围为pH 6-8的pH。在一些实施例中,缓冲剂选自由以下组成的组:琥珀酸盐、柠檬酸盐、碳酸氢盐、磷酸盐、tris或双甘氨酸。在一些实施例中,缓冲剂是琥珀酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐。在一些实施例中,缓冲剂是柠檬酸盐。在一些实施例中,缓冲剂是琥珀酸盐。在一些实施例中,缓冲剂是磷酸盐。在一些实施例中,缓冲剂在溶液中复原时包括范围为5mM至100mM的浓度。在一些实施例中,缓冲剂提高聚集体形成的起始温度。在一些实施例中,缓冲剂将聚集体形成的起始温度提高至少2℃。在一些实施例中,缓冲剂减少高分子量物种的形成。在一些实施例中,缓冲剂将高分子量物种的形成减少至少10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%或50%。

[0010] 在一些实施例中,本文所述的制剂包括一种或多种药学上可接受的添加剂。在一些实施例中,此类药学上可接受的添加剂是或包括稳定剂、氨基酸、盐、金属离子和表面活性剂。在一些实施例中,稳定剂是或包括糖、碳水化合物或多糖。在一些实施例中,此类糖选自自由以下组成的组:蔗糖、海藻糖、甘露糖、麦芽糖、乳糖、葡萄糖、棉子糖、纤维二糖、龙胆二糖、异麦芽糖、阿拉伯糖、葡糖胺、果糖、甘露糖醇或山梨糖醇。在一些实施例中,一种或多种药学上可接受的添加剂是或包括甘露糖醇。在一些实施例中,药学上可接受的添加剂是或包括蔗糖。在一些实施例中,药学上可接受的添加剂是或包括氨基酸。在一些实施例中,此类氨基酸选自自由以下组成的组:甘氨酸、精氨酸、组氨酸、丙氨酸、脯氨酸、丝氨酸和谷氨酸。在一些实施例中,氨基酸是精氨酸。在一些实施例中,药学上可接受的添加剂是盐,如但不限于氯化钠(NaCl)、氯化钙(CaCl_2)、氯化锌(ZnCl_2)和/或氯化镁(MgCl_2)。在一些实施例中,盐是氯化钙(CaCl_2)。在一些实施例中,所述药学上可接受的添加剂是表面活性剂,如但不限于聚山梨醇酯、泊洛沙姆、曲拉通(triton)、十二烷基硫酸钠、月桂基硫酸钠、辛基糖苷钠、月桂基磺基甜菜碱、肉豆蔻基-磺基甜菜碱、亚油酰基-磺基甜菜碱、硬脂基-磺基甜菜碱、月桂基肌氨酸、肉豆蔻基-肌氨酸、亚油酰基-肌氨酸、硬脂基-肌氨酸、亚油酰基-甜菜碱、肉豆蔻基-甜菜碱、鲸蜡基-甜菜碱、月桂酰胺基丙基-甜菜碱、椰油酰胺基丙基-甜菜碱、亚油酰胺基丙基-甜菜碱、肉豆蔻酰胺基丙基-甜菜碱、棕榈酰胺基丙基-甜菜碱、异硬脂酰胺基丙基-甜菜碱、肉豆蔻酰胺基丙基-二甲胺、棕榈酰胺基丙基二甲胺、异硬脂酰胺基丙基-二甲胺、甲基椰油酰基-牛磺酸钠、甲基油酰基-牛磺酸二钠、二羟丙基PEG 5亚油基氯化铵、聚乙二醇、聚丙二醇、聚山梨醇酯20、聚山梨醇酯21、聚山梨醇酯40、聚山梨醇酯60、聚山梨醇酯61、聚山梨醇酯65、聚山梨醇酯80、聚山梨醇酯81、聚山梨醇酯85、聚山梨醇酯188、PEG3350及其混合物。在一些实施例中,表面活性剂选自自由以下组成的组:聚山梨醇酯20(PS20)、聚山梨醇酯80(PS80)或聚山梨醇酯188(PS188)。在一些实施例中,表面活性剂是聚山梨醇酯20(PS20)。

[0011] 在一些实施例中,本文所述的制剂包括缓冲剂、稳定剂、盐、氨基酸和表面活性剂。在一些实施例中,缓冲剂是柠檬酸盐或琥珀酸盐,稳定剂是蔗糖或甘露糖醇,盐是氯化钙(CaCl_2),并且表面活性剂是聚山梨醇酯20(PS20)。

[0012] 在一些实施例中,本文所述的制剂(例如,在冻干制剂的情况下,当在复原溶液或无菌水中复原时)的pH是pH 6.2至pH 6.5。在一些实施例中,本文所述的制剂的pH(例如,在冻干制剂的情况下,当在复原溶液或无菌水中复原时)在约pH 6.0至约pH 7.0之间,包括pH 6.0和pH 7.0。

[0013] 在一些实施例中,本文所述的制剂包括约15至约25mM的柠檬酸盐。

[0014] 在一些实施例中,本文所述的制剂包括约75mM至约95mM的蔗糖、甘露糖醇或其组合中的每一种。

[0015] 在一些实施例中,本文所述的制剂包括约100mM至约300mM的蔗糖。

[0016] 在一些实施例中,本文所述的制剂包括约1mM至约3mM的氯化钙。

[0017] 在一些实施例中,制剂包括表面活性剂。表面活性剂可以是或包括例如聚山梨醇酯20(PS20)、聚山梨醇酯80(PS80)或泊洛沙姆Px188。在一些实施例中,表面活性剂是或包括PS20。在一些实施例中,表面活性剂在溶液中复原时以范围为约0.02%至约0.10% (w/v) 的浓度存在。在一些实施例中,本文所述的制剂包括约0.005%至约0.1% (w/v) 的表面活性

剂。在一些实施例中,本文所述的制剂包括约0.005%至约0.1% (w/v) 的PS20。在一些实施例中,表面活性剂增加对物理应力的抗性。

[0018] 在一些实施例中,一种或多种药学上可接受的添加剂在溶液中复原(例如,用复原缓冲液或无菌水复原)时的浓度在约5mM至约300mM的范围内。

[0019] 在一些实施例中,一种或多种药学上可接受的添加剂减少高分子量物种的形成。

[0020] 在一些实施例中,一种或多种药学上可接受的添加剂将高分子量物种的形成减少至少10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%。

[0021] 在一些实施例中,制剂包括ENPP1多肽辅因子,如但不限于钙、锌和/或单磷酸腺苷。在一些实施例中,ENPP1多肽辅因子是CaCl₂、CaSO₄、ZnCl₂、ZnSO₄和/或单磷酸腺苷。在一些实施例中,ENPP1多肽辅因子是CaCl₂和/或单磷酸腺苷。在一些实施例中,ENPP1多肽辅因子在溶液中复原时以范围为约1mM至约10mM的浓度存在。在一些实施例中,ENPP1多肽辅因子将高分子量物种的形成减少至少10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%。

[0022] 在一些实施例中,本文所述的制剂包括均匀的粒度或特征在于均匀的粒度。在一些实施例中,本文所述的制剂包括较大尺寸颗粒的两倍、三倍、四倍、五倍、六倍、七倍、八倍、九倍或十倍减少,如通过微流成像分析所确定的。

[0023] 在本文所述的任何制剂的一些实施例中,ENPP1多肽包括与包括SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:15的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。

[0024] 在一些实施例中,ENPP1多肽包括与包括SEQ ID NO:2的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。

[0025] 在一些实施例中,ENPP1多肽是包括可溶性ENPP1多肽结构域和一个或多个异源蛋白质部分的融合蛋白。在一些实施例中,异源蛋白质部分增加了可溶性ENPP1多肽在哺乳动物中的循环半衰期。在一些实施例中,异源蛋白质部分包括Fc结构域。在一些实施例中,Fc结构域包括与SEQ ID NO:12的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多相同的氨基酸序列。在一些实施例中,ENPP1多肽是ENPP1-Fc融合蛋白。在一些实施例中,ENPP1多肽进一步包括异源部分。在一些实施例中,异源部分选自由糖基化氨基酸、聚乙二醇化氨基酸、法尼基化氨基酸、乙酰化氨基酸、生物素化氨基酸和脂质部分组成的组。

[0026] 在一些实施例中,ENPP1多肽包括与包括SEQ ID NO:13的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。在一些实施例中,ENPP1多肽与SEQ ID NO:13至少90%相同。在一些实施例中,ENPP1多肽与SEQ ID NO:13至少95%相同。在一些实施例中,ENPP1多肽与SEQ ID NO:13至少99%相同。在一些实施例中,ENPP1多肽包括SEQ ID NO:13。在一些实施例中,ENPP1多肽由SEQ ID NO:13组成。在一些实施例中,ENPP1多肽包括Fc结构域。Fc结构域可以包括SEQ ID NO:12中所描绘的氨基酸序列或由其组成。在一些实施例中,ENPP1多肽包括连接ENPP1多肽部分和Fc结构域的接头氨基酸序列。在一些实施例中,接头氨基酸序列包括氨基酸序列LIN或由其组成。在一些实施例中,ENPP1多肽包括SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:11或由其组成。在一些实施例中,ENPP1多肽包括SEQ ID NO:9或由其组成。在一些实施

例中,ENPP1多肽包括SEQ ID NO:10或由其组成。在一些实施例中,ENPP1多肽包括SEQ ID NO:11或由其组成。

[0027] 在一些实施例中,ENPP1多肽包括与包括SEQ ID NO:14的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。在一些实施例中,ENPP1多肽与SEQ ID NO:14至少90%相同。在一些实施例中,ENPP1多肽与SEQ ID NO:14至少95%相同。在一些实施例中,ENPP1多肽与SEQ ID NO:14至少99%相同。在一些实施例中,ENPP1多肽包括SEQ ID NO:14。在一些实施例中,ENPP1多肽由SEQ ID NO:14组成。在一些实施例中,ENPP1多肽包括Fc结构域。Fc结构域可以包括SEQ ID NO:12中所描绘的氨基酸序列或由其组成。在一些实施例中,ENPP1多肽包括连接ENPP1多肽部分和Fc结构域的接头氨基酸序列。在一些实施例中,接头氨基酸序列包括氨基酸序列LIN或由其组成。在一些实施例中,ENPP1多肽包括SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:11或由其组成。在一些实施例中,ENPP1多肽包括SEQ ID NO:9或由其组成。在一些实施例中,ENPP1多肽包括SEQ ID NO:10或由其组成。在一些实施例中,ENPP1多肽包括SEQ ID NO:11或由其组成。

[0028] 在一些实施例中,ENPP1多肽包括与包括SEQ ID NO:15的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。在一些实施例中,ENPP1多肽与SEQ ID NO:15至少90%相同。在一些实施例中,ENPP1多肽与SEQ ID NO:15至少95%相同。在一些实施例中,ENPP1多肽与SEQ ID NO:15至少99%相同。在一些实施例中,ENPP1多肽包括SEQ ID NO:15。在一些实施例中,ENPP1多肽由SEQ ID NO:15组成。在一些实施例中,ENPP1多肽包括Fc结构域。Fc结构域可以包括SEQ ID NO:12中所描绘的氨基酸序列或由其组成。在一些实施例中,ENPP1多肽包括连接ENPP1多肽部分和Fc结构域的接头氨基酸序列。在一些实施例中,接头氨基酸序列包括氨基酸序列LIN或由其组成。在一些实施例中,ENPP1多肽包括SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:11或由其组成。在一些实施例中,ENPP1多肽包括SEQ ID NO:9或由其组成。在一些实施例中,ENPP1多肽包括SEQ ID NO:10或由其组成。在一些实施例中,ENPP1多肽包括SEQ ID NO:11或由其组成。

[0029] 在一些实施例中,制剂包括ENPP1多肽、缓冲剂、药学上可接受的盐、稳定剂、表面活性剂和一种或多种药学上可接受的添加剂。在一些实施例中,缓冲剂是柠檬酸盐缓冲剂。柠檬酸盐缓冲剂可以是例如柠檬酸三钠二水合物。在一些实施例中,药学上可接受的盐是氯化钙。在一些实施例中,稳定剂是糖,如蔗糖。在一些实施例中,一种或多种药学上可接受的添加剂是或包括甘露糖醇。在一些实施例中,ENPP1多肽包括SEQ ID NO:13或由其组成。在一些实施例中,ENPP1多肽包括SEQ ID NO:14或由其组成。在一些实施例中,ENPP1多肽包括SEQ ID NO:15或由其组成。在一些实施例中,ENPP1多肽包括Fc结构域。Fc结构域可以包括SEQ ID NO:12中所描绘的氨基酸序列或由其组成。在一些实施例中,ENPP1多肽包括连接ENPP1多肽部分和Fc结构域的接头氨基酸序列。在一些实施例中,接头氨基酸序列包括氨基酸序列LIN或由其组成。在一些实施例中,ENPP1多肽包括SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:11或由其组成。在一些实施例中,ENPP1多肽包括SEQ ID NO:9或由其组成。在一些实施例中,ENPP1多肽包括SEQ ID NO:10或由其组成。在一些实施例中,ENPP1多肽包括SEQ ID NO:11或由其组成。

[0030] 在一些实施例中,制剂包括:ENPP1多肽、柠檬酸盐缓冲剂、氯化钙、蔗糖和聚山梨醇酯。在一些实施例中,ENPP1多肽包括SEQ ID NO:13或由其组成。在一些实施例中,ENPP1多肽包括SEQ ID NO:14或由其组成。在一些实施例中,ENPP1多肽包括SEQ ID NO:15或由其组成。在一些实施例中,ENPP1多肽包括Fc结构域。Fc结构域可以包括SEQ ID NO:12中所描绘的氨基酸序列或由其组成。在一些实施例中,ENPP1多肽包括连接ENPP1多肽部分和Fc结构域的接头氨基酸序列。在一些实施例中,接头氨基酸序列包括氨基酸序列LIN或由其组成。在一些实施例中,ENPP1多肽包括SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:11或由其组成。在一些实施例中,ENPP1多肽包括SEQ ID NO:9或由其组成。在一些实施例中,ENPP1多肽包括SEQ ID NO:10或由其组成。在一些实施例中,ENPP1多肽包括SEQ ID NO:11或由其组成。

[0031] 在一些实施例中,制剂包括:ENPP1多肽、柠檬酸三钠二水合物、氯化钙二水合物、蔗糖和聚山梨醇酯20。在一些实施例中,ENPP1多肽包括SEQ ID NO:13或由其组成。在一些实施例中,ENPP1多肽包括SEQ ID NO:14或由其组成。在一些实施例中,ENPP1多肽包括SEQ ID NO:15或由其组成。在一些实施例中,ENPP1多肽包括Fc结构域。Fc结构域可以包括SEQ ID NO:12中所描绘的氨基酸序列或由其组成。在一些实施例中,ENPP1多肽包括连接ENPP1多肽部分和Fc结构域的接头氨基酸序列。在一些实施例中,接头氨基酸序列包括氨基酸序列LIN或由其组成。在一些实施例中,ENPP1多肽包括SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:11或由其组成。在一些实施例中,ENPP1多肽包括SEQ ID NO:9或由其组成。在一些实施例中,ENPP1多肽包括SEQ ID NO:10或由其组成。在一些实施例中,ENPP1多肽包括SEQ ID NO:11或由其组成。

[0032] 在一些实施例中,制剂包括:ENPP1多肽、柠檬酸盐缓冲剂、氯化钙、蔗糖、甘露糖醇和聚山梨醇酯。在一些实施例中,ENPP1多肽包括SEQ ID NO:13或由其组成。在一些实施例中,ENPP1多肽包括SEQ ID NO:14或由其组成。在一些实施例中,ENPP1多肽包括SEQ ID NO:15或由其组成。在一些实施例中,ENPP1多肽包括Fc结构域。Fc结构域可以包括SEQ ID NO:12中所描绘的氨基酸序列或由其组成。在一些实施例中,ENPP1多肽包括连接ENPP1多肽部分和Fc结构域的接头氨基酸序列。在一些实施例中,接头氨基酸序列包括氨基酸序列LIN或由其组成。在一些实施例中,ENPP1多肽包括SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:11或由其组成。在一些实施例中,ENPP1多肽包括SEQ ID NO:9或由其组成。在一些实施例中,ENPP1多肽包括SEQ ID NO:10或由其组成。在一些实施例中,ENPP1多肽包括SEQ ID NO:11或由其组成。

[0033] 在一些实施例中,制剂包括:ENPP1多肽、柠檬酸三钠二水合物、氯化钙二水合物、蔗糖、D(-)甘露糖醇和聚山梨醇酯20。在一些实施例中,ENPP1多肽包括SEQ ID NO:13或由其组成。在一些实施例中,ENPP1多肽包括SEQ ID NO:14或由其组成。在一些实施例中,ENPP1多肽包括SEQ ID NO:15或由其组成。在一些实施例中,ENPP1多肽包括Fc结构域。Fc结构域可以包括SEQ ID NO:12中所描绘的氨基酸序列或由其组成。在一些实施例中,ENPP1多肽包括连接ENPP1多肽部分和Fc结构域的接头氨基酸序列。在一些实施例中,接头氨基酸序列包括氨基酸序列LIN或由其组成。在一些实施例中,ENPP1多肽包括SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:11或由其组成。在一些实施例中,ENPP1多肽包括SEQ ID NO:9或由其组成。在一些实施例中,ENPP1多肽包括SEQ ID NO:10或由其组成。在一些实施例中,ENPP1多

肽包括SEQ ID NO:11或由其组成。

[0034] 在一些实施例中,制剂包括每0.5ml最终复原体积:约25mg的ENPP1多肽、约2.94mg的柠檬酸三钠二水合物、约0.15mg的氯化钙二水合物、约30mg的蔗糖、约7.5mg的D(-)甘露糖醇和约0.25mg的聚山梨糖醇(例如,PS20)。在一些实施例中,ENPP1多肽包括SEQ ID NO:13或由其组成。在一些实施例中,ENPP1多肽包括SEQ ID NO:14或由其组成。在一些实施例中,ENPP1多肽包括SEQ ID NO:15或由其组成。在一些实施例中,ENPP1多肽包括Fc结构域。Fc结构域可以包括SEQ ID NO:12中所描绘的氨基酸序列或由其组成。在一些实施例中,ENPP1多肽包括连接ENPP1多肽部分和Fc结构域的接头氨基酸序列。在一些实施例中,接头氨基酸序列包括氨基酸序列LIN或由其组成。在一些实施例中,ENPP1多肽包括SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:11或由其组成。在一些实施例中,ENPP1多肽包括SEQ ID NO:9或由其组成。在一些实施例中,ENPP1多肽包括SEQ ID NO:10或由其组成。在一些实施例中,ENPP1多肽包括SEQ ID NO:11或由其组成。

[0035] 在一些实施例中,制剂可以在无菌可注射溶液中复原。在一些实施例中,制剂可以在复原溶液或无菌水中复原。在一些实施例中,复原溶液包括药学上可接受的载体和/或添加剂。在一些实施例中,药学上可接受的载体选自盐水溶液、纯化水或无菌注射用水。在一些实施例中,制剂在小于100秒、80秒、70秒、68秒、65秒或60秒的时段内完全复原。

[0036] 在一些实施例中,复原制剂包括:至少或约50mg/mL的ENPP1多肽、约20mM的柠檬酸盐(约pH 6.3)、约2mM的氯化钙、约175mM的蔗糖、约82mM的甘露糖醇和约0.05%w/v的聚山梨醇酯。在一些实施例中,ENPP1多肽包括SEQ ID NO:13或由其组成。在一些实施例中,ENPP1多肽包括SEQ ID NO:14或由其组成。在一些实施例中,ENPP1多肽包括SEQ ID NO:15或由其组成。在一些实施例中,ENPP1多肽包括Fc结构域。Fc结构域可以包括SEQ ID NO:12中所描绘的氨基酸序列或由其组成。在一些实施例中,ENPP1多肽包括连接ENPP1多肽部分和Fc结构域的接头氨基酸序列。在一些实施例中,接头氨基酸序列包括氨基酸序列LIN或由其组成。在一些实施例中,ENPP1多肽包括SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:11或由其组成。

[0037] 在一些实施例中,复原制剂包括:至少或约50mg/mL的ENPP1多肽、约20mM的柠檬酸盐(约pH 6.3)、约2mM的氯化钙、约175mM的蔗糖、约82mM的(D)甘露糖醇和约0.05%w/v的聚山梨醇酯20。在一些实施例中,ENPP1多肽包括SEQ ID NO:13或由其组成。在一些实施例中,ENPP1多肽包括SEQ ID NO:14或由其组成。在一些实施例中,ENPP1多肽包括SEQ ID NO:15或由其组成。在一些实施例中,ENPP1多肽包括Fc结构域。Fc结构域可以包括SEQ ID NO:12中所描绘的氨基酸序列或由其组成。在一些实施例中,ENPP1多肽包括连接ENPP1多肽部分和Fc结构域的接头氨基酸序列。在一些实施例中,接头氨基酸序列包括氨基酸序列LIN或由其组成。在一些实施例中,ENPP1多肽包括SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:11或由其组成。

[0038] 在一些实施例中,复原制剂包括:至少或约50mg/mL的ENPP1多肽、约20mM的柠檬酸盐(约pH 6.3)、约88mM的蔗糖、约82mM的甘露糖醇、约2mM的氯化钙和约0.05%的聚山梨醇酯20。在一些实施例中,ENPP1多肽包括SEQ ID NO:13或由其组成。在一些实施例中,ENPP1多肽包括SEQ ID NO:14或由其组成。在一些实施例中,ENPP1多肽包括SEQ ID NO:15或由其组成。在一些实施例中,ENPP1多肽包括Fc结构域。Fc结构域可以包括SEQ ID NO:12中所描

绘的氨基酸序列或由其组成。在一些实施例中,ENPP1多肽包括连接ENPP1多肽部分和Fc结构域的接头氨基酸序列。在一些实施例中,接头氨基酸序列包括氨基酸序列LIN或由其组成。在一些实施例中,ENPP1多肽包括SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:11或由其组成。

[0039] 在一些实施例中,复原制剂包括:至少或约50mg/mL的ENPP1多肽、约20mM的柠檬酸盐(约pH 6.3)、约263mM的蔗糖、约2mM的氯化钙和约0.05%的聚山梨醇酯20。在一些实施例中,ENPP1多肽包括SEQ ID NO:13或由其组成。在一些实施例中,ENPP1多肽包括SEQ ID NO:14或由其组成。在一些实施例中,ENPP1多肽包括SEQ ID NO:15或由其组成。在一些实施例中,ENPP1多肽包括Fc结构域。Fc结构域可以包括SEQ ID NO:12中所描绘的氨基酸序列或由其组成。在一些实施例中,ENPP1多肽包括连接ENPP1多肽部分和Fc结构域的接头氨基酸序列。在一些实施例中,接头氨基酸序列包括氨基酸序列LIN或由其组成。在一些实施例中,ENPP1多肽包括SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:11或由其组成。

[0040] 在一些实施例中,冻干制剂在-80℃至40℃下表现出长期稳定性。在一些实施例中,冻干制剂具有至少3、6、12、24、36、48或60个月的保质期。在一些实施例中,复原制剂具有至少1、2、3、4、5、6、12、18、24、48或60小时的保质期。

[0041] 在一些实施例中,冻干制剂在5℃下储存时货架稳定至少36个月。在一些实施例中,冻干制剂在5℃下储存时货架稳定48个月。冻干制剂在室温(RT-25℃)下储存时货架稳定至少24个月。制剂在室温下储存时货架稳定至少36个月。制剂在室温下储存时货架稳定48个月。制剂在40℃下储存时货架稳定至少6个月。制剂在40℃下储存时货架稳定12个月。

[0042] 在一些实施例中,复原制剂在室温下在1mg/ml至50mg/ml范围内的浓度下稳定至少8小时。在一些实施例中,复原制剂在5℃下在1mg/ml至50mg/ml范围内的浓度下稳定至少24小时。

[0043] 在一些实施例中,复原制剂在5℃下在1mg/ml至10mg/ml范围内的浓度下稳定至少12小时。在一些实施例中,复原制剂在5℃下在1mg/ml下稳定至少12小时。在一些实施例中,复原制剂在5℃下在2.5mg/ml下稳定至少12小时。在一些实施例中,复原制剂在5℃下在10mg/ml下稳定至少12小时。

[0044] 在一些实施例中,将复原制剂储存在小瓶中。在一些实施例中,将复原制剂储存在注射器中。在一些实施例中,复原制剂在5℃储存在小瓶中时稳定至少12小时。在一些实施例中,复原制剂在5℃储存在注射器中时稳定至少8小时。

[0045] 因此,本公开的特征还在于一种包括冻干制剂的小瓶,所述冻干制剂包括ENPP1,优选ENPP1-Fc以及缓冲液、填充剂、稳定剂和/或表面活性剂中的一种或多种,其中所述小瓶包括1-100mg,例如1mg、5mg、10mg、15mg、20mg、25mg或50mg或100mg的ENPP1或ENPP1-Fc。

[0046] 在一些实施例中,小瓶包括冻干制剂,所述冻干制剂包括ENPP1、优选ENPP1-Fc以及缓冲液、填充剂、稳定剂和/或表面活性剂中的一种或多种,其中所述小瓶包括100mg的ENPP1或ENPP1-Fc。

[0047] 在一些实施例中,小瓶包括冻干制剂,所述冻干制剂包括ENPP1、优选ENPP1-Fc以及缓冲液、填充剂、稳定剂和/或表面活性剂中的一种或多种,其中所述小瓶包括50mg的ENPP1或ENPP1-Fc。

[0048] 在一些实施例中,小瓶包括冻干制剂,所述冻干制剂包括ENPP1、优选ENPP1-Fc以

及缓冲液、填充剂、稳定剂和/或表面活性剂中的一种或多种,其中所述小瓶包括25mg的ENPP1或ENPP1-Fc。

[0049] 在一些实施例中,小瓶包括冻干制剂,所述冻干制剂包括ENPP1、优选ENPP1-Fc以及缓冲液、填充剂、稳定剂和/或表面活性剂中的一种或多种,其中所述小瓶包括10mg的ENPP1或ENPP1-Fc。

[0050] 在一些实施例中,小瓶包括冻干制剂,所述冻干制剂包括ENPP1、优选ENPP1-Fc以及缓冲液、填充剂、稳定剂和/或表面活性剂中的一种或多种,其中所述小瓶包括5mg的ENPP1或ENPP1-Fc。

[0051] 在一些实施例中,小瓶包括冻干制剂,所述冻干制剂包括ENPP1、优选ENPP1-Fc以及缓冲液、填充剂、稳定剂和/或表面活性剂中的一种或多种,其中所述小瓶包括2.5mg的ENPP1或ENPP1-Fc。

[0052] 在一些实施例中,小瓶包括冻干制剂,所述冻干制剂包括ENPP1、优选ENPP1-Fc以及缓冲液、填充剂、稳定剂和/或表面活性剂中的一种或多种,其中所述小瓶包括1mg的ENPP1或ENPP1-Fc。

[0053] 因此,本公开的特征还在于一种小瓶,所述小瓶包括制剂,所述制剂包括复原的ENPP1、优选ENPP1-Fc以及缓冲液、填充剂、稳定剂和/或表面活性剂中的一种或多种,其中所述小瓶包括0.1mg/ml-100mg/ml,例如0.1mg/ml、1mg/ml、5mg/ml、10mg/ml、15mg/ml、20mg/ml、25mg/ml或50mg/ml或100mg/ml的ENPP1或ENPP1-Fc。

[0054] 在一些实施例中,小瓶包括制剂,所述制剂包括复原的ENPP1、优选ENPP1-Fc以及缓冲液、填充剂、稳定剂和/或表面活性剂中的一种或多种,其中所述小瓶包括100mg/ml的ENPP1或ENPP1-Fc。

[0055] 在一些实施例中,小瓶包括制剂,所述制剂包括复原的ENPP1、优选ENPP1-Fc以及缓冲液、填充剂、稳定剂和/或表面活性剂中的一种或多种,其中所述小瓶包括50mg/ml的ENPP1或ENPP1-Fc。

[0056] 在一些实施例中,小瓶包括制剂,所述制剂包括复原的ENPP1、优选ENPP1-Fc以及缓冲液、填充剂、稳定剂和/或表面活性剂中的一种或多种,其中所述小瓶包括25mg/ml的ENPP1或ENPP1-Fc。

[0057] 在一些实施例中,小瓶包括制剂,所述制剂包括复原的ENPP1、优选ENPP1-Fc以及缓冲液、填充剂、稳定剂和/或表面活性剂中的一种或多种,其中所述小瓶包括10mg/ml的ENPP1或ENPP1-Fc。

[0058] 在一些实施例中,小瓶包括制剂,所述制剂包括复原的ENPP1、优选ENPP1-Fc以及缓冲液、填充剂、稳定剂和/或表面活性剂中的一种或多种,其中所述小瓶包括5mg/ml的ENPP1或ENPP1-Fc。

[0059] 在一些实施例中,小瓶包括制剂,所述制剂包括复原的ENPP1、优选ENPP1-Fc以及缓冲液、填充剂、稳定剂和/或表面活性剂中的一种或多种,其中所述小瓶包括2.5mg/ml的ENPP1或ENPP1-Fc。

[0060] 在一些实施例中,小瓶包括制剂,所述制剂包括复原的ENPP1、优选ENPP1-Fc以及缓冲液、填充剂、稳定剂和/或表面活性剂中的一种或多种,其中所述小瓶包括1mg/ml的ENPP1或ENPP1-Fc。

[0061] 在一些实施例中,小瓶包括制剂,所述制剂包括复原的ENPP1、优选ENPP1-Fc以及缓冲液、填充剂、稳定剂和/或表面活性剂中的一种或多种,其中所述小瓶包括0.5mg/ml的ENPP1或ENPP1-Fc。

[0062] 在一些实施例中,小瓶包括制剂,所述制剂包括复原的ENPP1、优选ENPP1-Fc以及缓冲液、填充剂、稳定剂和/或表面活性剂中的一种或多种,其中所述小瓶包括0.1mg/ml的ENPP1或ENPP1-Fc。

[0063] 因此,本公开的特征还在于一种包括冻干制剂的注射器,所述冻干制剂包括ENPP1、优选ENPP1-Fc以及缓冲液、填充剂、稳定剂和/或表面活性剂中的一种或多种,其中所述小瓶包括0.1-100mg,例如0.1mg、1mg、5mg、10mg、15mg、20mg、25mg或50mg或100mg的ENPP1或ENPP1-Fc。

[0064] 在一些实施例中,注射器包括冻干制剂,所述冻干制剂包括ENPP1、优选ENPP1-Fc以及缓冲液、填充剂、稳定剂和/或表面活性剂中的一种或多种,其中所述小瓶包括100mg的ENPP1或ENPP1-Fc。

[0065] 在一些实施例中,注射器包括冻干制剂,所述冻干制剂包括ENPP1、优选ENPP1-Fc以及缓冲液、填充剂、稳定剂和/或表面活性剂中的一种或多种,其中所述小瓶包括50mg的ENPP1或ENPP1-Fc。

[0066] 在一些实施例中,注射器包括冻干制剂,所述冻干制剂包括ENPP1、优选ENPP1-Fc以及缓冲液、填充剂、稳定剂和/或表面活性剂中的一种或多种,其中所述小瓶包括25mg的ENPP1或ENPP1-Fc。

[0067] 在一些实施例中,注射器包括冻干制剂,所述冻干制剂包括ENPP1、优选ENPP1-Fc以及缓冲液、填充剂、稳定剂和/或表面活性剂中的一种或多种,其中所述小瓶包括10mg的ENPP1或ENPP1-Fc。

[0068] 在一些实施例中,注射器包括冻干制剂,所述冻干制剂包括ENPP1、优选ENPP1-Fc以及缓冲液、填充剂、稳定剂和/或表面活性剂中的一种或多种,其中所述小瓶包括5mg的ENPP1或ENPP1-Fc。

[0069] 在一些实施例中,注射器包括冻干制剂,所述冻干制剂包括ENPP1、优选ENPP1-Fc以及缓冲液、填充剂、稳定剂和/或表面活性剂中的一种或多种,其中所述小瓶包括2.5mg的ENPP1或ENPP1-Fc。

[0070] 在一些实施例中,注射器包括冻干制剂,所述冻干制剂包括ENPP1、优选ENPP1-Fc以及缓冲液、填充剂、稳定剂和/或表面活性剂中的一种或多种,其中所述小瓶包括1mg的ENPP1或ENPP1-Fc。

[0071] 在一些实施例中,注射器包括冻干制剂,所述冻干制剂包括ENPP1、优选ENPP1-Fc以及缓冲液、填充剂、稳定剂和/或表面活性剂中的一种或多种,其中所述小瓶包括0.5mg的ENPP1或ENPP1-Fc。

[0072] 在一些实施例中,注射器包括冻干制剂,所述冻干制剂包括ENPP1、优选ENPP1-Fc以及缓冲液、填充剂、稳定剂和/或表面活性剂中的一种或多种,其中所述小瓶包括0.1mg的ENPP1或ENPP1-Fc。

[0073] 因此,本公开的特征还在于一种包括制剂的注射器,所述制剂包括复原的ENPP1、优选ENPP1-Fc以及缓冲液、填充剂、稳定剂和/或表面活性剂中的一种或多种,其中所述小

瓶包括0.1mg/ml-100mg/ml,例如0.1mg/ml、1mg/ml、5mg/ml、10mg/ml、15mg/ml、20mg/ml、25mg/ml或50mg/ml或100mg/ml的ENPP1或ENPP1-Fc。

[0074] 在一些实施例中,注射器包括制剂,所述制剂包括复原的ENPP1、优选ENPP1-Fc以及缓冲液、填充剂、稳定剂和/或表面活性剂中的一种或多种,其中所述小瓶包括100mg/ml的ENPP1或ENPP1-Fc。

[0075] 在一些实施例中,注射器包括制剂,所述制剂包括复原的ENPP1、优选ENPP1-Fc以及缓冲液、填充剂、稳定剂和/或表面活性剂中的一种或多种,其中所述小瓶包括50mg/ml的ENPP1或ENPP1-Fc。

[0076] 在一些实施例中,注射器包括制剂,所述制剂包括复原的ENPP1、优选ENPP1-Fc以及缓冲液、填充剂、稳定剂和/或表面活性剂中的一种或多种,其中所述小瓶包括25mg/ml的ENPP1或ENPP1-Fc。

[0077] 在一些实施例中,注射器包括制剂,所述制剂包括复原的ENPP1、优选ENPP1-Fc以及缓冲液、填充剂、稳定剂和/或表面活性剂中的一种或多种,其中所述小瓶包括10mg/ml的ENPP1或ENPP1-Fc。

[0078] 在一些实施例中,注射器包括制剂,所述制剂包括复原的ENPP1、优选ENPP1-Fc以及缓冲液、填充剂、稳定剂和/或表面活性剂中的一种或多种,其中所述小瓶包括5mg/ml的ENPP1或ENPP1-Fc。

[0079] 在一些实施例中,注射器包括制剂,所述制剂包括复原的ENPP1、优选ENPP1-Fc以及缓冲液、填充剂、稳定剂和/或表面活性剂中的一种或多种,其中所述小瓶包括2.5mg/ml的ENPP1或ENPP1-Fc。

[0080] 在一些实施例中,注射器包括制剂,所述制剂包括复原的ENPP1、优选ENPP1-Fc以及缓冲液、填充剂、稳定剂和/或表面活性剂中的一种或多种,其中所述小瓶包括1mg/ml的ENPP1或ENPP1-Fc。

[0081] 在一些实施例中,注射器包括制剂,所述制剂包括复原的ENPP1、优选ENPP1-Fc以及缓冲液、填充剂、稳定剂和/或表面活性剂中的一种或多种,其中所述小瓶包括0.5mg/ml的ENPP1或ENPP1-Fc。

[0082] 在一些实施例中,注射器包括制剂,所述制剂包括复原的ENPP1、优选ENPP1-Fc以及缓冲液、填充剂、稳定剂和/或表面活性剂中的一种或多种,其中所述小瓶包括0.1mg/ml的ENPP1或ENPP1-Fc。

[0083] 在一些实施例中,冻干的ENPP1、优选ENPP1-Fc多肽储存在小瓶中。在一些实施例中,小瓶包括0.1mg的冻干的ENPP1、优选ENPP1-Fc多肽。在一些实施例中,小瓶包括0.5mg的冻干的ENPP1、优选ENPP1-Fc多肽。在一些实施例中,小瓶包括1mg的冻干的ENPP1、优选ENPP1-Fc多肽。在一些实施例中,小瓶包括5mg的冻干的ENPP1、优选ENPP1-Fc多肽。在一些实施例中,小瓶包括10mg的冻干的ENPP1、优选ENPP1-Fc多肽。在一些实施例中,小瓶包括15mg的冻干的ENPP1、优选ENPP1-Fc多肽。

[0084] 在一些实施例中,小瓶包括25mg的冻干的ENPP1、优选ENPP1-Fc多肽。

[0085] 在其他实施例中,小瓶包括50mg的冻干的ENPP1、优选ENPP1-Fc多肽。

[0086] 在其他实施例中,小瓶包括100mg的冻干的ENPP1、优选ENPP1-Fc多肽。

[0087] 在一些实施例中,冻干的ENPP1-Fc制剂被复原以用于施用并且储存在注射器中。

在一些实施例中,注射器包括100mg/ml的ENPP1-Fc以用于施用或后续稀释。在一些实施例中,注射器包括50mg/ml的ENPP1-Fc以用于施用或后续稀释。在一些实施例中,注射器包括25mg/ml的ENPP1-Fc以用于施用或后续稀释。在一些实施例中,注射器包括20mg/ml的ENPP1-Fc以用于施用或后续稀释。在一些实施例中,注射器包括15mg/ml的ENPP1-Fc以用于施用或后续稀释。在一些实施例中,注射器包括10mg/ml的ENPP1-Fc以用于施用或后续稀释。在一些实施例中,注射器包括5mg/ml的ENPP1-Fc以用于施用或后续稀释。在一些实施例中,注射器包括4mg/ml的ENPP1-Fc以用于施用或后续稀释。在一些实施例中,注射器包括3mg/ml的ENPP1-Fc以用于施用或后续稀释。在一些实施例中,注射器包括2.5mg/ml的ENPP1-Fc以用于施用或后续稀释。在一些实施例中,注射器包括2mg/ml的ENPP1-Fc以用于施用或后续稀释。在一些实施例中,注射器包括1mg/ml的ENPP1-Fc以用于施用或后续稀释。在一些实施例中,注射器包括0.5mg/ml的ENPP1-Fc以用于施用或后续稀释。在一些实施例中,注射器包括0.1mg/ml的ENPP1-Fc以用于施用或后续稀释。

[0088] 在一些实施例中,ENPP1-Fc制剂以0.2mg/kg至1.8mg/ml范围内的剂量施用于成人。在一些实施例中,ENPP1-Fc制剂以0.2mg/kg至0.6mg/kg范围内的剂量施用于体重超过1kg的儿童和婴儿。在一些实施例中,ENPP1-Fc制剂以0.05mg/kg至0.2mg/kg范围内的剂量施用于体重低于1kg的早产儿。在一些实施例中,ENPP1-Fc制剂以0.2mg/kg的剂量范围施用于体重超过1kg的婴儿。在一些实施例中,ENPP1-Fc制剂以0.1mg/kg的剂量施用于体重低于1kg的早产儿。

[0089] 在一些实施例中,本文所述的冻干制剂中的任一种包括治疗有效剂量。

[0090] 在一些实施例中,本文所述的复原制剂中的任一种包括治疗有效剂量。

[0091] 在又一方面,本公开的特征在于一种用于生成或制备本文所述的冻干制剂中的任一种的方法。所述方法包括将ENPP1多肽(如包括ENPP1的催化结构域和免疫球蛋白的Fc区的融合多肽)与缓冲剂、稳定剂、盐、氨基酸和表面活性剂中的一种或多种混合。在一些实施例中,所述方法包括将ENPP1多肽与柠檬酸盐缓冲液、蔗糖、甘露糖醇、氯化钙和聚山梨醇酯20混合。

[0092] 在又一方面,本公开的特征在于一种用于生成包括ENPP1多肽的药物溶液的方法。所述方法包括使本文所述的冻干多肽制剂中的任一种与无菌复原溶液或无菌水接触,由此生成包括ENPP1多肽的复原溶液。在一些实施例中,复原溶液包括药学上可接受的载体和/或添加剂。在一些实施例中,药学上可接受的载体选自盐水溶液、纯化水或无菌注射用水。在一些实施例中,制剂在小于100秒、80秒、70秒、68秒、65秒或60秒的时段内完全复原。在一些实施例中,复原制剂包括:至少或约50mg/mL的ENPP1多肽、约20mM的柠檬酸盐(约pH 6.3)、约2mM的氯化钙、约175mM的蔗糖、约82mM的甘露糖醇和约0.05%w/v的聚山梨醇酯。在一些实施例中,复原制剂包括:至少或约50mg/mL的ENPP1多肽、约20mM的柠檬酸盐(约pH 6.3)、约2mM的氯化钙、约175mM的蔗糖、约82mM的(D)甘露糖醇和约0.05%w/v的聚山梨醇酯20。在一些实施例中,复原制剂包括:至少或约50mg/mL的ENPP1多肽、约20mM的柠檬酸盐(约pH 6.3)、约88mM的蔗糖、约82mM的甘露糖醇、约2mM的氯化钙和约0.05%的聚山梨醇酯20。在一些实施例中,复原制剂包括:至少或约50mg/mL的ENPP1多肽、约20mM的柠檬酸盐(约pH 6.3)、约263mM的蔗糖、约2mM的氯化钙和约0.05%的聚山梨醇酯20。在另一方面,本公开的特征在于一种通过用于生成本文所述的药物溶液的方法中的任一种制备的复原溶液。

[0093] 在又一方面,本公开的特征在于一种预防有此需要的受试者的血管钙化进展或减少所述受试者的血管钙化的方法。所述方法包括:以有效预防所述受试者的血管钙化进展或减少所述受试者的血管钙化的量向受试者施用本文所述的复原制剂中的任一种。

[0094] 在另一方面,本公开的特征在于一种用于预防患有ENPP1缺乏症的受试者的病理性钙化进展或减少所述受试者的病理性钙化的方法。在另一方面,本公开的特征在于一种用于治疗患有ENPP1缺乏症的受试者的方法。这些方法包括:以有效预防所述受试者的病理性钙化进展或减少所述受试者的病理性钙化的量向受试者施用本文所述的复原制剂中的任一种。

[0095] 在另一方面,本公开的特征在于一种用于预防患有ABCC6缺乏症的受试者的病理性钙化进展或减少所述受试者的病理性钙化的方法。在另一方面,本公开的特征在于一种用于治疗患有ABCC6缺乏症(如PXE)的受试者的方法。这些方法包括:以有效预防所述受试者的病理性钙化进展或减少所述受试者的病理性钙化的量向受试者施用本文所述的复原制剂中的任一种。

[0096] 在一些实施例中,复原制剂可以约0.1mg/kg、约0.2mg/kg受试者、约0.6mg/kg受试者或约1.8mg/kg受试者的剂量施用于受试者。

[0097] 在一些实施例中,复原制剂可以约0.1mg/kg、约0.2mg/kg、约0.3mg/kg、约0.4mg/kg、约0.5mg/kg、约0.6mg/kg、约0.7mg/kg、约0.8mg/kg、约0.9mg/kg、约1mg/kg、约1.1mg/kg、约1.2mg/kg、约1.3mg/kg、约1.4mg/kg、约1.5mg/kg、约1.6mg/kg、约1.7mg/kg或1.8mg/kg受试者的剂量施用于受试者。

[0098] 在又一方面,本公开的特征在于一种用于预防有此需要的受试者的组织钙化进展或减少所述受试者的组织钙化的方法,所述方法包括以有效预防所述受试者的组织钙化进展或减少所述受试者的组织钙化的量向所述受试者施用本文所述的复原制剂中的任一种。在一些实施例中,受试者患有或怀疑患有ENPP1缺乏症。在一些实施例中,受试者患有或怀疑患有ABCC6缺乏症(如弹性假黄瘤(PXE))。

[0099] 在又一方面,本公开的特征在于一种用于预防有此需要的受试者的病理性骨化进展或减少所述受试者的病理性骨化的方法。所述方法包括以有效预防所述受试者的病理性骨化进展或减少所述受试者的病理性骨化的量向受试者施用本文所述的复原制剂中的任一种。在一些实施例中,受试者患有或怀疑患有ENPP1缺乏症。在一些实施例中,受试者患有或怀疑患有ABCC6缺乏症(如弹性假黄瘤(PXE))。

[0100] 在又一方面,本公开的特征在于一种用于增加有此需要的受试者的循环焦磷酸盐(PPi)的方法。所述方法包括以有效增加受试者的循环PPi的量向受试者施用本文所述的复原制剂中的任一种。在一些实施例中,受试者患有或怀疑患有ENPP1缺乏症。在一些实施例中,受试者患有或怀疑患有ABCC6缺乏症(如弹性假黄瘤(PXE))。短语“NPP1缺乏的”或“ENPP1缺乏症”是指相对于NPP1蛋白的正常血清水平或NPP1的正常活性,NPP1蛋白的量或NPP1活性减少,其中此类减少导致病理性钙化和/或病理性骨化和/或PPi水平减少的疾病或病症。此类病理性疾病包含但不限于GAC1和ARHR2。如本文所使用的,ENPP1缺乏症不是指NPP1蛋白和/或NPP1活性的少量减少,这不会导致病理性钙化和/或病理性骨化的疾病或病症。如本文所使用的,“ABCC6缺乏型患者”或“ABCC6缺乏型受试者”是指具有ABCC6基因中的影响ABC66蛋白的活性和/或表达的至少一种致病性突变的患者。

[0101] 在另一方面,本公开的特征在于一种用于增加有此需要的受试者的焦磷酸酶活性的方法。所述方法包括以有效增加受试者的循环PPi的量向受试者施用本文所述的复原制剂中的任一种。在一些实施例中,受试者患有或怀疑患有ENPP1缺乏症。在一些实施例中,受试者患有或怀疑患有ABCC6缺乏症(如弹性假黄瘤(PXE))。术语“磷酸酶活性”是指ENPP1酶水解分子如ATP中的两个磷酸酯基团之间的焦磷酸酯键的能力。

[0102] 在本文所述的任何方法的一些实施例中,受试者患有涉及病理性钙化的病症。在本文所述的任何方法的一些实施例中,受试者患有涉及病理性骨化的病症。在本文所述的任何方法的一些实施例中,受试者患有以下病症或处于发展以下病症的风险中:病理性软组织钙化、动脉钙化、血管钙化、慢性肾脏疾病(CKD)、终末期肾脏疾病(ESRD)、钙化性尿毒症性小动脉病(CUA)、钙化防御、后纵韧带骨化症(OPLL)或低磷性佝偻病。

[0103] 在又一方面,本公开的特征在于一种用于治疗或改善受试者的ENPP1缺乏症的一种或多种症状的方法,所述方法包括向所述受试者施用本文所述的复原制剂中的任一种以改善所述受试者的ENPP1缺乏症的一种或多种症状。

[0104] 在另一方面,本公开的特征在于一种用于治疗患有ENPP1缺乏症的受试者的方法。所述方法包括向所述受试者施用本文所述的复原制剂中的任一种,由此治疗所述受试者。

[0105] 在又一方面,本公开的特征在于一种用于治疗或改善受试者的ABCC6缺乏症的一种或多种症状的方法,所述方法包括以有效改善所述受试者的ABCC6缺乏症的一种或多种症状的量向所述受试者施用本文所述的复原制剂中的任一种。

[0106] 在另一方面,本公开的特征在于一种用于治疗患有ABCC6缺乏症的受试者的方法,所述方法包括以有效治疗所述受试者的量向所述受试者施用所述复原制剂。

[0107] 在本文所述的任何方法的一些实施例中,复原制剂肠胃外施用。在本文所述的任何方法的一些实施例中,复原制剂经由皮下注射施用。在本文所述的任何方法的一些实施例中,复原制剂经由静脉内注射施用。在本文所述的任何方法的一些实施例中,复原制剂经由皮内注射施用。在本文所述的任何方法的一些实施例中,复原制剂经由肌肉注射施用。

[0108] 在本文所述的任何方法的一些实施例中,复原制剂是自施用的。在本文所述的任何方法的一些实施例中,制剂每天、每两天、三天、一周或一个月施用若干次。

[0109] 在本文所述的任何方法的一些实施例中,制剂的第二剂量(或附加剂量)在(自第一剂量或先前剂量)至少两天后、四天后、一周后或一个月后的合适时间间隔之后施用。

附图说明

[0110] 图1示出了野生型ENPP1前体蛋白(SEQ ID NO:1)的完整的未加工的氨基酸序列。胞质区域和跨膜区域被加下划线。潜在的N-糖基化位点为粗体。PSCAKE(残基99-104;加框)是可溶性ENPP1蛋白部分的起点,其包含SMB1(残基104-144)和SMB2(残基145-189)。

[0111] 图2示出了人ENPP1的胞质结构域(残基1-77)、跨膜结构域(TM)(残基77-100)、生长调节素-B样结构域-1(SMB1)(残基100-142)、生长调节素-B样结构域-2(SMB2)(残基142-187)、催化结构域和核酸酶结构域。

[0112] 图3示出了可溶性ENPP1多肽的氨基酸序列(SEQ ID NO:2)。

[0113] 图4A和图4B示出了各种脊椎动物可溶性ENPP1多肽和人可溶性ENPP1多肽(SEQ ID NO:4-8)的多序列比对。各种可溶性ENPP1多肽于以下物种相对应并且表示特定NCBI登录号

的区:小鼠(NCBI登录号NP_001295256.1;SEQ ID NO:4)、牛(NCBI登录号NP_001193141;SEQ ID NO:5)、兔子(NCBI登录号NP_001162404.1;SEQ ID NO:6)、人(NCBI登录号NP_006199.2;SEQ ID NO:1)和狒狒(NCBI登录号NP_001076211.2;SEQ ID NO:8)。

[0114] 图5是显示包括各种缓冲液组分的ENPP1-Fc制剂的汇总尺寸排阻色谱法(SEC)结果的条形图。数据以高分子量物种(HMW) %或主峰%显示。

[0115] 图6是显示包括缓冲液和赋形剂组分各种组合的冻干ENPP1-Fc多肽制剂的复原制剂的回收率百分比的条形图。

[0116] 图7是显示在5℃和40℃下包括缓冲液和赋形剂组分各种组合的冻干ENPP1-Fc多肽制剂的汇总酶促活性数据的条形图。活性数据以U/mg表示。

[0117] 图8是显示在5℃和40℃下包括缓冲液和赋形剂组分各种组合的冻干ENPP1-Fc多肽制剂的SEC数据的汇总的条形图。数据以高分子量物种(HMW)、主峰物种或低分子量物种(LMW)的丰度百分比显示。

[0118] 图9A和图9B是显示包括各种缓冲液、赋形剂和表面活性剂组分的冻干ENPP1-Fc多肽制剂的汇总SEC数据的条形图。在应力条件下测试所描绘的制剂,该应力条件包括以600rpm搅动(描绘为“搅动”)或5轮冷冻解冻循环(即,在-80℃下储存≥60分钟,然后在室温下解冻;描绘为“F/T”)。数据以HMW%(图9A)或主峰%(图9B)显示。

[0119] 图10是显示包括在琥珀酸盐和蔗糖缓冲液/添加剂背景中的各种辅因子的冻干ENPP1-Fc多肽制剂的汇总SEC数据的条形图。数据表示5℃下HMW和主峰物种的丰度百分比。

[0120] 图11是显示包括在琥珀酸盐、蔗糖和PS20缓冲液/添加剂/表面活性剂背景中的各种辅因子冻干ENPP1-Fc多肽制剂的汇总SEC数据的条形图。数据表示在40℃下温育约6天的HMW和主峰物种的丰度百分比。

[0121] 图12A和12B是显示包括在琥珀酸盐、蔗糖和PS20缓冲液/添加剂/表面活性剂背景中的各种辅因子的冻干ENPP1-Fc多肽制剂的汇总SEC数据的条形图。数据表示在5℃下(图12B)或在40℃下温育约6天(图12A)的HMW、LMW和主峰物种的丰度百分比。

[0122] 图13是显示冻干ENPP1-Fc多肽制剂样品的汇总渗透压数据的条形图。

[0123] 图14是显示-75℃、5℃或40℃下储存至多13周的包括若干优选的缓冲液/赋形剂/添加剂/表面活性剂组合的冻干ENPP1-Fc多肽制剂样品的汇总SEC数据的条形图。数据表示在不同制剂/条件下的HMW和主峰物种的丰度百分比。

[0124] 图15是显示在5℃、25℃或40℃下储存3个月的时间段的两种优选冻干ENPP1多肽制剂(稳定性形式A和稳定性形式B)的汇总SEC数据的图。

[0125] 图16是显示在5℃、25℃或40℃下储存3个月的时间段的两种优选冻干ENPP1多肽制剂(稳定性形式A和稳定性形式B)的汇总酶促活性数据的图。

[0126] 图17是显示在5℃下储存不同时间段的冻干ENPP1-Fc多肽制剂的汇总SEC数据的图。

[0127] 图18是示出在25℃下储存不同时间段的冻干ENPP1-Fc多肽制剂的汇总SEC数据的图。

[0128] 图19是示出在40℃下储存不同时间段的冻干ENPP1-Fc多肽制剂的汇总SEC数据的图。

[0129] 图20是显示在如5℃、25℃和40℃下储存不同时间段的冻干ENPP1-Fc多肽制剂的

汇总酶促活性数据的图。

[0130] 图21是显示以不同的时间间隔储存在注射器或小瓶中的冻干ENPP1-Fc多肽的复原制剂的回收率百分比的条形图。

[0131] 图22是显示以不同的时间间隔储存在注射器或小瓶中的冻干ENPP1-Fc多肽的汇总酶促活性数据的条形图。

[0132] 图23是显示以不同的时间间隔储存在注射器或小瓶中的冻干ENPP1-Fc多肽的复原制剂的回收率百分比的图。

[0133] 图24是显示以不同的时间间隔储存在注射器或小瓶中的冻干ENPP1-Fc多肽的汇总酶促活性数据的图。

具体实施方式

[0134] 1. 概述

[0135] 本申请提供了包括ENPP1多肽的稳定冻干制剂及其在治疗与ENPP1相关的疾病中的用途。在某些方面,本公开涉及ENPP1多肽的冻干制剂及其用途(例如,治疗、预防和/或降低病理性钙化和/或骨化的进展速率和/或严重程度或者病理性钙化和/或骨化的一种或多种并发症)。本申请提供了冻干制剂,其展示出增强的稳定性、增加的保质期以及较低水平的高分子量物种(HMW)和聚集体。HMW物种可以是二聚体、四聚体和高阶聚集体(HMW1/HMW2)。

[0136] ENPP1多肽已显示可有效治疗某些异位组织钙化的疾病。ENPP1-Fc已显示减少用于GACI(婴儿的全身动脉钙化)的小鼠模型中的全身动脉钙化,所述GACI是在婴儿中发生的并且涉及广泛动脉钙化的严重疾病(Albright等人,2015,《自然通讯(Nature Comm.)》,10006)。ENPP1的融合蛋白也已被描述用于治疗严重组织钙化的疾病(参见例如,PCT申请公开第W0 2014/126965号和第W0 2016/187408号),并且已经描述了包括带负电荷的骨靶向结构域的ENPP1的融合蛋白用于治疗GACI(PCT申请公开第W0 2011/113027号和第W0 2012/125182号)。

[0137] 哺乳动物ENPP1多肽、突变体或其突变片段先前已在Braddock等人的国际PCT申请公开第W0/2014/126965号、Braddock等人的第W0/2016/187408号、Braddock等人的第W0/2017/087936号和Braddock等人的第W02018/027024号中描述,所述文献中的全部内容通过引用以其整体并入本文。

[0138] 2. 冻干制剂

[0139] 在某些方面,本公开考虑使用冻干ENPP1制剂来治疗或预防与ENPP1多肽的异常活性相关联的疾病或病状。

[0140] 在一个方面,本公开的ENPP1制剂被冻干。在冻干期间,ENPP1多肽从水相转化为无定形固相,这被认为保护蛋白质免受化学和/或构象不稳定的影响。冻干使用本领域常见的技术进行,并且针对稳定性、保质期以及降低的高分子量(HMW)物种和聚集体水平来优化该冻干制剂。Tang等人,《药物综述(Pharm Res.)》21:191-200,(2004)和Chang等人,《药物综述(Pharm Res.)》13:243-9(1996)。所公开的冻干ENPP1制剂有助于使蛋白质稳定以抗制造、运输和储存的应力。冻干制剂中使用的赋形剂和添加剂是制剂的必需组分,并且因此需要安全且被患者良好耐受。对于蛋白质药物,赋形剂和添加剂的选择特别重要,因为它们会

影响药物的功效和免疫原性。赋形剂和添加剂还可用于降低高浓度ENPP1多肽制剂的粘度,以便实现其递送并增强患者便利性。本文公开的制剂赋形剂和添加剂提供抗这些应力的稳定性。常见赋形剂是本领域已知的,并且可见于Powell等人,肠外制剂赋形剂简编(Compendium of Excipients for Parenteral Formulations) (1998),《PDA制药科学与技术杂志(PDAJ.Pharm.Sci.Technology)》,52:238-311。

[0141] 在某些实施例中,ENPP1制剂包括稳定剂。这些稳定剂可基于它们使蛋白质稳定以抗各种化学和物理应力的机制进行分类。一些稳定剂用于减轻特定应力的影响或调节具体蛋白质的特定敏感性。其他稳定剂对蛋白质的物理和共价稳定性具有更一般的影响。鉴于本文提供的教导和指导,本领域技术人员将知道在任何特定制剂中可以包含多少量或范围的稳定剂来实现本公开的ENPP1制剂,该制剂可能促进ENPP1多肽的保留和稳定性。

[0142] 在某些实施例中,本文公开的ENPP1制剂包括填充剂。包含此类填充剂的目的是长期稳定,使含有少量有效活性成分的固体制剂(因此通常称为“填充剂”、“填料”或“稀释剂”)增重,或赋予最终剂型中的活性成分治疗增强,如促进药物吸收、降低粘度或增强溶解度。

[0143] 本文公开的ENPP1制剂包括缓冲剂、稳定剂、表面活性剂、糖、盐和氨基酸,其在下文更详细地描述。

[0144] 本领域普通技术人员将认识到,本文所述的赋形剂的浓度在特定制剂内共享相互依赖性。举例来说,在一个方面,填充剂的浓度降低,其中例如存在高蛋白质浓度,或其中例如存在高稳定剂浓度。另外,本领域普通技术人员将认识到,为了维持其中不存在填充剂的特定制剂的等渗性,可以相应地增加稳定剂的浓度(即,将使用“张力调节”量的稳定剂。添加赋形剂和其他添加剂以赋予或增强可制造性和/或最终产品质量,如药物产品(例如,蛋白质)的稳定性和递送。本文公开的ENPP1制剂包括合适的赋形剂,其增强合适的稳定性、安全性和可销售性。

[0145] 在某些实施例中,冻干的ENPP1制剂包括缓冲液、填充剂、稳定剂和/或表面活性剂中的至少一种或多种。在一些实施例中,在冻干步骤期间或在复原期间聚集成为问题的情况下,选择表面活性剂以帮助减少HMW物种的形成。包含适当的缓冲剂以在制造(例如,稀释、无菌过滤、填充等)期间和在冻干产物复原之后将制剂维持在pH的稳定区内。下表提供了可用于冻干蛋白质制剂的某些赋形剂组分:

[0146]

表 1: 冻干蛋白制剂的赋形剂组分	
赋形剂组分	冻干制剂中的功能
缓冲液	在加工期间和复原时维持制剂的 pH
稳定剂	稳定剂包含冷冻保护剂和冻干保护剂, 如多元醇、糖和多糖 冷冻保护剂保护蛋白质免受冻结应力 冻干保护剂使蛋白质稳定在冷冻干燥状态下
填充剂	用于增强产品美观性并防止爆裂 为冻干饼提供结构强度 实例包含甘露糖醇和蔗糖
表面活性剂	如果冻干过程期间的聚集成问题, 则采用 可用于减少复原时间 实例包含聚山梨醇酯 20 和 80
抗氧化剂	极大地延迟冻干饼中的氧化反应
金属离子/螯合剂	如果仅包含特定金属离子作为辅因子, 或如果蛋白酶活性需要金属, 则可以包含
防腐剂	仅用于多剂量制剂 提供对制剂中微生物生长的防护 通常包含在复原稀释剂(例如, bWFI)中

[0147] (a) 缓冲液和缓冲剂

[0148] 通常, 观察到药理学活性多肽制剂的稳定性在窄 pH 范围内是最大的。需要在配制前研究早期鉴定最佳稳定性的 pH 范围。若干方法(如加速稳定性研究和量热筛选研究)可用于此努力(Remmele R.L.Jr. 等人,《生物化学(Biochemistry)》, 38(16):5241-7(1999))。一旦制剂被最终确定, 则蛋白质必须在其保质期内制造和维持。因此, 缓冲剂几乎总是用于控制制剂中的 pH。

[0149] 选择缓冲液时必须考虑若干因素。首先, 缓冲液物种及其浓度必须基于其 pKa 和期望的制剂 pH 来定义。同样重要的是确保缓冲液与蛋白质和其他制剂赋形剂相容, 并且不催化任何降解反应。需要考虑的第三重要方面是在施用时间缓冲液可能诱导的刺痛和刺激的感觉。对于经由皮下(SC)或肌内(IM)途径施用的药物, 刺痛和刺激的可能性更大, 其中与通过 IV 途径施用相比, 药物溶液在该位点保持相对更长的时间段, 在该 IV 途径中制剂在施用时被快速稀释到血液中。对于通过直接 IV 输注施用的制剂, 需要监测缓冲液(和任何其它制剂组分)的总量。必须特别注意以磷酸钾缓冲液的形式施用的钾离子, 其可以在患者中诱导心血管效应(Hollander-Rodriguez J C 等人,《美国家庭医生(Am.Fam.Physician.)》, 73(2):283-90(2006))。

[0150] 冻干制剂的缓冲液需要额外考虑。一些缓冲液如磷酸钠可在冷冻期间结晶出蛋白质无定形相, 从而导致 pH 改变。其他常见的缓冲液如乙酸盐和咪唑可以在冻干过程中升华或蒸发, 从而在冻干期间或在复原之后改变制剂的 pH。

[0151] 在某些实施例中, 用于缓冲如本文所示的 ENPP1 制剂的示例性缓冲剂包含但不限于有机酸、琥珀酸盐、磷酸盐、乙酸盐、柠檬酸盐、Tris、HEPES 和氨基酸或氨基酸的混合物, 包含但不限于天冬氨酸盐、组氨酸、精氨酸和甘氨酸。在某些实施例中, 缓冲剂是琥珀酸盐、柠檬酸盐和磷酸盐。在一个实施例中, ENPP1 制剂中存在的缓冲体系被选择为生理相容的并且维持药物制剂的期望 pH。在另一个实施例中, 溶液的 pH 在 pH 2.0 与 pH 12.0 之间。例如, 在

各种实施例中,溶液的pH可以是5.5、5.7、6.0、6.3、6.5、6.7、7.0、7.3、7.5、7.7、8.0、8.3、8.5、8.7、9.0、9.3、9.5、9.7或10.0。

[0152] pH缓冲化合物可以适于将ENPP1制剂的pH维持在预定水平的任何量存在。当使用适当低水平的缓冲液时,可以避免结晶和pH变化。在一个实施例中,pH缓冲浓度在0.1mM与500mM(1M)之间。例如,设想pH缓冲剂为至少0.1、0.5、0.7、0.8、0.9、1.0、1.2、1.5、1.7、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、40、50、60、70、80、90、100、200或500mM。在一些实施例中,缓冲剂在溶液中复原时维持范围为pH 6-7的pH。在一些实施例中,缓冲剂在溶液中复原时维持范围为pH 7-8的pH。

[0153] 用于缓冲如本文所示的ENPP1制剂的示例性pH缓冲剂包含但不限于有机酸、琥珀酸盐、磷酸盐、乙酸盐、柠檬酸盐、Tris、HEPES和氨基酸或氨基酸的混合物。在一些实施例中,缓冲剂将高分子量物种的形成减少至少10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%。

[0154] (b) 稳定剂和填充剂

[0155] 在本药物制剂的一个实施例中,添加稳定剂(或稳定剂的组合)以防止或减少储存诱导的聚集和化学降解。复原后的混浊或浑浊溶液通常指示蛋白质已沉淀或至少聚集。术语“稳定剂”意指能够防止聚集或化学降解(例如,自溶、脱酰胺化、氧化等)的赋形剂。在某些实施例中,本文提供的ENPP1制剂包含稳定剂,如但不限于蔗糖、海藻糖、甘露糖、麦芽糖、乳糖、葡萄糖、棉子糖、纤维二糖、龙胆二糖、异麦芽糖、阿拉伯糖、葡糖胺、果糖、甘露糖醇、山梨糖醇、多羟基化合物,包含多糖,如葡聚糖、淀粉、羟乙基淀粉、环糊精、N-甲基吡咯烷酮(N-methyl pyrrolidene)、纤维素和透明质酸[Carpenter等人,《生物标准开发(Develop.Biol.Standard)》74:225,(1991)]。在本公开的一个实施例中,蔗糖和甘露糖醇用作本文公开的ENPP1制剂中的稳定剂。在本公开的另一个实施例中,蔗糖用作稳定剂。

[0156] 在某些实施例中,ENPP1制剂包括浓度为约0.1、0.5、0.7、0.8、0.9、1.0、1.2、1.5、1.7、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、500、700、900或1000mM的稳定剂。同样,在本公开的某些实施例中,稳定剂以约0.005、0.01、0.02、0.03、0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、0.1、0.5、0.7、0.8、0.9、1.0、1.2、1.5、1.7、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20%w/v的浓度掺入。在其他实施例中,ENPP1制剂还包含适当量的填充剂和渗透压调节剂。在本公开的各种实施例中,填充剂包含例如聚合物,如葡聚糖、聚乙烯吡咯烷酮、羧甲基纤维素、乳糖、山梨糖醇、海藻糖或木糖醇。在本公开的各种实施例中,填充剂以约0.1、0.5、0.7、0.8、0.9、1.0、1.2、1.5、1.7、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、500、700、900或1000mM的浓度掺入。

[0157] (c) 表面活性剂

[0158] 在某些实施例中,本文公开的ENPP1制剂可以另外包含表面活性剂。表面活性剂通常用于蛋白质制剂中以防止表面诱导的降解。表面活性剂是两亲性分子,其具有在界面位置战胜蛋白质(和/或促进结构改变的蛋白质分子的适当重折叠)的能力。表面活性剂分子的疏水部分占据界面位置(例如,空气/液体),而分子的亲水部分保持朝向本体溶剂定向。在足够浓度下(通常在洗涤剂的关键胶束浓度左右),表面活性剂分子的表面层用于防止蛋白质分子吸附在界面处。因此,使表面诱导的降解最小化。本文所涵盖的表面活性剂包含但

不限于脱水山梨糖醇聚乙氧基化物的脂肪酸酯,即聚山梨醇酯20和聚山梨醇酯80。两者仅在脂肪族链的长度上不同,该脂肪族链分别赋予分子C-12和C-18疏水性。因此,聚山梨醇酯-80比聚山梨醇酯-20更具表面活性并且具有更低的临界胶束浓度。

[0159] 洗涤剂还可以影响蛋白质的热力学构象稳定性。非离子表面活性剂通常可用于蛋白质稳定。离子表面活性剂(洗涤剂)通常使蛋白质不稳定。这里,给定洗涤剂赋形剂的效果将再次是蛋白质特异性的。例如,聚山梨醇酯已显示出降低一些蛋白质的稳定性并增加其他蛋白质的稳定性。蛋白质的洗涤剂不稳定可以根据洗涤剂分子的疏水尾部来合理化,该洗涤剂分子可以参与与部分或完全展开的蛋白质状态的特异性结合。这些类型的相互作用可能导致构象平衡朝向更扩展的蛋白质状态的转变(即,增加蛋白质分子的疏水性部分的暴露以补充结合聚山梨醇酯)。可替代地,如果蛋白质天然状态表现出一些疏水性表面,则洗涤剂与天然状态的结合可以稳定该构象。聚山梨醇酯的另一方面是它们固有地易受氧化降解的影响。通常,作为原材料,它们含有足够量的过氧化物以引起蛋白质残基侧链、尤其是甲硫氨酸的氧化。由添加稳定剂引起的氧化损伤的可能性强调了在制剂中应使用最低有效浓度的赋形剂这一点。对于表面活性剂,给定蛋白质的有效浓度将取决于稳定机制。

[0160] 还以适当的量添加表面活性剂以防止在冷冻和干燥期间表面相关的聚集现象[Chang, B,《药物科学杂志(J. Pharm. Sci.)》85:1325, (1996)]。因此,示例性表面活性剂包含但不限于阴离子、阳离子、非离子、两性离子和两性表面活性剂,包含源自天然存在的氨基酸的表面活性剂。阴离子表面活性剂包含但不限于月桂基硫酸钠、二辛基磺化琥珀酸钠和二辛基磺酸钠、鹅去氧胆酸、N-月桂酰肌氨酸钠盐、十二烷基硫酸锂、1-辛烷磺酸钠盐、胆酸钠水合物、脱氧胆酸钠和甘氨酸脱氧胆酸钠盐。阳离子表面活性剂包含但不限于苯扎氯铵或苜蓿氯铵、西吡氯铵一水合物和十六烷基三甲基溴化铵。两性离子表面活性剂包含但不限于CHAPS、CHAPS0、SB3-10和SB3-12。非离子表面活性剂包含但不限于洋地黄皂苷、曲拉通X-100、曲拉通X-114、吐温-20和吐温-80。表面活性剂还包含但不限于聚桂醇400;聚氧乙烯40硬脂酸酯;聚氧乙烯氢化蓖麻油10、40、50和60;单硬脂酸甘油酯;聚山梨醇酯40、60、65和80;大豆卵磷脂和其他磷脂,如二油酰磷脂酰胆碱(DOPC)、二肉豆蔻酰磷脂酰甘油(DMPG)、二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱(DMPC)和(二油酰磷脂酰甘油)DOPG;蔗糖脂肪酸酯;甲基纤维素和羧甲基纤维素。因此,进一步提供了包括单独的或作为不同比率的混合物的这些表面活性剂的组合物。在本公开的一个实施例中,表面活性剂是吐温-80。在本制剂中,表面活性剂以约0.01至约0.5g/L的浓度掺入。在本文提供的制剂中,在各种实施例中,表面活性剂浓度为0.005、0.01、0.02、0.03、0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9或1.0g/L。同样,在本公开的某些实施例中,表面活性剂以约0.001、0.002、0.003、0.004、0.005、0.01、0.02、0.03、0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、0.1、0.5、0.7、0.8 0.9或1.0%w/v的浓度掺入。

[0161] (d) 盐

[0162] 在某些实施例中,本文公开的ENPP1制剂包含盐。通常添加盐以增加制剂的离子强度,这对于蛋白质溶解度、物理稳定性和等渗性可能是重要的。盐可以多种方式影响蛋白质的物理稳定性。离子可以通过与蛋白质表面上的带电残基结合来稳定蛋白质的天然状态。可替代地,盐可以通过沿着蛋白质主链($--CONH--$)与肽基团结合来稳定变性状态。盐还可以通过屏蔽蛋白质分子内的残基之间的排斥静电相互作用来稳定蛋白质天然构象。蛋白质

制剂中的盐还可以屏蔽蛋白质分子之间的有吸引力的静电相互作用,这可能导致蛋白质聚集和不溶性。盐(即,电解质)有时使得更难以冷冻干燥制剂。因此,制剂中应仅包含足以维持蛋白质结构稳定性的盐,并且通常这种电解质水平非常低。

[0163] 在某些实施例中,本文公开的ENPP1制剂可包含盐,如例如氯化钠(NaCl)、氯化钙(CaCl_2)、氯化锌(ZnCl_2)和/或氯化镁(MgCl_2)盐。在某些实施例中,本文公开的ENPP1制剂具有在0.0(即,无盐)、0.001、0.002、0.003、0.004、0.005、0.006、0.007、0.008、0.009、0.010、0.011、0.012、0.013、0.014、0.015、0.020、0.050、0.080、0.1、1、10、20、30、40、50、80、100、120、150、200、300和500mM之间的制剂的盐浓度。在本公开的一个实施例中,制剂中包含0.0mM NaCl(即,无NaCl)。

[0164] (e) 氨基酸

[0165] 氨基酸已发现在蛋白质制剂中广泛用作缓冲液、填充剂、稳定剂和抗氧化剂。因此,在一个方面,本文公开的ENPP1制剂包含氨基酸,如例如甘氨酸、精氨酸、组氨酸、丙氨酸、脯氨酸、丝氨酸和谷氨酸。这些氨基酸通常为多肽制剂提供多种益处。组氨酸常见于市售蛋白质制剂中,并且该氨基酸提供柠檬酸盐的替代方案,柠檬酸盐是已知在注射时止痛的缓冲液。有趣的是,也已报道组氨酸在液体和冻干呈递中以高浓度使用时就聚集而言均具有稳定作用(Chen B等人,《药物综述(Pharm Res.)》,20(12):1952-60(2003))。其他人还观察到组氨酸降低高蛋白浓度制剂的粘度。在其它方面,提供了制剂,其包含氨基酸甘氨酸、精氨酸和丙氨酸中的一种或多种,并且已显示通过优先排除机制稳定蛋白质。甘氨酸也是冻干制剂中常用的填充剂。精氨酸已显示是抑制聚集的有效试剂,并且已用于液体制剂和冻干制剂两者中。在所提供的ENPP1制剂中,氨基酸浓度在0.1、1、10、20、30、40、50、80、100、120、150、200、300和500mM之间。在本公开的一个实施例中,氨基酸是甘氨酸。

[0166] (f) 抗氧化剂

[0167] 蛋白质残基的氧化由许多不同来源产生。除了添加特定的抗氧化剂之外,氧化蛋白损伤的预防涉及在整个产品的制造过程和储存中仔细控制许多因素,如大气氧、温度、光暴露和化学污染。因此,本公开考虑了药物抗氧化剂的使用,包含但不限于还原剂、氧/自由基清除剂或螯合剂。在一个方面,治疗性蛋白质制剂中的抗氧化剂是水溶性的并且在整个产品保质期内保持活性。还原剂和氧/自由基清除剂通过在溶液中去除活性氧物种而起作用。在本文提供的制剂的各种实施例中,抗氧化剂浓度为0.005、0.01、0.02、0.03、0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9或1.0mg/mL。

[0168] (g) 金属离子

[0169] 一般来说,过渡金属离子在蛋白质制剂中是不期望的,因为它们可催化蛋白质中的物理和化学降解反应。然而,当特定金属离子是蛋白质的辅因子时,该特定金属离子被包含在制剂中,并且被包含在蛋白质的悬浮液制剂中,在该悬浮液制剂中,它们形成配位络合物(例如,胰岛素的锌悬浮液)。最近,已提出使用镁离子(10-120mM)来抑制天冬氨酸异构化为异天冬氨酸(WO 2004039337)。

[0170] (h) 防腐剂

[0171] 在开发涉及从同一容器中超过一次提取的多次使用肠胃外制剂时,防腐剂是必需的。其主要功能是抑制微生物生长,并确保在药物产品的整个保质期或使用期内的产品无菌性。常用防腐剂包含但不限于苯甲醇、苯酚和间甲酚。尽管防腐剂具有长期的使用历史,

但包含防腐剂的蛋白质制剂的开发可能具有挑战性。防腐剂几乎总是对蛋白质具有不稳定作用(聚集),并且这已成为限制其在多剂量蛋白质制剂中使用的主要因素(Roy S等人,《药物科学杂志(J Pharm Sci.)》,94(2):382-96(2005))。当可行时,防腐剂应包含在稀释剂制剂中,并且不包含在待冷冻干燥的制剂中。

[0172] 在某些实施例中,可溶性ENPP1多肽被配制成包括治疗量的本文公开的可溶性ENPP1多肽的冻干多肽制剂,由此冻干多肽制剂可复原为液体形式的溶液。在一些实施例中,冻干多肽制剂在无菌可注射溶液中复原。在一些实施例中,冻干多肽制剂在复原溶液中复原。在一些实施例中,复原溶液包括药学上可接受的载体和/或添加剂。在一些实施例中,药学上可接受的载体选自盐水溶液、纯化水或无菌注射用水。在一些实施例中,制剂在小于100秒、80秒、70秒、69秒、68秒、67秒、66秒、65秒、64秒、63秒、62秒、61秒或60秒的时段内完全复原。

[0173] 在某些实施例中,冻干多肽制剂包括ENPP1多肽。在一些实施例中,冻干多肽包括多肽,该多肽包括与SEQ ID NO:1的氨基酸序列至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列,基本上由其组成或由其组成。在一些实施例中,冻干多肽包括多肽,该多肽包括与具有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的多肽的一部分至少70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列,基本上由其组成或由其组成。在一些实施例中,ENPP1多肽是融合蛋白。在一些实施例中,ENPP1多肽是进一步包括免疫球蛋白的Fc结构域的融合蛋白。在一些实施例中,免疫球蛋白的Fc结构域是IgG1免疫球蛋白的Fc结构域。在一些实施例中,ENPP1多肽是包括可溶性ENPP1多肽结构域和一个或多个异源蛋白质部分的融合蛋白。在一些实施例中,异源蛋白质部分增加了可溶性ENPP1多肽在哺乳动物中的循环半衰期。在一些实施例中,异源蛋白质部分包括Fc结构域。在一些实施例中,Fc结构域包括多肽,该多肽包括与SEQ ID NO:12的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多相同的氨基酸序列,基本上由其组成或由其组成。在一些实施例中,ENPP1多肽进一步包括异源部分。在一些实施例中,异源部分选自由糖基化氨基酸、聚乙二醇化氨基酸、法尼基化氨基酸、乙酰化氨基酸、生物素化氨基酸和脂质部分组成的组。

[0174] 在某些实施例中,冻干多肽制剂包括缓冲剂。在某些实施例中,缓冲剂将pH维持在pH 5.0至pH 8.0的范围内、在约pH 5.5至pH 7.5的范围内、在约pH 6.0至pH 7.0的范围内、在约pH 6.0至pH 6.5的范围内。在一些实施例中,缓冲剂维持pH 6.5+/-0.5的pH。在一个优选的实施例中,pH是pH 6.3。在某些实施例中,缓冲剂选自由以下组成的组:琥珀酸盐、柠檬酸盐、碳酸氢盐、磷酸盐、tris或双甘氨酸。在某些优选实施例中,缓冲剂是琥珀酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐。在一个优选的实施例中,缓冲剂是柠檬酸盐。当冻干的多肽制剂在溶液中复原时,缓冲剂可以构成范围为5mM至100mM的浓度。在某些实施例中,缓冲剂以范围为10mM至50mM或15mM至25mM的浓度存在。在某些优选实施例中,缓冲剂以20mM的浓度存在。缓冲剂可以赋予呈冻干和复原两种形式的ENPP1多肽增加的稳定性。在某些实施例中,缓冲剂可以被选择以促进提高聚集体形成的起始温度。在一些实施例中,缓冲剂将聚集体形成的起始温度提高至少1℃、2℃、3℃、4℃、5℃、6℃、7℃、8℃、9℃或10℃。在某些实施例中,缓冲剂可以减少高分子量物种的形成。在一些实施例中,缓冲剂将高分子量物种的形成减少至少2%、

3%、4%、5%、10%、15%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%。在一些实施例中,缓冲剂将高分子量物种的形成减少至少10%至100%、20%至80%、30%至70%或40%至60%。在一些实施例中,缓冲剂将高分子量物种的形成减少至少50%。

[0175] 本公开的冻干多肽制剂可以包括一种或多种药学上可接受的添加剂和/或稳定剂。在某些实施例中,药学上可接受的添加剂包括氨基酸、盐、糖和/或多元醇。在一些实施例中,药学上可接受的添加剂是精氨酸、脯氨酸和/或甘氨酸。在优选的实施例中,药学上可接受的添加剂是稳定剂,如蔗糖和/或甘露糖醇。在某些实施例中,一种或多种药学上可接受的添加剂在溶液中复原时构成范围为50mM至300mM的浓度。在一些实施例中,一种或多种药学上可接受的添加剂在溶液中复原时构成范围为50mM至100mM、60mM至90mM或75mM至85mM的浓度。在一些实施例中,一种或多种药学上可接受的添加剂在溶液中复原时构成50mM、60mM、70mM、80mM、82mM、84mM、86mM、88mM、90mM、100mM、110mM、120mM、130mM、140mM、150mM、160mM、170mM、171mM、172mM、173mM、174mM、175mM、176mM、177mM、178mM、179mM、180mM、190mM、200mM、210mM、220mM、230mM、240mM、250mM、260mM、261mM、262mM、263mM、264mM、265mM、266mM、267mM、268mM、269mM、270mM、280mM、290mM、300mM的 $\pm$ 5mM内的浓度。药学上可接受的添加剂和/或稳定剂可以赋予呈冻干和复原两种形式的ENPP1多肽增加的稳定性。在某些实施例中,药学上可接受的添加剂和/或稳定剂将高分子量物种的形成减少至少2%、3%、4%、5%、10%、15%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%。在一些实施例中,药学上可接受的添加剂和/或稳定剂将高分子量物种的形成减少至少10%至100%、20%至80%、30%至70%或40%至60%。在一些实施例中,药学上可接受的添加剂和/或稳定剂将高分子量物种的形成减少至少50%。

[0176] 本公开的ENPP1多肽包括在ENPP1核酸酶样结构域和SMB样结构域内配位的辅因子(参见例如,Kato K.等人,《美国国家科学院院刊(Proc Natl Acad Sci USA)》.2012;109(42):16876-81)。在某些实施例中,本公开的冻干多肽制剂可以包括一种或多种ENPP1多肽辅因子。在一些实施例中,ENPP1多肽辅因子包括钙、锌和/或单磷酸腺苷。在一些实施例中,ENPP1多肽辅因子是 CaCl_2 、 CaSO_4 、 ZnCl_2 、 ZnSO_4 和/或单磷酸腺苷。在一些实施例中,ENPP1多肽辅因子是 CaCl_2 和/或单磷酸腺苷。在一个优选实施例中,辅因子ENPP1多肽辅因子是 CaCl_2 。在一些实施例中,ENPP1多肽辅因子在溶液中复原时构成范围为1mM至10mM、1mM至5mM或1mM至3mM的浓度。在一个优选实施例中,ENPP1多肽辅因子构成2mM的 $\pm$ 1mM内的浓度。在另一个优选的实施例中,ENPP1多肽辅因子构成2mM的浓度。

[0177] 在一些实施例中,组合物和制剂包括表面活性剂。在一些实施例中,表面活性剂包括聚山梨醇酯、泊洛沙姆、曲拉通、十二烷基硫酸钠、月桂基硫酸钠、辛基糖苷钠、月桂基磺基甜菜碱、肉豆蔻基-磺基甜菜碱、亚油酰基-磺基甜菜碱、硬脂基-磺基甜菜碱、月桂基肌氨酸、肉豆蔻基-肌氨酸、亚油酰基-肌氨酸、硬脂基-肌氨酸、亚油酰基-甜菜碱、肉豆蔻基-甜菜碱、鲸蜡基-甜菜碱、月桂酰胺基丙基-甜菜碱、椰油酰胺基丙基-甜菜碱、亚油酰胺基丙基-甜菜碱、肉豆蔻酰胺基丙基-甜菜碱、棕榈酰胺基丙基-甜菜碱、异硬脂酰胺基丙基-甜菜碱、肉豆蔻酰胺基丙基-二甲胺、棕榈酰胺基丙基二甲胺、异硬脂酰胺基丙基-二甲胺、甲基椰油酰基-牛磺酸钠、甲基油酰基-牛磺酸二钠、二羟丙基PEG 5亚油基氯化铵、聚乙二醇、聚丙二醇及其混合物。表面活性剂可以是例如但不限于聚山梨醇酯20、聚山梨醇酯21、聚山梨醇酯40、聚山梨醇酯60、聚山梨醇酯61、聚山梨醇酯65、聚山梨醇酯80、聚山梨醇酯81、聚山

梨醇酯85、聚山梨醇酯188、PEG3350及其混合物。在优选的实施例中,表面活性剂是聚山梨醇酯20(PS20)、聚山梨醇酯80(PS80)或聚山梨醇酯188(PS188)。在一个优选的实施例中,表面活性剂是聚山梨醇酯20(PS20)。

[0178] 表面活性剂的浓度可以表示为百分比(w/v)。对于冻干制剂,当在溶液中复原时,%(w/v)浓度表示表面活性剂浓度。表面活性剂的浓度通常在约0.001%(w/v)至1%(w/v)的范围内。在一些实施例中,表面活性剂的浓度在0.01%至0.5%(w/v)、0.015%至0.25%(w/v)、0.02%至0.1%(w/v)的范围内。在一个优选的实施例中,表面活性剂的浓度在0.02%至0.1%(w/v)的范围内。

[0179] 本公开的冻干多肽制剂可随时间推移表现出增加的稳定性。在某些实施例中,本公开的冻干多肽制剂在-80℃至40℃下表现出长期稳定性。在一些实施例中,制剂具有至少3、6、12、24、36、48或60个月的保质期。在一些实施例中,复原制剂具有至少1、2、3、4、5、6、12、18、24、48或60小时的保质期。

[0180] 在一些实施例中,复原制剂在室温下在1mg/ml至50mg/ml、2mg/ml至45mg/ml、5mg/ml至40mg/ml、10-30mg/ml、15-20mg/ml范围内的浓度下稳定至少8小时。在一些实施例中,复原制剂在5℃下在1mg/ml至50mg/ml、2mg/ml至45mg/ml、5mg/ml至40mg/ml、10-30mg/ml、15-20mg/ml范围内的浓度下稳定至少24小时。

[0181] 本文公开的冻干多肽制剂可以以复原形式施用。本文公开的复原冻干多肽制剂的施用途径包含吸入、口服、鼻、直肠、肠胃外、舌下、经皮、经粘膜(例如,舌下、舌、(经)颊、(经)尿道、阴道(例如,经阴道和阴道周)、鼻内以及(经)直肠、膀胱内、肺内、十二指肠内、胃内、鞘内、皮下、肌内、皮内、动脉内、静脉内、支气管内、吸入(例如,气雾剂)、眼部、肺部和局部施用。在一个优选实施例中,复原制剂肠胃外施用。在一些实施例中,复原制剂经由皮下注射、静脉内注射、皮内注射、肌内注射施用。在一些实施例中,复原制剂是自施用的。在一些实施例中,冻干制剂包括治疗有效剂量。在一些实施例中,制剂每天、每两天、三天、一周或一个月施用若干次。在一些实施例中,在至少两天后、四天后、一周后或一个月后的合适时间间隔之后施用第二剂量的制剂。

[0182] 在某些实施例中,本公开提供了包括冻干多肽制剂的试剂盒。在一些实施例中,试剂盒包括冻干多肽,其可在使用前在无菌可注射溶液(或无菌水)中复原。在一些实施例中,试剂盒包括一个或多个小瓶。在一些实施例中,试剂盒包括一个或多个小瓶,该小瓶包括冻干多肽制剂。在一些实施例中,试剂盒包括可注射装置,该可注射装置包括小瓶、复原溶液、注射器和/或预填充注射器。在一些实施例中,将复原溶液转移到小瓶中使冻干多肽在无菌可注射溶液中复原。在一些实施例中,冻干多肽在无菌可注射溶液中复原。在一些实施例中,冻干多肽在使用前在无菌可注射溶液(或无菌水)中复原。在一些实施例中,可注射装置用于肠胃外施用无菌可注射溶液。在一些实施例中,无菌可注射溶液经由皮下注射施用。在一些实施例中,无菌可注射溶液经由皮内注射施用。在一些实施例中,无菌可注射溶液经由肌内注射施用。在一些实施例中,无菌可注射溶液经由静脉内注射施用。在一些实施例中,无菌可注射溶液是自施用的。在一些实施例中,无菌可注射溶液包括治疗有效剂量。

[0183] 本文公开的冻干多肽制剂可以用于治疗、逆转或预防与本文所公开的ENPP1缺乏症相关的疾病的进展的方法。在一些实施例中,制剂用于治疗、逆转或预防有此需要的受试者的后纵韧带骨化症(OPLL)的进展的方法。在一些实施例中,制剂用于治疗、逆转或预防有

此需要的受试者的低磷性佝偻病的进展的方法。在一些实施例中,制剂用于治疗、逆转或预防有此需要的受试者的ABCC6缺乏症(例如,作为弹性假黄瘤(PXE))的进展的方法。在一些实施例中,制剂用于减少或预防有此需要的受试者的年龄相关动脉硬化的进展的方法。在一些实施例中,制剂用于治疗、逆转或预防有此需要的受试者的血管动脉中的动脉粥样硬化斑块钙化的进展。在一些实施例中,制剂用于治疗、逆转或预防有此需要的受试者的骨关节炎的进展的方法。在一些实施例中,制剂用于治疗、逆转或预防有此需要的受试者的由早衰引起的动脉硬化的进展的方法。在一些实施例中,制剂用于治疗、逆转或预防有此需要的受试者的血管动脉中的动脉粥样硬化斑块钙化的进展的方法。在一些实施例中,制剂用于治疗、逆转或预防有此需要的受试者的骨关节炎的进展的方法。在一些实施例中,制剂用于治疗、逆转或预防有此需要的受试者的由早衰引起的动脉硬化的进展的方法。在一些实施例中,制剂用于治疗、逆转或预防有此需要的受试者的X连锁低磷性佝偻病(XLH)、遗传性低磷性佝偻病(HHRH)、低磷性骨病(HBD)、常染色体显性低磷性佝偻病(ADHR)和/或常染色体隐性低磷性佝偻病的进展的方法。在一些实施例中,制剂用于治疗、逆转或预防有此需要的受试者的年龄相关骨量减少的进展的方法。在一些实施例中,制剂用于治疗、逆转或预防有此需要的受试者的强直性脊柱炎的进展的方法。在一些实施例中,制剂用于治疗、逆转或预防有此需要的受试者的小儿镰刀型细胞贫血病中的中风的方法。

[0184] 使用本领域熟知的技术将本文公开的制剂冻干。关于冻干的进一步信息可见于Carpenter, J.F.和Chang, B.S., 蛋白质药物的冻干(Lyophilization of Protein Pharmaceuticals), 《生物技术与生物药物制造、加工与保存(Biotechnology and Biopharmaceutical Manufacturing, Processing and Preservation)》, K.E. Avis和V.L. Wu编(Buffalo Grove, Interpharm Press, Inc.), pp.199-264 (1996), 美国专利第7,247,707号;第7,087,723号;和第6,586,573号。

[0185] 3. ENPP1多肽

[0186] 在某些方面,本公开涉及ENPP1多肽的冻干制剂及其用途。本文所公开的ENPP1多肽包含天然存在的ENPP1家族的多肽及其保留生物活性的任何变体(包含突变体、片段、融合体和模拟肽形式)。术语“ENPP1”或“ENPP1多肽”是指来源于任何物种的外核苷酸焦磷酸酶/磷酸二酯酶1蛋白(NPP1/ENPP1/PC-1)和ENPP1相关蛋白。ENPP1蛋白包括形成同源二聚体的II型跨膜糖蛋白。ENPP1蛋白的每个单体包括涉及靶向质膜的短的细胞内N端结构域、跨膜结构域和包括几个结构域的大胞外区域。大的胞外区包括SMB1和SMB2结构域,据报道其参与ENPP1二聚化(R. Gijssbers, H. 等人,《生物化学杂志(Biochem. J)》. 371;2003:321-330)。具体地, SMB结构域含有八个半胱氨酸残基,每个残基布置在四个二硫键中,并已被证明通过共价胱氨酸分子间和分子内键介导ENPP1同源二聚化。蛋白切割多种底物,所述底物包含核苷酸和核苷酸糖的磷酸二酯键以及核苷酸和核苷酸糖的焦磷酸盐键。ENPP1蛋白的功能是将核苷5'三磷酸酶水解为对应的单磷酸盐,并且还水解二腺苷多磷酸盐。ENPP1蛋白在涉及心血管、神经、免疫学、肌肉骨骼、激素和血液学功能的调节的嘌呤能信号传导中起作用。人ENPP1前体蛋白(NCBI登录NP_006199)的示例性氨基酸序列在图1(SEQ ID NO:1)中示出。人ENPP1前体蛋白包含在ENPP1 N末端处的内源性ENPP1信号肽序列。除非另有特别说明,否则本文所述所有ENPP1相关多肽的氨基酸的编号基于图1中提供的人ENPP1前体蛋白序列的编号。在某些实施例中,ENPP1前体蛋白进一步包括内源或异源信号肽序列。在蛋白

质水解后,信号肽序列从ENPP1前体蛋白上被切割,提供成熟的ENPP1蛋白。参见例如,Jansen S等人《细胞科学杂志(J Cell Sci.)》,2005;118(Pt 14):3081-9。可用于本文公开的多肽的示例性信号肽序列包含但不限于ENPP1信号肽序列、ENPP2信号肽序列、天青杀素信号序列、ENPP7信号肽序列和/或ENPP5信号肽序列。加工的(成熟的)胞外ENPP1多肽序列示出在图3(SEQ ID NO:2)中。

[0187] 本领域中通常已知,ENPP1在脊椎动物中是非常保守的,其中胞外结构域的大区段基本上是保守的。例如,图4A和图4B描绘了与各种ENPP1直系同源物相比,人ENPP1胞外结构域的多序列比对。与各种核苷酸三磷酸盐(例如,ATP、UTP、GTP、TTP和CTP)、pNP-TMP、3',5'-cAMP和2'-3'-cGAMP结合的ENPP1也是高度保守的(参见例如,Kato K.等人,《美国国家科学院院刊(Proc Natl Acad Sci USA)》.2012;109(42):16876-81和Mackenzie NC等人《骨骼》.2012;51(5):961-8)。因此,从这些比对中,可以预测对正常ENPP1活性重要的具有胞外结构域的关键氨基酸位置,以及预测可能耐受取代而不显著改变正常ENPP1活性的氨基酸位置。因此,根据本公开的组合物有用的活性人ENPP1多肽可包含位于另一个脊椎动物ENPP1序列的相应位置处的一个或多个氨基酸,或者可包含与人或其它脊椎动物序列中的残基类似的残基。在相应位置处的一个或多个氨基酸的取代可以包含保守变异或取代,其不可能改变多肽链的形状或改变正常的ENPP1活性。保守变异或取代的实例包含用一个疏水残基,如异亮氨酸、缬氨酸、亮氨酸或蛋氨酸替代另一个疏水残基,或用一个极性残基取代另一个极性残基,如用精氨酸取代赖氨酸、用谷氨酸替代天冬氨酸或用谷氨酰胺替代天冬酰胺。例如,ENPP1多肽包含衍生自任何已知ENPP1多肽的序列的多肽,其具有与ENPP1多肽的序列至少约80%相同的序列,并且优选地至少85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高的同一性。

[0188] ENPP1蛋白已在本领域中在结构和生物学特征方面表征。在某些实施例中,本文公开的可溶性ENPP1蛋白包括焦磷酸酶和/或磷酸二酯酶活性。例如,在一些实施例中,ENPP1蛋白结合核苷酸三磷酸盐(例如,ATP、UTP、GTP、TTP和CTP)、pNP-TMP、3',5'-cAMP和2'-3'-cGAMP;并将核苷酸三磷酸盐转化为无机焦磷酸盐[参见例如,Kato K.等人,《美国国家科学院院刊》.2012;109(42):16876-81;Li L等人《自然化学生物学(Nat Chem Biol)》.2014;10(12):1043-8;Jansen S等人《结构(Structure)》.2012;20(11):1948-59;以及Onyedibe KI等人《分子(Molecules)》.2019;24(22)]。

[0189] 如本文所用的,术语“酶促活性”或“生物活性”是指ENPP1多肽表现出焦磷酸酶和/或磷酸二酯酶活性(例如,能够将ATP结合到AMP中和/或水解为AMP,并且将PPi和/或AP3a结合到ATP中和/或水解为ATP)。例如,ENPP1蛋白的焦磷酸酶/磷酸二酯酶结构域水解细胞外核苷酸三磷酸盐以产生无机焦磷酸盐(PPi),并且通常是可溶的。这种活性可以使用如先前所描述的pNP-TMP测定来测量(Saunders等人,2008,《分子癌症疗法(Mol.Cancer Ther.)》7(10):3352-62;Albright等人,2015,《自然通信》6:10006)。在某些实施例中,可溶性ENPP1多肽对底物ATP的 k_{cat} 值大于或等于约 $3.4(\pm 0.4)s^{-1}酶^{-1}$,其中所述 k_{cat} 通过测量多肽的ATP水解速率来测定。在某些实施例中,可溶性ENPP1多肽对底物ATP的 K_M 值小于或等于约2pM,其中 K_M 通过测量多肽的ATP水解速率来确定。除了本文的教导之外,这些参考文献为如何产生保持一种或多种生物活性(例如,将核苷酸转化为无机焦磷酸盐)的可溶性ENPP1蛋白提供了充分的指导。

[0190] 在一个实施例中,本公开涉及ENPP1多肽。如本文所描述的,术语可溶性ENPP1多肽,包含ENPP1蛋白的任何天然存在的细胞外结构域及其保持生物活性(例如,酶活性)的任何变体(包含突变体、片段和模拟肽形式)。可溶性ENPP1多肽的实例包含例如如图3所示的ENPP1细胞外结构域(SEQ ID NO:2)。在某些实施例中,除了ENPP1多肽的细胞外结构域之外,可溶性ENPP1多肽进一步包括信号序列。示例性信号序列包含ENPP1多肽的天然信号序列,或来自另一种蛋白质的信号序列,如hENPP7信号序列。变体可溶性ENPP1多肽的实例提供于国际专利申请公开第W0 2012/125182号、第W0 2014/126965号、第W0 2016/187408号、第W0 2018/027024号、和第W0 2020/047520号中,所有这些专利均通过引用以其整体并入本文。

[0191] 在一些实施例中,ENPP1多肽是包括ENPP1多肽结构域和一个或多个异源蛋白质部分(即,与ENPP1异源的多肽结构域)的融合蛋白。如果氨基酸序列不是以SEQ ID NO:1表示的ENPP1的形式唯一发现的,则该氨基酸序列被理解为对ENPP1是异源的。在一些实施例中,异源蛋白质部分包括免疫球蛋白的Fc结构域。在一些实施例中,免疫球蛋白的Fc结构域是IgG1免疫球蛋白的Fc结构域。在某些实施例中,可溶性ENPP1多肽的C端与人免疫球蛋白1(IgG1)、人免疫球蛋白2(IgG2)、人免疫球蛋白3(IgG3)和/或人免疫球蛋白4(IgG4)的Fc结构域融合。在其它实施例中,可溶性ENPP1多肽的N端与人免疫球蛋白1(IgG1)、人免疫球蛋白2(IgG2)、人免疫球蛋白3(IgG3)和/或人免疫球蛋白4(IgG4)的Fc结构域融合。在一些实施例中,Fc结构域的存在改善了半衰期、溶解度,降低了免疫原性并且提高了可溶性ENPP1多肽的活性。在某些实施例中,天然人IgG蛋白的部分(IgG1、IgG2、IgG3和IgG4)可以用于Fc部分(例如,ENPP1-Fc)。例如,本公开提供了融合蛋白,其包括与多肽融合的ENPP1,该多肽包括免疫球蛋白的恒定结构域,如源于人IgG1、IgG2、IgG3和/或IgG4的CH1、CH2或CH3结构域。Fc片段可以包括天然IgG的区域,如铰链区(根据Rabat编号系统,人IgG1的残基216-230)、整个第二恒定结构域CH2(残基231-340)和第三恒定结构域CH3(残基341-447)。

[0192] 如本文所使用的,术语“ENPP1-Fc构建体”是指与IgG分子(优选地,人IgG)的FcR结合结构域重组融合和/或化学缀合(包含共价缀合和非共价缀合两者)的ENPP1(例如,ENPP1多肽的细胞外结构域)的可溶形式。在某些实施例中,ENPP1的C末端与FcR结合结构域的N末端融合或缀合。

[0193] 可以用于人IgG1的Fc部分(G1Fc)的氨基酸序列的实例为SEQ ID NO:12(表2)。本公开部分地提供了多肽,所述多肽包括与SEQ ID NO:12具有70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列,基本上由其组成或由其组成。

[0194] 在一些实施例中,异源蛋白质部分包括选自由多组氨酸、FLAG标签、Glu-Glu、谷胱甘肽S-转移酶(GST)、硫氧还蛋白、蛋白质A、蛋白质G、免疫球蛋白重链恒定区(Fc)、麦芽糖结合蛋白(MBP)或人血清白蛋白组成的组的一个或多个结构域。可以选择融合结构域以便赋予期望的性质。例如,一些融合结构域特别可用于通过亲和色谱法分离融合蛋白。出于亲和纯化的目的,使用用于亲和色谱法的相关基质,如谷胱甘肽缀合的树脂、淀粉酶缀合的树脂和镍缀合的树脂或钴缀合的树脂。许多这样的基质以“试剂盒”形式提供,如法玛西亚公司(Pharmacia)GST纯化系统和可与(HIS₆)融合伴侣一起使用的QIAexpressTM系统(凯杰公司)。作为另一个实例,可以选择融合结构域,以便促进ENPP1多肽的检测。这种检测结构域

的实例包含各种荧光蛋白(例如,GFP)以及“表位标签”,其通常是可获得特异性抗体的短肽序列。易于获得特异性单克隆抗体的熟知的表位标签包含FLAG、流感病毒血凝素(HA)和c-myc标签。在一些情况下,融合结构域具有蛋白酶切割位点,如例如因子Xa或凝血酶,其允许相关蛋白酶部分地消化融合蛋白,并由此释放重组蛋白。然后可以通过随后的色谱分离从融合结构域中分离释放的蛋白质。

[0195] 在一些实施例中,ENPP1融合蛋白进一步包括位于ENPP1多肽结构域与一个或多个异源蛋白质部分(例如,Fc免疫球蛋白结构域)之间的接头。在某些实施例中,可溶性ENPP1多肽与Fc结构域直接或间接融合。在一些实施例中,可溶性ENPP1融合蛋白包括Fc结构域与ENPP1多肽之间的接头。在一些实施例中,接头可以是包含1-200个氨基酸的氨基酸间隔子(amino acid spacer)。合适的肽间隔子是本领域已知的,并且包含例如含有柔性氨基酸残基如甘氨酸、丙氨酸和丝氨酸的肽接头。在一些实施例中,接头包括聚甘氨酸接头或Gly-Ser接头。在一些实施例中,间隔子可含有GGGA(SEQ ID NO:21)、GGGS(SEQ ID NO:22)、GGGG(SEQ ID NO:23)、GGGGA(SEQ ID NO:24)、GGGGS(SEQ ID NO:25)、GGGGG(SEQ ID NO:26)、GGAG(SEQ ID NO:27)、GGSG(SEQ ID NO:28)、AGGG(SEQ ID NO:29)、SGGGG(SEQ ID NO:30)、SGGG(SEQ ID NO:31)、GA(SEQ ID NO:103)、GS(SEQ ID NO:104)、GG(SEQ ID NO:105)、GGA(SEQ ID NO:106)、GGS(SEQ ID NO:107)或GGG(SEQ ID NO:108)的基序,例如,多个或重复基序。在一些实施例中,间隔子可含有2至12个氨基酸,包含GA或GS的基序,例如,GA、GS、GAGA(SEQ ID NO:32)、GSGS(SEQ ID NO:33)、GAGAGA(SEQ ID NO:34)、GSGSGS(SEQ ID NO:35)、GAGAGAGA(SEQ ID NO:36)、GSGSGSGS(SEQ ID NO:37)、GAGAGAGAGA(SEQ ID NO:38)、GSGSGSGSGS(SEQ ID NO:39)、GAGAGAGAGAGA(SEQ ID NO:40)和GSGSGSGSGSGS(SEQ ID NO:41)。在一些实施例中,间隔子可含有3至12个氨基酸,包含GGA或GGS的基序、GGA、GGS、GGAGGA(SEQ ID NO:42)、GGS GGS(SEQ ID NO:43)、GGAGGAGGA(SEQ ID NO:44)、GGS GGS GGS(SEQ ID NO:45)、GGAGGAGGAGGA(SEQ ID NO:46)和GGS GGS GGS GGS(SEQ ID NO:47)。在又一些实施例中,间隔子可含有4至12个氨基酸,包含GGAG(SEQ ID NO:48)、GGSG(SEQ ID NO:49),例如,GGAG(SEQ ID NO:50)、GGSG(SEQ ID NO:51)、GGAGGGAG(SEQ ID NO:52)、GGS GGS GGS GGS(SEQ ID NO:53)、GGAGGGAGGGAG(SEQ ID NO:54)和GGS GGS GGS GGS GGS(SEQ ID NO:55)的基序。在一些实施例中,间隔子可以含有GGGGA(SEQ ID NO:56)或GGGGS(SEQ ID NO:57),例如,GGGGAGGGGAGGGGA(SEQ ID NO:58)和GGGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO:59)的基序。在本发明的一些实施例中,异源蛋白质部分(例如,Fc结构域单体、野生型Fc结构域、具有氨基酸取代(例如,减少二聚化的一个或多个取代)的Fc结构域、白蛋白结合肽、纤连蛋白结构域或人血清白蛋白)与可溶性ENPP1多肽之间的氨基酸间隔子可以是GGG、GGGA(SEQ ID NO:21)、GGGG(SEQ ID NO:23)、GGGAG(SEQ ID NO:60)、GGGAGG(SEQ ID NO:61)或GGGAGGG(SEQ ID NO:62)。

[0196] 在一些实施例中,间隔子还可以含有除甘氨酸、丙氨酸和丝氨酸之外的氨基酸,例如TGGGG(SEQ ID NO:63)、AAAL(SEQ ID NO:64)、AAAK(SEQ ID NO:65)、AAAR(SEQ ID NO:66)、EGKSSGSGSESKST(SEQ ID NO:67)、GSAGSAAGSGEF(SEQ ID NO:68)、AEAAAKEAAKA(SEQ ID NO:69)、KESGSVSSEQLAQFRSLD(SEQ ID NO:70)、GENLYFQSGG(SEQ ID NO:71)、SACYCELS(SEQ ID NO:72)、RSIAT(SEQ ID NO:73)、RPACKIPNDLKQKVMNH(SEQ ID NO:74)、GGSAGGSGSGSSGGSSGASG TGTAGGTGSGSGTGSG(SEQ ID NO:75)、AAANSSIDLISVPVDSR(SEQ ID

NO:76)、GGSGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSGGGS (SEQ ID NO:77)、(R)_m;m=0-15 (SEQ ID NO:78)、DSSSEKFLRRIGRFG (SEQ ID NO:79)、EEEEEEPRGDT (SEQ ID NO:80)、APWHLSSQYSRT (SEQ ID NO:81)、STLPIPHFSRE (SEQ ID NO:82)、VTKHLNQISQSY (SEQ ID NO:83)、(E)_m;m=1-15 (SEQ ID NO:84)、RSGSGGS (SEQ ID NO:85)、(D)_m;m=1-15 (SEQ ID NO:86)、LVIMSLGLGLGLRK (SEQ ID NO:87)、VIMSLGLGLGLRK (SEQ ID NO:88)、IMSLGLGLGLRK (SEQ ID NO:89)、MSLGLGLGLRK (SEQ ID NO:90)、SLGLGLGLRK (SEQ ID NO:91)、LGLGLGLRK (SEQ ID NO:92)、GLGLGLRK (SEQ ID NO:93)、LGLGLRK (SEQ ID NO:94)、GLGLRK (SEQ ID NO:95)、LGLRK (SEQ ID NO:96)、GLRK (SEQ ID NO:97)、LGRK (SEQ ID NO:98)、LRK (SEQ ID NO:99)、(K)_m;m=1-15 (SEQ ID NO:100)、LIN (SEQ ID NO:109)、NSS (SEQ ID NO:110)、ESS (SEQ ID NO:111)、RQQ (SEQ ID NO:112)、KR (SEQ ID NO:113)、LRK (SEQ ID NO:114) 或 RK (SEQ ID NO:115)。在一些实施例中,间隔子可以含有EAAAK (SEQ ID NO:101)的基序,例如多个或重复基序。在一些实施例中,间隔子可以含有富含脯氨酸的序列的基序,例如,多个或重复基序,该富含脯氨酸的序列如(XP)_n(其中X可以是任何氨基酸(例如,A、K或E),并且n是1-5)以及PAPAP (SEQ ID NO:102)。

[0197] SEQ.ID NO:3-ENPP2信号序列

Leu Phe Thr Phe Ala Val Gly Val Asn Ile Cys Leu Gly
1 5 10
[0198] Phe Thr Ala
15

[0199] SEQ ID NO:7-天青杀素信号序列

Met Thr Arg Leu Thr Val Leu Ala Leu Leu Ala Gly Leu Leu Ala Ser
[0200] Ser Arg Ala

[0201] SEQ.ID NO:16-ENPP7信号序列

Met Arg Gly Pro Ala Val Leu Leu Thr Val Ala Leu Ala Thr Leu Leu
1 5 10 15
[0202] Ala Pro Gly Ala
20

[0203] SEQ.ID NO:17-ENPP7信号序列

Met Arg Gly Pro Ala Val Leu Leu Thr Val Ala Leu Ala Thr Leu Leu
1 5 10 15
[0204] Ala Pro Gly Ala Gly Ala
20

[0205] SEQ.ID NO:18-ENPP5信号序列

Met Thr Ser Lys Phe Leu Leu Val Ser Phe Ile Leu Ala Ala Leu Ser
1 5 10 15
[0206] Leu Ser Thr Thr Phe Ser
20

[0207] SEQ ID NO:19-ENPP121GLK信号序列

Met Glu Arg Asp Gly Cys Ala Gly Gly Gly Ser Arg Gly Gly Glu Gly
 1 5 10 15
 Gly Arg Ala Pro Arg Glu Gly Pro Ala Gly Asn Gly Arg Asp Arg Gly
 20 25 30
 Arg Ser His Ala Ala Glu Ala Pro Gly Asp Pro Gln Ala Ala Ala Ser
 35 40 45
 [0208] Leu Leu Ala Pro Met Asp Val Gly Glu Glu Pro Leu Glu Lys Ala Ala
 50 55 60
 Arg Ala Arg Thr Ala Lys Asp Pro Asn Thr Tyr Lys Ile Ile Ser Leu
 65 70 75 80
 Phe Thr Phe Ala Val Gly Val Asn Ile Cys Leu Gly Phe Thr Ala Gly
 85 90 95
 Leu Lys

[0209] SEQ ID NO:20-ENPP121信号序列

Met Glu Arg Asp Gly Cys Ala Gly Gly Gly Ser Arg Gly Gly Glu Gly
 1 5 10 15
 Gly Arg Ala Pro Arg Glu Gly Pro Ala Gly Asn Gly Arg Asp Arg Gly
 20 25 30
 Arg Ser His Ala Ala Glu Ala Pro Gly Asp Pro Gln Ala Ala Ala Ser
 35 40 45
 [0210] Leu Leu Ala Pro Met Asp Val Gly Glu Glu Pro Leu Glu Lys Ala Ala
 50 55 60
 Arg Ala Arg Thr Ala Lys Asp Pro Asn Thr Tyr Lys Ile Ile Ser Leu
 65 70 75 80
 Phe Thr Phe Ala Val Gly Val Asn Ile Cys Leu Gly Phe Thr Ala
 85 90 95

[0211] 肽间隔子的长度和所使用的氨基酸可以根据所涉及的两种蛋白质和最终蛋白融合多肽中所需的柔性程度进行调整。可以调整间隔子的长度以确保适当的蛋白质折叠并避免聚集体形成。

[0212] 在一些实施例中,融合蛋白的不同元件(例如,免疫球蛋白Fc融合蛋白)可以以与期望的功能性一致的任何方式排列。例如,可溶性ENPP1多肽结构域可以被置于异源蛋白质部分的C末端,或者可替代地,异源蛋白质部分可以被置于可溶性ENPP1多肽结构域的C末端。可溶性ENPP1多肽结构域和异源蛋白质部分可以在融合蛋白中直接或间接连接,并且附加结构域或氨基酸序列可以包含在任一结构域的C末端或N末端或结构域之间。优选的融合蛋白包括SEQ ID NO:9-11中任一者所述的氨基酸序列。在一些实施例中,ENPP1融合多肽包括SEQ ID NO:9或由其组成。在一些实施例中,ENPP1融合多肽包括SEQ ID NO:10或由其组成。在一些实施例中,ENPP1融合多肽包括SEQ ID NO:11或由其组成。

[0213] 在一些实施例中,本公开的可溶性ENPP1多肽含有一个或多个异源部分。任选地,可溶性ENPP1多肽包含一个或多个异源部分,所述异源部分选自:糖基化氨基酸、PEG化氨基酸、法尼基化氨基酸、乙酰化氨基酸、生物素化氨基酸、与脂质部分缀合的氨基酸和与有机衍生剂缀合的氨基酸。在一些实施例中,本文所公开的可溶性ENPP1多肽被进一步修饰。此类修饰包含但不限于乙酰化、羧化、糖基化、磷酸化、脂化和酰化。因此,可溶性ENPP1多肽可以含有非氨基酸元件,如聚乙二醇、脂质、多糖或单糖和磷酸盐。此类非氨基酸要素对可溶性ENPP1多肽的功能的影响可以如本文针对其它可溶性ENPP1多肽所描述的进行测试。当本公开的多肽通过切割多肽的新生形式在细胞中产生时,翻译后处理对于蛋白质的正确折叠和/或功能也可能是重要的。不同的细胞(例如,CHO、HeLa、MDCK、293、WI38、NIH-3T3或HEK293)具有用于此类翻译后活性的特定细胞机制和特征机制,并且可以被选择以确保可

溶性ENPP1多肽的正确修饰和加工。

[0214] 如本文所使用的,多肽序列与参考序列之间的“同一性”百分比被定义为在比对序列并引入空位(如有必要的话)以实现最大序列同一性百分比之后,多肽序列中与参考序列中的氨基酸残基相同的氨基酸残基的百分比。为了确定氨基酸序列同一性百分比的目的的比对可以以本领域的技术内的各种方式来实现,例如使用可公开获得的计算机软件,如BLAST、BLAST-2、ALIGN、MEGALIGN(DNASTAR)、CLUSTALW或CLUSTAL OMEGA软件来实现。在一些实施例中,使用CLUSTAL OMEGA软件进行比对。本领域技术人员可以确定用于比对序列的适当参数,包含对于在所比较的序列的全长上实现最大比对所需的任何算法。

[0215] 在一些实施例中,可溶性ENPP1多肽的活性也可以在基于细胞的或体内测定中进行测试。例如,可以测量可溶性ENPP1多肽对无机焦磷酸盐(P_{Pi})的产生的影响。具体地,ENPP1蛋白的焦磷酸酶/磷酸二酯酶结构域水解细胞外核苷酸三磷酸盐以产生无机焦磷酸盐(P_{Pi}),并且通常是可溶的。这种活性可以使用如先前所描述的pNP-TMP测定以及基于HPLC的ATP水解测定来测量(Saunders等人,2008,《分子癌症疗法》7(10):3352-62;Albright等人,2015,《自然通信》6:10006)。可以评估可溶性ENPP1多肽对涉及ENPP1相关疾病如ARHR2的基因表达(例如,成骨细胞和破骨细胞中成纤维细胞生长因子23的转录)的影响。根据需要,这可以在存在一种或多种核苷酸三磷酸盐或其它ENPP1底物的情况下进行,并且可以转染细胞以产生可溶性ENPP1多肽。类似地,可溶性ENPP1多肽可以施用于小鼠或其它动物,并且可以使用本领域公认的方法评估对ENPP1相关疾病的影响。

[0216] 在一些实施例中,根据本文所描述的方法使用的ENPP1多肽是分离的多肽。如本文所使用的,分离的蛋白质或多肽是已经与其自然环境的组分分离的蛋白质或多肽。在一些实施例中,如通过例如电泳(例如,SDS-PAGE、等电聚焦(IEF)、毛细管电泳)或色谱(例如,离子交换或反相HPLC)分析确定的,将本公开的多肽纯化至大于95%、96%、97%、98%或99%纯度。用于评估纯度的方法在本领域中是众所周知的[参见例如,Flatman等人,(2007)《色谱杂志(J.Chromatogr.)》B 848:79-87]。在一些实施例中,根据本文所描述的方法使用的可溶性ENPP1多肽是重组的多肽。

[0217] 本公开的ENPP1多肽可以通过多种现有技术已知的技术产生。例如,本公开的多肽可以使用标准蛋白质化学技术合成,如Bodansky,M.肽合成原理(Principles of Peptide Synthesis),施普林格出版社(Springer Verlag),柏林(1993)和Grant G.A.(编辑),《合成肽:用户指南(Synthetic Peptides:A User's Guide)》,W.H.弗里曼公司(W.H.Freeman and Company)(1992)中所描述的蛋白质化学技术。另外,自动化的肽合成器是可商购获得的(例如,Advanced ChemTech型号396;Milligen/Biosearch 9600)。可替代地,本公开的多肽,包含其片段或变体,可以使用各种表达系统重组产生[例如,大肠杆菌(E.coli)、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、COS细胞、杆状病毒、毕赤酵母(Yeast Pichia)],如本领域中众所周知的。该蛋白质可以在贴壁细胞或悬浮细胞中产生。在一些实施例中,融合蛋白在CHO细胞中表达。为了建立稳定的细胞系,将编码ENPP1构建体的核酸序列克隆到适当的载体中,以供大规模蛋白质产生。在一另外的实施例中,本公开的经修饰的或未修饰的多肽可以通过使用例如蛋白酶,例如,胰蛋白酶、嗜热菌蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、胃蛋白酶或配对的碱性氨基酸转化酶(PACE)消化重组产生的全长ENPP1多肽来产生。计算机分析(使用可商购获得的软件,例如,MacVector、Omega、PCGene,Molecular Simulation,Inc.)可以用于鉴定蛋白水解切割

位点。可替代地,这种多肽可以使用化学切割(例如,溴化氰、羟胺等)由重组产生的全长ENPP1多肽产生。

[0218] 许多表达系统是已知的并且可以用于产生ENPP1融合蛋白,包含细菌(例如,大肠杆菌和枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*))、酵母(例如,酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、乳酸克鲁维酵母(*Kluyveromyces lactis*)和巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*))、丝状真菌(例如,曲霉菌(*Aspergillus*))、植物细胞、动物细胞和昆虫细胞。期望的蛋白质可以常规方式产生,例如,从插入宿主染色体和游离质粒上的编码序列产生。

[0219] 酵母可以用期望的蛋白质的编码序列以任何通常方式(例如,电穿孔)转化。用于通过电穿孔转化酵母的方法公开于Becker和Guarente,1990,《酶学方法(Methods Enzymol)》194:182.可以通过熟知的技术来鉴定成功转化的细胞,即含有本公开的DNA构建体的细胞。例如,可以使由表达构建体的引入而产生的细胞生长以产生ENPP1多肽。可以收获并裂解细胞,并使用一种方法检查它们的DNA含量以确定DNA的存在,所述方法如Southern,1975,《分子生物学杂志》98:503和/或Berent等人,1985,《生物技术(Biotech)》3:208所描述。可替代地,可以使用抗体来检测上清液中蛋白质的存在。

[0220] 有用的酵母质粒载体包含pRS403-406和pRS413-416,并且通常可从美国加利福尼亚州拉霍亚策略克隆系统公司(Stratagene Cloning Systems,La Jolla,CA,USA)获得。质粒pRS403、pRS404、pRS405和pRS406是酵母整合质粒(Yip),并且并入酵母可选标志物I-11S3、TRP1、LEU2和1JRA3。质粒pRS413-416是酵母着丝粒质粒(YCp)。

[0221] 已经开发了通过互补的内聚末端将DNA可操作地连接至载体的各种方法。例如,可以将互补的均聚物束添加到DNA区段中以插入到载体DNA中。载体和DNA区段然后通过互补均聚物尾部之间的氢键连接以形成重组DNA分子。

[0222] 含有一个或多个限制性位点的合成接头提供了将DNA区段连接到载体的替代性方法。通过核酸内切酶限制消化产生的DNA区段用细菌噬菌体T4DNA聚合酶或大肠杆菌DNA聚合酶I处理,这些聚合酶是以其3'-5'-核酸外切酶活性去除突出的3'-单链末端并以其聚合活性填充凹陷的3'-端的酶。

[0223] 因此,这些活性的组合产生钝端的DNA区段。然后在能够催化钝端的DNA分子的连接的酶(如噬菌体T4 DNA连接酶)的存在下,将钝端的区段与大摩尔过量的接头分子一起温育。因此,反应的产物是在其末端处携带聚合物接头序列的DNA区段。这些DNA区段可以用适当的限制酶切割,并且连接至表达载体,所述表达载体已经用产生与DNA区段的末端相容的末端的酶切割。

[0224] 然后确立单个经稳定转染的细胞的克隆并筛选期望的ENPP1融合蛋白的高表达克隆。可以在96孔板中使用如前所述合成酶促底物pNP-TMP以高通量方式完成对用于ENPP1蛋白表达的单细胞克隆的筛选(Albright等人,2015,《自然通讯》6:10006)。在通过筛选鉴定高表达克隆后,可以在摇瓶或生物反应器中实现蛋白质产生,如先前在Albright,等人,2015,《自然通讯》,6:10006中所述。

[0225] ENPP1的纯化可以使用本领域已知的标准纯化技术的组合来完成。纯化后,可以将ENPP1-Fc透析到补充有 Zn^{2+} 和 Mg^{2+} 的PBS(PBSplus)中,该PBS被浓缩至介于5mg/ml至7mg/ml之间并且在-80℃下以200-500p1的等分试样冷冻。可以紧接着使用之前将等分试样解冻,并且可以通过在PBSplus中稀释将溶液的比活性调节至31.25au/ml(或约0.7mg/ml,具体取

决于制剂)。

[0226] 4. 示例性的用途

[0227] 在某些方面,本公开涉及某些可溶性ENPP1多肽(例如,及其融合蛋白)用于减少和/或预防有此需要的受试者的病理性钙化的进展的用途,方法包括向受试者施用治疗有效量的本文公开的多肽融合体和/或可溶性多肽(例如,SEQ ID NO:2、9、10和11)。在某些实施例中,病理性钙化选自特发性婴儿动脉钙化(IIAC)和动脉粥样硬化斑块钙化组成的组。在某些实施例中,病理性骨化选自后纵韧带骨化症(OPLL)、低磷性佝偻病和骨关节炎组成的组。

[0228] 在一些实施例中,本公开考虑了减少或预防有此需要的受试者的病理性骨化的进展的方法,该方法包括向受试者施用治疗有效量的本文公开的可溶性ENPP1多肽或ENPP1融合多肽(例如,SEQ ID NO:2、9、10和11)。

[0229] 在一些实施例中,本公开考虑了减少或预防软组织异位钙化的进展的方法,包含减少、改善或预防有此需要的受试者体内的血管钙化,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的本文所公开的可溶性ENPP1多肽或ENPP1融合多肽。

[0230] 在一些实施例中,本公开考虑了减少或预防由ENPP1缺乏症(例如,GACI和ARHR2)引起的疾病的进展的方法。ENPP1缺乏症的特征在于在有此需要的受试者中ENPP1活性水平降低和/或ENPP1表达水平缺乏(与分别在正常健康受试者中的ENPP1活性水平或ENPP1表达水平相比),该方法包括向受试者施用治疗有效量的本文公开的可溶性ENPP1多肽或ENPP1融合蛋白(例如,SEQ ID NO:2、9、10和11)。在一些实施例中,ENPP1缺乏症是GACI。在一些实施例中,ENPP1缺乏症是ARHR2。

[0231] 在一些实施例中,本公开考虑了减少或预防有此需要的受试者的由较低水平的血浆PPi引起的疾病的进展的方法,该方法包括向受试者施用治疗有效量的本文公开的多肽,以将受试者的血浆PPi增加至正常水平或高于正常水平(比正常水平高30-50%),并且此后接着将血浆PPi维持在恒定的正常水平或高于正常水平。血浆ppi的正常水平对应于2-5 μ M,在一些实施例中,正常水平为2-3 μ M。(Bernhard等人,使用ATP硫酸化酶法得到的儿童血浆无机焦磷酸盐水平的参考范围(A Reference range for Plasma levels of Inorganic Pyrophosphate in Children using the ATP Sulfurylase method),《临床内分泌学与新陈代谢杂志(Journal of Clinical Endocrinology&Metabolism)》,2021)该方法进一步包括以两天、三天、一周或一个月的间隔施用另外的治疗有效量,以将受试者的血浆PPi维持在恒定的正常水平或高于正常水平,从而减少或预防病理性钙化或骨化的进展。在某些实施例中,本文所公开的可溶性ENPP1多肽或ENPP1融合多肽可用于提高焦磷酸盐(PPi)水平低于正常水平的受试者中的PPi水平。在其它实施例中,本文所公开的可溶性ENPP1多肽或ENPP1融合多肽可以用于减少或预防PPi水平低于正常水平的受试者的病理性钙化或骨化的进展。在一些实施例中,本文所公开的可溶性ENPP1多肽或ENPP1融合多肽可以用于治疗受试者体内表现为细胞外PPi浓度降低的ENPP1缺乏症(例如,GACI和ARHR2)。在某些实施例中,在施用第一剂量的本文所公开的可溶性ENPP1多肽或ENPP1融合多肽之后实现的血浆PPi的稳态水平维持至少2天、至少4天、至少一周或至少一个月的时间段。

[0232] 在一些实施例中,本公开考虑了减少或预防有此需要的受试者的由低于正常水平的血浆PPi引起的疾病的进展的方法,该方法包括向受试者施用治疗有效量的本文公开的

可溶性ENPP1多肽或ENPP1融合多肽(例如,SEQ ID NO:2、9、10和11),以将受试者的血浆PPi增加至和/或维持在正常PPi水平的约90%、95%、100%、105%、110%、120%、130%、140%或150%的水平。在某些实施例中,所述方法进一步包括每两天、三天、一周或一个月进一步施用本文所公开的多肽,以将血浆PPi水平维持在正常PPi水平的约90%、95%、100%、105%、110%、120%、130%、140%或150%的水平,因此预防病理性钙化或骨化的进展。

[0233] 在某些实施例中,本文公开的第二剂量的可溶性ENPP1多肽或ENPP1融合多肽在约两天后、在四天后、在一周后或在一个月后的合适时间间隔后施用于受试者,使得血浆PPi的稳态水平维持在恒定或稳态水平,并且不返回到施用本文公开的第一剂量的构建体之前受试者具有的较低PPi水平。

[0234] 不希望受到理论的束缚,据信将血浆PPi的稳态浓度维持在正常水平减少和/或预防受试者的病理性钙化和病理性骨化的进展。

[0235] 在一些实施例中,本公开考虑了治疗、逆转或预防有此需要的受试者的后纵韧带骨化症(OPLL)的进展的方法,该方法包括向受试者施用治疗有效量的本文公开的可溶性ENPP1多肽或ENPP1融合多肽(例如,SEQ ID NO:2、9、10和11)。

[0236] 在一些实施例中,本公开考虑了治疗、逆转或预防有此需要的受试者的低磷性佝偻病的进展的方法,该方法包括向受试者施用治疗有效量的本文公开的可溶性ENPP1多肽或ENPP1融合多肽(例如,SEQ ID NO:2、9、10和11)。

[0237] 在一些实施例中,本公开的可溶性ENPP1多肽治疗人或动物的病症或病状,如异位钙化(例如,软组织钙化、动脉钙化和血管钙化)、慢性肾脏疾病(CKD)、终末期肾脏疾病(ESRD)、钙化性尿毒症性小动脉病(CUA)、钙化防御、后纵韧带骨化症(OPLL)、低磷性佝偻病、骨关节炎、衰老相关的动脉硬化、特发性婴儿动脉钙化(IIAC)、动脉粥样硬化斑块钙化、ENPP1缺乏症[例如,常染色体隐性低磷性佝偻病2型(ARHR2)和婴儿期全身动脉钙化(GACI)]、与ABCC6基因致病突变相关联的病症[例如,ABCC6缺乏症],如弹性假黄瘤(PXE)和病理性骨化。ENPP1多肽的实例包含人ENPP1前体多肽(例如,SEQ ID NO:1)和可溶性人ENPP1多肽(例如,SEQ ID NO:2、9、10和11)。

[0238] 在其他实施例中,软组织包括动脉粥样硬化斑块。在一些实施例中,软组织包括肌肉动脉。在一些实施例中,软组织选自关节和脊柱组成的组。在一些实施例中,关节选自自由手的关节和脚的关节组成的组。在一些实施例中,软组织选自关节软骨和脊椎盘软骨组成的组。在一些实施例中,软组织包括容器。在一些实施例中,软组织包括结缔组织。

[0239] 在一些实施例中,本公开考虑了治疗、逆转或预防有此需要的受试者的弹性假黄瘤(PXE)的进展的方法,该方法包括向受试者施用治疗有效量的本文公开的可溶性ENPP1多肽或ENPP1融合多肽(例如,SEQ ID NO:2、9、10和11)。

[0240] 在一些实施例中,本公开考虑了减少或预防有此需要的受试者的年龄相关动脉硬化的进展的方法,该方法包括向受试者施用治疗有效量的本文公开的可溶性ENPP1多肽或ENPP1融合多肽(例如,SEQ ID NO:2、9、10和11)。

[0241] 在一些实施例中,本公开考虑了治疗、逆转或预防有此需要的受试者的血管动脉中的动脉粥样硬化斑块钙化的进展的方法,该方法包括向受试者施用治疗有效量的本文公开的可溶性ENPP1多肽或ENPP1融合多肽(例如,SEQ ID NO:2、9、10和11)。

[0242] 在一些实施例中,本公开考虑了治疗、逆转或预防有此需要的受试者的骨关节炎

的进展的方法,该方法包括向受试者施用治疗有效量的本文公开的可溶性ENPP1多肽或ENPP1融合多肽(例如,SEQ ID NO:2、9、10和11)。

[0243] 在一些实施例中,本公开考虑了治疗、逆转或预防有此需要的受试者的由早衰引起的动脉硬化的进展的方法,该方法包括向受试者施用治疗有效量的本文公开的可溶性ENPP1多肽或ENPP1融合多肽(例如,SEQ ID NO:2、9、10和11)。

[0244] 在一些实施例中,本公开考虑了治疗、逆转或预防有此需要的受试者的X-连锁低磷性佝偻病(XLH)、遗传性低磷性佝偻病(HHRH)、低磷性骨病(HBD)、后纵韧带骨化症(OPLL)、常染色体显性低磷性佝偻病(ADHR)和/或常染色体隐性低磷性佝偻病(ARHR2)的进展的方法,该方法包括向受试者施用治疗有效量的本文公开的可溶性ENPP1多肽或ENPP1融合多肽(例如,SEQ ID NO:2、9、10和11)。

[0245] 在一些实施例中,本公开考虑了治疗、逆转或预防有此需要的受试者的年龄相关骨量减少的进展的方法,该方法包括向受试者施用治疗有效量的本文公开的可溶性ENPP1多肽或ENPP1融合多肽(例如,SEQ ID NO:2、9、10和11)。

[0246] 在一些实施例中,本公开考虑了治疗、逆转或预防有此需要的受试者的强直性脊柱炎的进展的方法,该方法包括向受试者施用治疗有效量的本文公开的可溶性ENPP1多肽或ENPP1融合多肽(例如,SEQ ID NO:2、9、10和11)。

[0247] 在一些实施例中,本公开考虑了治疗、逆转或预防有此需要的受试者的小儿镰刀型细胞贫血病中的中风的进展的方法,该方法包括向受试者施用治疗有效量的本文公开的可溶性ENPP1多肽或ENPP1融合多肽(例如,SEQ ID NO:2、9、10和11)。

[0248] 在某些实施例中,本公开考虑了治疗、逆转或预防诊断患有早衰的受试者的疾病的进展的方法,该方法包括向受试者施用治疗有效量的本文公开的可溶性ENPP1多肽或ENPP1融合多肽(例如,SEQ ID NO:2、9、10和11)。

[0249] 在某些实施例中,多肽是在哺乳动物细胞中表达的ENPP1前体蛋白质的分泌产物。在其他实施例中,ENPP1前体蛋白质包括信号肽序列和ENPP1多肽,其中ENPP1前体蛋白质经历对本文公开的多肽的蛋白水解加工。在一些实施例中,在ENPP1前体蛋白质中,信号肽序列与ENPP1多肽N末端缀合。在蛋白水解时,从ENPP1前体蛋白质中切割信号序列以提供ENPP1多肽。在某些实施例中,信号肽序列选自ENPP1信号肽序列、ENPP2信号肽序列、ENPP7信号肽序列和ENPP5信号肽序列组成的组。

[0250] 在某些实施例中,多肽急性地或慢性地施用于受试者。在其他实施例中,多肽被局部、区域、肠胃外或全身施用于受试者。

[0251] 在某些实施例中,受试者是哺乳动物。在其他实施例中,哺乳动物是人类。

[0252] 本领域技术人员将理解,当结合包含本文详述的方法的本公开时,本公开不限于一旦确定的疾病或病症的治疗。特别地,疾病或病症的症状不必表现到对受试者有害的程度;事实上,在施用治疗之前,不需要在受试者中检测疾病或病症。也就是说,在本发明的ENPP1多肽可以提供益处之前,不必发生来自疾病或病症的显著病理学。

[0253] 在某些方面,本公开涉及用于预防受试者的疾病和病症的方法,其中本文所公开的可溶性ENPP1多肽或ENPP1融合多肽可以在疾病或病症发作之前向受试者施用,由此预防疾病或病症发展。因此,本公开涉及用于预防或延迟受试者的疾病或病症的发作或减少其进展或生长的方法,包括在检测到疾病或病症之前向受试者施用ENPP1多肽。在某些实施例

中,将ENPP1多肽施用于具有疾病或病症的强家族史的受试者,由此预防或延迟疾病或病症的发作或进展。

[0254] 有了本文的本公开,本领域技术人员将因此理解,预防受试者的疾病或病症涵盖向受试者施用ENPP1多肽作为针对所述疾病或病症的预防措施。

[0255] 在某些实施例中,可以施用本文公开的冻干制剂以递送介于1ng/kg/天与100mg/kg/天之间的剂量。在其他实施例中,可以施用本文公开的冻干制剂以递送介于1ng/kg/天与500mg/kg/天之间的剂量。

[0256] 在一些实施例中,可以施用本文公开的冻干制剂以递送0.1mg/kg的剂量。在一些实施例中,可以施用本文公开的冻干制剂以递送0.2mg/kg的剂量。在一些实施例中,可以施用本文公开的冻干制剂以递送0.3mg/kg的剂量。在一些实施例中,可以施用本文公开的冻干制剂以递送0.4mg/kg的剂量。在一些实施例中,可以施用本文公开的冻干制剂以递送0.5mg/kg的剂量。在其它实施例中,可以施用本文公开的冻干制剂以递送0.6mg/kg的剂量。在其它实施例中,可以施用本文公开的冻干制剂以递送0.7mg/kg的剂量。在其它实施例中,可以施用本文公开的冻干制剂以递送0.8mg/kg的剂量。在其它实施例中,可以施用本文公开的冻干制剂以递送0.9mg/kg的剂量。在其它实施例中,可以施用本文公开的冻干制剂以递送1mg/kg的剂量。在其它实施例中,可以施用本文公开的冻干制剂以递送1.2mg/kg的剂量。在其它实施例中,可以施用本文公开的冻干制剂以递送1.4mg/kg的剂量。在其它实施例中,可以施用本文公开的冻干制剂以递送1.6mg/kg的剂量。在其它实施例中,可以施用本文公开的冻干制剂以递送1.8mg/kg的剂量。

[0257] 本文公开的冻干制剂中的活性成分(例如,可溶性ENPP1多肽及其融合蛋白)、药学上可接受的载体和任何另外成分的相对量将根据所治疗的受试者的特性、大小和病状并且进一步地根据组合物所施用的途径而变化。举例来说,所述组合物可以包括约0.1%至约100% (w/w)的活性成分。

[0258] 如本文所使用的“单位剂量”是包括预定量的活性成分(例如,可溶性ENPP1多肽及其融合蛋白)的冻干制剂的离散量。活性成分的量通常等于将施用于受试者的活性成分的剂量或此剂量的方便分数,如例如此剂量的一半或三分之一。单位剂型可以是单个日剂量或多个日剂量之一(例如每天约1次到4次或更多次)。当使用多个日剂量时,单位剂型对于每个剂量来说可以是相同的或不同的。

[0259] 在一些实施例中,ENPP1-Fc可以范围为约0.1至约300mg/ml的浓度存在于制剂中。在一些实施例中,ENPP1-Fc的浓度为约0.5mg/ml、约1mg/ml、约2mg/ml、约2.5mg/ml、约3mg/ml、约3.5mg/ml、约4mg/ml、约4.5mg/ml、约5mg/ml、约5.5mg/ml、约6mg/ml、约6.5mg/ml、约7mg/ml、约7.5mg/ml、约8mg/ml、约8.5mg/ml、约9mg/ml、约9.5mg/ml、约10mg/ml、约11mg/ml、约12mg/ml、约13mg/ml、约14mg/ml、约15mg/ml、约16mg/ml、约17mg/ml、约18mg/ml、约19mg/ml、约20mg/ml、约21mg/ml、约22mg/ml、约23mg/ml、约24mg/ml、约25mg/ml、约26mg/ml、约27mg/ml、约28mg/ml、约29mg/ml、约30mg/ml、约31mg/ml、约32mg/ml、约33mg/ml、约34mg/ml、约35mg/ml、约36mg/ml、约37mg/ml、约38mg/ml、约39mg/ml、约40mg/ml、约41mg/ml、约42mg/ml、约43mg/ml、约44mg/ml、约45mg/ml、约46mg/ml、约47mg/ml、约48mg/ml、约49mg/ml、约50mg/ml、约51mg/ml、约52mg/ml、约53mg/ml、约54mg/ml、约55mg/ml、约56mg/ml、约57mg/ml、约58mg/ml、约59mg/ml、约60mg/ml、约70mg/ml、约80mg/ml、约90mg/ml、约

100mg/ml、约101mg/ml、约102mg/ml、约102.5mg/ml、约103mg/ml、约103.5mg/ml、约104mg/ml、约104.5mg/ml、约105mg/ml、约105.5mg/ml、约106mg/ml、约106.5mg/ml、约107mg/ml、约107.5mg/ml、约108mg/ml、约108.5mg/ml、约109mg/ml、约109.5mg/ml、约110mg/ml、约111mg/ml、约112mg/ml、约113mg/ml、约114mg/ml、约115mg/ml、约116mg/ml、约117mg/ml、约118mg/ml、约119mg/ml、约120mg/ml、约121mg/ml、约122mg/ml、约123mg/ml、约124mg/ml、约125mg/ml、约126mg/ml、约127mg/ml、约128mg/ml、约129mg/ml、约130mg/ml、约131mg/ml、约132mg/ml、约133mg/ml、约134mg/ml、约135mg/ml、约136mg/ml、约137mg/ml、约138mg/ml、约139mg/ml、约140mg/ml、约141mg/ml、约142mg/ml、约143mg/ml、约144mg/ml、约145mg/ml、约146mg/ml、约147mg/ml、约148mg/ml、约149mg/ml、约150mg/ml、约151mg/ml、约152mg/ml、约153mg/ml、约154mg/ml、约155mg/ml、约156mg/ml、约157mg/ml、约158mg/ml、约159mg/ml、约160mg/ml、约170mg/ml、约180mg/ml、约190mg/ml、约200mg/ml、约201mg/ml、约202mg/ml、约203mg/ml、约204mg/ml、约205mg/ml、约206mg/ml、约207mg/ml、约208mg/ml、约209mg/ml、约210mg/ml、约211mg/ml、约212mg/ml、约213mg/ml、约214mg/ml、约215mg/ml、约216mg/ml、约217mg/ml、约218mg/ml、约219mg/ml、约220mg/ml、约221mg/ml、约222mg/ml、约223mg/ml、约224mg/ml、约225mg/ml、约226mg/ml、约227mg/ml、约228mg/ml、约229mg/ml、约230mg/ml、约231mg/ml、约232mg/ml、约233mg/ml、约234mg/ml、约235mg/ml、约236mg/ml、约237mg/ml、约238mg/ml、约239mg/ml、约240mg/ml、约241mg/ml、约242mg/ml、约243mg/ml、约244mg/ml、约245mg/ml、约246mg/ml、约247mg/ml、约248mg/ml、约249mg/ml、约250mg/ml、约251mg/ml、约252mg/ml、约253mg/ml、约254mg/ml、约255mg/ml、约256mg/ml、约257mg/ml、约258mg/ml、约259mg/ml、约260mg/ml、约270mg/ml、约280mg/ml、约290mg/ml或约300mg/ml。

[0260] 施用方案可能影响构成有效量的内容。例如,可以每天或依序施用若干个分开的剂量以及交错的剂量,或者剂量可以连续输注或可以是团注。进一步地,治疗制剂的剂量可以成比例增加或减少,如治疗或预防情况的迫切情况所指示的。

[0261] 本公开的组合物(例如,可溶性ENPP1多肽及其融合蛋白)施用于患者,如哺乳动物(即,人),可以使用已知程序,以有效治疗患者的疾病或病症的剂量和时间段进行。实现治疗作用所需的治疗化合物的有效量可以根据各种因素而变化,如所采用的特定化合物的活性;施用时间;化合物的排泄率;治疗的持续时间;其它药物;化合物或与化合物组合使用的材料;所治疗的患者的疾病或病症的状态、年龄、性别、体重、状况、一般健康和先前病史;以及医学领域众所周知的类似因素。剂量方案可以调整以提供最优治疗应答。剂量是基于治疗性化合物的生物学活性确定的,所述生物学活性进而取决于治疗性化合物曲线的半衰期和血浆时间下面积。根据本公开的多肽以每2天或每4天或每周或每月的适当时间间隔施用,以实现血浆PPi的接近正常(1-3pM)水平或高于PPi的正常水平(比正常水平高30%-50%)的连续水平。还可以基于半衰期或治疗多肽从体内清除的速率来确定ENPP1多肽的治疗剂量。根据本公开的多肽以每2天或每4天、每周或每月的适当的时间间隔施用,以便实现ENPP1的恒定水平的酶促活性。

[0262] 例如,可以每天施用若干个分开的剂量,或者可以根据治疗情况的紧急情况按比例减少剂量。本文公开的治疗性化合物的有效剂量范围的非限制性实例为约0.01mg/kg体重/天和50mg/kg体重/天。在一些实施例中,本文公开的治疗性化合物的有效剂量范围为约50ng/kg体重至500ng/kg体重,优选地100ng/kg体重至300ng/kg体重。本领域的普通技术人

员将能够研究相关因素,并且在不进行过度实验的情况下进行关于治疗性化合物的有效量的确定。

[0263] 可溶性ENPP1多肽及其融合蛋白可以每天若干次频繁地施用于患者,或者其可以不太频繁地施用,如每天一次、每周一次、每两周一次、每月一次或甚至更不太频繁地施用,如每几个月一次或甚至每年一次或更少。应当理解,每天给药的可溶性ENPP1多肽及其融合蛋白的量在非限制性实例中可以每天、每隔一天、每2天、每3天、每4天或每5天施用。例如,在每隔一天施用的情况下,可以在星期一开始给药5mg每天剂量,并且在星期三施用第一随后的5mg每天剂量,在星期五施用第二随后的5mg每天剂量等。剂量的频率对于技术人员是显而易见的,并且取决于任何数目的因素,如但不限于所治疗的疾病的类型和严重程度以及患者的类型和年龄。

[0264] 本公开的冻干制剂中的活性成分(例如,可溶性ENPP1多肽及其融合蛋白)的实际剂量水平可以变化,以便获得有效实现对特定患者、组合物以及施用模式的期望治疗应答而对患者无毒性的活性成分的量。

[0265] 具有本领域的普通技能的医生,例如医师,可以容易地确定并且开出所需冻干制剂的有效量。例如,医师或兽医可以以比为了实现期望的治疗作用所需的水平低的水平来开始冻干制剂中采用的本文公开的化合物的剂量,并且逐渐增加剂量直到实现期望的作用。

[0266] 在某些实施例中,本文公开的组合物以范围为每天一至五次或更多次的剂量施用于患者。在其他实施例中,本文公开的组合物以包含但不限于以下的剂量范围施用于患者:每天一次、每两天一次、每三天一次至每周一次,以及每两周一次。本文公开的各种组合性组合物的施用频率因受试者而异,这取决于许多因素,包含但不限于年龄、待治疗的疾病或病症、性别、整体健康和其他因素。因此,本公开不应被解释为限于任何特定剂量方案,并且要施用于任何患者的精确剂量和组合物将由主治医师考虑到关于患者的所有其他因素来确定。

[0267] 在某些实施例中,本公开涉及一种经封装的冻干制剂,其包括:容器,该容器保持单独的或与第二药剂组合的治疗有效量的本文公开的化合物;以及用于使用化合物来治疗、预防或减少患者的疾病或病症的一种或多种症状的说明书。

[0268] 在某些实施例中,多肽或其前体蛋白急性或慢性地施用于受试者。在其他实施例中,多肽或其前体蛋白质被局部、区域或全身施用于受试者。在又一个实施例中,多肽或其前体蛋白质被递送在编码的载体上,其中所述载体编码蛋白质,并且在向受试者施用所述载体后,从所述载体转录和翻译。

[0269] 如本文所使用的,冻干制剂的“肠胃外施用”包含特征在于对受试者的组织进行物理破坏和通过组织的破坏进行冻干制剂的施用的任何施用途径。肠胃外施用因此包含但不限于通过注射组合物来施用冻干制剂、通过外科手术切口应用组合物、通过穿透组织的非外科手术伤口应用组合物等。具体地,考虑了肠胃外施用包含但不限于皮下、静脉内、腹膜内、肌内、胸骨内注射和肾透析输注技术。

[0270] 适合于肠胃外施用的冻干制剂可以包括一种或多种ENPP1多肽与一种或多种药学上可接受的无菌等渗水性或非水性溶液、分散体、悬浮液或乳液、或可恰好在使用前被复原成无菌可注射溶液或分散体的无菌粉末的组合,其可以含有抗氧化剂、缓冲液、抑菌剂、使

制剂与预期的接受者的血液等渗的溶质或悬浮剂或增稠剂。可以用于本公开的冻干制剂中的合适的水性和非水性载体的实例包含水、乙醇、多元醇(如甘油、丙二醇、聚乙二醇等)及其合适的混合物、植物油例如橄榄油和可注射有机酯如油酸乙酯。例如,通过使用涂层材料(如卵磷脂),通过在分散体的情况下维持所需的粒度,以及通过使用表面活性剂,可以维持适当的流动性。

[0271] 如果需要,组合物和制剂可以存在于包装或分配器装置中,所述包装或分配器装置可以含有一种或多种含有活性成分的单位剂型。包装例如可以包括金属或塑料箔,如泡罩包装。包装或分配器装置可以附有施用的说明书。

[0272] 5.序列

[0273] 表2:序列

[0274]

SEQ ID NO	序列	描述
1	1 MERDGCAGGG SRGGEGGRAP REGPAGNGRD RGRSHAAEAP GDPQAAASLL 51 APMDVGEELP EKAARARTAK DPNTYKVLSL VLSVCVLTIT LGCIFGLKPS 101 CAKEVKSCCK RCFERTFGNC RCDAACVELG NCCLDYQETC IEPEHIWTCN 151 KFRGCEKRLT RSLCACSDDC KDKGDCCINY SSVQGEKSW VEEPCESEINE 201 PQCPAGFETP PTLLFSLDGF RAEYLHTWGG LLPVISKLKK CGTYTKNMRP 251 VYPTKTFFNH YSIVTGLYPE SHGIIDNKMY DPKMNASFSL KSKEKFNPEW 301 YKGEPIWVTA KYQGLKSGTF FWPGSDEIN GIFPDIYKMY NGSVPFEERI 351 LAVLQWLQLP KDERPHFYTL YLEEPDSSGH SYGVPVSSEVI KALQVRVDMV 401 GMLMDGLKEL NLHRCNLIL ISDHGMEQGS CKKIYLNKY LGDVKNIKVI 451 YGPAARLRPS DVPDKYYSFN YEGIARNLSC REPQHFHFKPY LKHFLPKRLH 501 FAKSDRIEPL TFYLDPQWQL ALNPSEKRYC GSGFHGSDNV FSNMQALFVG 551 YGPGFKHGIE ADTFENIEVY NLMCDLLNLT PAPNNGTHGS LNHLKPNVY 601 TPKHPKEVHP LVQCPFTTRNP RDNLCSCSNP SILPIEDFQT QFNLTVAEEK 651 IIKHETLPYG RPRVLQKENT ICLLSQHQM SGYSQDILMP LWTSTYVDRN 701 DSFSTEDFSN CLYQDFRIPL SPVHKCSFYK NNTKVSYGFL SPPQLNKNSS 751 GIYSEALLTT NIVPMYQS FQVIWRYFHD TLRLKYAEERN VNVVSGPVFD 801 FDYDGRCDL ENLRQKRRVI RNQEILIPTH FFIIVLTSCD TSQTPHLCEN 851 LDTLAFILPH RTDNSESCVH GKHDSSWVEE LLMLHRARIT DVEHITGLSF 901 YQQRKEPVSD ILKLKTHLPT FSQED	野生型 ENPP1 前体蛋白的完整的、未处理的氨基酸序列
2	1 PSCAKEVKSC KGRCFERTFG NCRCDACVE LGNCCLDYQE TCIEPEHIWT 51 CNKFRGCEKR LTRSLCACSD DCKDKGDCCI NYSSVCQGEK SWVEEPCESE 101 NEPQCPAGFE TPPTLLFSLD GFRAEYLHTW GGLLPVISKL KCGTYTKNM 151 RPVYPTKTFF NHYSIVTGLY PESHGIIDNK MYDPKMNASF SLKSKEKFN 201 EWYKGEPIWV TAKYQGLKSG TFFWPGSDVE INGIFPDIYK MYNGSVPFEE 251 RILAVLQWLQ LPKDERPHFY TLYLEEPDSS GHSYGPVSSE VIKALQVRVD 301 MVMGMLMDGL ELNLHRCNL ILISDHGMEQ GSCKKIYLN KYLGDVKNIK 351 VIYGPAARLR PSDVPDKYYS FNYEGIARNL SCREPQHFH PYLKHFLPKR 401 LHFASDRIE PLTFYLDPQW QALNPSEKRYC YGSGFHGSD NVFSNMQALF 451 VGYGPGFKHG IEADTFENIE VYNLMCDLLN LTPAPNNGTH GSLNHLKPN 501 VYTPKHPKEV HPLVQCPFTTR NPDNLGCSN NPSILPIEDF QTQFNLTVAE 551 EKIKHETLP YGRPRVLQKE NTICLLSQHQ FMSGYSQDIL MPLWTSYTV 601 RNDSFSTEDF SNCLYQDFRI PLSPVHKCSF YKNNTKVSYG FLSPQLNKN 651 SSGIYSEALL TTNIVPMYQS FQVIWRYFHD TLLRKYAEER NGNVVSGPV 701 FDFDYDGRCD SLENLRQKRR VIRNQEILIP THFFIVLTSC KDTSTQPLHC 751 ENLDTLAFIL PHRTDNSESC VHKGHDSSWV EELMLHRAR ITDVEHITGL 801 SFYQQRKEPV SDILKLKTHL PTFSQED	经处理（成熟）的细胞外 ENPP1 多肽序列
9	ETAGLKPSCAKEVKSCCKGRCFERTFGNCRCDACVELGNCCLDYQETCIEPEHIW TCNKFRGCEKRLTRSLCACSDDCDKGDCCINYSSVCQGEKSWVEEPCESEINEPQ CPAGFETPPTLLFSLDGFRAEYLHTWGGLLPVISKLLKCGTYTKNMRPVYPTKT FNHYSIVTGLYPEESHGIIDNKMYDPKMNASFSLKSKEKFNPEWYKGEPIWVTAKY QGLKSGTFFWPGSDVEINGIFPDIYKMYNGSVPFEEIRLAVLQWLQLPKDERPHF YTLYLEEPDSSGHSYGPVSSEVIKALQVRVDMVMGMLMDGLKELNLHRCNLILIS DHGMEQGSCKKIYLNKYLGDVKNIKVIYGPAAARLRPSDVPDKYYSFNIEGIARN LSCREPNQHFHFKPYLKHFLPKRLHFAKSDRIEPLTFYLDPQWQALNPSEKRYCGS GFHGSNDVFSNMQALFVGYPGFKHGIEADTFENIEVYNLMCDLLNLTAPNNGT HGSLNHLKPNVYTPKHPKEVHPLVQCPFTTRNPDNLGCSNPSILPIEDFQTQF NLTVAAEEKIKHETLPYGRPRVLQKENTICLLSQHQFMSGYSQDILMPLWTSYTV DRNDSFSTEDFSNCLYQDFRIPLSPVHKCSFYKNNTKVSYGFLSPPQLNKNSSGI YSEALLTTNIVPMYQS FQVIWRYFHD TLLRKYAEERN VNVVSGPVFD FDFDYDGR DSLENLRQKRRVIRNQEILIPTHFFIVLTSCDTSQTPHLCENLDTLAFILPHRT DNSESCVHKGHDSSWVEELMLHRARITDVEHITGLSFYQQRKEPVSDILKLKTH LPTFSQEDLINDKTHTCPPCAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP	ENPP1-接头 -hIgG1 Fc 构建体

[0275]

	SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
10	GLKPSCAKEVKSCKGRCFERTFGNCRCDAAVELGNCCLDYQETCIEPEHIWTCN KFRCEKRLTRSLCACSDCKDKGDCCINYSVCQGEKSWVEEPCEINEPQCPA GFETPTLLFSLDGFRAEYLHTWGGLLPVISKLKCGTYTKNMRPVYPTKTFPNH YSIVTGLYPESHGII DNKMYDPKMNASFSLKSKEKFNPEWYKGEPIWVTAKYQGL KSGTFFWPGSDVEINGIFPDIYKMYNGSVPFEEERILAVLQWLQLPKDERPHFYTL YLEEPDSSGHSYGPVSSEVIKALQVRDGMVGMMDGLKELNLHRCNLILISDHG MEQGSCKKYIYLNKYLGDVKNIKVIYGPAAARLRPSDVPDKYYSFNIEGIARNLSC REPNOHFKPYLKHFLPKRLHFAKSDRIEPLTFYLDPPQWLALNPSEKCYCGSGFH GSDNVFSNMQALFVGYPGPKHGIEADTFENIEVYNLMCDLLNLTAPANNNGTHGS LNHLLKNPVYTPKHPKEVHPLVQCFFTRNPRDNLGCSNPSILPIEDFQTQFNLT VAEEKIKHETLPYGRPRVLQKENTICLLSQHQFMSGYSQDILMPLWTSYTVDRN DSFSTEDFSNCLYQDFRIPLSPVHKCSFYKNNTKVSYGFLSPPQLNKNSSGIYSE ALLTTNIVPMYQSFQVIWRYFHDITLLRKYAEERNGVNVVSGPVDFDYDGRCDL ENLRQKRRVIRNQEILIPTHFFIVLTSCKDTSQTPHLCENLDTLAFILPHRTD NSC ESVHGKHDSSWVEELMLHRARITDVEHITGLSFYQQRKEPVSDILKLTHTLPT FSQEDLINDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVHLQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK	ENPP1-接头 -hIgG1 Fc 构建体
11	PSCAKEVKSCKGRCFERTFGNCRCDAAVELGNCCLDYQETCIEPEHIWTCNFR CCEKRLTRSLCACSDCKDKGDCCINYSVCQGEKSWVEEPCEINEPQCPAGFE TPTLLFSLDGFRAEYLHTWGGLLPVISKLKCGTYTKNMRPVYPTKTFPNHYSI VTGLYPESHGII DNKMYDPKMNASFSLKSKEKFNPEWYKGEPIWVTAKYQGLKSG TFFWPGSDVEINGIFPDIYKMYNGSVPFEEERILAVLQWLQLPKDERPHFYTL YLEEPDSSGHSYGPVSSEVIKALQVRDGMVGMMDGLKELNLHRCNLILISDHGMEQ GSCKKYIYLNKYLGDVKNIKVIYGPAAARLRPSDVPDKYYSFNIEGIARNLSCRE PNOHFKPYLKHFLPKRLHFAKSDRIEPLTFYLDPPQWLALNPSEKCYCGSGFHGSD NVFSNMQALFVGYPGPKHGIEADTFENIEVYNLMCDLLNLTAPANNNGTHGS LNHLLKNPVYTPKHPKEVHPLVQCFFTRNPRDNLGCSNPSILPIEDFQTQFNLT VAE EKIKHETLPYGRPRVLQKENTICLLSQHQFMSGYSQDILMPLWTSYTVDRNDS FSTEDFSNCLYQDFRIPLSPVHKCSFYKNNTKVSYGFLSPPQLNKNSSGIYSEALL TTNIVPMYQSFQVIWRYFHDITLLRKYAEERNGVNVVSGPVDFDYDGRCDL ENLRQKRRVIRNQEILIPTHFFIVLTSCKDTSQTPHLCENLDTLAFILPHRTD NSC VHGKHDSSWVEELMLHRARITDVEHITGLSFYQQRKEPVSDILKLTHTLPTFSQ EDLINDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVHLQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK	ENPP1-接头 -hIgG1 Fc 构建体
12	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVHLQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGK	人 IgG1 Fc
13	FTAGLKPSCAKEVKSCKGRCFERTFGNCRCDAAVELGNCCLDYQETCIEPEHIW TCNFRCEKRLTRSLCACSDCKDKGDCCINYSVCQGEKSWVEEPCEINEPQ CPAGFETPTLLFSLDGFRAEYLHTWGGLLPVISKLKCGTYTKNMRPVYPTKTF PNHYSIVTGLYPESHGII DNKMYDPKMNASFSLKSKEKFNPEWYKGEPIWVTAKY QGLKSGTFFWPGSDVEINGIFPDIYKMYNGSVPFEEERILAVLQWLQLPKDERPH FYTL YLEEPDSSGHSYGPVSSEVIKALQVRDGMVGMMDGLKELNLHRCNLILISDHG MEQGSCKKYIYLNKYLGDVKNIKVIYGPAAARLRPSDVPDKYYSFNIEGIARN LSCREPNQHFKPYLKHFLPKRLHFAKSDRIEPLTFYLDPPQWLALNPSEKCYCGS GFHGSNDNVFSNMQALFVGYPGPKHGIEADTFENIEVYNLMCDLLNLTAPANNNG THGS LNHLLKNPVYTPKHPKEVHPLVQCFFTRNPRDNLGCSNPSILPIEDFQTQFNLT VAE EKIKHETLPYGRPRVLQKENTICLLSQHQFMSGYSQDILMPLWTSYTVDRNDS FSTEDFSNCLYQDFRIPLSPVHKCSFYKNNTKVSYGFLSPPQLNKNSSGIYSEALL TTNIVPMYQSFQVIWRYFHDITLLRKYAEERNGVNVVSGPVDFDYDGRCDL ENLRQKRRVIRNQEILIPTHFFIVLTSCKDTSQTPHLCENLDTLAFILPHRTD NSC VHGKHDSSWVEELMLHRARITDVEHITGLSFYQQRKEPVSDILKLTHTLPTFSQ EDLINDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVHLQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK	ENPP1 的示例性 可溶性形式

[0276]

14	GLKPSCAKEVKSCKGRCFERTFGNCRCDAAACVELGNCCLDYQETCIEPEHIWTCN KFRCCGEKRLTRSLCACSDDDCKDKGDCINYSVCQGEKSWVEEPCESINEPQCPA GFETPPTLLFSLDGFRAEYLHTWGGLLPVI SKLKKCGTYTKNMRPVYPTKTFPNH YSIVTGLYPESHGII DNKMYDPKMNASFSLKSKEKFNPEWYKGEPIWVTAKYQGL KSGTFFWPGSDVEINGIFPDIYKMYNGSVPFEEIRILAVLQWLQLPKDERPHFYTL YLEEPDSSGHSYGVSSEVIKALQVRDGMVGMMDGLKELNLHRCNLILISDHG MEQGSCCKYIYLNKYLGDVKNIKVIYGPAAARLRPSDVPDKYYSFNIEGIARNLSC REPNOHFKPYLKHFLPKRLHFAKSDRIEPLTFYLDPQWQLALNPSEKCYGSGFGH GSDNVFSNMQALFVGYPGFKHGIEADTFENIEVYNLMCDLLNLTPAPNNGTHGS LNHLLKNPVYTPKHPKEVHPLVQCPFTRNPRDNLGCSNPSILPIEDFQTQFNLT VAEEKI IKHETLPYGRPRVLQKENTICLLSQHQFMSGYSQDILMPLWTSYTVDRN DSFSTEDFSNCLYQDFRIPLSPVHKCSFYKNNTKVSYGFLSPPQLNKNSSGIYSE ALLTTNIVPMYQSFQVIWRYFHDTLRLKYAEERNGVNVVSGPVDFDYDGRCDLSL ENLRQKRRVIRNQEILIPTHFFIVLTSCKDTSQTPLHCENLDTLAFILPHRTDNS ESCVHGKHDSSWVEELMLHRARITDVEHITGLSFYQQRKEPVSDILKLKTHLPT FSQED	ENPP1 的示例性 可溶性形式
15	PSCAKEVKSCKGRCFERTFGNCRCDAAACVELGNCCLDYQETCIEPEHIWTCNKR CGEKRLTRSLCACSDDDCKDKGDCINYSVCQGEKSWVEEPCESINEPQCPAGFE TPPTLLFSLDGFRAEYLHTWGGLLPVI SKLKKCGTYTKNMRPVYPTKTFPNHYSI VTGLYPESHGII DNKMYDPKMNASFSLKSKEKFNPEWYKGEPIWVTAKYQGLKSG TFFWPGSDVEINGIFPDIYKMYNGSVPFEEIRILAVLQWLQLPKDERPHFYTL YLEEPDSSGHSYGVSSEVIKALQVRDGMVGMMDGLKELNLHRCNLILISDHGMEQ GSCCKYIYLNKYLGDVKNIKVIYGPAAARLRPSDVPDKYYSFNIEGIARNLSCREP NQHFKPYLKHFLPKRLHFAKSDRIEPLTFYLDPQWQLALNPSEKCYGSGFGHSD NVFSNMQALFVGYPGFKHGIEADTFENIEVYNLMCDLLNLTPAPNNGTHGSLNH LLKNPVYTPKHPKEVHPLVQCPFTRNPRDNLGCSNPSILPIEDFQTQFNLTVAE EKI IKHETLPYGRPRVLQKENTICLLSQHQFMSGYSQDILMPLWTSYTVDRNDSF STEDFSNCLYQDFRIPLSPVHKCSFYKNNTKVSYGFLSPPQLNKNSSGIYSEALL TTNIVPMYQSFQVIWRYFHDTLRLKYAEERNGVNVVSGPVDFDYDGRCDLSLENL RQKRRVIRNQEILIPTHFFIVLTSCKDTSQTPLHCENLDTLAFILPHRTDNSESC VHGKHDSSWVEELMLHRARITDVEHITGLSFYQQRKEPVSDILKLKTHLPTFSQ ED	ENPP1 的示例性 可溶性形式

[0277] 在本说明书中使用的术语通常具有它们在本领域中、在本公开的上下文中和在其中使用每个术语的特定上下文中的普通含义。在下文或说明书中其他地方讨论了某些术语,以在描述本公开的组合物和方法以及如何制备和使用它们方面向实践者提供额外指导。术语的任何使用的范围或含义将从其中使用该术语的特定上下文中显而易见。

[0278] 鉴于测量值的性质或精度,“约(about)”和“大约(approximately)”通常应意指所测量的量的可接受误差程度。通常,示例性的误差程度在给定值或值的范围的20%(%)内,优选地在10%内,并且更优选地在5%内。

[0279] 可替代地,并且特别是在生物系统中,术语“约”和“大约”可以意指在给定值的量级内,优选地在5倍内,并且更优选地在2倍内的值。除非另有说明,否则本文给出的数字量是近似的,意味着可以在没有明确说明的情况下推断出术语“约”或“大约”。

[0280] 术语“一个(a)”和“一种(an)”包含复数指代物,除非其中使用该术语的上下文另有明确说明。术语“一个”(或“一种”)以及术语“一个或多个”和“至少一个”在本文中可互换使用。此外,在本文中使用的情况下“和/或”应被视为两个或更多个指定的特征或组分中的每一个的特定公开,具有或不具有另一个。因此,如本文在短语如“A和/或B”中使用的术语“和/或”旨在包含“A和B”、“A或B”、“A”(单独)和“B”(单独)。同样,如在短语如“A、B和/或C”中使用的术语“和/或”旨在涵盖以下方面中的每一个:A、B和C;A、B或C;A或C;A或B;B或C;A和C;A和B;B和C;A(单独);B(单独);和C(单独)。

[0281] 本文公开的数字范围包含限定所述范围的数字。

[0282] 本文公开的多肽可以包括并非天然存在的氨基酸序列。此类变体必须与起始分子具有小于100%的序列同一性或相似性。在某些实施例中,变体将具有与起始(例如,天然存在的或野生型)多肽的氨基酸序列具有约75%至小于100%的氨基酸序列同一性或相似性的氨基酸序列,更优选地约80%至小于100%,更优选地约85%至小于100%,更优选地约

90%至小于100%(例如,91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%),并且最优选地约95%至小于100%,例如在变体分子的长度上。

[0283] 本文描述了优选的方法和材料,尽管类似于或等同于本文所述的方法和材料的方法和材料也可以用于实施或测试目前公开的方法和组合物。本文提及的所有出版物、专利申请、专利和其他参考文献通过引用以其整体并入。

[0284] 例示

[0285] 通过参考以下实例,将更容易理解现在总体上描述的本发明,这些实例仅出于说明本发明的某些实施例和实施例的目的而被包含在内,并且不旨在限制本发明。

[0286] 实例1:ENPP1融合蛋白的生成

[0287] 将可溶性ENPP1融合蛋白经由接头(包括亮氨酸、异亮氨酸和天冬酰胺)与具有接头的人Fc结构域融合,下文称为ENPP1-Fc。三种ENPP1-Fc构建体在表2中显示为从CHO细胞纯化的SEQ ID NO:9、10和11。

[0288] ENPP1-Fc的纯化可以通过一系列柱色谱法步骤来实现,包含例如以下中的三个或更多个步骤,按任何顺序:蛋白质A色谱法、Q琼脂糖色谱法、苯基琼脂糖色谱法、尺寸排阻色谱法和阳离子交换色谱法。纯化可以用病毒过滤和缓冲液交换来完成。在纯化蛋白质之后,可以使用pNP-TMP作为显色底物来评估ENPP1-Fc蛋白的催化活性。为了鉴定在应力条件和非应力条件下均会导致ENPP1-Fc的最佳化学、物理和结构稳定性的制剂,在基线缓冲液、添加剂、溶解度、表面活性剂筛选和辅因子筛选的过程中以迭代方式评价多种缓冲液类型、pH条件、赋形剂和表面活性剂浓度。

[0289] 实例2.冻干ENPP1多肽制剂的生成

[0290] 根据以下步骤生成本文公开的冻干ENPP1多肽制剂。将浓度为44mg/mL的ENPP1-Fc缓冲液交换到不含表面活性剂的制剂缓冲液中。缓冲液交换过程进行总共四个循环,并且总稀释度>400倍。通过UV可见光谱法使用1.47ml/mg*cm的消光系数和1.0cm的路径长度测量缓冲液交换样品中的蛋白质浓度。在归一化至50.0mg/mL期间,将表面活性剂(PS20)添加到所有制剂中至0.05%的最终浓度。在缓冲液交换后,将制剂无菌过滤,以0.5mL的填充体积填充到三重冲洗的高压灭菌小瓶中,并配备有无菌橡胶塞。

[0291] ENPP1-Fc冻干循环(表3)由初始退火步骤组成,其中将温度从-50℃循环至-20℃持续若干小时以允许含甘露糖醇的制剂完全结晶。在退火步骤之后,通过将压力设定在100毫托并且将搁板温度增加到25℃来开始初次干燥,将循环在初次干燥下保持1793分钟(约30小时)。在完成初次干燥之后,通过将温度增加至40℃并保持600分钟(10小时)来进行二次干燥以去除任何剩余的水分。冻干循环的总持续时间为3648分钟(约2.5天)。在循环结束时,将小瓶在约570托的分压下用氮气回填,加塞并适当密封。所有含有ENPP1-Fc的冻干饼显示出象牙色的完整结构。在复原后,对于所有样品类型和条件,观察到液体外观为淡棕色-黄色,并且澄清且无可见颗粒。为了鉴定在应力和非应力条件下都将导致ENPP1-Fc的最佳化学、物理和结构稳定性的制剂,以迭代方式评价了多种缓冲液、pH条件、赋形剂、添加剂、表面活性剂和辅因子。

[0292] 表3:ENPP1-Fc冻干循环

[0293]

	温度 (°C)	速率 (C/分钟)	斜坡时间 (分钟)	保持时间 (分钟)	压力	总时间		
在室温 下加载	25°C			10 分钟				
斜坡	-5°C	0.5°C/分钟	60 分钟			70 分钟	1.2 小时	0.05 天
保持	-5°C			60 分钟		130 分钟	2.2 小时	0.09 天
斜坡	-50°C	0.5°C/分钟	90 分钟			220 分钟	3.7 小时	0.15 天
保持	-50°C			180 分钟		400 分钟	6.7 小时	0.28 天
斜坡	-20°C	0.5°C/分钟	60 分钟			460 分钟	7.7 小时	0.32 天
保持	-20°C			180 分钟		640 分钟	10.7 小时	0.44 天
斜坡	-50°C	0.5°C/分钟	60 分钟			700 分钟	11.7 小时	0.49 天
保持	-50°C			180 分钟		880 分钟	14.7 小时	0.61 天

[0294]

真空开始	-50°C				100 毫托	880 分钟	14.7 小时	0.61 天
斜坡	-25°C	0.5°C/分钟	50 分钟		100 毫托	930 分钟	15.5 小时	0.65 天
初次	-25°C			1793 分钟	100 毫托	2723 分钟	45.4 小时	1.89 天
斜坡	-40°C	0.2°C/分钟	325 分钟		100 毫托	3048 分钟	50.8 小时	2.12 天
二次	-40°C			600 分钟	100 毫托	3648 分钟	60.8 小时	2.53 天

[0295] 实例3.冻干ENPP1多肽制剂的复原

[0296] 基于用0.5mL注射用水复原来评价冻干样品复原。测量直到所有颗粒物质均溶解的时间。每种冻干样品在至少46秒的时段内完全溶解,不留下可见残留物或未溶解的物质。汇总复原数据显示于表4中。

[0297] 表4:冻干ENPP1-多肽制剂的复原时间

[0298]

缓冲液	赋形剂	制剂	时间点	条件	重建时间 (秒)
20 mM 琥珀酸盐, 2 mM CaCl ₂ pH 6.0	蔗糖 (9%)	A	T0	冻干	76
			4 周	5°C	53
				40°C	76
			13 周	5°C	52
	蔗糖 (3%) 甘露糖醇 (1.5%)	B	T0	冻干	60
			4 周	5°C	88
				40°C	83
			13 周	5°C	46
	蔗糖 (2%) 甘露糖醇 (2%)	C	T0	冻干	73
			4 周	5°C	91
				40°C	95
			13 周	5°C	60
20 mM 柠檬酸盐, 2 mM CaCl ₂ pH 6.0	蔗糖 (9%)	D	T0	冻干	71
			4 周	5°C	62
				40°C	77
			13 周	5°C	92
	蔗糖 (3%) 甘露糖醇 (1.5%)	E	T0	冻干	47
			4 周	5°C	69
				40°C	68
			13 周	5°C	54
	蔗糖 (2%) 甘露	F	T0	冻干	87
[0299]	糖醇 (2%)		4 周	5°C	82
				40°C	85
			13 周	5°C	88

[0300] 实例4. 冻干ENPP1多肽制剂中的残留水分的评价

[0301] 评价冻干饼的残留水分。在各时间点和条件下,所有冻干样品都具有极低的水分含量或没有水分含量。残留水分含量在0.0%-0.3%的范围内。汇总数据显示于表5中。

[0302] 表5:冻干样品的残留水分含量

[0303]

缓冲液	赋形剂	制剂	时间点	条件	水分 (%)
20 mM 琥珀酸盐, 2 mM CaCl ₂ pH 6.0	蔗糖 (9%)	A	T0		0.1
			4 周	5°C	0.1
				40°C	0.2
			13 周	5°C	0.2
	蔗糖 (3%) 甘露糖醇 (1.5%)	B	T0		0.0
			4 周	5°C	0.1
				40°C	0.2
			13 周	5°C	0.0
	蔗糖 (2%) 甘露糖醇 (2%)	C	T0		0.1
			4 周	5°C	0.1
				40°C	0.2
			13 周	5°C	0.0
20 mM 柠檬酸盐, 2 mM CaCl ₂ pH 6.0	蔗糖 (9%)	D	T0		0.3
			4 周	5°C	0.1
				40°C	0.2
			13 周	5°C	0.1
	蔗糖 (3%) 甘露糖醇 (1.5%)	E	T0		0.1
			4 周	5°C	0.1
				40°C	0.2
			13 周	5°C	0.0
	蔗糖 (2%) 甘露糖醇 (2%)	F	T0		0.0
			4 周	5°C	0.1
				40°C	0.1
			13 周	5°C	0.0

[0304] 实例5:基线缓冲液评价

[0305] 使用一组候选缓冲液在5.0-8.0的pH范围内评价ENPP1多肽制剂的稳定性,该候选缓冲液包含柠檬酸盐、组氨酸、磷酸盐、乙酸盐、碳酸氢钠、琥珀酸钠、双甘氨酸和tris。为了评价这些制剂的自缓冲能力,将样品缓冲液交换到水中。对于此研究,将ENPP1-Fc缓冲液交换到20mM乙酸盐 (pH5.0)、琥珀酸盐 (pH 5.0和6.0)、柠檬酸盐 (pH 5.0、6.0和7.0)、碳酸氢钠 (pH 6.0和7.0)、组氨酸 (pH 6.0和7.0)、磷酸钾 (pH 7.0和8.0)、tris (pH7.0和8.0)和双甘氨酸 (pH 8.0)缓冲液中。将ENPP1-Fc缓冲液交换到上述制剂缓冲液之一中,并在0.5mL中浓缩至2mg/mL。浓度和缓冲液交换后的蛋白质回收率在各制剂中通常是相当的,范围为约70-100%,除了交换到水中的ENPP1-Fc缓冲液之外。水中的缓冲液交换的ENPP1-Fc表现出34%的回收率,指示ENPP1-Fc缺乏自缓冲能力。

[0306] 通过差示扫描荧光法 (DSF) 监测ENPP1多肽制剂的热稳定性,该差示扫描荧光法提供与多肽的熔化温度 (T_m) 有关的数据。收集2mg/mL的蛋白质样品的T_m数据。将样品在20°C下平衡30秒,并且监测250-500nm (266nm激发波长) 的固有荧光光谱的重心平均值 (BCM),同时温度以0.5°C/分钟的速率增加至95°C。在展开事件期间BCM与温度曲线的拐点 (由衍生物迹线的最大值或最小值鉴定) 被鉴定为该转变的T_m。还与DSF测量并行测量266nm和473nm处的静态光散射 (SLS) 强度,以分别观察小聚集体形成和大聚集体形成的起始温度 (Tagg)。相对热稳定性受缓冲液类型和制剂pH两者的影响。柠檬酸盐pH 7.0、磷酸盐pH 7.0/8.0、碳酸

氢钠和双甘氨酸样品在266nm或473nm处未显示出显著的光散射,指示这些制剂明显缺乏聚集。在各制剂中,乙酸盐、琥珀酸盐pH 5.0、柠檬酸盐pH 5.0和tris pH7.0制剂表现出最高的Tagg。对于柠檬酸盐、组氨酸和tris样品,Tagg随着pH的增加而降低,磷酸盐的Tagg似乎对pH的变化不敏感。Tm值令人惊讶地显示出关于每种pH的缓冲液类型的明显趋势,指示琥珀酸盐pH 5.0和pH 6.0以及磷酸盐pH 5.0和pH 6.0的热稳定性更高。汇总DSF数据显示于表6中。

[0307] 表6:基线缓冲液DFS/SLS数据汇总

缓冲液		pH	制剂	T _{agg} 266 nm (°C)	T _{agg} 473 nm (°C)	T _{起始} BCM (°C)	T _{m1} BCM (°C)
[0308]	自缓冲（水）	N/A	A	62.4	62.1	43.9	55.4
	20 mM 乙酸盐	pH 5.0	B	80.6	80.2	39.7	54.6
	20 mM 琥珀酸盐	pH 5.0	C	77.7	79.5	40.5	57.4
		pH 6.0	D	65.7	66.2	53.5	62.8
[0309]	20 mM 柠檬酸盐	pH 5.0	E	81.0	80.8	45.7	57.1
		pH 6.0	F	61.2	61.3	51.2	60.9
		pH 7.0	G	58.4	61.7	49.7	60.5
	20 mM 碳酸氢钠	pH 6.0	H	ND	ND	45.4	57.0
		pH 7.0	I	ND	ND	44.7	56.6
	20 mM 组氨酸	pH 6.0	J	66.9	66.5	40.1	54.3
		pH 7.0	K	60.7	62.0	27.4	54.6
	20 mM 磷酸钾	pH 7.0	L	61.0	63.6	51.1	60.8
		pH 8.0	M	62.5	64.0	54.4	63.5
	20 mM Tris	pH 7.0	N	76.6	79.9	51.3	59.7
		pH 8.0	O	58.8	61.4	49.7	58.6
	20 mM 双甘氨酸	pH 8.0	P	58.4	61.2	48.0	57.2

[0310] ND: 由于计数非常低,所以未确定值。

[0311] 用于评价ENPP1多肽制剂样品中存在的聚集体和降解产物的量的尺寸排阻色谱法 (SEC)。报告总高分子量 (HMW) 物种、低分子量 (LMW) 物种和主峰纯度的丰度百分比。SEC结果汇总于表7和图5中。在SEC分析之前,将所有样品在30°C下温育48小时。HMW种类存在于所有制剂中,范围为3.3-14.5%。对于碳酸氢钠和磷酸盐制剂,观察到HMW物种的最低水平。在组氨酸pH 7.0中,高阶HMW物种最高。

[0312] 表7:基线缓冲液评价尺寸排阻色谱法数据汇总

缓冲液	pH	制剂	HMW%	主%	LMW%	柱回收率 (%) ^a	总面积 (μV*s)
自缓冲 (水)	0	A	6.2	93.3	0.5	94	8691405
20 mM 乙酸盐	5.0	B	4.6	95.4	ND	86	16192216
20 mM 琥珀酸盐	5.0	C	5.1	94.9	ND	91	17757935
	6.0	D	3.3	96.5	0.3	99	20957945
20 mM 柠檬酸盐	5.0	E	4.8	95.2	ND	94	19085508
	6.0	F	4.7	95.1	0.2	97	19232879
	7.0	G	5.5	94.5	ND	97	19272431
20 mM 碳酸氢钠	6.0	H	4.4	95.3	0.3	98	19623052
	7.0	I	3.9	95.7	0.3	97	20538912
20 mM 组氨酸	6.0	J	6.2	93.8	ND	95	20688528
	7.0	K	14.5	85.0	0.5	95	16752179
20 mM 磷酸钾	7.0	L	4.4	95.4	0.2	97	18897632
	8.0	M	4.0	95.8	0.2	98	19646363
20 mM Tris	7.0	N	5.9	93.9	0.3	96	19059185
	8.0	O	5.7	93.9	0.4	98	18835534

20 mM 双甘氨酸	8.0	P	4.0	96.0	ND	98	19571596
CC-15 起始材料			6.4	92.9	0.7	98	18917341
CC-15 光应力			48.4	50.5	1.1	101	19483433

[0315] ^a柱回收率 (%) = ((总峰面积/10⁶)*(流速/60) (消光系数*路径长度)) / (样品浓度*进样量/10³)*100

[0316] 总之,基线缓冲液评价数据指示包括≤pH 5.0和≥pH 6.0的缓冲液制剂为冻干的ENPP1多肽制剂提供了最大的稳定性。组氨酸pH 7.0比所测试的其他缓冲体系更不优选。乙酸盐不能在必要范围内缓冲冻干制剂。基于以上数据,将缓冲液分箱为两种方案,包括支持pH 6至pH 7的pH范围的那些(琥珀酸盐、柠檬酸盐、碳酸氢盐)和支持pH 7至pH 8的pH范围的那些(磷酸盐、tris、双甘氨酸)。在第一缓冲液方案中,柠檬酸盐制剂展示出优异的T起始(约5℃)。在第二缓冲液方案中,tris制剂展示出优异的T起始(约2℃)。用于进一步制剂开发的所选pH水平分别为使用琥珀酸盐、柠檬酸盐和磷酸盐缓冲体系的pH 6.0、pH 7.0和pH 8.0。在每种缓冲液类型下,评价了五种不同的药学上可接受的添加剂:精氨酸、NaCl、蔗糖、甘露糖醇和甘氨酸。所提出的添加剂涵盖一系列分子类别(即氨基酸、盐、糖和多元醇)。

[0317] 实例6:药学上可接受的添加剂筛选

[0318] 使用基线缓冲液评估中定义的缓冲体系(20mM琥珀酸盐,pH 6.0;柠檬酸盐,pH 7.0和磷酸盐,pH 8.0),在存在各种添加剂的情况下评估冻干的ENPP1多肽制剂的稳定性,所述添加剂在大致等渗浓度下具有报告的稳定特性。将ENPP1-Fc缓冲液交换到含有150mM NaCl、150mM L-精氨酸、250mM蔗糖、250mM甘露糖醇或200mM甘氨酸的每种候选缓冲液中。

[0319] 含有添加剂的ENPP1-Fc的制剂的DSF/SLS数据指示,如通过T_m(DSF)和Tagg在266和473nm(SLS)两者下评估的,添加剂对热稳定性没有重大影响。总的来说,DSF数据显示相当的熔融温度,并且对于大多数制剂明显缺乏更大的聚集体。

[0320] SEC数据(在表8和图6中汇总)指示在各制剂中,甘氨酸和NaCl/精氨酸组合产生最高的%HMW物种。NaCl pH 6.0和pH 7.0以及精氨酸pH 6.0的表现类似于蔗糖。在每种测试

制剂中,蔗糖至少生成%HMW物种($\leq 5.3\%$)。SEC数据证明,含有蔗糖的制剂提供了最高的总体稳定性。

[0321] 表8:SEC添加剂筛选汇总数据

缓冲液	赋形剂	制剂	HMW%	主%	LMW%	柱回收率 (%) ^a	总面积 ($\mu\text{V}\cdot\text{s}$)
琥珀酸盐 pH 6.0	NaCl	A	5.3	94.4	0.3	99	19084426
	精氨酸	B	4.7	94.9	0.3	98	18440146
	蔗糖	C	4.6	94.9	0.5	99	18651298
	甘露糖醇	D	5.1	94.3	0.6	98	19005559
	甘氨酸	E	7.1	92.6	0.3	98	18936695
柠檬酸盐 pH 7.0	NaCl	F	5.7	93.9	0.4	97	18937420
	精氨酸	G	8.4	91.1	0.4	96	18724123
	蔗糖	H	5.2	94.4	0.4	97	19198190
	甘露糖醇	I	5.9	93.7	0.4	98	19285938
	甘氨酸	J	10.4	89.3	0.4	96	18259087
磷酸盐 pH 8.0	NaCl	K	7.1	92.7	0.2	98	19447707
	精氨酸	L	6.8	92.9	0.3	97	19095422
	蔗糖	M	5.3	94.4	0.2	99	19455680
	甘露糖醇	N	8.1	91.7	0.2	98	19564507
	甘氨酸	O	14.9	84.8	0.3	96	18730132
组氨酸 pH 6.0	精氨酸/NaCl	P	15.7	83.8	0.4	93	18378845
起始材料			8.1	91.5	0.4	96	18756246

[0323] ^a柱回收率 (%) = ((总峰面积/ 10^6) * (流速/60) (消光系数*路径长度)) / (样品浓度*进样量/ 10^3) * 100

[0324] 实例7:冻干ENPP1多肽制剂的溶解度筛选

[0325] 为了建立用于冻干的ENPP1多肽制剂的最大溶解度的条件,在等渗浓度的蔗糖、脯氨酸和NaCl的存在下使用20mM琥珀酸盐pH 6.0、柠檬酸盐pH 5.0和pH 6.0、碳酸氢钠pH 7.0和组氨酸pH 6.0。在缓冲液交换和浓缩之后,将样品分成两个等体积等分试样,其中一个等分试样在40℃下热应力约7天,并且另一个保持在5℃下。评价热应力和5℃样品的酶促活性,并通过SEC评价HMW物种形成。通过将ENPP1-Fc与pNP-TMP混合来执行用于评价每种样品的活性的酶促测定。在25℃下,在405nm下通过分光光度法监测产物形成(pNP),持续5分钟的时段。ENPP1-Fc的比活性通过将每次样品制备获得的吸光度随时间的变化内插到已知浓度的pNP的标准曲线来计算。报告相对于参考样品材料的结果,其中单位对应于随时间(分钟)推移生成的产物的摩尔数。溶解度筛选酶促活性测定结果显示于表9和图7中。如对于这些样品中的每一个观察到的酶促活性增强所指出的,包括pH 6.0的制剂展示出增加的热稳定性。由于样品的胶凝,未确定在40℃下温育的柠檬酸盐pH 5.0的值。总的来说,酶促活性表明,当比较5℃与40℃温育的样品时,琥珀酸盐和柠檬酸盐pH 6.0是所评价的添加剂中表现最佳的缓冲液类型。

[0326] 表9:酶促活性测定溶解度筛选数据汇总

[0327]

缓冲液	pH	赋形剂	制剂	条件	U/mL	U/mg
20 mM 琥珀酸盐	pH 6.0	250 mM 蔗糖	A	5°C	9.8	9668
				40°C	11.8	11721
		250 mM 脯氨酸	B	5°C	10.5	9878
				40°C	11.9	11156
		150 mM NaCl	C	5°C	9.2	9363
				40°C	12.0	12180
20 mM 柠檬酸盐	pH 5.0	250 mM 蔗糖	D	5°C	8.9	8905
				40°C	ND	ND
		250 mM 脯氨酸	E	5°C	7.9	7607
				40°C	ND	ND
		150 mM NaCl	F	5°C	8.7	8365
				40°C	ND	ND
	pH 6.0	250 mM 蔗糖	G	5°C	10.1	9612
				40°C	11.7	11127
		250 mM 脯氨酸	H	5°C	10.6	10409
				40°C	9.5	9349
		150 mM NaCl	I	5°C	9.7	9582
				40°C	11.0	10863
20 mM 碳酸氢钠	pH 7.0	250 mM 蔗糖	J	5°C	8.6	8291
				40°C	6.5	6309
		250 mM 脯氨酸	K	5°C	10.5	10249
				40°C	3.2	3107
		150 mM NaCl	L	5°C	9.7	9300
				40°C	8.9	8528
20 mM 组氨酸	pH 6.0	100 mM Arg/50 mM NaCl	M	5°C	9.6	9704
				40°C	10.0	10113
起始材料					10.3	10459

[0328] ND: 未确定

[0329] 通过SEC确定的HMW物种的形成与酶促活性筛选中观察到的趋势一致。琥珀酸盐和柠檬酸盐pH 6.0表现出最低的%HMW, 而与制剂中使用的添加剂无关。在40°C下的柠檬酸盐pH 6.0优于所有其他40°C样品。在柠檬酸盐pH 5.0和碳酸氢钠pH 7.0中的脯氨酸和NaCl生成总体最高的%HMW物种。SEC溶解度筛选数据汇总显示于表10和图8中。

[0330] 表10: SEC溶解度筛选数据汇总

[0331]

缓冲液	pH	赋形剂	制剂	HMW (%)	主峰 (%)	LMW (%)	总面积 ($\mu\text{V}\cdot\text{s}$)
20 mM 琥珀酸盐	pH 6.0	250 mM 蔗糖	A	6.0	93.8	0.2	50123877
		250 mM 脯氨酸	B	6.3	93.5	0.2	35728620
		150 mM NaCl	C	5.9	93.8	0.2	35824216
20 mM 柠檬酸盐	pH 5.0	250 mM 蔗糖	D	8.2	91.5	0.3	39059229
		250 mM 脯氨酸	E	14.6	85.0	0.4	27138683
		150 mM NaCl	F	11.7	88.0	0.3	28169043
	pH 6.0	250 mM 蔗糖	G	5.3	94.5	0.2	52451719
		250 mM 脯氨酸	H	5.1	94.7	0.3	30695670
		150 mM NaCl	I	5.5	94.3	0.3	41407595
20 mM 碳酸氢钠	pH 7.0	250 mM 蔗糖	J	13.6	86.2	0.2	43615676
		250 mM 脯氨酸	K	16.5	83.3	0.2	51379433
		150 mM NaCl	L	12.5	87.3	0.2	34932916
20 mM 组氨酸	pH 6.0	100 mM Arg/50 mM NaCl	M	5.7	94.0	0.3	33330444

[0332] 实例8:表面活性剂筛选

[0333] 为了鉴定用于冻干ENPP1多肽制剂的优异表面活性剂,将ENPP1-Fc缓冲液交换到三种基础制剂(琥珀酸盐/蔗糖pH 6.0、琥珀酸盐/NaCl pH 6.0和柠檬酸盐/蔗糖pH 7.0)和对照制剂(组氨酸/精氨酸/NaCl pH 6.0)中。使制剂样品经由冷冻解冻循环和机械应力经受应力,另外保留两个小等分试样作为无应力对照。将冷冻解冻循环样品在-80℃下冷冻 ≥ 60 分钟并在室温下解冻。重复此过程总共5个循环。对于搅动应力,将样品在室温下置于设置为约600rpm、避光的微孔板振荡器上约72小时。

[0334] 为了评估应力样品的稳定性/聚集,测量酶促活性并进行SEC-HPLC。对于所有应力条件和制剂,各表面活性剂下的酶促活性相当,指示ENPP1-Fc的酶促活性在测试条件下不受影响。表面活性剂研究的SEC评价显示于表11、图9A和图9B中。在所有制剂中的%HMW含量指示表面活性剂对进行冷冻/解冻应力的样品没有影响,因为已显示应力样品与相应对照之间的值是等效的。对于搅动应力样品,P188样品是三种测试表面活性剂中最不稳定的。PS20在搅动应力下提供了优异的稳定性,并且在三种测试的表面活性剂中,生成降低的%HMW含量。这些数据指示表面活性剂的存在和类型在物理应力后影响ENPP1-Fc稳定性。SEC证明对于50mg/mL EnPP1-Fc的稳定性,PS20是最佳表面活性剂类型。在搅动后,P188在大多数赋形剂/缓冲液类型组合中显示出升高水平的总较高阶聚集体。

[0335] 表11:表面活性剂筛选SEC数据汇总

[0336]

缓冲液	pH	赋形剂	制剂	表面活性剂	条件	HMW%	主%	LMW%	柱回收率	总面积 ($\mu\text{V}\cdot\text{s}$)
20 mM 琥珀酸盐	pH 6.0	250 mM 蔗糖	A	-	搅动	8.9	90.8	0.3	101	3480
					搅动 对照	7.3	92.4	0.3	101	3303
					F/T	5.6	94.1	0.3	100	3505
					5°C	6.0	93.7	0.3	101	3598
			B	0.05% PS20	搅动	7.8	92.0	0.3	98	3365
					搅动 对照	7.2	92.4	0.3	98	3330
					F/T	5.5	94.2	0.3	98	3510
					5°C	5.9	93.8	0.3	98	3634
			C	0.05% PS80	搅动	8.1	91.6	0.3	98	3415
					搅动 对照	7.5	92.1	0.3	97	3260
					F/T	5.6	94.1	0.3	99	3568
					5°C	6.0	93.7	0.3	97	3648
			D	0.1% P188	搅动	8.9	90.9	0.3	87	3332
					搅动 对照	8.0	91.7	0.3	87	3316
					F/T	5.6	94.1	0.3	87	3528
					5°C	6.0	93.7	0.3	88	3595
		150 mM NaCl	E	-	搅动	7.7	92.0	0.3	99	3346
					搅动 对照	6.9	92.8	0.3	98	3223
					F/T	5.6	94.1	0.3	99	3510
					5°C	5.8	93.9	0.3	99	3621
			F	0.05% PS20	搅动	7.2	92.5	0.3	90	3406
					搅动 对照	6.8	92.8	0.3	92	3133
					F/T	5.5	94.2	0.3	91	3494
					5°C	5.8	93.9	0.3	94	3596
			G	0.05% PS80	搅动	7.5	92.2	0.3	90	3433
					搅动	7.0	92.7	0.3	91	3278

[0337]

					对照							
					F/T	5.6	94.1	0.3	90	3562		
					5°C	5.8	93.9	0.3	90	3631		
					H	0.1% P188	搅动	8.2	91.5	0.3	92	3309
							搅动 对照	7.5	92.1	0.3	94	3151
							F/T	5.6	94.1	0.3	95	3460
							5°C	5.9	93.8	0.3	95	3584
	20 mM 柠檬酸 盐	pH 7.0	250 mM 蔗糖	I	-	搅动	9.9	89.8	0.3	87	3403	
						搅动 对照	9.2	90.5	0.3	88	3115	
						F/T	7.2	92.4	0.3	8	3454	
						5°C	7.8	91.9	0.3	88	3598	
				J	0.05% PS20	搅动	9.5	90.2	0.3	93	3339	
						搅动 对照	9.2	90.5	0.3	92	3074	
						F/T	7.2	92.5	0.3	93	3489	
						5°C	7.7	92.0	0.4	93	3537	
				K	0.05% PS80	搅动	9.7	90.0	0.3	101	3304	
						搅动 对照	9.2	90.5	0.3	100	3081	
						F/T	7.2	92.4	0.4	101	3535	
						5°C	7.7	91.9	0.4	101	3555	
				L	0.1% P188	搅动	10.8	88.8	0.4	91	3268	
						搅动 对照	10.6	89.0	0.3	92	3063	
						F/T	7.3	92.4	0.4	92	3512	
						5°C	7.8	91.9	0.3	92	3600	
	20 mM 组氨酸	pH 6.0	100 mM Arg/50 mM NaCl	M	-	搅动	8.6	91.0	0.3	101	3329	
						搅动 对照	8.1	91.6	0.3	96	3112	
						F/T	6.9	92.7	0.4	101	3468	
						5°C	7.1	92.6	0.3	101	3560	
	起始材料						4.9	94.8	0.3	102	3590	

[0338] 实例9:辅因子筛选

[0339] 在20mM琥珀酸盐、250mM蔗糖pH 6.0中研究11种不同的辅因子组合(包含无辅因子阴性对照)。测试的辅因子包含Zn²⁺和Ca²⁺(其中氯离子和硫酸根离子作为抗衡离子)以及单磷酸腺苷(AMP)。对每种辅因子组合进行SEC实验。SEC数据汇总于表12中。图10。这些数据证明,AMP/ZnCl表现出最低水平的%HMW。然而,对于测试的辅因子,在不存在AMP的情况下,Ca²⁺(其中氯离子和硫酸根离子作为抗衡离子)产生最低的%HMW含量。Ca²⁺辅因子令人惊讶地稳定了ENPP1-Fc,但也证明了恢复在样品制备期间可能形成的更高阶聚集体物种的能力。通过比较制剂A和C观察到这些效应(图11)。锌产生最高水平的%HMW含量,然而,在锌的存在下%HMW因添加amp而显著减少,从而将%HMW水平降低到低于用于生成所有样品的源

材料的%HMW水平(即制剂A的%HMW水平)。这些结果指示,辅因子的存在和类型令人惊讶地并且显著地增加了ENPP1-Fc的稳定性。

[0340] 表12:辅因子筛选辅因子组合汇总SEC数据

缓冲液	制剂	样品类型	辅因子	HMW (%)	主 (%)	LMW (%)	柱回收率 (%)	USP 板计数	总面积 ($\mu V \cdot s$)	浓度 (mg/mL)
[0341] 20 mM 琥珀酸盐 250 mM 蔗糖 0.05% PS20 pH 6.0	A	缓冲液交换	-	18.8	80.9	0.3	97	3607		50.5
	B		2 mM ZnCl	71.0	28.8	0.2	95	3300		49.9
	C		2 mM CaCl	11.5	88.2	0.3	99	3523		50.6
	D		2 mM ZnCl + 2 mM CaCl	72.5	27.3	0.2	96	3368		52.1
	E	加标制剂 A	2 mM ZnCl	46.8	53.0	0.2	99	3644		50.6
	F		2 mM CaCl	12.1	87.4	0.5	97	3540		51.4
	G		2 mM ZnCl + 2 mM CaCl	47.8	52.0	0.2	100	3538		51.0
	H		2 mM ZnSO ₄	48.8	51.0	0.2	93	3472		54.0
	I		2 mM CaSO ₄	12.3	87.3	0.4	97	3489		50.1
	J		5 mM ZnSO ₄ + 2 mM CaSO ₄	52.0	47.9	0.2	97	3294		50.4
	K		2 mM ZnCl + 50 mM AMP	8.4	91.2	0.4	-	3396		44.0

[0342] 进一步研究了总共15种不同的缓冲液/辅因子组合。将ENPP1-Fc缓冲液交换到12种不同的制剂中。通过SEC评价蛋白质在各种制剂中的稳定性。在SEC分析之前,将样品在40℃下储存6天。在研究期间,将每种制剂的对照样品保持在5℃下。SEC数据汇总于表13和图12A-B中。与上文呈现的辅因子数据一致,Ca²⁺和Ca²⁺/单磷酸腺苷在测试的样品中生成最低量的高阶聚集体。当与柠檬酸盐和蔗糖组合时,Ca²⁺和Ca²⁺/单磷酸腺苷各自生成最低百分比(8.6%)的HMW,指示Ca²⁺和Ca²⁺/单磷酸腺苷是优异的辅因子,当与柠檬酸盐和蔗糖组合使用时,令人惊讶地增强制剂的总体稳定性。

[0343] 表13:辅因子筛选缓冲液/辅因子汇总SEC数据

[0344]

缓冲液	赋形剂	制剂	HMW (%)	主峰 (%)	LMW (%)
20 mM 琥珀酸盐, 250 mM 蔗糖, 0.05% PS20, pH 6.0	-	A	19.1	80.4	0.5
	AMP (0.5 mM)	B	18.4	81.2	0.4
	AMP (5 mM)	C	18.7	80.9	0.4
	AMP (50 mM)	D	12.4	86.6	0.9
	ZnCl ₂ (2 mM)	E	74.2	25.5	0.3
	ZnCl ₂ (2 mM) + AMP (5 mM)	F	27.9	71.6	0.6
	ZnCl ₂ (2 mM) + AMP (50 mM)	G	9.5	89.7	0.7
	CaCl ₂ (2 mM)	H	11.3	88.1	0.6
	CaCl ₂ (2 mM) + AMP (5 mM)	I	10.2	89.3	0.5
20 mM 柠檬酸盐, 250 mM 蔗糖, 0.05% PS20, pH 6.0	AMP (5 mM)	J	15.3	84.1	0.5
	CaCl ₂ (2 mM)	K	12.7	86.4	0.9
	CaCl ₂ (2 mM) + AMP (5 mM)	L	8.6	90.9	0.6
20 mM 柠檬酸盐, 150 mM NaCl, 0.05% PS20, pH 6.0	AMP (5 mM)	M	15.2	84.3	0.5
	CaCl ₂ (2 mM)	N	15.0	84.3	0.8
	CaCl ₂ (2 mM) + AMP (5 mM)	O	8.6	90.9	0.5

[0345] 实例10: 优选的冻干ENPP1多肽制剂的表征

[0346] 基于上文呈现的表征和稳定性数据, 优选的冻干ENPP1多肽制剂包括琥珀酸盐和柠檬酸盐。这些优选制剂列举在表13中, 并且进一步表征了多肽随时间推移的稳定性。确定包括柠檬酸盐的每种制剂样品的pH为 $\text{pH}6.3 \pm 0.1$, 并且包括琥珀酸盐的每种样品的pH为 $\text{pH}6.1 \pm 0.1$ 。测量包括琥珀酸盐或柠檬酸盐的ENPP1-Fc样品的渗透压, 并且所有样品的渗透压范围为265-432mOsm/kg。汇总数据显示在图13中。通过SEC评价这些制剂的ENPP1-Fc的主峰纯度和更高阶聚集体。结果显示在图14中。制剂A、B、C、E和F中的冻干ENPP1-Fc和对照在所有时间点和条件下均表现出>94%的相对主峰纯度。储存在5°C下的13周时间点的琥珀酸盐样品表现出1%的%HMW含量增加, 而柠檬酸盐样品显示出约0.5%的%HMW增加。通过微流成像分析(MFI)评价粒度分布和形态。在MFI中, 当连续样品流穿过位于显微镜系统的视场中的流动池时, 以连续帧捕获明场显微镜图像。样品中存在的颗粒的图像由图像形态分析软件处理, 该图像形态分析软件允许在尺寸和计数方面对它们进行定量。报告 $\geq 2\mu\text{m}$ 、 $\geq 5\mu\text{m}$ 、 $\geq 10\mu\text{m}$ 、 $\geq 25\mu\text{m}$ 等效圆直径(ECD)尺寸箱的代表性图像和颗粒浓度(每mL)。物体的ECD以微米表示, 并且代表占据与颗粒相同的二维表面积 of 球体的直径。结果汇总于表14中。所有制剂的总颗粒计数通常在可接受的限度内。 $\geq 10\mu\text{m}$ ECD箱的总颗粒计数均低于749, 并且 $\geq 25\mu\text{m}$ ECD箱的总颗粒计数均低于132, 指示本文公开的制剂缺乏较大尺寸的颗粒。

[0347] 表14: MFI汇总数据

[0348]

缓冲液	赋形剂	制剂	时间点	条件	总颗粒计数/mL			
					≥ 2	≥ 5	≥ 10	≥ 25
20 mM 琥珀酸盐, 2 mM CaCl ₂ pH 6.0	蔗糖 (9%)	A	T0	-75°C - 对照	1505	117	26	7
				冻干	2902	767	214	12
			4 周	-75°C - 对照	1835	582	201	34
				5°C	2301	830	320	35
				40°C	1210	398	123	16
			13 周	5°C	4068	1223	231	23
	蔗糖 (3%) 甘露糖醇 (1.5%)	B	T0	-75°C - 对照	720	90	17	1
				冻干	2753	763	267	42
			4 周	-75°C - 对照	2482	800	304	36
				5°C	1395	446	150	22
				40°C	839	218	77	8
			13 周	5°C	2090	652	142	31
	蔗糖 (2%) 甘露糖醇 (2%)	C	T0	-75°C - 对照	2280	659	210	26
				冻干	2634	617	201	23
			4 周	-75°C - 对照	2953	976	346	65
				5°C	3900	976	297	33
				40°C	877	211	70	15
			13 周	5°C	2127	615	99	4
20 mM 柠檬酸	蔗糖 (9%)	D	T0	-75°C - 对照	306	81	36	11

[0349]	盐, 2 mM CaCl ₂ pH 6.0				冻干	3574	386	92	9
				4 周	-75°C - 对照	234	73	31	7
					5°C	818	214	61	10
					40°C	1836	754	302	29
				13 周	5°C	4033	1951	749	132
		蔗糖 (3%) 甘 露糖醇 (1.5%)	E	T0	-75°C - 对照	188	48	17	5
					冻干	1235	195	67	10
				4 周	-75°C - 对照	2805	1174	349	34
					5°C	1389	411	140	22
					40°C	2090	850	326	47
				13 周	5°C	1842	566	121	23
		蔗糖 (2%) 甘 露糖醇 (2%)	F	T0	-75°C - 对照	718	289	114	26
					冻干	2285	357	117	8
				4 周	-75°C - 对照	1683	639	212	22
					5°C	1522	406	123	15
					40°C	1156	357	107	6
				13 周	5°C	3182	1283	492	95

[0350] 基于上述报告的数据,选择20mM柠檬酸盐、88mM蔗糖、82mM甘露糖醇、2mM氯化钙、0.05% PS20 pH 6.3 (制剂A) 和20mM柠檬酸盐、263mM蔗糖、2mM氯化钙、0.05% PS20 pH 6.3 (制剂B) 作为冻干ENPP1-Fc的最合适的制剂。进一步研究了这些制剂在各种储存条件下对冻干多肽稳定性的长期影响。在三种不同的储存条件 (5°C、25°C和40°C) 下,在三个月的时段内测试两种制剂。三个月后,所有含有ENPP1-Fc的冻干饼均显示出象牙色的完整结构。在复原后,对于所有样品类型,观察到液体外观为淡棕色-黄色,澄清且无可见颗粒。复原在与上文呈现的数据一致的窗口内发生,冻干样品的完全复原在59秒至108秒内发生。两种制剂随时间推移在各温度条件下的水分含量也与上文呈现的水分含量数据保持一致。在所有测试储存温度下,所有冻干样品时间点在各个时间点和条件下都具有极低的水分含量或无水分含量,并且残留水分含量范围为0.0%-0.3%。每种储存条件下的每种样品的pH值也随时间推移保持一致,在三个月的过程中样品pH保持在pH 6.3±0.1。还测量了每种样品的相对于50mg/mL归一化起始浓度的蛋白质回收率。表15中呈现了蛋白质回收率汇总数据。每种样品的回收率与零时间点阳性对照的回收率数据一致。测量零时间点阳性对照的浓度为40.1mg/mL。所有回收样品的浓度均在低于阳性对照样品0.3mg/mL以内,或在高于阳性对照样品的浓度8.8mg/mL以内。这些数据指示,蛋白质回收率在5°C、25°C和40°C储存条件下不会随时间推移而降低。

[0351] 表15: 在5°C、25°C和40°C下三个月内优选制剂蛋白质回收率数据汇总

样品	标称浓度 (mg/mL)	复原填充体 积 (mL)	时间点	条件	A280 回收率 (mg/mL)
[0352]	制剂 A	50.0	T0	冷冻对照	47.5
				冻干	40.1
			1 个月	冷冻对照	43.4
				5°C	43.1
				25°C	40.2
				40°C	39.8
			3 个月	冷冻对照	46.8
				5°C	43.9
				25°C	40.7
				40°C	46.3
	制剂 B	0.5	T0	冷冻对照	53.9
				冻干	48.5
			1 个月	冷冻对照	52.7
				5°C	48.0
				25°C	47.1
				40°C	48.9
			3 个月	冷冻对照	55.3
				5°C	49.4
				25°C	48.9
				40°C	49.9

[0353] 进行SEC实验以表征在将优选制剂的样品储存在5°C、25°C和40°C下时,在三个月时段内HMW物种发展的倾向。与总HMW物种、LMW物种和主峰物种的丰度百分比有关的汇总SEC数据报告于表16中。图15显示了每种储存条件下随时间推移HMW丰度百分比和主峰丰度百分比的汇总SEC数据。阳性对照零时间点样品具有大约4%的HMW含量。所有优选制剂样品与对照保持一致,每种制剂样品在5°C、25°C和40°C储存条件下在三个月的时段内具有±5%的HMW含量。这些结果指示,每种优选制剂令人惊讶地能够防止高分子量聚集体物种的形成达至少三个月的延长时间量。这些数据还指示,优选制剂即使在较高或非冷藏温度如25°C和40°C下储存时也能够使冻干多肽稳定以抗HMW物种形成。

[0354] 表16: 在5°C、25°C和40°C下三个月内优选制剂的汇总SEC数据

[0355]

样品	标称浓度 (mg/mL)	复原 填充体 积(mL)	样品 类型	时间点	条件	HMW (%)	主峰 纯度 (%)	LMW (%)
制剂 A	50.0	0.5	冻干	T0	冷冻对照	3.8	95.7	0.5
					冻干	3.7	95.8	0.5
				1 个月	冷冻对照	4.2	95.1	0.7
					5°C	4.0	95.2	0.7
					25°C	4.1	95.1	0.8
					40°C	4.3	95.0	0.7
				3 个月	冷冻对照	4.0	95.3	0.6
					5°C	4.2	95.2	0.6
					25°C	4.7	94.7	0.6
					40°C	4.2	95.2	0.6
制剂 B	50.0	0.5	冻干	T0	冷冻对照	3.9	95.5	0.6
					冻干	3.9	95.6	0.5
				1 个月	冷冻对照	4.2	95.1	0.8
					5°C	4.1	95.1	0.8
					25°C	4.2	95.1	0.8
					40°C	4.8	94.5	0.8
				3 个月	冷冻对照	4.1	95.3	0.6
					5°C	4.3	95.1	0.6
					25°C	4.9	94.5	0.6
					40°C	4.0	95.5	0.6

[0356] 使用上述酶促活性筛选评估对应于各时间点和储存条件的所有优选制剂样品的比活性。汇总数据显示于表17中。随时间推移绘制包含冷冻对照的每种样品的活性数据。图16中显示了代表性活性与时间的图。在各时间点和储存条件下的所有样品均呈现与阳性对照一致的酶促活性水平,活性水平范围为 $46009\mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ 至 $73173\mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ 。

[0357] 表17:在5°C、25°C和40°C下三个月内优选制剂的汇总酶促活性数据

[0358]

样品	标称浓度 (mg/mL)	填充 体积 (mL)	样品 类型	时间点	条件	比活性 ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)	标准偏差
制剂 A	50.0	0.5	冻干	T0	冷冻对照	54374	2181
					冻干	50840	3443
				1 个月	冷冻对照	46899	1679
					5°C	50717	2480
					25°C	46009	1776
					40°C	49521	2633
				3 个月	冷冻对照	75625	344
					5°C	69830	1623
					25°C	73173	1233
					40°C	68859	611
制剂 B	50.0	0.5	冻干	T0	冷冻对照	56227	3859
					冻干	75734	911
				1 个月	冷冻对照	49683	481
					5°C	49343	652
					25°C	55132	3391
					40°C	52421	1210
				3 个月	冷冻对照	67093	385
					5°C	68920	2554
					25°C	76087	803
					40°C	78107	2883

[0359] 通过MFI分析评价所有优选制剂时间点样品的粒度分布和形态。报告 $\geq 2\mu\text{m}$ 、 $\geq 5\mu\text{m}$ 、 $\geq 10\mu\text{m}$ 、 $\geq 25\mu\text{m}$ ECD尺寸箱的代表性图像和颗粒浓度(每mL)。结果汇总于表18中。总颗粒计数令人惊讶地远低于上述MFI结果中观察到的总颗粒计数,并且在所有优选制剂样品的可接受限度内。 $\geq 10\mu\text{m}$ ECD箱的总颗粒计数均低于146,并且 $\geq 25\mu\text{m}$ ECD箱的总颗粒计数均低于21,指示当与先前MFI分析中描述的其他制剂组合相比时,本文公开的优选制剂能够使较大尺寸颗粒减少近十倍。

[0360] 表18: 在5°C、25°C和40°C下三个月内优选制剂的汇总MFI数据

[0361]

样品	标称浓度 (mg/mL)	填充体 积(mL)	样品 类型	时间点	条件	总颗粒计数/mL
----	-----------------	--------------	----------	-----	----	----------

[0362]

						≥ 2	≥ 5	≥ 10	≥ 25					
	制剂 A	50.0	0.5	冻干	T0	冷冻对照	2128	504	103	14				
						冻干	27676	2200	20	8				
					1 个月	冷冻对照	1473	523	146	10				
						5°C	2033	675	101	10				
						25°C	1856	571	80	12				
						40°C	2037	735	142	21				
					3 个月	冷冻对照	2760	410	93	10				
						5°C	521	76	14	0				
						25°C	412	70	21	0				
						40°C	424	45	0	0				
					制剂 B	50.0	0.5	冻干	T0	冷冻对照	591	103	37	0
										冻干	28553	1961	43	6
	1 个月	冷冻对照	1134	412					86	8				
		5°C	2393	354					35	2				
		25°C	3124	379					21	0				
		40°C	1864	360					39	0				
	3 个月	冷冻对照	1114	140					29	0				
		5°C	1988	64					12	2				
		25°C	564	27	6	0								
		40°C	342	76	19	2								

[0363] 上述制剂开发研究集中于鉴定制剂组分,该制剂组分将导致ENPP1-Fc制剂在应力和非应力两种条件下的最佳化学、物理和结构稳定性。在基线缓冲液、赋形剂、溶解度、表面活性剂和辅因子研究的过程中,以迭代方式评价多种缓冲液类型、pH条件、赋形剂和表面活性剂浓度。基于本文公开的冻干制剂研究的结果,选择20mM柠檬酸盐pH 6.3、88mM蔗糖、82mM甘露糖醇、2mM氯化钙、0.05% PS20以及20mM柠檬酸盐pH 6.3、263mM蔗糖、2mM氯化钙、0.05% PS20作为ENPP1-Fc的最合适的制剂。这些优选制剂赋予目标浓度为50mg/mL的ENPP1-Fc的冻干多肽制剂最大的化学、物理和构象稳定性。

[0364] 另外,测试了另一种示例性制剂(制剂C1):50mg/mL ENPP1多肽、20mM柠檬酸盐(约pH 6.3)、2mM氯化钙、175mM蔗糖、82mM(D)甘露糖醇和0.05%w/v聚山梨醇酯20。研究了该制剂在12个月内在各种储存条件下对冻干ENPP1-Fc多肽稳定性的长期影响,该储存条件为以下三种不同的储存条件:5°C、25°C和40°C。在增加三个月后,含有ENPP1-Fc的冻干饼显示出象牙色的完整结构。在复原后,对于所有样品类型,观察到液体外观为淡棕色-黄色,澄清且无可见颗粒。复原在与上文呈现的数据一致的窗口内发生,冻干样品的完全复原在两至三分钟内发生。随时间推移的各温度条件下的水分含量也保持一致。在所有测试储存温度下,所有冻干样品时间点在各时间点和条件下都具有极低的水分含量或无水分含量,并且残留水分含量范围为0.0%-0.16%。每种储存条件下的每种样品的pH值也随时间推移保持一致,在三个月的过程中样品pH保持在pH 6.3±0.1。

[0365] 尺寸排阻色谱法(SEC)用于评价ENPP1多肽制剂样品中存在的聚集体和降解产物的量。在十二(12)个月(5°C和25°C)和六个月(40°C)时段内总高分子量(HMW)物种、低分子量(LMW)物种和主峰纯度的丰度百分比。

[0366] 表19:在5℃下十二个月内的制剂C1的汇总酶促活性数据

分析程序	单位	时间零	一个月	三个月	六个月	九个月	十二个月
比活性	U/mg – umol/min*mg	90.10	98.30	96.40	81.80	99.90	90.90
[0367] SE-HPLC HMWS	面积%	3.8	4.1	4.0	4.0	3.8	3.6
SE-HPLC LMWS	面积%	<0.3	<0.3	<0.3	<0.3	<0.3	<0.3
SE-HPLC 主峰	面积%	96.1	95.8	95.8	95.9	96.1	96.3

[0368] 表20:在25℃下十二个月内制剂C1的汇总酶促活性数据

分析程序	单位	时间零	一个月	三个月	六个月	九个月	十二个月
比活性	U/mg – umol/min*mg	90.10	101.80	91.20	86.70	101.40	92.70
[0369] SE-HPLC HMWS	面积%	3.8	4.3	4.4	4.4	4.2	3.9
SE-HPLC LMWS	面积%	<0.3	<0.3	<0.3	<0.3	<0.3	<0.3
SE-HPLC 主峰	面积%	96.1	95.6	95.4	95.4	95.7	96.0

[0370] 表21:在40℃下六个月内制剂C1的汇总酶促活性数据

分析程序	单位	时间零	一个月	三个月	六个月
[0371] 比活性	U/mg – umol/min*mg	90.10	102.90	96.0	85.90
[0372] SE-HPLC HMWS	面积%	3.8	4.5	4.9	5.0
SE-HPLC LMWS	面积%	<0.3	<0.3	<0.3	<0.3
SE-HPLC 主峰	面积%	96.1	95.3	94.9	94.8

[0373] 比活性和SEC数据证明,制剂C1,与制剂A和B(上文)一样,为ENPP1-Fc提供显著的总体稳定性,此处特别是在一系列温度下并且持续至少十二个月。

[0374] 实例11:使用冻干ENPP1多肽制剂进行治疗

[0375] ENPP1-Fc可以与所公开的上述制剂中的任一种一起施用。在一些实施例中,ENPP1-Fc在包括以下的制剂中施用:20mM柠檬酸盐(约pH 6.3)、2mM氯化钙、175mM蔗糖、82mM(D)甘露糖醇和0.05%w/v聚山梨醇酯20。在施用于有此需要的受试者之前,将冻干制剂在合适的复原缓冲液(或无菌水)中复原。

[0376] ENPP1-Fc以下所选剂量之一施用:0.2mg/kg、0.6mg/kg和1.8mg/kg。皮下(SC)施用,至少每两个月一次或两次、至少每月一次或两次、每月三次、至少每周一次或两次。

[0377] ENPP1-Fc的第一剂量可以在第1天施用。在第8天以及此后,以ENPP1的所选剂量每周两次向受试者施用ENPP1-Fc。剂量可以在每个给药日的大致相同时间施用。注射部位交替,其中在前2周内任何先前注射部位的2英寸内无部位。

[0378] ENPP1-Fc的所选剂量为0.2mg/kg、0.6mg/kg或1.8mg/kg SC中的一者。ENPP1-Fc的

第一剂量可以在第1天施用。在第一剂量之后,可以观察受试者7天,以监测安全性并收集PK样品。在第8天以及此后,受试者每周接受所选剂量两次。在执业医师认为合适的情况下,继续以所选剂量施用ENPP1-Fc。

[0379] 受试者可以在29天时间段的过程内接受8个剂量的ENPP1-Fc,例如,结果是0.2mg/kg、0.6mg/kg和1.8mg/kg的剂量的量每29天分别暴露1.6mg、4.8mg和14.4mg。或者,受试者可以接受多于或少于8个剂量的剂量,如医学界认为合适的。

[0380] 与内源性ENPP1酶一样,ENPP1-Fc切割ATP以生成AMP和PPi,由此增加血浆PPi水平并进入AMP中,CD73将AMP快速转变为腺苷。内源性人酶的替换旨在校正固有缺乏,并且允许改善健康和减轻与ENPP1缺乏症相关的临床并发症、基线患者、临床医生和护理人员结果。

[0381] 实例12:患有ENPP1缺乏症的患者的治疗

[0382] 使用如下的选择剂量,在第1天以及从第8天开始每周两次通过皮下注射向被鉴定为患有ENPP1缺乏症的患者施用如上配制的Enpp1-Fc。

[0383] 表22. 示例性剂量

[0384]	1	0.2mg/kg
	2	0.6mg/kg
	3	1.8mg/kg

[0385] ENPP1-Fc以所选剂量施用,ENPP1-Fc的所选剂量为0.2mg/kg、0.6mg/kg或1.8mg/kg SC之一,每周至少两次,持续由医学专业人员确定的时间。适当地监测患者对酶替代的应答,如由医学专业人员例如通过跟踪ENPP1缺乏症的一种或多种症状的减少和/或使用本文所提供的指导所测定。

[0386] 实例13:被诊断患有GACI的患者的治疗

[0387] Enpp1缺乏症可能被掩盖为GACI。GACI是一种发生在婴儿体内的罕见疾病,并且涉及广泛的动脉钙化(Albright等人,2015,《自然通讯》10006)。

[0388] 如上配制的ENPP1-Fc以ENPP1-Fc的所选剂量施用,ENPP1-Fc的所选剂量为0.2mg/kg、0.6mg/kg或1.8mg/kg SC之一,每周至少两次,持续由医学专业人员确定的时间段。适当地监测GACI患者对酶替代的应答,如由医学专业人员例如通过跟踪GACI的一种或多种症状的减少和/或使用本文所提供的指导所测定。

[0389] 实例14:被诊断患有ARHR2的患者的治疗

[0390] Enpp1缺乏症可能被掩盖为ARHR2。ARHR2是一种罕见的骨骼病症,其特征存在于血浆PPi和血清磷酸盐的水平低,其可能引起佝偻病、长骨的反复骨折、佝偻病性骨骼畸形以及生长和发育受损(Ferreira等人2014,Moran1975,Rutsch等人2008)。

[0391] 如上配制的ENPP1-Fc以ENPP1-Fc的所选剂量施用,ENPP1-Fc的所选剂量为0.2mg/kg、0.6mg/kg或1.8mg/kg SC之一,每周至少两次,持续由医学专业人员确定的时间段。适当地监测ARHR2患者对酶替代的应答,如由医学专业人员例如通过跟踪ARHR2的一种或多种症状的减少使用本文所提供的指导所测定。

[0392] 在整个说明书的背景下,以下实例为确定治疗方案和功效提供了指导。

[0393] 实例15:血浆无机焦磷酸盐的测量

[0394] 低血浆PPi水平是ENPP1缺乏症的特征并且用作治疗功效的指标。ENPP1-Fc特异性切割ATP以产生AMP和PPi。ENPP1 ERT的治疗目标是使细胞外PPi水平标准化,并校正与

ENPP1缺乏症相关的临床异常。

[0395] 通过获得患者血浆样品来测量PPi。测定的PPi数据可以用于调整剂量水平。PPi水平也可以充当PK/PD分析的主要PD标志物。

[0396] 哺乳动物中的Pi和PPi的浓度分别为1-3mM和2-3pM。

[0397] 实例16:与骨骼健康相关的生物标志物

[0398] 除了低血浆PPi外,ENPP1缺乏症患者的生物化学特征在于低血清磷酸盐、高尿酸盐、低肾TmP/GFR、正常钙(Ca)、低正常尿Ca、正常25-羟基维生素D(25OH D)、低正常1,25(OH)2D、高BAP、高完整FGF23和正常PTH(10F 2019)。

[0399] 表19中示出了可以用作经治疗患者的骨骼健康的额外决定因素的生物标志物。

[0400] 表23:临床中间体和生物标志物

[0401]	主要 药效动力学 标志物	实验室分析物	样品类型
		焦磷酸盐 (PPi)	血浆
		无机磷酸盐	血清
		FGF23 (完整)	血浆
		TmP/GFR	血清肌酐酞、血清磷酸盐、尿液磷酸盐
		ALP、BALP、CTx、PINP	血清、血浆、尿液

[0402] 实例17:ENPP1-Fc治疗的功效

[0403] 治疗功效可以通过测量血浆PPi以及测量其它血浆分析物,如FGF23、Pi、FGF23、Pi、TmP/GFR、血清碱性磷酸酶(ALP)、骨特异性ALP(BALP)、I型胶原蛋白的羧基末端交联三肽(CTx)和I型前胶原N端前肽(PINP)来评估。这些分析物测量结果可以用作与ENPP1缺乏症相关的PD标志物,以测定ENPP1-FC的功效。这些分析物的变化可以描述为在治疗过程中相对于基线和以时间依赖性方式的变化。还可以评估PK和PD参数的剂量线性。

[0404] 可以使用配对差异的t检验分析血浆PPi水平、FGF23水平和根据肌酐清除率的尿磷排泄量相对于基线的变化,以测试零假设,即PPi水平相对于基线的变化等于零。

[0405] 实例18:药物浓度测量

[0406] 另外,可以从患者获得血液样品以用于测量血浆中的ENPP1-FC浓度和在第一剂量(即单剂量)后和在多剂量(即稳态)下/之后的PK参数的后续确定。

[0407] 实例19:免疫原性(抗药物抗体)

[0408] 如果期望,可以使用抗药物抗体(ADA)测量ENPP1-Fc的免疫原性。免疫原性测试可以利用多层方法;如果在初始筛查中检测到ADA,则可以运行验证测试以确定特异性。样品还可以用于评估和进一步建立用于特异性确认(即滴度)和中和抗体的测定。

[0409] 实例20:药代动力学、药效动力学和探索性生物标志物分析

[0410] 可以对PK群体进行药代动力学分析,并且可以通过治疗以描述性统计汇总ENPP1-FC的PK参数。还可以评估PK和PD参数的剂量线性。可以测定PK/PD分析、免疫原性分析以及探索性生物标志物分析。

[0411] 实例21:功效的其它决定因素

[0412] 虽然恢复PPi的正常水平是使用NEPP1-Fc的治疗的功效的主要指标,但是如果期望,还可以使用其它物理测量来帮助测定治疗功效。这些包含以下中的一者或多者。

[0413] 1. 射线照相和成像

[0414] 针对骨骼严重程度的X射线。可以获得标准X射线以检测佝偻病骨骼畸形。可以获得例如手腕和膝盖的X射线。

[0415] DEXA扫描。DEXA扫描可以用于评估骨密度的变化。

[0416] 正电子发射断层扫描-计算机断层扫描。基线 Na^{18}F -PET/HRpQCT(或HR-CT)可以是在第一剂量的ENPP1-FC之后1个月内进行的全身扫描,以测量基线时动脉和器官的钙化以及骨骼异常,并用于未来的介入评估。 Na^{18}F -PET测量骨转换以及动脉的微钙化。高分辨率定量计算机断层扫描(HRQCT)或HR-CT可以测定非显性桡骨远端和胫骨的骨微观结构。计算标准骨骼几何参数。

[0417] 多普勒超声心动图。可以在第一剂量的ENPP1-FC之前3天内获得基线超声心动图。多普勒回波(Doppler echo)可以用于测量心脏功能[LVEF,血流]心脏和瓣膜钙化以及动脉硬化。

[0418] 光学相干层析成像。光学相干层析成像可以用于使新生内膜增殖可视化。

[0419] 外周动脉压力测量。外周动脉压力测量(PAT)可以用于评估多于数字体积变化相对应的数字脉冲波振幅(PWA)。

[0420] 肾脏超声。肾脏超声可以用于例如在开始ENPP1-FC的1周内测量肾钙化。

[0421] 骨组织形态学与骨活检。骨活检可以作为基线测量进行。优选在骨活检之前加载四环素,持续10天。

[0422] 2.步行能力。步行测试可以用作次最大运动测量,以测量组合心肺、神经肌肉和肌肉骨骼功能的走动患者的功能性能力。6分钟步行测试(6MWT)最初由美国胸科学会(ATS2002)开发,用于成人,并且现在通常用于成人和儿科群体两者(Mylius等人2016),以及患有神经肌肉疾病,如脊髓肌萎缩(Montes等人2018)、杜氏肌营养不良(McDonald等人2013)和婴儿期发作庞贝氏病(van der Meijden等人2018)的儿童。2分钟步行测试(2MWT)包含在NIH工具箱中,并且越来越多地用于测量相同的特性。

[0423] 6MWT和2MWT可以在治疗之前和期间由医疗保健提供者酌情决定施用于患者。如果受试者在基线时无法完成至少2MWT,则治疗期间的额外评估可以由医疗保健提供者酌情决定。在测试之前和测试后获得静息心率。可以记录6MWT的前2分钟内和完整的6分钟内步行的距离。在2分钟和6分钟内步行的距离可以与年龄和性别匹配的规范数据(预测值百分比)进行比较。

[0424] 3.肌力测定法。可以根据医疗保健提供者的判断,在治疗之前和/或期间使用肌力测定法来评估强度。手持式肌力测定法是儿童和成人两者中常用的强度直接测量。可以评估的肌肉群包含:肩外展、肩屈曲、肘屈曲、肘伸展、髋外展、髋屈曲、髋伸展和膝伸展。每个肌肉群可以双侧测量2次。

[0425] 握力。可以根据医疗保健提供者的判断,在治疗之前和/或期间使用握力测力仪测量握力。设备和评估员说明可以在不同地点进行标准化。可以通过双边方式评估抓握,对每只手采取1次练习和1次最大力测量,并且可以将结果与年龄和性别匹配的规范数据进行比较(在可用时)。

[0426] 运动范围。运动范围可以使用测角仪进行评估,所述测角仪是一种测试关节角度并测量关节运动程度的仪器。测角仪的固定臂与固定身体节段上的指定骨标志对齐,并且测角仪的移动臂与正在移动的肢体的指定骨骼标志对齐。使用运动轴和骨骼标志测量的每

个运动都指定了测角仪的支点。运动范围可以针对以下中的一者或多者进行评估：肩外展、肩屈曲、肘屈曲、肘伸展、髋外展、髋屈曲、髋伸展和膝伸展。

[0427] 4. 听力测试。中度听力丧失与ARHR2相关 (Brachet等人2014, Steichen-Gersdorf等人2015)。基线听力可以通过以下中的一者或多者测定：体格检查和耳镜检查、导抗测听法 (通常被称为鼓室导抗测试)、纯音测听 (PTA), 频率至多8kHz, 如果可能的话。(如果PTA阈值>15dB, 受试者还应接受骨传导测试)。高频听力测试 (HFA), 频率至多16kHz。

[0428] 5. 临床医生总体印象量表。开发临床医生总体印象 (CGI-S) 量表用于美国国家心理卫生研究所 (National Institute of Mental Health) 资助的临床研究, 以在开始使用研究药物之前和之后提供临床医生对患者总体功能的看法的简单、独立评估 (Guy 1976)。CGI提供临床医生确定的总体总结量度, 此量度考虑了所有可用信息, 包含关于患者的病史、心理社会状况、症状、行为以及症状对患者的功能能力的影响的知识。CGI-S可以在治疗之前和/或期间由医疗保健提供者酌情决定施用, 并且使用范围为-3 (重度恶化) 至+3 (显著改善) 的七点量表提供改变的总体评估。

[0429] 6. 粗大运动功能分类系统-扩展和修订。粗大运动分类系统-扩展和修订 (GMFCS-E和R) 可以在治疗之前和/或期间由医疗保健提供者酌情决定施用。GMFCS-E和R将患者发起的运动分类, 以1至5的量表强调移动性。

[0430] 7. 患者报告的结果测量信息系统。患者报告的结果测量信息系统 (PROMIS) 由美国国立卫生研究院 (NIH) 开发的各种问卷组成, 用于从患者的角度评估身体、心理和社会福利 (<http://www.healthmeasures.net>)。这些问卷已用于患有慢性健康病状, 如X连锁低磷血症、关节炎、多发性硬化和神经纤维瘤病的人的临床研究中。每个问卷含有8至10个项目, 由参与者按照从1 (从不) 至5 (始终) 的5分制李克特量表 (Likert scale) 评分。对每份问卷的评分进行求和, 其中高评分指示所测量的领域中更多 (例如, 更多疲劳、更多身体功能)。基于平均值50和标准偏差10, 将原始评分转换为T评分, 从而允许将研究样品与一般群体进行比较。PROMIS量表可以包含疼痛干扰 (简表8a)、疼痛强度 (第3a版)、身体功能-上肢 (定制简表)、身体功能-灵活性 (简表13a FACIT疲劳)、疲劳 (简表) 和认知影响 (简表8a), 并且可以在治疗之前和/或期间由医疗保健提供者酌情决定施用。这些评估可以由受试者在没有帮助的情况下完成。

[0431] 8. 护理者总体印象量表。护理者总体印象量表可以在治疗之前和/或期间由医疗保健提供者酌情决定施用于患者的护理者。护理者对变化的总体印象提供了使用从-3 (重度恶化) 到+3 (显著改善) 的七点量表对变化的总体评估。

[0432] 9. 西安大略和麦克马斯特大学骨关节炎指数。WOMAC是患者报告的结果, 用于评估患有髋关节或膝关节疼痛的患者的日常生活活动、功能性移动、步态、总体健康、疼痛和生活质量 (www.sralab.org)。评估由24个项目组成, 并且施用需要大约12分钟。WOMAC可以在治疗之前和/或期间由医疗保健提供者酌情决定施用。评估可以由受试者在没有帮助的情况下完成。

[0433] 实例22: 冻干ENPP1多肽制剂的扩展稳定性研究

[0434] 当在三种不同的储存条件 (5℃、25℃和40℃) 下储存36个月时段时, 测试优选制剂中的冻干ENPP1-Fc的长期稳定性。在24个月, 所有含有ENPP1-Fc的冻干饼均显示出象牙色的完整结构。在水中复原后, 对于所有样品类型, 观察到液体外观为淡棕色-黄色、澄清且

无可见颗粒。复原在与上文呈现的数据一致的窗口内发生,冻干样品的完全复原在59秒至108秒内发生。

[0435] 两种制剂随时间推移在各温度条件下的水分含量也与上文呈现的水分含量数据保持一致。在所有测试储存温度下,所有冻干样品时间点(0、3、6、9、12、18、24、30、36个月)在各时间点和条件下都具有极低的水分含量或无水分含量,并且残留水分含量范围为0.0%-0.3%。每种储存条件下的每种样品的pH值也随时间推移保持一致,在36个月的过程中样品pH保持在 $\text{pH } 6.3 \pm 0.1$ 。还测量了每种样品的相对于50mg/mL归一化起始浓度的蛋白质回收率。这些数据指示蛋白质回收率在5℃、25℃和40℃储存条件下不会随时间推移而降低。

[0436] 进行SEC实验以表征在将优选制剂的样品储存在5℃、25℃和40℃下时,在36个月时段内HMW物种发展的倾向。按照先前实例中概述的程序收集与总HMW物种、LMW物种和主峰物种的丰度百分比有关的汇总SEC数据。图17-19分别显示了在5℃、25℃和40℃下HMW丰度百分比和主峰丰度百分比随时间推移的汇总SEC数据。阳性对照零时间点样品具有大约4%的HMW含量。所有优选制剂样品与对照保持一致,每种优选制剂样品在5℃、25℃和40℃储存条件下在至少24个月的时段内具有 $\pm 5\%$ 的HMW含量。这些结果指示,每种优选制剂令人惊讶地能够防止高分子量聚集体物种的形成达延长的时间量。对于储存至多36个月的样品,观察到类似的结果。这些数据还指示,优选制剂即使在较高或非冷藏温度如25℃和40℃下储存时也能够使冻干多肽稳定以抗HMW物种形成。

[0437] 使用上文实例7中描述的酶促活性筛选评估对应于各时间点和储存条件的所有优选制剂样品的比活性。简言之,通过将ENPP1-Fc与pNP-TMP混合来执行用于评价每种制剂样品的活性的酶促测定。在25℃下,在405nm下通过分光光度法监测产物形成(pNP),持续5分钟的时段。ENPP1-Fc的比活性通过将每次样品制备获得的吸光度随时间的变化内插到已知浓度的pNP的标准曲线来计算。随时间推移绘制包含冷冻对照的每种样品的活性数据。图20中显示了在5℃、25℃和40℃下储存至多24个月的样品的代表性活性与时间的图。对于储存至多36个月的样品,观察到类似的结果。

[0438] 在各时间点和储存条件下,所有样品均呈现一致的酶促活性水平。因此,实验显示,冻干的ENPP1-Fc制剂即使在不同温度条件下储存时在长期储存下也保持稳定。

[0439] 实例23:小瓶和注射器中复原样品的稳定性分析

[0440] 进行以下测定以确定当储存在小瓶和注射器中达不同的时间点时,复原制剂是否在一段时间内经历任何蛋白质损失或活性损失。

[0441] 将优选制剂中的冻干ENPP1-Fc在水中复原,以达到范围为1mg/mL、2.5mg/mL和10mg/mL的不同浓度。将不同浓度的样品在两组注射器(高体积样品-250 μL 和低体积样品-50 μL)中在5℃下温育1-12小时范围内的不同时间间隔。一式三份重复实验。使用在测定时复原并稀释至10、2.5和1mg/mL的样品作为对照。确定未温育样品(时间-0小时)的酶活性。然后将温育样品(8-12小时)的活性相对于对照值归一化。还按照上文先前实例中所述的方案测量了每种样品的相对于50mg/mL归一化起始浓度的蛋白质回收率。

[0442] 图21显示了在不同时间间隔下储存在注射器或小瓶中的复原ENPP1-Fc的回收率百分比。这些数据指示,当以不同浓度储存在注射器中时,复原的ENPP1-Fc蛋白是稳定的。按照上文先前实例中所述的方案测量复原的ENPP1-Fc样品的比活性。图22显示了在不同时

间间隔下储存在注射器或小瓶中的复原ENPP1-Fc多肽样品的汇总酶促活性数据。在各时间点和储存条件下,所有样品均呈现一致的酶促活性水平。当储存在小瓶中时,蛋白质活性不变,但是当样品储存在注射器中超过8小时时,活性略微损失。

[0443] 实例24:复原样品稀释后的稳定性分析

[0444] 将小瓶中的冻干ENPP1-Fc制剂复原至25mg/mL。创建两组2.5mg/mL和1mg/mL稀释液。通过取单独的小瓶并使用注射器在测定时将其稀释至2.5mg/mL和1mg/mL来产生对照样品。因此,对照样品将处于零的温育时间。将稀释的样品2.5mg/mL和1mg/mL在5℃下温育过夜,并且将样品子集在室温(25℃)下温育1小时、2小时、3小时、4小时和8小时的时间间隔。如上文在先前实例中所述测量酶活性和蛋白质浓度。将值相对于对照样品归一化。图23显示了在不同时间间隔下储存在注射器或小瓶中的复原ENPP1-Fc的回收率百分比。该测定指示,当在5℃下储存在小瓶中过夜时或当在室温下储存至多8小时时,蛋白质浓度没有损失。图24显示了在不同时间间隔下储存在注射器或小瓶中的复原ENPP1-Fc多肽样品的汇总酶促活性数据。该测定指示,当在5℃下储存在小瓶中过夜时或当在室温下储存至多4小时时,蛋白质活性没有损失。当样品在室温下储存4小时后时,观察到酶活性的轻微损失。

[0445] 参考文献

[0446] ATS.美国胸科学会声明:六分钟步行测试指南(American Thoracic Society Statement:Guidelines for the six-minute walk test).《美国呼吸和重症护理医学杂志(AmJRespir,CritCare Med.)》2002 2002;166(1):111-7。

[0447] Brachet C,Mansbach AL,Clerckx A,Deltenre P,Heinrichs C.听力丧失是ENPP1功能丧失突变的临床表现的一部分(Hearing loss is part of the clinical picture of ENPP1 loss of function mutation).《儿科激素研究(Horm Res Paediatr.)》2014;81(1):63-6。

[0448] CTFG.临床试验中有关避孕和妊娠测试的建议(Recommendations related to contraception and pregnancy testing in clinical trials).2014[2020年5月19日];可从以下网址获得:

[0449] http://www.hma.eu/fileadmin/dateien/Human_Medicines/01-

[0450] [About HMA/Working Groups/CTFG/2014_09HMA_CTFG_Contraception.pdf](#)。

[0451] Ferreira C,Ziegler S,Gahl W.婴儿全身性动脉钙化(Generalized Arterial Calcification of Infancy).在以下文献中:Adam MP,Ardinger HH,Pagon RA,Wallace SE,Bean LJH,Stephens K等人,编辑.《基因评论(GeneReviews)》(R).西雅图(Seattle)(华盛顿州(WA))2014。

[0452] Guy W.临床整体印象量表(The Clinical Global Impression Scale).在以下文献中:Rush Jr AJ,First MB,Blacker D,编辑.《精神病测量手册(Handbook of Psychiatric Measures)》,2008.华盛顿特区(Washington,DC):美国精神病学出版公司(American Psychiatric Publishing,Inc);1976.第90-2页。

[0453] IOF.常染色体隐性低磷性佝偻病2型(Autosomal Recessive Hypophosphatemic Rickets Type 2,ARHR2).2019[2020年5月19日];可从以下网址获得:<https://www.iofbonehealth.org/osteoporosis-musculoskeletal-disorders/skeletal-rare-disorders/autosomal-recessive-hypophosphatemi-0>。

- [0454] Mackenzie NC,Huesa C,Rutsch F,MacRae VE.NPP1功能的新见解:来自临床和动物研究的经验教训(New insights into NPP1 function:lessons from clinical and animal studies).《骨骼(Bone)》.2012年11月;51(5):961-8。
- [0455] McDonald CM,Henricson EK,Abresch RT,Florence JM,Eagle M,Gappmaier E等人杜氏肌营养不良症的6分钟步行试验和其它终点:一项多中心研究48周的纵向自然史观察(The 6-minute walk test and other endpoints in Duchenne muscular dystrophy: longitudinal natural history observations over 48 weeks from a multicenter study).《肌肉神经(Muscle Nerve)》.2013年9月;48(3):343-56。
- [0456] Montes J,McDermott MP,Mirek E,Mazzone ES,Main M,Glanzman AM等人
- [0457] 脊髓性肌萎缩的动态功能:与年龄相关的进展模式(Ambulatory function in spinal muscular atrophy:Age-related patterns of progression).《公共科学图书馆·综合(PLoS One)》.2018;13(6):e0199657。
- [0458] Moran JJ.婴儿特发性动脉钙化的临床病理研究(Idiopathic arterial calcification of infancy:a clinicopathologic study).《病理学年鉴(Pathol Annu.)》1975;10:393-417。
- [0459] Mylius CF,Paap D,Takken T.儿童和青少年6分钟步行测试的参考值:系统综述(Reference value for the 6-minute walk test in children and adolescents: a systematic review).《呼吸医学专家综述(Expert Rev Respir Med.)》2016年12月;10(12):1335-52。
- [0460] NCI.国家癌症研究所癌症治疗和诊断部(National Cancer Institute Division of Cancer Treatment and Diagnosis,DCTD),国家癌症研究所(National Cancer Institute,NCI),国立卫生研究院(National Institutes of Health,NIH),卫生与公众服务部(Department of Health and Human Services,DHHS).《通用不良事件术语标准(Common Terminology Criteria for Adverse Events)》V5.0(CTCAE).公开:2017年11月27日.可在以下网址获得:https://ctep.cancer.gov/protocoldevelopment/electronic_applications/docs/ctcae_v5_quick_reference_8.5x11.pdf.2017。
- [0461] Orriss IR,Arnett TR,Russell RG.焦磷酸盐:矿化的主要抑制剂(Pyrophosphate:a key inhibitor of mineralisation).《当代药理学观点(Curr Opin Pharmacol.)》2016年6月;28:57-68。
- [0462] Rutsch F,Boyer P,Nitschke Y,Ruf N,Lorenz-Depierreux B,Wittkamp T等人低磷血症、高磷酸盐血症和二磷酸盐治疗与婴儿全身性动脉钙化的婴儿期后生存率相关(Hypophosphatemia,hyperphosphaturia,and bisphosphonate treatment are associated with survival beyond infancy in generalized arterial calcification of infancy).《循环-心血管遗传学(Circ Cardiovasc Genet.)》2008年12月;1(2):133-40。
- [0463] Steichen-Gersdorf E,Lorenz-Depierreux B,Strom TM,Shaw NJ.ENPP1功能缺失突变引起常染色体隐性低磷性佝偻病的早发性听力丧失(Early onset hearing loss in autosomal recessive hypophosphatemic rickets caused by loss of function mutation in ENPP1).《儿科内分泌与代谢杂志(J Pediatr Endocrinol Metab.)》2015年7

月;28(7-8):967-70。

[0464] van der Meijden JC,Kruijshaar ME,Harlaar L,Rizopoulos D,van der Beek N,van der Ploeg AT.酶替代疗法治疗17例儿童庞贝病患者的长期随访(Long-term follow-up of 17patients with childhood Pompe disease treated with enzyme replacement therapy).《遗传性代谢病杂志(J Inherit Metab Dis.)》2018年11月;41(6):1205-14。

[0465] 通过引用并入

[0466] 本文提及的所有出版物和专利都据此通过引用以其整体并入,就好像每个单独的出版物或专利都被具体和单独地指出通过引用并入。

[0467] 虽然已经讨论了本主题的具体实施例,但上述说明书是说明性的而不是限制性的。在阅读本说明书和下文权利要求书后,许多变化对于本领域的技术人员来说将变得明显。本发明的全部范围应参考权利要求书连同其等同物的全部范围以及说明书连同此类变化来确定。

```

1  MERDGCAGGG SRGGEGGRAP REGPAGNGRD RGRSHAAEAP GDPQAAASLL
51  APMDVGEEPL EKAARARTAK DPNTYKVLSL VLSVCVLTTI LGCIFGLKPS
101  CAKEVKSCKG RCFERTFGNC RCDAACVELG NCCLDYQETC IEPHIWTCN
151  KFCRCGEKRLT RSLCACSDDC KDKGDCCINY SSVCQGEKSW VEEPESINE
201  PQCPAGFETP PTLFLSLDGF RAEYLHTWGG LLPVISKLKK CGTYTKNMRP
251  VYPTKTFPNH YSIVTGLYPE SHGIIDNKMY DPKMNASFSL KSKEKFNPEW
301  YKGEPiWVTA KYQGLKSGTF FWPGSDVEIN GIFPDIYKMY NGSVPFEERI
351  LAVLQWLQLP KDERPHFYTL YLEEDSSGH SYGPVSSEVI KALQRVDGMV
401  GMLMDGLKEL NLHRCLNLIL ISDHGMEQGS CKKYIYLNKY LGDVKNIKVI
451  YGPAARLRPS DVPDKYYSFN YEGIARNLSC REPNQHFKPY LKHFLPKRLH
501  FAKSDRIEPL TFYLDPOWQL ALNPSEKRYC GSGFHGSDNV FSNMQALFVG
551  YGPGFKHGIE ADTFENIEVY NLMCDLLNLT PAPNNGTHGS LNHLKPNVY
601  TPKHPKEVHP LVQCPFTRNP RDNLGSCSNP SILPIEDFQT QFNLTVAEEK
651  IIKHETLPYG RPRVLQKENT ICLLSQHQM SGYSQDILMP LWTSYTVDRN
701  DSFSTEDFSN CLYQDFRIPL SPVHKCSFYK NNTKVSYGFL SPPQLNKNSS
751  GIYSEALLTT NIVPMYQSFQ VIWRYFHDTL LRKYAEERNG VNVVSGPVFD
801  FDYDGRCDL ENLRQKRRVI RNQEILIPTH FFIVLTSCKD TSQTPLHCEN
851  LDTLAFILPH RTDNSESCVH GKHDSSWVEE LLMLHRARIT DVEHITGLSF
901  YQQRKEPVSD ILKLKTHLPT FSQED (SEQ ID NO: 1)

```

图1

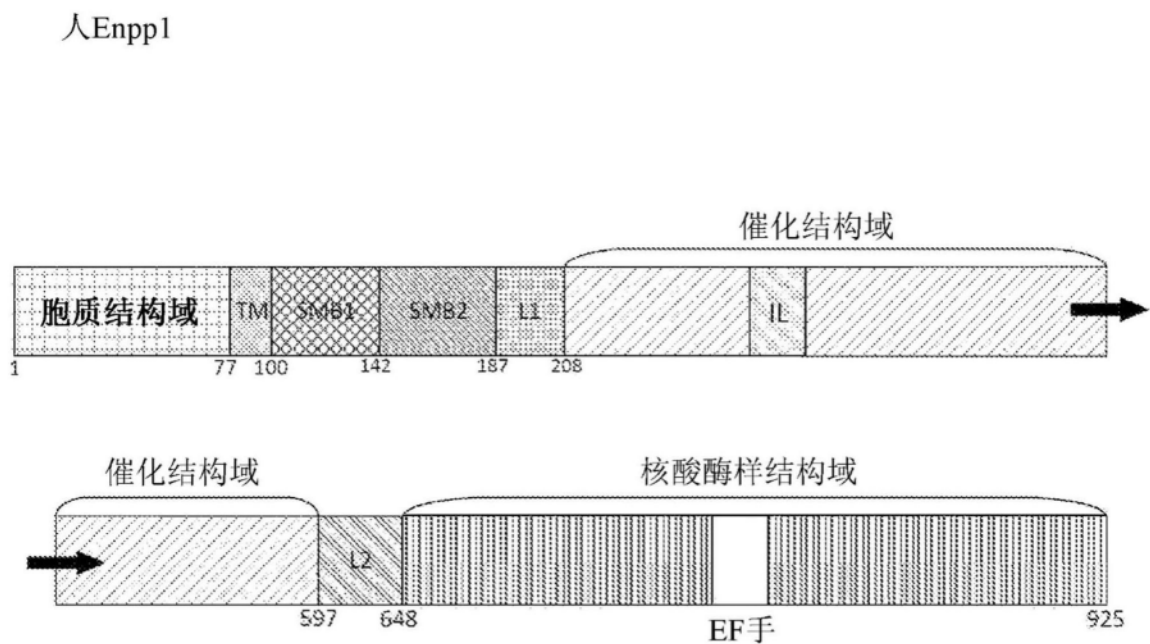


图2

```
1  PSCAKEVKSC  KGRCFERTFG  NCRCDAAACVE  LGNCCLDYQE  TCIEPEHIWT
51 CNKFRCGEKR  LTRSLCACSD  DCKDKGDCCI  NYSSVCQGEK  SWVEEPCESI
101 NEPQCPAGFE  TPPTLLFSLD  GFRAEYLHTW  GGLLPVISKL  KKCPTYTKNM
151 RPVYPTKTFP  NHYSIVTGLY  PESHGIIDNK  MYDPKMNASF  SLKSKEKFNP
201 EWYKGEPiWV  TAKYQGLKSG  TFFWPGSDVE  INGIFPDIYK  MYNGSVPFEE
251 RILAVLQWLQ  LPKDERPHFY  TLYLEEDSS  GHSYGPVSSE  VIKALQVRDG
301 MVGMLMDGLK  ELNLHRCLNL  ILISDHGMEQ  GSCKKYIYLN  KYLGDVKNIK
351 VIYGPAARLR  PSDVPDKYYS  FNYEGIARNL  SCREPNQHFK  PYLKHFLPKR
401 LHFASDRIE  PLTFYLDPQW  QLALNPSEK  YCGSGFHGSD  NVFSNMQALF
451 VGYGPGFKHG  IEADTFENIE  VYNLMCDLLN  LTPAPNNGTH  GSLNHLLKNP
501 VYTPKHPKEV  HPLVQCPFTR  NPRDNLGCSC  NPSILPIEDF  QTQFNLTVAE
551 EKIIKHETLP  YGRPRVLQKE  NTICLLSQHQ  FMSGYSQDIL  MPLWTSYTV
601 RNSFSTEDF  SNCLYQDFRI  PLSPVHKCSF  YKNNTKVSYG  FLSPQLNKN
651 SSGIYSEALL  TTNIVPMYQS  FQVIWRYFHD  TLLRKYAEER  NGVNVVSGPV
701 FDFDYDGRCD  SLENLRQKRR  VIRNQEILIP  THFFIVLTSC  KDTSQTPLHC
751 ENLDTLAFIL  PHRTDNSESC  VHGHKHDSSW  EELLMLHRAR  ITDVEHITGL
801 SFYQQRKEPV  SDILKLKTHL  PTFSQED (SEQ ID NO: 2)
```

图3

图4A

图4B

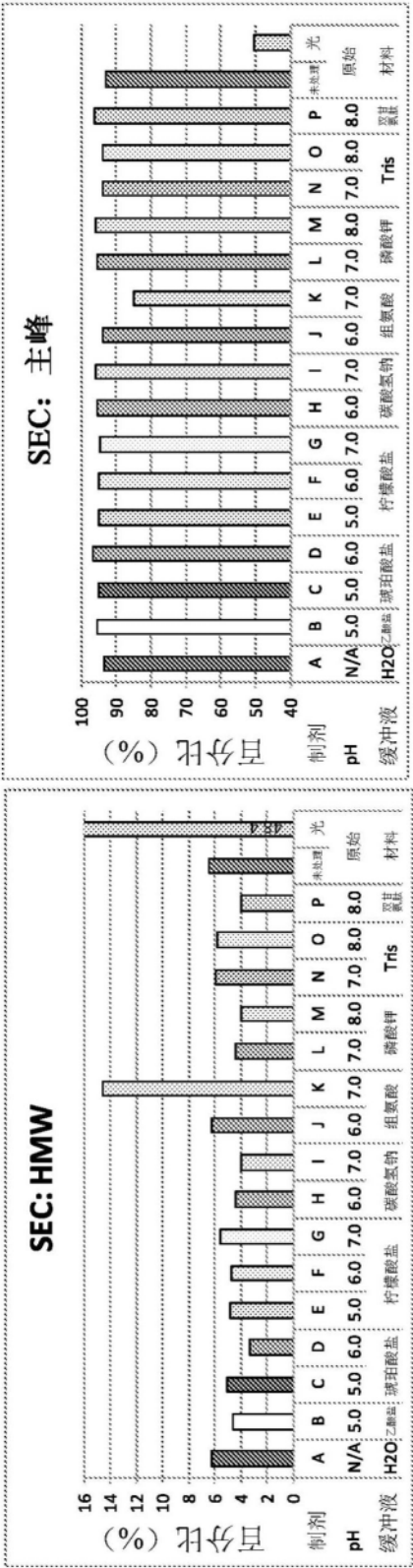


图5

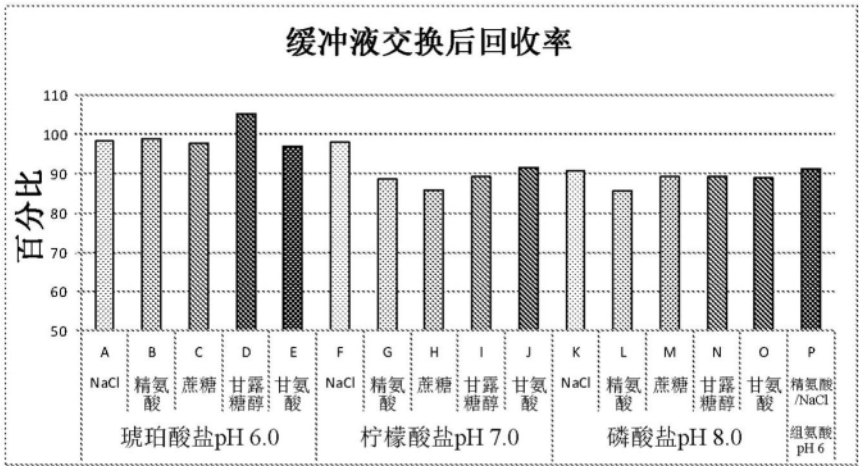


图6

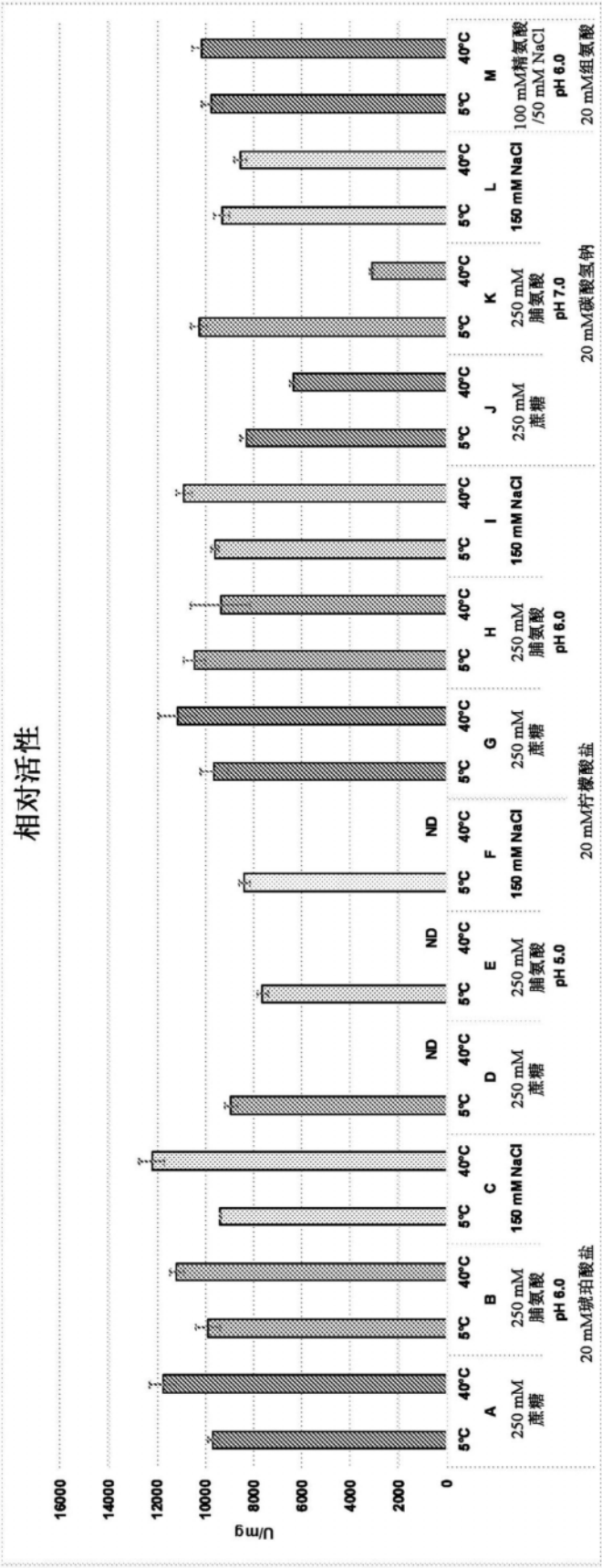


图7

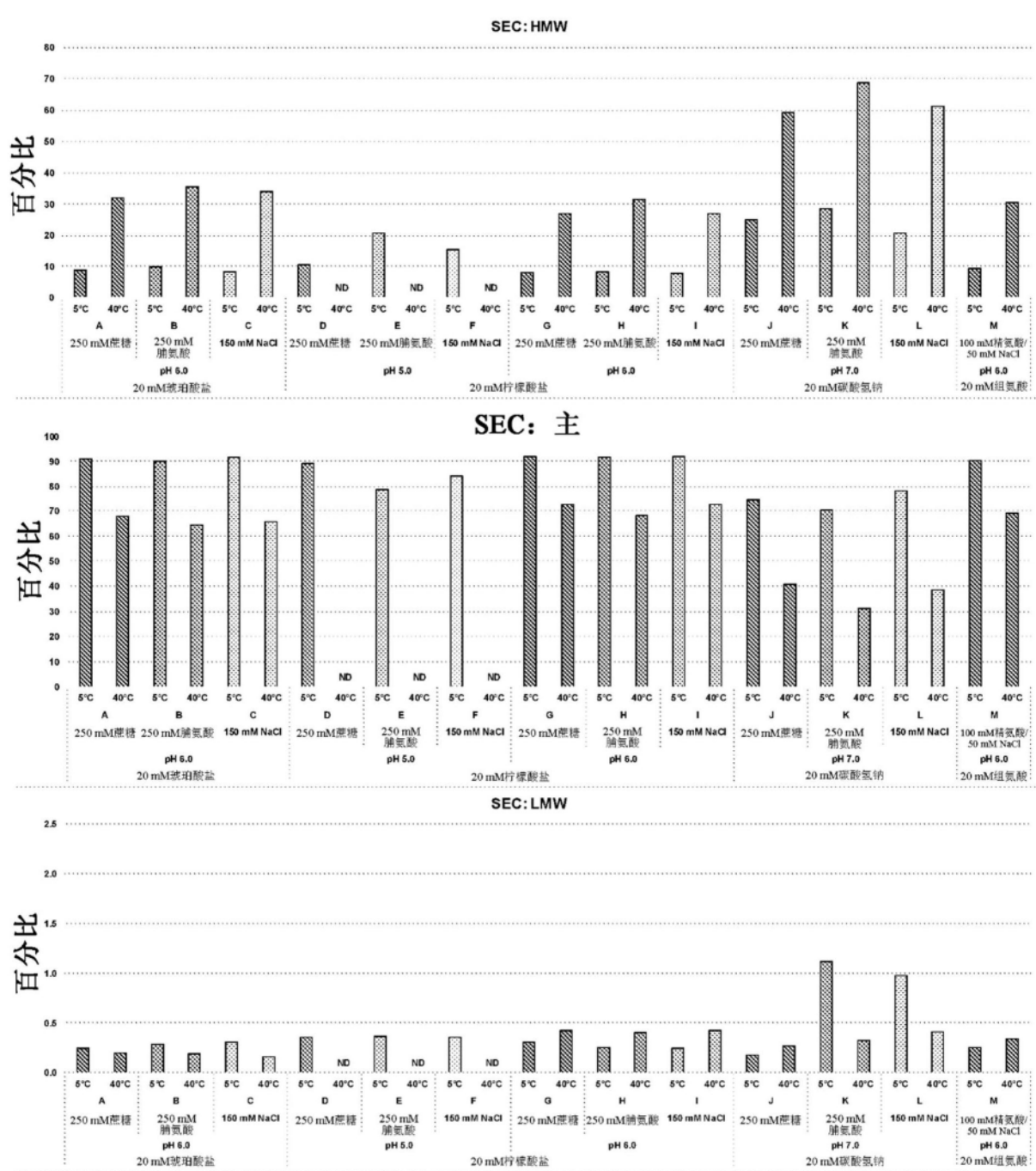


图8

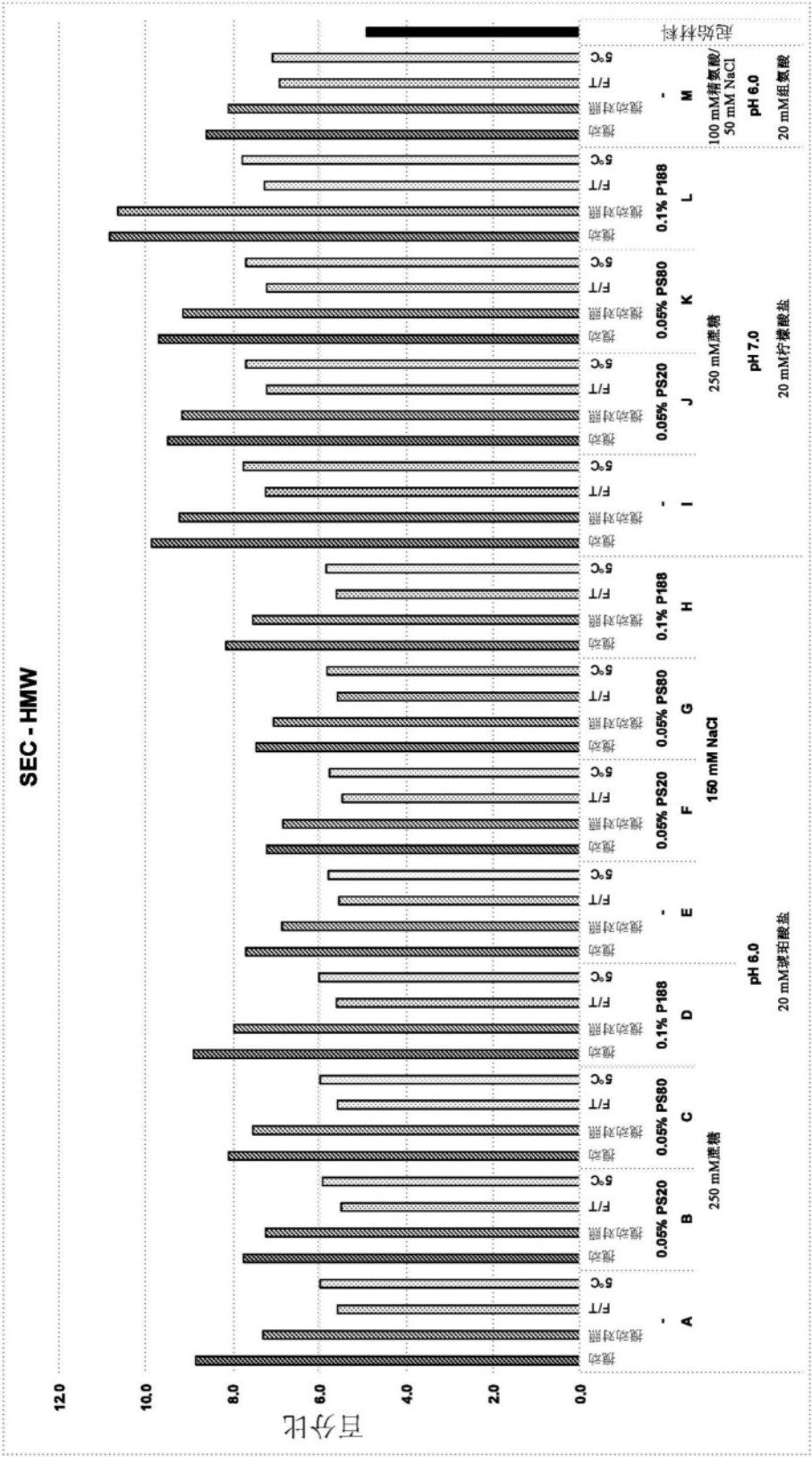


图9A

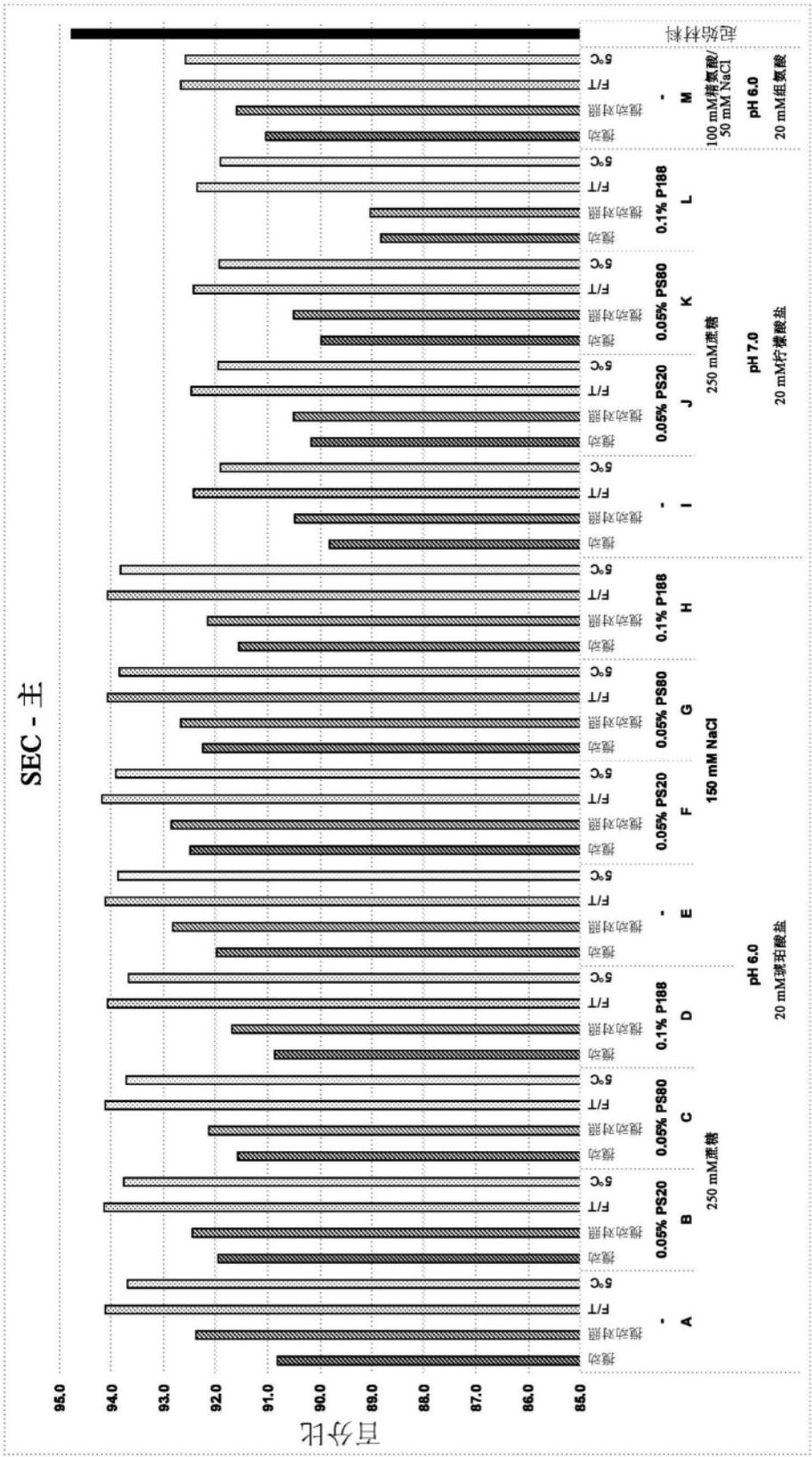


图9B

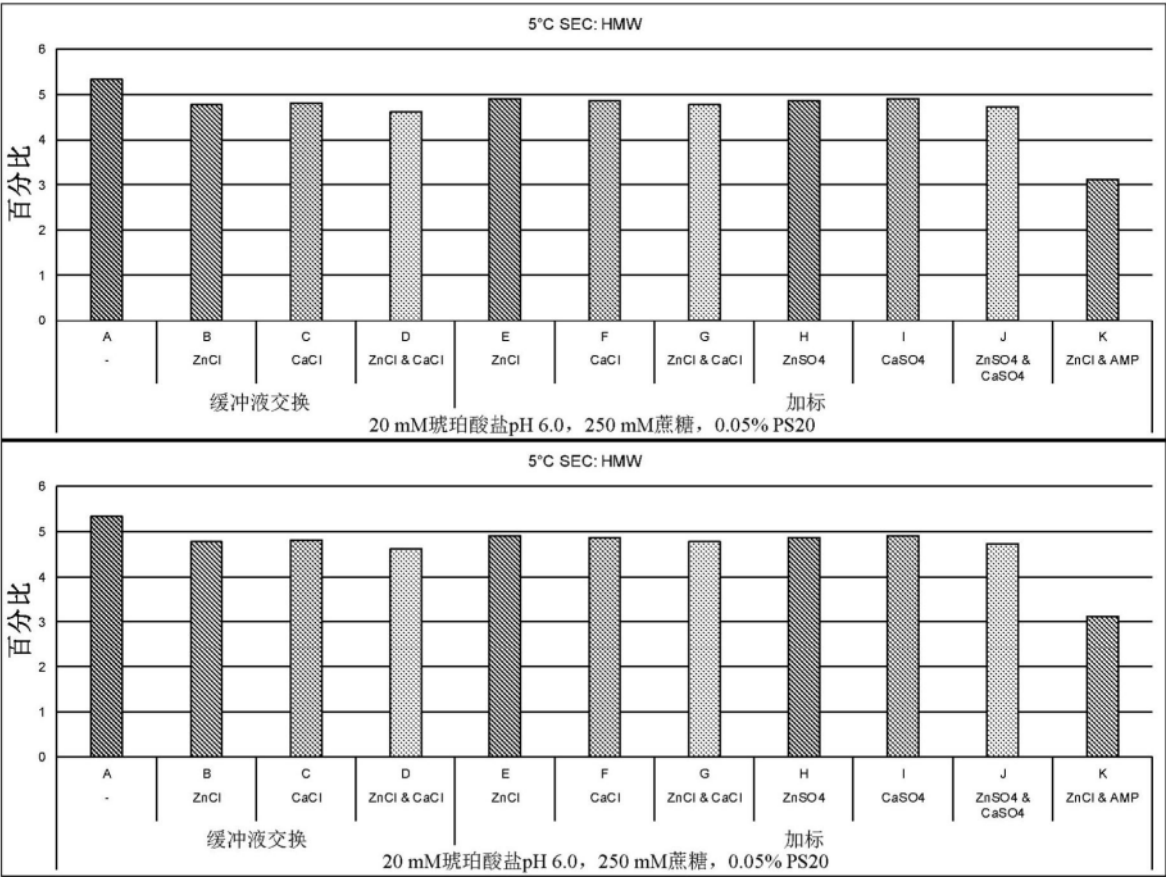


图10

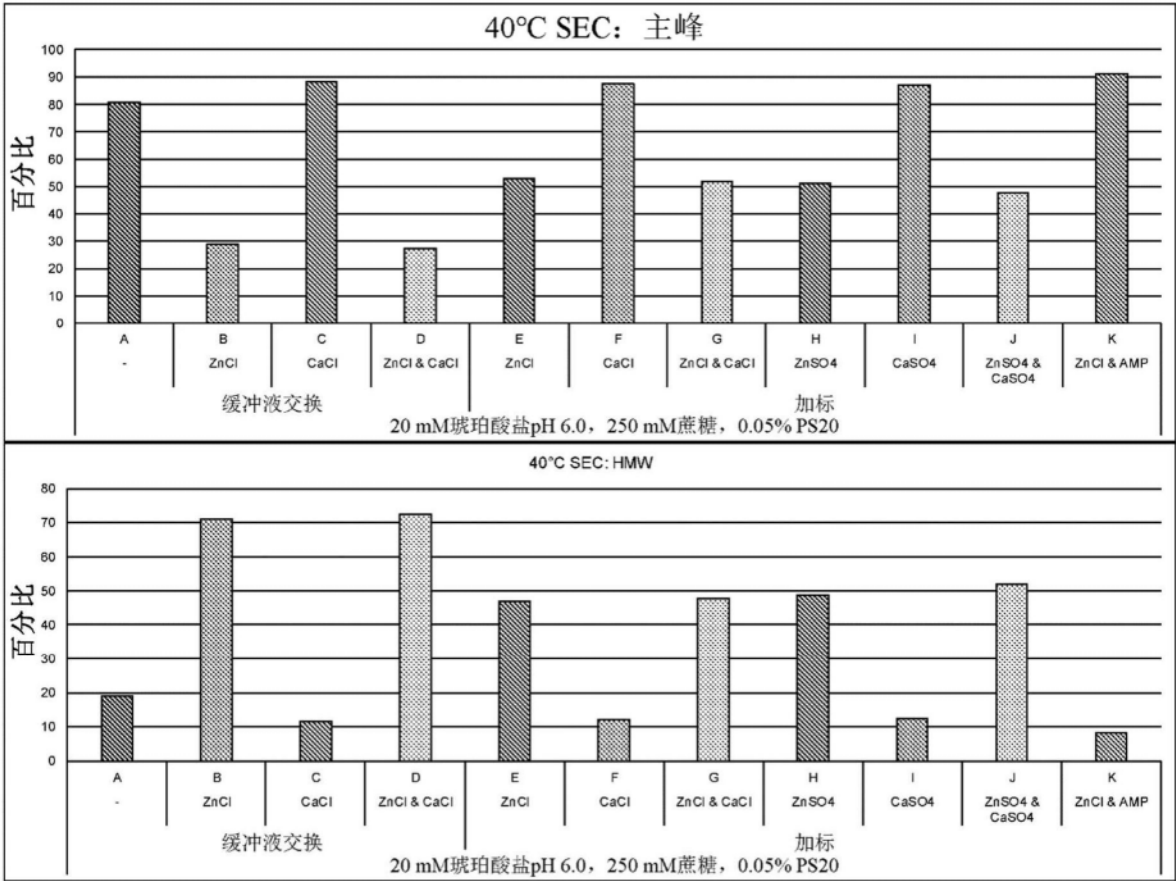


图11

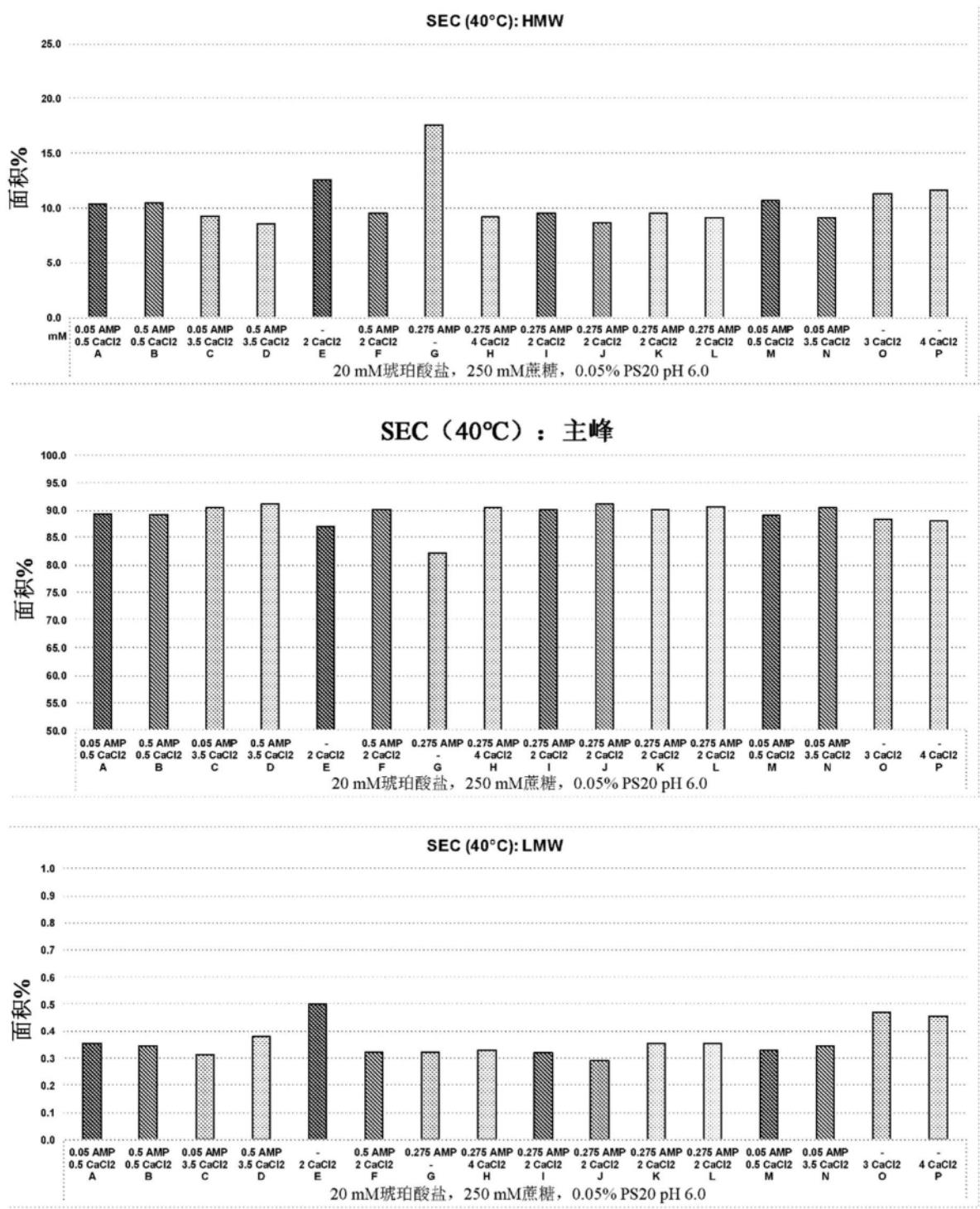


图12A

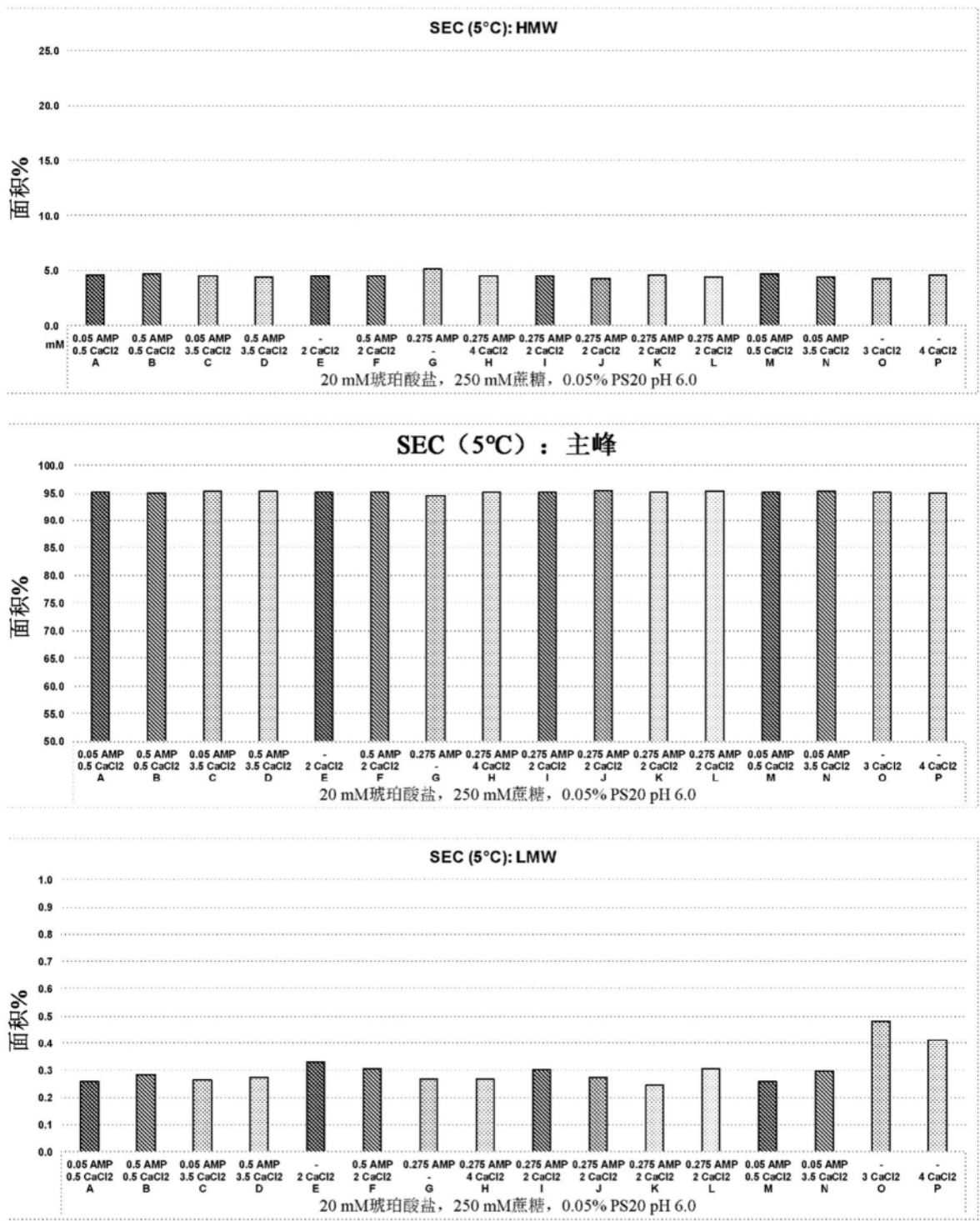


图12B

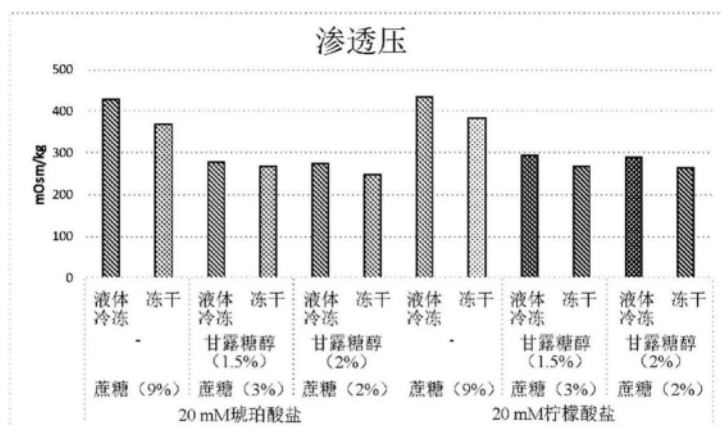


图13

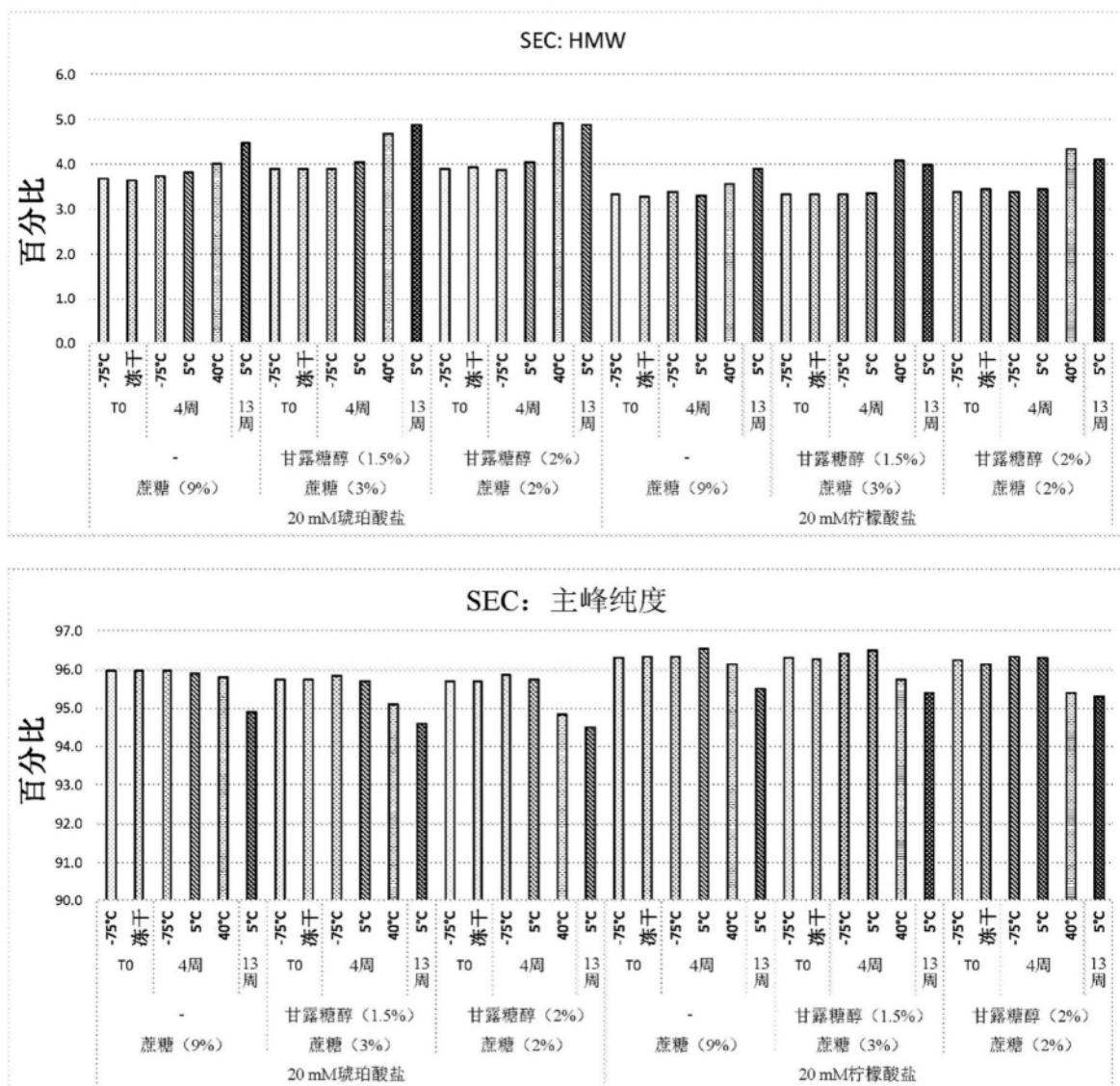


图14

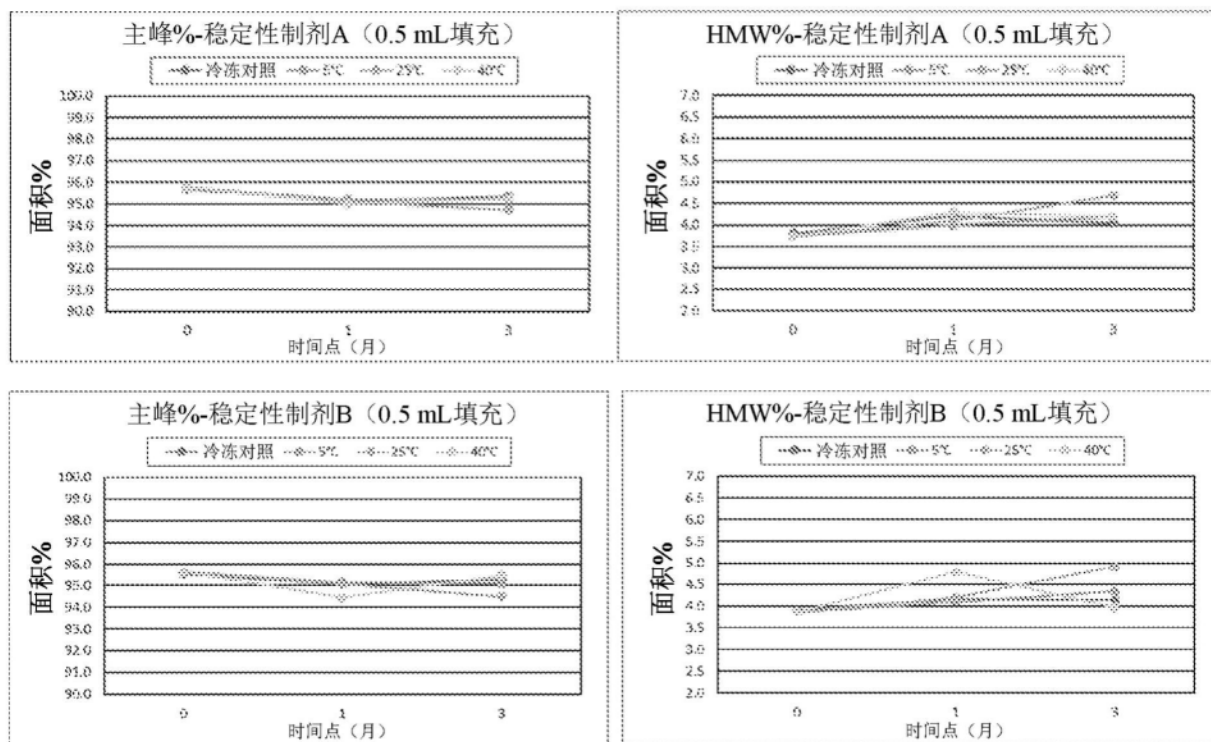


图15

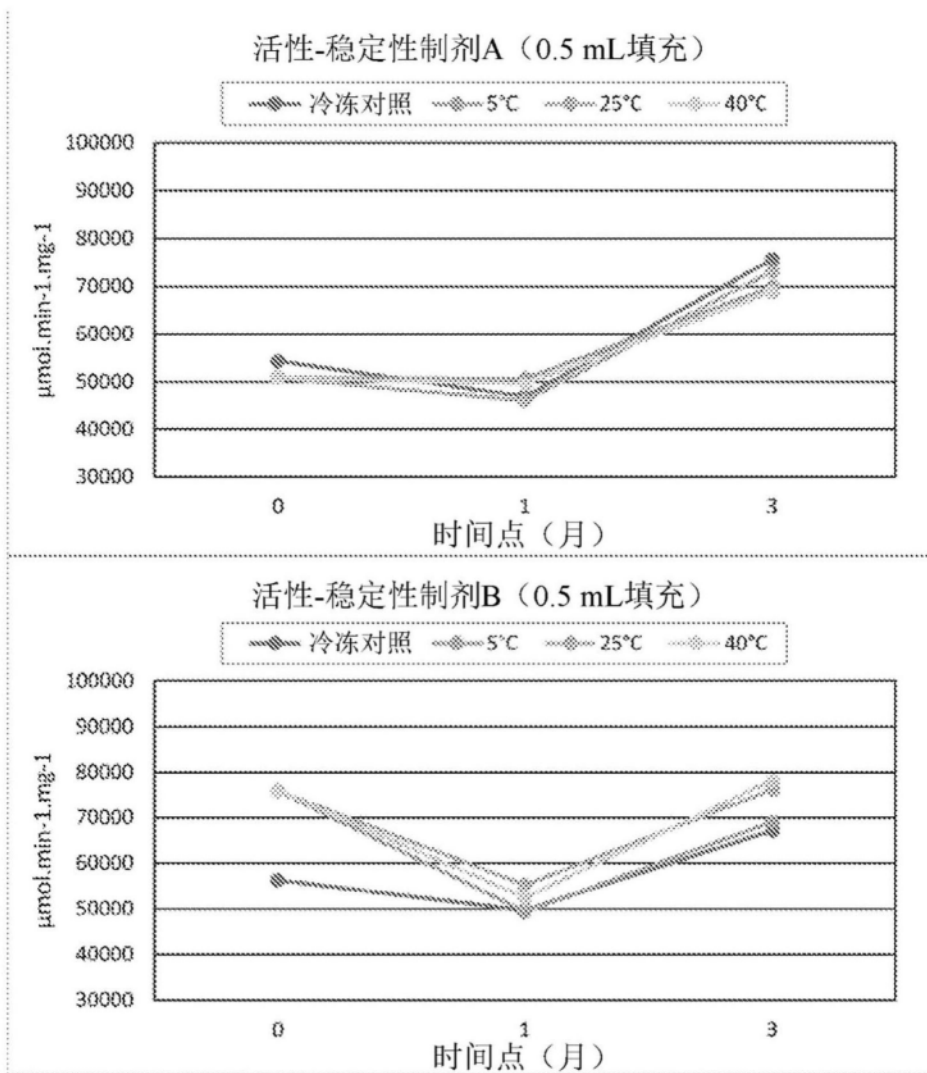
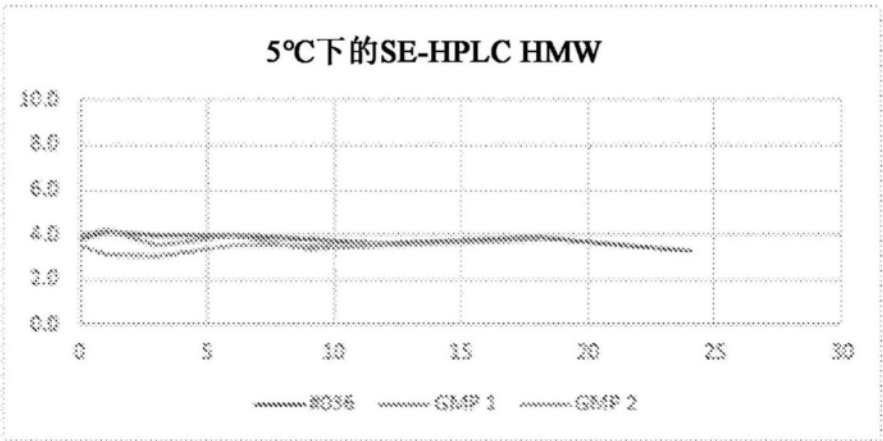
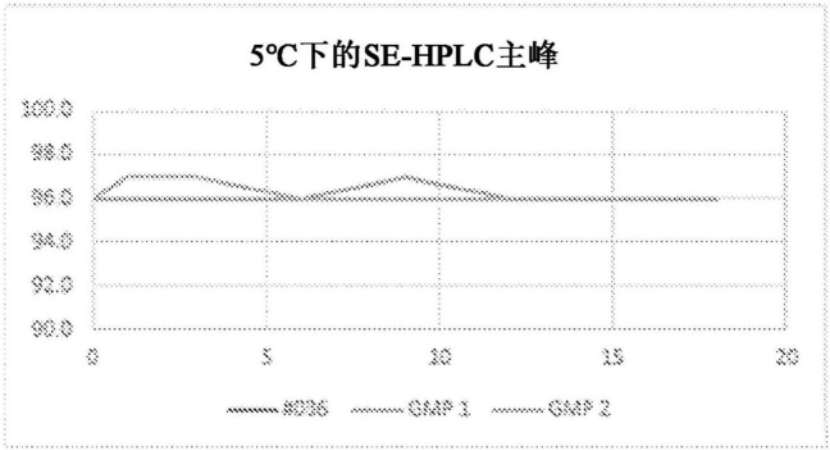


图16

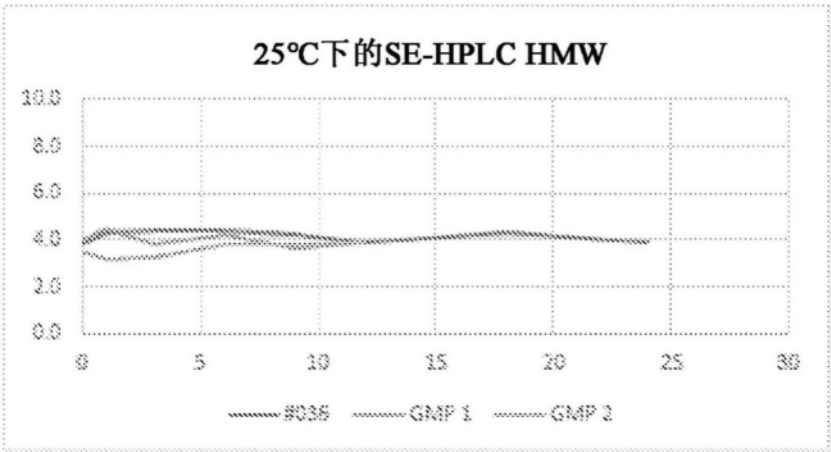


在5°C下24个月内HMW无显著变化

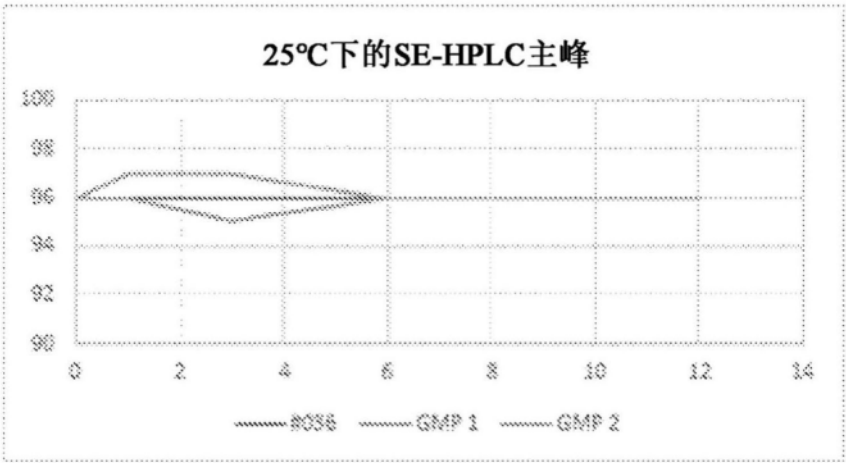


在5°C下24个月内主峰无显著变化

图17

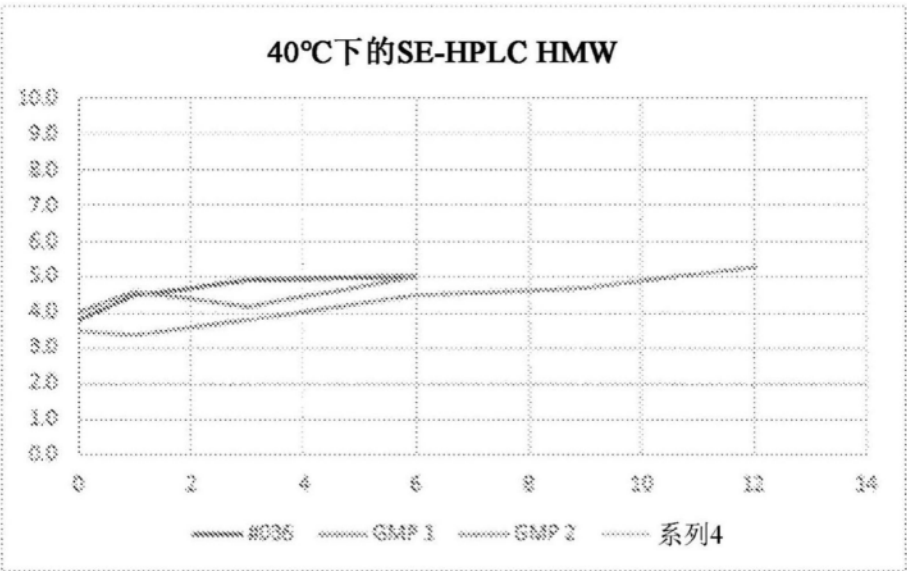


在25°C下24个月内HMW无显著变化



在25°C下24个月内主峰无显著变化

图18



在40°C下6个月内HMW略微增加

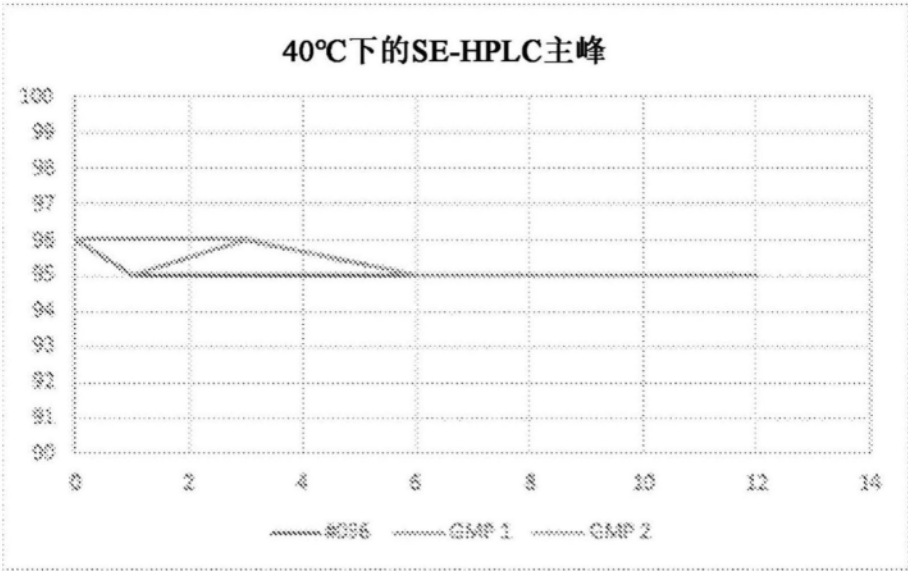
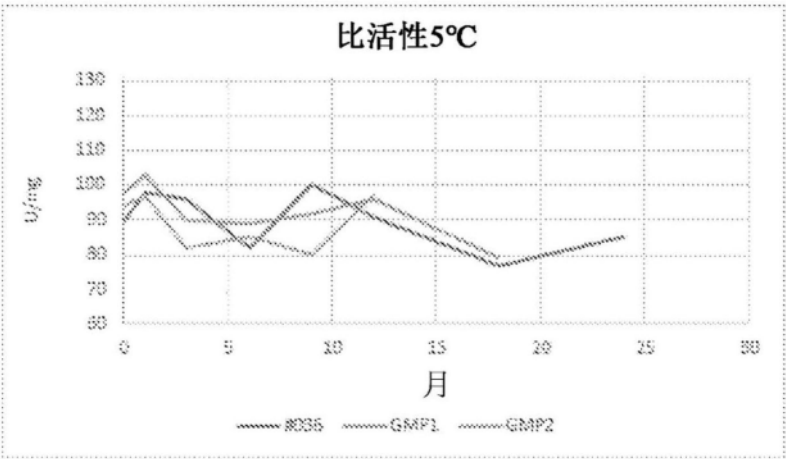
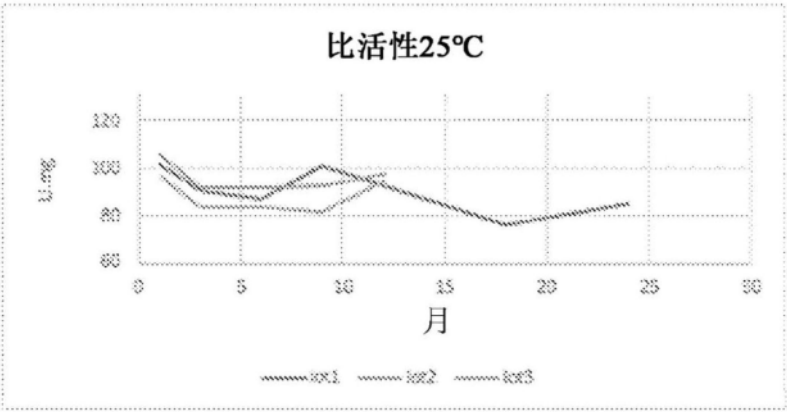


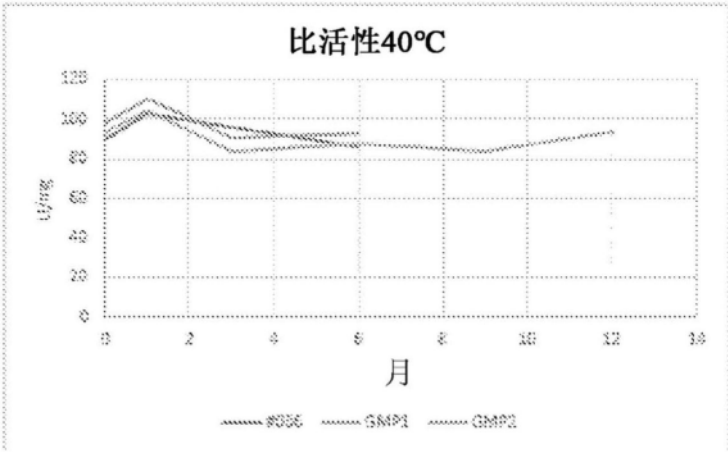
图19



在5℃下24个月内比活性无显著变化



在25℃下24个月内HMW无显著变化



在40℃下12个月后比活性略微降低

图20

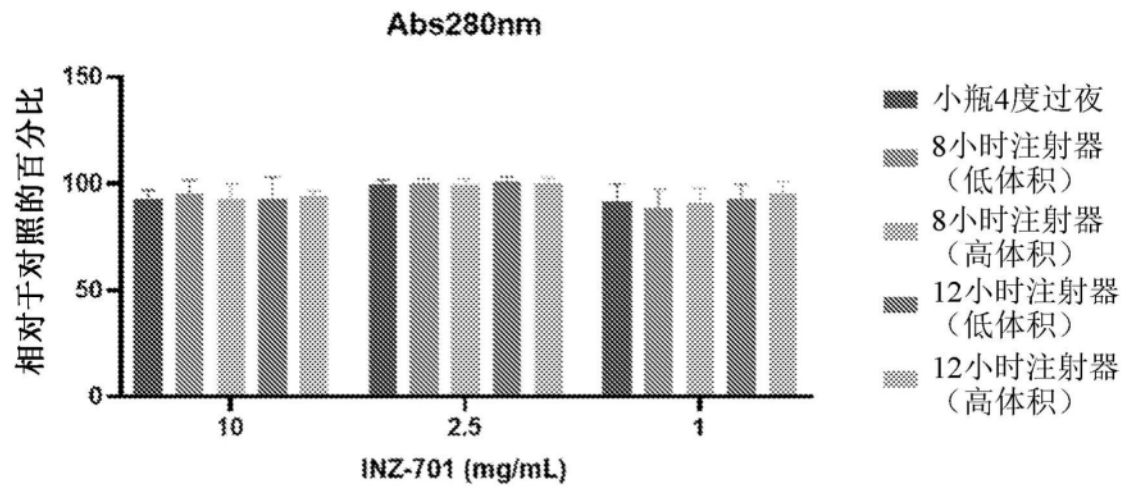


图21

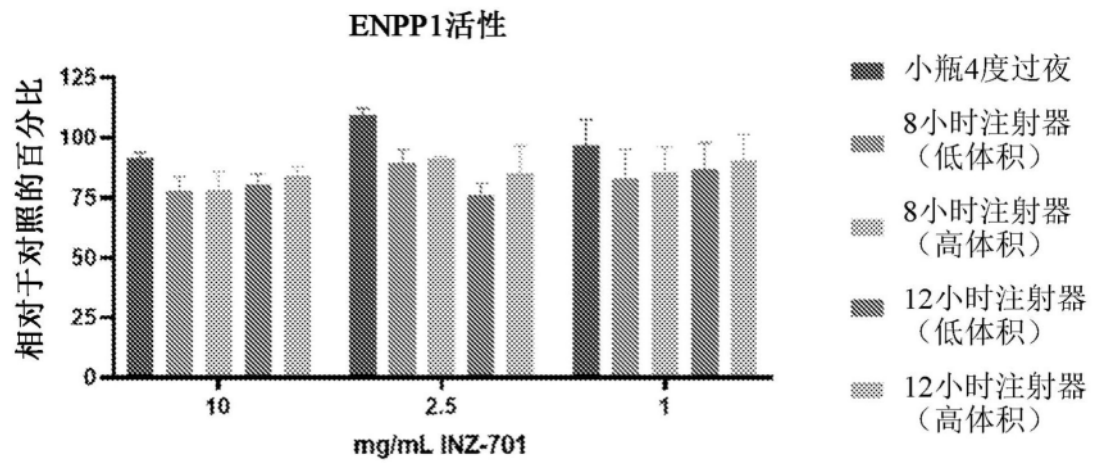


图22

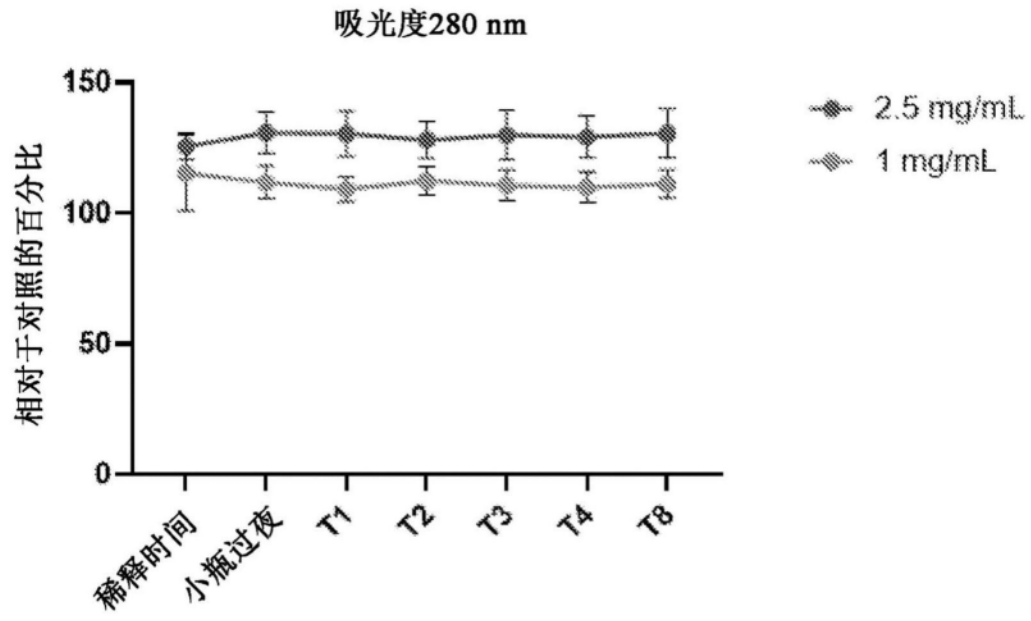


图23

5718333.1

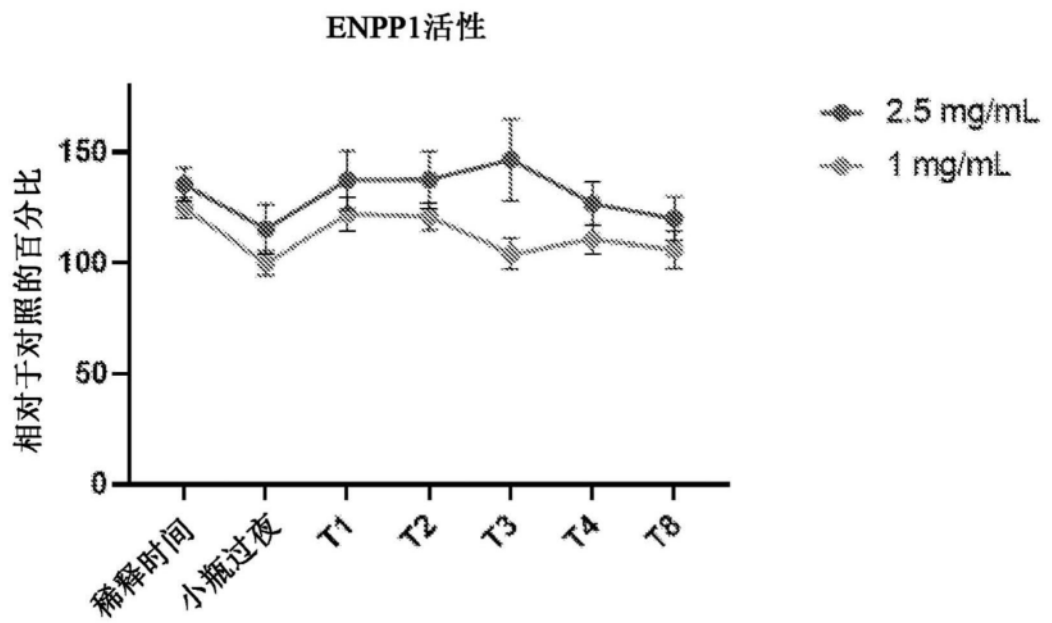


图24