



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0064707
(43) 공개일자 2024년05월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 9/19 (2006.01) A61K 38/00 (2006.01)
A61K 47/12 (2006.01) A61K 47/18 (2017.01)
A61K 47/26 (2017.01) A61K 9/00 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01) C12N 9/16 (2006.01)
C12N 9/96 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 9/19 (2013.01)
A61K 38/00 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2024-7012631

(22) 출원일자(국제) 2022년09월23일

심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2024년04월16일

(86) 국제출원번호 PCT/US2022/076969

(87) 국제공개번호 WO 2023/049864

국제공개일자 2023년03월30일

(30) 우선권주장

63/248,303 2021년09월24일 미국(US)

(71) 출원인

이노자임 파마, 인코포레이티드

미국 02210 매사추세츠 보스턴 슈트 400 셋머 스트리트 321

(72) 발명자

정글스, 스티븐

미국, 33040 플로리다, 아틀란틱 드라이브 키 웨스트 1311

(74) 대리인

특허법인(유한) 다래

전체 청구항 수 : 총 277 항

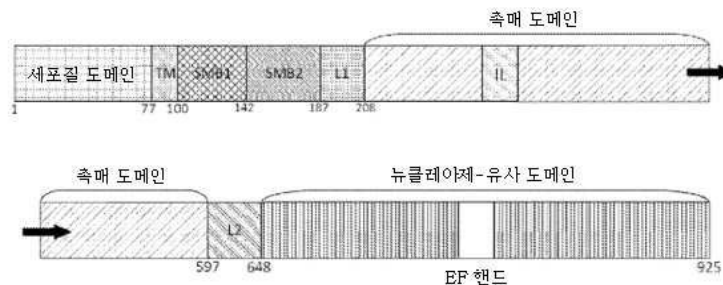
(54) 발명의 명칭 동결건조된 ENPP1 폴리펩티드 제형 및 이의 용도

(57) 요약

소정의 측면에서, 본 발명은 ENPP1 폴리펩티드의 신규한 동결건조된 제형뿐만 아니라, 이러한 동결건조된 제형 및 ENPP1의 재구성된 제형을 사용하여 ENPP1 결핍증과 연관된 적응증을 치료하기 위한 방법을 제공한다. 본원에 제공된 제형 및 방법은 병리학적 석회화 또는 병리학적 골화와 같은 ENPP1 결핍증과 연관된 질환을 치료하는 데 유용하다.

대표도 - 도2

인간 Enpp1



(52) CPC특허분류

A61K 47/12 (2013.01)
A61K 47/183 (2013.01)
A61K 47/26 (2013.01)
A61K 9/0019 (2013.01)
C07K 14/705 (2013.01)
C12N 9/16 (2013.01)
C12N 9/96 (2013.01)
C12Y 301/04001 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

동결건조된 폴리펩티드 제형으로서, 상기 제형은 (a) ENPP1 폴리펩티드 및 (b) 완충제, 안정화제, 염, 및 계면활성제 중 하나 이상을 포함하는, 제형.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 제형은 완충제를 포함하는, 제형.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 완충제는 용액에서 재구성될 때 pH 6 내지 7의 pH 범위를 유지하는, 제형.

청구항 4

제2항에 있어서, 상기 완충제는 용액에서 재구성될 때 pH 7 내지 8의 pH 범위를 유지하는, 제형.

청구항 5

제3항 또는 제4항에 있어서, 상기 완충제는 숙신산염, 구연산염, 중탄산염, 인산염, 트리스, 또는 글리실글리신으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 제형.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 완충제는 숙신산염, 구연산염, 또는 인산염인, 제형.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 완충제는 구연산염인, 제형.

청구항 8

제6항에 있어서, 상기 완충제는 숙신산염인, 제형.

청구항 9

제6항에 있어서, 상기 완충제는 인산염인, 제형.

청구항 10

제2항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 완충제는 용액에서 재구성될 때 5 mM 내지 100 mM 범위의 농도를 포함하는, 제형.

청구항 11

제2항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 완충제는 응집체 형성의 개시 온도를 증가시키는, 제형.

청구항 12

제2항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 완충제는 응집체 형성의 개시 온도를 적어도 2°C만큼 증가시키는, 제형.

청구항 13

제2항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 완충제는 고분자량 종의 형성을 감소시키는, 제형.

청구항 14

제2항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 완충제는 고분자량 중의 형성을 적어도 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%만큼 감소시키는, 제형.

청구항 15

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제형은 하나 이상의 약학적으로 허용 가능한 첨가제를 포함하는, 제형.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 하나 이상의 약학적으로 허용 가능한 첨가제는 안정화제, 아미노산, 염, 금속 이온, 및 계면활성제를 포함하는, 제형.

청구항 17

제15항 또는 제16항에 있어서, 상기 안정화제는 당, 탄수화물, 또는 다당류인, 제형.

청구항 18

제17항에 있어서, 상기 당은 수크로오스, 트레할로오스, 만노오스, 말토오스, 락토오스, 글루코오스, 라피노오스, 셀로비오스, 겐티오비오스, 이소말토오스, 아라비노오스, 글루코사민, 프룩토오스, 만니톨, 또는 소르비톨로 이루어진 군으로부터 선택되는, 제형.

청구항 19

제15항에 있어서, 상기 하나 이상의 약학적으로 허용 가능한 첨가제는 만니톨인, 제형.

청구항 20

제15항에 있어서, 상기 하나 이상의 약학적으로 허용 가능한 첨가제는 수크로오스인, 제형.

청구항 21

제15항에 있어서, 상기 약학적으로 허용 가능한 첨가제는 아미노산인, 제형.

청구항 22

제21항에 있어서, 상기 아미노산은 글리신, 아르기닌, 히스티딘, 알라닌, 프롤린, 세린, 및 글루탐산으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 제형.

청구항 23

제15항에 있어서, 상기 하나 이상의 약학적으로 허용 가능한 첨가제는 아르기닌인, 제형.

청구항 24

제15항에 있어서, 상기 약학적으로 허용 가능한 첨가제는 염인, 제형.

청구항 25

제24항에 있어서, 상기 염은 염화나트륨(NaCl), 염화칼슘(CaCl_2), 염화아연(ZnCl_2), 및/또는 염화마그네슘(MgCl_2)으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 제형.

청구항 26

제15항에 있어서, 상기 하나 이상의 약학적으로 허용 가능한 첨가제는 염화칼슘(CaCl_2)인, 제형.

청구항 27

제15항에 있어서, 상기 약학적으로 허용 가능한 첨가제는 계면활성제인, 제형.

청구항 28

제27항에 있어서, 상기 계면활성제는 폴리소르베이트, 폴록사머, 트리톤, 도데실 황산나트륨, 라우렐 황산 나트륨, 나트륨 옥틸 글리코시드, 라우릴설포베타인, 미리스틸-설포베타인, 리놀레일-설포베타인, 스테아릴-설포베타인, 라우릴사르코신, 미리스틸-사르코신, 리놀레일-사르코신, 스테아릴-사르코신, 리놀레일-베타인, 미리스틸-베타인, 세틸-베타인, 라우라미도프로필-베타인, 코카미도프로필-베타인, 리놀레아미도프로필-베타인, 미리스타미도프로필-베타인, 팜 이도프로필-베타인, 이소스테아라미도프로필-베타인, 미리스타미도프로필-딤 에틸아민, 팜 이도프로필디메틸아민, 이소스테아라미도프로필-딤 에틸아민, 나트륨 메틸 코코일-타우레이트, 디 나트륨 메틸 올레일- 타우레이트, 디히드록시프로필 PEG 5 리놀암모늄 염화물, 폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜, 폴리소르베이트 20, 폴리소르베이트 21, 폴리소르베이트 40, 폴리소르베이트 60, 폴리소르베이트 61, 폴리소르베이트 65, 폴리소르베이트 80, 폴리소르베이트 81, 폴리소르베이트 85, 폴리소르베이트 188, PEG3350, 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는, 제형.

청구항 29

제27항에 있어서, 상기 계면활성제는 폴리소르베이트 20(PS20), 폴리소르베이트 80(PS80), 또는 폴리소르베이트 188(PS188)로 이루어진 군으로부터 선택되는, 제형.

청구항 30

제29항에 있어서, 상기 계면활성제는 폴리소르베이트 20(PS20)인, 제형.

청구항 31

제1항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제형은 완충제, 안정화제, 염, 아미노산, 및 계면활성제를 포함하는, 제형.

청구항 32

제31항에 있어서, 상기 완충제는 구연산염 또는 숙신산염이고, 상기 안정화제는 수크로오스 또는 만니톨이고, 상기 염은 염화칼슘(CaCl_2)이고, 상기 계면활성제는 PS20인, 제형.

청구항 33

제1항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제형의 pH는 pH 6.2 내지 pH 6.5인, 제형.

청구항 34

제1항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제형은 15 내지 25 mM의 구연산염을 포함하는, 제형.

청구항 35

제32항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제형은 각각 75 mM 내지 95 mM의 수크로오스, 만니톨, 또는 이들의 조합을 포함하는, 제형.

청구항 36

제1항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제형은 100 mM 내지 300 mM의 수크로오스를 포함하는, 제형.

청구항 37

제1항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제형은 1 mM 내지 3 mM의 염화칼슘을 포함하는, 제형.

청구항 38

제1항 내지 제37항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제형은 0.005% 내지 0.1%(w/v)의 PS20을 포함하는, 제형.

청구항 39

제15항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 약학적으로 허용 가능한 첨가제는 용액에서 재구성될 때 5 mM 내지 300 mM 범위의 농도로 존재하는, 제형.

청구항 40

제15항 내지 제39항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 약학적으로 허용 가능한 첨가제는 고분자량 종의 형성을 감소시키는, 제형.

청구항 41

제40항에 있어서, 상기 하나 이상의 약학적으로 허용 가능한 첨가제는 고분자량 종의 형성을 적어도 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%만큼 감소시키는, 제형.

청구항 42

제1항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제형은 ENPP1 폴리펩티드 보조인자를 포함하는, 제형.

청구항 43

제42항에 있어서, 상기 ENPP1 폴리펩티드 보조인자는 칼슘, 아연, 및/또는 아데노신 모노포스페이트를 포함하는, 제형.

청구항 44

제42항 또는 제43항에 있어서, 상기 ENPP1 폴리펩티드 보조인자는 CaCl_2 , CaSO_4 , ZnCl_2 , ZnSO_4 , 및/또는 아데노신 모노포스페이트인, 제형.

청구항 45

제42항 또는 제43항에 있어서, 상기 ENPP1 폴리펩티드 보조인자는 CaCl_2 및/또는 아데노신 모노포스페이트인, 제형.

청구항 46

제42항 내지 제45항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 ENPP1 폴리펩티드 보조인자는 용액에서 재구성될 때 1 mM 내지 10 mM 범위의 농도로 존재하는, 제형.

청구항 47

제42항 내지 제45항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 ENPP1 폴리펩티드 보조인자는 고분자량 종의 형성을 적어도 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%만큼 감소시키는, 제형.

청구항 48

제1항 내지 제47항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제형은 계면활성제를 포함하는, 제형.

청구항 49

제48항에 있어서, 상기 계면활성제는 PS20, PS80, 또는 PS188을 포함하는, 제형.

청구항 50

제48항 또는 제49항에 있어서, 상기 계면활성제는 PS20을 포함하는, 제형.

청구항 51

제48항 내지 제50항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 계면활성제는 용액에서 재구성될 때 0.02% 내지 0.10%(w/v) 범위의 농도로 존재하는, 제형.

청구항 52

제48항 내지 제51항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 계면활성제는 물리적 응력에 대한 저항을 증가시키는, 제형.

청구항 53

제1항 내지 제52항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제형은 균질한 미립자 크기를 포함하는, 제형.

청구항 54

제1항 내지 제53항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제형은 마이크로 유동 이미징 분석에 의해 결정했을 때 더 큰 크기의 미립자의 2배, 3배, 4배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배, 또는 10배 감소를 포함하는, 제형.

청구항 55

제1항 내지 제54항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 ENPP1 폴리펩티드는 서열번호 13, 서열번호 14, 또는 서열번호 15를 포함하는 아미노산 서열과 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 제형.

청구항 56

제1항 내지 제55항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 ENPP1 폴리펩티드는 서열번호 2를 포함하는 아미노산 서열과 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 제형.

청구항 57

제1항 내지 제56항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 ENPP1 폴리펩티드는 가용성 ENPP1 폴리펩티드 도메인 및 하나 이상의 이종 단백질 부분을 포함하는 융합 단백질인, 제형.

청구항 58

제1항 내지 제57항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 이종 단백질 부분은 포유동물에서 가용성 ENPP1 폴리펩티드의 순환 반감기를 증가시키는, 제형.

청구항 59

제57항 또는 제58항에 있어서, 상기 이종 단백질 부분은 Fc 도메인을 포함하는, 제형.

청구항 60

제59항에 있어서, 상기 Fc 도메인은 서열번호 12의 아미노산 서열과 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 제형.

청구항 61

제59항 또는 제60항에 있어서, 상기 ENPP1 폴리펩티드는 ENPP1-Fc 융합 단백질인, 제형.

청구항 62

제1항 내지 제60항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 ENPP1 폴리펩티드는 이종 모이어티를 추가로 포함하는, 제형.

청구항 63

제62항에 있어서, 상기 이종 모이어티는 글리코실화된 아미노산, 폐길화 아미노산, 파르네실화 아미노산, 아세틸화 아미노산, 비오틴화 아미노산, 및 지질 모이어티로 이루어진 군으로부터 선택되는, 제형.

청구항 64

제1항 내지 제63항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 ENPP1 폴리펩티드는 서열번호 13을 포함하는 아미노산 서열과 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 제형.

청구항 65

제1항 내지 제64항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 ENPP1 폴리펩티드는 서열번호 13과 적어도 90% 동일한, 제형.

청구항 66

제1항 내지 제64항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 ENPP1 폴리펩티드는 서열번호 13과 적어도 95% 동일한, 제형.

청구항 67

제1항 내지 제64항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 ENPP1 폴리펩티드는 서열번호 13과 적어도 99% 동일한, 제형.

청구항 68

제1항 내지 제67항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 ENPP1 폴리펩티드는 서열번호 13을 포함하는, 제형.

청구항 69

제1항 내지 제67항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 ENPP1 폴리펩티드는 서열번호 13으로 이루어지는, 제형.

청구항 70

제1항 내지 제69항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 ENPP1 폴리펩티드는 서열번호 14를 포함하는 아미노산 서열과 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 제형.

청구항 71

제1항 내지 제64항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 ENPP1 폴리펩티드는 서열번호 14와 적어도 90% 동일한, 제형.

청구항 72

제1항 내지 제64항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 ENPP1 폴리펩티드는 서열번호 14와 적어도 95% 동일한, 제형.

청구항 73

제1항 내지 제64항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 ENPP1 폴리펩티드는 서열번호 14와 적어도 99% 동일한, 제형.

청구항 74

제1항 내지 제64항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 ENPP1 폴리펩티드는 서열번호 14를 포함하는, 제형.

청구항 75

제1항 내지 제64항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 ENPP1 폴리펩티드는 서열번호 14로 이루어지는, 제형.

청구항 76

제1항 내지 제75항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 ENPP1 폴리펩티드는 서열번호 15를 포함하는 아미노산 서열과 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 제형.

청구항 77

제1항 내지 제64항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 ENPP1 폴리펩티드는 서열번호 15와 적어도 90% 동일한, 제형.

청구항 78

제1항 내지 제64항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 ENPP1 폴리펩티드는 서열번호 15와 적어도 95% 동일한, 제형.

청구항 79

제1항 내지 제64항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 ENPP1 폴리펩티드는 서열번호 15와 적어도 99% 동일한, 제형.

청구항 80

제1항 내지 제64항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 ENPP1 폴리펩티드는 서열번호 15를 포함하는, 제형.

청구항 81

제1항 내지 제64항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 ENPP1 폴리펩티드는 서열번호 15로 이루어지는, 제형.

청구항 82

제1항 내지 제81항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제형은 ENPP1 폴리펩티드, 완충제, 약학적으로 허용 가능한 염, 안정화제, 계면활성제, 및 하나 이상의 약학적으로 허용 가능한 첨가제를 포함하는, 제형.

청구항 83

제82항에 있어서, 상기 완충제는 구연산염 완충제인, 제형.

청구항 84

제82항 또는 제83항에 있어서, 상기 구연산염 완충제는 구연산 삼나트륨 이수화물인, 제형.

청구항 85

제82항 내지 제84항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 약학적으로 허용 가능한 염은 염화칼슘인, 제형.

청구항 86

제82항 내지 제85항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 안정화제는 당인, 제형.

청구항 87

제86항에 있어서, 상기 안정화제는 수크로오스인, 제형.

청구항 88

제82항 내지 제87항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 약학적으로 허용 가능한 첨가제는 만니톨을 포함하는, 제형.

청구항 89

제82항 내지 제87항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제형은 ENPP1 폴리펩티드, 구연산염 완충제, 염화칼슘, 수크로오스, 및 폴리소르베이트를 포함하는, 제형.

청구항 90

제82항 내지 제87항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제형은 ENPP1 폴리펩티드, 구연산 삼나트륨 이수화물, 염화칼슘 이수화물, 수크로오스, 및 폴리소르베이트 20을 포함하는, 제형.

청구항 91

제82항 내지 제87항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제형은 ENPP1 폴리펩티드, 구연산염 완충제, 염화칼슘, 수크로오스, 만니톨, 및 폴리소르베이트를 포함하는, 제형.

청구항 92

제82항 내지 제87항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제형은 ENPP1 폴리펩티드, 구연산 삼나트륨 이수화물, 염화칼슘 이수화물, 수크로오스, D(-) 만니톨, 및 폴리소르베이트 20을 포함하는, 제형.

청구항 93

제82항 내지 제87항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제형은 0.5 ml의 최종 재구성 부피당: 약 25 mg의 ENPP1 폴리펩티드, 약 2.94 mg의 구연산 삼나트륨 이수화물, 약 0.15 mg의 염화칼슘 이수화물, 약 30 mg의 수크로오스,

약 7.5 mg D (-) 만니톨, 및 약 0.25 mg의 폴리소르베이트를 포함하는, 제형.

청구항 94

제82항 내지 제93항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 ENPP1 폴리펩티드는 서열번호 13을 포함하는, 제형.

청구항 95

제82항 내지 제93항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 ENPP1 폴리펩티드는 서열번호 13으로 이루어지는, 제형.

청구항 96

제82항 내지 제93항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 ENPP1 폴리펩티드는 서열번호 14를 포함하는, 제형.

청구항 97

제82항 내지 제93항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 ENPP1 폴리펩티드는 서열번호 14로 이루어지는, 제형.

청구항 98

제82항 내지 제93항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 ENPP1 폴리펩티드는 서열번호 15를 포함하는, 제형.

청구항 99

제82항 내지 제93항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 ENPP1 폴리펩티드는 서열번호 15로 이루어지는, 제형.

청구항 100

제82항 내지 제99항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 ENPP1 폴리펩티드는 Fc 도메인을 추가로 포함하는, 제형.

청구항 101

제100항에 있어서, 상기 Fc 도메인은 서열번호 12로 표시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어지는, 제형.

청구항 102

제100항 또는 제101항에 있어서, 상기 ENPP1 폴리펩티드는 ENPP1 폴리펩티드 부분과 Fc 도메인을 연결하는 링커 아미노산 서열을 포함하는, 제형.

청구항 103

제82항 내지 제101항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 링커 아미노산 서열은 아미노산 서열 LIN을 포함하거나 이로 이루어지는, 제형.

청구항 104

제82항 내지 제103항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 ENPP1 폴리펩티드는 서열번호 9, 서열번호 10, 또는 서열번호 11로 이루어지거나 이를 포함하는, 제형.

청구항 105

제1항 내지 제104항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제형은 멸균 주사 용액에서 재구성되는, 제형.

청구항 106

제105항에 있어서, 상기 제형은 재구성 용액 또는 멸균수에서 재구성되는, 제형.

청구항 107

제106항에 있어서, 상기 재구성 용액은 약학적으로 허용 가능한 담체 및/또는 첨가제를 포함하는, 제형.

청구항 108

제107항에 있어서, 상기 약학적으로 허용 가능한 담체는 식염수, 정제수, 또는 주사용 멸균수로부터 선택되는, 제형.

청구항 109

제105항 내지 제108항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제형은 100초, 80초, 70초, 68초, 65초, 또는 60초 미만의 기간 내에 완전히 재구성되는, 제형.

청구항 110

제105항 내지 제109항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 재구성된 제형은 적어도 또는 약 50 mg/mL의 ENPP1 폴리펩티드, 약 pH 6.3의 약 20 mM 구연산염, 약 2 mM 염화칼슘, 약 175 mM 수크로오스, 약 82 mM 만니톨, 및 약 0.05% w/v 폴리소르베이트를 포함하는, 제형.

청구항 111

제105항 내지 제109항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 재구성된 제형은 적어도 또는 약 50 mg/mL의 ENPP1 폴리펩티드, 약 pH 6.3의 약 20 mM 구연산염, 약 2 mM 염화칼슘, 약 175 mM 수크로오스, 약 82 mM (D) 만니톨, 및 약 0.05% w/v 폴리소르베이트 20을 포함하는, 제형.

청구항 112

제105항 내지 제109항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 재구성된 제형은 적어도 또는 약 50 mg/mL의 ENPP1 폴리펩티드, 약 pH 6.3의 약 20 mM 구연산염, 약 88 mM 수크로오스, 약 82 mM 만니톨, 약 2 mM 염화칼슘, 및 약 0.05% 폴리소르베이트 20을 포함하는, 제형.

청구항 113

제105항 내지 제109항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 재구성된 제형은 적어도 또는 약 50 mg/mL의 ENPP1 폴리펩티드, 약 pH 6.3의 약 20 mM 구연산염, 약 263 mM 수크로오스, 약 2 mM 염화칼슘, 및 약 0.05% 폴리소르베이트 20을 포함하는, 제형.

청구항 114

제1항 내지 제113항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제형은 -80℃ 내지 40℃에서 장기 안정성을 나타내는, 제형.

청구항 115

제114항에 있어서, 상기 제형은 적어도 3, 6, 12, 24, 36, 48, 또는 60개월의 저장 수명을 갖는, 제형.

청구항 116

제105항 내지 제115항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 재구성된 제형은 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12, 18, 24, 48, 또는 60시간의 저장 수명을 갖는, 제형.

청구항 117

ENPP1 폴리펩티드를 포함하는 약학적 용액을 생성하기 위한 방법으로서, 상기 방법은 제1항 내지 제104항 중 어느 한 항의 동결건조된 폴리펩티드 제형을 멸균 재구성 용액 또는 멸균수와 접촉시켜 ENPP1 폴리펩티드를 포함하는 재구성 용액을 생성하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 118

제117항에 있어서, 상기 재구성 용액은 약학적으로 허용 가능한 담체 및/또는 첨가제를 포함하는, 방법.

청구항 119

제118항에 있어서, 상기 약학적으로 허용 가능한 담체는 식염수, 정제수, 또는 주사용 멸균수로부터 선택되는, 방법.

청구항 120

제117항 내지 제119항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제형은 100초, 80초, 70초, 68초, 65초, 또는 60초 미만의 기간 내에 완전히 재구성되는, 방법.

청구항 121

제117항 내지 제120항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 재구성된 제형은 적어도 또는 약 50 mg/mL의 ENPP1 폴리펩티드, 약 pH 6.3의 약 20 mM 구연산염, 약 2 mM 염화칼슘, 약 175 mM 수크로오스, 약 82 mM 만니톨, 및 약 0.05% w/v 폴리소르베이트를 포함하는, 방법.

청구항 122

제117항 내지 제120항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 재구성된 제형은 적어도 또는 약 50 mg/mL의 ENPP1 폴리펩티드, 약 pH 6.3의 약 20 mM 구연산염, 약 2 mM 염화칼슘, 약 175 mM 수크로오스, 약 82 mM (D) 만니톨, 및 약 0.05% w/v 폴리소르베이트 20을 포함하는, 방법.

청구항 123

제117항 내지 제120항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 재구성된 제형은 적어도 또는 약 50 mg/mL의 ENPP1 폴리펩티드, 약 pH 6.3의 약 20 mM 구연산염, 약 88 mM 수크로오스, 약 82 mM 만니톨, 약 2 mM 염화칼슘, 및 약 0.05% 폴리소르베이트 20을 포함하는, 방법.

청구항 124

제117항 내지 제120항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 재구성된 제형은 적어도 또는 약 50 mg/mL의 ENPP1 폴리펩티드, 약 pH 6.3의 약 20 mM 구연산염, 약 263 mM 수크로오스, 약 2 mM 염화칼슘, 및 약 0.05% 폴리소르베이트 20을 포함하는, 방법.

청구항 125

제117항 내지 제124항 중 어느 한 항의 방법에 의해 제조된 재구성 용액.

청구항 126

이를 필요로 하는 대상체에서 혈관 석회화의 진행을 예방하거나 감소시키는 방법으로서, 상기 방법은: 제105항 내지 제116항 중 어느 한 항 또는 제125항에 따른 재구성된 제형의 유효량을 대상체에게 투여하여 대상체에서 혈관 석회화의 진행을 예방하거나 감소시키는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 127

ENPP1 결핍증을 가진 대상체에서 병리학적 석회화의 진행을 예방하거나 감소시키는 방법으로서, 상기 방법은: 제105항 내지 제116항 중 어느 한 항 또는 제125항에 따른 재구성된 제형의 유효량을 대상체에게 투여하여 대상체에서 병리학적 석회화의 진행을 예방하거나 감소시키는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 128

이를 필요로 하는 대상체에서 조직 석회화의 진행을 예방하거나 이를 감소시키는 방법으로서, 상기 방법은: 제105항 내지 제116항 중 어느 한 항 또는 제125항에 따른 재구성된 제형의 유효량을 대상체에게 투여하여 대상체에서 조직 석회화의 진행을 예방하거나 이를 감소시키는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 129

이를 필요로 하는 대상체에서 병리학적 골화의 진행을 예방하거나 이를 감소시키는 방법으로서, 상기 방법은: 제105항 내지 제116항 중 어느 한 항 또는 제125항에 따른 재구성된 제형의 유효량을 대상체에게 투여하여 대상체에서 조직 석회화의 진행을 예방하거나 이를 감소시키는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 130

이를 필요로 하는 대상체에서 순환 피로포스페이트(PPi)를 증가시키는 방법으로서, 상기 방법은: 제105항 내지

제116항 중 어느 한 항 또는 제125항에 따른 재구성된 제형의 유효량을 대상체에게 투여하여 대상체에서 순환 PPi를 증가시키는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 131

이를 필요로 하는 대상체에서 피로포스파타아제 활성을 증가시키는 방법으로서, 상기 방법은: 제105항 내지 제116항 중 어느 한 항 또는 제125항에 따른 재구성된 제형의 유효량을 대상체에게 투여하여 대상체에서 순환 PPi를 증가시키는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 132

제126항 내지 제131항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상체는 ENPP1 결핍증을 갖는, 방법.

청구항 133

제126항 내지 제131항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상체는 ABCC6 결핍증을 갖는, 방법.

청구항 134

제133항에 있어서, 상기 ABCC6 결핍증은 탄력섬유거짓황색종인, 방법.

청구항 135

제126항 내지 제131항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상체는 병리학적 석회화를 포함하는 장애를 갖는, 방법.

청구항 136

제126항 내지 제131항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상체는 병리학적 골화를 포함하는 장애를 갖는, 방법.

청구항 137

제126항 내지 제131항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상체는 병리학적 연조직 석회화, 동맥 석회화, 혈관 석회화, 만성 신장 질환(CKD), 말기 신장 질환(ESRD), 석회화 요독성 동맥병증(CUA), 칼시필락시스, 후종인대골화증(OPLL), 또는 저인산혈증 구루병을 갖거나 발병할 위험이 있는, 방법.

청구항 138

대상체에서 ENPP1 결핍증의 하나 이상의 증상을 완화시키는 방법으로서, 상기 방법은: 제105항 내지 제116항 중 어느 한 항 또는 제125항에 따른 재구성된 제형의 유효량을 대상체에게 투여하여 대상체에서 ENPP1 결핍증의 하나 이상의 증상을 완화시키는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 139

ENPP1 결핍증을 가진 대상체를 치료하기 위한 방법으로서, 상기 방법은 제105항 내지 제116항 중 어느 한 항 또는 제125항에 따른 재구성된 제형의 유효량을 대상체에게 투여하여 대상체를 치료하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 140

대상체에서 ABCC6 결핍증의 하나 이상의 증상을 완화시키는 방법으로서, 상기 방법은 제105항 내지 제116항 중 어느 한 항 또는 제125항에 따른 재구성된 제형의 유효량을 대상체에게 투여하여 대상체에서 ABCC6 결핍증의 하나 이상의 증상을 완화시키는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 141

ABCC6 결핍증을 가진 대상체를 치료하기 위한 방법으로서, 상기 방법은: 제105항 내지 제116항 중 어느 한 항 또는 제125항에 따른 재구성된 제형의 유효량을 대상체에게 투여하여 대상체를 치료하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 142

제126항 내지 제141항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 재구성된 제형은 비경구 투여되는, 방법.

청구항 143

제126항 내지 제141항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 재구성된 제형은 피하 주사를 통해 투여되는, 방법.

청구항 144

제126항 내지 제141항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 재구성된 제형은 정맥내 주사를 통해 투여되는, 방법.

청구항 145

제126항 내지 제141항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 재구성된 제형은 피내 주사를 통해 투여되는, 방법.

청구항 146

제126항 내지 제141항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 재구성된 제형은 근육내 주사를 통해 투여되는, 방법.

청구항 147

제126항 내지 제146항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 재구성된 제형은 자가 투여되는, 방법.

청구항 148

제126항 내지 제147항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제형은 매일, 2일마다, 3일마다, 1주일, 또는 1개월에 여러 번 투여되는, 방법.

청구항 149

제148항에 있어서, 상기 제형의 제2 투여량은 적어도 2일 후, 4일 후, 1주 후, 또는 1개월 후의 적절한 시간 간격 후에 투여되는, 제형.

청구항 150

제1항 내지 제116항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 동결건조된 제형은 치료적 유효 투여량을 포함하는, 제형.

청구항 151

제105항 내지 제116항 중 어느 한 항 또는 제125항에 있어서, 상기 재구성된 제형은 치료적 유효 투여량을 포함하는, 제형.

청구항 152

용액 중 5-100mM의 농도로 재구성된 동결건조된 ENPP1을 포함하는 제형으로서, 상기 제형은 완충제, 하나 이상의 약학적으로 허용 가능한 첨가제 중 하나 이상을 포함하는, 제형.

청구항 153

제152항에 있어서, 상기 완충제는 용액에서 재구성될 때 pH 6 내지 7의 pH 범위를 유지하는, 제형.

청구항 154

제152항 내지 제153항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 완충제는 용액에서 재구성될 때 pH 7 내지 8의 pH 범위를 유지하는, 제형.

청구항 155

제152항 내지 제154항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 완충제는 숙신산염, 구연산염, 중탄산염, 인산염, 트리스, 또는 글리실글리신으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 제형.

청구항 156

제152항 내지 제155항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 완충제는 숙신산염, 구연산염, 또는 인산염인, 제형.

청구항 157

제152항 내지 제156항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 완충제는 구연산염인, 제형.

청구항 158

제152항 내지 제157항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 완충제는 숙신산염인, 제형.

청구항 159

제152항 내지 제158항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 완충제는 인산염인, 제형.

청구항 160

제152항 내지 제159항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 완충제는 응집체 형성의 개시 온도를 증가시키는, 제형.

청구항 161

제152항 내지 제160항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 완충제는 응집체 형성의 개시 온도를 적어도 2℃만큼 증가시키는, 제형.

청구항 162

제152항 내지 제161항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 완충제는 고분자량 중의 형성을 감소시키는, 제형.

청구항 163

제152항 내지 제162항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 완충제는 고분자량 중의 형성을 적어도 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%만큼 감소시키는, 제형.

청구항 164

제152항 내지 제163항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 약학적으로 허용 가능한 첨가제는 안정화제, 아미노산, 염, 금속 이온, 및 계면활성제를 포함하는, 제형.

청구항 165

제152항 내지 제164항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 안정화제는 당, 탄수화물, 또는 다당류인, 제형.

청구항 166

제152항 내지 제165항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 당은 수크로오스, 트레할로오스, 만노오스, 말토오스, 락토오스, 글루코오스, 라피노오스, 셀로비오스, 겐티오비오스, 이소말토오스, 아라비노오스, 글루코사민, 프룩토오스, 만니톨, 또는 소르비톨로 이루어진 군으로부터 선택되는, 제형.

청구항 167

제152항 내지 제166항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 약학적으로 허용 가능한 첨가제는 만니톨인, 제형.

청구항 168

제152항 내지 제167항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 약학적으로 허용 가능한 첨가제는 수크로오스인, 제형.

청구항 169

제152항 내지 제168항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 약학적으로 허용 가능한 첨가제는 아미노산인, 제형.

청구항 170

제152항 내지 제169항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 아미노산은 글리신, 아르기닌, 히스티딘, 알라닌, 프롤린,

세린, 및 글루탐산으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 제형.

청구항 171

제152항 내지 제170항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 약학적으로 허용 가능한 첨가제는 아르기닌인, 제형.

청구항 172

제152항 내지 제171항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 약학적으로 허용 가능한 첨가제는 염인, 제형.

청구항 173

제152항 내지 제172항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 염은 염화나트륨(NaCl), 염화칼슘(CaCl₂), 염화아연(ZnCl₂), 및/또는 염화마그네슘(MgCl₂)으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 제형.

청구항 174

제152항 내지 제173항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 약학적으로 허용 가능한 첨가제는 염화칼슘(CaCl₂)인, 제형.

청구항 175

제152항 내지 제174항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 약학적으로 허용 가능한 첨가제는 계면활성제인, 제형.

청구항 176

제152항 내지 제175항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 계면활성제는 폴리소르베이트, 폴록사머, 트리톤, 도데실 황산 나트륨, 라우렐 황산 나트륨, 나트륨 옥틸 글리코사이드, 라우릴설포베타인, 미리스틸-설포베타인, 리놀레일-설포베타인, 스테아릴-설포베타인, 라우릴사르코신, 미리스틸-사르코신, 리놀레일-사르코신, 스테아릴-사르코신, 리놀레일-베타인, 미리스틸-베타인, 세틸-베타인, 라우라미도프로필-베타인, 코카미도프로필-베타인, 리놀레아미도프로필-베타인, 미리스타미도프로필-베타인, 팜 이도프로필-베타인, 이소스테아라미도프로필-베타인, 미리스타미도프로필-딤 에틸아민, 팜 이도프로필디메틸아민, 이소스테아라미도프로필-딤 에틸아민, 나트륨 메틸 코코일-타우레이트, 디나트륨 메틸 올레일-타우레이트, 디하이드록시프로필 PEG 5 리놀람도늄 염화물, 폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜, 폴리소르베이트 20, 폴리소르베이트 21, 폴리소르베이트 40, 폴리소르베이트 60, 폴리소르베이트 61, 폴리소르베이트 65, 폴리소르베이트 80, 폴리소르베이트 81, 폴리소르베이트 85, 폴리소르베이트 188, PEG3350, 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는, 제형.

청구항 177

제152항 내지 제176항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 계면활성제는 폴리소르베이트 20(PS20), 폴리소르베이트 80(PS80), 또는 폴리소르베이트 188(PS188)로 이루어진 군으로부터 선택되는, 제형.

청구항 178

제152항 내지 제177항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 계면활성제는 폴리소르베이트 20(PS20)인, 제형.

청구항 179

제152항 내지 제178항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제형은 완충제, 안정화제, 염, 아미노산, 및 계면활성제를 포함하는, 제형.

청구항 180

제152항 내지 제179항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 완충제는 구연산염 또는 숙신산염이고, 상기 안정화제는 수크로오스 또는 만니톨이고, 상기 염은 염화칼슘(CaCl₂)이고, 상기 계면활성제는 PS20인, 제형.

청구항 181

제152항 내지 제180항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제형의 pH는 pH 6.2 내지 pH 6.5인, 제형.

청구항 182

제152항 내지 제181항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제형은 15 내지 25 mM의 구연산염을 포함하는, 제형.

청구항 183

제152항 내지 제182항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제형은 각각 75 mM 내지 95 mM의 수크로오스, 만니톨, 또는 이들의 조합을 포함하는, 제형.

청구항 184

제152항 내지 제183항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제형은 100 mM 내지 300 mM의 수크로오스를 포함하는, 제형.

청구항 185

제152항 내지 제184항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제형은 1 mM 내지 3 mM의 염화칼슘을 포함하는, 제형.

청구항 186

제152항 내지 제185항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제형은 0.005% 내지 0.1%(w/v)의 PS20을 포함하는, 제형.

청구항 187

제152항 내지 제186항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 약학적으로 허용 가능한 첨가제는 용액에서 재구성될 때 5 mM 내지 300 mM 범위의 농도로 존재하는, 제형.

청구항 188

제152항 내지 제187항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 약학적으로 허용 가능한 첨가제는 고분자량 종의 형성을 감소시키는, 제형.

청구항 189

제152항 내지 제188항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 약학적으로 허용 가능한 첨가제는 고분자량 종의 형성을 적어도 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%만큼 감소시키는, 제형.

청구항 190

제152항 내지 제189항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제형은 ENPP1 폴리펩티드 보조인자를 포함하는, 제형.

청구항 191

제152항 내지 제190항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 ENPP1 폴리펩티드 보조인자는 칼슘, 아연, 및/또는 아데노신 모노포스페이트를 포함하는, 제형.

청구항 192

제152항 내지 제191항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 ENPP1 폴리펩티드 보조인자는 CaCl_2 , CaSO_4 , ZnCl_2 , ZnSO_4 , 및/또는 아데노신 모노포스페이트인, 제형.

청구항 193

제152항 내지 제192항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 ENPP1 폴리펩티드 보조인자는 CaCl_2 및/또는 아데노신 모노포스페이트인, 제형.

청구항 194

제152항 내지 제193항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 ENPP1 폴리펩티드 보조인자는 용액에서 재구성될 때 1 mM 내지 10 mM 범위의 농도로 존재하는, 제형.

청구항 195

제152항 내지 제194항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 ENPP1 폴리펩티드 보조인자는 고분자량 종의 형성을 적어도 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%만큼 감소시키는, 제형.

청구항 196

제152항 내지 제195항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제형은 계면활성제를 포함하는, 제형.

청구항 197

제152항 내지 제196항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 계면활성제는 PS20, PS80, 또는 PS188을 포함하는, 제형.

청구항 198

제152항 내지 제197항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 계면활성제는 PS20을 포함하는, 제형.

청구항 199

제152항 내지 제198항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 계면활성제는 용액에서 재구성될 때 0.02% 내지 0.10%(w/v) 범위의 농도로 존재하는, 제형.

청구항 200

제152항 내지 제199항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 계면활성제는 물리적 응력에 대한 저항을 증가시키는, 제형.

청구항 201

제152항 내지 제200항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제형은 균질한 미립자 크기를 포함하는, 제형.

청구항 202

제152항 내지 제201항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제형은 마이크로 유동 이미징 분석에 의해 결정했을 때 더 큰 크기의 미립자의 2배, 3배, 4배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배, 또는 10배 감소를 포함하는, 제형.

청구항 203

제152항 내지 제202항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 ENPP1 폴리펩티드는 서열번호 13, 서열번호 14, 또는 서열번호 15를 포함하는 아미노산 서열과 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 제형.

청구항 204

제152항 내지 제203항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 ENPP1 폴리펩티드는 서열번호 2를 포함하는 아미노산 서열과 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 제형.

청구항 205

제152항 내지 제204항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 ENPP1 폴리펩티드는 가용성 ENPP1 폴리펩티드 도메인 및 하나 이상의 이종 단백질 부분을 포함하는 융합 단백질인, 제형.

청구항 206

제152항 내지 제205항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 이종 단백질 부분은 포유동물에서 가용성 ENPP1 폴리펩티드의 순환 반감기를 증가시키는, 방법.

청구항 207

제152항 내지 제206항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 이종 단백질 부분은 Fc 도메인을 포함하는, 제형.

청구항 208

제152항 내지 제207항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 Fc 도메인은 서열번호 12의 아미노산 서열과 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 제형.

청구항 209

제152항 내지 제208항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 ENPP1 폴리펩티드는 ENPP1-Fc 융합 단백질인, 제형.

청구항 210

제152항 내지 제209항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 이중 모이어티는 글리코실화된 아미노산, 폐결핵 아미노산, 파르네실화 아미노산, 아세틸화 아미노산, 비오틴화 아미노산, 및 지질 모이어티로 이루어진 군으로부터 선택되는, 제형.

청구항 211

제152항 내지 제210항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 ENPP1 폴리펩티드는 서열번호 13을 포함하는 아미노산 서열과 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 제형.

청구항 212

제152항 내지 제211항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 ENPP1 폴리펩티드는 서열번호 14를 포함하는 아미노산 서열과 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 제형.

청구항 213

제152항 내지 제212항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 ENPP1 폴리펩티드는 서열번호 15를 포함하는 아미노산 서열과 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 제형.

청구항 214

제152항 내지 제213항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제형은 ENPP1 폴리펩티드, 완충제, 약학적으로 허용 가능한 염, 안정화제, 계면활성제, 및 하나 이상의 약학적으로 허용 가능한 첨가제를 포함하는, 제형.

청구항 215

제152항 내지 제214항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 완충제는 구연산염 완충제인, 제형.

청구항 216

제152항 내지 제215항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 구연산염 완충제는 구연산 삼나트륨 이수화물인, 제형.

청구항 217

제152항 내지 제216항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 약학적으로 허용 가능한 염은 염화칼슘인, 제형.

청구항 218

제152항 내지 제217항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 안정화제는 당인, 제형.

청구항 219

제152항 내지 제218항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 안정화제는 수크로오스인, 제형.

청구항 220

제152항 내지 제219항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 약학적으로 허용 가능한 첨가제는 만니톨을

포함하는, 제형.

청구항 221

제152항 내지 제220항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제형은 ENPP1 폴리펩티드, 구연산염 완충제, 염화칼슘, 수크로오스, 및 폴리소르베이트를 포함하는, 제형.

청구항 222

제152항 내지 제221항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제형은 ENPP1 폴리펩티드, 구연산 삼나트륨 이수화물, 염화칼슘 이수화물, 수크로오스, 및 폴리소르베이트 20을 포함하는, 제형.

청구항 223

제152항 내지 제222항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제형은 ENPP1 폴리펩티드, 구연산염 완충제, 염화칼슘, 수크로오스, 만니톨, 및 폴리소르베이트를 포함하는, 제형.

청구항 224

제152항 내지 제223항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제형은 ENPP1 폴리펩티드, 구연산 삼나트륨 이수화물, 염화칼슘 이수화물, 수크로오스, D(-) 만니톨, 및 폴리소르베이트 20을 포함하는, 제형.

청구항 225

제152항 내지 제224항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제형은 0.5 ml의 최종 재구성 부피 당 약 25 mg의 ENPP1 폴리펩티드, 약 2.94 mg의 구연산 삼나트륨 이수화물, 약 0.15 mg의 염화칼슘 이수화물, 약 30 mg의 수크로오스, 약 7.5 mg D (-) 만니톨, 및 약 0.25 mg의 폴리소르베이트를 포함하는, 제형.

청구항 226

제152항 내지 제225항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제형은 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12, 18, 24, 48, 또는 60시간의 저장 수명을 갖는, 제형.

청구항 227

제152항 내지 제226항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 ENPP1 폴리펩티드는 ENPP1 폴리펩티드 부분과 Fc 도메인을 연결하는 링커 아미노산 서열을 포함하는, 제형.

청구항 228

제152항 내지 제227항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 ENPP1 폴리펩티드는 ENPP1 폴리펩티드 부분과 Fc 도메인을 연결하는 링커 아미노산 서열을 포함하는, 제형.

청구항 229

제152항 내지 제228항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 링커 아미노산 서열은 아미노산 서열 LIN을 포함하거나 이로 이루어지는, 제형.

청구항 230

제152항 내지 제229항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 ENPP1 폴리펩티드는 서열번호 9, 서열번호 10, 또는 서열번호 11로 이루어지거나 이를 포함하는, 제형.

청구항 231

제152항 내지 제230항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제형은 멸균 주사 용액인, 제형.

청구항 232

제152항 내지 제231항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 재구성 용액은 약학적으로 허용 가능한 담체 및/또는 첨가제를 포함하는, 제형.

청구항 233

제152항 내지 제232항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 약학적으로 허용 가능한 담체는 식염수 용액, 정제수, 또는 주사용 멸균수로부터 선택되는, 제형.

청구항 234

제152항 내지 제233항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제형은 100초, 80초, 70초, 68초, 65초, 또는 60초 미만의 기간 내에 완전히 재구성되는, 제형.

청구항 235

제152항 내지 제234항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제형은 적어도 또는 약 50 mg/mL의 ENPP1 폴리펩티드, 약 pH 6.3의 약 20 mM 구연산염, 약 2 mM 염화칼슘, 약 175 mM 수크로오스, 약 82 mM 만니톨, 및 약 0.05% w/v 폴리소르베이트를 포함하는, 제형.

청구항 236

제152항 내지 제235항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 재구성된 제형은 적어도 또는 약 50 mg/mL의 ENPP1 폴리펩티드, 약 pH 6.3의 약 20 mM 구연산염, 약 2 mM 염화칼슘, 약 175 mM 수크로오스, 약 82 mM (D) 만니톨, 및 약 0.05% w/v 폴리소르베이트 20을 포함하는, 제형.

청구항 237

제152항 내지 제236항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 재구성된 제형은 적어도 또는 약 50 mg/mL의 ENPP1 폴리펩티드, 약 pH 6.3의 약 20 mM 구연산염, 약 88 mM 수크로오스, 약 82 mM 만니톨, 약 2 mM 염화칼슘, 및 약 0.05% 폴리소르베이트 20을 포함하는, 제형.

청구항 238

제152항 내지 제237항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 재구성된 제형은 적어도 또는 약 50 mg/mL의 ENPP1 폴리펩티드, 약 pH 6.3의 약 20 mM 구연산염, 약 263 mM 수크로오스, 약 2 mM 염화칼슘, 및 약 0.05% 폴리소르베이트 20을 포함하는, 제형.

청구항 239

제152항 내지 제238항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 재구성된 제형은 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12, 18, 24, 48, 또는 60시간의 저장 수명을 갖는, 제형.

청구항 240

제1항 내지 제116항 중 어느 한 항의 동결건조된 제형을 포함하는 바이알.

청구항 241

제155항 내지 제239항 중 어느 한 항의 재구성된 제형을 포함하는 바이알.

청구항 242

제1항 내지 제116항 중 어느 한 항의 동결건조된 제형을 포함하는 주사기.

청구항 243

제115항 내지 제239항 중 어느 한 항의 재구성된 제형을 포함하는 주사기.

청구항 244

제152항 내지 제239항 중 어느 한 항에 있어서, 병리학적 석회화 또는 골화의 질환을 치료하는 데 사용하기 위한, 제형.

청구항 245

제152항 내지 제239항 중 어느 한 항에 있어서, 이를 필요로 하는 대상체에서 혈관 석회화의 진행을 예방하거나 감소시키는 데 사용하기 위한, 제형.

청구항 246

제152항 내지 제239항 중 어느 한 항에 있어서, ENPP1 결핍증을 가진 대상체에서 병리학적 석회화의 진행을 예방하거나 감소시키는 데 사용하기 위한, 제형.

청구항 247

제152항 내지 제239항 중 어느 한 항에 있어서, 이를 필요로 하는 대상체에서 조직 석회화의 진행을 예방하거나 감소시키는 데 사용하기 위한, 제형.

청구항 248

제152항 내지 제239항 중 어느 한 항에 있어서, 이를 필요로 하는 대상체에서 순환 피로포스페이트(PPi)를 증가시키는 데 사용하기 위한, 제형.

청구항 249

제152항 내지 제239항 중 어느 한 항에 있어서, 이를 필요로 하는 대상체에서 피로포스파타아제 활성을 증가시키는 데 사용하기 위한, 제형.

청구항 250

제249항에 있어서, 상기 대상체는 병리학적 연조직 석회화, 동맥 석회화, 혈관 석회화, 만성 신장 질환(CKD), 말기 신장 질환(ESRD), 석회화 요독성 동맥병증(CUA), 칼시필락시스, 후종인대골화증(OPLL), 또는 저인산혈증 구루병을 갖거나 이에 걸릴 위험이 있는, 제형.

청구항 251

제152항 내지 제239항 중 어느 한 항에 있어서, ENPP1 결핍증의 하나 이상의 증상을 완화시키는 데 사용하기 위한, 제형.

청구항 252

제152항 내지 제239항 중 어느 한 항에 있어서, ENPP1 결핍증을 가진 대상체를 치료하는 데 사용하기 위한, 제형.

청구항 253

제152항 내지 제239항 중 어느 한 항에 있어서, ABCC6 결핍증의 하나 이상의 증상을 완화시키는 데 사용하기 위한, 제형.

청구항 254

제152항 내지 제239항 중 어느 한 항에 있어서, PXE의 하나 이상의 증상을 완화시키는 데 사용하기 위한, 제형.

청구항 255

제152항 내지 제239항 중 어느 한 항에 있어서, 병리학적 골화가 있는 대상체를 치료하는 데 사용하기 위한, 제형.

청구항 256

제240항 내지 제241항 중 어느 한 항에 있어서, 병리학적 석회화 또는 골화 질환을 치료하는 데 사용하기 위한, 바이알.

청구항 257

제240항 내지 제241항 중 어느 한 항에 있어서, 이를 필요로 하는 대상체에서 혈관 석회화의 진행을 예방하거나

감소시키는 데 사용하기 위한, 바이알.

청구항 258

제240항 내지 제241항 중 어느 한 항에 있어서, ENPP1 결핍증을 가진 대상체에서 병리학적 석회화의 진행을 예방하거나 감소시키는 데 사용하기 위한, 바이알.

청구항 259

제240항 내지 제241항 중 어느 한 항에 있어서, 이를 필요로 하는 대상체에서 조직 석회화의 진행을 예방하거나 이를 감소시키는 데 사용하기 위한, 바이알.

청구항 260

제240항 내지 제241항 중 어느 한 항에 있어서, 이를 필요로 하는 대상체에서 순환 피로포스페이트(PPi)를 증가시키는데 사용하기 위한, 바이알.

청구항 261

제240항 내지 제241항 중 어느 한 항에 있어서, 이를 필요로 하는 대상체에서 피로포스파타아제 활성을 증가시키는 데 사용하기 위한, 바이알.

청구항 262

제261항에 있어서, 상기 대상체는 병리학적 연조직 석회화, 동맥 석회화, 혈관 석회화, 만성 신장 질환(CKD), 말기 신장 질환(ESRD), 석회화 요독성 동맥병증(CUA), 칼시필락시스, 후종 인대골화증(OPLL), 또는 저인산혈증 구루병을 갖거나 이에 걸릴 위험이 있는, 바이알.

청구항 263

제240항 내지 제241항 중 어느 한 항에 있어서, ENPP1 결핍증의 하나 이상의 증상을 완화시키는 데 사용하기 위한, 바이알.

청구항 264

제240항 내지 제241항 중 어느 한 항에 있어서, ENPP1 결핍증을 가진 대상체를 치료하는 데 사용하기 위한, 바이알.

청구항 265

제240항 내지 제241항 중 어느 한 항에 있어서, ABCC6 결핍증의 하나 이상의 증상을 완화시키는 데 사용하기 위한, 바이알.

청구항 266

제240항 내지 제241항 중 어느 한 항에 있어서, PXE의 하나 이상의 증상을 완화시키는 데 사용하기 위한, 바이알.

청구항 267

제242항 내지 제243항 중 어느 한 항에 있어서, 병리학적 석회화 또는 골화의 질환을 치료하는 데 사용하기 위한, 주사기.

청구항 268

제242항 내지 제243항 중 어느 한 항에 있어서, 이를 필요로 하는 대상체에서 혈관 석회화의 진행을 예방하거나 감소시키는데 사용하기 위한, 주사기.

청구항 269

제242항 내지 제243항 중 어느 한 항에 있어서, ENPP1 결핍증을 가진 대상체에서 병리학적 석회화의 진행을 예

방하거나 감소시키는 데 사용하기 위한, 주사기.

청구항 270

제242항 내지 제243항 중 어느 한 항에 있어서, 이를 필요로 하는 대상체에서 조직 석회화의 진행을 예방하거나 이를 감소시키는 데 사용하기 위한, 주사기.

청구항 271

제242항 내지 제243항 중 어느 한 항에 있어서, 이를 필요로 하는 대상체에서 순환 피로포스페이트(PPi)를 증가시키는 데 사용하기 위한, 주사기.

청구항 272

제242항 내지 제243항 중 어느 한 항에 있어서, 이를 필요로 하는 대상체에서 피로포스파타아제 활성을 증가시키는 데 사용하기 위한, 주사기.

청구항 273

제272항에 있어서, 상기 대상체는 병리학적 연조직 석회화, 동맥 석회화, 혈관 석회화, 만성 신장 질환(CKD), 말기 신장 질환(ESRD), 석회화 요독성 동맥병증(CUA), 칼시필락시스, 후종인대골화증(OPLL), 또는 저인산혈증 구루병을 갖거나 이에 걸릴 위험이 있는, 주사기.

청구항 274

제242항 내지 제243항 중 어느 한 항에 있어서, ENPP1 결핍증의 하나 이상의 증상을 완화시키는 데 사용하기 위한, 주사기.

청구항 275

제242항 내지 제243항 중 어느 한 항에 있어서, ENPP1 결핍증을 가진 대상체를 치료하는 데 사용하기 위한, 주사기.

청구항 276

제242항 내지 제243항 중 어느 한 항에 있어서, ABCC6 결핍증의 하나 이상의 증상을 완화시키는 데 사용하기 위한, 주사기.

청구항 277

제242항 내지 제243항 중 어느 한 항에 있어서, PXE의 하나 이상의 증상을 완화시키는 데 사용하기 위한, 주사기.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 상호 참조

[0002] 본 출원은 2021년 9월 24일에 출원된 미국 특허 가출원 제63/248,303호에 대한 우선권을 주장하며, 그 내용은 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다.

[0003] 서열 목록

[0004] 본 출원은 xml. 포맷으로 전자적으로 제출되었고 그 전체가 참조로서 본원에 통합된 서열 목록을 포함한다. 2022년 9월 23일에 생성된, 상기 xml. 사본의 명칭은 4427-11902_sequence.txt 이고 크기는 137 KB이다.

배경 기술

[0005] 인간 엑토뉴클레오타이드 피로포스파타아제(ENPP) 단백질 계열은 인산디에스테르 결합을 가수분해하는 7개의 세포 외, 당화된 단백질(즉, ENPP1-ENPP7)을 포함한다. ENPP들은 세포 표면 효소이지만, ENPP2는 예외이며, 이것은

원형질막으로 유출되지만 푸린에 의해 절단되어 세포의 유체로 방출된다. ENPP 효소는 높은 서열 및 구조적 상동성 정도를 갖지만, 뉴클레오타이드에서 지질을 아우르는 다양한 기질 특이성을 나타낸다.

[0006] ENPP1(PC-1로도 알려짐) 및 ENPP3은 골모세포 및 연골세포의 무기질 침착 매트릭스 소포 상에 위치한 2형 세포의 막 결합 당단백질이며, 세포의 뉴클레오타이드(주로 ATP)를 아데노신 모노포스페이트(AMP) 및 무기 피로포스페이트(PPi)로 가수분해한다. PPi는 초기 수산화인회석(HA) 결정과 결합함으로써 이소성 조직 무기질화의 강력한 억제제로서 기능하여, 이들 결정의 향후 성장을 예방한다. ENPP1은 뉴클레오타이드 삼인산(NTP)의 가수분해를 통해 PPi를 생성한다.

[0007] 이소성 조직 무기질화는 만성 관절 질환 및 급성으로 치명적인 신생아 호흡곤란증후군을 포함하는, 다수의 인간 질환과 관련이 있다. 원치 않는 조직 석회화를 예방하기 위해, 조직 무기질화를 촉진하고 억제하는 인자들이 반드시 긴밀한 균형을 유지해야 한다. 세포의 무기 피로포스페이트(PPi)와 포스페이트(Pi)의 균형은 이소성 조직 무기질화의 중요한 조절자이다.

발명의 내용

[0008] 본 개시는, 무엇보다도, ENPP1 폴리펩티드를 포함하는 동결건조된 제형을 특징으로 한다. 이러한 제형은, 무엇보다도, 광범위한 온도 범위에 걸쳐 현저한 안정성을 특징으로 한다. 따라서, 일 측면에서, 본 개시는 동결건조된 폴리펩티드 제형을 특징으로 하며, 제형은 ENPP1 폴리펩티드를 포함한다.

[0009] 일부 실시예에서, 본원에 기술된 제형은 완충제를 포함한다. 일부 실시예에서, 완충제는 용액에서 재구성될 때 pH 6-7의 pH 범위를 유지한다. 일부 실시예에서, 완충제는 용액에서 재구성될 때 pH 7-8의 pH 범위를 유지한다. 일부 실시예에서, 완충제는 용액에서 재구성될 때 pH 6-8의 pH 범위를 유지한다. 일부 실시예에서, 완충제는 숙신산염, 구연산염, 중탄산염, 인산염, 트리스, 또는 글리실글리신으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시예에서, 완충제는 숙신산염, 구연산염, 또는 인산염이다. 일부 실시예에서, 완충제는 구연산염이다. 일부 실시예에서, 완충제는 숙신산염이다. 일부 실시예에서, 완충제는 인산염이다. 일부 실시예에서, 완충제는 용액에서 재구성될 때 5 mM 내지 100 mM 범위의 농도를 포함한다. 일부 실시예에서, 완충제는 응집체 형성의 개시 온도를 증가시킨다. 일부 실시예에서, 완충제는 응집체 형성의 개시 온도를 적어도 2°C만큼 증가시킨다. 일부 실시예에서, 완충제는 고분자량 중의 형성을 감소시킨다. 일부 실시예에서, 완충제는 고분자량 중의 형성을 적어도 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 또는 50%만큼 감소시킨다.

[0010] 일부 실시예에서, 본원에 기술된 제형은 하나 이상의 약학적으로 허용 가능한 첨가제를 포함한다. 일부 실시예에서, 이러한 약학적으로 허용 가능한 첨가제는 안정화제, 아미노산, 염, 금속 이온, 및 계면활성제이거나 이를 포함한다. 일부 실시예에서, 안정화제는 당, 탄수화물, 또는 다당류이거나 이를 포함한다. 일부 실시예에서, 이러한 당은 수크로오스, 트레할로오스, 만노오스, 말토오스, 락토오스, 글루코오스, 라피노오스, 셀로비오스, 젠티오비오스, 이소말토오스, 아라비노오스, 글루코사민, 프룩토오스, 만니톨, 또는 소르비톨로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시예에서, 하나 이상의 약학적으로 허용 가능한 첨가제는 만니톨이거나 이를 포함한다. 일부 실시예에서, 약학적으로 허용 가능한 첨가제는 수크로오스이거나 이를 포함한다. 일부 실시예에서, 약학적으로 허용 가능한 첨가제는 아미노산이거나 이를 포함한다. 일부 실시예에서, 이러한 아미노산은 글리신, 아르기닌, 히스티딘, 알라닌, 프롤린, 세린, 및 글루탐산으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시예에서, 아미노산은 아르기닌이다. 일부 실시예에서, 약학적으로 허용 가능한 첨가제는 염, 예컨대 염화나트륨(NaCl), 염화칼슘(CaCl₂), 염화아연(ZnCl₂), 및/또는 염화마그네슘(MgCl₂)이다. 일부 실시예에서, 염은 염화칼슘(CaCl₂)이다. 일부 실시예에서, 상기 약학적으로 허용 가능한 첨가제는 계면활성제이고, 예를 들어, 이에 한정되지는 않지만, 폴리소르베이트, 폴록사머, 트리톤, 도데실 황산 나트륨, 라우렐 황산 나트륨, 나트륨 옥틸 글리코사이드, 라우릴설포베타인, 미리스틸-설포베타인, 리놀레일-설포베타인, 스테아릴-설포베타인, 라우릴 사르코신, 미리스틸-사르코신, 리놀레일-사르코신, 스테아릴-사르코신, 리놀레일-베타인, 미리스틸-베타인, 세틸-베타인, 라우라미도프로필-베타인, 코카미도프로필-베타인, 리놀레아미도프로필-베타인, 미리스타미도프로필-베타인, 팜 이도프로필-베타인, 이소스테아라미도프로필-베타인, 미리스타미도프로필-딤 에틸아민, 팜 이도프로필디메틸아민, 이소스테아라미도프로필-딤 에틸아민, 나트륨 메틸 코코일-타우레이트, 디나트륨 메틸 올레일-타우레이트, 디하이드록시프로필 PEG 5 리놀암모늄 염화물, 폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜, 폴리소르베이트 20, 폴리소르베이트 21, 폴리소르베이트 40, 폴리소르베이트 60, 폴리소르베이트 61, 폴리소르베이트 65, 폴리소르베이트 80, 폴리소르베이트 81, 폴리소르베이트 85, 폴리소르베이트 188, PEG3350, 및 이들의 혼합물과 같다. 일부 실시예에서, 계면활성제는 폴리소르베이트 20(PS20), 폴리소르베이트 80(PS80), 또는 폴리소르

베이트 188(PS188)로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시예에서, 계면활성제는 폴리소르베이트 20(PS20)이다.

- [0011] 일부 실시예에서, 본원에 기술된 제형은 완충제, 안정화제, 염, 아미노산, 및 계면활성제를 포함한다. 일부 실시예에서, 완충제는 구연산염 또는 숙신산염이고, 안정화제는 수크로오스 또는 만니톨이고, 염은 염화칼슘(CaCl_2)이고, 계면활성제는 폴리소르베이트 20(PS20)이다.
- [0012] 일부 실시예에서, 본원에 기술된 제형(예를 들어, 동결건조된 제형의 경우, 재구성 용액 또는 멸균수에 재구성될 때)의 pH는 pH 6.2 내지 pH 6.5이다. 일부 실시예에서, 본원에 기술된 제형(예를 들어, 동결건조된 제형의 경우, 재구성 용액 또는 멸균수에 재구성될 때)의 pH는 약 pH 6.0 내지 약 pH 7.0이며, pH 6.0 및 pH 7.0을 포함한다.
- [0013] 일부 실시예에서, 본원에 기술된 제형은 약 15 내지 약 25 mM의 구연산염을 포함한다.
- [0014] 일부 실시예에서, 본원에 기술된 제형은 각각 약 75 mM 내지 약 95 mM의 수크로오스, 만니톨, 또는 이들의 조합을 포함한다.
- [0015] 일부 실시예에서, 본원에 기술된 제형은 약 100 mM 내지 약 300 mM의 수크로오스를 포함한다.
- [0016] 일부 실시예에서, 본원에 기술된 제형은 약 1 mM 내지 약 3 mM의 염화칼슘을 포함한다.
- [0017] 일부 실시예에서, 제형은 계면활성제를 포함한다. 계면활성제는, 예를 들어 폴리소르베이트 20(PS20), 폴리소르베이트 80(PS80), 또는 폴록사머 Px188이거나 이를 포함할 수 있다. 일부 실시예에서, 계면활성제는 PS20이거나 이를 포함한다. 일부 실시예에서, 계면활성제는 용액에서 재구성될 때 약 0.02% 내지 약 0.10%(w/v) 범위의 농도로 존재한다. 일부 실시예에서, 본원에 기술된 제형은 약 0.005% 내지 약 0.1%(w/v)의 계면활성제를 포함한다. 일부 실시예에서, 본원에 기술된 제형은 약 0.005% 내지 약 0.1%(w/v)의 PS20을 포함한다. 일부 실시예에서, 계면활성제는 물리적 응력에 대한 저항을 증가시킨다.
- [0018] 일부 실시예에서, 약학적으로 허용 가능한 첨가제 또는 첨가제는 용액에서 재구성될 때(예를 들어, 재구성 완충액 또는 멸균수로), 약 5 mM 내지 약 300 mM 범위의 농도를 갖는다.
- [0019] 일부 실시예에서, 하나 이상의 약학적으로 허용 가능한 첨가제는 고분자량 종의 형성을 감소시킨다.
- [0020] 일부 실시예에서, 하나 이상의 약학적으로 허용 가능한 첨가제는 고분자량 종의 형성을 적어도 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%만큼 감소시킨다.
- [0021] 일부 실시예에서, 제형은 칼슘, 아연, 및/또는 아테노신 모노포스페이트와 같은 ENPP1 폴리펩티드 보조인자를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 일부 실시예에서, ENPP1 폴리펩티드 보조인자는 CaCl_2 , CaSO_4 , ZnCl_2 , ZnSO_4 , 및/또는 아테노신 모노포스페이트다. 일부 실시예에서, ENPP1 폴리펩티드 보조인자는 CaCl_2 및/또는 아테노신 모노포스페이트다. 일부 실시예에서, ENPP1 폴리펩티드 보조인자는 용액에서 재구성될 때 약 1 mM 내지 약 10 mM 범위의 농도로 존재한다. 일부 실시예에서, ENPP1 폴리펩티드 보조인자는 고분자량 종의 형성을 적어도 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%만큼 감소시킨다.
- [0022] 일부 실시예에서, 본원에 기술된 제형은 균질한 미립자 크기를 포함하거나 이를 특징으로 한다. 일부 실시예에서, 본원에 기술된 제형은 마이크로 유동 이미징 분석에 의해 결정했을 때 더 큰 크기의 미립자의 2배, 3배, 4배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배, 또는 10배 감소를 포함한다.
- [0023] 본원에 기술된 제형 중 어느 하나의 일부 실시예에서, ENPP1 폴리펩티드는 서열번호 13, 서열번호 14, 또는 서열번호 15를 포함하는 아미노산 서열과 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다.
- [0024] 일부 실시예에서, ENPP1 폴리펩티드는 서열번호 2를 포함하는 아미노산 서열과 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다.
- [0025] 일부 실시예에서, ENPP1 폴리펩티드는 가용성 ENPP1 폴리펩티드 도메인 및 하나 이상의 이중 단백질 부분을 포함하는 융합 단백질이다. 일부 실시예에서, 이중 단백질 부분은 포유동물에서 가용성 ENPP1 폴리펩티드의 순환 반감기를 증가시킨다. 일부 실시예에서, 이중 단백질 부분은 Fc 도메인을 포함한다. 일부 실시예에서, Fc 도메인은 서열번호 12를 포함하는 아미노산 서열과 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, ENPP1 폴리펩티드는 ENPP1-Fc 융합 단

백질이다. 일부 실시예에서, ENPP1 폴리펩티드는 이중 모이어티를 추가로 포함한다. 일부 실시예에서, 이중 모이어티는 글리코실화된 아미노산, 페길화(PEGylated) 아미노산, 파르네실화 아미노산, 아세틸화 아미노산, 비오틴화 아미노산, 및 지질 모이어티로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0026] 일부 실시예에서, ENPP1 폴리펩티드는 서열번호 13을 포함하는 아미노산 서열과 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, ENPP1 폴리펩티드는 서열번호 13과 적어도 90% 동일하다. 일부 실시예에서, ENPP1 폴리펩티드는 서열번호 13과 적어도 95% 동일하다. 일부 실시예에서, ENPP1 폴리펩티드는 서열번호 13과 적어도 99% 동일하다. 일부 실시예에서, ENPP1 폴리펩티드는 서열번호 13을 포함한다. 일부 실시예에서, ENPP1 폴리펩티드는 서열번호 13로 이루어진다. 일부 실시예에서, ENPP1 폴리펩티드는 Fc 도메인을 포함한다. Fc 도메인은 서열번호 12로 표시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어질 수 있다. 일부 실시예에서, ENPP1 폴리펩티드는 ENPP1 폴리펩티드 부분과 Fc 도메인을 연결하는 링커 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, 링커 아미노산 서열은 아미노산 서열 LIN을 포함하거나 이로 이루어진다. 일부 실시예에서, ENPP1 폴리펩티드는 서열번호 9, 서열번호 10, 또는 서열번호 11로 이루어지거나 포함한다. 일부 실시예에서, ENPP1 폴리펩티드는 서열번호 9로 이루어지거나 포함한다. 일부 실시예에서, ENPP1 폴리펩티드는 서열번호 10으로 이루어지거나 포함한다. 일부 실시예에서, ENPP1 폴리펩티드는 서열번호 11로 이루어지거나 포함한다.

[0027] 일부 실시예에서, ENPP1 폴리펩티드는 서열번호 14를 포함하는 아미노산 서열과 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, ENPP1 폴리펩티드는 서열번호 14와 적어도 90% 동일하다. 일부 실시예에서, ENPP1 폴리펩티드는 서열번호 14와 적어도 95% 동일하다. 일부 실시예에서, ENPP1 폴리펩티드는 서열번호 14와 적어도 99% 동일하다. 일부 실시예에서, ENPP1 폴리펩티드는 서열번호 14를 포함한다. 일부 실시예에서, ENPP1 폴리펩티드는 서열번호 14로 이루어진다. 일부 실시예에서, ENPP1 폴리펩티드는 Fc 도메인을 포함한다. Fc 도메인은 서열번호 12로 표시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어질 수 있다. 일부 실시예에서, ENPP1 폴리펩티드는 ENPP1 폴리펩티드 부분과 Fc 도메인을 연결하는 링커 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, 링커 아미노산 서열은 아미노산 서열 LIN을 포함하거나 이로 이루어진다. 일부 실시예에서, ENPP1 폴리펩티드는 서열번호 9, 서열번호 10, 또는 서열번호 11로 이루어지거나 포함한다. 일부 실시예에서, ENPP1 폴리펩티드는 서열번호 9로 이루어지거나 포함한다. 일부 실시예에서, ENPP1 폴리펩티드는 서열번호 10으로 이루어지거나 포함한다. 일부 실시예에서, ENPP1 폴리펩티드는 서열번호 11로 이루어지거나 포함한다.

[0028] 일부 실시예에서, ENPP1 폴리펩티드는 서열번호 15를 포함하는 아미노산 서열과 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, ENPP1 폴리펩티드는 서열번호 15와 적어도 90% 동일하다. 일부 실시예에서, ENPP1 폴리펩티드는 서열번호 15와 적어도 95% 동일하다. 일부 실시예에서, ENPP1 폴리펩티드는 서열번호 15와 적어도 99% 동일하다. 일부 실시예에서, ENPP1 폴리펩티드는 서열번호 15를 포함한다. 일부 실시예에서, ENPP1 폴리펩티드는 서열번호 15로 이루어진다. 일부 실시예에서, ENPP1 폴리펩티드는 Fc 도메인을 포함한다. Fc 도메인은 서열번호 12로 표시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어질 수 있다. 일부 실시예에서, ENPP1 폴리펩티드는 ENPP1 폴리펩티드 부분과 Fc 도메인을 연결하는 링커 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, 링커 아미노산 서열은 아미노산 서열 LIN을 포함하거나 이로 이루어진다. 일부 실시예에서, ENPP1 폴리펩티드는 서열번호 9, 서열번호 10, 또는 서열번호 11로 이루어지거나 포함한다. 일부 실시예에서, ENPP1 폴리펩티드는 서열번호 9로 이루어지거나 포함한다. 일부 실시예에서, ENPP1 폴리펩티드는 서열번호 10으로 이루어지거나 포함한다. 일부 실시예에서, ENPP1 폴리펩티드는 서열번호 11로 이루어지거나 포함한다.

[0029] 일부 실시예에서, 제형은 ENPP1 폴리펩티드, 완충제, 약학적으로 허용 가능한 염, 안정화제, 계면활성제, 및 하나 이상의 약학적으로 허용 가능한 첨가제를 포함한다. 일부 실시예에서, 완충제는 구연산염 완충제이다. 구연산염 완충제는, 예를 들어 구연산 삼나트륨 이수화물일 수 있다. 일부 실시예에서, 약학적으로 허용 가능한 염은 염화칼슘이다. 일부 실시예에서, 안정화제는 수크로오스와 같은 당이다. 일부 실시예에서, 하나 이상의 약학적으로 허용 가능한 첨가제는 만니톨이거나 이를 포함한다. 일부 실시예에서, ENPP1 폴리펩티드는 서열번호 13을 포함하거나 이로 이루어진다. 일부 실시예에서, ENPP1 폴리펩티드는 서열번호 14를 포함하거나 이로 이루어진다. 일부 실시예에서, ENPP1 폴리펩티드는 서열번호 15를 포함하거나 이로 이루어진다. 일부 실시예에서, ENPP1 폴리펩티드는 Fc 도메인을 포함한다. Fc 도메인은 서열번호 12로 표시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어질 수 있다. 일부 실시예에서, ENPP1 폴리펩티드는 ENPP1 폴리펩티드 부분과 Fc 도메인을 연결하는 링커 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, 링커 아미노산 서열은 아미노산 서열 LIN을 포함하거나 이로

거나 이로 이루어진다. 일부 실시예에서, ENPP1 폴리펩티드는 서열번호 14를 포함하거나 이로 이루어진다. 일부 실시예에서, ENPP1 폴리펩티드는 서열번호 15를 포함하거나 이로 이루어진다. 일부 실시예에서, ENPP1 폴리펩티드는 Fc 도메인을 포함한다. Fc 도메인은 서열번호 12로 표시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어질 수 있다. 일부 실시예에서, ENPP1 폴리펩티드는 ENPP1 폴리펩티드 부분과 Fc 도메인을 연결하는 링커 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, 링커 아미노산 서열은 아미노산 서열 LIN을 포함하거나 이로 이루어진다. 일부 실시예에서, ENPP1 폴리펩티드는 서열번호 9, 서열번호 10, 또는 서열번호 11로 이루어지거나 이를 포함한다. 일부 실시예에서, ENPP1 폴리펩티드는 서열번호 9로 이루어지거나 포함한다. 일부 실시예에서, ENPP1 폴리펩티드는 서열번호 10으로 이루어지거나 포함한다. 일부 실시예에서, ENPP1 폴리펩티드는 서열번호 11로 이루어지거나 포함한다.

[0035] 일부 실시예에서, 제형은 멸균 주사 용액에서 재구성될 수 있다. 일부 실시예에서, 제형은 재구성 용액 또는 멸균수에서 재구성될 수 있다. 일부 실시예에서, 재구성 용액은 약학적으로 허용 가능한 담체 및/또는 첨가제를 포함한다. 일부 실시예에서, 약학적으로 허용 가능한 담체는 식염수, 정제수, 또는 주사용 멸균수로부터 선택된다. 일부 실시예에서, 제형은 100초, 80초, 70초, 68초, 65초, 또는 60초 미만의 기간 내에 완전히 재구성된다.

[0036] 일부 실시예에서, 재구성된 제형은 적어도 또는 약 50 mg/mL의 ENPP1 폴리펩티드, 약 pH 6.3의 약 20 mM 구연산염, 약 2 mM 염화칼슘, 약 175 mM 수크로오스, 약 82 mM 만니톨, 및 약 0.05% w/v 폴리소르베이트를 포함한다. 일부 실시예에서, ENPP1 폴리펩티드는 서열번호 13을 포함하거나 이로 이루어진다. 일부 실시예에서, ENPP1 폴리펩티드는 서열번호 14를 포함하거나 이로 이루어진다. 일부 실시예에서, ENPP1 폴리펩티드는 서열번호 15를 포함하거나 이로 이루어진다. 일부 실시예에서, ENPP1 폴리펩티드는 Fc 도메인을 포함한다. Fc 도메인은 서열번호 12로 표시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어질 수 있다. 일부 실시예에서, ENPP1 폴리펩티드는 ENPP1 폴리펩티드 부분과 Fc 도메인을 연결하는 링커 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, 링커 아미노산 서열은 아미노산 서열 LIN을 포함하거나 이로 이루어진다. 일부 실시예에서, ENPP1 폴리펩티드는 서열번호 9, 서열번호 10, 또는 서열번호 11로 이루어지거나 이를 포함한다.

[0037] 일부 실시예에서, 재구성된 제형은 적어도 또는 약 50 mg/mL의 ENPP1 폴리펩티드, 약 pH 6.3의 약 20 mM 구연산염, 약 2 mM 염화칼슘, 약 175 mM 수크로오스, 약 82 mM (D) 만니톨, 및 약 0.05% w/v 폴리소르베이트 20을 포함한다. 일부 실시예에서, ENPP1 폴리펩티드는 서열번호 13을 포함하거나 이로 이루어진다. 일부 실시예에서, ENPP1 폴리펩티드는 서열번호 14를 포함하거나 이로 이루어진다. 일부 실시예에서, ENPP1 폴리펩티드는 서열번호 15를 포함하거나 이로 이루어진다. 일부 실시예에서, ENPP1 폴리펩티드는 Fc 도메인을 포함한다. Fc 도메인은 서열번호 12로 표시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어질 수 있다. 일부 실시예에서, ENPP1 폴리펩티드는 ENPP1 폴리펩티드 부분과 Fc 도메인을 연결하는 링커 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, 링커 아미노산 서열은 아미노산 서열 LIN을 포함하거나 이로 이루어진다. 일부 실시예에서, ENPP1 폴리펩티드는 서열번호 9, 서열번호 10, 또는 서열번호 11로 이루어지거나 이를 포함한다.

[0038] 일부 실시예에서, 재구성된 제형은 적어도 또는 약 50 mg/mL의 ENPP1 폴리펩티드, 약 pH 6.3의 약 20 mM 구연산염, 약 88 mM 수크로오스, 약 82 mM 만니톨, 약 2 mM 염화칼슘, 및 약 0.05% 폴리소르베이트 20을 포함한다. 일부 실시예에서, ENPP1 폴리펩티드는 서열번호 13을 포함하거나 이로 이루어진다. 일부 실시예에서, ENPP1 폴리펩티드는 서열번호 14를 포함하거나 이로 이루어진다. 일부 실시예에서, ENPP1 폴리펩티드는 서열번호 15를 포함하거나 이로 이루어진다. 일부 실시예에서, ENPP1 폴리펩티드는 Fc 도메인을 포함한다. Fc 도메인은 서열번호 12로 표시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어질 수 있다. 일부 실시예에서, ENPP1 폴리펩티드는 ENPP1 폴리펩티드 부분과 Fc 도메인을 연결하는 링커 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, 링커 아미노산 서열은 아미노산 서열 LIN을 포함하거나 이로 이루어진다. 일부 실시예에서, ENPP1 폴리펩티드는 서열번호 9, 서열번호 10, 또는 서열번호 11로 이루어지거나 이를 포함한다.

[0039] 일부 실시예에서, 재구성된 제형은 적어도 또는 약 50 mg/mL의 ENPP1 폴리펩티드, 약 pH 6.3의 약 20 mM 구연산염, 약 263 mM 수크로오스, 약 2 mM 염화칼슘, 및 약 0.05% 폴리소르베이트 20을 포함한다. 일부 실시예에서, ENPP1 폴리펩티드는 서열번호 13을 포함하거나 이로 이루어진다. 일부 실시예에서, ENPP1 폴리펩티드는 서열번호 14를 포함하거나 이로 이루어진다. 일부 실시예에서, ENPP1 폴리펩티드는 서열번호 15를 포함하거나 이로 이루어진다. 일부 실시예에서, ENPP1 폴리펩티드는 Fc 도메인을 포함한다. Fc 도메인은 서열번호 12로 표시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어질 수 있다. 일부 실시예에서, ENPP1 폴리펩티드는 ENPP1 폴리펩티드 부분과 Fc 도메인을 연결하는 링커 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, 링커 아미노산 서열은 아미노산 서열 LIN을 포함하거나 이로 이루어진다. 일부 실시예에서, ENPP1 폴리펩티드는 서열번호 9, 서열번호 10, 또는

서열번호 11로 이루어지거나 이를 포함한다.

- [0040] 일부 실시예에서, 동결건조된 제형은 -80℃ 내지 40℃에서 장기 안정성을 나타낸다. 일부 실시예에서, 동결건조된 제형은 적어도 3, 6, 12, 24, 36, 48, 또는 60개월의 저장 수명을 갖는다. 일부 실시예에서, 재구성된 제형은 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12, 18, 24, 48, 또는 60시간의 저장 수명을 갖는다.
- [0041] 일부 실시예에서, 동결건조된 제형은 5℃에서 보관될 때 적어도 36개월 동안 저장 안정성이 있다. 일부 실시예에서, 제형은 5℃에서 보관될 때 48개월 동안 저장 안정성이 있다. 제형은 실온(RT-25℃)에서 보관했을 때 적어도 24개월 동안 저장 안정성이 있다. 제형은 RT에서 보관될 때 적어도 36개월 동안 저장 안정성이 있다. 제형은 RT에서 보관될 때 48개월 동안 저장 안정성이 있다. 제형은 40℃에서 보관될 때 적어도 6개월 동안 저장 안정성이 있다. 제형은 40℃에서 보관했을 때 12개월 동안 저장 안정성이 있다.
- [0042] 일부 실시예에서, 재구성된 제형은 RT에서 적어도 8시간 동안 1 mg/ml 내지 50 mg/ml 범위의 농도로 안정하다. 일부 실시예에서, 재구성된 제형은 5℃에서 적어도 24시간 동안 1 mg/ml 내지 50 mg/ml 범위의 농도로 안정하다.
- [0043] 일부 실시예에서, 재구성된 제형은 5℃에서 적어도 12시간 동안 1 mg/ml 내지 10 mg/ml 범위의 농도로 안정하다. 일부 실시예에서, 재구성된 제형은 5℃에서 적어도 12시간 동안 1 mg/ml로 안정하다. 일부 실시예에서, 재구성된 제형은 5℃에서 적어도 12시간 동안 2.5 mg/ml로 안정하다. 일부 실시예에서, 재구성된 제형은 5℃에서 적어도 12시간 동안 10 mg/ml로 안정하다.
- [0044] 일부 실시예에서, 재구성된 제형은 바이알에 보관된다. 일부 실시예에서, 재구성된 제형은 주사기에 보관된다. 일부 실시예에서, 재구성된 제형은 5℃에서 바이알에 보관될 때 적어도 12시간 동안 안정하다. 일부 실시예에서, 재구성된 제형은 5℃에서 주사기에 보관될 때 적어도 8시간 동안 안정하다.
- [0045] 따라서, 본 개시는 또한 ENPP1, 바람직하게는 ENPP1-Fc, 및 완충액, 벌크화제, 안정화제, 및/또는 계면활성제 중 하나 이상을 포함하는 동결건조된 제형을 포함하는 바이알을 특징으로 하며, 여기서 바이알은 1-100 mg, 예를 들어, 1 mg, 5 mg, 10 mg, 15 mg, 20 mg, 25 mg 또는 50 mg 또는 100 mg의 ENPP1 또는 ENPP1-Fc를 포함한다.
- [0046] 일부 실시예에서, 바이알은 ENPP1, 바람직하게는 ENPP1-Fc, 및 완충액, 벌크화제, 안정화제, 및/또는 계면활성제 중 하나 이상을 포함하는 동결건조된 제형을 포함하며, 바이알은 100 mg의 ENPP1 또는 ENPP1-Fc를 포함한다.
- [0047] 일부 실시예에서, 바이알은 ENPP1, 바람직하게는 ENPP1-Fc, 및 완충액, 벌크화제, 안정화제, 및/또는 계면활성제 중 하나 이상을 포함하는 동결건조된 제형을 포함하며, 바이알은 50 mg의 ENPP1 또는 ENPP1-Fc를 포함한다.
- [0048] 일부 실시예에서, 바이알은 ENPP1, 바람직하게는 ENPP1-Fc, 및 완충액, 벌크화제, 안정화제, 및/또는 계면활성제 중 하나 이상을 포함하는 동결건조된 제형을 포함하며, 바이알은 25 mg의 ENPP1 또는 ENPP1-Fc를 포함한다.
- [0049] 일부 실시예에서, 바이알은 ENPP1, 바람직하게는 ENPP1-Fc, 및 완충액, 벌크화제, 안정화제, 및/또는 계면활성제 중 하나 이상을 포함하는 동결건조된 제형을 포함하며, 바이알은 10 mg의 ENPP1 또는 ENPP1-Fc를 포함한다.
- [0050] 일부 실시예에서, 바이알은 ENPP1, 바람직하게는 ENPP1-Fc, 및 완충액, 벌크화제, 안정화제, 및/또는 계면활성제 중 하나 이상을 포함하는 동결건조된 제형을 포함하며, 바이알은 5 mg의 ENPP1 또는 ENPP1-Fc를 포함한다.
- [0051] 일부 실시예에서, 바이알은 ENPP1, 바람직하게는 ENPP1-Fc, 및 완충액, 벌크화제, 안정화제, 및/또는 계면활성제 중 하나 이상을 포함하는 동결건조된 제형을 포함하며, 바이알은 2.5 mg의 ENPP1 또는 ENPP1-Fc를 포함한다.
- [0052] 일부 실시예에서, 바이알은 ENPP1, 바람직하게는 ENPP1-Fc, 및 완충액, 벌크화제, 안정화제, 및/또는 계면활성제 중 하나 이상을 포함하는 동결건조된 제형을 포함하며, 바이알은 1 mg의 ENPP1 또는 ENPP1-Fc를 포함한다.
- [0053] 따라서, 본 개시는 또한 재구성된 ENPP1, 바람직하게는 ENPP1-Fc, 및 완충액, 벌크화제, 안정화제, 및/또는 계면활성제 중 하나 이상을 포함하는 제형을 포함하는 바이알을 특징으로 하며, 여기서 바이알은 0.1 mg/ml 내지 100 mg/ml, 예를 들어, 0.1 mg/ml, 1 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml, 15 mg/ml, 20 mg/ml, 25 mg/ml 또는 50 mg/ml 또는 100 mg/ml의 ENPP1 또는 ENPP1-Fc를 포함한다.
- [0054] 일부 실시예에서, 바이알은 재구성된 ENPP1, 바람직하게는 ENPP1-Fc, 및 완충액, 벌크화제, 안정화제, 및/또는 계면활성제 중 하나 이상을 포함하는 제형을 포함하며, 바이알은 100 mg/ml의 ENPP1 또는 ENPP1-Fc를 포함한다.
- [0055] 일부 실시예에서, 바이알은 재구성된 ENPP1, 바람직하게는 ENPP1-Fc, 및 완충액, 벌크화제, 안정화제, 및/또는

계면활성제 중 하나 이상을 포함하는 제형을 포함하며, 바이알은 50 mg/ml의 ENPP1 또는 ENPP1-Fc를 포함한다.

- [illegible]

- [0075] 일부 실시예에서, 주사기는 재구성된 ENPP1, 바람직하게는 ENPP1-Fc, 및 완충액, 벌크화제, 안정화제, 및/또는 계면활성제 중 하나 이상을 포함하는 제형을 포함하며, 바이알은 50 mg/ml의 ENPP1 또는 ENPP1-Fc를 포함한다.
- [0076] 일부 실시예에서, 주사기는 재구성된 ENPP1, 바람직하게는 ENPP1-Fc, 및 완충액, 벌크화제, 안정화제, 및/또는 계면활성제 중 하나 이상을 포함하는 제형을 포함하며, 바이알은 25 mg/ml의 ENPP1 또는 ENPP1-Fc를 포함한다.
- [0077] 일부 실시예에서, 주사기는 재구성된 ENPP1, 바람직하게는 ENPP1-Fc, 및 완충액, 벌크화제, 안정화제, 및/또는 계면활성제 중 하나 이상을 포함하는 제형을 포함하며, 바이알은 10 mg/ml의 ENPP1 또는 ENPP1-Fc를 포함한다.
- [0078] 일부 실시예에서, 주사기는 재구성된 ENPP1, 바람직하게는 ENPP1-Fc, 및 완충액, 벌크화제, 안정화제, 및/또는 계면활성제 중 하나 이상을 포함하는 제형을 포함하며, 바이알은 5 mg/ml의 ENPP1 또는 ENPP1-Fc를 포함한다.
- [0079] 일부 실시예에서, 주사기는 재구성된 ENPP1, 바람직하게는 ENPP1-Fc, 및 완충액, 벌크화제, 안정화제, 및/또는 계면활성제 중 하나 이상을 포함하는 제형을 포함하며, 바이알은 2.5 mg/ml의 ENPP1 또는 ENPP1-Fc를 포함한다.
- [0080] 일부 실시예에서, 주사기는 재구성된 ENPP1, 바람직하게는 ENPP1-Fc, 및 완충액, 벌크화제, 안정화제, 및/또는 계면활성제 중 하나 이상을 포함하는 제형을 포함하며, 바이알은 1 mg/ml의 ENPP1 또는 ENPP1-Fc를 포함한다.
- [0081] 일부 실시예에서, 주사기는 재구성된 ENPP1, 바람직하게는 ENPP1-Fc, 및 완충액, 벌크화제, 안정화제, 및/또는 계면활성제 중 하나 이상을 포함하는 제형을 포함하며, 바이알은 0.5 mg/ml의 ENPP1 또는 ENPP1-Fc를 포함한다.
- [0082] 일부 실시예에서, 주사기는 재구성된 ENPP1, 바람직하게는 ENPP1-Fc, 및 완충액, 벌크화제, 안정화제, 및/또는 계면활성제 중 하나 이상을 포함하는 제형을 포함하며, 바이알은 0.1 mg/ml의 ENPP1 또는 ENPP1-Fc를 포함한다.
- [0083] 일부 실시예에서, 동결건조된 ENPP1, 바람직하게는 ENPP1-Fc 폴리펩티드는 바이알에 보관된다. 일부 실시예에서, 바이알은 0.1 mg의 동결건조된 ENPP1, 바람직하게는 ENPP1-Fc 폴리펩티드를 포함한다. 일부 실시예에서, 바이알은 0.5 mg의 동결건조된 ENPP1, 바람직하게는 ENPP1-Fc 폴리펩티드를 포함한다. 일부 실시예에서, 바이알은 1 mg의 동결건조된 ENPP1, 바람직하게는 ENPP1-Fc 폴리펩티드를 포함한다. 일부 실시예에서, 바이알은 5 mg의 동결건조된 ENPP1, 바람직하게는 ENPP1-Fc 폴리펩티드를 포함한다. 일부 실시예에서, 바이알은 10 mg의 동결건조된 ENPP1, 바람직하게는 ENPP1-Fc 폴리펩티드를 포함한다. 일부 실시예에서, 바이알은 15 mg의 동결건조된 ENPP1, 바람직하게는 ENPP1-Fc 폴리펩티드를 포함한다. 일부 실시예에서, 바이알은 25 mg의 동결건조된 ENPP1, 바람직하게는 ENPP1-Fc 폴리펩티드를 포함한다. 다른 실시예에서, 바이알은 50 mg의 동결건조된 ENPP1, 바람직하게는 ENPP1-Fc 폴리펩티드를 포함한다. 다른 실시예에서, 바이알은 100 mg의 동결건조된 ENPP1, 바람직하게는 ENPP1-Fc 폴리펩티드를 포함한다.
- [0084] 일부 실시예에서, 동결건조된 ENPP1-Fc 제형은 투여를 위해 재구성되고 주사기에 보관된다. 일부 실시예에서, 주사기는 투여 또는 후속 회석을 위해 100 mg/ml의 ENPP1-Fc를 포함한다. 일부 실시예에서, 주사기는 투여 또는 후속 회석을 위해 50 mg/ml의 ENPP1-Fc를 포함한다. 일부 실시예에서, 주사기는 투여 또는 후속 회석을 위해 25 mg/ml의 ENPP1-Fc를 포함한다. 일부 실시예에서, 주사기는 투여 또는 후속 회석을 위해 20 mg/ml의 ENPP1-Fc를 포함한다. 일부 실시예에서, 주사기는 투여 또는 후속 회석을 위해 15 mg/ml의 ENPP1-Fc를 포함한다. 일부 실시예에서, 주사기는 투여 또는 후속 회석을 위해 10 mg/ml의 ENPP1-Fc를 포함한다. 일부 실시예에서, 주사기는 투여 또는 후속 회석을 위해 5 mg/ml의 ENPP1-Fc를 포함한다. 일부 실시예에서, 주사기는 투여 또는 후속 회석을 위해 4 mg/ml의 ENPP1-Fc를 포함한다. 일부 실시예에서, 주사기는 투여 또는 후속 회석을 위해 3 mg/ml의 ENPP1-Fc를 포함한다. 일부 실시예에서, 주사기는 투여 또는 후속 회석을 위해 2.5 mg/ml의 ENPP1-Fc를 포함한다. 일부 실시예에서, 주사기는 투여 또는 후속 회석을 위해 2 mg/ml의 ENPP1-Fc를 포함한다. 일부 실시예에서, 주사기는 투여 또는 후속 회석을 위해 1 mg/ml의 ENPP1-Fc를 포함한다. 일부 실시예에서, 주사기는 투여 또는 후속 회석을 위해 0.5 mg/ml의 ENPP1-Fc를 포함한다. 일부 실시예에서, 주사기는 투여 또는 후속 회석을 위해 0.1 mg/ml의 ENPP1-Fc를 포함한다.
- [0085] 일부 실시예에서, ENPP1-Fc 제형은 0.2 mg/kg 내지 1.8 mg/ml 범위의 투여량으로 성인에게 투여된다. 일부 실시예에서, ENPP1-Fc 제형은 0.2 mg/kg 내지 0.6 mg/kg 범위의 투여량으로 1 kg을 초과하는 어린이 및 아기에게 투여된다. 일부 실시예에서, ENPP1-Fc 제형은 체중이 1 kg 미만인 조산아에게 0.05 mg/kg 내지 0.2 mg/kg 범위의 투여량으로 투여된다. 일부 실시예에서, ENPP1-Fc 제형은 체중이 1 kg을 초과하는 아기에게 0.2 mg/kg 범위의 투여량으로 투여된다. 일부 실시예에서, ENPP1-Fc 제형은 체중이 1 kg 미만인 조산아에게 0.1 mg/kg의 투여량으로 투여된다.
- [0086] 일부 실시예에서, 본원에 기술된 동결건조된 제형 중 어느 하나는 치료적 유효 투여량을 포함한다.

- [0087] 일부 실시예에서, 본원에 기술된 재구성된 제형 중 어느 하나는 치료적 유효 투여량을 포함한다.
- [0088] 또 다른 측면에서, 본 개시는 본원에 기술된 동결건조된 제형 중 어느 하나를 생성하거나 제조하기 위한 방법을 특징으로 한다. 상기 방법은 완충제, 안정화제, 염, 아미노산, 및 계면활성제 중 하나 이상을 ENPP1 폴리펩티드 (예컨대, ENPP1의 촉매 도메인 및 면역글로불린의 Fc 영역을 포함하는 융합 폴리펩티드)와 혼합하는 단계를 포함한다. 일부 실시예에서, 상기 방법은 구연산염 완충액, 수크로오스, 만니톨, 염화칼슘, 및 폴리소르베이트 20을 ENPP1 폴리펩티드와 혼합하는 단계를 포함한다.
- [0089] 또 다른 측면에서, 본 개시는 ENPP1 폴리펩티드를 포함하는 약학적 용액을 생성하는 방법을 특징으로 한다. 상기 방법은 본원에 기술된 동결건조된 폴리펩티드 제형 중 어느 하나를 멸균 재구성 용액 또는 멸균수와 접촉시켜 ENPP1 폴리펩티드를 포함하는 재구성 용액을 생성하는 단계를 포함한다. 일부 실시예에서, 재구성 용액은 약학적으로 허용 가능한 담체 및/또는 첨가제를 포함한다. 일부 실시예에서, 약학적으로 허용 가능한 담체는 식염수, 정제수, 또는 주사용 멸균수로부터 선택된다. 일부 실시예에서, 제형은 100초, 80초, 70초, 68초, 65초, 또는 60초 미만의 기간 내에 완전히 재구성된다. 일부 실시예에서, 재구성된 제형은 적어도 또는 약 50 mg/mL의 ENPP1 폴리펩티드, 약 pH 6.3의 약 20 mM 구연산염, 약 2 mM 염화칼슘, 약 175 mM 수크로오스, 약 82 mM 만니톨, 및 약 0.05% w/v 폴리소르베이트를 포함한다. 일부 실시예에서, 재구성된 제형은 적어도 또는 약 50 mg/mL의 ENPP1 폴리펩티드, 약 pH 6.3의 약 20 mM 구연산염, 약 2 mM 염화칼슘, 약 175 mM 수크로오스, 약 82 mM 만니톨, 및 약 0.05% w/v 폴리소르베이트 20을 포함한다. 일부 실시예에서, 재구성된 제형은 적어도 또는 약 50 mg/mL의 ENPP1 폴리펩티드, 약 pH 6.3의 약 20 mM 구연산염, 약 88 mM 수크로오스, 약 82 mM 만니톨, 약 2 mM 염화칼슘, 및 약 0.05% 폴리소르베이트 20을 포함한다. 일부 실시예에서, 재구성된 제형은 적어도 또는 약 50 mg/mL의 ENPP1 폴리펩티드, 약 pH 6.3의 약 20 mM 구연산염, 약 263 mM 수크로오스, 약 2 mM 염화칼슘, 및 약 0.05% 폴리소르베이트 20을 포함한다. 또 다른 측면에서, 본 개시는 본원에 기술된 약학적 용액을 생성하기 위한 방법 중 어느 하나에 의해 제조된 재구성 용액을 특징으로 한다.
- [0090] 또 다른 측면에서, 본 개시는 이를 필요로 하는 대상체에서 혈관 석회화의 진행을 예방하거나 이를 감소시키는 방법을 특징으로 한다. 상기 방법은: 대상체에서 혈관 석회화의 진행을 예방하거나 감소시키는 데 효과적인 양으로 본원에 기술된 재구성된 제형 중 어느 하나를 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0091] 또 다른 측면에서, 본 개시는 ENPP1 결핍증을 가진 대상체에서 병리학적 석회화의 진행을 예방하거나 이를 감소시키는 방법을 특징으로 한다. 또 다른 측면에서, 본 개시는 ENPP1 결핍증을 가진 대상체를 치료하기 위한 방법을 특징으로 한다. 이들 방법은: 대상체에서 병리학적 석회화의 진행을 예방하거나 감소시키기에 효과적인 양으로 본원에 기술된 재구성된 제형 중 어느 하나를 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0092] 또 다른 측면에서, 본 개시는 ABCC6 결핍증을 가진 대상체에서 병리학적 석회화의 진행을 예방하거나 이를 감소시키는 방법을 특징으로 한다. 또 다른 측면에서, 본 개시는 PXE와 같은 ABCC6 결핍증을 가진 대상체를 치료하기 위한 방법을 특징으로 한다. 이들 방법은: 대상체에서 병리학적 석회화의 진행을 예방하거나 감소시키기에 효과적인 양으로 본원에 기술된 재구성된 제형 중 어느 하나를 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0093] 일부 실시예에서, 재구성된 제형은 대상체의 킬로그램 당 약 0.1 mg, 대상체의 킬로그램 당 약 0.2 mg, 대상체의 킬로그램 당 약 0.6 mg, 또는 대상체의 킬로그램 당 약 1.8 mg의 투여량으로 대상체에게 투여될 수 있다.
- [0094] 일부 실시예에서, 재구성된 제형은 약 0.1 mg/kg, 약 0.2 mg/kg, 약 0.3 mg/kg, 약 0.4 mg/kg, 약 0.5 mg/kg, 약 0.6 mg/kg, 약 0.7 mg/kg, 약 0.8 mg/kg, 약 0.9 mg/kg, 약 1 mg/kg, 약 1.1 mg/kg, 약 1.2 mg/kg, 약 1.3 mg/kg, 약 1.4 mg/kg, 약 1.5 mg/kg, 약 1.6 mg/kg, 약 1.7 mg/kg 또는 1.8 mg/kg의 투여량으로 대상체에게 투여될 수 있다.
- [0095] 또 다른 측면에서, 본 개시는 이를 필요로 하는 대상체에서 조직 석회화의 진행을 예방하거나 이를 감소시키는 방법을 특징으로 하며, 상기 방법은 대상체에서 조직 석회화의 진행을 예방하거나 이를 감소시키는 데 효과적인 양으로 본원에 기술된 재구성된 제형 중 어느 하나를 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 일부 실시예에서, 대상체는 ENPP1 결핍증을 앓고 있거나 앓고 있는 것으로 의심된다. 일부 실시예에서, 대상체는 ABCC6 결핍증(예컨대 탄력섬유거짓황색증(PXE))을 갖거나 갖는 것으로 의심된다.
- [0096] 또 다른 측면에서, 본 개시는 이를 필요로 하는 대상체에서 병리학적 골화의 진행을 예방하거나 이를 감소시키는 방법을 특징으로 한다. 상기 방법은 대상체에서 조직 석회화의 진행을 예방하거나 감소시키기에 효과적인 양으로 본원에 기술된 재구성된 제형 중 어느 하나를 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 일부 실시예에서, 대상체는 ENPP1 결핍증을 앓고 있거나 앓고 있는 것으로 의심된다. 일부 실시예에서, 대상체는 ABCC6 결핍증(예컨대

대 탄력섬유거짓황색종(PXE))을 갖거나 갖는 것으로 의심된다.

- [0097] 또 다른 측면에서, 본 개시는 순환 피로포스페이트(PPi)의 증가를 필요로 하는 대상체에서 이를 증가시키는 방법을 특징으로 한다. 상기 방법은 대상체에서 순환하는 PPi를 증가시키는 데 효과적인 양으로 본원에 기술된 재구성된 제형 중 어느 하나를 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 일부 실시예에서, 대상체는 ENPP1 결핍증을 앓고 있거나 앓고 있는 것으로 의심된다. 일부 실시예에서, 대상체는 ABCC6 결핍증(예컨대 탄력섬유거짓황색종(PXE))을 갖거나 갖는 것으로 의심된다. "NPP1 결핍" 또는 "ENPP1 결핍증"이라는 문구는 NPP1 단백질의 정상 혈청 수준 또는 NPP1의 정상 활성화에 비해 NPP1 단백질의 양 또는 NPP1 활성화의 감소를 지칭하며, 여기서 이러한 감소는 병리학적 석회화 및/또는 병리학적 골화 및/또는 PPi 수준 감소질환 또는 장애를 초래한다. 이러한 병리학적 질환은 GACI 및 ARHR2를 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 본원에서 사용되는 바와 같이, ENPP1 결핍증은 병리학적 석회화 및/또는 병리학적 골화의 질환 또는 장애를 초래하지 않는 NPP1 단백질의 양 및/또는 NPP1 활성화의 약간의 감소를 지칭하지 않는다. 본원에서 사용되는 바와 같이, "ABCC6 결핍 환자" 또는 "ABCC6 결핍 대상체"는 ABC66 단백질의 활성화 및/또는 발현에 영향을 미치는 ABCC6 유전자에 적어도 하나의 병원성 돌연변이를 갖는 환자를 지칭한다.
- [0098] 또 다른 측면에서, 본 개시는 이를 필요로 하는 대상체에서 피로포스파타아제 활성을 증가시키는 방법을 특징으로 한다. 상기 방법은 대상체에서 순환하는 PPi를 증가시키는 데 효과적인 양으로 본원에 기술된 재구성된 제형 중 어느 하나를 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 일부 실시예에서, 대상체는 ENPP1 결핍증을 앓고 있거나 앓고 있는 것으로 의심된다. 일부 실시예에서, 대상체는 ABCC6 결핍증(예컨대 탄력섬유거짓황색종(PXE))을 갖거나 갖는 것으로 의심된다. 용어 "피로포스파타아제 활성화"는 ATP와 같은 분자에서 2개의 인산염기 사이의 피로인산염 결합을 가수분해하는 ENPP1 효소의 능력을 지칭한다.
- [0099] 본원에 기술된 방법 중 어느 하나의 일부 실시예에서, 대상체는 병리학적 석회화를 포함하는 장애를 갖는다. 본원에 기술된 방법 중 어느 하나의 일부 실시예에서, 대상체는 병리학적 골화를 포함하는 장애를 갖는다. 본원에 기술된 방법 중 어느 하나의 일부 실시예에서, 대상체는 병리학적 연조직 석회화, 동맥 석회화, 혈관 석회화, 만성 신장 질환(CKD), 말기 신장 질환(ESRD), 석회화 요독성 동맥병증(CUA), 칼시필락시스, 후종인대골화증(OPLL), 또는 저인산혈증 구루병을 갖거나 이에 걸릴 위험이 있다.
- [0100] 또 다른 측면에서, 본 개시는 대상체에서 ENPP1 결핍증의 하나 이상의 증상을 치료하거나 완화시키는 방법을 특징으로 하며, 상기 방법은 대상체에서 ENPP1 결핍증의 하나 이상의 증상을 완화시키기 위해 본원에 기술된 재구성된 제형 중 어느 하나를 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0101] 또 다른 측면에서, 본 개시는 ENPP1 결핍증을 가진 대상체를 치료하기 위한 방법을 특징으로 한다. 상기 방법은 본원에 기술된 재구성된 제형 중 어느 하나를 대상체에게 투여하여 대상체를 치료하는 단계를 포함한다.
- [0102] 또 다른 측면에서, 본 개시는 대상체에서 ABCC6 결핍증의 하나 이상의 증상을 치료하거나 완화시키는 방법을 특징으로 하며, 상기 방법은 대상체에서 ABCC6 결핍증의 하나 이상의 증상을 완화시키는 데 효과적인 양으로 본원에 기술된 재구성된 제형 중 어느 하나를 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0103] 또 다른 측면에서, 본 개시는 ABCC6 결핍증을 앓고 있는 대상체를 치료하기 위한 방법을 특징으로 하며, 상기 방법은 재구성된 제형을 대상체를 치료하는 데 효과적인 양으로 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0104] 본원에 기술된 방법 중 어느 하나의 일부 실시예에서, 재구성된 제형은 비경구 투여된다. 본원에 기술된 방법 중 어느 하나의 일부 실시예에서, 재구성된 제형은 피하 주사를 통해 투여된다. 본원에 기술된 방법 중 어느 하나의 일부 실시예에서, 재구성된 제형은 정맥내 주사를 통해 투여된다. 본원에 기술된 방법 중 어느 하나의 일부 실시예에서, 재구성된 제형은 피내 주사를 통해 투여된다. 본원에 기술된 방법 중 어느 하나의 일부 실시예에서, 재구성된 제형은 근육내 주사를 통해 투여된다.
- [0105] 본원에 기술된 방법 중 어느 하나의 일부 실시예에서, 재구성된 제형은 자가 투여된다. 본원에 기술된 방법 중 어느 하나의 일부 실시예에서, 제형은 매일, 2일마다, 3일마다, 1주일, 또는 1개월에 여러 번 투여된다.
- [0106] 본원에 기술된 방법 중 어느 하나의 일부 실시예에서, 제형의 제2 투여량(또는 추가 투여량)은 적어도 2일 후, 4일 후, 1주 후, 또는 1개월 후(1차 또는 이전 투여량으로부터)의 적절한 시간 간격 후에 투여된다.

도면의 간단한 설명

- [0107] 도 1은 야생형 ENPP1 전구체 단백질의 전체, 미가공 아미노산 서열을 도시한다(서열번호 1). 세포질 및 막관통

영역은 밑줄이 그어져 있다. 잠재적 N-글리코실화 부위는 굵은 글씨체로 표시되어 있다. PSCAKE(잔기 99-104; 박스처리됨)는 SMB1(잔기 104-144) 및 SMB2(잔기 145-189)를 포함하는 가용성 ENPP1 단백질 부분의 시작이다.

도 2는 인간 ENPP1의 세포질 도메인(잔기 1-77), 막관통 도메인(TM)(잔기 77-100), 소마토메딘-B-유사 도메인-1(SMB1)(잔기 100-142), 소마토메딘-B-유사 도메인-2(SMB2)(잔기 142-187), 촉매 도메인 및 뉴클레아제 도메인을 도시한다.

도 3은 가용성 ENPP1 폴리펩티드의 아미노산 서열을 도시한다(서열번호 2).

도 4a 및 **도 4b**는 다양한 척추동물 가용성 ENPP1 폴리펩티드 및 인간 가용성 ENPP1 폴리펩티드의 다중 서열 정렬을 도시한다(서열번호 4-8). 다양한 가용성 ENPP1 폴리펩티드는 다음 중에 상응하며 특이적 NCBI 수탁번호의 영역을 나타낸다: 마우스(NCBI 수탁 NP_001295256.1; 서열번호 4), 소(NCBI 수탁 NP_001193141; 서열번호 5), 토끼(NCBI 수탁 NP_001162404.1; 서열번호 6), 인간(NCBI 수탁 NP_006199.2; 서열번호 1), 및 개코원숭이(NCBI 수탁 NP_001076211.2; 서열번호 8).

도 5는 다양한 완충액 성분을 포함하는 ENPP1-Fc 제형에 대한 요약 크기 배제 크로마토그래피(SEC) 결과를 보여주는 막대 그래프이다. 데이터는 % 고분자량 중(HMW), 또는 % 주 피크의 관점에서 도시되어 있다.

도 6은 완충액 및 부형제 성분의 다양한 조합을 포함하는 동결건조된 ENPP1-Fc 폴리펩티드 제형의 재구성된 제형에 대한 회수율을 보여주는 막대 그래프이다.

도 7은 5°C 및 40°C에서 완충액 및 부형제 성분의 다양한 조합을 포함하는 동결건조된 ENPP1-Fc 폴리펩티드 제형에 대한 요약된 효소 활성 데이터를 보여주는 막대 그래프이다. 활성 데이터는 U/mg으로 제시된다.

도 8은 5°C 및 40°C에서 완충액 및 부형제 성분의 다양한 조합을 포함하는 동결건조된 ENPP1-Fc 폴리펩티드 제형에 대한 SEC 데이터의 요약을 보여주는 막대 그래프이다. 데이터는 고분자량 중(HMW), 주 피크 중, 또는 저분자량 중(LMW)의 풍부도 백분율의 관점에서 도시되어 있다.

도 9a 및 **도 9b**는 다양한 완충액, 부형제 및 계면활성제 성분을 포함하는 동결건조된 ENPP1-Fc 폴리펩티드 제형에 대한 요약 SEC 데이터를 보여주는 막대 그래프이다. 도시된 제형을 600 rpm("교반"으로 도시됨)에서 교반 또는 5회의 동결 해동 사이클(즉, -80°C에서 ≥ 60분 동안 보관한 다음 실온에서 해동; "F/T"로 도시됨)을 포함하는 응력 조건 하에서 시험하였다. 데이터는 %HMW(도 9a) 또는 %주 피크(도 9b)의 관점에서 도시되어 있다.

도 10은 숙신산염 및 수크로오스 완충액/첨가제 배경에서 다양한 보조인자를 포함하는 동결건조된 ENPP1-Fc 폴리펩티드 제형에 대한 요약 SEC 데이터를 보여주는 막대 그래프이다. 데이터는 5°C에서 HMW 및 주 피크 중의 풍부도를 나타낸다.

도 11은 숙신산염, 수크로오스, 및 PS20 완충액/첨가제/계면활성제 배경에서 다양한 보조인자를 포함하는 동결건조된 ENPP1-Fc 폴리펩티드 제형에 대한 요약 SEC 데이터를 보여주는 막대 그래프이다. 데이터는 40°C에서 ~6일 동안 인큐베이션된 HMW 및 주 피크 중의 풍부도를 나타낸다.

도 12a 및 **도 12b**는 숙신산염, 수크로오스, 및 PS20 완충액/첨가제/계면활성제 배경에서 다양한 보조인자를 포함하는 동결건조된 ENPP1-Fc 폴리펩티드 제형에 대한 요약 SEC 데이터를 보여주는 막대 그래프이다. 데이터는 5°C에서 HMW, LMW, 및 주 피크 중의 풍부도를 나타내거나(도 12b), 40°C에서 ~6일 동안 인큐베이션하였다(도 12a).

도 13은 동결건조된 ENPP1-Fc 폴리펩티드 제형 샘플에 대한 요약 삼투압 데이터를 보여주는 막대 그래프이다.

도 14는 -75°C, 5°C, 또는 40°C에서 최대 13주 동안 보관된 여러 바람직한 완충액/부형제/첨가제/계면활성제 조합을 포함하는 동결건조된 ENPP1-Fc 폴리펩티드 제형 샘플에 대한 요약 SEC 데이터를 보여주는 막대 그래프이다. 데이터는 상이한 제형/조건에 걸친 HMW 및 주 피크 중의 풍부도를 나타낸다.

도 15는 3개월의 기간에 걸쳐 5°C, 25°C, 또는 40°C에서 보관된 2개의 바람직한 동결건조된 ENPP1 폴리펩티드 제형(안정성 형태 A 및 안정성 형태 B)에 대한 요약 SEC 데이터를 보여주는 도이다.

도 16은 3개월의 기간에 걸쳐 5°C, 25°C, 또는 40°C에서 보관된 2개의 바람직한 동결건조된 ENPP1 폴리펩티드 제형(안정성 형태 A 및 안정성 형태 B)에 대한 요약된 효소 활성 데이터를 보여주는 도이다.

도 17은 5°C에서 상이한 기간 동안 보관된 동결건조된 ENPP1-Fc 폴리펩티드 제형에 대한 요약 SEC 데이터를 보여주는 도이다.

도 18은 25℃에서 상이한 기간 동안 보관된 동결건조된 ENPP1-Fc 폴리펩티드 제형에 대한 요약 SEC 데이터를 보여주는 도이다.

도 19는 40℃에서 상이한 기간 동안 보관된 동결건조된 ENPP1-Fc 폴리펩티드 제형에 대한 요약 SEC 데이터를 보여주는 도이다.

도 20은 5℃, 25℃ 및 40℃와 같은 상이한 기간 동안 보관된 동결건조된 ENPP1-Fc 폴리펩티드 제형에 대한 요약 효소 활성 데이터를 보여주는 도이다.

도 21은 상이한 시간 간격으로 주사기 또는 바이알에 보관된 동결건조된 ENPP1-Fc 폴리펩티드의 재구성된 제형에 대한 회수율을 보여주는 막대 그래프이다.

도 22는 상이한 시간 간격으로 주사기 또는 바이알에 보관된 동결건조된 ENPP1-Fc 폴리펩티드에 대한 요약 효소 활성 데이터를 보여주는 막대 그래프이다.

도 23은 상이한 시간 간격으로 주사기 또는 바이알에 보관된 동결건조된 ENPP1-Fc 폴리펩티드의 재구성된 제형에 대한 회수율을 보여주는 도이다.

도 24는 상이한 시간 간격으로 주사기 또는 바이알에 보관된 동결건조된 ENPP1-Fc 폴리펩티드에 대한 요약된 효소 활성 데이터를 보여주는 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

1. 개요

본 출원은 ENPP1 폴리펩티드를 포함하는 안정적인 동결건조 제형 및 ENPP1과 연관된 질환을 치료하는 데 있어서 이들의 용도를 제공한다. 특정 측면에서, 본 개시는 가용성 ENPP1 폴리펩티드의 동결건조된 제형 및 이의 용도(예를 들어, 병리학적 석회화 및/또는 골화의 진행 속도 및/또는 중증도 또는 병리학적 석회화 및/또는 골화의 하나 이상의 합병증을 치료, 예방 및/또는 감소시키는 것)에 관한 것이다. 본 출원은 향상된 안정성, 증가된 저장 수명 및 더 낮은 수준의 고분자량 중(HMW) 및 응집체를 나타내는 동결건조된 제형을 제공한다. HMW 중은 이량체, 사량체, 및 고차 응집체(HMW1/HMW2)일 수 있다.

ENPP1 폴리펩티드는 이소성 조직 석회화의 특정 질환을 치료하는 데 효과적인 것으로 나타났다. ENPP1-Fc는 GACI(영아의 전신성 동맥 석회화)에 대한 마우스 모델에서 전신성 동맥 석회화를 감소시키는 것으로 나타났으며, GACI는 영아에서 발생하고 광범위한 동맥 석회화를 수반하는 중증 질환이다(Albright, 등, 2015, Nature Comm. 10006). ENPP1의 융합 단백질 또한 중증 조직 석회화 질환을 치료하는 것으로 기술되었으며(예를 들어, PCT 출원 공개 번호 WO 2014/126965 및 WO 2016/187408 참조), 및 음으로 하전된 골-표적 도메인을 포함하는 ENPP1의 융합 단백질은 GACI를 치료하는 것으로 기술되었다(PCT 출원 공개 번호 WO 2011/113027 및 WO 2012/125182).

포유동물 ENPP1 폴리펩티드, 돌연변이체, 또는 이의 돌연변이체 단편은 국제 PCT 출원 공개 번호 WO/2014/126965- Braddock 등, WO/2016/187408-Braddock 등, WO/2017/087936-Braddock 등 및 WO2018/027024-Braddock 등에 이전에 개시되어 있으며, 이들 모두 그 전문이 참조로서 본원에 통합된다.

2. 동결건조된 제형

특정 측면에서, 본 개시는 ENPP1 폴리펩티드의 비정상적인 활성과 관련된 질환 또는 병태를 치료 또는 예방하는 데 있어서, 동결건조된 ENPP1 제형을 사용하는 것을 고려한다.

일 측면에서, 본 개시의 ENPP1 제형은 동결건조된다. 동결건조 동안, ENPP1 폴리펩티드는 수성 상에서 비정질 고상으로 변환되며, 이는 화학적 및/또는 형태 불안정성으로부터 단백질을 보호하는 것으로 여겨진다. 동결건조는 당업계에서 흔한 기술을 사용하여 수행되며, 동결건조된 제형은 안정성, 저장 수명, 및 고분자량(HMW) 중 및 응집체의 감소된 수준에 대해 최적화된다. Tang 등, Pharm Res. 21:191-200, (2004) 및 Chang 등, Pharm Res. 13:243-9 (1996). 동결건조된 ENPP1 제형은 제조, 배송 및 보관의 스트레스에 대해 단백질을 안정화하는 데 도움을 주었다. 동결건조된 제형에 사용하는 부형제 및 첨가제는 제형의 일체형 성분이며, 따라서 환자가 안전하고 내약성이 양호할 필요가 있다. 단백질 약물의 경우, 부형제 및 첨가제의 선택은 약물의 효능 및 면역원성 모두에 영향을 미칠 수 있기 때문에 특히 중요하다. 부형제 및 첨가제는 또한 고농도 ENPP1 폴리펩티드 제형의 전달을 가능하게 하고 환자의 편의성을 향상시키기 위해 이들의 점도를 감소시키는 데 유용하다. 본원에 개시된

제형 부형제 및 첨가제는 이들 스트레스에 대한 안정성을 제공한다. 일반적인 부형제는 당업계에 공지되어 있으며, Powell 등의 Compendium of Excipients for Parenteral Formulations (1998), PDA J. Pharm. Sci. Technology, 52:238-311에서 볼 수 있다.

[0115] 특정 실시예에서, ENPP1 제형은 안정화제를 포함한다. 이들 안정화제는 다양한 화학적 및 물리적 스트레스에 대해 단백질을 안정화시키는 메커니즘에 기초하여 분류될 수 있다. 일부 안정화제는 특정 스트레스의 효과를 완화시키거나 특정 단백질의 특정 감수성을 조절하는 데 사용된다. 다른 안정화제는 단백질의 물리적 및 공유 안정성에 더 일반적인 영향을 미친다. 본원에 제공된 교시 및 지침을 고려하면, 당업자는 ENPP1 폴리펩티드의 보유 및 안정성을 촉진할 가능성이 있는 본 개시의 ENPP1 제형을 달성하기 위해 안정화제의 양 또는 범위가 임의의 특정 제형에 포함될 수 있는 것을 알 것이다.

[0116] 특정 실시예에서, 본원에 개시된 ENPP1 제형은 벌크화제를 포함한다. 이러한 벌크화제는 장기적인 안정화, 강력한 활성 성분을 소량으로 함유하는 고형 제형을 벌크업하거나(따라서 종종 "벌크화제", "필러", 또는 "희석제"로 지칭됨), 약물 흡수를 용이하게 하거나, 점도를 감소시키거나, 용해도를 향상시키는 것과 같은 최종 투여 형태의 활성 성분에 대한 치료적 향상을 부여하기 위해 포함한다.

[0117] 본원에 개시된 ENPP1 제형은 완충제, 안정화제, 계면활성제, 당, 염 및 아미노산을 포함하며, 이는 이하에서 더욱 상세히 설명된다.

[0118] 당업자는 본원에 기술된 부형제의 농도가 특정 제형 내에서 상호의존성을 공유한다는 것을 인식할 것이다. 예로서, 벌크화제의 농도는, 일 측면에서, 예를 들어, 높은 단백질 농도가 있거나, 예를 들어, 높은 안정화제 농도가 있는 경우 낮아진다. 또한, 당업자는, 벌크화제가 없는 특정 제형의 등장성을 유지하기 위해, 안정화제의 농도가 그에 따라 증가될 수 있음을 인식할 것이다(즉, 안정화제의 "강성화" 양이 사용될 것이다. 부형제 및 다른 첨가제를 첨가하여 제조 가능성 및/또는 최종 제품 품질, 예컨대 완제의약품(예를 들어, 단백질)의 안정성 및 전달을 부여하거나 향상시킨다). 본원에 개시된 ENPP1 제형은 적절한 안정성, 안전성 및 시판성을 향상시키는 적절한 부형제를 포함한다.

[0119] 특정의 실시예들에서, 동결건조된 ENPP1 제형은 완충액, 벌크화제, 안정화제, 및/또는 계면활성제 중 적어도 하나 이상을 포함한다. 일부 실시예에서, 계면활성제는 동결건조 단계 동안 또는 재구성 동안 응집이 문제가 되는 경우에 HMW 종의 형성을 감소시키는 것을 돕기 위해 선택된다. 적절한 완충제는 제조 동안(예를 들어, 희석, 멸균 여과, 충전 등) 및 동결건조된 제품의 재구성 후 제형을 pH의 안정한 구역 내에서 유지하기 위해 포함된다. 아래 표는 동결건조된 단백질 제형에 유용한 특정 부형제 성분을 제공한다:

표 1

동결건조된 단백질 제형의 부형제 성분	
부형제 성분	동결건조된 제형 내 기능
완충액	가공 중 및 재구성 시 제형의 pH를 유지함
안정화제	안정화제는 폴리올, 당 및 다당류와 같은 동해 및 동결 보호제를 포함한다 동해 보호제는 동결 스트레스로부터 단백질을 보호한다 동결 건조 상태에서 동결 보호제는 단백질을 안정화시킨다
벌크화제	제품의 우아함을 향상시키고 송풍을 방지하는 데 사용 동결건조 케이크에 구조적 강도 제공 예로는 만니톨 및 수크로오스를 포함한다
계면활성제	동결건조 공정 중 응집이 문제가 되는 경우 사용 재구성 시간을 단축하는 역할을 할 수 있음 예는 폴리소르베이트 20 및 80을 포함한다
항산화제	동결건조 케이크에서의 산화 반응은 크게 지연된다
금속 이온/킬레이트제	특정 금속 이온이 보조 인자로서만 포함되거나 금속이 프로테아제 활성화에 필요한 경우 포함될 수 있음
보존제	다회 투여 제형만 해당 제형 내 미생물 성장에 대한 보호 제공 일반적으로 재구성 희석제(예를 들어, bWFI)에 포함된다

[0120]

[0121] (a) 완충액 및 완충제

[0122] 일반적으로, 약리학적 활성 폴리펩티드 제형의 안정성은 좁은 pH 범위에서 최대인 것으로 관찰된다. 이러한 최적의 안정성 pH 범위는 예비-제형 연구 동안 조기에 식별될 필요가 있다. 가속 안정성 연구 및 열량측정 스크리닝 연구와 같은 여러 접근법이 이러한 노력에 유용하다(Remmele R. L. Jr. 등, Biochemistry, 38(16): 5241-7 (1999) 참조). 제형이 마무리되면, 단백질은 그의 저장 수명 내내 제조되고 유지되어야 한다. 따라서, 완충제는 제형 내의 pH를 조절하기 위해 거의 항상 사용된다.

[0123] 완충액을 선택할 때 여러 가지 요인을 고려해야 한다. 먼저, 완충액 중 및 이의 농도는 이의 pKa 및 원하는 제형 pH에 기초하여 정의되어야 한다. 마찬가지로 중요한 것은 완충액이 단백질 및 다른 제형 부형제와 상용성이고 임의의 분해 반응을 촉매하지 않도록 보장하는 것이다. 고려해야 할 세번째 중요한 측면은 투여 시 완충액이 유도할 수 있는 따끔거림 및 자극의 감각이다. 따끔거림 및 자극의 가능성은 피하(SC) 또는 근육내(IM) 경로를 통해 투여되는 약물의 경우 더 크며, 여기서 약물 용액은 투여 시 제형이 혈액 내로 신속하게 희석되는 IV 경로에 의해 투여될 때보다 상대적으로 더 긴 기간 동안 부위에 남아 있다. 직접 IV 주입에 의해 투여되는 제형의 경우, 완충액(및 임의의 다른 제형 성분)의 총량을 모니터링할 필요가 있다. 환자에게 심혈관 효과를 유도할 수 있는 인산칼륨 완충액의 형태로 투여되는 칼륨 이온에 대해 특히 주의해야 한다(Hollander-Rodriguez J C 등, Am. Fam. 의사, 73(2): 283-90 (2006)).

[0124] 동결건조된 제형을 위한 완충액은 추가적인 고려가 필요하다. 인산나트륨과 같은 일부 완충액은 동결 중에 단백질 비정질 상으로부터 결정화되어 pH의 이동을 초래할 수 있다. 아세테이트 및 이미다졸과 같은 다른 일반적인 완충액은 동결건조 공정 동안 승화되거나 증발될 수 있고, 이에 따라 동결건조 동안 또는 재구성 후에 제형의 pH를 이동시킬 수 있다.

[0125] 특정 실시예에서, 본원에 제시된 바와 같은 ENPP1 제형을 완충하는 데 사용되는 예시적인 완충제는 유기산, 숙신산염, 인산염, 아세테이트, 구연산염, 트리스, HEPES, 및 아스파르테이트, 히스티딘, 아르기닌 및 글리신을 포함하지만 이에 한정되지 않는 아미노산 또는 아미노산의 혼합물을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 특정 실시예에서, 완충제는 숙신산염, 구연산염, 및 인산염이다. 일 실시예에서, ENPP1 제형에 존재하는 완충액 시스템은 생리학적으로 호환 가능하고 약학적 제형의 원하는 pH를 유지하도록 선택된다. 다른 실시예에서, 용액의 pH는 pH 2.0 내지 pH 12.0이다. 예를 들어, 다양한 실시예에서, 용액의 pH는 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, 또는 10.0일 수 있다.

[0126] pH 완충 화합물은 ENPP1 제형의 pH를 미리 결정된 수준으로 유지하기에 적합한 임의의 양으로 존재할 수 있다. 적절하게 낮은 수준의 완충액이 사용되는 경우, 결정화 및 pH 이동을 피할 수 있다. 일 실시예에서, pH 완충 농도는 0.1 mM 내지 500 mM(1 M)이다. 예를 들어, pH 완충제는 적어도 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, 또는 500 mM인 것으로 고려된다. 일부 실시예에서, 완충제는 용액에서 재구성될 때 pH 6-7의 pH 범위를 유지한다. 일부 실시예에서, 완충제는 용액에서 재구성될 때 pH 7-8의 pH 범위를 유지한다.

[0127] 본원에 제시된 바와 같은 ENPP1 제형을 완충하는 데 사용되는 예시적인 pH 완충제는 유기산, 숙신산염, 인산염, 아세테이트, 구연산염, 트리스, HEPES, 및 아미노산 또는 아미노산의 혼합물을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 일부 실시예에서, 완충제는 고분자량 중의 형성을 적어도 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%만큼 감소시킨다.

[0128] (b) 안정화제 및 벌크화제

[0129] 본 약학적 제형의 일 실시예에서, 안정화제(또는 안정화제의 조합)가 첨가되어 보관 유도 응집 및 화학적 분해를 예방하거나 감소시킨다. 재구성 시 탁하거나 혼탁한 용액은 일반적으로 단백질이 침전되었거나 적어도 응집되었음을 나타낸다. 용어 "안정화제"는 응집, 또는 화학적 분해(예를 들어, 자가용해, 탈아미드화, 산화 등)를 예방할 수 있는 부형제를 의미한다. 특정 실시예에서, 본원에 제공된 ENPP1 제형은 수크로오스, 트레할로오스, 만노오스, 말토오스, 락토오스, 글루코오스, 라피노오스, 셀로비오스, 젠티오비오스, 이소말토오스, 아라비노오스, 글루코사민, 프룩토오스, 만니톨, 소르비톨, 텍스트란, 전분, 하이드록시에틸 전분, 시클로덱스트린, N-메틸 피롤리덴, 셀룰로오스 및 히알루론산과 같은 다당류를 포함하는 폴리-하이드록시 화합물과 같은 안정화제를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다[Carpenter 등, Develop. Biol. Standard 74:225, (1991)]. 본 개시의 일 실시예에서, 수크로오스 및 만니톨은 본원에 개시된 ENPP1 제형에서 안정화제로서 사용된다. 본 개시의 다른 실시예에서, 수크로오스는 안정화제로서 사용된다.

- [0130] 특정 실시예에서, ENPP1 제형은 약 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, 또는 1000 mM 농도의 안정화제를 포함한다. 마찬가지로, 본 개시의 특정 실시예에서, 안정화제는 약 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, 또는 20% w/v의 농도로 통합된다.
- [0131] 다른 실시예에서, ENPP1 제형은 또한 적절한 양의 벌크화 및 삼투질 농도 조절제를 포함한다. 본 개시의 다양한 실시예에서, 벌크화제는, 예를 들어 텍스트란, 폴리비닐피롤리돈, 카르복시메틸셀룰로오스, 락토오스, 소르비톨, 트레할로오스, 또는 자일리톨과 같은 중합체를 포함한다. 본 개시의 다양한 실시예에서, 벌크화제는 약 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, 또는 1000 mM의 농도로 통합된다.
- [0132] (c) 계면활성제
- [0133] 특정 실시예에서, 본원에 개시된 ENPP1 제형은 계면활성제를 추가로 포함할 수 있다. 계면활성제는 표면 유도 분해를 방지하기 위해 단백질 제형에 일반적으로 사용된다. 계면활성제는 계면 위치에 대해 단백질을 증가하는 양친매성 분자이다(및/또는 구조적으로 변경된 단백질 분자의 적절한 재접힘을 촉진함). 계면활성제 분자의 소수성 부분은 계면 위치(예를 들어, 공기/액체)를 점유하는 반면, 분자의 친수성 부분은 벌크 용매를 향해 배향된 상태로 유지된다. 충분한 농도(전형적으로 세제의 임계 미셀라 농도 주위)에서, 계면활성제 분자의 표면층은 단백질 분자가 계면에서 흡착되는 것을 방지하는 역할을 한다. 이에 따라, 표면 유도 분해가 최소화된다. 본원에서 고려되는 계면활성제는, 제한 없이, 소르비탄 폴리옥사이드레이트의 지방산 에스테르, 즉 폴리소르베이트 20 및 폴리소르베이트 80을 포함한다. 둘은 분자 C-12 및 C-18에 소수성 특성을 각각 부여하는 지방산 사슬의 길이만 상이하다. 따라서, 폴리소르베이트-80은 표면 활성이 더 높고 폴리소르베이트-20보다 더 낮은 임계 미셀라 농도를 갖는다.
- [0134] 세제는 또한 단백질의 열역학적 형태 안정성에 영향을 미칠 수 있다. 비이온성 계면활성제는 일반적으로 단백질 안정화에 유용하다. 이온성 계면활성제(세제)는 일반적으로 단백질을 불안정하게 한다. 여기서 다시, 주어진 세제 부형제의 효과는 단백질 특이적일 것이다. 예를 들어, 폴리소르베이트는 일부 단백질의 안정성을 감소시키고 다른 단백질의 안정성을 증가시키는 것으로 나타났다. 단백질의 세제 불안정화는 부분적으로 또는 완전히 펼쳐진 단백질 상태와 특이적 결합에 결합할 수 있는 세제 분자의 소수성 꼬리의 관점에서 합리화될 수 있다. 이러한 유형의 상호작용은 보다 확장된 단백질 상태를 향해 형태 평형의 이동을 야기할 수 있다(즉, 폴리소르베이트 결합에 대한 보체에서 단백질 분자의 소수성 부분의 노출을 증가시킴). 대안적으로, 단백질 고유 상태가 일부 소수성 표면을 나타내는 경우, 고유 상태에 결합하는 세제는 그 형태를 안정화시킬 수 있다. 폴리소르베이트의 다른 측면은 이들이 본질적으로 산화 분해에 민감하다는 것이다. 종종, 원료로서, 이들은 단백질 잔기 측쇄, 특히 메티오닌의 산화를 야기하기에 충분한 양의 과산화물을 함유한다. 안정화제의 첨가로 인해 발생하는 산화적 손상의 가능성은 가장 낮은 유효 농도의 부형제가 제형에 사용되어야 한다는 점을 강조한다. 계면활성제의 경우, 주어진 단백질에 대한 유효 농도는 안정화 메커니즘에 따라 달라질 것이다.
- [0135] 또한, 계면활성제를 적절한 양으로 첨가하여 냉동 및 건조 동안 표면 관련 응집 현상을 방지한다[Chang, B, J. Pharm. Sci. 85:1325, (1996)]. 따라서, 예시적인 계면활성제는, 제한 없이, 자연 발생 아미노산으로부터 유래된 계면활성제를 포함하는 음이온성, 양이온성, 비이온성, 쌍성이온성, 및 양쪽성 계면활성제를 포함한다. 음이온성 계면활성제는 라우릴 설페이트 나트륨, 디옥틸 설페이트 나트륨 및 디옥틸 설포네이트 나트륨, 케노데옥시콜산, N-라우로일사르코신 나트륨 염, 리튬 도데실 설페이트, 1-옥탄설포산 나트륨 염, 콜산나트륨 수화물, 데옥시콜레이트 나트륨, 및 글리코데옥시콜산 나트륨 염을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 양이온성 계면활성제는 벤즈알코늄 클로라이드 또는 벤즈에토늄 클로라이드, 세틸피리디늄 클로라이드 일수화물, 및 헥사데실트리메틸암모늄 브로마이드를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 쌍성이온성 계면활성제는 CHAPS, CHAPSO, SB3-10, 및 SB3-12를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 비이온성 계면활성제는 디기토닌, Triton X-100, Triton X-114, TWEEN-20, 및 TWEEN-80을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 계면활성제는 또한 라우로마르코골 400, 폴리옥실 40 스테아레이트, 폴리옥시에틸렌 수산화 피마자 오일 10, 40, 50 및 60, 글리세롤 모노스테아레이트, 폴리소르베이트 40, 60, 65 및 80, 대두 레시틴 및 다른 인지질, 예컨대 디올레일 포스파티딜 콜린(DOPC), 디미리스토일포스파티딜 글리세롤(DMPG), 디미리스토일포스파티딜 콜린(DMPC), 및 (디올레일 포스파티딜 글리세롤) DOPG; 스쿠로오스 지방산 에스테르, 메틸 셀룰로오스 및 카르복시메틸 셀룰로오스를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 따라서, 이들 계면활성제를 개별적으로 또는 상이한 비율의 혼합물로서 포함하는 조성물이 추가로 제공된다. 본 발명의 일 실시예에서, 계면활성제는 TWEEN-80이다. 본 제형에서, 계면활성제는 약

0.01 내지 약 0.5 g/L의 농도로 혼입된다. 본원에서 제공된 제형에서, 다양한 실시예에서, 계면활성제 농도는 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 또는 1.0 g/L이다. 마찬가지로, 본 발명의 특징의 실시예들에서, 계면활성제는 약 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, 또는 1.0% w/v의 농도로 혼입된다.

[0136] (d) 염

특정의 실시예에서, 본원에 개시된 ENPP1 제형은 염을 포함한다. 염은 종종 제형의 이온 강도를 증가시키기 위해 첨가되며, 이는 단백질 용해도, 물리적 안정성, 및 등장성에 중요할 수 있다. 염은 다양한 방식으로 단백질의 물리적 안정성에 영향을 미칠 수 있다. 이온은 단백질 표면 상의 하전된 잔기에 결합함으로써 단백질의 고유 상태를 안정화시킬 수 있다. 대안적으로, 염은 단백질 골격(--CONH--)을 따라 펩티드기에 결합함으로써 변성된 상태를 안정화시킬 수 있다. 염은 또한 단백질 분자 내의 잔기 사이의 반발적 정전기 상호작용을 차폐함으로써 단백질 고유 형태를 안정화시킬 수 있다. 단백질 제형 중의 염은 또한 단백질 응집 및 불용성을 초래할 수 있는 단백질 분자 사이의 매력적인 정전기 상호작용을 차폐할 수 있다. 염(즉, 전해질)은 때때로 제형을 동결 건조시키는 것을 더 어렵게 한다. 이러한 이유로, 단백질 구조적 안정성을 유지하기에 충분한 염만이 제형에 포함되어야 하며, 일반적으로 이러한 수준의 전해질은 매우 낮다.

특정 실시예에서, 본원에 개시된 ENPP1 제형은, 예를 들어 염화나트륨(NaCl), 염화칼슘(CaCl₂), 염화아연(ZnCl₂), 및/또는 염화마그네슘(MgCl₂) 염과 같은 염을 포함할 수 있다. 특정 실시예에서, 본원에 개시된 ENPP1 제형은 0.0(즉, 염 없음), 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 및 500mM 사이의 제형의 염농도를 갖는다. 본 개시의 일 실시예에서, 0.0 mM NaCl(즉, NaCl 없음)이 제형에 포함된다.

[0139] (e) 아미노산

아미노산은 완충제, 벌크화제, 안정화제 및 항산화제로서 단백질 제형에 대한 용도가 다양하다는 것을 발견하였다. 따라서, 일 측면에서, 본원에 개시된 ENPP1 제형은, 예를 들어 글리신, 아르기닌, 히스티딘, 알라닌, 프롤린, 세린, 및 글루탐산과 같은 아미노산을 포함한다. 이들 아미노산은 종종 폴리펩티드 제형에 다수의 이점을 제공한다. 히스티딘은 시판되는 단백질 제형에서 흔히 발견되며, 이 아미노산은 주사 시 따끔거리는 것으로 알려진 완충액인 구연산염에 대한 대안을 제공한다. 흥미롭게도, 히스티딘은 또한 액체 및 동결건조된 제형 모두에서 고농도로 사용될 때 응집과 관련하여 안정화 효과를 갖는 것으로 보고되었다(Chen B 등, Pharm Res., 20(12): 1952-60 (2003)). 히스티딘은 또한 고단백질 농도 제형의 점도를 감소시키는 것으로 다른 사람들에게 의해 관찰되었다. 다른 측면에서, 아미노산 글리신, 아르기닌 및 알라닌 중 하나 이상을 포함하고, 우선적인 배제 메커니즘에 의해 단백질을 안정화시키는 것으로 나타난 제형이 제공된다. 글리신은 또한 동결건조된 제형에서 일반적으로 사용되는 벌크화제이다. 아르기닌은 응집을 억제하는 데 효과적인 제제인 것으로 나타났고, 액체 제형과 동결건조 제형 모두에 사용되어 왔다. 제공된 ENPP1 제형에서, 아미노산 농도는 0.1, 1, 10, 20, 30, 40, 50, 80, 100, 120, 150, 200, 300, 및 500 mM 사이이다. 본 개시의 일 실시예에서, 아미노산은 글리신이다.

[0141] (f) 항산화제

단백질 잔기의 산화는 다수의 상이한 공급원으로부터 발생한다. 특정 항산화제의 첨가 외에도, 산화 단백질 손상의 예방은 제조 공정 및 제품의 보관 전반에 걸쳐 대기 산소, 온도, 광 노출, 및 화학적 오염과 같은 다수의 인자를 신중하게 제어하는 것을 포함한다. 따라서, 본 개시는 제한 없이, 환원제, 산소/유리 라디칼 소거제, 또는 킬레이트제를 포함하는 약학적 항산화제의 사용을 고려한다. 치료 단백질 제형 중의 항산화제는, 일 측면에서, 수용성이고, 제품 유통 기한 전체에 걸쳐 활성 상태로 유지된다. 환원제 및 산소/유리 라디칼 소거제는 용액 중 활성 산소 종을 절제함으로써 작용한다. 본원에 제공된 제형의 다양한 실시예에서, 항산화제 농도는 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 또는 1.0 mg/mL이다.

[0143] (g) 금속 이온

일반적으로, 전이금속 이온은 단백질에서 물리적 및 화학적 분해 반응을 촉매할 수 있기 때문에 단백질 제형에서 바람직하지 않다. 그러나, 특이적 금속 이온은 이들이 단백질에 대한 보조인자일 때 제형에 포함되고, 이들

이 조정 복합체(예를 들어, 인슐린의 아연 현탁액)를 형성하는 단백질의 현탁액 제형에 포함된다. 최근에, 아스파르트산의 이소아스파르트산으로의 이성질화를 억제하는 마그네슘 이온(10-120 mM)의 사용이 제안되었다(WO 2004039337).

[0145] (h) 보존제

[0146] 보존제는 동일한 용기로부터 하나 이상의 추출을 포함하는 다회용 비경구 제형을 개발할 때 필요하다. 이들의 주요 기능은 미생물 성장을 억제하고 완제의약품의 유통 기한 또는 사용 기간 전반에 걸쳐 제품 멸균성을 보장하는 것이다. 일반적으로 사용되는 보존제는 벤질 알코올, 페놀 및 m-크레졸을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 보존제는 오랫동안 사용되어 왔지만, 보존제를 포함하는 단백질 제형의 개발은 어려울 수 있다. 보존제는 거의 항상 단백질에 대해 불안정화 효과(응집)를 가지며, 이는 다회 투여량 단백질 제형에 대한 이들의 사용을 제한하는 주요 인자가 되었다(Roy S 등, J Pharm Sci., 94(2): 382-96 (2005)). 실제로, 보존제는 희석제 제형에 포함되어야 하며 동결 건조될 제형에 포함되지 않아야 한다.

[0147] 특정 실시예에서, 가용성 ENPP1 폴리펩티드는 본원에 개시된 가용성 ENPP1 폴리펩티드의 치료적 양을 포함하는 동결건조된 폴리펩티드 제형으로서 제형화되고, 이에 의해 동결건조된 폴리펩티드 제형은 액체 형태의 용액에서 재구성 가능하다. 일부 실시예에서, 동결건조된 폴리펩티드 제형은 멸균 주사 용액에서 재구성된다. 일부 실시예에서, 동결건조된 폴리펩티드 제형은 재구성 용액에서 재구성된다. 일부 실시예에서, 재구성 용액은 약학적으로 허용 가능한 담체 및/또는 첨가제를 포함한다. 일부 실시예에서, 약학적으로 허용 가능한 담체는 식염수, 정제수, 또는 주사용 멸균수로부터 선택된다. 일부 실시예에서, 제형은 100초, 80초, 70초, 69초, 68초, 67초, 66초, 65초, 64초, 63초, 62초, 61초, 또는 60초 미만의 기간 내에 완전히 재구성된다.

[0148] 특정 실시예에서, 동결건조된 폴리펩티드 제형은 ENPP1 폴리펩티드를 포함한다. 일부 실시예에서, 동결건조된 폴리펩티드는 서열번호 1의 아미노산 서열과 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 필수적으로 구성되거나, 이로 구성되는 폴리펩티드를 포함한다. 일부 실시예에서, 동결건조된 폴리펩티드는 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드의 일부분과 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 필수적으로 구성되거나, 이로 구성되는 폴리펩티드를 포함한다. 일부 실시예에서, ENPP1 폴리펩티드는 융합 단백질이다. 일부 실시예에서, ENPP1 폴리펩티드는 면역글로불린의 Fc 도메인을 추가로 포함하는 융합 단백질이다. 일부 실시예에서, 면역글로불린의 Fc 도메인은 IgG1 면역글로불린의 Fc 도메인이다. 일부 실시예에서, ENPP1 폴리펩티드는 가용성 ENPP1 폴리펩티드 도메인 및 하나 이상의 이종 단백질 부분을 포함하는 융합 단백질이다. 일부 실시예에서, 이종 단백질 부분은 포유동물에서 가용성 ENPP1 폴리펩티드의 순환 반감기를 증가시킨다. 일부 실시예에서, 이종 단백질 부분은 Fc 도메인을 포함한다. 일부 실시예에서, 상기 Fc 도메인은 서열번호 12의 아미노산 서열과 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 필수적으로 구성되거나, 이로 구성되는 폴리펩티드를 포함한다. 일부 실시예에서, ENPP1 폴리펩티드는 이종 모이어티를 추가로 포함한다. 일부 실시예에서, 이종 모이어티는 글리코실화된 아미노산, 페길화(PEGylated) 아미노산, 파르네실화 아미노산, 아세틸화 아미노산, 비오틴화 아미노산, 및 지질 모이어티로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0149] 특정 실시예에서, 동결건조된 폴리펩티드 제형은 완충제를 포함한다. 특정 실시예에서, 완충제는 pH 5.0 내지 pH 8.0 범위, 약 pH 5.5 내지 pH 7.5 범위, 약 pH 6.0 내지 pH 7.0 범위, 약 pH 6.0 내지 pH 6.5 범위의 pH를 유지한다. 일부 실시예에서, 완충제는 pH 6.5 +/- 0.5의 pH를 유지한다. 바람직한 실시예에서, pH는 pH 6.3이다. 특정 실시예에서, 완충제는 숙신산염, 구연산염, 중탄산염, 인산염, 트리스, 또는 글리실글리신으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 특정의 바람직한 실시예에서, 완충제는 숙신산염, 구연산염, 또는 인산염이다. 바람직한 실시예에서, 완충제는 구연산염이다. 완충제는 동결건조된 폴리펩티드 제형이 용액에서 재구성될 때 5 mM 내지 100 mM 범위의 농도를 포함할 수 있다. 특정 실시예에서, 완충제는 10 mM 내지 50 mM, 또는 15 mM 내지 25 mM 범위의 농도로 존재한다. 특정의 바람직한 실시예에서, 완충제는 20 mM의 농도로 존재한다. 완충제는 동결건조된 형태 및 재구성된 형태 모두에서 ENPP1 폴리펩티드의 증가된 안정성을 부여할 수 있다. 특정의 실시예에서, 완충제는 응집체 형성의 증가된 개시 온도를 촉진하도록 선택될 수 있다. 일부 실시예에서, 완충제는 응집체 형성의 개시 온도를 적어도 1°C, 2°C, 3°C, 4°C, 5°C, 6°C, 7°C, 8°C, 9°C, 또는 10°C만큼 증가시킨다. 특정의 실시예에서, 완충제는 고분자량 종의 형성을 감소시킬 수 있다. 일부 실시예에서, 완충제는 고분자량 종의 형성을 적어도 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 100%만큼 감소시킨다. 일부 실시예에서, 완충제는 고분자량 종의 형성을 적어도 10% 내지 100%, 20% 내지 80%, 30% 내지 70%, 또

는 40% 내지 60%만큼 감소시킨다. 일부 실시예에서, 완충제는 고분자량 종의 형성을 적어도 50%만큼 감소시킨다.

[0150] 본 개시의 동결건조된 폴리펩티드 제형은 하나 이상의 약학적으로 허용 가능한 첨가제 및/또는 안정화제를 포함할 수 있다. 특정 실시예에서, 약학적으로 허용 가능한 첨가제는 아미노산, 염, 당, 및/또는 폴리올을 포함한다. 일부 실시예에서, 약학적으로 허용 가능한 첨가제는 아르기닌, 프롤린, 및/또는 글리신이다. 바람직한 실시예에서, 약학적으로 허용 가능한 첨가제는 수크로오스 및/또는 만니톨과 같은 안정화제이다. 특정 실시예에서, 하나 이상의 약학적으로 허용 가능한 첨가제는 용액에서 재구성될 때 50 mM 내지 300 mM 범위의 농도를 포함한다. 일부 실시예에서, 하나 이상의 약학적으로 허용 가능한 첨가제는 용액에서 재구성될 때 50 mM 내지 100 mM, 60 mM 내지 90 mM, 또는 75 mM 내지 85 mM 범위의 농도를 포함한다. 일부 실시예에서, 상기 하나 이상의 약학적으로 허용 가능한 첨가제는 용액에서 재구성될 때 50 mM, 60 mM, 70 mM, 80 mM, 82 mM, 84 mM, 86 mM, 88 mM, 90 mM, 100 mM, 110 mM, 120 mM, 130 mM, 140 mM, 150 mM, 160 mM, 170 mM, 171 mM, 172 mM, 173 mM, 174 mM, 175 mM, 176 mM, 177 mM, 178 mM, 179 mM, 180 mM, 190 mM, 200 mM, 210 mM, 220 mM, 230 mM, 240 mM, 250 mM, 260 mM, 261 mM, 262 mM, 263 mM, 264 mM, 265 mM, 266 mM, 267 mM, 268 mM, 269 mM, 270 mM, 280 mM, 290 mM, 300 mM의 +/- 5 mM 이내의 농도를 포함한다. 약학적으로 허용 가능한 첨가제 및/또는 안정화제는 동결건조된 형태 및 재구성된 형태 모두에서 ENPP1 폴리펩티드의 증가된 안정성을 부여할 수 있다. 특정 실시예에서, 약학적으로 허용 가능한 첨가제 및/또는 안정화제는 고분자량 종의 형성을 적어도 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 100%만큼 감소시킨다. 일부 실시예에서, 약학적으로 허용 가능한 첨가제 및/또는 안정화제는 고분자량 종의 형성을 적어도 10% 내지 100%, 20% 내지 80%, 30% 내지 70%, 또는 40% 내지 60%만큼 감소시킨다. 일부 실시예에서, 약학적으로 허용 가능한 첨가제 및/또는 안정화제는 고분자량 종의 형성을 적어도 50%만큼 감소시킨다.

[0151] 본 개시의 ENPP1 폴리펩티드는 ENPP1 뉴클레아제-유사 도메인 및 SMB-유사 도메인 내에서 조정된 보조인자를 포함한다(예를 들어, Kato K. 등, Proc Natl Acad Sci USA. 2012;109(42):16876-81 참조). 특정 실시예들에서, 본 발명의 동결건조된 폴리펩티드 제형은 하나 이상의 ENPP1 폴리펩티드 보조인자를 포함할 수 있다. 일부 실시예에서, ENPP1 폴리펩티드 보조인자는 칼슘, 아연, 및/또는 아데노신 모노포스페이트를 포함한다. 일부 실시예에서, ENPP1 폴리펩티드 보조인자는 CaCl_2 , CaSO_4 , ZnCl_2 , ZnSO_4 , 및/또는 아데노신 모노포스페이트다. 일부 실시예에서, ENPP1 폴리펩티드 보조인자는 CaCl_2 및/또는 아데노신 모노포스페이트다. 바람직한 실시예에서, 보조인자 ENPP1 폴리펩티드 보조인자는 CaCl_2 이다. 일부 실시예에서, ENPP1 폴리펩티드 보조인자는 용액에서 재구성될 때 1 mM 내지 10 mM, 1 mM 내지 5 mM, 또는 1 mM 내지 3 mM 범위의 농도를 포함한다. 바람직한 실시예에서, ENPP1 폴리펩티드 보조인자는 2 mM의 +/- 1 mM 이내의 농도를 포함한다. 추가의 바람직한 실시예에서, ENPP1 폴리펩티드 보조인자는 2 mM의 농도를 포함한다.

[0152] 일부 실시예에서, 조성물 및 제형은 계면활성제를 포함한다. 일부 실시예에서, 상기 계면활성제는, 폴리소르베이트, 폴록사머, 트리톤, 도데실 황산나트륨, 라우렐 황산 나트륨, 나트륨 옥틸 글리코시드, 라우릴설포베타인, 미리스틸-설포베타인, 리놀레일-설포베타인, 스테아릴-설포베타인, 라우릴사르코신, 미리스틸-사르코신, 리놀레일-사르코신, 스테아릴-사르코신, 리놀레일-베타인, 미리스틸-베타인, 세틸-베타인, 라우라미도프로필-베타인, 코카미도프로필-베타인, 리놀레아미도프로필-베타인, 미리스타미도프로필-베타인, 팜 이도프로필-베타인, 이소스테아라미도프로필-베타인, 미리스타미도프로필-덱 에틸아민, 팜 이도프로필디메틸아민, 이소스테아라미도프로필-덱 에틸아민, 나트륨 메틸 코코일-타우레이트, 디나트륨 메틸 올레일-타우레이트, 디히드록시프로필 PEG 5 리놀암모늄 염화물, 폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜, 및 이들의 혼합물을 포함한다. 계면활성제는, 예를 들어 제한 없이, 폴리소르베이트 20, 폴리소르베이트 21, 폴리소르베이트 40, 폴리소르베이트 60, 폴리소르베이트 61, 폴리소르베이트 65, 폴리소르베이트 80, 폴리소르베이트 81, 폴리소르베이트 85, 폴리소르베이트 188, PEG3350, 및 이들의 혼합물일 수 있다. 바람직한 실시예에서, 계면활성제는 폴리소르베이트 20(PS20), 폴리소르베이트 80(PS80), 또는 폴리소르베이트 188(PS188)이다. 바람직한 실시예에서, 계면활성제는 폴리소르베이트 20(PS20)이다.

[0153] 계면활성제의 농도는 백분율(w/v)로서 표현될 수 있다. 동결건조된 제형의 경우, %(w/v) 농도는 용액에서 재구성될 때 계면활성제 농도를 나타낸다. 계면활성제의 농도는 일반적으로 약 0.001%(w/v) 내지 1%(w/v)의 범위이다. 일부 실시예에서, 계면활성제의 농도는 0.01% 내지 0.5%(w/v), 0.015% 내지 0.25%(w/v), 0.02% 내지 0.1%(w/v)의 범위이다. 바람직한 실시예에서, 계면활성제의 농도는 0.02% 내지 0.1%(w/v)의 범위이다.

[0154] 본 개시의 동결건조된 폴리펩티드 제형은 시간 경과에 따라 증가된 안정성을 나타낼 수 있다. 특정 실시예들에

서, 본 발명의 동결건조된 폴리펩티드 제형은 -80°C 내지 40°C 에서 장기 안정성을 나타낸다. 일부 실시예에서, 제형은 적어도 3, 6, 12, 24, 36, 48, 또는 60개월의 저장 수명을 갖는다. 일부 실시예에서, 재구성된 제형은 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12, 18, 24, 48, 또는 60시간의 저장 수명을 갖는다.

[0155] 일부 실시예에서, 재구성된 제형은 RT에서 적어도 8시간 동안 1 mg/ml 내지 50 mg/ml, 2 mg/ml 내지 45 mg/ml, 5 mg/ml 내지 40 mg/ml, 10 내지 30 mg/ml, 15 내지 20 mg/ml 범위의 농도로 안정하다. 일부 실시예에서, 재구성된 제형은 5°C 에서 적어도 24시간 동안 1 mg/ml 내지 50 mg/ml, 2 mg/ml 내지 45 mg/ml, 5 mg/ml 내지 40 mg/ml, 10 내지 30 mg/ml, 15 내지 20 mg/ml 범위의 농도로 안정하다.

[0156] 본원에 개시된 동결건조된 폴리펩티드 제형은 재구성된 형태로 투여될 수 있다. 본원에 개시된 재구성된 동결건조 폴리펩티드 투여 경로는 흡입, 경구, 비강, 직장, 비경구, 설하, 경피, 경점막(예를 들어, 설하, 설측, (경)협측, (경)요도, 질(예를 들어, 경- 및 질주위), 비강내 및 (경)직장, 방광내, 폐내, 심이지장내, 위내, 척수강내, 피하, 근육내, 피내, 동맥내, 정맥내, 기관지내, 흡입(예를 들어, 에어로졸), 안과, 폐, 및 국소 투여를 포함한다. 바람직한 실시예에서, 재구성된 제형은 비경구 투여된다. 일부 실시예에서, 재구성된 제형은 피하 주사, 정맥내 주사, 피내 주사, 근육내 주사를 통해 투여된다. 일부 실시예에서, 재구성된 제형은 자가 투여된다. 일부 실시예에서, 동결건조된 제형은 치료적 유효 투여량을 포함한다. 일부 실시예에서, 제형은 매일, 2일마다, 3일마다, 1주일, 또는 1개월에 여러 번 투여된다. 일부 실시예에서, 제형의 제2 투여량은 적어도 2일 후, 4일 후, 1주 후, 또는 1개월 후의 적절한 시간 간격 후에 투여된다.

[0157] 특정의 실시예들에서, 본 개시는 동결건조된 폴리펩티드 제형을 포함하는 키트를 제공한다. 일부 실시예에서, 키트는 사용 전에 멸균 주사 용액(또는 멸균수)에서 재구성될 수 있는 동결건조된 폴리펩티드를 포함한다. 일부 실시예에서, 키트는 하나 이상의 바이알을 포함한다. 일부 실시예에서, 키트는 동결건조된 폴리펩티드 제형을 포함하는 하나 이상의 바이알을 포함한다. 일부 실시예에서, 키트는 바이알, 재구성 용액, 주사기, 및/또는 미리 충전된 주사기를 포함하는 주사식 장치를 포함한다. 일부 실시예에서, 바이알로 재구성 용액을 옮기면 동결건조된 폴리펩티드가 멸균 주사 용액에서 재구성된다. 일부 실시예에서, 동결건조된 폴리펩티드는 멸균 주사 용액에서 재구성된다. 일부 실시예에서, 동결건조된 폴리펩티드는 사용 전에 멸균 주사 용액(또는 멸균수)에서 재구성된다. 일부 실시예에서, 주사식 장치는 멸균 주사식 용액을 비경구로 투여하는 데 사용된다. 일부 실시예에서, 멸균 주사 용액은 피하 주사를 통해 투여된다. 일부 실시예에서, 멸균 주사 용액은 피내 주사를 통해 투여된다. 일부 실시예에서, 멸균 주사 용액은 근육내 주사를 통해 투여된다. 일부 실시예에서, 멸균 주사 용액은 정맥내 주사를 통해 투여된다. 일부 실시예에서, 멸균 주사 용액은 자가 투여된다. 일부 실시예에서, 멸균 주사식 용액은 치료적 유효 투여량을 포함한다.

[0158] 본원에 개시된 동결건조된 폴리펩티드 제형은 본원에 개시된 바와 같은 ENPP1 결핍증과 연관된 질환을 치료, 역전 또는 진행을 예방하는 방법에 사용될 수 있다. 일부 실시예에서, 제형은 이를 필요로 하는 대상체에서 후종인대(OPLL)의 골화치료, 역전 또는 진행을 예방하는 방법에 사용하기 위한 것이다. 일부 실시예에서, 제형은 이를 필요로 하는 대상체에서 저인산혈증 구루병의 치료, 역전, 또는 진행을 예방하는 방법에 사용하기 위한 것이다. 일부 실시예에서, 제형은 이를 필요로 하는 대상체에서 ABCC6 결핍증(예를 들어, 탄력섬유거짓황색증(PXE)로서)의 치료, 역전 또는 진행을 예방하는 방법에 사용하기 위한 것이다. 일부 실시예에서, 제형은 이를 필요로 하는 대상체에서 동맥의 연령 관련 경화의 진행을 감소시키거나 예방하는 방법에 사용하기 위한 것이다. 일부 실시예에서, 제형은 이를 필요로 하는 대상체에서 혈관 동맥에서 죽상판의 석회화 치료, 역전 또는 진행을 예방하는 데 사용하기 위한 것이다. 일부 실시예에서, 제형은 이를 필요로 하는 대상체에서 골관절염의 치료, 역전 또는 진행을 예방하는 방법에 사용하기 위한 것이다. 일부 실시예에서, 제형은 이를 필요로 하는 대상체에서 조로증으로 인한 동맥 경화의 치료, 역전 또는 진행을 예방하는 방법에 사용하기 위한 것이다. 일부 실시예에서, 제형은 이를 필요로 하는 대상체에서 혈관 동맥에서 죽상판 석회화의 치료, 역전 또는 진행을 예방하는 방법에 사용하기 위한 것이다. 일부 실시예에서, 제형은 이를 필요로 하는 대상체에서 골관절염의 치료, 역전 또는 진행을 예방하는 방법에 사용하기 위한 것이다. 일부 실시예에서, 제형은 이를 필요로 하는 대상체에서 조로증으로 인한 동맥 경화의 치료, 역전 또는 진행을 예방하는 방법에 사용하기 위한 것이다. 일부 실시예에서, 제형은 이를 필요로 하는 대상체에서 X-연관 저인산혈증 구루병(XLH), 유전성 저인산혈증 구루병(HHRH), 저인산혈증 골 질환(HBD), 상염색체 우성 저인산혈증 구루병(ADHR), 및/또는 상염색체 열성 저인산혈증 구루병의 치료, 역전, 또는 진행을 예방하는 방법에 사용하기 위한 것이다. 일부 실시예에서, 제형은 이를 필요로 하는 대상체에서 연령 관련 골감소증의 치료, 역전 또는 진행을 예방하는 방법에 사용하기 위한 것이다. 일부 실시예에서, 제형은 이를 필요로 하는 대상체에서 강직성 척추염의 치료, 역전 또는 진행을 예방하는 방법에 사용하기 위한 것이다. 일부 실시예에서, 제형은 이를 필요로 하는 대상체에서 소아 겸상 적혈구 빈혈증에서 뇌졸중의 치

료, 역전 또는 진행을 예방하는 방법에 사용하기 위한 것이다.

[0159] 본원에 개시된 제형은 당업계에 잘 알려진 기술을 사용하여 동결건조된다. 동결건조에 대한 추가 정보는 Carpenter, J. F. and Chang, B. S., Lyophilization of Protein Pharmaceuticals, Biotechnology and Biopharmaceutical Manufacturing, Processing and Preservation, K. E. Avis and V. L. Wu, eds. (Buffalo Grove, Interpharm Press, Inc.), pp. 199 264 (1996), 미국 특허 제7,247,707호; 제7,087,723호; 및 제 6,586,573호에서 볼 수 있다.

[0160] 3. ENPP1 폴리펩티드

[0161] 특정 측면에서, 본 개시는 ENPP1 폴리펩티드의 동결건조된 제형 및 이의 용도에 관한 것이다. 본원에 개시된 ENPP1 폴리펩티드는 ENPP1 계열의 자연 발생 폴리펩티드뿐만 아니라 생물학적 활성을 보유하는 이의 임의의 변이체(돌연변이체, 단편, 융합체, 및 펩티드모방 형태 포함)를 포함한다. 용어 "ENPP1" 또는 "ENPP1 폴리펩티드"는 임의의 종으로부터 유래된, 엑토뉴클레오티드 피로포스파타아제/포스포디에스테라제 1 단백질(NPP1/ENPP1/PC-1) 및 ENPP1-관련 단백질을 지칭한다. ENPP1 단백질은 동종이량체를 형성하는 II형 막관통 당단백질을 포함한다. ENPP1 단백질의 각각의 단량체는 원형질막에 대한 표적화에 관여하는 짧은 세포내 N-말단 도메인, 막관통 도메인, 및 여러 도메인을 포함하는 큰 세포외 영역을 포함한다. 큰 세포외 영역은 ENPP1 이량체화에 참여하는 것으로 보고된, SMB1 및 SMB2 도메인을 포함한다(R. Gijssbers, H. 등, Biochem. J. 371; 2003: 321-330). 구체적으로, SMB 도메인은 각각 4개의 이황화 결합으로 배열된, 8개의 시스테인 잔기를 함유하며, 공유 시스테인 분자간 및 분자내 결합을 통해 ENPP1 동종이량체화를 매개하는 것으로 나타났다. 단백질은 뉴클레오티드 및 뉴클레오티드 당의 인산디에스테르 결합 및 뉴클레오티드 및 뉴클레오티드 당의 피로포스페이트 결합을 포함하는, 다양한 기질을 절단한다. ENPP1 단백질은 뉴클레오시드 5' 트리포스파타아제를 상응하는 모노포스페이트로 가수분해하고 또한 디아데노신 폴리포스페이트를 가수분해하는 기능을 한다. ENPP1 단백질은 심혈관, 신경, 면역, 근골격, 호르몬 및 혈액학적 기능의 조절에 관여하는 퓨린작동성 신호전달에 역할을 한다. 인간 ENPP1 전구체 단백질(NCBI 수탁 NP_006199)의 예시적인 아미노산 서열은 도 1(서열번호 1)에 도시되어 있다. 인간 ENPP1 전구체 단백질은 ENPP1 N-말단에 내인성 ENPP1 신호 펩티드 서열을 포함한다. 본원에 설명되는 모든 ENPP1-관련 폴리펩티드에 대한 아미노산의 번호는 달리 명시되지 않는 한 도 1에 제공된 인간 ENPP1 전구체 단백질 서열의 번호에 기초한다. 특정 실시예에서, ENPP1 전구체 단백질은 내인성 또는 이종 신호 펩티드 서열을 추가로 포함한다. 단백질분해 시, 신호 펩티드 서열을 ENPP1 전구체 단백질로부터 절단하여 성숙 ENPP1 단백질을 제공한다. 예를 들어, Jansen S, 등 J Cell Sci. 2005;118(Pt 14):3081-9 참조. 본원에서 개시된 폴리펩티드로 사용될 수 있는 예시적인 신호 펩티드 서열은 ENPP1 신호 펩티드 서열, ENPP2 신호 펩티드 서열, 아주로시딘 신호 서열, ENPP7 신호 펩티드 서열, 및/또는 ENPP5 신호 펩티드 서열을 포함하지만, 이들로 한정되지는 않는다. 가공된 (성숙) 세포외 ENPP1 폴리펩티드 서열은 도 3(서열번호 2)에 도시되어 있다.

[0162] 일반적으로, ENPP1이 척추동물 사이에서 잘 보존되고, 세포의 도메인이 크게 신장하여 실질적으로 보존된다는 것이 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 도 4a 및 도 4b는 다양한 ENPP1 오솔로그와 비교하여 인간 ENPP1 세포외 도메인의 다중 서열 정렬을 도시한다. 다양한 뉴클레오티드 트리포스페이트(예를 들어, ATP, UTP, GTP, TTP, 및 CTP), pNP-TMP, 3',5'-cAMP, 및 2'-3'-cGAMP에 대한 ENPP1 결합은 또한 고도로 보존된다(예를 들어, Kato K. 등, Proc Natl Acad Sci USA. 2012;109(42):16876-81 및 Mackenzie NC, 등, Bone. 2012;51(5):961-8 참조). 따라서, 이들 정렬로부터, 정상적인 ENPP1 활성을 상당히 변경시키지 않고 치환에 내성이 있을 가능성이 있는 아미노산 위치를 예측하는 것뿐만 아니라 정상적인 ENPP1 활성에 중요한 세포의 도메인으로 주요 아미노산 위치를 예측하는 것이 가능하다. 따라서, 현재 개시된 조성물에 따라 유용한 효소적으로 활성인 인간 ENPP1 폴리펩티드는 다른 척추동물 ENPP1의 서열로부터 상응하는 위치에서 하나 이상의 아미노산을 포함할 수 있거나, 인간 또는 다른 척추동물 서열에서의 것과 유사한 잔기를 포함할 수 있다. 상응하는 위치에서 하나 이상의 아미노산의 치환은 폴리펩티드 사슬의 형상을 변화시키거나 정상적인 ENPP1 활성을 변경시킬 가능성이 없는 보존적 변이 또는 치환을 포함할 수 있다. 보존적 변이 또는 치환의 예는, 이소류신, 발린, 류신 또는 메티오닌과 같은 하나의 소수성 잔기를 다른 것에 대해 대체하는 것, 또는 하나의 극성 잔기를 다른 것에 대해 치환하는 것, 예컨대 리신에 대한 아르기닌, 아스파르트산에 대한 글루탐산, 또는 아스파라긴에 대한 글루타민을 치환하는 것을 포함한다. 예를 들어, ENPP1 폴리펩티드는 ENPP1 폴리펩티드의 서열과 적어도 약 80% 동일한 서열, 바람직하게는 적어도 85%, 90%, 91%, 92%, 93 %, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 동일성을 갖는 임의의 공지된 ENPP1 폴리펩티드의 서열로부터 유래된 폴리펩티드를 포함한다.

[0163] ENPP1 단백질은 구조적 및 생물학적 특징 측면에서 당업계에서 특징지어졌다. 특정 실시예에서, 본원에 개시된 가용성 ENPP1 단백질은 피로포스파타아제 및/또는 포스포디에스테라제 활성을 포함한다. 예를 들어, 일부 실시

예에서, ENPP1 단백질은 뉴클레오타이드 트리포스페이트(예를 들어, ATP, UTP, GTP, TTP, 및 CTP), pNP-TMP, 3',5'-cAMP, 및 2'-3'-cGAMP에 결합하고; 뉴클레오타이드 트리포스페이트를 무기 피로포스페이트로 변환시킨다[예를 들어, Kato K 등, Proc Natl Acad Sci USA.2012;109(42):16876-81; Li L, 등. Nat Chem Biol. 2014;10(12):1043-8; Jansen S 등. Structure. 2012;20(11):1948-59; 및 Onyedibe KI 등. Molecules. 2019;24(22) 참조].

[0164] 본원에 사용되는 바와 같이, "효소적 활성" 또는 "생물학적 활성"이란 용어는 피로포스파타아제 및/또는 포스포디에스테라제 활성을 나타내는 ENPP1 폴리펩티드를 지칭한다(예를 들어, ATP를 AMP로 결합 및/또는 가수분해하고, PPi 및/또는 AP3a를 ATP로 가수분해할 수 있음). 예를 들어, ENPP1 단백질의 피로포스파타아제/포스포디에스테라제 도메인은 세포의 뉴클레오타이드 트리포스페이트를 가수분해하여 무기 피로포스페이트(PPi)를 생성하고 일반적으로 가용성이다. 이 활성은, 전술한 바와 같이, pNP-TMP 검정을 사용하여 측정될 수 있다(Saunders 등, 2008, Mol. Cancer Ther. 7(10):3352-62; Albright 등, 2015, Nat Comm. 6:10006). 특정 실시예에서, 가용성 ENPP1 폴리펩티드는 약 $3.4(\pm 0.4) \text{ s}^{-1}$ 효소⁻¹ 이상의 기질 ATP에 대한 k_{cat} 값을 가지며, 여기서 k_{cat} 은 폴리펩티드에 대한 ATP의 가수분해 속도를 측정함으로써 결정된다. 특정 실시예에서, 가용성 ENPP1 폴리펩티드는 약 2 pM 이하의 기질 ATP에 대한 K_M 값을 가지며, 여기서 K_M 은 폴리펩티드에 대한 ATP의 가수분해 속도를 측정함으로써 결정된다. 본원의 교시에 더하여, 이들 참조 문헌은 하나 이상의 생물학적 활성(예를 들어, 뉴클레오타이드를 무기 피로포스페이트로 변환)을 보유하는 가용성 ENPP1 단백질을 생성하는 방법에 대한 충분한 지침을 제공한다.

[0165] 일 실시예에서, 본 개시는 가용성 ENPP1 폴리펩티드에 관한 것이다. 본원에 설명되는 바와 같이, 가용성 ENPP1 폴리펩티드라는 용어는 생물학적 활성(예를 들어, 효소적 활성)을 보유하는 ENPP1 단백질의 임의의 자연 발생 세포의 도메인 뿐만 아니라 임의의 변이체(돌연변이체, 단편 및 펩티드모방 형태 포함)를 포함한다. 가용성 ENPP1 폴리펩티드의 예는, 예를 들어, 도 3에 도시된 바와 같은 ENPP1 세포의 도메인(서열번호 2)을 포함한다. 특정 실시예에서, 가용성 ENPP1 폴리펩티드는 ENPP1 폴리펩티드의 세포의 도메인에 더하여 신호 서열을 추가로 포함한다. 예시적인 신호 서열은 ENPP1 폴리펩티드의 고유 신호 서열, 또는 hENPP7 신호 서열과 같은 다른 단백질의 신호 서열을 포함한다. 변이체 가용성 ENPP1 폴리펩티드의 예는 국제 특허 출원 공개 번호 WO 2012/125182, WO 2014/126965, WO 2016/187408, WO 2018/027024, 및 WO 2020/047520에 제공되고, 이들 모두는 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다.

[0166] 일부 실시예에서, ENPP1 폴리펩티드는 ENPP1 폴리펩티드 도메인 및 하나 이상의 이종 단백질 부분(즉, ENPP1에 이종인 폴리펩티드 도메인)을 포함하는 융합 단백질이다. 아미노산 서열은 서열번호 1로 표시되는 ENPP1의 형태로 유일하게 발견되지 않는다면 ENPP1에 이종으로 이해한다. 일부 실시예에서, 이종 단백질 부분은 면역글로불린의 Fc 도메인을 포함한다. 일부 실시예에서, 면역글로불린의 Fc 도메인은 IgG1 면역글로불린의 Fc 도메인이다. 특정 실시예에서, 가용성 ENPP1 폴리펩티드는 인간 면역글로불린 1(IgG1), 인간 면역글로불린 2(IgG2), 인간 면역글로불린 3(IgG3), 및/또는 인간 면역글로불린 4(IgG4)의 Fc 도메인에 C-말단으로 융합된다. 다른 실시예에서, 가용성 ENPP1 폴리펩티드는 인간 면역글로불린 1(IgG1), 인간 면역글로불린 2(IgG2), 인간 면역글로불린 3(IgG3), 및/또는 인간 면역글로불린 4(IgG4)의 Fc 도메인에 N-말단으로 융합된다. 일부 실시예에서, Fc 도메인의 존재는 반감기, 용해도를 개선하고, 면역원성을 감소시키고, 가용성 ENPP1 폴리펩티드의 활성을 증가시킨다. 특정 실시예에서, 고유 인간 IgG 단백질(IgG1, IgG2, IgG3, 및 IgG4)의 일부가 Fc 부분(예를 들어, ENPP1-Fc)에 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 개시는 인간 IgG1, IgG2, IgG3, 및/또는 IgG4로부터 유래된 CH1, CH2, 또는 CH3 도메인과 같은, 면역글로불린의 불변 도메인을 포함하는 폴리펩티드에 융합된 ENPP1을 포함하는 융합 단백질을 제공한다. Fc 단편은 고유 IgG의 영역, 예컨대 힌지 영역(Rabat 넘버링 시스템에 따라, 인간 IgG1의 잔기 216-230), 전체 제2 불변 도메인 CH2(잔기 231-340) 및 제3 불변 도메인 CH3(잔기 341-447)을 포함할 수 있다.

[0167] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "ENPP1-Fc 작제물"은 IgG 분자(바람직하게는 인간 IgG)의 FcR 결합 도메인에 재조합적으로 융합 및/또는 화학적으로 접합된(공유 및 비공유 접합 둘 다 포함) ENPP1의 가용성 형태(예, ENPP1 폴리펩티드의 세포의 도메인)를 지칭한다. 특정 실시예에서, ENPP1의 C-말단은 FcR 결합 도메인의 N-말단에 융합되거나 접합된다.

[0168] 인간 IgG1의 Fc 부분(G1Fc)에 사용될 수 있는 아미노산 서열의 예는 서열번호 12(표 2)이다. 부분적으로, 본 개시는 서열번호 12와 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나, 필수적으로 이로 구성되거나, 이로 구성되는

폴리펩티드를 제공한다.

[0169]

일부 실시예에서, 이중 단백질 부분은 폴리히스티딘, FLAG 태그, Glu-Glu, 글루타티온 S-트랜스퍼라아제(GST), 티오레독신, 단백질 A, 단백질 G, 면역글로불린 중쇄 불변 영역(Fc), 말토오스 결합 단백질(MBP), 또는 인간 혈청 알부민으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 도메인을 포함한다. 원하는 특성을 부여하도록 융합 도메인이 선택될 수 있다. 예를 들어, 일부 융합 도메인은 친화성 크로마토그래피에 의한 융합 단백질의 단리에 특히 유용하다. 친화도 정제의 목적으로, 글루타티온-, 아밀라아제-, 및 니켈- 또는 코발트- 결합 수지와 같은 친화성 크로마토그래피를 위한 관련 매트릭스가 사용된다. 많은 이러한 매트릭스는 (HIS₆) 융합 파트너에서 유용한 Pharmacia GST 정제 시스템 및 QIAexpressTM 시스템(Qiagen)과 같은, "키트" 형태로 시판한다. 다른 예로서, 융합 도메인은 ENPP1 폴리펩티드의 검출을 용이하게 하도록 선택될 수 있다. 이러한 검출 도메인의 예는 다양한 형광 단백질(예를 들어, GFP)뿐만 아니라 특이적 항체가 이용 가능한 일반적으로 짧은 펩티드 서열인, "에피토프 태그"를 포함한다. 특이적 단클론 항체가 쉽게 이용 가능한 주지된 에피토프 태그로는 FLAG, 인플루엔자 바 이러스 헤마글루티닌(HA), 및 c-myc 태그를 포함한다. 일부 경우에, 융합 도메인은, 관련 프로테아제가 융합 단백질을 부분적으로 소화시켜 그로부터 재조합 단백질을 유리시킬 수 있게 하는, 팩터 Xa 또는 트롬빈과 같은, 프로테아제 절단 부위를 갖는다. 이어서, 유리된 단백질을 후속 크로마토그래피 분리에 의해 융합 도메인으로 부터 단리할 수 있다.

[0170]

일부 실시예에서, ENPP1 융합 단백질은 ENPP1 폴리펩티드 도메인과 하나 이상의 이중 단백질 부분(예를 들어, Fc 면역글로불린 도메인) 사이에 위치한 링커를 추가로 포함한다. 특정 실시예에서, 가용성 ENPP1 폴리펩티드는 Fc 도메인에 직접 또는 간접적으로 융합된다. 일부 실시예에서, 가용성 ENPP1 융합 단백질은 Fc 도메인과 ENPP1 폴리펩티드 사이에 링커를 포함한다. 일부 실시예에서, 링커는 1-200개 아미노산을 포함하는 아미노산 스페이서 일 수 있다. 적절한 펩티드 스페이서가 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어, 글리신, 알라닌 및 세린과 같은 가요성 아미노산 잔기를 함유하는 펩티드 링커를 포함한다. 일부 실시예에서, 링커는 폴리글리신 링커 또는 Gly-Ser 링커를 포함한다. 일부 실시예에서, 스페이서는 모티프, 예를 들어, GGG (서열번호 21), GGGG (서열번호 22), GGGG (서열번호 23), GGGG (서열번호 24), GGGG (서열번호 25), GGGG (서열번호 26), GGAG (서열번호 27), GSGG (서열번호 28), AGGG (서열번호 29), SGGG (서열번호 30), SGGG (서열번호 31), GA (서열번호 103), GS (서열번호 104), GG (서열번호 105), GGA (서열번호 106), GGS (서열번호 107), 또는 GGG(서열번호 108)의 다중 또는 반복 모티프를 함유할 수 있다. 일부 실시예에서, 스페이서는 GA 또는 GS의 모티프, 예를 들어, GA, GS, GAGA (서열번호 32), GSGS (서열번호 33), GAGAGA (서열번호 34), GSGSGS (서열번호 35), GAGAGAGA (서열번호 36), GSGSGSGS (서열번호 37), GAGAGAGAGA (서열번호 38), GSGSGSGSGS (서열번호 39), GAGAGAGAGAGA (서열번호 40), 및 GSGSGSGSGSGS(서열번호 41)를 포함하는 2 내지 12개의 아미노산을 함유할 수 있다. 일부 실시예에서, 스페이서는 GGA 또는 GGS의 모티프, 예를 들어, GGA, GGS, GGAGGA (서열번호 42), GGS GGS (서열번호 43), GGAGGAGGA (서열번호 44), GGS GGS GGS (서열번호 45), GGAGGAGGAGGA (서열번호 46), 및 GGS GGS GGS GGS(서열번호 47)를 포함하는 3 내지 12개의 아미노산을 함유할 수 있다. 또 다른 일부 실시예에서, 스페이서는 GGAG (서열번호 48), GSGG (서열번호 49), 예를 들어, GGAG (서열번호 50), GSGG (서열번호 51), GGAGGGAG (서열번호 52), GSGGGGSG (서열번호 53), GGAGGGAGGGAG (서열번호 54), 및 GSGGGGSGGGSG(서열번호 55)의 모티프를 포함하는 4 내지 12개의 아미노산을 함유할 수 있다. 일부 실시예에서, 스페이서는 GGGGA (서열번호 56) or GGGGS (서열번호 57), 예를 들어, GGGGAGGGAGGGGA (서열번호 58) 및 GGGGSGGGSGGGGS(서열번호 59)의 모티프를 함유할 수 있다. 본 발명의 일부 실시예에서, 이중 단백질 부분(예를 들어, Fc 도메인 단량체, 야생형 Fc 도메인, 아미노산 치환을 갖는 Fc 도메인(예를 들어, 이량체화를 감소시키는 하나 이상의 치환), 알부민-결합 펩티드, 피브로넥틴 도메인, 또는 인간 혈청 알부민) 및 가용성 ENPP1 폴리펩티드 사이의 아미노산 스페이서는 GGG, GGGG (서열번호 21), GGGG (서열번호 23), GGGAG (서열번호 60), GGGAGG (서열번호 61), 또는 GGGAGGG (서열번호 62)일 수 있다.

[0171]

일부 실시예에서, 스페이서는 또한 글리신, 알라닌, 및 세린 이외의 아미노산, 예를 들어, TGGG (서열번호 63), AAAL (서열번호 64), AAK (서열번호 65), AAAR (서열번호 66), EGKSSGSGSESKST (서열번호 67), GSAGSAGSGEF (서열번호 68), AEAAAKEAAKA (서열번호 69), KESGVSSEQLAQFRSLD (서열번호 70), GENLYFQSGG (서열번호 71), SACYCELS (서열번호 72), RSIAT (서열번호 73), RPACKIPNDLKQKVMNH (서열번호 74), GGSAGGSGSGSGSGSGSGTGTAGGTGSGSGTSGG (서열번호 75), AAANSSIDLISVPVDSR (서열번호 76), GGSAGGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGG (서열번호 77), (R)_m; m=0-15 (서열번호 78), DSSSEKFLRRIGRFG (서열번호 79), EEEEEPRGDT (서열번호 80), APWHLSSQYSRT (서열번호 81), STLPIPIHEFSRE (서열번호 82),

VTKHLNQISQSY (서열번호 83), (E)_m; m=1-15 (서열번호 84), RSGSGGS (서열번호 85), (D)_m; m=1-15 (서열번호 86), LVIMSLGLGLGLRK (서열번호 87), VIMSLGLGLGLRK (서열번호 88), IMSLGLGLGLRK (서열번호 89), MSLGLGLGLRK (서열번호 90), SLGLGLGLRK (서열번호 91), LGLGLGLRK (서열번호 92), GLGLGLRK (서열번호 93), LGLGLRK (서열번호 94), GLGLRK (서열번호 95), LGLRK (서열번호 96), GLRK (서열번호 97), GLRK (서열번호 98), GLRK (서열번호 99), (K)_m; m=1-15 (서열번호 100), LIN (서열번호 109), NSS (서열번호 110), ESS (서열번호 111), RQQ (서열번호 112), KR (서열번호 113), LRK (서열번호 114), 또는 RK(서열번호 115)를 함유할 수 있다. 일부 실시예에서, 스페이서는 모티프, 예를 들어, EAAAK(서열번호 101)의 다중 또는 반복 모티프를 함유할 수 있다. 일부 실시예에서, 스페이서는 모티프, 예를 들어, 프롤린-풍부 서열, 예컨대 (XP)_n, 여기서 X는 임의의 아미노산(예를 들어, A, K, 또는 E)일 수 있고 n은 1-5이고, PAPAP(서열번호 102)의 다중 또는 반복 모티프를 함유할 수 있다.

서열번호 3 - ENPP2 신호 서열

```
Leu Phe Thr Phe Ala Val Gly Val Asn Ile Cys Leu Gly
1           5           10
Phe Thr Ala
15
```

서열번호 7 - 아주로시딘 신호 서열

```
Met Thr Arg Leu Thr Val Leu Ala Leu Leu Ala Gly Leu Leu Ala Ser
Ser Arg Ala
```

서열번호 16 - ENPP7 신호 서열

```
Met Arg Gly Pro Ala Val Leu Leu Thr Val Ala Leu Ala Thr Leu Leu
1           5           10           15
Ala Pro Gly Ala
20
```

서열번호 17 - ENPP7 신호 서열

```
Met Arg Gly Pro Ala Val Leu Leu Thr Val Ala Leu Ala Thr Leu Leu
1           5           10           15
Ala Pro Gly Ala Gly Ala
20
```

서열번호 18 - ENPP5 신호 서열

```
Met Thr Ser Lys Phe Leu Leu Val Ser Phe Ile Leu Ala Ala Leu Ser
1           5           10           15
Leu Ser Thr Thr Phe Ser
20
```

서열번호 19 - ENPP121GLK 신호 서열

```
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
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
```

[0172]

서열번호 20 -ENPP121 신호 서열

```

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
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

```

[0173]

[0174]

사용된 펩티드 스페이서 및 아미노산의 길이는 관련된 2개의 단백질 및 최종 단백질 융합 폴리펩티드에서 원하는 유연성의 정도에 따라 조정될 수 있다. 스페이서의 길이는 적절한 단백질 접합을 보장하고 응집체 형성을 피하기 위해 조정될 수 있다.

[0175]

일부 실시예에서, 융합 단백질(예를 들어, 면역글로불린 Fc 융합 단백질)의 상이한 요소들이 원하는 기능성과 일치하는 임의의 방식으로 배열될 수 있다. 예를 들어, 가용성 ENPP1 폴리펩티드 도메인은 이중 단백질 부분에 C-말단에 놓일 수 있거나, 대안적으로, 이중 단백질 부분은 가용성 ENPP1 폴리펩티드 도메인에 C-말단에 놓일 수 있다. 가용성 ENPP1 폴리펩티드 도메인 및 이중 단백질 부분은 융합 단백질에서 직접 또는 간접적으로 연결될 수 있고, 추가 도메인 또는 아미노산 서열은 어느 하나의 도메인에 또는 도메인들 사이에 C-말단 또는 N-말단에 포함될 수 있다. 바람직한 융합 단백질은 서열번호 9-11 중 임의의 하나에 기재된 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, ENPP1 융합 폴리펩티드는 서열번호 9로 구성되거나 이를 포함한다. 일부 실시예에서, ENPP1 융합 폴리펩티드는 서열번호 10으로 구성되거나 이를 포함한다. 일부 실시예에서, ENPP1 융합 폴리펩티드는 서열번호 11로 구성되거나 이를 포함한다.

[0176]

일부 실시예에서, 본 개시의 가용성 ENPP1 폴리펩티드는 하나 이상의 이중 모이어티를 함유한다. 임의로, 가용성 ENPP1 폴리펩티드는 글리코실화 아미노산, 페길화 아미노산, 파르네실화 아미노산, 아세틸화 아미노산, 비오틴화 아미노산, 지질 모이어티에 접합된 아미노산, 및 유기 유도체화제에 접합된 아미노산으로부터 선택된 하나 이상의 이중 모이어티를 포함한다. 일부 실시예에서, 본원에 개시된 가용성 ENPP1 폴리펩티드는 추가로 변형된다. 이러한 변형은 아세틸화, 카르복실화, 글리코실화, 인산화, 지질화 및 아실화를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 결과적으로, 가용성 ENPP1 폴리펩티드는 폴리에틸렌 글리콜, 지질, 다당류 또는 단당류, 및 인산염과 같은, 비-아미노산 요소를 함유할 수 있다. 가용성 ENPP1 폴리펩티드의 기능성에 대한 이러한 비-아미노산 요소의 효과는 다른 가용성 ENPP1 폴리펩티드에 대해 본원에 설명되는 바와 같이 시험될 수 있다. 본 개시의 폴리펩티드가 폴리펩티드의 초기 형태를 절단함으로써 세포에서 생산되는 경우, 번역 후 가공은 단백질의 정확한 접합 및/또는 기능에도 중요할 수 있다. 상이한 세포(예를 들어, CHO, HeLa, MDCK, 293, WI38, NIH-3T3 또는 HEK293)는 이러한 번역 후 활성을 위한 특이적 세포 기계 및 특징적 메커니즘을 가지며, 가용성 ENPP1 폴리펩티드의 정확한 변형 및 가공을 보장하기 위해 선택될 수 있다.

[0177]

본원에서 사용되는 바와 같이, 폴리펩티드 서열과 기준 서열 간의 백분율 "동일성"은, 서열을 정렬하고 갭을 도입한 후, 필요한 경우, 최대 백분율 서열 동일성을 달성하기 위해, 기준 서열 내의 아미노산 잔기와 동일한 폴리펩티드 서열 내의 아미노산 잔기의 백분율로서 정의된다. 아미노산 서열 동일성 백분율을 결정하기 위한 목적의 정렬은 당 분야의 기술 내의 다양한 방식으로, 예를 들어, BLAST, BLAST-2, ALIGN, MEGALIGN (DNASTAR), CLUSTALW, 또는 CLUSTAL OMEGA 소프트웨어와 같은, 공개적으로 이용 가능한 컴퓨터 소프트웨어를 사용하여 달성될 수 있다. 일부 실시예에서, 정렬은 CLUSTAL OMEGA 소프트웨어를 사용하여 수행된다. 당 분야의 숙련자는 비교되는 서열의 전체 길이에 걸쳐 최대 정렬을 달성하는 데 필요한 임의의 알고리즘을 포함하여, 서열 정렬을 위한 적절한 파라미터를 결정할 수 있다.

[0178]

일부 실시예에서, 가용성 ENPP1 폴리펩티드의 활성은 세포 기반 또는 *생체 내* 검정으로 시험될 수도 있다. 예를 들어, 가용성 ENPP1 폴리펩티드가 무기 피로포스페이트(PPi)의 생산에 미치는 효과를 측정할 수 있다. 구체적으로, ENPP1 단백질의 피로포스파타아제/포스포디에스테라제 도메인은 세포의 뉴클레오타이드 트리포스페이트를 가수분해하여 무기 피로포스페이트(PPi)를 생성하고 일반적으로 가용성이다. 이 활성은, 전술한 바와 같이, pNP-TMP 검정뿐만 아니라 HPLC-기반 ATP 가수분해 검정을 사용하여 측정될 수 있다 (Saunders 등, 2008, Mol. Cancer Ther. 7(10):3352-62; Albright 등, 2015, Nat Comm. 6:10006). 가용성 ENPP1 폴리펩티드가 ARHR2와 같은 ENPP1 관련 질환에 관여하는 유전자의 발현에 미치는 효과(예를 들어, 골아세포 및 파골세포에서 섬유아세

포 성장 인자 23의 전사)를 평가할 수 있다. 이는, 필요에 따라, 하나 이상의 뉴클레오타이드 트리포스페이트 또는 다른 ENPP1 기질의 존재 하에 수행될 수 있고, 가용성 ENPP1 폴리펩티드를 생산하도록 세포를 형질감염시킬 수 있다. 마찬가지로, 가용성 ENPP1 폴리펩티드는 마우스 또는 다른 동물에게 투여될 수 있고, ENPP1 관련 질환에 대한 효과를 당업계에서 인정된 방법을 사용하여 평가할 수 있다.

[0179] 일부 실시예에서, 본원에 설명되는 방법에 따라 사용될 ENPP1 폴리펩티드는 단리된 폴리펩티드이다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 단리된 단백질 또는 폴리펩티드는 자연 환경의 성분으로부터 분리된 것이다. 일부 실시예에서, 본 개시의 폴리펩티드는, 예를 들어, 전기영동(예를 들어, SDS-PAGE, 등전점 포커싱(IEF), 모세관 전기영동) 또는 크로마토그래피(예를 들어, 이온 교환 또는 역상 HPLC) 분석에 의해 결정했을 때 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%를 초과하는 순도로 정제된다. 순도를 평가하는 방법은 당업계에 잘 알려져 있다[예를 들어, Flatman 등, (2007) J. Chromatogr. B 848:79-87 참조]. 일부 실시예에서, 본원에 설명되는 방법에 따라 사용될 가용성 ENPP1 폴리펩티드는 재조합 폴리펩티드이다.

[0180] 본 개시의 ENPP1 폴리펩티드는 다양한 당업계에 공지된 기술에 의해 생산될 수 있다. 예를 들어, 본 개시의 폴리펩티드는 Bodansky, M. Principles of Peptide Synthesis, Springer Verlag, Berlin (1993) 및 Grant G. A. (ed.), Synthetic Peptides: A User's Guide, W. H. Freeman and Company, New York (1992)에 기술된 것과 같은 표준 단백질 화학 기술을 사용하여 합성될 수 있다. 또한, 자동화된 펩티드 합성기가 상업적으로 이용 가능하다(예를 들어, Advanced ChemTech Model 396; Milligen/Bioscience 9600). 대안적으로, 본 개시의 폴리펩티드는, 그의 단편 또는 변이체를 포함하여, 다양한 발현 시스템 [예를 들어, 대장균, 차이니즈 햄스터 난소(Chinese Hamster Ovary, CHO) 세포, COS 세포, 바칼로바이러스, 효모 피키아]을 사용하여 재조합적으로 생산될 수 있으며, 이는 당업계에 잘 알려져 있다. 단백질은 부착 세포 또는 현탁 세포에서 생산될 수 있다. 일부 실시예에서, 융합 단백질은 CHO 세포에서 발현된다. 안정한 세포주를 확립하기 위해, ENPP1 작제물을 암호화하는 핵산 서열을 대규모 단백질 생산을 위한 적절한 벡터 내로 클로닝한다. 추가의 실시예에서, 본 개시의 변형되거나 변형되지 않은 폴리펩티드는, 예를 들어, 프로테아제, 예를 들어, 트립신, 썬모리신, 키모트립신, 펩신, 또는 쌍을 이룬 염기성 아미노산 변환 효소(PACE)를 사용하여 재조합적으로 생산된 전장 ENPP1 폴리펩티드의 소화에 의해 생산될 수 있다. 컴퓨터 분석(시판하는 소프트웨어, 예를 들어, MacVector, Omega, PCGene, Molecular Simulation, Inc.를 사용함)을 사용해 단백질분해 절단 부위를 식별할 수 있다. 대안적으로, 이러한 폴리펩티드는 화학적 절단(예를 들어, 시아노젠 브롬화물, 히드록실아민 등)을 사용하여 재조합적으로 생성된 전장 ENPP1 폴리펩티드로부터 생산될 수 있다.

[0181] 박테리아(예를 들어, 대장균 및 바실루스 서브틸리스), 효모(예를 들어, 사카로미세스 세레비시아, 클루이베로마이세스 락티스 및 피키아 파스토리스), 사상균류(예를 들어, 아스페르길루스), 식물 세포, 동물 세포 및 곤충을 포함하는 많은 발현 시스템이 ENPP1 융합 단백질의 생산에 사용될 수 있다. 원하는 단백질은 종래의 방식으로, 예를 들어 숙주 염색체에 삽입된 코딩 서열로부터 또는 유리 플라스미드 상에서 생산될 수 있다.

[0182] 효모는 임의의 통상적인 방식(예를 들어, 전기천공)으로 원하는 단백질에 대한 코딩 서열로 형질전환될 수 있다. 전기천공에 의한 효모의 형질전환 방법은 Becker & Guarente, 1990, Methods Enzymol. 194: 182에 개시되어 있다. 성공적으로 형질전환된 세포, 즉, 본 개시의 DNA 작제물을 함유하는 세포는 주지된 기술에 의해 식별될 수 있다. 예를 들어, 발현 작제물의 도입으로부터 생성된 세포는 성장하여 ENPP1 폴리펩티드를 생산할 수 있다. 세포는 수거되고 용해될 수 있으며, DNA의 존재에 대해 Southern, 1975, J. Mol. Biol., 98:503 및/또는 Berent 등, 1985, Biotech 3:208에 의해 기술된 것과 같은 방법을 사용하여 그들의 DNA 함량을 조사할 수 있다. 대안적으로, 상청액 내 단백질의 존재는 항체를 사용하여 검출될 수 있다.

[0183] 유용한 효모 플라스미드 벡터는 pRS403-406 및 pRS413-416을 포함하며, Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA, USA에서 일반적으로 입수할 수 있다. 플라스미드 pRS403, pRS404, pRS405 및 pRS406은 효모 통합 플라스미드(Yeast Integrating plasmids, Yips)이며 효모 선택성 마커 I-11S3, TRP1, LEU2 및 1JRA3를 통합한다. 플라스미드 pRS413-416은 효모 센트로머 플라스미드(Yeast Centromere plasmids, YCps)이다.

[0184] 상보적인 응집 말단을 통해 벡터에 DNA를 작동 가능하게 연결시키기 위한 다양한 방법이 개발되었다. 예를 들어, 벡터 DNA에 삽입된 DNA 분절에 상보성 동중중합체 트랙트가 첨가될 수 있다. 그런 다음, 벡터 및 DNA 분절은 상보성 동중중합체성 꼬리 사이의 수소 결합에 의해 결합되어 재조합 DNA 분자를 형성한다.

[0185] 하나 이상의 제한 부위를 함유하는 합성 링커는 벡터에 DNA 분절을 결합하는 대안적인 방법을 제공한다. 엔도뉴클레아제 제한 소화에 의해 생성된 DNA 분절을, 박테리오파지 T4 DNA 중합효소 또는 대장균 DNA 중합효소 I로 처리하는데, 이 효소는 3'-5'-엑소뉴클레오타틱 활성으로 돌출된 3'-단일-가닥 말단을 제거하고, 이들의 중합화

활성으로 옴복한 3'-말단을 채우는 효소다.

- [0186] 따라서, 이들 활성의 조합은 끝이 무딘 DNA 분절을 생성한다. 그런 다음, 끝이 무딘 분절을, 박테리오파지 T4 DNA 리가아제와 같은 끝이 무딘 DNA 분자의 결합을 촉매할 수 있는 효소의 존재 하에, 몰의 큰 과잉 링커 분자와 함께 인큐베이션한다. 그 결과, 반응의 생성물은 그들의 말단에서 중합체 링커 서열을 지닌 DNA 분절이다. 이들 DNA 분절은 적절한 제한 효소로 절단될 수 있고, DNA 분절의 것과 양립 가능한 말단을 생성하는 효소로 절단된 발현 벡터에 결합된다.
- [0187] 그런 다음, 안정적으로 형질감염된 단일 세포의 클론을 확립하고, 원하는 ENPP1 융합 단백질의 고발현 클론에 대해 스크리닝한다. ENPP1 단백질 발현을 위한 단일 세포 클론의 스크리닝은, 전술한 바와 같은 합성 효소 기질 pNP-TMP를 사용하여 96 웰 플레이트에서 고 처리량 방식으로 달성될 수 있다(Albright, 등, 2015, Nat. Commun. 6:10006). 스크리닝을 통해 고 발현 클론을 식별하면, Albright, 등 2015, Nat. Commun. 6:10006에서 이전에 기술한 진탕 플라스크 또는 생물반응기에서 단백질 생산이 달성될 수 있다.
- [0188] ENPP1의 정제는 당업계에 공지된 표준 정제 기술의 조합을 사용하여 달성될 수 있다. 정제 후에, ENPP1-Fc를 Zn^{2+} 및 Mg^{2+} 가 보충된 PBS에 투석하고 (PBSplus), 5 내지 7 mg/ml로 농축시키고, 200-500 pI의 분취량으로 -80 °C에서 냉동시켰다. 분취량은 사용 직전에 해동될 수 있고, 용액의 비활성은 PBSplus에서 희석에 의해 31.25 au/ml(또는 제조에 따라 약 0.7 mg/ml)로 조정될 수 있다.
- [0189] 4. 예시적인 용도
- [0190] 특정 측면에서, 본 개시는 이를 필요로 하는 대상체에서 병리학적 석회화의 감소 및/또는 진행을 예방하기 위한 특정 가용성 ENPP1 폴리펩티드(예를 들어, 이의 융합 단백질)의 용도에 관한 것이며, 상기 방법은 본원에 개시된 폴리펩티드 융합 및/또는 가용성 폴리펩티드(예를 들어, 서열번호 2, 9, 10 및 11)의 치료적 유효량을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 특정 실시예에서, 병리학적 석회화는 특발성 영아 동맥 석회화(IIAC) 및 죽상판의 석회화로 이루어진 군으로부터 선택된다. 특정 실시예에서, 병리학적 골화는 후종 인대 골화증(OPLL), 저인산혈증 구루병, 및 골관절염으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0191] 일부 실시예에서, 본 개시는 이를 필요로 하는 대상체에서 병리학적 골화의 감소 또는 진행을 예방하는 방법을 고려하며, 상기 방법은 본원에 개시된 가용성 ENPP1 폴리펩티드 또는 ENPP1 융합 폴리펩티드(예를 들어, 서열번호 2, 9, 10 및 11)의 치료적 유효량을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0192] 일부 실시예에서, 본 개시는 혈관 석회화의 감소, 개선, 또는 예방을 포함하여, 이를 필요로 하는 대상체에서 연조직의 이소성 석회화의 감소 또는 진행을 예방하는 방법을 고려하며, 상기 방법은 본원에 개시된 가용성 ENPP1 폴리펩티드 또는 ENPP1 융합 폴리펩티드의 치료적 유효량을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0193] 일부 실시예에서, 본 개시는 ENPP1 결핍증(예를 들어, GACI 및 ARHR2)에 의해 야기되는 질환의 감소 또는 진행을 예방하는 방법을 고려한다. ENPP1 결핍증은, 이를 필요로 하는 대상체에서 (정상적인 건강한 대상체에서 ENPP1 활성 수준 또는 ENPP1 발현 수준과 각각 비교하여) ENPP1 활성 수준의 감소 및/또는 ENPP1 수준의 결합 발현을 특징으로 하며, 상기 방법은 본원에 개시된 가용성 ENPP1 폴리펩티드 또는 ENPP1 융합 단백질 (예를 들어, 서열번호 2, 9, 10 및 11)의 치료적 유효량을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 일부 실시예에서, ENPP1 결핍증은 GACI이다. 일부 실시예에서, ENPP1 결핍증은 ARHR2이다.
- [0194] 일부 실시예에서, 상기 개시는, 이를 필요로 하는 대상체에서 더 낮은 혈장 PPi 수준에 의해 야기되는 질환의 감소 또는 진행을 예방하는 방법을 고려하며, 상기 방법은 본원에 개시된 폴리펩티드의 치료적 유효량을 대상체에게 투여하여 대상체의 혈장 PPi를 정상 수준 또는 정상 수준 위(30-50% 더 높게)로 증가시킨 다음 혈장 PPi를 일정한 정상 또는 정상 수준 위로 유지하는 단계를 포함한다. 정상 수준의 혈장 ppi는 2-5 μ M에 상응하며, 일부 실시예에서 정상 수준은 2-3 μ M이다. (Bernhard 등, *A Reference range for Plasma levels of Inorganic Pyrophosphate in Children using the ATP Sulfurylase method, Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2021) 상기 방법은, 대상체의 혈장 PPi를 일정한 정상 또는 정상 수준 위로 유지하여 병리학적 석회화 또는 골화의 감소 또는 진행을 예방하기 위해 2일, 3일, 1주 또는 1개월의 간격으로 추가 치료 유효량을 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 특정 실시예에서, 본원에 개시된 가용성 ENPP1 폴리펩티드 또는 ENPP1 융합 폴리펩티드는 PPi 수준이 정상 수준보다 낮은 대상체에서 피로포스페이트(PPi) 수준을 상승시키기 위해 사용될 수 있다. 다른 실시예에서, 본원에 개시된 가용성 ENPP1 폴리펩티드 또는 ENPP1 융합 폴리펩티드는 PPi 수준이 정상 수준보다 낮은 대상체에서 병리학적 석회화 또는 골화의 진행을 감소 또는 예방하기 위해 사용될 수 있다. 일부 실시예에서, 본원에 개시된 가용성 ENPP1 폴리펩티드 또는 ENPP1 융합 폴리펩티드는 대상체에서 세포외

PPi 농도의 감소에 의해 발현되는 ENPP1 결핍증(예를 들어, GACI 및 ARHR2)을 치료하는 데 사용될 수 있다. 특정 실시예에서, 본원에 개시된 가용성 ENPP1 폴리펩티드 또는 ENPP1 융합 폴리펩티드의 제1 용량의 투여 후 달성된 혈장 PPi의 항정 상태 수준은 적어도 2일, 적어도 4일, 적어도 1주 또는 적어도 1개월의 기간 동안 유지된다.

- [0195] 일부 실시예에서, 상기 개시는, 이를 필요로 하는 대상체에서 정상 수치보다 더 낮은 혈장 PPi 수준에 의해 야기되는 질환의 진행을 감소 또는 예방하며, 상기 방법은 본원에 개시된 가용성 ENPP1 폴리펩티드 또는 ENPP1 융합 폴리펩티드(예를 들어, 서열번호 2, 9, 10 및 11)의 치료적 유효량을 대상체에게 투여하여 대상체의 혈장 PPi를 정상 PPi 수준의 약 90%, 95%, 100%, 105%, 110%, 120%, 130%, 140%, 또는 150% 수준까지 증가 및/또는 유지시키는 단계를 포함한다. 특정 실시예에서, 상기 방법은 정상 PPi 수준의 약 90%, 95%, 100%, 105%, 110%, 120%, 130%, 140%, 또는 150% 수준으로 혈장 PPi 수준을 유지하여, 병리학적 석회화 또는 골화의 진행을 예방하기 위해 2일, 3일, 1주 또는 1개월마다 본원에 개시된 폴리펩티드를 추가로 투여하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0196] 특정 실시예에서, 본원에 개시된 가용성 ENPP1 폴리펩티드 또는 ENPP1 융합 폴리펩티드의 제2 용량이 약 2일 후, 4일 후, 1주일 후, 또는 1개월 후의 적절한 시간 간격 후에 대상체에게 투여되어서, 혈장 PPi의 항정 상태 수준이 일정하거나 항정 상태 수준으로 유지되고 대상체가 본원에 개시된 약제물의 제1 용량을 투여받기 전에 가졌던 더 낮은 수준으로 회복되지 않도록 된다.
- [0197] 이론에 구속되고자 하는 의도 없이, 정상 수준으로 혈장 PPi의 항정 상태 농도를 유지하는 것은 대상체의 병리학적 석회화 및 병리학적 골화의 감소 및/또는 진행을 예방하는 것으로 여겨진다.
- [0198] 일부 실시예에서, 본 개시는 이를 필요로 하는 대상체에서 후종 인대 골화증(OPLL)의 치료, 역전 또는 진행을 예방하는 방법을 고려하며, 상기 방법은 본원에 개시된 가용성 ENPP1 폴리펩티드 또는 ENPP1 융합 폴리펩티드(예를 들어, 서열번호 2, 9, 10 및 11)의 치료적 유효량을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0199] 일부 실시예에서, 본 개시는 이를 필요로 하는 대상체에서 저인산혈증 구루병의 치료, 역전 또는 진행을 예방하는 방법을 고려하며, 상기 방법은 본원에 개시된 가용성 ENPP1 폴리펩티드 또는 ENPP1 융합 폴리펩티드(예를 들어, 서열번호 2, 9, 10 및 11)의 치료적 유효량을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0200] 일부 실시예에서, 본 개시의 가용성 ENPP1 폴리펩티드는 다음과 같은 인간 또는 동물 장애 또는 병태를 치료한다: 이소성 석회화(예를 들어, 연조직 석회화, 동맥 석회화, 및 혈관 석회화), 만성 신장 질환(CKD), 말기 신장 질환(ESRD), 석회화 요독성 동맥병증(CUA), 칼시필라시스, 후종인대 골화증(OPLL), 저인산혈증 구루병, 골관절염, 나이 관련 동맥 경화, 특발성 영아 동맥 석회화(IIAC), 죽상판의 석회화, ENPP1 결함[예를 들어, 상염색체 열성 저인산혈증 구루병 2형(ARHR2) 및 영아기의 전신성 동맥 석회화(GACI)], ABCC6 유전자[예를 들어, ABCC6 결핍증], 탄력섬유거짓황색증(PXE) 등의 병원성 돌연변이와 연관된 장애, 및 병리학적 골화. ENPP1 폴리펩티드의 예는 인간 ENPP1 전구체 폴리펩티드(예를 들어, 서열번호 1), 및 가용성 인간 ENPP1 폴리펩티드(예를 들어, 서열번호 2, 9, 10, 및 11)를 포함한다.
- [0201] 다른 실시예에서, 연조직은 죽상판을 포함한다. 일부 실시예에서, 연조직은 근육 동맥을 포함한다. 일부 실시예에서, 연조직은 관절 및 척추로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시예에서, 관절은 손의 관절 및 발의 관절로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시예에서, 연조직은 혈관을 포함한다. 일부 실시예에서, 연조직은 결합 조직을 포함한다.
- [0202] 일부 실시예에서, 본 개시는 이를 필요로 하는 대상체에서 탄력섬유거짓황색증(PXE)의 치료, 역전 및/또는 진행을 예방하는 방법을 고려하고, 상기 방법은 본원에 개시된 가용성 ENPP1 폴리펩티드 또는 ENPP1 융합 폴리펩티드(예를 들어, 서열번호 2, 9, 10 및 11)의 치료적 유효량을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0203] 일부 실시예에서, 본 개시는 이를 필요로 하는 대상체에서 연령 관련 동맥 경화의 감소 또는 진행을 예방하는 방법을 고려하며, 상기 방법은 본원에 개시된 가용성 ENPP1 폴리펩티드 또는 ENPP1 융합 폴리펩티드(예를 들어, 서열번호 2, 9, 10 및 11)의 치료적 유효량을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0204] 일부 실시예에서, 본 개시는 이를 필요로 하는 대상체에서 혈관 동맥 내 죽상판 석회화의 치료, 역전 또는 진행의 예방 방법을 고려하고, 상기 방법은 본원에 개시된 가용성 ENPP1 폴리펩티드 또는 ENPP1 융합 폴리펩티드(예를 들어, 서열번호 2, 9, 10 및 11)의 치료적 유효량을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0205] 일부 실시예에서, 본 개시는 이를 필요로 하는 대상체에서 골관절염의 치료, 역전 또는 진행을 예방하는 방법을

고려하며, 상기 방법은 본원에 개시된 가용성 ENPP1 폴리펩티드 또는 ENPP1 융합 폴리펩티드(예를 들어, 서열번호 2, 9, 10 및 11)의 치료적 유효량을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0206] 일부 실시예에서, 본 개시는 이를 필요로 하는 대상체에서 조로증으로 인한 동맥 경화를 치료, 역전 또는 진행을 예방하는 방법을 고려하며, 상기 방법은 본원에 개시된 가용성 ENPP1 폴리펩티드 또는 ENPP1 융합 폴리펩티드(예를 들어, 서열번호 2, 9, 10 및 11)의 치료적 유효량을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0207] 일부 실시예에서, 본 개시는 이를 필요로 하는 대상체에서 X-염색체 연관 저인산혈증 구루병(XLH), 유전성 저인산혈증 구루병(HHRH), 저인산혈증 골 질환(HBD), 후종인대골화증(OPLL), 상염색체 우성 저인산혈증 구루병(ADHR), 및/또는 상염색체 열성 저인산혈증 구루병(ARHR2)을 치료, 역전 또는 진행을 예방하는 방법을 고려하며, 상기 방법은 본원에 개시된 가용성 ENPP1 폴리펩티드 또는 ENPP1 융합 폴리펩티드(예를 들어, 서열번호 2, 9, 10 및 11)의 치료적 유효량을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0208] 일부 실시예에서, 본 개시는 이를 필요로 하는 대상체에서 연령 관련 골감소증의 치료, 역전 또는 진행을 예방하는 방법을 고려하며, 상기 방법은 본원에 개시된 가용성 ENPP1 폴리펩티드 또는 ENPP1 융합 폴리펩티드(예를 들어, 서열번호 2, 9, 10 및 11)의 치료적 유효량을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0209] 일부 실시예에서, 본 개시는 이를 필요로 하는 대상체에서 강직성 척추염의 치료, 역전 또는 진행을 예방하는 방법을 고려하며, 상기 방법은 본원에 개시된 가용성 ENPP1 폴리펩티드 또는 ENPP1 융합 폴리펩티드(예를 들어, 서열번호 2, 9, 10 및 11)의 치료적 유효량을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0210] 일부 실시예에서, 본 개시는 이를 필요로 하는 대상체에서 소아 겸상 적혈구 빈혈증의 뇌졸중의 치료, 역전 또는 진행을 예방하는 방법을 고려하며, 상기 방법은 본원에 개시된 가용성 ENPP1 폴리펩티드 또는 ENPP1 융합 폴리펩티드(예를 들어, 서열번호 2, 9, 10 및 11)의 치료적 유효량을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0211] 특정의 실시예에서, 본 개시는 조로증으로 진단된 대상체에서 질환 치료, 역전 또는 진행을 예방하는 방법을 고려하며, 상기 방법은 본원에 개시된 가용성 ENPP1 폴리펩티드 또는 ENPP1 융합 폴리펩티드(예를 들어, 서열번호 2, 9, 10 및 11)의 치료적 유효량을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0212] 특정 실시예에서, 폴리펩티드는 포유동물 세포에서 발현된 ENPP1 전구체 단백질의 분비된 산물이다. 다른 실시예에서, ENPP1 전구체 단백질은 신호 펩티드 서열 및 ENPP1 폴리펩티드를 포함하고, ENPP1 전구체 단백질은 본원에 개시된 폴리펩티드에 대한 단백질분해 공정을 겪는다. 일부 실시예에서, ENPP1 전구체 단백질에서 신호 펩티드 서열은 ENPP1 폴리펩티드 N-말단에 접합된다. 단백질분해 시, 신호 서열을 ENPP1 전구체 단백질로부터 절단하여 ENPP1 폴리펩티드를 제공한다. 특정 실시예에서, 신호 펩티드 서열은 ENPP1 신호 펩티드 서열, ENPP2 신호 펩티드 서열, ENPP7 신호 펩티드 서열, 및 ENPP5 신호 펩티드 서열로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0213] 특정 실시예에서, 폴리펩티드는 대상체에게 급성 또는 만성으로 투여된다. 다른 실시예에서, 폴리펩티드는 대상체에게 국소적으로, 부위로, 비경구적으로 또는 전신적으로 투여된다.

[0214] 특정 실시예에서, 대상체는 포유동물이다. 다른 실시예에서, 포유동물은 인간이다.

[0215] 본원에서 상세히 설명된 방법을 포함하여 본 개시로 무장될 때, 일단 확립되면 본 개시가 질환 또는 장애의 치료에 한정되지 않음을 당 분야의 숙련자라면 이해할 것이다. 특히, 질환 또는 장애의 증상은 대상체에게 해를 끼치는 시점까지 나타날 필요는 없으며; 실제로, 질환 또는 장애는 치료제가 투여되기 전에 대상체에서 검출될 필요가 없다. 즉, 질환 또는 장애로부터의 유의한 병리가 본 ENPP1 폴리펩티드가 혜택을 제공할 수 있기 전에 발생할 필요는 없다.

[0216] 특정 측면에서, 본 개시는, 본원에 개시된, 가용성 ENPP1 폴리펩티드 또는 ENPP1 융합 폴리펩티드가 질환 또는 장애의 발병 전에 대상체에게 투여됨으로써, 질환 또는 장애의 발생을 예방할 수 있다는 점에서, 대상체에서 질환 및 장애를 예방하는 방법에 관한 것이다. 따라서, 본 개시는 대상체에서 질환 또는 장애의 발병을 예방 또는 지연시키거나, 진행 또는 발달을 감소시키는 방법에 관한 것으로, 상기 방법은 질환 또는 장애의 검출 전에 대상체에게 ENPP1 폴리펩티드를 투여하는 단계를 포함한다. 특정 실시예에서, ENPP1 폴리펩티드는 질환 또는 장애의 강한 가족력이 있는 대상체에게 투여됨으로써, 질환 또는 장애의 발병 또는 진행을 예방하거나 지연시킨다.

[0217] 따라서, 본원의 개시로 무장하여, 당 분야의 숙련자는 대상체에서 질환 또는 장애의 예방이 질환 또는 장애에 대한 예방 조치로서 ENPP1 폴리펩티드를 대상체에게 투여하는 것을 포함한다는 것을 이해할 것이다.

[0218] 특정 실시예에서, 본원에 개시된 동결건조된 제형은 1 ng/kg/일 내지 100 mg/kg/일의 투여량을 전달하기 위해

투여될 수 있다. 다른 실시예에서, 본원에 개시된 동결건조된 제형은 1 ng/kg/일 내지 500 mg/kg/일의 투여량을 전달하기 위해 투여될 수 있다.

[0219] 일부 실시예에서, 본원에 개시된 동결건조된 제형은 0.1 mg/kg의 투여량을 전달하도록 투여될 수 있다. 일부 실시예에서, 본원에 개시된 동결건조된 제형은 0.2 mg/kg의 투여량을 전달하도록 투여될 수 있다. 일부 실시예에서, 본원에 개시된 동결건조된 제형은 0.3 mg/kg의 투여량을 전달하도록 투여될 수 있다. 일부 실시예에서, 본원에 개시된 동결건조된 제형은 0.4 mg/kg의 투여량을 전달하도록 투여될 수 있다. 일부 실시예에서, 본원에 개시된 동결건조된 제형은 0.5 mg/kg의 투여량을 전달하도록 투여될 수 있다. 다른 실시예에서, 본원에 개시된 동결건조된 제형은 0.6 mg/kg의 투여량을 전달하도록 투여될 수 있다. 다른 실시예에서, 본원에 개시된 동결건조된 제형은 0.7 mg/kg의 투여량을 전달하도록 투여될 수 있다. 다른 실시예에서, 본원에 개시된 동결건조된 제형은 0.8 mg/kg의 투여량을 전달하도록 투여될 수 있다. 다른 실시예에서, 본원에 개시된 동결건조된 제형은 0.9 mg/kg의 투여량을 전달하도록 투여될 수 있다. 다른 실시예에서, 본원에 개시된 동결건조된 제형은 1 mg/kg의 투여량을 전달하도록 투여될 수 있다. 다른 실시예에서, 본원에 개시된 동결건조된 제형은 1.2 mg/kg의 투여량을 전달하도록 투여될 수 있다. 다른 실시예에서, 본원에 개시된 동결건조된 제형은 1.4 mg/kg의 투여량을 전달하도록 투여될 수 있다. 다른 실시예에서, 본원에 개시된 동결건조된 제형은 1.6 mg/kg의 투여량을 전달하도록 투여될 수 있다. 다른 실시예에서, 본원에 개시된 동결건조된 제형은 1.8 mg/kg의 투여량을 전달하도록 투여될 수 있다.

[0220] 본원에 개시된 동결건조된 제형에서 활성 성분(예를 들어, 가용성 ENPP1 폴리펩티드 및 이의 융합 단백질), 약학적으로 허용 가능한 담체, 및 임의의 추가 성분의 상대적인 양은 치료되는 대상체의 속성, 크기, 및 병태에 따라 달라질 것이고, 추가로 조성물이 투여될 경로에 따라 달라질 것이다. 예로서, 조성물은 약 0.1% 내지 약 100%(w/w)의 활성 성분을 포함할 수 있다.

[0221] 본원에서 사용되는 바와 같이, "단위 투여량"은 미리 결정된 양의 활성 성분(예를 들어, 가용성 ENPP1 및 이의 융합 단백질)을 포함하는 동결건조된 제형의 개별 양이다. 활성 성분의 양은 일반적으로 대상체에게 투여될 활성 성분의 용량과 동일하거나, 예를 들어, 이러한 용량의 1/2 또는 1/3과 같은, 이러한 용량의 적절한 분획과 동일하다. 단위 용량 형태는 1일 1회 투여 또는 1일 1회 다회 투여 중 하나일 수 있다(예를 들어, 1일 약 1회 내지 4회 이상). 일일 다회 투여량이 사용될 때, 단위 투여 형태는 각 투여량에 대해 동일하거나 상이할 수 있다.

[0222] 일부 실시예에서, ENPP1-Fc는 약 0.1 내지 약 300 mg/ml 범위의 농도로 제형에 존재할 수 있다. 일부 실시예에서, ENPP1-Fc의 농도는 약 0.5 mg/ml, 약 1 mg/ml, 약 2 mg/ml, 약 2.5 mg/ml, 약 3 mg/ml, 약 3.5 mg/ml, 약 4 mg/ml, 약 4.5 mg/ml, 약 5 mg/ml, 약 5.5 mg/ml, 약 6 mg/ml, 약 6.5 mg/ml, 약 7 mg/ml, 약 7.5 mg/ml, 약 8 mg/ml, 약 8.5 mg/ml, 약 9 mg/ml, 약 9.5 mg/ml, 약 10 mg/ml, 약 11 mg/ml, 약 12 mg/ml, 약 13 mg/ml, 약 14 mg/ml, 약 15 mg/ml, 약 16 mg/ml, 약 17 mg/ml, 약 18 mg/ml, 약 19 mg/ml, 약 20 mg/ml, 약 21 mg/ml, 약 22 mg/ml, 약 23 mg/ml, 약 24 mg/ml, 약 25 mg/ml, 약 26 mg/ml, 약 27 mg/ml, 약 28 mg/ml, 약 29 mg/ml, 약 30 mg/ml, 약 31 mg/ml, 약 32 mg/ml, 약 33 mg/ml, 약 34 mg/ml, 약 35 mg/ml, 약 36 mg/ml, 약 37 mg/ml, 약 38 mg/ml, 약 39 mg/ml, 약 40 mg/ml, 약 41 mg/ml, 약 42 mg/ml, 약 43 mg/ml, 약 44 mg/ml, 약 45 mg/ml, 약 46 mg/ml, 약 47 mg/ml, 약 48 mg/ml, 약 49 mg/ml, 약 50 mg/ml, 약 51 mg/ml, 약 52 mg/ml, 약 53 mg/ml, 약 54 mg/ml, 약 55 mg/ml, 약 56 mg/ml, 약 57 mg/ml, 약 58 mg/ml, 약 59 mg/ml, 약 60 mg/ml, 약 70 mg/ml, 약 80 mg/ml, 약 90 mg/ml, 약 100 mg/ml, 약 101 mg/ml, 약 102 mg/ml, 약 102.5 mg/ml, 약 103 mg/ml, 약 103.5 mg/ml, 약 104 mg/ml, 약 104.5 mg/ml, 약 105 mg/ml, 약 105.5 mg/ml, 약 106 mg/ml, 약 106.5 mg/ml, 약 107 mg/ml, 약 107.5 mg/ml, 약 108 mg/ml, 약 108.5 mg/ml, 약 109 mg/ml, 약 109.5 mg/ml, 약 110 mg/ml, 약 111 mg/ml, 약 112 mg/ml, 약 113 mg/ml, 약 114 mg/ml, 약 115 mg/ml, 약 116 mg/ml, 약 117 mg/ml, 약 118 mg/ml, 약 119 mg/ml, 약 120 mg/ml, 약 121 mg/ml, 약 122 mg/ml, 약 123 mg/ml, 약 124 mg/ml, 약 125 mg/ml, 약 126 mg/ml, 약 127 mg/ml, 약 128 mg/ml, 약 129 mg/ml, 약 130 mg/ml, 약 131 mg/ml, 약 132 mg/ml, 약 133 mg/ml, 약 134 mg/ml, 약 135 mg/ml, 약 136 mg/ml, 약 137 mg/ml, 약 138 mg/ml, 약 139 mg/ml, 약 140 mg/ml, 약 141 mg/ml, 약 142 mg/ml, 약 143 mg/ml, 약 144 mg/ml, 약 145 mg/ml, 약 146 mg/ml, 약 147 mg/ml, 약 148 mg/ml, 약 149 mg/ml, 약 150 mg/ml, 약 151 mg/ml, 약 152 mg/ml, 약 153 mg/ml, 약 154 mg/ml, 약 155 mg/ml, 약 156 mg/ml, 약 157 mg/ml, 약 158 mg/ml, 약 159 mg/ml, 약 160 mg/ml, 약 170 mg/ml, 약 180 mg/ml, 약 190 mg/ml, 약 200 mg/ml, 약 201 mg/ml, 약 202 mg/ml, 약 203 mg/ml, 약 204 mg/ml, 약 205 mg/ml, 약 206 mg/ml, 약 207 mg/ml, 약 208 mg/ml, 약 209 mg/ml, 약 210 mg/ml, 약 211 mg/ml, 약 212 mg/ml, 약 213 mg/ml, 약 214

mg/ml, 약 215 mg/ml, 약 216 mg/ml, 약 217 mg/ml, 약 218 mg/ml, 약 219 mg/ml, 약 220 mg/ml, 약 221 mg/ml, 약 222 mg/ml, 약 223 mg/ml, 약 224 mg/ml, 약 225 mg/ml, 약 226 mg/ml, 약 227 mg/ml, 약 228 mg/ml, 약 229 mg/ml, 약 230 mg/ml, 약 231 mg/ml, 약 232 mg/ml, 약 233 mg/ml, 약 234 mg/ml, 약 235 mg/ml, 약 236 mg/ml, 약 237 mg/ml, 약 238 mg/ml, 약 239 mg/ml, 약 240 mg/ml, 약 241 mg/ml, 약 242 mg/ml, 약 243 mg/ml, 약 244 mg/ml, 약 245 mg/ml, 약 246 mg/ml, 약 247 mg/ml, 약 248 mg/ml, 약 249 mg/ml, 약 250 mg/ml, 약 251 mg/ml, 약 252 mg/ml, 약 253 mg/ml, 약 254 mg/ml, 약 255 mg/ml, 약 256 mg/ml, 약 257 mg/ml, 약 258 mg/ml, 약 259 mg/ml, 약 260 mg/ml, 약 270 mg/ml, 약 280 mg/ml, 약 290 mg/ml, 또는 약 300 mg/ml 이다.

[0223] 투여 체계는 유효량을 구성하는 것에 영향을 미칠 수 있다. 예를 들어, 여러 개의 분할된 투여뿐만 아니라, 시차를 둔 투여가 매일 또는 순차적으로 투여될 수 있거나, 투여량이 연속적으로 주입될 수 있거나, 볼루스 주사일 수도 있다. 또한, 치료 제형의 투여는 치료적 또는 예방적 상황의 긴급성에 의해 표시된 바와 비례해서 증가되거나 감소될 수 있다.

[0224] 포유동물(즉, 인간)과 같은, 환자에게 본 개시의 조성물(예를 들어, 가용성 ENPP1 폴리펩티드 및 이의 융합 단백질)을 투여하는 것은, 환자의 질환 또는 장애를 치료하는 데 효과적인 기간 동안 투여량으로, 공지된 절차를 사용하여 수행될 수 있다. 치료 효과를 달성하는 데 필요한 치료 화합물의 유효량은 사용된 특정 화합물의 활성; 투여 시간; 화합물의 배출 속도; 치료 지속기간; 다른 약물, 화합물 또는 화합물과 조합하여 사용된 물질; 치료 중인 환자의 질환 또는 장애의 상태, 연령, 성별, 체중, 병태, 전반적 건강 및 이전 병력, 및 의학 분야에서 잘 알려진 기타 인자 같은 인자에 따라 달라질 수 있다. 최적 치료 반응을 제공하기 위해 투여 체계를 조정할 수 있다. 투여는 치료 화합물의 생물학적 활성에 기초하여 결정되며, 이는 결국 치료 화합물 곡선의 반감기 및 혈장 시간 아래 면적에 따라 달라진다. 본 개시에 따른 폴리펩티드는 정상(1-3 pM) 수준에 가깝거나 정상 PPi 수준보다 높은 (30-50% 더 높음) 혈장 PPi의 연속적인 수준을 달성하도록 2일마다, 또는 4일마다, 또는 매주 또는 매월 적절한 시간 간격으로 투여된다. ENPP1 폴리펩티드의 치료적 용량은 또한 반감기 또는 치료용 폴리펩티드가 신체로부터 제거되는 속도에 기초하여 결정될 수 있다. 본 개시에 따른 폴리펩티드는 ENPP1 효소 활성의 일정한 수준을 달성하도록 2일마다, 또는 4일마다, 매주 또는 매월의 적절한 시간 간격으로 투여된다.

[0225] 예를 들어, 여러 번의 분할된 투여량이 매일 투여될 수 있거나, 투여량은 치료 상황의 긴급성에 의해 표시된 바와 비례해서 감소될 수 있다. 본원에 개시된 치료 화합물에 대한 유효 투여량 범위의 비한정적인 예는 약 0.01 및 50 mg/kg의 체중/일이다. 특정 실시예에서, 본원에 개시된 치료 화합물의 유효 투여량 범위는 체중의 약 50 ng/kg 내지 500 ng/kg, 바람직하게는 100 ng 내지 300 ng/kg이다. 당해 분야 숙련자라면 관련 인자를 연구하고 과도한 실험 없이 치료 화합물의 유효량에 관한 결정을 내릴 수 있을 것이다.

[0226] 가용성 ENPP1 폴리펩티드 및 이의 융합 단백질은 매일 수회만큼 빈번하게 환자에게 투여될 수 있거나, 덜 빈번하게, 예컨대 1일 1회, 주 1회, 2주마다 1회, 월 1회, 또는 심지어 덜 빈번하게, 예컨대 수개월에 1회, 또는 심지어 1년에 1회 또는 그 이하로 투여될 수 있다. 일일 투여되는 가용성 ENPP1 폴리펩티드 및 이의 융합 단백질의 양은, 비한정적인 예에서, 매일, 격일, 2일마다, 3일마다, 4일마다, 또는 5일마다 투여될 수 있는 것으로 이해된다. 예를 들어, 격일마다 투여 시, 5 mg/일 투여량이 월요일에 개시될 수 있고, 첫번째 후속 5 mg/일 투여량이 수요일에 투여되고, 두번째 후속 5 mg/일 투여량은 금요일에 투여되는 것 등이다. 투여량의 빈도는 당해 분야 숙련자에게 쉽게 명백하며, 치료 중인 질환의 유형 및 중증도, 및 환자의 유형 및 연령과 같은 임의의 수의 인자에 의존하지만, 이에 한정되지 않는다.

[0227] 본 개시의 동결건조된 제형 중의 활성 성분(예를 들어, 가용성 ENPP1 폴리펩티드 및 이의 융합 단백질)의 실제 투여 수준은, 환자에게 독성이 되지 않으면서, 특정 환자, 조성물, 및 투여 방식에 대해 원하는 치료 반응을 달성하는 데 효과적인 활성 성분의 양을 수득하도록 다양할 수 있다.

[0228] 당해 분야 숙련자인 의사, 예를 들어, 내과 의사는 필요한 동결건조된 제형의 유효량을 쉽게 결정하고 처방할 수 있다. 예를 들어, 내과 의사 또는 수의사는, 원하는 치료 효과를 달성하기 위해 요구되는 수준보다 낮은 수준으로 동결건조된 제형에 사용된 본원에 개시된 화합물의 투약을 시작할 수 있고, 원하는 효과가 달성될 때까지 투여량을 점진적으로 증가시킬 수 있다.

[0229] 특정 실시예에서, 본원에 개시된 조성물은 1일 1 내지 5회 또는 그 이상의 투여량으로 환자에게 투여된다. 다른 실시예에서, 본원에 개시된 조성물은 1일, 2일마다, 3일마다 1회 내지 주 1회, 및 2주마다 1회를 포함하지만 이들에 한정되지 않는 투여 범위로 환자에게 투여된다. 본원에 개시된 다양한 조합 조성물의 투여 빈도는 대상체에서 대상체까지 다양하며, 이는 연령, 치료 대상 질환 또는 장애, 성별, 전반적인 건강 및 기타 인자를 포함하

지만 이에 한정되지 않는 많은 인자에 따라 달라진다. 따라서, 본 개시는 임의의 특정 투여 체제로 제한되는 것으로 해석되어서는 안 되며, 임의의 환자에게 투여될 정확한 투여량 및 조성물은 환자에 대한 모든 다른 인자를 고려한 참여중인 신체에 의해 결정될 것이다.

[0230] 특정 실시예에서, 본 개시는 본원에 개시된 화합물의 치료적 유효량을 단독으로 또는 제2 약학적 제제와 조합하여 보유하는 용기; 및 환자에서 질환 또는 장애의 하나 이상의 증상을 치료, 예방 또는 감소시키기 위해 화합물을 사용하기 위한 지침을 포함하는 포장된 동결건조된 조성물에 관한 것이다.

[0231] 특정 실시예에서, 폴리펩티드, 또는 이의 전구체 단백질은, 대상체에게 급성 또는 만성으로 투여된다. 다른 실시예에서, 폴리펩티드, 또는 이의 전구체 단백질은, 대상체에게 국소적으로, 부위로 또는 전신적으로 투여된다. 또 다른 실시예에서, 폴리펩티드, 또는 이의 전구체 단백질은, 암호화된 벡터 상에 전달되며, 여기서 벡터는 단백질 암호화하고, 벡터가 대상체에게 투여될 때 벡터로부터 전사되고 번역된다.

[0232] 본원에 사용되는 바와 같이, 동결건조된 제형의 "비경구 투여"는 대상체의 조직의 물리적과단 및 조직 내 과정을 통한 동결건조된 제형의 투여를 특징으로 하는 임의의 투여 경로를 포함한다. 따라서, 비경구 투여는, 조성물의 주사, 수술 절개를 통한 조성물의 적용, 조직 침투성 비-수술적 상처를 통한 조성물의 적용 등에 의한 동결건조된 제형의 투여를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 특히, 비경구 투여는 피하, 정맥 내, 복강 내, 근육 내, 근간 내 주사, 및 신장 투석 주입 기술을 포함하는 것으로 고려되지만, 이에 한정되지 않는다.

[0233] 비경구 투여에 적합한 동결건조된 제형은 하나 이상의 약학적으로 허용 가능한 멸균 등장성 수성 또는 비수성 용액, 분산액, 현탁액 또는 유화액, 또는 사용 직전에 멸균 주사 용액 또는 분산액으로 재구성될 수 있으며, 항산화제, 완충제, 정균제, 의도된 수용자의 혈액과 제형을 등장성으로 만드는 용질 또는 현탁제 또는 증점제를 함유할 수 있는, 멸균 분말과 조합된 하나 이상의 ENPP1 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 본 개시의 동결건조된 제형에 사용될 수 있는 적합한 수성 및 비수성 담체의 예는 물, 에탄올, 폴리올(예컨대 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜 등), 및 이들의 적절한 혼합물, 올리브 오일과 같은 식물성 오일, 및 에틸 올레이트와 같은 주사 가능한 유기 에스테르를 포함한다. 적절한 유동성은, 예를 들어 레시틴과 같은 코팅 재료의 사용에 의해, 분산액의 경우에 요구되는 입자 크기의 유지에 의해, 및 계면활성제의 사용에 의해 유지될 수 있다.

[0234] 조성물 및 제형은, 원하는 경우, 활성 성분을 함유하는 하나 이상의 단위 투여 형태를 함유할 수 있는 팩 또는 디스펜서 장치에 제공될 수 있다. 팩은, 예를 들어 블리스터 팩과 같은, 금속 또는 플라스틱 호일을 포함할 수 있다. 팩 또는 디스펜서 장치는 투여 지침을 수반할 수 있다.

[0235] 5. 서열

표 2

서열

서열 번호	서열	설명
1	1 MERDGCAGGG SRGGEGGRAP REGPAGNGRD RGRSHAAEAP GDPQAAASLL 51 APMDVGEPEL EKAARARTAK DPNTYKVLSL VLSVCVLTTI LGCIFGLKPS 101 CAKEVKSCCKG RCFERTFGNC RCDAAACVELG NCCLDYQETC IEPEHIWTCN 151 KFRCGEKRLT RSLCACSDDC KDKGDCCINY SSVQCQEKSW VEPECESINE 201 PQCPAGFETP PTLFLSLDGF RAEYLTWGG LLPVISKLKK CGTYTKNMRP 251 VYPTKTFPNH YSIVTGLYPE SHGIIDNMY DPKMNASFSL KSKEKFNPEW 301 YKGEPIWVTA KYQGLKSGTF FWPGSDVEIN GIFPDIYKMY NGSPVFEERI 351 LAVLQWLQLP KDERPHFYTL YLEEDSSGH SYGPVSSEVI KALQVRDGMV 401 GMLMDGLKEL NLHRCNLIL ISDHGMEQGS CKKIYLNKY LGDVKNKVI 451 YGPAARLRPS DVPDKYYSFN YEGIARNLSC REPNOHFKEPY LKHFLPKRLH 501 FAKSDRIEPL TFYLDPQWOL ALNPSEKRYC GSGFHGSDNV FSNMQALFVG 551 YGPGFKHGIE ADTFENIEVY NLMCDLLNT PAPNNGTHGS LNHLLKNPVY 601 TPKHPKEVHP LVQCPFTTRN RDNLGCSCNP SILPIEDFQT QFNLTVAEEK 651 IIKHETLPYG RPRVLQKENT ICLLSQHQFM SGYSQDILMP LWTSTYVDRN 701 DSFSTEDFSN CLYQDFRIPL SPVHKCSFYK NNTKVSYGYL SPPQLNKNSS 751 GIYSEALLTT NIVPMYQSFQ VIWRYFHDTL LRKYAEERNG VNVVSGPVFD 801 FDYDGRCDL ENLRQKRRV RNQEILIPTH FFIIVLTSCDK TSQTPLHCEN 851 LDTLAFILPH RTDNSESCVH GRKHDSWVEE LLMLHRARIT DVEHITGLSF 901 YQQRKEPVSD ILKLKTHLPT FSQED	야생형 ENPP1 전구체 단백질의 전체, 미가공 아미노산 서열
2	1 PSCAKEVKSC KGRCFERTFG NCRCDAAACVE LGNCCLDYQE TCIEPEHIWT 51 CNKFRCGEKR LTRSLCACSD DCKDKGDCCI NYSSVCQGEK SWVEEPCESI 101 NEPQCPAGFE TPPTLLFSLD GFRAEYLHW GGLLPVISKL KKGCTYTKNM 151 RPYPTKTFP NHYSIVTGLY PESHGIIDNK MYDPKMNASF SLKSKEKFN 201 EWYKGEPIWV TAKYQGLKSG TFFWPGSDVE INGIFPDIYK MYNGSVPFEE 251 RILAVLQWLQ LKDERPHFY TLYLEEDSS GHSYGPVSSE VIKALQVRDG 301 MVGMLMDGLK ELNLHRCNL ILISDHGMEQ GSKKIYILN KYLGDVKNK 351 VIYGPAARLR PSDVPDKYYS FNYEGIARNL SCREPNOHFKE PYLKHFLPKR 401 LHFASDRIE PLTFYLDPQW QALNPSEK YCGSGFHGSD NVFSNMQALF 451 VGYGPGFKHG IEADTFENIE VYNLMCDLLN LTPAPNNGTH GSLNHLLKNP 501 VYTPKHPKEV HPLVQCPFTR NPDNLGCSC NPSILPIEDF QTQFNLTVAE 551 EKIKHETLP YGRPRVLQKE NTICLLSQHQ FMSGYSQDIL MPLWTSTYVD 601 RNDSTEDF SNCLYQDFRI PLSPVHKCSF YKNNTKVSYG FLSPQLNKN 651 SSGIYSEALL TTINIVPMYQS FQVIWRYFHD TLLRKYAEER NGVNVVSGPV 701 FDFDYDGRCD SLENLRQKRR VIRNQEILP THFFIVLTSC KDTSTPLHC 751 ENLDTLAFIL PHRTDNSESC VHGHKDSWVE EELLMLHRAR ITDVEHITGL 801 SFYQQRKEPV SDILKLKTHL PTFSQED	가공된 (정숙) 세포외 ENPP1 폴리펩티드 서열
9	<u>FTAGLKPSCAKEVKSCKGRCFERTFGNCRCDAAACVELGNCCLDYQETCIEPEHIWTCN</u> <u>KFRCGEKRLTRSLCACSDCKDKGDCCINYSSVCQGEKSWVEEPCESINEPQCPAGFE</u> <u>TPPTLLFSLDGFRAEYLHWGGLLPVISKLKKGCTYTKNMRPVYPTKTFPNHYSIVTG</u> <u>LYPESHGIIDNKMYPKMNASFSLKSKEKFNPEWYKGEPIWVIAKYQGLKSGTFFWPG</u> <u>SDVEINGIFPDIYKMYNGSVPFEEIRILAVLQWLQLPKDERPHFYTLYLEEDSSGHSY</u> <u>GFVSSEVIKALQVRDGMVGMMDGLKELNLHRCNLILISDHGMEQGSCKKIYILNKY</u> <u>LGDVKNKVIYGPAARLRPSDVPDKYYSFNYEGIARNLSCREPNOHFKEPYLKHFLPKR</u> <u>LHFASDRIEPLTFYLDPQWQALNPSEKRYCGSGFHGSDNVFSNMQALFVGYGPGFK</u> <u>HGIEADTFENIEVYNLMCDLLNTLTPAPNNGTHGSLNHLLKNPVYTPKHPKEVHPLVQC</u> <u>PFTTRNPDNLGCSCNPSILPIEDFQTQFNLTVAEEKIIKHETLPYGRPRVLQKENTIC</u> <u>LLSQHQFMSGYSQDILMPLWTSTYVDRNDSTEDFSNCLYQDFRIPLSPVHKCSFYK</u> <u>NNTKVSYGFLSPPQLNKNSSGIYSEALLTTINIVPMYQSFQVIWRYFHDTLRKYAEER</u> <u>NGVNVVSGPVDFDYDGRCDLENLRQKRRVIRNQEILIPTHFFIVLTSCDKDTSTPL</u> <u>HCENLDTLAFILPHRTDNSESCVHGHKDSWVEELLMLHRARITDVEHITGLSFYQQR</u> <u>KEPVSDILKLKTHLPTFSQEDLINDRTHTCCPAPPELLGGPSVFLFPKPKRDTLMIS</u>	ENPP1-링커- hlgG1 Fc 작제물

[0236]

	RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNATKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK	
10	GLKPSCAKEVKSCKGRCFERTFGNCRCDAAACVELGNCCLDYQETCIEPEHIWTCNKFR CGEKRLTRSLCACSDCKDKGCCINYSSVCQGEKSWVEEPCESINEPQCPAGFETPP TLFSLDGFRAEYLTWGGLLFVISKLKCGTYTKNMRPVYPTKTFPNHYSIVTGLYP ESHGIIDNKMYDPKMNASFSLKSKEKFNPEWYKGEPIWVTAKYQGLKSGTFFWPGSDV EINGIFPDIYKMYNGSVFEEERILAVLQWLQLPKDERPHFYTLYLEEPDSSGHSYGFV SSEVIKALQRVDGMVGMMDGLKELNLHRCNLILISDHGMEQGSCKKIYILNKYLG VKNIKVIYGPAARLRPSDVPDKYYSFNIEGIARNLSREPNQHFKPYLKHFLPKRLHF AKSDRIEPLTFYLDPOWQLALNPSEKRYCGSGFHGSDNVFSNMQALFVGYPGPFKHGI EADTFENIEVYNLMCDLLNLTAPNNGTHGSLNHLLKNFVYTPKHPEVHPLVQCFPT RNPRDNLGCSNPSILPIEDFQTQFNLTVAEEKIHKHETLPYGRPRVLQKENTICLLS QHGFMSGYSQDILMPLWTSYTVDRNDSFSTEDFSNCLYQDFRIPLSPVHKCSFYKNNT KVSYGFLSPQNLKNSSGIYSEALLTINIVPMYQSFQVIWRYFHDITLLRKYAEERNV NVVSGPFVDFDYDGRCDLENLRQKRRVIRNQEILIPTHFFIVLTSCKDTSQTPHCE NLDTLAFILPHRTDNSESCVHGKHDSSWVEELMLHRARITDVEHITGLSFYQORKEP VSDILKLKTHLFTFSQEDLINDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMSRTP EVTCTVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNATKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGK	ENPP1-링커- hlgG1Fc 작제물
11	PSCAKEVKSCKGRCFERTFGNCRCDAAACVELGNCCLDYQETCIEPEHIWTCNKFRCE KRLTRSLCACSDCKDKGCCINYSSVCQGEKSWVEEPCESINEPQCPAGFETPPTLL FSLDGFRAEYLTWGGLLFVISKLKCGTYTKNMRPVYPTKTFPNHYSIVTGLYPESH GIIDNKMYDPKMNASFSLKSKEKFNPEWYKGEPIWVTAKYQGLKSGTFFWPGSDVEIN GIFPDIYKMYNGSVFEEERILAVLQWLQLPKDERPHFYTLYLEEPDSSGHSYGFVSSE VIKALQRVDGMVGMMDGLKELNLHRCNLILISDHGMEQGSCKKIYILNKYLGDVKN IKVIYGPAARLRPSDVPDKYYSFNIEGIARNLSREPNQHFKPYLKHFLPKRLHFAKS DRIEPLTFYLDPOWQLALNPSEKRYCGSGFHGSDNVFSNMQALFVGYPGPFKHGIEAD TFENIEVYNLMCDLLNLTAPNNGTHGSLNHLLKNFVYTPKHPEVHPLVQCFPTRN RDNLGCSNPSILPIEDFQTQFNLTVAEEKIHKHETLPYGRPRVLQKENTICLLSQHQ FMSGYSQDILMPLWTSYTVDRNDSFSTEDFSNCLYQDFRIPLSPVHKCSFYKNNTKVS YGFLSPQNLKNSSGIYSEALLTINIVPMYQSFQVIWRYFHDITLLRKYAEERNVNVV SGPFVDFDYDGRCDLENLRQKRRVIRNQEILIPTHFFIVLTSCKDTSQTPHLCENLD TLAFILPHRTDNSESCVHGKHDSSWVEELMLHRARITDVEHITGLSFYQORKEPVSD ILKLKTHLFTFSQEDLINDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMSRTPV CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNATKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNQKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK	ENPP1-링커- hlgG1Fc 작제물

[0237]

12	DKHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISAKAQGPPEPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFFYPSDIAVEWESNGQPENNYKITPPVLDSDGSSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	인간 IgG1 Fc
13	FTAGLKPFSCAKEVKSCGKRCFERTFGNCRCDAAVELGNCCLDYQETCIEPEHIWTCNKFRCGEKRLTRSLCACSDCKDKGDCINYSVQCQGEKSWVEEPCESINEPQCAGFETPTLLFSLDGFRAEYLHTWGGLLPVISKLLKCGTYTKNMRPVYPTKTFPNHYSIVTGLYPESHGIIIDNMKYDPKMNASFSLKSKEKFNPEWYKGEPIWVTAKYQGLKSGTFFWPGSDVEINGIFPDIYKMYNGSVPFEEIRILAVLQWLQPKDERPHFYTYLLEPDSSGHSYGPVSSEVIKALQVRVDMVGMMLDGLKELNLHRCNLILISDHGMEQGSCKKYIYLNKYLGDVKNIKVIYGPAAARLRPSDVPDKYYSFNYEGIARNLSCREPNQHFKPYLKHLFPLKRLHFAKSDRIEPLTFYLDQWQLALNPSEKRYCGSGFHGSDNVFSNMQALFVGYGPGFKHGIEADTFENIEVYNLMCDLLNLTAPNNGTHGSLNHLKPNVYTPKHPEVHPLVQCFTRNPRNLGSCSNPSILPIEDFQIQFNLTVAEEKIKHETLPGRPRVLQKENTICLLSQHQFMSGYSQDILMPLWTSTYTVDRNDSFSTEDFSNCLYQDFRIPLSPVHKCSFYKNNTKVSYGFLSPPQLNKNSSGIYSEALLTTNIVPMYQSFQVIWRYFHDITLLRKYAEERNVGVNVSFVDFDYDGRCDLENLRQKRRVIRNQEILIPTHFFIVLTSCKDTSTQPLHCENLDTLAFILPHRTDNSESCVHGKHDSSWVEELMLHRRARITDVEHITGLSFYQQRKEPVSIDILKLTHTLPTFSQED	ENPP1의 예시적인 가용성 형태
14	GLKPFSCAKEVKSCGKRCFERTFGNCRCDAAVELGNCCLDYQETCIEPEHIWTCNKFRCGEKRLTRSLCACSDCKDKGDCINYSVQCQGEKSWVEEPCESINEPQCAGFETPTLLFSLDGFRAEYLHTWGGLLPVISKLLKCGTYTKNMRPVYPTKTFPNHYSIVTGLYPESHGIIIDNMKYDPKMNASFSLKSKEKFNPEWYKGEPIWVTAKYQGLKSGTFFWPGSDVEINGIFPDIYKMYNGSVPFEEIRILAVLQWLQPKDERPHFYTYLLEPDSSGHSYGPVSSEVIKALQVRVDMVGMMLDGLKELNLHRCNLILISDHGMEQGSCKKYIYLNKYLGDVKNIKVIYGPAAARLRPSDVPDKYYSFNYEGIARNLSCREPNQHFKPYLKHLFPLKRLHFAKSDRIEPLTFYLDQWQLALNPSEKRYCGSGFHGSDNVFSNMQALFVGYGPGFKHGIEADTFENIEVYNLMCDLLNLTAPNNGTHGSLNHLKPNVYTPKHPEVHPLVQCFTRNPRNLGSCSNPSILPIEDFQIQFNLTVAEEKIKHETLPGRPRVLQKENTICLLSQHQFMSGYSQDILMPLWTSTYTVDRNDSFSTEDFSNCLYQDFRIPLSPVHKCSFYKNNTKVSYGFLSPPQLNKNSSGIYSEALLTTNIVPMYQSFQVIWRYFHDITLLRKYAEERNVGVNVSFVDFDYDGRCDLENLRQKRRVIRNQEILIPTHFFIVLTSCKDTSTQPLHCENLDTLAFILPHRTDNSESCVHGKHDSSWVEELMLHRRARITDVEHITGLSFYQQRKEPVSIDILKLTHTLPTFSQED	ENPP1의 예시적인 가용성 형태
15	PSCAKEVKSCGKRCFERTFGNCRCDAAVELGNCCLDYQETCIEPEHIWTCNKFRCGEKRLTRSLCACSDCKDKGDCINYSVQCQGEKSWVEEPCESINEPQCAGFETPTLLFSLDGFRAEYLHTWGGLLPVISKLLKCGTYTKNMRPVYPTKTFPNHYSIVTGLYPESHGIIIDNMKYDPKMNASFSLKSKEKFNPEWYKGEPIWVTAKYQGLKSGTFFWPGSDVEINGIFPDIYKMYNGSVPFEEIRILAVLQWLQPKDERPHFYTYLLEPDSSGHSYGPVSSEVIKALQVRVDMVGMMLDGLKELNLHRCNLILISDHGMEQGSCKKYIYLNKYLGDVKNIKVIYGPAAARLRPSDVPDKYYSFNYEGIARNLSCREPNQHFKPYLKHLFPLKRLHFAKSDRIEPLTFYLDQWQLALNPSEKRYCGSGFHGSDNVFSNMQALFVGYGPGFKHGIEADTFENIEVYNLMCDLLNLTAPNNGTHGSLNHLKPNVYTPKHPEVHPLVQCFTRNPRNLGSCSNPSILPIEDFQIQFNLTVAEEKIKHETLPGRPRVLQKENTICLLSQHQFMSGYSQDILMPLWTSTYTVDRNDSFSTEDFSNCLYQDFRIPLSPVHKCSFYKNNTKVSYGFLSPPQLNKNSSGIYSEALLTTNIVPMYQSFQVIWRYFHDITLLRKYAEERNVGVNVSFVDFDYDGRCDLENLRQKRRVIRNQEILIPTHFFIVLTSCKDTSTQPLHCENLDTLAFILPHRTDNSESCVHGKHDSSWVEELMLHRRARITDVEHITGLSFYQQRKEPVSIDILKLTHTLPTFSQED	ENPP1의 예시적인 가용성 형태

[0238]

[0239]

본 명세서에 사용된 용어는 일반적으로 당업계에서, 본 개시의 문맥 내에서, 및 각각의 용어가 사용되는 특정 맥락에서 이들의 통상적인 의미를 갖는다. 특정 용어는 본 개시의 조성물 및 방법, 및 이들의 제조 및 사용 방법을 기술함에 있어서 실무자에게 추가 지침을 제공하기 위해 하기 또는 명세서의 다른 곳에서 논의된다. 용어의 임의의 사용의 범위 또는 의미는 해당 용어가 사용되는 특정 문맥으로부터 명백해질 것이다.

[0240]

"약" 및 "대략"은 일반적으로 측정의 성질 또는 정밀도를 고려하여 측정된 양에 대해 허용 가능한 오차 정도를 의미한다. 전형적으로, 예시적인 오차의 정도는 주어진 값 또는 값들의 범위의 20% 이내(%), 바람직하게는 10% 이내, 및 더 바람직하게는 5% 이내이다.

[0241]

대안적으로, 특히 생물학적 시스템에서, 용어 "약" 및 "대략"은 주어진 값의 크기, 바람직하게는 5배 이내, 보다 바람직하게는 2배 이내인 값을 의미할 수 있다. 본원에서 주어진 수치 양은 달리 언급되지 않는 한 대략적인 양이며, 용어 "약" 또는 "대략"은 명시적으로 언급되지 않은 경우에 추론될 수 있음을 의미한다.

[0242]

용어 "a" 및 "an"은 용어가 사용되는 문맥이 달리 명확하게 지시하지 않는 한 복수의 참조를 포함한다. 용어 "a" (또는 "an") 뿐만 아니라 용어 "하나 이상" 및 "적어도 하나"는 본원에서 상호 교환적으로 사용될 수 있다. 또한, 본원에서 사용되는 "및/또는"은 다른 것의 유무와 상관없이 둘 이상의 특정된 특징부 또는 구성요소 각각의 특정 개시로서 간주되어야 한다. 따라서, 본원에서 "A 및/또는 B"와 같은 문구에 사용되는 용어 "및/또는"은 "A 및 B", "A 또는 B", "A"(단독), 및 "B"(단독)를 포함하도록 의도된다. 마찬가지로, "A, B, 및/또는 C"와 같은 문구에 사용되는 용어 "및/또는"은 다음의 측면 각각을 포함하도록 의도된다: A, B, 및 C; A, B, 또는 C; A 또는 C; A 또는 B; B 또는 C; A 및 C; A 및 B; B 및 C; A (단독); B (단독); 및 C (단독).

[0243]

본원에 개시된 숫자 범위는 범위를 정의하는 숫자를 포함한다.

[0244]

본원에 개시된 폴리펩티드는 자연 발생하지 않는 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 이러한 변이체는 반드시 출발 분자와 100% 미만의 서열 동일성 또는 유사성을 갖는다. 특정 실시예에서, 변이체는 출발 (예를 들어, 자연 발생 또는 야생형) 폴리펩티드의 아미노산 서열과 약 75% 내지 100% 미만의 아미노산 서열 동일성 또는 유사성,

보다 바람직하게는 약 80% 내지 100% 미만, 보다 바람직하게는 약 85% 내지 100% 미만, 보다 바람직하게는 약 90% 내지 100% 미만(예를 들어, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%) 및 가장 바람직하게는 약 95% 내지 100% 미만을, 예를 들어, 상기 변이체 분자의 길이에 걸쳐 가질 것이다.

[0245] 바람직한 방법 및 재료가 본원에 기술되어 있지만, 본원에 기재된 것과 유사하거나 동등한 방법 및 재료가 본원에 개시된 방법 및 조성물의 실시 또는 시험에 사용될 수 있다. 본원에 언급된 모든 간행물, 특허 출원, 특허 및 기타 참조 문헌은 그 전체가 참조로서 통합된다.

[0246] 예시

[0247] 이제 본 발명이 일반적으로 설명되고 있으며, 이는 다음의 실시예를 참조하여 보다 쉽게 이해될 것이며, 이들은 단지 본 발명의 특정 실시예 및 실시예의 예시 목적으로만 포함되며 본 발명을 제한하려는 의도가 아니다.

[0248] 예 1. ENPP1 융합 단백질의 생성

[0249] 가용성 ENPP1 융합 단백질을 링커(류신, 이소류신 및 아스파라긴을 포함함)를 통해 링커를 사용해 인간 Fc 도메인에 융합시켰다. 3개의 ENPP1-Fc 작제물은 CHO 세포로부터 정제된 바와 같이 서열번호 9, 10 및 11로서 표 2에 제시되어 있다.

[0250] ENPP1-Fc의 정제는, 예를 들어, 다음 중 3개 이상을 포함하는 일련의 컬럼 크로마토그래피 단계에 의해, 임의의 순서로 달성될 수 있다: 단백질 A 크로마토그래피, Q 세파로오스 크로마토그래피, 페닐세파로오스 크로마토그래피, 크기 배제 크로마토그래피, 및 양이온 교환 크로마토그래피. 바이러스 여과 및 완충액 교환으로 정제를 완료할 수 있다. 단백질의 정제 후, 발색 기질로서 pNP-TMP를 사용하여 ENPP1-Fc 단백질의 촉매 활성을 평가할 수 있었다. 응력이 가해진 조건 및 응력이 가해지지 않은 조건 모두에서 ENPP1-Fc의 최적의 화학적, 물리적 및 구조적 안정성을 초래할 제형을 식별하기 위해, 다수의 완충액 유형, pH 조건, 부형제, 및 계면활성제 농도를 베이스라인 완충액, 첨가제, 용해도, 계면활성제 스크리닝, 및 보조인자 스크리닝의 과정에 걸쳐 반복 방식으로 평가하였다.

[0251] 예 2. 동결건조된 ENPP1 폴리펩티드 제형의 생성

[0252] 본원에 개시된 동결건조된 ENPP1 폴리펩티드 제형을 다음 단계에 따라 생성하였다. 44 mg/mL 농도에서 ENPP1-Fc를 계면활성제가 결합된 제형화 완충액으로 완충액 교환하였다. 완충액 교환 공정은 총 4회의 사이클 및 > 400 배의 총 희석에 대해 수행하였다. 완충액 교환 샘플 중의 단백질 농도를 1.47 ml/mg*cm의 소광 계수 및 1.0 cm의 경로 길이를 사용하여 UV-가시광 분광법으로 측정하였다. 50.0 mg/mL로 정규화하는 동안, 계면활성제(PS20)를 모든 제형에 0.05%의 최종 농도로 첨가하였다. 완충액 교환 후, 제형을 멸균 여과하고, 0.5 mL의 충전 부피로 삼중 행균되고 오토클레이빙된 바이알에 충전하고, 멸균 고무 마개를 장착하였다.

[0253] ENPP1-Fc 동결건조 사이클(표 3)은 초기 어닐링 단계로 구성되었으며, 여기서 온도는 만니톨 함유 제형의 완전한 결정화를 허용하기 위해 수 시간 동안 -50℃에서 -20℃로 순환되었다. 어닐링 단계에 이어서, 압력을 100 mTorr로 설정하고 선반 온도를 25℃로 증가시킴으로써 일차 건조를 개시하고, 사이클을 일차 건조에서 1793분(약 30시간) 동안 유지하였다. 일차 건조가 완료된 후, 온도를 40℃로 증가시키고 600분(10시간) 동안 유지함으로써 임의의 잔여 수분을 제거하기 위한 이차 건조를 수행하였다. 동결건조 사이클의 총 지속 시간은 3648분(약 2.5일)이었다. 사이클이 완료되면, 약 570 Torr의 부분 압력에서 바이알을 질소로 역충진하고, 마개를 덮고 적절하게 밀봉하였다. ENPP1-Fc를 함유하는 모든 동결건조된 케이크는 상아색의 온전한 구조를 나타냈다. 재구성 후, 액체 외관은 갈색을 띤 노란색으로, 투명하고, 모든 샘플 유형 및 조건에 대해 눈에 보이는 미립자가 없는 것으로 관찰되었다. 응력이 가해진 조건 및 응력이 가해지지 않은 조건 모두에서 ENPP1-Fc의 최적의 화학적, 물리적 및 구조적 안정성을 초래할 제형을 식별하기 위해, 다수의 완충액, pH 조건, 부형제, 첨가제, 계면활성제 및 보조인자를 반복 방식으로 평가하였다.

표 3

ENPP1-Fc 동결건조 사이클

	온도 (°C)	속도 (C/분)	램프 시간 (분)	유지 시간 (분)	압력	총 시간		
RT 에서의 하중	25°C			10 분				
램프	-5°C	0.5°C/분	60 분			70 분	1.2 시간	0.05 일
유지	-5°C			60 분		130 분	2.2 시간	0.09 일
램프	-50°C	0.5°C/분	90 분			220 분	3.7 시간	0.15 일
유지	-50°C			180 분		400 분	6.7 시간	0.28 일
램프	-20°C	0.5°C/분	60 분			460 분	7.7 시간	0.32 일
유지	-20°C			180 분		640 분	10.7 시간	0.44 일
램프	-50°C	0.5°C/분	60 분			700 분	11.7 시간	0.49 일
유지	-50°C			180 분		880 분	14.7 시간	0.61 일
진공 시작	-50°C				100 mTorr	880 분	14.7 시간	0.61 일
램프	-25°C	0.5°C/분	50 분		100 mTorr	930 분	15.5 시간	0.65 일
일차	-25°C			1793 분	100 mTorr	2723 분	45.4 시간	1.89 일
램프	-40°C	0.2°C/분	325 분		100 mTorr	3048 분	50.8 시간	2.12 일
이차	-40°C			600 분	100 mTorr	3648 분	60.8 시간	2.53 일

[0254]

[0255]

예 3. 동결건조된 ENPP1 폴리펩티드 제형의 재구성

[0256]

동결건조된 샘플 재구성은 0.5 mL의 주사용수로 재구성한 것에 기초하여 평가하였다. 모든 미립자 물질이 용해 될 때까지 시간을 측정하였다. 각각의 동결건조된 샘플은 적어도 46초의 기간 내에 가시적인 잔류물 또는 용해 되지 않은 물질을 전혀 남기지 않고 완전히 용해되었다. 요약 재구성 데이터는 표 4에 나타나 있다.

표 4

동결건조된 ENPP1-폴리펩티드 제형에 대한 재구성 시간

완충액	부형제	제형	시점	조건	재구성 시간(초)
20 mM 숙신산염, 2 mM CaCl ₂ pH 6.0	수크로오스(9%)	A	T0	동결건조	76
			4 주	5°C	53
				40°C	76
			13 주	5°C	52
	수크로오스(3%) 만니톨(1.5%)	B	T0	동결건조	60
			4 주	5°C	88
				40°C	83
			13 주	5°C	46
	수크로오스(2%) 만니톨(2%)	C	T0	동결건조	73
			4 주	5°C	91
				40°C	95
			13 주	5°C	60
20 mM 구연산염, 2 mM CaCl ₂ pH 6.0	수크로오스(9%)	D	T0	동결건조	71
			4 주	5°C	62
				40°C	77
			13 주	5°C	92
	수크로오스(3%) 만니톨(1.5%)	E	T0	동결건조	47
			4 주	5°C	69
				40°C	68
			13 주	5°C	54
	수크로오스(2%) 만니톨(2%)	F	T0	동결건조	87
			4 주	5°C	82
				40°C	85
			13 주	5°C	88

[0257]

[0258] 예 4. 동결건조된 ENPP1 폴리펩티드 제형에서의 잔류 수분의 평가

[0259] 잔류 수분을 동결건조된 케이크에 대해 평가하였다. 모든 동결건조된 샘플은 시점 및 조건에 걸쳐 수분 함량이 매우 낮거나 전혀 없었다. 잔류 수분 함량은 0.0% 내지 0.3% 범위였다. 요약 데이터는 표 5에 나타나 있다.

표 5

동결건조된 샘플의 잔류 수분 함량

완충액	부형제	제형	시점	조건	수분 (%)
20 mM 숙신산염, 2 mM CaCl ₂ pH 6.0	수크로오스(9%)	A	T0		0.1
			4 주	5°C	0.1
				40°C	0.2
			13 주	5°C	0.2
	수크로오스(3%) 만니톨(1.5%)	B	T0		0.0
			4 주	5°C	0.1
				40°C	0.2
			13 주	5°C	0.0
	수크로오스(2%) 만니톨(2%)	C	T0		0.1
			4 주	5°C	0.1
				40°C	0.2
			13 주	5°C	0.0
20 mM 구연산염, 2 mM CaCl ₂ pH 6.0	수크로오스 (9%)	D	T0		0.3
			4 주	5°C	0.1
				40°C	0.2
			13 주	5°C	0.1
	수크로오스(3%) 만니톨(1.5%)	E	T0		0.1
			4 주	5°C	0.1
				40°C	0.2
			13 주	5°C	0.0
	수크로오스(2%) 만니톨(2%)	F	T0		0.0
			4 주	5°C	0.1
				40°C	0.1
			13 주	5°C	0.0

[0260]

[0261]

예 5: 베이스라인 완충액 평가

[0262]

ENPP1 폴리펩티드 제형의 안정성을 구연산염, 히스티딘, 인산염, 아세테이트, 중탄산나트륨, 숙신산염, 글리실 글리신, 및 트리스를 포함하는 후보 완충액의 패널을 사용하여 5.0-8.0의 pH 범위에 걸쳐 평가하였다. 이들 제형의 자가 완충 용량을 평가하기 위해, 샘플을 물로 완충액 교환하였다. 본 연구를 위해, ENPP1-Fc를 20 mM 아세테이트(pH 5.0), 숙신산염(pH 5.0 및 6.0), 구연산나트륨(pH 5.0, 6.0 및 7.0), 중탄산나트륨(pH 6.0 및 7.0), 히스티딘(pH 6.0 및 7.0), 인산칼륨(pH 7.0 및 8.0), 트리스(pH 7.0 및 8.0) 및 글리실글리신(pH 8.0) 완충액으로 완충액 교환하였다. ENPP1-Fc를 상기 식별된 제형화 완충액 중 하나로 완충액 교환하고, 0.5 mL 중 2 mg/mL로 농축시켰다. 농축 및 완충액 교환 후 단백질 회수율은, 물로 교환된 ENPP1-Fc 완충액을 제외하고, 약 70-100% 범위의 제형 간에 일반적으로 비슷하였다. 물 중의 완충액 교환된 ENPP1-Fc는 34% 회수율을 나타냈는데, 이는 ENPP1-Fc가 자가 완충 능력이 부족함을 나타낸다.

[0263]

ENPP1 폴리펩티드 제형의 열 안정성을 시차주사 형광측정(DSF)에 의해 모니터링하였으며, 이는 폴리펩티드의 용융 온도(T_m)에 관한 데이터를 제공한다. 2 mg/mL의 단백질 샘플에 대한 T_m 데이터를 수집하였다. 샘플을 20°C에서 30초 동안 평형화시키고, 250-500 nm(266 nm 여기 파장)의 고유 형광 스펙트럼의 무게중심 평균(BCM)을 모니터링하면서 0.5°C/분의 속도로 온도를 95°C로 증가시켰다. (미분 트레이스의 최대 또는 최소로 식별된) 펄스 이벤트 동안 BCM 내 온도 곡선의 변곡점을 해당 전이의 T_m 으로서 식별하였다. 또한, 266 nm 및 473 nm에서의 정적 광 산란(SLS) 강도를 DSF 측정과 병행하여 측정하여 각각 작고 큰 응집체 형성(Tagg)의 개시 온도를 관찰하였다. 상대 열 안정성은 완충액 유형 및 제형 pH 모두에 의해 영향을 받았다. 구연산염 pH 7.0, 인산염 pH 7.0/8.0, 중탄산나트륨 및 글리실글리신 샘플은 266 nm 또는 473 nm에서 상당한 광 산란을 나타내지 않았으며, 이는 이들 제형에 대한 응집의 명백한 결여를 나타낸다. 아세트산염, 숙신산염 pH 5.0, 구연산염 pH 5.0 및 트리스 pH 7.0 제형은 제형 전반에 걸쳐 가장 높은 Tagg를 나타냈다. 구연산염, 히스티딘 및 트리스 샘플의 경우, Tagg는 pH가 증가함에 따라 감소하였고, 인산염에 대한 Tagg는 pH의 변화에 민감하지 않은 것으로 나타났다. T_m 값은 놀랍게도 각 pH에 대한 완충액 유형과 관련하여 명확한 경향을 나타냈으며, 이는 pH 5.0 및 pH 6.0에서 숙신산염에 대해, pH 5.0 및 pH 6.0에서 인산염에 대해 더 큰 열 안정성을 나타낸다. 요약 DSF 데이터는 표 6에 나타나 있다.

표 6

베이스라인 완충액 DFS/SLS 데이터 요약

완충액	pH	제형	T_{agg} 266 nm (°C)	T_{agg} 473 nm (°C)	T_{onset} BCM (°C)	T_{m1} BCM (°C)
자기 (물)	N/A	A	62.4	62.1	43.9	55.4
20 mM 아세트이트	pH 5.0	B	80.6	80.2	39.7	54.6
20 mM 숙신산염	pH 5.0	C	77.7	79.5	40.5	57.4
	pH 6.0	D	65.7	66.2	53.5	62.8
20 mM 구연산염	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 중탄산나트륨	pH 6.0	H	ND	ND	45.4	57.0
	pH 7.0	I	ND	ND	44.7	56.6
20 mM 히스티딘	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 인산칼륨	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 트리스	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 글리실글리신	pH 8.0	P	58.4	61.2	48.0	57.2

ND: 매우 낮은 카운트로 인해 값이 결정되지 않음.

[0264]

[0265]

ENPP1 폴리펩티드 제형 샘플에 존재하는 응집체 및 분해 산물의 양을 평가하는 데 사용되는 크기 배제 크로마토그래피(SEC). 총 고분자량(HMW) 중, 저분자량(LMW) 중, 및 주요 피크 순도에 대한 풍부도 백분율을 보고한다. SEC 결과는 표 7 및 도 5에 요약되어 있다. SEC에 의한 분석 전에, 모든 샘플을 30°C에서 48시간 동안 인큐베이션하였다. HMW 종은 3.3 내지 14.5% 범위의 모든 제형에 존재하였다. HMW 종의 최저 수준이 중탄산나트륨 및 인

산염 제형에 대해 관찰되었다. 고차 HMW 종은 히스티딘 pH 7.0에서 가장 높았다.

표 7

요약 베이스라인 완충액 평가 크기 배제 크로마토그래피 데이터

완충액	pH	제형	% HMW	% 주요	% LMW	컬럼 회수율 (%) ^a	총 면적 (μV*s)
자기 (물)	0	A	6.2	93.3	0.5	94	8691405
20 mM 아세트레이트	5.0	B	4.6	95.4	ND	86	16192216
20 mM 숙신산염	5.0	C	5.1	94.9	ND	91	17757935
	6.0	D	3.3	96.5	0.3	99	20957945
20 mM 구연산염	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 중탄산나트륨	6.0	H	4.4	95.3	0.3	98	19623052
	7.0	I	3.9	95.7	0.3	97	20538912
20 mM 히스티딘	6.0	J	6.2	93.8	ND	95	20688528
	7.0	K	14.5	85.0	0.5	95	16752179
20 mM 인산칼륨	7.0	L	4.4	95.4	0.2	97	18897632
	8.0	M	4.0	95.8	0.2	98	19646363
20 mM 트리스	7.0	N	5.9	93.9	0.3	96	19059185
	8.0	O	5.7	93.9	0.4	98	18835534
20 mM 글리실글리신	8.0	P	4.0	96.0	ND	98	19571596
CC-15 출발 물질			6.4	92.9	0.7	98	18917341
CC-15 광 응력			48.4	50.5	1.1	101	19483433

^a컬럼 회수율 (%) = ((총 피크 면적/10⁶)*(유속/60)(흡광 계수*경로 길이))/(샘플

농도*주입 부피/10³)*100

[0266]

[0267]

요약하면, 베이스라인 완충액 평가 데이터는 ≤ pH 5.0, 및 ≥ pH 6.0을 포함하는 완충액 제형이 동결건조된 ENPP1 폴리펩티드 제형에 가장 큰 안정성을 제공한다는 것을 나타낸다. 히스티딘 pH 7.0은 시험된 다른 완충액 시스템보다 덜 바람직하다. 아세트산염은 동결건조된 제형을 필요한 범위에서 완충할 수 없다. 상기 데이터에 기초하여, 완충액을 pH 6 내지 pH 7의 pH 범위를 지지하는 것들(숙신산염, 구연산염, 중탄산염) 및 pH 7 내지 pH 8의 pH 범위를 지지하는 것들(인산염, 트리스, 글리실글리신)을 포함하는 2개의 체제로 비닝하였다. 제1 완충액 체제에서, 구연산염 제형은 (5℃ 정도의) 우수한 Tonset를 나타냈다. 제2 완충액 체제에서, 트리스 제형은 (2℃ 정도의) 우수한 Tonset를 나타냈다. 추가 제형 개발을 위해 선택된 pH 수준은 숙신산염, 구연산염 및 인산염 완충액 시스템을 사용하여 pH 6.0, pH 7.0 및 pH 8.0이었다. 각각의 완충액 유형에서, 5개의 상이한 약학적으로 허용 가능한 첨가제, 즉 아르기닌, NaCl, 수크로오스, 만니톨, 및 글리신을 평가하였다. 제안된 첨가제는 다양한 분자 부류(즉, 아미노산, 염, 당, 및 폴리올)를 포함한다.

[0268]

예 6: 약학적으로 허용 가능한 첨가제 스크리닝

[0269]

동결 건조된 ENPP1 폴리펩티드 제형의 안정성은 베이스라인 완충액 평가(20 mM 숙신산염, pH 6.0; 구연산염, pH

7.0, 및 인산염, pH 8.0)에 정의된 완충 시스템을 사용하여, 대략적인 등장성 농도에서 안정화 특성이 보고된 다양한 첨가제의 존재 하에 평가하였다. ENPP1-Fc를 150 mM NaCl, 150 mM L-아르기닌, 250 mM 수크로오스, 250 mM 만니톨 또는 200 mM 글리신 중 어느 하나를 함유하는 각각의 후보 완충액으로 완충액 교환하였다.

[0270] 첨가제를 함유하는 ENPP1-Fc의 제형에 대한 DSF/SLS 데이터는 첨가제가 266 및 473 nm(SLS) 모두에서 Tm(DSF) 및 Tagg에 의해 평가했을 때 열 안정성에 큰 영향을 미치지 않았음을 나타냈다. 전반적으로, DSF 데이터는 대부분의 제형에 대해 유사한 용융 온도 및 더 큰 응집체의 명백한 결여를 나타냈다.

[0271] SEC 데이터(표 8 및 도 6에 요약됨)는 글리신 및 NaCl/아르기닌 조합이 제형 전반에 걸쳐 가장 높은 %의 HMW 종을 생성하였음을 나타냈다. pH 6.0 및 pH 7.0의 NaCl, 및 아르기닌 pH 6.0은 수크로오스와 유사하게 행동하였다. 수크로오스는 시험된 제형 각각에 걸쳐 최소 %의 HMW 종($\leq 5.3\%$)을 생성하였다. SEC 데이터는 수크로오스를 함유하는 제형이 가장 높은 전체 안정성을 제공하였음을 입증한다.

표 8

SEC 첨가제 스크린 요약 데이터

완충액	부형제	제형	% HMW	% 주요	% LMW	컬럼 회수율 (%) ^a	총 면적 ($\mu\text{V}\cdot\text{s}$)
숙신산염 pH 6.0	NaCl	A	5.3	94.4	0.3	99	19084426
	아르기닌	B	4.7	94.9	0.3	98	18440146
	수크로오스	C	4.6	94.9	0.5	99	18651298
	만니톨	D	5.1	94.3	0.6	98	19005559
	글리신	E	7.1	92.6	0.3	98	18936695
구연산염 pH 7.0	NaCl	F	5.7	93.9	0.4	97	18937420
	아르기닌	G	8.4	91.1	0.4	96	18724123
	수크로오스	H	5.2	94.4	0.4	97	19198190
	만니톨	I	5.9	93.7	0.4	98	19285938
	글리신	J	10.4	89.3	0.4	96	18259087
인산염 pH 8.0	NaCl	K	7.1	92.7	0.2	98	19447707
	아르기닌	L	6.8	92.9	0.3	97	19095422
	수크로오스	M	5.3	94.4	0.2	99	19455680
	만니톨	N	8.1	91.7	0.2	98	19564507
	글리신	O	14.9	84.8	0.3	96	18730132
히스티딘 pH 6.0	아르기닌 / NaCl	P	15.7	83.8	0.4	93	18378845
출발 물질			8.1	91.5	0.4	96	18756246

^a컬럼 회수율 (%) = ((총 피크 면적/ 10^6)*(유속/60)/(흡광 계수*경로 길이))/(샘플

농도*주입 부피/ 10^3)*100

[0272]

[0273] 예 7: 동결건조된 ENPP1 폴리펩티드 제형에 대한 용해도 스크리닝

[0274] 동결건조된 ENPP1 폴리펩티드 제형의 최대 용해도에 대한 조건을 확립하기 위해, 20 mM 숙신산염 pH 6.0, 구연산염 pH 5.0 및 pH 6.0, 중탄산나트륨 pH 7.0 및 히스티딘 pH 6.0을 등장성 농도의 수크로오스, 프롤린 및 NaCl의 존재 하에 사용하였다. 완충액 교환 및 농축 후, 샘플을 2개의 동일한 부피의 분취액으로 나누고, 분취액 중 하나를 40°C에서 약 ~7일 동안 열 응력을 가하고, 다른 하나를 5°C에서 유지시켰다. 열 응력 및 5°C 샘플을 효

소 활성에 대해 평가하고, SEC에 의해 HMW 종의 형성에 대해 평가하였다. 각 샘플의 활성을 평가하는 데 사용된 효소 검정은 ENPP1-Fc를 pNP-TMP와 혼합함으로써 수행하였다. 생성물 형성(pNP)을 25℃에서 5분 동안 405 nm에서 분광 광도계로 모니터링한다. ENPP1-Fc의 비활성은 각 샘플 제제에 대해 수득된 시간 경과에 따른 흡광도의 변화를 pNP의 알려진 농도의 표준 곡선에 보간함으로써 계산된다. 결과는 기준 샘플 물질에 대해 보고되며, 여기서 단위는 시간(분)에 걸쳐 생성된 생성물의 몰에 해당한다. 용해도 스크린 효소 활성 검정 결과가 표 9 및 도 7에 나타나 있다. pH 6.0을 포함하는 제형은 이들 샘플 각각에 대해 관찰된 강화된 효소 활성에 언급된 바와 같이 증가된 열 안정성을 나타냈다. 40℃에서 인큐베이션한 pH 5.0의 구연산염 값은 샘플의 젤리화로 인해 결정되지 않았다. 전반적으로, 효소 활성은 pH 6.0의 숙신산염 및 구연산염이 5℃ 대 40℃ 배양 샘플을 비교할 때 평가된 첨가제 전반에 걸쳐 가장 우수한 완충액 유형임을 시사한다.

표 9

효소 활성 검정 용해도 스크리닝 데이터 요약

완충액	pH	부형제	제형	조건	U/mL	U/mg
20 mM 숙신산염	pH 6.0	250 mM 수크로오스	A	5°C	9.8	9668
				40°C	11.8	11721
		250 mM 프롤린	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 구연산염	pH 5.0	250 mM 수크로오스	D	5°C	8.9	8905
				40°C	ND	ND
		250 mM 프롤린	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 수크로오스	G	5°C	10.1	9612
				40°C	11.7	11127
		250 mM 프롤린	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 중탄산나트륨	pH 7.0	250 mM 수크로오스	J	5°C	8.6	8291
				40°C	6.5	6309
		250 mM 프롤린	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 히스티딘	pH 8.0	100 mM Arg/ 50 mM NaCl	M	5°C	9.6	9704
				40°C	10.0	10113
출발 물질					10.3	10459

ND: 결정되지 않음

[0275]

[0276]

SEC에 의해 결정된 HMW 종의 형성은 효소 활성 스크리닝에서 관찰된 경향과 일치하였다. pH 6.0의 숙신산염 및 구연산염은 제형에 사용된 첨가제와 독립적으로 가장 낮은 %HMW를 나타냈다. 40℃에서의 구연산염 pH 6.0은 다른 모든 40℃ 샘플보다 우수하였다. 구연산염 pH 5.0 중 프롤린 및 NaCl, 및 중탄산나트륨 pH 7.0은 전반적으로 가장 높은 %HMW 종을 생성하였다. 요약 SEC 용해도 스크린 데이터는 표 10 및 도 8에 도시되어 있다.

표 10

SEC 용해도 스크린 데이터 요약

완충액	pH	부형제	제형	HMW (%)	주 피크 (%)	LMW (%)	총 면적 ($\mu V \cdot s$)
20 mM 숙신산염	pH 6.0	250 mM 수크로오스	A	6.0	93.8	0.2	50123877
		250 mM 프롤린	B	6.3	93.5	0.2	35728620
		150 mM NaCl	C	5.9	93.8	0.2	35824216
20 mM 구연산염	pH 5.0	250 mM 수크로오스	D	8.2	91.5	0.3	39059229
		250 mM 프롤린	E	14.6	85.0	0.4	27138683
		150 mM NaCl	F	11.7	88.0	0.3	28169043
	pH 6.0	250 mM 수크로오스	G	5.3	94.5	0.2	52451719
		250 mM 프롤린	H	5.1	94.7	0.3	30695670
		150 mM NaCl	I	5.5	94.3	0.3	41407595
20 mM 중탄산나트륨	pH 7.0	250 mM 수크로오스	J	13.6	86.2	0.2	43615676
		250 mM 프롤린	K	16.5	83.3	0.2	51379433
		150 mM NaCl	L	12.5	87.3	0.2	34932916
20 mM 히스티딘	pH 6.0	100 mM Arg/50 mM NaCl	M	5.7	94.0	0.3	33330444

[0277]

[0278]

예 8: 계면활성제 스크린

[0279]

동결건조된 ENPP1 폴리펩티드 제형에 사용하기 위한 우수한 계면활성제를 식별하기 위해, ENPP1-Fc를 3개의 염기 제형(숙신산염/수크로오스 pH 6.0, 숙신산염/NaCl pH 6.0 및 구연산염/수크로오스 pH 7.0) 및 대조군 제형(히스티딘/아르기닌/NaCl pH 6.0)으로 완충액 교환하였다. 제형 샘플은 동결-해동 사이클 및 기계적 응력을 통해 응력을 받았고, 또한 2개의 작은 분취액을 무응력 대조군으로서 남겨 두었다. 동결 해동 사이클링 샘플을 -80°C 에서 ≥ 60 분 동안 냉동시키고 실온에서 해동하였다. 이 공정을 총 5 사이클 동안 반복하였다. 교반 응력을 위해, 샘플을 실온에서 약 ~72시간 동안 차광하여 약 ~600 rpm으로 설정된 마이크로플레이트 셰이커 상에 두었다.

[0280]

응력이 가해진 샘플의 안정성/응집을 평가하기 위해, 효소 활성을 측정하고 SEC-HPLC를 수행하였다. 모든 스트레스 조건 및 제형에 대한 계면활성제 전반에 걸친 효소 활성은 비슷하였는데, 이는 ENPP1-Fc의 효소 활성이 시험된 조건 하에서 영향을 받지 않았음을 나타낸다. 계면활성제 연구에 대한 SEC 평가는 표 11, 도 9a 및 도 9b에 도시되어 있다. 모든 제형에 걸친 %HMW 함량은 계면활성제가 동결/해동 응력에 제출된 샘플에 영향을 미치지 않았음을 나타내는데, 이는 응력이 가해진 샘플과 각각의 대조군 간에 값이 동등한 것으로 나타났기 때문이다. 교반 응력이 가해진 샘플의 경우, P188 샘플은 3개의 시험된 계면활성제 중 가장 덜 안정적이었다. PS20은 교반 응력 하에서 우수한 안정성을 제공하였고, 3개의 시험된 계면활성제에 걸쳐 감소된 %HMW 함량을 생성하였다. 이들 데이터는 계면활성제의 존재 및 유형이 물리적 응력에 이어서 ENPP1-Fc 안정성에 영향을 미친다는 것을 나타낸다. SEC는 PS20이 50 mg/mL에서 EnPP1-Fc 안정성에 대한 최적의 계면활성제 유형임을 입증한다. 교반 후,

P188은 대부분의 부형제/완충제 유형 조합에서 총 고차 응집체의 상승된 수준을 나타냈다.

표 11

계면활성제 스크리닝 SEC 데이터 요약

완충액	pH	부형제	제형	계면활성제	조건	% HMW	% 주요	% LMW	컬럼 회수	총 면적 ($\mu\text{V}\cdot\text{s}$)
20 mM 숙신산염	pH 6.0	250 mM 수크로오스	A	-	교반	8.9	90.8	0.3	101	3480
					교반 대조군	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	교반	7.8	92.0	0.3	98	3365
					교반 대조군	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	교반	8.1	91.6	0.3	98	3415
					교반 대조군	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	교반	8.9	90.9	0.3	87	3332
					교반 대조군	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	-	교반	7.7	92.0	0.3	99	3346
					교반 대조군	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	교반	7.2	92.5	0.3	90	3406

[0281]

					교반 대조군	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	교반 대조군	7.5	92.2	0.3	90	3433
					교반 대조군	7.0	92.7	0.3	91	3278
					F/T	5.6	94.1	0.3	90	3562
					5°C	5.8	93.9	0.3	90	3631
			H	0.1% P188	교반	8.2	91.5	0.3	92	3309
					교반 대조군	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 구연산염	pH 7.0	250 mM 수크로오스	I	-	교반	9.9	89.8
교반 대조군	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	교반				9.5	90.2	0.3	93	3339
		교반 대조군				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	교반				9.7	90.0	0.3	101	3304
		교반 대조군				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	교반				10.8	88.8	0.4	91	3268

[0282]

					교반 대조군	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 히스티딘	pH 6.0	100 mM Arg/50 mM NaCl	M	-	교반	8.6	91.0	0.3	101	3329
					교반 대조군	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
출발 물질						4.9	94.8	0.3	102	3590

[0283]

[0284]

[0285]

예 9: 보조인자 스크리닝

20 mM 숙신산염, 250 mM 수크로오스, pH 6.0 중 11개의 상이한 보조인자 조합(비 보조인자 음성 대조군 포함)을

조사하였다. 시험된 보조인자는 염화물 및 황산염을 반대 이온으로 갖는 Zn²⁺ 및 Ca²⁺뿐만 아니라 아데노신 일인산(AMP)을 포함하였다. SEC 실험은 각각의 보조인자 조합에 대해 수행하였다. SEC 데이터는 표 12에 요약되어 있다. 도 10. 이들 데이터는 AMP/ZnCl₂이 가장 낮은 수준의 %HMW를 나타냈음을 입증한다. 그러나, 시험된 보조인자의 경우, 염화물 또는 황산염이 반대 이온으로 가진 AMP, Ca²⁺의 부재는 가장 낮은 %HMW 함량을 생성하였다. Ca²⁺ 보조인자는 놀랍게도 ENPP1-Fc를 안정화시켰지만, 또한 샘플 제조 동안 잠재적으로 형성된 고차 응집 중을 역전시키는 능력을 입증하였다. 이들 효과는 제형 A와 제형 C를 비교함으로써 관찰된다(도 11). 아연은 가장 높은 수준의 %HMW 함량을 생성하였지만, 아연의 존재 하의 %HMW는 AMP의 첨가에 의해 상당히 감소되어, 모든 샘플, 제형 A를 생성하는 데 사용된 소스 물질의 %HMW 수준 미만으로 %HMW 수준을 감소시킨다. 이러한 결과는 보조인자의 존재 및 유형이 놀랍게도 ENPP1-Fc의 안정성을 상당히 증가시킨다는 것을 나타낸다.

표 12

보조인자 스크리닝 보조인자 조합 요약 SEC 데이터

완충액	양식	샘플 유형	보조인자	HMW (%)	주요 (%)	LMW (%)	컬럼 회수율 (%)	USP 플레이트 수	총 면적 (μV*s)	농도 (mg/mL)
20 mM 숙신산염 250 mM 수크로오스 0.05% PS20 pH 6.0	A	완충액-교환	-	18.8	80.9	0.3	97	3607		50.5
	B		2 mM ZnCl ₂	71.0	28.8	0.2	95	3300		49.9
	C		2 mM CaCl ₂	11.5	88.2	0.3	99	3523		50.6
	D		2 mM ZnCl ₂ + 2 mM CaCl ₂	72.5	27.3	0.2	96	3368		52.1
	E	스파이크된 제형 A	2 mM ZnCl ₂	46.8	53.0	0.2	99	3644		50.6
	F		2 mM CaCl ₂	12.1	87.4	0.5	97	3540		51.4
	G		2 mM ZnCl ₂ + 2 mM CaCl ₂	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 ₂ + 50	8.4	91.2	0.4	-	3396		44.0

[0286]

[0287]

			mM AMP							
--	--	--	--------	--	--	--	--	--	--	--

[0288]

총 15개의 상이한 완충액/보조 인자 조합을 추가로 조사하였다. ENPP1-Fc를 12개의 상이한 제형으로 완충액 교환하였다. 다양한 제형에서 단백질의 안정성을 SEC에 의해 평가하였다. SEC 분석 전에, 샘플을 40℃에서 6일 동안 보관하였다. 각 제형에 대한 대조군 샘플을 연구 기간 동안 5℃에서 유지하였다. SEC 데이터는 표 13 및 도 12a-b 요약되어 있다. 위에 제시된 보조인자 데이터와 일관되게, Ca²⁺ 및 Ca²⁺/아데노신 모노포스페이트는 시험된 샘플에 걸쳐 가장 낮은 양의 고차 응집체를 생성하였다. 구연산염 및 수크로오스와 조합될 때, Ca²⁺ 및 Ca²⁺/아데노신 모노포스페이트는 각각 가장 낮은 백분율(8.6%)의 HMW를 생성하였는데, 이는 Ca²⁺ 및 Ca²⁺/아데노신 모노포스페이트가 우수한 보조인자임을 나타내며, 이는 구연산염 및 수크로오스와 함께 사용될 때, 놀랍게도 제형의 전체 안정성을 향상시킨다.

표 13

보조 인자 스크리닝 완충액/보조 인자 요약 SEC 데이터

완충액	부형제	제형	HMW (%)	주 피크 (%)	LMW (%)
20 mM 숙신산염, 250 mM 수크로오스 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 구연산염, 250 mM 수크로오스 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 구연산염, 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

[0289]

[0290]

예 10: 바람직한 동결건조 ENPP1 폴리펩티드 제형의 특성 분석

[0291]

위에 제시된 특성 분석 및 안정성 데이터에 기초하여, 바람직한 동결건조된 ENPP1 폴리펩티드 제형은 숙신산염 및 구연산염을 포함한다. 이들 바람직한 제형은 표 13에 열거되어 있고, 시간 경과에 따른 폴리펩티드 안정성을 추가로 특성화하였다. pH는 구연산염을 포함하는 각 제형 샘플에 대해 pH 6.3±0.1이고, 숙신산염을 포함하는 각 샘플에 대해 pH 6.1±0.1인 것으로 결정하였다. 숙신산염 또는 구연산염을 포함하는 ENPP1-Fc 샘플에 대해 삼투질 농도를 측정하였고, 모든 샘플에 대한 삼투질 농도 값은 265 내지 432 mOsm/kg 범위였다. 요약 데이터는 도 13에 도시되어 있다. 이들 제형에 대한 ENPP1-Fc의 주 피크 순도 및 고차 응집체를 SEC에 의해 평가하였다.

결과는 도 14에 도시되어 있다. 제형 A, B, C, E 및 F에서, 동결건조된 ENPP1-Fc 및 대조군은 모든 시점 및 조건에 걸쳐 > 94%의 상대 주요 피크 순도를 나타냈다. 5°C에서 보관한 13주 시점에서의 숙신산염 샘플은 % HMW 함량의 1% 증가를 나타낸 반면, 구연산염 샘플은 %HMW의 약 0.5% 증가를 나타냈다. 입자 크기 분포 및 형태를 마이크로 유동 이미징 분석(MFI)에 의해 평가하였다. MFI에서, 연속 샘플 스트림이 현미경 시스템의 시야에 위치한 유동 세포를 통과함에 따라 광시야 현미경 이미지를 연속 프레임으로 캡처한다. 샘플에 존재하는 입자의 이미지는 크기 및 계수에서 정량화를 허용하는 이미지 형태 분석 소프트웨어에 의해 처리된다. 대표적인 이미지 및 입자 농도(mL 당)를 $\geq 2 \mu\text{m}$, $\geq 5 \mu\text{m}$, $\geq 10 \mu\text{m}$, $\geq 25 \mu\text{m}$ 등가 원형 직경(ECD) 크기 빈에 대해 보고하였다. 물체의 ECD는 μm 로 표현되고 입자와 동일한 2차원 표면적을 차지하는 구체의 직경을 나타낸다. 결과는 표 14에 요약되어 있다. 총 입자 수는 일반적으로 모든 제형에 대해 허용 가능한 한계 내에 있었다. $\geq 10 \mu\text{m}$ ECD 빈에 대한 총 입자 수는 모두 749 미만이었고 $\geq 25 \mu\text{m}$ ECD 빈에 대한 총 입자 수는 모두 132 미만이었으며, 이는 본원에 개시된 제형에 더 큰 크기의 미립자가 없음을 나타낸다.

표 14

MFI 요약 데이터

완충액	부형제	제형	시점	조건	mL 당 총 입자 수			
					≥ 2	≥ 5	≥ 10	≥ 25
20 mM 숙신산염, 2 mM CaCl ₂ pH 6.0	수크로오스 (9%)	A	T0	-75°C - 대조군	1505	117	26	7
				동결건조	2902	767	214	12
			4 주	-75°C - 대조군	1835	582	201	34
				5°C	2301	830	320	35
				40°C	1210	398	123	16
			13 주	5°C	4068	1223	231	23
	수크로오스(3%) 만니톨(1.5%)	B	T0	-75°C - 대조군	720	90	17	1
				동결건조	2753	763	267	42
			4 주	-75°C - 대조군	2482	800	304	36
				5°C	1395	446	150	22
				40°C	839	218	77	8
			13 주	5°C	2090	652	142	31
	수크로오스(2%) 만니톨(2%)	C	T0	-75°C - 대조군	2280	659	210	26

[0292]

				동결건조	2634	617	201	23
			4 주	-75°C - 대조군	2953	976	346	65
				5°C	3900	976	297	33
				40°C	877	211	70	15
			13 주	5°C	2127	615	99	4
20 mM 구연산염, 2 mM CaCl ₂ pH 6.0	수크로오스 (9%)	D	T0	-75°C - 대조군	306	81	36	11
				동결건조	3574	386	92	9
			4 주	-75°C - 대조군	234	73	31	7
				5°C	818	214	61	10
				40°C	1836	754	302	29
			13 주	5°C	4033	1951	749	132
	수크로오스(3%) 만니톨(1.5%)	E	T0	-75°C - 대조군	188	48	17	5
				동결건조	1235	195	67	10
			4 주	-75°C - 대조군	2805	1174	349	34
				5°C	1389	411	140	22
				40°C	2090	850	326	47

[0293]

	수크로오스(2%) 만니톨(2%)	F	13 주	5°C	1842	566	121	23
			T0	-75°C - 대조군	718	289	114	26
				동결건조	2285	357	117	8
			4 주	-75°C - 대조군	1683	639	212	22
				5°C	1522	406	123	15
				40°C	1156	357	107	6
			13 주	5°C	3182	1283	492	95

[0294]

[0295]

상기 보고된 데이터에 기초하여, 20 mM 구연산염, 88 mM 수크로오스, 82 mM 만니톨, 2 mM 염화칼슘, 0.05% PS20 pH 6.3(제형 A) 및 20 mM 구연산염, 263 mM 수크로오스, 2 mM 염화칼슘, 0.05% PS20 pH 6.3(제형 B)을 동결건조된 ENPP1-Fc에 가장 적합한 제형으로서 선택하였다. 이들 제형을 다양한 보관 조건에서 동결건조된 폴리캡티드 안정성에 대한 이들의 장기적인 효과에 대해 추가로 조사하였다. 2개의 제형을 3개월의 기간에 걸쳐 5℃, 25℃, 및 40℃의 3개의 상이한 보관 조건에서 시험하였다. 3개월 후, ENPP1-Fc를 함유하는 모든 동결건조된 케이크는 상아색의 온전한 구조를 나타냈다. 재구성 후, 액체 외관은 모든 샘플 유형에 대해 갈색을 띤 노란색으로, 투명하고, 눈에 보이는 미립자가 없는 것으로 관찰되었다. 재구성은 상기 제시된 데이터와 일치하는 윈도우 내에서 발생하였으며, 동결건조된 샘플의 완전한 재구성은 59초 내지 108초 이내에 발생하였다. 시간 경과에 따른 온도 조건에 걸쳐 두 제형 모두에 대한 수분 함량은 또한 상기 제시된 수분 함량 데이터와 일관되게 유지되었다. 시험된 모든 보관 온도의 모든 동결건조된 샘플 시점은 시점 및 조건에 걸쳐 수분 함량이 매우 낮거나 전혀 없었으며, 잔류 수분 함량은 0.0% 내지 0.3% 범위였다. 각 보관 조건의 각 샘플에 대한 pH 값 또한 시간 경과에 따라 일관되게 유지되었고, 샘플 pH는 3개월의 과정에 걸쳐 $pH\ 6.3 \pm 0.1$ 로 유지되었다. 50 mg/mL 정규화된 시작 농도에 대한 단백질 회수율도 각 샘플에 대해 측정하였다. 요약 단백질 회수 데이터는 표 15에 제시되어 있다. 각 샘플의 회수율은 0 시점 양성 대조군에 대한 회수 데이터와 일치하였다. 제로 시점 양성 대조군은 40.1 mg/mL의 농도를 갖는 것으로 측정되었다. 회수된 모든 샘플은 양성 대조군 샘플의 농도보다 0.3 mg/mL 이내, 또는 양성 대조군 샘플의 농도보다 8.8 mg/mL 이내의 농도를 나타냈다. 이들 데이터는 단백질 회수가 5℃, 25℃, 및 40℃ 보관 조건 하에서 시간 경과에 따라 분해되지 않음을 나타낸다.

표 15

5℃, 25℃, 및 40℃에서 3개월에 걸친 바람직한 제형 단백질 회수 데이터 요약

샘플	공칭 농도 (mg/mL)	재구성 총진 부피 (mL)	시점	조건	A280에 의한 회수율 (mg/mL)
제형 A	50.0	0.5	T0	냉동 대조군	47.5
				동결건조	40.1
			1개월	냉동 대조군	43.4
				5℃	43.1
				25℃	40.2
				40℃	39.8
			3개월	냉동 대조군	46.8
				5℃	43.9
				25℃	40.7
				40℃	46.3
제형 B	50.0	0.5	T0	냉동 대조군	53.9
				동결건조	48.5
			1개월	냉동 대조군	52.7
				5℃	48.0
				25℃	47.1
				40℃	48.9
			3개월	냉동 대조군	55.3
				5℃	49.4
				25℃	48.9
				40℃	49.9

[0296]

[0297]

SEC 실험을 수행하여, 바람직한 제형의 샘플을 5℃, 25℃, 및 40℃에서 보관한 후 3개월의 기간에 걸쳐 HMW 중의 발생 경향을 특성화하였다. 총 HMW 중, LMW 중, 및 주 피크 중에 대한 풍부도 백분율에 관한 요약 SEC 데이터는 표 16에 보고되어 있다. 도 15는 보관 조건 당, 시간 경과에 따른 풍부도 HMW 백분율 및 풍부도 주 피크 백분율에 대한 요약 SEC 데이터를 도시한다. 양성 대조군 0 시점 샘플은 약 4% HMW 함량을 가졌다. 모든 바람직한 제형 샘플은 대조군과 일관되게 유지되었으며, 각각은 5℃, 25℃, 및 40℃ 보관 조건 하에서 3개월의 기간에 걸쳐 $\pm 5\%$ HMW 함량을 갖는다. 이들 결과는 각각의 바람직한 제형이 놀랍게도 적어도 3개월의 연장된 시간 동안

고분자량 응집 종의 형성을 방지할 수 있음을 나타낸다. 이들 데이터는 또한, 바람직한 제형이 25°C 및 40°C와 같은 더 높거나 비냉장된 온도에서 보관될 때에도 HMW 종의 형성에 대해 동결건조된 폴리펩티드를 안정화시킬 수 있음을 나타낸다.

표 16

5°C, 25°C, 및 40°C 에서 3 개월에 걸쳐 바람직한 제형에 대한 SEC 데이터 요약

샘플	공칭 농도 (mg/mL)	재구성 충진 부피 (mL)	샘플 유형	시점	조건	HMW (%)	주 피크 순도 (%)	LMW (%)
제형 A	50.0	0.5	동결 건조	T0	냉동 대조군	3.8	95.7	0.5
					동결 건조	3.7	95.8	0.5
				1 개월	냉동 대조군	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 개월	냉동 대조군	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
제형 B	50.0	0.5	동결 건조	T0	냉동 대조군	3.9	95.5	0.6
					동결 건조	3.9	95.6	0.5
				1 개월	냉동 대조군	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 개월	냉동 대조군	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

[0298]

[0299]

각 시점 및 보관 조건에 상응하는 모든 바람직한 제형 샘플에 대한 비활성을 전술한 효소 활성 스크리닝을 사용하여 평가하였다. 요약 데이터는 표 17에 나타나 있다. 활성 데이터를 냉동 대조군을 포함하는 각 샘플에 대해 시간 경과에 따라 도시하였다. 대표적인 활성 대 시간 도표는 도 16에 도시되어 있다. 시점 및 보관 조건에 걸친 모든 샘플은 양성 대조군과 일관된 수준의 효소 활성을 나타냈으며, 활성 수준은 $46009 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ 내지 $73173 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ 범위였다.

표 17

5°C, 25°C, 및 40°C 에서 3 개월에 걸쳐 바람직한 제형에 대한 효소 활성 데이터

요약

샘플	공칭 농도 (mg/mL)	총진 부피 (mL)	샘플 유형	시점	조건	비활성 ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)	표준 편차			
제형 A	50.0	0.5	동결건조	T0	냉동 대조군	54374	2181			
					동결건조	50840	3443			
				1 개월	냉동 대조군	46899	1679			
					5°C	50717	2480			
					25°C	46009	1776			
					40°C	49521	2633			
				3 개월	냉동 대조군	75625	344			
					5°C	69830	1623			
					25°C	73173	1233			
					40°C	68859	611			
제형 B				50.0	0.5	동결건조	T0	냉동 대조군	56227	3859
								동결건조	75734	911
							1 개월	냉동 대조군	49683	481
								5°C	49343	652
	25°C	55132	3391							
	40°C	52421	1210							
	3 개월	냉동 대조군	67093				385			
		5°C	68920				2554			
		25°C	76087				803			
		40°C	78107				2883			

[0300]

[0301]

모든 바람직한 제형 시점 샘플에 대한 입자 크기 분포 및 형태를 MFI 분석에 의해 평가하였다. 대표적인 이미지 및 입자 농도(mL 당)를 $\geq 2\ \mu\text{m}$, $\geq 5\ \mu\text{m}$, $\geq 10\ \mu\text{m}$, $\geq 25\ \mu\text{m}$ ECD 크기 빈에 대해 보고하였다. 결과는 표 18에 요약되어 있다. 총 입자 수는 놀랍게도 전술한 MFI 결과에서 관찰된 것보다 훨씬 낮았으며, 모든 바람직한 제형 샘플에 대해 허용 가능한 한계 내에 있었다. $\geq 10\ \mu\text{m}$ ECD 빈에 대한 총 입자 수는 모두 146 미만이었고, $\geq 25\ \mu\text{m}$ ECD 빈에 대한 총 입자 수는 모두 21 미만이었으며, 이는 본원에 개시된 바람직한 제형이 이전 MFI 분석에 기술된 다른 제형 조합과 비교했을 때 더 큰 크기의 미립자를 거의 10배 감소시킬 수 있음을 나타낸다.

표 18

5°C, 25°C, 및 40°C 에서 3 개월에 걸쳐 바람직한 제형에 대한 MFI 데이터 요약

샘플	공칭 농도 (mg/mL)	총진 부피 (mL)	샘플 유형	시점	조건	총 입자 수/mL			
						≥ 2	≥ 5	≥ 10	≥ 25
제형 A	50.0	0.5	동결건조	T0	냉동 대조군	2128	504	103	14
					동결건조	27676	2200	20	8
				1 개월	냉동 대조군	1473	523	146	10
					5°C	2033	675	101	10
					25°C	1856	571	80	12
					40°C	2037	735	142	21
				3 개월	냉동 대조군	2760	410	93	10
					5°C	521	76	14	0
					25°C	412	70	21	0
					40°C	424	45	0	0
제형 B	50.0	0.5	동결건조	T0	냉동 대조군	591	103	37	0
					동결건조	28553	1961	43	6
				1 개월	냉동 대조군	1134	412	86	8
					5°C	2393	354	35	2
					25°C	3124	379	21	0
					40°C	1864	360	39	0
				3 개월	냉동 대조군	1114	140	29	0
					5°C	1988	64	12	2
					25°C	564	27	6	0
					40°C	342	76	19	2

[0302]

[0303]

상기 제형 개발 연구는 응력이 가해진 조건 및 응력이 가해지지 않은 조건 모두에서 ENPP1-Fc 제형의 최적의 화학적, 물리적 및 구조적 안정성을 초래할 제형 성분의 식별에 초점을 맞추었다. 다수의 완충액 유형, pH 조건, 부형제, 및 계면활성제 농도를 베이스라인 완충액, 부형제, 용해도, 계면활성제, 및 보조인자 연구의 과정에 걸쳐 반복 방식으로 평가하였다. 본원에 개시된 동결건조된 제형 연구의 결과에 기초하여, 20 mM 구연산염 pH 6.3, 88 mM 수크로오스, 82 mM 만니톨, 2 mM 염화칼슘, 0.05% PS20 및 20 mM 구연산염 pH 6.3, 263 mM 수크로오스, 2 mM 염화칼슘, 0.05% PS20을 ENPP1-Fc에 가장 적합한 제형으로서 선택하였다. 이들 바람직한 제형은 50 mg/mL 동결건조 폴리펩티드 제형의 목표 농도에서 ENPP1-Fc에 최대 화학적, 물리적 및 입체적 안정성을 제공한다.

[0304]

또한, 또 다른 예시적인 제형은 (제형 C1): 50 mg/mL의 ENPP1 폴리펩티드, 약 pH 6.3의 20 mM 구연산염, 2 mM 염화칼슘, 175 mM 수크로오스, 82 mM (D) 만니톨, 및 0.05% w/v 폴리소르베이트 20을 시험하였다. 이 제형은 3 가지 상이한 보관 조건에서 12개월에 걸쳐 다양한 보관 조건에서 동결건조된 ENPP1-Fc 폴리펩티드 안정성에 대한 이의 장기 효과에 대해 조사하였다: 5°C, 25°C, 및 40°C. 3개월 증분 후, ENPP1-Fc를 함유하는 동결건조된 케이크는 상아색의 온전한 구조를 나타냈다. 재구성 후, 액체 외관은 모든 샘플 유형에 대해 갈색을 띤 노란색으로, 투명하고, 눈에 보이는 미립자가 없는 것으로 관찰되었다. 재구성은 상기 제시된 데이터와 일치하는 원도우 내에서 발생하였으며, 동결건조된 샘플의 완전한 재구성은 2 내지 3분 이내에 발생하였다. 시간 경과에 따른 온도 조건에 걸친 수분 함량도 일관되게 유지되었다. 시험된 모든 보관 온도의 모든 동결건조된 샘플 시점은 시점 및 조건에 걸쳐 수분 함량이 매우 낮거나 전혀 없었으며, 잔류 수분 함량은 0.0% 내지 0.16% 범위였다. 각 보관 조건의 각 샘플에 대한 pH 값 또한 시간 경과에 따라 일관되게 유지되었고, 샘플 pH는 3개월의 과정에 걸쳐 pH 6.3±0.1로 유지되었다.

[0305]

크기 배제 크로마토그래피(SEC)를 사용하여 ENPP1 폴리펩티드 제형 샘플에 존재하는 응집체 및 분해 산물의 양을 평가하였다. 총 고분자량(HMW) 중, 저분자량(LMW) 중, 및 십이(12) 개월(5°C 및 25°C) 및 6개월(40°C) 기간에 걸친 주 피크 순도에 대한 풍부도 백분율.

표 19

5°C 에서 12 개월에 걸친 제형 C1 에 대한 요약된 효소 활성 데이터

분석 절차	단위	시간 0	1 개월	3 개월	6 개월	9 개월	12 개월
비활성	U/mg - umol/분*mg	90.10	98.30	96.40	81.80	99.90	90.90
SE- HPLC HMWS	면적 %	3.8	4.1	4.0	4.0	3.8	3.6
SE- HPLC LMWS	면적 %	<0.3	<0.3	<0.3	<0.3	<0.3	<0.3
SE- HPLC 주 피크	면적 %	96.1	95.8	95.8	95.9	96.1	96.3

[0306]

표 20

25°C 에서 12 개월에 걸친 제형 C1 에 대한 요약된 효소 활성 데이터

분석 절차	단위	시간 0	1 개월	3 개월	6 개월	9 개월	12 개월
비활성	U/mg - umol/분*mg	90.10	101.80	91.20	86.70	101.40	92.70
SE- HPLC HMWS	면적 %	3.8	4.3	4.4	4.4	4.2	3.9
SE- HPLC LMWS	면적 %	<0.3	<0.3	<0.3	<0.3	<0.3	<0.3
SE- HPLC 주 피크	면적 %	96.1	95.6	95.4	95.4	95.7	96.0

[0307]

표 21

40°C 에서 6 개월에 걸친 제형 C1 에 대한 요약된 효소 활성 데이터

분석 절차	단위	시간 0	1 개월	3 개월	6 개월
비활성	U/mg - umol/분*mg	90.10	102.90	96.0	85.90
SE- HPLC HMWS	면적 %	3.8	4.5	4.9	5.0
SE- HPLC LMWS	면적 %	<0.3	<0.3	<0.3	<0.3
SE- HPLC 주 피크	면적 %	96.1	95.3	94.9	94.8

[0308]

[0309]

비활성 및 SEC 데이터는 제형 A 및 B(상기)와 같은 제형 C1이 ENPP1-Fc에 대해, 특히 온도 범위에 걸쳐 그리고 적어도 12개월 동안 현저한 전체 안정성을 제공한다는 것을 입증한다.

[0310]

예 11: 동결건조된 ENPP1 폴리펩티드 제형을 사용한 처리

[0311]

ENPP1-Fc는 개시된 전술한 제형 중 어느 하나와 함께 투여될 수 있다. 일부 실시예에서, ENPP1-Fc는 약 pH 6.3 의 20 mM 구연산염, 2 mM 염화칼슘, 175 mM 수크로오스, 82 mM (D) 만니톨, 및 0.05% w/v 폴리소르베이트 20을 포함하는 제형으로 투여된다. 동결건조된 제형은 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하기 전에 적절한 재구성 완충액(또는 멸균수)에서 재구성된다.

[0312]

ENPP1-Fc는 0.2 mg/kg, 0.6 mg/kg, 및 1.8 mg/kg의 선택된 투여량 중 하나로 투여된다. 투여는 격일로 적어도 한 번 또는 두 번, 매일 적어도 한 번 또는 두 번, 매일 세 번, 매주 적어도 한 번 또는 두 번 피하(SC) 투여된다.

[0313]

ENPP1-Fc의 제1 투여량은 1일차에 투여될 수 있다. 8일차 및 그 이후에, ENPP1-Fc는 선택된 투여량의 ENPP1으로 매주 2회 대상체에게 투여된다. 투여량은 각 투여일에 대략 동일한 시간에 투여될 수 있다. 주사 부위는 이전 2 주 이내 주사 부위로부터 2인치 이내에 주사 부위가 없게 번갈아 한다.

[0314]

ENPP1- Fc의 선택된 투여량은 0.2mg/kg, 0.6mg/kg 또는 1.8mg/kg SC 중 하나이다. ENPP1- Fc의 제1 투여량은 1 일차에 투여될 수 있다. 첫 번째 투여 후, 안전성을 모니터링하고 PK 샘플을 수집하기 위해 7일 동안 대상체를 관찰할 수 있다. 8일차 및 그 이후에, 대상체는 선택된 투여량을 매주 2회 투여받는다. 선택된 투여량으로 ENPP1-Fc의 투여는 의료 전문가가 적절하다고 간주하는 바에 따라 계속된다.

[0315]

대상체는 29일의 기간에 걸쳐 ENPP1- Fc의 8회 투여량을 투여받아, 예를 들어, 0.2 mg/kg, 0.6 mg/kg, 및 1.8 mg/kg의 투여량에 대해 각각 29일당 1.6 mg, 4.8 mg, 및 14.4 mg의 노출을 초래할 수 있다. 또는 대상체는 의료 전문가가 적절하다고 간주하는 8회 이상 또는 미만의 용량을 받을 수 있다.

[0316]

내인성 ENPP1 효소와 마찬가지로, ENPP1- Fc는 ATP를 절단하여 AMP 및 PPi를 생성함으로써, 혈장 PPi 수준을 증가시키고 CD73이 빠르게 아데노신으로 전환되는 AMP로 전환한다. 내인성 인간 효소의 대체는 고유한 결핍을 교

정하고, 건강 개선 및 ENPP1 베이스라인 환자, 임상의 및 간병인 결과와 관련된 임상 합병증의 완화를 가능하게 하기 위한 것이다.

예 12: ENPP1 결핍증 환자의 치료

상기와 같이 제형된 Enpp1-Fc는 다음과 같은 선택 투여량을 사용하여 1일차에 피하 주사에 의해 ENPP1 결핍증을 갖는 것으로 식별된 환자에게 투여되고, 8일차에 시작하여 매주 2회 투여된다.

표 22

예시적인 투여량

1	0.2 mg/kg
2	0.6 mg/kg
3	1.8 mg/kg

ENPP1-Fc는 0.2 mg/kg, 0.6 mg/kg, 또는 1.8 mg/kg SC 중 하나인 선택된 투여량의 ENPP1-FC로 의료 전문가가 결정한 기간 동안 적어도 매주 2회 투여된다. 효소 대체에 대한 환자의 반응은, 예를 들어, ENPP1 결핍증의 하나 이상의 증상의 감소에 이어서, 및/또는 본원에 제공된 지침을 사용하여, 의료 전문가에 의해 결정된 바와 같이 적절하게 모니터링된다.

예 13: GACI 진단을 받은 환자의 치료

Enpp1 결핍증은 GACI로서 마스킹될 수 있다. GACI는 영아에서 발생하고 광범위한 동맥 석회화를 수반하는 희귀 질환이다(Albright, 등, 2015, Nature Comm. 10006).

상기와 같이 제형된 ENPP1-Fc는 0.2 mg/kg, 0.6 mg/kg, 또는 1.8 mg/kg SC 중 하나인 선택된 투여량의 ENPP1-FC로 의료 전문가가 결정한 기간 동안 적어도 매주 2회 투여된다. 효소 대체에 대한 GACI 환자 반응은, 예를 들어, GACI의 하나 이상의 증상의 감소에 이어서, 및/또는 본원에 제공된 지침을 사용하여, 의료 전문가에 의해 결정된 바와 같이 적절하게 모니터링된다.

예 14: ARHR2로 진단된 환자의 치료

Enpp1 결핍증은 ARHR2로서 마스킹될 수 있다. ARHR2는 낮은 혈장 PPi 및 혈청 인산염 수치를 특징으로 하는 희귀한 골격 장애로서, 구루병, 장골의 반복된 골절, 구루병 골격 기형 및 성장 및 발달 장애를 초래할 수 있다(Ferreira 등 2014, Moran 1975, Rutsch 등 2008).

상기와 같이 제형된 ENPP1-Fc는 0.2 mg/kg, 0.6 mg/kg, 또는 1.8 mg/kg SC 중 하나인 선택된 투여량의 ENPP1-Fc로 의료 전문가가 결정한 기간 동안 적어도 매주 2회 투여된다. 효소 대체에 대한 ARHR2 환자 반응은, 예를 들어, ARHR2의 하나 이상의 증상의 감소에 이어서, 본원에 제공된 지침을 사용하여, 의료 전문가에 의해 결정된 바와 같이 적절하게 모니터링된다.

다음의 예들은 전체 명세서의 맥락에서 치료 프로토콜 및 효능을 결정하기 위한 지침을 제공한다.

예 15: 혈장 무기 피로포스페이트 측정

낮은 혈장 PPi 수준은 ENPP1 결핍증의 특징이며 치료 효능의 지표로서 사용된다. ENPP1-Fc는 ATP를 특이적으로 절단하여 AMP 및 PPi를 생성한다. ENPP1 ERT의 치료 목표는 세포외 PPi 수준을 정상화하고 ENPP1 결핍증과 연관된 임상적 이상을 교정하는 것이다.

PPi는 환자 혈장 샘플을 수득함으로써 측정된다. 결정된 PPi 데이터를 사용하여 투여량 수준을 조정할 수 있다. PPi 수준은 PK/PD 분석을 위한 일차 PD 마커의 역할을 할 수도 있다.

포유류에서 Pi 및 PPi의 농도는 각각 1-3 mM 및 2-3 pM이다.

예 16: 뼈 건강과 연관된 바이오마커

낮은 혈장 PPi 이외에, ENPP1 결핍 환자는 생화학적으로 낮은 혈청 포스페이트, 높은 소변 포스페이트, 낮은 신

장 TmP/GFR, 정상 칼슘(Ca), 낮은 정상 소변 Ca, 정상 25-히드록시 비타민 D(25 OH D), 낮은 정상 1,25(OH)2D, 높은 BAP, 높은 온전한 FGF23, 및 정상 PTH(10F 2019)를 특징으로 한다.

[0334] 치료 환자의 뼈 건강의 추가 결정인자로서 사용될 수 있는 바이오마커가 표 19에 제시되어 있다.

표 23

임상 중간물질 및 바이오마커

	실험실 분석물	샘플 유형
일차 약리학 마커	피로포스페이트 (PPi)	혈장
	무기 포스페이트	혈청
	FGF23 (순수)	혈장
	TmP/GFR	혈청 크레아티닌, 혈청 포스페이트, 소변 포스페이트
	ALP, BALP, CTx, P1NP	혈청, 혈장, 소변

[0335]

[0336] **예 17: ENPP1-Fc 치료의 효능**

[0337] 치료 효능은 혈장 PPi를 측정하는 것뿐만 아니라, 다른 혈장 분석물, 예컨대 FGF23, Pi, FGF23, Pi, TmP/GFR, 혈청 알칼리성 포스파타제(ALP), 뼈-특이적 ALP(BALP), I형 콜라겐의 카르복시 말단 가교 결합된 텔로펩티드(CTx), 및 프로콜라겐 1형 N-말단 프로펩티드(P1NP)를 측정하는 것에 의해 평가될 수 있다. 이들 분석물 측정은 ENPP1-Fc에 대한 효능을 결정하기 위한 ENPP1 결핍증과 연관된 PD 마커로서 사용될 수 있다. 이들 분석물의 변화는 베이스라인 대비 변화로서 그리고 치료 과정에 걸쳐 시간 의존적인 방식으로 기술될 수 있다. PK 및 PD 파라미터의 투여량 선형성이 또한 평가될 수 있다.

[0338] 혈장 PPi 수준, FGF23 수준 및 크레아티닌 청소율 당 소변 인 배설량 베이스라인 대비 변화는 PPi 수준의 베이스라인 당 변화가 0과 같다는 귀무가설을 테스트하기 위한 쌍체 차이의 t 검정을 사용하여 분석할 수 있다.

[0339] **예 18: 약물 농도 측정**

[0340] 또한, 혈액 샘플은 혈장 내 ENPP1-Fc 농도의 측정 및 1회 투여 후(즉, 단일 투여량) 및 다회 투여 로/후(즉, 항정 상태) PK 파라미터의 후속 결정을 위해 환자로부터 취득될 수 있다.

[0341] **예 19: 면역원성 (항약물 항체)**

[0342] 원하는 경우, ENPP1-Fc에 대한 면역원성은 항약물 항체(ADA)를 사용하여 측정될 수 있다. 면역원성 시험은 다단계 접근법을 이용할 수 있으며; ADA가 초기 스크리닝에서 검출되는 경우, 특이성을 결정하기 위해 확인 시험을 실행할 수 있다. 샘플은 또한 특이성 확인(즉, 역가) 및 중화 항체를 평가하고 이에 대한 검정을 추가로 확립하는 데 사용될 수 있다.

[0343] **예 20: 약동학, 약리학 및 탐색적 바이오마커 분석**

[0344] PK 모집단에 대해 약동학 분석을 수행할 수 있고, ENPP1-Fc의 PK 파라미터를 기술 통계로 처리하여 치료별로 요약할 수 있다. PK 및 PD 파라미터의 투여량 선형성 또한 평가할 수 있다. PK/PD 분석, 면역원성 분석; 및 탐색적 바이오마커 분석을 결정할 수 있다.

[0345] **예 21: 효능의 추가 결정자**

[0346] 정상 수준의 PPi를 회복하는 것이 ENPP1-Fc를 사용하는 치료의 효능의 주요 지표이지만, 치료 효능을 결정하는데 도움이 되도록 원하는 경우, 다른 물리적 측정도 사용될 수 있다. 이는 다음 중 하나 이상을 포함한다.

[0347] **1. 방사선 촬영 및 영상 촬영**

[0348] **골격 중증도에 대한 X-선.** 표준 X-선은 구루병 골격 변형을 검출하기 위해 획득될 수 있다. 예를 들어, 손목과 무릎에서 X-선을 획득할 수 있다.

[0349] **DEXA 스캔.** DEXA 스캔은 골밀도의 변화를 평가하기 위해 사용될 수 있다.

- [0350] **양전자 방출 단층촬영 - 컴퓨터 단층촬영.** 베이스라인 $Na^{18}F$ -PET/HRpQCT(또는 HR-CT)는 베이스라인에서 및 향후 중재적 평가를 위해 동맥 및 기관의 석회화와 골격 이상을 측정하기 위해 ENPP1-Fc의 첫 투여로부터 1개월 이내에 실시하는 전신 스캔일 수 있다. $Na^{18}F$ -PET는 동맥의 미세 석회화뿐만 아니라 골 교체율도 측정한다. 고해상도 정량적 컴퓨터 단층촬영(HRQCT) 또는 HR-CT는 비-우성 원위 요골 및 경골에서 뼈 미세구조를 결정할 수 있다. 표준 뼈 기하학적 파라미터가 계산된다.
- [0351] **도플러 심장초음파 검사.** 베이스라인 심장초음파는 ENPP1-Fc의 첫 번째 투여 전 3일 이내에 획득할 수 있다. 도플러 에코를 사용하여 심장 기능[LVEF, 혈류] 심장 및 판막 석회화 및 동맥 경화를 측정할 수 있다.
- [0352] **광 간섭 단층촬영.** 광 간섭 단층촬영은 신내막 증식을 시각화하는 데 사용될 수 있다.
- [0353] **말초 동맥 혈압측정.** 말초 동맥 혈압측정(PAT)은 디지털 체적 변화에 대응하는 디지털 펄스와 진폭(PWA)을 평가하는 데 사용될 수 있다.
- [0354] **신장 초음파.** 신장 석회화를 측정하기 위해, 예를 들어, ENPP1-Fc 시작 후 1주일 이내에 신장 초음파를 사용할 수 있다.
- [0355] **뼈 조직형태학 및 뼈 생검.** 뼈 생검은 베이스라인 측정으로서 수행될 수 있다. 뼈 생검 전 10일 동안 테트라사이클린 부하가 바람직하다.
- [0356] **2.보행 능력.** 보행 검사는 심폐, 신경근 및 근골격 기능을 결합한 보행 환자의 기능적 능력을 측정하기 위한 준최대 운동 측정으로서 사용될 수 있다. 6분 보행 검사(6MWT)는 원래 성인을 대상으로 사용하기 위해 미국흉부학회(ATS 2002)에 의해 개발되었으며, 현재 성인 및 소아 모집단(Mylius 등 2016)과 척수 근위축증 (Montes 등 2018), 듀센 근이영양증(McDonald 등 2013), 및 영아 발병형 폼페병(van der Meijde 등 2018)과 같은 신경근 질환이 있는 어린이들에 흔히 사용된다. 2분 보행 검사(2MWT)는 NIH 도구상자에 포함되어 있으며, 동일한 속성을 측정하는 데 점점 더 사용되고 있다.
- [0357] 6MWT 및 2MWT는 의료 제공자의 재량에 따라 치료 전 및 치료 중에 환자에게 투여될 수 있다. 대상체가 베이스라인에서 적어도 2MWT를 완료할 수 없는 경우, 치료 중의 추가 평가는 의료 제공자의 재량에 맡길 수 있다. 휴식기 심박수는 검사 전과 검사 후 측정한다. 6MWT의 첫 2분 동안 걸은 거리 및 6분 전체를 기록할 수 있다. 2분 및 6분 동안에 걸은 거리를 연령 및 성별 매칭 표준 데이터(예측값 백분율)와 비교할 수 있다.
- [0358] **3.동력계.** 강도는 의료 제공자의 재량에 따라 치료 전 및/또는 치료 중에 동력계를 사용하여 평가할 수 있다. 휴대용 동력계는 어린이와 성인 모두에서 흔히 사용되는 강도의 직접적인 측정이다. 평가할 수 있는 근육 군은 어깨 외전, 어깨 굴곡, 팔꿈치 굴곡, 팔꿈치 신전, 고관절 외전, 고관절 굴곡, 고관절 신전 및 무릎 신전 등이다. 각각의 근육 군은 양측으로 2회 측정될 수 있다.
- [0359] **악력.** 악력은 의료 제공자의 재량에 따라 치료 전 및/또는 치료 중에 악력 동력계를 사용하여 측정할 수 있다. 장비 및 평가자 지침은 장소 전반에 걸쳐 표준화될 수 있다. 그룹은 각각의 손에 대해 취한 1개의 연습 및 1개의 최대 힘 측정으로 양측으로 평가될 수 있고, 결과는 연령 및 성별 매칭 표준 데이터와 비교될 수 있다(이용 가능한 경우).
- [0360] **운동 범위.** 운동 범위는 관절 각도를 검사하고 관절에서의 운동 정도를 측정하는 기기인 각도계를 사용하여 평가할 수 있다. 각도계의 고정 아암은 고정된 신체 분절 상의 지정된 뼈 랜드마크와 정렬되고, 각도계의 이동 아암은 움직이는 사지의 지정된 뼈 랜드마크와 정렬된다. 각도계의 받침점은 동작 축 및 뼈 랜드마크를 사용하여 측정된 각 동작에 대해 지정된다. 운동 범위는 다음 중 하나 이상에 대해 평가될 수 있다: 어깨 외전, 어깨 굴곡, 팔꿈치 굴곡, 팔꿈치 신전, 고관절 외전, 고관절 굴곡, 고관절 신전 및 무릎 신전.
- [0361] **4.청력 검사.** 중등도 난청은 ARHR2와 관련이 있었다(Brachet 등 2014, Steichen-Gersdorf 등 2015). 베이스라인 청력은 다음 중 하나 이상에 의해 결정될 수 있다: 신체 검사 및 이경 검사, 중이 청력 검사(일반적으로 고실계측이라 함), 가능한 경우 최대 8 kHz의 주파수를 이용한 순음 청력 검사(PTA). (PTA 임계값이 >15dB인 경우, 대상체는 또한 골전도 검사를 받아야 한다), 최대 16 kHz의 주파수로 고주파 청력 검사(HFA).
- [0362] **5.임상의 전반적 인상 척도.** 임상의 전반적 인상(Clinical Global Impression, CGI-S) 척도는 미국 국립 정신건강 연구소가 후원하는 임상 연구에서 연구 약물 개시 이전 및 이후에 환자의 전반적 기능에 대한 임상의의 견해에 대한 간략한 독립 평가를 제공하기 위해 개발되었다 (Guy 1976). CGI는 환자의 병력, 심리사회적 상황, 증상, 행동, 및 증상이 환자의 기능 능력에 미치는 영향에 대한 지식을 포함하여, 모든 이용 가능한 정보를 고려

한, 임상이가 결정하는 전반적인 요약 척도를 제공한다. CGI-S는 치료 전 및/또는 도중에 의료 제공자의 재량에 따라 시행될 수 있고 -3(심각한 악화)에서 +3(유의한 개선)까지의 7점 척도를 사용하여 변화에 대한 전반적 평가를 제공한다.

[0363] **6.대근육 운동 기능 분류 시스템 - 확장 및 개정.** 대근육 운동 분류 시스템 - 확장 및 개정(GMFCS - E 및 R)은 치료 전 및/또는 치료 중에 의료 제공자의 재량에 따라 시행할 수 있다. GMFCS - E 및 R은 1에서 5까지의 척도에서 이동성에 중점을 두고 환자 주도 운동을 분류한다.

[0364] **7.환자 보고 결과 측정 정보 시스템.** 환자 보고 결과 측정 정보 시스템(Patient Reported Outcomes Measurement Information Systems, PROMIS)은 환자 관점에서 신체적, 정신적, 사회적 안녕을 평가하기 위해 미국 국립보건원(National Institutes of Health, NIH)이 개발한 다양한 설문지로 구성된다(<http://www.healthmeasures.net>). 이러한 설문지는 X-연관 저인산혈증, 관절염, 다발성 경화증 및 신경섬유종증과 같은 만성 건강 질환을 앓고 있는 사람들을 대상으로 한 임상시험에서 사용되어 왔다. 각 설문지에는 참가자에 의해 1(전혀 없음)에서 5(항상)까지의 5점 리커트 척도(Likert scale)로 평가되는 8-10개의 항목이 포함된다. 점수는 각 설문지에 대해 합산되며, 높은 점수는 측정되는 영역의 더 많은 것(예: 더 많은 피로, 더 많은 신체 기능)을 나타낸다. 원점수는 평균 50 및 표준 편차 10을 기준으로 T-점수로 변환되어 연구 샘플을 일반 모집단과 비교할 수 있다. PROMIS 척도는 통증 간섭(8a의 약식), 통증 강도(버전 3a), 신체 기능 - 상지(맞춤형 약식), 신체 기능 - 이동성(약식 13a FACIT 피로), 피로(약식), 및 인지 영향(약식 8a)을 포함할 수 있으며, 이는 의료 제공자의 재량에 따라 치료 전 및/또는 치료 중에 시행될 수 있다. 이러한 평가는 보조 없이 대상체가 완료할 수 있다.

[0365] **8.간병인 전반적 인상 척도.** 상태에 대한 간병인 전반적 인상은 의료 제공자의 재량에 따라 치료 전 및/또는 치료 중에 환자의 간병인에게 실시할 수 있다. 변화에 대한 간병인의 전반적 인상은 -3(심각한 악화)에서 +3(유의한 개선)까지의 7점 척도를 사용하여 변화에 대한 전반적 평가를 제공한다.

[0366] **9.웨스턴 온타리오 및 맥마스터 대학 골관절염 지수.** WOMAC은 고관절 또는 무릎 통증이 있는 환자에서 일상생활 활동, 기능적 이동성, 보행, 전반적 건강, 통증 및 삶의 질을 평가하는 데 사용되는 환자 보고 결과이다(www.sralab.org). 평가는 24개 항목으로 구성되며 시행하는 데 약 12분이 소요된다. WOMAC은 의료 제공자의 재량에 따라 치료 전 및/또는 치료 중에 시행될 수 있다. 평가는 보조 없이 대상체가 완료할 수 있다.

[0367] **예 22: 동결건조된 ENPP1 폴리펩티드 제형의 연장된 안정성 연구**

[0368] 바람직한 제형의 동결건조된 ENPP1-Fc를 36개월의 기간에 걸쳐 5℃, 25℃, 및 40℃의 3가지 상이한 보관 조건에서 보관했을 때 장기 안정성에 대해 시험하였다. 24개월 후, ENPP1-Fc를 함유하는 모든 동결건조된 케이크는 상아색의 온전한 구조를 나타냈다. 물에서 재구성한 후, 액체 외관은 모든 샘플 유형에 대해 갈색을 띤 노란색으로, 투명하고, 눈에 보이는 미립자가 없는 것으로 관찰되었다. 재구성은 상기 제시된 데이터와 일치하는 윈도우 내에서 발생하였으며, 동결건조된 샘플의 완전한 재구성은 59초 내지 108초 이내에 발생하였다.

[0369] 시간 경과에 따른 온도 조건에 걸쳐 두 제형 모두에 대한 수분 함량은 또한 상기 제시된 수분 함량 데이터와 일관되게 유지되었다. 모든 시험된 보관 온도에서 모든 동결건조된 샘플 시점(0, 3, 6, 9, 12, 18, 24, 30, 36개월)은 시점 및 조건에 걸쳐 수분 함량을 매우 낮거나 전혀 갖지 않았으며, 잔류 수분 함량은 0.0% 내지 0.3% 범위였다. 각 보관 조건에서 각 샘플에 대한 pH 값도 시간 경과에 따라 일관되게 유지되었고, 샘플 pH는 36개월에 걸쳐 pH 6.3±0.1로 유지되었다. 50 mg/mL 정규화된 시작 농도에 대한 단백질 회수율도 각 샘플에 대해 측정하였다. 이들 데이터는 단백질 회수가 5℃, 25℃, 및 40℃ 보관 조건 하에서 시간 경과에 따라 분해되지 않음을 나타낸다.

[0370] SEC 실험을 수행하여, 바람직한 제형의 샘플을 5℃, 25℃, 및 40℃에서 보관한 후 36개월의 기간에 걸쳐 HMW 종의 발생 경향을 특성화하였다. 총 HMW 종, LMW 종, 및 주 피크 종에 대한 풍부도 백분율에 관한 요약 SEC 데이터를 이전 실시예에 개략된 절차에 따라 수집하였다. 도 17 내지 도 19는 각각 5℃, 25℃ 및 40℃에 대한 시간 경과에 따른 풍부도 HMW 백분율 및 풍부도 주 피크 백분율에 대한 요약 SEC 데이터를 도시한다. 양성 대조군 0 시점 샘플은 약 4% HMW 함량을 가졌다. 모든 바람직한 제형 샘플은 대조군과 일관되게 유지되었으며, 각각은 5℃, 25℃, 및 40℃ 보관 조건 하에서 적어도 24개월의 기간에 걸쳐 ±5% HMW 함량을 갖는다. 이들 결과는 각각의 바람직한 제형이 놀랍게도 연장된 시간 동안 고분자량 응집 종의 형성을 방지할 수 있음을 나타낸다. 최대 36개월 동안 보관된 샘플에 대해 유사한 결과가 관찰되었다. 이들 데이터는 또한, 바람직한 제형이 25℃ 및 40℃와 같은 더 높거나 비냉장된 온도에서 보관될 때에도 HMW 종의 형성에 대해 동결건조된 폴리펩티드를 안정화

시킬 수 있음을 나타낸다.

[0371] 각 시점 및 보관 조건에 상응하는 모든 바람직한 제형 샘플에 대한 비활성을 실시예 7에 기술한 효소 활성 스크리닝을 사용하여 평가하였다. 간략하게, 각 제형 샘플의 활성을 평가하는 데 사용된 효소 검정은 ENPP1-Fc를 pNP-TMP와 혼합함으로써 수행하였다. 생성물 형성(pNP)을 25℃에서 5분 동안 405 nm에서 분광 광도계로 모니터링한다. ENPP1-Fc의 비활성은 각 샘플 제형에 대해 획득된 시간 경과에 따른 흡광도의 변화를 pNP의 알려진 농도의 표준 곡선에 보간함으로써 계산된다. 활성 데이터를 냉동 대조군을 포함하는 각 샘플에 대해 시간 경과에 따라 도시하였다. 5℃, 25℃ 및 40℃에서 최대 24개월 동안 보관된 샘플에 대한 대표적인 활성 대 시간 도표는 도 20에 도시되어 있다. 최대 36개월 동안 보관된 샘플에 대해 유사한 결과가 관찰되었다.

[0372] 시점 및 보관 조건에 걸친 모든 샘플은 일관된 수준의 효소 활성을 나타냈다. 따라서, 실험은 동결건조된 ENPP1-Fc 제형이 상이한 온도 조건 하에서 보관될 때에도 장기 보관 하에서 안정적으로 유지되었음을 보여준다.

[0373] 예 23: 바이알 및 주사기에서 재구성된 샘플의 안정성 분석

[0374] 상이한 시점에 바이알 및 주사기에 보관될 때 재구성된 제형이 일정 기간에 걸쳐 단백질 손실 또는 활성 손실을 겪는지 여부를 결정하기 위해 다음 검정을 수행하였다.

[0375] 바람직한 제형의 동결건조된 ENPP1-Fc를 물에 재구성하여 1 mg/ml, 2.5 mg/ml 및 10 mg/ml 범위의 상이한 농도를 달성하였다. 상이한 농도의 샘플을 5℃에서 2세트의 주사기(고 부피 샘플-250 µl 및 저 부피 샘플-50 µl)에서 1-12시간 범위의 상이한 시간 간격 동안 인큐베이션하였다. 실험을 3회 반복하였다. 검정 시점에 10, 2.5, 및 1 mg/mL로 재구성하고 희석한 샘플을 대조군으로서 사용하였다. 인큐베이션되지 않은 샘플의 효소 활성(시간-0시간)을 결정하였다. 그런 다음, 인큐베이션된 샘플의 활성(8-12시간)을 대조군 값에 대해 정규화하였다. 50 mg/mL 정규화된 시작 농도에 대한 단백질 회수율도 이전 실시예에서 기술한 프로토콜에 따라 각 샘플에 대해 측정하였다.

[0376] 도 21은 상이한 시간 간격으로 주사기 또는 바이알에 보관된 재구성된 ENPP1-Fc에 대한 회수율을 보여준다. 이들 데이터는 재구성된 ENPP1-Fc 단백질이 상이한 농도의 주사기에 보관될 때 안정적임을 나타낸다. 재구성된 ENPP1-Fc 샘플의 비활성을 이전 실시예에서 기술한 프로토콜에 따라 측정하였다. 도 22는 상이한 시간 간격으로 주사기 또는 바이알에 보관된 재구성된 ENPP1-Fc 폴리펩티드 샘플에 대한 요약된 효소 활성 데이터를 보여준다. 시점 및 보관 조건에 걸친 모든 샘플은 일관된 수준의 효소 활성을 나타냈다. 단백질 활성은 바이알에 보관했을 때 변하지 않았지만, 샘플을 주사기에 8시간 넘게 보관했을 때 약간의 활성 손실이 있었다.

[0377] 예 24: 재구성된 샘플의 희석 후 안정성 분석

[0378] 바이알 중의 동결건조된 ENPP1-Fc 제형을 25 mg/mL로 재구성한다. 2.5 mg/mL 및 1 mg/mL 희석물의 2세트를 생성한다. 별도의 바이알을 취하고 주사기를 사용하여 검정 시점에 이를 2.5 mg/mL 및 1 mg/mL로 희석함으로써 대조군 샘플을 생성하였다. 따라서, 대조군 샘플은 인큐베이션 시간 0에 있을 것이다. 희석된 샘플 2.5 mg/ml 및 1 mg/ml를 5℃에서 밤새 인큐베이션하고, 샘플의 하위 집합을 1시간, 2시간, 3시간, 4시간 및 8시간의 시간 간격 동안 실온(25℃)에서 인큐베이션하였다. 효소 활성 및 단백질 농도를 이전 실시예에서 기술한 바와 같이 측정하였다. 값을 대조군 샘플에 대해 정규화하였다. 도 23은 상이한 시간 간격으로 주사기 또는 바이알에 보관된 재구성된 ENPP1-Fc에 대한 회수율을 보여준다. 검정은 5℃의 바이알에 밤새 보관하거나 RT에 최대 8시간 동안 보관했을 때 단백질 농도가 손실되지 않음을 나타냈다. 도 24는 상이한 시간 간격으로 주사기 또는 바이알에 보관된 재구성된 ENPP1-Fc 폴리펩티드 샘플에 대한 요약된 효소 활성 데이터를 보여준다. 검정은 5℃의 바이알에 밤새 보관하거나 RT에 최대 4시간 동안 보관했을 때 단백질 활성이 손실되지 않음을 나타냈다. 샘플을 4시간 후에 RT에 보관했을 때 효소 활성의 경미한 손실이 관찰되었다.

[0379] 참고 문헌

[0380] ATS. American Thoracic Society Statement: Guidelines for the six-minute walk test. AmJRespir, CritCare Med. 2002 2002;166(1):111-7.

[0381] Brachet C, Mansbach AL, Clerckx A, Deltenre P, Heinrichs C. Hearing loss is part of the clinical picture of ENPP1 loss of function mutation. Horm Res Paediatr. 2014;81(1):63-6.

[0382] CTFG. Recommendations related to contraception and pregnancy testing in clinical trials. 2014 [19 May 2020]; 출처:

- [0383] http://www.hma.eu/fileadmin/dateien/Human_Medicines/01-
- [0384] [About HMA/Working Groups/CTFG/2014_09_HMA_CTFG_Contraception.pdf.](#)
- [0385] Ferreira C, Ziegler S, Gahl W. Generalized Arterial Calcification of Infancy. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Stephens K, 등, editors. GeneReviews((R)). Seattle (WA)2014.
- [0386] Guy W. The Clinical Global Impression Scale. In: Rush Jr AJ, First MB, Blacker D, editors. Handbook of Psychiatric Measures, 2008. Washington, DC: American Psychiatric Publishing, Inc; 1976. p. 90-2.
- [0387] IOF. Autosomal Recessive Hypophosphatemic Rickets Type 2 (ARHR2). 2019 [19 May 2020]; 출처: <https://www.iofbonehealth.org/osteoporosis-musculoskeletal-disorders/skeletal-rare-disorders/autosomal-recessive-hypophosphatemi-0.>
- [0388] Mackenzie NC, Huesa C, Rutsch F, MacRae VE. New insights into NPP1 function: lessons from clinical and animal studies. Bone. 2012 Nov;51(5):961-8.
- [0389] McDonald CM, Henricson EK, Abresch RT, Florence JM, Eagle M, Gapmaier E, 등 The 6-minute walk test and other endpoints in Duchenne muscular dystrophy: longitudinal natural history observations over 48 weeks from a multicenter study. Muscle Nerve. 2013 Sep;48(3):343-56.
- [0390] Montes J, McDermott MP, Mirek E, Mazzone ES, Main M, Glanzman AM, 등
- [0391] Ambulatory function in spinal muscular atrophy: Age-related patterns of progression. PLoS One. 2018;13(6):e0199657.
- [0392] Moran JJ. Idiopathic arterial calcification of infancy: a clinicopathologic study. Pathol Annu. 1975;10:393-417.
- [0393] Mylius CF, Paap D, Takken T. Reference value for the 6-minute walk test in children and adolescents: a systematic review. Expert Rev Respir Med. 2016 Dec;10(12):1335-52.
- [0394] NCI. National Cancer Institute Division of Cancer Treatment and Diagnosis (DCTD), National Cancer Institute (NCI), National Institutes of Health (NIH), Department of Health and Human Services (DHHS). Common Terminology Criteria for Adverse Events V5.0 (CTCAE). Published: November 27, 2017. Available at https://ctep.cancer.gov/protocoldevelopment/electronic_applications/docs/ctcae_v5_quick_reference_8.5x11.pdf. 2017에서 입수가능.
- [0395] Orriss IR, Arnett TR, Russell RG. Pyrophosphate: a key inhibitor of mineralisation. Curr Opin Pharmacol. 2016 Jun;28:57-68.
- [0396] Rutsch F, Boyer P, Nitschke Y, Ruf N, Lorenz-Depierreux B, Wittkamp T, 등 Hypophosphatemia, hyperphosphaturia, and bisphosphonate treatment are associated with survival beyond infancy in generalized arterial calcification of infancy. Circ Cardiovasc Genet. 2008 Dec;1(2):133-40.
- [0397] Steichen-Gersdorf E, Lorenz-Depiereux B, Strom TM, Shaw NJ. Early onset hearing loss in autosomal recessive hypophosphatemic rickets caused by loss of function mutation in ENPP1. J Pediatr Endocrinol Metab. 2015 Jul;28(7-8):967-70.
- [0398] van der Meijden JC, Kruijshaar ME, Harlaar L, Rizopoulos D, van der Beek N, van der Ploeg AT. Long-term follow-up of 17 patients with childhood Pompe disease treated with enzyme replacement therapy. J Inherit Metab Dis. 2018 Nov;41(6):1205-14.
- [0399] **참조에 의한 통합**
- [0400] 본원에 언급된 모든 간행물 및 특허는 각각의 개별 간행물 또는 특허가 구체적으로 그리고 개별적으로 참조로서 통합되도록 표시된 것처럼 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다.
- [0401] 주제의 특정 실시예가 논의되었지만, 상기 명세서는 예시적인 것이며 제한적이지 않다. 본 명세서 및 하기 청구 범위를 검토하면 많은 변형이 당 분야의 숙련자에게 명백해질 것이다. 본 발명의 전체 범위는, 균등물의 전체 범위와 함께 청구범위 및 이러한 변형과 함께 명세서를 참조하여 결정되어야 한다.

도면

도면1

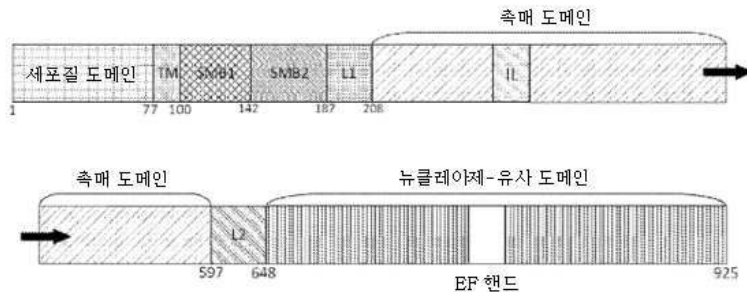
```

1 MERDGCAGGG SRGGEGGRAP REGPAGNGRD RGRSHAAEAP GDFQAAASLL
51 APMDVGEFPL EKAARARTAK DEWTYKVLGL VLSVCVLTIT LGCIIFGLAEP
101 CAKE/KSCKG KCFERTPGNC MCDAAACVELG NCCLDYOETC IEPEHIWTCN
151 KFRUCGKKLT RSLCACSDIK MKKDCDCIN NYSSVCQGEKW VEEPCESINE
201 PQCPAGFETP ETLLFSLIGF RAEYLHTWGG LLPVLSKLKK CGTYTKMNR
251 VYPTKTFFNH YSIVTGLYFE SHGIIDNKMY EPKMNASFSL KSKKEKFNPEW
301 YKGEPIWVTA KYQGLKSGTF FWFPGSDVEIN GIFFDIYKMY NGSVPFEERI
351 LAVLQWLQLP KDERPHFYTL YLEEFDSGH SYGPVSSEVI KALQRVDGMV
401 GMLMDGLKEL NLHRCNLIL ISDHGMEQGS CKKYIYLNKY LGDVKNIKVI
451 YGPAARLRD DVPDKYYSFN YEGIARNLSC REFNQHFKEF LKHFLPKRLH
501 FAKSDRIEPL TFVLDPOWOL ALNPSEKRYC GSGFHGSDMV FSNMQALFVG
551 YGPGFKHGIE ADTEENIEVY NLMCDLLNL PAEMNGTBGS LNHLLKNPVY
601 TKHPKKEVHP LVQCPFTANP ADNLGCSCNP SILPIEDFQT QFNLTVAEEK
651 JIKHETLPYG RPRVLQKENT TCLLSQHQFM SGYSQDILMF LWTSTYTVDRN
701 DSFSTEDFSN CLYQDFRIPL SPVHKCSFYK NNTKVSYGEL SPPQLNKNSS
751 GIYSEALLTT NIVPMYQSFO VIWRYFNHDL LRKYAEERNS VNVVSGPVFD
801 FDFDYDGRCD ENLRQKRRI ANQEILIPTH FFIVLTSCXD TSQTPLHCEN
851 LDTLAFILPH PRNTDNSECVH QKHDSWVEE LMLHRRART ENENITGLGF
901 YQQRKEPVSJ ILKLKTHLPT PFSQED (서열번호 1)

```

도면2

인간 Enpp1



도면3

```

1 PSCAKEVKSC KGRCFERTFG NCRCDAAACVE LGNCCLDYQE TCIEPEHIWT
51 CNKFRCEKLR LTRSLCACSD DCKDKGDCCI NYSSVCQGEK SWVEPCESI
101 NEPQCPAGFE TPPTLLFSLD GFRAEYLHTW GLLLPVISKL KKGTYTKNM
151 RPYPTKTFF NHYSIVTGly PESHGIIDNK MYDPKMNASF SLKSKEKFN
201 EWYKGEPIWV TAKYQGLKSG TFFWPGSDVE INGIFDIYK MYNGSVPFEE
251 RILAVLQWLQ LPKDERPHFY TLYLEEPDSS GHSYGPVSSE VIKALQRVDG
301 MVGMLMDGLK ELNLHRCNL ILISDHGMEQ GSCKKYIYLN KYLGDVKNIK
351 VIYGPAARLR PSDVPDKYYS FNYEGIARNL SCREPNQHFK PYLKHFLPKR
401 LHFAKSDRIE PLTFYLDPOW QLALNPSEK YCGSGFHGSD NVFSNMQALF
451 VGYGPGFKHG IEADTFENIE VYNLMCDLLN LTPAPNNGTH GSLNHLLKNP
501 VYTPKHPKEV HPLVQCPFTN NPRDNLGCSC NPSILPIEDF QTQFNLTVAE
551 EKIIKHETLP YGRPRVLQKE NTICLLSQHQ FMSGYSQDIL MPLWTSYTV
601 RNSDFSTEDF SNCLYQDFRI PLSPVHKCSF YKNNTKVSYG FLSPPLNKN
651 SSGIYSEALL TTNIVPMYQS FQVIWRYFHD TLLRKYAEER NGVNVVSGPV
701 FDFDYDGRCD SLENLRQKR VIRNQEILIP THFFIVLTSC KDTSTPLHC
751 ENLDTLAFIL PHRTDNSECV VHGHDSWVEE EELMLHRRAR ITDVEHITGL
801 SFYQQRKEPV SDILKLKTHL PTFSQED (서열번호 2)

```

도면4a

마우스	WVEETCESIDTPECPAEFESPTLLFSLDGFRAEYLHTWGGLLPVLSKLNKCGTYTKNMR	60
소	WAEEDCDSDIDEPQCPAGFETPTLLFSLDGFRAEYLHTWGGLLPVLSKLNKCGTYTKNMR	60
토끼	WVEETCENINEPQCPAGFETPTLLFSLDGFRAEYLHTWGGLLPVLSKLNKCGTYTKNMR	60
인간	WVEEPCEINIEPQCPAGFETPTLLFSLDGFRAEYLHTWGGLLPVLSKLNKCGTYTKNMR	60
개코원숭이	WVEEPCEINIEPQCPAGFETPTLLFSLDGFRAEYLHTWGGLLPVLSKLNKCGTYTKNMR	60
* * * * *		
마우스	PHYPTKTFPNHYSIVTGLYPESHGIIIDHKHYDPKKNASFSLSKSEKFNPEWYKGEPIWLT	120
소	PVYPTKTFPNHYSIVTGLYPESHGIIIDHNZYDPQKNANFALKNKEKFNPEWYKGEPIWLT	120
토끼	PVYPTKTFPNHYSIVTGLYPESHGIIIDHKHYDPKKNASFSLSKSEKFNPEWYKGEPIWLT	120
인간	PVYPTKTFPNHYSIVTGLYPESHGIIIDHKHYDPKKNASFSLSKSEKFNPEWYKGEPIWLT	120
개코원숭이	PVYPTKTFPNHYSIVTGLYPESHGIIIDHKHYDPKKNASFSLSKSEKFNPEWYKGEPIWLT	120
* * * * *		
마우스	ASHQEVKSGTYFWPGSDVEIDGILPDIVYVYNGSVPFEEIILAVLQWLQPSHERPHFYT	180
소	AKYQGLKSGTFFWPGSDVRIINGIFPDIVYIYNVSVPFEEIILAILKWLQLPDERPHFYT	180
토끼	AKYQGLKSGTFFWPGSDVRIINGIFPDIVYIYNVSVPFEEIILAILKWLRLPKDERPHFYT	180
인간	AKYQGLKSGTFFWPGSDVEINGIFPDIVYHYNGSVPFEEIILAVLQWLQLPDERPHFYT	180
개코원숭이	AKYQGLKSGTFFWPGSDVEINGIFPDIVYHYNGSVPFEEIILAVLQWLQLPKDERPHFYT	180
* * * * *		
마우스	LYLEEDSSGHSYGPVSSEVITKALQRVDNIVGNLMDGLKEILNLHRCNLILISDHGMEQG	240
소	LYLEEDSSGHSYGPVSSEVITKALQRVDNIVGNLMDGLKEILNLHRCNLILISDHGMEQG	240
토끼	LYLEEDSSGHSYGPVSSEVITKALQRVDNIVGNLMDGLKEILNLHRCNLILISDHGMEQG	240
인간	LYLEEDSSGHSYGPVSSEVITKALQRVDNIVGNLMDGLKEILNLHRCNLILISDHGMEQG	240
개코원숭이	LYLEEDSSGHSYGPVSSEVITKALQRVDNIVGNLMDGLKEILNLHRCNLILISDHGMEQG	240
* * * * *		
마우스	SCKKYVYLNHYLGDVNNKVVYVGAARLRFTDVPETYYSFNVEALAKNLSCREPNQHFFP	300
소	SCKKYVYLNHYLGDTIDYKVVYVGAARLRFSVPDKYYSFQYEGIAKNLSCQEPNQHFHP	300
토끼	SCKKYVYLNHYLGDTENIKVIYVGAARLRFSVPDKYYSFNVEIARNLSCREPNQHFFP	300
인간	SCKKYVYLNHYLGDVNIIKVIYVGAARLRFSVPDKYYSFNVEIARNLSCREPNQHFFP	300
개코원숭이	SCKKYVYLNHYLGDVNIIKVIYVGAARLRFSVPDKYYSFNVEIARNLSCREPNQHFFP	300
* * * * *		
마우스	YLKHFLLPKRLHFAKSDRIEPLTFYLDPPQWLALNPSEKRYCGSGFHGSDNIFSNQALFV	360
소	YLKHFLLPKRLHFAKNDRIERLTFYLDPPQWLALNPSEKRYCGSGFHGSDNIFSNQALFV	360
토끼	YLKHFLLPKRLHFAKSDRIEPLTFYLDPPQWLALNPSEKRYCGSGFHGSDNIFSNQALFV	360
인간	YLKHFLLPKRLHFAKSDRIEPLTFYLDPPQWLALNPSEKRYCGSGFHGSDNIFSNQALFV	360
개코원숭이	YLKHFLLPKRLHFAKSDRIEPLTFYLDPPQWLALNPSEKRYCGSGFHGSDNIFSNQALFV	360
* * * * *		

도면4b

마우스	GYGPAPFKHGAEVDSFENIEVYNYLMCDLLGLIPAPNHGSHGSLNHLKKNPIYHPSPHKKEE	420
소	GYGPGFKHSTEVDSFENIEVYNYLMCDLLNLTPAPNHGTHGSLNHLNHPVYTPKHPKEVR	420
토끼	GYSPGFQHGIEVDSFENIEVYNYLMCDLLNLTPAPNHGTHGSLNHLKKNPIYTPKHPKEVQ	420
인간	GYGPGFPHGIEADTFENIEVYNYLMCDLLNLTPAPNHGTHGSLNHLKKNPVYTPKHPKEVH	420
게코원숭이	GYGPGFPHGIEVDTFENIEVYNYLMCDLLNLTPAPNHGTHGSLNHLKKNPVYTPKHPKEVH	420

마우스	FLSQCPKIST-SNOLGCTCDPWIVPIKDFEKQLHITTEVDVDDIYHMTVPYGRPRILLKQH	475
소	PLVQCPFTRAPRESLDCSCDPSILPIVDFQTQLNLTHAEKTIKRGALPYGRPRVLQN-S	475
토끼	PSVQCPLAGSPRDSLGSCSNPSILPIVDFQTQFNLTTAEKKNIRASLPYGRPRLLQKKS	480
인간	PLVQCPFTRNPRDNLGSCSNPSILPIEDFQTQFNLTVAEKNIYHETLPYGRPRVLQKEN	480
게코원숭이	PLIQCPFTRNPRDNLGSCSNPSILPIEDFQTQFNLTVAEKNIYHETLPYGRPRVLQKEN	480

마우스	RVCLLQCCQLTGYSLDLMPLWASYTFISNDQFSRDFSNCLYQDLRIPLSPVHKCSFY	539
소	TVCLLYQHQPVSQYSDILMPLWTSYTIQANDSFSTEDFSNCLYQDLRIPLSPVHKCSFY	539
토끼	SVCLLYQHQPVSQYSHDILMPLWTSYTVANDSFSTEDFSNCLYQDLRIQFSPVHKCSFY	540
인간	TICLLSQHQFMSQYSDILMPLWTSYTVANDSFSTEDFSNCLYQDFRISLSPVHKCSFY	540
게코원숭이	TICLLSQHQFMSQYSDILMPLWTSYTVANDSFSTEDFSNCLYQDFRISLSPVHKCSFY	540

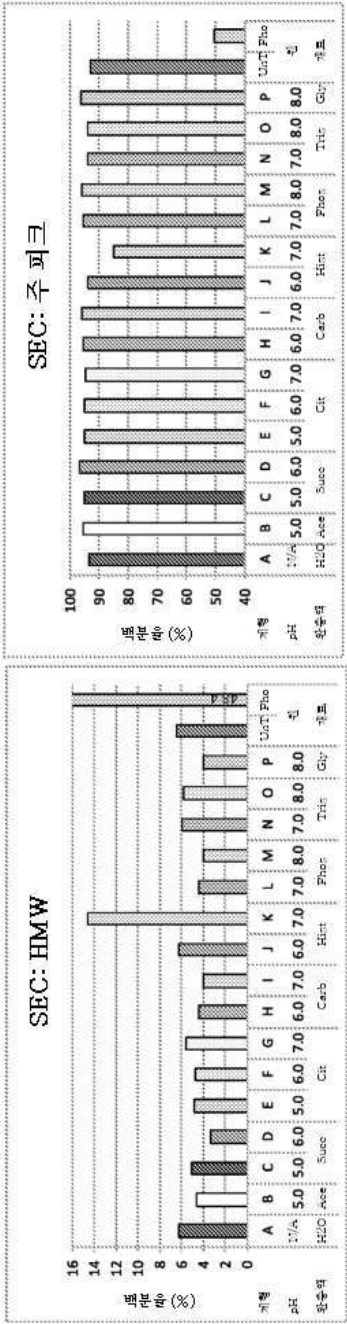
마우스	KSNKLSYGFLLTPPRLNHSNHIYSEALLTSNIVPYQSFQVWRYFHDILLQRYAEERN	598
소	KNNAKLSYGFLLSPPQLHIGSSQVYSEALLTSNIVPYQSFQVWRYFHDILLQRYAEERN	599
토끼	KNNAKLSYGFLLSPPQLHIGSSQVYSEALLTSNIVPYQSFQVWRYFHDILLQRYAEERN	600
인간	KNNKTVSYGFLLSPPQLNHSNHIYSEALLTSNIVPYQSFQVWRYFHDILLQRYAEERN	600
게코원숭이	KNNKTVSYGFLLSPPQLNHSNHIYSEALLTSNIVPYQSFQVWRYFHDILLQRYAEERN	600

마우스	GINNVSGPVDFDYDGRYDSLETLQNSRVIRSCEILIPTHFFIVLTSCKQLSETPLECS	659
소	GINNVSGPVDFDSYDGRYDSLETLQNSKIIRNLEVLIPTHFFIVLTSCKNTSQTPHQCE	659
토끼	SINNVSGPVDFDSYDGRYDSSEALKNNRVIRNCEILIPTHFFIVLTSCKNTSQTPHQCD	660
인간	GNNVSGPVDFDYDGRCDSENLQKRRVIRNCEILIPTHFFIVLTSCKNTSQTPHQCE	660
게코원숭이	GNNVSGPVDFDYDGRYDSLEILQKRRVIRNCEILIPTHFFIVLTSCKNTSQTPHQCE	660

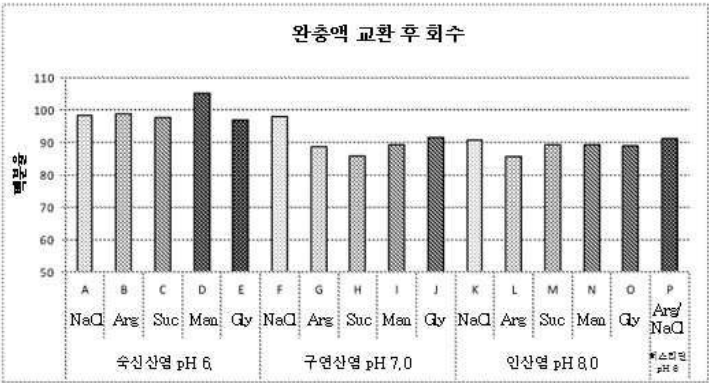
마우스	ALESSAYILPHRPHNIESCTHGKRESSWVEELLTHPARVTDVEITGLSFYQQRQESVS	719
소	NLDAMAFILPHKTONHSECAHGKHESLWVEELLKHTARITDVEHITGLSFYQQRKEPIS	719
토끼	NLDLAFILPHNSDHSSECVHERRSSWVEELLMMHARITDVEHITGLSFYQQRKEPVS	720
인간	NLDLAFILPHRTDHSSECVHGHESWVEELLMLHARITDVEHITGLSFYQQRKEPVS	720
게코원숭이	NLDLAFILPHRTDHSSECLHGKHESWVEELLMLHARITDVEHITGLSFYQQRKEPVS	720

마우스	EILRLYTHLPIFSQED	735
소	DILKLYTHLPTFNQED	735
토끼	DILKLYTHLPTVSQED	736
인간	DILKLYTHLPTFSQED	736
게코원숭이	DILKLYTHLPTFSQED	736

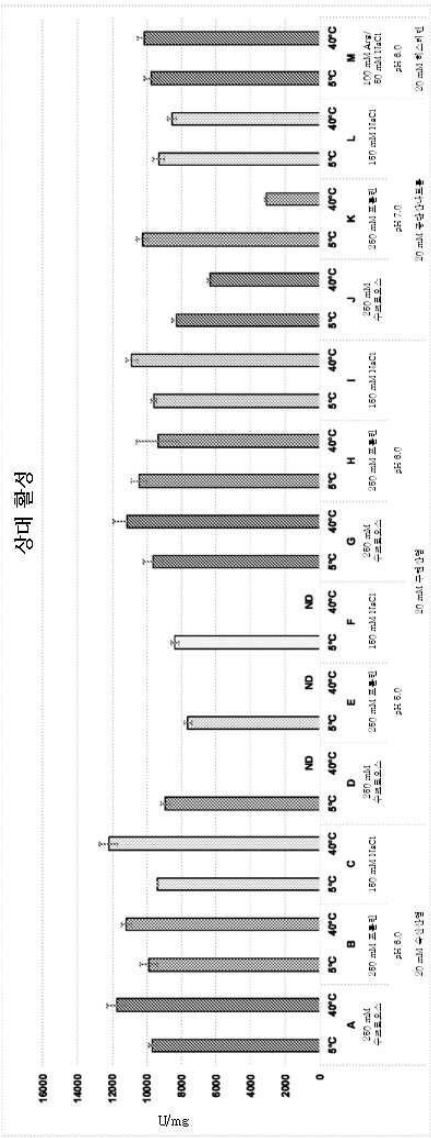
도면5



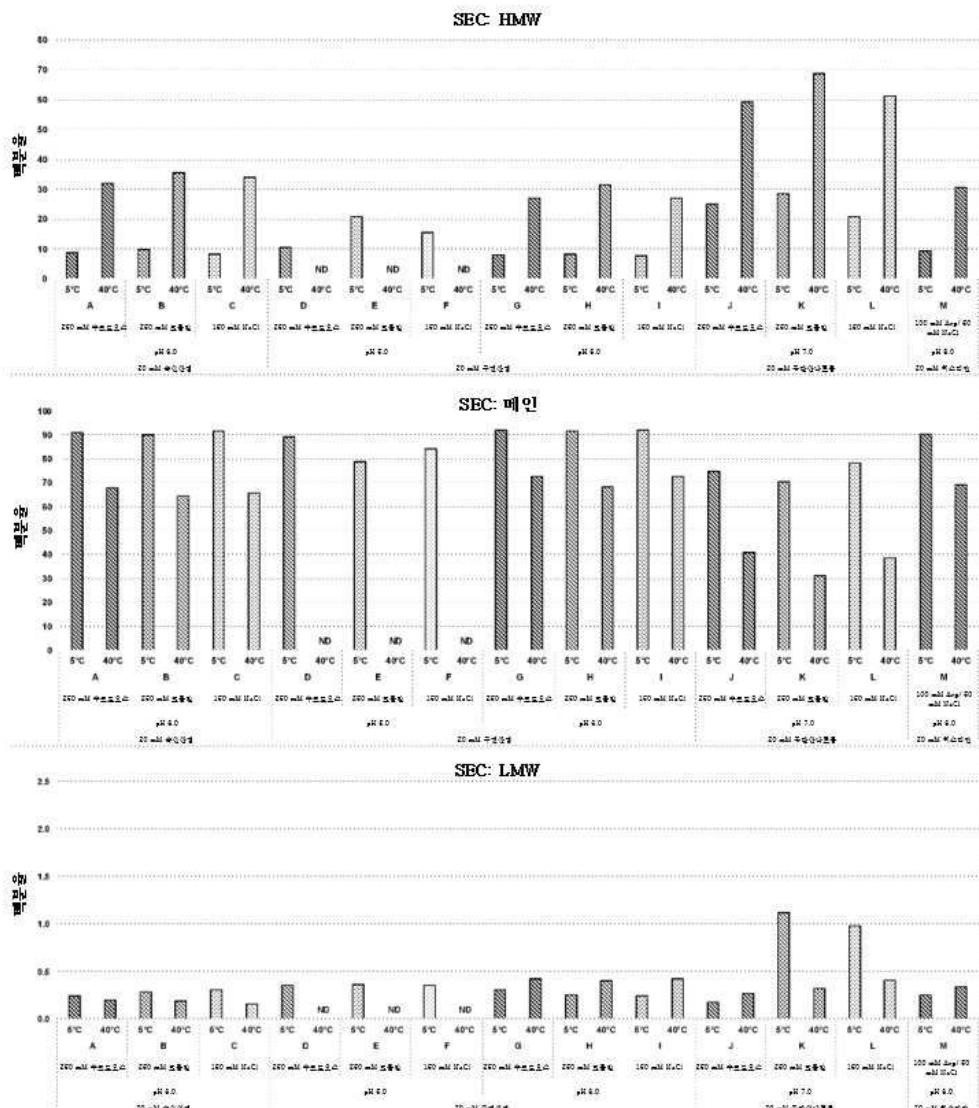
도면6



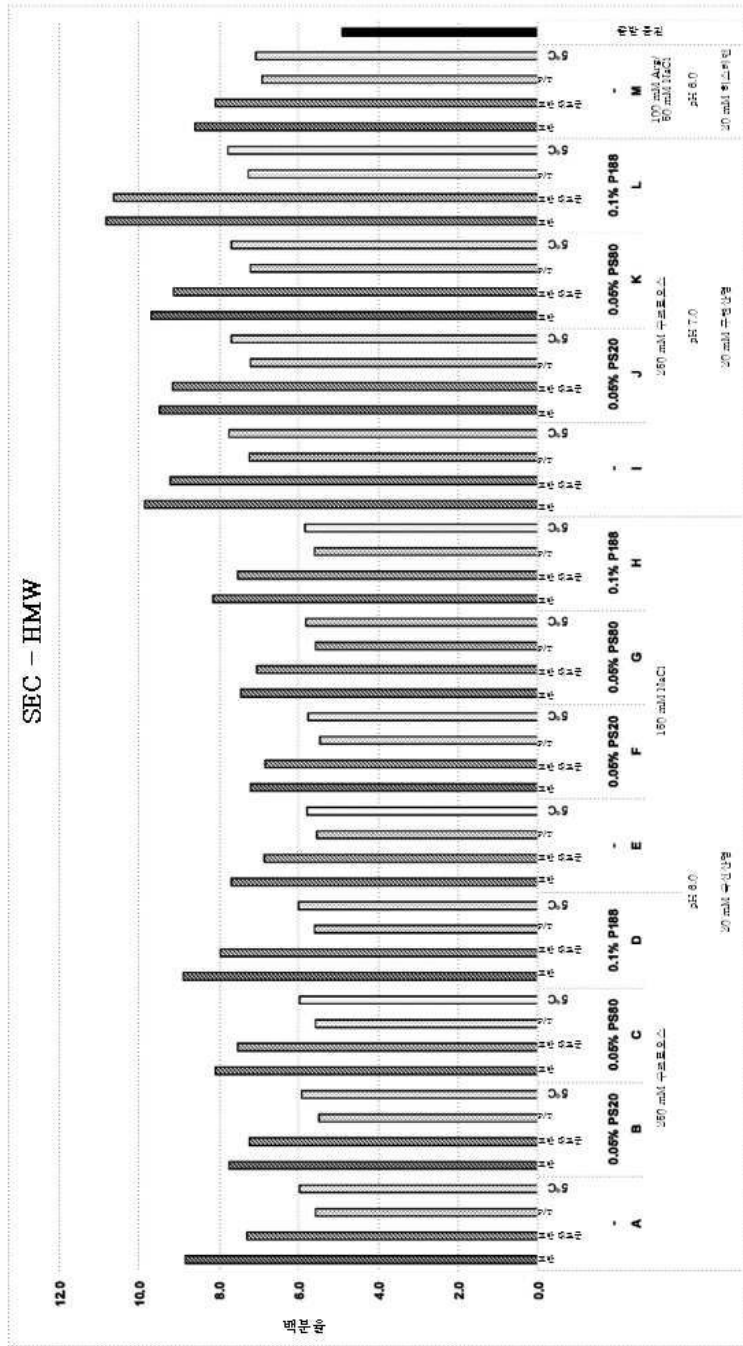
도면7



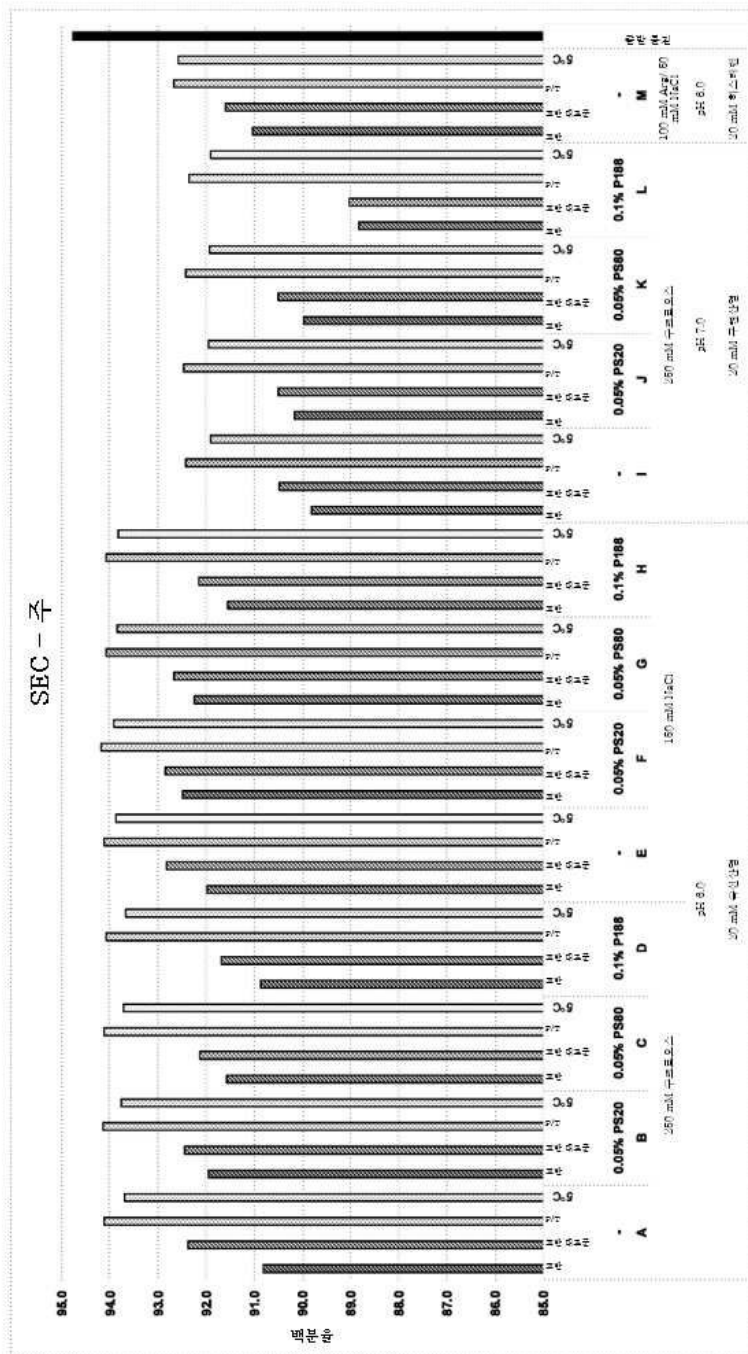
도면8



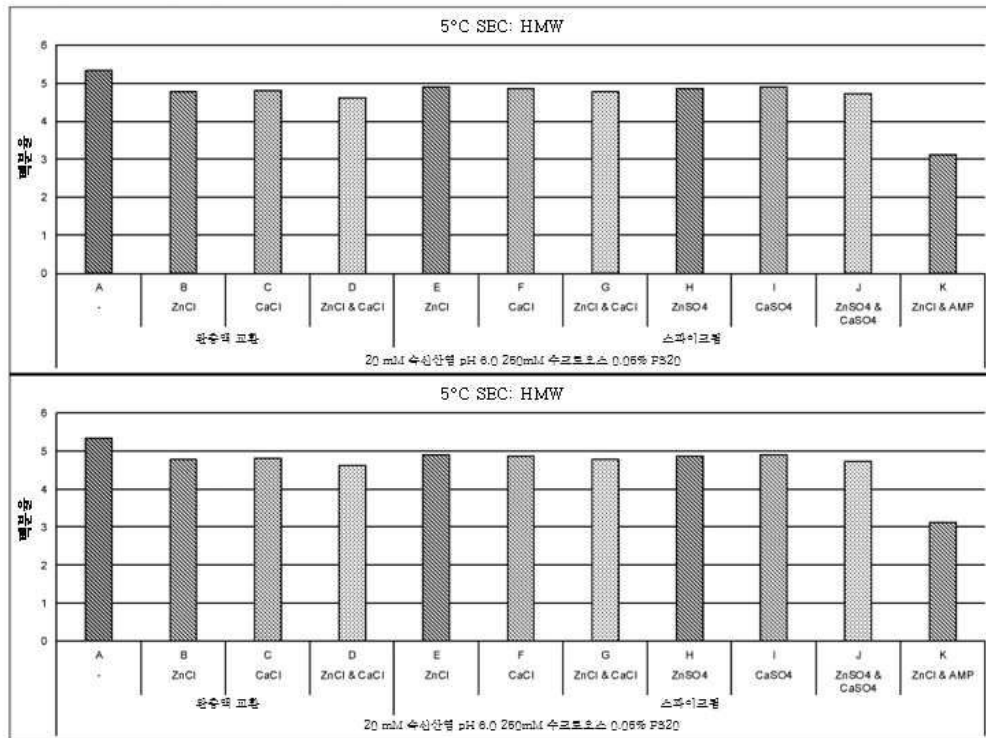
도면9a



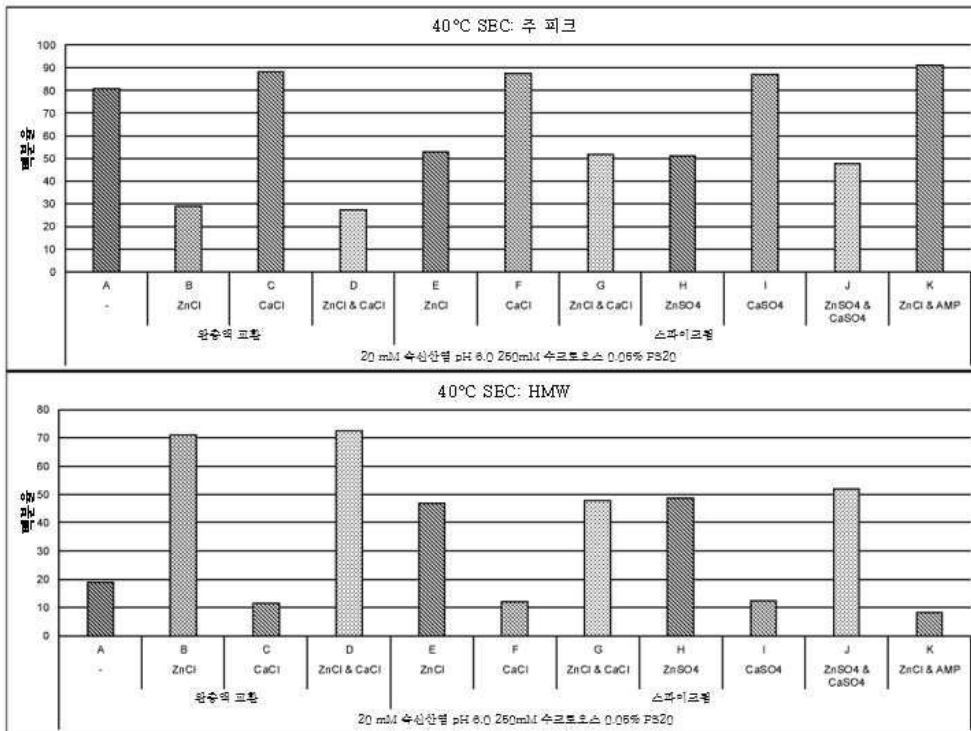
도면9b



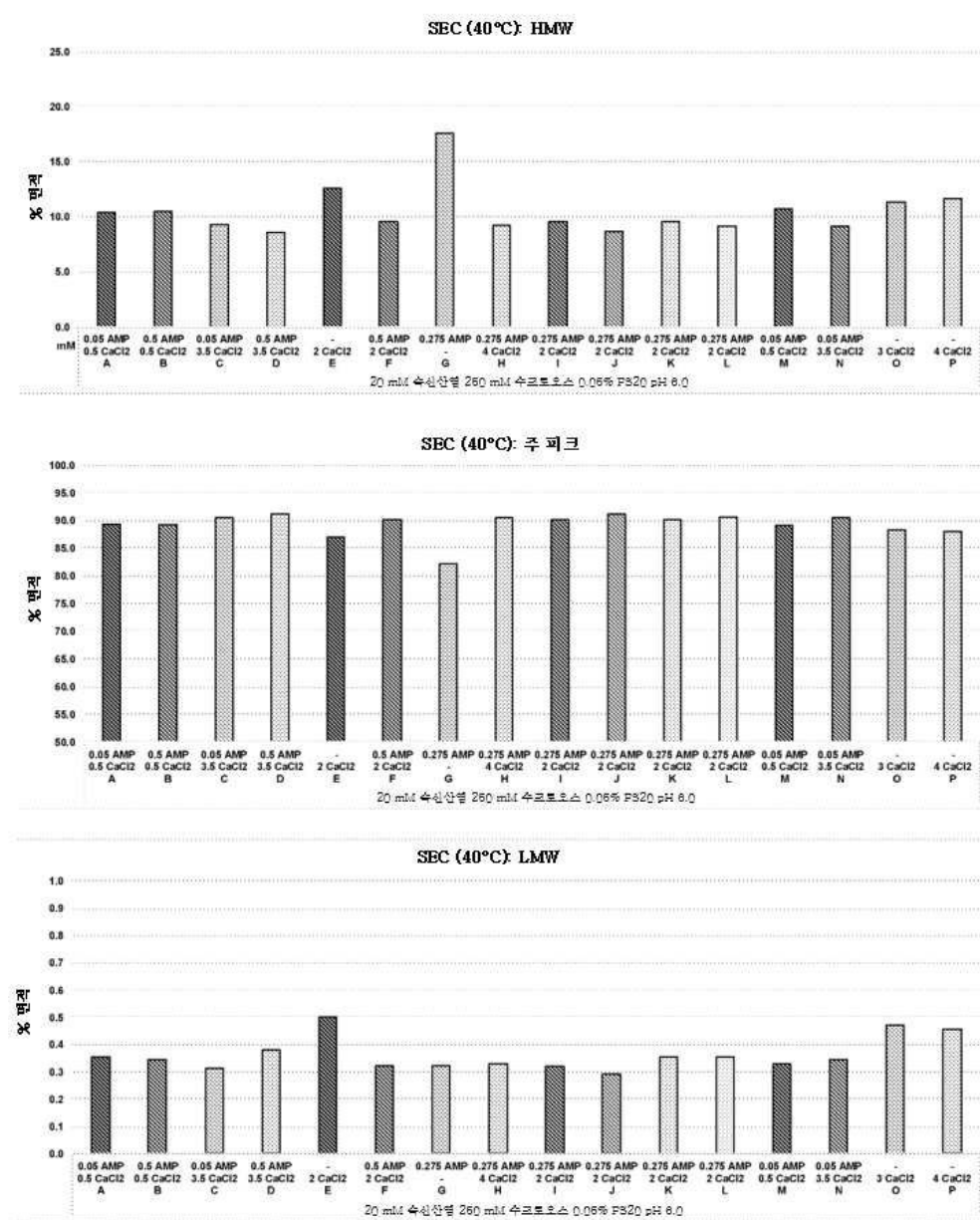
도면10



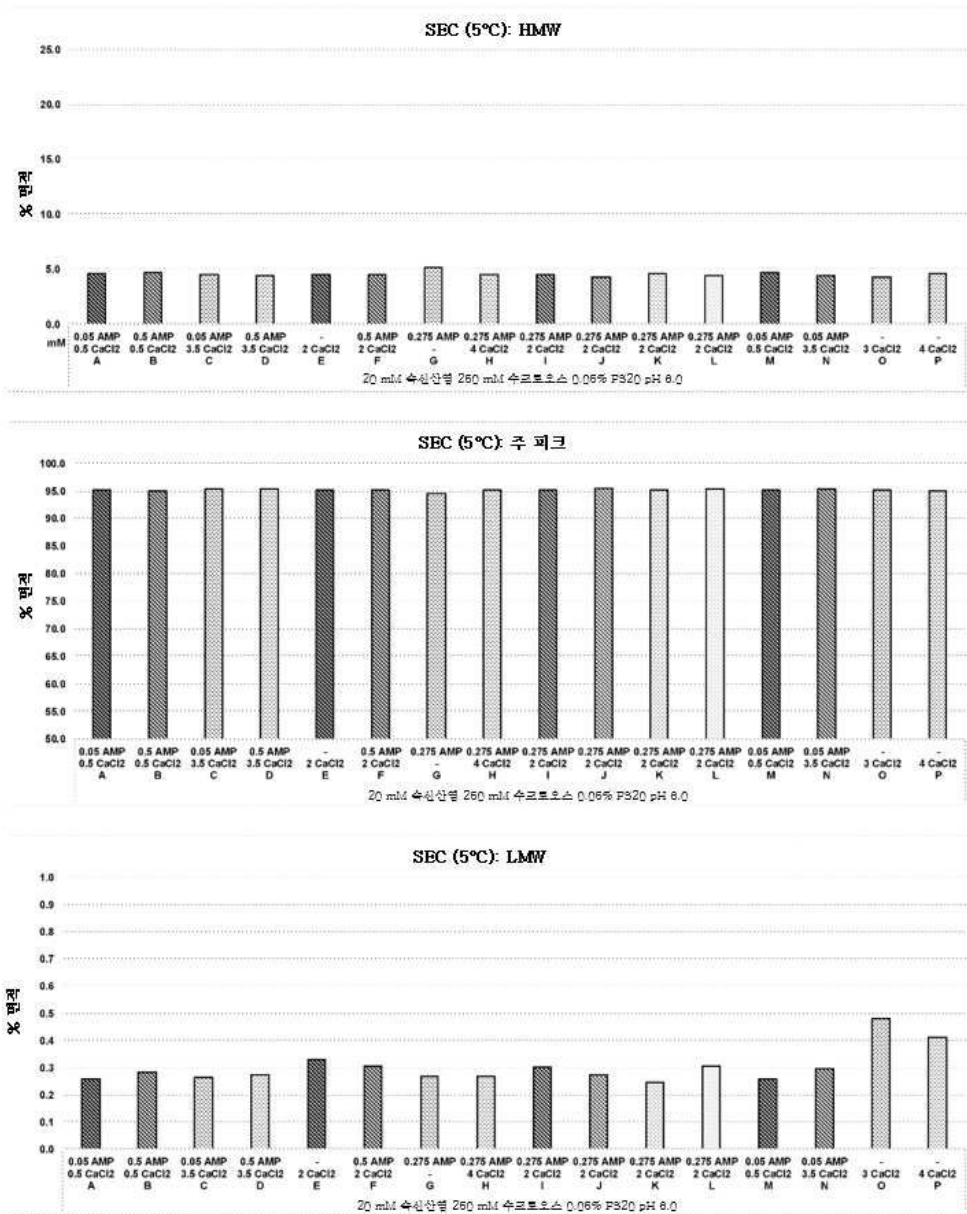
도면11



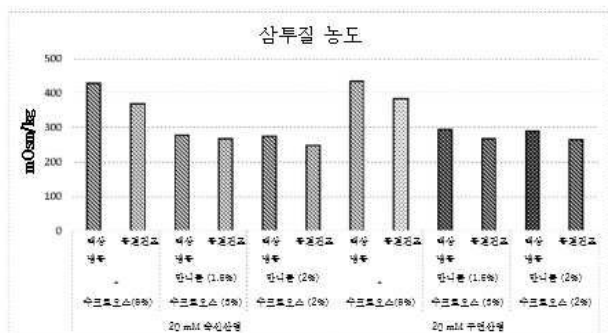
도면12a



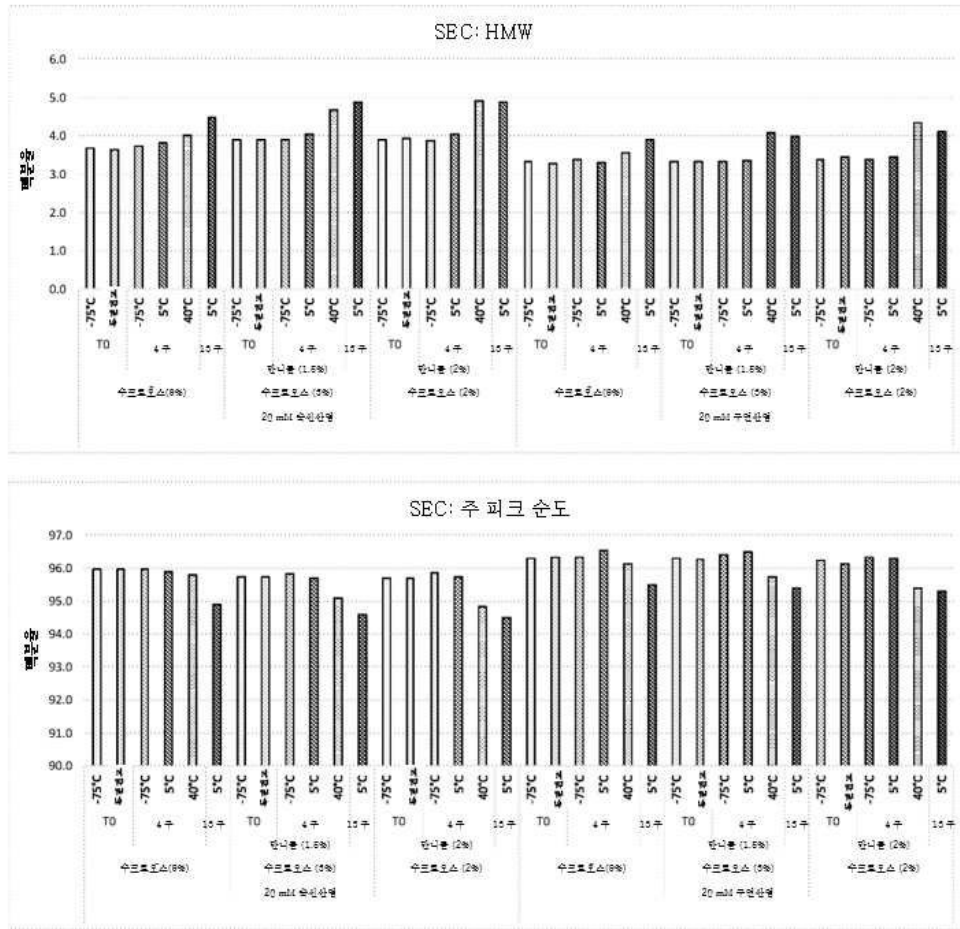
도면12b



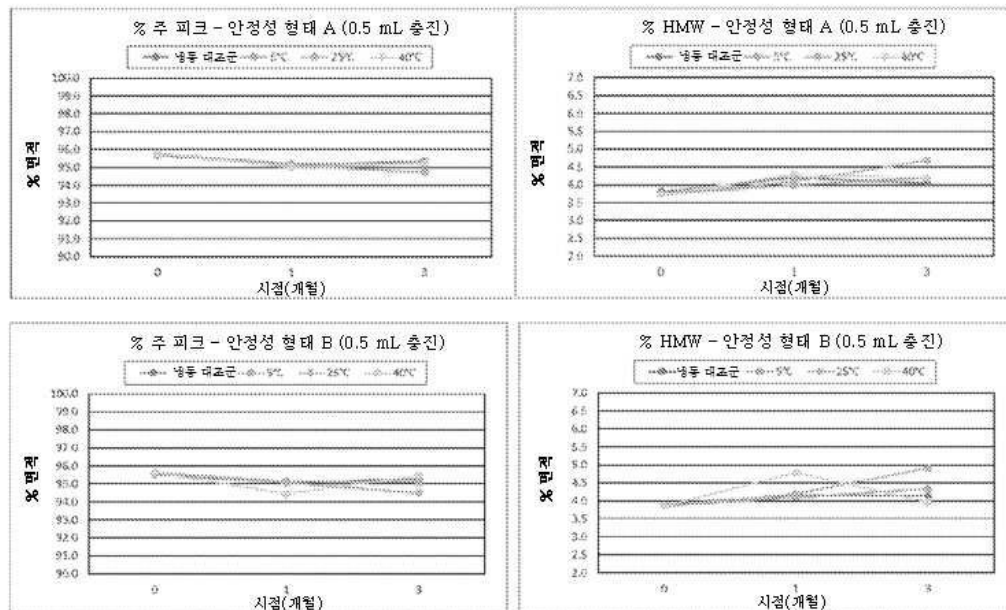
도면13



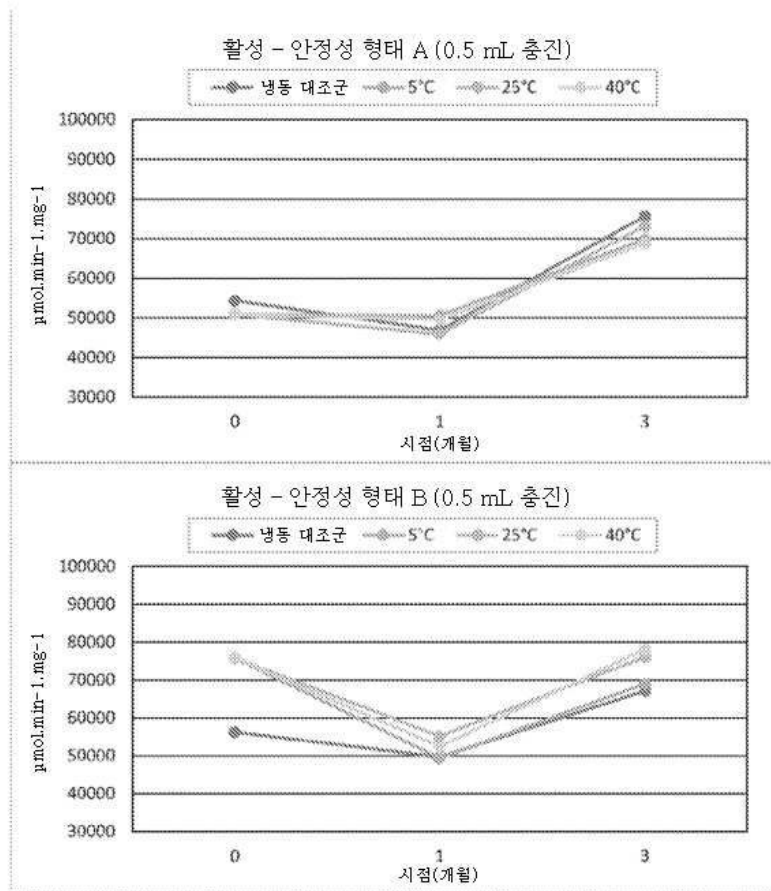
도면14



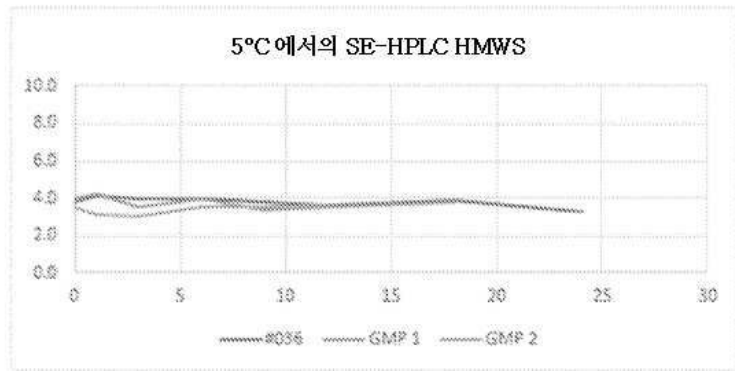
도면15



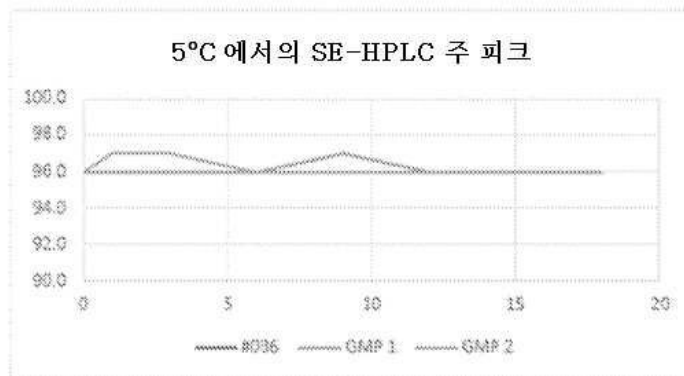
도면16



도면17

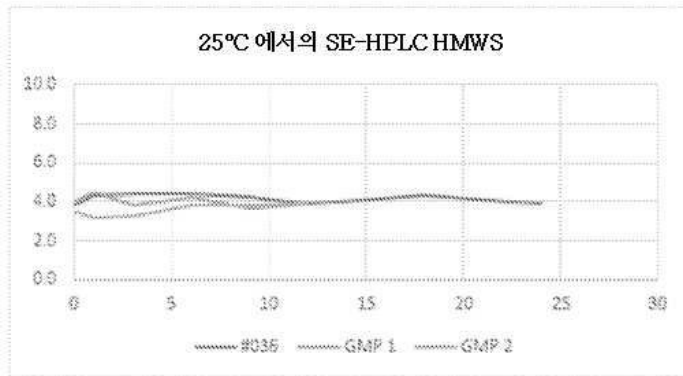


5°C에서 24개월 동안 HMW의 유의한 변화 없음

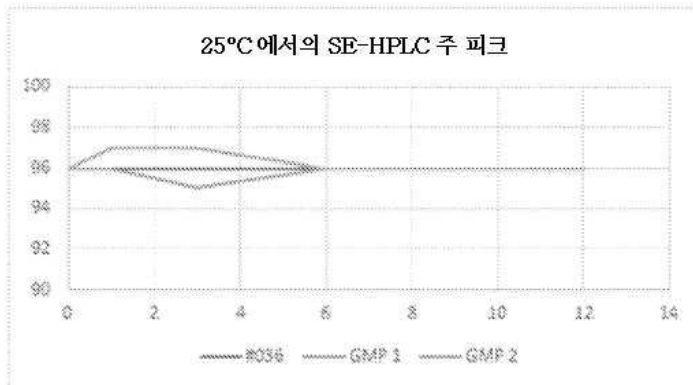


5°C에서 24개월 동안 주 피크의 유의한 변화 없음

도면18

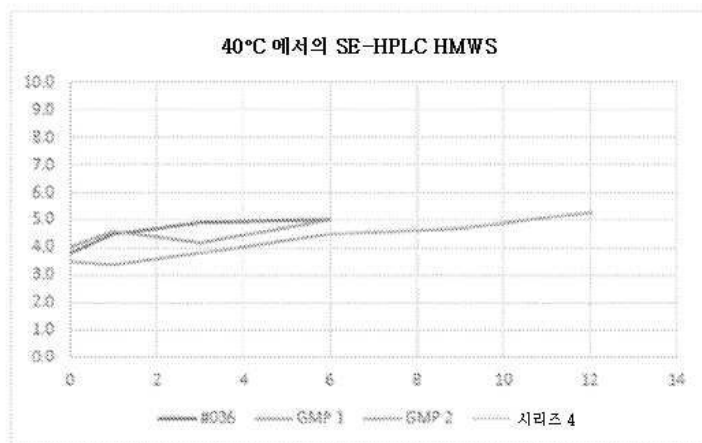


25°C에서 24개월 동안 HMW의 유의한 변화 없음

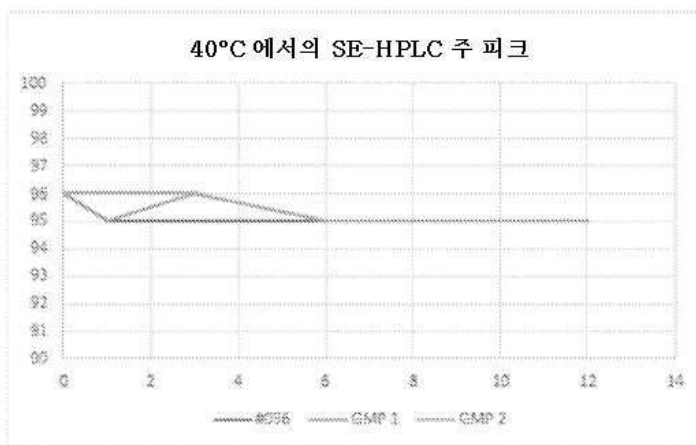


25°C에서 24개월 동안 주 피크의 유의한 변화 없음

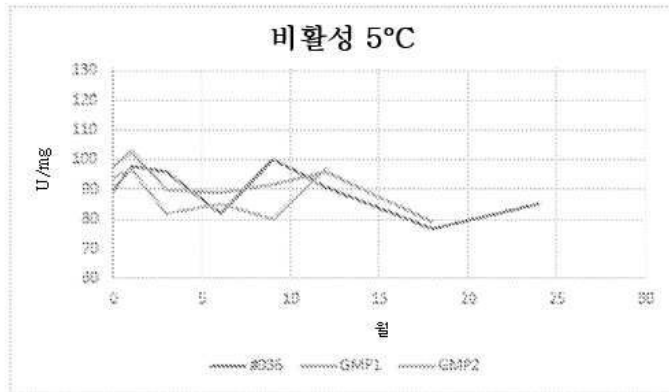
도면19



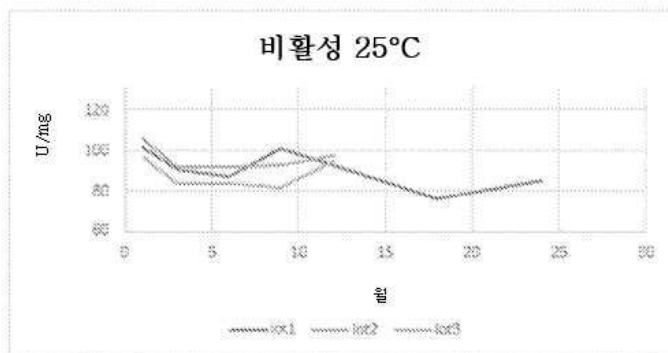
40°C에서 6개월에 걸쳐 HMW의 약간의 증가



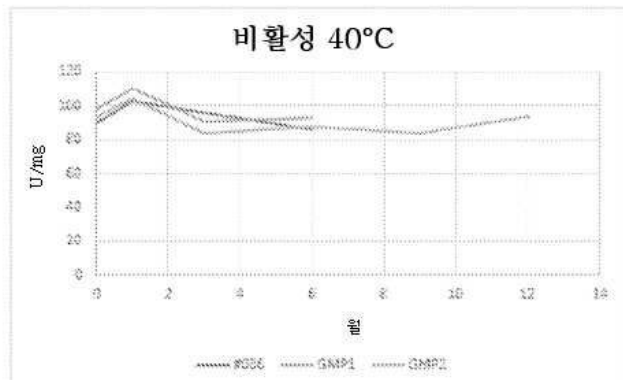
도면20



5°C 에서 24 개월 동안 비활성에 유의한 변화 없음

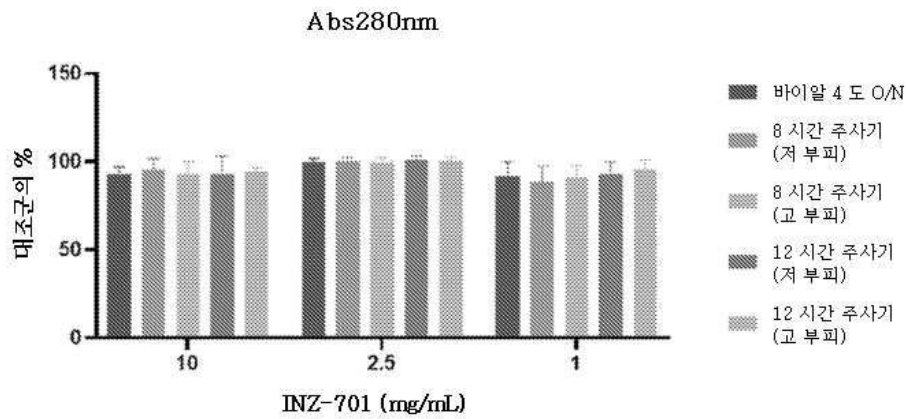


25°C 에서 24 개월 동안 HMW 의 유의한 변화 없음

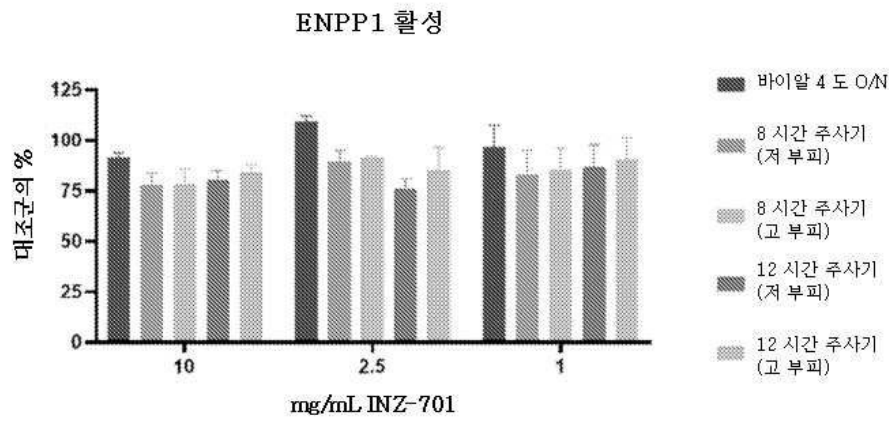


40°C 에서 12 개월 후 비활성의 약간의 감소

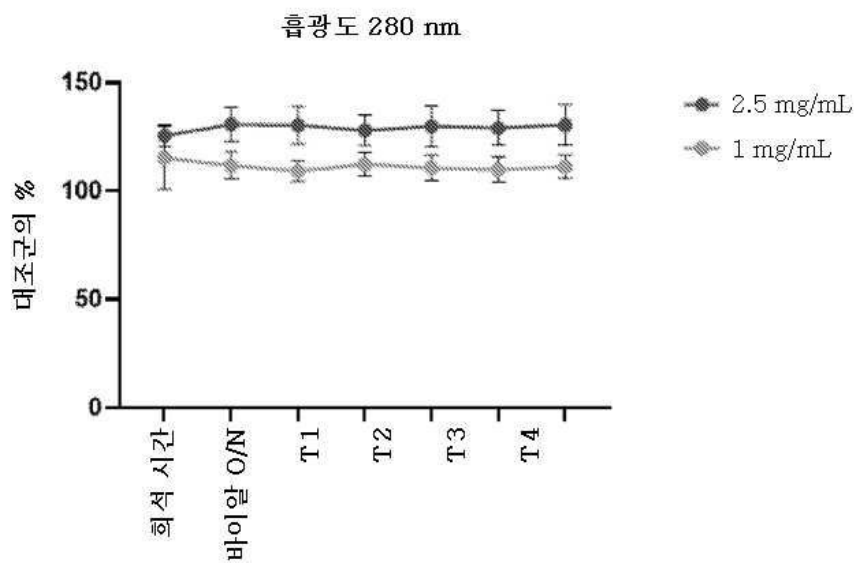
도면21



도면22

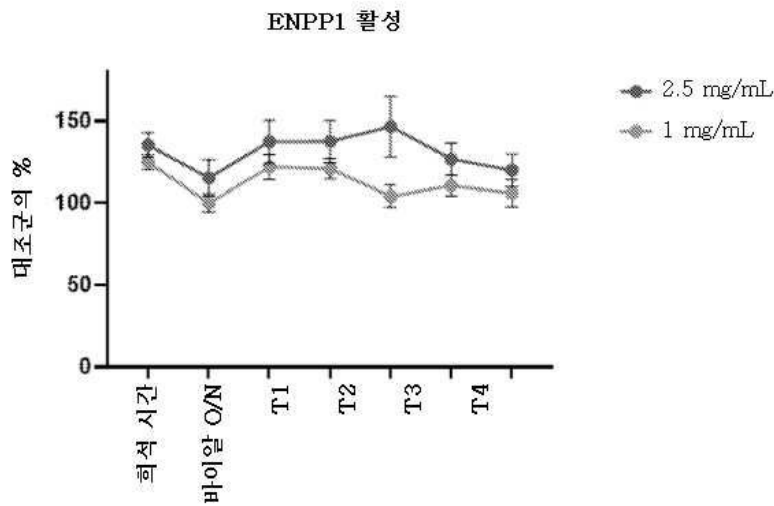


도면23



도면24

5718333.1



서열 목록

Sequence Listing Information:

DTD Version: V1_3

File Name: 4427-11902_sequence.xml

Software Name: WIPO Sequence

Software Version: 2.1.2

Production Date: 2022-09-23

General Information:

Current application / IP Office: WO

Current application / Filing date: 2022-09-23

Current application / Applicant file reference: 4427-11902

Earliest priority application / IP Office: US

Earliest priority application / Application number: 63/248,303

Earliest priority application / Filing date: 2021-09-24

Applicant name: Inozyme Pharma, Inc.

Applicant name / Language: en

Invention title: LYOPHILIZED ENPP1 POLYPEPTIDE FORMULATIONS AND USES THEREOF (en)

Sequence Total Quantity: 115

Sequences:

Sequence Number (ID): 1

Length: 925

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

- source, 1..925
 - > mol_type, protein
 - > organism, Homo sapiens

Residues:

MERDGCAGGG	SRGEGGGRAP	REGPAGNGRD	RGRSHAAEAP	GDPQAAASLL	APMDVGEEPL	60
EKAARARTAK	DPNTYKVLSL	VLSVCVLTTI	LGCIFGLKPS	CAKEVKSCKG	RCFERTFGNC	120
RCDAAACVELG	NCCLDYQETC	IEPEHIWTCN	KFRCGEKRLT	RSLCACSDDC	KDKGDCCINY	180
SSVCQGEKSW	VEEPCESINE	PQCPAGFETP	PTLLFSLDGF	RAEYLHTWGG	LLPVISKLKK	240
CGTYTKNMRP	VYPTKTFPNH	YSIVTGLYPE	SHGIIDNKMY	DPKMNASFSL	KSKEKFNPEW	300
YKGEPWVTA	KYQGLKSGTF	FWPGSDVEIN	GIFPDIYKMY	NGSVPFEERI	LAVLQWLQLP	360
KDERPHFYTL	YLEEPDSSGH	SYGPVSSEVI	KALQRVDGMV	GMLMDGLKEL	NLHRCLNLIL	420
ISDHGMEQGS	CKKYIYLNKY	LGDVKNIKVI	YGPAARLRPS	DVPDKYYSFN	YEGIARNLSC	480
REPQHFHPY	LKHFLPKRLH	FAKSDRIEPL	TFYLDPPWQL	ALNPSEKRYC	GSGFHGSDNV	540
FSNMQALFVG	YGPFGKHGIE	ADTFENIEVY	NLMCDLLNLT	PAPNNGTHGS	LNHLLKNPVY	600
TPKHPKEVHP	LVQCPFTRNP	RDNLGCSCNP	SILPIEDFQT	QFNLTVAEEK	IIKHETLPYG	660
RPRVLQKENT	ICLLSQHQFM	SGYSQDILMP	LWTSYTVDRN	DSFSTEDFSN	CLYQDFRIPL	720
SPVHKCSFYK	NNTKVSYGFL	SPPQLNKNSS	GIYSEALLTT	NIVPMYQSFQ	VIWRYFHDTL	780
LRKYAEERNG	VNVVSGPVFD	FDYDGRCDL	ENLRQKRRVI	RNQEILIPTH	FFIVLTSCKD	840
TSQTPLHCEN	LDTLAFILPH	RTDNSESCVH	GKHDSSWVEE	LLMLHRARIT	DVEHITGLSF	900
YQQRKEPVSD	ILKLKTHLPT	FSQED				925

Sequence Number (ID): 2

Length: 827

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

- REGION, 1..827
 - > note, ENPP1 Polypeptide
- source, 1..827
 - > mol_type, protein
 - > organism, synthetic construct

Residues:

PSCAKEVKSC	KGRCFERTFG	NCRDAACVE	LGNCCLDYQE	TCIEPEHIWT	CNKFRCGEKR	60
LTRSLCACSD	DKDKGDCCI	NYSSVCQGEK	SWVEEPCESI	NEPQCPAGFE	TPPTLLFSLD	120
GFRAEYLHTW	GGLLPVISKL	KKCGTYTKNM	RPVYPTKTFP	NHYSIVTGLY	PESHGIIDNK	180
MYDPKMNASF	SLKSKEKFNP	EWYKGEPWV	TAKYQGLKSG	TFFWPGSDVE	INGIFPDIYK	240
MYNGSVPFEE	RILAVLQWLQ	LPKDERPHFY	TLYLEEPDSS	GHSYGPVSSE	VIKALQRVDG	300
MVGMLMDGLK	ELNLHRCLNL	ILISDHGMEQ	GSCCKYIYLN	KYLGDVKNIK	VIYGPAARLR	360
PSDVPDKYYS	FNYEGIARNL	SCREPNQHFK	PYLKHFLPKR	LHFAKSDRIE	PLTFYLDPQW	420
QLALNPSEK	YCGSGFHGSD	NVFSNMQALF	VGYGPGFKHG	IEADTFENIE	VYNLMCDLLN	480
LTPAPNNGTH	GSLNHLKKNP	VYTPKHPKEV	HPLVQCPFTR	NPRDNLGCSC	NPSILPIEDF	540
QTQFNLTVAE	EKI IKHETLP	YGRPRVLQKE	NTICLLSQHQ	FMSGYSQDIL	MPLWTSYTV	600
RNDSFSTEDF	SNCLYQDFRI	PLSPVHKCSF	YKNNTKVSYG	FLSPPQLNKN	SSGIYSEALL	660
TTNIVPMYQS	FQVIWRYFHD	TLLRKYAEER	NGVNVVSGPV	FDFDYDGRCD	SLENLRQKRR	720
VIRNQEILIP	THFFIVLTSC	KDTSQTPHLC	ENLDTLAFIL	PHRTDNSESC	VHGKHDSSWV	780
EELLMLHRAR	ITDVEHITGL	SFYQQRKEPV	SDILKLKTHL	PTFSQED		827

Sequence Number (ID): 3

Length: 16

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

- REGION, 1..16
 - > note, ENPP2 Signal sequence
- source, 1..16
 - > mol_type, protein
 - > organism, synthetic construct

Residues:

LFTFAVGVNI	CLGFTA	16
------------	--------	----

Sequence Number (ID): 4

Length: 906

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

- source, 1..906
 - > mol_type, protein

> organism, Mus musculus

Residues:

MERDGDQAGH	GPRHGSAGNG	RELESPAAAS	LLAPMDLGEE	PLEKAERARP	AKDPNTYKVL	60
SLVLSVCLVT	TILGCIIFGLK	PSCAKEVKSC	KGRCFERTFS	NCRCDAACVS	LGNCCLDFQE	120
TCVEPTHIWT	CNKFRGCEKR	LSRFVCSCAD	DKTHNDCCI	NYSSVCQDKK	SWVEETCESI	180
DTPECPAEFE	SPPTLLFSLD	GFRAEYLHTW	GGLLPVISKL	KNCGTYTKNM	RPMYPTKTFP	240
NHYSIVTGLY	PESHGIIDNK	MYDPKMNASF	SLKSKEKFNP	LWYKGQPIWV	TANHQEVKSG	300
TYFWPGSDVE	IDGILPDIYK	VYNGSVPFEE	RILAVLEWLQ	LPSHERPHFY	TYLEEPDSS	360
GHSHPVPSSE	VIKALQKVDR	LVGMLMDGLK	DLGLDKCLNL	ILISDHGMEQ	GSCKKYVYLN	420
KYLGDVNNVK	VVYGPAARLR	PTDVPETYYS	FNYEALAKNL	SCREPNQHFR	PYLKPFLPKR	480
LHFAKSDRIE	PLTFYLDPOW	QLALNPSEK	YCGSGFHGSD	NLFSNMQALF	IGYGPAFKHG	540
AEVDSFENIE	VYNLMCDLLG	LIPAPNNGSH	GSLNHLKKP	IYNPSHPKEE	GFLSQCPIS	600
TSNDLGCTCD	PWIVPIKDFE	KQLNLTTEDV	DDIYHMTVPY	GRPRILLKQH	RVCLLQQQQF	660
LTGYSLDLLM	PLWASYTFLS	NDQFSRDDFS	NCLYQDLRIP	LSPVHKCSYY	KSNSKLSYGF	720
LTPPRLNRVS	NHIYSEALLT	SNIVPMYQSF	QVIWHYLHDT	LLQRYAHERN	GINVSGPVF	780
DFDYDGRYDS	LEILKQNSRV	IRSQEILIPT	HFFIVLTSCK	QLSETPLECS	ALESSAYILP	840
HRPDNIESCT	HGKRESSWVE	ELLTLHRARV	TDVELITGLS	FYQDRQESVS	ELLRLKTHLP	900
IFSQED						906

Sequence Number (ID): 5

Length: 924

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

```

- source, 1..924
    > mol_type, protein
    > organism, Bos taurus

```

Residues:

MERDSCAGGG	SRGEGGGRGP	REGLAGNGRD	PGPGRAAEAS	GEPQAAASLL	APMDLGEEPL	60
ERAARARPAK	DPNTYKVLSL	VLSVCLTTI	LGCIFGLKPS	CAKEIKSCKG	RCFERTFGNC	120
RCDAACVDLG	NCCLDYQETC	IEPERIWTCT	KFRGCEKRLS	RSLCSCSDDC	KDKGDCCINH	180
GSVCRGEKSW	AEEECDSIDE	PQCAGFETP	PTLLFSLDGF	RAEYLHTWGG	LLPVISKLKT	240
CGTYTKNMRP	VYPTKTFPNH	YSIVTGLYPE	SHGIIDNNIY	DPQMNAFAL	KNKEKFNPEW	300
YKGEPIWLTA	KYQGLKTGTF	FWPGSDVKIN	GIFPDIYKIY	NVSVPFEEIR	LAILKWLQLP	360

KDERPHFYTL	YLEEDSSGH	SYGPVSSEVI	RALQRVDNMV	GMLMDGLKEL	NLHRCNLIL	420
ISDHGMEQGS	CKKYVYLNKY	LGDTKDYKVV	YGPAARLRPS	DVPDKYYSFD	YEGIAKNLSC	480
QEPNQHFQPY	LKHFLPKRLH	FAKNDRIERL	TFYLDPPQWL	ALNPSEKRYC	GGGFHGSNT	540
FLNMQALFIG	YGPFGKHSTE	VDSFENIEVY	NLMCDLLNLT	PAPNNGTHGS	LNHLLSNPVY	600
TPKHPKEVRP	LVQCPFTRAP	RESLDCSDP	SILPIVDFQT	QLNLTMAEEK	TIKRGALPYG	660
RPRVLQNSTV	CLLYQHOFVS	GYSRDILMPL	WTSYTIGRND	SFSTEDFSNC	LYQDLRIPLS	720
PVHKCSFYKN	NAKLSYGLLS	PPQLHKGSQ	VYSEALLTN	IVPMYQSFQV	IWHYHGTLL	780
QRYAEERNGL	NVSGPVFDS	DYDGRYDSLE	TLKQNSKIIR	NLEVLIPTHF	FLVLTCKNT	840
SQTPLQCENL	DAMAFILPHK	TDNSESCHAG	KHESLWVEEL	LKLHTARITD	VEHITGLSFY	900

QERKEPISDI LKLKTHLPTF NQED 924

Sequence Number (ID): 6

Length: 925

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

- source, 1..925
- > mol_type, protein
- > organism, Oryctolagus cuniculus

Residues:

MERDGCAGGG	SRGEGGRAP	REGPAGNSRD	PGRSHAAEAP	GNPQAAASLL	APMDVGEEPL	60
EKAARARTAK	DPNTYKVLSL	VLSVCVLTTI	LGCIFGLKPS	CAKEVKSCKG	RCFERTFGNC	120
RCDAAACVELG	NCCLDYQETC	IEPEHIWTCN	KFRCGEKRLT	RSLCACSDDC	KDQGDCCINY	180
SSVCQGEKSW	VEEPCESINE	PQCAGFETP	PTLLFSLDGF	RAEYLHTWGG	LLPVISKLKK	240
CGTYTKNMRP	VYPTKTFPNH	YSIVTGLYPE	SHGIIDNKMY	DPKMNASFSL	KSKEKFNPEW	300
YKGEPIWVTA	KYQGLKSGTF	FWPGSDVEIN	GIFPDIYKMY	NGSVPFEERI	LAVLQWLQLP	360
KDERPHFYTL	YLEEDSSGH	SYGPVSSEVI	KALQRVDNMV	GMLMDGLKEL	NLHRCNLIL	420
VSDHGMEQGS	CKKYIYLNKY	LGDVKNIKVI	YGPAARLRPS	DVPDKYYSFN	YEGIARNLSC	480
REPQNHFQPY	LKHFLPKRLH	FAKSDRIEPL	TFYLDPPQWL	ALNPSEKRYC	GSGFHGSNT	540
FSNMQALFVG	YGPFGKHGIE	VDTFENIEVY	NLMCDLLNLT	PAPNNGTHGS	LNHLLKNPVY	600
TPKHPKEVHP	LIQCPFTRNP	RDNLCSCNP	SILPIEDFQT	QFNLTVAAEK	NIKHETLPYG	660
RPRVLQKNT	ICLLSQHQFM	SGYSQDILMP	LWTSYTVDRN	DSFSTEDFSN	CLYQDFRISL	720
SPVHKCSFYK	NNTKVSYGFL	SPPQLNKNSR	GIYSEALLTT	NIVPMYQSFQ	VIWRYFHDTL	780

LRKYAEERNG VNVVSGPVFD FDYDGRYDSL EILRQKRRVI RNQEILIPTH FFIVLTSCKD 840
 ASQTPLHCEN LDTLAFILPH RTDENSECLH GKHESSWVEE LLMLHRARIT DVEHITGLSF 900
 YQQRKEPVSD ILKLKTHLPT FSQED 925

Sequence Number (ID): 7

Length: 19

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

- REGION, 1..19

> note, Azurocidin Signal sequence

- source, 1..19

> mol_type, protein

> organism, synthetic construct

Residues:

MTRLTVLALL AGLASSRA 19

Sequence Number (ID): 8

Length: 926

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

- source, 1..926

> mol_type, protein

> organism, Papio hamadryas

Residues:

MERDGCAGGG SQGGGKGGRG PREGLAGNGR DPSHGQASEA PGDPQAAASL LAPMDLGEEP 60

LEKAAGARPA KDPNTYKVLS LVLSVCVLTT ILGCIFGLKP SCAKEVKSCCK GRCFERTFGN 120

CRCDVACVDL GNCCLDYQET CIEPERIWTC NKFRGCEKRL SRSLCACSDS CKERGDCCIN 180

YSAVCQGEKS WVEETCENIN EPQCPEGFEM PPTLLFSLDG FRAEYLHTWG GLLPVISKLK 240

KCGTYAKNMR PVYPTKTFFN HYSIVTGLYP ESHGIIDNKM YDPKMNASF S LKSKEKFNPE 300

WYKGEPDWLT AKYQGLRSGT FFWPGSDVKI NGIFPDYKI YNGSVPFEE ILAILKWRL 360

PKDERPHFYT LYLEEPDSSG HSYGPVSSEV IKALQRVDNM VGMLMDGLKE LNLHQCLNLI 420

LISDHGMEQG SCKKYIYLNK YLGDTKNIKV IYGAARLRP SDVPEKYYSF NYENIARNLS 480

CREPNQHFKEP YLKHFLPKRL HFAKSDRIEP LTFYLDPQWQ LALSPSERKY CGSGFHGSDN 540

VFSNMQALFV GYGPGFQHGI EVDSFENIEV YNLMCDLLNL TPAPNNGTHG SLNHLLKNPI 600

YTPKHPKEVQ	PSVQCPLAGS	PRDSLGCSCN	PSILPIVDFQ	TQFNLTAAEE	KNINRASLPY	660
GRPRLLQKKS	SVCLLYQHGF	VSGYSHDVLM	PLWTSYTVNR	NDSFSTEDFS	NCLYQDLRIS	720
FSPIHNCSEFY	KNNAKLSYGF	LSPPLSKDS	SQIYSEALLT	SNIVPMYQSF	QVIWRYFHDT	780
LLQRYAEERN	SINNVSGPVF	DSDYDGRYDS	SEALKRNRRV	IRNQEILIPT	HFFIVITSCK	840
NTSQTPLQCD	NLDPLAFILP	HRSDNSESCV	HEKRESSWIE	ELMMHRARI	MDVEHITGLS	900
FYQERKEPVS	DILKLKTHLP	TVSQED				926

Sequence Number (ID): 9

Length: 1063

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

- REGION, 1..1063
 - > note, ENPPI Polypeptide
- source, 1..1063
 - > mol_type, protein
 - > organism, synthetic construct

Residues:

FTAGLKPSCA	KEVKSCKGRC	FERTFGNCRC	DAACVELGNC	CLDYQETCIE	PEHIWTCNKF	60
RCGEKRLTRS	LCACSDDKD	KGDCCINYSS	VCQGEKSWVE	EPCEINPEPQ	CPAGFETPPT	120
LLFSLDGFRA	EYLHTWGGLL	PVISKLKCKG	TYTKNMRPVY	PTKTFPNHYS	IVTGLYPESH	180
GIIDNKMYDP	KMNASFSLKS	KEKFNPEWYK	GAPIWVTAKY	QGLKSGTFFW	PGSDVEINGI	240
FPDIYKMYNG	SVPFEERILA	VLQWLQPKD	ERPHFYTLYL	EEPSSGHSY	GPVSSEVIKA	300
LQRVDGMVGM	LMDGLKELNL	HRCLNLILIS	DHGMEQGSCK	KYIYLNKYL	DVKNIKVIYG	360
PAARLRPSDV	PDKYYSFNYE	GIARNLSCRE	PNQHFKEPYL	HFLPKRLHFA	KSDRIEPLTF	420
YLDPQWQLAL	NPSEKCYCGS	GFHGSDNVFS	NMQALFVGYG	PGFKHGIEAD	TFENIEVYNL	480
MCDLLNLTPA	PNNGTHGSLN	HLLKNPVYTP	KHPKEVHPLV	QCPFTRNPRD	NLGCSCNPSI	540
LPIEDFQTQF	NLTVAEEKII	KHETLPYGRP	RVLQKENTIC	LLSQHQFMSG	YSQDILMPLW	600
TSYTVDRNDS	FSTEDFSNCL	YQDFRIPLSP	VHKCSFYKNN	TKVSYGFLSP	PQLNKNSSGI	660
YSEALLTTNI	VPMYQSFQVI	WRYFHDTLLR	KYAEERNGVN	VVSGPVDFD	YDGRCDLEN	720
LRQKRRVIRN	QEILIPTHFF	IVLTSCDTS	QTPLHCENLD	TLAFILPHRT	DNSESCVHGK	780
HDSSWEELL	MLHRARITDV	EHITGLSFYQ	QRKEPVSDIL	KLKTHLPTFS	QEDLINDKTH	840
TCPPCPAPEL	LGGPSVFLFP	PKPKDTLMIS	RTPEVTCVVV	DVSHEDPEVK	FNWYVDGVEV	900
HNAKTKPREE	QYNSTYRVVS	VLTVLHQDWL	NGKEYKCKVS	NKALPAPIEK	TISKAKGQPR	960

EPQVYTLPPS	REEMTKNQVS	LTCLVKGFYP	SDIAVEWESN	GQPENNYKTT	PPVLDSGDSF	1020
FLYSKLTVDK	SRWQQGNVFS	CSVMHEALHN	HYTQKSLSLS	PGK		1063

Sequence Number (ID): 10

Length: 1060

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

- REGION, 1..1060
 - > note, ENPP1 Polypeptide
- source, 1..1060
 - > mol_type, protein
 - > organism, synthetic construct

Residues:

GLKPSCAKEV	KSCKGRCFER	TFGNCRCDAA	CVELGNCCLD	YQETCIEPEH	IWTCNKFRCG	60
EKRLTRSLCA	CSDDCCKDKG	CCINYSSVCQ	GEKSWVEEPC	ESINEPQCPA	GFETPPTLLF	120
SLDGFRAEYL	HTWGGLLPVI	SKLKKCGTYT	KNMRPVYPTK	TFPNHYSIVT	GLYPESHGII	180
DNKMYDPKMN	ASFSLKSKEK	FNPEWYKGEP	IWVTAKYQGL	KSGTFFWPGS	DVEINGIFPD	240
IYKMYNGSVP	FEERILAVLQ	WLQLPKDERP	HFYTLYLEEP	DSSGHSYGPV	SSEVIKALQR	300
VDGMVGMLMD	GLKELNLHRC	LNLILISDHG	MEQGSCKKYI	YLNKYLGDVK	NIKVIYGPA	360
RLRPSPVDPK	YYSFNIEGIA	RNLSCREPNQ	HFKPYLKHFL	PKRLHFAKSD	RIEPLTFYLD	420
PQWQLALNPS	ERKYCGSGFH	GSDNVFSNMQ	ALFVGYPGPF	KHGIEADTFE	NIEVYNLMCD	480
LLNLTPAPNN	GTHGSLNHLL	KNPVYTPKHP	KEVHPLVQCP	FTRNPRDNLG	CSCNPSILPI	540
EDFQTQFNLT	VAEEKI IKHE	TLPYGRPRVL	QKENTICLLS	QHQMMSGYSQ	DILMPLWTSY	600
TVDRNDSFST	EDFSNCLYQD	FRIPLSPVHK	CSFYKNNTKV	SYGFLSPPQL	NKNSSGIYSE	660
ALLTTNIVPM	YQSQVIWRY	FHDTLLRKYA	EERNGVNVVS	GPVDFDFDYG	RCDSLENLRQ	720
KRRVIRNQEI	LIPTHFFIVL	TSCKDTSQTP	LHCENLDTLA	FILPHRTDNS	ESCVHGKHDS	780
SWVEELLMLH	RARITDVEHI	TGLSFYQQRK	EPVSDILKLK	THLPTFSQED	LINDKTHTCP	840
PCPAPELLGG	PSVFLFPPKP	KDTLMISRTP	EVTVCVVVDVS	HEDPEVKFNW	YVDGVEVHNA	900
KTKPREEQYN	STYRVVSVLT	VLHQDWLNGK	EYCKVSNKA	LPAPIEKTIS	KAKGQPREPQ	960
VYTLPPSREE	MTKNQVSLTC	LVKGFYPSDI	AVEWESNGQP	ENNYKTPPV	LDSDGSFFLY	1020
SKLTVDKSRW	QQGNVFSCSV	MHEALHNHYT	QKSLSLSPGK			1060

Sequence Number (ID): 11

Length: 1057

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

- REGION, 1..1057
 - > note, ENPP1 Polypeptide
- source, 1..1057
 - > mol_type, protein
 - > organism, synthetic construct

Residues:

PSCAEVKSC	KGRCFERTFG	NCRDAACVE	LGNCCLDYQE	TCIEPEHIWT	CNKFRCGEKR	60
LTRSLCACSD	DCCKDGDCCI	NYSSVCQGEK	SWVEEPCESI	NEPQCPAGFE	TPPTLLFSLD	120
GFRAEYLHTW	GGLLPVISKL	KKCGTYTKNM	RPVYPTKTFP	NHYSIVTGLY	PESHGIIIDNK	180
MYDPKMNASF	SLKSKEKFNP	EWYKGEPiWV	TAKYQGLKSG	TFFWPGSDVE	INGIFPDIYK	240
MYNGSVPFEE	RILAVLQWLQ	LPKDERPHFY	TYLEEPDSS	GHSYGPVSSE	VIKALQRVDG	300
MVGMLMDGLK	ELNLHRCNL	ILISDHGMEQ	GSCCKYIYLN	KYLGDVKNIK	VIYGPAARLR	360
PSDVPDKYYS	FNYEGIARNL	SCREPNQHFK	PYLKHFLPKR	LHFAKSDRIE	PLTFYLDPQW	420
QLALNPSEK	YCGSGFHGSD	NVFSNMQALF	VGYGPGFKHG	IEADTFENIE	VYNLMCDLLN	480
LTPAPNNGTH	GSLNHLKKNP	VYTPKHPKEV	HPLVQCPFTR	NPRDNLGCSC	NPSILPIEDF	540
QTQFNLTVAE	EKI IKHETLP	YGRPRVLQKE	NTICLLSQHQ	FMSGYSQDIL	MPLWTSYTV	600
RNDSFSTEDF	SNCLYQDFRI	PLSPVHKCSF	YKNNTKVSYG	FLSPPQLNKN	SSGIYSEALL	660
TTNIVPMYQS	FQVIWRYFHD	TLLRKYAEER	NGVNVVSGPV	FDFDYDGRCD	SLENLRQKRR	720
VIRNQEILIP	THFFIVLTSC	KDTSQTPLHC	ENLDTLAFIL	PHRTDNSESC	VHGKHDSSWV	780
EELMLHRAR	ITDVEHITGL	SFYQQRKEPV	SDILKLKTHL	PTFSQEDLIN	DKTHTCPPCP	840
APELLGGPSV	FLFPPKPKDT	LMISRTPEVT	CVVVDVSHED	PEVKFNWYVD	GVEVHNAKTK	900
PREEQYNSTY	RVVSVLTVLH	QDWLNGKEYK	CKVSNKALPA	PIEKTISKAK	GQPREPQVYT	960
LPPSREEMTK	NQVSLTCLVK	GFYPSDIAVE	WESNGQPENN	YKTTTPVLDS	DGSFFLYSKL	1020
TVDKSRWQQG	NVFSCSVMEH	ALHNHYTQKS	LSLSPGK			1057

Sequence Number (ID): 12

Length: 227

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

- REGION, 1..227

> note, Human IgG1 Fc
 - source, 1..227
 > mol_type, protein
 > organism, synthetic construct

Residues:

DKTHTCPPCP	APELLGGPSV	FLFPPKPKDT	LMISRTPEVT	CVVVDVSHED	PEVKFNWYVD	60
GVEVHNAKTK	PREEQYNSTY	RVVSVLTVLH	QDWLNGKEYK	CKVSNKALPA	PIEKTISKAK	120
GQPREPQVYT	LPPSREEMTK	NQVSLTCLVK	GFYPSDIAVE	WESNGQPENN	YKTTTPVLDS	180
DGSFFFLYSKL	TVDKSRWQQG	NVFSCSVMHE	ALHNHYTQKS	LSLSPGK		227

Sequence Number (ID): 13

Length: 832

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

- REGION, 1..832
 > note, ENPP1 Polypeptide
 - source, 1..832
 > mol_type, protein
 > organism, synthetic construct

Residues:

TAGLKPSCAK	EVKCKGRGCF	ERTFGNCRCD	AACVELGNCC	LDYQETCIEP	EHIWTCNKFR	60
CGEKRLTRSL	CACSDCKDK	GDCCINYSSV	CQGEKSWVEE	PCESINEPQC	PAGFETPPTL	120
LFSLDGFRAE	YLHTWGGLLP	VISKLKKCGT	YTKNMRPVYP	TKTFPNHYSI	VTGLYPESHG	180
IIDNKMYDPK	MNASFSLKSK	EKFNPWYK	EPIWVTAKYQ	GLKSGTFFWP	GSDVEINGIF	240
PDIYKMYNGS	VPFEERILAV	LQWLQPKDE	RPHFYTYLLE	EPDSSGHSYG	PVSSEVIKAL	300
QRVDGMVGML	MDGLKELNLH	RCLNLILISD	HGMEQGSCKK	YIYLNKYLGD	VKNIKVIYGP	360
AARLRPSDVP	DKYYSFNYEG	IARNLSCREP	NQHFQPYLKH	FLPKRLHFAK	SDRIEPLTFY	420
LDPQWQLALN	PSERKYCGSG	FHGSDNVFSN	MQALFVGYGP	GFKHGIADT	FENIEVYNLM	480
CDLLNLTPAP	NNGTHGSLNH	LLKNPVYTPK	HPKEVHPLVQ	CPFTRNPRDN	LGCSCNPSIL	540
PIEDFQTFQFN	LTVAEEKIHK	HETLPYGRPR	VLQKENTICL	LSQHQFMSGY	SQDILMPLWT	600
SYTVDRNDSF	STEDFSNCLY	QDFRIPLSPV	HKCSFYKNNT	KVSYGFLSPP	QLNKNSSGIY	660
SEALLTTNIV	PMYQSFQVIW	RYFHDTLRLK	YAEERNGVNV	VSGPVDFDFY	DGRCDLENL	720
RQKRRVIRNQ	EILIPTHFFI	VLTSCKDTSQ	TPLHCENLDT	LAFILPHRTD	NSESCVHGKH	780

DSSWVEELLM LHRARITDVE HITGLSFYQQ RKEPVS DILK LKTHLPTFSQ ED 832

Sequence Number (ID): 14

Length: 830

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

- REGION, 1..830
 - > note, ENPP1 Polypeptide
- source, 1..830
 - > mol_type, protein
 - > organism, synthetic construct

Residues:

GLKPSCAKEV	KCKGRCFER	TFGNCRCDA	CVELGNCCLD	YQETCIEPEH	IWTCNKFRCG	60
EKRLTRSLCA	CSDCKDKGD	CCINYSSVCQ	GEKSWVEEPC	ESINEPQCPA	GFETPPTLLF	120
SLDGFRAYEL	HTWGGLLPVI	SKLKKCGTYT	KNMRPVYPTK	TFPNHYSIVT	GLYPESHGII	180
DNKMYDPKMN	ASFSLKSKEK	FNPEWYKGEP	IWVTAKYQGL	KSGTFFWPGS	DVEINGIFPD	240
IYKMYNGSVP	FEERILAVLQ	WLQLPKDERP	HFYTLYLEEP	DSSGHSYGPV	SSEVIKALQR	300
VDGMVGLMD	GLKELNLHRC	LNLILISDHG	MEQGSCKKYI	YLNKYLGDVK	NIKVIYGPA	360
RLRPSDVPDK	YYSFNIEGIA	RNLSCREPNQ	HFKPYLKHFL	PKRLHFAKSD	RIEPLTFYLD	420
PQWQLALNPS	ERKYCGSGFH	GSDNVFSNMQ	ALFVGYPGPF	KHGIEADTFE	NIEVYNLMCD	480
LLNLTPAPNN	GTHGSLNHL	KNPVYTPKHP	KEVHPLVQCP	FTRNPRDNLG	CSCNPSILPI	540
EDFQTQFNLT	VAEEKIIEKE	TLPYGRPRVL	QKENTICLLS	QHQMMSGYSQ	DILMPLWTSY	600
TVDRNDSFST	EDFSNCLYQD	FRIPLSPVHK	CSFYKNNTKV	SYGFLSPPQL	NKNSSGIYSE	660
ALLTTNIVPM	YQSFQVIWRY	FHDTLLRKYA	EERNGVNVVS	GPVDFDIDYG	RCDSLENLRQ	720
KRRVIRNQEI	LIPTHFFIVL	TSCKDTSQTP	LHCENLDTLA	FILPHRTDNS	ESCVHGKHDS	780
SWVEELMLH	RARITDVEHI	TGLSFYQQRK	EPVSDILKLK	THLPTFSQED		830

Sequence Number (ID): 15

Length: 827

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

- REGION, 1..827
 - > note, ENPP1 Polypeptide
- source, 1..827

> mol_type, protein
> organism, synthetic construct

Residues:

PSCAKEVKSC	KGRCFERTFG	NCRCDAACVE	LGNCCLDYQE	TCIEPEHIWT	CNKFRCGEKR	60
LTRSLCACSD	DCDKGDCCI	NYSSVCQGEK	SWVEEPCESI	NEPQCPAGFE	TPPTLLFSLD	120
GFRAEYLHTW	GGLLPVISKL	KKCGTYTKNM	RPVYPTKTFP	NHYSIVTGLY	PESHGIIIDNK	180
MYDPKMNASF	SLKSKEKFNP	EWYKGEPiWV	TAKYQGLKSG	TFFWPGSDVE	INGIFPDIYK	240
MYNGSVPFEE	RILAVLQWLQ	LPKDERPHFY	TYLEEPDSS	GHSYGPVSSE	VIKALQRVDG	300
MVGMLMDGLK	ELNLHRCNL	ILISDHGMEQ	GSCCKYIYLN	KYLGDVKNIK	VIYGPAARLR	360
PSDVPDKYYS	FNYEGIARNL	SCREPNQHFK	PYLKHFLPKR	LHFAKSDRIE	PLTFYLDQPW	420
QLALNPSEK	YCGSGFHGSD	NVFSNMQALF	VGYPGFKHG	IEADTFENIE	VYNLMCDLLN	480
LTPAPNNGTH	GSLNHLKKNP	VYTPKHPKEV	HPLVQCPFTR	NPRDNLGCSC	NPSILPIEDF	540
QTQFNLTVAE	EKI IKHETLP	YGRPRVLQKE	NTICLLSQHQ	FMSGYSQDIL	MPLWTSYTV	600
RNDSFSTEDF	SNCLYQDFRI	PLSPVHKCSF	YKNTKVSYG	FLSPPQLNKN	SSGIYSEALL	660
TTNIVPMYQS	FQVIWRYFHD	TLLRKYAEER	NGVNVVSGPV	FDFDYDGRC	SLENLRQKRR	720
VIRNQEILIP	THFFIVLTSC	KDTSQTPLHC	ENLDTLAFIL	PHRTDNSESC	VHGKHDSSWV	780
EELLMLHRAR	ITDVEHITGL	SFYQQRKEPV	SDILKLKTHL	PTFSQED		827

Sequence Number (ID): 16

Length: 20

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

- REGION, 1..20
 - > note, ENPP7 Signal sequence
- source, 1..20
 - > mol_type, protein
 - > organism, synthetic construct

Residues:

MRGPAVLLTV	ALATLLAPGA	20
------------	------------	----

Sequence Number (ID): 17

Length: 22

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

- REGION, 1..22
 - > note, ENPP7 Signal sequence
- source, 1..22
 - > mol_type, protein
 - > organism, synthetic construct

Residues:

MRGPAVLLTV ALATLLAPGA GA 22

Sequence Number (ID): 18

Length: 22

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

- REGION, 1..22
 - > note, ENPP5 Signal sequence
- source, 1..22
 - > mol_type, protein
 - > organism, synthetic construct

Residues:

MTSKFLLVSF ILAALSLSTT FS 22

Sequence Number (ID): 19

Length: 98

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

- REGION, 1..98
 - > note, ENPP121GLK Signal sequence
- source, 1..98
 - > mol_type, protein
 - > organism, synthetic construct

Residues:

MERDGCAGGG SRGGEGGRAP REGPAGNGRD RGRSHAAEAP GDPQAAASLL APMDVGEEPL 60
EKAARARTAK DPNTYKIISL FTFAVGVNIC LGFTAGLK 98

Sequence Number (ID): 20

Length: 94

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

- REGION, 1..94
 - > note, ENPP121 protein export signal sequence
- source, 1..94
 - > mol_type, protein
 - > organism, synthetic construct

Residues:

MERDGCAGGG SRGGEGRAP REGPAGNGRD RGRSHAAEAP GDPQAAASLL APMDVGEEPL 60
 EKAARARTAK DPNTYKIISL FTFAVGVNIC LGFT 94

Sequence Number (ID): 21

Length: 4

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

- REGION, 1..4
 - > note, Linker
- source, 1..4
 - > mol_type, protein
 - > organism, synthetic construct

Residues:

GGGA 4

Sequence Number (ID): 22

Length: 4

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

- REGION, 1..4
 - > note, Linker
- source, 1..4
 - > mol_type, protein
 - > organism, synthetic construct

Residues:

GGGS 4

Sequence Number (ID): 23

Length: 4

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

- REGION, 1..4
 - > note, Linker
- source, 1..4
 - > mol_type, protein
 - > organism, synthetic construct

Residues:

GGGG 4

Sequence Number (ID): 24

Length: 5

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

- REGION, 1..5
 - > note, Linker
- source, 1..5
 - > mol_type, protein
 - > organism, synthetic construct

Residues:

GGGGA 5

Sequence Number (ID): 25

Length: 5

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

- REGION, 1..5
 - > note, Linker
- source, 1..5
 - > mol_type, protein
 - > organism, synthetic construct

Residues:

GGGGS 5

Sequence Number (ID): 26

Length: 5

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

- REGION, 1..5

>

note, Linker

- source, 1..5

> mol_type, protein

> organism, synthetic construct

Residues:

GGGGG

5

Sequence Number (ID): 27

Length: 4

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

- REGION, 1..4

> note, Linker

- source, 1..4

> mol_type, protein

> organism, synthetic construct

Residues:

GGAG

4

Sequence Number (ID): 28

Length: 4

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

- REGION, 1..4

> note, Linker

- source, 1..4

> mol_type, protein

> organism, synthetic construct

Residues:

GGSG

4

Sequence Number (ID): 29

Length: 4

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

- REGION, 1..4
 - > note, Linker
- source, 1..4
 - > mol_type, protein
 - > organism, synthetic construct

Residues:

AGGG 4

Sequence Number (ID): 30

Length: 5

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

- REGION, 1..5
 - > note, Linker
- source, 1..5
 - > mol_type, protein
 - > organism, synthetic construct

Residues:

SGGGG 5

Sequence Number (ID): 31

Length: 4

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

- REGION, 1..4
 - > note, Linker
- source, 1..4
 - > mol_type, protein
 - > organism, synthetic construct

Residues:

SGGG 4

Sequence Number (ID): 32

Length: 4

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

- REGION, 1..4
 - > note, Linker
- source, 1..4
 - > mol_type, protein
 - > organism, synthetic construct

Residues:

GAGA 4

Sequence Number (ID): 33

Length: 4

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

- REGION, 1..4
 - >

note, Linker

- source, 1..4
 - > mol_type, protein
 - > organism, synthetic construct

Residues:

GSGS 4

Sequence Number (ID): 34

Length: 6

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

- REGION, 1..6
 - > note, Linker
- source, 1..6
 - > mol_type, protein
 - > organism, synthetic construct

Residues:

GAGAGA 6

Sequence Number (ID): 35

Length: 6

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

- REGION, 1..6
 - > note, Linker
- source, 1..6
 - > mol_type, protein
 - > organism, synthetic construct

Residues:

GS GSGS

6

Sequence Number (ID): 36

Length: 8

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

- REGION, 1..8
 - > note, Linker
- source, 1..8
 - > mol_type, protein
 - > organism, synthetic construct

Residues:

GAGAGAGA

8

Sequence Number (ID): 37

Length: 8

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

- REGION, 1..8
 - > note, Linker
- source, 1..8
 - > mol_type, protein
 - > organism, synthetic construct

Residues:

GS GSGSGS

8

Sequence Number (ID): 38

Length: 10

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

- REGION, 1..10
 - > note, Linker
- source, 1..10
 - > mol_type, protein
 - > organism, synthetic construct

Residues:

GAGAGAGAGA 10

Sequence Number (ID): 39

Length: 10

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

- REGION, 1..10
 - > note, Linker
- source, 1..10
 - > mol_type, protein
 - > organism, synthetic construct

Residues:

GSGSGSGSGS 10

Sequence Number (ID): 40

Length: 12

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

- REGION, 1..12
 - > note, Linker
- source, 1..12
 - > mol_type, protein
 - > organism, synthetic construct

Residues:

GAGAGAGAGA GA 12

Sequence Number (ID): 41

Length: 12

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

- REGION, 1..12
 - > note, Linker
- source, 1..12
 - > mol_type, protein
 - > organism, synthetic construct

Residues:

GSGSGSGSGS GS

12

Sequence Number (ID): 42

Length: 6

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

- REGION, 1..6
 - > note, Linker
- source, 1..6
 - > mol_type, protein
 - > organism, synthetic construct

Residues:

GGAGGA

6

Sequence Number (ID): 43

Length: 6

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

- REGION, 1..6
 - > note, Linker
- source, 1..6
 - > mol_type, protein
 - > organism, synthetic construct

Residues:

GGSGGS

6

Sequence Number (ID): 44

Length: 9

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

- REGION, 1..9
 - > note, Linker
- source, 1..9
 - > mol_type, protein
 - > organism, synthetic construct

Residues:

GGAGGAGGA

9

Sequence Number (ID): 45

Length: 9

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

- REGION, 1..9
 - > note, Linker
- source, 1..9
 - > mol_type, protein
 - > organism, synthetic construct

Residues:

GGSGGSGGS

9

Sequence Number (ID): 46

Length: 12

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

- REGION, 1..12
 - > note, Linker
- source, 1..12
 - > mol_type, protein
 - > organism, synthetic construct

Residues:

GGAGGAGGAG GA

12

Sequence Number (ID): 47

Length: 12

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

- REGION, 1..12

> note, Linker

- source, 1..12

> mol_type, protein

> organism, synthetic construct

Residues:

GGSGGSGGSG GS

12

Sequence Number (ID): 48

Length: 4

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

- REGION, 1..4

> note, Linker

- source, 1..4

> mol_type, protein

> organism, synthetic construct

Residues:

GGAG

4

Sequence Number (ID): 49

Length: 4

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

- REGION, 1..4

> note, Linker

- source, 1..4

> mol_type, protein

> organism, synthetic construct

Residues:

GGSG

4

Sequence Number (ID): 50

Length: 4

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

- REGION, 1..4
 - > note, Linker
- source, 1..4
 - > mol_type, protein
 - > organism, synthetic construct

Residues:

GGAG 4

Sequence Number (ID): 51

Length: 4

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

- REGION, 1..4
 - > note, Linker
- source, 1..4
 - > mol_type, protein
 - > organism, synthetic construct

Residues:

GGSG 4

Sequence Number (ID): 52

Length: 8

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

- REGION, 1..8
 - > note, Linker
- source, 1..8
 - > mol_type, protein
 - > organism, synthetic construct

Residues:

GGAGGGAG 8

Sequence Number (ID): 53

Length: 8

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

- REGION, 1..8
 - > note, Linker
- source, 1..8
 - > mol_type, protein
 - > organism, synthetic construct

Residues:

GGSGGGSG

8

Sequence Number (ID): 54

Length: 12

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

- REGION, 1..12

> note, Linker

- source, 1..12
 - > mol_type, protein
 - > organism, synthetic construct

Residues:

GGAGGGAGGG AG

12

Sequence Number (ID): 55

Length: 12

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

- REGION, 1..12
 - > note, Linker
- source, 1..12
 - > mol_type, protein
 - > organism, synthetic construct

Residues:

GGSGGGSGGG SG

12

Sequence Number (ID): 56

Length: 5

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

- REGION, 1..5
 - > note, Linker
- source, 1..5
 - > mol_type, protein
 - > organism, synthetic construct

Residues:

GGGGA 5

Sequence Number (ID): 57

Length: 5

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

- REGION, 1..5
 - > note, Linker
- source, 1..5
 - > mol_type, protein
 - > organism, synthetic construct

Residues:

GGGGS 5

Sequence Number (ID): 58

Length: 15

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

- REGION, 1..15
 - > note, Linker
- source, 1..15
 - > mol_type, protein
 - > organism, synthetic construct

Residues:

GGGGAGGGGA GGGGA 15

Sequence Number (ID): 59

Length: 15

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

- REGION, 1..15

```

> note, Linker
- source, 1..15
  > mol_type, protein
  > organism, synthetic construct

```

Residues:

GGGSGGGGS GGGGS 15

Sequence Number (ID): 60

Length: 5

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

```

- REGION, 1..5
  > note, Linker
- source, 1..5
  > mol_type, protein
  > organism, synthetic construct

```

Residues:

GGGAG 5

Sequence Number (ID): 61

Length: 6

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

```

- REGION, 1..6

```

```

> note, Linker

```

```

- source, 1..6
  > mol_type, protein
  > organism, synthetic construct

```

Residues:

GGGAGG 6

Sequence Number (ID): 62

Length: 7

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

```

- REGION, 1..7

```

```

        > note, Linker
    - source, 1..7
        > mol_type, protein
        > organism, synthetic construct

Residues:
GGGAGGG 7
Sequence Number (ID): 63

Length: 5
Molecule Type: AA
Features Location/Qualifiers:
    - REGION, 1..5
        > note, Linker
    - source, 1..5
        > mol_type, protein
        > organism, synthetic construct

Residues:
TGGGG 5
Sequence Number (ID): 64
Length: 4
Molecule Type: AA
Features Location/Qualifiers:
    - REGION, 1..4
        > note, Linker
    - source, 1..4
        > mol_type, protein
        > organism, synthetic construct

Residues:
AAAL 4

Sequence Number (ID): 65
Length: 4
Molecule Type: AA
Features Location/Qualifiers:
    - REGION, 1..4

```

```

> note, Linker
- source, 1..4
> mol_type, protein
> organism, synthetic construct

Residues:
AAAK 4
Sequence Number (ID): 66
Length: 4
Molecule Type: AA
Features Location/Qualifiers:
- REGION, 1..4
> note, Linker
- source, 1..4
> mol_type, protein
> organism, synthetic construct

Residues:
AAAR 4
Sequence Number (ID): 67
Length: 14
Molecule Type: AA
Features Location/Qualifiers:
- REGION, 1..14
> note, Linker
- source, 1..14
> mol_type, protein
> organism, synthetic construct

Residues:
EGKSSGSGSE SKST 14
Sequence Number (ID): 68
Length: 12
Molecule Type: AA
Features Location/Qualifiers:
- REGION, 1..12

```

```

> note, Linker
- source, 1..12
> mol_type, protein
> organism, synthetic construct

Residues:
GSAGSAAGSG EF 12
Sequence Number (ID): 69
Length: 12
Molecule Type: AA
Features Location/Qualifiers:
- REGION, 1..12
> note, Linker
- source, 1..12
> mol_type, protein
> organism, synthetic construct

Residues:
AEAAAKEAAA KA 12
Sequence Number (ID): 70

Length: 18
Molecule Type: AA
Features Location/Qualifiers:
- REGION, 1..18
> note, Linker
- source, 1..18
> mol_type, protein
> organism, synthetic construct

Residues:
KESGSVSSEQ LAQFRSLD 18
Sequence Number (ID): 71
Length: 10
Molecule Type: AA
Features Location/Qualifiers:
- REGION, 1..10
> note, Linker

```

- source, 1..10
 - > mol_type, protein
 - > organism, synthetic construct

Residues:

GENLYFQSGG 10

Sequence Number (ID): 72

Length: 8

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

- REGION, 1..8
 - > note, Linker
- source, 1..8
 - > mol_type, protein
 - > organism, synthetic construct

Residues:

SACYCELS 8

Sequence Number (ID): 73

Length: 5

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

- REGION, 1..5
 - > note, Linker
- source, 1..5
 - > mol_type, protein
 - > organism, synthetic construct

Residues:

RSIAT 5

Sequence Number (ID): 74

Length: 17

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

- REGION, 1..17
 - > note, Linker

- source, 1..17
 - > mol_type, protein
 - > organism, synthetic construct

Residues:

RPACKIPNDL KQKVMNH 17

Sequence Number (ID): 75

Length: 36

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

- REGION, 1..36
 - > note, Linker
- source, 1..36
 - > mol_type, protein
 - > organism, synthetic construct

Residues:

GGGAGGSGSG SGGSSGASG TGTAGGTGSG SGTGSG 36

Sequence Number (ID): 76

Length: 17

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

- REGION, 1..17
 - > note, Linker
- source, 1..17
 - > mol_type, protein
 - > organism, synthetic construct

Residues:

AAANSSIDLI SVPVDSR 17

Sequence Number (ID): 77

Length: 36

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

- REGION, 1..36
 - > note, Linker

- source, 1..36
 - > mol_type, protein
 - > organism, synthetic construct

Residues:

GGSGGGSEGG GSEGGGSEGG GSEGGGSEGG GSGGGS 36

Sequence Number (ID): 78

Length: 15

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

- REGION, 1..15
 - > note, Linker
- REGION, 1..15

> note, MISC_FEATURE - Features section of the listing that any one or all of aminoacids 1-15 can either be present or absent

- source, 1..15
 - > mol_type, protein
 - > organism, synthetic construct

Residues:

RRRRRRRRRR RRRRR 15

Sequence Number (ID): 79

Length: 16

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

- REGION, 1..16
 - > note, Linker
- source, 1..16
 - > mol_type, protein
 - > organism, synthetic construct

Residues:

DSSSEKFLR RIGRFG 16

Sequence Number (ID): 80

Length: 12

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

- REGION, 1..12
 - > note, Linker
- source, 1..12
 - > mol_type, protein
 - > organism, synthetic construct

Residues:

EEEEEEPRG DT 12

Sequence Number (ID): 81

Length: 12

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

- REGION, 1..12
 - > note, Linker
- source, 1..12
 - > mol_type, protein
 - > organism, synthetic construct

Residues:

APWHLSSQYS RT 12

Sequence Number (ID): 82

Length: 12

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

- REGION, 1..12
 - > note, Linker
- source, 1..12
 - > mol_type, protein
 - > organism, synthetic construct

Residues:

STLPIPHEFS RE 12

Sequence Number (ID): 83

Length: 12

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

- REGION, 1..12
 - > note, Linker
- source, 1..12
 - > mol_type, protein
 - > organism, synthetic construct

Residues:

VTKHLNQISQ SY 12

Sequence Number (ID): 84

Length: 15

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

- REGION, 1..15
 - > note, Linker
- REGION, 1..15
 - > note, MISC_FEATURE - Features section of the listing that any one or all of aminoacids 2-15 can either be present or absent
- source, 1..15
 - > mol_type, protein
 - > organism, synthetic construct

Residues:

EEEEEEEEEE EEEEE 15

Sequence Number (ID): 85

Length: 7

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

- REGION, 1..7
 - > note, Linker
- source, 1..7
 - > mol_type, protein
 - > organism, synthetic construct

Residues:

RSGSGGS 7

Sequence Number (ID): 86

Length: 15

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

- REGION, 1..15

> note, Linker

- REGION, 1..15

> note, MISC_FEATURE - Features section of the listing that any one or all of aminoacids 2-15 can either be present or absent

- source, 1..15

> mol_type, protein

> organism, synthetic construct

Residues:

DDDDDDDDDD DDDDD 15

Sequence Number (ID): 87

Length: 16

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

- REGION, 1..16

> note, Linker

- source, 1..16

> mol_type, protein

> organism, synthetic construct

Residues:

LVIMSLGLGL GLGLRK 16

Sequence Number (ID): 88

Length: 15

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

- REGION, 1..15

> note, Linker

- source, 1..15

> mol_type, protein

> organism, synthetic construct

Residues:

VIMSLGLGLG LGLRK 15

Sequence Number (ID): 89

Length: 14

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

- REGION, 1..14
 - > note, Linker
- source, 1..14
 - > mol_type, protein
 - > organism, synthetic construct

Residues:

IMSLGLGLGL GLRK 14

Sequence Number (ID): 90

Length: 13

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

- REGION, 1..13
 - > note, Linker
- source, 1..13
 - > mol_type, protein
 - > organism, synthetic construct

Residues:

MSLGLGLGLG LRK 13

Sequence Number (ID): 91

Length: 12

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

- REGION, 1..12
 - > note, Linker
- source, 1..12
 - > mol_type, protein
 - > organism, synthetic construct

Residues:

SLGLGLGLL RK 12

Sequence Number (ID): 92

Length: 11

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

- REGION, 1..11
 - > note, Linker
- source, 1..11
 - > mol_type, protein
 - > organism, synthetic construct

Residues:

LGLGLGLR K 11

Sequence Number (ID): 93

Length: 10

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

- REGION, 1..10
 - > note, Linker
- source, 1..10
 - > mol_type, protein
 - > organism, synthetic construct

Residues:

GLGLGLLRK 10

Sequence Number (ID): 94

Length: 9

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

- REGION, 1..9
 - > note, Linker
- source, 1..9
 - > mol_type, protein
 - > organism, synthetic construct

Residues:

LGLGLLRK

9

Sequence Number (ID): 95

Length: 8

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

- REGION, 1..8
 - > note, Linker
- source, 1..8
 - > mol_type, protein
 - > organism, synthetic construct

Residues:

GLGLLRK

8

Sequence Number (ID): 96

Length: 7

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

- REGION, 1..7
 - > note, Linker
- source, 1..7
 - > mol_type, protein
 - > organism, synthetic construct

Residues:

LGLLRK

7

Sequence Number (ID): 97

Length: 6

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

- REGION, 1..6
 - > note, Linker
- source, 1..6
 - > mol_type, protein
 - > organism, synthetic construct

Residues:

GLGLRK

6

Sequence Number (ID): 98

Length: 5

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

- REGION, 1..5
 - > note, Linker
- source, 1..5
 - > mol_type, protein
 - > organism, synthetic construct

Residues:

LGLRK

5

Sequence Number (ID): 99

Length: 4

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

- REGION, 1..4
 - > note, Linker
- source, 1..4
 - > mol_type, protein
 - > organism, synthetic construct

Residues:

GLRK

4

Sequence Number (ID): 100

Length: 15

Molecule Type: AA

Features Location/Qualifiers:

- REGION, 1..15

> note, Linker

- REGION, 1..15

> note, MISC_FEATURE - Features section of the listing that any one or all of aminoacids 2-15 can either be present or absent

- source, 1..15

```

> mol_type, protein
> organism, synthetic construct

Residues:
KKKKKKKKKK KKKKK 15
Sequence Number (ID): 101
Length: 5
Molecule Type: AA
Features Location/Qualifiers:
  - REGION, 1..5
    > note, Linker
  - source, 1..5
    > mol_type, protein
    > organism, synthetic construct

Residues:
EAAAK 5
Sequence Number (ID): 102
Length: 5
Molecule Type: AA
Features Location/Qualifiers:
  - REGION, 1..5
    > note, Linker
  - source, 1..5
    > mol_type, protein
    > organism, synthetic construct

Residues:
PAPAP 5
Sequence Number (ID): 103
Residues:
000
Sequence Number (ID): 104
Residues:
000
Sequence Number (ID): 105

```

Residues:

000

Sequence Number (ID): 106

Residues:

000

Sequence Number (ID): 107

Residues:

000

Sequence Number (ID): 108

Residues:

000

Sequence Number (ID): 109

Residues:

000

Sequence Number (ID): 110

Residues:

000

Sequence Number (ID): 111

Residues:

000

Sequence Number (ID): 112

Residues:

000

Sequence Number (ID): 113

Residues:

000

Sequence Number (ID): 114

Residues:

000

Sequence Number (ID): 115

Residues:

000

END