

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2024-536821
(P2024-536821A)

(43)公表日 令和6年10月8日(2024.10.8)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
A 6 1 K	38/46 (2006.01)	A 6 1 K	38/46	Z N A	4 C 0 7 6
A 6 1 K	9/19 (2006.01)	A 6 1 K	9/19		4 C 0 8 4
A 6 1 K	47/12 (2006.01)	A 6 1 K	47/12		4 H 0 4 5
A 6 1 K	47/02 (2006.01)	A 6 1 K	47/02		
A 6 1 K	47/18 (2017.01)	A 6 1 K	47/18		
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全110頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2024-518385(P2024-518385)	(71)出願人	521317586
(86)(22)出願日	令和4年9月23日(2022.9.23)		イノザイム ファーマ インク.
(85)翻訳文提出日	令和6年5月10日(2024.5.10)		Inozyme Pharma, Inc.
(86)国際出願番号	PCT/US2022/076969		アメリカ合衆国 0 2 2 1 0 マサチュー
(87)国際公開番号	WO2023/049864		セッツ ボストン サマー ストリート 3
(87)国際公開日	令和5年3月30日(2023.3.30)		2 1 スイート 4 0 0
(31)優先権主張番号	63/248,303		3 2 1 Summer Street,
(32)優先日	令和3年9月24日(2021.9.24)		Suite 400, Boston,
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		Massachusetts 0 2 2 1
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA	(74)代理人	100114890
	,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(		弁理士 アインゼル・フェリックス＝ラ
	AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A		インハルト
	T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR	(74)代理人	100098501
	,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,		
	最終頁に続く		最終頁に続く

(54)【発明の名称】 凍結乾燥された E N P P 1 ポリペプチド製剤及びその使用

(57)【要約】

ある特定の態様では、本発明は、E N P P 1 ポリペプチドの新規な凍結乾燥された製剤、並びにそのような E N P P 1 の凍結乾燥された製剤及び再構成された製剤を使用して、E N P P 1 欠乏と関連付けられる適応症を治療するための方法を提供する。本明細書に提供される製剤及び方法は、病的石灰化又は病的骨化などの E N P P 1 欠乏と関連付けられる疾患を治療することにおいて有用である。

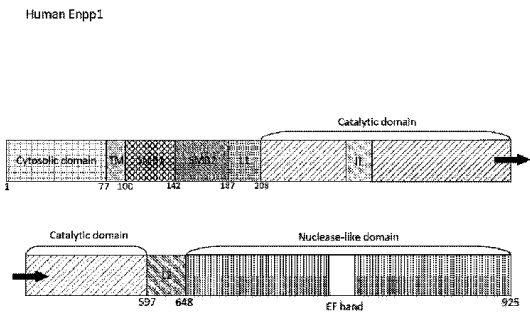


FIGURE 2

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) ENPP1 ポリペプチドと、(b) 緩衝剤、安定化剤、塩、及び界面活性剤のうちの 1 つ以上と、を含む、凍結乾燥されたポリペプチド製剤。

【請求項 2】

前記製剤が、緩衝剤を含む、請求項 1 に記載の製剤。

【請求項 3】

前記緩衝剤が、溶液中で再構成された場合、pH 6 ~ 7 の pH 範囲を維持する、請求項 2 に記載の製剤。

【請求項 4】

前記緩衝剤が、溶液中で再構成された場合、pH 7 ~ 8 の pH 範囲を維持する、請求項 2 に記載の製剤。

【請求項 5】

前記緩衝剤が、コハク酸塩、クエン酸塩、重炭酸塩、リン酸塩、トリス、又はグリシルグリシンからなる群から選択される、請求項 3 又は 4 に記載の製剤。

【請求項 6】

前記緩衝剤が、コハク酸塩、クエン酸塩、又はリン酸塩である、請求項 5 に記載の製剤。

【請求項 7】

前記緩衝剤が、クエン酸塩である、請求項 6 に記載の製剤。

【請求項 8】

前記緩衝剤が、コハク酸塩である、請求項 6 に記載の製剤。

【請求項 9】

前記緩衝剤が、リン酸塩である、請求項 6 に記載の製剤。

【請求項 10】

前記緩衝剤は、溶液中で再構成された場合、濃度が 5 mM ~ 100 mM の範囲である、請求項 2 ~ 9 のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項 11】

前記緩衝剤が、凝集体形成の開始温度を増加させる、請求項 2 ~ 10 のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項 12】

前記緩衝剤が、凝集体形成の開始温度を少なくとも 2 °C 増加させる、請求項 2 ~ 11 のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項 13】

前記緩衝剤が、高分子量種の形成を減少させる、請求項 2 ~ 12 のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項 14】

前記緩衝剤が、高分子量種の形成を、少なくとも 10 %、15 %、20 %、25 %、30 %、35 %、40 %、45 %、50 % 減少させる、請求項 2 ~ 13 のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項 15】

前記製剤が、1 つ以上の薬学的に許容可能な添加剤を含む、請求項 1 ~ 12 のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項 16】

前記 1 つ以上の薬学的に許容可能な添加剤が、安定化剤、アミノ酸、塩、金属イオン、及び界面活性剤を含む、請求項 15 に記載の製剤。

【請求項 17】

前記安定化剤が、糖、炭水化物、又は多糖類である、請求項 15 又は 16 に記載の製剤。

【請求項 18】

前記糖が、スクロース、トレハロース、マンノース、マルトース、ラクトース、グルコース、ラフィノース、セロビオース、ゲンチオビオース、イソマルトース、アラビノース、グルコサミン、フルクトース、マンニトール、又はソルビトールからなる群から選択される、請求項 17 に記載の製剤。

【請求項 19】

前記 1 つ以上の薬学的に許容可能な添加剤が、マンニトールである、請求項 15 に記載の製剤。

【請求項 20】

前記 1 つ以上の薬学的に許容可能な添加剤が、スクロースである、請求項 15 に記載の製剤。

10

【請求項 21】

前記薬学的に許容可能な添加剤が、アミノ酸である、請求項 15 に記載の製剤。

【請求項 22】

前記アミノ酸が、グリシン、アルギニン、ヒスチジン、アラニン、プロリン、セリン、及びグルタミン酸からなる群から選択される、請求項 21 に記載の製剤。

【請求項 23】

前記 1 つ以上の薬学的に許容可能な添加剤が、アルギニンである、請求項 15 に記載の製剤。

【請求項 24】

前記薬学的に許容可能な添加剤が、塩である、請求項 15 に記載の製剤。

20

【請求項 25】

前記塩が、塩化ナトリウム (NaCl)、塩化カルシウム (CaCl_2)、塩化亜鉛 (ZnCl_2)、及び／又は塩化マグネシウム (MgCl_2) からなる群から選択される、請求項 24 に記載の製剤。

【請求項 26】

前記 1 つ以上の薬学的に許容可能な添加剤が、塩化カルシウム (CaCl_2) である、請求項 15 に記載の製剤。

【請求項 27】

前記薬学的に許容可能な添加剤が、界面活性剤である、請求項 15 に記載の製剤。

【請求項 28】

前記界面活性剤が、ポリソルベート、ポロキサマー、トリトン、ドデシル硫酸ナトリウム、ラウレル硫酸ナトリウム、オクチルグリコシドナトリウム、ラウリルスルホベタイン、ミリスチルスルホベタイン、リノレイルスルホベタイン、ステアリルスルホベタイン、ラウリルサルコシン、ミリスチルサルコシン、リノレイルサルコシン、ステアリルサルコシン、リノレイルベタイン、ミリスチルベタイン、セチルベタイン、ラウロアミドプロピルベタイン、ココアミドプロピルベタイン、リノールアミドプロピルベタイン、ミリスタミドプロピルベタイン、パルミドプロピルベタイン、イソステアラミドプロピルベタイン、ミリスタミドプロピルジメチルアミン、パルミドプロピルジメチルアミン、イソステアラミドプロピルジメチルアミン、ココイルメチルタウリンナトリウム、オレイルメチルタウリンナトリウム、ジヒドロキシプロピルPEG-5 リノールアンモニウムクロリド、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、ポリソルベート 20、ポリソルベート 21、ポリソルベート 40、ポリソルベート 60、ポリソルベート 61、ポリソルベート 65、ポリソルベート 80、ポリソルベート 81、ポリソルベート 85、ポリソルベート 188、PEG 3350、及びそれらの混合物からなる群から選択される、請求項 27 に記載の製剤。

30

40

【請求項 29】

前記界面活性剤が、ポリソルベート 20 (PS 20)、ポリソルベート 80 (PS 80)、又はポリソルベート 188 (PS 188) からなる群から選択される、請求項 27 に記載の製剤。

【請求項 30】

50

前記界面活性剤が、ポリソルベート 20 (PS20) である、請求項 29 に記載の製剤。

【請求項 31】

前記製剤が、緩衝剤、安定化剤、塩、アミノ酸、及び界面活性剤を含む、請求項 1～30 のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項 32】

前記緩衝剤が、クエン酸塩又はコハク酸塩であり、前記安定化剤が、スクロース又はマンニトールであり、前記塩が、塩化カルシウム (CaCl₂) であり、前記界面活性剤が、PS20 である、請求項 31 に記載の製剤。

【請求項 33】

前記製剤の pH が、pH 6.2～pH 6.5 である、請求項 1～32 のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項 34】

前記製剤が、15～25 mM のクエン酸塩を含む、請求項 1～32 のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項 35】

前記製剤が、スクロース、マンニトールの各々 75 mM～95 mM、又はそれらの組み合わせを含む、請求項 32 又は 34 に記載の製剤。

【請求項 36】

前記製剤が、100 mM～300 mM のスクロースを含む、請求項 1～35 のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項 37】

前記製剤が、1 mM～3 mM の塩化カルシウムを含む、請求項 1～36 のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項 38】

前記製剤が、0.005%～0.1% (w/v) の PS20 を含む、請求項 1～37 のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項 39】

前記 1 つ以上の薬学的に許容可能な添加剤が、溶液中で再構成された場合、5 mM～300 mM の範囲の濃度で存在する、請求項 15～38 のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項 40】

前記 1 つ以上の薬学的に許容可能な添加剤が、高分子量種の形成を減少させる、請求項 15～39 のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項 41】

前記 1 つ以上の薬学的に許容可能な添加剤が、高分子量種の形成を、少なくとも 10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50% 減少させる、請求項 40 に記載の製剤。

【請求項 42】

前記製剤が、ENPP1 ポリペプチド補因子を含む、請求項 1～41 のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項 43】

前記 ENPP1 ポリペプチド補因子が、カルシウム、亜鉛、及び／又はアデノシンーリン酸を含む、請求項 42 に記載の製剤。

【請求項 44】

前記 ENPP1 ポリペプチド補因子が、CaCl₂、CaSO₄、ZnCl₂、ZnSO₄、及び／又はアデノシンーリン酸である、請求項 42 又は 43 に記載の製剤。

【請求項 45】

前記 ENPP1 ポリペプチド補因子が、CaCl₂ 及び／又はアデノシンーリン酸である、請求項 42 又は 43 に記載の製剤。

【請求項 46】

前記 E N P P 1 ポリペプチド補因子が、溶液中で再構成された場合、1 m M ~ 1 0 m M の範囲の濃度で存在する、請求項 4 2 ~ 4 5 のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項 4 7】

前記 E N P P 1 ポリペプチド補因子が、高分子量種の形成を、少なくとも 1 0 %、1 5 %、2 0 %、2 5 %、3 0 %、3 5 %、4 0 %、4 5 %、5 0 % 減少させる、請求項 4 2 ~ 4 5 のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項 4 8】

前記製剤が、界面活性剤を含む、請求項 1 ~ 4 7 のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項 4 9】

前記界面活性剤が、P S 2 0、P S 8 0、又は P S 1 8 8 を含む、請求項 4 8 に記載の製剤。

10

【請求項 5 0】

前記界面活性剤が、P S 2 0 を含む、請求項 4 8 又は 4 9 に記載の製剤。

【請求項 5 1】

前記界面活性剤が、溶液中で再構成された場合、0 . 0 2 % ~ 0 . 1 0 % (w / v) の範囲の濃度で存在する、請求項 4 8 ~ 5 0 のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項 5 2】

前記界面活性剤が、物理的ストレスに対する耐性を増加させる、請求項 4 8 ~ 5 1 のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項 5 3】

前記製剤は、粒径が均一である、請求項 1 ~ 5 2 のいずれか一項に記載の製剤。

20

【請求項 5 4】

前記製剤が、マイクロフローイメージング分析によって決定して、より大きな粒径の粒子の 2 分の 1、3 分の 1、4 分の 1、5 分の 1、6 分の 1、7 分の 1、8 分の 1、9 分の 1、又は 1 0 分の 1 の低減を含む、請求項 1 ~ 5 3 のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項 5 5】

前記 E N P P 1 ポリペプチドが、配列番号 1 3、配列番号 1 4、又は配列番号 1 5 を含むアミノ酸配列と少なくとも 7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、又は 1 0 0 % 同一であるアミノ酸配列を含む、先行請求項のいずれか一項に記載の製剤。

30

【請求項 5 6】

前記 E N P P 1 ポリペプチドが、配列番号 2 を含むアミノ酸配列と少なくとも 7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、又は 1 0 0 % 同一であるアミノ酸配列を含む、先行請求項のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項 5 7】

前記 E N P P 1 ポリペプチドが、可溶性 E N P P 1 ポリペプチドドメインと 1 つ以上の異種タンパク質部分とを含む融合タンパク質である、請求項 1 ~ 5 6 のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項 5 8】

前記異種タンパク質部分が、哺乳動物における前記可溶性 E N P P 1 ポリペプチドの循環半減期を増加させる、請求項 1 ~ 5 7 のいずれか一項に記載の製剤。

40

【請求項 5 9】

前記異種タンパク質部分が、F c ドメインを含む、請求項 5 7 又は 5 8 に記載の製剤。

【請求項 6 0】

前記 F c ドメインが、配列番号 1 2 のアミノ酸配列と少なくとも 7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、又はそれ以上同一であるアミノ酸配列を含む、請求項 5 9 に記載の製剤。

【請求項 6 1】

前記 E N P P 1 ポリペプチドが、E N P P 1 - F c 融合タンパク質である、請求項 5 9

50

又は 60 に記載の製剤。

【請求項 62】

前記 ENPP1 ポリペプチドが、異種部分を更に含む、請求項 1～60 のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項 63】

前記異種部分が、グリコシル化アミノ酸、PEG 化アミノ酸、ファルネシル化アミノ酸、アセチル化アミノ酸、ビオチン化アミノ酸、及び脂質部分からなる群から選択される、請求項 62 に記載の製剤。

【請求項 64】

前記 ENPP1 ポリペプチドが、配列番号 13 を含むアミノ酸配列と少なくとも 75 %、80 %、85 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、又は 100 % 同一であるアミノ酸配列を含む、先行請求項のいずれか一項に記載の製剤。

10

【請求項 65】

前記 ENPP1 ポリペプチドが、配列番号 13 と少なくとも 90 % 同一である、請求項 1～64 のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項 66】

前記 ENPP1 ポリペプチドが、配列番号 13 と少なくとも 95 % 同一である、請求項 1～64 のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項 67】

前記 ENPP1 ポリペプチドが、配列番号 13 と少なくとも 99 % 同一である、請求項 1～64 のいずれか一項に記載の製剤。

20

【請求項 68】

前記 ENPP1 ポリペプチドが、配列番号 13 を含む、請求項 1～67 のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項 69】

前記 ENPP1 ポリペプチドが、配列番号 13 からなる、請求項 1～67 のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項 70】

前記 ENPP1 ポリペプチドが、配列番号 14 を含むアミノ酸配列と少なくとも 75 %、80 %、85 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、又は 100 % 同一であるアミノ酸配列を含む、先行請求項のいずれか一項に記載の製剤。

30

【請求項 71】

前記 ENPP1 ポリペプチドが、配列番号 14 と少なくとも 90 % 同一である、請求項 1～64 のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項 72】

前記 ENPP1 ポリペプチドが、配列番号 14 と少なくとも 95 % 同一である、請求項 1～64 のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項 73】

前記 ENPP1 ポリペプチドが、配列番号 14 と少なくとも 99 % 同一である、請求項 1～64 のいずれか一項に記載の製剤。

40

【請求項 74】

前記 ENPP1 ポリペプチドが、配列番号 14 を含む、請求項 1～64 のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項 75】

前記 ENPP1 ポリペプチドが、配列番号 14 からなる、請求項 1～64 のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項 76】

前記 ENPP1 ポリペプチドが、配列番号 15 を含むアミノ酸配列と少なくとも 75 %

50

、 80 %、 85 %、 90 %、 91 %、 92 %、 93 %、 94 %、 95 %、 96 %、 97 %、 98 %、 99 %、 又は 100 % 同一であるアミノ酸配列を含む、先行請求項のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項 77】

前記 ENPP1 ポリペプチドが、配列番号 15 と少なくとも 90 % 同一である、請求項 1 ～ 64 のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項 78】

前記 ENPP1 ポリペプチドが、配列番号 15 と少なくとも 95 % 同一である、請求項 1 ～ 64 のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項 79】

前記 ENPP1 ポリペプチドが、配列番号 15 と少なくとも 99 % 同一である、請求項 1 ～ 64 のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項 80】

前記 ENPP1 ポリペプチドが、配列番号 15 を含む、請求項 1 ～ 64 のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項 81】

前記 ENPP1 ポリペプチドが、配列番号 15 からなる、請求項 1 ～ 64 のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項 82】

前記製剤が、ENPP1 ポリペプチド、緩衝剤、薬学的に許容可能な塩、安定化剤、界面活性剤、及び 1 つ以上の薬学的に許容可能な添加剤を含む、請求項 1 ～ 81 のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項 83】

前記緩衝剤が、クエン酸塩緩衝剤である、請求項 82 に記載の製剤。

【請求項 84】

前記クエン酸塩緩衝剤が、クエン酸三ナトリウム二水和物である、請求項 82 又は 83 に記載の製剤。

【請求項 85】

前記薬学的に許容可能な塩が、塩化カルシウムである、請求項 82 ～ 84 のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項 86】

前記安定化剤が、糖である、請求項 82 ～ 85 のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項 87】

前記安定化剤が、スクロースである、請求項 86 に記載の製剤。

【請求項 88】

前記 1 つ以上の薬学的に許容可能な添加剤が、マンニトールを含む、請求項 82 ～ 87 のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項 89】

前記製剤が、ENPP1 ポリペプチド、クエン酸塩緩衝剤、塩化カルシウム、スクロース、及びポリソルベートを含む、請求項 82 ～ 87 のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項 90】

前記製剤が、ENPP1 ポリペプチド、クエン酸三ナトリウム二水和物、塩化カルシウム二水和物、スクロース、及びポリソルベート 20 を含む、請求項 82 ～ 87 のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項 91】

前記製剤が、ENPP1 ポリペプチド、クエン酸塩緩衝剤、塩化カルシウム、スクロース、マンニトール、及びポリソルベートを含む、請求項 82 ～ 87 のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項 92】

前記製剤が、ENPP1 ポリペプチド、クエン酸三ナトリウム二水和物、塩化カルシウム

10

20

30

40

50

ムニ水和物、スクロース、D（－）マンニトール、及びポリソルベート 20 を含む、請求項 82～87 のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項 93】

前記製剤が、0.5 ml の最終再構成体積当たり、約 25 mg の ENPP1 ポリペプチド、約 2.94 mg のクエン酸三ナトリウムニ水和物、約 0.15 mg の塩化カルシウムニ水和物、約 30 mg のスクロース、約 7.5 mg の D（－）マンニトール、及び約 0.25 mg のポリソルベートを含む、請求項 82～87 のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項 94】

前記 ENPP1 ポリペプチドが、配列番号 13 を含む、請求項 82～93 のいずれか一項に記載の製剤。

10

【請求項 95】

前記 ENPP1 ポリペプチドが、配列番号 13 からなる、請求項 82～93 のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項 96】

前記 ENPP1 ポリペプチドが、配列番号 14 を含む、請求項 82～93 のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項 97】

前記 ENPP1 ポリペプチドが、配列番号 14 からなる、請求項 82～93 のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項 98】

前記 ENPP1 ポリペプチドが、配列番号 15 を含む、請求項 82～93 のいずれか一項に記載の製剤。

20

【請求項 99】

前記 ENPP1 ポリペプチドが、配列番号 15 からなる、請求項 82～93 のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項 100】

前記 ENPP1 ポリペプチドが、Fcドメインを更に含む、請求項 82～99 のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項 101】

前記 Fcドメインが、配列番号 12 に示されるアミノ酸配列を含むか、又はそれからなる、請求項 100 に記載の製剤。

30

【請求項 102】

前記 ENPP1 ポリペプチドが、前記 ENPP1 ポリペプチド部分と前記 Fcドメインとを接合するリンカーアミノ酸配列を含む、請求項 100 又は 101 に記載の製剤。

【請求項 103】

前記リンカーアミノ酸配列が、アミノ酸配列 LIN を含むか、又はそれからなる、請求項 82～101 のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項 104】

前記 ENPP1 ポリペプチドが、配列番号 9、配列番号 10、又は配列番号 11 からなるか、又はそれを含む、請求項 82～103 のいずれか一項に記載の製剤。

40

【請求項 105】

前記製剤が、滅菌注射溶液中で再構成される、請求項 1～104 のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項 106】

前記製剤が、再構成溶液又は滅菌水中で再構成される、請求項 105 に記載の製剤。

【請求項 107】

前記再構成溶液が、薬学的に許容可能な担体及び／又は添加剤を含む、請求項 106 に記載の製剤。

【請求項 108】

前記薬学的に許容可能な担体が、生理食塩水、精製水、又は注射用滅菌水から選択され

50

る、請求項 107 に記載の製剤。

【請求項 109】

前記製剤が、100 秒、80 秒、70 秒、68 秒、65 秒、又は 60 秒未満の期間内に完全に再構成される、請求項 105～108 のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項 110】

前記再構成された製剤が、少なくとも又は約 50 mg/mL の前記 ENPP1 ポリペプチド、約 pH 6.3 の約 20 mM のクエン酸塩、約 2 mM の塩化カルシウム、約 175 mM のスクロース、約 82 mM のマンニトール、及び約 0.05 % w/v のポリソルベートを含む、請求項 105～109 のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項 111】

前記再構成された製剤が、少なくとも又は約 50 mg/mL の前記 ENPP1 ポリペプチド、約 pH 6.3 の約 20 mM のクエン酸塩、約 2 mM の塩化カルシウム、約 175 mM のスクロース、約 82 mM の (D) マンニトール、及び約 0.05 % w/v のポリソルベート 20 を含む、請求項 105～109 のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項 112】

前記再構成された製剤が、少なくとも又は約 50 mg/mL の前記 ENPP1 ポリペプチド、約 pH 6.3 の約 20 mM のクエン酸塩、約 88 mM のスクロース、約 82 mM のマンニトール、約 2 mM の塩化カルシウム、及び約 0.05 % のポリソルベート 20 を含む、請求項 105～109 のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項 113】

前記再構成された製剤が、少なくとも又は約 50 mg/mL の前記 ENPP1 ポリペプチド、約 pH 6.3 の約 20 mM のクエン酸塩、約 263 mM のスクロース、約 2 mM の塩化カルシウム、及び約 0.05 % のポリソルベート 20 を含む、請求項 105～109 のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項 114】

前記製剤が、-80℃～40℃で長期安定性を呈する、請求項 1～113 のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項 115】

前記製剤が、少なくとも 3、6、12、24、36、48、又は 60 か月の貯蔵寿命を有する、請求項 114 に記載の製剤。

【請求項 116】

前記再構成された製剤が、少なくとも 1、2、3、4、5、6、12、18、24、48、又は 60 時間の貯蔵寿命を有する、請求項 105～115 のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項 117】

ENPP1 ポリペプチドを含む医薬溶液を生成するための方法であって、請求項 1～104 のいずれか一項に記載の凍結乾燥されたポリペプチド製剤を滅菌再構成溶液又は滅菌水と接触させて、それにより前記 ENPP1 ポリペプチドを含む再構成された溶液を生成することを含む、方法。

【請求項 118】

前記再構成溶液が、薬学的に許容可能な担体及び／又は添加剤を含む、請求項 117 に記載の製剤。

【請求項 119】

前記薬学的に許容可能な担体が、生理食塩水、精製水、又は注射用滅菌水から選択される、請求項 118 に記載の方法。

【請求項 120】

前記製剤が、100 秒、80 秒、70 秒、68 秒、65 秒、又は 60 秒未満の期間内に完全に再構成される、請求項 117～119 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 121】

前記再構成された製剤が、少なくとも又は約 50 mg/mL の前記 ENPP1 ポリペ

10

20

30

40

50

チド、約 pH 6.3 の約 20 mM のクエン酸塩、約 2 mM の塩化カルシウム、約 175 mM のスクロース、約 82 mM のマンニトール、及び約 0.05 % w/v のポリソルベートを含む、請求項 117～120 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 122】

前記再構成された製剤が、少なくとも又は約 50 mg/mL の前記 ENPP1 ポリペプチド、約 pH 6.3 の約 20 mM のクエン酸塩、約 2 mM の塩化カルシウム、約 175 mM のスクロース、約 82 mM の (D) マンニトール、及び約 0.05 % w/v のポリソルベート 20 を含む、請求項 117～120 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 123】

前記再構成された製剤が、少なくとも又は約 50 mg/mL の前記 ENPP1 ポリペプチド、約 pH 6.3 の約 20 mM のクエン酸塩、約 88 mM のスクロース、約 82 mM のマンニトール、約 2 mM の塩化カルシウム、及び約 0.05 % のポリソルベート 20 を含む、請求項 117～120 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 124】

前記再構成された製剤が、少なくとも又は約 50 mg/mL の前記 ENPP1 ポリペプチド、約 pH 6.3 の約 20 mM のクエン酸塩、約 263 mM のスクロース、約 2 mM の塩化カルシウム、及び約 0.05 % のポリソルベート 20 を含む、請求項 117～120 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 125】

請求項 117～124 のいずれか一項に記載の方法によって作製される、再構成された溶液。

【請求項 126】

血管石灰化の進行を防止するか又は血管石灰化を低減させることを、それを必要とする対象において行うための方法であって、有効量の請求項 105～116 又は 125 のいずれか一項に記載の再構成された製剤を前記対象に投与し、それにより前記対象において血管石灰化の進行を防止するか又は血管石灰化を低減させることを含む、方法。

【請求項 127】

病的石灰化の進行を防止するか又は病的石灰化を低減させることを、ENPP1 欠乏を有する対象において行うための方法であって、有効量の請求項 105～116 又は 125 のいずれか一項に記載の再構成された製剤を前記対象に投与し、それにより前記対象において病的石灰化の進行を防止するか又は病的石灰化を低減させることを含む、方法。

【請求項 128】

組織石灰化の進行を防止するか又は組織石灰化を低減させることを、それを必要とする対象において行うための方法であって、有効量の請求項 105～116 又は 125 のいずれか一項に記載の再構成された製剤を前記対象に投与し、それにより前記対象において組織石灰化の進行を防止するか又は組織石灰化を低減させることを含む、方法。

【請求項 129】

病的骨化の進行を防止するか又は低減させることを、それを必要とする対象において行うための方法であって、有効量の請求項 105～116 又は 125 のいずれか一項に記載の再構成された製剤を前記対象に投与し、それにより前記対象において組織石灰化の進行を防止するか又は組織石灰化を低減させることを含む、方法。

【請求項 130】

循環ピロリン酸 (PPi) を増加させることを、それを必要とする対象において行うための方法であって、有効量の請求項 105～116 又は 125 のいずれか一項に記載の再構成された製剤を前記対象に投与し、それにより前記対象において循環 PPi を増加させることを含む、方法。

【請求項 131】

ピロホスファターゼ活性を増加させることを、それを必要とする対象において行うための方法であって、有効量の請求項 105～116 又は 125 のいずれか一項に記載の再構成された製剤を前記対象に投与し、それにより前記対象において循環 PPi を増加させる

10

20

30

40

50

ことを含む、方法。

【請求項 1 3 2】

前記対象が、E N P P 1 欠乏を有する、請求項 1 2 6 ～ 1 3 1 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 3 3】

前記対象が、A B C C 6 欠乏を有する、請求項 1 2 6 ～ 1 3 1 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 3 4】

前記 A B C C 6 欠乏が、弾性線維性仮性黄色腫である、請求項 1 3 3 に記載の方法。

【請求項 1 3 5】

前記対象が、病的石灰化を伴う障害を有する、請求項 1 2 6 ～ 1 3 1 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 3 6】

前記対象が、病的骨化を伴う障害を有する、請求項 1 2 6 ～ 1 3 1 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 3 7】

前記対象は、病的軟部組織石灰化、動脈石灰化、血管石灰化、慢性腎臓疾患（C K D）、末期腎疾患（E S R D）、尿毒症性細小動脈石灰化症（C U A）、カルシフィラキシス、後縦靱帯骨化症（O P L L）、又は低リン酸血症性くる病を有するか、又はそれを発症するリスクがある、請求項 1 2 6 ～ 1 3 1 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 3 8】

対象において E N P P 1 欠乏の 1 つ以上の症状を改善するための方法であって、有効量の請求項 1 0 5 ～ 1 1 6 又は 1 2 5 のいずれか一項に記載の再構成された製剤を前記対象に投与し、それにより前記対象において E N P P 1 欠乏の 1 つ以上の症状を改善することを含む、方法。

【請求項 1 3 9】

E N P P 1 欠乏を有する対象を治療するための方法であって、有効量の請求項 1 0 5 ～ 1 1 6 又は 1 2 5 のいずれか一項に記載の再構成された製剤を前記対象に投与し、それにより前記対象を治療することを含む、方法。

【請求項 1 4 0】

対象において A B C C 6 欠乏の 1 つ以上の症状を改善するための方法であって、有効量の請求項 1 0 5 ～ 1 1 6 又は 1 2 5 のいずれか一項に記載の再構成された製剤を前記対象に投与し、それにより前記対象において A B C C 6 欠乏の 1 つ以上の症状を改善することを含む、方法。

【請求項 1 4 1】

A B C C 6 欠乏を有する対象を治療するための方法であって、有効量の請求項 1 0 5 ～ 1 1 6 又は 1 2 5 のいずれか一項に記載の再構成された製剤を前記対象に投与し、それにより前記対象を治療することを含む、方法。

【請求項 1 4 2】

前記再構成された製剤が、非経口投与される、請求項 1 2 6 ～ 1 4 1 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 4 3】

前記再構成された製剤が、皮下注射を介して投与される、請求項 1 2 6 ～ 1 4 1 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 4 4】

前記再構成された製剤が、静脈内注射を介して投与される、請求項 1 2 6 ～ 1 4 1 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 4 5】

前記再構成された製剤が、皮内注射を介して投与される、請求項 1 2 6 ～ 1 4 1 のいずれか一項に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 1 4 6】

前記再構成された製剤が、筋肉内注射を介して投与される、請求項 1 2 6 ～ 1 4 1 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 4 7】

前記再構成された製剤が、自己投与される、請求項 1 2 6 ～ 1 4 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 4 8】

前記製剤が、1 日数回、2 日ごと、3 日ごと、1 週間ごと、又は 1 か月ごとに投与される、請求項 1 2 6 ～ 1 4 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 4 9】

前記製剤の第 2 の用量が、少なくとも 2 日後、4 日後、1 週間後、又は 1 か月後の好適な時間間隔の後で投与される、請求項 1 4 8 に記載の製剤。

【請求項 1 5 0】

前記凍結乾燥された製剤が、治療有効用量を含む、請求項 1 ～ 1 1 6 のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項 1 5 1】

前記再構成された製剤が、治療有効用量を含む、請求項 1 0 5 ～ 1 1 6 又は 1 2 5 のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項 1 5 2】

溶液中 5 ～ 1 0 0 m M の濃度で再構成され凍結乾燥された E N P P 1 を含む製剤であって、緩衝剤、1 つ以上の薬学的に許容可能な添加剤のうちの 1 つ以上を含む、製剤。

【請求項 1 5 3】

前記緩衝剤が、溶液中で再構成された場合、p H 6 ～ 7 の p H 範囲を維持する、請求項 1 5 2 に記載の製剤。

【請求項 1 5 4】

前記緩衝剤が、溶液中で再構成された場合、p H 7 ～ 8 の p H 範囲を維持する、請求項 1 5 2 又は 1 5 3 に記載の製剤。

【請求項 1 5 5】

前記緩衝剤が、コハク酸塩、クエン酸塩、重炭酸塩、リン酸塩、トリス、又はグリシルグリシンからなる群から選択される、請求項 1 5 2 ～ 1 5 4 のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項 1 5 6】

前記緩衝剤が、コハク酸塩、クエン酸塩、又はリン酸塩である、請求項 1 5 2 ～ 1 5 5 のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項 1 5 7】

前記緩衝剤が、クエン酸塩である、請求項 1 5 2 ～ 1 5 6 のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項 1 5 8】

前記緩衝剤が、コハク酸塩である、請求項 1 5 2 ～ 1 5 7 のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項 1 5 9】

前記緩衝剤が、リン酸塩である、請求項 1 5 2 ～ 1 5 8 のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項 1 6 0】

前記緩衝剤が、凝集体形成の開始温度を増加させる、請求項 1 5 2 ～ 1 5 9 のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項 1 6 1】

前記緩衝剤が、凝集体形成の開始温度を少なくとも 2 °C 増加させる、請求項 1 5 2 ～ 1 6 0 のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項 1 6 2】

前記緩衝剤が、高分子量種の形成を減少させる、請求項 1 5 2 ～ 1 6 1 のいずれか一項

10

20

30

40

50

に記載の製剤。

【請求項 1 6 3】

前記緩衝剤が、高分子量種の形成を、少なくとも 1 0 %、1 5 %、2 0 %、2 5 %、3 0 %、3 5 %、4 0 %、4 5 %、5 0 % 減少させる、請求項 1 5 2 ~ 1 6 2 のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項 1 6 4】

前記 1 つ以上の薬学的に許容可能な添加剤が、安定化剤、アミノ酸、塩、金属イオン、及び界面活性剤を含む、請求項 1 5 2 ~ 1 6 3 のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項 1 6 5】

前記安定化剤が、糖、炭水化物、又は多糖類である、請求項 1 5 2 ~ 1 6 4 のいずれか一項に記載の製剤。

10

【請求項 1 6 6】

前記糖が、スクロース、トレハロース、マンノース、マルトース、ラクトース、グルコース、ラフィノース、セロビオース、ゲンチオビオース、イソマルトース、アラビノース、グルコサミン、フルクトース、マンニトール、又はソルビトールからなる群から選択される、請求項 1 5 2 ~ 1 6 5 のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項 1 6 7】

前記 1 つ以上の薬学的に許容可能な添加剤が、マンニトールである、請求項 1 5 2 ~ 1 6 6 のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項 1 6 8】

20

前記 1 つ以上の薬学的に許容可能な添加剤が、スクロースである、請求項 1 5 2 ~ 1 6 7 に記載の製剤。

【請求項 1 6 9】

前記薬学的に許容可能な添加剤が、アミノ酸である、請求項 1 5 2 ~ 1 6 8 のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項 1 7 0】

前記アミノ酸が、グリシン、アルギニン、ヒスチジン、アラニン、プロリン、セリン、及びグルタミン酸からなる群から選択される、請求項 1 5 2 ~ 1 6 9 のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項 1 7 1】

30

前記 1 つ以上の薬学的に許容可能な添加剤が、アルギニンである、請求項 1 5 2 ~ 1 7 0 のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項 1 7 2】

前記薬学的に許容可能な添加剤が、塩である、請求項 1 5 2 ~ 1 7 1 のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項 1 7 3】

前記塩が、塩化ナトリウム (NaCl)、塩化カルシウム (CaCl_2)、塩化亜鉛 (ZnCl_2)、及び／又は塩化マグネシウム (MgCl_2) からなる群から選択される、請求項 1 5 2 ~ 1 7 2 のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項 1 7 4】

40

前記 1 つ以上の薬学的に許容可能な添加剤が、塩化カルシウム (CaCl_2) である、請求項 1 5 2 ~ 1 7 3 のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項 1 7 5】

前記薬学的に許容可能な添加剤が、界面活性剤である、請求項 1 5 2 ~ 1 7 4 のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項 1 7 6】

前記界面活性剤が、ポリソルベート、ポロキサマー、トリトン、ドデシル硫酸ナトリウム、ラウレル硫酸ナトリウム、オクチルグリコシドナトリウム、ラウリルスルホベタイン、ミリスチルスルホベタイン、リノレイルスルホベタイン、ステアリルスルホベタイン、ラウリルサルコシン、ミリスチルサルコシン、リノレイルサルコシン、ステア

50

リル-サルコシン、リノレイル-ベタイン、ミリスチル-ベタイン、セチル-ベタイン、ラウロアミドプロピル-ベタイン、コカミドプロピル-ベタイン、リノールアミドプロピル-ベタイン、ミリスタミドプロピル-ベタイン、パルミドプロピル-ベタイン、イソステアラミドプロピル-ベタイン、ミリスタミドプロピル-ジメチルアミン、パルミドプロピル-ジメチルアミン、イソステアラミドプロピル-ジメチルアミン、ココイルメチルタウリンナトリウム、オレイルメチルタウリンナトリウム、ジヒドロキシプロピル PEG-5 リノールアンモニウムクロリド、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、ポリソルベート 20、ポリソルベート 21、ポリソルベート 40、ポリソルベート 60、ポリソルベート 61、ポリソルベート 65、ポリソルベート 80、ポリソルベート 81、ポリソルベート 85、ポリソルベート 188、PEG 3350、及びそれらの混合物からなる群から選択される、請求項 152～175 のいずれか一項に記載の製剤。 10

【請求項 177】

前記界面活性剤が、ポリソルベート 20 (PS20)、ポリソルベート 80 (PS80)、又はポリソルベート 188 (PS188) からなる群から選択される、請求項 152～176 のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項 178】

前記界面活性剤が、ポリソルベート 20 (PS20) である、請求項 152～177 のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項 179】

前記製剤が、緩衝剤、安定化剤、塩、アミノ酸、及び界面活性剤を含む、請求項 152～178 のいずれか一項に記載の製剤。 20

【請求項 180】

前記緩衝剤が、クエン酸塩又はコハク酸塩であり、前記安定化剤が、スクロース又はマンニトールであり、前記塩が、塩化カルシウム (CaCl₂) であり、前記界面活性剤が、PS20 である、請求項 152～179 のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項 181】

前記製剤の pH が、pH 6.2～pH 6.5 である、請求項 152～180 のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項 182】

前記製剤が、15～25 mM のクエン酸塩を含む、請求項 152～181 のいずれか一項に記載の製剤。 30

【請求項 183】

前記製剤が、スクロース、マンニトールの各々 75 mM～95 mM、又はそれらの組み合わせを含む、請求項 152～182 のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項 184】

前記製剤が、100 mM～300 mM のスクロースを含む、請求項 152～183 のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項 185】

前記製剤が、1 mM～3 mM の塩化カルシウムを含む、請求項 152～184 のいずれか一項に記載の製剤。 40

【請求項 186】

前記製剤が、0.005%～0.1% (w/v) の PS20 を含む、請求項 152～185 のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項 187】

前記 1 つ以上の薬学的に許容可能な添加剤が、溶液中で再構成された場合、5 mM～300 mM の範囲の濃度で存在する、請求項 152～186 のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項 188】

前記 1 つ以上の薬学的に許容可能な添加剤が、高分子量種の形成を減少させる、請求項 152～187 のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項 189】

前記 1 つ以上の薬学的に許容可能な添加剤が、高分子量種の形成を、少なくとも 10 %、15 %、20 %、25 %、30 %、35 %、40 %、45 %、50 % 減少させる、請求項 152 ~ 188 のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項 190】

前記製剤が、ENPP1 ポリペプチド補因子を含む、請求項 152 ~ 189 のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項 191】

前記 ENPP1 ポリペプチド補因子が、カルシウム、亜鉛、及び／又はアデノシンーリン酸を含む、請求項 152 ~ 190 のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項 192】

前記 ENPP1 ポリペプチド補因子が、CaCl₂、CaSO₄、ZnCl₂、ZnSO₄、及び／又はアデノシンーリン酸である、請求項 152 ~ 191 のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項 193】

前記 ENPP1 ポリペプチド補因子が、CaCl₂ 及び／又はアデノシンーリン酸である、請求項 152 ~ 192 のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項 194】

前記 ENPP1 ポリペプチド補因子が、溶液中で再構成された場合、1 mM ~ 10 mM の範囲の濃度で存在する、請求項 152 ~ 193 のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項 195】

前記 ENPP1 ポリペプチド補因子が、高分子量種の形成を、少なくとも 10 %、15 %、20 %、25 %、30 %、35 %、40 %、45 %、50 % 減少させる、請求項 152 ~ 194 のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項 196】

前記製剤が、界面活性剤を含む、請求項 152 ~ 195 のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項 197】

前記界面活性剤が、PS20、PS80、又は PS188 を含む、請求項 152 ~ 196 のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項 198】

前記界面活性剤が、PS20 を含む、請求項 152 ~ 197 のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項 199】

前記界面活性剤が、溶液中で再構成された場合、0.02 % ~ 0.10 % (w/v) の範囲の濃度で存在する、請求項 152 ~ 198 のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項 200】

前記界面活性剤が、物理的ストレスに対する耐性を増加させる、請求項 152 ~ 199 のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項 201】

前記製剤は、粒径が均一である、請求項 152 ~ 200 のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項 202】

前記製剤が、マイクロフローイメージング分析によって決定して、より大きな粒径の粒子の 2 分の 1、3 分の 1、4 分の 1、5 分の 1、6 分の 1、7 分の 1、8 分の 1、9 分の 1、又は 10 分の 1 の低減を含む、請求項 152 ~ 201 のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項 203】

前記 ENPP1 ポリペプチドが、配列番号 13、配列番号 14、又は配列番号 15 を含むアミノ酸配列と少なくとも 75 %、80 %、85 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、又は 100 % 同一であるアミノ酸配列を含む、請求項 152 ~ 202 のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項 204】

前記 ENPP1 ポリペプチドが、配列番号 2 を含むアミノ酸配列と少なくとも 75 %、

10

20

30

40

50

80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一であるアミノ酸配列を含む、請求項152～203のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項205】

前記ENPP1ポリペプチドが、可溶性ENPP1ポリペプチドドメインと1つ以上の異種タンパク質部分とを含む融合タンパク質である、請求項152～204のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項206】

前記異種タンパク質部分が、哺乳動物における前記可溶性ENPP1ポリペプチドの循環半減期を増加させる、請求項152～205のいずれか一項に記載の製剤。

10

【請求項207】

前記異種タンパク質部分が、Fcドメインを含む、請求項152～206のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項208】

前記Fcドメインが、配列番号12のアミノ酸配列と少なくとも75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又はそれ以上同一であるアミノ酸配列を含む、請求項152～207のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項209】

前記ENPP1ポリペプチドが、ENPP1-Fc融合タンパク質である、請求項152～208のいずれか一項に記載の製剤。

20

【請求項210】

前記異種部分が、グリコシル化アミノ酸、PEG化アミノ酸、ファルネシル化アミノ酸、アセチル化アミノ酸、ビオチン化アミノ酸、及び脂質部分からなる群から選択される、請求項152～209のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項211】

前記ENPP1ポリペプチドが、配列番号13を含むアミノ酸配列と少なくとも75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一であるアミノ酸配列を含む、請求項152～210のいずれか一項に記載の製剤。

30

【請求項212】

前記ENPP1ポリペプチドが、配列番号14を含むアミノ酸配列と少なくとも75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一であるアミノ酸配列を含む、請求項152～211のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項213】

前記ENPP1ポリペプチドが、配列番号15を含むアミノ酸配列と少なくとも75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一であるアミノ酸配列を含む、請求項152～212のいずれか一項に記載の製剤。

40

【請求項214】

前記製剤が、ENPP1ポリペプチド、緩衝剤、薬学的に許容可能な塩、安定化剤、界面活性剤、及び1つ以上の薬学的に許容可能な添加剤を含む、請求項152～213のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項215】

前記緩衝剤が、クエン酸塩緩衝剤である、請求項152～214のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項216】

前記緩衝剤が、クエン酸三ナトリウム二水和物である、請求項152～215のいずれか一項に記載の製剤。

50

【請求項 2 1 7】

前記薬学的に許容可能な塩が、塩化カルシウムである、請求項 1 5 2 ～ 2 1 6 のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項 2 1 8】

前記安定化剤が、糖である、請求項 1 5 2 ～ 2 1 7 のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項 2 1 9】

前記安定化剤が、スクロースである、請求項 1 5 2 ～ 2 1 8 のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項 2 2 0】

前記 1 つ以上の薬学的に許容可能な添加剤が、マンニトールを含む、請求項 1 5 2 ～ 2 1 9 のいずれか一項に記載の製剤。 10

【請求項 2 2 1】

前記製剤が、E N P P 1 ポリペプチド、クエン酸塩緩衝剤、塩化カルシウム、スクロース、及びポリソルベートを含む、請求項 1 5 2 ～ 2 2 0 のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項 2 2 2】

前記製剤が、E N P P 1 ポリペプチド、クエン酸三ナトリウム二水和物、塩化カルシウム二水和物、スクロース、及びポリソルベート 2 0 を含む、請求項 1 5 2 ～ 2 2 1 のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項 2 2 3】

前記製剤が、E N P P 1 ポリペプチド、クエン酸塩緩衝剤、塩化カルシウム、スクロース、マンニトール、及びポリソルベートを含む、請求項 1 5 2 ～ 2 2 2 のいずれか一項に記載の製剤。 20

【請求項 2 2 4】

前記製剤が、E N P P 1 ポリペプチド、クエン酸三ナトリウム二水和物、塩化カルシウム二水和物、スクロース、D (-) マンニトール、及びポリソルベート 2 0 を含む、請求項 1 5 2 ～ 2 2 3 のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項 2 2 5】

前記製剤が、0 . 5 m l の最終再構成体積当たり、約 2 5 m g の E N P P 1 ポリペプチド、約 2 . 9 4 m g のクエン酸三ナトリウム二水和物、約 0 . 1 5 m g の塩化カルシウム二水和物、約 3 0 m g のスクロース、約 7 . 5 m g の D (-) マンニトール、及び約 0 . 2 5 m g のポリソルベートを含む、請求項 1 5 2 ～ 2 2 4 のいずれか一項に記載の製剤。 30

【請求項 2 2 6】

前記製剤が、少なくとも 1、2、3、4、5、6、1 2、1 8、2 4、4 8、又は 6 0 時間の貯蔵寿命を有する、請求項 1 5 2 ～ 2 2 5 のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項 2 2 7】

前記 E N P P 1 ポリペプチドが、前記 E N P P 1 ポリペプチド部分と前記 F c ドメインとを接合するリンカーアミノ酸配列を含む、請求項 1 5 2 ～ 2 2 6 のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項 2 2 8】

前記 E N P P 1 ポリペプチドが、前記 E N P P 1 ポリペプチド部分と前記 F c ドメインとを接合するリンカーアミノ酸配列を含む、請求項 1 5 2 ～ 2 2 7 のいずれか一項に記載の製剤。 40

【請求項 2 2 9】

前記リンカーアミノ酸配列が、アミノ酸配列 L I N を含むか、又はそれからなる、請求項 1 5 2 ～ 2 2 8 のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項 2 3 0】

前記 E N P P 1 ポリペプチドが、配列番号 9、配列番号 1 0、又は配列番号 1 1 からなるか、又はそれを含む、請求項 1 5 2 ～ 2 2 9 のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項 2 3 1】

前記製剤が、滅菌注射溶液である、請求項 1 5 2 ～ 2 3 0 のいずれか一項に記載の製剤 50

。

【請求項 2 3 2】

前記再構成溶液が、薬学的に許容可能な担体及び／又は添加剤を含む、請求項 1 5 2 ～ 2 3 1 のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項 2 3 3】

前記薬学的に許容可能な担体が、生理食塩水、精製水、又は注射用滅菌水から選択される、請求項 1 5 2 ～ 2 3 2 のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項 2 3 4】

前記製剤が、1 0 0 秒、8 0 秒、7 0 秒、6 8 秒、6 5 秒、又は 6 0 秒未満の期間内に完全に再構成される、請求項 1 5 2 ～ 2 3 3 のいずれか一項に記載の製剤。

10

【請求項 2 3 5】

前記製剤が、少なくとも又は約 5 0 m g / m L の前記 E N P P 1 ポリペプチド、約 p H 6 . 3 の約 2 0 m M のクエン酸塩、約 2 m M の塩化カルシウム、約 1 7 5 m M のスクロース、約 8 2 m M のマンニトール、及び約 0 . 0 5 % w / v のポリソルベートを含む、請求項 1 5 2 ～ 2 3 4 のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項 2 3 6】

前記再構成された製剤が、少なくとも又は約 5 0 m g / m L の前記 E N P P 1 ポリペプチド、約 p H 6 . 3 の約 2 0 m M のクエン酸塩、約 2 m M の塩化カルシウム、約 1 7 5 m M のスクロース、約 8 2 m M の (D) マンニトール、及び約 0 . 0 5 % w / v のポリソルベート 2 0 を含む、請求項 1 5 2 ～ 2 3 5 のいずれか一項に記載の製剤。

20

【請求項 2 3 7】

前記再構成された製剤が、少なくとも又は約 5 0 m g / m L の前記 E N P P 1 ポリペプチド、約 p H 6 . 3 の約 2 0 m M のクエン酸塩、約 8 8 m M のスクロース、約 8 2 m M のマンニトール、約 2 m M の塩化カルシウム、及び約 0 . 0 5 % のポリソルベート 2 0 を含む、請求項 1 5 2 ～ 2 3 6 のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項 2 3 8】

前記再構成された製剤が、少なくとも又は約 5 0 m g / m L の前記 E N P P 1 ポリペプチド、約 p H 6 . 3 の約 2 0 m M のクエン酸塩、約 2 6 3 m M のスクロース、約 2 m M の塩化カルシウム、及び約 0 . 0 5 % のポリソルベート 2 0 を含む、請求項 1 5 2 ～ 2 3 7 のいずれか一項に記載の製剤。

30

【請求項 2 3 9】

前記再構成された製剤が、少なくとも 1、2、3、4、5、6、1 2、1 8、2 4、4 8、又は 6 0 時間の貯蔵寿命を有する、請求項 1 5 2 ～ 2 3 8 のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項 2 4 0】

請求項 1 ～ 1 1 6 のいずれか一項に記載の凍結乾燥された製剤を含む、バイアル。

【請求項 2 4 1】

請求項 1 5 5 ～ 2 3 9 のいずれか一項に記載の再構成された製剤を含む、バイアル。

【請求項 2 4 2】

請求項 1 ～ 1 1 6 のいずれか一項に記載の凍結乾燥された製剤を含む、シリンジ。

40

【請求項 2 4 3】

請求項 1 1 5 ～ 2 3 9 のいずれか一項に記載の再構成された製剤を含む、シリンジ。

【請求項 2 4 4】

病的石灰化又は骨化の疾患を治療するために使用するための、請求項 1 5 2 ～ 2 3 9 のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項 2 4 5】

血管石灰化の進行を防止するか、又は血管石灰化を低減させることを、それを必要とする対象において行うために使用するための、請求項 1 5 2 ～ 2 3 9 のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項 2 4 6】

50

病的石灰化の進行を防止するか、又は病的石灰化を低減させることを、E N P P 1 欠乏を有する対象において行うことに使用するための、請求項 1 5 2 ～ 2 3 9 のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項 2 4 7】

組織石灰化の進行を防止するか、又は組織石灰化を低減させることを、それを必要とする対象において行うことに使用するための、請求項 1 5 2 ～ 2 3 9 のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項 2 4 8】

循環ピロリン酸 (P P i) を増加させることを、それを必要とする対象において行うことに使用するための、請求項 1 5 2 ～ 2 3 9 のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項 2 4 9】

ピロホスファターゼ活性を増加させることを、それを必要とする対象において行うことに使用するための、請求項 1 5 2 ～ 2 3 9 のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項 2 5 0】

前記対象は、病的軟部組織石灰化、動脈石灰化、血管石灰化、慢性腎臓疾患 (C K D) 、末期腎疾患 (E S R D) 、尿毒症性細小動脈石灰化症 (C U A) 、カルシフィラキシス、後縦靱帯骨化症 (O P L L) 、又は低リン酸血症性くる病を有するか、又はそれを発症するリスクがある、請求項 2 4 9 に記載の製剤。

【請求項 2 5 1】

E N P P 1 欠乏の 1 つ以上の症状を改善することに使用するための、請求項 1 5 2 ～ 2 3 9 のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項 2 5 2】

E N P P 1 欠乏を有する対象を治療することに使用するための、請求項 1 5 2 ～ 2 3 9 のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項 2 5 3】

A B C C 6 欠乏の 1 つ以上の症状を改善することに使用するための、請求項 1 5 2 ～ 2 3 9 のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項 2 5 4】

P X E の 1 つ以上の症状を改善することに使用するための、請求項 1 5 2 ～ 2 3 9 のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項 2 5 5】

病的骨化を有する対象を治療することに使用するための、請求項 1 5 2 ～ 2 3 9 のいずれか一項に記載の製剤。

【請求項 2 5 6】

病的石灰化又は骨化の疾患を治療することに使用するための、請求項 2 4 0 又は 2 4 1 に記載のバイアル。

【請求項 2 5 7】

血管石灰化の進行を防止するか、又は血管石灰化を低減させることを、それを必要とする対象において行うことに使用するための、請求項 2 4 0 又は 2 4 1 に記載のバイアル。

【請求項 2 5 8】

病的石灰化の進行を防止するか、又は病的石灰化を低減させることを、E N P P 1 欠乏を有する対象において行うことに使用するための、請求項 2 4 0 又は 2 4 1 に記載のバイアル。

【請求項 2 5 9】

組織石灰化の進行を防止するか、又は組織石灰化を低減させることを、それを必要とする対象において行うことに使用するための、請求項 2 4 0 又は 2 4 1 に記載のバイアル。

【請求項 2 6 0】

循環ピロリン酸 (P P i) を増加させることを、それを必要とする対象において行うことに使用するための、請求項 2 4 0 又は 2 4 1 に記載のバイアル。

【請求項 2 6 1】

ピロホスファターゼ活性を増加させることを、それを必要とする対象において行うことに使用するための、請求項 2 4 0 又は 2 4 1 に記載のバイアル。

【請求項 2 6 2】

前記対象は、病的軟部組織石灰化、動脈石灰化、血管石灰化、慢性腎臓疾患（CKD）、末期腎疾患（ESRD）、尿毒症性細小動脈石灰化症（CUA）、カルシフィラキシス、後縦靭帯骨化症（OPLL）、又は低リン酸血症性くる病を有するか、又はそれを発症するリスクがある、請求項 2 6 1 に記載のバイアル。

【請求項 2 6 3】

ENPP1 欠乏の 1 つ以上の症状を改善することに使用するための、請求項 2 4 0 又は 2 4 1 に記載のバイアル。

【請求項 2 6 4】

ENPP1 欠乏を有する対象を治療することに使用するための、請求項 2 4 0 又は 2 4 1 に記載のバイアル。

【請求項 2 6 5】

ABCC6 欠乏の 1 つ以上の症状を改善することに使用するための、請求項 2 4 0 又は 2 4 1 に記載のバイアル。

【請求項 2 6 6】

PXE の 1 つ以上の症状を改善することに使用するための、請求項 2 4 0 又は 2 4 1 に記載のバイアル。

【請求項 2 6 7】

病的石灰化又は骨化の疾患を治療することに使用するための、請求項 2 4 2 又は 2 4 3 に記載のシリンジ。

【請求項 2 6 8】

血管石灰化の進行を防止するか、又は血管石灰化を低減させることを、それを必要とする対象において行うことに使用するための、請求項 2 4 2 又は 2 4 3 に記載のシリンジ。

【請求項 2 6 9】

病的石灰化の進行を防止するか、又は病的石灰化を低減させることを、ENPP1 欠乏を有する対象において行うことに使用するための、請求項 2 4 2 又は 2 4 3 に記載のシリンジ。

【請求項 2 7 0】

組織石灰化の進行を防止するか、又は組織石灰化を低減させることを、それを必要とする対象において行うことに使用するための、請求項 2 4 2 又は 2 4 3 に記載のシリンジ。

【請求項 2 7 1】

循環ピロリン酸（PPi）を増加させることを、それを必要とする対象において行うことに使用するための、請求項 2 4 2 又は 2 4 3 に記載のシリンジ。

【請求項 2 7 2】

ピロホスファターゼ活性を増加させることを、それを必要とする対象において行うことに使用するための、請求項 2 4 2 又は 2 4 3 に記載のシリンジ。

【請求項 2 7 3】

前記対象は、病的軟部組織石灰化、動脈石灰化、血管石灰化、慢性腎臓疾患（CKD）、末期腎疾患（ESRD）、尿毒症性細小動脈石灰化症（CUA）、カルシフィラキシス、後縦靭帯骨化症（OPLL）、又は低リン酸血症性くる病を有するか、又はそれを発症するリスクがある、請求項 2 7 2 に記載のシリンジ。

【請求項 2 7 4】

ENPP1 欠乏の 1 つ以上の症状を改善することに使用するための、請求項 2 4 2 又は 2 4 3 に記載のシリンジ。

【請求項 2 7 5】

ENPP1 欠乏を有する対象を治療することに使用するための、請求項 2 4 2 又は 2 4 3 に記載のシリンジ。

【請求項 2 7 6】

10

20

30

40

50

A B C C 6 欠乏の 1 つ以上の症状を改善するために使用するための、請求項 2 4 2 又は 2 4 3 に記載のシリンジ。

【請求項 2 7 7】

P X E の 1 つ以上の症状を改善するために使用するための、請求項 2 4 2 又は 2 4 3 に記載のシリンジ。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

相互参照

本出願は、全内容が参照により本明細書に組み込まれる 2 0 2 1 年 9 月 2 4 日に出願された米国仮特許出願第 6 3 / 2 4 8 , 3 0 3 号の優先権を主張する。

【0 0 0 2】

配列表

本出願は、x m l . 形式で電子的に提出され、全体が参照により本明細書に組み込まれる配列表を含む。2 0 2 2 年 9 月 2 3 日作成の当該 x m l . コピーは、名称が 4 4 2 7 - 1 1 9 0 2 _ s e q u e n c e . t x t であり、サイズが 1 3 7 K B である。

【背景技術】

【0 0 0 3】

ヒトエクトヌクレオチドピロホスファターゼ (E N P P) タンパク質ファミリーには、ホスホジエステル結合を加水分解する 7 つの細胞外グリコシル化タンパク質 (すなわち、E N P P 1 - E N P P 7) が含まれる。E N P P は、細胞表面酵素であるが、E N P P 2 は例外で、原形質膜に運び出されるが、フーリンによって切断され、細胞外液中に放出される。E N P P 酵素は、高度な配列及び構造相同性を有するが、ヌクレオチドから脂質までを包含する多様な基質特異性を呈する。

【0 0 0 4】

E N P P 1 (P C - 1 としても知られる) 及び E N P P 3 は、骨芽細胞及び軟骨細胞の鉱質沈着基質小胞上に位置する 2 型細胞外膜結合糖タンパク質であり、細胞外ヌクレオチド (主に A T P) をアデノシンリン酸 (A M P) 及び無機ピロリン酸 (P P i) に加水分解する。P P i は、発生期のヒドロキシアパタイト (H A) 結晶に結合することによって異所性組織石灰化の強力な阻害剤として機能し、それにより、これらの結晶の更なる成長を予防する。E N P P 1 は、三リン酸ヌクレオチド (N T P) の加水分解を介して P P i を生成する。

【0 0 0 5】

異所性組織石灰化は、慢性関節疾患及び急性致死性新生児症候群を含む、多数のヒト疾患と関連付けられる。望ましくない組織石灰化を防止するために、組織石灰化を促進及び阻害する因子は、緊密なバランスに保たなければならない。細胞外無機ピロリン酸 (P P i) 及びリン酸 (P i) のバランスは、異所性組織石灰化の重要な調節因子である。

【0 0 0 6】

発明の概要

本開示は、とりわけ、E N P P 1 ポリペプチドを含む凍結乾燥された製剤を特徴とする。そのような製剤は、とりわけ、広範囲の温度にわたる顕著な安定性を特徴とする。したがって、一態様では、本開示は、E N P P 1 ポリペプチドを含む凍結乾燥されたポリペプチド製剤を特徴とする。

【0 0 0 7】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の製剤は、緩衝剤を含む。いくつかの実施形態では、緩衝剤は、溶液中で再構成された場合、p H 6 ~ 7 の p H 範囲を維持する。いくつかの実施形態では、緩衝剤は、溶液中で再構成された場合、p H 7 ~ 8 の p H 範囲を維持する。いくつかの実施形態では、緩衝剤は、溶液中で再構成された場合、p H 6 ~ 8 の p H 範囲を維持する。いくつかの実施形態では、緩衝剤は、コハク酸塩、クエン酸塩、重炭酸塩、リン酸塩、トリス、又はグリシルグリシンからなる群から選択される。いくつか

10

20

30

40

50

の実施形態では、緩衝剤は、コハク酸塩、クエン酸塩、又はリン酸塩である。いくつかの実施形態では、緩衝剤は、クエン酸塩である。いくつかの実施形態では、緩衝剤は、コハク酸塩である。いくつかの実施形態では、緩衝剤は、リン酸塩である。いくつかの実施形態では、緩衝剤は、溶液中で再構成された場合、濃度が5 mM～100 mMの範囲である。いくつかの実施形態では、緩衝剤は、凝集体形成の開始温度を増加させる。いくつかの実施形態では、緩衝剤は、凝集体形成の開始温度を少なくとも2℃増加させる。いくつかの実施形態では、緩衝剤は、高分子量種の形成を減少させる。いくつかの実施形態では、緩衝剤は、高分子量種の形成を、少なくとも10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、又は50%減少させる。

【0008】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の製剤は、1つ以上の薬学的に許容可能な添加剤を含む。いくつかの実施形態では、そのような薬学的に許容可能な添加剤は、安定化剤、アミノ酸、塩、金属イオン、及び界面活性剤であるか、又はそれを含む。いくつかの実施形態では、安定化剤は、糖、炭水化物、又は多糖類であるか、又はそれを含む。いくつかの実施形態では、そのような糖は、スクロース、トレハロース、マンノース、マルトース、ラクトース、グルコース、ラフィノース、セロビオース、ゲンチオビオース、イソマルトース、アラビノース、グルコサミン、フルクトース、マンニトール、又はソルビトールからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、1つ以上の薬学的に許容可能な添加剤は、マンニトールであるか、又はそれを含む。いくつかの実施形態では、薬学的に許容可能な添加剤は、スクロースであるか、又はそれを含む。いくつかの実施形態では、薬学的に許容可能な添加剤は、アミノ酸であるか、又はそれを含む。いくつかの実施形態では、そのようなアミノ酸は、グリシン、アルギニン、ヒスチジン、アラニン、プロリン、セリン、及びグルタミン酸からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、アミノ酸は、アルギニンである。いくつかの実施形態では、薬学的に許容可能な添加剤は、塩、例えば、限定されないが、塩化ナトリウム (NaCl)、塩化カルシウム (CaCl_2)、塩化亜鉛 (ZnCl_2)、及び／又は塩化マグネシウム (MgCl_2) である。いくつかの実施形態では、塩は、塩化カルシウム (CaCl_2) である。いくつかの実施形態では、該薬学的に許容可能な添加剤は、界面活性剤、例えば、限定されないが、ポリソルベート、ポロキサマー、トリトン、ドデシル硫酸ナトリウム、ラウレル硫酸ナトリウム、オクチルグリコシドナトリウム、ラウリルスルホベタイン、ミリスチルスルホベタイン、リノレイルスルホベタイン、ステアリルスルホベタイン、ラウリルサルコシン、ミリスチルサルコシン、リノレイルサルコシン、ステアリルサルコシン、リノレイルベタイン、ミリスチルベタイン、セチルベタイン、ラウロアミドプロピルベタイン、コカミドプロピルベタイン、リノールアミドプロピルベタイン、ミリスタミドプロピルベタイン、パルミドプロピルベタイン、イソステアラミドプロピルベタイン、ミリスタミドプロピルジメチルアミン、パルミドプロピルジメチルアミン、イソステアラミドプロピルジメチルアミン、ココイルメチルタウリンナトリウム、オレイルメチルタウリンナトリウム、ジヒドロキシプロピルPEG-5リノールアンモニウムクロリド、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、ポリソルベート20、ポリソルベート21、ポリソルベート40、ポリソルベート60、ポリソルベート61、ポリソルベート65、ポリソルベート80、ポリソルベート81、ポリソルベート85、ポリソルベート188、PEG3350、及びそれらの混合物である。いくつかの実施形態では、界面活性剤は、ポリソルベート20 (PS20)、ポリソルベート80 (PS80)、又はポリソルベート188 (PS188) からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、界面活性剤は、ポリソルベート20 (PS20) である。

【0009】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の製剤は、緩衝剤、安定化剤、塩、アミノ酸、及び界面活性剤を含む。いくつかの実施形態では、緩衝剤は、クエン酸塩又はコハク酸塩であり、安定化剤は、スクロース又はマンニトールであり、塩は、塩化カルシウム (CaCl_2) であり、界面活性剤は、ポリソルベート20 (PS20) である。

10

20

30

40

50

【0010】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の製剤のpH（例えば、凍結乾燥された製剤について言えば、再構成溶液又は滅菌水中で再構成される場合）は、pH 6.2～pH 6.5である。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の製剤のpH（例えば、凍結乾燥された製剤について言えば、再構成溶液又は滅菌水中で再構成される場合）は、約pH 6.0～約pH 7.0（pH 6.0及びpH 7.0を含める）である。

【0011】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の製剤は、約15～約25mMのクエン酸塩を含む。

【0012】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の製剤は、スクロース、マンニトールの各々約75mM～約95mM、又はそれらの組み合わせを含む。

【0013】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の製剤は、約100mM～約300mMのスクロースを含む。

【0014】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の製剤は、約1mM～約3mMの塩化カルシウムを含む。

【0015】

いくつかの実施形態では、本製剤は、界面活性剤を含む。界面活性剤は、例えば、ポリソルベート20（PS20）、ポリソルベート80（PS80）、又はポロキサマーPx188であり得るか、又はそれを含み得る。いくつかの実施形態では、界面活性剤は、PS20であるか、又はそれを含む。いくつかの実施形態では、界面活性剤は、溶液中で再構成された場合、約0.02%～約0.10%（w/v）の範囲の濃度で存在する。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の製剤は、約0.005%～約0.1%（w/v）の界面活性剤を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の製剤は、約0.005%～約0.1%（w/v）のPS20を含む。いくつかの実施形態では、界面活性剤は、物理的ストレスに対する耐性を増加させる。

【0016】

いくつかの実施形態では、薬学的に許容可能な添加剤（単数又は複数）は、溶液中で（例えば、再構成緩衝液又は滅菌水を用いて）再構成された場合、濃度が約5mM～約300mMの範囲である。

【0017】

いくつかの実施形態では、1つ以上の薬学的に許容可能な添加剤は、高分子量種の形成を減少させる。

【0018】

いくつかの実施形態では、1つ以上の薬学的に許容可能な添加剤は、高分子量種の形成を、少なくとも10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%減少させる。

【0019】

いくつかの実施形態では、本製剤は、ENPP1ポリペプチド補因子、例えば、限定されないが、カルシウム、亜鉛、及び／又はアデノシンーリン酸を含む。いくつかの実施形態では、ENPP1ポリペプチド補因子は、CaCl₂、CaSO₄、ZnCl₂、ZnSO₄、及び／又はアデノシンーリン酸である。いくつかの実施形態では、ENPP1ポリペプチド補因子は、CaCl₂及び／又はアデノシンーリン酸である。いくつかの実施形態では、ENPP1ポリペプチド補因子は、溶液中で再構成された場合、約1mM～約10mMの範囲の濃度で存在する。いくつかの実施形態では、ENPP1ポリペプチド補因子は、高分子量種の形成を、少なくとも10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%減少させる。

【0020】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の製剤は、粒径が均質であるか、又は粒径が均質であることを特徴とする。いくつかの実施形態では、本製剤は、マイクロフローイメージング分析によって決定して、より大きな粒径の粒子の2分の1、3分の1、4分の1、5分の1、6分の1、7分の1、8分の1、9分の1、又は10分の1の低減を含む。

【0021】

本明細書に記載の製剤のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、ENPP1ポリペプチドは、配列番号13、配列番号14、又は配列番号15を含むアミノ酸配列と少なくとも75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一であるアミノ酸配列を含む。

【0022】

いくつかの実施形態では、ENPP1ポリペプチドは、配列番号2を含むアミノ酸配列と少なくとも75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一であるアミノ酸配列を含む。

【0023】

いくつかの実施形態では、ENPP1ポリペプチドは、可溶性ENPP1ポリペプチドドメインと1つ以上の異種タンパク質部分とを含む融合タンパク質である。いくつかの実施形態では、異種タンパク質部分は、哺乳動物における可溶性ENPP1ポリペプチドの循環半減期を増加させる。いくつかの実施形態では、異種タンパク質部分は、Fcドメインを含む。いくつかの実施形態では、Fcドメインは、配列番号12のアミノ酸配列と少なくとも75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一であるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、ENPP1ポリペプチドは、ENPP1-Fc融合タンパク質である。いくつかの実施形態では、ENPP1ポリペプチドは、異種部分を更に含む。いくつかの実施形態では、異種部分は、グリコシル化アミノ酸、PEG化アミノ酸、ファルネシル化アミノ酸、アセチル化アミノ酸、ビオチン化アミノ酸、及び脂質部分からなる群から選択される。

【0024】

いくつかの実施形態では、ENPP1ポリペプチドは、配列番号13を含むアミノ酸配列と少なくとも75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一であるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、ENPP1ポリペプチドは、配列番号13と少なくとも90%同一である。いくつかの実施形態では、ENPP1ポリペプチドは、配列番号13と少なくとも95%同一である。いくつかの実施形態では、ENPP1ポリペプチドは、配列番号13と少なくとも99%同一である。いくつかの実施形態では、ENPP1ポリペプチドは、配列番号13を含む。いくつかの実施形態では、ENPP1ポリペプチドは、配列番号13からなる。いくつかの実施形態では、ENPP1ポリペプチドは、Fcドメインを含む。Fcドメインは、配列番号12に示されるアミノ酸配列を含み得るか、又はそれからなり得る。いくつかの実施形態では、ENPP1ポリペプチドは、ENPP1ポリペプチド部分とFcドメインとを接合するリンカーアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、リンカーアミノ酸配列は、アミノ酸配列LINを含むか、又はそれからなる。いくつかの実施形態では、ENPP1ポリペプチドは、配列番号9、配列番号10、又は配列番号11からなるか、又はそれを含む。いくつかの実施形態では、ENPP1ポリペプチドは、配列番号9からなるか、又はそれを含む。いくつかの実施形態では、ENPP1ポリペプチドは、配列番号10からなるか、又はそれを含む。いくつかの実施形態では、ENPP1ポリペプチドは、配列番号11からなるか、又はそれを含む。

【0025】

いくつかの実施形態では、ENPP1ポリペプチドは、配列番号14を含むアミノ酸配列と少なくとも75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一であるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、ENPP1ポリペプチドは、配列番号14と少なくとも90%同一である。いくつかの実施形態では、ENPP1ポリペプチドは、配列番号14と少な

10

20

30

40

50

くとも95%同一である。いくつかの実施形態では、ENPP1ポリペプチドは、配列番号14と少なくとも99%同一である。いくつかの実施形態では、ENPP1ポリペプチドは、配列番号14を含む。いくつかの実施形態では、ENPP1ポリペプチドは、配列番号14からなる。いくつかの実施形態では、ENPP1ポリペプチドは、Fcドメインを含む。Fcドメインは、配列番号12に示されるアミノ酸配列を含み得るか、又はそれからなり得る。いくつかの実施形態では、ENPP1ポリペプチドは、ENPP1ポリペプチド部分とFcドメインとを接合するリンカーアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、リンカーアミノ酸配列は、アミノ酸配列LINを含むか、又はそれからなる。いくつかの実施形態では、ENPP1ポリペプチドは、配列番号9、配列番号10、又は配列番号11からなるか、又はそれを含む。いくつかの実施形態では、ENPP1ポリペプチドは、配列番号9からなるか、又はそれを含む。いくつかの実施形態では、ENPP1ポリペプチドは、配列番号10からなるか、又はそれを含む。いくつかの実施形態では、ENPP1ポリペプチドは、配列番号11からなるか、又はそれを含む。

10

【0026】

いくつかの実施形態では、ENPP1ポリペプチドは、配列番号15を含むアミノ酸配列と少なくとも75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一であるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、ENPP1ポリペプチドは、配列番号15と少なくとも90%同一である。いくつかの実施形態では、ENPP1ポリペプチドは、配列番号15と少なくとも95%同一である。いくつかの実施形態では、ENPP1ポリペプチドは、配列番号15と少なくとも99%同一である。いくつかの実施形態では、ENPP1ポリペプチドは、配列番号15を含む。いくつかの実施形態では、ENPP1ポリペプチドは、配列番号15からなる。いくつかの実施形態では、ENPP1ポリペプチドは、Fcドメインを含む。Fcドメインは、配列番号12に示されるアミノ酸配列を含み得るか、又はそれからなり得る。いくつかの実施形態では、ENPP1ポリペプチドは、ENPP1ポリペプチド部分とFcドメインとを接合するリンカーアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、リンカーアミノ酸配列は、アミノ酸配列LINを含むか、又はそれからなる。いくつかの実施形態では、ENPP1ポリペプチドは、配列番号9、配列番号10、又は配列番号11からなるか、又はそれを含む。いくつかの実施形態では、ENPP1ポリペプチドは、配列番号9からなるか、又はそれを含む。いくつかの実施形態では、ENPP1ポリペプチドは、配列番号10からなるか、又はそれを含む。いくつかの実施形態では、ENPP1ポリペプチドは、配列番号11からなるか、又はそれを含む。

20

30

【0027】

いくつかの実施形態では、本製剤は、ENPP1ポリペプチド、緩衝剤、薬学的に許容可能な塩、安定化剤、界面活性剤、及び1つ以上の薬学的に許容可能な添加剤を含む。いくつかの実施形態では、緩衝剤は、クエン酸塩緩衝剤である。クエン酸塩緩衝剤は、例えば、クエン酸三ナトリウム二水和物であり得る。いくつかの実施形態では、薬学的に許容可能な塩は、塩化カルシウムである。いくつかの実施形態では、安定化剤は、スクロースなどの糖である。いくつかの実施形態では、1つ以上の薬学的に許容可能な添加剤は、マンニトールであるか、又はそれを含む。いくつかの実施形態では、ENPP1ポリペプチドは、配列番号13を含むか、又はそれからなる。いくつかの実施形態では、ENPP1ポリペプチドは、配列番号14を含むか、又はそれからなる。いくつかの実施形態では、ENPP1ポリペプチドは、配列番号15を含むか、又はそれからなる。いくつかの実施形態では、ENPP1ポリペプチドは、Fcドメインを含む。Fcドメインは、配列番号12に示されるアミノ酸配列を含み得るか、又はそれからなり得る。いくつかの実施形態では、ENPP1ポリペプチドは、ENPP1ポリペプチド部分とFcドメインとを接合するリンカーアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、リンカーアミノ酸配列は、アミノ酸配列LINを含むか、又はそれからなる。いくつかの実施形態では、ENPP1ポリペプチドは、配列番号9、配列番号10、又は配列番号11からなるか、又はそれを含む。いくつかの実施形態では、ENPP1ポリペプチドは、配列番号9からなるか、又

40

50

はそれを含む。いくつかの実施形態では、E N P P 1 ポリペプチドは、配列番号 1 0 かなるか、又はそれを含む。いくつかの実施形態では、E N P P 1 ポリペプチドは、配列番号 1 1 かなるか、又はそれを含む。

【0028】

いくつかの実施形態では、本製剤は、E N P P 1 ポリペプチド、クエン酸塩緩衝剤、塩化カルシウム、スクロース、及びポリソルベートを含む。いくつかの実施形態では、E N P P 1 ポリペプチドは、配列番号 1 3 を含むか、又はそれかなる。いくつかの実施形態では、E N P P 1 ポリペプチドは、配列番号 1 4 を含むか、又はそれかなる。いくつかの実施形態では、E N P P 1 ポリペプチドは、配列番号 1 5 を含むか、又はそれかなる。いくつかの実施形態では、E N P P 1 ポリペプチドは、F c ドメインを含む。F c ドメインは、配列番号 1 2 に示されるアミノ酸配列を含み得るか、又はそれかなり得る。いくつかの実施形態では、E N P P 1 ポリペプチドは、E N P P 1 ポリペプチド部分と F c ドメインとを接合するリンカーアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、リンカーアミノ酸配列は、アミノ酸配列 L I N を含むか、又はそれかなる。いくつかの実施形態では、E N P P 1 ポリペプチドは、配列番号 9、配列番号 1 0、又は配列番号 1 1 かなるか、又はそれを含む。いくつかの実施形態では、E N P P 1 ポリペプチドは、配列番号 9 かなるか、又はそれを含む。いくつかの実施形態では、E N P P 1 ポリペプチドは、配列番号 1 0 かなるか、又はそれを含む。いくつかの実施形態では、E N P P 1 ポリペプチドは、配列番号 1 1 かなるか、又はそれを含む。

10

20

【0029】

いくつかの実施形態では、本製剤は、E N P P 1 ポリペプチド、クエン酸三ナトリウム二水和物、塩化カルシウム二水和物、スクロース、及びポリソルベート 2 0 を含む。いくつかの実施形態では、E N P P 1 ポリペプチドは、配列番号 1 3 を含むか、又はそれかなる。いくつかの実施形態では、E N P P 1 ポリペプチドは、配列番号 1 4 を含むか、又はそれかなる。いくつかの実施形態では、E N P P 1 ポリペプチドは、配列番号 1 5 を含むか、又はそれかなる。いくつかの実施形態では、E N P P 1 ポリペプチドは、F c ドメインを含む。F c ドメインは、配列番号 1 2 に示されるアミノ酸配列を含み得るか、又はそれかなり得る。いくつかの実施形態では、E N P P 1 ポリペプチドは、E N P P 1 ポリペプチド部分と F c ドメインとを接合するリンカーアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、リンカーアミノ酸配列は、アミノ酸配列 L I N を含むか、又はそれかなる。いくつかの実施形態では、E N P P 1 ポリペプチドは、配列番号 9、配列番号 1 0、又は配列番号 1 1 かなるか、又はそれを含む。いくつかの実施形態では、E N P P 1 ポリペプチドは、配列番号 9 かなるか、又はそれを含む。いくつかの実施形態では、E N P P 1 ポリペプチドは、配列番号 1 0 かなるか、又はそれを含む。いくつかの実施形態では、E N P P 1 ポリペプチドは、配列番号 1 1 かなるか、又はそれを含む。

30

【0030】

いくつかの実施形態では、本製剤は、E N P P 1 ポリペプチド、クエン酸塩緩衝剤、塩化カルシウム、スクロース、マンニトール、及びポリソルベートを含む。いくつかの実施形態では、E N P P 1 ポリペプチドは、配列番号 1 3 を含むか、又はそれかなる。いくつかの実施形態では、E N P P 1 ポリペプチドは、配列番号 1 4 を含むか、又はそれかなる。いくつかの実施形態では、E N P P 1 ポリペプチドは、配列番号 1 5 を含むか、又はそれかなる。いくつかの実施形態では、E N P P 1 ポリペプチドは、F c ドメインを含む。F c ドメインは、配列番号 1 2 に示されるアミノ酸配列を含み得るか、又はそれかなり得る。いくつかの実施形態では、E N P P 1 ポリペプチドは、E N P P 1 ポリペプチド部分と F c ドメインとを接合するリンカーアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、リンカーアミノ酸配列は、アミノ酸配列 L I N を含むか、又はそれかなる。いくつかの実施形態では、E N P P 1 ポリペプチドは、配列番号 9、配列番号 1 0、又は配列番号 1 1 かなるか、又はそれを含む。いくつかの実施形態では、E N P P 1 ポリペプチドは、配列番号 9 かなるか、又はそれを含む。いくつかの実施形態では、E N P P 1 ポリペプチドは、配列番号 1 0 かなるか、又はそれを含む。いくつかの実施形態では、E

40

50

N P P 1 ポリペプチドは、配列番号 1 1 からなるか、又はそれを含む。

【 0 0 3 1 】

いくつかの実施形態では、本製剤は、E N P P 1 ポリペプチド、クエン酸三ナトリウム二水和物、塩化カルシウム二水和物、スクロース、D (-) マンニトール、及びポリソルベート 2 0 を含む。いくつかの実施形態では、E N P P 1 ポリペプチドは、配列番号 1 3 を含むか、又はそれからなる。いくつかの実施形態では、E N P P 1 ポリペプチドは、配列番号 1 4 を含むか、又はそれからなる。いくつかの実施形態では、E N P P 1 ポリペプチドは、配列番号 1 5 を含むか、又はそれからなる。いくつかの実施形態では、E N P P 1 ポリペプチドは、F c ドメインを含む。F c ドメインは、配列番号 1 2 に示されるアミノ酸配列を含み得るか、又はそれからなり得る。いくつかの実施形態では、E N P P 1 ポリペプチドは、E N P P 1 ポリペプチド部分と F c ドメインとを接合するリンカーアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、リンカーアミノ酸配列は、アミノ酸配列 L I N を含むか、又はそれからなる。いくつかの実施形態では、E N P P 1 ポリペプチドは、配列番号 9、配列番号 1 0、又は配列番号 1 1 からなるか、又はそれを含む。いくつかの実施形態では、E N P P 1 ポリペプチドは、配列番号 9 からなるか、又はそれを含む。いくつかの実施形態では、E N P P 1 ポリペプチドは、配列番号 1 0 からなるか、又はそれを含む。いくつかの実施形態では、E N P P 1 ポリペプチドは、配列番号 1 1 からなるか、又はそれを含む。

10

【 0 0 3 2 】

いくつかの実施形態では、本製剤は、0 . 5 m l の最終再構成体積当たり、約 2 5 m g の E N P P 1 ポリペプチド、約 2 . 9 4 m g のクエン酸三ナトリウム二水和物、約 0 . 1 5 m g の塩化カルシウム二水和物、約 3 0 m g のスクロース、約 7 . 5 m g の D (-) マンニトール、及び約 0 . 2 5 m g のポリソルベート (例えば、P S 2 0) を含む。いくつかの実施形態では、E N P P 1 ポリペプチドは、配列番号 1 3 を含むか、又はそれからなる。いくつかの実施形態では、E N P P 1 ポリペプチドは、配列番号 1 4 を含むか、又はそれからなる。いくつかの実施形態では、E N P P 1 ポリペプチドは、配列番号 1 5 を含むか、又はそれからなる。いくつかの実施形態では、E N P P 1 ポリペプチドは、F c ドメインを含む。F c ドメインは、配列番号 1 2 に示されるアミノ酸配列を含むか、又はそれからなる。いくつかの実施形態では、E N P P 1 ポリペプチドは、E N P P 1 ポリペプチド部分と F c ドメインとを接合するリンカーアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、リンカーアミノ酸配列は、アミノ酸配列 L I N を含むか、又はそれからなる。いくつかの実施形態では、E N P P 1 ポリペプチドは、配列番号 9、配列番号 1 0、又は配列番号 1 1 からなるか、又はそれを含む。いくつかの実施形態では、E N P P 1 ポリペプチドは、配列番号 9 からなるか、又はそれを含む。いくつかの実施形態では、E N P P 1 ポリペプチドは、配列番号 1 0 からなるか、又はそれを含む。いくつかの実施形態では、E N P P 1 ポリペプチドは、配列番号 1 1 からなるか、又はそれを含む。

20

30

【 0 0 3 3 】

いくつかの実施形態では、本製剤は、滅菌注射溶液中で再構成され得る。いくつかの実施形態では、本製剤は、再構成溶液又は滅菌水中で再構成され得る。いくつかの実施形態では、再構成溶液は、薬学的に許容可能な担体及び／又は添加剤を含む。いくつかの実施形態では、薬学的に許容可能な担体は、生理食塩水、精製水、又は注射用滅菌水から選択される。いくつかの実施形態では、本製剤は、1 0 0 秒、8 0 秒、7 0 秒、6 8 秒、6 5 秒、又は 6 0 秒未満の期間内に完全に再構成される。

40

【 0 0 3 4 】

いくつかの実施形態では、再構成された製剤は、少なくとも又は約 5 0 m g / m l の E N P P 1 ポリペプチド、約 p H 6 . 3 の約 2 0 m M のクエン酸塩、約 2 m M の塩化カルシウム、約 1 7 5 m M のスクロース、約 8 2 m M のマンニトール、及び約 0 . 0 5 % w / v のポリソルベートを含む。いくつかの実施形態では、E N P P 1 ポリペプチドは、配列番号 1 3 を含むか、又はそれからなる。いくつかの実施形態では、E N P P 1 ポリペプチドは、配列番号 1 4 を含むか、又はそれからなる。いくつかの実施形態では、E N P P 1 ポ

50

リペプチドは、配列番号 15 を含むか、又はそれからなる。いくつかの実施形態では、ENPP1 ポリペプチドは、Fc ドメインを含む。Fc ドメインは、配列番号 12 に示されるアミノ酸配列を含み得るか、又はそれからなり得る。いくつかの実施形態では、ENPP1 ポリペプチドは、ENPP1 ポリペプチド部分と Fc ドメインとを接合するリンカーアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、リンカーアミノ酸配列は、アミノ酸配列 LIN を含むか、又はそれからなる。いくつかの実施形態では、ENPP1 ポリペプチドは、配列番号 9、配列番号 10、又は配列番号 11 からなるか、又はそれを含む。

【0035】

いくつかの実施形態では、再構成された製剤は、少なくとも又は約 50 mg/mL の ENPP1 ポリペプチド、約 pH 6.3 の約 20 mM のクエン酸塩、約 2 mM の塩化カルシウム、約 175 mM のスクロース、約 82 mM の (D) マンニトール、及び約 0.05 % w/v のポリソルベート 20 を含む。いくつかの実施形態では、ENPP1 ポリペプチドは、配列番号 13 を含むか、又はそれからなる。いくつかの実施形態では、ENPP1 ポリペプチドは、配列番号 14 を含むか、又はそれからなる。いくつかの実施形態では、ENPP1 ポリペプチドは、配列番号 15 を含むか、又はそれからなる。いくつかの実施形態では、ENPP1 ポリペプチドは、Fc ドメインを含む。Fc ドメインは、配列番号 12 に示されるアミノ酸配列を含み得るか、又はそれからなり得る。いくつかの実施形態では、ENPP1 ポリペプチドは、ENPP1 ポリペプチド部分と Fc ドメインとを接合するリンカーアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、リンカーアミノ酸配列は、アミノ酸配列 LIN を含むか、又はそれからなる。いくつかの実施形態では、ENPP1 ポリペプチドは、配列番号 9、配列番号 10、又は配列番号 11 からなるか、又はそれを含む。

10

20

【0036】

いくつかの実施形態では、再構成された製剤は、少なくとも又は約 50 mg/mL の ENPP1 ポリペプチド、約 pH 6.3 の約 20 mM のクエン酸塩、約 88 mM のスクロース、約 82 mM のマンニトール、約 2 mM の塩化カルシウム、及び約 0.05 % w/v のポリソルベート 20 を含む。いくつかの実施形態では、ENPP1 ポリペプチドは、配列番号 13 を含むか、又はそれからなる。いくつかの実施形態では、ENPP1 ポリペプチドは、配列番号 14 を含むか、又はそれからなる。いくつかの実施形態では、ENPP1 ポリペプチドは、配列番号 15 を含むか、又はそれからなる。いくつかの実施形態では、ENPP1 ポリペプチドは、Fc ドメインを含む。Fc ドメインは、配列番号 12 に示されるアミノ酸配列を含み得るか、又はそれからなり得る。いくつかの実施形態では、ENPP1 ポリペプチドは、ENPP1 ポリペプチド部分と Fc ドメインとを接合するリンカーアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、リンカーアミノ酸配列は、アミノ酸配列 LIN を含むか、又はそれからなる。いくつかの実施形態では、ENPP1 ポリペプチドは、配列番号 9、配列番号 10、又は配列番号 11 からなるか、又はそれを含む。

30

【0037】

いくつかの実施形態では、再構成された製剤は、少なくとも又は約 50 mg/mL の ENPP1 ポリペプチド、約 pH 6.3 の約 20 mM のクエン酸塩、約 263 mM のスクロース、約 2 mM の塩化カルシウム、及び約 0.05 % w/v のポリソルベート 20 を含む。いくつかの実施形態では、ENPP1 ポリペプチドは、配列番号 13 を含むか、又はそれからなる。いくつかの実施形態では、ENPP1 ポリペプチドは、配列番号 14 を含むか、又はそれからなる。いくつかの実施形態では、ENPP1 ポリペプチドは、配列番号 15 を含むか、又はそれからなる。いくつかの実施形態では、ENPP1 ポリペプチドは、Fc ドメインを含む。Fc ドメインは、配列番号 12 に示されるアミノ酸配列を含み得るか、又はそれからなり得る。いくつかの実施形態では、ENPP1 ポリペプチドは、ENPP1 ポリペプチド部分と Fc ドメインとを接合するリンカーアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、リンカーアミノ酸配列は、アミノ酸配列 LIN を含むか、又はそれからなる。いくつかの実施形態では、ENPP1 ポリペプチドは、配列番号 9、配列番号 10、又は配列番号 11 からなるか、又はそれを含む。

40

50

【0038】

いくつかの実施形態では、凍結乾燥された製剤は、 -80°C ～ 40°C で長期安定性を呈する。いくつかの実施形態では、凍結乾燥された製剤は、少なくとも3、6、12、24、36、48、又は60か月の貯蔵寿命を有する。いくつかの実施形態では、再構成された製剤は、少なくとも1、2、3、4、5、6、12、18、24、48、又は60時間の貯蔵寿命を有する。

【0039】

いくつかの実施形態では、凍結乾燥された製剤は、 5°C で貯蔵された場合、少なくとも36か月間、貯蔵安定である。いくつかの実施形態では、本製剤は、 5°C で貯蔵された場合、48か月間、貯蔵安定である。本製剤は、室温（ $\text{RT}-25^{\circ}\text{C}$ ）で貯蔵された場合、少なくとも24か月間、貯蔵安定である。本製剤は、室温で貯蔵された場合、少なくとも36か月間、貯蔵安定である。本製剤は、室温で貯蔵された場合、48か月間、貯蔵安定である。本製剤は、 40°C で貯蔵された場合、少なくとも6か月間、貯蔵安定である。本製剤は、 40°C で貯蔵された場合、12か月間、貯蔵安定である。

10

【0040】

いくつかの実施形態では、再構成された製剤は、室温で少なくとも8時間、 1 mg/ml ～ 50 mg/ml の範囲の濃度で安定である。いくつかの実施形態では、再構成された製剤は、 5°C で少なくとも24時間、 1 mg/ml ～ 50 mg/ml の範囲の濃度で安定である。

【0041】

いくつかの実施形態では、再構成された製剤は、 5°C で少なくとも12時間、 1 mg/ml ～ 10 mg/ml の範囲の濃度で安定である。いくつかの実施形態では、再構成された製剤は、 5°C で少なくとも12時間、 1 mg/ml で安定である。いくつかの実施形態では、再構成された製剤は、 5°C で少なくとも12時間、 2.5 mg/ml で安定である。いくつかの実施形態では、再構成された製剤は、 5°C で少なくとも12時間、 10 mg/ml で安定である。

20

【0042】

いくつかの実施形態では、再構成された製剤は、バイアルに貯蔵される。いくつかの実施形態では、再構成された製剤は、シリンジに貯蔵される。いくつかの実施形態では、再構成された製剤は、 5°C でバイアルに貯蔵された場合、少なくとも12時間安定である。いくつかの実施形態では、再構成された製剤は、 5°C でシリンジに貯蔵された場合、少なくとも8時間安定である。

30

【0043】

したがって、本開示は、ENPP1、好ましくはENPP1-Fcと、緩衝液、増量剤、安定化剤、及び／又は界面活性剤のうちの1つ以上とを含む凍結乾燥された製剤が含まれるバイアルも特徴とし、本バイアルには、1～100mg、例えば、1mg、5mg、10mg、15mg、20mg、25mg、又は50mg、又は100mgのENPP1又はENPP1-Fcが含まれる。

【0044】

いくつかの実施形態では、本バイアルには、ENPP1、好ましくはENPP1-Fcと、緩衝液、増量剤、安定化剤、及び／又は界面活性剤のうちの1つ以上とを含む凍結乾燥された製剤が含まれ、本バイアルに、100mgのENPP1又はENPP1-Fcが含まれる。

40

【0045】

いくつかの実施形態では、本バイアルには、ENPP1、好ましくはENPP1-Fcと、緩衝液、増量剤、安定化剤、及び／又は界面活性剤のうちの1つ以上とを含む凍結乾燥された製剤が含まれ、本バイアルに、50mgのENPP1又はENPP1-Fcが含まれる。

【0046】

いくつかの実施形態では、本バイアルには、ENPP1、好ましくはENPP1-Fc

50

と、緩衝液、増量剤、安定化剤、及び／又は界面活性剤のうちの1つ以上とを含む凍結乾燥された製剤が含まれ、本バイアルに、25 mgのENPP1又はENPP1-Fcが含まれる。

【0047】

いくつかの実施形態では、本バイアルには、ENPP1、好ましくはENPP1-Fcと、緩衝液、増量剤、安定化剤、及び／又は界面活性剤のうちの1つ以上とを含む凍結乾燥された製剤が含まれ、本バイアルに、10 mgのENPP1又はENPP1-Fcが含まれる。

【0048】

いくつかの実施形態では、本バイアルには、ENPP1、好ましくはENPP1-Fcと、緩衝液、増量剤、安定化剤、及び／又は界面活性剤のうちの1つ以上とを含む凍結乾燥された製剤が含まれ、本バイアルに、5 mgのENPP1又はENPP1-Fcが含まれる。

【0049】

いくつかの実施形態では、本バイアルには、ENPP1、好ましくはENPP1-Fcと、緩衝液、増量剤、安定化剤、及び／又は界面活性剤のうちの1つ以上とを含む凍結乾燥された製剤が含まれ、本バイアルに、2.5 mgのENPP1又はENPP1-Fcが含まれる。

【0050】

いくつかの実施形態では、本バイアルには、ENPP1、好ましくはENPP1-Fcと、緩衝液、増量剤、安定化剤、及び／又は界面活性剤のうちの1つ以上とを含む凍結乾燥された製剤が含まれ、本バイアルに、1 mgのENPP1又はENPP1-Fcが含まれる。

【0051】

したがって、本開示は、再構成されたENPP1、好ましくはENPP1-Fcと、緩衝液、増量剤、安定化剤、及び／又は界面活性剤のうちの1つ以上とを含む製剤が含まれるバイアルも特徴とし、本バイアルには、0.1 mg/ml~100 mg/ml、例えば、0.1 mg/ml、1 mg/ml、5 mg/ml、10 mg/ml、15 mg/ml、20 mg/ml、25 mg/ml、又は50 mg/ml、又は100 mg/mlのENPP1又はENPP1-Fcが含まれる。

【0052】

いくつかの実施形態では、本バイアルには、再構成されたENPP1、好ましくはENPP1-Fcと、緩衝液、増量剤、安定化剤、及び／又は界面活性剤のうちの1つ以上とを含む製剤が含まれ、本バイアルに、100 mg/mlのENPP1又はENPP1-Fcが含まれる。

【0053】

いくつかの実施形態では、本バイアルには、再構成されたENPP1、好ましくはENPP1-Fcと、緩衝液、増量剤、安定化剤、及び／又は界面活性剤のうちの1つ以上とを含む製剤が含まれ、本バイアルに、50 mg/mlのENPP1又はENPP1-Fcが含まれる。

【0054】

いくつかの実施形態では、本バイアルには、再構成されたENPP1、好ましくはENPP1-Fcと、緩衝液、増量剤、安定化剤、及び／又は界面活性剤のうちの1つ以上とを含む製剤が含まれ、本バイアルに、25 mg/mlのENPP1又はENPP1-Fcが含まれる。

【0055】

いくつかの実施形態では、本バイアルには、再構成されたENPP1、好ましくはENPP1-Fcと、緩衝液、増量剤、安定化剤、及び／又は界面活性剤のうちの1つ以上とを含む製剤が含まれ、本バイアルに、10 mg/mlのENPP1又はENPP1-Fcが含まれる。

【0056】

いくつかの実施形態では、本バイアルには、再構成されたENPP1、好ましくはENPP1-Fcと、緩衝液、増量剤、安定化剤、及び／又は界面活性剤のうちの1つ以上とを含む製剤が含まれ、本バイアルに、5mg/mlのENPP1又はENPP1-Fcが含まれる。

【0057】

いくつかの実施形態では、本バイアルには、再構成されたENPP1、好ましくはENPP1-Fcと、緩衝液、増量剤、安定化剤、及び／又は界面活性剤のうちの1つ以上とを含む製剤が含まれ、本バイアルに、2.5mg/mlのENPP1又はENPP1-Fcが含まれる。

10

【0058】

いくつかの実施形態では、本バイアルには、再構成されたENPP1、好ましくはENPP1-Fcと、緩衝液、増量剤、安定化剤、及び／又は界面活性剤のうちの1つ以上とを含む製剤が含まれ、本バイアルに、1mg/mlのENPP1又はENPP1-Fcが含まれる。

【0059】

いくつかの実施形態では、本バイアルには、再構成されたENPP1、好ましくはENPP1-Fcと、緩衝液、増量剤、安定化剤、及び／又は界面活性剤のうちの1つ以上とを含む製剤が含まれ、本バイアルに、0.5mg/mlのENPP1又はENPP1-Fcが含まれる。

20

【0060】

いくつかの実施形態では、本バイアルには、再構成されたENPP1、好ましくはENPP1-Fcと、緩衝液、増量剤、安定化剤、及び／又は界面活性剤のうちの1つ以上とを含む製剤が含まれ、本バイアルに、0.1mg/mlのENPP1又はENPP1-Fcが含まれる。

【0061】

したがって、本開示は、ENPP1、好ましくはENPP1-Fcと、緩衝液、増量剤、安定化剤、及び／又は界面活性剤のうちの1つ以上とを含む凍結乾燥された製剤が含まれるシリンジも特徴とし、バイアルに、0.1~100mg、例えば、0.1mg、1mg、5mg、10mg、15mg、20mg、25mg、又は50mg、又は100mgのENPP1又はENPP1-Fcが含まれる。

30

【0062】

いくつかの実施形態では、本シリンジには、ENPP1、好ましくはENPP1-Fcと、緩衝液、増量剤、安定化剤、及び／又は界面活性剤のうちの1つ以上とを含む凍結乾燥された製剤が含まれ、バイアルに、100mgのENPP1又はENPP1-Fcが含まれる。

【0063】

いくつかの実施形態では、本シリンジには、ENPP1、好ましくはENPP1-Fcと、緩衝液、増量剤、安定化剤、及び／又は界面活性剤のうちの1つ以上とを含む凍結乾燥された製剤が含まれ、バイアルに、50mgのENPP1又はENPP1-Fcが含まれる。

40

【0064】

いくつかの実施形態では、本シリンジには、ENPP1、好ましくはENPP1-Fcと、緩衝液、増量剤、安定化剤、及び／又は界面活性剤のうちの1つ以上とを含む凍結乾燥された製剤が含まれ、バイアルに、25mgのENPP1又はENPP1-Fcが含まれる。

【0065】

いくつかの実施形態では、本シリンジには、ENPP1、好ましくはENPP1-Fcと、緩衝液、増量剤、安定化剤、及び／又は界面活性剤のうちの1つ以上とを含む凍結乾燥された製剤が含まれ、バイアルに、10mgのENPP1又はENPP1-Fcが含まれる。

50

れる。

【0066】

いくつかの実施形態では、本シリンジには、ENPP1、好ましくはENPP1-Fcと、緩衝液、増量剤、安定化剤、及び／又は界面活性剤のうちの1つ以上とを含む凍結乾燥された製剤が含まれ、バイアルに、5mgのENPP1又はENPP1-Fcが含まれる。

【0067】

いくつかの実施形態では、本シリンジには、ENPP1、好ましくはENPP1-Fcと、緩衝液、増量剤、安定化剤、及び／又は界面活性剤のうちの1つ以上とを含む凍結乾燥された製剤が含まれ、バイアルに、2.5mgのENPP1又はENPP1-Fcが含まれる。

10

【0068】

いくつかの実施形態では、本シリンジには、ENPP1、好ましくはENPP1-Fcと、緩衝液、増量剤、安定化剤、及び／又は界面活性剤のうちの1つ以上とを含む凍結乾燥された製剤が含まれ、バイアルに、1mgのENPP1又はENPP1-Fcが含まれる。

【0069】

いくつかの実施形態では、本シリンジには、ENPP1、好ましくはENPP1-Fcと、緩衝液、増量剤、安定化剤、及び／又は界面活性剤のうちの1つ以上とを含む凍結乾燥された製剤が含まれ、バイアルに、0.5mgのENPP1又はENPP1-Fcが含まれる。

20

【0070】

いくつかの実施形態では、本シリンジには、ENPP1、好ましくはENPP1-Fcと、緩衝液、増量剤、安定化剤、及び／又は界面活性剤のうちの1つ以上とを含む凍結乾燥された製剤が含まれ、バイアルに、0.1mgのENPP1又はENPP1-Fcが含まれる。

【0071】

したがって、本開示は、再構成されたENPP1、好ましくはENPP1-Fcと、緩衝液、増量剤、安定化剤、及び／又は界面活性剤のうちの1つ以上とを含む製剤が含まれるシリンジも特徴とし、バイアルに、0.1mg/ml~100mg/ml、例えば、0.1mg/ml、1mg/ml、5mg/ml、10mg/ml、15mg/ml、20mg/ml、25mg/ml、又は50mg/ml、又は100mg/mlのENPP1又はENPP1-Fcが含まれる。

30

【0072】

いくつかの実施形態では、本シリンジには、再構成されたENPP1、好ましくはENPP1-Fcと、緩衝液、増量剤、安定化剤、及び／又は界面活性剤のうちの1つ以上とを含む製剤が含まれ、バイアルに、100mg/mlのENPP1又はENPP1-Fcが含まれる。

【0073】

いくつかの実施形態では、本シリンジには、再構成されたENPP1、好ましくはENPP1-Fcと、緩衝液、増量剤、安定化剤、及び／又は界面活性剤のうちの1つ以上とを含む製剤が含まれ、バイアルに、50mg/mlのENPP1又はENPP1-Fcが含まれる。

40

【0074】

いくつかの実施形態では、本シリンジには、再構成されたENPP1、好ましくはENPP1-Fcと、緩衝液、増量剤、安定化剤、及び／又は界面活性剤のうちの1つ以上とを含む製剤が含まれ、バイアルに、25mg/mlのENPP1又はENPP1-Fcが含まれる。

【0075】

いくつかの実施形態では、本シリンジには、再構成されたENPP1、好ましくはEN

50

PP1-Fcと、緩衝液、増量剤、安定化剤、及び／又は界面活性剤のうちの1つ以上とを含む製剤が含まれ、バイアルに、10mg/mlのENPP1又はENPP1-Fcが含まれる。

【0076】

いくつかの実施形態では、本シリンジには、再構成されたENPP1、好ましくはENPP1-Fcと、緩衝液、増量剤、安定化剤、及び／又は界面活性剤のうちの1つ以上とを含む製剤が含まれ、バイアルに、5mg/mlのENPP1又はENPP1-Fcが含まれる。

【0077】

いくつかの実施形態では、本シリンジには、再構成されたENPP1、好ましくはENPP1-Fcと、緩衝液、増量剤、安定化剤、及び／又は界面活性剤のうちの1つ以上とを含む製剤が含まれ、バイアルに、2.5mg/mlのENPP1又はENPP1-Fcが含まれる。

【0078】

いくつかの実施形態では、本シリンジには、再構成されたENPP1、好ましくはENPP1-Fcと、緩衝液、増量剤、安定化剤、及び／又は界面活性剤のうちの1つ以上とを含む製剤が含まれ、バイアルに、1mg/mlのENPP1又はENPP1-Fcが含まれる。

【0079】

いくつかの実施形態では、本シリンジには、再構成されたENPP1、好ましくはENPP1-Fcと、緩衝液、増量剤、安定化剤、及び／又は界面活性剤のうちの1つ以上とを含む製剤が含まれ、バイアルに、0.5mg/mlのENPP1又はENPP1-Fcが含まれる。

【0080】

いくつかの実施形態では、本シリンジには、再構成されたENPP1、好ましくはENPP1-Fcと、緩衝液、増量剤、安定化剤、及び／又は界面活性剤のうちの1つ以上とを含む製剤が含まれ、バイアルに、0.1mg/mlのENPP1又はENPP1-Fcが含まれる。

【0081】

いくつかの実施形態では、凍結乾燥されたENPP1、好ましくはENPP1-Fcポリペプチドは、バイアルに貯蔵される。いくつかの実施形態では、バイアルには、0.1mgの凍結乾燥されたENPP1、好ましくはENPP1-Fcポリペプチドが含まれる。いくつかの実施形態では、バイアルには、0.5mgの凍結乾燥されたENPP1、好ましくはENPP1-Fcポリペプチドが含まれる。いくつかの実施形態では、バイアルには、1mgの凍結乾燥されたENPP1、好ましくはENPP1-Fcポリペプチドが含まれる。いくつかの実施形態では、バイアルには、5mgの凍結乾燥されたENPP1、好ましくはENPP1-Fcポリペプチドが含まれる。いくつかの実施形態では、バイアルには、10mgの凍結乾燥されたENPP1、好ましくはENPP1-Fcポリペプチドが含まれる。いくつかの実施形態では、バイアルには、15mgの凍結乾燥されたENPP1、好ましくはENPP1-Fcポリペプチドが含まれる。いくつかの実施形態では、バイアルには、25mgの凍結乾燥されたENPP1、好ましくはENPP1-Fcポリペプチドが含まれる。他の実施形態では、バイアルには、50mgの凍結乾燥されたENPP1、好ましくはENPP1-Fcポリペプチドが含まれる。他の実施形態では、バイアルには、100mgの凍結乾燥されたENPP1、好ましくはENPP1-Fcポリペプチドが含まれる。

【0082】

いくつかの実施形態では、凍結乾燥されたENPP1-Fc製剤は、投与のために再構成され、シリンジに貯蔵される。いくつかの実施形態では、シリンジには、投与のため又はその後の希釈のために、100mg/mlのENPP1-Fcが含まれる。いくつかの実施形態では、シリンジには、投与のため又はその後の希釈のために、50mg/mlの

10

20

30

40

50

ENPP1-Fcが含まれる。いくつかの実施形態では、シリンジには、投与のため又はその後の希釈のために、 25 mg/ml のENPP1-Fcが含まれる。いくつかの実施形態では、シリンジには、投与のため又はその後の希釈のために、 20 mg/ml のENPP1-Fcが含まれる。いくつかの実施形態では、シリンジには、投与のため又はその後の希釈のために、 15 mg/ml のENPP1-Fcが含まれる。いくつかの実施形態では、シリンジには、投与のため又はその後の希釈のために、 10 mg/ml のENPP1-Fcが含まれる。いくつかの実施形態では、シリンジには、投与のため又はその後の希釈のために、 5 mg/ml のENPP1-Fcが含まれる。いくつかの実施形態では、シリンジには、投与のため又はその後の希釈のために、 4 mg/ml のENPP1-Fcが含まれる。いくつかの実施形態では、シリンジには、投与のため又はその後の希釈のために、 3 mg/ml のENPP1-Fcが含まれる。いくつかの実施形態では、シリンジには、投与のため又はその後の希釈のために、 2.5 mg/ml のENPP1-Fcが含まれる。いくつかの実施形態では、シリンジには、投与のため又はその後の希釈のために、 2 mg/ml のENPP1-Fcが含まれる。いくつかの実施形態では、シリンジには、投与のため又はその後の希釈のために、 1 mg/ml のENPP1-Fcが含まれる。いくつかの実施形態では、シリンジには、投与のため又はその後の希釈のために、 0.5 mg/ml のENPP1-Fcが含まれる。いくつかの実施形態では、シリンジには、投与のため又はその後の希釈のために、 0.1 mg/ml のENPP1-Fcが含まれる。

10

【0083】

いくつかの実施形態では、ENPP1-Fc製剤は、成人には、 $0.2\text{ mg/kg} \sim 1.8\text{ mg/ml}$ の範囲の用量で投与される。いくつかの実施形態では、ENPP1-Fc製剤は、体重 1 kg 超の小児及び乳幼児には、 $0.2\text{ mg/kg} \sim 0.6\text{ mg/kg}$ の範囲の用量で投与される。いくつかの実施形態では、ENPP1-Fc製剤は、体重 1 kg 未満の低出生体重児には、 $0.05\text{ mg/kg} \sim 0.2\text{ mg/kg}$ の範囲の用量で投与される。いくつかの実施形態では、ENPP1-Fc製剤は、体重 1 kg 超の乳幼児には、 0.2 mg/kg の範囲の用量で投与される。いくつかの実施形態では、ENPP1-Fc製剤は、体重 1 kg 未満の低出生体重児には、 0.1 mg/kg の用量で投与される。

20

【0084】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の凍結乾燥された製剤のうちのいずれも、治療有効用量を含む。

30

【0085】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の再構成された製剤のうちのいずれも、治療有効用量を含む。

【0086】

更に別の態様では、本開示は、本明細書に記載の凍結乾燥された製剤のうちのいずれも生成又は作製するための方法の特徴とする。本方法には、ENPP1ポリペプチド（ENPP1の触媒ドメイン及び免疫グロブリンのFc領域を含む融合ポリペプチドなど）と、緩衝剤、安定化剤、塩、アミノ酸、及び界面活性剤のうちの1つ以上を混合することが含まれる。いくつかの実施形態では、本方法には、ENPP1ポリペプチドと、クエン酸塩緩衝剤、スクロース、マンニトール、塩化カルシウム、及びポリソルベート20を混合することが含まれる。

40

【0087】

更に別の態様では、本開示は、ENPP1ポリペプチドを含む医薬溶液を生成するための方法の特徴とする。本方法には、本明細書に記載の凍結乾燥されたポリペプチド製剤のうちのいずれかを滅菌再構成溶液又は滅菌水と接触させて、それによりENPP1ポリペプチドを含む再構成された溶液を生成することが含まれる。いくつかの実施形態では、再構成溶液は、薬学的に許容可能な担体及び／又は添加剤を含む。いくつかの実施形態では、薬学的に許容可能な担体は、生理食塩水、精製水、又は注射用滅菌水から選択される。いくつかの実施形態では、本製剤は、100秒、80秒、70秒、68秒、65秒、又は60秒未満の期間内に完全に再構成される。いくつかの実施形態では、再構成された製剤

50

は、少なくとも又は約 50 mg/mL の ENPP1 ポリペプチド、約 pH 6.3 の約 20 mM のクエン酸塩、約 2 mM の塩化カルシウム、約 175 mM のスクロース、約 82 mM のマンニトール、及び約 0.05 % w/v のポリソルベートを含む。いくつかの実施形態では、再構成された製剤は、少なくとも又は約 50 mg/mL の ENPP1 ポリペプチド、約 pH 6.3 の約 20 mM のクエン酸塩、約 2 mM の塩化カルシウム、約 175 mM のスクロース、約 82 mM の (D) マンニトール、及び約 0.05 % w/v のポリソルベート 20 を含む。いくつかの実施形態では、再構成された製剤は、少なくとも又は約 50 mg/mL の ENPP1 ポリペプチド、約 pH 6.3 の約 20 mM のクエン酸塩、約 263 mM のスクロース、約 2 mM の塩化カルシウム、及び約 0.05 % のポリソルベート 20 を含む。別の態様では、本開示は、本明細書に記載の医薬溶液を生成するための方法のうちのいずれかによって作製された再構成された溶液を特徴とする。

10

【0088】

更に別の態様では、本開示は、血管石灰化の進行を防止するか、又は低減させることを、それを必要とする対象において行うための方法の特徴とする。本方法には、対象に、本明細書に記載の再構成された製剤のうちのいずれかを、対象において血管石灰化の進行を防止するか、又は血管石灰化を低減させるのに有効な量で投与することが含まれる。

20

【0089】

別の態様では、本開示は、病的石灰化の進行を防止するか、又は低減させることを、ENPP1 欠乏を有する対象において行うための方法の特徴とする。別の態様では、本開示は、ENPP1 欠乏を有する対象を治療するための方法の特徴とする。これらの方法には、対象に、本明細書に記載の再構成された製剤のうちのいずれかを、対象において病的石灰化の進行を防止するか、又は病的石灰化を低減させるのに有効な量で投与することが含まれる。

【0090】

別の態様では、本開示は、病的石灰化の進行を防止するか、又は低減させることを、ABCC6 欠乏を有する対象において行うための方法の特徴とする。別の態様では、本開示は、PXE などの ABCC6 欠乏を有する対象を治療するための方法の特徴とする。これらの方法には、対象に、本明細書に記載の再構成された製剤のうちのいずれかを、対象において病的石灰化の進行を防止するか、又は病的石灰化を低減させるのに有効な量で投与することが含まれる。

30

【0091】

いくつかの実施形態では、再構成された製剤は、対象に、対象の 1 キログラム当たり約 0.1 mg、対象の 1 キログラム当たり約 0.2 mg、対象の 1 キログラム当たり約 0.6 mg、又は対象の 1 キログラム当たり約 1.8 mg の用量で投与され得る。

【0092】

いくつかの実施形態では、再構成された製剤は、対象に、対象の 1 キログラム当たり約 0.1 mg、1 キログラム当たり約 0.2 mg、kg 当たり約 0.3 mg、kg 当たり約 0.4 mg、kg 当たり約 0.5 mg、kg 当たり約 0.6 mg、kg 当たり約 0.7 mg、kg 当たり約 0.8 mg、kg 当たり約 0.9 mg、kg 当たり約 1 mg、kg 当たり約 1.1 mg、kg 当たり約 1.2 mg、kg 当たり約 1.3 mg、kg 当たり約 1.4 mg、kg 当たり約 1.5 mg、kg 当たり約 1.6 mg、kg 当たり約 1.7 mg、又は 1.8 mg/kg の用量で投与され得る。

40

【0093】

更に別の態様では、本開示は、組織石灰化の進行を防止するか、又は組織石灰化を低減させることを、それを必要とする対象において行うための方法の特徴とし、本方法には、対象に、本明細書に記載の再構成された製剤のうちのいずれかを、対象において組織石灰

50

化の進行を防止するか、又は組織石灰化を低減させるのに有効な量で投与することが含まれる。いくつかの実施形態では、対象は、ENPP1欠乏を有するか、又は有すると疑われる。いくつかの実施形態では、対象は、ABCC6欠乏（例えば、弾性線維性仮性黄色腫（PXE））を有するか、又は有すると疑われる。

【0094】

更に別の態様では、本開示は、病的骨化の進行を防止するか、又は低減させることを、それを必要とする対象において行うための方法の特徴とする。本方法には、対象に、本明細書に記載の再構成された製剤のうちのいずれかを、対象において組織石灰化の進行を防止するか、又は組織石灰化を低減させるのに有効な量で投与することが含まれる。いくつかの実施形態では、対象は、ENPP1欠乏を有するか、又は有すると疑われる。いくつかの実施形態では、対象は、ABCC6欠乏（例えば、弾性線維性仮性黄色腫（PXE））を有するか、又は有すると疑われる。

10

【0095】

更に別の態様では、本開示は、循環ピロリン酸（PPi）を増加させることを、それを必要とする対象において行うための方法の特徴とする。本方法には、対象に、本明細書に記載の再構成された製剤のうちのいずれかを、対象において循環PPiを増加させるのに有効な量で投与することが含まれる。いくつかの実施形態では、対象は、ENPP1欠乏を有するか、又は有すると疑われる。いくつかの実施形態では、対象は、ABCC6欠乏（例えば、弾性線維性仮性黄色腫（PXE））を有するか、又は有すると疑われる。「ENPP1が欠乏している」又は「ENPP1欠乏」という語句は、NPP1タンパク質の正常な血清レベル又はNPP1の正常な活性に対するNPP1タンパク質の量又はNPP1活性の低減を指し、そのような低減により、病的石灰化及び／若しくは病的骨化の疾患若しくは障害及び／又はPPiレベルの低減が生じる。そのような病的疾患には、GACI及びARHR2が含まれるが、これらに限定されない。ENPP1欠乏は、本明細書で 사용되는場合、病的石灰化及び／又は病的骨化の疾患又は障害を生じさせない、NPP1タンパク質の量及び／又はNPP1活性のわずかな低減を指さない。「ABCC6欠乏患者」又は「ABCC6欠乏対象」という語句は、本明細書で 사용되는場合、ABCC6タンパク質の活性及び／又は発現に影響を及ぼすABCC6遺伝子の少なくとも1つの病的変異を有する患者を指す。

20

【0096】

別の態様では、本開示は、ピロホスファターゼ活性を増加させることを、それを必要とする対象において行うための方法の特徴とする。本方法には、対象に、本明細書に記載の再構成された製剤のうちのいずれかを、対象において循環PPiを増加させるのに有効な量で投与することが含まれる。いくつかの実施形態では、対象は、ENPP1欠乏を有するか、又は有すると疑われる。いくつかの実施形態では、対象は、ABCC6欠乏（例えば、弾性線維性仮性黄色腫（PXE））を有するか、又は有すると疑われる。「ピロホスファターゼ活性」という用語は、ATPなどの分子中の2つのリン酸基間のピロリン酸結合を加水分解するENPP1酵素の能力を指す。

30

【0097】

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、対象は、病的石灰化を伴う障害を有する。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、対象は、病的骨化を伴う障害を有する。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、対象は、病的軟部組織石灰化、動脈石灰化、血管石灰化、慢性腎臓疾患（CKD）、末期腎疾患（ESRD）、尿毒症性細小動脈石灰化症（CUA）、カルシフィラキシス、後縦靱帯骨化症（OPLL）、又は低リン酸血症性くる病を有するか、又はそれを発症するリスクがある。

40

【0098】

更に別の態様では、本開示は、対象においてENPP1欠乏の1つ以上の症状を治療又は改善するための方法の特徴とし、本方法には、対象に、本明細書に記載の再構成された製剤のうちのいずれかを投与して、対象においてENPP1欠乏の1つ以上の症状を改善

50

することが含まれる。

【0099】

別の態様では、本開示は、ENPP1欠乏を有する対象を治療するための方法の特徴とする。本方法には、対象に、本明細書に記載の再構成された製剤のうちのいずれかを投与し、それにより対象を治療することが含まれる。

【0100】

更に別の態様では、本開示は、対象においてABCC6欠乏の1つ以上の症状を治療又は改善するための方法の特徴とし、本方法には、対象に、本明細書に記載の再構成された製剤のうちのいずれかを、対象においてABCC6欠乏の1つ以上の症状を改善するのに有効な量で投与することが含まれる。

10

【0101】

別の態様では、本開示は、ABCC6欠乏を有する対象を治療するための方法の特徴とし、本方法には、対象に、再構成された製剤を、対象を治療するのに有効な量で投与することが含まれる。

【0102】

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、再構成された製剤は、非経口投与される。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、再構成された製剤は、皮下注射を介して投与される。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、再構成された製剤は、静脈内注射を介して投与される。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、再構成された製剤は、皮内注射を介して投与される。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、再構成された製剤は、筋肉内注射を介して投与される。

20

【0103】

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、再構成された製剤は、自己投与される。本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、製剤は、1日数回、2日ごと、3日ごと、1週間ごと、又は1か月ごとに投与される。

【0104】

本明細書に記載の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、製剤の第2の用量（又は追加の用量）が、（第1の用量又は以前の用量から）少なくとも2日後、4日後、1週間後、又は1か月後の好適な時間間隔の後で投与される。

30

【図面の簡単な説明】

【0105】

【図1】野生型ENPP1前駆体タンパク質の完全な未処理のアミノ酸配列（配列番号1）を示す。細胞質及び膜貫通領域には、下線を引いている。可能性のあるN-グリコシル化部位は、太字にしている。PSCAKE（残基99～104、枠付き）は、SMB1（残基104～144）及びSMB2（残基145～189）を含む可溶性ENPP1タンパク質部分の始まりである。

【図2】ヒトENPP1の細胞質ドメイン（残基1～77）、膜貫通ドメイン（TM）（残基77～100）、ソマトメジンB様ドメイン1（SMB1）（残基100～142）、ソマトメジンB様ドメイン2（SMB2）（残基142～187）、触媒ドメイン、及びヌクレアーゼドメインを示す。

40

【図3】可溶性ENPP1ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号2）を示す。

【図4】図4A及び図4Bは、様々な脊椎動物可溶性ENPP1ポリペプチド及びヒト可溶性ENPP1ポリペプチドの多重整列（配列番号4～8）を示す。様々な可溶性ENPP1ポリペプチドは、次の種に対応し、特定のNCBIアクセッション番号の領域を表す：マウス（NCBIアクセッションNP_001295256.1、配列番号4）、ウシ（NCBIアクセッションNP_001193141、配列番号5）、ウサギ（NCBIアクセッションNP_001162404.1、配列番号6）、ヒト（NCBIアクセッションNP_006199.2、配列番号1）、及びヒヒ（NCBIアクセッションNP_001076211.2、配列番号8）。

50

【図 5】様々な緩衝液成分を含む E N P P 1 - F c 製剤のサイズ排除クロマトグラフィー (S E C) の結果を示す棒グラフである。データは、高分子量種 (H M W) % 又は主要ピーク % で示される。

【図 6】緩衝液及び賦形剤成分の様々な組み合わせを含む凍結乾燥された E N P P 1 - F c ポリペプチド製剤の再構成された製剤についての回収率を示す棒グラフである。

【図 7】5℃及び40℃での緩衝液及び賦形剤成分の様々な組み合わせを含む凍結乾燥された E N P P 1 - F c ポリペプチド製剤についての酵素活性データの要約を示す棒グラフである。活性データは、U / m g で表される。

【図 8】5℃及び40℃での緩衝液及び賦形剤成分の様々な組み合わせを含む凍結乾燥された E N P P 1 - F c ポリペプチド製剤についての S E C データの要約を示す棒グラフである。データは、高分子量種 (H M W) 、主要ピーク種、又は低分子量種 (L M W) の存在率で示される。

【図 9】図 9 A 及び図 9 B は、様々な緩衝液、賦形剤、及び界面活性剤成分を含む凍結乾燥された E N P P 1 - F c ポリペプチド製剤についての S E C データの要約を示す棒グラフである。図示した製剤を、600 r p m での攪拌 (「攪拌」として図示) 又は5ラウンドの凍結融解サイクル (すなわち、-80℃で60分間以上貯蔵した後、室温で解凍 ; 「 F / T 」として図示される) を含むストレス条件下で試験した。データは、H M W % (図 9 A) 又は主要ピーク % (図 9 B) で示される。

【図 10】コハク酸塩及びスクロース緩衝液 / 添加剤の背景において様々な補因子を含む凍結乾燥された E N P P 1 - F c ポリペプチド製剤についての S E C データの要約を示す棒グラフである。データは、5℃での H M W 及び主要ピーク種の存在率を表す。

【図 11】コハク酸塩、スクロース、及び P S 20 緩衝液 / 添加剤 / 界面活性剤の背景において様々な補因子を含む凍結乾燥された E N P P 1 - F c ポリペプチド製剤についての S E C データの要約を示す棒グラフである。データは、40℃で約6日間インキュベートした H M W 及び主要ピーク種の存在率を表す。

【図 12】図 12 A 及び図 12 B は、コハク酸塩、スクロース、及び P S 20 緩衝液 / 添加剤 / 界面活性剤の背景において様々な補因子を含む凍結乾燥された E N P P 1 - F c ポリペプチド製剤についての S E C データの要約を示す棒グラフである。データは、5℃での (図 12 B) 、又は40℃で約6日間インキュベートした (図 12 A) H M W 、 L M W 、及び主要ピーク種の存在率を表す。

【図 13】凍結乾燥された E N P P 1 - F c ポリペプチド製剤試料についてのオスモル濃度データの要約を示す棒グラフである。

【図 14】-75℃、5℃、又は40℃で最大13週間貯蔵したいくつかの好ましい緩衝液 / 賦形剤 / 添加剤 / 界面活性剤の組み合わせを含む凍結乾燥された E N P P 1 - F c ポリペプチド製剤試料についての S E C データの要約を示す棒グラフである。データは、異なる製剤 / 条件にわたる H M W 及び主要ピーク種の存在率を表す。

【図 15】5℃、25℃、又は40℃のいずれかで3か月間の期間にわたって貯蔵した2つの好ましい凍結乾燥された E N P P 1 ポリペプチド製剤 (安定性形態 A 及び安定性形態 B) の S E C データの要約を示すプロットである。

【図 16】5℃、25℃、又は40℃のいずれかで3か月間の期間にわたって貯蔵した2つの好ましい凍結乾燥された E N P P 1 ポリペプチド製剤 (安定性形態 A 及び安定性形態 B) の酵素活性データの要約を示すプロットである。

【図 17】5℃で異なる期間貯蔵した凍結乾燥された E N P P 1 - F c ポリペプチド製剤の S E C データの要約を示すプロットである。

【図 18】25℃で異なる期間貯蔵した凍結乾燥された E N P P 1 - F c ポリペプチド製剤の S E C データの要約を示すプロットである。

【図 19】40℃で異なる期間貯蔵した凍結乾燥された E N P P 1 - F c ポリペプチド製剤の S E C データの要約を示すプロットである。

【図 20】5℃、25℃、及び40℃など、異なる期間貯蔵した凍結乾燥された E N P P 1 - F c ポリペプチド製剤についての酵素活性データの要約を示すプロットである。

10

20

30

40

50

【図 2 1】異なる時間間隔でシリンジ又はバイアルに貯蔵した凍結乾燥された E N P P 1 - F c ポリペプチドの再構成された製剤についての回収率を示す棒グラフである。

【図 2 2】異なる時間間隔でシリンジ又はバイアルに貯蔵した凍結乾燥された E N P P 1 - F c ポリペプチドについての酵素活性データの要約を示す棒グラフである。

【図 2 3】異なる時間間隔でシリンジ又はバイアルに貯蔵した凍結乾燥された E N P P 1 - F c ポリペプチドの再構成された製剤についての回収率を示すプロットである。

【図 2 4】異なる時間間隔でシリンジ又はバイアルに貯蔵した凍結乾燥された E N P P 1 - F c ポリペプチドについての酵素活性データの要約を示すプロットである。

【発明を実施するための形態】

【0106】

10

1. 概要

本出願は、E N P P 1 ポリペプチドを含む安定な凍結乾燥された製剤、及び E N P P 1 と関連付けられる疾患の治療におけるそれらの使用を提供する。ある特定の態様では、本開示は、E N P P 1 ポリペプチドの凍結乾燥された製剤及びそれらの使用（例えば、病的石灰化及び／若しくは骨化、又は病的石灰化及び／若しくは骨化の 1 つ以上の合併症の進行速度並びに／又は重症度を治療する、防止する、又は低減させること）に関する。本出願は、安定性の強化、貯蔵寿命の増加、並びにより低いレベルの高分子量種（H M W）及び凝集体を示す凍結乾燥された製剤を提供する。H M W 種は、二量体であっても、四量体であっても、より高次の凝集体（H M W 1 / H M W 2）であってもよい。

【0107】

20

E N P P 1 ポリペプチドは、異所性組織石灰化のある特定の疾患の治療に効果的であることが示されている。E N P P 1 - F c は、乳児に発生し、かつ広範な動脈石灰化を伴う重篤な疾患である G A C I（乳児の全身性動脈石灰化）のマウスモデルにおいて、全身性動脈石灰化を低減することが示されている（A l b r i g h t, e t a l., 2015, N a t u r e C o m m. 10006）。E N P P 1 の融合タンパク質はまた、重度の組織石灰化の疾患を治療することが説明されており（例えば、P C T 出願公開第 2014 / 126965 号及び同第 2016 / 187408 号を参照されたい）、負に帯電した骨標的化ドメインを含む E N P P 1 の融合タンパク質は、G A C I を治療することが説明されている（P C T 出願公開第 2011 / 113027 号及び同第 2012 / 125182 号）。

30

【0108】

哺乳動物 E N P P 1 ポリペプチド、変異体、又はその変異体断片は、国際 P C T 出願公開第 2014 / 126965 号 - B r a d d o c k e t a l., 同第 2016 / 187408 号 - B r a d d o c k e t a l., 同第 2017 / 087936 号 - B r a d d o c k e t a l., 及び同第 2018 / 027024 号 - B r a d d o c k e t a l. で以前に開示されており、これらの全ては、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

【0109】

2. 凍結乾燥された製剤

ある特定の態様では、本開示は、凍結乾燥された E N P P 1 製剤を、E N P P 1 ポリペプチドの異常活性と関連付けられる疾患又は状態の治療又は防止に使用することを企図している。

40

【0110】

一態様では、本開示の E N P P 1 製剤は、凍結乾燥される。凍結乾燥中、E N P P 1 ポリペプチドは、水相にある状態から非晶質固相にある状態へと変換され、このことにより、タンパク質が化学的及び／又は立体構造不安定性から保護されると考えられる。凍結乾燥は、当該技術分野で一般的な技法を使用して実施され、凍結乾燥された製剤は、安定性、貯蔵寿命、並びに高分子量（H M W）種及び凝集体のレベルの減少に対して最適化される。T a n g e t a l., P h a r m R e s. 21:191-200, (2004) and C h a n g e t a l., P h a r m R e s. 13:243-9 (19

50

96) . 開示される凍結乾燥されたENPP1製剤は、製造、輸送、及び貯蔵のストレスに対してタンパク質を安定させるのに役立つ。凍結乾燥された製剤に使用される賦形剤及び添加剤は、製剤の不可欠な構成成分であり、したがって、患者にとって安全かつ忍容性良好である必要がある。タンパク質薬については、賦形剤及び添加剤の選択は、薬物の有効性及び免疫原性の両方に影響を与え得るため、特に重要である。賦形剤及び添加剤はまた、高濃度ENPP1ポリペプチド製剤の粘度を低減して、それらの送達を可能にし、患者の利便性を強化するのにも有用である。本明細書に開示の製剤、賦形剤、及び添加剤は、これらのストレスに対する安定性を提供する。一般的な賦形剤は、当該技術分野で既知であり、Powell et al., Compendium of Excipients for Parenteral Formulations (1998), PD A J. Pharm. Sci. Technology, 52:238-311に見ることができる。

10

【0111】

ある特定の実施形態では、ENPP1製剤は安定化剤を含む。これらの安定化剤は、様々な化学的及び物理的ストレスに対してタンパク質を安定させるその機序に基づいて分類することができる。一部の安定化剤は、特定のストレスの影響を軽減するために、又は特定のタンパク質の特定の感受性を調節するために使用される。他の安定化剤は、タンパク質の物理的及び共有結合安定性により全般的な効果を有する。本明細書に提供される教示及び指導を考慮すると、当業者であれば、ENPP1ポリペプチドの保持及び安定性を促進する可能性が高い本開示のENPP1製剤を達成するために、どれだけの量又は範囲の安定化剤を任意の特定の製剤に含めることができるかを理解する。

20

【0112】

ある特定の実施形態では、本明細書に開示のENPP1製剤は、増量剤を含む。そのような充填剤は、長期安定化、強力な活性成分を少量で含む固体製剤を増量すること（このため、多くの場合、「増量剤」、「充填剤」、又は「希釈剤」と称される）、又は薬剤吸収の促進、粘度の低減、若しくは溶解性の強化などの最終剤形中の活性成分に対する治療的強化を付与する目的で含まれる。

【0113】

本明細書に開示のENPP1製剤は、緩衝剤、安定化剤、界面活性剤、糖、塩、及びアミノ酸を含み、これらは以下でより詳細に説明される。

30

【0114】

当業者であれば、本明細書に記載の賦形剤の濃度が、特定の製剤内で相互依存性を共有することを認識する。一例として、増量剤の濃度は、一態様では、例えば、タンパク質濃度が高い場合、又は例えば、安定化剤濃度が高い場合、低下する。加えて、当業者であれば、増量剤がない特定の製剤の等張性を維持するために、適宜、安定化剤の濃度を増加させ得る（すなわち、「張化」量の安定化剤を使用し得る）ことを認識する。賦形剤及び他の添加剤は、薬物製品（例えば、タンパク質）の安定性及び送達などの製造可能性及び／又は最終製品品質を付与又は強化するために加えられる。本明細書に開示のENPP1製剤は、好適な安定性、安全性、及び市場性を強化する好適な賦形剤を含む。

【0115】

40

ある特定の実施形態では、凍結乾燥されたENPP1製剤は、緩衝液、増量剤、安定化剤、及び／又は界面活性剤のうちの少なくとも1つ以上を含む。いくつかの実施形態では、界面活性剤は、凍結乾燥ステップ中又は再構成中の凝集が問題となる場合、HMW種の形成の低減を助けるように選択される。製造中（例えば、希釈、滅菌濾過、充填など）及び凍結乾燥された製品の再構成後に、製剤を安定なpHゾーン内に維持するため、適切な緩衝剤が含まれる。以下の表は、凍結乾燥されたタンパク質製剤に有用なある特定の賦形剤成分を提供する。

50

【表 1】

表 1：凍結乾燥されたタンパク質製剤の賦形剤成分	
賦形剤成分	凍結乾燥された製剤中での機能
緩衝液	処理中及び再構成時に製剤の pH を維持する
安定化剤	安定化剤には、ポリオール、糖、及び多糖類などの凍結保護剤及びリオプロテクタント凍結保護剤が含まれる 凍結保護剤はタンパク質を凍結ストレスから保護する リオプロテクタントは凍結乾燥状態でタンパク質を安定させる
増量剤	製品優雅の強化及び噴出防止に使用される リオケーキに構造強度を提供する 例としては、マンニトール及びスクロースが挙げられる
界面活性剤	凍結乾燥プロセス中に凝集が問題となる場合に用いられる 再構成時間を低減させるのに役立つ 例としては、ポリソルベート 20 及び 80 が挙げられる
抗酸化剤	リオケーキ中の酸化反応が大幅に遅延される
金属イオン／キレート剤	特定の金属イオンが補因子としてのみ含まれる場合、又は金属がプロテアーゼ活性に必要とされる場合、含めてもよい
保存剤	複数回投与製剤のみ 製剤中の微生物増殖に対する保護を提供する 通常、再構成希釈剤（例えば、b W F I）に含まれる

10

20

【0116】

(a) 緩衝液及び緩衝剤

典型的には、薬理的に活性なポリペプチド製剤の安定性は、狭い pH 範囲で最大であることが観察される。最適な安定性のこの pH 範囲は、製剤試験前の間に早期に特定する必要がある。加速安定性試験及び熱量スクリーニング試験などのいくつかのアプローチが、この試みにおいて有用である (Remmelle R. L. Jr., et al., Biochemistry, 38 (16) : 5241-7 (1999))。製剤が完成したら、タンパク質は、その貯蔵寿命を通して製造及び維持されなければならない。したがって、緩衝剤は、製剤中の pH を制御するためにほぼ常に用いられる。

30

【0117】

緩衝液を選択する際には、いくつかの要因を考慮しなければならない。第一に、緩衝液種及びその濃度は、その pKa 及び所望の製剤 pH に基づいて定義されなければならない。同様に重要なのは、緩衝液がタンパク質及び他の製剤賦形剤と適合性があり、分解反応を触媒しないことである。考慮すべき第 3 の重要な態様は、投与時に緩衝液が誘発し得る刺すような感覚及び刺激感である。皮下 (SC) 経路又は筋肉内 (IM) 経路を介して投与される薬物については、刺すような感覚及び刺激の可能性が高く、これらの経路では、薬物溶液は、投与時に製剤が血液中に急速に希釈される IV 経路によって投与されるときよりも比較的長い期間、部位に留まる。直接 IV 注入によって投与される製剤については、緩衝液（及び任意の他の製剤成分）の総量をモニタリングする必要がある。リン酸カリウム緩衝液の形態で投与されるカリウムイオンについては特に注意する必要がある、これは、患者において心血管効果を誘発し得る (Hollander-Rodriguez J. C., et al., Am. Fam. Physician., 73 (2) : 283-90 (2006))。

40

【0118】

凍結乾燥された製剤用の緩衝液は、更なる検討を必要とする。リン酸ナトリウムなどのいくつかの緩衝液は、凍結中にタンパク質非晶質相から結晶化して pH のシフトをもたらす。酢酸塩及びイミダゾールなどの他の一般的な緩衝液は、凍結乾燥プロセス中に昇華又は蒸発し、それにより凍結乾燥中又は再構成後に製剤の pH をシフトさせ得る。

50

【0119】

ある特定の実施形態では、本明細書に記載されるENPP1製剤を緩衝するために使用される例示的な緩衝剤としては、限定されないが、有機酸、コハク酸塩、リン酸塩、酢酸塩、クエン酸塩、トリス、HEPES、並びに限定されないが、アスパラギン酸、ヒスチジン、アルギニン、及びグリシンを含むアミノ酸又はアミノ酸の混合物が挙げられる。ある特定の実施形態では、緩衝剤は、コハク酸塩、クエン酸塩、及びリン酸塩である。一実施形態では、ENPP1製剤中に存在する緩衝系は、生理学的に適合性があり、医薬製剤の所望のpHを維持するように選択される。別の実施形態では、溶液のpHは、pH2.0～pH12.0である。例えば、様々な実施形態では、溶液のpHは、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、又は10.0であってもよい。

10

【0120】

pH緩衝化合物は、ENPP1製剤のpHを所定のレベルに維持するのに好適ないずれの量で存在してもよい。適切に低レベルの緩衝液を使用する場合、結晶化及びpHシフトが回避され得る。一実施形態では、pH緩衝濃度は、0.1mM～500mM（1M）である。例えば、pH緩衝剤は、少なくとも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、又は500mMであることが企図される。いくつかの実施形態では、緩衝剤は、溶液中で再構成された場合、pH6～7のpH範囲を維持する。いくつかの実施形態では、緩衝剤は、溶液中で再構成された場合、pH7～8のpH範囲を維持する。

20

【0121】

本明細書に記載されるENPP1製剤を緩衝するために使用される例示的なpH緩衝剤としては、限定されないが、有機酸、コハク酸塩、リン酸塩、酢酸塩、クエン酸塩、トリス、HEPES、及びアミノ酸又はアミノ酸の混合物が挙げられる。いくつかの実施形態では、緩衝剤は、高分子量種の形成を少なくとも10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%減少させる。

【0122】

(b) 安定化剤及び増量剤

本医薬製剤の一実施形態では、安定化剤（又は安定化剤の組み合わせ）を加えて、貯蔵誘導性の凝集及び化学分解を防止又は低減する。再構成時の震んだ溶液又は濁った溶液は、通常、タンパク質が沈殿したか、又は少なくとも凝集したことを示す。「安定化剤」という用語は、凝集又は化学分解（例えば、自己溶解、脱アミド化、酸化など）を防止することができる賦形剤を意味する。ある特定の実施形態では、本明細書に提供されるENPP1製剤は、限定されないが、スクロース、トレハロース、マンノース、マルトース、ラクトース、グルコース、ラフィノース、セロビオース、ゲンチオビオース、イソマルトース、アラビノース、グルコサミン、フルクトース、マンニトール、ソルビトール、ポリヒドロキシ化合物（デキストラン、デンプン、ヒドロキシエチルデンプン、シクロデキストリン、N-メチルピロリデン、セルロース、及びヒアルロン酸などの多糖類を含む）などの安定化剤を含む[Carpenter et al., Develop. Biol. Standard 74:225, (1991)]。本開示の一実施形態では、スクロース及びマンニトールが、本明細書に開示のENPP1製剤中で安定化剤として使用される。本開示の別の実施形態では、スクロースが安定化剤として使用される。

30

40

【0123】

ある特定の実施形態では、ENPP1製剤は、安定化剤を、約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、又は1000mMの濃度で含む。同様に、本開示のある特定の実施形態では、安定化剤は、約0.0

50

0.5、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、又は20%w/vの濃度で組み込まれる。

他の実施形態では、ENPP1製剤はまた、適切な量の増量剤及び浸透圧調節剤を含む。本開示の様々な実施形態では、増量剤としては、例えば、デキストラン、ポリビニルピロリドン、カルボキシメチルセルロース、ラクトース、ソルビトール、トレハロース、又はキシリトールなどのポリマーが挙げられる。増量剤は、本開示の様々な実施形態では、約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、又は1000mMの濃度で組み込まれる。

10

【0124】

(c) 界面活性剤

ある特定の実施形態では、本明細書に開示のENPP1製剤は、界面活性剤を追加で含んでもよい。界面活性剤は、表面誘導性分解を防止するためにタンパク質製剤で一般的に使用される。界面活性剤は、界面位置についてのタンパク質との競合に勝つ（及び／又は構造的に改変されたタンパク質分子の適当なリフォールディングを促進する）能力を有する両親媒性分子である。界面活性剤分子の疎水性部分は界面位置（例えば、気体／液体）を占める一方、分子の親水性部分はバルク溶媒に向かって配向されたままである。十分な濃度（典型的には、洗剤の臨界ミセル濃度周辺）で、界面活性剤分子の表面層は、タンパク質分子が界面で吸着するのを防止する役割を果たす。それにより、表面誘導性分解が最小化される。本明細書で企図される界面活性剤には、ソルビタンポリエトキシレートの脂肪酸エステル、すなわち、ポリソルベート20及びポリソルベート80が含まれるが、これらに限定されない。これら2つは、分子C-12及びC-18にそれぞれ疎水性を付与する脂肪族鎖の長さが異なるだけである。したがって、ポリソルベート80は、表面活性が高く、ポリソルベート20よりも臨界ミセル濃度が低い。

20

【0125】

洗剤はまた、タンパク質の熱力学的立体構造安定性に影響を与え得る。非イオン性界面活性剤は、タンパク質安定化に概して有用である。イオン界面活性剤（洗剤）は、通常、タンパク質を不安定化する。ここでも、所与の洗剤賦形剤の効果は、タンパク質特異的となる。例えば、ポリソルベートは、一部のタンパク質の安定性を低下させ、他のタンパク質の安定性を増加させることが示されている。タンパク質の洗剤不安定化は、部分的に又は完全に折り畳まれていないタンパク質状態との特異的結合に関与し得る洗剤分子の疎水性テールの観点から、理論的に説明することができる。これらのタイプの相互作用は、より拡張されたタンパク質状態への立体構造平衡のシフトを引き起こし得る（すなわち、ポリソルベートへの結合を相補してタンパク質分子の疎水性部分の曝露を増加させる）。あるいは、タンパク質天然状態が何らかの疎水性表面を呈する場合、天然状態への洗剤結合は、その立体構造を安定化させ得る。ポリソルベートの別の態様は、それらが本質的に酸化分解の影響を受けやすいことである。多くの場合、原材料として、それらは、タンパク質残基側鎖、特にメチオニンの酸化を引き起こすのに十分な量の過酸化物を含む。安定化剤を加えることから生じる酸化的損傷の可能性は、最も低い有効濃度の賦形剤を製剤に使用するべきである点を強調する。界面活性剤については、所与のタンパク質に対する有効濃度は、安定化の機序に依存する。

30

40

【0126】

界面活性剤はまた、凍結及び乾燥中の表面関連凝集現象を防止するのに適切な量で加えられる[Chang, B, J. Pharm. Sci. 85:1325, (1996)]。このため、例示的な界面活性剤としては、限定されないが、天然アミノ酸に由来する界面活性剤を含む、アニオン性、カチオン性、非イオン性、両性イオン性、及び両性界面活性剤が挙げられる。アニオン性界面活性剤としては、限定されないが、ラウリル硫酸ナトリ

50

ウム、スルホコハク酸ジオクチルナトリウム及びスルホン酸ジオクチルナトリウム、ケノ
デオキシコール酸、N-ラウロイルサルコシンナトリウム塩、ドデシル硫酸リチウム、1
-オクタンスルホン酸ナトリウム塩、コール酸ナトリウム水和物、デオキシコール酸ナト
リウム、及びグリコデオキシコール酸ナトリウム塩が挙げられる。カチオン性界面活性剤
としては、限定されないが、塩化ベンザルコニウム又は塩化ベンゼトニウム、塩化セチル
ピリジニウム-水和物、及び臭化ヘキサデシルトリメチルアンモニウムが挙げられる。両
性イオン性界面活性剤としては、限定されないが、CHAPS、CHAPSO、SB3-
10、及びSB3-12が挙げられる。非イオン性界面活性剤としては、限定されないが、
ジギトニン、Triton X-100、Triton X-114、TWEEN-
20、及びTWEEN-80が挙げられる。界面活性剤には、限定されないが、ラウロマ
クロゴール400、ステアリン酸ポリオキシル40、ポリオキシエチレン水素化ヒマシ油
10、40、50、及び60、モノステアリン酸グリセロール、ポリソルベート40、6
0、65、及び80、大豆レシチン、並びにジオレイルホスファチジルコリン(DOPC)
)、ジミリストイルホスファチジルグリセロール(DMPG)、ジミリストイルホスファ
チジルコリン(DMPC)、及び(ジオレイルホスファチジルグリセロール)DOPGな
どの他のリン脂質；スクロース脂肪酸エステル、メチルセルロース、及びカルボキシメチ
ルセルロースが含まれる。したがって、これらの界面活性剤を個別に又は異なる比率の混
合物として含む組成物が更に提供される。本開示の一実施形態では、界面活性剤はTWE
EN-80である。本製剤において、界面活性剤は、約0.01~約0.5 g/Lの濃度
で組み込まれる。本明細書に提供される製剤において、様々な実施形態では、界面活性剤
濃度は、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、又は1.0 g/Lである。同様に、本開示のある特定の実施形態では、界面
活性剤は、約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、又は1.0 % w/vの濃度で組み込まれる。

10

20

30

40

50

【0127】

(d) 塩

ある特定の実施形態では、本明細書に開示のENPP1製剤は、塩を含む。塩は、多く
の場合、タンパク質溶解度、物理的安定性、及び等張性に重要であり得る製剤のイオン強
度を増加させるために加えられる。塩は、様々な方法でタンパク質の物理的安定性に影響
を与え得る。イオンは、タンパク質の表面上の荷電残基に結合することによって、タンパ
ク質の天然状態を安定させることができる。あるいは、塩は、タンパク質骨格に沿ってペ
プチド基に結合することによって変性状態を安定させることができる(—CONH—
)。塩はまた、タンパク質分子内の残基間の反発的な静電相互作用を遮蔽することによっ
て、タンパク質天然構造を安定させることができる。タンパク質製剤中の塩はまた、タン
パク質凝集及び不溶解性をもたらし得るタンパク質分子間の求引性静電相互作用を遮蔽す
ることができる。塩(すなわち、電解質)は、製剤を凍結乾燥させることをより困難にす
る場合がある。このため、タンパク質構造安定性を維持するのに十分なだけの塩を製剤に
含めるべきであり、通常、この電解質のレベルは非常に低い。

【0128】

ある特定の実施形態では、本明細書に開示のENPP1製剤は、例えば、塩化ナトリウ
ム(NaCl)、塩化カルシウム(CaCl₂)、塩化亜鉛(ZnCl₂)、及び/又は
塩化マグネシウム(MgCl₂)塩などの塩を含んでもよい。ある特定の実施形態では、
本明細書に開示のENPP1製剤は、塩濃度が、0.0(すなわち、塩なし)、0.00
1、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、4
0、50、80、100、120、150、200、300、及び500 mMの間である
。本開示の一実施形態では、0.0 mMのNaCl(すなわち、NaClなし)が製剤中

に含まれる。

【0129】

(e) アミノ酸

アミノ酸は、緩衝液、増量剤、安定化剤、及び抗酸化剤として、タンパク質製剤において汎用性があることが分かっている。このため、一態様では、本明細書に開示のENPP1製剤は、例えば、グリシン、アルギニン、ヒスチジン、アラニン、プロリン、セリン、及びグルタミン酸などのアミノ酸を含む。これらのアミノ酸は、多くの場合、ポリペプチド製剤に複数の利益を提供する。ヒスチジンは、市販のタンパク質製剤に一般的に見出され、このアミノ酸は、注射時に刺すような感覚をもたらすことが知られている緩衝液であるクエン酸塩の代替物を提供する。興味深いことに、ヒスチジンは、液体形態及び凍結乾燥形態の両方において高濃度で使用される場合、凝集に関して安定化効果を有することも報告されている(Chen B, et al., Pharm Res., 20(12): 1952-60 (2003))。ヒスチジンはまた、他の研究者により、高タンパク質濃度製剤の粘度を低減させることが観察された。他の態様では、アミノ酸グリシン、アルギニン、及びアラニンのうちの1つ以上を含み、優先的な排除の機序によってタンパク質を安定させることが示されている製剤が提供される。グリシンも、凍結乾燥された製剤で一般的に使用される増量剤である。アルギニンは、凝集を阻害するのに有効な薬剤であることが示されており、液体製剤及び凍結乾燥された製剤の両方で使用されている。提供されるENPP1製剤では、アミノ酸濃度は、0.1、1、10、20、30、40、50、80、100、120、150、200、300、及び500mMである。本開示の実施形態では、アミノ酸はグリシンである。

10

20

【0130】

(f) 抗酸化剤

タンパク質残基の酸化は、ある数の異なる源から生じる。特定の抗酸化剤を加えるだけでなく、酸化性タンパク質損傷の防止には、製造プロセス全体、及び大気酸素、温度、光曝露、及び化学的汚染などの製品の貯蔵全体を通して、ある数の要因の慎重な制御が伴う。したがって、本開示は、還元剤、酸素／遊離ラジカル捕捉剤、又はキレート剤を含むがこれらに限定されない、医薬抗酸化剤の使用を企図する。治療用タンパク質製剤中の抗酸化剤は、一態様では、水溶性であり、製品貯蔵寿命を通して活性のままである。還元剤及び酸素／フリーラジカル捕捉剤は、溶液中の活性酸素種を除去することによって機能する。本明細書に提供される製剤の様々な実施形態では、抗酸化剤濃度は、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、又は1.0mg/mLである。

30

【0131】

(g) 金属イオン

概して、遷移金属イオンは、タンパク質中の物理的及び化学的分解反応を触媒し得るため、タンパク質製剤では望ましくない。しかしながら、特定の金属イオンは、それらがタンパク質の補因子である製剤、及びそれらが配位錯体(例えば、インスリンの亜鉛懸濁液)を形成するタンパク質の懸濁液製剤には含まれる。最近、マグネシウムイオン(10～120mM)の使用により、アスパラギン酸のイソアスパラギン酸への異性化が阻害されることが提案されている(WO2004/039337)。

40

【0132】

(h) 保存剤

保存剤は、同じ容器からの2回以上の抽出を伴う複数回使用非経口製剤を開発する場合に必要である。それらの主な機能は、微生物の成長を阻害し、薬物製品の貯蔵寿命又は使用期間を通して製品の滅菌性を確保することである。一般的に使用される保存剤としては、限定されないが、ベンジルアルコール、フェノール、及びm-クレゾールが挙げられる。保存剤は使用の歴史が長いが、保存剤を含むタンパク質製剤の開発は困難であり得る。保存剤は、ほぼ常にタンパク質に対して不安定化効果(凝集)を有し、これは、複数回投

50

与タンパク質製剤でのそれらの使用を制限する主要な因子となっている（Roy S, et al., J Pharm Sci., 94 (2) : 382-96 (2005)）。実用的な場合、保存剤は、希釈剤製剤に含め、凍結乾燥される製剤には含めてはならない。

【0133】

ある特定の実施形態では、可溶性ENPP1ポリペプチドは、治療量の本明細書に開示の可溶性ENPP1ポリペプチドを含む凍結乾燥されたポリペプチド製剤として製剤化され、それにより、凍結乾燥されたポリペプチド製剤は、液体形態の溶液に再構成可能となる。いくつかの実施形態では、凍結乾燥されたポリペプチド製剤は、滅菌注射溶液中で再構成される。いくつかの実施形態では、凍結乾燥されたポリペプチド製剤は、再構成溶液中で再構成される。いくつかの実施形態では、再構成溶液は、薬学的に許容可能な担体及び／又は添加剤を含む。いくつかの実施形態では、薬学的に許容可能な担体は、生理食塩水、精製水、又は注射用滅菌水から選択される。いくつかの実施形態では、製剤は、100秒、80秒、70秒、69秒、68秒、67秒、66秒、65秒、64秒、63秒、62秒、61秒、又は60秒未満の期間内に完全に再構成される。

【0134】

ある特定の実施形態では、凍結乾燥されたポリペプチド製剤は、ENPP1ポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、凍結乾燥されたポリペプチドは、配列番号1のアミノ酸配列と少なくとも70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一であるアミノ酸配列を含むか、それから本質的になるか、又はそれからなるポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、凍結乾燥されたポリペプチドは、配列番号2のアミノ酸配列を有するポリペプチドの一部と少なくとも70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一であるアミノ酸配列を含むか、それから本質的になるか、又はそれからなるポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、ENPP1ポリペプチドは、融合タンパク質である。いくつかの実施形態では、ENPP1ポリペプチドは、免疫グロブリンのFcドメインを更に含む融合タンパク質である。いくつかの実施形態では、免疫グロブリンのFcドメインは、IgG1免疫グロブリンのFcドメインである。いくつかの実施形態では、ENPP1ポリペプチドは、可溶性ENPP1ポリペプチドドメインと1つ以上の異種タンパク質部分とを含む融合タンパク質である。いくつかの実施形態では、異種タンパク質部分は、哺乳動物における可溶性ENPP1ポリペプチドの循環半減期を増加させる。いくつかの実施形態では、異種タンパク質部分が、Fcドメインを含む。いくつかの実施形態では、Fcドメインは、配列番号12のアミノ酸配列と少なくとも75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一であるアミノ酸配列を含むか、それから本質的になるか、又はそれからなるポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、ENPP1ポリペプチドは、異種部分を更に含む。いくつかの実施形態では、異種部分が、グリコシル化アミノ酸、PEG化アミノ酸、ファルネシル化アミノ酸、アセチル化アミノ酸、ビオチン化アミノ酸、及び脂質部分からなる群から選択される。

【0135】

ある特定の実施形態では、凍結乾燥されたポリペプチド製剤は、緩衝剤を含む。ある特定の実施形態では、緩衝剤は、pHを、pH5.0～pH8.0の範囲、約pH5.5～pH7.5の範囲、約pH6.0～pH7.0の範囲、約pH6.0～pH6.5の範囲に維持する。いくつかの実施形態では、緩衝剤は、pH6.5±0.5のpHを維持する。好ましい実施形態では、pHはpH6.3である。ある特定の実施形態では、緩衝剤は、コハク酸塩、クエン酸塩、重炭酸塩、リン酸塩、トリス、又はグリシルグリシンからなる群から選択される。ある特定の実施形態では、緩衝剤は、コハク酸塩、クエン酸塩、又はリン酸塩である。好ましい実施形態では、緩衝剤は、クエン酸塩である。緩衝剤は、凍結乾燥されたポリペプチド製剤が溶液中で再構成された場合、濃度が5mM～100mM

の範囲であり得る。ある特定の実施形態では、緩衝剤は、10 mM～50 mM、又は15 mM～25 mMの範囲の濃度で存在する。ある特定の好ましい実施形態では、緩衝剤は、20 mMの濃度で存在する。緩衝剤は、凍結乾燥形態及び再構成形態の両方でENPP1ポリペプチドの安定性の増加を付与し得る。ある特定の実施形態では、緩衝剤は、凝集体形成の開始温度を増加させることを促進するように選択されてもよい。いくつかの実施形態では、緩衝剤は、凝集体形成の開始温度を少なくとも1℃、2℃、3℃、4℃、5℃、6℃、7℃、8℃、9℃、又は10℃増加させる。ある特定の実施形態では、緩衝剤は、高分子量種の形成を減少させ得る。いくつかの実施形態では、緩衝剤は、高分子量種の形成を少なくとも2%、3%、4%、5%、10%、15%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、又は100%減少させる。いくつかの実施形態では、緩衝剤は、高分子量種の形成を少なくとも10%～100%、20%～80%、30%～70%、又は40%～60%減少させる。いくつかの実施形態では、緩衝剤は、高分子量種の形成を少なくとも50%減少させる。

10

【0136】

本開示の凍結乾燥されたポリペプチド製剤は、1つ以上の薬学的に許容可能な添加剤及び／又は安定化剤を含んでもよい。ある特定の実施形態では、薬学的に許容可能な添加剤は、アミノ酸、塩、糖、及び／又はポリオールを含む。いくつかの実施形態では、薬学的に許容可能な添加剤は、アルギニン、プロリン、及び／又はグリシンである。好ましい実施形態では、薬学的に許容可能な添加剤は、スクロース及び／又はマンニトールなどの安定化剤である。ある特定の実施形態では、1つ以上の薬学的に許容可能な添加剤は、溶液中で再構成された場合、濃度が50 mM～300 mMの範囲である。いくつかの実施形態では、1つ以上の薬学的に許容可能な添加剤は、溶液中で再構成された場合、濃度が、50 mM～100 mM、60 mM～90 mM、又は75 mM～85 mMである。いくつかの実施形態では、1つ以上の薬学的に許容可能な添加剤は、溶液中で再構成された場合、濃度が、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 mMの±5 mM以内である。薬学的に許容可能な添加剤及び／又は安定化剤は、凍結乾燥形態及び再構成形態の両方でENPP1ポリペプチドの安定性の増加を付与し得る。ある特定の実施形態では、薬学的に許容可能な添加剤及び／又は安定化剤は、高分子量種の形成を少なくとも2%、3%、4%、5%、10%、15%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、又は100%減少させる。いくつかの実施形態では、薬学的に許容可能な添加剤及び／又は安定化剤は、高分子量種の形成を少なくとも10%～100%、20%～80%、30%～70%、又は40%～60%減少させる。いくつかの実施形態では、薬学的に許容可能な添加剤及び／又は安定化剤は、高分子量種の形成を少なくとも50%減少させる。

20

30

40

【0137】

本開示のENPP1ポリペプチドは、ENPP1ヌクレアーゼ様ドメイン及びSMB様ドメイン内で協調された補因子を含む（例えば、Kato K. et al., Proc Natl Acad Sci USA, 2012; 109(42): 16876-81を参照）。ある特定の実施形態では、本開示の凍結乾燥されたポリペプチド製剤は、1つ以上のENPP1ポリペプチド補因子を含んでもよい。いくつかの実施形態では、ENPP1ポリペプチド補因子は、カルシウム、亜鉛、及び／又はアデノシンーリン酸を含む。いくつかの実施形態では、ENPP1ポリペプチド補因子は、CaCl₂、CaSO₄、ZnCl₂、ZnSO₄、及び／又はアデノシンーリン酸である。いくつかの実施形態では、ENPP1ポリペプチド補因子は、CaCl₂及び／又はアデノシンーリン酸である。

50

好ましい実施形態では、補因子 ENPP1 ポリペプチド補因子は、CaCl₂ である。いくつかの実施形態では、ENPP1 ポリペプチド補因子は、溶液中で再構成された場合、濃度が、1 mM ~ 10 mM、1 mM ~ 5 mM、又は 1 mM ~ 3 mM の範囲である。好ましい実施形態では、ENPP1 ポリペプチド補因子は、濃度が 2 mM の ± 1 mM 以内である。更に好ましい実施形態では、ENPP1 ポリペプチド補因子は、濃度が 2 mM である。

【0138】

いくつかの実施形態では、組成物及び製剤は、界面活性剤を含む。いくつかの実施形態では、界面活性剤は、ポリソルベート、ポロキサマー、トリトン、ドデシル硫酸ナトリウム、ラウレル硫酸ナトリウム、オクチルグリコシドナトリウム、ラウリルスルホベタイン、ミリスチルスルホベタイン、リノレイルスルホベタイン、ステアリルスルホベタイン、ラウリルサルコシン、ミリスチルサルコシン、リノレイルサルコシン、ステアリルサルコシン、リノレイルベタイン、ミリスチルベタイン、セチルベタイン、ラウロアミドプロピルベタイン、ココアミドプロピルベタイン、リノールアミドプロピルベタイン、ミリスタミドプロピルベタイン、パルミドプロピルベタイン、イソステアラミドプロピルベタイン、ミリスタミドプロピルジメチルアミン、パルミドプロピルジメチルアミン、イソステアラミドプロピルジメチルアミン、ココイルメチルタウリンナトリウム、オレイルメチルタウリンナトリウム、ジヒドロキシプロピルPEG-5 リノールアンモニウムクロリド、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、及びそれらの混合物を含む。界面活性剤は、例えば、限定されないが、ポリソルベート 20、ポリソルベート 21、ポリソルベート 40、ポリソルベート 60、ポリソルベート 61、ポリソルベート 65、ポリソルベート 80、ポリソルベート 81、ポリソルベート 85、ポリソルベート 188、PEG 3350、及びそれらの混合物であり得る。好ましい実施形態では、界面活性剤は、ポリソルベート 20 (PS 20)、ポリソルベート 80 (PS 80)、又はポリソルベート 188 (PS 188) である。好ましい実施形態では、界面活性剤は、ポリソルベート 20 (PS 20) である。

【0139】

界面活性剤の濃度は、パーセンテージ (w/v) として表されてもよい。凍結乾燥された製剤については、濃度 % (w/v) は、溶液中で再構成された場合の界面活性剤濃度を表す。界面活性剤の濃度は、概して、約 0.001 % (w/v) ~ 1 % (w/v) の範囲である。いくつかの実施形態では、界面活性剤の濃度は、0.01 % ~ 0.5 % (w/v)、0.015 % ~ 0.25 % (w/v)、0.02 % ~ 0.1 % (w/v) の範囲である。好ましい実施形態では、界面活性剤の濃度は、0.02 % ~ 0.1 % (w/v) の範囲である。

【0140】

本開示の凍結乾燥されたポリペプチド製剤は、経時的な安定性の増加を呈し得る。ある特定の実施形態では、本開示の凍結乾燥されたポリペプチド製剤は、-80 °C ~ 40 °C で長期安定性を呈する。いくつかの実施形態では、本製剤は、少なくとも 3、6、12、24、36、48、又は 60 か月の貯蔵寿命を有する。いくつかの実施形態では、再構成された製剤は、少なくとも 1、2、3、4、5、6、12、18、24、48、又は 60 時間の貯蔵寿命を有する。

【0141】

いくつかの実施形態では、再構成された製剤は、室温で少なくとも 8 時間、1 mg/ml ~ 50 mg/ml、2 mg/ml ~ 45 mg/ml、5 mg/ml ~ 40 mg/ml、10 ~ 30 mg/ml、15 ~ 20 mg/ml の範囲の濃度で安定である。いくつかの実施形態では、再構成された製剤は、5 °C で少なくとも 24 時間、1 mg/ml ~ 50 mg/ml、2 mg/ml ~ 45 mg/ml、5 mg/ml ~ 40 mg/ml、10 ~ 30 mg/ml、15 ~ 20 mg/ml の範囲の濃度で安定である。

【0142】

本明細書に開示の凍結乾燥されたポリペプチド製剤は、再構成形態で投与されてもよい。本明細書に開示の再構成された凍結乾燥されたポリペプチド製剤の投与経路としては、

吸入、経口、鼻腔、直腸、非経口、舌下、経皮、経粘膜（例えば、舌下、舌、（経）頬側、（経）尿道、膣（例えば、経膣及び膣周囲）、鼻腔内、（経）直腸、膀胱内、肺内、十二指腸内、胃内、髄腔内、皮下、筋肉内、皮内、動脈内、静脈内、気管支内、吸入（例えば、エアロゾル）、眼、呼吸器、及び局所投与が挙げられる。好ましい実施形態では、再構成された製剤は、非経口投与される。いくつかの実施形態では、再構成された製剤は、皮下注射、静脈内注射、皮内注射、筋肉内注射を介して投与される。いくつかの実施形態では、再構成された製剤は、自己投与される。いくつかの実施形態では、凍結乾燥された製剤は、治療有効用量を含む。いくつかの実施形態では、製剤は、1日数回、2日ごと、3日ごと、1週間ごと、又は1か月ごとに投与されるいくつかの実施形態では、製剤の第2の用量が、少なくとも2日後、4日後、1週間後、又は1か月後の好適な時間間隔の後で投与される。

10

【0143】

ある特定の実施形態では、本開示は、凍結乾燥されたポリペプチド製剤を含むキットを提供する。いくつかの実施形態では、キットは、使用前に滅菌注射溶液（又は滅菌水）中で再構成されてもよい凍結乾燥されたポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、キットは、1つ以上のバイアルを含む。いくつかの実施形態では、キットは、凍結乾燥されたポリペプチド製剤を含む1つ以上のバイアルを含む。いくつかの実施形態では、キットは、バイアル、再構成溶液、シリンジ、及び／又は事前充填シリンジを含む注射用装置を含む。いくつかの実施形態では、再構成溶液をバイアルに移すことで、凍結乾燥されたポリペプチドが滅菌注射溶液中で再構成される。いくつかの実施形態では、凍結乾燥されたポリペプチドは、滅菌注射溶液中で再構成される。いくつかの実施形態では、凍結乾燥されたポリペプチドは、使用前に滅菌注射溶液（又は滅菌水）中で再構成される。いくつかの実施形態では、注射用装置は、滅菌注射溶液を非経口投与するために使用される。いくつかの実施形態では、滅菌注射溶液は、皮下注射を介して投与される。いくつかの実施形態では、滅菌注射溶液は、皮内注射を介して投与される。いくつかの実施形態では、滅菌注射溶液は、筋肉内注射を介して投与される。いくつかの実施形態では、滅菌注射溶液は、自己投与される。いくつかの実施形態では、滅菌注射溶液は、治療有効用量を含む。

20

【0144】

本明細書に開示の凍結乾燥されたポリペプチド製剤は、本明細書に開示されるENPP1欠乏と関連付けられる疾患の進行を治療、逆転、又は防止する方法に使用され得る。いくつかの実施形態では、製剤は、後縦靱帯骨化症（OPLL）の進行を治療、逆転、又は防止することを、それを必要とする対象において行う方法で使用するためのものである。いくつかの実施形態では、製剤は、低リン酸血症性くる病の進行を治療、逆転、又は防止することを、それを必要とする対象において行う方法で使用するためのものである。いくつかの実施形態では、製剤は、ABC6欠乏（例えば、弾性線維性仮性黄色腫（PXE）など）の進行を治療、逆転、又は防止することを、それを必要とする対象において行う方法で使用するためのものである。いくつかの実施形態では、製剤は、加齢に伴う動脈硬化の進行を低減又は防止することを、それを必要とする対象において行う方法で使用するためのものである。いくつかの実施形態では、製剤は、血管動静におけるアテローム性動脈硬化プラークの石灰化の進行の治療、逆転、又は防止を、それを必要とする対象において行うことに使用するためのものである。いくつかの実施形態では、製剤は、変形性関節症の進行を治療、逆転、又は防止することを、それを必要とする対象において行う方法で使用するためのものである。いくつかの実施形態では、製剤は、早老症に起因する動脈硬化の進行を治療、逆転、又は防止することを、それを必要とする対象において行う方法で使用するためのものである。いくつかの実施形態では、製剤は、血管動静におけるアテローム性動脈硬化プラークの石灰化の進行の治療、逆転、又は防止を、それを必要とする対象において行う方法で使用するためのものである。いくつかの実施形態では、製剤は、早老症に起

30

40

50

因する動脈の硬化の進行を治療、逆転、又は防止することを、それを必要とする対象において行う方法で使用するためのものである。いくつかの実施形態では、製剤は、X連鎖低リン酸血症性くる病（X L H）、遺伝性低リン酸血症性くる病（H H R H）、低リン血症性骨疾患（H B D）、常染色体優性低リン血症性くる病（A D H R）、及び／又は及び常染色体劣性低リン血症性くる病の進行を治療、逆転、又は防止することを、それを必要とする対象において行う方法で使用するためのものである。いくつかの実施形態では、製剤は、加齢関連骨減少症の進行を治療、逆転、又は防止することを、それを必要とする対象において行う方法で使用するためのものである。いくつかの実施形態では、製剤は、強直性脊椎炎の進行を治療、逆転、又は防止することを、それを必要とする対象において行う方法で使用するためのものである。いくつかの実施形態では、製剤は、小児鎌状赤血球貧血における脳卒中の進行を治療、逆転、又は防止することを、必要とする対象において行う方法で使用するためのものである。

10

【0145】

本明細書に開示の製剤は、当該技術分野で周知の技法を使用して凍結乾燥される。凍結乾燥に関する更なる情報は、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)、米国特許第7,247,707号、同第7,087,723号、及び同第6,586,573号に見ることができる。

20

【0146】

3. ENPP1ポリペプチド

ある特定の態様では、本開示は、ENPP1ポリペプチドの凍結乾燥された製剤及びその使用に関する。本明細書に開示のENPP1ポリペプチドは、ENPP1ファミリーの自然発生ポリペプチド、及び生物学的活性を保持するその任意のバリエーション（変異体、断片、融合体、及び／又はペプチド模倣形態を含む）を含む。「ENPP1」又は「ENPP1ポリペプチド」という用語は、任意の種に由来する、エクトヌクレオチドピロホスファターゼ／ホスホジエステラーゼ1タンパク質（NPP1／ENPP1／PC-1）及びENPP1関連タンパク質を指す。ENPP1タンパク質は、ホモ二量体を形成するII型膜貫通糖タンパク質を含む。ENPP1タンパク質の各単量体は、原形質膜への標的化に関与する短い細胞内N末端ドメイン、膜貫通ドメイン、及び数個のドメインを含む大きい細胞外領域を含む。大きな細胞外領域は、SMB1及びSMB2ドメインを含み、これらは、ENPP1二量体化に関与することが報告されている（R. Gijssbers, H. et al., *Biochem. J.* 371; 2003: 321-330）。具体的には、SMBドメインは、8つのシステイン残基を含み、各々が4つのジスルフィド結合に配置され、共有結合シスチン間結合及び分子内結合を通じて、ENPP1ホモ二量体化を媒介することが示されている。タンパク質は、ヌクレオチド及びヌクレオチド糖のホスホジエステル結合、並びにヌクレオチド及びヌクレオチド糖のピロリン酸結合を含む、様々な基質を切断する。ENPP1タンパク質は、ヌクレオシド5'トリホスファターゼを、対応するモノホスフェートに加水分解し、またジアデノシンポリリン酸も加水分解するように機能する。ENPP1タンパク質は、心血管、神経学的、免疫学的、筋骨格、ホルモン、及び血液学的機能の調節に関与する、プリン作動性シグナル伝達における役割を果たす。ヒトENPP1前駆体タンパク質（NCBIアクセッションNP_006199）の例示的なアミノ酸配列が図1に示される（配列番号1）。ヒトENPP1前駆体タンパク質は、ENPP1 N末端に内在性ENPP1シグナルペプチド配列を含む。本明細書に説明される全てのENPP1関連ポリペプチドに対するアミノ酸の番号は、別段の指定がない限り、図1に提供されるヒトENPP1前駆体タンパク質配列の番号に基づく。ある特定の実施形態では、ENPP1前駆体タンパク質は、内在性又は異種のシグナルペプチ

30

40

50

ド配列を更に含む。タンパク質分解時に、シグナルペプチド配列は、ENPP1前駆体タンパク質から切断され、成熟ENPP1タンパク質を提供する。例えば、Jansen S, et al. J Cell Sci. 2005; 118 (Pt 14): 3081-9を参照されたい。本明細書で開示されるポリペプチドとともに使用され得る例示的なシグナルペプチド配列としては、これらに限定されないが、ENPP1シグナルペプチド配列、ENPP2シグナルペプチド配列、アズロジシンシグナル配列、ENPP7シグナルペプチド配列、及び／又はENPP5シグナルペプチド配列が挙げられる。処理された（成熟）細胞外ENPP1ポリペプチド配列を、図3に示す（配列番号2）。

【0147】

ENPP1は、脊椎動物の間で良好に保存されており、細胞外ドメインの大部分は、実質的に保存されていることが当該技術分野で概して知られている。例えば、図4A及び図4Bは、様々なENPP1オルソログと比較した、ヒトENPP1細胞外ドメインの多重整列を図示する。様々なヌクレオチド三リン酸（例えば、ATP、UTP、GTP、TTP、及びCTP）、pNP-TMP、3', 5'-cAMP、及び2'-3'-cGAMPに結合するENPP1もまた、高度に保存されている（例えば、Kato K. et al., Proc Natl Acad Sci USA. 2012; 109 (42): 16876-81及びMackenzie NC, et al. Bone. 2012; 51 (5): 961-8を参照されたい）。したがって、これらの整列から、正常なENPP1活性に重要である細胞外ドメインとの重要なアミノ酸位置を予測すること、及び正常なENPP1活性を顕著に改変することなく、置換に耐性がある可能性が高いアミノ酸位置を予測することが可能である。それゆえに、本開示の組成物による有用な活性のあるヒトENPP1ポリペプチドは、別の脊椎動物ENPP1の配列からの対応する位置に1つ以上のアミノ酸を含んでもよく、ヒト若しくは他の脊椎動物配列のものと類似の残基を含んでもよい。対応する位置における1つ以上のアミノ酸の置換は、ポリペプチド鎖の形状を改変するか、又は正常なENPP1活性を改変する可能性が低い保存的変形又は置換を含んでもよい。保存的変形、又は置換の例としては、別のものに対するイソロイシン、バリン、ロイシン、若しくはメチオニンなどの1つの疎水性残基の置換、又はリジンに対するアルギニン、アスパラギン酸に対するグルタミン、若しくはアスパラギンに対するグルタミンの置換などの、別のものに対する1つの極性残基の置換などが挙げられる。例えば、ENPP1ポリペプチドは、ENPP1ポリペプチドの配列と少なくとも約80%、好ましくは、少なくとも85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一性の配列を有する任意の既知のENPP1ポリペプチドの配列に由来するポリペプチドを含む。

【0148】

ENPP1タンパク質は、構造的及び生物学的特徴の点で、当該技術分野で特徴付けられてきた。ある特定の実施形態では、本明細書に開示の可溶性ENPP1タンパク質は、ピロホスファターゼ及び／又はホスホジエステラーゼ活性を含む。例えば、いくつかの実施形態では、ENPP1タンパク質は、ヌクレオチド三リン酸（例えば、ATP、UTP、GTP、TTP、及びCTP）、pNP-TMP、3', 5'-cAMP、及び2'-3'-cGAMPに結合し、ヌクレオチド三リン酸を無機ピロリン酸に変換する〔例えば、Kato K. et al., Proc Natl Acad Sci USA. 2012; 109 (42): 16876-81、Li L, et al. Nat Chem Biol. 2014; 10 (12): 1043-8、Jansen S, et al. Structure. 2012; 20 (11): 1948-59、及びOnyedibe KI, et al. Molecules. 2019; 24 (22) 参照〕。

【0149】

本明細書で使用される場合、「酵素的に活性」又は「生物学的に活性」という用語は、ピロホスファターゼ及び／又はホスホジエステラーゼ活性を呈する（例えば、ATPをAMP及びPPiに、並びに／又はAP3aをATPに結合及び／又は加水分解することができる）ENPP1ポリペプチドを指す。例えば、ENPP1タンパク質のピロホスファ

ターゼ／ホスホジエステラーゼドメインは、細胞外ヌクレオチド三リン酸を加水分解して、無機ピロリン酸（ PPi ）を生成し、概して、可溶性である。この活性は、以前に記載されたように pNP-TMP アッセイを使用して測定され得る（Saunders, et al., 2008, Mol. Cancer Ther. 7 (10): 3352-62、Albright, et al., 2015, Nat Comm. 6: 10006）。ある特定の実施形態では、可溶性 ENPP1 ポリペプチドは、約 $3.4 (\pm 0.4) \text{ s}^{-1}$ 酵素¹以上の基質 ATP に対する k_{cat} 値を有し、 k_{cat} は、ポリペプチドに対する ATP の加水分解速度を測定することによって決定される。ある特定の実施形態では、可溶性 ENPP1 ポリペプチドは、約 2 pM 以下の基質 ATP に対する K_{M} 値を有し、 K_{M} は、ポリペプチドに対する ATP の加水分解速度を測定することによって決定される。本明細書の教示に加えて、これらの参考文献は、1つ以上の生物学的活性を保持する可溶性 ENPP1 タンパク質を生成する方法（例えば、無機ピロリン酸へのヌクレオチドの変換）のための十分な指導を提供する。

10

【0150】

一実施形態では、本開示は、 ENPP1 ポリペプチドに関する。本明細書に記載されるように、可溶性 ENPP1 ポリペプチドという用語は、生物学的活性（例えば、酵素的活性）を保持する、 ENPP1 タンパク質の任意の自然発生細胞外ドメイン、及びその任意のバリエーション（変異体、断片、及びペプチド模倣形態を含む）を含む。可溶性 ENPP1 ポリペプチドの例としては、例えば、図3に示されるように、 ENPP1 細胞外ドメイン（配列番号2）が挙げられる。ある特定の実施形態では、可溶性 ENPP1 ポリペプチドは、 ENPP1 ポリペプチドの細胞外ドメインに加えてシグナル配列を更に含む。例示的なシグナル配列は、 ENPP1 ポリペプチドの天然シグナル配列、又は hENPP7 シグナル配列などの別のタンパク質からのシグナル配列を含む。バリエーション可溶性 ENPP1 ポリペプチドの例は、国際特許出願公開第2012/125182号、同第2014/126965号、同第2016/187408号、同第2018/027024号、及び同第2020/047520号に提供され、それらは、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

20

【0151】

いくつかの実施形態では、 ENPP1 ポリペプチドは、 ENPP1 ポリペプチドドメイン及び1つ以上の異種タンパク質部分（すなわち、 ENPP1 に対して異種のポリペプチドドメイン）を含む融合タンパク質である。アミノ酸配列は、配列番号1によって表される ENPP1 の形態において固有に見出されるものではない場合、 ENPP1 に対して異種であると理解される。いくつかの実施形態では、異種タンパク質部分は、免疫グロブリンの Fc ドメインを含む。いくつかの実施形態では、免疫グロブリンの Fc ドメインは、 IgG1 免疫グロブリンの Fc ドメインである。ある特定の実施形態では、可溶性 ENPP1 ポリペプチドは、ヒト免疫グロブリン1（ IgG1 ）、ヒト免疫グロブリン2（ IgG2 ）、ヒト免疫グロブリン3（ IgG3 ）、及び／又はヒト免疫グロブリン4（ IgG4 ）の Fc ドメインに C 末端融合される。他の実施形態では、可溶性 ENPP1 ポリペプチドは、ヒト免疫グロブリン1（ IgG1 ）、ヒト免疫グロブリン2（ IgG2 ）、ヒト免疫グロブリン3（ IgG3 ）、及び／又はヒト免疫グロブリン4（ IgG4 ）の Fc ドメインに N 末端融合される。いくつかの実施形態では、 Fc ドメインの存在は、半減期、可溶性を改善し、免疫原性を低減し、可溶性 ENPP1 ポリペプチドの活性を増加させる。ある特定の実施形態では、天然ヒト IgG タンパク質（ IgG1 、 IgG2 、 IgG3 、及び IgG4 ）の部分が、 Fc 部分（例えば、 ENPP1-Fc ）の代わりに使用されてもよい。例えば、本開示は、ヒト IgG1 、 IgG2 、 IgG3 、及び／又は IgG4 に由来する CH1 、 CH2 、又は CH3 ドメインなどの、免疫グロブリンの定常ドメインを含むポリペプチドに融合された ENPP1 を含む融合タンパク質を提供する。 Fc 断片は、ヒンジ領域（ Rabata ナンバリングシステムによる、ヒト IgG1 の残基216～230）などの天然 IgG の領域、第2の定常ドメイン CH2 （残基231～340）全体、及び第3の定常ドメイン CH3 （残基341～447）を含んでもよい。

30

40

50

【0152】

本明細書で使用される場合、「ENPP1-Fc構築物」という用語は、IgG分子（好ましくは、ヒトIgG）のFcR結合ドメインに、組換え融合及び／又は化学的にコンジュゲートされた（共有結合及び非共有結合の両方を含む）ENPP1の可溶形態（例えば、ENPP1の細胞外ドメイン）を指す。ある特定の実施形態では、ENPP1のC末端は、FcR結合ドメインのN末端に融合又はコンジュゲートされる。

【0153】

ヒトIgG1（G1Fc）のFc部分に使用され得るアミノ酸配列の例は、配列番号12（表2）である。部分的に、本開示は、配列番号12と70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%の同一性を有するアミノ酸配列を含む、それから本質的になる、又はそれからなるポリペプチドを提供する。

【0154】

いくつかの実施形態では、異種タンパク質部分は、ポリヒスチジン、FLAGタグ、Glu-Glu、グルタチオンS-トランスフェラーゼ（GST）、チオレドキシン、タンパク質A、タンパク質G、免疫グロブリン重鎖定常領域（Fc）、マルトース結合タンパク質（MBP）、又はヒト血清アルブミンからなる群から選択される1つ以上のドメインを含む。融合ドメインは、所望の特性を付与するように選択されてもよい。例えば、いくつかの融合ドメインが、アフィニティークロマトグラフィーによる融合タンパク質の単離に特に有用である。親和性精製の目的で、グルタチオン、アミラーゼ、及びニッケル又はコバルトコンジュゲート化樹脂などの、アフィニティークロマトグラフィーのための関連基質が使用される。そのような基質の多くは、Pharmacia GST精製システム及び（HIS6）融合パートナーと有用なQIAexpress（商標）システム（QIAGEN）などの、「キット」形態で利用可能である。別の例として、融合ドメインは、ENPP1ポリペプチドの検出を容易にするために選択され得る。そのような検出ドメインの例としては、様々な蛍光タンパク質（例えば、GFP）、及び特異的抗体が利用可能である、通常短いペプチド配列である「エピトープタグ」が挙げられる。特定のモノクローナル抗体が容易に入手可能である周知のエピトープタグとしては、FLAG、インフルエンザウイルスヘマグルチニン（HA）、及びc-mycタグが挙げられる。いくつかの場合、融合ドメインは、例えば、第Xa因子又はトロンビンなどのプロテアーゼ切断部位を有し、これは、関連プロテアーゼが、融合タンパク質を部分的に消化し、それにより、そこから組換えタンパク質を遊離させることを可能にする。次いで、遊離されたタンパク質は、後続のクロマトグラフィー分離によって融合ドメインから単離され得る。

【0155】

いくつかの実施形態では、ENPP1融合タンパク質は、ENPP1ポリペプチドドメインと1つ以上の異種タンパク質部分（例えば、Fc免疫グロブリンドメイン）との間に位置付けられたリンカーを更に含む。ある特定の実施形態では、可溶性ENPP1ポリペプチドは、Fcドメインに直接的又は間接的に融合される。いくつかの実施形態では、可溶性ENPP1融合タンパク質は、FcドメインとENPP1ポリペプチドとの間のリンカーを含む。いくつかの実施形態では、リンカーは、1～200個のアミノ酸を含むアミノ酸スペーサーであってもよい。好適なペプチドスペーサーは、当該技術分野で既知であり、例えば、グリシン、アラニン、及びセリンなどの柔軟なアミノ酸残基を含むペプチドリンカーを含む。いくつかの実施形態では、リンカーは、ポリグリシンリンカー又はGly-Serリンカーを含む。いくつかの実施形態では、スペーサーは、GGGA（配列番号21）、GGGS（配列番号22）、GGGG（配列番号23）、GGGGA（配列番号24）、GGGGS（配列番号25）、GGGGG（配列番号26）、GGAG（配列番号27）、GGSG（配列番号28）、AGGG（配列番号29）、SGGGG（配列番号30）、SGGG（配列番号31）、GA（配列番号103）、GS（配列番号104）、GG（配列番号105）、GGA（配列番号106）、GGS（配列番号107）、又はGGG（配列番号108）のモチーフ、例えば、複数の又は反復するモチーフを含

20

30

50

かの実施形態では、スペーサーは、Xがいずれのアミノ酸（例えば、A、K、又はE）であってもよく、nが1～5である（XP）n、及びPAPAP（配列番号102）などの、プロリンリッチ配列のモチーフ、例えば、複数の又は反復するモチーフを含み得る。

配列番号3－ENPP2シグナル配列

【数1】

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

10

配列番号7－アズロシジシグナル配列

【数2】

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

配列番号16－ENPP7シグナル配列

【数3】

```
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
```

20

配列番号17－ENPP7シグナル配列

【数4】

```
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
```

30

配列番号18－ENPP5シグナル配列

【数5】

```
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
```

配列番号19－ENPP121GLKシグナル配列

【数6】

40

50

```

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

```

10

配列番号 20 - ENPP121 シグナル配列

【数 7】

```

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

```

20

【0157】

ペプチドスペーサーの長さ及び使用されるアミノ酸は、関与する2つのタンパク質、及び最終タンパク質融合ポリペプチドにおいて望ましい柔軟性の程度に応じて調整され得る。スペーサーの長さは、適切なタンパク質フォールディングを確保し、凝集体形成を回避するように調整され得る。

30

【0158】

いくつかの実施形態では、融合タンパク質（例えば、免疫グロブリンFc融合タンパク質）の異なる要素が、所望の機能性と一致する任意の様式で配置され得る。例えば、可溶性ENPP1ポリペプチドドメインが、異種タンパク質部分に対してC末端に配置され得るか、又は代替的に、異種タンパク質部分が、可溶性ENPP1ポリペプチドドメインに対してC末端に配置され得る。可溶性ENPP1ポリペプチドドメイン及び異種タンパク質部分が、融合タンパク質において直接的又は間接的に結合され得、追加のドメイン又はアミノ酸配列が、いずれかのドメイン又はドメイン間のC又はN末端に含まれ得る。好ましい融合タンパク質は、配列番号9～11のうちのいずれか1つに示されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、ENPP1融合ポリペプチドは、配列番号9からなるか、又はそれを含む。いくつかの実施形態では、ENPP1融合ポリペプチドは、配列番号10からなるか、又はそれを含む。いくつかの実施形態では、ENPP1融合ポリペプチドは、配列番号11からなるか、又はそれを含む。

40

【0159】

いくつかの実施形態では、本開示の可溶性ENPP1ポリペプチドは、1つ以上の異種部分を含む。任意選択的に、可溶性ENPP1ポリペプチドは、グリコシル化アミノ酸、PEG化アミノ酸、ファメシル化アミノ酸、アセチル化アミノ酸、ビオチン化アミノ酸、脂質部分にコンジュゲートされたアミノ酸、及び有機誘導体化剤にコンジュゲートされたアミノ酸から選択される1つ以上の異種部分を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に開示の可溶性ENPP1ポリペプチドは、更に修飾される。そのような修飾としては、

50

アセチル化、カルボキシル化、グリコシル化、リン酸化、脂質化、及びアシル化が挙げられるが、これらに限定されない。結果として、可溶性ENPP1ポリペプチドは、ポリエチレングリコール、脂質、多糖類又は単糖類、及びリン酸塩などの、非アミノ酸要素を含んでもよい。可溶性ENPP1ポリペプチドの機能性に対するそのような非アミノ酸要素の効果は、他の可溶性ENPP1ポリペプチドに関して本明細書に説明されるように試験されてもよい。本開示のポリペプチドが、ポリペプチドの新生形態を切断することによって細胞内で生成される場合には、翻訳後処理も、タンパク質の正しいフォールディング及び／又は機能にとって重要となり得る。異なる細胞（例えば、CHO、HeLa、MDCK、293、WI38、NIH-3T3、又はHEK293）が、そのような翻訳後活性に対する特定の細胞機構及び特徴的な機構を有し、可溶性ENPP1ポリペプチドの正しい修飾及び処理を確保するように選択されてもよい。

10

【0160】

本明細書で使用される場合、ポリペプチド配列と参照配列との間の「同一性」パーセントは、最大の配列同一性パーセントを達成するために、必要に応じて配列を整列させてギャップを導入した後、参照配列中のアミノ酸残基と同一であるポリペプチド配列中のアミノ酸残基のパーセンテージとして定義される。アミノ酸配列同一性パーセントを決定する目的のための整列は、例えば、BLAST、BLAST-2、ALIGN、MEALIGN（DNASTAR）、CLUSTALW、又はCLUSTAL OMEGAソフトウェアなどの公開されているコンピュータソフトウェアを使用して、当該技術分野の技術内である様々な方式で達成され得る。いくつかの実施形態では、整列は、CLUSTAL OMEGAソフトウェアを使用して実施される。当業者であれば、比較される配列の全長にわたって最大整列を達成するために必要な任意のアルゴリズムを含む、配列を整列するための適切なパラメータを決定することができる。

20

【0161】

いくつかの実施形態では、可溶性ENPP1ポリペプチドの活性はまた、細胞ベース又はインビボアッセイで試験されてもよい。例えば、無機ピロリン酸（PPi）の産生に対する可溶性ENPP1ポリペプチドの効果を測定することができる。具体的には、ENPP1タンパク質のピロホスファターゼ／ホスホジエステラーゼドメインは、細胞外ヌクレオチド三リン酸を加水分解して、無機ピロリン酸（PPi）を生成し、概して、可溶性である。この活性は、以前に記載されるように、pNP-TMPアッセイ、及びHPLCベースATP加水分解アッセイを使用して測定することができる（Saunders, et al., 2008, Mol. Cancer Ther. 7 (10): 3352-62, Albright, et al., 2015, Nat Comm. 6: 10006）。ARHR2（例えば、骨芽細胞及び破骨細胞における線維芽細胞成長因子23の転写）などのENPP1関連疾患に關与する遺伝子の発現に対する可溶性ENPP1ポリペプチドの効果を評価することができる。これは、必要に応じて、1つ以上のヌクレオチド三リン酸、又は他のENPP1基質の存在下で実施されてもよく、細胞は、可溶性ENPP1ポリペプチドを産生するようにトランスフェクトされてもよい。同様に、可溶性ENPP1ポリペプチドは、マウス又は他の動物に投与されてもよく、ENPP1関連疾患に対する効果が、当該技術分野で認識された方法を使用して評価されてもよい。

30

40

【0162】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法に従って使用されるENPP1ポリペプチドは、単離されたポリペプチドである。本明細書で使用される場合、単離されたタンパク質又はポリペプチドは、その自然環境の構成要素から分離されたものである。いくつかの実施形態では、本開示のポリペプチドは、例えば、電気泳動（例えば、SDS-PAGE、等電点電気泳動（IEF）、キャピラリー電気泳動）又はクロマトグラフィー（例えば、イオン交換又は逆相HPLC）分析によって決定される際に、95%、96%、97%、98%、又は99%を超える純度に精製される。純度の評価のための方法は、当該技術分野で周知である〔例えば、Flatman et al., (2007) J. Chromatogr. B 848: 79-87を参照〕。いくつかの実施形態では、本明細

50

書に記載の方法に従って使用される可溶性ENPP1ポリペプチドは、組換えポリペプチドである。

【0163】

本開示のENPP1ポリペプチドは、様々な当該技術分野で既知の技術によって產生され得る。例えば、本開示のポリペプチドは、Bodansky, M. *Principles of Peptide Synthesis*, Springer Verlag, Berlin (1993) 及び Grant G. A. (ed.), *Synthetic Peptides: A User's Guide*, W. H. Freeman and Company, New York (1992) に記載されているものなどの、標準タンパク質化学技術を使用して合成することができる。加えて、自動ペプチド合成装置が市販されている（例えば、Advanced ChemTech Model 396; Milligen/Biosearch 9600）。あるいは、その断片及び／又はバリエーションを含む、本開示のポリペプチドは、当該技術分野で周知であるように、様々な発現系〔例えば、*E. coli*、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、COS細胞、バキュロウイルス、酵母 *Pichia*〕を使用して組換えで產生されてもよい。タンパク質は、接着又は懸濁細胞のいずれかで產生され得る。いくつかの実施形態では、融合タンパク質は、CHO細胞で発現される。安定した細胞株を確立するために、ENPP1構築物をコードする核酸配列は、大規模なタンパク質生産のための適切なベクターにクローニングされる。更なる実施形態では、本開示の修飾又は非修飾ポリペプチドは、例えば、プロテアーゼ、例えば、トリプシン、サーモリシン、キモトリプシン、ペプシン、又は対の塩基性アミノ酸変換酵素（PACE）を使用することによる、組換えで產生された全長ENPP1ポリペプチドの消化によって產生されてもよい。コンピュータ分析（市販のソフトウェア、例えば、MacVector、Omega、PCGene、Molecular Simulation, Inc. を使用する）が、タンパク質切断部位を識別するために使用され得る。あるいは、そのようなポリペプチドは、化学切断（例えば、シアノゲンブロミド、ヒドロキシルアミンなど）を使用して、組換えで生成された全長ENPP1ポリペプチドから產生されてもよい。

10

20

【0164】

細菌（例えば、*E. coli* 及び *Bacillus subtilis*）、酵母（例えば、*Saccharomyces cerevisiae*、*Kluyveromyces lactis*、及び *Pichia pastoris*）、糸状菌（例えば、*Aspergillus*）、植物細胞、動物細胞、及び昆虫細胞を含む、多くの発現系が既知であり、ENPP1融合タンパク質の生産に使用され得る。所望のタンパク質は、従来の方式で、例えば、宿主染色体又は遊離プラスミドに挿入されたコード配列から產生され得る。

30

【0165】

酵母は、通常の方法（例えば、エレクトロポレーション）のうちのいずれかで、所望のタンパク質のコード配列を用いて形質転換され得る。エレクトロポレーションによる酵母の形質転換のための方法は、Becker & Guarente, 1990, *Methods Enzymol.* 194:182に開示されている。正常に形質転換された細胞、すなわち、本開示のDNA構築物を含む細胞は、周知の技術によって特定することができる。例えば、発現構築物の導入から結果的に得られる細胞を、ENPP1ポリペプチドを産生するように成長させることができる。細胞を採取し、溶解させ、それらのDNA含有量を、Southern, 1975, *J. Mol. Biol.*, 98:503 及び／又は Berent, et al., 1985, *Biotech* 3:208によって説明される方法などの方法を使用して、DNAの存在について調べることができる。あるいは、上清中のタンパク質の存在は、抗体を使用して検出することができる。

40

【0166】

有用な酵母プラスミドベクターとしては、pRS403-406及びpRS413-416が挙げられ、概して *Stratagene Cloning Systems* (La Jolla, CA, USA) から入手可能であり、プラスミドpRS403、pRS40

50

4、pRS405、及びpRS406は、Yeast Integratingプラスミド（Yips）であり、酵母を選択可能なマーカーI-11S3、TRP1、LEU2、及び1JRA3を組み込むものである。プラスミドpRS413-416は、Yeast Centromereプラスミド（YCps）である。

【0167】

相補的凝集末端を介してDNAをベクターに作動可能に結合する様々な方法が開発されている。例えば、相補的なホモポリマーラクトを、ベクターDNAに挿入されるDNAセグメントに加えることができる。次いで、ベクター及びDNAセグメントは、相補的なホモポリマーテール間の水素結合によって結合され、組換えDNA分子を形成する。

【0168】

1つ以上の制限部位を含む合成リンカーは、DNAセグメントをベクターに結合する代替的な方法を提供する。エンドヌクレアーゼ制限消化によって生成されるDNAセグメントは、バクテリオファージT4 DNAポリメラーゼ又はE. coli DNAポリメラーゼIで処理され、これらの酵素は、3'-5'-核酸分解活性によって、突出する3'-一本鎖末端を除去し、それらの重合活性によって、陥凹3'-末端に埋め合わせをする酵素である。

【0169】

したがって、これらの活性の組み合わせは、平滑末端DNAセグメントを生成する。次いで、平滑末端セグメントを、バクテリオファージT4 DNAリガーゼなどの平滑末端DNA分子のライゲーションを触媒することができる酵素の存在下で、大きいモル過剰のリンカー分子とインキュベートする。結果として、反応の産物は、それらの末端にポリマーリンカー配列を担持するDNAセグメントである。これらのDNAセグメントは、適切な制限酵素で切断し、DNAセグメントのものと適合する末端を産生する酵素で切断された発現ベクターにライゲーションすることができる。

【0170】

次いで、単一の安定的にトランスフェクトされた細胞のクローンを確立し、所望のENPP1融合タンパク質の高発現クローンについてスクリーニングする。ENPP1タンパク質発現のための単一細胞クローンのスクリーニングは、以前に記載される合成酵素基質pNP-TMPを使用して、96ウェルプレートでハイスループット様式で達成することができる（Albright, et al., 2015, Nat Commun. 6:10006）。スクリーニングを通じた高発現クローンの特定時、タンパク質産生が、Albright, et al., 2015, Nat. Commun. 6:10006に以前に記載されている振盪フラスコ又はバイオリアクターにおいて達成することができる。

【0171】

ENPP1の精製は、当該技術分野で既知の標準的な精製技術の組み合わせを使用して達成することができる。精製後、ENPP1-Fcを、5~7mg/mlに濃縮されたZn²⁺及びMg²⁺（PBSPlus）を補充したPBSに透析し、-80℃で200~500pLのアリコート中で凍結させることができる。アリコートは、使用直前に解凍することができる。溶液の比活性は、PBSPlus中で希釈することによって31.25au/ml（又は調製物に応じて約0.7mg/ml）に調整することができる。

【0172】

4. 例示的な使用

ある特定の態様では、本開示は、病的石灰化の進行を低減及び／又は防止することを、それを必要としている対象において行うためのある特定の可溶性ENPP1ポリペプチド（例えば、及びその融合タンパク質）の使用に関し、本方法には、治療有効量の本明細書に開示のポリペプチド融合及び／又は可溶性ポリペプチド（例えば、配列番号2、9、10、及び11）を対象に投与することが含まれる。ある特定の実施形態では、病的石灰化は、特発性乳児動脈石灰化（IEAC）及びアテローム性動脈硬化プラークの石灰化からなる群から選択される。ある特定の実施形態では、病的骨化は、後縦靱帯骨化症（OPLL）、低リン血症性くる病、及び変形性関節炎からなる群から選択される。

【0173】

いくつかの実施形態では、本開示は、病的骨化の進行を低減及び／又は防止することを、それを必要としている対象において行う方法を企図し、本方法には、治療有効量の本明細書に開示の可溶性ENPP1ポリペプチド及び／又はENPP1融合ポリペプチド（例えば、配列番号2、9、10、及び11）を対象に投与することが含まれる。

【0174】

いくつかの実施形態では、本開示は、血管石灰化の低減、改善、又は防止を含む、軟部組織の異所性石灰化の進行を低減又は防止することを、それを必要とする対象において行う方法を企図し、本方法には、治療有効量の本明細書に開示の可溶性ENPP1ポリペプチド又はENPP1融合ポリペプチドを対象に投与することが含まれる。

10

【0175】

いくつかの実施形態では、本開示は、ENPP1欠乏によって引き起こされる疾患（例えば、GACI及びARHR2）の進行を低減又は防止する方法を企図する。ENPP1欠乏は、必要としている対象における低減したレベルのENPP1活性及び又はENPP1レベルの発現の欠乏（健常な対象におけるそれぞれENPP1活性レベル又はENPP1発現レベルのものと比較して）によって特徴付けられ、本方法には、治療有効量の本明細書に開示の可溶性ENPP1ポリペプチド又はENPP1融合タンパク質（例えば、配列番号2、9、10、及び11）を対象に投与することが含まれる。いくつかの実施形態では、ENPP1欠乏は、GACIである。いくつかの実施形態では、ENPP1欠乏は、ARHR2である。

20

【0176】

いくつかの実施形態では、本開示は、より低いレベルの血漿PPiによって引き起こされる疾患の進行を低減又は防止することを、それを必要とする対象において行う方法を企図し、本方法には、治療有効量の本明細書に開示のポリペプチドを対象に投与して、対象の血漿PPiを正常レベル又は正常レベル超（30～50%より高い）に増加させた後、血漿PPiをその後も一定の正常レベル又は正常レベル超に維持することが含まれる。血漿pp iの正常レベルは、2～5 μ Mに対応し、いくつかの実施形態では、正常レベルは、2～3 μ Mである。（Bernhard et al., A Reference range for Plasma levels of Inorganic Pyrophosphate in Children using the ATP Sulfurylase method, Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2021）本方法には、対象の血漿PPiを一定の正常レベル又は正常レベル超に維持して、病的石灰化又は骨化の進行を低減又は防止するために、2日、3日、1週間、又は1か月の間隔で追加の治療有効量を投与することが更に含まれる。ある特定の実施形態では、本明細書に開示の可溶性ENPP1ポリペプチド又はENPP1融合ポリペプチドは、正常レベルよりも低いピロリン酸（PPi）レベルを有する対象においてPPiレベルを上昇させるために使用することができる。他の実施形態では、本明細書に開示の可溶性ENPP1ポリペプチド又はENPP1融合ポリペプチドは、正常レベルよりも低いPPiレベルを有する対象において、病的石灰化又は骨化の進行を低減又は防止するために使用することができる。いくつかの実施形態では、本明細書に開示の可溶性ENPP1ポリペプチド又はENPP1融合ポリペプチドは、対象における細胞外PPi濃度の低減によって現れるENPP1欠乏（例えば、GACI及びARHR2）を治療するために使用することができる。ある特定の実施形態では、第1の用量の本明細書に開示の可溶性ENPP1ポリペプチド又はENPP1融合ポリペプチドの投与後に達成される血漿PPiの定常状態レベルは、少なくとも2日、少なくとも4日、少なくとも1週間、又は少なくとも1か月の期間にわたって維持される。

30

40

【0177】

いくつかの実施形態では、本開示は、正常レベルよりも低い血漿PPiによって引き起こされる疾患の進行を低減又は防止することを、それを必要とする対象において行う方法を企図し、本方法には、治療有効量の本明細書に開示の可溶性ENPP1ポリペプチド又

50

は E N P P 1 融合ポリペプチド（例えば、配列番号 2、9、10、及び 11）を対象に投与して、対象の血漿 P P i を正常 P P i レベルの約 90%、95%、100%、105%、110%、120%、130%、140%、又は 150% であるレベルに増加させる及び／又は維持することが含まれる。ある特定の実施形態では、本方法には、血漿 P P i レベルを正常な P P i レベルの約 90%、95%、100%、105%、110%、120%、130%、140%、又は 150% であるレベルに維持するために、本明細書に開示のポリペプチドを、2 日、3 日、1 週間、又は 1 か月ごとに更に投与し、それにより、病的石灰化又は骨化の進行を防止することが含まれる。

【0178】

ある特定の実施形態では、第 2 の用量の本明細書に開示の可溶性 E N P P 1 ポリペプチド又は E N P P 1 融合ポリペプチドは、血漿 P P i の定常状態レベルが一定又は定常状態レベルで維持され、かつ対象が第 1 の用量の本明細書に開示される構築物の投与前に有していたより低いレベルの P P i に戻らないように、約 2 日後、約 4 日後、約 1 週間後、又は約 1 か月後の好適な時間間隔の後で対象に投与される。

【0179】

理論に縛られることを意図せず、正常なレベルで定常状態の血漿 P P i 濃度を維持することは、対象の病的石灰化及び病的骨化の進行を低減及び／又は防止すると考えられる。

【0180】

いくつかの実施形態では、本開示は、後縦靱帯骨化症（O P L L）の進行を治療、逆転、又は防止することを、それを必要とする対象において行う方法を企図し、本方法には、治療有効量の本明細書に開示の可溶性 E N P P 1 ポリペプチド又は E N P P 1 融合ポリペプチド（例えば、配列番号 2、9、10、及び 11）を対象に投与することが含まれる。

【0181】

いくつかの実施形態では、本開示は、低リン血症性くる病の進行を治療、逆転、又は防止することを、それを必要とする対象において行う方法を企図し、本方法には、治療有効量の本明細書に開示の可溶性 E N P P 1 ポリペプチド又は E N P P 1 融合ポリペプチド（例えば、配列番号 2、9、10、及び 11）を対象に投与することが含まれる。

【0182】

いくつかの実施形態では、本開示の可溶性 E N P P 1 ポリペプチドは、異所性石灰化（例えば、軟部組織石灰化、動脈石灰化、及び血管石灰化）、慢性腎臓疾患（C K D）、末期腎疾患（E S R D）、尿毒症性細小動脈石灰化（C U A）、カルシフィラキシス、後縦靱帯骨化症（O P L L）、低リン血症性くる病、変形性関節炎、加齢に伴う動脈の硬化、特発性乳児動脈石灰化（I I A C）、アテローム性動脈硬化プラークの石灰化、E N P P 1 欠乏 [例えば、常染色体劣性低リン血症性くる病 2 型（A R H R 2）及び乳児全身性動脈石灰化（G A C I）]、A B C C 6 遺伝子 [（例えば、A B C C 6 欠乏）、弾性線維性仮性黄色腫（P X E）など] における病原性変異と関連付けられる障害、並びに病的骨化などの、ヒト又は動物の障害又は状態を治療する。E N P P 1 ポリペプチドの例としては、ヒト E N P P 1 前駆体ポリペプチド（例えば、配列番号 1）、及び／又は可溶性ヒト E N P P 1 ポリペプチド（例えば、配列番号 2、9、10、及び 11）が挙げられる。

【0183】

他の実施形態では、軟部組織は、アテローム性動脈硬化プラークを含む。いくつかの実施形態では、軟部組織は、筋性動脈を含む。いくつかの実施形態では、軟部組織は、関節及び脊椎からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、関節は、手の関節及び足の関節からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、軟部組織は、関節軟骨及び脊椎板軟骨からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、軟部組織は、血管を含む。いくつかの実施形態では、軟部組織は、結合組織を含む。

【0184】

いくつかの実施形態では、本開示は、弾性線維性仮性黄色腫（P X E）の進行を治療、逆転、又は防止することを、それを必要とする対象において行う方法を企図し、本方法には、治療有効量の本明細書に開示の可溶性 E N P P 1 ポリペプチド又は E N P P 1 融合ポ

10

20

30

40

50

リペプチド（例えば、配列番号 2、9、10、及び 11）を対象に投与することが含まれる。

【0185】

いくつかの実施形態では、本開示は、加齢に伴う動脈の硬化の進行を低減又は防止することを、それを必要とする対象において行う方法を企図し、本方法には、治療有効量の本明細書に開示の可溶性 ENPP1 ポリペプチド又は ENPP1 融合ポリペプチド（例えば、配列番号 2、9、10、及び 11）を対象に投与することが含まれる。

【0186】

いくつかの実施形態では、本開示は、血管動脈におけるアテローム性動脈硬化プラークの石灰化の進行を治療、逆転、又は防止することを、それを必要とする対象において行う方法を企図し、本方法には、治療有効量の本明細書に開示の可溶性 ENPP1 ポリペプチド又は ENPP1 融合ポリペプチド（例えば、配列番号 2、9、10、及び 11）を対象に投与することが含まれる。

10

【0187】

いくつかの実施形態では、本開示は、変形性関節炎の進行を治療、逆転、又は防止することを、それを必要とする対象において行う方法を企図し、本方法には、治療有効量の本明細書に開示の可溶性 ENPP1 ポリペプチド又は ENPP1 融合ポリペプチド（例えば、配列番号 2、9、10、及び 11）を対象に投与することが含まれる。

【0188】

いくつかの実施形態では、本開示は、早老症に起因する動脈の硬化の進行を治療、逆転、又は防止することを、それを必要とする対象において行う方法を企図し、本方法には、治療有効量の本明細書に開示の可溶性 ENPP1 ポリペプチド又は ENPP1 融合ポリペプチド（例えば、配列番号 2、9、10、及び 11）を対象に投与することが含まれる。

20

【0189】

いくつかの実施形態では、本開示は、X連鎖性低リン血症性くる病（XLH）、遺伝性低リン血症性くる病（HHRH）、低リン血症性骨疾患（HBD）、後縦靱帯骨化症（OPLL）、常染色体優性低リン血症性くる病（ADHR）、及び／又は及び常染色体劣性低リン血症性くる病（ARHR2）の進行を治療、逆転、又は防止することを、それを必要とする対象において行う方法を企図し、本方法には、治療有効量の本明細書に開示の可溶性 ENPP1 ポリペプチド又は ENPP1 融合ポリペプチド（例えば、配列番号 2、9、10、及び 11）を対象に投与することが含まれる。

30

【0190】

いくつかの実施形態では、本開示は、加齢に伴う骨減少の進行を治療、逆転、又は防止することを、それを必要とする対象において行う方法を企図し、本方法には、治療有効量の本明細書に開示の可溶性 ENPP1 ポリペプチド又は ENPP1 融合ポリペプチド（例えば、配列番号 2、9、10、及び 11）を対象に投与することが含まれる。

【0191】

いくつかの実施形態では、本開示は、強直性脊椎炎の進行を治療、逆転、又は防止することを、それを必要とする対象において行う方法を企図し、本方法には、治療有効量の本明細書に開示の可溶性 ENPP1 ポリペプチド又は ENPP1 融合ポリペプチド（例えば、配列番号 2、9、10、及び 11）を対象に投与することが含まれる。

40

【0192】

いくつかの実施形態では、本開示は、小児鎌状赤血球症における脳卒中の進行を治療、逆転、又は防止することを、それを必要とする対象において行う方法を企図し、本方法には、治療有効量の本明細書に開示の可溶性 ENPP1 ポリペプチド又は ENPP1 融合ポリペプチド（例えば、配列番号 2、9、10、及び 11）を対象に投与することが含まれる。

【0193】

ある特定の実施形態では、本開示は、早老症と診断された対象における疾患の進行を治療、逆転、又は防止する方法を企図し、本方法には、治療有効量の本明細書に開示の可溶

50

性 E N P P 1 ポリペプチド又は E N P P 1 融合ポリペプチド（例えば、配列番号 2、9、10、及び 11）を対象に投与することが含まれる。

【0194】

ある特定の実施形態では、ポリペプチドは、哺乳動物細胞中に発現される E N P P 1 前駆体タンパク質の分泌された産物である。他の実施形態では、E N P P 1 前駆体タンパク質は、シグナルペプチド配列及び E N P P 1 ポリペプチドを含み、E N P P 1 前駆体タンパク質は、本明細書に開示のポリペプチドへのタンパク質分解処理を受ける。いくつかの実施形態では、E N P P 1 前駆体タンパク質において、シグナルペプチド配列は、E N P P 1 ポリペプチド N 末端にコンジュゲートされる。タンパク質分解時に、シグナル配列は、E N P P 1 前駆体タンパク質から切断されて、E N P P 1 ポリペプチドを提供する。ある特定の実施形態では、シグナルペプチド配列は、E N P P 1 シグナルペプチド配列、E N P P 2 シグナルペプチド配列、E N P P 7 シグナルペプチド配列、及び E N P P 5 シグナルペプチド配列からなる群から選択される。

10

【0195】

ある特定の実施形態では、ポリペプチドは、対象に急性的又は慢性的に投与される。他の実施形態では、ポリペプチドは、局所的に、領域的に、非経口的に、又は全身的に対象に投与される。

【0196】

ある特定の実施形態では、対象は、哺乳動物である。他の実施形態では、哺乳動物は、ヒトである。

20

【0197】

当業者であれば、本明細書に詳述される方法を含む本開示をもってすると、本開示が、確立された後の疾患又は障害の治療に限定されないことを理解する。特に、疾患又は障害の症状は、対象に害を与えるほど現れている必要はなく、実際、疾患又は障害は、治療が行われる前に対象において検出される必要はない。すなわち、疾患又は障害からの顕著な病理は、本発明の E N P P 1 ポリペプチドが利益を提供し得る前に発生する必要はない。

【0198】

ある特定の態様では、本開示は、本明細書に開示の可溶性 E N P P 1 ポリペプチド又は E N P P 1 融合ポリペプチドが、疾患又は障害の発症前に対象に投与され、それにより、疾患又は障害が発症することを防止し得るという点で、対象において疾患及び障害を防止するための方法に関する。したがって、本開示は、対象において疾患又は障害の発症を防止若しくは遅延させるか、又はその進行若しくは成長を低減する方法に関し、本方法には、疾患又は障害の検出前に、E N P P 1 ポリペプチドを対象に投与することが含まれる。ある特定の実施形態では、E N P P 1 ポリペプチドは、疾患又は障害の強い家族歴を有する対象に投与され、それにより、疾患又は障害の発症又は進行を防止又は遅延する。

30

【0199】

本明細書の開示をもって、当業者であれば、したがって、対象の疾患又は障害の防止には、疾患又は障害に対する防止策として、E N P P 1 ポリペプチドを対象に投与することが包含されることを理解する。

【0200】

ある特定の実施形態では、本明細書に開示の凍結乾燥された製剤は、1 n g / k g / 日 ~ 1 0 0 m g / k g / 日の用量を送達するように投与されてもよい。他の実施形態では、本明細書に開示の凍結乾燥された製剤は、1 n g / k g / 日 ~ 5 0 0 m g / k g / 日の用量を送達するように投与されてもよい。

40

【0201】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示の凍結乾燥された製剤は、0 . 1 m g / k g の用量を送達するように投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に開示の凍結乾燥された製剤は、0 . 2 m g / k g の用量を送達するように投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に開示の凍結乾燥された製剤は、0 . 3 m g / k g の用量を送達するように投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に開示の凍結

50

乾燥された製剤は、 0.4 mg/kg の用量を送達するように投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に開示の凍結乾燥された製剤は、 0.5 mg/kg の用量を送達するように投与されてもよい。他の実施形態では、本明細書に開示の凍結乾燥された製剤は、 0.6 mg/kg の用量を送達するように投与されてもよい。他の実施形態では、本明細書に開示の凍結乾燥された製剤は、 0.7 mg/kg の用量を送達するように投与されてもよい。他の実施形態では、本明細書に開示の凍結乾燥された製剤は、 0.8 mg/kg の用量を送達するように投与されてもよい。他の実施形態では、本明細書に開示の凍結乾燥された製剤は、 0.9 mg/kg の用量を送達するように投与されてもよい。他の実施形態では、本明細書に開示の凍結乾燥された製剤は、 1 mg/kg の用量を送達するように投与されてもよい。他の実施形態では、本明細書に開示の凍結乾燥された製剤は、 1.2 mg/kg の用量を送達するように投与されてもよい。他の実施形態では、本明細書に開示の凍結乾燥された製剤は、 1.4 mg/kg の用量を送達するように投与されてもよい。他の実施形態では、本明細書に開示の凍結乾燥された製剤は、 1.6 mg/kg の用量を送達するように投与されてもよい。他の実施形態では、本明細書に開示の凍結乾燥された製剤は、 1.8 mg/kg の用量を送達するように投与されてもよい。

10

【0202】

本明細書に開示の凍結乾燥された製剤中の活性成分（例えば、可溶性ENPP1ポリペプチド及びその融合タンパク質）、薬学的に許容可能な担体、及び任意の追加の成分の相対量は、治療される対象の同一性、サイズ、及び状態に応じて、また組成物が投与される経路に更に応じて、変化することになる。例として、組成物は、約 0.1% ～約 100% （w/w）の活性成分を含んでもよい。

20

【0203】

本明細書で使用される場合、「単位用量」は、所定量の活性成分（例えば、可溶性ENPP1ポリペプチド及びその融合タンパク質）を含む凍結乾燥された製剤の別個の量である。活性成分の量は、概して、対象に投与されることになる活性成分の投与量、又は例えば、そのような投与量の2分の1若しくは3分の1などのそのような投与量の便宜的な分数に等しい。単位剤形は、単回1日用量又は複数回1日用量（例えば、1日当たり約1～4回以上）のうちの1つのためのものであってもよい。複数回1日用量が使用される場合、単位剤形は、各用量に対して同一であっても異なってもよい。

【0204】

いくつかの実施形態では、ENPP1-Fcは、約 0.1 ～約 300 mg/ml の範囲の濃度で製剤中に存在してもよい。いくつかの実施形態では、ENPP1-Fcの濃度は、約 0.5 mg/ml 、約 1 mg/ml 、約 2 mg/ml 、約 2.5 mg/ml 、約 3 mg/ml 、約 3.5 mg/ml 、約 4 mg/ml 、約 4.5 mg/ml 、約 5 mg/ml 、約 5.5 mg/ml 、約 6 mg/ml 、約 6.5 mg/ml 、約 7 mg/ml 、約 7.5 mg/ml 、約 8 mg/ml 、約 8.5 mg/ml 、約 9 mg/ml 、約 9.5 mg/ml 、約 10 mg/ml 、約 11 mg/ml 、約 12 mg/ml 、約 13 mg/ml 、約 14 mg/ml 、約 15 mg/ml 、約 16 mg/ml 、約 17 mg/ml 、約 18 mg/ml 、約 19 mg/ml 、約 20 mg/ml 、約 21 mg/ml 、約 22 mg/ml 、約 23 mg/ml 、約 24 mg/ml 、約 25 mg/ml 、約 26 mg/ml 、約 27 mg/ml 、約 28 mg/ml 、約 29 mg/ml 、約 30 mg/ml 、約 31 mg/ml 、約 32 mg/ml 、約 33 mg/ml 、約 34 mg/ml 、約 35 mg/ml 、約 36 mg/ml 、約 37 mg/ml 、約 38 mg/ml 、約 39 mg/ml 、約 40 mg/ml 、約 41 mg/ml 、約 42 mg/ml 、約 43 mg/ml 、約 44 mg/ml 、約 45 mg/ml 、約 46 mg/ml 、約 47 mg/ml 、約 48 mg/ml 、約 49 mg/ml 、約 50 mg/ml 、約 51 mg/ml 、約 52 mg/ml 、約 53 mg/ml 、約 54 mg/ml 、約 55 mg/ml 、約 56 mg/ml 、約 57 mg/ml 、約 58 mg/ml 、約 59 mg/ml 、約 60 mg/ml 、約 70 mg/ml 、約 80 mg/ml 、約 90 mg/ml 、約 100 mg/ml 、約 101 mg/ml 、約 102 mg/ml 、約 102.5 mg/ml 、約 103 mg/ml 、約 103.5 mg/ml 、約 104 mg/ml

30

40

50

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

10

20

30

40

50

【0205】

投与のレジメンは、有効量を構成するものに影響を与え得る。例えば、いくつかの分割された投与量、及び時差投与量は、毎日投与されても逐次的に投与されてもよく、あるいは用量は、連続的に注入されても、ボラス注射であってもよい。更に、治療製剤の投与量は、治療的又は予防的状況の緊急性によって示されるとおりに、比例的に増加させても減少させてもよい。

【0206】

哺乳動物（すなわち、ヒト）などの患者への本開示の組成物（例えば、可溶性ENPP1ポリペプチド並びにその融合タンパク質）の投与は、既知の手順を使用して、患者の疾患又は障害を治療するために有効な用量で、及び期間にわたって実施されてもよい。治療効果を達成するために必要な有効量の治療用化合物は、採用される特定の化合物の活性、投与の時間、化合物の排泄速度、治療の期間、化合物と組み合わせて使用される他の薬物、化合物、及び材料、治療されている患者の疾患又は障害の状態、年齢、性別、体重、状態、一般健康、及び既往歴、並びに医学分野で周知の同様の要因などの要因に従って変化し得る。投与量レジメンは、最適な治療応答を提供するように調整されてもよい。投与量は、治療用化合物の生物学的活性に基づいて決定され、これは次に、治療用化合物曲線の半減期及び血漿時間下面積に依存する。本開示によるポリペプチドは、正常（1～3 pM

）レベルに近いが、又は正常レベルを上回る（30～50%より高い）のPPiのいずれかである、連続的なレベルの血漿PPiを達成するために、2日ごと、又は4日ごと、又は毎週、又は毎月の適切な時間間隔で投与される。ENPP1ポリペプチドの治療投与量はまた、半減期又は治療用ポリペプチドが体外に排出される速度に基づいて決定されてもよい。本開示によるポリペプチドは、ENPP1の酵素活性の一定レベルを達成するために、2日ごと、又は4日ごと、毎週、又は毎月のいずれかの適切な時間間隔で投与される。

【0207】

例えば、いくつかの分割された用量は、毎日投与されてもよく、又は用量は、治療状況の緊急性によって示されるように比例的に低減されてもよい。本開示の治療用化合物の有効用量範囲の非限定的な例は、約0.01～50mg/体重1kg/日である。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される治療用化合物の有効用量範囲は、約50ng～500ng/体重1kg、好ましくは100ng～300ng/体重1kgである。当業者であれば、関連する因子を試験し、過度の実験なしで、治療用化合物の有効量に関する決定を行うことができるであろう。

10

【0208】

可溶性ENPP1ポリペプチド及びその融合タンパク質は、1日数回の頻度で患者に投与されてもよく、あるいは1日1回、1週間に1回、2週間に1回、1か月に1回、又は数か月に1回若しくは1年に1回以下などの更に少ない頻度などの、低頻度で投与されてもよい。1日当たりに投与される可溶性ENPP1ポリペプチド及びその融合タンパク質の量は、非限定的な例では、毎日、隔日、2日ごと、3日ごと、4日ごと、又は5日ごとに投与されてもよいことが理解される。例えば、隔日投与では、1日当たり5mgの投薬を月曜日に開始し、水曜日に第1の後続の1日当たり5mgの投薬、金曜日に第2の後続の1日当たり5mgの投薬、などとしてもよい。投薬の頻度は、当業者にとって容易に明らかであり、限定されないが、治療されている疾患の種類及び重症度、並びに患者の種類及び年齢などの任意の数の因子に依存する。

20

【0209】

本開示の凍結乾燥された製剤中の活性成分（例えば、可溶性ENPP1ポリペプチド及びその融合タンパク質）の実際の投与量レベルは、患者に毒性であることなく、特定の患者、組成物、及び投与様式について望ましい治療応答を達成するために有効である活性成分の量を取得するために変化させてもよい。

30

【0210】

当該技術分野における通常の技術を有する医師、例えば、内科医は、必要とされる凍結乾燥された製剤の有効量を容易に決定し、処方し得る。例えば、内科医又は獣医は、所望の治療効果を達成するために必要とされるレベルよりも低いレベルで、凍結乾燥された製剤に用いられる本明細書に開示の化合物の投薬を開始し、所望の効果が達成されるまで投与量を徐々に増加させることができる。

【0211】

ある特定の実施形態では、本明細書に開示の組成物は、1日当たり1回～5回以上の範囲の投与量で患者に投与される。他の実施形態では、本明細書に開示の組成物は、限定されるものではないが、1日1回、2日ごとに1回、3日ごとに1回～週に1回、及び2週間ごとに1回を含む投与量の範囲で患者に投与される。本明細書に開示の様々な併用組成物の投与頻度は、限定されるものではないが、年齢、治療される疾患又は障害、性別、全体的な健康、及び他の因子を含む多くの因子に応じて、対象ごとに変化する。このため、本開示は、任意の特定の投与量レジームに限定されると解釈されるべきではなく、任意の患者に投与される正確な投与量及び組成物は、患者に関する他の全ての因子を考慮して、主治医によって決定されることになる。

40

【0212】

ある特定の実施形態では、本開示は、単独で、又は第2の薬学的剤と組み合わせて、治療有効量の本明細書に開示の化合物を保持する容器と、患者の疾患又は障害の1つ以上の

50

症状を治療、防止、又は低減するために化合物を使用するための説明書とを含む、パッケージングされた凍結乾燥された製剤を対象とする。

【0213】

ある特定の実施形態では、ポリペプチド、又はその前駆体タンパク質は、対象に急性の又は慢性的に投与される。他の実施形態では、ポリペプチド、又はその前駆体タンパク質は、局所的、領域的、又は全身的に対象に投与される。更に別の実施形態では、ポリペプチド、又はその前駆体タンパク質は、コードされたベクター上で送達され、ベクターは、タンパク質をコードし、それは、対象へのベクターの投与時にベクターから転写及び翻訳される。

【0214】

本明細書で使用される場合、凍結乾燥された製剤の「非経口投与」は、対象の組織の物理的侵害によって特徴付けられる投与、及び組織における侵害を通じた凍結乾燥された製剤の投与の任意の投与経路を含む。したがって、非経口投与は、限定されないが、組成物の注射による、外科手術切開を通じた組成物の適用による、組織膜透過型非外科的創傷を通じた組成物の適用などによる、凍結乾燥された製剤の投与を含む。特に、非経口投与は、限定されないが、皮下、静脈内、腹腔内、筋肉内、胸骨内注射、及び腎透析注入技術を含むことが企図される。

【0215】

非経口投与に好適な凍結乾燥された製剤は、1つ以上のENPP1ポリペプチドと、1つ以上の薬学的に許容可能な滅菌等張水性若しくは非水性溶液、分散液、懸濁液若しくは乳濁液、又は使用直前に滅菌注射溶液若しくは分散液に再構成され得る滅菌粉末とを組み合わせ含み得、抗酸化剤、緩衝液、静菌、製剤を意図されるレシピエントの血液と等張にする溶質、又は懸濁若しくは濃縮剤を含んでもよい。本開示の凍結乾燥された製剤に採用され得る好適な水性及び非水性担体の例としては、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールなど）、及びそれらの好適な混合物、オリーブオイルなどの植物油、並びにオレイン酸エチルなどの注射可能な有機エステルが挙げられる。適切な流動性を、例えば、レシチンなどのコーティング材料の使用によって、分散体の場合に必要な粒子サイズの維持によって、及び界面活性剤の使用によって、維持することができる。

【0216】

組成物及び製剤は、所望される場合、活性成分を含む1つ以上の単位剤形を含んでもよいパック又はディスペンサ装置に提示されてもよい。パックは、例えば、ブリスターパックなどの金属又はプラスチックホイルを含んでもよい。パック又はディスペンサ装置には、投与のための説明が添付されてもよい。

【0217】

5. 配列

10

20

30

40

50

【表 2 - 1】

表 2 : 配列

配列番号	配列	説明
1	1 MERDGCAGGG SRGEGGGRAP REGPAGNGRD RGRSHAAEAP GDPQAAASLL 51 APMDVGEEPL EKAARARTAK DPNTYKVLSSL VLSVCLVTTI LGCIFGLKPS 101 CAKEVKSCCKG RCFERTFGNC RCDAACVELG NCCLDYQETC IEPEHIWTCN 151 KFRCGEKRLT RSLCACSDDC KDKGDCCINY SSVQCQGEKSW VEEPCESINE 201 PQCPAGFETP PTLFLSLDGF RAEYLHTWGG LLPVISKLKK CGTYTKNMRP 251 VYPTKTFPNH YSIVTGLYPE SHGIIDNKMY DPKMNASFSL KSKEKFNPEW 301 YKGEPiWVTA KYQGLKSGTF FWPQSDVEIN GIFPDIYKMY NGSVPFEEERI 351 LAVLQWLQLP KDERPHFYTL YLEEDSSGH SYGPVSSEVI KALQRVDGMV 401 GMLMDGLKEL NLHRCNLNLL ISDHGMEQGS CKKYIYLNKY LGDVKNIKVI 451 YGPAARLRPS DVPDKYYSFN YEGIAARNLSC REPNQHFQPY LKHFLPKRLH 501 FAKSDRIEPL TFYLDPQWQL ALNPSEKRYC GSGFHGSDNV FSNMQALFVG 551 YGPGFKHGIE ADTFENIEVY NLMCDLLNLT PAPNNGTHGS LNHLKKNPVY 601 TPKHPKEVHP LVQCFPTRNP RDNLGCSCNP SILPIEDFQT QFNLTVAEEK 651 IIKHETLPYG RPRVLQKENT ICLLSQHQM SGYSQDILMP LWTSTYTVDRN 701 DSFSTEDFSN CLYQDFRIPL SPVHKCSFYK NNTKVSYGFL SPPQLNKNSS 751 GIYSEALLTT NIVPMYQSFQ VIWRYFHDTL LRKYAEERNG VNVVSGPVFD 801 FDDYDGRCDL ENLRQKRRVI RNQEILIPTH FFIVLTSCKD TSQTPLHCEN 851 LDTLAFILPH RTDNSESCVH GKHDSSWVEE LLMLHRARIT DVEHITGLSF 901 YQQRKEPVSD ILKLKTHLPT FFSQED	野生型 ENP P1 前駆体タンパク質の完全な未処理アミノ酸配列
2	1 PSCAKEVKSC KGRCFERTFG NCRCAACVE LGNCCLDYQE TCIEPEHIWT 51 CNKFRCGEKR LTRSLCACSD DCKDKGDCCI NYSSVCQGEK SWVEEPCESI 101 NEPQCPAGFE TPPTLLFSLD GFRAEYLHTW GGLLPVISKL KKGTYTKNM 151 RPVYPTKTFP NHYSIVTGLY PESHGIIDNK MYDPKMNASF SLKSKEKENP 201 EWYKGEPIWV TAKYQGLKSG TFFWPGSDVE INGIFPDIYK MYNGSVPFEE 251 RILAVLQWLQ LPKDERPHFY TLYLEEDPSS GHSGYGPVSSE VIKALQRVDG 301 MVGMLMDGLK ELNLHRCNLN ILISDHGMEQ GSCKKYIYLN KYLGDVKNIK 351 VIYGPAARLR PSDVDPKYYS FNYEGIAARNL SCREPNQHF PYLKHFLPKR 401 LHFASDRIE PLTFYLDPQW QLALNPSEK YCGSGFHGSD NVFSNMQALF 451 VYGPGFKHG IEADTFENIE VYNLMCDLLN LTPAPNNGTH GSLNHLKKNP 501 VYTPKHPKEV HPLVQCFPTR NPRDNLGCSC NPSILPIEDF QTQFNLTVAE 551 EKLIKHETLP YGRPRVLQKE NTICLLSQHQ FMSGYSQDIL MPLWTSYTV 601 RNDSTEDF SNCLYQDFRI PLSPVHKCSF YKNNTKVSYG FLSPQLNKN 651 SSGIYSEALL TTNIVPMYQS FQVIWRYFHD TLLRKYAEER NGVNVVSGPV 701 FDDYDGRCD SLENLROKRR VIRNOEILIP THFFIVLTSC KDTSTPLHC 751 ENLDTLAFIL PHRTDNSESC VHGHKHDSSWV EELLMLHRAR ITDVEHITGL 801 SFYQQRKEPV SDILKLKTHL PTFSQED	処理された (成熟) 細胞外 ENP P1 ポリペプチド配列
9	FTAGLKPSCAKEVKSCCKGRCFERTFGNCRCAACVELGNCCLDYQETCIEPEHIWTCNKRFCGEKRLTRSLCACSDCK DKGDCCINYSSVCQGEKSWVEEPCESINEPQCPAGFETPPTLLFSLDGFRAEYLHTWGGLLPVISKLKKGTYTKNMRP VYPTKTFPNHYSIVTGLYPESHGIIDNKMYDPKMNASFSLKSKEKFNPEWYKGEPIWVTAKYQGLKSGTFFWPGSDVEI NGIFPDIYKMYNGSVPFEEERILAVLQWLQLPKDERPHFYTLYLEEDPSSGHSGYGPVSSEVIKALQRVDGMVGMGLMDGLK ELNLHRCNLNLLISDHGMEQGSCKKYIYLNKYLGDKVKNIKVIYGPAAARLRPSDVPDKYYSFNIEGIAARNLSCREPNQHF KPYLKHFLPKRLHFAKSDRIEPLTFYLDPQWQLALNPSEKRYC GSGFHGSDNVFSNMQALFVGYPGFKHGIEADTFEN IEVYNLMCDLLNLTAPNNGTHGSLNHLKKNPVYTPKHPKEVHPLVQCFPTRNPRDNLGCSCNP SILPIEDFQTQFNLT VAEEKIIKHETLPYGRPRVLQKENTICLLSQHQFMSGYSQDILMPLWTSYTVDRNDSTEDFSNCLYQDFRIPLSPVH KCSFYKNNTKVSYGFLSPPQLNKNSSGIYSEALLTTNIVPMYQSFQVIWRYFHDTLRLKYAEERNGVNVVSGPVDFDY DGRCDLENLRQKRRVIRNQEILIPTHFFIVLTSCKDTSTPLHCENLDTLAFILPHRTDNSESCVHGHKHDSSWVEELL MLHRARITDVEHITGLSFYQQRKEPVSDILKLKTHLPTFSQEDLINDKTHTCPPCAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVYVDSHEDPEVKFNYYVDGVEVHNAKTPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	ENP P1-リンカー-hlgG1Fc 構築物

10

20

30

40

50

【表 2 - 2】

10	GLKPSCAKEVKSCKGRCFERTFGNCRDAACVELGNCLDYQETCIEPEHIWTCNKFRCGEKRLTRSLCACSDDCDKG DCCINYSVVCQGEKSWVEEPCESINEPQCPAGFETPPTLLFSLDGFRAEYLHTWGGLLPVISKLKKCGTYTKNMRPVYP TKTFPNHYSIVTGLYPESHGIIIDNKMYDPKMNASFSLKSKEKFNPEWYKGEPIWVTAKYQGLKSGTFFWPGSDVEINGI FPDIYKMYNGSVPFEEIRLAVLQWLQPKDERPHFYTYLLEEDSSGHSYGPVSSEVIKALQRVDGMVGMMDGLKELN LHRCNLILISDHGMEQGSCKKIYLNKYLGDVKNIKVIYGPAARLRPSDVPDKYYSFNIEGIARNLSCREPNQHF KPYLKHFLPKRLHFAKSDRIEPLTFYLDQWQLALNPSEKRYCGSGFHGSDNVFSNMQALFVGYGPGFKHGEADTFENIEV YNLMCDLLNLTAPNNGTHGSLNHLKPNVYTPKHPKEVHPLVQCPFTRNPRDNLGCSCNPSILPIEDFQTQFNLTVAE EKIIKHETLPYGRPRVLQKENTICLLSQHQFMSGYSQDILMPLWTSYTVDRNDSFSTEDFSNCLYQDFRIPLSPVHKCS FYKNNTKVSYGFLSPPQLNKNSSGIYSEALLTTNIVPMYQSFQVIWRYFHDTLRLKYAEERNGVNVSGPVDFDYDGR CDSLENLRQKRRVIRNQEILIPTHFFIVLTSCKDTSTPLHCENLDTLAFILPHRTDNSESCVHGKHDSSWVEELMLH RARITDVEHITGLSFYQQRKEPVSILKLKTHLPTFSQEDLINDKTHTCPPCAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	ENPP1ーリン カー-h I g G 1 F c 構築物	10
11	PSCAKEVKSCKGRCFERTFGNCRDAACVELGNCLDYQETCIEPEHIWTCNKFRCGEKRLTRSLCACSDDCDKGDCC INYSVVCQGEKSWVEEPCESINEPQCPAGFETPPTLLFSLDGFRAEYLHTWGGLLPVISKLKKCGTYTKNMRPVYPTKT FPNHYSIVTGLYPESHGIIIDNKMYDPKMNASFSLKSKEKFNPEWYKGEPIWVTAKYQGLKSGTFFWPGSDVEINGIFPD IYKMYNGSVPFEEIRLAVLQWLQPKDERPHFYTYLLEEDSSGHSYGPVSSEVIKALQRVDGMVGMMDGLKELNLHR CLNLILISDHGMEQGSCKKIYLNKYLGDVKNIKVIYGPAARLRPSDVPDKYYSFNIEGIARNLSCREPNQHF KPYLKHFLPKRLHFAKSDRIEPLTFYLDQWQLALNPSEKRYCGSGFHGSDNVFSNMQALFVGYGPGFKHGEADTFENIEVYNL MCDLLNLTAPNNGTHGSLNHLKPNVYTPKHPKEVHPLVQCPFTRNPRDNLGCSCNPSILPIEDFQTQFNLTVAE EKIIKHETLPYGRPRVLQKENTICLLSQHQFMSGYSQDILMPLWTSYTVDRNDSFSTEDFSNCLYQDFRIPLSPVHKCSFYK NNTKVSYGFLSPPQLNKNSSGIYSEALLTTNIVPMYQSFQVIWRYFHDTLRLKYAEERNGVNVSGPVDFDYDGR CDSLENLRQKRRVIRNQEILIPTHFFIVLTSCKDTSTPLHCENLDTLAFILPHRTDNSESCVHGKHDSSWVEELMLHR ARITDVEHITGLSFYQQRKEPVSILKLKTHLPTFSQEDLINDKTHTCPPCAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	ENPP1ーリン カー-h I g G 1 F c 構築物	20
12	DKTHTCPPCAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	ヒト I g G 1 F c	30
13	FTAGLPSCAKEVKSCKGRCFERTFGNCRDAACVELGNCLDYQETCIEPEHIWTCNKFRCGEKRLTRSLCACSDDC DKGDCCINYSVVCQGEKSWVEEPCESINEPQCPAGFETPPTLLFSLDGFRAEYLHTWGGLLPVISKLKKCGTYTKNMRP VYPTKTFPNHYSIVTGLYPESHGIIIDNKMYDPKMNASFSLKSKEKFNPEWYKGEPIWVTAKYQGLKSGTFFWPGSDVEI NGIFPDIIYKMYNGSVPFEEIRLAVLQWLQPKDERPHFYTYLLEEDSSGHSYGPVSSEVIKALQRVDGMVGMMDGLK ELNLHRCNLILISDHGMEQGSCKKIYLNKYLGDVKNIKVIYGPAARLRPSDVPDKYYSFNIEGIARNLSCREPNQHF KPYLKHFLPKRLHFAKSDRIEPLTFYLDQWQLALNPSEKRYCGSGFHGSDNVFSNMQALFVGYGPGFKHGEADTFEN IEVYNLMCDLLNLTAPNNGTHGSLNHLKPNVYTPKHPKEVHPLVQCPFTRNPRDNLGCSCNPSILPIEDFQTQFNLT VAEEKIIKHETLPYGRPRVLQKENTICLLSQHQFMSGYSQDILMPLWTSYTVDRNDSFSTEDFSNCLYQDFRIPLSPVH KCSFYKNNTKVSYGFLSPPQLNKNSSGIYSEALLTTNIVPMYQSFQVIWRYFHDTLRLKYAEERNGVNVSGPVDFDY DGRCDLENLRQKRRVIRNQEILIPTHFFIVLTSCKDTSTPLHCENLDTLAFILPHRTDNSESCVHGKHDSSWVEEL MLHRARITDVEHITGLSFYQQRKEPVSILKLKTHLPTFSQED	ENPP1の例示 的な可溶性形態	40

【表 2 - 3】

1 4	GLKPSCAKEVKSCCKGRCFERTFGNCRDAACVELGNCLDYQETCIEPEHIWTCNKFRCGEKRLTRSLCACSDCKDKG DCCINYSVCQGEKSWVEEPCESINEPQCPAGFETPTLLFSLDGFRAEYLHTWGGLLPVISKLKCGTYTKNMRPVYP TKTFPNHYSIVTGLYPESHGIDNKMYPKMNASFSLKSKEKFNPEWYKGEPIWVTAKYQGLKSGTFFWPGSDVEINGI FPDIYKMYNGSVPFEEIRILAVLQWLQPKDERPHFYTYLLEPDSSGHSYGPVSSEVIKALQRVDGMVGLMDGLKELN LHRCNLILISDHGMEQGSCKKYIYLNKYLGDVKNIKVIYGAARLRPSDVPDKYYSFNYEGIARNLSCREPNQHFQPY LKHFLPKRLHFAKSDRIEPLTFYLDPQWQALALNPSEKRYCGSGFHGSDNVFSNMQALFVGYPGPKHGIEADTFENIEV YNLMCDLLNLTPAPNNGTHGSLNHLKPNVYTPKHPKEVHPLVQCPFTNRNPRDNLGCSCNPSILPIEDFQTQFNLV AEKIKHETLPYGRPRVLQKENTICLLSQHQFMSGYSQDILMPLWTSYTVDRNDSFSTEDFSNCLYQDFRIPLSPVHKCS FYKNNTKVSYGFLSPPQLNKNSSGIYSEALLTTNIVPMYQSFQVIWRYFHDTLRLKYAEERNGVNVVSGPVDFDYGDR CDSLENLRQKRRVIRNQEILIPTHFFIVLTSCKDTSQTPLHCENLDTLAFILPHRTDNSESCVHGKHDSSWVEELMLH RARTDVEHITGLSFYQQRKEPVSIDLKLTHTLPTFSQED	ENPP1の例示 的な可溶性形態
1 5	PSCAKEVKSCCKGRCFERTFGNCRDAACVELGNCLDYQETCIEPEHIWTCNKFRCGEKRLTRSLCACSDCKDKGDC INYSVCQGEKSWVEEPCESINEPQCPAGFETPTLLFSLDGFRAEYLHTWGGLLPVISKLKCGTYTKNMRPVYP TKTFPNHYSIVTGLYPESHGIDNKMYPKMNASFSLKSKEKFNPEWYKGEPIWVTAKYQGLKSGTFFWPGSDVEINGI FPDIYKMYNGSVPFEEIRILAVLQWLQPKDERPHFYTYLLEPDSSGHSYGPVSSEVIKALQRVDGMVGLMDGLKELN LHRCNLILISDHGMEQGSCKKYIYLNKYLGDVKNIKVIYGAARLRPSDVPDKYYSFNYEGIARNLSCREPNQHFQPY LKHFLPKRLHFAKSDRIEPLTFYLDPQWQALALNPSEKRYCGSGFHGSDNVFSNMQALFVGYPGPKHGIEADTFENIEV YNLMCDLLNLTPAPNNGTHGSLNHLKPNVYTPKHPKEVHPLVQCPFTNRNPRDNLGCSCNPSILPIEDFQTQFNLV AEKIKHETLPYGRPRVLQKENTICLLSQHQFMSGYSQDILMPLWTSYTVDRNDSFSTEDFSNCLYQDFRIPLSPVHKCS FYKNNTKVSYGFLSPPQLNKNSSGIYSEALLTTNIVPMYQSFQVIWRYFHDTLRLKYAEERNGVNVVSGPVDFDYGDR CDSLENLRQKRRVIRNQEILIPTHFFIVLTSCKDTSQTPLHCENLDTLAFILPHRTDNSESCVHGKHDSSWVEELMLH RARTDVEHITGLSFYQQRKEPVSIDLKLTHTLPTFSQED	ENPP1の例示 的な可溶性形態

10

【0218】

20

本明細書で使用される用語は、概して、本開示の文脈内、及び各用語が使用される特定の文脈内で、当該技術分野におけるそれらの通常の意味を有する。ある特定の用語は、本開示の組成物及び方法、並びにそれらを作製及び使用する方法を説明する際に、実践者に追加の指導を提供するために、本明細書の以下又は別の場所で論じられる。用語の任意の使用の範囲又は意味は、その用語が使用される特定の文脈から明らかとなる。

【0219】

「約」及び「およそ」は、概して、測定の本質又は精度を考慮して、測定された量に対する許容可能な誤差の程度を意味するものとする。典型的には、例示的な誤差の程度は、所与の値又は値の範囲の20パーセント(%)以内、好ましくは10%以内、より好ましくは5%以内である。

30

【0220】

あるいは、特に生物学的系において、「約」及び「およそ」という用語は、所与の値の1桁以内、好ましくは5倍以内、より好ましくは2倍以内である値を意味してもよい。本明細書で付与される数値は、別途記載がない限り、およそであり、これは、明示的に示されていないとき、「約」又は「およそ」という用語が推定され得ることを意味する。

【0221】

「a」及び「an」という用語は、用語が使用される文脈が別途明確に指示しない限り、複数の参照を含む。「a」(又は「an」)という用語、並びに「1つ以上」及び「少なくとも1つ」という用語は、本明細書では互換的に使用され得る。更に、本明細書で利用される場合、「及び／又は」は、他のものの有無にかかわらず、2つ以上の指定された特徴又は構成要素の各々についての特定の開示として解釈されるべきである。このため、本明細書の「A及び／又はB」などの語句で利用される「及び／又は」という用語は、「A及びB」、「A又はB」、「A」(単独)、及び「B」(単独)を含むことが意図される。同様に、「A、B、及び／又はC」などの語句で利用される「及び／又は」という用語は、以下の態様の各々を包含することが意図される：A、B、及びC；A、B、又はC；A又はC；A又はB；B又はC；A及びC；A及びB；B及びC；A(単独)；B(単独)；並びにC(単独)。

40

【0222】

本明細書に開示される数値範囲は、範囲を定義する数を包含する。

【0223】

50

本明細書に開示されるポリペプチドは、天然発生型ではないアミノ酸配列を含み得る。そのようなバリエーションは、必ず、開始分子との100%未満の配列同一性又は類似性を有する。ある特定の実施形態では、バリエーションは、例えば、バリエーション分子の長さにわたって、開始（例えば、天然発生型又は野生型）ポリペプチドのアミノ酸配列との約75%～100%未満、より好ましくは、約80%～100%未満、より好ましくは、約85%～100%未満、より好ましくは、約90%～100%未満（例えば、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%）、最も好ましくは約95%～100%未満のアミノ酸配列同一性又は類似性のアミノ酸配列を有することになる。

【0224】

好ましい方法及び材料が本明細書に説明されているが、本明細書に開示されるものと同様又は均等の方法及び材料もまた、本開示の方法及び組成物の実施又は試験に使用され得る。本明細書に述べられる全ての刊行物、特許出願、特許、及び他の参考文献は、参照によりその全体が組み込まれる。

【実施例】

【0225】

次に、本発明を概要して説明するが、これは、以下の実施例を参照することでより容易に理解されることになり、これらの実施例は、単に本発明のある特定の実施形態及び実施形態の例示の目的で含まれており、本発明を限定することを意図していない。

【0226】

実施例1．ENPP1融合タンパク質の生成

可溶性ENPP1融合タンパク質を、リンカー（ロイシン、イソロイシン、及びアスパラギンを含む）を介してリンカーによりヒトFcドメインに融合させ、これを以後ENPP1-Fcと称する。3つのENPP1-Fc構築物を、CHO細胞から精製した配列番号9、10、及び11として表2に示す。

【0227】

ENPP1-Fcの精製は、例えば、タンパク質Aクロマトグラフィー、Qセファロースクロマトグラフィー、フェニルセファロースクロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、及びカチオン交換クロマトグラフィーのうちの3つ以上を任意の順番で含む、一連のカラムクロマトグラフィーステップによって達成され得る。精製は、ウイルス濾過及び緩衝液交換で完了し得る。タンパク質の精製後、ENPP1-Fcタンパク質の触媒活性を、pNP-TMPを発色基質として使用して評価することができた。ストレスを受けた条件下及びストレスを受けていない条件下の両方でENPP1-Fcの最適な化学的、物理的、及び構造的安定性をもたらす得る製剤を特定するために、ベースライン緩衝液、添加剤、溶解度、界面活性剤スクリーニング、及び補因子スクリーニングの過程にわたって、複数の緩衝液タイプ、pH条件、賦形剤、及び界面活性剤濃度を反復様式で評価した。

【0228】

実施例2．凍結乾燥されたENPP1ポリペプチド製剤の生成

本明細書に開示の凍結乾燥されたENPP1ポリペプチド製剤を、以下のステップに従って生成した。44mg/mLの濃度のENPP1-Fcを、界面活性剤を欠く製剤緩衝液に緩衝液交換した。緩衝液交換プロセスは、合計4サイクル、及び合計400倍超の希釈で行った。緩衝液交換試料中のタンパク質濃度を、1.47mL/mg*cmの吸光係数及び1.0cmの経路長を使用したUV可視分光法によって測定した。50.0mg/mLへの正規化中、界面活性剤（PS20）を全ての製剤に0.05%の最終濃度まで加えた。緩衝液交換後、製剤を滅菌濾過し、0.5mLの充填体積を有する三重すすぎオートクレーブバイアルに充填し、滅菌ゴムストッパーを取り付けた。

【0229】

ENPP1-Fc凍結乾燥サイクル（表3）は、初期アニーリングステップからなり、温度を-50℃から-20℃に数時間でサイクルして、マンニトール含有製剤の完全な結晶化を可能にした。アニーリングステップの後、圧力を100mTorrに設定し、貯蔵

10

20

30

40

50

温度を25℃に上昇させることによって、一次乾燥を開始し、サイクルを一次乾燥で1793分（約30時間）保持した。一次乾燥が完了した後、温度を40℃に上昇させ、600分間（10時間）保持することによって、あらゆる残留水分を除去するために二次乾燥を行った。凍結乾燥サイクルの総持続時間は3648分（約2.5日）であった。サイクルの完了時に、バイアルを約570Torrの分圧で窒素により埋め戻し、栓をし、適切に密封した。ENPP1-Fcを含む全ての凍結乾燥ケーキは、アイボリー色の無傷の構造を示した。再構成した後、液体の外観は、試料全種類及び全条件について、褐色がかった黄色であり、透き通り、目に見える粒子を含まないことが観察された。ストレスを受けた条件下及びストレスを受けていない条件下の両方でENPP1-Fcの最適な化学的、物理的、及び構造的安定性をもたらす得る製剤を特定するために、複数の緩衝液、pH条件、賦形剤、添加剤、界面活性剤、及び補因子を反復様式で評価した。

【表3】

表3:ENPP1-Fc凍結乾燥サイクル

	温度 (℃)	速度 (℃/分)	ランプ時間 (分)	保持時間 (分)	圧力	合計時間		
室温でのロード	25° C			10 分				
ランプ	-5° C	0.5℃/分	60 分			70 分	1.2 時間	0.05 日
保持	-5° C			60 分		130 分	2.2 時間	0.09 日
ランプ	-50° C	0.5℃/分	90 分			220 分	3.7 時間	0.15 日
保持	-50° C			180 分		400 分	6.7 時間	0.28 日
ランプ	-20° C	0.5℃/分	60 分			460 分	7.7 時間	0.32 日
保持	-20° C			180 分		640 分	10.7 時間	0.44 日
ランプ	-50° C	0.5℃/分	60 分			700 分	11.7 時間	0.49 日
保持	-50° C			180 分		880 分	14.7 時間	0.61 日
真空開始	-50° C				100mTorr	880 分	14.7 時間	0.61 日
ランプ	-25° C	0.5℃/分	50 分		100mTorr	930 分	15.5 時間	0.65 日
一次	-25° C			1793 分	100mTorr	2723 分	45.4 時間	1.89 日
ランプ	-40° C	0.2℃/分	325 分		100mTorr	3048 分	50.8 時間	2.12 日
二次	-40° C			600 分	100mTorr	3648 分	60.8 時間	2.53 日

【0230】

実施例3．凍結乾燥されたENPP1ポリペプチド製剤の再構成

凍結乾燥された試料の再構成を、0.5mLの注射用水を用いた再構成に基づいて評価した。全ての粒子状物質が溶解するまで時間を測定した。各凍結乾燥された試料は、少なくとも46秒の期間内に、目に見える残留物又は未溶解物質を残さずに完全に溶解した。再構成データの概要を表4に示す。

【表 4】

表 4:凍結乾燥された ENPP1 ポリペプチド製剤の再構成時間

緩衝液	賦形剤	製剤	時点	条件	再構成時間(秒)
20mM のコハク酸塩、2mM の CaCl ₂ pH6.0	スクロース (9%)	A	T0	リオ	76
			4 週間	5° C	53
				40° C	76
			13 週間	5° C	52
	スクロース (3%) マンニトール (1.5%)	B	T0	リオ	60
			4 週間	5° C	88
				40° C	83
			13 週間	5° C	46
	スクロース (2%) マンニトール (2%)	C	T0	リオ	73
			4 週間	5° C	91
				40° C	95
			13 週間	5° C	60
20mM のクエン酸塩、2mM の CaCl ₂ pH6.0	スクロース (9%)	D	T0	リオ	71
			4 週間	5° C	62
				40° C	77
			13 週間	5° C	92
	スクロース (3%) マンニトール (1.5%)	E	T0	リオ	47
			4 週間	5° C	69
				40° C	68
			13 週間	5° C	54
	スクロース (2%) マンニトール (2%)	F	T0	リオ	87
			4 週間	5° C	82
				40° C	85
			13 週間	5° C	88

【 0 2 3 1 】

実施例 4 . 凍結乾燥された E N P P 1 ポリペプチド製剤中の残留水分の評価

残留水分を凍結乾燥ケーキについて評価した。全ての凍結乾燥試料が、時点及び条件にわたって含水量が非常に低いか、又は含水量を有しなかった。残留含水量は 0 . 0 % ~ 0 . 3 % の範囲であった。概要データを表 5 に示す。

【表 5】

表 5:凍結乾燥された試料の残留含水量

緩衝液	賦形剤	製剤	時点	条件	水分 (%)
20mM のコハク酸塩、2mM の CaCl ₂ pH6.0	スクロース (9%)	A	T0		0.1
			4 週間	5° C	0.1
				40° C	0.2
			13 週間	5° C	0.2
	スクロース (3%) マンニトール (1.5%)	B	T0		0.0
			4 週間	5° C	0.1
				40° C	0.2
			13 週間	5° C	0.0
	スクロース (2%) マンニトール (2%)	C	T0		0.1
			4 週間	5° C	0.1
				40° C	0.2
			13 週間	5° C	0.0
20mM のクエン酸塩、2mM の CaCl ₂ pH6.0	スクロース (9%)	D	T0		0.3
			4 週間	5° C	0.1
				40° C	0.2
			13 週間	5° C	0.1
	スクロース (3%) マンニトール (1.5%)	E	T0		0.1
			4 週間	5° C	0.1
				40° C	0.2
			13 週間	5° C	0.0
	スクロース (2%) マンニトール (2%)	F	T0		0.0
			4 週間	5° C	0.1
				40° C	0.1
			13 週間	5° C	0.0

【 0 2 3 2 】

実施例 5：ベースライン緩衝液評価

ENPP1 ポリペプチド製剤の安定性を、クエン酸塩、ヒスチジン、リン酸塩、酢酸塩、重炭酸ナトリウム、コハク酸塩、グリシルグリシン、及びトリスを含む候補緩衝液のパネルを使用して、5.0～8.0のpH範囲にわたって評価した。これらの製剤の自己緩衝能力を評価するために、試料を水に緩衝液交換した。この試験では、ENPP1-Fcを、20mMの酢酸塩（pH5.0）、コハク酸塩（pH5.0及び6.0）、クエン酸塩（pH5.0、6.0、及び7.0）、重炭酸ナトリウム（pH6.0及び7.0）、ヒスチジン（pH6.0及び7.0）、リン酸カリウム（pH7.0及び8.0）、トリス（pH7.0及び8.0）、及びグリシルグリシン（pH8.0）緩衝液に緩衝液交換した。ENPP1-Fcを、上で特定した製剤緩衝液のうちの1つに緩衝液交換し、0.5mL中で2mg/mLに濃縮した。濃縮及び緩衝液交換後のタンパク質回収は、水に交換したENPP1-Fc緩衝液を除いて、約70～100%の範囲で、製剤にわたって概して同等であった。水中の緩衝液交換したENPP1-Fcは34%回収率を示し、ENPP1-Fcが自己緩衝能力を欠いていることを示している。

【 0 2 3 3 】

ENPP1 ポリペプチド製剤の熱安定性を、示差走査蛍光測定法（DSF）によってモニタリングし、これにより、ポリペプチドの融解温度（Tm）に関するデータが提供される。Tmデータを、2mg/mLのタンパク質試料について収集した。試料を20℃で30秒間平衡化し、温度を0.5℃/分の速度で95℃に上昇させながら、250～500nm（266nm励起波長）の固有蛍光スペクトルの重心平均（BCM）をモニタリングした。アンフォールディング事象（導関数トレースの最大又は最小によって特定）中のBCM対温度曲線の変曲点を、その遷移のTmとして特定した。266nm及び473nm

での静的光散乱（SLS）強度も、DFS測定と並行して測定し、それぞれ、小さい凝集体形成及び大きい凝集体形成（Tagg）の開始温度を観察した。相対的熱安定性は、緩衝液タイプ及び製剤pHの両方による影響を受けた。クエン酸塩pH7.0、リン酸塩pH7.0／8.0、重炭酸ナトリウム、及びグリシルグリシン試料は、266nm又は473nmで有意な光散乱を示さず、これらの製剤について明らかな凝集の欠如が示された。酢酸塩、コハク酸塩pH5.0、クエン酸塩pH5.0、及びトリスpH7.0製剤は、製剤にわたって最も高いTaggを呈した。クエン酸塩、ヒスチジン、及びトリス試料については、pHの増加とともにTaggが減少し、リン酸塩のTaggはpHの変化に対して非感受性であるように見えた。Tm値は、驚くべきことに、各pHについて緩衝液タイプに関して明確な傾向を示し、pH5.0及びpH6.0でのコハク酸塩、並びにpH5.0及びpH6.0でのリン酸塩について、より優れた熱安定性を示した。概要DFSデータを表6に示す。

10

【表6】

表6:ベースライン緩衝液DFS/SLSデータの概要

緩衝液	pH	製剤	T _{agg} 266nm(°C)	T _{agg} 473nm(°C)	T _{on set} BCM(°C)	T _{m1} BCM(°C)
自己(水)	N/A	A	62.4	62.1	43.9	55.4
20mMの酢酸塩	pH5.0	B	80.6	80.2	39.7	54.6
20mMのコハク酸塩	pH5.0	C	77.7	79.5	40.5	57.4
	pH6.0	D	65.7	66.2	53.5	62.8
20mMのクエン酸塩	pH5.0	E	81.0	80.8	45.7	57.1
	pH6.0	F	61.2	61.3	51.2	60.9
	pH7.0	G	58.4	61.7	49.7	60.5
20mMの重炭酸ナトリウム	pH6.0	H	ND	ND	45.4	57.0
	pH7.0	I	ND	ND	44.7	56.6
20mMのヒスチジン	pH6.0	J	66.9	66.5	40.1	54.3
	pH7.0	K	60.7	62.0	27.4	54.6
20mMリン酸カリウム	pH7.0	L	61.0	63.6	51.1	60.8
	pH8.0	M	62.5	64.0	54.4	63.5
20mMのトリス	pH7.0	N	76.6	79.9	51.3	59.7
	pH8.0	O	58.8	61.4	49.7	58.6
20mMのグリシルグリシン	pH8.0	P	58.4	61.2	48.0	57.2

20

30

ND: 計数が非常に少ないために値を決定せず。

【0234】

サイズ排除クロマトグラフィー（SEC）を使用して、ENPP1ポリペプチド製剤試料中に存在する凝集体及び分解産物の量を評価した。総高分子量（HMW）種、低分子量（LMW）種、及び主要ピーク純度の存在率を報告する。SECの結果を表7及び図5に要約する。SECによる分析の前に、全ての試料を30℃で48時間インキュベートした。HMW種は、3.3～14.5%の範囲で全ての製剤に存在した。重炭酸ナトリウム製剤及びリン酸塩製剤では、最低レベルのHMW種が観察された。高次HMW種は、ヒスチジンpH7.0で最も高かった。

40

50

【表 7】

表 7:ベースライン緩衝液評価サイズ排除クロマトグラフィーデータの概要

緩衝液	pH	製剤	HMW%	主要%	LMW%	カラム回収率(%) ^a	総面積(μ V*s)
自己(水)	0	A	6.2	93.3	0.5	94	8691405
20mM の酢酸塩	5.0	B	4.6	95.4	ND	86	16192216
20mM のコハク酸塩	5.0	C	5.1	94.9	ND	91	17757935
	6.0	D	3.3	96.5	0.3	99	20957945
20mM のクエン酸塩	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
20mM の重炭酸ナトリウム	6.0	H	4.4	95.3	0.3	98	19623052
	7.0	I	3.9	95.7	0.3	97	20538912
20mM のヒスチジン	6.0	J	6.2	93.8	ND	95	20688528
	7.0	K	14.5	85.0	0.5	95	16752179
20mM リン酸カリウム	7.0	L	4.4	95.4	0.2	97	18897632
	8.0	M	4.0	95.8	0.2	98	19646363
20mM のトリス	7.0	N	5.9	93.9	0.3	96	19059185
	8.0	O	5.7	93.9	0.4	98	18835534
20mM のグリシルグリシン	8.0	P	4.0	96.0	ND	98	19571596
CC-15 出発物質			6.4	92.9	0.7	98	18917341
CC-15 光ストレス			48.4	50.5	1.1	101	19483433

^a カラム回収率(%)=((総ピーク面積/ 10^6)*(流量/60)(吸光係数*経路長))/(試料濃度*注入体積/ 10^3)*100

【0235】

要約すると、ベースライン緩衝液評価データは、pH 5.0 以下及び pH 6.0 以上を含む緩衝液製剤が、凍結乾燥された ENPP1 ポリペプチド製剤に対して最大の安定性を提供することを示す。ヒスチジン pH 7.0 は、試験した他の緩衝液系よりも好ましくない。酢酸塩は、凍結乾燥された製剤を必要な範囲で緩衝することができない。上記のデータに基づいて、緩衝液を、pH 6~pH 7 の pH 範囲を支持するもの（コハク酸塩、クエン酸塩、重炭酸塩）、及び pH 7~pH 8 の pH 範囲を支持するもの（リン酸、トリス、グリシルグリシン）を含む 2 つのレジームにビンニングした。第 1 の緩衝液レジームでは、クエン酸塩製剤が、優れた Tonset (5℃程度)を示した。第 2 の緩衝液レジームでは、トリス製剤が、優れた Tonset (2℃程度)を示した。更なる製剤開発のために選択した pH レベルは、コハク酸塩、クエン酸塩、及びリン酸塩緩衝液系を使用して、それぞれ、pH 6.0、pH 7.0、及び pH 8.0 であった。各緩衝液タイプで、アルギニン、NaCl、スクロース、マンニトール、及びグリシンの 5 つの異なる薬学的に許容可能な添加剤を評価した。提案する添加剤は、様々な分子クラス（すなわち、アミノ酸、塩、糖、及びポリオール）を網羅する。

【0236】

実施例 6：薬学的に許容可能な添加物スクリーニング

凍結乾燥された ENPP1 ポリペプチド製剤の安定性を、ベースライン緩衝液評価で定義した緩衝系（20mM のコハク酸塩 pH 6.0、クエン酸塩 pH 7.0、及びリン酸塩 pH 8.0）を使用して、ほぼ等張濃度の報告した安定化特性を有する様々な添加剤の存在下で評価した。ENPP1-Fc を、150mM の NaCl、150mM の L-アルギニン、250mM のスクロース、250mM のマンニトール、又は 200mM のグリシンのいずれかを含む各候補緩衝液に緩衝液交換した。

【0237】

ENPP1-Fc含有添加剤の製剤のDSF／SLSデータは、Tm（DSF）及び266nm及び473nmの両方でのTagg（SLS）によって評価して、添加剤が熱安定性に大規模な効果を有しなかったことを示した。全体として、DSFデータは、製剤の大部分について、同等の融解温度及びより大きな凝集体の明確な欠如を示した。

【0238】

SECデータ（表8及び図6に要約）は、グリシン及びNaCl／アルギニンの組み合わせが製剤間で最も高いHMW種％を生み出したことを示した。pH6.0及びpH7.0でのNaCl、並びにアルギニンpH6.0は、スクロースと同様に挙動した。スクロースは、試験した製剤の各々にわたって最小のHMW種％（5.3％以下）を生んだ。SECデータにより、スクロースを含む製剤が最も高い全体的な安定性を提供したことが示される。

【表8】

表8:SEC 添加剤スクリーニング概要データ

緩衝液	賦形剤	製剤	HMW (%)	主要%	LMW (%)	カラム回収率 (%) ^a	総面積 (μV*s)
コハク酸塩 pH6.0	NaCl	A	5.3	94.4	0.3	99	19084426
	アルギニン	B	4.7	94.9	0.3	98	18440146
	スクロース	C	4.6	94.9	0.5	99	18651298
	マンニトール	D	5.1	94.3	0.6	98	19005559
	グリシン	E	7.1	92.6	0.3	98	18936695
クエン酸塩 pH7.0	NaCl	F	5.7	93.9	0.4	97	18937420
	アルギニン	G	8.4	91.1	0.4	96	18724123
	スクロース	H	5.2	94.4	0.4	97	19198190
	マンニトール	I	5.9	93.7	0.4	98	19285938
	グリシン	J	10.4	89.3	0.4	96	18259087
リン酸塩 pH8.0	NaCl	K	7.1	92.7	0.2	98	19447707
	アルギニン	L	6.8	92.9	0.3	97	19095422
	スクロース	M	5.3	94.4	0.2	99	19455680
	マンニトール	N	8.1	91.7	0.2	98	19564507
	グリシン	O	14.9	84.8	0.3	96	18730132
ヒスチジン pH6.0	アルギニン /NaCl	P	15.7	83.8	0.4	93	18378845
出発物質			8.1	91.5	0.4	96	18756246

^aカラム回収率(%)=((総ピーク面積/10⁶)*(流量/60)(吸光係数*経路長))/(試料濃度*注入体積/10³)*100

【0239】

実施例7：凍結乾燥されたENPP1ポリペプチド製剤の溶解度スクリーニング

凍結乾燥されたENPP1ポリペプチド製剤の最大溶解度についての条件を確立するために、20mMのコハク酸塩pH6.0、クエン酸塩pH5.0及びpH6.0、重炭酸ナトリウムpH7.0、及びヒスチジンpH6.0を、等張濃度のスクロース、プロリン、及びNaClの存在下で使用した。緩衝液交換及び濃縮の後、試料を2つの等体積アリコートに分割し、アリコートのうちの一方を40℃で約7日間熱ストレスにかけ、もう一方を5℃で保持した。熱ストレスをかけた試料及び5℃の試料を、酵素活性及びHMW種の形成についてSECにより評価した。各試料の活性を評価するために使用した酵素アッセイを、ENPP1-FcをpNP-TMPと混合することによって行った。生成物形成(pNP)を、405nmで5分の期間、25℃で分光光度法によりモニタリングする。ENPP1-Fcの比活性は、各試料調製について得られた経時的な吸光度の変化を、既

知の濃度の p N P の標準曲線に補間することによって計算する。結果は、参照試料材料に対して報告し、単位は、経時的（分）に生成された生成物のモルに対応する。溶解度スクリーニング酵素活性アッセイの結果を表 9 及び図 7 に示す。p H 6 . 0 を含む製剤は、これらの試料の各々について観察された酵素活性の上昇に示されるように、熱安定性の増加を示した。4 0 ° C でインキュベートした p H 5 . 0 のクエン酸塩の値は、試料のゲル化に起因して決定されなかった。全体として、酵素活性は、5 ° C 対 4 0 ° C のインキュベート試料を比較する際に、p H 6 . 0 のコハク酸塩及びクエン酸塩が、評価した添加剤にわたって最も性能の高い緩衝液タイプであることを示唆している。

【表 9】

表 9: 酵素活性アッセイ溶解度スクリーニングデータの要約

緩衝液	pH	賦形剤	製剤	条件	U/mL	U/mg
20mM のコハク酸塩	pH6.0	250mM のスクロース	A	5° C	9.8	9668
				40° C	11.8	11721
		250mM のプロリン	B	5° C	10.5	9878
				40° C	11.9	11156
		150mM の NaCl	C	5° C	9.2	9363
				40° C	12.0	12180
20mM のクエン酸塩	pH5.0	250mM のスクロース	D	5° C	8.9	8905
				40° C	ND	ND
		250mM のプロリン	E	5° C	7.9	7607
				40° C	ND	ND
		150mM の NaCl	F	5° C	8.7	8365
				40° C	ND	ND
	pH6.0	250mM のスクロース	G	5° C	10.1	9612
				40° C	11.7	11127
		250mM のプロリン	H	5° C	10.6	10409
				40° C	9.5	9349
		150mM の NaCl	I	5° C	9.7	9582
				40° C	11.0	10863
20mM の重炭酸ナトリウム	pH7.0	250mM のスクロース	J	5° C	8.6	8291
				40° C	6.5	6309
		250mM のプロリン	K	5° C	10.5	10249
				40° C	3.2	3107
		150mM の NaCl	L	5° C	9.7	9300
				40° C	8.9	8528
20mM のヒスチジン	pH6.0	100mM の Arg/50mM の NaCl	M	5° C	9.6	9704
				40° C	10.0	10113
出発物質					10.3	10459

ND: 決定せず

【0240】

S E C により決定した H M W 種の形成は、酵素活性スクリーニングで観察された傾向と一致した。p H 6 . 0 のコハク酸塩及びクエン酸塩は、製剤で使用する添加剤とは無関係に、最も低い H M W % を呈した。4 0 ° C のクエン酸 p H 6 . 0 は、他の全ての 4 0 ° C 試料よりも優れていた。クエン酸塩 p H 5 . 0 、及び重炭酸ナトリウム p H 7 . 0 中のプロリン及び N a C l は、全体的に最も高い H M W 種 % を生んだ。S E C 溶解度スクリーニングデータの概要を表 1 0 及び図 8 に示す。

10

20

30

40

50

【表 1 0】

表 10:SEC 溶解度スクリーニングデータの概要

緩衝液	pH	賦形剤	製剤	HMW(%)	主要ピーク(%)	LMW(%)	総面積(μV*s)
20mM のコハク酸塩	pH6.0	250mM のスクロース	A	6.0	93.8	0.2	50123877
		250mM のプロリン	B	6.3	93.5	0.2	35728620
		150mM の NaCl	C	5.9	93.8	0.2	35824216
20mM のクエン酸塩	pH5.0	250mM のスクロース	D	8.2	91.5	0.3	39059229
		250mM のプロリン	E	14.6	85.0	0.4	27138683
		150mM の NaCl	F	11.7	88.0	0.3	28169043
	pH6.0	250mM のスクロース	G	5.3	94.5	0.2	52451719
		250mM のプロリン	H	5.1	94.7	0.3	30695670
		150mM の NaCl	I	5.5	94.3	0.3	41407595
20mM の重炭酸ナトリウム	pH7.0	250mM のスクロース	J	13.6	86.2	0.2	43615676
		250mM のプロリン	K	16.5	83.3	0.2	51379433
		150mM の NaCl	L	12.5	87.3	0.2	34932916
20mM のヒスチジン	pH6.0	100mM の Arg/50mM の NaCl	M	5.7	94.0	0.3	33330444

【 0 2 4 1】

実施例 8：界面活性剤スクリーニング

凍結乾燥された E N P P 1 ポリペプチド製剤で使用するための優れた界面活性剤を特定するために、E N P P 1－F c を、3つの基礎製剤（コハク酸塩／スクロース p H 6 . 0、コハク酸塩／N a C l p H 6 . 0、及びクエン酸塩／スクロース p H 7 . 0）及び対照製剤（ヒスチジン／アルギニン／N a C l p H 6 . 0）に緩衝液交換した。製剤試料を、凍結融解サイクル及び機械的ストレスを介してストレスに供し、加えて、2つの小さなアリコートにストレスなしの対照として確保した。凍結融解サイクル試料を－8 0℃で6 0 分間以上凍結させ、室温で解凍した。このプロセスを合計5 サイクル繰り返した。攪拌ストレスについては、試料を、遮光し、約6 0 0 r p m に設定したマイクロプレート振盪機上に、約7 2 時間室温で置いた。

【 0 2 4 2】

ストレスをかけた試料の安定性／凝集を評価するために、酵素活性を測定し、S E C－H P L C を行った。全てのストレス条件及び製剤についての界面活性剤間の酵素活性は同等であり、E N P P 1－F c の酵素活性が試験条件下で影響を受けなかったことを示している。界面活性剤試験の S E C 評価を、表 1 1、図 9 A、及び図 9 B に示す。全ての製剤にわたる H M W 含量％は、界面活性剤が凍結／融解ストレスに供された試料に影響を与えなかったことを示しており、これは、ストレスをかけた試料とそれぞれの対照との間で値が同等であることが示されているためである。攪拌ストレスをかけた試料については、P 1 8 8 試料が、3つの試験した界面活性剤のうちの最も安定であった。P S 2 0 は、攪拌ストレス下で優れた安定性を提供し、試験した3つの界面活性剤にわたって H M W 含量％の減少を生んだ。これらのデータは、界面活性剤の存在及びタイプが、物理的ストレス後の E N P P 1－F c 安定性に影響を与えることを示す。S E C は、P S 2 0 が、5 0 m g／m L での E n P P 1－F c 安定性のための最適な界面活性剤タイプであることを示す。攪拌後、P 1 8 8 は、大部分の賦形剤／緩衝液タイプの組み合わせにおいて、高次凝集体の合計レベルの上昇を示した。

10

20

30

40

50

【表 1 1 - 1】

表 11: 界面活性剤スクリーニング SEC データの概要

緩衝液	pH	賦形剤	製剤	界面活性剤	条件	HMW%	主要%	LMW%	カラム回収率	総面積 (μ V*s)
20mM のコハク酸塩	pH6.0	250mM のスクロース	A	-	攪拌	8.9	90.8	0.3	101	3480
					攪拌対照	7.3	92.4	0.3	101	3303
					F/T	5.6	94.1	0.3	100	3505
					5℃	6.0	93.7	0.3	101	3598
			B	0.05% PS20	攪拌	7.8	92.0	0.3	98	3365
					攪拌対照	7.2	92.4	0.3	98	3330
					F/T	5.5	94.2	0.3	98	3510
					5℃	5.9	93.8	0.3	98	3634
			C	0.05% PS80	攪拌	8.1	91.6	0.3	98	3415
					攪拌対照	7.5	92.1	0.3	97	3260
					F/T	5.6	94.1	0.3	99	3568
					5℃	6.0	93.7	0.3	97	3648
			D	0.1% P188	攪拌	8.9	90.9	0.3	87	3332
					攪拌対照	8.0	91.7	0.3	87	3316
					F/T	5.6	94.1	0.3	87	3528
					5℃	6.0	93.7	0.3	88	3595
		150mM の NaCl	E	-	攪拌	7.7	92.0	0.3	99	3346
					攪拌対照	6.9	92.8	0.3	98	3223
					F/T	5.6	94.1	0.3	99	3510
					5℃	5.8	93.9	0.3	99	3621
			F	0.05% PS20	攪拌	7.2	92.5	0.3	90	3406
					攪拌対照	6.8	92.8	0.3	92	3133
					F/T	5.5	94.2	0.3	91	3494
					5℃	5.8	93.9	0.3	94	3596
			G	0.05% PS80	攪拌	7.5	92.2	0.3	90	3433
					攪拌対照	7.0	92.7	0.3	91	3278
					F/T	5.6	94.1	0.3	90	3562
					5℃	5.8	93.9	0.3	90	3631
			H	0.1% P188	攪拌	8.2	91.5	0.3	92	3309
					攪拌対照	7.5	92.1	0.3	94	3151
					F/T	5.6	94.1	0.3	95	3460
					5℃	5.9	93.8	0.3	95	3584

10

20

30

40

50

【表 1 1 - 2】

20mM のクエン酸塩	pH7.0	250mM のスクロース	I	-	攪拌	9.9	89.8	0.3	87	3403
					攪拌対照	9.2	90.5	0.3	88	3115
					F/T	7.2	92.4	0.3	8	3454
					5℃	7.8	91.9	0.3	88	3598
			J	0.05% PS20	攪拌	9.5	90.2	0.3	93	3339
					攪拌対照	9.2	90.5	0.3	92	3074
					F/T	7.2	92.5	0.3	93	3489
					5℃	7.7	92.0	0.4	93	3537
			K	0.05% PS80	攪拌	9.7	90.0	0.3	101	3304
					攪拌対照	9.2	90.5	0.3	100	3081
					F/T	7.2	92.4	0.4	101	3535
					5℃	7.7	91.9	0.4	101	3555
			L	0.1% P188	攪拌	10.8	88.8	0.4	91	3268
					攪拌対照	10.6	89.0	0.3	92	3063
					F/T	7.3	92.4	0.4	92	3512
					5℃	7.8	91.9	0.3	92	3600
20mM のヒスチジン	pH6.0	100mM の Arg/50mM の NaCl	M	-	攪拌	8.6	91.0	0.3	101	3329
					攪拌対照	8.1	91.6	0.3	96	3112
					F/T	6.9	92.7	0.4	101	3468
					5℃	7.1	92.6	0.3	101	3560
出発物質						4.9	94.8	0.3	102	3590

10

20

【0 2 4 3】

実施例 9：補因子スクリーニング

20mM のコハク酸塩、250mM のスクロース、pH6.0 中の 11 個の異なる補因子の組み合わせ（補因子なしの陰性対照を含む）を調査した。試験した補因子には、対イオンとして塩化物及び硫酸塩を対イオンとする Zn^{+2} 及び Ca^{+2} 、並びにアデノシンーリン酸（AMP）が含まれた。SEC 実験を、各補因子の組み合わせに行った。SEC データを表 12 に要約する。図 10. これらのデータは、AMP / $ZnCl_2$ が最も低い HMW% レベルを呈したことを示す。しかしながら、試験した補因子については、塩化物又は硫酸塩いずれかを対イオンとする、AMP、 Ca^{+2} が、最も低い HMW 含量%を生み出した。 Ca^{+2} 補因子は、驚くべきことに、ENPP1-Fc を安定化させたが、試料調製中に形成された可能性のある高次凝集体種を戻す能力も示した。これらの効果は、製剤 A と製剤 C とを比較することによって観察される（図 11）。亜鉛は、最も高いレベルの HMW 含量%を生み出したが、亜鉛の存在下での HMW% は、amp を加えることによって有意に減退し、全ての試料、製剤 A を生成するために使用した原料物質の HMW レベル%を下回って低減する。これらの結果は、補因子の存在及び種類が、驚くべきことに及び有意に、ENPP1-Fc の安定性を増加させることを示す。

30

40

50

【表 1 2】

表 12: 補因子スクリーニング補因子組み合わせ概要 SEC データ

緩衝液	製剤	試料の種類	補因子	HMW (%)	主要 (%)	LMW (%)	カラム回収率 (%)	USP プレート計数	総面積 (μ V*s)	濃度 (mg/mL)
20mM の コハク 酸塩 250mM の スクロース 0.05% の PS20 pH6.0	A	緩衝液交換	-	18.8	80.9	0.3	97	3607		50.5
	B		2mM の ZnCl	71.0	28.8	0.2	95	3300		49.9
	C		2mM の CaCl	11.5	88.2	0.3	99	3523		50.6
	D		2mM の ZnCl+2mM の CaCl	72.5	27.3	0.2	96	3368		52.1
	E	スパイクした 製剤 A	2mM の ZnCl	46.8	53.0	0.2	99	3644		50.6
	F		2mM の CaCl	12.1	87.4	0.5	97	3540		51.4
	G		2mM の ZnCl+2mM の CaCl	47.8	52.0	0.2	100	3538		51.0
	H		2mM の ZnSO ₄	48.8	51.0	0.2	93	3472		54.0
	I		2mM の CaSO ₄	12.3	87.3	0.4	97	3489		50.1
	J		5mM の ZnSO ₄ +2mM の CaSO ₄	52.0	47.9	0.2	97	3294		50.4
	K		2mM の ZnCl+50mM の AMP	8.4	91.2	0.4	-	3396		44.0

【0 2 4 4】

合計 15 個の異なる緩衝液／補因子の組み合わせを更に調査した。ENPP1-Fc を 12 種類の製剤に緩衝液交換した。様々な製剤中のタンパク質の安定性を SEC により評価した。SEC 分析の前に、試料を 40℃ で 6 日間貯蔵した。各製剤の対照試料を、試験期間中、5℃ に保った。SEC データを表 13 及び図 12A～図 12B に要約する。上で提示した補因子データと一致して、Ca²⁺ 及び Ca²⁺／アデノシンリン酸は、試験した試料にわたって最も少ない量の高次凝集体を生成した。クエン酸塩及びスクロースと組み合わせた場合、Ca²⁺ 及び Ca²⁺／アデノシンリン酸は、各々、最も低い割合（8.6%）の HMW を生成し、これにより、Ca²⁺ 及び Ca²⁺／アデノシンリン酸が優れた補因子であること、クエン酸塩及びスクロースと併用した場合、製剤の全体的な安定性を驚くほど強化することが示される。

10

20

30

40

50

【表 1 3】

表 13: 補因子スクリーニング緩衝液/補因子概要 SEC データ

緩衝液	賦形剤	製剤	HMW (%)	主要ピーク (%)	LMW (%)
20mM のコハク酸塩、250mM のスクロース 0.05%の PS20、pH6.0	—	A	19.1	80.4	0.5
	AMP (0.5mM)	B	18.4	81.2	0.4
	AMP (5mM)	C	18.7	80.9	0.4
	AMP (50mM)	D	12.4	86.6	0.9
	ZnCl ₂ (2mM)	E	74.2	25.5	0.3
	ZnCl ₂ (2mM) +AMP (5mM)	F	27.9	71.6	0.6
	ZnCl ₂ (2mM) +AMP (50mM)	G	9.5	89.7	0.7
	CaCl ₂ (2mM)	H	11.3	88.1	0.6
	CaCl ₂ (2mM) +AMP (5mM)	I	10.2	89.3	0.5
20mM のクエン酸塩、250mM のスクロース 0.05%の PS20、pH6.0	AMP (5mM)	J	15.3	84.1	0.5
	CaCl ₂ (2mM)	K	12.7	86.4	0.9
	CaCl ₂ (2mM) +AMP (5mM)	L	8.6	90.9	0.6
20mM のクエン酸塩、150mM の NaCl 0.05%の PS20、pH6.0	AMP (5mM)	M	15.2	84.3	0.5
	CaCl ₂ (2mM)	N	15.0	84.3	0.8
	CaCl ₂ (2mM) +AMP (5mM)	O	8.6	90.9	0.5

【0 2 4 5】

実施例 10：好ましい凍結乾燥された ENPP1 ポリペプチド製剤の特徴付け

上に提示した特徴付け及び安定性データに基づく、好ましい凍結乾燥された ENPP1 ポリペプチド製剤は、コハク酸塩及びクエン酸塩を含む。これらの好ましい製剤を表 13 に列挙し、経時的なポリペプチド安定性について更に特徴付けた。pH は、クエン酸塩を含む各製剤試料について pH 6.3 ± 0.1、コハク酸塩を含む各試料について pH 6.1 ± 0.1 であると決定した。コハク酸塩又はクエン酸塩を含む ENPP1-Fc 試料についてオスモル濃度を測定し、全ての試料についてのオスモル濃度値は、265 ~ 432 mOsm/kg の範囲であった。概要データを図 13 に示す。これらの製剤の ENPP1-Fc の主要ピーク純度及び高次凝集体を SEC により評価した。結果を図 14 に示す。製剤 A、B、C、E、及び F 中の凍結乾燥された ENPP1-Fc 及び対照は、全ての時点及び条件にわたって、94% 超の相対主要ピーク純度を呈した。5℃で貯蔵した 13 週時点でのコハク酸塩試料は、HMW 含量 % の 1% の増加を呈し、一方でクエン酸塩試料は、HMW % の約 0.5% の増加を示した。粒径分布及び形態を、マイクロフローイメージング分析 (MFI) によって評価した。MFI では、連続試料ストリームが顕微鏡システムの視野に位置付けられたフローセルを通過すると、明視野顕微鏡画像が連続フレームで捕捉される。試料中に存在する粒子の画像は、サイズ及び計数の定量化を可能にする画像形態分析ソフトウェアによって処理する。代表的な画像及び粒子濃度 (1 mL 当たり) を、2 µm 以上、5 µm 以上、10 µm 以上、25 µm 以上の円相当径 (ECD) サイズビンについて報告した。物体の ECD は、ミクロンで表され、粒子と同じ二次元表面積を占める球の直径を表す。結果を表 14 に要約する。総粒子数は、概して、全ての製剤について許容限界内であった。10 µm 以上の ECD ビンの総粒子数は、全て 749 未満であり、25 µm 以上の ECD ビンの総粒子数は、全て 132 未満であり、本明細書に開示の製剤が、より大きな粒径の粒子を欠くことを示す。

10

20

30

40

50

【表 1 4】

表 14:MFI 要約データ

緩衝液	賦形剤	製剤	時点	条件	1mL 当たりの総粒子数			
					≧2	≧5	≧10	≧25
20mM のコハク酸塩、 2mM の CaCl ₂ pH6.0	スクロース (9%)	A	T0	-75℃-対照	1505	117	26	7
				リオ	2902	767	214	12
			4 週間	-75℃-対照	1835	582	201	34
				5℃	2301	830	320	35
				40℃	1210	398	123	16
			13 週間	5℃	4068	1223	231	23
	スクロース (3%) マンニトール (1.5%)	B	T0	-75℃-対照	720	90	17	1
				リオ	2753	763	267	42
			4 週間	-75℃-対照	2482	800	304	36
				5℃	1395	446	150	22
				40℃	839	218	77	8
			13 週間	5℃	2090	652	142	31
	スクロース (2%) マンニトール (2%)	C	T0	-75℃-対照	2280	659	210	26
				リオ	2634	617	201	23
			4 週間	-75℃-対照	2953	976	346	65
				5℃	3900	976	297	33
				40℃	877	211	70	15
			13 週間	5℃	2127	615	99	4
20mM のクエン酸塩、 2mM の CaCl ₂ pH6.0	スクロース (9%)	D	T0	-75℃-対照	306	81	36	11
				リオ	3574	386	92	9
			4 週間	-75℃-対照	234	73	31	7
				5℃	818	214	61	10
				40℃	1836	754	302	29
			13 週間	5℃	4033	1951	749	132
	スクロース (3%) マンニトール (1.5%)	E	T0	-75℃-対照	188	48	17	5
				リオ	1235	195	67	10
			4 週間	-75℃-対照	2805	1174	349	34
				5℃	1389	411	140	22
				40℃	2090	850	326	47
			13 週間	5℃	1842	566	121	23
	スクロース (2%) マンニトール (2%)	F	T0	-75℃-対照	718	289	114	26
				リオ	2285	357	117	8
			4 週間	-75℃-対照	1683	639	212	22
				5℃	1522	406	123	15
				40℃	1156	357	107	6
			13 週間	5℃	3182	1283	492	95

【 0 2 4 6 】

上で報告したデータに基づいて、凍結乾燥された E N P P 1 - F c に最も好適な製剤として、20mM のクエン酸塩、88mM のスクロース、82mM のマンニトール、2mM の塩化カルシウム、0.05% の P S 2 0 pH 6.3 (製剤 A)、及び 20mM のクエン酸塩、263mM のスクロース、2mM の塩化カルシウム、0.05% の P S 2 0 pH 6.3 (製剤 B) を選択した。これらの製剤を、様々な貯蔵条件での凍結乾燥されたポリペプチドの安定性に対するそれらの長期効果について更に調査した。2つの製剤を、3か月の期間にわたって、5℃、25℃、及び 40℃ の3つの異なる貯蔵条件で試験した。3か月後、E N P P 1 - F c を含む全ての凍結乾燥ケーキが、アイボリー色の無傷の構造を示した。再構成した後、液体の外観は、試料全種類について、褐色がかった黄色であり、透過し、目に見える粒子を含まないことが観察された。再構成は、上述のデータと一致するウィンドウ内で生じ、凍結乾燥された試料の完全な再構成は、59秒〜108秒以

内に生じた。経時的な温度条件にわたる両製剤の含水量も、上述の含水量データと一致したままであった。試験した貯蔵温度の全てにおける全ての凍結乾燥された試料の時点は、時点及び条件にわたって含水量が非常に低いか又は皆無であり、残留含水量は0.0%~0.3%の範囲であった。各貯蔵条件での各試料のpH値も経時的に一貫したままであり、試料pHは3か月の過程にわたってpH6.3±0.1のままであった。50mg/mLの正規化した開始濃度に対するタンパク質回収も、各試料について測定した。タンパク質回収の概要データを表15に示す。各試料の回収は、ゼロ時点陽性対照の回収データと一致した。ゼロ時点陽性対照は、40.1mg/mLの濃度を有すると測定された。回収された全ての試料が、陽性対照試料を0.3mg/mL下回る範囲内、又は陽性対照試料の濃度を8.8mg/mL上回る範囲内のいずれかの濃度を示した。これらのデータにより、タンパク質回収が、5℃、25℃、及び40℃の貯蔵条件下で経時的に劣化しないことが示される。

【表15】

表 15:5℃、25℃、及び40℃で3か月間にわたる好ましい製剤タンパク質回収データの概要

試料	公称濃度 (mg/mL)	再構成充填体積 (mL)	時点	条件	A280による回収 (mg/mL)
製剤 A	50.0	0.5	T0	凍結対照	47.5
				リオ	40.1
			1 か月	凍結対照	43.4
				5℃	43.1
				25℃	40.2
				40℃	39.8
			3 か月	凍結対照	46.8
				5℃	43.9
				25℃	40.7
				40℃	46.3
製剤 B	50.0	0.5	T0	凍結対照	53.9
				リオ	48.5
			1 か月	凍結対照	52.7
				5℃	48.0
				25℃	47.1
				40℃	48.9
			3 か月	凍結対照	55.3
				5℃	49.4
				25℃	48.9
				40℃	49.9

【0247】

SEC実験を実施して、好ましい製剤の試料を、5℃、25℃、及び40℃で貯蔵したときに、3か月の期間にわたってHMW種が発生する傾向を特徴付けた。総HMW種、LMW種、及び主要ピーク種の存在率に関するSECデータの概要を、表16に報告する。図15は、貯蔵条件ごとの、経時的なHMW存在率及び主要ピーク存在率についてのSECデータの概要を示す。陽性対照ゼロ時点試料は、およそ4%のHMW含量を有した。全ての好ましい製剤試料は対照と一致したままであり、各々、5℃、25℃、及び40℃の貯蔵条件下で、3か月の期間にわたり±5%のHMW含有量を有した。これらの結果は、各好ましい製剤が、驚くべきことに、少なくとも3か月の長期間にわたって高分子量凝集体種の形成を防止することができることを示す。これらのデータはまた、好ましい製剤が

、 2 5 ℃ 及 び 4 0 ℃ などのより高い温度又は非冷蔵温度で貯蔵したときでさえ、凍結乾燥されたポリペプチドを H M W 種の形成に対して安定させることができることを示す。

【表 1 6】

表 16:5℃、25℃、及び 40℃で 3 か月間にわたる好ましい製剤の SEC データの概要

試料	公称濃度 (mg/mL)	再構成 充填体積 (mL)	試料の 種類	時点	条件	HMW (%)	主要ピーク 純度 (%)	LMW (%)
製剤 A	50.0	0.5	リオ	T0	凍結対照	3.8	95.7	0.5
					リオ	3.7	95.8	0.5
				1 か月	凍結対照	4.2	95.1	0.7
					5℃	4.0	95.2	0.7
					25℃	4.1	95.1	0.8
					40℃	4.3	95.0	0.7
				3 か月	凍結対照	4.0	95.3	0.6
					5℃	4.2	95.2	0.6
					25℃	4.7	94.7	0.6
					40℃	4.2	95.2	0.6
製剤 B	50.0	0.5	リオ	T0	凍結対照	3.9	95.5	0.6
					リオ	3.9	95.6	0.5
				1 か月	凍結対照	4.2	95.1	0.8
					5℃	4.1	95.1	0.8
					25℃	4.2	95.1	0.8
					40℃	4.8	94.5	0.8
				3 か月	凍結対照	4.1	95.3	0.6
					5℃	4.3	95.1	0.6
					25℃	4.9	94.5	0.6
					40℃	4.0	95.5	0.6

【 0 2 4 8 】

各時点及び貯蔵条件に対応する全ての好ましい製剤試料についての比活性を、上記の酵素活性スクリーニングを利用して評価した。概要データを表 1 7 に示す。活性データを、凍結対照を含む各試料について経時的にプロットした。代表的な活性対時間プロットを図 1 6 に示す。時点及び貯蔵条件にわたる全ての試料が、陽性対照と一致したレベルの酵素活性を示し、活性レベルは、 $46009\text{ }\mu\text{mol 分}^{-1}\text{mg}^{-1}\sim73173\text{ }\mu\text{mol 分}^{-1}\text{mg}^{-1}$ の範囲であった。

【表 1 7】

表 17:5℃、25℃、及び 40℃で 3 か月間にわたる好ましい製剤の酵素活性データの概要

試料	公称濃度 (mg/mL)	充填体 積 (mL)	試料の 種類	時点	条件	比活性 (μ mol. 分 ⁻¹ . mg ⁻¹)	標準 偏差
製剤 A	50.0	0.5	リオ	T0	凍結対照	54374	2181
					リオ	50840	3443
				1 か月	凍結対照	46899	1679
					5℃	50717	2480
					25℃	46009	1776
					40℃	49521	2633
				3 か月	凍結対照	75625	344
					5℃	69830	1623
					25℃	73173	1233
					40℃	68859	611
製剤 B	50.0	0.5	リオ	T0	凍結対照	56227	3859
					リオ	75734	911
				1 か月	凍結対照	49683	481
					5℃	49343	652
					25℃	55132	3391
					40℃	52421	1210
				3 か月	凍結対照	67093	385
					5℃	68920	2554
					25℃	76087	803
					40℃	78107	2883

【 0 2 4 9 】

全ての好ましい製剤の時点の試料の粒径分布及び形態を、M F I 分析によって評価した。代表的な画像及び粒子濃度（1 m L 当たり）を、2 μ m 以上、5 μ m 以上、1 0 μ m 以上、2 5 μ m 以上の E C D サイズビンについて報告した。結果を表 1 8 に要約する。総粒子数は、上記の M F I 結果で観察されたものよりも驚くほどはるかに低く、全ての好ましい製剤試料について許容限界内であった。1 0 μ m 以上の E C D ビンの総粒子数は、全て 1 4 6 未満であり、2 5 μ m 以上の E C D ビンの総粒子数は、全て 2 1 未満であり、このことは、本明細書に開示の好ましい製剤が、以前の M F I 分析に記載した他の製剤の組み合わせと比較して、より大きな粒径の粒子をほぼ 1 0 分の 1 に低減することができることを示す。

【表 1 8】

表 18:5℃、25℃、及び 40℃で 3 か月間にわたる好ましい製剤の MFI データの概要

試料	公称濃度 (mg/mL)	充填体積 (mL)	試料の種 類	時点	条件	総粒子数/mL			
						≥2	≥5	≥10	≥25
製剤 A	50.0	0.5	リオ	T0	凍結対照	2128	504	103	14
					リオ	27676	2200	20	8
				1 か月	凍結対照	1473	523	146	10
					5℃	2033	675	101	10
					25℃	1856	571	80	12
					40℃	2037	735	142	21
				3 か月	凍結対照	2760	410	93	10
					5℃	521	76	14	0
					25℃	412	70	21	0
					40℃	424	45	0	0
製剤 B	50.0	0.5	リオ	T0	凍結対照	591	103	37	0
					リオ	28553	1961	43	6
				1 か月	凍結対照	1134	412	86	8
					5℃	2393	354	35	2
					25℃	3124	379	21	0
					40℃	1864	360	39	0
				3 か月	凍結対照	1114	140	29	0
					5℃	1988	64	12	2
					25℃	564	27	6	0
					40℃	342	76	19	2

【0 2 5 0】

上記の製剤開発研究では、ストレスをかけた条件下及びストレスをかけていない条件下の両方で、ENPP1-Fc 製剤の最適な化学的、物理的、及び構造的安定性をもたらし得る製剤成分の特定に焦点を当てた。複数の緩衝液タイプ、pH 条件、賦形剤、及び界面活性剤濃度を、ベースライン緩衝液、賦形剤、溶解度、界面活性剤、及び補因子試験の過程にわたって反復して評価した。本明細書に開示の凍結乾燥製剤試験の結果に基づいて、ENPP1-Fc に最も好適な製剤として、20 mM のクエン酸塩 pH 6.3、88 mM のスクロース、82 mM のマンニトール、2 mM の塩化カルシウム、0.05 % の PS20、及び 20 mM のクエン酸塩 pH 6.3、263 mM のスクロース、2 mM の塩化カルシウム、0.05 % の PS20 を選択した。これらの好ましい製剤は、50 mg/mL の凍結乾燥されたポリペプチド製剤の標的濃度で、ENPP1-Fc に最大の化学的、物理的、及び立体構造的安定性を付与する。

【0 2 5 1】

加えて、別の例示的な製剤である（製剤 C1）：50 mg/mL の ENPP1 ポリペプチド、約 pH 6.3 の 20 mM のクエン酸塩、2 mM の塩化カルシウム、175 mM のスクロース、82 mM の（D）マンニトール、及び 0.05 % w/v のポリソルベート 20 を試験した。この製剤を、5℃、25℃、及び 40℃の3つの異なる貯蔵条件で12か月間にわたって様々な貯蔵条件での凍結乾燥された ENPP1-Fc ポリペプチド安定性に対するその長期効果について調査した。3か月の増分後、ENPP1-Fc を含む凍結乾燥ケーキは、アイボリー色の無傷の構造を示した。再構成した後、液体の外観は、試料全種類について、褐色がかった黄色であり、透過通り、目に見える粒子を含まないことが観察された。再構成は、上述のデータと一致するウィンドウ内で生じ、凍結乾燥された試料

の完全な再構成は、2～3分以内に生じた。経時的な温度条件にわたる含水量も、一貫したままであった。試験した貯蔵温度の全てにおける全ての凍結乾燥された試料の時点は、時点及び条件にわたって含水量が非常に低いか又は皆無であり、残留含水量は0.0%～0.16%の範囲であった。各貯蔵条件での各試料のpH値も経時的に一貫したままであり、試料pHは3か月の過程にわたってpH6.3±0.1のままであった。

【0252】

サイズ排除クロマトグラフィー（SEC）を使用して、ENPP1ポリペプチド製剤試料中に存在する凝集体及び分解産物の量を評価した。12か月（5℃及び25℃）及び6か月（40℃）にわたる総高分子量（HMW）種、低分子量（LMW）種、及び主要ピーク純度の存在率を報告する。

10

【表19】

表 19:5℃での12か月間にわたる製剤C1についての酵素活性データの概要

分析手順	単位	時間ゼロ	1か月	3か月	6か月	9か月	12か月
比活性	U/mg-umol/ 分*mg	90.10	98.30	96.40	81.80	99.90	90.90
SE-HPLC HMWS	面積%	3.8	4.1	4.0	4.0	3.8	3.6
SE-HPLC LMWS	面積%	<0.3	<0.3	<0.3	<0.3	<0.3	<0.3
SE-HPLC 主 要ピーク	面積%	96.1	95.8	95.8	95.9	96.1	96.3

20

【表20】

表 20:25℃での12か月間にわたる製剤C1についての酵素活性データの概要

分析手順	単位	時間ゼロ	1か月	3か月	6か月	9か月	12か月
比活性	U/mg-umol/ 分*mg	90.10	101.80	91.20	86.70	101.40	92.70
SE-HPLC HMWS	面積%	3.8	4.3	4.4	4.4	4.2	3.9
SE-HPLC LMWS	面積%	<0.3	<0.3	<0.3	<0.3	<0.3	<0.3
SE-HPLC 主 要ピーク	面積%	96.1	95.6	95.4	95.4	95.7	96.0

30

【表21】

表 21:40℃での6か月間にわたる製剤C1についての酵素活性データの概要

分析手順	単位	時間ゼロ	1か月	3か月	6か月
比活性	U/mg-umol/ 分*mg	90.10	102.90	96.0	85.90
SE-HPLC HMWS	面積%	3.8	4.5	4.9	5.0
SE-HPLC LMWS	面積%	<0.3	<0.3	<0.3	<0.3
SE-HPLC 主 要ピーク	面積%	96.1	95.3	94.9	94.8

40

50

【0253】

比活性及びSECデータにより、製剤A及びB（上記）のような製剤C1が、特に様々な温度にわたって、少なくとも12か月間、ENPP1-Fcに対して顕著な全体的安定性を提供することが示される。

【0254】

実施例11：凍結乾燥されたENPP1ポリペプチド製剤を使用した処理

ENPP1-Fcは、開示される前述の製剤のうちのいずれかとともに投与することができる。いくつかの実施形態では、ENPP1-Fcは、約pH6.3の20mMのクエン酸塩、2mMの塩化カルシウム、175mMのスクロース、82mMの（D）マンニトール、及び0.05%w/vのポリソルベート20を含む製剤で投与する。凍結乾燥された製剤は、それを必要とする対象への投与前に、好適な再構成緩衝液（又は滅菌水）中で再構成する。

10

【0255】

ENPP1-Fcは、以下の選択された用量：0.2mg/kg、0.6mg/kg、及び1.8mg/kgのうちの1つで投与する。投与は、少なくとも隔月に1又は2回、少なくとも月に1又は2回、月に3回、少なくとも週に1又は2回、皮下（SC）である。

【0256】

ENPP1-Fcの第1の用量は、1日目に投与してもよい。8日目及びその後、ENPP1-Fcは、ENPP1の選択された用量で週に2回、対象に投与する。用量は、各投与日にほぼ同じ時間に投与してもよい。注射部位は交互にし、過去2週間以内のあらゆる以前の注射部位から2インチ以内の部位には行わない。

20

【0257】

ENPP1-Fcの選択された用量は、0.2mg/kg、0.6mg/kg、又は1.8mg/kg SCのうちの1つである。ENPP1-Fcの第1の用量は、1日目に投与してもよい。第1の用量の後、安全性をモニタリングし、PK試料を収集するために、対象を7日間観察してもよい。8日目及びその後、対象は、選択された用量を週2回受ける。選択された用量でのENPP1-Fcの投与は、医療従事者によって適切であるとみなされる場合、継続される。

【0258】

対象は、29日間の期間の過程にわたり、8つの用量のENPP1-Fcを受けてもよく、例えば、0.2mg/kg、0.6mg/kg、及び1.8mg/kgの用量について、それぞれ、29日ごとに1.6mg、4.8mg、及び14.4mgの曝露をもたらす。そうでなければ、対象は、医療専門家によって適切であるとみなされる場合に、大体8つの用量を受けてもよい。

30

【0259】

内因性ENPP1酵素と同様に、ENPP1-Fcは、ATPを切断してAMP及びPPiを生成し、それにより、血漿PPiレベルを増加させ、CD73がアデノシンに急速に変換するAMPへと増加させる。内因性ヒト酵素の補充は、内在する欠乏を是正し、健康の改善及びENPP1ベースラインの患者、臨床医、及び介護者アウトカムに関連する臨床合併症の軽減を可能にすることが意図される。

40

【0260】

実施例12：ENPP1欠乏を有する患者の治療

上記のように製剤化したEnpp1-Fcを、以下のように選択用量を使用して、1日目及び8日目に開始する週2回、皮下注射によりENPP1欠乏を有すると特定された患者に投与する。

【表 2 2】

表 2 2. 例示的な用量

1	0. 2 m g / k g
2	0. 6 m g / k g
3	1. 8 m g / k g

【0 2 6 1】

ENPP1－Fc は、医療従事者によって決定される期間、少なくとも週 2 回、0. 2 m g / k g、0. 6 m g / k g、又は 1. 8 m g / k g の SC のうちの 1 つである ENPP1－Fc の選択された用量で投与する。酵素補充に対する患者の応答を、例えば、ENPP1 欠乏の 1 つ以上の症状の低減に続いて、及び／又は本明細書に提供される指導を使用して、医療従事者によって決定されるように、必要に応じてモニタリングする。

【0 2 6 2】

実施例 1 3：GACI と診断された患者の治療

Enpp1 欠乏は、GACI としてマスクされ得る。GACI は、乳児に発生し、かつ広範な動脈石灰化を伴う稀な疾患である (Albright, et al., 2015, Nature Comm. 10006)。

【0 2 6 3】

上記のように製剤化した ENPP1－Fc は、医療従事者によって決定される期間、少なくとも週 2 回、0. 2 m g / k g、0. 6 m g / k g、又は 1. 8 m g / k g の SC のうちの 1 つである ENPP1－Fc の選択された用量で投与する。GACI 患者の応答を、例えば、GACI の 1 つ以上の症状の低減に続いて、及び／又は本明細書に提供される指導を使用して、医療従事者によって決定されるように、必要に応じてモニタリングする。

【0 2 6 4】

実施例 1 4：ARHR2 と診断された患者の治療

Enpp1 欠乏は、ARHR2 としてマスクされ得る。ARHR2 は、低レベルの血漿 P P i 及び血清リン酸塩によって特徴付けられる稀な骨格障害であり、これは、くる病、長骨の繰り返される骨折、くる病の骨格変形、並びに成長及び発達の障害をもたらし得る (Ferreira et al 2014、Moran 1975、Rutsch et al 2008)。

【0 2 6 5】

上記のように製剤化した ENPP1－Fc は、医療従事者によって決定される期間、少なくとも週 2 回、0. 2 m g / k g、0. 6 m g / k g、又は 1. 8 m g / k g の SC のうちの 1 つである ENPP1－Fc の選択された用量で投与する。ARHR2 患者の応答を、例えば、ARHR2 の 1 つ以上の症状の低減に続いて、及び／又は本明細書に提供される指導を使用して、医療従事者によって決定されるように、必要に応じてモニタリングする。

【0 2 6 6】

以下の実施例は、本明細書全体の文脈において、治療プロトコル及び有効性を決定するための指導を提供する。

【0 2 6 7】

実施例 1 5：血漿中無機ピロリン酸の測定

低い血漿中 P P i レベルは、ENPP1 欠乏の特徴であり、治療有効性の指標として使用される。ENPP1－Fc は、ATP を特異的に切断して、AMP 及び P P i を生成する。ENPP1 ERT の治療目標は、細胞外 P P i レベルを正規化し、ENPP1 欠乏と関連付けられる臨床的異常を是正することである。

【0 2 6 8】

PPiは、患者の血漿試料を得ることによって測定する。決定されたPPiデータは、用量レベルを調整するために使用してもよい。PPiレベルはまた、PK/PD分析のための主要なPDマーカーとしても機能し得る。

【0269】

哺乳動物におけるPi及びPPiの濃度は、それぞれ、1～3mM及び2～3pMである。

【0270】

実施例16：骨の健康と関連付けられるバイオマーカー

低い血漿中PPiに加えて、ENPP1欠乏の患者は、低い血清中リン酸塩、高い尿中リン酸塩、低い腎TmP/GFR、正常なカルシウム(Ca)、低い正常尿Ca、正常な25-ヒドロキシビタミンD(25-OH-D)、低い正常1,25-(OH)₂D、高いBAP、高いインタクトFGF23、及び正常なPTH(1-34)を生化学的に特徴とする。

【0271】

治療された患者の骨の健康の追加の決定因子として使用され得るバイオマーカーを表19に示す。

【表23】

表23：臨床中間体及びバイオマーカー

	臨床検査分析物	試料の種類
主要薬力学マーカー	ピロリン酸(PPi)	血漿
	無機リン酸塩	血清
	FGF23(インタクト)	血漿
	TmP/GFR	血清中クレアチニン、血清中リン酸塩、尿中リン酸塩
	ALP、BALP、CTX、PINP	血清、血漿、尿

【0272】

実施例17：ENPP1-Fcによる治療の有効性

治療有効性は、血漿中PPiを測定すること、並びにFGF23、Pi、FGF23、Pi、TmP/GFR、血清中アルカリホスファターゼ(ALP)、骨特異的ALP(BALP)、I型コラーゲンのカルボキシ末端架橋テロペプチド(CTX)、及びプロコラーゲン1型N末端プロペプチド(PINP)などの他の血漿分析物を測定することによって評価してもよい。これらの分析物測定値を、ENPP1欠乏と関連付けられるPDマーカーとして使用して、ENPP1-Fcの有効性を決定することができる。これらの分析物の変化は、治療の過程にわたって、ベースラインからの、及び時間依存的な様式での変化として説明され得る。また、PK及びPDパラメータの用量線形性を評価してもよい。

【0273】

血漿中PPiレベル、FGF23レベル、及びクレアチニークリアランス当たりの尿中リン酸塩排出のベースラインからの変化を、PPiレベルのベースラインからの変化がゼロに等しいという帰無仮説を検定するために、対応のある差のt検定を使用して分析してもよい。

【0274】

実施例18：薬物濃度測定

加えて、血漿中のENPP1-Fc濃度の測定、並びに第1の用量(すなわち、単回用量)後及び複数回用量(すなわち、定常状態)とその後のPKパラメータのその後の決定のために、血液試料を患者から得てもよい。

【0275】

実施例19：免疫原性(抗薬物抗体)

所望である場合、ENPP1-Fcに対する免疫原性を、抗薬物抗体(ADA)を使用

して測定してもよい。免疫原性試験では、多層的なアプローチを利用することができ、初期スクリーニングでADAが検出された場合、特異性を決定するために確認試験を実施してもよい。試料はまた、特異性確認（すなわち、力価）及び中和抗体のアッセイを評価及び更に確立するために使用してもよい。

【0276】

実施例20：薬物動態、薬力学、及び探索的バイオマーカー分析

薬物動態分析をPK集団に対して実施してもよく、ENPP1-FCのPKパラメータを、記述統計量を用いた処置によって要約してもよい。また、PK及びPDパラメータの用量線形性を評価してもよい。PK/PD分析、免疫原性分析、及び探索的バイオマーカー分析を決定してもよい。

10

【0277】

実施例21：有効性の追加の決定要因

正常レベルのPPiの回復は、NEPP1-FCを使用した治療の有効性の主要な指標であるが、治療有効性の決定を支援するために望ましい場合、他の物理的測定値も使用することができる。これらには、以下のうちの1つ以上が含まれる。

【0278】

1. X線撮影及び撮像

骨格重症度のX線。標準的なX線を取得して、くる病の骨格変形を検出してもよい。取得X線は、例えば、手首及び膝上で取得してもよい。

【0279】

20

DEXAスキャン。DEXAスキャンを使用して、骨密度の変化を評価してもよい。

【0280】

陽電子放出断層撮影-コンピュータ断層撮影。ベースラインNa¹⁸F-PET/HRpQCT（又はHR-CT）は、ベースライン及び将来の介入評価のために動脈及び器官の石灰化並びに骨格異常を測定するように、ENPP1-FCの第1の用量から1か月以内に行われる全身スキャンであってもよい。Na¹⁸F-PETは、骨代謝及び動脈の微小石灰化を測定する。高分解能定量的コンピュータ断層撮影（HRQCT）又はHR-CTは、非優性遠位端及び脛骨で骨微細構造を決定することができる。標準的な骨幾何学的パラメータを計算する。

【0281】

30

ドップラー心エコー図。ベースラインの心エコー図は、ENPP1-FCの第1の用量前3日以内に取得してもよい。ドップラーエコーを使用して、心臓及び弁の心臓機能[LVEF、血流]石灰化、並びに動脈硬化を測定することができる。

【0282】

光干渉断層撮影。光干渉断層撮影を使用して、新生内膜増殖を可視化してもよい。

【0283】

末梢動脈トノメトリー。末梢動脈トノメトリー（PAT）を使用して、デジタル拍出量変動に対応する、デジタル脈波振幅（PWA）を評価してもよい。

【0284】

腎臓超音波検査。腎臓超音波検査を使用して、例えば、ENPP1-FCの開始から1週間以内に、腎臓石灰化を測定してもよい。

40

【0285】

骨組織形態学及び骨生検。骨生検を、ベースライン測定として実施してもよい。骨生検前の10日間のテトラサイクリン負荷が好ましい。

【0286】

2. 歩行能力。歩行試験は、心肺機能、神経筋機能、及び筋骨格機能を組み合わせた歩行可能な患者の機能能力を測定するための最大下運動測定として使用してもよい。6分間歩行試験（6MWT）は、本来は成人で使用するために米国胸部学会（ATS 2002）によって開発され、現在では成人集団及び小児集団の両方（Mylius et al 2016）、並びに脊髄性筋萎縮症（Montes et al 2018）、デュシェ

50

ンヌ型筋ジストロフィー (McDonald et al 2013)、及び乳児期発症ポンペ病 (van der Meijden et al 2018) などの神経筋疾患を有する子供で一般的に使用されている。2 分間歩行試験 (2 MWT) は、NIH ツールボックスに含まれており、同じ特性を測定するためにますます使用されている。

【0287】

6 MWT 及び 2 MWT は、医療供給者の裁量で、治療前及び治療中に患者に施され得る。対象がベースラインで少なくとも 2 MWT を完了することができない場合、治療中の追加の評価は、医療供給者の裁量に委ねられ得る。安静時の心拍数は、検査前及び検査後に取得する。6 MWT の最初の 2 分間及び 6 分間全体で歩いた距離を記録してもよい。2 分間及び 6 分間で歩いた距離を、年齢及び性別が一致した基準データ (予測値パーセント) と比較してもよい。

10

【0288】

3. ダイナモメトリー。強度を、医療供給者の裁量で、治療前及び／又は治療中にダイナモメトリーを使用して評価してもよい。ハンドヘルドダイナモメトリーは、小児及び成人の両方で一般的に使用される強度の直接測定である。評価することができる筋肉の群には、肩の外転、肩の屈曲、肘の屈曲、肘の伸展、股関節の外転、腰の屈曲、腰の伸展、及び膝の伸展が含まれる。各筋肉の群は、両側で 2 回測定してもよい。

【0289】

握力強度。握力強度を、医療供給者の裁量で、治療前及び／又は治療中に握力強度ダイナモメーターを使用して測定してもよい。機器及び評価者の指示は、施設間で標準化してもよい。握力は、各手に対して取られた 1 つの練習及び 1 つの最大力の測定値を用いて両側で評価してもよく、結果を、年齢及び性別が一致した基準データ (利用可能な場合) と比較してもよい。

20

【0290】

関節可動域。関節の角度を試験し、関節における動きの程度を測定する器具であるゴニオメーターを使用して、関節可動域を評価してもよい。ゴニオメーターの固定アームは、固定本体セグメント上の指定された骨ランドマークと整列し、ゴニオメーターの移動アームは、移動している肢の指定された骨ランドマークと整列する。ゴニオメーターの支点は、動きの軸及び骨ランドマークを使用して測定した各動きに対して指定する。関節可動域は、肩の外転、肩の屈曲、肘の屈曲、肘の伸展、股関節の外転、腰の屈曲、腰の伸展、及び膝の伸展のうちの 1 つ以上について評価してもよい。

30

【0291】

4. 聴覚検査。中等度の難聴は、ARHR2 と関連付けられている (Brachet et al 2014、Steichen-Gersdorf et al 2015)。ベースラインの聴覚を、以下のうちの 1 つ以上によって決定してもよい。身体検査及び耳鏡検査、インピーダンス聴力検査 (一般には、ティンパノメトリーと称される)、純音聴力検査 (PTA) (可能な場合、最大 8 kHz の周波数)。(PTA 閾値が > 15 dB である場合、対象は骨伝導検査も受けるべきである。)、高周波聴力検査 (HFA) (最大 16 kHz の周波数)。

【0292】

40

5. 臨床医の全般的印象尺度。臨床全般印象 (CGI-S) 尺度は、米国国立精神衛生研究所がスポンサーとなる臨床試験で使用するために開発され、治験薬を開始する前及び開始後に、患者の全般機能に関する臨床医の観点の簡潔で独立した評価を提供する (Guy 1976)。CGI は、患者の病歴、心理社会的状況、症状、行動、及び患者の機能能力に対する症状の影響に関する知識を含む、利用可能な全ての情報を考慮する、臨床医により決定される全体的な要約尺度を提供する。CGI-S は、医療供給者の裁量で、治療前及び／又は治療中に管理されてもよく、-3 (重度の悪化) から +3 (著しい改善) までの 7 段階尺度を使用して、変化の全般評価を提供する。

【0293】

6. 粗大運動機能分類システム-拡張及び改訂版。粗大運動分類システム-拡張及び改

50

訂版（GMFCS-E及びR）を、医療供給者の裁量で、治療前及び／又は治療中に施してもよい。GMFCS-E及びRは、1～5の尺度で可動性に重点を置いて、患者が開始した動きを分類する。

【0294】

7. 患者報告アウトカム測定情報システム。患者報告アウトカム測定情報システム（PROMIS）は、米国国立衛生研究所（NIH）によって開発された様々な質問票からなり、患者の視点から身体的、精神的、及び社会的な健康を評価する（<http://www.healthmeasures.net>）。これらの質問票は、X連鎖性低リン血症、関節炎、多発性硬化症、及び神経線維腫症などの慢性的な健康状態を有する人々における臨床試験で使用されてきた。各質問票には、参加者が1（全くない）から5（常に）までの範囲の5段階リッカート尺度で評価する8～10項目が含まれる。各質問票のスコアは合計され、高いスコアはより多くの測定されるドメイン（例えば、より高い疲労、より高い身体機能）を示す。生スコアは、平均50及び標準偏差10に基づいてTスコアに変換され、研究試料と一般集団との比較を可能にする。PROMIS尺度には、疼痛干渉（短縮形8a）、疼痛強度（バージョン3a）、身体機能－上肢（カスタム短縮形）、身体機能－可動性（短縮形13a FACIT疲労）、疲労（短縮形）、及び認知的影響（短縮形8a）が含まれてもよく、医療供給者の裁量で、治療前及び／又は治療中に施されてもよい。これらの評価は、対象が補助なしで完了することができる。

10

【0295】

8. 介護者の全般的印象尺度。介護者の全般的状態の印象を、医療供給者の裁量で、治療前及び／又は治療中に患者の介護者に対して施してもよい。介護者の全般的変化の印象は、-3（重度な悪化）から+3（著しい改善）までの範囲の7段階尺度を使用して、変化の全般評価を提供する。

20

【0296】

9. ウェスタンオンタリオ・マクマスター大学変形性関節症指数。WOMACは、腰痛又は膝痛を有する患者の日常生活の活動、機能的移動能力、歩行、全般的な健康、疼痛、及び生活の質を評価するために使用される患者報告アウトカムである（www.sralab.org）。評価は24項目からなり、実施にはおよそ12分かかる。WOMACは、医療供給者の裁量で、治療前及び／又は治療中に施してもよい。評価は、対象が補助なしで完了することができる。

30

【0297】

実施例22：凍結乾燥されたENPP1ポリペプチド製剤の長期安定性試験

好ましい製剤中の凍結乾燥されたENPP1-Fcを、36か月の期間にわたって、5℃、25℃、及び40℃の3つの異なる貯蔵条件で貯蔵したときの長期安定性について試験した。24か月後、ENPP1-Fcを含む全ての凍結乾燥ケーキが、アイボリー色の無傷の構造を示した。水中で再構成した後、液体の外観は、試料全種類について、褐色がかった黄色であり、透き通り、目に見える粒子を含まないことが観察された。再構成は、上述のデータと一致するウィンドウ内で生じ、凍結乾燥された試料の完全な再構成は、59秒～108秒以内に生じた。

【0298】

経時的な温度条件にわたる両製剤の含水量も、上述の含水量データと一致したままであった。試験した貯蔵温度の全てにおける全ての凍結乾燥された試料の時点（0、3、6、9、12、18、24、30、36か月）は、時点及び条件にわたって含水量が非常に低いか又は皆無であり、残留含水量は0.0%～0.3%の範囲であった。各貯蔵条件での各試料のpH値も経時的に一貫したままであり、試料pHは36か月の過程にわたってpH6.3±0.1のままであった。50mg/mLの正規化した開始濃度に対するタンパク質回収も、各試料について測定した。これらのデータにより、タンパク質回収が、5℃、25℃、及び40℃の貯蔵条件下で経時的に劣化しないことが示される。

40

【0299】

SEC実験を実施して、好ましい製剤の試料を、5℃、25℃、及び40℃で貯蔵した

50

ときに、36か月の期間にわたってHMW種が発生する傾向を特徴付けた。総HMW種、LMW種、及び主要ピーク種の存在率に関するSECデータの概要を、先行実施例に概説した手順に従って収集した。図17～図19は、5℃、25℃、及び40℃それぞれの経時的なHMW存在率及び主要ピーク存在率についてのSECデータの概要を示す。陽性対照ゼロ時点試料は、およそ4%のHMW含量を有した。全ての好ましい製剤試料は対照と一致したままであり、各々、5℃、25℃、及び40℃の貯蔵条件下で、少なくとも24か月の期間にわたり±5%のHMW含有量を有した。これらの結果は、各好ましい製剤が、驚くべきことに、長期間にわたって高分子量凝集体種の形成を防止することができることを示す。最大36か月間貯蔵した試料についても同様の結果が見られた。これらのデータはまた、好ましい製剤が、25℃及び40℃などのより高い温度又は非冷蔵温度で貯蔵したときでさえ、凍結乾燥されたポリペプチドをHMW種の形成に対して安定させることができることを示す。

10

【0300】

各時点及び貯蔵条件に対応する全ての好ましい製剤試料についての比活性を、実施例7で上記した酵素活性スクリーニングを利用して評価した。簡潔に述べると、各製剤試料の活性を評価するために使用した酵素アッセイを、ENPP1-FcをpNP-TMPと混合することによって行った。生成物形成(pNP)を、405nmで5分の期間、25℃で分光光度法によりモニタリングする。ENPP1-Fcの比活性は、各試料調製について得られた経時的な吸光度の変化を、既知の濃度のpNPの標準曲線に補間することによって計算する。活性データを、凍結対照を含む各試料について経時的にプロットした。5℃、25℃、及び40℃で最大24か月間貯蔵した試料の代表的な活性対時間のプロットを図20に示す。最大36か月間貯蔵した試料についても同様の結果が見られた。

20

【0301】

時点及び貯蔵条件にわたる全試料が、一貫したレベルの酵素活性を示した。このため、実験により、凍結乾燥されたENPP1-Fc製剤が、異なる温度条件下で貯蔵したときでも、長期貯蔵下で安定なままであることが示される。

【0302】

実施例23：バイアル及びシリンジ中の再構成された試料の安定性分析

以下のアッセイを行い、再構成された製剤が、異なる時点でバイアル及びシリンジに貯蔵したときに、ある期間にわたって何らかのタンパク質の喪失又は活性の喪失を受けるかどうかを決定した。

30

【0303】

好ましい製剤中の凍結乾燥されたENPP1-Fcを水中で再構成して、1mg/mL、2.5mg/mL、及び10mg/mLの範囲の異なる濃度を達成した。異なる濃度の試料を、5℃で、2組のシリンジ（高体積試料-250μL及び低体積試料-50μL）中、1～12時間の範囲の異なる時間間隔にわたってインキュベートした。実験を3回繰り返した。アッセイ時に再構成し、10、2.5、及び1mg/mLに希釈した試料を対照として使用した。インキュベートしていない試料の酵素活性（時間-0時間）を決定した。次いで、インキュベートした試料の活性（8～12時間）を対照値に対して正規化した。50mg/mLの正規化した開始濃度に対するタンパク質回収も、先行実施例で上記したプロトコルに従い、各試料について測定した。

40

【0304】

図21は、異なる時間間隔でシリンジ又はバイアルに貯蔵した再構成されたENPP1-Fcの回収率を示す。これらのデータにより、再構成されたENPP1-Fcタンパク質が、異なる濃度でシリンジに貯蔵したときに安定であることが示される。再構成されたENPP1-Fc試料の比活性を、前述の実施例で上記したプロトコルに従って測定した。図22は、異なる時間間隔でシリンジ又はバイアルに貯蔵した再構成されたENPP1-Fcポリペプチド試料についての酵素活性データの概要を示す。時点及び貯蔵条件にわたる全試料が、一貫したレベルの酵素活性を示した。タンパク質活性は、バイアルに貯蔵した場合は変化しなかったが、試料をシリンジに8時間を超えて貯蔵した場合、活性のわ

50

ずかな喪失があった。

【0305】

実施例 24：再構成された試料の希釈後の安定性分析

バイアル中の凍結乾燥された ENPP1-Fc 製剤を 25 mg/mL に再構成する。2.5 mg/mL 及び 1 mg/mL の希釈の 2 つのセットを作製する。対照試料を、別個のバイアルを取り出し、シリンジを使用してアッセイ時に 2.5 mg/mL 及び 1 mg/mL に希釈することによって作製した。したがって、対照試料は、ゼロのインキュベーション時間のものとなる。希釈した試料 2.5 mg/mL 及び 1 mg/mL を 5℃で一晩インキュベートし、試料のサブセットを室温 (25℃) で 1 時間、2 時間、3 時間、4 時間、及び 8 時間の時間間隔にわたってインキュベートした。酵素活性及びタンパク質濃度を、先行実施例で上記したように測定した。値を対照試料に対して正規化した。図 23 は、異なる時間間隔でシリンジ又はバイアルに貯蔵した再構成された ENPP1-Fc の回収率を示す。アッセイにより、一晩バイアル中 5℃で貯蔵した場合、又は室温で最大 8 時間貯蔵した場合、タンパク質濃度に喪失はないことが示された。図 24 は、異なる時間間隔でシリンジ又はバイアルに貯蔵した再構成された ENPP1-Fc ポリペプチド試料についての酵素活性データの概要を示す。アッセイにより、一晩バイアル中 5℃で貯蔵した場合、又は室温で最大 4 時間貯蔵した場合、タンパク質活性に喪失はないことが示された。試料を室温で 4 時間後に貯蔵した場合、酵素活性の小規模な喪失が観察された。

10

【0306】

参考文献

20

ATS. American Thoracic Society Statement : Guidelines for the six-minute walk test . Am J Respir, Crit Care Med. 2002 2002 ; 166 (1) : 111-7 .

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 .

CTFG. Recommendations related to contraception and pregnancy testing in clinical trials. 2014 [2020年5月19日] ; 以下から利用可能 :

30

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

About HMA/Working Groups/CTFG/2014 09 HMA CTFG Contraception. pdf.

Ferreira C, Ziegler S, Gahl W. Generalized Arterial Calcification of Infancy. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Stephens K, et al., editors. GeneReviews (R) . Seattle (WA) 2014 .

40

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 .

IOF. Autosomal Recessive Hypophosphatemic Rickets Type 2 (ARHR2) . 2019 [2020年5月19日] ; 以下から利用可能 : <https://www.iofbonehealth.org/osteoporosis-musculoskeletal-disorders/s>

50

keletal-rare-disorders/autosomal-recessive-hypophosphatemi-0.

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.

McDonald CM, Henricson EK, Abresch RT, Florence JM, Eagle M, Gappmaier E, et al. 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. 10

Montes J, McDermott MP, Mirek E, Mazzone ES, Main M, Glanzman AM, et al.

Ambulatory function in spinal muscular atrophy: Age-related patterns of progression. *PLoS One*. 2018; 13 (6) : e0199657.

Moran JJ. Idiopathic arterial calcification of infancy: a clinicopathologic study. *Pathol Annu*. 1975; 10 : 393-417. 20

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.

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 V 5.0 (CTCAE). 公開日: 2017年11月27日。以下で利用可能 https://ctep.cancer.gov/protocoldevelopment/electronic_applications/docs/ctcae_v5_quick_reference_8.5x11.pdf. 2017. 30

Orriss IR, Arnett TR, Russell RG. Pyrophosphate: a key inhibitor of mineralisation. *Curr Opin Pharmacol*. 2016 Jun; 28 : 57-68.

Rutsch F, Boyer P, Nitschke Y, Ruf N, Lorenz-Depiereux B, Wittkamp T, et al. 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. 40

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* 50

. 2015 Jul; 28 (7-8) : 967-70.
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 Inheri t Metab Dis. 2018 Nov; 41 (6) : 1205-14.

【0307】

参照による組み込み

全ての刊行物及び特許出願は、各個々の刊行物又は特許出願の参照による組み込みが具 体的かつ個別に示唆されるのと同程度に、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込ま

【0308】

主題の特定の実施形態を考察してきたが、上記の明細書は、例示であり、限定ではない。本明細書及び以下の特許請求の範囲を検討すると、当業者には多くの変形が明らかになるであろう。本発明の完全な範囲は、特許請求の範囲を、それらの均等物の完全な範囲とともに、かつ明細書を、そのような変形とともに参照することによって決定されるべきである。

【図面】

【図 1】

```
1 MERDGCAGGG SRGEGGGRAP REGPAGNGRD RGRSHAAEAP GDPQAAASLL
51 APMDVGEDEPL EKAARARTAK DPNTYKVLSL VLSVCVLTIT LGCIFGLKES
101 CAKEVKCKG RCFERTFGNC RCDAACVELG NCCLDYQETC IEPHIWTCN
151 KFRCGEKRLT RSLCACSDDC KDKGCCCLNY SSVCGGEKSW VEEPCESINE
201 PQCPAGFETP PTLFSLDGF RAEYLHTWGG LLPVISLKKK CGTYTKNMRP
251 VYPTKTFPNH YSIVTGLYPE SHGLIDNKMY DPKMNASFSL KSKKFNPEW
301 YKGEPWVTA KYQGLKSGTF FWPGSDVEIN GIFFDIYKMY NGSVPFEERI
351 LAVLQWLQLP KDERPHFYTL YLEEDSSGH SYGPVSSEVI KALQVRDGMV
401 GMLMDGLKEL NLHRCNLNLL ISDHGMEQGS CKKYIYLNKY LGDVKNIKVI
451 YGPAARLRPS DVPDKYYSFN YEGIANLSC REPNOHFEPY LKHFLPKRLH
501 FAKSDRIEPL TFYLDPQWQL ALNPSEKRYC GSGFHGSDNV FSNMQALFVG
551 YGPGFKHGIE ADTFENIEVY NLMCDLLNLT PAPNGTHGS LNHLLKNPVY
601 TPKHPKEVHP LVQCPFTTRN RDNLGCSCNP SILPIEDFQT QENLTVAEEK
651 IIKHETLPYG RPRVLQKENT ICLLSQHCFM SGYSQDILMP LWTSTVDRN
701 DSFSTEDFSN CLYQDFRIFL SPVHKCSFYK NNTKVSYGFL SPQQLNKSS
751 GIYSEALLTT NIVPMYQSFQ VIWRYFHDTL LRKYAEERNG VNVVSGPVFD
801 FDYDGRCDL ENLRQKRRVI RNQEIILPTH FFIVLTSCDK TSQTPLHCEN
851 LDTLAFILPH RTDNSESCVH GKHDSSWVEE LLMLHRARIT DVEHITGLSF
901 YQQRKEPVSD ILKLKTHLPT FSQED (配列番号 1)
```

図 1

【図 2】

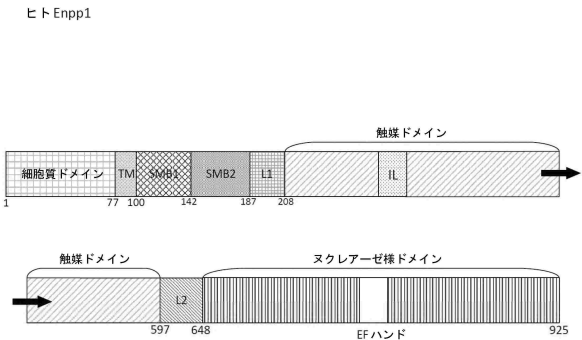


図 2

10

20

30

40

50

【圖 3】

1	PSKAEKCEKRS	KGRCFTRFV	NCRCDAACVE	LGNCCLLDVQE	TCIEPHHVI
51	SNKFRCEGKRL	LTRLSCASD	DKCKRGDCCI	YNSVQCEGK	SWIPEPECSI
101	NEPQCPAGFE	TPPTLLFSLD	GFRAEYLHTW	GGLLPVISKL	KKCGTYTKNM
151	RPVYPTKTFP	NYHSIVTGLY	PESHGIDNK	MYGKNANAF	SKLSKEKFN
201	EWYKGEPIKQ	TAQYGLKSG	TPFWGSDVE	INGFPDKAY	MLKSGVPFEE
251	RLVAMLQWLQ	LPKDERPHY	TLTLEEDPES	GHSYGVPSSE	VTKALQVRQG
301	MIGLMDGLK	ELNLHRLCL	ILISDHMEQ	GSKCYYILN	LYGLDVKNIK
351	VIYGPAARLR	PSDVPDKYYS	VNEFIAGRL	SCREPNQHKF	PYFLHFLPKR
401	LHFAKSDRL	PLTYFLDQW	LQALNPSRK	YCGSGPHGSD	NVNSMQMFL
451	VGYPGFGKHG	IEADTFENIE	VYNLMCDLLN	LTPANNGNTH	GSLNHLKKNP
501	VTYKHPHEV	HPFLQCFPTR	NPRDNLGCS	NPSILPIEDF	QPTNLTSTVE
551	EKIIKHKTRP	YGRPRVLKE	NTICLLSQHQ	PMSCGYSDIL	PLQWMTYAD
601	RNDSFTSDFT	SNCLYQDFRI	PLSWYHKCSF	YKNNTKYSYG	FLGSPQLNKN
651	SSGIVSEALL	TNTNVMYQS	QFVWRYHFH	TLRLKAEAYR	NLNVNVSQGV
701	FDFDYDGRCL	SENLRLKRR	VIHQEILPI	THEFTVLTC	KDTSQVTHGL
751	ENLTDLAFIC	PHRTDNSEK	VRGHQDSSW	BEEFLMLHR	ITDVEHTPLG
801	SFYQQRKEPV	SDILKLTHL	PTFSQD	(配列番号2)	

図 3

【圖 4-1】

マウス	1WVEETCE2SDPCEPAEFPSTPTLLFSLDGFRAEYLHWGGLLPVTSKLNKCGTYTNKMR	60
ウシ	AAEEECDSDEPQCPAGETPTPTLLFSLDGFRAEYLHWGGLLPVTSKLNKCGTYTNKMR	60
ウサギ	WVEEPCENIEPQCPAGFEMHPTLLFSLDGFRAEYLHWGGLLPVTSKLNKCGTYTNKMR	60
ヒト	WVEEPCENIEPQCPAGETPTPTLLFSLDGFRAEYLHWGGLLPVTSKLNKCGTYTNKMR	60

マウス	PMYPTKTFPNHYSIVTGLVPESHGIDINKHYDPKIMNASFLSKSEKFNPLWYKQGPWIWT	120
ウシ	PYPTKTFPNHYSIVTGLVPESHGIDINKDYDPKIMANFLKNIKEFNPEWYGPETIWT	120
ウサギ	PYPTKTFPNHYSIVTGLVPESHGIDINKHYDPKIMNASFLSKSEKFNPEWYGPETIWT	120
ヒト	PYPTKTFPNHYSIVTGLVPESHGIDINKHYDPKIMNASFLSKSEKFNPEWYGPETIWT	120

マウス	ANHQGEKSGTYVPFGSDVEIGDLPDIYKYVNGSVPFERTLAVLEWLQLPSHERPHFYT	180
ウシ	AKQYGLSGTGYFPGSDVEINGTFPDYKYNGSVNVSVPFEERLAILKMLPKDERPHFYT	180
ウサギ	AKQYGLSGTGYFPGSDVEINGTFPDYKYNGSVPFERTLAVLQLPKDERPHFYT	180
ヒト	AKQYGLSGTGYFPGSDVEINGTFPDYKYNGSVPFERTLAVLQLPKDERPHFYT	180

マウス	LYLEEPDSSGSHSGVPSSVEIKALQVRDVHGLMDGLKDLGNLHRLCNLLISDHGHEG	240
ウシ	LYLEEPDSSGSHSGVPSSVEIRALQVRDVHVGHLMDGLKELNLHRLCNLLISDHGHEG	240
ウサギ	LYLEEPDSSGSHSGVPSSVEIKALQVRDVHGLMDGLKELNLHRLCNLLISDHGHEG	240
ヒト	LYLEEPDSSGSHSGVPSSVEIKALQVRDVHVGHLMDGLKELNLHRLCNLLISDHGHEG	240

マウス	SKCKVYVLYMKYLGDVNIKVYGAARLPSPDPKYYSFNIYEAGIARNLSCREPNHQFRP	300
ウシ	SKCKVYVLYMKDGLKYVYVGAARLPSPDPKYYSFDEYGAIALNSCREPNHQFRP	300
ウサギ	SKCKVYVLYMKYLGDTNKIVYGAARLPSPDPKYYSFNIYEAGIARNLSCREPNHQFRP	300
ヒト	SKCKVYVLYMKYLGDNINKIVYGAARLPSPDPKYYSFNIYEAGIARNLSCREPNHQFRP	300

マウス	YLKPLPKRLHFKASDRIEPTLFYLDPQQLALNPSERYKCGSGHGSDNIFSNMQALFV	360
ウシ	YLKHLPLKRLHFKANDRIEPTLFYLDPQQLALNPSERYKCGSGHGSDNIFSNMQALFV	360
ウサギ	YLKHLPLKRLHFKASDRIEPTLFYLDPQQLALNPSERYKCGSGHGSDNIFSNMQALFV	360
ヒト	YLKHLPLKRLHFKASDRIEPTLFYLDPQQLALNPSERYKCGSGHGSDNIFSNMQALFV	360

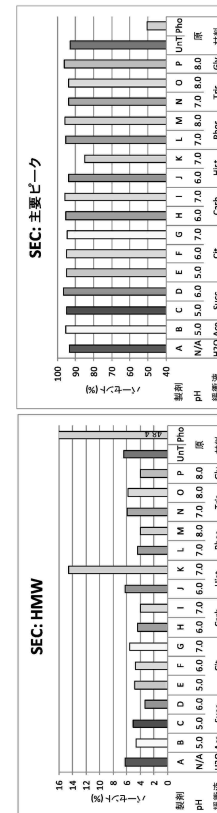
图 4 A

【圖 4-2】

[illegible]

图 4 B

【図 5】



5 ☒

【図 9 - 2】

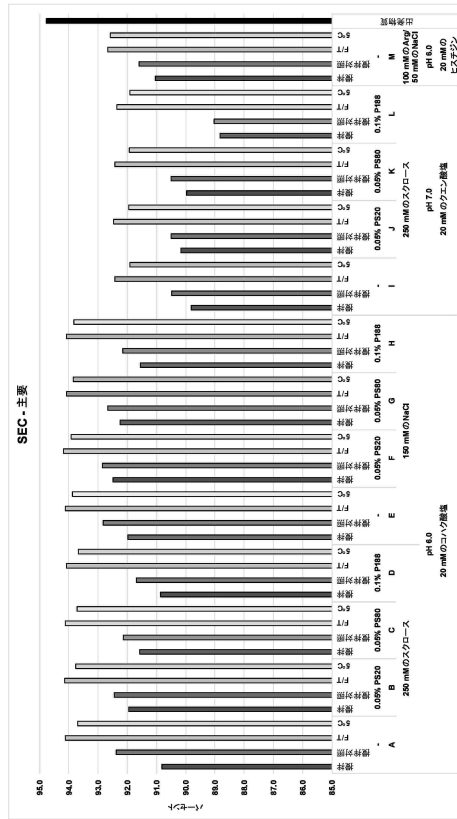


図 9 B

【図 10】

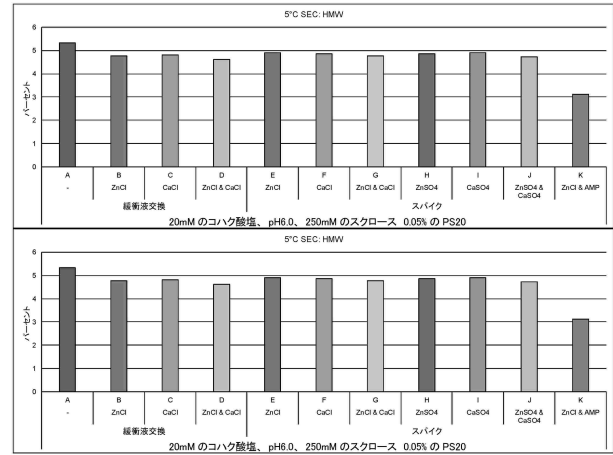


図 10

10

20

【図 11】

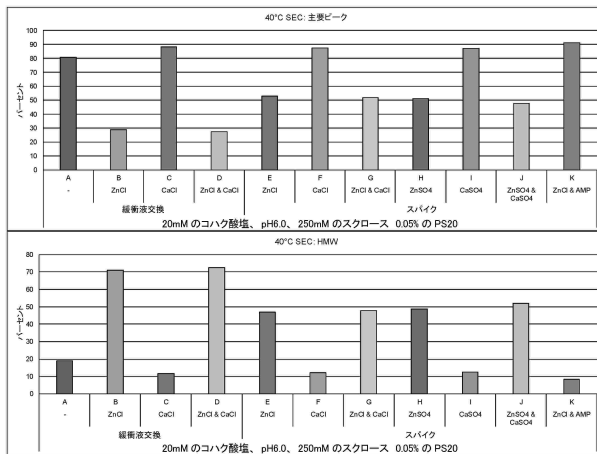
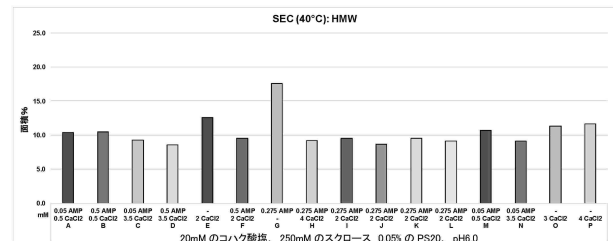
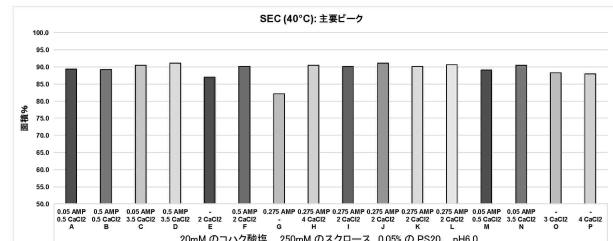


図 11

【図 12 - 1】



30



40

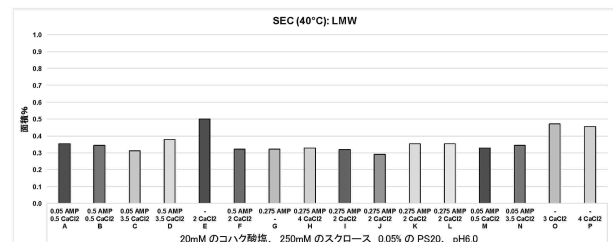


図 12 A

50

【図 1 2 - 2】

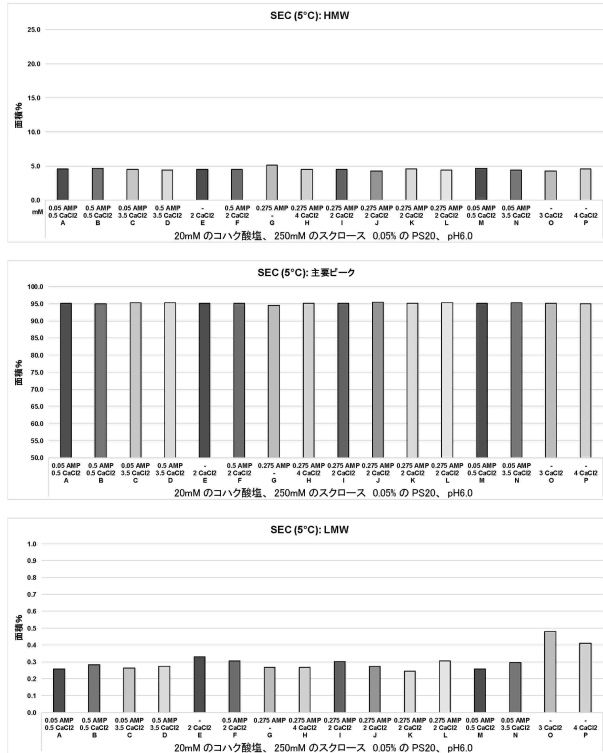


図 1 2 B

【図 1 3】

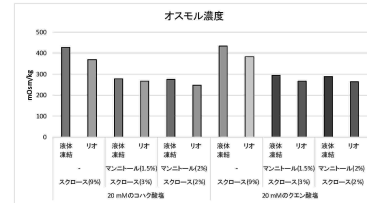


図 1 3

10

20

【図 1 4】

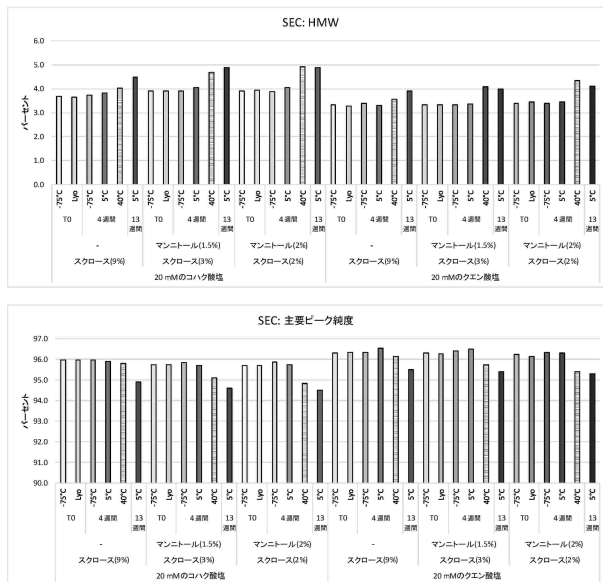


図 1 4

【図 1 5】

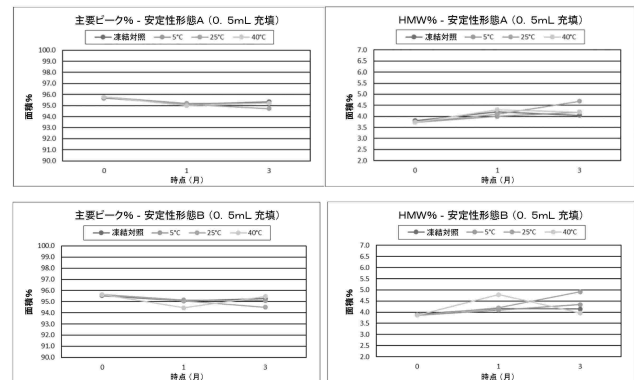


図 1 5

30

40

50

【図 16】

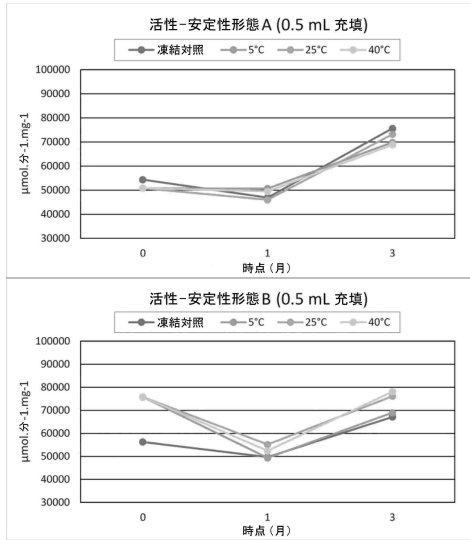
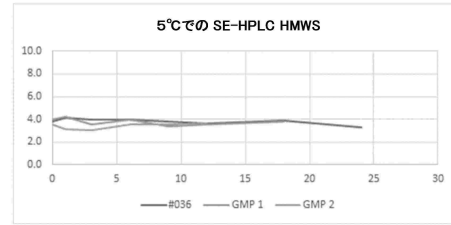
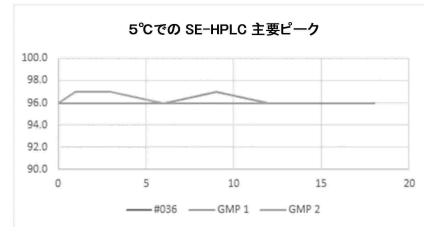


図 16

【図 17】



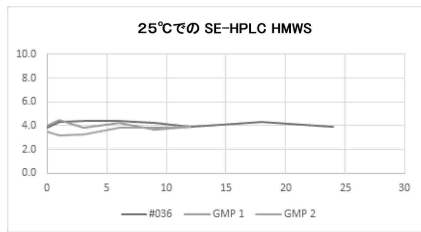
5°Cで24か月間、HMWに有意な変化はなかった



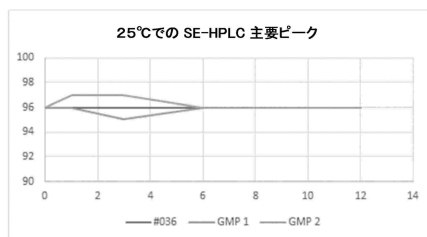
5°Cで24か月間、主要ピークに有意な変化はなかった

図 17

【図 18】



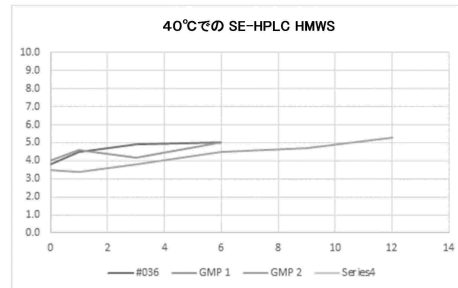
25°Cで24か月間、HMWに有意な変化はなかった



25°Cで24か月間、主要ピークに有意な変化はなかった

図 18

【図 19】



40°Cで6か月間にわたりHMWにわずかな増加があった

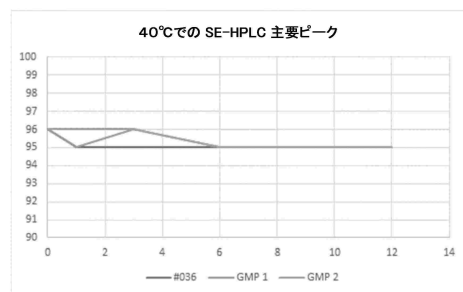


図 19

10

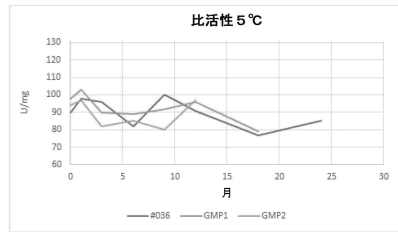
20

30

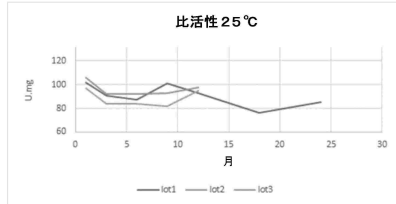
40

50

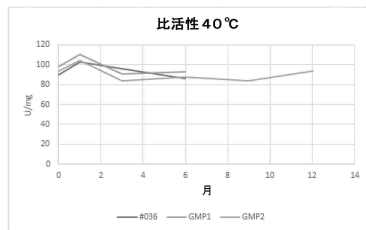
【図 2 0】



5℃で24か月間、比活性に有意な変化はなかった



25℃で24か月間、HMWに有意な変化はなかった



40℃で12か月後、比活性にわずかな減少があった

図 2 0

【図 2 1】

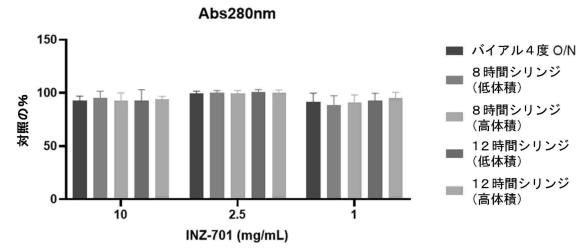


図 2 1

10

20

【図 2 2】

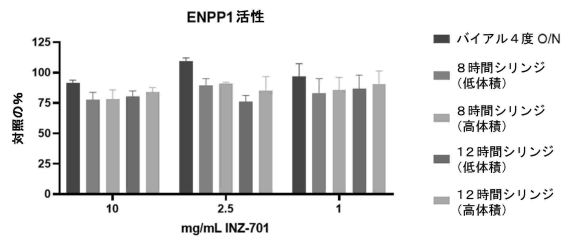


図 2 2

【図 2 3】

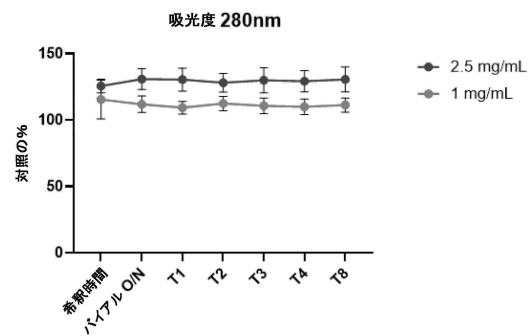


図 2 3

30

40

50

【図 2 4】

5718333.1

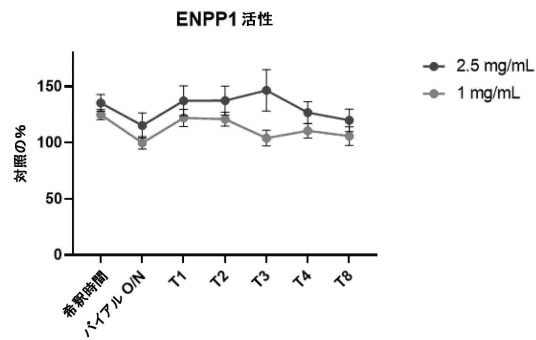


図 2 4

【配列表】

2024536821000001.xml

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US22/76969

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC - INV. A61K 48/00; A61K 38/00; C12Q 1/6883 (2022.01) ADD. CPC - INV. A61K 48/005; A61K 38/00; C12Q 1/6883 ADD. C07K 2319/31; C12N 2750/14143 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) See Search History document Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched See Search History document Electronic database consulted during the international search (name of database and, where practicable, search terms used) See Search History document		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X — Y	WO 2020/150716 A1 (INOZYME PHARMA, INC.) 23 July 2020; Page 41, fourth paragraph; page 172, second paragraph; claims: 1; 19; 20; 79	1-6, 9 — 7, 8
Y	A. BAHETI ET AL. "Excipients used in lyophilization of small molecules" 41-54. IPEC-Americas Inc., Web. 07 May 2010; Page 50, first column, first paragraph	7-8
P,X	WO 2022/076848 A1 (INOZYME PHARMA, INC.) 14 April 2022; Abstract; claim 1	1-3, 6, 9
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 21 November 2022 (21.11.2022)		Date of mailing of the international search report DEC 20 2022
Name and mailing address of the ISA/ Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer Shane Thomas Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2022)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US22/76969

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

a. ☒ forming part of the international application as filed.

b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US22/76969

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claims Nos.: 10-277
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

10

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

20

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

30

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

40

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

A 6 1 K	47/26	(2006.01)	A 6 1 K	47/26	
A 6 1 K	47/36	(2006.01)	A 6 1 K	47/36	
A 6 1 K	47/22	(2006.01)	A 6 1 K	47/22	
A 6 1 K	47/10	(2017.01)	A 6 1 K	47/10	
A 6 1 K	47/20	(2006.01)	A 6 1 K	47/20	
A 6 1 K	47/64	(2017.01)	A 6 1 K	47/64	
A 6 1 K	47/68	(2017.01)	A 6 1 K	47/68	
A 6 1 K	47/65	(2017.01)	A 6 1 K	47/65	
A 6 1 P	9/00	(2006.01)	A 6 1 P	9/00	
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 0 7
A 6 1 P	13/12	(2006.01)	A 6 1 P	13/12	
A 6 1 P	19/08	(2006.01)	A 6 1 P	19/08	
A 6 1 K	47/60	(2017.01)	A 6 1 K	47/60	
A 6 1 K	47/54	(2017.01)	A 6 1 K	47/54	
C 1 2 N	9/48	(2006.01)	C 1 2 N	9/48	
C 0 7 K	19/00	(2006.01)	C 0 7 K	19/00	
C 0 7 K	16/00	(2006.01)	C 0 7 K	16/00	
C 0 7 K	14/47	(2006.01)	C 0 7 K	14/47	

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,N
E,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,
CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,J
M,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY
,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,T
H,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. T R I T O N

2. T W E E N

弁理士 森田 拓

(74)代理人 100116403

弁理士 前川 純一

(74)代理人 100134315

弁理士 永島 秀郎

(74)代理人 100162880

弁理士 上島 類

(72)発明者 スティーヴン ジャングルズ

アメリカ合衆国 0 2 2 1 0 マサチューセッツ ボストン サマー ストリート 3 2 1 スイート 4 0 0

F ターム (参考) 4C076 AA12 AA30 CC11 CC41 DD09 DD22 DD23 DD24 DD25Z DD26Z
DD38Q DD42Z DD43Z DD50Z DD51 DD52 DD55 DD58 DD67Q DD69 EE23
EE30Q EE41Z EE59 FF31 FF36 FF61
4C084 AA02 BA02 BA44 DC22 MA17 MA44 MA55 MA65 MA66 NA12
ZA361 ZA811 ZA961 ZB221
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA75 DA89 EA20
FA74 GA21 GA26