

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2023-548758

(P2023-548758A)

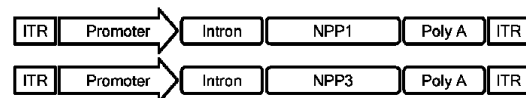
(43)公表日 令和5年11月21日(2023.11.21)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	15/55 (2006.01)	C 1 2 N	15/55	Z N A	2 G 0 4 5
C 1 2 N	15/864 (2006.01)	C 1 2 N	15/864	1 0 0 Z	4 B 0 6 3
C 1 2 N	15/62 (2006.01)	C 1 2 N	15/62	Z	4 B 0 6 5
C 1 2 N	15/13 (2006.01)	C 1 2 N	15/13		4 C 0 8 4
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10		4 C 0 8 7
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全259頁)
		最終頁に続く			
(21)出願番号	特願2023-521661(P2023-521661)	(71)出願人	521317586 イノザイム ファーマ インク. Inozyme Pharma, Inc. 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 3 2 1 Summer Street, Suite 400, Boston, Massachusetts 0 2 2 1 0, United States of America		
(86)(22)出願日	令和3年10月8日(2021.10.8)				
(85)翻訳文提出日	令和5年6月7日(2023.6.7)				
(86)国際出願番号	PCT/US2021/054216				
(87)国際公開番号	WO2022/076848				
(87)国際公開日	令和4年4月14日(2022.4.14)				
(31)優先権主張番号	63/248,339				
(32)優先日	令和3年9月24日(2021.9.24)				
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(71)出願人	593152720 イェール ユニバーシティ Yale University アメリカ合衆国 コネチカット 0 6 5 1		
(31)優先権主張番号	63/165,650				
(32)優先日	令和3年3月24日(2021.3.24)				
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)				
(31)優先権主張番号	63/089,515				
		最終頁に続く		最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 ENPP1またはENPP3の肝臓特異的生成

(57) 【要約】

本開示は、特に、インビボでのENPP1またはENPP3の発現のためのベクターおよび対象における石灰化および骨化の疾患を治療する方法を提供する。



SCHEMATIC VIEW OF EXPRESSION VECTORS

FIG. 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) 肝臓特異的プロモーターと、(b) エク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 (ENPP1) ポリペプチドの触媒ドメインまたはエク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 3 (ENPP3) ポリペプチドの触媒ドメインをコードするヌクレオチド配列と、を含む組み換え核酸。

【請求項 2】

前記 ENPP1 ポリペプチドまたは前記 ENPP3 ポリペプチドをコードする前記ヌクレオチド配列が、可溶性 ENPP1 または可溶性 ENPP3 ポリペプチドをコードする、請求項 1 に記載の組み換え核酸。

【請求項 3】

前記核酸が、前記コードされたポリペプチドを発現することができるベクターまたはプラスミドを含む、請求項 1 または 2 に記載の組み換え核酸。

【請求項 4】

前記組み換え核酸がウイルスベクターによって送達される、請求項 3 に記載の組み換え核酸。

【請求項 5】

前記ウイルスベクターが、アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターである、請求項 4 に記載の組み換え核酸。

【請求項 6】

前記核酸は、アズロシグナルペプチドをコードし、前記シグナルペプチドは、前記 ENPP1 ポリペプチドまたは前記 ENPP3 ポリペプチドと動作可能に関連付けられている、請求項 1～5 のいずれか一項に記載の組み換え核酸。

【請求項 7】

前記 ENPP1 ポリペプチドまたは前記 ENPP3 ポリペプチドをコードする前記ヌクレオチド配列が、前記 ENPP1 ポリペプチドまたは前記 ENPP3 ポリペプチドおよび異種タンパク質を含む ENPP1 または ENPP3 融合タンパク質をコードする、請求項 1～6 のいずれか一項に記載の組み換え核酸。

【請求項 8】

前記ヌクレオチド配列によってコードされる前記 ENPP1 融合タンパク質または ENPP3 融合タンパク質が、哺乳動物において増加した循環半減期を、前記異種タンパク質を含まない ENPP1 ポリペプチドの前記循環半減期と比較して有する、請求項 7 に記載の組み換え核酸。

【請求項 9】

前記 ENPP1 または ENPP3 融合タンパク質をコードする前記ヌクレオチド配列によってコードされる前記異種タンパク質が、イムノグロブリン結晶化可能断片 (Fc) ポリペプチドまたはアルブミンポリペプチドである、請求項 7 または 8 に記載の組み換え核酸。

【請求項 10】

前記ヌクレオチド配列によりコードされる前記 ENPP1 または ENPP3 融合タンパク質が、前記融合タンパク質のアミノ末端からカルボキシ末端の順序で、前記 ENPP1 または前記 ENPP3 ポリペプチドおよび前記 Fc ポリペプチドまたは前記アルブミンポリペプチドを含む、請求項 9 に記載の組み換え核酸。

【請求項 11】

前記 ENPP1 または ENPP3 融合タンパク質をコードする前記ヌクレオチド配列によってコードされる前記 Fc ポリペプチドが、IgG1 Fc ポリペプチドである、請求項 9 または 10 に記載の組み換え核酸。

【請求項 12】

前記コードされた IgG1 Fc ポリペプチドが、配列番号 34 の前記アミノ酸配列を含む、請求項 11 に記載の組み換え核酸。

10

20

30

40

50

【請求項 13】

前記コードされた I g G 1 F c ポリペプチドが、バリエント I g G F c である、請求項 9～12 のいずれか一項に記載の組み換え核酸。

【請求項 14】

前記コードされたバリエント F c ポリペプチドが、E U 番号による M 2 5 2 Y / S 2 5 4 T / T 2 5 6 E のアミノ酸置換を含む、請求項 13 に記載の組み換え核酸。

【請求項 15】

前記コードされたバリエント F c ポリペプチドが、配列番号 95 のアミノ酸 8 5 3～1079 を含む、請求項 13 または 14 に記載の組み換え核酸。

【請求項 16】

前記 E N P P 1 ポリペプチドをコードする前記ヌクレオチド配列が、配列番号 1 のアミノ酸 99～925 をコードする、請求項 1～13 のいずれか一項に記載の組み換え核酸。

【請求項 17】

前記 E N P P 1 ポリペプチドをコードする前記ヌクレオチド配列が、バリエント前記 E N P P 1 ポリペプチドをコードする、請求項 1～15 のいずれか一項に記載の組み換え核酸。

【請求項 18】

前記コードされたバリエント E N P P 1 ポリペプチドが、配列番号 1 に対して 3 3 2 位のアミノ酸置換をコードする配列を含む、請求項 17 に記載の組み換え核酸。

【請求項 19】

配列番号 1 に対する 3 3 2 位の前記アミノ酸置換をコードする前記配列が、I 3 3 2 T を含む、請求項 18 に記載の組み換え核酸。

【請求項 20】

前記 E N P P 1 ポリペプチドをコードする前記ヌクレオチド配列が、配列番号 95 のアミノ酸 21～847 をコードする配列を含む、請求項 17～19 のいずれか一項に記載の組み換え核酸。

【請求項 21】

前記 E N P P 1 ポリペプチドをコードする前記ヌクレオチド配列が、配列番号 95 のアミノ酸 20～847 をコードする配列を含む、請求項 17～19 のいずれか一項に記載の組み換え核酸。

【請求項 22】

前記コードされた E N P P 1 融合タンパク質が、前記コードされた E N P P 1 ポリペプチドと前記コードされた異種ポリペプチドとを連結するタンパク質リンカーをコードする配列を含む、請求項 7～19 のいずれか一項に記載の組み換え核酸。

【請求項 23】

前記コードされたタンパク質リンカーが、配列番号 94 (G G G G S) の前記アミノ酸配列を含む、請求項 22 に記載の組み換え核酸。

【請求項 24】

前記 E N P P 1 融合タンパク質をコードする前記ヌクレオチド配列が、配列番号 95 のアミノ酸 21～1079 を含む、請求項 1～23 のいずれか一項に記載の組み換え核酸。

【請求項 25】

前記 E N P P 1 融合タンパク質をコードする前記ヌクレオチド配列が、配列番号 95 のアミノ酸 20～1079 を含む、請求項 1～23 のいずれか一項に記載の組み換え核酸。

【請求項 26】

(a) 肝臓特異的プロモーターと、(a) 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 (E N P P 1) ポリペプチドまたは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 3 (E N P P 3) ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列と、を含む核酸を含むウイルスベクター。

【請求項 27】

前記肝臓特異的プロモーターが、肝臓プロモーター 1 (L P 1) およびハイブリッド肝

10

20

30

40

50

臓プロモーター（HLP）からなる群から選択される、請求項1～15のいずれか一項に記載の組み換え核酸または請求項26のウイルスベクター。

【請求項28】

前記ベクターが、ポリアデニル化信号をコードする配列を含む、請求項8～12のいずれか一項に記載のウイルスベクター。

【請求項29】

前記ベクターが、アズロシジニングシグナルペプチドであるシグナルペプチドをコードする、請求項8～13のいずれか一項に記載のウイルスベクター。

【請求項30】

前記ウイルスベクターが、アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターである、請求項8～13のいずれか一項に記載のウイルスベクター。

【請求項31】

前記AAVベクターが、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、およびAAV-rh74からなる群から選択される血清型を有する、請求項14に記載のウイルスベクター。

【請求項32】

前記ウイルスベクターが、請求項1～25のいずれか一項に記載の前記核酸を含む、請求項26～31のいずれか一項に記載のウイルスベクター。

【請求項33】

請求項26～32のいずれか一項に記載の組み換えウイルスベクターを取得する方法であって、

1. 請求項4～25のいずれか一項に記載の核酸を含む細胞を提供するステップと、
2. 前記ウイルスの組立に適切な条件下に前記細胞を維持するステップと、
3. 前記細胞によって産生される前記ウイルスベクターを精製するステップと、を含む方法。

【請求項34】

ENPP1またはENPP3タンパク質を対象に提供する方法であって、前記哺乳動物に、請求項26～32のいずれか一項に記載のウイルスベクターを投与すること、を含む方法。

【請求項35】

請求項26～32のいずれか一項に記載の前記ウイルスベクターおよび生理学的に適合する担体を含む医薬組成物。

【請求項36】

疾患の予防または進行の低減を必要とする対象において疾患の予防または進行の低減する方法であって、前記哺乳動物に、請求項35に記載の治療有効量の前記医薬組成物を投与することを含み、前記疾患は、X連鎖性低リン血症（XLH）、慢性腎臓疾患（CKD）、ミネラル骨障害（MBD）、血管石灰化、軟部組織の病理学的石灰化、軟部組織の病理学的骨化、乳児の全身性動脈石灰化（GACI）、および後縦靱帯の骨化（OPLL）からなる群から選択され、前記哺乳動物における前記疾患が予防されるまたはその進行が低減される方法。

【請求項37】

請求項1～25のいずれか一項に記載の前記核酸を含む細胞。

【請求項38】

病理学的石灰化または病理学的骨化の疾患または障害の治療または予防を必要とする対象において病理学的石灰化または病理学的骨化の疾患または障害の治療または予防する方法であって、前記対象に、請求項26～32のいずれか一項に記載の前記ウイルスベクターの治療有効量、請求項33に記載の前記方法によって作製されたウイルスベクター、または請求項35に記載の前記医薬組成物を投与し、それによって前記疾患または障害を治療または予防することを含む方法。

【請求項39】

10

20

30

40

50

ENPP1タンパク質欠損を有する対象を治療する方法であって、前記対象に、請求項26～32のいずれか一項に記載の前記ウイルスベクターの治療有効量、請求項33に記載の前記方法によって作製されたウイルスベクター、または請求項35に記載の前記医薬組成物を投与し、それによって前記対象を治療することを含む方法。

【請求項40】

前記疾患または障害または前記ENPP1タンパク質欠損が、前記対象におけるNPP1遺伝子の機能喪失変異、またはABCC6遺伝子の機能喪失変異と関連する、請求項38または39に記載の方法。

【請求項41】

前記ウイルスベクターが、組み換えENPP1ポリペプチドをコードする、請求項38～40に記載の方法。

【請求項42】

前記ウイルスベクターが、組み換えENPP3ポリペプチドをコードする、請求項38～40に記載の方法。

【請求項43】

ENPP1タンパク質欠損を有する対象を治療する方法であって、前記対象に、請求項26～32のいずれか一項に記載の前記ウイルスベクターの治療有効量、請求項33に記載の前記方法によって作製されたウイルスベクター、または請求項35に記載の前記医薬組成物を投与し、それによって前記対象を治療することを含む方法。

【請求項44】

前記疾患または障害または前記ENPP1タンパク質欠損が、前記対象におけるNPP1遺伝子の機能喪失変異、またはABCC6遺伝子の機能喪失変異と関連する、請求項43に記載の方法。

【請求項45】

前記ウイルスベクターまたは医薬組成物が、前記対象の $1 \times 10^{12} \sim 1 \times 10^{15}$ v g / k g の用量で投与される、請求項36または38～44のいずれか一項に記載の方法。

【請求項46】

前記ウイルスベクターまたは医薬組成物が、前記対象の $1 \times 10^{13} \sim 1 \times 10^{14}$ v g / k g の用量で投与される、請求項36または38～44のいずれか一項に記載の方法。

【請求項47】

前記ウイルスベクターまたは医薬組成物が、前記対象の $5 \times 10^{11} \sim 5 \times 10^{15}$ v g / k g の用量で投与される、請求項36または38～44のいずれか一項に記載の方法。

【請求項48】

前記ウイルスベクターまたは医薬組成物の前記対象への投与が、前記対象において、血漿ピロホスフェート（PPi）および／または血漿ENPP1またはENPP3濃度を増加させる、請求項36または38～44のいずれか一項に記載の方法。

【請求項49】

前記対象から得られた生物学的試料において、以下（i）前記ピロホスフェートの濃度、（ii）前記ENPP1またはENPP3の発現レベル、および（iii）前記ENPP1またはENPP3の酵素活性の一つ以上のパラメータを検出または測定することをさらに含む、請求項36または38～48のいずれか一項に記載の方法。

【請求項50】

前記検出または測定が、前記ウイルスベクターまたは医薬組成物を投与する前に起こる、請求項49に記載の方法。

【請求項51】

Enpp1欠損対象において骨欠損を補正する方法であって、前記対象に、請求項26～32のいずれか一項に記載のウイルスベクターを、前記骨欠損を補正するのに有効な量

10

20

30

40

50

で投与し、それによって前記骨欠損を補正することを含む方法。

【請求項 5 2】

E n p p 1 欠損対象において成長板構造を修復する方法であって、前記対象に、請求項 2 6 ～ 3 2 のいずれか一項に記載のウイルスベクターを、成長板構造を修復するのに有効な量で投与し、それによって前記対象において成長板構造を修復することを含む方法。

【請求項 5 3】

E n p p 1 欠損対象において異常な骨芽細胞機能の発達を阻害する方法であって、前記対象に、請求項 2 6 ～ 3 2 のいずれか一項に記載のウイルスベクターを、前記対象において前記異常な骨芽細胞機能の発達を阻害するのに有効な量で投与し、それによって前記対象において前記異常な骨芽細胞機能の発達を阻害することを含む方法。

10

【請求項 5 4】

E n p p 1 欠損対象において骨形成速度を増加する方法であって、前記対象に、請求項 2 6 ～ 3 2 のいずれか一項に記載のウイルスベクターを、骨形成を増加するのに有効な量で投与し、それによって前記対象において骨形成を増加することを含む方法。

【請求項 5 5】

E n p p 1 欠損対象において骨芽細胞面を増加する方法であって、前記対象に、請求項 2 6 ～ 3 2 のいずれか一項に記載のウイルスベクターを、骨芽細胞面を増加するのに有効な量で投与し、それによって前記対象において骨芽細胞面を増加する方法。

【請求項 5 6】

前記ウイルスベクターが単回投与で投与される、請求項 5 1 ～ 5 5 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 5 7】

前記ウイルスベクターが、二回以上の用量で投与される、請求項 5 1 ～ 5 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 8】

前記補正が、骨長、イントラベキュラー (i n t r a b e c u l a r) 数、皮質厚、骨梁厚、骨梁骨体積、骨形成速度、および骨芽細胞面からなる群の一つ以上の増加として、前記対象において表される、請求項 5 1 に記載の方法。

【請求項 5 9】

前記補正、修復、阻害、および減少が、それぞれ、骨長、イントラベキュラー (i n t r a b e c u l a r) 数、皮質厚、骨梁厚、骨梁骨体積、骨形成速度、および骨芽細胞面からなる群の一つ以上の増加として、前記対象において表される、請求項 5 1 ～ 5 5 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 6 0】

前記補正、修復、阻害、および減少が、それぞれ、非侵襲的撮像を介して検出される、請求項 5 1 ～ 5 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6 1】

前記非侵襲的撮像が、動的組織形態計測分析を含む、請求項 6 0 に記載の方法。

【請求項 6 2】

前記検出が、前記対象への前記投与前の検出に関する、請求項 6 0 に記載の方法。

40

【請求項 6 3】

前記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 (E N P P 1) ポリペプチドの触媒ドメインまたは前記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 3 (E N P P 3) ポリペプチドの触媒ドメインをコードする組み換え核酸であって、前記組み換え核酸が、非ウイルスベクターによって細胞内に送達される組み換え核酸。

【請求項 6 4】

前記組み換え核酸を含む前記非ウイルスベクターが、DNA／カチオン性脂質 (リポプレックス) 、 DNA／カチオン性ポリマー (ポリプレックス) 、 DNA／カチオン性ポリマー／カチオン性脂質 (リポポリプレックス) 、 脂質ナノ粒子 (L P N) 、 イオン化可能

50

な脂質、リポドイド、ペプチド系ベクターおよびポリマー系ベクターからなる群から選択される、請求項 6 3 に記載の組み換え核酸。

【請求項 6 5】

前記非ウイルスベクターが、リポプレックス、ポリプレックス、リポポリプレックス、イオン化可能な脂質、リポドイド、脂質ナノ粒子（L P N）、ペプチド系ベクターおよびポリマー系ベクターからなる群から選択される、請求項 6 4 に記載の組み換え核酸。

【請求項 6 6】

前記非ウイルスベクターが、脂質ナノ粒子（L P N）である、請求項 6 5 に記載の組み換え核酸。

【請求項 6 7】

前記組み換え核酸の送達に使用される前記 L N P が、L N P 安定性強化部分で被覆および／またはコンジュゲートされている、請求項 6 6 に記載の組み換え核酸。

【請求項 6 8】

L N P の前記 L N P 安定性強化部分がポリエチレングリコール（P E G）である、請求項 6 7 に記載の組み換え核酸。

【請求項 6 9】

前記組み換え核酸の送達に使用される前記 L N P が、標的部分で被覆および／またはコンジュゲートされている、請求項 6 6 に記載の組み換え核酸。

【請求項 7 0】

前記標的部分が、鉄飽和トランスフェリン（T f）、葉酸、アルギニルグリシルアスパラギン酸（R G D）およびアニサミドからなる群から選択される、請求項 6 9 に記載の組み換え核酸。

【請求項 7 1】

前記組み換え核酸の送達に使用される前記 L N P が、p H 感受性リンカーとコンジュゲートされる、請求項 6 6 に記載の組み換え核酸。

【請求項 7 2】

前記 p H 感受性リンカーが、ジオルトエステル、オルトエステル、ビニルエーテル、ホスホルアミデート、ヒドラジン、およびベータチオプロピオネートからなる群から選択される、請求項 7 1 に記載の組み換え核酸。

【請求項 7 3】

前記組み換え核酸の送達に使用される前記 L N P が、前記組み換え核酸を前記肝臓に送達するために標的部分で修飾される、請求項 6 6 に記載の組み換え核酸。

【請求項 7 4】

前記組み換え核酸の送達に使用される前記 L N P が、ビタミン A 結合リポソームである、請求項 7 3 に記載の組み換え核酸。

【請求項 7 5】

前記組み換え核酸の送達に使用される前記 L N P が、特異的受容体を標的とするリガンドとコンジュゲートされる、請求項 6 6 に記載の組み換え核酸。

【請求項 7 6】

前記特異的受容体が、コラーゲン型 V I 受容体、マンノース－6－ホスフェート受容体およびガラクトース受容体からなる群から選択される、請求項 7 5 に記載の組み換え核酸。

【請求項 7 7】

前記非ウイルスベクターがペプチド系ベクターである、請求項 6 5 に記載の組み換え核酸。

【請求項 7 8】

前記非ウイルスベクターがポリマー系ベクターである、請求項 6 5 に記載の組み換え核酸。

【請求項 7 9】

前記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（E N P P 1

10

20

30

40

50

）ポリペプチドの触媒ドメインまたは前記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－３（ＥＮＰＰ３）ポリペプチドの触媒ドメインをコードする核酸を含む非ウイルスベクター。

【請求項８０】

前記核酸が肝臓特異的プロモーターをさらに含む、請求項７９に記載の非ウイルスベクター。

【請求項８１】

前記肝臓プロモーターが、肝臓プロモーター１（ＬＰ１）およびハイブリッド肝臓プロモーター（ＨＬＰ）からなる群から選択される、請求項８０に記載の非ウイルスベクター。

10

【請求項８２】

前記核酸が、アズロシジニンシグナルペプチドであるシグナルペプチドをさらにコードする、請求項７９～８１のいずれか一項に記載の非ウイルスベクター。

【請求項８３】

前記非ウイルスベクターが、ＤＮＡ／カチオン性脂質（リポプレックス）、ＤＮＡ／カチオン性ポリマー（ポリプレックス）、ＤＮＡ／カチオン性ポリマー／カチオン性脂質（リポポリプレックス）、脂質ナノ粒子（ＬＰＮ）、イオン化可能な脂質、リポドイド、ペプチド系ベクターおよびポリマー系ベクターからなる群から選択される、請求項７９～８２のいずれか一項に記載の非ウイルスベクター。

【請求項８４】

前記非ウイルスベクターが、リポプレックス、ポリプレックス、リポポリプレックス、イオン化可能な脂質、リポドイド、脂質ナノ粒子（ＬＰＮ）、ペプチド系ベクターおよびポリマー系ベクターからなる群から選択される、請求項７９～８２のいずれか一項に記載の非ウイルスベクター。

20

【請求項８５】

ＥＮＰＰ１またはＥＮＰＰ３タンパク質を対象に提供する方法であって、前記哺乳動物に、請求項７９～８４のいずれか一項に記載の非ウイルスベクターを投与すること、を含む方法。

【請求項８６】

請求項７９～８４のいずれか一項に記載の前記非ウイルスベクターおよび生理学的に適合する担体を含む医薬組成物。

30

【請求項８７】

疾患の予防または進行の低減を必要とする対象において疾患の予防または進行の低減する方法であって、前記哺乳動物に、請求項８６に記載の前記医薬組成物の治療有効量を投与することを含み、前記疾患が、Ｘ連鎖性低リン血症（ＸＬＨ）、慢性腎臓疾患（ＣＫＤ）、ミネラル骨障害（ＭＢＤ）、血管石灰化、軟部組織の病理学的石灰化、軟部組織の病理学的骨化、乳児の全身性動脈石灰化（ＧＡＣＩ）、および後縦靱帯の骨化（ＯＰＬＬ）からなる群から選択され、前記哺乳動物における前記疾患が予防されるまたはその進行が低減される方法。

【請求項８８】

病理学的石灰化または病理学的骨化の疾患または障害の治療または予防を必要とする対象において病理学的石灰化または病理学的骨化の疾患または障害の治療または予防する方法であって、前記対象に、請求項７９～８４のいずれか一項に記載の前記非ウイルスベクターの治療有効量、または請求項８６に記載の前記医薬組成物を投与し、それによって前記疾患または障害を治療または予防することを含む方法。

40

【請求項８９】

ＥＮＰＰ１タンパク質欠損を有する対象を治療する方法であって、前記対象に、請求項７９～８４のいずれか一項に記載の前記非ウイルスベクターの治療有効量、または請求項８６に記載の前記医薬組成物を投与し、それによって前記対象を治療することを含む方法。

50

【請求項 90】

前記疾患または障害または前記 ENPP1 タンパク質欠損が、前記対象における NPP1 遺伝子の機能喪失変異または ABC C6 遺伝子の機能喪失変異に関連する、請求項 88～89 に記載の方法。

【請求項 91】

前記非ウイルスベクターが、組み換え ENPP1 ポリペプチドをコードする核酸を含む、請求項 88～90 に記載の方法。

【請求項 92】

前記非ウイルスベクターが、組み換え ENPP3 ポリペプチドをコードする核酸を含む、請求項 88～90 に記載の方法。

10

【請求項 93】

ENPP1 タンパク質欠損を有する対象を治療する方法であって、前記対象に、請求項 79～84 のいずれか一項に記載の非ウイルスベクターの治療有効量、または請求項 86 に記載の前記医薬組成物を投与することを含み、それによって前記対象を治療することを含む方法。

【請求項 94】

前記疾患または障害または前記 ENPP1 タンパク質欠損が、前記対象における NPP1 遺伝子の機能喪失変異または ABC C6 遺伝子の機能喪失変異に関連する、請求項 93 に記載の方法。

【請求項 95】

前記非ウイルスベクターまたは医薬組成物の前記対象への投与が、前記対象において、血漿ピロホスフェート (PPi) および／または血漿 ENPP1 または ENPP3 濃度を増加する、請求項 87～94 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 96】

前記対象から得られた生物学的試料において、以下 (i) 前記ピロホスフェートの濃度、(ii) 前記 ENPP1 または ENPP3 の発現レベル、および (iii) 前記 ENPP1 または ENPP3 の酵素活性の一つ以上のパラメータを検出または測定することをさらに含む、請求項 87～94 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 97】

前記検出または測定が、前記非ウイルスベクターまたは医薬組成物を投与する前に起こる、請求項 96 に記載の方法。

30

【請求項 98】

Enpp1 欠損対象において骨欠損を補正する方法であって、前記対象に、請求項 79～84 のいずれか一項に記載の非ウイルスベクターを、前記骨欠損を補正するのに有効な量で投与し、それによって前記骨欠損を補正することを含む方法。

【請求項 99】

Enpp1 欠損対象において成長板構造を修復する方法であって、前記対象に、請求項 79～84 のいずれか一項に記載の非ウイルスベクターを、成長板構造を修復するのに有効な量で投与し、それによって前記対象において成長板構造を修復することを含む方法。

【請求項 100】

Enpp1 欠損対象において異常な骨芽細胞機能の発達を阻害する方法であって、前記対象に、請求項 79～84 のいずれか一項に記載の非ウイルスベクターを、前記対象において異常な骨芽細胞機能の発達を阻害するのに有効な量で投与し、それによって前記対象における異常な骨芽細胞機能の発達を阻害することを含む方法。

40

【請求項 101】

Enpp1 欠損対象において骨形成速度を増加する方法であって、前記対象に、請求項 79～84 のいずれか一項に記載の非ウイルスベクターを、骨形成を増加するのに有効な量で投与し、それによって前記対象における骨形成を増加することを含む方法。

【請求項 102】

Enpp1 欠損対象において骨芽細胞面を増加する方法であって、前記対象に、請求項

50

79～84のいずれか一項に記載の非ウイルスベクターを、骨芽細胞面を増加するのに有効な量で投与し、それによって前記対象において骨芽細胞面を増加することを含む方法。

【請求項103】

前記補正が、前記対象において、骨長、イントラベキュラー（intrabecular）数、皮質厚、骨梁厚、骨梁骨体積、骨形成速度、および骨芽細胞面からなる群の一つ以上の増加として表される、請求項98に記載の方法。

【請求項104】

前記補正、修復、阻害および減少が、それぞれ、前記対象において、骨長、イントラベキュラー（intrabecular）数、皮質厚、骨梁厚、骨梁骨体積、骨形成速度、および骨芽細胞面からなる群の一つ以上の増加として表される、請求項98～102のいずれか一項に記載の方法。

【請求項105】

前記補正、修復、阻害および減少が、それぞれ、非侵襲的撮像を介して検出される、請求項98～102のいずれか一項に記載の方法。

【請求項106】

前記非侵襲的撮像が、動的組織形態計測分析を含む、請求項105に記載の方法。

【請求項107】

前記検出が、前記対象への前記投与前の検出に関する、請求項105に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

相互参照

本出願は、以下の仮出願、2020年10月8日に出願された米国特許出願第63／089,515号、2021年3月24日に出願された米国特許出願第63／165,650号、および2021年9月24日に出願された米国特許出願第63／248,339号に対する優先権を主張するものであり、これらの各々の内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0002】

本発明は概して、ENPP1またはENPP3をコードする核酸を哺乳動物に提供することによる、ENPP1またはENPP3の欠損に関与する疾患の治療に関する。

【0003】

配列表

本出願は、ASCII形式で電子的に提出された配列表を含み、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。2021年10月8日に作成された前述のASCIIコピーは、4427-11304__sequence__ST25.txtと名付けられ、466,539バイトのサイズである。

【背景技術】

【0004】

ENPP1（PC-1としても知られる）は、骨芽細胞およ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ATP）をアデノシンモノホスフェート（AMP）およびピロホスフェート（PPi）に加水分解する。PPiは、発生期のヒドロキシアパタイト（HA）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、それによって、これらの結晶の将来の成長を防止する。ENPP1が、ヌクレオチドトリホスフェート（NTP）の加水分解を介してPPiを生成し、進行性強直タンパク質（ANK）が、細胞内PPiを細胞外空間に輸送し、組織非特異性アルカリホスファターゼ（TNAP）が、PPiのPiへの直接加水分解を介してPPiを除去する。WO 2011/113027-Quinn et al., WO 2012/125182-Quinn et al., WO 2016/100803-Quinn et al. および WO 2017/218786-Yan et al. がNPP1について記載している。

【0005】

ENPP1のようなENPP3はまた、ホスホジエステラーゼI／ヌクレオチドピロホスファターゼ酵素ファミリーに属する。これらの酵素はII型膜貫通タンパク質であり、デオキシヌクレオチド、NAD、およびヌクレオチド糖を含む様々な分子のホスホジエステルおよびホスホスルフェートの結合の切断を触媒する。ENPP1は、幼児に発生し、かつ広範な動脈石灰化を伴う重篤な疾患であるGACI（幼児の全身性動脈石灰化）に対するマウスモデルにおいて、全身性動脈石灰化を低減するなど、異所性の組織石灰化の特定の疾患の治療に効果的であることが示されている（Albright, et al., 2015, Nature Comm. 10006）。

【0006】

発明の概要

一態様では、本開示は、（a）肝臓特異的プロモーターと、（b）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（ENPP1）ポリペプチドの触媒ドメインまたは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-3（ENPP3）ポリペプチドの触媒ドメインをコードするヌクレオチド配列と、を含む組み換え核酸を提供する。

【0007】

組み換え核酸の一部の実施形態では、前述のENPP1ポリペプチドまたは前述のENPP3ポリペプチドをコードする前述のヌクレオチド配列が、可溶性ENPP1または可溶性ENPP3ポリペプチドをコードする。

【0008】

組み換え核酸の一部の実施形態では、前述の該核酸は、前述のコードされたポリペプチドを発現することができるベクターまたはプラスミドを含む。

【0009】

組み換え核酸の一部の実施形態では、前述のベクターはウイルスベクターである。

【0010】

組み換え核酸がベクターにより哺乳類細胞中に伝達される一部の実施形態では、前述のベクターはウイルスベクターである。

【0011】

組み換え核酸がベクターにより哺乳類細胞中に伝達される一部の実施形態では、前述のベクターは非ウイルスベクターである。

【0012】

組み換え核酸の一部の実施形態では、ウイルスベクターはアデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターである。

【0013】

前述の組み換え核酸の一部の実施形態では、前述の核酸はアズロシジニンシグナルペプチドをコードし、前述のシグナルペプチドは前述のENPP1ポリペプチドまたは前述のENPP3ポリペプチドと動作可能に関連付けられている、

【0014】

任意の前述の組み換え核酸の一部の実施形態では、前述のENPP1ポリペプチドまたは前述のENPP3ポリペプチドをコードする前述のヌクレオチド配列は、前述のENPP1ポリペプチドまたは前述のENPP3ポリペプチドおよび異種タンパク質を含むENPP1またはENPP3融合タンパク質をコードする。

【0015】

組み換え核酸の一部の実施形態では、前述のヌクレオチド配列によってコードされる前述のENPP1融合タンパク質またはENPP3融合タンパク質は、異種タンパク質を含まないENPP1ポリペプチドの循環半減期と比較して、哺乳動物において循環半減期が増加する。

【0016】

組み換え核酸の一部の実施形態では、前述のENPP1またはENPP3融合タンパク

10

20

30

40

50

質をコードする前述のヌクレオチド配列によってコードされる前述の異種タンパク質は、イムノグロブリン結晶化可能断片（Fc）ポリペプチドまたはアルブミンポリペプチドである。

【0017】

組み換え核酸の一部の実施形態では、前述のヌクレオチド配列によりコードされる前述のENPP1またはENPP3融合タンパク質は、前述の融合タンパク質のアミノ末端からカルボキシ末端の順序で、前述のENPP1または前述のENPP3ポリペプチドおよび前述のFcポリペプチドまたは前述のアルブミンポリペプチドを含む。

【0018】

任意の組み換え核酸の一部の実施形態では、前述のENPP1またはENPP3融合タンパク質をコードする前述のヌクレオチド配列によってコードされる前述のFcポリペプチドは、IgG1 Fcポリペプチドである。

【0019】

組み換え核酸の一部の実施形態では、前述のコードされたIgG1 Fcポリペプチドは、配列番号34のアミノ酸を含む。

【0020】

組み換え核酸の一部の実施形態では、前述のコードされたIgG1 Fcポリペプチドは、バリエーションIgG Fcである。

【0021】

組み換え核酸の一部の実施形態では、前述のバリエーションFcポリペプチドは、アミノ酸置換、EU番号によるM252Y/S254T/T256E、を含む。

【0022】

組み換え核酸の一部の実施形態では、前述のコードされたバリエーションFcポリペプチドは、配列番号95のアミノ酸853-1079を含む。

【0023】

前述の組み換え核酸の一部の実施形態では、前述のENPP1ポリペプチドをコードする前述のヌクレオチド配列は、配列番号1のアミノ酸99~925をコードする。

【0024】

組み換え核酸の一部の実施形態では、前述のENPP1ポリペプチドをコードする前述のヌクレオチド配列は、バリエーションの前述のENPP1ポリペプチドをコードする。

【0025】

組み換え核酸の一部の実施形態では、前述のコードされたバリエーションENPP1ポリペプチドは、配列番号1に対する332位のアミノ酸置換をコードする配列を含む。

【0026】

組み換え核酸の一部の実施形態では、前述の配列番号1に対する332位のアミノ酸置換をコードする前述の配列は、I332Tを含む。

【0027】

組み換え核酸の一部の実施形態では、前述のENPP1ポリペプチドをコードする前述のヌクレオチド配列は、配列番号95のアミノ酸21~847をコードする配列を含む。

【0028】

組み換え核酸の一部の実施形態では、前述のENPP1ポリペプチドをコードする前述のヌクレオチド配列は、配列番号95のアミノ酸20~847をコードする。

【0029】

組み換え核酸の一部の実施形態では、前述のコードされたENPP1融合タンパク質は、前述のコードされたENPP1ポリペプチドおよび前述のコードされた異種ポリペプチドとを連結するタンパク質リンカーをコードする配列を含む。

【0030】

組み換え核酸の一部の実施形態では、前述のコードされたタンパク質リンカーは、配列番号94（GGGGS）のアミノ酸配列を含む。

【0031】

10

20

30

40

50

組み換え核酸の一部の実施形態では、前述の ENPP1 融合タンパク質をコードする前述のヌクレオチド配列は、配列番号 95 のアミノ酸 21～1079 を含む。

【0032】

組み換え核酸の一部の実施形態では、前述の ENPP1 融合タンパク質をコードする前述のヌクレオチド配列は、配列番号 95 のアミノ酸 20～1079 を含む。

【0033】

別の態様では、本開示は、(a) 肝臓特異的プロモーターと、(a) 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 (ENPP1) ポリペプチドのまたは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-3 (ENPP3) ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列と、を含むウイルスベクターを提供する。

【0034】

一部の実施形態では、前述の肝臓特異的プロモーターが、肝臓プロモーター1 (LP1) およびハイブリッド肝臓プロモーター (HLP) からなる群から選択される、任意の前述の組み換え核酸、または任意の前述のウイルスベクター。

【0035】

ウイルスベクターの一部の実施形態では、ベクターは、ポリアデニル化信号をコードする配列を含む。

【0036】

ウイルスベクターの一部の実施形態では、ベクターは、アズロシジシングナルペプチドであるシグナルペプチドをコードする。

【0037】

ウイルスベクターの一部の実施形態では、ウイルスベクターはアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターである。

【0038】

ウイルスベクターの一部の実施形態では、前述の血清型を有する AAV ベクターは、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、および AAV-rh74 からなる群から選択される血清型を有する。

【0039】

一部の実施形態では、任意の前述のウイルスベクターは、ウイルスベクターは任意の前述の核酸を含む。

【0040】

一部の実施形態では、ENPP1 または ENPP3 の触媒ドメインをコードする前述の組み換え核酸の細胞への送達は、ウイルスベクターを使用して行われる。

【0041】

一部の実施形態では、ENPP1 または ENPP3 の触媒ドメインをコードする前述の組み換え核酸の細胞への送達は、非ウイルスベクターを使用して行われる。

【0042】

一部の実施形態では、前述の組み換え核酸の細胞への送達は、弾道 DNA、エレクトロポレーション、ソノポレーション、フォトポレーション、マグネトフェクション、ハイドロポレーションのうちの一つ以上の使用を伴う。

【0043】

一部の実施形態では、ENPP1 または ENPP3 の触媒ドメインをコードする前述の組み換え核酸を含む非ウイルスベクターの細胞内への送達は、DNA／カチオン性脂質 (リポプレックス)、DNA／カチオン性ポリマー (ポリプレックス)、DNA／カチオン性ポリマー／カチオン性脂質 (リポポリプレックス)、脂質ナノ粒子 (LPN)、イオン化可能な脂質、リポイド、ペプチド系ベクター、およびポリマー経ベクターのうちの一つ以上の使用を伴う。

【0044】

一部の実施形態では、前述の組み換え核酸の送達に使用される非ウイルスベクターは、リポプレックス、ポリプレックス、リポポリプレックス、イオン化可能な脂質、リポイド

10

20

30

40

50

ド、脂質ナノ粒子（LNP）、ペプチド系ベクター、およびポリマー系ベクターからなる群から選択される。

【0045】

一部の実施形態では、前述の組み換え核酸の送達に使用される非ウイルスベクターは、脂質ナノ粒子（LNP）である。

【0046】

一部の実施形態では、前述の組み換え核酸の送達に使用されるLNPは、安定性強化部分で被覆および／またはコンジュゲートされる。

【0047】

一部の実施形態では、LNPの安定性強化部分はポリエチレングリコール（PEG）である。

【0048】

一部の実施形態では、前述の組み換え核酸の送達に使用されるLNPは、標的部分で被覆および／またはコンジュゲートされる。

【0049】

一部の実施形態では、前述の組み換え核酸の送達に使用されるLNPは、一つ以上の標的部分とコンジュゲートされ、標的部分は、鉄飽和トランスフェリン（Tf）、葉酸、アルギニルグリシルアスパラギン酸（RGD）、およびアニサミドからなる群から選択される。

【0050】

一部の実施形態では、前述の組み換え核酸の送達に使用されるLNPは、pH感受性リンカーとコンジュゲートされる。

【0051】

一部の実施形態では、前述の組み換え核酸の送達に使用されるLNPは、pH感受性リンカーとコンジュゲートされ、pH感受性リンカーは、ジオルトエステル、オルトエステル、ビニルエーテル、ホスホルアミデート、ヒドラジン、およびベータチオプロピオネートからなる群から選択される。

【0052】

一部の実施形態では、前述の組み換え核酸の送達に使用されるLNPは、肝臓に組み換え核酸を特異的に送達するために、標的部分で改変される。

【0053】

一部の実施形態では、前述の組み換え核酸の肝臓への送達に使用されるLNPは、ビタミンA結合リポソームである。

【0054】

一部の実施形態では、前述の組み換え核酸の送達に使用されるLNPは、コラーゲンVI型受容体、マンノース-6-ホスフェート受容体、およびガラクトース受容体からなる群から選択される特異的受容体を標的とするリガンドとコンジュゲートされる。

【0055】

一部の実施形態では、前述の組み換え核酸の送達に使用される非ウイルスベクターは、ペプチド系ベクターである。

【0056】

一部の実施形態では、前述の組み換え核酸の送達に使用される非ウイルスベクターは、ポリマー系ベクターである。

【0057】

一部の実施形態では、ポリマー系ベクターは、天然および合成ポリマーからなる群から選択される。

【0058】

一部の実施形態では、ポリマー系ベクターは天然であり、タンパク質、ペプチド、または多糖類から選択される。

【0059】

10

20

30

40

50

一部の実施形態では、ポリマー系ベクターは、キトサンである。

【0060】

一部の実施形態では、ポリマー系ベクターは合成であり、タンパク質、ペプチド、または多糖類から選択される。

【0061】

一部の実施形態では、ポリマー系ベクターは合成であり、ポリエチレン鉱物（PEI）、デンドリマー、およびポリホスホエステルから選択される。

【0062】

さらに別の態様では、本開示は、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（ENPP1）ポリペプチドのまたは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-3（ENPP3）ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む組み換え核酸を含む非ウイルスベクターを特徴とする。ENPP1ポリペプチドは、本明細書に記載される任意のENPP1ポリペプチドであってもよい。ENPP3ポリペプチドは、本明細書に記載される任意のENPP3ポリペプチドであってもよい。一部の実施形態では、核酸は肝臓特異的プロモーター配列をさらに含む。

【0063】

別の態様では、本開示はまた、前述の任意の組み換えウイルスベクターを取得する方法を提供し、本方法は、

i. 核酸を含む細胞を提供するステップと、

ii. ウイルスの組立に適切な条件下に細胞を維持するステップと、

iii. 細胞によって産生されるウイルスベクターを精製するステップと、を含む。

【0064】

一部の実施形態では、ENPP1またはENPP3タンパク質を哺乳動物に提供する方法は、任意の前述のウイルスベクターを前述の哺乳動物に投与することを含む。

【0065】

別の態様では、本開示は、ウイルスベクターの任意の一つおよび生理学的に適合する担体を含む医薬組成物を提供する。

【0066】

別の態様では、本開示は、疾患の進行の予防または減少を必要とする哺乳動物における疾患の進行を予防または減少させる方法を提供し、方法は、前述の哺乳動物に、治療有効量の医薬組成物を投与することを含み、疾患は、X連鎖性低リン血症（XLH）、慢性腎臓疾患（CKD）、ミネラル骨障害（MBD）、血管石灰化、軟部組織の病理学的石灰化、軟部組織の病理学的骨化、乳児の全身性動脈石灰化（GACI）、および後縦靱帯の骨化（OPLL）からなる群から選択され、前述の哺乳動物における前述の疾患が予防されるまたはその進行が低減される。

【0067】

別の態様では、本開示は、任意の前述の核酸を含む細胞を提供する。

【0068】

関連の態様では、本開示は、病理学的石灰化または病理学的骨化の疾患または障害の治療または予防を必要とする対象において病理学的石灰化または病理学的骨化の疾患または障害の治療または予防する方法を提供し、方法は、対象に、治療有効量の任意の前述のウイルスベクター、前述の方法によって産生されるウイルスベクター、または医薬組成物を投与し、それによって前述の疾患または障害を治療または予防することを含む。

【0069】

別の態様では、本開示は、ENPP1タンパク質欠損を有する対象を治療する方法を提供し、本方法は、対象に、治療有効量の任意の前述のウイルスベクター、前述の任意の方法によって産生されるウイルスベクター、または医薬組成物を投与し、それによって前述の対象を治療することを含む。

【0070】

方法の一部の実施形態では、前述の疾患または障害または前述のENPP1タンパク質

10

20

30

40

50

欠損は、前述の対象における N P P 1 遺伝子の機能喪失変異または A B C C 6 遺伝子の機能喪失変異と関連する。

【0071】

方法の一部の実施形態では、前述のウイルスペクターは、組み換え E N P P 1 ポリペプチドをコードする。

【0072】

方法の一部の実施形態では、前述のウイルスペクターは、組み換え E N P P 3 ポリペプチドをコードする。

【0073】

E N P P 1 タンパク質欠損を有する対象を治療する方法の一部の実施形態では、方法は、治療有効量の前述のウイルスペクター、前述の任意の方法によって產生されるウイルスペクター、または医薬組成物を対象に投与することを含み、それによって前述の対象を治療する。

10

【0074】

方法の一部の実施形態では、前述の疾患または障害、または前述の E N P P 1 タンパク質欠損は、前述の対象における N P P 1 遺伝子の機能喪失変異、または A B C C 6 遺伝子の機能喪失変異と関連する。

【0075】

方法の一部の実施形態では、ウイルスペクターまたは医薬組成物は、対象の $1 \times 10^{12} \sim 1 \times 10^{15}$ v g / k g の用量で投与される。

20

【0076】

方法の一部の実施形態では、ウイルスペクターまたは医薬組成物は、対象の $1 \times 10^{13} \sim 1 \times 10^{14}$ v g / k g の用量で投与される。

【0077】

方法の一部の実施形態では、ウイルスペクターまたは医薬組成物は、対象の $5 \times 10^{11} \sim 5 \times 10^{15}$ v g / k g の用量で投与される。

【0078】

方法の一部の実施形態では、前述のウイルスペクターまたは医薬組成物の対象への投与は、前述の対象において、血漿ピロホスフェート (P P i) および／または血漿 E N P P 1 または E N P P 3 濃度を増加させる。

30

【0079】

方法の一部の実施形態では、対象または哺乳動物から得られた生物学的試料において、(i) ピロホスフェートの濃度、(i i) E N P P 1 または E N P P 3 の発現レベル、および (i i i) E N P P 1 または E N P P 3 の酵素活性の一つ以上のパラメータを検出または測定することをさらに含む。

【0080】

方法の一部の実施形態では、検出または測定は、ウイルスペクターまたは医薬組成物を投与する前に起こる。別の態様では、本開示は、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 (E N P P 1) または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 3 (E N P P 3) を含む組み換えポリペプチドをコードする組み換えポリヌクレオチドを提供する。

40

【0081】

別の態様では、本開示は、本明細書に記載の任意の組み換えポリヌクレオチドを含むウイルスペクターを提供する。

【0082】

一部の実施形態では、組み換えポリヌクレオチドは、ヒト E N P P 1 またはヒト E N P P 3 ポリペプチドをコードする。このため、本開示はまた、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 (E N P P 1) または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 3 (E N P P 3) を含む組み換えポリペプチドをコードする組み換えポリヌクレオチドを含むウイルスペクターを提供する。

50

【0083】

本明細書に記載される任意のポリヌクレオチドまたはウイルスベクターの一部の実施形態では、組み換えポリペプチドは、ENPP1融合ポリペプチドである。

【0084】

本明細書に記載される任意のポリヌクレオチドまたはウイルスベクターの一部の実施形態では、組み換えポリペプチドは、ENPP3融合ポリペプチドである。

【0085】

本明細書に記載される任意のポリヌクレオチドまたはウイルスベクターの一部の実施形態では、ENPP1融合ポリペプチドは、ENPP1-Fc融合ポリペプチドまたはENPP1-アルブミン融合ポリペプチドである。

10

【0086】

本明細書に記載される任意のポリヌクレオチドまたはウイルスベクターの一部の実施形態では、ENPP3融合ポリペプチドは、ENPP3-Fc融合ポリペプチドまたはENPP3-アルブミン融合ポリペプチドである。

【0087】

本明細書に記載される任意のポリヌクレオチドまたはウイルスベクターの一部の実施形態では、組み換えポリペプチドは、ENPP1またはENPP3と融合されたシグナルペプチドである。

【0088】

本明細書に記載される任意のポリヌクレオチドまたはウイルスベクターの一部の実施形態では、シグナルペプチドは、アズロシジシグナルペプチドまたはNPP2シグナルペプチドまたはNPP7シグナルペプチドである。

20

【0089】

本明細書に記載される任意のポリヌクレオチドまたはウイルスベクターの一部の実施形態では、ウイルスベクターは、アデノ随伴ウイルスベクター、または単純ヘルペスベクター、またはアルファウイルスベクター、またはレンチウイルスベクターである。本発明の一態様では、アデノ随伴ウイルスベクター(AAV)の血清型は、AAV1、AAV2、もしくはAAV3、もしくはAAV4、もしくはAAV5、もしくはAAV6、もしくはAAV7、もしくはAAV8、もしくはAAV9、もしくはAAV-rh74である。

【0090】

さらに別の態様では、本開示は、ENPP1-Fc融合ポリペプチドをコードする組み換えポリペプチドを含むアデノ随伴ウイルスベクターを提供する。

30

【0091】

さらに別の態様では、本開示は、ENPP1-Fc融合ポリペプチドに融合されたアズロシジシグナルペプチドを含む組み換えポリペプチドをコードする組み換えポリペプチドを含むアデノ随伴ウイルスベクターを提供する。

【0092】

一部の実施形態では、ウイルスベクターは、バキュロウイルスベクターなどの昆虫ウイルスベクターではない。

【0093】

一部の実施形態では、ウイルスベクターは、ヒト細胞（例えば、ヒト肝細胞またはHEK細胞、HeLaまたはA549または肝細胞）などの哺乳類細胞を感染させることができる。一部の実施形態では、ウイルスベクターは、ヒト細胞などの哺乳類細胞に感染、侵入、および／または融合することができる。一部の実施形態では、ウイルスベクターのポリヌクレオチドのすべてまたは機能的部分（例えば、本明細書に記載のポリペプチドを発現することができる部分）は、本明細書に記載されるウイルスベクターによって接触される細胞のゲノムを統合する、またはそれに統合される。一部の実施形態では、ウイルスベクターのポリヌクレオチドのすべてまたは機能的部分は、本明細書に記載されるウイルスベクターと接触した哺乳類細胞のゲノム内に統合されることなく、染色体外状態で持続することができる。

40

50

【0094】

一部の実施形態では、組み換えポリヌクレオチドは、ウイルスタンパク質および／またはヒトENPP1をコードするベクターまたはプラスミドを含む。一部の実施形態では、組み換えポリヌクレオチドは、ウイルスタンパク質および／またはヒトENPP3をコードするベクターまたはプラスミドを含む。一部の実施形態では、ベクターまたは前述のプラスミドは、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 (ENPP1) または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-3 (ENPP3) に融合されたアズロシジニングナルペプチドを含むコードされたポリペプチドを発現することができる。

【0095】

一部の実施形態では、コードされたポリペプチドは、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 (ENPP1) に融合されたアズロシジニングナルペプチドを含み、膜貫通ドメイン、ソマトメジンドメイン、触媒ドメイン、およびヌクレアーゼドメインを含む。

【0096】

一部の実施形態では、コードされたポリペプチドは、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 (ENPP1) に融合されたアズロシジニングナルペプチドを含み、シトソル内に分泌される。

【0097】

一部の実施形態では、ポリペプチドをコードする組み換えポリヌクレオチドは、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 (ENPP1) に融合された膜貫通ドメインを含み、分泌されず、膜結合している。

【0098】

一部の実施形態では、本開示は、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 (ENPP1) を含むポリペプチドをコードする組み換えポリヌクレオチドを提供する。一部の実施形態では、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 (ENPP1) を含むポリペプチドは、配列番号1のアミノ酸残基を含む。

【0099】

一部の実施形態では、コードされたポリペプチドは、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 (ENPP1) に融合されたアズロシジニングナルペプチドを含む。

【0100】

一部の実施形態では、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 (ENPP1) に融合されたアズロシジニングナルペプチドを含むポリペプチドは、ポリアスパラギンドメインまたは負に帯電した骨標的ドメインを欠く。

【0101】

一部の実施形態では、ベクターは、ウイルズベクターである。一部の実施形態では、ウイルズベクターはアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターである。一部の実施形態では、本明細書に記載される任意のポリヌクレオチドは、ENPP1に融合されたアズロシジニングナルペプチドまたはENPP3に融合されたアズロシジニングナルペプチド、およびアミノ末端からカルボキシ末端の順序で、アズロシジニングナルペプチド-ENPP1-Fcまたはアズロシジニングナルペプチド-ENPP3-Fcを形成するためにFcポリペプチドに融合されるENPP1またはENPP3を、それぞれコードする。

【0102】

一部の実施形態では、組み換えポリヌクレオチドは、ENPP1に融合されたアズロシジニングナルペプチドまたはENPP3に融合されたアズロシジニングナルペプチド、およびアミノ末端からカルボキシ末端の順序で、アズロシジニングナルペプチド-ENPP1-アルブミンまたはアズロシジニングナルペプチド-ENPP3-アルブミンを形成するためにヒト血清アルブミンに融合されるENPP1またはENPP3を、それぞれコー

10

20

30

40

50

ドする。

【0103】

一部の実施形態では、Fcまたはアルブミン配列は、ENPP1またはENPP3タンパク質のC末端に直接融合される。一部の実施形態では、Fcまたはアルブミン配列は、例えば、可撓性リンカーなどのリンカーを通じて、ENPP1またはENPP3タンパク質のC末端に融合される。一部の実施形態では、リンカーは、配列番号57～88から選択される。

【0104】

一部の実施形態では、ウイルスベクターは、ENPP1またはENPP3のN末端に融合されたシグナルペプチドをコードする核酸配列を含み、かつそれを発現することができる。ウイルスベクターの一部の実施形態では、ベクターはプロモーターを含む。ウイルスベクターの一部の実施形態では、プロモーターは肝臓特異的プロモーターである。

【0105】

ウイルスベクターの一部の実施形態では、肝臓特異的プロモーターは、アルブミンプロモーター、ホスホエノールビルビン酸カルボキシキナーゼ（PEPCK）プロモーター、およびアルファ-1-抗トリプシンプロモーターからなる群から選択される。ウイルスベクターの一部の実施形態では、ベクターは、ポリアデニル化信号をコードする配列を含む。

【0106】

ウイルスベクターの一部の実施形態では、シグナルペプチドは、アズロシジニンシグナルペプチドである。ウイルスベクターの一部の実施形態では、ウイルスベクターはアデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターである。ウイルスベクターの一部の実施形態では、血清型を有するAAVベクターは、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、およびAAV-rh74からなる群から選択される。

【0107】

ウイルスベクターの一部の実施形態では、本発明のポリヌクレオチドは、ENPP1に融合されたアズロシジニンシグナルペプチド、またはENPP3に融合されたアズロシジニンシグナルペプチド、およびアミノ末端からカルボキシ末端の順序で、アズロシジニンシグナルペプチド-ENPP1-Fcまたはアズロシジニンシグナルペプチド-ENPP3-Fcを形成するためにFcポリペプチドに融合されるENPP1またはENPP3を、それぞれコードする。

【0108】

ウイルスベクターの一部の実施形態では、ポリヌクレオチドは、ENPP1に融合されたアズロシジニンシグナルペプチド、またはENPP3に融合されたアズロシジニンシグナルペプチド、およびアミノ末端からカルボキシ末端の順序で、アズロシジニンシグナルペプチド-ENPP1-アルブミンまたはアズロシジニンシグナルペプチド-ENPP3-アルブミンを形成するためにヒト血清アルブミンに融合されるENPP1またはENPP3を、それぞれコードする。

【0109】

さらに別の態様では、本開示は、本明細書に記載される任意のポリヌクレオチドを含む細胞（例えば、齧歯類細胞、非ヒト霊長類細胞、またはヒト細胞などの哺乳類細胞）を提供する。

【0110】

一部の実施形態では、本発明はまた、
i. 本発明のポリヌクレオチドを含む細胞を提供するステップと、
ii. ウイルスの組立に適切な条件下に細胞を維持するステップと、
iii. 細胞によって産生されるウイルスベクターを精製するステップと、を含む、組み換えウイルスベクターを得る方法を提供する。

【0111】

別の態様では、本開示は、組み換えウイルスベクターを産生する方法を提供する。本方法は、

i. 本明細書に記載のポリヌクレオチドを含む細胞または細胞集団を提供することであって、細胞が、組み換えウイルスベクターへのポリヌクレオチドのパッケージングまたは組立に必須なウイルスタンパク質を発現する提供することと、

ii. 前述の組み換えウイルスベクターのパッケージングの組立に適切な条件下に、細胞または細胞集団を維持することと、を含む。

【0112】

一部の実施形態では、方法は、細胞もしくは細胞集団から、または細胞もしくは細胞集団が維持される培地から、ウイルスベクターを精製することを含む。

【0113】

一部の実施形態では、細胞は、齧歯類細胞（例えば、ラット細胞、マウス細胞、ハムスター細胞）、非ヒト霊長類細胞、またはヒト細胞（例えば、HEK293、HeLaまたはA549）などの哺乳類細胞である。

【0114】

一部の実施形態では、方法は、細胞または細胞集団に、一つ以上のウイルスタンパク質（ウイルスベクターのパッケージングまたは組立に必須であるものなど）をコードする組み換え核酸を導入すること、例えば、細胞または細胞集団をかかる組み換え核酸を含むヘルパーウイルスに感染させること、細胞または細胞集団とかかる組み換え核酸などを含むヘルパープラスミドとのトランスフェクションなど、をさらに含む。

【0115】

一部の実施形態では、ウイルスベクターは、標的細胞に感染すると、本明細書に記載される一つ以上のポリペプチドを発現することができる。

【0116】

一部の実施形態では、本開示は、本明細書に記載の精製ウイルスベクターを含む医薬組成物を提供する。一部の実施形態では、本開示は、本明細書に記載の滅菌／エンドトキシン遊離精製ウイルスベクターを含む滅菌医薬組成物を提供する。

【0117】

別の態様では、本開示は、本明細書に記載の任意の方法によって取得および精製されるウイルスベクターを提供する。

【0118】

別の態様では、本開示は、本明細書に記載の任意の方法によって取得および精製される任意のウイルスベクターを含む医薬組成物を提供する。

【0119】

特定の実施形態では、本発明は、ENPP1またはENPP3を哺乳動物に提供する方法を提供し、方法は、本発明のウイルスベクターを哺乳動物に投与することを含む。

【0120】

特定の実施形態では、本開示は、哺乳動物（例えば、かかる発現を必要とするヒトなどのヒト）においてENPP1またはENPP3を発現する方法を提供し、方法は、本明細書に記載される任意のウイルスベクターを哺乳動物に投与することを含む。哺乳動物へのウイルスベクターの投与の前に、と同時に、および／またはその後に、方法は、哺乳動物から得られた生物学的試料において、ENPP1および／またはENPP3の発現、ENPP1および／またはENPP3の活性レベル、および／またはピロホスフェートレベルまたは濃度のパラメータのうちの一つ以上を検出および／または測定することをさらに含むことができる。一部の実施形態では、一つ以上のパラメータは、ウイルスベクターの哺乳動物への投与後、1週間、1～2週間、および／または1か月以内に検出または測定される。一部の実施形態では、哺乳動物（例えば、ヒト）は、ENPP1またはABCC6欠損を有する哺乳動物である。

【0121】

別の態様では、本開示は、本明細書に記載の任意のウイルスベクターおよび生理学的に

10

20

30

40

50

適合する担体を含む医薬組成物を提供する。

【0122】

一部の実施形態では、本開示は、病態または疾患の進行を防止または低減を必要とする哺乳動物において病態または疾患の進行を防止または低減する方法を提供し、方法は、前述の哺乳動物に、治療有効量の本発明による組成物を投与することを含み、病態または疾患は、限定されるものではないが、以下、NPP1の欠損、低レベルのPPI、動脈および／または結合組織におけるカルシウムおよび他のミネラルの沈着の蓄積を特徴とする進行性障害、軟部組織の異所性石灰化、動脈または静脈の石灰化、大動脈組織や冠動脈組織などの心臓組織の石灰化、弾性線維性仮性黄色腫（PXE）、X連鎖性低リン血症（XLH）、慢性腎臓疾患（CRO）、ミネラル骨障害（MBD）、血管石灰化、軟部組織の病

10

【0123】

別の態様では、本開示は、病理学的石灰化または病理学的骨化の疾患または障害の治療または予防を、それを必要とする対象において治療または予防および／または改善する方法を提供し、方法は、治療有効量の任意の本明細書に記載のウイルスベクターを投与し、それによって前述の疾患または障害を治療、予防、または改善することを含む。一部の実施形態では、ウイルスベクターは、ヒトENPP1またはヒトENPP3ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む。

20

【0124】

別の態様では、本開示は、ENPP1タンパク質欠損を有する対象を治療する方法を提供し、方法は、組み換えENPP1またはENPP3ポリペプチドをコードする治療有効量のウイルスベクターを対象に投与し、それによって対象を治療することを含む。本発明の一態様では、ウイルスベクターは、ヒトENPP1またはヒトENPP3ポリペプチドをコードする。

【0125】

別の態様では、対象は、対象のNPP1遺伝子の機能喪失変異、または対象のABCC6遺伝子の機能喪失変異に関連する疾患または障害またはENPP1タンパク質欠損を有する。

30

【0126】

本明細書に記載される任意の方法の一部の実施形態では、ウイルスベクターは、ENPP1-Fc融合ポリペプチドをコードするAAVベクターであり、ベクターは、 $1 \times 10^{12} \sim 1 \times 10^{15}$ v g / k g、好ましくは $1 \times 10^{13} \sim 1 \times 10^{14}$ v g / k gの用量で対象に投与される。

【0127】

本明細書に記載される任意の方法の一部の実施形態では、ウイルスベクターは、ENPP1-Fc融合ポリペプチドをコードするAAVベクターであり、ベクターは、 $5 \times 10^{11} \sim 5 \times 10^{15}$ v g / k gの用量で対象に投与される。

【0128】

本明細書に記載される任意の方法の一部の実施形態では、ウイルスベクターは、ENPP1-Fc融合ポリペプチドをコードするAAVベクターであり、対象当たり約 $1 \times 10^{12} \sim 1 \times 10^{15}$ v g / k gが、ENPP1-Fcポリペプチドの送達および発現のために投与される。

40

【0129】

本明細書に記載される任意の方法の一部の実施形態では、ウイルスベクターは、ENPP3-Fc融合ポリペプチドをコードするAAVベクターであり、ベクターは、 $1 \times 10^{12} \sim 1 \times 10^{15}$ v g / k g、好ましくは $1 \times 10^{13} \sim 1 \times 10^{14}$ v g / k gの用量で対象に投与される。

【0130】

50

本明細書に記載される任意の方法の一部の実施形態では、ウイルスペクターは、E N P P 3 - F c 融合ポリペプチドをコードするA A V ベクターであり、ベクターは、 $5 \times 10^{11} \sim 5 \times 10^{15}$ v g / k g の用量で対象に投与される。

【0131】

本明細書に記載される任意の方法の一部の実施形態では、ウイルスペクターは、E N P P 3 - F c 融合ポリペプチドをコードするA A V ベクターであり、対象当たり約 $1 \times 10^{12} \sim 1 \times 10^{15}$ v g / k g が、E N P P 3 - F c ポリペプチドの送達および発現のために投与される。

【0132】

本明細書に記載される任意の方法の一部の実施形態では、E N P P 1 - F c ポリペプチドをコードするA A V ベクターを対象への投与により、前述の対象において、血漿ピロホスフェート (P P i) の用量依存的増加、および血漿E N P P 1 濃度の用量依存的増加が生じる。

【0133】

哺乳動物へのウイルスペクターの投与の前に、と同時に、および／またはその後に、本明細書に記載される任意の方法は、哺乳動物から得られた生物学的試料において、E N P P 1 および／またはE N P P 3 の発現、E N P P 1 および／またはE N P P 3 の活性レベル、および／またはピロホスフェートレベルまたは濃度のパラメータのうちの一つ以上を検出および／または測定することをさらに含むことができる。一部の実施形態では、一つ以上のパラメータは、ウイルスペクターの哺乳動物への投与後、1 週間、1 ～ 2 週間、および／または1 か月以内に検出または測定される。

【0134】

さらに別の態様では、本開示は、病理学的石灰化または病理学的骨化の疾患または障害の治療または予防を、それを必要とする対象において治療または予防する方法を提供し、前述の対象に組み換えE N P P 1 またはE N P P 3 ポリペプチドをコードする治療有効量のウイルスペクターを投与し、それによって前述の疾患または障害を治療または予防することを含む。

【0135】

別の態様では、本開示は、E N P P 1 タンパク質欠損を有する対象を治療する方法を提供し、組み換えE N P P 1 またはE N P P 3 ポリペプチドをコードする治療有効量のウイルスペクターを前述の対象に投与し、それによって前述の対象を治療することを含む。

【0136】

本明細書に記載される任意の方法の一部の実施形態では、前述の疾患または障害、または前述のE N P P 1 タンパク質欠損は、前述の対象におけるN P P 1 遺伝子の機能喪失変異、またはA B C C 6 遺伝子の機能喪失変異と関連する。

【0137】

本明細書に記載される任意の方法の一部の実施形態では、前述のウイルスペクターは、組み換えE N P P 1 ポリペプチドをコードする。

【0138】

本明細書に記載される任意の方法の一部の実施形態では、前述のウイルスペクターは、組み換えE N P P 3 ポリペプチドをコードする。

【0139】

本明細書に記載される任意の方法の一部の実施形態では、前述のウイルスペクターは、組み換えE N P P 1 - F c 融合ポリペプチドまたは組み換えE N P P 1 - アルブミン融合ポリペプチドをコードする。

【0140】

本明細書に記載される任意の方法の一部の実施形態では、前述のウイルスペクターは、組み換えE N P P 3 - F c 融合ポリペプチドまたは組み換えE N P P 3 - アルブミン融合ポリペプチドをコードする。

【0141】

10

20

30

40

50

本明細書に記載される任意の方法の一部の実施形態では、前述のウイルスペクターは、E N P P 1 または E N P P 3 に融合されたシグナルペプチドを含む組み換えポリペプチドをコードする。

【0142】

本明細書に記載される任意の方法の一部の実施形態では、前述のペクターは、E N P P 1 - F c または E N P P 1 - アルブミンをコードする。

【0143】

本明細書に記載される任意の方法の一部の実施形態では、前述のシグナルペプチドは、アズロシジシグナルペプチド、N P P 2 シグナルペプチド、または N P P 7 シグナルペプチドである。

【0144】

本明細書に記載される任意の方法の一部の実施形態では、ウイルスペクターは、アデノ随伴ウイルスペクター、または単純ヘルペスペクター、またはアルファウイルスペクター、またはレンチウイルスペクターである。

【0145】

本明細書に記載される任意の方法の一部の実施形態では、アデノ随伴ウイルスペクター (A A V) の血清型は、A A V 1、または A A V 2、または A A V 3、または A A V 4、または A A V 5、または A A V 6、または A A V 7、または A A V 8、または A A V 9、または A A V - r h 7 4 である。

【0146】

本明細書に記載される任意の方法の一部の実施形態では、ウイルスペクターは、E N P P 1 - F c 融合ポリペプチドに融合されたアズロシジシグナルペプチドを含む組み換えポリペプチドをコードするアデノ随伴ウイルス (A A V) ペクターである。

【0147】

本明細書に記載される任意の方法の一部の実施形態では、前述の E N P P 1 - F c 融合ポリペプチドをコードする前述の A A V ペクターは、 $1 \times 10^{12} \sim 1 \times 10^{15} \text{ v g} / \text{ k g}$ の用量で対象に投与される。

【0148】

本明細書に記載される任意の方法の一部の実施形態では、前述の用量は、 $1 \times 10^{13} \sim 1 \times 10^{14} \text{ v g} / \text{ k g}$ である。

【0149】

本明細書に記載される任意の方法の一部の実施形態では、前述の A A V ペクターは、 $5 \times 10^{11} \sim 5 \times 10^{15} \text{ v g} / \text{ k g}$ の用量で対象に投与される。

【0150】

本明細書に記載される任意の方法の一部の実施形態では、前述の A A V ペクターは、E N P P 1 - F c をコードする A A V ペクターであり、 $1 \times 10^{12} \sim 1 \times 10^{15} \text{ v g} / \text{ k g}$ の用量で対象に投与される。

【0151】

任意の前述の方法の一部の実施形態では、E N P P 1 - F c ポリペプチドをコードする A A V ペクターの対象への投与により、前述の対象において、血漿ピロホスフェート (P P i) の用量依存的増加、および血漿 E N P P 1 濃度の用量依存的増加が生じる。

【0152】

本明細書に記載される任意の方法の一部の実施形態では、対象は哺乳動物であるが、哺乳動物に限定されない。本明細書に記載される任意の方法の一部の実施形態では、哺乳動物は、ヒト、マウス、ラット、ウマ、ネコ、およびイヌを含むが、これらに限定されない。

【0153】

別の態様では、本開示は、E N P P 1 または E N P P 3 タンパク質の触媒ドメインを含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含むウイルスペクターを特徴とする。

【0154】

10

20

30

40

50

本明細書に記載される任意のウイルスベクターの一部の実施形態では、ポリペプチドは、ENPP1およびENPP3タンパク質の細胞外ドメインを含む。

【0155】

本明細書に記載される任意のウイルスベクターの一部の実施形態では、ポリペプチドは、ENPP1およびENPP3タンパク質の膜貫通ドメインを含む。

【0156】

本明細書に記載される任意のウイルスベクターの一部の実施形態では、ポリペプチドは、ENPP1およびENPP3タンパク質のヌクレアーゼドメインを含む。

【0157】

本明細書に記載される任意のウイルスベクターの一部の実施形態では、ポリペプチドは、配列番号1の残留物99～925 (Pro Ser Cys～Gln Glu Asp) を含む。

10

【0158】

本明細書に記載される任意のウイルスベクターの一部の実施形態では、ポリペプチドは、配列番号7の残留物31～875 (Leu Leu Val～Thr Thr Ile) を含む。

【0159】

本明細書に記載される任意のウイルスベクターの一部の実施形態では、ポリペプチドは、配列番号1の残留物191～591 (Val Glu Glu～Gly Ser Leu) を含む。

20

【0160】

本明細書に記載される任意のウイルスベクターの一部の実施形態では、ポリペプチドは、配列番号7の残留物140～510 (Leu Glu Glu～Glu Val Glu) を含む。

【0161】

本明細書に記載される任意のウイルスベクターの一部の実施形態では、ポリペプチドは、配列番号92の残留物1～827 (Pro Ser Cys～Gln Glu Asp) を含む。

【0162】

本明細書に記載される任意のウイルスベクターの一部の実施形態では、ポリペプチドは、配列番号89の残留物1～833 (Pro Ser Cys～Gln Glu Asp) または配列番号91の残留物1～830 (Gly Leu Lys～Gln Glu Asp) を含む。

30

【0163】

本明細書に記載される任意のウイルスベクターの一部の実施形態では、ウイルスベクターは、昆虫ウイルスベクターではない。

【0164】

本明細書に記載される任意のウイルスベクターの一部の実施形態では、ウイルスベクターは、哺乳類細胞を感染させる、または感染させることができる。

【0165】

本明細書に記載される任意のウイルスベクターの一部の実施形態では、ポリヌクレオチドはプロモーター配列をコードする。

40

【0166】

本明細書に記載される任意のウイルスベクターの一部の実施形態では、前述のプロモーターは肝臓特異的プロモーターである。

【0167】

本明細書に記載される任意のウイルスベクターの一部の実施形態では、肝臓特異的プロモーターは、アルブミンプロモーター、ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ (PEPCK) プロモーター、およびアルファ-1-抗トリプシンプロモーターからなる群から選択される。

50

【0168】

本明細書に記載される任意のウイルスベクターの一部の実施形態では、ポリヌクレオチドは、ポリアデニル化信号をコードするヌクレオチド配列を含む。

【0169】

本明細書に記載される任意のウイルスベクターの一部の実施形態では、ポリヌクレオチドは、ENPP1またはENPP3タンパク質をコードするヌクレオチド配列に対してシグナルペプチドアミノ末端をコードする。

【0170】

本明細書に記載される任意のウイルスベクターの一部の実施形態では、シグナルペプチドは、アズロシジニンシグナルペプチドである。

【0171】

本明細書に記載される任意のウイルスベクターの一部の実施形態では、ウイルスベクターは、アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターである。

【0172】

本明細書に記載される任意のウイルスベクターの一部の実施形態では、前述のAAVベクターは、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、およびAAV-rh74からなる群から選択される血清型を有する。

【0173】

本明細書に記載される任意のウイルスベクターの一部の実施形態では、前述のポリヌクレオチドは、前述のENPP1に融合された前述のアズロシジニンシグナルペプチドまたは前述のENPP3に融合された前述のアズロシジニンシグナルペプチドと、およびアミノからカルボキシ末端の順序で、アズロシジニンシグナルペプチド-ENPP1-Fcまたはアズロシジニンシグナルペプチド-ENPP3-Fcを形成するためにFcポリペプチドに融合される前述のENPP1または前述のENPP3と、をそれぞれコードする。

【0174】

本明細書に記載される任意のウイルスベクターの一部の実施形態では、前記ポリヌクレオチドは、前述のENPP1に融合された前述のアズロシジニンシグナルペプチド、または前述のENPP3に融合された前述のアズロシジニンシグナルペプチド、およびアミノからカルボキシ末端の順序で、アズロシジニンシグナルペプチド-ENPP1-アルブミンまたはアズロシジニンシグナルペプチド-ENPP3-アルブミンを形成するためにヒト血清アルブミンに融合される前述のENPP1または前述のENPP3とを、それぞれコードする。

【0175】

本明細書に記載される任意のウイルスベクターの一部の実施形態では、ポリペプチドは、(i) ENPP1タンパク質またはENPP3タンパク質と、(ii) 半減期延長ドメインと、を含む融合タンパク質である。

【0176】

本明細書に記載される任意のウイルスベクターの一部の実施形態では、半減期延長ドメインは、IgG FcドメインまたはIgG Fcドメインまたはその機能的断片の非存在下でのポリペプチドの半減期と比較して、哺乳動物におけるポリペプチドの半減期を延長することができるIgG Fcドメインの機能的断片である。

【0177】

本明細書に記載される任意のウイルスベクターの一部の実施形態では、半減期延長ドメインは、アルブミンドメインまたはその機能的断片の非存在下でのポリペプチドの半減期と比較して、哺乳動物におけるポリペプチドの半減期を延長することができるアルブミンドメインまたはアルブミンドメインの機能的断片である。

【0178】

本明細書に記載される任意のウイルスベクターの一部の実施形態では、半減期延長ドメインは、融合タンパク質中のENPP1またはENPP3タンパク質に対するカルボキシ末端である。

10

20

30

40

50

【0179】

本明細書に記載される任意のウイルスベクターの一部の実施形態では、IgGFcドメインは、配列番号34に示されるアミノ酸配列を含む。

【0180】

本明細書に記載される任意のウイルスベクターの一部の実施形態では、アルブミンドメインは、配列番号35に示されるアミノ酸配列を含む。

【0181】

本明細書に記載される任意のウイルスベクターの一部の実施形態では、ポリヌクレオチドはリンカー配列をコードする。

【0182】

本明細書に記載される任意のウイルスベクターの一部の実施形態では、リンカー配列は、SINの57～88からなる群から選択される。

【0183】

本明細書に記載される任意のウイルスベクターの一部の実施形態では、リンカー配列は、ENPP1またはENPP3タンパク質と融合タンパク質の半減期延長ドメインを結合する。

【0184】

本明細書に記載される任意のウイルスベクターの一部の実施形態では、ポリペプチドは、配列番号89、91、92、および93に示されるアミノ酸配列を含む。

【0185】

別の態様では、本開示は、組み換えウイルスベクターを生成する方法を提供し、方法は、

i. ENPP1またはENPP3タンパク質の触媒ドメインを含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む細胞または細胞集団を提供することであって、細胞が、ポリヌクレオチドの組み換えウイルスベクターへのパッケージングおよび／または組立に必要なウイルスタンパク質を発現する提供することと、

ii. ポリヌクレオチドを含む前述の組み換えウイルスベクターのパッケージングの組立に適切な条件下で、細胞または細胞集団を維持することと、を含む。

【0186】

本明細書に記載される任意の方法の一部の実施形態では、哺乳類細胞は、齧歯類細胞またはヒト細胞である。

【0187】

本明細書に記載される任意の方法の一部の実施形態では、ウイルスベクターは、本明細書に記載されるウイルスベクターの任意の一つである。

【0188】

一部の実施形態では、本明細書に記載される任意の方法は、細胞もしくは細胞集団から、または細胞もしくは細胞集団が維持される培地から、組み換えウイルスベクターを精製することをさらに含むことができる。

【0189】

別の態様では、本開示は、本明細書に記載の組み換えウイルスベクターを産生および／または精製する方法から精製された組み換えウイルスベクターを特徴とする。

【0190】

別の態様では、本開示は、本明細書に記載のウイルスベクターまたは組み換えウイルスベクターの任意の一つ、および薬学的に許容可能な担体を含む医薬組成物を提供する。

【0191】

さらに別の態様では、本開示は、疾患の進行を予防または低減を必要とする哺乳動物における疾患の進行を予防または低減する方法を提供し、方法は、前述の哺乳動物に、本明細書に記載される任意の一つの医薬組成物の治療有効量を投与して、疾患または障害の進行を防止または低減することを含む。

【0192】

10

20

30

40

50

本明細書に記載される任意の方法の一部の実施形態では、哺乳動物は、ヒトである。

【0193】

本明細書に記載される任意の方法の一部の実施形態では、疾患は、X連鎖性低リン血症（X L H）、慢性腎臓疾患（C K D）、ミネラル骨障害（M B D）、血管石灰化、軟部組織の病理学的石灰化、軟部組織の病理学的骨化、P X E、乳児の全身性動脈石灰化（G A C I）、および後縦靱帯の骨化（O P L L）からなる群から選択される。

【0194】

別の態様では、本開示は、それを必要とする対象において病理学的石灰化または病理学的骨化の疾患または障害を治療または予防する方法を提供し、方法は、本明細書に記載されるウイルスベクターまたは医薬組成物の任意の一つの治療有効量を対象に投与し、それによって、前述の疾患または障害を治療または予防することを含む。

10

【0195】

別の態様では、本開示は、E N P P 1 タンパク質欠損を有する対象を治療する方法を特徴とし、方法は、本明細書に記載されるウイルスベクターまたは医薬組成物の任意の一つの治療有効量を対象に投与し、それによって前述の対象を治療することを含む。

【0196】

本明細書に記載される任意の方法の一部の実施形態では、前述の疾患または障害、または前述のE N P P 1 タンパク質欠損は、前述の対象におけるN P P 1 遺伝子の機能喪失変異、またはA B C C 6 遺伝子の機能喪失変異と関連する。

【0197】

本明細書に記載される任意の方法の一部の実施形態では、ウイルスベクターまたは医薬組成物は、対象または哺乳動物の $1 \times 10^{12} \sim 1 \times 10^{15}$ v g / k g の用量で投与される。

20

【0198】

本明細書に記載される任意の方法の一部の実施形態では、ウイルスベクターまたは医薬組成物は、対象または哺乳動物の $1 \times 10^{13} \sim 1 \times 10^{14}$ v g / k g の用量で投与される。

【0199】

本明細書に記載される任意の方法の一部の実施形態では、ウイルスベクターまたは医薬組成物は、対象または哺乳動物の $5 \times 10^{11} \sim 5 \times 10^{15}$ v g / k g の用量で投与される。

30

【0200】

本明細書に記載される任意の方法の一部の実施形態では、ウイルスベクターまたは医薬組成物は、対象または哺乳動物の $1 \times 10^{12} \sim 1 \times 10^{15}$ v g / k g の用量で投与される。

【0201】

本明細書に記載される任意の方法の一部の実施形態では、前述のウイルスベクターまたは医薬組成物の対象または哺乳動物への投与により、前述の対象または哺乳動物において、血漿ピロホスフェート（P P i）および／または血漿E N P P 1 またはE N P P 3 濃度が増加する。

40

【0202】

一部の実施形態では、前述の任意の方法は、対象または哺乳動物から得られた生物学的試料において、（i）ピロホスフェートの濃度、（i i）E N P P 1 またはE N P P 3 の発現レベル、および（i i i）E N P P 1 またはE N P P 3 の酵素活性のパラメータの一つ以上を検出または測定することをさらに含む。

【0203】

本明細書に記載される任意の方法の一部の実施形態では、検出または測定は、ウイルスベクターまたは医薬組成物を投与する前に発生する。

【0204】

別の態様では、本開示は、E n p p 1 欠損の対象、またはE n p p 3 欠損の対象もしくは

50

はそれを必要とする対象における骨欠損を補正するための方法を提供し、治療有効量の本明細書に記載のウイルスベクターまたは医薬組成物の任意の一つを、前述の骨欠損を補正するのに有効な量で前述の対象に投与し、それによって前述の骨欠損を補正することを含む。

【0205】

別の態様では、本開示は、Enpp1欠損の対象またはEnpp3欠損の対象またはそれを必要とする対象において成長板構造を修復する方法を提供し、前述の対象に本明細書に記載されるウイルスベクターまたは医薬組成物の任意の一つの治療有効量を、成長板構造を修復するのに有効な量で投与し、それによって前述の対象の成長板構造を修復することを含む。

10

【0206】

別の態様では、本開示は、Enpp1欠損対象またはEnpp3欠損対象またはそれを必要とする対象において、異常な骨芽細胞機能の発達を阻害する方法を提供し、前述の対象に本明細書に記載されるウイルスベクターまたは医薬組成物の任意の一つの治療有効量を、前述の対象における異常な骨芽細胞の発達を阻害するのに有効な量で投与し、それによって前述の対象における異常な骨芽細胞の発達を阻害することを含む。

【0207】

別の態様では、本開示は、Enpp1欠損の対象またはEnpp3欠損の対象またはそれを必要とする対象において、骨形成速度を増加させる方法を提供し、前述の対象に本明細書に記載されるウイルスベクターまたは医薬組成物の任意の一つの治療有効量を、骨形成を増加させるのに有効な量で投与し、それによって前述の対象における骨形成を増加させることを含む。

20

【0208】

別の態様では、本開示は、Enpp1欠損の対象またはEnpp3欠損の対象またはそれを必要とする対象において、骨芽細胞面を増加させる方法を提供し、前述の対象に本明細書に記載されるウイルスベクターまたは医薬組成物の任意の一つの治療有効量を、骨芽細胞面を増加させるのに有効な量で投与し、それによって前述の対象の骨芽細胞面を増加させることを含む。

【0209】

本明細書に記載される任意の方法の一部の実施形態では、ウイルスベクターは、単回用量で投与される。本明細書に記載される任意の方法の一部の実施形態では、ウイルスベクターは、二回以上の用量で投与される。

30

【0210】

Enpp1欠損対象またはEnpp3欠損対象またはそれを必要とする対象の骨欠損を補正するための本明細書に記載される方法の一部の実施形態では、前述の対象に、本明細書に記載されるウイルスベクターまたは医薬組成物の任意の一つの治療有効量を投与することを含み、前述の骨欠損を補正するのに有効な量で、それによって前述の骨欠損を補正し、補正が、前述の対象において、骨長、イントラベキュラー (intrabecular) 数、皮質厚、骨梁厚、骨梁骨体積、骨形成速度および骨芽細胞面からなる群の一つ以上の増加として示されることを含む。

40

【0211】

Enpp1欠損対象またはEnpp3欠損対象またはそれを必要とする対象の骨欠損を補正するための本明細書に記載される方法の一部の実施形態では、成長板構造の修復、およびくる病の表現型の発現の阻害を含み、前述の対象において、骨長、イントラベキュラー (intrabecular) 数、皮質厚、骨梁厚、骨梁骨体積、骨形成速度および骨芽細胞面からなる群の一つ以上の増加として示される。

【0212】

Enpp1欠損対象またはEnpp3欠損対象またはそれを必要とする対象の骨欠損を補正するための本明細書に記載される方法の一部の実施形態では、前述の補正は、非侵襲的撮像を介して検出される。本明細書に開示される方法の一部の態様では、非侵襲的撮像

50

は、動的組織形態計測分析を含む。本明細書に記載される任意の方法の一部の実施形態では、Enpp1欠損対象またはEnpp3欠損対象またはそれを必要とする対象の骨欠損を補正するための本明細書に記載される方法を含み、補正の検出は、本明細書に記載されるウイルスベクターまたは医薬組成物の任意の一つの治療有効量の投与の前に前述の対象に表示される表現型または測定値に関連する。補正の指標は、好ましくは少なくとも0.1mmであり、0.1mm～5mmの範囲である骨長の増加と、好ましくは、少なくとも一つのイントラベキュラー (intrabecular) ユニットから最大6ユニットまでの増加を含むイントラベキュラー (intrabecular) 数の増加と、好ましくは少なくとも0.005mm～最大0.04mmの増加を含む骨梁厚の増加と、好ましくは少なくとも0.01mm～0.3mmの増加を含む皮質厚の増加と、好ましくは少なくとも0.01BV/TV (骨梁骨体積/総骨量) の増加を含む骨梁骨体積の増加と、好ましくは少なくとも1mm³/mm²/年～300mm³/mm²/年の増加を含む骨形成速度の増加と、好ましくは統計的に有意な増加を含む骨芽細胞面の増加と、を含む。

10

【0213】

別の態様では、本開示は、ENPP1またはENPP3タンパク質の触媒ドメインを含むポリペプチドをコードする組み換え核酸を含む非ウイルスベクターを特徴とする。

【0214】

本明細書に記載される任意の非ウイルスベクターの一部の実施形態では、ポリペプチドは、ENPP1およびENPP3タンパク質の細胞外ドメインを含む。

20

【0215】

本明細書に記載される任意の非ウイルスベクターの一部の実施形態では、ポリペプチドは、ENPP1およびENPP3タンパク質の膜貫通ドメインを含む。

【0216】

本明細書に記載される任意の非ウイルスベクターの一部の実施形態では、ポリペプチドは、ENPP1およびENPP3タンパク質のヌクレアーゼドメインを含む。

【0217】

本明細書に記載される任意の非ウイルスベクターの一部の実施形態では、ポリペプチドは、配列番号1の残留物99～925 (Pro Ser Cys～Gln Glu Asp) を含む。

30

【0218】

本明細書に記載される任意の非ウイルスベクターの一部の実施形態では、ポリペプチドは、配列番号7の残留物31～875 (Leu Leu Val～Thr Thr Ile) を含む。

【0219】

本明細書に記載される任意の非ウイルスベクターの一部の実施形態では、ポリペプチドは、配列番号1の残留物191～591 (Val Glu Glu～Gly Ser Leu) を含む。

【0220】

本明細書に記載される任意の非ウイルスベクターの一部の実施形態では、ポリペプチドは、配列番号7の残留物140～510 (Leu Glu Glu～Glu Val Glu) を含む。

40

【0221】

本明細書に記載される任意の非ウイルスベクターの一部の実施形態では、ポリペプチドは、配列番号92の残留物1～827 (Pro Ser Cys～Gln Glu Asp) を含む。

【0222】

本明細書に記載される任意の非ウイルスベクターの一部の実施形態では、ポリペプチドは、配列番号89の残留物1～833 (Phe Thr Ala～Gln Glu Asp) および配列番号91の残留物1～830 (Gly Leu Lys～Gln Glu Asp) を含む。

50

【0223】

本明細書に記載される任意の非ウイルスベクターの一部の実施形態では、組み換え核酸は、プロモーター配列をコードする。

【0224】

本明細書に記載される任意の非ウイルスベクターの一部の実施形態では、前述のプロモーターは肝臓特異的プロモーターである。

【0225】

本明細書に記載される任意の非ウイルスベクターの一部の実施形態では、肝臓特異的プロモーターは、アルブミンプロモーター、ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ (PEPCK) プロモーター、およびアルファ-1-抗トリプシンプロモーターからなる群から選択される。

10

【0226】

本明細書に記載される任意の非ウイルスベクターの一部の実施形態では、組み換え核酸は、ポリアデニル化信号をコードするヌクレオチド配列を含む。

【0227】

本明細書に記載される任意の非ウイルスベクターの一部の実施形態では、組み換え核酸は、ENPP1またはENPP3タンパク質をコードするヌクレオチド配列に対してシグナルペプチドアミノ末端をコードする。

【0228】

本明細書に記載される任意の非ウイルスベクターの一部の実施形態では、シグナルペプチドは、アズロシジニンシグナルペプチドである。

20

【0229】

本明細書に記載される任意の非ウイルスベクターの一部の実施形態では、非ウイルスベクターは、脂質ナノ粒子 (LPN) である。

【0230】

本明細書に記載される任意の非ウイルスベクターの一部の実施形態では、非ウイルスベクターは、ペプチド系ベクターである。

【0231】

本明細書に記載される任意の非ウイルスベクターの一部の実施形態では、非ウイルスベクターはポリマー系ベクターである。

30

【0232】

本明細書に記載される任意の非ウイルスベクターの一部の実施形態では、前述の組み換え核酸は、前述のENPP1に融合された前述のアズロシジニンシグナルペプチド、または前述のENPP3に融合された前述のアズロシジニンシグナルペプチド、およびアミノ末端からカルボキシ末端の順序でアズロシジニンシグナルペプチド-ENPP1-Fcまたはアズロシジニンシグナルペプチド-ENPP3-Fcを形成するためにFcポリペプチドに融合された前述のENPP1または前述のENPP3を、それぞれコードする。

【0233】

本明細書に記載される任意の非ウイルスベクターの一部の実施形態では、前述の組み換え核酸は、前述のENPP1に融合された前述のアズロシジニンシグナルペプチド、または前述のENPP3に融合された前述のアズロシジニンシグナルペプチド、アミノ末端からカルボキシ末端の順序でアズロシジニンシグナルペプチド-ENPP1-アルブミンまたはアズロシジニンシグナルペプチド-ENPP3-アルブミンを形成するためにヒト血清アルブミンに融合された前述のENPP1または前述のENPP3を、それぞれコードする。

40

【0234】

本明細書に記載される任意の非ウイルスベクターの一部の実施形態では、ポリペプチドは、(i) ENPP1タンパク質またはENPP3タンパク質と、(ii) 半減期延長ドメインと、を含む融合タンパク質である。

【0235】

本明細書に記載される任意の非ウイルスベクターの一部の実施形態では、半減期延長ド

50

メインは、I g G F c ドメインまたはその機能的断片の非存在下でのポリペプチドの半減期と比較して、哺乳動物におけるポリペプチドの半減期を延長することができる I g G F c ドメインまたは I g G F c ドメインの機能的断片である。

【0236】

本明細書に記載される任意の非ウイルスベクターの一部の実施形態では、半減期延長ドメインは、アルブミンドメインまたはその機能的断片の非存在下でのポリペプチドの半減期と比較して、哺乳動物におけるポリペプチドの半減期を延長することができるアルブミンドメインまたはアルブミンドメインの機能的断片である。

【0237】

本明細書に記載される任意の非ウイルスベクターの一部の実施形態では、半減期伸長ドメインは、融合タンパク質中の E N P P 1 または E N P P 3 タンパク質に対するカルボキシ末端である。

【0238】

本明細書に記載される任意の非ウイルスベクターの一部の実施形態では、I g G F c ドメインは、配列番号 34 に示されるアミノ酸配列を含む。

【0239】

本明細書に記載される任意の非ウイルスベクターの一部の実施形態では、アルブミンドメインは、配列番号 35 に示されるアミノ酸配列を含む。

【0240】

本明細書に記載される任意の非ウイルスベクターの一部の実施形態では、ポリヌクレオチドはリンカー配列をコードする。

【0241】

本明細書に記載される任意の非ウイルスベクターの一部の実施形態では、リンカー配列は、S I N : 57 ~ 88 からなる群から選択される。

【0242】

本明細書に記載される任意の非ウイルスベクターの一部の実施形態では、リンカー配列は、E N P P 1 または E N P P 3 タンパク質と融合タンパク質の半減期延長ドメインとを結合する。

【0243】

別の態様では、本開示は、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ー 1 (E N P P 1) ポリペプチドの触媒ドメイン、または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ー 3 (E N P P 3) ポリペプチドの触媒ドメインをコードする組み換え核酸を含む非ウイルスベクターを提供する。

【0244】

非ウイルスベクターの一部の実施形態では、前述の組み換え核酸は、肝臓特異的プロモーターをさらに含む。

【0245】

非ウイルスベクターの一部の実施形態では、肝臓プロモーターは、肝臓プロモーター 1 (L P 1) およびハイブリッド肝臓プロモーター (H L P) からなる群から選択される。

【0246】

非ウイルスベクターの一部の実施形態では、前述の核酸は、アズロシジニンシグナルペプチドであるシグナルペプチドをさらにコードする。

【0247】

前述の任意の非ウイルスベクターの一部の実施形態では、非ウイルスベクターは、D N A / カチオン性脂質 (リポプレックス)、D N A / カチオン性ポリマー (ポリプレックス)、D N A / カチオン性ポリマー / カチオン性脂質 (リポポリプレックス)、脂質ナノ粒子 (L P N)、イオン化可能な脂質、リポイド、ペプチド系ベクター、およびポリマー系ベクターからなる群から選択される。

【0248】

前述の任意の非ウイルスベクターの一部の実施形態では、前述の非ウイルスベクターは

10

20

30

40

50

、リポブレックス、ポリブレックス、リポポリブレックス、イオン化可能な脂質、リポイド、リポイド、脂質ナノ粒子（LPN）、ペプチド系ベクター、およびポリマー系ベクターからなる群から選択される。

【0249】

別の態様では、本開示は、ENPP1またはENPP3タンパク質を対象に提供する方法を提供し、方法は、前述の任意の非ウイルスベクターを前述の哺乳動物に投与することを含む。

【0250】

別の態様では、本開示は、非ウイルスベクターの任意の一つおよび生理学的に適合する担体を含む医薬組成物を提供する。

【0251】

別の態様では、本開示は、疾患の進行の予防または減少を必要とする対象における疾患の進行を予防または減少させる方法を提供し、方法は、前述の哺乳動物に、治療有効量の前述のウイルスベクターの医薬組成物を投与することを含み、疾患は、X連鎖性低リン血症（XLH）、慢性腎臓疾患（CKD）、ミネラル骨障害（MBD）、血管石灰化、軟部組織の病理学的石灰化、軟部組織の病理学的骨化、乳児の全身性動脈石灰化（GACI）、および後縦靱帯の骨化（OPLL）からなる群から選択され、前述の哺乳動物における前述の疾患が予防されるまたはその進行が低減される。

【0252】

本開示の別の態様では、病理学的石灰化または病理学的骨化の疾患または障害の治療または予防する方法を、それを必要とする対象において提供し、方法は、治療有効量の任意の前述の非ウイルスベクターまたは非ウイルスベクターの医薬組成物を対象に投与し、それによって前述の疾患または障害を治療または予防することを含む。

【0253】

別の態様では、本開示は、ENPP1タンパク質欠損を有する対象を治療する方法を提供し、治療有効量の任意の前述のウイルスベクターまたは非ウイルスベクターの医薬組成物を対象に投与し、それによって前述の対象を治療することを含む。

【0254】

方法の一部の実施形態では、前述の疾患または障害、または前述のENPP1タンパク質欠損は、前述の対象におけるNPP1遺伝子の機能喪失変異、またはABCC6遺伝子の機能喪失変異と関連する。

【0255】

方法の一部の実施形態では、前述の非ウイルスベクターは、組み換えENPP1ポリペプチドをコードする核酸を含む。

【0256】

方法の一部の実施形態では、前述の非ウイルスベクターは、組み換えENPP3ポリペプチドをコードする核酸を含む。

【0257】

別の態様では、本開示は、ENPP1タンパク質欠損を有する対象を治療する方法を提供し、方法は、治療有効量の任意の前述のウイルスベクターまたは前述の非ウイルスベクターの医薬組成物を対象に投与することを含む。

【0258】

方法の一部の実施形態では、前述の疾患または障害、または前述のENPP1タンパク質欠損は、前述の対象におけるNPP1遺伝子の機能喪失変異、またはABCC6遺伝子の機能喪失変異と関連する。

【0259】

方法の一部の実施形態では、前述の非ウイルスベクターまたは医薬組成物の対象への投与は、前述の対象において、血漿ピロホスフェート（PPi）および／または血漿ENPP1またはENPP3濃度を増加させる。

【0260】

10

20

30

40

50

方法の一部の実施形態では、対象から得られた生物学的試料において、(i) ピロホスフェートの濃度、(ii) ENPP1またはENPP3の発現レベル、および(iii) ENPP1またはENPP3の酵素活性の一つ以上のパラメータを検出または測定することをさらに含む。

【0261】

方法の一部の実施形態では、検出または測定は、非ウイルスベクターまたは医薬組成物を投与する前に起こる。

【0262】

別の態様では、本開示は、Enpp1欠損対象において骨欠損を補正する方法を提供し、前述の任意の非ウイルスベクターを、前述の骨欠損を補正するのに有効な量で前述の対象に投与し、それによって前述の骨欠損を補正することを含む。

10

【0263】

別の態様では、本開示は、Enpp1欠損対象において成長板構造を修復する方法を提供し、前述の任意の非ウイルスベクターを、成長板構造を修復するのに有効な量で前述の対象に投与し、それによって前述の対象において成長板構造を修復することを含む。

【0264】

別の態様では、本開示は、Enpp1欠損対象において異常な骨芽細胞機能の発達を阻害する方法を提供し、前述の対象に前述の任意の非ウイルスベクターを、前述の対象において異常な骨芽細胞機能の発達を阻害するのに有効な量で投与することを含み、それによって前述の対象における異常な骨芽細胞機能の発達を阻害する。

20

【0265】

別の態様では、本開示は、Enpp1欠損対象において骨形成速度を増加させる方法を提供し、前述の任意の非ウイルスベクターを、骨形成を増加させるのに有効な量で前述の対象に投与し、それによって前記対象の骨形成を増加させることを含む。

【0266】

別の態様では、本開示は、Enpp1欠損対象において骨芽細胞面を増加させる方法を提供し、前述の任意の非ウイルスベクターを、骨芽細胞面を増加させるのに有効な量で前述の対象に投与し、それによって前記対象の骨芽細胞面を増加させることを含む。

【0267】

方法の一部の実施形態では、補正が、骨長、イントラベキュラー(intrabecular)数、皮質厚、骨梁厚、骨梁骨体積、骨形成速度、および骨芽細胞面からなる群から選択される一つ以上の増加として前述の対象において示される。

30

【0268】

方法の一部の実施形態では、前述の補正、復元、阻害、および減少はそれぞれ、骨長、イントラベキュラー(intrabecular)数、皮質厚、骨梁厚、骨梁骨体積、骨形成速度、および骨芽細胞面からなる群の一つ以上の増加として、前述の対象に提示される。

【0269】

方法の一部の実施形態では、前述の補正、修復、阻害、および減少は、それぞれ非侵襲的撮像を介して検出される。

40

【0270】

方法の一部の実施形態では、前述の非侵襲的撮像は、動的組織形態計測分析を含む。

【0271】

方法の一部の実施形態では、前述の検出は、前述の対象への前述の投与前の検出に関する。

【0272】

特許または出願ファイルは、カラーで作成された少なくとも一つの図面を含む。色付きの図面を含む本特許または特許出願公報の写しは、要請があれば、必要な手数料の支払いがあった時点で、オフィスから提供されるであろう。

【図面の簡単な説明】

50

【0273】

【図1】図1は、AAV構築物を示す概略図である。

【図2】図2は、NPP2およびNPP7シグナル配列と比較して、アズロシジンシグナル配列を使用した際のENPP1の発現量の増加を示す。

【図3】図3は、ENPP1-Fc融合を発現するベクターのプラスミドマップである。

【図4】図4は、モデルマウスへのENPP1構築物を含むウイルス粒子の投与を示す概略図である。

【図5】図5は、ウイルスベクター投与の7日後、28日後、および56日後に収集された対照、低用量、および高用量のマウスコホートから得られた血漿試料におけるENPP1活性の用量依存性の増加を示す図である。

10

【図6】図6は、ウイルスベクター投与の7日後、28日後、および56日後に収集された対照、低用量、および高用量のマウスコホートから得られた血漿試料におけるENPP1濃度の用量依存性の増加を示す図である。

【図7】図7は、ウイルスベクター投与の7日後、28日後、および56日後に収集された対照、低用量、および高用量のマウスコホートから得られた血漿試料における血漿PPI濃度の用量依存性の増加を示す図である。

【図8】図8は、ウイルスベクター投与後最大112日間のEnpp1の持続的発現を示す図である。

【図9】図9は、ウイルスベクター投与の7日後、28日後、56日後、および112日後に収集された対照、低用量、および高用量のマウスコホートから得られた血漿試料におけるENPP1活性の用量依存性の増加を示す図である。

20

【図10】図10は、ENPP1をコードおよび発現する様々なウイルス構築物を投与されたC57BL/6マウスの血漿で測定された可溶性ENPP1の活性を示す折れ線グラフである。Y軸は、mOD/分単位であり、X軸は、日単位である。

【図11】図11は、AAVウイルスベクターを使用して送達されたバリエーションENPP1-Fc融合タンパク質の、治療マウスの血液中の異なる時点での酵素活性を示す図である。

【図12】図12は、異なる用量濃度のENPP1欠損マウスと比較した、野生型マウスにおけるバリエーションENPP1-Fc融合タンパク質に関する血漿ピロホスフェートレベルの濃度を示す図である。

30

【図13】図13は、ENPP1-Fc融合タンパク質を用いた処置後の、異なる時点でのマウスコホートの体重チャートを示す図である。

【図14】図14は、処置されたマウスからの異なる組織の石灰化のレベルを示す図である。パネルAは、処置された変異型マウスの大動脈における石灰化レベルを示す。パネルBは、処置されたマウスの腎臓における石灰化レベルを示す。パネルCは、処置されたマウスの脾臓における石灰化レベルを示す。パネルDは、処置されたマウスの感覚毛における石灰化レベルを示す。

【図15】図15A~15Eは、骨長(mm)図15A、骨梁数(1/mm)図15B、皮質厚(mm)図15C、骨梁厚(mm)図15D、および骨梁骨体積BV/TV図15Eを含む、処置されたマウスの骨構造のいくつかのパラメータを示す。

40

【図16】図16A~16Bは、メスの大腿骨の組織形態分析に基づく、処置されたマウスにおける骨形成速度および骨芽細胞面を、それぞれ示す。AAV用量は 2.5×10^{13} vg/kgであった。

【図17】図17は、野生型マウス、ビヒクルで処置されたASj-2jマウス、およびAAV-ENPP1-Fcで処置されたASj-2jマウス、すなわちEnpp1^{ASj-2J}/ASj-2Jマウスにおける異常肥大した軟骨細胞の構造を比較する。

【発明を実施するための形態】

【0274】

本発明は、哺乳動物ENPP1または哺乳動物ENPP3をコードする核酸の、ENPP1またはENPP3の欠損を有する哺乳動物への送達に関する。

50

【0275】

定義

別途定義されない限り、本明細書で使用される全ての技術用語および科学用語は、本発明が属する分野の当業者によって一般的に理解されるものと同じ意味を有する。本明細書に記載されるものと類似または同等である任意の方法および材料を、本発明の実践または試験に使用することができるが、例証的な方法および材料が記載される。本明細書で 사용되는場合、以下の用語の各々は、本節においてそれに関連する意味を有する。

【0276】

冠詞「a」および「an」は、本明細書では、冠詞の文法的対象の一つまたは複数（すなわち、少なくとも一つ）を指すために使用される。一例として、「要素」は、一つの要素または複数の要素を意味する。

10

【0277】

本明細書で使用される場合、組成物または方法または生成物を指す場合の「含む」という用語は、組成物、方法または生成物が特定の特徴を含むが、他の特徴の存在が、その意図される使用または目的に対してそれぞれの組成物または方法または生成物を機能しない状態にしない限り、他の特徴の存在を排除しないことを意味する。

【0278】

本明細書で使用される場合、用語「～からなる」は、組成物または方法または生成物を指す場合、列挙されたものとは別に、組成物、方法または生成物にさらなる特徴が存在しないことを意味する。

20

【0279】

本明細書で使用される場合、用語「実質的に～からなる」または「実質的に含む」は、組成物または方法または生成物に向けられたとき、列挙された特徴が存在し、特定の追加の特徴または要素も存在しうるが、追加の特徴または要素の存在は、組成物、方法、または生成物の本質的な特徴または機能に実質的に影響を与えないことを意味する。

【0280】

以下の表記法は、明確さのために本開示に適用される。いずれにせよ、本明細書における本規則に従わない任意の教示は、依然として本開示の一部であり、教示が開示される文脈に照らして完全に理解され得る。タンパク質記号は、非斜字の大文字で開示されている。非限定的な例として、「ENPP1」はタンパク質を指す。特定の実施形態では、タンパク質がヒトタンパク質である場合、タンパク質記号の前に「h」が使用される。他の実施形態では、タンパク質がマウスタンパク質である場合、タンパク質記号の前に「m」が使用される。ヒトENPP1は「hENPP1」と呼ばれ、マウスENPP1は「mENPP1」と呼ばれる。ヒト遺伝子記号は、斜体の大文字で開示される。非限定的な例として、タンパク質hENPP1に対応するヒト遺伝子は、ENPP1である。マウス遺伝子記号は、最初の文字が大文字および残りの文字が小文字で開示され、さらにマウス遺伝子記号は斜体で示される。非限定的な例として、タンパク質mEnpp1を作製するマウス遺伝子は、Enpp1である。遺伝子変異に関する記載は、大文字で示される。

30

【0281】

「ヒトEnpp1」： ヒトNPP1 (NCBI accession NP_006199/Uniprot-Swissprot P22413)

40

【0282】

「可溶性ヒトENPP1」は、NCBIアクセッションNP_006199の残基96～925を含むポリペプチドである。

【0283】

配列番号1に示されるENPP1アミノ酸配列は、細胞質ドメイン、膜貫通ドメイン、SMB1ドメイン、SMB2ドメイン、ホスホジエステラーゼ/触媒ドメイン、リンカードメイン、およびヌクレアーゼドメインを含む。

【0284】

SMB1ドメイン、SMB2ドメイン、触媒ドメイン、リンカードメイン、およびヌク

50

レアーゼドメインは、合わせて細胞外ドメインと呼ばれる。残基1～76 (Met Glu Arg～Thr Tyr Lys) は、細胞質ドメインに対応する。残基77～97 (Val Leu Ser～Phe Gly Leu) は、膜貫通ドメインに対応する。残基99～925 (Pro Ser Cys～Gln Glu Asp) は、細胞外ドメインに対応する。残基104～144 (Glu Val Lys～Glu Pro Glu) はSMB1ドメインに対応し、残基145～189 (His Ile Trp～Glu Lys Ser) はSMB2ドメインに対応する。残基597～647は、触媒ドメインとヌクレアーゼドメインを接続するリンカードメインに対応する。残基191～591 (Val Glu Glu～Gly Ser Leu) は、触媒／ホスホジエステラーゼドメインに対応する。残基654～925 (His Glu Thr～Gln Glu Asp) は、ヌクレアーゼドメインに対応する。残基番号およびドメイン分類は、ヒトNPP1配列に基づく (NCBIアクセッションNP_006199/UniProt-Sussprot P22413)

10

【0285】

「ヒトEnpp3」： ヒトNPP3 (UniProtKB/Swiss-Prot: O14638.2)

【0286】

「可溶性ヒトENPP3」は、UniProtKB/Swiss-Prot: O14638.2の残基49～895を含むポリペプチドである。

【0287】

20

配列番号7に示されるENPP3アミノ酸配列は、細胞質ドメイン、膜貫通ドメイン、ホスホジエステラーゼ／触媒ドメイン、およびヌクレアーゼドメインを含む。触媒ドメインおよびヌクレアーゼドメインは、合わせて細胞外ドメインと呼ばれる。残基1～11 (Met Glu Ser～Ala Thr Glu) は、細胞質ドメインに対応する。

【0288】

残基12～30 (Gln Pro Val～Leu Leu Ala) は、膜貫通ドメインに対応する。残基31～875 (Leu Leu Val～Thr Thr Ile) は、細胞外ドメインに相当する。残基140～510 (Leu Glu Glu～Glu Val Glu) は、触媒／ホスホジエステラーゼドメインに対応する。残基605～875 (Lys Val Asn～Thr Thr Ile) は、ヌクレアーゼドメインに対応する。残基番号およびドメイン分類は、ヒトNPP3配列 (UniProtKB/Swiss-Prot: O14638.2) に基づく。

30

【0289】

「石灰化の低減」：本明細書で使用される場合、「石灰化の低減」は、X線、マイクロCT、およびMRIのような非侵襲的方法を使用することにより観察される。^{99m}Tc-ピロホスフェート (^{99m}PYP) 取り込みを用いる無線撮像を使用することによって、石灰化の低減も推測される。マウスにおける石灰化の存在は、マイクロコンピュータ断層撮影 (CT) スキャン、ならびにヘマトキシリンおよびエオジン (H及びE) およびアリザリンレッドなどの染料を使用する心臓、大動脈、および腎臓から採取された組織学的切片により、Braddock et al. (Nature Communications volume 6, Article number: 10006 (2015)) によって確立されたプロトコルに従って、検死を介して評価される。

40

【0290】

ENPP1またはENPP3に関する「酵素活性」は、AMPおよびPPiへのATP加水分解活性および／またはATPへのAP3a加水分解を有し、かつ基質を結合する活性を有するものとして定義される。

【0291】

ATP加水分解活性は、以下のように決定され得る。

【0292】

NPP1のATP加水分解活性

50

NPP1は、ATPをAMPおよびPPiに容易に加水分解する。NPP1の定常状態のミカエリス-メンテン酵素定数は、ATPを基質として使用して決定される。NPP1は、酵素反応のHPLC分析によってATPを切断することが示され得、反応の基質および生成物の同一性は、ATP、AMP、およびADP標準を使用して確認される。ATP基質は、NPP1の存在下で経時的に分解し、酵素産物AMPの蓄積を伴う。ATP基質の様々な濃度を使用して、NPP1の初期速度の速度は、ATPの存在下で導出され、データは、酵素速度定数を導出するために曲線に適合される。生理学的pHでは、NPP1の運動速度定数は、 $K_m = 144 \mu M$ および $k_{cat} = 7.8 s^{-1}$ である。

【0293】

NPP3のATP加水分解活性

NPP3の酵素活性を、pNP-TMPまたはATPを基質として測定した。NPP3タンパク質を、37℃で、pH8.9の100mMのトリス-HClおよび5mMのpNP-TMPまたは50μMの[γ-32P]ATPのいずれかの存在下において培養した。pNP-TMPの加水分解は、3% (w/v) トリクロロ酢酸中の10倍希釈によって停止された。続いて、反応混合物を、60μlの5N NaOHで中和し、形成されたp-ニトロフェノール(pNP)を405nmで比色定量した。ATPの加水分解は、100mMのEDTAの添加によって停止された。反応混合物の1μlを、ポリエチレンイミンセルロースプレート(Merck)上の薄層クロマトグラフィーにより分析した。ヌクレオチドおよび分解生成物を、pH3.0で750mMのKH₂PO₄中での上昇クロマトグラフィーによって分離した。オートラジオグラフィーによって放射性スポットを可視化した。50μM [α-32P]ATPの加水分解中に形成されたヌクレオチジル化中間体は、Blytt et al. (H. J. Blytt, J. E. Brotherton, L. Butler Anal. Biochem. 147 (1985), pp. 517-520), with slight modifications (R. Gijssbers, H. Ceulemans, W. Stalmans, M. Bollen J. Biol. Chem., 276 (2001), pp. 1361-1368)に従って、捕捉された。SDS-PAGEに続いて、捕捉された中間体をオートラジオグラフィーによって可視化した。Bis-pNPPおよびpNPPも、NPP3の基質として試験した。NPP3アイソフォームを、pH8.9で100mMのトリス-HCl中および5mMのbis-pNPPまたはpNPPのいずれかで、37℃で2.5時間培養した。その後、形成されたpNPを、405nmで比色定量した。(Gijssbers R1, Aoki J, Arai H, Bollen M, FEBS Lett. 2003 Mar 13; 538 (1-3): 60-4.) 生理学的pHでは、NPP3は、ENPP1と類似した約2.59 (±0.04) s⁻¹およびK_m (<8 μM) 値のk_{cat}値を有する。(WO 2017/087936)

【0294】

HPLCプロトコル

NPP1によるATP切断の測定、および生成物の識別使用されるHPLCプロトコルは、文献(Stocchi et al., 1985, Anal. Biochem. 146: 118-124)から変更されている。50mMのトリスpH8.0、140mMのNaCl、5mMのKCl、1mMのMgCl₂、および1mMのCaCl₂緩衝液中のATPの様々な濃度を含む反応は、0.2~1μMのNPP1の添加によって開始され、等体積の3Mのギ酸、または0.5NのKOHによって様々な時点でクエンチされ、pH6に氷酢酸によって再酸性化される。クエンチした反応溶液を体系的に希釈し、HPLCシステム(Waters, Milford Mass.)に装填し、基質および産物を254または259nmのUV吸光度により監視する。基質および生成物を、C18、5μm 250×4.6mm HPLCカラム(Higgins Analytical, Mountain View, Calif.)で、15mMのアンモニウムアセテートpH 6.0溶液を使用して、0%から10%(または20%)のメタノー

ル勾配で分離する。生成物および基質は、対応するピークおよび式の統合に従って定量される：

【数 1】

$$[\text{生成物/基質}] = \frac{\text{面積}_{\text{生成物/基質}} / \Sigma \text{生成物/基質}}{\text{面積}_{\text{生成物}} / \Sigma \text{生成物} + \text{面積}_{\text{基質}} / \Sigma \text{基質}} [\text{基質}]$$

式中、[基質] は、初期基質濃度である。式で使用された AMP、ADP および ATP の減退係数は、 $15.4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ であった。254 nm でモニタリングする場合、反応と同じ日に行われた基質および生成物標準が、統合された生成物／基質のピーク面積を濃度に変換するのに使用された。

10

【0295】

「病理学的石灰化」：本明細書で使用される場合、本用語は、軟部組織、分泌物、および体の排泄経路におけるカルシウム塩の異常な沈着が硬化することを指す。二つの種類があり、それは、細胞および組織の恒常性能力を超える、死滅するおよび死滅した組織で生じる異栄養性石灰化と、カルシウムの細胞外レベルを上昇させる転移性石灰化（高カルシウム血症）である。石灰化には、細胞、ならびに基底膜のコラーゲンおよび動脈壁の弾性繊維などの細胞外マトリックス成分も関与し得る。石灰化しやすい組織のいくつかの例としては、以下が挙げられる：胃粘膜－胃の内部上皮内層、腎臓および肺、角膜、全身動脈、ならびに肺静脈。

20

【0296】

「病理学的骨化」：本明細書で使用される場合、用語は、骨系にない組織および通常は骨形成特性を示さない結合組織において骨が発生する、病理学的状態を指す。骨化は、罹患している組織または器官の性質に応じて三つの種類に分類され、軟骨内骨化は、軟骨内で生じ、かつ軟骨に置き換わる骨化である。膜内骨化は、結合組織で生じ、かつ結合組織に置き換わる骨化である。変形骨化は、通常軟らかい身体構造における骨質物質の発達であり、異所性骨化とも呼ばれる。

【0297】

NPP1 の「欠損」とは、対象が、血漿中に正常なレベルの NPP1 の 5%～10% 以下を有する状態を指す。健康なヒト対象における NPP1 の正常レベルは、およそ $10 \sim 30 \text{ ng/ml}$ である。（Am J Pathol. 2001 年 2 月、158（2）：543－554）

30

【0298】

「低」レベルの PPI は、対象が、正常なレベルの血漿ピロホスフェート（PPI）の 2%～5% 以下を有する状態を指す。健康なヒト対象における正常なレベルの血漿 PPI は、約 $1.8 \sim 2.6 \mu\text{M}$ である。（Arthritis and Rheumatism, Vol. 22, No. 8（August 1979））

【0299】

「異所性石灰化」は、組織におけるカルシウム塩の病理学的沈着または軟部組織における骨成長によって特徴付けられる状態を指す。

40

【0300】

「軟部組織の異所性石灰化」は、典型的には、軟部組織の硬化の喪失につながる、軟部組織で生じるカルシウムホスフェート、ヒドロキシアパタイト、カルシウムオキサレート、およびオカタカルシウムホスフェートからなる不適切なバイオミネラル化を指す。「動脈石灰化」は、動脈の硬化および／または狭小化につながる、動脈および心臓弁に生じる異所性石灰化を指す。動脈の石灰化は、アテローム性プラークの負荷、ならびに心筋梗塞のリスクの増加、末梢血管疾患における虚血性エピソードの増加、および血管形成術後の解離のリスクの増加と相関する。

【0301】

50

「静脈石灰化」という用語は、静脈の弾性を低減し、かつ血流を制限し、次いで、血圧および冠動脈欠損の増加につながり得る、静脈に生じる異所性石灰化を指す。

【0302】

「血管石灰化」という用語は、血管系におけるミネラルの病理学的沈着を指す。これは、内膜石灰化および内側石灰化を含む様々な形態を有するが、心臓の弁にも見出され得る。血管石灰化は、アテローム性動脈硬化症、糖尿病、ある特定の遺伝状態、および腎臓疾患、特にCKDと関連している。血管石灰化を有する患者は、有害な心血管事象のリスクがより高い。血管石灰化は、多種多様な患者に影響を与える。特発性乳児動脈石灰化は、新生児の動脈が石灰化する、まれな形態の血管石灰化である。

【0303】

「脳石灰化」(BC)という用語は、血管壁および実質組織におけるカルシウムおよび他のミネラルの沈着が生じ、神経細胞死および神経膠症につながる、非特異的神経病理学を指す。脳石灰化は、ダウン症候群、レビー小体病、アルツハイマー病、パーキンソン病、血管性認知症、脳腫瘍、および様々な内分泌状態を含む様々な慢性および急性脳障害としばしば関連している。

【0304】

心臓組織の石灰化は、大動脈組織および冠動脈組織などの心臓の組織におけるカルシウムの沈着物(他のミネラルを含む可能性がある)の蓄積を指す。

【0305】

本明細書で使用される場合、用語「慢性腎臓疾患(CKD)」は、健康に影響を伴う、三か月超持続する腎臓の構造または機能の異常を指す。概して、ほとんどの慢性腎臓疾患では、排泄、内分泌、および代謝機能が共に低下する。心血管疾患は、慢性腎臓疾患(CRD)を有する患者において最もよく見られる死因であり、血管石灰化は、心血管リスクの最も強力な予測因子の一つである。腎機能の低下に伴い、血管石灰化の有病率が増加し、石灰化は、一般集団よりも数年早く、CKD患者で発生する。血管石灰化の防止、低減、および／または反転は、CKDを有する患者の生存率の増加をもたらし得る。

【0306】

慢性腎臓疾患の臨床症状には、痒み、筋肉の痙攣、悪心、食欲の欠如、足および足首の腫れ、不眠および呼吸困難が含まれる。慢性腎臓疾患は、未治療のまま放置すると末期腎臓疾患(ESRD)に進行する傾向がある。ESRDの一般的な症状には、排尿不能、疲労、倦怠感、体重減少、骨の痛み、皮膚の色の变化、頻繁なあざの形成、および指、つま先、手、および脚などの四肢の浮腫が含まれる。カルシフィラキシスまたは石灰性尿毒症性細動脈症(CUA)は、脂肪および皮膚の血管内にカルシウムを蓄積させる状態である。ESRDに罹患している患者の亜集団も、カルシフィラキシスを発症し得る。カルシフィラキシスの一般的な症状には、皮膚上の大きな紫色の網様パターン、潰瘍化し治癒しない黒褐色の痂皮を伴う開いた傷を形成する深く痛みのある塊、下肢または大腿、乳房、殿部、および腹部などの脂肪含量が高い領域の皮膚病変が含まれる。カルシフィラキシスを有する人は、血液中のカルシウム(高カルシウム血)およびホスフェート(高リン酸血)が正常レベルよりも高いことがあり得る。また、副甲状腺機能亢進症の症状も認められる。副甲状腺機能亢進症は、副甲状腺が過剰な副甲状腺ホルモン(PTH)を産生するとき

【0307】

ESRDに関連する血管石灰化は、脈圧を上昇させ、高血圧を引き起こし、または悪化させ、心筋梗塞および脳卒中を誘発または激化することによって、不良な転帰に寄与する。ESRD患者の大半は、腎不全で死亡するわけではなく、ESRDの心血管系合併症から死亡し、また、透析中の非常に若い患者の多くは、冠動脈の石灰化を有することに注意することが重要である。CKDに関連する血管石灰化の組織学的サブタイプは、メンケベルグ(Monckeberg)硬化症として知られており、これは血管硬化の一種であり、カルシウム沈着物が内側血管壁の筋層に見られる。この形態の石灰化は、が、ヒトCK

10

20

30

40

50

D患者、および本明細書に記載される疾患の齧歯類モデルで観察される血管石灰化と同一であるが、アテローム性動脈硬化症で一般的に観察される内膜または新内膜の血管壁の石灰化と組織学的に異なっている。

【0308】

本明細書で使用される場合、「幼児の全身性動脈石灰化（GACI）」（IACIとしても知られる）は、出生前または生後数か月以内に明らかになる循環器系に影響を及ぼす障害を指す。それは、心臓から体のその他の部分（動脈）に血液を運ぶ血管の壁にミネラルカルシウムが異常に蓄積すること（石灰化）を特徴とする。石灰化は、しばしば動脈壁（内膜）の内層の肥厚と共に起こる。これらの変化は、動脈の狭窄（狭窄）および硬化をもたらす、血液をポンプで送るために心臓がより激しく働くことになる。その結果、心不全は、呼吸困難、四肢の液体の蓄積（浮腫）、皮膚または唇の青みがかかった外観（チアノーゼ）、重度の高血圧（高血圧）、および肥大した心臓（心臓肥大）を含む兆候および症状を有する、罹患した個人で発症しうる。GACIの患者は、他の器官や組織にも、特に関節の周りに石灰化を有する。さらに、それらは、くる病と呼ばれる難聴または骨の軟化および弱さを有し得る。

10

【0309】

全身性動脈石灰化（GACI）または突発性乳児動脈石灰化（IIAC）は、心臓から体のその他の部分（動脈）に血液を運ぶ血管の壁にミネラルカルシウムが異常に蓄積すること（石灰化）を特徴とする。石灰化は、動脈壁（内膜）の内層の肥厚と共にしばしば起こる。これらの変化は、動脈の狭窄（狭窄）および硬化をもたらす、血液をポンプで送るために心臓がより激しく働くことになる。その結果、心不全は、呼吸困難、四肢の液体の蓄積（浮腫）、皮膚または唇の青みがかかった外観（チアノーゼ）、重度の高血圧（高血圧）、および肥大した心臓（心臓肥大）を含む兆候および症状を有する、罹患した個人で発症しうる。

20

【0310】

本明細書で使用される場合、用語「動脈石灰化」、または「血管石灰化」、または「動脈硬化」は、筋動脈壁の肥厚および弾性の喪失によって特徴付けられるプロセスを指す。肥厚および弾性の喪失は、血管系の内膜および内側層（内側血管石灰化）の二つの異なる部位で発生する。内膜石灰化はアテローム性動脈硬化と関連し、内側石灰化は血管硬化および動脈硬化を特徴とする。これにより、心血管系の血行動態が損なわれ、動脈の弾性が低下し、罹患率と死亡率の傾向が増加する。

30

【0311】

「骨形成速度」は、骨表面の単位当たりの単位時間内で形成される新しい骨の量である。これは、骨表面の単位当たりの単位時間内で形成される新しい骨の量であり、石灰化表面をミネラル付着率で乗じることによって計算される。

【0312】

「皮質厚」は、0.5～2.25 mmの範囲であり、平均の厚さは1.28 mmをわずかに超える。皮質骨は、内部空洞の周りに保護層を形成する、骨の高密度の外表面である。緻密骨としても知られるこのタイプの骨は、骨格質量の80%近くを占め、曲げやねじれに対して高い耐性があるため、体構造および体重負荷に不可欠である。

40

【0313】

骨梁骨は、骨髄で満たされた細孔を囲む骨梁と呼ばれる相互接続されたロッドおよびプレートネットワークに組織化された、高度に多孔質（典型的には75～95%）の骨組織である。「骨梁骨の厚さ」は200および400 μm の範囲であり、構造は、骨機能と体内の位置に応じて変化する。「骨梁数」は、長さの単位当たりの骨梁の数である。計測単位は mm^{-1} である。

【0314】

「骨体積（BV/TV）」は、単位体積当たりの石灰化骨の体積を包含し、試料BVは表面により含まれる体積であり、TVは総試験体積の周りに巻かれた表面によって囲まれた体積である。

50

【0315】

「骨欠損の補正」には、以下、一つの形成速度、皮質厚、骨梁厚、骨梁数、骨体積、および成長板構造などのパラメータによって決定されるが、これらに限定されない、正常な表現型により近く見えるように骨を修復することを含む。

【0316】

「成長板構造」は、骨の長軸方向成長が起こる長骨の軟骨性の部分である。その構造には、最終的に死に至るまで成熟のいくつかの段階を経て、骨芽細胞、破骨細胞、および層板骨によって置換される、コラーゲン基質中に懸濁された軟骨細胞が含まれる。

【0317】

「成長板構造の復元」には、限定されるものではないが、成長板構造における異常肥大した軟骨細胞の配列の復元、限定されるものではないが、特にくる病表現型の復元が含まれる。本開示はまた、成長する骨の不適切な石灰化によって特徴付けられる代謝性骨疾患または障害から生じるくる病表現型の防止を包含する。

【0318】

本明細書で使用される場合、「ミネラル骨障害（MBD）」という用語は、異常なホルモンレベルによって特徴付けられる障害を指し、人の血液中のカルシウムおよびリンレベルがバランスを欠くことを引き起こす。ミネラルと骨の障害は、一般的に、CKDを有する人に起こり、透析を受ける腎不全のほとんどの人に起こる。

【0319】

骨減少症は、骨の衰弱と骨折のリスクの増加をもたらす、骨密度の減少を特徴とする骨の状態である。骨軟化症は、新たに形成された骨の石灰化の減少を特徴とする骨障害である。骨軟化症は、重度のビタミンD欠乏症（栄養性、または遺伝性症候群によって引き起こされ得る）および非常に低い血中ホスフェートレベルを引き起こす状態によって引き起こされる。骨軟化症と骨減少症の両方が、骨折のリスクを高める。骨軟化症の症状には、骨痛および筋力低下、骨の圧痛、歩行困難、ならびに筋痙攣が含まれる。

【0320】

本明細書で使用される場合、「加齢関連骨減少症」は、骨ミネラル濃度が正常より低い状態を指す。一般的に、骨減少症を有する患者は、 $-1.0 \sim -2.5$ の骨ミネラル濃度Tスコアを有する。骨減少症は、治療されずに放置されると、進行し、骨粗しょう症となり、骨がもろくなり、非常に骨折しやすくなる。

【0321】

本明細書で使用される場合、用語「後縦靱帯の骨化（OPLL）」は、後縦靱帯の異所性石灰化をもたらす、過形成（過剰な骨成長）状態を指す。後縦靱帯は、脊柱の骨を接続し、安定化させる。靱帯の肥厚または石灰化は、脊髄を圧迫し、脊髄症を生じ得る。脊髄症の症状には、歩行困難、腸および膀胱の制御困難が含まれる。OPLLはまた、神経根障害、または神経根の圧迫を引き起こし得る。頸部神経根障害の症状には、首、肩、腕、または手の疼痛、チクチク感、または麻痺が含まれる。

【0322】

OPLLによって引き起こされる臨床症状および徴候は、（1）脊髄症、または上肢および下肢の運動障害および感覚障害、痙攣、および膀胱機能障害を伴う脊髄病変、（2）上肢の痛みおよび感覚障害を伴う頸部神経根障害、ならびに（3）頸部周辺の痛みおよび硬直を伴う軸性不快感、に分類される。OPLLの初期の最も一般的な症状には、手の感覚異常およびチクチクする感覚、ならびにぎこちなさが含まれる。神経学的欠損の進行に伴い、歩行困難などの下肢症状が現れ得る。OPLLは、側面単純X線写真で検出され、頸部OPLLの診断および形態学的詳細は、磁気共鳴画像法（MRI）およびコンピュータ断層撮影法（CT）によって明確に示される。

【0323】

本明細書で使用される場合、用語「弾性線維性仮性黄色腫（PXE）」は、弾性繊維中におけるカルシウムおよび他のミネラルの沈着の蓄積（石灰化）によって特徴付けられる進行性障害を指す。弾性繊維は結合組織の成分であり、体全体の構造に強度と柔軟性を提

10

20

30

40

50

供する。P X Eでは、石灰化は皮膚、眼、および血管の弾性繊維に影響を与え、消化管などの他の領域では与える頻度は低い。P X Eの患者は、首、脇下、および関節が曲がったときに触れる皮膚の他の領域に丘疹と呼ばれる黄色っぽい隆起を有し得る。心臓から身体に残りの部分に血液を運ぶ血管（動脈）の石灰化は、P X Eの他の徴候および症状を引き起こす可能性がある。例えば、この状態を有する人は、動脈の狭窄（動脈硬化）または腕および脚への血流の減少による運動中の筋痙攣および痛みを特徴とする跛行と呼ばれる状態を発症し得る。

【0324】

グレンブラッド・ストランドベリー症候群としても知られる弾性線維性仮性黄色腫（P X E）は、一部の組織において弾性繊維の断裂と石灰化を引き起こす遺伝性疾患である。最も一般的な問題は、皮膚と眼、および後に血管で早期アテローム性動脈硬化の形態で発生する。P X Eは、16番染色体の短腕のA B C C 6遺伝子（16 p 13.1）における常染色体劣性変異によって引き起こされる。一部の場合では、一部の乳児は、G A C Iを生き延び、成人に成長した際に弾性線維性仮性黄色腫（P X E）を発症する。P X Eは、結合組織の成分である弾性繊維におけるカルシウムおよび他のミネラルの蓄積（石灰化）を特徴とする。結合組織は、体全体の構造に強度と柔軟性を提供する。G A C Iでも発生するP X Eの特徴には、脇下および関節の屈曲時に接触する皮膚の他の領域の丘疹と呼ばれる黄色っぽい隆起（屈曲領域）、動脈狭窄、および眼検査中に検出される眼の裏の組織に影響を与える網膜色素線条（網膜出血）と呼ばれる異常が含まれる。

【0325】

本明細書で使用される場合、用語「末期腎臓疾患（E S R D）」は、患者の腎臓がもはや機能しなくなった慢性腎臓疾患の進行期を指す。一般的な症状には、貧血（低血中鉄）を伴う疲労、食欲減退、悪心、嘔吐、カリウム上昇を含む臨床検査値異常、骨の健康に関連するホルモン異常、リン上昇および／またはカルシウム低下、高血圧（高血圧）、手／脚／目／腰（仙骨）の腫れ、および息切れが含まれる。

【0326】

本明細書で使用される場合、「石灰性尿毒症性細動脈症（C U A）」または「カルシフィラキシス」は、腎臓疾患、特に末期腎臓疾患（E S R D）を有する患者に見られる、高い罹患率および死亡率を有する状態を指す。それは、血栓を生じさせる、脂肪組織内および皮膚の深層内に位置した小さな血管の石灰化、および過剰な石灰化による血流の減少による皮膚細胞の死滅を特徴とする。

【0327】

本明細書で使用される場合、「低リン血症性くる病」は、血液中のホスフェートレベルが低いために、骨が軟化し、容易に屈曲する障害を指す。症状は通常、幼児期に始まり、脚の弓状変形、骨の変形、骨痛、関節痛、骨の成長不良、低身長など、重症度はさまざまである。

【0328】

本明細書で使用される場合、「遺伝性低リン血症性くる病」は、血液中の低レベルのホスフェートに関連する障害（低リン血症）を指す。ホスフェートは、骨および歯の正常な形成に必須のミネラルである。最も一般的には、P H E X遺伝子の突然変異により引き起こされる。この状態の原因となり得る他の遺伝子としては、C L C N 5、D M P 1、E N P P 1、F G F 2 3、およびS L C 3 4 A 3遺伝子が挙げられる。遺伝性低リン血症性くる病の他の徴候および症状には、頭蓋骨の早期融合（頭蓋骨癒合症）および歯の異常が含まれ得る。この障害はまた、靱帯および腱が関節に付着する異常な骨成長（筋腱付着部症）も引き起こし得る。成人では、低リン血症は、骨軟化症として知られる骨の軟化を特徴とする。別の稀なタイプの障害は、高カルシウム尿症を伴う遺伝性低リン血症性くる病（H H R H）として知られており、低リン血症に加えて、この状態は、尿中の高レベルのカルシウムの排出（高カルシウム尿症）によって特徴付けられる。

【0329】

「X連鎖性低リン血症（X L H）」、本明細書で使用される場合、用語X連鎖性低リン

血症（X L H）は、X連鎖性優性低リン血症性（X L H）、またはX連鎖性ビタミンD抵抗性くる病とも呼ばれ、ビタミンDの補足がそれを治癒しないという点で、くる病のほとんどの症例とは異なる、くる病（または骨軟化症）のX連鎖性優性形態である。それは、低身長および内反膝（O脚）を含む、骨の変形を引き起こし得る。これは、P H E X 遺伝子配列（X p . 2 2）の変異、およびそれに続くP H E X タンパク質の非活性と関連している。

【0330】

本明細書で使用される場合、用語「常染色体劣性低リン血症性くる病2型（A R H R 2）」は、低リン血症、くる病、および／または骨軟化症および成長の遅れを特徴とする遺伝性腎臓ホスフェート消耗性障害を指す。常染色体劣性低リン血症性くる病2型（A R H R 2）は、E N P P 1 遺伝子のホモ接合性機能喪失型変異によって引き起こされる。

10

【0331】

本明細書で使用される場合、「常染色体優性低リン血症性くる病（A D H R）」は、尿中のホスフェートの過剰喪失が、形成不良な骨（くる病）、骨痛、および歯の膿瘍につながる、希少な遺伝性疾患を指す。A D H R は、線維芽細胞成長因子23（F G F 2 3）の突然変異によって引き起こされる。A D H R は、骨の石灰化障害、くる病、および／または骨軟化症、カルシトリオール（1、25-ジヒドロキシビタミンD3）の抑制レベル、腎臓ホスフェートの消耗、および低血清ホスフェートにより特徴付けられる。F G F 2 3 の突然変異は、プロテアーゼによってタンパク質をより安定的および分裂不可能にし、その結果、F G F 2 3 の生物活性が増強される。F G F 2 3 変異体の増強された活性は、近位尿細管細胞の頂点表面上のリン酸ナトリウム共輸送体であるN P T 2 a およびN P T 2 c の発現を減少させ、腎臓ホスフェートの消耗をもたらす。

20

【0332】

低リン血症性くる病（以前はビタミンD抵抗性くる病と呼ばれていた）は、血液中のホスフェートレベルが低いため、骨が痛みを伴うほど軟化し、曲がりやすくなる障害である。症状には、脚および他の骨の弓状変形、骨痛、関節痛、骨の成長不良、および低身長が含まれ得る。罹患した一部の乳児では、頭蓋骨間の空間が早く閉じすぎるため、頭蓋骨癒合症に至る。ほとんどの患者は、カルシウム-ホスフェート代謝の異常、歯のエナメル質の異常、歯の萌出遅延、および長くて狭い頭部（長頭）を呈する。

【0333】

本明細書において互換的に使用される、用語「ウイルスベクター」または「ウイルス粒子」は、少なくとも一つのウイルスクャプシドタンパク質と、封入された組み換えウイルスゲノム（またはウイルスタンパク質および／またはウイルス複製を指示するウイルス配列をコードするウイルスゲノムの一部）とからなるウイルス粒子を指す。ウイルス粒子は、ヒトE N P P 1 の触媒ドメインまたはヒトE N P P 3 またはその機能的に等価なバリエーション）、および任意選択的に転写調節領域および／またはプロモーター領域を最後にコードする配列を含む異種ポリヌクレオチドを有する組み換えウイルスゲノムを含む。粒子は、典型的には、「ベクター粒子」と称される。

30

【0334】

「アデノ随伴ウイルスベクター」、「A A V ベクター」、「アデノ随伴ウイルス」、「A A V ウイルス」、「A A V ビリオン」、「A A V ウイルス粒子」および「A A V 粒子」という用語は、本明細書で交換可能に使用され、少なくとも一つのA A V カプシドタンパク質（好ましくは、特定のA A V 血清型の全カプシドタンパク質による）およびカプシド形成された組み換えウイルスゲノムとからなるウイルス粒子を指す。粒子は、ヒトE N P P 1 もしくはヒトE N P P 3 またはその機能的等価バリエーション）をコードする配列、およびA A V 逆位末端反復に隣接したプロモーターを少なくとも含む転写調節領域を含む異種ポリヌクレオチドを有する組み換えウイルスゲノムを含む。粒子は、典型的には、「A A V ベクター粒子」または「A A V ベクター」と称される。

40

【0335】

本明細書で使用される場合、「ベクター」という用語は、それが連結されている別の核

50

酸を輸送することができる核酸分子を意味する。一部の実施形態では、ベクターは、プラスミド、すなわち、追加のDNAセグメントがライゲーションされ得る円形二重鎖DNAループである。一部の実施形態では、ベクターは、ウイルスベクターであり、追加のヌクレオチド配列は、ウイルスゲノム内にライゲーションされ得る。一部の実施形態では、ベクターは、導入される宿主細胞（例えば、複製の細菌起源を有する細菌ベクターおよびエピソード哺乳類ベクター）において、自律複製することができる。他の実施形態では、ベクター（例えば、非エピソード哺乳類ベクター）は、宿主細胞に導入されると宿主細胞のゲノム内に統合されることによって、宿主ゲノムとともに複製される。更に、ある特定のベクター（発現ベクター）は、それらが動作可能に連結された遺伝子の発現を指示することができる。

10

【0336】

本明細書で使用される場合、「非ウイルスベクター」は、少なくともENPP1またはENPP3の触媒ドメインをコードする核酸の送達を指し、ここで、送達は、遺伝物質を細胞に送達する物理的または化学的方法に依存し、ウイルスベクター（本明細書に定義）に依存しない。これは、物理的技術（細胞に入る針など）または化学的技術（実験室で創出される）のいずれかであり得る。非ウイルスベクターには、例えば、化学的破損、エレクトロポレーション、およびポリマー系試薬を使用した核酸の送達が含まれる。非ウイルスベクターの例には、コード核酸を包含する脂質ナノ粒子が含まれる。

【0337】

本明細書で使用される場合、「脂質ナノ粒子」（LNP）は、組み換え核酸成分および脂質成分を含む。脂質成分は、カチオン性および／またはイオン化可能な脂質、例えば、リン脂質、ペグ化脂質、および／または構造脂質（コレステロールまたはコルチコステロイドなど）を含有してもよい。典型的には、LNPは、インビボまたはインビトロで哺乳類細胞をトランスフェクトして、そこに含まれる核酸コード配列を発現するために使用される。

20

【0338】

本明細書で使用される場合、用語「組み換え宿主細胞」（または単に「宿主細胞」）は、本明細書で使用される場合、外因性核酸および／または組み換えベクターが導入されている細胞を意味する。「組み換え宿主細胞」および「宿主細胞」は、特定の対象細胞だけでなく、そのような細胞の子孫も意味することが理解されるべきである。変異または環境の影響のいずれかに起因して、ある特定の変異が後続する世代で生じ得るため、かかる子孫は、実際には親細胞と同一ではない場合があるが、本明細書で 사용되는ように、依然として「宿主細胞」という用語の範囲内に含まれる。

30

【0339】

用語「組み換えウイルスゲノム」は、ウイルスゲノム、または少なくとも一つの発現カセットが挿入されるその一部を指す。

【0340】

本明細書で使用される場合、用語「AAV組み換えウイルスゲノム」は、少なくとも一つの発現カセットポリヌクレオチドが挿入されるAAVゲノムを指す。本発明による有用なAAVのゲノムの最低限の「ゲノム」は、典型的には、シス作用5'および3'逆位末端反復配列（ITR）および発現カセットを含む。

40

【0341】

本明細書で使用される場合、「発現カセット」という用語は、標的細胞における特定の核酸の転写を可能にする一連の特定の核酸エレメントを有する、組換えまたは合成で生成された核酸構築物を指す。本開示によるAAVベクターのAAV組み換えウイルスゲノムの発現カセットは、ENPP1もしくはENPP3またはその機能的等価バリエーションをコードするヌクレオチド配列に動作可能に連結された転写調節領域を含み得る。

【0342】

本明細書で使用される場合、「転写調節領域」という用語は、一つ以上の遺伝子の発現を調節することができる核酸断片を指す。本発明による転写調節領域は、プロモーター、

50

および任意選択的にエンハンサーを含む。

【0343】

「プロモーター」という用語は、本明細書で使用される場合、ポリヌクレオチド配列の上流に位置する、一つ以上のポリヌクレオチドの転写を制御する働きをする核酸断片を指し、DNA依存性RNAポリメラーゼの結合部位、転写開始部位、ならびにこれらに限定されないが、転写因子結合部位、リプレッサー、および活性化因子タンパク質結合部位を含む任意の他のDNA配列、ならびに当該技術分野で既知のヌクレオチドの任意の他の配列の存在によって構造的に識別され、プロモーターからの転写量を調節するために直接的または間接的に作用する。誘導性プロモーター、構成的プロモーター、および組織特異的プロモーターを含む任意の種類のプロモーターが、本発明で使用され得る。

10

【0344】

本明細書で使用される場合、「エンハンサー」という用語は、転写因子が結合して遺伝子転写を増加させるDNA配列エレメントを指す。エンハンサーの例としては、制限されるものではないが、RSVエンハンサー、CMVエンハンサー、HCRエンハンサーなどが挙げられる。別の実施形態では、エンハンサーは、肝臓特異的エンハンサー、より好ましくは肝臓制御領域エンハンサー（HCR）である。

【0345】

本明細書で使用される場合、「動作可能に連結された」という用語は、目的のポリヌクレオチドに関するプロモーター配列の機能的関係および位置を指す（例えば、プロモーターまたはエンハンサーは、配列の転写に影響を与える場合、コード配列に動作可能に連結される）。概して、動作可能に連結されたプロモーターは、目的の配列に連続している。しかしながら、エンハンサーは、その発現を制御するために、目的の配列に連続する必要はない。別の実施形態では、プロモーターおよびENPP1もしくはENPP3またはその機能的等価バリエーションをコードするヌクレオチド配列。

20

【0346】

「治療有効量」という用語は、所望の生物学的結果を提供するために、ENPP1またはENPP3をコードするウイルスベクターの非毒性であるが、十分な量を指す。その結果は、疾患の兆候、症状、もしくは原因の低減および／または軽減、または生物学的系の任意の他の所望の改変であり得る。例えば、本発明によるAAVベクターの治療有効量は、生成に十分な量である。

30

【0347】

本明細書で使用される場合、用語「Capタンパク質」は、天然AAV Capタンパク質（例えば、VP1、VP2、VP3）の少なくとも一つの機能的活性を有するポリペプチドを指す。Capタンパク質の機能的活性の例としては、カプシドの形成を誘導する、一本鎖DNAの蓄積を促進する、カプシドへのAAV DNAパッケージングを促進する（すなわち、カプシド形成）、細胞受容体と結合する、およびビリオンの宿主細胞への侵入を促進する能力が挙げられる。原則的に、任意のCapタンパク質を本発明の状況で使用することができる。

【0348】

本明細書で使用される場合、用語「カプシド」は、ウイルスゲノムがパッケージングされる構造を指す。カプシドは、タンパク質から作製されたいくつかのオリゴマー構造サブユニットからなる。例えば、AAVは、三つのカプシドタンパク質：VP1、VP2、およびVP3の相互作用によって形成される正二十面体型カプシドを有する。

40

【0349】

本明細書で使用される場合、「Repタンパク質」という用語は、天然AAV Repタンパク質（例えば、Rep40、52、68、78）の少なくとも一つの機能的活性を有するポリペプチドを指す。Repタンパク質の「機能的活性」は、認識、DNA複製のAAV起源の結合およびニッキング、ならびにDNAヘリカーゼ活性を介してDNAの複製を促進することを含む、タンパク質の生理学的機能に関連する任意の活性である。追加の機能には、AAV（または他の異種）プロモーターからの転写の調節、およびAAV

50

DNAの宿主染色体への部位特異的統合が含まれる。特定の実施形態では、AAV rep 遺伝子は、血清型AAV1、AAV2、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、またはAAVrh10に由来する。より好ましくは、AAV2、AAV5、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、およびAAVrh10からなる群から選択されるAAV血清型に由来する。

【0350】

本明細書で使用される場合、表現「AAVが複製に依存するウイルスタンパク質」は、AAVが複製に依存する機能（すなわち、「ヘルパー機能」）を行うポリペプチドを指す。ヘルパー機能には、AAV遺伝子転写の活性化に関与する部分、段階特異的AAV mRNAスプライシング、AAV DNA複製、キャップ発現産物の合成、およびAAVカプシド組立を含むが、これらに限定されない、AAV複製に必要な機能が含まれる。ウイルス系アクセサリ機能は、アデノウイルス、ヘルペスウイルス（単純ヘルペスウイルス1型以外）、およびワクシニアウイルスなどの任意の既知のヘルパーウイルスに由来する。ヘルパー機能には、アデノウイルスE1、E2a、VA、およびE4、またはヘルペスウイルスUL5、ULB、UL52、およびUL29、ならびにヘルペスウイルスポリメラーゼが含まれるが、これらに限定されない。別の実施形態では、AAVが複製に依存するタンパク質は、アデノウイルスに由来する。

【0351】

本明細書で使用される場合、用語「アデノ随伴ウイルスITR」または「AAV ITR」は、アデノ随伴ウイルスのゲノムのDNA鎖の両端に存在する逆位末端反復を指す。ITR配列は、AAVゲノムの効率的な増殖に必要とされる。これらの配列の別の特性は、ヘアピンを形成するそれらの能力である。この特性は、第二のDNA鎖のプライマーゼ非依存性合成を可能にするその自己プライミングに寄与する。これらのITR配列を修飾するための手順は、当該技術分野で既知である（Brown T, “Gene Cloning”, Chapman & Hall, London, GB, 1995、Watson R, et al., “Recombinant DNA”, 2^d Ed. Scientific American Books, New York, N.Y., US, 1992、Alberts B, et al., “Molecular Biology of the Cell”, Garland Publishing Inc., New York, N.Y., US, 2008、Innis M, et al., Eds., “PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications”, Academic Press Inc., San Diego, Calif., US, 1990、およびSchleef M, Ed., “Plasmid for Therapy and Vaccination”, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, Del., 2001）。

【0352】

「組織特異的」プロモーターという用語は、特定の種類の分化細胞または組織でのみ活性である。典型的には、組織特異的プロモーター中の下流遺伝子は、他のどのプロモーターよりも特異的である組織においてはるかに高い程度に活性であるものである。この場合、特異的である組織以外の任意の組織において、プロモーターの活性がほとんどまたは実質的にない場合がある。

【0353】

本明細書で使用される場合、用語「骨格筋特異的プロモーター」は、プロモーターとして機能する（すなわち、プロモーターに動作可能に連結された選択された核酸配列の発現を調節する）核酸配列を指し、骨格筋の特定の組織細胞における選択された核酸配列の発現を促進する。骨格筋特異的プロモーターの例としては、限定されないが、ミオシン軽鎖プロモーター（MLC）および筋クレアチンキナーゼプロモーター（MCK）が挙げられる。

【0354】

本明細書で使用される場合、用語「肝臓特異的プロモーター」は、プロモーターとして機能する（すなわち、プロモーターに動作可能に連結された選択された核酸配列の発現を調節する）核酸配列を指し、肝細胞における選択された核酸配列の発現を促進する。典型的には、肝臓特異的プロモーターは、体内の任意の他の組織におけるその活性と比較して、肝臓においてより活性である。肝臓特異的プロモーターは、構成的または誘導的であり得る。適切な肝臓特異的プロモーターとしては、例えば、Nathwani et al., Blood 2006; 107(7):2653-2661 and the hybrid liver promoter (HLP) as described in McIntosh et al., Blood 2013; 121(17):3335-44. に記載の肝臓プロモーター1 (LP1) が挙げられる。かかるプロモーターには、[アルファ] 1-抗トリプシン (AAT) プロモーター、甲状腺ホルモン結合グロブリンプロモーター、アルファフェトタンパク質プロモーター、アルコールデヒドロゲナーゼプロモーター、第VII因子 (FVII) プロモーター、HBV塩基性コアプロモーター (BCP) およびPreS2プロモーター、アルブミンプロモーター、-460~73bpのホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ (PEPCK) プロモーター、チロキシン結合グロブリン (TBG) プロモーター、肝臓制御領域 (HCR) -ApocIIIハイブリッドプロモーター、HCR-hAATハイブリッドプロモーター、マウスアルブミン遺伝子エンハンサー (Ealb) 要素と組み合わせたAATプロモーター、アポリポタンパク質Eプロモーター、低密度リポタンパク質プロモーター、ピルビン酸キナーゼプロモーター、レシチンコレステロールアシルトランスフェラーゼ (LCAT) プロモーター、アポリポタンパク質H (ApoH) プロモーター、トランスフェリンプロモーター、トランスチレチンプロモーター、アルファ-フィブリノーゲンおよびベーターフィブリノーゲンプロモーター、アルファ1-抗キモトリプシンプロモーター、アルファ2-HS糖タンパク質プロモーター、ハプトグロビンプロモーター、セルロプラスミンプロモーター、プラスミノーゲンプロモーター、補体タンパク質のプロモーター (CIq、CIr、C2、C3、C4、C5、C6、C8、C9、補体因子Iおよび因子H)、C3補体活性化因子および [アルファ] -酸糖タンパク質プロモーター、が含まれる。追加的な組織特異的プロモーターは、Tissue-Specific Promoter Database, TiProD (Nucleic Acids Research, J4:D104-D107 (2006)) に見出し得る。別の実施形態では、肝臓特異的プロモーターは、アルブミンプロモーター、ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ (PEPCK) プロモーター、およびアルファ1-抗トリプシンプロモーター、より好ましくはアルファ1-抗トリプシンプロモーター、さらにより好ましくはヒトアルファ1-抗トリプシンプロモーターからなる群から選択される。

10

20

30

40

50

【0355】

本明細書で使用される場合、用語「誘導性プロモーター」は、例えば、化学誘導剤の適用によって、生理学的または発生学的に制御されるプロモーターを指す。例えば、それは、テトラサイクリン誘導性プロモーター、ミフェプリストン (RU-486) 誘導性プロモーターなどであり得る。

【0356】

本明細書で使用される場合、「構成的プロモーター」という用語は、その活性が、生物の全ての細胞において、またはほとんどの発達段階の間に、細胞環境条件をほとんどまたは全く考慮せずに、比較的一定のレベルで維持されるプロモーターを指す。別の実施形態では、転写調節領域は、ENPP1の構成的発現を可能にする。構成的プロモーターの例としては、限定されるものでないが、レトロウイルスのラウス肉腫ウイルス (RSV) LTRプロモーター (任意選択的にRSVエンハンサーを含む)、サイトメガロウイルス (CMV) プロモーター (任意選択的にCMVエンハンサーを含む)、SV40プロモーター、ジヒドロ葉酸レダクターゼプロモーター、 β -アクトニンプロモーター、ホスホグリセロールキナーゼ (PGK) プロモーター、およびEF1aプロモーター (Boshart M, et al., Cell 1985; 41:521-530) が含まれる。好ましく

は、構成的プロモーターは、肝臓における ENPP1 の発現に好適であり、限定されないが、ヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ (HPT R) のプロモーター、アデノシンデアミナーゼのプロモーター、ピルビン酸キナーゼのプロモーター、 β -アクチンのプロモーター、伸長因子1アルファ (EF1) プロモーター、ホスホグリセリン酸キナーゼ (PGK) プロモーター、ユビキチン (Ubc) プロモーター、アルブミンプロモーター、および他の構成的プロモーターを含む。細胞内で構成的に機能する例示的なウイルスプロモーターには、例えば、SV40 初期プロモーター領域 (Bernois t a n d C h a m b o n , 1981, N a t u r e 290:304-310)、ラウス肉腫ウイルスの3'末端反復に含まれるプロモーター (Y a m a m o t o e t a l . , 1980, C e l l 22:787-797)、またはヘルペスチミジンキナーゼプロモーター (W a g n e r e t a l . , 1981, P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U . S . A . 78:1441-1445) が含まれる。

10

【0357】

本明細書で使用される場合、用語「ポリアデニル化信号」は、mRNA の3'末端へのポリアデニンストレッチの結合を媒介する核酸配列に関する。好適なポリアデニル化信号には、限定されるものではないが、SV40 早期ポリアデニル化信号、SV40 後期ポリアデニル化信号、HSV チミジンキナーゼポリアデニル化信号、プロタミン遺伝子ポリアデニル化信号、アデノウイルス5 E1b ポリアデニル化信号、ウシ成長ホルモンポリアデニル化信号、ヒトバリエント成長ホルモンポリアデニル化信号などが含まれる。

【0358】

用語「ヌクレオチドまたは核酸配列」は、本明細書において「ポリヌクレオチド」と互換的に使用され、任意の長さの任意のポリマー型のヌクレオチドに関する。前述のヌクレオチド配列は、シグナルペプチドおよび ENPP1 タンパク質またはその機能的に均等なバリエントをコードする。

20

【0359】

本明細書で使用される場合、「シグナルペプチド」という用語は、タンパク質翻訳中に新生の目的のタンパク質のアミノ末端で結合されたアミノ酸残基 (10~30 残基の長さの範囲) の配列を指す。シグナルペプチドは、シグナル認識粒子 (SRP) によって認識され、小胞体での輸送後にシグナルペプチダーゼによって切断される。(L o d i s h e t a l . , 2000, M o l e c u l a r C e l l B i o l o g y , 4 t h e d i t i o n) 。

30

【0360】

本明細書で使用される場合、用語「対象」は、ヒト、非ヒト霊長類 (例えば、チンパンジーおよび他の類人類およびサル種)、家畜 (例えば、鳥類、魚、ウシ、ヒツジ、ブタ、ヤギ、およびウマ)、家畜哺乳動物 (例えば、イヌおよびネコ)、または実験動物 (例えば、マウス、マウス、モルモットなど齧歯類、) などの個々の哺乳動物を指す。用語は、任意の年齢または性別の対象を含む。別の実施形態では、対象は哺乳動物、好ましくはヒトである。

【0361】

疾患または障害の症状の重症度、かかる症状が患者によって経験される頻度、またはその両方が低減された場合、疾患または障害は「軽減」される。

40

【0362】

本明細書で使用される場合、「改変」、「欠陥」、「変動」、または「変異」という用語は、ミスセンスおよびナンセンス変異、挿入、欠失、フレームシフト、ならびに未成熟終止を含む、それがコードするポリペプチドの機能、活性、発現 (転写もしくは翻訳) または立体配座に影響を及ぼす、細胞内の遺伝子の変異を指す。

【0363】

「疾患」は、動物がホメオスタシスを維持できない動物の健康状態であり、疾患が改善されない場合、動物の健康状態は悪化し続ける。

【0364】

50

動物の中の「障害」は、動物がホメオスタシスを維持することができるが、その動物の健康状態が、障害が無い場合よりも好ましくない健康状態である。治療を受けないまま放置した場合、障害が必ずしも動物の健康状態のさらなる低下を引き起こすとは限らない。

【0365】

本明細書で使用される場合、用語「免疫応答」または「免疫反応」は、侵入（感染）病原性生物における抗原、または外来性タンパク質の導入もしくは発現に対する宿主の免疫系を指す。免疫応答は、概して、液性かつ局所的であり、B細胞によって産生される抗体は、抗原－抗体複合体中の抗原と組み合わせさせて、抗原を不活化または中和する。ヒトタンパク質をマウスモデル系に注射すると、免疫応答が観察されることが多い。一般的に、マウスモデル系は、外来抗原の導入前に免疫抑制薬を注射して、より良好な生存率を確実にすることにより、免疫寛容になる。

10

【0366】

本明細書で使用される場合、「免疫抑制」という用語は、外来タンパク質、臓器移植、骨髄および組織移植などの外来抗原に対する免疫寛容を促進するために免疫抑制薬を使用する、宿主免疫系の活性化または有効性の意図的な低減である。免疫抑制薬の非限定的な例としては、抗CD4（GK1.5）抗体、シクロホスファミド、アザチオプリン（イムラン）、ミコフェノール酸モフェチル（セルセプト）、シクロスポリン（ネオール、サンディミュン、ゲングラフィ）、メトトレキサート（リウマトレックス）、レフルノミド（アラバ）、シクロホスファミド（シトキサン）、およびクロラムブシル（ロイケラン）が挙げられる。

20

【0367】

本明細書で使用される場合、用語「ENPP」または「NPP」は、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を指す。

【0368】

本明細書で使用される場合、用語「ENPP1タンパク質」または「ENPP1ポリペプチド」は、ENPP1遺伝子によってコードされ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タンパク質を指す。コードされるタンパク質は、II型膜貫通糖タンパク質であり、ヌクレオチドおよびヌクレオチド糖のホスホジエステル結合、ならびにヌクレオチドおよびヌクレオチド糖のピロホスフェート結合を含む、様々な基質を切断する。ENPP1タンパク質は、膜貫通ドメインおよび可溶性細胞外ドメインを有する。細胞外ドメインは、ソマトメジンBドメイン、触媒ドメイン、およびヌクレアーゼドメインに更に細分される。野生型ENPP1の配列および構造は、Braddock, et al. のPCT出願公開第2014/126965号で詳細に説明され、これは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

30

【0369】

哺乳動物ENPP1およびENPP3ポリペプチド、変異体、またはその変異体断片は、国際PCT出願公開第2014/126965-Braddock et al.、同第2016/187408-Braddock et al.、同第2017/087936-Braddock et al.、および同第2018/027024-Braddock et al. 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。

40

【0370】

本明細書で使用される場合、用語「ENPP3タンパク質」または「ENPP3ポリペプチド」は、ENPP3遺伝子によってコードされ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3タンパク質を指す。コードされるタンパク質は、II型膜貫通糖タンパク質であり、ヌクレオチドおよびヌクレオチド糖のホスホジエステル結合、ならびにヌクレオチドおよびヌクレオチド糖のピロホスフェート結合を含む、様々な基質を切断する。ENPP3タンパク質は、膜貫通ドメインおよび可溶性細胞外ドメインを有する。野生型ENPP3の配列および構造は、Braddock, et al. のPCT出願公開第2017/087936号で詳細に説明され、これは、参照によりその全体

50

が本明細書に組み込まれる。

【0371】

本明細書で使用される場合、「ENPP1前駆体タンパク質」という用語は、ENPP1 N末端にそのシグナルペプチド配列を有するENPP1を指す。タンパク質分解時に、シグナル配列は、ENPP1から切断され、ENPP1タンパク質を提供する。本発明内で有用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、アルブミンシグナル配列、アズロシジンシグナル配列、ENPP1シグナルペプチド配列、ENPP2シグナルペプチド配列、ENPP7シグナルペプチド配列、および／またはENPP5シグナルペプチド配列が挙げられる。

【0372】

本明細書で使用される場合、用語「ENPP3前駆体タンパク質」は、ENPP3 N末端にそのシグナルペプチド配列を有するENPP3を指す。タンパク質分解時に、シグナル配列は、ENPP3から切断され、ENPP3タンパク質を提供する。本発明内で有用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、アルブミンシグナルペプチド配列、アズロシジンシグナルペプチド配列、ENPP1シグナルペプチド配列、ENPP2シグナルペプチド配列、ENPP7シグナルペプチド配列、および／またはENPP5シグナルペプチド配列が挙げられる。

【0373】

本明細書で使用される場合、「アズロシジンシグナルペプチド配列」という用語は、ヒトアズロシジンに由来するシグナルペプチドを指す。カチオン性抗微生物タンパク質CAP37またはヘパリン結合タンパク質(HBP)としても知られるアズロシジンは、ヒトにおいてAZU1遺伝子によってコードされるタンパク質である。アズロシジンシグナルペプチド(MTRLTVLALLAGLLASSRA)をコードするヌクレオチド配列は、コードされると、ENPP1前駆体タンパク質またはENPP3前駆体タンパク質を生成する、NPP1またはNPP3遺伝子のヌクレオチド配列と融合される。(Optimized signal peptides for the development of high expressing CHO cell lines, Kober et al., Biotechnol Bioeng. 2013 Apr;110(4):1164-73)

【0374】

本明細書で使用される場合、用語「ENPP1-Fc構築物」は、IgG分子（好ましくは、ヒトIgG）のFcR結合ドメインに（共有結合および非共有結合の両方を含む）組換え融合および／または化学的にコンジュゲートされたENPP1を指す。特定の実施形態では、ENPP1のC末端は、FcR結合ドメインのN末端に融合またはコンジュゲートされる。

【0375】

本明細書で使用される場合、「ENPP3-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（共有結合および非共有結合の両方を含む）組換え融合および／または化学的にコンジュゲートされたENPP3を指す。特定の実施形態では、ENPP1のC末端は、FcR結合ドメインのN末端に融合またはコンジュゲートされる。

【0376】

本明細書で使用される場合、「Fc」という用語は、ヒトIgG（イムノグロブリン）Fcドメインを指す。IgG1、IgG2、IgG3、およびIgG4などのIgGのサブタイプは、Fcドメインとして使用するために企図される。

【0377】

本明細書で使用される場合、「Fc領域またはFcポリペプチド」は、IgG分子のパイン消化により得られた結晶化可能断片と相関するIgG分子の部分である。Fc領域は、ジスルフィド結合によって連結されるIgG分子の二つの重鎖のC末端の半分を含む。抗原結合活性はないが、FcRn受容体を含む相補体およびFc受容体の炭水化物部分

10

20

30

40

50

および結合部位を含む。Fc断片は、第二の定常ドメインCH2全体（Kabat番号システムによるヒトIgG1の残基231～340）および第三の定常ドメインCH3（残基341～447）を含む。「IgGヒンジーFc領域」または「ヒンジーFc断片」という用語は、Fc領域（残基231～447）およびFc領域のN末端から延びるヒンジ領域（残基216～230）からなるIgG分子の領域を指す。「定常ドメイン」という用語は、イムノグロブリンの他の部分、抗原結合部位を含む可変ドメインに対して、より保存されたアミノ酸配列を有するイムノグロブリン分子の部分の部分を指す。定常ドメインは、重鎖のCH1、CH2、およびCH3ドメイン、ならびに軽鎖のCHLドメインを含む。Fc変異体の実施例は、Conceptual Approaches to Modulating Antibody Effector Functions and Circulation Half-Life, Front. Immunol., 07 June 2019.に記載されているので参照。

10

【0378】

本明細書で使用される場合、用語「動作可能に連結」または「動作可能に関連付けられる」は、融合タンパク質の形成をもたらす、ENPP1またはENPP3などの標的タンパク質およびFcまたはアルブミンなどの異種タンパク質の機能のいずれかに有害に影響を与えないような方法で実施される、標的タンパク質と異種タンパク質との間の接続を指す。

【0379】

本明細書で使用される場合、用語「循環半減期」は、哺乳動物、好ましくはヒトの全血中を循環する際に、ENPP1またはENPP3などの組成物の血清濃度が、その定常状態を半減（血清半減期）するのにかかる時間を指す。例えば、ENPP1-FcまたはENPP1-アルブミン異種タンパク質融合物は、野生型ENPP1タンパク質にわたって半減期の増加を示す。Braddockらは、ENPP1変異およびFc変異（ENPP1-Fcバリエーション）を含むENPP1-Fc融合タンパク質が、約35時間の半減期の増加を示したと報告した。（Braddock et al., Protein Engineering and Glycan Optimization Improve Pharmacokinetics of an Enzyme Biologic 10-fold, Biochemistry and Molecular Biology, April 2019, FASEBを参照）。

20

30

【0380】

本明細書で使用される場合、用語「ENPP1-Fcバリエーション」は、ENPP1タンパク質と例えばFcなどの異種タンパク質の動作可能な連結によって形成される融合タンパク質を指し、それらは、ENPP1タンパク質で置換された一つ、二つ、三つ、四つ、または五つの残基、および／またはFcタンパク質領域で置換された一つ、二つ、三つ、四つ、または五つの残基を含む。例えば、配列番号95に示されるENPP1-Fcバリエーションは、ENPP1タンパク質領域中に単一変異（I332T変異、配列番号1に示されるENPP1 WTタンパク質に対する位置番号）を、およびFc領域中に三重変異を有する。（EU番号によるM252Y, S254TおよびT256E変異）。いくつかのENPP1-Fcバリエーションは、一つ以上の置換を含むENPP1タンパク質を、既知の変異を含むFcタンパク質と動作可能に連結することによって容易に生成され得る。（IgG Fc engineering to modulate antibody effector functions, Protein Cell. 2018 Jan; 9(1): 63-73の表Iを参照）

40

【0381】

本明細書で使用される場合、用語「ENPP3-Fcバリエーション」は、ENPP1タンパク質と例えばFcなどの異種タンパク質の動作可能な連結によって形成される融合タンパク質を指し、それらは、ENPP3タンパク質で置換された一つ、二つ、三つ、四つ、または五つの残基、および／またはFcタンパク質領域で置換された一つ、二つ、三つ、四つ、または五つの残基を含む。例えば、配列番号96に示されるENPP3-Fcバリエーション

50

アントは、Fc領域（EU番号によるM252Y、S254TおよびT256E変異）に三重変異を有する。いくつかのENPP3-Fcバリエーションは、一つ以上の置換を含むENPP3タンパク質を、既知の変異を含むFcタンパク質と動作可能に連結することによって容易に生成され得る。（IgG Fc engineering to modulate antibody effector functions, Protein Cell. 2018 Jan; 9(1): 63-73を参照）

【0382】

本明細書で使用される場合、用語「アルブミン」は、球状タンパク質のファミリーを指し、概して、様々なリガンドに結合し、それらを運ぶ輸送タンパク質である。一般的な例としては、ヒト血清アルブミン、アルファ-フェットタンパク質、オバルブミン、およびラクトアルブミンが挙げられる。ヒト血清アルブミンは、ヒト血漿の主要タンパク質である。それは、ヒト血漿タンパク質の約50%を占める。アルブミンバリエーションのいくつかの例は、Amino Acid Substitutions in Genetic Variants of Human Serum Albumin and in Sequences Inferred from Molecular Cloning, PNAS, Vol. 84, No. 13 (Jul. 1, 1987), pp. 4413-4417; & Albumin as a versatile platform for drug half-life extension, Biochimica et Biophysica Acta 1830(12), April 2013. に記載されている。

【0383】

本明細書で使用される場合、核酸に適用される場合、用語「断片」は、より大きな核酸のサブ配列を指す。核酸の「断片」は、少なくとも約15個、50~100個、100~500個、500~1000個、1000~1500個のヌクレオチド、1500~2500個、または2500個のヌクレオチド（およびその間の任意の整数値）であり得る。本明細書で使用される場合、タンパク質またはペプチドに適用される用語「断片」は、より大きなタンパク質またはペプチドのサブ配列を指し、少なくとも約20、50、100、200、300または400アミノ酸長（およびその間の任意の整数値）であり得る。

【0384】

「単離された」は、天然状態から改変または除去されたことを意味する。例えば、生きている動物に天然に存在する核酸またはポリペプチドは、「単離されて」いないが、その天然状態の共存物質から部分的または完全に分離された同じ核酸またはポリペプチドは、「単離されて」いる。単離された核酸またはタンパク質は、実質的に精製された形態で存在することができるか、または例えば、宿主細胞などの非天然環境中に存在することができる。

【0385】

「オリゴヌクレオチド」または「ポリヌクレオチド」という用語は、少なくとも2個、ある特定の実施形態では、少なくとも8、15、または25個のヌクレオチドの長さの範囲の核酸であるが、最大50、100、1000、もしくは5000個のヌクレオチドの長さ、またはポリヌクレオチドに特異的にハイブリダイズする化合物であり得る。

【0386】

本明細書で使用される場合、用語「患者」、「個体」、または「対象」は、ヒトを指す。

【0387】

本明細書で使用される場合、用語「医薬組成物」または「組成物」は、薬学的に許容可能な担体を含む本開示内の有用な少なくとも一つの化合物の混合物を指す。医薬組成物は、患者への化合物の投与を容易にする。これらに限定されないが、皮下、静脈内、経口、エアロゾル、吸入、直腸、膺、経皮、鼻腔内、頬側、舌下、非経口、髄腔内、胃内、眼、肺、および局所投与を含む、化合物を投与する複数の技術が、当該技術分野に存在する。

【0388】

本明細書で使用される場合、「薬学的に許容可能な」という用語は、化合物の生物学的活性または特性を破壊せず、比較的非毒性である、担体または希釈剤などの材料を指し、すなわち、材料は、望ましくない生物学的効果を引き起こすことなく、または例えば、リン酸緩衝食塩水（PBS）などのそれが含まれる組成物の任意の構成成分と有害な様式で相互作用することなく、個体に投与され得る。

【0389】

本明細書で使用される場合、用語「血漿ピロホスフェート（PPi）レベル」は、動物の血漿中に存在するピロホスフェートの量を指す。ある特定の実施形態では、動物には、ラット、マウス、ネコ、イヌ、ヒト、ウシ、およびウマが含まれる。血小板からの放出のため、血清ではなく血漿中のPPiを測定する必要がある。PPiを測定するにはいくつかの方法があり、そのうちの一つは、修飾を伴うウリジン-ジホスホグルコース（UDPG）ピロホスホリラーゼ（Lust & Seegmiller, 1976, Clin. Chim. Acta 66:241-249; Cheung & Suhadolnik, 1977, Anal. Biochem. 83:61-63）を使用した酵素アッセイによるものである。典型的には、健康な対象における正常なPPiレベルは、約1 μm ～約3 μm の範囲であり、一部の場合では、1～2 μm である。ENPP1発現欠損を有する対象は、正常なレベルより少なくとも10%下回る、正常なレベルより少なくとも20%下回る、正常なレベルより少なくとも30%下回る、正常なレベルより少なくとも40%下回る、正常なレベルより少なくとも50%下回る、正常なレベルより少なくとも60%下回る、正常なレベルより少なくとも70%下回る、正常なレベルより少なくとも80%下回る、およびそれらの組み合わせの範囲である、低ppiレベルを呈する傾向がある。GACIに悩まされた患者において、ppiレベルは、1 μm 未満であることが見出され、いくつかの場合では検出可能なレベルを下回る。PXEに悩まされた患者において、ppiレベルは、0.5 μm を下回る。（Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2014 Sep; 34(9):1985-9; Braddock et al., Nat Commun. 2015; 6: 10006.）

【0390】

本明細書で使用される場合、用語「ポリペプチド」は、自然発生構造バリエーションに関連するアミノ酸残基、およびペプチド結合を介して連結されたその合成非自然発生類似体から構成されるポリマーを指す。

【0391】

本明細書で使用される場合、「PPi」という用語は、ピロホスフェートを指す。

【0392】

本明細書で使用される場合、用語「予防する」または「予防」は、何も生じなかった場合に障害もしくは疾患の発症がないこと、または障害もしくは疾患の発症が既にあった場合に更なる障害もしくは疾患の発症がないことを意味する。また、障害または疾患に関連する症状のうちのいくつかまたは全てを予防する能力も考慮される。

【0393】

本明細書で使用される場合、「試料」または「生物学的試料」は、対象から単離された生物学的材料を意味する。生物学的試料は、対象における生理学的または病理学的プロセスのmRNA、ポリペプチド、または他のマーカーの検出に好適な任意の生物学的物質を含有してもよく、個体から得られた液体、組織、細胞および／または非細胞物質を含んでもよい。

【0394】

本明細書で使用される場合、「実質的に精製された」は、他の構成成分を本質的に含まないことを指す。例えば、実質的に精製されたポリペプチドは、通常その自然発生状態で会合している他の構成成分から分離されているポリペプチドである。非限定的な実施形態には、95%の純度、99%の純度、99.5%の純度、99.9%の純度、および100%の純度が含まれる。

【0395】

本明細書で使用される場合、用語「治療」または「治療すること」は、患者への治療剤、すなわち本発明で有用な化合物（単独または別の医薬品と組み合わせた）の適用もしくは投与、または疾患もしくは障害、疾患もしくは障害の症状、または疾患もしくは障害を発症する可能性を有する患者からの（例えば、診断またはエクスピボ適用のための）単離された組織もしくは細胞株への治療剤の適用もしくは投与として定義され、疾患もしくは障害、疾患もしくは障害の症状、または疾患もしくは障害を発症する可能性を治す、治療する、軽減する、緩和する、改変する、是正する、改善する、改良する）、またはそれに影響を及ぼす目的を伴う。そのような治療は、薬理ゲノミクスの分野から得られた知識に基づいて、特異的に調整または修正され得る。

10

【0396】

本明細書で使用される場合、用語「予防する」、「予防している」、および「予防」は、対象における疾患の発症の阻害または発生の減少を指す。予防は、完全であってもよく（例えば、対象における病理学的細胞の完全な不存在）、または部分的であってもよい。予防はまた、臨床状態に対する感受性の低下を指す。

【0397】

本明細書で使用される場合、用語「野生型」は、自然発生起源から単離された遺伝子または遺伝子産物を指す。野生型遺伝子は、集団で最も頻繁に観察され、したがって、ヒトNPP1遺伝子またはNPP3遺伝子の「正常」または「野生型」形態を任意に設計される。対照的に、「機能的等価」という用語は、野生型遺伝子または遺伝子産物と比較した場合に、配列および／または機能的特性（すなわち、改変された特性）の修飾を示す、NPP1もしくはNPP3遺伝子または遺伝子産物を指す。自然発生変異体は単離することができる。これらは、野生型遺伝子または遺伝子産物と比較した場合、改変された特徴（改変された核酸配列を含む）を有するという事実によって識別される。

20

【0398】

本明細書で使用される場合、用語「機能的等価バリエーション」は、ENPP1またはENPP3の配列（上記で定義される）に対して実質的に相同であり、かつそれぞれENPP1またはENPP3の酵素および生物学的活性を保持するポリペプチドに関する。バリエーションが天然のENPP1またはENPP3の生物学的活性を保持するかどうかを決定する方法は、当業者に広く知られており、前述の出願の実験部分で使用される任意のアッセイを含む。特に、ウイルスベクターによって送達されるENPP1またはENPP3の機能的等価バリエーションは、本発明によって包含される。

30

【0399】

ENPP1またはENPP3の機能的等価バリエーションは、それぞれ天然のENPP1またはENPP3に対して実質的に相同であるポリペプチドである。「実質的に相同」という表現は、前述のタンパク質配列が、それぞれ先に記載のENPP1またはENPP3配列に関して少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%の同一性の程度を有する場合のタンパク質配列に関する。

40

【0400】

二つのポリペプチド間の同一性の程度は、当業者に広く知られているコンピュータアルゴリズムおよび方法を使用して決定される。二つのアミノ酸配列間の同一性は、好ましくは、BLASTPアルゴリズム（BLAST Manual, Altschul, S., et al., NCBI NLM NIH Bethesda, Md. 20894, Altschul, S., et al., J. Mol. Biol. 215: 403-410 (1990))を使用することによって決定されるが、他の類似のアルゴリズムも使用することができる。BLASTおよびBLAST 2.0は、本明細書に記載されるパラメータを用いて、配列同一性パーセントを決定するために使用される。BLAST分析を行うためのソフトウェアは、アメリカ国立生物工学情報センター

50

を通じて公開されている。

【0401】

ENPP1またはENPP3の「機能的等価バリエーション」は、それぞれ、ENPP1またはENPP3を産生するために使用される宿主細胞中のコドン選好を説明するポリヌクレオチド内のヌクレオチドを置き換えることによって得ることができる。かかる「コドン最適化」は、University of Wisconsin Package Version 9.0, Genetics Computer Group, Madison, Wis.によって提供されるコドン選好の「Human high.cod」などのコドン出現頻度表を組み込むコンピュータアルゴリズムを介して決定され得る。

【0402】

量、持続時間などの測定可能値を指す場合、本明細書で使用される場合、「約」は、指定された値から±20%または±10%の変動、特定の実施形態では±5%の変動、特定の実施形態では±1%の変動、特定の実施形態では±0.1%の変動を包含することを意味する。これは、かかる変動は、開示された方法を実施するのに適切であるためである。

【0403】

本開示は、本発明のタンパク質配列および核酸配列の代表的な例を提供する。記載したタンパク質配列は、リバース(reverse)翻訳およびコドン最適化を行うことによって核酸配列に変換することができる。かかる変換を可能にするExPASy(<https://www.expasy.org/>)やバイオインフォマティクスサーバー(<http://www.bioinformatics.org>)など、いくつかのツールが、技術分野で利用可能である。

【0404】

範囲：本開示の全体を通して、本発明による様々な態様が範囲形式で提示され得る。範囲形式の記載は、単に利便性および簡潔性のためであり、本発明による非柔軟な制限として解釈されるべきではないことが理解されるべきである。したがって、範囲の説明は、その範囲内の全ての可能な部分範囲ならびに個々の数値を具体的に開示しているとみなされるべきである。例えば、1～6などの範囲の記述は、1～3、1～4、1～5、2～4、2～6、3～6などの具体的に開示された部分範囲、ならびに例えば、1、2、2.7、3、4、5、5.3、および6などのその範囲内の個々の数を、有するとみなされるべきである。これは、範囲の広さに関係なく適用される。

【0405】

可溶性ENPP1ポリペプチド

特定の態様では、本開示は、可溶性ENPP1ポリペプチドに関する。本明細書に開示されるENPP1ポリペプチドが、ENPP1ファミリーの自然発生ポリペプチド、およ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、および/またはペプチド模倣形態を含む)を含む。「ENPP1」または「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)および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、および数個のドメインを含む大きい細胞外領域を含む。大きい細胞外領域は、SMB1および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、八つのシステイン残基を含有し、各々が四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およ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。ENPP1タンパク質は、ヌクレオチドおよびヌクレオチド糖のホスホジエステル結合、ならびにヌクレオチドおよびヌクレオチド糖のピロホスフェート結合を含む、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

10

20

30

40

50

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、およ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。

【0406】

特定の実施形態では、ENPP1前駆体タンパク質は、内在性または異種のシグナルペプチド配列を更に含む。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。Jansen S, et al. J Cell Sci. 2005;118(Pt 14):3081-9を参照。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、限定されるものではないが、ENPP1シグナルペプチド配列、ENPP2シグナルペプチド配列、ENPP7シグナルペプチド配列、および／またはENPP5シグナルペプチド配列が挙げられる。処理された（成熟、可溶性）細胞外ENPP1ポリペプチド配列が配列番号2に示される。

【0407】

様々なヌクレオチドトリホスフェート（例えば、ATP、UTP、GTP、TTP、およびCTP）、pNP-TMP、3', 5'-cAMP、および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 and Mackenzie NC, et al. Bone. 2012;51(5):961-8参照）。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、および正常な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、本開示の方法による、活性のある有用なヒト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の一つ以上のアミノ酸を含み得るか、またはヒトもしくは他の脊椎動物配列のものと同様の残基を含み得る。対応する位置における一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、または正常なENPP1活性を改変する可能性が低い保存的変形または置換を含み得る。保存的変形、また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、もしくはメチオニンなどの一つの疎水性残基の置換、また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、もしくはアスパラギンに対するグルタミンの置換などの、別のものに対する一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%またはそれを超えるの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。一部の実施形態では、可溶性ENPP1ポリペプチドは、ENPP1ポリペプチドドメイン（例えば、SMB1、SMB2、触媒ドメイン、ヌクレアーゼ様ドメイン、リンカー配列）、または別の種（例えば、ヒトとカニクイザル）からの対応するドメインもしくは部分配列で置換された部分配列を含み得る。

【0408】

ENPP1タンパク質は、構造的および生物学的特徴の点で当技術分野で特徴付けられてきた。特定の実施形態では、本明細書に開示される可溶性ENPP1タンパク質は、ピロホスファターゼおよび／またはホスホジエステラーゼ活性を含む。例えば、一部の実施形態では、ENPP1タンパク質は、ヌクレオチドトリホスフェート（例えば、ATP、UTP、GTP、TTP、およびCTP）、pNP-TMP、3', 5'-cAMP、およ

10

20

30

40

50

び 2' - 3' - c G A M P に結合し、ヌクレオチドトリホスフェートを無機ピロホスフェートに変換する〔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; and Onyedibe KI, et al. Molecules. 2019;24(22) 参照〕。本明細書で使用される場合、用語「酵素的に活性」または「生物学的に活性」は、ピロホスファターゼおよび／またはホスホジエステラーゼ活性を呈する（例えば、ATPをAMPおよびPPiに、ならびに／またはAP3aをATPに結合および／または加水分解することができる）ENPP1ポリペプチドを指す。

10

【0409】

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トリホスフェートを加水分解して、無機ピロホスフェート（PPi）を生成し、概して、可溶性である。この活性は、上記に説明されたように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）。特定の実施形態では、可溶性ENPP1ポリペプチドは、約3.4（±0.4）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。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、一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やり方（例えば、無機ピロホスフェートへのヌクレオチドの変換）のための十分なガイダンスを提供する。

20

【0410】

一実施形態では、本開示は、可溶性ENPP1ポリペプチドに関する。本明細書に説明されるように、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、およびその任意のバリエーション（変異体、断片、およびペプチド模倣形態を含む）を含む。例示的な可溶性ENPP1ポリペプチドは、ENPP1タンパク質の細胞外ドメイン（例えば、NCBIアクセッションNP_006199の残基96～925）を含み、本明細書に説明される。

30

【0411】

例示的な可溶性ENPP1ポリペプチドは、ENPP1ポリペプチドの細胞外ドメインの全てまたは一部に加えてシグナル配列を更に含み得る。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、または限定されるものではないが、本面最初に記載されるhENPP7シグナル配列またはアズロシジン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、本開示全体を通して、ならびに国際特許出願公開第WO2012/125182号、同第WO2014/126965号、同第WO2016/187408号、同第WO 2018/027024号、および同第WO 2020/047520号に提供され、それらの全てが参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

40

【0412】

特定の実施形態では、本明細書に記載のENPP1ポリペプチドまたは可溶性ENPP1ポリペプチドは、バリエーションポリペプチドであり、一つ以上のアミノ酸置換、欠失、または挿入によってポリペプチドの野生型形態とは異なる。

【0413】

特定の実施形態では、可溶性ENPP1ポリペプチドは、組み換えポリペプチドである

50

。一部の実施形態では、可溶性ENPP1ポリペプチドは、ENPP1膜貫通ドメインを欠くENPP1ポリペプチドを含む。一部の実施形態では、ポリペプチドは、ENPP1ポリペプチドを含み、ENPP1膜貫通ドメインは、除去され（および／または切断され）、例えば、非限定的な例として、ENPP2、ENPP5、またはENPP7などの、別のポリペプチドの膜貫通ドメインで置き換えられている。

【0414】

一部の実施形態では、本明細書に記載されるバリエーションENPP1ポリペプチドまたはバリエーション可溶性ENPP1ポリペプチドは、一つ以上のアミノ酸置換を含む。一部の実施形態では、バリエーションENPP1ポリペプチドまたはバリエーション可溶性ENPP1ポリペプチドは、国際特許出願公開WO2020/0047520に記載されるアミノ酸置換のうちの一つ以上を含む。一部の実施形態では、本明細書に記載されるバリエーションENPP1ポリペプチドまたはバリエーション可溶性ENPP1ポリペプチドは、配列番号1に関する、332位での少なくとも一つのアミノ酸置換を含む。特定の実施形態では、アミノ酸置換は、配列番号1に対する332位のイソロイシン（I）とトレオニン（T）との置換である。特定の実施形態では、アミノ酸置換は、配列番号1に対する332位のイソロイシン（I）とセリン（S）との置換である。

【0415】

一部の実施形態では、ENPP1ポリペプチドまたは可溶性ENPP1ポリペプチドは、配列番号95に示されるアミノ酸配列を含む、またはからなる。

【0416】

一部の実施形態では、可溶性ENPP1ポリペプチドまたはENPP3ポリペプチドは、ENPP1ポリペプチドドメインおよび一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。アミノ酸配列が、配列番号1によって表されるENPP1の形態で一意に見出されない場合、ENPP1に対して異種であると理解される。一部の実施形態では、異種タンパク質部分は、イムノグロブリンのFcドメインを含む。一部の実施形態では、イムノグロブリンのFcドメインは、IgG1イムノグロブリンのFcドメインである。特定の実施形態では、可溶性ENPP1ポリペプチドは、ヒトイムノグロブリン1（IgG1）、ヒトイムノグロブリン2（IgG2）、ヒトイムノグロブリン3（IgG3）、および／またはヒトイムノグロブリン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、ヒトイムノグロブリン1（IgG1）、ヒトイムノグロブリン2（IgG2）、ヒトイムノグロブリン3（IgG3）、および／またはヒトイムノグロブリン4（IgG4）のFcドメインにN末端融合される。一部の実施形態では、Fcドメインの存在は、循環半減期、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。特定の実施形態では、天然ヒトIgGタンパク質（IgG1、IgG2、IgG3、およびIgG4）の部分が、Fc部分（例えば、ENPP1-Fc）の代わりに使用され得る。例えば、本開示は、ヒトIgG1、IgG2、IgG3、および／またはIgG4に由来するCH1、CH2、またはCH3ドメインなどの、イムノ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（Kabat番号システムによる、ヒトIgG1の残基216～230）などの天然IgGの領域、第二の定常ドメインCH2（残基231～340）全体、および第三の定常ドメインCH3（残基341～447）を含み得る。

【0417】

一部の実施形態では、Fcドメインは、バリエーションFc定常領域を含む。一部の実施形態では、バリエーションFc定常領域は、それが由来した天然定常領域に対して、30個以下（例えば、29、28、27、26、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、または2個以下）のアミノ酸置換、挿入、または欠失を含む。一部の実施形態では、バリエーションFc定常領域は、M252Y、S254T、T256E、N434S、M428L

、V 2 5 9 I、T 2 5 0 I、およびV 3 0 8 Fからなる群から選択される一つ以上のアミノ酸置換を含む。一部の実施形態では、バリエーションFc定常領域は、アミノ酸置換M 2 5 2 Y、S 2 5 4 T、およびT 2 5 6 Eを含む。一部の実施形態では、バリエーションFc定常領域は、各々EU番号において、位置4 2 8にメチオニン、および位置4 3 4にアスパラギンを含む。一部の実施形態では、バリエーションFc定常領域が、例えば、米国特許第8, 088, 376号に説明される4 2 8 L / 4 3 4 S二重置換を含む。一部の実施形態では、機能的均等物または機能的誘導体が、本明細書に開示されるENPP1-Fc構築物と同一のもしくは類似の、またはそれよりも高い生物学的活性を有するか否かを決定する方法は、WO 2 0 1 6 / 1 8 7 4 0 8に説明されるATP切断を伴う酵素学的アッセイを使用することによって決定され得る。一部の実施形態では、バリエーションFc領域は、配列番号95のアミノ酸853～1079を含む。

10

【0418】

一部の実施形態では、ENPP1融合タンパク質が、ENPP1ポリペプチドドメインと一つ以上の異種タンパク質部分（例えば、Fcイムノ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。特定の実施形態では、可溶性ENPP1ポリペプチドは、Fcドメインに直接的または間接的に融合される。一部の実施形態では、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。一部の実施形態では、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、当技術分野で公知であり、例えば、グリシン、アラニン、およびセリンなどの柔軟なアミノ酸残基を含有するペプチドリリンカーを含む。一部の実施形態では、リンカーは、ポリグリシンリンカーまたはGly-Serリンカーを含む。一部の実施形態では、リンカーアミノ酸配列は、配列番号94に示されたアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる。

20

【0419】

特定の実施形態では、可溶性ENPP1ポリペプチドは、負に帯電した骨標的化ドメインを欠く。一部の実施形態では、ポリアスパラギン酸ドメイン（約2～約20個以上の連続アスパラギン酸残基）は、負に帯電した骨標的化ドメインの非限定的な例である。一部の実施形態では、負に帯電した骨標的化ドメインは、8個の連続アスパラギン酸残基を含むポリアスパラギン酸ドメインを含む。一部の実施形態では、負に帯電した骨標的化ドメインは、10個の連続アスパラギン酸残基を含むポリアスパラギン酸ドメインを含む。一部の実施形態では、可溶性ENPP1ポリペプチドは、負に帯電した骨標的化ドメインを含む。一部の実施形態では、本明細書に開示される可溶性ENPP1ポリペプチドは、上記に説明されたように、負に帯電した骨標的化ドメインを欠く（PCT出願公開WO 2 0 1 1 / 1 1 3 0 2 7号および同第WO 2 0 1 2 / 1 2 5 1 8 2号）。

30

【0420】

ENPP1およびENPP3のインビボ発現のためのウイルスベクター

NPP1またはNPP3配列を含むポリヌクレオチドなどの遺伝物質を哺乳動物に導入して、ENPP1またはENPP3ポリペプチドの欠損を補償することができる。

【0421】

特定の修飾ウイルスは、哺乳動物への投与後、ウイルスが細胞に感染し、コードされたタンパク質を発現するため、コード配列を担持するためのベクターとしてしばしば使用される。本発明による有用な修飾ウイルスは、例えば、以下：パルボウイルス、ピコルナウイルス、仮性狂犬病ウイルス、A型、B型、またはC型肝炎ウイルス、パピローマウイルス、パポバウイルス（ポリオーマおよびSV40など）またはヘルペスウイルス（エプスタインバーウイルス、水痘帯状疱疹ウイルス、サイトメガロウイルス、帯状疱疹および単純ヘルペスウイルス1型および2型）、RNAウイルス、またはモロニー Maus 白血病ウイルスもしくはレンチウイルスなどのレトロウイルス（すなわち、ヒト免疫不全ウイルス、ネコ免疫不全ウイルス、ウマ感染性貧血ウイルスなど）を含むウイルスに由来する。本発明による有用なDNAウイルスには、以下がある：アデノ随伴ウイルスアデノウイルス、アルファウイルス、およびレンチウイルス。

40

50

【0422】

ウイルスベクターは、一般的に注射により投与され、最も頻繁には、直接体内に静脈内（IVにより）に、または特定の組織中に直接投与され、そこでは個々の細胞によって取り込まれる。代替的に、ウイルスベクターは、エキスピボでウイルスベクターを患者の細胞の試料と接触させることによって投与されてもよく、それによってウイルスベクターが細胞を感染させることを可能にし、次いでベクターを含む細胞が患者に戻される。ウイルスベクターが送達されると、コード配列が発現され、機能性タンパク質がもたらされる。概して、ウイルスベクターによる細胞の感染および形質導入は、ウイルスカプシドの標的細胞表面上の受容体との相互作用、エンドサイトーシスによる内在化、エンドサイトーシス／プロテアソーム区画を通じた細胞内輸送、エンドソーム脱出、核輸入、ビリオン脱殻、ならびに組み換えコード配列対象の転写および発現につながるウイルスDNA二重鎖変換という一連の連続的な事象によって生じる。（Colella et al., Mol Ther Methods Clin Dev. 2017 Dec 1; 8: 87-104.）。

10

【0423】

本発明によるアデノ随伴ウイルスベクター

AAVは、パルボウイルス科のディペンドウイルス属に属するウイルスを指す。AAVゲノムは、約4.7キロベースの長さであり、ポジティブまたはネガティブセンスのいずれかであり得る直鎖一本鎖デオキシリボ核酸（ssDNA）からなる。ゲノムは、DNA鎖の両端に逆位末端反復（ITR）、ならびに二つのオープンリーディングフレーム（ORF）：repおよびcapを含む。repフレームは、AAVライフサイクルに必要な非構造複製（Rep）タンパク質をコードする四つの重複遺伝子から作製されている。capフレームは、構造VPカプシドタンパク質：VP1、VP2、およびVP3の重複ヌクレオチド配列を含み、それらは一緒に相互作用して、正二十面体型カプシドを形成する。

20

【0424】

末端145ヌクレオチドは、自己相補的であり、T字形状のヘアピンを形成する、エネルギー的に安定した分子内二本鎖が形成され得るように組織化される。これらのヘアピン構造は、ウイルスDNA複製の起源として機能し、細胞DNAポリメラーゼ複合体のプライマーとしての役目を果たす。哺乳類細胞における野生型AAV感染に続いて、rep遺伝子（すなわち、Rep78およびRep52）は、それぞれ、P5プロモーターおよびP19プロモーターから発現され、両方のRepタンパク質は、ウイルスゲノムの複製において機能を有する。rep ORFにおけるスプライシング事象は、実際には四つのRepタンパク質（すなわち、Rep78、Rep68、Rep52、およびRep40）の発現をもたらす。しかしながら、哺乳類細胞におけるRep78およびRep52タンパク質をコードする非スプライシングmRNAは、AAVベクター生産に十分であることが示されている。また、昆虫細胞では、Rep78およびRep52タンパク質はAAVベクター生産に十分である。

30

【0425】

AAVベクターは、典型的にはrepおよびcapフレームを欠く。かかるAAVベクターは、repおよびcap遺伝子産物（すなわち、AAV RepおよびCapタンパク質）をコードおよび発現するベクターでトランスフェクトされている宿主細胞中に存在する場合、複製および感染性ウイルス粒子中にパッケージングされてもよく、宿主細胞は、アデノウイルスオープンリーディングフレームE4orf6からタンパク質をコードおよび発現するベクターでトランスフェクトされている。

40

【0426】

一実施形態では、本発明は、哺乳動物ENPP1または哺乳動物ENPP3をコードする配列を含むアデノ随伴ウイルス（AAV）発現ベクターに関し、哺乳動物に投与すると、ベクターは、細胞内のENPP1またはENPP3前駆体を発現し、前駆体は、そのカルボキシ末端でENPP1またはENPP3のアミノ末端に融合されたアズロシジニング

50

ナルペプチドを含む。ENPP1またはENPP3前駆体は、IgGFc領域またはヒトアルブミンなどの安定化ドメインを含み得る。細胞から前駆体が分泌されると、シグナルペプチドは、切断され、酵素的に活性な可溶性哺乳動物ENPP1またはENPP3は、細胞外に提供される。

【0427】

AAV発現ベクターは、アズロシジシグナルペプチド配列および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（ENPP1）ポリペプチド配列を含むポリペプチドをコードする組み換え核酸配列に動作可能に連結された転写調節領域を含むヌクレオチド配列に動作可能に連結された転写調節領域を含む発現カセットを含み得る。

【0428】

一部の実施形態では、発現カセットは、プロモーターおよびエンハンサー、コザック配列GCCACCATGG、哺乳動物NPP1タンパク質をコードするヌクレオチド配列または哺乳動物NPP3タンパク質をコードするヌクレオチド配列、他の好適な調節エレメント、ならびにポリアデニル化信号を含む。

【0429】

一部の実施形態では、本発明によるAAVベクターのAAV組み換えゲノムは、repオープンリーディングフレームおよび／またはcapオープンリーディングフレームを欠く。

【0430】

本開示によるAAVベクターは、任意の血清型に由来するカプシドを含む。一般に、AAV血清型は、アミノ酸および核酸レベルで顕著な相同性のゲノム配列を有し、同一の遺伝的機能のセットを提供し、実質的に同一の機序を介して複製およびアセンブリする。特に、本発明のAAVは、AAV（AAV1）、AAV2、AAV3（タイプ3Aおよび3Bを含む）、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、トリAAV、ウシAAV、イヌAAV、ウマAAV、またはヒツジAAVの血清型1に属し得る。

【0431】

異なるAAV血清型のゲノムの配列の例は、文献またはGenBankなどの公開データベースで見出され得る。例えば、GenBankアクセッション番号NC_001401.2（AAV2）、NC_001829.1（AAV4）、NC_006152.1（AAV5）、AF028704.1（AAV6）、NC_006260.1（AAV7）、NC_006261.1（AAV8）、AX753250.1（AAV9）、およびAX753362.1（AAV10）などである。

【0432】

一部の実施形態では、本発明によるアデノ随伴ウイルスベクターは、AAV2、AAV5、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、およびAAVrh10血清型からなる群から選択される血清型に由来するカプシドを含む。別の実施形態では、AAVの血清型は、AAV8である。ウイルスベクターがカプシドタンパク質をコードする配列を含む場合、これらは、AAVを一つもしくは複数の特定の細胞型に配向するために、または標的ベクターの細胞への送達の効率を増加させるために、またはAAVの精製もしくは検出を促進するために、または宿主応答を低減するために、外因性配列を含むように修飾され得る。

【0433】

その内容が参照によりそれらの全体で本明細書に組み込まれる、公開された出願US2017/0290926-Smith et al. は、AAVベクターが生成、送達、および投与されるプロセスを詳細に説明している。

【0434】

本発明による有用なアデノウイルスベクター

アデノウイルスは、所望の遺伝子産物（例えば、ENPP1またはENPP3）をコードおよび発現するように操作されてもよく、同時に、正常な溶解ウイルスライフサイクル

10

20

30

40

50

で複製するその能力に関して不活性化される。加えて、アデノウイルスは、気道上皮に対して天然指向性を有する。ウイルスは、気道に見られるような静止細胞に感染することができ、レトロウイルスよりも大きい利点を提供する。アデノウイルス発現は、宿主細胞染色体へのウイルスDNAの組み込みなしで達成され、それによって、挿入変異誘発に関する懸念を軽減する。更に、アデノウイルスは、長年にわたって、優れた安全性プロファイルを有する生腸ワクチンとして使用されてきた (Schwartz, A. R. et al. (1974) Am. Rev. Respir. Dis. 109:233-238)。最後に、アデノウイルス介在性遺伝子導入は、アルファ-1-抗トリプシンおよびCFTFのコットンラットの肺への導入を含むいくつかの事例で実証されている (Rosenfeld, M. A. et al. (1991) Science 252:431-434; Rosenfeld et al., (1992) Cell 68:143-155)。更に、アデノウイルスをヒトの癌の原因物質として確立しようとする広範な研究は、一様に否定的であった (Green, M. et al. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:6606)。

【0435】

偽アデノウイルスベクター (PAV) - PAVs は、アデノウイルス逆位末端反復と、ヘルパーウイルス依存性のベクターの複製およびパッケージングに必要な最小のアデノウイルス5'配列と、を含有する。これらのベクターは、潜在的に有害なウイルス遺伝子を含有せず、36kb近い異物に対する理論的容量を有し、合理的に高い力価で産生され、分裂および非分裂ヒト標的細胞型に対する親ウイルスの指向性を維持し得る。PAVベクターは、プラスミド媒介性構築物、または感染性ウイルス粒子のいずれかとして維持され得る。プラスミド構築物として、PAVは、野生型または欠損型ヘルパーウイルスのいずれかによる、これらの配列および任意の所望の追加の外因性遺伝物質の効率的な複製およびパッケージングに必要な野生型アデノウイルス2型からの最小限の配列から構成される。

【0436】

その内容が参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれるGregoryらの米国特許公開第7,318,919号は、アデノウイルスベクターが生成、送達されるプロセス、および疾患治療のためのそれらの対応する使用について詳細に説明している。本発明は、ENPP1またはENPP3をコードするヌクレオチドをそれを必要とする対象に送達するためのアデノウイルスベクターの使用、ならびにそれを使用する治療方法を企図している。

【0437】

本発明による有用な単純ヘルペスベクター

単純ヘルペスベクター (HSV系ウイルスベクター) は、核酸配列を多数の細胞型に導入するためのベクターとしての使用に好適である。成熟HSVビリオンは、152kbである線形二本鎖DNA分子からなるウイルスゲノムを有する、エンベロープされた二面体カプシドからなる。別の実施形態では、HSV系ウイルスベクターは、少なくとも一つの必須HSV遺伝子を欠損している。一部の実施形態では、少なくとも一つの必須HSV遺伝子が欠損しているHSV系ウイルスベクターは、複製欠損である。大部分の複製欠損HSVベクターは、複製を防止するために、一つ以上の最初期、初期、または後期HSV遺伝子を除去するための欠失を含有する。例えば、HSVベクターは、ICP4、ICP22、ICP27、ICP47、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される最初期遺伝子を欠損し得る。HSVベクターの利点は、長期DNA発現を結果的にもたらし得る潜伏段階に入るその能力、および最大25kbの外因性DNA挿入を収容し得るその大きいウイルスDNAゲノムである。

【0438】

HSV系ベクターは、例えば、Prestonらの米国特許第5,837,532号、Wickhamらの同第5,846,782号、およびDeLucaらの同第5,804,413号、ならびにPrestonらの国際特許出願第WO91/02788号、Pr

estonらの同第WO96/04394号、DeLucaらの同第WO98/15637号、およびGloriosoらの同第WO99/06583号に説明され、これらは、参照により本明細書に組み込まれる。HSVベクターは、HSVゲノムの早期領域のみ、HSVゲノムの最初期領域のみ、HSVゲノムの後期領域のみ、またはHSVゲノムの早期および後期両方の領域の複製必須遺伝子機能を欠損し得る。HSVベクターの産生は、当該技術分野で周知の標準的な分子生物学的技術を使用することを伴う。

【0439】

複製欠損HSVベクターは、典型的には、複製欠損HSVベクターには存在しないが、ウイルス増殖に必要とされる遺伝子機能を、ウイルスベクターストックの高い力価を生成するために適切なレベルで提供する相補細胞株で産生される。タンパク質をコードする核酸配列の発現は、核酸配列に動作可能に連結された好適な発現制御配列によって制御される。「発現制御配列」は、別の核酸配列の発現（典型的には、かつ好ましくは転写）を促進、増強、または制御する任意の核酸配列である。

【0440】

好適な発現制御配列としては、構成的プロモーター、誘導性プロモーター、抑制性プロモーター、およびエンハンサーが挙げられる。ベクター中のタンパク質をコードする核酸配列は、その内因性プロモーターによって、または好ましくは、非天然プロモーター配列によって調節され得る。好適な非天然プロモーターの例としては、ヒトサイトメガロウイルス（HCMV）最初期プロモーター（HCMV IEp）などのHCMVプロモーター、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）長末端反復プロモーターなどのHIV由来のプロモーター、ホスホグリセリン酸キナーゼ（PGK）プロモーター、ラウス肉腫ウイルス（RSV）長末端反復などのRSVプロモーター、マウス乳腺腫瘍ウイルス（MMTV）プロモーター、Lap2プロモーター、またはヘルペスチミジンキナーゼプロモーター（Wagner et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 78, 1444-1445 (1981))、SV40またはエプスタインバーウイルス由来のプロモーターなどが挙げられる。別の実施形態では、プロモーターは、HCMV IEpである。

【0441】

プロモーターはまた、誘導性プロモーター、すなわち、適切なシグナルに応答して上方および／または下方調節されるプロモーターであってもよい。例えば、薬学的剤によって上方調節される発現制御配列は、疼痛管理用途において特に有用である。例えば、プロモーターは、薬学的誘導性プロモーター（例えば、テトラサイクリンに応答する）であり得る。プロモーターは、当該技術分野で公知の方法によって、例えば、ゲノムの所与の領域における固有の制限部位の導入によって、ベクターのゲノム内に導入され得る。

【0442】

Gloriosoらの米国特許公報US 7,531,167では、単純ヘルペスベクターが生成、送達されるプロセス、および疾患の治療のためのそれらの対応する使用について詳細に説明されており、その内容は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。本発明は、ENPP1またはENPP3をコードするヌクレオチドを必要としている対象にそれを送達するための単純ヘルペスベクターの使用、ならびにそれを使用する治療方法を企図している。

【0443】

本発明による有用なアルファウイルスベクター

アルファウイルス発現ベクターは、シンドビスウイルス（SIN）、セムリキ森林ウイルス（SFV）、およびベネズエラウマ脳炎（VEE）ウイルスを含む、異なるタイプのアルファウイルスから開発されてきた。アルファウイルスレプリコンは、その5'末端に、ウイルスRNAが細胞内にトランスフェクトされたときに翻訳されるウイルス複製体（Rep）をコードするオープンリーディングフレームを含有する。Repは、ポリタンパク質として発現され、その後、四つのサブユニット（nsps1~4）に処理される。未処理Repは、RNAベクターをマイナス鎖RNAにコピーしてもよく、これは、ラン

スフェクションまたは感染後最初の3～4時間の間のみ行われるプロセスである。処理されると、Repは、より多くのレプリコン分子を合成するためのテンプレートとして、マイナス鎖RNAを使用することになる。処理されたRepは、マイナス鎖RNA内の内部配列、またはサブゲノムプロモーターを認識することができ、そこから、レプリコンの3'末端に対応するサブゲノムプラス鎖RNAを合成することになる。このサブゲノムRNAは、翻訳されて、異種タンパク質を大量に産生することになる。

【0444】

nsp2 (nsp2中のSIN P726Lベクター)中の位置726の単一アミノ酸変化(Lに対するP)を含有するSINから単離された非細胞変性変異体は、Repハイパープロセッシングを示した(Frollov et al., 1999, J. Virol. 73: 3854-65)。この変異体は、BHK細胞において連続複製を効率的に確立することができた。この非細胞変性SINベクターは、元のSINベクターで取得されたそれらのうち約4%の良好な安定性レベルおよび発現レベルを有する長期間の導入遺伝子発現を提供することができるため、インビトロで広く使用されている(Agapov et al., 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 95: 12989-94)。同様に、Smerdouらの特許出願第WO2008065225号は、非細胞変性SFVベクターが、複製nsp2サブユニット中に変異R649H/P718Tを有すると説明している。上述のベクターは、その抵抗性遺伝子がアルファウイルスベクターに組み込まれる抗生物質の存在下で培養することによって、関心対象の遺伝子を構成的かつ安定的に発現することができる細胞株を取得することを可能にする(Casales et al., 2008, Virology. 376: 242-51)。

【0445】

本発明は、ENPP1またはENPP3などの関心対象の遺伝子の配列が、部位特異的組み換えの認識配列とともに組み込まれている、アルファウイルスレプリコンに相補的なDNA配列を含むベクターを設計することを企図する。前述のベクターによって、関心対象の遺伝子の配列を含むアルファウイルスレプリコンが細胞ゲノム内に組み込まれた細胞を取得および選択することができ、その結果、細胞は、ENPP1またはENPP3ポリペプチドを安定的に発現する。本発明はまた、アルファウイルスレプリコンが誘導性プロモーターの制御下にある発現ベクターを生成することも企図する。所与のリガンドの存在下で、アルファウイルスレプリコン転写を調節するプロモーターの活性を正に調節することができる転写アクチベーターをコードする発現カセットを組み込むことによって更に修飾されている細胞に組み込まれたときの前述のベクター。

【0446】

その内容が参照によりその全体が本明細書に組み込まれるArandaらの米国特許公報US 10,011,847には、アルファウイルスベクターが生成、送達されるプロセス、および疾患治療のためのそれらの対応する使用が詳細に説明されている。本発明は、ENPP1またはENPP3をコードするヌクレオチドを必要としている対象にそれを送達するためのアルファウイルスベクターの使用、ならびにそれを使用する治療方法を企図している。

【0447】

本発明による有用なレンチウイルスベクター

レンチウイルスは、レトロウイルス科のウイルス属に属し、長い潜伏期間によって特徴付けられる。レンチウイルスは、宿主細胞のDNA内に相当量のウイルスRNAを送達し、非分裂細胞に感染することができるレトロウイルスの中でも独自の能力を有し得る。レンチウイルスベクター、特にHIV-1由来のそれらは、広く研究されており、頻繁に使用されるベクターである。レンチウイルスベクターバックボーンの進化、および組み換えDNA分子(導入遺伝子)を標的細胞内に送達するウイルスの能力は、遺伝療法およびインビトロの組み換えタンパク質産生で機能的遺伝子の復元におけるそれらの使用につながっている。

【0448】

本発明は、ENPP1またはENPP3などの目的のタンパク質を発現する好適なプロモーターおよび導入遺伝子を含むレンチウイルスベクターを企図する。典型的には、ベクターのバックボーンは、SIV1またはアフリカミドリザルSIV（SIV-AGM）などの、類人猿免疫不全ウイルス（SIV）由来である。一実施形態では、プロモーターは、好ましくは、ハイブリッドヒトCMVエンハンサー／EF1a（hCEF）プロモーターである。本発明は、レンチウイルスベクターの製造方法、関心対象の遺伝子を発現するレンチウイルスベクターを含む組成物、ならびに石灰化または骨化の疾患を治療するためにENPP1またはENPP3タンパク質を発現する遺伝子療法における使用を包含する。本発明によるレンチウイルスベクターは、治療用タンパク質の分泌を促進するための遺伝子療法の方法にも使用され得る。更なる例として、本発明は、気道または循環器系の内腔への治療用タンパク質の分泌を提供する。したがって、本発明によるベクターの投与、および気道細胞によるその取り込みは、「工場」としての肺（または鼻もしくは気道）の使用を可能にして、治療用タンパク質を生成してもよく、次いで、治療用タンパク質が分泌され、治療レベルで全身循環に入り、治療効果を引き出すために関心対象の細胞／組織に移動し得る。細胞内または膜タンパク質とは対照的に、そのような分泌されたタンパク質の産生は、形質導入される特定の疾患標的細胞に依存せず、これは、顕著な利点であり、高レベルのタンパク質発現を達成する。したがって、心血管疾患および血液障害などの、気道疾患ではない他の疾患もまた、レンチウイルスベクターによって治療され得る。本発明によるものなどのレンチウイルスベクターは、形質導入された細胞のゲノムに組み込まれ、それらを幹細胞／前駆細胞の形質導入に好適にする長期間の発現につながり得る。

10

20

【0449】

その内容が参照によりその全体が本明細書に組み込まれるAlttonらの米国特許出願公開第2017/0096684号には、レンチウイルスベクターが生成、送達されるプロセス、および疾患治療のためのそれらの対応する使用が詳細に説明されている。本発明は、ENPP1またはENPP3をコードするヌクレオチドをそれを必要とする対象に送達するためのレンチウイルスベクターの使用、ならびにそれを使用する治療方法を企図している。

【0450】

本発明による非ウイルスベクター

30

組み換え核酸の非ウイルスベクター系送達には、限定されるものではないが、バリスティックDNA、エレクトロポレーション、ソノポレーション、フォトポレーション（photoporation）、マグネトフェクション、ハイドロポレーションなどの物理的方法、およびDNA／カチオン性脂質（リポプレックス）、DNA／カチオン性ポリマー（ポリプレックス）、およびDNA／カチオン性ポリマー／カチオン性脂質（リポポリプレックス）、イオン化可能な脂質、リポイド、ペプチド系ベクターおよびポリマー系ベクターの一つ以上の使用を伴う化学的方法が含まれる。（See Nonviral gene delivery: principle, limitations, and recent progress, Al-Dosari MS et al., AAPS J. 2009 Dec; 11(4):671-81; Gascon et al., Nonviral delivery systems in gene therapy. In Gene therapy - tools and potential application. 2013; "Nonviral vectors in gene therapy - an overview.", Ramamoorthi et al., Journal of clinical and diagnostic research: JCDR vol. 9, 1 (2015) 参照）

40

【0451】

一部の実施形態では、非ウイルスベクターは、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（ENPP1）ポリペプチドまたは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-3（ENPP3）ポリペプチドの触媒ドメイン

50

をコードする組み換え核酸を伝達するために使用される。

【0452】

一部の実施形態では、非ウイルスベクターは、組み換え核酸を伝達するために使用され、前述の核酸は、(a) 肝臓特異的プロモーターと、(b) 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 (ENPP1) ポリペプチドまたは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-3 (ENPP3) ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列と、を含む。

【0453】

脂質系送達の一部の非限定的な例には、カチオン性脂質、脂質ナノエマルジョン、リポイド脂質ナノ粒子 (LPN)、および固体脂質ナノ粒子が含まれる。(Lipid Nanoparticles for Gene Delivery, Yi Zhao et al., Adv Genet. 2014 ; 88 : 13-36を参照)。

【0454】

脂質ナノ粒子 (LNP) は、細胞に、数個のヌクレオチド (RNA) から数百万個のヌクレオチド (染色体) の範囲のサイズの様々な核酸分子を濃縮し送達する力強い能力を示した。LNPはまた、標的化リガンドの組み込みによって容易に改変されて、肝臓、腎臓、脳、心臓および脾臓などの所望の関心領域への組み換え核酸の焦点送達を容易にすることができる。カチオン性脂質は、典型的には、両方を接続するリンカー構造を有する親水性頭部および疎水性尾部を正に電荷する。正電荷の頭部基は、核酸中で負電荷のホスフェート基と結合し、リボプレックスと呼ばれる固有の圧縮構造を形成する。トランスフェクション効率は、全体的な幾何学的形状、分子当たりの電荷基の数、脂質アンカーの性質、およびリンカーの結合に依存する。リボプレックスは、その正電荷により、負電荷糖タンパク質および細胞膜のプロテオグリカンと静電的に相互作用し、これは細胞の核酸の取込みを促進し得る。遺伝物質を取り囲む正電荷した脂質は、細胞内および細胞外ヌクレアーゼから保護するのに役立つ。

【0455】

一部の実施形態では、ポリエチレングリコール (PEG) などの中性ポリマーを、リボプレックスの表面コーティングとして使用して、過剰な電荷を克服し、LNPの安定性／半減期を延長することができる。一部の実施形態では、LNPは、一つ以上の鉄飽和トランスフェリン (Tf) (Huang et al., 2013)、葉酸 (Hu et al., Surfactant-free, lipo-polymerosomes stabilized by iron oxide nanoparticles/polymer interlayer for synergistically targeted and magnetically guided gene delivery. Advanced Healthcare Materials. 2014, 3 (2) : 273-282; Xiang et al. PSA-responsive and PSMA-mediated multifunctional liposomes for targeted therapy of prostate cancer. Biomaterials. 2013; 34 (28) : 6976-6991.)、アルギニルグリシルアスパラギン酸 (RGD) (Han et al., Targeted gene silencing using RGD-labeled chitosan nanoparticles. Clinical Cancer Research. 2010; 16 (15) : 3910-3922.; Majzoub et al., Uptake and transfection efficiency of PEGylated cationic liposome-DNA complexes with and without RGD-tagging, Biomaterials. 2014; 35 (18) : 4996-5005.)、およびアニサミド (Li et al., Efficient oncogene silencing and metastasis inhibition via systemic delivery of siRNA, Molecula

r Therapy. 2008; 16(5):942-946)とのコンジュゲートを含む。

【0456】

一部の実施形態では、LNPは、より特異的な送達、例えば、ジオルトエステル、オルトエステル、ビニルエーテル、ホスホルアミデート、ヒドラジン、およびベータチオプロピオネート(Romberg et al., Sheddable coatings for long-circulating nanoparticles, Pharmaceutical Research. 2008; 25(1):55-71.)を達成するために、ナノ粒子に適用されるpH感受性リンカーとコンジュゲートされる。

【0457】

一部の実施形態では、LNPは、遺伝子欠損を補正するために、コードされたポリペプチド(NPP1またはNPP3)を発現することができるベクターまたはプラスミドを含む治療用核酸を付着させることによって官能化され得る、磁気LNPと呼ばれる脂質コーティングを有する磁気コアを有する。

【0458】

一部の実施形態では、LNPは、例えば、ビタミンA結合リポソームを使用して、組み換え核酸を肝臓に送達するために、標的部分で修飾される(Sato et al., Resolution of liver cirrhosis using vitamin A-coupled liposomes to deliver siRNA against a collagen-specific chaperone. Nature Biotechnology. 2008; 26(4):431-442.)。

【0459】

一部の実施形態では、LNPは、それらが、限定されるものではないが、コラーゲンタイプVI受容体(Du et al., Cyclic Arg-Gly-Asp peptide-labeled liposomes for targeting drug therapy of hepatic fibrosis in rats, Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. 2007; 322(2):560-568.)、マンノース-6-ホスフェート受容体(Adrian et al., Effects of a new bioactive lipid-based drug carrier on cultured hepatic stellate cells and liver fibrosis in bile duct-ligated rats, Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. 2007; 321(2):536-543)、およびガラクトース受容体(Mandal et al., Hepatoprotective activity of liposomal flavonoid against arsenite-induced liver fibrosis, Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. 2007; 320(3):994-1001)などの特異的受容体に向けられるように、標的部分で修飾される。

【0460】

イオン化可能な脂質は、ポリアニオン性核酸と混合された場合にナノ粒子に自己構築できる脂質のクラスである。pKa値が調節されたイオン化可能なカチオン性脂質は、核酸ペイロードを増加させ、遺伝子療法の治療有効性を強化する。低pH状態である製剤化のステップでは、イオン化可能な脂質は、正電荷となり、高い核酸負荷をもたらす。注射時に、pHがイオン化可能な脂質のpKaを超える生理学的環境では、LNPの表面は、網膜内皮系(RES)取り込みを回避し、循環を改善し、毒性を低減できるほぼ中性電荷を有する。しかしながら、ナノ粒子が、pHが脂質のpKaよりも低いエンドソーム内に取

10

20

30

40

50

ム脂質と会合し、エンドソームの脱出を促進する。イオン化可能なカチオン性脂質の一部の非限定的な例としては、6.7のpKaを有するDLin-KC2-DMA (2,2-ジリノール-4-(2-ジメチルアミノエチル)-[1,3]-ジオキソラン)、および6.4のpKaを有するDLin-MC3-DMA (1,2-ジリノールオキシン-N,N-ジメチル-3-アミノプロパン)が挙げられる。(Jayaraman et al., Maximizing the potency of siRNA lipid nanoparticles for hepatic gene silencing in vivo, Angewandte Chemie International Edition. 2012; 51(34):8529-8533)。

【0461】

リピドイドは、三級アミンを含有する脂質様物質の新しいクラスである。それらは、市販のアミンをコンジュゲートすることによって調製される。特に、リピドイドライブラリーを生成するための合成反応は、溶媒または触媒の非存在下で進行し、それによって精製または濃縮ステップを取り除く。リピドイドおよび脂質は、遺伝子送達のためのリポソームの形成を駆動する物理化学的特性の多くを共有する。しかしながら、リピドイドは合成および精製が容易であり、効率的なDNA送達のためのコリピド (colipid) を必要としない。(Akin et al., Development of lipidoid siRNA formulations for systemic delivery to the liver, Molecular Therapy. 2009; 17(5):872-879.; Sun et al., Combinatorial library of lipidoids for in vitro DNA delivery. Bioconjugate Chemistry. 2012; 23(1):135-140参照)。

【0462】

脂質エマルションは、乳化剤によって安定化された別の液体中の一つの非混和性液体の分散液である。それらは、約200nmの粒子であり、オイル、水、および界面活性剤を含む。組み換え核酸は、脂質エマルションの生成前に混合物に添加され、これにより、エマルションにて生成されたナノ粒子によって核酸を封入することができる。

【0463】

固体脂質粒子は、室温および体温の両方で固体状態のままである脂質から生成される。それは、カチオン性脂質および脂質ナノエマルジョンの両方の利点を有する。カチオン性固体脂質ナノ粒子は、ヌクレアーゼ分解から核酸を効果的に保護することができる。

【0464】

ペプチド系ベクターは、タイトでコンパクトで、DNA、標的特異的細胞受容体を保護し、エンドソーム膜を破壊し、遺伝子カーゴを核内に送達するという点において、他の非ウイルスベクターよりも有利である。リジンおよび／またはアルギニンなどの塩基性残基が豊富なカチオン性ペプチドは、組み換え核酸の送達に一般的に使用される。ペプチドリガンドをポリプレックスまたはリポプレックスに付加することにより、ベクターを特定の標的に向けることができる。一部の実施形態では、ウイルスタンパク質から採取された短いペプチド配列は、ベクターが、遺伝物質の核内への輸送を支援する核局在化シグナルを提供することを可能にする。これらの利点のために、ペプチドはカチオン性リポプレックスまたはポリプレックスを機能化するために頻繁に使用される(Kang et al., Peptide-based gene delivery vectors, J Mater Chem B. 2019 Mar 21; 7(11):1824-1841参照)。細胞透過性ペプチド(CPP)は、ペプチド系ベクターの一つかかるクラスであり、CPPは、インビトロおよびインビボの両方で細胞内に組み換え核酸を送達する能力を有する比較的短い、カチオン性、および／または両親媒性ペプチドである。(前述のHassane et al., B Cell penetrating peptides: overview and applications to the delivery of oligonucleotides, Cell Mol Li

f e S c i . 2 0 1 0 M a r ; 6 7 (5) : 7 1 5 - 2 6 . 参 照)

【 0 4 6 5 】

カチオン性ポリマーなどのポリマー系ベクターは、DNAと混合して、ポリプレックスと呼ばれるナノサイズの複合体を形成する。ポリプレックスは、リポプレックスよりも安定している。ポリマーは、天然および合成ポリマーに分類される。天然ポリマーの一部の非限定的な例としては、キトサン、タンパク質、およびペプチドなどの多糖類が挙げられる。キトサンは、カチオン性多糖類に基づく天然ポリマーである。それは、高濃度であっても毒性はない。それは、グルコサミンから構成される直鎖状カチオン性多糖類である。キトサンの正電荷は、負電荷を帯びたDNAと静電的に結合する。その粘膜付着性の特性を考慮すると、キトサン／DNAポリプレックスは、経口および経鼻遺伝子療法に適している。一部の実施形態では、キトサンは、葉酸とコンジュゲートされて、細胞内バリアを効果的に通過する。

10

【 0 4 6 6 】

合成ポリマーの一部の非限定的な例としては、ポリエチレン鉱物 (PEI)、デンドリマー、およびポリホスホエステルが挙げられる。PEIなどのカチオン性ポリマーは、高密度アミン基を有し、これはタンパク質スポンジ効果を発揮し、最終的にエンドソーム pH の酸性化を停止する。これにより、コンパートメント内に塩化物が流入し、浸透圧が上昇し、エンドソーム膜の膨張および破裂につながる。一部の実施形態では、組み換え核酸の送達に使用される合成ポリマーは、生分解性である。ポリ (DL-ラクチド) (PLA) およびポリ (DL-ラクチド-コグリコシド) (PLGA) は、生分解性ポリエステルであり、バルク加水分解を受け、結果として組み換え核酸の持続的送達を提供する。デンドリマーは、サイズおよび形状が対称であり、末端基の機能を備える。デンドリマーは、正に電荷された周辺基が生理的 pH で核酸と相互作用する場合、組み換え核酸に結合する。ナノメートルサイズのため、細胞膜、細胞小器官、およびタンパク質と効果的に相互作用することができる。ポリメタクリレートは、ポリヌクレオチドをナノメートルサイズの粒子に凝縮することができるビニル系ポリマーである。

20

【 0 4 6 7 】

したがって本開示は、組み換え核酸を送達する非ウイルスベクターの使用を想定し、前述の核酸は、前述のコードされたポリペプチドを発現することができるベクターまたはプラスミドを含む。

30

【 0 4 6 8 】

配列

配列番号 1 - ENPP1 アミノ酸配列 - 野生型 (位置 332 は太字で示されている)

40

50

【表 1 - 1】

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	Val	Leu	Ser	Leu
65					70					75				80	
Val	Leu	Ser	Val	Cys	Val	Leu	Thr	Thr	Ile	Leu	Gly	Cys	Ile	Phe	Gly
				85					90					95	
Leu	Lys	Pro	Ser	Cys	Ala	Lys	Glu	Val	Lys	Ser	Cys	Lys	Gly	Arg	Cys
		100					105					110			
Phe	Glu	Arg	Thr	Phe	Gly	Asn	Cys	Arg	Cys	Asp	Ala	Ala	Cys	Val	Glu
	115						120					125			
Leu	Gly	Asn	Cys	Cys	Leu	Asp	Tyr	Gln	Glu	Thr	Cys	Ile	Glu	Pro	Glu
	130					135						140			
His	Ile	Trp	Thr	Cys	Asn	Lys	Phe	Arg	Cys	Gly	Glu	Lys	Arg	Leu	Thr
145					150					155				160	
Arg	Ser	Leu	Cys	Ala	Cys	Ser	Asp	Asp	Cys	Lys	Asp	Lys	Gly	Asp	Cys
			165						170				175		
Cys	Ile	Asn	Tyr	Ser	Ser	Val	Cys	Gln	Gly	Glu	Lys	Ser	Trp	Val	Glu
		180						185					190		
Glu	Pro	Cys	Glu	Ser	Ile	Asn	Glu	Pro	Gln	Cys	Pro	Ala	Gly	Phe	Glu
	195						200					205			
Thr	Pro	Pro	Thr	Leu	Leu	Phe	Ser	Leu	Asp	Gly	Phe	Arg	Ala	Glu	Tyr
	210					215					220				
Leu	His	Thr	Trp	Gly	Gly	Leu	Leu	Pro	Val	Ile	Ser	Lys	Leu	Lys	Lys
225					230					235				240	
Cys	Gly	Thr	Tyr	Thr	Lys	Asn	Met	Arg	Pro	Val	Tyr	Pro	Thr	Lys	Thr
			245					250					255		
Phe	Pro	Asn	His	Tyr	Ser	Ile	Val	Thr	Gly	Leu	Tyr	Pro	Glu	Ser	His
		260						265					270		
Gly	Ile	Ile	Asp	Asn	Lys	Met	Tyr	Asp	Pro	Lys	Met	Asn	Ala	Ser	Phe
	275					280						285			
Ser	Leu	Lys	Ser	Lys	Glu	Lys	Phe	Asn	Pro	Glu	Trp	Tyr	Lys	Gly	Glu
	290					295					300				
Pro	Ile	Trp	Val	Thr	Ala	Lys	Tyr	Gln	Gly	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Phe
305					310					315				320	
Phe	Trp	Pro	Gly	Ser	Asp	Val	Glu	Ile	Asn	Gly	Ile	Phe	Pro	Asp	Ile
			325						330				335		
Tyr	Lys	Met	Tyr	Asn	Gly	Ser	Val	Pro	Phe	Glu	Glu	Arg	Ile	Leu	Ala
		340						345					350		
Val	Leu	Gln	Trp	Leu	Gln	Leu	Pro	Lys	Asp	Glu	Arg	Pro	His	Phe	Tyr
	355						360						365		

10

20

30

40

50

【表 1 - 2】

Thr	Leu	Tyr	Leu	Glu	Glu	Pro	Asp	Ser	Ser	Gly	His	Ser	Tyr	Gly	Pro		
370			375			380											
Val	Ser	Ser	Glu	Val	Ile	Lys	Ala	Leu	Gln	Arg	Val	Asp	Gly	Met	Val		
385			390			395			400								
Gly	Met	Leu	Met	Asp	Gly	Leu	Lys	Glu	Leu	Asn	Leu	His	Arg	Cys	Leu		
405				410				415									
Asn	Leu	Ile	Leu	Ile	Ser	Asp	His	Gly	Met	Glu	Gln	Gly	Ser	Cys	Lys		
420			425			430											
Lys	Tyr	Ile	Tyr	Leu	Asn	Lys	Tyr	Leu	Gly	Asp	Val	Lys	Asn	Ile	Lys		
435			440			445											
Val	Ile	Tyr	Gly	Pro	Ala	Ala	Arg	Leu	Arg	Pro	Ser	Asp	Val	Pro	Asp		10
450			455			460											
Lys	Tyr	Tyr	Ser	Phe	Asn	Tyr	Glu	Gly	Ile	Ala	Arg	Asn	Leu	Ser	Cys		
465			470			475			480								
Arg	Glu	Pro	Asn	Gln	His	Phe	Lys	Pro	Tyr	Leu	Lys	His	Phe	Leu	Pro		
485				490				495									
Lys	Arg	Leu	His	Phe	Ala	Lys	Ser	Asp	Arg	Ile	Glu	Pro	Leu	Thr	Phe		
500			505			510											
Tyr	Leu	Asp	Pro	Gln	Trp	Gln	Leu	Ala	Leu	Asn	Pro	Ser	Glu	Arg	Lys		
515			520			525											
Tyr	Cys	Gly	Ser	Gly	Phe	His	Gly	Ser	Asp	Asn	Val	Phe	Ser	Asn	Met		
530			535			540											
Gln	Ala	Leu	Phe	Val	Gly	Tyr	Gly	Pro	Gly	Phe	Lys	His	Gly	Ile	Glu		20
545			550			555			560								
Ala	Asp	Thr	Phe	Glu	Asn	Ile	Glu	Val	Tyr	Asn	Leu	Met	Cys	Asp	Leu		
565				570				575									
Leu	Asn	Leu	Thr	Pro	Ala	Pro	Asn	Asn	Gly	Thr	His	Gly	Ser	Leu	Asn		
580			585			590											
His	Leu	Leu	Lys	Asn	Pro	Val	Tyr	Thr	Pro	Lys	His	Pro	Lys	Glu	Val		
595			600			605											
His	Pro	Leu	Val	Gln	Cys	Pro	Phe	Thr	Arg	Asn	Pro	Arg	Asp	Asn	Leu		
610			615			620											
Gly	Cys	Ser	Cys	Asn	Pro	Ser	Ile	Leu	Pro	Ile	Glu	Asp	Phe	Gln	Thr		
625			630			635			640								
Gln	Phe	Asn	Leu	Thr	Val	Ala	Glu	Glu	Lys	Ile	Ile	Lys	His	Glu	Thr		30
645				650				655									
Leu	Pro	Tyr	Gly	Arg	Pro	Arg	Val	Leu	Gln	Lys	Glu	Asn	Thr	Ile	Cys		
660			665			670											
Leu	Leu	Ser	Gln	His	Gln	Phe	Met	Ser	Gly	Tyr	Ser	Gln	Asp	Ile	Leu		
675			680			685											
Met	Pro	Leu	Trp	Thr	Ser	Tyr	Thr	Val	Asp	Arg	Asn	Asp	Ser	Phe	Ser		
690			695			700											
Thr	Glu	Asp	Phe	Ser	Asn	Cys	Leu	Tyr	Gln	Asp	Phe	Arg	Ile	Pro	Leu		
705			710			715			720								
Ser	Pro	Val	His	Lys	Cys	Ser	Phe	Tyr	Lys	Asn	Asn	Thr	Lys	Val	Ser		
725				730				735									
Tyr	Gly	Phe	Leu	Ser	Pro	Pro	Gln	Leu	Asn	Lys	Asn	Ser	Ser	Gly	Ile		40
740			745			750											

【表 1 - 3】

Tyr	Ser	Glu	Ala	Leu	Leu	Thr	Thr	Asn	Ile	Val	Pro	Met	Tyr	Gln	Ser
755								760						765	
Phe	Gln	Val	Ile	Trp	Arg	Tyr	Phe	His	Asp	Thr	Leu	Leu	Arg	Lys	Tyr
770						775					780				
Ala	Glu	Glu	Arg	Asn	Gly	Val	Asn	Val	Val	Ser	Gly	Pro	Val	Phe	Asp
785				790						795				800	
Phe	Asp	Tyr	Asp	Gly	Arg	Cys	Asp	Ser	Leu	Glu	Asn	Leu	Arg	Gln	Lys
			805					810					815		
Arg	Arg	Val	Ile	Arg	Asn	Gln	Glu	Ile	Leu	Ile	Pro	Thr	His	Phe	Phe
			820					825					830		
Ile	Val	Leu	Thr	Ser	Cys	Lys	Asp	Thr	Ser	Gln	Thr	Pro	Leu	His	Cys
		835				840						845			
Glu	Asn	Leu	Asp	Thr	Leu	Ala	Phe	Ile	Leu	Pro	His	Arg	Thr	Asp	Asn
		850				855						860			
Ser	Glu	Ser	Cys	Val	His	Gly	Lys	His	Asp	Ser	Ser	Trp	Val	Glu	Glu
865				870						875				880	
Leu	Leu	Met	Leu	His	Arg	Ala	Arg	Ile	Thr	Asp	Val	Glu	His	Ile	Thr
			885					890					895		
Gly	Leu	Ser	Phe	Tyr	Gln	Gln	Arg	Lys	Glu	Pro	Val	Ser	Asp	Ile	Leu
		900						905					910		
Lys	Leu	Lys	Thr	His	Leu	Pro	Thr	Phe	Ser	Gln	Glu	Asp			
		915						920				925			

10

20

【0469】

上述のNPP1アミノ酸配列は、細胞質ドメイン、膜貫通ドメイン、SMB1ドメイン、SMB2ドメイン、ホスホジエステラーゼ／触媒ドメイン、リンカードメイン、およびヌクレアーゼドメインを含む。SMB1ドメイン、SMB2ドメイン、触媒ドメイン、リンカードメイン、およびヌクレアーゼドメインは、合わせて細胞外ドメインと呼ばれる。残基1～76 (Met Glu Arg～Thr Tyr Lys) は、細胞質ドメインに対応する。残基77～97 (Val Leu Ser～Phe Gly Leu) は、膜貫通ドメインに対応する。残基99～925 (Pro Ser Cys～Gln Glu Asp) は、細胞外ドメインに対応する。残基104～144 (Glu Val Lys～Glu Pro Glu) はSMB1ドメインに対応し、残基145～189 (His Ile Trp～Glu Lys Ser) はSMB2ドメインに対応する。残基597～647は、触媒ドメインとヌクレアーゼドメインを接続するリンカードメインに対応する。残基191～591 (Val Glu Glu～Gly Ser Leu) は、触媒／ホスホジエステラーゼドメインに対応する。残基654～925 (His Glu Thr～Gln Glu Asp) は、ヌクレアーゼドメインに対応する。残基番号およびドメイン分類は、ヒトNPP1配列に基づく (NCBIアクセッションNP_006199 / Uniprot-Sussprot P22413)。

30

40

【0470】

配列番号2 - アズロシジン-ENPP1-FC

【表 2】

MTRLTVLALLAGLLASSRA**APSCAKEVKSCKGRCFERTFGNCRCDAAACVELGNCCLDYQETCIEPEHIWTCNKFRCGEKR
 LTRSLCACSDDCDKGDCCINYSSVCQGEKSWVEEPCESINEPQCPAGFETPPTLLFSLDGFRAEYLHTWGGLLPVISKLKK
 CGTYTKNMRPVYPTKTFPNHYSIVTGLYPESHGIIDNKMYDPKMNASFSLKSKEKFNPEWYKGEPIWVTAKYQGLKSGTFFW
 PGSDVEINGIFPDIYKMYNGSVPFEEILAVLQWLQLPKDERPHFYTLYLEEPDSSGHSYGPVSSEVIKALQRVDGMVGMMLM
 DGLKELNLHRCLNLILISDHGMEQGSCKKYIYLNKYLGDVKNIKVIYGPAARLRPSDVPDKYYSFNIEGIARNLSREPNQH
 FKPYLKHFLPKRLHFAKSDRIEPLTFYLDPQWQLALNPSEKRYCGSGFHGSDNVFSNMQUALFVGYPGPFKHGIEADTFENIE
 VYNLMCDLLNLTPAPNNGTHGSLNHLKPNVYTPKHPKEVHPLVQCPFTRNPRDNLGCSCNPSILPIEDFQTQFNLTVAEEK
 I IKHETLPYGRPRVLQKENTICLLSQHQFMSGYSQDILMPLWTSYTVDRNDSFSTEDFSNCLYQDFRIPLSPVHKCSFYKNN
 TKVSYGFLSPPQLNKNSSGIYSEALLTNIVPMYQSFQVIWRYFHDTLRLKYAEERNGVNVVSGPVDFDYDGRCDLENLR
 QKRRVIRNQEILIPTHFFIVLTSCKDTSTPLHCENLDTLAFILPHRTDNSESCVHGKHDSSWVEELLMLHRARITDVEHIT
 GLSFYQQRKEPVSDILKLKTHLPTFSQEDLINDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE
 DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTT
 LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSFCSVMHEA
 LHNHYTQKSLSLSPGK

10

単一下線－アズロシジンシグナル配列、二重下線－ENPP1配列の始まりおよび終わり
 、太字残基－Fc配列、**は、シグナル配列の切断点を示す。

【0471】

配列番号 3 － アズロシジン－ENPP1－Alb

20

【表 3】

MTRLTVLALLAGLLASSRA**APSCAKEVKSCKGRCFERTFGNCRCDAAACVELGNCCLDYQETCIEPEHIWTCNKFRCGEKR
 LTRSLCACSDDCDKGDCCINYSSVCQGEKSWVEEPCESINEPQCPAGFETPPTLLFSLDGFRAEYLHTWGGLLPVISKLKK
 CGTYTKNMRPVYPTKTFPNHYSIVTGLYPESHGIIDNKMYDPKMNASFSLKSKEKFNPEWYKGEPIWVTAKYQGLKSGTFFW
 PGSDVEINGIFPDIYKMYNGSVPFEEILAVLQWLQLPKDERPHFYTLYLEEPDSSGHSYGPVSSEVIKALQRVDGMVGMMLM
 DGLKELNLHRCLNLILISDHGMEQGSCKKYIYLNKYLGDVKNIKVIYGPAARLRPSDVPDKYYSFNIEGIARNLSREPNQH
 FKPYLKHFLPKRLHFAKSDRIEPLTFYLDPQWQLALNPSEKRYCGSGFHGSDNVFSNMQUALFVGYPGPFKHGIEADTFENIE
 VYNLMCDLLNLTPAPNNGTHGSLNHLKPNVYTPKHPKEVHPLVQCPFTRNPRDNLGCSCNPSILPIEDFQTQFNLTVAEEK
 I IKHETLPYGRPRVLQKENTICLLSQHQFMSGYSQDILMPLWTSYTVDRNDSFSTEDFSNCLYQDFRIPLSPVHKCSFYKNN
 TKVSYGFLSPPQLNKNSSGIYSEALLTNIVPMYQSFQVIWRYFHDTLRLKYAEERNGVNVVSGPVDFDYDGRCDLENLR
 QKRRVIRNQEILIPTHFFIVLTSCKDTSTPLHCENLDTLAFILPHRTDNSESCVHGKHDSSWVEELLMLHRARITDVEHIT
 GLSFYQQRKEPVSDILKLKTHLPTFSQEDLINMKWVTFLLLFVSGSAFSGVFRREAHKSEIAHRYNDLGEQHFGLVLI
 AFSQYLQKCSYDEHAKLVQEVTDFAKTCVADESAANCDKSLHTLFGDKLCAIPNLRENYGELADCCCKQEPERNECFLOHK
 DDNPSLPPFERPEAEAMCTSFKENPTTFMGHYLHEVARRHPYFYAPELLYAEQYNEILTQCCAEADKESCLTPKLDGVKE
 KALVSSVRQRMKSSMQKFGERAFAKAWAVARLSQTFPNADFAEITKLATDLTKVNKECCHGDLLECADDRAELAKYMCENQ
 ATISSKLQTCCKPLKKAHCLSEVEHDTMPADLPAIAADFVEDQEVCKNYAEAKDVFLGTFLYEYSRRHPDYSVSLLLRL
 AKKYEATLEKCCAEANPPACYGTVLAEFQPLVEEPKNLVKTNCDLYEKLGEYGFQNAILVRYTQKAPQVSTPTLVEAARNL
 GRVGTKCCTLPEDQRLPCVEDYLSAILNRVCLLHEKTPVSEHVTKCCSGSLVERRPCFSALTVDETYVPKEFKAETFTFHS
 DICTLPEKEKQIKKQATALAELVKHKPKATAEQLKTVMDFAQLDTCCKAADKDTCFSTEGPNLVTRCKDALARSWHPQF
 EK

30

40

単一下線－アズロシジンシグナル配列、二重下線－ENPP1配列の始まりおよび終わり
 、太字残基－アルブミン配列、**は、シグナル配列の切断点を示す。

【0472】

配列番号 4 － アズロシジン－ENPP1

50

【表 4】

MTRLTVLALLAGLLASSRA**APSCAKEVKSKGRCFERTFGNCRCDAACVELGNCCLDYQETCIEPEHIWTCNKFRCGEKR
 LTRSLCACSDDCDKGDCCINYSSVCQGEKSWVEEPCESINEPQCPAGFETPPTLLFSLDGFRAEYLHTWGGLLPVISKLKK
 CGTYTKNMRPVYPTKTFPNHYSIVTGLYPESHGIDNKMYPKMNASFSLKSKEKFNPEWYKGEPWVTAKYQGLKSGTFFW
 PGSDVEINGIFPDIYKMYNGSVPFEEILAVLQWLQLPKDERPHFYTLYLEEPDSSGHSYGPVSSEVIKALQRVDGMVGMMLM
 DGLKELNLHRCLNLILISDHGMEQGSCCKYIYLNKYLGDVKNIKVIYGPAARLRPSDVPDKYYSFNIEGIARNLSCREPNQH
 FKPYLKHFLPKRLHFAKSDRIEPLTFYLDPQWQLALNPSEKRYCGSGFHGSDNVFSNMQALFVGYPGPFKHGIEADTFENIE
 VYNLMCDLLNLTPAPNNGTHGSLNHLKPNVYTPKHPKEVHPLVQCPFTRNPRDNLGCSCNPSILPIEDFQTQFNLTVAEEK
 I IKHETLPYGRPRVLQKENTICLLSQHQFMSGYSQDILMPLWTSYTVDRNDSFSTEDFSNCLYQDFRIPLSPVHKCSFYKNN
 TKVSYGFLSPPQLNKNSSGIYSEALLTTNIVPMYQSFQVIWRYFHDTLLRKYAEERNGVNVVSGPVDFDYGRCDSLENLR
 QKRRVIRNQEILIPTHFFIVLTSCKDTSQTAPSCAKEVKSKGRCFERTFGNCRCDAACVELGNCCLDYQETCIEPEHIWTC
 NKFRFCGEKRLTRSLCACSDDCDKGDCCINYSSVCQGEKSWVEEPCESINEPQCPAGFETPPTLLFSLDGFRAEYLHTWGGL
 LPVISKLKKCGTYTKNMRPVYPTKTFPNHYSIVTGLYPESHGIDNKMYPKMNASFSLKSKEKFNPEWYKGEPWVTAKYQ
 GLKSGTFFWPGSDVEINGIFPDIYKMYNGSVPFEEILAVLQWLQLPKDERPHFYTLYLEEPDSSGHSYGPVSSEVIKALQR
 VDGMVGMMLMDGLKELNLHRCLNLILISDHGMEQGSCCKYIYLNKYLGDVKNIKVIYGPAARLRPSDVPDKYYSFNIEGIARN
 LSCREPNQHFKPYLKHFLPKRLHFAKSDRIEPLTFYLDPQWQLALNPSEKRYCGSGFHGSDNVFSNMQALFVGYPGPFKHGIE
 EADTFENIEVYNLMCDLLNLTPAPNNGTHGSLNHLKPNVYTPKHPKEVHPLVQCPFTRNPRDNLGCSCNPSILPIEDFQTQ
 FNLTVAEEKI IKHETLPYGRPRVLQKENTICLLSQHQFMSGYSQDILMPLWTSYTVDRNDSFSTEDFSNCLYQDFRIPLSPV
 HKCSFYKNNTKVSYGFLSPPQLNKNSSGIYSEALLTTNIVPMYQSFQVIWRYFHDTLLRKYAEERNGVNVVSGPVDFDYG
 RCDLENLRQKRRVIRNQEILIPTHFFIVLTSCKDTSQTPLHCENLDTLAFILPHRTDNSESCVHGKHDSSWVEELMLHRA
 RITDVEHITGLSFYQQRKEPVSDILKLKTHLPTFSQED

10

20

単一下線－アズロシジシングナル配列、二重下線－ENPP1配列の始まりおよび終わり
 、**は、シグナル配列の切断点を示す。

【0473】

配列番号 5 － ENPP2アミノ酸配列－野生型

30

40

50

【表 5 - 1】

Met	Ala	Arg	Arg	Ser	Ser	Phe	Gln	Ser	Cys	Gln	Ile	Ile	Ser	Leu	Phe	
1			5					10						15		
Thr	Phe	Ala	Val	Gly	Val	Asn	Ile	Cys	Leu	Gly	Phe	Thr	Ala	His	Arg	
			20					25					30			
Ile	Lys	Arg	Ala	Glu	Gly	Trp	Glu	Glu	Gly	Pro	Pro	Thr	Val	Leu	Ser	
		35					40					45				
Asp	Ser	Pro	Trp	Thr	Asn	Ile	Ser	Gly	Ser	Cys	Lys	Gly	Arg	Cys	Phe	
	50					55					60					
Glu	Leu	Gln	Glu	Ala	Gly	Pro	Pro	Asp	Cys	Arg	Cys	Asp	Asn	Leu	Cys	
65					70					75				80		
Lys	Ser	Tyr	Thr	Ser	Cys	Cys	His	Asp	Phe	Asp	Glu	Leu	Cys	Leu	Lys	
				85					90					95		
Thr	Ala	Arg	Gly	Trp	Glu	Cys	Thr	Lys	Asp	Arg	Cys	Gly	Glu	Val	Arg	
			100					105					110			
Asn	Glu	Glu	Asn	Ala	Cys	His	Cys	Ser	Glu	Asp	Cys	Leu	Ala	Arg	Gly	
		115					120					125				
Asp	Cys	Cys	Thr	Asn	Tyr	Gln	Val	Val	Cys	Lys	Gly	Glu	Ser	His	Trp	
	130					135					140					
Val	Asp	Asp	Asp	Cys	Glu	Glu	Ile	Lys	Ala	Ala	Glu	Cys	Pro	Ala	Gly	
145					150					155				160		
Phe	Val	Arg	Pro	Pro	Leu	Ile	Ile	Phe	Ser	Val	Asp	Gly	Phe	Arg	Ala	
				165					170					175		
Ser	Tyr	Met	Lys	Lys	Gly	Ser	Lys	Val	Met	Pro	Asn	Ile	Glu	Lys	Leu	
		180						185					190			
Arg	Ser	Cys	Gly	Thr	His	Ser	Pro	Tyr	Met	Arg	Pro	Val	Tyr	Pro	Thr	
		195					200					205				
Lys	Thr	Phe	Pro	Asn	Leu	Tyr	Thr	Leu	Ala	Thr	Gly	Leu	Tyr	Pro	Glu	
	210					215					220					
Ser	His	Gly	Ile	Val	Gly	Asn	Ser	Met	Tyr	Asp	Pro	Val	Phe	Asp	Ala	
225					230					235				240		
Thr	Phe	His	Leu	Arg	Gly	Arg	Glu	Lys	Phe	Asn	His	Arg	Trp	Trp	Gly	
			245						250					255		
Gly	Gln	Pro	Leu	Trp	Ile	Thr	Ala	Thr	Lys	Gln	Gly	Val	Lys	Ala	Gly	
		260						265					270			
Thr	Phe	Phe	Trp	Ser	Val	Val	Ile	Pro	His	Glu	Arg	Arg	Ile	Leu	Thr	
		275					280					285				
Ile	Leu	Gln	Trp	Leu	Thr	Leu	Pro	Asp	His	Glu	Arg	Pro	Ser	Val	Tyr	
	290					295					300					
Ala	Phe	Tyr	Ser	Glu	Gln	Pro	Asp	Phe	Ser	Gly	His	Lys	Tyr	Gly	Pro	
305					310					315				320		
Phe	Gly	Pro	Glu	Met	Thr	Asn	Pro	Leu	Arg	Glu	Ile	Asp	Lys	Ile	Val	
				325					330					335		
Gly	Gln	Leu	Met	Asp	Gly	Leu	Lys	Gln	Leu	Lys	Leu	His	Arg	Cys	Val	
		340						345					350			
Asn	Val	Ile	Phe	Val	Gly	Asp	His	Gly	Met	Glu	Asp	Val	Thr	Cys	Asp	
		355					360					365				

10

20

30

40

50

【表 5 - 2】

Arg	Thr	Glu	Phe	Leu	Ser	Asn	Tyr	Leu	Thr	Asn	Val	Asp	Asp	Ile	Thr	
370						375					380					
Leu	Val	Pro	Gly	Thr	Leu	Gly	Arg	Ile	Arg	Ser	Lys	Phe	Ser	Asn	Asn	
385					390					395					400	
Ala	Lys	Tyr	Asp	Pro	Lys	Ala	Ile	Ile	Ala	Asn	Leu	Thr	Cys	Lys	Lys	
				405					410					415		
Pro	Asp	Gln	His	Phe	Lys	Pro	Tyr	Leu	Lys	Gln	His	Leu	Pro	Lys	Arg	
			420					425					430			
Leu	His	Tyr	Ala	Asn	Asn	Arg	Arg	Ile	Glu	Asp	Ile	His	Leu	Leu	Val	
	435					440						445				
Glu	Arg	Arg	Trp	His	Val	Ala	Arg	Lys	Pro	Leu	Asp	Val	Tyr	Lys	Lys	
450						455					460					
Pro	Ser	Gly	Lys	Cys	Phe	Phe	Gln	Gly	Asp	His	Gly	Phe	Asp	Asn	Lys	
465					470				475						480	
Val	Asn	Ser	Met	Gln	Thr	Val	Phe	Val	Gly	Tyr	Gly	Ser	Thr	Phe	Lys	
				485					490					495		
Tyr	Lys	Thr	Lys	Val	Pro	Pro	Phe	Glu	Asn	Ile	Glu	Leu	Tyr	Asn	Val	
			500					505					510			
Met	Cys	Asp	Leu	Leu	Gly	Leu	Lys	Pro	Ala	Pro	Asn	Asn	Gly	Thr	His	
	515						520					525				
Gly	Ser	Leu	Asn	His	Leu	Leu	Arg	Thr	Asn	Thr	Phe	Arg	Pro	Thr	Met	
530						535					540					
Pro	Glu	Glu	Val	Thr	Arg	Pro	Asn	Tyr	Pro	Gly	Ile	Met	Tyr	Leu	Gln	
545					550					555					560	
Ser	Asp	Phe	Asp	Leu	Gly	Cys	Thr	Cys	Asp	Asp	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	
				565					570					575		
Asn	Lys	Leu	Asp	Glu	Leu	Asn	Lys	Arg	Leu	His	Thr	Lys	Gly	Ser	Thr	
			580					585					590			
Glu	Ala	Glu	Thr	Arg	Lys	Phe	Arg	Gly	Ser	Arg	Asn	Glu	Asn	Lys	Glu	
	595						600					605				
Asn	Ile	Asn	Gly	Asn	Phe	Glu	Pro	Arg	Lys	Glu	Arg	His	Leu	Leu	Tyr	
610						615					620					
Gly	Arg	Pro	Ala	Val	Leu	Tyr	Arg	Thr	Arg	Tyr	Asp	Ile	Leu	Tyr	His	
625					630					635					640	
Thr	Asp	Phe	Glu	Ser	Gly	Tyr	Ser	Glu	Ile	Phe	Leu	Met	Pro	Leu	Trp	
			645						650					655		
Thr	Ser	Tyr	Thr	Val	Ser	Lys	Gln	Ala	Glu	Val	Ser	Ser	Val	Pro	Asp	
			660					665					670			
His	Leu	Thr	Ser	Cys	Val	Arg	Pro	Asp	Val	Arg	Val	Ser	Pro	Ser	Phe	
	675						680					685				
Ser	Gln	Asn	Cys	Leu	Ala	Tyr	Lys	Asn	Asp	Lys	Gln	Met	Ser	Tyr	Gly	
690						695					700					
Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Tyr	Leu	Ser	Ser	Ser	Pro	Glu	Ala	Lys	Tyr	Asp	
705					710					715					720	
Ala	Phe	Leu	Val	Thr	Asn	Met	Val	Pro	Met	Tyr	Pro	Ala	Phe	Lys	Arg	
				725					730					735		
Val	Trp	Asn	Tyr	Phe	Gln	Arg	Val	Leu	Val	Lys	Lys	Tyr	Ala	Ser	Glu	
			740					745					750			

10

20

30

40

50

【表 5 - 3】

Arg	Asn	Gly	Val	Asn	Val	Ile	Ser	Gly	Pro	Ile	Phe	Asp	Tyr	Asp	Tyr
	755						760					765			
Asp	Gly	Leu	His	Asp	Thr	Glu	Asp	Lys	Ile	Lys	Gln	Tyr	Val	Glu	Gly
	770						775				780				
Ser	Ser	Ile	Pro	Val	Pro	Thr	His	Tyr	Tyr	Ser	Ile	Ile	Thr	Ser	Cys
785					790					795					800
Leu	Asp	Phe	Thr	Gln	Pro	Ala	Asp	Lys	Cys	Asp	Gly	Pro	Leu	Ser	Val
				805					810					815	
Ser	Ser	Phe	Ile	Leu	Pro	His	Arg	Pro	Asp	Asn	Glu	Glu	Ser	Cys	Asn
			820					825					830		
Ser	Ser	Glu	Asp	Glu	Ser	Lys	Trp	Val	Glu	Glu	Leu	Met	Lys	Met	His
	835						840					845			
Thr	Ala	Arg	Val	Arg	Asp	Ile	Glu	His	Leu	Thr	Ser	Leu	Asp	Phe	Phe
	850					855				860					
Arg	Lys	Thr	Ser	Arg	Ser	Tyr	Pro	Glu	Ile	Leu	Thr	Leu	Lys	Thr	Tyr
865					870					875					880
Leu	His	Thr	Tyr	Glu	Ser	Glu	Ile								
				885											

10

20

【0474】

配列番号 6 - ENPP3 の細胞外ドメイン：

30

40

50

【表 6 - 1】

Glu	Lys	Gln	Gly	Ser	Cys	Arg	Lys	Lys	Cys	Phe	Asp	Ala	Ser	Phe	Arg		
1				5					10					15			
Gly	Leu	Glu	Asn	Cys	Arg	Cys	Asp	Val	Ala	Cys	Lys	Asp	Arg	Gly	Asp		
			20					25					30				
Cys	Cys	Trp	Asp	Phe	Glu	Asp	Thr	Cys	Val	Glu	Ser	Thr	Arg	Ile	Trp		
		35					40					45					
Met	Cys	Asn	Lys	Phe	Arg	Cys	Gly	Glu	Thr	Arg	Leu	Glu	Ala	Ser	Leu		
	50					55					60						
Cys	Ser	Cys	Ser	Asp	Asp	Cys	Leu	Gln	Arg	Lys	Asp	Cys	Cys	Ala	Asp		
65				70					75					80			
Tyr	Lys	Ser	Val	Cys	Gln	Gly	Glu	Thr	Ser	Trp	Leu	Glu	Glu	Asn	Cys		10
				85					90					95			
Asp	Thr	Ala	Gln	Gln	Ser	Gln	Cys	Pro	Glu	Gly	Phe	Asp	Leu	Pro	Pro		
		100						105					110				
Val	Ile	Leu	Phe	Ser	Met	Asp	Gly	Phe	Arg	Ala	Glu	Tyr	Leu	Tyr	Thr		
		115					120						125				
Trp	Asp	Thr	Leu	Met	Pro	Asn	Ile	Asn	Lys	Leu	Lys	Thr	Cys	Gly	Ile		
		130				135					140						
His	Ser	Lys	Tyr	Met	Arg	Ala	Met	Tyr	Pro	Thr	Lys	Thr	Phe	Pro	Asn		
145					150				155					160			
His	Tyr	Thr	Ile	Val	Thr	Gly	Leu	Tyr	Pro	Glu	Ser	His	Gly	Ile	Ile		
				165					170					175			20
Asp	Asn	Asn	Met	Tyr	Asp	Val	Asn	Leu	Asn	Lys	Asn	Phe	Ser	Leu	Ser		
			180					185					190				
Ser	Lys	Glu	Gln	Asn	Asn	Pro	Ala	Trp	Trp	His	Gly	Gln	Pro	Met	Trp		
		195				200						205					
Leu	Thr	Ala	Met	Tyr	Gln	Gly	Leu	Lys	Ala	Ala	Thr	Tyr	Phe	Trp	Pro		
		210				215					220						
Gly	Ser	Glu	Val	Ala	Ile	Asn	Gly	Ser	Phe	Pro	Ser	Ile	Tyr	Met	Pro		
225					230				235					240			
Tyr	Asn	Gly	Ser	Val	Pro	Phe	Glu	Glu	Arg	Ile	Ser	Thr	Leu	Leu	Lys		
			245						250				255				
Trp	Leu	Asp	Leu	Pro	Lys	Ala	Glu	Arg	Pro	Arg	Phe	Tyr	Thr	Met	Tyr		
		260					265						270				30
Phe	Glu	Glu	Pro	Asp	Ser	Ser	Gly	His	Ala	Gly	Gly	Pro	Val	Ser	Ala		
		275					280					285					
Arg	Val	Ile	Lys	Ala	Leu	Gln	Val	Val	Asp	His	Ala	Phe	Gly	Met	Leu		
		290				295					300						
Met	Glu	Gly	Leu	Lys	Gln	Arg	Asn	Leu	His	Asn	Cys	Val	Asn	Ile	Ile		
305					310				315					320			
Leu	Leu	Ala	Asp	His	Gly	Met	Asp	Gln	Thr	Tyr	Cys	Asn	Lys	Met	Glu		
			325						330				335				
Tyr	Met	Thr	Asp	Tyr	Phe	Pro	Arg	Ile	Asn	Phe	Phe	Tyr	Met	Tyr	Glu		
		340						345					350				
Gly	Pro	Ala	Pro	Arg	Ile	Arg	Ala	His	Asn	Ile	Pro	His	Asp	Phe	Phe		40
		355					360					365					

【表 6 - 2】

Ser	Phe	Asn	Ser	Glu	Glu	Ile	Val	Arg	Asn	Leu	Ser	Cys	Arg	Lys	Pro	
370						375					380					
Asp	Gln	His	Phe	Lys	Pro	Tyr	Leu	Thr	Pro	Asp	Leu	Pro	Lys	Arg	Leu	
385				390						395					400	
His	Tyr	Ala	Lys	Asn	Val	Arg	Ile	Asp	Lys	Val	His	Leu	Phe	Val	Asp	
			405						410					415		
Gln	Gln	Trp	Leu	Ala	Val	Arg	Ser	Lys	Ser	Asn	Thr	Asn	Cys	Gly	Gly	
		420						425					430			
Gly	Asn	His	Gly	Tyr	Asn	Asn	Glu	Phe	Arg	Ser	Met	Glu	Ala	Ile	Phe	
	435					440					445					
Leu	Ala	His	Gly	Pro	Ser	Phe	Lys	Glu	Lys	Thr	Glu	Val	Glu	Pro	Phe	
450						455				460						
Glu	Asn	Ile	Glu	Val	Tyr	Asn	Leu	Met	Cys	Asp	Leu	Leu	Arg	Ile	Gln	
465				470						475					480	
Pro	Ala	Pro	Asn	Asn	Gly	Thr	His	Gly	Ser	Leu	Asn	His	Leu	Leu	Lys	
			485						490					495		
Val	Pro	Phe	Tyr	Glu	Pro	Ser	His	Ala	Glu	Glu	Val	Ser	Lys	Phe	Ser	
		500						505					510			
Val	Cys	Gly	Phe	Ala	Asn	Pro	Leu	Pro	Thr	Glu	Ser	Leu	Asp	Cys	Phe	
	515					520						525				
Cys	Pro	His	Leu	Gln	Asn	Ser	Thr	Gln	Leu	Glu	Gln	Val	Asn	Gln	Met	
530					535						540					
Leu	Asn	Leu	Thr	Gln	Glu	Glu	Ile	Thr	Ala	Thr	Val	Lys	Val	Asn	Leu	
545				550						555					560	
Pro	Phe	Gly	Arg	Pro	Arg	Val	Leu	Gln	Lys	Asn	Val	Asp	His	Cys	Leu	
			565						570					575		
Leu	Tyr	His	Arg	Glu	Tyr	Val	Ser	Gly	Phe	Gly	Lys	Ala	Met	Arg	Met	
		580						585					590			
Pro	Met	Trp	Ser	Ser	Tyr	Thr	Val	Pro	Gln	Leu	Gly	Asp	Thr	Ser	Pro	
	595					600						605				
Leu	Pro	Pro	Thr	Val	Pro	Asp	Cys	Leu	Arg	Ala	Asp	Val	Arg	Val	Pro	
610					615						620					
Pro	Ser	Glu	Ser	Gln	Lys	Cys	Ser	Phe	Tyr	Leu	Ala	Asp	Lys	Asn	Ile	
625				630						635					640	
Thr	His	Gly	Phe	Leu	Tyr	Pro	Pro	Ala	Ser	Asn	Arg	Thr	Ser	Asp	Ser	
			645						650					655		
Gln	Tyr	Asp	Ala	Leu	Ile	Thr	Ser	Asn	Leu	Val	Pro	Met	Tyr	Glu	Glu	
		660						665					670			
Phe	Arg	Lys	Met	Trp	Asp	Tyr	Phe	His	Ser	Val	Leu	Leu	Ile	Lys	His	
	675						680						685			
Ala	Thr	Glu	Arg	Asn	Gly	Val	Asn	Val	Val	Ser	Gly	Pro	Ile	Phe	Asp	
690					695						700					
Tyr	Asn	Tyr	Asp	Gly	His	Phe	Asp	Ala	Pro	Asp	Glu	Ile	Thr	Lys	His	
705				710						715					720	
Leu	Ala	Asn	Thr	Asp	Val	Pro	Ile	Pro	Thr	His	Tyr	Phe	Val	Val	Leu	
			725						730					735		
Thr	Ser	Cys	Lys	Asn	Lys	Ser	His	Thr	Pro	Glu	Asn	Cys	Pro	Gly	Trp	
		740						745						750		

10

20

30

40

50

【表 6 - 3】

Leu	Asp	Val	Leu	Pro	Phe	Ile	Ile	Pro	His	Arg	Pro	Thr	Asn	Val	Glu
		755					760					765			
Ser	Cys	Pro	Glu	Gly	Lys	Pro	Glu	Ala	Leu	Trp	Val	Glu	Glu	Arg	Phe
		770				775					780				
Thr	Ala	His	Ile	Ala	Arg	Val	Arg	Asp	Val	Glu	Leu	Leu	Thr	Gly	Leu
785					790					795					800
Asp	Phe	Tyr	Gln	Asp	Lys	Val	Gln	Pro	Val	Ser	Glu	Ile	Leu	Gln	Leu
				805					810					815	
Lys	Thr	Tyr	Leu	Pro	Thr	Phe	Glu	Thr	Thr	Ile					
			820					825							

10

【 0 4 7 5】

配列番号 7 - N P P 3 アミノ酸配列：

20

30

40

50

Met	Glu	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ala	Thr	Glu	Gln	Pro	Val	Lys	Lys	Asn	
1				5					10					15		
Thr	Leu	Lys	Lys	Tyr	Lys	Ile	Ala	Cys	Ile	Val	Leu	Leu	Ala	Leu	Leu	
			20					25					30			
Val	Ile	Met	Ser	Leu	Gly	Leu	Gly	Leu	Gly	Leu	Gly	Leu	Arg	Lys	Leu	
		35					40					45				
Glu	Lys	Gln	Gly	Ser	Cys	Arg	Lys	Lys	Cys	Phe	Asp	Ala	Ser	Phe	Arg	
	50					55				60						
Gly	Leu	Glu	Asn	Cys	Arg	Cys	Asp	Val	Ala	Cys	Lys	Asp	Arg	Gly	Asp	
65				70						75				80		
Cys	Cys	Trp	Asp	Phe	Glu	Asp	Thr	Cys	Val	Glu	Ser	Thr	Arg	Ile	Trp	
				85					90					95		
Met	Cys	Asn	Lys	Phe	Arg	Cys	Gly	Glu	Thr	Arg	Leu	Glu	Ala	Ser	Leu	
			100					105					110			
Cys	Ser	Cys	Ser	Asp	Asp	Cys	Leu	Gln	Arg	Lys	Asp	Cys	Cys	Ala	Asp	
		115					120					125				
Tyr	Lys	Ser	Val	Cys	Gln	Gly	Glu	Thr	Ser	Trp	Leu	Glu	Glu	Asn	Cys	
	130					135					140					
Asp	Thr	Ala	Gln	Gln	Ser	Gln	Cys	Pro	Glu	Gly	Phe	Asp	Leu	Pro	Pro	
145				150						155				160		
Val	Ile	Leu	Phe	Ser	Met	Asp	Gly	Phe	Arg	Ala	Glu	Tyr	Leu	Tyr	Thr	
				165					170					175		
Trp	Asp	Thr	Leu	Met	Pro	Asn	Ile	Asn	Lys	Leu	Lys	Thr	Cys	Gly	Ile	
			180					185					190			
His	Ser	Lys	Tyr	Met	Arg	Ala	Met	Tyr	Pro	Thr	Lys	Thr	Phe	Pro	Asn	
		195					200					205				
His	Tyr	Thr	Ile	Val	Thr	Gly	Leu	Tyr	Pro	Glu	Ser	His	Gly	Ile	Ile	
	210					215					220					
Asp	Asn	Asn	Met	Tyr	Asp	Val	Asn	Leu	Asn	Lys	Asn	Phe	Ser	Leu	Ser	
225				230						235				240		
Ser	Lys	Glu	Gln	Asn	Asn	Pro	Ala	Trp	Trp	His	Gly	Gln	Pro	Met	Trp	
				245					250					255		
Leu	Thr	Ala	Met	Tyr	Gln	Gly	Leu	Lys	Ala	Ala	Thr	Tyr	Phe	Trp	Pro	
			260				265						270			
Gly	Ser	Glu	Val	Ala	Ile	Asn	Gly	Ser	Phe	Pro	Ser	Ile	Tyr	Met	Pro	
		275					280					285				
Tyr	Asn	Gly	Ser	Val	Pro	Phe	Glu	Glu	Arg	Ile	Ser	Thr	Leu	Leu	Lys	
	290					295					300					
Trp	Leu	Asp	Leu	Pro	Lys	Ala	Glu	Arg	Pro	Arg	Phe	Tyr	Thr	Met	Tyr	
305				310						315				320		
Phe	Glu	Glu	Pro	Asp	Ser	Ser	Gly	His	Ala	Gly	Gly	Pro	Val	Ser	Ala	
				325					330					335		
Arg	Val	Ile	Lys	Ala	Leu	Gln	Val	Val	Asp	His	Ala	Phe	Gly	Met	Leu	
			340					345					350			
Met	Glu	Gly	Leu	Lys	Gln	Arg	Asn	Leu	His	Asn	Cys	Val	Asn	Ile	Ile	
		355					360				365					

【表 7 - 2】

Leu	Leu	Ala	Asp	His	Gly	Met	Asp	Gln	Thr	Tyr	Cys	Asn	Lys	Met	Glu	
370						375					380					
Tyr	Met	Thr	Asp	Tyr	Phe	Pro	Arg	Ile	Asn	Phe	Phe	Tyr	Met	Tyr	Glu	
385					390					395					400	
Gly	Pro	Ala	Pro	Arg	Ile	Arg	Ala	His	Asn	Ile	Pro	His	Asp	Phe	Phe	
				405					410					415		
Ser	Phe	Asn	Ser	Glu	Glu	Ile	Val	Arg	Asn	Leu	Ser	Cys	Arg	Lys	Pro	
			420					425					430			
Asp	Gln	His	Phe	Lys	Pro	Tyr	Leu	Thr	Pro	Asp	Leu	Pro	Lys	Arg	Leu	
		435					440						445			
His	Tyr	Ala	Lys	Asn	Val	Arg	Ile	Asp	Lys	Val	His	Leu	Phe	Val	Asp	
450						455					460					
Gln	Gln	Trp	Leu	Ala	Val	Arg	Ser	Lys	Ser	Asn	Thr	Asn	Cys	Gly	Gly	
465					470					475					480	
Gly	Asn	His	Gly	Tyr	Asn	Asn	Glu	Phe	Arg	Ser	Met	Glu	Ala	Ile	Phe	
				485					490					495		
Leu	Ala	His	Gly	Pro	Ser	Phe	Lys	Glu	Lys	Thr	Glu	Val	Glu	Pro	Phe	
			500					505					510			
Glu	Asn	Ile	Glu	Val	Tyr	Asn	Leu	Met	Cys	Asp	Leu	Leu	Arg	Ile	Gln	
		515					520					525				
Pro	Ala	Pro	Asn	Asn	Gly	Thr	His	Gly	Ser	Leu	Asn	His	Leu	Leu	Lys	
	530					535					540					
Val	Pro	Phe	Tyr	Glu	Pro	Ser	His	Ala	Glu	Glu	Val	Ser	Lys	Phe	Ser	
545					550					555					560	
Val	Cys	Gly	Phe	Ala	Asn	Pro	Leu	Pro	Thr	Glu	Ser	Leu	Asp	Cys	Phe	
				565					570					575		
Cys	Pro	His	Leu	Gln	Asn	Ser	Thr	Gln	Leu	Glu	Gln	Val	Asn	Gln	Met	
			580					585					590			
Leu	Asn	Leu	Thr	Gln	Glu	Glu	Ile	Thr	Ala	Thr	Val	Lys	Val	Asn	Leu	
		595					600						605			
Pro	Phe	Gly	Arg	Pro	Arg	Val	Leu	Gln	Lys	Asn	Val	Asp	His	Cys	Leu	
	610					615						620				
Leu	Tyr	His	Arg	Glu	Tyr	Val	Ser	Gly	Phe	Gly	Lys	Ala	Met	Arg	Met	
625					630					635					640	
Pro	Met	Trp	Ser	Ser	Tyr	Thr	Val	Pro	Gln	Leu	Gly	Asp	Thr	Ser	Pro	
				645						650				655		
Leu	Pro	Pro	Thr	Val	Pro	Asp	Cys	Leu	Arg	Ala	Asp	Val	Arg	Val	Pro	
			660					665					670			
Pro	Ser	Glu	Ser	Gln	Lys	Cys	Ser	Phe	Tyr	Leu	Ala	Asp	Lys	Asn	Ile	
		675						680					685			
Thr	His	Gly	Phe	Leu	Tyr	Pro	Pro	Ala	Ser	Asn	Arg	Thr	Ser	Asp	Ser	
	690					695						700				
Gln	Tyr	Asp	Ala	Leu	Ile	Thr	Ser	Asn	Leu	Val	Pro	Met	Tyr	Glu	Glu	
705					710					715					720	
Phe	Arg	Lys	Met	Trp	Asp	Tyr	Phe	His	Ser	Val	Leu	Leu	Ile	Lys	His	
				725						730				735		
Ala	Thr	Glu	Arg	Asn	Gly	Val	Asn	Val	Val	Ser	Gly	Pro	Ile	Phe	Asp	
			740					745					750			

10

20

30

40

50

【表 7 - 3】

Tyr Asn Tyr Asp Gly His Phe Asp Ala Pro Asp Glu Ile Thr Lys His
 755 760 765
 Leu Ala Asn Thr Asp Val Pro Ile Pro Thr His Tyr Phe Val Val Leu
 770 775 780
 Thr Ser Cys Lys Asn Lys Ser His Thr Pro Glu Asn Cys Pro Gly Trp
 785 790 795 800
 Leu Asp Val Leu Pro Phe Ile Ile Pro His Arg Pro Thr Asn Val Glu
 805 810 815
 Ser Cys Pro Glu Gly Lys Pro Glu Ala Leu Trp Val Glu Glu Arg Phe
 820 825 830
 Thr Ala His Ile Ala Arg Val Arg Asp Val Glu Leu Leu Thr Gly Leu
 835 840 845
 Asp Phe Tyr Gln Asp Lys Val Gln Pro Val Ser Glu Ile Leu Gln Leu
 850 855 860
 Lys Thr Tyr Leu Pro Thr Phe Glu Thr Thr Ile
 865 870 875

10

【0 4 7 6】

上述の N P P 3 アミノ酸配列は、細胞質ドメイン、膜貫通ドメイン、ホスホジエステラーゼ／触媒ドメイン、およびヌクレアーゼドメインを含む。触媒ドメインおよびヌクレアーゼドメインは、合わせて細胞外ドメインと呼ばれる。残基 1～11 (Met Glu Ser～Ala Thr Glu) は、細胞質ドメインに対応する。残基 12～30 (Gln Pro Val～Leu Leu Ala) は、膜貫通ドメインに対応する。残基 31～875 (Leu Leu Val～Thr Thr Ile) は、細胞外ドメインに相当する。残基 140～510 (Leu Glu Glu～Glu Val Glu) は、触媒／ホスホジエステラーゼドメインに対応する。残基 605～875 (Lys Val Asn～Thr Thr Ile) は、ヌクレアーゼドメインに対応する。残基番号およびドメイン分類は、ヒト N P P 3 配列 (UniProtKB / Swiss-Prot: O14638.2) に基づく。

20

30

【0 4 7 7】

配列番号 8 - アズロシジン - E N P P 3 - F C

【表 8】

MTRLTVLALLAGLLASSRA**AKQGSCRKKCFDASFRGLENCRCDVACKDRGDCCWDFEDTCVESTRIWMCNKFRCGETRLE
 ASLSCSCSDDCLQRKDCCADYKSVCQGETSWLEENCDAQQSQCEGFDLPPVILFSMDGFRAEYLYTWDTLMPNINKLKTG
 IHSKYMAMYPTKTFFPNHYTIVTGLYPESHGIIIDNNMYDVNLKNFSLSSKEQNNPAWWHGQPMNLTAMYQGLKAATYFWPG
 SEVAINGSFSPSIYMPYNGSVPFEEIRISTLLKWLDPKAERPRFYTMFEEDSSGHAGGPVSARVIKALQVVDHAFGMLMEG
 LKQRNLHNCVNIILLADHGMDQTYCNKMEYMTDYFPRINFFYMEGPAPRIAHNIPHDFFSFNSEEIVRNLSCKRPDQHF
 PYLTPDLKRLHYAKNVRIDKVLHFLVDQQWLAVRSKSNNTNCGGNHGYNNEFRSMEAIFLAHGSPFKEKTEVEPFENIEVYN
 LMCDLLRIQPAPNNGTHGSLNHLKVPFYEPSHAEEVSKFSVCGFANPLPTESLDCFCPHLQNSTQLEQVNQMLNLTQEEIT
 ATVKVNLFPGRPRVLQKNVDHCLLYHREYVSGFGKAMRMPMWSSYTVPQLGDTSPLPPTVPDCLRADVRVPPSESQKCSFY
 LADKNITHGFLYPASNRTSDSQYDALITSNLVPMYEEFRKMWDYFHSVLLIKHATERNGVNVVSGPIFDYNYDGHFDAPDEI
 TKHLANTDVPIPTHYFVVLTSCKNKSHTPENCPGWLDPFIIPHRPTNVESCEPKPEALWVEERFTHAHARVRDVELLTG
 LDFYQDKVQPVSEILQLKTYLPTFETTIDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV
 KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS
 REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNH
 YTQKSLSLSPGK

40

単一下線 - アズロシジンシグナル配列、二重下線 - E N P P 3 配列の始まりおよび終わり、太字残基 - F c 配列、** は、シグナル配列の切断点を示す。

50

【 0 4 7 8 】

配列番号 9 - アズロシジン - E N P P 3 - アルブミン

【 表 9 】

MTRLTVLALLAGLLASSRA**AKQGSCRKKCFDASFRGLNCRCDVACKDRGDCCWDFEDTCVESTRIWMCNKFRCGETRLE
 ASLCSCSDDCLQRKCCADYKSVCQGETSWLEENCDAQQSQCEGFDLPPVILFSMDGFRAEYLYTWDTLMPNINKLKTCG
 IHSKYMRAMYPTKTFPNHYTIVTGLYPESHGIIIDNNMYDVNLNKNFSLSSKEQNNPAWWHGQPMNLTAMYQGLKAATYFWPG
 SEVAINGSFPSIYMPYNGSVPFEEIRSTLLKWLDPKAERPRFYTMFEEDSSGHAGGPVSARVIKALQVVDHAFGLMEG
 LKQRNLHNCVNIILLADHGMDQTYCNKMEYMTDYFPRINFFYMEGPAPRIAHNIPHDFFSFNSEEIVRNLSCKRPDQHF
 PYLTPDLKRLHYAKNVRIDKVLHFDVQQLAVRSKSNNTNCGGNHGYNNEFRSMEAIFLAHGSPFKEKTEVEPFENIEVYN
 LMCDLLRIQPAPNNGTHGSLNHLKVPFYEPSHAEEVSKFSVCGFANPLPTESLDCFCPHLQNSTQLEQVNQMLNLTQEEIT
 ATVKVNLFPGRPRVLQKNVDHCLLYHREYVSGFGKAMRMPMWSSYTVPQLGDTSPLPPTVPDCLRADVRVPPSESQKCSFY
 LADKNITHGFLYPASNRTSDSQYDALITSNLVPMYEEFRKMWDYFHSVLLIKHATERNGVNVVSGPIFDYNDGHFDAPDEI
 TKHLANTDVIPIPTHYFVLTSCNNKSHTPENCPGWLDPFIIPHRPTNVESCEGKPEALWVEERFTHAIAVRDVELLTG
 LDFYQDKVQPVSEILQLKTYLPTFETIIMKWVTFLLLLFVSGSAFSRGVFRREAHKSEIAHRYNDLGEQHFKGLVLIAFSQ
YLQKCSYDEHAKLVQEVTDAKTCVADESAANCDKSLHTLFGDKLCAIPNLRENYGELADCCTKQEPERNECFLQHKDDNP
SLPPFERPEAEAMCTSFKENPTTFMGHYLHEVARRHPYFYAPPELLYYAEQYNEILTQCCAEADKESCLTPKLDGVKEKALV
SSVRQRMKCSSMQKFGERAFAKAWAVARLSQTFPNADFAEITKLATDLTKVNKECCHGDLLCADDRAELAKYMCENQATIS
SKLQTCCKPLLKKAHCLSEVEHDTMPADLPAIAADFVEDQEVCKNYAEAKDVFLGTFLYEYSRRHPDYSVLLRLAKKY
EATLEKCCAEANPPACYGTVLAEFQPLVEEPKNLVKTNCDLYEKLGEYGFQNAILVRYTQKAPQVSTPTLVEAARNLGRVG
TKCCTLPEDQRLPCVEDYLSAILNRVCLLHEKTPVSEHVTKCCSGSLVERRPCFSALTVDETYVPKEFKAETFTFHSDICT
LPEKEKQIKKQTALAEVLKHKPKATAEQLKTVMDFAQFLDTCCAADKDTCFSTEGPNLVTRCKDALARSWSHPQFEK

10

20

単一下線 - アズロシジンシグナル配列、二重下線 - E N P P 3 配列の始まりおよび終わり
 、太字残基 - アルブミン配列、**は、シグナル配列の切断点を示す。

【 0 4 7 9 】

配列番号 10 - アズロシジン - E N P P 3

【 表 10 】

MTRLTVLALLAGLLASSRA**AKQGSCRKKCFDASFRGLNCRCDVACKDRGDCCWDFEDTCVESTRIWMCNKFRCGETRLE
 ASLCSCSDDCLQRKCCADYKSVCQGETSWLEENCDAQQSQCEGFDLPPVILFSMDGFRAEYLYTWDTLMPNINKLKTCG
 IHSKYMRAMYPTKTFPNHYTIVTGLYPESHGIIIDNNMYDVNLNKNFSLSSKEQNNPAWWHGQPMNLTAMYQGLKAATYFWPG
 SEVAINGSFPSIYMPYNGSVPFEEIRSTLLKWLDPKAERPRFYTMFEEDSSGHAGGPVSARVIKALQVVDHAFGLMEG
 LKQRNLHNCVNIILLADHGMDQTYCNKMEYMTDYFPRINFFYMEGPAPRIAHNIPHDFFSFNSEEIVRNLSCKRPDQHF
 PYLTPDLKRLHYAKNVRIDKVLHFDVQQLAVRSKSNNTNCGGNHGYNNEFRSMEAIFLAHGSPFKEKTEVEPFENIEVYN
 LMCDLLRIQPAPNNGTHGSLNHLKVPFYEPSHAEEVSKFSVCGFANPLPTESLDCFCPHLQNSTQLEQVNQMLNLTQEEIT
 ATVKVNLFPGRPRVLQKNVDHCLLYHREYVSGFGKAMRMPMWSSYTVPQLGDTSPLPPTVPDCLRADVRVPPSESQKCSFY
 LADKNITHGFLYPASNRTSDSQYDALITSNLVPMYEEFRKMWDYFHSVLLIKHATERNGVNVVSGPIFDYNDGHFDAPDEI
 TKHLANTDVIPIPTHYFVLTSCNNKSHTPENCPGWLDPFIIPHRPTNVESCEGKPEALWVEERFTHAIAVRDVELLTG
 LDFYQDKVQPVSEILQLKTYLPTFETI

30

単一下線 - アズロシジンシグナル配列、二重下線 - E N P P 3 配列の始まりおよび終わり
 、**は、シグナル配列の切断点を示す。

40

【 0 4 8 0 】

配列番号 11 - E N P P 4 アミノ酸配列 - 野生型

【表 1 1 - 1】

Met	Lys	Leu	Leu	Val	Ile	Leu	Leu	Phe	Ser	Gly	Leu	Ile	Thr	Gly	Phe	
1			5						10					15		
Arg	Ser	Asp	Ser	Ser	Ser	Ser	Leu	Pro	Pro	Lys	Leu	Leu	Leu	Val	Ser	
		20					25					30				
Phe	Asp	Gly	Phe	Arg	Ala	Asp	Tyr	Leu	Lys	Asn	Tyr	Glu	Phe	Pro	His	
	35					40					45					
Leu	Gln	Asn	Phe	Ile	Lys	Glu	Gly	Val	Leu	Val	Glu	His	Val	Lys	Asn	
	50				55					60						
Val	Phe	Ile	Thr	Lys	Thr	Phe	Pro	Asn	His	Tyr	Ser	Ile	Val	Thr	Gly	
65				70					75				80			
Leu	Tyr	Glu	Glu	Ser	His	Gly	Ile	Val	Ala	Asn	Ser	Met	Tyr	Asp	Ala	
			85					90				95				
Val	Thr	Lys	Lys	His	Phe	Ser	Asp	Ser	Asn	Asp	Lys	Asp	Pro	Phe	Trp	
		100					105				110					
Trp	Asn	Glu	Ala	Val	Pro	Ile	Trp	Val	Thr	Asn	Gln	Leu	Gln	Glu	Asn	
	115					120					125					
Arg	Ser	Ser	Ala	Ala	Ala	Met	Trp	Pro	Gly	Thr	Asp	Val	Pro	Ile	His	
	130					135					140					
Asp	Thr	Ile	Ser	Ser	Tyr	Phe	Met	Asn	Tyr	Asn	Ser	Ser	Val	Ser	Phe	
145				150					155				160			
Glu	Glu	Arg	Leu	Asn	Asn	Ile	Thr	Met	Trp	Leu	Asn	Asn	Ser	Asn	Pro	
			165					170				175				
Pro	Val	Thr	Phe	Ala	Thr	Leu	Tyr	Trp	Glu	Glu	Pro	Asp	Ala	Ser	Gly	
		180					185				190					
His	Lys	Tyr	Gly	Pro	Glu	Asp	Lys	Glu	Asn	Met	Ser	Arg	Val	Leu	Lys	
	195					200				205						
Lys	Ile	Asp	Asp	Leu	Ile	Gly	Asp	Leu	Val	Gln	Arg	Leu	Lys	Met	Leu	
	210				215				220							
Gly	Leu	Trp	Glu	Asn	Leu	Asn	Val	Ile	Ile	Thr	Ser	Asp	His	Gly	Met	
225				230					235				240			
Thr	Gln	Cys	Ser	Gln	Asp	Arg	Leu	Ile	Asn	Leu	Asp	Ser	Cys	Ile	Asp	
			245				250				255					
His	Ser	Tyr	Tyr	Thr	Leu	Ile	Asp	Leu	Ser	Pro	Val	Ala	Ala	Ile	Leu	
	260					265					270					
Pro	Lys	Ile	Asn	Arg	Thr	Glu	Val	Tyr	Asn	Lys	Leu	Lys	Asn	Cys	Ser	
	275					280					285					
Pro	His	Met	Asn	Val	Tyr	Leu	Lys	Glu	Asp	Ile	Pro	Asn	Arg	Phe	Tyr	
	290					295				300						
Tyr	Gln	His	Asn	Asp	Arg	Ile	Gln	Pro	Ile	Ile	Leu	Val	Ala	Asp	Glu	
305				310					315				320			
Gly	Trp	Thr	Ile	Val	Leu	Asn	Glu	Ser	Ser	Gln	Lys	Leu	Gly	Asp	His	
			325				330				335					
Gly	Tyr	Asp	Asn	Ser	Leu	Pro	Ser	Met	His	Pro	Phe	Leu	Ala	Ala	His	
	340					345					350					
Gly	Pro	Ala	Phe	His	Lys	Gly	Tyr	Lys	His	Ser	Thr	Ile	Asn	Ile	Val	
	355					360					365					

10

20

30

40

50

【表 1 1 - 2】

Asp Ile Tyr Pro Met Met Cys His Ile Leu Gly Leu Lys Pro His Pro
 370 375 380
 Asn Asn Gly Thr Phe Gly His Thr Lys Cys Leu Leu Val Asp Gln Trp
 385 390 395 400
 Cys Ile Asn Leu Pro Glu Ala Ile Ala Ile Val Ile Gly Ser Leu Leu
 405 410 415
 Val Leu Thr Met Leu Thr Cys Leu Ile Ile Ile Met Gln Asn Arg Leu
 420 425 430
 Ser Val Pro Arg Pro Phe Ser Arg Leu Gln Leu Gln Glu Asp Asp Asp
 435 440 445
 Asp Pro Leu Ile Gly
 450

10

20

30

40

50

【0 4 8 1】

配列番号 1 2 - E N P P 5 1 アミノ酸配列

【表 1 2 - 1】

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	Leu	Gln	Pro	Ser	Cys	Ala	Lys	Glu	Val	Lys
		20					25					30			
Ser	Cys	Lys	Gly	Arg	Cys	Phe	Glu	Arg	Thr	Phe	Ser	Asn	Cys	Arg	Cys
	35					40					45				
Asp	Ala	Ala	Cys	Val	Ser	Leu	Gly	Asn	Cys	Cys	Leu	Asp	Phe	Gln	Glu
	50					55					60				
Thr	Cys	Val	Glu	Pro	Thr	His	Ile	Trp	Thr	Cys	Asn	Lys	Phe	Arg	Cys
65					70					75				80	
Gly	Glu	Lys	Arg	Leu	Ser	Arg	Phe	Val	Cys	Ser	Cys	Ala	Asp	Asp	Cys
			85					90					95		
Lys	Thr	His	Asn	Asp	Cys	Cys	Ile	Asn	Tyr	Ser	Ser	Val	Cys	Gln	Asp
		100						105					110		
Lys	Lys	Ser	Trp	Val	Glu	Glu	Thr	Cys	Glu	Ser	Ile	Asp	Thr	Pro	Glu
	115						120					125			
Cys	Pro	Ala	Glu	Phe	Glu	Ser	Pro	Pro	Thr	Leu	Leu	Phe	Ser	Leu	Asp
	130					135						140			
Gly	Phe	Arg	Ala	Glu	Tyr	Leu	His	Thr	Trp	Gly	Gly	Leu	Leu	Pro	Val
145					150					155				160	
Ile	Ser	Lys	Leu	Lys	Asn	Cys	Gly	Thr	Tyr	Thr	Lys	Asn	Met	Arg	Pro
			165					170					175		
Met	Tyr	Pro	Thr	Lys	Thr	Phe	Pro	Asn	His	Tyr	Ser	Ile	Val	Thr	Gly
		180						185					190		
Leu	Tyr	Pro	Glu	Ser	His	Gly	Ile	Ile	Asp	Asn	Lys	Met	Tyr	Asp	Pro
	195					200						205			
Lys	Met	Asn	Ala	Ser	Phe	Ser	Leu	Lys	Ser	Lys	Glu	Lys	Phe	Asn	Pro
	210					215					220				
Leu	Trp	Tyr	Lys	Gly	Gln	Pro	Ile	Trp	Val	Thr	Ala	Asn	His	Gln	Glu
225					230					235				240	
Val	Lys	Ser	Gly	Thr	Tyr	Phe	Trp	Pro	Gly	Ser	Asp	Val	Glu	Ile	Asp
			245					250				255			
Gly	Ile	Leu	Pro	Asp	Ile	Tyr	Lys	Val	Tyr	Asn	Gly	Ser	Val	Pro	Phe
	260					265						270			
Glu	Glu	Arg	Ile	Leu	Ala	Val	Leu	Glu	Trp	Leu	Gln	Leu	Pro	Ser	His
	275					280					285				
Glu	Arg	Pro	His	Phe	Tyr	Thr	Leu	Tyr	Leu	Glu	Glu	Pro	Asp	Ser	Ser
	290					295					300				
Gly	His	Ser	His	Gly	Pro	Val	Ser	Ser	Glu	Val	Ile	Lys	Ala	Leu	Gln
305					310					315				320	
Lys	Val	Asp	Arg	Leu	Val	Gly	Met	Leu	Met	Asp	Gly	Leu	Lys	Asp	Leu
			325					330				335			
Gly	Leu	Asp	Lys	Cys	Leu	Asn	Leu	Ile	Leu	Ile	Ser	Asp	His	Gly	Met
	340					345					350				
Glu	Gln	Gly	Ser	Cys	Lys	Lys	Tyr	Val	Tyr	Leu	Asn	Lys	Tyr	Leu	Gly
	355					360					365				

10

20

30

40

50

【表 1 2 - 2】

Asp Val Asn Asn Val Lys Val Val Tyr Gly Pro Ala Ala Arg Leu Arg	
370 375 380	
Pro Thr Asp Val Pro Glu Thr Tyr Tyr Ser Phe Asn Tyr Glu Ala Leu	
385 390 395 400	
Ala Lys Asn Leu Ser Cys Arg Glu Pro Asn Gln His Phe Arg Pro Tyr	
405 410 415	
Leu Lys Pro Phe Leu Pro Lys Arg Leu His Phe Ala Lys Ser Asp Arg	
420 425 430	
Ile Glu Pro Leu Thr Phe Tyr Leu Asp Pro Gln Trp Gln Leu Ala Leu	
435 440 445	
Asn Pro Ser Glu Arg Lys Tyr Cys Gly Ser Gly Phe His Gly Ser Asp	10
450 455 460	
Asn Leu Phe Ser Asn Met Gln Ala Leu Phe Ile Gly Tyr Gly Pro Ala	
465 470 475 480	
Phe Lys His Gly Ala Glu Val Asp Ser Phe Glu Asn Ile Glu Val Tyr	
485 490 495	
Asn Leu Met Cys Asp Leu Leu Gly Leu Ile Pro Ala Pro Asn Asn Gly	
500 505 510	
Ser His Gly Ser Leu Asn His Leu Leu Lys Lys Pro Ile Tyr Asn Pro	
515 520 525	
Ser His Pro Lys Glu Glu Gly Phe Leu Ser Gln Cys Pro Ile Lys Ser	
530 535 540	
Thr Ser Asn Asp Leu Gly Cys Thr Cys Asp Pro Trp Ile Val Pro Ile	20
545 550 555 560	
Lys Asp Phe Glu Lys Gln Leu Asn Leu Thr Thr Glu Asp Val Asp Asp	
565 570 575	
Ile Tyr His Met Thr Val Pro Tyr Gly Arg Pro Arg Ile Leu Leu Lys	
580 585 590	
Gln His Arg Val Cys Leu Leu Gln Gln Gln Gln Phe Leu Thr Gly Tyr	
595 600 605	
Ser Leu Asp Leu Leu Met Pro Leu Trp Ala Ser Tyr Thr Phe Leu Ser	
610 615 620	
Asn Asp Gln Phe Ser Arg Asp Asp Phe Ser Asn Cys Leu Tyr Gln Asp	
625 630 635 640	
Leu Arg Ile Pro Leu Ser Pro Val His Lys Cys Ser Tyr Tyr Lys Ser	30
645 650 655	
Asn Ser Lys Leu Ser Tyr Gly Phe Leu Thr Pro Pro Arg Leu Asn Arg	
660 665 670	
Val Ser Asn His Ile Tyr Ser Glu Ala Leu Leu Thr Ser Asn Ile Val	
675 680 685	
Pro Met Tyr Gln Ser Phe Gln Val Ile Trp His Tyr Leu His Asp Thr	
690 695 700	
Leu Leu Gln Arg Tyr Ala His Glu Arg Asn Gly Ile Asn Val Val Ser	
705 710 715 720	
Gly Pro Val Phe Asp Phe Asp Tyr Asp Gly Arg Tyr Asp Ser Leu Glu	
725 730 735	
Ile Leu Lys Gln Asn Ser Arg Val Ile Arg Ser Gln Glu Ile Leu Ile	40
740 745 750	

【表 1 2 - 3】

Pro Thr His Phe Phe Ile Val Leu Thr Ser Cys Lys Gln Leu Ser Glu
 755 760 765
 Thr Pro Leu Glu Cys Ser Ala Leu Glu Ser Ser Ala Tyr Ile Leu Pro
 770 775 780
 His Arg Pro Asp Asn Ile Glu Ser Cys Thr His Gly Lys Arg Glu Ser
 785 790 795 800
 Ser Trp Val Glu Glu Leu Leu Thr Leu His Arg Ala Arg Val Thr Asp
 805 810 815
 Val Glu Leu Ile Thr Gly Leu Ser Phe Tyr Gln Asp Arg Gln Glu Ser
 820 825 830
 Val Ser Glu Leu Leu Arg Leu Lys Thr His Leu Pro Ile Phe Ser Gln
 835 840 845
Glu Asp
 850

10

単一下線：シグナルペプチド配列、二重下線：N P P 1 の始まりおよび終わり、* * = シ
 グナルペプチド配列での切断位置

【 0 4 8 2 】

配列番号 1 3 - E N P P 5 1 - A L B アミノ酸配列：

20

30

40

50

【表 13 - 1】

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	Leu	Gln	Pro	Ser	Cys	Ala	Lys	Glu	Val	Lys
			20				25					30			
Ser	Cys	Lys	Gly	Arg	Cys	Phe	Glu	Arg	Thr	Phe	Ser	Asn	Cys	Arg	Cys
		35				40					45				
Asp	Ala	Ala	Cys	Val	Ser	Leu	Gly	Asn	Cys	Cys	Leu	Asp	Phe	Gln	Glu
	50					55					60				
Thr	Cys	Val	Glu	Pro	Thr	His	Ile	Trp	Thr	Cys	Asn	Lys	Phe	Arg	Cys
65					70					75				80	
Gly	Glu	Lys	Arg	Leu	Ser	Arg	Phe	Val	Cys	Ser	Cys	Ala	Asp	Asp	Cys
			85					90					95		
Lys	Thr	His	Asn	Asp	Cys	Cys	Ile	Asn	Tyr	Ser	Ser	Val	Cys	Gln	Asp
		100						105					110		
Lys	Lys	Ser	Trp	Val	Glu	Glu	Thr	Cys	Glu	Ser	Ile	Asp	Thr	Pro	Glu
	115						120					125			
Cys	Pro	Ala	Glu	Phe	Glu	Ser	Pro	Pro	Thr	Leu	Leu	Phe	Ser	Leu	Asp
	130					135						140			
Gly	Phe	Arg	Ala	Glu	Tyr	Leu	His	Thr	Trp	Gly	Gly	Leu	Leu	Pro	Val
145					150					155				160	
Ile	Ser	Lys	Leu	Lys	Asn	Cys	Gly	Thr	Tyr	Thr	Lys	Asn	Met	Arg	Pro
			165					170					175		
Met	Tyr	Pro	Thr	Lys	Thr	Phe	Pro	Asn	His	Tyr	Ser	Ile	Val	Thr	Gly
		180						185					190		
Leu	Tyr	Pro	Glu	Ser	His	Gly	Ile	Ile	Asp	Asn	Lys	Met	Tyr	Asp	Pro
	195					200						205			
Lys	Met	Asn	Ala	Ser	Phe	Ser	Leu	Lys	Ser	Lys	Glu	Lys	Phe	Asn	Pro
	210					215					220				
Leu	Trp	Tyr	Lys	Gly	Gln	Pro	Ile	Trp	Val	Thr	Ala	Asn	His	Gln	Glu
225				230						235				240	
Val	Lys	Ser	Gly	Thr	Tyr	Phe	Trp	Pro	Gly	Ser	Asp	Val	Glu	Ile	Asp
			245					250				255			
Gly	Ile	Leu	Pro	Asp	Ile	Tyr	Lys	Val	Tyr	Asn	Gly	Ser	Val	Pro	Phe
	260					265						270			
Glu	Glu	Arg	Ile	Leu	Ala	Val	Leu	Glu	Trp	Leu	Gln	Leu	Pro	Ser	His
	275					280					285				
Glu	Arg	Pro	His	Phe	Tyr	Thr	Leu	Tyr	Leu	Glu	Glu	Pro	Asp	Ser	Ser
	290					295					300				
Gly	His	Ser	His	Gly	Pro	Val	Ser	Ser	Glu	Val	Ile	Lys	Ala	Leu	Gln
305				310						315				320	
Lys	Val	Asp	Arg	Leu	Val	Gly	Met	Leu	Met	Asp	Gly	Leu	Lys	Asp	Leu
			325					330				335			
Gly	Leu	Asp	Lys	Cys	Leu	Asn	Leu	Ile	Leu	Ile	Ser	Asp	His	Gly	Met
	340					345					350				
Glu	Gln	Gly	Ser	Cys	Lys	Lys	Tyr	Val	Tyr	Leu	Asn	Lys	Tyr	Leu	Gly
	355					360					365				

10

20

30

40

50

【表 13 - 2】

Asp Val Asn Asn Val Lys Val Val Tyr Gly Pro Ala Ala Arg Leu Arg	
370 375 380	
Pro Thr Asp Val Pro Glu Thr Tyr Tyr Ser Phe Asn Tyr Glu Ala Leu	
385 390 395 400	
Ala Lys Asn Leu Ser Cys Arg Glu Pro Asn Gln His Phe Arg Pro Tyr	
405 410 415	
Leu Lys Pro Phe Leu Pro Lys Arg Leu His Phe Ala Lys Ser Asp Arg	
420 425 430	
Ile Glu Pro Leu Thr Phe Tyr Leu Asp Pro Gln Trp Gln Leu Ala Leu	
435 440 445	
Asn Pro Ser Glu Arg Lys Tyr Cys Gly Ser Gly Phe His Gly Ser Asp	10
450 455 460	
Asn Leu Phe Ser Asn Met Gln Ala Leu Phe Ile Gly Tyr Gly Pro Ala	
465 470 475 480	
Phe Lys His Gly Ala Glu Val Asp Ser Phe Glu Asn Ile Glu Val Tyr	
485 490 495	
Asn Leu Met Cys Asp Leu Leu Gly Leu Ile Pro Ala Pro Asn Asn Gly	
500 505 510	
Ser His Gly Ser Leu Asn His Leu Leu Lys Lys Pro Ile Tyr Asn Pro	
515 520 525	
Ser His Pro Lys Glu Glu Gly Phe Leu Ser Gln Cys Pro Ile Lys Ser	
530 535 540	
Thr Ser Asn Asp Leu Gly Cys Thr Cys Asp Pro Trp Ile Val Pro Ile	20
545 550 555 560	
Lys Asp Phe Glu Lys Gln Leu Asn Leu Thr Thr Glu Asp Val Asp Asp	
565 570 575	
Ile Tyr His Met Thr Val Pro Tyr Gly Arg Pro Arg Ile Leu Leu Lys	
580 585 590	
Gln His Arg Val Cys Leu Leu Gln Gln Gln Gln Phe Leu Thr Gly Tyr	
595 600 605	
Ser Leu Asp Leu Leu Met Pro Leu Trp Ala Ser Tyr Thr Phe Leu Ser	
610 615 620	
Asn Asp Gln Phe Ser Arg Asp Asp Phe Ser Asn Cys Leu Tyr Gln Asp	
625 630 635 640	
Leu Arg Ile Pro Leu Ser Pro Val His Lys Cys Ser Tyr Tyr Lys Ser	30
645 650 655	
Asn Ser Lys Leu Ser Tyr Gly Phe Leu Thr Pro Pro Arg Leu Asn Arg	
660 665 670	
Val Ser Asn His Ile Tyr Ser Glu Ala Leu Leu Thr Ser Asn Ile Val	
675 680 685	
Pro Met Tyr Gln Ser Phe Gln Val Ile Trp His Tyr Leu His Asp Thr	
690 695 700	
Leu Leu Gln Arg Tyr Ala His Glu Arg Asn Gly Ile Asn Val Val Ser	
705 710 715 720	
Gly Pro Val Phe Asp Phe Asp Tyr Asp Gly Arg Tyr Asp Ser Leu Glu	
725 730 735	
Ile Leu Lys Gln Asn Ser Arg Val Ile Arg Ser Gln Glu Ile Leu Ile	40
740 745 750	

【表 1 3 - 3】

Pro Thr His Phe Phe Ile Val Leu Thr Ser Cys Lys Gln Leu Ser Glu	
755 760 765	
Thr Pro Leu Glu Cys Ser Ala Leu Glu Ser Ser Ala Tyr Ile Leu Pro	
770 775 780	
His Arg Pro Asp Asn Ile Glu Ser Cys Thr His Gly Lys Arg Glu Ser	
785 790 795 800	
Ser Trp Val Glu Glu Leu Leu Thr Leu His Arg Ala Arg Val Thr Asp	
805 810 815	
Val Glu Leu Ile Thr Gly Leu Ser Phe Tyr Gln Asp Arg Gln Glu Ser	
820 825 830	
Val Ser Glu Leu Leu Arg Leu Lys Thr His Leu Pro Ile Phe Ser <u>Gln</u>	
835 840 845	
<u>Glu Asp</u> Gly Gly Ser Gly Gly Ser Met Lys Trp Val Thr Phe Leu Leu	
850 855 860	
Leu Leu Phe Val Ser Gly Ser Ala Phe Ser Arg Gly Val Phe Arg Arg	
865 870 875 880	
Glu Ala His Lys Ser Glu Ile Ala His Arg Tyr Asn Asp Leu Gly Glu	
885 890 895	
Gln His Phe Lys Gly Leu Val Leu Ile Ala Phe Ser Gln Tyr Leu Gln	
900 905 910	
Lys Cys Ser Tyr Asp Glu His Ala Lys Leu Val Gln Glu Val Thr Asp	
915 920 925	
Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Ala Asn Cys Asp Lys	
930 935 940	
Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Ala Ile Pro Asn Leu	
945 950 955 960	
Arg Glu Asn Tyr Gly Glu Leu Ala Asp Cys Cys Thr Lys Gln Glu Pro	
965 970 975	
Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Ser Leu	
980 985 990	
Pro Pro Phe Glu Arg Pro Glu Ala Glu Ala Met Cys Thr Ser Phe Lys	
995 1000 1005	
Glu Asn Pro Thr Thr Phe Met Gly His Tyr Leu His Glu Val Ala	
1010 1015 1020	
Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Tyr Tyr Ala	
1025 1030 1035	
Glu Gln Tyr Asn Glu Ile Leu Thr Gln Cys Cys Ala Glu Ala Asp	
1040 1045 1050	
Lys Glu Ser Cys Leu Thr Pro Lys Leu Asp Gly Val Lys Glu Lys	
1055 1060 1065	
Ala Leu Val Ser Ser Val Arg Gln Arg Met Lys Cys Ser Ser Met	
1070 1075 1080	
Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg	
1085 1090 1095	
Leu Ser Gln Thr Phe Pro Asn Ala Asp Phe Ala Glu Ile Thr Lys	
1100 1105 1110	
Leu Ala Thr Asp Leu Thr Lys Val Asn Lys Glu Cys Cys His Gly	
1115 1120 1125	

10

20

30

40

50

【表 1 3 - 4】

Asp Leu	Leu Glu Cys Ala Asp	Asp Arg Ala Glu Leu	Ala Lys Tyr
1130	1135	1140	
Met Cys	Glu Asn Gln Ala Thr	Ile Ser Ser Lys Leu	Gln Thr Cys
1145	1150	1155	
Cys Asp	Lys Pro Leu Leu Lys	Lys Ala His Cys Leu	Ser Glu Val
1160	1165	1170	
Glu His	Asp Thr Met Pro Ala	Asp Leu Pro Ala Ile	Ala Ala Asp
1175	1180	1185	
Phe Val	Glu Asp Gln Glu Val	Cys Lys Asn Tyr Ala	Glu Ala Lys
1190	1195	1200	
Asp Val	Phe Leu Gly Thr Phe	Leu Tyr Glu Tyr Ser	Arg Arg His
1205	1210	1215	
Pro Asp	Tyr Ser Val Ser Leu	Leu Leu Arg Leu Ala	Lys Lys Tyr
1220	1225	1230	
Glu Ala	Thr Leu Glu Lys Cys	Cys Ala Glu Ala Asn	Pro Pro Ala
1235	1240	1245	
Cys Tyr	Gly Thr Val Leu Ala	Glu Phe Gln Pro Leu	Val Glu Glu
1250	1255	1260	
Pro Lys	Asn Leu Val Lys Thr	Asn Cys Asp Leu Tyr	Glu Lys Leu
1265	1270	1275	
Gly Glu	Tyr Gly Phe Gln Asn	Ala Ile Leu Val Arg	Tyr Thr Gln
1280	1285	1290	
Lys Ala	Pro Gln Val Ser Thr	Pro Thr Leu Val Glu	Ala Ala Arg
1295	1300	1305	
Asn Leu	Gly Arg Val Gly Thr	Lys Cys Cys Thr Leu	Pro Glu Asp
1310	1315	1320	
Gln Arg	Leu Pro Cys Val Glu	Asp Tyr Leu Ser Ala	Ile Leu Asn
1325	1330	1335	
Arg Val	Cys Leu Leu His Glu	Lys Thr Pro Val Ser	Glu His Val
1340	1345	1350	
Thr Lys	Cys Cys Ser Gly Ser	Leu Val Glu Arg Arg	Pro Cys Phe
1355			
Ser Ala	Leu Thr Val Asp Glu	Thr Tyr Val Pro Lys	Glu Phe Lys
1370	1375	1380	
Ala Glu	Thr Phe Thr Phe His	Ser Asp Ile Cys Thr	Leu Pro Glu
1385	1390	1395	
Lys Glu	Lys Gln Ile Lys Lys	Gln Thr Ala Leu Ala	Glu Leu Val
1400	1405	1410	
Lys His	Lys Pro Lys Ala Thr	Ala Glu Gln Leu Lys	Thr Val Met
1415	1420	1425	
Asp Asp	Phe Ala Gln Phe Leu	Asp Thr Cys Cys Lys	Ala Ala Asp
1430	1435	1440	
Lys Asp	Thr Cys Phe Ser Thr	Glu Gly Pro Asn Leu	Val Thr Arg
1445	1450	1455	
Cys Lys	Asp Ala Leu Ala Arg	Ser Trp Ser His Pro	Gln Phe Glu
1460	1465	1470	
Lys			

10

20

30

40

単一下線：シグナルペプチド配列、二重下線：N P P 1の始まりおよび終わり、**＝シグナルペプチド配列での切断位置、太字残基は、アルブミン配列を示す

【0 4 8 3】

配列番号 1 4 - E N P P 5 - N P P 3 - F c 配列

【表 1 4 - 1】

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	Lys	Gln	Gly	Ser	Cys	Arg	Lys	Lys	Cys	Phe
			20				25						30		
Asp	Ala	Ser	Phe	Arg	Gly	Leu	Glu	Asn	Cys	Arg	Cys	Asp	Val	Ala	Cys
		35				40						45			
Lys	Asp	Arg	Gly	Asp	Cys	Cys	Trp	Asp	Phe	Glu	Asp	Thr	Cys	Val	Glu
	50					55					60				
Ser	Thr	Arg	Ile	Trp	Met	Cys	Asn	Lys	Phe	Arg	Cys	Gly	Glu	Arg	Leu
65				70						75				80	
Glu	Ala	Ser	Leu	Cys	Ser	Cys	Ser	Asp	Asp	Cys	Leu	Gln	Arg	Lys	Asp
			85					90						95	
Cys	Cys	Ala	Asp	Tyr	Lys	Ser	Val	Cys	Gln	Gly	Glu	Thr	Ser	Trp	Leu
		100						105					110		
Glu	Glu	Asn	Cys	Asp	Thr	Ala	Gln	Gln	Ser	Gln	Cys	Pro	Glu	Gly	Phe
		115					120						125		
Asp	Leu	Pro	Pro	Val	Ile	Leu	Phe	Ser	Met	Asp	Gly	Phe	Arg	Ala	Glu
	130					135						140			
Tyr	Leu	Tyr	Thr	Trp	Asp	Thr	Leu	Met	Pro	Asn	Ile	Asn	Lys	Leu	Lys
145					150						155			160	
Thr	Cys	Gly	Ile	His	Ser	Lys	Tyr	Met	Arg	Ala	Met	Tyr	Pro	Thr	Lys
			165						170					175	
Thr	Phe	Pro	Asn	His	Tyr	Thr	Ile	Val	Thr	Gly	Leu	Tyr	Pro	Glu	Ser
			180					185						190	
His	Gly	Ile	Ile	Asp	Asn	Asn	Met	Tyr	Asp	Val	Asn	Leu	Asn	Lys	Asn
	195						200							205	
Phe	Ser	Leu	Ser	Ser	Lys	Glu	Gln	Asn	Asn	Pro	Ala	Trp	Trp	His	Gly
	210						215							220	
Gln	Pro	Met	Trp	Leu	Thr	Ala	Met	Tyr	Gln	Gly	Leu	Lys	Ala	Ala	Thr
225					230						235			240	
Tyr	Phe	Trp	Pro	Gly	Ser	Glu	Val	Ala	Ile	Asn	Gly	Ser	Phe	Pro	Ser
			245							250				255	
Ile	Tyr	Met	Pro	Tyr	Asn	Gly	Ser	Val	Pro	Phe	Glu	Glu	Arg	Ile	Ser
	260						265						270		
Thr	Leu	Leu	Lys	Trp	Leu	Asp	Leu	Pro	Lys	Ala	Glu	Arg	Pro	Arg	Phe
	275						280						285		
Tyr	Thr	Met	Tyr	Phe	Glu	Glu	Pro	Asp	Ser	Ser	Gly	His	Ala	Gly	Gly
	290						295					300			
Pro	Val	Ser	Ala	Arg	Val	Ile	Lys	Ala	Leu	Gln	Val	Val	Asp	His	Ala
305					310						315			320	
Phe	Gly	Met	Leu	Met	Glu	Gly	Leu	Lys	Gln	Arg	Asn	Leu	His	Asn	Cys
			325							330				335	
Val	Asn	Ile	Ile	Leu	Leu	Ala	Asp	His	Gly	Met	Asp	Gln	Thr	Tyr	Cys
	340								345					350	
Asn	Lys	Met	Glu	Tyr	Met	Thr	Asp	Tyr	Phe	Pro	Arg	Ile	Asn	Phe	Phe
	355						360							365	

10

20

30

40

50

【表 1 4 - 2】

Tyr Met Tyr Glu Gly Pro Ala Pro Arg Ile Arg Ala His Asn Ile Pro	
370 375 380	
His Asp Phe Phe Ser Phe Asn Ser Glu Glu Ile Val Arg Asn Leu Ser	
385 390 395 400	
Cys Arg Lys Pro Asp Gln His Phe Lys Pro Tyr Leu Thr Pro Asp Leu	
405 410 415	
Pro Lys Arg Leu His Tyr Ala Lys Asn Val Arg Ile Asp Lys Val His	
420 425 430	
Leu Phe Val Asp Gln Gln Trp Leu Ala Val Arg Ser Lys Ser Asn Thr	
435 440 445	
Asn Cys Gly Gly Gly Asn His Gly Tyr Asn Asn Glu Phe Arg Ser Met	10
450 455 460	
Glu Ala Ile Phe Leu Ala His Gly Pro Ser Phe Lys Glu Lys Thr Glu	
465 470 475 480	
Val Glu Pro Phe Glu Asn Ile Glu Val Tyr Asn Leu Met Cys Asp Leu	
485 490 495	
Leu Arg Ile Gln Pro Ala Pro Asn Asn Gly Thr His Gly Ser Leu Asn	
500 505 510	
His Leu Leu Lys Val Pro Phe Tyr Glu Pro Ser His Ala Glu Glu Val	
515 520 525	
Ser Lys Phe Ser Val Cys Gly Phe Ala Asn Pro Leu Pro Thr Glu Ser	
530 535 540	
Leu Asp Cys Phe Cys Pro His Leu Gln Asn Ser Thr Gln Leu Glu Gln	20
545 550 555 560	
Val Asn Gln Met Leu Asn Leu Thr Gln Glu Glu Ile Thr Ala Thr Val	
565 570 575	
Lys Val Asn Leu Pro Phe Gly Arg Pro Arg Val Leu Gln Lys Asn Val	
580 585 590	
Asp His Cys Leu Leu Tyr His Arg Glu Tyr Val Ser Gly Phe Gly Lys	
595 600 605	
Ala Met Arg Met Pro Met Trp Ser Ser Tyr Thr Val Pro Gln Leu Gly	
610 615 620	
Asp Thr Ser Pro Leu Pro Pro Thr Val Pro Asp Cys Leu Arg Ala Asp	
625 630 635 640	
Val Arg Val Pro Pro Ser Glu Ser Gln Lys Cys Ser Phe Tyr Leu Ala	30
645 650 655	
Asp Lys Asn Ile Thr His Gly Phe Leu Tyr Pro Pro Ala Ser Asn Arg	
660 665 670	
Thr Ser Asp Ser Gln Tyr Asp Ala Leu Ile Thr Ser Asn Leu Val Pro	
675 680 685	
Met Tyr Glu Glu Phe Arg Lys Met Trp Asp Tyr Phe His Ser Val Leu	
690 695 700	
Leu Ile Lys His Ala Thr Glu Arg Asn Gly Val Asn Val Val Ser Gly	
705 710 715 720	
Pro Ile Phe Asp Tyr Asn Tyr Asp Gly His Phe Asp Ala Pro Asp Glu	
725 730 735	
Ile Thr Lys His Leu Ala Asn Thr Asp Val Pro Ile Pro Thr His Tyr	40
740 745 750	

【表 1 4 - 3】

Phe Val Val Leu Thr Ser Cys Lys Asn Lys Ser His Thr Pro Glu Asn	
755 760 765	
Cys Pro Gly Trp Leu Asp Val Leu Pro Phe Ile Ile Pro His Arg Pro	
770 775 780	
Thr Asn Val Glu Ser Cys Pro Glu Gly Lys Pro Glu Ala Leu Trp Val	
785 790 795 800	
Glu Glu Arg Phe Thr Ala His Ile Ala Arg Val Arg Asp Val Glu Leu	
805 810 815	
Leu Thr Gly Leu Asp Phe Tyr Gln Asp Lys Val Gln Pro Val Ser Glu	10
820 825 830	
Ile Leu Gln Leu Lys Thr Tyr Leu Pro Thr Phe Glu <u>Thr Thr Ile Asp</u>	
835 840 845	
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly	
850 855 860	
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile	
865 870 875 880	
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu	
885 890 895	
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His	
900 905 910	20
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg	
915 920 925	
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys	
930 935 940	
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu	
945 950 955 960	
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr	
965 970 975	
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu	
980 985 990	
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp	30
995 1000 1005	
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro	
1010 1015 1020	
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr	
1025 1030 1035	
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser	
1040 1045 1050	
Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu	
1055 1060 1065	
Ser Leu Ser Pro Gly Lys	40
1070	

単一下線：シグナルペプチド配列、二重下線：N P P 3 3の始まりおよび終わり、** = シグナルペプチド配列での切断位置、太字残基は、アルブミン配列を示す

【 0 4 8 4 】

配列番号 1 5 - E N P P 5 - N P P 3 - アルブミン配列

【表 15 - 1】

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	Lys	Gln	Gly	Ser	Cys	Arg	Lys	Lys	Cys	Phe
		20				25						30			
Asp	Ala	Ser	Phe	Arg	Gly	Leu	Glu	Asn	Cys	Arg	Cys	Asp	Val	Ala	Cys
	35					40						45			
Lys	Asp	Arg	Gly	Asp	Cys	Cys	Trp	Asp	Phe	Glu	Asp	Thr	Cys	Val	Glu
	50					55						60			
Ser	Thr	Arg	Ile	Trp	Met	Cys	Asn	Lys	Phe	Arg	Cys	Gly	Glu	Arg	Leu
65					70					75				80	
Glu	Ala	Ser	Leu	Cys	Ser	Cys	Ser	Asp	Asp	Cys	Leu	Gln	Arg	Lys	Asp
			85						90					95	
Cys	Cys	Ala	Asp	Tyr	Lys	Ser	Val	Cys	Gln	Gly	Glu	Thr	Ser	Trp	Leu
		100						105						110	
Glu	Glu	Asn	Cys	Asp	Thr	Ala	Gln	Gln	Ser	Gln	Cys	Pro	Glu	Gly	Phe
		115						120						125	
Asp	Leu	Pro	Pro	Val	Ile	Leu	Phe	Ser	Met	Asp	Gly	Phe	Arg	Ala	Glu
	130						135							140	
Tyr	Leu	Tyr	Thr	Trp	Asp	Thr	Leu	Met	Pro	Asn	Ile	Asn	Lys	Leu	Lys
145						150						155			160
Thr	Cys	Gly	Ile	His	Ser	Lys	Tyr	Met	Arg	Ala	Met	Tyr	Pro	Thr	Lys
			165							170				175	
Thr	Phe	Pro	Asn	His	Tyr	Thr	Ile	Val	Thr	Gly	Leu	Tyr	Pro	Glu	Ser
			180							185				190	
His	Gly	Ile	Ile	Asp	Asn	Asn	Met	Tyr	Asp	Val	Asn	Leu	Asn	Lys	Asn
	195							200						205	
Phe	Ser	Leu	Ser	Ser	Lys	Glu	Gln	Asn	Asn	Pro	Ala	Trp	Trp	His	Gly
	210						215							220	
Gln	Pro	Met	Trp	Leu	Thr	Ala	Met	Tyr	Gln	Gly	Leu	Lys	Ala	Ala	Thr
225						230						235			240
Tyr	Phe	Trp	Pro	Gly	Ser	Glu	Val	Ala	Ile	Asn	Gly	Ser	Phe	Pro	Ser
			245							250				255	
Ile	Tyr	Met	Pro	Tyr	Asn	Gly	Ser	Val	Pro	Phe	Glu	Glu	Arg	Ile	Ser
		260						265						270	
Thr	Leu	Leu	Lys	Trp	Leu	Asp	Leu	Pro	Lys	Ala	Glu	Arg	Pro	Arg	Phe
	275							280						285	
Tyr	Thr	Met	Tyr	Phe	Glu	Glu	Pro	Asp	Ser	Ser	Gly	His	Ala	Gly	Gly
	290						295					300			
Pro	Val	Ser	Ala	Arg	Val	Ile	Lys	Ala	Leu	Gln	Val	Val	Asp	His	Ala
305						310						315			320
Phe	Gly	Met	Leu	Met	Glu	Gly	Leu	Lys	Gln	Arg	Asn	Leu	His	Asn	Cys
			325							330				335	
Val	Asn	Ile	Ile	Leu	Leu	Ala	Asp	His	Gly	Met	Asp	Gln	Thr	Tyr	Cys
		340								345				350	
Asn	Lys	Met	Glu	Tyr	Met	Thr	Asp	Tyr	Phe	Pro	Arg	Ile	Asn	Phe	Phe
	355							360						365	

10

20

30

40

50

【表 15 - 2】

Tyr Met Tyr Glu Gly Pro Ala Pro Arg Ile Arg Ala His Asn Ile Pro	
370 375 380	
His Asp Phe Phe Ser Phe Asn Ser Glu Glu Ile Val Arg Asn Leu Ser	
385 390 395 400	
Cys Arg Lys Pro Asp Gln His Phe Lys Pro Tyr Leu Thr Pro Asp Leu	
405 410 415	
Pro Lys Arg Leu His Tyr Ala Lys Asn Val Arg Ile Asp Lys Val His	
420 425 430	
Leu Phe Val Asp Gln Gln Trp Leu Ala Val Arg Ser Lys Ser Asn Thr	
435 440 445	
Asn Cys Gly Gly Gly Asn His Gly Tyr Asn Asn Glu Phe Arg Ser Met	10
450 455 460	
Glu Ala Ile Phe Leu Ala His Gly Pro Ser Phe Lys Glu Lys Thr Glu	
465 470 475 480	
Val Glu Pro Phe Glu Asn Ile Glu Val Tyr Asn Leu Met Cys Asp Leu	
485 490 495	
Leu Arg Ile Gln Pro Ala Pro Asn Asn Gly Thr His Gly Ser Leu Asn	
500 505 510	
His Leu Leu Lys Val Pro Phe Tyr Glu Pro Ser His Ala Glu Glu Val	
515 520 525	
Ser Lys Phe Ser Val Cys Gly Phe Ala Asn Pro Leu Pro Thr Glu Ser	
530 535 540	
Leu Asp Cys Phe Cys Pro His Leu Gln Asn Ser Thr Gln Leu Glu Gln	20
545 550 555 560	
Val Asn Gln Met Leu Asn Leu Thr Gln Glu Glu Ile Thr Ala Thr Val	
565 570 575	
Lys Val Asn Leu Pro Phe Gly Arg Pro Arg Val Leu Gln Lys Asn Val	
580 585 590	
Asp His Cys Leu Leu Tyr His Arg Glu Tyr Val Ser Gly Phe Gly Lys	
595 600 605	
Ala Met Arg Met Pro Met Trp Ser Ser Tyr Thr Val Pro Gln Leu Gly	
610 615 620	
Asp Thr Ser Pro Leu Pro Pro Thr Val Pro Asp Cys Leu Arg Ala Asp	
625 630 635 640	
Val Arg Val Pro Pro Ser Glu Ser Gln Lys Cys Ser Phe Tyr Leu Ala	30
645 650 655	
Asp Lys Asn Ile Thr His Gly Phe Leu Tyr Pro Pro Ala Ser Asn Arg	
660 665 670	
Thr Ser Asp Ser Gln Tyr Asp Ala Leu Ile Thr Ser Asn Leu Val Pro	
675 680 685	
Met Tyr Glu Glu Phe Arg Lys Met Trp Asp Tyr Phe His Ser Val Leu	
690 695 700	
Leu Ile Lys His Ala Thr Glu Arg Asn Gly Val Asn Val Val Ser Gly	
705 710 715 720	
Pro Ile Phe Asp Tyr Asn Tyr Asp Gly His Phe Asp Ala Pro Asp Glu	
725 730 735	
Ile Thr Lys His Leu Ala Asn Thr Asp Val Pro Ile Pro Thr His Tyr	40
740 745 750	

【表 15 - 3】

Phe Val Val Leu Thr Ser Cys Lys Asn Lys Ser His Thr Pro Glu Asn	
755 760 765	
Cys Pro Gly Trp Leu Asp Val Leu Pro Phe Ile Ile Pro His Arg Pro	
770 775 780	
Thr Asn Val Glu Ser Cys Pro Glu Gly Lys Pro Glu Ala Leu Trp Val	
785 790 795 800	
Glu Glu Arg Phe Thr Ala His Ile Ala Arg Val Arg Asp Val Glu Leu	
805 810 815	
Leu Thr Gly Leu Asp Phe Tyr Gln Asp Lys Val Gln Pro Val Ser Glu	
820 825 830	
Ile Leu Gln Leu Lys Thr Tyr Leu Pro Thr Phe Glu <u>Thr Thr Ile Gly</u>	
835 840 845	
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Met Lys Trp	
850 855 860	
Val Thr Phe Leu Leu Leu Phe Val Ser Gly Ser Ala Phe Ser Arg	
865 870 875 880	
Gly Val Phe Arg Arg Glu Ala His Lys Ser Glu Ile Ala His Arg Tyr	
885 890 895	
Asn Asp Leu Gly Glu Gln His Phe Lys Gly Leu Val Leu Ile Ala Phe	
900 905 910	
Ser Gln Tyr Leu Gln Lys Cys Ser Tyr Asp Glu His Ala Lys Leu Val	
915 920 925	
Gln Glu Val Thr Asp Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala	
930 935 940	
Ala Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys	
945 950 955 960	
Ala Ile Pro Asn Leu Arg Glu Asn Tyr Gly Glu Leu Ala Asp Cys Cys	
965 970 975	
Thr Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp	
980 985 990	
Asp Asn Pro Ser Leu Pro Pro Phe Glu Arg Pro Glu Ala Glu Ala Met	
995 1000 1005	
Cys Thr Ser Phe Lys Glu Asn Pro Thr Thr Phe Met Gly His Tyr	
1010 1015 1020	
Leu His Glu Val Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu	
1025 1030 1035	
Leu Leu Tyr Tyr Ala Glu Gln Tyr Asn Glu Ile Leu Thr Gln Cys	
1040 1045 1050	
Cys Ala Glu Ala Asp Lys Glu Ser Cys Leu Thr Pro Lys Leu Asp	
1055 1060 1065	
Gly Val Lys Glu Lys Ala Leu Val Ser Ser Val Arg Gln Arg Met	
1070 1075 1080	
Lys Cys Ser Ser Met Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala	
1085 1090 1095	
Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Thr Phe Pro Asn Ala Asp Phe	
1100 1105 1110	
Ala Glu Ile Thr Lys Leu Ala Thr Asp Leu Thr Lys Val Asn Lys	
1115 1120 1125	

10

20

30

40

50

【表 15 - 4】

Glu Cys	Cys His	Gly Asp	Leu	Leu Glu	Cys Ala	Asp	Asp Arg	Ala
1130			1135			1140		
Glu Leu	Ala Lys	Tyr Met	Cys	Glu Asn	Gln Ala	Thr	Ile Ser	Ser
1145			1150			1155		
Lys Leu	Gln Thr	Cys Cys	Asp	Lys Pro	Leu Leu	Lys	Lys Ala	His
1160			1165			1170		
Cys Leu	Ser Glu	Val Glu	His	Asp Thr	Met Pro	Ala	Asp Leu	Pro
1175			1180			1185		
Ala Ile	Ala Ala	Asp Phe	Val	Glu Asp	Gln Glu	Val	Cys Lys	Asn
1190			1195			1200		
Tyr Ala	Glu Ala	Lys Asp	Val	Phe Leu	Gly Thr	Phe	Leu Tyr	Glu
1205			1210			1215		
Tyr Ser	Arg Arg	His Pro	Asp	Tyr Ser	Val Ser	Leu	Leu Leu	Arg
1220			1225			1230		
Leu Ala	Lys Lys	Tyr Glu	Ala	Thr Leu	Glu Lys	Cys	Cys Ala	Glu
1235			1240			1245		
Ala Asn	Pro Pro	Ala Cys	Tyr	Gly Thr	Val Leu	Ala	Glu Phe	Gln
1250			1255			1260		
Pro Leu	Val Glu	Glu Pro	Lys	Asn Leu	Val Lys	Thr	Asn Cys	Asp
1265			1270			1275		
Leu Tyr	Glu Lys	Leu Gly	Glu	Tyr Gly	Phe Gln	Asn	Ala Ile	Leu
1280			1285			1290		
Val Arg	Tyr Thr	Gln Lys	Ala	Pro Gln	Val Ser	Thr	Pro Thr	Leu
1295			1300			1305		
Val Glu	Ala Ala	Arg Asn	Leu	Gly Arg	Val Gly	Thr	Lys Cys	Cys
1310			1315			1320		
Thr Leu	Pro Glu	Asp Gln	Arg	Leu Pro	Cys Val	Glu	Asp Tyr	Leu
1325			1330			1335		
Ser Ala	Ile Leu	Asn Arg	Val	Cys Leu	Leu His	Glu	Lys Thr	Pro
1340			1345			1350		
Val Ser	Glu His	Val Thr	Lys	Cys Cys	Ser Gly	Ser	Leu Val	Glu
1355			1360			1365		
Arg Arg	Pro Cys	Phe Ser	Ala	Leu Thr	Val Asp	Glu	Thr Tyr	Val
1370			1375			1380		
Pro Lys	Glu Phe	Lys Ala	Glu	Thr Phe	Thr Phe	His	Ser Asp	Ile
1385			1390			1395		
Cys Thr	Leu Pro	Glu Lys	Glu	Lys Gln	Ile Lys	Lys	Gln Thr	Ala
1400			1405			1410		
Leu Ala	Glu Leu	Val Lys	His	Lys Pro	Lys Ala	Thr	Ala Glu	Gln
1415			1420			1425		
Leu Lys	Thr Val	Met Asp	Asp	Phe Ala	Gln Phe	Leu	Asp Thr	Cys
1430			1435			1440		
Cys Lys	Ala Ala	Asp Lys	Asp	Thr Cys	Phe Ser	Thr	Glu Gly	Pro
1445			1450			1455		
Asn Leu	Val Thr	Arg Cys	Lys	Asp Ala	Leu Ala			
1460			1465					

10

20

30

40

単一下線：シグナルペプチド配列、二重下線：N P P 3の始まりおよび終わり、**＝シグナルペプチド配列での切断位置、太字残基は、アルブミン配列を示す

【0485】

配列番号 16 - E N P P 5 タンパク質輸出シグナル配列

【表 1 6】

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 Xaa
 20

【0 4 8 6】

配列番号 1 7 - E N P P 5 - 1 - F c

【表 1 7 - 1】

Met Thr Ser Lys Phe Leu Leu Val Ser Phe Ile Leu Ala Ala Leu Ser	10
1 5 10 15	
Leu Ser Thr Thr Phe Ser*Gly Leu Lys Pro Ser Cys Ala Lys Glu Val	
20 25 30	
Lys Ser Cys Lys Gly Arg Cys Phe Glu Arg Thr Phe Gly Asn Cys Arg	
35 40 45	
Cys Asp Ala Ala Cys Val Glu Leu Gly Asn Cys Cys Leu Asp Tyr Gln	
50 55 60	
Glu Thr Cys Ile Glu Pro Glu His Ile Trp Thr Cys Asn Lys Phe Arg	
65 70 75 80	
Cys Gly Glu Lys Arg Leu Thr Arg Ser Leu Cys Ala Cys Ser Asp Asp	
85 90 95	
Cys Lys Asp Lys Gly Asp Cys Cys Ile Asn Tyr Ser Ser Val Cys Gln	20
100 105 110	
Gly Glu Lys Ser Trp Val Glu Glu Pro Cys Glu Ser Ile Asn Glu Pro	
115 120 125	
Gln Cys Pro Ala Gly Phe Glu Thr Pro Pro Thr Leu Leu Phe Ser Leu	
130 135 140	
Asp Gly Phe Arg Ala Glu Tyr Leu His Thr Trp Gly Gly Leu Leu Pro	
145 150 155 160	
Val Ile Ser Lys Leu Lys Lys Cys Gly Thr Tyr Thr Lys Asn Met Arg	
165 170 175	
Pro Val Tyr Pro Thr Lys Thr Phe Pro Asn His Tyr Ser Ile Val Thr	
180 185 190	
Gly Leu Tyr Pro Glu Ser His Gly Ile Ile Asp Asn Lys Met Tyr Asp	30
195 200 205	
Pro Lys Met Asn Ala Ser Phe Ser Leu Lys Ser Lys Glu Lys Phe Asn	
210 215 220	
Pro Glu Trp Tyr Lys Gly Glu Pro Ile Trp Val Thr Ala Lys Tyr Gln	
225 230 235 240	
Gly Leu Lys Ser Gly Thr Phe Phe Trp Pro Gly Ser Asp Val Glu Ile	
245 250 255	
Asn Gly Ile Phe Pro Asp Ile Tyr Lys Met Tyr Asn Gly Ser Val Pro	
260 265 270	
Phe Glu Glu Arg Ile Leu Ala Val Leu Gln Trp Leu Gln Leu Pro Lys	
275 280 285	
Asp Glu Arg Pro His Phe Tyr Thr Leu Tyr Leu Glu Glu Pro Asp Ser	40
290 295 300	
Ser Gly His Ser Tyr Gly Pro Val Ser Ser Glu Val Ile Lys Ala Leu	
305 310 315 320	
Gln Arg Val Asp Gly Met Val Gly Met Leu Met Asp Gly Leu Lys Glu	
325 330 335	
Leu Asn Leu His Arg Cys Leu Asn Leu Ile Leu Ile Ser Asp His Gly	
340 345 350	
Met Glu Gln Gly Ser Cys Lys Lys Tyr Ile Tyr Leu Asn Lys Tyr Leu	
355 360 365	

【表 17 - 2】

Gly Asp Val Lys Asn Ile Lys Val Ile Tyr Gly Pro Ala Ala Arg Leu	
370 375 380	
Arg Pro Ser Asp Val Pro Asp Lys Tyr Tyr Ser Phe Asn Tyr Glu Gly	
385 390 395 400	
Ile Ala Arg Asn Leu Ser Cys Arg Glu Pro Asn Gln His Phe Lys Pro	
405 410 415	
Tyr Leu Lys His Phe Leu Pro Lys Arg Leu His Phe Ala Lys Ser Asp	
420 425 430	
Arg Ile Glu Pro Leu Thr Phe Tyr Leu Asp Pro Gln Trp Gln Leu Ala	
435 440 445	
Leu Asn Pro Ser Glu Arg Lys Tyr Cys Gly Ser Gly Phe His Gly Ser	10
450 455 460	
Asp Asn Val Phe Ser Asn Met Gln Ala Leu Phe Val Gly Tyr Gly Pro	
465 470 475 480	
Gly Phe Lys His Gly Ile Glu Ala Asp Thr Phe Glu Asn Ile Glu Val	
485 490 495	
Tyr Asn Leu Met Cys Asp Leu Leu Asn Leu Thr Pro Ala Pro Asn Asn	
500 505 510	
Gly Thr His Gly Ser Leu Asn His Leu Leu Lys Asn Pro Val Tyr Thr	
515 520 525	
Pro Lys His Pro Lys Glu Val His Pro Leu Val Gln Cys Pro Phe Thr	
530 535 540	
Arg Asn Pro Arg Asp Asn Leu Gly Cys Ser Cys Asn Pro Ser Ile Leu	20
545 550 555 560	
Pro Ile Glu Asp Phe Gln Thr Gln Phe Asn Leu Thr Val Ala Glu Glu	
565 570 575	
Lys Ile Ile Lys His Glu Thr Leu Pro Tyr Gly Arg Pro Arg Val Leu	
580 585 590	
Gln Lys Glu Asn Thr Ile Cys Leu Leu Ser Gln His Gln Phe Met Ser	
595 600 605	
Gly Tyr Ser Gln Asp Ile Leu Met Pro Leu Trp Thr Ser Tyr Thr Val	
610 615 620	
Asp Arg Asn Asp Ser Phe Ser Thr Glu Asp Phe Ser Asn Cys Leu Tyr	
625 630 635 640	
Gln Asp Phe Arg Ile Pro Leu Ser Pro Val His Lys Cys Ser Phe Tyr	30
645 650 655	
Lys Asn Asn Thr Lys Val Ser Tyr Gly Phe Leu Ser Pro Pro Gln Leu	
660 665 670	
Asn Lys Asn Ser Ser Gly Ile Tyr Ser Glu Ala Leu Leu Thr Thr Asn	
675 680 685	
Ile Val Pro Met Tyr Gln Ser Phe Gln Val Ile Trp Arg Tyr Phe His	
690 695 700	
Asp Thr Leu Leu Arg Lys Tyr Ala Glu Glu Arg Asn Gly Val Asn Val	
705 710 715 720	
Val Ser Gly Pro Val Phe Asp Phe Asp Tyr Asp Gly Arg Cys Asp Ser	
725 730 735	
Leu Glu Asn Leu Arg Gln Lys Arg Arg Val Ile Arg Asn Gln Glu Ile	40
740 745 750	

【表 17-3】

Leu	Ile	Pro	Thr	His	Phe	Phe	Ile	Val	Leu	Thr	Ser	Cys	Lys	Asp	Thr	
	755						760					765				
Ser	Gln	Thr	Pro	Leu	His	Cys	Glu	Asn	Leu	Asp	Thr	Leu	Ala	Phe	Ile	
	770				775					780						
Leu	Pro	His	Arg	Thr	Asp	Asn	Ser	Glu	Ser	Cys	Val	His	Gly	Lys	His	
785				790						795					800	
Asp	Ser	Ser	Trp	Val	Glu	Glu	Leu	Leu	Met	Leu	His	Arg	Ala	Arg	Ile	
			805						810					815		
Thr	Asp	Val	Glu	His	Ile	Thr	Gly	Leu	Ser	Phe	Tyr	Gln	Gln	Arg	Lys	
		820					825						830			
Glu	Pro	Val	Ser	Asp	Ile	Leu	Lys	Leu	Lys	Thr	His	Leu	Pro	Thr	Phe	
	835						840					845				
Ser	<u>Gln</u>	<u>Glu</u>	<u>Asp</u>	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	
	850					855						860				
Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	
865				870					875					880		
Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	
			885					890					895			
Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	
		900					905					910				
Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	
	915					920					925					
Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	
	930					935					940					
Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	
945				950						955				960		
Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	
			965					970				975				
Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	
		980					985					990				
Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	
	995						1000					1005				
Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr		
	1010					1015					1020					
Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu		
	1025					1030					1035					
Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn		
	1040					1045					1050					
Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr		
	1055					1060					1065					
Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys						
	1070					1075										

10

20

30

40

単一下線：シグナルペプチド配列、二重下線：N P P 3の始まりおよび終わり、** = シグナルペプチド配列での切断位置、太字残基は、Fc配列を示す

【0487】

配列番号 18 - E N P P 7 - 1 - F c アミノ酸配列

【表 18 - 1】

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	Gly	Leu	Lys	Pro	Ser	Cys	Ala	Lys	Glu	Val
		20					25					30			
Lys	Ser	Cys	Lys	Gly	Arg	Cys	Phe	Glu	Arg	Thr	Phe	Gly	Asn	Cys	Arg
	35					40						45			
Cys	Asp	Ala	Ala	Cys	Val	Glu	Leu	Gly	Asn	Cys	Cys	Leu	Asp	Tyr	Gln
	50				55						60				
Glu	Thr	Cys	Ile	Glu	Pro	Glu	His	Ile	Trp	Thr	Cys	Asn	Lys	Phe	Arg
65				70					75					80	
Cys	Gly	Glu	Lys	Arg	Leu	Thr	Arg	Ser	Leu	Cys	Ala	Cys	Ser	Asp	Asp
			85					90						95	
Cys	Lys	Asp	Lys	Gly	Asp	Cys	Cys	Ile	Asn	Tyr	Ser	Ser	Val	Cys	Gln
	100							105					110		
Gly	Glu	Lys	Ser	Trp	Val	Glu	Glu	Pro	Cys	Glu	Ser	Ile	Asn	Glu	Pro
	115						120						125		
Gln	Cys	Pro	Ala	Gly	Phe	Glu	Thr	Pro	Pro	Thr	Leu	Leu	Phe	Ser	Leu
	130					135							140		
Asp	Gly	Phe	Arg	Ala	Glu	Tyr	Leu	His	Thr	Trp	Gly	Gly	Leu	Leu	Pro
145				150						155				160	
Val	Ile	Ser	Lys	Leu	Lys	Lys	Cys	Gly	Thr	Tyr	Thr	Lys	Asn	Met	Arg
			165						170					175	
Pro	Val	Tyr	Pro	Thr	Lys	Thr	Phe	Pro	Asn	His	Tyr	Ser	Ile	Val	Thr
		180						185						190	
Gly	Leu	Tyr	Pro	Glu	Ser	His	Gly	Ile	Ile	Asp	Asn	Lys	Met	Tyr	Asp
	195						200						205		
Pro	Lys	Met	Asn	Ala	Ser	Phe	Ser	Leu	Lys	Ser	Lys	Glu	Lys	Phe	Asn
	210					215							220		
Pro	Glu	Trp	Tyr	Lys	Gly	Glu	Pro	Ile	Trp	Val	Thr	Ala	Lys	Tyr	Gln
225				230						235				240	
Gly	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Phe	Phe	Trp	Pro	Gly	Ser	Asp	Val	Glu	Ile
			245					250						255	
Asn	Gly	Ile	Phe	Pro	Asp	Ile	Tyr	Lys	Met	Tyr	Asn	Gly	Ser	Val	Pro
	260						265						270		
Phe	Glu	Glu	Arg	Ile	Leu	Ala	Val	Leu	Gln	Trp	Leu	Gln	Leu	Pro	Lys
	275						280						285		
Asp	Glu	Arg	Pro	His	Phe	Tyr	Thr	Leu	Tyr	Leu	Glu	Glu	Pro	Asp	Ser
	290					295						300			
Ser	Gly	His	Ser	Tyr	Gly	Pro	Val	Ser	Ser	Glu	Val	Ile	Lys	Ala	Leu
305				310						315				320	
Gln	Arg	Val	Asp	Gly	Met	Val	Gly	Met	Leu	Met	Asp	Gly	Leu	Lys	Glu
			325						330					335	
Leu	Asn	Leu	His	Arg	Cys	Leu	Asn	Leu	Ile	Leu	Ile	Ser	Asp	His	Gly
	340						345						350		
Met	Glu	Gln	Gly	Ser	Cys	Lys	Lys	Tyr	Ile	Tyr	Leu	Asn	Lys	Tyr	Leu
	355						360						365		

10

20

30

40

50

【表 18 - 2】

Gly Asp Val Lys Asn Ile Lys Val Ile Tyr Gly Pro Ala Ala Arg Leu	
370 375 380	
Arg Pro Ser Asp Val Pro Asp Lys Tyr Tyr Ser Phe Asn Tyr Glu Gly	
385 390 395 400	
Ile Ala Arg Asn Leu Ser Cys Arg Glu Pro Asn Gln His Phe Lys Pro	
405 410 415	
Tyr Leu Lys His Phe Leu Pro Lys Arg Leu His Phe Ala Lys Ser Asp	
420 425 430	
Arg Ile Glu Pro Leu Thr Phe Tyr Leu Asp Pro Gln Trp Gln Leu Ala	
435 440 445	
Leu Asn Pro Ser Glu Arg Lys Tyr Cys Gly Ser Gly Phe His Gly Ser	10
450 455 460	
Asp Asn Val Phe Ser Asn Met Gln Ala Leu Phe Val Gly Tyr Gly Pro	
465 470 475 480	
Gly Phe Lys His Gly Ile Glu Ala Asp Thr Phe Glu Asn Ile Glu Val	
485 490 495	
Tyr Asn Leu Met Cys Asp Leu Leu Asn Leu Thr Pro Ala Pro Asn Asn	
500 505 510	
Gly Thr His Gly Ser Leu Asn His Leu Leu Lys Asn Pro Val Tyr Thr	
515 520 525	
Pro Lys His Pro Lys Glu Val His Pro Leu Val Gln Cys Pro Phe Thr	
530 535 540	
Arg Asn Pro Arg Asp Asn Leu Gly Cys Ser Cys Asn Pro Ser Ile Leu	20
545 550 555 560	
Pro Ile Glu Asp Phe Gln Thr Gln Phe Asn Leu Thr Val Ala Glu Glu	
565 570 575	
Lys Ile Ile Lys His Glu Thr Leu Pro Tyr Gly Arg Pro Arg Val Leu	
580 585 590	
Gln Lys Glu Asn Thr Ile Cys Leu Leu Ser Gln His Gln Phe Met Ser	
595 600 605	
Gly Tyr Ser Gln Asp Ile Leu Met Pro Leu Trp Thr Ser Tyr Thr Val	
610 615 620	
Asp Arg Asn Asp Ser Phe Ser Thr Glu Asp Phe Ser Asn Cys Leu Tyr	
625 630 635 640	
Gln Asp Phe Arg Ile Pro Leu Ser Pro Val His Lys Cys Ser Phe Tyr	30
645 650 655	
Lys Asn Asn Thr Lys Val Ser Tyr Gly Phe Leu Ser Pro Pro Gln Leu	
660 665 670	
Asn Lys Asn Ser Ser Gly Ile Tyr Ser Glu Ala Leu Leu Thr Thr Asn	
675 680 685	
Ile Val Pro Met Tyr Gln Ser Phe Gln Val Ile Trp Arg Tyr Phe His	
690 695 700	
Asp Thr Leu Leu Arg Lys Tyr Ala Glu Glu Arg Asn Gly Val Asn Val	
705 710 715 720	
Val Ser Gly Pro Val Phe Asp Phe Asp Tyr Asp Gly Arg Cys Asp Ser	
725 730 735	
Leu Glu Asn Leu Arg Gln Lys Arg Arg Val Ile Arg Asn Gln Glu Ile	40
740 745 750	

【表 18 - 3】

Leu Ile Pro Thr His Phe Phe Ile Val Leu Thr Ser Cys Lys Asp Thr			
755	760	765	
Ser Gln Thr Pro Leu His Cys Glu Asn Leu Asp Thr Leu Ala Phe Ile			
770	775	780	
Leu Pro His Arg Thr Asp Asn Ser Glu Ser Cys Val His Gly Lys His			
785	790	795	800
Asp Ser Ser Trp Val Glu Glu Leu Leu Met Leu His Arg Ala Arg Ile			
805	810	815	
Thr Asp Val Glu His Ile Thr Gly Leu Ser Phe Tyr Gln Gln Arg Lys			10
820	825	830	
Glu Pro Val Ser Asp Ile Leu Lys Leu Lys Thr His Leu Pro Thr Phe			
835	840	845	
Ser <u>Gln Glu Asp</u> Leu Ile Asn Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys			
850	855	860	
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro			
865	870	875	880
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys			
885	890	895	
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp			20
900	905	910	
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu			
915	920	925	
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu			
930	935	940	
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn			
945	950	955	960
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly			
965	970	975	
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu			
980	985	990	
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr			30
995	1000	1005	
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu			
1010	1015	1020	
Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser			
1025	1030	1035	
Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln			
1040	1045	1050	
Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His			
1055	1060	1065	
Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys			40
1070	1075	1080	

単一下線：シグナルペプチド配列、二重下線：N P P 1の始まりおよび終わり、** = シグナルペプチド配列での切断位置、太字残基は、Fc配列を示す

【0488】

配列番号19 - E N P P 7 1 (N P P 1 N末端G L Kを欠く) アミノ酸配列：

【表 19 - 1】

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	Pro	Ser	Cys	Ala	Lys	Glu	Val	Lys	Ser	Cys
			20				25						30		
Lys	Gly	Arg	Cys	Phe	Glu	Arg	Thr	Phe	Gly	Asn	Cys	Arg	Cys	Asp	Ala
		35					40					45			
Ala	Cys	Val	Glu	Leu	Gly	Asn	Cys	Cys	Leu	Asp	Tyr	Gln	Glu	Thr	Cys
	50					55					60				
Ile	Glu	Pro	Glu	His	Ile	Trp	Thr	Cys	Asn	Lys	Phe	Arg	Cys	Gly	Glu
65					70					75				80	
Lys	Arg	Leu	Thr	Arg	Ser	Leu	Cys	Ala	Cys	Ser	Asp	Asp	Cys	Lys	Asp
				85						90				95	
Lys	Gly	Asp	Cys	Cys	Ile	Asn	Tyr	Ser	Ser	Val	Cys	Gln	Gly	Glu	Lys
			100					105					110		
Ser	Trp	Val	Glu	Glu	Pro	Cys	Glu	Ser	Ile	Asn	Glu	Pro	Gln	Cys	Pro
		115					120					125			
Ala	Gly	Phe	Glu	Thr	Pro	Pro	Thr	Leu	Leu	Phe	Ser	Leu	Asp	Gly	Phe
		130					135					140			
Arg	Ala	Glu	Tyr	Leu	His	Thr	Trp	Gly	Gly	Leu	Leu	Pro	Val	Ile	Ser
145					150					155				160	
Lys	Leu	Lys	Lys	Cys	Gly	Thr	Tyr	Thr	Lys	Asn	Met	Arg	Pro	Val	Tyr
				165						170				175	
Pro	Thr	Lys	Thr	Phe	Pro	Asn	His	Tyr	Ser	Ile	Val	Thr	Gly	Leu	Tyr
				180						185				190	
Pro	Glu	Ser	His	Gly	Ile	Ile	Asp	Asn	Lys	Met	Tyr	Asp	Pro	Lys	Met
			195							200				205	
Asn	Ala	Ser	Phe	Ser	Leu	Lys	Ser	Lys	Glu	Lys	Phe	Asn	Pro	Glu	Trp
		210								215				220	
Tyr	Lys	Gly	Glu	Pro	Ile	Trp	Val	Thr	Ala	Lys	Tyr	Gln	Gly	Leu	Lys
225					230					235				240	
Ser	Gly	Thr	Phe	Phe	Trp	Pro	Gly	Ser	Asp	Val	Glu	Ile	Asn	Gly	Ile
			245							250				255	
Phe	Pro	Asp	Ile	Tyr	Lys	Met	Tyr	Asn	Gly	Ser	Val	Pro	Phe	Glu	Glu
			260							265				270	
Arg	Ile	Leu	Ala	Val	Leu	Gln	Trp	Leu	Gln	Leu	Pro	Lys	Asp	Glu	Arg
		275								280				285	
Pro	His	Phe	Tyr	Thr	Leu	Tyr	Leu	Glu	Glu	Pro	Asp	Ser	Ser	Gly	His
		290								295				300	
Ser	Tyr	Gly	Pro	Val	Ser	Ser	Glu	Val	Ile	Lys	Ala	Leu	Gln	Arg	Val
305						310					315			320	
Asp	Gly	Met	Val	Gly	Met	Leu	Met	Asp	Gly	Leu	Lys	Glu	Leu	Asn	Leu
				325						330				335	
His	Arg	Cys	Leu	Asn	Leu	Ile	Leu	Ile	Ser	Asp	His	Gly	Met	Glu	Gln
			340							345				350	
Gly	Ser	Cys	Lys	Lys	Tyr	Ile	Tyr	Leu	Asn	Lys	Tyr	Leu	Gly	Asp	Val
			355							360				365	

10

20

30

40

50

【表 19 - 2】

Lys Asn Ile Lys Val Ile Tyr Gly Pro Ala Ala Arg Leu Arg Pro Ser	
370 375 380	
Asp Val Pro Asp Lys Tyr Tyr Ser Phe Asn Tyr Glu Gly Ile Ala Arg	
385 390 395 400	
Asn Leu Ser Cys Arg Glu Pro Asn Gln His Phe Lys Pro Tyr Leu Lys	
405 410 415	
His Phe Leu Pro Lys Arg Leu His Phe Ala Lys Ser Asp Arg Ile Glu	
420 425 430	
Pro Leu Thr Phe Tyr Leu Asp Pro Gln Trp Gln Leu Ala Leu Asn Pro	
435 440 445	
Ser Glu Arg Lys Tyr Cys Gly Ser Gly Phe His Gly Ser Asp Asn Val	10
450 455 460	
Phe Ser Asn Met Gln Ala Leu Phe Val Gly Tyr Gly Pro Gly Phe Lys	
465 470 475 480	
His Gly Ile Glu Ala Asp Thr Phe Glu Asn Ile Glu Val Tyr Asn Leu	
485 490 495	
Met Cys Asp Leu Leu Asn Leu Thr Pro Ala Pro Asn Asn Gly Thr His	
500 505 510	
Gly Ser Leu Asn His Leu Leu Lys Asn Pro Val Tyr Thr Pro Lys His	
515 520 525	
Pro Lys Glu Val His Pro Leu Val Gln Cys Pro Phe Thr Arg Asn Pro	
530 535 540	
Arg Asp Asn Leu Gly Cys Ser Cys Asn Pro Ser Ile Leu Pro Ile Glu	20
545 550 555 560	
Asp Phe Gln Thr Gln Phe Asn Leu Thr Val Ala Glu Glu Lys Ile Ile	
565 570 575	
Lys His Glu Thr Leu Pro Tyr Gly Arg Pro Arg Val Leu Gln Lys Glu	
580 585 590	
Asn Thr Ile Cys Leu Leu Ser Gln His Gln Phe Met Ser Gly Tyr Ser	
595 600 605	
Gln Asp Ile Leu Met Pro Leu Trp Thr Ser Tyr Thr Val Asp Arg Asn	
610 615 620	
Asp Ser Phe Ser Thr Glu Asp Phe Ser Asn Cys Leu Tyr Gln Asp Phe	
625 630 635 640	
Arg Ile Pro Leu Ser Pro Val His Lys Cys Ser Phe Tyr Lys Asn Asn	30
645 650 655	
Thr Lys Val Ser Tyr Gly Phe Leu Ser Pro Pro Gln Leu Asn Lys Asn	
660 665 670	
Ser Ser Gly Ile Tyr Ser Glu Ala Leu Leu Thr Thr Asn Ile Val Pro	
675 680 685	
Met Tyr Gln Ser Phe Gln Val Ile Trp Arg Tyr Phe His Asp Thr Leu	
690 695 700	
Leu Arg Lys Tyr Ala Glu Glu Arg Asn Gly Val Asn Val Val Ser Gly	
705 710 715 720	
Pro Val Phe Asp Phe Asp Tyr Asp Gly Arg Cys Asp Ser Leu Glu Asn	
725 730 735	
Leu Arg Gln Lys Arg Arg Val Ile Arg Asn Gln Glu Ile Leu Ile Pro	40
740 745 750	

【表 19-3】

Thr His Phe Phe Ile Val Leu Thr Ser Cys Lys Asp Thr Ser Gln Thr
 755 760 765
 Pro Leu His Cys Glu Asn Leu Asp Thr Leu Ala Phe Ile Leu Pro His
 770 775 780
 Arg Thr Asp Asn Ser Glu Ser Cys Val His Gly Lys His Asp Ser Ser
 785 790 795 800
 Trp Val Glu Glu Leu Leu Met Leu His Arg Ala Arg Ile Thr Asp Val
 805 810 815
 Glu His Ile Thr Gly Leu Ser Phe Tyr Gln Gln Arg Lys Glu Pro Val
 820 825 830
 Ser Asp Ile Leu Lys Leu Lys Thr His Leu Pro Thr Phe Ser Gln Glu
 835 840 845
Asp

10

単一下線：シグナルペプチド配列、二重下線：N P P 3 の始まりおよび終わり、** = シ
 グナルペプチド配列での切断位置

【0489】

配列番号 20 - E N P P 7 1 (N P P 1 N 末端 G L K を欠く) F c アミノ酸配列：

20

30

40

50

【表 20 - 1】

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	Pro	Ser	Cys	Ala	Lys	Glu	Val	Lys	Ser	Cys
			20				25						30		
Lys	Gly	Arg	Cys	Phe	Glu	Arg	Thr	Phe	Gly	Asn	Cys	Arg	Cys	Asp	Ala
		35					40					45			
Ala	Cys	Val	Glu	Leu	Gly	Asn	Cys	Cys	Leu	Asp	Tyr	Gln	Glu	Thr	Cys
	50					55				60					
Ile	Glu	Pro	Glu	His	Ile	Trp	Thr	Cys	Asn	Lys	Phe	Arg	Cys	Gly	Glu
65					70					75				80	
Lys	Arg	Leu	Thr	Arg	Ser	Leu	Cys	Ala	Cys	Ser	Asp	Asp	Cys	Lys	Asp
				85						90				95	
Lys	Gly	Asp	Cys	Cys	Ile	Asn	Tyr	Ser	Ser	Val	Cys	Gln	Gly	Glu	Lys
			100					105					110		
Ser	Trp	Val	Glu	Glu	Pro	Cys	Glu	Ser	Ile	Asn	Glu	Pro	Gln	Cys	Pro
		115					120					125			
Ala	Gly	Phe	Glu	Thr	Pro	Pro	Thr	Leu	Leu	Phe	Ser	Leu	Asp	Gly	Phe
		130					135					140			
Arg	Ala	Glu	Tyr	Leu	His	Thr	Trp	Gly	Gly	Leu	Leu	Pro	Val	Ile	Ser
145					150					155				160	
Lys	Leu	Lys	Lys	Cys	Gly	Thr	Tyr	Thr	Lys	Asn	Met	Arg	Pro	Val	Tyr
				165						170				175	
Pro	Thr	Lys	Thr	Phe	Pro	Asn	His	Tyr	Ser	Ile	Val	Thr	Gly	Leu	Tyr
				180						185				190	
Pro	Glu	Ser	His	Gly	Ile	Ile	Asp	Asn	Lys	Met	Tyr	Asp	Pro	Lys	Met
			195							200				205	
Asn	Ala	Ser	Phe	Ser	Leu	Lys	Ser	Lys	Glu	Lys	Phe	Asn	Pro	Glu	Trp
		210								215				220	
Tyr	Lys	Gly	Glu	Pro	Ile	Trp	Val	Thr	Ala	Lys	Tyr	Gln	Gly	Leu	Lys
225					230					235				240	
Ser	Gly	Thr	Phe	Phe	Trp	Pro	Gly	Ser	Asp	Val	Glu	Ile	Asn	Gly	Ile
			245							250				255	
Phe	Pro	Asp	Ile	Tyr	Lys	Met	Tyr	Asn	Gly	Ser	Val	Pro	Phe	Glu	Glu
			260							265				270	
Arg	Ile	Leu	Ala	Val	Leu	Gln	Trp	Leu	Gln	Leu	Pro	Lys	Asp	Glu	Arg
		275								280				285	
Pro	His	Phe	Tyr	Thr	Leu	Tyr	Leu	Glu	Glu	Pro	Asp	Ser	Ser	Gly	His
		290								295				300	
Ser	Tyr	Gly	Pro	Val	Ser	Ser	Glu	Val	Ile	Lys	Ala	Leu	Gln	Arg	Val
305						310					315			320	
Asp	Gly	Met	Val	Gly	Met	Leu	Met	Asp	Gly	Leu	Lys	Glu	Leu	Asn	Leu
				325						330				335	
His	Arg	Cys	Leu	Asn	Leu	Ile	Leu	Ile	Ser	Asp	His	Gly	Met	Glu	Gln
			340							345				350	
Gly	Ser	Cys	Lys	Lys	Tyr	Ile	Tyr	Leu	Asn	Lys	Tyr	Leu	Gly	Asp	Val
			355							360				365	

10

20

30

40

50

【表 20 - 2】

Lys Asn Ile Lys Val Ile Tyr Gly Pro Ala Ala Arg Leu Arg Pro Ser	
370 375 380	
Asp Val Pro Asp Lys Tyr Tyr Ser Phe Asn Tyr Glu Gly Ile Ala Arg	
385 390 395 400	
Asn Leu Ser Cys Arg Glu Pro Asn Gln His Phe Lys Pro Tyr Leu Lys	
405 410 415	
His Phe Leu Pro Lys Arg Leu His Phe Ala Lys Ser Asp Arg Ile Glu	
420 425 430	
Pro Leu Thr Phe Tyr Leu Asp Pro Gln Trp Gln Leu Ala Leu Asn Pro	
435 440 445	
Ser Glu Arg Lys Tyr Cys Gly Ser Gly Phe His Gly Ser Asp Asn Val	10
450 455 460	
Phe Ser Asn Met Gln Ala Leu Phe Val Gly Tyr Gly Pro Gly Phe Lys	
465 470 475 480	
His Gly Ile Glu Ala Asp Thr Phe Glu Asn Ile Glu Val Tyr Asn Leu	
485 490 495	
Met Cys Asp Leu Leu Asn Leu Thr Pro Ala Pro Asn Asn Gly Thr His	
500 505 510	
Gly Ser Leu Asn His Leu Leu Lys Asn Pro Val Tyr Thr Pro Lys His	
515 520 525	
Pro Lys Glu Val His Pro Leu Val Gln Cys Pro Phe Thr Arg Asn Pro	
530 535 540	
Arg Asp Asn Leu Gly Cys Ser Cys Asn Pro Ser Ile Leu Pro Ile Glu	20
545 550 555 560	
Asp Phe Gln Thr Gln Phe Asn Leu Thr Val Ala Glu Glu Lys Ile Ile	
565 570 575	
Lys His Glu Thr Leu Pro Tyr Gly Arg Pro Arg Val Leu Gln Lys Glu	
580 585 590	
Asn Thr Ile Cys Leu Leu Ser Gln His Gln Phe Met Ser Gly Tyr Ser	
595 600 605	
Gln Asp Ile Leu Met Pro Leu Trp Thr Ser Tyr Thr Val Asp Arg Asn	
610 615 620	
Asp Ser Phe Ser Thr Glu Asp Phe Ser Asn Cys Leu Tyr Gln Asp Phe	
625 630 635 640	
Arg Ile Pro Leu Ser Pro Val His Lys Cys Ser Phe Tyr Lys Asn Asn	30
645 650 655	
Thr Lys Val Ser Tyr Gly Phe Leu Ser Pro Pro Gln Leu Asn Lys Asn	
660 665 670	
Ser Ser Gly Ile Tyr Ser Glu Ala Leu Leu Thr Thr Asn Ile Val Pro	
675 680 685	
Met Tyr Gln Ser Phe Gln Val Ile Trp Arg Tyr Phe His Asp Thr Leu	
690 695 700	
Leu Arg Lys Tyr Ala Glu Glu Arg Asn Gly Val Asn Val Val Ser Gly	
705 710 715 720	
Pro Val Phe Asp Phe Asp Tyr Asp Gly Arg Cys Asp Ser Leu Glu Asn	
725 730 735	
Leu Arg Gln Lys Arg Arg Val Ile Arg Asn Gln Glu Ile Leu Ile Pro	40
740 745 750	

【表 20 - 3】

Thr His Phe Phe Ile Val Leu Thr Ser Cys Lys Asp Thr Ser Gln Thr	
755	760
Pro Leu His Cys Glu Asn Leu Asp Thr Leu Ala Phe Ile Leu Pro His	
770	775
Arg Thr Asp Asn Ser Glu Ser Cys Val His Gly Lys His Asp Ser Ser	
785	790
Trp Val Glu Glu Leu Leu Met Leu His Arg Ala Arg Ile Thr Asp Val	
805	810
Glu His Ile Thr Gly Leu Ser Phe Tyr Gln Gln Arg Lys Glu Pro Val	
820	825
Ser Asp Ile Leu Lys Leu Lys Thr His Leu Pro Thr Phe Ser <u>Gln Glu</u>	
835	840
<u>Asp</u> Leu Ile Asn Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro	
850	855
Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys	
865	870
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val	
885	890
Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp	
900	905
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr	
915	920
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp	
930	935
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu	
945	950
Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg	
965	970
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys	
980	985
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp	
995	1000
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr	
1010	1015
Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu	
1025	1030
Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn	
1040	1045
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr	
1055	1060
Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys	
1070	1075

単一下線：シグナルペプチド配列、二重下線：NPP1の始まりおよび終わり、**＝シグナルペプチド配列での切断位置、太字残基は、Fc配列を示す

【0490】

配列番号21 - ENPP7-1 (NPP1 N末端GLKを欠く) - ALBアミノ酸配列

【表 2 1 - 1】

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	Pro	Ser	Cys	Ala	Lys	Glu	Val	Lys	Ser	Cys
			20				25						30		
Lys	Gly	Arg	Cys	Phe	Glu	Arg	Thr	Phe	Gly	Asn	Cys	Arg	Cys	Asp	Ala
		35				40						45			
Ala	Cys	Val	Glu	Leu	Gly	Asn	Cys	Cys	Leu	Asp	Tyr	Gln	Glu	Thr	Cys
	50				55					60					
Ile	Glu	Pro	Glu	His	Ile	Trp	Thr	Cys	Asn	Lys	Phe	Arg	Cys	Gly	Glu
65				70					75					80	
Lys	Arg	Leu	Thr	Arg	Ser	Leu	Cys	Ala	Cys	Ser	Asp	Asp	Cys	Lys	Asp
			85					90					95		
Lys	Gly	Asp	Cys	Cys	Ile	Asn	Tyr	Ser	Ser	Val	Cys	Gln	Gly	Glu	Lys
		100					105						110		
Ser	Trp	Val	Glu	Glu	Pro	Cys	Glu	Ser	Ile	Asn	Glu	Pro	Gln	Cys	Pro
	115						120					125			
Ala	Gly	Phe	Glu	Thr	Pro	Pro	Thr	Leu	Leu	Phe	Ser	Leu	Asp	Gly	Phe
	130						135					140			
Arg	Ala	Glu	Tyr	Leu	His	Thr	Trp	Gly	Gly	Leu	Leu	Pro	Val	Ile	Ser
145				150						155				160	
Lys	Leu	Lys	Lys	Cys	Gly	Thr	Tyr	Thr	Lys	Asn	Met	Arg	Pro	Val	Tyr
			165						170					175	
Pro	Thr	Lys	Thr	Phe	Pro	Asn	His	Tyr	Ser	Ile	Val	Thr	Gly	Leu	Tyr
		180						185					190		
Pro	Glu	Ser	His	Gly	Ile	Ile	Asp	Asn	Lys	Met	Tyr	Asp	Pro	Lys	Met
	195						200					205			
Asn	Ala	Ser	Phe	Ser	Leu	Lys	Ser	Lys	Glu	Lys	Phe	Asn	Pro	Glu	Trp
	210					215						220			
Tyr	Lys	Gly	Glu	Pro	Ile	Trp	Val	Thr	Ala	Lys	Tyr	Gln	Gly	Leu	Lys
225				230						235				240	
Ser	Gly	Thr	Phe	Phe	Trp	Pro	Gly	Ser	Asp	Val	Glu	Ile	Asn	Gly	Ile
			245						250					255	
Phe	Pro	Asp	Ile	Tyr	Lys	Met	Tyr	Asn	Gly	Ser	Val	Pro	Phe	Glu	Glu
	260							265					270		
Arg	Ile	Leu	Ala	Val	Leu	Gln	Trp	Leu	Gln	Leu	Pro	Lys	Asp	Glu	Arg
	275						280					285			
Pro	His	Phe	Tyr	Thr	Leu	Tyr	Leu	Glu	Glu	Pro	Asp	Ser	Ser	Gly	His
	290					295						300			
Ser	Tyr	Gly	Pro	Val	Ser	Ser	Glu	Val	Ile	Lys	Ala	Leu	Gln	Arg	Val
305				310						315				320	
Asp	Gly	Met	Val	Gly	Met	Leu	Met	Asp	Gly	Leu	Lys	Glu	Leu	Asn	Leu
			325						330					335	
His	Arg	Cys	Leu	Asn	Leu	Ile	Leu	Ile	Ser	Asp	His	Gly	Met	Glu	Gln
	340						345						350		
Gly	Ser	Cys	Lys	Lys	Tyr	Ile	Tyr	Leu	Asn	Lys	Tyr	Leu	Gly	Asp	Val
	355						360						365		

10

20

30

40

50

【表 2 1 - 2】

Lys Asn Ile Lys Val Ile Tyr Gly Pro Ala Ala Arg Leu Arg Pro Ser	
370 375 380	
Asp Val Pro Asp Lys Tyr Tyr Ser Phe Asn Tyr Glu Gly Ile Ala Arg	
385 390 395 400	
Asn Leu Ser Cys Arg Glu Pro Asn Gln His Phe Lys Pro Tyr Leu Lys	
405 410 415	
His Phe Leu Pro Lys Arg Leu His Phe Ala Lys Ser Asp Arg Ile Glu	
420 425 430	
Pro Leu Thr Phe Tyr Leu Asp Pro Gln Trp Gln Leu Ala Leu Asn Pro	
435 440 445	
Ser Glu Arg Lys Tyr Cys Gly Ser Gly Phe His Gly Ser Asp Asn Val	10
450 455 460	
Phe Ser Asn Met Gln Ala Leu Phe Val Gly Tyr Gly Pro Gly Phe Lys	
465 470 475 480	
His Gly Ile Glu Ala Asp Thr Phe Glu Asn Ile Glu Val Tyr Asn Leu	
485 490 495	
Met Cys Asp Leu Leu Asn Leu Thr Pro Ala Pro Asn Asn Gly Thr His	
500 505 510	
Gly Ser Leu Asn His Leu Leu Lys Asn Pro Val Tyr Thr Pro Lys His	
515 520 525	
Pro Lys Glu Val His Pro Leu Val Gln Cys Pro Phe Thr Arg Asn Pro	
530 535 540	
Arg Asp Asn Leu Gly Cys Ser Cys Asn Pro Ser Ile Leu Pro Ile Glu	20
545 550 555 560	
Asp Phe Gln Thr Gln Phe Asn Leu Thr Val Ala Glu Glu Lys Ile Ile	
565 570 575	
Lys His Glu Thr Leu Pro Tyr Gly Arg Pro Arg Val Leu Gln Lys Glu	
580 585 590	
Asn Thr Ile Cys Leu Leu Ser Gln His Gln Phe Met Ser Gly Tyr Ser	
595 600 605	
Gln Asp Ile Leu Met Pro Leu Trp Thr Ser Tyr Thr Val Asp Arg Asn	
610 615 620	
Asp Ser Phe Ser Thr Glu Asp Phe Ser Asn Cys Leu Tyr Gln Asp Phe	
625 630 635 640	
Arg Ile Pro Leu Ser Pro Val His Lys Cys Ser Phe Tyr Lys Asn Asn	30
645 650 655	
Thr Lys Val Ser Tyr Gly Phe Leu Ser Pro Pro Gln Leu Asn Lys Asn	
660 665 670	
Ser Ser Gly Ile Tyr Ser Glu Ala Leu Leu Thr Thr Asn Ile Val Pro	
675 680 685	
Met Tyr Gln Ser Phe Gln Val Ile Trp Arg Tyr Phe His Asp Thr Leu	
690 695 700	
Leu Arg Lys Tyr Ala Glu Glu Arg Asn Gly Val Asn Val Val Ser Gly	
705 710 715 720	
Pro Val Phe Asp Phe Asp Tyr Asp Gly Arg Cys Asp Ser Leu Glu Asn	
725 730 735	
Leu Arg Gln Lys Arg Arg Val Ile Arg Asn Gln Glu Ile Leu Ile Pro	40
740 745 750	

Thr	His	Phe	Phe	Ile	Val	Leu	Thr	Ser	Cys	Lys	Asp	Thr	Ser	Gln	Thr	
	755						760							765		
Pro	Leu	His	Cys	Glu	Asn	Leu	Asp	Thr	Leu	Ala	Phe	Ile	Leu	Pro	His	
	770					775				780						
Arg	Thr	Asp	Asn	Ser	Glu	Ser	Cys	Val	His	Gly	Lys	His	Asp	Ser	Ser	
	785				790					795					800	
Trp	Val	Glu	Glu	Leu	Leu	Met	Leu	His	Arg	Ala	Arg	Ile	Thr	Asp	Val	
				805					810					815		
Glu	His	Ile	Thr	Gly	Leu	Ser	Phe	Tyr	Gln	Gln	Arg	Lys	Glu	Pro	Val	
		820					825						830			
Ser	Asp	Ile	Leu	Lys	Leu	Lys	Thr	His	Leu	Pro	Thr	Phe	Ser	<u>Gln</u>	<u>Glu</u>	
	835					840						845				
<u>Asp</u>	Arg	Ser	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Met	Lys	Trp	Val	Thr	Phe	Leu	Leu	
	850				855						860					
Leu	Leu	Phe	Val	Ser	Gly	Ser	Ala	Phe	Ser	Arg	Gly	Val	Phe	Arg	Arg	
	865				870					875					880	
Glu	Ala	His	Lys	Ser	Glu	Ile	Ala	His	Arg	Tyr	Asn	Asp	Leu	Gly	Glu	
			885						890					895		
Gln	His	Phe	Lys	Gly	Leu	Val	Leu	Ile	Ala	Phe	Ser	Gln	Tyr	Leu	Gln	
		900						905						910		
Lys	Cys	Ser	Tyr	Asp	Glu	His	Ala	Lys	Leu	Val	Gln	Glu	Val	Thr	Asp	
	915					920						925				
Phe	Ala	Lys	Thr	Cys	Val	Ala	Asp	Glu	Ser	Ala	Ala	Asn	Cys	Asp	Lys	
	930					935					940					
Ser	Leu	His	Thr	Leu	Phe	Gly	Asp	Lys	Leu	Cys	Ala	Ile	Pro	Asn	Leu	
	945				950					955				960		
Arg	Glu	Asn	Tyr	Gly	Glu	Leu	Ala	Asp	Cys	Cys	Thr	Lys	Gln	Glu	Pro	
				965					970					975		
Glu	Arg	Asn	Glu	Cys	Phe	Leu	Gln	His	Lys	Asp	Asp	Asn	Pro	Ser	Leu	
		980						985					990			
Pro	Pro	Phe	Glu	Arg	Pro	Glu	Ala	Glu	Ala	Met	Cys	Thr	Ser	Phe	Lys	
		995					1000					1005				
Glu	Asn	Pro	Thr	Thr	Phe	Met	Gly	His	Tyr	Leu	His	Glu	Val	Ala		
	1010					1015						1020				

40

【表 2 1 - 4】

Asp Leu	Leu Glu Cys Ala Asp	Asp Arg Ala Glu Leu	Ala Lys Tyr
1130	1135	1140	
Met Cys	Glu Asn Gln Ala Thr	Ile Ser Ser Lys Leu	Gln Thr Cys
1145	1150	1155	
Cys Asp	Lys Pro Leu Leu Lys	Lys Ala His Cys Leu	Ser Glu Val
1160	1165	1170	
Glu His	Asp Thr Met Pro Ala	Asp Leu Pro Ala Ile	Ala Ala Asp
1175	1180	1185	
Phe Val	Glu Asp Gln Glu Val	Cys Lys Asn Tyr Ala	Glu Ala Lys
1190	1195	1200	
Asp Val	Phe Leu Gly Thr Phe	Leu Tyr Glu Tyr Ser	Arg Arg His
1205	1210	1215	
Pro Asp	Tyr Ser Val Ser Leu	Leu Leu Arg Leu Ala	Lys Lys Tyr
1220	1225	1230	
Glu Ala	Thr Leu Glu Lys Cys	Cys Ala Glu Ala Asn	Pro Pro Ala
1235	1240	1245	
Cys Tyr	Gly Thr Val Leu Ala	Glu Phe Gln Pro Leu	Val Glu Glu
1250	1255	1260	
Pro Lys	Asn Leu Val Lys Thr	Asn Cys Asp Leu Tyr	Glu Lys Leu
1265	1270	1275	
Gly Glu	Tyr Gly Phe Gln Asn	Ala Ile Leu Val Arg	Tyr Thr Gln
1280	1285	1290	
Lys Ala	Pro Gln Val Ser Thr	Pro Thr Leu Val Glu	Ala Ala Arg
1295	1300	1305	
Asn Leu	Gly Arg Val Gly Thr	Lys Cys Cys Thr Leu	Pro Glu Asp
1310	1315	1320	
Gln Arg	Leu Pro Cys Val Glu	Asp Tyr Leu Ser Ala	Ile Leu Asn
1325	1330	1335	
Arg Val	Cys Leu Leu His Glu	Lys Thr Pro Val Ser	Glu His Val
1340	1345	1350	
Thr Lys	Cys Cys Ser Gly Ser	Leu Val Glu Arg Arg	Pro Cys Phe
1355	1360	1365	
Ser Ala	Leu Thr Val Asp Glu	Thr Tyr Val Pro Lys	Glu Phe Lys
1370	1375	1380	
Ala Glu	Thr Phe Thr Phe His	Ser Asp Ile Cys Thr	Leu Pro Glu
1385	1390	1395	
Lys Glu	Lys Gln Ile Lys Lys	Gln Thr Ala Leu Ala	Glu Leu Val
1400	1405	1410	
Lys His	Lys Pro Lys Ala Thr	Ala Glu Gln Leu Lys	Thr Val Met
1415	1420	1425	
Asp Asp	Phe Ala Gln Phe Leu	Asp Thr Cys Cys Lys	Ala Ala Asp
1430	1435	1440	
Lys Asp	Thr Cys Phe Ser Thr	Glu Gly Pro Asn Leu	Val Thr Arg
1445	1450	1455	
Cys Lys	Asp Ala Leu Ala Arg	Ser Trp Ser His Pro	Gln Phe Glu
1460	1465	1470	
Lys			

10

20

30

40

単一下線：シグナルペプチド配列、二重下線：N P P 1の始まりおよび終わり、* * = シグナルペプチド配列での切断位置、太字残基は、アルブミン配列を示す

【0 4 9 1】

配列番号 2 2 - E N P P 7 - N P P 3 - F c 配列：

【表 2 2 - 1】

Met	Arg	Gly	Pro	Ala	Val	Leu	Leu	Thr	Val	Ala	Leu	Ala	Thr	Leu	Leu
1			5					10						15	
Ala	Pro	Gly	Ala	Lys	Gln	Gly	Ser	Cys	Arg	Lys	Lys	Cys	Phe	Asp	Ala
			20				25					30			
Ser	Phe	Arg	Gly	Leu	Glu	Asn	Cys	Arg	Cys	Asp	Val	Ala	Cys	Lys	Asp
		35					40					45			
Arg	Gly	Asp	Cys	Cys	Trp	Asp	Phe	Glu	Asp	Thr	Cys	Val	Glu	Ser	Thr
	50				55					60					
Arg	Ile	Trp	Met	Cys	Asn	Lys	Phe	Arg	Cys	Gly	Glu	Arg	Leu	Glu	Ala
65				70					75				80		
Ser	Leu	Cys	Ser	Cys	Ser	Asp	Asp	Cys	Leu	Gln	Arg	Lys	Asp	Cys	Cys
			85					90					95		
Ala	Asp	Tyr	Lys	Ser	Val	Cys	Gln	Gly	Glu	Thr	Ser	Trp	Leu	Glu	Glu
		100						105					110		
Asn	Cys	Asp	Thr	Ala	Gln	Gln	Ser	Gln	Cys	Pro	Glu	Gly	Phe	Asp	Leu
	115						120						125		
Pro	Pro	Val	Ile	Leu	Phe	Ser	Met	Asp	Gly	Phe	Arg	Ala	Glu	Tyr	Leu
	130					135							140		
Tyr	Thr	Trp	Asp	Thr	Leu	Met	Pro	Asn	Ile	Asn	Lys	Leu	Lys	Thr	Cys
145					150					155				160	
Gly	Ile	His	Ser	Lys	Tyr	Met	Arg	Ala	Met	Tyr	Pro	Thr	Lys	Thr	Phe
			165					170					175		
Pro	Asn	His	Tyr	Thr	Ile	Val	Thr	Gly	Leu	Tyr	Pro	Glu	Ser	His	Gly
		180						185					190		
Ile	Ile	Asp	Asn	Asn	Met	Tyr	Asp	Val	Asn	Leu	Asn	Lys	Asn	Phe	Ser
		195					200						205		
Leu	Ser	Ser	Lys	Glu	Gln	Asn	Asn	Pro	Ala	Trp	Trp	His	Gly	Gln	Pro
	210					215						220			
Met	Trp	Leu	Thr	Ala	Met	Tyr	Gln	Gly	Leu	Lys	Ala	Ala	Thr	Tyr	Phe
225				230					235					240	
Trp	Pro	Gly	Ser	Glu	Val	Ala	Ile	Asn	Gly	Ser	Phe	Pro	Ser	Ile	Tyr
			245					250					255		
Met	Pro	Tyr	Asn	Gly	Ser	Val	Pro	Phe	Glu	Glu	Arg	Ile	Ser	Thr	Leu
		260						265					270		
Leu	Lys	Trp	Leu	Asp	Leu	Pro	Lys	Ala	Glu	Arg	Pro	Arg	Phe	Tyr	Thr
		275						280					285		
Met	Tyr	Phe	Glu	Glu	Pro	Asp	Ser	Ser	Gly	His	Ala	Gly	Gly	Pro	Val
	290					295						300			
Ser	Ala	Arg	Val	Ile	Lys	Ala	Leu	Gln	Val	Val	Asp	His	Ala	Phe	Gly
305					310					315				320	
Met	Leu	Met	Glu	Gly	Leu	Lys	Gln	Arg	Asn	Leu	His	Asn	Cys	Val	Asn
			325					330					335		
Ile	Ile	Leu	Leu	Ala	Asp	His	Gly	Met	Asp	Gln	Thr	Tyr	Cys	Asn	Lys
		340						345					350		
Met	Glu	Tyr	Met	Thr	Asp	Tyr	Phe	Pro	Arg	Ile	Asn	Phe	Phe	Tyr	Met
	355						360					365			

10

20

30

40

50

【表 2 2 - 2】

Tyr	Glu	Gly	Pro	Ala	Pro	Arg	Ile	Arg	Ala	His	Asn	Ile	Pro	His	Asp				
370						375					380								
Phe	Phe	Ser	Phe	Asn	Ser	Glu	Glu	Ile	Val	Arg	Asn	Leu	Ser	Cys	Arg				
385				390						395				400					
Lys	Pro	Asp	Gln	His	Phe	Lys	Pro	Tyr	Leu	Thr	Pro	Asp	Leu	Pro	Lys				
			405						410					415					
Arg	Leu	His	Tyr	Ala	Lys	Asn	Val	Arg	Ile	Asp	Lys	Val	His	Leu	Phe				
			420					425						430					
Val	Asp	Gln	Gln	Trp	Leu	Ala	Val	Arg	Ser	Lys	Ser	Asn	Thr	Asn	Cys				
		435				440							445						
Gly	Gly	Gly	Asn	His	Gly	Tyr	Asn	Asn	Glu	Phe	Arg	Ser	Met	Glu	Ala				
		450				455					460								
Ile	Phe	Leu	Ala	His	Gly	Pro	Ser	Phe	Lys	Glu	Lys	Thr	Glu	Val	Glu				
465				470						475				480					
Pro	Phe	Glu	Asn	Ile	Glu	Val	Tyr	Asn	Leu	Met	Cys	Asp	Leu	Leu	Arg				
			485						490					495					
Ile	Gln	Pro	Ala	Pro	Asn	Asn	Gly	Thr	His	Gly	Ser	Leu	Asn	His	Leu				
		500						505						510					
Leu	Lys	Val	Pro	Phe	Tyr	Glu	Pro	Ser	His	Ala	Glu	Glu	Val	Ser	Lys				
		515						520						525					
Phe	Ser	Val	Cys	Gly	Phe	Ala	Asn	Pro	Leu	Pro	Thr	Glu	Ser	Leu	Asp				
		530				535					540								
Cys	Phe	Cys	Pro	His	Leu	Gln	Asn	Ser	Thr	Gln	Leu	Glu	Gln	Val	Asn				
545				550						555				560					
Gln	Met	Leu	Asn	Leu	Thr	Gln	Glu	Glu	Ile	Thr	Ala	Thr	Val	Lys	Val				
			565						570					575					
Asn	Leu	Pro	Phe	Gly	Arg	Pro	Arg	Val	Leu	Gln	Lys	Asn	Val	Asp	His				
			580					585						590					
Cys	Leu	Leu	Tyr	His	Arg	Glu	Tyr	Val	Ser	Gly	Phe	Gly	Lys	Ala	Met				
		595						600						605					
Arg	Met	Pro	Met	Trp	Ser	Ser	Tyr	Thr	Val	Pro	Gln	Leu	Gly	Asp	Thr				
		610						615						620					
Ser	Pro	Leu	Pro	Pro	Thr	Val	Pro	Asp	Cys	Leu	Arg	Ala	Asp	Val	Arg				
625					630						635			640					
Val	Pro	Pro	Ser	Glu	Ser	Gln	Lys	Cys	Ser	Phe	Tyr	Leu	Ala	Asp	Lys				
			645								650			655					
Asn	Ile	Thr	His	Gly	Phe	Leu	Tyr	Pro	Pro	Ala	Ser	Asn	Arg	Thr	Ser				
		660								665				670					
Asp	Ser	Gln	Tyr	Asp	Ala	Leu	Ile	Thr	Ser	Asn	Leu	Val	Pro	Met	Tyr				
		675								680				685					
Glu	Glu	Phe	Arg	Lys	Met	Trp	Asp	Tyr	Phe	His	Ser	Val	Leu	Leu	Ile				
		690									700								
Lys	His	Ala	Thr	Glu	Arg	Asn	Gly	Val	Asn	Val	Val	Ser	Gly	Pro	Ile				
705					710						715			720					
Phe	Asp	Tyr	Asn	Tyr	Asp	Gly	His	Phe	Asp	Ala	Pro	Asp	Glu	Ile	Thr				
			725							730				735					
Lys	His	Leu	Ala	Asn	Thr	Asp	Val	Pro	Ile	Pro	Thr	His	Tyr	Phe	Val				
			740							745				750					

10

20

30

40

50

【表 2 3 - 1】

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	Leu	Lys	Pro	Ser	Cys	Ala	Lys	Glu	Val	Lys	Ser
			20				25					30			
Cys	Lys	Gly	Arg	Cys	Phe	Glu	Arg	Thr	Phe	Gly	Asn	Cys	Arg	Cys	Asp
		35					40					45			
Ala	Ala	Cys	Val	Glu	Leu	Gly	Asn	Cys	Cys	Leu	Asp	Tyr	Gln	Glu	Thr
	50					55					60				
Cys	Ile	Glu	Pro	Glu	His	Ile	Trp	Thr	Cys	Asn	Lys	Phe	Arg	Cys	Gly
65					70					75				80	
Glu	Lys	Arg	Leu	Thr	Arg	Ser	Leu	Cys	Ala	Cys	Ser	Asp	Asp	Cys	Lys
				85					90					95	
Asp	Lys	Gly	Asp	Cys	Cys	Ile	Asn	Tyr	Ser	Ser	Val	Cys	Gln	Gly	Glu
		100						105					110		
Lys	Ser	Trp	Val	Glu	Glu	Pro	Cys	Glu	Ser	Ile	Asn	Glu	Pro	Gln	Cys
		115					120						125		
Pro	Ala	Gly	Phe	Glu	Thr	Pro	Pro	Thr	Leu	Leu	Phe	Ser	Leu	Asp	Gly
	130						135						140		
Phe	Arg	Ala	Glu	Tyr	Leu	His	Thr	Trp	Gly	Gly	Leu	Leu	Pro	Val	Ile
145						150					155				160
Ser	Lys	Leu	Lys	Lys	Cys	Gly	Thr	Tyr	Thr	Lys	Asn	Met	Arg	Pro	Val
				165						170				175	
Tyr	Pro	Thr	Lys	Thr	Phe	Pro	Asn	His	Tyr	Ser	Ile	Val	Thr	Gly	Leu
				180						185				190	
Tyr	Pro	Glu	Ser	His	Gly	Ile	Ile	Asp	Asn	Lys	Met	Tyr	Asp	Pro	Lys
		195						200					205		
Met	Asn	Ala	Ser	Phe	Ser	Leu	Lys	Ser	Lys	Glu	Lys	Phe	Asn	Pro	Glu
	210						215						220		
Trp	Tyr	Lys	Gly	Glu	Pro	Ile	Trp	Val	Thr	Ala	Lys	Tyr	Gln	Gly	Leu
225						230					235				240
Lys	Ser	Gly	Thr	Phe	Phe	Trp	Pro	Gly	Ser	Asp	Val	Glu	Ile	Asn	Gly
				245						250				255	
Ile	Phe	Pro	Asp	Ile	Tyr	Lys	Met	Tyr	Asn	Gly	Ser	Val	Pro	Phe	Glu
			260						265					270	
Glu	Arg	Ile	Leu	Ala	Val	Leu	Gln	Trp	Leu	Gln	Leu	Pro	Lys	Asp	Glu
	275							280					285		
Arg	Pro	His	Phe	Tyr	Thr	Leu	Tyr	Leu	Glu	Glu	Pro	Asp	Ser	Ser	Gly
	290						295						300		
His	Ser	Tyr	Gly	Pro	Val	Ser	Ser	Glu	Val	Ile	Lys	Ala	Leu	Gln	Arg
305					310						315				320
Val	Asp	Gly	Met	Val	Gly	Met	Leu	Met	Asp	Gly	Leu	Lys	Glu	Leu	Asn
				325						330				335	
Leu	His	Arg	Cys	Leu	Asn	Leu	Ile	Leu	Ile	Ser	Asp	His	Gly	Met	Glu
			340						345					350	
Gln	Gly	Ser	Cys	Lys	Lys	Tyr	Ile	Tyr	Leu	Asn	Lys	Tyr	Leu	Gly	Asp
		355							360					365	

10

20

30

40

50

【表 2 3 - 2】

Val Lys Asn Ile Lys Val Ile Tyr Gly Pro Ala Ala Arg Leu Arg Pro	
370 375 380	
Ser Asp Val Pro Asp Lys Tyr Tyr Ser Phe Asn Tyr Glu Gly Ile Ala	
385 390 395 400	
Arg Asn Leu Ser Cys Arg Glu Pro Asn Gln His Phe Lys Pro Tyr Leu	
405 410 415	
Lys His Phe Leu Pro Lys Arg Leu His Phe Ala Lys Ser Asp Arg Ile	
420 425 430	
Glu Pro Leu Thr Phe Tyr Leu Asp Pro Gln Trp Gln Leu Ala Leu Asn	
435 440 445	
Pro Ser Glu Arg Lys Tyr Cys Gly Ser Gly Phe His Gly Ser Asp Asn	10
450 455 460	
Val Phe Ser Asn Met Gln Ala Leu Phe Val Gly Tyr Gly Pro Gly Phe	
465 470 475 480	
Lys His Gly Ile Glu Ala Asp Thr Phe Glu Asn Ile Glu Val Tyr Asn	
485 490 495	
Leu Met Cys Asp Leu Leu Asn Leu Thr Pro Ala Pro Asn Asn Gly Thr	
500 505 510	
His Gly Ser Leu Asn His Leu Leu Lys Asn Pro Val Tyr Thr Pro Lys	
515 520 525	
His Pro Lys Glu Val His Pro Leu Val Gln Cys Pro Phe Thr Arg Asn	
530 535 540	
Pro Arg Asp Asn Leu Gly Cys Ser Cys Asn Pro Ser Ile Leu Pro Ile	20
545 550 555 560	
Glu Asp Phe Gln Thr Gln Phe Asn Leu Thr Val Ala Glu Glu Lys Ile	
565 570 575	
Ile Lys His Glu Thr Leu Pro Tyr Gly Arg Pro Arg Val Leu Gln Lys	
580 585 590	
Glu Asn Thr Ile Cys Leu Leu Ser Gln His Gln Phe Met Ser Gly Tyr	
595 600 605	
Ser Gln Asp Ile Leu Met Pro Leu Trp Thr Ser Tyr Thr Val Asp Arg	
610 615 620	
Asn Asp Ser Phe Ser Thr Glu Asp Phe Ser Asn Cys Leu Tyr Gln Asp	
625 630 635 640	
Phe Arg Ile Pro Leu Ser Pro Val His Lys Cys Ser Phe Tyr Lys Asn	30
645 650 655	
Asn Thr Lys Val Ser Tyr Gly Phe Leu Ser Pro Pro Gln Leu Asn Lys	
660 665 670	
Asn Ser Ser Gly Ile Tyr Ser Glu Ala Leu Leu Thr Thr Asn Ile Val	
675 680 685	
Pro Met Tyr Gln Ser Phe Gln Val Ile Trp Arg Tyr Phe His Asp Thr	
690 695 700	
Leu Leu Arg Lys Tyr Ala Glu Glu Arg Asn Gly Val Asn Val Val Ser	
705 710 715 720	
Gly Pro Val Phe Asp Phe Asp Tyr Asp Gly Arg Cys Asp Ser Leu Glu	
725 730 735	
Asn Leu Arg Gln Lys Arg Arg Val Ile Arg Asn Gln Glu Ile Leu Ile	40
740 745 750	

【表 2 3 - 3】

Pro Thr His Phe Phe Ile Val Leu Thr Ser Cys Lys Asp Thr Ser Gln	
755	760
Thr Pro Leu His Cys Glu Asn Leu Asp Thr Leu Ala Phe Ile Leu Pro	
770	780
His Arg Thr Asp Asn Ser Glu Ser Cys Val His Gly Lys His Asp Ser	
785	800
Ser Trp Val Glu Glu Leu Leu Met Leu His Arg Ala Arg Ile Thr Asp	
805	815
Val Glu His Ile Thr Gly Leu Ser Phe Tyr Gln Gln Arg Lys Glu Pro	
820	830
Val Ser Asp Ile Leu Lys Leu Lys Thr His Leu Pro Thr Phe Ser <u>Gln</u>	
835	845
<u>Glu Asp</u> Gly Gly Ser Gly Gly Ser Met Lys Trp Val Thr Phe Leu Leu	
850	860
Leu Leu Phe Val Ser Gly Ser Ala Phe Ser Arg Gly Val Phe Arg Arg	
865	880
Glu Ala His Lys Ser Glu Ile Ala His Arg Tyr Asn Asp Leu Gly Glu	
885	895
Gln His Phe Lys Gly Leu Val Leu Ile Ala Phe Ser Gln Tyr Leu Gln	
900	910
Lys Cys Ser Tyr Asp Glu His Ala Lys Leu Val Gln Glu Val Thr Asp	
915	925
Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Ala Asn Cys Asp Lys	
930	940
Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Ala Ile Pro Asn Leu	
945	960
Arg Glu Asn Tyr Gly Glu Leu Ala Asp Cys Cys Thr Lys Gln Glu Pro	
965	975
Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Ser Leu	
980	990
Pro Pro Phe Glu Arg Pro Glu Ala Glu Ala Met Cys Thr Ser Phe Lys	
995	1005
Glu Asn Pro Thr Thr Phe Met Gly His Tyr Leu His Glu Val Ala	
1010	1020
Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Tyr Tyr Ala	
1025	1035
Glu Gln Tyr Asn Glu Ile Leu Thr Gln Cys Cys Ala Glu Ala Asp	
1040	1050
Lys Glu Ser Cys Leu Thr Pro Lys Leu Asp Gly Val Lys Glu Lys	
1055	1065
Ala Leu Val Ser Ser Val Arg Gln Arg Met Lys Cys Ser Ser Met	
1070	1080
Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg	
1085	1095
Leu Ser Gln Thr Phe Pro Asn Ala Asp Phe Ala Glu Ile Thr Lys	
1100	1110
Leu Ala Thr Asp Leu Thr Lys Val Asn Lys Glu Cys Cys His Gly	
1115	1125

10

20

30

40

50

【表 2 3 - 4】

Asp Leu	Leu Glu Cys Ala	Asp	Asp Arg Ala Glu Leu	Ala Lys Tyr
1130		1135		1140
Met Cys	Glu Asn Gln Ala Thr	Ile Ser Ser Lys	Leu	Gln Thr Cys
1145		1150		1155
Cys Asp	Lys Pro Leu Leu Lys	Lys Ala His Cys	Leu	Ser Glu Val
1160		1165		1170
Glu His	Asp Thr Met Pro Ala	Asp Leu Pro Ala Ile	Ala Ala Asp	
1175		1180		1185
Phe Val	Glu Asp Gln Glu Val	Cys Lys Asn Tyr Ala	Glu Ala Lys	
1190		1195		1200
Asp Val	Phe Leu Gly Thr Phe	Leu Tyr Glu Tyr Ser	Arg Arg His	
1205		1210		1215
Pro Asp	Tyr Ser Val Ser Leu	Leu Leu Arg Leu Ala	Lys Lys Tyr	
1220		1225		1230
Glu Ala	Thr Leu Glu Lys Cys	Cys Ala Glu Ala Asn	Pro Pro Ala	
1235		1240		1245
Cys Tyr	Gly Thr Val Leu Ala	Glu Phe Gln Pro Leu	Val Glu Glu	
1250		1255		1260
Pro Lys	Asn Leu Val Lys Thr	Asn Cys Asp Leu Tyr	Glu Lys Leu	
1265		1270		1275
Gly Glu	Tyr Gly Phe Gln Asn	Ala Ile Leu Val Arg	Tyr Thr Gln	
1280		1285		1290
Lys Ala	Pro Gln Val Ser Thr	Pro Thr Leu Val Glu	Ala Ala Arg	
1295		1300		1305
Asn Leu	Gly Arg Val Gly Thr	Lys Cys Cys Thr Leu	Pro Glu Asp	
1310		1315		1320
Gln Arg	Leu Pro Cys Val Glu	Asp Tyr Leu Ser Ala	Ile Leu Asn	
1325		1330		1335
Arg Val	Cys Leu Leu His Glu	Lys Thr Pro Val Ser	Glu His Val	
1340		1345		1350
Thr Lys	Cys Cys Ser Gly Ser	Leu Val Glu Arg Arg	Pro Cys Phe	
1355		1360		1365
Ser Ala	Leu Thr Val Asp Glu	Thr Tyr Val Pro Lys	Glu Phe Lys	
1370		1375		1380
Ala Glu	Thr Phe Thr Phe His	Ser Asp Ile Cys Thr	Leu	
1385		1390		1395

10

20

30

単一下線：シグナルペプチド配列、二重下線：N P P 3 の始まりおよび終わり、* * = シグナルペプチド配列での切断位置、太字残基は、F c 配列を示す

40

【0 4 9 3】

配列番号 2 4 — E N P P 7 — N P P 3 — アルブミン

【表 2 4 - 1】

Met	Arg	Gly	Pro	Ala	Val	Leu	Leu	Thr	Val	Ala	Leu	Ala	Thr	Leu	Leu
1			5					10						15	
Ala	Pro	Gly	Ala	Lys	Gln	Gly	Ser	Cys	Arg	Lys	Lys	Cys	Phe	Asp	Ala
			20				25					30			
Ser	Phe	Arg	Gly	Leu	Glu	Asn	Cys	Arg	Cys	Asp	Val	Ala	Cys	Lys	Asp
		35				40					45				
Arg	Gly	Asp	Cys	Cys	Trp	Asp	Phe	Glu	Asp	Thr	Cys	Val	Glu	Ser	Thr
	50				55					60					
Arg	Ile	Trp	Met	Cys	Asn	Lys	Phe	Arg	Cys	Gly	Glu	Arg	Leu	Glu	Ala
65				70					75				80		
Ser	Leu	Cys	Ser	Cys	Ser	Asp	Asp	Cys	Leu	Gln	Arg	Lys	Asp	Cys	Cys
			85					90					95		
Ala	Asp	Tyr	Lys	Ser	Val	Cys	Gln	Gly	Glu	Thr	Ser	Trp	Leu	Glu	Glu
		100						105				110			
Asn	Cys	Asp	Thr	Ala	Gln	Gln	Ser	Gln	Cys	Pro	Glu	Gly	Phe	Asp	Leu
	115					120						125			
Pro	Pro	Val	Ile	Leu	Phe	Ser	Met	Asp	Gly	Phe	Arg	Ala	Glu	Tyr	Leu
	130					135						140			
Tyr	Thr	Trp	Asp	Thr	Leu	Met	Pro	Asn	Ile	Asn	Lys	Leu	Lys	Thr	Cys
145					150					155				160	
Gly	Ile	His	Ser	Lys	Tyr	Met	Arg	Ala	Met	Tyr	Pro	Thr	Lys	Thr	Phe
			165					170					175		
Pro	Asn	His	Tyr	Thr	Ile	Val	Thr	Gly	Leu	Tyr	Pro	Glu	Ser	His	Gly
		180						185					190		
Ile	Ile	Asp	Asn	Asn	Met	Tyr	Asp	Val	Asn	Leu	Asn	Lys	Asn	Phe	Ser
		195						200					205		
Leu	Ser	Ser	Lys	Glu	Gln	Asn	Asn	Pro	Ala	Trp	Trp	His	Gly	Gln	Pro
	210					215						220			
Met	Trp	Leu	Thr	Ala	Met	Tyr	Gln	Gly	Leu	Lys	Ala	Ala	Thr	Tyr	Phe
225				230					235					240	
Trp	Pro	Gly	Ser	Glu	Val	Ala	Ile	Asn	Gly	Ser	Phe	Pro	Ser	Ile	Tyr
			245					250					255		
Met	Pro	Tyr	Asn	Gly	Ser	Val	Pro	Phe	Glu	Glu	Arg	Ile	Ser	Thr	Leu
		260						265					270		
Leu	Lys	Trp	Leu	Asp	Leu	Pro	Lys	Ala	Glu	Arg	Pro	Arg	Phe	Tyr	Thr
		275						280					285		
Met	Tyr	Phe	Glu	Glu	Pro	Asp	Ser	Ser	Gly	His	Ala	Gly	Gly	Pro	Val
	290					295						300			
Ser	Ala	Arg	Val	Ile	Lys	Ala	Leu	Gln	Val	Val	Asp	His	Ala	Phe	Gly
305					310						315			320	
Met	Leu	Met	Glu	Gly	Leu	Lys	Gln	Arg	Asn	Leu	His	Asn	Cys	Val	Asn
			325					330					335		
Ile	Ile	Leu	Leu	Ala	Asp	His	Gly	Met	Asp	Gln	Thr	Tyr	Cys	Asn	Lys
		340						345					350		
Met	Glu	Tyr	Met	Thr	Asp	Tyr	Phe	Pro	Arg	Ile	Asn	Phe	Phe	Tyr	Met
	355						360					365			

10

20

30

40

50

【表 2 4 - 2】

Tyr	Glu	Gly	Pro	Ala	Pro	Arg	Ile	Arg	Ala	His	Asn	Ile	Pro	His	Asp				
370						375					380								
Phe	Phe	Ser	Phe	Asn	Ser	Glu	Glu	Ile	Val	Arg	Asn	Leu	Ser	Cys	Arg				
385				390						395				400					
Lys	Pro	Asp	Gln	His	Phe	Lys	Pro	Tyr	Leu	Thr	Pro	Asp	Leu	Pro	Lys				
			405						410					415					
Arg	Leu	His	Tyr	Ala	Lys	Asn	Val	Arg	Ile	Asp	Lys	Val	His	Leu	Phe				
			420					425						430					
Val	Asp	Gln	Gln	Trp	Leu	Ala	Val	Arg	Ser	Lys	Ser	Asn	Thr	Asn	Cys				
	435					440						445							
Gly	Gly	Gly	Asn	His	Gly	Tyr	Asn	Asn	Glu	Phe	Arg	Ser	Met	Glu	Ala				
	450					455				460									
Ile	Phe	Leu	Ala	His	Gly	Pro	Ser	Phe	Lys	Glu	Lys	Thr	Glu	Val	Glu				
465				470						475					480				
Pro	Phe	Glu	Asn	Ile	Glu	Val	Tyr	Asn	Leu	Met	Cys	Asp	Leu	Leu	Arg				
			485						490					495					
Ile	Gln	Pro	Ala	Pro	Asn	Asn	Gly	Thr	His	Gly	Ser	Leu	Asn	His	Leu				
	500							505						510					
Leu	Lys	Val	Pro	Phe	Tyr	Glu	Pro	Ser	His	Ala	Glu	Glu	Val	Ser	Lys				
	515					520							525						
Phe	Ser	Val	Cys	Gly	Phe	Ala	Asn	Pro	Leu	Pro	Thr	Glu	Ser	Leu	Asp				
	530					535					540								
Cys	Phe	Cys	Pro	His	Leu	Gln	Asn	Ser	Thr	Gln	Leu	Glu	Gln	Val	Asn				
545				550						555				560					
Gln	Met	Leu	Asn	Leu	Thr	Gln	Glu	Glu	Ile	Thr	Ala	Thr	Val	Lys	Val				
			565						570					575					
Asn	Leu	Pro	Phe	Gly	Arg	Pro	Arg	Val	Leu	Gln	Lys	Asn	Val	Asp	His				
	580					585								590					
Cys	Leu	Leu	Tyr	His	Arg	Glu	Tyr	Val	Ser	Gly	Phe	Gly	Lys	Ala	Met				
	595					600					605								
Arg	Met	Pro	Met	Trp	Ser	Ser	Tyr	Thr	Val	Pro	Gln	Leu	Gly	Asp	Thr				
	610					615					620								
Ser	Pro	Leu	Pro	Pro	Thr	Val	Pro	Asp	Cys	Leu	Arg	Ala	Asp	Val	Arg				
625				630						635				640					
Val	Pro	Pro	Ser	Glu	Ser	Gln	Lys	Cys	Ser	Phe	Tyr	Leu	Ala	Asp	Lys				
			645						650					655					
Asn	Ile	Thr	His	Gly	Phe	Leu	Tyr	Pro	Pro	Ala	Ser	Asn	Arg	Thr	Ser				
	660					665								670					
Asp	Ser	Gln	Tyr	Asp	Ala	Leu	Ile	Thr	Ser	Asn	Leu	Val	Pro	Met	Tyr				
	675					680								685					
Glu	Glu	Phe	Arg	Lys	Met	Trp	Asp	Tyr	Phe	His	Ser	Val	Leu	Leu	Ile				
	690					695								700					
Lys	His	Ala	Thr	Glu	Arg	Asn	Gly	Val	Asn	Val	Val	Ser	Gly	Pro	Ile				
705				710						715				720					
Phe	Asp	Tyr	Asn	Tyr	Asp	Gly	His	Phe	Asp	Ala	Pro	Asp	Glu	Ile	Thr				
			725						730					735					
Lys	His	Leu	Ala	Asn	Thr	Asp	Val	Pro	Ile	Pro	Thr	His	Tyr	Phe	Val				
			740						745					750					

10

20

30

40

50

【表 2 4 - 3】

Val	Leu	Thr	Ser	Cys	Lys	Asn	Lys	Ser	His	Thr	Pro	Glu	Asn	Cys	Pro					
755						760				765										
Gly	Trp	Leu	Asp	Val	Leu	Pro	Phe	Ile	Ile	Pro	His	Arg	Pro	Thr	Asn					
770				775				780												
Val	Glu	Ser	Cys	Pro	Glu	Gly	Lys	Pro	Glu	Ala	Leu	Trp	Val	Glu	Glu					
785					790				795				800							
Arg	Phe	Thr	Ala	His	Ile	Ala	Arg	Val	Arg	Asp	Val	Glu	Leu	Leu	Thr					
805						810				815										
Gly	Leu	Asp	Phe	Tyr	Gln	Asp	Lys	Val	Gln	Pro	Val	Ser	Glu	Ile	Leu					
820				825				830												
Gln	Leu	Lys	Thr	Tyr	Leu	<u>Pro</u>	<u>Thr</u>	<u>Phe</u>	<u>Glu</u>	<u>Thr</u>	<u>Thr</u>	<u>Ile</u>	Gly	Gly	Gly				10	
835				840				845												
Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Met	Lys	Trp	Val	Thr					
850				855				860												
Phe	Leu	Leu	Leu	Phe	Val	Ser	Gly	Ser	Ala	Phe	Ser	Arg	Gly	Val						
865					870				875				880							
Phe	Arg	Arg	Glu	Ala	His	Lys	Ser	Glu	Ile	Ala	His	Arg	Tyr	Asn	Asp					
885					890				895											
Leu	Gly	Glu	Gln	His	Phe	Lys	Gly	Leu	Val	Leu	Ile	Ala	Phe	Ser	Gln					
900				905				910												
Tyr	Leu	Gln	Lys	Cys	Ser	Tyr	Asp	Glu	His	Ala	Lys	Leu	Val	Gln	Glu					
915				920				925												
Val	Thr	Asp	Phe	Ala	Lys	Thr	Cys	Val	Ala	Asp	Glu	Ser	Ala	Ala	Asn				20	
930				935				940												
Cys	Asp	Lys	Ser	Leu	His	Thr	Leu	Phe	Gly	Asp	Lys	Leu	Cys	Ala	Ile					
945				950				955				960								
Pro	Asn	Leu	Arg	Glu	Asn	Tyr	Gly	Glu	Leu	Ala	Asp	Cys	Cys	Thr	Lys					
965					970				975											
Gln	Glu	Pro	Glu	Arg	Asn	Glu	Cys	Phe	Leu	Gln	His	Lys	Asp	Asp	Asn					
980				985				990												
Pro	Ser	Leu	Pro	Pro	Phe	Glu	Arg	Pro	Glu	Ala	Glu	Ala	Met	Cys	Thr					
995				1000				1005												
Ser	Phe	Lys	Glu	Asn	Pro	Thr	Thr	Phe	Met	Gly	His	Tyr	Leu	His						
1010				1015				1020												
Glu	Val	Ala	Arg	Arg	His	Pro	Tyr	Phe	Tyr	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu					30	
1025				1030				1035												
Tyr	Tyr	Ala	Glu	Gln	Tyr	Asn	Glu	Ile	Leu	Thr	Gln	Cys	Cys	Ala						
1040				1045				1050												
Glu	Ala	Asp	Lys	Glu	Ser	Cys	Leu	Thr	Pro	Lys	Leu	Asp	Gly	Val						
1055				1060				1065												
Lys	Glu	Lys	Ala	Leu	Val	Ser	Ser	Val	Arg	Gln	Arg	Met	Lys	Cys						
1070				1075				1080												
Ser	Ser	Met	Gln	Lys	Phe	Gly	Glu	Arg	Ala	Phe	Lys	Ala	Trp	Ala						
1085				1090				1095												
Val	Ala	Arg	Leu	Ser	Gln	Thr	Phe	Pro	Asn	Ala	Asp	Phe	Ala	Glu						
1100				1105				1110												
Ile	Thr	Lys	Leu	Ala	Thr	Asp	Leu	Thr	Lys	Val	Asn	Lys	Glu	Cys					40	
1115				1120				1125												

【表 2 4 - 4】

Cys His	Gly Asp Leu Leu Glu	Cys Ala Asp Asp Arg	Ala Glu Leu
1130	1135	1140	
Ala Lys	Tyr Met Cys Glu Asn	Gln Ala Thr Ile Ser	Ser Lys Leu
1145	1150	1155	
Gln Thr	Cys Cys Asp Lys Pro	Leu Leu Lys Lys Ala	His Cys Leu
1160	1165	1170	
Ser Glu	Val Glu His Asp Thr	Met Pro Ala Asp Leu	Pro Ala Ile
1175	1180	1185	
Ala Ala	Asp Phe Val Glu Asp	Gln Glu Val Cys Lys	Asn Tyr Ala
1190	1195	1200	
Glu Ala	Lys Asp Val Phe Leu	Gly Thr Phe Leu Tyr	Glu Tyr Ser
1205	1210	1215	
Arg Arg	His Pro Asp Tyr Ser	Val Ser Leu Leu Leu	Arg Leu Ala
1220	1225	1230	
Lys Lys	Tyr Glu Ala Thr Leu	Glu Lys Cys Cys Ala	Glu Ala Asn
1235	1240	1245	
Pro Pro	Ala Cys Tyr Gly Thr	Val Leu Ala Glu Phe	Gln Pro Leu
1250	1255	1260	
Val Glu	Glu Pro Lys Asn Leu	Val Lys Thr Asn Cys	Asp Leu Tyr
1265	1270	1275	
Glu Lys	Leu Gly Glu Tyr Gly	Phe Gln Asn Ala Ile	Leu Val Arg
1280	1285	1290	
Tyr Thr	Gln Lys Ala Pro Gln	Val Ser Thr Pro Thr	Leu Val Glu
1295	1300	1305	
Ala Ala	Arg Asn Leu Gly Arg	Val Gly Thr Lys Cys	Cys Thr Leu
1310	1315	1320	
Pro Glu	Asp Gln Arg Leu Pro	Cys Val Glu Asp Tyr	Leu Ser Ala
1325	1330	1335	
Ile Leu	Asn Arg Val Cys Leu	Leu His Glu Lys Thr	Pro Val Ser
1340	1345	1350	
Glu His	Val Thr Lys Cys Cys	Ser Gly Ser Leu Val	Glu Arg Arg
1355	1360	1365	
Pro Cys	Phe Ser Ala Leu Thr	Val Asp Glu Thr Tyr	Val Pro Lys
1370	1375	1380	
Glu Phe	Lys Ala Glu Thr Phe	Thr Phe His Ser Asp	Ile Cys Thr
1385	1390	1395	
Leu Pro	Glu Lys Glu Lys Gln	Ile Lys Lys Gln Thr	Ala Leu Ala
1400	1405	1410	
Glu Leu	Val Lys His Lys Pro	Lys Ala Thr Ala Glu	Gln Leu Lys
1415	1420	1425	
Thr Val	Met Asp Asp Phe Ala	Gln Phe Leu Asp Thr	Cys Cys Lys
1430	1435	1440	
Ala Ala	Asp Lys Asp Thr Cys	Phe Ser Thr Glu Gly	Pro Asn Leu
1445	1450	1455	
Val Thr	Arg Cys Lys Asp Ala	Leu Ala	
1460	1465		

10

20

30

40

単一下線：シグナルペプチド配列、二重下線：N P P 3の始まりおよび終わり、** = シグナルペプチド配列での切断位置、太字残基は、アルブミン配列を示す

【0 4 9 4】

配列番号 2 5 - E N P P 7 - E N P P 3 - アルブミン

【表 25 - 1】

Met	Arg	Gly	Pro	Ala	Val	Leu	Leu	Thr	Val	Ala	Leu	Ala	Thr	Leu	Leu
1			5					10						15	
Ala	Pro	Gly	Ala	Lys	Gln	Gly	Ser	Cys	Arg	Lys	Lys	Cys	Phe	Asp	Ala
			20				25					30			
Ser	Phe	Arg	Gly	Leu	Glu	Asn	Cys	Arg	Cys	Asp	Val	Ala	Cys	Lys	Asp
		35					40					45			
Arg	Gly	Asp	Cys	Cys	Trp	Asp	Phe	Glu	Asp	Thr	Cys	Val	Glu	Ser	Thr
	50				55					60					
Arg	Ile	Trp	Met	Cys	Asn	Lys	Phe	Arg	Cys	Gly	Glu	Arg	Leu	Glu	Ala
65				70					75				80		
Ser	Leu	Cys	Ser	Cys	Ser	Asp	Asp	Cys	Leu	Gln	Arg	Lys	Asp	Cys	Cys
			85					90					95		
Ala	Asp	Tyr	Lys	Ser	Val	Cys	Gln	Gly	Glu	Thr	Ser	Trp	Leu	Glu	Glu
		100						105					110		
Asn	Cys	Asp	Thr	Ala	Gln	Gln	Ser	Gln	Cys	Pro	Glu	Gly	Phe	Asp	Leu
	115						120					125			
Pro	Pro	Val	Ile	Leu	Phe	Ser	Met	Asp	Gly	Phe	Arg	Ala	Glu	Tyr	Leu
	130					135						140			
Tyr	Thr	Trp	Asp	Thr	Leu	Met	Pro	Asn	Ile	Asn	Lys	Leu	Lys	Thr	Cys
145					150					155				160	
Gly	Ile	His	Ser	Lys	Tyr	Met	Arg	Ala	Met	Tyr	Pro	Thr	Lys	Thr	Phe
			165					170					175		
Pro	Asn	His	Tyr	Thr	Ile	Val	Thr	Gly	Leu	Tyr	Pro	Glu	Ser	His	Gly
		180						185					190		
Ile	Ile	Asp	Asn	Asn	Met	Tyr	Asp	Val	Asn	Leu	Asn	Lys	Asn	Phe	Ser
	195						200					205			
Leu	Ser	Ser	Lys	Glu	Gln	Asn	Asn	Pro	Ala	Trp	Trp	His	Gly	Gln	Pro
	210					215				220					
Met	Trp	Leu	Thr	Ala	Met	Tyr	Gln	Gly	Leu	Lys	Ala	Ala	Thr	Tyr	Phe
225				230					235					240	
Trp	Pro	Gly	Ser	Glu	Val	Ala	Ile	Asn	Gly	Ser	Phe	Pro	Ser	Ile	Tyr
			245					250					255		
Met	Pro	Tyr	Asn	Gly	Ser	Val	Pro	Phe	Glu	Glu	Arg	Ile	Ser	Thr	Leu
	260							265					270		
Leu	Lys	Trp	Leu	Asp	Leu	Pro	Lys	Ala	Glu	Arg	Pro	Arg	Phe	Tyr	Thr
	275						280					285			
Met	Tyr	Phe	Glu	Glu	Pro	Asp	Ser	Ser	Gly	His	Ala	Gly	Gly	Pro	Val
	290					295					300				
Ser	Ala	Arg	Val	Ile	Lys	Ala	Leu	Gln	Val	Val	Asp	His	Ala	Phe	Gly
305					310					315				320	
Met	Leu	Met	Glu	Gly	Leu	Lys	Gln	Arg	Asn	Leu	His	Asn	Cys	Val	Asn
			325					330					335		
Ile	Ile	Leu	Leu	Ala	Asp	His	Gly	Met	Asp	Gln	Thr	Tyr	Cys	Asn	Lys
	340							345					350		
Met	Glu	Tyr	Met	Thr	Asp	Tyr	Phe	Pro	Arg	Ile	Asn	Phe	Phe	Tyr	Met
	355						360					365			

10

20

30

40

50

【表 2 5 - 2】

Tyr	Glu	Gly	Pro	Ala	Pro	Arg	Ile	Arg	Ala	His	Asn	Ile	Pro	His	Asp		
370																	
Phe	Phe	Ser	Phe	Asn	Ser	Glu	Glu	Ile	Val	Arg	Asn	Leu	Ser	Cys	Arg		
385																	
Lys	Pro	Asp	Gln	His	Phe	Lys	Pro	Tyr	Leu	Thr	Pro	Asp	Leu	Pro	Lys		
Arg	Leu	His	Tyr	Ala	Lys	Asn	Val	Arg	Ile	Asp	Lys	Val	His	Leu	Phe		
Val	Asp	Gln	Gln	Trp	Leu	Ala	Val	Arg	Ser	Lys	Ser	Asn	Thr	Asn	Cys		
Gly	Gly	Gly	Asn	His	Gly	Tyr	Asn	Asn	Glu	Phe	Arg	Ser	Met	Glu	Ala		
Ile	Phe	Leu	Ala	His	Gly	Pro	Ser	Phe	Lys	Glu	Lys	Thr	Glu	Val	Glu		
Pro	Phe	Glu	Asn	Ile	Glu	Val	Tyr	Asn	Leu	Met	Cys	Asp	Leu	Leu	Arg		
Ile	Gln	Pro	Ala	Pro	Asn	Asn	Gly	Thr	His	Gly	Ser	Leu	Asn	His	Leu		
Leu	Lys	Val	Pro	Phe	Tyr	Glu	Pro	Ser	His	Ala	Glu	Glu	Val	Ser	Lys		
Phe	Ser	Val	Cys	Gly	Phe	Ala	Asn	Pro	Leu	Pro	Thr	Glu	Ser	Leu	Asp		
Cys	Phe	Cys	Pro	His	Leu	Gln	Asn	Ser	Thr	Gln	Leu	Glu	Gln	Val	Asn		
Gln	Met	Leu	Asn	Leu	Thr	Gln	Glu	Glu	Ile	Thr	Ala	Thr	Val	Lys	Val		
Asn	Leu	Pro	Phe	Gly	Arg	Pro	Arg	Val	Leu	Gln	Lys	Asn	Val	Asp	His		
Cys	Leu	Leu	Tyr	His	Arg	Glu	Tyr	Val	Ser	Gly	Phe	Gly	Lys	Ala	Met		
Arg	Met	Pro	Met	Trp	Ser	Ser	Tyr	Thr	Val	Pro	Gln	Leu	Gly	Asp	Thr		
Ser	Pro	Leu	Pro	Pro	Thr	Val	Pro	Asp	Cys	Leu	Arg	Ala	Asp	Val	Arg		
Val	Pro	Pro	Ser	Glu	Ser	Gln	Lys	Cys	Ser	Phe	Tyr	Leu	Ala	Asp	Lys		
Asn	Ile	Thr	His	Gly	Phe	Leu	Tyr	Pro	Pro	Ala	Ser	Asn	Arg	Thr	Ser		
Asp	Ser	Gln	Tyr	Asp	Ala	Leu	Ile	Thr	Ser	Asn	Leu	Val	Pro	Met	Tyr		
Glu	Glu	Phe	Arg	Lys	Met	Trp	Asp	Tyr	Phe	His	Ser	Val	Leu	Leu	Ile		
Lys	His	Ala	Thr	Glu	Arg	Asn	Gly	Val	Asn	Val	Val	Ser	Gly	Pro	Ile		
Phe	Asp	Tyr	Asn	Tyr	Asp	Gly	His	Phe	Asp	Ala	Pro	Asp	Glu	Ile	Thr		
Lys	His	Leu	Ala	Asn	Thr	Asp	Val	Pro	Ile	Pro	Thr	His	Tyr	Phe	Val		

【表 2 5 - 3】

Val	Leu	Thr	Ser	Cys	Lys	Asn	Lys	Ser	His	Thr	Pro	Glu	Asn	Cys	Pro				
755					760					765									
Gly	Trp	Leu	Asp	Val	Leu	Pro	Phe	Ile	Ile	Pro	His	Arg	Pro	Thr	Asn				
770					775					780									
Val	Glu	Ser	Cys	Pro	Glu	Gly	Lys	Pro	Glu	Ala	Leu	Trp	Val	Glu	Glu				
785					790					795					800				
Arg	Phe	Thr	Ala	His	Ile	Ala	Arg	Val	Arg	Asp	Val	Glu	Leu	Leu	Thr				
805					810					815									
Gly	Leu	Asp	Phe	Tyr	Gln	Asp	Lys	Val	Gln	Pro	Val	Ser	Glu	Ile	Leu				
820					825					830									
Gln	Leu	Lys	Thr	Tyr	Leu	Pro	Thr	<u>Phe</u>	<u>Glu</u>	<u>Thr</u>	<u>Thr</u>	<u>Ile</u>	Asp	Lys	Thr				10
835					840					845									
His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser				
850					855					860									
Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg				
865					870					875					880				
Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly				
885					890					895									
Gly	Gly	Ser	Met	Lys	Trp	Val	Thr	Phe	Leu	Leu	Leu	Leu	Phe	Val	Ser				
900					905					910									
Gly	Ser	Ala	Phe	Ser	Arg	Gly	Val	Phe	Arg	Arg	Glu	Ala	His	Lys	Ser				
915					920					925									
Glu	Ile	Ala	His	Arg	Tyr	Asn	Asp	Leu	Gly	Glu	Gln	His	Phe	Lys	Gly				20
930					935					940									
Leu	Val	Leu	Ile	Ala	Phe	Ser	Gln	Tyr	Leu	Gln	Lys	Cys	Ser	Tyr	Asp				
945					950					955					960				
Glu	His	Ala	Lys	Leu	Val	Gln	Glu	Val	Thr	Asp	Phe	Ala	Lys	Thr	Cys				
965					970					975									
Val	Ala	Asp	Glu	Ser	Ala	Ala	Asn	Cys	Asp	Lys	Ser	Leu	His	Thr	Leu				
980					985					990									
Phe	Gly	Asp	Lys	Leu	Cys	Ala	Ile	Pro	Asn	Leu	Arg	Glu	Asn	Tyr	Gly				
995					1000					1005									
Glu	Leu	Ala	Asp	Cys	Cys	Thr	Lys	Gln	Glu	Pro	Glu	Arg	Asn	Glu					
1010					1015					1020									
Cys	Phe	Leu	Gln	His	Lys	Asp	Asp	Asn	Pro	Ser	Leu	Pro	Pro	Phe					30
1025					1030					1035									
Glu	Arg	Pro	Glu	Ala	Glu	Ala	Met	Cys	Thr	Ser	Phe	Lys	Glu	Asn					
1040					1045					1050									
Pro	Thr	Thr	Phe	Met	Gly	His	Tyr	Leu	His	Glu	Val	Ala	Arg	Arg					
1055					1060					1065									
His	Pro	Tyr	Phe	Tyr	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Tyr	Tyr	Ala	Glu	Gln					
1070					1075					1080									
Tyr	Asn	Glu	Ile	Leu	Thr	Gln	Cys	Cys	Ala	Glu	Ala	Asp	Lys	Glu					
1085					1090					1095									
Ser	Cys	Leu	Thr	Pro	Lys	Leu	Asp	Gly	Val	Lys	Glu	Lys	Ala	Leu					
1100					1105					1110									
Val	Ser	Ser	Val	Arg	Gln	Arg	Met	Lys	Cys	Ser	Ser	Met	Gln	Lys					40
1115					1120					1125									

【表 2 5 - 4】

Phe Gly	Glu Arg Ala Phe Lys	Ala Trp Ala Val Ala	Arg Leu Ser
1130	1135	1140	
Gln Thr	Phe Pro Asn Ala Asp	Phe Ala Glu Ile Thr	Lys Leu Ala
1145	1150	1155	
Thr Asp	Leu Thr Lys Val Asn	Lys Glu Cys Cys His	Gly Asp Leu
1160	1165	1170	
Leu Glu	Cys Ala Asp Asp Arg	Ala Glu Leu Ala Lys	Tyr Met Cys
1175	1180	1185	
Glu Asn	Gln Ala Thr Ile Ser	Ser Lys Leu Gln Thr	Cys Cys Asp
1190	1195	1200	
Lys Pro	Leu Leu Lys Lys Ala	His Cys Leu Ser Glu	Val Glu His
1205	1210	1215	
Asp Thr	Met Pro Ala Asp Leu	Pro Ala Ile Ala Ala	Asp Phe Val
1220	1225	1230	
Glu Asp	Gln Glu Val Cys Lys	Asn Tyr Ala Glu Ala	Lys Asp Val
1235	1240	1245	
Phe Leu	Gly Thr Phe Leu Tyr	Glu Tyr Ser Arg Arg	His Pro Asp
1250	1255	1260	
Tyr Ser	Val Ser Leu Leu Leu	Arg Leu Ala Lys Lys	Tyr Glu Ala
1265	1270	1275	
Thr Leu	Glu Lys Cys Cys Ala	Glu Ala Asn Pro Pro	Ala Cys Tyr
1280	1285	1290	
Gly Thr	Val Leu Ala Glu Phe	Gln Pro Leu Val Glu	Glu Pro Lys
1295	1300	1305	
Asn Leu	Val Lys Thr Asn Cys	Asp Leu Tyr Glu Lys	Leu Gly Glu
1310	1315	1320	
Tyr Gly	Phe Gln Asn Ala Ile	Leu Val Arg Tyr Thr	Gln Lys Ala
1325	1330	1335	
Pro Gln	Val Ser Thr Pro Thr	Leu Val Glu Ala Ala	Arg Asn Leu
1340	1345	1350	
Gly Arg	Val Gly Thr Lys Cys	Cys Thr Leu Pro Glu	Asp Gln Arg
1355	1360	1365	
Leu Pro	Cys Val Glu Asp Tyr	Leu Ser Ala Ile Leu	Asn Arg Val
1370	1375	1380	
Cys Leu	Leu His Glu Lys Thr	Pro Val Ser Glu His	Val Thr Lys
1385	1390	1395	
Cys Cys	Ser Gly Ser Leu Val	Glu Arg Arg Pro Cys	Phe Ser Ala
1400	1405	1410	
Leu Thr	Val Asp Glu Thr Tyr	Val Pro Lys Glu Phe	Lys Ala Glu
1415	1420	1425	
Thr Phe	Thr Phe His Ser Asp	Ile Cys Thr Leu Pro	Glu Lys Glu
1430	1435	1440	
Lys Gln	Ile Lys Lys Gln Thr	Ala Leu Ala Glu Leu	Val Lys His
1445	1450	1455	
Lys Pro	Lys Ala Thr Ala Glu	Gln Leu Lys Thr Val	Met Asp Asp
1460	1465	1470	
Phe Ala	Gln Phe Leu Asp Thr	Cys Cys Lys Ala Ala	Asp Lys Asp
1475	1480	1485	

10

20

30

40

【表 2 5 - 5】

Thr Cys	Phe Ser Thr Glu Gly	Pro Asn Leu Val Thr	Arg Cys Lys
1490	1495	1500	
Asp Ala	Leu Ala		
1505			

単一下線：シグナルペプチド配列、二重下線：N P P 3 の始まりおよび終わり、** = シグナルペプチド配列での切断位置、太字残基は、アルブミン配列を示す

【0 4 9 5】

50

配列番号 2 6 - E N P P 7 1 - G L K アミノ酸配列

【表 2 6 - 1】

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	*Gly	Leu	Lys	Pro	Ser	Cys	Ala	Lys	Glu	Val
			20					25					30		
Lys	Ser	Cys	Lys	Gly	Arg	Cys	Phe	Glu	Arg	Thr	Phe	Gly	Asn	Cys	Arg
			35					40					45		
Cys	Asp	Ala	Ala	Cys	Val	Glu	Leu	Gly	Asn	Cys	Cys	Leu	Asp	Tyr	Gln
			50					55					60		
Glu	Thr	Cys	Ile	Glu	Pro	Glu	His	Ile	Trp	Thr	Cys	Asn	Lys	Phe	Arg
65					70					75				80	
Cys	Gly	Glu	Lys	Arg	Leu	Thr	Arg	Ser	Leu	Cys	Ala	Cys	Ser	Asp	Asp
					85					90				95	
Cys	Lys	Asp	Lys	Gly	Asp	Cys	Cys	Ile	Asn	Tyr	Ser	Ser	Val	Cys	Gln
					100					105				110	
Gly	Glu	Lys	Ser	Trp	Val	Glu	Glu	Pro	Cys	Glu	Ser	Ile	Asn	Glu	Pro
					115					120				125	
Gln	Cys	Pro	Ala	Gly	Phe	Glu	Thr	Pro	Pro	Thr	Leu	Leu	Phe	Ser	Leu
					130					135				140	
Asp	Gly	Phe	Arg	Ala	Glu	Tyr	Leu	His	Thr	Trp	Gly	Gly	Leu	Leu	Pro
145					150					155				160	
Val	Ile	Ser	Lys	Leu	Lys	Lys	Cys	Gly	Thr	Tyr	Thr	Lys	Asn	Met	Arg
					165					170				175	
Pro	Val	Tyr	Pro	Thr	Lys	Thr	Phe	Pro	Asn	His	Tyr	Ser	Ile	Val	Thr
					180					185				190	
Gly	Leu	Tyr	Pro	Glu	Ser	His	Gly	Ile	Ile	Asp	Asn	Lys	Met	Tyr	Asp
					195					200				205	
Pro	Lys	Met	Asn	Ala	Ser	Phe	Ser	Leu	Lys	Ser	Lys	Glu	Lys	Phe	Asn
					210					215				220	
Pro	Glu	Trp	Tyr	Lys	Gly	Glu	Pro	Ile	Trp	Val	Thr	Ala	Lys	Tyr	Gln
225					230					235				240	
Gly	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Phe	Phe	Trp	Pro	Gly	Ser	Asp	Val	Glu	Ile
					245					250				255	
Asn	Gly	Ile	Phe	Pro	Asp	Ile	Tyr	Lys	Met	Tyr	Asn	Gly	Ser	Val	Pro
					260					265				270	
Phe	Glu	Glu	Arg	Ile	Leu	Ala	Val	Leu	Gln	Trp	Leu	Gln	Leu	Pro	Lys
					275					280				285	
Asp	Glu	Arg	Pro	His	Phe	Tyr	Thr	Leu	Tyr	Leu	Glu	Glu	Pro	Asp	Ser
					290					295				300	
Ser	Gly	His	Ser	Tyr	Gly	Pro	Val	Ser	Ser	Glu	Val	Ile	Lys	Ala	Leu
305					310					315				320	
Gln	Arg	Val	Asp	Gly	Met	Val	Gly	Met	Leu	Met	Asp	Gly	Leu	Lys	Glu
					325					330				335	
Leu	Asn	Leu	His	Arg	Cys	Leu	Asn	Leu	Ile	Leu	Ile	Ser	Asp	His	Gly
					340					345				350	
Met	Glu	Gln	Gly	Ser	Cys	Lys	Lys	Tyr	Ile	Tyr	Leu	Asn	Lys	Tyr	Leu
					355					360				365	

10

20

30

40

50

【表 26-2】

Gly Asp Val Lys Asn Ile Lys Val Ile Tyr Gly Pro Ala Ala Arg Leu	
370 375 380	
Arg Pro Ser Asp Val Pro Asp Lys Tyr Tyr Ser Phe Asn Tyr Glu Gly	
385 390 395 400	
Ile Ala Arg Asn Leu Ser Cys Arg Glu Pro Asn Gln His Phe Lys Pro	
405 410 415	
Tyr Leu Lys His Phe Leu Pro Lys Arg Leu His Phe Ala Lys Ser Asp	
420 425 430	
Arg Ile Glu Pro Leu Thr Phe Tyr Leu Asp Pro Gln Trp Gln Leu Ala	
435 440 445	
Leu Asn Pro Ser Glu Arg Lys Tyr Cys Gly Ser Gly Phe His Gly Ser	10
450 455 460	
Asp Asn Val Phe Ser Asn Met Gln Ala Leu Phe Val Gly Tyr Gly Pro	
465 470 475 480	
Gly Phe Lys His Gly Ile Glu Ala Asp Thr Phe Glu Asn Ile Glu Val	
485 490 495	
Tyr Asn Leu Met Cys Asp Leu Leu Asn Leu Thr Pro Ala Pro Asn Asn	
500 505 510	
Gly Thr His Gly Ser Leu Asn His Leu Leu Lys Asn Pro Val Tyr Thr	
515 520 525	
Pro Lys His Pro Lys Glu Val His Pro Leu Val Gln Cys Pro Phe Thr	
530 535 540	
Arg Asn Pro Arg Asp Asn Leu Gly Cys Ser Cys Asn Pro Ser Ile Leu	20
545 550 555 560	
Pro Ile Glu Asp Phe Gln Thr Gln Phe Asn Leu Thr Val Ala Glu Glu	
565 570 575	
Lys Ile Ile Lys His Glu Thr Leu Pro Tyr Gly Arg Pro Arg Val Leu	
580 585 590	
Gln Lys Glu Asn Thr Ile Cys Leu Leu Ser Gln His Gln Phe Met Ser	
595 600 605	
Gly Tyr Ser Gln Asp Ile Leu Met Pro Leu Trp Thr Ser Tyr Thr Val	
610 615 620	
Asp Arg Asn Asp Ser Phe Ser Thr Glu Asp Phe Ser Asn Cys Leu Tyr	
625 630 635 640	
Gln Asp Phe Arg Ile Pro Leu Ser Pro Val His Lys Cys Ser Phe Tyr	30
645 650 655	
Lys Asn Asn Thr Lys Val Ser Tyr Gly Phe Leu Ser Pro Pro Gln Leu	
660 665 670	
Asn Lys Asn Ser Ser Gly Ile Tyr Ser Glu Ala Leu Leu Thr Thr Asn	
675 680 685	
Ile Val Pro Met Tyr Gln Ser Phe Gln Val Ile Trp Arg Tyr Phe His	
690 695 700	
Asp Thr Leu Leu Arg Lys Tyr Ala Glu Glu Arg Asn Gly Val Asn Val	
705 710 715 720	
Val Ser Gly Pro Val Phe Asp Phe Asp Tyr Asp Gly Arg Cys Asp Ser	
725 730 735	
Leu Glu Asn Leu Arg Gln Lys Arg Arg Val Ile Arg Asn Gln Glu Ile	40
740 745 750	

【表 2 6 - 3】

Leu Ile Pro Thr His Phe Phe Ile Val Leu Thr Ser Cys Lys Asp Thr
 755 760 765
 Ser Gln Thr Pro Leu His Cys Glu Asn Leu Asp Thr Leu Ala Phe Ile
 770 775 780
 Leu Pro His Arg Thr Asp Asn Ser Glu Ser Cys Val His Gly Lys His
 785 790 795 800
 Asp Ser Ser Trp Val Glu Glu Leu Leu Met Leu His Arg Ala Arg Ile
 805 810 815
 Thr Asp Val Glu His Ile Thr Gly Leu Ser Phe Tyr Gln Gln Arg Lys
 820 825 830
 Glu Pro Val Ser Asp Ile Leu Lys Leu Lys Thr His Leu Pro Thr Phe
 835 840 845
 Ser Gln Glu Asp
 850

10

単一下線：シグナルペプチド配列、二重下線：N P P 1 の始まりおよび終わり、* * = シ
 グナルペプチド配列での切断位置

【 0 4 9 6 】

配列番号 2 7 - E N P P 1 2 1 アミノ酸配列

20

30

40

50

【表 27-1】

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	~~Asp~~	Phe	Thr	Ala
				85					90					95	
Leu	Lys	<u>Pro</u>	<u>Ser</u>	<u>Cys</u>	Ala	Lys	Glu	Val	Lys	Ser	Cys	Lys	Gly	Arg	Cys
		100							105				110		
Phe	Glu	Arg	Thr	Phe	Gly	Asn	Cys	Arg	Cys	Asp	Ala	Ala	Cys	Val	Glu
	115						120						125		
Leu	Gly	Asn	Cys	Cys	Leu	Asp	Tyr	Gln	Glu	Thr	Cys	Ile	Glu	Pro	Glu
	130						135						140		
His	Ile	Trp	Thr	Cys	Asn	Lys	Phe	Arg	Cys	Gly	Glu	Lys	Arg	Leu	Thr
145					150					155				160	
Arg	Ser	Leu	Cys	Ala	Cys	Ser	Asp	Asp	Cys	Lys	Asp	Lys	Gly	Asp	Cys
			165						170				175		
Cys	Ile	Asn	Tyr	Ser	Ser	Val	Cys	Gln	Gly	Glu	Lys	Ser	Trp	Val	Glu
			180						185				190		
Glu	Pro	Cys	Glu	Ser	Ile	Asn	Glu	Pro	Gln	Cys	Pro	Ala	Gly	Phe	Glu
	195						200					205			
Thr	Pro	Pro	Thr	Leu	Leu	Phe	Ser	Leu	Asp	Gly	Phe	Arg	Ala	Glu	Tyr
	210					215					220				
Leu	His	Thr	Trp	Gly	Gly	Leu	Leu	Pro	Val	Ile	Ser	Lys	Leu	Lys	Lys
225						230				235				240	
Cys	Gly	Thr	Tyr	Thr	Lys	Asn	Met	Arg	Pro	Val	Tyr	Pro	Thr	Lys	Thr
			245						250				255		
Phe	Pro	Asn	His	Tyr	Ser	Ile	Val	Thr	Gly	Leu	Tyr	Pro	Glu	Ser	His
		260						265					270		
Gly	Ile	Ile	Asp	Asn	Lys	Met	Tyr	Asp	Pro	Lys	Met	Asn	Ala	Ser	Phe
	275						280					285			
Ser	Leu	Lys	Ser	Lys	Glu	Lys	Phe	Asn	Pro	Glu	Trp	Tyr	Lys	Gly	Glu
	290					295					300				
Pro	Ile	Trp	Val	Thr	Ala	Lys	Tyr	Gln	Gly	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Phe
305					310					315				320	
Phe	Trp	Pro	Gly	Ser	Asp	Val	Glu	Ile	Asn	Gly	Ile	Phe	Pro	Asp	Ile
			325						330				335		
Tyr	Lys	Met	Tyr	Asn	Gly	Ser	Val	Pro	Phe	Glu	Glu	Arg	Ile	Leu	Ala
		340						345					350		
Val	Leu	Gln	Trp	Leu	Gln	Leu	Pro	Lys	Asp	Glu	Arg	Pro	His	Phe	Tyr
	355						360						365		

10

20

30

40

50

【表 2 7 - 2】

Thr	Leu	Tyr	Leu	Glu	Pro	Asp	Ser	Ser	Gly	His	Ser	Tyr	Gly	Pro	
370			375			380									
Val	Ser	Ser	Glu	Val	Ile	Lys	Ala	Leu	Gln	Arg	Val	Asp	Gly	Met	Val
385			390			395						400			
Gly	Met	Leu	Met	Asp	Gly	Leu	Lys	Glu	Leu	Asn	Leu	His	Arg	Cys	Leu
405				410				415							
Asn	Leu	Ile	Leu	Ile	Ser	Asp	His	Gly	Met	Glu	Gln	Gly	Ser	Cys	Lys
420			425			430									
Lys	Tyr	Ile	Tyr	Leu	Asn	Lys	Tyr	Leu	Gly	Asp	Val	Lys	Asn	Ile	Lys
435			440			445									
Val	Ile	Tyr	Gly	Pro	Ala	Ala	Arg	Leu	Arg	Pro	Ser	Asp	Val	Pro	Asp
450			455			460									
Lys	Tyr	Tyr	Ser	Phe	Asn	Tyr	Glu	Gly	Ile	Ala	Arg	Asn	Leu	Ser	Cys
465			470			475						480			
Arg	Glu	Pro	Asn	Gln	His	Phe	Lys	Pro	Tyr	Leu	Lys	His	Phe	Leu	Pro
485				490				495							
Lys	Arg	Leu	His	Phe	Ala	Lys	Ser	Asp	Arg	Ile	Glu	Pro	Leu	Thr	Phe
500			505			510									
Tyr	Leu	Asp	Pro	Gln	Trp	Gln	Leu	Ala	Leu	Asn	Pro	Ser	Glu	Arg	Lys
515			520			525									
Tyr	Cys	Gly	Ser	Gly	Phe	His	Gly	Ser	Asp	Asn	Val	Phe	Ser	Asn	Met
530			535			540									
Gln	Ala	Leu	Phe	Val	Gly	Tyr	Gly	Pro	Gly	Phe	Lys	His	Gly	Ile	Glu
545			550			555						560			
Ala	Asp	Thr	Phe	Glu	Asn	Ile	Glu	Val	Tyr	Asn	Leu	Met	Cys	Asp	Leu
565				570				575							
Leu	Asn	Leu	Thr	Pro	Ala	Pro	Asn	Asn	Gly	Thr	His	Gly	Ser	Leu	Asn
580			585			590									
His	Leu	Leu	Lys	Asn	Pro	Val	Tyr	Thr	Pro	Lys	His	Pro	Lys	Glu	Val
595			600			605									
His	Pro	Leu	Val	Gln	Cys	Pro	Phe	Thr	Arg	Asn	Pro	Arg	Asp	Asn	Leu
610			615			620									
Gly	Cys	Ser	Cys	Asn	Pro	Ser	Ile	Leu	Pro	Ile	Glu	Asp	Phe	Gln	Thr
625			630			635						640			
Gln	Phe	Asn	Leu	Thr	Val	Ala	Glu	Glu	Lys	Ile	Ile	Lys	His	Glu	Thr
645				650				655							
Leu	Pro	Tyr	Gly	Arg	Pro	Arg	Val	Leu	Gln	Lys	Glu	Asn	Thr	Ile	Cys
660			665			670									
Leu	Leu	Ser	Gln	His	Gln	Phe	Met	Ser	Gly	Tyr	Ser	Gln	Asp	Ile	Leu
675			680			685									
Met	Pro	Leu	Trp	Thr	Ser	Tyr	Thr	Val	Asp	Arg	Asn	Asp	Ser	Phe	Ser
690			695			700									
Thr	Glu	Asp	Phe	Ser	Asn	Cys	Leu	Tyr	Gln	Asp	Phe	Arg	Ile	Pro	Leu
705			710			715						720			
Ser	Pro	Val	His	Lys	Cys	Ser	Phe	Tyr	Lys	Asn	Asn	Thr	Lys	Val	Ser
725				730				735							
Tyr	Gly	Phe	Leu	Ser	Pro	Pro	Gln	Leu	Asn	Lys	Asn	Ser	Ser	Gly	Ile
740			745			750									

Tyr	Ser	Glu	Ala	Leu	Leu	Thr	Thr	Asn	Ile	Val	Pro	Met	Tyr	Gln	Ser
755				760				765							
Phe	Gln	Val	Ile	Trp	Arg	Tyr	Phe	His	Asp	Thr	Leu	Leu	Arg	Lys	Tyr
770				775				780							
Ala	Glu	Glu	Arg	Asn	Gly	Val	Asn	Val	Val	Ser	Gly	Pro	Val	Phe	Asp
785				790				795				800			
Phe	Asp	Tyr	Asp	Gly	Arg	Cys	Asp	Ser	Leu	Glu	Asn	Leu	Arg	Gln	Lys
805				810				815							
Arg	Arg	Val	Ile	Arg	Asn	Gln	Glu	Ile	Leu	Ile	Pro	Thr	His	Phe	Phe
820				825				830							
Ile	Val	Leu	Thr	Ser	Cys	Lys	Asp	Thr	Ser	Gln	Thr	Pro	Leu	His	Cys
835				840				845							
Glu	Asn	Leu	Asp	Thr	Leu	Ala	Phe	Ile	Leu	Pro	His	Arg	Thr	Asp	Asn
850				855				860							
Ser	Glu	Ser	Cys	Val	His	Gly	Lys	His	Asp	Ser	Ser	Trp	Val	Glu	Glu
865				870				875				880			
Leu	Leu	Met	Leu	His	Arg	Ala	Arg	Ile	Thr	Asp	Val	Glu	His	Ile	Thr
885				890				895							
Gly	Leu	Ser	Phe	Tyr	Gln	Gln	Arg	Lys	Glu	Pro	Val	Ser	Asp	Ile	Leu
900				905				910							
Lys	Leu	Lys	Thr	His	Leu	Pro	Thr	Phe	Ser	<u>Gln</u>	<u>Glu</u>	<u>Asp</u>			
915				920				925							

20

配列番号番号：28 - ENPP121-Fc アミノ酸配列

50

【表 28-1】

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	<u>Leu</u>
65					70					75				80	
<u>Phe</u>	<u>Thr</u>	<u>Phe</u>	<u>Ala</u>	<u>Val</u>	<u>Gly</u>	<u>Val</u>	<u>Asn</u>	<u>Ile</u>	<u>Cys</u>	<u>Leu</u>	<u>Gly</u>	<u>Asp</u>	<u>Phe</u>	<u>Thr</u>	<u>Ala</u>
				85					90					95	
Leu	Lys	<u>Pro</u>	<u>Ser</u>	<u>Cys</u>	Ala	Lys	Glu	Val	Lys	Ser	Cys	Lys	Gly	Arg	Cys
		100							105				110		
Phe	Glu	Arg	Thr	Phe	Gly	Asn	Cys	Arg	Cys	Asp	Ala	Ala	Cys	Val	Glu
	115						120						125		
Leu	Gly	Asn	Cys	Cys	Leu	Asp	Tyr	Gln	Glu	Thr	Cys	Ile	Glu	Pro	Glu
	130						135						140		
His	Ile	Trp	Thr	Cys	Asn	Lys	Phe	Arg	Cys	Gly	Glu	Lys	Arg	Leu	Thr
145					150					155				160	
Arg	Ser	Leu	Cys	Ala	Cys	Ser	Asp	Asp	Cys	Lys	Asp	Lys	Gly	Asp	Cys
			165						170				175		
Cys	Ile	Asn	Tyr	Ser	Ser	Val	Cys	Gln	Gly	Glu	Lys	Ser	Trp	Val	Glu
			180						185				190		
Glu	Pro	Cys	Glu	Ser	Ile	Asn	Glu	Pro	Gln	Cys	Pro	Ala	Gly	Phe	Glu
	195						200						205		
Thr	Pro	Pro	Thr	Leu	Leu	Phe	Ser	Leu	Asp	Gly	Phe	Arg	Ala	Glu	Tyr
	210					215						220			
Leu	His	Thr	Trp	Gly	Gly	Leu	Leu	Pro	Val	Ile	Ser	Lys	Leu	Lys	Lys
225						230				235				240	
Cys	Gly	Thr	Tyr	Thr	Lys	Asn	Met	Arg	Pro	Val	Tyr	Pro	Thr	Lys	Thr
			245						250				255		
Phe	Pro	Asn	His	Tyr	Ser	Ile	Val	Thr	Gly	Leu	Tyr	Pro	Glu	Ser	His
		260						265					270		
Gly	Ile	Ile	Asp	Asn	Lys	Met	Tyr	Asp	Pro	Lys	Met	Asn	Ala	Ser	Phe
	275						280					285			
Ser	Leu	Lys	Ser	Lys	Glu	Lys	Phe	Asn	Pro	Glu	Trp	Tyr	Lys	Gly	Glu
	290					295						300			
Pro	Ile	Trp	Val	Thr	Ala	Lys	Tyr	Gln	Gly	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Phe
305					310					315				320	
Phe	Trp	Pro	Gly	Ser	Asp	Val	Glu	Ile	Asn	Gly	Ile	Phe	Pro	Asp	Ile
			325						330				335		
Tyr	Lys	Met	Tyr	Asn	Gly	Ser	Val	Pro	Phe	Glu	Glu	Arg	Ile	Leu	Ala
		340						345					350		
Val	Leu	Gln	Trp	Leu	Gln	Leu	Pro	Lys	Asp	Glu	Arg	Pro	His	Phe	Tyr
	355					360							365		

10

20

30

40

50

【表 2 8 - 2】

Thr	Leu	Tyr	Leu	Glu	Glu	Pro	Asp	Ser	Ser	Gly	His	Ser	Tyr	Gly	Pro				
370				375				380											
Val	Ser	Ser	Glu	Val	Ile	Lys	Ala	Leu	Gln	Arg	Val	Asp	Gly	Met	Val				
385				390				395				400							
Gly	Met	Leu	Met	Asp	Gly	Leu	Lys	Glu	Leu	Asn	Leu	His	Arg	Cys	Leu				
405				410				415											
Asn	Leu	Ile	Leu	Ile	Ser	Asp	His	Gly	Met	Glu	Gln	Gly	Ser	Cys	Lys				
420				425				430											
Lys	Tyr	Ile	Tyr	Leu	Asn	Lys	Tyr	Leu	Gly	Asp	Val	Lys	Asn	Ile	Lys				
435				440				445											
Val	Ile	Tyr	Gly	Pro	Ala	Ala	Arg	Leu	Arg	Pro	Ser	Asp	Val	Pro	Asp				
450				455				460											
Lys	Tyr	Tyr	Ser	Phe	Asn	Tyr	Glu	Gly	Ile	Ala	Arg	Asn	Leu	Ser	Cys				
465				470				475				480							
Arg	Glu	Pro	Asn	Gln	His	Phe	Lys	Pro	Tyr	Leu	Lys	His	Phe	Leu	Pro				
485				490				495											
Lys	Arg	Leu	His	Phe	Ala	Lys	Ser	Asp	Arg	Ile	Glu	Pro	Leu	Thr	Phe				
500				505				510											
Tyr	Leu	Asp	Pro	Gln	Trp	Gln	Leu	Ala	Leu	Asn	Pro	Ser	Glu	Arg	Lys				
515				520				525											
Tyr	Cys	Gly	Ser	Gly	Phe	His	Gly	Ser	Asp	Asn	Val	Phe	Ser	Asn	Met				
530				535				540											
Gln	Ala	Leu	Phe	Val	Gly	Tyr	Gly	Pro	Gly	Phe	Lys	His	Gly	Ile	Glu				
545				550				555				560							
Ala	Asp	Thr	Phe	Glu	Asn	Ile	Glu	Val	Tyr	Asn	Leu	Met	Cys	Asp	Leu				
565				570				575											
Leu	Asn	Leu	Thr	Pro	Ala	Pro	Asn	Asn	Gly	Thr	His	Gly	Ser	Leu	Asn				
580				585				590											
His	Leu	Leu	Lys	Asn	Pro	Val	Tyr	Thr	Pro	Lys	His	Pro	Lys	Glu	Val				
595				600				605											
His	Pro	Leu	Val	Gln	Cys	Pro	Phe	Thr	Arg	Asn	Pro	Arg	Asp	Asn	Leu				
610				615				620											
Gly	Cys	Ser	Cys	Asn	Pro	Ser	Ile	Leu	Pro	Ile	Glu	Asp	Phe	Gln	Thr				
625				630				635				640							
Gln	Phe	Asn	Leu	Thr	Val	Ala	Glu	Glu	Lys	Ile	Ile	Lys	His	Glu	Thr				
645				650				655											
Leu	Pro	Tyr	Gly	Arg	Pro	Arg	Val	Leu	Gln	Lys	Glu	Asn	Thr	Ile	Cys				
660				665				670											
Leu	Leu	Ser	Gln	His	Gln	Phe	Met	Ser	Gly	Tyr	Ser	Gln	Asp	Ile	Leu				
675				680				685											
Met	Pro	Leu	Trp	Thr	Ser	Tyr	Thr	Val	Asp	Arg	Asn	Asp	Ser	Phe	Ser				
690				695				700											
Thr	Glu	Asp	Phe	Ser	Asn	Cys	Leu	Tyr	Gln	Asp	Phe	Arg	Ile	Pro	Leu				
705				710				715				720							
Ser	Pro	Val	His	Lys	Cys	Ser	Phe	Tyr	Lys	Asn	Asn	Thr	Lys	Val	Ser				
725				730				735											
Tyr	Gly	Phe	Leu	Ser	Pro	Pro	Gln	Leu	Asn	Lys	Asn	Ser	Ser	Gly	Ile				
740				745				750											

【表 28-3】

Tyr Ser Glu Ala Leu Leu Thr Thr Asn Ile Val Pro Met Tyr Gln Ser
 755 760 765
 Phe Gln Val Ile Trp Arg Tyr Phe His Asp Thr Leu Leu Arg Lys Tyr
 770 775 780
 Ala Glu Glu Arg Asn Gly Val Asn Val Val Ser Gly Pro Val Phe Asp
 785 790 795 800
 Phe Asp Tyr Asp Gly Arg Cys Asp Ser Leu Glu Asn Leu Arg Gln Lys
 805 810 815
 Arg Arg Val Ile Arg Asn Gln Glu Ile Leu Ile Pro Thr His Phe Phe
 820 825 830
 Ile Val Leu Thr Ser Cys Lys Asp Thr Ser Gln Thr Pro Leu His Cys
 835 840 845
 Glu Asn Leu Asp Thr Leu Ala Phe Ile Leu Pro His Arg Thr Asp Asn
 850 855 860
 Ser Glu Ser Cys Val His Gly Lys His Asp Ser Ser Trp Val Glu Glu
 865 870 875 880
 Leu Leu Met Leu His Arg Ala Arg Ile Thr Asp Val Glu His Ile Thr
 885 890 895
 Gly Leu Ser Phe Tyr Gln Gln Arg Lys Glu Pro Val Ser Asp Ile Leu
 900 905 910
 Lys Leu Lys Thr His Leu Pro Thr Phe Ser Gln Glu Asp Leu Ile Asn
 915 920 925
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 930 935 940
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 945 950 955 960
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 965 970 975
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 980 985 990
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 995 1000 1005
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
 1010 1015 1020
 Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
 1025 1030 1035
 Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 1040 1045 1050
 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
 1055 1060 1065
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 1070 1075 1080
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 1085 1090 1095
 Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 1100 1105 1110
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 1115 1120 1125

10

20

30

40

【表 28-4】

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
 1130 1135 1140
 Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 1145 1150 1155

単一下線：シグナルペプチド配列、二重下線：N P P 1の始まりおよび終わり、** = シグナルペプチド配列での切断位置、太字残基は、Fc配列を示す

【0498】

50

配列番号 29 - ENPP121-ALB アミノ酸配列:

【表 29-1】

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	<u>Leu</u>				10
65					70					75				80					
<u>Phe</u>	<u>Thr</u>	<u>Phe</u>	<u>Ala</u>	<u>Val</u>	<u>Gly</u>	<u>Val</u>	<u>Asn</u>	<u>Ile</u>	<u>Cys</u>	<u>Leu</u>	<u>Gly</u>	<u>**Phe</u>	<u>Thr</u>	<u>Ala</u>	<u>Gly</u>				
				85				90					95						
Leu	Lys	<u>Pro</u>	<u>Ser</u>	<u>Cys</u>	Ala	Lys	Glu	Val	Lys	Ser	Cys	Lys	Gly	Arg	Cys				
		100						105					110						
Phe	Glu	Arg	Thr	Phe	Gly	Asn	Cys	Arg	Cys	Asp	Ala	Ala	Cys	Val	Glu				
		115					120					125							
Leu	Gly	Asn	Cys	Cys	Leu	Asp	Tyr	Gln	Glu	Thr	Cys	Ile	Glu	Pro	Glu				
		130				135					140								
His	Ile	Trp	Thr	Cys	Asn	Lys	Phe	Arg	Cys	Gly	Glu	Lys	Arg	Leu	Thr				
		145				150				155				160					
Arg	Ser	Leu	Cys	Ala	Cys	Ser	Asp	Asp	Cys	Lys	Asp	Lys	Gly	Asp	Cys				20
			165					170					175						
Cys	Ile	Asn	Tyr	Ser	Ser	Val	Cys	Gln	Gly	Glu	Lys	Ser	Trp	Val	Glu				
		180						185					190						
Glu	Pro	Cys	Glu	Ser	Ile	Asn	Glu	Pro	Gln	Cys	Pro	Ala	Gly	Phe	Glu				
		195					200					205							
Thr	Pro	Pro	Thr	Leu	Leu	Phe	Ser	Leu	Asp	Gly	Phe	Arg	Ala	Glu	Tyr				
		210				215						220							
Leu	His	Thr	Trp	Gly	Gly	Leu	Leu	Pro	Val	Ile	Ser	Lys	Leu	Lys	Lys				
		225				230				235				240					
Cys	Gly	Thr	Tyr	Thr	Lys	Asn	Met	Arg	Pro	Val	Tyr	Pro	Thr	Lys	Thr				
			245					250					255						
Phe	Pro	Asn	His	Tyr	Ser	Ile	Val	Thr	Gly	Leu	Tyr	Pro	Glu	Ser	His				30
		260						265					270						
Gly	Ile	Ile	Asp	Asn	Lys	Met	Tyr	Asp	Pro	Lys	Met	Asn	Ala	Ser	Phe				
		275						280					285						
Ser	Leu	Lys	Ser	Lys	Glu	Lys	Phe	Asn	Pro	Glu	Trp	Tyr	Lys	Gly	Glu				
		290				295						300							
Pro	Ile	Trp	Val	Thr	Ala	Lys	Tyr	Gln	Gly	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Phe				
		305				310				315				320					
Phe	Trp	Pro	Gly	Ser	Asp	Val	Glu	Ile	Asn	Gly	Ile	Phe	Pro	Asp	Ile				
			325					330					335						
Tyr	Lys	Met	Tyr	Asn	Gly	Ser	Val	Pro	Phe	Glu	Glu	Arg	Ile	Leu	Ala				
		340						345					350						
Val	Leu	Gln	Trp	Leu	Gln	Leu	Pro	Lys	Asp	Glu	Arg	Pro	His	Phe	Tyr				40
		355						360					365						

【表 2 9 - 2】

Thr	Leu	Tyr	Leu	Glu	Pro	Asp	Ser	Ser	Gly	His	Ser	Tyr	Gly	Pro					
370			375			380													
Val	Ser	Ser	Glu	Val	Ile	Lys	Ala	Leu	Gln	Arg	Val	Asp	Gly	Met	Val				
385			390			395			400										
Gly	Met	Leu	Met	Asp	Gly	Leu	Lys	Glu	Leu	Asn	Leu	His	Arg	Cys	Leu				
405				410				415											
Asn	Leu	Ile	Leu	Ile	Ser	Asp	His	Gly	Met	Glu	Gln	Gly	Ser	Cys	Lys				
420			425			430													
Lys	Tyr	Ile	Tyr	Leu	Asn	Lys	Tyr	Leu	Gly	Asp	Val	Lys	Asn	Ile	Lys				
435			440			445													
Val	Ile	Tyr	Gly	Pro	Ala	Ala	Arg	Leu	Arg	Pro	Ser	Asp	Val	Pro	Asp				10
450			455			460													
Lys	Tyr	Tyr	Ser	Phe	Asn	Tyr	Glu	Gly	Ile	Ala	Arg	Asn	Leu	Ser	Cys				
465			470			475			480										
Arg	Glu	Pro	Asn	Gln	His	Phe	Lys	Pro	Tyr	Leu	Lys	His	Phe	Leu	Pro				
485				490				495											
Lys	Arg	Leu	His	Phe	Ala	Lys	Ser	Asp	Arg	Ile	Glu	Pro	Leu	Thr	Phe				
500			505			510													
Tyr	Leu	Asp	Pro	Gln	Trp	Gln	Leu	Ala	Leu	Asn	Pro	Ser	Glu	Arg	Lys				
515			520			525													
Tyr	Cys	Gly	Ser	Gly	Phe	His	Gly	Ser	Asp	Asn	Val	Phe	Ser	Asn	Met				
530			535			540													
Gln	Ala	Leu	Phe	Val	Gly	Tyr	Gly	Pro	Gly	Phe	Lys	His	Gly	Ile	Glu				20
545			550			555			560										
Ala	Asp	Thr	Phe	Glu	Asn	Ile	Glu	Val	Tyr	Asn	Leu	Met	Cys	Asp	Leu				
565				570				575											
Leu	Asn	Leu	Thr	Pro	Ala	Pro	Asn	Asn	Gly	Thr	His	Gly	Ser	Leu	Asn				
580			585			590													
His	Leu	Leu	Lys	Asn	Pro	Val	Tyr	Thr	Pro	Lys	His	Pro	Lys	Glu	Val				
595			600			605													
His	Pro	Leu	Val	Gln	Cys	Pro	Phe	Thr	Arg	Asn	Pro	Arg	Asp	Asn	Leu				
610			615			620													
Gly	Cys	Ser	Cys	Asn	Pro	Ser	Ile	Leu	Pro	Ile	Glu	Asp	Phe	Gln	Thr				
625			630			635			640										
Gln	Phe	Asn	Leu	Thr	Val	Ala	Glu	Glu	Lys	Ile	Ile	Lys	His	Glu	Thr				30
645				650				655											
Leu	Pro	Tyr	Gly	Arg	Pro	Arg	Val	Leu	Gln	Lys	Glu	Asn	Thr	Ile	Cys				
660			665			670													
Leu	Leu	Ser	Gln	His	Gln	Phe	Met	Ser	Gly	Tyr	Ser	Gln	Asp	Ile	Leu				
675			680			685													
Met	Pro	Leu	Trp	Thr	Ser	Tyr	Thr	Val	Asp	Arg	Asn	Asp	Ser	Phe	Ser				
690			695			700													
Thr	Glu	Asp	Phe	Ser	Asn	Cys	Leu	Tyr	Gln	Asp	Phe	Arg	Ile	Pro	Leu				
705			710			715			720										
Ser	Pro	Val	His	Lys	Cys	Ser	Phe	Tyr	Lys	Asn	Asn	Thr	Lys	Val	Ser				
725				730				735											
Tyr	Gly	Phe	Leu	Ser	Pro	Pro	Gln	Leu	Asn	Lys	Asn	Ser	Ser	Gly	Ile				40
740			745			750													

【表 2 9 - 3】

Tyr	Ser	Glu	Ala	Leu	Leu	Thr	Thr	Ile	Val	Pro	Met	Tyr	Gln	Ser																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																															</
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	----

【表 29 - 4】

Asp Lys	Glu Ser Cys Leu Thr	Pro Lys Leu Asp Gly	Val Lys Glu
1130	1135	1140	
Lys Ala	Leu Val Ser Ser Val	Arg Gln Arg Met Lys	Cys Ser Ser
1145	1150	1155	
Met Gln	Lys Phe Gly Glu Arg	Ala Phe Lys Ala Trp	Ala Val Ala
1160	1165	1170	
Arg Leu	Ser Gln Thr Phe Pro	Asn Ala Asp Phe Ala	Glu Ile Thr
1175	1180	1185	
Lys Leu	Ala Thr Asp Leu Thr	Lys Val Asn Lys Glu	Cys Cys His
1190	1195	1200	
Gly Asp	Leu Leu Glu Cys Ala	Asp Asp Arg Ala Glu	Leu Ala Lys
1205	1210	1215	
Tyr Met	Cys Glu Asn Gln Ala	Thr Ile Ser Ser Lys	Leu Gln Thr
1220	1225	1230	
Cys Cys	Asp Lys Pro Leu Leu	Lys Lys Ala His Cys	Leu Ser Glu
1235	1240	1245	
Val Glu	His Asp Thr Met Pro	Ala Asp Leu Pro Ala	Ile Ala Ala
1250	1255	1260	
Asp Phe	Val Glu Asp Gln Glu	Val Cys Lys Asn Tyr	Ala Glu Ala
1265	1270	1275	
Lys Asp	Val Phe Leu Gly Thr	Phe Leu Tyr Glu Tyr	Ser Arg Arg
1280	1285	1290	
His Pro	Asp Tyr Ser Val Ser	Leu Leu Leu Arg Leu	Ala Lys Lys
1295	1300	1305	
Tyr Glu	Ala Thr Leu Glu Lys	Cys Cys Ala Glu Ala	Asn Pro Pro
1310	1315	1320	
Ala Cys	Tyr Gly Thr Val Leu	Ala Glu Phe Gln Pro	Leu Val Glu
1325	1330	1335	
Glu Pro	Lys Asn Leu Val Lys	Thr Asn Cys Asp Leu	Tyr Glu Lys
1340	1345	1350	
Leu Gly	Glu Tyr Gly Phe Gln	Asn Ala Ile Leu Val	Arg Tyr Thr
1355	1360	1365	
Gln Lys	Ala Pro Gln Val Ser	Thr Pro Thr Leu Val	Glu Ala Ala
1370	1375	1380	
Arg Asn	Leu Gly Arg Val Gly	Thr Lys Cys Cys Thr	Leu Pro Glu
1385	1390	1395	
Asp Gln	Arg Leu Pro Cys Val	Glu Asp Tyr Leu Ser	Ala Ile Leu
1400	1405	1410	
Asn Arg	Val Cys Leu Leu His	Glu Lys Thr Pro Val	Ser Glu His
1415	1420	1425	
Val Thr	Lys Cys Cys Ser Gly	Ser Leu Val Glu Arg	Arg Pro Cys
1430	1435	1440	
Phe Ser	Ala Leu Thr Val Asp	Glu Thr Tyr Val Pro	Lys Glu Phe
1445	1450	1455	
Lys Ala	Glu Thr Phe Thr Phe	His Ser Asp Ile Cys	Thr Leu Pro
1460	1465	1470	
Glu Lys	Glu Lys Gln Ile Lys	Lys Gln Thr Ala Leu	Ala Glu Leu
1475	1480	1485	

10

20

30

40

50

【表 2 9 - 5】

Val	Lys	His	Lys	Pro	Lys	Ala	Thr	Ala	Glu	Gln	Leu	Lys	Thr	Val
1490						1495					1500			
Met	Asp	Asp	Phe	Ala	Gln	Phe	Leu	Asp	Thr	Cys	Cys	Lys	Ala	Ala
1505						1510					1515			
Asp	Lys	Asp	Thr	Cys	Phe	Ser	Thr	Glu	Gly	Pro	Asn	Leu	Val	Thr
1520						1525					1530			
Arg	Cys	Lys	Asp	Ala	Leu	Ala	Arg	Ser	Trp	Ser	His	Pro	Gln	Phe
1535						1540					1545			
Glu	Lys													
1550														

10

単一下線：シグナルペプチド配列、二重下線：N P P 1 の始まりおよび終わり、* * = シグナルペプチド配列での切断位置、太字残基は、アルブミン配列を示す

【 0 4 9 9 】

配列番号 3 0 - E N P P 1 2 1 - N P P 3 - F c 配列

20

30

40

50

【表 30 - 1】

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	<u>Leu</u>
65					70					75				80	
<u>Phe</u>	<u>Thr</u>	<u>Phe</u>	<u>Ala</u>	<u>Val</u>	<u>Gly</u>	<u>Val</u>	<u>Asn</u>	<u>Ile</u>	<u>Cys</u>	<u>Leu</u>	<u>Gly</u>	<u>Phe</u>	<u>Thr</u>	<u>Ala</u>	<u>**Lys</u>
				85					90					95	
<u>Gln</u>	<u>Gly</u>	Ser	Cys	Arg	Lys	Lys	Cys	Phe	Asp	Ala	Ser	Phe	Arg	Gly	Leu
			100					105					110		
Glu	Asn	Cys	Arg	Cys	Asp	Val	Ala	Cys	Lys	Asp	Arg	Gly	Asp	Cys	Cys
	115						120					125			
Trp	Asp	Phe	Glu	Asp	Thr	Cys	Val	Glu	Ser	Thr	Arg	Ile	Trp	Met	Cys
	130						135					140			
Asn	Lys	Phe	Arg	Cys	Gly	Glu	Arg	Leu	Glu	Ala	Ser	Leu	Cys	Ser	Cys
145					150					155				160	
Ser	Asp	Asp	Cys	Leu	Gln	Arg	Lys	Asp	Cys	Cys	Ala	Asp	Tyr	Lys	Ser
			165						170					175	
Val	Cys	Gln	Gly	Glu	Thr	Ser	Trp	Leu	Glu	Glu	Asn	Cys	Asp	Thr	Ala
			180						185					190	
Gln	Gln	Ser	Gln	Cys	Pro	Glu	Gly	Phe	Asp	Leu	Pro	Pro	Val	Ile	Leu
	195						200						205		
Phe	Ser	Met	Asp	Gly	Phe	Arg	Ala	Glu	Tyr	Leu	Tyr	Thr	Trp	Asp	Thr
	210					215						220			
Leu	Met	Pro	Asn	Ile	Asn	Lys	Leu	Lys	Thr	Cys	Gly	Ile	His	Ser	Lys
225					230					235				240	
Tyr	Met	Arg	Ala	Met	Tyr	Pro	Thr	Lys	Thr	Phe	Pro	Asn	His	Tyr	Thr
			245						250					255	
Ile	Val	Thr	Gly	Leu	Tyr	Pro	Glu	Ser	His	Gly	Ile	Ile	Asp	Asn	Asn
			260						265					270	
Met	Tyr	Asp	Val	Asn	Leu	Asn	Lys	Asn	Phe	Ser	Leu	Ser	Ser	Lys	Glu
	275						280						285		
Gln	Asn	Asn	Pro	Ala	Trp	Trp	His	Gly	Gln	Pro	Met	Trp	Leu	Thr	Ala
	290						295					300			
Met	Tyr	Gln	Gly	Leu	Lys	Ala	Ala	Thr	Tyr	Phe	Trp	Pro	Gly	Ser	Glu
305					310					315				320	
Val	Ala	Ile	Asn	Gly	Ser	Phe	Pro	Ser	Ile	Tyr	Met	Pro	Tyr	Asn	Gly
			325						330					335	
Ser	Val	Pro	Phe	Glu	Glu	Arg	Ile	Ser	Thr	Leu	Leu	Lys	Trp	Leu	Asp
			340						345					350	
Leu	Pro	Lys	Ala	Glu	Arg	Pro	Arg	Phe	Tyr	Thr	Met	Tyr	Phe	Glu	Glu
	355						360							365	

10

20

30

40

50

【表 30 - 2】

Pro Asp Ser Ser Gly His Ala Gly Gly Pro Val Ser Ala Arg Val Ile	
370 375 380	
Lys Ala Leu Gln Val Val Asp His Ala Phe Gly Met Leu Met Glu Gly	
385 390 395 400	
Leu Lys Gln Arg Asn Leu His Asn Cys Val Asn Ile Ile Leu Leu Ala	
405 410 415	
Asp His Gly Met Asp Gln Thr Tyr Cys Asn Lys Met Glu Tyr Met Thr	
420 425 430	
Asp Tyr Phe Pro Arg Ile Asn Phe Phe Tyr Met Tyr Glu Gly Pro Ala	
435 440 445	
Pro Arg Ile Arg Ala His Asn Ile Pro His Asp Phe Phe Ser Phe Asn	10
450 455 460	
Ser Glu Glu Ile Val Arg Asn Leu Ser Cys Arg Lys Pro Asp Gln His	
465 470 475 480	
Phe Lys Pro Tyr Leu Thr Pro Asp Leu Pro Lys Arg Leu His Tyr Ala	
485 490 495	
Lys Asn Val Arg Ile Asp Lys Val His Leu Phe Val Asp Gln Gln Trp	
500 505 510	
Leu Ala Val Arg Ser Lys Ser Asn Thr Asn Cys Gly Gly Gly Asn His	
515 520 525	
Gly Tyr Asn Asn Glu Phe Arg Ser Met Glu Ala Ile Phe Leu Ala His	
530 535 540	
Gly Pro Ser Phe Lys Glu Lys Thr Glu Val Glu Pro Phe Glu Asn Ile	20
545 550 555 560	
Glu Val Tyr Asn Leu Met Cys Asp Leu Leu Arg Ile Gln Pro Ala Pro	
565 570 575	
Asn Asn Gly Thr His Gly Ser Leu Asn His Leu Leu Lys Val Pro Phe	
580 585 590	
Tyr Glu Pro Ser His Ala Glu Glu Val Ser Lys Phe Ser Val Cys Gly	
595 600 605	
Phe Ala Asn Pro Leu Pro Thr Glu Ser Leu Asp Cys Phe Cys Pro His	
610 615 620	
Leu Gln Asn Ser Thr Gln Leu Glu Gln Val Asn Gln Met Leu Asn Leu	
625 630 635 640	
Thr Gln Glu Glu Ile Thr Ala Thr Val Lys Val Asn Leu Pro Phe Gly	30
645 650 655	
Arg Pro Arg Val Leu Gln Lys Asn Val Asp His Cys Leu Leu Tyr His	
660 665 670	
Arg Glu Tyr Val Ser Gly Phe Gly Lys Ala Met Arg Met Pro Met Trp	
675 680 685	
Ser Ser Tyr Thr Val Pro Gln Leu Gly Asp Thr Ser Pro Leu Pro Pro	
690 695 700	
Thr Val Pro Asp Cys Leu Arg Ala Asp Val Arg Val Pro Pro Ser Glu	
705 710 715 720	
Ser Gln Lys Cys Ser Phe Tyr Leu Ala Asp Lys Asn Ile Thr His Gly	
725 730 735	
Phe Leu Tyr Pro Pro Ala Ser Asn Arg Thr Ser Asp Ser Gln Tyr Asp	40
740 745 750	

【表 3 0 - 3】

Ala Leu Ile Thr Ser Asn Leu Val Pro Met Tyr Glu Glu Phe Arg Lys	
755	760
Met Trp Asp Tyr Phe His Ser Val Leu Leu Ile Lys His Ala Thr Glu	
770	775
Arg Asn Gly Val Asn Val Val Ser Gly Pro Ile Phe Asp Tyr Asn Tyr	
785	790
Asp Gly His Phe Asp Ala Pro Asp Glu Ile Thr Lys His Leu Ala Asn	
805	810
Thr Asp Val Pro Ile Pro Thr His Tyr Phe Val Val Leu Thr Ser Cys	
820	825
Lys Asn Lys Ser His Thr Pro Glu Asn Cys Pro Gly Trp Leu Asp Val	
835	840
Leu Pro Phe Ile Ile Pro His Arg Pro Thr Asn Val Glu Ser Cys Pro	
850	855
Glu Gly Lys Pro Glu Ala Leu Trp Val Glu Glu Arg Phe Thr Ala His	
865	870
Ile Ala Arg Val Arg Asp Val Glu Leu Leu Thr Gly Leu Asp Phe Tyr	
885	890
Gln Asp Lys Val Gln Pro Val Ser Glu Ile Leu Gln Leu Lys Thr Tyr	
900	905
<u>Leu Pro Thr Phe Glu Thr Thr Ile Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro</u>	
915	920
Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro	
930	935
Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr	
945	950
Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn	
965	970
Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg	
980	985
Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val	
995	1000
Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val	
1010	1015
Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys	
1025	1030
Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro	
1040	1045
Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu	
1055	1060
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser	
1070	1075
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu	
1085	1090
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp	
1100	1105
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met	
1115	1120

10

20

30

40

【表 3 0 - 4】

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu	
1130	1135
Ser Pro Gly Lys	
1145	

単一下線：シグナルペプチド配列、二重下線：N P P 1 の始まりおよび終わり、** = シグナルペプチド配列での切断位置、太字残基は、F c 配列を示す

【0 5 0 0】

50

配列番号 3 1 - E N P P 1 2 1 - N P P 3 - アルブミン配列

【表 3 1 - 1】

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	*Lys
				85					90					95	
Gln	Gly	Ser	Cys	Arg	Lys	Lys	Cys	Phe	Asp	Ala	Ser	Phe	Arg	Gly	Leu
			100					105					110		
Glu	Asn	Cys	Arg	Cys	Asp	Val	Ala	Cys	Lys	Asp	Arg	Gly	Asp	Cys	Cys
		115					120					125			
Trp	Asp	Phe	Glu	Asp	Thr	Cys	Val	Glu	Ser	Thr	Arg	Ile	Trp	Met	Cys
	130						135					140			
Asn	Lys	Phe	Arg	Cys	Gly	Glu	Arg	Leu	Glu	Ala	Ser	Leu	Cys	Ser	Cys
145				150						155				160	
Ser	Asp	Asp	Cys	Leu	Gln	Arg	Lys	Asp	Cys	Cys	Ala	Asp	Tyr	Lys	Ser
			165							170				175	
Val	Cys	Gln	Gly	Glu	Thr	Ser	Trp	Leu	Glu	Glu	Asn	Cys	Asp	Thr	Ala
		180						185						190	
Gln	Gln	Ser	Gln	Cys	Pro	Glu	Gly	Phe	Asp	Leu	Pro	Pro	Val	Ile	Leu
		195					200					205			
Phe	Ser	Met	Asp	Gly	Phe	Arg	Ala	Glu	Tyr	Leu	Tyr	Thr	Trp	Asp	Thr
	210					215						220			
Leu	Met	Pro	Asn	Ile	Asn	Lys	Leu	Lys	Thr	Cys	Gly	Ile	His	Ser	Lys
225				230						235				240	
Tyr	Met	Arg	Ala	Met	Tyr	Pro	Thr	Lys	Thr	Phe	Pro	Asn	His	Tyr	Thr
			245							250				255	
Ile	Val	Thr	Gly	Leu	Tyr	Pro	Glu	Ser	His	Gly	Ile	Ile	Asp	Asn	Asn
		260							265					270	
Met	Tyr	Asp	Val	Asn	Leu	Asn	Lys	Asn	Phe	Ser	Leu	Ser	Ser	Lys	Glu
		275					280						285		
Gln	Asn	Asn	Pro	Ala	Trp	Trp	His	Gly	Gln	Pro	Met	Trp	Leu	Thr	Ala
	290						295					300			
Met	Tyr	Gln	Gly	Leu	Lys	Ala	Ala	Thr	Tyr	Phe	Trp	Pro	Gly	Ser	Glu
305				310						315				320	
Val	Ala	Ile	Asn	Gly	Ser	Phe	Pro	Ser	Ile	Tyr	Met	Pro	Tyr	Asn	Gly
			325						330					335	
Ser	Val	Pro	Phe	Glu	Glu	Arg	Ile	Ser	Thr	Leu	Leu	Lys	Trp	Leu	Asp
		340							345					350	
Leu	Pro	Lys	Ala	Glu	Arg	Pro	Arg	Phe	Tyr	Thr	Met	Tyr	Phe	Glu	Glu
		355					360							365	

10

20

30

40

50

【表 3 1 - 2】

Pro Asp Ser Ser Gly His Ala Gly Gly Pro Val Ser Ala Arg Val Ile	
370 375 380	
Lys Ala Leu Gln Val Val Asp His Ala Phe Gly Met Leu Met Glu Gly	
385 390 395 400	
Leu Lys Gln Arg Asn Leu His Asn Cys Val Asn Ile Ile Leu Leu Ala	
405 410 415	
Asp His Gly Met Asp Gln Thr Tyr Cys Asn Lys Met Glu Tyr Met Thr	
420 425 430	
Asp Tyr Phe Pro Arg Ile Asn Phe Phe Tyr Met Tyr Glu Gly Pro Ala	
435 440 445	
Pro Arg Ile Arg Ala His Asn Ile Pro His Asp Phe Phe Ser Phe Asn	10
450 455 460	
Ser Glu Glu Ile Val Arg Asn Leu Ser Cys Arg Lys Pro Asp Gln His	
465 470 475 480	
Phe Lys Pro Tyr Leu Thr Pro Asp Leu Pro Lys Arg Leu His Tyr Ala	
485 490 495	
Lys Asn Val Arg Ile Asp Lys Val His Leu Phe Val Asp Gln Gln Trp	
500 505 510	
Leu Ala Val Arg Ser Lys Ser Asn Thr Asn Cys Gly Gly Gly Asn His	
515 520 525	
Gly Tyr Asn Asn Glu Phe Arg Ser Met Glu Ala Ile Phe Leu Ala His	
530 535 540	
Gly Pro Ser Phe Lys Glu Lys Thr Glu Val Glu Pro Phe Glu Asn Ile	20
545 550 555 560	
Glu Val Tyr Asn Leu Met Cys Asp Leu Leu Arg Ile Gln Pro Ala Pro	
565 570 575	
Asn Asn Gly Thr His Gly Ser Leu Asn His Leu Leu Lys Val Pro Phe	
580 585 590	
Tyr Glu Pro Ser His Ala Glu Glu Val Ser Lys Phe Ser Val Cys Gly	
595 600 605	
Phe Ala Asn Pro Leu Pro Thr Glu Ser Leu Asp Cys Phe Cys Pro His	
610 615 620	
Leu Gln Asn Ser Thr Gln Leu Glu Gln Val Asn Gln Met Leu Asn Leu	
625 630 635 640	
Thr Gln Glu Glu Ile Thr Ala Thr Val Lys Val Asn Leu Pro Phe Gly	30
645 650 655	
Arg Pro Arg Val Leu Gln Lys Asn Val Asp His Cys Leu Leu Tyr His	
660 665 670	
Arg Glu Tyr Val Ser Gly Phe Gly Lys Ala Met Arg Met Pro Met Trp	
675 680 685	
Ser Ser Tyr Thr Val Pro Gln Leu Gly Asp Thr Ser Pro Leu Pro Pro	
690 695 700	
Thr Val Pro Asp Cys Leu Arg Ala Asp Val Arg Val Pro Pro Ser Glu	
705 710 715 720	
Ser Gln Lys Cys Ser Phe Tyr Leu Ala Asp Lys Asn Ile Thr His Gly	
725 730 735	
Phe Leu Tyr Pro Pro Ala Ser Asn Arg Thr Ser Asp Ser Gln Tyr Asp	40
740 745 750	

【表 3 1 - 3】

Ala Leu Ile Thr Ser Asn Leu Val Pro Met Tyr Glu Glu Phe Arg Lys	
755	760
Met Trp Asp Tyr Phe His Ser Val Leu Leu Ile Lys His Ala Thr Glu	
770	780
Arg Asn Gly Val Asn Val Ser Gly Pro Ile Phe Asp Tyr Asn Tyr	
785	790
Asp Gly His Phe Asp Ala Pro Asp Glu Ile Thr Lys His Leu Ala Asn	
805	810
Thr Asp Val Pro Ile Pro Thr His Tyr Phe Val Val Leu Thr Ser Cys	
820	825
Lys Asn Lys Ser His Thr Pro Glu Asn Cys Pro Gly Trp Leu Asp Val	
835	840
Leu Pro Phe Ile Ile Pro His Arg Pro Thr Asn Val Glu Ser Cys Pro	
850	855
Glu Gly Lys Pro Glu Ala Leu Trp Val Glu Glu Arg Phe Thr Ala His	
865	870
Ile Ala Arg Val Arg Asp Val Glu Leu Leu Thr Gly Leu Asp Phe Tyr	
885	890
Gln Asp Lys Val Gln Pro Val Ser Glu Ile Leu Gln Leu Lys Thr Tyr	
900	905
Leu <u>Pro Thr Phe Glu Thr Thr Ile</u> Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly	
915	920
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Met Lys Trp Val Thr Phe Leu Leu Leu Leu	
930	935
Phe Val Ser Gly Ser Ala Phe Ser Arg Gly Val Phe Arg Arg Glu Ala	
945	950
His Lys Ser Glu Ile Ala His Arg Tyr Asn Asp Leu Gly Glu Gln His	
965	970
Phe Lys Gly Leu Val Leu Ile Ala Phe Ser Gln Tyr Leu Gln Lys Cys	
980	985
Ser Tyr Asp Glu His Ala Lys Leu Val Gln Glu Val Thr Asp Phe Ala	
995	1000
Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Ala Asn Cys Asp Lys Ser	
1010	1015
Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Ala Ile Pro Asn Leu	
1025	1030
Arg Glu Asn Tyr Gly Glu Leu Ala Asp Cys Cys Thr Lys Gln Glu	
1040	1045
Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro	
1055	1060
Ser Leu Pro Pro Phe Glu Arg Pro Glu Ala Glu Ala Met Cys Thr	
1070	1075
Ser Phe Lys Glu Asn Pro Thr Thr Phe Met Gly His Tyr Leu His	
1085	1090
Glu Val Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu	
1100	1105
Tyr Tyr Ala Glu Gln Tyr Asn Glu Ile Leu Thr Gln Cys Cys Ala	
1115	1120

10

20

30

40

50

【表 3 1 - 4】

Glu Ala	Asp Lys	Glu Ser	Cys	Leu Thr	Pro Lys	Leu	Asp Gly	Val	
1130			1135			1140			
Lys Glu	Lys Ala	Leu Val	Ser	Ser Val	Arg Gln	Arg	Met Lys	Cys	
1145			1150			1155			
Ser Ser	Met Gln	Lys Phe	Gly	Glu Arg	Ala Phe	Lys	Ala Trp	Ala	
1160			1165			1170			
Val Ala	Arg Leu	Ser Gln	Thr	Phe Pro	Asn Ala	Asp	Phe Ala	Glu	
1175			1180			1185			
Ile Thr	Lys Leu	Ala Thr	Asp	Leu Thr	Lys Val	Asn	Lys Glu	Cys	
1190			1195			1200			
Cys His	Gly Asp	Leu Leu	Glu	Cys Ala	Asp Asp	Arg	Ala Glu	Leu	
1205			1210			1215			
Ala Lys	Tyr Met	Cys Glu	Asn	Gln Ala	Thr Ile	Ser	Ser Lys	Leu	
1220			1225			1230			
Gln Thr	Cys Cys	Asp Lys	Pro	Leu Leu	Lys Lys	Ala	His Cys	Leu	
1235			1240			1245			
Ser Glu	Val Glu	His Asp	Thr	Met Pro	Ala Asp	Leu	Pro Ala	Ile	
1250			1255			1260			
Ala Ala	Asp Phe	Val Glu	Asp	Gln Glu	Val Cys	Lys	Asn Tyr	Ala	
1265			1270			1275			
Glu Ala	Lys Asp	Val Phe	Leu	Gly Thr	Phe Leu	Tyr	Glu Tyr	Ser	
1280			1285			1290			
Arg Arg	His Pro	Asp Tyr	Ser	Val Ser	Leu Leu	Leu	Arg Leu	Ala	
1295			1300			1305			
Lys Lys	Tyr Glu	Ala Thr	Leu	Glu Lys	Cys Cys	Ala	Glu Ala	Asn	
1310			1315			1320			
Pro Pro	Ala Cys	Tyr Gly	Thr	Val Leu	Ala Glu	Phe	Gln Pro	Leu	
1325			1330			1335			
Val Glu	Glu Pro	Lys Asn	Leu	Val Lys	Thr Asn	Cys	Asp Leu	Tyr	
1340			1345			1350			
Glu Lys	Leu Gly	Glu Tyr	Gly	Phe Gln	Asn Ala	Ile	Leu Val	Arg	
1355			1360			1365			
Tyr Thr	Gln Lys	Ala Pro	Gln	Val Ser	Thr Pro	Thr	Leu Val	Glu	
1370			1375			1380			
Ala Ala	Arg Asn	Leu Gly	Arg	Val Gly	Thr Lys	Cys	Cys Thr	Leu	
1385			1390			1395			
Pro Glu	Asp Gln	Arg Leu	Pro	Cys Val	Glu Asp	Tyr	Leu Ser	Ala	
1400			1405			1410			
Ile Leu	Asn Arg	Val Cys	Leu	Leu His	Glu Lys	Thr	Pro Val	Ser	
1415			1420			1425			
Glu His	Val Thr	Lys Cys	Cys	Ser Gly	Ser Leu	Val	Glu Arg	Arg	
1430			1435			1440			
Pro Cys	Phe Ser	Ala Leu	Thr	Val Asp	Glu Thr	Tyr	Val Pro	Lys	
1445			1450			1455			
Glu Phe	Lys Ala	Glu Thr	Phe	Thr Phe	His Ser	Asp	Ile Cys	Thr	
1460			1465			1470			
Leu Pro	Glu Lys	Glu Lys	Gln	Ile Lys	Lys Gln	Thr	Ala Leu	Ala	
1475			1480			1485			

10

20

30

40

50

【表 3 1 - 5】

Glu	Leu	Val	Lys	His	Lys	Pro	Lys	Ala	Thr	Ala	Glu	Gln	Leu	Lys
1490						1495					1500			
Thr	Val	Met	Asp	Asp	Phe	Ala	Gln	Phe	Leu	Asp	Thr	Cys	Cys	Lys
1505						1510					1515			
Ala	Ala	Asp	Lys	Asp	Thr	Cys	Phe	Ser	Thr	Glu	Gly	Pro	Asn	Leu
1520						1525					1530			
Val	Thr	Arg	Cys	Lys	Asp	Ala	Leu	Ala						
1535						1540								

10

単一下線：シグナルペプチド配列、二重下線：N P P 3 の始まりおよび終わり、** = シグナルペプチド配列での切断位置、太字残基は、アルブミン配列を示す

【0 5 0 1】

配列番号 3 2 - E N P P 1 2 1 G L K タンパク質輸出シグナル配列

【表 3 2】

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														

20

【0 5 0 2】

配列番号 3 3 - アルブミン配列

30

40

50

【表 3 3 - 1】

Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Met
1				5					10					15	
Lys	Trp	Val	Thr	Phe	Leu	Leu	Leu	Leu	Phe	Val	Ser	Gly	Ser	Ala	Phe
		20						25					30		
Ser	Arg	Gly	Val	Phe	Arg	Arg	Glu	Ala	His	Lys	Ser	Glu	Ile	Ala	His
		35					40					45			
Arg	Tyr	Asn	Asp	Leu	Gly	Glu	Gln	His	Phe	Lys	Gly	Leu	Val	Leu	Ile
	50					55					60				
Ala	Phe	Ser	Gln	Tyr	Leu	Gln	Lys	Cys	Ser	Tyr	Asp	Glu	His	Ala	Lys
65					70					75				80	
Leu	Val	Gln	Glu	Val	Thr	Asp	Phe	Ala	Lys	Thr	Cys	Val	Ala	Asp	Glu
				85					90					95	
Ser	Ala	Ala	Asn	Cys	Asp	Lys	Ser	Leu	His	Thr	Leu	Phe	Gly	Asp	Lys
			100					105					110		
Leu	Cys	Ala	Ile	Pro	Asn	Leu	Arg	Glu	Asn	Tyr	Gly	Glu	Leu	Ala	Asp
	115						120					125			
Cys	Cys	Thr	Lys	Gln	Glu	Pro	Glu	Arg	Asn	Glu	Cys	Phe	Leu	Gln	His
	130						135					140			
Lys	Asp	Asp	Asn	Pro	Ser	Leu	Pro	Pro	Phe	Glu	Arg	Pro	Glu	Ala	Glu
145					150					155				160	
Ala	Met	Cys	Thr	Ser	Phe	Lys	Glu	Asn	Pro	Thr	Thr	Phe	Met	Gly	His
			165						170					175	
Tyr	Leu	His	Glu	Val	Ala	Arg	Arg	His	Pro	Tyr	Phe	Tyr	Ala	Pro	Glu
			180					185					190		
Leu	Leu	Tyr	Tyr	Ala	Glu	Gln	Tyr	Asn	Glu	Ile	Leu	Thr	Gln	Cys	Cys
	195						200					205			
Ala	Glu	Ala	Asp	Lys	Glu	Ser	Cys	Leu	Thr	Pro	Lys	Leu	Asp	Gly	Val
	210					215				220					
Lys	Glu	Lys	Ala	Leu	Val	Ser	Ser	Val	Arg	Gln	Arg	Met	Lys	Cys	Ser
225					230					235				240	
Ser	Met	Gln	Lys	Phe	Gly	Glu	Arg	Ala	Phe	Lys	Ala	Trp	Ala	Val	Ala
			245						250					255	
Arg	Leu	Ser	Gln	Thr	Phe	Pro	Asn	Ala	Asp	Phe	Ala	Glu	Ile	Thr	Lys
		260						265					270		
Leu	Ala	Thr	Asp	Leu	Thr	Lys	Val	Asn	Lys	Glu	Cys	Cys	His	Gly	Asp
	275						280					285			
Leu	Leu	Glu	Cys	Ala	Asp	Asp	Arg	Ala	Glu	Leu	Ala	Lys	Tyr	Met	Cys
	290					295						300			
Glu	Asn	Gln	Ala	Thr	Ile	Ser	Ser	Lys	Leu	Gln	Thr	Cys	Cys	Asp	Lys
305					310					315				320	
Pro	Leu	Leu	Lys	Lys	Ala	His	Cys	Leu	Ser	Glu	Val	Glu	His	Asp	Thr
			325						330					335	
Met	Pro	Ala	Asp	Leu	Pro	Ala	Ile	Ala	Ala	Asp	Phe	Val	Glu	Asp	Gln
		340						345					350		
Glu	Val	Cys	Lys	Asn	Tyr	Ala	Glu	Ala	Lys	Asp	Val	Phe	Leu	Gly	Thr
	355						360					365			

10

20

30

40

50

[illegible]

20

30

配列番号 35 - アルブミン配列

【表 3 5 - 1】

Met	Lys	Trp	Val	Thr	Phe	Leu	Leu	Leu	Leu	Phe	Val	Ser	Gly	Ser	Ala	
1				5					10					15		
Phe	Ser	Arg	Gly	Val	Phe	Arg	Arg	Glu	Ala	His	Lys	Ser	Glu	Ile	Ala	
		20						25					30			
His	Arg	Tyr	Asn	Asp	Leu	Gly	Glu	Gln	His	Phe	Lys	Gly	Leu	Val	Leu	
		35				40						45				
Ile	Ala	Phe	Ser	Gln	Tyr	Leu	Gln	Lys	Cys	Ser	Tyr	Asp	Glu	His	Ala	
	50					55				60						
Lys	Leu	Val	Gln	Glu	Val	Thr	Asp	Phe	Ala	Lys	Thr	Cys	Val	Ala	Asp	
65				70					75					80		
Glu	Ser	Ala	Ala	Asn	Cys	Asp	Lys	Ser	Leu	His	Thr	Leu	Phe	Gly	Asp	
				85					90					95		
Lys	Leu	Cys	Ala	Ile	Pro	Asn	Leu	Arg	Glu	Asn	Tyr	Gly	Glu	Leu	Ala	
			100					105					110			
Asp	Cys	Cys	Thr	Lys	Gln	Glu	Pro	Glu	Arg	Asn	Glu	Cys	Phe	Leu	Gln	
		115				120						125				
His	Lys	Asp	Asp	Asn	Pro	Ser	Leu	Pro	Pro	Phe	Glu	Arg	Pro	Glu	Ala	
	130					135					140					
Glu	Ala	Met	Cys	Thr	Ser	Phe	Lys	Glu	Asn	Pro	Thr	Thr	Phe	Met	Gly	
145					150					155				160		
His	Tyr	Leu	His	Glu	Val	Ala	Arg	Arg	His	Pro	Tyr	Phe	Tyr	Ala	Pro	
				165					170					175		
Glu	Leu	Leu	Tyr	Tyr	Ala	Glu	Gln	Tyr	Asn	Glu	Ile	Leu	Thr	Gln	Cys	
			180					185				190				
Cys	Ala	Glu	Ala	Asp	Lys	Glu	Ser	Cys	Leu	Thr	Pro	Lys	Leu	Asp	Gly	
		195						200				205				
Val	Lys	Glu	Lys	Ala	Leu	Val	Ser	Ser	Val	Arg	Gln	Arg	Met	Lys	Cys	
	210					215					220					
Ser	Ser	Met	Gln	Lys	Phe	Gly	Glu	Arg	Ala	Phe	Lys	Ala	Trp	Ala	Val	
225					230					235				240		
Ala	Arg	Leu	Ser	Gln	Thr	Phe	Pro	Asn	Ala	Asp	Phe	Ala	Glu	Ile	Thr	
				245					250					255		
Lys	Leu	Ala	Thr	Asp	Leu	Thr	Lys	Val	Asn	Lys	Glu	Cys	Cys	His	Gly	
		260						265				270				
Asp	Leu	Leu	Glu	Cys	Ala	Asp	Asp	Arg	Ala	Glu	Leu	Ala	Lys	Tyr	Met	
		275						280				285				
Cys	Glu	Asn	Gln	Ala	Thr	Ile	Ser	Ser	Lys	Leu	Gln	Thr	Cys	Cys	Asp	
		290				295						300				
Lys	Pro	Leu	Leu	Lys	Lys	Ala	His	Cys	Leu	Ser	Glu	Val	Glu	His	Asp	
305					310					315				320		
Thr	Met	Pro	Ala	Asp	Leu	Pro	Ala	Ile	Ala	Ala	Asp	Phe	Val	Glu	Asp	
				325					330					335		
Gln	Glu	Val	Cys	Lys	Asn	Tyr	Ala	Glu	Ala	Lys	Asp	Val	Phe	Leu	Gly	
			340					345					350			
Thr	Phe	Leu	Tyr	Glu	Tyr	Ser	Arg	Arg	His	Pro	Asp	Tyr	Ser	Val	Ser	
		355					360					365				

10

20

30

40

50

配列番号 38 - シグナル配列 ENPP7**【表 38】**

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

【0508】**配列番号 39 - シグナル配列 ENPP1-2-1****【表 39】**

10

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

【0509】**配列番号 40 - exENPP3****【表 40】**

Leu Leu Val Ile Met Ser Leu Gly Leu Gly Leu Gly Leu Gly Leu Arg
 1 5 10 15
 Lys

30

【0510】**配列番号 41 - シグナル配列 ENPP5:****【表 41】**

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

【0511】**配列番号 42 - アズロシジン-ENPP1-FCヌクレオチド配列**

40

ggtagccgccacc**atg**acaaagactgacagtgtggtctgtgctggcggagctgttggtctctcttagagct**gct**cccttctgccc
ccaaagaagtgaagtcctgcaagggcagatgcttcgagcggaccttcggcaactgtagatgtgacgccgcttgctgtggaact
gggcaactgctgcctggactaccaagagacatgcatcgagccccgagcacatctggacctgcaacaagttcagatgcggcgag
aagcggtgaccagatctctgtgcgctgctctgacgactgcaaggacaagggcgactgctgcatcaactactcctctgtgt
gccaggggcagaaagtccctgggttgaagaacctgcgagtcacatcaacgagccctcagtgtcctgccggcttcgagacacctcc
tactctgctgttctccctggatggcttcagagccgagtagctgcatacttggggaggcctgctgccagtgatctccaagctg
aagaagtgcggcacctacaccaagaacatgaggcctgtgtacctaccaagacattccccaaacctactccatcgtgaccg
gcctgtatcctgagagccacggcatcatcgacaacaagatgtacgaccccaagatgaacgcctccttcagcctgaagtccaa
agagaagttcaaccccgagtgggtataagggcgagcctatctgggtcaccgctaagtaccagggactgaagctctggcaccttc
ttttggcctggctccgacgtggaaatcaacggcatcttccccgacatctataagatgtacaacggctccgtgccctttcgagg
aacgcattctggtctgtctgacgtggctgcagctgcctaaggatgagaggcctcacttctacacctgtacctggaagaacc
tgactcctccggccactcttatggccctgtgtcctctgaagtgatcaaggccctgcagcgagtggacggaatggctcggaatg
ctgatggacggcctgaaagagctgaacctgcacagatgcttgaacctgatcctgatctccgaccacggcatggaacagggga
gtgcaagaagtacatctacctgaacaagtacctggggcagctgaagaacatcaaagtgatctacggcccagccgcccagact
gaggccttctgatgtgcctgacaagtactactccttcaactacgaggggaatcgccccgaacctgtcctgcagagagcccta
cagcacttcaagccctacctgaagcactttctgcctaagcggctgcacttcgccaagctgacagaatcgagccctgacct
tctatctggacctcagtggcagctggccctgaatccttagcgagagaaaagtaactgttggtccggcttccacggctccgaca
cgtgttctctaatatgcaggccctgttcgtcggtacggccctggctttaaacacggcatcgaggccgacaccttcgagaac
atcgaggtgtacaatctgatgtgtgacctgctgaatctgacccctgctcctaacaacggcaccacggatctctgaaccatc
tgtgaagaatcccggtgtacacccctaagcaccccaagaggttcacctctgggtccagtgctcttccaccagaaatcctcg
ggacaacctgggctgctcttgaaccttctatctgcctatcgaggacttccagaccagttcaacctgacctggccgag
gaaaagatcatcaagcacgagacactgcccacggcagacctagagtgtctgcagaaagagaacaccatctgcctgctgtccc
agcaccagttcatgtccggctactcccaggacatcctgatgcctctgtggacctctacacctggaccggaacgatagctt
ctccaccgaggacttcagcaactgcctgtaccaggatttcagaatccctctgagccccgtgcacaagtgcagcttctacaag
aacaacaccaaggtgtcctacggcttctctgtctcctccacagctgaacaagaactccagcggcatctactctgaggccctgc
tgaccaccaacatctgtgcccatgtaccagtccttccaagtgatctggcggtacttccacgacacctgcttgaggaagtacgc
cgaagaaagaaacggcggtgaacgtgggtgtctggccccgtgttcgacttcgactacgacggcagatgcgactctctggaaaac
ctgcggcgagaaaagacgagtgatccggaatcaagagatcctgattcctacacacttctttatcgtgctgaccagctgcaagg
atacctctcagacccctctgcaactgcgagaatctggacacctggccttcattctgcctcagagaaccgacaactccgagtc
ctgtgtgcacggcgaagcacgactcctcttgggtcgagaactgtgatgtctgcacggggccagaatcaccgatgtggaacac
atcacggcctgagcttctaccagcagcggaaagaacctgtgtccgatatacctgaagctgaaaacctatctgccaaccttca
gccaaagaggacctgatcaacgacaagaccacacctgtcctccatgtcctgctccagaactgctcggaggccccctctgtgtt
cctgtttccacctaaagccaaaggacacactgatgatctctcggacccctgaagtgacctgcgtgggtgggtggatgtgtctcac
gaagatcccgaaagtcaagttcaattgggtacgtggacggcgtggaagtgcacaacgccaaagaccaagcctagagaggaacagt
acaactccacctacagagtgggtgtccgtgctgactgtgtctgcaccaggattggctgaacggcgaagagtacaagtgcaaagt
gtccaacaaggtctgcccgtcctatcgaaaagaccatctccaaggctaagggccagcctcggaacctcaggtttacacc
ctgcctccatctcgggaagagatgaccaagaaccaggtgtccctgacctgcctggctcaagggttctacccttccgatatcg
ccgtggaatgggagttcaatggccagcctgagaacaactacaagacaacctcctctgtgctggacagcgacggctcattctt
cctgtactctaaagtgcacgtggacaagtcccggtggcagcaaggcaatgtgttttctgctctgtgatgcacgaggccctc
cacaatactacaccagaagtccctgtctctgtccccctggcaaat**tgatagc**tcgag

配列番号 43 - アズロシジン-ENPP1-アルブミンヌクレオチド配列

【表 4 3 - 1】

atgacaagactgacagtgcctggctctgctggccgactgttgccctcttctagagctgctccttctgcgccaagaagtga
 agtctctgcaagggcagatgcttcgagcggaccttcggcaactgtagatgtgacgcgcttgctggaactgggcaactgctg
 cctggactaccaagagacatgcatcgagcccgagcacatctggacctgcaacaagttcagatgcggcgagaagcggctgacc
 agatctctgtgcgctgctctgacgactgcaaggacaaggcgactgctgcatcaactactcctctgtgtgccaggcgaga
 agtctctgggttgaagaacctgcgagtcacatcaacgagcctcagtgctcctgcggcttcgagacacctcctactctgctgtt
 ctccctggatggcttcagagccgagtacctgcatacttggggaggcctgctgccagtgatctccaagctgaagaagtgcggc
 acctacaccaagaacatgagcctgtgtacctaccaagacattccccaccactactccatcgtgaccggcctgtatcctg
 agagccacggcatcatcgacaacaagatgtacgaccccaagatgaacgcctccttcagcctgaagtccaaagagaagttaa
 ccccgagtgtgataaggcgagcctatctgggtcacgcctaagtaccagggactgaagtctggcaccctcttttggcctggc
 tccgacgtggaatcaacggcatctccccgacatctataagatgtacaacggctccgtgccttctcgaggaaacgattctgg
 ctgttctgacgtggctgcagctgcctaaggatgagaggcctcacttctacacctgtacctggaagaacctgactcctccgg
 ccactcttatggcctgtgtcctctgaagtgatcaaggccctgcagcagtggaaggatggtcggatgctgatggacggc
 ctgaaagagctgaacctgcacagatgcctgaacctgatctcctgaccacggcatggaacaggggagctgcaagaagt
 acatctacctgaacaagtacctggcgacgtgaagaacatcaagtgatctacggccagccgagactgaggccttctga
 tgtcctgacaagtaactactccttcaactacgagggaatcgcccggaacctgtcctgcagagacctaaacgacattcaag
 ccctacctgaagcactttctgcctaagcggtgcacttcgccaagcttgacagaaatcgagccctgaccttctatctggacc
 ctgagtggaagctggccctgaatccttagcgagagaaagtactgtggctccggcttcacggctccgacaacgtgttctctaa
 tatgcaggccctgttctcgctggctacggccctggctttaaacacggcatcgaggccgacaccttcgagaacatcgaggtgtac
 aatctgatgtgtgacctgctgaatctgacctgctcctaacaacggcacccacggatctctgaacctctgctgaagaatc
 ccgtgtacacccctaagcaccccaagaggttcacctctgtgtccagtgctccttaccagaaatcctcgggacaacctggg
 ctgctcttgcaaccttctatctcgtcctatcgaggacttccagaccagttcaacctgacctggccgaggaaaagatcatc
 aagcacgagacactgccctacggcagacctagagtgctgcagaaagagaacaccatctgcctgctgtcccagcaccagttca
 tgtccggtactcccaggacatcctgatgcctctgtggacctctacacctggaccggaacgatagcttctccaccgagga
 cttcagcaactgcctgtaccaggatttcagaatcctctgagcccggtgcacaagtgacgttctacaagaacaacaccaag
 gtgtcctacggcttctgtctcctccacagctgaacaagaactccagcgccatctactctgaggccctgctgaccaccaaca
 tcgtgccatgtaccagtccttccaagtgtatctggcggtacttccacgacacctgctgagggaagtacggcgaagaaagaaa
 cggtgtgaacgtgtgtctggcccggtgttcgacttcgactacgacggcagatgcgactctctggaaaacctgcggcagaaa
 agacgagtgatccggaatcaagagatcctgattcctacacacttctttatcgtgctgaccagctgcaaggatacctctcaga
 cccctctgactgcgagaatctggacacctggccttcattctgctcacaagaaccgacaactccgagtcctgtgtgcacgg
 caagcacgactcctcttgggtcgaagaactgctgatgtgcaccgggcccagaatcaccgatgtggaacacatcaccggcctg
 agcttctaccagcagcggaagaacctgtgtccgatctcctgaagctgaaaacctatcgccaaccttcagccaagaggacc
 tgatcaacatgaagtgggtgaccttctgctgctgtgttcgtgagcggcagcgccttcagcagaggcgtgttcagaagaga
 ggcccacaagagcgagatcgccacagatacaacgacctggcgagcagcacttcaaggccctgggtgctgatcgcttccagc
 cagtacctgcagaagtgcagctacgacgacgacccaagctgggtgcaggaggtgaccgacttcgccaagacctgcgtggccg
 acgagagcgccgcaactgcgacaagagcctgcacacctgttcggcgacaagctgtgcgccatccccacctgagagagaa
 ctacggcgagctggccgactgctgcaccaagcaggagcccgagagaaacgagtgttctctgcagcacaaggacgacaacccc
 agcctgcccccttcgagagacctgaggccgaggccatgtgaccagcttcaaggagaacccaccaccttcatggccact
 acctgcacgaggtggccagaagacacctacttctacgccccgagctgctgtactacgcccagcagtaaacgagatcct
 gaccagtgctgcgccgaggccgacaaggagagctgctgacccccagctggacggcgtgaaggagaaggccctgggtgagc
 agcgtgagacagagaatgaagtgcagcagcatgcagaagtccggcgagagagccttcaaggcctgggcccgtggccagactga
 gccagaccttccccaacgcgacttcgcccagatcaccaagctggccaccgacctgaccaaggtgaacaaggagtgtgccaa
 cggcgacctgctggagtgcgccgacgacagagccgagctggccaagtacatgtgcgagaaccaggccaccatcagcagcaag
 ctgcagacctgctgcgacaagccccctgtgaagaaggccactgcctgagcaggtggagcacgacacccatgcccgcgacc
 tgcgcccatcgcccgacttctgtggaggaccaggaggtgtgcaagaactacgcccaggccaaggacgtgttctgggcac
 ctctctgtacgagtacagcagaagacccccgactacagcgtgagcctgctgtgagactggccaagaagtacgagccacc
 ctggagaagtgtgcgcccaggccaacccccccgctgtacggcacctgctggccgagttccagccccgtgtggaggagc

10

20

30

40

50

【表 4 3 - 2】

ccaagaacctggtgaagaccaactgcgacctgtacgagaagctgggagctacggcttccagaacgccatcctggtgagata
 caccagaaggccccccaggtgagcaccaccacctggtggaggccgccagaaacctgggcagagtgggaccaagtgtgc
 acctgcccaggaccagagactgccctgctggaggactacctgagcgccatcctgaacagagtgtgctgtgcacgaga
 agacccccgtgagcgagcacgtgaccaagtgtgcagcgccagcctggtggagagaagacctgttcagcgccctgaccgt
 ggacgagacctacgtgcccaggagttcaaggccgagaccttaccttccacagcgacatctgcacctgcccagaaggag
 aagcagatcaagaagcagaccgcccctggccgagctggtgaagcacaagcccaaggccaccgcccagcagctgaagacctga
 tggacgacttcgcccagttcctggacacctgtgtgaaggccgccgacaaggacacctgttcagcaccgagggccccaacct
 ggtgaccagatgcaaggacgcccctggccagaagctggagccacccccagttcgagaag

10

【0 5 1 3】

配列番号 4 4 - アズロシジン - E N P P 1 ヌクレオチド配列

【表 4 4】

atgacaagactgacagtgtggtctctgctggccggactgttggcctcttctagagctgctccttctctgcgcccagaagtga
 agtcttgaaggcagatgtcttgagcgacccttcggcaactgtagatgtgacggccttgctggaaactgggcaactgtg
 cctggactaccaagagacatgcacgagcccgagcacatctggacctgcaacaagttcagatgcggcgagaagcggtgacc
 agatctctgtgcgctgtctgtacgactgcaaggacaagggcgactgtgtcatcaactactcctctgtgtgccaggcgaga
 agtcttgggttgaagaacctgtcgagttcatcaacgagcctcagtgctcctgcccgttcgagacacctcctactctgtgtt
 ctccctggatggcttcagagccgagtacctgcatacttggggaggcctgtgtccagtgtatctcaagctgaagaagtgcggc
 acctacaccaagaacatgaggcctgtgtacctaccaagacattcccccaacctactccatcgtgaccggcctgtatcctg
 agagccacggcatcatcgacaacaagatgtacgaccccaagatgaacgcctccttcagcctgaagtccaaagagaagttcaa
 ccccgagtgggtataaggcgagcctatctgggtcaccgctaagtaccaggagctgaagtctggcaccttcttttggcctggc
 tccgacgtggaaatcaacggcatcttccccgacatctataagatgtacaacggctccgtgcctttcgaggaacgcattctgg
 ctgttctgcagtggctgcagctgcctaaggatgagaggcctcacttctacacctgtacctggaagaacctgactcctccgg
 ccactcttatggccctgtgtcctctgaagtgtcaaggccctgcagcgagtggacggaatggtcggaatgtgatggacggc
 ctgaaagagctgaacctgcacagatgcctgaacctgatcctgatctccgaccacggcatggaacaggggagctgcaagaagt
 acatctacctgaacaagtacctgggcgacgtgaagaacatcaaagtgtatctacggcccagccgagactgaggccttctga
 tgtcctgacaagtaactactccttcaactacgagggaatcgcccggaacctgtcctgcagagagcctaaccagcacttcaag
 cctacctgaagcactttctgcctaagcggtgcacttcgccaagtctgacagaatcgagccctgaccttctatctggacc
 ctgagtgccagctggccctgaatcctagcgagagaaagtactgtggctccggcttccacggctccgacaacgtgttctctaa
 tatgcaggccctgttcgctcggtacggccctggctttaaacacggcatcgaggccgacaccttcgagaacatcgaggtgtac
 aatctgatgtgtgacctgtgaatctgacctgtccttaacaacggcacccacggatctctgaaccatctgtgaagaatc
 ccgtgtacacccctaagcaccccaagaggttaccctctgggtccagtgtcctttcaccagaaatctcgggacaacctggg
 ctgctcttgcaaccttctatcctgcctatcgaggactttcagacccagttcaacctgacctggccgaggaaaagatcatc
 aagcacgagacactgcctacggcgagacctagagtgtgcagaaagagaacaccatctgcctgtgtcccagcaccagttca
 tgtccggctactcccaggacatcctgatgcctctgtggacctcctacacctggaccggaacgatagcttctccaccgagga
 cttcagcaactgcctgtaccagatttcagaatccctctgagccccgtgcacaagtgcagcttctacaagaacaacaccaag
 gtgtcctacggcttctgtctcctccacagctgaacaagaactccagcggcatctactctgagggcctgtgtgaccaccaaca
 tcgtgcccctgtaccagtccttccaagtgtatctggcggtacttccacgacacctgtgtgaggaagtacgccgaagaaagaaa
 cggcgtgaacgtggtgtctggccccgtgttcgacttcgactacgacggcagatgcgactctctggaaaacctgcggcagaaa
 agacgagtgatccggaatcaagagatcctgattcctacacacttctttatcgtgtgtgaccagctgcaaggatacctctcaga
 cccctctgcactgcgagaatctggacacctggccttcattctgcctcacagaaccgacaactccgagtcctgtgtgcacgg
 caagcacgactcctcttgggtcgaagaactgtgtgtgtgcacgggcccagaaatcaccgatgtggaacacatcaccggcctg
 agcttctaccagcagcggaaagaacctgtgtccgatctcctgaagctgaaaacccatctgccaaaccttcagccaagaggac

20

30

40

【0 5 1 4】

配列番号 4 5 - アズロシジン - E N P P 3 - F C ヌクレオチド配列

50

【表 4 5】

atgaccagaactgaccgtgctggccctgctggccggcctgctggccagcagcagagccgccaagcagggcagctgcagaaaga
 agtgcttcgacgccagcttcagaggcctggagaactgcagatgcgacgtggcctgcaaggacagaggcgactgctgctggga
 cttcgaggacacctgcgtggagagcaccagaatctggatgtgcaacaagttcagatgcggcgagaccagactggaggccagc
 ctgtgcagctgcagcgaactgctgcagagaaaggactgctgcgcgactacaagagcgtgtgccaggcgagaccagct
 ggctggaggagaactgcgacaccgcccagcagagccagtggcccgagggttcgacctgccccctgctgctgttcagcat
 ggacggcttcagagccaggtacctgtacacctgggacacctgtatgcccacatcaacaagctgaagacctgcggcatccac
 agcaagtacatgagagccatgtaccccaccaagaccttccccaacctacacctcgtgaccggcctgtaccccgagagcc
 acggcatcatcgacaacaacatgtacgacgtgaacctgaacaagaacttcagcctgagcagcaaggagcagaacaacccgc
 ctggtggcagggccagcccatgaacctgaccgcatgtaccaggcctgaaggccgccacctacttctggcccgagcagag
 gtggccatcaacggcagcttccccagcatctacatgcccataacggcagcgtgcccttcgaggagagaatcagcaccctgc
 tgaagtggctggacctgcccaggccgagagaccagattctacacctgtacttcgaggagcccagcagcagcgccacgc
 cggcgcccccgtgagcgccagagtgtatcaaggccctgcaggtggtggaccacgccttcggcatgctgtatggaggcctgaag
 cagagaaacctgcacaactgcgtgaacatcatcctgctggccgaccagggcatggaccagacctactgcaacaagatggagt
 acatgaccgactacttccccagaatcaacttcttctacatgtacgaggggcccccagcaatcagagccacacaatcccc
 ccacgacttcttcagcttcaacagcgaggagatcgtgagaaacctgagctgcagaaagcccgaccagcacttcaagccctac
 ctgacccccgacctgcccagagactgcactacgccaagaactgagaatcgacaaggtgcacctgttcgtggaccagcagt
 ggctggcgtgagaagcaagagcaacaccaactgcggcgccggcgaaccacggctacaacaacagagttcagaagcatggaggc
 catcttcttggccacggccccagcttcaaggagaagaccgaggtggagcccttcgagaacatcgaggtgtacaacctgatg
 tgcgacctgctgagaatccagcccgcaccaacacggcaccacggcagcctgaaccacctgctgaaggtgcccttctacg
 agcccagccacgcccagggaggtgagcaagttcagcgtgtgcggcttcgccaacccctgcccaccgagagcctggactgctt
 ctgccccacctgcagaacagcaccagctggagcaggtgaaccagatgctgaacctgaccaggaggagatcacggccacc
 gtgaaggtgaacctgcccttcggcagaccagagtgtgcagaagaactggaccactgctgctgtaccacagagagtagc
 tgagcggcttcggaagccatgagaatgcccattgtggagcagctacaccgtgcccagctgggacacaccagccccctgcc
 cccaccgtgcccagctgctgagagccgacgtgagagtgcacccagcagagccagaagtgacgttctacctggccgac
 aagaacatcacccacggcttctgtacccccccgagcaacagaaccagcgacagccagtagcagccctgatccagca
 acctggtgcccattgtacgaggagttcagaaagatgtgggactacttccacagcgtgctgctgatcaagcacgccaccgagag
 aaacggcgtgaacgtggtgagcggccccatcttcgactacaactacgacggccacttcgacgccccgacgagatcaccaag
 cacctggccaacacgagcgtgcccataccccacactacttctggtgctgaccagctgcaagaacaagaccacacccccg
 agaactgccccggctggctggacgtgctgcccttcacatccccacagaccaccaacgtggagagctgccccgagggcaa
 gcccagggcctgtgggtggaggagagattcaccgcccacatcgccagagtgagagacgtggagctgctgaccggcctggac
 ttctaccaggacaaggtgcagcccgtagcgagatcctgcagctgaagacctacctgcccaccttcgagaccacctcgaca
 agaccacacctgccccccctgccccgccccgagctgctggcgcccccagcgtgttctgttcccccccaagcccaagga
 caccctgatgatcagcagaacccccgaggtgacctgctggtggtggacgtgagccacgaggacccccgaggtgaagttcaac
 tggtagctggacggcgtggaggtgcacaacgccaagaccaagcccagagaggagcagtagaacagcacctacagagtggtaga
 gcgtgctgacctgctgcaccagactggctgaacggcaaggagtagaagtgcaaggtgagcaacaaggccctgccccccc
 catcgagaagaccatcagcaaggccaaggccagccagagagcccgaggtgtacacctgccccccagcagagaggagatg
 accaagaaccaggtgagcctgacctgctggtgaagggttctaccccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaacggcc
 agcccagagaacaactacaagaccacccccccgtgctggacagcgacggcagcttcttctgtacagcaagctgacctgga
 caagagcagatggcagcagggaacgtgttcagctgcagcgtgatgcacgaggccctgcacaaccactacaccagaagagc
 ctgagcctgagccccggcaag

10

20

30

40

【0515】

配列番号 46 - アズロシジン - ENPP3 - アルブミンヌクレオチド配列

【表 4 6 - 1】

atgaccagactgaccgtgctggccctgctggccgctgctggccagcagcagagccgccaagcagggcagctgcagaaaga
 agtgtcttcgacgccagcttcagaggcctggagaactgcagatgcagctggcctgcaaggacagaggcagctgctgtggga
 cttcaggacacctgctggagagcaccagaatctggatgtgcaacaagttcagatgcggcgagaccagactggaggccagc
 ctgtgcagctgcagcgacactgcttcagagaaaggactgctgcggcactacaagagcgtgtgccaggcgagaccagct
 ggctggaggagaactgcgacaccgcccagcagagccagtgccccgagggttcgacctgcccccgatgacctgttcagcat
 ggacggcttcagagccgagtagctgtacacctgggacacctgatgcccacatacaagctgaagacctgcgcatccac
 agcaagtacatgagagccatgtaccccaagaccttcccccaacctacaccatcgtgaccggcctgtaccccagagacc
 accgcatcatcgacaacaacatgtacgacgtgaacctgaacaagaacttcagcctgagcagcaaggagcagaacaacccgc
 ctggtggcagcgccagccatgaacctgaccgcatgtaccaggcctgaaggccgacaccttcttggcccgagcagag
 gtggccatcaacggcagcttccccagcatctacatgcctacaacggcagcgtgccttcgaggagagaatcagacacctgc
 tgaagtggctggacctgcccaggccgagagaccagattctacacatgtacttcgaggagcccgacagcagggccacgc
 cggcgcccgctgagcgccagagtgtacaaggccctgcaggtggtagccacgccttcggcatgctgatggaggcctgaag
 cagagaaacctgcacaactgctgaacatcatctgctggccgaccacggcatggaccagacctactgcaacaagatggagt
 acatgaccgactacttccccagaatcaacttcttctacatgtacgaggccccgccccagaatcagagcccaacatccc
 ccagacttcttcagcttcaacagcgaggagatcgtgagaacctgagctgcagaaagcccgaccagcacttcaagccctac
 ctgacccccgacctgcccagagactgcactacgccaagaactgagaatcgacaaggtagcctgttcgtggaccagcagct
 ggctggccgtgagaagcaagagcaacaccaactgcggcgccggaaccacggctacaacaacgagttcagaagcatggaggc
 catcttctggccacggccccagcttcaaggagaagaccgaggtggagcccttcgagaacatcgaggtgtacaacctgatg
 tgcgacctgctgagaatccagccgcccccaacaacggcaccacggcagcctgaaccacctgctgaaggtgccttctacg
 agcccgaccacgcccaggaggtgagcaagttcagcgtgtgcggcttcgccaacccctgcccaccgagagcctggactgctt
 ctgccccacctgagaaccagcaccagctggagcaggtgaaccagatgctgaacctgaccaggaggagatcaccgccacc
 gtgaaggtgaacctgccccttcggcagacccagagtgctgcagaagaactggaccactgcctgctgtaccacagagagtag
 tgagcggttcggcaaggccatgagaatgcccattgtggagcagctacacctgcccagctggcgacaccagccccctgcc
 cccaccgtgcccagctgctgagagccgacgtgagagtgccccccagcgagagccagaagtgcagcttctacctggccgac
 aagaacatcacccacggcttctgtacccccccgagcaacagaaccagcgacagccagtagcacgcccctgatcaccagca
 acctgggtgcccattgtacaggagttcagaaagatgtgggactacttcacagcgtgctgctgatcaagcagccaccgagag
 aaacggcgtgaacgtggtgagcgccccatcttcgactacaactacgacggccacttcgacgccccgacgagatcaccaag
 cactggccaacaccgagctgcccattccccaccactacttctgtgtgctgaccagctgcaagaacaagagccacccccg
 agaactgccccggtggtgagcgtgctgcccctcatcatccccacagaccaccaacgtggagagctgccccgagggcaa
 gcccaggccctgtgggtggaggagagattcacgcccacatcgccagagtgagagacgtggagctgctgaccggcctggac
 ttctaccaggacaaggtgcagccgtgagcgagatcctgcagctgaagacctactgcccaccttcgagaccaccatcatga
 agtggtgaccttctgctgctgctgttcgtgagcgccagcgcttcagcagaggcgtgttcagaagagaggcccaagag
 cgagatcgcccacagatacaacgacctggcgagcagcacttcaaggcctggtgctgatcgcttcagccagtagctgcag
 aagtcagctacgacgagcagccaagctggtgcaggaggtgaccgacttcgccaagacctgcgtggccgacgagagcgccg
 ccaactgcgacaagagcctgcacacctgttcggcgacaagctgtgcgcatcccccaacctgagagagaactacggcgagct
 ggccgactgctgcaccaagcaggagcccgagagaaacgagtgcttctgcagcacaaggacgacaacccagcctgcccccc
 ttgagagacccgaggccgaggccatgtgcaccagcttcaaggagaacccaccaccttcatgggccaactacctgcacgagg
 tggccagaagacaccttacttctacgccccgagctgctgtactacgcccagcagtagacaacgagatcctgaccagtgctg
 cgccaggccgacaaggagagctgctgaccccccaagctggacggcgtgaaggagaaggccctggtgagcagcgtgagacag
 agaatgaagtgcagcagcatgcagaagttcggcgagagagccttcaaggcctgggcccgtggccagactgagccagaccttc
 ccaacgcgacttcgcccagatcaccaagctggccaccgacctgaccaaggtgaacaaggagtgctgccacggcgacctgct
 ggagtgcggcgacgacagagcagctggccaagtacatgtgcgagaaccaggccaccatcagcagcaagctgcagacctgc
 tgcgacaagccccctgtgaagaaggccactgctgagcaggtggagcagacaccatgcccggcagctgcccgcctcg
 ccgccaacttcgtggaggaccaggaggtgtgcaagaactacggcaggccaggagctgttctgggacaccttctgtacga
 gtacagcagaagacacccgactacagcgtgagcctgctgctgagactggccaagaagtagaggccacctggagaagtg
 tgcccgaggccaaccccccgctgtacggcaccgtgctggccgagttccagccccgtgtggaggagcccaagaacctgg

10

20

30

40

50

【表 4 6 - 2】

tgaagaccaactgcgacctgtacgagaagctgggagtagtgcgcttcagaaacgcatcctggtagatacaccagaaagc
 cccccaggtgagcaccaccacctgggtggaggccgcagaaacctgggcagagtgggcaccaagtgtgcacctgcccag
 gaccagagactgcccctgctggaggactacctgagcgccatcctgaacagagtgtgacctgctgcacgagaagacccccgtga
 gcgagcacgtgaccaagtgtgcagcgccagcctgggtggagagaagacctgcttcagcgccctgacctggacgagacctga
 cgtgcccgaaggagttcaaggccgagaccttcaccttcacagcgacatctgcacctgcccagagaaggagaagcagatcaag
 aagcagaccgcccctggccgagctgggtgaagcacaagcccaaggccaccgcccagcagctgaagacctgatggacgacttcg
 cccagttcctggacacctgctgcaaggccgcccagacaaggacacctgcttcagcaccgagggccccaacctgggtgaccagatg
 caaggacgcccctggccagaagctggagccacccccagttcgagaag

10

【0 5 1 6】

配列番号 4 7 - アズロシジン - E N P P 3 - F C ヌクレオチド配列

【表 4 7】

atgaccagactgacctgctggccctgctggccggcctgctggccagcagcagagccgccaagcagggcagctgcagaaaga
 agtgcttcgacgccagcttcagaggcctggagaactgcagatgcgacgtggcctgcaaggacagaggcgactgctgctggga
 cttcgaggacacctgctggagagcaccagaatctggatgtgcaacaagttcagatgcggcgagaccagactggaggccagc
 ctgtgcagctgcagcgacgactgacctgcagagaaaggactgctgcgccgactacaagagcgtgtgccaggcgagaccagct
 ggctggaggagaactgcgacaccgcccagcagagccagtgccccgagggtcttcgacctgccccctgctgcttcagcat
 ggacggcttcagagccgagtacctgtacacctgggacacctgatgcccacatcaacaagctgaagacctgcggcatccac
 agcaagtacatgagagccatgtacccccaccaagaccttccccaaacctacaccatcgtagccggcctgtacccccgagagcc
 acggcatcatcgacaacaacatgtacgacgtgaacctgaacaagaacttcagcctgagcagcaaggagcagaacaacccgc
 ctggtggcacggccagcccagctgaacctgaccgccatgtaccaggccctgaaggccgccacctacttctggccggcagcgag
 gtggccatcaacggcagcttccccagcatctacatgcccataacggcagcgtgcccttcgaggagagaatcagcacctgc
 tgaagtggctggacctgcccgaaggccgagagaccagattctacacctgtacttcgaggagcccgacagcagcgccacgc
 cggcgcccccgtgagcgccagagtgtcaaggccctgcaggtgggtggaccacgccttcggcatgctgatggaggccctgaag
 cagagaaacctgcacaactgctgaacatcactctgctggccgaccacggcatggaccagacctactgcaacaagatggagt
 acatgaccgactacttccccagaatcaacttcttctacatgtacgaggggcccccgccccagaatcagagcccacaacatccc
 ccacgacttcttcagcttcaacagcgaggagatcgtagaaaacctgagctgcagaaagcccgaccagcacttcaagccctac
 ctgacccccgacctgcccgaagagactgcactacgccaagaactgagaatcgacaaggtgcacctgttcgtggaccagcagt
 ggctggccgtgagaagcaagagcaacaccaactgcggcgccggaaccacggctacaacaacgagttcagaagcatggaggc
 catcttcttgccccacggccccagcttcaaggagaagaccgaggtggagcccttcgagaacatcgaggtgtacaacctgatg
 tgcacctgctgagaatccagcccccccccaaacggcacccacggcagcctgaaccacctgctgaaggtgccttctacg
 agcccagccacgcccagggaggtgagcaagttcagcgtgtgcggcttcgccaacccctgcccaccgagagcctggactgctt
 ctgccccacctgcagaacagcaccagctggagcaggtgaaccagatgctgaacctgaccagggagagatcaccgccacc
 gtgaaggtgaacctgccccttcggcagaccagagtgctgcagaagaactggaccactgcctgctgtaccacagagagtacg
 tgagcggttcggcaaggccatgagaatgccatgtggagcagctacacctgccccagctgggcgacaccagccccctgcc
 cccacacctgcccagctgcctgagagccgacgtgagagtgccccccagcgagagccagaagtgcagcttctacctggccgac
 aagaacatcaccacggcttctgtacccccccgcccagcaacagaaccagcgacagccagctacgacgcccctgatcaccagca
 acctggtgcccagctgacgaggagttcagaaagatgtgggactacttcacagcgtgctgctgatcaagcacgccaccgagag
 aaacggcgtgaacgtggtagcgggcccatcttcgactacaactacgacggccacttcgacgccccgacgagatcaccaag
 cacctggccaacaccgacgtgcccataccccccccactacttcgtgggtgctgaccagctgcaagaacaagagccacacccccg
 agaactgccccggctggctggacgtgctgcccctcatcatccccacagaccaccaacgtggagagctgccccgagggcaa
 gcccagggccctgtgggtggaggagagattcaccgcccacatcgccagagtgagagacgtggagctgctgaccggcctggac
 ttctaccaggacaaggtgcagccctgagcgagatcctgcagctgaagacctacctgcccaccttcgagaccaccatc

20

30

40

【0 5 1 7】

配列番号 4 8 - E N P P 7 - 1 - F c ヌクレオチド配列

50

【表 48-1】

atgagaggac	ctgcccgtcct	gctgaccgtc	gccctggcta	ccttgctggc	ccctggtgct	60	
ggtgcaccca	gctgcgccaa	agaagtgaag	tcctgcaagg	gccggtgctt	cgagcggacc	120	
ttcggcaact	gcagatgcga	cgccgcctgt	gtggaactgg	gcaactgctg	cctggactac	180	
caggaaacct	gcacgcagcc	cgagcacatc	tggacctgca	acaagttcag	atgcggcgag	240	
aagcggctga	ccagatccct	gtgtgcctgc	agcgacgact	gcaaggacaa	ggcgactgc	300	
tgcataact	acagcagcgt	gtgccagggc	gagaagtcct	gggtggaaga	accctgcgag	360	
agcatcaacg	agccccagtg	ccctgccggc	ttcgagacac	ctctaccct	gctgttcagc	420	
ctggacggct	ttcgggcccga	gtacctgcac	acatggggag	gcctgctgcc	cgtgatcagc	480	
aagctgaaga	agtgcggcac	ctacaccaag	aacatgcggc	ccgtgtacc	caccaagacc	540	
ttccccaacc	actactccat	cgtgaccggc	ctgtacccc	agagccacgg	catcatcgac	600	
aacaagatgt	acgaccccaa	gatgaacgcc	agcttcagcc	tgaagtccaa	agagaagttc	660	10
aaccccagtg	ggtataagg	cgagcccatc	tgggtcaccc	ccaagtacca	ggcctgaaa	720	
agcggcacat	tcttttgcc	cggcagcgac	gtggaaatca	acggcatctt	ccccgacatc	780	
tataagatgt	acaacggcag	cgtgcccttc	gaggaacgga	tcctggctgt	gctgcagtgg	840	
ctgcagctgc	ccaaggatga	gcggccccac	ttctacaccc	tgtacctgga	agaacctgac	900	
agcagcggcc	acagctacgg	ccctgtgtcc	agcgaagtga	tcaaggccct	gcagcgggtg	960	
gacggcatgg	tgggaatgct	gatggacggc	ctgaaagagc	tgaacctgca	cagatgcctg	1020	
aacctgatcc	tgatcagcga	ccacggcatg	gaacagggat	cctgcaagaa	gtacatctac	1080	
ctgaacaagt	acctgggcca	cgtgaagaac	atcaaagtga	tctacggccc	agccgccaga	1140	
ctgaggccta	gcgacgtgcc	cgacaagtac	tacagcttca	actacgaggg	aatcgcccgg	1200	
aacctgagct	gcagagagcc	caaccagcac	ttcaagccct	acctgaagca	cttctgccc	1260	
aagcggctgc	acttcgccaa	gagcgacaga	atcgagcccc	tgaccttcta	cctggacccc	1320	20
cagtggcagc	tggccctgaa	tcccagcgag	agaaaagtact	gcggcagcgg	cttcacggc	1380	
tccgacaacg	tgctcagcaa	catgcaggcc	ctgttcgtgg	gctacggacc	cggctttaag	1440	
cacggcatcg	aggccgacac	cttcgagaac	atcgagggtg	acaatctgat	gtgcgacctg	1500	
ctgaatctga	cccctgcccc	caacaatggc	acccacggca	gcctgaacca	tctgctgaag	1560	
aaccccggtg	acacccctaa	gcaccccaaa	gaggtgcacc	ccctggtgca	gtgccccttc	1620	
accagaaacc	ccagagacaa	cctgggctgt	agctgcaacc	ccagcatcct	gcccacgag	1680	
gacttccaga	ccagttcaa	cctgaccgtg	gccgaggaaa	agatcatcaa	gcacgagaca	1740	
ctgccctacg	gcagaccccg	ggtgctgcag	aaagagaaca	ccatctgcct	gctgagccag	1800	
caccagtcca	tgagcggcta	ctcccaggac	atcctgatgc	ccctgtggac	cagctacacc	1860	
gtggaccgga	acgacagctt	ctccaccgag	gatttcagca	actgcctgta	ccaggatttc	1920	
cggatccccc	tgagcccggt	gcacaagtgc	agcttctaca	agaacaacac	caaggtgtcc	1980	
tacggcttcc	tgagccctcc	ccagctgaac	aagaacagct	ccggcatcta	cagcgaggcc	2040	30
ctgctgacta	ccaacatcgt	gcccattgtac	cagagcttcc	aagtgatctg	gcggtacttc	2100	
cacgacaccc	tgtgcgggaa	gtacgccgaa	gaacggaaacg	gcgtgaacgt	ggtgtccggc	2160	
ccagtgttcg	acttcgacta	cgacggcaga	tgtgacagcc	tggaaaatct	gcggcagaaa	2220	
agaagagtga	tcgggaacca	ggaaaattctg	atccctaccc	acttctttat	cgtgctgaca	2280	
agctgcaagg	ataccagcca	gacccccctg	cactgcgaga	acctggatac	cctggccttc	2340	
atcctgcctc	accggaccga	caacagcgag	agctgtgtgc	acggcaagca	cgacagctct	2400	
tgggtggaag	aactgctgat	gctgcaccgg	gccagaatca	ccgatgtgga	acacatcacc	2460	
ggcctgagct	tttaccagca	gcggaaaagaa	cccgtgtccg	atatactgaa	gctgaaaacc	2520	
catctgcccc	ccttcagcca	ggaagatgac	aagaccacaa	cttgcccccc	ctgcccagct	2580	
cctgaactgc	tgggaggacc	ctctgtgttc	ctgttcccc	caaagcccaa	ggacacccctg	2640	
atgatctcta	ggacccccga	agtcacttgc	gtcgtcgtcg	acgtgtccca	cgaggaccct	2700	
gaagtcaagt	tcaactggta	cgtcgacggg	gtcgaagtcc	acaacgccaa	gaccaagccc	2760	40

【表 4 8 - 2】

agggaagaac agtacaactc tacctaccgc gtcgtcagcg tcctgaccgt cctgcaccag	2820
gactggctga acggaaagga atacaagtgc aaggtgtcca acaaggccct gcctgcccc	2880
atcgaaaaga ccatctctaa ggccaaggga cagccccgcg aaccccaggt ctacaccctg	2940
ccaccctcta gggaagaaat gaccaagaac caggtgtccc tgacctgcct ggteaaggga	3000
ttctaccct ctgacatgc cgtcgaatgg gaatctaacg gacagcccga aaacaactac	3060
aagaccaccc cccctgtcct ggactctgac ggatcattct tcctgtactc taagctgact	3120
gtcgacaagt ctaggtggca gcagggaaac gtgttctctt gctctgtcat gcacgaagcc	3180
ctgcacaacc actacacca gaagtctctg tctctgtccc ccggaag	3228

10

【0 5 1 8】

配列番号 4 9 - E N P P 7 - N P P 1 アルブミンヌクレオチド配列：

20

30

40

50

【表 4 9 - 1】

atgagaggac	ctgcccgtcct	gctgaccgtc	gccctggcta	ccttgctggc	ccctggtgct	60	
ggtgcaccca	gctgcgccaa	agaagtgaag	tccctgaagg	gccggtgctt	cgagcggacc	120	
ttcggcaact	gcagatgcga	cgccgcctgt	gtggaactgg	gcaactgctg	cctggactac	180	
caggaaacct	gcacgcagcc	cgagcacatc	tggacctgca	acaagttcag	atgcggcgag	240	
aagcggctga	ccagatccct	gtgtgcctgc	agcgacgact	gcaaggacaa	ggcgcgactgc	300	
tgcatacaact	acagcagcgt	gtgccagggc	gagaagtcct	gggtggaaga	accctgcgag	360	
agcatcaacg	agccccagtg	ccctgcccgc	ttcgagacac	ctctaccct	gctgttcagc	420	
ctggacggct	ttcgggcccga	gtacctgcac	acatggggag	gcctgctgcc	cgtgatcagc	480	
aagctgaaga	agtgcggcac	ctacaccaag	aacatgcggc	ccgtgtaccc	caccaagacc	540	
ttccccaaac	actactecat	cgtgaccggc	ctgtaccccg	agagccacgg	catcatcgac	600	
aacaagatgt	acgaccccaa	gatgaacgcc	agcttcagcc	tgaagtccaa	agagaagttc	660	
aaccccagtg	ggtataaggg	cgagcccata	tgggtcaccc	ccaagtaacca	gggcctgaaa	720	
agcggcacat	tcttttggcc	cggcagcgac	gtggaaatca	acggcatctt	ccccgacata	780	
tataagatgt	acaacggcag	cgtgcccttc	gaggaacgga	tccctggctgt	gctgcagtgg	840	
ctgcagctgc	ccaaggatga	gcggccccac	ttctacaccc	tgtacctgga	agaacctgac	900	
agcagcggcc	acagctacgg	ccctgtgtcc	agcgaagtga	tcaaggccct	gcagcgggtg	960	
gacggcatgg	tgggaatgct	gatggacggc	ctgaaagagc	tgaacctgca	cagatgcctg	1020	
aacctgatcc	tgatcagcga	ccacggcatg	gaacagggat	cctgcaagaa	gtacatctac	1080	
ctgaacaagt	acctgggcca	cgtgaagaac	atcaaagtga	tctacggccc	agccgccaga	1140	
ctgaggccta	gcgacgtgcc	cgacaagtac	tacagcttca	actacgaggg	aatcgcccgg	1200	
aacctgagct	gcagagagcc	caaccagcac	ttcaagccct	acctgaagca	cttctgccc	1260	
aagcggctgc	acttcgccaa	gagcgacaga	atcgagcccc	tgaccttcta	cctggacccc	1320	
cagtggcagc	tggccctgaa	tcccagcgag	agaaaagtact	gcggcagcgg	cttccacggc	1380	
tccgacaacg	tgctcagcaa	catgcaggcc	ctgttcgtgg	gctacggacc	cggctttaag	1440	
cacggcatcg	aggccgacac	cttcgagaa	atcgaggtgt	acaatctgat	gtgcgacctg	1500	
ctgaatctga	ccctgcccc	caacaatggc	acccacggca	gcctgaacca	tctgctgaag	1560	
aaccccgtgt	acacccctaa	gcaccccaaa	gaggtgcacc	ccctggtgca	gtgccccttc	1620	
accagaaacc	ccagagacaa	cctgggctgt	agctgcaacc	ccagcatcct	gcccacgag	1680	
gacttccaga	ccagttcaa	cctgaccgtg	gccgaggaaa	agatcatcaa	gcacgagaca	1740	
ctgccctacg	gcagaccccg	ggtgctgcag	aaagagaaca	ccatctgcct	gctgagccag	1800	
caccagttca	tgagcggcta	ctcccaggac	atcctgatgc	ccctgtggac	cagctacacc	1860	
gtggaccgga	acgacagctt	ctccaccgag	gatttcagca	actgcctgta	ccaggatttc	1920	
cggatccccc	tgagccccgt	gcacaagtgc	agcttctaca	agaacaacac	caaggtgtcc	1980	
tacggcttcc	tgagccctcc	ccagctgaac	aagaacagct	ccggcateta	cagcgagccc	2040	
ctgctgacta	ccaacatcgt	gcccattgtac	cagagcttcc	aagtgatctg	gcggtaacttc	2100	
cacgacaccc	tgctgeggaa	gtacgccgaa	gaacggaaac	gcgtgaacgt	ggtgtccggc	2160	
ccagtgttcg	acttcgacta	cgacggcaga	tgtgacagcc	tggaaaatct	gcggcagaaa	2220	
agaagagtga	tccggaacca	ggaaattctg	atccctaccc	acttctttat	cgtgctgaca	2280	
agctgcaagg	ataccagcca	gaccccccctg	cactgcgaga	acctggatac	cctggccttc	2340	
atcctgcctc	accggaccga	caacagcgag	agctgtgtgc	acggcaagca	cgacagctct	2400	
tgggtggaag	aactgctgat	gctgcaccgg	gccagaatca	ccgatgtgga	acacatcacc	2460	
ggcctgagct	tttaccagca	gcggaaaagaa	cccgtgtccg	atatactgaa	gctgaaaacc	2520	
catctgcccc	ccttcagcca	ggaagatggt	ggaggaggct	ctggtggagg	cggtagcgga	2580	
ggcggagggt	cgggagggttc	tggatcaatg	aagtgggtaa	cctttatttc	ccttcttttt	2640	
ctcttttagct	cggcttattc	caggggtgtg	tttcgtcgag	atgcacacaa	gagtgaggtt	2700	
gctcatcggt	ttaaagattt	gggagaagaa	aatttcaaag	ccttggtgtt	gattgccttt	2760	

10

20

30

40

【表 4 9 - 2】

gctcagtatc	ttcagcagtg	tccatttgaa	gatcatgtaa	aattagtgaa	tgaagtaact	2820
gaattttgaa	aaacatgtgt	tgctgatgag	tcagctgaaa	attgtgacaa	atcacttcat	2880
accctttttg	gagacaaatt	atgcacagtt	gcaactcttc	gtgaaaccta	tggtgaaatg	2940
gctgactgct	gtgcaaaaca	agaacctgag	agaaatgaat	gcttcttgca	acacaaagat	3000
gacaacccaa	acctcccccg	attggtgaga	ccagagggtg	atgtgatgtg	cactgctttt	3060
catgacaatg	aagagacatt	tttgaaaaaa	tacttatatg	aaattgccag	aagacatcct	3120
tacttttatg	ccccggaact	ccttttcttt	gctaaaaggt	ataaagctgc	ttttacagaa	3180
tgttgccaag	ctgctgataa	agctgcctgc	ctgttgccaa	agctcgatga	acttcgggat	3240
gaagggaagg	cttcgtctgc	caaacagaga	ctcaagtgtg	ccagtctcca	aaaatttgga	3300
gaaaagagctt	tcaaagcatg	ggcagtagct	cgctgagcc	agagatttcc	caaagctgag	3360
tttgcagaag	tttccaagtt	agtacagat	cttaccaaag	tccacacgga	atgctgccat	3420
ggagatctgc	ttgaatgtgc	tgatgacagg	gcggaccttg	ccaagtatat	ctgtgaaaat	3480
caagattcga	tctccagtaa	actgaaggaa	tgctgtgaaa	aacctctgtt	ggaaaaatcc	3540
cactgcattg	ccgaagtgga	aaatgatgag	atgcctgctg	acttgccctc	attagctgct	3600
gattttgttg	aaagtaagga	tgtttgcaaa	aactatgctg	aggcaaagga	tgtcttctctg	3660
ggcatgtttt	tgtatgaata	tgcaagaagg	catcctgatt	actctgtcgt	gctgctgctg	3720
agacttgcca	agacatatga	aaccactcta	gagaagtgtc	gtgccgtgc	agatcctcat	3780
gaatgctatg	ccaaagtgtt	cgatgaattt	aaacctcttg	tggaagagcc	tcagaattta	3840
atcaaacaaa	attgtgagct	ttttgagcag	cttgagaggt	acaaattcca	gaatgcgcta	3900
ttagttcggt	acaccaagaa	agtaccccaa	gtgtcaactc	caactcttgt	agaggtctca	3960
agaaacctag	gaaaagtggg	cagcaaatgt	tgtaaacatc	ctgaagcaaa	aagaatgccc	4020
tgtgcagaag	actatctatc	cgtggtcctg	aaccagttat	gtgtgttgca	tgagaaaacg	4080
ccagtaagtg	acagagtcac	caaatgctgc	acagaatcct	tggtgaacag	gcgacctgc	4140
ttttcagctc	tggaagtgcg	tgaaacatac	gttcccaaag	agtttaatgc	tgaaacattc	4200
accttccatg	cagatatatg	cacactttct	gagaaggaga	gacaaatcaa	gaaacaaact	4260
gcacttggtg	agctcgtgaa	acacaagccc	aaggcaacaa	aagagcaact	gaaagctggt	4320
atggatgatt	tcgcagcttt	tgtagagaag	tgctgcaagg	ctgacgataa	ggagacctgc	4380
tttgccgagg	agggtaaaaa	acttggtgct	gcaagtcaag	ctgccttagg	ctta	4434

10

20

30

【0 5 1 9】

配列番号 5 0 - N P P 1 2 1 - N P P 3 - F c のヌクレオチド配列

40

50

【表 50 - 1】

atggaaaggg	acggatgcgc	cgggtggtgga	tctcgcggag	gcgaaggtgg	aagggccct	60	
aggggaaggac	ctgccgga	cggaaggac	aggggacgct	ctcacgccgc	tgaagtc	120	
ggcgaccctc	aggccgctgc	ctctctgctg	gctcctatgg	acgtcggaga	agaaccctg	180	
gaaaaggccg	ccagggccag	gactgccaag	gacccaaca	cctacaagat	catctccctc	240	
ttcactttcg	ccgtcggagt	caacatctgc	ctgggattca	ccgccgaaaa	gcaaggcagc	300	
tgcaggaaga	agtgtttga	tgcacatctt	agaggactgg	agaactgccg	gtgtgatgtg	360	
gcatgtaaag	accgaggtga	ttgtctgtgg	gattttgaag	acacctgtgt	ggaatcaact	420	
cgaatatgga	tgtgcaataa	atttcgttgt	ggagagacca	gatttagaggc	cagcctttgc	480	
tcttgttcag	atgactgttt	gcagaggaaa	gattgtctgtg	ctgactataa	gagtgtttgc	540	
caaggagaaa	cctcatggct	ggaagaaaac	tgtgacacag	cccagcagtc	tcagtgc	600	10
gaagggtttg	acctgccacc	agttatcttg	ttttctatgg	atggatttag	agctgaatat	660	
ttatacacat	gggatacttt	aatgccaaat	atcaataaac	tgaaaacatg	tggaattcat	720	
tcaaaataca	tgagagctat	gtatcctacc	aaaaccttcc	caaatcatta	caccattgtc	780	
acgggcttgt	atccagagtc	acatggcatc	attgacaata	atatgtatga	tgtaaatctc	840	
aacaagaatt	tttcactttc	ttcaaaggaa	caaaataaat	cagcctgggtg	gcatgggcaa	900	
ccaatgtggc	tgacagcaat	gtatcaaggt	ttaaaagccg	ctacctactt	ttggcccggg	960	
tcagaagtgg	ctataaatgg	ctcctttcct	tccatataca	tgctttacaa	cggaaagtgc	1020	
ccatttgaag	agaggatttc	tacactgtta	aatggctgg	acctgcccc	agctgaaaga	1080	
cccaggtttt	ataccatgta	ttttgaagaa	cctgattcct	ctggacatgc	aggtggacca	1140	
gtcagtgc	gagtaattaa	agccttacag	gtagtagatc	atgcttttgg	gatgttgatg	1200	
gaaggcctga	agcagcggaa	tttgacacac	tgtgtcaata	tcaccttct	ggctgaccat	1260	
ggaatggacc	agacttattg	taacaagatg	gaatacatga	ctgattattt	tccagaata	1320	20
aacttcttct	acatgtacga	agggcctgcc	ccccgcaccc	gagctcataa	tatacctcat	1380	
gactttttta	gttttaattc	tgaggaaatt	gttagaaacc	tcagttgccg	aaaacctgat	1440	
cagcatttca	agcctatttt	gactcctgat	ttgccaaagc	gactgcacta	tgccaagaac	1500	
gtcagaatcg	acaaagtcca	tctctttgtg	gatcaacagt	ggctggctgt	taggagtaaa	1560	
tcaaatacaa	attgtggagg	aggcaaccat	ggttataaca	atgagtttag	gagcatggag	1620	
gctatctttc	tgccacatgg	accagtttt	aaagagaaga	ctgaagtga	accatttgaa	1680	
aatattgaag	tctataacct	aatgtgtgat	cttctacgca	ttcaaccagc	accaaacaat	1740	
ggaacccatg	gtagtttaaa	ccatcttctg	aaggtgcctt	tttatgagcc	atcccatgca	1800	
gaggaggtgt	caaagttttc	tgtttgtggc	tttgctaate	cattgcccac	agagtctctt	1860	
gactgtttct	gccctcacct	acaaaatagt	actcagctgg	aacaagtga	tcagatgcta	1920	
aatctcacc	aagaagaaat	aacagcaaca	gtgaaagtaa	atttgccatt	tgggagccct	1980	
agggtactgc	agaagaacgt	ggaccactgt	ctcctttacc	acagggaata	tgtcagtgga	2040	30
tttggaag	ctatgaggat	gcccatgtgg	agttcataca	cagtccccca	gttgggagac	2100	
acatgcctc	tgccctccac	tgtccagac	tgtctcggg	ctgatgtcag	ggttctctct	2160	
tctgagagcc	aaaaatgttc	cttctattta	gcagacaaga	atatcaccca	cggcttctct	2220	
tatctctctg	ccagcaatag	aacatcagat	agccaatatg	atgctttaat	tactagcaat	2280	
ttggtacct	tgtatgaaga	attcagaaaa	atgtgggact	acttccacag	tgttcttctt	2340	
ataaaacatg	ccacagaaag	aatggagta	aatgtggta	gtggaccaat	atttgattat	2400	
aattatgatg	gccattttga	tgtccagat	gaaattacca	aacatttagc	caacactgat	2460	
gttcccatcc	caacacacta	ctttgtgggtg	ctgaccagtt	gtaaaaacaa	gagccacaca	2520	
ccggaaaact	gccctgggtg	gctggatgtc	ctacctttta	tcacccctca	ccgacctacc	2580	
aacgtggaga	gctgtcctga	aggtaaacca	gaagctcttt	gggttgaaga	aagatttaca	2640	
gctcacattg	cccggtccg	tgatgtagaa	cttctcactg	ggcttgactt	ctatcaggat	2700	
aaagtgcagc	ctgtctctga	aattttgcaa	ctaaagacat	atttaccac	atttgaaacc	2760	40

【表 5 0 - 2】

actattgaca aaactcacac atgcccaccg tgcccagcac ctgaactcct ggggggaccg	2820
tcagtcttcc tcttccccc aaaacccaag gacacctca tgatctccc gaccttgag	2880
gtcacatgcg tgggtggtgga cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac	2940
gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc	3000
acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag	3060
tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc ccagcccca tcgagaaaac catctccaaa	3120
gccaaagggc agccccgaga accacaggtg tacacctgc ccccatcccg ggaggagatg	3180
accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc	3240
gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgc tcccgctctg	3300
gactccgacg gctccttctt cctctatagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag	3360
caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag	3420
aagagcctct ccctgtcccc gggtaaa	3447

10

【0 5 2 0】

配列番号 5 1 - N P P 1 2 1 - N P P 3 - F c のヌクレオチド配列

20

30

40

50

【表 5 1 - 1】

atggaaaggg	acggatgcgc	cgggtggtgga	tctcgcggag	gcgaaggtgg	aagggccccct	60	
agggaaaggac	ctgccggaaa	cggaagggac	aggggacgct	ctcacgccgc	tgaagctcca	120	
ggcgaaccctc	aggccgctgc	ctctctgctg	gctcctatgg	acgtcggaga	agaacccctg	180	
gaaaaggccg	ccagggccag	gactgccaag	gaccccaaca	cctacaagat	catctccctc	240	
ttcactttcg	ccgtcggagt	caacatctgc	ctgggattca	ccgccgaaaa	gcaaggcagc	300	
tgcaggaaga	agtgttttga	tgcacatctt	agaggactgg	agaactgccg	gtgtgatgtg	360	
gcatgtaaag	accgaggtga	ttgctgctgg	gattttgaag	acacctgtgt	ggaatcaact	420	
cgaatatgga	tgtgcaataa	atttcgttgt	ggagagacca	gatttagaggc	cagcctttgc	480	
tcttgttcag	atgactgttt	gcagaggaaa	gattgctgtg	ctgactataa	gagtgtttgc	540	
caaggagaaa	cctcatggct	ggaagaaaac	tgtgacacag	cccagcagtc	tcagtgccca	600	
gaagggtttg	acctgccacc	agttatcttg	ttttctatgg	atggatttag	agctgaatat	660	10
ttatacacat	gggatacttt	aatgccaaat	atcaataaac	tgaaaacatg	tggaattcat	720	
tcaaaataca	tgagagctat	gtatcctacc	aaaaccttcc	caaatcatta	caccattgtc	780	
acgggcttgt	atccagagtc	acatggcatc	attgacaata	atatgtatga	tgtaaatctc	840	
aacaagaatt	tttcaacttc	ttcaaaggaa	caaaataaat	cagcctgggtg	gcatgggcaa	900	
ccaatgtggc	tgacagcaat	gtatcaaggt	ttaaaagccg	ctacctactt	ttggcccggg	960	
tcagaagtgg	ctataaatgg	ctcctttcct	tccatataca	tgccttacia	cggaagtgtc	1020	
ccatttgaag	agaggatttc	tacactgtta	aatggcttgg	acctgcccac	agctgaaaga	1080	
cccagggtttt	ataccatgta	ttttgaagaa	cctgattcct	ctggacatgc	aggtggacca	1140	
gtcagtgccca	gagtaattaa	agccttacag	gtagtagatc	atgcttttgg	gatgtttgatg	1200	
gaaggcctga	agcagcggaa	tttgacacac	tgtgtcaata	tcacccctct	ggctgaccat	1260	
ggaatggacc	agacttattg	taacaagatg	gaatacatga	ctgattattt	tcccagaata	1320	20
aacttcttct	acatgtacga	agggcctgcc	ccccgcaccc	gagctcataa	tatacctcat	1380	
gactttttta	gttttaattc	tgaggaaatt	gttagaaacc	tcagttgccg	aaaacctgat	1440	
cagcatttca	agcctatttt	gactcctgat	ttgccaaagc	gactgcacta	tgccaagaac	1500	
gtcagaatcg	acaaagtcca	tctctttgtg	gatcaacagt	ggctggctgt	taggagtaaa	1560	
tcaaatacaa	attgtggagg	aggcaaccat	ggttataaca	atgagtttag	gagcatggag	1620	
gctatctttc	tggcacatgg	accagttttt	aaagagaaga	ctgaagttga	accatttgaa	1680	
aatatgtgaag	tctataacct	aatgtgtgat	cttctacgca	ttcaaccagc	accaaacaat	1740	
ggaacccatg	gtagttttaa	ccatcttctg	aaggtgcctt	tttatgagcc	atcccatgca	1800	
gaggaggtgt	caaagttttc	tgtttgtggc	tttgctaate	cattgcccac	agagtctctt	1860	
gactgtttct	gccctcacct	acaaaatagt	actcagctgg	aacaagtga	tcagatgcta	1920	
aatctcacc	aagaagaaat	aacagcaaca	gtgaaagtaa	atttgccatt	tgggaggcct	1980	
agggtactgc	agaagaacgt	ggaccactgt	ctcctttacc	acagggaata	tgtcagtgga	2040	30
tttggaanaa	ctatgaggat	gcccatgttg	agttcataca	cagtcccca	gttgggagac	2100	
acatgcctc	tgcctcccac	tgtcccagac	tgtctcgggg	ctgatgtcag	ggttctctct	2160	
tctgagagcc	aaaaatgttc	cttctattta	gcagacaaga	atatcaccca	cgcttctctc	2220	
tatctctctg	ccagcaatag	aacatcagat	agccaatatg	atgctttaat	tactagcaat	2280	
ttggtacct	tgtatgaaga	attcagaaaa	atgtgggact	acttccacag	tgttctctct	2340	
ataaaacatg	ccacagaaag	aatggagta	aatgtggta	gtggaccaat	atttgattat	2400	
aattatgatg	gccattttga	tgtccagat	gaaattacca	aacatttagc	caacactgat	2460	
gttcccatcc	caacacacta	ctttgtgggtg	ctgaccagtt	gtaaaaacaa	gagccacaca	2520	
ccggaaaact	gccctgggtg	gctggatgtc	ctacccttta	tcacccctca	ccgacctacc	2580	
aacgtggaga	gtgtcctga	aggtaaacca	gaagctcttt	gggttgaaga	aagatttaca	2640	
gctcacattg	cccggtccg	tgatgtagaa	cttctcactg	ggcttgactt	ctatcaggat	2700	
aaagtgcagc	ctgtctctga	aattttgcaa	ctaaagacat	atttaccac	atttgaaacc	2760	40

【表 5 1 - 2】

actattggtg	gaggaggctc	tggtggaggc	ggtagcggag	gcggagggtc	gatgaagtgg	2820	
gtaaaccttta	tttcccttct	ttttctcttt	agctcggctt	attccagggg	tgtgtttcgt	2880	
cgagatgcac	acaagagtga	ggttgctcat	cggtttaaag	atttgggaga	agaaaatttc	2940	
aaagccttgg	tgttgattgc	ctttgctcag	tatcttcagc	agtgtccatt	tgaagatcat	3000	
gtaaaattag	tgaatgaagt	aactgaatth	gcaaaaacat	gtgttgctga	tgagtcagct	3060	
gaaaattgtg	acaaatcact	tcataccctt	tttgagagac	aattatgcac	agttgcaact	3120	
cttcgtgaaa	cctatgggtg	aatggctgac	tgctgtgcaa	aacaagaacc	tgagagaaat	3180	
gaatgcttct	tgcaacacaa	agatgacaac	ccaaacctcc	cccgattggt	gagaccagag	3240	
gttgatgtga	tgtgactgc	ttttcatgac	aatgaagaga	cattttttgaa	aaaataactta	3300	10
tatgaaattg	ccagaagaca	tccttacttt	tatgccccgg	aactcctttt	ctttgctaaa	3360	
aggtataaag	ctgcttttac	agaatgttgc	caagctgctg	ataaagctgc	ctgcctgttg	3420	
ccaaagctcg	atgaacttcg	ggatgaaggg	aaggcttcgt	ctgccaaaca	gagactcaag	3480	
tgtgccagtc	tccaaaaatt	tggagaaaga	gctttcaaag	catgggcagt	agctcgcctg	3540	
agccagagat	ttcccaaagc	tgagtttgca	gaagtttcca	agttagtgc	agatcttacc	3600	
aaagtcacac	cggatgctg	ccatggagat	ctgcttgaat	gtgctgatga	cagggcggac	3660	
cttgccaagt	atatctgtga	aaatcaagat	tcgatctcca	gtaaaactgaa	ggaatgctgt	3720	
gaaaaacctc	tgttgaaaaa	atcccactgc	attgccgaag	tggaatga	tgagatgcct	3780	
gtgacttgc	cttcattagc	tgctgatttt	gttgaaagta	aggatgtttg	caaaaactat	3840	
gtgaggcaa	aggatgtctt	cctgggcatg	tttttgatg	aatatgcaag	aaggcatcct	3900	20
gattactctg	tcgtgctgct	gctgagactt	gccaaagacat	atgaaaccac	tctagagaag	3960	
tgctgtgccg	ctgcagatcc	tcatgaatgc	tatgccaaag	tgttcgatga	atttaaacct	4020	
cttgtggaag	agcctcagaa	tttaatcaaa	caaaattgtg	agctttttga	gcagcttgga	4080	
gagtacaaat	tccagaatgc	gctattagtt	cgttacacca	agaaagtacc	ccaagtgtca	4140	
actccaactc	ttgtagaggt	ctcaagaaac	ctaggaaaag	tgggcagcaa	atgttgtaaa	4200	
catcctgaag	caaaaagaat	gccctgtgca	gaagactatc	tatccgtggt	cctgaaccag	4260	
ttatgtgtgt	tgcatgagaa	aacgccagta	agtgcagag	tcaccaaagt	ctgcacagaa	4320	
tccttggtga	acaggcgacc	atgcttttca	gctctggaag	tcgatgaaac	atacgttccc	4380	
aaagagttaa	atgctgaaac	attcaccttc	catgcagata	tatgcacact	ttctgagaag	4440	
gagagacaaa	tcaagaaaca	aactgcactt	gttgagctcg	tgaaacacaa	gcccaggca	4500	30
acaaaagagc	aactgaaagc	tgttatggat	gatttcgcag	cttttgtaga	gaagtgcctg	4560	
aaggctgacg	ataaggagac	ctgctttgcc	gaggagggtg	aaaaacttgt	tgctgcaagt	4620	
caagctgcct	taggctta					4638	

【0521】

配列番号 52 - h N P P 3 - h F c - p c D N A 3 のヌクレオチド配列

【表 5 2 - 1】

gacggatcgg	gagatctccc	gatccccat	ggctgactct	cagtacaatc	tgctctgatg	60	
ccgcatagtt	aagccagtat	ctgctccctg	cttgtgtgtt	ggaggtcgct	gagtagtgcg	120	
cgagcaaaat	ttaagctaca	acaaggcaag	gcttgaccga	caattgcatg	aagaatctgc	180	
ttagggttag	gcgttttgcg	ctgcttcgcg	atgtacgggc	cagatatacg	cgttgacatt	240	
gattattgac	tagttattaa	tagtaataca	ttacggggtc	attagttcat	agccccata	300	
tggagtccg	cgttacataa	cttacggtaa	atggcccgc	tggtgaccg	cccaacgacc	360	
cccggccatt	gacgtcaata	atgacgtatg	ttcccatagt	aacgccaata	gggactttcc	420	
attgacgtca	atgggtggac	tatttacggt	aaactgcccc	cttggcagta	catcaagtgt	480	
atcatatgcc	aagtaacgcc	cctattgacg	tcaatgacgg	taaatggccc	gcctggcatt	540	
atgcccagta	catgacctta	tgggactttc	ctacttgcca	gtacatctac	gtattagtca	600	10
tcgtatttac	catgggtgat	cggttttggc	agtacatcaa	tgggcgtgga	tagcggtttg	660	
actcacgggg	atttccaagt	ctccacccca	ttgacgtcaa	tgggagtttg	ttttggcacc	720	
aaaatcaacg	ggactttcca	aaatgtcgta	acaactccgc	cccattgacg	caaattggcg	780	
gtaggcgtgt	acggtgggag	gtctatataa	gcagagctct	ctggctaact	agagaaccca	840	
ctgcttactg	gcttategaa	attaatacga	ctcactatag	ggagacccaa	gcttatggaa	900	
agggacggat	gcgccgggtg	tggatctcgc	ggaggcgaag	gtggaagggc	ccctagggaa	960	
ggacctgccg	gaaacgggaag	ggacagggga	cgctctcacg	ccgctgaagc	tccaggcgac	1020	
cctcaggccg	ctgcctctct	gctggctcct	atggacgtcg	gagaagaacc	cctggaaaag	1080	
gccgccaggg	ccaggactgc	caaggacccc	aacacctaca	agatcatctc	cctcttctact	1140	
ttcgccgtcg	gagtcaacat	ctgcctggga	ttcaccccg	aaaagcaagg	cagctgcagg	1200	
aagaagtgt	ttgatgcac	atttagagga	ctggagaact	gccgggtgtga	tgtggcatgt	1260	
aaagaccgag	gtgattgtcg	ctgggatttt	gaagacacct	gtgtggaatc	aactcgaata	1320	20
tggatgtgca	ataaatttcg	ttgtggagag	accagattag	aggccagcct	ttgctcttgt	1380	
tcagatgact	gtttgcagag	gaaagattgc	tgtgtgact	ataagagtgt	ttccaagga	1440	
gaaacctcat	ggctggaaga	aaactgtgac	acagcccagc	agtcctcagt	cccagaaggg	1500	
tttgacctgc	caccagttat	cttgttttct	atggatggat	ttagagctga	atattttatac	1560	
acatgggata	ctttaatgcc	aaatatcaat	aaactgaaaa	catgtggaat	tcattcaaaa	1620	
tacatgagag	ctatgtatcc	taccaaaacc	ttcccaaate	attacacat	tgtcacgggc	1680	
ttgtatccag	agtcacatgg	catcattgac	aataatatgt	atgatgtaaa	tctcaacaag	1740	
aatttttca	tttcttcaaa	ggaacaaaat	aatccagcct	ggtggcatgg	gcaaccaatg	1800	
tggctgacag	caatgtatca	aggtttaaaa	gccgtacct	acttttggcc	cggatcagaa	1860	
gtggctataa	atggctcctt	tccttccata	tacatgcctt	acaacggaag	tgtcccattt	1920	
gaagagagga	tttctacact	gttaaaatgg	ctggacctgc	ccaaagctga	aagaccagg	1980	
ttttatacca	tgtattttga	agaacctgat	tcctctggac	atgcagggtg	accagtcagt	2040	30
gccagagtaa	ttaaagcctt	acaggtagta	gatcatgctt	ttgggatgtt	gatggaagge	2100	
ctgaagcagc	ggaatttgca	caactgtgtc	aatatcatcc	ttctggctga	ccatggaatg	2160	
gaccagactt	attgtaacaa	gatggaatac	atgactgatt	attttcccag	aataaaacttc	2220	
ttctacatgt	acgaagggcc	tgccccccgc	atccgagctc	ataatatacc	tcatgacttt	2280	
tttagtttta	attctgagga	aattgttaga	aacctcagtt	gccgaaaacc	tgatcagcat	2340	
ttcaagccct	atttgactcc	tgatttgcca	aagegactgc	actatgccaa	gaacgtcaga	2400	
atcgacaaa	ttcatctctt	tgtggatcaa	cagtggctgg	ctgttaggag	taaatcaaat	2460	
acaaattgtg	gaggaggcaa	ccatggttat	aacaatgagt	ttaggagcat	ggaggtatc	2520	
tttctggcac	atggaccag	ttttaagag	aagactgaag	ttgaaccatt	tgaataatatt	2580	
gaagtctata	acctaattgt	tgatcttcta	cgcattcaac	cagcaccaaa	caatggaacc	2640	
catggtagtt	taaacatct	tctgaagggt	cctttttatg	agccatccca	tgcagaggag	2700	
gtgtcaaaagt	tttctgtttg	tggctttgct	aatccattgc	ccacagagtc	tcttgactgt	2760	40

【表 5 2 - 2】

ttctgccctc	acctacaaaa	tagtactcag	ctggaacaag	tgaatcagat	gctaaatctc	2820	
acccaagaag	aaataacagc	aacagtgaag	gtaaatttgc	catttgggag	gcctagggtg	2880	
ctgcagaaga	acgtggacca	ctgtctctt	taccacaggg	aatatgtcag	tggatttggg	2940	
aaagctatga	ggatgcccac	gtggagtcca	tacacagtc	cccagttggg	agacacatcg	3000	
cctctgccct	ccactgtccc	agactgtctg	cgggctgatg	tcagggttcc	tccttctgag	3060	
agccaaaaat	gttcttctta	tttagcagac	aagaatatca	cccacggctt	cctctatcct	3120	
cctgccagca	atagaacatc	agatagccaa	tatgatgctt	taattactag	caatttggta	3180	
cctatgtatg	aagaattcag	aaaaatgtgg	gactacttcc	acagtgttct	tcttataaaa	3240	
catgccacag	aaagaaatgg	agtaaatgtg	gttagtggac	caatatttga	ttataattat	3300	
gatggccatt	ttgatgctcc	agatgaaatt	accaaacatt	tagccaacac	tgatgttccc	3360	
ateccaacac	actactttgt	ggtgctgacc	agttgtaaaa	acaagagcca	cacaceggaa	3420	10
aactgccctg	ggtggtctga	tgctctaccc	tttatcatcc	ctcacggacc	taccaacgtg	3480	
gagagctgtc	ctgaaggtaa	accagaagct	ctttgggttg	aagaaagatt	tacagctcac	3540	
attgcccggg	tcctgtatgt	agaacttctc	actgggcttg	acttctatca	ggataaagtg	3600	
cagcctgtct	ctgaaatttt	gcaactaaag	acatatattac	caacatttga	aaccactatt	3660	
gacaaaactc	acacatgccc	accgtgcccc	gcacctgaac	tcctgggggg	accgtcagtc	3720	
ttctcttccc	ccccaaaacc	caaggacacc	ctcatgatct	cccggacccc	tgaggtcaca	3780	
tgctgtgttg	tgacgtgag	ccacgaagac	cctgaggtca	agttcaactg	gtacgtggac	3840	
ggcgtggagg	tgcataatgc	caagacaaag	ccgcgggagg	agcagtacaa	cagcacgtac	3900	
cgtgtgtgta	gcgtctctac	cgctctgcac	caggactggc	tgaatggcaa	ggagtacaag	3960	
tgcaaggtct	ccaacaaagc	cctcccagcc	cccctcgaga	aaacctctc	caaagccaaa	4020	
gggcagcccc	gagaaccaca	ggtgtacacc	ctgcccccat	cccgggagga	gatgaccaag	4080	
aaccagggtc	gcctgacctg	cctgggtcaaa	ggcttctatc	ccagcgacat	cgcctgtggg	4140	20
tgggagagca	atgggcagcc	ggagaacaac	tacaagacca	gcctcccctg	gctggactcc	4200	
gacggctcct	tcttctctta	tagcaagctc	accgtggaca	agagcagggtg	gcagcagggg	4260	
aacgtcttct	catgtccctg	gatgcatgag	gctctgcaca	accactacac	gcagaagagc	4320	
cttccctctg	ccccgggtaa	atgaaattct	gcagatatcc	atcacactgg	cgcgcgctcg	4380	
agcatgcac	tagaggggcc	tattctatag	tgctaccta	atgctagagc	tcgctgatca	4440	
gcctcgactg	tgcttcttag	ttgccagcca	tctgttgttt	gccccctccc	cgtgccttcc	4500	
ttgaccttg	aaggtgccac	tcccactgtc	ctttccta	aaaatgagga	aattgcatcg	4560	
cattgtctga	gtagggtgtc	ttctattctg	gggggtgggg	tggggcagga	cagcaagggg	4620	
gaggattggg	aagacaatag	caggcatgct	ggggatgcgg	tgggctctat	ggcttctgag	4680	
gcggaaagaa	ccagctgggg	ctctaggggg	tatccccacg	cgccctgtag	cggcgcat	4740	
agcgcggcgg	gtgtgtgtgt	tacgcgcagc	gtgaccgcta	cacttgccag	cgccttagcg	4800	
cccgtctctt	tcgttttctt	cccttctt	ctcgccacgt	tcgcggctt	tcctcgctca	4860	
gctctaaatc	ggggcatccc	tttaggggtc	cgatttagtg	ctttacggca	cctcgacccc	4920	30
aaaaaacttg	attagggtga	tggttcacgt	agtgggccat	cgccctgata	gacggttttt	4980	
cgccctttga	cgttggagtc	cagtttctt	aatagtggac	tcttgttcca	aactggaaca	5040	
acactcaacc	ctatctcggt	ctattctttt	gatttataag	ggattttggg	gatttcggcc	5100	
tattggttaa	aaaatgagct	gatttaacaa	aaatttaacg	cgaattaatt	ctgtggaatg	5160	
tgtgtcagtt	agggtgtgga	aagtcgccag	gctccccagg	caggcagaag	tatgcaaagc	5220	
atgcattcca	attagtcagc	aaccaggtgt	ggaaagtccc	caggctcccc	agcaggcaga	5280	
agtatgcaaa	gcatgcatct	caattagtca	gcaaccatag	tcccgcccc	aactccgccc	5340	
atcccgcccc	taactccgcc	cagttccgcc	cattctccgc	cccatggctg	actaattttt	5400	
tttattttatg	cagaggccga	ggccgcctct	gcctctgagc	tattccagaa	gtagttagga	5460	
ggcttttttg	gaggcctagg	cttttgcaaa	aagctcccg	gagcttgat	atccattttc	5520	
ggatctgac	aagagacagg	atgaggatcg	tttcgcatga	ttgaacaaga	tggattgcac	5580	
gcaggttctc	cgcccgcttg	ggtggagagg	ctattcggt	atgactgggc	acaacagaca	5640	40

【表 5 2 - 3】

atcggtctct	ctgatccgc	ctgtttccgg	ctgtcagcgc	aggggcgccc	ggttcttttt	5700	
gtcaagaccg	acctgtccgg	tgccctgaat	gaactgcagg	acgaggcagc	gcggctatcg	5760	
tggtctggcca	cgacgggcgt	tccttgcgca	gctgtgctcg	acgttggtcac	tgaagcggga	5820	
agggactggc	tgctattggg	cgaagtgcgg	gggcaggatc	tcctgtcacc	tcaccttgct	5880	
cctgccgaga	aagtatccat	catggctgat	gcaatgcggc	ggctgcatac	gcttgatccg	5940	
gctacctgcc	cattcgacca	ccaagcgaaa	catcgcatcg	agcgagcacg	tactcgatg	6000	
gaagccggtc	ttgtcgatca	ggatgatctg	gacgaagagc	atcaggggct	cgcgccagcc	6060	
gaactgttcg	ccaggctcaa	ggcgcgcatg	cccgcggcgg	aggatctcgt	cgtgacctat	6120	
ggcgatgcct	gcttgccgaa	tatcatgggtg	gaaaatggcc	gcttttctgg	attcatcgac	6180	
tgtggccggc	tggtgtggc	ggaccgctat	caggacatag	cgttggtctac	ccgtgatatt	6240	
gctgaagagc	ttggcggcga	atgggctgac	cgttctctcg	tgctttacgg	tatcgccgct	6300	10
cccgatctgc	agcgcatcgc	cttctatcgc	cttcttgacg	agttcttctg	agcgggactc	6360	
tggtggttca	aatgaccgac	caagcgacgc	ccaacctgcc	atcacgagat	ttcgattcca	6420	
ccgcccgttt	ctatgaaagg	ttgggcttcg	gaatcgtttt	ccgggacgccc	ggctggatga	6480	
tcctccagcg	cggggatctc	atgctggagt	tcctcgccca	ccccaaacttg	tttattgcag	6540	
cttataatgg	ttacaataaa	agcaatagca	tcacaaattt	cacaaataaa	gcattttttt	6600	
cactgcattc	tagttgtggt	ttgtccaaac	tcataaatgt	atcttatcat	gtctgtatac	6660	
cgctgcacct	tagctagagc	ttggcgtaat	catggtcata	gctgtttcct	gtgtgaaatt	6720	
gttatccgct	cacaattcca	cacaacatac	gagccggaag	cataaagtgt	aaagcctggg	6780	
gtgcctaatt	agttagctaa	ctcacattaa	ttgcgttgcg	ctcactgccc	gctttccagt	6840	
cgggaaacct	gtcgtgccag	ctgcattaat	gaatcgccca	acgcgcgggg	agaggcggtt	6900	
tgcgtattgg	gcgctcttcc	gcttctctgc	tcactgactc	gctgcgctcg	gtcgttcggc	6960	
tgcggcgagc	ggtatcagct	cactcaaaag	cggtaatacg	gttatccaca	gaatcagggg	7020	20
ataacgcagg	aaagaacatg	tgagcaaaa	gccagcaaaa	ggccagggaac	cgtaaaaagg	7080	
ccgctgttct	ggcgtttttc	cataggctcc	gccccctga	cgagcatcac	aaaaatcgac	7140	
gctcaagtca	gaggtggcga	aaccgcagac	gactataaa	ataccaggcg	tttccccctg	7200	
gaagctccct	cggtgcctct	cctgttccga	ccctgccgct	taccggatac	ctgtccgcct	7260	
tttccccctc	gggaagcgtg	gcgctttctc	aatgctcacg	ctgtagggtat	ctcagttcgg	7320	
tgtaggctcg	tcgctccaag	ctgggctgtg	tgcacgaacc	ccccgttcag	cccgaaccgt	7380	
gcgccttacc	cgttaactat	cgtcttgagt	ccaacccggg	aagacacgac	ttatcgccac	7440	
tggcagcagc	cactggtaac	aggattagca	gagcgaggta	tgtaggcggg	gtacagaggt	7500	
tcctgaagtg	gtggcctaac	tacggctaca	ctagaaggac	agtatttggt	atctgcgctc	7560	
tgtgaagccc	agttaccttc	ggaaaaagag	ttggtagctc	ttgatccggc	aaacaaacca	7620	
ccgctggtag	cgtgtgtttt	tttgtttgca	agcagcagat	tacgcgcaga	aaaaaaggat	7680	
ctcaagaaga	tcctttgata	ttttctacgg	ggctctgacg	tcagtgggac	gaaaaactac	7740	
gttaagggat	tttggtcatg	agattatcaa	aaaggatctt	cacctagatc	cttttaaat	7800	30
aaaaatgaag	ttttaaatca	atctaaagta	tatatgagta	aacttggtct	gacagttacc	7860	
aatgcttaat	cagtggagca	cctatctcag	cgatctgtct	atttcgttca	tcctagtttg	7920	
cctgactccc	cgctgtgtag	ataactacga	tacgggaggg	cttaccatct	ggccccagtg	7980	
ctgcaatgat	accgcgagac	ccacgctcac	cggctccaga	ttatccagca	ataaaccagc	8040	
cagccggaag	ggccgagcgc	agaagtgggc	ctgcaacttt	atccgcctcc	atccagtcta	8100	
ttaattgttg	ccgggaagct	agagtaagta	gttcgccagt	taatagtttg	cgcaacgttg	8160	
ttgccattgc	tacaggcatc	gtggtgtcac	gctcgtcggt	tggtatggct	tcattcagct	8220	
ccggttccca	acgatacagg	cgagttacat	gatcccccat	gttgtgcaaa	aaagcggtta	8280	
gctccttcgg	tcctccgata	gttgctagaa	gtaagttggc	cgcagtgtta	tcactcatgg	8340	
ttatggcagc	actgcataat	tccttactcg	tcatgccatc	cgtaagatgc	ttttctgtga	8400	
ctggtgagta	ctcaaccaag	tcattctgag	aatagtgtat	cgggcgaccg	agttgctctt	8460	
gcccggcgct	aatacgggat	aataccgcgc	cacatagcag	aactttaaaa	gtgctcatca	8520	40

【表 5 2 - 4】

ttggaaaacg	ttcttcgggg	cgaaaaactct	caaggatctt	accgctgttg	agatccagtt	8580
cgatgtaacc	cactcgtgca	cccaactgat	cttcagcatc	ttttactttc	accagcgttt	8640
ctgggtgagc	aaaaacagga	aggcaaaatg	ccgcaaaaaa	gggaataagg	gcgacacgga	8700
aatgttgaat	actcatactc	ttcctttttc	aatattattg	aagcatttat	cagggttatt	8760
gtctcatgag	cggatacata	tttgaatgta	tttagaaaaa	taaacaaata	ggggttccgc	8820
gcacatttcc	ccgaaaagtg	ccacctgacg	tc			8852

配列番号 53 - ENPP121-Fcヌクレオチド配列

【表 53-1】

atggaaaggg	acggatgcgc	cggtggtgga	tctcgcgag	gcgaaggtgg	aaggccccct	60
agggaaggac	ctgccggaaa	cggaaaggac	aggggacgct	ctcacgccgc	tgaagctcca	120
ggcgaccctc	aggccgctgc	ctctctgctg	gctcctatgg	acgtcggaga	agaacccctg	180
gaaaaggccg	ccagggccag	gactgccaa	gaccccaaca	cctacaagat	catctccctc	240
ttcactttcg	ccgtcgaggt	caacatctgc	ctgggattca	ccgccggact	gaagcccagc	300
tgcgccaaag	aagtgaagtc	ctgcaagggc	cggtgcttcg	agcggacctt	cggcaactgc	360
agatgcgacg	ccgcctgtgt	ggaactgggc	aactgctgcc	tggactacca	ggaacacctgc	420
atcgagcccc	agcacatctg	gacctgcaac	aagttcagat	gcggcgagaa	gcggctgacc	480
agatccctgt	gtgcctgcag	cgacgactgc	aaggacaagg	gcgactgctg	catcaactac	540
agcagcgtgt	gccagggcga	gaagtcttgg	gtggaagaac	cctgcgagag	catcaacgag	600
ccccagtgcc	ctgccggctt	cgagacacct	cctaccctgc	tgttcagcct	ggacggcttt	660
cgggcccagt	acctgcacac	atggggaggc	ctgctgcccc	tgatcagcaa	gctgaagaag	720
tgcgacacct	acaccaagaa	catgcggccc	gtgtacccca	ccaagacctt	ccccaccac	780
tactccatcg	tgaccggcct	gtaccccgag	agccacggca	tcacgacaa	caagatgtac	840
gacccaaga	tgaacgccag	cttcagcctg	aagtccaagg	agaagttcaa	ccccgagtgg	900
tataaggggc	agcccatctg	ggtcaccgcc	aagtaccagg	gcctgaaaag	cggcacattc	960
ttttggcccc	gcagcgacgt	ggaatcaaac	ggcatcttcc	ccgacatcta	taagatgtac	1020
aacgacagcg	tgcccttcca	ggaacggatc	ctggctgtgc	tgcagtggct	gcagctgccc	1080
aaggatgagc	ggccccactt	ctacacccctg	tacctggaag	aacctgacag	cagcggccac	1140
agctacggcc	ctgtgtccag	cgaagtgtac	aaggccctgc	agcgggtgga	cggcatgtgt	1200
ggaatgctga	tggacggcct	gaaagagctg	aacctgcaca	gatgcctgaa	cctgatcctg	1260
atcagcgacc	acggcatgga	acagggatcc	tgcaagaagt	acatctacct	gaacaagtac	1320
ctgggcgacg	tgaagaacat	caaagtgtac	tacggcccag	ccgccagact	gaggcctagc	1380
gacgtgcccc	acaagtacta	cagcttcaac	tacgagggaa	tcgcccgaa	cctgagctgc	1440
agagagccca	accagcactt	caagccctac	ctgaagcaat	tcctgcccac	gcggctgcac	1500
ttcgccaaga	gcgacagaat	cgagccccctg	accttctacc	tggaccccca	gtggcagctg	1560
gccctgaatc	ccagcgagag	aaagtactgc	ggcagcggtc	tcacggctc	cgacaacgtg	1620
ttcagcaaca	tgcaggccct	gttcgtgggc	tacggaccgc	gctttaagca	cggcatcgag	1680
gccgacacct	tcgagaacat	cgagggtgtac	aatctgatgt	gcgacctgct	gaatctgacc	1740
cctgccccca	acaatggcac	ccaaggcagc	ctgaaccatc	tgtgaagaa	ccccgtgtac	1800
acccctaagc	accccaaaaga	ggtgcacccc	ctggtgcagt	gccccctcac	cagaaacccc	1860
agagacaacc	tgggctgtag	ctgcaacccc	agcatcctgc	ccatcgagga	cttccagacc	1920
cagttcaacc	tgaccgtggc	cgaggaaaag	atcatcaagc	acgagacact	gccttacggc	1980
agacccccgg	tgtgcagaa	agagaacacc	atctgcctgc	tgagccagca	ccagttcatg	2040
agcggctact	cccaggacat	cctgatgccc	ctgtggacca	gctacaccgt	ggaccggaac	2100
gacagcttct	ccaccgagga	tttcagcaac	tgcctgtacc	aggatttccg	gatccccctg	2160
agccccgtgc	acaagtgcag	cttctacaag	aacaacacca	aggtgtccta	cggcttctctg	2220
agccctcccc	agctgaacaa	gaacagctcc	ggcatctaca	gcgaggccct	gctgactacc	2280
aacatcgtgc	ccatgtacca	gagcttccaa	gtgatctggc	ggtacttcca	cgcacacctg	2340
ctgcggaagt	acgccgaaga	acggaacggc	gtgaacgtgg	tgtccggccc	agtgttcgac	2400
ttcgactacg	acggcagatg	tgacagcctg	gaaaatctgc	ggcagaaaag	aagagtgatc	2460
cggaaaccag	aaattctgat	ccctaccacc	ttctttatcg	tgctgacaag	ctgcaaggat	2520
accagccaga	ccccctgca	ctgcgagaa	ctggataccc	tggccttcat	cctgcctcac	2580
cggaccgaca	acagcgagag	ctgtgtgcac	ggcaagcacg	acagctcttg	ggtggaagaa	2640
ctgctgatgc	tgacccgggc	cagaatcacc	gatgtggaac	acatcaccgg	cctgagcttt	2700
taccagcagc	gaaaagaacc	cgtgtccgat	atcctgaagc	tgaaaaccca	tctgcccacc	2760

10

20

30

40

50

【表 5 3 - 2】

ttcagccagg aagatgacaa gaccacact tgccccccct gcccagctcc tgaactgctg	2820
ggaggaccct ctgtgttccct gtcccccca aagcccaagg acaccctgat gatctctagg	2880
acccccgaag tcacttgctg cgctcgtcgac gtgtcccacg aggaccctga agtcaagttc	2940
aactggtaag tcgacggtgt cgaagtccac aacgccaaga ccaagcccag ggaagaacag	3000
tacaactcta cctaccgctg cgtcagcgtc ctgaccgtcc tgcaccagga ctggctgaac	3060
ggaaaggaat acaagtgcaa ggtgtccaac aaggccctgc ctgcccccat cgaaaagacc	3120
atctctaagg ccaagggaca gcccccgaa ccccaggtct acaccctgcc accctctagg	3180
gaagaaatga ccaagaacca ggtgtccctg acctgcctgg tcaagggatt ctaccctct	3240
gacatgcctg tcgaatggga atctaacgga cagcccgaaa acaactacaa gaccacccc	3300
cctgtcctgg actctgacgg atcattcttc ctgtactcta agctgactgt cgacaagtct	3360
aggtggcagc agggaaacgt gttctcttgc tctgtcatgc acgaagccct gcacaaccac	3420
tacaccaga agtctctgtc tctgtcccc ggaaag	3456

10

【0 5 2 3】

配列番号 5 4 - E N P P 1 2 1 - アルブミンヌクレオチド配列

20

30

40

50

【表 5 4 - 1】

atggaaaggg	acggatgcgc	cgggtggtgga	tctcgcggag	gcgaaggtgg	aagggccct	60	
agggaaaggac	ctgccggaaa	cggaaggagac	aggggacgct	ctcacgccgc	tgaagctcca	120	
ggcgaccctc	aggccgctgc	ctctctgctg	gctcctatgg	acgtcggaga	agaaccctg	180	
gaaaaggccg	ccagggccag	gactgccaag	gacccaaca	cctacaagat	catctccctc	240	
ttcactttcg	ccgtcggagt	caacatctgc	ctgggattca	ccgccggact	gaagcccagc	300	
tgcgccaag	aagtgaagtc	ctgcaagggc	cgggtgcttcg	agcggacctt	cggcaactgc	360	
agatgcgacg	ccgcctgtgt	ggaactgggc	aactgctgcc	tggactacca	gaaacctgc	420	
atcgagcccg	agcacatctg	gacctgcaac	aagttcagat	gcggcgagaa	gcggctgacc	480	
agatccctgt	gtgcctgcag	cgaactgcgc	aaggacaagg	gcgactgctg	catcaactac	540	
agcagcgtgt	gccagggcga	gaagtcttgg	gtggaagaac	cctgcgagag	catcaacgag	600	
ccccagtgc	ctgccggctt	cgagacacct	cctaccctgc	tgttcagcct	ggacggcttt	660	10
cgggcccag	acctgcacac	atggggaggc	ctgctgccc	tgatcagcaa	gctgaagaag	720	
tgcggcacct	acaccaagaa	catgcggccc	gtgtacccca	ccaagacctt	ccccaaccac	780	
tactccatcg	tgaccggcct	gtaccccag	agccaaggca	tcacgacaa	caagatgtac	840	
gacccaaga	tgaacgccag	cttcagcctg	aagtccaaag	agaagttcaa	ccccgagtgg	900	
tataaggcgc	agcccatctg	ggtcaccgcc	aagtaccagg	gcctgaaaag	cggcacattc	960	
ttttggccc	gcagcgacgt	gaaaatcaac	ggcatcttcc	ccgacatcta	taagatgtac	1020	
aacggcagcg	tgcccttcga	ggaacggatc	ctggctgtgc	tgcagtggct	gcagctgccc	1080	
aaggatgagc	ggccccactt	ctacacctg	tacctggaag	aacctgacag	cagcggccac	1140	
agctacggcc	ctgtgtccag	cgaagtgtac	aaggccctgc	agcgggtgga	cggcatggtg	1200	
ggaatgctga	tggacggcct	gaaagagctg	aacctgcaca	gatgcctgaa	cctgatcctg	1260	
atcagcgacc	acggcatgga	acagggatcc	tgcaagaagt	acatctacct	gaacaagtac	1320	20
ctgggcgacg	tgaagaacat	caaagtgtac	tacggcccag	ccgccagact	gaggcctagc	1380	
gacgtgcccc	acaagtacta	cagcttcaac	tacgagggaa	tcgcccgga	cctgagctgc	1440	
agagagccca	accagcactt	caagccctac	ctgaagcact	tcctgcccga	gcggctgcac	1500	
ttcgccaaga	gcgacagaat	cgagccctg	accttctacc	tggaccccca	gtggcagctg	1560	
gccctgaatc	ccagcgagag	aaagtactgc	ggcagcggct	tccacggctc	cgacaacgtg	1620	
ttcagcaaca	tgcaggccct	gttcgtgggc	tacggacccg	gctttaagca	cggcatcgag	1680	
gccgacacct	tcgagaacat	cgagggtgtac	aatctgatgt	gcgacctgct	gaatctgacc	1740	
cctgccccca	acaatggcac	ccacggcagc	ctgaaccatc	tgctgaagaa	ccccgtgtac	1800	
accctaagc	accccaaga	ggtgcacccc	ctggtgcagt	gccccttcac	cagaaacccc	1860	
agagacaacc	tgggtgttag	ctgcaacccc	agcatcctgc	ccatcgagga	cttccagacc	1920	
cagttcaacc	tgaccgtggc	cgaggaaaag	atcatcaagc	acgagacact	gccctacggc	1980	
agaccccg	tgctgcagaa	agagaacacc	atctgcctgc	tgagccagca	ccagttcatg	2040	30
agcggctact	cccaggacat	cctgatgccc	ctgtggacca	gtacacacct	ggaccggaac	2100	
gacagcttct	ccaccgagga	tttcagcaac	tgctgtacc	aggatttccg	gateccccctg	2160	
agccccgtgc	acaagtgcag	cttctacaag	aacaacacca	aggtgtccta	cggcttctctg	2220	
agccctcccc	agctgaacaa	gaacagctcc	ggcatctaca	ggagggccct	gtgactacc	2280	
aacatcgtgc	ccatgtacca	gagcttccaa	gtgatctggc	ggtacttcca	cgacacctg	2340	
ctgcggaagt	acgccgaaga	acggaacggc	gtgaacgtgg	tgtccggccc	agtgttcgac	2400	
ttcgactacg	acggcagatg	tgacagcctg	gaaaatctgc	ggcagaaaaag	aagagtgtac	2460	
cggaaaccagg	aaattctgat	ccctacccac	ttctttatcg	tgctgacaag	ctgcaaggat	2520	
accagccaga	ccccctgca	ctgcgagaac	ctggataccc	tggccttcat	cctgcctcac	2580	
cggaccgaca	acagcgagag	ctgtgtgcac	ggcaagcacg	acagctcttg	ggtggaagaa	2640	
ctgctgatgc	tgcaccgggc	cagaatcacc	gatgtggaac	acatcaccgg	cctgagcttt	2700	
taccagcagc	ggaaagaacc	cgtgtccgat	atcctgaagc	tgaaaaccca	tctgccacc	2760	40

【表 5 4 - 2】

ttcagccagg	aagatggtgg	aggaggctct	ggtggaggcg	gtagcggagg	cggagggtcg	2820	
ggaggttctg	gatcaatgaa	gtgggtaacc	tttattttccc	ttctttttct	cttttagctcg	2880	
gcttattcca	gggtgtgtt	tcgtcgagat	gcacacaaga	gtgaggttgc	tcatecggttt	2940	
aaagatttgg	gagaagaaaa	tttcaaagcc	ttggtgttga	ttgcctttgc	tcagtatctt	3000	
cagcagtgtc	catttgaaga	tcatgtaaaa	ttagtgaatg	aagtaactga	atttgcaaaa	3060	
acatgtgttg	ctgatgagtc	agctgaaaat	tgtgacaaat	cacttcatac	cctttttgga	3120	
gacaaattat	gcacagtgtc	aactcttcgt	gaaacctatg	gtgaaatggc	tgactgctgt	3180	
gcaaaacaag	aacctgagag	aaatgaatgc	ttcttgcaac	acaaagatga	caacccaaac	3240	
ctcccccgat	tggtgagacc	agaggttgat	gtgatgtgca	ctgcttttca	tgacaatgaa	3300	10
gagacatttt	tgaaaaaata	cttatatgaa	attgccagaa	gacatcctta	cttttatgcc	3360	
ccggaactcc	ttttctttgc	taaaaggtat	aaagctgctt	ttacagaatg	ttgccaagct	3420	
gctgataaag	ctgcctgcct	gttgccaaag	ctcgatgaac	ttcgggatga	agggaaggct	3480	
tcgtctgcca	aacagagact	caagtgtgcc	agtctccaaa	aatttggaga	aagagctttc	3540	
aaagcatggg	cagtagctcg	cctgagccag	agatttccca	aagctgagtt	tgcagaagtt	3600	
tccaagttag	tgacagatct	taccaaagtc	cacacggaat	gttgccatgg	agatctgctt	3660	
gaatgtgctg	atgacagggc	ggaccttgcc	aagtatatct	gtgaaaatca	agattcgatc	3720	
tccagtaaac	tgaaggaatg	ctgtgaaaaa	cctctgttgg	aaaaatccca	ctgcattgcc	3780	
gaagtggaaa	atgatgagat	gcctgtgac	ttgccttcat	tagctgctga	ttttgttgaa	3840	
agtaaggatg	tttgcaaaaa	ctatgtgag	gcaaaggatg	tcttcctggg	catgtttttg	3900	20
tatgaatatg	caagaaggca	tctgattac	tctgtctgtc	tgtgtctgag	acttgccaag	3960	
acatatgaaa	ccactctaga	gaagtgtgt	gccgtgcag	atcctcatga	atgctatgcc	4020	
aaagtgttcg	atgaatttaa	acctcttggt	gaagagcctc	agaatttaat	caaacaaaat	4080	
tgtgagcttt	ttgagcagct	tggagagtac	aaattccaga	atgcgctatt	agttcgttac	4140	
accaagaaaag	taccccaagt	gtcaactcca	actctttag	aggtctcaag	aaacctagga	4200	
aaagtgggca	gcaaatgttg	taaacatcct	gaagcaaaaa	gaatgccctg	tgcagaagac	4260	
tatctatccg	tggtcctgaa	ccagttatgt	gtgttgcatg	agaaaacgcc	agtaagtgac	4320	
agagtcacca	aatgctgcac	agaatccttg	gtgaacaggc	gacatgctt	ttcagctctg	4380	
gaagtgcgatg	aaacatacgt	tcccaaagag	tttaatgctg	aaacattcac	cttccatgca	4440	
gatatatgca	cactttctga	gaaggagaga	caaatcaaga	aacaaactgc	acttgttgag	4500	30
ctcgtgaaac	acaagcccaa	ggcaacaaaa	gagcaactga	aagctgttat	ggatgatttc	4560	
gcagcttttg	tagagaagtg	ctgcaaggct	gacgataagg	agacctgctt	tgccgaggag	4620	
ggtaaaaaaac	ttgttgctgc	aagtcaagct	gccttaggct	ta		4662	

【0 5 2 4】

配列番号 5 5 - E N P P 3 ヌクレオチド配列

【表 5 5】

atggaatcta	cgttgacttt	agcaacggaa	caacctgtta	agaagaacac	tcttaagaaa	60	
tataaaatag	cttgcatgtt	tcttcttgc	ttgctgggtg	tcatgtcact	tggtattaggc	120	
ctggggcttg	gactcaggaa	actggaaaag	caaggcagct	gcaggaagaa	gtgctttgat	180	
gcatcattta	gaggactgga	gaactgccgg	tgtgatgtgg	catgtaaaga	ccgaggtgat	240	
tgctgctggg	attttgaa	cacctgtgtg	gaatcaactc	gaatatggat	gtgcaataaa	300	
tttcgttgtg	gagagaccag	attagaggcc	agccttttgc	ctgtttcaga	tgactgtttg	360	
cagagaaaag	attgctgtgc	tgactataag	agtgtttgcc	aaggagaaac	ctcatggctg	420	
gaagaaaact	gtgacacagc	ccagcagttc	cagtgccccg	aagggtttga	cctgccacca	480	
gttatcttgt	tttctatgga	tggatttaga	gtggaatatt	tatacacatg	ggatacttta	540	
atgccaaata	tcaataaact	gaaaacatgt	ggaattcatt	caaaatacat	gagagctatg	600	10
tatectacca	aaaccttccc	aaatcattac	accattgtca	cgggcttgta	tccagagtca	660	
catggcatca	ttgacaataa	tatgtatgat	gtaaatctca	acaagaattt	ttcactttct	720	
tcaaaggaac	aaaataatcc	agcctggtgg	catgggcaac	caatgtggct	gacagcaatg	780	
tatcaagggt	taaaagccgc	tacctacttt	tggcccggat	cagaagtggc	tataaatggc	840	
tcctttcctt	ccatatacat	gccttacaac	ggaagtgtcc	catttgaaga	gaggatttct	900	
acactgttaa	aatggctgga	cctgcccaca	gctgaaagac	ccaggtttta	taccatgtat	960	
tttgaagaac	ctgattcctc	tggacatgca	ggtggaccag	tcagtgccag	agtaattaaa	1020	
gccttacagg	tagtagatca	tgtttttggg	atgttgatgg	aaggcctgaa	gcagcggaat	1080	
ttgcacaact	gtgtcaatat	catccttctg	gctgaccatg	gaatggacca	gacttattgt	1140	
aacaagatgg	aatacatgac	tgattatttt	cccagaataa	acttcttcta	catgtacgaa	1200	
gggcctgccc	cccgcatccg	agctcataat	atacctcatg	acttttttag	ttttaattct	1260	20
gaggaatttg	ttagaaacct	cagttgcccga	aaacctgatc	agcatttcaa	gcctattttg	1320	
actcctgatt	tgccaaagcg	actgcactat	gccaaagacg	tcagaatcga	caaagttcat	1380	
ctctttgtgg	atcaacagtg	gctggctgtt	aggagtaaat	caaatacaaa	ttgtggagga	1440	
ggcaaccatg	gttataacaa	tgagtttagg	agcatggagg	ctatctttct	ggcacatgga	1500	
cccagtttta	aagagaagac	tgaagttgaa	ccatttgaaa	atattgaagt	ctataaccta	1560	
atgtgtgata	ttctacgcat	tcaaccagca	ccaaacaatg	gaacccatgg	tagtttaaac	1620	
catcttctga	agggtgcctt	ttatgagcca	tcccatgcag	aggaggtgtc	aaagttttct	1680	
gtttgtggct	ttgctaatac	attgccacaa	gagtctcttg	actgtttctg	ccctcaccta	1740	
caaaatagta	ctcagctgga	acaagtgaat	cagatgctaa	atctcaccca	agaagaaata	1800	
acagcaacag	tgaagtaaaa	tttgccattt	gggaggccta	gggtactgca	gaagaacgtg	1860	
gaccactgtc	tcctttacca	cagggaatat	gtcagtggat	ttggaaaagc	tatgaggatg	1920	
cccatgtgga	gttcatacac	agtcctccag	ttgggagaca	catcgctctc	gcctcccact	1980	30
gtcccagact	gtctgcgggc	tgatgtcagg	gttcctcctt	ctgagagcca	aaaatgttcc	2040	
ttctatttag	cagacaagaa	tatcacccac	ggcttctctc	atcctctctg	cagcaataga	2100	
acatcagata	gccaatatga	tgttttaatt	actagcaatt	tggtacctat	gtatgaagaa	2160	
ttcagaaaaa	tgtgggacta	cttcacacgt	gttcttctta	taaaacatgc	cacagaaaga	2220	
aatggagtaa	atgtgggttag	tggaccaata	tttgattata	attatgatgg	ccattttgat	2280	
gctccagatg	aaattacca	acatttagcc	aacactgatg	ttcccatccc	aacacactac	2340	
tttgtgggtg	tgaccagttg	taaaaacaag	agccacacac	cggaaaactg	ccctgggtgg	2400	
ctggatgtcc	taccttttat	catcctcac	cgacctacca	acgtggagag	ctgtcctgaa	2460	
ggtaaaccag	aagctctttg	ggttgaagaa	agattttacag	ctcacattgc	ccgggtccgt	2520	
gatgtagaac	ttctcactgg	gcttgacttc	tatcaggata	aagtgcagcc	tgtctctgaa	2580	
attttgcaac	taaagacata	tttaccacaa	tttgaaacca	ctatt		2625	40

【0525】

配列番号 56 — ENPP1ヌクレオチド配列：

【表 5 6】

atggaacggg	acggctgtgc	cggcggagga	tcaagaggcg	gagaaggcgg	cagagccct	60	
agagaaggac	ctgccggcaa	cggcagagac	agaggcagat	ctcatgccgc	cgaagccct	120	
ggcgatcctc	aggctgtgc	ttctctgtg	gccccatgg	atgtgggca	ggaacctctg	180	
gaaaaggccg	ccagagccag	aaccgccaag	gacccaaca	cctacaaggt	gctgagcctg	240	
gtgctgtccg	tgtgcgtgt	gaccaccatc	ctgggtgca	tcttcggcct	gaagcccagc	300	
tgcgcaaaag	aagtgaagtc	ctgcaagggc	cggtgcttcg	agcggacctt	cgcaactgc	360	
agatgcgacg	ccgctgtgt	ggaactgggc	aactgtgcc	tggactacca	ggaacctgc	420	
atcgagcccg	agcacatctg	gacctgcaac	aagttcagat	gcggcgagaa	gcggctgacc	480	
agatccctgt	gtgcctcgag	cgacactgc	aaggacaagg	gcgactgctg	catcaactac	540	
agcagcgtgt	gccaggcgca	gaagtcctgg	gtggaagaac	cctgcgagag	catcaacgag	600	
ccccagtgc	ctgccggtt	cgagacacct	cctaccctgc	tgttcagcct	ggacggcttt	660	10
cgggccgagt	gtgcctcac	ctggggagc	ctgctgccc	tgtacagcaa	gctgaagaag	720	
tgcgacacct	acaccaagaa	catgcggccc	gtgtacccca	ccaagacctt	ccccaccac	780	
tactccatcg	tgaccggcct	gtaccgccag	agccacggca	tcacgacaa	caagatgtac	840	
gacccaaga	tgaacgccag	cttcagcctg	aagtccaaag	agaagttcaa	ccccgagtgg	900	
tataaggcgc	agcccatctg	ggtcacccgc	aagtaccagg	gcctgaaaag	cggcacattc	960	
ttttggccc	gcagcgagct	ggaaatcaac	ggcatcttcc	ccgacatcta	taagatgtac	1020	
aacggcagcg	tgcccttcga	ggaacggatc	ctggctgtgc	tgcagtggct	gcagctgccc	1080	
aaggatgagc	ggccccactt	ctacacctg	tacctggaag	aacctgacag	cagcggccac	1140	
agctacggcc	ctgtgtccag	cgaagtgtac	aaggccctgc	agcgggtgga	cgcatggtg	1200	
ggaatgtctg	tggacggcct	gaaagagctg	aacctgcaca	gatgcctgaa	cctgatcctg	1260	
atcagcgacc	acggcatgga	acagggatcc	tgcaagaagt	acatctacct	gaacaagtac	1320	
ctgggcgacg	tgaagaacat	caaagtgtac	tacggcccag	ccgccagact	gaggcctagc	1380	20
gacgtgcccg	acaagtacta	cagcttcaac	tacgagggaa	tcgcccgaa	cctgagctgc	1440	
agagagccca	accagcactt	caagccctac	ctgaagcact	tcctgcccac	gcggctgcac	1500	
ttcgccaaga	gcacagaaat	cgagccccctg	accttctacc	tggaccccc	gtggcagctg	1560	
gccctgaatc	ccagcgagag	aaagtactgc	ggcagcggct	tcacggctc	cgacaacgtg	1620	
ttcagcaaca	tgaggccct	gttcgtgggc	tacggaccgc	gctttaagca	cgcatcgag	1680	
gccgacacct	tcgagaacat	cgaggtgtac	aatctgatgt	gcgacctgct	gaatctgacc	1740	
cctgccccca	acaatggcac	ccacggcagc	ctgaaccatc	tgctgaagaa	ccccgtgtac	1800	
acccctaagc	accccaaga	ggtgcacccc	ctggtgcagt	gccccctcac	cagaaacccc	1860	
agagacaacc	tgggctgtag	ctgcaacccc	agcatcctgc	ccatcgagga	cttcagacc	1920	
cagttcaacc	tgaccgtggc	cgaggaaaag	atcatcaagc	acgagacact	gccttacggc	1980	
agaccccggg	tgctgcagaa	agagaacacc	atctgcctgc	tgagccagca	ccagttcatg	2040	
agcggctact	cccaggacat	cctgatgccc	ctgtggacca	gctacaccgt	ggaccggaac	2100	30
gacagcttct	ccaccgagga	tttcagcaac	tgctgtacc	aggatttccg	gatccccctg	2160	
agccccgtgc	acaagtgcag	cttctacaag	aacaacacca	aggtgtccta	cggttctctg	2220	
agccctcccc	agctgaacaa	gaacagctcc	ggcatctaca	gcgaggccct	gctgactacc	2280	
aacatcgtgc	ccatgtacca	gagcttccaa	gtgatctggc	ggtacttcca	cgacacctg	2340	
ctgcggaagt	acgccgaaga	acggaacggc	gtgaacgtgg	tgtccggccc	agtgttcgac	2400	
ttcgactacg	acggcagatg	tgacagcctg	gaaaatctgc	ggcagaaaag	aagagtgtac	2460	
cggaaccagg	aaattctgat	ccctaccac	ttctttatcg	tgctgacaag	ctgcaaggat	2520	
accagccaga	ccccctgca	ctgcgagaac	ctggataccc	tggccttcac	cctgcctcac	2580	
cggaccgaca	acagcgagag	ctgtgtgcac	ggcaagcacg	acagctcttg	ggtggaagaa	2640	
ctgctgatgc	tgaccgggc	cagaatcacc	gatgtggaac	acatcacccg	cctgagcttt	2700	
taccagcagc	ggaagaacc	cgtgtccgat	atcctgaagc	tgaaaaccca	tctgcccacc	2760	
ttcagccagg	aagat					2775	40

【0 5 2 6】

配列番号 5 7 - リンカー

【表 5 7】

Asp Ser Ser

【0 5 2 7】

配列番号 5 8 - リンカー

【表 5 8】

Glu Ser Ser

【0 5 2 8】

配列番号 5 9 - リンカー

【表 5 9】

Arg Gln Gln

10

【0 5 2 9】

配列番号 6 0 - リンカー

【表 6 0】

Lys Arg

【0 5 3 0】

配列番号 6 1 - リンカー

【表 6 1】

 $(Arg)_m$ 、 $m=0\sim 15$

20

【0 5 3 1】

配列番号 6 2 - リンカー

【表 6 2】

Asp Ser Ser Ser Glu Glu Lys Phe Leu Arg Arg Ile Gly Arg Phe Gly

【0 5 3 2】

配列番号 6 3 - リンカー

【表 6 3】

Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Pro	Arg	Gly	Asp	Thr
1				5					10		

30

【0 5 3 3】

配列番号 6 4 - リンカー

【表 6 4】

Ala	Pro	Trp	His	Leu	Ser	Ser	Gln	Tyr	Ser	Arg	Thr
1				5						10	

40

【0 5 3 4】

配列番号 6 5 - リンカー

【表 6 5】

Ser	Thr	Leu	Pro	Ile	Pro	His	Glu	Phe	Ser	Arg	Glu
1				5						10	

【0 5 3 5】

配列番号 6 6 - リンカー

50

【表 6 6】

Val	Thr	Lys	His	Leu	Asn	Gln	Ile	Ser	Gln	Ser	Tyr
1				5					10		

【0 5 3 6】

配列番号 6 7 - リンカー

【表 6 7】

(Glu)_m; m=1-15

10

【0 5 3 7】

配列番号 6 8 - リンカー

【表 6 8】

Leu Ile Asn

【0 5 3 8】

配列番号 6 9 - リンカー

【表 6 9】

Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser
1			5		

20

【0 5 3 9】

配列番号 7 0 - リンカー

【表 7 0】

Arg	Ser	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser
1				5		

【0 5 4 0】

配列番号 7 1 - リンカー

【表 7 1】

(Asp)_m, m=1-15

1

30

【0 5 4 1】

配列番号 7 2 - リンカー

【表 7 2】

Leu	Val	Ile	Met	Ser	Leu	Gly	Leu	Gly	Leu	Gly	Leu	Gly	Leu	Arg	Lys
1				5				10					15		

40

【0 5 4 2】

配列番号 7 3 - リンカー

【表 7 3】

Val	Ile	Met	Ser	Leu	Gly	Leu	Gly	Leu	Gly	Leu	Gly	Leu	Arg	Lys
1				5				10					15	

【0 5 4 3】

配列番号 7 4 - リンカー

50

【表 7 4】

Ile Met Ser Leu Gly Leu Gly Leu Gly Leu Gly Leu Arg Lys
1 5 10

【0 5 4 4】

配列番号 7 5 - リンカー

【表 7 5】

Met Ser Leu Gly Leu Gly Leu Gly Leu Gly Leu Arg Lys
1 5 10

10

【0 5 4 5】

配列番号 7 6 - リンカー

【表 7 6】

Ser Leu Gly Leu Gly Leu Gly Leu Gly Leu Arg Lys
1 5 10

【0 5 4 6】

配列番号 7 7 - リンカー

【表 7 7】

Leu Gly Leu Gly Leu Gly Leu Gly Leu Arg Lys
1 5 10

20

【0 5 4 7】

配列番号 7 8 - リンカー

【表 7 8】

Gly Leu Gly Leu Gly Leu Gly Leu Arg Lys
1 5 10

【0 5 4 8】

配列番号 7 9 - リンカー

【表 7 9】

Leu Gly Leu Gly Leu Gly Leu Arg Lys
1 5

30

【0 5 4 9】

配列番号 8 0 - リンカー

【表 8 0】

Gly Leu Gly Leu Gly Leu Arg Lys
1 5

40

【0 5 5 0】

配列番号 8 1 - リンカー

【表 8 1】

Leu Gly Leu Gly Leu Arg Lys
1 5

【0 5 5 1】

配列番号 8 2 - リンカー

50

【表 8 2】

Gly Leu Gly Leu Arg Lys
1 5

【0 5 5 2】

配列番号 8 3 - リンカー

【表 8 3】

Leu Gly Leu Arg Lys
1 5

10

【0 5 5 3】

配列番号 8 4 - リンカー

【表 8 4】

Gly Leu Arg Lys
1

【0 5 5 4】

配列番号 8 5 - リンカー

【表 8 5】

Leu Arg Lys
1

20

【0 5 5 5】

配列番号 8 6 - リンカー

【表 8 6】

Arg Lys
1

【0 5 5 6】

配列番号 8 7 - リンカー

【表 8 7】

(Lys)_m、m=0~15
1

30

【0 5 5 7】

配列番号 8 8 - リンカー

【表 8 8】

D_m、m=1~15
1

40

【0 5 5 8】

配列番号 8 9 - 可溶性 N P P 1 - F c 融合タンパク質配列

50

【表 89 - 1】

Phe Thr Ala Gly Leu Lys <u>Pro Ser Cys</u> Ala Lys Glu Val Lys Ser Cys Lys Gly Arg Cys	
Phe Glu Arg Thr Phe Gly Asn Cys Arg Cys Asp Ala Ala Cys Val Glu Leu Gly Asn Cys	
Cys Leu Asp Tyr Gln Glu Thr Cys Ile Glu Pro Glu His Ile Trp Thr Cys Asn Lys Phe	
Arg Cys Gly Glu Lys Arg Leu Thr Arg Ser Leu Cys Ala Cys Ser Asp Asp Cys Lys Asp	
Lys Gly Asp Cys Cys Ile Asn Tyr Ser Ser Val Cys Gln Gly Glu Lys Ser Trp Val Glu	
Glu Pro Cys Glu Ser Ile Asn Glu Pro Gln Cys Pro Ala Gly Phe Glu Thr Pro Pro Thr	
Leu Leu Phe Ser Leu Asp Gly Phe Arg Ala Glu Tyr Leu His Thr Trp Gly Gly Leu Leu	
Pro Val Ile Ser Lys Leu Lys Lys Cys Gly Thr Tyr Thr Lys Asn Met Arg Pro Val Tyr	
Pro Thr Lys Thr Phe Pro Asn His Tyr Ser Ile Val Thr Gly Leu Tyr Pro Glu Ser His	
Gly Ile Ile Asp Asn Lys Met Tyr Asp Pro Lys Met Asn Ala Ser Phe Ser Leu Lys Ser	10
Lys Glu Lys Phe Asn Pro Glu Trp Tyr Lys Gly Glu Pro Ile Trp Val Thr Ala Lys Tyr	
Gln Gly Leu Lys Ser Gly Thr Phe Phe Trp Pro Gly Ser Asp Val Glu Ile Asn Gly Ile	
Phe Pro Asp Ile Tyr Lys Met Tyr Asn Gly Ser Val Pro Phe Glu Glu Arg Ile Leu Ala	
Val Leu Gln Trp Leu Gln Leu Pro Lys Asp Glu Arg Pro His Phe Tyr Thr Leu Tyr Leu	
Glu Glu Pro Asp Ser Ser Gly His Ser Tyr Gly Pro Val Ser Ser Glu Val Ile Lys Ala	
Leu Gln Arg Val Asp Gly Met Val Gly Met Leu Met Asp Gly Leu Lys Glu Leu Asn Leu	
His Arg Cys Leu Asn Leu Ile Leu Ile Ser Asp His Gly Met Glu Gln Gly Ser Cys Lys	
Lys Tyr Ile Tyr Leu Asn Lys Tyr Leu Gly Asp Val Lys Asn Ile Lys Val Ile Tyr Gly	
Pro Ala Ala Arg Leu Arg Pro Ser Asp Val Pro Asp Lys Tyr Tyr Ser Phe Asn Tyr Glu	
Gly Ile Ala Arg Asn Leu Ser Cys Arg Glu Pro Asn Gln His Phe Lys Pro Tyr Leu Lys	
His Phe Leu Pro Lys Arg Leu His Phe Ala Lys Ser Asp Arg Ile Glu Pro Leu Thr Phe	
Tyr Leu Asp Pro Gln Trp Gln Leu Ala Leu Asn Pro Ser Glu Arg Lys Tyr Cys Gly Ser	20
Gly Phe His Gly Ser Asp Asn Val Phe Ser Asn Met Gln Ala Leu Phe Val Gly Tyr Gly	
Pro Gly Phe Lys His Gly Ile Glu Ala Asp Thr Phe Glu Asn Ile Glu Val Tyr Asn Leu	
Met Cys Asp Leu Leu Asn Leu Thr Pro Ala Pro Asn Asn Gly Thr His Gly Ser Leu Asn	
His Leu Leu Lys Asn Pro Val Tyr Thr Pro Lys His Pro Lys Glu Val His Pro Leu Val	
Gln Cys Pro Phe Thr Arg Asn Pro Arg Asp Asn Leu Gly Cys Ser Cys Asn Pro Ser Ile	
Leu Pro Ile Glu Asp Phe Gln Thr Gln Phe Asn Leu Thr Val Ala Glu Glu Lys Ile Ile	
Lys His Glu Thr Leu Pro Tyr Gly Arg Pro Arg Val Leu Gln Lys Glu Asn Thr Ile Cys	
Leu Leu Ser Gln His Gln Phe Met Ser Gly Tyr Ser Gln Asp Ile Leu Met Pro Leu Trp	
Thr Ser Tyr Thr Val Asp Arg Asn Asp Ser Phe Ser Thr Glu Asp Phe Ser Asn Cys Leu	
Tyr Gln Asp Phe Arg Ile Pro Leu Ser Pro Val His Lys Cys Ser Phe Tyr Lys Asn Asn	
Thr Lys Val Ser Tyr Gly Phe Leu Ser Pro Pro Gln Leu Asn Lys Asn Ser Ser Gly Ile	
Tyr Ser Glu Ala Leu Leu Thr Thr Asn Ile Val Pro Met Tyr Gln Ser Phe Gln Val Ile	30
Trp Arg Tyr Phe His Asp Thr Leu Leu Arg Lys Tyr Ala Glu Glu Arg Asn Gly Val Asn	
Val Val Ser Gly Pro Val Phe Asp Phe Asp Tyr Asp Gly Arg Cys Asp Ser Leu Glu Asn	
Leu Arg Gln Lys Arg Arg Val Ile Arg Asn Gln Glu Ile Leu Ile Pro Thr His Phe Phe	
Ile Val Leu Thr Ser Cys Lys Asp Thr Ser Gln Thr Pro Leu His Cys Glu Asn Leu Asp	
Thr Leu Ala Phe Ile Leu Pro His Arg Thr Asp Asn Ser Glu Ser Cys Val His Gly Lys	
His Asp Ser Ser Trp Val Glu Glu Leu Leu Met Leu His Arg Ala Arg Ile Thr Asp Val	
Glu His Ile Thr Gly Leu Ser Phe Tyr Gln Gln Arg Lys Glu Pro Val Ser Asp Ile Leu	
Lys Leu Lys Thr His Leu Pro Thr Phe Ser <u>Gln Glu Asp</u> Leu Ile Asn Asp Lys Thr His	
Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu <u>Leu Gly Gly</u> Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro	
Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val	
Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val	
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser	40

【表 8 9 - 2】

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
 Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 Pro Gly Lys

10

二重下線：N P P 1 の始まりと終わり；太字の残基は F c 配列を示す

【 0 5 5 9 】

配列番号 9 0 — 可溶性 N P P 1 — F c のヌクレオチド配列

20

30

40

50

【表 90 - 1】

				ttca	ccgccggact	gaagcccagc	
tgcgccaaag	aagtgaagtc	ctgcaagggc	cgggtgcttcg	agcggacatt	cggcaactgc		
agatgcgacg	ccgcctgtgt	ggaactgggc	aactgctgcc	tggactacca	gaaacactgc		
atcgagcccg	agcacatctg	gacctgcaac	aagttcagat	gcggcgagaa	gcggctgacc		
agatccctgt	gtgcctgcag	cgacgactgc	aaggacaagg	gcgactgctg	catcaactac		
agcagcgtgt	gccagggcga	gaagtcctgg	gtggaagaac	cctgcgagag	catcaacgag		
ccccagtgcc	ctgccggctt	cgagacacct	cctaccctgc	tgttcagcct	ggacggcctt		
cgggccgagt	acctgcacac	atggggaggc	ctgctgcccc	tgatcagcaa	gctgaagaag		
tgcggcacct	acaccaagaa	catgcggccc	gtgtacccca	ccaagacctt	ccccaacccac		
tactccatcg	tgaccggcct	gtaccccag	agccacggca	tcacgcacaa	caagatgtac		
gaccccaaga	tgaacgccag	cttcagcctg	aagtccaaag	agaagttcaa	ccccgagtgg		10
tataaggcg	agcccatctg	ggtcacccgc	aagtaccagg	gcctgaaaag	cggcacattc		
ttttggcccc	gcagcgacgt	ggaaatcaac	ggcatcttcc	ccgacateta	taagatgtac		
aacggcagcg	tgcccttcga	ggaacggatc	ctggctgtgc	tgcagtggct	gcagctgccc		
aaggatgagc	ggccccactt	ctacacacctg	tacctggaag	aacctgacag	cagcggccac		
agctacggcc	ctgtgtccag	cgaagtgate	aaggccctgc	agcgggtgga	cggcatggtg		
ggaatgctga	tggaacggct	gaaagagctg	aacctgcaca	gatgcctgaa	cctgatcctg		
atcagcgacc	acggcatgga	acagggatcc	tgcaagaagt	acatctacct	gaacaagtac		
ctgggcgacg	tgaagaacat	caaagtgate	tacggcccag	ccgccagact	gaggcctagc		
gacgtgcccc	acaagtacta	cagcttcaac	tacgagggaa	tcgcccgga	cctgagctgc		
agagagccca	accagcactt	caagccctac	ctgaagcact	tcctgccccaa	gcggctgcac		
ttcgccaaga	gcgacagaat	cgagccctcg	accttctacc	tggaccccca	gtggcagctg		20
gccctgaatc	ccagcgagag	aaagtactgc	ggcagcggct	tcacggctc	cgacaacgtg		
ttcagcaaca	tgacggcct	gttcgtgggc	tacggaccgg	gctttaagca	cggcatcgag		
gccgacacct	tcgagaacat	cgaggtgtac	aatctgatgt	gcgacctgct	gaatctgacc		
cctgccccca	acaatggcac	ccacggcagc	ctgaaccatc	tgctgaagaa	ccccgtgtac		
accctaagc	accccaagaa	ggtgcacccc	ctggtgcagt	gcccccttac	cagaaacccc		
agagacaacc	tggtctgtag	ctgcaacccc	agcatcctgc	ccatcgagga	cttcagacc		
cagttcaacc	tgaccgtggc	cgaggaaaag	atcatcaagc	acgagacact	gccctacggc		
agaccccg	tgctgcagaa	agagaacacc	atctgcctgc	tgagccagca	ccagttcatg		
agcggctact	cccaggacat	cctgatgccc	ctgtggacca	gctacaccgt	ggaccggaac		
gacagcttct	ccaccgagga	tttcagcaac	tgcctgtacc	aggatttccg	gatccccctg		
agccccgtgc	acaagtgcag	cttctacaag	aacaacacca	aggtgtccta	cggcttctctg		
agccctcccc	agctgaacaa	gaacagctcc	ggcatctaca	gcgaggccct	gctgactacc		30
aacatcgtgc	ccatgtacca	gagcttccaa	gtgatctggc	ggtacttcca	cgacaccttg		
ctgcggaagt	acgccgaaga	acggaacggc	gtgaacgtgg	tgtccggccc	agtgttcgac		
ttcgactacg	acggcagatg	tgacagcctg	gaaaatctgc	ggcagaaaag	aagagtgate		
cggaaaccag	aaattctgat	ccctacccac	ttctttatcg	tgtcgacaag	ctgcaaggat		
accagccaga	ccccctgca	ctgcgagaa	ctggataccc	tggccttcat	cctgectcac		
cggaccgaca	acagcgagag	ctgtgtgcac	ggcaagcacg	acagctcttg	ggtggaagaa		
ctgctgatgc	tgacccgggc	cagaatcacc	gatgtggaac	acatcaccgg	cctgagcttt		
taccagcagc	ggaaagaacc	cgtgtccgat	atcctgaagc	tgaacaccca	tctgcccacc		
ttcagccagg	aagatgacaa	gacccacact	tgcctccccct	gcccagctcc	tgaactgctg		
ggaggaccct	ctgtgttctt	gttcccccca	aagcccaagg	acaccctgat	gatctctagg		
acccccgaag	tcacttgcgt	cgtcgtcgac	gtgtccacag	aggacctga	agtcaagttc		
aactggtagc	tcgacgggtg	cgaagtccac	aacgccaaga	ccaagcccag	ggaagaacag		40

【表 9 0 - 2】

tacaactcta cctaccggt cgtcagcgtc ctgaccgtcc tgcaccagga ctggtgaac
ggaaaggaat acaagtgcaa ggtgtccaac aaggccctgc ctgcccccat cgaaaagacc
atctctaagg ccaagggaca gccccgcgaa ccccaggtct acaccctgcc accctctagg
gaagaaatga ccaagaacca ggtgtccctg acctgcctgg tcaagggtt ctaccctct
gacatgcgctc tcgaatggga atctaacgga cagcccgaaa acaactacaa gaccaccccc
cctgtcctgg actctgacgg atcattcttc ctgtactcta agctgactgt cgacaagtct
aggtggcagc agggaaacgt gttctcttgc tctgtcatgc acgaagccct gcacaaccac
tacaccaga agtctctgtc tctgtccccc ggaaag

10

【0 5 6 0】

配列番号 9 1 - 可溶性 N P P 1 - (G L K) - F c 融合タンパク質配列

20

30

40

50

【表 9 1 - 1】

Gly	Leu	Lys	<u>Pro</u>	<u>Ser</u>	<u>Cys</u>	Ala	Lys	Glu	Val	Lys	Ser	Cys	Lys	Gly	Arg	Cys	Phe	Glu	Arg
Thr	Phe	Gly	Asn	Cys	Arg	Cys	Asp	Ala	Ala	Cys	Val	Glu	Leu	Gly	Asn	Cys	Cys	Leu	Asp
Tyr	Gln	Glu	Thr	Cys	Ile	Glu	Pro	Glu	His	Ile	Trp	Thr	Cys	Asn	Lys	Phe	Arg	Cys	Gly
Glu	Lys	Arg	Leu	Thr	Arg	Ser	Leu	Cys	Ala	Cys	Ser	Asp	Asp	Cys	Lys	Asp	Lys	Gly	Asp
Cys	Cys	Ile	Asn	Tyr	Ser	Ser	Val	Cys	Gln	Gly	Glu	Lys	Ser	Trp	Val	Glu	Glu	Pro	Cys
Glu	Ser	Ile	Asn	Glu	Pro	Gln	Cys	Pro	Ala	Gly	Phe	Glu	Thr	Pro	Pro	Thr	Leu	Leu	Phe
Ser	Leu	Asp	Gly	Phe	Arg	Ala	Glu	Tyr	Leu	His	Thr	Trp	Gly	Gly	Leu	Leu	Pro	Val	Ile
Ser	Lys	Leu	Lys	Lys	Cys	Gly	Thr	Tyr	Thr	Lys	Asn	Met	Arg	Pro	Val	Tyr	Pro	Thr	Lys
Thr	Phe	Pro	Asn	His	Tyr	Ser	Ile	Val	Thr	Gly	Leu	Tyr	Pro	Glu	Ser	His	Gly	Ile	Ile
Asp	Asn	Lys	Met	Tyr	Asp	Pro	Lys	Met	Asn	Ala	Ser	Phe	Ser	Leu	Lys	Ser	Lys	Glu	Lys
Phe	Asn	Pro	Glu	Trp	Tyr	Lys	Gly	Glu	Pro	Ile	Trp	Val	Thr	Ala	Lys	Tyr	Gln	Gly	Leu
Lys	Ser	Gly	Thr	Phe	Phe	Trp	Pro	Gly	Ser	Asp	Val	Glu	Ile	Asn	Gly	Ile	Phe	Pro	Asp
Ile	Tyr	Lys	Met	Tyr	Asn	Gly	Ser	Val	Pro	Phe	Glu	Glu	Arg	Ile	Leu	Ala	Val	Leu	Gln
Trp	Leu	Gln	Leu	Pro	Lys	Asp	Glu	Arg	Pro	His	Phe	Tyr	Thr	Leu	Tyr	Leu	Glu	Glu	Pro
Asp	Ser	Ser	Gly	His	Ser	Tyr	Gly	Pro	Val	Ser	Ser	Glu	Val	Ile	Lys	Ala	Leu	Gln	Arg
Val	Asp	Gly	Met	Val	Gly	Met	Leu	Met	Asp	Gly	Leu	Lys	Glu	Leu	Asn	Leu	His	Arg	Cys
Leu	Asn	Leu	Ile	Leu	Ile	Ser	Asp	His	Gly	Met	Glu	Gln	Gly	Ser	Cys	Lys	Lys	Tyr	Ile
Tyr	Leu	Asn	Lys	Tyr	Leu	Gly	Asp	Val	Lys	Asn	Ile	Lys	Val	Ile	Tyr	Gly	Pro	Ala	Ala
Arg	Leu	Arg	Pro	Ser	Asp	Val	Pro	Asp	Lys	Tyr	Tyr	Ser	Phe	Asn	Tyr	Glu	Gly	Ile	Ala
Arg	Asn	Leu	Ser	Cys	Arg	Glu	Pro	Asn	Gln	His	Phe	Lys	Pro	Tyr	Leu	Lys	His	Phe	Leu
Pro	Lys	Arg	Leu	His	Phe	Ala	Lys	Ser	Asp	Arg	Ile	Glu	Pro	Leu	Thr	Phe	Tyr	Leu	Asp
Pro	Gln	Trp	Gln	Leu	Ala	Leu	Asn	Pro	Ser	Glu	Arg	Lys	Tyr	Cys	Gly	Ser	Gly	Phe	His
Gly	Ser	Asp	Asn	Val	Phe	Ser	Asn	Met	Gln	Ala	Leu	Phe	Val	Gly	Tyr	Gly	Pro	Gly	Phe
Lys	His	Gly	Ile	Glu	Ala	Asp	Thr	Phe	Glu	Asn	Ile	Glu	Val	Tyr	Asn	Leu	Met	Cys	Asp
Leu	Leu	Asn	Leu	Thr	Pro	Ala	Pro	Asn	Asn	Gly	Thr	His	Gly	Ser	Leu	Asn	His	Leu	Leu
Lys	Asn	Pro	Val	Tyr	Thr	Pro	Lys	His	Pro	Lys	Glu	Val	His	Pro	Leu	Val	Gln	Cys	Pro
Phe	Thr	Arg	Asn	Pro	Arg	Asp	Asn	Leu	Gly	Cys	Ser	Cys	Asn	Pro	Ser	Ile	Leu	Pro	Ile
Glu	Asp	Phe	Gln	Thr	Gln	Phe	Asn	Leu	Thr	Val	Ala	Glu	Glu	Lys	Ile	Ile	Lys	His	Glu
Thr	Leu	Pro	Tyr	Gly	Arg	Pro	Arg	Val	Leu	Gln	Lys	Glu	Asn	Thr	Ile	Cys	Leu	Leu	Ser
Gln	His	Gln	Phe	Met	Ser	Gly	Tyr	Ser	Gln	Asp	Ile	Leu	Met	Pro	Leu	Trp	Thr	Ser	Tyr
Thr	Val	Asp	Arg	Asn	Asp	Ser	Phe	Ser	Thr	Glu	Asp	Phe	Ser	Asn	Cys	Leu	Tyr	Gln	Asp
Phe	Arg	Ile	Pro	Leu	Ser	Pro	Val	His	Lys	Cys	Ser	Phe	Tyr	Lys	Asn	Asn	Thr	Lys	Val
Ser	Tyr	Gly	Phe	Leu	Ser	Pro	Pro	Gln	Leu	Asn	Lys	Asn	Ser	Ser	Gly	Ile	Tyr	Ser	Glu
Ala	Leu	Leu	Thr	Thr	Asn	Ile	Val	Pro	Met	Tyr	Gln	Ser	Phe	Gln	Val	Ile	Trp	Arg	Tyr
Phe	His	Asp	Thr	Leu	Leu	Arg	Lys	Tyr	Ala	Glu	Glu	Arg	Asn	Gly	Val	Asn	Val	Val	Ser
Gly	Pro	Val	Phe	Asp	Phe	Asp	Tyr	Asp	Gly	Arg	Cys	Asp	Ser	Leu	Glu	Asn	Leu	Arg	Gln
Lys	Arg	Arg	Val	Ile	Arg	Asn	Gln	Glu	Ile	Leu	Ile	Pro	Thr	His	Phe	Phe	Ile	Val	Leu
Thr	Ser	Cys	Lys	Asp	Thr	Ser	Gln	Thr	Pro	Leu	His	Cys	Glu	Asn	Leu	Asp	Thr	Leu	Ala
Phe	Ile	Leu	Pro	His	Arg	Thr	Asp	Asn	Ser	Glu	Ser	Cys	Val	His	Gly	Lys	His	Asp	Ser
Ser	Trp	Val	Glu	Glu	Leu	Leu	Met	Leu	His	Arg	Ala	Arg	Ile	Thr	Asp	Val	Glu	His	Ile
Thr	Gly	Leu	Ser	Phe	Tyr	Gln	Gln	Arg	Lys	Glu	Pro	Val	Ser	Asp	Ile	Leu	Lys	Leu	Lys
Thr	His	Leu	Pro	Thr	Phe	Ser	<u>Gln</u>	<u>Glu</u>	<u>Asp</u>	Leu	Ile	Asn	<u>Asp</u>	<u>Lys</u>	<u>Thr</u>	<u>His</u>	<u>Thr</u>	<u>Cys</u>	<u>Pro</u>
<u>Pro</u>	<u>Cys</u>	<u>Pro</u>	<u>Ala</u>	<u>Pro</u>	<u>Glu</u>	<u>Leu</u>	<u>Gln</u>	<u>Gly</u>	<u>Leu</u>	<u>Pro</u>	<u>Ser</u>	<u>Val</u>	<u>Phe</u>	<u>Leu</u>	<u>Phe</u>	<u>Pro</u>	<u>Pro</u>	<u>Lys</u>	<u>Pro</u>
Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser
His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala
Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr

【表 9 1 - 2】

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
 Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

二重下線：N P P 1 の始まりと終わり；太字の残基は F c 配列を示す
【 0 5 6 1 】

配列番号 9 2 - 可溶性 N P P 1 - F c 融合タンパク質配列

【表 9 2 - 1】

Pro Ser Cys Ala Lys Glu Val Lys Ser Cys Lys Gly Arg Cys Phe Glu Arg Thr Phe Gly
Asn Cys Arg Cys Asp Ala Ala Cys Val Glu Leu Gly Asn Cys Cys Leu Asp Tyr Gln Glu
Thr Cys Ile Glu Pro Glu His Ile Trp Thr Cys Asn Lys Phe Arg Cys Gly Glu Lys Arg
Leu Thr Arg Ser Leu Cys Ala Cys Ser Asp Asp Cys Lys Asp Lys Gly Asp Cys Cys Ile
Asn Tyr Ser Ser Val Cys Gln Gly Glu Lys Ser Trp Val Glu Glu Pro Cys Glu Ser Ile
Asn Glu Pro Gln Cys Pro Ala Gly Phe Glu Thr Pro Pro Thr Leu Leu Phe Ser Leu Asp
Gly Phe Arg Ala Glu Tyr Leu His Thr Trp Gly Gly Leu Leu Pro Val Ile Ser Lys Leu
Lys Lys Cys Gly Thr Tyr Thr Lys Asn Met Arg Pro Val Tyr Pro Thr Lys Thr Phe Pro
Asn His Tyr Ser Ile Val Thr Gly Leu Tyr Pro Glu Ser His Gly Ile Ile Asp Asn Lys
Met Tyr Asp Pro Lys Met Asn Ala Ser Phe Ser Leu Lys Ser Lys Glu Lys Phe Asn Pro
Glu Trp Tyr Lys Gly Glu Pro Ile Trp Val Thr Ala Lys Tyr Gln Gly Leu Lys Ser Gly
Thr Phe Phe Trp Pro Gly Ser Asp Val Glu Ile Asn Gly Ile Phe Pro Asp Ile Tyr Lys
Met Tyr Asn Gly Ser Val Pro Phe Glu Glu Arg Ile Leu Ala Val Leu Gln Trp Leu Gln
Leu Pro Lys Asp Glu Arg Pro His Phe Tyr Thr Leu Tyr Leu Glu Glu Pro Asp Ser Ser
Gly His Ser Tyr Gly Pro Val Ser Ser Glu Val Ile Lys Ala Leu Gln Arg Val Asp Gly
Met Val Gly Met Leu Met Asp Gly Leu Lys Glu Leu Asn Leu His Arg Cys Leu Asn Leu
Ile Leu Ile Ser Asp His Gly Met Glu Gln Gly Ser Cys Lys Lys Tyr Ile Tyr Leu Asn
Lys Tyr Leu Gly Asp Val Lys Asn Ile Lys Val Ile Tyr Gly Pro Ala Ala Arg Leu Arg
Pro Ser Asp Val Pro Asp Lys Tyr Tyr Ser Phe Asn Tyr Glu Gly Ile Ala Arg Asn Leu
Ser Cys Arg Glu Pro Asn Gln His Phe Lys Pro Tyr Leu Lys His Phe Leu Pro Lys Arg
Leu His Phe Ala Lys Ser Asp Arg Ile Glu Pro Leu Thr Phe Tyr Leu Asp Pro Gln Trp
Gln Leu Ala Leu Asn Pro Ser Glu Arg Lys Tyr Cys Gly Ser Gly Phe His Gly Ser Asp
Asn Val Phe Ser Asn Met Gln Ala Leu Phe Val Gly Tyr Gly Pro Gly Phe Lys His Gly
Ile Glu Ala Asp Thr Phe Glu Asn Ile Glu Val Tyr Asn Leu Met Cys Asp Leu Leu Asn
Leu Thr Pro Ala Pro Asn Asn Gly Thr His Gly Ser Leu Asn His Leu Leu Lys Asn Pro
Val Tyr Thr Pro Lys His Pro Lys Glu Val His Pro Leu Val Gln Cys Pro Phe Thr Arg
Asn Pro Arg Asp Asn Leu Gly Cys Ser Cys Asn Pro Ser Ile Leu Pro Ile Glu Asp Phe
Gln Thr Gln Phe Asn Leu Thr Val Ala Glu Glu Lys Ile Ile Lys His Glu Thr Leu Pro
Tyr Gly Arg Pro Arg Val Leu Gln Lys Glu Asn Thr Ile Cys Leu Leu Ser Gln His Gln
Phe Met Ser Gly Tyr Ser Gln Asp Ile Leu Met Pro Leu Trp Thr Ser Tyr Thr Val Asp
Arg Asn Asp Ser Phe Ser Thr Glu Asp Phe Ser Asn Cys Leu Tyr Gln Asp Phe Arg Ile
Pro Leu Ser Pro Val His Lys Cys Ser Phe Tyr Lys Asn Asn Thr Lys Val Ser Tyr Gly
Phe Leu Ser Pro Pro Gln Leu Asn Lys Asn Ser Ser Gly Ile Tyr Ser Glu Ala Leu Leu
Thr Thr Asn Ile Val Pro Met Tyr Gln Ser Phe Gln Val Ile Trp Arg Tyr Phe His Asp
Thr Leu Leu Arg Lys Tyr Ala Glu Glu Arg Asn Gly Val Asn Val Val Ser Gly Pro Val
Phe Asp Phe Asp Tyr Asp Gly Arg Cys Asp Ser Leu Glu Asn Leu Arg Gln Lys Arg Arg
Val Ile Arg Asn Gln Glu Ile Leu Ile Pro Thr His Phe Phe Ile Val Leu Thr Ser Cys
Lys Asp Thr Ser Gln Thr Pro Leu His Cys Glu Asn Leu Asp Thr Leu Ala Phe Ile Leu
Pro His Arg Thr Asp Asn Ser Glu Ser Cys Val His Gly Lys His Asp Ser Ser Trp Val
Glu Glu Leu Leu Met Leu His Arg Ala Arg Ile Thr Asp Val Glu His Ile Thr Gly Leu
Ser Phe Tyr Gln Gln Arg Lys Glu Pro Val Ser Asp Ile Leu Lys Leu Lys Thr His Leu
Pro Thr Phe Ser Gln Glu Asp Leu Ile Asn **Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro**
Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His

10

20

30

40

【表 9 2 - 2】

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
 Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

二重下線：N P P 1 の始まりと終わり；太字の残基は F c 配列を示す

10

【 0 5 6 2 】

配列番号 9 3 - 可溶性 N P P 1 - F c 融合タンパク質配列

20

30

40

50

【表 9 3 - 1】

Ala	Pro	Ser	Cys	Ala	Lys	Glu	Val	Lys	Ser	Cys	Lys	Gly	Arg	Cys	Phe	Glu	Arg	Thr	Phe		
Gly	Asn	Cys	Arg	Cys	Asp	Ala	Ala	Cys	Val	Glu	Leu	Gly	Asn	Cys	Cys	Leu	Asp	Tyr	Gln		
Glu	Thr	Cys	Ile	Glu	Pro	Glu	His	Ile	Trp	Thr	Cys	Asn	Lys	Phe	Arg	Cys	Gly	Glu	Lys		
Arg	Leu	Thr	Arg	Ser	Leu	Cys	Ala	Cys	Ser	Asp	Asp	Cys	Lys	Asp	Lys	Gly	Asp	Cys	Cys		
Ile	Asn	Tyr	Ser	Ser	Val	Cys	Gln	Gly	Glu	Lys	Ser	Trp	Val	Glu	Glu	Pro	Cys	Glu	Ser		
Ile	Asn	Glu	Pro	Gln	Cys	Pro	Ala	Gly	Phe	Glu	Thr	Pro	Pro	Thr	Leu	Leu	Phe	Ser	Leu		
Asp	Gly	Phe	Arg	Ala	Glu	Tyr	Leu	His	Thr	Trp	Gly	Gly	Leu	Leu	Pro	Val	Ile	Ser	Lys		
Leu	Lys	Lys	Cys	Gly	Thr	Tyr	Thr	Lys	Asn	Met	Arg	Pro	Val	Tyr	Pro	Thr	Lys	Thr	Phe		
Pro	Asn	His	Tyr	Ser	Ile	Val	Thr	Gly	Leu	Tyr	Pro	Glu	Ser	His	Gly	Ile	Ile	Asp	Asn		
Lys	Met	Tyr	Asp	Pro	Lys	Met	Asn	Ala	Ser	Phe	Ser	Leu	Lys	Ser	Lys	Glu	Lys	Phe	Asn		10
Pro	Glu	Trp	Tyr	Lys	Gly	Glu	Pro	Ile	Trp	Val	Thr	Ala	Lys	Tyr	Gln	Gly	Leu	Lys	Ser		
Gly	Thr	Phe	Phe	Trp	Pro	Gly	Ser	Asp	Val	Glu	Ile	Asn	Gly	Ile	Phe	Pro	Asp	Ile	Tyr		
Lys	Met	Tyr	Asn	Gly	Ser	Val	Pro	Phe	Glu	Glu	Arg	Ile	Leu	Ala	Val	Leu	Gln	Trp	Leu		
Gln	Leu	Pro	Lys	Asp	Glu	Arg	Pro	His	Phe	Tyr	Thr	Leu	Tyr	Leu	Glu	Glu	Pro	Asp	Ser		
Ser	Gly	His	Ser	Tyr	Gly	Pro	Val	Ser	Ser	Glu	Val	Ile	Lys	Ala	Leu	Gln	Arg	Val	Asp		
Gly	Met	Val	Gly	Met	Leu	Met	Asp	Gly	Leu	Lys	Glu	Leu	Asn	Leu	His	Arg	Cys	Leu	Asn		
Leu	Ile	Leu	Ile	Ser	Asp	His	Gly	Met	Glu	Gln	Gly	Ser	Cys	Lys	Lys	Tyr	Ile	Tyr	Leu		
Asn	Lys	Tyr	Leu	Gly	Asp	Val	Lys	Asn	Ile	Lys	Val	Ile	Tyr	Gly	Pro	Ala	Ala	Arg	Leu		
Arg	Pro	Ser	Asp	Val	Pro	Asp	Lys	Tyr	Tyr	Ser	Phe	Asn	Tyr	Glu	Gly	Ile	Ala	Arg	Asn		
Leu	Ser	Cys	Arg	Glu	Pro	Asn	Gln	His	Phe	Lys	Pro	Tyr	Leu	Lys	His	Phe	Leu	Pro	Lys		
Arg	Leu	His	Phe	Ala	Lys	Ser	Asp	Arg	Ile	Glu	Pro	Leu	Thr	Phe	Tyr	Leu	Asp	Pro	Gln		
Trp	Gln	Leu	Ala	Leu	Asn	Pro	Ser	Glu	Arg	Lys	Tyr	Cys	Gly	Ser	Gly	Phe	His	Gly	Ser		20
Asp	Asn	Val	Phe	Ser	Asn	Met	Gln	Ala	Leu	Phe	Val	Gly	Tyr	Gly	Pro	Gly	Phe	Lys	His		
Gly	Ile	Glu	Ala	Asp	Thr	Phe	Glu	Asn	Ile	Glu	Val	Tyr	Asn	Leu	Met	Cys	Asp	Leu	Leu		
Asn	Leu	Thr	Pro	Ala	Pro	Asn	Asn	Gly	Thr	His	Gly	Ser	Leu	Asn	His	Leu	Leu	Lys	Asn		
Pro	Val	Tyr	Thr	Pro	Lys	His	Pro	Lys	Glu	Val	His	Pro	Leu	Val	Gln	Cys	Pro	Phe	Thr		
Arg	Asn	Pro	Arg	Asp	Asn	Leu	Gly	Cys	Ser	Cys	Asn	Pro	Ser	Ile	Leu	Pro	Ile	Glu	Asp		
Phe	Gln	Thr	Gln	Phe	Asn	Leu	Thr	Val	Ala	Glu	Glu	Lys	Ile	Ile	Lys	His	Glu	Thr	Leu		
Pro	Tyr	Gly	Arg	Pro	Arg	Val	Leu	Gln	Lys	Glu	Asn	Thr	Ile	Cys	Leu	Leu	Ser	Gln	His		
Gln	Phe	Met	Ser	Gly	Tyr	Ser	Gln	Asp	Ile	Leu	Met	Pro	Leu	Trp	Thr	Ser	Tyr	Thr	Val		
Asp	Arg	Asn	Asp	Ser	Phe	Ser	Thr	Glu	Asp	Phe	Ser	Asn	Cys	Leu	Tyr	Gln	Asp	Phe	Arg		
Ile	Pro	Leu	Ser	Pro	Val	His	Lys	Cys	Ser	Phe	Tyr	Lys	Asn	Asn	Thr	Lys	Val	Ser	Tyr		
Gly	Phe	Leu	Ser	Pro	Pro	Gln	Leu	Asn	Lys	Asn	Ser	Ser	Gly	Ile	Tyr	Ser	Glu	Ala	Leu		
Leu	Thr	Thr	Asn	Ile	Val	Pro	Met	Tyr	Gln	Ser	Phe	Gln	Val	Ile	Trp	Arg	Tyr	Phe	His		30
Asp	Thr	Leu	Leu	Arg	Lys	Tyr	Ala	Glu	Glu	Arg	Asn	Gly	Val	Asn	Val	Val	Ser	Gly	Pro		
Val	Phe	Asp	Phe	Asp	Tyr	Asp	Gly	Arg	Cys	Asp	Ser	Leu	Glu	Asn	Leu	Arg	Gln	Lys	Arg		
Arg	Val	Ile	Arg	Asn	Gln	Glu	Ile	Leu	Ile	Pro	Thr	His	Phe	Phe	Ile	Val	Leu	Thr	Ser		
Cys	Lys	Asp	Thr	Ser	Gln	Thr	Pro	Leu	His	Cys	Glu	Asn	Leu	Asp	Thr	Leu	Ala	Phe	Ile		
Leu	Pro	His	Arg	Thr	Asp	Asn	Ser	Glu	Ser	Cys	Val	His	Gly	Lys	His	Asp	Ser	Ser	Trp		
Val	Glu	Glu	Leu	Leu	Met	Leu	His	Arg	Ala	Arg	Ile	Thr	Asp	Val	Glu	His	Ile	Thr	Gly		
Leu	Ser	Phe	Tyr	Gln	Gln	Arg	Lys	Glu	Pro	Val	Ser	Asp	Ile	Leu	Lys	Leu	Lys	Thr	His		
Leu	Pro	Thr	Phe	Ser	<u>Gln</u>	<u>Glu</u>	<u>Asp</u>	Leu	Ile	Asn	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys		
Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp		
Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu		
Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr		
Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu		40

【表 9 3 - 2】

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

二重下線：N P P 1 の始まりと終わり；太字の残基は F c 配列を示す

【 0 5 6 3 】

配列番号 9 4－リンカー

【表 9 4】

Gly Gly Gly Gly Ser

【 0 5 6 4 】

配列番号 9 5－ E N P P 1－F c バリエーションの例－（E N P P 1 部分は I 3 3 2 T 変異（配列番号 1 に示される E N P P 1 W T タンパク質に基づく変異位置番号）を有し、I g G 1 F c 部分は M 2 5 2 Y、S 2 5 4 T 変異および T 2 5 6 E 変異（E U 番号による変異位置）を有する

10

【表 9 5】

MTRLTVLALLAGLLASSRAAPSCAKEVKSCKGRFCFERTFGNCRCDAAACVELGNCCLDYQETCIEPEHIWTCNKFRCGEKRLT
 RSLCACSDDCDKGDCCINYSSVCQGEKSWVEEPCESINEPQCPAGFETPPTLLFSLDGFRAEYLHTWGGLLPVISKLKCG
 TYTKNMRPVYPTKTFPNHYSIVTGLYPESHGIIIDNKMYDPKMNASFSLKSKEKFNPEWYKGEPIWVTAKYQGLKSGTFFWPG
 SDVEINGTFPDIYKMYNGSVPFEEIRILAVLQWLQLPKDERPHFYTLYLEEPDSSGHSYGPVSSEVIKALQRVDGMVGMMDG
 LKELNLHRCLNLILISDHGMEQGSCKKYIYLNKYLGDKNIKVIYGPAARLRPSDVPDKYYSFNYEGIARNLSCREPNQHFK
 PYLKHFLPKRLHFAKSDRIEPLTFYLDPQWQLALNPSEKRYCGSGFHGSDNVFSNMQALFVGYPGFKGIEADTFENIEVY
 NLMCDLLNLTPAPNNGTHGSLNHLLKNPVYTPKHPKEVHPLVQCPFTRNPRDNLGCSCNP SILPIEDFQTQFNLTVAEEKII
 KHETLPYGRPRVLQKENTICLLSQHQFMSGYSQDILMPLWTSYTVDRNDSFSTEDFSNCLYQDFRIPLSPVHKCSFYKNNTK
 VSYGFLSPPQLNKNSSGIYSEALLTNIIVPMYQSFQVIWRYFHDTLRLKYAEERNGVNVVSGPVDFDYGRCDSLENLRQK
 RRVIRNQEILIPTHFFIVLTSCKDTSQTPLHCENLDLAFILPHRTDNSESCVHGKHDSSWVEELMLHRARITDVEHITGL
 SFYQQRKEPVSDILKLKTHLPTFSQEDGGGSDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHED
 PEVKFNWYVDGVEVHNAAKTPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLTP
 PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSFSVMHEALHN
 HTQKSLSLSPGK（配列番号 95_）

20

【 0 5 6 5 】

アノテーションキー：

30

- ・下線のアミノ酸配列：アズロシジンシグナルペプチド；
- ・二重下線のアミノ酸配列：3 3 2 位で単一アミノ酸置換を含むバリエーションヒト可溶性 E N P P 1 ポリペプチド（I 3 3 2 T、太字）；
- ・イタリック体アミノ酸配列：リンカーアミノ酸配列、および
- ・非修飾アミノ酸配列部分：太字で識別された三つのアミノ酸置換を含むバリエーションヒト I g G 1 F c 部分。

【 0 5 6 6 】

配列番号 9 6－E N P P 3－F c バリエーションの例－（E N P P 3 部分は変異を有さず、I g G 1 F c 部分は E U 番号による M 2 5 2 Y、S 2 5 4 T および T 2 5 6 E 変異を有する）

40

【表 9 6】

MTRLTVLALLAGLLASSRA**AKQGSCRKKCFDASFRGLENCRCDVACKDRGDCCWDFEDTCVESTRIWMCNKFRCGETRLE
ASLSCSDDCLQRKDCCADYKSVCCGETSWLEENCDTAQSSQCPEGFDLPPVILFSMDGFRAEYLYTWDTLMPNINKLKTG
IHSKYMRAMYPTKTFPNHYTIVTGLYPESHGIIIDNNMYDVNLNKNFSLSSKEQNNPAWWHGQPMNLTAMYQGLKAATYFWPG
SEVAINGSFPSIYMPYNGSVPFEEIRSTLLKWLDLPKAERPRFYTMFEEDSSGHAGGPVSARVIKALQVVDHAFGMLMEG
LKQRNLHNCVNIILLADHGMDQTYCNKMEYMTDYFPRINFFYMYEGPAPRIAHNIPHDFFSFNSEEIVRNLSCRKPDQHF
PYLTPDLPKRLHYAKNVRIDKVHLFVDQQLAVRSKSNNTNCGGNHGYNNEFRSMEAIFLAHGSPFKEKTEVEPFENIEVYN
LMCDLLRIQPAPNNGTHGSLNHLKVPFYEP SHAEEVSKFVCGFANPLPTESLDCFCPHLQNSTQLEQVNQMLNLTQEEIT
ATVKVNLFPGRPRVLQKNVDHCLLYHREYVSGFGKAMRMPWSSYTVPQLGDTSPLPPTVPDCLRADVRVPPSESQKCSFY
ADKNITHGFLYPASNRTSDSQYDALITSNLVPMYEEFRKMWDYFHSVLLIKHATERNGVNVVSGPIFDYNYDGHFDAPDEI
TKHLANTDVPIPTHYFVLTSCNKSHTPENCPGWLDPFIIPHRPTNVESCEPKPEALWVEERFTHAIARVRDVELLTG
LDIFYQDKVQPVSEILQLKTYLPTFETTIGGGSDKTHTCPPCAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHE
 DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
 PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGSSFLYSLKLTVDKSRWQQGNVFSQVMHEALH
 NHYTQKSLSLSPGK (配列番号 96)。

10

【0 5 6 7】

アノテーションキー：

- ・下線のアミノ酸配列：アズロシジンシグナルペプチド；
 - ・二重下線のアミノ酸配列：バリエーション可溶性 ENPP3 ポリペプチド
 - ・イタリック体アミノ酸配列：リンカーアミノ酸配列、および
 - ・非修飾アミノ酸配列部分：太字で識別された三つのアミノ酸置換を含むバリエーション
- I g G 1 F c 部分。

20

＊ ＊ － シグナル配列の切断点を示す。

【0 5 6 8】

配列番号 9 7 － ハイブリッド肝臓プロモーター (HLP)

【表 9 7】

tgtttgctgcttgcattgtttgcccatttaggggtggacacaggacgctgtggtttctgagccagggggcgactcagatccc
 agccagtggacttagccctgtttgctcctcgataactggggtgaccttggttaatatcaccagcagcctccccgttgc
 ccctctggatccactgcttaataacggacgaggacagggccctgtctcctcagcttcaggcaccaccactgacctgggacag
 tgaatc

30

【0 5 6 9】

本発明による医薬組成物

本発明による AAV ベクターは、医薬組成物における前述のベクターの製剤化を必要とする従来の方法によって、ヒトまたは動物の体に投与することができる。一実施形態では、本発明は、組み換えウイルスゲノムを含む AAV ベクターを含む医薬組成物（以下、本発明による医薬組成物という）に関し、前述の組み換えウイルスゲノムは、ENPP1 もしくは ENPP3 またはその機能的に等価なバリエーションをコードするヌクレオチド配列に動作可能に連結された転写調節領域を含む発現カセットを含む。

40

【0 5 7 0】

アデノ随伴ウイルスベクター、単純ヘルペスベクター、アデノウイルスベクター、アルファウイルスベクター、およびレンチウイルスベクターに関連して開示されるすべての実施形態は、本発明による医薬組成物にも適用可能である。

【0 5 7 1】

一部の実施形態では、医薬組成物は、本発明による AAV ベクターの治療有効量および薬学的に許容可能な担体を含み得る。一部の実施形態では、医薬組成物は、本発明によるアデノウイルスベクターの治療有効量および薬学的に許容可能な担体を含み得る。

【0 5 7 2】

一部の実施形態では、医薬組成物は、本発明によるレンチウイルスベクターの治療有効

50

量および薬学的に許容可能な担体を含み得る。

【0573】

一部の実施形態では、医薬組成物は、本発明によるアルファウイルスベクターの治療有効量および薬学的に許容可能な担体を含み得る。

【0574】

一部の実施形態では、医薬組成物は、本発明による単純ヘルペスウイルスベクターの治療有効量および薬学的に許容可能な担体を含み得る。

【0575】

用語「治療有効量」は、所望の効果を生成するために計算された本発明によるAAVベクターの数量を指し、他にも理由はあるが、本発明によるウイルスベクターの自体の特徴および得られる治療効果によって一般的に決定される。疾患の治療に有効であろう本発明によるウイルスベクターの量は、本明細書に記載される、または当技術分野で公知の標準的な臨床技術によって決定することができる。さらに、インビトロ試験を任意選択的に使用して、最適な用量範囲の特定を助けることもできる。製剤で使用するための正確な用量は、投与経路、および状態の重症度に依存し、医師の判断で、および各患者の状況に応じて決定されるべきである。

【0576】

プロモーター

遺伝子療法で使用されるベクターは、発現カセットを必要とする。発現カセットは、プロモーター、治療遺伝子、およびポリアデニル化信号の三つの重要な構成要素からなる。プロモーターは、治療遺伝子の発現を制御するために不可欠である。組織特異的プロモーターは、特定の細胞型においてのみ活性を有するプロモーターである。発現カセットにおける組織特異的プロモーターの使用は、望ましくない導入遺伝子発現を制限し、また持続的な導入遺伝子発現を促進することができる。遺伝子療法に一般的に使用されるプロモーターには、サイトメガロウイルス最初期(CMV-IE)プロモーター、ラウス肉腫ウイルスロング末端反復(RSV-LTR)、モロニー Maus 白血病ウイルス(MoMLV) LTR、および他のレトロウイルスLTRプロモーターが含まれる。真核性プロモーターは、遺伝子療法に使用することができる。真核性プロモーターの一般的な例としては、ヒト α 1-抗トリプシン(hAAT)およびマウスRNAポリメラーゼII(大型サブユニット)プロモーターが挙げられる。小核RNA U1bプロモーター、EF1aプロモーター、およびPGK1プロモーターなどの非組織特異的プロモーターも、遺伝子療法での使用に利用可能である。Apo A-I、Apo Eおよび α 1-抗トリプシン(hAAT)などの組織特異的プロモーターは、遺伝子療法における目的のタンパク質の組織特異的発現を可能にする。Papadakis et al. の表I (Promoters and Control Elements: Designing Expression Cassettes for Gene Therapy, Current Gene Therapy, 2004, 4, 89-113) は、遺伝子療法における真核性プロモーターを使用した転写標的化の例を列挙しており、それらすべては参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0577】

用量および投与方法

AAV力価は、1ml (vg/ml) または (vg/kg) のベクターまたはウイルスゲノム当たりの1キログラム用量当たりのベクターまたはウイルスゲノムにおける「物理的」力価として与えられる。精製されたベクター粒子のQPCRを使用して、力価を決定することができる。AAV VG数滴定を実施する方法の一つは、以下のとおりである：精製されたAAVベクター試料は、最初にDNaseで処理され、生産プロセスからカプシド化されていないAAVゲノムDNAまたは汚染プラスミドDNAを除去する。次に、DNase耐性粒子を熱処理して、カプシドからゲノムを放出する。放出されたゲノムは、ウイルスゲノムの特定の領域を標的とするプライマー/プローブセットを使用したリアルタイムPCRによって定量化される。

【0578】

ウイルス組成物は、ヒト患者に対して、約 $1.0 \times 10^9 \text{ vg/kg}$ ～約 $1.0 \times 10^{15} \text{ vg/kg}$ 、および好ましくは $1.0 \times 10^{12} \text{ vg/kg}$ ～ $1.0 \times 10^{14} \text{ vg/kg}$ の範囲内の量のウイルスベクターを含む用量単位で製剤化され得る。好ましくは、製剤中のウイルスの用量は、 $1.0 \times 10^9 \text{ vg/kg}$ 、 $5.0 \times 10^9 \text{ vg/kg}$ 、 $1.0 \times 10^{10} \text{ vg/kg}$ 、 $5.0 \times 10^{10} \text{ vg/kg}$ 、 $1.0 \times 10^{11} \text{ vg/kg}$ 、 $5.0 \times 10^{11} \text{ vg/kg}$ 、 $1.0 \times 10^{12} \text{ vg/kg}$ 、 $5.0 \times 10^{12} \text{ vg/kg}$ 、 $1.0 \times 10^{13} \text{ vg/kg}$ 、 $5.0 \times 10^{13} \text{ vg/kg}$ 、 $1.0 \times 10^{14} \text{ vg/kg}$ 、 $5.0 \times 10^{14} \text{ vg/kg}$ 、 $1.0 \times 10^{15} \text{ vg/kg}$ 、または $5.0 \times 10^{15} \text{ vg/kg}$ である。

10

【0579】

一部の実施形態では、本発明による文脈において哺乳動物、特にヒトに投与される用量は、特定のウイルスベクター、ベクターおよびその担体を含む組成物（上記で論じたように）、および投与様式によって変化する。用量は、望ましい応答、例えば、治療的または予防的応答を、望ましい時間枠内でもたらすのに十分な量である。ウイルスベクターに関しては、用量は、最大 $1 \times 10^{15} \text{ vg/kg}$ とすることができる。

【0580】

本発明のベクターは、長期の遺伝子発現を可能にし、治療用タンパク質の長期効果をもたらす。「長期的発現」、「維持的発現」および「持続的発現」という語句は、互換的に使用される。本発明による長期的発現は、好ましくは治療レベルでの、少なくとも45日間、少なくとも60日間、少なくとも90日間、少なくとも120日間、少なくとも180日間、少なくとも250日間、少なくとも360日間、少なくとも450日間、少なくとも730日間以上の、治療遺伝子および／またはタンパク質の発現を意味する。好ましくは、長期的発現は、少なくとも90日間、少なくとも120日間、少なくとも180日間、少なくとも250日間、少なくとも360日間、少なくとも450日間、少なくとも720日間以上、より好ましくは、少なくとも360日間、少なくとも450日間、少なくとも720日間以上の発現を意味する。この長期的発現は、反復投与（可能であれば）または単回投与によって達成され得る。

20

【0581】

反復投与は、1日2回、1日1回、週2回、週1回、月1回、二か月毎、三か月毎、四か月毎、六か月毎、一年毎、二年毎以上の期間毎で投与されてもよい。投薬は、例えば、少なくとも六か月、少なくとも一年、二年、三年、四年、五年、十年、十五年、二十年以上の期間、治療される患者の生涯に至るまで、必要なだけ継続され得る。

30

【0582】

本発明による医薬組成物は、局所的または全身的に、筋肉内、静脈内および非経口的に投与され得る。本発明による治療用組成物の送達は、中枢神経系、心臓系、および肺系に向けることができる。一般的な送達戦略は、直接的な筋肉注射である。非限定的な例として、骨格筋は、効率的に形質導入される標的組織型であることが示されている。形質導入されると、筋細胞は、多くのAAVバリエーションによって局所的または全身的に作用できるタンパク質産物の産生部位としての役目を果たす。

40

【0583】

一実施形態では、医薬組成物は、その細胞が形質導入される組織または器官の近くに投与される。特定の実施形態では、本発明による医薬組成物は、肝実質内への注射により、肝内で局所的に投与される。別の実施形態では、本発明による医薬組成物は全身的に投与される。

【0584】

非限定的な例として、全身投与は、例えば筋肉内（im）、血管内（ie）、動脈内（ia）、静脈内（iv）、腹腔内（ip）、または皮下注射などの本発明によるAAVベクターの全身注射を含む。好ましくは、全身投与は、im、ip、is、またはiv注射を介したものである。一部の実施形態では、本発明によるAAVベクターは、静脈内注射

50

を介して投与される。

【0585】

別の実施形態では、本発明による医薬組成物は、対象の肝臓に送達される。肝臓への投与は、限定されないが、静脈内投与、門脈内投与、胆管内投与、動脈内投与、および肝実質への直接注射を含む、当技術分野に公知の方法を使用して達成される。別の実施形態では、医薬組成物は静脈内投与される。

【0586】

本発明による医薬組成物は、単回投与で投与されてもよく、または本発明による特定の実施形態では、複数の用量（例えば、二回、三回、四回以上の投与）を使用して治療効果を達成してもよい。好ましくは、本発明による医薬組成物に含まれるAAVベクターは、中和抗体の効果を排除するために複数回用量が必要とされる場合、異なる血清型由来である。

10

【0587】

製剤

調製物はまた、緩衝塩を含んでもよい。代替的に、組成物は、使用前に適切なビヒクル（例えば、滅菌された発熱物質を含まない水）を用いる構成のための粉末形態であってもよい。必要に応じて、組成物はまた、注射部位の痛みを軽減するためのリドカインなどの局所麻酔薬を含んでもよい。組成物が浸潤によって投与される場合、医薬品質の水または生理食塩水を含有する浸潤ボトルで分注することができる。組成物が注射によって投与される場合、注射液または滅菌生理食塩水のために水バイアルが提供されてもよく、それによって、成分が投与前に混合され得る。好ましくは、薬学的に許容可能な担体は、生理食塩水およびPluronic（登録商標）などの洗浄剤である。

20

【0588】

本発明による組成物は、獣医学用途で動物（例えば、家畜（ウシ、ブタ、その他））、および他の非ヒト哺乳類対象、ならびにヒト対象への送達のために製剤化されてもよい。AAVベクターは、遺伝子導入および遺伝子治療の適用において使用する生理学的に許容可能な担体を用いて製剤化することができる。非限定的な例として、本発明によるAAVベクターと組み合わせた、または混合したアジュバントの使用も包含される。企図されるアジュバントには、鉍塩アジュバントまたは鉍塩ゲルアジュバント、粒子アジュバント、微粒子アジュバント、粘膜アジュバントが含まれるが、これらに限定されない。アジュバントは、本発明によるAAVベクターとの混合物として対象に投与されてもよく、または前述のAAVベクターと組み合わせて使用されてもよい。

30

【0589】

本明細書で互換的に使用される用語「薬学的に許容可能な担体」、「薬学的に許容可能な希釈剤」、「薬学的に許容可能な賦形剤」、または「薬学的に許容可能なビヒクル」は、任意の従来的なタイプの非毒性の固体、半固体、または液体充填剤、希釈剤、封入材料、または製剤補助剤を指す。薬学的に許容可能な担体は、使用される用量および濃度で、レシピエントにとって本質的に非毒性であり、製剤の他の成分と適合性がある。薬学的に許容可能な担体の数および性質は、所望の投与形態に依存する。薬学的に許容可能な担体は既知であり、当技術分野で周知の方法によって調製されてもよい（Faulstich, C., “Tratado de Farmacia Galenica”. Ed. Luzan 5, S. A., Madrid, ES, 1993; Genaro A, Ed., “Remington: The Science and Practice of Pharmacy” 20th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa., U S, 2003）。

40

【0590】

非限定的な例として、AAVベクターは、注射（例えば、ボラス注射または連続注入）による非経口投与のために製剤化され得る。注射のための製剤は、添加された防腐剤とともに単位剤形（例えば、アンプルまたは複数回用量容器）で提示され得る。ウイルス組

50

成物は、油性または水性ビヒクル中の懸濁液、溶液、またはエマルションなどの形態を取ってもよく、懸濁剤、安定化剤、または分散剤などの配合剤を含んでもよい。A A V 製剤の液体調製物は、懸濁剤（例えば、ソルビトールシロップ、セルロース誘導体、または水素化食用脂肪）、乳化剤（例えば、レシチンまたはアカシア）、非水性ビヒクル（例えば、アーモンドオイル、油性エステル、エチルアルコールまたは分画植物油）、および防腐剤（例えば、メチルまたはプロピル-p-ヒドロキシベンゾエートまたはソルビン酸）などの薬学的に許容可能な添加剤を用いて、従来の手段によって調製され得る。

【0591】

非経口投与に適した製剤には、水性および非水性の等張性滅菌注射液が含まれ、これは、製剤を意図したレシipientの血液と等張にする抗酸化剤、緩衝剤、バクテリオスタット、および溶質、ならびに懸濁剤、可溶化剤、増粘剤、安定剤、および保存剤を含み得る水性および非水性の滅菌懸濁液が含まれる。製剤は、単位用量または複数回用量のアンフルおよびバイアルなどの密封容器に提示することができ、例えば、使用直前の、注射のための水などの滅菌液体賦形剤の添加のみを必要とする凍結乾燥（凍結乾燥）状態で保存することができる。即時の注射溶液および懸濁液は、前述の滅菌粉末、顆粒、および錠剤の類から調製することができる。

【0592】

さらに、組成物は、追加の治療剤または生物活性剤を含み得る。例えば、特定の適応症の治療に有用な治療因子が存在し得る。イブプロフェンまたはステロイドなどの炎症を制御する因子は、ベクターのインビボ投与および生理学的苦痛に関連する腫れおよび炎症を減少させるための組成物の一部であり得る。免疫系抑制剤は、ベクター自体に対する、または障害と関連する免疫応答を低減する合成方法を用いて投与することができる。免疫抑制薬または免疫抑制剤の投与は、意図的に誘発された免疫抑制の主な方法であり、最適な状況では、免疫抑制剤は、免疫系の任意の超活性成分のみを標的とする。

【0593】

免疫抑制剤、免疫抑制薬、または抗拒絶剤は、免疫系の活性を阻害または予防する薬剤である。かかる薬剤には、グルココルチコイド、細胞分裂阻害剤、抗体、イムノフィリンに作用する薬剤が含まれる。薬理的（超生理学的）用量では、プレドニゾン、デキサメタゾン、およびヒドロコルチゾンなどのグルココルチコイドが、様々なアレルギー性および炎症性反応を抑制するために使用される。プリン類似体などの細胞分裂阻害剤、窒素マスタード（シクロホスファミド）などのアルキル化剤、ニトロソウレア、プラチナ化合物、およびその他。シクロホスファミド（Baxter's Cytosan）は、おそらく最も強力な免疫抑制化合物である。代謝拮抗物質、例えば、メトトレキサートなどの葉酸類似体、アザチオプリンおよびメルカプトプリンなどのプリン類似体、フルオロウラシルなどのピリミジン類似体、およびタンパク質合成阻害剤。細胞傷害性抗生物質の中では、ダクチノマイシンが最も重要である。それは、腎臓移植に使用される。他の細胞傷害性抗生物質は、アントラサイクリン、マイトマイシンC、プレオマイシン、ミトラマイシンである。抗体は、時に、急性拒絶反応（例えば抗-CD20モノクローナル）を防止する、迅速で強力な免疫抑制療法として使用されることがある。

【0594】

あるいは、免疫エンハンサーを組成物中に含めて、疾患に対する体の天然防御を上方制御することができる。

【0595】

遺伝子導入手順および他の障害に関連する感染のリスクを減少させるために、抗生物質、すなわち、殺菌剤および殺菌剤が存在し得る。

【0596】

医薬組成物は、ヒトへの静脈内、皮下、または筋肉内投与に適合された医薬組成物として、日常的な手順に従って製剤化することができる。

【0597】

本発明による治療方法

非限定的な例として、ヒト ENPP1 または ENPP3 をコードするウイルスベクターは哺乳動物に投与され、ENPP1 または ENPP3 をコードする DNA の送達、および哺乳動物におけるタンパク質の発現をもたらす、それによって、軟部組織における石灰化または骨化を低減するために必要な ENPP1 または ENPP3 のレベルが復元される。

【0598】

一態様では、本発明は、組み換えウイルスゲノムを含むアデノ随伴ウイルスベクターに関し、前述の組み換えウイルスゲノムは、病理学的石灰化または骨化の疾患の治療および／または予防に使用のための、ENPP1 もしくは ENPP3 もしくはその機能的に均等なバリエーションもしくは前述のウイルスベクターを含む医薬組成物をコードするヌクレオチド配列に動作可能に連結された転写調節領域を含む発現カセットを含む。

10

【0599】

別の態様では、本発明は、組み換えウイルスゲノムを含むアデノ随伴ウイルスベクターの使用に関し、前述の組み換えウイルスゲノムは、病理学的石灰化または骨化の疾患の治療および／または予防のための薬剤の製造のための、ENPP1 もしくは ENPP3 もしくはその機能的に均等なバリエーションもしくは前述のウイルスベクターを含む医薬組成物をコードするヌクレオチド配列に動作可能に連結された転写調節領域を含む発現カセットを含む。

【0600】

別の態様では、本発明は、病理学的石灰化または骨化の疾患の治療および／または予防のための方法を、それを必要とする対象において提供し、方法は、組み換えウイルスゲノムを含むアデノ随伴ウイルスベクターの前述の対象への投与を含み、前述の組み換えウイルスゲノムは、ENPP1 もしくは ENPP3、またはその機能的に均等なバリエーション、または前述のウイルスベクターを含む医薬組成物をコードするヌクレオチド配列に動作可能に連結された転写調節領域を含む発現カセットを含む。

20

【0601】

別の態様では、本発明の組成物および方法によって治療される病理学的石灰化または骨化の疾患は、X連鎖性低リン血症 (XLP)、慢性腎臓疾患 (CKD)、ミネラル骨障害 (MBD)、血管石灰化、軟部組織の病理学的石灰化、軟部組織の病理学的骨化、乳児の全身性動脈石灰化 (GACI)、後縦靱帯の骨化 (OPLL) からなる群から選択される。

30

【0602】

別の態様では、本開示は、Enpp1 欠損個体または対象、または Enpp3 欠損個体または対象、または骨欠損の補正を必要とする哺乳動物または固体または対象の骨欠損を補正する方法であって、請求項 26～32 の任意の一項に記載のウイルスベクターを投与することを含み、ウイルスベクターは (a) 肝臓特異的プロモーターおよび (a) 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 (ENPP1) ポリペプチドまたは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 3 (ENPP3) ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む核酸を含み、一部の実施形態では、肝臓特異的プロモーターは、肝臓プロモーター 1 (LP1) およびハイブリッド肝臓プロモーター (HLP) からなる群から選択され、一部の実施形態では、ベクターは、ポリアデニル化信号をコードする配列を含み、一部の実施形態では、ベクターは、アズロシグナルペプチドであるシグナルペプチドをコードし、一部の実施形態では、ウイルスベクターは、アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターであり、一部の実施形態では、AAV ベクターは、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、および AAV-rh74 からなる群から選択される血清型を有し、一部の実施形態では、ウイルスベクターは、(a) 肝臓特異的プロモーター、および (a) 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 (ENPP1) ポリペプチドまたは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 3 (ENPP3) ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む組み換え核酸を含み、一部の実施形態では、前述の ENPP1 ポリペプチドまたは前述の ENPP3 ポリペ

40

50

チドをコードする前述のヌクレオチド配列は、可溶性 E N P P 1 または可溶性 E N P P 3 ポリペプチドをコードし、一部の実施形態では、前述の核酸は、前述のコードされたポリペプチドを発現することができるベクターまたはプラスミドを含み、一部の実施形態では、前述のベクターはウイルスベクターであり、一部の実施形態では、前述のウイルスベクターは、アデノ随伴ウイルス (A A V) ベクターであり、一部の実施形態では、前述の核酸はアズロシジニングナルペプチドをコードし、前述のシグナルペプチドは前述の E N P P 1 ポリペプチドまたは前述の E N P P 3 ポリペプチドと動作可能に関連付けられ、一部の実施形態では、前述の E N P P 1 ポリペプチドまたは前述の E N P P 3 ポリペプチドをコードする前述のヌクレオチド配列は、前述の E N P P 1 ポリペプチドまたは前述の E N P P 3 ポリペプチドおよび異種タンパク質を含む E N P P 1 または E N P P 3 融合タンパク質をコードし、一部の実施形態では、前述のヌクレオチド配列によってコードされる前述の E N P P 1 融合タンパク質または E N P P 3 融合タンパク質は、異種タンパク質を含まない E N P P 1 ポリペプチドの循環半減期と比較して、哺乳動物において循環半減期が増加し、一部の実施形態では、前述の E N P P 1 または E N P P 3 融合タンパク質をコードする前述のヌクレオチド配列によってコードされる前述の異種タンパク質は、イムノグロブリン結晶化可能断片 (F c) ポリペプチドまたはアルブミンポリペプチドであり、一部の実施形態では、前述のヌクレオチド配列によってコードされる前述の E N P P 1 または E N P P 3 融合タンパク質は、アミノ末端からカルボキシ末端の順序で、前述の融合タンパク質前述の E N P P 1 または前述の E N P P 3 ポリペプチド、および前述の F c ポリペプチドまたは前述のアルブミンポリペプチドを含み、一部の実施形態では、前述の E N P P 1 または E N P P 3 融合タンパク質をコードする前述のヌクレオチド配列によってコードされる前述の F c ポリペプチドは、I g G 1 F c ポリペプチドであり、一部の実施形態では、前述の I g G 1 F c ポリペプチドは、配列番号 3 4 のアミノ酸配列を含み、一部の実施形態では、前述のコードされた I g G 1 F c ポリペプチドは、バリエント I g G F c であり、一部の実施形態では、前述のコードされたバリエント F c ポリペプチドは、E U 番号に従う M 2 5 2 Y / S 2 5 4 T / T 2 5 6 E のアミノ酸置換を含み、一部の実施形態では、前述のコードされたバリエント F c ポリペプチドは、配列番号 9 5 のアミノ酸配列 8 5 3 ~ 1 0 7 9 を含み、一部の実施形態では、前述の E N P P 1 ポリペプチドをコードする前述のヌクレオチド配列は、配列番号 1 のアミノ酸配列 9 9 ~ 9 2 5 を含み、一部の実施形態では、前述の E N P P 1 ポリペプチドをコードする前述のヌクレオチド配列は、バリエント前述の E N P P 1 ポリペプチドをコードし、一部の実施形態では、前述のコードされたバリエント E N P P 1 ポリペプチドは、配列番号 1 に関する位置 3 3 2 のアミノ酸置換をコードする配列を含み、一部の実施形態では、配列番号 1 に関する位置 3 3 2 の前述のアミノ酸置換をコードする前述の配列は、I 3 3 2 T を含み、一部の実施形態では、前述の E N P P 1 ポリペプチドをコードする前述のヌクレオチド配列は、配列番号 9 5 のアミノ酸 2 1 ~ 8 4 7 をコードする配列を含み、一部の実施形態では、前述の E N P P 1 ポリペプチドをコードする前述のヌクレオチド配列は、配列番号 9 5 のアミノ酸 2 0 ~ 8 4 7 をコードする配列を含み、一部の実施形態では、前述のコードされた E N P P 1 融合タンパク質は、前述のコードされた E N P P 1 ポリペプチドと前述のコードされた異種ポリペプチドとを連結するタンパク質リンカーをコードする配列を含み、一部の実施形態では、前述のコードされたタンパク質リンカーは、配列番号 9 4 (G G G G S) のアミノ酸配列を含み、一部の実施形態では、前述の E N P P 1 融合タンパク質をコードする前述のヌクレオチド配列は、配列番号 9 5 のアミノ酸 2 1 ~ 1 0 7 9 を含み、一部の実施形態では、前述の E N P P 1 融合タンパク質をコードする前述のヌクレオチド配列は、単回投与以上で、配列番号 9 5 のアミノ酸 2 0 ~ 1 0 7 9 を含み、補正は、前述の個体において、骨長、イントラベキュラー (i n t r a b e c u l a r) 数、皮質厚、骨梁厚、骨梁骨体積、骨形成速度と骨芽細胞面からなる群から選択される一つ以上増加として示され、増加は、前述の未処理の E n p p 1 欠損個体または対象、または前述の E n p p 3 欠損個体または対象、または前述の哺乳動物、それを必要とする固体または対象に関し、前述の増加は、例えば検非侵襲的撮像技術によって、検出される。

10

20

30

40

50

【0603】

別の態様では、E n p p 1 欠損個体または対象、または E n p p 3 欠損個体または対象、または哺乳動物、それを必要とする個体または対象における成長板構造を修復する方法が開示されており、(a) 肝臓特異的プロモーター、および (a) 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 (E N P P 1) ポリペプチドまたは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-3 (E N P P 3) ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む核酸を含むウイルスベクターを投与することを含み、一部の実施形態では、肝臓特異的プロモーターは、肝臓プロモーター-1 (L P 1) およびハイブリッド肝臓プロモーター (H L P) からなる群から選択され、一部の実施形態では、ベクターは、ポリアデニル化信号をコードする配列を含み、一部の実施形態では、ベクターは、アズロシジシングナルペプチドであるシグナルペプチドをコードし、一部の実施形態では、ウイルスベクターは、アデノ随伴ウイルス (A A V) ベクターであり、一部の実施形態では、A A V ベクターは、A A V 1、A A V 2、A A V 3、A A V 4、A A V 5、A A V 6、A A V 7、A A V 8、A A V 9、および A A V - r h 7 4 からなる群から選択される血清型を有し、一部の実施形態では、ウイルスベクターは、(a) 肝臓特異的プロモーター、および (a) 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 (E N P P 1) ポリペプチドまたは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-3 (E N P P 3) ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む組み換え核酸を含み、一部の実施形態では、前述の E N P P 1 ポリペプチドまたは前述の E N P P 3 ポリペプチドをコードする前述のヌクレオチド配列は、可溶性 E N P P 1 または可溶性 E N P P 3 ポリペプチドをコードし、一部の実施形態では、前述の核酸は、前述のコードされたポリペプチドを発現することができるベクターまたはプラスミドを含み、一部の実施形態では、前述のベクターはウイルスベクターであり、一部の実施形態では、前述のウイルスベクターは、アデノ随伴ウイルス (A A V) ベクターであり、一部の実施形態では、前述の核酸はアズロシジシングナルペプチドをコードし、前述のシグナルペプチドは前述の E N P P 1 ポリペプチドまたは前述の E N P P 3 ポリペプチドと動作可能に関連付けられ、一部の実施形態では、前述の E N P P 1 ポリペプチドまたは前述の E N P P 3 ポリペプチドをコードする前述のヌクレオチド配列は、前述の E N P P 1 ポリペプチドまたは前述の E N P P 3 ポリペプチドおよび異種タンパク質を含む E N P P 1 または E N P P 3 融合タンパク質をコードし、一部の実施形態では、前述のヌクレオチド配列によってコードされる前述の E N P P 1 融合タンパク質または E N P P 3 融合タンパク質は、異種タンパク質を含まない E N P P 1 ポリペプチドの循環半減期と比較して、哺乳動物において循環半減期が増加し、一部の実施形態では、前述の E N P P 1 または E N P P 3 融合タンパク質をコードする前述のヌクレオチド配列によってコードされる前述の異種タンパク質は、イムノグロブリン結晶化可能断片 (F c) ポリペプチドまたはアルブミンポリペプチドであり、一部の実施形態では、前述のヌクレオチド配列によってコードされる前述の E N P P 1 または E N P P 3 融合タンパク質は、アミノ末端からカルボキシ末端の順序で、前述の融合タンパク質前述の E N P P 1 または前述の E N P P 3 ポリペプチド、および前述の F c ポリペプチドまたは前述のアルブミンポリペプチドを含み、一部の実施形態では、前述の E N P P 1 または E N P P 3 融合タンパク質をコードする前述のヌクレオチド配列によってコードされる前述の F c ポリペプチドは、I g G 1 F c ポリペプチドであり、一部の実施形態では、前述の I g G 1 F c ポリペプチドは、配列番号 3 4 のアミノ酸配列を含み、一部の実施形態では、前述のコードされた I g G 1 F c ポリペプチドは、バリエーション I g G F c であり、一部の実施形態では、前述のコードされたバリエーション F c ポリペプチドは、E U 番号に従う M 2 5 2 Y / S 2 5 4 T / T 2 5 6 E のアミノ酸置換を含み、一部の実施形態では、前述のコードされたバリエーション F c ポリペプチドは、配列番号 9 5 のアミノ酸配列 8 5 3 ~ 1 0 7 9 を含み、一部の実施形態では、前述の E N P P 1 ポリペプチドをコードする前述のヌクレオチド配列は、配列番号 1 のアミノ酸配列 9 9 ~ 9 2 5 を含み、一部の実施形態では、前述の E N P P 1 ポリペプチドをコードする前述のヌクレオチド配列は、バリエーション前述の E N P P 1 ポリペプチドをコード

10

20

30

40

50

し、一部の実施形態では、前述のコードされたバリエーション ENPP1 ポリペプチドは、配列番号 1 に関する位置 332 のアミノ酸置換をコードする配列を含み、一部の実施形態では、配列番号 1 に関する位置 332 の前述のアミノ酸置換をコードする前述の配列は、I332T を含み、一部の実施形態では、前述の ENPP1 ポリペプチドをコードする前述のヌクレオチド配列は、配列番号 95 のアミノ酸 21～847 をコードする配列を含み、一部の実施形態では、前述の ENPP1 ポリペプチドをコードする前述のヌクレオチド配列は、配列番号 95 のアミノ酸 20～847 をコードする配列を含み、一部の実施形態では、前述のコードされた ENPP1 融合タンパク質は、前述のコードされた ENPP1 ポリペプチドと前述のコードされた異種ポリペプチドとを連結するタンパク質リンカーをコードする配列を含み、一部の実施形態では、前述のコードされたタンパク質リンカーは、配列番号 94 (GGGGS) のアミノ酸配列を含み、一部の実施形態では、前述の ENPP1 融合タンパク質をコードする前述のヌクレオチド配列は、配列番号 95 のアミノ酸 21～1079 を含み、一部の実施形態では、前述の ENPP1 融合タンパク質をコードする前述のヌクレオチド配列は、単回投与以上で、配列番号 95 のアミノ酸 20～1079 を含み、修復は、前述の未処理の Enpp1 欠損個体または対象、または前述の Enpp3 欠損個体または対象、または前述の哺乳動物、それを必要とする固体または対象に関し、前述の修復は、例えば検非侵襲的撮像技術または動的組織形態計測分析によって検出される。

10

【0604】

別の態様では、Enpp1 欠損個体または対象、または Enpp3 欠損個体または対象、または哺乳動物、それを必要とする個体または対象における異常な骨芽細胞機能の発達を阻害する方法が開示されており、(a) 肝臓特異的プロモーター、および (a) 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 (ENPP1) ポリペプチドまたは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-3 (ENPP3) ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む核酸を含むウイルスベクターを投与することを含み、一部の実施形態では、肝臓特異的プロモーターは、肝臓プロモーター 1 (LP1) およびハイブリッド肝臓プロモーター (HLP) からなる群から選択され、一部の実施形態では、ベクターは、ポリアデニル化信号をコードする配列を含み、一部の実施形態では、ベクターは、アズロシグナルペプチドであるシグナルペプチドをコードし、一部の実施形態では、ウイルスベクターは、アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターであり、一部の実施形態では、AAV ベクターは、AV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、および AAV-rh74 からなる群から選択される血清型を有し、一部の実施形態では、ウイルスベクターは、(a) 肝臓特異的プロモーター、および (a) 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 (ENPP1) ポリペプチドまたは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-3 (ENPP3) ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む組み換え核酸である請求項 1～25 の任意の一項に記載の核酸を含み、一部の実施形態では、前述の ENPP1 ポリペプチドまたは前述の ENPP3 ポリペプチドをコードする前述のヌクレオチド配列は、可溶性 ENPP1 または可溶性 ENPP3 ポリペプチドをコードし、一部の実施形態では、前述の核酸は、前述のコードされたポリペプチドを発現することができるベクターまたはプラスミドを含み、一部の実施形態では、前述のベクターはウイルスベクターであり、一部の実施形態では、前述のウイルスベクターは、アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターであり、一部の実施形態では、前述の核酸はアズロシグナルペプチドをコードし、前述のシグナルペプチドは前述の ENPP1 ポリペプチドまたは前述の ENPP3 ポリペプチドと動作可能に関連付けられ、一部の実施形態では、前述の ENPP1 ポリペプチドまたは前述の ENPP3 ポリペプチドをコードする前述のヌクレオチド配列は、前述の ENPP1 ポリペプチドまたは前述の ENPP3 ポリペプチドおよび異種タンパク質を含む ENPP1 または ENPP3 融合タンパク質をコードし、一部の実施形態では、前述のヌクレオチド配列によってコードされる前述の ENPP1 融合タンパク質または ENPP3 融合タンパク質は、異種タンパク質を含み

20

30

40

50

ない E N P P 1 ポリペプチドの循環半減期と比較して、哺乳動物において循環半減期が増加し、一部の実施形態では、前述の E N P P 1 または E N P P 3 融合タンパク質をコードする前述のヌクレオチド配列によってコードされる前述の異種タンパク質は、イムノグロブリン結晶化可能断片 (F c) ポリペプチドまたはアルブミンポリペプチドであり、一部の実施形態では、前述のヌクレオチド配列によってコードされる前述の E N P P 1 または E N P P 3 融合タンパク質は、アミノ末端からカルボキシ末端の順序で、前述の融合タンパク質前述の E N P P 1 または前述の E N P P 3 ポリペプチド、および前述の F c ポリペプチドまたは前述のアルブミンポリペプチドを含み、一部の実施形態では、前述の E N P P 1 または E N P P 3 融合タンパク質をコードする前述のヌクレオチド配列によってコードされる前述の F c ポリペプチドは、I g G 1 F c ポリペプチドであり、一部の実施形態では、前述の I g G 1 F c ポリペプチドは、配列番号 34 のアミノ酸配列を含み、一部の実施形態では、前述のコードされた I g G 1 F c ポリペプチドは、バリエーション I g G F c であり、一部の実施形態では、前述のコードされたバリエーション F c ポリペプチドは、E U 番号に従う M 2 5 2 Y / S 2 5 4 T / T 2 5 6 E のアミノ酸置換を含み、一部の実施形態では、前述のコードされたバリエーション F c ポリペプチドは、配列番号 95 のアミノ酸配列 8 5 3 ~ 1 0 7 9 を含み、一部の実施形態では、前述の E N P P 1 ポリペプチドをコードする前述のヌクレオチド配列は、配列番号 1 のアミノ酸配列 9 9 ~ 9 2 5 を含み、一部の実施形態では、前述の E N P P 1 ポリペプチドをコードする前述のヌクレオチド配列は、バリエーション前述の E N P P 1 ポリペプチドをコードし、一部の実施形態では、前述のコードされたバリエーション E N P P 1 ポリペプチドは、配列番号 1 に関する位置 3 3 2 のアミノ酸置換をコードする配列を含み、一部の実施形態では、配列番号 1 に関する位置 3 3 2 の前述のアミノ酸置換をコードする前述の配列は、I 3 3 2 T を含み、一部の実施形態では、前述の E N P P 1 ポリペプチドをコードする前述のヌクレオチド配列は、配列番号 95 のアミノ酸 2 1 ~ 8 4 7 をコードする配列を含み、一部の実施形態では、前述の E N P P 1 ポリペプチドをコードする前述のヌクレオチド配列は、配列番号 95 のアミノ酸 2 0 ~ 8 4 7 をコードする配列を含み、一部の実施形態では、前述のコードされた E N P P 1 融合タンパク質は、前述のコードされた E N P P 1 ポリペプチドと前述のコードされた異種ポリペプチドとを連結するタンパク質リンカーをコードする配列を含み、一部の実施形態では、前述のコードされたタンパク質リンカーは、配列番号 94 (G G G G S) のアミノ酸配列を含み、一部の実施形態では、前述の E N P P 1 融合タンパク質をコードする前述のヌクレオチド配列は、配列番号 95 のアミノ酸 2 1 ~ 1 0 7 9 を含み、一部の実施形態では、前述の E N P P 1 融合タンパク質をコードする前述のヌクレオチド配列は、単回投与以上で、配列番号 95 のアミノ酸 2 0 ~ 1 0 7 9 を含み、阻害は、前述の未処理の E n p p 1 欠損個体または対象、または前述の E n p p 3 欠損個体または対象、または前述の哺乳動物、それを必要とする固体または対象に関し、前述の阻害は、例えば検非侵襲的撮像技術または動的組織形態計測分析によって検出される。

【0605】

別の態様では、本開示は、E n p p 1 欠損個体または対象、または E n p p 3 欠損個体または対象、または哺乳動物またはそれを必要とする固体または対象の骨形成速度を増加する方法であって、請求項 26 ~ 32 の任意の一項に記載のウイルスベクターを投与することを含み、ウイルスベクターは (a) 肝臓特異的プロモーターおよび (a) 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 (E N P P 1) ポリペプチドまたは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 - 3 (E N P P 3) ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む核酸を含み、一部の実施形態では、肝臓特異的プロモーターは、肝臓プロモーター 1 (L P 1) およびハイブリッド肝臓プロモーター (H L P) からなる群から選択され、一部の実施形態では、ベクターは、ポリアデニル化信号をコードする配列を含み、一部の実施形態では、ベクターは、アズロシグナルペプチドであるシグナルペプチドをコードし、一部の実施形態では、ウイルスベクターは、アデノ随伴ウイルス (A A V) ベクターであり、一部の実施形態では、A A V ベクターは、A A V 1、A A V 2、A A V 3、A A V 4、A A V 5、A A V 6、A A V 7、

AAV8、AAV9、およびAAV-rh74からなる群から選択される血清型を有し、一部の実施形態では、ウイルスベクターは、(a) 肝臓特異的プロモーター、および(a) エクス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 (ENPP1) ポリペプチドまたはエクス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-3 (ENPP3) ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む組み換え核酸を含み、一部の実施形態では、前述のENPP1ポリペプチドまたは前述のENPP3ポリペプチドをコードする前述のヌクレオチド配列は、可溶性ENPP1または可溶性ENPP3ポリペプチドをコードし、一部の実施形態では、前述の核酸は、前述のコードされたポリペプチドを発現することができるベクターまたはプラスミドを含み、一部の実施形態では、前述のベクターはウイルスベクターであり、一部の実施形態では、前述のウイルスベクターは、アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターであり、一部の実施形態では、前述の核酸はアズロシジシグナルペプチドをコードし、前述のシグナルペプチドは前述のENPP1ポリペプチドまたは前述のENPP3ポリペプチドと動作可能に関連付けられ、一部の実施形態では、前述のENPP1ポリペプチドまたは前述のENPP3ポリペプチドをコードする前述のヌクレオチド配列は、前述のENPP1ポリペプチドまたは前述のENPP3ポリペプチドおよび異種タンパク質を含むENPP1またはENPP3融合タンパク質をコードし、一部の実施形態では、前述のヌクレオチド配列によってコードされる前述のENPP1融合タンパク質またはENPP3融合タンパク質は、異種タンパク質を含まないENPP1ポリペプチドの循環半減期と比較して、哺乳動物において循環半減期が増加し、一部の実施形態では、前述のENPP1またはENPP3融合タンパク質をコードする前述のヌクレオチド配列によってコードされる前述の異種タンパク質は、イムノグロブリン結晶化可能断片(Fc)ポリペプチドまたはアルブミンポリペプチドであり、一部の実施形態では、前述のヌクレオチド配列によってコードされる前述のENPP1またはENPP3融合タンパク質は、アミノ末端からカルボキシ末端の順序で、前述の融合タンパク質前述のENPP1または前述のENPP3ポリペプチド、および前述のFcポリペプチドまたは前述のアルブミンポリペプチドを含み、一部の実施形態では、前述のENPP1またはENPP3融合タンパク質をコードする前述のヌクレオチド配列によってコードされる前述のFcポリペプチドは、IgG1 Fcポリペプチドであり、一部の実施形態では、前述のIgG1 Fcポリペプチドは、配列番号34のアミノ酸配列を含み、一部の実施形態では、前述のコードされたIgG1 Fcポリペプチドは、バリエーションIgG Fcであり、一部の実施形態では、前述のコードされたバリエーションFcポリペプチドは、EU番号に従うM252Y/S254T/T256Eのアミノ酸置換を含み、一部の実施形態では、前述のコードされたバリエーションFcポリペプチドは、配列番号95のアミノ酸配列853~1079を含み、一部の実施形態では、前述のENPP1ポリペプチドをコードする前述のヌクレオチド配列は、配列番号1のアミノ酸配列99~925を含み、一部の実施形態では、前述のENPP1ポリペプチドをコードする前述のヌクレオチド配列は、バリエーション前述のENPP1ポリペプチドをコードし、一部の実施形態では、前述のコードされたバリエーションENPP1ポリペプチドは、配列番号1に関する位置332のアミノ酸置換をコードする配列を含み、一部の実施形態では、配列番号1に関する位置332の前述のアミノ酸置換をコードする前述の配列は、I332Tを含み、一部の実施形態では、前述のENPP1ポリペプチドをコードする前述のヌクレオチド配列は、配列番号95のアミノ酸21~847をコードする配列を含み、一部の実施形態では、前述のENPP1ポリペプチドをコードする前述のヌクレオチド配列は、配列番号95のアミノ酸20~847をコードする配列を含み、一部の実施形態では、前述のコードされたENPP1融合タンパク質は、前述のコードされたENPP1ポリペプチドと前述のコードされた異種ポリペプチドとを連結するタンパク質リンカーをコードする配列を含み、一部の実施形態では、前述のコードされたタンパク質リンカーは、配列番号94(GGGGS)のアミノ酸配列を含み、一部の実施形態では、前述のENPP1融合タンパク質をコードする前述のヌクレオチド配列は、配列番号95のアミノ酸21~1079を含み、一部の実施形態では、前述のENPP1融合タンパク質をコードする前述のヌクレオチド配列は

10

20

30

40

50

、単回投与以上で、配列番号 95 のアミノ酸 20 ～ 1079 を含み、増加は、前述の未処理の E n p p 1 欠損個体または対象、または前述の E n p p 3 欠損個体または対象、または前述の哺乳動物、それを必要とする固体または対象に関し、前述の増加は、例えば動的組織形態計測分析によって検出される。

【0606】

別の態様では、E n p p 1 欠損個体または対象、または E n p p 3 欠損個体または対象、または哺乳動物、それを必要とする個体または対象における骨芽細胞面を増加する方法が開示されており、(a) 肝臓特異的プロモーター、および (a) 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 (E N P P 1) ポリペプチドまたは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-3 (E N P P 3) ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む核酸を含むウイルスベクターを投与することを含み、一部の実施形態では、肝臓特異的プロモーターは、肝臓プロモーター 1 (L P 1) およびハイブリッド肝臓プロモーター (H L P) からなる群から選択され、一部の実施形態では、ベクターは、ポリアデニル化信号をコードする配列を含み、一部の実施形態では、ベクターは、アズロシジシングナルペプチドであるシグナルペプチドをコードし、一部の実施形態では、ウイルスベクターは、アデノ随伴ウイルス (A A V) ベクターであり、一部の実施形態では、A A V ベクターは、A A V 1、A A V 2、A A V 3、A A V 4、A A V 5、A A V 6、A A V 7、A A V 8、A A V 9、および A A V - r h 7 4 からなる群から選択される血清型を有し、一部の実施形態では、ウイルスベクターは、(a) 肝臓特異的プロモーター、および (a) 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 (E N P P 1) ポリペプチドまたは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-3 (E N P P 3) ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む組み換え核酸を含み、一部の実施形態では、前述の E N P P 1 ポリペプチドまたは前述の E N P P 3 ポリペプチドをコードする前述のヌクレオチド配列は、可溶性 E N P P 1 または可溶性 E N P P 3 ポリペプチドをコードし、一部の実施形態では、前述の核酸は、前述のコードされたポリペプチドを発現することができるベクターまたはプラスミドを含み、一部の実施形態では、前述のベクターはウイルスベクターであり、一部の実施形態では、前述のウイルスベクターは、アデノ随伴ウイルス (A A V) ベクターであり、一部の実施形態では、前述の核酸はアズロシジシングナルペプチドをコードし、前述のシグナルペプチドは前述の E N P P 1 ポリペプチドまたは前述の E N P P 3 ポリペプチドと動作可能に関連付けられ、一部の実施形態では、前述の E N P P 1 ポリペプチドまたは前述の E N P P 3 ポリペプチドをコードする前述のヌクレオチド配列は、前述の E N P P 1 ポリペプチドまたは前述の E N P P 3 ポリペプチドおよび異種タンパク質を含む E N P P 1 または E N P P 3 融合タンパク質をコードし、一部の実施形態では、前述のヌクレオチド配列によってコードされる前述の E N P P 1 融合タンパク質または E N P P 3 融合タンパク質は、異種タンパク質を含まない E N P P 1 ポリペプチドの循環半減期と比較して、哺乳動物において循環半減期が増加し、一部の実施形態では、前述の E N P P 1 または E N P P 3 融合タンパク質をコードする前述のヌクレオチド配列によってコードされる前述の異種タンパク質は、イムノグロブリン結晶化可能断片 (F c) ポリペプチドまたはアルブミンポリペプチドであり、一部の実施形態では、前述のヌクレオチド配列によってコードされる前述の E N P P 1 または E N P P 3 融合タンパク質は、アミノ末端からカルボキシ末端の順序で、前述の融合タンパク質前述の E N P P 1 または前述の E N P P 3 ポリペプチド、および前述の F c ポリペプチドまたは前述のアルブミンポリペプチドを含み、一部の実施形態では、前述の E N P P 1 または E N P P 3 融合タンパク質をコードする前述のヌクレオチド配列によってコードされる前述の F c ポリペプチドは、I g G 1 F c ポリペプチドであり、一部の実施形態では、前述の I g G 1 F c ポリペプチドは、配列番号 34 のアミノ酸配列を含み、一部の実施形態では、前述のコードされた I g G 1 F c ポリペプチドは、バリエント I g G F c であり、一部の実施形態では、前述のコードされたバリエント F c ポリペプチドは、E U 番号に従う M 2 5 2 Y / S 2 5 4 T / T 2 5 6 E のアミノ酸置換を含み、一部の実施形態では、前述のコードされたバリエント F c ポリペ

10

20

30

40

50

チドは、配列番号 95 のアミノ酸配列 853～1079 を含み、一部の実施形態では、前述の ENPP1 ポリペプチドをコードする前述のヌクレオチド配列は、配列番号 1 のアミノ酸配列 99～925 を含み、一部の実施形態では、前述の ENPP1 ポリペプチドをコードする前述のヌクレオチド配列は、バリエーションの ENPP1 ポリペプチドをコードし、一部の実施形態では、前述のコードされたバリエーション ENPP1 ポリペプチドは、配列番号 1 に関する位置 332 のアミノ酸置換をコードする配列を含み、一部の実施形態では、配列番号 1 に関する位置 332 の前述のアミノ酸置換をコードする前述の配列は、I332T を含み、一部の実施形態では、前述の ENPP1 ポリペプチドをコードする前述のヌクレオチド配列は、配列番号 95 のアミノ酸 21～847 をコードする配列を含み、一部の実施形態では、前述の ENPP1 ポリペプチドをコードする前述のヌクレオチド配列は、配列番号 95 のアミノ酸 20～847 をコードする配列を含み、一部の実施形態では、前述のコードされた ENPP1 融合タンパク質は、前述のコードされた ENPP1 ポリペプチドと前述のコードされた異種ポリペプチドとを連結するタンパク質リンカーをコードする配列を含み、一部の実施形態では、前述のコードされたタンパク質リンカーは、配列番号 94 (GGGGS) のアミノ酸配列を含み、一部の実施形態では、前述の ENPP1 融合タンパク質をコードする前述のヌクレオチド配列は、配列番号 95 のアミノ酸 21～1079 を含み、一部の実施形態では、前述の ENPP1 融合タンパク質をコードする前述のヌクレオチド配列は、単回投与以上で、配列番号 95 のアミノ酸 20～1079 を含み、増加は、前述の未処理の Enpp1 欠損個体または対象、または前述の Enpp3 欠損個体または対象、または前述の哺乳動物、それを必要とする固体または対象に関し、前述の増加は、例えば動的組織形態計測分析によって検出される。

10

20

【0607】

本発明によるポリヌクレオチド、ベクターおよびプラスミド

本発明はまた、ウイルスベクター、例えば本発明による AAV ベクターを産生するのに有用なポリヌクレオチドに関する。一実施形態では、本発明は、アデノ随伴ウイルス ITR に隣接した発現カセットを含むポリヌクレオチド（「本発明によるポリヌクレオチド」）に関し、前述の発現カセットは、ENPP1 もしくは ENPP3 またはその機能的に等価なバリエーションをコードするヌクレオチド配列に動作可能に連結された転写調節領域を含む。

【0608】

一実施形態では、本発明によるポリヌクレオチドは、プロモーター、好ましくは構成的プロモーター、より好ましくは肝臓特異的プロモーター、より好ましくはアルブミンプロモーター、ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ (PEPCK) プロモーターおよびアルファ 1-抗トリプシンプロモーターからなる群から選択される肝臓特異的プロモーターを含む転写調節領域を含み、最も好ましいのはヒトアルファ 1-抗トリプシンプロモーターである。別の実施形態では、本発明によるポリヌクレオチドの転写調節領域は、プロモーター、好ましくは肝臓特異的エンハンサー、より好ましくは肝臓制御領域エンハンサー (HCR) に動作可能に連結されたエンハンサーをさらに含む。

30

【0609】

別の実施形態では、本発明によるポリヌクレオチドの発現カセットはポリアデニル化信号、より好ましくは SV40 polyA をさらに含む。別の実施形態では、本発明によるポリヌクレオチドによってコードされる ENPP1 は、ヒト ENPP1 およびヒト ENPP3 からなる群から選択される。

40

【0610】

本発明によるポリヌクレオチドは、例えばプラスミドなどのベクターに組み込まれ得る。したがって、別の態様では、本発明は、本発明によるポリヌクレオチドを含むベクターまたはプラスミドに関する。特定の実施形態では、本発明によるポリヌクレオチドは、アデノ随伴ウイルスベクターまたはプラスミドに組み込まれる。

【0611】

好ましくは、アデノ随伴ウイルスの産生に必要な他のすべての構造的および非構造的コ

50

ード配列は、プラスミドなどの別のベクターによってトランスで提供され得るか、または配列をパッケージング細胞株に安定的に統合することによって提供され得るため、ウイルスベクター中に存在しない。

【0612】

本発明によるAAVの入手方法

本発明はまた、非限定的な例として、AAVベクターなどの、本発明によるウイルスベクターを取得する方法に関する。前述のAAVベクターは、本発明によるポリヌクレオチドを、RepおよびCapタンパク質を構造的に発現する細胞に導入することによって、取得することができ、RepおよびCapコード配列はプラスミドもしくはベクターで提供される。したがって、別の態様では、本発明は、

(i) 本発明によるポリヌクレオチド、AAV Capタンパク質、AAV Repタンパク質、および任意選択的にAAVが複製に依存するウイルスタンパク質を含む細胞を提供するステップと、

(ii) AAVの組立に適切な状態下に細胞を維持するステップと、

(iii) 細胞によって産生されるアデノ随伴ウイルスベクターを精製するステップと、を含むアデノ随伴ウイルスベクターを取得する方法に関する。

【0613】

導入遺伝子をベクター化するための組み換えAAV (rAAV) の産生は、以前にも説明されている (Ayuso E, et al., Curr. Gene Ther. 2010, 10:423-436; Okada T, et al., Hum. Gene Ther. 2009, 20:1013-1021; Zhang H, et al., Hum. Gene Ther. 2009, 20:922-929; and Virag T, et al., Hum. Gene Ther. 2009, 20:807-817)。これらのプロトコルは、本発明によるAAVを生成するために使用または適合することができる。アデノ随伴ウイルスベクターを産生することができる任意の細胞を、哺乳類および昆虫細胞を含む本発明で使用するすることができる。

【0614】

一実施形態では、産生細胞株は、本発明によるポリヌクレオチド (ITRに隣接した発現カセットを含む) およびRepおよびCapタンパク質をコードし、ヘルパー機能を提供する構築物で一過性にトランスフェクトされる。別の実施形態では、細胞株はヘルパー機能を安定的に供給し、本発明によるポリヌクレオチド (ITRに隣接した発現カセットを含む) およびRepおよびCapタンパク質をコードする構築物で一過性にトランスフェクトされる。

【0615】

別の実施形態では、細胞株は、RepおよびCapタンパク質、ならびにヘルパー機能を安定的に供給し、本発明によるポリヌクレオチドで一過性にトランスフェクトされる。別の実施形態では、細胞株は、RepおよびCapタンパク質を安定的に供給し、本発明によるポリヌクレオチドおよびヘルパー機能をコードするポリヌクレオチドで一過性にトランスフェクトされる。さらに別の実施形態では、細胞株は、本発明によるポリヌクレオチド、RepおよびCapタンパク質、ならびにヘルパー機能を安定的に供給する。これらおよび他のAAV生産系を作製および使用する方法は、当技術分野で説明されてきた。

【0616】

別の実施形態では、産生細胞株は、RepおよびCapタンパク質を提供するバキュロウイルス発現ベクターに感染する昆虫細胞株 (典型的にはSf9細胞) である。このシステムは、アデノウイルスヘルパー遺伝子を必要としない (Ayuso E, et al., Curr. Gene Ther. 2010, 10:423-436)。

【0617】

別の実施形態では、AAVの導入遺伝子送達能力は、アニーリングして頭尾コンカテマーを形成することができる二つのゲノムのAAV ITRを提供することによって増加させることができる。一般的に、AAVが宿主細胞に侵入すると、導入遺伝子を含有する一

10

20

30

40

50

本鎖DNAは、宿主細胞DNAポリメラーゼ複合体によって二本鎖DNAに変換され、その後、ITRは核におけるコンカタマー形成を助ける。代替として、AAVは、標的細胞への侵入時にウイルスベクターが二本鎖合成のステップをバイパスすることを可能にする自己相補的(sc)AAVとなるように操作されてもよく、より速く、潜在的にはより高い(例えば、100倍まで)導入遺伝子発現を有するscAAVウイルスベクターを提供する。

【0618】

例えば、AAVは、導入遺伝子ユニットおよびその補体をそれぞれコードする二つの連結した一本鎖DNAを含むゲノムを有するように操作されてもよく、これは標的細胞への送達後に一緒に折ることができ、対象導入遺伝子ユニットをコードする二本鎖DNAをもたらす。自己相補的AAVは当技術分野で記載されている(Carter B, U.S. Pat. No. 6,596,535, Carter B, U.S. Pat. No. 7,125,717, and Takano H, et al., U.S. Pat. No. 7,456,683)。

10

【0619】

好ましくは、全ての構造的および非構造コード配列(Capタンパク質およびRepタンパク質)は、プラスミドなどのベクターによってトランスで提供され得るため、AAVベクター中に存在しない。Capタンパク質は、AAVウイルスの宿主向性、細胞、組織、または器官の特異性、受容体の使用、感染効率、および免疫原性に影響を与えることが報告されている。したがって、rAAVで使用するためのAAVキャップは、例えば、対象の種(例えば、ヒトまたは非ヒト)、対象の免疫状態、長期または短期の治療に対する対象の適合性、または特定の治療的適用(例えば、特定の疾患もしくは障害の治療、または特定の細胞、組織もしくは器官への送達)を考慮して選択されうる。

20

【0620】

別の実施形態では、Capタンパク質は、AAV2、AAV5、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、およびAAVrh10血清型からなる群のAAVに由来する。別の実施形態では、Capタンパク質はAAV8に由来する。

【0621】

一部の実施形態では、本発明による方法で使用するAAV Capは、前述のAAV Capのうちの一つまたはそのコードする核酸の変異誘発(すなわち、挿入、欠失、または置換)によって生成され得る。一部の実施形態では、AAVキャップは、前述のAAV Capの一つ以上に、少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、または99%以上類似する。

30

【0622】

一部の実施形態では、AAV Capは、前述のAAV Capのうちの二、三、四個以上のドメインを含むキメラである。一部の実施形態では、AAV Capは、二つまたは三つの異なるAAVまたは組み換えAAVに由来するVP1、VP2、およびVP3モノマーのモザイクである。一部の実施形態では、rAAV組成物は、前述のCapのうちの一つ以上を含む。

【0623】

一部の実施形態では、rAAV組成物で使用するAAV Capは、異種配列または他の修飾を含むように操作される。例えば、選択的標的化または免疫回避をもたらすペプチドまたはタンパク質配列を、Capタンパク質に操作してもよい。代替的に、または追加的に、rAAVの表面がポリエチレングリコール化(すなわちペグ化)されるように、Capは化学的に改変することができ、それによって免疫回避が促進され得る。Capタンパク質はまた、変異誘発されてもよい(例えば、その天然受容体結合を除去するために、または免疫原性エピトープをマスクするために)。

40

【0624】

一部の実施形態では、本発明による方法で使用するAAV Repタンパク質は、前述のAAV Repの一つまたはそのコードする核酸の変異誘発(すなわち、挿入、欠失、

50

または置換)によって生成され得る。一部の実施形態では、AAV Repは、前述のAAV Repのうちの一つ以上と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、または99%以上類似している。

【0625】

別の実施形態では、AAV RepおよびCapタンパク質は、AAAV2、AAV5、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、およびAAVrh10からなる群から選択されるAAV血清型に由来する。

【0626】

一部の実施形態では、AAVが本発明による方法における使用のための複製に依存するウイルスタンパク質は、前述のウイルスタンパク質のうちの一つまたはそのコードする核酸の変異誘発(すなわち、挿入、欠失、または置換)によって生成され得る。一部の実施形態では、ウイルスタンパク質は、前述のウイルスタンパク質のうちの一つ以上と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、または99%以上類似している。

【0627】

AAVが複製を依存するCapタンパク質、Repタンパク質、およびウイルスタンパク質の機能をアッセイする方法は、当技術分野で周知である。AAV rep、AAV cap遺伝子、およびヘルパー機能を提供する遺伝子は、前述の遺伝子を例えばプラスミドなどのベクターに組み込み、前述のベクターを細胞に導入することによって細胞内に導入することができる。遺伝子は、同じプラスミド内に、または異なるプラスミド内に組み込まれてもよい。別の実施形態では、AAV repおよびcap遺伝子は、一つのプラスミドに組み込まれ、ヘルパー機能を提供する遺伝子は、別のプラスミドに組み込まれている。本発明による方法での使用に適したAAV repおよびcap遺伝子を含むプラスミドの例としては、pHLP19ベクターおよびpRep6cap6ベクターが挙げられる(Collisi P, U.S. Pat. No. 6,001,650 and Russell D, et al., U.S. Pat. No. 6,156,303)。

【0628】

本発明によるポリヌクレオチドならびにAAV repおよびcap遺伝子を含むポリヌクレオチドまたはヘルパー機能を提供する遺伝子は、当技術分野で周知の任意の適切な方法を使用することにより細胞内に導入することができる。トランスフェクションの方法の例としては、以下に限定されないが、カルシウムホスフェート、DEAE-デキストラン、ポリブレンとの共沈、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、リポソーム介在性融合、リポフェクション、レトロウイルス感染、およびバイオリスティックトランスフェクションが挙げられる。特定の実施形態では、トランスフェクションは、カルシウムホスフェートとの共沈によって実施される。細胞が、任意のAAV repおよびcap遺伝子およびアデノウイルスヘルパー機能を提供する遺伝子の発現を欠く場合、前述の遺伝子は、本発明によるポリヌクレオチドと同時に細胞内に導入され得る。

【0629】

代替的に、前述の遺伝子は、本発明によるポリヌクレオチドの導入の前または後に細胞内に導入され得る。特定の実施形態では、細胞は、

- 1) 本発明によるポリヌクレオチドを含むプラスミド、
- 2) AAV repおよびcap遺伝子を含むプラスミド、
- 3) ヘルパー機能を提供する遺伝子を含むプラスミド、の三つのプラスミドと同時にトランスフェクトされる。

【0630】

代替的に、AAV repおよびcap遺伝子およびヘルパー機能を提供する遺伝子は、エピソーム的におよび／またはパッケージング細胞のゲノム内に組み込まれることによって、パッケージング細胞によって運ばれてもよい。

【0631】

本発明は、AAVの組立に適切な条件下での細胞の維持に関する方法を含む。パッケー

10

20

30

40

50

ジング細胞を培養する方法、および細胞溶解物の生成などのAAVベクター粒子の放出を促進する例示的な条件は、本明細書の実施例に記載されるように実施され得る。産生細胞は、AAVの組立およびウイルスベクターの培地への放出を促進するために、適切な期間にわたって増殖される。概して、細胞は、約24時間、約36時間、約48時間、約72時間、約4日、約5日、約6日、約7日、約8日、約9日、最大約10日の間、増殖され得る。約10日後（またはより早い時期、培養条件および使用される特定の産生細胞に応じて）、産生レベルは概して著しく減少する。一般的に、培養時間は、ウイルス産生の時点から測定される。例えば、AAVの場合、ウイルス産生は概して、本明細書に記載されるように適切な産生細胞にヘルパーウイルス機能を供給することにより始まる。一般的に、細胞は、ヘルパーウイルス感染後（またはウイルス産生開始後）、約48～約100、好ましくは約48～約96、好ましくは約72～約96、好ましくは約68～約72時間後に採取される。

10

【0632】

本発明は、細胞によって産生されるアデノ随伴ウイルスベクターを精製する方法を包含する。本発明によるAAVは、i) 本発明によるポリヌクレオチドでトランスフェクトされた細胞、およびii) トランスフェクション後の期間、好ましくは72時間後の前述の細胞の培地、の両方から取得することができる。本発明によるAAVを取得するために、前述の細胞または前述の培地からのAAVの精製のための任意の方法を使用できる。特定の実施形態では、本発明によるAAVは、ポリエチレングリコール沈殿ステップおよび二つの連続的な塩化セシウム(CsCl)勾配に基づいて最適化された方法に従って精製される。本発明による精製AAVは、PBSに対して透析され、-80℃で濾過され、保存されることができる。ウイルスゲノムの力価は、線形化プラスミドDNAを標準曲線として使用するAAV2参照標準物質について記載されるプロトコルに従って定量的PCRによって決定され得る(Lock M, et al., Hum. Gene Ther. 2010; 21:1273-1285)。

20

【0633】

別の実施形態では、精製はポリエチレングリコール沈殿ステップまたは塩化セシウム勾配分画によってさらに実施される。一部の実施形態では、方法は、例えば、細胞溶解物のベンゾナーゼによる処理、CsCl勾配による細胞溶解物の精製、またはヘパリン硫酸クロマトグラフィーの使用による細胞溶解物の精製などの精製ステップをさらに含む(Halbert C, et al., Methods Mol. Biol. 2004; 246:201-212)。

30

【0634】

様々な自然発生および組み換えAAV、それらのコードする核酸、AAV CapおよびRepタンパク質ならびにそれらの配列、ならびにかかるAAVを単離または生成、増殖、および精製する方法、とりわけ、AAV生産における使用に適したそれらのキャプシドは、当技術分野で公知である。

【0635】

動物モデル

以下は、病理学的骨化または石灰化の進行を防止または低減するために、ENPP1またはENPP3を投与する有効性を試験するために使用できる非限定的な動物モデルである。

40

1. 幼児の全身性動脈石灰化(GACI)のEnpp1^{asj/asj}モデル; Li, et al., 2013, Disease Models & Mech. 6(5): 1227-35.
2. 幼児の全身性動脈石灰化(GACI)のEnpp1^{asj/asj}モデル; Li, et al., 2014, PLoS one 9(12): e113542.
3. 弾性線維性仮性黄色腫(PXE)のABCC6-/-マウスモデル、Jiang, et al., 2007, J. Invest. Derm. 127(6): 1392-4102.

50

4. X連鎖性低ホスファターゼ症(XLH)のHYPマウスモデル、Liang, et al., 2009, Calcif. Tissue Int. 85(3):235-46。
5. ハッチンソン・ギルフォード・プロジェリア症候群のLmnaG609G/+マウスモデル; Villa-Bellocosta, et al., 2013, Circulation 127(24):2442-51。
6. 後縦靱帯の骨化(OPLL)のつま先歩行(ttw)マウス(Okawa, et al., 1998, Nature Genetics 19(3):271-3; Nakamura, et al., 1999, Human Genetics 104(6):492-7) and osteoarthritis (Bertrand, et al., 2012, Annals Rheum. Diseases 71(7):1249-53)。
7. アデニン食に関する慢性腎臓疾患(CKD)のラットモデル、Schibler, et al., 1968, Clin. Sci. 35(2):363-72; O'Neill, et al., 2011, Kidney Int. 79(5):512-7。
8. アデニン食に関する慢性腎臓疾患(CKD)のマウスモデル; Jia, et al., 2013, BMC Nephrol. 14:116。
9. 5/6腎臓摘出のCKDラットモデル; Morrison, 1962, Lab Invest. 11:321-32、Shimamura & Morrison, 1975, Am. J. Pathol. 79(1):95-106。
10. GACIおよび骨減少症のENPP1ノックアウトマウスモデル、Mackenzie, et al., 2012, PloS one 7(2):e32177。
【0636】

上記などの動物モデルは、本発明による、ENPP1またはENPP3をコードするベクターの投与時に、軟部組織の石灰化および骨化の変化を試験するために使用される。例えば、以下のマウスモデル: (a) $Npt2a^{-/-}$ (b) 二重変異体 $Npt2a^{-/-}/Enpp1^{asj/asj}$ 、および (c) 腎結石の食事誘発性形成に供されているC57BL/6マウス(Jackson Labs)、食事は高カルシウム、低マグネシウム食(Teklad Labs diet TD.00042, Harlan Labs, Madison, WIなど)。

【0637】

$Npt2a^{-/-}$ マウスは、離乳齢から始まり通常 of 食物を与えられ、少なくとも10週齢まで持続すると、腎結石形成を示す。逆に、二重変異 $Npt2a^{-/-}/Enpp1^{asj/asj}$ マウスは、通常 of 食物を与えられた場合、 $Npt2a^{-/-}$ マウスと比較して、腎結石形成の二倍のレベルを提示する。 $Npt2a^{-/-}$ マウス、および $Npt2a^{-/-}/Enpp1^{asj/asj}$ マウスは、Jackson Laboratory、MEから市販されている。二重変異マウス($Npt2a^{-/-}/Enpp1^{asj/asj}$)は、当技術分野で公知の標準プロトコルに従って $Npt2a^{-/-}$ マウスおよび $Enpp1^{asj/asj}$ マウスを交配させることによって作製される(Jackson Laboratory Recourse Manual, (2007, 1-29))。腎結石関連疾患に対する $Npt2a^{-/-}$ または $Npt2a^{-/-}/Enpp1^{asj/asj}$ 二重変異マウスモデルを使用して、本発明による治療の有効性を試験することができる(Khan & Canales, 2011, J. Urol. 186(3):1107-13; Wu, 2015, Urolithiasis 43(Suppl 1):65-76)。オキサレート石形成齧歯類モデル、すなわち、エチレングリコール、ヒドロキシルプリン飼育マウスもしくはラット、またはマウスおよびラットのオキサレートナトリウムの腹腔内注射(Khan & Glenton, J. Urology 184:1189-1196)、尿酸石形成(Wu, et al., 1994, P

roc. Natl. Acad. Sci. U S A 91 (2) : 742-6) およびシスチン尿症マウスモデル (Zee, et al., 2017, Nat. Med. 23 (3) : 288-290; Sahota, et al., 2014, Urology 84 (5) : 1249 e9-15) も試験することができる。

【0638】

特定の実施形態では、文献において、常染色体劣性低リン酸血症性くる病2型 (ARHR2) と呼ばれる、ヒト疾患GACIの成体形態を再現する齧歯類モデルはない (Levy-Litan, et al., 2010, Am. J. Human Gen. 86 (2) : 273-8.)。

【0639】

ENPP1の酵素活性、ENPP3の酵素活性、血漿PPiの定量化、マイクロCTスキャン、血漿PPiの取り込みの定量化に関する実験詳細は、本明細書に参照によりその全体が組み込まれる、PCT/US2016/33236-Braddock et al.、WO 2014/126965-Braddock et al.、WO 2017/087936-Braddock et al.、およびUS 2015/0359858-Braddock et al.の特許出願および刊行物に詳細に記載されている。

【0640】

本発明は、以下の実施例によってさらに図示されており、これはさらなる限定であると決して解釈されるべきではない。本出願全体を通して引用されたすべての引用文献 (文献参考、発行された特許、公開された特許出願、および同時係属中の特許出願を含む) の内容は、参照により本明細書に明示的に組み込まれる。

【実施例】

【0641】

実施例1-AAVシステムへのNPP1配列のクローニング、AAV感染、AAV産生および精製のための構築物の生成

本実施例で使用されるAAVプラスミドは、AAV2からの二つのITRに隣接する発現カセットを含む。AAV2のゲノムは、AAV8で偽型とすることができる。発現カセットは、5'から3'の方向に、以下の要素、肝臓特異的エンハンサー肝臓制御領域 (HCR)、肝臓特異的プロモーターヒトアルファ抗トリプシン (hAAT)、イントロン、N末端アズロシジニングシグナル配列を含むポリヌクレオチド、NPP1 cDNA、C末端Fc配列、およびSV40ポリアデニル化信号、を有し得る。発現カセットは、AAV2から5' ITRおよび3' ITRに隣接されている。生成された構築物は、図1の概略図に示される。

【0642】

ENPP1タンパク質は、別個の膜内ドメインを有する細胞表面に局在化された膜貫通タンパク質である。ENPP1タンパク質は、膜貫通ドメインを省略することによって可溶性にされる。ヒトNPP1 (NCBIAクセセッションNP_006199) は、その膜貫通領域 (例えばENPP1の残基77~98、NCBIAクセセッションNP_006199) を、(a) ヒトNPP2の残基12~30 (NCBIAクセセッションNP_001124335)、または(b) NPP7の残基1~22、または(c) NPP5の残基1~24、または(d) ヒト血清アルブミン、(e) ヒトアズロシジンからなる群から選択される適切なシグナルペプチド配列で置換することによって、可溶性の、組み換えタンパク質を発現するように修飾された。

【0643】

配列番号 (1~4、6~15、17~31、および42~56) は、いくつかのENPP1-FcおよびENPP3-Fc構築物を示し、それらはすべて、ENPP1またはENPP3配列のAAV感染のための構築物を生成するAAVシステムへのクローニングに使用することができる。

【0644】

10

20

30

40

50

修飾されたNPP1配列を、標準的な分子生物学プロトコルを使用してプラスミド内にクローニングした。構築物の同じ成分を担持するが、NPP1 cDNAを含まず、マルチクローニング部位を有する非コードプラスミドを使用して、対照としてヌル粒子を生成した。

【0645】

感染性AAVベクター粒子は、各ローラーボトルを125 µgのベクタープラスミド（ITRおよび発現カセットを含む）と共に、125 µgのrep/capプラスミド（AAV粒子のキャプシドタンパク質およびウイルス複製に必要なタンパク質を発現する）、および150 µgのアデノウイルスヘルパー機能を発現するヘルパープラスミドをカルシウムホスフェート共沈により共トランスフェクトすることによって、ローラーボトルで培養されたHEK293細胞で生成される。各ベクター調製には、合計10個のローラーボトルが使用される。トランスフェクションの約3日後、細胞を採取し、2500 gで10分間遠心分離する。次いで、細胞ペレットおよび培地を別々に処理する。細胞ペレットは、TBS（50 mMのトリスHCl、150 mMのNaCl、2 mMのMgCl₂、pH 8.0）中で完全に再構成される。

【0646】

3回の凍結／融解サイクル後、溶解物を2500 gで30分間遠心分離する。この遠心分離からの上清を培地に加え、ベクター粒子を、PEG8000（Sigma）の8%で15時間培養し、2500 gで30分間ペレット化することによって沈殿させる。細胞および培地由来のベクターを含有するペレットは、TBS内で完全に再構成され、37°Cで30分間ベンゾナーゼ（Merck）で処理され、10,000 gで10分間遠心分離される。上清を、1.3～1.5 g/mlのCsCl密度ステップ勾配を含有する37.5 mlのウルトラクリアチューブ（Beckman）にロードし、SW28ローター（Beckman）中で28,000 rpmで17時間遠心分離する。ウイルスバンドは、10 mlのシリンジおよび18ゲージの針を使用して収集され、新しい12.5 mlのウルトラクリアチューブに移され、これは1.379 g/mlのCsCl溶液で満たされて、連続的な勾配を生成する。SWSW40Tiローター（Beckman）中で、チューブを38,000 rpmで48時間遠心分離する。最後に、10 kDa膜（Slide-A-Lyzer Dialysis Products, Pierce）を使用して、完全な粒子のバンドを収集し、PBS中で透析し、0.45 µmミリポアフィルターで濾過する。このPEGおよびCsCl系精製プロトコルは、空のAAVキャプシドと、ウイルスストックからのDNAおよびタンパク質不純物を劇的に減少させ、従ってAAVの純度を増加させ、最終的にインビボでの形質導入を高める。いずれのENPPタンパク質もコードしない「ヌル」ベクターを担持する感染性AAV粒子を生成するために、同じプロトコルが使用される。

【0647】

実施例2－異なるシグナル配列を使用したENPP1の発現

ENPP1は、CHOまたはHEK293哺乳類細胞のいずれかに安定したトランスフェクションを確立することによって産生される。安定細胞株を確立するために、ENPP1融合タンパク質（例えば、本明細書の他の場所に開示される配列）をコードする核酸配列を、大規模なタンパク質産生のための適切なベクター中に配置する。市販の供給源から入手可能な様々なかかるベクターがある。

【0648】

例えば、図3は、pcDNA3プラスミドにクローニングされたNPP2 signal-NPP1-Fc、pcDNA3プラスミドにクローニングされたNPP7 signal-NPP1-Fc、および適切なエンドヌクレアーゼ制限部位を有するpcDNA3プラスミドにクローニングされたアズロシジン signal-NPP1-Fcのプラスミドマップを示す。所望のタンパク質構築物を含むpcDNA3プラスミドは、エレクトロポレーションまたはリポフェクタミンなどの確立された技術を使用して、発現プラスミドに安定的にトランスフェクトされ、細胞は、抗生物質選択下で増殖されて、安定的にトランス

10

20

30

40

50

フェクトされた細胞に対して強化される。

【0649】

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が確立され、所望の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される。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、ENPP1用に先に記載された合成酵素基質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される (Saunders, et al., 2008, Mol. Cancer Ther. 7 (10): 3352-62; Albright, et al., 2015, Nat Commun. 6: 10006)。

【0650】

スクリーニングを通じた高発現クローンの識別時、タンパク質産生が、振盪フラスコ内で、または以前ENPP1に対して説明されたバイオリアクターを使用して達成される (Albright, et al., 2015, Nat Commun. 6: 10006)。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。

【0651】

図2に示すように、アズロシジシグナル配列を含む構築物は、最も高い量のNPP1タンパク質を生成する。アズロシジシグナル配列 (731mg/リットル) を使用して産生されたENPP1タンパク質の量は、NPP2 (127mg/リットル) またはNPP7 (136mg/リットル) シグナル配列を使用して産生されたENPP1タンパク質と比較して、驚くべきことに五倍高い。このように生成されたENPP1タンパク質は、追加の技術および/または上述のクロマトグラフィーステップを使用してさらに精製され、純度約99%などの大幅に高い純度に達する。

【0652】

このように生成されたENPP1の酵素活性は、HPLCを使用してヒトNPP1によるATPの定常状態加水分解を決定することによって測定される。簡潔に述べると、酵素反応は、20mMのトリス、pH7.4、150mMのNaCl、4.5nMのKCl、14μMのZnCl₂、1mMのMgCl₂、および1mMのCaCl₂を含有する反応緩衝液中のATPの様々な濃度に10nMのENPP1を加えることによって開始される。様々な時点で、50μlの反応溶液を除去し、等体積の3Mギ酸でクエンチする。クエンチした反応溶液を、5mMのアンモニウムアセテート (pH6.0) 溶液中で平衡化したC-18 (5μm, 250×4.6mm) カラム (Higgins Analytical) にロードし、0%~20%のメタノール勾配で溶出する。基質および生成物を、259nmでのUV吸光度によって監視し、対応するピークおよび標準曲線の統合に従って定量化した。したがって、ENPP1タンパク質は、本明細書ならびにPCT/2014/015945 - Braddock et al.; PCT/2016/033236 - Braddock et al. および PCT/2016/063034 - Braddock et al. の他の箇所にて記載されるプロトコルに従って特徴づけられる。

【0653】

実施例3 - ENPP1-FcをコードするAAVウイルス粒子のマウスへの注射、および体重増加、骨密度、骨強度および骨体積の測定。

NPP1またはNPP3をコードし、それらを発現できるベクターの送達の有効性は、Enpp1^{asj/asj}マウスモデル、ABCC6^{-/-}マウスモデル、HYPマウスモデル、ttwマウスモデル、慢性腎臓疾患のマウスモデル (CKD)、またはCKDの5/6腎臓摘出のラットモデルなどのマウスモデルを使用して試験される。非限定的な例として、以下の実験では、マウスモデルとしてEnpp1^{asj/asj}マウスを使用し、マウスモデルに送達されるポリヌクレオチドとしてアズロシジン-NPP1-Fc構築物を使用し、送達は、インビボでENPP1-Fcタンパク質をコードするAAV粒子 (実施例1に示すように調製される) を使用することによって達成される。

【0654】

当業者であれば、病理学的石灰化または骨化の疾患を治療する遺伝子療法の効果を試験するための本発明で開示される、代替のマウスモデル、異なるENPP1融合タンパク質（ENPP1-アルブミンまたはENPP1-FcもしくはENPP1の機能的等価物、またはFcもしくはアルブミンドメインを欠くENPP1など）、または異なるENPP3融合タンパク質（ENPP3-FcもしくはENPP3-アルブミンまたはFcもしくはアルブミンドメインを欠くENPP3もしくはENPP3の機能的等価物）をコードする代替のシグナル配列（NPP2、NPP5、NPP7アルブミンまたはアズロシジンなど）を含む代替ポリヌクレオチド構築物を使用することにより、同じ実験を繰り返すことができることを認識するであろう。実験で利用されるアズロシジン-NPP1-Fc構築物は、概念実証としてヒトENPP1-Fcタンパク質をコードし、ヒトENPP3-Fcをコードするアズロシジン-NPP3-Fc構築物で同じ実験を繰り返すことができる。

10

【0655】

この実験では、四セットのマウスを使用し、各セットは、少なくとも五匹のマウス（6～8週齢）を有し、AAV粒子を注射する前に、すべてのマウスセットは、1000 µg/mlの濃度の力価GK1.5CD4抗体（25～40 µg/動物の最終用量）の腹腔内注射によって寛容化され、AAV構築物によって産生されるヒトタンパク質に対するマウスの免疫反応を減少させる。対照群として機能するENPP1^{wt}マウスの第一のコホートに、ヌルベクターを含むAAV粒子を注射し、対照群として機能するENPP1^{asj/asj}マウスの第二のコホートに、ヌルベクターを含むAAV粒子を注射し、試験群として機能するENPP1^{wt}マウスの第三のコホートに、ENPP1-Fcタンパク質をコードするポリヌクレオチドを含むAAV粒子を注射し、および試験群として機能するENPP1^{asj/asj}の第四のコホートに、ENPP1-Fcタンパク質をコードするポリヌクレオチドを含むAAV粒子を注射する。各コホートへのAAV注射の後、寛容化注射は毎週繰り返される（すなわち、AAV注射後、7、14、21、28、35、42、49、56、63、70、77、84、91、98、および105日目）。

20

【0656】

実験のマウスは、加速食（リンに富み、マグネシウム含有量を減少させた（Harlan Teklad, Rodent diet TD. 00442, Madison, WI）、または通常の食事（Laboratory Autoclavable Rodent Diet 5010; PMI Nutritional International, Brentwood, MO）のいずれかを与えられ、6～8週齢後、すべてのマウスは、pH 7.4のPBSの約 $1 \times 10^{12} \sim 1 \times 10^{15}$ v g/kg、好ましくは $1 \times 10^{13} \sim 1 \times 10^{14}$ v g/kgの後眼窩注射または尾静脈注射を受ける。注射されたベクターは、空の「ヌル」（対照群）であるか、またはNPP1遺伝子（試験群）を担持するのいずれかである。体重測定は、AAV注射後のいかなる体重の増加または減少も記録するために毎日行われる。マウスからの血液、尿、骨、および組織試料を採取して、以下のとおり分析する。実験プロトコルは、Albright et al., Nat Commun. 2015 Dec 1; 6:10006, およびCaballero et al., PLoS One. 2017; 12(7): e0180098に詳細に列挙され、それらすべての内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。試験終了時（7、28、および112日、マウスはすべて、イソフルランを用いた深層麻酔における眼窩放血により安楽死させ、重要な器官を、当技術分野で記載されるように除去する。（Impaired urinary osteopontin excretion in Npt2a-/- mice., Caballero et al., Am J Physiol Renal Physiol. 2017 Jan 1; 312(1): F77-F83; Response of Npt2a knockout mice to dietary calcium and phosphorus, Li Y et al., PLoS One. 2017; 12(4):

30

40

50

e 0 1 7 6 2 3 2 .) 。

【0657】

血漿 P P i の定量化

動物は、ヘパリン化されたマイクロピペットを使用して後方眼窩に採血され、血液はヘパリン処理したエッペンドルフ管に分注され、湿った氷上に置かれる。試料を、4, 0 0 0 r . p . m . で4℃の事前冷却した微小遠心機中で5分間回転させ、血漿を収集し、50mMの体積のトリス-アセテート pH=8.0で希釈する。収集された血漿を、超遠心分離 (Nano Sep 300K, Pall Corp., Ann Arbour, MI) を介して300KDa膜を通して濾過し、-80℃で凍結する。ピロホスフェートを、ウリジン5'-ジホスホ [4C] グルコースを使用した標準的な三つのステップの酵素アッセイを使用して定量化し、反応生成物、ウリジン5'-ジホスホ [4C] グルコン酸を記録する。(Analysis of inorganic pyrophosphate at the picomole level. Cheung CP, Suhadolnik RJ, Anal Biochem. 1977 Nov; 83 (1): 61-3)。簡潔に述べると、5mMのMgCl2、90mMのKCL、63mMのトリス-HCL (pH 7.6)、1nmolのNADP+、2nmolのグルコース1, 6-ジホスフェート、400pmolのウリジン5'-ジホスホグルコース、0.02μCiのウリジン5'-ジホスホ [4C] グルコース、ウリジン5'-ジホスホグルコースの0.25単位、ホスホグルコースムターゼの0.25単位、グルコース6-ホスフェートデヒドロゲナーゼの0.5単位、および無機ピロホスフェート (50~200pmol) を含む反応混合物を含む反応混合物 (100μl) を37℃で30分培養する。反応は、水中に十分に懸濁された200μlの2%の炭素の添加によって終了する。次いで、200μlの上清のアリコートをし、シンチレーション溶液中で計数する。

【0658】

インビボ^{99m}PYP撮像

必要に応じて、骨撮像を実施することができる。骨撮像剤^{99m}Tc-ピロホスフェート (Pharmalucence, Inc) は、二重の1mmピンホールコリメータ (X-SPECT, Gamma Medica-Ideas) 38を有する前臨床microSPECT/CTハイブリッド撮像システムを使用して、動物のコホートで評価される。各動物に、2~5mCiの放射性標識トレーサーを腹腔内注射し、注射の1~1.5時間後に撮像する。SPECT画像との解剖学的共局在化のために、CTスキャン (50kVp、800uA、および倍率1.25で512投影) が取得される。SPECT画像は、反時計回りの回転でコリメータヘッド当たり180°で取得され、射影は32、射影当たり60秒、RORは7.0cm、FOVは8.95cm、エネルギーウィンドウは140keV±20である。CT画像は、フィルタリングされたバックプロジェクションアルゴリズムを使用して、FLEX X-O CTソフトウェア (Gamma Medica-Ideas) を用いて再構成されるものとする。SPECT画像は、FLEX SPECTソフトウェア (5つの反復、4つのサブセット) を使用して再構成され、その後、CT画像と融合され、AMIRAソフトウェアを使用して分析される。

【0659】

^{99m}PYP取り込みの定量化

^{99m}PYPマウススキャンでは、動物を注射から7日以内に撮像する。得られたSPECTスキャンは、NIHの画像処理ソフトウェアImageJにインポートされ、関心領域が各動物の頭部 (標的器官) および全身の周りに描かれる。しばしば「パーセント注射用量」と称される注入活性パーセント (PIA) は、頭部の計数と全身の計数の比率を比較することによって計算され、パーセント注射用量として表され、放射性トレーサーが関心領域 (頭部) によって取り込まれる親和性の尺度を与える。各スキャンでの合計計数は、注入用量の全身尺度として理解される。

【0660】

血液および尿パラメータ

生化学的分析はまた、血液試料（眼窩の放血により採取される）および、午前10時から午後2時の間の同じ時間に一晚絶食した後に採取されるスポット尿を使用して実施され得る。濾過によるヘパリン化血漿の脱タンパク質化（NanoSep 300 K, Pall Corp., Ann Arbor, MI）後、血漿および尿の総ピロホスフェート（PPi）濃度を、蛍光プローブ（AB112155, ABCAM, Cambridge, MA）を使用して決定する。尿PPiは、尿クレアチニンに対して補正され、これは、アッセイ間の変動性を調整するための適切な対照を使用して、LC-MS/MSまたはELISAによって測定される。

【0661】

腎臓の組織構造

左腎臓は、4%のホルマリン/PBS中で4℃で12時間固定され、その後、エタノールおよびキシレンの濃度を上げて脱水し、続いてパラフィンで包埋する。1%メチルグリーンで対比染色した10μmのフォンコッサ染色切片で、鉱床沈着物を決定する。ヘマトキシリン/エオシンは、形態学的評価のための対比染色として使用される。組織形態計測評価、皮質、髄質および骨盤を含む矢状腎臓切片の組織形態計測評価は、骨形態計測装置（Osteometrics, Atlanta, GA）を使用して、二人の独立した観察者によって盲検化される。石灰化面積の割合は、式を使用して決定され： $\% \text{石灰化面積} = 100 * \text{石灰化面積} / \text{総面積}$ （皮質、髄質、および骨盤腔を含む）、セクション当たりの観察された面積の数に依存する。石灰化サイズは、式を使用して決定され： $\text{石灰化サイズ} = \text{石灰化面積} / \text{セクション当たりの観察された石灰化面積の数}$ 。

【0662】

透過電子顕微鏡では、左腎臓の1mmの³ブロックを、リン酸緩衝食塩水中の2.5%グルタルアルデヒドおよび2%パラホルムアルデヒド中で2時間固定し、続いて1%のオスミウム液体中で2時間後固定する。脱水は、一連のエタノール濃度（50%~100%）を使用して実施される。腎組織はエポキシ樹脂に包埋され、重合は60℃で一晩実施される。薄い切片（50nm）を調製した後、組織をウランおよび鉛で二重染色し、Tecna Biotwin（LaB6, 80kV）（FEI, Thermo Fisher, Hillsboro, OR）を使用して観察する。

【0663】

組織型、組織形態計測、およびマイクロCT

マウスの脛骨および大腿骨は、軟部組織から剥がされ、70%エタノールに固定され、脱水され、メチルメタクリレート中に埋め込まれて切片化され、トルイジンブルーで染色される（C. B. Ware et al., Targeted disruption of the low-affinity leukemia inhibitory factor receptor gene causes placental, skeletal, neural and metabolic defects and results in perinatal death. Development 121, 1283-1299 (1995)）。組織形態計測測定は、一次海綿質に対応する成長板のすぐ下の固定領域で実施される（A. M. Parfitt et al., Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. J Bone Miner Res 2, 595-610 (1987)） and analyzed by Osteomeasure software（Osteometrics, Atlanta, GA）。骨は、Scanco uCT-35（Scanco, Brütisellen, Switzerland）を使用してスキャンされ、成長板直下の脛骨近位部および大腿骨遠位部の両方（骨梁骨）で、および脛骨または大腿骨中軸部（皮質骨）で、多数の構造パラメータについて分析される。

【0664】

骨の生体力学的検査

加速食のマウスからの大腿骨は、三点曲げで破損するまで負荷をかけられ、通常食のマウスからの大腿骨は四点曲げで破損するまで負荷がかけられる。すべての全骨試験は、大腿骨を後方から前方に負荷をかけることによって行われ、その結果、前方四分円は引張荷重を受ける。四点曲げ装置の下側および上側支持体の幅はそれぞれ7 mmおよび3 mmである。試験は、油圧サーボ試験機 (Instron model 8874; Instron Corp., Norwood, MA, USA) を使用して、0.05 mm/秒のたわみ率で実施される。負荷およびミッドスパンの偏向は、200 Hzのサンプリング周波数で直接取得される。負荷-偏向曲線は、剛性、最大荷重、および骨折までの仕事について分析される。降伏は、初期接線剛性と比較して、割線剛性の10%減少(偏向範囲に対して正規化された負荷範囲)として定義される。大腿骨を室温で試験し、リン酸緩衝食塩水(PBS)で湿潤に保つ。破損時のたわみから降伏時のたわみを引いたものと定義される、降伏後のたわみも測定される。

10

【0665】

実施例4-ENPP1またはENPP3を発現するウイルスベクターを使用した慢性腎臓疾患の治療。

以下の実施例は、血管石灰化およびCKDに関連する症状の治療に有効であると予想される、ENPP1またはENPP3を発現するAAVを提供する。ENPP1-FcおよびENPP3-Fcは、例示の目的で実施例において使用され、本発明の他のENPP1またはENPP3融合物を使用することにより類似の結果を得ることができる。

20

【0666】

ENPP1-FcおよびENPP3-Fcタンパク質を発現するAAVビリオンは、実施例1に従って作製され、CKDマウス(慢性腎臓疾患(CKD)のモデルである(BMC Nephrology, 2013, 14:116))に投与される。ENPP1およびENPP3を用いた処置には、マウスの六セットが使用される。

【0667】

対照コホート：この実験では、対照群として機能するENPP1^{wt}マウスの第一のコホートに、ヌルベクターを含むAAV粒子を注射し、対照群として機能する第二のコホートに、ヌルベクターを含むAAV粒子を注射する。

【0668】

ENPP1-処理マウスコホート：ENPP1^{wt}マウスの第三のコホートにENPP1-Fcタンパク質を発現するように操作されたAAV粒子を注射し、またCKDマウスの第四のコホートにENPP1-Fcタンパク質を発現するように操作されたAAV粒子を注射する。

【0669】

ENPP3-処理マウスコホート：ENPP1^{wt}マウスの第五のコホートに、ENPP3-Fcタンパク質を発現するように操作されたAAV粒子を注射し、またCKDマウスの第六のコホートにENPP3-Fcタンパク質を発現するように操作されたAAV粒子を注射する。

【0670】

アデニン食：CKDマウスは、アデニン食で維持され、野生型マウスは、通常食で維持される(Laboratory Autoclavable Rodent Diet 5010; PMI Nutritional International, Brentwood, MO)。CKDマウスが消費するアデニンを含む食を提供するため、アデニンを臭気と味覚を鈍らせるカゼイン系食事と混合した。アデニンはSigma Aldrich(MO, USA)から購入され、カゼイン系食事はSpecial Diets Services(SDS、英国)から購入される(参照番号824522)。食事の他の成分は、トウモロコシデンプン(39.3%)、カゼイン(20.0%)、マルトデキストリン(14.0%)、スクロース(9.2%)、トウモロコシ/コーンオイル(5%)、セルロース(5%)、ビタミンミックス(1.0%)、DL-メチオニン(0.

30

40

50

3%)、およびコリンビタルトレート(0.2%)である。

【0671】

ベクター注射：生後2週間後、すべてのマウスは、マウス当たりpH 7.4のPBSの、約 $1 \times 10^{12} \sim 1 \times 10^{15} \text{ v g / k g k g}$ 、好ましくは $1 \times 10^{13} \sim 1 \times 10^{14} \text{ v g / k g}$ の後眼窩注射または尾静脈注射を受ける。注射されたベクターは、空の「ヌル」(対照群)であるか、またはNPP1 or NPP3遺伝子(試験群)を担持している。

【0672】

アッセイ：腎臓組織型、PPiレベル、およびFGF-23レベル、ビタミンD、副甲状腺ホルモン(PTH)レベル、血清/血液尿素レベル、血中尿素窒素(BUN)レベル、血清/血液クレアチンレベル、および血漿ピロホスフェート(PPi)などの血液尿パラメータを、実施例3に記載されるように各コホートについて分析する。尿は、自然排尿後にスポット尿試料として収集される。血清および尿カルシウム、リン、クレアチニンおよび尿素レベルは、KoneLab 20XTi(Thermo Scientific, Finland)で測定される。クレアチニン濃度は、比色アッセイ(BioChain, CA USA)で検証される。PTHはマウスインタクトなPTH ELISAキット(Immutopics, CA, USA)により測定され、FGF23レベルはインタクトなFGF23 ELISA(Kainos, Japan)により測定され、ビタミンDはEIAキット(Immunodiagnostic Systems, UK)により測定される。実験の詳細は、BMC Nephrology, 2013, 14:116, and PLoS One, 2017 Jul 13;12(7). に列挙される。

【0673】

結果：未処置のCKDマウスは概して、体重減少と、尿中尿素/血清尿素および尿クレアチニン/血清クレアチニンとの間の比の減少など、腎機能低下の兆候を示す。対照的に、ENPP1またはENPP3タンパク質を発現するAAVで処置されたCKDマウスは、正常なWTマウスの体重範囲に近づく体重の増加を示すと予想される。一般的に、80~100mg/dLの範囲の血清尿素レベルが最適であるとみなされる。100mg/dLを超える尿素レベルは、体重減少および身体活動の減少と共に、罹患率の増加と関連している。処置された(ENPP1またはENPP3を有するAAV)CKDマウスは、血清尿素レベルの低下および尿尿素レベルの増加によって明示される腎臓機能の改善を示し、尿尿素/血清尿素比の上昇をもたらすと予想される。

【0674】

CKDマウスの肝組織の腎臓組織学分析は、例えば、管腔、微小膿瘍および拡張尿細管などの領域における結晶質構造の沈着、拡張したボウマン嚢腔を示す過ヨウ素酸-シッフ(PAS)染色、タンパク質キャストを伴う萎縮性尿細管(「甲状腺化」)および管状基底膜の肥厚を伴う管状萎縮の存在、Ladewig染色で見られる軽度の間質性線維症の存在およびフォンコッサ染色で見られる管状構造の広範な石灰化の発生を示すと予想される。対照的に、ENPP1またはENPP3で本発明に従って処置されたCKDマウスは、管腔における腎ミネラル沈着の減少または欠乏および健康な野生型マウスの組織型と類似した組織型を有するおよび軟部組織の血管系を示すと予想される。

【0675】

未処置のCKDマウスは、健常な野生型マウスと比較する時、血清無機リン(pi)の有意な増加、PTHおよびFGF23レベルの増加が予想されるが、1,25(OH)₂-ビタミンDレベルの減少およびPPiレベルの低下(約0.5μM)が予想される(PPiの正常レベルは約2~4μMであり、PTHについては約10~65ng/Lであり、FGF23レベルの中央値は13RU/mlであり、正常なFGF23レベルは5~210RU/mlであり、正常なビタミンDレベルは20ng/L~50ng/Lである)。対照的に、処置されたCKDマウスは、PPiのレベルの上昇(約4~5μM)を示すことが予想され、これは未処置CKDマウスに見られるPPiレベル(約0.5μM)よりも高いことが予想される。したがって、当業者は、組織学的分析によって可視化された

腎臓および冠動脈の軟部組織の石灰化の減少（25%、または50%、または70%、または90%または100%）、血清P P i値の増加、ビタミンDレベルの正常化、F G F 2 3レベルの正常範囲までの低下、血液分析からのP T Hレベルの正常化、生存率の増加、体重増加を伴う尿中尿素およびクレアチンの増加によって観察される腎機能の改善などの一つ以上の要素を観察することにより、慢性腎臓疾患の治療におけるベクター系E N P P 1またはE N P P 3の治療効果の決定を行うことができる。

【0676】

ヒト対象の治療：

C K Dに罹患しているヒト患者は、p H 7 . 4で1 X P B S中約 $5 \times 10^{11} \sim 5 \times 10^{15}$ v g / k gを含有するイントラベナル（i n t r a v e n a l）注射を提供することによって治療され、一部の実施形態では、E N P P 1またはE N P P 3を送達および発現することができる対象当たり、p H 7 . 4で1 X P B S中約 $1 \times 10^{12} \sim 1 \times 10^{15}$ v g / k gである。マウスモデルで論じたように、定期的な血液および尿検査を通して前述のパラメータの一つ以上を監視することによって、C K Dの治療の成功が観察される。生きている患者において行うことができない腎臓の切片または動脈組織の染色を必要とする組織学的分析の代わりに、C Tスキャン、超音波、または静脈性腎盂造影などの当業者において一般的に知られている非侵襲的可視化技術を使用して、C K Dに罹患している患者におけるE N P P 1またはE N P P 3のベクター系送達および発現に応答して、石灰化の存在および石灰化の減少を可視化する。静脈性腎盂造影は、染料として機能する造影剤を使用するX線検査で、尿路の可視化と腎石灰化の検出に役立つ。コンピュータ断層撮影法は、X線技術を使用して、尿路などの身体の内部構造を描写する非侵襲的撮像技術である。腎石灰化は、C Tスキャンで見ることができる。C Tスキャンは、身体の周りの異なる角度からX線画像を収集し、詳細な断面画像ならびに身体の内部構造および器官の三次元画像を生成する。C Tスキャンは、治療後の石灰化の存在およびその後の減少を検出するために、動脈でも使用することができる。コンピュータは、身体を通して伝送される放射線を分析して、内部構造および器官の画像を再構築する。

【0677】

軟部組織の石灰化、心臓の石灰化、心筋梗塞を可視化する技術を有する医師は、ヒトE N P P 1またはヒトE N P P 3を発現するA A Vビリオンを投与することによって、C K Dに罹患した対象の治療を行う。医師は、h E N P P 1またはh E N P P 3の構築物を送達し、誘導性プロモーターの制御下で対応するタンパク質を発現するウイルス粒子を投与する。したがって、医師は、症状の改善率および程度に基づいて、用量（発現されたh E N P P 1またはh E N P P 3の量）を制御する選択肢を有する。治療の成功は、腎機能の改善、尿クレアチン値の改善（正常な尿中のクレアチンレベルは男性ではクレアチン値は $40 \sim 278$ m g / d L、女性では $29 \sim 226$ m g / d L）、尿尿素レベルの改善（成人の尿中の尿素値は正常で $26 - 43$ g / 24時間）、正常な血清クレアチン値（正常な血清クレアチニン範囲は女性では $0.6 \sim 1.1$ m g / d L、男性では $0.7 - 1.3$ m g / d L）、正常なビタミンDレベル（健康な人には 20 n g / m L ~ 50 n g / m Lが、適切であると考えられる。 12 n g / m L未満のレベルは、ビタミンD欠損を示す）、正常な血中尿素窒素レベル（健康な成人のB U Nレベルは $7 \sim 20$ m g / d L）、体重増加、血清P P iレベルの増加（少なくとも約 $4 \sim 5$ μ m）、動脈組織の石灰化の減少（25%、または50%、または70%、または90%、または100%減少）、およびまたはC Tまたは超音波スキャンなどの非侵襲的技術によって可視化された腎臓尿細管における石灰化の減少などの一つ以上の陽性症状を観察することによって、当業者の医療専門家によって観察される。

【0678】

実施例5 - E N P P 1またはE N P P 3を発現するウイルスベクターを使用したG A C Iの治療。

以下の実施例は、血管石灰化およびG A C Iに関連する症状の治療に有効であると予想される、E N P P 1またはE N P P 3を発現するA A Vを提供する。E N P P 1 - F cお

よび ENPP3-Fc は、例示の目的で実施例において使用され、本発明の他の ENPP1 または ENPP3 融合物を使用することにより類似の結果を得ることができる。

【0679】

ENPP1-Fc および ENPP3-Fc タンパク質を発現する AAV ビリオンは、実施例 1 に従って作製され、Enpp1^{asj/asj} マウス（これは、全身性動脈石灰化のモデルである（Li, et al., 2013, Disease Models & Mech. 6 (5): 1227-35））に投与される。ENPP1 および ENPP3 を用いた処置には、マウスの六セットが使用される。

【0680】

対照コホート：この実験では、対照群として機能する ENPP1^{wt} マウスの第一のコホートに、ヌルベクターを含む AAV 粒子を注射し、対照群として機能する enpp1^{asj/asj} マウスの第二のコホートに、ヌルベクターを含む AAV 粒子を注射する。

【0681】

ENPP1-処置マウスコホート：ENPP1^{wt} マウスの第三のコホートに ENPP1-Fc タンパク質を発現するように操作された AAV 粒子を注射し、Enpp1^{asj/asj} マウスの第四のコホートに ENPP1-Fc タンパク質を発現するように操作された AAV 粒子を注射する。

【0682】

ENPP3-処置マウスコホート：ENPP1^{wt} マウスの第五のコホートに ENPP3-Fc タンパク質を発現するように操作された AAV 粒子を注射し、Enpp1^{asj/asj} マウスの第六のコホートに ENPP3-Fc タンパク質を発現するように操作された AAV 粒子を注射する。野生型マウスは、通常食で維持され、Enpp1^{asj/asj} マウスは、高ホスフェート Teklad 食事を与えられた。

【0683】

ベクター注射：2 週齢後、すべてのマウスは、マウス当たり約 $1 \times 10^{12} \sim 1 \times 10^{15}$ vg/kg、好ましくは $1 \times 10^{13} \sim 1 \times 10^{14}$ vg/kg の後眼窩注射または尾静脈注射を PBS pH 7.4 で受ける。注射されたベクターは、空の「ヌル」（対照群）であるか、または NPP1 または NPP3 遺伝子（試験群）を担持したのいずれかである。

【0684】

アッセイ：腎臓組織型、PPi レベル、および、FGF-23 レベル、ビタミン D、副甲状腺ホルモン（PTH）レベル、血清／血液尿素レベル、血中尿素窒素（BUN）レベル、血清／血液クレアチンレベル、および血漿ピロホスフェート（PPi）などの血液尿パラメータを、実施例 3 および 4 に記載されるように各コホートについて分析する。

【0685】

結果：未処置の Enpp1^{asj/asj} マウスは、概して体重減少および死亡率の増加を呈する。対照的に、ENPP1 タンパク質または ENPP3 タンパク質を発現する AAV で処置された Enpp1^{asj/asj} マウスは、正常な WT マウスの体重範囲に近く体重の増加を示すと予測される。

【0686】

ヌルベクターで処置された Enpp1^{asj/asj} マウスは、心臓、大動脈および冠動脈に石灰化、および右心室の自由壁の心筋梗塞の組織学的証拠、冠動脈、心臓、上行大動脈および下行大動脈の石灰化、心筋細胞壊死、ならびに冠動脈石灰化の領域に隣接する心筋組織における心筋線維症を示すことが予想される。対照的に、ENPP1-Fc または ENPP3-Fc を発現する AAV で処置された Enpp1^{asj/asj} 動物は、組織型または死後のマイクロ CT において心臓、動脈、または大動脈の石灰化の不在を示すことが予想される。ヌルベクターで処置された Enpp1^{asj/asj} マウスはまた、腎皮質への拡張を伴う、外側髄質を中心とする重度の広範な石灰化とともに、腎髄質を中心とする石灰化を示す。対照的に、ENPP1 または ENPP3 を用いて本発明により処置された Enpp1^{asj/asj} マウスは、管腔における腎ミネラル沈着の減少または

10

20

30

40

50

欠乏および健康な野生型マウスの組織型と類似した組織型を有する軟部組織の血管系を示すと予想される。

【0687】

生存、毎日の動物体重、および末期組織型に加えて、治療応答は、死後高解像度マイクロCTスキャンを介して評価され、血管石灰化、血漿PPi濃度、および99mTc PPi (99mPPYP) 取り込みを撮像する。WTまたは処置された (ENPP1またはENPP3を発現するベクター) Enpp1^{asj/asj}/asjのいずれも、未処置 (ヌルベクター) Enpp1^{asj/asj} コホートの大動脈、冠動脈、および心臓に予想される劇的な石灰化とは対照的に、マイクロCTを介していかなる血管石灰化を有しないと予想される。さらに、処置した (ENPP1またはENPP3を発現するベクター) Enpp1^{asj/asj} 動物 (5.2 μM) の血清PPi濃度は、WTレベル (4.4 μM) まで上昇し、未処置のenpp1^{asj/asj} レベル (0.5 μM) を有意に上回ると予想される。

10

【0688】

99mPPYPは、心臓撮像および骨リモデリングに典型的に使用される撮像剤である。それは、ヒドロキシアパタイトの表面に局在し、その後破骨細胞により取り込まれる得るため、異常に骨の再構築活性が高い領域に敏感である。未処置のEnpp1^{asj/asj} 動物の毎週の連続撮像は、処置されたEnpp1^{asj/asj} 動物のそれと比較して、頭部における99mPPYPのより大きな取り込みを示すと予想される。測定は、ENPP1を発現するヌルベクターまたはベクターを含有するウイルス粒子の投与後30~35日目および50~65日後に行われる。これらの実験群の比較は、ENPP1-FcまたはENPP3-Fc処置が、GACIマウスにおける99mPPYPの取込みをWTレベルに戻し、ENPP1-FcまたはENPP3-Fc処置は、細胞外PPi濃度を上昇させることによって、Enpp1^{asj/asj} マウスにおける非制御組織、感覚毛、および頭蓋骨の石灰化を廃棄できることを示唆することを示すと予想される。これらの観察結果は、ENPP1-FcまたはENPP3-Fcを発現するベクターを含有するウイルス粒子を投与されたEnpp1^{asj/asj} マウスは、血管石灰化がなく、正常な血漿PPi濃度を有することを示すことが予想される。

20

【0689】

未処置のEnpp1^{asj/asj} マウスはまた、健康な野生型マウスと比較して、血清無機リン (pi) の有意な増加、PTHおよびFGF23レベルの増加、しかしながら1,25(OH)₂-ビタミンDレベルの減少およびPPiレベルの低下 (約0.5 M) を示すと予想される (ppの正常レベルは約2~4 μMであり、PTHについては約10~65 ng/Lであり、FGF23レベルの中央値は13 RU/mLであり、正常なFGF23レベルは5~210 RU/mLの範囲であり、正常ビタミンDレベルは20 ng/mL~50 ng/mLである)。対照的に、処置されたEnpp1^{asj/asj} マウスは、PPiのレベルの上昇 (約4~5 μM) を示すことが予想され、これは未処置のCKDマウスに見られるPPiレベル (約0.5 μM) よりも高いことが予想される。したがって、当業者は、GACIの治療におけるベクター系ENPP1またはENPP3ベースの治療の有効性を、組織学的分析を通じて可視化された肝臓および冠動脈の軟部組織の石灰化の減少 (25%、または50%、または70%、または90%または100%減少)、血清PPiレベルの増加、ビタミンDレベルの正常化、FGF23レベルの正常範囲までの低下および血液分析からのPTHレベルの正常化、生存率の増加、体重増加に伴う尿中尿素とクレアチンの増加によって観察される腎機能の改善などの、一つ以上の要素を観察することによって、決定することができる。

30

40

【0690】

ヒト対象の治療

GACIに罹患しているヒト患者は、pH7.4で1X PBS中、およそ5×10¹¹~5×10¹⁵ v g/kgを含む注射を提供することによって治療される。一部の実施形態では、hENPP1またはhENPP3を送達および発現することができる、対象当た

50

り、 $\text{pH} 7.4$ で $1 \times \text{PBS}$ 中、およそ $1 \times 10^{12} \sim 1 \times 10^{15} \text{ v g / kg}$ である。 GACI の治療の成功は、マウスモデルで論じた定期的な血液および尿検査を通して、前述の一つ以上のパラメータを監視することによって観察される。生きている患者において行うのが現実的ではない腎臓の切片または動脈組織の染色を必要とする組織学的分析の代わりに、実施例4で論じた非侵襲的可視化技術を使用する。

【0691】

軟部組織の石灰化、心臓の石灰化、心筋梗塞を可視化する技術を有する医師は、 hENPP1 または hENPP3 を発現する AAV ビリオンを投与することによって、 GACI に罹患した対象の治療を行う。医師は、 hENPP1 または hENPP3 をコードする構築物を送達するウイルス粒子を投与し、ベクターは、誘導性プロモーターの制御下で ENPP タンパク質を発現する。医師は、症状の改善率および程度に基づいて、用量（発現された hENPP1 または hENPP3 の量）を制御できる。正常なビタミンDレベル（ $20 \text{ ng / ml} \sim 50 \text{ ng / ml}$ が、健康な人には適切であるとみなされる。 12 ng / ml 未満のレベルはビタミンD欠損を示す）、正常な血中尿素窒素レベル（健康な成人の BUN レベルは $7 \sim 20 \text{ mg / dL}$ ）、体重増加、血清 PPi レベルの増加（少なくとも約 $4 \sim 5 \mu \text{m}$ ）、動脈組織の石灰化の減少（ 25% 、または 50% 、または 70% 、または 90% または 100% 減少）および／または CT または超音波スキャンなどの非侵襲的な技術によって可視化された腎臓細管における石灰化の減少などの一つ以上の陽性症状を観察することによって、当業者である医療専門家によって治療の成功が観察される。

【0692】

実施例6— ENPP1 または ENPP3 を発現するウイルスベクターを使用した PXE の処理。

以下の実施例は、血管石灰化および PXE に関連する症状の治療に効果的であることが予想される、 ENPP1 または ENPP3 を発現する AAV を提供する。 ENPP1-Fc および ENPP3-Fc は、例示の目的で実施例において使用され、本発明の他の ENPP1 または ENPP3 融合物を使用することにより類似の結果を得ることができる。

【0693】

ENPP1-Fc タンパク質および ENPP3-Fc タンパク質を発現する AAV ビリオンは、実施例1に従って作製され、 ABCC6-/- マウス（弾性線維性仮性黄色腫のモデルである；*Jiang, et al., 2007, J. Invest. Derm.* 127 (6): 1392-4102）に投与される。 ENPP1 および ENPP3 を用いた処置には、マウスの六セットが使用される。

【0694】

対照コホート：この実験では、対照群として機能する ENPP1^{wt} マウスの第一のコホートに、ヌルベクターを含む AAV 粒子を注射し、対照群として機能する ABCC6-/- マウスの第二のコホートに、ヌルベクターを含む AAV 粒子を注射する。

【0695】

ENPP1 —処置マウスコホート： ENPP1^{wt} マウスの第三のコホートに ENPP1-Fc タンパク質を発現するように操作された AAV 粒子を注射し、 ABCC6-/- マウスの第四のコホートに ENPP1-Fc タンパク質を発現するように操作された AAV 粒子を注射する。

【0696】

ENPP3 —処置マウスコホート： ENPP1^{wt} マウスの第五のコホートに ENPP3-Fc タンパク質を発現するように操作された AAV 粒子を注射し、 ABCC6-/- マウスの第六のコホートに ENPP3-Fc タンパク質を発現するように操作された AAV 粒子を注射する。野生型マウスは、通常食で維持され、 ABCC6-/- マウスは、高ホスフェート Teklad 食事を与えられた。

【0697】

ベクター注射：2週齢後、すべてのマウスは、マウス当たり約 $1 \times 10^{12} \sim 1 \times 10^{15} \text{ v g / kg}$ 、好ましくは $1 \times 10^{13} \sim 1 \times 10^{14} \text{ v g / kg}$ の後眼窩注射または尾静

10

20

30

40

50

脈注射をPBS pH 7.4で受ける。注射されたベクターは、空の「ヌル」（対照群）であるか、またはNPP1またはNPP3遺伝子（試験群）を担持したのいずれかである。

【0698】

アッセイ：腎臓組織型、PPiレベル、および、FGF-23レベル、ビタミンD、副甲状腺ホルモン（PTH）レベル、血清／血液尿素レベル、血中尿素窒素（BUN）レベル、血清／血液クレアチンレベル、および血漿ピロホスフェート（PPi）などの血液パラメータを、実施例3および4に記載されるように各コホートについて分析する。

【0699】

結果：未処置のABCC6^{-/-}マウスは、概して体重減少および死亡率の増加を呈する。対照的に、ENPP1またはENPP3タンパク質を発現するAAVで処置されたABCC6^{-/-}マウスは、正常なWTマウスの体重範囲に近づく体重の増加を示すと予測される。ヌルベクターで処置されたABCC6^{-/-}マウスは、心臓、大動脈および冠動脈に石灰化、および右心室の自由壁の心筋梗塞の組織学的証拠、冠動脈、心臓、上行大動脈および下行大動脈の石灰化、心筋細胞壊死、ならびに冠動脈石灰化の領域に隣接する心筋組織における心筋線維症を示すことが予想される。対照的に、ENPP1-FcまたはENPP3-Fcを発現するベクターで処置されたABCC6^{-/-}動物は、組織型または死後のマイクロCTにおいて心臓、動脈、または大動脈の石灰化の不在を示すことが予想される。ヌルベクターで処置されたEnpp1^{asj/asj}マウスはまた、腎皮質への拡張を伴う、外側髄質を中心とする重度の広範な石灰化とともに、腎髄質を中心とする石灰化を示す。対照的に、ENPP1またはENPP3のウイルスベクター系発現を用いて処置されたEnpp1^{asj/asj}マウスは、健康な野生型マウスの組織型と類似した組織型を有する管腔および軟部組織の血管系における腎ミネラル沈着の減少または欠乏を示すと予想される。

【0700】

生存、毎日の動物体重、および末期組織型に加えて、治療応答は、死後高解像度マイクロCTスキャンを介して評価され、血管石灰化、および血漿PPi濃度を撮像する。WTまたは処置された（ENPP1を発現するベクター）ABCC6^{-/-}は、未処置（ヌルベクター）ABCC6^{-/-}コホートの動脈、冠動脈、および心臓に見られると予想される劇的な石灰化とは対照的に、マイクロCTを介していかなる血管石灰化を有さないと予測される。さらに、処置した（ENPP1を発現するベクター）ABCC6^{-/-}動物（5.2 μM）の血清PPi濃度は、WTレベル（4.4 μM）まで上昇し、未処置のABCC6^{-/-}レベル（0.5 μM）を有意に上回ると予想される。

【0701】

未処置のABCC6^{-/-}マウスはまた、健康な野生型マウスと比較して、血清無機リン（Pi）の有意な増加、PTHおよびFGF23レベルの増加、しかしながら1,25(OH)₂-ビタミンDレベルの減少およびPPiレベルの低下（約0.5 μM）を示すと予想される（Piの正常レベルは約2~4 μMであり、PTHについては約10~65 ng/Lであり、FGF23レベルの中央値は13 RU/mLであり、正常なFGF23レベルは5~210 RU/mLの範囲であり、正常ビタミンDレベルは20 ng/mL~50 ng/mLである）。対照的に、処置されたABCC6^{-/-}マウスは、PPiのレベルの上昇（約4~5 μM）を示すことが予想され、これは未処置のABCC6^{-/-}マウスに見られるPPiレベル（約0.5 μM）よりも高いことが予想される。したがって、当業者は、PXEの治療におけるベクター系のENPP1またはENPP3ベースの治療の有効性を、組織学的分析を通じて可視化された肝臓および冠動脈の軟部組織の石灰化の減少（25%、または50%、または70%、または90%または100%減少）、血清PPiレベルの増加、ビタミンDレベルの正常化、FGF23レベルの正常範囲までの低下および血液分析からのPTHレベルの正常化、生存率の増加、体重増加に伴う尿中尿素とクレアチンの増加によって観察される腎機能の改善などの、一つ以上の要素を観察することによって、決定することができる。

【0702】

ヒト対象の治療：

PXEに罹患しているヒト患者は、pH7.4で1X PBS中、およそ $5 \times 10^{11} \sim 5 \times 10^{15}$ vg/kgを含むイントラベナル (intravenous) 注射を提供することによって治療される。一部の実施形態では、ENPP1またはENPP3を送達および発現することができる、対象当たり、pH7.4で1X PBS中、およそ $1 \times 10^{12} \sim 1 \times 10^{15}$ vg/kgである。PXEの治療の成功は、マウスモデルで論じた定期的な血液および尿検査を通して、前述の一つ以上のパラメータを監視することによって観察される。生きている患者において行うのが現実的ではない腎臓の切片または動脈組織の染色を必要とする組織学的分析の代わりに、実施例4で論じた非侵襲的可視化技術を使用する。

10

【0703】

軟部組織の石灰化、心臓の石灰化、心筋梗塞を可視化する技術を有する医師は、ENPP1またはENPP3を発現するAAVビリオンを投与することによって、PXEに罹患した対象の治療を行うことができる。医師は、ENPP1またはENPP3の構築物を送達し、誘導性プロモーターの制御下で対応するタンパク質を発現するウイルス粒子を使用することもできる。したがって、医師は、症状の改善率および程度に基づいて、用量 (ENPP1またはENPP3の発現量) を制御する選択肢を有する。正常なビタミンDレベル ($20 \text{ ng/ml} \sim 50 \text{ ng/mL}$ が、健康な人には適切であるとみなされる。 12 ng/ml 未満のレベルはビタミンD欠損を示す)、網膜色素線条の消失およびそのサイズおよびまたは数の減少、腎出血の減少または欠乏、正常な血中尿素窒素レベル (健康な成人のBUNレベルは $7 \sim 20 \text{ mg/dL}$)、体重増加、血清PPiレベルの増加 (少なくとも約 $4 \sim 5 \mu\text{m}$)、動脈組織、結合組織の石灰化の減少 (25%、または50%、または70%、または90%または100%減少) および/またはCTまたは超音波スキャンなどの非侵襲的な技術によって可視化された腎臓細管における石灰化の減少などの一つ以上の陽性症状を観察することによって、当業者である医療専門家によって治療の成功および適切な用量が容易に推察される。

20

【0704】

実施例7-ヒトENPP1またはENPP3を発現するウイルスベクターを使用したOPLLの治療。

30

以下の実施例は、血管石灰化およびPXEに関連する症状の治療に効果的であることが予想される、ヒトENPP1またはENPP3を発現するAAVを提供する。ENPP1-FcおよびENPP3-Fc融合物は、例示の目的で実施例において使用され、本発明の他のENPP1またはENPP3融合物を使用することにより類似の結果を得ることができる。

【0705】

ENPP1-Fcタンパク質またはENPP3-Fcタンパク質を発現するAAVビリオンは、実施例1に従って作製され、つま先歩行 (ttw) マウス (後縦靱帯の骨化のためのモデルである; (Okawa, et al, 1998, Nature Genetics 19 (3): 271-3; Nakamura, et al, 1999, Human Genetics 104 (6): 492-7) に投与される。ENPP1およびENPP3を用いた処置には、マウスの六セットが使用される。

40

【0706】

対照コホート：この実験では、対照群として機能するENPP1^{wt}マウスの第一のコホートに、ヌルベクターを含むAAV粒子を注射し、対照群として機能するttwマウスの第二のコホートに、ヌルベクターを含むAAV粒子を注射する。

【0707】

ENPP1-処置マウスコホート：ENPP1^{wt}マウスの第三のコホートにENPP1-Fcタンパク質を発現するように操作されたAAV粒子を注射し、ttwマウスの第四のコホートにENPP1-Fcタンパク質を発現するように操作されたAAV粒子を注射

50

する。

【0708】

ENPP3-処置マウスコホート：ENPP1^{wt}マウスの第五のコホートにENPP3-Fcタンパク質を発現するように操作されたAAV粒子を注射し、ttwマウスの第六のコホートにENPP3-Fcタンパク質を発現するように操作されたAAV粒子を注射する。野生型マウスは、通常食で維持され、ttwマウスは、高ホスフェートTeklad食事を与えられた。

【0709】

ベクター注射：2週齢後、すべてのマウスは、マウス当たり約 $1 \times 10^{12} \sim 1 \times 10^{15}$ vg/kg、好ましくは $1 \times 10^{13} \sim 1 \times 10^{14}$ vg/kgの後眼窩注射または尾静脈注射をPBS pH 7.4で受ける。注射されたベクターは、空の「ヌル」（対照群）であるか、またはNPP1またはNPP3遺伝子（試験群）を担持したのいずれかである。

10

【0710】

アッセイ：腎臓組織型、PPiレベル、および、FGF-23レベル、ビタミンD、副甲状腺ホルモン（PTH）レベル、血清／血液尿素レベル、血中尿素窒素（BUN）レベル、血清／血液クレアチンレベル、および血漿ピロホスフェート（PPi）などの血液尿パラメータを、実施例3および4に記載されるように各コホートについて分析する。

【0711】

結果：未処置のttwマウスは、概して体重減少、脊柱の肥厚、昏睡、および死亡率の増加を呈する。対照的に、ENPP1タンパク質またはENPP3タンパク質を発現するAAVで処置されたttwマウスは、正常なWTマウスの体重範囲に近づく体重の増加、正常な覚醒、および野生型マウスの厚さに近づく脊柱の厚さの減少を示すと予想される。ヌルベクターで処置されたttwマウスは、その心臓、大動脈および冠動脈の石灰化、右心室の自由壁における心筋梗塞の組織学的証拠、冠動脈、心臓、上行大動脈および下行大動脈の石灰化、心筋細胞壊死、冠動脈石灰化領域に隣接した心筋組織における心筋線維症を呈する。対照的に、ENPP1-FcまたはENPP3-Fcを発現するベクターで処置されたttw動物は、組織型または死後マイクロCTで心臓、動脈、または大動脈の石灰化の非存在を示すことが予想される。ヌルベクターで処置されたttwマウスはまた、腎皮質への拡張を伴う、外側髄質の中心とする重度の広範な石灰化とともに、腎髄質を中心とする石灰化を示す。対照的に、ENPP1またはENPP3のウイルスベクター系発現を用いて処置されたttwマウスは、管腔における腎ミネラル沈着の減少または欠乏、脊柱の石灰化の減少、および健康な野生型マウスの組織型と類似した組織型を有する軟部組織の血管系を示すと予想される。

20

30

【0712】

生存、毎日の動物体重、および末期組織型に加えて、治療応答は、死後高解像度マイクロCTスキャンを介して評価され、血管石灰化、および血漿PPi濃度を撮像する。WTまたは処置された（ENPP1を発現するベクター）ttwのいずれも、未処置（ヌルベクター）ttwコホートの動脈、冠動脈、および心臓に見られると予想される劇的な石灰化とは対照的に、マイクロCTを介していかなる血管石灰化を有しないと予測される。さらに、処置済み（ENPP1を発現するベクター）ttw動物（ $5.2 \mu\text{M}$ ）の血清PPi濃度は、WTレベル（ $4.4 \mu\text{M}$ ）まで上昇し、未処置ttwレベル（ $0.5 \mu\text{M}$ ）を有意に上回ると予想される。

40

【0713】

未処置のttwマウスはまた、健康な野生型マウスと比較して、血清無機リン（pi）の有意な増加、PTHおよびFGF23レベルの増加が予想されるが、 $1,25(\text{OH})_2$ ～ビタミンDレベルの減少およびPPiレベルの低下（約 $0.5 \mu\text{M}$ ）を示す（PPの正常レベルは約 $2 \sim 4 \mu\text{M}$ であり、PTHについては約 $10 \sim 65 \text{ ng/L}$ であり、FGF23レベルの中央値は 13 RU/mL であり、正常なFGF23レベルは $5 \sim 210 \text{ RU/mL}$ であり、正常なビタミンDレベルは $20 \text{ ng/mL} \sim 50 \text{ ng/mL}$ である）。

50

対照的に、処置された *t t w* マウスは、*P P i* のレベルの上昇（約 $4 \sim 5 \mu M$ ）を示すと予想され、これは未処置 *t t w* マウス（約 $0.5 \mu M$ ）に見られる *P P i* レベルよりも高いと予想される。したがって、当業者は、組織学的分析によって可視化された腎臓および冠動脈の軟部組織の石灰化の減少（ 25% 、または 50% 、または 70% 、または 90% または 100% の減少）、血清 *P P i* 値の増加、ビタミン *D* レベルの正常化、*F G F 23* レベルの正常範囲までの低下および血液分析からの *P T H* レベルの正常化、生存率の増加、体重増加の増加をとまなう尿尿素およびクレアチンの増加によって観察されたおよび腎機能の改善などの一つ以上の要素を観察することによって、*O L L* の治療におけるベクター系 *E N P P 1* または *E N P P 3* の治療の有効性を決定することができる。

【0714】

10

ヒト対象の治療：

O P L L に罹患しているヒト患者は、*p H 7.4* で *1 X P B S* 中、およそ $5 \times 10^{11} \sim 5 \times 10^{15} \text{ v g / k g}$ を含有するイントラベナル (*i n t r a v e n a l*) 注射を提供することによって治療される。一部の実施形態では、対象当たり *p H 7.4* で、*1 X P B S* 中、およそ $1 \times 10^{12} \sim 1 \times 10^{15} \text{ v g / k g}$ の *h E N P P 1* または *h E N P P 3* を送達および発現することができる。*O P L L* の治療の成功は、マウスモデルで論じた定期的な血液および尿検査を通して、一つ以上の前述のパラメータを監視することによって観察される。生きている患者において行うのが現実的ではない腎臓の切片または動脈組織の染色を必要とする組織学的分析の代わりに、実施例 4 で論じた非侵襲的可視化技術を使用する。

20

【0715】

軟部組織の石灰化、心臓の石灰化、心筋梗塞を可視化する技術を持つ医師は、*h E N P P 1* または *h E N P P 3* を発現する *A A V* ビリオンの投与時に *O P L L* に罹患した対象の治療を行うことができる。一部の実施形態では、医師は、*h E N P P 1* または *h E N P P 3* の構築物を送達し、誘導性プロモーターの制御下で対応するタンパク質を発現するウイルス粒子を使用する。したがって、医師は、症状の改善率および程度に基づいて、用量（発現された *h E N P P 1* または *h E N P P 3* の量）を制御する選択肢を有する。治療の成功および適切な用量は、正常なビタミン *D* レベル（ $20 \text{ n g / m l} \sim 50 \text{ n g / m l}$ は、健康な人には適切とみなされる。 12 n g / m l 未満のレベルは、ビタミン *D* 欠損）、正常な血中尿素窒素レベル（健康な成人の *B U N* レベルは $7 \sim 20 \text{ m g / d l}$ ）、体重増加、血清 *P P i* レベルの増加（少なくとも約 $4 \sim 5 \mu m$ ）、動脈組織の石灰化の減少（ 25% 、または 50% 、または 70% 、または 90% または 100% 減少）、脊柱の肥厚および痛覚の減少、*C T*、磁気共鳴画像法 (*M R I*) または超音波などの非侵襲的手法によって可視化された脊柱狭窄の減少（*M R I* スキャン、または *M R I* スキャンなどの磁気共鳴検査、などの一つ以上の陽性症状を観察することによって、当業者である医療専門家によって容易に推察される。

30

【0716】

実施例 8 - *E N P P 1* または *E N P P 3* を発現するウイルスベクターを使用した骨減少症および／または骨軟化症の治療。

以下の実施例は、骨減少症および／または骨軟化症に関連する症状の治療に効果的であると予想される、*E N P P 1* または *E N P P 3* を発現する *A A V* を提供する。*E N P P 1 - F c* および *E N P P 3 - F c* は、例示の目的で実施例において使用され、本発明の他の *E N P P 1* または *E N P P 3* 融合物を使用することにより類似の結果を得ることができる。

40

【0717】

E N P P 1 - F c タンパク質または *E N P P 3 - F c* タンパク質を発現する *A A V* ビリオンは、実施例 1 に従って作製され、つま先歩行 (*t t w*) マウス（変形性関節症のマウスモデルである (*B e r t r a n d , e t a l , 2012, A n n a l s R h e u m . D i s e a s e s 71 (7) : 1249 - 53*)）に投与される。*E N P P 1* および *E N P P 3* を用いた処置には、マウスの六セットが使用される。同様の実験は

50

、骨減少症のモデルとしても機能する $ENPP1$ ノックアウトマウス ($ENPP1^{KO}$) を使用して繰り返される。GACIに加えて、(Mackenzie, et al, 2012, Plos one 7(2): e32177)。

【0718】

対照コホート：この実験では、対照群として機能する $ENPP1^{wt}$ マウスの第一のコホートに、ヌルベクターを含む AAV 粒子を注射し、対照群として機能する ttw (または $ENPP1^{KO}$) マウスの第二のコホートに、ヌルベクターを含む AAV 粒子を注射する。

【0719】

$ENPP1$ - 処置マウスコホート： $ENPP1^{wt}$ マウスの第三のコホートに $ENPP1$ - Fc タンパク質を発現するように操作された AAV 粒子を注射し、 ttw マウス (または $ENPP1^{KO}$) の第四のコホートに $ENPP1$ - Fc タンパク質を発現するように操作された AAV 粒子を注射する。

【0720】

$ENPP3$ - 処置マウスコホート： $ENPP1^{wt}$ マウスの第五のコホートに $ENPP3$ - Fc タンパク質を発現するように操作された AAV 粒子を注射し、 ttw (または $ENPP1^{KO}$) マウスの第六のコホートに $ENPP3$ - Fc タンパク質を発現するように操作された AAV 粒子を注射する。野生型マウスは、通常食で維持され、 ttw マウス (または $ENPP1^{KO}$) は、高ホスフェート Teklad 食事を与えられた。

【0721】

ベクター注射：生後 2 週間後、すべてのマウスは、マウス当たり pH 7.4 の PBS の、約 $1 \times 10^{12} \sim 1 \times 10^{15} \text{ vg/kg}$ 、好ましくは $1 \times 10^{13} \sim 1 \times 10^{14} \text{ vg/kg}$ の後眼窩注射または尾静脈注射を受ける。注射されたベクターは、空の「ヌル」(対照群)であるか、または $NPP1$ or $NPP3$ 遺伝子 (試験群) を担持している。

【0722】

アッセイ：腎臓組織型、PPi レベル、および、FGF-23 レベル、ビタミン D、副甲状腺ホルモン (PTH) レベル、血清/血液尿素レベル、血中尿素窒素 (BUN) レベル、血清/血液クレアチンレベル、および血漿ピロホスフェート (PPi) などの血液尿パラメータを、実施例 3 および 4 に記載されるように各コホートについて分析する。

【0723】

組織型、組織形態計測、およびマイクロCT：骨分析は、実施例 3 に記載されるプロトコルに従って実施される。

【0724】

骨の生体力学的検査：骨分析は、実施例 3 に記載されるプロトコルに従って実施される。

【0725】

結果：未処置の ttw (または $ENPP1^{KO}$) マウスは概して、体重減少、昏睡、皮質骨の厚さおよび骨梁骨体積の減少、軟骨および靱帯の石灰化、大腿骨および脛骨などの長骨における骨密度の減少、ならびに野生型と比較して死亡率の増加を呈する。対照的に、 $ENPP1$ タンパク質または $ENPP3$ タンパク質を発現する AAV で処置された ttw (または $ENPP1^{KO}$) マウスは、正常な WT マウスの体重範囲に近づく体重の増加、正常な注意力、骨ミネラル濃度の増加、皮質骨厚および骨梁骨体積の改善、骨強度および骨延性の増加を示すことが予測される。ヌルベクターで処置された ttw (または $ENPP1^{KO}$) マウスは、心臓、大動脈および冠動脈に石灰化、および右心室の自由壁の心筋梗塞の組織学的証拠、冠動脈、心臓、上行大動脈および下行大動脈の石灰化、心筋細胞壊死、ならびに冠動脈石灰化の領域に隣接する心筋組織における心筋線維症を示すことが予想される。対照的に、 $ENPP1$ - Fc または $ENPP3$ - Fc を発現するベクターで処置された ttw (または $ENPP1^{KO}$) 動物は、組織学的または死後のマイクロCTにおいて心臓、動脈、または大動脈の石灰化の不在を示すことが予想される。ヌルベクターで処置された ttw (または $ENPP1^{KO}$) マウスはまた、腎皮質への拡張を伴う、外側髄質を中心とする重度の広範な石灰化とともに、腎髄質を中心とする石灰化を示す。対

10

20

30

40

50

照的に、ENPP1またはENPP3のウイルスベクター系発現を用いて処置されたttw（またはENPP1^{KO}）マウスは、管腔における腎ミネラル沈着の減少または欠乏、脊柱の石灰化、健康な野生型マウスの組織型と類似した組織型を有する軟部組織の血管系を示すと予想される。

【0726】

生存、毎日の動物体重、および末期組織型に加えて、治療応答は、死後高解像度マイクロCTスキャンを介して評価され、血管石灰化、および血漿PPi濃度を撮像する。WTまたは処置された（ENPP1を発現するベクター）ttw（またはENPP1^{KO}）のいずれも、未処置（ヌルベクター）ttw（またはENPP1^{KO}）コホートの大動脈、冠動脈、および心臓に見られると予想される劇的な石灰化とは対照的に、マイクロCTを介していかなる血管石灰化を有しないと予測される。さらに、処置した（ENPP1を発現するベクター）ttw（またはENPP1^{KO}）動物（5.2 μM）の血清PPi濃度は、WTレベル（4.4 μM）まで上昇し、未処置のttw（またはENPP1^{KO}）レベル（0.5 μM）を有意に上回ると予想される。

10

【0727】

未処置のttw（またはENPP1^{KO}）マウスはまた、健常な野生型マウスと比較して、血清無機リン（pi）の有意な増加、PTHおよびFGF23レベルの増加、しかしながら1,25(OH)₂-ビタミンDレベルの減少およびPPiレベルの低下（約0.5 μM）を示すと予想される（ppの正常レベルは約2~4 μMであり、PTHについては約10~65 ng/Lであり、FGF23レベルの中央値は13 RU/mLであり、正常なFGF23レベルは5~210 RU/mLの範囲であり、正常ビタミンDレベルは20 ng/mL~50 ng/mLである）。対照的に、処置されたttw（またはENPP1^{KO}）マウスは、PPiのレベルの上昇（約4~5 μM）を示すことが予想され、これは未処置のttw（またはENPP1^{KO}）マウスに見られるPPiレベル（約0.5 μM）よりも高いと予想される。したがって、当業者は、骨減少症または骨軟化症または変形性関節症の治療におけるベクター系ENPP1またはENPP3の治療の有効性を、組織学的分析を通じて可視化された肝臓および冠動脈の軟部組織の石灰化の減少（25%、または50%、または70%、または90%または100%減少）、血清PPiレベルの増加、ビタミンDレベルの正常化、FGF23レベルの正常範囲までの低下および血液分析からのPTHレベルの正常化、長骨の強度の向上、骨密度の向上、皮質骨の厚さおよび骨梁骨体積の向上、生存率の増加、体重増加に伴う尿中尿素とクレアチンの増加によって観察される腎機能の改善などの、一つ以上の要素を観察することによって、決定することができる。

20

30

【0728】

ヒト対象の治療：

骨減少症または骨軟化症または変形性関節症に罹患しているヒト患者は、pH7.4で1X PBS中、およそ5×10¹¹~5×10¹⁵ v g/kgを含むイントラベナル（intravenous）注射を提供することによって治療され、一部の実施形態では、hENPP1またはhENPP3を送達および発現することができる対象当たり、pH7.4で1X PBS中、およそ1×10¹²~1×10¹⁵ v g/kgである。骨減少症または骨軟化症または変形性関節症の治療の成功は、マウスモデルで論じた定期的な骨強度、骨密度、血液および尿検査を通して、前述の一つ以上のパラメータを監視することによって観察される。生きている患者において行うのが現実的ではない腎臓の切片または動脈組織の染色を必要とする組織学的分析の代わりに、実施例4で論じた非侵襲的可視化技術を使用する。

40

【0729】

同様に、患者は、二重エネルギーX線吸収測定法（DXA）または周辺二重エネルギーX線吸収測定法（pDXA）または定量的超音波（QUS）または周辺定量的コンピュータ断層撮影法（pQCT）を使用して、定期的な骨密度測定を受ける。これらの方法の一つから取得された骨密度スコアは、治療後に取得された状態および進行の指標を提供する

50

。－１．０以上のＴスコアは、正常な骨密度とみなされ、－１．０～－２．５の間のＴスコアは、骨減少症の存在を示し、一方で－２．５以下のＴスコアは、骨粗しょう症の存在を示す。本発明のＥＮＰＰ１またはＥＮＰＰ３で治療された患者において、Ｔスコアの段階的な改善が予想される。

【０７３０】

軟部組織の石灰化、心臓の石灰化、骨密度を可視化する技術を有する医師は、ｈＥＮＰＰ１またはｈＥＮＰＰ３を発現するＡＡＶビリオンの投与によって、骨減少症または変形性関節症に罹患した対象の治療を行う。一部の実施形態では、医師は、ｈＥＮＰＰ１またはｈＥＮＰＰ３の構築物を送達し、誘導性プロモーターの制御下で対応するタンパク質を発現するウイルス粒子を使用する。したがって、医師は、症状の改善率および程度に基づいて、用量（発現されたｈＥＮＰＰ１またはｈＥＮＰＰ３の量）を制御する選択肢を有する。正常なビタミンＤレベル（ $20\text{ ng/ml} \sim 50\text{ ng/mL}$ が、健康な人には適切であるとみなされる。 12 ng/ml 未満のレベルはビタミンＤ欠損を示す）、正常な骨密度（－１以上のＴスコア）、正常な血中尿素窒素レベル（健康な成人のＢＵＮレベルは $7 \sim 20\text{ mg/dL}$ ）、体重増加、血清ＰＰｉレベルの増加（少なくとも約 $4 \sim 5\text{ }\mu\text{m}$ ）、動脈組織の石灰化の減少（ 25% 、または 50% 、または 70% 、または 90% または 100% 減少）、ＣＴ、磁気共鳴画像法（ＭＲＩ）または超音波スキャンなどの非侵襲的な技術によって可視化された向上した骨強度などの一つ以上の陽性症状を観察することによって、当業者である医療専門家によって治療の成功および適切な用量が容易に推察される。

10

20

【０７３１】

実施例９－ＥＮＰＰ１またはＥＮＰＰ３を発現するウイルスベクターを使用したＡＤＨＲ－２またはＡＲＨＲ－２およびまたはＸＬＨの治療。

以下の実施例は、ＡＤＨＲ－２またはＡＲＨＲ－２またはＸＬＨに関連する症状の治療に有効であると予想される、ＥＮＰＰ１またはＥＮＰＰ３を発現するＡＡＶを提供する。ＥＮＰＰ１－ＦｃおよびＥＮＰＰ３－Ｆｃは、例示の目的で実施例において使用され、本発明の他のＥＮＰＰ１またはＥＮＰＰ３融合物を使用することにより類似の結果を得ることができる。

【０７３２】

ＥＮＰＰ１－Ｆｃタンパク質またはＥＮＰＰ３－Ｆｃタンパク質を発現するＡＡＶビリオンは、実施例１に従って作製され、Ｘ連鎖性低ホスファターゼ症（ＸＬＨ）のＨＹＰマウスモデルに投与される（*Liang, et al., 2009, Calcif. Tissue Int.* 85（３）：235－46）。ＥＮＰＰ１およびＥＮＰＰ３を用いた処置には、マウスの六セットが使用される。同様の実験をＡＲＨＲ－２のモデルの役割も果たすＥＮＰＰ１年齢硬化関節マウス（ＥＮＰＰ１^{asj/asj}）を使用し、繰り返す。ＧＡＣＩに加えて、（*Am J Hum Genet.* 2010 Feb 12； 86（２）： 273－278.）。

30

【０７３３】

対照コホート：この実験では、対照群として機能するＥＮＰＰ１^{w t}マウスの第一のコホートに、ヌルベクターを含むＡＡＶ粒子を注射し、対照群として機能するＨＹＰ（またはＥＮＰＰ１^{asj/asj}）マウスの第二のコホートに、ヌルベクターを含むＡＡＶ粒子を注射する。

40

【０７３４】

ＥＮＰＰ１－処置マウスコホート：ＥＮＰＰ１^{w t}マウスの第三のコホートにＥＮＰＰ１－Ｆｃタンパク質を発現するように操作されたＡＡＶ粒子を注射し、ＨＹＰ（またはＥＮＰＰ１^{asj/asj}）マウスの第四のコホートにＥＮＰＰ１－Ｆｃタンパク質を発現するように操作されたＡＡＶ粒子を注射する。

【０７３５】

ＥＮＰＰ３－処置マウスコホート：ＥＮＰＰ１^{w t}マウスの第五のコホートにＥＮＰＰ３－Ｆｃタンパク質を発現するように操作されたＡＡＶ粒子を注射し、ＨＹＰ（またはＥ

50

PP1^{asj/asj}マウスの第六のコホートにENPP3-Fcタンパク質を発現するように操作されたAAV粒子を注射する。野生型マウスは、通常食で維持され、HYP（またはENPP1^{asj/asj}）マウスは、高ホスフェートTeklad食事を与えられた。

【0736】

ベクター注射：2週齢後、すべてのマウスは、後眼窩注射または尾静脈注射を、PBS中、pH 7.4でマウス当たり約 $1 \times 10^{12} \sim 1 \times 10^{15}$ vg/kg、好ましくは $1 \times 10^{13} \sim 1 \times 10^{14}$ vg/kgで受ける。注射されたベクターは、空の「ヌル」（対照群）であるか、またはNPP1 or NPP3遺伝子（試験群）を担持している。

【0737】

アッセイ：腎臓組織型、PPiレベル、および、FGF-23レベル、ビタミンD、副甲状腺ホルモン（PTH）レベル、血清／血液尿素レベル、血中尿素窒素（BUN）レベル、血清／血液クレアチンレベル、および血漿ピロホスフェート（PPi）などの血液パラメータを、実施例3および4に記載されるように各コホートについて分析する。

【0738】

組織型、組織形態計測、およびマイクロCT：骨分析は、実施例3に記載されるプロトコルに従って実施される。

【0739】

骨の生体力学的検査：骨分析は、実施例3に記載されるプロトコルに従って実施される。

【0740】

結果：未処置のHYP（またはENPP1^{asj/asj}）マウスは概して、体重減少、昏睡、皮質骨の厚さおよび骨梁骨体積の減少、軟骨および靱帯の石灰化、大腿骨および脛骨などの長骨における骨密度の減少、ならびに野生型と比較して死亡率の増加を呈する。対照的に、ENPP1タンパク質またはENPP3タンパク質を発現するAAVで処置されたHYP（またはENPP1^{asj/asj}）マウスは、正常なWTマウスの体重範囲に近づく体重の増加、正常な注意力、骨ミネラル濃度の増加、皮質骨厚および骨梁骨体積の改善、骨強度および骨延性の増加を示すことが予想される。ヌルベクターで処置されたHYP（またはENPP1^{asj/asj}）マウスは、心臓、大動脈および冠動脈に石灰化、および右心室の自由壁の心筋梗塞の組織学的証拠、冠動脈、心臓、上行大動脈および下行大動脈の石灰化、心筋細胞壊死、ならびに冠動脈石灰化の領域に隣接する心筋組織における心筋線維症を示すことが予想される。対照的に、ENPP1-FcまたはENPP3-Fcを発現するベクターで処置されたHYP（またはENPP1^{asj/asj}）マウスは、組織型または死後のマイクロCTにおいて心臓、動脈、または大動脈の石灰化の不在を示すことが予想される。ヌルベクターで処置されたHYP（またはENPP1^{asj/asj}）マウスはまた、腎皮質への拡張を伴う、外側髄質を中心とする重度の広範な石灰化とともに、腎髄質を中心とする石灰化を示す。対照的に、ENPP1またはENPP3のウイルスベクター系発現を用いて処置されたHYP（またはENPP1^{asj/asj}）マウスは、管腔における腎ミネラル沈着の減少または欠乏、脊柱の石灰化、健康な野生型マウスの組織型と類似した組織型を有する軟部組織の血管系を示すと予想される。

【0741】

生存、毎日の動物体重、および末期組織型に加えて、治療応答は、死後高解像度マイクロCTスキャンを介して評価され、血管石灰化、および血漿PPi濃度を撮像する。WTマウスまたは処置された（ENPP1を発現するベクター）HYP（ENPP1^{asj/asj}）マウスのいずれも、未処置（ヌルベクター）HYP（またはENPP1^{asj/asj}）コホートの動脈、冠動脈、および心臓に見られると予想される劇的な石灰化とは対照的に、マイクロCTを介して血管石灰化を有しないと予想される。さらに、処置した（ENPP1を発現するベクター）HYP（またはENPP1^{asj/asj}）マウス（5.2 μM）の血清PPi濃度は、WTレベル（4.4 μM）まで上昇し、未処置のHYP（またはENPP1^{asj/asj}）レベル（0.5 μM）を有意に上回ると予想される。

10

20

30

40

50

【0742】

未処置のHYP（またはENPP1^{asj/asj}）マウスはまた、健常な野生型マウスと比較して、血清無機リン（*pi*）の有意な増加、PTHおよびFGF23レベルの増加、しかしながら1,25(OH)₂-ビタミンDレベルの減少およびPPiレベルの低下（約0.5 μM）を示すと予想される（ppの正常レベルは約2~4 μMであり、PTHについては約10~65 ng/Lであり、FGF23レベルの中央値は13 RU/mLであり、正常なFGF23レベルは5~210 RU/mLの範囲であり、正常ビタミンDレベルは20 ng/mL~50 ng/mLである）。対照的に、処置されたHYP（またはENPP1^{asj/asj}）マウスは、PPiのレベルの上昇（約4~5 μM）を示すことが予想され、これは未処置のHYP（またはENPP1^{asj/asj}）マウスに見られるPPiレベル（約0.5 μM）よりも高いことが予想される。したがって、当業者は、ADHR-2またはARHR-2またはXLHの治療におけるベクター系ENPP1またはENPP3の治療の有効性を、組織学的分析を通じて可視化された肝臓および冠動脈の軟部組織の石灰化の減少（25%、または50%、または70%、または90%または100%減少）、血清PPiレベルの増加、ビタミンDレベルの正常化、FGF23レベルの正常範囲までの低下および血液分析からのPTHレベルの正常化、長骨の強度の向上、骨密度の向上、皮質骨の厚さおよび骨梁骨体積の向上、生存率の増加、体重増加に伴う尿中尿素とクレアチンの増加によって観察される腎機能の改善などの、一つ以上の要素を観察することによって、決定することができる。

10

【0743】

20

ヒト対象の治療：

ADHR-2またはARHR-2またはXLHに罹患しているヒト患者は、pH7.4で1X PBS中、およそ $5 \times 10^{11} \sim 5 \times 10^{15}$ vg/kgを含むイントラベナル（intravenous）注射を提供することによって治療される。一部の実施形態では、hENPP1またはhENPP3を送達および発現することができる、対象当たり、pH7.4で1X PBS中、およそ $1 \times 10^{12} \sim 1 \times 10^{15}$ vg/kgである。ADHR-2またはARHR-2またはXLHの治療の成功は、マウスモデルで論じた定期的な骨強度、骨密度、血液および尿検査を通して、前述の一つ以上のパラメータを監視することによって観察される。生きている患者において行うのが現実的ではない腎臓の切片または動脈組織の染色を必要とする組織学的分析の代わりに、実施例4で論じた非侵襲的可視化技術を使用する。

30

【0744】

同様に、患者は、二重エネルギーX線吸収測定法（DXA）または周辺二重エネルギーX線吸収測定法（pDXA）または定量的超音波（QUS）または周辺定量的コンピュータ断層撮影法（pQCT）を使用して、定期的な骨密度測定を受ける。これらの方法の一つから取得された骨密度スコアは、治療後に取得された状態および進行の指標を提供する。-1.0以上のTスコアは、正常な骨密度とみなされ、-1.0~-2.5の間のTスコアは、骨減少症の存在を示し、一方で-2.5以下のTスコアは、骨粗しょう症の存在を示す。本発明のENPP1またはENPP3で治療された患者において、Tスコアの段階的な改善が予想される。

40

【0745】

軟部組織の石灰化、心臓の石灰化、骨密度を可視化する技術を有する医師は、hENPP1またはhENPP3を発現するAAVビリオンの投与によって、ADHR-2またはARHR-2またはXLHに罹患した対象の治療を行う。一部の実施形態では、医師は、hENPP1またはhENPP3の構築物を送達し、誘導性プロモーターの制御下で対応するタンパク質を発現するウイルス粒子を使用する。したがって、医師は、症状の改善率および程度に基づいて、用量（発現されたhENPP1またはhENPP3の量）を制御する選択肢を有する。正常なビタミンDレベル（20 ng/mL~50 ng/mLが、健康な人には適切であるとみなされる。12 ng/mL未満のレベルはビタミンD欠損を示す）、正常な骨密度（-1以上のTスコア）、正常な血中尿素窒素レベル（健康な成人の

50

BUNレベルは7～20 mg/dL)、体重増加、血清PPiレベルの増加(少なくとも約4～5 μm)、動脈組織の石灰化の減少(25%、または50%、または70%、または90%または100%減少)、CT、磁気共鳴画像法(MRI)または超音波スキャンなどの非侵襲的な技術によって可視化された向上した骨強度などの一つ以上の陽性症状を観察することによって、当業者である医療専門家によって治療の成功および適切な用量が容易に推察される。

【0746】

実施例10—ウイルス投与後のモデルマウスにおける血漿PPiレベル、ENPP1濃度および活性レベルの分析。

この実験には、正常なマウスの三つのコホートを使用した。各コホートは、五匹の成体マウスを含む。第一のコホートを「対照群」として使用し、生理食塩水を対照群に注射した。第二のコホートを「低用量群」として使用し、 1×10^3 v g/kg濃度のAAVベクターを低用量群に注射した。第三のコホートを「高用量群」として使用し、 1×10^4 v g/kg濃度のAAVベクターを高用量群に注射した。AAV構築物からウイルス粒子を生成し、ENPP1融合タンパク質を含む組み換えAAVウイルス粒子を正常なマウスに注入するプロセスを、図4に概略的に示す。すべてのコホートからのマウスを、投与後7日目、28日目、および56日目に採血し、血漿および血清を採取した。

【0747】

血液をヘパリン処置チューブに採取した。血漿を単離し、ナノセップ30 kDaのオメガ遠心フィルター(Pall、OD030C35)を通して濾過することによって血小板を除去した。試料を、最高速度(約20 kg)で4℃で20分間遠心分離した。フロースルーを収集し、ドライアイス上に置き、試料を急速凍結した。試料を後にアッセイで使用するため-80℃で保存した。

【0748】

採取した試料を最初にアッセイして、比色基質であるp-ニトロフェニルチミジン5'-モノホスフェート(Sigma)を使用してENPP1の活性レベルを決定した。血漿試料を、1%のトリトン、200 mMのトリス、pH 8.0の緩衝液中で、1 mg/mlのp-ニトロフェニルチミジン5'-モノホスフェートで1時間培養した。1時間後、反応を停止させるために100 mMのNaOHを添加し、吸光度を405 nmで測定した。組み換えヒトENPP-1; カタログ番号: 6136-WNについて、R&D Systemsによって開示されるアッセイプロトコルに従って、特異的活性を決定した。

【数2】

$$\text{特異的活性 (pmol/分/}\mu\text{g)} = \frac{\text{調整 } V_{\text{max}}^* \text{ (OD/分)} \times \text{変換係数}^{**} \text{ (pmol/OD)}}{\text{酵素量 (}\mu\text{g)}}$$

* 基質ブランク用に調整

** 校正用標準物質 4-ニトロフェノール(シグマアルドリッチ社製、カタログ番号241326)を用いて算出。

【0749】

ENPP1活性アッセイの結果は図5にあり、それらは注射後のENPP1活性の用量依存性の増加があることを示す。正常なマウス血漿を、ENPP1活性レベルを正規化するための参照標準として使用し、一元配置分散分析を統計分析に使用した。図5は、ENPP1活性レベルが、対照群のそれと比較して低用量群の方が高かったことを示す。同様に、ENPP1活性レベルは、低用量群および対照群のそれと比較して、高用量群の方が高かった。低用量および高用量コホートにおいて、ENPP1活性は、高用量群の7日目から56日目まで血漿試料で安定していたが、低用量群の28日目から56日目までにENPP1活性のわずかな減少があった。

【0750】

次いで、試料をアッセイして、シグマ (SAB1400199) に由来する ENPP1 ポリクローナル抗体を用いたサンドイッチ ELISA アッセイを使用して、ENPP1 の濃度を決定した。96 ウェル透明平底ポリスチレン高結合マイクロプレート (Corning Cat# 9018)、BSA (Sigma# 7906)、10X ダルベッコリン酸緩衝食塩水 (DPBS) (Quality Biological Cat# 119-068-101)、Tween-20 (Sigma Cat# P2287)、抗-ENPP1、マウス (Sigma-Aldrich Cat# SAB1400199) で産生される抗体、Sure Blue TMB Microwell ペルオキシダーゼ基質 (1 成分) (KPL Prod # 52-00-01)、2N 硫酸 (BDH Product# BDH7500-1)、MilliQ 水、C57BL/6 マウス血漿 NaHep プール性別 (BioIVT cat# MSE01PLNHPNN)、マウス血清 (BioIVT Elevating Science cat# MSE01SRMPNN) を ELISA アッセイに使用した。

10

20

30

40

50

【0751】

ENPP1-Fc タンパク質の標準曲線は、当技術分野で公知の標準的な手順に従って生成される。2mg/ml ~ 30 ng/ml の範囲の ENPP1-Fc タンパク質の連続希釈を簡単に作製した。96 ウェルプレートを最初に、1X PBS 中の ENPP1 捕捉抗体を含む 1 µg / 1 mL の一晚コート溶液で被覆した。次いで、ウェルを、PBS 中の 5% BSA で、1 時間培養し、次いでブロック後溶液で洗浄した。ENPP1 希釈試料を、コーティングされた 96 ウェルプレートに加え、1.5 時間培養した。培養後、ウェルを、0.05 T% の PBST の 300 µl で四回洗浄した。次いで、洗浄されたウェルを、検出 HRP 抗体コンジュゲートの 100 µl / ウェルで処理し、1 時間培養した。HRP 抗体コンジュゲートでの培養後、ウェルを、0.05 T% の PBST の 300 µl で四回洗浄した。次いで、洗浄されたウェルを、ウェル当たり 100 µl の TMB マイクロウェルペルオキシダーゼ基質で処理し、暗所で 30 分間培養した。次いで、ウェルを、300 µl の 0.05 T% の PBST で四回洗浄し、2N 硫酸を使用して反応を停止した。ウェルの吸光度を、450 nm の波長でマイクロプレートリーダーを使用して読み取った。標準曲線は、吸光度読み取りおよび対応する ENPP1 連続希釈試料の濃度を使用して生成された。

【0752】

次いで、ウイルス注射の 7、28、および 56 日後に、対照、低用量、および高用量コホートから得られた血漿試料を使用してアッセイを繰り返した。各血漿試料で生成された吸光度は、ENPP1-Fc の標準曲線と相関して、血漿試料中の ENPP1-Fc の濃度を決定した。ENPP1 濃度アッセイの結果を図 6 に示し、ウイルスベクター注射後の ENPP1 濃度の用量依存的な増加を示す。正常なマウス血漿を、ENPP1 濃度レベルを正規化するための参照標準として使用し、一元配置分散分析を統計分析に使用した。図 6 は、ENPP1 濃度が、対照群の濃度と比較して低用量群において高かったことを示す。同様に、ENPP1 活性レベルは、低用量群および対照群のそれと比較して、高用量群の方が高かった。低用量および高用量コホートにおいて、ENPP1 レベルは、高用量群の 7 日目から 56 日目まで試料で安定していたが、低用量群の 28 日目から 56 日目までに ENPP1 レベルのわずかな減少があった。

【0753】

試料も、スルフリラーゼアッセイを使用して血漿 PPI の濃度を決定するためにアッセイされた。ATP スルフリラーゼ (NEB-M0394L、ロット番号: 10028529)、アデノシン 5'-ホスホスルフェート (APS; Santa Cruz、sc-214506)、PPI: 100 uM ストック、HEPES pH 7.4 緩衝液 (Boston Bioproducts BB2076)、1M の硫酸マグネシウム (MgSO4) 溶液、1M の塩化カルシウム (CaCl2) 溶液、Bacter Glo (Promega Plate G8231)、プレート (Costar 3915, black flat bottom) およびプレートリーダー (Molecular Device

s Spectramax I3x) が、PPi スルフィラーゼアッセイで使用された。PPi 標準 ($0.125 \sim 4 \mu\text{M}$) を、連続希釈を使用して水中で調製した。濾過血漿試料中の PPi 標準および PPi は、過剰なアデノシン 5'-ホスホスルフェート (APS) の存在下で、ATP スルフィラーゼによって ATP に変換された。試料 ($15 \mu\text{l}$) を、 8 mM CaCl_2 、 2 mM MgSO_4 、 $40 \text{ mM HEPES pH } 7.4$ 、 $80 \mu\text{M APS}$ (Santa Cruz, sc-214506)、および $0.1 \text{ U/ml ATP スルフィラーゼ}$ (NEB-M0394L) を含有する $5 \mu\text{l}$ の混合物で処理した。混合物を、 37°C で 40 分間培養し、その後、ATP スルフィラーゼを、 90°C で 10 分間培養することによって不活化した。生成された ATP は、 $20 \mu\text{l}$ の処理された試料または標準試料を $20 \mu\text{l}$ の Bactiter Glo 試薬と混合することによって、Bactiter Glo (Promega G8231) を使用して決定された。次いで、マイクロプレートリーダーで生物発光を決定し、標準曲線から、各試料で生成された PPi の量を續いて決定した。

10

20

30

40

50

【0754】

血漿 PPi アッセイの結果を図 7 に示す。結果は、ウイルスベクター注射後の血漿 PPi の用量依存性の増加を示す。正常なマウス血漿を、血漿 PPi 濃度レベルを正規化するための参照標準として使用し、一元配置分散分析を統計分析に使用した。図 7 は、血漿 PPi 濃度が、対照群のそれと比較して低用量群においてわずかに高いことを示す。同様に、血漿 PPi 濃度は、低用量群および対照群のそれと比較して、高用量群の方が高かった。低用量および高用量コホートにおいて、ENPP1 レベルは、高用量群の 7 日目から 56 日目まで血漿試料で安定していたが、低用量群の 28 日目から 56 日目までに ENPP1 レベルのわずかな減少が観察された。

【0755】

関連する実験では、5~6 週齢の C57/B1 オスマウスに、 $1 \times 10^4 \text{ v.g./kg}$ の AAV ウイルスベクター、またはビヒクル対照 (AAV ベクターを含まない) の単回用量を静脈内投与した。動物に、GK1.5 を投与した (ウイルスベクターまたはビヒクルの投与の一日前に $40 \mu\text{g}/\text{mouse}$ 、その後、試験完了まで 7 日ごとに $25 \mu\text{g}/\text{mouse}$)。AAV ウイルスベクターは、融合タンパク質の ENPP1 部分および IgG Fc 部分がリンカーアミノ酸配列: GGGGS によって結合されたことを除いて、実施例 10 に記載されるポリペプチドと類似の ENPP1 および IgG Fc の融合タンパク質を発現するように操作された。AAV ウイルスベクターを投与したマウスは、約 40 日間にわたって測定されたように、ビヒクルのみの対照よりも高いレベルの ENPP1 酵素活性を示した。

【0756】

実施例 11 - ウイルス投与の 112 日後のモデルマウスにおける ENPP1 濃度および活性レベルの分析。

この実験には、正常なマウスの三つのコホートを使用した。各コホートは、五匹の成体マウスを含む。第一のコホートを「対照群」として使用し、生理食塩水を対照群に注射した。第二のコホートを「低用量群」として使用し、 $1 \times 10^3 \text{ v.g./kg}$ 濃度の AAV ベクターを低用量群に注射した。第三のコホートを「高用量群」として使用し、 $1 \times 10^4 \text{ v.g./kg}$ 濃度の AAV ベクターを高用量群に注射した。AAV 構築物からウイルス粒子を生成し、ENPP1 融合タンパク質を含む組み換え AAV ウイルス粒子を正常なマウスに注入するプロセスを、図 4 に概略的に示す。すべてのコホートからのマウスを、投与後 7 日目、28 日目、56 日目、および 112 日目に採血し、血漿および血清を採取した。

【0757】

血液をヘパリン処置チューブに採取した。試料を、最高速度 (約 20 kg) で 4°C で 20 分間遠心分離した。フロースルーを収集し、ドライアイス上に置き、試料を急速凍結した。試料を後にアッセイで使用するため -80°C で保存した。

【0758】

採取した試料を最初にアッセイして、実施例 10 に記載される比色基質、p-ニトロフ

エニルチミジン 5' - モノホスフェート (Sigma) を使用して、ENPP1 の活性レベルを決定した。ENPP1 活性アッセイの結果は図 9 にあり、それらは注射後の ENPP1 活性の用量依存性の増加があることを示す。正常なマウス血漿を、ENPP1 活性レベルを正規化するための参照標準として使用し、一元配置分散分析を統計分析に使用した。図 9 は、ENPP1 活性レベルが、対照群のそれと比較して低用量群においてわずかに高いことを示す。同様に、ENPP1 活性レベルは、低用量群および対照群のそれと比較して、高用量群の方が高かった。

【0759】

次いで、実施例 10 で教示されたプロトコルに従って、Sigma (SAB1400199) に由来する ENPP1 ポリクローナル抗体を用いたサンドイッチ ELISA アッセイを使用して、試料をアッセイして、ENPP1 の濃度を決定した。次いで、ウイルス注射の 7、28、56、および 112 日後に、対照、低用量、および高用量コホートから得られた血漿試料を使用してアッセイを繰り返した。各血漿試料で生成された吸光度は、ENPP1-Fc の標準曲線と相関して、血漿試料中の ENPP1-Fc の濃度を決定した。

10

【0760】

ENPP1 濃度アッセイの結果を図 8 に示し、それらはウイルスベクター注射後の ENPP1 濃度の用量依存性の増加を示す。正常なマウス血漿を、ENPP1 濃度レベルを正規化するための参照標準として使用し、一元配置分散分析を統計分析に使用した。図 8 は、ENPP1 濃度が、対照群のそれと比較して低用量群において高いことを示す。同様に、ENPP1 レベルは、低用量群および対照群のそれと比較して、高用量群の方が高かった。

20

【0761】

実施例 12 - バリエント ENPP1-Fc 配列の AAV システムへのクローニング、AAV 感染、AAV 産生および精製のための構築物の生成

AAV8 プラスミドは、5' から 3' の方向に以下の要素を有する発現カセットを含みながら生成された：三つの異なるプロモーター（以下を参照）のうちの一つ、N 末端アズロシジニンシグナル配列を含むポリヌクレオチド、以下に記載されるバリエント ENPP1-Fc 構築物をコードするポリヌクレオチド、および SV40 ポリアデニル化信号。発現カセットは、AAV8 から 5' ITR および 3' ITR に隣接されている。本明細書で言及されるように、構築物 10.1 は、サイトメガロウイルス (CMV) プロモーターを含む。構築物 10.2 は、肝臓特異的プロモーターである肝臓プロモーター 1 (LP1) を含む (Nathwani et al., Blood 2006; 107 (7): 2653-2661 を参照)。構築物 10.3 は、肝臓特異的プロモーター、ハイブリッド肝臓プロモーター (HLP) を含む (McIntosh et al., Blood. 2013; 121 (17): 3335-44 を参照)。HLP 配列の例が配列番号 97 に示される。

30

【0762】

これらの構築物では、ENPP1-Fc のバリエント形態を使用した。バリエント ENPP1-Fc は、332 位 (I332T; 配列番号 1 に対する) での単一アミノ酸置換を含む組み換え可溶性ヒト ENPP1 ポリペプチド部分、リンカー配列 (GGGGS (配列番号 94)、および野生型ヒト IgG1 Fc (EU 番号による M252Y/S254T/T256E) に対して三つのアミノ酸置換を含むヒトイムノグロブリン IgG1 Fc 部分を含む。バリエント ENPP1-Fc の配列を以下に示す (アノテーションを含む)。

40

【0763】

【表 9 8】

MTRLTVLALLAGLLASSRAAPSCAKEVKSCKGRFCERTFGNCRCDAAVELGNCCLDYQETCIEPEHIWTCNKFRCEKRLT
 RSLCACSDDCDKGDCCINYSSVCQGEKSWVEEPCESINEPQCPAGFETPPTLLFSLDGFRAEYLHTWGGLLPVISKLKCG
 TYTKNMRPVYPTKTFPNHYSIVTGLYPESHGIIIDNKMYDPKMNASFSLKSKEKFNPEWYKGEPWWTAKYQGLKSGTFFWPG
 SDVEINGTFPDIYKMYNGSVPFEEILAVLQWLQLPKDERPHFYTLYLEEPDSSGHSYGPVSSEVIKALQRVDGMVGMMDG
 LKELNLHRCLNLILISDHGMEQGSCKKIYLNKYLGDVKNIKVIYGPAARLRPSDVPDKYYSFNIEGIARNLSCREPNQHFK
 PYLKHFLPKRLHFAKSDRIEPLTFYLDPQWQLALNPSEKCYGSGFHGSDNVFSNMQALFVGYGPGFKHIEADTFENIEVY
 NLMCDLLNLTPAPNNGTHGSLNHLKNPVYTPKHPKEVHPLVQCPFTRNPRDNLGCSCNPSILPIEDFQTQFNLTVAEEKII
 KHETLPYGRPRVLQKENTICLLSQHQFMSGYSQDILMPLWTSYTVDRNDSFSTEDFSNCLYQDFRIPLSPVHKCSFYKNNTK
 VSYGFLSPPQLNKNSSGIYSEALLTTNIVPMYQSFQVIWRYFHDTLRLKYAEERNGVNVVSGPVDFDYDGRCDSENLRLQK
 RRVIRNQEILIPTHFFIVLTSCKDTSQTPLHCENLDTLAFILPHRTDNSESCVHGKHDSSWVEELMLHRARITDVEHITGL
 SFYQQRKEPVSDILKLKTHLPTFSQEDGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHED
 PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLTP
 PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHN
 HTYQKSLSLSPGK (配列番号 95)。

10

【0764】

アノテーションキー：

- ・下線のアミノ酸配列：アズロシジシングナルペプチド；
- ・二重下線のアミノ酸配列：332位で単一アミノ酸置換を含むバリエーションヒト可溶性 E
NPP1 ポリペプチド (I332T、太字)；
- ・イタリック体アミノ酸配列：リンカーアミノ酸配列、および
- ・非修飾アミノ酸配列部分：太字で識別された三つのアミノ酸置換を含むバリエーションヒト
IgG1 Fc 部分。

20

【0765】

バリエーション E N P P 1 - F c 配列を、標準的な分子生物学プロトコルを使用して A A V 8 プラスミドにクローニングした。感染性 A A V 8 ベクター粒子を、上述のように生成した。

【0766】

実施例 13 - バリエーション E N P P 1 - F c をコードする A A V ウイルス粒子のマウスへの注射および E N P P 1 酵素活性の測定。

30

バリエーション E N P P 1 - F c をコードするおよび発現することができるベクターの送達の有効性を、野生型マウス (C57BL/6 マウス) で試験した。この実験では、四セットのマウスを使用し、各セットは、5匹のマウス (5~6週齢) を含み、A A V 8 粒子の注射前に、すべてのセットのマウスを、1000 μg/ml の濃度 (最終用量 25~40 μg/動物) の力価 G K 1 . 5 C D 4 抗体の腹腔内注射により寛容化し、A A V 8 構築物によって産生されるヒトタンパク質に対するマウスの免疫反応を減少させた。対照群として機能したマウスの第一のコホートにビヒクル対照を注射し、試験群として機能した第二のコホートに、CMV プロモーター (構築物 10.1) によって駆動されるバリエーション E N P P 1 - F c タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む A A V 8 粒子を注射し、別の試験群として機能したマウスの第三のコホートに、LP1 プロモーター (構築物 10.2) の制御下でバリエーション E N P P 1 - F c タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む A A V 8 粒子を注射し、およびさらに別の試験群として機能したマウスの第四のコホートに、HLP プロモーター (構築物 10.3) の制御下でバリエーション E N P P 1 - F c タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む A A V 8 粒子を注射した。各群の各マウスに、それぞれの A A V 構築物の I V 注射 1 e 1 4 v g / k g 用量で投与した。各コホートへの A A V 注射後、寛容化注射を毎週繰り返した。

40

【0767】

- 1 (A A V 構築物の注射から)、7、21、28、および 42 日目にマウスから血液を採取し、上述のように E N P P 1 酵素活性を測定した。

50

【0768】

ENPP1 活性アッセイの結果を図10に示し、それらは、注射後、ENPP1 活性が、構築物10.1 (CMVプロモーター) またはビヒクル対照と比較して、構築物10.2 (LP1プロモーター) および10.3 (HLPプロモーター) を投与された動物において、経時的に著しく高いことを示した。正常なマウス血漿を、ENPP1 活性レベルを正規化するための参照標準として使用し、一元配置分散分析を統計分析に使用した。

【0769】

これらの結果は、肝臓特異的プロモーターLP1およびHLPが、動物における組み換えENPP1 構築物の発現を駆動するのに非常に効率的であることを示す。

【0770】

実施例14-バリエーションPP3-Fc配列のAAVシステムへのクローニング、AAV感染、AAV産生および精製のための構築物の生成

AAV8プラスミドは、5'から3'の方向に以下の要素を有する発現カセットを含みながら生成された：三つの異なるプロモーター（以下を参照）のうちの一つ、N末端アズロシジニンシグナル配列を含むポリヌクレオチド、以下に記載されるバリエーションENPP3-Fc構築物をコードするポリヌクレオチド、およびSV40ポリアダニル化信号。発現カセットは、AAV8から5' ITRおよび3' ITRに隣接されている。本明細書で言及されるように、構築物(x)は、サイトメガロウイルス (CMV) プロモーターを含む。構築物(y)は、肝臓特異的プロモーターである肝臓プロモーター1 (LP1) を含む (Nathwani et al. Blood 2006; 107 (7): 2653-2661を参照)。構築物(z)は、肝臓特異的プロモーター、ハイブリッド肝臓プロモーター (HLP) を含む (McIntosh et al. Blood. 2013; 121 (17): 3335-44を参照)。

【0771】

これらの構築物では、ENPP3-Fcのバリエーション形態を使用した。バリエーションENPP3-Fcは、組み換え可溶性ヒトENPP3ポリペプチド、リンカー配列 (GGGGS (配列番号94)、および野生型ヒトIgG1 Fc (EU番号によるM252Y/S254T/T256E) に対して三つのアミノ酸置換を含むヒトイムノグロブリンIgG1 Fc部分を含む。バリエーションENPP3-Fcの配列を以下に示す (アノテーションを含む)。

【0772】

【表99】

MTRLTVLALLAGLLASSRA**AKQGSCRKKCFDASFRGLENCRCDVACKDRGDCCWDFEDTCVESTRIWMCNKFRCGETRLE
ASLCSCSDCLQRKDCADYKSVCGGETSWLEENCDAQQSQCEGFDLPPVILFSMDGFRAEYLYTWDTLMPNINKLKTG
IHSKYMAMYPTKTFPNHYTIVTGLYPESHGIIDNNMYDVNLNKNFSLSSKEQNNPAWWHGQPMNLTAMYQGLKAATYFWPG
SEVAINGSFPSIYMPYNGSVPFEEIRSTLLKWLDPKAERPRFYTMFEEDSSGHAGGPVSARVIKALQVVDHAFGLMEG
LKQRNLHNCVNIILLADHGMDQTYCNKMEYMTDYFPRINFFYMEGPAPRIAHNIPHDFFSFNSEEIVRNLSCKRPDQHF
PYLTPDLPKRLHYAKNVRIDKVLHFDVQQLAVRSKSNNTCCGGNHGYNNEFRSMEAIFLAHGSPFKEKTEVEPFENIEVYN
LMCDLLRIQPAPNNGTHGSLNHLKVPFYEPSHAEEVSKFSVCGFANPLPTESLDCFCPLQNSTQLEQVNQMLNLTQEEIT
ATVKVNLFPGRPRVLQKNVDHCLLYHREYVSGFGKAMRPMWSSYTVPQLGDTSPLPPTVPDCLRADVRVPPSESQKCSFY
ADKNITHGFLYPASNRTSDSYDALITSNLVPMYEEFRKMWDYFHSVLLIKHATERNGVNVVSGPIFDYNYDGHFDAPDEI
TKHLANTDVPIPTHYFVVLTSCKNKSHTPENCPGWLDPFIIIPHRPTNVESCEPKPEALWVEERFTHAIARVRDVELLTG
LDIFYQDKVQPVSEILQLKTYLPTFETI GGGSDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSH
DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALH
NHYTQKSLSLSPGK (配列番号96)。

【0773】

アノテーションキー：

・下線のアミノ酸配列：アズロシジニンシグナルペプチド；

10

20

30

40

50

- ・ 二重下線のアミノ酸配列：バリエーションヒト可溶性 ENPP3 ポリペプチド
- ・ イタリック体アミノ酸配列：リンカーアミノ酸配列、および
- ・ 非修飾アミノ酸配列部分：太字で識別された三つのアミノ酸置換を含むバリエーションヒト IgG1 Fc 部分。
- ・ * * - シグナル配列の切断点を示す。

【0774】

バリエーション ENPP3-Fc 配列は、標準的な分子生物学プロトコルを使用して AAV8 プラスミドにクローニングされる。感染性 AAV8 ベクター粒子は、上述のように生成される。

【0775】

実施例 15 - バリエーション ENPP3-Fc をコードする AAV ウイルス粒子のマウスへの注射および ENPP3 酵素活性の測定。

バリエーション ENPP3-Fc をコードするおよび発現することができるベクターの送達の有効性を、野生型マウス (C57BL/6 マウス) で試験する。この実験では、四セットのマウスを使用し、各セットは、五匹のマウス (5~6 週齢) を含み、AAV8 粒子の注射前に、すべてのセットのマウスを、 $1000 \mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度 (最終用量 $25 \sim 40 \mu\text{g}/\text{動物}$) の力価 GK1.5CD4 抗体の腹腔内注射により寛容化し、AAV8 構築物によって産生されるヒトタンパク質に対するマウスの免疫反応を減少させる。

【0776】

マウスの第一のコホート (対照群) にビヒクル対照を注射し、第二のコホート (試験群-x) に、CMV プロモーター (構築物 x) によって駆動されるバリエーション ENPP1-Fc タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む AAV8 粒子を注射し、マウスの第三のコホート (試験群-y) に、LP1 プロモーター (構築物 y) の制御下でバリエーション ENPP3-Fc タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む AAV8 粒子を注射し、およびマウスの第四のコホート (試験群-z) に、HLP プロモーター (構築物 z) の制御下でバリエーション ENPP1-Fc タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む AAV8 粒子を注射した。各群の各マウスに、それぞれの AAV 構築物の IV 注射 $1 \text{ e } 14 \text{ v g}/\text{k g}$ 用量で投与した。各コホートへの AAV 注射後、寛容化注射を毎週繰り返した。

【0777】

- 1 (AAV 構築物の注射から)、7、21、28、および 42 日目にマウスから血液試料を採取し、上述のように ENPP3 酵素活性を測定する。

【0778】

実施例 16 - ENPP1-Fc バリエーション PK および PD プロファイルの評価

バリエーション ENPP1-Fc 融合タンパク質を発現する単回用量 AAV8 ベクター後の PK および PD プロファイルを評価するために、10 週間試験を実施した。2 週齢の *Enpp1^{asj-2J/asj-2J}* マウスを四つの群に無作為に割り当て、ビヒクル (赤色ドットとして示される)、または単回静脈内 (IV) 用量の AAV8 ENPP1-Fc を $1 \times 10^{10} \text{ v g}/\text{k g}$ (低用量、マゼンタドットとして示される)、 $1 \times 10^{12} \text{ v g}/\text{k g}$ (中用量、オレンジ色ドットとして示される)、または $1 \times 10^{14} \text{ v g}/\text{k g}$ (高用量、黒色ドットとして示される) のいずれかを投与した。野生型マウスの一群 (青色のドットとして示される) に、比較のためにビヒクルを投与した。

【0779】

バリエーション ENPP1-Fc 融合は、配列番号 95 に示されるアミノ酸配列を含む (EU 番号による Fc 領域における配列番号 1 & M252Y、S254T および T256E 変異に対する I332T 変異を含む ENPP1-Fc バリエーション)。ENPP1-Fc 融合のためのヌクレオチドコード配列の発現は、HLP 肝臓特異的プロモーター (配列番号 97) によって駆動された。

【0780】

血液試料を 7、14、28、42 および 70 日目に収集し、血漿 ENPP1 酵素活性お

10

20

30

40

50

よび P P i レベルを測定した。試験終了時に、組織カルシウム分析のために大動脈、腎臓、脾臓、および感覚毛を採取した。

【0781】

高用量の A A V 8 E N P P 1 - F c で処置された E n p p 1 a s j - 2 J / a s j - 2 J マウスは、試験期間中、有意に上昇した血漿 E N P P 1 活性レベルを示した (図 11)。A A V 8 E N P P 1 - F c で処置された変異マウスは、血漿 P P i (図 12) および体重 (図 13) の用量依存性の増加、ならびに組織カルシウム含量 (図 14 A - D) の減少を示した。W T マウスの平均血漿 P P i レベルは、約 $4.9 \mu\text{M}$ であった。ビヒクルで処置した E n p p 1 a s j - 2 J / a s j - 2 J マウスにおける約 $0.5 \mu\text{M}$ の血漿 P P i レベルと比較して、A A V 8 の中および高用量は、平均血漿 P P i をそれぞれ $3.3 \mu\text{M}$ および $12.9 \mu\text{M}$ に増加させた。 $1 \times 10^{14} \text{ v g} / \text{ k g}$ (高用量、黒色ドットとして示される) での A A V 8 E N P P 1 - F c の単回用量は、E n p p 1 a s j - 2 J / a s j - 2 J マウスにおいて、大動脈、感覚毛、脾臓、および腎臓における異所性組織石灰化を完全に防止した。

10

【0782】

実施例 17 - 骨構造の評価

単一の高用量 ($2.5 \times 10^{13} \text{ v g} / \text{ k g}$) の A A V 8 E N P P 1 - F c 融合を処置された E n p p 1 a s j - 2 J / a s j - 2 J メスマウスの骨構造の変化を、ビヒクルのみで処置された年齢が合致した野生型マウスおよび E n p p 1 a s j - 2 J / a s j - 2 J マウスの両方と比較して、評価する試験を実施した。実施例 16 にあるように、A A V 8 E N P P 1 - F c 融合は、配列番号 95 に示されたアミノ酸配列を含んだ (E U 番号による F c 領域における配列番号 1 & M 2 5 2 Y、S 2 5 4 T および T 2 5 6 E 変異に対する I 3 3 2 T 変異を含む E N P P 1 - F c バリエーション)。E N P P 1 - F c 融合のためのヌクレオチドコード配列の発現は、H L P 肝臓特異的プロモーター (配列番号 97) によって駆動された。

20

【0783】

骨長、骨梁数、皮質厚、骨梁厚および骨梁骨体積を含む、これらの処置されたマウスの骨構造を評価するためにいくつかのパラメータを評価した。

【0784】

すべての骨分析は、メスマウスから解剖された骨試料で行った。固定された大腿骨を、インビボマイクロ C T スキャナで撮像した。骨形態学および密度パラメータを計算するために、骨梁骨および皮質骨の関心領域 (R O I) を選択した。

30

【0785】

単一の高用量 ($2.5 \times 10^{13} \text{ v g} / \text{ k g}$) の A A V 8 E N P P 1 - F c 融合で処置された E n p p 1 a s j - 2 J / a s j - 2 J メスマウスにおいて、賦形剤のみで処置された E n p p 1 a s j - 2 J / a s j - 2 J ($p \leq 0.001$) およびマウス野生型マウスの両方と比較して、骨長の有意な増加が観察された。ビヒクルのみで処置された E n p p 1 a s j - 2 J / a s j - 2 J マウスは、ビヒクルのみで処置された野生型マウスと比較して、骨長の有意な減少を示した ($p < 0.05$)。図 15 A。

【0786】

ビヒクルのみで処置された E n p p 1 a s j - 2 J / a s j - 2 J マウスと比較して、単一の高用量 ($2.5 \times 10^{13} \text{ v g} / \text{ k g}$) の A A V 8 E N P P 1 - F c 融合で処置された E n p p 1 a s j - 2 J / a s j - 2 J メスマウスにおいて、皮質厚の有意な増加が観察されたが ($p < 0.05$)、この増加は、ビヒクルのみで処置された野生型マウスによって提示される皮質の厚さと等しくなかった。ビヒクルのみで処置された E n p p 1 a s j - 2 J / a s j - 2 J マウスは、ビヒクルのみで処置された野生型マウスと比較して皮質厚の減少を示した ($p \leq 0.0001$)。図 15 B。

40

【0787】

ビヒクルのみで処置された E n p p 1 a s j - 2 J / a s j - 2 J マウスおよびビヒクルのみで処置された野生型マウスと比較して、単回の高用量 ($2.5 \times 10^{13} \text{ v g} / \text{ k g}$

50

）のAAV8 ENPP1-Fc融合で処置されたEnpp1^{asj-2J/asj-2J}メスマウスでは、それぞれ、骨梁数および厚さ（ $p < 0.05$ ）および（ $p \leq 0.001$ ）の有意な増加が観察された。ビヒクルのみで処置されたEnpp1^{asj-2J/asj-2J}マウスは、ビヒクルのみで処置された野生型マウスと比較して、骨梁数および厚さの両方の減少を示した。それぞれ、図15Cおよび15D。

【0788】

ビヒクルのみで処置されたEnpp1^{asj-2J/asj-2J}マウスに対し、単回の高用量（ 2.5×10^{13} vg/kg）のAAV8 ENPP1-Fc融合で処置されたEnpp1^{asj-2J/asj-2J}メスマウスにおいて、骨梁骨体積分画（BV/TV）（試料の単位体積当たりの石灰化骨体積）の有意な増加が観察された（ $P \leq 0.01$ ）。ビヒクルのみで処置されたEnpp1^{asj-2J/asj-2J}マウスは、ビヒクルのみで処置された野生型マウスと比較して、骨体積の減少を示した。図15E。

10

【0789】

したがって、ビヒクルで処置したEnpp1^{asj-2J/asj-2J}マウスは、野生型マウスと比較して、骨長が短く、皮質骨が薄く、骨梁数および骨梁厚が小さく、骨梁骨体積が少なかった。 2.5×10^{13} vg/kgのAAV-ENPP1-Fcを用いた処置は、骨長を増加させ、変異マウスにおける大腿骨の骨梁および皮質領域の欠損を補正した。

【0790】

実施例18－骨芽細胞機能および成長の評価

20

単一の高用量（ 2.5×10^{13} vg/kg）のAAV8 ENPP1-Fc融合を処置されたEnpp1^{asj-2J/asj-2J}メスマウスの骨芽細胞機能の変化および成長を、ビヒクルのみで処置された年齢が合致した野生型マウスおよびEnpp1^{asj-2J/asj-2J}マウスの両方と比較して、評価する試験。実施例16および17にあるように、AAV8 ENPP1-Fc融合は、配列番号95に示されるアミノ酸配列を含んだ（EU番号によるFc領域における配列番号1&M252Y、S254TおよびT256E変異に対するI332T変異を含むENPP1-Fcバリエーション）。ENPP1-Fc融合のためのヌクレオチドコード配列の発現は、HLP肝臓特異的プロモーター（配列番号97）によって駆動された。

【0791】

30

動的組織形態計測分析のために、 10 mg/kg のカルセインを9日間の間隔でマウスに注射した。 10% 中性緩衝ホルマリン中に固定した後、脱灰されていない大腿骨をメチルメタクリレートに包埋し、近位骨幹端を長軸方向に切片化し、骨芽細胞についてはトリジンブルーで染色し、石灰化についてはフォンコッサで染色した。骨形成速度（BFR）/骨表面（BS）、骨芽細胞面（Ob.S）/BSを、骨幹端の骨梁骨で画定される関心領域で測定する。組織学的分析については、脛骨を 10% 中性緩衝ホルマリン中に固定し、EDTAにより2～4週間脱灰した。脱灰した脛骨をパラフィン包埋し、切断した。脱灰した脛骨の切片を、成長板内の軟骨細胞についてサフラニンOで染色した。

【0792】

単一の高用量（ 2.5×10^{13} vg/kg）のAAV8 ENPP1-Fc融合で処置されたEnpp1^{asj-2J/asj-2J}メスマウスにおいて、ビヒクルのみで処置されたEnpp1^{asj-2J/asj-2J}と比較して、骨形成速度および骨芽細胞面の両方の有意な増加が観察された。これらの後者のマウスは、ビヒクルのみで処置された野生型マウスと比較して、骨形成速度および骨芽細胞面の両方の減少を示した。それぞれ、図16Aおよび16B。

40

【0793】

ビヒクルのみで処置されたEnpp1^{asj-2J/asj-2J}マウスと比較して、単一の高用量（ 2.5×10^{13} vg/kg）のAAV8 ENPP1-Fc融合で処置されたEnpp1^{asj-2J/asj-2J}マウスにおいて、異常肥大軟骨細胞の数および柱状組織の両方の減少により示されるように、くる病表現型の減少が観察された。これらの後

50

者のマウスは、ビヒクルのみで処置された野生型マウスと比較して、くる病表現型の増加を示した。図 17。

【0794】

したがって、野生型マウスと比較して、ビヒクルで処置された *Enpp1^{asj-2J} / asj-2J* マウスは、低い骨形成速度、低い骨芽細胞面、およびくる病表現型の特徴である異常肥大軟骨細胞のより多くの層を示した。対照的に、 $2.5 \times 10^{13} \text{ vg/kg}$ の *AAV-ENPP1-Fc* を用いた処置は、変異型マウスにおける骨形成速度、骨芽細胞面積および成長板構造を正常化した。

【0795】

実施例 19 - 脂質ナノ粒子の作製

ENPP1 または *ENPPENPP3* タンパク質の触媒ドメインを含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの細胞への送達における使用のための、安定化され、安全かつ有効な脂質ナノ粒子を調査するために、様々な製剤が調製され、試験される。ナノ粒子は、二つの流体ストリームのマイクロ流体および T 接合混合などの混合プロセスを用いて作製することができ、その一方は組み換え核酸を含有し、他方は脂質成分を有する。

【0796】

カチオン性および／またはイオン化可能な脂質は、3-(ジドデシルアミノ)-N1、N1, 4-トリドデシル (*tridodecyl*)-1-ピペラジンエタンアミン (KL10)、N1-[2-(ジドデシルアミノ)エチル]-N1, N4, N4-トリドデシル (*tridodecyl*)-1, 4-ピペラジンジエタンアミン (KL22)、14, 25-ジトリドデシル-15, 18, 21, 24-テトラアザ-オクタトリアコンタン (KL25)、1, 2-ジリノレイルオキシ-N, N-ジメチルアミノプロパン (DLin-DMA)、2, 2-ジリノレイル-4-ジメチルアミノメチル-[1, 3-ジオキサラン (DLin-K-DMA)、ヘプタトリアコンタ-6, 9, 28, 31-テトラエン-19-イル 4-(ジメチルアミノ)ブタノエート (DLin-MC3-DMA)、2, 2-ジリノレイル-4-(2-ジメチルアミノエチル)-[1, 3-ジオキサラン (DLin-KC2-DMA)、1, 2-ジオレイルオキシ-N, N-ジメチルアミノプロパン (DODMA)、2-({8-[(β3)-コレスト-5-エン-3-イルオキシ] オクチル} オキシ)-N, N-ジメチル-3 [(9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエン-1-イルオキシ] プロパン-1-アミン (オクチル-CLinDMA)、(2R)-2-({8-[(β3)-コレスト-5-エン-3-イルオキシ] オクチル} オキシ)-N, N-ジメチル-3 [(9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエン-1-イルオキシ] プロパン-1-アミン (オクチル-CLinDMA (2R))、(2S)-2-({8-[(β3)-コレスト-5-エン-3-イルオキシ] オクチル} オキシ)-N, N-ジメチル-3 [(9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエン-1-イルオキシ] プロパン-1-アミン (オクチル-CLinDMA (2S))、からなる非制限的な群から選択されてもよい。

【0797】

脂質組成物は、エタノール中約 50mM の濃度で、MC3、リン脂質 (*Avanti Polar Lipids*, *Alabaster*, *Ala.* から入手可能な *DOPE* または *DSPC* など)、PEG 脂質 (*Avanti Polar Lipids*, *Alabaster*, *Ala.* から入手可能な、例えば、1, 2-ジミリスチル-s-n-グリセロールメトキシポリエチレングリコール、PEG-DMG としても知られる)、および構造脂質 (例えば、*Sigma-Aldrich*, *Taufkirchen*, *Germany* より入手可能なコレステロール、またはコルチコステロイド (例えば、プレドニゾン、デキサメタゾン、プレドニゾン、ヒドロコルチゾン、またはそれらの組み合わせ) などのイオン化可能な脂質を組み合わせることによって調製される。溶液は、例えば、-20℃で保存するために冷却すべきである。

【0798】

脂質を組み合わせ、所望のモル比 (例えば、表 1 を参照) を得て、水およびエタノ-

10

20

30

40

50

ルで希釈して、約 5 . 5 m M ~ 約 2 5 m M の最終脂質濃度とする。

【 0 7 9 9 】

【 表 1 0 0 】

表 1

例示的な LNP

組成 (モル%)	成分	
40:20:38.5:1.5	イオン化可能/カチオン性脂質：リン脂質：コル(Chol):PEG-DMG	10
45:15:38.5:1.5	イオン化可能/カチオン性脂質：リン脂質：コル(Chol):PEG-DMG	
50:10:38.5:1.5	イオン化可能/カチオン性脂質：リン脂質：コル(Chol):PEG-DMG	
55:5:38.5:1.5	イオン化可能/カチオン性脂質：リン脂質：コル(Chol):PEG-DMG	
60:5:33.5:1.5	イオン化可能/カチオン性脂質：リン脂質：コル(Chol):PEG-DMG	
45:20:33.5:1.5	イオン化可能/カチオン性脂質：リン脂質：コル(Chol):PEG-DMG	
50:20:28.5:1.5	イオン化可能/カチオン性脂質：リン脂質：コル(Chol):PEG-DMG	
55:20:23.5:1.5	イオン化可能/カチオン性脂質：リン脂質：コル(Chol):PEG-DMG	
60:20:18.5:1.5	イオン化可能/カチオン性脂質：リン脂質：コル(Chol):PEG-DMG	
40:15:43.5:1.5	イオン化可能/カチオン性脂質：リン脂質：コル(Chol):PEG-DMG	
50:15:33.5:1.5	イオン化可能/カチオン性脂質：リン脂質：コル(Chol):PEG-DMG	20
55:15:28.5:1.5	イオン化可能/カチオン性脂質：リン脂質：コル(Chol):PEG-DMG	
60:15:23.5:1.5	イオン化可能/カチオン性脂質：リン脂質：コル(Chol):PEG-DMG	
40:10:48.5:1.5	イオン化可能/カチオン性脂質：リン脂質：コル(Chol):PEG-DMG	
45:10:43.5:1.5	イオン化可能/カチオン性脂質：リン脂質：コル(Chol):PEG-DMG	
55:10:33.5:1.5	イオン化可能/カチオン性脂質：リン脂質：コル(Chol):PEG-DMG	
60:10:28.5:1.5	イオン化可能/カチオン性脂質：リン脂質：コル(Chol):PEG-DMG	
40:5:53.5:1.5	イオン化可能/カチオン性脂質：リン脂質：コル(Chol):PEG-DMG	
45:5:48.5:1.5	イオン化可能/カチオン性脂質：リン脂質：コル(Chol):PEG-DMG	
50:5:43.5:1.5	イオン化可能/カチオン性脂質：リン脂質：コル(Chol):PEG-DMG	
40:20:40:0	イオン化可能/カチオン性脂質：リン脂質：コル(Chol):PEG-DMG	30
45:20:35:0	イオン化可能/カチオン性脂質：リン脂質：コル(Chol):PEG-DMG	
50:20:30:0	イオン化可能/カチオン性脂質：リン脂質：コル(Chol):PEG-DMG	
55:20:25:0	イオン化可能/カチオン性脂質：リン脂質：コル(Chol):PEG-DMG	
60:20:20:0	イオン化可能/カチオン性脂質：リン脂質：コル(Chol):PEG-DMG	
40:15:45:0	イオン化可能/カチオン性脂質：リン脂質：コル(Chol):PEG-DMG	
45:15:40:0	イオン化可能/カチオン性脂質：リン脂質：コル(Chol):PEG-DMG	
50:15:35:0	イオン化可能/カチオン性脂質：リン脂質：コル(Chol):PEG-DMG	
55:15:30:0	イオン化可能/カチオン性脂質：リン脂質：コル(Chol):PEG-DMG	
60:15:25:0	イオン化可能/カチオン性脂質：リン脂質：コル(Chol):PEG-DMG	
40:10:50:0	イオン化可能/カチオン性脂質：リン脂質：コル(Chol):PEG-DMG	40
45:10:45:0	イオン化可能/カチオン性脂質：リン脂質：コル(Chol):PEG-DMG	
50:0:48.5:1.5	イオン化可能/カチオン性脂質：リン脂質：コル(Chol):PEG-DMG	
50:10:40:0	イオン化可能/カチオン性脂質：リン脂質：コル(Chol):PEG-DMG	
55:10:35:0	イオン化可能/カチオン性脂質：リン脂質：コル(Chol):PEG-DMG	
60:10:30:0	イオン化可能/カチオン性脂質：リン脂質：コル(Chol):PEG-DMG	

【 0 8 0 0 】

組み換え核酸成分および脂質成分を含む脂質ナノ粒子は、脂質成分対核酸成分の、約 5 : 1 ~ 約 5 0 : 1 の間の w t : w t 比で、脂質溶液と、E N P P 1 または E N P P 3 タンパク質の触媒ドメインを含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの溶液と、を組み合わせることによって調製される。脂質溶液を、約 1 0 m l / 分 ~ 約 1 8 m l / 分の間の流量で、N a n o A s s e m b l e r マイクロ流体システムを使用して、治療用および / または予防的溶液中に急速に注入し、約 1 : 1 ~ 約 4 : 1 の水対エタノール比の懸濁液

を生成する。

【0801】

脂質ナノ粒子は、エタノールを除去し、緩衝液交換を達成するために、透析によって処理することができる。製剤は、10kDの分子量カットオフで、Slide-A-Lyzerカセット(Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, Ill.)を使用して、一次生成物の体積の200倍で、リン酸緩衝食塩水(PBS)、pH7.4に対して二回透析される。最初の透析は、室温で3時間実施される。次いで、製剤を4℃で一晩透析する。得られたナノ粒子懸濁液を、0.2µmの滅菌フィルター(Sarstedt, Ntimbrecht, Germany)を通してガラスバイアルに濾過する。

10

【0802】

上述の方法は、ナノ沈殿および粒子形成を誘発する。T接合および直接注入を含むが、これに限定されない代替的プロセスを使用して、同じナノ沈殿を達成してもよい。したがって調製されるENPP1またはENPP3の触媒ドメインをコードする組み換え核酸を含むLPNは、以下の実施例で特徴付けられ、投与される。

【0803】

実施例20-脂質ナノ粒子の特徴付け

Zetasizer Nano ZS(Malvern Instruments Ltd, Malvern, Worcestershire, UK)を使用して、粒子サイズを決定することができ、多分散度指数(PDI)および1×PBS中の脂質ナノ粒子のゼータ電位を使用して粒子サイズを、および15mMのPBSを使用してゼータ電位を、決定することができる。

20

【0804】

紫外可視分光法を使用して、脂質ナノ粒子中の組み換え核酸の濃度を決定することができる。1×PBS中の希釈された製剤の100µLを、メタノールおよびクロロホルムの4:1(v/v)混合物の900µLに加える。混合後、溶液の吸光度スペクトルを、例えば、DU 800分光光度計(Beckman Coulter, Beckman Coulter, Inc., Brea, Calif.)上で230nm~330nmの間で記録する。脂質ナノ粒子中の組み換え核酸の濃度を、組成物で使用される核酸の減退係数、および例えば、260nmの波長での吸光度と、例えば、330nmの波長でのベースライン値との間の差に基づいて計算することができる。

30

【0805】

ds DNAを含む脂質ナノ粒子については、Quant-iT(商標)。PicoGreen dsDNA試薬を使用して、脂質ナノ粒子によるDNAの封入を評価することができる。試料を、TE緩衝液(10mMのトリス-HCl、1mMのEDTA、pH7.5)中で、約5µg/mLの濃度に希釈する。希釈された50µLの試料を、ポリスチレン96ウェルプレートに移し、50µLのTE緩衝液または50µLの2%のトリトンX-100溶液のいずれか一つをウェルに加える。プレートを、37℃の温度で15分間培養する。PicoGreen(登録商標)試薬をTE緩衝液中で1:100に希釈し、この溶液の100µLを各ウェルに加える。蛍光強度は、例えば、約485nmの励起波長および例えば、約535nmの放射波長の蛍光プレートリーダー(Wallac Victor 1420 Multilabel Counter; Perkin Elmer, Waltham, Mass.)を使用して測定することができる。試薬ブランクの蛍光値は、各試料の蛍光値から減算され、遊離DNAのパーセンテージは、完全な試料(トリトンX-100の添加なし)の蛍光強度を、破壊された試料の蛍光値(トリトンX-100の添加によって生じる)で割ることによって決定される。

40

【0806】

ENPP1またはENPP3タンパク質の触媒ドメインを含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含むLPNは、このように調製され、インビボまたはインビトロで哺乳類細胞をトランスフェクトするために使用され得る。

50

【0807】

実施例－21－マウスへのENPP1－Fcをコードする核酸を含むLNP粒子の注射および体重増加、骨密度、骨強度、および骨体積の測定。

NPP1またはNPP3ポリペプチドをコードする組み換え核酸を含むLNPの送達の有効性は、Enpp1^{asj/asj}マウスモデル、ABCC6^{-/-}マウスモデル、HYPマウスモデル、ttwマウスモデル、慢性腎臓疾患のマウスモデル（CKD）、またはCKDの5/6腎臓摘出のラットモデルなどのマウスモデルを使用して試験される。非限定的な例として、以下の実験では、マウスモデルとしてEnpp1^{asj/asj}マウスを使用し、マウスモデルに送達されるポリヌクレオチドとしてアズロシジン－NPP1－Fc構築物を使用し、送達は、インビボでENPP1－Fcタンパク質をコードするLNP粒子（実施例19に示すように調製される）を使用することによって達成される。

10

【0808】

当業者であれば、病理学的石灰化または骨化の疾患を治療する遺伝子療法の効果を試験するための本発明で開示される、代替のマウスモデル、異なるENPP1融合タンパク質（ENPP1－アルブミンまたはENPP1－FcもしくはENPP1の機能的等価物、またはFcもしくはアルブミンドメインを欠くENPP1など）、または異なるENPP3融合タンパク質（ENPP3－FcもしくはENPP3－アルブミンまたはFcもしくはアルブミンドメインを欠くENPP3もしくはENPP3の機能的等価物）をコードする代替のシグナル配列（NPP2、NPP5、NPP7アルブミンまたはアズロシジンなど）を含む代替ポリヌクレオチド構築物を使用することにより、同じ実験を繰り返すことができることを認識するであろう。実験で利用されるアズロシジン－NPP1－Fc構築物は、概念実証としてヒトENPP1－Fcタンパク質をコードし、ヒトENPP3－Fcをコードするアズロシジン－NPP3－Fc構築物で同じ実験を繰り返すことができる。

20

【0809】

この実験では、四セットのマウスを使用し、各セットは少なくとも五匹のマウス（6～8週齢）を有し、照群として機能するENPP1^{wt}マウスの第一のコホートに、ヌルベクターを含むLNP粒子を注射し、対照群として機能するEnpp1^{asj/asj}マウスの第二のコホートに、ヌルベクターを含むLNP粒子を注射し、試験群として機能するENPP1^{wt}マウスの第三のコホートに、ENPP1－Fcタンパク質をコードするポリヌクレオチドを含むLNP粒子を注射し、および試験群として機能するEnpp1^{asj/asj}の第四のコホートに、ENPP1－Fcタンパク質をコードするポリヌクレオチドを含むLNP粒子を注射する。

30

【0810】

実験のマウスは、加速食（リンに富み、マグネシウム含有量を減少させた（Harlan Teklad, Rodent diet TD. 00442, Madison, WI））、または通常の食事（Laboratory Autoclavable Rodent Diet 5010; PMI Nutritional International, Brentwood, MO）のいずれかを与えられ、6～8週齢後、すべてのマウスは、pH 7.4のPBSのENPP1またはENPP1－Fcの触媒ドメインをコードする組み換え核酸を含むLNPの後眼窩注射または尾静脈注射を受ける。注射されたベクターは、空の「ヌル」（対照群）であるか、またはNPP1遺伝子（試験群）を担持するのいずれかである。体重測定は、LNP注射後のいかなる体重の増加または減少も記録するために毎日行われる。マウスからの血液、尿、骨、および組織試料を採取して、以下のとおり分析する。実験プロトコルは、Albright et al., Nat Commun. 2015 Dec 1; 6:10006, およびCaballero et al., PLoS One. 2017; 12(7): e0180098に詳細に列挙され、それらすべての内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。試験終了時（7、28、および112日、マウスはすべて、イソフルランを用いた深層麻酔における眼窩放血により安楽死させ、重要な器官を、当技術分野で記載され

40

50

るように除去する。(Impaired urinary osteopontin excretion in Npt2a^{-/-} mice., Caballero et al., Am J Physiol Renal Physiol. 2017 Jan 1; 312 (1): F77-F83; Response of Npt2a knockout mice to dietary calcium and phosphorus, Li Y et al., PLoS One. 2017; 12 (4): e0176232.)。

【0811】

アッセイ：腎臓組織型、PPiレベル、および、FGF-23レベル、ビタミンD、副甲状腺ホルモン（PTH）レベル、血清／血液尿素レベル、血中尿素窒素（BUN）レベル、血清／血液クレアチンレベル、および血漿ピロホスフェート（PPi）などの血液尿パラメータを、実施例3および4に記載されるように各コホートについて分析する。

10

【0812】

結果：未処置のEnpp1^{asj/asj}マウスは、概して体重減少および死亡率の増加を呈する。対照的に、ENPP1の触媒ドメインをコードする組み換え核酸を含むLNPで処置されたEnpp1^{asj/asj}マウスは、正常なWTマウスの体重範囲に近づく体重の増加を示すと予測される。

【0813】

ヌルベクターで処置されたEnpp1^{asj/asj}マウスは、心臓、大動脈および冠動脈に石灰化、および右心室の自由壁の心筋梗塞の組織学的証拠、冠動脈、心臓、上行大動脈および下行大動脈の石灰化、心筋細胞壊死、ならびに冠動脈石灰化の領域に隣接する心筋組織における心筋線維症を示すことが予想される。対照的に、ENPP1-Fcの触媒ドメインをコードする組み換え核酸を含むLNPで処置されたEnpp1^{asj/asj}動物は、組織型または死後マイクロCTにおいて心臓、動脈、または大動脈の石灰化の非存在を呈することが予想される。ヌルベクターで処置されたEnpp1^{asj/asj}マウスはまた、腎皮質への拡張を伴う、外側髄質を中心とする重度の広範な石灰化とともに、腎髄質を中心とする石灰化を示す。対照的に、ENPP1を用いて本発明により処置されたEnpp1^{asj/asj}マウスは、管腔における腎ミネラル沈着の減少または欠乏および健康な野生型マウスの組織型と類似した組織型を有する軟部組織の血管系を示すと予想される。

20

30

【0814】

生存、毎日の動物体重、および末期組織型に加えて、治療応答は、死後高解像度マイクロCTスキャンを介して評価され、血管石灰化、血漿PPi濃度、および99mTc-PPi（99mPYP）取り込みを撮像する。WTまたはLNP処置された（ENPP1またはENPP3を発現するベクターを含む）Enpp1^{asj/asj}のいずれも、未処置（ヌルベクター）Enpp1^{asj/asj}コホートの動脈、冠動脈、および心臓に予想される劇的な石灰化とは対照的に、マイクロCTを介していかなる血管石灰化を有しないと予想される。さらに、LNP処置した（ENPP1またはENPP3を発現するベクターを含む）Enpp1^{asj/asj}動物（5.2 μM）の血清PPi濃度は、WTレベル（4.4 μM）まで上昇し、未処置のenpp1^{asj/asj}レベル（0.5 μM）を有意に上回ると予想される。

40

【0815】

他の実施形態

前述の説明から、本発明に従う範囲内である病理学的石灰化または骨化の存在によって特徴付けられるあらゆる疾患を治療するための、当該技術分野で既知の異なるプロモーターもしくはエンハンサー、または異なる細胞型を有する異なるウイルスベクターにおける、ENPP1もしくはENPP3またはそれらの組み合わせの機能的バリエーションを発現する異なるシグナル配列の使用を含む、様々な使用および条件にそれを採用するために、本明細書に記載される発明に変形および修正がなされ得ることは明らかであろう。本発明による他の実施形態は、以下の請求項の範囲内である。

50

【0816】

本明細書の変数の任意の定義における要素の一覧の列挙は、任意の単一の要素または列挙された要素の組み合わせ（または部分的組み合わせ）としてのその変数の定義を含む。本明細書の実施形態の列挙は、任意の単一の実施形態として、または任意の他の実施形態もしくはその一部と組み合わせたその実施形態を含む。

【0817】

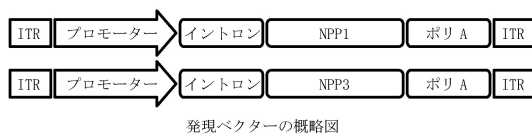
本明細書で言及される全ての刊行物および特許出願は、本発明が関連する当業者の技術レベルを示すものである。全ての刊行物および特許出願は、各個々の刊行物または特許出願が、参照により組み込まれることを具体的かつ個別に示唆された場合と同じ程度で、参照により本明細書に組み込まれる。

【0818】

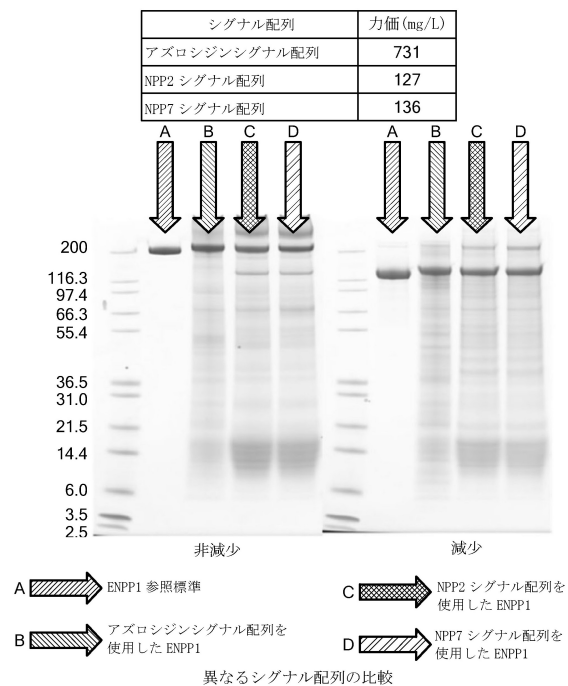
他の実施形態は、以下の請求項の範囲内である。

【図面】

【図1】



【図2】



10

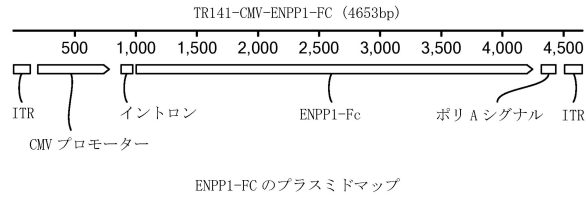
20

30

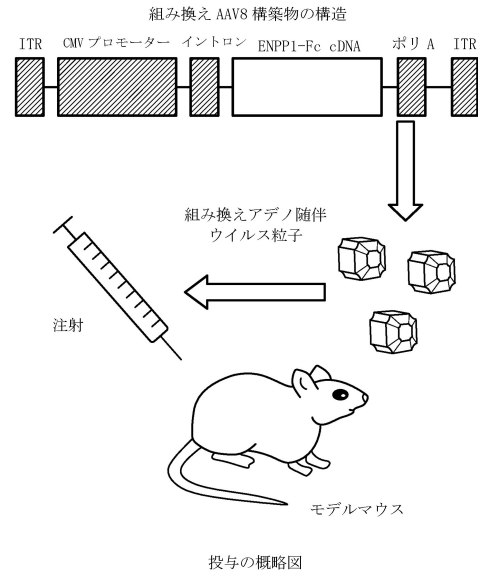
40

50

【図 3】

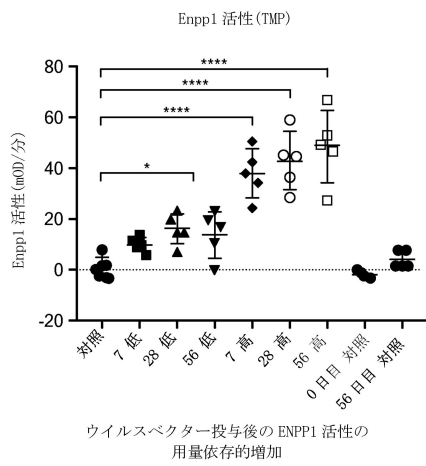


【図 4】

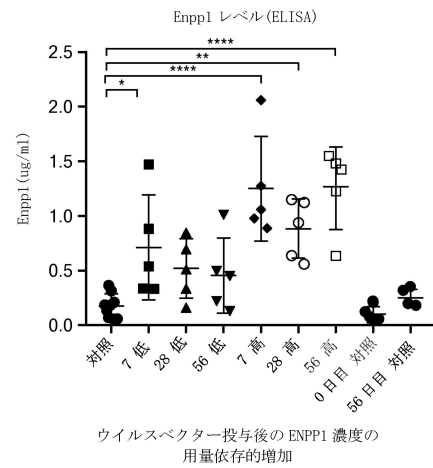


10

【図 5】



【図 6】



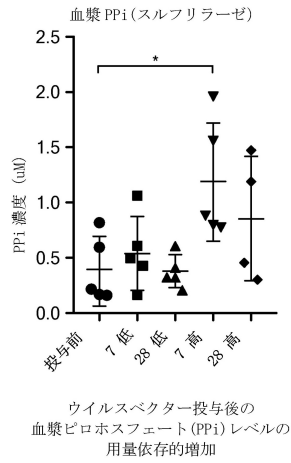
20

30

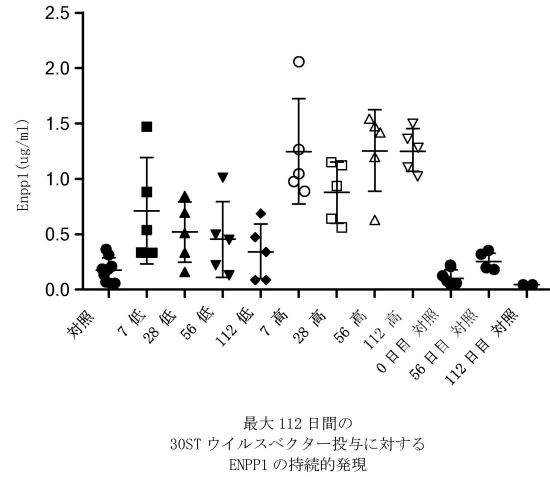
40

50

【図 7】

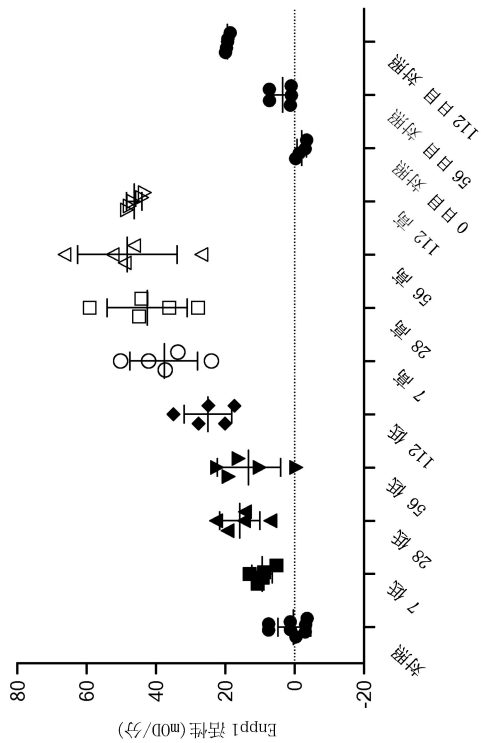


【図 8】

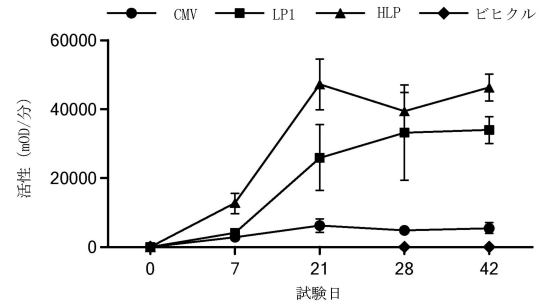


10

【図 9】



【図 10】



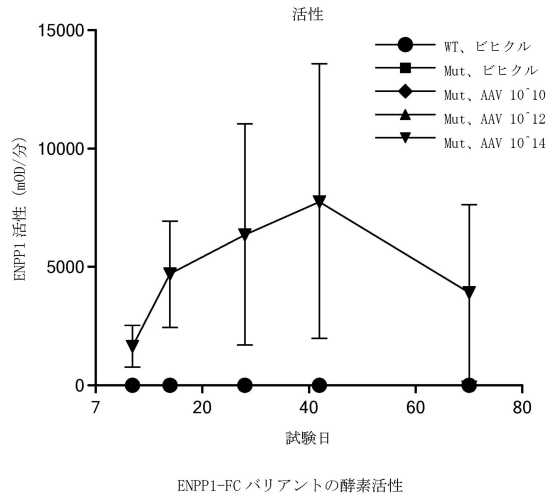
20

30

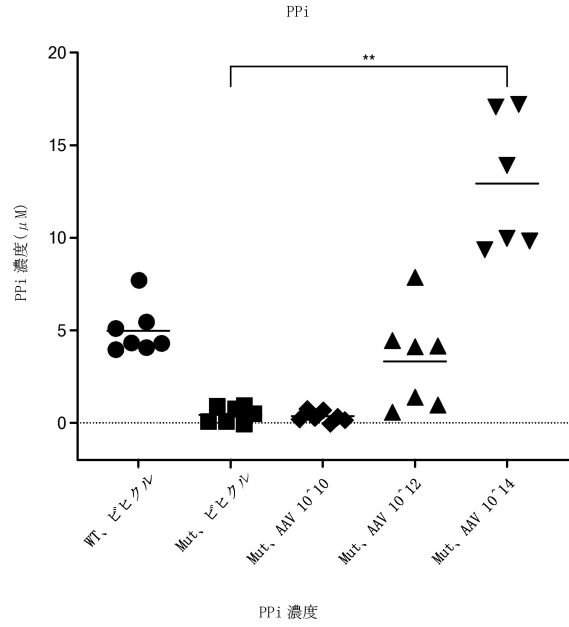
40

50

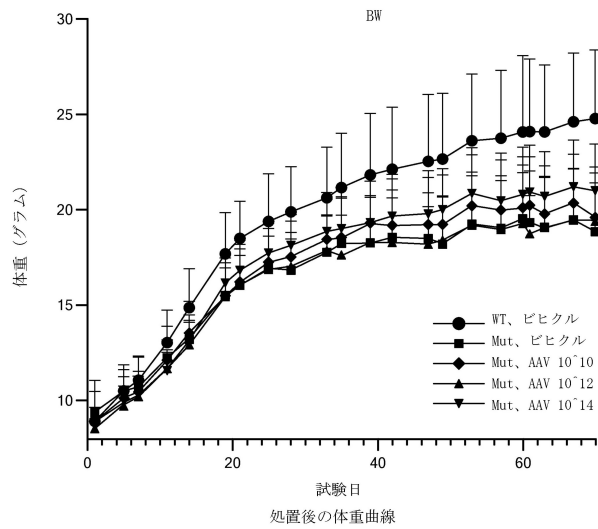
【図 1 1】



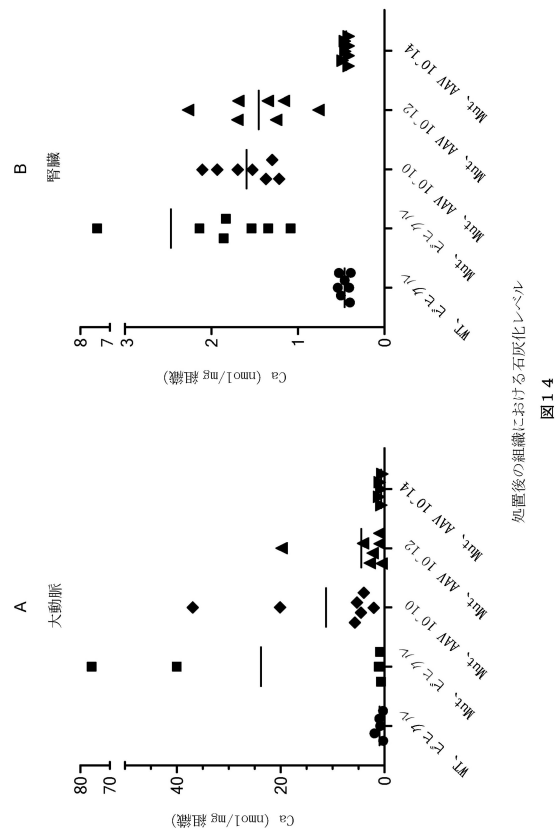
【図 1 2】



【図 1 3】



【図 1 4 - 1】



10

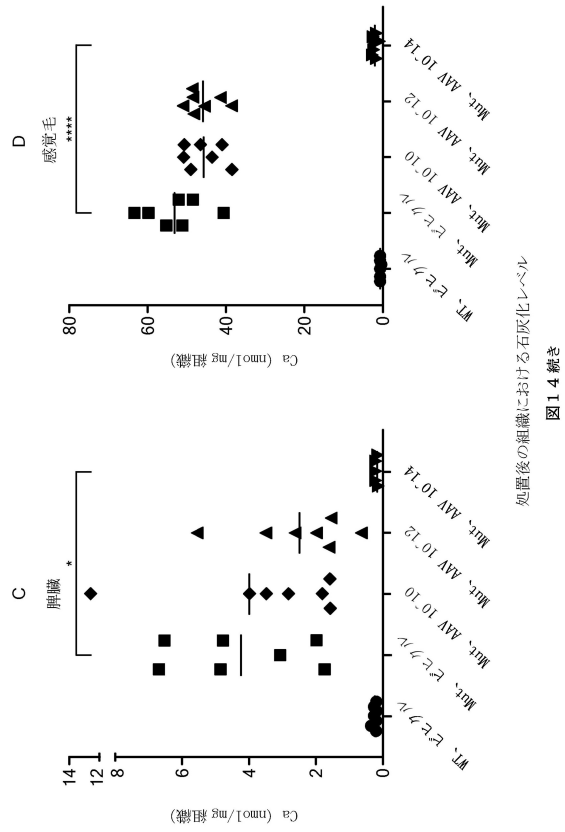
20

30

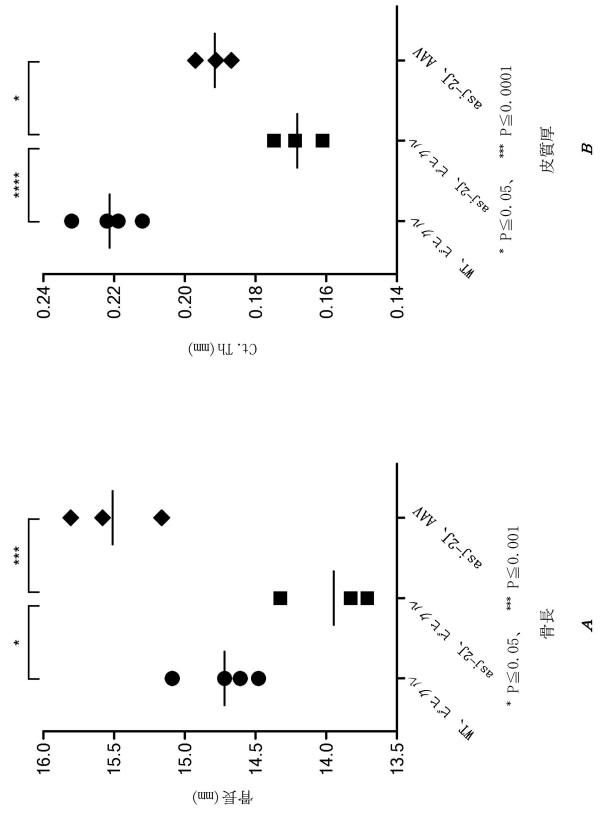
40

50

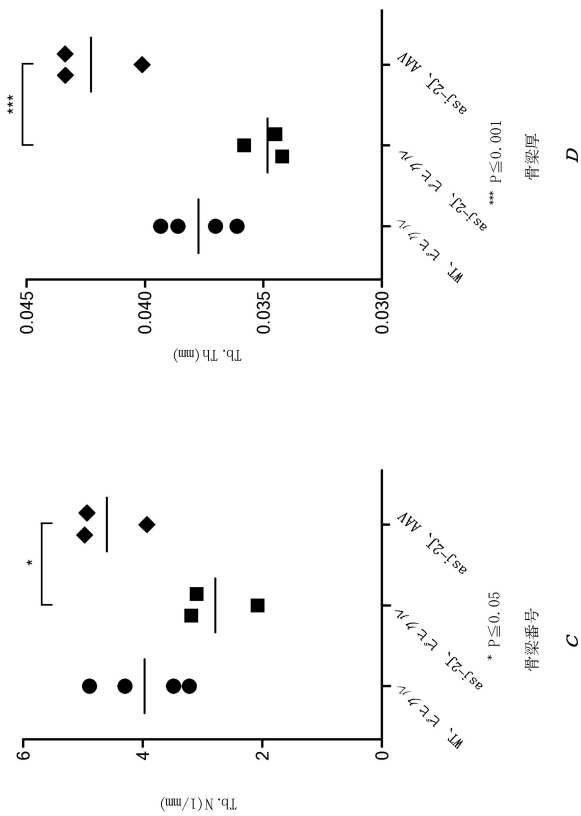
【図 1 4 - 2】



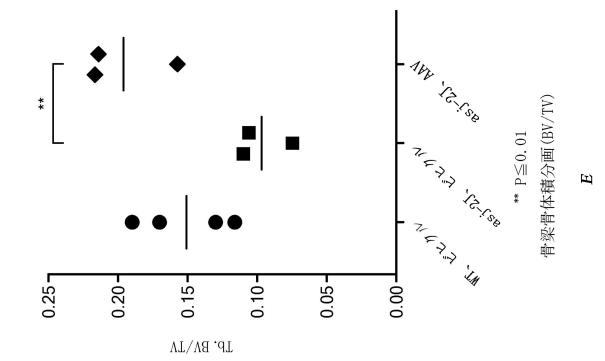
【図 1 5 - 1】



【図 1 5 - 2】



【図 1 5 - 3】



10

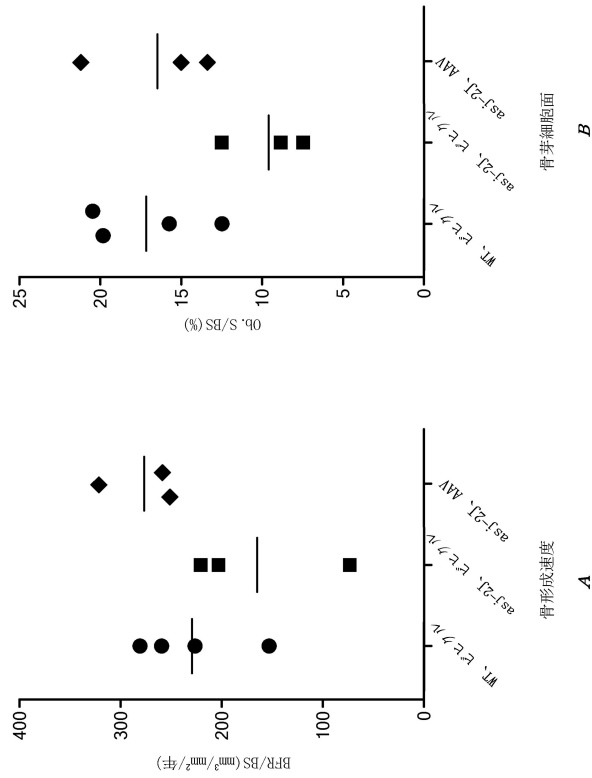
20

30

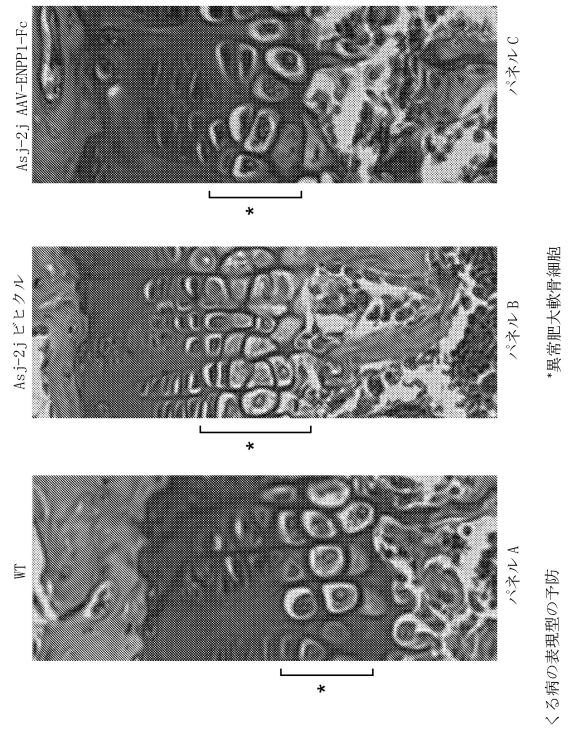
40

50

【図 16】



【図 17】



【配列表】

202354875800001.app

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 21/54216

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC - C12N 15/86, A61K 48/00, C12N 9/14, C12Q 1/6883 (2021.01)

CPC - C12N 2750/14143, G01N 33/6893, A01K 2217/05

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 data base consulted during the international search (name of data base 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.
Y	US 2017/0340713 A1 (YALE UNIVERSITY) 30 November 2017 (30.11.2017) Abstract; Claim 1; Claim 2; Claim 4; para [0043]; para [0060]; para [0076]	1-5, 26
Y	US 2012/0009592 A1 (FROGUEL et al.) 12 January 2012 (12.01.2012) Abstract; para [0009]; para [0127]	1-5, 26
Y	US 2013/0012574 A1 (MONAHAN et al.) 10 January 2013 (10.01.2013) Abstract; para [0014]; para [0107]	5

☐ 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

31 December 2021

Date of mailing of the international search report

FEB 22 2022

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents

P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450

Facsimile No. 571-273-8300

Authorized officer

Kari Rodriguez

Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2019)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 21/54216

Box No. 1 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:

☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.

☐ on paper or in the form of an image file.

b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).

☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 21/54216

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.: 6-25, 27-62, 83-107
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

----Please see continuation in first extra sheet -----

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.:
1-5, 26, limited to a viral vector encoding ENPP1 polypeptide

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.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 21/54216

Continuation of Box No. III. Observations where unity of invention is lacking.

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be searched, the appropriate additional search fees must be paid.

Group I+, Claims 1-5, 26, directed to a recombinant nucleic acid comprising: (a) a liver specific promoter and (b) nucleotide sequence encoding the catalytic domain of ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase and a viral vector comprising said nucleic acid. The recombinant nucleic acid will be searched to the extent that the recombinant nucleic acid encompasses a viral vector comprising nucleic acid comprising a nucleotide sequence encoding the catalytic domain of ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase-1 (ENPP1) polypeptide (note, this is the first claimed enzyme for the inventive nucleic acid embodiment). It is believed that claims 1-5, 26 encompass this first named invention, and thus these claims will be searched without fee to the extent that the recombinant nucleic acid encompasses a viral vector comprising nucleic acid comprising (a) a liver specific promoter and a nucleotide sequence encoding the catalytic domain of ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase-1 (ENPP1) polypeptide. Additional nucleic acid(s) encoding additional polypeptide(s) will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the claims that encompass any additionally elected nucleic acid(s) encoding additional polypeptide(s). Applicants must further indicate, if applicable, the claims which encompass the first named invention, if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched. An exemplary election would be a recombinant nucleic acid comprising a nucleotide sequence encoding the catalytic domain of ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase-3 (ENPP3) polypeptide (claims 1-5, 26).

Group II+, Claims 63-82, directed to a recombinant nucleic acid encoding the catalytic domain of ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase and a non-viral vector comprising said nucleic acid. Group II+ will be searched upon payment of additional fees. The recombinant nucleic acid may be searched, for example, to encompass a non-viral vector comprising a nucleotide sequence encoding the catalytic domain of ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase-1 (ENPP1) polypeptide for an additional fee and election as such. It is believed that claims 63-82 read on this exemplary invention. Additional nucleic acid(s) encoding additional polypeptide(s) will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the claims that encompass any additionally elected nucleic acid(s) encoding additional polypeptide(s). Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched. Another exemplary election would be a non-viral vector comprising a nucleotide sequence encoding the catalytic domain of ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase-3 (ENPP3) polypeptide (claims 63-82).

The inventions listed as Groups I+ and II+ do not relate to a single special technical feature under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Special technical features

Group I+ has the special technical feature of a viral vector comprising recombinant nucleic acid, that is not required by Group II+.

Group II+ has the special technical feature of a non-viral vector comprising recombinant nucleic acid, that is not required by Group I+.

Common technical features

The inventions of Group I+ and Group II+ share the common technical feature of:

a recombinant nucleic acid encoding the catalytic domain of ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase-1 (ENPP1) polypeptide or the catalytic domain of ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase-3 (ENPP3) polypeptide. However, these shared technical features are previously disclosed by US 2017/0340713 A1 to Yale University, (hereinafter "Yale").

Yale teaches a recombinant nucleic acid encoding the catalytic domain of ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase-1 (ENPP1) polypeptide (Claim 1 - "A method of reducing or preventing progression of at least one disease selected from the group consisting of chronic kidney disease (CKD), end stage renal disease (ESRD), calcific uremic arteriopathy (CUA), and calciphylaxis in a subject diagnosed with the at least one disease, the method comprising administering to the subject a therapeutically effective amount of a polypeptide comprising a soluble ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase-1 (ENPP1) polypeptide, whereby the at least one disease is reduced or its progression is prevented in the subject"; Claim 2 - "The method of claim 1, wherein the soluble ENPP1 polypeptide comprises a somatomedin B domain, an ENPP1 catalytic domain, and an ENPP1 nuclease domain"; Claim 4 - "The method of claim 1, wherein the soluble ENPP1 polypeptide is a secreted product of a precursor polypeptide expressed in a mammalian cell, wherein the precursor polypeptide comprises a signal sequence and ENPP1, wherein the precursor polypeptide undergoes proteolytic processing to the soluble ENPP1 polypeptide"; para [0043] - "FIG. 8 is a schematic illustration of a plasmid used to express SEQ ID NO:22"; para [0060] - "The term "coding sequence," as used herein, means a sequence of a nucleic acid or its complement, or a part thereof, that can be transcribed and/or translated to produce the mRNA and/or the polypeptide or a fragment thereof. Coding sequences include exons in a genomic DNA or immature primary RNA transcripts, which are joined together by the cell's biochemical machinery to provide a mature mRNA"; para [0076] - "The term therefore includes, for example, a recombinant DNA which is incorporated into a vector").

As the technical features were known in the art at the time of the invention, they cannot be considered special technical features that would otherwise unify the groups. Therefore, Group I+ and II+ inventions lack unity under PCT Rule 13 because they do not share the same or corresponding special technical feature.

*Continuation of Item 4 above: claims 6-25, 27-62, 83-107 are held unsearchable because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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 35/76 (2015.01)	A 6 1 K 35/76	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 P 3/00 (2006.01)	A 6 1 P 3/00	
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 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 5
A 6 1 P 21/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
G 0 1 N 33/68 (2006.01)	A 6 1 P 21/00	
C 1 2 Q 1/68 (2018.01)	G 0 1 N 33/68	
C 1 2 Q 1/42 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68	
C 1 2 N 15/88 (2006.01)	C 1 2 Q 1/42	
	C 1 2 N 15/88	Z

(32)優先日 令和2年10月8日(2020.10.8)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(81)指定国・地域 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,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,NE,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,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,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,TH,TJ,TM,TN,TR,T,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. TRITON

0, ニュー ハイブン, ウィットニー アベニュー 2

2 Whitney Avenue, New Haven, CT 06510, United States of America

(74)代理人 100114890

弁理士 アインゼル・フェリックス＝ラインハルト

(74)代理人 100098501

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 3 3 0 4 0 フロリダ キー ウェスト アトランティック ドライブ 1 3 1 1

(72)発明者 デメトリオス ブラドック

アメリカ合衆国 0 6 4 3 7 コネチカット ギルフォード ブラフ ビュー ドライブ 2 4 0

F ターム (参考) 2G045 AA25 CA26 DA36 FB01

4B063 QA01 QA19 QQ33 QQ42 QQ52 QQ89 QR57 QX01

4B065 AA90X AA90Y AB01 AC14 BA02 BA05 CA24 CA25 CA31 CA44

4C084 AA13 NA14 ZA361 ZA811 ZA941 ZA961 ZB211 ZC191 ZC211

4C087 AA01 AA02 AA03 BC83 CA08 CA12 NA14 ZA36 ZA81 ZA94

ZA96 ZB21 ZC19 ZC21