(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0047645
(43) 공개일자 2025년04월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 38/46 (2006.01) *A61P 19/02* (2006.01)
C12N 9/16 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 38/465 (2013.01)
A61P 19/02 (2018.01)
(21) 출원번호 10-2024-7035979
(22) 출원일자(국제) 2022년09월30일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2024년10월28일
(86) 국제출원번호 PCT/US2022/077407
(87) 국제공개번호 WO 2023/191898
국제공개일자 2023년10월05일
(30) 우선권주장
63/325,554 2022년03월30일 미국(US)

(71) 출원인
예일 유니버시티
미국, 코네티컷 06511, 뉴 헤븐, 투 휘트니 애비뉴
(72) 발명자
브래독 데메트리오스
미국, 코네티컷 06511, 뉴 헤이븐, 433 템플 스트리트
(74) 대리인
특허법인한얼

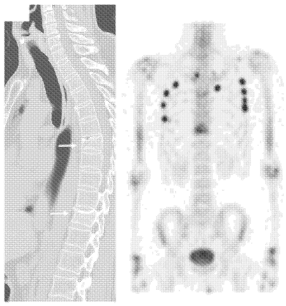
전체 청구항 수 : 총 22 항

(54) 발명의 명칭 **미만성 특발성 골격뼈 과다증(DISH)의 치료, 개선, 및/또는 예방을 위한 방법 및 조성물**

(57) 요 약

일 양태에서, 본 개시내용은 미만성 특발성 골격뼈 과다증(DISH), 강직척추염, 및/또는 척추관절염의 *생체내* 치료를 위한 특이적 용량의 ENPP1 제제를 제공한다.

대 표 도



도 1a 도 1b

(52) CPC특허분류
C12N 9/16 (2013.01)
C12Y 301/04001 (2013.01)
C07K 2319/036 (2013.01)
C07K 2319/30 (2013.01)
C07K 2319/31 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

미만성 특발성 골격뼈 과다증(Diffuse Idiopathic Skeletal Hyperostosis)(DISH), 및/또는 척추관절염(Spondylarthritis)의 치료, 개선, 이들의 추가의 발병 및/또는 진행의 예방, 및/또는 이들의 예방을 필요로 하는 환자(patient)에서 미만성 특발성 골격뼈 과다증(DISH) 및/또는 척추관절염을 치료하고/하거나, 개선하고/하거나, 이들의 추가의 발병 및/또는 진행을 예방하고/하거나, 이들을 예방하는 방법으로서, 상기 방법은 환자에게 치료적으로 유효량의 화학식 (I)의 화합물(compound), 또는 이의 염 또는 용매화물(solvate)을 투여하고:

PROTEIN-Z-DOMAIN-X-Y

(I),

상기 식 (I)에서:

PROTEIN은 ENPP1의 촉매 영역(catalytic region)을 포함하고;

DOMAIN은 부재하거나, 인간 IgG Fc 도메인(domain)(Fc), 인간 혈청 알부민 단백질(ALB), 및 이의 단편으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 적어도 하나이고;

X 및 Z는 독립적으로 부재하거나, 1개 내지 20개 아미노산을 포함하는 폴리펩티드이며,

Y는 음으로 하전된(negatively charged) 뼈-표적화 서열(bone-targeting sequence)이다;

그럼으로써 환자에서 DISH 및/또는 척추관절염을 치료하고/하거나, 개선하고/하거나, 이들의 추가의 발병 및/또는 진행을 예방하고/하거나, 이들을 예방하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 환자는 ENPP1 반가불충분성(haploinsufficiency)을 갖는, 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 환자는 ENPP1 반가불충분성을 갖지 않는, 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 환자는 ENPP1 결핍(deficient)이 아닌, 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 환자는 ENPP1 결핍인, 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 환자는 경구, 에어로졸(aerosol), 흡입, 직장, 질, 경피, 피하, 비강내, 협측, 설하, 비경구, 척추강내, 위내, 안구, 폐, 및 국소로 이루어지는 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 경로에 의해 화합물이 투여되는, 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 화합물은 환자에게 정맥내로 또는 피하로 투여되는, 방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 환자에게 화합물을 투여하는 것은, 환자의 세포외 피로인산염(extracellular pyrophosphate) 농도를 증가시키거나, 이의 추가의 감소를 예방하는, 방법.

청구항 9

제1항에 있어서, 환자에게 화합물을 투여하는 것은, 환자에서 아킬레스건의 석회화(calcification), 척추 석회화, 고관절 석회화, 및 양측성 석회화 중 하나 이상을 감소시키거나, 이들의 추가의 증가를 예방하는, 방법.

청구항 10

제1항에 있어서, DOMAIN은 알부민을 포함하는, 방법.

청구항 11

제1항에 있어서, DOMAIN은 IgG Fc 도메인을 포함하는, 방법.

청구항 12

제1항에 있어서, PROTEIN은 ENPP1 막관통 도메인(transmembrane domain)이 결여된, 방법.

청구항 13

제1항에 있어서, 화합물은 적어도 하나의 약제학적으로 허용 가능한 담체(carrier)를 추가로 포함하는 약제학적 조성물로서 환자에게 투여되는, 방법.

청구항 14

제1항에 있어서, 환자는 포유류인, 방법.

청구항 15

제1항에 있어서, 포유류는 인간인, 방법.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, PROTEIN은 서열번호 1의 아미노산 잔기 99번(PSCAKE) 내지 925번(QED)을 포함하는, 방법.

청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, PROTEIN은 서열번호 3의 아미노산 잔기 1번 내지 833번을 포함하는, 방법.

청구항 18

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, PROTEIN은 서열번호 2에 제시된 아미노산 서열을 포함하는, 방법.

청구항 19

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, PROTEIN은 서열번호 3 또는 4 또는 5에 제시된 아미노산 서열을 포함하는, 방법.

청구항 20

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, DOMAIN은 DOMAIN이 결여된 화합물의 순환 반감기(circulating half-life)에 비해 화합물의 순환 반감기를 증가시키는, 방법.

청구항 21

제1항에 있어서, 환자는 또한 조기 발병 골다공증(Early onset osteoporosis), 골감소증(Osteopenia), 연령 관련 골감소증, OPLL, 유전성 저인산혈 구루병(Hereditary Hypophosphatemic Ricket), X-연관 저인산혈증(X-linked hypophosphatemia), 상염색체 열성(Autosomal Recessive) 저인산혈 구루병 2형, 상염색체 우성(Autosomal Dominant) 저인산혈 구루병, 및 저인산혈 구루병으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 질환 또는 병태(condition)로 진단된, 방법.

청구항 22

제1항에 있어서, 환자는 조기 발병 골다공증, 골감소증, 연령 관련 골감소증, OPLL, 유전성 저인산혈 구루병, X-연관 저인산혈증, 상염색체 열성 저인산혈 구루병 2형, 상염색체 우성 저인산혈 구루병, 및 저인산혈 구루병으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 질환 또는 병태로 진단되지 않은, 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 관련 출원의 상호 - 참조

[0002] 본 출원은 2022년 3월 30일에 제출된 미국 가출원 번호 제63/325,554호에 대한 우선권을 주장하며, 이로써 이의 내용은 그들 전문이 본원에 참조로 통합된다.

[0003] 연방정부 지원 연구 및 개발에 관한 진술

[0004] 본 발명은 국립 보건원(National Institutes of Health)에 의해 수여된 DK121326-01, AR080416-01, 및 AG067347A1 하에서 정부 지원으로 이루어졌다. 정부는 본 발명에서 특정한 권리를 갖는다.

[0005] 기술분야

[0006] 본 발명의 분야는, 일 양태에서, 효소 요법(therapy)에 의해 DISH, 강직척추염(Ankylosing Spondylitis), 및/또는 척추관절염(Spondylarthritis)의 치료 및/또는 개선에 관한 것이다.

[0007] 서열 목록

[0008] 2022년 9월 29일 생성된, 149 킬로바이트의 크기를 포함하는, "047162-7377WO1(01806) Sequence Listing.xml"로 명명된 제출된 이 XML이 이로써 그 전문이 참조로 통합된다.

배 경 기 술

[0009] 엑토뉴클레오티드 피로포스파타아제/포스포디에스테라아제 1(Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1; ENPP1)은, 그 세포외(extracellular) 활성이 세포외 뉴클레오티드, 예컨대 아데노신 3인산염(ATP)의 포스포디에스테르 결합을 가수분해하여 아데노신 1인산(AMP) 및 무기 피로인산염(pyrophosphate)(PPi)을 생성하는 2형 막관통(transmembrane) 단백질이다. PPi는 수산화인회석 침착(hydroxyapatite deposition)의 주요 생리적 억제제(inhibitor)이기 때문에, 이중대립유전자(biallelic) ENPP1 결핍증(deficiency)은 생애 초기에 이소성 무기질침착(ectopic mineralization)으로 이어지며, 동맥 석회화(calcification) 및 내강 협착으로 발생하는 유아기 사망률이 높다(문헌 [Ziegler et al., Generalized arterial calcification of infancy. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al., (eds). Gene Reviews 2014]). 신생아 석회화를 나타내지 않는 ENPP1-결핍(deficient) 개체뿐만 아니라 살아남은 환자는 생애 후반에 섬유아세포 성장 인자 23(FGF23)-매개 저인산혈 구루병(hypophosphatemic ricket)이 발병할 수 있다(문헌 [Ferreira et al., Prospective phenotyping of long-term survivors of generalized arterial calcification of infancy (GACI), Genet Med. 2020;23:396-407]).

[0010] WO2014126965호는 ENPP1 결핍증을 수반하는 질환에서 병리적 석회화 및 병리적 골화(ossification)의 치료에 관한 것이다. 3개의 단백질 - ENPP1, 조직-비특이적 알칼리 포스파타아제(TNAP), 및 진행성 관절강직(progressive ankylosis) 단백질 또는 안키린(ankyrin)(ANK) - 은 무기 피로인산염(PPi)과 인산염(Pi)의 세포외 균형을 조절하는 역할을 한다. 무기 피로인산염(PPi)은 ENPP1에 의한 세포외 뉴클레오티드 3인산염(NTP)의 절단에 의해 또는 Ank에 의한 세포내 공간으로부터 세포외 공간으로의 이동에 의해 생성된다. TNAP은 PPi로 분해되어 Pi를 생성한다.

[0011] "ENPP1 결핍증"은 대상체(subject)의 혈청 및/또는 혈장에서 ENPP1 효소적 활성화의 감소된 수준을 특징으로 한다. ENPP1 결핍증은 ENPP1 효소를 인코딩(encoding)하는 ENPP1 유전자에서 돌연변이를 불활성화시킴으로써 야기되는 희귀 유전 장애이다. 본원에서의 다른 곳에서 기재된 바와 같이, ENPP1은 세포외 도메인(domain)이 피로포스파타아제 및 포스포디에스테라아제 활성을 지니는 내재성(integral) 막관통 단백질이다. 그러하여, ENPP1은

세포외 ATP를 무기 피로인산염(PPi) 및 AMP로 전환한다.

[0012] 생물학적 시스템에서 석회화는 국부(regional) 순환 체액 또는 기타 이동성 유체에서보다 비순환 기질(matrix)에서 칼슘염이 더 높은 농도로 유지되는 복잡한 과정이다. 정상적인 석회화의 주요 결과는, 이들 모두가 종 사이에서 다를 수 있는, 특화된 세포간 기질에서의 유사한 배열 및 화학적 구성의 결정질 패턴(crystalline pattern)으로의 칼슘 및 연관 무기염의 축적이다. 반면에, 병리학적 석회화의 순 효과는 이들 특화된 기질에서뿐만 아니라 다른 세포간, 세포외, 및 세포 물질에서 또한 화학적 구성 또는 패턴의 다양성에서 정상 범위보다 더 큰 범위의 칼슘 및 연관 무기 염의 축적이며, 그럼으로써 이는 여러 가지 질환 상태로 이어진다.

[0013] 미만성 특발성 골격뼈 과다증(Diffuse Idiopathic Skeletal Hyperostosis)(DISH)은 특이한 새로운 뼈 형성을 특징으로 하는 골격계 장애이다(문헌 [Resnick et al., Diffuse idiopathic skeletal hyperostosis (DISH): Forestier's disease with extraspinal manifestations, Radiology. 1975;115:513-524]). 새로운 뼈는 인대와 힘줄이 뼈와 이어지는 곳(뼈부착(entheseal) 부위)에서 가장 자주 형성되지만, 또한 뼈의 전반적인 경화 및 뼈 과성장(뼈과다증)이 존재한다(문헌 [Pillai & Littlejohn, Metabolic Factors in Diffuse Idiopathic Skeletal Hyperostosis - A Review of Clinical Data. The Open Rheumatology Journal. 2014; 8:116-128]). DISH와 관련하여 ENPP1, TNAP, 및 ANK의 각자의 역할은 이해되지 않는다. 추가로, 이들 효소 중 하나 이상에서의 결핍이 DISH 표현형의 일부인지 여부는 또한 알려져 있지 않다.

발명의 내용

[0014] 개시내용은 미만성 특발성 골격뼈 과다증(DISH), 강직척추염, 및/또는 척추관절염의 치료, 개선, 및/또는 예방을 필요로 하는 환자에서 미만성 특발성 골격뼈 과다증(DISH), 강직척추염, 및/또는 척추관절염을 치료하고/하거나, 개선하고/하거나, 예방하는 방법을 제공한다. 특정한 구현예에서, 방법은 화학식 (I)의 화합물, 또는 이의 염 또는 용매화물(solvate)의 치료적으로 유효량을 환자에게 투여하고:

[0015] PROTEIN-Z-DOMAIN-X-Y (I),

[0016] 상기 식 (I)에서:

[0017] PROTEIN은 ENPP1의 촉매 영역(catalytic region)을 포함하고;

[0018] DOMAIN은 부재하거나, 인간 IgG Fc 도메인(Fc), 인간 혈청 알부민 단백질(ALB), 및 이의 단편으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 적어도 하나이고;

[0019] X 및 Z는 독립적으로 부재하거나, 1개 내지 20개 아미노산을 포함하는 폴리펩티드이고,

[0020] Y는 부재하거나, 음으로 하전된(negatively charged) 뼈-표적화 서열(bone-targeting sequence)이고,

[0021] 그럼으로써 환자에서 DISH, 강직척추염, 및/또는 척추관절염을 치료, 개선, 및/또는 예방하는 단계를 포함한다.

[0022] 특정한 구현예에서, 화합물은 음으로 하전된 뼈-표적화 서열이 결여되어 있다.

[0023] 특정한 구현예에서, Y는 부재하다.

[0024] 특정한 구현예에서, 화합물은 음으로 하전된 뼈-표적화 서열을 포함한다.

[0025] 특정한 구현예에서, 환자는 ENPP1 반가불충분성(haploinsufficiency)을 갖는다.

[0026] 특정한 구현예에서, 환자는 ENPP1 반가불충분성을 갖지 않는다.

[0027] 특정한 구현예에서, 환자는 ENPP1 결핍이 아니다.

[0028] 특정한 구현예에서, 환자는 ENPP1 결핍이다.

[0029] 특정한 구현예에서, 환자는 경구, 에어로졸, 흡입, 직장, 질, 경피, 피하, 비강내, 협측, 설하, 비경구, 척추강내, 위내, 안구, 폐, 및 국소로 이루어지는 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 경로에 의해 화합물이 투여된다.

[0030] 특정한 구현예에서, 화합물은 환자에게 정맥내로 또는 피하로 투여된다.

[0031] 특정한 구현예에서, 환자에게 화합물을 투여하는 것은, 환자의 세포외 피로인산염 농도를 증가시키거나, 이의 추가의 감소를 예방한다.

[0032] 특정한 구현예에서, 환자에게 화합물을 투여하는 것은, 환자에서 아킬레스건의 석회화, 척추 석회화, 고관절 석회화, 및 양측성 석회화 중 하나 이상을 감소시키거나, 이들의 추가의 증가를 예방한다.

[0033] 특정한 구현예에서, DOMAIN은 알부민을 포함한다.

[0034] 특정한 구현예에서, DOMAIN은 IgG Fc 도메인을 포함한다.

[0035] 특정한 구현예에서, PROTEIN은 ENPP1 막관통 도메인(transmembrane domain)이 결여되어 있다.

[0036] 특정한 구현예에서, 화합물은 적어도 하나의 약제학적으로 허용 가능한 담체(carrier)를 추가로 포함하는 약제학적 조성물로서 환자에게 투여된다.

[0037] 특정한 구현예에서, 환자는 포유류이다.

[0038] 특정한 구현예에서, 포유류는 인간이다.

[0039] 특정한 구현예에서, PROTEIN은 서열번호 1의 아미노산 잔기 99번(PSCAKE…) 내지 925번(…QED)을 포함한다.

[0040] 특정한 구현예에서, PROTEIN은 서열번호 3의 아미노산 잔기 1번 내지 833번을 포함한다.

[0041] 특정한 구현예에서, PROTEIN은 서열번호 2에 제시된 아미노산 서열을 포함한다.

[0042] 특정한 구현예에서, PROTEIN은 서열번호 3 또는 4 또는 5에 제시된 아미노산 서열을 포함한다.

[0043] 특정한 구현예에서, DOMAIN은 DOMAIN이 결여된 화합물의 순환 반감기(circulating half-life)에 비해 화합물의 순환 반감기를 증가시킨다.

[0044] 특정한 구현예에서, 환자는 또한 조기 발병 골다공증(Early onset osteoporosis), 골감소증(Osteopenia), 연령 관련(age relate) 골감소증, OPLL, 유전성 저인산혈 구루병(Hereditary Hypophosphatemic Ricket), X-연관 저인산혈증(X-linked hypophosphatemia), 상염색체 열성(Autosomal Recessive) 저인산혈 구루병 2형, 상염색체 우성(Autosomal Dominant) 저인산혈 구루병, 및 저인산혈 구루병으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 질환 또는 병태(condition)로 진단되었다.

[0045] 특정한 구현예에서, 환자는 조기 발병 골다공증, 골감소증, 연령 관련 골감소증, OPLL, 유전성 저인산혈 구루병, X-연관 저인산혈증, 상염색체 열성 저인산혈 구루병 2형, 상염색체 우성 저인산혈 구루병, 및 저인산혈 구루병으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 질환 또는 병태로 진단되지 않았다.

[0046] 상세한 설명

[0047] 특정한 구현예에서, 본원에서 고려되는 질환 또는 장애는 미만성 특발성 골격뼈 과다증(DISH)이다. 특정한 구현예에서, 본원에서 고려되는 질환 또는 장애는 강직척추염이다. 특정한 구현예에서, 본원에서 고려되는 질환 또는 장애는 척추관절염이다. 특정한 구현예에서, 본원에서 고려되는 질환 또는 장애는 미만성 특발성 골격뼈 과다증(DISH) 및/또는 강직척추염이다. 특정한 구현예에서, 본원에서 고려되는 질환 또는 장애는 DISH 및/또는 척추관절염이다. 특정한 구현예에서, 본원에서 고려되는 질환 또는 장애는 강직척추염 및/또는 척추관절염이다.

[0048] 본 발명은 미만성 특발성 골격뼈 과다증(DISH), 강직척추염, 및/또는 척추관절염의 치료, 개선, 이들의 추가의 발병 및/또는 진행의 예방, 및/또는 이들의 예방을 필요로 하는 환자에서 미만성 특발성 골격뼈 과다증(DISH), 강직척추염, 및/또는 척추관절염을 치료하고/하거나, 개선하고/하거나, 이들의 추가의 발병 및/또는 진행을 예방하고/하거나, 이들을 예방하는 방법을 제공한다. 본 발명은 추가로 DISH, 강직척추염, 및/또는 척추관절염의 치료 및/또는 개선을 필요로 하는 환자에서 DISH, 강직척추염, 및/또는 척추관절염을 치료하고/하거나 개선하는 방법을 제공한다.

[0049] 일 양태에서, 개시내용은, DISH, 강직척추염, 및/또는 척추관절염을 갖는 대상체에게 ENPP1 제제(agent)의 치료적으로 유효량을 투여함으로써, DISH, 강직척추염, 및/또는 척추관절염을 치료하고/하거나, 개선하고/하거나, 이들의 추가의 발병 및/또는 진행을 예방하고/하거나, 이들을 예방하는 것에 관한 것이다.

[0050] 일 양태에서, 개시내용은, 대상체에게 ENPP1 제제의 치료적으로 유효량을 투여함으로써 대상체에서 ENPP1 결핍증을 치료하고/하거나, 개선하고/하거나, 이의 추가의 발병 및/또는 진행을 예방하고/하거나, 이들을 예방하는 것에 관한 것이다.

[0051] 일 양태에서, 개시내용은, 대상체에게 ENPP1 제제의 치료적으로 유효량을 투여함으로써, 대상체에서 ENPP1 반가불충분성의 하나 이상의 증상을 치료하고/하거나, 개선하고/하거나, 이들의 추가의 발병 및/또는 진행을 예방하

고/하거나, 이들을 예방하는 것에 관한 것이다.

[0052] DISH, 강직척추염, 및/또는 척추관절염의 치료는 킬로그램당 약 0.1 mg, 대상체의 킬로그램당 약 0.2 mg, 대상체의 킬로그램당 약 0.3 mg, 대상체의 킬로그램당 약 0.4 mg, 대상체의 킬로그램당 약 0.5 mg, 대상체의 킬로그램당 약 0.6 mg, 대상체의 킬로그램당 약 0.7 mg, 대상체의 킬로그램당 약 0.8 mg, 대상체의 킬로그램당 약 0.9 mg, 대상체의 킬로그램당 약 1.0 mg, 대상체의 킬로그램당 약 1.1 mg, 대상체의 킬로그램당 약 1.2 mg, 대상체의 킬로그램당 약 1.3 mg, 대상체의 킬로그램당 약 1.4 mg, 대상체의 킬로그램당 약 1.5 mg, 대상체의 킬로그램당 약 1.6 mg, 대상체의 킬로그램당 약 1.7 mg, 대상체의 킬로그램당 약 1.8 mg, 대상체의 킬로그램당 약 1.9 mg, 또는 대상체의 킬로그램당 약 2.0 mg의 용량으로 ENPP1 제제를 투여하여, 그럼으로써 DISH, 강직척추염, 및/또는 척추관절염 질환의 하나 이상의 증상을 치료, 감소, 및/또는 개선하는 것을 포함하고, 여기서 대상체는 ENPP1 결핍증을 갖지 않는다.

[0053] 일 양태에서, 개시내용은, DISH, 강직척추염, 및/또는 척추관절염을 갖는 대상체에게 킬로그램당 약 0.1 mg, 대상체의 킬로그램당 약 0.2 mg, 대상체의 킬로그램당 약 0.3 mg, 대상체의 킬로그램당 약 0.4 mg, 대상체의 킬로그램당 약 0.5 mg, 대상체의 킬로그램당 약 0.6 mg, 대상체의 킬로그램당 약 0.7 mg, 대상체의 킬로그램당 약 0.8 mg, 대상체의 킬로그램당 약 0.9 mg, 대상체의 킬로그램당 약 1.0 mg, 대상체의 킬로그램당 약 1.1 mg, 대상체의 킬로그램당 약 1.2 mg, 대상체의 킬로그램당 약 1.3 mg, 대상체의 킬로그램당 약 1.4 mg, 대상체의 킬로그램당 약 1.5 mg, 대상체의 킬로그램당 약 1.6 mg, 대상체의 킬로그램당 약 1.7 mg, 대상체의 킬로그램당 약 1.8 mg, 대상체의 킬로그램당 약 1.9 mg, 또는 대상체의 킬로그램당 약 2.0 mg의 용량으로 ENPP1 제제를 투여하여, 그럼으로써 DISH, 강직척추염, 및/또는 척추관절염 질환의 하나 이상의 증상을 치료, 감소, 및/또는 개선하는 것에 관한 것이며, 여기서 대상체는 ENPP1 결핍증을 갖는다.

[0054] 일 양태에서, 개시내용은 DISH, 강직척추염, 및/또는 척추관절염을 갖는 대상체에게 킬로그램당 약 0.1 mg, 대상체의 킬로그램당 약 0.2 mg, 대상체의 킬로그램당 약 0.3 mg, 대상체의 킬로그램당 약 0.4 mg, 대상체의 킬로그램당 약 0.5 mg, 대상체의 킬로그램당 약 0.6 mg, 대상체의 킬로그램당 약 0.7 mg, 대상체의 킬로그램당 약 0.8 mg, 대상체의 킬로그램당 약 0.9 mg, 대상체의 킬로그램당 약 1.0 mg, 대상체의 킬로그램당 약 1.1 mg, 대상체의 킬로그램당 약 1.2 mg, 대상체의 킬로그램당 약 1.3 mg, 대상체의 킬로그램당 약 1.4 mg, 대상체의 킬로그램당 약 1.5 mg, 대상체의 킬로그램당 약 1.6 mg, 대상체의 킬로그램당 약 1.7 mg, 대상체의 킬로그램당 약 1.8 mg, 대상체의 킬로그램당 약 1.9 mg, 또는 대상체의 킬로그램당 약 2.0 mg의 용량으로 ENPP1 제제를 투여하여, 그럼으로써 DISH, 강직척추염, 및/또는 척추관절염 질환의 하나 이상의 증상을 치료, 감소, 및/또는 개선하는 것에 관한 것이며, 여기서 대상체는 ENPP1 반가불충분성을 갖지 않는다.

[0055] 일 양태에서, 개시내용은 DISH, 강직척추염, 및/또는 척추관절염을 갖는 대상체에게 킬로그램당 약 0.1 mg, 대상체의 킬로그램당 약 0.2 mg, 대상체의 킬로그램당 약 0.3 mg, 대상체의 킬로그램당 약 0.4 mg, 대상체의 킬로그램당 약 0.5 mg, 대상체의 킬로그램당 약 0.6 mg, 대상체의 킬로그램당 약 0.7 mg, 대상체의 킬로그램당 약 0.8 mg, 대상체의 킬로그램당 약 0.9 mg, 대상체의 킬로그램당 약 1.0 mg, 대상체의 킬로그램당 약 1.1 mg, 대상체의 킬로그램당 약 1.2 mg, 대상체의 킬로그램당 약 1.3 mg, 대상체의 킬로그램당 약 1.4 mg, 대상체의 킬로그램당 약 1.5 mg, 대상체의 킬로그램당 약 1.6 mg, 대상체의 킬로그램당 약 1.7 mg, 대상체의 킬로그램당 약 1.8 mg, 대상체의 킬로그램당 약 1.9 mg, 또는 대상체의 킬로그램당 약 2.0 mg의 용량으로 ENPP1 제제를 투여하여, 그럼으로써 DISH, 강직척추염, 및/또는 척추관절염 질환의 하나 이상의 증상을 치료, 감소, 및/또는 개선하는 것에 관한 것이며, 여기서 대상체는 ENPP1 반가불충분성을 갖는다.

[0056] 일 양태에서, 개시내용은, 대상체의 혈장 및/또는 조직에서 ENPP1 단백질 및/또는 활성의 생리적 수준을 회복하기 위해, DISH, 강직척추염, 및/또는 척추관절염을 갖는 대상체에게 킬로그램당 약 0.1 mg, 대상체의 킬로그램당 약 0.2 mg, 대상체의 킬로그램당 약 0.3 mg, 대상체의 킬로그램당 약 0.4 mg, 대상체의 킬로그램당 약 0.5 mg, 대상체의 킬로그램당 약 0.6 mg, 대상체의 킬로그램당 약 0.7 mg, 대상체의 킬로그램당 약 0.8 mg, 대상체의 킬로그램당 약 0.9 mg, 대상체의 킬로그램당 약 1.0 mg, 대상체의 킬로그램당 약 1.1 mg, 대상체의 킬로그램당 약 1.2 mg, 대상체의 킬로그램당 약 1.3 mg, 대상체의 킬로그램당 약 1.4 mg, 대상체의 킬로그램당 약 1.5 mg, 대상체의 킬로그램당 약 1.6 mg, 대상체의 킬로그램당 약 1.7 mg, 대상체의 킬로그램당 약 1.8 mg, 대상체의 킬로그램당 약 1.9 mg, 또는 대상체의 킬로그램당 약 2.0 mg의 용량으로 ENPP1 제제를 투여하는 것에 관한 것이다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 혈장 및/또는 조직에서 ENPP1 단백질 및/또는 활성의 생리적 수준은 인간 혈청에서 PPi의 생리적 수준을 달성하고 유지하기에 충분한 ENPP1 제제의 양 또는 농도이다. 특정한 구현예에서, ENPP1 제제는 ENPP1 및/또는 ENPP1 활성을 포함하는 ENPP1 작제물(construct)이다.

[0057] 일 양태에서, 개시내용은, 대상체의 혈장 및/또는 조직에서 ENPP1 단백질 및/또는 활성의 생리적 수준을 회복하기 위해, ENPP1 반가불충분성을 갖는 대상체에게 킬로그램당 약 0.1 mg, 대상체의 킬로그램당 약 0.2 mg, 대상체의 킬로그램당 약 0.3 mg, 대상체의 킬로그램당 약 0.4 mg, 대상체의 킬로그램당 약 0.5 mg, 대상체의 킬로그램당 약 0.6 mg, 대상체의 킬로그램당 약 0.7 mg, 대상체의 킬로그램당 약 0.8 mg, 대상체의 킬로그램당 약 0.9 mg, 대상체의 킬로그램당 약 1.0 mg, 대상체의 킬로그램당 약 1.1 mg, 대상체의 킬로그램당 약 1.2 mg, 대상체의 킬로그램당 약 1.3 mg, 대상체의 킬로그램당 약 1.4 mg, 대상체의 킬로그램당 약 1.5 mg, 대상체의 킬로그램당 약 1.6 mg, 대상체의 킬로그램당 약 1.7 mg, 대상체의 킬로그램당 약 1.8 mg, 대상체의 킬로그램당 약 1.9 mg, 또는 대상체의 킬로그램당 약 2.0 mg의 용량으로 ENPP1 제제를 투여하는 것에 관한 것이다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 혈장 및/또는 조직에서 ENPP1 단백질 및/또는 활성의 생리적 수준은 인간 혈청에서 PPi의 생리적 수준을 달성하고 유지하기에 충분한 ENPP1 제제의 양 또는 농도이다. 특정한 구현예에서, ENPP1 제제는 ENPP1 및/또는 ENPP1 활성을 포함하는 ENPP1 작제물이다.

[0058] 일 양태에서, 개시내용은 DISH, 강직척추염, 및/또는 척추관절염을 앓는 대상체에서 순환 피로인산염(PPi)을 증가시키기 위한 방법에 관한 것이며, 방법은 대상체에게 킬로그램당 약 0.1 mg, 대상체의 킬로그램당 약 0.2 mg, 대상체의 킬로그램당 약 0.3 mg, 대상체의 킬로그램당 약 0.4 mg, 대상체의 킬로그램당 약 0.5 mg, 대상체의 킬로그램당 약 0.6 mg, 대상체의 킬로그램당 약 0.7 mg, 대상체의 킬로그램당 약 0.8 mg, 대상체의 킬로그램당 약 0.9 mg, 대상체의 킬로그램당 약 1.0 mg, 대상체의 킬로그램당 약 1.1 mg, 대상체의 킬로그램당 약 1.2 mg, 대상체의 킬로그램당 약 1.3 mg, 대상체의 킬로그램당 약 1.4 mg, 대상체의 킬로그램당 약 1.5 mg, 대상체의 킬로그램당 약 1.6 mg, 대상체의 킬로그램당 약 1.7 mg, 대상체의 킬로그램당 약 1.8 mg, 대상체의 킬로그램당 약 1.9 mg, 또는 대상체의 킬로그램당 약 2.0 mg의 용량으로 ENPP1 제제를 투여하여, 그럼으로써 대상체에서 순환 PPi를 증가시키는 단계를 포함한다.

[0059] 일 양태에서, 개시내용은 ENPP1 반가불충분성이 있는 대상체에서 순환 피로인산염(PPi)을 증가시키기 위한 방법에 관한 것이며, 방법은 대상체에게 킬로그램당 약 0.1 mg, 대상체의 킬로그램당 약 0.2 mg, 대상체의 킬로그램당 약 0.3 mg, 대상체의 킬로그램당 약 0.4 mg, 대상체의 킬로그램당 약 0.5 mg, 대상체의 킬로그램당 약 0.6 mg, 대상체의 킬로그램당 약 0.7 mg, 대상체의 킬로그램당 약 0.8 mg, 대상체의 킬로그램당 약 0.9 mg, 대상체의 킬로그램당 약 1.0 mg, 대상체의 킬로그램당 약 1.1 mg, 대상체의 킬로그램당 약 1.2 mg, 대상체의 킬로그램당 약 1.3 mg, 대상체의 킬로그램당 약 1.4 mg, 대상체의 킬로그램당 약 1.5 mg, 대상체의 킬로그램당 약 1.6 mg, 대상체의 킬로그램당 약 1.7 mg, 대상체의 킬로그램당 약 1.8 mg, 대상체의 킬로그램당 약 1.9 mg, 또는 대상체의 킬로그램당 약 2.0 mg의 용량으로 ENPP1 제제를 투여하여, 그럼으로써 대상체에서 순환 PPi를 증가시키는 단계를 포함한다.

[0060] 일 양태에서, 개시내용은, 대상체에서 ENPP1 반가불충분성의 하나 이상의 증상을 개선하기 위한 방법에 관한 것이며, 방법은 대상체에게 킬로그램당 약 0.1 mg, 대상체의 킬로그램당 약 0.2 mg, 대상체의 킬로그램당 약 0.3 mg, 대상체의 킬로그램당 약 0.4 mg, 대상체의 킬로그램당 약 0.5 mg, 대상체의 킬로그램당 약 0.6 mg, 대상체의 킬로그램당 약 0.7 mg, 대상체의 킬로그램당 약 0.8 mg, 대상체의 킬로그램당 약 0.9 mg, 대상체의 킬로그램당 약 1.0 mg, 대상체의 킬로그램당 약 1.1 mg, 대상체의 킬로그램당 약 1.2 mg, 대상체의 킬로그램당 약 1.3 mg, 대상체의 킬로그램당 약 1.4 mg, 대상체의 킬로그램당 약 1.5 mg, 대상체의 킬로그램당 약 1.6 mg, 대상체의 킬로그램당 약 1.7 mg, 대상체의 킬로그램당 약 1.8 mg, 대상체의 킬로그램당 약 1.9 mg, 또는 대상체의 킬로그램당 약 2.0 mg의 용량으로 ENPP1 제제를 투여하여, 그럼으로써 대상체에서 ENPP1 결핍증의 하나 이상의 증상 또는 ENPP1 반가불충분성의 하나 이상의 증상을 완화하는 단계를 포함한다.

[0061] 일 양태에서, 개시내용은, DISH, 강직척추염, 및/또는 척추관절염을 앓는 대상체에서 존재하는 생리적 석회화 및/또는 골화 종괴(ossified mass)를 예방하고/하거나 이들의 진행을 역전시키거나, 이들을 최소화하고/하거나 감소시키기 위한 방법에 관한 것이며, 방법은 대상체에게 킬로그램당 약 0.1 mg, 대상체의 킬로그램당 약 0.2 mg, 대상체의 킬로그램당 약 0.3 mg, 대상체의 킬로그램당 약 0.4 mg, 대상체의 킬로그램당 약 0.5 mg, 대상체의 킬로그램당 약 0.6 mg, 대상체의 킬로그램당 약 0.7 mg, 대상체의 킬로그램당 약 0.8 mg, 대상체의 킬로그램당 약 0.9 mg, 대상체의 킬로그램당 약 1.0 mg, 대상체의 킬로그램당 약 1.1 mg, 대상체의 킬로그램당 약 1.2 mg, 대상체의 킬로그램당 약 1.3 mg, 대상체의 킬로그램당 약 1.4 mg, 대상체의 킬로그램당 약 1.5 mg, 대상체의 킬로그램당 약 1.6 mg, 대상체의 킬로그램당 약 1.7 mg, 대상체의 킬로그램당 약 1.8 mg, 대상체의 킬로그램당 약 1.9 mg, 또는 대상체의 킬로그램당 약 2.0 mg의 용량으로 ENPP1 제제를 투여하여, 그럼으로써 대상체에서 생리적 석회화 및/또는 골화된 골격계 종괴를 예방하고/하거나, 이들의 진행을 역전시키거나, 이들을 최소화하고/하거나 감소시키는 단계를 포함한다.

[0062] 상기의 방법 중 임의의 것의 일부 구현예에서, 방법은 ENPP1 제제의 치료적으로 유효량을 환자에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0063] 일부 구현예에서, ENPP1 제제는 화학식 (I)의 화합물, 또는 이의 염 또는 용매화물이다:

[0064] W-PROTEIN-Z-DOMAIN-X-Y

[0065] (I),

[0066] 상기 식 (I)에서:

[0067] W는 부재하거나 세포외 공간으로 화합물의 외수송(export)을 허용하는 신호 서열을 포함하고;

[0068] PROTEIN은 ENPP1의 촉매 영역을 포함하고;

[0069] DOMAIN은 부재하거나, 인간 IgG Fc 도메인(Fc), 인간 혈청 알부민 단백질(ALB), 및 이들의 생물학적으로 활성인 단편으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 적어도 하나이고;

[0070] X 및 Z는 독립적으로 부재하거나, 1개 내지 20개 아미노산을 포함하는 폴리펩티드이며;

[0071] Y는 부재하거나 "뼈 표적화" 서열기(sequence group)이고

[0072] 여기서 m은 독립적으로 1 내지 15의 범위의 정수이며,

[0073] 여기서 n은 독립적으로 1 내지 10의 범위의 정수이다.

[0074] 일부 구현예에서, W는 부재하다. 일부 구현예에서, W는 세포외 공간으로 화합물의 외수송을 허용하는 신호 서열을 포함한다.

[0075] 일부 구현예에서, Y는 다음으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 "뼈 표적화" 서열기이다: D_m(서열번호 11), $(DSS)_n$(서열번호 12), $(ESS)_n$(서열번호 13), $(RQQ)_n$(서열번호 14), $(KR)_n$(서열번호 15), R_m(서열번호 16), DSSSEEKFLRRIGRFG(서열번호 17), EEEEEEEPRGDT(서열번호 18), APWHLSSQYSRT(서열번호 19), STLPIPHEFSRE(서열번호 20), VTKHLNQISQSY(서열번호 116), 및 E_m(서열번호 117).

도면의 간단한 설명

[0076] 도 1a-1b는 환자 1의 척추 CT 및 뼈 섬광조영술(scintigraphy)을 도시한다. 도 1a는 흰색 화살표로서 나타낸 척추 CT에 의해 검출된 척추에서 다발 압박 골절(multiple compression fracture)의 존재를 나타낸다. 도 1b는 늑골(rib)에서의 다발 축적을 밝혀낸 뼈 섬광조영술을 도시한다.

도 1c-1h는 환자 1의 고관절, 무릎 관절 및 아킬레스건의 엑스레이를 도시한다. 도 1c: 오른쪽 고관절, 도 1d: 왼쪽 고관절, 도 1e: 오른쪽 무릎 관절, 도 1f: 왼쪽 무릎 관절; 도 1g: 오른쪽 아킬레스건, 도 1h: 왼쪽 아킬레스건. 이소성 골화의 어떤 징후도 존재하지 않았다.

도 2a-2c는 ENPP1 돌연변이 가족 족보(family pedigree)를 도시하며 각각 환자 1, 2, 및 3에 해당한다. 화살표는 발단자(proband)를 나타낸다.

도 3a-3g는 환자 2의 고관절, 무릎 관절 및 아킬레스건의 척추 CT, 엑스레이를 도시한다. 도 3a: 척추 CT는 척추주위(paraspinal) 인대 골화(흰색 화살촉) 및 다발 압박 골절(흰색 화살표)을 나타내었다. 도 3b-3c는 각각 오른쪽 고관절(도 3b) 및 왼쪽 고관절(도 3b)의 엑스레이에 해당한다. 도면은 이소성 골화의 어떤 징후도 관찰되지 않았음을 나타낸다. 도 3d-3e는 각각 오른쪽 무릎 관절(도 3d) 및 왼쪽 무릎 관절(도 3e)의 엑스레이에 해당한다. 도면은 이소성 골화의 어떤 징후도 관찰되지 않았음을 나타낸다. 도 3f 및 도 3g는 각각 오른쪽 아킬레스건(도 3f) 및 왼쪽 아킬레스건(도 3g)의 엑스레이에 해당한다. 오른쪽 아킬레스건에서 경골 부착부병증(enthesopathy)의 징후가 검출되었다(흰색 화살촉으로 나타냄).

도 4a-4i는 환자 3의 고관절, 무릎 관절 및 아킬레스건의 척추 CT, 엑스레이를 도시한다. 도 4a-4c는 경추(cervical spine)(도 4a), 흉추(thoracic spine)(도 4b) 및 요추(umbar spine)(도 4c)(흰색 화살촉)에서의 다발 척추주위 골화를 나타낸 척추 CT에 해당한다. 도 4d-4e는 엑스레이(흰색 화살촉)에서 검출된 오른쪽(도 4d) 및 왼쪽(도 4e) 고관절 주위의 현저한 골화를 도시한다. 도 4f-4g는 이소성 골화의 어떤 징후도 나타내지 않는 오른쪽(도 4f) 및 왼쪽(도 4g) 무릎 관절의 엑스레이를 도시한다. 도 4h-4i는 오른쪽(도 4h) 및 왼쪽(도 4i) 아

킬레스건(흰색 화살촉)의 엑스레이에서 현저한 부착부병증이 검출되었음을 나타낸다.

도 5a-5g는 환자 1의 고관절, 무릎 관절 및 아킬레스건의 척추 CT 및 엑스레이를 도시한다. (도 5a) 척추 CT, (도 5b) 오른쪽 고관절, (도 5c) 왼쪽 고관절, (도 5d) 오른쪽 무릎 관절, (도 5e) 왼쪽 무릎 관절, (도 5f) 오른쪽 아킬레스건, (도 5g) 왼쪽 아킬레스건. 이소성 골화의 어떤 징후도 존재하지 않았다.

도 6a-6g는 환자 3의 한 명의 아들의 고관절, 무릎 관절 및 아킬레스건의 척추 CT 및 엑스레이를 도시한다. (도 6a) 척추 CT, (도 6b) 오른쪽 고관절, (도 6c) 왼쪽 고관절, (도 6d) 오른쪽 무릎 관절, (도 6e) 왼쪽 무릎 관절, (도 6f) 오른쪽 아킬레스건, (도 6g) 왼쪽 아킬레스건. 왼쪽 아킬레스건에서는 약간의 부착부병증이 존재하였다(흰색 화살촉).

도 7a-7g는 사례 3의 한 명의 아들의 고관절, 무릎 관절 및 아킬레스건의 척추 CT 및 엑스레이를 도시한다. (도 7a) 척추 CT, (도 7b) 오른쪽 고관절, (도 7c) 왼쪽 고관절, (도 7d) 오른쪽 무릎 관절, (도 7e) 왼쪽 무릎 관절, (도 7f) 오른쪽 아킬레스건, (도 7g) 왼쪽 아킬레스건. 왼쪽 아킬레스건에서는 약간의 부착부병증이 존재하였다(흰색 화살촉).

도 8은 환자 3에서 ENPP1 변이체에 대한 복합 이형접합성(compound heterozygosity)을 확인하는 상보적 DNA의 생거 시퀀싱(Sanger sequencing)을 도시한다. 클론 유형 1은 ENPP1 변이체 c.536A>G를 함유하지만, 또 다른 ENPP1 변이체인 c. 1352A>G는 클론 유형 2에 위치하는데, 이는 복합 이형접합성을 암시한다.

도 9는 ENPP1 구조 및 본 변이체의 위치의 비-제한적인 도식을 도시한다. ENPP1은 세포질 도메인(CD), 막관통 도메인(TM), 및 2개의 소마토메딘(somatomedin) 도메인(SMB1 및 SMB2), 촉매 도메인, 및 뉴클레아제-유사 도메인으로 구성된 세포외 도메인으로 이루어진다. N179S 및 Y451C는 각각 SMB2 및 촉매 도메인에 위치한다.

도 10은 WT, N179S, 및 Y451C의 효소적 활성의 비교를 도시한다. WT ENPP1과 비교할 때, N179S 및 Y451C 변이체는 각각 효소적 반응의 55% 및 70% 감소된 속도를 나타내었다. 바아(bar)는 중간값 및 사분위수 값을 나타낸다. ****: $p<0.0001$.

도 11은 야생형 ENPP1 전구체 단백질의 가공되지 않은 전체 아미노산 서열(서열번호 1)을 도시한다. 세포질 및 막관통 영역에는 밑줄쳐져 있다. 잠재적인 N-당화(N-glycosylation) 부위는 굵은 글씨체이다. PSCAKE(잔기 99번 내지 104번; 상자형(boxed))은 SMB1(잔기 104번 내지 144번) 및 SMB2(잔기 145번 내지 189번)을 포함하는 가용성 ENPP1 단백질 부분의 시작이다.

도 12는 비히클 또는 ENPP1의 나타낸 피하 용량이 매주마다 투약된 $Enpp1^{asj}$ 마우스 및 WT에서의 혈장 PPi의 반응(도 12)을 도시한다. $^{*}p<0.05$, $^{**}p<0.01$; (ANOVA, 크루스칼-왈리스 검정(Kruskal-Wallis test)).

도 13은 비히클 또는 ENPP1 작제물 #1118 및 #2000의 나타낸 피하 용량으로 매주마다 투약된 17-주령 $Enpp1^{asj}$ 수컷 마우스 및 17-주령 WT에서의 척추주위 골증식체(osteophytes) 및 관절강직의 반응을 도시한다. 작제물 #1118은 3주차에 시작하여 주에 1회 투약된 반면, 작제물 #2000은 5주차에 시작하여 주에 1회 투약되었다. 마이크로-CT 이미지는 우선적으로 작제물 #2000에서 척추주위 골증식체 및 관절강직의 쇠퇴(attenuation)를 입증하며 1 mg/Kg 주마다의 용량으로 투약된 $Enpp1^{asj}$ 수컷 및 암컷 마우스 둘 모두에서 명백하다.

도 14는 비히클 또는 ENPP1 작제물 #1118 및 #2000의 나타낸 피하 용량으로 매주마다 투약된 17-주령 $Enpp1^{asj}$ 암컷 마우스 및 17-주령 WT에서의 척추주위 골증식체 및 관절강직의 반응을 도시한다. 작제물 #1118은 3주차에 시작하여 주에 1회 투약된 반면, 작제물 #2000은 5주차에 시작하여 주에 1회 투약되었다. 마이크로-CT 이미지는 우선적으로 작제물 #2000에서 척추주위 골증식체 및 관절강직의 쇠퇴를 입증하며 1 mg/Kg 주마다의 용량으로 투약된 $Enpp1^{asj}$ 수컷 및 암컷 마우스 둘 모두에서 명백하다.

도 15a-15b는 비히클 또는 ENPP1 작제물 #1118 및 #2000의 나타낸 피하 용량으로 매주마다 투약된 17-주령 $Enpp1^{asj}$ 마우스 및 17-주령 WT에서의 청각 뇌관(auditory brain stem)의 반응을 도시한다. 작제물 #1118은 3주차에 시작하여 주에 1회 투약된 반면, 작제물 #2000은 5주차에 시작하여 주에 1회 투약되었다. 자극 빈도 측정은 2 mg/Kg ENPP1 작제물 #1118의 주마다의 용량에 의한, 및 ENPP1 작제물 #2000의 0.5 및 1 mg/Kg의 주마다의 용량에서 저 주파수(8 kHz) 범위의 청력 손실의 예방을 입증한다. 우선적으로 1 mg/Kg의 주마다의 용량으로 투약된 ENPP1 작제물 #2000에서, ENPP1 결핍 동물에서 청력의 개선이 또한 고 주파수(32 kHz) 범위에서도 나타난

다.

도 16은 비히클 또는 ENPP1 작제물 #1118 및 #2000의 나타낸 피하 용량을 매주마다 이용한 WT 및 17-주령 $ENPP1^{asj}$ 마우스의 온전한 FGF23 수준을 예시한다. 작제물 #1118은 3주차에 시작하여 주에 1회 투약된 반면, 작제물 #2000은 5주차에 시작하여 주에 1회 투약되었다. 데이터는, 우선적으로 ENPP1 작제물 #2000에서, 주당 1 mg/Kg 및 4 mg/Kg으로 투약될 때의 온전한 FGF23의 억제를 입증한다. 통계적 유의성은 ANOVA 크루스칼-왈리스 검정에 이어 던의 사후검정(Dunn's post hoc analysis)에 의해 평가하여 WT 수준과의 차이를 평가하였다(일원배치 ANOVA) 통계적 유의성은 다음과 같은 표기법을 이용하여 p 값으로 표시된다: $^{*}p<0.05$, $^{**}p< 0.01$, $^{***}p < 0.001$, $^{****}p < 0.0001$.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0077] 본 명세서에서 사용되는 용어는 각각의 용어가 사용되는 구체적인 맥락 내에서 및 개시내용의 맥락 내에서 당해 분야에서의 그들의 일반적인 의미를 일반적으로 갖는다. 특정한 용어가 하기에서 또는 명세서의 다른 곳에서 논의되어, 개시내용의 조성물 및 방법 및 이들을 어떻게 만들고 사용하는 지를 기재하는 데 있어 의사에게 추가적인 지침(guidance)을 제공한다. 용어의 임의의 사용의 범주 또는 의미는 용어가 사용되는 구체적인 맥락으로부터 명백해질 것이다.

[0078] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "DISH"는 포레스티어병(Forestier's disease)으로 또한 알려진 미만성 특발성 골격뼈 과다증을 지칭하며, 특이한 새로운 뼈 형성을 특징으로 하는 골격계 장애이다(문헌 [Resnick et al., Diffuse idiopathic skeletal hyperostosis (DISH): Forestier's disease with extraspinal manifestations, Radiology. 1975;115:513-524]). DISH는 신체 내 인대 및 힘줄을 석회화(경화)시키고/시키거나 척추-주위 및 골격 부위에서 새로운 뼈 성장의 출현(골화 종괴)을 야기한다. 이들 석회화된 부위는 일부 사례에서 또한 통증, 경직(stiffness), 및 감소된 이동성을 야기할 수 있는 골극(bone spur)(비정상적인 새로운 뼈 성장)을 형성할 수 있다. 새로운 뼈는 인대와 힘줄이 뼈와 이어지는 곳(뼈부착 부위)에서 가장 자주 형성되지만, 뼈부착 석회화와 척추-주위 골화 종괴 사이의 관계는 이해되지 않는다. 또한 뼈의 전반적인 경화 및 뼈 과성장(뼈과다증)도 존재한다(문헌 [Pillai & Littlejohn, Metabolic Factors in Diffuse Idiopathic Skeletal Hyperostosis - A Review of Clinical Data, The Open Rheumatology Journal. 2014; 8:116-128]). 질환의 또 다른 양태는 비정상적인 뼈 성장으로 인해 큰, 흘러내리는 듯한(flowing) 골증식체가 형성된다는 것이다. 이들 골화는 흉부 영역이 주요 위치인 축 골격(axial skeleton)에서 주로 보인다. 또한, 말초 뼈부착부위(entheses), 예컨대 슬개골주위 인대, 아킬레스건 삽입부, 족저근막(plantar fascia), 어깨, 주두(olecranon) 및 손허리손가락 관절(metacarpophalangeal joint)이 또한 석회화를 가질 수 있다. 일부 사례에서 석회화는 엉덩이, 무릎, 발목, 발, 어깨, 손, 및 늑골에서 보인다(문헌 [Helfgott, Diffuse idiopathic skeletal hyperostosis (DISH). UpToDate. June 7, 2017]). DISH의 일반적인 특징 및/또는 증상은 전종(anterior longitudinal) 인대의 국소 및 미만성 석회화 및 골화, 척추주위 결합 조직 및 섬유륜(annulus fibrosus)의 석회화, 말초 섬유륜 섬유의 변성(degeneration), 섬유 조직의 전외측 신전(anterolateral extension), 혈관과다(hypervascularity), 만성 염증성 세포 침윤(chronic inflammatory cellular infiltration), 척추체의 앞 표면 상의 골막(periosteal) 새로운 뼈 형성, 손허리손가락 관절의 골화, 흉추, 요추, 및/또는 경추 부위의 통증, 신경뿌리병증(radiculopathy), 다관절 통증(polyarticular pain), 단관절 윤활막염(monoarticular synovitis) 및/또는 연하곤란(dysphagia)을 포함한다.

[0079] DISH는 힘줄 및 인대에서 칼슘염의 축적(석회화) 및 비정상적인 새로운 뼈 성장(골화)으로 나타나지만 그 이유는 알려져 있지 않다[문헌 [Mader et al., Diffuse idiopathic skeletal hyperostosis: clinical features and pathogenic mechanisms, Nat Rev Rheumatol. December 2013; 9(12):741-50] & [Nascimento et al. Diffuse idiopathic skeletal hyperostosis: A review, Surgical Neurology International. 2014; 5(Suppl 3):S122-S125]). DISH의 발병에 대한 공통적인 위험 요인은 이에 제한되지는 않으나, 큰 허리 둘레, BMI/비만, 고인슐린혈증(hyperinsulinemia), 당뇨병(diabetes mellitus), 고요산혈증(hyperuricemia), 이상지질혈증(dyslipidemia), 고혈압(hypertension), 심장 동맥 질환(coronary artery disease) 및 통풍(gout)을 포함한다. DISH는 증상이 없을 수 있으며, 이러한 사례에서는 일반적으로 방사선 영상(radiographic image)에 기반하여 진단이 이루어진다.

[0080] DISH는 노화와 연관된 진행성 근골격계 질환이다. DISH의 이환율(prevalence)은 2개의 대규모 미드웨스턴(Midwestern) 병원 집단에서 50세 이상의 연령 남성의 25% 및 여성의 15%이었다. 더욱이, 일본 인구의

6.3%까지, 및 북아메리카인의 퇴행성 경추 척수증(degenerative cervical myelopathy) 환자의 25%는 OPLL로 알려진 병태에서 척추 후종 인대(posterior longitudinal ligament)에서의 진행성 석회화가 발병되었다. 뼈부착부위에서의 진행성 칼슘 침착은 성장하는 척추주위 종괴로부터의 척수 압박(spinal cord compression) 및 관 협착증(canal stenosis)을 초래한다. 결과적인 척수증은 종종 심각하게 통증을 주며 쇠약성이다. 증상을 보이는 경과에 대한 원인이 되는 진행성 골화를 예방하는 효과적인 요법이 없고, 이소성(heterotopic) 무기질침착을 개시하고 촉진하는 원인이 되는 요인에 대한 이해가 거의 없으므로, 치료는 일반적으로 NSAID를 사용한 보존적 만성 통증 관리로 이루어진다. 수술을 이용한 감압(decompression)은 급성 사례에서 단기적 완화를 제공하기 위해 사용되지만, OPLL에서 뼈부착부위의 진행은 보존적으로 관리되는 환자보다 수술(척추후궁성형술(laminoplasty))) 후 더 빠르게 발생하여(각각 70% 대 24%), 모든 그러나 중증의 증상을 보이는 사례에서는 수술적 개입을 권장하지 않는다.

[0081] 본원에서 사용되는 바와 같이, DISH를 갖는 대상체는 DISH로 진단된 대상체를 지칭한다. DISH의 진단은 방사선학 및/또는 임상적 발견에 기반하며 레즈닉 및 니와야나(Resnick and Niwayana)에 의해 정의된다. 흉추 및 요추의 방사선 촬영은 DISH의 진단에서 가장 유용한 단일 영상 기법이다. 컴퓨터 단층촬영(CT) 스캐닝은 합병증, 예컨대 골절, 또는 기관, 식도, 및 정맥에 대한 압력 효과에 의해 야기될 수 있는 증상을 평가하는 데 사용될 수 있다. 이것은 강직척추염 또는 OPLL로의 독립체(entity)의 구별을 허용한다(문헌 [Artner et al., Diffuse idiopathic skeletal hyperostosis: current aspects of diagnostics and therapy, 2012, Orthopade. 2012 Nov;41(11):916-22]; [Olivieri et al., Diffuse idiopathic skeletal hyperostosis may give the typical postural abnormalities of advanced ankylosing spondylitis, Rheumatology 2007 Nov 1;46(11):1709-11]). 주로 디스크 높이가 보존된 적어도 4개의 인접한 척수골(3개의 추간판 공간에 걸쳐)의 전외측 측면(전종 인대)을 따른 흘러내리는 듯한 석회화 및 골화의 존재는 DISH를 나타낸다. DISH 환자의 방사선 사진 및 CT 영상에서 보이는 척추 및 척추외 특징(문헌 [Radswiki & Baba, Diffuse idiopathic skeletal hyperostosis. Reference article, Radiopaedia.org])은 다음과 같다:

[0082] 비-제한적인 척추 특징:

[0083] · 흘러내리는 듯한 골화: 적어도 4개의 인접한 척수골의 앞쪽 또는 오른쪽 전외측 측면을 따른 화려한, 흘러내리는 듯한 골화

[0084] · 디스크 공간은 일반적으로 잘 보존됨

[0085] · 관절강직은 경추 또는 요추보다 흉추에서 더 흔함

[0086] · 종종 불완전함

[0087] · 흘러내리는 듯한 골화 시 돌출(protruding)된 디스크 물질의 손가락가지모양(interdigitating)의 영역을 가질 수 있음

[0088] · 천장관절염(sacroiliitis) 또는 후관절(facet joint) 강직은 없으나, 천장관절 전방 연결(bridging), 후방 연결, 뼈부착 연결이 존재할 수 있음 10

[0089] 비-제한적인 척추외 특징:

[0090] · 장골능선(iliac crest), 좌골결절(ischial tuberosity), 및 대전자(greater trochanter)의 부착부병증

[0091] · 자주 나타나는, 사지 골격(appendicular skeleton)(주두(olecranon), 종골(calcaneum), 무릎 인대(patellar ligament))에서의 골극 형성

[0092] · '휘스커링(whiskering)' 뼈돌기(enthesophyte)

[0093] 비-제한적인 임상적 특징:

[0094] · 통증

[0095] · 감소된 움직임 범위

[0096] · 일부 환자에서 척추 골절의 증가된 위험

[0097] 일부 경우에, DISH는 증상이 나타나게 되며, 주요 임상적 특징은 통증, 경직 및 감소된 이동성(움직임의 범위), 연하곤란(골증식체의 압박으로 인해 야기됨), 식도 폐쇄(oesophagal obstruction), 쉰 소리(hoarseness), 경추 척수증, 고리중쇠 부분탈구(atlantoaxial subluxation), 척추관협착(spinal stenosis), 후종 인대의 골화, 척

수 손상(spinal cord injury), 호흡곤란(dyspnea), 이물감(foreign body sensation), 척수의 압박으로 인한 신경학적 소견(neurologic manifestation), 콜레스테롤과잉혈(hypercholesterinemia)(심장혈관계 동반이환(comorbidity)을 초래함), 및/또는 말초 관절 정동(peripheral joint affection) 중 하나 이상을 포함한다.

[0098] "뼈부착부위(enthesis)"는 뼈에 대한 힘줄 또는 인대의 부착의 부위이며, 4개의 구역으로 구조화된다: 섬유아세포형 세포(건세포)로 밀집되어 있고 콜라겐 유형 I 및 III과 데코린(decorin)으로 구성된 조밀한(dense) 섬유결합 조직 구역; 섬유연골세포(fibrochondrocyte)로 밀집되어 있고 콜라겐 유형 I 및 II와 아그레칸(aggrecan)으로 구성된 무기질 비침착된 섬유연골; 비대성 연골세포로 밀집되어 있고 콜라겐 유형 II 및 X와 아그레칸으로 구성된 무기질침착된 섬유연골; 및, 조골세포, 골세포, 및 파골세포로 밀집되어 있고 콜라겐 유형 I로 구성된 뼈(문헌 [Calejo et al., Enthesis tissue engineering: biological requirements meet at the interface, Tissue Eng Part B Rev. 2019;25(4):330-356]). 이에 따라 뼈부착부위는 2개의 매우 상이한 조직인 힘줄 또는 인대(순응하는 연조직)와 뼈(경직성의 경조직) 사이에 부드러운 이행을 허용하는 근골격계 구조를 나타낸다(문헌 [Calejo et al., Enthesis tissue engineering: biological requirements meet at the interface, Tissue Eng Part B Rev. 2019;25(4):330-356]). 이 경계면(interface)에서 갑작스러운 이행은 구역 사이의 응력 집중(stress concentration) 및 증가된 부진의 위험으로 이어질 것이다; 반대로, 뼈부착부위에 대한 구성 및 구조의 점진적인 이행은 응력 집중을 완화한다. (문헌 [Genin et al., Functional grading of mineral and collagen in the attachment of tendon to bone, Biophys J. 2009;97(4):976-985]). 콜라겐 섬유 정렬의 점진적인 감소 및 무기질 함량의 증가가 힘줄에서부터 뼈 쪽으로 보이며 이는 조직 경직도의 기울기를 생성한다(문헌 [Genin et al., Functional grading of mineral and collagen in the attachment of tendon to bone, Biophys J. 2009;97(4):976-985]). 뼈부착부위 무기질침착의 감소는 이 구조의 감소된 강도로 이어지는 반면에(문헌 [Deymier et al., Micro-mechanical properties of the tendon-to-bone attachment, Acta Biomater. 2017;1(56):25-35]) 또한 무기질침착된 연골이 신장된 동물 모델은 감소된 뼈부착부위 강도를 나타낸다(문헌 [Marinovich et al., The role of bone sialoprotein in the tendon-bone insertion, Matrix Biol. 2016;52-54:325-338]). 이에 따라, 무기질침착은 뼈부착부위의 최적의 기계적 특성을 달성하기 위해 적절하게 조절되어야만 한다.

[0099] 본원에서 사용되는 바와 같이, "강직척추염"은 전형적으로 척추가 골반에 이어지는 척추의 관절의 장기간 염증을 특징으로 하는 관절염(arthritis)의 유형을 지칭한다. 영향받는 부위는 다른 관절, 예컨대 어깨 또는 엉덩이를 포함할 수 있으며, 눈 및 창자 문제뿐만 아닐 요통도 발생할 수 있다. 영향받는 부위에서 관절 이동성은 일반적으로 시간이 지남에 따라 악화된다.

[0100] 강직척추염의 원인은 알려져있지 않지만, 유전적 및 환경적 요인의 조합을 포함하는 것으로 여겨진다. 영향받는 많은 이들이 HLA-B27 항원으로 알려진 특이적 인간 백혈구 항원을 갖는다. 근본적인 메커니즘은 자가면역성 또는 자가염증성인 것으로 여겨진다. 진단은 전형적으로 의료 영상화 및 혈액 검사로부터 뒷받침되는 증상에 기반한다. 강직척추염은 혈청음성 척추관절병증(spondyloarthropathy)의 일종이며, 이는 시험이 류마티스 인자(RF) 항체의 어떤 존재도 없음을 나타냄을 의미한다. 강직척추염에 대한 알려진 치료법은 존재하지 않는다. 치료는 약물 요법, 운동 요법, 물리치료, 및 드문 사례에서 수술을 포함할 수 있다. 사용되는 약물은 NSAID, 스테로이드, DMARD, 예컨대 설파살라진, 및 생물학적 제제(agent), 예컨대 TNF 억제제를 포함한다. 모든 인간의 대략 0.1% 및 0.8%가 젊은 성인에서 전형적으로 발생하는 발병에 영향을 받는다. 남성 및 여성은 동일하게 영향을 받는다; 그러나, 여성은 남성보다 융합보다는 염증을 경험할 가능성이 더 높다.

[0101] 본원에서 사용되는 바와 같이, "척추관절염(Spondyloarthritis)" 또는 "SpA"는 축 골격(천장관절염, 척추염), 말초 관절, 및 뼈부착부위에서의 염증을 특징으로 한다. 골외성 징후, 예컨대 앞포도막염(anterior uveitis), 건선(psoriasis), 염증성 장질환(inflammatory bowel disease)이 발생할 수 있다. HLA-B27은 주요 유전적 위험 요인이다. SpA의 전체 군은 0.1% 내지 1.9%의 세계 이환율을 가지며, 이는 나라와 인종 사이에서 다양하다. 비-스테로이드성 항-염증 약물(일반적으로 NSAID라고 함)은 통증 및 부기를 감소시킴으로써 대부분의 환자에게 증상 완화를 제공한다. 항-TNF-약물(TNF 차단제) 및 항-IL-17 약물(IL-17 차단제)을 포함하는 생물학적제제로 불리는 다른 약물이 NSAID에 충분히 잘 반응하지 않는 환자에서 효과적이다.

[0102] "ENPP1 결핍증"은 대상체의 혈청 및/또는 혈장에서 ENPP1 효소적 활성화의 감소된 수준을 특징으로 한다. ENPP1 결핍증은 ENPP1 효소를 인코딩하는 *ENPP1* 유전자에서 돌연변이를 불활성화시킴으로써 야기되는 희귀 유전 장애이다. ENPP1은 세포외 도메인이 피로포스파타아제 및 포스포디에스테라아제 활성을 지니는 내재성(integral) 막관통 단백질이다. ENPP1은 세포외 ATP를 무기 피로인산염(PPi) 및 AMP로 전환한다.

[0103] ENPP1 폴리펩티드에 관하여 "효소적으로 활성의", 또는 본원에서 사용되는 바와 같이, ENPP1 폴리펩티드에 관하여 "효소적 활성"은 AMP 및 PPi로의 ATP 가수분해 활성 및/또는 ATP로의 AP3A 가수분해를 소유하는 것으로 정의된다. ENPP1는 ATP를 AMP 및 PPi로 용이하게 가수분해한다. ENPP1의 항정-상태 미카엘리스-멘텐(steady-state Michaelis-Menten) 효소 상수는 기질로서 ATP를 사용하여 결정된다. ENPP1은 효소적 반응의 HPLC 분석에 의해 ATP를 절단하는 것으로 입증될 수 있으며, ATP, AMP, 및 ADP 표준을 사용하여 반응의 기질 및 산물의 동일성이 확인된다. ATP 기질은 ENPP1의 존재 하에서 시간이 지남에 따라 분해되며, 효소적 산물인 AMP가 축적된다. ATP 기질의 다양한 농도를 사용하여, ENPP1에 대한 초기 속도 속력(rate velocity)은 ATP의 존재 하에서 유도되며, 데이터를 곡선에 피팅(fitting)하여 효소 속도 상수를 유도한다. 생리적 pH에서, ENPP1의 속도론 속도 상수는 K_m= 2 μM 및 k_{cat}=3.4 ± 0.4 s^{-1}이다.

[0104] 본원에서 사용되는 바와 같이 용어 "혈장 피로인산염(PPi) 수준"은 동물의 혈장에 존재하는 피로인산염의 양을 지칭한다. 특정한 구현예에서, 동물은 랫트, 마우스, 고양이, 개, 인간, 소 및 말을 포함한다. 혈소판으로부터의 방출 때문에 혈청보다는 혈장에서 PPi를 측정하는 것이 필요하다. PPi를 측정하는 여러 가지 방식이 존재하며, 그 중 하나는 변형된, 우리딘-디포스포글루코스(UDPG) 피로포스포릴라아제를 사용한 효소 검정에 의한 것이다(문헌 [Lust & Seegmiller, 1976, Clin. Chim. Acta 66:241-249]; [Cheung & Suhadolnik, 1977, Anal. Biochem. 83:61-63]).

[0105] 전형적으로, 건강한 인간 대상체에서 혈장 PPi 수준은 약 1 μM 내지 약 3 μM, 일부 사례에서는 1 내지 2 μM의 범위이다. 혈장에서의 ENPP1의 정상 수준은 건강한 대상체에서 혈장 피로인산염(PPi)의 정상 수준을 유지하는 데 요구되는 ENPP1 단백질의 양을 지칭한다. 건강한 인간에서 PPi의 정상 수준은 2 내지 3 μM에 해당한다. ENPP1의 결핍증을 갖는 대상체는 정상 수준의 적어도 10% 미만, 정상 수준의 적어도 20% 미만, 정상 수준의 적어도 30% 미만, 정상 수준의 적어도 40% 미만, 정상 수준의 적어도 50% 미만, 정상 수준의 적어도 60% 미만, 정상 수준의 적어도 70% 미만, 정상 수준의 적어도 80% 미만 및 이들의 조합의 범위인 낮은 PPi 수준을 나타낸다. GACI를 앓고 있는 환자에서, PPi 수준은 1 μM 미만인 것으로 발견되었으며 일부 사례에서는 검출 가능한 수준 미만이다. PXE를 앓고 있는 환자에서, PPi 수준은 0.5 μM 미만이다(문헌 [Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2014 Sep;34(9):1985-9]; [Braddock et al., Nat Commun. 2015; 6: 10006]).

[0106] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "병리적 석회화"는 신체의 연조직, 분비 및 배설 통로에서의 칼슘염의 비정상적 침착이 이들의 경화를 야기하는 것을 지칭한다. 이에는 2가지 유형이 존재한다: 죽어가는 그리고 죽은 조직에서 발생하는 이영양(dystrophic) 석회화, 및 세포 및 조직의 항상성 능력을 초과하는, 상승된 칼슘의 세포외 수준(고칼슘혈증(hypercalcemia))를 특징으로 하는 전이성(metastatic) 석회화. 석회화는 세포뿐만 아니라 세포외 기질 성분, 예컨대 기저막 내의 콜라겐 및 동맥 벽의 탄력 섬유를 포함할 수 있다. 석회화하는 경향이 있는 조직의 일부 예는 다음을 포함한다: 위 점막 - 위, 신장 및 폐, 각막, 전신 동맥 및 폐정맥의 내부 상피내벽(epithelial lining).

[0107] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "병리적 골화"는 골계(osseous system)에서가 아닌 조직에서, 또는 일반적으로 골형성(osteogenic) 특성을 나타내지 않는 결합 조직에서 뼈가 발생하는 병리적 상태를 지칭한다. 골화는 영향을 받는 조직 또는 기관의 성질에 따라 3가지 유형으로 분류된다: 연골내(endochondral) 골화는 연골에서 발생하고 이를 대체하는 골화이고; 막내(intramembranous) 골화는 결합 조직에서 발생하고 이를 대체하는 뼈의 골화이며; 화생성(metaplastic) 골화 정상적으로 연한 신체 구조에서의 뼈 물질의 발생; 또한 종속영양성(heterotrophic) 골화라고도 한다.

[0108] ENPP1의 "결핍증"은 대상체가 혈액 혈장에서 ENPP1의 정상 수준의 5% 내지 10% 이하를 갖는 병태를 지칭한다. 건강한 인간 대상체에서 ENPP1의 정상 수준은 대략 10 내지 30 ng/ml이다(문헌 [Am J Pathol. 2001 Feb; 158(2): 543-554]).

[0109] "이소성 석회화"는 조직에서의 칼슘 염의 병리적 침착 또는 연조직 내의 뼈 성장을 특징으로 하는 병태를 지칭한다.

[0110] "연조직의 이소성 석회화"는 전형적으로 연조직에서 발생하는 인산칼슘, 수산화인회석, 옥살산칼슘, 및 인산팔칼슘으로 구성되는, 부적절한 생물무기화(biomineralization)를 지칭하며 이는 연조직의 경화의 손실로 이어진다. “동맥 석회화”는 동맥 및 심장 판막에서 발생하여 동맥이 경화되거나 좁아지는 것으로 이어지는 이소성 석회화를 지칭한다. 동맥 내 석회화는 죽상경화판(atherosclerotic plaque) 부담 및 증가된 심근경색증의 위험, 말초 혈관 질환에서의 증가된 허혈성 에피소드(ischemic episode), 혈관성형술(angioplasty) 다음의 증가된 박

리(dissection) 위험과 상관관계가 있다.

[0111] "정맥 석회화"는, 정맥의 탄력성을 감소시키고, 혈류를 제한하여, 그 후에 혈압의 상승 및 심장 결함(coronary defect)으로 이어질 수 있는, 정맥에서 발생하는 이소성 석회화를 지칭한다.

[0112] "혈관 석회화"는 혈관계에서의 무기질의 병리적 침착을 지칭한다. 이것은 내막(intimal) 석회화 및 내측(medial) 석회화를 포함하여 다양한 형태를 갖지만, 또한 심장의 판막에서도 발견될 수 있다. 혈관 석회화는 죽상경화증(atherosclerosis), 당뇨, 특정한 유전 병태(heredity condition), 및 신장 질환(kidney disease), 특히 CKD와 연관되어 있다. 혈관 석회화가 있는 환자는 심혈관 이상 반응(adverse cardiovascular event)에 대해 더 높은 위험성이 있다. 혈관 석회화는 매우 다양한 환자에게 영향을 미친다. 특발성 영아 동맥 석회화(Idiopathic infantile arterial calcification)는 신생아의 동맥이 석회화되는 희귀한 형태의 혈관 석회화이다.

[0113] "뇌 석회화(Brain calcification)"(BC)는 혈관벽 및 조직 유조직(parenchyma)에 칼슘 및 기타 무기질의 침착이 발생하여 신경세포사(neuronal death) 및 신경아교종(gliosis)으로 이어지는 비특이적 신경병리를 지칭한다. 뇌 석회화는 종종 다운 증후군(Down's syndrome), 루이소체병(Lewy body disease), 알츠하이머병(Alzheimer's disease), 파킨슨병(Parkinson's disease), 혈관성 치매(vascular dementia), 뇌 종양(brain tumor), 및/또는 다양한 내분비학적(endocrinologic) 병태를 포함하는 다양한 만성 및 급성 뇌 장애와 연관되어 있다.

[0114] 심장 조직의 석회화는 심장의 조직 내, 예컨대 대동맥 조직 및 관상동맥 조직 내의 칼슘(가능하게는 기타 무기질을 포함함)의 침착의 축적을 지칭한다.

[0115] 본원에서 사용되는 바와 같이 "무기질 뼈 장애(Mineral bone disorder)(MBD)"는 비정상적 호르몬 수준이 사람의 혈액에서 칼슘 및 인(phosphorus) 수준이 균형을 벗어나도록 야기하는 것을 특징으로 하는 장애를 지칭한다. 무기질 및 뼈 장애는 CKD를 앓는 사람에게서 일반적으로 발생하며 투석을 받는 신부전(kidney failure)을 앓는 대부분의 사람에게 영향을 미친다.

[0116] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "조기 발병 골다공증"은 일반적으로 요통, 웅크린 자세, 및/또는 골 질량의 느린 손실을 특징으로 하는 골다공증의 시작 단계를 지칭한다. 일반적인 원인은 낮은-칼슘 식이요법, 흡연, 연령-관련 호르몬 변화를 포함한다.

[0117] "골감소증"은 감소된 골밀도를 특징으로 하는 뼈 병태로, 이는 뼈 약화 및 뼈 골절의 증가된 위험으로 이어진다. 골연화증은 새롭게 형성된 뼈의 감소된 무기질침착을 특징으로 하는 뼈 장애이다. 골연화증은 중증의 비타민 D 결핍(영양적이거나 유전 증후군에 의해 야기될 수 있음)에 의해 및 매우 낮은 혈중 인산염 수준을 야기하는 상태에 의해 야기된다. 골연화증 및 골감소증 둘 모두는 뼈가 부러질 위험을 증가시킨다. 골연화증의 증상은 뼈 통증 및 근육 약화(weakness), 뼈 압통(tenderness), 보행 어려움(difficulty walking), 및 근육 연축(muscle spasm)을 포함한다.

[0118] 본원에서 사용되는 바와 같이 "연령 관련 골감소증"은 뼈 무기질 밀도가 정상보다 낮은 병태를 지칭한다. 일반적으로, 골감소증을 앓는 환자는 -1.0 내지 -2.5의 뼈 무기질 밀도 T-점수를 갖는다. 치료되지 않은 채로 남아 있는 경우 골감소증은 뼈가 잘 부러지게 되고 매우 골절되는 경향이 큰 골다공증으로 진행된다.

[0119] 본원에서 사용되는 바와 같이 "후종 인대의 골화(OPLL)"는 후종 인대의 이소성 석회화를 초래하는 골화과잉(hyperostotic)(과잉의 뼈 성장) 상태를 지칭한다. 후종 인대는 척추의 뼈를 연결하고 안정화한다. 두꺼워지거나 석회화된 인대는 척추를 압박하여, 척수증을 일으킬 수 있다. 척수증의 증상은 보행 어려움 및 장 및 방광 조절의 어려움을 포함한다. OPLL은 또한 신경뿌리병증, 또는 신경근의 압박을 야기할 수 있다. 경추 신경뿌리병증의 증상은 목, 어깨, 팔, 또는 손에서의 통증, 저림(tingling), 또는 무감각(numbness)을 포함한다. 골화가 흉부 영역 및 전종 인대에서 또한 발생하는 DISH와 달리, OPLL의 경우 골화가 후종 인대에서만 발생하므로, OPLL은 DISH와 구별된다.

[0120] OPLL에 의해 야기되는 임상적 증상 및 징후는 다음과 같이 카테고리화할 수 있다: (1) 척수증, 또는 상지와 하지의 운동 및 감각 장애(motor and sensory disturbance), 강직(spasticity) 및 방광 기능장애(dysfunction)를 동반한 척수 병변; (2) 상지의 통증 및 감각 장애를 동반하는 경추 신경뿌리병증; (3) 목 주변의 통증 및 경직을 동반한 축 불편함. OPLL의 초기 단계에서 가장 흔한 증상은 손에서의 촉각 장애(dysesthesia) 및 저림 감각, 및 어둔함(clumsiness)을 포함한다. 신경학적 결핍이 진행됨에 따라, 하지 증상, 예컨대 보행 장애(gait disturbance)가 나타날 수 있다. OPLL은 측면 단순 방사선 사진에서 검출되며, 자기 공명 영상(MRI) 및 컴퓨터

단층촬영(CT)에 의해 경추 OPLL의 진단 및 형태학적 세부사항이 명확하게 입증되었다.

[0121] OPLL은 경추 척수증을 앓는 미국인에게 널리 퍼져있으며, 아시아 인구에서는 훨씬 더욱 광범위하게 나타난다. 척수증 및 감소된 이동성은 연령에 따라 점차 악화되며, 척수증 및 경직의 원인이 되는 척추주위 골화의 진행을 예방하는 효과적인 수단은 존재하지 않는다. 현재의 요법은 증상적 완화에 초점을 맞추고 있으며, 수술이 단기적으로는 도움이 될 수 있는 반면, 부착부병증의 그 다음의 급격한 진행 및 증상의 재발이 종종 이 접근법을 복잡하게 한다.

[0122] 급격한 진행성 OPLL을 앓는 환자는 순환 FGF23의 상승을 입증하는데(문헌 [Kawaguchi, Y., et al., Serum biomarkers in patients with ossification of the posterior longitudinal ligament (OPLL): Inflammation in OPLL. PLoS One, 2017. 12(5): p. e0174881]; [Kawaguchi, Y., et al., Increase of the Serum FGF-23 in Ossification of the Posterior Longitudinal Ligament. Global Spine J, 2019. 9(5): p. 492-498]), 이는 희귀 장애 X-연관 저인산혈증(XLH) 및 상염색체 열성 저인산혈 구루병(ARHR)의 중심이 되는 발견이며, 이들 둘 모두는 또한 DISH 및 OPLL과 유사한 부착부병증을 나타낸다. 이들 발견은 부착부병증의 발병(pathogenesis)에서 FGF23(또는 결과적인 저인산혈증)의 원인이 되는 역할을 나타내지만, 상승된 FGF23 및/또는 감소된 인산염이 부착부병증 또는 척추 골화를 유발할 수 있는 메커니즘은 알려져있지 않다.

[0123] 본원에서 사용되는 바와 같이 "유전성 저인산혈 구루병"은 혈중 인산염의 낮은 수준과 관련된 장애(저인산혈증)를 지칭한다. 인산염은 뼈 및 이빨의 정상적인 형성에 필수적인 무기질이다. 가장 일반적으로, 이것은 PHEX 유전자의 돌연변이에 의해 야기된다. 병태의 원인이 될 수 있는 기타 유전자는 CLCN5, DMP1, ENPP1, FGF23, 및 SLC34A3 유전자를 포함한다. 유전성 저인산혈 구루병의 기타 징후 및 증상은 두개골의 조기 융합(두개골유합증(craniosynostosis)) 및 치아 이상을 포함할 수 있다. 장애는 또한 인대 및 힘줄이 관절에 부착되는 곳에서 비정상적인 뼈 성장을 야기할 수 있다(부착부병증). 성인에서, 저인산혈증은 골연화증으로 알려진 뼈의 연화를 특징으로 한다. 장애의 또 다른 희귀 유형은 고칼슘뇨 동반 유전성 저인산혈 구루병(hereditary hypophosphatemic rickets with hypercalciuria)(HHRH)으로 알려져 있으며 여기서 저인산혈증에 더하여, 이 병태는 소변 내 칼슘의 높은 수준의 배설을 특징으로 한다(고칼슘뇨).

[0124] 본원에서 사용되는 바와 같이, 또한 X-연관 우성 저인산혈 구루병, 또는 X-연관 비타민 D-저항성 구루병으로도 불리는 "X-연관 저인산혈증(XLH)", 용어 X-연관 저인산혈증(XLH)은 비타민 D 보충이 질환을 치료하지 않는 대부분의 사례의 구루병과 상이한 구루병(또는 골연화증)의 X-연관 우성 형태이다. 이것은 저신장(short stature), 내반슬(genu varum)(안굽이 무릎(bow leggedness))을 포함하여 뼈 기형(bone deformity)을 유발할 수 있다. 이것은 PHEX 유전자 서열(Xp.22)에서의 돌연변이 및 그 다음의 PHEX 단백질의 불활성화와 연관되어 있다.

[0125] 본원에서 사용되는 바와 같이 "상염색체 열성 저인산혈 구루병 2형(ARHR2)"은 저인산혈, 구루병 및/또는 골연화증 및 느린 성장을 특징으로 하는 유전성 콩팥 인산염-소실 장애(phosphate-wasting disorder)를 지칭한다. 상염색체 열성 저인산혈 구루병 2형(ARHR2)은 ENPP1 유전자에서의 동형 기능-상실(homozygous loss-of-function) 돌연변이에 의해 야기된다.

[0126] 본원에서 사용되는 바와 같이 "상염색체 우성 저인산혈 구루병(ADHR)"은 소변 중 인산염의 과량의 손실이 불완전하게 형성되는 뼈(구루병), 뼈 통증, 및 치아 농양(abscess)으로 이어지는 희귀한 유전성 질환을 지칭한다. ADHR은 섬유아세포 성장 인자 23(FGF23)에서의 돌연변이에 의해 야기된다. ADHR은 뼈, 구루병 및/또는 골연화증의 손상된 무기질침착, 칼시트리올(calcitriol)(1,25-디하이드록시비타민 D3)의 억제된 수준, 신장 인산염 소실, 및 낮은 혈청 인산염을 특징으로 한다. FGF23에서의 돌연변이는 단백질을 보다 더 안정하게 하고 프로테아제에 의해 절단 가능하지 않도록 하여 FGF23의 강화된 생체활성을 초래한다. FGF23 돌연변이체의 강화된 활성은 근위세뇨관 세포의 첨단(apical) 표면 상에서, 인산나트륨 공동-수송체인 NPT2a 및 NPT2c의 발현을 감소시켜 신장 인산염 소실을 초래한다.

[0127] "저인산혈 구루병"(이전에는 비타민 D-저항성 구루병으로 불림)은 혈중 인산염의 낮은 수준으로 인해 뼈가 고통스럽게 부드러워지고 쉽게 구부러지게 되는 장애이다. 증상은 다리의 굽어짐(bowing) 및 기타 뼈 기형; 뼈 통증; 관절 통증; 불량한 뼈 성장; 및 단신을 포함할 수 있다. 일부 영향받는 아기들에서, 두개골 사이의 공간이 너무 빨리 닫혀 두개골유합증으로 이어진다. 대부분의 환자는 인산칼슘 대사의 이상, 치아 법랑질의 이상, 치아의 지연된 분출 및 길고 얇은 머리(장두증(dolichocephaly))를 나타낸다.

[0128] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "ENPP1 반가불충분성"은 ENPP1 유전자의 하나의 사본(copy)은 불활성화되거나 결실되고 ENPP1 유전자의 잔여의 기능성 사본은 정상 기능을 보존하는 데 필요한 유전자 산물을 생산하는 데

충분하지 않은 유전성 병태를 지칭한다. ENPP1의 결과로서, 반가물충분성은 낮은 PPi 수준 및 병리적 석회화의 형성을 나타낼 수 있지만, 필연적으로 나타낼 필요는 없다. DISH 또는 골다공증의 조기 발병 같은 질환은 특정한 구현예에서 ENPP1 반가불충분성과 연관될 수 있고/있거나 이에 의해 야기될 수 있다.

[0129] 대부분의 유전자의 경우, 단일 사본이 2배체(diploid) 유기체의 정상적인 성장 및 발달을 뒷받침하기에 충분하지만, 반가불충분성의(HI) 유전자로 알려진 유전자의 작은 하위집합(subset)은 감소된 유전자량(gene dosage)에 대해 극도의 민감성을 나타낸다. 유기체의 수명에 걸쳐 유전자-불활성화 돌연변이의 상대적으로 높은 빈도, 및 유전자 발현의 세포-간 변이성(cell-to-cell variability)을 고려할 때, 반가불충분성은 유기체 적합성(organismal fitness)에 대한 유의한 장벽을 나타낸다. 유전학에서 반가불충분성은 2배체 유기체에서의 우성 유전자 작용의 모델을 설명하는데, 변이체 대립유전자와 조합된 이형접합 조합의 자리(locus)에서의 야생형 대립유전자의 단일 사본은 야생형 표현형을 생산하기에 불충분하다. 반가불충분성은 변이체 대립유전자에서 새로(de novo) 또는 유전된 기능-상실 돌연변이로부터 발생되어, 이것이 유전자 산물을 거의 생산하지 않거나 어떤 유전자 산물도 생산하지 않도록 한다.

[0130] 예를 들어, ENPP1에서 N179S 돌연변이는 ENPP1 단백질의 기능의 상실을 초래하는 것으로 발견된 바 있다. N179S 돌연변이를 갖는 돌연변이된 ENPP1 유전자의 단일 사본의 존재는 감소된 PPi 생산을 초래한다. 발명은 N179S 돌연변이가 DISH 또는 골다공증의 조기 발병을 앓는 특정한 환자에서 발견되며 특정한 구현예에서 DISH 또는 골다공증의 존재 또는 미래의 발병 및/또는 진행에 대한 유전적 마커로서 역할을 할 수 있음을 개시한다.

[0131] 비슷하게, ENPP1에서 Y451C 돌연변이는 ENPP1 단백질의 기능의 상실을 초래하는 것으로 발견된 바 있다. Y451C 돌연변이를 갖는 돌연변이된 ENPP1 유전자의 단일 사본의 존재는 감소된 PPi 생산을 초래한다. 발명은 Y451C 돌연변이가 DISH 또는 골다공증의 조기 발병을 앓는 특정한 환자에서 발견되며 특정한 구현예에서 DISH 또는 골다공증의 존재 또는 미래의 발병 및/또는 진행에 대한 유전적 마커로서 역할을 할 수 있음을 개시한다.

[0132] 본원에서 사용되는 바와 같이, "사전-치료"는 본원에 기재된 치료 방법을 시작하기에 앞선 치료를 의미한다.

[0133] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "대상체"는 개체, 예컨대 포유류, 예컨대 인간, 비-인간 영장류(예를 들어, 침팬지 및 기타 유인원 및 원숭이종), 농장 동물(예를 들어, 새, 어류, 소, 양, 돼지, 염소, 및 말), 가축 포유류(예를 들어, 개 및 고양이), 또는 실험 동물(예를 들어, 설치류, 예컨대, 마우스, 랫트 및 기니피그)를 지칭한다. 용어는 임의의 연령 또는 성별의 대상체를 포함한다. 또 다른 구현예에서, 대상체는 포유류, 바람직하게는 인간이다.

[0134] 질환 또는 장애는 질환 또는 장애의 증상의 중증도, 환자가 이러한 증상을 경험하는 빈도, 또는 둘 모두가 감소되는 경우 "완화된다".

[0135] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "변경", "결손", "변이체", 또는 "돌연변이"는 이것이 인코딩하는 폴리펩티드의 기능, 활성, 발현(전사 또는 번역) 또는 형태에 영향을 미치는, 미스센스(missense) 및 넌센스(nonsense) 돌연변이, 삽입, 결실, 틀이동(frameshift) 및 조기 종결을 포함하는 세포 내 유전자에서의 돌연변이를 지칭한다.

[0136] "질환"은 동물이 항상성을 유지할 수 없고, 만약 질환이 개선되지 않으면 동물의 건강이 계속해서 약화되는 동물의 건강 상태이다.

[0137] 동물에서의 "장애"는 동물이 항상성을 유지할 수 있는 건강 상태이지만, 동물의 건강 상태가 장애의 부재 시에 그럴 것보다 덜 유리한 건강 상태이다. 치료되지 않은 채 남겨져도, 장애가 동물의 건강 상태의 추가의 감소를 필연적으로 야기하는 것은 아니다.

[0138] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "ENPP" 또는 "NPP"는 엑토뉴클레오티드 피로포스파타아제/포스포디에스터라아제를 지칭한다.

[0139] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "ENPP1 단백질" 또는 "ENPP1 폴리펩티드"는 ENPP1 유전자에 의해 인코딩되는 엑토뉴클레오티드 피로포스파타아제/포스포디에스터라아제-1 단백질을 지칭한다. 인코딩된 단백질은 유형 II 막관통 당단백질이며 뉴클레오티드와 뉴클레오티드 당의 포스포디에스테르 결합 및 뉴클레오티드와 뉴클레오티드 당의 피로인산염 결합을 포함하는 다양한 기질을 절단한다. ENPP1 단백질은 막관통 도메인 및 가용성 세포외 도메인을 갖는다. 세포외 도메인은 추가로 소마토메딘 B 도메인, 촉매 도메인(서열번호 1의 잔기 186번 내지 586번) 및 뉴클레아제 도메인(서열번호 1의 잔기 524번 내지 885번)으로 세분된다. 야생형 ENPP1의 서열 및 구조는 문헌 브라독 등(Braddock et al.,)의 PCT 출원 공개 번호 WO 2014/126965호에 상세히 기재되어 있으며,

이 문헌은 그 전문이 본원에 참조로 통합된다.

[0140] 포유류 ENPP1 폴리펩티드, 돌연변이체, 또는 이의 돌연변이체 단편은 이전에 브라독 등의 국제 PCT 출원 공개 번호 WO/2014/126965호, 브라독 등의 WO/2016/187408호, 브라독 등의 WO/2017/087936호, 및 브라독 등의 WO2018/027024호에서 개시된 바 있으며, 이들 모두는 그들 전문이 본원에 참조로 통합된다.

[0141] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "ENPP1 전구체 단백질"은 ENPP1 N-말단에 이의 신호 펩티드 서열이 있는 ENPP1을 지칭한다. 단백질분해 시, 신호 서열(특정한 비-제한적인 구현예에서, 화학식 (I)의 화합물에서 W로 표시됨)이 ENPP1로부터 절단되어 ENPP1 단백질을 제공한다. 발명 내에서 유용한 신호 펩티드 서열은, 이에 제한되지는 않으나, 알부민 신호 서열, 아주로시딘(azurocidin) 신호 서열, ENPP1 신호 펩티드 서열, ENPP2 신호 펩티드 서열, ENPP7 신호 펩티드 서열, 및/또는 ENPP5 신호 펩티드 서열을 포함한다.

[0142] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "ENPP1-Fc 작제물"은 IgG 분자(바람직하게는, 인간 IgG)의 FcR 결합 도메인에 재조합적으로 융합되고/되거나 화학적으로 접합된(conjugated)(공유적 및 비-공유적 접합 둘 모두를 포함함) ENPP1을 지칭한다. 특정한 구현예에서, ENPP1의 C-말단은 FcR 결합 도메인의 N-말단에 융합되거나 접합된다.

[0143] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "Fc"는 인간 IgG(면역글로불린) Fc 도메인을 지칭한다. IgG의 하위유형, 예컨대 IgG1, IgG2, IgG3, 및 IgG4가 Fc 도메인으로서 사용하기 위해 고려된다.

[0144] 본원에서 사용되는 바와 같이, "Fc 영역 또는 Fc 폴리펩티드"는 IgG 분자의 파파인 분해(papain digestion)에 의해 수득된 결정가능(crystallizable) 단편과 상관관계가 있는 IgG 분자의 부분이다. Fc 영역은 이황화 결합에 의해 연결된 IgG 분자의 2개의 중쇄의 C-말단 절반을 포함한다. 이것은 항원 결합 활성을 갖지 않지만 탄수화물 모이어티(moiety) 및, 보체와, FcRn 수용체를 포함하는 Fc 수용체에 대한 결합 부위를 함유한다. Fc 단편은 전체 제2 불변 도메인 CH2(카밧 넘버링 시스템(Kabat numbering system)에 따르면, 인간 IgG1의 잔기 231번 내지 340번) 및 제3 불변 도메인 CH3(잔기 341번 내지 447번)을 함유한다. 용어 "IgG 힌지(hinge)-Fc 영역" 또는 "힌지-Fc 단편"은 Fc 영역(잔기 231번 내지 447번) 및 Fc 영역의 N 말단으로부터 연장된 힌지 영역(잔기 216번 내지 230번)으로 이루어지는 IgG 분자의 영역을 지칭한다. 용어 "불변 도메인"은 항원 결합 부위를 함유하는, 면역글로불린의 다른 부분인 가변 도메인에 비해 보다 더 보존된 아미노산 서열을 갖는 면역글로불린 분자의 부분을 지칭한다. 불변 도메인은 중쇄의 CH1, CH2 및 CH3 도메인 및 경쇄의 CHL 도메인을 함유한다.

[0145] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "단편"은, 핵산에 적용될 때, 보다 큰 핵산의 하위서열을 지칭한다. 핵산의 "단편"은 적어도 약 15개, 50개 내지 100개, 100개 내지 500개, 500개 내지 1000개, 1000개 내지 1500개 뉴클레오티드, 1500개 내지 2500개, 또는 2500개 뉴클레오티드(및 이들 사이의 임의의 정수 값)일 수 있다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "단편"은, 단백질 또는 펩티드에 적용될 때, 보다 큰 단백질 또는 펩티드의 하위서열을 지칭하며, 적어도 길이가 적어도 약 20개, 50개, 100개, 200개, 300개 또는 400개 아미노산(및 이들 사이의 임의의 정수 값)일 수 있다.

[0146] "단리된"은 천연(natural) 상태로부터 변경되거나 또는 제거된 것을 의미한다. 예를 들어, 살아있는 동물에 자연적으로 존재하는 핵산 또는 폴리펩티드는 "단리된" 것이 아니지만, 이의 천연 상태의 공존하는 물질로부터 부분적으로 또는 완전하게 분리된 같은 핵산 또는 폴리펩티드는 "단리된" 것이다. 단리된 핵산 또는 단백질은 실질적으로 정제된 형태로 존재할 수 있거나, 비-천연(non-native) 환경, 예컨대, 예를 들어 숙주 세포에 존재할 수 있다.

[0147] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "환자", "개체" 또는 "대상체"는 인간을 지칭한다.

[0148] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "약제학적 조성물" 또는 "조성물"은 발명 내에서 유용한 적어도 하나의 화합물과 약제학적으로 허용 가능한 담체의 혼합물을 지칭한다. 약제학적 조성물은 환자에게의 화합물의 투여를 촉진한다. 화합물을 투여하는 다수의 기술이, 이에 제한되지 않으나 피하, 정맥내, 경구, 에어로졸, 흡입, 직장, 질, 경피, 비내, 구강, 설하, 비경구, 척추강내, 위내, 눈, 폐 및 국소 투여를 포함하여, 당해 분야에 존재한다.

[0149] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "약제학적으로 허용 가능한"은 화합물의 생물학적 활성 또는 특성을 폐기시키지 않고, 상대적으로 무독성인 재료, 예컨대 담체 또는 희석제를 지칭하고, 즉, 재료는 바람직하지 않은 생물학적 효과를 야기하거나 그것이 함유되는 조성물의 임의의 성분; 예를 들어, 인산-완충 식염수(PBS)와 유해한 방식으로 상호작용하지 않고 개체에 투여될 수 있다.

[0150] 본원에서 사용되는 바와 같이 용어 "혈장 피로인산염(PPi) 수준"은 동물의 혈장에 존재하는 피로인산염의 양을

지칭한다. 특정한 구현예에서, 동물은 랫트, 마우스, 고양이, 개, 인간, 소 및 말을 포함한다. 혈소판으로부터의 방출 때문에 혈청보다는 혈장에서 PPi를 측정하는 것이 필요하다. PPi를 측정하는 여러 가지 방식이 존재하며, 그 중 하나는 변형된, 우리딘-디포스포글루코스(UDPG) 피로포스포릴라아제를 사용한 효소 검정에 의한 것이다(문헌 [Lust & Seegmiller, 1976, Clin. Chim. Acta 66:241-249]; [Cheung & Suhadolnik, 1977, Anal. Biochem. 83:61-63]). 전형적으로, 건강한 대상체에서 정상 PPi 수준은 약 1 μM 내지 약 3 μM, 일부 사례에서는 1 내지 2 μM의 범위이다. 일부 사례에서, PPi의 "낮은" 수준은 대상체가 혈장 피로인산염(PPi)의 정상 수준의 2% 내지 5% 이하를 갖는 상태를 지칭한다(문헌 [Arthritis and Rheumatism, Vol. 22, No. 8 (August 1979)]).

[0151] 결함이 있는 ENPP1 발현을 갖는 대상체는 정상 수준의 적어도 10% 미만, 정상 수준의 적어도 20% 미만, 정상 수준의 적어도 30% 미만, 정상 수준의 적어도 40% 미만, 정상 수준의 적어도 50% 미만, 정상 수준의 적어도 60% 미만, 정상 수준의 적어도 70% 미만, 정상 수준의 적어도 80% 미만 및 이들의 조합의 범위인 낮은 PPi 수준을 나타내는 경향이 있다. GACI를 앓고 있는 환자에서, PPi 수준은 1 μM 미만인 것으로 발견되었으며 일부 사례에서는 검출 가능한 수준 미만이다. PXE를 앓고 있는 환자에서, PPi 수준은 0.5 μM 미만이다(문헌 [Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2014 Sep;34(9):1985-9]; [Braddock et al., Nat Commun. 2015; 6: 10006]).

[0152] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "폴리펩티드"는 펩티드 결합을 통해 연결된 아미노산 잔기로 구성된 중합체, 관련된 자연적으로 발생하는 구조적 변이체, 및 이의 합성의 비-자연적으로 발생하는 유사체를 지칭한다.

[0153] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "PPi"는 피로인산염을 지칭한다.

[0154] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "예방하다" 또는 "예방"은 어떠한 것도 발생되지 않았을 경우 장애 또는 질환 발병이 없거나, 또는 장애 또는 질환의 발생이 이미 있었을 경우 추가의 장애 또는 질환 발병이 없음을 의미한다. 또한 장애 또는 질환과 연관된 증상의 일부 또는 전부를 예방하는 능력이 고려된다.

[0155] 본원에서 사용되는 바와 같이 "시료" 또는 "생물학적 시료"는 대상체로부터 단리된 생물학적 물질을 의미한다. 생물학적 시료는 대상체에서의 생리적 또는 병리적 과정의 mRNA, 폴리펩티드 또는 기타 마커를 검출하는 데 적합한 임의의 생물학적 물질을 함유할 수 있으며, 개체로부터 수득된 체액, 조직, 세포 및/또는 비-세포 물질을 포함할 수 있다.

[0156] 본원에서 사용되는 바와 같이, "실질적으로 정제된"은 다른 성분을 실질적으로 무함유함을 의미한다. 예를 들어, 실질적으로 정제된 폴리펩티드는 이것이 일반적으로 이의 자연적으로 발생한 상태와 연관된 다른 성분으로부터 분리된 폴리펩티드이다. 비-제한적인 구현예는 95% 순도, 99% 순도, 99.5% 순도, 99.9% 순도 및 100% 순도를 포함한다.

[0157] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "치료" 또는 "치료하는"은 질환 또는 장애의 진행, 및/또는 질환 또는 장애의 증상을 치유하고/하거나, 치료하고/하거나, 경감시키고/시키거나, 완화하고/하거나, 변경하고/하거나, 교정하고/하거나, 개선하고/하거나, 호전시키고/시키거나, 또는 영향을 주고/주거나, 예방하고/하거나 최소화하기 위한 목적으로, 환자에게 치료제, 즉 발명 내에서 유용한 화합물(단독으로 또는 또 다른 약제학적 제제와 조합하여)의 적용 또는 투여, 또는 질환 또는 장애 및/또는 질환 또는 장애의 증상을 갖는 환자로부터의 단리된 조직 또는 세포주에의 치료제의 적용 또는 투여(예를 들어, 진단 또는 생체외 적용을 위해)로서 정의된다. 이러한 치료는 약리유전체학 분야로부터 수득된 지식에 기반하여, 특별하게 맞춰지거나 수정될 수 있다.

[0158] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "예방하다", "예방하는", 및 "예방"은 대상체에서 질환의 시작(inception)을 억제하거나 발생을 감소시키는 것을 지칭한다. 예방은 완전하거나(예를 들어, 대상체에서 병리적 세포의 완전한 부재) 부분적일 수 있다. 예방은 또한 임상적 병태에 대한 감소된 민감성(susceptibility)을 지칭한다. 특정한 구현예에서, "예방"은 질환 또는 장애의 발병을 예방하는 것을 포함한다.

[0159] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "야생형"은 자연적으로 발생하는 공급원으로부터 단리된 유전자 또는 유전자 산물을 지칭한다. 야생형 유전자는 집단에서 가장 자주 관찰되며 이에 따라 인간 ENPP1 유전자의 "정상" 또는 "야생형" 형식을 임의로 설계한다. 대조적으로, 용어 "기능적으로 등가의"는 야생형 유전자 또는 유전자 산물과 비교될 때 서열 및/또는 기능적 특성(즉, 변경된 특성)에서 변화를 나타내는 ENPP1 유전자 또는 유전자 산물을 지칭한다. 자연적으로 발생하는 돌연변이체는 단리될 수 있다; 이것은 이들이 야생형 유전자 또는 유전자 산물과 비교될 때 변경된 특징(변경된 핵산 서열을 포함함)을 갖는다는 사실에 의해 식별된다.

[0160] 본원에서 사용되는 바와 같이, "기능적 등가의 변이체"는 ENPP1의 서열(상기에 정의됨)에 대해 실질적으로 상동

이고, ENPP1의 효소적 및 생물학적 활성을 보존하는 폴리펩티드에 관한 것이다. 변이체가 천연(native) ENPP1의 생물학적 활성을 보존하는지 여부를 결정하기 위한 방법은 당업자에게 널리 알려져 있으며, 본 출원의 실험 부분에서 사용된 임의의 검정을 포함한다. 특히, 바이러스 벡터에 의해 전달되는 ENPP1의 기능적으로 등가의 변이체가 본 발명에 의해 포괄된다.

[0161] ENPP1의 기능적으로 등가의 변이체는 천연 ENPP1에 대해 실질적으로 상동인 폴리펩티드이다. 표현 "실질적으로 상동인"은 상기에 기재된 ENPP1 서열에 관하여 단백질 서열이 각각 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99%의 동일성의 정도(degree of identity)를 가질 때의 단백질 서열에 관한 것이다.

[0162] 2개의 폴리펩티드 사이의 동일성의 정도는 컴퓨터 알고리즘 및 당업자에게 널리 알려진 방법을 사용하여 결정된다. 2개의 아미노산 서열 사이의 동일성은 바람직하게는 BLASTP 알고리즘을 사용함으로써 결정되지만(문헌 [BLAST Manual, Altschul et al., NCBI NLM NIH Bethesda, Md. 20894, Altschul et al., J. Mol. Biol. 215: 403-410 (1990)]), 기타 유사한 알고리즘이 또한 사용될 수 있다. 본원에 기재된 패러미터를 이용해 BLAST 및 BLAST 2.0가 사용되어 백분율 서열 동일성을 결정한다. BLAST 분석을 수행하기 위한 소프트웨어는 미국 국립 생물공학 정보 센터(National Center for Biotechnology Information)를 통해 공개적으로 이용 가능하다.

[0163] ENPP1의 "기능적으로 등가의 변이체"는 각각 ENPP1을 생산하는데 사용될 숙주 세포에서의 코돈 선호도(codon preference)의 원인이 되는 폴리뉴클레오티드 내에서의 뉴클레오티드를 대체함으로써 수득될 수 있다. 이러한 "코돈 최적화"는 위스콘신의 위스콘신 대학교 패키지(University of Wisconsin Package) 버전 9.0, 제네틱스 컴퓨터 그룹(Genetics Computer Group), 매디슨(Madison)에 의해 제공되는 바와 같이 코돈 선호도에 대해 코돈 빈도 표, 예컨대 "Human high.cod"를 통합하는 컴퓨터 알고리즘을 통해 결정될 수 있다.

[0164] 본원에서 사용되는 바와 같이 측정 가능한 값, 예컨대 양, 시간적 기간 등을 언급할 때의 사용되는 "약"은 특정한 값(0.2 mg/kg 또는 0.6 mg/kg 또는 1.8 mg/kg)으로부터 ±10% 또는 ±5%, 특정한 구현예에서는 ±1-5%, 특정한 구현예에서는 ±5%, 특정한 구현예에서는 ±4%, 특정한 구현예에서는 ±4%, 특정한 구현예에서는 ±3%, 특정한 구현예에서는 ±2%, 및 특정한 구현예에서는 ±1%의 편차를 포괄함을 의미하며, 그러한 편차는 개시된 방법을 수행하는데 적절하다.

[0165] 개시내용은 단백질 서열의 대표적인 예를 제공한다. 기재된 단백질 서열은 역번역 및 코돈 최적화를 수행함으로써 핵산 서열로 전환될 수 있다. 이러한 전환을 가능하게 하는 이용 가능한 여러 가지 도구, 예컨대 엑스파시(Expasy)(https://www.expasy.org/) 및 생물정보학 서버(www *dot* bioinformatics *dot* org)가 존재한다.

[0166] 범위: 개시내용 전반에 걸쳐, 본 발명에 따른 다양한 양태가 범위 형식으로 제시될 수 있다. 범위 형식으로의 상세한 설명은 단지 편의와 간결성을 위한 것이며 본 발명에 따른 범주에 대한 확고한 제한으로 해석되어서는 안 된다는 점이 이해되어야 한다. 따라서, 범위의 상세한 설명은 모든 가능한 하위범위 뿐만 아니라 범위 내의 개별적인 수치 값을 구체적으로 개시한 것으로 고려되어야 한다. 예를 들어, 범위의 상세한 설명, 예컨대 1 내지 6은 하위범위, 예컨대 1 내지 3, 1 내지 4, 1 내지 5, 2 내지 4, 2 내지 6, 3 내지 6 등, 뿐만 아니라 범위 내의 개별적인 수, 예를 들어, 1, 2, 2.7, 3, 4, 5, 5.3, 및 6을 구체적으로 개시한 것으로 고려되어야 한다. 이것은 범위의 폭과 관계없이 적용된다.

[0167] 바람직한 방법 및 재료가 본원에 기재되지만, 본원에 기재된 것과 유사하거나 등가인 방법 및 재료가 현재의 개시된 방법 및 조성물의 실시 또는 시험에 사용될 수 있다. 본원에 언급된 모든 간행물, 특허 출원, 특허, 및 기타 참고문헌은 그들 전문이 참조로 통합된다.

[0168] 상세한 설명

[0169] **1. ENPP1 제제**

[0170] ENPP1 제제는 ENPP1 폴리펩티드이다. 본원에 개시된 ENPP1 폴리펩티드는, 이에 제한되지는 않으나, ENPP1 패밀리의 자연적으로 발생한 폴리펩티드뿐만 아니라 생물학적 활성, 예컨대 이에 제한되지는 않으나 ENPP1의 촉매 활성을 보유하는 이의 임의의 변이체(돌연변이체, 단편, 융합, 및 펩티도미메틱(peptidomimetic) 형태)을 포함한다.

[0171] ENPP1 제제는 하기에 나타난 화학식의 형태로 나타낼 수 있다:

[0172] W-PROTEIN-Z-DOMAIN-X-Y

[0173] (I),

[0174] 상기 식 (I)에서:

[0175] W는 부재하거나 세포외 공간으로 화합물의 외수송을 허용하는 신호 서열을 포함하고;

[0176] PROTEIN은 ENPP1의 촉매 영역을 포함하고;

[0177] DOMAIN은 부재하거나, 인간 IgG Fc 도메인(Fc), 인간 혈청 알부민 단백질(ALB), 및 이들의 생물학적으로 활성인 단편으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 적어도 하나이고;

[0178] X 및 Z는 독립적으로 부재하거나, 1개 내지 20개 아미노산을 포함하는 폴리펩티드이며;

[0179] Y는 부재하거나 다음으로 이루어지는 "뼈 표적화" 서열기로부터 선택되는 서열이다: D_m(서열번호 11), $(DSS)_n$(서열번호 12), $(ESS)_n$(서열번호 13), $(RQQ)_n$(서열번호 14), $(KR)_n$(서열번호 15), R_m(서열번호 16), DSSSEEKFLRRIGRFG(서열번호 17), EEEEEEEPRGDT(서열번호 18), APWHLSSQYSRT(서열번호 19), STLPIPHEFSRE(서열번호 20), VTKHLNQISQSY(서열번호 116), 및 E_m(서열번호 117).

[0180] 여기서 m은 독립적으로 1 내지 15의 범위의 정수이며,

[0181] 여기서 n은 독립적으로 1 내지 10의 범위의 정수이다.

[0182] 일부 구현예에서, W는 부재하다. 일부 구현예에서, W는 세포외 공간으로 화합물의 외수송을 허용하는 신호 서열을 포함한다.

[0183] 일부 구현예에서, ENPP1 제제는 뼈 표적화 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 뼈 표적화 도메인은 아미노산의 음으로 하전된 서열이다. 일부 구현예에서, 음으로 하전된 뼈 표적화 도메인은 폴리아스파르트산이다.

[0184] 용어 "ENPP1" 또는 "ENPP1 폴리펩티드"는 임의의 종으로부터 유래된 엑토뉴클레오티드 피로포스파타아제/포스포디에스테라아제 1 단백질(NPP1/ENPP1/PC-1) 및 ENPP1-관련 단백질을 지칭한다. ENPP1 단백질은 동종이량체(homodimer)를 형성하는 유형 II 막관통 당단백질을 포함한다. ENPP1 단백질의 각각의 단량체는 원형질 막을 표적화하는 데 수반되는 짧은 세포내 N-말단 도메인, 막관통 도메인, 및 여러 가지 도메인을 포함하는 큰 세포외 영역을 포함한다. 큰 세포외 영역은 SMB1 및 SMB2 도메인을 포함하는데, 이들은 ENPP1 이량체화에 참여하는 것으로 보고된 바 있다(문헌 [Gijsbers et al., Biochem. J. 371; 2003: 321-330]). 구체적으로, SMB 도메인은, 각각 4개의 이황화 결합 내에 정렬된 8개의 시스테인 잔기를 함유하며, 공유 시스테인 분자간- 및 분자내 결합을 통해 ENPP1 동종이량체화를 매개하는 것으로 나타났다. 단백질은 뉴클레오티드와 뉴클레오티드 당의 포스포디에스테르 결합 및 뉴클레오티드와 뉴클레오티드 당의 피로인산염 결합을 포함하는 다양한 기질을 절단한다. ENPP1 단백질은 뉴클레오시드 5' 트리포스파타아제를 상응하는 1인산염으로 가수분해하거나 또한 디아데노신 폴리포스페이트를 가수분해하는 기능을 한다. ENPP1 단백질은 심혈관계, 신경학적, 면역학적, 근골격, 호르몬, 및 혈액학적 기능의 조절에 관여하는 퓨린성(purinergic) 신호 전달에서 역할을 한다. 인간 ENPP1 전구체 단백질의 예시적인 아미노산 서열(NCBI 수탁 NP_006199)은 도 11(서열번호 1)에 도시되어 있다. 인간 ENPP1 전구체 단백질은 ENPP1 N-말단에 내인성 ENPP1 신호 펩티드 서열을 포함한다. 본원에 기재된 모든 ENPP1-관련 폴리펩티드에 대한 아미노산의 넘버링은 달리 구체적으로 지정되지 않는 한 도 2에 제공된 인간 ENPP1 전구체 단백질 서열의 넘버링을 기반으로 한다. 특정한 구현예에서, ENPP1 전구체 단백질은 내인성 또는 이종의 신호 펩티드 서열을 추가로 포함한다. 가수분해 시에, 신호 펩티드 서열은 ENPP1 전구체 단백질로부터 절단되어 성숙 ENPP1 단백질을 제공한다. 예를 들어, 문헌 [Jansen et al. J Cell Sci. 2005;118(Pt 14):3081-9]를 참조한다. 본원에 개시된 폴리펩티드와 함께 사용될 수 있는 예시적인 신호 펩티드 서열은, 이에 제한되지는 않으나, ENPP1 신호 펩티드 서열, ENPP2 신호 펩티드 서열, ENPP7 신호 펩티드 서열, 및/또는 ENPP5 신호 펩티드 서열을 포함한다. 비-제한적인 가공된(성숙) 세포외 ENPP1 폴리펩티드 서열은 서열번호 2에 나타나 있다.

[0185] ENPP1은 척추동물 사이에서 잘-보존되어 있고, 세포외 도메인의 큰 구간이 실질적으로 보존되어 있다는 사실이 일반적으로 당해 분야에 알려져 있다. 예를 들어, 도 7a-7b는 다양한 ENPP1 오르쏘로그(ortholog)와 비교된 인간 ENPP1 세포외 도메인의 다중-서열 정렬을 표시한다. 다양한 뉴클레오티드 3인산염(예를 들어, ATP, UTP, GTP, TTP, 및 CTP), pNP-TMP, 3',5'-cAMP, 및 2'-3'-cGAMP에 대한 ENPP1 결합이 또한 매우 보존되어 있다(예를 들어, 문헌 [Kato et al., Proc Natl Acad Sci USA. 2012;109(42):16876-81] 및 [Mackenzie et al. Bone. 2012;51(5):961-8]을 참조한다). 따라서, 이들 정렬로부터, 정상적인 ENPP1 활동에 중요한 세포외 도메인이 있는 주요 아미노산 위치를 예측하는 것뿐만 아니라 정상적인 ENPP1 활동을 유의적으로 변경시키지 않고 치환에

내성이 있을 수 있는 아미노산 위치를 예측하는 것이 가능하다. 그러므로, 현재의 개시된 조성물에 따라 유용한 효소적으로 활성인 인간 ENPP1 폴리펩티드는 또 다른 척추동물 ENPP1의 서열로부터의 상응하는 위치에 하나 이상의 아미노산을 포함할 수 있거나, 인간 또는 다른 척추동물 서열에서의 것과 유사한 잔기를 포함할 수 있다. 상응하는 위치에서의 하나 이상의 아미노산의 치환은 폴리펩티드 사슬의 형태를 변화시키거나 정상적인 ENPP1 활성을 변경할 가능성이 없는 보존적 변이 또는 치환을 포함할 수 있다. 보존적 변이, 또는 치환의 예는, 하나의 소수성 잔기, 예컨대 이소류신, 발린, 류신 또는 메티오닌의 다른 것에 대한 교체, 또는 하나의 극성 잔기의 또 다른 것에 대한 치환, 예컨대 아르기닌의 리신에 대한 치환, 글루탐산의 아스파르트산에 대한 치환, 또는 글루타민의 아스파라긴에 대한 치환을 포함한다. 예를 들어, ENPP1 폴리펩티드는 ENPP1 폴리펩티드의 서열에 대해 적어도 약 80% 동일한 서열, 및 바람직하게는 적어도 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 동일성을 갖는 임의의 알려진 ENPP1 폴리펩티드의 서열로부터 유래된 폴리펩티드를 포함한다.

[0186] **2. ENPP1의 효소적 활성**

[0187] ENPP1 단백질은 구조적 및 생물학적 특징의 측면에서 당해 분야에서 특징화되었다. 특정한 구현예에서, 본원에 개시된 가용성 ENPP1 단백질은 피로포스파타아제 및/또는 포스포디에스테라아제 활성을 포함한다. 예를 들어, 일부 구현예에서, ENPP1 단백질은 뉴클레오티드 3인산염(예를 들어, ATP, UTP, GTP, TTP, 및 CTP), pNP-TMP, 3',5'-cAMP, 및 2'-3'-cGAMP에 결합하며; 뉴클레오티드 3인산염을 무기 피로인산염으로 전환시킨다(예를 들어, 문헌 [Kato et al., Proc Natl Acad Sci USA. 2012;109(42):16876-81]; [Li, et al., Nat Chem Biol. 2014;10(12):1043-8]; [Jansen et al., Structure. 2012;20(11):1948-59]; 및 [Onyedibe et al., Molecules. 2019;24(22) 참조].

[0188] "효소적으로 활성인" 또는 "생물학적으로 활성인" ENPP1 폴리펩티드는 피로포스파타아제 및/또는 포스포디에스터라아제 활성을 나타낸다(예를 들어, ATP에 결합하고/하거나 ATP를 AMP 및 PPi로 가수분해하고/하거나 AP3a를 ATP로 가수분해할 수 있다). 예를 들어, ENPP1 단백질의 피로포스파타아제/포스포디에스터라아제 도메인은 세포외 뉴클레오티드 3인산염을 가수분해하여 무기 피로인산염(PPi)을 생산하고 일반적으로 가용성이다. 이 활성은 이전에 기재된 바와 같이 pNP-TMP 검정을 사용하여 측정될 수 있다(문헌 [Saunders et al., 2008, Mol. Cancer Ther. 7(10):3352-62]; [Albright et al., 2015, Nat Comm. 6:10006]). 특정한 구현예에서, 가용성 ENPP1 폴리펩티드는 기질 ATP에 대해 약 3.4(±0.4)s^{-1} 효소$^{-1}$ 이상의 k_{cat} 값을 갖는데, 여기서 k_{cat}은 폴리펩티드에 대한 ATP의 가수분해의 속도를 측정함으로써 결정된다. 특정한 구현예에서, 가용성 ENPP1 폴리펩티드는 기질 ATP에 대해 약 2 μM 이하의 K_M 값을 갖는데, 여기서 K_M은 폴리펩티드에 대한 ATP의 가수분해의 속도를 측정함으로써 결정된다. 본원에서의 교시사항에 더하여, 이들 참조문헌은 하나 이상의 생물학적 활성(예를 들어, 뉴클레오티드의 무기 피로인산염으로의 전환)을 보유하는 가용성 ENPP1 단백질을 생성하는 방법에 대한 충분한 지침을 제공한다.

[0189] **3. 가용성 ENPP1**

[0190] 일 구현예에서, 개시내용은 ENPP1 제제, 예컨대 이에 제한되지는 않으나 ENPP1 폴리펩티드에 관한 것이다. 본원에서 기재되는 바와 같이, 용어 가용성 ENPP1 폴리펩티드는 ENPP1 단백질의 임의의 자연적으로 발생하는 세포외 도메인뿐만 아니라 생물학적 활성(예를 들어, 효소적 활성)을 보유하는 이의 임의의 변이체(돌연변이체, 단편 및 펩티도미메틱 형태)를 포함한다. 가용성 ENPP1 폴리펩티드의 예는, 예를 들어, ENPP1 세포외 도메인(서열번호 2)를 포함한다. 특정한 구현예에서, 가용성 ENPP1 폴리펩티드는 ENPP1 폴리펩티드의 세포외 도메인에 더하여 신호 서열을 추가로 포함한다. 예시적인 신호 서열은 ENPP1 폴리펩티드의 천연 신호 서열, 또는 또 다른 단백질로부터의 신호 서열, 예컨대 hENPP7 신호 서열을 포함한다. 변이체 가용성 ENPP1 폴리펩티드의 예는 국제 특허 출원 공개 번호 WO 2012/125182호, WO 2014/126965호, WO 2016/187408호, WO 2018/027024호, WO 2020206302호 및 WO 2020/047520호에서 제공되며, 이들 모두의 내용은 그들 전문이 본원에 참조로 통합된다.

[0191] **4. ENPP1 융합 단백질**

[0192] 일부 구현예에서, ENPP1 폴리펩티드는 ENPP1 폴리펩티드 도메인 및 하나 이상의 이종의 단백질 부분(즉, ENPP1에 대해 이종인 폴리펩티드 도메인)을 포함하는 융합 단백질이다. 아미노산 서열은 이것이 서열번호 1에 나타난 ENPP1의 형태로 독특하게 발견되지 않는 경우 ENPP1에 대해 이종인 것으로 이해된다. 일부 구현예에서, 이종 단백질 부분은 면역글로불린의 Fc 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 면역글로불린의 Fc 도메인은 IgG1 면역글로불린의 Fc 도메인이다. 특정한 구현예에서, 가용성 ENPP1 폴리펩티드는 인간 면역글로불린 1(IgG1), 인간 면역글로불린 2(IgG2), 인간 면역글로불린 3(IgG3), 및/또는 인간 면역글로불린 4(IgG4)의 Fc 도메인에 C-말단적

으로 융합되어 있다. 다른 구현예에서, 가용성 ENPP1 폴리펩티드는 인간 면역글로불린 1(IgG1), 인간 면역글로불린 2(IgG2), 인간 면역글로불린 3 (IgG3), 및/또는 인간 면역글로불린 4(IgG4)의 Fc 도메인에 N-말단적으로 융합되어 있다. 일부 구현예에서, Fc 도메인의 존재는 반감기, 용해도를 개선하고, 면역원성(immunogenicity)을 감소시키고, 가용성 ENPP1 폴리펩티드의 활성을 증가시킨다. 특정한 구현예에서, 천연 인간 IgG 단백질(IgG1, IgG2, IgG3, 및 IgG4)의 부분이 Fc 부분을 위해 사용될 수 있다(예를 들어, ENPP1-Fc). 예를 들어, 본 개시내용은 면역글로불린의 불변 도메인, 예컨대 인간 IgG1, IgG2, IgG3, 및/또는 IgG4로부터 유래된 CH1, CH2, 또는 CH3 도메인을 포함하는 폴리펩티드에 융합된 ENPP1을 포함하는 융합 단백질을 제공한다. Fc 단편은 천연 IgG의 영역, 예컨대 힌지 영역(라밧(Rabat) 넘버링 시스템에 따른 인간 IgG1의 잔기 216번 내지 230번), 전체 제2 불변 도메인 CH2(잔기 231번 내지 340번), 및 제3 불변 도메인 CH3(잔기 341번 내지 447번)을 포함할 수 있다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "ENPP1-Fc 작제물"은 IgG 분자(바람직하게는, 인간 IgG)의 FcR 결합 도메인에 재조합적으로 융합되고/되거나 화학적으로 접합된(공유적 및 비-공유적 접합 둘 모두를 포함함) ENPP1의 가용성 형태(예를 들어, ENPP1 폴리펩티드의 세포외 도메인)를 지칭한다. 특정한 구현예에서, ENPP1의 C-말단은 FcR 결합 도메인의 N-말단에 융합되거나 접합된다.

[0193] 인간 IgG1의 Fc 부분(G1Fc)을 위해 사용될 수 있는 아미노산 서열의 예는 서열번호 6(표 1)이다. 부분적으로, 개시내용은 서열번호 6에 대해 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지는 폴리펩티드를 제공한다.

[0194] 일부 구현예에서, 이종의 단백질 부분은 폴리히스티딘, FLAG 태그(tag), Glu-Glu, 글루타티온 S-트랜스퍼라아제(GST), 티오레독신, 단백질 A, 단백질 G, 면역글로불린 중쇄 불변 영역(Fc), 말토스 결합 단백질(MBP), 또는 인간 혈청 알부민으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 도메인을 포함한다. 융합 도메인은 원하는 특성을 부여하도록 선택될 수 있다. 예를 들어, 일부 융합 도메인은 친화성 크로마토그래피에 의한 융합 단백질의 단리에 특히 유용하다. 친화성 정제의 목적을 위해, 친화성 크로마토그래피용 관련 지지체(matrix), 예컨대 글루타티온-, 아밀라아제-, 및 니켈- 또는 코박트-접합 수지가 사용된다. 이러한 지지체 중 많은 것이 "키트" 형태, 예컨대 (HIS_6) 융합 파트너와 함께 유용한 퀴아익스프레스™ 시스템(QIAexpress™ system)(퀴아겐(Qiagen))

및 파마시아(Pharmacia) GST 정제 시스템에서 이용 가능하다. 또 다른 예로서, 융합 도메인은 ENPP1 폴리펩티드의 검출을 촉진하도록 선택될 수 있다. 이러한 검출 도메인의 예는 다양한 형광 단백질(예를 들어, GFP) 뿐만 아니라 "에피토프(epitope) 태그"를 포함하는데, 이는 일반적으로 특이적 항체가 이용 가능한 짧은 펩티드 서열이다. 특이적 단클론성 항체가 용이하게 이용 가능한 널리-알려진 에피토프 태그는 FLAG, 인플루엔자 바이러스 헤마글루티닌(HA), 및 c-myc 태그를 포함한다. 일부 사례에서, 융합 도메인은 프로테아제 절단 부위, 예컨대 인자 Xa 또는 트롬빈를 위한 부위를 갖는데, 이는 관련된 프로테아제가 융합 단백질을 부분적으로 소화하도록 허용하여 그럼으로써 이로부터 재조합 단백질을 유리시킨다. 그 후에 유리된 단백질은 그 다음의 크로마토그래피 분리에 의해 융합 단백질로부터 단리될 수 있다.

[0195] 5. 링커

[0196] 일부 구현예에서, ENPP1 융합 단백질은 ENPP1 폴리펩티드 도메인과 하나 이상의 이종의 단백질 부분(예를 들어, Fc 면역글로불린 도메인) 사이에 위치한 링커(Z)를 추가로 포함한다. 특정한 구현예에서, 가용성 ENPP1 폴리펩티드는 Fc 도메인에 직접적으로 또는 간접적으로 융합되어 있다. 일부 구현예에서, 가용성 ENPP1 융합 단백질은 Fc 도메인과 ENPP1 폴리펩티드 사이에 링커를 포함한다. 일부 구현예에서, 링커는 1개 내지 200개 아미노산을 포함하는 아미노산 스페이서(spacer)일 수 있다. 적합한 펩티드 스페이서는 당해 분야에 알려져 있으며, 예를 들어, 유연한(flexible) 아미노산 잔기, 예컨대 글리신, 알라닌, 및 세린을 함유하는 펩티드 링커를 포함한다.

[0197] 일부 구현예에서, 링커는 폴리글리신 링커 또는 Gly-Ser 링커를 포함한다. 일부 구현예에서, 스페이서는 GA(서열번호 21), GS(서열번호 22), GG(서열번호 23), GGA(서열번호 24), GGS(서열번호 25), GGG(서열번호 26), GGGA(서열번호 27), GGGS(서열번호 28), GGGG(서열번호 29), GGGGA(서열번호 30), GGGGS(서열번호 31), GGGGG(서열번호 32), GGAG(서열번호 33), GGSG(서열번호 34), AGGG(서열번호 35), SGGGG(서열번호 36), 또는 SGGG(서열번호 37)의 모티프(motif), 예를 들어, 다중 또는 반복 모티프를 함유할 수 있다. 일부 구현예에서, 스페이서는 GA 또는 GS, 예를 들어, GA, GS, GAGA(서열번호 38), GSGS(서열번호 39), GAGAGA(서열번호 40), GSGSGS(서열번호 41), GAGAGAGA(서열번호 42), GSGSGSGS(서열번호 43), GAGAGAGAGA(서열번호 44), GSGSGSGSGS(서열번호 45), GAGAGAGAGAGA(서열번호 46), 및 GSGSGSGSGSGS(서열번호 47)의 모티프를 포함하는 2개 내지 12개 아미노산을 함유할 수 있다. 일부 구현예에서, 스페이서는 GGA 또는 GGS, 예를 들어, GGA, GGS, GGAGGA(서열

번호 48), GGSGGS(서열번호 49), GGAGGAGGA(서열번호 50), GGSGGSGGS(서열번호 51), GGAGGAGGAGGA(서열번호 52), 및 GGSGGSGGSGGS(서열번호 53)의 모티프를 포함하는 3개 내지 12개 아미노산을 함유할 수 있다. 또 다른 일부 구현예에서, 스페이서는 GGAG(서열번호 54), GGSG(서열번호 55), 예를 들어, GGAG(서열번호 56), GGSG(서열번호 57), GGAGGGAG(서열번호 58), GGSGGGSG(서열번호 59), GGAGGGAGGGAG(서열번호 60), 및 GGSGGGSGGGSG(서열번호 61)의 모티프를 포함하는 4개 내지 12개 아미노산을 함유할 수 있다. 일부 구현예에서, 스페이서는 GGGGA(서열번호 62) 또는 GGGGS(서열번호 63), 예를 들어, GGGGAGGGGAGGGGA(서열번호 64) 및 GGGGSGGGGSGGGGS(서열번호 65)의 모티프를 함유할 수 있다. 본 발명의 일부 구현예에서, 이종의 단백질 부분(예를 들어, Fc 도메인 단량체, 야생형 Fc 도메인, 아미노산 치환(예를 들어, 이량체화를 감소시키는 하나 이상의 치환)이 있는 Fc 도메인), 알부민-결합 펩티드, 피브로넥틴 도메인, 또는 인간 혈청 알부민)과 가용성 ENPP1 폴리펩티드 사이의 아미노산 스페이서는 GGG, GGGA(서열번호 27), GGGG(서열번호 29), GGGAG(서열번호 66), GGGAGG(서열번호 67), 또는 GGGAGGG(서열번호 68)일 수 있다.

[0198] 일부 구현예에서, 스페이서는 또한 글리신, 알라닌, 및 세린 이외의 아미노산, 예를 들어, LIN(서열번호 69), TGGGG(서열번호 70), AAAL(서열번호 71), AAAK(서열번호 72), AAAR(서열번호 73), EGKSSGSGSESKST(서열번호 74), GSAGSAAGSGEF(서열번호 75), AEAAAKEAAAKA(서열번호 76), KESGSVSSEQLAQFRSLD(서열번호 77), GENLYFQSGG(서열번호 78), SACYCELS(서열번호 79), RSIAT(서열번호 80), RPACKIPNDLKQKVMNH(서열번호 81), GGSAGGSGSGSSGGSSGASGTGTAGGTGSGSGTGSG(서열번호 82), AAANSSIDLISVPVDSR(서열번호 83), GGSGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSGGGS(서열번호 84), NSS(서열번호 87), ESS(서열번호 88), RQQ(서열번호 89), KR(서열번호 90), $(R)_m$; m=0-15(서열번호 91), DSSSEEKFLRRIGRFG(서열번호 92), EEEEEEEPRGDT(서열번호 93), APWHLSSQYSRT(서열번호 94), STLPIPHEFSRE(서열번호 95), VTKHLNQISQSY(서열번호 96), $(E)_m$; m=1-15(서열번호 97), RSGSGGS(서열번호 98), $(D)_m$; m=1-15(서열번호 99), LVIMSLGLGLGLGLRK(서열번호 100), VIMSLGLGLGLGLRK(서열번호 101), IMSLGLGLGLGLRK(서열번호 102), MSLGLGLGLGLRK(서열번호 103), SLGLGLGLGLRK(서열번호 104), LGLGLGLGLRK(서열번호 105), GLGLGLGLRK(서열번호 106), LGLGLGLRK(서열번호 107), GLGLGLRK(서열번호 108), LGLGLRK(서열번호 109), GLGLRK(서열번호 110), LGLRK(서열번호 111), GLRK(서열번호 112), LRK(서열번호 113), RK(서열번호 114), 또는 $(K)_m$; m=1-15 (서열번호 115)를 함유할 수 있다. 일부 구현예에서, 스페이서는 EAAAK(서열번호 85)의 모티프, 예를 들어, 다중 또는 반복 모티프를 함유할 수 있다. 일부 구현예에서, 스페이서는 프랄린(praline)-풍부 서열, 예컨대 X는 임의의 아미노산(예를 들어, A, K, 또는 E)일 수 있고 n은 1 내지 5인 (Xp)n 및 PAPAP(서열번호 86)의 모티프, 예를 들어, 다중 또는 반복 모티프를 함유할 수 있다.

[0199] 사용되는 펩티드 스페이서 및 아미노산의 길이는 관여된 2개의 단백질 및 최종 단백질 융합 폴리펩티드에서 원하는 유연성의 정도에 따라 조정될 수 있다. 스페이서의 길이는 적절한 단백질 접합(folding)을 보장하고 응집체 형성을 피하도록 조정될 수 있다.

[0200] 일부 구현예에서, 융합 단백질(예를 들어, 면역글로불린 Fc 융합 단백질)의 상이한 요소는 원하는 기능성과 일치하는 임의의 방식으로 배열될 수 있다. 예를 들어, 가용성 ENPP1 폴리펩티드 도메인은 이종의 단백질 부분에 대해 C-말단에 놓일 수 있거나, 대안적으로, 이종의 단백질 부분은 가용성 ENPP1 폴리펩티드 도메인에 대해 C-말단에 놓일 수 있다. 가용성 ENPP1 폴리펩티드 도메인 및 이종의 단백질 부분은 융합 단백질 내에서 직접적으로 또는 간접적으로 연결될 수 있거나, 추가적인 도메인 또는 아미노산 서열이 각각의 도메인 또는 도메인 사이에 대해 C- 또는 N-말단에 포함될 수 있다. 바람직한 융합 단백질은 서열번호 3 내지 5 중 임의의 어느 하나에 제시된 아미노산 서열을 포함한다.

[0201] 일부 구현예에서, 본 개시내용의 가용성 ENPP1 폴리펩티드는 하나 이상의 이종의 모이어티를 함유한다. 임의로, 가용성 ENPP1 폴리펩티드는 다음으로부터 선택되는 하나 이상의 이종의 모이어티를 포함한다: 글리코실화 아미노산, 페길화(PEGylated) 아미노산, 파네실화(farnesylated) 아미노산, 아세틸화 아미노산, 비오티닐화 아미노산, 지질 모이어티에 접합된 아미노산, 및 유기 유도체화제에 접합된 아미노산. 일부 구현예에서, 본원에 개시된 가용성 ENPP1 폴리펩티드는 추가로 개질된다. 이러한 개질은, 이에 제한되지는 않으나, 아세틸화, 카복실화, 글리코실화, 인산화, 지질화, 및 아실화를 포함한다. 결과적으로, 가용성 ENPP1 폴리펩티드는 비-아미노산 요소, 예컨대 폴리에틸렌 글리콜, 지질, 다당류 또는 단당류, 및 인산염을 함유할 수 있다. 가용성 ENPP1 폴리펩티드의 기능성에 대한 이러한 비-아미노산 요소의 효과는 다른 가용성 ENPP1 폴리펩티드에 대해 본원에 기재된 바와 같이 시험될 수 있다. 개시내용의 폴리펩티드가 폴리펩티드의 초기(nascent) 형태를 절단함으로써 세포에서 생산될 때, 번역-후 가공(post-translational processing)이 또한 단백질의 올바른 접힘 및/또는 기능에

중요할 수 있다. 상이한 세포(예를 들어, CHO, HeLa, MDCK, 293, WI38, NIH-3T3 또는 HEK293)는 이러한 번역-후 활성을 위한 특이적인 세포 기구(cellular machinery) 및 특징적인 메커니즘을 가지며, 가용성 ENPP1 폴리펩티드의 올바른 개질 및 가공을 보장하도록 선택될 수 있다.

[0202] 본원에서 사용되는 바와 같이, 폴리펩티드 서열과 참조 서열 사이의 백분율 "동일성"은 참조 서열 내의 아미노산 잔기와 동일한 폴리펩티드 서열 내의 아미노산의 백분율로서 정의되며, 필요한 경우에, 서열을 정렬하고 갭(gap)을 도입한 후, 최대 백분율 서열 동일성을 달성한다. 백분율 아미노산 서열 동일성을 결정하려는 목적의 정렬은 당해 분야의 기술 내에 있는 다양한 방식으로, 예를 들어, 공개적으로 이용가능한 컴퓨터 소프트웨어, 예컨대 BLAST, BLAST-2, ALIGN, MEGALIGN(DNASTAR), CLUSTALW, 또는 CLUSTAL OMEGA 소프트웨어를 사용하여 달성될 수 있다. 일부 구현예에서, 정렬은 CLUSTAL OMEGA 소프트웨어를 사용하여 수행된다. 당업자는 비교되는 서열의 전장에 걸쳐 최대의 정렬을 달성하는 데 필요한 임의의 알고리즘을 포함하여, 서열을 정렬하기 위한 적절한 매개변수를 결정할 수 있다.

[0203] **6. 용해도 결정**

[0204] 일부 구현예에서, 가용성 ENPP1 폴리펩티드의 활성은 또한 세포-기반 또는 *생체내* 검정에서 시험될 수 있다. 예를 들어, 무기 피로인산염(PPi)의 생산에 대한 가용성 ENPP1 폴리펩티드의 효과가 측정될 수 있다. 구체적으로, ENPP1 단백질의 피로포스파타아제/포스포디에스터라아제 도메인은 세포외 뉴클레오티드 3인산염을 가수분해하여 무기 피로인산염(PPi)을 생산하고 일반적으로 가용성이다. 이 활성은 이전에 기재된 바와 같이 pNP-TMP 검정뿐만 아니라 HPLC-기반 ATP 가수분해 검정을 사용하여 측정될 수 있다(문헌 [Saunders et al., 2008, Mol. Cancer Ther. 7(10):3352-62]; [Albright et al., 2015, Nat Comm. 6:10006]). ENPP1 연관 질환, 예컨대 ARHR2에 관여된 유전자의 발현(예를 들어, 골아세포 및 파골세포에서 섬유아세포 성장 인자 23의 전사)에 대한 가용성 ENPP1 폴리펩티드의 효과가 평가될 수 있다. 이것은 필요에 따라 하나 이상의 뉴클레오티드 3인산염 또는 다른 ENPP1 기질의 존재 하에서 수행될 수 있으며, 가용성 ENPP1 폴리펩티드를 생성하도록 세포가 형질감염될 수 있다. 마찬가지로, 가용성 ENPP1 폴리펩티드는 마우스 또는 다른 동물에 투여될 수 있으며, ENPP1 연관 질환에 대한 효과가 당해 분야에서 인식되는 방법을 사용하여 평가될 수 있다.

[0205] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 방법에 따라 사용될 ENPP1 폴리펩티드는 단리된 폴리펩티드이다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 단리된 단백질 또는 폴리펩티드는 이의 자연 환경의 성분으로부터 분리된 것이다. 일부 구현예에서, 개시내용의 폴리펩티드는, 예를 들어, 전기영동(예를 들어, SDS-PAGE, 등전점 전기영동(isoelectric focusing)(IEF), 모세관 전기영동) 또는 크로마토그래피(예를 들어, 이온 교환 또는 역상 HPLC) 분석에 의해 결정되는 바와 같은 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 초과의 순도로 정제된다. 순도의 평가를 위한 방법은 당해 분야에 널리 알려져있다[예를 들어, 문헌 [Flatman et al., 2007, J. Chromatogr. B 848:79-87] 참조]. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 방법에 따라 사용될 가용성 ENPP1 폴리펩티드는 재조합 폴리펩티드이다.

[0206] **7. ENPP1 생산**

[0207] 개시내용의 ENPP1 폴리펩티드는 당해 분야에서-알려진 기술에 의해 생산될 수 있다. 예를 들어, 개시내용의 폴리펩티드는 표준 단백질 화학 기술, 예컨대 문헌 [Bodansky, Principles of Peptide Synthesis, Springer Verlag, Berlin (1993) and Grant G. A. (ed.), Synthetic Peptides: A User's Guide, W. H. Freeman and Company, New York (1992)]에 기재된 바를 사용하여 합성될 수 있다. 더욱이, 자동화 펩티드 합성기가 상업적으로 이용 가능하다(예를 들어, 어드밴스드 켐테크 모델(Advanced ChemTech Model) 396; 밀리겐/바이오서치(Milligen/Biosearch) 9600). 대안적으로, 단편 또는 이의 변이체를 포함하는 개시내용의 폴리펩티드는 당해 분야에서 널리 알려진 바와 같이 다양한 발현 시스템[예를 들어, 이. 콜라이(E. Coli), 중국 햄스터 난소(CHO) 세포, COS 세포, 바큘로바이러스(baculovirus), 효모 피치아(Yeast Pichia)]을 사용하여 재조합적으로 생산될 수 있다. 단백질은 부착 또는 현탁 세포 중 어느 하나에서 생산될 수 있다. 일부 구현예에서, 융합 단백질은 CHO 세포에서 발현된다. 안정된 세포주를 확립하기 위해, ENPP1 작제물을 인코딩하는 핵산 서열이 대규모 단백질 생산에 적절한 벡터 내로 클로닝(cloning)된다. 특정한 구현예에서, 개시내용의 개질된 또는 비개질된 폴리펩티드는, 예를 들어, 프로테아제, 예를 들어, 트립신, 써모리신, 키모트립신, 펩신 또는 쌍을 이루는 염기성 아미노산 전환 효소(paired basic amino acid converting enzyme)(PACE)를 사용함으로써, 재조합적으로 생산된 전-장 ENPP1 폴리펩티드의 소화에 의해 생산될 수 있다. 컴퓨터 분석(상업적으로 이용 가능한 소프트웨어, 예를 들어, 맥벡터(MacVector), 오메가(Omega), 피씨진(PCGene), 몰레큘러 시뮬레이션, 인크.(Molecular Simulation, Inc.))가 단백질분해적 절단 부위를 식별하는 데 사용될 수 있다. 대안적으로, 이러한 폴리펩티드는 화학적 절단(예를 들어, 시아노겐 브로마이드, 하이드록실아민 등)을 사용하여 재조합적으로 생성된 전-장 ENPP1 폴리펩

티드로부터 생산될 수 있다.

[0208] **8. 발현 시스템**

[0209] 박테리아(예를 들어, 이. 콜라이 및 바실러스 서브틸리스(Bacillus subtilis)), 효모(예를 들어, *사카로마이세스 세레비지에*(*Saccharomyces cerevisiae*), *클루이베론마이세스 락티스*(*Kluyveronmyces lactis*) 및 *피치아 파스토리*(*Pichia Pastori*)), 사상진균(filamentous fungi)(예를 들어, *아스페르길러스*(*Aspergillus*)), 식물 세포, 동물 세포 및 곤충 세포를 포함하여, 많은 발현 시스템이 알려져 있으며 ENPP1 융합 단백질의 생산을 위해 사용될 수 있다. 원하는 단백질이 통상적인 방식, 예를 들어, 숙주 염색체 내로 또는 유리 플라스미드 상에 삽입된 코딩 서열로부터 생산될 수 있다.

[0210] 효모는 보통의 방식(예를 들어, 전기천공)의 방식으로 원하는 단백질에 대한 코딩 서열로 형질전환될 수 있다. 전기천공에 의한 효모의 형질전환을 위한 방법은 문헌 [Becker & Guarente, 1990, Methods Enzymol. 194: 182]에 개시되어 있다. 성공적으로 형질전환된 세포, 즉 본 개시내용의 DNA 작제물을 함유하는 세포는 널리-알려진 기술에 의해 식별될 수 있다. 예를 들어, 발현 작제물의 도입으로부터 생성된 세포는 성장하여 ENPP1 폴리펩티드를 생산할 수 있다. 세포는 수확되고 용해될 수 있으며 그들의 DNA 함량이, 방법, 예컨대 문헌 [Southern, 1975, J. Mol. Biol, 98:503] 및/또는 [Berent et al., 1985, Biotech 3:208]에 기재된 것을 사용하여 DNA의 존재에 대해 조사될 수 있다. 대안적으로, 상층액 중 단백질의 존재가 항체를 사용하여 검출될 수 있다.

[0211] 유용한 효모 플라스미드 벡터는 pRS403－406 및 pRS413－416을 포함하며, 일반적으로 스트라타진 클로닝 시스템즈(Stratagene Cloning Systems), 라 호이아(La Jolla), 캘리포니아, 미국 앞에서 가능하다 플라스미드 pRS403, pRS404, pRS405 및 pRS406은 효소 통합 플라스미드(Yeast Integrating plasmid)(Yip)이며 효모 선택 가능한 마커 I-11S3, TRP1, LEU2 및 1JRA3을 통합시킨다. 플라스미드 pRS413－ 416은 효모 동원체 플라스미드(YCp)이다.

[0212] 다양한 방법이 상보적인 점착성의 말단을 통해 벡터에 DNA를 작동 가능하게 연결하기 위해 개발되어 왔다. 예를 들어, 상보적인 단독중합체 트랙(tract)이 벡터 DNA에 삽입될 DNA 세그먼트(segment)에 부가될 수 있다. 그 후에 벡터 및 DNA 세그먼트는 상보적인 단독중합체성 꼬리 사이의 수소 결합에 의해 이어져 재조합 DNA 분자를 형성한다.

[0213] 하나 이상의 제한 부위를 함유하는 합성 링커는 DNA 세그먼트를 벡터에 잇는 대안적인 방법을 제공한다. 엔도뉴클레아제 제한 소화에 의해 생성된 DNA 세그먼트는, 그들의 3'-5'-엑소핵산 절단(exonucleolytic) 활성으로 돌출된(protruding) 3'-단일-가닥 말단을 제거하고, 그들의 중합 활성으로 오목한 3'-말단을 채우는 효소인 박테리오파지 T4 DNA 폴리머라아제 또는 이.콜라이 DNA 폴리머라아제 I로 처리된다.

[0214] 이에 따라 이들 활성의 조합은 비점착성-말단화(blunt-ended) DNA 세그먼트를 생성한다. 그 후에 비점착성-말단화 세그먼트는, 비점착성-말단화 DNA 분자의 결찰(ligation)을 촉매할 수 있는 효소, 예컨대 박테리오파지 T4 DNA 리가아제의 존재 하에서 보다 더 큰 몰 과량의 링커 분자와 함께 인큐베이션된다. 결과적으로, 반응의 산물은 그들의 말단에서 중합체성 링커 서열을 지니는 DNA 세그먼트이다. 이들 DNA 세그먼트는 적절한 제한 효소로 절단되고 DNA 세그먼트의 것과 호환성인 말단을 생산하는 효소로 절단된 발현 벡터에 결찰될 수 있다.

[0215] 그 후에 단일의, 안정하게 형질감염된 세포의 클론이 확립되고 원하는 ENPP1 융합 단백질의 높은 발현 클론에 대해 스크리닝된다. ENPP1 단백질 발현에 대한 단일 세포 클론의 스크리닝은 이전에 기재된 바와 같이 합성 효소적 기질 pNP-TMP를 사용하여 96 웰 플레이트에서 고-효율(high-throughput) 방식으로 달성될 수 있다(문헌 [Albright et al., 2015, Nat. Commun. 6:10006]). 스크리닝을 통한 높은 발현 클론의 식별 시, 단백질 생산은 이전에 문헌 [Albright et al., 2015, Nat. Commun. 6:10006]에 기재된 진탕 플라스크 또는 생물-반응기에서 완수될 수 있다.

[0216] **9. ENPP1 정제**

[0217] ENPP1의 정제는 당해 기술 분야에 알려진 표준 정제 기술의 조합을 사용하여 완수될 수 있다. 정제 다음에, ENPP1-Fc는 Zn^{2+} 및 Mg^{2+}로 보충된 PBS(PBS플러스(plus)) 내로 투석되어 5 내지 7 mg/ml로 농축되고 200 내지 500 pl의 분취량(aliquot)으로 -80℃에서 냉동될 수 있다. 분취량은 사용 직전에 해동될 수 있으며 용액의 고유 활성도(specific activity)는 PBS플러스에서의 희석에 의해 31.25 au/ml(또는 조제(preparation)에 따라 약 0.7 mg/ml)로 조정될 수 있다.

[0218] **10. 투여의 경로 및 빈도**

[0219] 폴리펩티드는 대상체에게 급성으로 또는 만성적으로 투여될 수 있다. 특정한 구현예에서, 본원에 개시된 가용성 ENPP1 폴리펩티드 또는 ENPP1 융합 폴리펩티드의 제2 복용량(dosage)은 약 2일 후, 약 4일 후, 약 1주 후, 또는 약 1개월 후 대상체에게 또는 보다 덜 빈번하게, 예컨대 수개월 마다 1회 또는 심지어 1년에 1회 이하의 적합한 시간 간격 후 투여된다. 용량의 빈도는 당업자에게 용이하게 명백하며, 임의의 수의 요인, 예컨대, 이에 제한되지는 않으나, 치료되는 질환의 유형 및 중증도, 및 환자의 유형 및 연령에 따라 달라진다.

[0220] 용량 양 또는 빈도는, 혈장 PPi의 항정 상태 수준이 일정하거나 변함없는 수준에서 유지되도록, 그리고/또는 정상(2 내지 3 μM) 수준에 가까이 또는 PPi의 정상 수준(보다 30% 내지 50% 높음) 초과인 혈장 PPi의 연속적 수준이 달성되고 대상체가 본원에 개시된 작제물의 제1 복용량의 투여에 앞서 대상체가 가졌던 PPi의 보다 낮은 수준으로 되돌아가지 않도록 선택될 수 있다.

[0221] 대안적으로, ENPP1 제제는 ENPP1의 효소적 활성의 일정한 수준이 달성되도록 2일마다, 또는 4일마다, 매주마다 또는 매월마다의 적절한 시간 간격으로 투여될 수 있다.

[0222] 대안적으로, 개시내용에 따른 ENPP1 제제는 대상체의 질환 또는 장애의 하나 이상의 증상을 모니터링함으로써 2일마다, 또는 4일마다, 또는 매주마다 또는 매월마다의 적절한 시간 간격으로 투여된다.

[0223] 이론에 얽매이지 않고, 혈장 PPi의 항정 상태 농도를 정상 수준에서 유지하는 것은 대상체의 병리적 석회화의 진행을 감소 및/또는 예방하는 것으로 여겨진다.

[0224] 특정한 구현예에서, 폴리펩티드는 국부적으로, 부위적으로, 비경구적으로 또는 전신적으로 대상체에게 투여된다. 일부 구현예에서, 폴리펩티드는 피하로 투여된다.

[0225] 본원에서 사용되는 바와 같이, 제형(formulation)의 "비경구 투여"는 대상체의 조직의 물리적 파괴구 개설(breaching) 및 조직 내 파괴구 개설을 통한 ENPP1 제제의 투여를 특징으로 하는 임의의 투여 경로를 포함한다. 이에 따라 비경구 투여는, 이에 제한되지는 않으나, 조성물의 주사에 의한, 수술적 절개를 통한 조성물의 적용에 의한, 조직-관통 비-수술적 상처를 통한 조성물의 적용 등에 의한 ENPP1 제제의 투여를 포함한다. 특히, 비경구 투여는, 이에 제한되지는 않으나, 피하, 정맥내, 복강내, 근육내, 간내(intrastemal) 주사, 및 신장 투석 주사 기술을 포함하는 것으로 고려된다.

[0226] 투여의 양생법(regimen)은 유효량을 구성하는 것에 영향을 미칠 수 있다. 예를 들어, 여러 가지 분할된 복용량, 뿐만 아니라 시차를 둔 복용량이 주어진 기간(매일)에 또는 순차적으로 투여될 수 있거나, 용량은 연속적으로 주입될 수 있거나, 볼루스(bolus) 주사일 수 있다. 추가로, ENPP1 제제의 언급된 용량의 선택은 치료적 또는 예방적 상황의 긴급성에 의해 나타날 수 있다.

[0227] 본 개시내용의 조성물(예를 들어, 가용성 ENPP1 폴리펩티드 및 이의 융합 단백질)의 환자, 예컨대 포유류(즉, 인간)에게의 투여는 알려진 절차를 사용하여, 환자에서 질환 또는 장애를 치료하기에 효과적인 복용량으로 및 시간 동안 수행될 수 있다. 치료적 효과를 달성하는 데 필요한 ENPP1 제제의 언급된 복용량의 유효량은 요인, 예컨대 이용된 특정한 화합물의 활성; 투여의 시간; 화합물의 배설 속도; 치료의 지속 기간; 화합물과 조합되어 사용되는 기타 약물, 화합물, 또는 재료; 질환 또는 장애의 상태, 연령, 성별, 체중, 상태, 치료받는 환자의 일반적인 건강 및 이전 병력, 및 의학 분야에서 널리-알려진 유사한 요인들에 따라 달라질 수 있다. 복용량 양생법은 최적의 치료적 반응을 제공하도록 조정될 수 있다. 선택된 복용량은 결국 치료적 화합물 곡선의 혈장 시간 하 면적 및 반감기에 따라 달라지는 치료적 화합물의 생물학적 활성에 기반하여 결정된다.

[0228] **11. 예방적 투여**

[0229] 본원의 개시내용을 갖추어, 이에 따라 당업자는 대상체에서의 질환 또는 장애의 예방이 대상체에게 질환 또는 장애에 대한 예방적 조치로서 ENPP1 폴리펩티드를 투여하는 것을 포괄한다는 사실을 인식할 것이다.

[0230] 활성 성분(예를 들어, 가용성 ENPP1 폴리펩티드 및 이의 융합 단백질), 약제학적으로 허용 가능한 담체, 및 본원에 개시된 제형 중의 임의의 추가적인 성분의 상대적 양은 치료되는 대상체의 신원, 크기, 및 상태에 따라, 및 추가로 조성물이 투여될 경로에 따라 달라질 것이다. 예로서, 조성물은 약 0.1% 내지 약 100%(w/w) 활성 성분을 포함할 수 있다.

[0231] **12. ENPP1 폴리펩티드 서열**

[0232] **표 1: 서열**

서열번호	서열	상세한 설명
1	1 MERDGCAGGG SRGGEGGRAP REGPAGNGRD RGRSHAAEAP GDPQAAASLL 51 APMDVGEEPL EKAARARTAK DPNTYKVLSL VLSVCVLTTI LGCIFGLKPS 101 CAKEVKSCKG RCFERTFGNC RCDAACVELG NCCLDYQETC IEPEHIWTCN 151 KFRCGEKRLT RSLCACSDDC KDKGDCCINY SSVCQGEKSW VEEPCESINE 201 PQCPAGFETP PTLLFSLDGF RAEYLHTWGG LLPVISKLKK CGTYTKNMRP 251 VYPTKTFPNH YSIVTGLYPE SHGIIDNKMY DPKMNASFSL KSKEKFNPEW 301 YKGEPIWVTA KYQGLKSGTF FWPGSDVEIN GIFPDIYKMY NGSVPFEERI 351 LAVLQWLQLP KDERPHFYTL YLEEPDSSGH SYGPVSSEVI KALQRVDGMV 401 GMLMDGLKEL NLHRCLNLIL ISDHGMEQGS CKKYIYLNKY LGDVKNIKVI 451 YGPAARLRPS DVPDKYYSFN YEGIARNLSC REPNQHFKPY LKHFLPKRLH 501 FAKSDRIEPL TFYLDPQWQL ALNPSERKYC GSGFHGSDNV FSNMQALFVG 551 YGPGFKHGIE ADTFENIEVY NLMCDLLNLT PAPNNGTHGS LNHLLKNPVY 601 TPKHPKEVHP LVQCPFTRNP RDNLGCSCNP SILPIEDFQT QFNLTVAEEK 651 IIKHETLPYG RPRVLQKENT ICLLSQHQFM SGYSQDILMP LWTSYTVDRN	야생형 ENPP1 전구체 단백질의 가공되지 않은 전체 아미노산 서열

[0233]

	701 DSFSTEDFSN CLYQDFRIPL SPVHKCSFYK NNTKVSYGFL SPPQLNKNSS 751 GIYSEALLTT NIVPMYQSFQ VIWRYFHDTL LRKYAEERNG VNVVSGPVFD 801 FDYDGRCDSL ENLRQKRRVI RNQEILIPTH FFIVLTSCKD TSQTPLHCEN 851 LDTLAFILPH RTDNSESCVH GKHDSSWVEE LLMLHRARIT DVEHITGLSF 901 YQQRKEPVSD ILKLKTHLPT FSQED	
2	1 PSCAKEVKSC KGRCFERTFG NCRCDAACVE LGNCCLDYQE TCIEPEHIWT 51 CNKFRCGEKR LTRSLCACSD DCKDKGDCCI NYSSVCQGEK SWVEEPCESI 101 NEPQCPAGFE TPPTLLFSLD GFRAEYLHTW GGLLPVISKL KKCGTYTKNM 151 RPVYPTKTFP NHYSIVTGLY PESHGIIDNK MYDPKMNASF SLKSKEKFNP 201 EWYKGEPIWV TAKYQGLKSG TFFWPGSDVE INGIFPDIYK MYNGSVPFEE 251 RILAVLQWLQ LPKDERPHFY TLYLEEPDSS GHSYGPVSSE VIKALQRVDG 301 MVGMLMDGLK ELNLHRCLNL ILISDHGMEQ GSCKKYIYLN KYLGDVKNIK 351 VIYGPAARLR PSDVPDKYYS FNYEGIARNL SCREPNQHFK PYLKHFLPKR 401 LHFAKSDRIE PLTFYLDPQW QLALNPSERK YCGSGFHGSD NVFSNMQALF 451 VGYGPGFKHG IEADTFENIE VYNLMCDLLN LTPAPNNGTH GSLNHLLKNP 501 VYTPKHPKEV HPLVQCPFTR NPRDNLGCSC NPSILPIEDF QTQFNLTVAE 551 EKIIKHETLP YGRPRVLQKE NTICLLSQHQ FMSGYSQDIL MPLWTSYTVD 601 RNDSFSTEDF SNCLYQDFRI PLSPVHKCSF YKNNTKVSYG FLSPPQLNKN 651 SSGIYSEALL TTNIVPMYQS FQVIWRYFHD TLLRKYAEER NGVNVVSGPV 701 FDFDYDGRCD SLENLRQKRR VIRNQEILIP THFFIVLTSC KDTSQTPLHC 751 ENLDTLAFIL PHRTDNSESC VHGKHDSSWV EELLMLHRAR ITDVEHITGL 801 SFYQQRKEPV SDILKLKTHL PTFSQED	가공된 (성숙) 세포외 ENPP1 폴리펩티드 서열
3	FTAGLKPSCAKEVKSCKGRCFERTFGNCRCDAACVELGNCCLDYQETCIEPEHIWTCNKF RCGEKRLTRSLCACSDDCKDKGDCCINYSSVCQGEKSWVEEPCESINEPQCPAGFETPPT LLFSLDGFRAEYLHTWGGLLPVISKLKKCGTYTKNMRPVYPTKTFPNHYSIVTGLYPESH GIIDNKMYDPKMNASFSLKSKEKFNPEWYKGEPIWVTAKYQGLKSGTFFWPGSDVEINGI FPDIYKMYNGSVPFEERILAVLQWLQLPKDERPHFYTLYLEEPDSSGHSYGPVSSEVIKA LQRVDGMVGMLMDGLKELNLHRCLNLILISDHGMEQGSCKKYIYLNKYLGDVKNIKVIYG PAARLRPSDVPDKYYSFNYEGIARNLSCREPNQHFKPYLKHFLPKRLHFAKSDRIEPLTF YLDPQWQLALNPSERKYCGSGFHGSDNVFSNMQALFVGYGPGFKHGIEADTFENIEVYNL MCDLLNLTPAPNNGTHGSLNHLLKNPVYTPKHPKEVHPLVQCPFTRNPRDNLGCSCNPSI LPIEDFQTQFNLTVAEEKIIKHETLPYGRPRVLQKENTICLLSQHQFMSGYSQDILMPLW TSYTVDRNDSFSTEDFSNCLYQDFRIPLSPVHKCSFYKNNTKVSYGFLSPPQLNKNSSGI YSEALLTTNIVPMYQSFQVIWRYFHDTLLRKYAEERNGVNVVSGPVFDFDYDGRCDSLEN LRQKRRVIRNQEILIPTHFFIVLTSCKDTSQTPLHCENLDTLAFILPHRTDNSESCVHGK HDSSWVEELLMLHRARITDVEHITGLSFYQQRKEPVSDILKLKTHLPTFSQEDLIN**DKTH** **TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV** **HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR** **EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF** **FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK**	ENPP1-링커-hIgG1 Fc 작제물
4	GLKPSCAKEVKSCKGRCFERTFGNCRCDAACVELGNCCLDYQETCIEPEHIWTCNKFRCG EKRLTRSLCACSDDCKDKGDCCINYSSVCQGEKSWVEEPCESINEPQCPAGFETPPTLLF SLDGFRAEYLHTWGGLLPVISKLKKCGTYTKNMRPVYPTKTFPNHYSIVTGLYPESHGII DNKMYDPKMNASFSLKSKEKFNPEWYKGEPIWVTAKYQGLKSGTFFWPGSDVEINGIFPD IYKMYNGSVPFEERILAVLQWLQLPKDERPHFYTLYLEEPDSSGHSYGPVSSEVIKALQR VDGMVGMLMDGLKELNLHRCLNLILISDHGMEQGSCKKYIYLNKYLGDVKNIKVIYGPAA RLRPSDVPDKYYSFNYEGIARNLSCREPNQHFKPYLKHFLPKRLHFAKSDRIEPLTFYLD PQWQLALNPSERKYCGSGFHGSDNVFSNMQALFVGYGPGFKHGIEADTFENIEVYNLMCD LLNLTPAPNNGTHGSLNHLLKNPVYTPKHPKEVHPLVQCPFTRNPRDNLGCSCNPSILPI EDFQTQFNLTVAEEKIIKHETLPYGRPRVLQKENTICLLSQHQFMSGYSQDILMPLWTSY TVDRNDSFSTEDFSNCLYQDFRIPLSPVHKCSFYKNNTKVSYGFLSPPQLNKNSSGIYSE ALLTTNIVPMYQSFQVIWRYFHDTLLRKYAEERNGVNVVSGPVFDFDYDGRCDSLENLRQ KRRVIRNQEILIPTHFFIVLTSCKDTSQTPLHCENLDTLAFILPHRTDNSESCVHGKHDS SWVEELLMLHRARITDVEHITGLSFYQQRKEPVSDILKLKTHLPTFSQEDLIN**DKTHTCP** **PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA** **KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ** **VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY** **SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK**	ENPP1-링커-hIgG1 Fc 작제물
5	PSCAKEVKSCKGRCFERTFGNCRCDAACVELGNCCLDYQETCIEPEHIWTCNKFRCGEKR LTRSLCACSDDCKDKGDCCINYSSVCQGEKSWVEEPCESINEPQCPAGFETPPTLLFSLD GFRAEYLHTWGGLLPVISKLKKCGTYTKNMRPVYPTKTFPNHYSIVTGLYPESHGIIDNK MYDPKMNASFSLKSKEKFNPEWYKGEPIWVTAKYQGLKSGTFFWPGSDVEINGIFPDIYK MYNGSVPFEERILAVLQWLQLPKDERPHFYTLYLEEPDSSGHSYGPVSSEVIKALQRVDG	ENPP1-링커-hIgG1 Fc 작제물

[0234]

	MVGMLMDGLKELNLHRCLNLILISDHGMEQGSCKKYIYLNKYLGDVKNIKVIYGPAARLR PSDVPDKYYSFNYEGIARNLSCREPNQHFKPYLKHFLPKRLHFAKSDRIEPLTFYLDPQW QLALNPSERKYCGSGFHGSDNVFSNMQALFVGYGPGFKHGIEADTFENIEVYNLMCDLLN LTPAPNNGTHGSLNHLLKNPVYTPKHPKEVHPLVQCPFTRNPRDNLGCSCNPSILPIEDF QTQFNLTVAEEKIIKHETLPYGRPRVLQKENTICLLSQHQFMSGYSQDILMPLWTSYTVD RNDSFSTEDFSNCLYQDFRIPLSPVHKCSFYKNNTKVSYGFLSPPQLNKNSSGIYSEALL TTNIVPMYQSFQVIWRYFHDTLLRKYAEERNGVNVVSGPVFDFDYDGRCDSLENLRQKRR VIRNQEILIPTHFFIVLTSCKDTSQTPLHCENLDTLAFILPHRTDNSESCVHGKHDSSWV EELLMLHRARITDVEHITGLSFYQQRKEPVSDILKLKTHLPTFSQEDLIN**DKTHTCPPCP** **APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK** **PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT** **LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL** **TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK**	
6	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	인간 IgG1 Fc
118	X- PSCAKEVKSCKGRCFERTFGNCRCDAACVELGNCCLDYQETCIEPEHIWTCNKFRCGEKR LTRSLCACSDDCKDKGDCCINYSSVCQGEKSWVEEPCESINEPQCPAGFETPPTLLFSLD GFRAEYLHTWGGLLPVISKLKKCGTYTKNMRPVYPTKTFPNHYSIVTGLYPESHGIIDNK MYDPKMNASFSLKSKEKFNPEWYKGEPIWVTAKYQGLKSGTFFWPGSDVEING**T**FPDIYK MYNGSVPFEERILAVLQWLQLPKDERPHFYTLYLEEPDSSGHSYGPVSSEVIKALQRVDG MVGMLMDGLKELNLHRCLNLILISDHGMEQGSCKKYIYLNKYLGDVKNIKVIYGPAARLR PSDVPDKYYSFNYEGIARNLSCREPNQHFKPYLKHFLPKRLHFAKSDRIEPLTFYLDPQW QLALNPSERKYCGSGFHGSDNVFSNMQALFVGYGPGFKHGIEADTFENIEVYNLMCDLLN LTPAPNNGTHGSLNHLLKNPVYTPKHPKEVHPLVQCPFTRNPRDNLGCSCNPSILPIEDF QTQFNLTVAEEKIIKHETLPYGRPRVLQKENTICLLSQHQFMSGYSQDILMPLWTSYTVD RNDSFSTEDFSNCLYQDFRIPLSPVHKCSFYKNNTKVSYGFLSPPQLNKNSSGIYSEALL TTNIVPMYQSFQVIWRYFHDTLLRKYAEERNGVNVVSGPVFDFDYDGRCDSLENLRQKRR VIRNQEILIPTHFFIVLTSCKDTSQTPLHCENLDTLAFILPHRTDNSESCVHGKHDSSWV EELLMLHRARITDVEHITGLSFYQQRKEPVSDILKLKTHLPTFSQED**RSDKTHTCPPCPA** **PELLGGPSVFLFPPKPKDTLYI*T*REPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP** **REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL** **PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT** **VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK**-Y	BL-1118 (긴 작용성)
119	X- PSCAKEVKSCKGRCFERTFGNCRCDAACVELGNCCLDYQETCIEPEHIWTCNKFRCGEKR LTRSLCACSDDCKDKGDCCINYSSVCQGEKSWVEEPCESINEPQCPAGFETPPTLLFSLD GFRAEYLHTWGGLLPVISKLKKCGTYTKNMRPVYPTKTFPNHYSIVTGLYPESHGIIDNK MYDPKMNASFSLKSKEKFNPEWYKGEPIWVTAKYQGLKSGTFFWPGSDVEINGIFPDIYK MYNGSVPFEERILAVLQWLQLPKDERPHFYTLYLEEPDSSGHSYGPVSSEVIKALQRVDG MVGMLMDGLKELNLHRCLNLILISDHGMEQGSCKKYIYLNKYLGDVKNIKVIYGPAARLR PSDVPDKYYSFNYEGIARNLSCREPNQHFKPYLKHFLPKRLHFAKSDRIEPLTFYLDPQW QLALNPSERKYCGSGFHGSDNVFSNMQALFVGYGPGFKHGIEADTFENIEVYNLMCDLLN LTPAPNNGTHGSLNHLLKNPVYTPKHPKEVHPLVQCPFTRNPRDNLGCSCNPSILPIEDF QTQFNLTVAEEKIIKHETLPYGRPRVLQKENTICLLSQHQFMSGYSQDILMPLWTSYTVD RNDSFSTEDFSNCLYQDFRIPLSPVHKCSFYKNNTKVSYGFLSPPQLNKNSSGIYSEALL TTNIVPMYQSFQVIWRYFHDTLLRKYAEERNGVNVVSGPVFDFDYDGRCDSLENLRQKRR VIRNQEILIPTHFFIVLTSCKDTSQTPLHCENLDTLAFILPHRTDNSESCVHGKHDSSWV EELLMLHRARITDVEHITGLSFYQQRKEPVSDILKLKTHLPTFSQEDRS**DKTHTCPPCPA** **PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP** **REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL** **PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT** **VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK**-Y	BL-782

[0235]

[0236] 서열번호 118 및 119의 경우:

[0237] X= 외수송 서열

[0238] Y= 뼈 표적화 태그 또는 정지 코돈(즉, *로 표시된 아미노산이 없음)

[0239] 뼈 표적화 서열의 비-제한적인 예는, 이에 제한되지는 않으나, DDDDDDDD 및/또는 EEEEEEEE를 포함한다.

[0240] 굵게 표시되지 않고 밑줄이 표시되지 않은 글꼴 = 링커 영역, 이는 다양한 길이 등일 수 있다. 링커의 아미노산 구성은 다양할 수 있다. 특정한 비-제한적인 구현예에서, 링커 영역은 비-특이적 프로테아제 절단을 권장하지 않는 잔기, 예컨대 히스티딘을 포함할 수 있다(즉, RS 또는 RG 대신에 HS 또는 HG).

[0241] 굵은 글꼴 = 인간 IgG1(굵은 이탤릭체로 강조된 M883Y S885T T887E 돌연변이를 이용해 BL-1118에서 최적화됨).

[0242] 밑줄친 글꼴 = 인간 ENPP1의 세포외 도메인(굵게 밑줄쳐 강조된, I256T 치환을 이용해 B1-1118에서 최적화됨)

[0243] **서열번호 7***(마우스 ENPP1- NCBI 수탁 NP_001295256.1)*

```
  1 MERDGDQAGH GPRHGSAGNG RELESPAAAS LLAPMDLGEE PLEKAERARP AKDPNTYKVL
 61 SLVLSVCVLT TILGCIFGLK PSCAKEVKSC KGRCFERTFS NCRCDAACVS LGNCCLDFQE
121 TCVEPTHIWT CNKFRCGEKR LSRFVCSCAD DCKTHNDCCI NYSSVCQDKK SWVEETCESI
181 DTPECPAEFE SPPTLLFSLD GFRAEYLHTW GGLLPVISKL KNCGTYTKNM RPMYPTKTFP
241 NHYSIVTGLY PESHGIIDNK MYDPKMNASF SLKSKEKFNP LWYKGQPIWV TANHQEVKSG
301 TYFWPGSDVE IDGILPDIYK VYNGSVPFEE RILAVLEWLQ LPSHERPHFY TLYLEEPDSS
361 GHSHGPVSSE VIKALQKVDR LVGMLMDGLK DLGLDKCLNL ILISDHGMEQ GSCKKYVYLN
421 KYLGDVNNVK VVYGPAARLR PTDVPETYYS FNYEALAKNL SCREPNQHFR PYLKPFLPKR
481 LHFAKSDRIE PLTFYLDPQW QLALNPSERK YCGSGFHGSD NLFSNMQALF IGYGPAFKHG
541 AEVDSFENIE VYNLMCDLLG LIPAPNNGSH GSLNHLLKKP IYNPSHPKEE GFLSQCPIKS
601 TSNDLGCTCD PWIVPIKDFE KQLNLTTEDV DDIYHMTVPY GRPRILLKQH RVCLLQQQQF
661 LTGYSLDLLM PLWASYTFLS NDQFSRDDFS NCLYQDLRIP LSPVHKCSYY KSNSKLSYGF
721 LTPPRLNRVS NHIYSEALLT SNIVPMYQSF QVIWHYLHDT LLQRYAHERN GINVVSGPVF
781 DFDYDGRYDS LEILKQNSRV IRSQEILIPT HFFIVLTSCK QLSETPLECS ALESSAYILP
841 HRPDNIESCT HGKRESSWVE ELLTLHRARV TDVELITGLS FYQDRQESVS ELLRLKTHLP
901 IFSQED
```

[0244]

[0245] **서열번호 8***(소 ENPP1- NCBI 수탁 NP_001193141.1)*

```
  1 MERDSCAGGG SRGGEGGRGP REGLAGNGRD PGPGRAAEAS GEPQAAASLL APMDLGEEPL
 61 ERAARARPAK DPNTYKVLSL VLSVCVLTTI LGCIFGLKPS CAKEIKSCKG RCFERTFGNC
121 RCDAACVDLG NCCLDYQETC IEPERIWTCT KFRCGEKRLS RSLCSCSDDC KDKGDCCINH
181 GSVCRGEKSW AEEECDSIDE PQCPAGFETP PTLLFSLDGF RAEYLHTWGG LLPVISKLKT
241 CGTYTKNMRP VYPTKTFPNH YSIVTGLYPE SHGIIDNNIY DPQMNANFAL KNKEKFNPEW
301 YKGEPIWLTA KYQGLKTGTF FWPGSDVKIN GIFPDIYKIY NVSVPFEERI LAILKWLQLP
361 KDERPHFYTL YLEEPDSSGH SYGPVSSEVI RALQRVDNMV GMLMDGLKEL NLHRCLNLIL
421 ISDHGMEQGS CKKYVYLNKY LGDTKDYKVV YGPAARLRPS DVPDKYYSFD YEGIAKNLSC
481 QEPNQHFKPY LKHFLPKRLH FAKNDRIERL TFYLDPQWQL ALNPSERKYC GGGFHGSDNT
541 FLNMQALFIG YGPGFKHSTE VDSFENIEVY NLMCDLLNLT PAPNNGTHGS LNHLLSNPVY
601 TPKHPKEVRP LVQCPFTRAP RESLDCSCDP SILPIVDFQT QLNLTMAEEK TIKRGALPYG
661 RPRVLQNSTV CLLYQHQFVS GYSRDILMPL WTSYTIGRND SFSTEDFSNC LYQDLRIPLS
721 PVHKCSFYKN NAKLSYGLLS PPQLHKGSSQ VYSEALLTTN IVPMYQSFQV IWHYLHGTLL
781 QRYAEERNGL NVVSGPVFDS DYDGRYDSLE TLKQNSKIIR NLEVLIPTHF FLVLTSCKNT
841 SQTPLQCENL DAMAFILPHK TDNSESCAHG KHESLWVEEL LKLHTARITD VEHITGLSFY
901 QERKEPISDI LKLKTHLPTF NQED
```

[0246]

[0247] **서열번호 9***(토끼 ENPP1- NCBI 수탁 NP_001162404.1)*

```
  1 MERDGCAGGG SRGGEGGRAP REGPAGNSRD PGRSHAAEAP GNPQAAASLL APMDVGEEPL
 61 EKAARARTAK DPNTYKVLSL VLSVCVLTTI LGCIFGLKPS CAKEVKSCKG RCFERTFGNC
121 RCDAACVELG NCCLDYQETC IEPEHIWTCN KFRCGEKRLT RSLCACSDDC KDQGDCCINY
```

[0248]

```
181 SSVCQGEKSW VEEPCESINE PQCPAGFETP PTLLFSLDGF RAEYLHTWGG LLPVISKLKK
241 CGTYTKNMRP VYPTKTFPNH YSIVTGLYPE SHGIIDNKMY DPKMNASFSL KSKEKFNPEW
301 YKGEPIWVTA KYQGLKSGTF FWPGSDVEIN GIFPDIYKMY NGSVPFEERI LAVLQWLQLP
361 KDERPHFYTL YLEEPDSSGH SYGPVSSEVI KALQRVDNMV GMLMDGLKEL NLHRCLNLIL
421 VSDHGMEQGS CKKYIYLNKY LGDVKNIKVI YGPAARLRPS DVPDKYYSFN YEGIARNLSC
481 REPNQHFKPY LKHFLPKRLH FAKSDRIEPL TFYLDPQWQL ALNPSERKYC GSGFHGSDNI
541 FSNMQALFVG YGPGFKHGIE VDTFENIEVY NLMCDLLNLT PAPNNGTHGS LNHLLKNPVY
601 TPKHPKEVHP LIQCPFTRNP RDNLGCSCNP SILPIEDFQT QFNLTVAEEK NIKHETLPYG
661 RPRVLQKKNT ICLLSQHQFM SGYSQDILMP LWTSYTVDRN DSFSTEDFSN CLYQDFRISL
721 SPVHKCSFYK NNTKVSYGFL SPPQLNKNSR GIYSEALLTT NIVPMYQSFQ VIWRYFHDTL
781 LRKYAEERNG VNVVSGPVFD FDYDGRYDSL EILRQKRRVI RNQEILIPTH FFIVLTSCKD
841 ASQTPLHCEN LDTLAFILPH RTDNSESCLH GKHESSWVEE LLMLHRARIT DVEHITGLSF
901 YQQRKEPVSD ILKLKTHLPT FSQED
```

[0249]

[0250] **서열번호 10***(개코원숭이 ENPP1- NCBI 수탁 NP_001076211.2)*

```
  1 MERDGCAGGG SQGGGKGGRG PREGLAGNGR DPSHGQASEA PGDPQAAASL LAPMDLGEEP
 61 LEKAAGARPA KDPNTYKVLS LVLSVCVLTT ILGCIFGLKP SCAKEVKSCK GRCFERTFGN
121 CRCDVACVDL GNCCLDYQET CIEPERIWTC NKFRCGEKRL SRSLCACSDD CKERGDCCIN
181 YSAVCQGEKS WVEETCENIN EPQCPEGFEM PPTLLFSLDG FRAEYLHTWG GLLPVISKLK
241 KCGTYAKNMR PVYPTKTFPN HYSIVTGLYP ESHGIIDNKM YDPKMNASFS LKSKEKFNPE
301 WYKGEPIWLT AKYQGLRSGT FFWPGSDVKI NGIFPDIYKI YNGSVPFEER ILAILKWLRL
361 PKDERPHFYT LYLEEPDSSG HSYGPVSSEV IKALQRVDNM VGMLMDGLKE LNLHQCLNLI
421 LISDHGMEQG SCKKYIYLNK YLGDTKNIKV IYGPAARLRP SDVPEKYYSF NYENIARNLS
481 CREPNQHFKP YLKHFLPKRL HFAKSDRIEP LTFYLDPQWQ LALSPSERKY CGSGFHGSDN
541 VFSNMQALFV GYGPGFQHGI EVDSFENIEV YNLMCDLLNL TPAPNNGTHG SLNHLLKNPI
601 YTPKHPKEVQ PSVQCPLAGS PRDSLGCSCN PSILPIVDFQ TQFNLTTAEE KNINRASLPY
661 GRPRLLQKKS SVCLLYQHQF VSGYSHDVLM PLWTSYTVNR NDSFSTEDFS NCLYQDLRIS
721 FSPIHNCSFY KNNAKLSYGF LSPPQLSKDS SQIYSEALLT SNIVPMYQSF QVIWRYFHDT
781 LLQRYAEERN SINVVSGPVF DSDYDGRYDS SEALKRNRRV IRNQEILIPT HFFIVITSCK
841 NTSQTPLQCD NLDPLAFILP HRSDNSESCV HEKRESSWIE ELLMMHRARI MDVEHITGLS
901 FYQERKEPVS DILKLKTHLP TVSQED
```

[0251]

[0252] **서열번호 118(작제물 1118 - 가용성 ENPP1-Fc)**

```
MRGPAVLLTVALATLLAPGAGAPSCAKEVKSCKGRCFERTFGNCRCDAACVELGNCCLDYQETCIEPEHIWTCNK
FRCGEKRLTRSLCACSDDCKDKGDCCINYSSVCQGEKSWVEEPCESINEPQCPAGFETPPTLLFSLDGFRAEYLH
TWGGLLPVISKLKKCGTYTKNMRPVYPTKTFPNHYSIVTGLYPESHGIIDNKMYDPKMNASFSLKSKEKFNPEWY
KGEPIWVTAKYQGLKSGTFFWPGSDVEINGTFPDIYKMYNGSVPFEERILAVLQWLQLPKDERPHFYTLYLEEPD
SSGHSYGPVSSEVIKALQRVDGMVGMLMDGLKELNLHRCLNLILISDHGMEQGSCKKYIYLNKYLGDVKNIKVIY
GPAARLRPSDVPDKYYSFNYEGIARNLSCREPNQHFKPYLKHFLPKRLHFAKSDRIEPLTFYLDPQWQLALNPSE
RKYCGSGFHGSDNVFSNMQALFVGYGPGFKHGIEADTFENIEVYNLMCDLLNLTPAPNNGTHGSLNHLLKNPVYT
PKHPKEVHPLVQCPFTRNPRDNLGCSCNPSILPIEDFQTQFNLTVAEEKIIKHETLPYGRPRVLQKENTICLLSQ
HQFMSGYSQDILMPLWTSYTVDRNDSFSTEDFSNCLYQDFRIPLSPVHKCSFYKNNTKVSYGFLSPPQLNKNSSG
IYSEALLTTNIVPMYQSFQVIWRYFHDTLLRKYAEERNGVNVVSGPVFDFDYDGRCDSLENLRQKRRVIRNQEIL
IPTHFFIVLTSCKDTSQTPLHCENLDTLAFILPHRTDNSESCVHGKHDSSWVEELLMLHRARITDVEHITGLSFY
QQRKEPVSDILKLKTHLPTFSQEDRSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHE
DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR
EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ
GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*
```

[0253]

[0254] **서열번호 119(작제물 2000 - 뼈 표적화 ENPP1-Fc)**

```
MRGPAVLLTVALATLLAPGAGAPSCAKEVKSCKGRCFERTFGNCRCDAACVELGNCCLDYQETCIEPEHIWTCNK
FRCGEKRLTRSLCACSDDCKDKGDCCINYSSVCQGEKSWVEEPCESINEPQCPAGFETPPTLLFSLDGFRAEYLH
TWGGLLPVISKLKKCGTYTKNMRPVYPTKTFPNHYSIVTGLYPESHGIIDNKMYDPKMNASFSLKSKEKFNPEWY
KGEPIWVTAKYQGLKSGTFFWPGSDVEINGTFPDIYKMYNGSVPFEERILAVLQWLQLPKDERPHFYTLYLEEPD
SSGHSYGPVSSEVIKALQRVDGMVGMLMDGLKELNLHRCLNLILISDHGMEQGSCKKYIYLNKYLGDVKNIKVIY
GPAARLRPSDVPDKYYSFNYEGIARNLSCREPNQHFKPYLKHFLPKRLHFAKSDRIEPLTFYLDPQWQLALNPSE
RKYCGSGFHGSDNVFSNMQALFVGYGPGFKHGIEADTFENIEVYNLMCDLLNLTPAPNNGTHGSLNHLLKNPVYT
PKHPKEVHPLVQCPFTRNPRDNLGCSCNPSILPIEDFQTQFNLTVAEEKIIKHETLPYGRPRVLQKENTICLLSQ
```

[0255]

```
HQFMSGYSQDILMPLWTSYTVDRNDSFSTEDFSNCLYQDFRIPLSPVHKCSFYKNNTKVSYGFLSPPQLNKNSSG
IYSEALLTTNIVPMYQSFQVIWRYFHDTLLRKYAEERNGVNVVSGPVFDFDYDGRCDSLENLRQKRRVIRNQEIL
IPTHFFIVLTSCKDTSQTPLHCENLDTLAFILPHRTDNSESCVHGKHDSSWVEELLMLHRARITDVEHITGLSFY
QQRKEPVSDILKLKTHLPTFSQEDRSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHE
DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR
EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ
GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKDDDDDDDD*
```

[0256]

[0257] **실험 실시예**

[0258] 개시내용은 다음의 실험 실시예를 참조하여 추가로 상세히 기재된다. 이들 실시예는 단지 예시의 목적으로 제공되며, 달리 그렇다고 명시되지 않는 한 제한하려는 의도가 아니다. 이에 따라, 개시내용은 다음의 실시예에 제한되는 것으로 해석되어서는 안 되며, 오히려 본원에서 제공되는 교시사항의 결과로서 명백해지는 임의의 및 모든 변형을 포괄하는 것으로 해석되어야 한다.

[0259] 추가의 상세한 설명 없이도, 당업자는 전술한 상세한 설명 및 다음의 예시적인 실시예를 사용하여, 본 개시내용의 화합물을 만들고 활용하며 청구된 방법을 실시할 수 있다고 여겨진다. 그러므로 다음의 작업 실시예는 구체적으로 본 개시내용의 바람직한 구현예를 가리키며, 개시내용의 나머지를 어떤 방식으로든 제한하는 것으로 해석되어서는 안된다.

[0260] 다음의 실시예에서 이용된 재료 및 방법이 이제 기재된다.

[0261] **인간 대상체**

[0262] 실험실 데이터, 엑스레이, 컴퓨터 단층촬영(CT), 및 골밀도(bone mineral density)(BMD)를 포함하는 환자의 데이터를 후향적으로 수집하고 ENPP1 돌연변이가 있는 환자의 골격계 및 생화학적 데이터를 보고하였다.

[0263] **돌연변이 분석**

[0264] 유전성 저인산혈 구루병, 골형성부전증(osteogenesis imperfecta)(OI), 및 골다공증-거짓신경아교종 증후군(osteoporosis-pseudoglioma syndrome)(OPPG)와 연관된 유전자의 돌연변이 분석(표 2)을 수행하였으며, 이전에 보고된 바와 같이(문헌 [Fujiki et al., 2018)], 카즈사 DNA 리서치 인스티튜트(Kazusa DNA Research Institute)에서 MiSeq 시퀀싱 시스템(Sequencing System)을 이용한 차세대 서열분석을 활용하였다. 검출된 ENPP1 변이체의 직접적인 서열분석을 이전에 보고된 바와 같이(문헌 [Fujiki et al., 2018)]) 또는 표 2에 나열된 프라이머를 사용함으로써 발단자의 가족 구성원에서 수행하였다. 검출된 변이체의 병원성(pathogenicity)은 가상 환경에서의(in silico) 도구 폴리펜-2(PolyPhen-2), SIFT,및 뮤테이션 테이스터(Mutation Taster)에 의해 평가하였다(문헌 [Adzhubei et al., 2010]; [Kumar et al., 2009]; [Schwarz et al., 2010]).

[0265] **표 2.**

[0266] **본 사례 시리즈에서 시험된 유전자(A) 및 *ENPP1* 유전자의 변이체의 표적화된 서열에 대해 사용된 프라이머(B)**

(A) 본 보고에서 시험된 유전자	유전자
OI 및 OPPG 연관 유전자	*BMP1, COL1A1, COL1A2, CRTAP, FKBP10, IFITM5, P3H1, PPIB, SERPINF1, SERPINH1, SP7, TMEM38B, WNT1, CREB3L1, SPARC, TENT5A, MBTPS2, MESD*
저인산혈 구루병 연관 유전자	*PHEX, FGF23, DMP1, ENPP1, FAM20C, FGFR1, PTH1R, SLC34A3, SLC9A3R1, CLCN5, OCRL, CYP27B1, CYP2R1, VDR, HNRNPC, CYP3A4, NF1, SLC34A1*

(B) *ENPP1* 유전자에서 변이체의 표적 서열에 대해 사용되는 프라이머

변이체	올리고뉴클레오티드 서열	배향	산물 크기
ENPP1 c.536A>G	GGATCATACTCAGGAAGACAGC	정방향	321
	TGGCCAATAGCCATGACTCC	역방향	

OI, 골형성부전증; OPPG, 골다공증-거짓신경아교종 증후군

[0267]

[0268] **상보적인 DNA의 클로닝**

[0269] 환자 3의 사례에서, 역전사 및 중합효소 연쇄 반응(PCR)을 사용하여, 말초 혈액 단핵구 세포로부터의 총 RNA를 ENPP1 cDNA의 합성을 위해 사용하였다. ENPP1 cDNA 및 pT7블루 T-벡터(머크(Merck), 다름슈타트, 독일)를 이. 콜라이 내로의 형질전환 전에 결찰시켰다. 증폭된 벡터를 퀴아프렙 스핀 미니프렙 키트(QIAprep Spin Miniprep kit)(퀴아겐(Qiagen, 레드우드 시티, 캘리포니아, 미국)로 정제하고 두 대립유전자 모두에서 서열분석을 거쳤다.

[0270] **온전한 FGF23의 측정**

[0271] 온전한 FGF23은 제조업자의 프로토콜(미나리스 메디칼(Minaris Medical), 도쿄, 일본)에 따라, 디터미나(Determinar) CL FGF23(CL)에 의해 측정하였다. CL은 항-인간 FGF23 마우스 단클론성 항체를 사용하는 샌드위치 화학발광 효소 면역검정(sandwich chemiluminescent enzyme immunoassay)(CLEIA)이다. 이 방법을 사용하여, FGF23의 참조 범위는 FGF23-관련 저인산혈증에 대한 컷-오프(cut-off) 값이 30 pg/ml인 16.1 내지 49.3 pg/ml였다(문헌 [Ito et al., 2021]; [Kato et al., 2021]).

[0272] **혈장 PPi의 측정**

[0273] 혈장을 참가자로부터 수집하여 혈장 피로인산염(PPi) 농도를 측정하였다. 혈장 단리 후, 혈소판을 제거하기 위

한 원심분리를 통해 30 kDa 막(PALL, 포트 워싱턴, 뉴욕, 미국)을 통해 여과하였고, 단일 사용을 위해, 혈액 수집의 1시간 이내에 -80℃에서 냉동하였다. 혈장 [PPi]의 측정은 이전에 기재된 바와 같은 적게 변형된, ATP 설퓨릴라아제(sulfurylase)를 사용하여 수행하였다(문헌 [Jansen et al., 2013]; [Jansen et al., 2014]). 발광 신호는 실온에서 엔스파이어 멀티모드 플레이트 리더(EnSpire Multimode Plate Reader)(퍼킨엘머(PerkinElmer), 월쌈, 메사추세츠, 미국)에 의해 판독하였다. 최종 혈장 [PPi]는 적절한 대조군에서 [PPi]를 배경 차감(background subtracting)함으로써 정규화하였다. ATP 설퓨릴라아제 방법을 사용한, 건강한 어린이 및 청소년에서 [PPi]의 참조 범위는 최근에 2,360 내지 4,440인 것으로 보고되었다(문헌 [Bernhard et al., 2022]). 이들 값은 건강한 성인에서 이전에 보고된(문헌 [O'Neill et al., 2010]) 앞선 표준 범위와 유사하다.

[0274] **ENPP1에 대한 효소 반응속도 검정**

[0275] 인간 돌연변이를 퀵체인지 II-XL 사이트 디렉티드 뮤타제네시스(Quikchange II-XL Site Directed Mutagenesis)(아질런트 테크놀로지스(Agilent Technologies), 산타클라라, 캘리포니아, 미국)를 사용하여 hENPP1-Fc 작제물 내로 조작하였다. 서열 검증(verification) 후, 작제물을 리포펙타민(Lipofectamine) 2000(써모 피셔 사이언티픽(Thermo Fisher Scientific), 월쌈, 메사추세츠, 미국)을 사용하여 CHO-K1 세포 내로 형질전환시켰다. 형질전환 후 사십-팔 시간에 10 μL의 상층액을 250 mM 트리스(Tris) pH 8.0, 500 mM NaCl, 0.05% 트리톤(Triton) X-100, 및 1 mM 티미딘(Thymidine) 50-1인산염 p-니트로페닐을 함유하는 90 μL의 검정 완충액과 혼합하였다. 색원체 기질(chromogenic substrate)로부터 유리되는 p-니트로페닐기의 속력은 각각의 작제물에 대해 적어도 5회 반복하여 OD 405 nM/min에서의 변화로 보고하였으며, %WT에 대해 정규화하였다.

[0276] **통계적 분석**

[0277] PPi 수준은 평균 ± 표준 편차(SD)로서 제시하였다. WT 및 돌연변이 사이의 ENPP1에 대한 효소 반응속도 검정의 비교는 ANOVA에 의해 분석하였다. 유의성은 $P < 0.05$에서 설정하였다. 데이터 분석은 윈도우(Window)용 그래프패드 프리즘(GraphPad Prism) 버전 6.05(그래프패드 소프트웨어(GraphPad Software), 샌디에이고, 캘리포니아, 미국)를 통해 수행하였다.

[0278] **실시예 1: 환자에서 ENPP1 반가불층분성의 식별**

[0279] 환자 1은 상지 및 하지 골절의 병력이 있는 47세 연령의 남성이었다. 그는 소셜 드링커(social drinker)였으며 20갑-년의 흡연 이력을 가졌다. 그는 요관결석증(ureterolithiasis) 또는 흡수장애(malabsorption) 증후군의 병력이 없었고, 골다공증과 연관된 요법의 이력도 없었으며, 골다공증의 가족력도 없었다. 46세에 그는 척추 압박 골절로 진단된 요통을 겪었고, 또한 허리 통증 후 한 달 만에 시작된 무릎, 손목, 및 발목 통증을 겪었다. 그는 지역 병원에 의뢰되었으며, 요추 및 근위 대퇴골의 이중 에너지 X-선 흡수 측정기(DEXA)는 각각 -3.8 및 -2.6의 T-점수를 나타내었다. 척추의 CT 스캔은 7번 및 11번 흉추에서 압박 골절을 입증하였다(도 1a).

[0280] 뼈 섬광조영술은 늑골에서의 다발성 섭취(multiple uptake)를 나타내었는데, 이는 다발 골절을 암시한다(도 1b). 고관절 및 무릎 관절, 아킬레스건, 또는 척추주위 인대에서는 이소성 골화의 어떤 징후도 검출되지 않았다(도 1c-1h). 환자는 조기-발병 골다공증으로 진단받았으며, 속발성 골다공증 및 골연화증을 배제하기 위한 실험실 검사를 수행하였다. 한 지역 병원에서는 약간 증가된 혈청 알칼리 포스파타아제 및 뼈 알칼리 포스파타아제와 함께 낮은-정상 혈청 인이 검출되었지만, 또 다른 병원에서는 혈청 칼슘, 인, 또는 FGF23의 어떤 이상도 검출되지 않았다(보충 표 1).

[0281] 기타 내분비 기능 시험, 예컨대 갑상선-자극 호르몬, 유리 테스토스테론, 및 코르티솔(아침에 측정됨)은 정상 한계 내에 있었다(보충 표 1). 그러므로 그는 추가의 평가를 위해 도쿄 대학 병원에 의뢰되었으며, 혈액 화학을 재-평가하였다(표 3). 실험실 데이터는 혈청 알부민의 정상적인 수준, 정상적인 교정 칼슘(8.8 mg/dL), 낮은 정상 혈청 인(2.7 mg/dL, 참조 간격 2.7 내지 4.6 mg/dL), 정상 FGF23(28 pg/mL, 참조 간격 16.1 내지 49.3 pg/mL), 및 낮은 25 하이드록시 비타민 D(7.2 ng/mL)를 나타내었다.

[0282] OI 또는 OPPG의 경도의 표현형 진단을 고려하였고, 병원성 변이체의 식별 없이 OI 또는 OPPG와 연관된 유전자의 돌연변이 분석을 수행하였다(표 2). 초기 병원에서 측정된 혈청 분석물(보충 표 1) 및 우리 병원에서의 낮은-정상 혈청 인의 존재를 기반으로, 경도의 저인산혈 구루병 진단을 다음으로 고려하였고, 관련된 유전자의 돌연변이 분석을 수행하여, ENPP1에서의 미스센스 변이체를 밝혀내었다(c.536A>G, p.Asn179Ser[N179S])(표 3). 다음으로 ENPP1에서의 검출된 변이체의 직접적인 서열분석을 18세 연령의 환자의 아들에서 수행하여, 동일한 이형접합 ENPP1 변이체를 밝혀내었다(도 2a). 아들은 낮은-정상 BMD - 요추(-1.6) 및 근위 대퇴골(-0.8)에서 낮은 Z-점수 - 를 나타내었지만, 그는 척추, 고관절 또는 무릎 관절에서, 또는 아킬레스건에서 자연 골절 또는 이소성

골화의 병력이 없었다(도 5a 내지 5g 및 표 3).

[0283] 환자 2는 미만성 특발성 골격뼈 과다증(DISH)으로 진단된 77세 연령의 여성이었으며 그녀가 척추의 압박 골절을 겪었을 때 도쿄 대학 병원에 의뢰되었다. 평가 시, 척추주위 인대에서의 골화 및 다발 척추 압박 골절을 CT에 의해 관찰하였다(도 3a). 더욱이, 약간의 이소성 골화가 아킬레스건에서 검출되었지만(도 3f), 고관절 및 무릎 관절은 온전하였다(도 3b, 3c, 3d, 및 3e). 척추 CT에 의해 검출된 골화는 조직학적으로 평가하지 않았다. 환자의 생화학적 프로파일은 낮은-정상 혈청 인(3.1 mg/dL, 참조 간격 2.7 내지 4.6 mg/dL) 및 높은-정상 FGF23(43.3 pg/mL, 참조 간격 16.1 내지 49.3 pg/mL)을 입증하였다. 척추주위 인대 및 아킬레스건에서의 이소성 골화의 존재로 인해, 유전성 FGF23 관련 저인산혈증(구체적으로, ARHR 또는 XLH)의 진단을 고려하였다. 유전성 저인산혈 구루병과 연관된 유전자의 시험(표 2)은 ENPP1에서의 이형접합 미스센스 변이체의 존재를 밝혀내었다(c.1352A>G, p.Tyr451Cys[Y451C])(표 3).

[0284] 환자 3은 54세 연령의 여성이며 고관절, 무릎 관절, 및 허리에서의 통증의 불편으로 인근 병원을 방문하였다. 그 다음에 그녀는 DISH로 진단된 전/후종 인대(OALL/OPLL)의 골화, 양측 고관절 주변의 골증식체, 양측 아킬레스건의 부착부병증을 나타내었다(도 4a 내지 4i). 실험실 데이터는 높은-정상 혈청 FGF23(38.4 pg/mL, 참조 범위 16.1 내지 49.3 pg/mL)과 함께 낮은-정상 혈청 인산염(2.9 mg/dL)을 나타내었다. 이소성 척추주위 골화의 발견과 결합된 생화학적 프로파일은 FGF23-관련 저인산혈증의 결론으로 이어졌고, 유전적 분석(표 2)은 환자 1 및 2에서의 것과 같은 ENPP1 변이체(c.536A>G 및 c.1352A>G)를 밝혀내었다(표 3). 다음으로 그녀의 아들(19세 및 23세)에서 생거 서열분석을 수행하여, 둘 모두에서 이형접합 ENPP1 변이체 c.1352A>G를 밝혀내었다(도 2c). 유의적으로, 이들 젊은 성인 둘 모두는 척추 또는 엉덩이에서의 이소성 골화의 존재 없이 석회성 아킬레스건 부착부병증을 나타내었다(도 6a-6g 및 7a-7g).

[0285] **보충 표 1. 의뢰 전 사례 1의 생화학적 및 호르몬 데이터**

	RI, 성인	**사례 1**
혈청 칼슘 (mg/dL)	8.8 - 10.1	9.4
혈청 인산염 (mg/dL)	2.7 - 4.6	2.8
eGFR (mL/min/1.73m^2)		
25(OH)D (ng/mL)		< 4.0
1,25(OH)$_2$D (pg/mL)	20 - 60	39.7
ALP (U/L)	38 - 113	152
BAP (μg/L)	3.7 - 20.9	25.6
TRACP-5b (mU/dL)	170 - 590	594
iPTH (pg/mL)	25.8 - 75.7	36
FGF23 (pg/mL)	16.1 - 49.3	28
TSH (μIU/mL)	0.38 - 4.31	2.46
유리 테스토스테론 (pg/mL)	4.7 - 21.6	5.6
코르티솔 (μg/dL)	4.5 - 21.1	6.0

[0286]

[0287] 약어: RI, 참조 구간; eGFR, 추정된 사구체 여과율; 25(OH)D, 25-하이드록시 비타민 D; 1,25(OH)$_2$D, 1,25-디하이드록시 비타민; ALP, 알칼리 포스파타아제; BAP, 뼈 알칼리 포스파타아제; TRACP-5b, 타르트레이트-저항성 산성 포스파타아제 5b; iPTH, 온전한 부갑상선 호르몬; FGF23, 섬유아세포 성장 인자 23; TSH, 갑상선 자극 호르몬.

[0288] **표 3. 단일대립유전자 *ENPP1* 변이체 또는 복합 이형접합 *ENPP1* 변이체, c.536A>G 또는 c.1352A>G가 있는 성인에서의 인구통계, 임상, 및 생화학적 데이터**

[0289]

	RI, 성인	사례 1	사례 1의 아들	사례 2	사례 3	사례 3의 아들 (Ⅲ-2)	사례 3의 아들 (Ⅲ-3)
ENPP1 변이체		c.536A>G, 이형접합	c.536A>G, 이형접합	c.1352A>G 이형접합	c. 536 A>G / c.1352 A>G	c.1352A>G 이형접합	c.1352A>G 이형접합
단백질 변화		p.Asn179Ser	p.Asn179Ser	p.Tyr451Cys	p.Asn179Ser / p.Tyr451Cys	p.Tyr451Cys	p.Tyr451Cys
인구통계 데이터							
연령(세)/성별		48/M	18/M	78/F	54/F	23/M	19/M
키 (cm/SD)		166 / -0.9	177 / 1.2	146 / -0.9	155 / -0.4	167 / -0.4	164 / -2.0
임상 데이터							
이소성 골화							
척추주위 인대		없음	없음	**있음**	**있음**	없음	없음
고관절		없음	없음	없음	**있음**	없음	없음
무릎 관절		없음	없음	없음	없음	없음	없음
아킬레스건		없음	없음	**있음**	**있음**	**있음**	**있음**
BMD(T-점수/Z-점수)							
근위 대퇴골		-2.6 / -2.3	NA / -0.8	-3.5 / -1.3	0.2 / 0.7	NE	NE
요추		-3.8 / -2.6	NA / -1.6	-3.3 / -0/8	3.6 / 2.9	NE	NE
생화학적 데이터							
혈청 칼슘 (mg/dL)	8.8 - 10.1	8.8	9.9	9.6	9.3	9.6	10.0

혈청 인산염 (mg/dL)	2.7 - 4.6	2.7	3.7	3.1	2.9	3.4	3.2		
혈장 PP_i (nM)	2360 - 4440	1646 ± 36	NE	1748 ± 45	1866 ± 82	1585 ± 56	1153 ± 31		
eGFR (mL/min/1.73m^2)		76.8	99	96.4	84.2	84.4	129.1		
25(OH)D (ng/mL)		7.2	18.1	9.5	9.2	15.0	10.1		
1,25$(OH)_2$D (pg/mL)	20 - 60	40	31	26	48.1	68.3	65.9		
BAP (μg/L)	3.7 - 20.9	13.5	13.9	NE	19.1	12.5	26.5		
TRACP-5b (mU/dL)	170 - 590 (M) 120 - 420 (F)	450	308	245	289	228	430		
iPTH (pg/mL)	25.8 - 75.7	35	35	29	106	37.1	21.4		
FGF23 (pg/mL)	16.1 - 49.3	28.0	34.0	43.3	38.4	39.0	43.2		
TPR (%)	>80	93	93	NE	96	97	97		
TmP/GFR (mg/dL)	2.3 - 4.3	2.5	3.6	NE	2.8	3.3	3.1		

[0290]

[0291] 약어: RI, 참조 구간; M, 남성; F, 여성; SD, 표준 편차; BMD: 골밀도; NA, 해당 없음; NE, 조사되지 않음; PPi, 피로인산염; eGFR, 추정된 사구체 여과율; 25(OH)D, 25-하이드록시 비타민 D; 1,25$(OH)_2$D, 1,25-디하이드록시 비타민; BAP, 뼈 알칼리 포스파타아제; TRACP-5b, 타르트레이트-저항성 산성 포스파타아제 5b; iPTH, 온전한 부갑상선 호르몬; FGF23, 섬유아세포 성장 인자 23; TPR, 세뇨관 인산염 재흡수율.

[0292] **실시예 2: 환자에서 ENPP1 반가불층분성의 효과의 특징화**

[0293] ***환자 3에서 ENPP1에 대한 상보적 DNA의 클로닝***

[0294] ENPP1에 대한 상보적인 DNA를 클로닝하고 서열분석하여 2개의 ENPP1 변이체가 같은 대립유전자에 또는 반대 대립유전자에 위치하는지 여부를 평가하였다. 각각의 대립유전자의 서열 데이터는 사례 3이 ENPP1 변이체에 대해 복합 이형접합성을 가짐을 밝혀내었다(도 8).

[0295] ***검출된 ENPP1 변이체에 대한 병원성의 가상 환경에서의 예측***

[0296] 현재 사례에서 검출된 N179S 및 Y451C의 대립유전자 빈도는 게놈 어그레게이션 데이터베이스(Genome Aggregation Database)(지놈AD(GnomAD))에서 각각 0.00010 및 0.00016으로 보고되었다. 그러나, 도호쿠 메디컬 메가뱅크 오거나이제이션(Tohoku Medical Megabank Organization)(톰모(ToMMo))에 의해 구축된, 3552명의 일반

일본인 개인으로부터의 전체-게놈 참조 패널에서는, N179S 및 Y451C의 대립유전자 빈도가 각각 0.0071 및 0.0055인 것으로 보고되었다(표 4). Asn 179는 단백질 이량체화 및 안정성에 중요한 소마토메딘 B 도메인 2(SMB2)에 위치하는 반면, Tyr 451은 촉매 도메인에 있고(도 9), Asn 179 및 Tyr 451 둘 모두는 모든 종에 걸쳐 고도로 보존되어 있다. 방법에서 기재된 가상 환경에서의 도구의 조합은 N179S 및 Y451C 돌연변이를 병원성으로 분류하였다(표 4).

[0297] **표 4. *ENPP1* 변이체, c.536A>G 또는 c.1352A>G의 대립유전자 빈도 및 *가상 환경에서의* 예측**

	대립유전자 빈도		*가상 환경에서의* 예측		
변이체	G놈AD	톰모	폴리펜-2	SIFT	돌연변이테이스터
c.536A>G	0.00010	0.0071	아마도 해로움	해로움	질환 야기
c.1352A>G	0.00016	0.0055	아마도 해로움	해로움	다형성

[0298]

[0299] ***혈장 PPi의 측정***

[0300] 혈장 PPi를 3명의 발단자(사례 1-3) 및 그들의 가족 구성원에서 측정하였다. 이형접합 ENPP1 변이체가 있는 환자는 1,000 내지 2,000 nM의 혈장 PPi 수준을 나타내었으며(표 3), 이중대립유전자 ENPP1 변이체가 있는 환자에서 혈장 PPi는 1,866 nM의 유사한 농도를 나타내었다.

[0301] ***ENPP1에 대한 효소 반응속도 검정***

[0302] ENPP1 촉매 활성에 대한 돌연변이의 효과를 추가로 평가하기 위해, 모든 변이체의 효소 속도를 WT ENPP1 아이소형(isoform)과 비교된 시험관내 검정에서 나란히 평가하였다. N179S 및 Y451C 변형은 WT ENPP1과 비교할 때 ENPP1의 촉매 속도를 각각 55% 및 70% 감소시켰다(도 10). 그러므로 N179S 및 Y451C 변이체는 ACMG 지침에 따라, "병원성의 가능성이 있는" 것으로 분류되었다(N179S: PM1+PP3+PS3, Y451C: PM1+PS3).

[0303] ***선택된 결과***

[0304] 결과는 1차 대상체(환자 1-3)에서 단일대립유전자 ENPP1 결핍증의 2개 사례와 복합 이중대립유전자 이형접합성 ENPP1 결핍증의 1개 사례의 임상적 징후의 존재, 및 이들 대상체의 어린이에서의 ENPP1 반가불충분성의 추가적인 3개 사례를 나타낸다.

[0305] 환자 1은 조기-발병 골다공증을 나타낸 반면, 환자 2는 척추의 뼈과다증 및 DISH의 추정 진단을 나타내었으며 추가적으로 골다공증이 있는 것으로 발견되었다(척추에서의 압박 골절에 의해 입증된 바와 같음, 도 1a-1b 및 3a-3g). 환자 3은 환자 1 및 2에 존재하는 개별적인 돌연변이로 구성된 복합 이형접합 ENPP1 돌연변이를 보유하여 환자는 ENPP1 동형접합 결핍이었으며, 환자는 척추주위 인대에서의 두드러진 골화뿐만 아니라 고관절 주변의 석회화 및 아킬레스건의 양측성 석회화 부착부병증을 나타내었다(도 4a 내지 4i).

[0306] 게다가, 원발성 환자로부터 유전된 단일대립유전자 ENPP1 변이체를 보유한 모든 어린이는 놀라울 정도로 어린 나이에 근골격계 질환, 예컨대 환자 1의 18세 연령의 아들에서 낮은 뼈 질량(요추에서 -1.6의 Z 점수) 및 환자 3의 19세 및 23세 연령의 어린이의 아킬레스건에서 석회성 부착부병증을 나타내었다. 표현형과 유전자형의 구분은 ENPP1 결핍증이 연구에서 기재된 골격계 장애의 발병에서 중심적인 역할을 한다는 개념을 추가로 뒷받침한다.

[0307] 이전에, GACI를 유도하는 동형접합 ENPP1 돌연변이를 보유한 가족에 대한 평가는, 반가불충분성 ENPP1 운반자(carrier)는 증상이 없었지만, 저칼슘혈증 및 저인산혈증의 혈청 생화학을 보유하고 있어, 칼슘 및 인산염 항상성에서 ENPP1의 역할이 있을 수 있음을 시사한다는 사실을 보고하였다(문헌 [Kotwal et al., 2020]). 대조적으로, 오헤임 등(Oheim et al.)은 조기-발병 골다공증을 앓는 성인 남성에서 ENPP1 반가불충분성을을 보고하였는데, 이 표현형은 ENPP1asj/asj로 불리는 ENPP1 동형접합 결핍 마우스에 또한 존재하며(문헌[Oheim et al., 2020]), 이는 ENPP1이 포유류 골 질량을 조절한다는 개념을 뒷받침한다. 실제로, 환자 1 및 그녀의 18세 아들의 골격계 표현형은 조기 발병 골다공증과의 ENPP1 반가불충분성의 연관성을 시사한다.

[0308] 연구는 ENPP1 반가불충분성의 연관성을, DISH를 앓는 환자로 확장한다. DISH는 인대 및 뼈부착부위, 특히 흉추 주변의 골화를 특징으로 하는 전신성 병태이다. DISH를 앓는 환자는 때때로 통증, 감소된 움직임의 범위, 및 척추 골절의 증가된 위험으로 고통받는다(문헌 [Mader et al., 2013]). 병원성 메커니즘은 알려져 있지 않지만, DISH는 노령(50세 이상), 남성, 비만, 고혈압, 및 당뇨병과 연관되어 있다(문헌 [Kuperus et al., 2020]).

[0309] 환자 2의 사례에서, 그녀는 50세 이상의 연령이었지만, DISH에 대한 다른 위험 요인은 부재하였으며 대신에 환자는 ENPP1 반가불충분성인 것으로 발견되었다. 인간 및 마우스에서 임상적 및 전임상적 연구가 동형접합 ENPP1 결핍증을 척추 인대 골화와 관련시켰다는 점을 고려하면(문헌 [Okawa et al., 1998]; [Nakamura et al., 1999]; [Saito et al., 2011]; [Hirao et al., 2016]), 혈장 PPi를 낮추는 것으로 이어지는 손상된 ENPP1 활성이 이 환자에 존재하는 진행성 척추주위 골화 및 석회성 부착부병증에 대한 위험 요인이다.

[0310] 기재된 ENPP1 변이체(N179S 및 Y451C) 둘 모두는 이량체화 및 안정성(Asn 179). 및 촉매 활성(Tyr 451)에 중요한 ENPP1의 영역에 위치된, 고도로 보존된 서열 내에 있다. 더욱이, N179S 및 Y451C는 다수의 가상 환경에서의 도구에 의해 유해한 것으로 발견되었으며(표 4) 현재까지 병원성으로 보고되지 않았다.

[0311] 더욱이, N179S 및 Y451C는 각각 WT 수준과 비교된 55% 및 70%만큼의 효소적 활성을 감소시키는데, 이는 ENPP1의 다른 병원성 변이체에 존재하는 잔여의 효소적 활성과 유사하다(문헌 [Kotwal et al., 2020]; [Oheim et al., 2020]; [Rutsch et al., 2003]; [Stella et al., 2016]; [Thumbigere-Math et al., 2018]). 종합적으로, 이들 발견은 ENPP1 변이체(들) N179S 및/또는 Y451C가 세 명의 발단자에 존재하는 골격계 표현형 및 이소성 골화의 원인이 된다는 발견을 뒷받침한다.

[0312] ENPP1이 근골격계 무기질침착을 조절하는 메커니즘은 아직 완전히 이해되지 않았지만, 즉, 촉매 효과를 통해서든 촉매-독립적인 단백질 신호전달을 통해서든, 환자 1 및 2에 기재된 환자는 둘 모두 낮은 혈장[PPi](기준 범위 2,360 내지 4,440 nM과 함께 각각 1,646 nM 및 1,748 nM)을 나타내었으며, 이는 관찰된 비정상적인 표현형에서 ENPP1 촉매 활성에 대한 역할과 일치한다. ENPP1 및 ABCC6 결핍증 둘 모두는 낮은 혈장 PPi 수준으로 이어진다(문헌 [Lorenz-Depiereux et al., 2010]; [Levy-litan et al., 2010]; [Rutsch et al., 2001]; [Nitschke et al., 2012]; [Le Saux et al., 2000]). ENPP1 반가불충분성 환자에서 혈장 PPi 수준은 ENPP1 결핍증이 없는 환자와 동형접합 ENPP1 결핍 환자의 PPi 수준 사이의 중간이다(문헌 [Kotwal et al., 2020]; [Oheim et al., 2020]). 우리의 환자에서 PPi 수준은 또한 1,000 내지 2,000 nM 범위에 속했지만, 예상하지 못하게, 복합 이형접합 ENPP1 결핍증이 있는 환자 3의 PPi 농도는 반가불충분성 ENPP1 환자와 유사하였는데, 이는 보상 메커니즘의 관여를 시사한다(문헌 [Kotwal et al., 2020]).

[0313] 추가적으로, 속발성 부갑상샘기능항진증(hyperparathyroidism)이 환자 3에서 관찰되었는데, 이 발견은 또한 동형접합 ENPP1 결핍증을 앓는 다른 환자(문헌 [Kotwal et al., 2020], 및 [Capelli et al., 2015]), 및 ENPP1 결핍증의 뮤린 모델에서 발견된다. PTH는 또한 상승된 FGF23 증가로 인해 유발된 다른 장애, 예컨대 FGF23의 작용에 의한 비타민 D의 손상된 활성화로 인해 속발성 부갑상샘기능항진증이 발병한 XLH 및 ARHR을 앓는 인간 및 Hyp 마우스에서도 상승한다(문헌 [Carpenter JBMR, 2011]). 유사한 메커니즘이 비타민 D 결핍인 것으로 나타난 사례 3, 뿐만 아니라 동형접합 ENPP1 결핍증의 다른 사례에서 속발성 부갑상샘기능항진증의 이유를 설명할 수 있다(문헌 [Kotwal et al., 2020]). 환자 3에 기재된 환자는 골연화증을 나타내지 않았으므로, 그러므로 활성 비타민 D 대신 천연 비타민 D를 이용한 치료가 속발성 부갑상샘기능항진증의 악화를 개선 및 예방하는 데 적합할 것이다.

[0314] 연구에 참여한 환자들은 정상적인 온전한 FGF23을 나타내었지만, 그 수준은 그들의 낮은-정상 혈청 인 수치의 맥락에서 상승된 것으로 해석되어, 유전적으로 유도된 인산염 소실 장애의 가능성을 높였다. 이와 관련하여, ARHR2의 원래의 보고서에 기재된 대부분의 환자는 낮은 혈청 인의 맥락에서 높은-정상 또는 약간 상승된 온전한 FGF23을 갖는다. 구루병 환자 3명의 레비-리탄(Levy-Litan)의 상세한 설명에서, 3명 중 2명은 높은-정상 온전한 FGF23(10 내지 50 pg의 정상 기준 범위와 함께 50 pg 및 47 pg)을 가졌고(문헌 [Levy-litan et al., 2010]), 로렌즈-디피에레욱스(Lorenz-Depiereux)에 의해 보고된 ARHR2 환자 7명 중 5명은 반복 측정 시 정상의 상위 범위에 있거나 약간 상승된 온전한 FGF23을 가졌다. 이들 범위는 마찬가지로 낮은 인산염 값 및 환자가 나타내는 중증의 구루병 표현형의 맥락에서 높은 것으로 해석되었다.

[0315] 임의의 이론에 얽매이지 않고, 본 연구는 ENPP1 반가불충분성이 동형접합 ENPP1 결핍증보다 더 큰 FGF23 상승을 유도한다는 사실을 나타내는데, 정상 또는 낮은 정상 혈청 인(2.7 내지 4.6 mg/dL의 참조 범위와 함께 2.7 내지 3.1 mg/dL)의 맥락에서 온전한 FGF23의 정상 및 높은-정상 수준이, 유전적으로 유도된 저인산혈증에 대한 의심을 일으켰으며, 유전자 검사를 개시하였다. 연구는 증가된 순환 FGF23 및 저인산혈증이 희귀한 대사 장애, 예컨대 ARHR, XLH, 및 저인산혈 종양성 석회증(tumoral calcinosis)에서 석회화 부착부병증을 앓는 환자에서(문헌 [Okawa et al., 1998]; [Nakamura et al., 1999]; [Saito et al., 2011]; [Hirao et al., 2016]; [Maulding et al., 2021]; [Rutsch et al., 2001]; [Cheng et al., 2005]; [Albright et al., 2015]), 및 OPLL의 급격한 진행성 형태를 앓는 환자에서의 일반적인 의학 개체군(medical population)(문헌 [Albright et al., 2015;

Ferreira et al., 2021])에서 발생한다는 사실을 나타낸다. 대조적으로, 석회화 부착부병증은 저인산혈 구루병의 FGF23-독립적인 형태, 예컨대 SLC34A3 결핍증과는 연관되어 있지 않다(문헌 [Kotwal et al., 2020]). 이에 따라 FGF23은 부착부병증의 발병과 밀접한 관련이 있는 것으로 보인다.

[0316] ENPP1 결핍 마우스의 전체 뼈에서 수행된 이전의 전사체(transcriptome) 분석은 Enpp1의 불활성화 돌연변이가 Fgf23 전사를 증가시키고 Wnt10b 및 Wnt16 전사를 감소시킴을 보고하였는데(문헌 [Maulding et al., 2021]), 이는 ENPP1 결핍증이 손상된 Wnt 신호전달을 통해 부분적으로 비정상적인 골격계 무기질침착을 유도함을 시사한다. 환자 1은 상승된 FGF23 수준을 동반하는 명시적인 저인산혈 구루병을 나타내지 않았으며, 뼈 흡수 마커인 타르타르산-저항성 산성 포스파타아제 5b(TRACP-5b)는 정상 범위에 있었는데 이는 높은 뼈 교체율(turnover) 없이 골다공증이 발생한다는 사실 - 결함이 있는 Wnt 신호전달에 의해 유도된 동화작용 결함과 일치하는 결과를 뒷받침한다. 그러므로 인간 관찰은 ENPP1 결핍증의 뮤린 모델에서 전사체 분석에 의해 제안된 골다공증 메커니즘과 일치한다(문헌 [Maulding et al., 2021]).

[0317] 최종적으로, 연구에서 기재된 변이체의 대립유전자 빈도의 차이에 주목하는 것이 중요하다. 환자 2에서 검출된 대립유전자(Y451C)의 빈도는 모든 다른 인종(G놈AD:0.00016)보다도 일본인에서 약 30배 더 높다(톰모: 0.0055). 단일대립유전자 ENPP1 Y451C 돌연변이가 OPLL과 연관되어 있다는 관찰을 고려하면, 이 변이체 빈도의 차이는 미국(0.12%) 및 독일(0.1%)에서보다 일본(1.8 내지 4.1%)에서의 OPLL의 10 내지 40배 더 높은 이환율을 설명할 수 있다(문헌 [Stapleton et al., 2011]).

[0318] **실시예 3: ENPP1 융합 단백질의 생성 및 DISH 모델 마우스의 치료**

[0319] **ENPP1 생성**

[0320] ENPP1 융합 단백질의 하나의 예는 ENPP1-Fc이다. 그러나, ENPP1-Fc의 예시는 본원에 제시된 바와 같이 다른 ENNPP1 융합 단백질(예컨대 ENPP1-알부민)에 적용될 수 있다.

[0321] ENPP1-Fc는 IgG1의 Fc 단편(rhENPP1-Fc)과 커플링(coupling)된 인간 ENPP1(가용성 ENPP1)의 세포외 도메인을 함유하는 재조합 융합 단백질이다. ENPP1-Fc 도메인의 재조합 세포외 도메인은 이의 촉매 활성을 함유하며 천연 ENPP1 효소와 동일하다. ENPP1-Fc는 동물-유래 성분을 무함유하는 유가(fed batch) 세포 배양 과정을 통해 CHO 세포에서 생산된 재조합 인간 단백질이다. ENPP1-Fc 이량체의 분자량은 대략 290 kDa이다; ENPP1-Fc는 고도로 글리코실화되며 대략 6.0의 pI를 갖는다. 내인성 ENPP1과 마찬가지로, ENPP1-Fc의 1차 기질은 ATP이며, 이는 AMP와 PPi로 절단된다.

[0322] 구체적인 구현예에서, 가용성 ENPP1 단백질은 링커(류신, 이소류신, 및 아스파라긴을 포함함)를 통해 링커로 인간 Fc 도메인에 융합되었다. 3개의 ENPP1-Fc 작제물이 CHO 세포로부터 정제된 바와 같이 서열번호 3, 4, 및 5로서 표 1에 나타나있다.

[0323] ENPP1-Fc의 정제는, 예를 들어, 임의의 순서로 다음 중 3개 이상을 포함하는 일련의 컬럼 크로마토그래피 단계에 의해 달성할 수 있다: 단백질 A 크로마토그래피, Q 세파로오스(sepharose) 크로마토그래피, 페닐세파로오스 크로마토그래피, 크기 배제 크로마토그래피, 및 양이온 교환 크로마토그래피. 정제는 바이러스 여과 및 완충액 교환으로 완료할 수 있다. 단백질의 정제 다음에, ENPP1-Fc 단백질의 촉매 활성은 색원체 기질로서 pNP-TMP를 사용하여 평가할 수 있다.

[0324] **DISH 모델 마우스의 ENPP1 제제를 이용한 치료**

[0325] 척추 부착부병증(DISH)에 대해 가장 널리-확립된 뮤린 모델은 ttw('*첨족 보행(tip toe walking) 쥐*')로 지칭되는 Enpp1 결핍 마우스이다. ttw 마우스는 중증의 척수증 및 광범위한 척추주위 인대 석회화 및 골증식체 형성을 나타낸다. PPi 부착부병증의 중증도 사이의 관계를 평가하기 위해, 규칙적인 정상 식이(chow diet)가 유지된 23주령 $Enpp1^{asj}$ 마우스에서 아킬레스건을 검사하였다.

[0326] 동물에 피하의 밀리그램-이하(sub-milligram) 용량 후 1주일 이상 동안 혈장 [PPi]를 정상화할 수 있는 인간 ENPP1-Fc 또는 비히클(PBS) 중 어느 하나를 투약하였다. ENPP1-Fc의 투여, 방사선 사진술 분석 및 조직학적 실험을 위한 프로토콜은 문헌 [Ferreira et al., Musculoskeletal Comorbidities and Quality of Life in ENPP1-Deficient Adults and the Response of Enthesopathy to Enzyme Replacement Therapy in Murine Models. J Bone Miner Res, 2021)]에 약술되어 있다. 임의로 실험은 더 우수한 전달 및 더 높은 효능을 위한 뼈 표적화 도메인을 함유하는 ENPP1 제제(예컨대 이에 제한되지는 않으나, ENPP1-Fc)를 사용하여 반복할 수 있다.

[0327] ENPP1 제제(예컨대 이에 제한되지는 않으나 ENPP1-Fc)는 2주차 내지 23주차에 주당 0.3 mg/kg으로 $Enpp1^{asj}$ 마우스에 투여하며, 투약된 $Enpp1^{asj}$ 마우스에서 혈장 PPi를 측정하였다. PPi는 유의적으로 증가된 것으로 나타나지만, WT 쌍에 비해 완전히 정상화되지는 않았다(각각 1358 vs 2235 nM, 표 6).

[0328] **표 6.**

[0329] **23주령 $Enpp1^{WT}$ 및 투약 및 비투약된 $Enpp1^{asj/\ asj}$ 마우스에서의 혈장 분석물**

패러미터	단위	$Enpp1^{wt}$ + PBS	$ENPP1^{asj}$ + PBS	$Enpp1^{asj}$ + BL-1118
칼슘	mg/dL	6.6 ± 0.5	7.0 ± 0.8	6.9 ± 0.4
인산염	mg/dL	6.4 ± 0.9	5.7 ± 0.5	5.5 ± 0.8
PTH	pg/ml	137 ± 80	229 ± 89	**524 ± 248*(↑)**
FGF23	pg/ml	172 ± 28	**439 ± 215*(↑)**	**614 + 167***(↑)**
PPi	nM	2235±621	**51 ± 22**** (↓)**	**1358 ± 268**(↓)**

[0330]

[0331] 아킬레스건에서의 부착부병증은 조직학적으로 및 맞춤형 MATLAB 소프트웨어를 사용하여 둘 모두에 의해 분석하여 알리자린-적색 염색된 섹션(section)의 현미경 사진에서의 적색 픽셀(pixel)을 정량화한다. 비히클 처리된 $Enpp1^{asj}$ 마우스의 아킬레스건은 힘줄의 길이 전체에 걸쳐 실질적인 석회화를 드러낼 것으로 기대되는 반면, ENPP1-Fc로 치료된 $Enpp1^{asj}$ 마우스에서의 힘줄 석회화는 억제될 것으로 기대된다.

[0332] 이론에 얽매이지 않고, 부착부병증은 혈장 PPi에 의존할 수 있으며, 뼈부착부위는 생물학적 효소, 예컨대 ENPP1 제제, 예컨대 ENPP1-Fc로 혈장 PPi를 상승시킴으로써 예방될 수 있다. 발견은 부착부병증의 완전한 억제가 용량 상승 시 달성될 수 있음을 나타낸다.

[0333] **DISH 모델 마우스에 대한 PPi의 효과**

[0334] DISH의 뮤린 모델에서의 골증식체 형성, 척추 융합, 및 골화에 대한 혈장 PPi의 효과를 평가하기 위해, $Enpp1^{asj}$ 마우스에 비히클 또는 1 mg/kg ENPP1-Fc로 3주차 내지 17주차에 투약하고 그들의 척추를 마이크로-CT에 의해 분석한다. 도 12: ENPP1-Fc로 투약된 마우스는 WT 수준을 수배 넘는 더 높은 혈장 PPi 수준(~10 μm)을 나타낸다.

[0335] ENPP1 제제, 예컨대 ENPP1-Fc로 치료된 DISH의 뮤린 모델에서의 척추주위 골화의 감소 및 상승된 혈장 PPi의 존재는 DISH를 앓는 인간 대상체에게의 이러한 ENPP1 투여가 또한 척추주위 골증식체, 관절강직, 및 척추 융합을 약화시킬 것임을 나타낼 것이다.

[0336] **실시예 4: 치료 프로토콜**

[0337] ENPP1 제제(예컨대, 이에 제한되지는 않으나, ENPP1, ENPP1-X, ENPP1-Fc, 및/또는 ENPP1-Fc-X, 여기서 X는 본원의 다른 곳에 기재된 바와 같은 뼈 표적화 태그임)는 다음의 선택된 용량 중 하나로 투여된다: 0.2 mg/kg, 0.3 mg/kg, 0.4 mg/kg, 0.5 mg/kg, 0.6 mg/kg, 0.7 mg/kg, 0.8 mg/kg, 0.9 mg/kg, 1.0 mg/kg, 1.1 mg/kg, 1.2 mg/kg, 1.3 mg/kg, 1.4 mg/kg, 1.5 mg/kg, 1.6 mg/kg, 1.7 mg/kg, 1.8 mg/kg, 1.9 mg/kg, 2.0 mg/kg, 2.1 mg/kg, 2.2 mg/kg, 2.3 mg/kg, 2.4 mg/kg, 2.5 mg/kg, 2.6 mg/kg, 2.7 mg/kg, 2.8 mg/kg, 2.9 mg/kg, 3.0 mg/kg, 3.1 mg/kg, 3.2 mg/kg, 3.3 mg/kg, 3.4 mg/kg, 3.5 mg/kg, 3.6 mg/kg, 3.7 mg/kg, 3.8 mg/kg, 3.9 mg/kg, 4.0 mg/kg, 4.1 mg/kg, 4.2 mg/kg, 4.3 mg/kg, 4.4 mg/kg, 4.5 mg/kg, 4.6 mg/kg, 4.7 mg/kg, 4.8 mg/kg, 4.9 mg/kg, 5.0 mg/kg, 5.1 mg/kg, 5.2 mg/kg, 5.3 mg/kg, 5.4 mg/kg, 5.5 mg/kg, 5.6 mg/kg, 5.7 mg/kg, 5.8 mg/kg, 5.9 mg/kg, 6.0 mg/kg, 6.1 mg/kg, 6.2 mg/kg, 6.3 mg/kg, 6.4 mg/kg, 6.5 mg/kg, 6.6 mg/kg, 6.7 mg/kg, 6.8 mg/kg, 6.9 mg/kg, 7.0 mg/kg, 7.1 mg/kg, 7.2 mg/kg, 7.3 mg/kg, 7.4 mg/kg, 7.5 mg/kg, 7.6 mg/kg, 7.7 mg/kg, 7.8 mg/kg, 7.9 mg/kg, 8.0 mg/kg, 8.1 mg/kg, 8.2 mg/kg, 8.3 mg/kg, 8.4 mg/kg, 8.5 mg/kg, 8.6 mg/kg, 8.7 mg/kg, 8.8 mg/kg, 8.9 mg/kg, 9.0 mg/kg, 9.1 mg/kg, 9.2 mg/kg, 9.3 mg/kg, 9.4 mg/kg, 9.5 mg/kg, 9.6 mg/kg, 9.7 mg/kg, 9.8 mg/kg, 9.9 mg/kg, 10.0 mg/kg, 및/또는 이들의 분

율 또는 배수. 투여는 두달마다 적어도 1회 또는 2회, 매달마다 적어도 1회 또는 2회, 매달마다 3회, 주마다 적어도 1회 또는 2회 피하(SC)이다.

[0338] ENPP1 제제의 제1 용량은 1일차에 투여될 수 있다. 8일차에 및 그 후에, ENPP1 제제는 주마다 2회 ENPP1 제제 mg/kg 용량의 선택된 용량으로 대상체에게 투여된다. 용량은 각각의 복용 일에 대략 같은 시간에 투여될 수 있다. 주사의 부위는 교대로 이루어지며, 앞선 2주 내에 임의의 앞선 주사 부위의 2인치 이내에는 부위가 없다.

[0339] ENPP1 제제의 선택된 용량은 0.2 mg/kg, 0.3 mg/kg, 0.4 mg/kg, 0.5 mg/kg, 0.6 mg/kg, 또는 1.8 mg/kg SC 중 하나이다. SC에 의한 ENPP1 제제의 또 다른 선택된 용량은 0.2 mg/kg, 0.3 mg/kg, 0.4 mg/kg, 0.5 mg/kg, 0.6 mg/kg, 0.7 mg/kg, 0.8 mg/kg, 0.9 mg/kg, 1.0 mg/kg, 1.1 mg/kg, 1.2 mg/kg, 1.3 mg/kg, 1.4 mg/kg, 1.5 mg/kg, 1.6 mg/kg, 1.7 mg/kg, 1.8 mg/kg, 1.9 mg/kg, 2.0 mg/kg, 2.1 mg/kg, 2.2 mg/kg, 2.3 mg/kg, 2.4 mg/kg, 2.5 mg/kg, 2.6 mg/kg, 2.7 mg/kg, 2.8 mg/kg, 2.9 mg/kg, 3.0 mg/kg, 3.1 mg/kg, 3.2 mg/kg, 3.3 mg/kg, 3.4 mg/kg, 3.5 mg/kg, 3.6 mg/kg, 3.7 mg/kg, 3.8 mg/kg, 3.9 mg/kg, 4.0 mg/kg, 4.1 mg/kg, 4.2 mg/kg, 4.3 mg/kg, 4.4 mg/kg, 4.5 mg/kg, 4.6 mg/kg, 4.7 mg/kg, 4.8 mg/kg, 4.9 mg/kg, 5.0 mg/kg, 5.1 mg/kg, 5.2 mg/kg, 5.3 mg/kg, 5.4 mg/kg, 5.5 mg/kg, 5.6 mg/kg, 5.7 mg/kg, 5.8 mg/kg, 5.9 mg/kg, 6.0 mg/kg, 6.1 mg/kg, 6.2 mg/kg, 6.3 mg/kg, 6.4 mg/kg, 6.5 mg/kg, 6.6 mg/kg, 6.7 mg/kg, 6.8 mg/kg, 6.9 mg/kg, 7.0 mg/kg, 7.1 mg/kg, 7.2 mg/kg, 7.3 mg/kg, 7.4 mg/kg, 7.5 mg/kg, 7.6 mg/kg, 7.7 mg/kg, 7.8 mg/kg, 7.9 mg/kg, 8.0 mg/kg, 8.1 mg/kg, 8.2 mg/kg, 8.3 mg/kg, 8.4 mg/kg, 8.5 mg/kg, 8.6 mg/kg, 8.7 mg/kg, 8.8 mg/kg, 8.9 mg/kg, 9.0 mg/kg, 9.1 mg/kg, 9.2 mg/kg, 9.3 mg/kg, 9.4 mg/kg, 9.5 mg/kg, 9.6 mg/kg, 9.7 mg/kg, 9.8 mg/kg, 9.9 mg/kg, 10.0 mg/kg, 및/또는 이들의 분율 또는 배수 중 하나이다. ENPP1 제제의 제1 용량은 1일차에 투여될 수 있다. 제1 용량 후, 대상체는 안정성을 모니터링하고 PK 샘플을 수집하기 위해 7일 동안 관찰될 수 있다. 8일차에 및 그 후에, 대상체는 주마다 2회 선택된 용량을 받는다. 선택된 용량에서의 ENPP1 제제의 투여는 전문 의료진에 의해 적절하게 고려되는 대로 계속된다.

[0340] 대상체는 예를 들어, 29일당 각각 1.6 mg, 4.8 mg, 및 14.4 mg의 노출을 초래하는 29일 기간의 경과 동안 0.2 mg/kg, 0.6 mg/kg, 및 1.8 mg/kg의 용량 양에 대해 ENPP1 제제의 8회 용량을 받을 수 있다. 또는 대상체는 전문 의료진에 의해 적절하게 고려되는 대로, 8회 초과 또는 미만의 용량을 받을 수 있다.

[0341] 내인성 ENPP1 효소와 마찬가지로, ENPP1 제제는 ATP를 절단하여 AMP 및 PPi를 생성하고, 그럼으로써 혈장 PPi 수준을 증가시키고 CD73이 신속하게 아데노신으로 전환되는 AMP로 증가시킨다. 내인성 인간 효소의 대체는 내재적 결핍증을 교정하고 개선된 건강, 및 ENPP1 기준 환자, 임상의, 및 간병인 결과와 연관된 임상적 합병증의 완화를 허용하도록 의도된다.

[0342] **실시예 5: ENPP1 반가불충분성을 갖는 환자의 치료**

[0343] ENPP1 제제는 다음과 같이 선택 용량을 사용하여 1일차에서 및 8일차에서 시작하는 주마다 2회의 피하 주사에 의해 ENPP1 반가불충분성을 갖는 것으로 식별된 환자에게 투여된다.

[0344] **표 7.**

[0345]

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

[0346] ENPP1 제제는 전문 의료진에 의해 결정된 기간 동안 주마다 적어도 2회 0.2 mg/kg, 0.6 mg/kg, 또는 1.8 mg/kg SC 중 하나의 선택된 용량으로 투여된다. 효소 대체에 대한 환자의 반응은, 예를 들어, ENPP1 결핍증의 하나 이상의 증상의 감소를 추적함으로써, 및/또는 본원에 제공된 지침을 사용함으로써 전문 의료진의 결정에 따라 적절하게 모니터링된다.

[0347] **실시예 6: DISH로 진단된 환자의 치료**

[0348] DISH는 일반적으로 척추 주위의 힘줄 및 인대의 석회화를 수반한다. 힘줄 및 인대가 한 번 경화되면, 이들 조직의 일부는 뼈로 변할 수 있다. 이것은 대개 조직이 뼈에 연결된 곳에서 발생한다. 결과적으로, 뼈의 가장자리를 따라 발생하는 파생물(outgrowth)인 뼈의 골극이 발생한다. DISH는 일반적으로 흉추 및 경추로 알려진 허리 및 목의 상부에 영향을 미친다. 그러나, DISH는 또한 어깨, 팔꿈치, 손, 무릎, 엉덩이, 발뒤꿈치, 및/또는 발목에도 영향을 미칠 수 있다.

[0349] 특정한 구현예에서, DISH로 진단된 대상체는 전문 의료진에 의해 결정된 기간 동안 주마다 적어도 2회 0.2 mg/kg, 0.6 mg/kg, 또는 1.8 mg/kg SC, IV, 및/또는 IP 중 하나의 선택된 용량으로 투여되는 ENPP1 제제로 치료된다.

[0350] 특정한 구현예에서, DISH로 진단된 대상체는 전문 의료진에 의해 결정된 기간 동안 주마다 적어도 2회 0.2 mg/kg, 0.3 mg/kg, 0.4 mg/kg, 0.5 mg/kg, 0.6 mg/kg, 0.7 mg/kg, 0.8 mg/kg, 0.9 mg/kg, 1.0 mg/kg, 1.1 mg/kg, 1.2 mg/kg, 1.3 mg/kg, 1.4 mg/kg, 1.5 mg/kg, 1.6 mg/kg, 1.7 mg/kg, 1.8 mg/kg, 1.9 mg/kg, 2.0 mg/kg, 2.1 mg/kg, 2.2 mg/kg, 2.3 mg/kg, 2.4 mg/kg, 2.5 mg/kg, 2.6 mg/kg, 2.7 mg/kg, 2.8 mg/kg, 2.9 mg/kg, 3.0 mg/kg, 3.1 mg/kg, 3.2 mg/kg, 3.3 mg/kg, 3.4 mg/kg, 3.5 mg/kg, 3.6 mg/kg, 3.7 mg/kg, 3.8 mg/kg, 3.9 mg/kg, 4.0 mg/kg, 4.1 mg/kg, 4.2 mg/kg, 4.3 mg/kg, 4.4 mg/kg, 4.5 mg/kg, 4.6 mg/kg, 4.7 mg/kg, 4.8 mg/kg, 4.9 mg/kg, 5.0 mg/kg, 5.1 mg/kg, 5.2 mg/kg, 5.3 mg/kg, 5.4 mg/kg, 5.5 mg/kg, 5.6 mg/kg, 5.7 mg/kg, 5.8 mg/kg, 5.9 mg/kg, 6.0 mg/kg, 6.1 mg/kg, 6.2 mg/kg, 6.3 mg/kg, 6.4 mg/kg, 6.5 mg/kg, 6.6 mg/kg, 6.7 mg/kg, 6.8 mg/kg, 6.9 mg/kg, 7.0 mg/kg, 7.1 mg/kg, 7.2 mg/kg, 7.3 mg/kg, 7.4 mg/kg, 7.5 mg/kg, 7.6 mg/kg, 7.7 mg/kg, 7.8 mg/kg, 7.9 mg/kg, 8.0 mg/kg, 8.1 mg/kg, 8.2 mg/kg, 8.3 mg/kg, 8.4 mg/kg, 8.5 mg/kg, 8.6 mg/kg, 8.7 mg/kg, 8.8 mg/kg, 8.9 mg/kg, 9.0 mg/kg, 9.1 mg/kg, 9.2 mg/kg, 9.3 mg/kg, 9.4 mg/kg, 9.5 mg/kg, 9.6 mg/kg, 9.7 mg/kg, 9.8 mg/kg, 9.9 mg/kg, 10.0 mg/kg, 및/또는 이들의 분율 또는 배수, SC, IV, 및/또는 IP 중 하나의 선택된 용량으로 투여되는 ENPP1 제제로 치료된다.

[0351] 효소 대체에 대한 DISH 환자의 반응은, 예를 들어, DISH의 하나 이상의 증상의 감소를 추적함으로써, 본원에 제공된 지침을 사용하여 전문 의료진의 결정에 따라 적절하게 모니터링된다.

[0352] 대안적으로, DISH에 걸릴 위험이 있다고 의심되는 대상체는 선택된 용량의 ENPP1 제제의 투여에 의해 ENPP1 제제로 치료된다. 특정한 구현예에서, DISH의 발병에 대한 공통적인 위험 요인은 이에 제한되지는 않으나, 큰 허리 둘레, BMI/비만, 고인슐린혈증, 당뇨병, 고요산혈증, 이상지질혈증, 고혈압, 심장 동맥 질환 및/또는 통풍을 포함한다. DISH는 증상이 없을 수 있으며, 이러한 사례에서는 일반적으로 방사선 영상에 기반하여 진단이 이루어진다. 특정한 구현예에서, DISH는 노령(50세 이상 연령), 남성, 비만, 고혈압, 및/또는 당뇨병과 연관되어 있다.

[0353] 대안적으로, DISH의 방사선 사진술 증거가 있지만 질환의 임상적 징후는 결여된 대상체는 DISH와 연관된 알려진 표현형인 증가된 척추 골절, 감소된 이동성, 척수병, 및/또는 통증을 예방하거나 최소화하기 위해 ENPP1 제제로 치료될 수 있다.

[0354] 전체 명세서의 맥락에서, 다음의 실시예는 치료 프로토콜 및 효능을 결정하기 위한 지침을 제공한다.

[0355] **실시예 7: 뼈 건강과 연관된 바이오마커**

[0356] 낮은 혈장 PPi에 더하여, ENPP1 결핍 환자는 생화학적으로 낮은 혈청 인산염, 높은 소변 인산염, 낮은 신장 TmP/GFR, 정상 칼슘(Ca), 낮은-정상 소변 Ca, 정상 25-하이드록시 비타민 D(25 OH D), 낮은-정상 1,25(OH)2D, 높은 BAP, 높은 온전한 FGF23, 및 정상 및/또는 상승된 PTH(IOF 2019)를 특징으로 한다.

[0357] 특정한 구현예에서 치료된 환자의 뼈 건강의 추가적인 결정요인으로서 사용할 수 있는 바이오마커는 표 8에 제시되어 있다.

[0358] **표 8. 임상적 중간체 및 바이오마커**

	실험실	시료 유형
1차 효력시험 (Primary Pharmacodynamic) 마커	피로인산염 (PPi)	혈장 또는 혈청
	무기 인산염	혈장 또는 혈청
	FGF23 (온전한)	혈장 또는 혈청
	TmP/GFR	혈청 크레아티닌, 혈청 인산염, 소변 인산염
	ALP, BALP, CTx, P1NP	혈청, 혈장, 소변

[0359]

[0360] **실시예 8: ENPP1 제제를 이용한 치료의 효능**

[0361] 치료 효능은 혈장 PPi를 측정함으로써 뿐만 아니라 다른 혈장 분석물, 예컨대 FGF23, Pi, FGF23, Pi, TmP/GFR, 혈청 알칼리 포스파타아제(ALP), 뼈-특이적 ALP(BALP), 유형 I 콜라겐의 카복시 말단 가교-결합된 텔로펩티드

(CTx), 및/또는 프로콜라겐 유형 1 N-말단 프로펩티드(P1NP)를 측정함으로써 평가할 수 있다. 이들 분석물 측정은 ENPP1 제제에 대한 효능을 결정하기 위한, ENPP1 결핍증과 연관된 PD 마커로서 사용할 수 있다. 이들 분석물의 변화는 치료의 경과 동안 기준선 대비 변화로서 및 시간-의존적 방식으로 기재할 수 있다. PK 및 PD 패러미터의 용량 선형성을 또한 평가할 수 있다.

[0362] 혈장 PPi 수준, FGF23 수준 및 크레아티닌 청소율(clearance)당 소변의 인 배설의 기준선 대비 변화는 대응 차이의 t-검정(t test of paired difference)을 사용하여 분석할 수 있다.

[0363] **실시예 9: 약물 농도 측정**

[0364] 더욱이, 혈액 시료는 혈장 내 ENPP1 제제 농도의 측정 및 그 다음의 제1 용량(즉, 단일 용량) 다음의 및/또는 다중 용량에서/후(즉, 항정-상태)의 PK 패러미터의 결정을 위해 환자로부터 수득할 수 있다.

[0365] **실시예 10: 면역원성(항-약물 항체)**

[0366] 원하는 경우, ENPP1 제제에 대한 면역원성이 항-약물 항체(ADA)를 사용하여 측정될 수 있다. 면역원성 시험은 다층(multi-tiered) 접근법을 활용할 수 있다; DAD가 초기 스크린에서 검출되는 경우, 특이성을 결정하기 위해 확인 시험을 수행할 수 있다. 시료는 또한 특이성 확인(예를 들어, 역가) 및 중화 항체에 대한 검정을 평가하고 추가로 확립하는 데 사용할 수도 있다.

[0367] **실시예 11: 약동학, 약력학, 및 탐색적 바이오마커 분석**

[0368] 약동학적 분석은 PK 집단에서 수행할 수 있으며, ENPP1 제제의 PK 패러미터는 기술 통계를 이용한 처리에 의해 요약할 수 있다. PK 및 PD 패러미터의 용량 선형성을 또한 평가할 수 있다. PK/PD 분석, 면역원성 분석; 및 탐색적 바이오마커 분석을 결정할 수 있다.

[0369] **실시예 12: 효능의 추가적인 결정요인**

[0370] PPi의 정상 수준을 회복하는 것이 ENPP1 제제를 사용한 치료 효능의 주요 지표이지만, 원하는 경우 치료 효능을 결정하는 데 도움을 주기 위해 다른 물리적 측정을 또한 사용할 수 있다. 이들은 다음 중 하나 이상을 포함한다.

[0371] **1. 방사선 촬영 및 영상화**

[0372] a. *골격계 중증도에 대한 엑스레이*. 표준 엑스레이는 구루병 골격 기형을 검출하기 위해 수득될 수 있다. 엑스레이 수득은, 예를 들어, 손목 및 무릎에서 수득할 수 있다.

[0373] *b. DEXA 스캔*. DEXA 스캔을 뼈 밀도의 변화를 평가하는 데 사용할 수 있다.

[0374] *c. 양전자 방출 단층촬영*. 컴퓨터 단층촬영. 기준선 Na18F-PET/HRpQCT(또는 HR-CT)는 기준선에서 및 미래의 중재 평가(interventional assessment)를 위해 동맥 및 기관의 석회화, 및 골격계 이상을 측정하기 위해 ENPP1 제제의 제1 용량의 1개월 이내에 수행되는 전신 스캔일 수 있다. $Na^{18}F$-PET는 뼈 교체율뿐만 아니라 동맥의 미세석회화를 측정한다. 고해상도 정량적 컴퓨터 단층촬영(High-resolution quantitative computed tomography)(HRQCT) 또는 HR-CT는 비-우성 원위 요골 및 경골에서 뼈 미세구조를 결정할 수 있다. 표준 뼈 기하학적 패러미터가 계산된다.

[0375] *d. 도플러 심장초음파(Doppler Echocardiogram)*. 기준선 심장초음파는 ENPP1 제제의 제1 용량에 앞선 3일 이내에 수득될 수 있다. 도플러 에코(echo)는 심장 기능[LVEF, 혈류] 심장 및 판막의 석회화, 및 동맥 경직을 측정하는 데 사용할 수 있다.

[0376] *e. 광 간섭 단층촬영(Optical Coherence Tomography)*. 광 간섭 단층촬영은 신생내막(neointimal) 증식을 시각화하는 데 사용할 수 있다.

[0377] *f. 말초 동맥 압력계(Peripheral Arterial Tonometry)*. 말초 동맥 압력계(PAT)는 디지털 용적 변화에 해당하는 디지털 맥파 진폭(pulse wave amplitude)(PWA)을 평가하는 데 사용할 수 있다.

[0378] *g. 신장 초음파 검사*. 신장 초음파 검사는, 예를 들어, ENPP1 제제의 시작 1주 이내에, 신장 석회화를 측정하는 데 사용할 수 있다.

[0379] *h. 뼈 조직형태학 및 뼈 생검*. 뼈 생검은 기준선 측정으로서 수행할 수 있다. 뼈 생검에 앞선 10일 동안 테트라사이클린을 로딩(loading)하는 것이 바람직하다.

[0380] 2. 보행 능력

[0381] 보행 시험은 심폐 기능, 신경근 기능, 및 근골격계 기능을 결합하여 보행 가능한 환자의 기능적 능력을 측정하기 위한 준최대(submaximal) 운동 측정법으로서 사용할 수 있다. 6분 보행 시험(6 Minute Walk Test)(6MWT)은 원래 미국 흉부 학회(American Thoracic Society)(ATS 2002)에 의해 성인을 대상으로 개발되었으며, 이제는 성인과 소아 집단에서(문헌 [Mylius et al., 2016]), 및 신경근 질환, 예컨대 척수성 근위축(spinal muscular atrophy)(문헌 [Montes et al., 2018]), 뒤시엔느 근육퇴행위축(Duchenne muscular dystrophy)(문헌 [McDonald et al., 2013]), 및 영아-발병 폼페병(infantile-onset Pompe)(문헌 [van der Meijden et al., 2018])을 앓는 어린이와 함께 일반적으로 사용된다. 2분 보행 시험(2MWT)은 NIH 툴박스(Toolbox)에 포함되어 있으며 같은 특성을 측정하는 데 점점 더 많이 사용되고 있다.

[0382] 6MWT 및 2MWT는 의료서비스 제공자의 재량에 따라 치료 전 및 치료 동안 환자에게 실시할 수 있다. 대상체가 적어도 기준선에서의 2MWT를 완료할 수 없는 경우, 치료 동안 추가적인 평가는 의료서비스 제공자의 재량에 맡겨질 수 있다. 안정 시 심박수는 시험에 앞서 및 시험-이후에 수득된다. 6MWT의 처음 2분 및 전체 6분에 걸은 거리를 기록할 수 있다. 2분 및 6분에 걸은 거리는 연령- 및 성별- 일치된 규범적(normative) 데이터(예측된 값 백분율)와 비교할 수 있다.

[0383] 3. 동력측정법(Dynamometry)

[0384] 근력(strength)은 의료서비스 제공자의 재량에 따라 치료 전 및/또는 치료 동안 동력측정법을 사용하여 평가할 수 있다. 휴대용 동력측정법은 어린이 및 성인 둘 모두에서 일반적으로 사용되는 근력의 직접적인 측정법이다. 평가할 수 있는 근육 군은: 어깨 외전(abduction), 어깨 굴곡(flexion), 팔꿈치 굴곡, 팔꿈치 신전, 엉덩이 외전, 엉덩이 굴곡, 엉덩이 신장 및 무릎 신장을 포함한다. 각각의 근육 군을 양측으로 2회 측정할 수 있다.

[0385] *a. 악력.* 악력은 의료서비스 제공자의 재량에 따라 치료 전 및/또는 치료 동안 악력 동력측정기를 사용하여 측정될 수 있다. 장비 및 평가자 지침(Equipment and assessor instruction)은 현장 전반에 걸쳐 표준화할 수 있다. 쥐는 것은 각각의 손에 대해 취해진 1회의 연습 및 1회의 최대 힘 측정을 통해 양측으로 평가할 수 있으며 결과는 연령 및 성별 일치된 규범적 데이터(이용 가능한 경우)와 비교할 수 있다.

[0386] *b. 움직임의 범위.* 이동성의 범위는 관절의 각도를 시험하고 관절의 움직임의 정도를 측정하는 기구인 지각도계(goniometer)를 사용하여 평가할 수 있다. 지각도계의 고정 아암(arm)은 고정된 신체 세그먼트의 지정된 뼈 경계표(bony landmark)와 정렬되고, 지각도계의 움직이는 아암은 움직이는 사지의 지정된 뼈 경계표와 정렬된다. 지각도계의 받침점은 움직임의 축 및 뼈 경계표를 사용하여 측정된 각각의 움직임에 대해 지정된다. 움직임의 범위는 다음 중 하나 이상에 대해 평가할 수 있다: 어깨 외전, 어깨 굴곡, 팔꿈치 굴곡, 팔꿈치 신전, 엉덩이 외전, 엉덩이 굴곡, 엉덩이 신장, 및 무릎 신장.

[0387] 4. 청력 시험

[0388] 중등도 청력 상실은 ARHR2와 연관되어 있다(문헌 [Brachet et al 2014], [Steichen-Gersdorf et al 2015]). 기준선 청력은 다음 중 하나 이상에 의해 결정할 수 있다: 신체검사 및 이경검사, 임피던스 청력검사(Immittance audiometry)(일반적으로 고실측정이라고 함), 가능한 경우 최대 8 kHz의 주파수를 이용한 순음청력검사(PTA). (>15 dB의 PTA 임계값이 존재하는 경우, 대상체는 골전도 시험을 또한 받아야 함.), 최대 16 kHz의 주파수를 이용한 고주파 청력검사(HFA).

[0389] 5. 임상의 전반적 인상 척도(Clinician Global Impression Scales)

[0390] 임상적 전반적 인상(CGI-S) 척도는 국립 정신건강연구소(National Institute of Mental Health)가 후원하는 임상 연구에서의 사용을 위해 연구 약물의 개시에 앞서 및 후에 환자의 전반적인 기능에 대한 임상의의 견해에 대한 간략하고 독립적인 평가를 제공하기 위해 개발되었다(문헌 [Guy 1976]). CGI는 환자의 병력, 심리사회적 상황, 증상, 행동, 및 증상이 환자의 기능하는 능력에 미치는 영향에 대한 지식을 포함하여, 이용 가능한 모든 정보를 고려하는 전반적인 임상의-결정 요약 척도를 제공한다. CGI-S는 의료서비스 제공자의 재량에 따라 치료 전 및/또는 치료 동안 실시할 수 있으며, -3(중증의 악화)에서 +3(유의적인 개선)의 범위의 7점-척도를 사용하여 변화의 전반적인 평가를 제공한다.

[0391] 6. 대동작 기능 분류 시스템 - 확장 및 개정판(Gross Motor Function Classification System - Expanded and Revised)

[0392] 대동작 기능 분류 시스템 - 확장 및 개정판(GMFCS - E and R)은 의료서비스 제공자의 재량에 따라 치료 전 및/

또는 동안 실시할 수 있다. GMFCS - E and R은 환자-개시 움직임을 1 내지 5의 척도 상에서 이동성을 중심으로 분류한다.

[0393] **7. 환자 보고 결과 측정 정보 시스템**

[0394] 환자 보고 결과 측정 정보 시스템(PROMIS)은 환자 관점에서 신체적, 정신적, 및 사회적 웰빙(well-being)을 평가하기 위해 국립 보건원(NIH)에 의해 개발된 다양한 설문지로 이루어진다(www *dot* healthmeasures *dot* net). 이들 설문지는 만성 건강 병태, 예컨대 X-연관 저인산혈증, 관절염, 다발경화증 및 신경 섬유종증(neurofibromatosis)을 앓고 있는 사람들에서의 임상 연구에서 사용되었다. 각각의 설문지는 8개 내지 10개의 항목을 함유하며 이는 참가자에 의해 1(전혀 그렇지 않음)부터 5(항상)까지의 범위의 5점 리커트(Likert) 척도로 평가된다. 점수는 각각의 설문지에 대해 합산되며, 높은 점수는 측정되는 도메인이 더 많음을 나타낸다(예를 들어, 더 많은 피로, 더 많은 신체 기능). 원점수(Raw score)는 50의 평균과 10의 표준 편차를 기반으로 T-점수로 변환되어, 연구 표본의 일반 모집단과의 비교를 허용한다. PROMIS 척도는 통증 간섭(단문형 8a), 통증 강도(버전 3a), 신체 기능 - 상지(맞춤 단문형), 신체 기능 - 이동성(단문형 13a FACIT 피로), 피로(단문형), 및 인지 영향(단문형 8a)을 포함할 수 있으며 의료서비스 제공자의 재량에 따라 치료 전 및/또는 치료 동안 실시할 수 있다. 평가는 도움 없이 대상체에 의해 완료될 수 있다.

[0395] **8. 간병인 전반적 인상 척도**

[0396] 상태의 간병인 전반적 인상 척도는 의료서비스 제공자의 재량에 따라 치료 전 및/또는 치료 동안 간병인에게 실시할 수 있다. 변화의 간병인 전반적 인상 척도는 -3(중증의 악화)에서 +3(유의적인 개선)의 범위의 7점-척도를 사용하여 변화의 전반적 평가를 제공한다.

[0397] **9. 서부 온타리오 및 맥마스터 대학교(Western Ontario and McMaster University) 골관절염 지수**

[0398] WOMAC은 엉덩이 또는 무릎 통증이 있는 환자의 일상 생활의 활동, 기능적 이동성, 보행, 전반적인 건강, 통증, 및 삶의 질을 평가하는 데 사용되는 환자-보고 결과이다(www *dot* sralab *dot* org). 평가는 24개 항목으로 이루어지며 실시하는 데 대략 12분이 걸린다. WOMAC는 의료서비스 제공자의 재량에 따라 치료 전 및/또는 치료 동안 실시할 수 있다. 평가는 도움 없이 대상체에 의해 완료될 수 있다.

[0399] **실시예 13: 경추 및 청각 표현형에 대한 가용성(작제물 1118, 서열번호 118) 및 뼈 표적화된(작제물 2000, 서열번호 119) ENPP1-Fc의 비교**

[0400] 도 13은 비히클 또는 ENPP1 작제물 #1118 및 #2000의 나타낸 피하 용량으로 매주마다 투약한 17-주령 $Enpp1^{asj}$ 수컷 마우스 및 17-주령 WT에서의 척추주위 골증식체 및 관절강직의 반응을 도시한다. 작제물 #1118은 3주차에 시작하여 주에 1회 투약한 반면, 작제물 #2000은 5주차에 시작하여 주에 1회 투약하였다. 마이크로-CT 이미지는 우선적으로 작제물 #2000 투약 $Enpp1^{asj}$ 수컷 마우스에서 척추주위 골증식체 및 관절강직의 약화를 입증한다.

[0401] 도 14는 비히클 또는 ENPP1 작제물 #1118 및 #2000의 나타낸 피하 용량으로 매주마다 투약한 17-주령 $Enpp1^{asj}$ 암컷 마우스 및 17-주령 WT에서의 척추주위 골증식체 및 관절강직의 반응을 도시한다. 작제물 #1118은 3주차에 시작하여 주에 1회 투약한 반면, 작제물 #2000은 5주차에 시작하여 주에 1회 투약하였다. 마이크로-CT 이미지는 우선적으로 작제물 #2000 투약 $Enpp1^{asj}$ 암컷 마우스에서 척추주위 골증식체 및 관절강직의 약화를 입증한다.

[0402] 도 15a-15b는 비히클 또는 ENPP1 작제물 #1118 및 #2000의 나타낸 피하 용량으로 매주마다 투약한 17-주령 $Enpp1^{asj}$ 마우스 및 17-주령 WT에서의 청각 뇌관의 반응을 도시한다. 작제물 #1118은 3주차에 시작하여 주에 1회 투약한 반면, 작제물 #2000은 5주차에 시작하여 주에 1회 투약하였다. 자극 빈도 측정은 2 mg/Kg ENPP1 작제물 #1118의 주마다의 용량 의한, 및 ENPP1 작제물 #2000의 0.5 및 1 mg/Kg의 주마다의 용량에서 저 주파수(8 kHz) 범위의 청력 손실의 예방을 입증한다. 우선적으로 1 mg/Kg의 주마다의 용량으로 투약한 ENPP1 작제물 #2000에서, ENPP1 결핍 동물의 청력의 개선이 또한 고 주파수(32 kHz) 범위에서도 나타난다.

[0403] 도 16은 비히클 또는 ENPP1 작제물 #1118 및 #2000의 나타낸 피하 용량을 매주마다 이용한 WT 및 17-주령 $ENPP1^{asj}$ 마우스의 온전한 FGF23 수준을 도시한다. 작제물 #1118은 3주차에 시작하여 주에 1회 투약한 반면, 작제물 #2000은 5주차에 시작하여 주에 1회 투약하였다. 데이터는, 우선적으로 ENPP1 작제물 #2000에서, 주당 1 mg/Kg 및 4 mg/Kg으로 투약될 때의 온전한 FGF23의 억제를 입증한다. 통계적 유의성은 ANOVA 크루스칼-왈리스 검정에 이어 던의 사후검정에 의해 평가하여 WT과의 차이를 평가하였다(일원 배치 ANOVA). 통계적 유의성은 다

음과 같은 표기법을 이용하여 p 값으로 표시된다: $^{*}p<0.05$, $^{**}p< 0.01$, $^{***}p < 0.001$, $^{****}p < 0.0001$.

[0404] **참조문헌**

1. Lorenz-Depiereux B, Schnabel D, Tiosano D, et al. Loss-of-Function ENPP1 Mutations Cause Both Generalized Arterial Calcification of Infancy and Autosomal-Recessive Hypophosphatemic Rickets. Am J Hum Genet. 2010;86:267-272.

2. Levy-litan V, Hershkovitz E, Avizov L, et al. Autosomal-Recessive Hypophosphatemic Rickets Is Associated with an Inactivation Mutation in the ENPP1 Gene. Am J Hum Genet. 2010;86:273-278.

3. Goding JW, Grobben B, Slegers H. Physiological and pathophysiological functions of the ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family. Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis. 2003;1638:1-19.

4. Okawa A, Nakamura I, Goto S, et al. Mutation in Npps in a mouse model of ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine. Nat Genet. 1998;19:271-273.

5. Nakamura I, Ikegawa S, Okawa A, et al. Association of the human NPPS gene with ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine (OPLL). Hum Genet. 1999;104:492-497.

[0405]

6. Saito T, Shimizu Y, Hori M, et al. Case Report A patient with hypophosphatemic rickets and ossification of posterior longitudinal ligament caused by a novel homozygous mutation in ENPP1 gene. Bone. 2011;49:913-916.

7. Hirao Y, Chikuda H, Oshima Y, et al. Extensive ossification of the paraspinal ligaments in a patient with vitamin D-resistant rickets: Case report with literature review. Int J Surg Case Rep. 2016;27:125-128.

8. Maulding ND, Kavanagh D, Zimmerman K, et al. Genetic pathways disrupted by ENPP1 deficiency provide insight into mechanisms of osteoporosis, osteomalacia, and paradoxical mineralization. Bone. 2021;142:115656.

9. Rutsch F, Vaingankar S, Johnson K, et al. PC-1 nucleoside triphosphate pyrophosphohydrolase deficiency in idiopathic infantile arterial calcification. Am J Pathol. 2001;158:543-554.

10. Cheng KS, Chen MR, Ruf N, et al. Generalized arterial calcification of infancy: Different clinical courses in two affected siblings. Am J Med Genet. 2005;136 A:210-213.

11. Albright RA, Stabach P, Cao W, et al. ENPP1-Fc prevents mortality and vascular calcifications in rodent model of generalized arterial calcification of infancy. Nat Commun. 2015;6:1-11.

12. Ferreira CR, Kavanagh D, Oheim R, et al. Response of the ENPP1-Deficient Skeletal Phenotype to Oral Phosphate Supplementation and/or Enzyme Replacement Therapy: Comparative Studies in Humans and Mice. J Bone Miner Res. 2021;36:942-955.

13. Ferreira CR, Ansh J, Nester C, et al. Musculoskeletal comorbidities and quality of life in ENPP1-deficient adults and the response of enthesopathy to enzyme replacement therapy in murine models. J Bone Miner Res. 2021. doi: 10.1002/jbmr.4487.

14. Kotwal A, Ferrer A, Kumar R, et al. Clinical and Biochemical Phenotypes in a Family With ENPP1 Mutations. J Bone Miner Res. 2020;35:662-670.

15. Oheim R, Zimmerman K, Maulding ND, et al. Human Heterozygous ENPP1 Deficiency Is Associated With Early Onset Osteoporosis, a Phenotype Recapitulated in a Mouse Model of Enpp1 Deficiency. J Bone Miner Res. 2020;35:528-539.

16. Fujiki R, Ikeda M, Yoshida A, et al. Assessing the Accuracy of Variant Detection in Cost-Effective Gene Panel Testing by Next-Generation Sequencing. J Mol Diagnostics. 2018;20:572-582.

17. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, et al. A method and server for predicting damaging missense mutations. Nat Methods. 2010;7:248-249.

[0406]

18. Kumar P, Henikoff S, Ng PC. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. Nat Protoc. 2009;4:1073-1082.

19. Schwarz JM, Rödelsperger C, Schuelke M, et al. MutationTaster evaluates disease-causing potential of sequence alterations. Nat Methods. 2010;7:575-576.

20. Ito N, Kubota T, Kitanaka S, et al. Clinical performance of a novel chemiluminescent enzyme immunoassay for FGF23. J Bone Miner Metab. 2021. doi:10.1007/s00774-021-01250-1

21. Kato H, Hidaka N, Koga M, et al. Performance evaluation of the new chemiluminescent intact FGF23 assay relative to the existing assay system. J Bone Miner Metab. 2021. doi:10.1007/s00774-021-01258-7

22. Jansen RS, Küçükosmanoğlu A, De Haas M, et al. ABCC6 prevents ectopic mineralization seen in pseudoxanthoma elasticum by inducing cellular nucleotide release. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013;110:20206-20211.

23. Jansen RS, Duijst S, Mahakena S, et al. ABCC6-mediated ATP secretion by the liver is the main source of the mineralization inhibitor inorganic pyrophosphate in the systemic circulation - Brief report. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2014;34:1985-1989.

24. Lek M, Karczewski KJ, Minikel E V., et al. Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. Nature. 2016;536:285-291.

25. Kuriyama S, Yaegashi N, Nagami F, et al. The Tohoku Medical Megabank Project: Design and mission. J Epidemiol. 2016;26:493-511.

26. Richards S, Aziz N, Bale S, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. Genet Med. 2015;17:405-424.

27. Rutsch F, Ruf N, Vaingankar S, et al. Mutations in ENPP1 are associated with "idiopathic" infantile arterial calcification. Nat Genet. 2003;34:379-381.

28. Stella J, Buers I, van de Wetering K, et al. Effects of Different Variants in the ENPP1 Gene on the Functional Properties of Ectonucleotide Pyrophosphatase/Phosphodiesterase Family Member 1. Hum Mutat. 2016;37:1190-1201.

29. Thumbigere-Math V, Alqadi A, Chalmers NI, et al. Hypercementosis Associated with ENPP1 Mutations and GACI. J Dent Res. 2018;97:432-441.

30. Stapleton CJ, Pham MH, Attenello FJ, et al. Ossification of the posterior longitudinal ligament: Genetics and pathophysiology. Neurosurg Focus. 2011;30:9-12.

[0407]

31. Resnick D, Shaul SR, Robins JM. Diffuse idiopathic skeletal hyperostosis (DISH): Forestier's disease with extraspinal manifestations. Radiology. 1975;115:513-524.

32. Mader R, Verlaan JJ, Buskila D. Diffuse idiopathic skeletal hyperostosis: Clinical features and pathogenic mechanisms. Nat Rev Rheumatol. 2013;9:741-750.

33. Kuperus JS, Mohamed Hoesein FAA, de Jong PA, et al. Diffuse idiopathic skeletal hyperostosis: Etiology and clinical relevance. Best Pract Res Clin Rheumatol. 2020;34:101527.

34. Rashdan NA, Rutsch F, Kempf H, et al. New perspectives on rare connective tissue calcifying diseases. Curr Opin Pharmacol. 2016;28:14-23.

35. Whyte MP. Hypophosphatasia: Enzyme Replacement Therapy Brings New Opportunities and New Challenges. J Bone Miner Res. 2017;32:667-675.

36. Nitschke Y, Baujat G, Botschen U, et al. Generalized arterial calcification of infancy and pseudoxanthoma elasticum can be caused by mutations in either ENPP1 or ABCC6. Am J Hum Genet. 2012;90:25-39.

37. Le Saux O, Urban Z, Tschuch C, et al. Mutations in a gene encoding an ABC transporter cause pseudoxanthoma elasticum. Nat Genet. 2000;25:223-227.

38. Kawaguchi Y, Kitajima I, Nakano M, et al. Increase of the Serum FGF-23 in Ossification of the Posterior Longitudinal Ligament. Glob Spine J. 2019;9:492-498.

39. Kato H, Koga M, Kinoshita Y, et al. Incidence of Complications in 25 Adult Patients with X-linked Hypophosphatemia. J Clin Endocrinol Metab. 2021;106:E3682-E3692.

40. Bernhard, E., et al., A Reference Range for Plasma Levels of Inorganic Pyrophosphate in Children Using the ATP Sulfurylase Method. J Clin Endocrinol Metab, 2022. 107(1): p. 109-118.

41. O'Neill, W.C., M.K. Sigrist, and C.W. McIntyre, Plasma pyrophosphate and vascular calcification in chronic kidney disease. Nephrol Dial Transplant, 2010. 25(1): p. 187-91.

42. Capelli, S., et al., Clinical and molecular heterogeneity in a large series of patients with hypophosphatemic rickets. Bone, 2015. 79: p. 143-9.

43. Chalmers, J., Enthesopathy as the presenting feature of X-linked hypophosphatemia. A case report. Acta Orthop Scand, 1993. 64(2): p. 221-3.

44. Hardy, D.C., et al., X-linked hypophosphatemia in adults: prevalence of skeletal radiographic and scintigraphic features. Radiology, 1989. 171(2): p. 403-14.

45. Liang, G., et al., Survey of the enthesopathy of X-linked hypophosphatemia and its characterization in Hyp mice. Calcif Tissue Int, 2009. 85(3): p. 235-46.

[0408]

46. Ramonda, R., et al., [The enthesopathy of vitamin D-resistant osteomalacia in adults]. Reumatismo, 2005. 57(1): p. 52-6.

47. Reid, I.R., et al., X-linked hypophosphatemia: a clinical, biochemical, and histopathologic assessment of morbidity in adults. Medicine (Baltimore), 1989. 68(6): p. 336-52.

48. Ferreira, C.R., et al., Musculoskeletal Comorbidities and Quality of Life in ENPP1-Deficient Adults and the Response of Enthesopathy to Enzyme Replacement Therapy in Murine Models. J Bone Miner Res, 2021.

49. Karaplis, A.C., et al., Mineralizing enthesopathy is a common feature of renal phosphate-wasting disorders attributed to FGF23 and is exacerbated by standard therapy in hyp mice. Endocrinology, 2012. 153(12): p. 5906-17.

50. Gafni, R., et al., SUN-364: Enthesophytes are a common feature of FGF23-mediated hypophosphatemia due to tumor-induced osteomalacia. J Endocrine Soc, 2020. 4-(Supplement 1).

51. Kawaguchi, Y., et al., Serum biomarkers in patients with ossification of the posterior longitudinal ligament (OPLL): Inflammation in OPLL. PLoS One, 2017. 12(5): p. e0174881.

52. Kawaguchi, Y., et al., Increase of the Serum FGF-23 in Ossification of the Posterior Longitudinal Ligament. Global Spine J, 2019. 9(5): p. 492-498.

53. Chen, A., et al., Description of 5 Novel SLC34A3/NPT2c Mutations Causing Hereditary Hypophosphatemic Rickets With Hypercalciuria. Kidney Int Rep, 2019. 4(8): p. 1179-1186.

[0409]

[0410] **실시예 3-12에 대한 추가적인 참조문헌**

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

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

CTFG. Recommendations related to contraception and pregnancy testing in clinical trials. 2014 [19 May 2020]; Available from: http://www.hma.eu/fileadmin/dateien/Human_Medicines/01-About HMA/Working Groups/CTFG/2014 09 HMA CTFG Contraception.pdf.

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

[0411]

Guy W. The Clinical Global Impression Scale. In: Rush Jr AJ, First MB, Blacker D, editors. Handbook of Psychiatric Measures, 2008. Washington, DC: American Psychiatric Publishing, Inc; 1976. p. 90-2.
IOF. Autosomal Recessive Hypophosphatemic Rickets Type 2 (ARHR2). 2019 [19 May 2020]; Available from: https://www.iofbonehealth.org/osteoporosis-musculoskeletal-disorders/skeletal-rare-disorders/autosomal-recessive-hypophosphatemi-0.
Mackenzie NC, Huesa C, Rutsch F, MacRae VE. New insights into NPP1 function: lessons from clinical and animal studies. Bone. 2012 Nov;51(5):961-8.
McDonald CM, Henricson EK, Abresch RT, Florence JM, Eagle M, Gappmaier E, et al. The 6-minute walk test and other endpoints in Duchenne muscular dystrophy: longitudinal natural history observations over 48 weeks from a multicenter study. Muscle Nerve. 2013 Sep;48(3):343-56.
Montes J, McDermott MP, Mirek E, Mazzone ES, Main M, Glanzman AM, et al. Ambulatory function in spinal muscular atrophy: Age-related patterns of progression. PLoS One. 2018;13(6):e0199657.
Moran JJ. Idiopathic arterial calcification of infancy: a clinicopathologic study. Pathol Annu. 1975;10:393-417.
Mylius CF, Paap D, Takken T. Reference value for the 6-minute walk test in children and adolescents: a systematic review. Expert Rev Respir Med. 2016 Dec;10(12):1335-52.
NCI. National Cancer Institute Division of Cancer Treatment and Diagnosis (DCTD), National Cancer Institute (NCI), National Institutes of Health (NIH), Department of Health and Human Services (DHHS). Common Terminology Criteria for Adverse Events V5.0 (CTCAE). Published: November 27, 2017. Available at https://ctep.cancer.gov/protocoldevelopment/electronic_applications/docs/ctcae_v5_quick_reference 8.5x11.pdf. 2017.
Orriss IR, Arnett TR, Russell RG. Pyrophosphate: a key inhibitor of mineralisation. Curr Opin Pharmacol. 2016 Jun;28:57-68.
Rutsch F, Boyer P, Nitschke Y, Ruf N, Lorenz-Depierieux B, Wittkampf T, et al. Hypophosphatemia, hyperphosphaturia, and bisphosphonate treatment are associated with survival beyond infancy in generalized arterial calcification of infancy. Circ Cardiovasc Genet. 2008 Dec;1(2):133-40.

[0412]

[0413] 열거된 구현예

[0414] 다음의 예시적인 구현예가 제공되며, 이의 넘버링은 중요성의 수준을 지정하는 것으로 해석되어서는 안된다.

[0415] 구현예 1: 미만성 특발성 골격뼈 과다증(DISH), 강직척추염, 및/또는 척추관절염의 치료, 개선, 이들의 추가의 발병 및/또는 진행의 예방, 및/또는 이들의 예방을 필요로 하는 환자에서 미만성 특발성 골격뼈 과다증(DISH), 강직척추염, 및/또는 척추관절염을 치료하고/하거나, 개선하고/하거나, 이들의 추가의 발병 및/또는 진행을 예방하고/하거나, 이들을 예방하는 방법으로서, 상기 방법은 환자에게 치료적으로 유효량의 화학식 (I)의 화합물, 또는 이의 염 또는 용매화물을 투여하고:

[0416] PROTEIN-Z-DOMAIN-X-Y

[0417] (I),

[0418] 상기 식 (I)에서:

[0419] PROTEIN은 ENPP1의 촉매 영역을 포함하고;

[0420] DOMAIN은 부재하거나, 인간 IgG Fc 도메인(Fc), 인간 혈청 알부민 단백질(ALB), 및 이의 단편으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 적어도 하나이고;

[0421] X 및 Z는 독립적으로 부재하거나, 1개 내지 20개 아미노산을 포함하는 폴리펩티드이며,

[0422] Y는 음으로 하전된 뼈-표적화 서열이다;

[0423] 그럼으로써 환자에서 DISH, 강직척추염, 및/또는 척추관절염을 치료하고/하거나, 개선하고/하거나, 이들의 추가의 발병 및/또는 진행을 예방하고/하거나, 이들을 예방하는 단계를 포함하는, 방법.

[0424] 구현예 2: 구현예 1에 있어서, 환자는 ENPP1 반가불충분성을 갖는, 방법.

[0425] 구현예 3: 구현예 1에 있어서, 환자는 ENPP1 반가불충분성을 갖지 않는, 방법.

[0426] 구현예 4: 구현예 1 내지 3 중 어느 하나에 있어서, 환자는 ENPP1 결핍이 아닌, 방법.

[0427] 구현예 5: 구현예 1 내지 3 중 어느 하나에 있어서, 환자는 ENPP1 결핍인, 방법.

[0428] 구현예 6: 구현예 1 내지 5 중 어느 하나에 있어서, 환자는 경구, 에어로졸, 흡입, 직장, 질, 경피, 피하, 비강내, 협측, 설하, 비경구, 척추강내, 위내, 안구, 폐, 및 국소로 이루어지는 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 경로에 의해 화합물이 투여되는, 방법.

[0429] 구현예 7: 구현예 1 내지 6 중 어느 하나에 있어서, 화합물은 환자에게 정맥내로 또는 피하로 투여되는, 방법.

[0430] 구현예 8: 구현예 1 내지 7 중 어느 하나에 있어서, 환자에게 화합물을 투여하는 것은, 환자의 세포외 피로인산염 농도를 증가시키거나, 이의 추가의 감소를 예방하는, 방법.

[0431] 구현예 9: 구현예 1 내지 8 중 어느 하나에 있어서, 환자에게 화합물을 투여하는 것은, 환자에서 아킬레스건의 석회화, 척추 석회화, 고관절 석회화, 및 양측성 석회화 중 하나 이상을 감소시키거나, 이들의 추가의 증가를 예방하는, 방법.

[0432] 구현예 10: 구현예 1 내지 9 중 어느 하나에 있어서, DOMAIN은 알부민을 포함하는, 방법.

[0433] 구현예 11: 구현예 1 내지 10 중 어느 하나에 있어서, DOMAIN은 IgG Fc 도메인을 포함하는, 방법.

[0434] 구현예 12: 구현예 1 내지 11 중 어느 하나에 있어서, PROTEIN은 ENPP1 막관통 도메인이 결여된, 방법.

[0435] 구현예 13: 구현예 1 내지 12 중 어느 하나에 있어서, 화합물은 적어도 하나의 약제학적으로 허용 가능한 담체를 추가로 포함하는 약제학적 조성물로서 환자에게 투여되는, 방법.

[0436] 구현예 14: 구현예 1 내지 13 중 어느 하나에 있어서, 환자는 포유류인, 방법.

[0437] 구현예 15: 구현예 14에 있어서, 포유류는 인간인, 방법.

[0438] 구현예 16: 구현예 1 내지 15 중 어느 하나에 있어서, PROTEIN은 서열번호 1의 아미노산 잔기 99번(PSCAKE) 내지 925번(QED)을 포함하는, 방법.

[0439] 구현예 17: 구현예 1 내지 16 중 어느 하나에 있어서, PROTEIN은 서열번호 3의 아미노산 잔기 1번 내지 833번을 포함하는, 방법.

[0440] 구현예 18: 구현예 1 내지 16 중 어느 하나에 있어서, PROTEIN은 서열번호 2에 제시된 아미노산 잔기를 포함하는, 방법.

[0441] 구현예 19: 구현예 1 내지 16 중 어느 하나에 있어서, PROTEIN은 서열번호 3 또는 4 또는 5에 제시된 아미노산 서열을 포함하는, 방법.

[0442] 구현예 20: 구현예 1 내지 19 중 어느 하나에 있어서, DOMAIN은 DOMAIN이 결여된 화합물의 순환 반감기에 비해 화합물의 순환 반감기를 증가시키는, 방법.

[0443] 구현예 21: 구현예 1 내지 20 중 어느 하나에 있어서, 환자는 또한 조기 발병 골다공증, 골감소증, 연령 관련 골감소증, OPLL, 유전성 저인산혈 구루병, X-연관 저인산혈증, 상염색체 열성 저인산혈 구루병 2형, 상염색체 우성 저인산혈 구루병, 및 저인산혈 구루병으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 질환 또는 병태로 진단된, 방법.

[0444] 구현예 22: 구현예 1 내지 20 중 어느 하나에 있어서, 환자는 조기 발병 골다공증, 골감소증, 연령 관련 골감소증, OPLL, 유전성 저인산혈 구루병, X-연관 저인산혈증, 상염색체 열성 저인산혈 구루병 2형, 상염색체 우성 저인산혈 구루병, 및 저인산혈 구루병으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 질환 또는 병태로 진단되지 않은, 방

법.

[0445] 구현예 23: 구현예 1 내지 22 중 어느 하나에 있어서, 환자는 조기 발병 골다공증, 골감소증, 연령 관련 골감소증, OPLL, 유전성 저인산혈 구루병, X-연관 저인산혈증, 상염색체 열성 저인산혈 구루병 2형, 상염색체 우성 저인산혈 구루병, 및 저인산혈 구루병으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 질환 또는 병태를 갖는, 방법.

[0446] 구현예 22: 구현예 1 내지 22 중 어느 하나에 있어서, 환자는 조기 발병 골다공증, 골감소증, 연령 관련 골감소증, OPLL, 유전성 저인산혈 구루병, X-연관 저인산혈증, 상염색체 열성 저인산혈 구루병 2형, 상염색체 우성 저인산혈 구루병, 및 저인산혈 구루병으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 질환 또는 병태를 갖지 않는, 방법.

[0447] 참조에 의한 통합

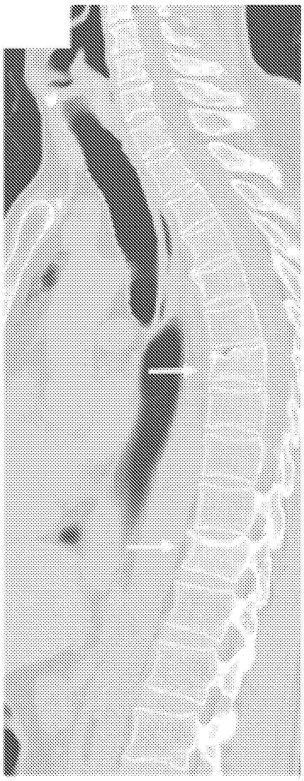
[0448] 본원에서 언급된 모든 간행물 및 특허는, 각각의 개별적인 간행물 또는 특허가 참조로 통합되도록 구체적이고 개별적으로 나타난 것처럼 이로써 그들의 전문이 참조로 통합된다.

[0449] 기타 구현예

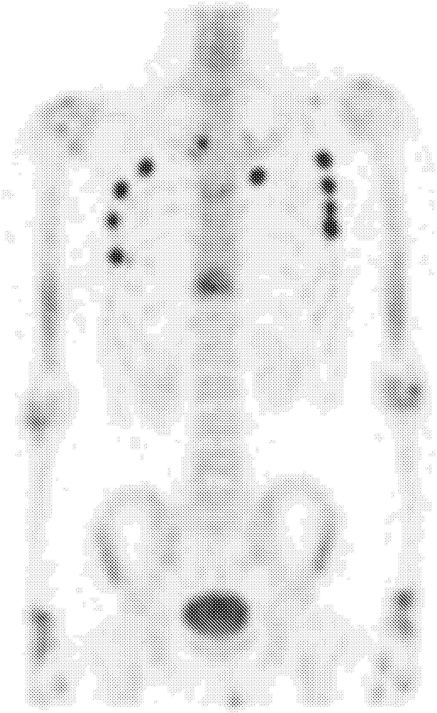
[0450] 주제의 구체적인 실시예가 논의되었지만, 상기의 명세서는 예시적이며 제한적이지 않다. 본 명세서 및 하기의 청구범위의 검토 시 당업자에게 많은 변형이 명백해질 것이다. 본 발명의 전체 범주는 그들의 등가물의 전체 범주와 함께 청구범위를, 및 그러한 변형과 함께 명세서를 참조하여 결정되어야 한다.

도면

도면1ab

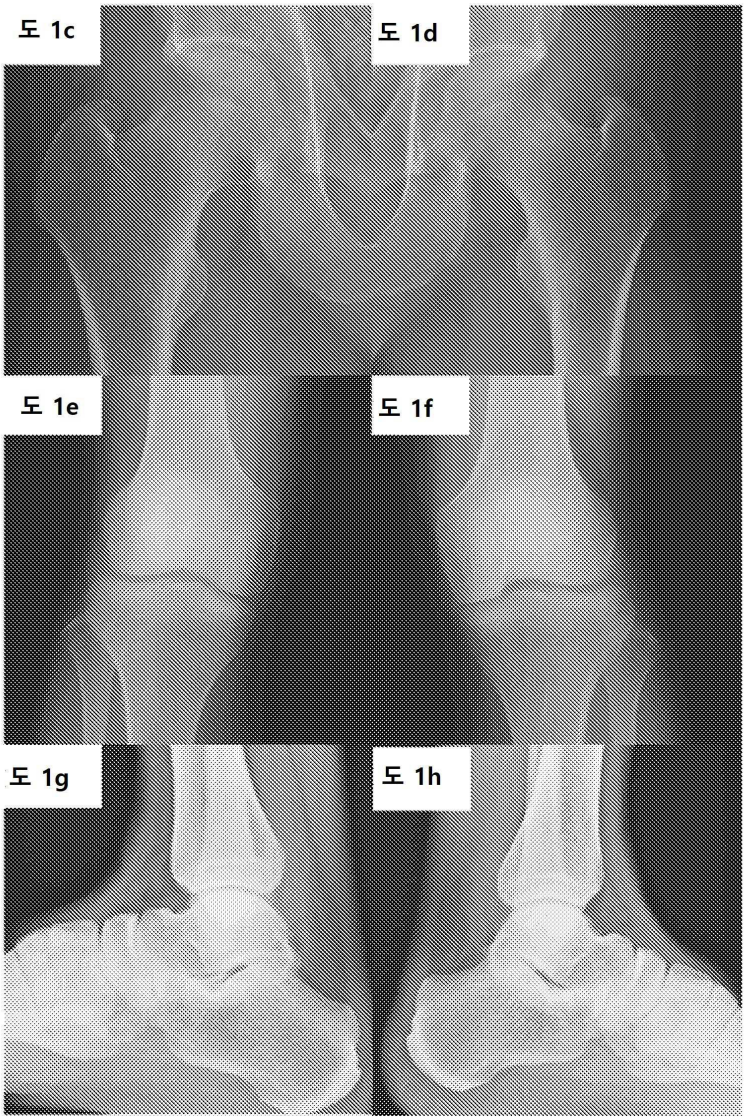


도 1a



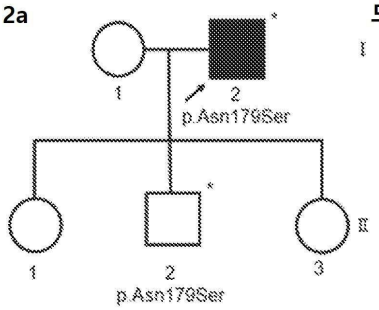
도 1b

도면1ch

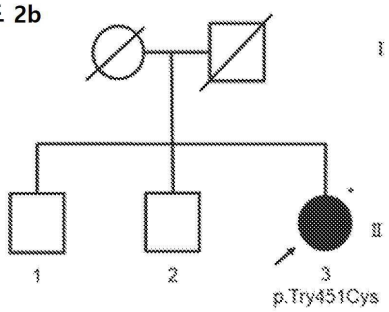


도면2

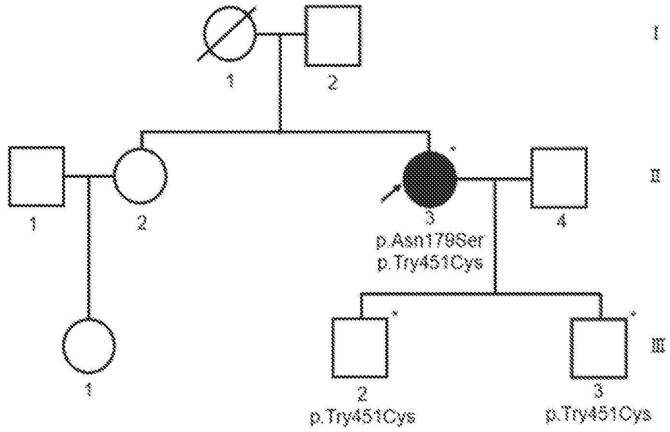
도 2a



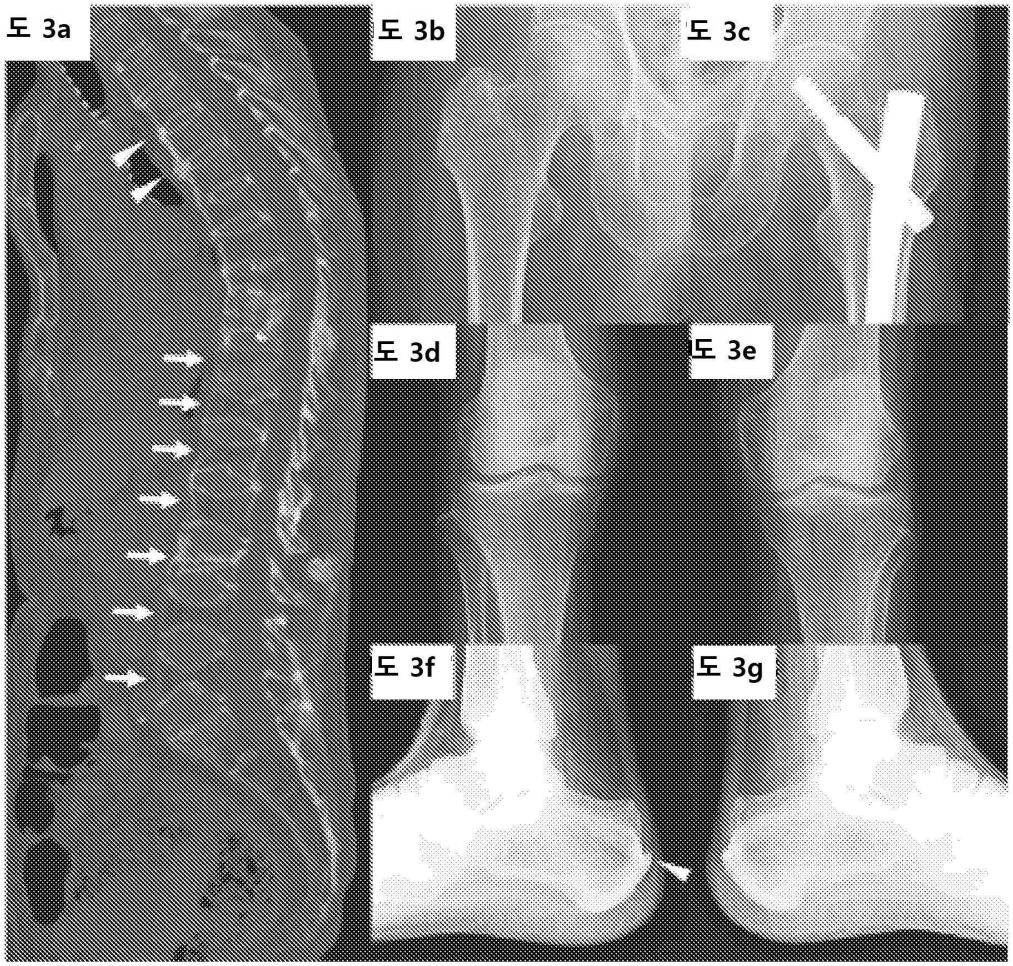
도 2b



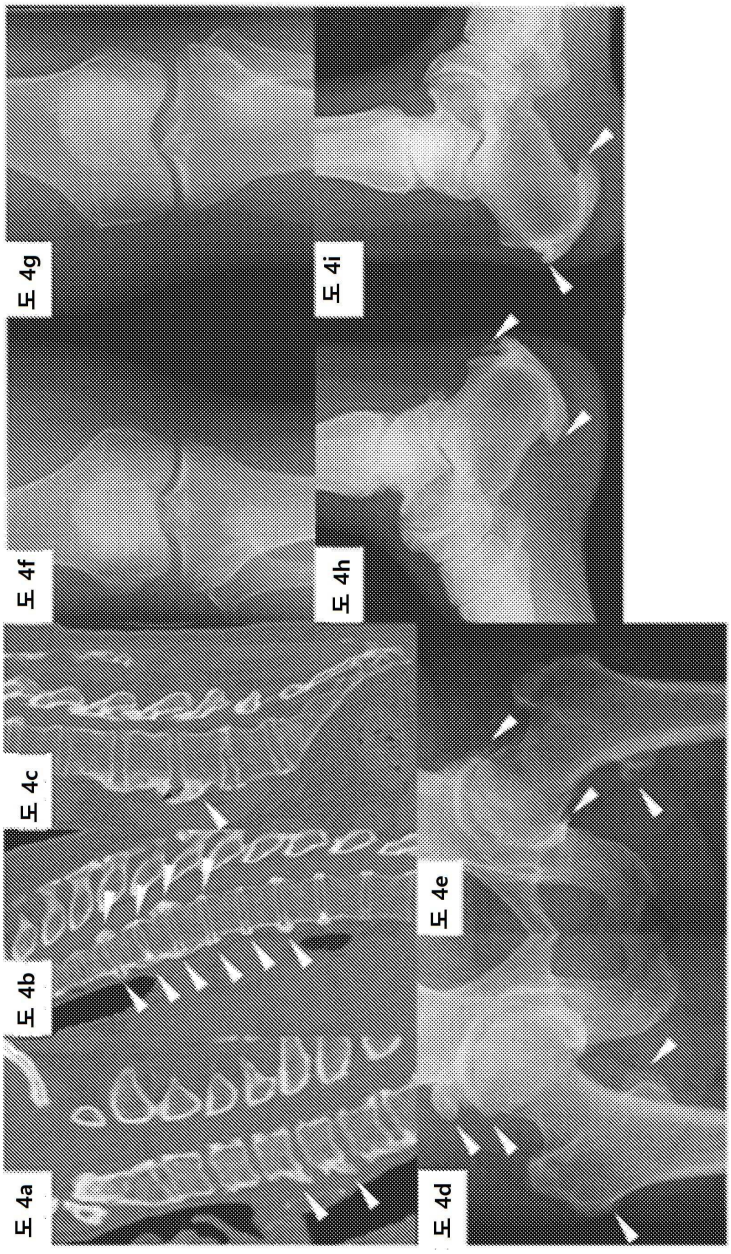
도 2c



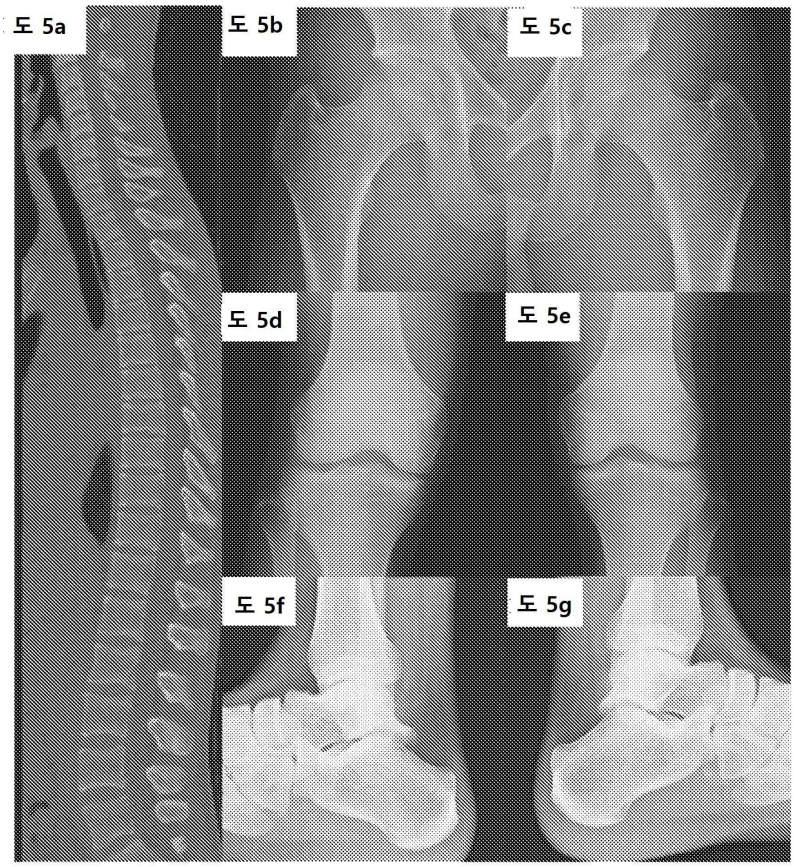
도면3



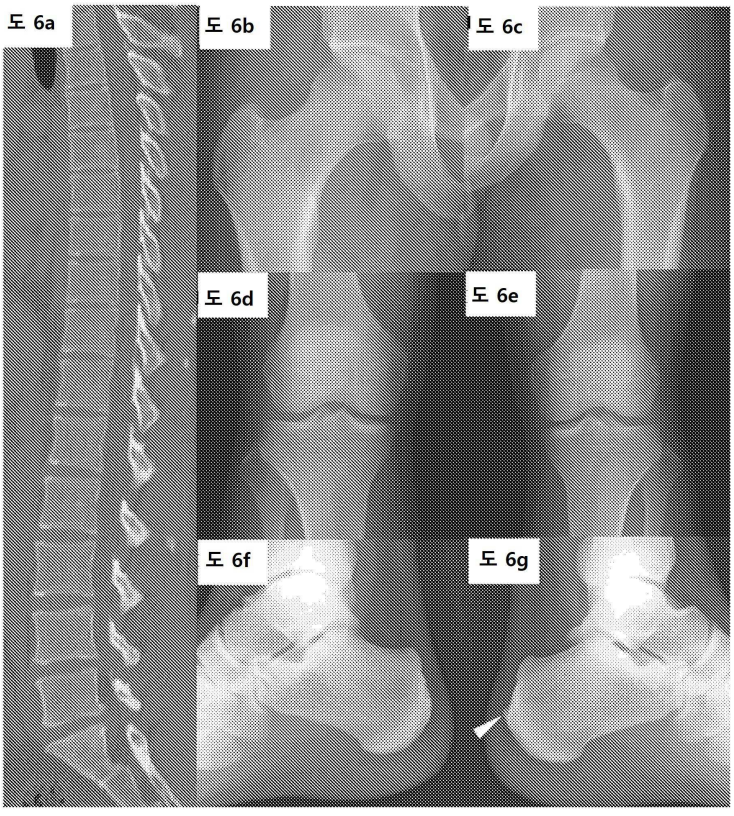
도면4



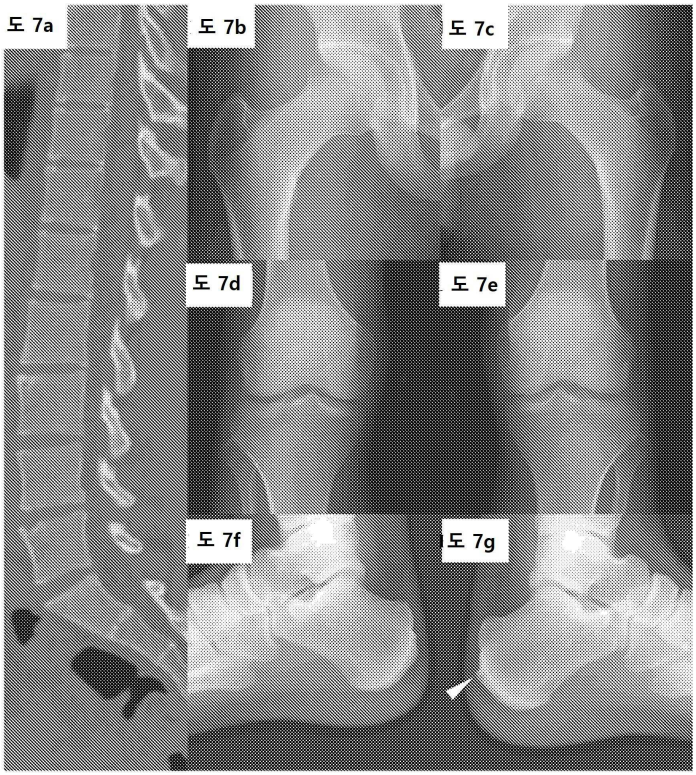
도면5



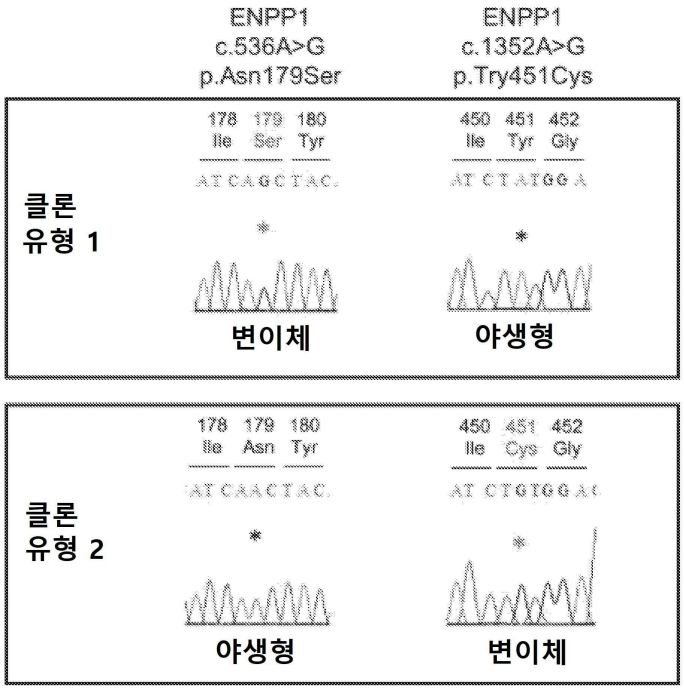
도면6



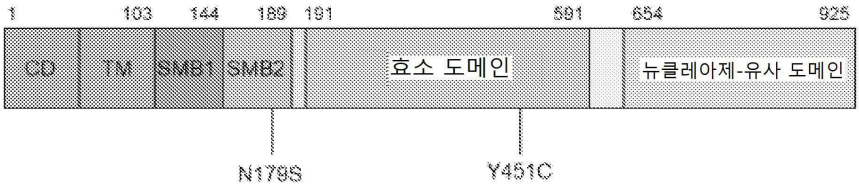
도면7


도 7a
도 7b
도 7c
도 7d
도 7e
도 7f
도 7g

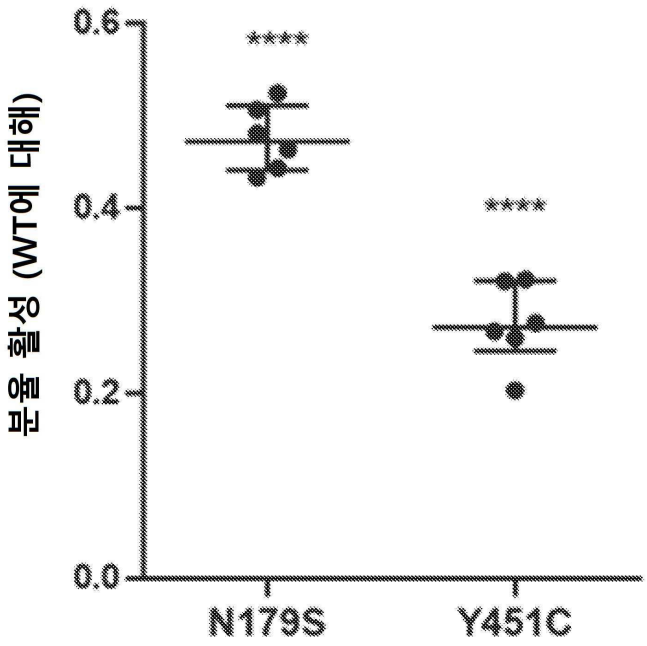
도면8


ENPP1
c.536A>G
p.Asn179Ser
ENPP1
c.1352A>G
p.Try451Cys
클론
유형 1
178 179 180
Ile Ser Tyr
450 451 452
Ile Tyr Gly
변이체
야생형
클론
유형 2
178 179 180
Ile Asn Tyr
450 451 452
Ile Cys Gly
야생형
변이체

도면9



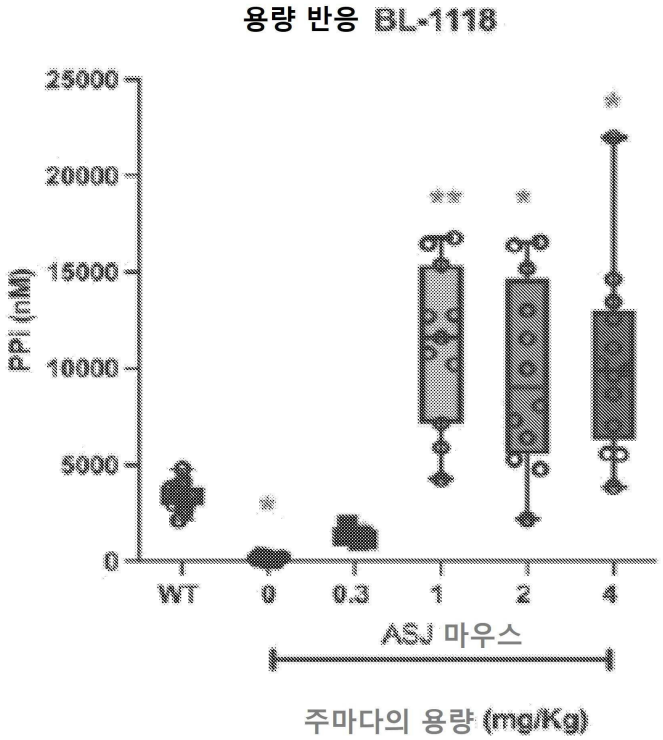
도면10



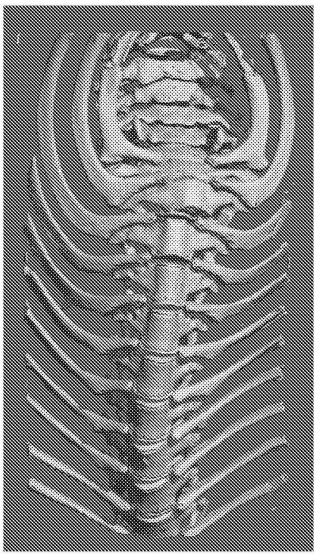
도면11

```
  1 MERDGCAGGG SRGGEGGRAP REGPAGNGRD RGRSHAAEAP GDPQAAASLL
 51 APMDVGEEPL EKAARARTAK DPNTYKVLSL VLSVCVLTTI LGCIFGLKPS
101 CAKEVKSCKG RCFERTFGNC RCDAACVELG NCCLDYQETC IEPEHIWTCN
151 KFRCGEKRLT RSLCACSDDC KDKGDCCINY SSVCQGEKSW VEEPCESINE
201 PQCPAGFETP PTLLFSLDGF RAEYLHTWGG LLPVISKLKK CGTYTKNMRP
251 VYPTKTFPNH YSIVTGLYPE SHGIIDNKMY DPKMNASFSL KSKEKFNPEW
301 YKGEPIWVTA KYQGLKSGTF FWPGSDVEIN GIFPDIYKMY NGSVPFEERI
351 LAVLQWLQLP KDERPHFYTL YLEEPDSSGH SYGPVSSEVI KALQRVDGMV
401 GMLMDGLKEL NLHRCLNLIL ISDHGMEQGS CKKYIYLNKY LGDVKNIKVI
451 YGPAARLRPS DVPDKYYSFN YEGIARNLSC REPNQHFKPY LKHFLPKRLH
501 FAKSDRIEPL TFYLDPQWQL ALNPSERKYC GSGFHGSDNV FSNMQALFVG
551 YGPGFKHGIE ADTFENIEVY NLMCDLLNLT PAPNNGTHGS LNHLLKNPVY
601 TPKHPKEVHP LVQCPFTRNP RDNLGCSCNP SILPIEDFQT QFNLTVAEEK
651 IIKHETLPYG RPRVLQKENT ICLLSQHQFM SGYSQDILMP LWTSYTVDRN
701 DSFSTEDFSN CLYQDFRIPL SPVHKCSFYK NNTKVSYGFL SPPQLNKNSS
751 GIYSEALLTT NIVPMYQSFQ VIWRYFHDTL LRKYAEERNG VNVVSGPVFD
801 FDYDGRCDSL ENLRQKRRVI RNQEILIPTH FFIVLTSCKD TSQTPLHCEN
851 LDTLAFILPH RTDNSESCVH GKHDSSWVEE LLMLHRARIT DVEHITGLSF
901 YQQRKEPVSD ILKLKTHLPT FSQED  (서열번호 1)
```

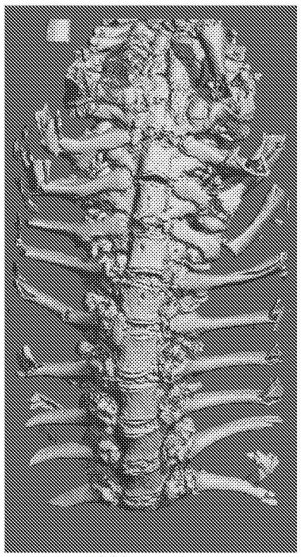
도면12


용량 반응 BL-1118
25000
20000
15000
10000
5000
0
PPi (nM)
WT
0
0.3
1
2
4
ASJ 마우스
주마다의 용량 (mg/Kg)

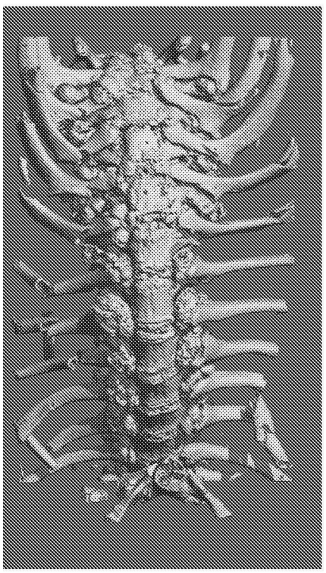
도면13



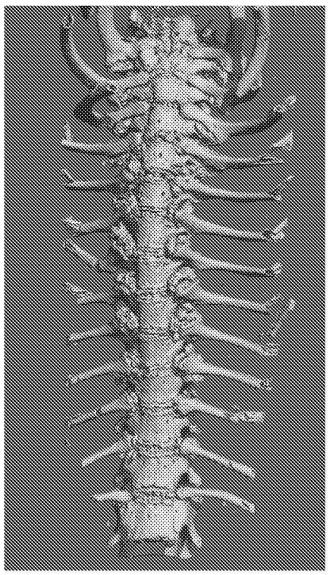
야생형 M



M ASJ - 비히클

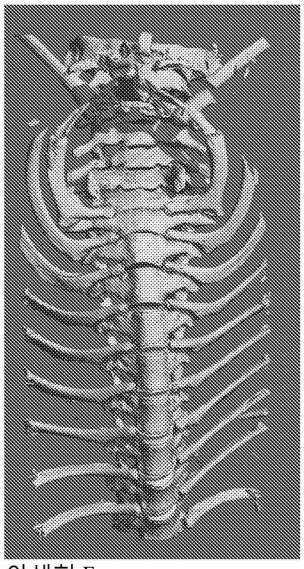


M ASJ – 1 mg/kg
가용성 ENPP1 (1118)

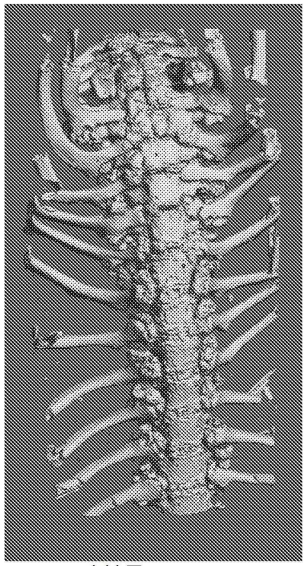


M ASJ – 1m g/kg
뼈 표적화된 ENPP1 (2000)

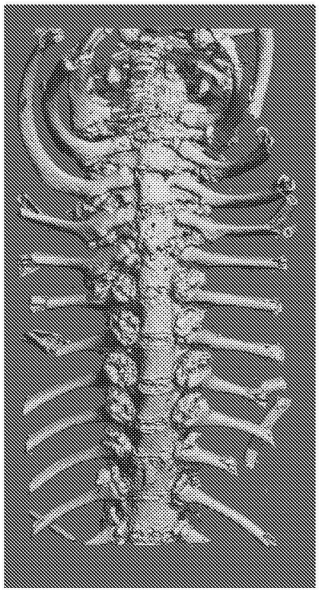
도면14



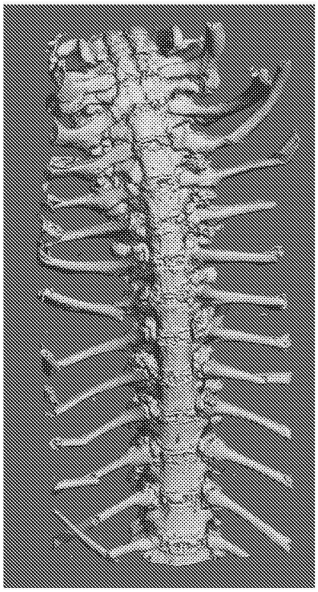
야생형 F



F ASJ - 비히클

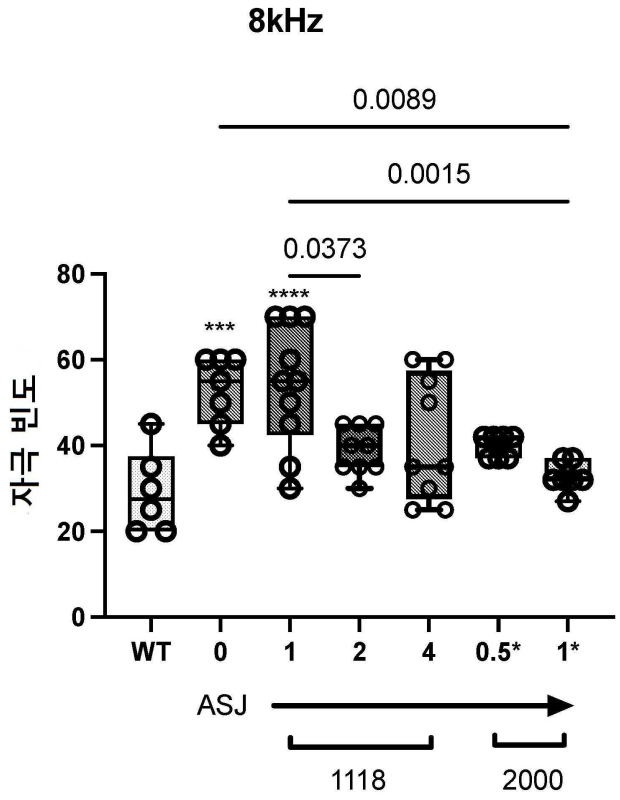


F ASJ – 1 mg/kg
가용성 ENPP1 (작제물 1118)

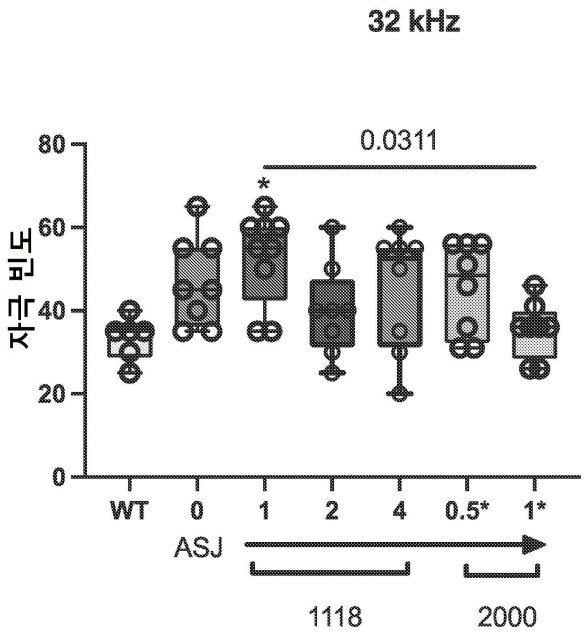


F ASJ – 1m g/kg
뼈 표적화된 ENPP1 (작제물 2000)

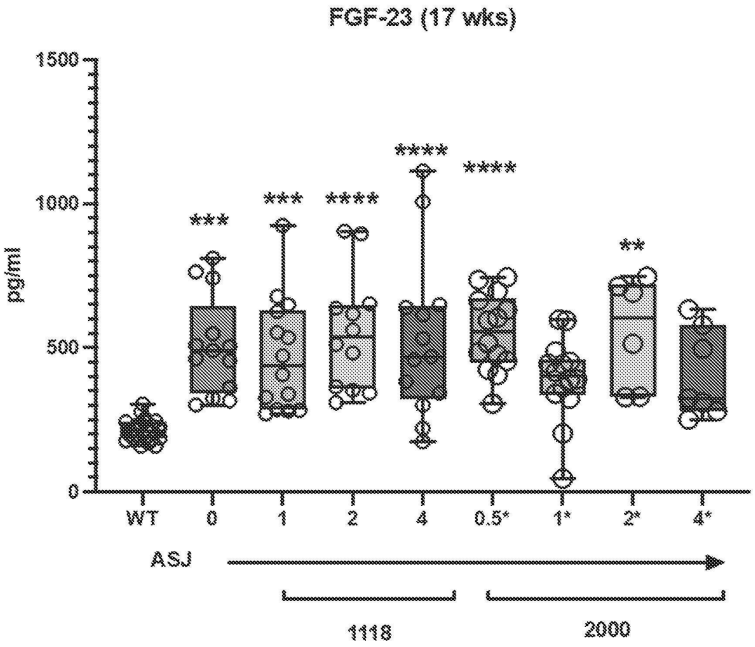
도면15a


8kHz
0.0089
0.0015
0.0373
80
60
40
20
0
자극 빈도
***
****
WT
0
1
2
4
0.5*
1*
ASJ
1118
2000

도면15b


32 kHz
0.0311
80
60
40
20
0
자극 빈도
*
WT
0
1
2
4
0.5*
1*
ASJ
1118
2000

도면16



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.