

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2025-510963
(P2025-510963A)

(43)公表日 令和7年4月15日(2025.4.15)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
A 6 1 K	38/47 (2006.01)	A 6 1 K	38/47	4 C 0 7 6	
A 6 1 P	19/02 (2006.01)	A 6 1 P	19/02	4 C 0 8 4	
A 6 1 P	19/00 (2006.01)	A 6 1 P	19/00	4 H 0 4 5	
A 6 1 P	19/08 (2006.01)	A 6 1 P	19/08		
A 6 1 P	19/10 (2006.01)	A 6 1 P	19/10		
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全75頁) 最終頁に続く					
(21)出願番号	特願2024-557495(P2024-557495)	(71)出願人	503469393		
(86)(22)出願日	令和4年9月30日(2022.9.30)		イエール ユニバーシティ		
(85)翻訳文提出日	令和6年11月14日(2024.11.14)		アメリカ合衆国 コネチカット州 ニュー		
(86)国際出願番号	PCT/US2022/077407		ヘブン トゥ ホイットニー アベニュー		
(87)国際公開番号	WO2023/191898	(74)代理人	100102978		
(87)国際公開日	令和5年10月5日(2023.10.5)		弁理士 清水 初志		
(31)優先権主張番号	63/325,554	(74)代理人	100205707		
(32)優先日	令和4年3月30日(2022.3.30)		弁理士 小寺 秀紀		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100160923		
(81)指定国・地域	AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV	(74)代理人	100119507		
	最終頁に続く		弁理士 山口 裕孝		
		(74)代理人	100142929		
			弁理士 刑部 俊		
		(74)代理人	100148699		
			弁理士 井上 隆一		
			最終頁に続く		

(54)【発明の名称】 広汎性特発性骨増殖症（D I S H）の治療、改善および／または予防のための方法および組成物

(57)【要約】
本開示は、一局面では、広汎性特発性骨増殖症（DISH）、強直性脊椎炎および/または脊椎関節炎のインビボ治療のための、特定の用量のENPP1作用物質を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下を含む、その必要がある患者の広汎性特発性骨増殖症（DISH）ならびに/または脊椎関節炎を治療する、改善する、そのさらなる発症および/もしくは進行を予防する、ならびに/またはそれらを予防する方法：

式（I）の化合物またはその塩もしくは溶媒和物：

PROTEIN-Z-DOMAIN-X-Y （I）

の治療有効量を該患者に投与する工程であって、

（I）において、

PROTEINが、ENPP1の触媒領域を含み、

10

DOMAINが、存在しないか、またはヒトIgG Fcドメイン（Fc）、ヒト血清アルブミンタンパク質（ALB）およびその断片からなる群より選択される少なくとも1つであり、XおよびZが、独立して、存在しないか、または1～20個のアミノ酸を含むポリペプチドであり、かつ

Yが、負に帯電した骨標的化配列であり、

それによって、該患者のDISHならびに/または脊椎関節炎を治療する、改善する、そのさらなる発症および/もしくは進行を予防する、ならびに/またはそれを予防する、工程。

【請求項 2】

前記患者がENPP1ハプロ不全を有する、請求項1記載の方法。

20

【請求項 3】

前記患者がENPP1ハプロ不全を有しない、請求項1記載の方法。

【請求項 4】

前記患者がENPP1欠乏ではない、請求項1記載の方法。

【請求項 5】

前記患者がENPP1欠乏である、請求項1記載の方法。

【請求項 6】

前記患者が、経口、エアロゾル、吸入、直腸、膣、経皮、皮下、鼻腔内、頬側、舌下、非経口、髄腔内、胃内、眼、肺および局所からなる群より選択される少なくとも1つの経路によって前記化合物を投与される、請求項1記載の方法。

30

【請求項 7】

前記化合物が、前記患者に静脈内投与または皮下投与される、請求項1記載の方法。

【請求項 8】

前記患者へ前記化合物を投与する工程が、該患者の細胞外ピロリン酸濃度を増加させるか、またはそのさらなる低下を予防する、請求項1記載の方法。

【請求項 9】

前記患者へ前記化合物を投与する工程が、該患者におけるアキレス腱の石灰化、脊椎石灰化、股関節石灰化および両側性石灰化のうちの1つもしくは複数を減少させるか、またはそれらのさらなる増加を予防する、請求項1記載の方法。

【請求項 10】

40

前記DOMAINがアルブミンを含む、請求項1記載の方法。

【請求項 11】

前記DOMAINがIgG Fcドメインを含む、請求項1記載の方法。

【請求項 12】

前記PROTEINが、ENPP1膜貫通ドメインを欠く、請求項1記載の方法。

【請求項 13】

前記化合物が、少なくとも1つの薬学的に許容される担体をさらに含む薬学的組成物として前記患者に投与される、請求項1記載の方法。

【請求項 14】

前記患者が哺乳動物である、請求項1記載の方法。

50

【請求項 15】

前記哺乳動物がヒトである、請求項14記載の方法。

【請求項 16】

前記PROTEINが、SEQ ID NO:1のアミノ酸残基99 (PSCAKE) ~925 (QED) を含む、請求項1~15のいずれか一項記載の方法。

【請求項 17】

前記PROTEINが、SEQ ID NO:3のアミノ酸残基1~833を含む、請求項1~16のいずれか一項記載の方法。

【請求項 18】

前記PROTEINが、SEQ ID NO:2に示されるアミノ酸配列を含む、請求項1~16のいずれか一項記載の方法。

10

【請求項 19】

前記PROTEINが、SEQ ID NO:3または4または5に示されるアミノ酸配列を含む、請求項1~16のいずれか一項記載の方法。

【請求項 20】

前記DOMAINが、前記化合物の循環半減期を、該DOMAINを欠く該化合物の循環半減期と比較して増加させる、請求項1~19のいずれか一項記載の方法。

【請求項 21】

前記患者がまた、早期発症骨粗鬆症、骨減少症、加齢性骨減少症、OPLL、遺伝性低リン血症性くる病、X連鎖性低リン血症、常染色体潜性低リン血症性くる病2型、常染色体顕性低リン血症性くる病および低リン血症性くる病からなる群より選択される疾患または状態とも診断されている、請求項1記載の方法。

20

【請求項 22】

前記患者が、早期発症骨粗鬆症、骨減少症、加齢性骨減少症、OPLL、遺伝性低リン血症性くる病、X連鎖性低リン血症、常染色体潜性低リン血症性くる病2型、常染色体顕性低リン血症性くる病および低リン血症性くる病からなる群より選択される疾患または状態と診断されていない、請求項1記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

30

関連出願の相互参照

本出願は、2022年3月30日に提出された米国仮特許出願第63/325,554号の優先権を主張し、参照によりその内容全体を本明細書に組み入れる。

【0002】

連邦政府による資金提供を受けた研究開発の記載

本発明は、国立衛生研究所によって授与されたDK121326-01、AR080416-01およびAG067347A1の下、政府の支援を受けて行われた。政府は、本発明に一定の権利を有する。

【0003】

分野

40

本発明の分野は、一局面では、酵素療法によるDISH、強直性脊椎炎および/または脊椎関節炎の治療および/または改善に関する。

【0004】

配列表

2022年9月29日に作成された「047162-7377W01 (01806) Sequence Listing.xml」という名称のこのXMLファイルは、149Kバイトのサイズを含み、参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。

【背景技術】

【0005】

背景

50

エクトヌクレオチドピロホスファターゼ/ホスホジエステラーゼ1 (ENPP1) は、その細胞外活性がアデノシン三リン酸 (ATP) などの細胞外ヌクレオチドのホスホジエステル結合を加水分解して、アデノシン一リン酸 (AMP) および無機ピロリン酸 (PPi) を生成する2型膜貫通タンパク質である。PPiはヒドロキシアパタイト沈着の主要な生理学的阻害物質であるため、二対立遺伝子ENPP1欠乏は、若齢期に異所性石灰化をもたらし、乳児では、動脈石灰化および管腔狭窄に起因する死亡率が高い (Ziegler et al., Generalized arterial calcification of infancy. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al., (eds) .Gene Reviews 2014 (非特許文献1))。生存している患者、および新生児期の石灰化を示さないENPP1欠乏個体は、線維芽細胞増殖因子23 (FGF23) によって媒介される低リン血症性くる病を晩年に発症する可能性がある (Ferreira et al., Prospective phenotyping of long-term survivors of generalized arterial calcification of infancy (GACI) , Genet Med. 2020; 23: 396-407 (非特許文献2))。

10

20

30

40

50

【0006】

国際公開公報第2014126965号は、ENPP1欠乏を伴う疾患における病的石灰化および病的骨化の治療に関する。3つのタンパク質—ENPP1、組織非特異的アルカリホスファターゼ (TNAP)、および進行性強直症タンパク質 (progressive ankylosis protein) またはアンキリン (ANK)—は、無機ピロリン酸 (PPi) および無機リン酸 (Pi) の細胞外バランスを調節する点で何らかの役割を果たす。無機ピロリン酸 (PPi) は、ENPP1による細胞外ヌクレオチド三リン酸 (NTP) の切断、またはAnkによる細胞内空間から細胞外空間へのPPiの移動によって生成される。TNAPは、PPiを分解してPiを生成する。

【0007】

「ENPP1欠乏」は、対象の血清および/または血漿中のENPP1酵素活性レベルの低下を特徴とする。ENPP1欠乏は、ENPP1酵素をコードするENPP1遺伝子の変異を不活性化することによって引き起こされるまれな遺伝性障害である。本明細書において他の箇所に記載されるように、ENPP1は、その細胞外ドメインがピロホスファターゼ活性およびホスホジエステラーゼ活性を有する内在性膜貫通タンパク質である。したがって、ENPP1は、細胞外ATPを無機ピロリン酸 (PPi) およびAMPに変換する。

【0008】

生物系における石灰化は、非循環マトリックス内で局所的な循環体液または他の可動性流体よりも高い濃度でカルシウム塩が維持される複雑なプロセスである。正常な石灰化では、特殊な細胞間マトリックス内に同様の配置および化学組成の結晶パターンでカルシウム塩および関連する無機塩の蓄積が主にもたらされ、これらはいずれも種間で異なり得る。一方、病的石灰化では、これらの特殊なマトリックスだけでなく、他の細胞間材料、細胞外材料および細胞材料内でも、化学組成、またはパターンの多様性において正常範囲を超えるカルシウム塩および関連する無機塩の蓄積が最終的にもたらされ、それによって、いくつかの疾患状態がもたらされる。

【0009】

広汎性特発性骨増殖症 (DISH) は、異常な新たな骨形成を特徴とする骨障害である (Resnick et al., Diffuse idiopathic skeletal hyperostosis (DISH) : Forestier's disease with extraspinal manifestations, Radiology. 1975; 115: 513-524 (非特許文献3))。新たな骨は、ほとんどの場合、靱帯および腱が骨に接合する場所 (腱付着領域) に形成されるが、骨の全体的な硬化、および骨の過成長 (骨増殖症) もある (Pillai & Littlejohn, Metabolic Factors in Diffuse Idiopathic Skeletal Hyperostosis-A Review of Clinical Data. The Open Rheumatology Journal. 2014; 8: 116-128 (非特許文献4))。DISHに対するENPP1、TNAPおよびANKのそれぞれの役割は理解されていない。さらに、これらの酵素のうちの1つまたは複数の欠乏がDISH表現型の一部であるのかも分かっていない。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0010】

【非特許文献1】Ziegler et al., Generalized arterial calcification of infancy. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al., (eds) .Gene Reviews 2014

【非特許文献2】Ferreira et al., Prospective phenotyping of long-term survivors of generalized arterial calcification of infancy (GACI) , Genet Med .2020;23:396-407

【非特許文献3】Resnick et al., Diffuse idiopathic skeletal hyperostosis (DISH) :Forestier's disease with extraspinal manifestations, Radiology.1975;115:513-524

【非特許文献4】Pillai & Littlejohn, Metabolic Factors in Diffuse Idiopathic Skeletal Hyperostosis-A Review of Clinical Data. The Open Rheumatology Journal.2014;8:116-128

【発明の概要】

【0011】

簡単な概要

本開示は、その必要がある患者の広汎性特発性骨増殖症（DISH）、強直性脊椎炎および/または脊椎関節炎を治療、改善および/または予防する方法を提供する。ある特定の態様では、方法は、式（I）の化合物またはその塩もしくは溶媒和物：

PROTEIN-Z-DOMAIN-X-Y （I）

の治療有効量を患者に投与する工程であって

（I）において、

PROTEINが、ENPP1の触媒領域を含み、

DOMAINが、存在しないか、またはヒトIgG Fcドメイン（Fc）、ヒト血清アルブミンタンパク質（ALB）およびその断片からなる群より選択される少なくとも1つであり、XおよびZが、独立して、存在しないか、または1～20個のアミノ酸を含むポリペプチドであり、

Yが、存在しないか、または負に帯電した骨標的化配列であり、

それによって、患者のDISH、強直性脊椎炎および/または脊椎関節炎を治療、改善および/または予防する、工程を含む。

【0012】

ある特定の態様では、化合物は、負に帯電した骨標的化配列を欠く。

【0013】

ある特定の態様では、Yは存在しない。

【0014】

ある特定の態様では、化合物は、負に帯電した骨標的化配列を含む。

【0015】

ある特定の態様では、患者は、ENPP1ハプロ不全を有する。

【0016】

ある特定の態様では、患者は、ENPP1ハプロ不全を有しない。

【0017】

ある特定の態様では、患者は、ENPP1欠乏ではない。

【0018】

ある特定の態様では、患者は、ENPP1欠乏である。

【0019】

ある特定の態様では、患者は、経口、エアロゾル、吸入、直腸、膣、経皮、皮下、鼻腔内、頬側、舌下、非経口、髄腔内、胃内、眼、肺および局所からなる群より選択される少なくとも1つの経路によって化合物を投与される。

【0020】

ある特定の態様では、化合物は、患者に静脈内投与または皮下投与される。

【0021】

ある特定の態様では、患者へ化合物を投与する工程は、患者の細胞外ピロリン酸濃度を増加させるか、またはそのさらなる低下を予防する。

【0022】

ある特定の態様では、患者へ化合物を投与する工程は、患者におけるアキレス腱の石灰化、脊椎石灰化、股関節石灰化および両側性石灰化（bilateral calcification）のうちの1つもしくは複数を減少させるか、またはそれらのさらなる増加を予防する。

【0023】

ある特定の態様では、DOMAINは、アルブミンを含む。

【0024】

ある特定の態様では、DOMAINは、IgG Fcドメインを含む。

【0025】

ある特定の態様では、PROTEINは、ENPP1膜貫通ドメインを欠く。

【0026】

ある特定の態様では、化合物は、少なくとも1つの薬学的に許容される担体をさらに含む薬学的組成物として患者に投与される。

【0027】

ある特定の態様では、患者は哺乳動物である。

【0028】

ある特定の態様では、哺乳動物はヒトである。

【0029】

ある特定の態様では、PROTEINは、SEQ ID NO:1のアミノ酸残基99（PSCAKE…）～925（…QED）を含む。

【0030】

ある特定の態様では、PROTEINは、SEQ ID NO:3のアミノ酸残基1～833を含む。

【0031】

ある特定の態様では、PROTEINは、SEQ ID NO:2に示されるアミノ酸配列を含む。

【0032】

ある特定の態様では、PROTEINは、SEQ ID NO:3または4または5に示されるアミノ酸配列を含む。

【0033】

ある特定の態様では、DOMAINは、化合物の循環半減期を、DOMAINを欠く化合物の循環半減期と比較して増加させる。

【0034】

ある特定の態様では、患者はまた、早期発症骨粗鬆症、骨減少症、加齢性骨減少症、OPLL、遺伝性低リン血症性くる病、X連鎖性低リン血症、常染色体潜性低リン血症くる病2型（Autosomal Recessive Hypophosphatemia Rickets type 2）、常染色体顕性低リン血症性くる病および低リン血症性くる病からなる群より選択される疾患または状態と診断されている。

【0035】

ある特定の態様では、患者は、早期発症骨粗鬆症、骨減少症、加齢性骨減少症、OPLL、遺伝性低リン血症性くる病、X連鎖性低リン血症、常染色体潜性低リン血症くる病2型、常染色体顕性低リン血症性くる病および低リン血症性くる病からなる群より選択される疾患または状態と診断されていない。

【0036】

説明

ある特定の態様では、本明細書において企図される疾患または障害は、広汎性特発性骨増殖症（DISH）である。ある特定の態様では、本明細書において企図される疾患または障害は、強直性脊椎炎である。ある特定の態様では、本明細書において企図される疾患または障害は、脊椎関節炎である。ある特定の態様では、本明細書において企図される疾患

10

20

30

40

50

または障害は、広汎性特発性骨増殖症（DISH）および/または強直性脊椎炎である。ある特定の態様では、本明細書において企図される疾患または障害は、DISHおよび/または脊椎関節炎である。ある特定の態様では、本明細書において企図される疾患または障害は、強直性脊椎炎および/または脊椎関節炎である。

【0037】

本発明は、その必要がある患者の広汎性特発性骨増殖症（DISH）、強直性脊椎炎ならびに/または脊椎関節炎を治療する、改善する、そのさらなる発症および/もしくは進行を予防する、ならびに/またはそれを予防する方法を提供する。本発明は、その必要がある患者のDISH、強直性脊椎炎および/または脊椎関節炎を治療および/または改善する方法をさらに提供する。

10

【0038】

一局面では、本開示は、DISH、強直性脊椎炎および/または脊椎関節炎を有する対象に治療有効量のENPP1作用物質を投与することによって、DISH、強直性脊椎炎ならびに/または脊椎関節炎を治療する、改善する、そのさらなる発症および/もしくは進行を予防する、ならびに/またはそれを予防することに関する。

【0039】

一局面では、本開示は、対象に治療有効量のENPP1作用物質を投与することによって、対象のENPP1欠乏を治療する、改善する、そのさらなる発症および/もしくは進行を予防する、ならびに/またはそれを予防することに関する。

【0040】

一局面では、本開示は、対象に治療有効量のENPP1作用物質を投与することによって、対象のENPP1ハプロ不全の1つまたは複数の症状を治療する、改善する、そのさらなる発症および/もしくは進行を予防する、ならびに/またはそれを予防することに関する。

20

【0041】

DISH、強直性脊椎炎および/または脊椎関節炎の治療は、1キログラム当たり約0.1mg、対象1キログラム当たり約0.2mg、対象1キログラム当たり約0.3mg、対象1キログラム当たり約0.4mg、対象1キログラム当たり約0.5mg、対象1キログラム当たり約0.6mg、対象1キログラム当たり約0.7mg、対象1キログラム当たり約0.8mg、対象1キログラム当たり約0.9mg、対象1キログラム当たり約1.0mg、対象1キログラム当たり約1.1mg、対象1キログラム当たり約1.2mg、対象1キログラム当たり約1.3mg、対象1キログラム当たり約1.4mg、対象1キログラム当たり約1.5mg、対象1キログラム当たり約1.6mg、対象1キログラム当たり約1.7mg、対象1キログラム当たり約1.8mg、対象1キログラム当たり約1.9mg、または対象1キログラム当たり約2.0mgの用量でENPP1作用物質を投与し、それによって、DISH、強直性脊椎炎および/または脊椎関節炎疾患の1つまたは複数の症状を治療、低減および/または改善することを含み、対象は、ENPP1欠乏を有しない。

30

【0042】

一局面では、本開示は、DISH、強直性脊椎炎および/または脊椎関節炎を有する対象に、1キログラム当たり約0.1mg、対象1キログラム当たり約0.2mg、対象1キログラム当たり約0.3mg、対象1キログラム当たり約0.4mg、対象1キログラム当たり約0.5mg、対象1キログラム当たり約0.6mg、対象1キログラム当たり約0.7mg、対象1キログラム当たり約0.8mg、対象1キログラム当たり約0.9mg、対象1キログラム当たり約1.0mg、対象1キログラム当たり約1.1mg、対象1キログラム当たり約1.2mg、対象1キログラム当たり約1.3mg、対象1キログラム当たり約1.4mg、対象1キログラム当たり約1.5mg、対象1キログラム当たり約1.6mg、対象1キログラム当たり約1.7mg、対象1キログラム当たり約1.8mg、対象1キログラム当たり約1.9mg、または対象1キログラム当たり約2.0mgの用量でENPP1作用物質を投与し、それによって、DISH、強直性脊椎炎および/または脊椎関節炎疾患の1つまたは複数の症状を治療、低減および/または改善することに関し、対象は、ENPP1欠乏を有する。

40

【0043】

50

一局面では、本開示は、DISH、強直性脊椎炎および/または脊椎関節炎を有する対象に、1キログラム当たり約0.1mg、対象1キログラム当たり約0.2mg、対象1キログラム当たり約0.3mg、対象1キログラム当たり約0.4mg、対象1キログラム当たり約0.5mg、対象1キログラム当たり約0.6mg、対象1キログラム当たり約0.7mg、対象1キログラム当たり約0.8mg、対象1キログラム当たり約0.9mg、対象1キログラム当たり約1.0mg、対象1キログラム当たり約1.1mg、対象1キログラム当たり約1.2mg、対象1キログラム当たり約1.3mg、対象1キログラム当たり約1.4mg、対象1キログラム当たり約1.5mg、対象1キログラム当たり約1.6mg、対象1キログラム当たり約1.7mg、対象1キログラム当たり約1.8mg、対象1キログラム当たり約1.9mg、または対象1キログラム当たり約2.0mgの用量でENPP1作用物質を投与し、それによって、DISH、強直性脊椎炎および/または脊椎関節炎疾患の1つまたは複数の症状を治療、低減および/または改善することに関し、対象は、ENPP1ハプロ不全を有しない。

10

【0044】

一局面では、本開示は、DISH、強直性脊椎炎および/または脊椎関節炎を有する対象に、1キログラム当たり約0.1mg、対象1キログラム当たり約0.2mg、対象1キログラム当たり約0.3mg、対象1キログラム当たり約0.4mg、対象1キログラム当たり約0.5mg、対象1キログラム当たり約0.6mg、対象1キログラム当たり約0.7mg、対象1キログラム当たり約0.8mg、対象1キログラム当たり約0.9mg、対象1キログラム当たり約1.0mg、対象1キログラム当たり約1.1mg、対象1キログラム当たり約1.2mg、対象1キログラム当たり約1.3mg、対象1キログラム当たり約1.4mg、対象1キログラム当たり約1.5mg、対象1キログラム当たり約1.6mg、対象1キログラム当たり約1.7mg、対象1キログラム当たり約1.8mg、対象1キログラム当たり約1.9mg、または対象1キログラム当たり約2.0mgの用量でENPP1作用物質を投与し、それによって、DISH、強直性脊椎炎および/または脊椎関節炎疾患の1つまたは複数の症状を治療、低減および/または改善することに関し、対象は、ENPP1ハプロ不全を有する。

20

【0045】

一局面では、本開示は、対象の血漿中および/または組織内のENPP1タンパク質および/または活性の生理学的レベルを回復させるために、DISH、強直性脊椎炎および/または脊椎関節炎を有する対象に、1キログラム当たり約0.1mg、対象1キログラム当たり約0.2mg、対象1キログラム当たり約0.3mg、対象1キログラム当たり約0.4mg、対象1キログラム当たり約0.5mg、対象1キログラム当たり約0.6mg、対象1キログラム当たり約0.7mg、対象1キログラム当たり約0.8mg、対象1キログラム当たり約0.9mg、対象1キログラム当たり約1.0mg、対象1キログラム当たり約1.1mg、対象1キログラム当たり約1.2mg、対象1キログラム当たり約1.3mg、対象1キログラム当たり約1.4mg、対象1キログラム当たり約1.5mg、対象1キログラム当たり約1.6mg、対象1キログラム当たり約1.7mg、対象1キログラム当たり約1.8mg、対象1キログラム当たり約1.9mg、または対象1キログラム当たり約2.0mgの用量でENPP1作用物質を投与することに関する。本明細書において使用される、血漿中および/または組織内のENPP1タンパク質および/または活性の生理学的レベルとは、ヒト血清中のPPiのある生理学的レベルを達成および維持するのに十分な、ENPP1作用物質の量または濃度である。ある特定の態様では、ENPP1作用物質は、ENPP1、および/またはENPP1活性を含むENPP1構築物である。

30

40

【0046】

一局面では、本開示は、対象の血漿中および/または組織内のENPP1タンパク質および/または活性の生理学的レベルを回復させるために、ENPP1ハプロ不全を有する対象に、1キログラム当たり約0.1mg、対象1キログラム当たり約0.2mg、対象1キログラム当たり約0.3mg、対象1キログラム当たり約0.4mg、対象1キログラム当たり約0.5mg、対象1キログラム当たり約0.6mg、対象1キログラム当たり約0.7mg、対象1キログラム当たり約0.8mg、対象1キログラム当たり約0.9mg、対象1キログラム当たり約1.0mg、対象1キログラム当たり約1.1mg、対象1キログラム当たり約1.2mg、対象1キログラム当たり約1.3mg、対象1キログラム当たり約1.4mg、対象1キログラム当たり約1.5

50

mg、対象1キログラム当たり約1.6mg、対象1キログラム当たり約1.7mg、対象1キログラム当たり約1.8mg、対象1キログラム当たり約1.9mg、または対象1キログラム当たり約2.0mgの用量でENPP1作用物質を投与することに関する。本明細書において使用される、血漿中および/または組織内のENPP1タンパク質および/または活性の生理学的レベルとは、ヒト血清中のPPiのある生理学的レベルを達成および維持するのに十分な、ENPP1作用物質の量または濃度である。ある特定の態様では、ENPP1作用物質は、ENPP1、および/またはENPP1活性を含むENPP1構築物である。

【0047】

一局面では、本開示は、DISH、強直性脊椎炎および/または脊椎関節炎を有する対象において循環ピロリン酸（PPi）を増加させる方法であって、対象に、1キログラム当たり約0.1mg、対象1キログラム当たり約0.2mg、対象1キログラム当たり約0.3mg、対象1キログラム当たり約0.4mg、対象1キログラム当たり約0.5mg、対象1キログラム当たり約0.6mg、対象1キログラム当たり約0.7mg、対象1キログラム当たり約0.8mg、対象1キログラム当たり約0.9mg、対象1キログラム当たり約1.0mg、対象1キログラム当たり約1.1mg、対象1キログラム当たり約1.2mg、対象1キログラム当たり約1.3mg、対象1キログラム当たり約1.4mg、対象1キログラム当たり約1.5mg、対象1キログラム当たり約1.6mg、対象1キログラム当たり約1.7mg、対象1キログラム当たり約1.8mg、対象1キログラム当たり約1.9mg、または対象1キログラム当たり約2.0mgの用量でENPP1作用物質を投与して、それによって、対象において循環PPiを増加させる工程を含む方法に関する。

10

20

【0048】

一局面では、本開示は、ENPP1ハプロ不全を有する対象において循環ピロリン酸（PPi）を増加させる方法であって、対象に、1キログラム当たり約0.1mg、対象1キログラム当たり約0.2mg、対象1キログラム当たり約0.3mg、対象1キログラム当たり約0.4mg、対象1キログラム当たり約0.5mg、対象1キログラム当たり約0.6mg、対象1キログラム当たり約0.7mg、対象1キログラム当たり約0.8mg、対象1キログラム当たり約0.9mg、対象1キログラム当たり約1.0mg、対象1キログラム当たり約1.1mg、対象1キログラム当たり約1.2mg、対象1キログラム当たり約1.3mg、対象1キログラム当たり約1.4mg、対象1キログラム当たり約1.5mg、対象1キログラム当たり約1.6mg、対象1キログラム当たり約1.7mg、対象1キログラム当たり約1.8mg、対象1キログラム当たり約1.9mg、または対象1キログラム当たり約2.0mgの用量でENPP1作用物質を投与して、それによって、対象において循環PPiを増加させる工程を含む方法に関する。

30

【0049】

一局面では、本開示は、対象におけるENPP1ハプロ不全の1つまたは複数の症状を改善する方法であって、対象に、1キログラム当たり約0.1mg、対象1キログラム当たり約0.2mg、対象1キログラム当たり約0.3mg、対象1キログラム当たり約0.4mg、対象1キログラム当たり約0.5mg、対象1キログラム当たり約0.6mg、対象1キログラム当たり約0.7mg、対象1キログラム当たり約0.8mg、対象1キログラム当たり約0.9mg、対象1キログラム当たり約1.0mg、対象1キログラム当たり約1.1mg、対象1キログラム当たり約1.2mg、対象1キログラム当たり約1.3mg、対象1キログラム当たり約1.4mg、対象1キログラム当たり約1.5mg、対象1キログラム当たり約1.6mg、対象1キログラム当たり約1.7mg、対象1キログラム当たり約1.8mg、対象1キログラム当たり約1.9mg、または対象1キログラム当たり約2.0mgの用量でENPP1作用物質を投与して、それによって、対象におけるENPP1欠乏の1つもしくは複数の症状、またはENPP1ハプロ不全の1つもしくは複数の症状を改善する工程を含む方法に関する。

40

【0050】

一局面では、本開示は、DISH、強直性脊椎炎および/もしくは脊椎関節炎を有する対象に存在する病的石灰化および/もしくは骨化塊の進行を予防するおよび/もしくは逆転させる、またはDISH、強直性脊椎炎および/もしくは脊椎関節炎を有する対象に存在する病的石灰化および/もしくは骨化塊を最小限に抑えるおよび/もしくは減少させる方法

50

であって、対象に、1キログラム当たり約0.1mg、対象1キログラム当たり約0.2mg、対象1キログラム当たり約0.3mg、対象1キログラム当たり約0.4mg、対象1キログラム当たり約0.5mg、対象1キログラム当たり約0.6mg、対象1キログラム当たり約0.7mg、対象1キログラム当たり約0.8mg、対象1キログラム当たり約0.9mg、対象1キログラム当たり約1.0mg、対象1キログラム当たり約1.1mg、対象1キログラム当たり約1.2mg、対象1キログラム当たり約1.3mg、対象1キログラム当たり約1.4mg、対象1キログラム当たり約1.5mg、対象1キログラム当たり約1.6mg、対象1キログラム当たり約1.7mg、対象1キログラム当たり約1.8mg、対象1キログラム当たり約1.9mg、または対象1キログラム当たり約2.0mgの用量でENPP1作用物質を投与して、それによって、対象における病的石灰化および/もしくは骨化骨格塊の進行を予防するおよび/もしくは逆転させる、または対象における病的石灰化および/もしくは骨化骨格塊を最小限に抑えるおよび/もしくは減少させる工程を含む方法に関する。

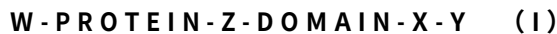
10

【0051】

前述の方法のいずれかのいくつかの態様では、方法は、治療有効量のENPP1作用物質を患者に投与する工程を含む。

【0052】

いくつかの態様では、ENPP1作用物質は、式(I)の化合物またはその塩もしくは溶媒和物:



であり、

20

(I)において、

Wは、存在しないか、または細胞外空間への化合物の輸送を可能にするシグナル配列を含み、

PROTEINは、ENPP1の触媒領域を含み、

DOMAINは、存在しないか、またはヒトIgG Fcドメイン(Fc)、ヒト血清アルブミンタンパク質(ALB)およびその生物学的に活性な断片からなる群より選択される少なくとも1つであり、

XおよびZは、独立して、存在しないか、または1~20個のアミノ酸を含むポリペプチドであり、かつ

Yは、存在しないか、または「骨標的化」配列群であり、

30

mは、独立して、1~15の範囲の整数であり、かつ

nは、独立して、1~10の範囲の整数である。

【0053】

いくつかの態様では、Wは存在しない。いくつかの態様では、Wは、細胞外空間への化合物の輸送を可能にするシグナル配列を含む。

【0054】

いくつかの態様では、Yは、以下からなる群より選択される「骨標的化」配列群である: D_m(SEQ ID NO:11), (DSS)_n(SEQ ID NO:12), (ESS)_n(SEQ ID NO:13),

(RQQ)_n(SEQ ID NO:14), (KR)_n(SEQ ID NO:15), R_m(SEQ ID NO:16),

40

DSSSEKFLRRIGRFG(SEQ ID NO:17), EEEEEPRGDT(SEQ ID NO:18),

APWHLSSQYSRT(SEQ ID NO:19), STLPIHEFSRE(SEQ ID NO:20),

VTKHLNQISQSY(SEQ ID NO:116), および E_m(SEQ ID NO:117)

。

【図面の簡単な説明】

【0055】

【図1-1】図1A~図1Bは、患者1の脊椎CTおよび骨シンチグラフィーを示す。図1Aは、白い矢印として示される、脊椎CTによって検出された脊椎における複数の圧迫骨折

50

の存在を示す。図1Bは、肋骨における複数の蓄積を明らかにした骨シンチグラフィーを示す。図1C～図1Hは、患者1の股関節、膝関節およびアキレス腱のX線写真を示す。図1C:右股関節、図1D:左股関節、図1E:右膝関節、図1F:左膝関節、図1G:右アキレス腱、図1H:左アキレス腱。異所性骨化の徴候はなかった。

【図1-2】図1-1の説明を参照されたい。

【図2】図2A～図2Cは、ENPP1変異家系図を示し、それぞれ患者1、2および3に対応する。矢印は、発端者を示す。

【図3】図3A～図3Gは、患者2の脊椎CT、股関節、膝関節およびアキレス腱のX線写真を示す。図3A:脊椎CTは、傍脊椎靱帯骨化（白い矢頭）と、複数の圧迫骨折（白い矢印）とを示した。図3B～図3Cは、それぞれ右股関節（図3B）および左股関節（図3C）のX線写真に対応する。図は、異所性骨化の徴候が観察されなかったことを示す。図3D～図3Eは、それぞれ右膝関節（図3D）および左膝関節（図3E）のX線写真に対応する。図は、異所性骨化の徴候が観察されなかったことを示す。図3Fおよび図3Gは、それぞれ右アキレス腱（図3F）および左アキレス腱（図3G）のX線写真に対応する。右アキレス腱に、脛骨の腱付着部症の徴候（白い矢頭として示されている）が検出された。

10

【図4】図4A～図4Iは、患者3の脊椎CT、股関節、膝関節およびアキレス腱のX線写真を示す。図4A～図4Cは、頸椎（図4A）、胸椎（図4B）および腰椎（図4C）に複数の傍脊椎骨化（白い矢頭）を示した脊椎CTに対応する。図4D～図4Eは、X線写真で検出された、右股関節（図4D）および左股関節（図4E）周囲の顕著な骨化（白い矢頭）を示す。図4F～図4Gは、異所性骨化の徴候を示さない右膝関節（図4F）および左膝関節（図4G）のX線写真を示す。図4H～図4Iは、右アキレス腱（図4H）および左アキレス腱（図4I）のX線写真では顕著な腱付着部症（白い矢頭）が検出されたことを示している。

20

【図5】図5A～図5Gは、患者1の息子の脊椎CT、ならびに股関節、膝関節およびアキレス腱のX線写真を示す。（図5A）脊椎CT、（図5B）右股関節、（図5C）左股関節、（図5D）右膝関節、（図5E）左膝関節、（図5F）右アキレス腱、（図5G）左アキレス腱。異所性骨化の徴候はなかった。

【図6】図6A～図6Gは、患者3の息子1人の脊椎CT、ならびに股関節、膝関節およびアキレス腱のX線写真を示す。（図6A）脊椎CT、（図6B）右股関節、（図6C）左股関節、（図6D）右膝関節、（図6E）左膝関節、（図6F）右アキレス腱、（図6G）左アキレス腱。左アキレス腱にわずかな腱付着部症があった（白い矢頭）。

30

【図7】図7A～図7Gは、症例3の別の息子の脊椎CT、ならびに股関節、膝関節およびアキレス腱のX線写真を示す。（図7A）脊椎CT、（図7B）右股関節、（図7C）左股関節、（図7D）右膝関節、（図7E）左膝関節、（図7F）右アキレス腱、（図7G）左アキレス腱。左アキレス腱にわずかな腱付着部症があった（白い矢頭）。

【図8】図8は、患者3におけるENPP1バリエーションに関する、相補的DNAによって確認された複合ヘテロ接合体のサンガーシーケンシングを示す。クローン1型はENPP1バリエーションc.536A>Gを含有していたのに対して、別のENPP1バリエーションc.1352A>Gはクローン2型に位置し、複合ヘテロ接合体が示唆された。

【図9】図9は、ENPP1構造の非限定的な概略図と、本バリエーションの位置とを示す。ENPP1は、細胞質ドメイン（CD）と、膜貫通ドメイン（TM）と、2つのソマトメジンドメイン（SMB1およびSMB2）、触媒ドメインならびにヌクレアーゼ様ドメインから構成される細胞外ドメインとからなる。それぞれ、SMB2および触媒ドメインに位置するN179SおよびY451C。

40

【図10】図10は、WT、N179SおよびY451Cの酵素活性の比較を示す。WT ENPP1と比較した場合、N179SバリエーションおよびY451Cバリエーションは、酵素反応の速度の55%および70%の低下をそれぞれ示した。バーは、中央値および四分位値を示す。***: $p < 0.0001$ 。

【図11】図11は、野生型ENPP1前駆体タンパク質（SEQ ID NO:1）の完全な非プロセシングアミノ酸配列を示す。細胞質ゾル領域および膜貫通領域には下線が引かれている。潜在的なN-グリコシル化部位は太字である。PSCAKE（残基99～104;囲み）は、SM

50

B1（残基104～144）およびSMB2（残基145～189）を含む可溶性ENPP1タンパク質部分の開始である。

【図12】図12は、示される毎週の皮下用量のビヒクルまたはENPP1を投与されたWTマウスおよびEnpp1^{asj}マウスにおける血漿PPIの応答（図12）を示す。 $*p<0.05$ 、 $**p<0.01$ ；(ANOVA、Kruskal-Wallis検定)。

【図13】図13は、示される毎週の皮下用量のビヒクルまたはENPP1構築物#1118および#2000を投与された17週齢のWT雄マウスおよび17週齢のEnpp1^{asj}雄マウスにおける傍脊椎骨棘および強直症の応答を示す。構築物#1118を3週目から週1回投与し、構築物#2000を5週目から週1回投与した。マイクロCT画像は、構築物#2000における傍脊椎骨棘および強直症の減弱を優先的に実証し、1mg/Kgの毎週用量で投与されたEnpp1^{asj}雄マウスおよびEnpp1^{asj}雌マウスの両方で明らかである。

10

【図14】図14は、示される毎週の皮下用量のビヒクルまたはENPP1構築物#1118および#2000を投与された17週齢のWT雌マウスおよび17週齢のEnpp1^{asj}雌マウスにおける傍脊椎骨棘および強直症の応答を示す。構築物#1118を3週目から週1回投与し、構築物#2000を5週目から週1回投与した。マイクロCT画像は、構築物#2000における傍脊椎骨棘および強直症の減弱を優先的に実証し、1mg/Kgの毎週用量で投与されたEnpp1^{asj}雄マウスおよび雌マウスの両方で明らかである。

【図15A】図15A～図15Bは、示される毎週の皮下用量のビヒクルまたはENPP1構築物#1118および#2000を投与された17週齢のWTマウスおよび17週齢のEnpp1^{asj}マウスにおける聴覚脳幹応答を示す。構築物#1118を3週目から週1回投与し、構築物#2000を5週目から週1回投与した。刺激頻度の測定は、2mg/Kgの毎週用量のENPP1構築物#1118による、ならびに0.5および1mg/Kgの毎週用量のENPP1構築物#2000での、低周波数（8kHz）範囲での難聴の予防を実証している。1mg/Kgの毎週用量で投与されたENPP1構築物#2000では、高周波数範囲（32kHz）でも、ENPP1欠乏動物における聴力の改善が優先的に認められる。

20

【図15B】図15Aの説明を参照されたい。

【図16】図16は、示される毎週の皮下用量のビヒクルまたはENPP1構築物#1118および#2000を用いたWTマウスおよび17週齢のENPP1^{asj}マウスのインタクトなFGF23レベルを示す。構築物#1118を3週目から週1回投与し、構築物#2000を5週目から週1回投与した。データは、週に1mg/Kgおよび4mg/Kgで投与した場合、ENPP1構築物#2000では、インタクトなFGF23が抑制されることを優先的に実証している。WTレベルとの差を評価するために、ANOVA Kruskal-Wallis検定、続いて、Dunnの事後分析によって統計的有意性を評価した（一元配置ANOVA）。以下の注釈とともに、p値によって統計的有意性を表す： $*p<0.05$ 、 $**p<0.01$ 、 $***p<0.001$ 、 $****p<0.0001$ 。

30

【発明を実施するための形態】

【0056】

定義

本明細書において使用される用語は、本開示の文脈内、および各用語が使用される特定の文脈内で、当技術分野における通常の意味を一般に有する。特定の用語は、本開示の組成物および方法ならびにそれらを作製および使用する方法を説明する際に実施者に追加の指針を提供するために、以下に、または本明細書の他の箇所で説明される。用語の任意の使用の範囲または意味は、その用語が使用される具体的な文脈から明らかであろう。

40

【0057】

本明細書において使用される場合、用語「DISH」は、フォレストイエ病としても知られている広汎性特発性骨増殖症を指し、異常な新たな骨形成を特徴とする骨障害である（Resnick et al., Diffuse idiopathic skeletal hyperostosis (DISH) : Forestier's disease with extraspinal manifestations, Radiology. 1975;115:513-524）。DISHは、体内の靱帯および腱を石灰化（硬化）させ、ならびに/または脊椎周囲および骨格領域に新たな骨成長を出現させる（骨化塊）。これらの石灰化領域は、場合によ

50

っては、疼痛、硬直および可動性低下を引き起こす可能性がある骨棘（異常な新たな骨成長）を形成することもある。新たな骨は、ほとんどの場合、靱帯および腱が骨に接合する場所（腱付着領域）に形成されるが、腱付着部石灰化と脊椎周囲骨化塊との関係は理解されていない。骨の全体的な硬化、および骨の過成長（骨増殖症）もある（Pillai & Littlejohn, Metabolic Factors in Diffuse Idiopathic Skeletal Hyperostosis-A Review of Clinical Data, The Open Rheumatology Journal. 2014; 8:116-128）。この疾患の別の局面は、異常な骨成長に起因する大きな流動性の骨棘の形成である。これらの骨化は、ほとんどが軸骨格に見られ、軸骨格の胸部領域が主な位置である。また、膝蓋周囲靱帯（peripatellar ligament）、アキレス腱挿入部、足底筋膜、肩、肘頭および中手指節関節などの末梢腱付着部も石灰化を有する可能性がある。場合によっては、股関節、膝、足首、足、肩、手および肋骨に石灰化が見られる（Helfgott, Diffuse idiopathic skeletal hyperostosis (DISH). UpToDate. June 7, 2017）。DISHの一般的な特徴および/または症状には、前縦靱帯の限局性および広汎性の石灰化および骨化、傍脊椎結合組織および線維輪の石灰化、末梢線維輪線維の変性、線維組織の前外側伸長、血管過多、慢性炎症性細胞浸潤、椎体の前面の骨膜新生骨形成、中手指節関節の骨化、胸部領域、腰部領域および/もしくは頸部領域の疼痛、神経根症、多関節痛、単関節滑膜炎、ならびに/または嚥下障害が含まれる。

10

【0058】

DISHは、腱および靱帯におけるカルシウム塩の蓄積（石灰化）、ならびに異常な新たな骨成長（骨化）として現れるが、その理由は不明である（Mader et al., Diffuse idiopathic skeletal hyperostosis: clinical features and pathogenic mechanisms, Nat Rev Rheumatol. December 2013; 9 (12) : 741-50 および Nascimento et al., Diffuse idiopathic skeletal hyperostosis: A review, Surgical Neurology International. 2014; 5 (Suppl 3) : S122-S125）。DISHを発症する一般的な危険因子には、限定されることなく、大きい腹囲、BMI/肥満、高インスリン血症、真性糖尿病、高尿酸血症、脂質異常症、高血圧、冠動脈疾患および痛風が含まれる。DISHは無症候性であり得、その場合、診断はX線撮影画像に基づいて通常行われる。

20

【0059】

DISHは、加齢に関連する進行性の筋骨格疾患である。DISHの有病率は、中西部の大きな2つの病院集団では、50歳を超える男性の25%および女性の15%であった。加えて、日本人集団の最大6.3%、および北米の変性頸髄症（degenerative cervical myelopathy）患者の25%が、OPLLとして公知の状態で脊椎後縦靱帯に進行性の石灰化を発症する。腱付着部における進行性のカルシウム沈着は、成長する傍脊椎塊から脊柱管狭窄症および脊髄圧迫をもたらす。結果として生じる脊髄症は、多くの場合、重度の疼痛性および消耗性である。症候性経過に関与する進行性骨化を予防する有効な治療法はなく、異所性石灰化の開始および促進に関与する因子はほとんど理解されていないため、治療は、通常、NSAIDによる保存的慢性疼痛管理からなる。急性症例では短期間の軽減を提供するために手術による減圧が使用されるが、OPLLにおける腱付着部の進行は、保存的に管理された患者よりも手術（椎弓形成術）後の方が迅速に起こり（それぞれ24%対70%）、重度の症候性の症例を除くあらゆる症例の外科的介入を思いとどまらせる。

30

40

【0060】

DISHを有する対象とは、本明細書において使用される場合、DISHと診断された対象を指す。DISHの診断は、放射線学および/または臨床的所見に基づき、Resnick and Niwayanaによって定義される。胸椎および腰椎のX線撮影は、DISHの診断では最も有用な唯一の画像診断法である。コンピュータ断層撮影（CT）走査を使用して、骨折などの合併症、または気管、食道および静脈に対する圧力の影響によって引き起こされ得る症状を評価することができる。これにより、実体を強直性脊椎炎またはOPLLに区別することが可能になる（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

50

give the typical postural abnormalities of advanced ankylosing spondylitis, *Rheumatology* 2007 Nov 1;46 (11):1709-11)。椎間板高が維持された少なくとも4つの連続する椎骨（3つの椎間板隙にわたる）の前外側の側面（前縦靱帯）に主に沿った流動性の石灰化および骨化の存在は、DISHを示す。DISH患者のX線写真およびCT画像上に見える、脊椎および脊椎外の特徴（Radswiki&Baba, Diffuse idiopathic skeletal hyperostosis. 参考論文、Radiopaedia.org）は、以下の通りである：

非限定的な脊椎の特徴：

- ・流動性の骨化：少なくとも4つの隣接する椎骨の前側または右前外側の側面に沿った鮮紅色の流動性の骨化
- ・椎間板隙は、通常良好に維持される
- ・頸椎または腰椎よりも胸椎の方が強直症が多い
 - ・頻繁に不完全
 - ・流動性の骨化の際に突出した椎間板物質の交互嵌合領域を有し得る
- ・仙腸関節炎または椎間関節強直症は存在しないが、前仙腸関節ブリッジング（bridging）、後ブリッジング、腱付着ブリッジングが存在し得る 10

非限定的な脊椎外の特徴：

- ・腸骨稜、坐骨結節および大転子の腱付着部症
- ・付属肢骨格（肘頭、踵骨、膝蓋靱帯）に骨棘形成が頻繁に存在する
- ・「whiskering」付着部骨棘

非限定的な臨床的特徴：

- ・疼痛
- ・可動域の低減
- ・一部の患者では脊椎骨折のリスク上昇。

【0061】

場合によっては、DISHは症候性になり、主な臨床的特徴には、疼痛、硬直および可動性（可動域）低下、嚥下障害（骨棘の圧迫によって引き起こされる）、食道閉塞、嘔声、頸髄症、環軸椎亜脱臼、脊椎管狭窄、後縦靱帯の骨化、脊髄損傷、呼吸困難、異物感、脊髄の圧迫による神経学的症状、高コレステロール血症（心血管併存疾患をもたらす）、ならびに/または末梢関節病変のうちの1つまたは複数が含まれる。

【0062】

「腱付着部」は、骨への腱または靱帯の付着部位であり、4つの区域、すなわち、線維芽細胞型細胞（腱細胞）によって占められ、I型コラーゲンおよびIII型コラーゲンとデコリンとから構成される緻密な線維性結合組織区域；線維軟骨細胞（fibrochondrocyte）によって占められ、I型コラーゲンおよびII型コラーゲンとアグリカンとから構成される非石灰化線維軟骨；肥大軟骨細胞によって占められ、II型コラーゲンおよびX型コラーゲンとアグリカンとから構成される石灰化線維軟骨；ならびに骨芽細胞、骨細胞および破骨細胞によって占められ、I型コラーゲンから構成される骨に構造化されている（Calejo et al., *Enthesis tissue engineering: biological requirements meet at the interface*, *Tissue Eng Part B Rev.* 2019;25 (4):330-356)。したがって、腱付着部は、2つの大きく異なる組織、腱または靱帯（柔軟な軟組織）と骨（堅い硬組織）との間の滑らかな移行を可能にする筋骨格構造を表す（Calejo et al., *Enthesis tissue engineering: biological requirements meet at the interface*, *Tissue Eng Part B Rev.* 2019;25 (4):330-356）。この界面での急激な移行は、区域間の応力集中と、故障リスクの増加とにつながる。逆に、腱付着部上の組成および構造の緩やかな移行は、応力集中を緩和する。（Genin et al., *Functional grading of mineral and collagen in the attachment of tendon to bone*, *Biophys J.* 2009;97 (4):976-985）。腱から骨に向かってコラーゲン線維の整列の漸進的な減少とミネラル含有量の増加とが見られ、組織剛性の勾配が作り出される（Genin et al., *Functional grading of mineral and collagen in the attachment of tendon to bone*, *Biophys J.* 2009;97 (4):976-985）。腱付着部石灰化の減少は、この構造の強度を低下させ

るが (Deymier et al., Micro-mechanical properties of the tendon-to-bone attachment, Acta Biomater. 2017; 1 (56) :25-35)、石灰化線維軟骨の拡大を伴う動物モデルも、腱付着部強度の低下を示す (Marinovich et al., The role of bone sialoprotein in the tendon-bone insertion, Matrix Biol. 2016; 52-54:325-338)。したがって、石灰化は、腱付着部の最適な機械的特性を達成するために適切に調節されなければならない。

【0063】

本明細書において使用される場合、「強直性脊椎炎」は、典型的には脊椎が骨盤に接合する場所の脊椎の関節の長期炎症を特徴とする関節炎の一種を指す。患部には肩または股関節などの他の関節が含まれ得、眼および腸の問題、ならびに背部痛が起こる場合もある。患部における関節可動性は、一般に、経時的に悪化する。

10

【0064】

強直性脊椎炎の原因は不明であるが、遺伝的要因と環境的要因との組合せを伴うと考えられている。多くの罹患者は、HLA-B27抗原として公知の特異的なヒト白血球抗原を有する。根底にある機構は、自己免疫性または自己炎症性であると考えられている。診断は、症状に典型的に基づき、医学的撮像および血液検査からの支援を伴う。強直性脊椎炎は、血清陰性脊椎関節症の一種であり、これは、試験ではリウマチ因子 (RF) 抗体の存在が示されないことを意味する。強直性脊椎炎の治癒は知られていない。治療には、投薬、運動、理学療法、およびまれに手術が含まれ得る。使用される医薬品には、NSAID、ステロイド、スルファサラジンなどのDMARD、およびTNF阻害剤などの生物学的薬剤が含まれる。ヒト全体の約0.1%および約0.8%が罹患し、典型的には若年成人に発症する。男性と女性とは等しく罹患するが、女性は、癒合よりも炎症を経験する可能性が男性よりも高い。

20

【0065】

本明細書において使用される場合、「脊椎関節炎」または「SpA」は、軸骨格 (仙腸関節炎、脊椎炎)、周辺関節および腱付着部の炎症を特徴とする。前部ぶどう膜炎、乾癬および炎症性腸疾患などの骨格外症状が起こる場合がある。HLA-B27は、主要な遺伝的危険因子である。SpA群全体の世界的な有病率は0.1%~1.9%であり、国と民族との間にばらつきがある。非ステロイド系抗炎症薬 (一般にNSAIDと呼ばれる) は、疼痛および腫脹を低減することによって、ほとんどの患者に症状軽減をもたらす。抗TNF薬 (TNF遮断薬) および抗IL-17薬 (IL-17遮断薬) を含む、生物製剤と呼ばれる他の薬物は、NSAIDに十分に応答しない患者に有効である。

30

【0066】

「ENPP1欠乏」は、対象の血清および/または血漿中のENPP1酵素活性レベルの低下を特徴とする。ENPP1欠乏は、ENPP1酵素をコードするENPP1遺伝子の変異を不活性化することによって引き起こされるまれな遺伝性障害である。ENPP1は、その細胞外ドメインがピロホスファターゼ活性およびホスホジエステラーゼ活性を有する内在性膜貫通タンパク質である。ENPP1は、細胞外ATPを無機ピロリン酸 (PPi) およびAMPに変換する。

【0067】

ENPP1ポリペプチドに関して「酵素的に活性」、または本明細書において使用される場合、ENPP1ポリペプチドに関して「酵素活性」は、AMPおよびPPiへのATP加水分解活性、ならびに/またはATPへのAP3A加水分解を有すると定義される。ENPP1は、ATPをAMPおよびPPiに容易に加水分解する。ENPP1の定常状態のMichaelis-Menten酵素定数は、基質としてATPを使用して決定される。ENPP1は、酵素反応のHPLC分析によってATPを切断することを実証され得、反応の基質および生成物の同一性は、ATP、AMPおよびADPの標準を使用することによって確認される。ATP基質は、ENPP1の存在下で経時的に分解し、酵素生成物AMPが蓄積する。様々な濃度のATP基質を使用して、ATPの存在下でENPP1の初期速度を導出し、データを曲線に当てはめて酵素速度定数を導出する。生理学的pHでは、ENPP1の速度定数は、 $K_m = 2 \mu M$ 、および $k_{cat} = 3.4 \pm 0$

40

50

$.4\text{ s}^{-1}$ である。

【0068】

本明細書において使用される場合、用語「血漿ピロリン酸 (PPI) レベル」は、動物の血漿中に存在するピロリン酸の量を指す。ある特定の態様では、動物には、ラット、マウス、ネコ、イヌ、ヒト、ウシおよびウマが含まれる。血小板からの放出に起因して、血清ではなく血漿中のPPIを測定する必要がある。PPIを測定する方法はいくつかあり、その1つは、ウリジン-ジホスホグルコース (UDPG) ピロホスホリラーゼ (Lust & Seegmiller, 1976, Clin. Chim. Acta 66:241-249; Cheung & Suhadolnik, 1977, Anal. Biochem. 83:61-63) を修飾して使用する酵素アッセイによるものである。

【0069】

典型的には、健康なヒト対象における血漿PPIレベルは、約 $1\text{ }\mu\text{M}$ ～約 $3\text{ }\mu\text{M}$ 、場合によっては $1\sim 2\text{ }\mu\text{M}$ の範囲である。血漿中のENPP1の正常レベルとは、健康な対象において血漿ピロリン酸 (PPI) の正常レベルを維持するために必要なENPP1タンパク質の量を指す。健康なヒトにおけるPPIの正常レベルは、 $2\sim 3\text{ }\mu\text{M}$ に相当する。ENPP1の欠乏を有する対象は、正常レベルよりも少なくとも10%低い、正常レベルよりも少なくとも20%低い、正常レベルよりも少なくとも30%低い、正常レベルよりも少なくとも40%低い、正常レベルよりも少なくとも50%低い、正常レベルよりも少なくとも60%低い、正常レベルよりも少なくとも70%低い、正常レベルよりも少なくとも80%低い、およびそれらの組合せからの範囲である、低いPPIレベルを示す。GACIに罹患している患者では、PPIレベルは $1\text{ }\mu\text{M}$ 未満であることが見出され、場合によっては検出可能なレベル未満である。PXEに罹患している患者では、PPIレベルは $0.5\text{ }\mu\text{M}$ 未満である (Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2014 Sep; 34 (9) :1985-9; Braddock et al., Nat Commun. 2015; 6:10006)。

【0070】

本明細書において使用される場合、用語「病的石灰化」は、軟組織、身体の分泌路および排泄路にカルシウム塩が異常に沈着し、それらを硬化させることを指す。死につつある組織および死んだ組織内で生じる異栄養性石灰化、ならびに細胞および組織の恒常性能力を超える細胞外カルシウムレベルの上昇 (高カルシウム血症) を特徴とする転移性石灰化の2つの種類がある。石灰化は、細胞、ならびに細胞外マトリックス成分、例えば、基底膜内のコラーゲン、および動脈壁内の弾性線維を伴い得る。石灰化しやすい組織のいくつかの例には、胃粘膜-胃の内側上皮内層、腎臓および肺、角膜、全身動脈ならびに肺静脈が挙げられる。

【0071】

本明細書において使用される場合、用語「病的骨化」は、骨系にない組織、または骨形成特性を通常示さない結合組織に骨が生じる病的状態を指す。骨化は、罹患している組織または器官の性質に応じて3つの種類に分類される: 軟骨内骨化は、軟骨内で生じ、軟骨に取って代わる骨化である; 膜内骨化は、結合組織内で生じ、結合組織に取って代わる、骨の骨化である; 変形骨化、通常は柔らかい身体構造における骨物質の発達; 異所性骨化とも呼ばれる。

【0072】

ENPP1の「欠乏」は、対象が血漿中のENPP1の正常レベルの5%～10%以下を有する状態を指す。健康なヒト対象におけるENPP1の正常レベルは、約 $10\sim 30\text{ ng/ml}$ である (Am J Pathol. 2001 Feb; 158 (2) :543-554)。

【0073】

「異所性石灰化」は、組織内のカルシウム塩の病的沈着、または軟組織内の骨成長を特徴とする状態を指す。

【0074】

「軟組織の異所性石灰化」は、軟組織に生じるリン酸カルシウム、ヒドロキシアパタイト、シュウ酸カルシウムおよびリン酸八カルシウムから典型的に構成され、軟組織の硬化の喪失をもたらす不適切な生体内鉱質形成を指す。「動脈石灰化」は、動脈および心臓弁

10

20

30

40

50

に生じ、動脈の硬化および/または狭窄をもたらす異所性石灰化を指す。動脈の石灰化は、動脈硬化プラーク負荷、および心筋梗塞のリスク増加、末梢血管疾患における虚血エピソードの増加、ならびに血管形成術後の解離のリスク増加と相関している。

【0075】

「静脈石灰化」は、静脈に生じ、静脈の弾力性を低下させ、血流を制限し、次いで、血圧の上昇と冠動脈の欠陥とをもたらす異所性石灰化を指す。

【0076】

「血管石灰化」は、血管系内のミネラルの病的沈着を指す。これは、内膜石灰化および内側石灰化を含む様々な形態を有するが、心臓の弁にも見られ得る。血管石灰化は、アテローム性動脈硬化症、糖尿病、特定の遺伝状態、および腎疾患、特にCKDに関連する。血管石灰化を有する患者は、有害な心血管事象のリスクが高い。血管石灰化は、多種多様な患者に影響を及ぼす。特発性乳児動脈石灰化は、新生児の動脈が石灰化するまれな形態の血管石灰化である。

【0077】

「脳石灰化」(BC)は、血管壁および組織実質内にカルシウムおよび他のミネラルの沈着が生じ、ニューロン死およびグリオーシスをもたらす非特異的な神経病理を指す。脳石灰化は、ダウン症候群、レビー小体病、アルツハイマー病、パーキンソン病、血管性認知症、脳腫瘍および/または様々な内分泌学的状態を含む様々な慢性および急性脳障害に関連することが多い。

【0078】

心臓組織の石灰化とは、心臓の組織、例えば、大動脈組織および冠動脈組織内のカルシウム(場合により他のミネラルを含む)の沈着物の蓄積を指す。

【0079】

本明細書において使用される「ミネラル骨障害(MBD)」は、人の血液中のカルシウムおよびリンのレベルのバランスを崩す異常なホルモンレベルを特徴とする障害を指す。ミネラルおよび骨の障害は、CKDを有する人々に一般に起こり、透析を受けている、腎不全を有するほとんどの人々に発症する。

【0080】

本明細書において使用される場合、用語「早期発症骨粗鬆症」は、背部痛、前屈姿勢、および/または骨量のゆっくりとした喪失を一般に特徴とする、骨粗鬆症の初期段階を指す。一般的な原因には、低カルシウム食、喫煙、加齢性ホルモン変化が含まれる。

【0081】

「骨減少症」は、骨の脆弱化と、骨折のリスクの増加とをもたらす、骨密度の低下を特徴とする骨の状態である。骨軟化症は、新たに形成された骨の石灰化の減少を特徴とする骨障害である。骨軟化症は、重度のビタミンD欠乏症(栄養性であり得るか、または遺伝性症候群によって引き起こされ得る)によって、および極めて低い血中リン酸レベルを引き起こす状態によって引き起こされる。骨軟化症および骨減少症はいずれも、骨を破壊するリスクを増加させる。骨軟化症の症状には、骨痛および筋力低下、骨圧痛、歩行困難ならびに筋攣縮が含まれる。

【0082】

本明細書において使用される「加齢性骨減少症」は、骨密度が正常よりも低い状態を指す。一般に、骨減少症患者は、-1.0~-2.5の骨密度Tスコアを有する。骨減少症は、未治療のまま放置すると、骨が脆くなり、極めて骨折しやすくなる骨粗鬆症に進行する。

【0083】

本明細書において使用される「後縦靱帯骨化症(OPLL)」は、後縦靱帯の異所性石灰化をもたらす骨過形成(hyperostotic)(過剰な骨成長)状態を指す。後縦靱帯は、脊柱の骨を接続し、安定させる。肥厚または石灰化した靱帯は、脊髄を圧迫し、脊髄症を引き起こすことがある。脊髄症の症状には、歩行困難、ならびに腸および膀胱の制御困難が含まれる。OPLLはまた、神経根症、または神経根の圧迫を引き起こし得る。頸部神経根症の症状には、頸部、肩、腕または手の疼痛、刺痛またはしびれが含まれる。胸部領域お

10

20

30

40

50

よび前縦靱帯でも骨化が起こるDISHとは異なり、OPLLでは後縦靱帯でのみ骨化が起こるため、OPLLはDISHとは異なる。

【0084】

OPLLによって引き起こされる臨床症状および徴候は、(1) 脊髄症、または上肢および下肢の運動および感覚の障害、痙縮、および膀胱機能障害を伴う脊髄病変; (2) 上肢の疼痛および感覚障害を伴う頸部神経根症; ならびに (3) 頸部周辺の疼痛および硬直を伴う、軸方向の不快感に分類される。OPLLの初期段階における最も一般的な症状には、手の感覚異常および刺痛感覚、ならびにぎこちなさが含まれる。神経障害の進行に伴い、歩行障害などの下肢症状が現れることがある。OPLLは、側方単純X線写真を用いて検出され、頸部OPLLの診断および形態学的詳細は、磁気共鳴画像法 (MRI) およびコンピュータ断層撮影 (CT) によって明確に実証されている。

10

【0085】

OPLLは、頸髄症を有するアメリカ人、さらに広範囲にアジア人集団では一般的である。脊髄症および可動性低下は年齢とともに徐々に悪化し、脊髄症および硬直に關与する傍脊椎骨化の進行を予防する有効な手段はない。現在の治療法は症状の軽減に焦点を当てており、手術は短期的には有用であり得るが、腱付着部症のその後の急速な進行と、症状の再発とは、多くの場合、この手法を複雑にする。

【0086】

急速進行性のOPLLを有する患者は、いずれもDISHおよびOPLLと同様の腱付着部症を示す、まれな障害であるX連鎖性低リン血症 (XLH) および常染色体潜性低リン血症性くる病 (ARHR) の中心的な所見である循環FGF23の上昇を示す (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)。これらの所見は、腱付着部症の病因に果たすFGF23 (または結果として生じる低リン血症) の原因的役割を示しているが、FGF23の上昇および/またはホスフェートの減少が腱付着部症または脊椎骨化を誘発し得る機序は不明である。

20

【0087】

本明細書において使用される「遺伝性低リン血症性くる病」は、血液中の低レベルのホスフェートに關連する障害 (低リン血症) を指す。ホスフェートは、骨および歯の正常な形成に不可欠なミネラルである。最も一般的には、これは、PHEX遺伝子の変異によって引き起こされる。この状態に關与し得る他の遺伝子には、CLCN5遺伝子、DMP1遺伝子、ENPP1遺伝子、FGF23遺伝子およびSLC34A3遺伝子が含まれる。遺伝性低リン血症性くる病の他の徴候および症状には、頭蓋骨の早すぎる融合 (頭蓋縫合早期癒合症)、および歯牙の異常が含まれ得る。この障害はまた、靱帯および腱が関節に付着する場所の異常な骨成長 (腱付着部症) を引き起こし得る。成人では、低リン血症は、骨軟化症として公知の、骨の軟化を特徴とする。別のまれな種類の障害は、高カルシウム尿症を伴う遺伝性低リン血症性くる病 (HHRH) として公知であり、この場合、低リン血症に加えて、この状態は、尿中の高レベルのカルシウムの排泄 (高カルシウム尿症) を特徴とする。

30

40

【0088】

「X連鎖性低リン血症 (XLH)」本明細書において使用される場合、X連鎖性顕性低リン血症性くる病またはX連鎖性ビタミンD抵抗性くる病とも呼ばれるX連鎖性低リン血症 (XLH) という用語は、ビタミンD補充がそれを治癒させないという点で、くる病のほとんどの場合とは異なる、X連鎖性顕性形態のくる病 (または骨軟化症) である。これは、低身長および内反膝 (O脚) を含む骨変形を引き起こす可能性がある。これは、PHEX遺伝子配列 (Xp.22) の変異、およびPHEXタンパク質のその後の不活性に關連する。

【0089】

本明細書において使用される「常染色体潜性低リン血症性くる病2型 (ARHR2)」は、低リン血症、くる病および/または骨軟化症、ならびに成長の遅れを特徴とする遺伝性腎

50

ホスフェート消費障害を指す。常染色体潜性低リン血症性くる病2型 (ARHR2) は、ENPP1遺伝子のホモ接合性機能喪失変異によって引き起こされる。

【0090】

本明細書において使用される「常染色体顕性低リン血症性くる病 (ADHR)」は、尿中のホスフェートの過剰な喪失が、形成不良な骨 (くる病)、骨痛、および歯の膿瘍をもたらすまれな遺伝性疾患を指す。ADHRは、線維芽細胞増殖因子23 (FGF23) の変異によって引き起こされる。ADHRは、骨の石灰化障害、くる病、および/または骨軟化症、カルシトリオール (1,25-ジヒドロキシビタミンD3) のレベルの抑制、腎ホスフェート消費、ならびに低い血清ホスフェートを特徴とする。FGF23の変異は、該タンパク質をさらに安定にし、プロテアーゼによって切断不能にし、FGF23の生物活性の増強をもたらす。FGF23変異体の活性の増強は、近位尿細管細胞の頂端表面上のリン酸ナトリウム共輸送体、NPT2aおよびNPT2cの発現を減少させ、腎ホスフェート消費をもたらす。

10

【0091】

「低リン血症性くる病」 (以前はビタミンD抵抗性くる病と呼ばれていた) は、血液中のホスフェートレベルが低いために、骨が痛みを伴って柔らかくなり、容易に曲がる障害である。症状には、脚の湾曲、および他の骨変形;骨痛;関節痛;骨成長不良;ならびに低身長が含まれ得る。一部の罹患した乳児では、頭蓋骨間の空間が早く閉じすぎて頭蓋縫合早期癒合症に至る。ほとんどの患者は、リン酸カルシウム代謝の異常、歯のエナメル質の異常、歯の萌出遅延、および細長い頭部 (長頭症) を示す。

【0092】

本明細書において使用される場合、用語「ENPP1ハプロ不全」は、ENPP1遺伝子の1つのコピーが不活性化または欠失しており、ENPP1遺伝子の残りの機能的コピーが、正常な機能を維持するために必要とされる遺伝子産物を生成するのに十分でない遺伝的状態を指す。ENPP1ハプロ不全の結果として、必ずしもそうである必要はないが、低PPiレベルおよび病的石灰化の形態で現れ得る。DISH、または骨粗鬆症の早期発症のような疾患は、ある特定の態様では、ENPP1ハプロ不全に関連し得る、および/またはENPP1ハプロ不全によって引き起こされ得る。

20

【0093】

ほとんどの遺伝子では、単一コピーは、二倍体生物の正常な成長および発達を支援するのに十分であるが、ハプロ不全 (HI) 遺伝子として公知の遺伝子の小さなサブセットは、遺伝子量の減少に対して極端な感受性を示す。生物の寿命にわたる遺伝子不活性化変異の比較的高い頻度、および遺伝子発現の細胞間変動性を考慮すると、ハプロ不全は、生物の適応性に対する重大な障壁である。遺伝学におけるハプロ不全は、二倍体生物における顕性遺伝子作用のモデルを表し、この場合、バリエーション対立遺伝子とヘテロ接合性に組み合わされた遺伝子座における野生型対立遺伝子の単一コピーは、野生型表現型を生じさせるには不十分である。ハプロ不全は、バリエーション対立遺伝子におけるデノボまたは遺伝性機能喪失変異から生じ得、その結果遺伝子産物をほとんどまたは全く生成しない。

30

【0094】

例えば、ENPP1におけるN179S変異は、ENPP1タンパク質の機能喪失をもたらすことが見出されている。N179S変異を有する変異ENPP1遺伝子の単一コピーの存在は、PPi生成を減少させる。本発明は、N179S変異が、DISH、または骨粗鬆症の早期発症を有する特定の患者に見られ、ある特定の態様では、DISHまたは骨粗鬆症の存在または将来の発症および/もしくは進行の遺伝子マーカーとして役立ち得ることを開示する。

40

【0095】

同様に、ENPP1におけるY451C変異は、ENPP1タンパク質の機能喪失をもたらすことが見出されている。Y451C変異を有する変異ENPP1遺伝子の単一コピーの存在は、PPi生成を減少させる。本発明は、Y451C変異が、DISH、または骨粗鬆症の早期発症を有する特定の患者に見られ、ある特定の態様では、DISHまたは骨粗鬆症の存在または将来の発症および/もしくは進行の遺伝子マーカーとして役立ち得ることを開示する。

【0096】

50

本明細書において使用される「前治療」は、本明細書において記載される治療方法の開始前の治療を意味する。

【0097】

本明細書において使用される用語「対象」は、個体、例えば、哺乳動物、例えば、ヒト、非ヒト霊長類（例えば、チンパンジーならびに他の類人猿およびサル種）、家畜（例えば、鳥類、魚類、ウシ、ヒツジ、ブタ、ヤギおよびウマ）、飼育哺乳動物（例えば、イヌおよびネコ）、または実験動物（例えば、マウス、ラットおよびモルモットなどの齧歯類）を指す。該用語は、任意の年齢または性別の対象を含む。別の態様では、対象は、哺乳動物、好ましくはヒトである。

【0098】

疾患または障害は、その疾患もしくは障害の症状の重症度、そのような症状が患者によって経験される頻度、またはその両方が低減する場合、「緩和される」。

【0099】

本明細書において使用される場合、用語「変更」、「欠陥」、「変動」または「変異」は、それがコードするポリペプチドの機能、活性、発現（転写もしくは翻訳）または立体配座に影響を及ぼす、細胞内の遺伝子の変異、例えば、ミスセンス変異およびナンセンス変異、挿入、欠失、フレームシフトならびに早期終了を指す。

【0100】

「疾患」は、動物が恒常性を維持することができず、疾患が改善されない場合、動物の健康が悪化し続ける、動物の健康状態である。

【0101】

動物の「障害」は、動物が恒常性を維持することができるが、動物の健康状態が、障害がない場合よりも好ましくない健康状態である。未治療のままでも、障害は、必ずしも動物の健康状態をさらに低下させない。

【0102】

本明細書において使用される場合、用語「ENPP」または「NPP」は、エクトヌクレオチドピロホスファターゼ/ホスホジエステラーゼを指す。

【0103】

本明細書において使用される場合、用語「ENPP1タンパク質」または「ENPP1ポリペプチド」は、ENPP1遺伝子によってコードされるエクトヌクレオチドピロホスファターゼ/ホスホジエステラーゼ-1タンパク質を指す。コードされるタンパク質は、II型膜貫通糖タンパク質であり、ヌクレオチドおよびヌクレオチド糖のホスホジエステル結合、ならびにヌクレオチドおよびヌクレオチド糖のピロリン酸結合を含む様々な基質を切断する。ENPP1タンパク質は、膜貫通ドメインと可溶性細胞外ドメインとを有する。細胞外ドメインは、ソマトメジンBドメイン、触媒ドメイン（SEQ ID NO:1の残基186～586）およびヌクレアーゼドメイン（SEQ ID NO:1の残基524～885）にさらに細分される。野生型ENPP1の配列および構造は、参照によりその全体が本明細書に組み入れられる、BraddockらのPCT出願公開番号WO 2014/126965に詳細に記載されている。

【0104】

哺乳動物ENPP1ポリペプチド、その変異体または変異体断片は、いずれも参照によりその全体が本明細書に組み入れられる、Braddockらの国際PCT出願公開番号WO/2014/126965、BraddockらのWO/2016/187408、BraddockらのWO/2017/087936、およびBraddockらのWO2018/027024に以前に開示されている。

【0105】

本明細書において使用される場合、用語「ENPP1前駆体タンパク質」は、ENPP1 N末端にそのシグナルペプチド配列を有するENPP1を指す。タンパク質分解の際に、シグナル配列（ある特定の非限定的な態様では、式（I）の化合物におけるWによって示される）がENPP1から切断されて、ENPP1タンパク質が提供される。本発明内で有用なシグナルペプチド配列には、限定されることなく、アルブミンシグナル配列、アズロシジンシグナル配列、ENPP1シグナルペプチド配列、ENPP2シグナルペプチド配列、ENPP7シ

10

20

30

40

50

グナルペプチド配列および/またはENPP5シグナルペプチド配列が含まれる。

【0106】

本明細書において使用される場合、用語「ENPP1-Fc構築物」は、IgG分子（好ましくは、ヒトIgG）のFcR結合ドメインに組換え融合されたおよび/または化学的にコンジュゲートされた（共有結合コンジュゲーションおよび非共有結合コンジュゲーションの両方を含む）ENPP1を指す。ある特定の態様では、ENPP1のC末端は、FcR結合ドメインのN末端に融合またはコンジュゲートされる。

【0107】

本明細書において使用される場合、用語「Fc」は、ヒトIgG（免疫グロブリン）Fcドメインを指す。IgGのサブタイプ、例えば、IgG1、IgG2、IgG3およびIgG4は、Fcドメインとしての使用が企図される。

10

【0108】

本明細書において使用される場合、「Fc領域またはFcポリペプチド」は、IgG分子のパパイン消化によって得られる結晶化可能な断片と相関する、IgG分子の部分である。Fc領域は、ジスルフィド結合によって連結された、IgG分子の2つの重鎖のC末端半分を含む。Fc領域は、抗原結合活性を有しないが、炭水化物部分と、補体、およびFcRn受容体を含むFc受容体に対する結合部位とを含有する。Fc断片は、第2の定常ドメインCH2全体（Kabatナンバリング系によるヒトIgG1の残基231～340）と、第3の定常ドメインCH3（残基341～447）とを含有する。用語「IgGヒンジ-Fc領域」または「ヒンジ-Fc断片」は、Fc領域（残基231～447）と、Fc領域のN末端から延びるヒンジ領域（残基216～230）とからなる、IgG分子の領域を指す。用語「定常ドメイン」は、免疫グロブリンの他の部分、抗原結合部位を含有する可変ドメインよりも保存されたアミノ酸配列を有する、免疫グロブリン分子の部分の部分を指す。定常ドメインは、重鎖のCH1ドメイン、CH2ドメインおよびCH3ドメインと、軽鎖のCHLドメインとを含有する。

20

【0109】

本明細書において使用される場合、核酸に適用される用語「断片」は、さらに大きな核酸の部分配列を指す。核酸の「断片」は、少なくとも約15、少なくとも約50～100、少なくとも約100～500、少なくとも約500～1000、少なくとも約1000～1500ヌクレオチド、少なくとも約1500～2500、または少なくとも約2500ヌクレオチド（およびその間の任意の整数値）であり得る。本明細書において使用される場合、タンパク質またはペプチドに適用される用語「断片」は、さらに大きなタンパク質またはペプチドの部分配列を指し、少なくとも約20、少なくとも約50、少なくとも約100、少なくとも約200、少なくとも約300または少なくとも約400アミノ酸長（およびその間の任意の整数値）であり得る。

30

【0110】

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

40

【0111】

本明細書において使用される場合、用語「患者」、「個体」または「対象」は、ヒトを指す。

【0112】

本明細書において使用される場合、用語「薬学的組成物」または「組成物」は、本発明内で有用な少なくとも1つの化合物と薬学的に許容される担体との混合物を指す。薬学的組成物は、患者への化合物の投与を容易にする。限定されることなく、皮下投与、静脈内投与、経口投与、エアロゾル投与、吸入投与、直腸投与、膣投与、経皮投与、鼻腔内投与、頬側投与、舌下投与、非経口投与、髄腔内投与、胃内投与、眼投与、肺投与および局所投与を含む、化合物を投与する複数の技術が当技術分野において存在する。

50

【0113】

本明細書において使用される場合、用語「薬学的に許容される」は、化合物の生物学的活性または生物学的特性を無効にせず、比較的非毒性である材料であって、すなわち、望ましくない生物学的効果を引き起こすことなく、またはそれが含有される組成物の成分のいずれとも有害な様式で相互作用することなく、個体に投与され得る材料、例えば、担体または希釈剤、例えば、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）を指す。

【0114】

本明細書において使用される場合、用語「血漿ピロリン酸（PPi）レベル」は、動物の血漿中に存在するピロリン酸の量を指す。ある特定の態様では、動物には、ラット、マウス、ネコ、イヌ、ヒト、ウシおよびウマが含まれる。血小板からの放出に起因して、血清ではなく血漿中のPPiを測定する必要がある。PPiを測定する方法はいくつかあり、その1つは、ウリジン-ジホスホグルコース（UDPG）ピロホスホリラーゼ（Lust & Seegmiller, 1976, Clin. Chim. Acta 66:241-249; Cheung & Suhadolnik, 1977, Anal. Biochem. 83:61-63）を修飾して使用する酵素アッセイによるものである。典型的には、健康な対象における正常なPPiレベルは、約1 μ M～約3 μ M、場合によっては1～2 μ Mの範囲である。場合によっては、「低」レベルのPPiとは、対象が正常レベルの血漿ピロリン酸（PPi）の2%～5%以下を有する状態を指す（Arthritis and Rheumatism, Vol. 22, No. 8 (August 1979)）。

【0115】

ENPP1発現に欠陥がある対象は、正常レベルよりも少なくとも10%低い、正常レベルよりも少なくとも20%低い、正常レベルよりも少なくとも30%低い、正常レベルよりも少なくとも40%低い、正常レベルよりも少なくとも50%低い、正常レベルよりも少なくとも60%低い、正常レベルよりも少なくとも70%低い、正常レベルよりも少なくとも80%低い、およびそれらの組合せからの範囲である、低いPPiレベルを示す傾向がある。GACIに罹患している患者では、PPiレベルは1 μ M未満であることが見出され、場合によっては検出可能なレベル未満である。PXEに罹患している患者では、PPiレベルは0.5 μ M未満である（Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2014 Sep; 34 (9):1985-9; Braddock et al., Nat Commun. 2015; 6:10006）。

【0116】

本明細書において使用される場合、用語「ポリペプチド」は、ペプチド結合を介して連結されたアミノ酸残基、関連する天然構造バリエーション、およびその合成非天然類似体から構成されるポリマーを指す。

【0117】

本明細書において使用される場合、用語「PPi」は、ピロリン酸を指す。

【0118】

本明細書において使用される場合、用語「予防する」または「予防」は、障害もしくは疾患が発生していない場合、障害もしくは疾患の発症がないこと、または障害もしくは疾患が既に発症している場合、さらなる障害もしくは疾患の発症がないことを意味する。障害または疾患に関連する症状の一部または全部を予防する能力も考慮される。

【0119】

本明細書において使用される「試料」または「生体試料」は、対象から単離された生物学的材料を意味する。生体試料は、対象における生理学的プロセスまたは病理学的プロセスのmRNA、ポリペプチドまたは他のマーカーを検出するのに適した任意の生物学的材料を含有し得、個体から得られた流体、組織、細胞材料および/または非細胞材料を含み得る。

【0120】

本明細書において使用される場合、「実質的に精製された」は、他の成分を本質的に含まないことを指す。例えば、実質的に精製されたポリペプチドは、天然に存在する状態で通常会合している他の成分から分離されているポリペプチドである。非限定的な態様は、95%純度、99%純度、99.5%純度、99.9%純度および100%純度を含む。

【0121】

本明細書において使用される場合、用語「治療」または「治療すること」は、疾患もしくは障害および/もしくは疾患もしくは障害の症状を治癒させる、癒す、緩和する、軽減する、変化させる、治す、改善する、改良する、それに影響を及ぼす、および/もしくはそれを予防する、ならびに/または疾患もしくは障害および/もしくは疾患もしくは障害の症状の進行を最小限に抑えることを目的とした、患者への治療剤、すなわち、本発明内で有用な化合物の適用もしくは投与（単独で、もしくは別の薬学的作用物質と組み合わせで）、または疾患もしくは障害および/もしくは疾患もしくは障害の症状を有する患者から単離された組織もしくは細胞株への治療剤の適用もしくは投与（例えば、診断もしくはエクスピボ用途のために）として定義される。そのような治療は、薬理ゲノミクスの分野から得られた知識に基づいて、具体的に調整または改変され得る。

10

【0122】

本明細書において使用される用語「予防する」、「予防すること」および「予防」は、対象における疾患の発端を阻害すること、または対象における疾患の発生を減少させることを指す。予防は、完全（例えば、対象に病的細胞が完全に存在しないこと）または部分的であり得る。予防はまた、臨床状態に対する感受性の低減を指す。ある特定の態様では、「予防すること」は、疾患または障害の発症を予防することを含む。

【0123】

本明細書において使用される場合、用語「野生型」は、天然源から単離された遺伝子または遺伝子産物を指す。野生型遺伝子は、集団では最も頻繁に観察されるため、ヒトENPP1遺伝子の「正常」または「野生型」形態が任意に設計される。対照的に、用語「機能的に等価」は、野生型遺伝子または野生型遺伝子産物と比較した場合、配列および/または機能的特性に改変（すなわち、特徴の変化）を示すENPP1遺伝子またはENPP1遺伝子産物を指す。天然に存在する変異体を単離することができ、これらは、野生型遺伝子または野生型遺伝子産物と比較した場合、特徴の変化（核酸配列の変化を含む）を有するという事実によって同定される。

20

【0124】

本明細書において使用される用語「機能的に等価なバリエーション」は、ENPP1（上で定義された）の配列と実質的に相同であり、ENPP1の酵素活性および生物学的活性を維持するポリペプチドに関する。バリエーションが天然ENPP1の生物学的活性を維持するかどうかを決定する方法は、当業者に広く公知であり、本出願の実験部分で使用されるアッセイのいずれかを含む。特に、ウイルスベクターによって送達される、ENPP1の機能的に等価なバリエーションが本発明に包含される。

30

【0125】

ENPP1の機能的に等価なバリエーションは、天然ENPP1と実質的に相同なポリペプチドである。「実質的に相同」という表現は、タンパク質配列が上記のENPP1配列に対してそれぞれ少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%または少なくとも99%の同一性の程度を有する場合のタンパク質配列に関する。

40

【0126】

2つのポリペプチド間の同一性の程度は、当業者に広く公知のコンピュータアルゴリズムおよび方法を使用して決定される。2つのアミノ酸配列間の同一性は、BLASTPアルゴリズム（BLAST Manual, Altschul et al., NCBI NLM NIH Bethesda, Md. 20894, Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990)）を使用することによって好ましくは決定されるが、他の同様のアルゴリズムも使用することができる。本明細書において記載されるパラメータとともにBLASTおよびBLAST 2.0を使用して、パーセント配列同一性を決定する。BLAST分析を行うためのソフトウェアは、米国立生物工学情報センターを通じて公的に入手可能である。

【0127】

50

ENPP1の「機能的に等価なバリエーション」は、それぞれENPP1を産生するために使用される宿主細胞内のコドン優先の原因となる、ポリヌクレオチド内のヌクレオチドを置換することによって得られ得る。そのような「コドン最適化」は、University of Wisconsin Package Version 9.0, Genetics Computer Group, Madison, Wis.によって提供される、コドン優先に関する「Human high.cod」などのコドン頻度表を組み込むコンピュータアルゴリズムによって決定され得る。

【0128】

測定可能な値、例えば、量、持続時間などに言及する際に本明細書において使用される「約」は、指定された値（0.2 mg/kgまたは0.6 mg/kgまたは1.8 mg/kg）から±10%または±5%、ある特定の態様では±1~5%、ある特定の態様では±5%、ある特定の態様では±4%、ある特定の態様では±4%、ある特定の態様では±3%、ある特定の態様では±2%、およびある特定の態様では±1%の変動を包含することを意味し、そのような変動は、開示される方法を行うのに適切である。

10

【0129】

本開示は、タンパク質配列の代表的な例を提供する。記載されたタンパク質配列は、逆翻訳およびコドン最適化を行うことによって核酸配列に変換され得る。当技術分野において、そのような変換を可能にするExpasy (<https://www.expasy.org/>) およびバイオインフォマティクスサーバ (www.dot-bioinformatics.org) などの利用可能なくいくつかのツールがある

【0130】

20

範囲:本開示全体を通して、本発明による様々な局面は、範囲形式で提示され得る。範囲形式での説明は、単に便宜および簡潔さのためのものであり、本発明による範囲に対する柔軟性のない限定として解釈されるべきではないことを理解されたい。したがって、範囲の説明は、すべての可能な部分範囲、およびその範囲内の個々の数値を具体的に開示したと見なされるべきである。例えば、1~6などの範囲の説明は、1~3、1~4、1~5、2~4、2~6、3~6などのような部分範囲、ならびにその範囲内の個々の数、例えば、1、2、2.7、3、4、5、5.3および6を具体的に開示していると見なされるべきである。これは、範囲の幅に関係なく適用される。

【0131】

好ましい方法および材料が本明細書において記載されているが、本明細書において記載されるものと同様または同等の方法および材料も、本開示の方法および組成物の実施または試験に使用することができる。本明細書において言及されるすべての刊行物、特許出願、特許および他の参考文献は、参照によりその全体が組み入れられる。

30

【0132】

詳細な説明

1. ENPP1作用物質

ENPP1作用物質は、ENPP1ポリペプチドである。本明細書において開示されるENPP1ポリペプチドには、限定されることなく、ENPP1ファミリーの天然に存在するポリペプチド、ならびに生物学的活性、例えば、限定されることなく、ENPP1の触媒活性を保持するその任意のバリエーション（変異体、断片、融合物およびペプチド模倣形態を含む）が含まれる。

40

【0133】

ENPP1作用物質は、以下に示す式の形態:

W-PROTEIN-Z-DOMAIN-X-Y (I)

で表され得、

(I) において、

Wは、存在しないか、または細胞外空間への化合物の輸送を可能にするシグナル配列を含み、

PROTEINは、ENPP1の触媒領域を含み、

DOMAINは、存在しないか、またはヒトIgG Fcドメイン (Fc)、ヒト血清アルブミ

50

ンタンパク質 (ALB) およびその生物学的に活性な断片からなる群より選択される少なくとも1つであり、

XおよびZは、独立して、存在しないか、または1~20個のアミノ酸を含むポリペプチドであり、

Yは、存在しないか、または

D_m (SEQ ID NO:11), (DSS)_n (SEQ ID NO:12), (ESS)_n (SEQ ID NO:13),

(RQQ)_n (SEQ ID NO:14), (KR)_n (SEQ ID NO:15), R_m (SEQ ID NO:16),

DSSSEEKFLRRIGRFG (SEQ ID NO:17), EEEEEEEPRGDT (SEQ ID NO: 18),

APWHLSSQYSRT (SEQ ID NO: 19), STLPIPHFSRE (SEQ ID NO: 20),

VTKHLNQISQSY (SEQ ID NO: 116), および E_m (SEQ ID NO: 117)

10

からなる「骨標的化」配列群から選択される配列であり、

mは、独立して、1~15の範囲の整数であり、

nは、独立して、1~10の範囲の整数である。

【0134】

いくつかの態様では、Wは存在しない。いくつかの態様では、Wは、細胞外空間への化合物の輸送を可能にするシグナル配列を含む。

【0135】

いくつかの態様では、ENPP1作用物質は、骨標的化ドメインを含む。いくつかの態様では、骨標的化ドメインは、アミノ酸の負に荷電した配列である。いくつかの態様では、負に荷電した骨標的化ドメインはポリアスパラギン酸である。

【0136】

用語「ENPP1」または「ENPP1ポリペプチド」は、任意の種に由来するエクトヌクレオチドピロホスファターゼ/ホスホジエステラーゼ1タンパク質 (NPP1/ENPP1/PC-1) およびENPP1関連タンパク質を指す。ENPP1タンパク質は、ホモ二量体を形成するII型膜貫通糖タンパク質を含む。ENPP1タンパク質の各単量体は、原形質膜への標的化に関与する短い細胞内N末端ドメインと、膜貫通ドメインと、いくつかのドメインを含む大きな細胞外領域とを含む。大きな細胞外領域は、ENPP1二量体化に関与することが報告されているSMB1ドメインおよびSMB2ドメインを含む (Gijssbers et al., Biochem. J. 371;2003:321-330)。具体的には、SMBドメインは、4つのジスルフィド結合にそれぞれ配置された8つのシステイン残基を含有し、共有結合性シスチン分子間結合および共有結合性シスチン分子内結合を介してENPP1ホモ二量体化を媒介することが示されている。該タンパク質は、ヌクレオチドおよびヌクレオチド糖のホスホジエステル結合、ならびにヌクレオチドおよびヌクレオチド糖のピロリン酸結合を含む様々な基質を切断する。ENPP1タンパク質は、ヌクレオシド5'トリホスファターゼを対応するいずれかのモノホスフェートに加水分解し、ジアデノシンポリリン酸も加水分解するように機能する。ENPP1タンパク質は、心血管機能、神経機能、免疫機能、筋骨格機能、ホルモン機能および血液機能の調節に関与するプリン作動性シグナル伝達に何らかの役割を果たす。ヒトENPP1前駆体タンパク質の例示的なアミノ酸配列 (NCBIアクセッションNP_006199) を図11に示す (SEQ ID NO:1)。ヒトENPP1前駆体タンパク質は、ENPP1 N末端に内因性ENPP1シグナルペプチド配列を含む。本明細書において記載されるあらゆるENPP1関連ポリペプチドに対するアミノ酸のナンバリングは、別途具体的に指定されない限り、図2に提供されるヒトENPP1前駆体タンパク質配列のナンバリングに基づく。ある特定の態様では、ENPP1前駆体タンパク質は、内因性シグナルペプチド配列または異種シグナルペプチド配列をさらに含む。タンパク質分解の際に、シグナルペプチド配列は、ENPP1前駆体タンパク質から切断されて、成熟ENPP1タンパク質が提供される。例えば、Jansen et al. J Cell Sci.2005;118 (Pt 14):3081-9を参照されたい。本明細書において開示されるポリペプチドとともに使用され得る例示的なシグナルペプチド配

20

30

40

50

列には、限定されることなく、ENPP1シグナルペプチド配列、ENPP2シグナルペプチド配列、ENPP7シグナルペプチド配列および/またはENPP5シグナルペプチド配列が含まれる。非限定的なプロセッシングされた（成熟）細胞外ENPP1ポリペプチド配列をSEQ ID NO:2に示す。

【0137】

ENPP1が脊椎動物間でよく保存されており、細胞外ドメインの大きなストレッチが実質的に保存されていることは、当技術分野において一般に公知である。例えば、図7A～図7Bは、様々なENPP1オルソログと比較した、ヒトENPP1細胞外ドメインの多重配列アラインメントを示す。様々なヌクレオチド三リン酸（例えば、ATP、UTP、GTP、TTPおよびCTP）、pNP-TMP、3',5'-cAMP、ならびに2'-3'-cGAMPへのENPP1結合も高度に保存されている（例えば、Kato et al., *Proc Natl Acad Sci USA*.2012;109 (42):16876-81およびMackenzie et al. *Bone*.2012;51 (5):961-8を参照）。したがって、これらのアラインメントから、正常なENPP1活性に重要な細胞外ドメインを有する重要なアミノ酸位置を予測することと、正常なENPP1活性を顕著に変化させることなく、置換に対して耐性である可能性が高いアミノ酸位置を予測することが可能である。そのため、本開示の組成物に従って有用な酵素的に活性なヒトENPP1ポリペプチドは、別の脊椎動物ENPP1の配列からの対応する位置に1つもしくは複数のアミノ酸を含み得るか、またはヒトもしくは他の脊椎動物の配列の残基と類似した残基を含み得る。対応する位置での1つまたは複数のアミノ酸の置換には、ポリペプチド鎖の形状を変化させにくい、または正常なENPP1活性を変化させにくい保存的な変異または置換が含まれ得る。保存的な変異または置換の例には、イソロイシン、バリン、ロイシンもしくはメチオニンなどの1つの疎水性残基を別のものに置換すること、または1つの極性残基を別のものに置換すること、例えば、アルギニンをリジンに置換すること、グルタミン酸をアスパラギン酸に置換すること、またはグルタミンをアスパラギンに置換することが挙げられる。例えば、ENPP1ポリペプチドには、ENPP1ポリペプチドの配列と少なくとも約80%同一の配列、好ましくは少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%またはそれ以上の同一性を有する、任意の公知のENPP1ポリペプチドの配列に由来するポリペプチドが含まれる。

【0138】

2. ENPP1の酵素活性

ENPP1タンパク質は、構造的特徴および生物学的特徴に関して当技術分野において特徴付けられている。ある特定の態様では、本明細書において開示される可溶性ENPP1タンパク質は、ピロホスファターゼおよび/またはホスホジエステラーゼ活性を含む。例えば、いくつかの態様では、ENPP1タンパク質は、ヌクレオチド三リン酸（例えば、ATP、UTP、GTP、TTPおよびCTP）、pNP-TMP、3',5'-cAMP、ならびに2'-3'-cGAMPに結合し、ヌクレオチド三リン酸を無機ピロリン酸に変換する[例えば、Kato 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;およびOnyedibe et al.,*Molecules*.2019;24 (22)を参照]。

【0139】

「酵素的に活性」または「生物学的に活性」なENPP1ポリペプチドは、ピロホスファターゼおよび/またはホスホジエステラーゼ活性を示す（例えば、ATPをAMPおよびPPiに結合および/もしくは加水分解し、ならびに/またはAP3aをATPに結合および/もしくは加水分解することができる）。例えば、ENPP1タンパク質のピロホスファターゼ/ホスホジエステラーゼドメインは、細胞外ヌクレオチド三リン酸を加水分解して無機ピロリン酸（PPi）を生成し、一般に可溶性である。この活性は、以前に記載されたように（Saunders et al.,2008,*Mol.Cancer Ther.*7 (10):3352-62;Albright et al.,2015,*Nat Comm.*6:10006）、pNP-TMPアッセイを使用して測定され得る。ある特定の態様では、可溶性ENPP1ポリペプチドは、基質ATPに対して約3.4（±0.4）s⁻¹酵素⁻¹

以上の k_{cat} 値を有し、 k_{cat} は、該ポリペプチドに対するATPの加水分解速度を測定することによって決定される。ある特定の態様では、可溶性ENPP1ポリペプチドは、基質ATPに対して約 $2\mu M$ 以下の K_M 値を有し、 K_M は、該ポリペプチドに対するATPの加水分解速度を測定することによって決定される。本明細書における教示に加えて、これらの参考文献は、1つまたは複数の生物学的活性を保持する可溶性ENPP1タンパク質をどのように生成するかについて（例えば、無機ピロリン酸へのヌクレオチドの変換）十分な指針を提供する。

【0140】

3. 可溶性ENPP1

一態様では、本開示は、限定されることなく、ENPP1ポリペプチドなどのENPP1作用物質に関する。本明細書において記載されるように、可溶性ENPP1ポリペプチドという用語は、ENPP1タンパク質の任意の天然に存在する細胞外ドメイン、ならびに生物学的活性（例えば、酵素的に活性）を保持するその任意のバリエーション（変異体、断片およびペプチド模倣形態を含む）を含む。可溶性ENPP1ポリペプチドの例には、例えば、ENPP1細胞外ドメイン（SEQ ID NO:2）が挙げられる。ある特定の態様では、可溶性ENPP1ポリペプチドは、ENPP1ポリペプチドの細胞外ドメインに加えてシグナル配列をさらに含む。例示的なシグナル配列には、ENPP1ポリペプチドの天然のシグナル配列、または別のタンパク質由来のシグナル配列、例えば、hENPP7シグナル配列が含まれる。バリエーション可溶性ENPP1ポリペプチドの例は、国際特許出願公開番号WO 2012/125182、WO 2014/126965、WO 2016/187408、WO 2018/027024、WO 2020206302およびWO 2020/047520に提供されている。これらのすべての内容は、参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。

【0141】

4. ENPP1融合タンパク質

いくつかの態様では、ENPP1ポリペプチドは、ENPP1ポリペプチドドメインと、1つまたは複数の異種タンパク質部分（すなわち、ENPP1に対して異種のポリペプチドドメイン）とを含む融合タンパク質である。アミノ酸配列は、それがSEQ ID NO:1によって表されるENPP1の形態で一意的に見出されない場合、ENPP1に対して異種であると理解される。いくつかの態様では、異種タンパク質部分は、免疫グロブリンのFcドメインを含む。いくつかの態様では、免疫グロブリンのFcドメインは、IgG1免疫グロブリンのFcドメインである。ある特定の態様では、可溶性ENPP1ポリペプチドは、ヒト免疫グロブリン1（IgG1）、ヒト免疫グロブリン2（IgG2）、ヒト免疫グロブリン3（IgG3）および/またはヒト免疫グロブリン4（IgG4）のFcドメインにC末端融合される。他の態様では、可溶性ENPP1ポリペプチドは、ヒト免疫グロブリン1（IgG1）、ヒト免疫グロブリン2（IgG2）、ヒト免疫グロブリン3（IgG3）および/またはヒト免疫グロブリン4（IgG4）のFcドメインにN末端融合される。いくつかの態様では、Fcドメインの存在は、半減期、溶解性を改善し、免疫原性を低下させ、可溶性ENPP1ポリペプチドの活性を増加させる。ある特定の態様では、天然ヒトIgGタンパク質（IgG1、IgG2、IgG3およびIgG4）の一部をFc部分（例えば、ENPP1-Fc）に使用してもよい。例えば、本開示は、免疫グロブリンの定常ドメイン、例えば、ヒトIgG1、ヒトIgG2、ヒトIgG3および/またはヒトIgG4に由来するCH1ドメイン、CH2ドメインまたはCH3ドメインを含むポリペプチドに融合したENPP1を含む融合タンパク質を提供する。Fc断片は、天然IgGの領域、例えば、ヒンジ領域（Rabatナンバリング系によるヒトIgG1の残基216～230）、第2の定常ドメインCH2全体（残基231～340）、および第3の定常ドメインCH3（残基341～447）を含み得る。本明細書において使用される場合、用語「ENPP1-Fc構築物」は、IgG分子（好ましくは、ヒトIgG）のFcR結合ドメインに組換え融合されたおよび/または化学的にコンジュゲートされた（共有結合コンジュゲーションおよび非共有結合コンジュゲーションの両方を含む）ENPP1（例えば、ENPP1ポリペプチドの細胞外ドメイン）の可溶性形態を指す。ある特定の態様では、ENPP1のC末端は、FcR結合ドメインのN末端に融合またはコンジュゲートされる。

10

20

30

40

50

【0142】

ヒトIgG1 (G1Fc) のFc部分に使用され得るアミノ酸配列の例は、SEQ ID NO:6 (表1) である。一部では、本開示は、SEQ ID NO:6に対して70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の同一性を有するアミノ酸配列を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなるポリペプチドを提供する。

【0143】

いくつかの態様では、異種タンパク質部分は、ポリヒスチジン、FLAGタグ、Glu-Glu、グルタチオンS-トランスフェラーゼ (GST)、チオレドキシン、プロテインA、プロテインG、免疫グロブリン重鎖定常領域 (Fc)、マルトース結合タンパク質 (MBP) またはヒト血清アルブミンからなる群より選択される1つまたは複数のドメインを含む。融合ドメインは、所望の特性を付与するように選択され得る。例えば、いくつかの融合ドメインは、アフィニティークロマトグラフィーによる融合タンパク質の単離に特に有用である。アフィニティー精製のために、アフィニティークロマトグラフィーに関連するマトリックス、例えば、グルタチオン-コンジュゲート樹脂、アミラーゼ-コンジュゲート樹脂、およびニッケル-コンジュゲート樹脂またはコバルト-コンジュゲート樹脂が使用される。そのようなマトリックスの多くは、(HIS₆) 融合パートナーとともに有用なPharmacia GST精製システムおよびQIAexpress (商標) システム (Qiagen) などの「キット」形態で利用可能である。別の例として、融合ドメインは、ENPP1ポリペプチドの検出を容易にするように選択され得る。そのような検出ドメインの例には、様々な蛍光タンパク質 (例えば、GFP)、および特異的抗体が利用可能な通常短いペプチド配列である「エピトープタグ」が挙げられる。特異的モノクローナル抗体が容易に入手可能な周知のエピトープタグには、FLAG、インフルエンザウイルス赤血球凝集素 (HA)、およびc-mycタグが含まれる。場合によっては、融合ドメインは、関連するプロテアーゼが融合タンパク質を部分的に消化し、それによって、組換えタンパク質をそこから遊離させることを可能にする、Xa因子またはトロンピンなどのプロテアーゼ切断部位を有する。次いで、遊離したタンパク質は、その後のクロマトグラフィー分離によって融合ドメインから単離され得る。

【0144】

5. リンカー

いくつかの態様では、ENPP1融合タンパク質は、ENPP1ポリペプチドドメインと1つまたは複数の異種タンパク質部分 (例えば、Fc免疫グロブリンドメイン) との間に配置されたリンカー (Z) をさらに含む。ある特定の態様では、可溶性ENPP1ポリペプチドは、Fcドメインに直接的または間接的に融合される。いくつかの態様では、可溶性ENPP1融合タンパク質は、FcドメインとENPP1ポリペプチドとの間にリンカーを含む。いくつかの態様では、リンカーは、1~200個のアミノ酸を含むアミノ酸スペーサーであり得る。好適なペプチドスペーサーは当技術分野において公知であり、それらには、例えば、グリシン、アラニンおよびセリンなどの柔軟なアミノ酸残基を含有するペプチドリナーが含まれる。

【0145】

いくつかの態様では、リンカーは、ポリグリシンリンカーまたはGly-Serリンカーを含む。いくつかの態様では、スペーサーは、GA (SEQ ID NO:21)、GS (SEQ ID NO:22)、GG (SEQ ID NO:23)、GGA (SEQ ID NO:24)、GGS (SEQ ID NO:25)、GGG (SEQ ID NO:26)、GGGA (SEQ ID NO:27)、GGGS (SEQ ID NO:28)、GGGG (SEQ ID NO:29)、GGGGA (SEQ ID NO:30)、GGGGS (SEQ ID NO:31)、GGGGG (SEQ ID NO:32)、GGAG (SEQ ID NO:33)、GGSG (SEQ ID NO:34)、AGGG (SEQ ID NO:35)、SGGGG (SEQ ID NO:36) またはSGGG (SEQ ID NO:37) のモチーフ、例えば、複数のモチーフまたは反復モチーフを含有することができる。いくつかの態様では、スペーサーは、GAまたはGS、例えば、GA、GS、GAGA (SEQ ID NO:38)、GSGS (SEQ ID NO:39)、GAGAGA (SEQ ID NO:40)、GSGSG

S (SEQ ID NO:41)、GAGAGAGA (SEQ ID NO:42)、GSGSGSGS (SEQ ID NO:43)、GAGAGAGAGA (SEQ ID NO:44)、GSGSGSGSGS (SEQ ID NO:45)、GAGAGAGAGAGA (SEQ ID NO:46) およびGSGSGSGSGSGS (SEQ ID NO:47) のモチーフを含む2~12個のアミノ酸を含有することができる。いくつかの態様では、スペーサーは、GGAまたはGGS、例えば、GGA、GGS、GGAGGA (SEQ ID NO:48)、GSGSGS (SEQ ID NO:49)、GGAGGAGGA (SEQ ID NO:50)、GSGSGSGS (SEQ ID NO:51)、GGAGGAGGAGGA (SEQ ID NO:52) およびGSGSGSGSGSGS (SEQ ID NO:53) のモチーフを含む3~12個のアミノ酸を含有することができる。さらにいくつかの態様では、スペーサーは、GGAG (SEQ ID NO:54)、GSG (SEQ ID NO:55)、例えば、GGAG (SEQ ID NO:56)、GSG (SEQ ID NO:57)、GGAGGGAG (SEQ ID NO:58)、GSGGGSG (SEQ ID NO:59)、GGAGGGAGGGAG (SEQ ID NO:60) およびGSGGGSGGGSG (SEQ ID NO:61) のモチーフを含む4~12個のアミノ酸を含有することができる。いくつかの態様では、スペーサーは、GGGA (SEQ ID NO:62) またはGGGS (SEQ ID NO:63)、例えば、GGGAGGGGAGGGGA (SEQ ID NO:64) およびGGGSGGGSGGGSG (SEQ ID NO:65) のモチーフを含有することができる。本発明のいくつかの態様では、異種タンパク質部分（例えば、Fcドメイン単量体、野生型Fcドメイン、アミノ酸置換（例えば、二量体化を減少させる1つもしくは複数の置換）を有するFcドメイン、アルブミン結合ペプチド、フィブロンectinドメインまたはヒト血清アルブミン）と可溶性ENPP1ポリペプチドとの間のアミノ酸スペーサーは、GGG、GGGA (SEQ ID NO:27)、GGG (SEQ ID NO:29)、GGGAG (SEQ ID NO:66)、GGGAGG (SEQ ID NO:67) またはGGGAGGG (SEQ ID NO:68) であり得る。

【0146】

いくつかの態様では、スペーサーはまた、グリシン、アラニンおよびセリン以外のアミノ酸、例えば、

10

20

30

40

50

LIN (SEQ ID NO: 69), TGGGG (SEQ ID NO: 70), AAAL (SEQ ID NO: 71), AAAK (SEQ ID NO: 72), AAAR (SEQ ID NO: 73), EGKSSGSGSESKST (SEQ ID NO: 74), GSAGSAAGSGEF (SEQ ID NO: 75), AEAAAKEAAAKA (SEQ ID NO: 76), KESGSVSSEQLAQFRSLD (SEQ ID NO: 77), GENLYFQSGG (SEQ ID NO: 78), SACYCELS (SEQ ID NO: 79), RSIAT (SEQ ID NO: 80), RPACKIPNDLKQKVMNH (SEQ ID NO: 81), GGSAGGSGSGSSGGSSGASGTGTAGGTGSGSGTGSG (SEQ ID NO: 82), AAANSSIDLISVPVDSR (SEQ ID NO: 83), GGSGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSGGGS (SEQ ID NO: 84), NSS (SEQ ID NO: 87), ESS (SEQ ID NO: 88), RQQ (SEQ ID NO: 89), KR (SEQ ID NO: 90), (R)_m; m=0-15 (SEQ ID NO: 91), DSSSEEKFLRRIGRFG (SEQ ID NO: 92), EEEEEEEPRGDT (SEQ ID NO: 93), APWHLSSQYSRT (SEQ ID NO: 94), STLPIPHFSRE (SEQ ID NO: 95), VTKHLNQISQSY (SEQ ID NO: 96), (E)_m; m=1-15 (SEQ ID NO: 97), RSGSGGS (SEQ ID NO: 98), (D)_m; m=1-15 (SEQ ID NO: 99), LVIMSLGLGLGLGLRK (SEQ ID NO: 100), VIMSLGLGLGLGLRK (SEQ ID NO: 101), IMSLGLGLGLGLRK (SEQ ID NO: 102), MSLGLGLGLGLRK (SEQ ID NO: 103), SLGLGLGLGLRK (SEQ ID NO: 104), LGLGLGLGLRK (SEQ ID NO: 105), GLGLGLGLRK (SEQ ID NO: 106), LGLGLGLRK (SEQ ID NO: 107), GLGLGLRK (SEQ ID NO: 108), LGLGLRK (SEQ ID NO: 109), GLGLRK (SEQ ID NO: 110), LGLRK (SEQ ID NO: 111), GLRK (SEQ ID NO: 112), LRK (SEQ ID NO: 113), RK (SEQ ID NO: 114), または (K)_m; m=1-15 (SEQ ID NO: 115)

10

20

を含有することができる。いくつかの態様では、スペーサーは、EAAAK (SEQ ID NO: 85) のモチーフ、例えば、複数のモチーフまたは反復モチーフを含有することができる。いくつかの態様では、スペーサーは、プラリン (praline) リッチ配列、例えば、(X P)_n (式中、Xは任意のアミノ酸 (例えば、A、KまたはE) であり得、nは1~5である) およびPAPAP (SEQ ID NO: 86) のモチーフ、例えば、複数のモチーフまたは反復モチーフを含有することができる。

30

【0147】

ペプチドスペーサーの長さ、使用されるアミノ酸とは、関与する2つのタンパク質と、最終的なタンパク質融合ポリペプチドに望ましい柔軟性の程度とに応じて調整され得る。スペーサーの長さは、適切なタンパク質フォールディングを確実にし、凝集体形成を回避するように調整され得る。

【0148】

いくつかの態様では、融合タンパク質 (例えば、免疫グロブリンFc融合タンパク質) の様々なエレメントが、所望の機能性と一致する任意の様式で配置され得る。例えば、可溶性ENPP1ポリペプチドドメインは、異種タンパク質部分に対してC末端に配置され得るか、または代替的に、異種タンパク質部分は、可溶性ENPP1ポリペプチドドメインに対してC末端に配置され得る。可溶性ENPP1ポリペプチドドメインおよび異種タンパク質部分は、融合タンパク質内に直接的または間接的に連結されてもよく、追加のドメインまたはアミノ酸配列が、いずれかのドメインに対してC末端もしくはN末端に含まれてもよい、またはドメイン間に含まれてもよい。好ましい融合タンパク質は、SEQ ID NO: 3~5のいずれか1つに記載のアミノ酸配列を含む。

40

【0149】

いくつかの態様では、本開示の可溶性ENPP1ポリペプチドは、1つまたは複数の異種

50

部分を含有する。任意で、可溶性ENPP1ポリペプチドは、グリコシル化アミノ酸、PEG化アミノ酸、ファルネシル化アミノ酸、アセチル化アミノ酸、ビオチン化アミノ酸、脂質部分にコンジュゲートされたアミノ酸、および有機誘導体化作用物質にコンジュゲートされたアミノ酸から選択される1つまたは複数の異種部分を含む。いくつかの態様では、本明細書において開示される可溶性ENPP1ポリペプチドは、さらに修飾される。そのような修飾には、限定されることなく、アセチル化、カルボキシル化、グリコシル化、リン酸化、脂質化およびアシル化が含まれる。結果として、可溶性ENPP1ポリペプチドは、ポリエチレングリコール、脂質、多糖または単糖、およびホスフェートなどの非アミノ酸エレメントを含有し得る。可溶性ENPP1ポリペプチドの機能性に対するそのような非アミノ酸エレメントの効果は、他の可溶性ENPP1ポリペプチドについて本明細書において記載されるように試験され得る。本開示のポリペプチドが、ポリペプチドの新生形態を切断することによって細胞内で産生される場合、タンパク質の正しいフォールディングおよび/または機能にとって、翻訳後プロセッシングも重要であり得る。様々な細胞（例えば、CHO、HeLa、MDCK、293、WI38、NIH-3T3、またはHEK293）が、そのような翻訳後活性のための特異的な細胞機構および特徴的な機構を有し、可溶性ENPP1ポリペプチドの正しい修飾およびプロセッシングを確実にするように選択され得る。

10

【0150】

本明細書において使用される場合、ポリペプチド配列と参照配列との間のパーセント「同一性」は、配列をアラインメントし、必要に応じてギャップを導入して最大のパーセント配列同一性を達成した後、参照配列内のアミノ酸残基と同一である、ポリペプチド配列内のアミノ酸残基のパーセンテージとして定義される。パーセントアミノ酸配列同一性を決定するためのアラインメントは、例えば、BLAST、BLAST-2、ALIGN、MEGALIGN（DNASTAR）、CLUSTALW、またはCLUSTAL OMEGAソフトウェアなどの公的に入手可能なコンピュータソフトウェアを使用して、当技術分野における技能の範囲内である様々な方法で達成され得る。いくつかの態様では、アラインメントは、CLUSTAL OMEGAソフトウェアを使用して行われる。当業者であれば、比較される配列の全長にわたって最大アラインメントを達成するために必要な任意のアルゴリズムを含む、配列をアラインメントするための適切なパラメータを決定することができる。

20

【0151】

6. 溶解性の決定

30

いくつかの態様では、細胞に基づくアッセイ、またはインビボアッセイで可溶性ENPP1ポリペプチドの活性を試験してもよい。例えば、無機ピロリン酸（PPi）の生成に対する可溶性ENPP1ポリペプチドの効果を測定することができる。具体的には、ENPP1タンパク質のピロホスファターゼ/ホスホジエステラーゼドメインは、細胞外ヌクレオチド三リン酸を加水分解して無機ピロリン酸（PPi）を生成し、一般に可溶性である。この活性は、以前に記載されたように（Saunders et al., 2008, Mol. Cancer Ther. 7 (10) : 3352-62; Albright et al., 2015, Nat Comm. 6:10006）、pNP-TMPアッセイ、およびHPLCに基づくATP加水分解アッセイを使用して測定され得る。ENPP1関連疾患、例えば、ARHR2に関連する遺伝子の発現に対する可溶性ENPP1ポリペプチドの効果（例えば、骨芽細胞および破骨細胞における線維芽細胞増殖因子23の転写）を評価することができる。これは、必要に応じて、1つまたは複数のヌクレオチド三リン酸または他のENPP1基質の存在下で行われてもよく、可溶性ENPP1ポリペプチドを産生するように細胞をトランスフェクトしてもよい。同様に、可溶性ENPP1ポリペプチドをマウスまたは他の動物に投与してもよく、当技術分野において認識されている方法を使用してENPP1関連疾患に対する効果を評価してもよい。

40

【0152】

いくつかの態様では、本明細書において記載される方法に従って使用されるENPP1ポリペプチドは、単離されたポリペプチドである。本明細書において使用される場合、単離されたタンパク質またはポリペプチドとは、その天然の環境の成分から分離されたものである。いくつかの態様では、本開示のポリペプチドは、例えば、電気泳動分析（例えば、

50

SDS-PAGE、等電点電気泳動（IEF）、キャピラリー電気泳動）またはクロマトグラフィー（例えば、イオン交換HPLCもしくは逆相HPLC）分析によって決定される場合、純度95%超、96%超、97%超、98%超または99%超まで精製される。純度を評価するための方法は、当技術分野において周知である〔例えば、Flatman et al., 2007, J. Chromatogr. B 848:79-87を参照〕。いくつかの態様では、本明細書において記載される方法に従って使用される可溶性ENPP1ポリペプチドは、組換えポリペプチドである。

【0153】

7. ENPP1産生

本開示のENPP1ポリペプチドは、当技術分野において公知の様々な技術によって産生され得る。例えば、本開示のポリペプチドは、標準的なタンパク質化学技術、例えば、Bodansky, Principles of Peptide Synthesis, Springer Verlag, Berlin (1993) および Grant G.A. (ed.), Synthetic Peptides: A User's Guide, W.H. Freeman and Company, New York (1992) に記載されているものを使用して合成され得る。加えて、自動ペプチド合成装置が市販されている（例えば、Advanced ChemTech Model 396; Milligen/Bioscience 9600）。あるいは、本開示のポリペプチドは、その断片またはバリエーションを含めて、当技術分野において周知の様々な発現系〔例えば、大腸菌（*E. coli*）、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、COS細胞、バキュロウイルス、酵母ピキア（*Pichia*）〕を使用して組換え産生され得る。タンパク質は、接着細胞または懸濁細胞内で産生され得る。いくつかの態様では、融合タンパク質は、CHO細胞内で発現される。安定な細胞株を確立するために、ENPP1構築物をコードする核酸配列は、大規模なタンパク質産生のための適切なベクターにクローニングされる。ある特定の態様では、本開示の修飾ポリペプチドまたは非修飾ポリペプチドは、例えば、プロテアーゼ、例えば、トリプシン、サーモリシン、キモトリプシン、ペプシン、または対になった塩基性アミノ酸変換酵素（paired basic amino acid converting enzyme）（PACE）を使用することによる組換え産生された全長ENPP1ポリペプチドの消化によって産生され得る。コンピュータ分析（市販のソフトウェア、例えば、MacVector、Omega、PCGene、Molecular Simulation, Inc.）を使用して、タンパク質分解切断部位を同定することができる。あるいは、そのようなポリペプチドは、化学的切断（例えば、臭化シアン、ヒドロキシルアミンなど）を使用して、組換え生成された全長ENPP1ポリペプチドから産生され得る。

【0154】

8. 発現系

細菌（例えば、大腸菌およびバチルス・スブチリス（*Bacillus subtilis*））、酵母（例えば、サッカロミセス・セレビシエ（*Saccharomyces cerevisiae*）、クルイベロミセス・ラクチス（*Kluyveromyces lactis*）およびピキア・パストリス（*Pichia pastoris*））、糸状菌（例えば、アスペルギルス（*Aspergillus*））、植物細胞、動物細胞ならびに昆虫細胞を含む多くの発現系が公知であり、ENPP1融合タンパク質の産生に使用され得る。所望のタンパク質は、従来の方法で、例えば、宿主染色体または遊離プラスミドに挿入されたコード配列から産生され得る。

【0155】

酵母は、通常の方法（例えば、エレクトロポレーション）のいずれかで所望のタンパク質のコード配列を用いて形質転換され得る。エレクトロポレーションによる酵母の形質転換方法は、Becker & Guarente, 1990, Methods Enzymol. 194:182に開示されている。首尾よく形質転換された細胞、すなわち、本開示のDNA構築物を含有する細胞は、周知の技術によって同定され得る。例えば、発現構築物の導入から生じる細胞を増殖させて、ENPP1ポリペプチドを産生することができる。細胞を採取および溶解し、Southern, 1975, J. Mol. Biol. 98:503および/または Berent et al., 1985, Biotech 3:208によって記載されているものなどの方法を使用してDNAの存在についてそれらのDNA含有量を調査することができる。あるいは、抗体を使用して、上清中のタンパク質の存在を検出することができる。

【0156】

有用な酵母プラスミドベクターには、pRS403～406、およびpRS413～416が含まれ、有用な酵母プラスミドベクターは、Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA, USAから一般に入手可能であるプラスミドpRS403、pRS404、pRS405およびpRS406は、酵母組込み用プラスミド（Yeast Integrating plasmid）（Yip）であり、酵母選択マーカーI-11S3、TRP1、LEU2および1JRA3を組み込んでいる。プラスミドpRS413～416は酵母セントロメアプラスミド（YCp）である。

【0157】

相補的な凝集性末端を介してDNAをベクターに機能的に連結するための様々な方法が開発されている。例えば、ベクターDNAに挿入されるDNAセグメントに、相補的なホモポリマータクトを付加することができる。次いで、ベクターとDNAセグメントとは、相補的なホモポリマーテール間の水素結合によって連結されて、組換えDNA分子が形成される。

10

【0158】

1つまたは複数の制限部位を含有する合成リンカーは、DNAセグメントをベクターに連結する代替方法を提供する。エンドヌクレアーゼ制限消化によって生成されたDNAセグメントは、突出した3'-一本鎖末端をそれらの3'-5'-エキソヌクレアーゼ活性によって除去し、陥凹した3'-末端にそれらの重合活性を満たす酵素であるバクテリオファージT4 DNAポリメラーゼまたは大腸菌DNAポリメラーゼIによって処理される。

【0159】

したがって、これらの活性の組合せは、平滑末端DNAセグメントを生成する。次いで、平滑末端セグメントを、平滑末端DNA分子のライゲーションを触媒することができる酵素、例えば、バクテリオファージT4 DNAリガーゼの存在下で、大モル過剰のリンカー分子とともにインキュベートする。結果として、この反応の生成物は、それらの末端にポリマーリンカー配列を有するDNAセグメントである。これらのDNAセグメントを、適切な制限酵素によって切断し、DNAセグメントの末端と適合する末端を生成する酵素によって切断された発現ベクターにライゲーションすることができる。

20

【0160】

次いで、単一の安定にトランスフェクトされた細胞のクローンを確立し、所望のENPP1融合タンパク質の高発現クローンについてスクリーニングする。ENPP1タンパク質発現に関する単一細胞クローンのスクリーニングは、以前に記載されたように（Albright et al., 2015, Nat. Commun. 6:10006）、合成酵素基質pNP-TMPを使用して、96ウェルプレート内でハイスループット様式で達成することができる。スクリーニングによって高発現クローンを同定すると、Albright et al., 2015, Nat. Commun. 6:10006に以前に記載されたように、振蕩フラスコまたはバイオリアクター内でタンパク質産生を達成することができる。

30

【0161】

9. ENPP1精製

当技術分野において公知の標準的な精製技術の組合せを使用して、ENPP1の精製を達成することができる。精製後、ENPP1-Fcを、5～7mg/mlに濃縮された、 Zn^{2+} および Mg^{2+} を補充したPBS（PBSplus）中に透析し、200～500plのアリコートで-80℃で凍結することができる。アリコートを使用直前に解凍することができ、PBSplusでの希釈によって溶液の比活性を31.25 au/ml（または調製物に応じて約0.7 mg/ml）に調整することができる。

40

【0162】

10. 投与経路および投与頻度

ポリペプチドは、対象に急性的または慢性的に投与され得る。ある特定の態様では、本明細書において開示される可溶性ENPP1ポリペプチドまたはENPP1融合ポリペプチドの第2の投与量が、約2日後、約4日後、約1週間後もしくは約1ヶ月後という好適な時間間隔の後で対象に投与されるか、またはさらに少ない頻度で、例えば、数ヶ月ごとに1回、

50

もしくはさらには1年に1回もしくはそれ以下で投与される。投与の頻度は、当業者には容易に明らかであり、限定されることなく、治療されている疾患の種類および重症度、ならびに患者の種類および年齢などの任意の数の要因に依存する。

【0163】

血漿PPIの定常状態レベルが一定レベルもしくは定常状態レベルに維持されるように、および/または正常なPPIレベル（2～3 μM）に近いもしくは正常なPPIレベルよりも高い（30～50%高い）かのいずれかであり、本明細書において開示される構築物の第1の投与量の投与前に対象が有した低いPPIレベルに戻らない連続した血漿PPIレベルを達成するように、用量または頻度が選択され得る。

【0164】

あるいは、ENPP1作用物質は、ENPP1の一定レベルの酵素活性を達成するために、2日ごと、または4日ごと、1週間ごと、または1ヶ月ごとのいずれかという適切な時間間隔で投与され得る。

【0165】

あるいは、本開示によるENPP1作用物質は、対象の疾患または障害の1つまたは複数の症状をモニタリングすることによって、2日ごと、または4日ごと、または1週間ごと、または1ヶ月ごとという適切な時間間隔で投与される。

【0166】

理論に束縛されることを望むものではないが、血漿PPIの定常状態濃度を正常レベルで維持することは、対象の病的石灰化の進行を低減および/または予防すると考えられる。

【0167】

ある特定の態様では、ポリペプチドは、対象に局所的、局部的、非経口的または全身的に投与される。いくつかの態様では、ポリペプチドは皮下投与される。

【0168】

本明細書において使用される場合、製剤の「非経口投与」は、対象の組織の物理的な破損と組織の破損を介したENPP1作用物質の投与とを特徴とする任意の投与経路を含む。したがって、非経口投与には、限定されることなく、組成物の注射による、外科的切開を介した組成物の適用による、組織貫通非外科的創傷を介した組成物の適用などによるENPP1作用物質の投与が含まれる。特に、非経口投与は、限定されることなく、皮下注射、静脈内注射、腹腔内注射、筋肉内注射、幹内（intrastemal）注射、および腎臓透析注入技術を含むことが企図される。

【0169】

投与レジメンは、有効量を構成するものに影響を及ぼし得る。例えば、いくつかの分割投与量、および互い違いの投与量が、所与の期間（連日）に、もしくは連続的に投与されてもよいが、または用量は連続的に注入されてもよいが、もしくはボーラス注射であってよい。さらに、列挙された用量のENPP1作用物質の選択は、治療的状況または予防的状況の緊急性によって示され得る。

【0170】

哺乳動物（すなわち、ヒト）などの患者への本開示の組成物（例えば、可溶性ENPP1ポリペプチドおよびその融合タンパク質）の投与は、公知の手順を使用して、患者の疾患または障害を治療するのに有効な投与量でかつ期間にわたって行われ得る。治療効果を達成するのに必要な列挙された投与量のENPP1作用物質の有効量は、使用される特定の化合物の活性；投与時間；化合物の排泄速度；治療期間；化合物と組み合わせて使用される他の薬物、化合物または材料；疾患または障害の状態、治療されている患者の年齢、性別、体重、状態、全般的な健康状態および以前の病歴、ならびに医学分野において周知の同様の要因などの要因に従って変動し得る。投与レジメンは、最適な治療応答を提供するように調整され得る。選択された投与量は、治療用化合物の生物学的活性に基づいて決定され、治療用化合物の生物学的活性は、半減期と、治療用化合物の血漿中時間曲線下面積とに依存する。

【0171】

11. 予防的投与

したがって、本明細書における開示を得て、当業者であれば、対象の疾患または障害の予防が、疾患または障害に対する予防手段としてENPP1ポリペプチドを対象に投与することを包含することを理解するであろう。

【0172】

本明細書において開示される製剤中の活性成分（例えば、可溶性ENPP1ポリペプチドおよびその融合タンパク質）と、薬学的に許容される担体と、任意の追加の成分との相対量は、治療される対象の独自性、サイズおよび状態に応じて、さらに、組成物が投与される経路に応じて変動する。例として、組成物は、約0.1%～約100%（w/w）の活性成分を含み得る。

【0173】

12. ENPP1ポリペプチド配列

（表1）配列

SEQ ID NO	配列	説明
1	1 MERDGCAGGG SRGEGGGRAP REGPAGNGRD RGRSHAAEAP GDPQAAASLL 51 APMDVGEEPL EKAARARTAK DPNTYKVLST VLSVCVLTIT LGCIFGLKPS 101 CAKEVKSCKG RCFERTFGNC RCDAACVELG NCCLDYQETC IEPEHIWTCN 151 KFRCGEKRLT RSLCACSDDC KDKGDCCINY SSVCQGEKSW VEEPCEISINE 201 PQCPAGFETP PTLFSLDGF RAEYLHTWGG LLPVISKLKK CGTYTKNMRP 251 VYPTKTFPNH YSIVTGLYPE SHGIIDNKMY DPKMNASFSL KSKEKFNPEW 301 YKGEPIWVTA KYQGLKSGTF FWPGSDVEIN GIFPDIYKMY NGSVPFEERI 351 LAVLQWLQLP KDERPHFYTL YLEEDSSGH SYGPVSSEVI KALQRVDGMV 401 GMLMDGLKEL NLHRCNLIL ISDHGMEQGS CKKYIYLNKY LGDVKNIKVI 451 YGPAARLRPS DVPDKYYSFN YEGIARNLSC REPNQHFQPY LKHFLPKRLH 501 FAKSDRIEPL TFYLDPQWQL ALNPSEKRYC GSGFHGSDNV FSNMQALFVG 551 YGPGFKHGIE ADTFENIEVY NLMCDLLNLT PAPNNGTHGS LNHLLKNPVY 601 TPKHPKEVHP LVQCPFTRNP RDNLCSCNP SILPIEDFQT QFNLTVAEEK 651 IIKHETLPYG RPRVLQKENT ICLLSQHQM SGYSQDILMP LWTSTYTVDRN	野生型ENPP1 前駆体タンパク質の 完全な 非プロセシング アミノ酸配列

10

20

30

40

50

	701 DSFSTEDFSN CLYQDFRIPL SPVHKCSFYK NNTKVSYGFL SPPQLNKNSS 751 GIYSEALITT NIVPMYQSFQ VIWRYFHDTL LRKYAEERNNG VNVVSGPVFD 801 FDYDGRCDL ENLRQKRRVI RNQEILIPTH FFIVLTSCDK TSQTPLHCEN 851 LDTLAFILPH RTDNSESCVH GKHDSSWVEE LLMHLRARIT DVEHITGLSF 901 YQQRKEPVSD ILKLKTHLPT FSQED		
2	1 PSCAKEVKSC KGRCFERTFG NCRCDAAVCE LGNCCLDYQE TCIEPEHIWT 51 CNKFRGGEKR LTRSLCACSD DCKDKGDCCI NYSSVCQGEK SWVEEPCESI 101 NEPQCPAGFE TPPTLLFSLD GFRAEYLHTW GGLLPVISKL KCGTYTKNM 151 RPVYPTKTFP NHYSIVTGLY PESHGIIDNK MYDPKMNASF SLKSKEKFN 201 EWKGEPIWV TAKYQGLKSG TFFWPGSDVE INGI FPDYK MYNGSVPFEE 251 RILAVLQWLQ LPKDERPHFY TLYLEEPDSS GHSYGPVSSE VIKALQRVDG 301 MVGMLMDGLK ELNLHRCNL ILISDHGMEQ GSCCKYIYLN KYLGDVKNIK 351 VIYGPAARLR PSDVPDKYYS FNYEGIANRL SCREPNQHF PYLKHFLPKR 401 LHFASDRIE PLTFYLDPOW QLALNPSERK YCGSGFHGSD NVFSNMQALF 451 VGYGPGFKHG IEADTFENIE VYNLMCDLLN LTPAPNNGTH GSLNHLKKNP 501 VYTPKHPEV HPLVQCPFTR NPDNLGCSC NPSILPIEDF QTQFNLTVAE 551 EKIKHETLP YGRPRVLQKE NTICLLSQHQ FMSGYSQDIL MPLWTSYTV 601 RNDSTEDF SNCLYQDFRI PLSPVHKCSF YKNNTKVSYG FLSPPQLNKN 651 SSGYSEALL TTNIVPMYQS FQVIWRYFHD TLLRKYAEER NGVNVVSGPV 701 FDFDYDGRCD SLENLRQKRR VIRNQEILIP THFFIVLTSC KDTSQTPPLHC 751 ENLDTLAFIL PHRTDNSESC VHGHHDSSWV EELLMLHRRAR ITDVEHITGL 801 SFYQQRKEPV SDILKLKTHL PTFSQED	プロセシングされた (成熟) 細胞外-ENPP1 ポリペプチド配列	10
3	<u>FTAGLKPSCAKEVSKCKGRCFERTFGNCRCDAAVELGNCCLDYQETCIEPEHIWTCNKFC</u> <u>RCGEKRLTRSLCACSDDDCKDKGDCCINYSVCQGEKSWVEEPCESINEPQCPAGFETPPT</u> <u>LLFSLDGFRAEYLHTWGGLLPVISKLKCGTYTKNMRPVYPTKTFPNHYSIVTGLYPESH</u> <u>GIIDNKMYDPKMNASFSLKSKEKFNPEWYKGEPIWVTAKYQGLKSGTFFWPGSDVEINGI</u> <u>FPDIYKMYNGSVPFEEERILAVLQWLQ LPKDERPHFY TLYLEEPDSSGHSYGPVSSEVIKA</u> <u>LQRVDGMVGMMLDGLKELNLHRCNLILISDHGMEQGSCKKYIYLNKYLGDVKNIKVIYG</u> <u>PAARLRPSDVPDKYYSFNYEGIANRLSCREPNQHF KPYLKHFLPKRLHFAKSDRIEPLTF</u> <u>YLDPOWQLALNPSERK YCGSGFHGSDNVFSNMQALFVGYGPGFKHGLEADTFENIEVYNL</u> <u>MCDLLNLTPAPNNGTHGSLNHLKKNPVYTPKHPEVHPLVQCPFTRNPDNLGCSCNPSI</u> <u>LPIEDFQTQFNLTVAEKKIKHETLPYGRPRVLQKENTICLLSQHQFMSGYSQDILMPLW</u> <u>TSYTVDRNDSFSTEDFSNCLYQDFRIPLSPVHKCSFYKNNTKVSYGFLSPPQLNKNSSGI</u> <u>YSEALLTTNIVPMYQS FQVIWRYFHD TLLRKYAEERNGNVNVVSGPVDFDYDGRCDSEN</u> <u>LRQKRRVIRNQEILIP THFFIVLTSCDKTSQTPLHCENLDTLAFILPHRTDNSESCVHGK</u> <u>HDSSWVEELLMLHRRARITDVEHITGLSFYQQRKEPVSDILKLKTHLPTFSQEDLINDKTH</u> <u>TCPPCPAPELLGGPSVFLFPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV</u> <u>HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR</u> <u>EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF</u> <u>FLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</u>	ENPP1-リンカー- hIgG1 Fc 構築物	20
4	<u>GLKPSCAKEVSKCKGRCFERTFGNCRCDAAVELGNCCLDYQETCIEPEHIWTCNKFCRG</u> <u>EKRLTRSLCACSDDDCKDKGDCCINYSVCQGEKSWVEEPCESINEPQCPAGFETPPTLLF</u> <u>SLDGFRAEYLHTWGGLLPVISKLKCGTYTKNMRPVYPTKTFPNHYSIVTGLYPESHGII</u> <u>DNKMYDPKMNASFSLKSKEKFNPEWYKGEPIWVTAKYQGLKSGTFFWPGSDVEINGIFPD</u> <u>IYKMYNGSVPFEEERILAVLQWLQ LPKDERPHFY TLYLEEPDSSGHSYGPVSSEVIKALQ</u> <u>VDGMVGMMLDGLKELNLHRCNLILISDHGMEQGSCKKYIYLNKYLGDVKNIKVIYGPAA</u> <u>RLRPSDVPDKYYSFNYEGIANRLSCREPNQHF KPYLKHFLPKRLHFAKSDRIEPLTFYLD</u> <u>PQWQLALNPSERK YCGSGFHGSDNVFSNMQALFVGYGPGFKHGLEADTFENIEVYNLMCD</u> <u>LLNLTPAPNNGTHGSLNHLKKNPVYTPKHPEVHPLVQCPFTRNPDNLGCSCNPSILPI</u> <u>EDFQTQFNLTVAEKKIKHETLPYGRPRVLQKENTICLLSQHQFMSGYSQDILMPLWTSY</u> <u>TVDRNDSFSTEDFSNCLYQDFRIPLSPVHKCSFYKNNTKVSYGFLSPPQLNKNSSGIYSE</u> <u>ALLTTNIVPMYQS FQVIWRYFHD TLLRKYAEERNGNVNVVSGPVDFDYDGRCDSENLRQ</u> <u>KRRVIRNQEILIP THFFIVLTSCDKTSQTPLHCENLDTLAFILPHRTDNSESCVHGKHS</u> <u>SWVEELLMLHRRARITDVEHITGLSFYQQRKEPVSDILKLKTHLPTFSQEDLINDKTHTCP</u> <u>PCPAPELLGGPSVFLFPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA</u> <u>KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ</u> <u>VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY</u> <u>SKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</u>	ENPP1-リンカー- hIgG1 Fc 構築物	30
5	<u>PSCAKEVSKCKGRCFERTFGNCRCDAAVELGNCCLDYQETCIEPEHIWTCNKFCRGEKR</u> <u>LTRSLCACSDDDCKDKGDCCINYSVCQGEKSWVEEPCESINEPQCPAGFETPPTLLFSLD</u> <u>GFRAEYLHTWGGLLPVISKLKCGTYTKNMRPVYPTKTFPNHYSIVTGLYPESHGIIDNK</u> <u>MYDPKMNASFSLKSKEKFNPEWYKGEPIWVTAKYQGLKSGTFFWPGSDVEINGIFPDYK</u> <u>MYNGSVPFEEERILAVLQWLQ LPKDERPHFY TLYLEEPDSSGHSYGPVSSEVIKALQRVDG</u>	ENPP1-リンカー- hIgG1 Fc 構築物	40

	MVGMLMDGLKELNLHRCNLNLILISDHGMEQGSCKKYIYLNKYLGDVKNIKVIYGPAARLR PSDVDPKYYSFNYEGIARNLSCREFNQHFHPYLKHFLPKRLHFAKSDRIEPLTFYLDPOW QLALNPSEKRYCGSGFHGSDNVFSNMQALFVGYPGPFKHGIEADTFENIEVYNLMCDLLN LTPAPNNGTHGSLNHLKPNVYTPKHPKEVHPLVQCPFTRNPRDNLGCSCNPSILPIEDF QTQENLTVAEEKLIKHETLPYGRPRVLQKENTICLLSQHQFMSGYSQDILMPLWTSYTV RNDSFSTEDFSNCLYQDFRIPLSPVHKCSFYKNNTKVSYGFLSPPQLNKNSSGIYSEALL TTNIVPMYQSFQVIWRYFHDITLLRKYAEERNGVNVVSGPVDFDYDGRCDSENLRQKRR VIRNQEILIPTHFFIVLTSCKDTSTQPLHCENLDTLAFILPHRTDNSESCVHGKHDSSWV EELMLHRRARITDVEHITGLSFYQQRKEPVSDILKLKTHLPTFSQEDLINDKTHTCPPCP APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK	
6	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK	ヒト IgG1 Fc
118	X- PSCAKEVKSCKGRCFERTFGNCRCDAAACVELGNCCLDYQETCIEPEHIWTCNKFRGCEKR LTRSLCACSDCKDKGCCINYSVCQGEKSWVEEPCESINEPQCPAGFETPPTLLFSLD GFRAEYLHTWGGLLPVISKLKCCGYTKNMRPVYPTKTFPNHYSIVTGLYPESHGII DNK MYDPKMNASFSLKSKEKFNPEWYKGEPIWVTAQYQGLKSGTFFWPGSDVEINGTFFDIYK MYNGSVPFEEERILAVLQWLQLPKDERPHFYTLYLEEPDSSGHSYGPVSSEVIKALQVRD MVGMLMDGLKELNLHRCNLNLILISDHGMEQGSCKKYIYLNKYLGDVKNIKVIYGPAARLR PSDVDPKYYSFNYEGIARNLSCREFNQHFHPYLKHFLPKRLHFAKSDRIEPLTFYLDPOW QLALNPSEKRYCGSGFHGSDNVFSNMQALFVGYPGPFKHGIEADTFENIEVYNLMCDLLN LTPAPNNGTHGSLNHLKPNVYTPKHPKEVHPLVQCPFTRNPRDNLGCSCNPSILPIEDF QTQENLTVAEEKLIKHETLPYGRPRVLQKENTICLLSQHQFMSGYSQDILMPLWTSYTV RNDSFSTEDFSNCLYQDFRIPLSPVHKCSFYKNNTKVSYGFLSPPQLNKNSSGIYSEALL TTNIVPMYQSFQVIWRYFHDITLLRKYAEERNGVNVVSGPVDFDYDGRCDSENLRQKRR VIRNQEILIPTHFFIVLTSCKDTSTQPLHCENLDTLAFILPHRTDNSESCVHGKHDSSWV EELMLHRRARITDVEHITGLSFYQQRKEPVSDILKLKTHLPTFSQEDRSDKTHTCPPCP PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK-Y	BL-1118 (長時間作用型)
119	X- PSCAKEVKSCKGRCFERTFGNCRCDAAACVELGNCCLDYQETCIEPEHIWTCNKFRGCEKR LTRSLCACSDCKDKGCCINYSVCQGEKSWVEEPCESINEPQCPAGFETPPTLLFSLD GFRAEYLHTWGGLLPVISKLKCCGYTKNMRPVYPTKTFPNHYSIVTGLYPESHGII DNK MYDPKMNASFSLKSKEKFNPEWYKGEPIWVTAQYQGLKSGTFFWPGSDVEINGIFPDIYK MYNGSVPFEEERILAVLQWLQLPKDERPHFYTLYLEEPDSSGHSYGPVSSEVIKALQVRD MVGMLMDGLKELNLHRCNLNLILISDHGMEQGSCKKYIYLNKYLGDVKNIKVIYGPAARLR PSDVDPKYYSFNYEGIARNLSCREFNQHFHPYLKHFLPKRLHFAKSDRIEPLTFYLDPOW QLALNPSEKRYCGSGFHGSDNVFSNMQALFVGYPGPFKHGIEADTFENIEVYNLMCDLLN LTPAPNNGTHGSLNHLKPNVYTPKHPKEVHPLVQCPFTRNPRDNLGCSCNPSILPIEDF QTQENLTVAEEKLIKHETLPYGRPRVLQKENTICLLSQHQFMSGYSQDILMPLWTSYTV RNDSFSTEDFSNCLYQDFRIPLSPVHKCSFYKNNTKVSYGFLSPPQLNKNSSGIYSEALL TTNIVPMYQSFQVIWRYFHDITLLRKYAEERNGVNVVSGPVDFDYDGRCDSENLRQKRR VIRNQEILIPTHFFIVLTSCKDTSTQPLHCENLDTLAFILPHRTDNSESCVHGKHDSSWV EELMLHRRARITDVEHITGLSFYQQRKEPVSDILKLKTHLPTFSQEDRSDKTHTCPPCP PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK-Y	BL-782

SEQ ID NO:118および119について:

X = エクスポート配列

Y = 骨標的化タグまたは終止コドン (すなわち、*によって示されるアミノ酸はない)

骨標的化配列の非限定的な例には、限定されることなく、DDDDDDDDおよび/またはEEEEEEEEが挙げられる。

太字でなく、下線が引かれていないフォント = 様々な長さなどであり得るリンカー領域。リンカーのアミノ酸組成は可変であり得る。ある特定の非限定的な態様では、リンカー領域は、非特異的プロテアーゼ切断を妨げるヒスチジンなどの残基を含むことができる (すなわち、RSまたはRGの代わりにHSまたはHG)。

10

20

30

40

50

太字フォント=ヒトIgG1 (太字斜体で強調されたM883Y S885T T887E変異を有するBL-1118において最適化)

下線が引かれたフォント=ヒトENPP1の細胞外ドメイン (太字下線で強調されたI256T置換を有するBL-1118において最適化)

SEQ ID NO: 7 (マウス *ENPP1*-NCBI アクセション *NP_001295256.1*)

```
1 MERDGDQAGH GPRHGSAGNG RELESPAAAS LLAPMDLGEE PLEKAERARP AKDPNTYKVL
61 SLVLSVCVLT TILGCI FGLK PSCAKEVKSC KGRCFERTFS NCRCDAA CVS LGNCCLDFQE
121 TCVEPTHIWT CNKFRCEGKR LSRFVCSCAD DCKTHNDCCI NYSSVCQDKK SWVEETCESI
181 DTPECPAEFE SPPTLLFSLD GFRAEYLHTW GGLLPVISKL KNCGTYTKNM RPYPTKTTFP
241 NHYSIVTGLY PESHGIIDNK MYDPKMNASF SLKSKEKFNP LWYKGQPIWV TANHQEVKSG
301 TYFWPGSDVE IDGILPDIYK VYNGSVPFEE RILAVLEWLQ LPSHERPHFY TLYLEEDPSS
361 GHSHGPVSSE VIKALQKVDR LVGMLMDGLK DLGLDKCLNL ILISDHGMEQ GSCKKYVYLN
421 KYLGDVNNVK VVYGPAARLR PTDVPETYYS FNYEALAKNL SCREPNQHFR PYLKPFLPKR
481 LHFASDRIE PLTFYLD PQW QLALNP SERK YCGSGFHGSD NLFSNMQALF IGYGPAFKHG
541 AEVDSFENIE VYNLMCDLLG LIPAPNNGSH GSLNHL LKKP IYNPSHPKEE GFLSQCPIS
601 TSNDLGCTCD PWIVPIKDFE QQLNLTTEDV DDIYHMTVPY GRPRILLKQH RVCLLQQQQF
661 LTGYSLDLLM PLWASYTFLS NDQFSRDDFS NCLYQDLRIP LSPVHKCSYY KSNKLSYGF
721 LTPPRLNRVS NHIYSEALLT SNIVPMYQSF QVIWYHLHDT LLQRYAHERN GINVVSGPVF
781 DFDYDGRYDS LEILKQNSRV IRSQEILIPT HFFIVLTSCK QLSETPLECS ALESSAYILP
841 HRPDNIESCT HGKRESSWVE ELLTLHRARV TDVELITGLS FYQDRQESVS ELLRLKTHLP
901 IFSQED
```

10

SEQ ID NO: 8 (ウシ *ENPP1*-NCBI アクセション *NP_001193141.1*)

```
1 MERDSCAGGG SRGGEGGRGP REGLAGNGRD PGPGRAAEAS GEPQAAASLL APMDLGEEPL
61 ERAARARPAK DPNTYKVL SL VLSVCVLTTI LGCIFGLKPS CAKEIKSCKG RCFERTFGNC
121 RCDAACVDLG NCCLDYQETC IEPERIWCTT KFRCEGKRLS RSLCSCSDDC KDKGDCCINH
181 GSVCRGESKW AEEECDSIDE PQCPAGFETP PTLLFSLDGF RAEYLHTWGG LLPVISKLKT
241 CGTYTKNMRP VYPTKTFFNH YSIVTGLYPE SHGIIDNNIY DPQMNANFAL KNKEKFNPEW
301 YKGEPIWLTA KYQGLKTGTF FWPGSDVKIN GIFPDIYKIY NVSVPFEE RI LAILKWLQLP
361 KDERPHFYTL YLEEDSSGH SYGPVSSEVI RALQRVDNMV GMLMDGLKEL NLHRCLNLIL
421 ISDHGMEQGS CKKYVYLNKY LGDTKDYKV VYGPAARLRPS DVPDKYYSFD YEGIAKNLSC
481 QEPNQHF KPY LKHFLPKRLH FAKNDRIERL TFYLD PQWQL ALNP SERKYC GGGFHGSDNT
541 FLNMQALFIG YGPGFKHSTE VDSFENIEVY NLMCDLLNLT PAPNNGTHGS LNHLLSNPVY
601 TPKHPKEVRP LVQCPFTRAP RESLDCSCDP SILPIVDFQT QLNLTM AEEK TIKRGALPYG
661 RPRVLQNSTV CILYQH QFVS GYSRDILMPL WTSYTIGRND SFSTEDFSNC LYQDLRIPLS
721 PVHKCSFYKN NAKLSYGLLS PPQLHKGSSQ VYSEALLTTN IVPYQSFQV IWHY LHGTLL
781 QRYAEERNGL NVVSGPVFDS DYDGRYDSLE TLKQNSKIIR NLEVLIPTHF FLVLT SCKNT
841 SQTPLQCENL DAMAFILPHK TDNSESCAHG KHESLWVEEL LKLHTARITD VEHITGLSFY
901 QERKEPISDI LKLKTHLP TF NQED
```

20

30

SEQ ID NO: 9 (ウサギ *ENPP1*-NCBI アクセション *NP_001162404.1*)

```
1 MERDGCAGGG SRGGEGGRAP REGPAGNSRD PGRSHAAEAP GNPQAAASLL APMDVGE EPL
61 EKAARARTAK DPNTYKVL SL VLSVCVLTTI LGCIFGLKPS CAKEVKSCKG RCFERTFGNC
121 RCDAACVELG NCCLDYQETC IEPEHIWTCN KFRCEGKRLT RSLCACSDDC KDQGDCCINY
```

40

50

181 SSVQCQGEKSW VEEPCESINE PQCPAGFETP PTLLFSLDGF RAEYLHTWGG LLPVISKLLK
241 CGTYTKNMRP VYPTKTFPNH YSIVTGLYPE SHGIIDNKMY DPKMNASFSL KSKEKFNPEW
301 YKGEPIWVTA KYQGLKSGTF FWPQSDVEIN GIFFDIYKMY NGSVPFEEER LAVLQWLQLP
361 KDERPHFYTL YLEEDPSSGH SYGPVSSEVI KALQVRDNNV GMLMDGLKEL NLHRCNLIL
421 VSDHGMEQGS CKKYYIYNKY LGDVKNIKVI YGPAARLRPS DVPDKYYSFN YEGIARNLSC
481 REPNQHFHPY LKHFLPKRLH FAKSDRIEPL TFFYLDPOWQL ALNPSEKRYC GSGFHGSDNI
541 FSNMQALFVG YGPGFKHGLE VDTFENIEVY NLMCDLLNLT PAPNNGTHGS LNHLKKNPVY
601 TPKHPKEVHP LIQCPFTTRN RDNLCGSCNP SILPIEDFQT QFNLTVAEEK NIKHETLPYG
661 RPRVLQKKNT ICLLSQHGFQ SGYSQDILMP LWTSYTVDRN DSFSTEDFSN CLYQDFRISL
721 SPVHKCSFYK NNTKVSYGFL SPPQLNKNRS GIYSEALLT NIVPMYQSFQ VIWRYFHDTL
781 LRKYAEERNNG VNVVSGPVFD FDYDGRYDSL EILRQKRRVI RNQEILIPTH FFIVLTSCKD
841 ASQTPHLCEN LDTLAFILPH RTDNSESCLH GKHESSWVEE LMLHRARIT DVEHITGLSF
901 YQQRKEPVSD ILKLKTHLPT FSQED

SEQ ID NO: 10 (ヒヒ ENPP1-NCBI アクセション NP_001076211.2)

1 MERDGCAGGG SQGGGKGGRG PREGLAGNGR DPSHGQASEA PGDPQAAASL LAPMDLGEEP
61 LEKAAGARPA KDPNTYKVL S LVLVSCVLT ILGCIFGLKP SCAKEVKSKC GRCFERTFGN
121 CRCDVACVDL GNCCLDYQET CIEPERIWT NKFRCEKRL SRSLCACSD CKERGDCIN
181 YSAVCQGEKS WVEETCENIN EPQCPEGFEM PPTLLFSLDG FRAEYLHTWG GLLPVISKLLK
241 KCGTYAKNMR PVYPTKTFPN HYSIVTGLYP ESHGIIDNKM YDPKMNASF LKSKEKFNPE
301 WYKGEPIWLT AKYQGLRSGT FFWPGSDVKI NGIFFDIYKI YNGSVPFEEER ILAILKWLRL
361 PKDERPHFYT LYLEEPDSSG HSYGPVSSEV IKALQVRDNN VMLMDGLKE LNLHQCLNLI
421 LISDHGMEQG SCKKYYIYNK YLGDTKNIKV IYGPAARLRP SDVPEKYYSF NYENIARNLS
481 CREPNQHFKP YLKHFLPKRL HFAKSDRIEPL TFFYLDPOWQL LALSPSEKRY CGSGFHGSDN
541 VFSNMQALFV GYGPGFQHG EVDSEFENIEV YNLMCDLLNL TPAPNNGTHG SLNHLKKNPI
601 YTPKHPKEVQ PSVQCPLAGS PRDLSGCSCN PSILPIVDFQ TQFNLTAAE KNINRASLPY
661 GRPRLQKKS SVCLLYQHGF VSGYSHDVL PLWTSYTVNR NDSFSTEDFS NCLYQDLRIS
721 FSPIHNCIFY KNNAKLSYGF LSPPQLSKDS SQIYSEALLT SNIVPMYQSF QVIWRYFHDT
781 LLQRYAERN SINVVSGPVF DSDYDGRYDS SEALKRNRV IRNQEILIPT HFFIVTSCK
841 NTSQTPLQCD NLDPLAFILP TRSDNSES CV HEKRESSWIE ELLMMHRARI MDVEHITGLS
901 FYQERKEPVSD DILKLKTHLP HVSQED

SEQ ID NO: 118 (構築物 1118 – 可溶性 ENPP1-Fc)

MRGPAVLLTVALATLLAPGAGAPSCAKEVKSCKGRCFERTFGNCRCDAAACVELGNCCLDYQETCIEPEHIWTCNK
FRCEKRLTRSLCACSDCKDKGDCCINYSVQCQGEKSWVEEPCESINEPQCPAGFETPPTLLFSLDGFRAEYLH
TWGGLLPVISKLLKCGTYTKNMRPVYPTKTFPNHYSIVTGLYPESHGIIIDNKMYDPKMNASFSLKSKEKFNPEWY
KGEPIWVTAKYQGLKSGTFWWPGSDVEINGTFPDIYKMYNGSVPFEEERILAVLQWLQLPKDERPHFYTYLLEEDP
SSGHSYGPVSSEVIKALQVRDGMVGMMDGLKELNLHRCNLILISDHGMEQGSCKKYYIYNKYLGDKVKNIKVIY
GPAARLRPSDVPDKYYSFNYEGIARNLS CREPNQHFKPYLKHFLPKRLHFAKSDRIEPLTFFYLDPOWQLALNPSE
RKYCGSGFHGSDNVFSNMQALFVGYPGFKHGLEADTFENIEVYNLMCDLLNLTTPAPNNGTHGS LNHLKKNPVYT
PKHPKEVHPLVQCPFTTRNPRDNLGCSCNP SILPIEDFQTQFNLTVAEEKIIKHETLPYGRPRVLQKENTICLLSQ
HQFMSGYSQDILMPLWTSYTVDRNDSFSTEDFSNCLYQDFRIPLSPVHKCSFYKNNTKVSYGFLSPPQLNKNSSG
IYSEALLTTNIVPMYQSFQVIWRYFHDTLLRKYAEERNNGVNVVSGPVFDYDGRCDSENLRQKRRVIRNQEIL
IPTHFFIVLTSCKDTSTPLHCENLDTLAFILPHRTDNSESCVHGKHDSSWVEELMLHRARITDVEHITGLSFY
QQRKEPVSDILKLKTHLPTFSQEDRSKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHE
DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR
EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ
GNVFSQSVMHREALHNYTQKSLSLSPGK*

SEQ ID NO: 119 (構築物 2000 – 骨標的 ENPP1-Fc)

MRGPAVLLTVALATLLAPGAGAPSCAKEVKSCKGRCFERTFGNCRCDAAACVELGNCCLDYQETCIEPEHIWTCNK
FRCEKRLTRSLCACSDCKDKGDCCINYSVQCQGEKSWVEEPCESINEPQCPAGFETPPTLLFSLDGFRAEYLH
TWGGLLPVISKLLKCGTYTKNMRPVYPTKTFPNHYSIVTGLYPESHGIIIDNKMYDPKMNASFSLKSKEKFNPEWY
KGEPIWVTAKYQGLKSGTFWWPGSDVEINGTFPDIYKMYNGSVPFEEERILAVLQWLQLPKDERPHFYTYLLEEDP
SSGHSYGPVSSEVIKALQVRDGMVGMMDGLKELNLHRCNLILISDHGMEQGSCKKYYIYNKYLGDKVKNIKVIY
GPAARLRPSDVPDKYYSFNYEGIARNLS CREPNQHFKPYLKHFLPKRLHFAKSDRIEPLTFFYLDPOWQLALNPSE
RKYCGSGFHGSDNVFSNMQALFVGYPGFKHGLEADTFENIEVYNLMCDLLNLTTPAPNNGTHGS LNHLKKNPVYT
PKHPKEVHPLVQCPFTTRNPRDNLGCSCNP SILPIEDFQTQFNLTVAEEKIIKHETLPYGRPRVLQKENTICLLSQ
HQFMSGYSQDILMPLWTSYTVDRNDSFSTEDFSNCLYQDFRIPLSPVHKCSFYKNNTKVSYGFLSPPQLNKNSSG
IYSEALLTTNIVPMYQSFQVIWRYFHDTLLRKYAEERNNGVNVVSGPVFDYDGRCDSENLRQKRRVIRNQEIL
IPTHFFIVLTSCKDTSTPLHCENLDTLAFILPHRTDNSESCVHGKHDSSWVEELMLHRARITDVEHITGLSFY
QQRKEPVSDILKLKTHLPTFSQEDRSKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHE
DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR
EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ
GNVFSQSVMHREALHNYTQKSLSLSPGKDDDDDD*

【実施例】**【0174】****実験実施例**

以下の実験実施例を参照して、本開示を詳細にさらに説明する。これらの例は、例示のみを目的として提供されており、そのように指定されない限り、限定することを意図するものではない。したがって、本開示は、以下の実施例に限定されると決して解釈されるべきではなく、むしろ、本明細書において提供される教示の結果として明らかになるありとあらゆる変形例を包含すると解釈されるべきである。

【0175】

10

20

30

40

50

さらなる説明がなければ、当業者であれば、前述の説明、および以下の例示的な実施例を使用して、本開示の化合物を作製および利用し、主張される方法を実施することができると考えられる。したがって、以下の実施例は、本開示の好ましい態様を具体的に指摘しており、本開示の残りの部分を限定するものと決して解釈されるべきではない。

【0176】

以下の実施例で使用される材料および方法をここで説明する。

【0177】

ヒト対象

検査データ、X線写真、コンピュータ断層撮影（CT）および骨密度（BMD）を含む患者データを遡及的に収集し、ENPP1変異を有する患者の骨格データおよび生化学的データを報告した。

10

【0178】

変異分析

以前に報告されたように（Fujiki et al., 2018）、Kazusa DNA Research InstituteのMiSeq Sequencing Systemによる次世代シーケンシングを利用して、遺伝性低リン血症性くる病、骨形成不全症（OI）、および骨粗鬆症・偽神経膠腫症候群（OPPG）に関連する遺伝子の変異分析（表2）を行った。以前に報告されたように（Fujiki et al., 2018）、または表2に列挙されたプライマーを使用することによって、発端者の家族を対象に、検出されたENPP1バリエーションの直接シーケンシングを行った。インシリコツールPolyPhen-2、SIFT、およびMutation Taster（Adzhubei et al., 2010; Kumar et al., 2009; Schwarz et al., 2010）によって、検出されたバリエーションの病原性を評価した。

20

【0179】

（表2）本症例シリーズで試験した遺伝子（A）、およびENPP1遺伝子におけるバリエーションの標的配列に使用したプライマー（B）

(A) 本報告で
試験した遺伝子

OIおよびOPPGに関連する 遺伝子	<i>BMP1, COL1A1, COL1A2, CRTAP, FKBP10, IFITM5, P3H1, PPIB, SERPINF1, SERPINH1, SP7, TMEM38B, WNT1, CREB3L1, SPARC, TENT5A, MBTPS2, MESD</i>
低リン血症性くる病に 関連する遺伝子	<i>PHEX, FGF23, DMP1, ENPP1, FAM20C, FGFR1, PTH1R, SLC34A3, SLC9A3R1, CLCN5, OCRL, CYP27B1, CYP2R1, VDR, HNRNPC, CYP3A4, NF1, SLC34A1</i>

30

(B) ENPP1遺伝子のバリエーションの標的配列に使用したプライマー

バリエーション	オリゴヌクレオチド配列	方向	生成物サイズ
<i>ENPP1</i> c.536A>G	GGATCATACTCAGGAAGACAGC TGGCCAATAGCCATGACTCC	フォワード リバース	321

40

OI、骨形成不全症;OPPG、骨粗鬆症・偽神経膠腫症候群

【0180】

相補的DNAのクローニング

患者3の場合、逆転写およびポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）を使用して、ENPP1 cDNAの合成に末梢血単核細胞由来の全RNAを使用した。大腸菌への形質転換前に、ENPP1 cDNAとpT7blue T-ベクター（Merck, Darmstadt, Germany）とをライゲーション

50

ョンした。増幅されたベクターをQIAprep Spin Miniprepキット (Qiagen, Redwood City, CA, USA) を用いて精製し、両対立遺伝子におけるシーケンシングに供した。

【0181】

インタクトなFGF23の測定

製造者のプロトコル (Minaris Medical, Tokyo, Japan) に従って、Determinar CL FGF23 (CL) によって、インタクトなFGF23を測定した。CLは、抗ヒトFGF23マウスモノクローナル抗体を使用するサンドイッチ化学発光酵素イムノアッセイ (CLEIA) である。この方法を使用すると、FGF23の基準範囲は16.1~49.3 pg/mlであり、FGF23関連低リン血症のカットオフ値は30 pg/mlである (Ito et al., 2021; Kato et al., 2021)。

10

【0182】

血漿PPIの測定

血漿ピロリン酸 (PPI) 濃度を測定するために、参加者から血漿を収集した。血漿単離後、試料を遠心分離によって30 kDa膜 (PALL, Port Washington, NY, USA) を通して濾過して血小板を除去し、単回使用のために採血の1時間以内に-80°Cで凍結した。軽微な改変を加えて、以前に記載されたように (Jansen et al., 2013; Jansen et al., 2014)、ATPスルフリラーゼを使用して血漿 [PPI] の測定を行った。室温でEnSpire Multimode Plate Reader (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) によって、発光シグナルを読み取った。適切な対照からのバックグラウンド減算 [PPI] によって、最終血漿 [PPI] を正規化した。ATPスルフリラーゼ法を使用した、健康な小児および青年における [PPI] の基準範囲は、2,360~4,440であることが近年報告された (Bernhard et al., 2022)。これらの値は、健康な成人において以前に報告された以前の標準範囲と同様である (O'Neill et al., 2010)。

20

【0183】

ENPP1の酵素動態アッセイ

Quikchange II-XL Site Directed Mutagenesis (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) を使用して、hENPP1-Fc構築物に入るようにヒト変異を操作した。配列検証後、Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を使用して、構築物をCHO-K1細胞にトランスフェクトした。トランスフェクションの48時間後、250 mM Tris pH 8.0と、500 mM NaClと、0.05% Triton X-100と、1 mM チミジン50-モノホスフェートp-ニトロフェニルとを含有する90 µLのアッセイ緩衝液と10 µLの上清を混合した。発色基質から遊離したp-ニトロフェニル基の速度を、各構築物について少なくとも5回の反復でOD405 nm/分での変化として報告し、% WTに正規化した。

30

【0184】

統計分析

PPIレベルを平均±標準偏差 (SD) として示した。WTと変異との間のENPP1の酵素動態アッセイの比較をANOVAによって分析した。有意性をP<0.05に設定した。GraphPad Prism version 6.05 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) によってデータ分析を行った。

40

【0185】

実施例1: 患者におけるENPP1ハプロ不全の同定

患者1は、上肢および下肢の骨折歴を有す47歳男性であった。患者は社会的飲酒家であり、20パックイヤーの喫煙歴を有した。患者は、尿管結石症および吸収不良症候群の病歴を有さず、骨粗鬆症に関連する治療歴を有さず、骨粗鬆症の家族歴を有しなかった。患者は、46歳の時点で、脊椎圧迫骨折と診断された背部痛のほか、背部痛の1ヶ月後に始まった、膝、手首および足首の疼痛を起こした。患者は地元の病院を受診し、腰部および近位大腿骨の二重エネルギーX線吸収測定法 (DEXA) では、それぞれ-3.8および-2.6のTスコアが示された。脊椎のCTスキャンにより、第7胸椎および第11胸椎に圧迫骨折が示された (図1A)。

50

【0186】

骨シンチグラフィーでは、肋骨における複数の取込みが示され、多重骨折が示唆された（図1B）。股関節および膝関節、アキレス腱にも、傍脊椎靱帯にも異所性骨化の徴候は検出されなかった（図1C～図1H）。患者は早期発症骨粗鬆症と診断され、続発性骨粗鬆症および骨軟化症がないことを確認するための臨床検査が行われた。地元の1つの病院では、血清アルカリホスファターゼおよび骨アルカリホスファターゼのわずかな上昇とともに、低い正常な血清リンが検出されたが、別の病院では、血清カルシウム、リンおよびFGF23の異常は検出されなかった（補足表1）。

【0187】

甲状腺刺激ホルモン、遊離テストステロンおよびコルチゾール（午前中に測定）などの他の内分泌機能検査は、正常範囲内であった（補足表1）。そのため、患者はさらなる評価のためにUniversity of Tokyo Hospitalsを受診し、血液化学が再評価された（表3）。検査データは、血清アルブミンの正常レベル、正常な補正カルシウム（8.8mg/dL）、低い正常な血清リン（2.7mg/dL、基準範囲2.7～4.6mg/dL）、正常なFGF23（28pg/mL、基準範囲16.1～49.3pg/mL）、および低い25-ヒドロキシビタミンD（7.2ng/mL）を示した。

【0188】

OIまたはOPPGの軽度の表現型の診断が考慮され、病原性バリエーションを同定することなく、OIまたはOPPGに関連する遺伝子の変異分析が行われた（表2）。最初の病院で測定された血清分析物（補足表1）と、本発明者らの病院での低い正常な血清リンの存在とに基づいて、軽度の低リン血症性くる病の診断が次に検討され、関連遺伝子の変異分析が行われたところ、ENPP1におけるミスセンスバリエーションが明らかにされた（c.536A>G、p.Asn179Ser [N179S]）（表3）。次に、患者の18歳の息子に対して、ENPP1の検出されたバリエーションの直接シーケンシングが行われ、同一のヘテロ接合性ENPP1バリエーションが明らかにされた（図2A）。息子は、低い正常なBMD—腰部（-1.6）および近位大腿骨（-0.8）における低いZスコアを示したが、脊椎、股関節および膝関節、およびアキレス腱（図5A～図5Gおよび表3）における自発性骨折および異所性骨化の病歴を有しなかった。

【0189】

患者2は77歳の女性であり、広汎性特発性骨増殖症（DISH）と診断され、脊椎の圧迫骨折を起こした際にUniversity of Tokyo hospitalを受診した。評価時、傍脊椎靱帯の骨化と、多発性脊椎圧迫骨折とがCTによって観察された（図3A）。加えて、アキレス腱にわずかな異所性骨化が検出されたが（図3F）、股関節および膝関節は無傷であった（図3B、図3C、図3Dおよび図3E）。脊椎CTによって検出された骨化は、組織学的に評価されなかった。患者の生化学的プロファイルは、低い正常な血清リン（3.1mg/dL、基準範囲2.7～4.6mg/dL）および高い正常なFGF23（43.3pg/mL、基準範囲16.1～49.3pg/mL）を示した。傍脊椎靱帯およびアキレス腱における異所性骨化の存在のために、遺伝性FGF23関連低リン血症（具体的には、ARHRまたはXLH）の診断が検討された。遺伝性低リン血症性くる病に関連する遺伝子の検査（表2）により、ENPP1におけるヘテロ接合性ミスセンスバリエーションの存在が明らかにされた（c.1352A>G、p.Tyr451Cys [Y451C]）（表3）。

【0190】

患者3は54歳の女性であり、股関節、膝関節および背中の疼痛を訴えて近隣の病院を受診した。患者は、その後、前/後縦靱帯の骨化（OALL/OPLL）を示し、これは、DISH、両側股関節周囲の骨棘、および両側アキレス腱の腱付着部症と診断された（図4A～図4I）。検査データは、低い正常な血清ホスフェート（2.9mg/dL）および高い正常な血清FGF23（38.4pg/mL、基準範囲16.1～49.3pg/mL）を示した。異所性傍脊椎骨化の所見と組み合わせた生化学的プロファイルにより、FGF23関連低リン血症という結論がもたらされ、遺伝子分析（表2）により、患者1および2と同じENPP1バリエーション（c.536A>G、およびc.1352A>G）が明らかにされた（表3）。次に、患者の息子（19

10

20

30

40

50

歳および23歳) に対してサンガーシーケンシングが行われ、いずれの息子でもヘテロ接合性ENPP1バリエーションc.1352A>Gが明らかにされた(図2C)。重要なことに、これらの若年成人はいずれも、脊椎または股関節における異所性骨化の存在を伴わず、石灰化アキレス腱腱付着部症を示した(図6A~図6Gおよび図7A~図7G)。

【0191】

(補足表1) 紹介前の症例1の生化学的データおよびホルモンデータ

	RI, 成人	症例 1
血清カルシウム (mg/dL)	8.8 - 10.1	9.4
血清ホスフェート (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
遊離テストステロン (pg/mL)	4.7 - 21.6	5.6
コルチゾール (μg/dL)	4.5 - 21.1	6.0

略語: RI、基準範囲; eGFR、推定糸球体濾過速度; 25(OH)D、25-ヒドロキシビタミンD; 1,25(OH)₂D、1,25-ジヒドロキシビタミン; ALP、アルカリホスファターゼ; BAP、骨アルカリホスファターゼ; TRACP-5b、酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ5b; iPTH、インタクトな副甲状腺ホルモン; FGF23、線維芽細胞増殖因子23; TSH、甲状腺刺激ホルモン。

【0192】

(表3) 一対立遺伝子ENPP1バリエーションまたは複合ヘテロ接合性ENPP1バリエーション、c.536A>Gまたはc.1352A>Gを有する成人における人口統計データ、臨床データおよび生化学的データ。

10

20

30

40

50

R1 成人	症例1	症例1の息子		症例2	症例3	症例3の息子 (Ⅲ-2)		症例3の息子 (Ⅲ-3)
		ヘテロ接合性	ヘテロ接合性	ヘテロ接合性	ヘテロ接合性	ヘテロ接合性	ヘテロ接合性	
ENPP1 バリアント	e.536A>G	e.536A>G	e.536A>G	e.1352A>G	e.536A>G / e.1352A>G	e.1352A>G	e.1352A>G	e.1352A>G
タンパク質の変化	p.Asn179Ser	p.Asn179Ser	p.Asn179Ser	p.Tyr451Cys	p.Asn179Ser / p.Tyr451Cys	p.Tyr451Cys	p.Tyr451Cys	p.Tyr451Cys
人口統計データ								
年齢(歳)/性別	48/M	18/M	78/F	54/F	23/M	19/M		
身長 (cm/SD)	166 / +0.9	177 / 1.2	146 / +0.9	155 / +0.4	167 / +0.4	164 / +2.0		
臨床データ								
異所性骨化								
傍脊椎靱帯	なし	なし	あり	あり	なし	なし	なし	なし
股関節	なし	なし	なし	なし	あり	なし	なし	なし
膝関節	なし	なし	なし	なし	なし	なし	なし	なし
アキレス腱	なし	なし	あり	あり	あり	あり	あり	あり
MMI (Tスコア/Zスコア)								
近位大腿骨	-2.6 / -2.3	NA / -0.8	-3.5 / -1.3	0.2 / 0.7	NE	NE	NE	NE
腰部	-3.8 / -2.6	NA / -1.6	-3.3 / -0.8	3.6 / 2.9	NE	NE	NE	NE
生化学的データ								
血清カルシウム (mg/dL)	8.8	9.9	9.6	9.3	9.6	10.0		

10

20

30

40

50

血清ホスフェート(mg/dL)	2.7-4.6	2.7	3.7	3.1	2.9	3.4	3.2
血漿 PP _i (nM)	2360-4440	1646±36	NE	1748±45	1866±82	1585±36	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

略語:RI、基準範囲;M、男性;F、女性;SD、標準偏差;BMD、骨密度;NA、該当せず;NE、調査せず;PP_i、ピロリン酸;eGFR、推定糸球体濾過速度;25(OH)D、25-ヒドロキシビタミンD;1,25(OH)₂D、1,25-ジヒドロキシビタミン;BAP、骨アルカリホスファターゼ;TRACP-5b、酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ5b;iPTH、インタクトな副甲状腺ホルモン;FGF23、線維芽細胞増殖因子23;TPR、尿細管ホスフェート再吸収。

【0193】

実施例2:患者におけるENPP1ハプロ不全の影響の特徴付け

患者3におけるENPP1の相補的DNAのクローニング

ENPP1の相補的DNAをクローニングし、シーケンシングして、2つのENPP1バリアン

10

20

30

40

50

トが同じ対立遺伝子または反対の対立遺伝子に位置するかどうかを評価した。各対立遺伝子の配列データから、症例3がENPP1バリエーションについて複合ヘテロ接合体を有することが明らかにされた（図8）。

【0194】

検出されたENPP1バリエーションに関する病原性のインシリコ予測

本症例で検出されたN179SおよびY451Cの対立遺伝子頻度は、Genome Aggregation Database (GnomAD) では、それぞれ0.00010および0.00016であると報告された。しかし、Tohoku Medical Megabank Organization (ToMMo) によって構築された一般日本人個体3552例から得られた全ゲノム参照パネルでは、N179SおよびY451Cの対立遺伝子頻度は、それぞれ0.0071および0.0055であると報告された（表4）。Asn 179はソマトメジンBドメイン2（SMB2）に位置し、これはタンパク質の二量体化および安定性にとって重要であるが、Tyr 451は触媒ドメインに位置し（図9）、Asn 179およびTyr 451はいずれも、あらゆる種にわたって高度に保存されている。方法に記載されるインシリコツールの組合せは、N179S変異およびY451C変異を病原性として標識した（表4）。

10

【0195】

（表4）ENPP1バリエーション、c.536A>Gまたはc.1352A>Gの対立遺伝子頻度およびインシリコ予測

バリエーション	対立遺伝子頻度		インシリコ予測		
	GnomAD	ToMMo	PolyPhen-2	SIFT	変異テイスター
c.536A>G	0.00010	0.0071	おそらく損傷	損傷	病因
c.1352A>G	0.00016	0.0055	おそらく損傷	損傷	多型

20

【0196】

血漿PPiの測定

発端者（症例1～3）3例およびそれらの家族を対象に、血漿PPiを測定した。ヘテロ接合性ENPP1バリエーションを有する患者は、1,000～2,000nMの血漿PPiレベルを示し（表3）、二対立遺伝子ENPP1バリエーションを有する患者における血漿PPiは、1,866nMという同様の濃度を示した。

30

【0197】

ENPP1の酵素動態アッセイ

ENPP1触媒活性に対する変異の影響をさらに評価するために、WT ENPP1アイソフォームと比較して、全バリエーションの酵素速度を並行したインビトロアッセイで評価した。N179SバリエーションおよびY451Cバリエーションは、WT ENPP1と比較した場合、ENPP1の触媒速度をそれぞれ55%および70%低下させた（図10）。そのため、ACMGガイドライン（N179S:PM1+PP3+PS3、Y451C:PM1+PS3）に従って、N179SバリエーションおよびY451Cバリエーションを「おそらく病原性」と分類した。

【0198】

選択した結果

結果は、原発対象（患者1～3）における一対立遺伝子ENPP1欠乏の2つの症例および複合二対立遺伝子ヘテロ接合性ENPP1欠乏の症例の臨床症状の存在、ならびにこれらの対象の子供におけるENPP1ハプロ不全症の追加の3つの症例の存在を示す。

40

【0199】

患者1は早期発症骨粗鬆症を示したのに対して、患者2は脊椎の骨増殖症と、DISHの推定診断とを示し、骨粗鬆症である（脊椎の圧迫骨折によって証明される、図1A～図1Bおよび図3A～図3G）ことがさらに判明した。患者3は、患者1および2に存在する個々の変異から構成される複合ヘテロ接合性ENPP1変異を有し、その結果、該患者は、ENPP1ホモ接合性欠乏であり、傍脊椎靱帯に顕著な骨化、ならびに股関節周囲の石灰化、および

50

アキレス腱の両側石灰化腱付着部症を示した（図4A～図4I）。

【0200】

さらに、原発患者から遺伝した一対立遺伝子ENPP1バリエーションを有する子供はいずれも、患者1の18歳の息子の低骨量（腰椎のZスコア-1.6）、ならびに患者3の19歳および23歳の子供のアキレス腱の石灰化腱付着部症など、驚くべきことに若年時に筋骨格疾患を示した。表現型を有する遺伝子型の分離は、ENPP1欠乏が本試験に記載された骨障害の病因に中心的な役割を果たすという考えをさらに裏付ける。

【0201】

以前に、GACIを誘導するホモ接合性ENPP1変異を有する家族の評価では、ハプロ不全ENPP1保有者は無症候性であるが、低カルシウム血症および低リン血症の血清生化学を有することが報告され、カルシウムおよびホスフェートの恒常性におけるENPP1の果たし得る役割が示唆された（Kotwal et al., 2020）。対照的に、Oheimらは、早期発症骨粗鬆症を有する成人男性におけるENPP1ハプロ不全を報告し、これは、ENPP1^{asj/asj}と呼ばれるENPP1ホモ接合性欠乏マウスにも存在する表現型であり（Oheim et al., 2020）、ENPP1が哺乳動物の骨量を調節するという考えが裏付けられた。実際、患者1およびその18歳の息子の骨格表現型は、ENPP1ハプロ不全と早期発症骨粗鬆症との関連を裏付けている。

【0202】

本試験は、ENPP1ハプロ不全の関連をDISH患者まで広げる。DISHは、特に胸椎周囲の靱帯および腱付着部の骨化を特徴とする全身状態である。DISH患者は、疼痛、および可動域の減少、ならびに脊椎骨折のリスクの増加を時折起こす（Mader et al., 2013）。発症機序は不明であるが、DISHには、高齢（50歳を超える年齢）、男性、肥満、高血圧および真性糖尿病が関連している（Kuperus et al., 2020）

【0203】

患者2の場合、患者は50歳を超えていたが、DISHの他の危険因子は存在せず、代わりに、患者はENPP1ハプロ不全であることが判明した。ヒトおよびマウスを対象とした臨床試験および前臨床試験では、脊椎靱帯骨化にホモ接合性ENPP1欠乏に関連したことを考慮すると（Okawa et al., 1998; Nakamura et al., 1999; Saito et al., 2011; Hirao et al., 2016）、血漿PPIを低下させる、ENPP1活性の障害は、この患者に存在する進行性の傍脊椎骨化および石灰化腱付着部症の危険因子である。

【0204】

記載されたENPP1バリエーション（N179SおよびY451C）はいずれも、二量体化および安定性（Asn 179）ならびに触媒活性（Tyr 451）に重要な、ENPP1の領域に位置する高度に保存された配列にある。さらに、N179SおよびY451Cは、複数のインシリコツールによって有害であることが判明したが（表4）、これまで病原性として報告されていない。

【0205】

加えて、N179SおよびY451Cは、酵素活性をWTレベルと比較してそれぞれ55%および70%低下させ、これは、ENPP1の他の病原性バリエーションに存在する残留酵素活性と類似している（Kotwal et al., 2020; Oheim et al., 2020; Rutsch et al., 2003; Stella et al., 2016; Thumbigere-Math et al., 2018）。まとめると、これらの所見は、ENPP1バリエーションN179Sおよび/またはY451Cが、発端者3例に存在する骨格表現型および異所性骨化の原因であるという知見を裏付けている。

【0206】

ENPP1が筋骨格石灰化を調節する機序は未だ完全には理解されていないが、すなわち、触媒作用または触媒非依存性タンパク質シグナル伝達を介してであろうとなかろうと、患者1および2に記載された患者はいずれも、観察された異常な表現型におけるENPP1触媒活性の役割と一致して、低い血漿[PPI]（それぞれ1,646nMおよび1,748nM、基準範囲2,360～4,440nM）を示した。ENPP1欠乏およびABCC6欠乏はいずれも、低い血漿PPIレベルをもたらす（Lorenz-Depiereux et al., 2010; Levy-litan et al., 20

10

20

30

40

50

10;Rutsch et al.,2001;Nitschke et al.,2012;Le Saux et al.,2000)。ENPP1ハプロ不全患者における血漿PPIレベルは、ENPP1欠乏のない患者のPPIレベルとホモ接合性ENPP1欠乏患者のPPIレベルとの中間である(Kotwal et al.,2020;Oheim et al.,2020)。本発明者らの患者におけるPPIレベルも1,000~2,000nMの範囲内に入ったが、予想外にも、複合ヘテロ接合性ENPP1欠乏を有する患者3のPPI濃度はハプロ不全ENPP1患者と類似しており、代償機序の関与が示唆された(Kotwal et al.,2020)。

【0207】

さらに、患者3には二次性副甲状腺機能亢進症が観察され、この所見は、ホモ接合性ENPP1欠乏を有する他の患者(Kotwal et al.,2020、およびCapelli et al.,2015)、ならびにENPP1欠乏のマウスモデルでも観察された。また、上昇したFGF23によって誘発される他の障害、例えば、FGF23の作用によるビタミンDの活性化障害に起因して二次性副甲状腺機能亢進症を発症するHypマウスならびにXLHおよびARHRを有するヒトでは、PTHが上昇する(Carpenter JBMR,2011)。同様の機序が、ビタミンD欠乏であることが認められた症例3における二次性副甲状腺機能亢進症、およびホモ接合性ENPP1欠乏の他の症例の原因となっている可能性がある(Kotwal et al.,2020)。患者3に記載された患者は骨軟化症を示さなかったため、活性化ビタミンDの代わりに天然ビタミンDを用いた治療は、二次性副甲状腺機能亢進症を改善するのに、および二次性副甲状腺機能亢進症の悪化を予防するのに適していると考えられる。

【0208】

本試験の患者は正常なインタクトなFGF23を示したが、それらのレベルは、それらの低い正常な血清リンレベルに関連して上昇していると解釈され、遺伝的に誘導されたホスフェート消耗障害の可能性が提起された。これに関して、ARHR2の元の報告に記載されている患者の大部分が、低い血清リンに関連して、高い正常な、またはわずかに上昇したインタクトなFGF23を有する。くる病患者3例に関するLevy-Litanの記載では、3例のうち2例が高い正常なインタクトなFGF23を有し(50pgおよび47pg、正常基準範囲10~50pg、(Levy-litan et al.,2010)、Lorenz-Depiereuxによって報告されたARHR2患者7例のうち5例は、反復測定時に、正常の上限にあるかまたはわずかに上昇したインタクトなFGF23を有した。これらの範囲は、低いホスフェート値と、患者によって示される重度のくる病表現型とに関連して高いと同様に解釈された。

【0209】

いかなる理論によっても制限されることを望むものではないが、本試験では、ENPP1ハプロ不全がホモ接合性ENPP1欠乏よりも大きなFGF23上昇を誘発することが示され、正常な、または低い正常な血清リン(2.7~3.1mg/dL、基準範囲2.7~4.6mg/dL)に関連した正常レベルおよび高い正常レベルのインタクトなFGF23によって、遺伝的に誘導された低リン血症の疑いが高まり、遺伝子検査を開始した。本試験は、ARHR、XLHおよび低リン血症性腫瘍性石灰沈着症などのまれな代謝障害では石灰化腱付着部症を有する患者に(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)、および急速進行型のOPLLを有する患者の一般医療集団に(Albright et al.,2015;Ferreira et al.,2021)、循環FGF23の増加、および低リン血症が起こることを示している。対照的に、石灰化腱付着部症は、SLC34A3欠乏などの低リン血症性くる病のFGF23非依存性形態と関連していない(Kotwal et al.,2020)。したがって、FGF23は、腱付着部症の発症に密接に関連しているように思われる。

【0210】

ENPP1欠乏マウスの骨全体に対して行われた以前のトランスクリプトーム解析では、Enpp1の不活性化変異がFgf23転写を増加させ、Wnt10bおよびWnt16の転写を減少させることが報告され(Maulding et al.,2021)、ENPP1欠乏が、Wntシグナル伝達の障害を部分的に介して異常な骨格石灰化を誘発することが示唆された。患者1は、FGF23レベルの上昇を伴う明白な低リン血症性くる病を示さず、骨吸収マーカーである酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ5b(TRACP-5b)は正常範囲にあったことから、欠陥Wnt

シグナル伝達によって誘発される同化欠陥と一致する所見である、高い骨代謝回転を伴わない骨粗鬆症の発症が示唆された。したがって、ヒトの観察結果は、ENPP1欠乏のマウスモデルに対するトランスクリプトーム解析によって示唆される骨粗鬆症機構と一致する (Maulding et al., 2021)。

【0211】

最後に、本試験に記載されたバリエーションの対立遺伝子頻度の差に留意することが重要である。患者2 (Y451C) に検出された対立遺伝子の頻度について、日本人 (ToMMo:0.0055) は他の全人種 (GnomAD:0.00016) の約30倍である。一対立遺伝子ENPP1 Y451C変異がOPLLに関連するという観察結果を考慮すると、このバリエーション頻度の差は、日本 (1.8~4.1%) では、OPLLの有病率が米国 (0.12%) およびドイツ (0.1%) の10~40倍であることを説明し得る (Stapleton et al., 2011)。

10

【0212】

実施例3:ENPP1融合タンパク質の生成、およびDISHモデルマウスの処置

ENPP1生成

ENPP1融合タンパク質の一例は、ENPP1-Fcである。ただし、ENPP1-Fcの例示は、本明細書において記載される他のENPP1融合タンパク質 (ENPP1-アルブミンなど) に適用することができる。

【0213】

ENPP1-Fcは、IgG1のFc断片 (rhENPP1-Fc) と結合した、ヒトENPP1 (可溶性ENPP1) の細胞外ドメインを含有する組換え融合タンパク質である。ENPP1-Fcの組換え細胞外ドメインは、その触媒活性を含有し、天然ENPP1酵素と同一である。ENPP1-Fcは、動物由来成分を含まないフェドバッチ細胞培養プロセスを介してCHO細胞内で産生される組換えヒトタンパク質である。ENPP1-Fc二量体の分子量は約290kDaである。ENPP1-Fcは、高度にグリコシル化されており、約6.0のpIを有する。内因性ENPP1と同様に、ENPP1-Fcの一次基質はATPであり、ATPはAMPおよびPPiに切断される。

20

【0214】

特定の態様では、リンカー (ロイシン、イソロイシンおよびアスパラギンを含む) を介してリンカーにより可溶性ENPP1タンパク質をヒトFcドメインに融合した。CHO細胞から精製した3つのENPP1-Fc構築物は、SEQ ID NO:3、4および5として表1に示されている。

30

【0215】

ENPP1-Fcの精製は、例えば、任意の順序で以下のうちの3つ以上、すなわち、プロテインAクロマトグラフィー、Qセファロースクロマトグラフィー、フェニルセファロースクロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィーおよびカチオン交換クロマトグラフィーを含む一連のカラムクロマトグラフィー工程によって達成することができた。ウイルス濾過および緩衝液交換を用いて精製を完了することができた。タンパク質の精製後、発色基質としてpNP-TMPを使用して、ENPP1-Fcタンパク質の触媒活性を評価することができた。

【0216】

ENPP1作用物質によるDISHモデルマウスの処置

40

脊椎腱付着部症 (DISH) について最もよく確立されたマウスモデルは、ttw (「つま先歩行マウス」) と呼ばれるEnpp1欠乏マウスである。ttwマウスは、重度の脊椎症と、広範囲な傍脊椎靱帯石灰化および骨棘形成とを示す。PPiと腱付着部症の重症度との関係を評価するために、通常の固形飼料食を用いて維持した23週齢のEnpp1^{asj}マウスのアキレス腱を調査する。

【0217】

動物に、皮下サブミリグラム投与後1週間にわたって、ビヒクル (PBS)、または血漿 [PPi] を正常化することができるヒトENPP1-Fcのいずれかを投与した。ENPP1-Fcの投与、X線撮影分析、および組織学的実験のためのプロトコルは、Ferreira et al., Musculoskeletal Comorbidities and Quality of Life in ENPP1-Deficient Ad

50

ults and the Response of Enthesopathy to Enzyme Replacement Therapy in Murine Models. J Bone Miner Res, 2021) に概説されている。任意で、さらに良好な送達およびさらに高い有効性のために骨標的化ドメインを含有するENPP1作用物質（限定されることなく、ENPP1-Fcなど）を使用して実験を繰り返すことができる。

【0218】

ENPP1作用物質（限定されることなく、ENPP1-Fcなど）をEnpp1^{asj}マウスに0.3 mg/kg/週で2～23週目に投与し、投与したEnpp1^{asj}マウスの血漿PPiを測定した。PPiは、有意に増加するが、WT対と比較して完全には正常化されないことが注目される（それぞれ2235 nM対1358 nM、表6）。

【0219】

（表6）23週齢Enpp1^{WT}マウスならびに投与および非投与Enpp1^{asj/asj}マウスにおける血漿分析物

パラメータ	単位	Enpp1 ^{wt} + PBS	ENPP1 ^{asj} + PBS	Enpp1 ^{asj} + BL-1118
カルシウム	mg/dL	6.6 ± 0.5	7.0 ± 0.8	6.9 ± 0.4
ホスフェート	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** (↓)

【0220】

アキレス腱の腱付着部症を組織学的に、およびカスタムMATLABソフトウェアを使用して分析して、アリザリン-赤色染色切片の顕微鏡写真における赤色画素を定量する。ビヒクル処置Enpp1^{asj}マウスのアキレス腱は、腱の全長にわたって実質的な石灰化を明らかにすると予測されるが、ENPP1-Fcによって処置したEnpp1^{asj}マウスでは腱石灰化が抑制されると予測される。

【0221】

理論に束縛されるものではないが、腱付着部症は血漿PPiに依存し得、ENPP1作用物質、例えば、ENPP1-Fcなどの酵素生物製剤を用いて血漿PPiを上昇させることによって、腱付着部を予防することができる。所見は、用量漸増時に腱付着部症の完全な抑制が達成可能であり得ることを示している。

【0222】

DISHモデルマウスに対するPPiの影響

DISHのマウスモデルにおける骨棘形成、脊椎癒合および骨化に対する血漿PPiの影響を評価するために、Enpp1^{asj}マウスに3～17週目にビヒクルまたは1 mg/kg ENPP1-Fcを投与し、それらの脊椎をマイクロCTによって分析する。図12: ENPP1-Fcを投与したマウスは、WTレベルの数倍である、高い血漿PPiレベル（約10 μm）を示す。

【0223】

ENPP1-FcなどのENPP1作用物質を用いて処置した、DISHのマウスモデルにおける血漿PPiの上昇および傍脊椎骨化の減少の存在は、DISHを有するヒト対象へのそのようなENPP1投与が、傍脊椎骨棘、強直症および脊椎癒合も減弱させるであろうことを示すと考えられる。

【0224】

実施例4: 治療プロトコル

ENPP1作用物質（限定されることなく、ENPP1、ENPP1-X、ENPP1-Fc、および/またはENPP1-Fc-Xなど、ここで、Xは、本明細書において他の箇所に記載される骨標

的化タグである) は、以下の選択された用量のうちの1つで投与される: 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、および/またはそれらの分数もしくは倍数。投与は、2ヶ月に少なくとも1回または2回、1ヶ月に少なくとも1回または2回、毎月3回、1週間に少なくとも1回または2回の皮下(SC)である。

10

20

【0225】

ENPP1作用物質の最初の用量は、1日目に投与され得る。8日目およびそれ以後、ENPP1作用物質は、選択された用量のENPP1作用物質mg/kg用量で週2回対象に投与される。用量は、各投与日にほぼ同時に投与され得る。注射部位を交互にし、先行する2週間以内のいずれかの先行する注射部位から2インチ以内の部位は用いない。

【0226】

ENPP1作用物質の選択された用量は、0.2 mg/kg、0.3 mg/kg、0.4 mg/kg、0.5 mg/kg、0.6 mg/kgまたは1.8 mg/kg SCのうちの1つである。SCによるENPP1作用物質の別の選択された用量は、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、および/またはそれらの分数もしくは倍数のうちの1つである。ENPP1作用物質の最初の用量は、1日目に投与され得る。最初の用量後、対象を7日間観察して、安全性をモニタリングし、PK試料を収集してもよい。8日目およびそれ以後、対象に、選択された用量を週2回投与する。選択された用量でのENPP1作用物質の投与は、医療専門家によって適切と考えられるように継続される。

30

40

【0227】

対象に、29日間の期間にわたって8用量のENPP1作用物質を投与し、例えば、0.2 mg

50

/kg、0.6mg/kgおよび1.8mg/kgの用量では、それぞれ29日間あたり1.6mg、4.8mgおよび14.4mgの曝露をもたらしてもよい。または対象に、医療専門家によって適切と考えられるように、8用量よりも多いまたは少ない用量を投与してもよい。

【0228】

内因性ENPP1酵素と同様に、ENPP1作用物質はATPを切断してAMPおよびPPiを生成し、それによって、血漿PPiレベルおよびAMPを増加させ、これにより、CD73がアデノシンに急速に変換される。内因性ヒト酵素の置換は、固有の欠乏を補正し、ENPP1ベースライン患者、臨床医およびケアラーの転帰に関連する健康状態の改善と臨床的合併症の緩和とを可能にすることが意図される。

【0229】

実施例5:ENPP1ハプロ不全を有する患者の治療

ENPP1作用物質は、ENPP1ハプロ不全を有すると同定された患者に、以下のように選択された用量を使用して、1日目に、および8日目から週2回、皮下注射によって投与される。

【0230】

(表7)

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

【0231】

ENPP1作用物質は、0.2mg/kg、0.6mg/kgまたは1.8mg/kg SCのうちの1つの選択された用量で、医療専門家によって決定された期間にわたって少なくとも週2回投与される。酵素置換に対する患者の応答は、医療専門家によって判定されるように、例えば、ENPP1欠乏の1つもしくは複数の症状の減少を追跡することによって、および/または本明細書において提供される指針を使用することによって、適切にモニタリングされる。

【0232】

実施例6:DISHと診断された患者の治療

DISHは、脊椎周囲の腱および靱帯の石灰化を一般に伴う。腱および靱帯が硬化すると、これらの組織の一部が骨に変わる可能性がある。これは、組織が骨と接続する場所に通常起こる。結果として、骨の縁に沿って発達する骨の増殖物である骨棘が発達する。DISHは、胸椎および頸椎として公知の、背中および頸部の上部に一般に発症する。ただし、DISHは、肩、肘、手、膝、股関節、踵および/または足首にも発症し得る。

【0233】

ある特定の態様では、DISHと診断された対象は、0.2mg/kg、0.6mg/kgまたは1.8mg/kg SC、IVおよび/またはIPのうちの1つの選択された用量で、医療専門家によって決定された期間にわたって少なくとも週2回投与されるENPP1作用物質によって治療される。

【0234】

ある特定の態様では、DISHと診断された対象は、0.2mg/kg、0.3mg/kg、0.4mg/kg、0.5mg/kg、0.6mg/kg、0.7mg/kg、0.8mg/kg、0.9mg/kg、1.0mg/kg、1.1mg/kg、1.2mg/kg、1.3mg/kg、1.4mg/kg、1.5mg/kg、1.6mg/kg、1.7mg/kg、1.8mg/kg、1.9mg/kg、2.0mg/kg、2.1mg/kg、2.2mg/kg、2.3mg/kg、2.4mg/kg、2.5mg/kg、2.6mg/kg、2.7mg/kg、2.8mg/kg、2.9mg/kg、3.0mg/kg、3.1mg/kg、3.2mg/kg、3.3mg/kg、3.4mg/kg、3.5mg/kg、3.6mg/kg、3.7mg/kg、3.8mg/kg、3.9mg/kg、4.0mg/kg、4.1mg/kg、4.2mg/kg、4.3mg/kg、4.4mg/kg、4.5mg/kg、4.6mg/kg、4.7mg/kg、4.8mg/kg、4.9mg/kg、5.0mg/kg、5.1mg/kg、5.2mg/kg、5.3mg/kg、5.4mg/kg、5.5mg/kg、5.

6mg/kg、5.7mg/kg、5.8mg/kg、5.9mg/kg、6.0mg/kg、6.1mg/kg、6.2mg/kg、6.3mg/kg、6.4mg/kg、6.5mg/kg、6.6mg/kg、6.7mg/kg、6.8mg/kg、6.9mg/kg、7.0mg/kg、7.1mg/kg、7.2mg/kg、7.3mg/kg、7.4mg/kg、7.5mg/kg、7.6mg/kg、7.7mg/kg、7.8mg/kg、7.9mg/kg、8.0mg/kg、8.1mg/kg、8.2mg/kg、8.3mg/kg、8.4mg/kg、8.5mg/kg、8.6mg/kg、8.7mg/kg、8.8mg/kg、8.9mg/kg、9.0mg/kg、9.1mg/kg、9.2mg/kg、9.3mg/kg、9.4mg/kg、9.5mg/kg、9.6mg/kg、9.7mg/kg、9.8mg/kg、9.9mg/kg、10.0mg/kg、ならびに/またはそれらの分数もしくは倍数、SC、IVおよび/もしくはIPのうちの1つの選択された用量で、医療専門家によって決定された期間にわたって少なくとも週2回投与されるENPP1作用物質によって治療される。

10

【0235】

酵素置換に対するDISH患者の応答は、医療専門家によって判定されるように、例えば、本明細書において提供される指針を使用してDISHの1つまたは複数の症状の減少を追跡することによって、適切にモニタリングされる。

【0236】

あるいは、DISHのリスクがあると疑われる対象は、選択された用量のENPP1作用物質の投与によってENPP1作用物質により治療される。ある特定の態様では、DISHを発症する一般的な危険因子には、限定されることなく、大きい腹囲、BMI/肥満、高インスリン血症、真性糖尿病、高尿酸血症、脂質異常症、高血圧、冠動脈疾患および/または痛風が含まれる。DISHは無症候性であり得、その場合、診断はX線撮影画像に基づいて通常行われる。ある特定の態様では、DISHには、高齢（50歳を超える年齢）、男性、肥満、高血圧および/または真性糖尿病が関連している。

20

【0237】

あるいは、DISHに関連する公知の表現型である脊椎骨折の増加、可動性低下、脊髄症および/または疼痛を予防するかまたは最小限に抑えるために、疾患の臨床症状を欠く、X線撮影によるDISHの証拠を有する対象をENPP1作用物質を用いて治療してもよい。

【0238】

以下の実施例は、本明細書全体に関連して、治療プロトコルおよび有効性を決定するための指針を提供する。

【0239】

実施例7: 骨の健康状態に関連するバイオマーカー

30

低い血漿PPIに加えて、ENPP1欠乏患者は、低い血清ホスフェート、高い尿ホスフェート、低い腎臓TmP/GFR、正常なカルシウム(Ca)、低い正常な尿Ca、正常な25-ヒドロキシビタミンD(25 OH D)、低い正常な1,25(OH)2D、高いBAP、高いインタクトなFGF23、ならびに正常なおよび/または上昇したPTH(10F 2019)を生化学的に特徴とする。

【0240】

治療される患者の骨の健康状態の追加の決定因子として、ある特定の態様で使用され得るバイオマーカーを表8に記載する。

【0241】

40

(表8) 臨床中間体およびバイオマーカー

	検査	試料タイプ
主要な 薬力学的 マーカー	ピロリン酸 (PPI)	血漿または血清
	無機ホスフェート	血漿または血清
	FGF23 (インタクト)	血漿または血清
	TmP/GFR	血清クレアチニン、血清ホスフェート、尿ホスフェート
	ALP, BALP, CTx, PINP	血清、血漿、尿

50

【0242】

実施例8: ENPP1作用物質による治療の有効性

治療有効性は、血漿PPIを測定すること、ならびに他の血漿分析物、例えば、FGF23、Pi、FGF23、Pi、TmP/GFR、血清アルカリホスファターゼ（ALP）、骨特異的ALP（BALP）、I型コラーゲンのカルボキシ末端架橋テロペプチド（CTx）、および/またはプロコラーゲン1型N末端プロペプチド（P1NP）を測定することによって評価され得る。これらの分析物測定値は、ENPP1作用物質の有効性を決定するために、ENPP1欠乏に関連するPDマーカーとして使用され得る。これらの分析物の変化は、ベースラインからの変化として、および治療の経過にわたって時間依存的に記載され得る。PKパラメータおよびPDパラメータの用量直線性も評価され得る。

10

【0243】

血漿PPIレベル、FGF23レベル、およびクレアチニンクリアランス当たりの尿中リン排泄量のベースラインからの変化は、対応のある差のt検定を使用して分析され得る。

【0244】

実施例9: 薬物濃度測定

加えて、血漿中のENPP1作用物質濃度の測定、ならびに初回投与（すなわち、単回投与）後、および複数回投与（すなわち、定常状態）時/後のPKパラメータのその後の決定のために、患者から血液試料を得てもよい。

【0245】

実施例10: 免疫原性（抗薬物抗体）

所望であれば、抗薬物抗体（ADA）を使用して、ENPP1作用物質に対する免疫原性を測定してもよい。免疫原性試験では、多層的な手法が利用され得る。最初のスクリーニングでADAが検出された場合、確認試験を行って特異性を決定してもよい。試料はまた、特異性確認（すなわち、力価）および中和抗体のアッセイを評価し、さらに確立するために使用され得る。

20

【0246】

実施例11: 薬物動態学的、薬力学的および探索的バイオマーカー分析

薬物動態学的分析をPK集団に対して行ってもよく、ENPP1作用物質のPKパラメータを記述統計による処理によって要約してもよい。PKパラメータおよびPDパラメータの用量直線性も評価され得る。PK/PD分析、免疫原性分析および探索的バイオマーカー分析を決定してもよい。

30

【0247】

実施例12: 有効性の追加の決定因子

正常レベルのPPIを回復させることが、ENPP1作用物質を使用する治療の有効性の主要な指標であるが、治療有効性を決定するのに助けるために、所望であれば、他の物理的測定値を使用してもよい。これらには、以下のうちの1つまたは複数が含まれる。

【0248】

1. X線撮影および画像化

a. 骨格重症度のX線写真。標準的なX線写真を取得して、くる病の骨格変形を検出してもよい。X線写真を取得するのは、例えば、手首および膝において取得されてもよい。

40

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

c. 陽電子放射断層撮影。コンピュータ断層撮影。ベースラインNa¹⁸F-PET/HRpQCT（またはHR-CT）は、ベースラインで、およびその後の介入評価のために、動脈および器官の石灰化、ならびに骨格異常を測定するためにENPP1作用物質の初回投与の1ヶ月以内に行われる全身スキャンであり得る。Na¹⁸F-PETは、骨代謝回転、および動脈の微小石灰化を測定する。高分解能定量的コンピュータ断層撮影（HRQCT）またはHR-CTは、非利き側遠位橈骨および脛骨における骨微細構造を決定することができる。標準的な骨の形状パラメータが計算される。

d. ドブラ心エコー図。ENPP1作用物質の初回投与前の3日以内に、ベースライン心エコー図を取得してもよい。ドブラエコーは、心臓および弁の心機能〔LVEF、血流〕石灰

50

化、ならびに動脈硬化を測定するために使用され得る。

e. 光干渉断層撮影。光干渉断層撮影を使用して、新生内膜増殖を視覚化してもよい。

f. 末梢動脈トノメータ法。末梢動脈トノメータ法（PAT）を使用して、デジタル容積変動に対応するデジタル脈波振幅（PWA）を評価してもよい。

g. 腎超音波。例えば、ENPP1作用物質を開始してから1週間以内に腎超音波を使用して、腎石灰化を測定してもよい。

h. 骨組織形態学および骨生検。骨生検は、ベースライン測定として行われ得る。骨生検前の10日間にわたるテトラサイクリン負荷が好ましい。

【0249】

2. 歩行能力

心肺機能、神経筋機能および筋骨格機能を組み合わせた、歩行できる患者の機能的能力を測定するための最大下運動測定として、歩行試験が使用され得る。6 Minute Walk Test（6MWT）は、American Thoracic Society（ATS 2002）によって、成人に使用するために元々は開発され、現在は、成人および小児の集団（Mylius et al., 2016）に、ならびに脊髄性筋萎縮症（Montes et al., 2018）、デュシェンヌ型筋ジストロフィー（McDonald et al., 2013）および乳児発症ポンペ病（van der Meijden et al., 2018）などの神経筋疾患を有する小児に一般的に使用されている。2 Minute Walk Test（2MWT）は、NIH Toolboxに含まれており、同じ特性を測定するためにますます使用されている。

【0250】

6MWTおよび2MWTは、医療提供者の裁量により、治療前および治療中に患者に対して施行され得る。対象がベースラインで少なくとも2MWTを完了することができない場合、治療中の追加の評価は、医療提供者の裁量に委ねられ得る。試験前および試験後に安静時心拍数を得る。6MWTの最初の2分間、および6分間全体で歩行した距離を記録してもよい。2分および6分で歩行した距離を、年齢および性別を一致させた基準データ（パーセント予測値）と比較してもよい。

【0251】

3. 動力測定法

医療提供者の裁量により、治療前および/または治療中に動力測定法を使用して強度を評価してもよい。携帯式動力測定法は、小児および成人の両方に一般的に使用される、強度の直接測定である。評価され得る筋肉群には、肩外転、肩屈曲、肘屈曲、肘伸展、股関節外転、股関節屈曲、股関節伸展および膝伸展が含まれる。各筋肉群は、両側で2回測定され得る。

a. 握力。医療提供者の裁量により、治療前および/または治療中に握力ダイナモメータを使用して握力を測定してもよい。設備、および評価者の指示は、現場全体で標準化され得る。各手に対して1回の練習と1回の最大力測定とを行って把持を両側で評価してもよく、結果を年齢および性別を一致させた基準データ（利用可能な場合）と比較してもよい。

b. 可動域。関節の角度を試験し、関節の動きの程度を測定する機器であるゴニオメータを使用して、可動域を評価してもよい。ゴニオメータの固定アームは、固定体セグメント上の指定された骨ランドマークと位置合わせされ、ゴニオメータの移動アームは、移動している手足の指定された骨ランドマークと位置合わせされる。ゴニオメータの支点は、運動軸および骨ランドマークを使用して測定された各運動に対して指定される。以下のうちの1つまたは複数について可動域が評価され得る：肩外転、肩屈曲、肘屈曲、肘伸展、股関節外転、股関節屈曲、股関節伸展および膝伸展。

【0252】

4. 聴力検査

中程度の難聴はARHR2と関連している（Brachet et al 2014, Steichen-Gersdorf et al 2015）。身体検査および耳鏡検査、イミタンスオージオメトリー（Immittance audiometry）（鼓膜聴力検査と一般に呼ばれる）、可能であれば、最大8kHzの周波数

を用いる標準純音聴力検査（PTA）のうちの1つまたは複数によってベースライン聴力を決定してもよい。（>15dBのPTA閾値がある場合、対象は骨伝導検査も受けるべきである。）、最大16kHzの周波数を用いる高周波聴力検査(High Frequency Audiometry)（HFA）。

【0253】

5. 臨床全般印象尺度(Clinician Global Impression Scales)

治験薬投与の開始前および開始後の患者の総合機能に関する臨床医の見解の簡潔で独立した評価を提供するために、全米精神衛生学会が支援する臨床試験で使用するための臨床全般印象（CGI-S）尺度が開発された（Guy 1976）。CGIは、患者の病歴、心理社会的状況、症状、行動、および患者の機能する能力に対する症状の影響の情報を含む利用可能なあらゆる情報を考慮する、臨床医が決定した全体的な要約尺度を提供する。CGI-Sは、医療提供者の裁量により、治療前および/または治療中に施行されてもよく、-3（重度の悪化）～+3（顕著な改善）の範囲の7段階の尺度を使用して変化の総合評価を提供する。

10

【0254】

6. 粗大運動能力分類システム-拡張・改訂版(Gross Motor Function Classification System-Expanded and Revised)

粗大運動能力分類システム-拡張・改訂版（GMFCS-E&R）は、医療提供者の裁量により、治療前および/または治療中に施行されてもよい。GMFCS-E&Rは、1～5の尺度で可動性に重点を置いて、患者が開始した動きを分類する。

20

【0255】

7. 患者報告アウトカム測定法情報システム

患者報告アウトカム測定法情報システム（PROMIS）は、患者の視点から身体的、精神的および社会的健康を評価するために国立衛生研究所（NIH）によって開発された様々なアンケートからなる（www dot healthmeasures dot net）。これらのアンケートは、X連鎖性低リン血症、関節炎、多発性硬化症および神経線維腫症などの慢性健康状態を有する人々に対して臨床試験で使用されている。各アンケートは、1（一度もない）～5（常に）の範囲の5段階のLikert尺度で参加者によって評価される8～10の項目を含む。各アンケートについてスコアが合計され、高いスコアは、さらに多くのドメイン（例えば、さらに多くの疲労、さらに多くの身体機能）が測定されていることを示す。生スコアを平均50および標準偏差10に基づいてTスコアに変換し、試験サンプルと一般集団との比較を可能にする。PROMIS尺度は、疼痛干渉（短縮形8a）、疼痛強度（バージョン3a）、身体機能-上肢（カスタム短縮形）、身体機能-可動性（短縮形13a FACIT疲労）、疲労（短縮形）および認知影響（短縮形8a）を含み得、医療提供者の裁量により、治療前および/または治療中に施行され得る。これらの評価は、補助を伴わず対象によって完了され得る。

30

【0256】

8. ケアラー全般印象尺度(Caregiver Global Impression Scales)

ケアラー全般印象ステータス(Caregiver Global Impression of Status)は、医療提供者の裁量により、治療前および/または治療中に患者のケアラーに施行され得る。ケアラー全般印象変化(Caregiver Global Impression of Change)は、-3（重度の悪化）～+3（顕著な改善）の範囲の7段階の尺度を使用して変化の総合評価を提供する。

40

【0257】

9. Western Ontario and McMaster University Osteoarthritis Index

WOMACは、股関節または膝の疼痛を有する患者の日常生活動作、機能的可動性、歩調、全般的な健康状態、疼痛、および生活の質を評価するために使用される、患者によって報告される転帰である（www dot sralab dot org）。評価は24の項目からなり、施行に約12分かかる。WOMACは、医療提供者の裁量により、治療前および/または治療中に施行され得る。評価は、補助を伴わず対象によって完了され得る。

【0258】

50

実施例13:頸椎表現型および聴力表現型に対する可溶性ENPP1-Fc（構築物1118、SEQ ID NO:118）と骨標的ENPP1-Fc（構築物2000、SEQ ID NO:119）との比較

図13は、示される毎週の皮下用量のビヒクルまたはENPP1構築物#1118および#2000を投与された17週齢のWT雄マウスおよび17週齢のEnpp1^{asj}雄マウスにおける傍脊椎骨棘および強直症の応答を示す。構築物#1118を3週目から週1回投与し、構築物#2000を5週目から週1回投与した。マイクロCT画像は、構築物#2000を投与したEnpp1^{asj}雄マウスにおける傍脊椎骨棘および強直症の減弱を優先的に実証する。

【0259】

図14は、示される毎週の皮下用量のビヒクルまたはENPP1構築物#1118および#2000を投与された17週齢のWT雌マウスおよび17週齢のEnpp1^{asj}雌マウスにおける傍脊椎骨棘および強直症の応答を示す。構築物#1118を3週目から週1回投与し、構築物#2000を5週目から週1回投与した。マイクロCT画像は、構築物#2000を投与したEnpp1^{asj}雌マウスにおける傍脊椎骨棘および強直症の減弱を優先的に実証する。

【0260】

図15A～図15Bは、示される毎週の皮下用量のビヒクルまたはENPP1構築物#1118および#2000を投与された17週齢のWTマウスおよび17週齢のEnpp1^{asj}マウスにおける聴覚脳幹応答を示す。構築物#1118を3週目から週1回投与し、構築物#2000を5週目から週1回投与した。刺激頻度の測定は、2mg/Kgの毎週用量のENPP1構築物#1118による、ならびに0.5および1mg/Kgの毎週用量のENPP1構築物#2000での、低周波数（8kHz）範囲での難聴の予防を実証している。1mg/Kgの毎週用量で投与されたENPP1構築物#2000では、高周波数範囲（32kHz）でも、ENPP1欠乏動物における聴力の改善が優先的に認められる。

【0261】

図16は、示される毎週の皮下用量のビヒクルまたはENPP1構築物#1118および#2000を用いたWTマウスおよび17週齢のENPP1^{asj}マウスのインタクトなFGF23レベルを示す。構築物#1118を3週目から週1回投与し、構築物#2000を5週目から週1回投与した。データは、週に1mg/Kgおよび4mg/Kgで投与した場合、ENPP1構築物#2000では、インタクトなFGF23が抑制されることを優先的に実証している。WTとの差を評価するために、ANOVA Kruskal-Wallis検定、続いて、Dunnの事後分析によって統計的有意性を評価した（一元配置ANOVA）。以下の注釈とともに、p値によって統計的有意性を表す:*p<0.05、**p<0.01、***p<0.001、****p<0.0001。

【0262】

参考文献

10

20

30

40

50

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. 10
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. 20

30

40

50

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. 10
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. 20
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. 30
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. 40

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, Rödelberger 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.

10

20

30

40

50

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. 10
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. 20
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. 30
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. 40

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. 10
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). 20
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.
- 実施例 3 ～ 12 の追加の参考文献** 30
- 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. 40
- 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.

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-Depierreux B, Wittkamp T, et al. Hypophosphatemia, hyperphosphaturia, and bisphosphonate treatment are associated with survival beyond infancy in generalized arterial calcification of infancy. Circ Cardiovasc Genet. 2008 Dec;1(2):133-40.

【 0 2 6 3 】

態様の列挙

以下の例示的な態様が提供されるが、その番号付けは重要度を指定するものと解釈されるべきではない：

態様 1：

以下を含む、その必要がある患者の広汎性特発性骨増殖症（DISH）、強直性脊椎炎、ならびに/または脊椎関節炎を治療する、改善する、そのさらなる発症および/もしくは進行を予防する、ならびに/またはそれを予防する方法：

式（1）の化合物またはその塩もしくは溶媒和物：

10

20

30

40

50

PROTEIN-Z-DOMAIN-X-Y (I)

の治療有効量を該患者に投与する工程であって、

(I)において、

PROTEINが、ENPP1の触媒領域を含み、

DOMAINが、存在しないか、またはヒトIgG Fcドメイン (Fc)、ヒト血清アルブミンタンパク質 (ALB) およびその断片からなる群より選択される少なくとも1つであり、XおよびZが、独立して、存在しないか、または1~20個のアミノ酸を含むポリペプチドであり、かつ

Yが、負に帯電した骨標的化配列であり、

それによって、該患者のDISH、強直性脊椎炎、ならびに/または脊椎関節炎を治療する、改善する、そのさらなる発症および/もしくは進行を予防する、ならびに/またはそれを予防する、工程。

10

態様2:

前記患者がENPP1ハプロ不全を有する、態様1の方法。

態様3:

前記患者がENPP1ハプロ不全を有しない、態様1の方法。

態様4:

前記患者がENPP1欠乏ではない、態様1~3のいずれかの方法。

態様5:

前記患者がENPP1欠乏である、態様1~3のいずれかの方法。

20

態様6:

前記患者が、経口、エアロゾル、吸入、直腸、膣、経皮、皮下、鼻腔内、頬側、舌下、非経口、髄腔内、胃内、眼、肺および局所からなる群より選択される少なくとも1つの経路によって前記化合物を投与される、態様1~5のいずれかの方法。

態様7:

前記化合物が、前記患者に静脈内投与または皮下投与される、態様1~6のいずれかの方法。

態様8:

前記患者へ前記化合物を投与する工程が、該患者の細胞外ピロリン酸濃度を増加させるか、またはそのさらなる低下を予防する、態様1~7のいずれかの方法。

30

態様9:

前記患者へ前記化合物を投与する工程が、該患者におけるアキレス腱の石灰化、脊椎石灰化、股関節石灰化および両側性石灰化のうちの1つもしくは複数を減少させるか、またはそれらのさらなる増加を予防する、態様1~8のいずれかの方法。

態様10:

前記DOMAINがアルブミンを含む、態様1~9のいずれかの方法。

態様11:

前記DOMAINがIgG Fcドメインを含む、態様1~10のいずれかの方法。

態様12:

前記PROTEINが、ENPP1膜貫通ドメインを欠く、態様1~11のいずれかの方法。

40

態様13:

前記化合物が、少なくとも1つの薬学的に許容される担体をさらに含む薬学的組成物として前記患者に投与される、態様1~12のいずれかの方法。

態様14:

前記患者が哺乳動物である、態様1~13のいずれかの方法。

態様15:

前記哺乳動物がヒトである、態様14の方法。

態様16:

前記PROTEINが、SEQ ID NO:1のアミノ酸残基99 (PSCAKE) ~925 (QED) を含む、態様1~15のいずれかの方法。

50

態様 17 :

前記PROTEINが、SEQ ID NO:3のアミノ酸残基1〜833を含む、態様1〜16のいずれかの方法。

態様 18 :

前記PROTEINが、SEQ ID NO:2に示されるアミノ酸配列を含む、態様1〜16のいずれかの方法。

態様 19 :

前記PROTEINが、SEQ ID NO:3または4または5に示されるアミノ酸配列を含む、態様1〜16のいずれかの方法。

態様 20 :

前記DOMAINが、前記化合物の循環半減期を、該DOMAINを欠く該化合物の循環半減期と比較して増加させる、態様1〜19のいずれかの方法。

態様 21 :

前記患者がまた、早期発症骨粗鬆症、骨減少症、加齢性骨減少症、OPLL、遺伝性低リン血症性くる病、X連鎖性低リン血症、常染色体潜性低リン血症性くる病2型、常染色体顕性低リン血症性くる病および低リン血症性くる病からなる群より選択される疾患または状態とも診断されている、態様1〜20のいずれかの方法。

態様 22 :

前記患者が、早期発症骨粗鬆症、骨減少症、加齢性骨減少症、OPLL、遺伝性低リン血症性くる病、X連鎖性低リン血症、常染色体潜性低リン血症性くる病2型、常染色体顕性低リン血症性くる病および低リン血症性くる病からなる群より選択される疾患または状態と診断されていない、態様1〜20のいずれかの方法。

態様 23 :

患者が、早期発症骨粗鬆症、骨減少症、加齢性骨減少症、OPLL、遺伝性低リン血症性くる病、X連鎖性低リン血症、常染色体潜性低リン血症性くる病2型、常染色体顕性低リン血症性くる病および低リン血症性くる病からなる群より選択される疾患または状態を有する、態様1〜22のいずれかの方法。

態様 22 :

患者が、早期発症骨粗鬆症、骨減少症、加齢性骨減少症、OPLL、遺伝性低リン血症性くる病、X連鎖性低リン血症、常染色体潜性低リン血症性くる病2型、常染色体顕性低リン血症性くる病および低リン血症性くる病からなる群より選択される疾患または状態を有しない、態様1〜22のいずれかの方法。

【0264】

参照による組入れ

本明細書において言及されたすべての刊行物および特許は、あたかも各個々の刊行物または特許が参照により組み入れられることが具体的かつ個別に示されているかのように、参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。

【0265】

他の態様

主題の特定の態様について説明してきたが、上記の明細書は例示的なものであり、限定的なものではない。本明細書および添付の特許請求の範囲を検討すると、多くの変形例が当業者に明らかになるであろう。本発明の全範囲は、特許請求の範囲、その均等物の全範囲、および明細書、ならびにそのような変形例を参照することによって決定されるべきである。

10

20

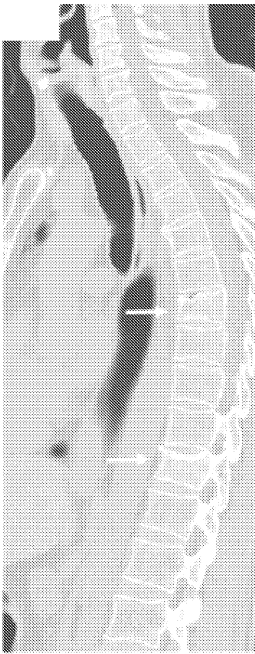
30

40

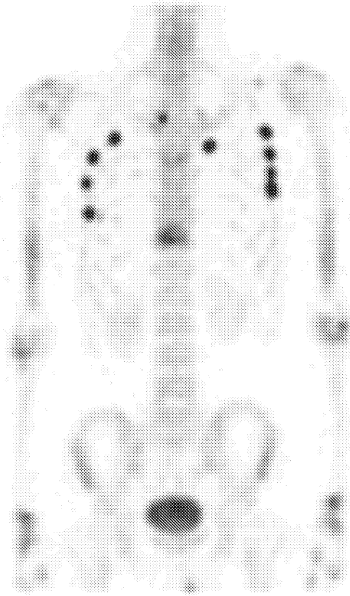
50

【図面】

【図 1 - 1】

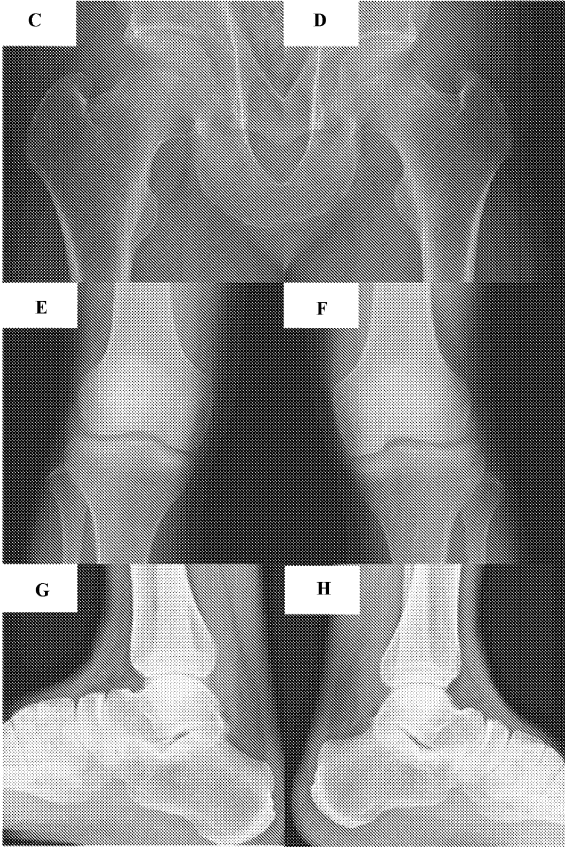


A



B

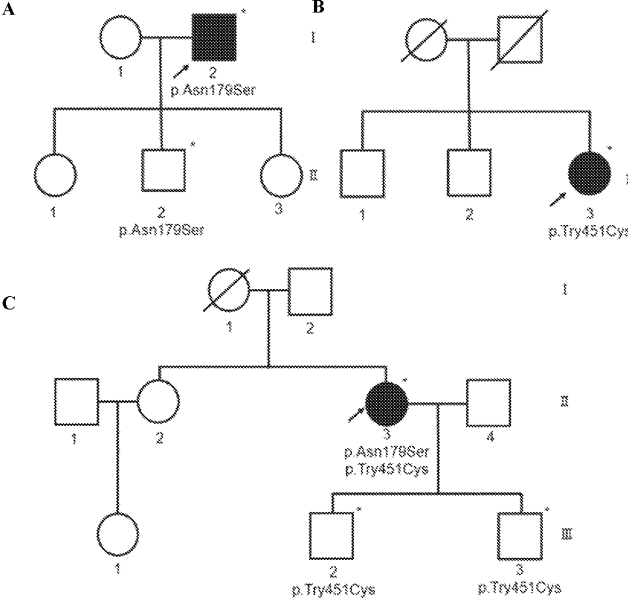
【図 1 - 2】



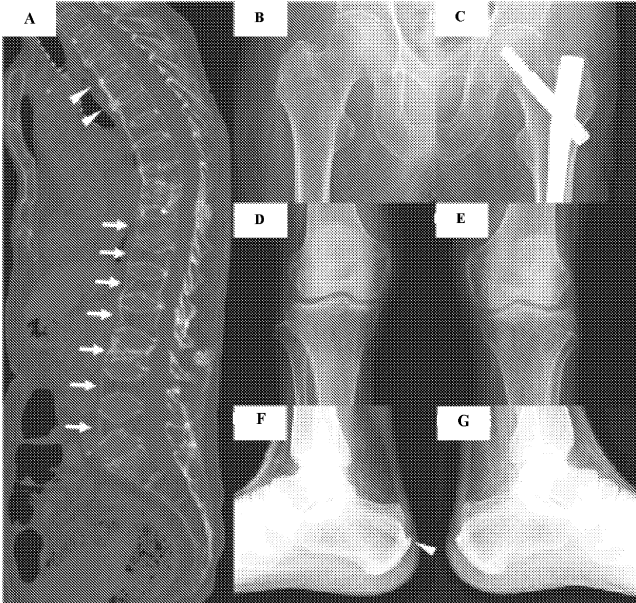
10

20

【図 2】



【図 3】

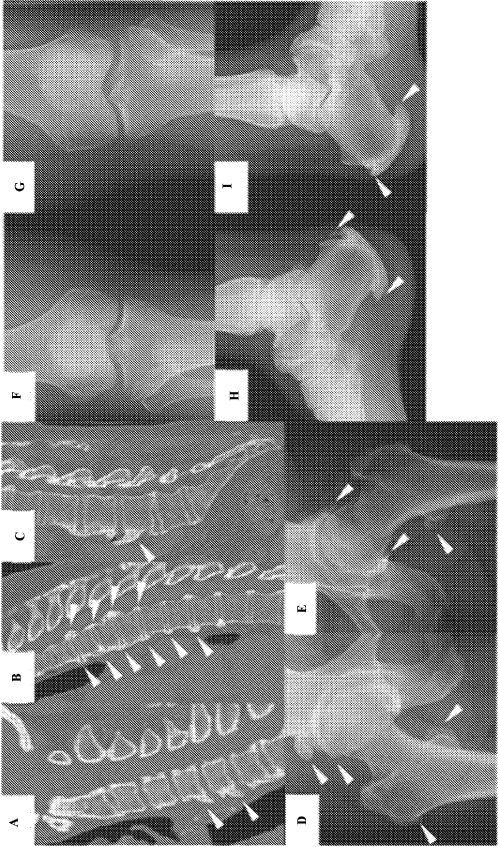


30

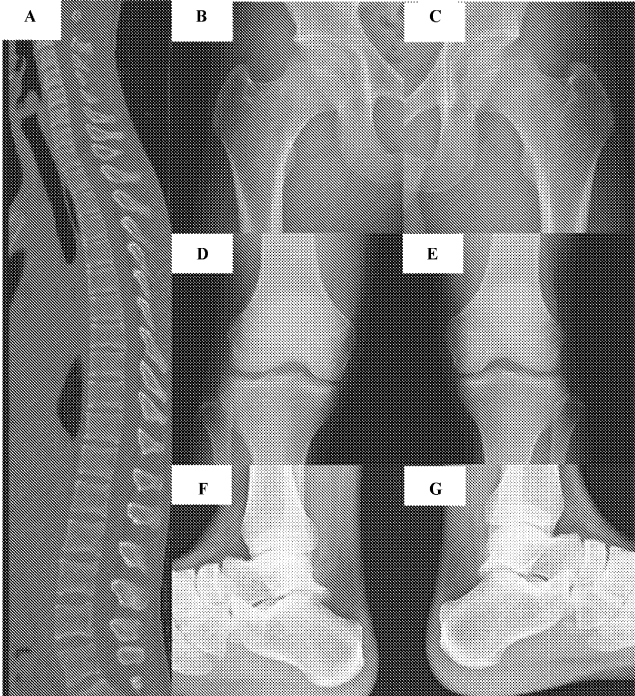
40

50

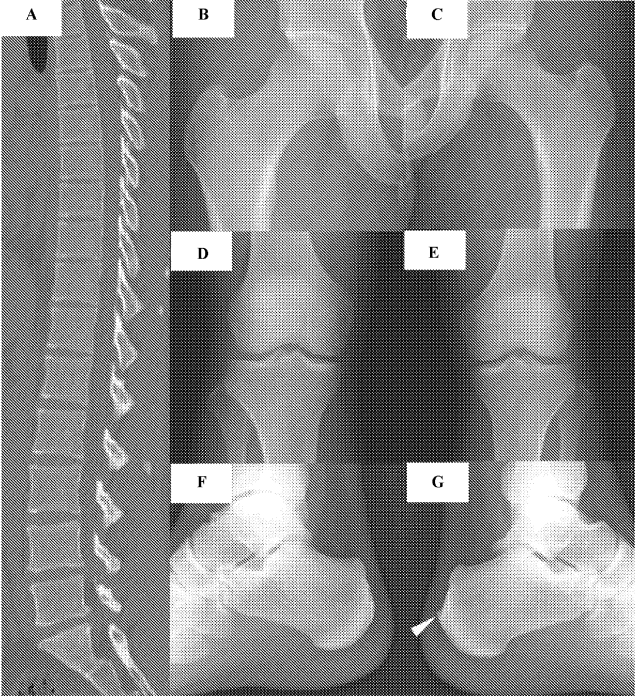
【図 4】



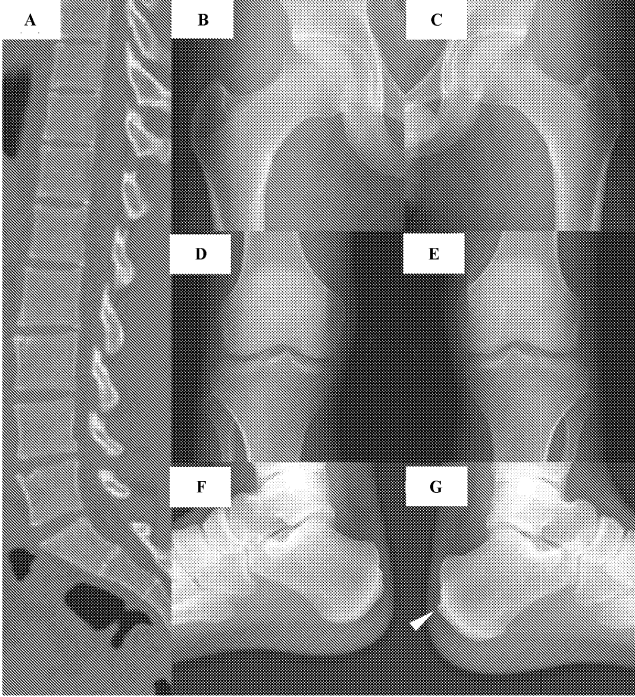
【図 5】



【図 6】



【図 7】



10

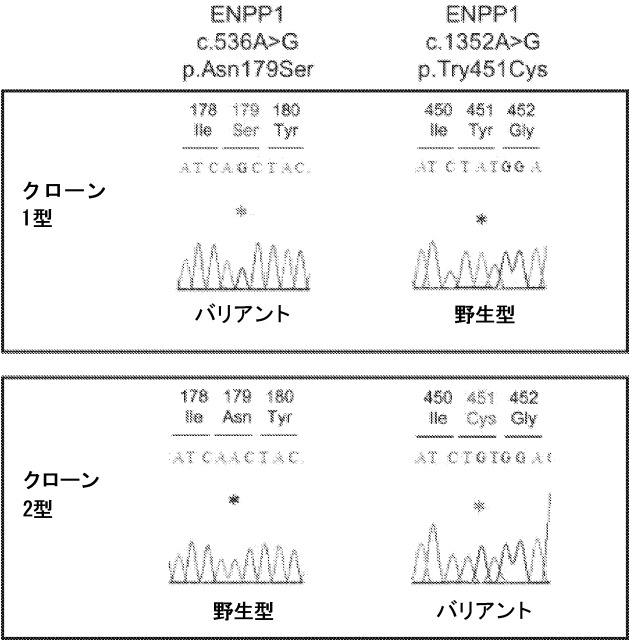
20

30

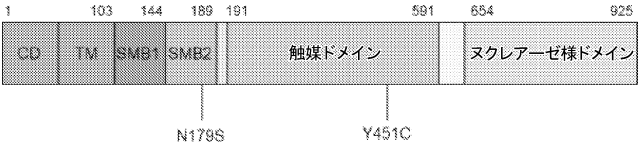
40

50

【図 8】

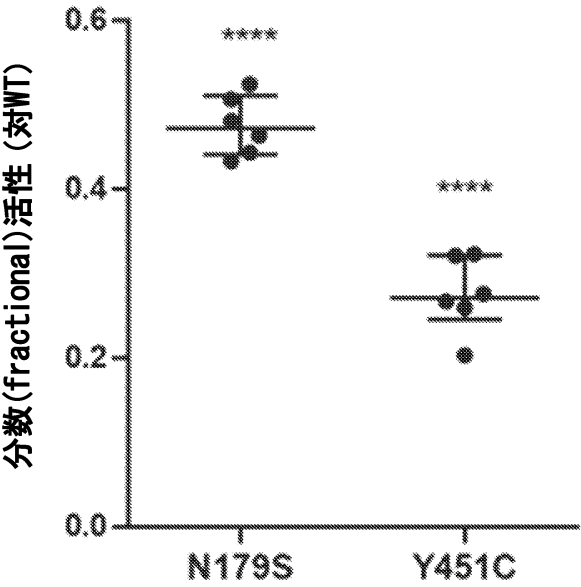


【図 9】



10

【図 10】



【図 11】

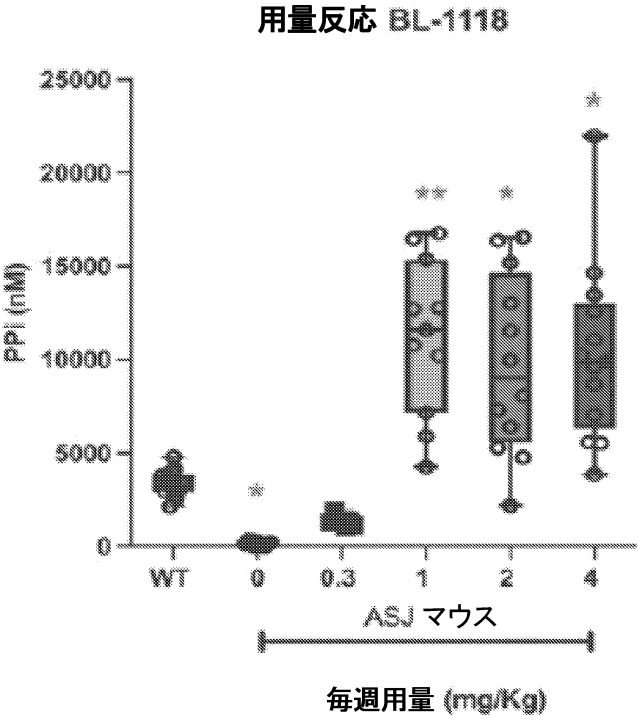
1 MERDGCAGGG SRGGEGGRAP REGPAGNGRD RGRSHAAEAP GDPQAAASLL
51 APMDVGEEPL EKAARARTAK DPNTYKVLST VLSVCLTTI LGCIFGLKPS
101 CAKEVVKCKG RCFERTFGNC RCDAACVELG NCCLDYQETC IEPEHIWTCN
151 KFRCGEKRLT RSLCACSDDC KDKGDCCINY SSVCQGEKSW VEEPCESINE
201 PQCPAGFETP PTLFSLDGF RAEYLHTWGG LLPVISKLKK CGTYTKNMRP
251 VYPTKTFPNH YSIVTGLYPE SHGIIDNKMY DPKMNASFSL KSKEKFNPEW
301 YKGEPINWTA KYQGLKSGTF FWPGSDVEIN GIFPDIYKMY NGSVPFEERI
351 LAVLQWLQLP KDERPHFYTL YLEEDSSGH SYGPVSSEVI KALQRVDGMV
401 GMLMDGLKEL NLHRCNLIL ISDHGMEQGS CKKIYLNKY LGDVKNIKVI
451 YGPAARLRPS DVPDKYYSFN YEGIARNLSC REPQHFEPY LKHFLPKRLH
501 FAKSDRIEPL TFYLDPQWQL ALNPSEKRYC GSGFHGSDNV FSNMQALFVG
551 YGPGFKHGIE ADTFENIEVY NLMCDLLNLT PAPNNGTHGS LNHLKPNVY
601 TPKHPKEVHP LVQCPFTRNP RDNLCSCNP SILFIEDFQT QFNLTVAEEK
651 IIKHETLPYG RPRVLQKENT ICLLSQHQM SGYSQDILMP LWTSYTVDRN
701 DSFSTEDFSN CLYQDFRIPL SPVHKCSFYK NNTKVSYGFL SPPQLNKNSS
751 GIYSEALLTT NIVPMYQSFQ VIWRYFHTL LKRYAEERNV VNVVSGPVFD
801 FDYDGRCDL ENLRQKRRVI RNQEILIPH FFIVLTSCDK TSQTPHLCEN
851 LDTLAFILPH RTDNSESCVH GKHDSSWVEE LLMLHRARIT DVEHITGLSF
901 YQQRKEPVSD ILKLKTHLPT FSGED (SEQ ID NO: 1)

30

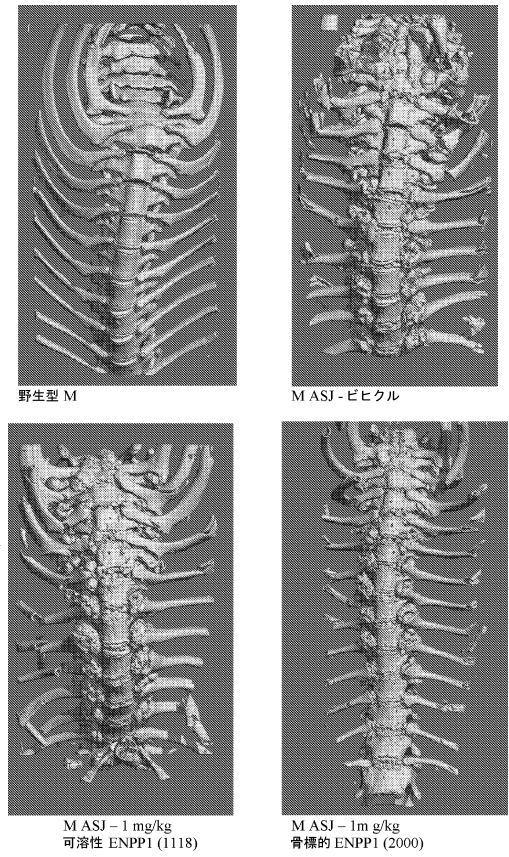
40

50

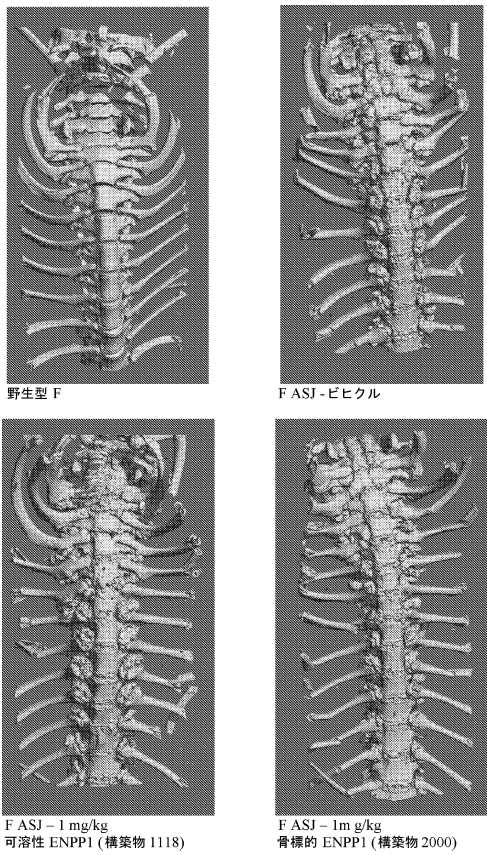
【図 1 2】



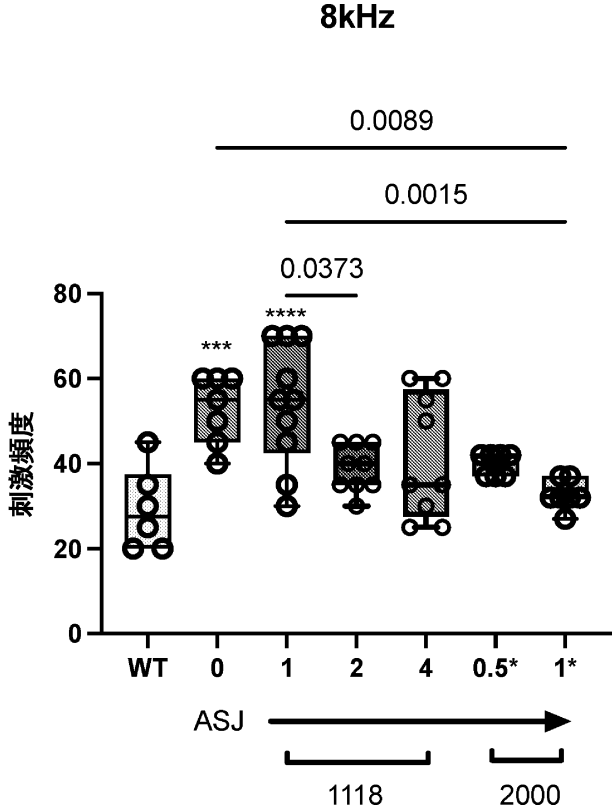
【図 1 3】



【図 1 4】



【図 1 5 A】



10

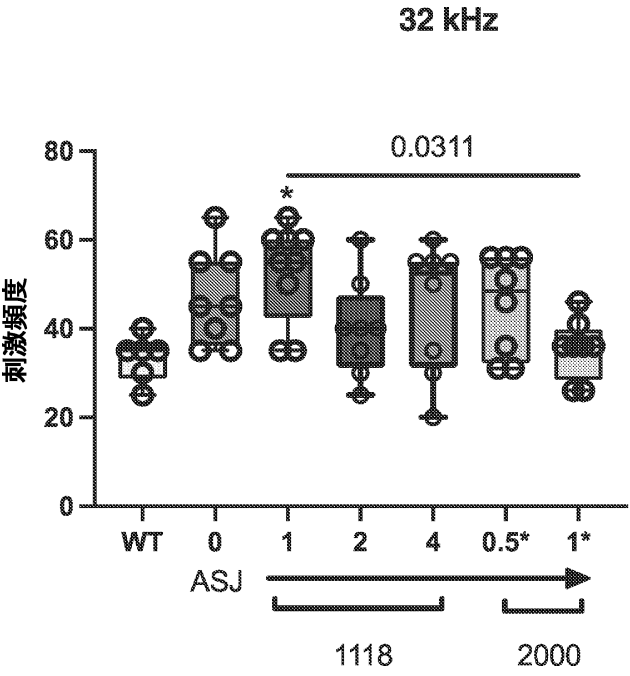
20

30

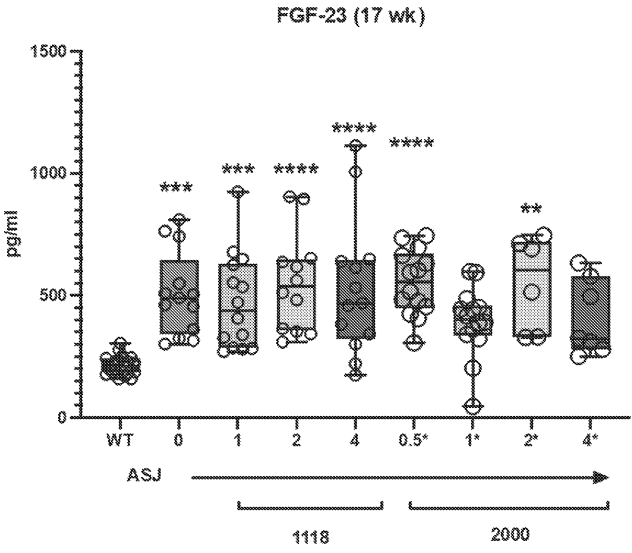
40

50

【図 1 5 B】



【図 1 6】



10

20

【配列表】

2025510963000001.xml

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2022/077407

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - INV. - A61K 38/46; A61P 19/02; A61P 19/08; C12N 9/14 (2023.01) ADD. CPC - INV. - A61K 38/46; A61P 19/02; A61P 19/08 (2023.01) ADD. - C12Y 306/01009 (2023.01) According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) See Search History document Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched See Search History document Electronic database consulted during the international search (name of database and, where practicable, search terms used) See Search History document		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X — Y	WO 2021/252549 A1 (INOZYME PHARMA INC. et al) 16 December 2021 (16.12.2021) entire document	1, 3-9, 13-16, 21, 22 — 2
Y	KATO et al., Abstract of "Identification of ENPP1 Haploinsufficiency in Patients With Diffuse Idiopathic Skeletal Hyperostosis and Early-Onset Osteoporosis," Journal of Bone and Mineral Research, 26 March 2022 (26.03.2022) [retrieved on 31 January 2023]. Retrieved from the Internet: <URL: https://asbmr.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jbmr.4550 >. entire document	2
A	US 2012/0009592 A1 (FROGUEL et al) 12 January 2012 (12.01.2012) entire document	1-9, 13-16, 21, 22
A	WO 2000/032217 A1 (HISTATEK LLC) 08 June 2000 (08.06.2000) entire document	1-9, 13-16, 21, 22
A	WO 2020/206302 A1 (YALE UNIVERSITY) 08 October 2020 (08.10.2020) entire document	1-9, 13-16, 21, 22
A	WO 2020/047520 A1 (YALE UNIVERSITY) 05 March 2020 (05.03.2020) entire document	1-9, 13-16, 21, 22
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 31 January 2023		Date of mailing of the international search report FEB 28 2023
Name and mailing address of the ISA/ Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer Taina Matos Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2022/077407

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

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claims Nos.: 17-20
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
See extra sheet(s).

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-9, 13-16, 21, 22

Remark on Protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2022/077407

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☐ forming part of the international application as filed.
- b. ☒ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13/ter.1(a)),
☒ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2022/077407

Continued from Box No. III Observations where unity of invention is lacking

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees need to be paid.

Group I+: claims 1-16, 21, and 22 are drawn to methods of treating, ameliorating, preventing further development and/or progression of, and/or preventing diffuse idiopathic skeletal hyperostosis (DISH) and/or Spondylarthritis in a patient in need thereof.

The first invention of Group I+ is restricted to a compound of formula (I), or a salt or solvate thereof, wherein PROTEIN comprises amino acid residues 89 to 925 of SEQ ID NO: 1, DOMAIN is absent; X and Z are independently absent; and Y is a negatively charged bone-targeting sequence, and methods of treating, ameliorating, preventing further development and/or progression of, and/or preventing diffuse idiopathic skeletal hyperostosis (DISH) and/or Spondylarthritis in a patient in need thereof. It is believed that claims 1-8, 13-16, 21, and 22 read on this first named invention and thus these claims will be searched without fee to the extent that they read on the above embodiment.

Applicant is invited to elect additional formula(e) for each additional compound to be searched in a specific combination by paying an additional fee for each set of election. Each additional elected formula(e) requires the selection of a single definition for each compound variable. An exemplary election would be a compound of formula (I), or a salt or solvate thereof, wherein PROTEIN comprises amino acid residues 1 to 833 of SEQ ID NO: 3, DOMAIN is absent; X and Z are independently absent; and Y is a negatively charged bone-targeting sequence, and methods of treating, ameliorating, preventing further development and/or progression of, and/or preventing diffuse idiopathic skeletal hyperostosis (DISH) and/or Spondylarthritis in a patient in need thereof. Additional formula(e) will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the claims that read on any additional elected inventions. Applicants must further indicate, if applicable, the claims which read on the first named invention if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched/examined.

The inventions listed in Groups I+ do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1, because under PCT Rule 13.2 they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

The Groups I+ formulae do not share a significant structural element requiring the selection of alternatives for the compound variables PROTEIN, DOMAIN, X, Z, Y, and accordingly these groups lack unity a priori.

Additionally, even if Groups I+ were considered to share the technical features of a compound having the core structure of formula (I), or a salt or solvate thereof, and a method of treating, ameliorating, preventing further development and/or progression of, and/or preventing diffuse idiopathic skeletal hyperostosis (DISH) and/or Spondylarthritis in a patient in need thereof, the method comprising administering to the patient a therapeutically effective amount of a compound, thereby treating, ameliorating, preventing further development and/or progression of, and/or preventing DISH and/or Spondylarthritis in the patient, these shared technical features do not represent a contribution over the prior art.

Specifically, WO 2020/047520 to Yale University (hereinafter, "Yale") teaches a compound having the core structure of formula (I), or a salt or solvate thereof (Pg. 7, Lns. 22-24, present invention relates, in one aspect, to the discovery that certain ENPP1-Fc polypeptides having improved in vivo half-lives as compared to the ENPP1-Fc polypeptides known in the art; Pg. 25, Lns. 31-32, the polypeptide has a negatively-charged bone-targeting sequence).

Further, WO 2000/32217 to Histatek, LLC (hereinafter, "Histatek") teaches a method of treating, ameliorating, preventing further development and/or progression of, and/or preventing diffuse idiopathic skeletal hyperostosis (DISH) and/or Spondylarthritis in a patient in need thereof, the method comprising administering to the patient a therapeutically effective amount of a compound, thereby treating, ameliorating, preventing further development and/or progression of, and/or preventing DISH and/or Spondylarthritis in the patient (Claim 7, method for treating arthritis selected from the group consisting of osteoarthritis, psoriatic arthritis, lupus and spondylarthritis, the method comprising administering to the mammal an anti-arthritis effective amount of a peptide).

The inventions listed in Groups I+ therefore lack unity under Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical features.

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 1 1
A 6 1 K	47/64 (2017.01)	A 6 1 K	47/64	
C 1 2 N	9/16 (2006.01)	C 1 2 N	9/16	
C 0 7 K	16/00 (2006.01)	C 0 7 K	16/00	
C 0 7 K	14/765 (2006.01)	C 0 7 K	14/765	
C 0 7 K	19/00 (2006.01)	C 0 7 K	19/00	

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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. T R I T O N

2. M A T L A B

弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100188433

弁理士 梅村 幸輔

(74)代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100214396

弁理士 塩田 真紀

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(74)代理人 100221741

弁理士 酒井 直子

(74)代理人 100114926

弁理士 枝松 義恵

(72)発明者 ブラッドック デメトリオス

アメリカ合衆国 0 6 5 1 1 コネチカット州 ニューヘブン テンプル ストリート 4 3 3 イエール ベンチャーズ内

F ターム (参考) 4C076 AA95 BB01 BB05 BB13 BB16 BB22 BB25 BB27 BB31 CC09

CC29 EE41 EE59

4C084 AA02 BA01 BA08 BA22 BA23 BA41 BA44 DC22 MA52 MA55

MA56 MA57 MA58 MA59 MA60 MA63 MA65 MA66 NA13 NA14 ZA961

ZA962 ZA971 ZA972 ZC411 ZC412

4H045 AA10 AA30 BA09 BA41 CA40 DA76 DA89 EA20 EA50 FA74