



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 119183382 A

(43) 申请公布日 2024. 12. 24

(21) 申请号 202280096064.9

(22) 申请日 2022.09.30

(30) 优先权数据

63/325,554 2022.03.30 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.11.13

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2022/077407 2022.09.30

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/191898 EN 2023.10.05

(71) 申请人 耶鲁大学

地址 美国康涅狄格州

(72) 发明人 D·布拉多克

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

专利代理师 董志勇

(51) Int.Cl.

A61K 38/46 (2006.01)

A61P 19/02 (2006.01)

A61P 19/08 (2006.01)

G12N 9/14 (2006.01)

权利要求书2页 说明书53页
序列表(电子公布) 附图17页

(54) 发明名称

治疗、改善和/或防止弥漫性特发性骨肥厚症(DISH)的方法和组合物

(57) 摘要

在一个方面,本公开内容提供了用于体内治疗弥漫性特发性骨肥厚症(DISH)、强直性脊柱炎和/或脊关节炎的具体剂量的ENPP1剂。

1. 一种治疗、改善、防止有需要的患者中的弥漫性特发性骨肥厚症 (DISH) 和/或脊关节炎的进一步发展和/或进展, 和/或防止所述患者中的弥漫性特发性骨肥厚症 (DISH) 和/或脊关节炎的方法, 所述方法包括向所述患者施用治疗有效量的式 (I) 的化合物或其盐或溶剂化物:

蛋白质-Z-结构域-X-Y

(I),

其中在 (I) 中:

蛋白质包括ENPP1的催化区;

结构域不存在或为选自人IgG Fc结构域 (Fc)、人血清白蛋白 (ALB) 和其片段的至少一个;

X和Z独立地不存在或为包括1-20个氨基酸的多肽, 并且

Y是带负电荷的骨靶向序列;

从而治疗、改善、防止所述患者中的DISH和/或脊关节炎的进一步发展和/或进展和/或防止所述患者中的DISH和/或脊关节炎。

2. 根据权利要求1所述的方法, 其中所述患者具有ENPP1单倍性不足。

3. 根据权利要求1所述的方法, 其中所述患者没有ENPP1单倍性不足。

4. 根据权利要求1所述的方法, 其中所述患者不是ENPP1缺陷的。

5. 根据权利要求1所述的方法, 其中所述患者是ENPP1缺陷的。

6. 根据权利要求1所述的方法, 其中所述患者通过至少一种选自以下的途径施用所述化合物: 口服、气溶胶、吸入、直肠、阴道、透皮、皮下、鼻内、颊、舌下、肠胃外、鞘内、胃内、眼科、肺部和局部。

7. 根据权利要求1所述的方法, 其中所述化合物被静脉内或皮下注射施用至所述患者。

8. 根据权利要求1所述的方法, 其中向所述患者施用所述化合物增加所述患者的细胞外焦磷酸盐浓度或防止所述患者的细胞外焦磷酸盐浓度进一步降低。

9. 根据权利要求1所述的方法, 其中向所述患者施用所述化合物降低所述患者的跟腱钙化、脊柱钙化、髋关节钙化和双侧钙化中的一种或多种或防止所述患者的跟腱钙化、脊柱钙化、髋关节钙化和双侧钙化中的一种或多种的进一步增加。

10. 根据权利要求1所述的方法, 其中所述结构域包括白蛋白。

11. 根据权利要求1所述的方法, 其中所述结构域包括IgG Fc结构域。

12. 根据权利要求1所述的方法, 其中所述蛋白质缺乏ENPP1跨膜结构域。

13. 根据权利要求1所述的方法, 其中所述化合物作为药物组合物施用至所述患者, 所述药物组合物进一步包括至少一种药学上可接受的运载体。

14. 根据权利要求1所述的方法, 其中所述患者是哺乳动物。

15. 根据权利要求14所述的方法, 其中所述哺乳动物是人类。

16. 根据权利要求1-15中任一项所述的方法, 其中所述蛋白质包括SEQ ID NO:1的氨基酸残基99 (PSCAKE) 至925 (QED)。

17. 根据权利要求1-16中任一项所述的方法, 其中所述蛋白质包括SEQ ID NO:3的氨基酸残基1至833。

18. 根据权利要求1-16中任一项所述的方法, 其中所述蛋白质包括SEQ ID NO:2中描绘

的氨基酸序列。

19. 根据权利要求1-16中任一项所述的方法, 其中所述蛋白质包括SEQ ID NO:3或4或5中描绘的氨基酸序列。

20. 根据权利要求1-19中任一项所述的方法, 其中相对于缺乏所述结构域的所述化合物的循环半衰期, 所述结构域增加了所述化合物的循环半衰期。

21. 根据权利要求1所述的方法, 其中所述患者还被诊断患有选自以下的疾病或病症: 早发性骨质疏松症、骨质减少、与年龄有关的骨质减少、OPLL、遗传性低血磷酸盐性佝偻病、X连锁低磷酸盐血症、常染色体隐性低血磷酸盐性佝偻病2型、常染色体显性低血磷酸盐性佝偻病和低血磷酸盐性佝偻病。

22. 根据权利要求1所述的方法, 其中所述患者没有被诊断出患有选自以下的疾病或病症: 早发性骨质疏松症、骨质减少、与年龄有关的骨质减少、OPLL、遗传性低血磷酸盐性佝偻病、X连锁低磷酸盐血症、常染色体隐性低血磷酸盐性佝偻病2型、常染色体显性低血磷酸盐性佝偻病和低血磷酸盐性佝偻病。

治疗、改善和/或防止弥漫性特发性骨肥厚症(DISH)的方法和组合物

[0001] 与相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2022年3月30日提交的美国临时专利申请第63/325,554号的优先权，其内容在此通过引用以其全部内容并入本文。

[0003] 关于联邦资助的研究和开发的声明

[0004] 本发明是在国家卫生研究院授予的DK121326-01、AR080416-01和AG067347A1的政府支持下完成的。政府拥有本发明的某些权利。

技术领域

[0005] 在一个方面，本发明的领域涉及通过酶疗法治疗和/或改善DISH、强直性脊柱炎和/或脊关节炎的问题。

[0006] 序列表

[0007] 该命名为“047162-7377W01 (01806) 序列表.xml”的XML文件，创建于2022年9月29日，大小为149KB，现通过引用以其全部内容并入本文。

技术背景

[0008] 外核苷酸焦磷酸酶/磷酸二酯酶1 (ENP1) 是一种2型跨膜蛋白，其细胞外活性水解细胞外核苷酸，如三磷酸腺苷 (ATP) 的磷酸二酯键，以生成单磷酸腺苷 (AMP) 和无机焦磷酸盐 (PPi)。由于PPi是羟基磷灰石沉积的主要生理性抑制剂，双等位基因的ENPP1缺陷导致生命早期的异位矿化，在婴儿期因动脉钙化和管腔变窄而导致高死亡率 (Ziegler等, Generalized arterial calcification of infancy. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al., (eds). Gene Reviews 2014)。存活下来的患者，以及没有表现出新生儿钙化的ENPP1缺陷个体，在以后的生活中可出现成纤维细胞生长因子23 (FGF23) 介导的低血磷酸盐性佝偻病 (Ferreira等人, Prospective phenotyping of long-term survivors of generalized arterial calcification of infancy (GACI), Genet Med. 2020; 23: 396-407)。

[0009] W02014126965涉及在包括ENPP1缺陷的疾病中病理性钙化和病理性骨化的治疗。三种蛋白质——ENPP1、组织非特异性碱性磷酸酶 (TNAP) 和进行性关节强直蛋白或锚蛋白 (ANK) ——在调节无机焦磷酸盐 (PPi) 和磷酸盐 (Pi) 的细胞外平衡中发挥作用。无机焦磷酸盐 (PPi) 是由ENPP1裂解细胞外核苷酸三磷酸酯 (NTPs) 或由Ank将PPi从细胞内转移到细胞外空间而生成。TNAP降解PPi以生成Pi。

[0010] “ENPP1缺陷”的特征在于受试者血清和/或血浆中的ENPP1酶活性水平降低。ENPP1缺陷是由编码ENPP1酶的ENPP1基因的失活突变引起的罕见的遗传性障碍。如本文其他部分所述，ENPP1是整合跨膜蛋白，其细胞外结构域具有焦磷酸酶和磷酸二酯酶活性。因此，ENPP1将细胞外ATP转化为无机焦磷酸盐 (PPi) 和AMP。

[0011] 生物系统中的钙化是一个复杂的过程，钙盐在非循环基质中维持的浓度高于区域

循环体液或其他流动液体中的浓度。正常钙化的主要结果是钙和相关的无机盐在专门的细胞间基质中以类似的排列和化学组成的结晶模式的积累,所有这些可能在不同的物种中有所不同。另一方面,病理性钙化的净效应是钙和相关无机盐的积累,其化学组成或模式多样性大于正常范围,这不仅在这些专门的基质中,而且在其他细胞间、细胞外和细胞物质中,从而导致了几种疾病状态。

[0012] 弥漫性特发性骨肥厚症 (DISH) 是以不寻常的新骨形成为特征的骨骼障碍 (Resnick等, Diffuse idiopathic skeletal hyperostosis (DISH): Forestier's disease with extraspinal manifestations, Radiology. 1975; 115: 513-524)。新骨的形成最常见于韧带和腱与骨结合处 (肌腱末端区 (entheseal area)), 但也有普遍的骨骼硬化和骨骼过度生长 (骨肥厚) (Pillai & Littlejohn, Metabolic Factors in Diffuse Idiopathic Skeletal Hyperostosis - A Review of Clinical Data. The Open Rheumatology Journal. 2014; 8: 116-128)。ENPP1、TNAP 和 ANK 各自与 DISH 相关的作用还不清楚。此外, 也不知道这些酶中的一种或多种的缺陷是否是 DISH 表型的一部分。

发明内容

[0013] 本发明内容提供了治疗、改善和/或防止有需要的患者中的弥漫性特发性骨肥厚症 (DISH)、强直性脊柱炎和/或脊关节炎的方法。在某些实施方式中, 方法包括向患者施用治疗有效量的式 (I) 的化合物, 或其盐或溶剂化物,

[0014] 蛋白质-Z-结构域-X-Y (I),

[0015] 其中在 (I) 中:

[0016] 蛋白质包括 ENPP1 的催化区;

[0017] 结构域不存在或为选自人 IgG Fc 结构域 (Fc)、人血清白蛋白 (ALB) 和其片段的至少一个;

[0018] X 和 Z 独立地不存在或为包括 1-20 个氨基酸的多肽,

[0019] Y 不存在或为带负电荷的骨靶向序列,

[0020] 从而治疗、改善和/或防止患者的 DISH、强直性脊柱炎和/或脊关节炎。

[0021] 在某些实施方式中, 化合物缺乏带负电荷的骨靶向序列。

[0022] 在某些实施方式中, Y 不存在。

[0023] 在某些实施方式中, 化合物包括带负电荷的骨靶向序列。

[0024] 在某些实施方式中, 患者具有 ENPP1 单倍性不足。

[0025] 在某些实施方式中, 患者没有 ENPP1 单倍性不足。

[0026] 在某些实施方式中, 患者不是 ENPP1 缺陷的。

[0027] 在某些实施方式中, 患者是 ENPP1 缺陷的。

[0028] 在某些实施方式中, 患者通过至少一种选自以下的途径施用化合物: 口服、气溶胶、吸入、直肠、阴道、透皮、皮下、鼻内、颊、舌下、肠胃外、鞘内、胃内、眼科、肺部和局部。

[0029] 在某些实施方式中, 化合物被静脉内或皮下施用至患者。

[0030] 在某些实施方式中, 向患者施用化合物增加患者的细胞外焦磷酸盐浓度或防止其进一步降低。

[0031] 在某些实施方式中, 向患者施用化合物降低患者的跟腱钙化、脊柱钙化、髋关节钙

化和双侧钙化中的一种或多种或防止其进一步增加。

[0032] 在某些实施方式中,结构域包括白蛋白。

[0033] 在某些实施方式中,结构域包括IgG Fc结构域。

[0034] 在某些实施方式中,蛋白质缺乏ENPP1跨膜结构域。

[0035] 在某些实施方式中,化合物作为药物组合物施用至患者,该药物组合物进一步包括至少一种药学上可接受的运载体。

[0036] 在某些实施方式中,患者是哺乳动物。

[0037] 在某些实施方式中,哺乳动物是人类。

[0038] 在某些实施方式中,蛋白质包括SEQ ID NO:1的氨基酸残基99(PSCAKE……)至925(……QED)。

[0039] 在某些实施方式中,蛋白质包括SEQ ID NO:3的氨基酸残基1至833。

[0040] 在某些实施方式中,蛋白质包括SEQ ID NO:2中描绘的氨基酸序列。

[0041] 在某些实施方式中,蛋白质包括SEQ ID NO:3或4或5中描绘的氨基酸序列。

[0042] 在某些实施方式中,相对于缺乏结构域的化合物的循环半衰期,该结构域增加了化合物的循环半衰期。

[0043] 在某些实施方式中,患者还被诊断出患有选自以下的疾病或病症:早发性骨质疏松症、骨质减少、与年龄有关的骨质减少、OPLL、遗传性低血磷酸盐性佝偻病、X连锁低磷酸盐血症、常染色体隐性低血磷酸盐性佝偻病2型、常染色体显性低血磷酸盐性佝偻病和低血磷酸盐性佝偻病。

[0044] 在某些实施方式中,患者没有被诊断出患有选自以下的疾病或病症:早发性骨质疏松症、骨质减少、与年龄有关的骨质减少、OPLL、遗传性低血磷酸盐性佝偻病、X连锁低磷酸盐血症、常染色体隐性低血磷酸盐性佝偻病2型、常染色体显性低血磷酸盐性佝偻病和低血磷酸盐性佝偻病。

[0045] 描述

[0046] 在某些实施方式中,本文所考虑的疾病或障碍是弥漫性特发性骨肥厚症(DISH)。在某些实施方式中,本文所考虑的疾病或障碍是强直性脊柱炎。在某些实施方式中,本文所考虑的疾病或障碍是脊关节炎。在某些实施方式中,本文考虑的疾病或障碍是弥漫性特发性骨肥厚症(DISH)和/或强直性脊柱炎。在某些实施方式中,本文所考虑的疾病或障碍是DISH和/或脊关节炎。在某些实施方式中,本发明所考虑的疾病或障碍是强直性脊柱炎和/或脊关节炎。

[0047] 本发明提供了治疗、改善、防止有需要的患者中的弥漫性特发性骨肥厚症(DISH)、强直性脊柱炎和/或脊关节炎的进一步发展或进展和/或防止有需要的患者中的弥漫性特发性骨肥厚症(DISH)、强直性脊柱炎和/或脊关节炎。本发明进一步提供了治疗和/或改善有需要的患者中的DISH、强直性脊柱炎和/或脊关节炎的方法。

[0048] 在一个方面,本公开内容涉及通过向患有DISH、强直性脊柱炎和/或脊关节炎的受试者施用治疗有效量的ENPP1剂来治疗、改善、防止DISH、强直性脊柱炎和/或脊关节炎的进一步发展和/或进展,和/或防止DISH、强直性脊柱炎和/或脊关节炎。

[0049] 在一个方面,本公开内容涉及通过向受试者施用治疗有效量的ENPP1剂来治疗、改善、防止受试者中的ENPP1缺陷的进一步发展和/或进展,和/或防止受试者中的ENPP1缺陷。

[0050] 在一个方面,本公开内容涉及通过向受试者施用治疗有效量的ENPP1剂来治疗、改善、防止受试者中的ENPP1单倍性不足的一种或多种症状的进一步发展和/或进展,和/或防止受试者中的ENPP1单倍性不足的一种或多种症状。

[0051] 治疗DISH、强直性脊柱炎和/或脊关节炎包括施用剂量为每千克约0.1mg、每千克的受试者约0.2mg、每千克的受试者约0.3mg、每千克的受试者约0.4mg、每千克的受试者约0.5mg、每千克的受试者约0.6mg、每千克的受试者约0.7mg、每千克的受试者约0.8mg、每千克的受试者约0.9mg、每千克的受试者约1.0mg、每千克的受试者约1.1mg、每千克的受试者约1.2mg、每千克的受试者约1.3mg、每千克的受试者约1.4mg、每千克的受试者约1.5mg、每千克的受试者约1.6mg、每千克的受试者约1.7mg、每千克的受试者约1.8mg、每千克的受试者约1.9mg、或每千克的受试者约2.0mg的ENPP1剂,从而治疗、减少和/或改善DISH、强直性脊柱炎和/或脊关节炎疾病的一个或多个症状,其中受试者没有ENPP1缺陷。

[0052] 在一个方面,本公开内容涉及向患有DISH、强直性脊柱炎和/或脊关节炎的受试者施用剂量为每千克约0.1mg、每千克的受试者约0.2mg、每千克的受试者约0.3mg、每千克的受试者约0.4mg、每千克的受试者约0.5mg、每千克的受试者约0.6mg、每千克的受试者约0.7mg、每千克的受试者约0.8mg、每千克的受试者约0.9mg、每千克的受试者约1.0mg、每千克的受试者约1.1mg、每千克的受试者约1.2mg、每千克的受试者约1.3mg、每千克的受试者约1.4mg、每千克的受试者约1.5mg、每千克的受试者约1.6mg、每千克的受试者约1.7mg、每千克的受试者约1.8mg、每千克的受试者约1.9mg、或每千克的受试者约2.0mg的ENPP1剂,其从而治疗、减少和/或改善DISH、强直性脊柱炎和/或脊关节炎疾病的一个或多个症状,其中受试者具有ENPP1缺陷。

[0053] 在一个方面,本公开内容涉及向患有DISH、强直性脊柱炎和/或脊关节炎的受试者施用剂量为每千克约0.1mg、每千克的受试者约0.2mg、每千克的受试者约0.3mg、每千克的受试者约0.4mg、每千克的受试者约0.5mg、每千克的受试者约0.6mg、每千克的受试者约0.7mg、每千克的受试者约0.8mg、每千克的受试者约0.9mg、每千克的受试者约1.0mg、每千克的受试者约1.1mg、每千克的受试者约1.2mg、每千克的受试者约1.3mg、每千克的受试者约1.4mg、每千克的受试者约1.5mg、每千克的受试者约1.6mg、每千克的受试者约1.7mg、每千克的受试者约1.8mg、每千克的受试者约1.9mg、或每千克的受试者约2.0mg的ENPP1剂,从而治疗、减少和/或改善DISH、强直性脊柱炎和/或脊关节炎疾病的一个或多个症状,其中受试者没有ENPP1单倍性不足。

[0054] 在一个方面,本公开内容涉及向患有DISH、强直性脊柱炎和/或脊关节炎的受试者施用剂量为每千克约0.1mg、每千克的受试者约0.2mg、每千克的受试者约0.3mg、每千克的受试者约0.4mg、每千克的受试者约0.5mg、每千克的受试者约0.6mg、每千克的受试者约0.7mg、每千克的受试者约0.8mg、每千克的受试者约0.9mg、每千克的受试者约1.0mg、每千克的受试者约1.1mg、每千克的受试者约1.2mg、每千克的受试者约1.3mg、每千克的受试者约1.4mg、每千克的受试者约1.5mg、每千克的受试者约1.6mg、每千克的受试者约1.7mg、每千克的受试者约1.8mg、每千克的受试者约1.9mg、或每千克的受试者约2.0mg的ENPP1剂,从而治疗、减少和/或改善DISH、强直性脊柱炎和/或脊关节炎疾病的一个或多个症状,其中受试者具有ENPP1单倍性不足。

[0055] 在一个方面,本公开内容涉及向患有DISH、强直性脊柱炎和/或脊关节炎的受试者

施用剂量为每千克约0.1mg、每千克的受试者约0.2mg、每千克的受试者约0.3mg、每千克的受试者约0.4mg、每千克的受试者约0.5mg、每千克的受试者约0.6mg、每千克的受试者约0.7mg、每千克的受试者约0.8mg、每千克的受试者约0.9mg、每千克的受试者约1.0mg、每千克的受试者约1.1mg、每千克的受试者约1.2mg、每千克的受试者约1.3mg、每千克的受试者约1.4mg、每千克的受试者约1.5mg、每千克的受试者约1.6mg、每千克的受试者约1.7mg、每千克的受试者约1.8mg、每千克的受试者约1.9mg、或每千克的受试者约2.0mg的ENPP1剂,以恢复受试者血浆和/或组织中的ENPP1蛋白和/或活性的生理水平。本文所用的血浆和/或组织中的ENPP1蛋白和/或活性的生理水平,是指足以实现和维持人类血清中PPi生理水平的ENPP1剂的量或浓度。在某些实施方式中,ENPP1剂是ENPP1和/或包含ENPP1活性的ENPP1构建体。

[0056] 在一个方面,本公开内容涉及向患有ENPP1单倍性不足的受试者施用剂量为每千克约0.1mg、每千克的受试者约0.2mg、每千克的受试者约0.3mg、每千克的受试者约0.4mg、每千克的受试者约0.5mg、每千克的受试者约0.6mg、每千克的受试者约0.7mg、每千克的受试者约0.8mg、每千克的受试者约0.9mg、每千克的受试者约1.0mg、每千克的受试者约1.1mg、每千克的受试者约1.2mg、每千克的受试者约1.3mg、每千克的受试者约1.4mg、每千克的受试者约1.5mg、每千克的受试者约1.6mg、每千克的受试者约1.7mg、每千克的受试者约1.8mg、每千克的受试者约1.9mg、或每千克的受试者约2.0mg的ENPP1剂,以恢复受试者血浆和/或组织中的ENPP1蛋白和/或活性的生理水平。本文所用的血浆和/或组织中的ENPP1蛋白和/或活性的生理水平,是指足以实现和维持人类血清中PPi生理水平的ENPP1剂的量或浓度。在某些实施方式中,ENPP1剂是ENPP1和/或包含ENPP1活性的ENPP1构建体。

[0057] 在一个方面,本公开内容涉及增加患有DISH、强直性脊柱炎和/或脊柱关节炎的受试者中的循环焦磷酸盐(PPi)的方法,该方法包括向受试者施用剂量为每千克约0.1mg、每千克的受试者约0.2mg、每千克的受试者约0.3mg、每千克的受试者约0.4mg、每千克的受试者约0.5mg、每千克的受试者约0.6mg、每千克的受试者约0.7mg、每千克的受试者约0.8mg、每千克的受试者约0.9mg、每千克的受试者约1.0mg、每千克的受试者约1.1mg、每千克的受试者约1.2mg、每千克的受试者约1.3mg、每千克的受试者约1.4mg、每千克的受试者约1.5mg、每千克的受试者约1.6mg、每千克的受试者约1.7mg、每千克的受试者约1.8mg、每千克的受试者约1.9mg、或每千克的受试者约2.0mg的ENPP1剂,从而增加受试者中的循环PPi。

[0058] 在一个方面,本公开内容涉及增加患有ENPP1单倍性不足的受试者中的循环焦磷酸盐(PPi)的方法,该方法包括向受试者施用剂量为每千克约0.1mg、每千克的受试者约0.2mg、每千克的受试者约0.3mg、每千克的受试者约0.4mg、每千克的受试者约0.5mg、每千克的受试者约0.6mg、每千克的受试者约0.7mg、每千克的受试者约0.8mg、每千克的受试者约0.9mg、每千克的受试者约1.0mg、每千克的受试者约1.1mg、每千克的受试者约1.2mg、每千克的受试者约1.3mg、每千克的受试者约1.4mg、每千克的受试者约1.5mg、每千克的受试者约1.6mg、每千克的受试者约1.7mg、每千克的受试者约1.8mg、每千克的受试者约1.9mg、或每千克的受试者约2.0mg的ENPP1剂,从而增加受试者中的循环PPi。

[0059] 在一个方面,本公开内容涉及改善受试者中的ENPP1单倍性不足的一个或多个症状的方法,该方法包括向受试者施用剂量为每千克约0.1mg、每千克的受试者约0.2mg、每千克的受试者约0.3mg、每千克的受试者约0.4mg、每千克的受试者约0.5mg、每千克的受试者

约0.6mg、每千克的受试者约0.7mg、每千克的受试者约0.8mg、每千克的受试者约0.9mg、每千克的受试者约1.0mg、每千克的受试者约1.1mg、每千克的受试者约1.2mg、每千克的受试者约1.3mg、每千克的受试者约1.4mg、每千克的受试者约1.5mg、每千克的受试者约1.6mg、每千克的受试者约1.7mg、每千克的受试者约1.8mg、每千克的受试者约1.9mg、或每千克的受试者约2.0mg的ENPP1剂,从而改善受试者中的ENPP1缺陷的一种或多种症状或ENPP1单倍性不足的一种或多种症状。

[0060] 在一个方面,本公开内容涉及防止和/或逆转患有DISH、强直性脊柱炎和/或脊柱关节炎的受试者中存在的病理性钙化和/或骨化块的进展,或最小化和/或减少患有DISH、强直性脊柱炎和/或脊柱关节炎的受试者中存在的病理性钙化和/或骨化块,该方法包括向受试者施用剂量为每千克约0.1mg、每千克的受试者约0.2mg、每千克的受试者约0.3mg、每千克的受试者约0.4mg、每千克的受试者约0.5mg、每千克的受试者约0.6mg、每千克的受试者约0.7mg、每千克的受试者约0.8mg、每千克的受试者约0.9mg、每千克的受试者约1.0mg、每千克的受试者约1.1mg、每千克的受试者约1.2mg、每千克的受试者约1.3mg、每千克的受试者约1.4mg、每千克的受试者约1.5mg、每千克的受试者约1.6mg、每千克的受试者约1.7mg、每千克的受试者约1.8mg、每千克的受试者约1.9mg、或每千克的受试者约2.0mg的ENPP1剂,从而防止和/或逆转受试者中的病理性钙化和/或骨化的骨骼块的进展,或最小化和/或减少受试者中的病理性钙化和/或骨化的骨骼块。

[0061] 在上述任何方法的一些实施方式中,方法包括向患者施用治疗有效量的ENPP1剂。

[0062] 在一些实施方式中,ENPP1剂是式(I)的化合物,或其盐或溶剂化物。

[0063] W-蛋白质-Z-结构域-X-Y

[0064] (I),

[0065] 其中在(I)中:

[0066] W不存在或包括允许将化合物输出到细胞外空间中的信号序列;

[0067] 蛋白质包括ENPP1的催化区;

[0068] 结构域不存在或为选自人IgG Fc结构域(Fc)、人血清白蛋白(ALB)和其生物活性片段的至少一个。

[0069] X和Z独立地不存在,或为包括1-20个氨基酸的多肽;和

[0070] Y不存在或是“骨靶向”序列基团

[0071] 其中m独立地是从1到15的整数,和

[0072] 其中n独立地是从1到10的整数。

[0073] 在一些实施方式中,W不存在。在一些实施方式中,W包括允许将化合物输出到细胞外空间中的信号序列。

[0074] 在一些实施方式中,Y是选由以下的“骨靶向”序列基团: 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)、 $EEEEEEPRGDT$ (SEQ ID NO:18)、 $APWHLSSQYSRT$ (SEQ ID NO:19)、 $STLPIPHFSRE$ (SEQ ID NO:20)、 $VTKHLNQISQSY$ (SEQ ID NO:116)和 E_m (SEQ ID NO:117)。

附图说明

[0075] 图1A-1B显示了患者1的脊柱CT和骨闪烁显像图。图1A表示脊柱CT检测到的脊柱中存在多个压缩性骨折,显示为白色箭头。图1B显示骨闪烁显像图,其揭示肋骨中多个积累。

[0076] 图1C-1H显示了患者1的髋关节、膝关节和跟腱的X光照片。图1C:右髋关节,图1D:左髋关节,图1E:右膝关节,图1F:左膝关节,图1G:右跟腱,图1H:左跟腱。没有异位骨化的迹象。

[0077] 图2A-2C显示ENPP1突变家族家谱,分别对应于患者1、2和3。箭头表示先证者。

[0078] 图3A-3G显示了患者2的脊柱CT,髋关节、膝关节和跟腱的X光照片。图3A:脊柱CT显示脊柱旁韧带骨化(白色箭头)和多个压缩性骨折(白色箭头)。图3B-3C分别对应于右髋关节(图3B)和左髋关节(图3C)的X光照片。图片表明没有观察到异位骨化的迹象。图3D-3E分别对应于右膝关节(图3D)和左膝关节(图3E)的X光照片。图片显示没有观察到异位骨化的迹象。图3F和图3G分别对应于右跟腱(图3F)和左跟腱(图3G)的X光照片。在右跟腱中发现了起止点病的迹象(显示为白色箭头)。

[0079] 图4A-4I显示了患者3的脊柱CT,髋关节、膝关节和跟腱的X光照片。图4A-4C对应于脊柱CT,其显示颈椎(图4A)、胸椎(图4B)和腰椎(图4C)中的多个脊柱旁骨化(白色箭头)。图4D-4E显示了X光照片中检测到的右髋关节(图4D)和左髋关节(图4E)周围突出的骨化(白色箭头)。图4F-4G显示了右膝关节(图4F)和左膝关节(图4G)的X光照片,其没有异位骨化的迹象。图4H-4I显示了在右跟腱(图4H)和左跟腱(图4I)的X光照片中检测到突出的起止点病(白色箭头)。

[0080] 图5A-5G显示了患者1的儿子的脊柱CT和髋关节、膝关节和跟腱的X光照片。(图5A)脊柱CT,(图5B)右髋关节,(图5C)左髋关节,(图5D)右膝关节,(图5E)左膝关节,(图5F)右跟腱,(图5G)左跟腱。没有异位骨化的迹象。

[0081] 图6A-6G显示患者3的一个儿子的脊柱CT和髋关节、膝关节和跟腱的X光照片。(图6A)脊柱CT,(图6B)右髋关节,(图6C)左髋关节,(图6D)右膝关节,(图6E)左膝关节,(图6F)右跟腱,(图6G)左跟腱。在左跟腱中有轻微的起止点病(enthesopathy)(白色箭头)。

[0082] 图7A-7G为病例3的另一个儿子的脊柱CT和髋关节、膝关节和跟腱的X光照片。图7A)脊柱CT,(图7B)右髋关节,(图7C)左髋关节,(图7D)右膝关节,(图7E)左膝关节,(图7F)右跟腱,(图7G)左跟腱。左脚跟腱有轻微的起止点病(白色箭头)。

[0083] 图8显示互补DNA的Sanger测序证实了患者3的ENPP1变体的复合杂合性。虽然克隆类型1包含ENPP1变体c.536A>G,但另一个ENPP1变体c.1352A>G位于克隆类型2中,表明了复合杂合性。

[0084] 图9显示了ENPP1结构的非限制性示意图和本变体的位置。ENPP1由细胞质结构域(CD)、跨膜结构域(TM)和由两个生长调节素结构域(SMB1和SMB2)、催化结构域和核酸酶样结构域组成的细胞外结构域组成。N179S和Y451C分别位于SMB2和催化结构域中。

[0085] 图10显示了WT、N179S和Y451C的酶活性的比较。当与WT ENPP1相比,N179S和Y451C变体分别显示出55%和70%的酶促反应速度下降。条形图表示中位数和四分位数值。****: $p < 0.0001$ 。

[0086] 图11显示了野生型ENPP1前体蛋白(SEQ ID NO:1)的完整的、未加工的氨基酸序列。胞质和跨膜区域以下划线表示。潜在的N-糖基化位点以黑体表示。PSCAKE(残基99-104;

方框内)是可溶性ENPP1蛋白部分的起点,其包括SMB1(残基104-144)和SMB2(残基145-189)。

[0087] 图12显示了在每周用指定的皮下剂量的媒介物或ENPP1给药的WT和Enpp1^{asj}小鼠中的血浆PPi的反应(图12)。*P<0.05,**P<0.01;(方差分析,Kruskal-Wallis检验)。

[0088] 图13显示了在每周用指定的皮下剂量的媒介物或ENPP1构建体#1118和#2000给药的17周龄的WT和17周龄的Enpp1^{asj}雄性小鼠中的脊柱旁骨赘和关节强直的反应。构建体#1118从第3周开始每周给药一次,而构建体#2000从第5周开始每周给药一次。显微CT图像显示优选在构建体#2000中脊柱旁骨赘和关节强直的衰减,并且在以每周1mg/Kg剂量给药的Enpp1^{asj}雄性和雌性小鼠中都很明显。

[0089] 图14显示了在每周用指定的皮下剂量的媒介物或ENPP1构建体#1118和#2000给药的17周龄的WT和17周龄的Enpp1^{asj}雌性小鼠中的脊柱旁骨赘和关节强直的反应。构建体#1118从第3周开始每周给药一次,而构建体#2000从第5周开始每周给药一次。显微CT图像显示优选在构建体#2000中脊柱旁骨赘和关节强直的衰减,并且在以每周1mg/Kg剂量给药的Enpp1^{asj}雄性和雌性小鼠中都很明显。

[0090] 图15A-15B显示了在每周用指定的皮下剂量的媒介物或ENPP1构建体#1118和#2000给药的17周龄的WT和17周龄的Enpp1^{asj}小鼠中的听觉脑干反应。构建体#1118从第3周开始每周给药一次,而构建体2000构建体从第5周开始每周给药一次。刺激频率测量表明,每周2mg/Kg剂量的ENPP1构建体#1118,以及每周0.5和1mg/Kg剂量的ENPP1构建体#2000,可以防止低频(8kHz)范围内的听力损失。也注意到,优选在每周1mg/Kg剂量给药的ENPP1构建体#2000中,在高频范围(32kHz)内ENPP1缺陷动物的听力改善。

[0091] 图16显示了在每周用指定的皮下剂量的媒介物或ENPP1构建体#1118和#2000的WT和17周龄的ENPP1^{asj}小鼠中的完整的FGF23水平。构建体#1118从第3周开始每周给药一次,而构建体#2000构建物从第5周开始每周给药一次。数据显示,当每周以1mg/Kg和4mg/Kg给药时,ENPP1构建体#2000优选抑制完整的FGF23。统计学显著性是通过方差分析Kruskal-Wallis测试,然后通过Dunn的事后分析来评估与WT水平的差异(单因素方差分析)。统计学显著性用p值表示,并附有以下注释:*p<0.05,**p<0.01,***p<0.001,****p<0.0001。

[0092] 定义

[0093] 本说明书中使用的术语通常在本公开内容的背景下和每个术语使用的具体背景下具有其在本领域中的普通含义。某些术语在下文或说明书的其他地方进行了讨论,以便为从业者描述本公开内容的组合物和方法以及如何制造和使用它们提供额外的指导。术语的任何使用范围或含义将从使用该术语的具体上下文中显而易见。

[0094] 如本文所用,术语“DISH”是指弥漫性特发性骨肥厚症,也被称为Forestier病,是一种以不寻常的新骨形成为特征的骨骼障碍(Resnick等,Diffuse idiopathic skeletal hyperostosis(DISH)。Forestier's disease with extraspinal manifestations, Radiology.1975;115:513-524)。DISH导致体内韧带和腱钙化(变硬)和/或在脊柱周围和骨骼区域出现新的骨骼生长(骨化块)。这些钙化的区域在一些实例中还可以形成骨刺(异常的新骨生长),其可引起疼痛、僵化和活动性下降。新骨的形成最常见于韧带和腱与骨结合处(肌腱末端区),但肌腱末端钙化与脊柱周围骨化块之间的关系尚不清楚。还有普遍的骨骼硬化和骨骼过度生长(骨肥厚症)(Pillai&Littlejohn, Metabolic Factors in Diffuse

Idiopathic Skeletal Hyperostosis-A Review of Clinical Data, The Open Rheumatology Journal. 2014; 8:116-128)。该疾病的另一个方面是由于异常的骨骼生长而形成大的、流动的骨赘。这些骨化多见于轴向骨骼, 其中胸区是主要位置。另外, 周边的肌腱端, 如髌周韧带、跟腱插入处、足底筋膜、肩部、鹰嘴和掌指关节也可以有钙化。在一些实例中, 钙化见于髌、膝盖、脚踝、脚、肩部、手和肋骨 (Helfgott, Diffuse idiopathic skeletal hyperostosis (DISH). UpToDate. June 7, 2017)。DISH的共同特性和/或症状包括前纵韧带的局灶性和弥漫性钙化和骨化, 脊柱旁结缔组织和纤维环的钙化, 周边纤维环纤维 (peripheral annulus fibrosus fiber) 的退化, 纤维组织的前外侧延伸, 血管过多, 慢性炎症细胞浸润, 椎体前表面上骨膜新骨形成, 掌指关节骨化, 胸椎、腰椎和/或颈椎区域疼痛, 神经根病, 多关节疼痛, 单关节滑膜炎和/或吞咽困难。

[0095] DISH表现为腱和韧带中钙盐的堆积 (钙化) 和异常的新骨生长 (骨化), 但原因不明 (Mader等人, Diffuse idiopathic skeletal hyperostosis: clinical features and pathogenic mechanisms, Nat Rev Rheumatol. December 2013; 9(12): 741-50 & Nascimento等人, Diffuse idiopathic skeletal hyperostosis: A review, Surgical Neurology International. 2014; 5 (Suppl 3): S122-S125)。形成DISH的常见危险因素包括但不限于大腰围、BMI/肥胖、高胰岛素血症、糖尿病、高尿酸血症、血脂紊乱、高血压、冠状动脉疾病和痛风。DISH可以是无症状的, 在这些情况下, 通常根据放射学图像进行诊断。

[0096] DISH是与衰老有关的进行性肌肉骨骼疾病。在两家大型中西部医院人群中, 50岁以上的男性和女性中DISH的发病率分别为25%和15%。此外, 在日本人群中高达6.3%, 在北美有25%的退行性颈椎病患者在称为OPLL的病症中在脊柱后纵韧带中出现进行性钙化。在肌腱端中进行性钙沉积导致脊柱旁肿块不断增长引起的椎管狭窄和脊髓压迫。由此产生的脊髓病往往是严重的疼痛和虚弱。治疗通常由使用NSAID的保守性慢性疼痛管理组成, 因为没有有效的疗法来防止导致症状过程的进行性骨化, 而且对导致启动和促进异位矿化的因素知之甚少。手术减压用于在急性病例中提供短期缓解, 但是OPLL中的肌腱端进展在手术 (椎板成形术) 后与保守管理的患者相比发生得更快 (分别为70%和24%), 因此, 除了症状严重的病例外, 不鼓励进行手术干预。

[0097] 如本文所用, 患有DISH的受试者, 是指被诊断为DISH的受试者。DISH的诊断基于放射学和/或临床结果, 并由Resnick和Niwayana定义。胸椎和腰椎的放射线照相术是诊断DISH的单一最有用成像方式。计算机断层成像 (CT) 扫描可用于评估并发症, 如骨折, 或由对气管、食道和静脉的压力作用引起的症状。这可以将该实体与强直性脊柱炎或OPLL区分开来 (Artner等人, Diffuse idiopathic skeletal hyperostosis: current aspects of diagnostics and therapy, 2012, Orthopade. 2012 Nov; 41 (11): 916-22; Olivieri等人, Diffuse idiopathic skeletal hyperostosis may give the typical postural abnormalities of advanced Ankylosing Spondylitis Rheumatology 2007 Nov 1; 46 (11): 1709-11)。主要沿至少4个相邻椎骨 (跨越3个椎间盘空间) 的前外侧 (前纵韧带) 存在流动的钙化和骨化, 并保留椎间盘高度, 表明DISH。在DISH患者的放射照片和CT图像上可见的脊柱和脊柱外的特征 (Radswiki & Baba, Diffuse idiopathic skeletal hyperostosis. Reference article, Radiopaedia.org) 如下。

[0098] 非限制性脊柱特征:

[0099] -流动的骨化:沿着至少四个相邻的椎骨的前部或右前外侧有花状的(fluid)流动骨化

[0100] -盘空间通常保存良好

[0101] -关节强直在胸椎比颈椎或腰椎更常见

[0102] -经常不完整

[0103] -流动的骨化中可以有突出的盘材料的交错区

[0104] -无骶髂关节炎或切面关节强直,尽管可能存在骶髂关节前桥、后桥、肌腱末端桥10。

[0105] 非限制性脊柱外特征:

[0106] -髂嵴、坐骨结节和大转子的起止点病

[0107] -经常出现附属骨架的骨刺形成(鹰嘴、跟骨、髌骨韧带)。

[0108] -“须状”的边缘骨刺(enthesisophytes)

[0109] 非限制性的临床特征:

[0110] -疼痛

[0111] -活动范围减小

[0112] -一些患者中脊柱骨折的风险增加

[0113] 在一些实例中,DISH会出现症状,主要的临床特征包括疼痛、僵化和活动力(活动范围)下降、吞咽困难(由骨赘压迫引起)、食道梗阻、声音嘶哑、颈椎病、寰枢椎半脱位、椎管狭窄、后纵韧带骨化、脊髓损伤、呼吸困难、异物感、脊髓受压引起的神经系统表现、高胆固醇血症(导致心血管并发症)和/或周围关节病变中的一种或多种。

[0114] “肌腱端(起止点,entheses)”是腱或韧带与骨附接的部位,其结构分为四个区域:密集的纤维结缔组织区,由成纤维细胞类型细胞(腱细胞(tenocytes))填充,并且由I型和III型胶原蛋白和饰胶蛋白聚糖组成;未矿化的纤维软骨,由纤维软骨细胞填充,并且由I型和II型胶原蛋白和聚集蛋白聚糖组成;矿化的纤维软骨,由肥大软骨细胞填充,并且由II型和X型胶原蛋白和聚集蛋白聚糖组成;以及骨,由成骨细胞、骨细胞和破骨细胞填充,并且由I型胶原蛋白组成(Calejo et al.,Enthesis tissue engineering:biological requirements meet at the interface,Tissue Eng Part B Rev.2019;25(4):330-356)。因此,肌腱端代表了一种肌肉骨骼结构,其可以在两种截然不同的组织——腱或韧带(顺应性软组织)和骨骼(刚性硬组织)之间实现平稳过渡(Calejo等人,Enthesis tissue engineering:biological requirements meet at the interface,Tissue Eng Part B Rev.2019;25(4):330-356)。在这个界面上的突然过渡会导致区域之间的应力集中,增加失败的风险;相反,在肌腱端之上的组成和结构的逐渐过渡减轻应力集中。(Genin等人,Functional grading of mineral and collagen in the attachment of tendon to bone,Biophys J.2009;97(4):976-985)。从腱朝向骨骼,可见胶原纤维排列逐渐减少和矿物质含量增加,这产生了组织僵化的梯度(Genin等人,Functional grading of mineral and collagen in the attachment of tendon to bone,Biophys J.2009;97(4):976-985)。肌腱端矿化的降低导致该结构的强度下降(Deymier等人,Micro-mechanical properties of the tendon-to-bone attachment,Acta Biomater.2017;1(56):25-35),而矿化的纤维软骨扩张的动物模型也表现出肌腱端强度下降(Marinovich等人,The role

of bone sialoprotein in the tendon-bone insertion, *Matrix Biol.* 2016;52-54:325-338)。因此,必须适当地调节矿化,以实现肌腱端的最佳机械性能。

[0115] 如本文所用,“强直性脊柱炎”是指一种关节炎,其特征不在于脊柱关节的长期炎症,通常是在脊柱与骨盆的连接处。受影响的区域可能包括其他关节,如肩或髋,可能出现眼睛和肠道问题以及背部疼痛。受影响区域的关节活动性一般会随着时间的推移而恶化。

[0116] 尽管强直性脊柱炎的病因不明,但据认为它涉及遗传和环境因素的组合。许多受影响的人有特殊的人类白细胞抗原,称为HLA-B27抗原。其基本机制被认为是自身免疫性或自体炎性。诊断通常基于症状,并有医学影像和血液测试的支持。强直性脊柱炎是一种血清阴性的脊柱关节病,意味着测试显示没有类风湿因子(RF)抗体的存在。强直性脊柱炎尚无已知的治愈方法。治疗可能包括药物治疗、运动、物理疗法,以及在极少数情况下的手术。使用的药物包括NSAID、类固醇、DMARD(例如柳氮磺吡啶)和生物制剂(如TNF抑制剂)。所有人类中大约有0.1%和0.8%的人受到影响,其中发病通常发生在年轻的成年人中。男性和女性同等地受到影响;然而,女性比男性更可能出现炎症而不是融合。

[0117] 如本文所用,“脊关节炎”或“SpA”的特征在于轴向骨骼(骶髂关节炎、脊柱炎)、周围关节和肌腱端的炎症。骨骼外的表现可以发生,如前葡萄膜炎、银屑病和炎症性肠病。HLA-B27是主要的遗传风险因素。整个SpA组在全球的发病率为0.1%至1.9%,在不同国家和种族之间存在差异。非甾体抗炎药(通常称为NSAID)通过减轻疼痛和肿胀为大多数患者提供症状缓解。被称为生物制剂的其他药物(包括抗TNF药物(TNF阻断剂)和抗IL-17药物(IL-17阻断剂))对NSAID反应不够好的患者有效。

[0118] “ENPP1缺陷”的特征在于受试者血清和/或血浆中ENPP1酶活性水平减少。ENPP1缺陷是罕见的遗传性障碍,由编码ENPP1酶的ENPP1基因的失活突变引起。ENPP1是整合跨膜蛋白,其细胞外结构域具有焦磷酸酶和磷酸二酯酶活性。ENPP1将细胞外ATP转化为无机焦磷酸盐(PPi)和AMP。

[0119] 相对于ENPP1多肽的“酶促活性的”,或如本文所用,相对于ENPP1多肽的“酶活性的”定义为具有将ATP水解为AMP和PPi和/或将AP3A水解为ATP的活性。ENPP1易于将ATP水解为AMP和PPi。使用ATP作为底物确定ENPP1的稳态Michaelis-Menten酶常数。可以通过酶促反应的HPLC分析证明ENPP1裂解ATP,并通过使用ATP、AMP和ADP标准品确认底物和反应产物的身份。在存在ENPP1的情况下,ATP底物随时间降解,并具有酶促产物AMP的积累。使用不同浓度的ATP底物,在存在ATP的情况下导出ENPP1的初始速率(rate velocity),并将数据拟合到曲线上以得出酶速率常数。在生理pH值下,ENPP1的动力学速率常数为 $K_m = 2\mu\text{M}$ 和 $k_{cat} = 3.4 \pm 0.4\text{s}^{-1}$ 。

[0120] 如本文所使用的术语“血浆焦磷酸盐(PPi)水平”是指动物血浆中存在的焦磷酸盐的量。在某些实施方式中,动物包括大鼠、小鼠、猫、狗、人、牛和马。由于自血小板的释放,有必要测量血浆而不是血清中的PPi。有几种测量PPi的方法,其中之一是使用尿苷-二磷酸葡萄糖(UDPG)焦磷酸化酶的酶法试验(Lust&Seegmiller,1976,*Clin.Chim.Acta* 66:241-249;Cheung&Suhadolnik,1977,*Anal.Biochem.* 83:61-63),具有修改。

[0121] 通常情况下,健康人受试者的血浆PPi水平范围在约 $1\mu\text{M}$ 到 $3\mu\text{M}$ 之间,在一些情况下在 $1-2\mu\text{M}$ 之间。血浆中ENPP1的正常水平是指健康受试者中维持血浆焦磷酸盐(PPi)正常水平所需的ENPP1蛋白的量。健康人的PPi的正常水平对应于 $2-3\mu\text{M}$ 。患有ENPP1缺陷的受试者

表现出低PPi水平,其范围比正常水平至少低10%、比正常水平至少低20%、比正常水平至少低30%、比正常水平至少低40%、比正常水平至少低50%、比正常水平至少低60%、比正常水平至少低70%、比正常水平至少低80%及其组合。在患有GACI的患者中,发现PPi水平低于1 μ M,在一些情况中低于可检测的水平。在患有PXE的患者中,PPi水平低于0.5 μ M (Arterioscler Thromb Vasc Biol.2014Sep;34(9):1985-9;Braddock等人,Nat Commun.2015;6:10006)。

[0122] 如本文所用,术语“病理性钙化”是指钙盐在身体的软组织、分泌和排泄通道中的异常沉积导致其变硬。有两种类型:发生在垂死和死亡组织中的营养不良性钙化,以及转移性钙化,其特征在于细胞外钙水平升高(高钙血症),超过细胞和组织的体内平衡能力。钙化可以涉及细胞以及细胞外基质组分,例如基底膜中的胶原蛋白和动脉壁中的弹性纤维。容易发生钙化的一些组织的实例包括:胃粘膜——胃的内部上皮层,肾脏和肺,角膜,体动脉和肺静脉。

[0123] 本文所用的术语“病理性骨化”是指在非骨系统的组织中,或在通常不表现成骨性质的结缔组织中产生骨的病理性状况。根据受影响的组织或器官的性质,骨化分为三种类型:软骨内骨化是发生在软骨中并取代软骨的骨化;膜内骨化是发生在结缔组织中并取代结缔组织的骨的骨化;化生性骨化(metaplastic ossification)是在正常的软体结构中发展出骨性物质;也叫异养骨化。

[0124] ENPP1的“缺陷”是指其中受试者血浆中的ENPP1低于或等于正常水平的5%-10%的病症。健康人受试者中ENPP1的正常水平大约在10至30 ng/mL之间 (Am J Pathol.2001Feb;158(2):543-554)。

[0125] “异位钙化”是指以钙盐在组织中的病理性沉积或软组织中骨骼生长为特征的病症。

[0126] “软组织的异位钙化”是指不适当的生物矿化,通常由软组织中发生的导致软组织硬化损失的磷酸钙、羟基磷灰石、草酸钙和磷酸八钙组成。“动脉钙化”是指发生在动脉和心脏瓣膜中导致动脉硬化和/或变窄的异位钙化。动脉钙化与动脉粥样硬化斑块的负担和心肌梗死的风险增加、周围血管疾病的缺血性发作增加,以及血管成形术后解剖的风险增加有关。

[0127] “静脉钙化”是指发生在静脉中的异位钙化,它减少了静脉的弹性并限制了血流,然后可导致血压升高和冠状动脉缺陷。

[0128] “脉管钙化”是指矿物在脉管系统中的病理性沉积。它有多种形式,包括内膜钙化和内侧钙化,但也可在心脏瓣膜中发现。脉管钙化与动脉粥样硬化、糖尿病、某些遗传性病症和肾脏疾病(具体是CKD)有关。脉管钙化的患者处于不良心血管事件的更高风险下。脉管钙化影响着多种多样的患者。特发性婴儿动脉钙化是罕见的脉管钙化形式,其中新生儿的动脉钙化。

[0129] “脑钙化”(BC)是指非特异性的神经病理学,其中钙和其他矿物在血管壁和组织实质中的沉积发生,导致神经元死亡和神经胶质增生。脑钙化通常与多种慢性和急性脑部障碍有关,包括唐氏综合症、路易体病、阿尔茨海默病、帕金森病、血管性痴呆、脑肿瘤和/或多种内分泌病症。

[0130] 心脏组织钙化是指钙的沉积物(可能包括其他矿物质)在心脏组织例如主动脉组

组织和冠状动脉组织中的积累。

[0131] 如本文所用,“矿物质骨障碍(MBD)”是指以异常激素水平导致人血液中钙和磷水平失衡为特征的障碍。矿物质和骨障碍通常发生在患有CKD的人,并影响大多数接受透析的具有肾衰竭的人。

[0132] 如本文所用,术语“早发性骨质疏松症”是指骨质疏松症的开始阶段,其通常以背痛、弯腰姿势和/或缓慢的骨量缺失为特征。常见原因包括低钙饮食、吸烟、与年龄有关的激素变化。

[0133] “骨质减少”是以骨密度下降为特征的骨骼病症,它导致骨骼变弱和骨折的风险增加。骨软化是骨骼障碍,其特征在于新形成的骨骼的矿化程度下降。骨软化是由严重的维生素D缺陷(可能是营养性的,也可能是由遗传性综合征引起的)和导致非常低血磷酸盐水平的病症引起的。骨软化和骨质减少二者都会增加断骨的风险。骨软化的症状包括骨痛和肌肉无力、骨骼压痛、行走困难和肌肉痉挛。

[0134] 如本文所用,“与年龄有关的骨质减少”是指其中骨矿物质密度低于正常的病症。一般来说,骨质减少患者的骨矿物质密度T分数在-1.0和-2.5之间。骨质减少如果不加以治疗,就会进展成骨质疏松症,其中骨骼会变得很脆,极易发生骨折。

[0135] 如本文所用,“后纵韧带骨化(OPLL)”是指导致后纵韧带异位钙化的骨肥厚(过度骨骼生长)病症。后纵韧带连接并稳定脊柱的骨骼。增厚或钙化的韧带可能会压迫脊髓,产生脊髓病。脊髓病的症状包括行走困难以及肠道和膀胱控制困难。OPLL也可能导致神经根病,或压迫神经根。颈神经根病的症状包括颈部、肩部、手臂或手的疼痛、刺痛或麻木。OPLL与DISH不同,因为对于OPL,骨化只发生在后纵韧带,而不像骨化也发生在胸区和前纵韧带的DISH。

[0136] OPLL引起的临床症状和体征可分类为:(1)脊髓病,或脊髓损伤,伴有上下肢运动和感觉失调、痉挛和膀胱功能障碍;(2)颈神经根病,伴有上肢疼痛和感觉失调;(3)轴性不适,颈部周围疼痛和僵化。OPLL早期最常见的症状包括手的感觉迟钝和刺痛感,以及笨拙。随着神经功能缺损的进展,可能出现下肢症状,如步态失调。OPLL在侧位普通放射线片上检测到,磁共振成像(MRI)和计算机断层成像(CT)已明确显示了颈部OPLL的诊断和形态学细节。

[0137] OPLL在患有颈椎病的美国人中很普遍,在亚洲人群中甚至更为广泛。脊髓病和活动力下降随着年龄的增长而逐渐加重,目前还没有有效的措施防止导致脊髓病和僵化的脊柱旁骨化的发展。目前疗法集中于缓解症状,虽然手术在短期内可能有帮助,但随后起止点病的快速进展和症状的复发往往使这种方法复杂化。

[0138] 患有进展迅速的OPLL的患者显示出循环FGF23的升高(Kawaguchi, Y., 等人, Serum biomarkers in patients with ossification of the posterior longitudinal ligament(OPLL): Inflammation in OPLL. PLoS One, 2017. 12(5): p. e0174881; Kawaguchi, Y., 等人, Increase of the Serum FGF-23 in Ossification of the Posterior Longitudinal Ligament. Global Spine J, 2019. 9(5): p. 492-498), 这是罕见障碍X连锁低磷酸盐血症(XLH)和常染色体隐性低血磷酸盐性佝偻病(ARHR)的核心发现,这两种疾病也表现出与DISH和OPLL类似的起止点病。这些发现表明,FGF23(或所得的低磷酸盐血症)在起止点病的发病机制中起着致病作用,然而,FGF23升高和/或磷酸盐降低可能诱发起止点病

或脊柱骨化的机制尚不清楚。

[0139] 如本文所用的“遗传性低血磷酸盐性佝偻病”是指与血液中磷酸盐水平低有关的障碍(低磷酸盐血症)。磷酸盐是矿物质,其对骨骼和牙齿的正常形成至关重要。最常见的是,它是由PHEX基因的突变引起的。其他可能导致这种病症的基因包括CLCN5、DMP1、ENPP1、FGF23和SLC34A3基因。遗传性低血磷酸盐性佝偻病的其他体征和症状可包括颅骨过早融合(颅缝早闭(craniosynostosis))和牙齿畸形。这种障碍还可能导致韧带和腱与关节附接处的异常骨骼生长(起止点病)。在成人中,低磷酸盐血症的特征在于称为骨软化的骨骼软化。另一种罕见类型的障碍被称为具有高钙尿症(HHRH)的遗传性低血磷酸盐性佝偻病,其中除了低磷酸盐血症外,这种病症的特征还在于尿液中高水平钙的排泄(高钙尿症)。

[0140] 如本文所用,“X连锁低磷酸盐血症(XLH)”,术语X连锁低磷酸盐血症(XLH),也称为X连锁显性低血磷酸盐性佝偻病,或X连锁维生素D抗性佝偻病,是X连锁显性形式的佝偻病(或骨软化),其与大多数佝偻病的情况不同,因为补充维生素D并不能治愈它。它可以导致骨骼畸形,包括身材矮小和膝内翻(弓形腿)。它与PHEX基因序列(Xp.22)的突变和随后的PHEX蛋白的失活有关。

[0141] 如本文所用,“常染色体隐性低磷酸盐血症佝偻病2型(ARHR2)”是指以低磷酸盐血症、佝偻病和/或骨软化及生长缓慢为特征的遗传性肾脏磷酸盐消耗障碍。常染色体隐性低血磷酸盐性佝偻病2型(ARHR2)是由ENPP1基因的纯合功能损失突变引起。

[0142] 如本文所用,“常染色体显性低血磷酸盐性佝偻病(ADHR)”是指罕见的遗传性疾病,其中尿液中磷酸盐的过度损失导致骨骼形成不良(佝偻病)、骨痛和牙齿脓肿。ADHR是由成纤维细胞生长因子23(FGF23)的突变引起的。ADHR的特征在于骨骼矿化受损、佝偻病和/或骨软化、骨化三醇(1,25-二羟基维生素D3)水平被抑制、肾脏磷酸盐消耗以及低血清磷酸盐。FGF23的突变使该蛋白质更稳定和不被蛋白酶裂解,从而增强了FGF23的生物活性。FGF23突变体的活性增强减少了近端肾小管细胞顶端表面上的钠磷共转运体(sodium-phosphate co-transporter)NPT2a和NPT2c的表达,导致了肾脏磷酸盐消耗。

[0143] “低血磷酸盐性佝偻病”(以前称为维生素D抗性佝偻病)是其中由于血液中磷酸盐水平低,骨骼变得非常地(painfully)柔软且容易弯曲的障碍。症状可能包括腿部弯曲和其他骨骼畸形;骨骼疼痛;关节疼痛;骨骼生长不良;和身材矮小。在一些受影响的婴儿中,颅骨之间的空间过早地关闭,导致颅缝早闭。大多数患者表现钙磷代谢异常、牙釉质异常、牙齿萌出延迟和头长而窄(长头症(dolichocephaly))。

[0144] 如本文所用,术语“ENPP1单倍性不足”是指其中ENPP1基因的一个拷贝失活或缺失,并且剩下的ENPP1基因的功能拷贝不足以产生所需的基因产物以保持正常功能的遗传病症。由于ENPP1单倍性不足可以但不一定必须以低PPi水平和病理性钙化的形式表现。类似DISH或早发性骨质疏松症的疾病在某些实施方式中可以与ENPP1单倍性不足有关,和/或由其引起。

[0145] 对于大多数基因来说,单个拷贝足以支持二倍体生物的正常生长和发育,但被称为单倍性不足(HI)基因的小因子表现出对基因剂量降低的极端敏感性。鉴于在生物体的生命周期中,基因失活突变的频率相对较高,以及基因表达在细胞间的差异性,单倍性不足代表了生物体健康的重要障碍。遗传学中的单倍性不足描述了二倍体生物中显性基因作用的模型,其中基因座处的野生型等位基因的单拷贝与变体等位基因的杂合组合不足以产

生野生型表型。单倍性不足可能来自于变体等位基因的新发或遗传的功能损失突变,从而使其产生很少或没有基因产物。

[0146] 例如,已发现ENPP1的N179S突变导致ENPP1蛋白的功能损失。具有N179S突变的单拷贝突变ENPP1基因的存在导致PPi生产下降。本发明公开了N179S突变在某些具有DISH或早发性骨质疏松症的患者中发现,并在某些实施方式中可作为DISH或骨质疏松症存在或未来发展和/或进展的遗传标志物。

[0147] 同样,已发现ENPP1的Y451C突变导致ENPP1蛋白的功能损失。具有Y451C突变的单拷贝突变ENPP1基因的存在导致PPi生产下降。本发明公开了Y451C突变在某些具有DISH或早发性骨质疏松症的患者中发现,并在某些实施方式中可作为DISH或骨质疏松症存在或未来发展和/或进展的遗传标志物。

[0148] 如本文所用,“预处理”是指在开始本文所述的治疗方法之前的处理。

[0149] 如本文所用,术语“受试者”是指个体,如哺乳动物,如人、非人灵长类动物(如黑猩猩和其他猿和猴类)、农场动物(如鸟、鱼、牛、绵羊、猪、山羊和马)、家养哺乳动物(如狗和猫)或实验动物(如啮齿动物,如小鼠、大鼠和豚鼠)。该术语包括任何年龄或性别的受试者。在另一个实施方式中,受试者是哺乳动物,优选是人类。

[0150] 如果疾病或障碍的症状的严重程度、患者经历这种症状的频率或两者都减少,则该疾病或障碍得到“缓解”。

[0151] 如本文所用,术语“改变”、“缺陷”、“变异”或“突变”是指细胞中的基因的突变,影响其编码的多肽的功能、活性、表达(转录或翻译)或构型,包括错义和无义突变、插入、缺失、移码和过早终止。

[0152] “疾病”是动物的健康状态,其中动物无法维持体内稳态,并且其中如果疾病没有得到改善,则动物的健康状况将继续恶化。

[0153] 动物的“障碍”是一种健康状态,其中动物能够维持体内稳态,但其中与没有该障碍的情况相比,动物的健康状态不利。如果不治疗,障碍不一定会导致动物健康状况进一步下降。

[0154] 如本文所用,术语“ENPP”或“NPP”是指外核苷酸焦磷酸酶/磷酸二酯酶。

[0155] 如本文所用,术语“ENPP1蛋白质”或“ENPP1多肽”是指由ENPP1基因编码的外核苷酸焦磷酸酶/磷酸二酯酶-1蛋白质。编码的蛋白质是II型跨膜糖蛋白,并裂解多种底物,其包括核苷酸和核苷酸糖的磷酸二酯键以及核苷酸和核苷酸糖的焦磷酸键。ENPP1蛋白质具有跨膜结构域和可溶性细胞外结构域。细胞外结构域进一步细分为生长调节素B结构域、催化结构域(SEQ ID NO:1的残基186至586)和核酸酶结构域(SEQ ID NO:1的残基524至885)。野生型ENPP1的序列和结构在Braddock等人的PCT申请公开号W0 2014/126965中详细描述,其通过引用以其整体并入本文。

[0156] 哺乳动物ENPP1多肽、突变体或其突变体片段先前已在以下的国际PCT申请公开号中公开:Braddock等人的W0/2014/126965、Braddock等人的W0/2016/187408、Braddock等人的W0/2017/087936和Braddock等人的W02018/027024,所有这些都通过引用以其整体并入本文。

[0157] 如本文所用,术语“ENPP1前体蛋白质”是指在ENPP1的N端具有其信号肽序列的ENPP1。在蛋白水解后,信号序列(在某些非限制性的实施方式中,在式(I)的化合物中用W表

示)从ENPP1裂解,以提供ENPP1蛋白质。在本发明中有用的信号肽序列包括但不限于白蛋白信号序列、天青杀素信号序列(azurocidin signal sequence)、ENPP1信号肽序列、ENPP2信号肽序列、ENPP7信号肽序列和/或ENPP5信号肽序列。

[0158] 如本文所用,术语“ENPP1-Fc构建体”是指与IgG分子(优选地,人IgG)的FcR结合结构域重组融合和/或化学缀合(包括共价和非共价缀合)的ENPP1。在某些实施方式中,ENPP1的C端与FcR结合结构域的N端融合或缀合。

[0159] 如本文所用,术语“Fc”是指人IgG(免疫球蛋白)Fc结构域。考虑将诸如IgG1、IgG2、IgG3和IgG4的IgG亚型用作Fc结构域。

[0160] 如本文所用,“Fc区或Fc多肽”是IgG分子的一部分,其与通过木瓜蛋白酶消化IgG分子获得的可结晶片段相关。Fc区包含通过二硫键连接的IgG分子的两条重链的C端一半。它没有抗原结合活性,但包含碳水化合物部分以及补体和Fc受体(包括FcRn受体)的结合位点。Fc片段包含整个第二恒定结构域CH2(根据Kabat编号系统,人IgG1的残基231-340)和第三恒定结构域CH3(残基341-447)。术语“IgG铰链-Fc区”或“铰链-Fc片段”是指由Fc区(残基231-447)和从Fc区的N端延伸的铰链区(残基216-230)组成的IgG分子区域。术语“恒定结构域”是指免疫球蛋白分子的一部分,其相对于免疫球蛋白的另一部分,即含有抗原结合位点的可变结构域,具有更保守的氨基酸序列。恒定结构域包含重链的CH1、CH2和CH3结构域以及轻链的CHL结构域。

[0161] 如本文所用,术语“片段”应用于核酸时,是指较大核酸的子序列。核酸的“片段”可以是至少约15、50-100、100-500、500-1000、1000-1500个核苷酸、1500-2500或2500个核苷酸(及其之间的任何整数值)。如本文所用,术语“片段”应用于蛋白质或肽时,是指较大蛋白质或肽的子序列,长度可以至少为约20、50、100、200、300或400个氨基酸(及其之间的任何整数值)。

[0162] “分离的”是指从天然状态改变或移出的。例如,活体动物中天然存在的核酸或多肽不是“分离的”,但与其天然状态的共存材料部分或完全分开的相同核酸或多肽是“分离的”。分离的核酸或蛋白质可以基本上纯化的形式存在,或可以存在于非天然环境中,例如宿主细胞中。

[0163] 如本文所用,术语“患者”、“个体”或“受试者”是指人类。

[0164] 如本文所用,术语“药物组合物”或“组合物”是指在本发明中有用的至少一种化合物与药学上可接受的运载体的混合物。该药物组合物促进了化合物向患者的施用。本领域中存在多种施用化合物的技术,其包括但不限于皮下、静脉内、口服、气雾剂、吸入、直肠、阴道、透皮、鼻内、颊、舌下、肠胃外、鞘内、胃内、眼科、肺部和局部施用。

[0165] 如本文所用,术语“药学上可接受的”是指不消除化合物的生物学活性或性质并且相对无毒的材料,例如运载体或稀释剂,即,该材料可以被施用至个体,而不会引起不良的生物学影响或以有害的方式与组合物中所含的任何组分相互作用;例如,磷酸盐缓冲盐水(PBS)

[0166] 如本文所用,术语“血浆焦磷酸盐(PPi)水平”是指动物血浆中存在的焦磷酸盐的量。在某些实施方式中,动物包括大鼠、小鼠、猫、狗、人、奶牛和马。由于从血小板释放,有必要测量血浆而不是血清中的PPi。有多种测量PPi的方式,其中一种是通过使用尿苷二磷酸葡萄糖(UDPG)焦磷酸化酶的酶法试验(Lust和Seegmiller,1976,Clin.Chim.Acta 66:241-

249; Cheung和Suhadolnik, 1977, Anal. Biochem 83:61-63), 具有修改。健康受试者的正常PPi水平范围通常为约1 μ M至约3 μ M, 在一些情况下为1-2 μ M之间。在一些实施方式中, PPi的“低”水平是指受试者的血浆焦磷酸盐(PPi) 低于或等于正常水平的2% - 5%的状况(Arthritis and Rheumatism, Vol.22, No.8(August 1979))。

[0167] 患有ENPP1表达缺陷的受试者倾向于表现出较低的PPi水平, 其范围比正常水平低至少10%、比正常水平低至少20%、比正常水平低至少30%、比正常水平低至少40%、比正常水平低至少50%、比正常水平低至少60%、比正常水平低至少70%、比正常水平低至少80%及其组合。在患有GACI的患者中, 发现PPi水平低于1 μ M, 在一些情况下低于可检测的水平。在患有PXE的患者中, PPi水平低于0.5Mm(Arterioscler Thromb Vasc Biol.2014Sep; 34(9):1985-9; Braddock等人, Nat Commun.2015; 6:10006)。

[0168] 如本文所用, 术语“多肽”是指由通过肽键连接的氨基酸残基、相关的天然存在的结构变体和合成的非天然存在的其类似物组成的聚合物。

[0169] 如本文所用, 术语“PPi”是指焦磷酸盐。

[0170] 如本文所用, 术语“预防”或“防止”是指如果没有障碍或疾病发生, 则没有障碍或疾病发展, 或如果已经有障碍或疾病发展, 则没有进一步的障碍或疾病发展。还考虑了人预防与障碍或疾病有关的一些或全部症状的能力。

[0171] 如本文所用的“样品”或“生物样品”是指从受试者分离的生物材料。生物样品可以包含适合于检测受试者的生理或病理过程的mRNA、多肽或其他标志物的任何生物材料, 并且可以包含获自个体的流体、组织、细胞和/或非细胞材料。

[0172] 如本文所用, “基本上纯化的”是指基本上不含其他组分。例如, 基本上纯化的多肽是已经与其通常以其天然存在状态缔合的其他组分分开的多肽。非限制性实施方式包括95%的纯度、99%的纯度、99.5%的纯度、99.9%的纯度和100%的纯度。

[0173] 如本文所用, 术语“治疗”或“处理”定义为将治疗剂, 即在本发明中有用的化合物(单独或与另一种药剂组合)应用或施用至患者, 或将治疗剂应用或施用至来自患者的分离的组织或细胞系(例如, 用于诊断或离体应用), 该患者具有疾病或障碍和/或疾病或障碍的症状, 旨在治疗、治愈、减轻、缓解、改变、补救、改良、改善、影响和/或防止和/或最小化疾病或障碍和/或疾病或障碍的症状的进展。基于从药物基因组学领域获得的知识, 可以具体地定制或修改这样的治疗。

[0174] 如本文所用, 术语“预防”、“预防的”和“防止”是指抑制受试者疾病的开始或减少其发生。防止可以是完全的(如受试者中完全没有病理细胞)或部分的。防止也指对临床病症的易感性减少。在某些实施方式中, “防止”包括防止疾病或障碍的发作。

[0175] 如本文所用, 术语“野生型”是指从天然存在来源分离的基因或基因产物。野生型基因在人群中最常见, 并因此被任意设计为人ENPP1基因的“正常”或“野生型”形式。相反, 术语“功能等效”是指与野生型基因或基因产物相比, 在序列和/或功能性质(即改变的特性)上显示出改变的ENPP1基因或基因产物。可以分离天然存在的突变体; 通过与野生型基因或基因产物相比其具有改变的特性(包括改变的核酸序列)这一事实来对其进行鉴定。

[0176] 如本文所用, 术语“功能等效变体”涉及与ENPP1(上文定义)的序列基本上同源的多肽, 并且保留了ENPP1的酶促和生物学活性。确定变体是否保留了原生ENPP1的生物学活性的方法是技术人员广泛了解的, 包括本申请的实验部分所使用的任何实验方法。具体地,

由病毒载体递送的ENPP1的功能等效变体被本发明所包括。

[0177] ENPP1的功能等效变体是与原生ENPP1基本上同源的多肽。“基本上同源的”涉及当蛋白质序列与上述ENPP1序列的同一性程度分别为至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%时的蛋白质序列。

[0178] 两个多肽之间的同一性程度是使用计算机算法和本领域技术人员广泛了解的方法来确定的。两个氨基酸序列之间的同一性优选通过使用BLASTP算法 (BLAST Manual, Altschul等人, NCBI NLM NIH Bethesda, Md. 20894, Altschul et al., J. Mol. Biol. 215: 403-410 (1990)) 确定, 但是也可以使用其他类似的算法。使用BLAST和BLAST 2.0, 用本文描述的参数来确定序列同一性百分比。执行BLAST分析的软件可通过国家生物技术信息中心公开获得。

[0179] ENPP1的“功能等效变体”可以通过替换多核苷酸内的核苷酸来获得, 这些核苷酸分别考虑用于生产ENPP1的宿主细胞中的密码子偏好。这样的“密码子优化”可以经由计算机算法确定, 该算法并入了密码子频率表, 例如University of Wisconsin Package Version 9.0, Genetics Computer Group, Madison, Wis提供的密码子偏好的“Human high.cod”。

[0180] 如本文所用, “约”当指可测量的值, 例如数量、时间段等时, 意指包括从指定的值 (2mg/kg或0.6mg/kg或1.8mg/kg) 的 $\pm 10\%$ 或 5% , 在某些实施方式中为 $\pm 1-5\%$, 在某些实施方式中为 $\pm 5\%$, 在某些实施方式中为 $\pm 4\%$, 在某些实施方式中为 $\pm 4\%$, 在某些实施方式中为 $\pm 2\%$, 和在某些实施方式中为 $\pm 1\%$ 的变化, 因为这样的变化对于执行所公开的方法是合适的。

[0181] 本公开方式提供了有代表性的蛋白质序列的实例。所述的蛋白质序列可以通过进行反转录和密码子优化转换为核酸序列。在技术上有几种可以进行这种转换的工具, 例如ExPASy (<https://www.expasy.org/>) 和生物信息学服务器 ([www dot bioinformatics dot org](http://www.dot-bioinformatics.org))。

[0182] 范围: 在整个的本公开内容中, 根据本发明的多个方面可以以范围格式呈现。应当理解, 以范围格式进行的描述仅是为了方便和简洁, 而不应被解释为对根据本发明范围的不灵活的限制。因此, 应该将范围的描述视为已明确公开了在该范围内的所有可能的子范围以及单个数值。例如, 应将例如从1到6的范围描述视为已明确公开了子范围, 例如从1到3、从1到4、从1到5、从2到4、从2到6、从3到6等, 以及该范围内的单个数字, 例如1、2、2.7、3、4、5、5.3和6。无论范围的广度如何, 这都适用。

[0183] 本文描述了优选的方法和材料, 但与本文所述的方法和材料相似或等效的方法和材料也可用于本公开的方法和组合物的实践或测试。本文提到的所有出版物、专利申请、专利和其他参考文献都通过引用以其整体并入本文。

具体实施方式

[0184] 1. ENPP1剂

[0185] ENPP1剂是一种ENPP1多肽。本文公开的ENPP1多肽包括但不限于ENPP1家族的天然存在的多肽以及保留生物活性 (例如但不限于ENPP1的催化活性) 的其任何变体 (包括突变

体、片段、融合体和肽模拟物形式)。

[0186] ENPP1剂可以用下面所示的公式形式表示。

[0187] W-蛋白质-Z-结构域-X-Y

[0188] (I),

[0189] 其中在(I)中:

[0190] W不存在或包括允许将化合物输出到细胞外空间中的信号序列;

[0191] 蛋白质包括ENPP1的催化区;

[0192] 结构域不存在或为选自人IgG Fc结构域(Fc)、人血清白蛋白(ALB)和其生物活性片段的至少一个;

[0193] X和Z独立地不存在或为包括1-20个氨基酸的多肽;和

[0194] Y不存在或是选自由以下“骨靶向”序列的序列: 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)、 $EEEEEEPRGDT$ (SEQ ID NO:18)、 $APWHLSSQYSRT$ (SEQ ID NO:19)、 $STLPIPHFSRE$ (SEQ ID NO:20)、 $VTKHLNQISQSY$ (SEQ ID NO:116)和 E_m (SEQ ID NO:117),

[0195] 其中m独立地是从1到15的整数,和

[0196] 其中n独立地是从1到10的整数。

[0197] 在一些实施方式中,W不存在。在一些实施方式中,W包括允许将化合物输出到细胞外空间的信号序列。

[0198] 在一些实施方式中,ENPP1剂包括骨靶向结构域。在一些实施方式中,骨靶向结构域是带负电荷的氨基酸序列。在一些实施方式中,带负电荷的骨靶向结构域是聚天冬氨酸。

[0199] 术语“ENPP1”或“ENPP1多肽”是指来自任何物种的外核苷酸焦磷酸酶/磷酸二酯酶1蛋白(NPP1/ENPP1/PC-1)和ENPP1相关蛋白。ENPP1蛋白包括形成同型二聚体的II型跨膜糖蛋白。ENPP1蛋白的每个单体包括参与靶向质膜的短的细胞内N端结构域、跨膜结构域和包含数个结构域的大的细胞外区域。大的胞外区域包括SMB1和SMB2结构域,据报道它们参与ENPP1二聚化(Gijsbers等,Biochem.J.371;2003:321-330)。具体来说,SMB结构域包含八个半胱氨酸残基,每个排列成四个二硫键,并被证明通过共价半胱氨酸分子间和分子内键介导ENPP1的同型二聚化。蛋白裂解多种底物,其包括核苷酸和核苷酸糖的磷酸二酯键以及核苷酸和核苷酸糖的焦磷酸键。ENPP1蛋白的功能是将核苷酸5'三磷酸酶水解为相应的单磷酸酯,也水解二腺苷多磷酸酯。ENPP1蛋白在嘌呤信号传导中发挥作用,而嘌呤信号传导参与心血管、神经、免疫、肌肉骨骼、激素和血液学功能的调节。图11显示了人ENPP1前体蛋白(NCBI登录号NP_006199)的示例性氨基酸序列(SEQ ID NO:1)。人ENPP1前体蛋白在ENPP1的N端包括内源性ENPP1信号肽序列。本文所述的所有ENPP1相关多肽的氨基酸的编号基于图2中提供的人ENPP1前体蛋白序列的编号,除非另有特别指定。在某些实施方式中,ENPP1前体蛋白进一步包括内源性或异源性的信号肽序列。在蛋白质水解时,信号肽序列从ENPP1前体蛋白中裂解出来,以提供成熟的ENPP1蛋白。见,例如,Jansen等人,J Cell Sci.2005;118(Pt 14):3081-9。可与本文公开的多肽一起使用的示例性信号肽序列包括但不限于ENPP1信号肽序列、ENPP2信号肽序列、ENPP7信号肽序列和/或ENPP5信号肽序列。非限制性的加工(成熟)的细胞外ENPP1多肽序列在SEQ ID NO:2中显示。

[0200] 本领域一般都知道,ENPP1在脊椎动物中是很保守的,其中细胞外结构域的大段序列都是基本上保守的。例如,图7A-7B描绘了人ENPP1细胞外结构与多种ENPP1直向同源物相比的多序列比对。ENPP1与多种核苷酸三磷酸酯(如ATP、UTP、GTP、TTP和CTP)、pNP-TMP、3',5'-cAMP和2'-3'-cGAMP的结合也是高度保守的(例如,见Kato等人,Proc Natl Acad Sci USA.2012;109(42):16876-81和Mackenzie等人,Bone.2012;51(5):961-8)。因此,从这些比对中,可以预测对正常ENPP1活性很重要的细胞外结构域的关键氨基酸位置,也可以预测可能容忍取代而不显著改变正常ENPP1活性的氨基酸位置。因此,根据目前公开的组合物有用的具有酶活性的人ENPP1多肽可以包括另一种脊椎动物ENPP1序列中相应位置处的一个或多个氨基酸,或者可以包括与人类或其他脊椎动物序列中相似的残基。在相应位置处一个或多个氨基酸的取代可以包括保守的变化或取代,其不可能改变多肽链的形状或改变正常ENPP1活性。保守的变化或取代的实例包括用一个疏水残基如异亮氨酸、缬氨酸、亮氨酸或甲硫氨酸替换另一个,或用一个极性残基取代另一个,如用精氨酸取代赖氨酸,用谷氨酸取代天冬氨酸,或用谷氨酰胺取代天冬酰胺。例如,ENPP1多肽包括源自任何已知的ENPP1多肽的序列的多肽,其序列与ENPP1多肽的序列至少有约80%的同一性,优选是至少85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更大的同一性。

[0201] 2.ENPP1的酶活性

[0202] 在结构和生物学特性方面在本领域中已经表征了ENPP1蛋白。在某些实施方式中,本文公开的可溶性ENPP1蛋白包括焦磷酸酶和/或磷酸二酯酶活性。例如,在一些实施方式中,ENPP1蛋白结合核苷酸三磷酸酯(如ATP、UTP、GTP、TTP和CTP)、pNP-TMP、3',5'-cAMP和2'-3'-cGAMP;并将核苷酸三磷酸酯转化为无机焦磷酸盐[见,例如Kato等,Proc Natl Acad Sci USA.2012;109(42):16876-81;Li等人,Nat Chem Biol.2014;10(12):1043-8;Jansen等人,Structure.2012;20(11):1948-59;和Onyedibe等人,Molecules.2019;24(22)]。

[0203] “酶活性的”或“生物活性的”ENPP1多肽表现出焦磷酸酶和/或磷酸二酯酶活性(例如,能够结合ATP和/或将其水解为AMP和PPi,和/或结合AP3a和/或将其水解为ATP)。例如,ENPP1蛋白的焦磷酸酶/磷酸二酯酶结构域水解细胞外核苷酸三磷酸酯,以产生无机焦磷酸盐(PPi),并且一般是可溶的。这种活性可以使用以前描述的pNP-TMP试验来测量(Saunders等人,2008,Mol.Cancer Ther.7(10):3352-62;Albright et al.,2015,Nat Comm.6:10006)。在某些实施方式中,可溶性ENPP1多肽对底物ATP的 k_{cat} 值大于或等于约 $3.4(\pm 0.4)$ s⁻¹酶⁻¹,其中 k_{cat} 是通过测量多肽水解ATP的速率确定的。在某些实施方式中,可溶性ENPP1多肽对底物ATP的 K_M 值小于或等于约2 μ M,其中 K_M 是通过测量多肽水解ATP速率确定的。除了本文的教导外,这些参考文献也为如何生成保留一种或多种生物活性(如将核苷酸转化为无机焦磷酸盐)的可溶性ENPP1蛋白质提供了充分的指导。

[0204] 3.可溶性ENPP1

[0205] 在一个实施方式中,本公开内容涉及ENPP1剂,如但不限于ENPP1多肽。如本文所述,术语可溶性ENPP1多肽包括ENPP1蛋白的任何天然存在的细胞外结构域以及保留了生物活性(例如,酶活性)的其任何变体(包括突变体、片段和肽模拟物形式)。可溶性ENPP1多肽的实例包括,例如,ENPP1细胞外结构域(SEQ ID NO:2)。在某些实施方式中,可溶性ENPP1多肽除了ENPP1多肽的细胞外结构域之外,进一步包括信号序列。示例性的信号序列包括ENPP1多肽的原生信号序列,或来自另一种蛋白质的信号序列,如hENPP7信号序列。国际专

利申请公开号WO 2012/125182、WO 2014/126965、WO 2016/187408、WO 2018/027024、WO 2020/06302和WO 2020/047520中提供了变体可溶性ENPP1多肽的实例,其所有内容以其整体通过引用并入本文。

[0206] 4. ENPP1融合蛋白

[0207] 在一些实施方式中,ENPP1多肽是融合蛋白,其包括ENPP1多肽结构域和一个或多个异源蛋白部分(即与ENPP1异源的多肽结构域)。如果氨基酸序列在SEQ ID NO:1所表示的ENPP1的形式中没有唯一地发现,则被理解为与ENPP1异源。在一些实施方式中,异源蛋白部分包括免疫球蛋白的Fc结构域。在某些实施方式中,免疫球蛋白的Fc结构域是IgG1免疫球蛋白的Fc结构域。在某些实施方式中,可溶性ENPP1多肽在C端与人免疫球蛋白1(IgG1)、人免疫球蛋白2(IgG2)、人免疫球蛋白3(IgG3)和/或人免疫球蛋白4(IgG4)的Fc结构域融合。在其他实施方式中,可溶性ENPP1多肽在N端与人免疫球蛋白1(IgG1)、人免疫球蛋白2(IgG2)、人免疫球蛋白3(IgG3)和/或人免疫球蛋白4(IgG4)的Fc结构域融合。在一些实施方式中,Fc结构域的存在改善了半衰期、可溶性、减少了免疫原性,并增加了可溶性ENPP1多肽的活性。在某些实施方式中,原生人类IgG蛋白的部分(IgG1、IgG2、IgG3和IgG4)可用于Fc部分(例如ENPP1-Fc)。例如,本公开内容提供的融合蛋白包括与包含免疫球蛋白恒定结构域的多肽融合的ENPP1,所述恒定结构域例如源自人IgG1、IgG2、IgG3和/或IgG4的CH1、CH2或CH3结构域。Fc片段可包括原生IgG的区域,如铰链区(根据Rabat编号系统,人IgG1的残基216-230)、整个第二恒定结构域CH2(残基231-340)和第三恒定结构域CH3(残基341-447)。如本文所用,术语“ENPP1-Fc构建体”是指ENPP1的可溶性形式(例如,ENPP1多肽的细胞外结构域),其与IgG分子(优选为人IgG)的FcR结合结构域重组融合和/或化学缀合(包括共价和非共价缀合)。在某些实施方式中,ENPP1的C端与FcR结合结构域的N端融合或缀合。

[0208] 可用于人IgG1的Fc部分(G1Fc)的氨基酸序列的实例是SEQ ID NO:6(表1)。部分地,本公开内容提供了包括以下、基本由以下组成或由以下组成的多肽:与SEQ ID NO:6具有70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。

[0209] 在一些实施方式中,异源蛋白部分包括选自以下的一个或多个结构域:聚组氨酸、FLAG标签、Glu-Glu、谷胱甘肽S-转移酶(GST)、硫氧还蛋白、蛋白A、蛋白G、免疫球蛋白重链恒定区(Fc)、麦芽糖结合蛋白(MBP)或人血清白蛋白。融合结构域可以被选择,以赋予所期望的性质。例如,一些融合结构域对通过亲和色谱分离融合蛋白特别有用。为了亲和纯化的目的,使用相关的亲和色谱基质,如谷胱甘肽、淀粉酶、镍或钴缀合的树脂。许多这样的基质以“试剂盒”形式提供,如Pharmacia GST纯化系统和QIAexpress™系统(Qiagen),可供(HIS₆)融合伴侣使用。作为另一个实例,可以选择融合结构域,以促进ENPP1多肽的检测。这种检测结构域的实例包括多种荧光蛋白(如GFP)以及“表位标签”,这通常是短肽序列,特异性抗体对其是可用的。特异性单克隆抗体可容易可用的熟知的表位标签包括FLAG、流感病毒血凝素(HA)和c-myc标签。在一些实施方式中,融合结构域具有蛋白酶裂解位点,例如因子Xa或凝血酶,这使得相关的蛋白酶部分地消化融合蛋白,从而将重组蛋白从其中释放出来。然后,通过随后的色谱分离,可以将释放的蛋白质从融合结构域中分离出来。

[0210] 5. 接头

[0211] 在一些实施方式中,ENPP1融合蛋白进一步包括定位在ENPP1多肽结构域和一个或

多个异源蛋白部分(例如,Fc免疫球蛋白结构域)之间的接头(Z)。在某些实施方式中,可溶性ENPP1多肽直接或间接地与Fc结构域融合。在一些实施方式中,可溶性ENPP1融合蛋白包括Fc结构域和ENPP1多肽之间的接头。在一些实施方式中,接头可以是包括1-200个氨基酸的氨基酸间隔物。合适的肽间隔物是本领域已知的,例如包括含有挠性氨基酸残基如甘氨酸、丙氨酸和丝氨酸的肽接头。

[0212] 在一些实施方式中,接头包括聚甘氨酸接头或Gly-Ser接头。在一些实施方式中,间隔物可以包含下述的基序,例如多个或重复基序: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)或SGGG (SEQ ID NO:37)。在一些实施方式中,间隔物可以包含2至12个氨基酸,包括GA或GS的基序,例如GA、GS、GAGA (SEQ ID NO:38)、GSGS (SEQ ID NO:39)、GAGAGA (SEQ ID NO:40)、GSGSGS (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)和GSGSGSGSGSGS (SEQ ID NO:47)。在一些实施方式中,间隔物可以包含3至12个氨基酸,包括GGA或GGS的基序,例如GGA、GGS、GGAGGA (SEQ ID NO:48)、GGS GGS (SEQ ID NO:49)、GGAGGAGGA (SEQ ID NO:50)、GGS GGS GGS (SEQ ID NO:51)、GGAGGAGGAGGA (SEQ ID NO:52)和GGS GGS GGS GGS (SEQ ID NO:53)。在还有一些实施方式中,间隔物可以包含4至12个氨基酸,包括GGAG (SEQ ID NO:54)、GGSG (SEQ ID NO:55)的基序,例如GGAG (SEQ ID NO:56)、GGSG (SEQ ID NO:57)、GGAGGGAG (SEQ ID NO:58)、GGS GGS GGS (SEQ ID NO:59)、GGAGGGAGGGAG (SEQ ID NO:60)和GGS GGS GGS GGS GGS (SEQ ID NO:61)。在一些实施方式中,间隔物可以包含GGGGA (SEQ ID NO:62)或GGGGS (SEQ ID NO:63)的基序,例如GGG GAGGGGAGGGGA (SEQ ID NO:64)和GGG GSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:65)。在本发明的一些实施方式中,异源蛋白部分(例如,Fc结构域单体、野生型Fc结构域、具有氨基酸取代的Fc结构域(例如,可减少二聚化的一个或多个取代)、白蛋白结合肽、纤连蛋白结构域或人血清白蛋白)和可溶性ENPP1多肽之间的氨基酸间隔物可以是GGG、GGGA (SEQ ID NO:27)、GGGG (SEQ ID NO:29)、GGGAG (SEQ ID NO:66)、GGGAGG (SEQ ID NO:67)或GGGAGGG (SEQ ID NO:68)。

[0213] 在一些实施方式中,间隔物也可以包含除甘氨酸、丙氨酸和丝氨酸以外的氨基酸,例如,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)、KESGVSSEQLAQFRSLD (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)、GGS GGS GGS GGS GGS GGS GGS GGS GGS GGS (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)、EEEEEEPRGDT (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)、LVIMSLGLGLGLRLK (SEQ ID NO:100)、VIMSLGLGLGLRLK

(SEQ ID NO:101)、IMSLGLGLGLRK (SEQ ID NO:102)、MSLGLGLGLRK (SEQ ID NO:103)、SLGLGLGLRK (SEQ ID NO:104)、LGLGLGLRK (SEQ ID NO:105)、GLGLGLRK (SEQ ID NO:106)、LGLGLRK (SEQ ID NO:107)、GLGLRK (SEQ ID NO:108)、LGLRK (SEQ ID NO:109)、GLLRK (SEQ ID NO:110)、LGLRK (SEQ ID NO:111)、GLRK (SEQ ID NO:112)、LRK (SEQ ID NO:113)、RK (SEQ ID NO:114) 或 $(K)_m$; $m=1-15$ (SEQ ID NO:115)。在一些实施方式中,间隔物可以包含EAAAK (SEQ ID NO:85)的基序,例如多个或重复的基序。在一些实施方式中,间隔物可以包含富含果仁糖序列的基序,例如多个或重复的基序,所述富含果仁糖序列例如 $(XP)_n$,其中X可以是任何氨基酸(例如A、K或E), n 是1-5,以及PAPAP (SEQ ID NO:86)。

[0214] 肽间隔物的长度和使用的氨基酸可以根据所涉及的两种蛋白质和最终蛋白质融合多肽所需的挠性程度来调整。间隔物的长度可以调整,以确保适当的蛋白质折叠并避免聚集体形成。

[0215] 在一些实施方式中,融合蛋白(如免疫球蛋白Fc融合蛋白)的不同元件可以以与所期望功能一致的任何方式排列。例如,可溶性ENPP1多肽结构域可以置于异源蛋白部分的C端,或可选的,异源蛋白部分可以置于可溶性ENPP1多肽结构域的C端。可溶性ENPP1多肽结构域和异源蛋白部分可以直接或间接地连接在融合蛋白中,另外的结构域或氨基酸序列可以包括在任一结构域的C端或N端或结构域之间。优选的融合蛋白包括SEQ ID NO:3-5中任何一个列出的氨基酸序列。

[0216] 在一些实施方式中,本公开内容的可溶性ENPP1多肽含有一个或多个异源部分。任选地,可溶性ENPP1多肽包括选自以下的一个或多个异源部分:糖基化的氨基酸、PEG化的氨基酸、法尼基化的氨基酸、乙酰化的氨基酸、生物素化的氨基酸、与脂质部分缀合的氨基酸和与有机衍生剂缀合的氨基酸。在一些实施方式中,本文公开的可溶性ENPP1多肽被进一步修饰。这种修饰包括但不限于乙酰化、羧化、糖基化、磷酸化、脂化和酰化。因此,可溶性ENPP1多肽可能含有非氨基酸元件,如聚乙二醇、脂类、多糖或单糖和磷酸盐。这种非氨基酸元件对可溶性ENPP1多肽功能的影响可按本文对其他可溶性ENPP1多肽的描述进行测试。当本公开内容的多肽在细胞中通过裂解多肽的新生形式产生时,翻译后加工对于蛋白质的正确折叠和/或功能也可能是重要的。不同的细胞(如CHO、HeLa、MDCK、293、WI38、NIH-3T3或HEK293)对这种翻译后活性有特定的细胞机器和特征机构,可选择不同的细胞以确保可溶性ENPP1多肽的正确修饰和加工。

[0217] 如本文所用,多肽序列和参考序列之间的“同一性”百分比定义为在比对序列并引入间隙(如果有必要的话)以达到最大的序列同一性百分比之后,多肽序列中与参考序列中的氨基酸残基相同的氨基酸残基的百分比。为确定氨基酸序列同一性百分比的目的而进行的比对可以通过本领域技术人员的多种方式实现,例如,使用公开可得的计算机软件,例如BLAST、BLAST-2、ALIGN、MEGALIGN(DNASTAR)、CLUSTALW或CLUSTAL OMEGA软件。在一些实施方式中,使用CLUSTAL OMEGA软件进行比对。本领域的技术人员可以确定比对序列的适当参数,包括在被比较的序列的全长上实现最大的比对所需的任何算法。

[0218] 6. 确定可溶性

[0219] 在一些实施方式中,可溶性ENPP1多肽的活性也可以在基于细胞或体内的试验中进行测试。例如,可以测量可溶性ENPP1多肽对无机焦磷酸盐(PPi)产生的影响。具体来说,ENPP1蛋白的焦磷酸酶/磷酸二酯酶结构域水解细胞外核苷酸三磷酸酯以产生无机焦磷酸

盐 (PPi), 并且通常是可溶的。这种活性可以使用pNP-TMP试验以及基于HPLC的ATP水解试验来测量, 如前所述 (Saunders等人, *Mol. Cancer Ther.* 7 (10):3352-62; Albright et al., 2015, *Nat Comm.* 6:10006)。可以评估可溶性ENPP1多肽对参与ENPP1相关疾病例如ARHR2的基因表达的影响 (例如成纤维细胞生长因子23在成骨细胞和破骨细胞的转录)。这可以根据需要在一种或多种核苷酸三磷酸酯或其他ENPP1底物的存在下进行, 细胞可以被转染以便产生可溶性ENPP1多肽。同样, 可溶性ENPP1多肽可被施用至小鼠或其他动物, 并且对ENPP1相关疾病的影响可使用本领域公认的方法进行评估。

[0220] 在一些实施方式中, 根据本文所述方法使用的ENPP1多肽是分离的多肽。如本文所用, 分离的蛋白质或多肽是指已经与其自然环境的组分分开的蛋白质或多肽。在一些实施方式中, 本发明内容的多肽被纯化到大于95%、96%、97%、98%或99%的纯度, 如通过例如电泳 (例如SDS-PAGE、等电聚焦 (IEF)、毛细管电泳) 或色谱 (例如离子交换或反相HPLC) 分析确定的。评估纯度的方法在本领域是众所周知的 [见, 例如, Flatman等人, 2007, *J. Chromatogr. B* 848:79-87]。在一些实施方式中, 根据本文所述的方法使用的可溶性ENPP1多肽是重组多肽。

[0221] 7. ENPP1生产

[0222] 本公开内容的ENPP1多肽可以通过多种本领域已知的技术生产。例如, 可以使用标准的蛋白质化学技术合成本公开内容的多肽, 如Bodansky, *Principles of Peptide Synthesis*, Springer Verlag, Berlin (1993) 和Grant G.A. (ed.), *Synthetic Peptides: A User's Guide*, W.H. Freeman and Company, New York (1992) 中描述的。此外, 自动多肽合成仪是商业上可购的 (例如Advanced ChemTech Model 396; Milligen/Bioscience 9600)。可选地, 本公开内容的多肽, 包括其片段或变体, 可以使用多种表达系统 [例如大肠杆菌、中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞、COS细胞、杆状病毒、毕赤酵母] 重组生产, 这在本领域是众所周知的。该蛋白可以在贴壁细胞或悬浮细胞中生产。在一些实施方式中, 融合蛋白在CHO细胞中表达。为了建立稳定的细胞系, 将编码ENPP1构建体的核酸序列克隆到适当的载体中, 以用于大规模的蛋白质生产。在某些实施方式中, 可通过使用例如蛋白酶, 例如胰蛋白酶、嗜热菌蛋白酶、糜蛋白酶、胃蛋白酶或配对碱性氨基酸转化酶 (PACE) 消化重组产生的全长ENPP1多肽来生产本公开内容的修饰的或未修饰的多肽。计算机分析 (使用商业上可售的软件, 例如MacVector, Omega, PCGene, Molecular Simulation, Inc.) 可以用来鉴定蛋白酶水解裂解位点。可选地, 这种多肽可以使用化学裂解法 (例如溴化氰、羟胺等) 从重组生成的全长ENPP1多肽中产生。

[0223] 8. 表达系统

[0224] 已知许多表达系统并且可用于生产ENPP1融合蛋白, 包括细菌 (例如大肠杆菌和枯草芽孢杆菌)、酵母 (例如酿酒酵母、乳酸克鲁维酵母和巴斯德毕赤酵母)、丝状真菌 (例如曲霉)、植物细胞、动物细胞和昆虫细胞。所期望的蛋白质可以以常规方式产生, 例如从插入宿主染色体中或游离质粒上的编码序列产生。

[0225] 可以用任何通常的方式 (例如电穿孔), 用期望蛋白质的编码序列转化酵母。通过电穿孔转化酵母的方法在Becker和Guarente, 1990, *Methods Enzymol.* 194:182中公开。成功转化的细胞, 即含有本公开内容的DNA构建体的细胞, 可以通过众所周知的技术进行鉴定。例如, 引入表达构建体所产生的细胞可以生长以生产ENPP1多肽。可以收获细胞并进行

裂解,并使用诸如Southern,1975,J.Mol.Biol.98:503和/或Berent等人,1985,Biotech 3:208中描述的方法检查细胞的DNA含量,以检测DNA的存在。可选地,可以使用抗体检测上清液中蛋白质的存在。

[0226] 有用的酵母质粒载体包括pRS403-406和pRS413-416,并且通常可从Stratagene Cloning Systems,La Jolla,CA,USA获得。质粒pRS403、pRS404、pRS405和pRS406是酵母整合质粒(Yip),并且并入了酵母选择性标记I-11S3、TRP1、LEU2和IJRA3。质粒pRS413-416是酵母着丝粒质粒(YCp)。

[0227] 已经开发了多种方法来通过互补的粘性末端将DNA与载体可操作地连接。例如,可以将互补的均聚物束(homopolymer tract)添加到DNA区段中以插入到载体DNA中。然后通过互补的均聚物尾之间的氢键将载体和DNA区段连接起来以形成重组DNA分子。

[0228] 含有一个或多个限制性位点的合成接头提供了将DNA区段连接到载体的可选方法。通过内切核酸酶限制性消化生成的DNA区段用噬菌体T4 DNA聚合酶或大肠杆菌DNA聚合酶I处理,这些酶是去除具有其3'-5'-外切核酸酶活性的突出的3'-单链末端,并利用其聚合活性填充凹入的3'-末端的酶。

[0229] 这些活性的组合因此生成了平端DNA区段。然后在能够催化平端DNA分子的连接的酶(例如,噬菌体T4 DNA连接酶)的存在下,将平端区段与大量摩尔过量的接头分子一起温育。结果是,反应的产物是在其末端带有聚合接头序列的DNA区段。这些DNA区段可以用适当的限制性内切酶裂解,并连接至表达载体,该表达载体已被产生与DNA区段末端相容的末端的酶裂解。

[0230] 然后建立单个稳定转染的细胞的克隆,并筛选期望ENPP1融合蛋白的高表达克隆。可以在96孔板中以高通量方式使用如前所述的合成酶底物pNP-TMP(Albright等人,2015,Nat.Comm.6:10006)完成筛选ENPP1蛋白表达的单细胞克隆。通过筛选鉴定高表达克隆后,蛋白质生产可以在摇瓶或生物反应器中完成,如在Albright等人,2015,Nat.Comm.6:10006中描述的。

[0231] 9.ENPP1纯化

[0232] ENPP1的纯化可以使用本领域已知的标准纯化技术组合来完成。纯化后,可以将ENPP1-Fc透析至补充有 Zn^{2+} 和 Mg^{2+} 的浓缩至5和7mg/ml之间的PBS(PBSplus),并以200-500p1的等分试样在-80℃下冷冻。就在使用前可以将等分部分融化,并通过在PBSplus中稀释可以将溶液的比活性调节至31.25au/ml(或约0.7mg/ml,这取决于制剂)。

[0233] 10.施用途和频率

[0234] 多肽可以急性或慢性地施用至受试者。在某些实施方式中,在大约两天后、四天后、一周后或一个月后的适当时间间隔后对受试者施用本文公开的可溶性ENPP1多肽或ENPP1融合多肽的第二剂量,或甚至更少的频率,如每几个月一次或甚至一年一次或更少。剂量的频率对技术人员来说是显而易见的,并取决于任何数量的因素,例如,但不限于,被治疗疾病的类型和严重程度,以及患者的类型和年龄。

[0235] 可以选择剂量的量或频率以使血浆PPi的稳态水平保持在恒定或稳态水平,和/或使血浆PPi的持续水平接近正常PPi水平(2-3 μ M)或高于正常PPi水平(比其高30-50%),并且不返回到受试者在施用本文公开的第一剂量构建体之前的较低PPi水平。

[0236] 可选地,ENPP1剂可以以每2天,或每4天,每周或每月的适当时间间隔施用,以达到

ENPP1的酶活性的恒定水平。

[0237] 可选地,通过监测受试者的疾病或障碍的一个或多个症状,以每2天、或每4天、或每周或每月的适当时间间隔施用根据本公开内容的ENPP1剂。

[0238] 在不希望受理论约束的情况下,相信将血浆PPi的稳态浓度维持在正常水平减少和/或防止受试者的病理性钙化的进展。

[0239] 在某些实施方式中,多肽被局部、区域、肠胃外或全身地施用至受试者。在一些实施方式中,多肽被皮下施用。

[0240] 如本文所用,制剂的“肠胃外施用”包括特征在于以受试者组织的物理破坏和通过组织中的该破坏施用ENPP1剂的任何施用途径。因此,肠胃外施用包括但不限于通过注射组合物、通过手术切口施加组合物、通过穿透组织的非手术伤口施加组合物等来施用ENPP1剂。具体地,考虑肠胃外施用包括但不限于皮下、静脉内、腹膜内、肌肉、胸骨内(intrasternal)注射和肾透析输注技术。

[0241] 施用方案可能会影响有效量的构成。例如,可以在一个给定的时间段(每天)或依次施用几个分割的剂量以及交错的剂量,也可以连续输注剂量,或可以是弹丸注射。此外,ENPP1剂的所述剂量的选择可通过治疗或预防情况的紧迫性来指示。

[0242] 对患者,例如哺乳动物(即人类)施用本公开内容的组合物(例如可溶性ENPP1多肽及其融合蛋白),可使用已知的程序,以有效来治疗患者的疾病或障碍的剂量和时间段来进行。为达到治疗效果所需的ENPP1剂的所述剂量的有效量可根据以下因素而变化,例如所采用的具体化合物的活性;施用时间;化合物的排泄率;治疗持续时间;与化合物组合使用的其他药物、化合物或材料;被治疗的患者的疾病或障碍状态、年龄、性别、体重、状况、一般健康情况和先前的病史,以及医学领域中众所周知的类似因素。可以调整剂量方案以提供最佳的治疗反应。选定剂量是基于治疗性化合物的生物活性来确定的,而生物活性又取决于半衰期和治疗性化合物曲线的血浆时间下面积。

[0243] 11. 预防性施用

[0244] 通过本文公开内容,本领域的技术人员将理解,防止受试者的疾病或障碍包括向受试者施用ENPP1多肽作为疾病或障碍的预防性措施。

[0245] 活性成分(例如,可溶性ENPP1多肽及其融合蛋白)、药学上可接受的运载体以及本文公开的制剂中的任何另外的成分的相对数量将有所不同,这取决于被治疗的受试者的身份、大小和病症,并进一步取决于组合物被施用的途径。举例来说,组合物可包括约0.1%至约100% (w/w) 之间的活性成分。

[0246] 12. ENPP1多肽序列

[0247] 表1:序列

[0248]

SEQ ID NO	序列	描述
1	1 MERDGCAGGG SRGGEGGRAP REGPAGNGRD RGRSHAAEAP GDPQAAASLL 51 APMDVGEEPL EKAARARTAK DPNTYKVLST VLSVCVLTIT LGCIFGLKPS 101 CAKEVKSCCKG RCFERTFGNC RCDAACVELG NCCLDYQETC IEPEHIWTCN 151 KFRCGEKRLT RSLCACSDDC KDKGDCCINY SSVQCGEKSW VEEPCESINE 201 PQCPAGFETP PTLLFSLDGF RAEYLHTWGG LLPVISKLKK CGTYTKNMRP 251 VYPTKTFFPNH YSIVTGLYPE SHGIIDNKMY DPKMNASFSL KSKEKFNPEW 301 YKGEPIWVTA KYQGLKSGTF FWPFGSDVEIN GIFPDIYKMY NGSVVPFEERI 351 LAVLQWLQLP KDERPHFYTL YLEEDPDSSGH SYGVPVSSEVI KALQVRVDMV 401 GMLMDGLKEL NLHRCLNLIL ISDHGMEQGS CKKYIYLNKY LGDVKNIKVI 451 YGPAARLRPS DVPDKYYSFN YEGIAARNLSC REPNOHFHPY LKHFLPKRLH 501 FAKSDRIEPL TFYLDPOWQL ALNPSEKRYC GSGFHGSDNV FSNMQALFVG 551 YGPGFKHGIE ADTFENIEVY NLMCDLLNLT PAPNNGTHGS LNHLLKNPVY 601 TPKHPKEVHP LVQCPFTRNP RDNLCGSCNP SILPIEDFQT QFNLTVAEEK 651 IIKHETLPYG RPRVLQKENT ICLLSQHQFM SGYSQDILMP LWTSTVDRN 701 DSFSTEDFSN CLYQDFRIPL SPVHKCSFYK NNTKVSYGFL SPFQLNKNSS 751 GIYSEALLTT NIVPMYQSFO VIWRYFHDIT LRYAEERNNG VNVVSGPVFD 801 FDYDGRCDL ENLRQKRRVI RNQEILIPTH FFIVLTSCKD TSQTLPHCEN 851 LDTLAFILPH RTDNSESCVH GKHDSSWVEE LLMLHRARIT DVEHITGLSF 901 YQQRKEPVSD ILKLKTHLPT FSQED	野生型 ENPP1 前体蛋白的完全的、未加工的氨基酸序列
2	1 PSCAKEVKSC KGRCFERTFG NCRCDAAVE LGNCCLDYQE TCIEPEHIWT 51 CNKFRCGEKR LTRSLCACSD DCKDKGDCCI NYSSVCQGEK SWVEEPCESI 101 NEPQCPAGFE TPPTLLFSLD GFRAEYLHTW GGLLPVISKL KCGTYTKNM 151 RPVYPTKTFP NHYSIVTGLY PESHGIIDNK MYDPKMNASF SLKSKEKFN 201 EWKGEPIWV TAKYQGLKSG TFFWPGSDVE INGIFPDIYK MYNGSVPFEE 251 RILAVLQWLQ LPKDERPHFY TLYLEEDPDSS GHSYGPVSSE VIKALQVRD 301 MVGMLMDGLK ELNLHRCLNL ILISDHGMEQ GSCKKYIYLN KYLGDVKNIK 351 VIYGPAARLR PSDVPDKYYS FNYEGIAARNL SCREPNOHFK PYLKHFLPKR 401 LHFASDRIE PLTFYLDPOW QLALNPSEK YCGSGFHGSD NVFSNMQALF 451 VGYGPGFKHG IEADTFENIE VYNLMCDLLN LTPAPNNGTH GSNLHLLKNP 501 VYTPKHPKEV HPLVQCPFTR NPDNLGCSC NPSILPIEDF QTQFNLTVAE 551 EKIIKHETLP YGRPRVLQKE NTICLLSQHQ FMSGYSQDIL MPLWTSYTV 601 RNSFSSTEDF SNCLYQDFRI PLSPVHKCSF YKNNTKVSYG FLSPPLNKN 651 SSGIYSEALL TTNIVPMYQS FQVIWRYFHD TLLRKYAEER NGVNVVSGPV 701 FDFDYDGRCD SLENLRQKRR VIRNQEILIP THFFIVLTSC KDTSTPLHC 751 ENLDTLAFIL PHRTDNSESC VHGHKHDSSWV EELLMLHRAR ITDVEHITGL 801 SFYQQRKEPV SDILKLKTHL PTFSQED	加工的(成熟的)细胞外 ENPP1 多肽序列
3	FTAGLKPSCAKEVKSCCKGRCFERTFGNCRCDAAACVELGNCCLDYQETCIEPEHIWTCNKF RCGEKRLTRSLCACSDCKDKGDCCINYSSVCQGEKSWVEEPCESINEPQCPAGFETPPT LLFSLDGFRAEYLHTWGGLLPVISKLKCGTYTKNMRPVYPTKTFFPNHYSIVTGLYPESH GIIDNKMYDPKMNASFSLKSKEKFNPEWYKGEPIWVTAKYQGLKSGTFFWPGSDVEINGI FDPDIYKMYNGSVVPFEERILAVLQWLQLPKDERPHFYTYLEEDPDSSGHSYGPVSSEVIK LQVRVDMVGMLMDGLKELNLHRCLNLILISDHGMEQGSCKKYIYLNKYLGDKVKNIKVIY GPAARLRPSDVPDKYYSFNIEGIAARNLSCREPNOHFKPYLKHFLPKRLHFAKSDRIEPLTF YLDPQWQLALNPSEKRYCGSGFHGSDNVFSNMQALFVGYPGFKHGIEADTFENIEVYNL MCDLLNLTAPNNGTHGSNLHLLKNPVYTPKHPKEVHPLVQCPFTRNPDNLGCSCNPSI LPIEDFQTQFNLTVAEEKIIKHETLPYGRPRVLQKENTICLLSQHQFMSGYSQDILMPLW TSYTVDRNDSFSTEDFSNCLYQDFRIPLSPVHKCSFYKNNTKVSYGFLSPPLNKNSSGI YSEALLTTNIVPMYQSFOVIWRYFHDITLLRKYAEERNGVNVVSGPVFDYDGRCDLEN	ENPP1-接头-hIgG1 Fc 构建体

[0249]

	LRQKRRVIRNQEILIPTHFFIVLTSCKDTSTQPLHCENLDTLAFILPHRTDNSESCVHGK HDSWVEELMLHRARITDVEHITGLSFYQQRKEPVSILKLKTHLPTFSQEDLINDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPPKPDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYITLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
4	GLKPSCAKEVKSCKGRFCERTFGNCRDAACVELGNCCLDYQETCIEPEHIWTCNKFRCG EKRLTRSLCACSDCKDKGDCCINYSVCQGEKSWVEEPCESINEPQCPAGFETPPTLLF SLDGFRAEYLHTWGLLPVISLKLKCGTYTKNMRPVYPTKTFPNHYSIVTGLYPESHGII DNKMYDPKMNASFSLKSKEKFNPEWYKGEPIWVTAKYQGLKSGTFFWPGSDVEINGIFPD IYKMYNGSVPFEEERILAVLQWLQLPKDERPHFYTLYLEEPDSSGHSYGPVSSEVIKALQR VDGMVGMMLDGLKELNLHRCNLILISDHGMEQGSCKKYIYLNKYLGDVKNIKVIYGPAAR RLRPSDVPDKYYSFNYEGIAARNLSREPNQHFYKPYLKHFLPKRLHFAKSDRIEPLTFYLD PQWQLALNPSEKRYCGSGFHGSDNVFSNMQALFVGYPGPKHGIEADTFENIEVYNLMCD LLNLTAPANNTHGSLNHLKPNVYTPKHKEVHPLVQCPFTTRNPRDNLGCSCNPSILPI EDFQTFNLTVAAEKIKHETLPGYGRPRVLQKENTICLLSQHQFMSGYSQDILMPLWTSY TVDRNDSFSTEDFSNCLYQDFRIPLSPVHKCSFYKNNTKVSYGFLSPPQLNKNSSGIYSE ALLTTNIVPMYQSFQVIWRYFHDTLRLKYAEERNGVNVVSGPVDFDYDGRCDLENLRQ KRRVIRNQEILIPTHFFIVLTSCKDTSTQPLHCENLDTLAFILPHRTDNSESCVHGKHDS SWVEELMLHRARITDVEHITGLSFYQQRKEPVSILKLKTHLPTFSQEDLINDKTHTCPP CPAPELLGGPSVFLFPPPKPDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYITLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	ENPP1-接头-hIgG1 Fc 构建体
5	PSCAKEVKSCKGRFCERTFGNCRDAACVELGNCCLDYQETCIEPEHIWTCNKFRCGEKR LTRSLCACSDCKDKGDCCINYSVCQGEKSWVEEPCESINEPQCPAGFETPPTLLFSLD GFRAEYLHTWGLLPVISLKLKCGTYTKNMRPVYPTKTFPNHYSIVTGLYPESHGII MYDPKMNASFSLKSKEKFNPEWYKGEPIWVTAKYQGLKSGTFFWPGSDVEINGIFPDYK MYNGSVPFEEERILAVLQWLQLPKDERPHFYTLYLEEPDSSGHSYGPVSSEVIKALQRVDG MVGMLDGLKELNLHRCNLILISDHGMEQGSCKKYIYLNKYLGDVKNIKVIYGPAARLR PSDVPDKYYSFNYEGIAARNLSREPNQHFYKPYLKHFLPKRLHFAKSDRIEPLTFYLDQW QLALNPSEKRYCGSGFHGSDNVFSNMQALFVGYPGPKHGIEADTFENIEVYNLMCDLLN LTPAPNNGTHGSLNHLKPNVYTPKHKEVHPLVQCPFTTRNPRDNLGCSCNPSILPIEDF QTFNLTVAAEKIKHETLPGYGRPRVLQKENTICLLSQHQFMSGYSQDILMPLWTSYTV RNDSTEDFSNCLYQDFRIPLSPVHKCSFYKNNTKVSYGFLSPPQLNKNSSGIYSEALL TTNIVPMYQSFQVIWRYFHDTLRLKYAEERNGVNVVSGPVDFDYDGRCDLENLRQKRR VIRNQEILIPTHFFIVLTSCKDTSTQPLHCENLDTLAFILPHRTDNSESCVHGKHDSWV EELMLHRARITDVEHITGLSFYQQRKEPVSILKLKTHLPTFSQEDLINDKTHTCPPCP APELLGGPSVFLFPPPKPDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY ITLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	ENPP1-接头-hIgG1 Fc 构建体
6	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPPKPDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYITLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	人 IgG1 Fc
118	X- PSCAKEVKSCKGRFCERTFGNCRDAACVELGNCCLDYQETCIEPEHIWTCNKFRCGEKR LTRSLCACSDCKDKGDCCINYSVCQGEKSWVEEPCESINEPQCPAGFETPPTLLFSLD GFRAEYLHTWGLLPVISLKLKCGTYTKNMRPVYPTKTFPNHYSIVTGLYPESHGII MYDPKMNASFSLKSKEKFNPEWYKGEPIWVTAKYQGLKSGTFFWPGSDVEINGIFPDYK MYNGSVPFEEERILAVLQWLQLPKDERPHFYTLYLEEPDSSGHSYGPVSSEVIKALQRVDG MVGMLDGLKELNLHRCNLILISDHGMEQGSCKKYIYLNKYLGDVKNIKVIYGPAARLR PSDVPDKYYSFNYEGIAARNLSREPNQHFYKPYLKHFLPKRLHFAKSDRIEPLTFYLDQW QLALNPSEKRYCGSGFHGSDNVFSNMQALFVGYPGPKHGIEADTFENIEVYNLMCDLLN LTPAPNNGTHGSLNHLKPNVYTPKHKEVHPLVQCPFTTRNPRDNLGCSCNPSILPIEDF QTFNLTVAAEKIKHETLPGYGRPRVLQKENTICLLSQHQFMSGYSQDILMPLWTSYTV RNDSTEDFSNCLYQDFRIPLSPVHKCSFYKNNTKVSYGFLSPPQLNKNSSGIYSEALL TTNIVPMYQSFQVIWRYFHDTLRLKYAEERNGVNVVSGPVDFDYDGRCDLENLRQKRR VIRNQEILIPTHFFIVLTSCKDTSTQPLHCENLDTLAFILPHRTDNSESCVHGKHDSWV EELMLHRARITDVEHITGLSFYQQRKEPVSILKLKTHLPTFSQEDRSDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPPKPDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYITL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK-Y	BL-1118 (长效)

[0250]

119	X- PSCAKEVKSCKGRCFERTFGNCRCDAAACVELGNCCLDYQETCIEPEHIWTCNKFRGCEKR LTRSLCACSDCKDKGDCCINYSSVCQGEKSWVEEPCESINEPQCPAGFETPPTLLFSLD GFRAEYLHTWGGLLPVISKLKCGTYTKNMRPVYPTKTFPNHYSIVTGLYPESHGIIDNK MYDPKMNASFSLKSKEKFNPWEYKGEPIWVTAKYQGLKSGTFFWPGSDVEINGIFPDYK MYNGSVPFEERILAVLQWLQPKDERPHFYTLYLEEPDSSGHSYGPVSSEVIKALQVRVDG MVGMLMDGLKELNHLRCLNLILISDHGMEQGSCKKYIYLNKYLGDVKNIKVIYGPAARLR PSDVPDKYYSFNYEGIARNLSREPNQHFKPYLKHFLPKRLHFAKSDRIEPLTFYLDPOW QLALNPSEKCYCGSGFHGSDNVFSNMQALFVGYGPGFKHGEADTFENIEVYNLMCDLLN LTPAPNNGTHGSLNHLKPNVYTPKHPKEVHPLVQCPTFRNPRDNLGCSCNPSILPIEDF QTQFNLTVAEEKI IKHETLPYGRPRVLQKENTICLLSQHQFMSGYSDILMPLWTSYTV RNDSTFSTEDFSNCLYQDFRIPSPVHKCSFYKNNTKVSYGFLSPPQLNKNSSGIYSEALL TTNIVPMYQSFQVIWRYFHDTLRLKYAEERNGVNVVSGPVDFDYDGRCDSENLRQKRR VIRNQEILIPTHFFIVLTSCKDTSTQPLHCENLDTLAFILPHRTDNSESCVHGKHDSSWV EELLMLHRARITDVEHITGLSFYQQRKEPVS DILKLTHTLPTFSQEDRS DKHTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK-Y	BL-782
-----	--	--------

[0251] 对于SEQ ID NO:118和119:

[0252] X=输出序列

[0253] Y=骨靶向标签或终止密码子(即没有氨基酸,如通过*标记的)

[0254] 骨靶向序列的非限制性实例包括但不限于DDDDDDDD和/或EEEEEEEE。

[0255] 非粗体、非下划线字体=接头区域,其可以是多种长度等。接头的氨基酸组成可以是可变的。在某些非限制性的实施方式中,接头区域可以包括残基,如组氨酸,以阻止非特异性蛋白酶裂解(即HS或HG而不是RS或RG)。

[0256] 粗体字体=人IgG1(在BL-1118中优化,其中M883Y S885T T887E突变以粗斜体字突出显示)

[0257] 下划线字体=人ENPP1的细胞外结构域(在BL-1118中优化,其中I256T的取代用粗体下划线突出显示)

[0258] SEQ ID NO:7(小鼠ENPP1-NCBI登录号NP_001295256.1)

1 MERDGDQAGH GPRHGSAGNG RELESPAAAS LLAPMDLGEE PLEKAERARP AKDPNTYKVL
61 SLVLSVCVLT TILGCIFGLK PSCAKEVKSC KGRCFERTFS NCRCDAA CVS LGNCCLDYQ
121 TCVEPHTIWT CNKFRGCEKR LSRFVCSCAD DCKTHNDCCI NYSSVCQDKK SWVEETCESI
181 DTPECPAEFE SPPTLLFSLD GFRAEYLHTW GGLLPVISKL KNCGYTYTKN RPMYPTKTFP
241 NHYSIVTGLY PESHGIIDNK MYDPKMNASF SLKSKEKFNP LWYKGQPIWV TANHQEVKSG
301 TYFWPGSDVE IDGILPDIYK VYNGSVPFEE RILAVLEWLQ LPSHERPHFY TLYLEEPDSS
361 GHSHGPVSSE VIKALQKVDR LVGMLMDGLK DLGLDKCLNL ILISDHGMEQ GSCKKYVYLN
[0259] 421 KYLGDVNNVK VYVGPAARLR PTDVPETYYS FNYEALAKNL SCREPNQHFR PYLKPFLPKR
481 LHFASDRIE PLTFYLDPOW QLALNPSEK YCGSGFHGSD NLFSNMQALF IGYGPAFKHG
541 AEVDSFENIE VYNLMCDLLG LIPAPNNGSH GSLNHLKPK IYNPSHPKEE GFLSQCPKIS
601 TSNDLGCTCD PWIVPIKDFE KQLNLTEDV DDIYHMTVPY GRPRILLKQH RVCLLQQQQF
661 LTGYSLDLLM PLWASYTFLS NDQFSRDDFS NCLYQDLRIP LSPVHKCSYY KSNKLSYGF
721 LTPPRLNRVS NHIYSEALLT SNIVPMYQSF QVIWHYLHDT LLQRYAHERN GINVVSGPVF
781 DFDYDGRYDS LEILKQNSRV IRSQEILIPT HFFIVLTSCQ QLSETPLECS ALESSAYILP
841 HRPDNIESCT HGKRESSWVE ELLTLHRARV TDVELITGLS FYQDRQESVS ELLRLKTHLP
901 IFSQED

[0260]

[0261] SEQ ID NO:8(牛ENPP1-NCBI登录号NP_001193141.1)

- [0262] 1 MERDSCAGGG SRGGEGGRGP REGLAGNRD PGPGRAAEAS GEPQAAASLL APMDLGEEPL
 61 ERAARARPAK DPNTYKVLST VLSVCVLTTI LGCIFGLKPS CAKEIKSCKG RCFERTFGNC
 121 RCDAACVDLG NCCLDYQETC IEPERIWTCT KFRGCEKRLS RSLCSCSDDC KDKGDCCINH
 181 GSVCRGEKSW AEEECDSIDE PQCPAGFETP PTLLFSLDGF RAEYLHTWGG LLPVISKLKT
 241 CGTYTKNMRP VYPTKTFPNH YSIVTGLYPE SHGIIDNNIY DPQMNANFAL KNKEKFNPEW
 301 YKGEPIWLTA KYQGLKTGTF FWPGSDVKIN GIFPDIYKIY NVSVPFEERI LAILKWLQLP
 361 KDERPHFYTL YLEEDSSGH SYGPVSSEVI RALQVRDNMV GMLMDGLKEL NLHRCLNLIL
 421 ISDHGMEQGS CKKYVYLNKY LGDTKDYKVV YGPAARLRPS DVPDKYYSFD YEGIAKNLSC
 481 QEPNQHFQPY LKHFLPKRLH FAKNDRIERL TFYLDPOWQL ALNPSEKRYC GGGFHGSDNT
 541 FLNQALFIG YGPGFKHSTE VDSFENIEVY NLMCDLLNLT PAPNNGTHGS LNHLNPNVY
 601 TPKHPKEVRP LVQCPFTRAP RESLDCSDP SILPIVDFQT QNLNLTMAEEK TIKRGALPYG
 661 RPRVLQNSTV CLLYQHGFVS GYSRDILMPL WTSYTIGRND SFSTEDFSNC LYQDLRIPLS
 721 PVHKCSFYKN NAKLSYGLLS PPQLHKGSSQ VYSEALLTTN IVPYQSFQV IWHYLHGTLL
 781 QRYAEERNGL NVVSGPVFDS DYDGRYDSLE TLKQNSKIIR NLEVLIPTHF FLVLTSCNT
 841 SQTPLQCENL DAMAFILPHK TDNSESCAHG KHESLWVEEL LKLHTARITD VEHITGLSFY
 901 QERKEPISDI LKLKTHLPTF NQED
- [0263] SEQ ID NO:9 (兔ENPP1-NCBI登录号NP_001162404.1)
 1 MERDGCAGGG SRGGEGGRAP REGPAGNSRD PGRSHAAEAP GNPQAAASLL APMDVGEPEL
 61 EKAARARTAK DPNTYKVLST VLSVCVLTTI LGCIFGLKPS CAKEVKSCCKG RCFERTFGNC
 121 RCDAACVELG NCCLDYQETC IEPEHIWTCN KFRGCEKRLT RSLCACSDDC KDQGDCCINY
 181 SSVQGEKSW VEEPCESINE PQCPAGFETP PTLLFSLDGF RAEYLHTWGG LLPVISKLKK
 241 CGTYTKNMRP VYPTKTFPNH YSIVTGLYPE SHGIIDNKMY DPKMNASFSL KSKEKFNPEW
 301 YKGEPIWVTA KYQGLKSGTF FWPGSDVEIN GIFPDIYKMY NGSVPFEERI LAVLQWLQLP
 361 KDERPHFYTL YLEEDSSGH SYGPVSSEVI KALQVRDNMV GMLMDGLKEL NLHRCLNLIL
 421 VSDHGMEQGS CKKYIYLNKY LGDVKNIKVI YGPAARLRPS DVPDKYYSFN YEGIAKNLSC
 481 REPNQHFQPY LKHFLPKRLH FAKSDRIEPL TFYLDPOWQL ALNPSEKRYC GSGFHGSDNI
 541 FSNMQALFVG YGPGFKHGIE VDTFENIEVY NLMCDLLNLT PAPNNGTHGS LNHLNPNVY
 601 TPKHPKEVHP LIQCPFTRNP RDNLCSCNP SILPIEDFQT QFNLTVAEEK NIKHETLPYG
 661 RPRVLQKNT ICLLSQHGFQ SGYSQDILMP LWTSYTVDRN DSFSTEDFSN CLYQDFRISL
 721 SPVHKCSFYK NNTKVSYGFL SPPQLNKNSR GIYSEALLTT NIVPMYQSFQ VIWRYFHDTL
 781 LRKYAEERNG VNVVSGPVFD FDYDGRYDSL EILRQKRRVI RNQEILIPTH FFIVLTSCKD
 841 ASQTPLHCEN LDTLAFILPH RTDNSESLH GKHESSWVEE LLMLHRARIT DVEHITGLSF
 901 YQQRKEPVSD ILKLKTHLPT FSQED
- [0264] SEQ ID NO:10 (狒狒ENPP1-NCBI登录号NP_001076211.2)
 1 MERDGCAGGG SQGGGKGGRG PREGLAGNR DPSHGQASEA PGDPQAAASL LAPMDLGEEP
 61 LEKAAGARPA KDPNTYKVLST LVLSVCVLTT ILGCIFGLKP SCAKEVKSCCK GRCFERTFGN
 121 CRCDVACVDL GNCCLDYQET CIEPERIWTC NKFRGCEKRL SRS LCACSDC CKERGDCCIN
 181 YSAVCQGEKS WVEETCENIN EPQCPEGFEM PPTLLFSLDG FRAEYLHTWG GLLPVISKLK
 241 KCGTYAKNMR PVYPTKTFPN HYSIVTGLYP ESHGIIDNKM YDPKMNASFS LKSKEKFNPE
 301 WYKGEPIWLT AKYQGLRSGT FFWPGSDVKI NGIFPDIYKI YNGSVPFEER ILAILKWLRL

361 PKDERPHFYT LYLEEPDSSG HSYGPVSSEV IKALQRVDNM VGMLMDGLKE LNLHQCLNLI
421 LISDHGMEQG SCKKYIYLNK YLGDTKNIKV IYGPAARLRP SDVPEKYYSF NYENIARNLS
481 CREPNQHFKP YLKHFLPKRL HFAKSDRIEP LTFYLDPQWQ LALSPSERKY CGSGFHGSDN
541 VFSNMQALFV GYGPGFQHGI EVDSFENIEV YNLMCDLLNL TPAPNNGTHG SLNHLLKNPI
601 YTPKHPKEVQ PSVQCPLAGS PRDSLGCSCN PSILPIVDFQ TQFNLTAAEE KNINRASLPY
661 GRPRLQKKS SVCLLYQHOF VSGYSHDVLN PLWTSYTVNR NDSFSTEDFS NCLYQDLRIS
721 FSPIHNCSFY KNNAKLSYGF LSPPQLSKDS SQIYSEALLT SNIVPMYQSF QVIWRYFHDT
781 LLQRYAEERN SINVVSGPVF DSDYDGRYDS SEALKRNRRV IRNQEILIPT HFFIVITSCK
841 NTSQTPLQCD NLDPLAFILP HRSDNSESCV HEKRESSWIE ELLMMHRARI MDVEHITGLS
901 FYQERKEPVS DILKLKTHLP TVSQED

[0267] SEQ ID NO:118(构建体1118-可溶性ENPP1-Fc)

[0268] MRGPAVLLTVALATLLAPGAGAPSCAKEVKCKGRCFERTFGNCRDAACVELGNCCLDYQETCIEPE
HIWTCNKFRCEKRLTRSLCACSDCKDKGDCCINYSVCQGEKSWVEEPCESINEPQCPAGFETPPTLLFSLDGF
RAEYLHTWGGLLPVISKLKCGTYTKNMRPVYPTKTFPNHYSIVTGLYPESHGIIDNKMYDPKMNASFSLKSKEKF
NPEWYKGEPIWVTAKYQGLKSGTFFWPGSDVEINGTFPDIYKMYNGSVPFEERILAVLQWLQLPKDERPHFYTLYL
EEPDSGHSYGPVSSEVIKALQRVDGMVGMLMDGLKELNLHRCLNLI LISDHGMEQG SCKKYIYLNKYLGDVKNIK
VIYGPAARLRPSDVPDKYYSFNYEGIARNLSCREPNQHFKPYLKHFLPKRLHFAKSDRIEPLTFYLDPQWQLALNP
SERKYCGSGFHGSDNVFSNMQALFVGYPGFKHGI EADTFENIEVYNLMCDLLNLTPAPNNGTHGSLNHLLKNPVY
TPKHPKEVHPLVQCPFTRNPRDNLGCSCNPSILPIEDFQTQFNLTVAEEKI IKHETLPYGRPRVLQKENTICLLSQ
HQFMSGYSQDILMPLWTSYTVDRNDSFSTEDFSNCLYQDFRIPLSPVHKCSFYKNNTKVSYGFLSPPQLNKNSSGI
YSEALLTTNIVPMYQSFQVIWRYFHDTLLRKYAEERNGVNVVSGPVDFDYGRCDSLENLRQKRRVIRNQEILIP
THFFIVLTSCKDTSQTPLHCENLDTLAFILPHRTDNSESCVHGKHDSSWVEELLMLHRARITDVEHITGLSFYQQR
KEPVSDILKLKTHLPTFSQEDRSKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEV
KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY
TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC
SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*

[0269] SEQ ID NO:119(构建体2000-骨靶向的ENPP1-Fc)

[0270] MRGPAVLLTVALATLLAPGAGAPSCAKEVKCKGRCFERTFGNCRDAACVELGNCCLDYQETCIEPE
HIWTCNKFRCEKRLTRSLCACSDCKDKGDCCINYSVCQGEKSWVEEPCESINEPQCPAGFETPPTLLFSLDGF
RAEYLHTWGGLLPVISKLKCGTYTKNMRPVYPTKTFPNHYSIVTGLYPESHGIIDNKMYDPKMNASFSLKSKEKF
NPEWYKGEPIWVTAKYQGLKSGTFFWPGSDVEINGTFPDIYKMYNGSVPFEERILAVLQWLQLPKDERPHFYTLYL
EEPDSGHSYGPVSSEVIKALQRVDGMVGMLMDGLKELNLHRCLNLI LISDHGMEQG SCKKYIYLNKYLGDVKNIK
VIYGPAARLRPSDVPDKYYSFNYEGIARNLSCREPNQHFKPYLKHFLPKRLHFAKSDRIEPLTFYLDPQWQLALNP
SERKYCGSGFHGSDNVFSNMQALFVGYPGFKHGI EADTFENIEVYNLMCDLLNLTPAPNNGTHGSLNHLLKNPVY
TPKHPKEVHPLVQCPFTRNPRDNLGCSCNPSILPIEDFQTQFNLTVAEEKI IKHETLPYGRPRVLQKENTICLLSQ
HQFMSGYSQDILMPLWTSYTVDRNDSFSTEDFSNCLYQDFRIPLSPVHKCSFYKNNTKVSYGFLSPPQLNKNSSGI
YSEALLTTNIVPMYQSFQVIWRYFHDTLLRKYAEERNGVNVVSGPVDFDYGRCDSLENLRQKRRVIRNQEILIP
THFFIVLTSCKDTSQTPLHCENLDTLAFILPHRTDNSESCVHGKHDSSWVEELLMLHRARITDVEHITGLSFYQQR
KEPVSDILKLKTHLPTFSQEDRSKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEV
KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY

TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC
SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKDDDDDDDD*

[0271] 实验实施例

[0272] 通过参考以下实验实施例,进一步详细描述本公开内容。提供这些实施例只是为了说明,并不意味着是限制性的,除非有特别说明。因此,本公开内容绝不应被解释为仅限于以下实施例,而应被解释为包括由于本文提供的教导而变得明显的任何和所有变化。

[0273] 无需进一步描述,相信本领域的普通技术人员可以利用前面的描述和下面的说明性实施例,制造和利用本公开内容的化合物并实践所要求保护的方法。因此,下面的工作实施例具体指出了本公开内容的优选实施方式,而不应被理解为以任何方式限制本公开内容的其余部分。

[0274] 现对以下实施例中采用的材料和方法进行描述。

[0275] 人类受试者

[0276] 回顾性地收集患者的数据,包括实验室数据、X光照片、计算机断层扫描(CT)和骨矿物质密度(BMD),并报告具有ENPP1突变的患者的骨骼和生物化学数据。

[0277] 突变分析

[0278] 对与遗传性低血磷酸盐性佝偻病、成骨不全症(OI)和骨质疏松症-假性神经胶质瘤综合征(OPPG)(表2)相关的基因进行了突变分析,利用Kazusa DNA研究所的MiSeq Sequencing系统进行了下一代测序,如之前报道的(Fujiki等人,2018)。如之前所报道的(Fujiki等,2018),或通过使用表2所列出的引物,在先证者的家庭成员中对检测到的ENPP1变体进行直接测序。通过硅学(in silico)工具PolyPhen-2、SIFT和Mutation Taster(Adzhubei等人,2010;Kumar等人,2009;Schwarz等人,2010)评估检测到的变体的致病性。

[0279] 表2.

[0280] 本案例系列中测试的基因(A)和用于ENPP1基因变体的靶向序列的引物(B)。

(A) 基因

本报告中测试的基因

与OI和OPPG相关的基因	<i>BMP1, COL1A1, COL1A2, CRTAP, FKBPI0, IFITM5, P3H1, PPIB, SERPINF1, SERPINH1, SP7, TMEM38B, WNT1, CREB3L1, SPARC, TENT5A, MBTPS2, MESD</i>
---------------	--

与低血磷酸盐性佝偻病相关的基因	<i>PHEX, FGF23, DMP1, ENPP1, FAM20C, FGFR1, PTH1R, SLC34A3, SLC9A3R1, CLCN5, OCRL, CYP27B1, CYP2R1, VDR, HNRNPC, CYP3A4, NF1, SLC34A1</i>
-----------------	---

[0281]

(B)用于ENPP1基因变体的靶向序列的引物

变体	寡核苷酸序列	方向	产物大小
<i>ENPP1</i> c.536A>G	GGATCATACTCAGGAAGACAGC	正向	321
	TGGCCAATAGCCATGACTCC	反向	

[0282] OI,成骨不全症;OPPG,骨质疏松症-假性神经胶质瘤综合征

[0283] 补体DNA的克隆

[0284] 在患者3的病例中,使用逆转录和聚合酶链反应(RT-PCR),来自外周血单核细胞的

总RNA被用于合成ENPP1 cDNA。ENPP1 cDNA和pT7blue T-载体 (Merck, Darmstadt, Germany) 在转化到大肠杆菌中之前进行连接。用QIAprep Spin Miniprep试剂盒 (Qiagen, Redwood City, CA, USA) 对扩增的载体进行纯化,并在两个等位基因中进行测序。

[0285] 完整的FGF23的测量

[0286] 根据制造商的方案,通过Determinar CL FGF23 (CL) 测量完整的FGF23 (Minaris Medical, Tokyo, Japan)。CL是夹心化学发光酶免疫测定法 (CLEIA),使用抗人FGF23小鼠单克隆抗体。使用这种方法,FGF23的参考范围为16.1-49.3pg/ml,其中FGF23相关的低磷酸盐血症的截止值为30pg/ml (Ito等人,2021;Kato等人,2021)。

[0287] 血浆PPi的测量

[0288] 收集参与者的血浆以测量血浆焦磷酸盐 (PPi) 浓度。血浆分离后,样品经由离心过滤通过30kDa膜 (PALL, Port Washington, NY, USA) 以去除血小板,并在采血后1小时内冷冻于-80℃,供单次使用。血浆[PPi]的测量使用ATP硫酸化酶进行,如前所述,稍作修改 (Jansen等人,2013;Jansen等人,2014)。发光信号通过EnSpire多模式平板阅读器 (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) 在室温下读取。最终的血浆[PPi]通过来自适当对照的背景减去[PPi]而归一化。使用ATP硫酸化酶法检测健康儿童和青少年的[PPi]参考范围最近被报道为2,360到4,440 (Bernhard等人,2022)。这些值与之前报告的健康成人的标准范围 (O'Neill等人,2010) 相似。

[0289] ENPP1的酶动力学试验

[0290] 使用Quikchange II-XL位点定向诱变法 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) 将人类突变工程化到hENPP1-Fc结构体中。序列验证后,使用Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) 将构建体转染到CHO-K1细胞中。转染48小时后,将10μL上清液与90μL含有250mM Tris pH 8.0、500mM NaCl、0.05% Triton X-100和1mM胸苷50-单磷酸盐对硝基苯基的试验缓冲液混合。从发色底物中释放出对硝基苯基的速度被报告为OD405 nm/分钟的变化,每个构建体至少有5次重复,并相对于WT%归一化。

[0291] 统计分析

[0292] PPi水平以平均值±标准偏差 (SD) 表示。用方差分析来分析WT和突变之间的ENPP1的酶动力学试验的比较。显著性被设定为P<0.05。数据分析经由Windows的GraphPad Prism version 6.05 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) 进行。

[0293] 实施例1:鉴定患者的ENPP1单倍性不足

[0294] 患者1是一名47岁的男性,具有上肢和下肢的骨折史。他是个应酬饮者,有20包年的吸烟史。他没有输尿管结石或吸收不良综合征史,没有与骨质疏松症有关的治疗史,也没有骨质疏松症的家族史。46岁时,他出现背痛,被诊断为脊柱压缩性骨折,在背痛一个月后开始还出现了膝关节、腕关节和踝关节疼痛。他被转到当地医院,腰部和股骨近侧双能X射线吸收仪 (DEXA) 显示T分数分别为-3.8和-2.6。脊柱的CT扫描显示第7和第11胸椎处的压缩性骨折 (图1A)。

[0295] 骨闪烁显像图显示肋骨有多个摄取点 (uptake),表明有多处骨折 (图1B)。在髋关节和膝关节、跟腱或脊柱旁韧带中没有检测到异位骨化的迹象 (图1C-1H)。该患者被诊断患有早发性骨质疏松症,并进行了实验室检查以排除继发性骨质疏松症和骨软化。虽然在当地一家医院检测到低-正常的血清磷,同时血清碱性磷酸酶和骨碱性磷酸酶略有升高,但在

另一家医院没有检测到血清钙、磷或FGF23的异常(补充表1)。

[0296] 其他内分泌功能检查,如促甲状腺激素、游离睾酮和皮质醇(早晨测量)都在正常范围内(补充表1)。因此,他被转到University of Tokyo Hospitals作进一步评估,并重新评估了血液化学成分(表3)。实验室数据显示,正常血清白蛋白水平,正常校正钙(8.8mg/dL),低正常血清磷(2.7mg/dL,参考区间2.7-4.6mg/dL),正常FGF23(28pg/mL,参考区间16.1-49.3pg/mL),以及低25羟基维生素D(7.2ng/mL)。

[0297] 考虑OI或OPPG轻度表型的诊断,并对与OI或OPPG相关的基因进行了突变分析(表2),但没有鉴定出致病变体。基于在最初医院测量的血清分析物(补充表1)和在我们医院的低-正常血清磷存在,接下来考虑轻度低血磷酸盐性佝偻病的诊断,并对相关基因进行突变分析,揭示了ENPP1中存在错义变体(c.536A>G,p.Asn179Ser[N179S])(表3)。接下来在18岁的患者的儿子中进行了检测的ENPP1变体的直接测序,揭示了相同的杂合ENPP1变体(图2A)。尽管该儿子表现出低-正常的BMD——腰部(-1.6)和股骨近侧(-0.8)的低Z分数,但他在脊柱、髋关节、膝关节或跟腱中没有自发性骨折或异位骨化的历史(图5A-5G和表3)。

[0298] 患者2是77岁的女性,其被诊断患有弥漫性特发性骨肥厚症(DISH),当她遭受脊柱中的压缩性骨折时被转到University of Tokyo hospital。评估时,通过CT观察到脊柱旁韧带的骨化和多个脊柱压缩性骨折(图3A)。此外,在跟腱中检测到了轻微的异位骨化(图3F),但髋关节和膝关节是完整的(图3B、3C、3D和3E)。脊柱CT检测到的骨化没有进行组织学评估。患者的生化谱显示,低-正常血清磷(3.1mg/dL,参考区间2.7-4.6mg/dL),高-正常FGF23(43.3pg/mL,参考区间16.1-49.3pg/mL)。由于脊柱旁韧带和跟腱存在异位骨化,考虑遗传性FGF23相关的低磷酸盐血症的诊断(具体为ARHR或XLH)。对与遗传性低血磷酸盐性佝偻病相关基因的测试(表2)揭示了ENPP1存在杂合错义变体(c.1352A>G,p.Tyr451Cys[Y451C])(表3)。

[0299] 患者3是54岁的女性,到附近医院就诊,主诉髋关节、膝关节和背部疼痛。她随后出现了前/后纵韧带骨化(OALL/OPLL),被诊断为DISH,双侧髋关节周围有骨赘,双侧跟腱中有起止点病(图4A-4I)。实验室数据显示,低-正常血清磷酸盐(2.9mg/dL)和高-正常血清FGF23(38.4pg/mL,参考范围16.1-49.3pg/mL)。生化谱与异位脊柱旁骨化的发现相结合,得出了FGF23相关的低磷酸盐血症的结论,并且基因分析(表2)揭示了与患者1和2相同的ENPP1变体(c.536A>G和c.1352A>G)(表3)。接下来对她的儿子(19岁和23岁)进行了Sanger测序,揭示两人都有c.1352A>G的杂合ENPP1变体(图2C)。值得注意的是,这两个年轻人都表现出钙化的跟腱起止点病,而在脊柱或髋中不存在异位骨化(图6A-6G和7A-7G)。

[0300] 补充表1.转诊前病例1的生化和激素数据

[0301]

	RI,成人	病例1
血清钙(mg/dL)	8.8-10.1	9.4
血清磷酸盐(mg/dL)	2.7-4.6	2.8
eGFR(mL/分钟/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
游离睾酮 (pg/mL)	4.7-21.6	5.6
皮质醇 (μg/dL)	4.5-21.1	6.0

[0302] 缩略语:RI,参考区间;eGFR,估计的肾小球滤过率;25 (OH) D,25-羟基维生素D;1, 25 (OH) ₂ D,1,25-二羟基维生素;ALP,碱性磷酸酶;BAP,骨碱性磷酸酶;TRACP-5b,抗酒石酸酸性磷酸酶5b;iPTH,完整的甲状旁腺激素;FGF23,成纤维细胞生长因子23;TSH,促甲状腺激素。

[0303]

表3. 具有单等位基因ENPP1变体或复合杂合ENPP1变体的成人中人口、临床和生化数据, c.536A>G 或 c.1352A>G.

ENPP1 变体	RI, 成人				病例3的				病例3的 儿子 (III-3)
	病例1	病例1的 儿子	病例2	病例3	病例3的 儿子 (III-2)	病例3的 儿子 (III-2)	病例3的 儿子 (III-2)	病例3的 儿子 (III-2)	
蛋白质变化	c.536A>G, 杂合	c.536A>G, 杂合	c.1352A>G, 杂合	c.536A>G/ c.1352A>G	c.1352A>G 杂合	c.1352A>G 杂合	c.1352A>G 杂合	c.1352A>G 杂合	p.Tyr451Cys
人口数据	p.Asn179Ser	p.Asn179Ser	p.Asn179Ser	p.Asn179Ser/ p.Tyr451Cys	p.Tyr451Cys	p.Tyr451Cys	p.Tyr451Cys	p.Tyr451Cys	
年龄(年)/性别	48/M	18/M	78/F	54/F	23/M	19/M	19/M	19/M	
身高 (cm/SD)	166 / -0.9	177 / 1.2	146 / -0.9	155 / -0.4	167 / -0.4	164 / -2.0	164 / -2.0	164 / -2.0	
临床数据	否	否	是	是	否	否	否	否	
异位骨化	否	否	否	否	否	否	否	否	
脊柱旁韧带	否	否	否	否	否	否	否	否	
腕关节	否	否	否	否	否	否	否	否	
膝关节	否	否	否	否	否	否	否	否	
跟腱	否	否	否	否	否	否	否	否	
BMD (T分数 / Z分数)	-2.6 / -2.3	NA / -0.8	-3.5 / -1.3	0.2 / 0.7	NE	NE	NE	NE	
股骨近侧	-3.8 / -2.6	NA / -1.6	-3.3 / -0.8	3.6 / 2.9	NE	NE	NE	NE	
生化数据									
血清钙 (mg/dL)	8.8	9.9	9.6	9.3	9.6	9.6	9.6	10.0	

[0304]

血清磷酸盐 (mg/dL)	2.7 - 4.6	2.7	3.7	3.1	2.9	3.4	3.2
血浆 PP _i (nM)	2360 - 4440	1646 ± 36	NE	1748 ± 45	1866 ± 82	1585 ± 56	1153 ± 31
eGFR (mL/min/1.73m ²)		76.8	99	96.4	84.2	84.4	129.1
25(OH)D (ng/mL)		7.2	18.1	9.5	9.2	15.0	10.1
1,25(OH) ₂ D (pg/mL)	20 - 60	40	31	26	48.1	68.3	65.9
BAP (μg/L)	3.7 - 20.9	13.5	13.9	NE	19.1	12.5	26.5
TRACP-5b (mU/dL)	170 - 590 (M)	450	308	245	289	228	430
	120 - 420 (F)						
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
缩写语：RI, 参考区间；M, 男；F, 女；SD, 标准偏差；BMD, 骨矿物质密度；NA, 不适用；NE, 未检测；PP _i , 焦磷酸盐；eGFR, 估计的肾小球滤过率；25(OH)D, 25-羟基维生素D；1,25(OH) ₂ D, 1,25-二羟基维生素；BAP, 骨碱性磷酸酶；TRACP-5b, 抗酒石酸性磷酸酶5b；iPTH, 完整的甲状旁腺激素；FGF23, 成纤维细胞生长因子23；TPR, 管状磷酸盐重吸收。							

[0305] 实施例2:ENPP1单倍性不足在患者中影响的表征

[0306] 克隆患者3中的ENPP1的互补DNA

[0307] 对ENPP1的互补DNA进行克隆和测序,以评估两个ENPP1变体是位于同一等位基因还是相反的等位基因中。每个等位基因的序列数据揭示病例3具有ENPP1变体的复合杂合性(图8)。

[0308] 对检测到的ENPP1变体的致病性的硅学预测

[0309] 在本病例中检测到的N179S和Y451C的等位基因频率在基因组聚集数据库(GnomAD)中被报道分别为0.00010和0.00016。然而,在由Tohoku Medical Megabank Organization (ToMMo) 构建的3552名普通日本人个体的全基因组参考组中,N179S和Y451C的等位基因频率被报道分别为0.0071和0.0055(表4)。Asn 179位于生长调节素B结构域2(SMB2)中,其对蛋白质二聚化和稳定性至关重要,而Tyr 451在催化结构域中(图9),Asn 179和Tyr 451在所有物种中都是高度保守的。方法中描述的硅学工具的组合将N179S和Y451C突变标记为致病性的(表4)。

[0310] 表4. ENPP1变体的等位基因频率和硅学预测, c.536A>Gorc.1352A>G

变体	等位基因频率		硅学预测		
	GnomAD	ToMMo	PolyPhen-2	SIFT	Mutation Taster
c.536A>G	0.00010	0.0071	可能有害	有害	引起疾病
c.1352A>G	0.00016	0.0055	可能有害	有害	多态性

[0312] 血浆PPi的测量

[0313] 对三个先证者(病例1-3)及其家庭成员的血浆PPi进行了测量。具有杂合ENPP1变体的患者表现出在1,000至2,000nM之间的血浆PPi水平(表3),而患有双等位基因ENPP1变体的患者中的血浆PPi表现出类似的1,866nM的浓度。

[0314] ENPP1的酶动力学试验

[0315] 为了进一步评估突变对ENPP1催化活性的影响,与WT ENPP1同工型相比,在体外试验中一起对所有变体的酶促率进行了评估。与WT ENPP1相比,N179S和Y451C变体分别降低了ENPP1的催化率55%和70%(图10)。因此,根据ACMG指南,N179S和Y451C变体被分类为“可能致病的”(N179S:PM1+PP3+PS3,Y451C:PM1+PS3)。

[0316] 选定结果

[0317] 结果表明,在原发受试者(患者1-3)中存在两例单等位基因ENPP1缺陷和一例复合双等位基因杂合ENPP1缺陷的临床表现,在这些受试者的子女中还存在另外三例ENPP1单倍性不足。

[0318] 患者1表现为早发性骨质疏松症,而患者2表现为脊柱骨肥厚症和DISH的推定诊断,并被另外发现有骨质疏松症(由脊柱中的压缩性骨折证明,图1A-1B和3A-3G)。患者3拥有复合杂合ENPP1突变,其由患者1和2中存在的单个突变组成,使得患者是ENPP1纯合缺陷的,患者表现出突出的脊柱旁韧带骨化,以及髋关节周围的钙化和双侧跟腱钙化起止点病(图4A-4I)。

[0319] 此外,所有拥有从原发患者那里继承的单等位基因ENPP1变体的儿童都在令人惊讶的年轻年纪时表现出肌肉骨骼疾病,如患者1的18岁儿子的低骨量(腰椎的Z得分为-1.6)和患者3的19岁和23岁儿童的跟腱钙化起止点病。基因型与表型的分离进一步支持了ENPP1缺陷在本研究中描述的骨骼障碍的发病机制中起核心作用的观点。

[0320] 此前,对拥有诱导GACI的纯合ENPP1突变的家族的评估报告,单倍性不足ENPP1携带者无症状,但拥有低钙血症和低磷酸盐血症的血清生化指标,表明ENPP1可能在钙和磷酸盐体内稳态中发挥作用(Kotwal等人,2020)。相反,Oheim等人报告了在患有早发性骨质疏松症的成年男性中的ENPP1单倍性不足,这种表型也存在于称为ENPP1^{asj/asj}的ENPP1纯合缺陷小鼠中(Oheim等人,2020),这支持了ENPP1调节哺乳动物骨量的观点。事实上,患者1和她18岁的儿子的骨骼表型支持ENPP1单倍性不足与早发性骨质疏松症的关联。

[0321] 该研究将ENPP1单倍性不足的关联扩展到DISH患者。DISH是全身性疾病,其特征存在于韧带和肌腱端的骨化,尤其是在胸椎周围。DISH患者有时会遭受疼痛和运动范围减少,并增加脊柱骨折的风险(Mader等人,2013)。虽然发病机制不明,但DISH与年龄较大(50岁以上)、男性、肥胖、高血压和糖尿病有关(Kuperus等,2020)。

[0322] 在患者2的病例中,她的年龄超过50岁,但不存在DISH的其他风险因素,相反,发现该患者为ENPP1单倍性不足。鉴于人类和小鼠的临床和临床前研究将纯合ENPP1缺陷与脊柱韧带骨化相关联(Okawa等,1998;Nakamura等,1999;Saito等,2011;Hirao等,2016),导致血浆PPi降低的ENPP1活性受损是该患者中存在的进行性脊柱旁骨化和钙化起止点病的一个风险因素。

[0323] 所描述的两个ENPP1变体(N179S和Y451C)都位于ENPP1区域的高度保守序列中,其对二聚化和稳定性(Asn 179)以及催化活性(Tyr 451)非常重要。此外,N179S和Y451C被多个硅学工具发现是有害的(表4),但迄今尚未被报告为致病性的。

[0324] 此外,与WT水平相比,N179S和Y451C分别降低酶活性55%和70%,这与ENPP1的其他致病性变体中存在的残余酶活性相似(Kotwal等人,2020;Oheim等人,2020;Rutsch等人,2003;Stella等人,2016;Thumbiger-Math等人,2018)。综上所述,这些发现支持一个或多个ENPP1变体N179S和/或Y451C负责三个先证者中存在骨骼表型和异位骨化。

[0325] 虽然ENPP1调节肌肉骨骼矿化的机制尚不完全理解,即是通过催化作用还是不依赖催化的蛋白信号传导,但患者1和2中所述的患者都表现出低血浆[PPi](分别为1,646nM和1,748nM,参考范围为2,360-4,440nM),这与ENPP1的催化活性在观察到的异常表型中的作用一致。ENPP1和ABCC6缺陷都会导致低血浆PPi水平(Lorenz-Depiereux等人,2010;Levy-litan等人,2010;Rutsch等人,2001;Nitschke等人,2012;Le Saux等人,2000)。ENPP1单倍性不足患者中的血浆PPi水平介于无ENPP1缺陷和纯合ENPP1缺陷患者的PPi水平之间(Kotwal等人,2020;Oheim等人,2020)。我们的患者中的PPi水平也落在1,000至2,000nM的范围内,但出乎意料的是,具有复合杂合ENPP1缺陷的患者3的PPi浓度与单倍性不足ENPP1患者相似,这表明有补偿机制参与(Kotwal等人,2020)。

[0326] 此外,在患者3中观察到继发性甲状旁腺功能亢进,这一发现也在其他具有纯合ENPP1缺陷的患者(Kotwal等,2020,和Capelli等,2015)和ENPP1缺陷的小鼠模型中观察到。在由FGF23升高诱发的其他障碍中,PTH也会升高,如Hyp小鼠和具有XLH和ARHR的人类,其由于FGF23的作用导致维生素D活化受损而出现继发性甲状旁腺功能亢进(Carpenter JBMR, 2011)。类似的机制可能解释了病例3中的继发性甲状旁腺功能亢进,该患者被指出维生素D缺陷,以及纯合ENPP1缺陷的其他病例(Kotwal等人,2020)。由于患者3中描述的患者没有出现骨软化,因此,用天然维生素D而不是活性维生素D治疗将适合于改善和防止继发性甲状旁腺功能亢进症的恶化。

[0327] 虽然研究中的患者呈现出正常的完整FGF23,但在其低度正常血清磷水平的背景下,该水平被解释为升高,这就提出了遗传诱导的磷酸盐消耗性障碍的可能性。在这方面,ARHR2的原始报告中所描述的大多数患者在低血清磷的背景下具有高-正常或轻微升高的完整FGF23。在Levy-Litan对3名佝偻病患者的描述中,3人中有2人具有高-正常的完整的FGF23 (50pg和47pg,正常参考范围为10-50pg), (Levy-Litan等,2010),Lorenz-Depiereux报告的7名ARHR2患者中有5人的完整FGF23处于正常范围的上限或重复测量时略有升高。在低磷酸盐值和患者表现出的严重佝偻病表型的背景下,这些范围也同样被解释为高。

[0328] 在不希望受到任何理论限制的情况下,本研究表明ENPP1单倍性不足比纯合ENPP1缺陷诱导更大的FGF23升高,在正常或低-正常血清磷(2.7-3.1mg/dL,参考范围为2.7-4.6mg/dL)的情况下,完整FGF23的正常和高-正常水平引起了对基因诱导的低磷酸盐血症的怀疑,并开始进行基因测试。该研究表明,在罕见的代谢性障碍如ARHR、XLH和低血磷酸盐性肿瘤钙化症的患有钙化起止点病患者中(Okawa等人,1998;Nakamura等人,1999;Saito等人,2011年;Hirao等人,2016年;Maulding等人,2021年;Rutsch等人,2001年;Cheng等人,2005年;Albright等人,2015年),以及在快速进展形式OPL患者的一般医疗人群中(Albright等人,2015年;Ferreira等人,2021年),增加的循环FGF23和低磷酸盐血症发生。相反,钙化起止点病与不依赖FGF23的低血磷酸盐性佝偻病形式如SLC34A3缺陷无关(Kotwal等人,2020)。因此,FGF23似乎与起止点病的发展有密切关系。

[0329] 先前在ENPP1缺陷小鼠全骨中进行的转录组分析报告Enpp1的失活突变增加了Fgf23转录,并减少了Wnt10b和Wnt16转录(Maulding等人,2021),这表明ENPP1缺陷部分地通过受损的Wnt信号传导诱导了异常的骨骼矿化。患者1没有表现出明显的具有升高FGF23水平的低血磷酸盐性佝偻病,而且骨吸收标志物抗酒石酸酸性磷酸酶5b(TRACP-5b)处于正常范围,表明骨质疏松症的发展没有高骨转换——这一发现与缺陷的Wnt信号传导诱导的合成代谢缺陷一致。因此,人类的观察结果与ENPP1缺陷的小鼠模型的转录组分析所建议的骨质疏松机制一致(Maulding等人,2021)。

[0330] 最后,重要地是注意该研究中描述的变体的等位基因频率的差异。在患者2中检测到的等位基因(Y451C)的频率在日本人中(ToMMo:0.0055)比在所有其他种族中(GnomAD:0.00016)高约30倍。鉴于观察到单等位基因ENPP1 Y451C突变与OPL有关,这种变体频率的差异可能解释了日本的OPLL发病率(1.8-4.1%)比美国(0.12%)和德国(0.1%)高10-40倍(Stapleton等人,2011)。

[0331] 实施例3:ENPP1融合蛋白的生成和对DISH模型小鼠的治疗

[0332] ENPP1的生成

[0333] ENPP1融合蛋白的一个实例是ENPP1-Fc。然而,ENPP1-Fc的例证也可适用于如本文阐述的其他ENPP1融合蛋白(如ENPP1-白蛋白)。

[0334] ENPP1-Fc是重组融合蛋白,其含有与IgG1的Fc片段(rhENPP1-Fc)结合的人ENPP1(可溶性ENPP1)的细胞外结构域。ENPP1-Fc的重组细胞外结构域包含其催化活性,与原生ENPP1酶相同。ENPP1-Fc是在CHO细胞中经由补料分批细胞培养过程生产的重组人蛋白,其不含动物来源的组分。ENPP1-Fc二聚体的分子量约为290kDa;ENPP1-Fc是高度糖基化的,pI为约6.0。与内源性ENPP1一样,ENPP1-Fc的主要底物是ATP,它被裂解为AMP和PPi。

[0335] 在具体实施方式中,可溶性ENPP1蛋白经由接头(包括亮氨酸、异亮氨酸和天冬酰

胺)与带有接头的人类Fc结构域融合。三个ENPP1-Fc构建体在表1中显示为SEQ ID NO:3、4和5,如从CHO细胞中纯化的。

[0336] ENPP1-Fc的纯化可通过一系列色谱步骤实现,其例如包括以下三种或更多种,以任何顺序进行:蛋白A色谱法、Q琼脂糖凝胶色谱法、苯基琼脂糖凝胶色谱法、尺寸排阻色谱法和阳离子交换色谱法。纯化可以通过病毒过滤和缓冲液交换来完成。蛋白纯化后,可以使用pNP-TMP作为发色底物来评估ENPP1-Fc蛋白的催化活性。

[0337] 用ENPP1剂治疗DISH模型小鼠

[0338] 最成熟的脊柱起止点病(DISH)小鼠模型是Enpp1缺陷的小鼠,被称为ttw(“趾尖行走小鼠”(tip toe walking mice))。ttw小鼠表现出严重的脊髓病和广泛的脊柱旁韧带钙化和骨赘形成。为了评估PPi与起止点病的严重程度之间的关系,我们对23周龄的Enpp1^{asj}小鼠的跟腱进行了检查,这些小鼠以普通饲料饲养。

[0339] 在皮下亚毫克计量后,用媒介物(PBS)或能够使血浆[PPi]正常化的人ENPP1-Fc向动物给药超过一周。ENPP1-Fc的施用方案、放射线分析和组织学实验概述于Ferreira等人, *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)。任选地,可使用含有骨靶向结构域的ENPP1剂(例如但不限于ENPP1-Fc)重复实验,以更好地递送和更高的疗效。

[0340] 在第2-23周之间,以每周0.3mg/kg向Enpp1^{asj}小鼠施用ENPP1剂(例如但不限于ENPP1-Fc),并测量给药Enpp1^{asj}小鼠中的血浆PPi。注意到相对于WT来说,PPi显著增加,但没有完全正常化(分别为1358vs 2235nM,表6)。

[0341] 表6

[0342] 23周龄的Enpp1^{WT}和给药的及未给药的Enpp1^{asj/asj}小鼠的血浆分析物

参数	单位	Enpp1 ^{WT}	ENPP1 ^{asj}	Enpp1 ^{asj}
		+ PBS	+ PBS	+ BL-1118
钙	mg/dL	6.6 ± 0.5	7.0 ± 0.8	6.9 ± 0.4
磷酸盐	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 ^{**} (↓)

[0344] 对跟腱中的起止点病进行组织学分析,并使用定制的MATLAB软件对茜素红染色切片的显微照片中的红色像素进行量化。经媒介物处理的Enpp1^{asj}小鼠的跟腱预计会在整个腱的长度上出现实质上的钙化,而经ENPP1-Fc处理的Enpp1^{asj}小鼠的腱钙化预计会被抑制。

[0345] 在不受理论约束的情况下,起止点病可以依赖于血浆PPi,并且可以通过用例如ENPP1剂(例如ENPP1-Fc)的酶类生物制剂升高血浆PPi来防止起止点病。研究结果表明,在剂量扩大后,可能会达到完全抑制起止点病。

[0346] PPi对DISH模型小鼠的影响

[0347] 为了评估血浆PPi对DISH小鼠模型中的骨赘形成、脊柱融合和骨化的影响,在第3-

17周之间用媒介物或1mg/kg ENPP1-Fc向Enpp1^{asj}小鼠给药,并通过显微CT分析其脊柱。图12:用ENPP1-Fc给药的小鼠表现出较高的血浆PPi水平(约10 μ m),其比WT水平高数倍。

[0348] 在用ENPP1剂(例如ENPP1-Fc)治疗的DISH小鼠模型中,存在血浆PPi的升高和脊柱旁骨化的减少将表明,对患有DISH的人类受试者的这种ENPP1施用也会减轻脊柱旁骨赘、关节强直和脊柱融合。

[0349] 实施例4:治疗方案

[0350] 以下列选定的剂量之一施用ENPP1剂(例如,但不限于ENPP1、ENPP1-X、ENPP1-Fc和/或ENPP1-Fc-X,其中X是如本文其他部分所述的骨靶向标签):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和/或其分数或倍数。施用为皮下注射(SC),每两个月至少一次或两次、每月至少一次或两次、每月三次、每周至少一次或两次。

[0351] ENPP1剂的第一剂量可在第1天施用。在第8天及其后,以选定计量的ENPP1剂mg/kg的剂量每周两次向受试者施用ENPP1剂。剂量可在每个给药日的大约同一时间施用。注射部位是交替进行的,其中在过去2周内的任何过去注射部位的2英寸范围内没有注射部位。

[0352] ENPP1剂的选定剂量是0.2mg/kg、0.3mg/kg、0.4mg/kg、0.5mg/kg、0.6mg/kg或1.8mg/kg SC之一。通过SC的ENPP1剂的另一选定剂量是以下之一:0.2mg/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和/或其分数或倍数。ENPP1剂的第一剂量可在第1天施用。第一剂量后,可对受试者观察7天,以监测安全性并收集PK样品。在第8天和此后,受试者每周两次接受选定的剂量。在医疗专家认为合适的情况下,继续以选定的剂量施用ENPP1剂。

[0353] 受试者可以在29天的时间段内接受8剂量的ENPP1剂,例如,对于剂量的量为0.2mg/kg、0.6mg/kg和1.8mg/kg,导致每29天分别暴露1.6mg、4.8mg和14.4mg。或者受试者可以接受多于或少于8个剂量,如医疗专家认为合适的情况下。

[0354] 与内源性ENPP1酶一样,ENPP1剂裂解ATP以生成AMP和PPi,从而增加血浆PPi水平,并转化为AMP,CD73迅速将其转化为腺苷。替换内源性人类酶旨在改正固有的缺陷,并允许改善健康状况和减轻与ENPP1基线患者、临床医生和照顾者结果有关的临床并发症。

[0355] 实施例5:对具有ENPP1单倍性不足的患者的治疗

[0356] 通过在第1天皮下注射,并从第8天开始每周两次使用如下的选定剂量对被鉴定为具有ENPP1单倍性不足的患者施用ENPP1剂。

[0357] 表7.

[0358]	1	0.2 mg/kg
	2	0.6 mg/kg
[0359]	3	1.8 mg/kg

[0360] ENPP1剂以0.2mg/kg、0.6mg/kg或1.8mg/kg SC之一的选定剂量施用,每周至少两次,时间段由医疗专家确定。根据需要,监测患者对酶置换的反应,如由专业医师确定的,例如,通过跟踪ENPP1缺陷的一个或多个症状的减少,和/或使用本文提供的指导。

[0361] 实施例6:对诊断患有DISH的患者的治疗

[0362] DISH通常涉及脊柱周围腱和韧带的钙化。一旦腱和韧带变硬,这些组织的一部分就会变成骨头。这通常发生在组织与骨的连接处。因此,会出现骨刺,这是沿骨头边缘发展的骨骼向外生长。DISH通常影响背部和颈部的上半部分,即胸椎和颈椎。然而,DISH也可以影响肩、肘、手、膝盖、髌、脚跟和/或脚踝。

[0363] 在某些实施方式中,用ENPP1剂治疗被诊断患有DISH的受试者,选定剂量为0.2mg/kg、0.6mg/kg或1.8mg/kg之一,SC、IV和/或IP施用ENPP1剂,每周至少两次,时间段由医疗专家确定。

[0364] 在某些实施方式中,用ENPP1剂治疗被诊断患有DISH的受试者,选定剂量为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和/或其分数或倍数之一,SC、IV和/或IP施用ENPP1剂,每周至少两次,时间段由医疗专家确定。

[0365] 根据需要,监测DISH患者对酶置换的反应,如由专业医师确定的,例如,通过跟踪DISH的一个或多个症状的减少、使用本文提供的指导。

[0366] 可选地,怀疑有DISH风险的受试者通过施用选定剂量的ENPP1剂来治疗。在某些实施方式中,发展DISH的常见风险因素包括但不限于大腰围、BMI/肥胖、高胰岛素血症、糖尿病、高尿酸血症、血脂紊乱、高血压、冠状动脉疾病和/或痛风。DISH可以是无症状的,在那些情况下,通常根据放射学图像进行诊断。在某些实施方式中,DISH与年龄较大(50岁以上)、男性、肥胖、高血压和/或糖尿病有关。

[0367] 可选地,具有DISH的放射学证据但缺乏该疾病的临床表现的受试者可以用ENPP1剂治疗,以防止或最小化脊柱骨折的增加、活动能力下降、脊髓病和/或疼痛,这些都是与DISH有关的已知表型。

[0368] 在整个说明书的背景下,下面的实施例为确定治疗方案和疗效提供了指导。

[0369] 实施例7:与骨健康有关的生物标志物

[0370] 除低血浆PPi外,ENPP1缺陷的患者的生化特征在于低血清磷酸盐、高尿磷酸盐、低肾TmP/GFR、正常钙(Ca)、低-正常尿Ca、正常25-羟基维生素D(25OH D)、低-正常1,25(OH)2D、高BAP、高完整FGF23、正常和/或升高的PTH(10F 2019)。

[0371] 表8中叙述了可在某些实施方式中作为治疗患者的骨骼健康的另外决定因素的生物标志物。

[0372] 表8.临床中间物和生物标志物

[0373]	主要药效学标志物	实验室	样品类型
		焦磷酸盐(PPi)	血浆或血清
		无机磷酸盐	血浆或血清
		FGF23 (完整的)	血浆或血清
		TmP/GFR	血清肌酐、血清磷酸盐、尿磷酸盐
		ALP, BALP, CTx, PINP	血清、血浆、尿液

[0374] 实施例8:用ENPP1剂的治疗的疗效

[0375] 可以通过测量血浆PPi以及测量其他血浆分析物,如FGF23、Pi、FGF23、Pi、TmP/GFR、血清碱性磷酸酶(ALP)、骨特异性ALP(BALP)、I型胶原的羧基末端交联端肽(CTx)和/或I型前胶原N端前肽(PINP)来评估治疗疗效。这些分析物测量可作为与ENPP1缺陷有关的PD标志物,以确定ENPP1剂的疗效。这些分析物的变化可被描述为从基线开始的变化,并在治疗过程中以时间依赖的方式。可以评估PK和PD参数的剂量线性度。

[0376] 血浆PPi水平、FGF23水平和每肌酐清除率的尿磷排泄量从基线的变化可以用成对差异的t检验来分析。

[0377] 实施例9:药物浓度的测量

[0378] 此外,可从患者获得血样,以测量血浆中的ENPP1剂浓度,并在第一剂量后(即单次

剂量)和多次剂量时/后(即稳态)进行后续的PK参数测定。

[0379] 实施例10:免疫原性(抗药物抗体)

[0380] 如果需要,对ENPP1剂的免疫原性可以使用抗药物抗体(ADA)来测量。免疫原性测试可以利用多层次的方法;如果在最初的筛选中检测到ADA,则可以进行确认测试以确定特异性。样品也可用于评估和进一步建立用于特异性确认(即滴度)和中和抗体的试验。

[0381] 实施例11:药代动力学、药效学和探索性生物标志物分析

[0382] 可对PK人群进行药代动力学分析,ENPP1剂的PK参数可通过描述性统计的处理来总结。也可以评估PK和PD参数的剂量线性度。可以确定PK/PD分析、免疫原性分析;以及探索性生物标志物分析。

[0383] 实施例12:疗效的其他决定因素

[0384] 尽管恢复正常的PPi水平是使用ENPP1剂治疗的疗效的主要指标,但如果需要的话,也可以使用其他的物理测量来辅助确定治疗疗效。这些物理测量包括以下一项或多项。

[0385] 1.放射线照相术和成像

[0386] a.骨骼严重程度的X光照片(x-ray)。可以获得标准的X光照片,以发现佝偻性骨骼畸形。例如,可以获得手腕和膝盖的X光照片。

[0387] b.DEXA扫描。DEXA扫描可用于评估骨密度的变化。

[0388] c.正电子发射断层成像。计算机断层成像。基线 Na^{18}F -PET/HRpQCT(或HR-CT)可能是在第一剂量的ENPP1剂的1个月内进行的全身扫描,以测量基线处动脉和器官的钙化以及骨骼的异常,并用于未来的干预性评估。 Na^{18}F -PET测量骨转换以及动脉的微钙化。高分辨率定量计算机断层成像(HRQCT)或HR-CT可以确定非支配性桡骨和胫骨远端(non-dominant distal radius and tibia)处的骨微结构。计算标准的骨骼几何参数。

[0389] d.多普勒超声心动图。可在第一剂量的ENPP1剂前的3天内获得基线超声心动图。多普勒超声可用于测量心脏功能[LVEF、血流]、心脏和瓣膜的钙化以及动脉僵化。

[0390] e.光学相干断层成像。光学相干断层成像可用于可视化新内膜增殖。

[0391] f.外周动脉张力测量。外周动脉张力测量(PAT)可用于评估数字脉搏波幅(PWA),它与数字容积变化相对应。

[0392] g.肾脏超声。肾脏超声检查可用于,例如,在开始使用ENPP1剂的1周内,测量肾脏钙化。

[0393] h.骨组织形态学和骨活检。可进行骨活检作为基线测量。在进行骨活检前,优选四环素负荷10天。

[0394] 2.步行能力

[0395] 步行测试可作为亚最大锻炼的测量值,以结合心肺、神经肌肉和肌肉骨骼功能测量非卧床患者中的功能能力。6分钟步行测试(6MWT)最初由美国胸科协会(American Thoracic Society)(ATS2002)开发用于成人,现在普遍用于成人和儿科群体(Mylius等,2016),以及患有神经肌肉疾病的儿童,如脊髓性肌萎缩症(Montes等,2018)、杜氏肌肉营养不良症(McDonald等,2013)和婴儿型庞贝病(van der Meijden等,2018)。2分钟步行测试(2MWT)包括在NIH工具箱中,并且越来越多地被用来测量相同的性质。

[0396] 6MWT和2MWT可在治疗前和治疗期间由医疗服务提供者决定施用至患者。如果受试者在基线时不能完成至少2MWT,则治疗期间的另外评估可由医疗服务提供者决定。在测试

前和测试后获得静息心率。可以记录6MWT的前2分钟和整个6分钟内步行的距离。2分钟和6分钟内步行的距离可与年龄和性别匹配的正常数据进行比较(预测值百分比)。

[0397] 3.肌力测定法

[0398] 在治疗前和/或治疗期间,可由医疗服务提供者决定使用肌力测定法评估力量。手持式肌力测定法是直接测量力量的方法,常用于儿童和成人。可以评估的肌肉群包括:肩部外展、肩部屈曲、肘部屈曲、肘部伸展、腕部外展、腕部屈曲、腕部伸展和膝部伸展。每个肌肉群可以在双侧测量2次。

[0399] a.握力。在治疗前和/或治疗期间,可由医疗服务提供者决定使用握力测力计来测量握力。设备和评估者的说明可以在不同的地点进行标准化。握力可在双侧进行评估,其中每只手进行一次练习和一次最大力量测量,结果可与年龄和性别匹配的正常数据进行比较(如果有的话)。

[0400] b.运动范围。活动范围可以用测角器来评估,这是一种测试关节角度和测量关节处移动程度的仪器。测角器的固定臂对准固定体段上的指定骨性标志,测角器的移动臂对准正在移动的肢体上的指定骨性标志。为使用运动轴和骨性标志测量的每一个运动,指定测角器的支点。运动范围可以评估以下一项或多项:肩部外展、肩部屈曲、肘部屈曲、肘部伸展、腕部外展、腕部屈曲、腕部伸展和膝部伸展。

[0401] 4.听力测试

[0402] 中度听力损失与ARHR2有关(Brachet等人,2014;Steichen-Gersdorf等人,2015)。基线听力可以通过以下一种或多种确定:体检和耳镜检查、导抗听力测验(通常称为鼓室测量法)、纯音听力测验(PTA)(如果可能的话,频率可达8kHz)(如果PTA的阈值>15dB,则受试者还应该接受骨传导测试)、高频听力测验(HFA),频率高达16kHz。

[0403] 5.临床医师总体印象量表

[0404] 临床总体印象(CGI-S)量表是为用于国家精神卫生研究所赞助的临床研究而开发的,以提供临床医生在开始使用研究药物之前和之后对患者总体功能看法的简短、独立的评估(Guy1976)。CGI提供了由临床医生决定的考虑了所有可用信息的整体总结性测量,其包括对患者历史、社会心理环境、症状、行为以及症状对患者功能能力的影响的了解。可以在治疗前和/或治疗期间施用CGI-S,其由医疗服务提供者决定,并且使用范围从-3(严重恶化)到+3(显著改善)的七点量表对变化进行总体评估。

[0405] 6.粗大运动功能分类系统-扩展和修订版

[0406] 粗大运动功能分类系统-扩展和修订版(GMFCS-E和R)可以在治疗前和/或治疗期间施用,其由医疗服务提供者决定。GMFCS-E和R对患者发起的运动进行分类,重点是在量表上1到5的移动。

[0407] 7.患者报告结果测量信息系统

[0408] 患者报告结果测量信息系统(PROMIS)由美国国立卫生研究院(NIH)开发的多种问卷组成,以从患者的角度评估身体、精神和社会福利(www.healthmeasures.net)。这些问卷已被用于患有慢性健康状况的人的临床研究中,如X连锁低磷酸盐血症、关节炎、多发性硬化症和神经纤维瘤病。每份问卷包含8到10个项目,由参与者以从1(从不)到5(总是)的5分的李克特量表进行评分。每份问卷的分数相加,其中高分表示被测量的领域更多(如更多的疲劳,更多的身体功能)。原始分数基于50的平均值和10的标准偏差转换为T分数(T-

Scores),以便将研究样本与一般人群进行比较。PROMIS量表可包括疼痛干扰(短表8a)、疼痛强度(版本3a)、身体功能-上肢(定制简短表)、身体功能-移动性(短表13a FACIT疲劳)、疲劳(短表)和认知影响(短表8a),可由医疗服务提供者决定在治疗前和/或治疗期间施用。这些评估可以由受试者在没有帮助的情况下完成。

[0409] 8.照顾者总体印象量表

[0410] 在治疗前和/或治疗期间,可由医疗服务提供者决定对患者的照顾者施用照顾者总体状态印象。照顾者总体变化印象提供了变化的总体评估,其使用七点量表,范围从-3(严重恶化)到+3(显著改善)。

[0411] 9.西安大略和麦克马斯特大学骨关节炎指数

[0412] WOMAC是患者报告的结果,用于评估髋关节或膝关节疼痛患者的日常生活活动、功能活动、步态、一般健康、疼痛和生活质量(www.sralab.org)。该评估由24个项目组成,花费大约需要12分钟施用。WOMAC可以在治疗前和/或治疗期间施用,其由医疗服务提供者决定。该评估可以由受试者在没有帮助的情况下完成。

[0413] 实施例13:可溶性(构建体1118,SEQ ID NO:118)和骨靶向(构建体2000,SEQ ID NO:119)ENPP1-Fc对颈椎和听觉表型的比较

[0414] 图13显示了在每周用指定的皮下剂量的媒介物或ENPP1构建体#1118和#2000给药的17周龄的WT和17周龄的Enpp1^{asj}雄性小鼠中的脊柱旁骨赘和关节强直的反应。构建体#1118从第3周开始每周给药一次,而构建体#2000从第5周开始每周给药一次。显微CT图像显示优选在构建体#2000给药的Enpp1^{asj}雄性小鼠中脊柱旁骨赘和关节强直的衰减。

[0415] 图14显示了在每周用指定的皮下剂量的媒介物或ENPP1构建体#1118和#2000给药的17周龄的WT和17周龄的Enpp1^{asj}雌性小鼠中的脊柱旁骨赘和关节强直的反应。构建体#1118从第3周开始每周给药一次,而构建体#2000从第5周开始每周给药一次。显微CT图像显示,优选在构建体#2000给药的Enpp1^{asj}雌性小鼠中脊柱旁骨赘和关节强直的衰减。

[0416] 图15A-15B显示了在每周用指定的皮下剂量的媒介物或ENPP1构建体#1118和#2000给药的17周龄的WT和17周龄的Enpp1^{asj}小鼠中的听觉脑干反应。构建体#1118从第3周开始每周给药一次,而构建体2000构建体从第5周开始每周给药一次。刺激频率测量表明,每周2mg/Kg剂量的ENPP1构建体#1118,以及每周0.5和1mg/Kg剂量的ENPP1构建体#2000,可以防止低频(8kHz)范围内的听力损失。也注意到,优选在每周1mg/Kg剂量给药的ENPP1构建体#2000中,在高频范围(32kHz)内ENPP1缺陷动物的听力改善。

[0417] 图16显示了在每周用指定的皮下剂量的媒介物或ENPP1构建体#1118和#2000的WT和17周龄的ENPP1^{asj}小鼠中的完整的FGF23水平。构建体#1118从第3周开始每周给药一次,而构建体#2000构建物从第5周开始每周给药一次。数据显示,当每周以1mg/Kg和4mg/Kg给药时,ENPP1构建体#2000优选抑制完整的FGF23。统计学显著性是通过方差分析Kruskal-Wallis测试,然后通过Dunn的事后分析来评估与WT水平的差异(单因素方差分析)。统计学显著性用p值表示,并附有以下注释:*p<0.05,**p<0.01,***p<0.001,****p<0.0001。

[0418] 参考文献

[0419] 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.

- [0420] 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.
- [0421] 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.
- [0422] 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.
- [0423] 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.
- [0424] 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.
- [0425] 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.
- [0426] 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.
- [0427] 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.
- [0428] 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;136A:210-213.
- [0429] 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.
- [0430] 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.
- [0431] 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.
- [0432] 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.
- [0433] 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.
- [0434] 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.
- [0435] 17. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, et al. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods.* 2010;7:248-249.
- [0436] 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.
- [0437] 19. Schwarz JM, Rödelsperger C, Schuelke M, et al. MutationTaster evaluates disease-causing potential of sequence alterations. *Nat Methods.* 2010;7:575-576.
- [0438] 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
- [0439] 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
- [0440] 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.
- [0441] 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.
- [0442] 24. Lek M, Karczewski KJ, Minikel EV, et al. Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature.* 2016;536:285-291.
- [0443] 25. Kuriyama S, Yaegashi N, Nagami F, et al. The Tohoku Medical Megabank Project: Design and mission. *J Epidemiol.* 2016;26:493-511.
- [0444] 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.
- [0445] 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.

- [0446] 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.
- [0447] 29. Thumbigere-Math V, Alqadi A, Chalmers NI, et al. Hypercementosis Associated with ENPP1 Mutations and GACI. *J Dent Res.* 2018;97:432-441.
- [0448] 30. Stapleton CJ, Pham MH, Attenello FJ, et al. Ossification of the posterior longitudinal ligament: Genetics and pathophysiology. *Neurosurg Focus.* 2011;30:9-12.
- [0449] 31. Resnick D, Shaul SR, Robins JM. Diffuse idiopathic skeletal hyperostosis (DISH): Forestier's disease with extraspinal manifestations. *Radiology.* 1975;115:513-524.
- [0450] 32. Mader R, Verlaan JJ, Buskila D. Diffuse idiopathic skeletal hyperostosis: Clinical features and pathogenic mechanisms. *Nat Rev Rheumatol.* 2013;9:741-750.
- [0451] 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.
- [0452] 34. Rashdan NA, Rutsch F, Kempf H, et al. New perspectives on rare connective tissue calcifying diseases. *Curr Opin Pharmacol.* 2016;28:14-23.
- [0453] 35. Whyte MP. Hypophosphatasia: Enzyme Replacement Therapy Brings New Opportunities and New Challenges. *J Bone Miner Res.* 2017;32:667-675.
- [0454] 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.
- [0455] 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.
- [0456] 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.
- [0457] 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.
- [0458] 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.
- [0459] 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.
- [0460] 42. Capelli S, et al., Clinical and molecular heterogeneity in a large

series of patients with hypophosphatemic rickets. Bone, 2015. 79: p. 143-9.

[0461] 43. Chalmers, J., Enthesopathy as the presenting feature of X-linked hypophosphatemia. A case report. Acta Orthop Scand, 1993. 64(2): p. 221-3.

[0462] 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.

[0463] 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.

[0464] 46. Ramonda, R., et al., [The enthesopathy of vitamin D-resistant osteomalacia in adults]. Reumatismo, 2005. 57(1): p. 52-6.

[0465] 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.

[0466] 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.

[0467] 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.

[0468] 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).

[0469] 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.

[0470] 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.

[0471] 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.

[0472] 对于实施例3-12的另外的参考文献

[0473] ATS. American Thoracic Society Statement: Guidelines for the six-minute walk test. Am J Respir Crit Care Med. 2002; 166(1): 111-7.

[0474] 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.

[0475] CTFG. Recommendations related to contraception and pregnancy testing in clinical trials. 2014 [19 May 2020]; 可获自:

- [0476] http://www.hma.eu/fileadmin/dateien/Human_Medicines/01-
- [0477] About HMA/Working Groups/CTFG/2014 09HMA CTFG Contraception.pdf.
- [0478] 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.
- [0479] 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.
- [0480] IOF.Autosomal Recessive Hypophosphatemic Rickets Type 2 (ARHR2).2019 [19May 2020];可获自:<https://www.iofbonehealth.org/osteoporosis-musculoskeletal-disorders/skeletal-rare-disorders/autosomal-recessive-hypophosphatemi-0>.
- [0481] Mackenzie NC,Huesa C,Rutsch F,MacRae VE.New insights into NPP1 function:lessons fromclinical and animal studies.Bone.2012Nov;51(5):961-8.
- [0482] 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 48weeks from a multicenter study.Muscle Nerve.2013Sep;48(3):343-56.
- [0483] Montes J,McDermott MP,Mirek E,Mazzone ES,Main M,Glanzman AM,et al.
- [0484] Ambulatory function in spinal muscular atrophy:Age-related patterns of progression.PLoS One.2018;13(6):e0199657.
- [0485] Moran JJ.Idiopathic arterial calcification of infancy:a clinicopathologic study.Pathol Annu.1975;10:393-417.
- [0486] 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.2016Dec;10(12):1335-52.
- [0487] NCI.National Cancer Institute Division of Cancer Treatment and Diagnosis(DCTD),National Cancer Institute(NCI),National Institutes of Health (NIH),Department of Healthand 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_re ference 8.5x11.pdf](https://ctep.cancer.gov/protocoldevelopment/electronic_applications/docs/ctcae_v5_quick_reference_8.5x11.pdf).2017.
- [0488] Orriss IR,Arnett TR,Russell RG.Pyrophosphate:a key inhibitor of mineralisation.Curr Opin Pharmacol.2016Jun;28:57-68.
- [0489] Rutsch F,Boyer P,Nitschke Y,Ruf N,Lorenz-Depierieux 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.2008Dec;1(2):133-40.
- [0490] 列举的实施方式

[0491] 提供了下列示例性实施方式,其编号不被解释为指定重要性级别。

[0492] 实施方式1.一种治疗、改善、防止有需要的患者中的弥漫性特发性骨肥厚症(DISH)、强直性脊柱炎和/或脊关节炎的进一步发展和/或进展,和/或防止所述患者中的弥漫性特发性骨肥厚症(DISH)、强直性脊柱炎和/或脊关节炎的方法,所述方法包括向所述患者施用治疗有效量的式(I)的化合物或其盐或溶剂化物:

[0493] 蛋白质-Z-结构域-X-Y

[0494] (I),

[0495] 其中在(I)中:

[0496] 蛋白质包括ENPP1的催化区;

[0497] 结构域不存在或为选自人IgG Fc结构域(Fc)、人血清白蛋白(ALB)和其片段的至少一个;

[0498] X和Z独立地不存在或为包括1-20个氨基酸的多肽,并且

[0499] Y是带负电荷的骨靶向序列;

[0500] 从而治疗、改善、防止所述患者中的DISH、强直性脊柱炎和/或脊关节炎的进一步发展和/或进展和/或防止所述患者中的DISH和/或脊关节炎。

[0501] 实施方式2.根据实施方式1所述的方法,其中所述患者具有ENPP1单倍性不足。

[0502] 实施方式3.根据实施方式1所述的方法,其中所述患者没有ENPP1单倍性不足。

[0503] 实施方式4.根据实施方式1-3中任一项所述的方法,其中所述患者不是ENPP1缺陷的。

[0504] 实施方式5.根据实施方式1-3中任一项所述的方法,其中所述患者是ENPP1缺陷的。

[0505] 实施方式6.根据实施方式1-5中任一项所述的方法,其中所述患者通过至少一种选自以下的途径施用所述化合物:口服、气溶胶、吸入、直肠、阴道、透皮、皮下、鼻内、颊、舌下、肠胃外、鞘内、胃内、眼科、肺部和局部。

[0506] 实施方式7.根据实施方式1-6中任一项所述的方法,其中所述化合物被静脉内或皮下注射施用至所述患者。

[0507] 实施方式8.根据实施方式1-7中任一项所述的方法,其中向所述患者施用所述化合物增加所述患者的细胞外焦磷酸盐浓度或防止所述患者的细胞外焦磷酸盐浓度进一步降低。

[0508] 实施方式9.根据实施方式1-8中任一项所述的方法,其中向所述患者施用所述化合物降低所述患者的跟腱钙化、脊柱钙化、髋关节钙化和双侧钙化中的一种或多种或防止所述患者的跟腱钙化、脊柱钙化、髋关节钙化和双侧钙化中的一种或多种的进一步增加。

[0509] 实施方式10.根据实施方式1-9中任一项所述的方法,其中所述结构域包括白蛋白。

[0510] 实施方式11.根据实施方式1-10中任一项所述的方法,其中所述结构域包括IgG Fc结构域。

[0511] 实施方式12.根据实施方式1-11中任一项所述的方法,其中所述蛋白质缺乏ENPP1跨膜结构域。

[0512] 实施方式13.根据实施方式1-12中任一项所述的方法,其中所述化合物作为药物

组合物施用至所述患者,所述药物组合物进一步包括至少一种药学上可接受的运载体。

[0513] 实施方式14.根据实施方式1-13中任一项所述的方法,其中所述患者是哺乳动物。

[0514] 实施方式15.根据实施方式14所述的方法,其中所述哺乳动物是人类。

[0515] 实施方式16.根据实施方式1-15中任一项所述的方法,其中所述蛋白质包括SEQ ID NO:1的氨基酸残基99(PSCAKE)至925(QED)。

[0516] 实施方式17.根据实施方式1-16中任一项所述的方法,其中所述蛋白质包括SEQ ID NO:3的氨基酸残基1至833。

[0517] 实施方式18.根据实施方式1-16中任一项所述的方法,其中所述蛋白质包括SEQ ID NO:2中描绘的氨基酸序列。

[0518] 实施方式19.根据实施方式1-16中任一项所述的方法,其中所述蛋白质包括SEQ ID NO:3或4或5中描绘的氨基酸序列。

[0519] 实施方式20.根据实施方式1-19中任一项所述的方法,其中相对于缺乏所述结构域的所述化合物的循环半衰期,所述结构域增加了所述化合物的循环半衰期。

[0520] 实施方式21.根据实施方式1-20中任一项所述的方法,其中所述患者还被诊断患有选自以下的疾病或病症:早发性骨质疏松症、骨质减少、与年龄有关的骨质减少、OPLL、遗传性低血磷酸盐性佝偻病、X连锁低磷酸盐血症、常染色体隐性低血磷酸盐性佝偻病2型、常染色体显性低血磷酸盐性佝偻病和低血磷酸盐性佝偻病。

[0521] 实施方式22.根据实施方式1-20中任一项所述的方法,其中所述患者没有被诊断出患有选自以下的疾病或病症:早发性骨质疏松症、骨质减少、与年龄有关的骨质减少、OPLL、遗传性低血磷酸盐性佝偻病、X连锁低磷酸盐血症、常染色体隐性低血磷酸盐性佝偻病2型、常染色体显性低血磷酸盐性佝偻病和低血磷酸盐性佝偻病。

[0522] 实施方式23.根据实施方式1-22中任一项所述的方法,其中所述患者患有选自以下的疾病或病症:早发性骨质疏松症、骨质减少、与年龄有关的骨质减少、OPLL、遗传性低血磷酸盐性佝偻病、X连锁低磷酸盐血症、常染色体隐性低血磷酸盐性佝偻病2型、常染色体显性低血磷酸盐性佝偻病和低血磷酸盐性佝偻病。

[0523] 实施方式22.根据实施方式1-22中任一项所述的方法,其中所述患者不患有选自以下的疾病或病症:早发性骨质疏松症、骨质减少、与年龄有关的骨质减少、OPLL、遗传性低血磷酸盐性佝偻病、X连锁低磷酸盐血症、常染色体隐性低血磷酸盐性佝偻病2型、常染色体显性低血磷酸盐性佝偻病和低血磷酸盐性佝偻病。

[0524] 通过引用并入

[0525] 本文提到的所有出版物和专利通过引用以其整体并入本文,就像每一个单独的出版物或专利被具体和单独指明通过引用并入。

[0526] 其他实施方式

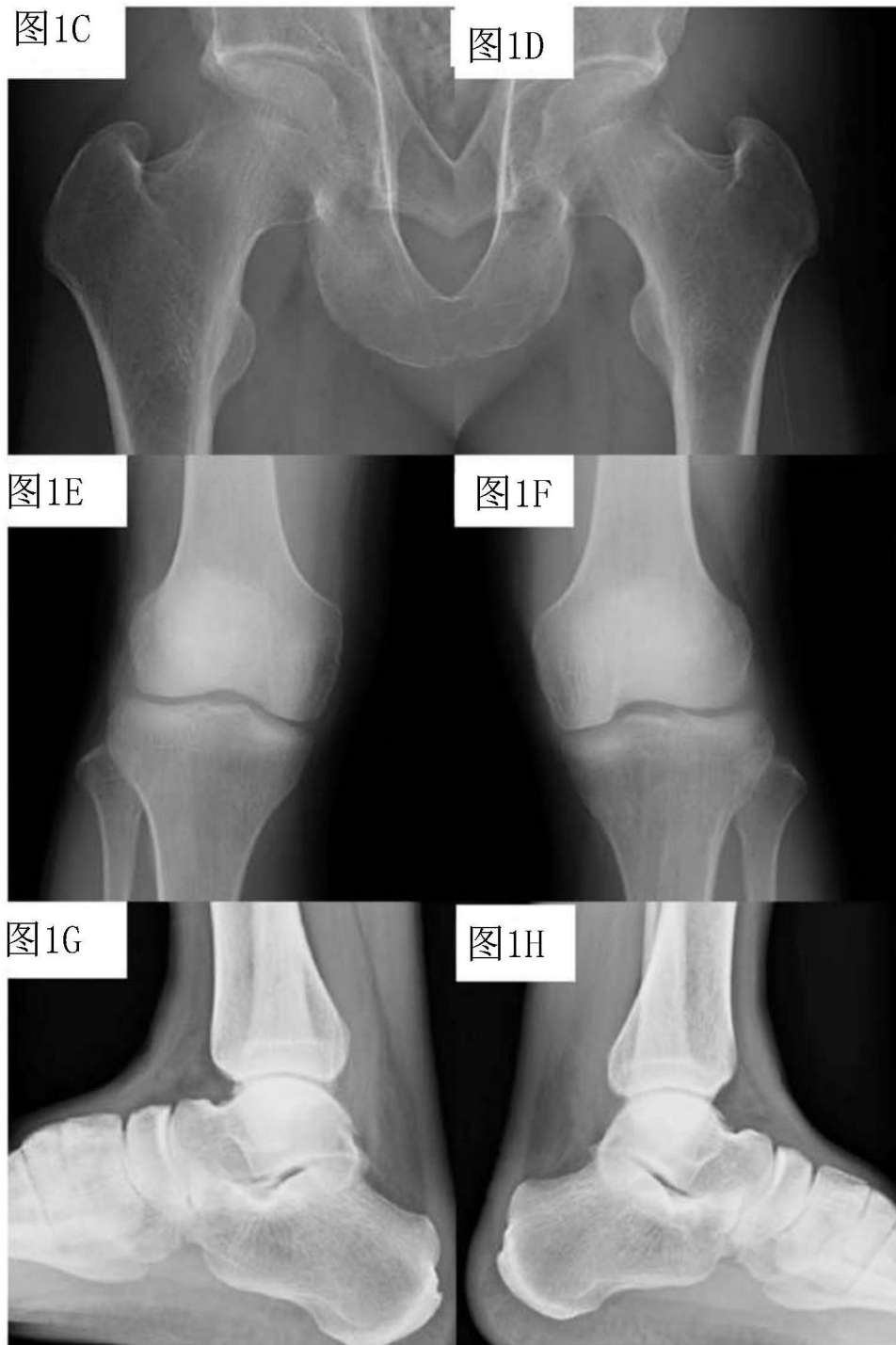
[0527] 虽然已经讨论了本主题的具体实施方式,但上述说明书是说明性的,而不是限制性的。本领域的技术人员在阅读本说明书和下面的权利要求书后,许多变化会变得显而易见。本发明的全部范围应参照权利要求书及其等同物,以及说明书和这些变化的全部范围来确定。



图1A



图1B



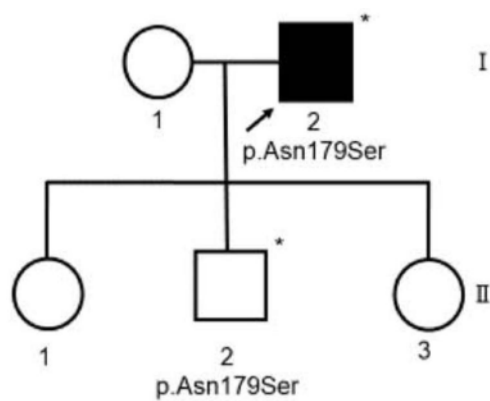


图2A

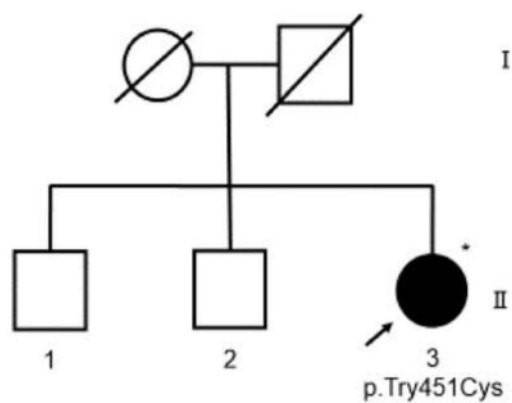


图2B

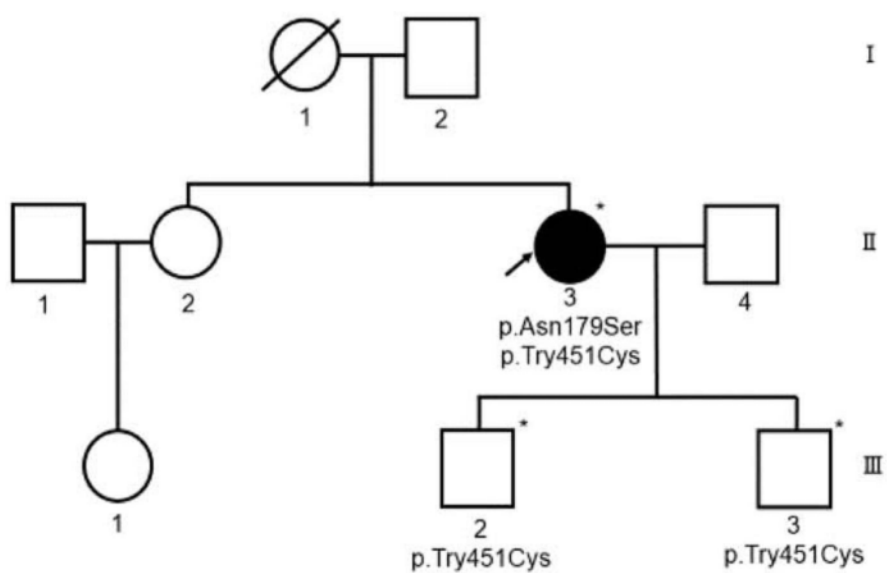
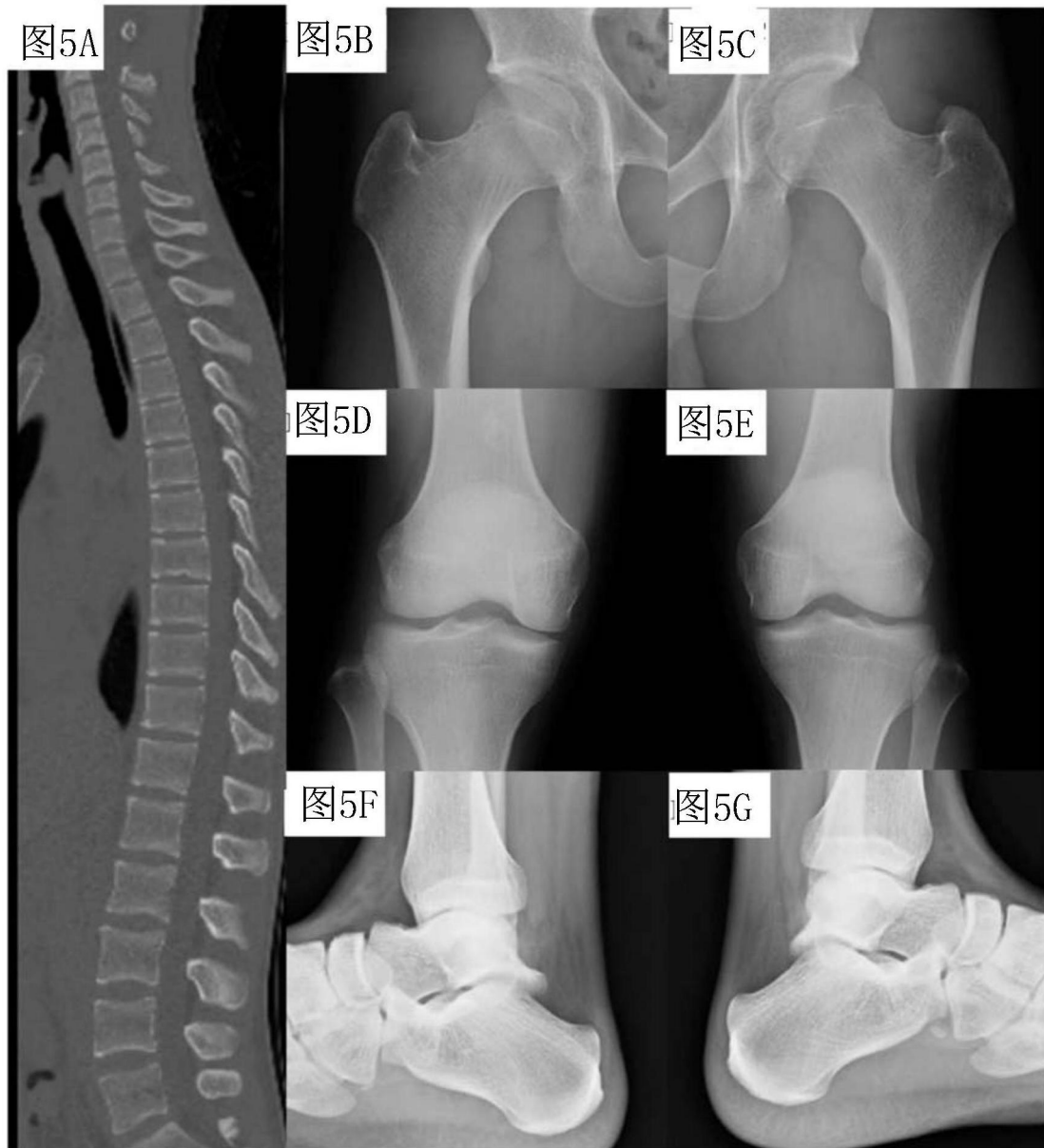
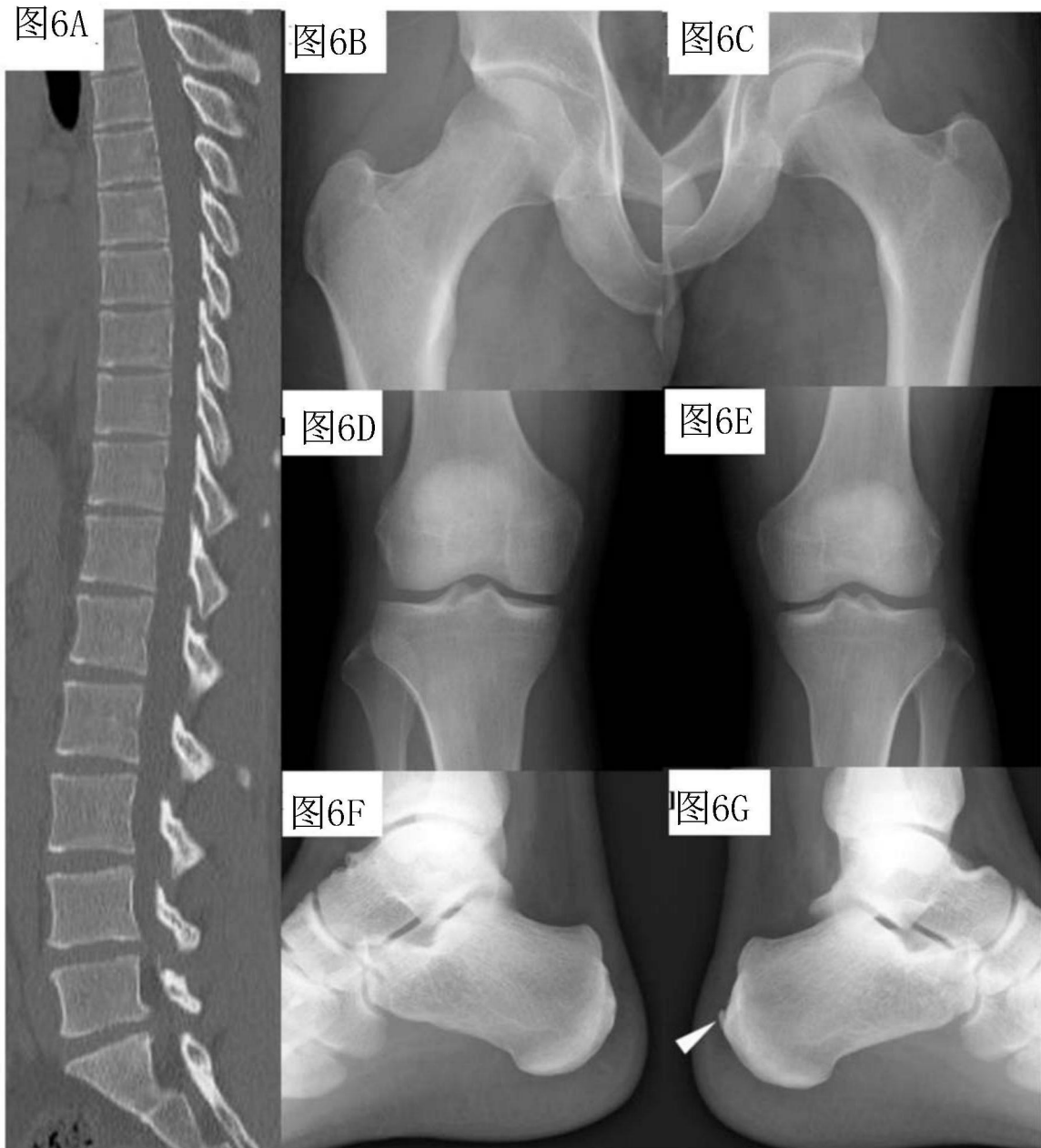


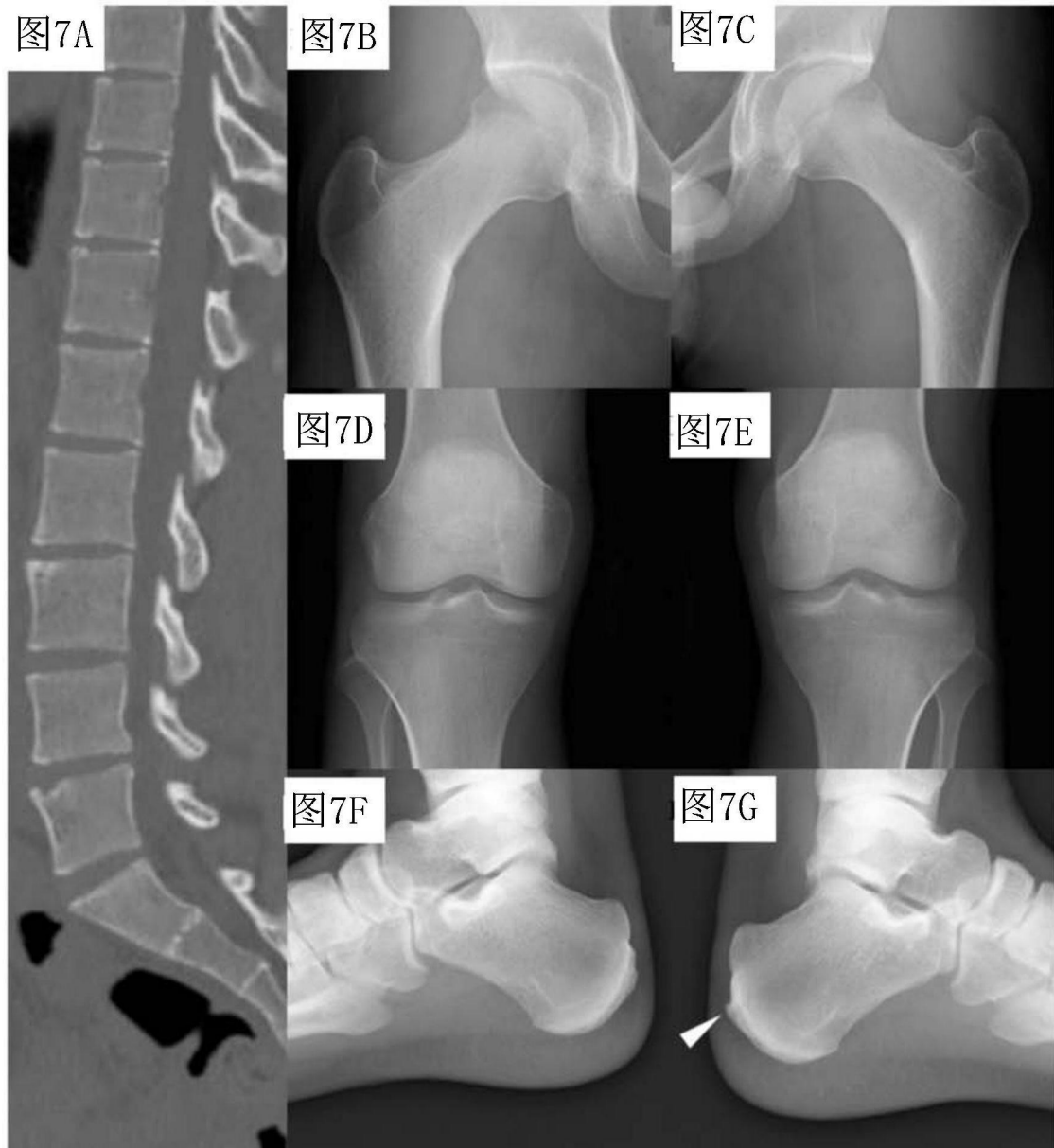
图2C











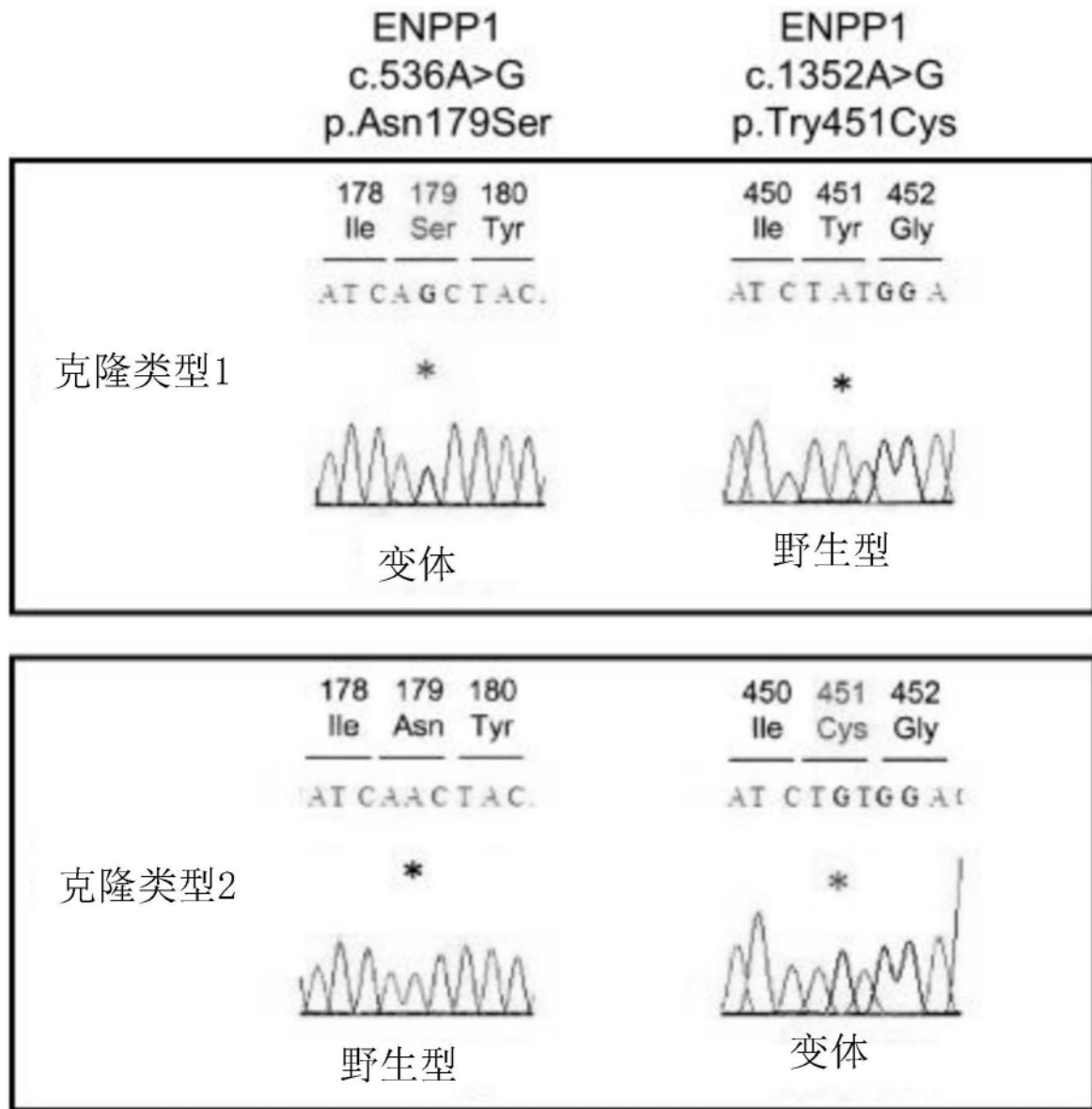


图8

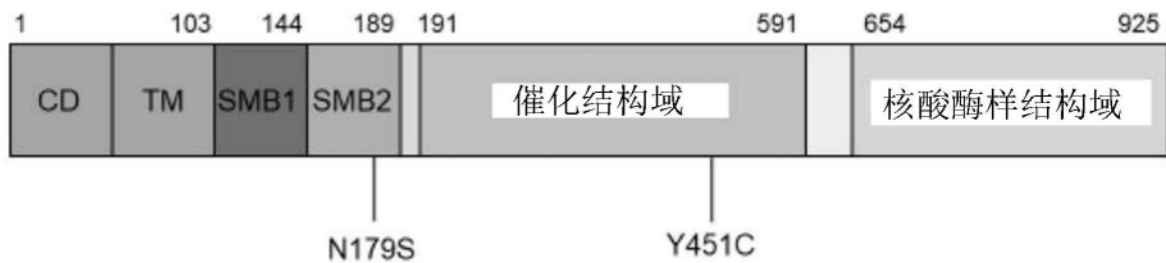


图9

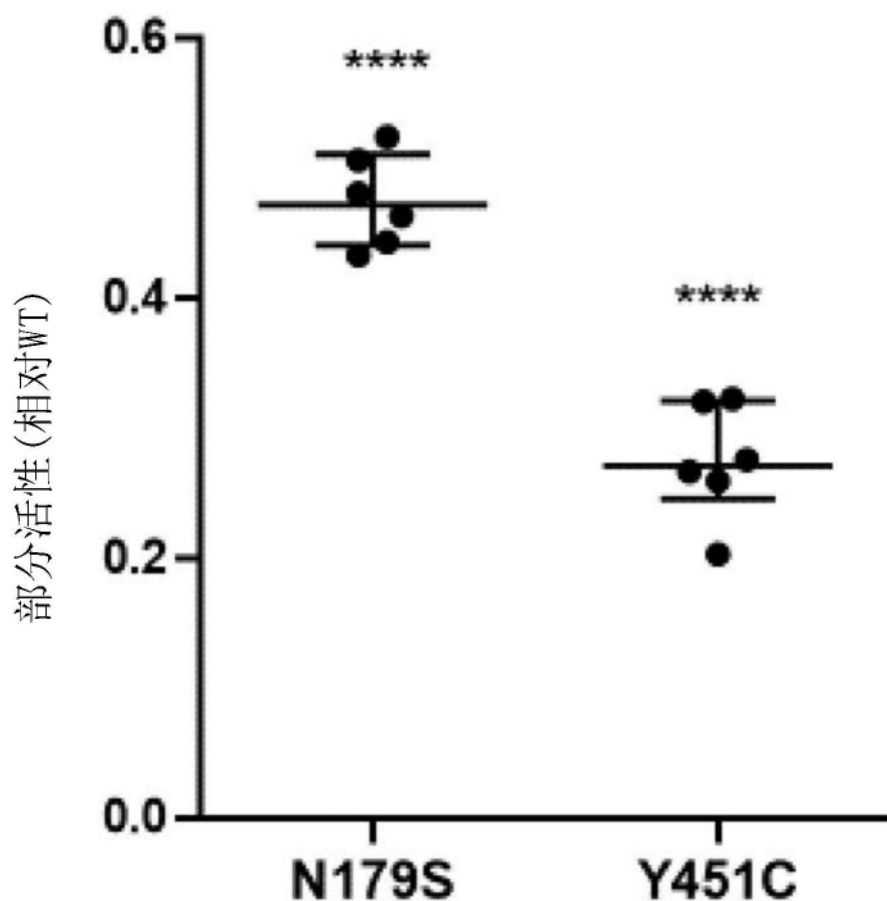


图10

1 MERDGCAGGG SRGGEGGRAP REGPAGNGRD RGRSHAAEAP GDPQAAASLI
 51 APMDVGEEPL EKAARARTAK DPNTYKVLST VLSVCVLTTI LGCIFGLKPS
 101 **CAKE**VKSCKG RCFERTFGNC RCDAACVELG NCCLDYQETC IEPEHIWTCN
 151 KFRCGEKRLT RSLCACSDDC KDKGDCCINY SSVQCQGEKSW VEEPESINE
 201 PQCPAGFETP PTLFSLDGF RAEYLHTWGG LLPVISKLKK CGTYTKNMRP
 251 VYPTKTFPNH YSIVTGLYPE SHGIIDNKMY DPKMNASFSL KSKEKFNPEW
 301 YKGEPiWVTA KYQGLKSGTF FWPGSDVEIN GIFPDIYKMY **NGSVP**FEERI
 351 LAVLQWLQLP KDERPHFYTL YLEEDSSGH SYGPVSSEVI KALQRVDGMV
 401 GMLMDGLKEL NLHRCLNLIL ISDHGMEQGS CKKYIYLNKY LGDVKNIKVI
 451 YGPAARLRPS DVPDKYYSFN YEGIARNLSC REPNQHFKPY LKHFLPKRLH
 501 FAKSDRIEPL TFYLDPQWQL ALNPSEKRYC GSGFHGSDNV FSNMQALFVG
 551 YGPGFKHGIE ADTFENIEVY NLMCDLLNLT PAPNNGTHGS LNHLLKNPVY
 601 TPKHPKEVHP LVQCPFTRNP RDNLCSCNP SILPIEDFQT QFNLTVAEEK
 651 IIKHETLPYG RPRVLQKENT ICLLSQHQFM SGYSQDILMP LWTSYTVDRN
 701 DSFSTEDFSN CLYQDFRIPL SPVHKCSFYK **NNTKVS**YGFL SPPQLNKNSS
 751 GIYSEALLTT NIVPMYQS FQ VIWRYFHDTL LRKYAEERNG VNVVSGPVFD
 801 FDYDGRCDL ENLRQKRRVI RNQEILIPTH FFIVLTSCKD TSQTPLHCEN
 851 LDTLAFILPH RTDNSESCVH GKHDSSWVEE LLMLHRARIT DVEHITGLSF
 901 YQQRKEPVSD ILKLKTHLPT FS**QED** (SEQ ID NO: 1)

图11

剂量反应 BL-1118

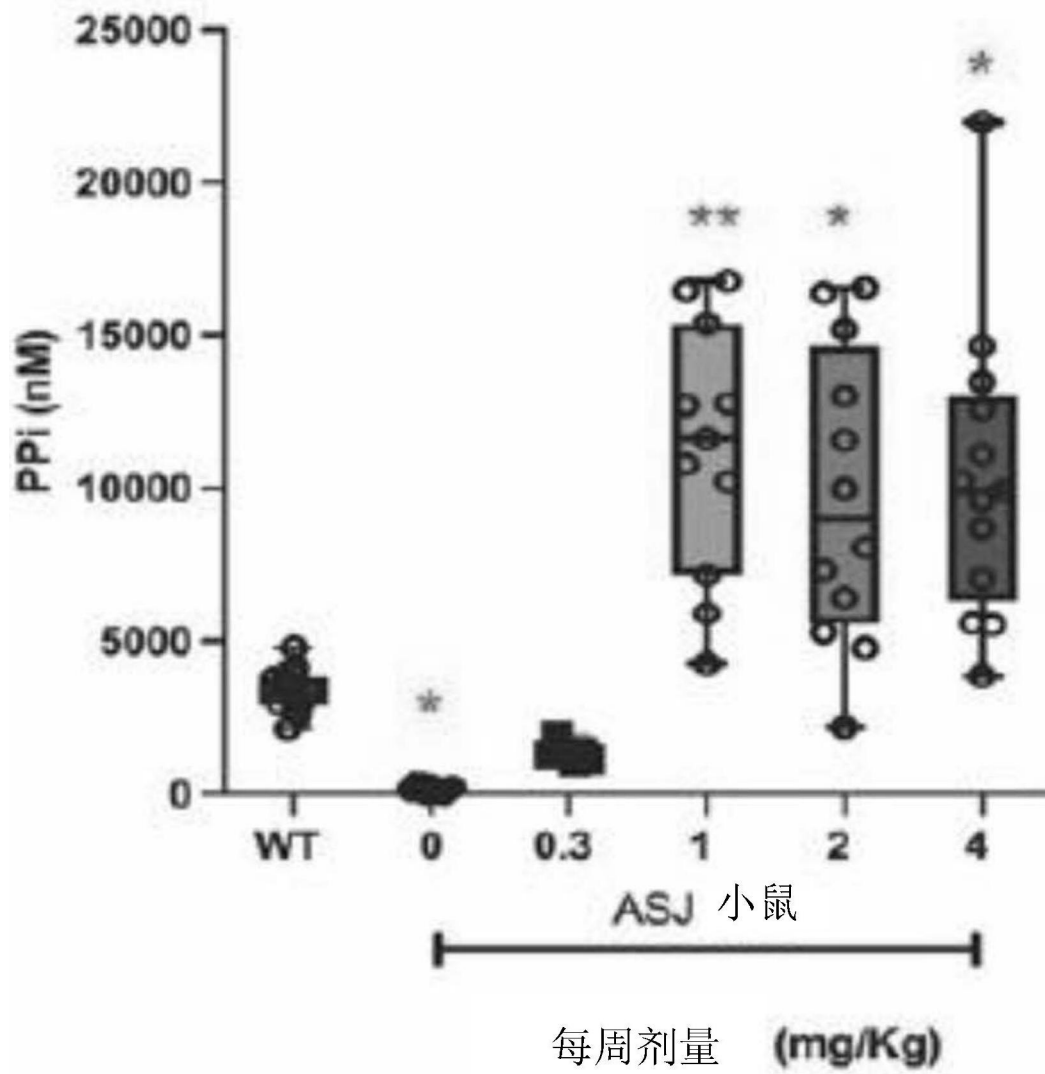
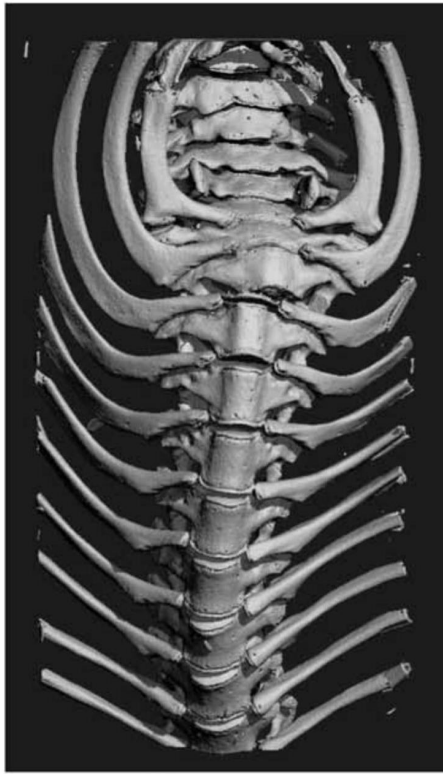
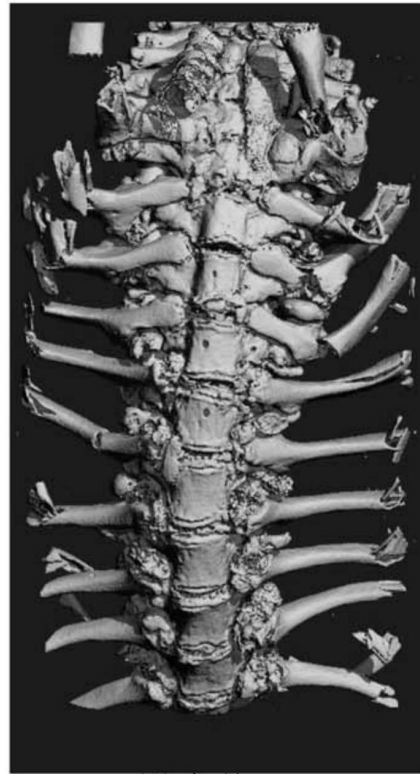


图12



野生型 M



M ASJ - 媒介物

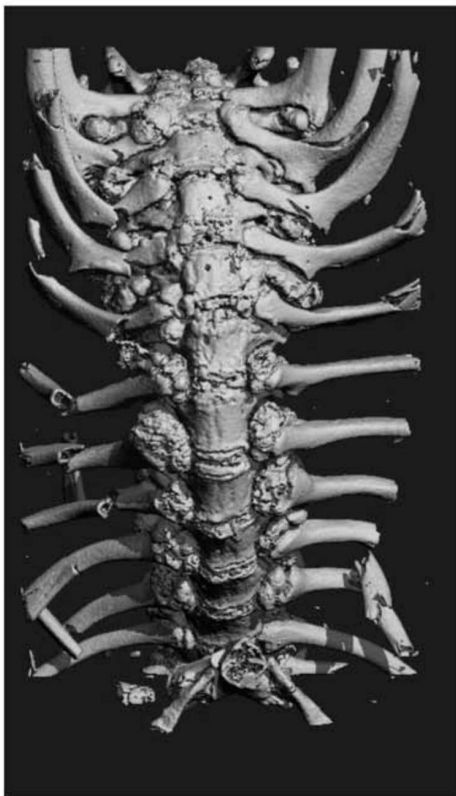
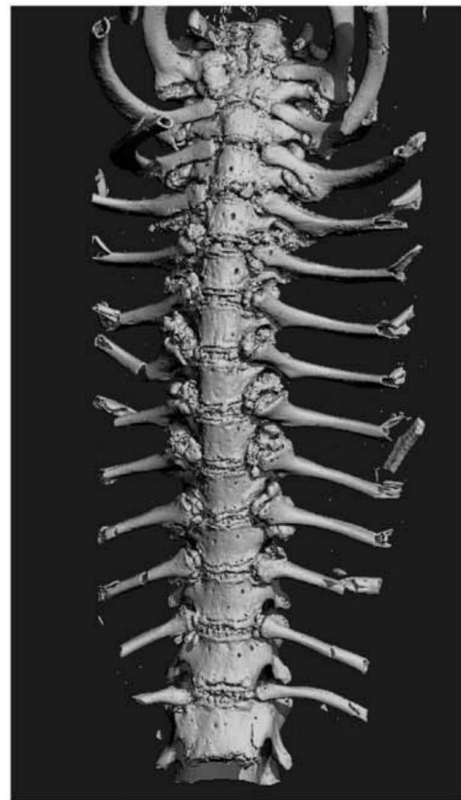
M ASJ - 1 mg/kg
可溶性 ENPP1 (1118)M ASJ - 1mg/kg
骨靶向的 ENPP1 (2000)

图13

野生型^F

F ASJ - 媒介物

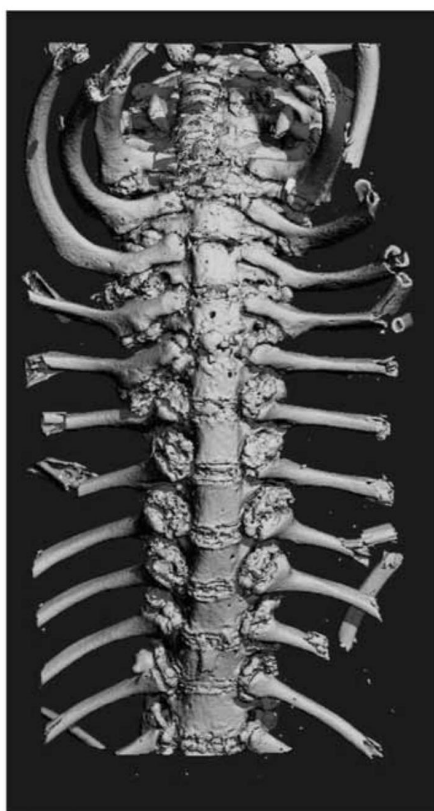
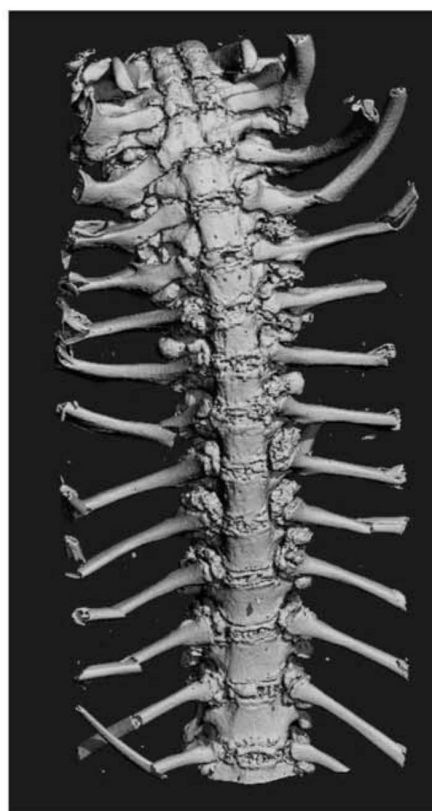
F ASJ - 1 mg/kg
可溶性 ENPP1 (构建体1118)F ASJ - 1mg/kg
骨靶向的 ENPP1 (构建体2000)

图14

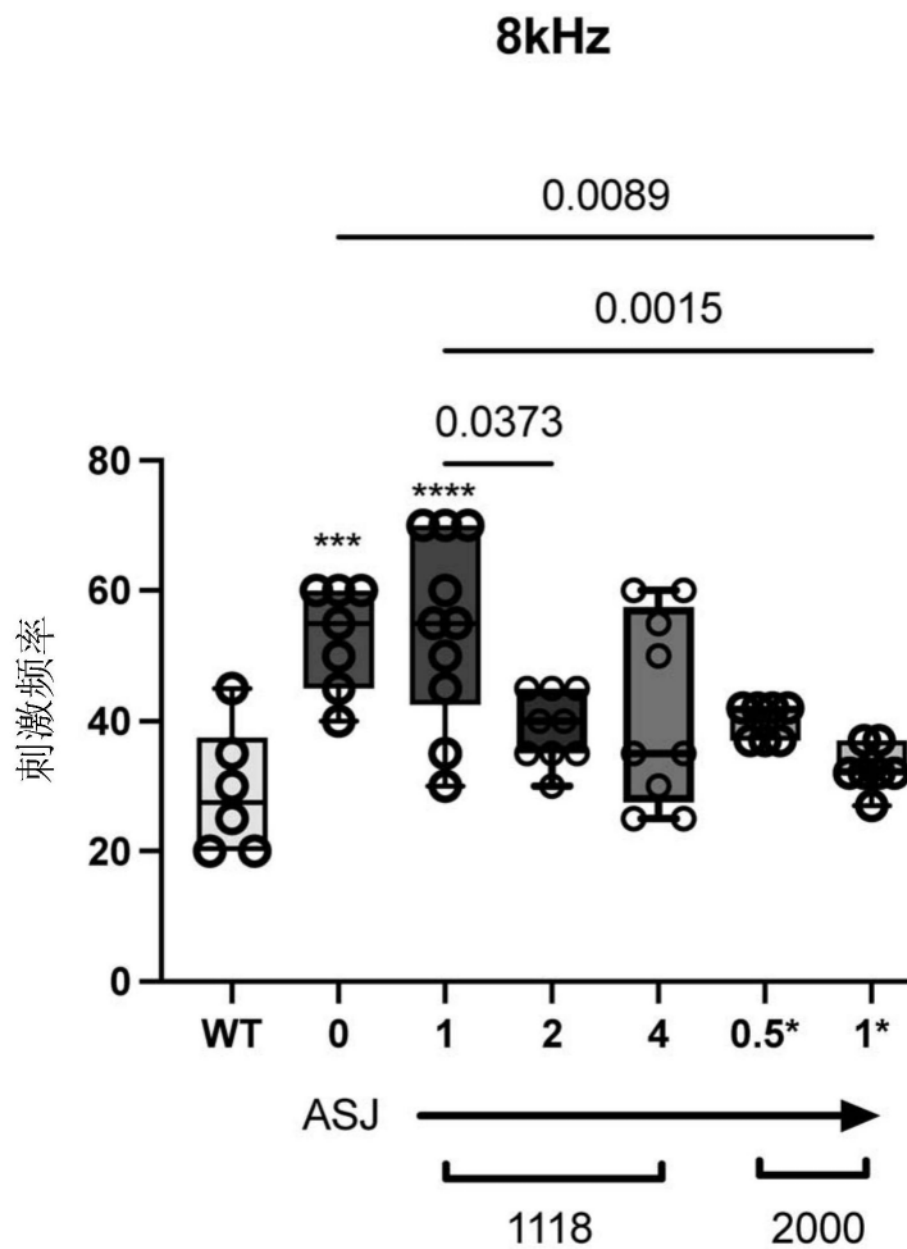


图15A

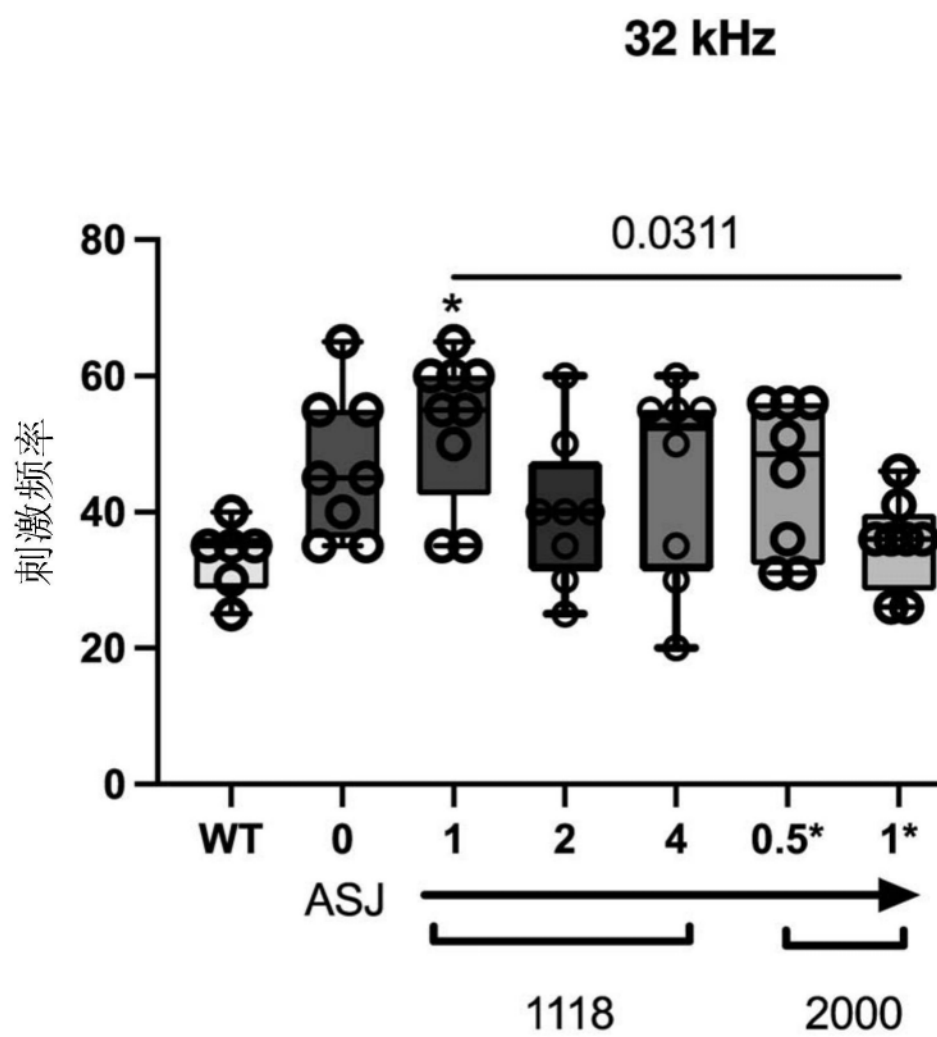


图15B

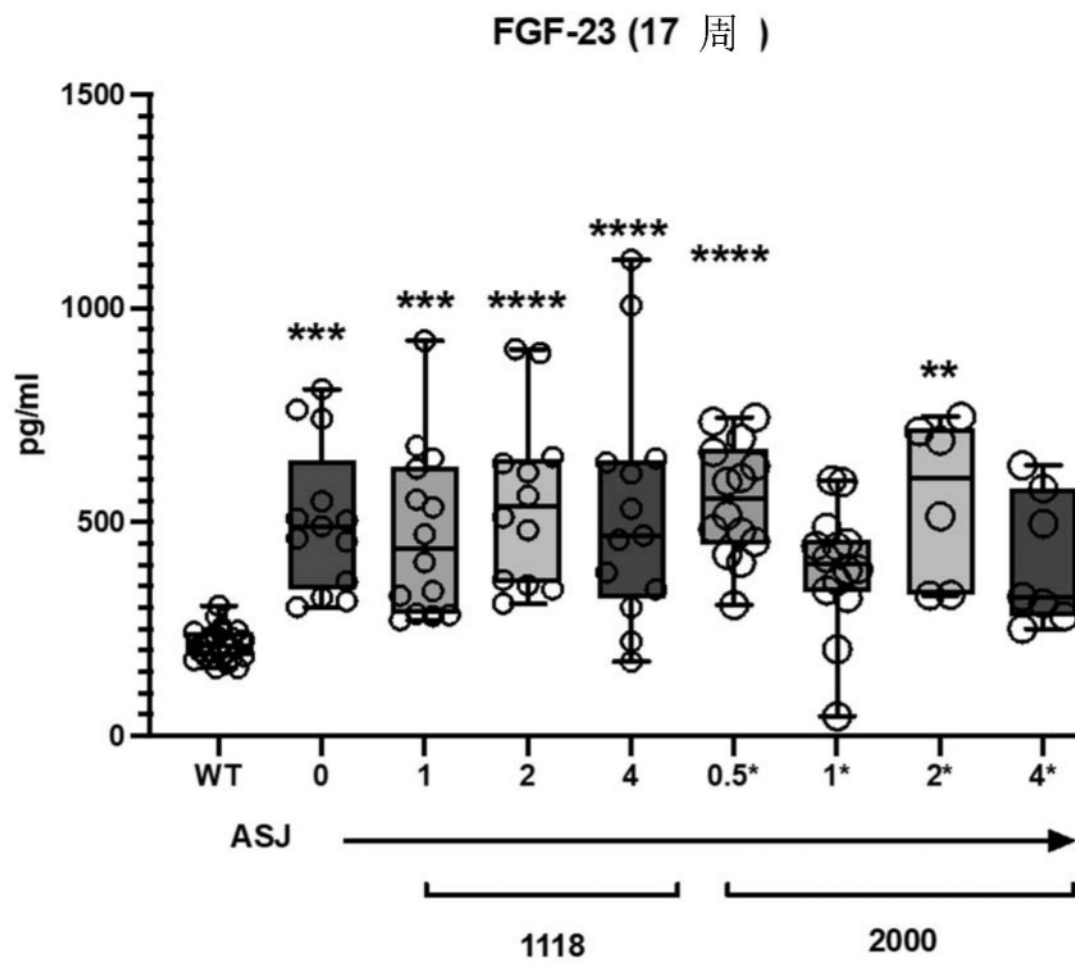


图16