



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년08월22일
(11) 등록번호 10-2434879
(24) 등록일자 2022년08월17일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/409 (2006.01) A61K 45/06 (2006.01)
A61P 11/00 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 31/409 (2013.01)
A61K 45/06 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2018-7037697
- (22) 출원일자(국제) 2017년05월25일
심사청구일자 2020년05월25일
- (85) 번역문제출일자 2018년12월26일
- (65) 공개번호 10-2019-0013926
- (43) 공개일자 2019년02월11일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2017/034420
- (87) 국제공개번호 WO 2017/205595
국제공개일자 2017년11월30일
- (30) 우선권주장
62/341,848 2016년05월26일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌
Lian Chenn et al. Targeting Glutamine Induces Apoptosis: A Cancer Therapy Approach, Int. J. Mol. Sci. v.16, pp.22830-22855 (2015.09.22.)
Thomas Berter et al. Matrix Remodeling Promotes Pulmonary Hypertension through Feedback Mechanoactivation of the YAP/TAZ-miR-130/301 Circuit, Cell Rep pp, v.13(5) pp.1016-1032 (2015.11.3.)

- (73) 특허권자
유니버시티 오브 피츠버그 - 오브 더 커먼웰스 시스템 오브 하이어 에듀케이션
미국 펜실베이니아 15260, 피츠버그, 130 새커리 애비뉴, 퍼스트 플로어 가드너 스틸 컨퍼런스 센터 더 브리검 앤드 우먼즈 하스피탈, 인크.
미국 02115 메사추세츠주 보스턴 프란시스 스트리트 75
- (72) 발명자
찬, 스테판 와이.
미국 펜실베이니아 15238 피츠버그 도그우드 레인 111
베르테로, 토마스
프랑스 니스 06200 바트 비 파르크 다쥐르 애비뉴 데 매그놀리아 레지던스 르 22
- (74) 대리인
특허법인다나

전체 청구항 수 : 총 4 항

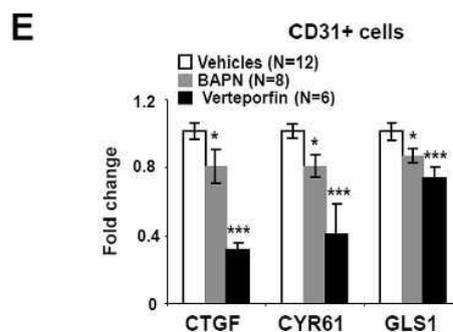
심사관 : 박희연

(54) 발명의 명칭 폐혈관 질환 치료용 조성물 및 방법

(57) 요약

치료 유효량의 YAP/TAZ 억제 조성물 및/또는 GLS1 억제 조성물을 대상체에 투여하는 단계를 포함하는, 대상체의 폐혈관 질환을 치료하기 위한 조성물 및 방법이 제공된다.

대표도 - 도4e



(52) CPC특허분류

A61P 11/00 (2018.01)

A61K 2300/00 (2013.01)

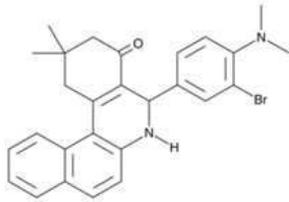
명세서

청구범위

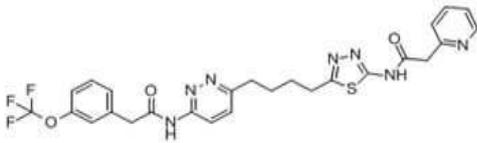
청구항 1

C968(Glutaminase Inhibitor Compound 968) 또는 CB-839(Telaglenastat), 또는 이의 염을 유효성분으로 포함하고,

상기 C968(Glutaminase Inhibitor Compound 968)는 하기 구조식으로 표시되며: 및



상기 CB-839(Telaglenastat)는 하기 구조식으로 표시되는 폐 고혈압 치료용 조성물:



청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 폐 고혈압은 폐동맥 고혈압인 폐 고혈압 치료용 조성물.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

상기 조성물은 베르테포르핀 또는 이의 염을 추가로 포함하는 폐 고혈압 치료용 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서,

상기 조성물은 베르테포르핀 또는 이의 염을 유효 성분으로 포함하는 조성물과 병용 투여되는 폐 고혈압 치료용 조성물.

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 본 출원은 2016년 5월 26일자로 출원된 미국 가출원 번호 제62/341,848호의 우선권을 주장하며, 이의 각각의 개시 내용은 본원에 참고 문헌으로 포함된다.
- [0002] 본 발명은 국립 보건원 (National Institutes of Health)이 수여한 허가 번호 HL124021의 정부 지원으로 이루어졌다. 정부는 발명에 대해 특정 권리를 가진다.
- [0003] 본 발명은 폐혈관 질환 치료용 조성물 및 방법에 관한 것이다.

배경 기술

- [0004] 폐 고혈압(Pulmonary hypertension, PH) 및 이의 매우 심각한 서브타입 폐동맥 고혈압(pulmonary arterial hypertension, PAH)은 전-증식성 세포 표현형과 이상폐혈관 재형성을 특징으로 하는 잘 이해되지 않은 혈관 질환이다. 혈관 세포 외 기질(ECM)의 변화는 점점 더 PH의 분자 드라이버로 인식되고 있다.
- [0005] 조절 장애의(Dysregulated) 콜라겐과 엘라스틴 생성(Mecham RP, et al., Science. 1987;237(4813):423-6)은 말기 및 초기 질환(Bertero T, et al., Cell Reports. 2015;13(5):1016-32) 및 근위(proximal) 및 원위(distal) 혈관(Lammers S, et al., Compr Physiol. 2012; 2 (1) : 295-319) 모두에서 관찰되었다. 혈관 내 ECM의 약리학적 표적화는 PH를 향상시킬 수 있지만(Cowan K, et al., Nature Medicine. 2000;6(6):698-702; Nave AH, et al. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology. 2014;34(7): 1446-58), ECM 기계적 변환(즉, 세포가 외부 기계적 힘을 감지하고 적응할 수 있게 하는 프로세스)을 혈관계와 연결시키는 과정이 새롭게 부상하고 있다. Hippo 시그널링 경로에 내재된 두 가지 관련 공동 전사 인자인 YAP (Yes Associated Protein 1)과 TAZ (또는 WWTR1)는 경질 ECM에 의해 기계적 활성화되고 여러 장기에 걸쳐 세포 증식과 생존의 중심 조절자로 기능하여 조직 성장과 발달을 조절한다 (Dupont S, et al. Nature. 2011 ;474(7350): 179-83; Pan D. Dev Cell. 2010; 19(4):491 -505). 최근에 폐혈관 경직이 질병 초기에 YAP/TAZ를 활성화시킴으로써 miR-130/301 계통이 PH 내 인 비보에서 ECM 재형성을 추가로 유도한다는 결론이 났다 (Bertero T, et al, Cell Reports. 2015; 13 (5) : 1016-32). ECM 경직도(stiffness)가 PH에서 세포 증식을 유도한다는 것이 또한 결정되었지만, 이러한 기능적 연결이 중요한 중요성을 가지는 반면, 그 분자 메커니즘은 여전히 불분명하다.
- [0006] 별도로, 미토콘드리아 산화 인산화로부터 해당과정으로의 에너지 생산의 만성적인 변화인 호기성 해당과정은 (Cottrill KA 및 Chan SY, European J. of Clin. Invest. 2013; 43 (8) : 855-65 검토되는 바와 같이) PH에서 폐동맥 내피 및 평활근 증식 및 이동의 병원성 조절인자(pathogenic driver)로 기술되어 왔다. 이 대사 이동과 관련된 PH의 이전 역학 연구는 저산소 질병 모델링에 역사적으로 의존해 왔다 (Paulin R, and Michelakis ED. Circ. Res. 2014; 115(1): 148-64; Zhao L, et al. Nature. 2015;524(7565):356-60). 그러나 많은 형태의 PH - 유전적 돌연변이, 선천성 심장병, 경피증 및 인간 면역 결핍 바이러스(HIV) 감염에 취약한 특발성 또는 이차적 상태와 관련된 서브타입- 는 뚜렷한 저산소 손상이 없을 때 또한 극심한 대사 조절 장애를 특징으로 한다. PH의 심각한 저산소증과 무관하게 작동하는 대사 조절 장애의 분자 조절인자(molecular regulators)에 관한 데이터가 새롭게 등장하고 있다 (Diebold I, et al. Cell Metabolism. 2015, 21 (4) : 596-608)
- [0007] 이러한 관점을 염두에 두고 증가하는 증거는 글루코오스 소비 및 호기성 해당과정과 관련된 과정을 포함하여 PH 이상의 상황에서 YAP/TAZ 활성화와 세포 대사의 중심적인 연결을 제시한다 (Wang W, et al. Nat Cell Biol. 2015; 17(4):490-9; Mo JS, et al. Nat Cell Biol. 2015; 17(4):500-10; Enzo E, et al. EMBO J. 2015;34(10): 1349-70). 그러나 증가된 해당과정 단독으로는 증식하는 세포의 총 대사 요구를 충족시키기에는 불충분하다. 트리카르복시산(tricarboxylic acid, TCA) 주기는 또한 글루타민과 같은 아미노산의 산화를 통한 에너지 생산의 주요 원천 역할을 한다 (Le A, et al. Cell metabolism. 2012; 15 (1) : 1 10-21). TCA 주기의 지속적인 기능을 위해서는 탄소 중간체의 보충이 필요하다. 이 보충, 또는 보전(anaplerosis)은, 두 가지 주요 경로를 통해 수행된다: 글루타민 분해(효소 글루타미나제 [GLS]를 통한 글루타민의 탈아미드화) 및 ATP-의존성

피루베이트 카르복시라제 (PC)를 통한 옥살로아세테이트로의 피루베이트의 카르복실화. 구체적으로, GLS 활성을 통한 글루타민 분해는 특히 빠르게 증식하는 세포에서 세포 간 에너지, 탄소 및 질소의 동원을 가능하게 함으로써 보전(anaplerosis)을 일으키며(Lunt SY, and Vander Heiden MG. Annu Rev Cell Dev Biol. 201 1 ;27(441-64)), 세포 성장 및 생존 능력을 유지하기 위해 산화적 인산화로부터 해당과정으로 대사를 전환한 형질전환된 세포에서 중요한 과정으로 작용한다(Zhao Y, et al. Cell Death Dis. 2013;4(e532). 증식의 직접 유도를 위한 아스파테이트 생산을 지원하기 위한 글루타민 분해 (및/또는 피루베이트 카르복실화)의 특정 능력은 최근 악성 세포에서 보고되었다 (Sullivan LB, et al. Cell. 2015; 162(3):552-63; Birsoy K, et al. Cell. 2015; 162(3):540-51). PH에서 손상된 우심실 심근 세포에서 글루타민 분해의 조절 장애가 관찰되었다 (Piao L, et al. Journal of molecular medicine. 2013;91 (10): 1185-97). 그러나 글루타민 대사의 병리학적 중요성, 특히 폐혈관 경직도 또는 YAP/TAZ 활성화와 관련해서는 아직 정의되지 않았다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 치료 유효량의 YAP/TAZ 억제 조성물 및/또는 GLS1 억제 조성물을 대상체에 투여하는 단계를 포함하는, 대상체의 폐혈관 질환을 치료하기 위한 조성물 및 방법을 제공한다. 일부 구현예에서, 상기 YAP/TAZ 억제 조성물은 베르테포르핀, 이의 염, 전구 약물(prodrug) 또는 유도체이다. 다른 또는 추가적인 구현예에서, 상기 GLS1 억제 조성물은 CB-839, 이의 염, 전구 약물 또는 유도체이다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 출원 전반에 걸쳐 사용된 용어는 당업자에게 통상적인 의미 및 통상적인 의미로 해석되어야 한다. 그러나, 출원인은 하기 용어가 하기 정의된 특정 정의를 부여 받기를 희망한다.

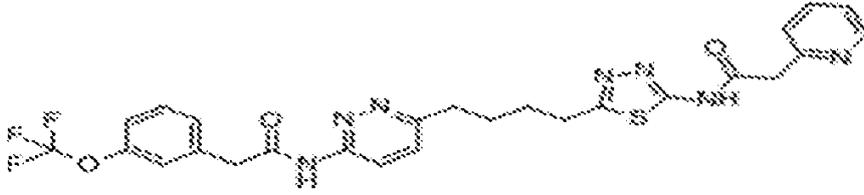
[0010] **정의**

[0011] 명세서 및 청구의 범위에서 사용된 단수 형태 "a", "an" 및 "the"는 문맥상 다르게 지시하지 않는 한 복수 인용 문헌을 포함한다. 예를 들어, 용어 "a cell"은 이의 혼합물을 포함하는 복수의 cells을 포함한다.

[0012] 용어 "투여하는"은 경구, 국소, 정맥 내, 피부, 피하, 경피, 경피, 근육 내, 관절 내, 비경구, 동맥 내, 피부 내, 심실 내, 두개 내, 복강 내, 병 내, 비강 내, 직장, 질식, 흡입 또는 이식된 저장소를 통해 투여될 수 있다. 용어 "비경구"는 피하, 정맥 내, 근육 내, 관절 내, 활막 내, 흉골 내, 척수강 내, 간내, 병변 내 및 두개 내 주사 또는 주입 기술을 포함한다. 일 구현예에서, 투여는 정맥 내 투여이다.

[0013] 범위는 본원에서 "약" 하나의 특정 값으로부터, 및/또는 "약" 다른 특정 값까지 표현될 수 있다. 그러한 범위가 표현될 때, 또 다른 구현예는 하나의 특정 값으로부터, 및/또는 다른 특정 값까지를 포함한다. 유사하게, 값들이 근사치로 표현될 때, "약"이라는 전제를 사용함으로써, 특정 값이 또 다른 양상을 이룬다는 것을 이해할 수 있다. 상기 범위 각각의 끝점은 다른 끝점과 관련하여, 그리고 다른 끝점과는 독립적으로 중요하다는 것이 더 이해될 것이다. 본원에 개시된 다수의 값이 있으며, 각 값은 또한 값 그 자체 이외에 특정 값에 대해 "약"으로 여기에 개시됨을 또한 이해할 수 있다. 예를 들어, 값 "10"이 개시되는 경우 "약 10"이 또한 개시된다. 또한, 값이 개시되면, 당업자에 의해 적절히 이해되듯이, 그 값 "보다 작거나 같음", 그 값 "보다 크거나 같음" 그리고 그 값들 사이 가능한 범위 또한 개시된다. 예를 들면, 값 "10"이 개시되는 경우, "10 보다 적거나 같음"뿐만 아니라 "10 보다 크거나 같음" 것 또한 개시된다. 또한 출원 데이터 전체가 다양한 형식으로 제공되며, 이 데이터는 데이터 요소의 모든 조합에 대한 끝점과 시작점 및 범위를 나타내는 것임을 이해한다. 예를 들면, 특정 데이터 포인트 "10" 및 특정 데이터 포인트 "15"가 개시되는 경우, 10과 15 초과, 이상, 미만, 이하 그리고 같음은 10 내지 15로 또한 개시된다고 고려하는 것으로 이해된다. 또한, 2개의 특정 유닛들 사이의 각 유닛이 또한 개시되어 있는 것으로 이해된다. 예를 들어 10과 15가 개시되면 11, 12, 13, 14도 개시된다.

[0014] 용어 "CB-839"는 본원에서 하기에 나타난 화학 구조식을 갖는 화학 조성물 및/또는 미국 특허 제8,604,016호 및 /또는 미국 특허 제8,865,718호에 기재된 바와 같은 화학 조성물을 지칭한다.



- [0015]
- [0016] "조성물"은 활성제 또는 제제들(예, 베르테포르핀 및/또는 CB-839 조성물)과 어쥬번트와 같은 비활성(예를 들어, 검출 가능한 제제 또는 표지물) 또는 활성 다른 화합물 또는 조성물의 조합을 포함하는 것으로 의도된다.
- [0017] 본원에서 사용된 바와 같이, "포함하는"이라는 용어는 조성물 및 방법이 인용된 요소를 포함하지만 다른 요소를 배제하지 않는 것을 의미하는 것으로 의도된다. 조성물 및 방법을 정의하는데 사용되는 경우 "필수적으로 구성 되어 있는"은 상기 조합에 대한 임의의 본질적인 중요한 다른 요소를 배제하는 것을 의미할 것이다. 따라서, 본원에서 정의된 바와 같이 상기 요소로 필수적으로 구성된 조성물은 분리 및 정제 방법으로부터의 미량 오염물 및 인산 완충 식염수, 방부제 등과 같은 약학적으로 허용 가능한 담체를 배제하지 않을 것이다. "구성된"은 본 발명의 조성물을 투여하기 위한 다른 성분의 미량 원소 및 실질적인 방법 단계를 배제하는 것을 의미한다. 이들 이행 용어들 각각에 의해 정의된 구현예들은 본 발명의 범위 내에 있다.
- [0018] "대조군"은 비교 목적을 위해 실험에 사용되는 대체 대상체 또는 샘플이다. 대조군은 "양성" 또는 "음성"일 수 있다.
- [0019] "질환"이란 용어는 감염, 염증, 환경적 요인 또는 유전적 결함과 같은 다양한 원인, 및 식별 가능한 징후, 증상, 아니면 둘 다에 기인한 대상체의 부위, 기관 또는 체계의 비정상 상태를 말한다. 일부 구현예에서, 상기 질환은 암이다.
- [0020] "유효량"은 유익하거나 바람직한 결과를 얻기에 충분한 양이다. 상기 유효량은 하나 이상의 투여, 도포 또는 복용으로 투여될 수 있다.
- [0021] 용어 "GLS1 억제 조성물"은 본원에서 대상체 또는 혈관 세포에 투여될 때, GLS1을 (부분적으로 또는 전체적으로) 감소시키거나 불활성화시키는 임의의 조성물을 의미한다. 일부 구현예에서, 용어 "GLS1 억제 조성물"은 대상체 또는 혈관 세포에 투여되고 GLS1을 감소시키거나 불활성화하고, 폐 고혈압, 폐동맥 고혈압 및/또는 혈관 경직 또한 치료하는 임의의 조성물을 의미한다. GLS1 억제 조성물의 비제한적인 예로는 본원에 기재된 바와 같이 CB-839, C-968, DON 및 BPTES이다.
- [0022] "GLS1"이라는 용어는 본원에서 인간의 글루타미나제 및 K-글루타미나제로도 알려져 있는 GLS1 폴리펩타이드를 지칭하며, GLS 유전자에 의해 코딩된다. 용어 "GLS1 폴리뉴클레오타이드"는 GLS1 인코딩 폴리뉴클레오타이드를 지칭하며, 전체적으로 GLS 유전자의 전부 또는 이의 단편을 포함한다. 일부 구현예에 있어서, GLS1 폴리펩타이드 또는 폴리뉴클레오타이드는 다음과 같이 하나 이상의 공개적으로 이용 가능한 데이터베이스에서 동정된 것이다: HGNC : 4331; Entrez Gene : 2744; Ensembl : ENSG00000115419; OMIM : 138280; 및 UniProtKB : 094925. 일부 구현예에서, 상기 GLS1 폴리뉴클레오타이드는 SEQ ID NO: 3의 서열 (KGA 아이소형으로 공지됨), 또는 SEQ ID NO: 3과 약 80% 이상, 약 85% 이상, 약 90% 이상, 약 95% 이상, 또는 약 98% 이상 상동성을 가지는 폴리펩타이드 서열을 포함하는 GLS1 폴리펩타이드, 또는 SEQ ID NO: 3의 일부를 포함하는 폴리펩타이드를 인코딩한다. 상기 SEQ ID NO: 3의 GLS1 폴리펩타이드는 성숙 TAZ의 미성숙 또는 전-가공 된 형태를 나타낼 수 있으며, 따라서 본원에 SEQ ID NO: 3의 GLS 폴리펩타이드의 성숙 또는 가공된 부분이 포함된다. 일부 실시예에서, 상기 GLS1 폴리펩타이드는 GAC 아이소형이고 이의 서열은 SEQ ID NO: 3과 다음 551-669과 같이 상이하다: VKS VINLLFA .. TVHKNLDGLL → HSFGLDYES ... YRMESLGEKS.
- [0023] "포유류"란 치료 목적으로 인간, 가축 및 농장 동물, 비인간 영장류, 개, 말, 고양이, 소 등과 같은 동물원, 스포츠 또는 애완으로 사용되는 동물을 포함하여 포유류로 분류된 모든 동물을 의미한다.
- [0024] "약학적 조성물"은 활성제와 약학적으로 허용되는 담체 (비활성 또는 활성)의 조합을 포함하여 상기 조성물을 *in vivo* 또는 *ex vivo*에서 진단적 또는 치료적 용도로 적합하게 하는 것을 의미한다.
- [0025] 용어 "약학적으로 허용 가능한 담체"는 일반적으로 안전하고 무독성인 약학적 조성물을 제조하는데 유용한 담체 또는 부형제를 의미하며, 수의학 및/또는 인간 약학적 용도로 허용되는 담체를 포함한다. 본원에 사용된 "약학적으로 허용 가능한 담체"라는 용어는 인산염 완충 식염수, 물 및 오일/물 또는 물/오일 에멀전과 같은 에멀전

등의 임의의 표준 약학적 담체 및 다양한 형태의 습윤제를 포함한다. 본원에 사용된 용어 "담체"는 임의의 부형제, 희석제, 충전제, 염, 완충제, 안정화제, 가용 화제, 지질, 안정화제 또는 약학적 제제에서 사용하기 위해 당업계에 잘 알려진 후술하는 바와 같은 다른 물질을 포함한다. 상기 약학적 조성물은 또한 방부제를 포함할 수 있다. 명세서 및 청구범위에서 사용되는 "약학적으로 허용되는 담체"는 상기 담체 하나 이상을 포함한다.

[0026] 용어 "약학적 유효량", "치료 유효량" 또는 "치료 투여량"은 연구원, 의사, 또는 다른 임상시에 의해 탐색되는 조직, 체계, 동물 또는 인간의 생물학적 또는 의학적 반응을 이끌어 낼 YAP/TAZ 억제 조성물 및/또는 GLS1 억제 조성물과 같은 조성물의 양을 지칭한다. 일부 구현예에서, 바람직한 반응은 폐 고혈압, 폐동맥 고혈압 및/또는 폐혈관 경직도와 같은 혈관 질환의 치료이다. 이러한 치료는 우심실 수축기 혈압 (RVSP), 우심실 비대 (Fulton index, RV/LV+S), 혈관 재형성 및 동맥 근육화를 측정함으로써 정량화할 수 있다.

[0027] 일부 경우에, 바람직한 생물학적 또는 의학적 반응은 수 일, 수 주 또는 수 년 동안 대상체에 상기 조성물의 다회 투여량을 투여한 후에 달성된다. "약학적 유효량", "치료 유효량" 또는 "치료 투여량"이란 용어는 YAP/TAZ 억제 조성물 및/또는 GLS1 억제 조성물과 같은 조성물의 양을 포함한다. 즉, 투여될 때, 치료된 질환의 증상 중 하나 이상을 발달을 막거나 어느 정도 완화시키는데 충분하다. 치료 유효량은 조성물, 예를 들어 YAP/TAZ 억제 조성물 및/또는 GLS1 억제 조성물, 질환 및 이의 중증도, 투여 경로, 투여 시간, 배설 속도, 약물 조합, 치료의 사의 판단, 투여 형태, 및 치료될 대상의 나이, 체중, 일반적인 건강, 성별 및/또는 식이 요법에 따라 달라질 수 있다. 본 방법과 관련하여, 약학적으로 또는 치료학적으로 유효한 양 또는 YAP/TAZ 억제 조성물 및/또는 GLS1 억제 조성물의 투여량은 폐 고혈압, 폐동맥 고혈압 및/또는 폐혈관 경직도를 치료하기에 충분한 양을 포함한다.

[0028] 본원에 사용된 용어 "예방하다", "예방하는", "예방" 및 이의 문법적 변형은 질환 및/또는 하나 또는 그 이상의 부수적인 증상의 발병 또는 재발을 부분적으로 또는 완전히 지연시키거나 배제하거나 대상체에 질환을 얻거나 재획득하지 못하도록 하거나 질환 또는 하나 이상의 부수적인 증상을 얻거나 재획득하는 위험을 감소시키는 방법을 의미한다.

[0029] 용어 "폐혈관 질환"은 폐혈관성 고혈압을 지칭하기 위해 본원에서 사용되며 폐 고혈압(PH) 및 폐동맥 고혈압(PAH) 모두를 포함한다. 폐혈관 질환은 폐혈관 경직도에 의해 유발될 수 있고/거나 폐혈관 경직도를 포함할 수 있다.

[0030] "염"은 본원에서 정의된 바와 같은 물 또는 오일-가용성 또는 분산성 및 치료학적으로 허용 가능한 본원에 개시된 상기 화합물의 썬비터 이온성 형태를 의미한다. 상기 염은 화합물의 최종 분리 및 정제 중에 제조될 수 있거나 또는 유리 염기 형태의 적합한 화합물을 적합한 산과 반응시킴으로써 개별적으로 제조될 수 있다. 적합한 염의 목록은 Remington's Pharmaceutical Sciences, 20th ed., Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 2000, p. 704; 및 "Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use," P. Heinrich Stahl and Camille G. Wermuth, Eds., Wiley-VCH, Weinheim, 2002에 나와있다. 염의 예로는, 아민과 같은 염기성 잔기의 무기 또는 유기산 염; 및 카르복실산과 같은 산성 잔기의 알칼리 또는 유기 염을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0031] 대표적인 산 부가염은 아세테이트, 아디페이트, 알기네이트, L-아스코르베이트, 아스파테이트, 벤조에이트, 벤젠설포네이트(베실레이트), 바이셀레이트, 부티레이트, 캄포레이트, 캄포설포네이트, 시트레이트, 디글루코네이트, 포르메이트, 푸마레이트, 겐티세이트, 글루타레이트, 글리세로포스페이트, 글리코레이트, 헤미셀레이트, 헵타노에이트, 헥사노에이트, 히푸레이트, 하이드로클로라이드, 하이드로브로마이드, 하이드로아이오다이드, 2-하이드록시에탄설포네이트(이세티오네이트), 락테이트, 말레에이트, 말로네이트, DL-만델레이트, 메시틸렌설포네이트, 메탄설포네이트, 나프틸렌설포네이트, 니코티네이트, 2-나프탈렌설포네이트, 옥살레이트, 과모네이트, 펙티네이트, 3-페닐프로프리오네이트, 포스포네이트, 파이크레이트, 파이발레이트, 프로피오네이트, 피로글루타메이트, 석신네이트, 설포네이트, 타르트레이트, L-타르트레이트, 트리클로로아세테이트, 트리플루오로아세테이트, 포스페이트, 글루타메이트, 바이카보네이트, 파라-톨루엔설포네이트(p-토실레이트) 및 운데카노에이트를 포함한다. 또한, 본원에 개시된 화합물의 염기성 그룹은 메틸, 에틸, 프로필 및 부틸 클로라이드, 브로마이드 및 아이오다이드; 디메틸, 디에틸, 디부틸 및 디아밀 설페이트; 데실, 라우릴, 미리스틸 및 스테릴 클로라이드, 브로마이드 및 아이오다이드; 및 벤질 및 펜에틸 브로마이드로 4급화될 수 있다. 치료적으로 허용 가능한 부가 염을 형성하는데 사용될 수 있는 산의 예는 무기산, 예컨대 염산, 브롬산, 황산 및 인산, 및 유기산, 예컨대 옥살산, 말레산, 숙신산 및 시트르산을 포함한다. 염은 또한 화합물을 알칼리 금속 또는 알칼리 토 이온으로 배위시킴으로써 형성될 수 있다. 따라서, 본원에 개시된 화합물의 소듐, 포타슘, 마그네슘 및

칼슘 염 등이 형성될 수 있다.

[0032] 염기성 부가염은 카복시기를 금속 양이온의 수산화물, 탄산염 또는 중탄산염과 같은 적합한 염기 또는 암모니아 또는 유기 1차, 2차 또는 3차 아민과 반응시킴으로써 화합물의 최종 분리 및 정제 동안 제조될 수 있다. 치료학적으로 허용되는 염의 양이온은 리튬, 소듐, 포타슘, 칼슘, 마그네슘 및 알루미늄뿐만 아니라 암모늄, 테트라메틸암모늄, 테트라에틸암모늄, 메틸아민, 디메틸아민, 트리메틸아민, 트리에틸아민, 디에틸아민, 에틸아민, 트리부틸아민, 피리딘, N,N-디메틸아닐린, N-메틸피페리딘, N-메틸모르폴린, 디사이클로헥실아민, 프로카인, 디벤질아민, N, N-디벤질펜에틸아민, 1-에펜아민 및 N,N'-디벤질에틸렌디아민과 같은 비독성 4급 아민 양이온을 포함한다. 염기 부가염의 형성에 유용한 다른 대표적인 유기 아민은 에틸렌디아민, 에탄올아민, 디에탄올아민, 피페리딘 및 피페라진을 포함한다.

[0033] "전구 약물(prodrug)"은 생리학적 조건 하에서 치료학적 활성 화합물로 전환되는 화합물을 의미한다. 전구 약물은 비활성 (또는 상당히 덜 활성인) 형태로 투여된다. 일단 투여되면, 전구 약물은 체내에서 (in vivo에서) 활성 화합물로 대사된다. 본원에 개시된 특정 화합물은 또한 약물 및 전구약물 대사의 가수 분해: 화학, 생화학 및 효소학 (Testa, Bernard and Mayer, Joachim M. Wiley-VHCA, Zurich, Switzerland 2003)에 기술되어 있듯이, 전구 약물로서 존재할 수 있다. 본원에 기재된 화합물의 전구 약물은 상기 화합물을 제공하기 위해 생리적 조건 하에서 화학적 변화를 용이하게 받는 화합물의 구조적으로 변형된 형태이다. 또한, 전구 약물은 *ex vivo* 환경에서 화학적 또는 생화학적 방법에 의해 화합물로 전환될 수 있다. 예를 들어, 적절한 효소 또는 화학시약을 갖는 경피 패치 저장소에 배치될 때 전구 약물은 화합물로 서서히 전환될 수 있다. 전구 약물은 종종 어떤 경우에는 화합물, 또는 패런트(모) 약물 보다 투여하기가 더 쉽기 때문에 유용하다. 예를 들어, 경구 투여로 생체 이용 가능할 수 있지만 패런트 약물은 그렇지 않다. 전구 약물은 또한 패런트 약물 보다 약학적 조성물에 향상된 용해도를 가질 수 있다. 전구 약물의 가수 분해 또는 산화 활성화에 의존하는 다양한 전구 약물 유도체가 당업계에 공지되어 있다. 비제한적인 예로, 전구 약물은 에스테르("전구 약물")로 투여되지만, 활성 물질인 카르복실산으로 대사적으로 가수 분해되는 화합물일 수 있다. 추가적인 예는 화합물의 캡티딜 유도체를 포함한다.

[0034] 적합한 전구 약물을 선택하고 제조하는 방법은 예를 들어 다음에 제공된다: T. Higuchi and V. Stella, "Prodrugs as Novel Delivery Systems," Vol. 14, ACS Symposium Series, 1975; H. Bundgaard, Design of Prodrugs, Elsevier, 1985; and Bioreversible Carriers in Drug Design, ed. Edward Roche, American Pharmaceutical Association and Pergamon Press, 1987. 활성 화합물의 전구 약물은 통상적인 에스테르일 수 있다. 전구 약물로 이용된 몇몇 일반적인 에스테르는 페닐 에스테르, 지방족 (C₇-C₈ 또는 C₈-C₂₄) 에스테르, 콜레스테롤 에스테르, 아실옥시메틸 에스테르, 카바메이트 및 아미노산 에스테르이다. 바람직하게는, 본원에 개시된 화합물의 전구 약물은 약학적으로 허용 가능하다.

[0035] "대상체"란 용어는 본원에서 영장류(예, 인간), 소, 양, 염소, 말, 개, 고양이, 토끼, 랫트, 마우스 등을 포함하는 포유류와 같은 동물을 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다. 일부 구현예에서, 상기 대상체는 인간이다.

[0036] 본원에서 사용된 용어 "치환된"은 유기 화합물의 모든 허용 가능한 치환체를 포함하는 것으로 고려된다. 넓은 의미로, 허용 가능한 치환체는 유기 화합물의 비고리형 및 고리형, 분지 및 비분지, 카보사이클릭 및 헤테로사이클릭, 및 방향족 및 비방향족 치환기를 포함한다. 예시적인 치환체는 예를 들어 하기된 것을 포함한다. 허용 가능한 치환기는 적절한 유기 화합물에 대해 하나 이상(예, "이중 치환된", "삼중 치환된" 등으로 지칭됨)일 수 있고 동일하거나 상이할 수 있다. 본 명세서의 목적을 위해, 질소 및 산소와 같은 헤테로 원자는 헤테로 원자의 원자가를 만족시키는 수소 치환체/또는 본원에 기재된 유기 화합물의 임의의 허용 가능한 치환체를 가질 수 있다. 이 개시는 임의의 방식으로 유기 화합물의 허용 가능한 치환체에 의해 제한되는 것으로 의도되지 않는다. 또한, 용어 "치환" 또는 "치환된"은 그러한 치환이 치환된 원자 및 치환기의 허용된 원자에게서 그리고 상기 치환이 안정한 화합물, 예를 들어, 재배열, 고리화, 제거 등에 의한 변형을 자발적으로 겪지 않는 화합물을 생성함을 암시적으로 포함한다. 또한, 본원에서 사용된 "치환" 또는 "치환된"은 하나의 치환기가 다른 치환기에 융합되는 배열을 포함하는 것을 의미한다. 예를 들어, 아릴기로 치환된 아릴기 (또는 그 반대로도)는 하나의 아릴기가 단일 시그마 결합을 통해 제 2 아릴기에 결합되고 또한 2개의 아릴기가 융합됨을 의미할 수 있으며, 예를 들어, 하나의 알킬기의 2개 탄소는 다른 아릴기의 2개의 탄소와 공유된다.

[0037] 본원에서 사용된 용어 "치료하다", "치료하는", "치료" 및 그 문법적 변형은 질환의 하나 이상의 부수 증상의 강도를 부분적으로 또는 완전히 지연, 경감, 완화 또는 감소시키고/거나 질환의 하나 이상의 원인을 경감, 완화 또는 지연시키는 것을 포함한다. 본 발명에 따른 치료는 예방적으로, 예방을 위해, 치료적으로 또는 구제적으로

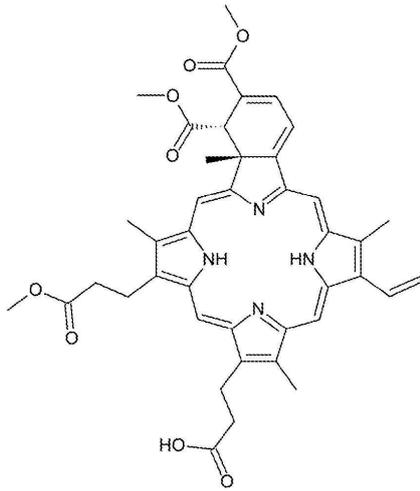
적용될 수 있다. 예방적 치료는 발병하기 전에 (예를 들어, 질환의 명백한 징후가 나타나기 전에), 조기 발병 중에 (예를 들어, 질환의 초기 징후 및 증상 시), 또는 질환의 확립된 발병 후에 대상체에 투여된다. 예방적 투여는 감염의 증상이 나타나기 몇 일 내지 몇 년 동안 발생할 수 있다. 어떤 경우에, 용어 "치료하다", "치료하는", "치료" 및 그 문법적 변형은 대상체의 치료 전과 비교하여 또는 일반 또는 연구 집단에서 이러한 증상의 발생정도와 비교하여 폐 고혈압, 폐동맥 고혈압 및/또는 혈관 경직도를 부분적 또는 완전히 감소시키는 것을 포함한다. 상기 감소는 5%, 10%, 20%, 30%, 40% 또는 그 이상이 될 수 있다.

[0038] "YAP/TAZ 억제 조성물"이란 용어는 본 명세서에서 대상체 또는 혈관 세포에 투여될 때, YAP 및/또는 TAZ의 성분을 감소시키거나 또는 불활성화시키는 임의의 조성물을 의미한다. 일부 구현예에서, 용어 "YAP/TAZ 억제 조성물"은 피하 또는 혈관 세포에 투여될 때 YAP 및/또는 TAZ를 감소시키거나 불활성화시키는 임의의 조성물을 의미하며, 이는 폐 고혈압, 폐동맥 고혈압 및/또는 혈관 경직도를 감소시킨다.

[0039] 용어 "TAZ"는 본원에서 전사 조절인자 단백질 1을 포함하는 WWTR1 또는 WW 도메인으로도 알려진 폴리펩타이드를 지칭한다. 용어 "TAZ 폴리뉴클레오타이드"는 TAZ/WWTR1 인코딩 폴리뉴클레오타이드를 지칭하며, TAZ/WWTR1 유전자 전체 또는 그의 단편을 포함한다. 일부 구현예에서, TAZ/WWTR1 폴리펩타이드 또는 폴리뉴클레오타이드는 다음과 같이 하나 이상의 공개적으로 이용 가능한 데이터베이스에서 동정된 것이다: HGNC : 24042; Entrez Gene : 25937; Ensembl : ENSG0000018408; OMIM : 607392; 및 UniProtKB : Q9GZV5. 일부 구현예에서, TAZ 폴리뉴클레오타이드는 SEQ ID NO : 1의 서열을 포함하는 TAZ 폴리펩타이드, 또는 SEQ ID NO : 1과 약 80% 이상, 약 85% 이상, 약 90% 이상, 또는 그 이상 약 95%, 또는 약 98% 이상의 상동성을 가지는 폴리펩타이드 서열, 또는 SEQ ID NO : 1의 일부를 포함하는 폴리펩타이드를 인코딩한다. SEQ ID NO : 1의 TAZ 폴리펩타이드는 성숙 TAZ의 미성숙 또는 예비-가공된 형태를 나타낼 수 있으며, 따라서 본원에 SEQ ID NO : 1의 TAZ 폴리펩타이드의 성숙 또는 가공된 부분이 포함된다.

[0040] 용어 "YAP"은 본원에서 YAP1, Yes-관련된 단백질 1 또는 Yap65로도 알려진 YAP 폴리펩타이드를 지칭하고, 인간에서는 YAP1 유전자에 의해 인코딩된다. 용어 "YAP 폴리뉴클레오타이드"는 YAP 인코딩 폴리뉴클레오타이드를 지칭하고, 그 전체 또는 그의 단편 내에 YAP1 유전자를 포함한다. 일부 구현예에서, YAP 폴리펩타이드 또는 폴리뉴클레오타이드는 다음과 같이 하나 이상의 공개적으로 이용 가능한 데이터베이스에서 동정된 것이다 : HGNC : 16262; Entrez Gene : 10413; Ensembl : ENSG00000137693; OMIM : 606608; 및 UniProtKB : P46937. 일부 구현예에서, YAP 폴리뉴클레오타이드는 SEQ ID NO : 2의 서열을 포함하는 YAP 폴리펩타이드, 또는 SEQ ID NO : 2와 약 80% 이상, 약 85% 이상, 약 90% 이상, 또는 약 95% 이상, 또는 약 98% 이상의 상동성을 가지는 폴리펩타이드 서열 또는 SEQ ID NO : 2의 일부를 포함하는 폴리펩타이드를 인코딩한다. SEQ ID NO : 2의 YAP 폴리펩타이드는 성숙 YAP의 미성숙 또는 예비-가공된 형태를 나타낼 수 있으며, 따라서 본원에 SEQ ID NO : 2의 YAP 폴리펩타이드의 성숙 또는 가공된 부분이 포함된다.

[0041] "베르테포르핀 (verteporfin)"이란 용어는 본원에서 화학명 3-[(23S,24R)-14-에테닐-5-(3-메톡시-3-옥소프로필)-22,23-비스(메톡시카보닐)]-4,10,15,24-테트라메틸-25,26,27,28-테트라아자헥사사이클로[16.6.1.1^{3,6}.1^{8,11}.1^{13,16}.0^{19,24}]옥타코사-1,3,5,7,9,11(27),12,14,16,18(25),19,21-도데카엔-9-일]프로파노익산을 가지는, 미국 특허 제 5,707,608 호, 미국 특허 제 5,798,345 호 및/또는 미국 특허 제 5,756,541 호에 기재된 바와 같은 하기 화학 구조를 갖는 화합물을 포함한다.



[0042]

[0043] **화합물 및 조성물**

[0044] 폐고혈압의 치료, 폐동맥 고혈압의 치료, 혈관 경직도의 감소 및/또는 YAP/TAZ- 및/또는 GLS1-매개된 경로의 억제를 위한 화합물이 개시된다. 폐고혈압의 치료, 폐동맥 고혈압의 치료, 혈관 경직도의 감소 및/또는 YAP/TAZ- 및/또는 GLS1-매개된 경로의 억제를 위한 화합물은 베르테포르핀, CB-839, 또는 이들의 전구 약물, 유도체, 염, 용매화물 또는 이들의 조합일 수 있다. 본원에 기재된 하나 이상의 화합물을 함유하는 약학적 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체를 사용하여 제조될 수 있다. "약학적으로 허용 가능한" 담체는 합리적인 이익/위험 비율에 상응하는 과도한 부작용(예: 독성, 자극 및 알레르기 반응) 없이 인간 및/또는 동물과 함께 사용하기에 적합한 것이다. 담체는 활성 성분 또는 성분들 외의 약학적 조성물에 존재하는 모든 성분이다. 담체는 희석제, 결합제, 윤활제, 붕괴제, pH 조절제, 방부제, 항산화제, 용해도 증강제, 안정제, 계면 활성제 및 코팅 조성물을 포함할 수 있지만, 이에 제한되지 않는다.

[0045] "충진제(filler)"라고도 불리는 희석제는 전형적으로 고체 투여 형태의 부피를 증가시켜서 정제의 압축 또는 비드 및 과립의 형성에 실질적인 크기가 제공되도록 필요하다. 적합한 희석제는 인산이칼슘 2 수화물, 황산칼슘, 락토오스, 수크로오스, 만니톨, 소르비톨, 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 카올린, 염화나트륨, 건조 전분, 가수분해 전분, 프리젤라틴화 전분, 이산화 실리콘, 산화티탄, 규산 마그네슘 알루미늄 및 분말화된 당을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0046] 결합제는 고체 투여 제제에 응집성을 부여하기 위해 사용되며, 따라서 정제 또는 비드 또는 과립이 제형의 형성 후에 손상되지 않도록 한다. 적합한 결합제 물질은 전분, 프리젤라틴화 전분, 젤라틴, 당류(수크로오스, 글루코오스, 텍스트로스, 락토오스 및 소르비톨을 포함), 폴리에틸렌 글리콜, 왁스, 아카시아, 트라가칸트, 알긴산 나트륨과 같은 천연 및 합성 검, 히드록시프로필메틸셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스, 에틸셀룰로오스 및 비검을 포함하는 셀룰로오스, 아크릴산 및 메타크릴산 공중합체, 메타크릴산 공중합체, 메틸메타크릴레이트 공중합체, 아미노알킬 메타크릴레이트 공중합체, 폴리아크릴산/폴리메타크릴산 및 폴리비닐피롤리돈과 같은 합성 중합체를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0047] 윤활제는 정제 제조를 용이하게 하기 위해 사용된다. 적합한 윤활제의 예로는 마그네슘 스테아레이트, 칼슘 스테아레이트, 스테아르산, 글리세롤 베헤네이트, 폴리에틸렌 글리콜, 탈크 및 미네랄 오일을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0048] 붕해제는 투여 후 투약 형태의 붕괴 또는 "분열"을 촉진시키는데 사용되며, 전분, 소듐 전분 글리콜레이트, 소듐 카르복시메틸 전분, 소듐 카르복시메틸 셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스, 프리젤라틴화 전분, 클레이, 셀룰로오스, 알기닌, 검 또는 가교-결합된 PVP (GAF Chemical Corp의 Polyplasdone XL)와 같은 가교 결합된 중합체를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0049] 안정화제는 예를 들어 산화 반응을 포함할 수 있는 약물 분해 반응을 억제하거나 지연시키는데 사용된다.

[0050] 계면활성제는 음이온성, 양이온성, 양쪽성 또는 비이온성 계면활성제일 수 있다. 적합한 음이온성 계면활성제는 카복실레이트, 설포네이트 및 설페이트 이온을 함유하는 것들을 포함할 수 있지만, 이에 제한되지 않는다. 음이온성 계면 활성제의 예로는 장쇄 알킬 설포네이트의 소듐, 포타슘, 암모늄 및 소듐 도데실벤젠 설포네이트와 같은 알킬 아릴 설포네이트; 소듐 도데실 벤젠 설포네이트와 같은 디알킬 소듐 설포숙시네이트; 소듐 비스-(2-에

틸티옥실)-설포숙시네이트와 같은 디알킬 소듐 설포숙시네이트; 및 소듐 라우릴 설페이트와 같은 알킬 설페이트를 포함한다. 양이온성 계면활성제는 벤잘코늄 클로라이드, 벤제토늄 클로라이드, 세트리모늄 브로마이드, 스테아릴 디메틸벤질 암모늄 클로라이드, 폴리옥시에틸렌 및 코코넛 아민과 같은 4급 암모늄 화합물을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 비이온성 계면활성제의 예로는 에틸렌 글리콜 모노스테아레이트, 프로필렌 글리콜 미리스테이트, 글리세릴 모노스테아레이트, 글리세릴 스테아레이트, 폴리글리세릴-4-올레이트, 소르비탄 아실레이트, 수크로오스 아실레이트, PEG-150 라우레이트, PEG-400 모노라우레이트, 폴리옥시에틸렌 모노라우레이트, 폴리소르베이트, 폴리옥시에틸렌 옥틸페닐에테르, PEG-1000 세틸 에테르, 폴리옥시에틸렌 트리데실 에테르, 폴리프로필렌 글리콜 부틸 에테르, POLOXAMER™ 401, 스테아로일 모노이소프로판올아미드 및 폴리옥시에틸렌 수소첨가 탈로우 아미드를 포함한다. 양쪽성 계면활성제의 예로는 소듐 N-도데실-β-알라닌, 소듐 N-라우릴-β-이미노디프로피오네이트, 미리스토암포아세테이트, 라우릴 베타인 및 라우릴 설포베타인을 포함한다.

[0051] 코팅 조성물은 가스제, 안료, 착색제, 안정화제 및 활택제를 포함할 수 있다. 적합한 코팅 물질의 예는 셀룰로오스 아세테이트 프탈레이트, 히드록시 프로필 셀룰로오스, 히드록시 프로필 메틸셀룰로오스, 히드록시 프로필 메틸셀룰로오스 프탈레이트 및 히드록시 프로필 메틸셀룰로오스 아세테이트 석시네이트와 같은 셀룰로오스 중합체; 폴리비닐 아세테이트 프탈레이트, 아크릴산 중합체 및 공중합체 및 EUDRAGIT™ (Roth Pharma, Westerstadt, Germany)의 상표명으로 시판중인 메타크릴 수지, 제인(zein), 셸락(shellac) 및 폴리사카라이드를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0052] 본원에 개시된 화합물 및 조성물은 정맥 내 또는 경구와 같은 전신 투여될 수 있으며, 선택적으로 불활성 희석제와 같은 약학적으로 허용 가능한 담체 또는 경구 전달을 위한 동화 가능한 담체와 함께 투여될 수 있다. 그들은 경질 또는 연질 셀 젤라틴 캡슐로 포장하거나, 정제로 압축하거나, 환자 식이의 음식과 직접 혼합할 수 있다. 구강 치료학적 투여의 경우, 활성 화합물을 하나 이상의 부형제와 배합하여 섭취 가능한 정제, 구강정, 트로키제, 캡슐제, 엘릭서제, 현탁제, 시럽제, 웨이퍼, 에어로졸 스프레이 등의 형태로 사용할 수 있다.

[0053] 상기 정제, 트로키제, 환제, 캡슐 등은 또한 다음을 함유할 수 있다 : 검 트라가칸트, 아카시아, 옥수수 전분 또는 젤라틴과 같은 결합제; 인산 제2 칼슘과 같은 부형제; 옥수수 전분, 감자 전분, 알긴산 등과 같은 붕해제; 마그네슘 스테아레이트와 같은 윤활제; 수크로오스, 프럭토오스, 락토오스 또는 아스파탐과 같은 감미제 또는 페퍼민트, 윈터그린의 오일 또는 체리 향료와 같은 향미제를 첨가할 수 있다. 단위 투여 형태가 캡슐일 때, 상기 유형의 물질 이외에 식물성 오일 또는 폴리에틸렌 글리콜과 같은 액체 담체를 함유할 수 있다. 다양한 다른 물질이 코팅으로서 또는 고체 단위 투약 형태의 물리적 형태를 변형시키기 위해 존재할 수 있다. 예를 들어, 정제, 환제 또는 캡슐은 젤라틴, 왁스, 셸락 또는 당 등으로 코팅될 수 있다. 시럽 또는 엘릭서는 감미제로서 활성 화합물, 수크로오스 또는 프럭토오스, 방부제로서 메틸 및 프로필파라벤, 체리 또는 오렌지 향과 같은 염료 및 향료를 함유할 수 있다. 물론, 임의의 단위 투여 형태를 제조하는데 사용되는 임의의 물질은 약학적으로 허용 가능하고 실질적으로 사용되는 양에 무독성이어야 한다. 또한, 활성 화합물은 서방형 제제 및 장치에 혼입될 수 있다.

[0054] 이의 약학적으로 허용되는 염, 수화물, 전구 약물 또는 유도체를 포함하는 본원에 개시된 화합물 및 조성물은 주입 또는 주사에 의해 정맥 내, 근육 내 또는 복강 내 투여될 수 있다. 활성제 또는 이의 염의 용액은 물에서, 임의로 무독성 계면활성제와 혼합하여 제조할 수 있다. 분산액은 또한 글리세롤, 액체 폴리에틸렌 글리콜, 트리아세틴 및 이들의 혼합물 및 오일에서 제조될 수 있다. 일반적인 저장 및 사용 조건 하에서, 이들 제제는 미생물의 성장을 방지하기 위한 방부제를 함유할 수 있다.

[0055] 주사 또는 주입에 적합한 약학적 투여 형태는 선택적으로 리포솜에 캡슐화된 멸균 주사 가능한 또는 주입 가능한 용액 또는 분산액의 즉석 제조에 적합한 활성 성분을 포함하는 멸균 수용액 또는 분산액 또는 멸균 분말을 포함할 수 있다. 최종 투여 형태는 제조 및 저장 조건 하에서 무균, 유효성 및 안정해야 한다. 액체 담체 또는 비히클은 예를 들어 물, 에탄올, 폴리올(예, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 액체 폴리에틸렌 글리콜 등), 식물성 오일, 무독성 글리세릴 에스테르 및 이들의 적합한 혼합물을 포함하는 용매 또는 액체 분산 매질일 수 있다. 적절한 유효성은 예를 들어 리포솜의 형성, 분산액의 경우 필요한 입자 크기의 유지 또는 계면 활성제의 사용에 의해 유지될 수 있다. 선택적으로, 미생물 작용의 예방은 다양한 다른 항 박테리아 및 항진균제, 예를 들어, 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 소르브산, 티메로살 등에 의해 야기될 수 있다. 많은 경우에, 당, 완충액 또는 염화나트륨과 같은 등장화제를 포함하는 것이 바람직할 것이다. 주사 가능한 조성물의 장시간 흡수는 흡수를 지연시키는 제제, 예를 들어 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴을 포함시킴으로써 이루어질 수 있다.

[0056] 멸균 주사용 용액은 본원에 개시된 화합물 및/또는 약제(agent)를 필요에 따라 적절한 용매에 상기 열거한 여러

가지 다른 성분과 함께 필요에 따라 혼합한 후 필터 멸균함으로써 제조할 수 있다. 멸균 주사 용액의 제조를 위한 멸균 분말의 경우, 바람직한 제조 방법은 진공 건조 및 동결 건조 기술이며, 이는 활성 성분과 이전에 멸균 여과된 용액에 존재하는 임의의 추가 요구 성분의 분말을 생성한다.

[0057] 이들의 약학적으로 허용되는 염, 수화물, 전구 약물 또는 유도체를 포함하는 본원에 개시된 화합물 및 조성물은 제어 방출 제형으로 투여될 수 있다. 이러한 조성물은 본 단백질 및 유도체의 물리적 상태, 안정성, *in vivo* 방출 속도 및 *in vivo* 제거율에 영향을 미칠 수 있다. 예를 들어, Remington's Pharmaceutical Sciences, 21st Ed. (2005, Lippincott, Williams & Wilins, Baltimore, Md. 21201) pages 889-964 and "Pharmaceutical dosage form tablets", eds. Liberman et al. (New York, Marcel Dekker, Inc., 1989)를 참조하십시오. 이 참고 문헌은 정제, 캡슐 및 지연 방출 제형의 정제, 캡슐 및 과립을 제조하기 위한 담체, 물질, 장비 및 공정에 대한 정보를 제공한다.

[0058] 제어 방출 조성물은 조성물의 투여 후에 전신으로 단시간 또는 장시간 방출을 위해 제조될 수 있다. 상기 조성물은 액체 형태, 건조 분말(예, 동결 건조) 형태 또는 중합체 장치 (로드, 실린더, 필름, 디스크)로 제조될 수 있다. 매트릭스는 마이크로스피어와 같은 마이크로입자 형태일 수 있으며, 여기서 활성제는 고체 중합성 매트릭스 또는 마이크로캡슐 내에 분산되고, 코어는 중합성 셸과는 다른 재료로 되어 있으며, 활성제는 본질적으로 액체 또는 고체일 수 있는 코어에 분산되거나 현탁된다. 대안으로, 상기 중합체는 나노미터 내지 4센티미터 범위의 얇은 슬랩(slab) 또는 필름, 분쇄 또는 다른 표준 기술에 의해 생성된 분말, 또는 하이드로겔과 같은 겔로도 주조될 수 있다.

[0059] 생분해성 매트릭스가 선호되지만, 비-생분해성 또는 생분해성 매트릭스가 공개된 화합물의 전달에 사용될 수 있다. 이들은 천연 또는 합성 중합체일 수 있다. 중합체는 방출이 요구되는 기간에 기초하여 선택된다. 어떤 경우에는 선형 방출이 가장 유용할 수 있지만, 다른 경우에는 펄스 방출 또는 "벌크 방출"이 보다 효과적인 결과를 제공할 수 있다. 중합체는 하이드로겔 (전형적으로 물의 약 90 중량%까지 흡수함)의 형태일 수 있고, 선택적으로 다가 이온 또는 중합체로 가교 결합될 수 있다.

[0060] 상기 매트릭스는 용매 증발, 분무 건조, 용매 추출 및 당업자에게 공지된 다른 방법에 의해 형성될 수 있다. 생체 침식성 마이크로스피어는 약물 전달을 위한 마이크로스피어 제조를 위해 개발된 방법 중 임의의 것을 사용하여 제조될 수 있으며, 예를 들어 Mathiowitz and Langer, J Controlled Release, 1987, 5: 13-22; Mathiowitz, et al , Reactive Polymers, 1987, 6:275-283; 및 Mathiowitz, et al. , J. Appl. Polymer Sci, 1988, 35:755- 774에 기술되어 있다.

[0061] 이의 약학적으로 허용되는 염, 수화물, 전구 약물 또는 유도체를 포함하는 본원에 개시된 화합물 및 조성물은 확산 또는 침출 기작, 예 필름 또는 겜에 의해 방출을 허용하는 불활성 매트릭스에 혼입될 수 있다. 서서히 분해되는 매트릭스도 제제에 혼입될 수 있다. 제어된 방출의 또 다른 형태는 약물이 삼투 효과로 인해 하나의 작은 개구부를 통해 물을 유입시키고 약물을 밀어낼 수 있게 하는 반투막에 약물이 봉입된 형태이다. 경구 제형의 경우, 방출 위치는 위, 소장 (십이지장, 빈창자 또는 돌창자) 또는 대장일 수 있다. 바람직하게는, 방출은 활성제 (또는 유도체)의 보호에 의해 또는 소장과 같은 위 환경을 벗어나는 활성제의 방출에 의한 위장 환경의 해로운 영향을 피할 것이다. 완전한 위 내성을 보장하기 위해, 장용성 코팅 (즉, 적어도 pH 5.0으로 불침투성)이 필수적이다. 이러한 코팅은 혼합 필름 또는 Banner Pharmacaps에서 입수 가능한 것과 같은 캡슐로 사용할 수 있다.

[0062] **방법**

[0063] 또한, 치료를 필요로 하는 대상체에 혈관 질환, 폐고혈압 및/또는 폐동맥 고혈압을 치료하고, 혈관 경직도를 감소시키며 및/또는 YAP/TAZ- 및/또는 GSK3-매개 경로를 억제하는 방법을 본원에서 제공한다. 상기 방법은 치료 유효량의 하나 이상의 본원에 기재된 화합물 또는 조성물을 대상체에 투여하는 단계를 포함할 수 있다. 일부 실시예에서, 상기 방법은 치료 유효량의 베르테포르핀 또는 이를 포함하는 약학적 조성물을 대상체에 투여하는 단계를 포함한다. 일부 실시예에서, 상기 방법은 치료 유효량의 베르테포르핀, 이의 염, 전구 약물 또는 유도체 또는 이의 조합을 대상체에 투여하는 단계를 포함할 수 있다. 다른 실시예 또는 추가 실시예에서, 상기 방법은 치료 유효량의 CB-839 또는 이를 포함하는 약학적 조성물을 대상체에 투여하는 단계를 포함한다. 일부 실시예에서, 상기 방법은 치료 유효량의 CB-839를 투여하는 단계를 포함할 수 있다. 따라서, 치료 유효량의 베르테포르핀 및 CB-839(여기서, 치료 유효량이 두 조성물의 투여로 인한 것일 수 있는)를 투여하는 방법이 본원에 포함된다.

[0064] 이러한 방법은 호기성 해당과정에서 증식에 필요한 세포 영양을 필요로 하는 글루타민 분해 효소 GLS1에 YAP/TAZ의 기계적 활성을 증대한 연관성이 있음을 보여주는 새로운 결과를 반영한다. 이러한 분자적 통찰력은 혈관 경직도의 패러다임을 단지 혈관 적합성에 대한 혈액학적 효과의 연구를 넘어서기보다는 오히려 혈관 재형성 및 PH 발달의 특이 대사 원인으로 발전시킨다. 이러한 결과는 또한 YAP/TAZ를 통한 조절의 공유된 체계를 통해 글루타민 대사와 호기성 해당과정 모두를 밝혀냄으로써 직접 저산소 손상 이상으로 PH 자체의 조절되지 않은 대사 축의 근본적인 이해를 변화시킨다. 마지막으로, 글루타민 분해(glutaminolysis)를 세포 외 환경이 폐혈관 장애를 어떻게 지시하는지 중심 메커니즘으로 놓음으로써, 이러한 결과는 새로운 치료법을 개발하거나, 이미 YAP1-GLS1 축을 타겟으로 하는 PH 이미 승인된 약물에서 재사용하기 위한 근거를 형성할 수 있다.

[0065] 최근 연구는 PH에서 혈관 경직도가 PH에서 초기에 유력한 병원성 트리거라는 개념을 발전시켰다. 그러나 혈관 증식과의 연관성을 넘어서, 그러한 기계적 자극에 의해 영향을 받는 하향 분자 경로의 상세한 특성화가 빠져 있다. 또는 이전 연구들은 PH에서 심오한 미토콘드리아 및 대사성 기능 장애를 입증하였지만 그러한 대사 이벤트의 복합적 개시 트리거, 특히 저산소 손상의 직접적인 결과를 넘어서는 것들을 파악하기 어려웠다.

[0066] 현재까지, 이러한 대사성 표현형의 일부는 저산소증에 의해 유도되어, 피루베이트 탈수소효소의 피루베이트 탈수소효소 키나아제(PDK)-매개된 저해를 통한 당분해 전환으로 이어진다. 더 최근의 데이터는 비-코딩 RNA, BMPR2(bone morphogenetic protein receptor type 2)의 기능 상실 및 PH의 전체 미토콘드리아 기능 장애에 대한 시르투인 3 결핍(sirtuin 3 deficiency)과 관련이 있다. 본원에서 기계적으로 활성화된 과정으로서 호기성 해당작용과 함께 조절되는 글루타민 분해의 확인은 PH의 대사 재프로그램에서 관찰되는 조절 체계의 이해를 향상시킨다. 이러한 경직도와 대사 사이의 경계는 매트릭스 재형성과 관련하여 중앙에서 제안된 관련 재프로그램밍 이벤트와 평행을 이룬다. 대사 조절 장애와의 직접적인 관계로 인해 혈관 경직도의 패러다임이 단순한 말기 특징이 아니라 이 질환의 초기 발병 트리거로 작용한다.

[0067] 혈관 경직도와 글루타민 분해 및 증식을 연결하는 기능적 연결의 설명은 또한 PH의 개시 및 발달 동안 여러 혈관 세포 유형 사이의 세포 증식, 이동 및 세포 사멸 사이의 상호 작용에 대한 기본적인 통찰력을 제공한다. 다른 생물학적 문맥에 기술된 바와 같이, 경질 매트릭스와 YAP/TAZ 활성화에 대한 반응으로 글루타민 분해와 보전(anaplerosis)이 증가하면 특히 원발성 인간 폐동맥 평활근 세포(Primary human pulmonary arterial smooth muscle cells, PSMCs)에서 과증식 상태를 유지하기 위한 중요한 대사 필요성에 부응하여 PH에서 병리학적 혈관 재형성을 유도한다. PSMCs 외에도 YAP/TAZ-마이크로RNA-130/301 피드백 루프가 최근에 매트릭스 경직도가 증가하여 인접한 경질 매트릭스와 접촉하는 순수 섬유아세포의 기계적 활성화를 통해 폐 혈관계 및 폐 실질 세포를 통해 퍼지게 된다. 글루타민 분해로 YAP/TAZ 활성화와 관련된 현재 연구 결과에 비추어 볼 때, 섬유아세포에서 글루타민 분해와 보전(anaplerosis)이 본질적으로 매트릭스 경직도와 재형성의 조절과 관련되어 있을 가능성이 있다.

[0068] 다른 한편, 경직도와 글루타민 분해의 역할이 PH에서 여전히 불완전하게 기술된 원발성 인간 폐동맥 내피 세포(Primary human pulmonary arterial endothelial cells, PAECs)의 기능 장애를 조절하는데 더 복잡할 수 있다. 현재까지, PAECs 세포사멸이 PH 병인을 유발하는 초기 역할을 한다고 생각된다. 초기 EC 세포사멸은 질환 진행에 결정적인 과증식 및 병원성 PAECs의 분리 집단을 발생시킨다. 이러한 PAECs 세포사멸과 증식의 시공간적 균형은 원래 Voelkel과 이의 동료들에 의해 기술되었다. 이 결과는 PAECs 세포사멸의 동역학 모델과 일치하며, YAP/TAZ-GLS1 활성화와 글루타민 분해에 의해 손상 및 세포사멸의 개시 변동이 밀접하게 이어져 PAECs의 증식을 촉진한다는 것을 나타낸다. 주목할 만하게, 이 모델은 다른 사람에 의해 보고된 바와 같이, 특히 PH가 천천히 진행되는 상황에서 PH 개시 이후의 늦은 시점에서도 PAECs 아포토시스를 계속 배제하지 않는다. 그러나 이러한 세포사멸 이벤트는 증식성 성분 이외의 세포에서 발생해야 한다-우리가 발견한 성분은 명백한 혈관 경직도와 글루타민 분해가 더욱 분명해지면 PH의 더 심각한 모델에서 더 널리 퍼진다. 그러한 증식은 PA의 초기 단계에서 증가된 PAECs 전환율(turnover)을 반영할 수 있으며(랫트의 모노크로탈린 주사 후 D3-D7로 나타냄, 데이터 미도시), PAECs 개체군에서 세포사멸과 증식의 균형이 더욱 분명해진다. 그러나, YAP1 및 GLS1 상향-조절이 지속되는 중증 PH의 후기 단계 동안, 세포사멸 동안에 PAECs 증식의 우위는 명확하다. 이 발견은 PAH에서 인간 망상의(plexiform) 병변의 관찰과 관련이 있으며(데이터 미도시), YAP 상향-조절 및 글루타민 분해 과정은 PAECs-유사 세포의 명백한 과성장을 수반한다. 내피 층이 분명히 과성장하지 않는 환경에서도, 과증식, 항-세포사멸 PAECs가 내피-간엽 전이--현재 PH 병인에 직접적으로 연결되어 있으며, 추가로 증식이 진행되면 내피 세포가 중간층(단순히 내막 보다는 오히려) 과형성을 일으킬 수 있는 과정-을 위해 재프로그램될 가능성이 있다. 마지막으로, PAECs에서 증가된 증식능과 관련하여, 이 발견은 또한 매트릭스 경직도와 YAP-GLS1 축에 의해 촉진되는 전-이동(pro-migratory) 표현형을 나타내었다 (데이터 미도시). 인간 망상의 병변에서 증식 및 이동의 장애가 관찰되었

으며, PH에서의 과증식성 PAECs의 보다 최근 연구는 수반되는 이동 표현형을 기술하였다. 이러한 무질서한 이동은 PH에서 비정상적인 혈관 신생에 기여할 수 있으며, 일부 경우에는 폐동맥의 전구-혈관형성 및 병원성 재형성과 연관되어 있으며, 다른 경우에는 혈관형성의 결핍 및 전체 폐혈관 계통의 전지(pruning)와 관련되어 있다. 결과적으로, 본원에서 기술된 결과는 혈관 경직도, YAP/TAZ-GLS1 축, 및 PH 발병 기작의 중심점에서의 글루타민 분해를 일으키며, 정확한 시간 및 단계-특이적 방식으로 여러 폐혈관 세포 표현형에 영향을 미친다.

[0069] 글루타민 분해의 중재자로서의 YAP/TAZ의 기계적 활성화는 또한 일반적으로 히포(Hippo) 시그널링에 의한 복잡한 대사 조절에 대한 이해를 향상시킨다. 주목할 만하게, 상기 데이터는 YAP와 TAZ 둘다, 단독으로는 아니지만, 적어도 매트릭스 경직에 대한 내인성 반응의 조건에서 GLS1, LDHA 및 PC 발현에 *필요하다*는 것을 나타낸다 (도 2C-E). 그러나 YAP1 단독의 과발현으로 이러한 하향 유전자를 증가시킬 수 있기 때문에(도 2F-H), YAP1은 이 표현형에 *충분하고* 글루타민 분해를 조절하는데 있어 일부 중복된 기능을 보유할 수 있다고 결론지었다. 그러나 TAZ가 매트릭스 경직 동안에도 상향-조절되면 이러한 중복성은 명확하지 않으며, 따라서 TAZ를 가진 YAP의 활성화 경직 조건 하에서 글루타민 분해 유도를 허용하는 우호적인 파트너십을 나타냄을 제안한다. 또한, 이전 연구들은 AMP-키나아제 활성화 또는 호기성 해당 작용을 통한 YAP/TAZ의 전사 활성의 직접적인 촉진을 통해 YAP 활성의 강력한 조절 인자로서 세포 에너지 상태를 포함시켰다. 메발로네이트(mevalonate) 대사는 또한 Rho GTPase를 활성화시킬 수 있으며, 이는 차례로 YAP/TAZ를 탈인산화시킨다. 특히, YAP 활성화와 글루타민 합성 효소(GS) 사이의 연결은 GS 발현이 우세할 수 있는 간에서 특이적으로 보고되었다. 그러나, 폐혈관계와 같은 다른 조직 구획에서 YAP/TAZ가 대사 신호에 반응한다는 개념을 보완하며, 이러한 결과는 해당 및 글루타민 분해성 경로를 재프로그래밍하고 세포 증식과 조정하는 기계적 센서로서 이러한 요소를 보다 직접적으로 정의한다. 상향 및 하향 대사 경로를 지닌 YAP/TAZ 간의 이러한 상호 관계는 이 경로에 내재하는 조정 가능한 피드백-구동 특성을 제안하며, ECM 재형성, PH 아형(subtype), 중증도 또는 일시적인 단계에 따라 대사 프로그램의 개별적인 "조정(tuning)"에 부분적으로 책임이 있을 수 있다. 더욱이, YAP/TAZ에 영향을 주는 알려진 환경 신호의 확장된 레퍼토리가 주어지면, 히포 시그널링의 대사 작용은 혈관 경직도 또는 PH 단독 보다 심지어 더 넓은 영향 범위로 확장될 가능성이 있다. 확실히 장기 발달과 종양 형성의 맥락에서, 증식 능력과 효율적인 에너지 생산의 균형을 맞추는 주요 메커니즘으로 글루타민 분해 및 해당작용에 대한 히포 시그널링의 주된 조절 역할에 대해 짐작하려고 유도하게 한다.

[0070] PH 병 표현형(pathophenotype)의 결정적인 매개체인 글루타민 분해 확인은 이 질환에서 호기성 해당 작용을 넘어선 필수 조절 대사 체크포인트로 관심을 옮긴다. 마디(nodal) 조절점으로서의 GLS1의 확인은 PH와 암의 병인 발생 사이의 중요한 유사성을 일반적으로 결정짓는 주요 분자 결정인자로서 글루타민 분해 및 보전(anaplerosis)을 강조한다. 이러한 연구 결과는 또한 글루타민 전달체와 같은 글루타민 핸들링의 다른 측면이 관련될 수 있음을 시사한다. 더욱이, GLS1을 넘어, 두 가지 추가 효소-LDHA 및 피루베이트 카르복실라제-가 해당 및 보전(anaplerosis)의 경직도-매개 변화에서 연결 체크 포인트로 본원에서 확인되었으며(도 1), 향후 특성화를 기다리고 있는 PH의 대사 환경에 대해 광범위한 수준을 나타낸다.

[0071] HIV-PAH에 대한 YAP/TAZ-GLS 축의 기계적 연결은 또한 PH의 이 애매한 형태의 병인에 대한 필요한 통찰력을 제공한다. HIV-감염된 개체에 PAH의 유행이 증가하지만 HIV-PAH의 분자 발병 기전에 대해서는 알려진 바가 거의 없다. HIV 또는 SIV 감염에 PAH 이차적인 영장류 및 인체 모델에서 YAP/TAZ 및 GLS의 작용을 확립함으로써, 이러한 결과는 조직 병리학적 연관성을 뛰어 넘어 이 PAH의 아형에서 활성인 분자 및 세포 병 표현형이 다른 PAH 형과 중첩되며 유사하게 표적화된 치료법으로 치료할 수 있다는 대망의 증거를 제공한다.

[0072] 마지막으로, PH에서 글루타민 분해의 기계적 활성화의 확인은 PH에서 새로운 임상 관리 전략을 개발할 단계를 설정한다. 지금까지, 디클로로아세테이트에 의한 PDK의 약리학적 억제제는 PH에 대한 임상 연구 하에서 가장 두드러진 대사 표적 전략이었다. 본원에 기술된 결과는 매트릭스 재형성 및 글루타민 분해와 관련된 기능적으로 연결된 표적의 범위가 PH에서 추가 치료학적 개발에 대한 가능성을 보여주고 있음을 입증한다. BAPN을 가진 모노크로탈린-노출된 랫트에서 PH의 혈액학적 및 조직학적 지표의 향상은 PH 병인에서 콜라겐 가교-결합 및 ECM 리모델링의 중요성을 강화시키고 만성 저산소 PH에서 Lox(라이실 옥시다아제)를 억제하는 이전 연구와 일치한다. 그러나, 특히 Lox 억제제 단독의 치료 용도는 불필요하거나 보완적인 기능을 나타낼 수 있는 몇 가지 다른 라이실 옥시다아제의 중요성으로 인해 대단하지 않는 효능(즉, 우심실 리모델링 개선, 도 4)에 시달릴 수 있다. 그러나, 하향 YAP1-GLS1 대사 축의 표적과 결합될 때, 부가적인 또는 아마도 상승적인 치료 효과가 폐혈관의 증식 및 재형성을 억제하는데 나타날 수 있다. 이는 YAP1 억제제 베르테포르핀을 단독으로 사용했을 때 폐혈관계에서 히포 시그널링의 변화와 증증의 설치류 PH의 강력한 개선을 넘어서는 여러 가지 나타나는 유익한 효과를 감안할 때 특히 분명하다 (도 4).

- [0073] 기술된 화합물 또는 조성물은 임상 반응에 따라 요구되는 바와 같이 조절될 수 있는 적절한 투여량으로 초기에 투여될 수 있다. 예를 들어, 동물 시험에서 결정된 예비 투여량 및 인간 투여를 위한 투여량의 조정은 당해 기술 분야의 관행에 따라 수행된다. 예를 들어, 마우스 및 다른 동물에서, 인간에게 효과적인 투여량을 외삽하는 방법은 당업계에 공지되어 있다; 예를 들어, 미국 특허 제 4,938,949 호, Freireich et al, Cancer Chemother Reports, 1966, 50 (4) : 219-244를 참조하시오. 독성 및 치료 효능은 예, LD₅₀ (집단의 50%에 치사되는 투여량) 및 ED₅₀ (집단의 50%에 치료학적으로 유효한 투여량)을 결정하기 위해, 세포 배양 또는 실험 동물에서의 표준 약학적 절차에 의해 결정될 수 있다. 독성 및 치료 효과 간의 투여 비율은 치료학적 지수이며, LD₅₀/ED₅₀ 비율로 표현될 수 있다. 일부 실시예에서, 큰 치료학적 지수를 나타내는 조성물이 사용된다.
- [0074] 치료 유효량은 초기에 세포 배양 검정으로부터 추정될 수 있다. 세포 배양 검정 또는 동물 모델에서 결정된 바와 같이, IC₅₀ (즉, 증상의 최대 억제에 달하는 치료학적 화합물의 농도)을 포함하는 순환 혈장 농도 범위를 달성하기 위해 동물 모델에서 투여량을 제제화할 수 있다. 혈장 내 수준은 예를 들어, ELISA 또는 HPLC에 의해 측정될 수 있다. 임의의 특정 투여량의 효과는 적절한 생물 검정에 의해 모니터링될 수 있다. 투여량의 예는: 약 0.1xIC₅₀, 약 0.5xIC₅₀, 약 1xIC₅₀, 약 5xIC₅₀, 10xIC₅₀, 약 50xIC₅₀ 및 약 100xIC₅₀이다.
- [0075] 본원에 기재된 화합물의 치료 유효량의 예는 화합물 및 증상의 중증도에 따라, 약 1 μ g/kg 내지 약 40mg/kg이다. 적절한 치료 유효량은 치료 임상시에 의해 선택될 수 있으며, 일부 실시예에서 약 1 μ g/kg 내지 약 40 mg/kg, 약 1 μ g/kg 내지 약 25 mg/kg, 약 1 μ g/kg 내지 약 10 mg/kg, 약 10 μ g/kg 내지 약 1 mg/kg, 약 10 μ g/kg 내지 약 100 μ g/kg, 또는 약 100 μ g/kg 내지 약 1 mg/kg 범위이다. 또한, 동물의 특정 투여량은 실시예에 나타내었다.
- [0076] 베르테포르핀의 경우, 유효량은 약 1 mg/kg 내지 약 50 mg/kg(예, 약 2.5 mg/kg 내지 약 30 mg/kg 또는 약 10 mg/kg 내지 약 25 mg/kg)의 범위일 수 있다. 유효 투여량은 또한 투여 경로, 부형제 사용 및 다른 치료제의 사용을 포함하는 다른 치료법과의 병용 가능성에 따라 당업자에 의해 인식되는 바와 같이 다양할 것이다. 일부 실시예에서, 치료 유효량의 베르테포르핀, 이의 염, 전구 약물 또는 유도체 또는 이들의 조합은 1일당 약 10 내지 25 mg/kg이다.
- [0077] C-968 및 CB839의 경우, 유효량은 약 1 mg/kg 내지 약 30 mg/kg(예, 약 2.5 mg/kg 내지 약 20 mg/kg 또는 약 5 mg/kg 내지 약 15 mg/kg)의 범위일 수 있다. 유효 투여량은 또한 투여 경로, 부형제 사용 및 다른 치료제의 사용을 포함하는 다른 치료법과 병용 가능성에 따라 당업자에 의해 인식되는 바와 같이 다양할 것이다. 일부 실시예에서, 치료 유효량의 C-968 또는 CB839, 이의 염, 전구 약물 또는 유도체 또는 이들의 조합은 1일당 약 10mg/kg이다.
- [0078] 투여량은 의사에 의해 결정될 수 있고, 필요에 따라 치료의 관찰된 효과에 적합하도록 조정될 수 있다. 상기 조성물은 투여 후 최장시간 동안 순환 수준을 최대화하기 위해 볼루스(bolus) 투여량으로 제공될 수 있다. 지속적인 주입은 또한 볼루스 투여 후 사용할 수 있다. 일부 실시예에서, 화합물 또는 조성물은 2, 3, 4 또는 6회 등량의 별도 투여로 투여될 수 있다. 예를 들어, 1일당 약 25mg/kg을 2, 3, 4 또는 6회 등량의 별도 투여로 투여될 수 있다. 다른 실시예에서, 1일당 약 10 mg/kg을 2, 3, 4 또는 6회 등량의 별도 투여로 투여될 수 있다.
- [0079] 본원에 기재된 화합물 또는 조성물은 단기간 및 장기간의 사용에 적합하다. 본원에 사용된 "단기간 사용"은 개시된 화합물 또는 조성물의 약 20회 이하의 투여량을 환자에게 투여하는 것을 지칭할 수 있다. 따라서, 본원에 사용된 용어 "장기간 사용"은 상기 화합물 또는 조성물의 약 20회 초과 투여량을 환자에게 투여하는 것을 의미할 수 있다.
- [0080] 본원에 기술된 화합물 및 조성물은 단독으로 또는 통증, 염증, 기능적 또는 신경병증성 통증 치료에 사용되는 진통제 또는 항염증제와 같은 부가적인 치료제 하나 이상과 병용으로 투여될 수 있다. 하나 이상의 부가적인 치료제는 단독으로 투여될 때 치료 효과를 생성할 수도 생성하지 않을 수도 있지만, 개시된 화합물 또는 조성물 중 임의의 것으로 투여될 때 그러한 효과(예: 통증 감소)를 초래한다.
- [0081] 본원에 기술된 하나 이상의 부가적인 치료제 및 상기 화합물 및 조성물은 동시 투여 뿐만 아니라 수 일 간격으로 일시적으로 이겨된 순서를 포함하는 임의의 순서로 투여될 수 있다. 본원에 기술된 하나 이상의 부가적인 제제 및 상기 화합물 및 조성물의 투여는 동일하거나 상이한 경로에 의한 것일 수 있다. 일부 실시예에서, 하나 이상의 부가적인 제제는 본원에 기재된 화합물 및 조성물과 조합될 수 있다.
- [0082] 또한, 전술한 내용은 본 발명의 바람직한 구현예에 관한 것이며, 본 발명의 범위를 벗어나지 않으면서 다양한

변경이 가능하다는 것을 이해해야 한다. 본 발명은 하기 실시예에 의해 추가로 예시되며, 이는 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 해석되어서는 안된다. 반대로, 본원 명세서를 읽은 후, 본 발명의 사상 및/또는 첨부된 청구범위를 벗어나지 않으면서 당업자에게 제안할 수 있는 다양한 다른 실시예, 변형 및 균등물을 행할 수 있음을 명확히 이해할 것이다. 본원에 언급된 모든 특허, 특허 출원 및 출판물은 모든 목적을 위해 그 전체가 참조로 포함된다.

도면의 간단한 설명

[0083]

도 1 (A-C)는 ECM 경직도에 의해 유도된 대사 스위치가 YAP/TAZ의 기계적 활성화에 의해 조절됨을 보여준다. A) 면역블랏 분석에서는 PAECs에서 2개의 독립적인 siRNA 서열에 의한 YAP와 TAZ의 녹다운(knockdown)을 확인하였다. B-E) PAECs를 연결 또는 경질 매트릭스에서 배양하였다. 세포 내 락테이트는 경질 매트릭스에서 증가되었지만, YAP/TAZ의 siRNA 녹다운(B)에 의해 그러한 증가는 둔화되었다. 경질 매트릭스에서 YAP/TAZ 녹다운은 또한 보전(anaplerotic) 및 해당 활성화(B)뿐만 아니라 락테이트/피루베이트 비율(C)을 반영하는 특이 대사물 변화를 둔화시켰다. 데이터는 평균 ± SEM (* P<0.05; ** P<0.01, *** P<0.001)으로 표시됨. 스케일 바, 20µm. (유사한 결과가 PSMCs에서 발견되었음, 데이터 미도시).

도 2 (A-H)는 YAP/TAZ가 주요 대사 효소의 전사를 제어한다. A) 서열 분석은 GLS1, LDHA 및 PC의 프로모터 영역에서 TEAD 결합 부위 (A-D로 표시)의 존재를 예측하였다. B) ChIP-qPCR은 GLS1, LDHA 및 PC 프로모터 영역에서 TEAD/YAP 결합 부위의 존재를 확인하였다. 알려진 YAP 표적인 CTGF를 양성대조군으로 사용하였다. 결과는 항-YAP 또는 항-IgG 대조군을 이용한 면역침전 전의 전체 입력 DNA의 퍼센트로 표시된다. C-E) 면역블랏팅(D)과 농도 측정법(E)을 수반하는 RT-qPCR(C)은 경질 매트릭스의 PAECs에서 증가된 GLS1, LDHA 및 PC 발현이 YAP/TAZ 녹다운에 의해 둔화되었음을 나타냈다. F-H) RT-qPCR(F) 및 면역블랏팅/농도 측정법 (G-H)은 YAP (pYAP)이 연결 매트릭스에서 PAECs의 GLS1, LDHA 및 PC 발현을 증가시켰음을 보여주었다. 모든 패널에서, 대조군 (siNC, 연결 매트릭스 상에서 배양된 pYAP)에서의 평균 발현을 1의 배수 변화를 나타내고, 관련 샘플을 비교하였다. 데이터는 평균±SEM (*P<0.05; **P<0.01, ***P<0.001)으로 표시됨. 스케일 바, 20µm. (유사한 결과가 PSMCs (말초 동맥 평활근 세포)에서 발견되었음. 데이터 미도시).

도 3 (A-G)는 GLS의 약리학적 또는 유전적 억제자 경질 매트릭스에서 글루타민 분해의 상향-조절을 둔화시킴을 나타낸다. A-C) PAECs에서, 표적화된 LC-MS/MS는 GLS (BPTES 또는 DON)의 약리학적 억제자 경질 매트릭스에서 대사 발현의 변화를 둔화시켰음을 나타내었다. 특히, 경질 매트릭스 대조군 (si-NC Stiff)와 비교하여, GLS1 억제제는 글루타민, 피루베이트, 숙시네이트를 증가시켰고 글루타메이트와 아스파테이트(A)를 감소시켰고 락테이트(B)와 락테이트/피루베이트 비율(C)을 증가시켰다. D) 면역블랏 분석은 2개의 독립적인 siRNA 서열에 의한 GLS1의 녹다운을 확인하였다. E-G) PAECs에서 GLS1 녹다운은 경질 매트릭스에서 대사 발현의 변화를 둔화시켰고 글루타민, 피루베이트 및 숙시네이트를 증가시켰다. 글루타메이트 및 아스파테이트(E)를 감소시켰다; 그리고 락테이트/피루베이트 비율 (F-G)을 감소시켰다. 모든 패널에서, 대조군 (연결 매트릭스)의 평균 발현은 1의 배수 변화로 나타내고, 관련 샘플을 비교하였다. 데이터는 평균±표준 편차로 나타내었다 (*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001).

도 4 (A-I)는 모노크로탈린-노출된 랫트의 기계적 변환(mechanotransduction)의 조절이 글루타민 분해에 영향을 미쳐 폐혈관 증식을 감소시키고 PAH를 예방함을 보여준다. A-B) 모노크로탈린 노출 후, 랫트를 매일 BAPN 또는 비히클(A) 또는 비히클 또는 베르테포르핀(B)의 매일 복강 내 주사로 처리하였다. C) BAPN과 베르테포르핀 모두가 모노크로탈린에 노출된 랫트의 폐에서 LOX 활성을 감소시켰다. D) 원자력 현미경 검사에서 BAPN과 베르테포르핀으로 처리된 랫트에서 폐동맥(100 mm 미만)의 경직도가 감소되었음을 확인하였다. 검은 선은 중간 값을 나타낸다. 기호는 개별 PA 측정을 나타낸다. E-F) PAH CD31+ 세포의 RT-qPCR은 BAPN 및 베르테포르핀로 처리된 랫트에서 CTL 및 CYR61 두 YAP/TAZ 표적 유전자의 감소뿐만 아니라 GLS 발현(E) 및 활성화도(F)의 감소를 나타내었다. G) 헤마톡실린/에오신 착색 및 공동 면역형광 현미경 검사로 BAPN 및 베르테포르핀 처리된 랫트에서 비히클 랫트와 비교하여 혈관 두께 및 근육화 감소뿐만 아니라 YAP1+ 세포의 감소, GLS1 혈관 강도의 감소 및 CD31/PCNA 및 α-SMA/PCNA 이중-양성세포의 감소가 나타났다. H-I) 베르테포르핀과 낮은 정도의 BACN는 RVSP (I)에 의해 정량화되어 PAH의 중증도를 완화시켰다. 모든 패널에서, 대조군에서의 평균 발현은 1의 배수변화 (fold change)를 나타내었고, 관련 샘플을 비교하였다. *P<0.05; **P<0.01, ***P<0.001. 스케일 바, 50 µm.

도 5 (A-H)는 모노크로탈린-노출된 랫트에서 GLS의 약리학적 억제자 글루타민 분해 및 관련된 폐혈관 세포 증식을 감소시켰음을 보여준다. 모노크로탈린 질환 유도 후, 실험용 프로토콜 (A-B)의 개략도에 기술된 GLSas의 두 약리학적 억제제인 C968 또는 CB839 비히클의 매일 복강 내 주사로 랫트를 처리하였다. C-D) C968(C) 또는

CB839 (D)는 모노크로탈린-노출된 랫트의 폐에서 GLS 활성을 감소시켰다. E-H) 공동-면역 형광 현미경 검사는 병이 있는 폐동맥(비히클)에서 Ki67/PCNA-양성 증식 세포를 나타내었다. C968 또는 CB839는 α -SMA+ 내측 (G-H) 및 CD31/vWF+ 내피 (E-F) 구획에서 Ki67/PCNA 양성 세포의 수를 감소시켰다. 모든 폐널에서, 대조군에서의 평균 발현은 1의 배수변화(fold change)를 나타내었고, 관련 샘플을 비교하였다. 데이터는 평균±SEM (*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001)으로 표시된다. 스케일 바, 50 μ m.

도 6 (A-H)는 모노크로탈린-노출된 랫트에서 GLS의 약물학적 억제에 PAH 증상을 개선함을 보여준다. 혈관 재형성(A-B), 동맥 근육화(C-D), RVSP (E-G) 및 우심실 비대 (Fulton index, RV/LV+S)(H)에 의해 정량화된, 예방 실험 (C968) 또는 글루타민 분해의 전환 연구 억제에서의 모노크로탈린 주사 후 PAH 중증도가 개선되었다. 모든 폐널에서, 대조군에서의 평균 발현은 1의 배수변화(fold change)를 나타내었고, 관련 샘플을 비교하였다. 데이터는 평균±SEM (*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001)으로 표시된다. 스케일 바, 50 μ m.

도 7 (A-C)는 GLS1의 유전적 또는 약리학적 억제가 PAECs 증식을 조절하나 세포사멸을 조절하지 않음을 나타낸다. A-C) PAECs를 연질 (1 kPa) 또는 경질 (50 kPa) 매트릭스 상에 플레이팅하고, 명시된 처리로 노출시켰다. 세포사멸(A-C) 및 증식 (B-C)을 플레이팅 후 48시간 동안 정량화하였다. A) 효소 분석은 연질 매트릭스에서 혈청 고갈 후 24시간 카스파제 3/7 활성의 증가를 나타내었고, 그보다 약간 낮은 정도로 경질 매트릭스에서 나타났다. 대조군 처리(비히클 대조군, siRNA 스크램블된 대조군, siNC)와 비교하여 두 개의 독립적인 siRNA (si-GLS1_1, siGLS1_2)에 의한 GLS1 (BPTES, C968)의 약리학적 억제제의 존재 또는 GLS1 녹다운 후에 유의한 변화는 관찰되지 않았다. B-C) 면역형광 현미경(B) 및 정량화(C)에 의해 나타낸 바와 같이, 증식은 매트릭스 경직에 의해 (PCNA 염색에 의해 반영되는 것과 같이) 증가되었지만, 약리학적 GLS1 억제에 의해 감소되었다. 연질 및 경질 조건에서 혈청 기아에 의해 세포사멸은(절단된 카스파제-3 염색, CC-3+에 의해 반영되는 것과 같이) 증가되었지만 GLS1 억제에 영향을 받지 않았다. 모든 폐널에서, 대조군 (연질 매트릭스)의 평균 발현은 1의 배수변화(fold change)를 나타내었고, 관련 샘플을 비교하였다. 데이터는 평균±표준 편차 (*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001)로 표시된다.

도 8 (A-E)는 여러 형태의 PAH를 앓고 있는 인간 환자에서 동맥주위 섬유성 콜라겐의 증가가 GLS, 글루타민 분해 및 아스파테이트 생산의 증가와 관련이 있음을 보여준다. A-B) 동시 면역형광 현미경 검사 및 정량화는 동맥주위 섬유성 콜라겐 증착의 증가가 인간 PAH (n=6)에서 증가된 LDHA (A) 및 PC (B) 발현을 동반함을 나타내었다. 그러한 염색은 병이 있는 폐동맥에서 YAP1/LDHA (A)와 YAP1/PC (B) 이중-양성 세포의 증가를 추가로 입증하였다. C) 이러한 변화는 내측(α -SMA+) 및 내피 세포(vWF+) 구획에서의 증식하는 폐혈관 세포 (Ki67+)의 증가와 혈관 세포사멸 세포 (CC-3+)의 유의한 감소를 동반하였다. D-E) 망상의 병변에서도 비슷한 변화가 관찰되었다.

도 9 (A-L)은 글루타민 분해가 병에 걸리기 전(pro-diseased) 세포의 기질을 만들기 위해 활성화된 PAAF의 대사 요구를 유지함을 보여준다. A-C) BPTES, C968 또는 CB839에 의한 GLS1의 약리학적 억제는 글루타민 분해 (A), 해당작용 (B) 및 아스파테이트 생산 (C)에 의해 반영된 바와 같이 경질 매트릭스 상에서 배양된 PAAF의 대사 활성을 둔화시켰다. D-E) BPTES, C968 또는 CB839에 의한 GLS1의 약리학적 억제는 전-염증성 사이토카인 (EDN1, IL6 또는 TGF- β)에 의한 자극 시 PAAF 의존성 ECM 재형성을 감소시켰다. F) RT-qPCR은 C968 또는 CB839에 의한 GLS1의 억제가 섬유아세포 활성 마커(α -SMA)뿐만 아니라 TGF- β -유도된 ECM 관련 유전자 발현을 감소시킴을 나타내었다. G-H) 피크로시리우스 레드 염색에 의한 미소섬유 콜라겐 시각화 (G) 및 정량화 (H)는 GLS1 억제제의 존재 내 활성화된 PAAF (TGF- β)에 의한 ECM 재형성의 감소를 확인하였다. I-M) PAAF를 명시된 처리에 따라 배양하였다. 세포를 제거하고 PAAF에 의해 합성된 매트릭스 상에서 폐동맥 내피세포(PAECs)를 배양하였다. PCNA 염색 (I)과 정량화는 대조군(TGF- β)와 비교하여 TGF- β +GLS1 억제제로 처리된 PAAF에 의해 재형성된 매트릭스 상의 증식성 세포(PCNA+)의 감소를 나타내었다. 동일한 조건에서, 대조군(TGF- β)와 비교하여 TGF- β +GLS1 억제제로 처리된 PAAF에 의해 합성된 매트릭스 상에서 배양된 PAECs에 의해 RT-qPCR은 전-염증성 사이토카인 유전자 발현 (J-L)의 감소를 나타내었다. 데이터는 3번씩 수행된 3회 이상의 독립적인 실험의 평균±SEM (*P<0.05, § P<0.01, #P<0.001)으로 표시된다. 1-way ANOVA와 post-hoc Tukey 검정을 그룹 비교에 사용하는 동안, 대응샘플 (paired samples)을 2-tailed Student's t 테스트로 비교하였다.

도 10 (A-F)는 ECM 재형성 또는 GLS1의 약리학적 억제가 ECM 경직과 글루타민 분해 사이의 피드백 루프를 나타내는 것을 보여준다. A-D) 모노크로탈린 노출 후, 랫트를 매일 BAPN (n=8) 대 비히클 (A-B; n=7) 또는 매일 i.p. 별도의 베르테포르핀 (n = 6) 대 별도의 비히클 (C-D; n = 6)의 주사로 처리하였다. RT-qPCR에 의해 평가된 바와 같이, BAPN 및 베르테포르핀은 모노크로탈린-노출된 랫트의 폐에서 GLS1 발현을 감소시켰다. E-F) 모노크로탈린 노출 후, 랫트를 매일 CB839 (n=8) 대 비히클 (E-F; n=7)으로 처리하였다. 원자력 현미경 (F)은

CB839-처리된 랫트에서 폐동맥 (100 μ m 미만) 경직의 감소를 나타내었다. 수평선은 중간 값을 나타낸다; 기호는 개별 폐동맥 측정을 나타낸다. 모든 폐혈에서, 대조군에서의 평균 발현은 1의 배수변화로 나타내었고, 관련 샘플들을 비교하였다. 대응샘플을 1-way ANOVA와 post-hoc Tukey 검정을 그룹 비교에 사용하면서 (*P<0.05, #P<0.001), 2-tailed Student's t 테스트로 비교하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0084] 실시예
- [0085] 실시예 1
- [0086] 실험 절차
- [0087] 세포 배양 및 시약
- [0088] HEK293T 세포 (American Type Culture Collection)를 10% 소 태아 혈청(FBS)이 함유된 DMEM에서 배양하였다. EGM-2 세포 배양 배지(Lonza)에서 원발성 인간 폐동맥 내피 세포(Primary human pulmonary arterial endothelial cells, PAECs)를 성장시켰고, 실험을 3-6 계대로 수행하였다. 원발성 인간 폐동맥 평활근 세포 (Primary human pulmonary arterial smooth muscle cells, PASMCs)를 SmGM-2 세포 배양 배지(Lonza)에서 배양하였고, 실험을 3-9 계대로 수행하였다. GLS1(2, 3)의 억제제: BPTES (비스-2-(5-페닐아세트아미도-1,3,4-티아디아졸-2-일)에틸 설��파이드), DON (6-디아조-5-옥소-L-노르류신) 및 C968 (글루타미나아제 억제제, 화합물 968, 5-(3-브로모-4-(디메틸아미노)페닐)-2,2-디메틸-2,3,5,6-테트라하이드로벤조[a]페난트리딘-4(1H)-온)은 시그마 알드리치에서 구입하였으며, 각각 10 μ M, 5 μ M 및 10 μ M의 농도로 사용하였다. 글루타메이트는 시그마 알드리치에서 구입하였으며, 2mM 농도로 사용하였다. 아스파테이트는 시그마 알드리치에서 구입하였으며, 10mM 농도로 사용하였다.
- [0089] 올리고뉴클레오타이드 및 형질감염
- [0090] YAP (J-012200-07 및 J-012200-05), TAZ (WWTR1; J-016083-05 및 J-016083-06), GLS (J-004548-09, si-GLS_1; J-004548-10, si-GLS_2) 및 스크램블드 대조군 (D-001810-01 및 D-001810-02)에 대한 온 타겟 플러스(On Target Plus) siRNAs는 ThermoScientific/Dharmacon에서 구입하였다. siRNA 실험은 siYAP_1/TAZ_1 또는 siYAP_2/TAZ_2로 얻은 결과를 나타낸다. PAECs 및 PASMCs를 콜라겐-코팅된 플라스틱 (50 μ g/mL)에 플레이팅하고 제조사의 지시에 따라 siRNA (25nM) 및 리포펙타민 2000 시약 (Life Technologies)을 사용하여 70-80% 융합성(confluence)에서 24시간 후에 형질감염시켰다. 형질감염 8시간 후, 세포를 트립신 처리하고 하이드로겔 상에 재-플레이팅하였다.
- [0091] 플라스미드
- [0092] YAP1 코딩 서열을 구입하고(Addgene; Plasmid # 18881), EcoRI 및 NotI 제한 부위를 사용하여 pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP (System Biosciences)에서 서브-클로닝하였다. GFP를 발현하는 렌티바이러스 패런트(모) 벡터를 대조군으로 사용하였다. PAECs 및 PASMCs에서 이러한 구조의 안정한 발현은 렌티바이러스 형질도입에 의해 달성되었다. 모든 클로닝된 플라스미드는 DNA 시퀀싱에 의해 확인되었다.
- [0093] 렌티바이러스 생산
- [0094] HEK293T 세포를 제조사의 지시에 따라 패키징 플라스미드(pPACK, System Biosciences)와 함께 렌티바이러스 플라스미드를 가진 리포펙타민 2000 (Life Technologies)을 사용하여 형질감염시켰다. 바이러스를 수거하고, 멸균 여과 (0.45 μ m)하고, 유전자 형질도입에 대한 PAECs 및 PASMCs (24-48 시간 인큐베이션)의 후속 감염에 사용하였다.
- [0095] 메신저 RNA 추출
- [0096] 세포를 1 ml의 QiaZol 시약 (Qiagen)에서 균질화시켰다. 총 RNA 함량은 miRNeasy 키트 (Qiagen)를 사용하여 제조사의 지시에 따라 추출하였다. 총 RNA 농도는 ND-1000 마이크로-분광 광도계 (NanoDrop Technologies)를 사용하여 측정하였다.
- [0097] 메신저 RNA의 정량적 RT-PCR
- [0098] cDNA를 생성하기 위해 Multiscript RT 키트 (Life Technologies)를 사용하여 메신저 RNA를 역전사시켰다. 형광 표지된 Taqman 프라이머 세트를 통해 어플라이드 바이오시스템 7900HT 급속 실시간 PCR 장치(Applied

Biosystems 7900HT Fast Real Time PCR device)를 사용하여 cDNA를 증폭시켰다. 두 GLS1 아이소형인 KGA와 GAC의 상대적 발현을 구체적으로 측정하기 위해 TaqMan 유전자 발현 분석 Hs01014019_m1과 Hs01022166_m1이 각각 사용되었다. RPLPO 발현으로 정규화된 식 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)을 사용하여 RNA 종의 배수-변화(fold-change)를 계산하였다.

[0099] ChIP-qPCR

[0100] PAECs를 48시간 동안 플라스틱에서 배양하였다. 세포를 2 mM 디숙신이미딜 글 루타레이트(DSG)로 45분간 그리고 이어서 실온에서 15분간 1% 파라포름알데히드에서 이중 가교결합시켰다. 고정된 세포를 0.05% Triton X100, 2.5% 글리세롤을 함유하고 10분간 빙상에서 1X 프로테아제 억제제 콕테일(Roche)로 보충된 용해 버퍼 [50 mM HEPES (pH 7.5), 140 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.1% IGEPAL 630 (Sigma Aldrich)] 10ml에서 용해시키고, 실온에서 15분 동안 버퍼 2[프로테아제 억제제와 함께 0.1 M Tris HCl (pH 8) 및 200 mM NaCl]에서 인큐베이션하였다. 크로마틴을 진폭의 30%에서 10분 동안(1분 10 사이클) 초음파 처리하였다. 샘플을 원심분리(2 x 14,000 g, 각각 5분간)하고 가용성 크로마틴을 새로운 튜브로 옮겼다. 초음파 처리 후 가교결합된 DNA를 4 °C에서 밤새 항-YAP1 항체(sc-15407X, Santa Cruz Biotechnology) 또는 비-면역성 토끼 IgG(ab27472, Abcam) 5 µg으로 침전시켰다. 크로마틴/항체 복합체를 PureProteome™ Protein G Magnetic Beads (Millipore)로 뽑아내고 저- 및 고-염 버퍼에서 세척하였다. 가교 복귀 (65 °C 4시간 동안) 및 프로테이나아제 K 처리 후, 크로마틴을 페놀-클로로포름 추출 및 에탄올 침전에 의해 정제하였다. 침전된 DNA는 예상되는 TEAD 결합 부위 또는 비-관련 계놈 영역(대조군)에 대해 생성된 프라이머를 사용하여 qPCR에 의해 분석되었다.

[0101] 마이크로어레이

[0102] siRNA 대조군 (si-NC) 또는 GLS1에 대한 siRNA (si-GLS_1)로 PAECs를 형질감염시키고 연결 하이드로겔 (1kPa) 또는 경질 하이드로겔 (50kPa)에서 배양하였다. 형질감염 48시간 후, 세포를 용해시키고, 제조사의 지시에 따라 Affymetrix 마이크로어레이 (HuGene 2.0 ST) 상에 하이브리드화를 위해 RNA를 추출하였다. 간단히 말하면, 제조사의 지시에 따라 miRNeasy 키트 (Qiagen)를 사용하여 PAECs 세포로부터 총 RNA를 추출하였다. 총 RNA 농도는 ND-1000 마이크로-분광광도계(NanoDrop Technologies)를 사용하여 측정하였다. 바이오티닐화된 cDNA를 WT 플러스 증폭 키트(Affymetrix)를 사용하여 100ng의 전체 RNA로부터 준비하였다. 단편화 후, 5.5 µg의 cDNA를 진칩 (GeneChip) 인간 유전자 2.0 ST 어레이 (Affymetrix)에 하이브리드시켰다. 진칩을 세척하고 Affymetrix Fluidics Station 450에서 염색하고 Affymetrix GeneChip Scanner 3000 7G를 사용하여 스캔하였다. 로우 데이터는 Affymetrix Expression Console에서 RMA를 사용하여 표준화되었으며 로그 변환된 신호 강도로 표시된다.

[0103] 경로 강화 분석

[0104] 연결 및 경질 매트릭스 백그라운드 모두에서 si-GLS1-처리된 및 비히클-처리된 PAECs 사이의 차별적인 발현을 시험하기 위해 one-way ANOVA 테스트를 유전자별로 사용하였다. 차별적으로 발현된 유전자를 0.05의 p-값 컷오프와 1.5의 폴드-변화 컷오프에 기초하여 선별하였다. 차별적으로 발현된 유전자의 경로 강화는 Cytoscape 2.8.1 환경에서 Reactome FI 분석 도구를 사용하여 수행되었다 (4). 경로별 열 지도(heat map)는 TM4 MultiExperiment Viewer를 사용하여 생성되었다 (5).

[0105] 면역블랏팅 및 항체

[0106] 세포를 램펠리 버퍼(Boston BioProducts)에서 용해시켰다. 단백질 용해물을 SDS-PAGE로 분석하고 PVDF 막 (Biorad) 상으로 옮겼다. TN 버퍼 (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl) 중 5% 무지방 우유 또는 TN 버퍼 중 5% BSA에서 멤브레인을 블로킹하고 1차 항체 및 2차 항체 존재 하에 인큐베이션하였다. 0.1% 트윈을 함유하는 TN 버퍼에서 세척한 후, 면역반응성 밴드를 ECL 시스템(Amersham Biosciences)으로 시각화하였다. YAP1 (#4912; 1/1000) 및 YAP/TAZ (#8418; 1/1000)에 대한 1차 항체를 셀 시그널링으로부터 얻었다. GLS1(ab156876; 1/1000), PC(ab115579; 1/1000), LDHA(ab47010; 1/1000)에 대한 1차 항체를 Abcam으로부터 얻었다. 튜블린 (T4026; 1/5000)에 대한 1차 항체를 시그마 알드리치로부터 입수하였다. TAZ(sc-48805)에 대한 1차 항체는 산타 크루즈 바이오테크놀로지로부터 입수하였다. HRP와 결합된 적합한 2차 항체(항-토끼, 항-마우스 및 항-염소)를 사용하였다 (Dako).

[0107] 면역형광법

[0108] 다양한 지시 처리 후, 배양된 세포를 PBS/PFA 4%로 10분간 고정시키고 PBS/Triton 100X 0.1%로 10분간 침투시켰다. 이어서, 상기 세포를 실온에서 2시간 동안 항-PCNA(#4912; 1/100; Invitrogen), 항-Ki67(ab15580; 1/200; Abcam) 및/또는 항-절단된 카스파제-3(1/200; Cell Signaling)로 인큐베이트하였다. Alexa-594 및/또는

Alexa-488 (Thermo Scientific)과 결합된 2차 항체를 1/500로 사용하였다. 핵을 DAPI (Sigma)로 대조 염색하였다.

[0109] 세포 계수 분석

[0110] 지시된 대로 특이 전-처리 또는 형질감염 프로토콜 후, PAECs 또는 PSMCs를 웰당 30,000 세포로 6웰 플레이트에서 3번씩 플레이팅하였다. 세포가 부착되도록 밤새 배양한 후, 6웰을 계수하여 처리(글루타메이트, 아스파테이트, BPTES, DON 또는 C968) 시간에 개시 카운트를 측정하였다. 2일, 4일 또는 6일 후, 웰의 내용물을 트립신 처리하고 계수하고, 증식률을 계산하였다.

[0111] BrdU 증식 분석

[0112] 기하급수적으로 성장하는 세포를 지시된 매트릭스에 48시간 동안 플레이팅하였다. 증식 분석을 위해, 세포 배양 배지에 5-브로모-2-우리딘(BrdU)을 1시간 동안 가하고 검출 키트(BrdU 세포 증식 검정 키트 #6813, 셀 시그널링)를 사용하여 DNA에 결합된 BrdU를 밝혀냈다.

[0113] 스크래치 분석

[0114] 융합성 PAECs를 파이펫 팁로 상처내고 상처 베드 폐쇄(wound bed closure)를 10시간 이상 연속적으로 실시하였다. Brightamed 이미지를 매 시간 마다 메타모ρφ 소프트웨어(로퍼 사이언티픽)가 관리하는 CoolSNAPHQ CCD 카메라의 106 단계 대조 대물 렌즈로 촬영하였다. NIH ImageJ 소프트웨어 (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>)를 사용하여 상처 부위를 정량화하였다.

[0115] 미토콘드리아 전위 측정

[0116] 이전에 설명한 바와 같이 (6), 세포를 37 °C에서 30분 동안 2nM TMRM (tetramethylrhodamine methyl ester, Life Technologies)와 Hoechst (0.1 µg/ml)로 염색하였다. 웰당 5 내지 8개의 랜덤 이미지를 Nikon TE2000 포식 현미경을 사용하여 기록하였다. 각 이미지의 평균 세포 형광 강도를 NIH ImageJ 소프트웨어를 사용하여 측정하였다.

[0117] 카스파제 3/7 어세이

[0118] 카스파제 3/7 활성을 제조자의 지시에 따라 카스파제-Glo 3/7 어세이 (Promega)를 사용하여 정량화하였다. 간략하게, 기술된 바와 같이 세포를 상이한 경직도의 하이드로겔 상에 플레이팅하고 처리하였다. 플레이팅 후 24시간, 혈청의 존재 또는 부재 하에 24시간 동안 세포를 배양하였다. 이어서 세포를 용해시키고 10 µg의 총 단백질을 카스파제 기질과 1시간 동안 배양하고, 발광을 플레이트 리더(Synergy HTX 멀티-모드 리더, Biotek)로 정량화하였다.

[0119] 동물

[0120] 모노크로탈린-처리된 랫트: 이전에 기술된 바와 같이 (7, 8), 수컷 Sprague-Dawley 랫트(10-14 주령)에 0시간째 60 mg/kg 모노크로탈린을 주사하였다. 노출 후 0-4 주에 우심 도관 삽입술을 수행한 후 후술한 대로 RNA 추출 또는 파라핀 삽입을위한 폐조직을 수거하였다 (섹션 : 조직 수거).

[0121] 시미안 면역결핍 바이러스에 감염된 붉은털원숭이: 상술한 바와 같이 (9), 6 ~ 10년령의 붉은털원숭이(RM)를 피츠버그 대학교(University of Pittsburgh)의 실험동물 연구 부서 (Division of Laboratory Animal Research)에서 승인한 영장류 센터 또는 공급 업체로부터 구입하였다. 원숭이에 SIV ΔB670(피츠버그 대학교의 M. Murphey-Corb 기증)를 정맥 내 주사하였다. 혈장 바이러스성 부하 및 말초 혈액 CD4⁺ T 세포를 정량적 RT-PCR 및 유동 세포 계측법으로 측정하였다. 감염 전에 폐동맥 도관 삽입술을 시행하였으며, 감염 후 6개월 및 10-12개월에 반복하였다. 또한, 폐조직을 부검 과정에서 얻었으며, 폐동맥을 원숭이의 신원을 알지 못하는 수의학 병리학자에 의해 검사하였다.

[0122] 혈장에서 대사 산물 추출

[0123] 이전에 발표된 프로토콜 (10)에 따라, 내부 표준 물질(STD)이 첨가된 80% 냉 메탄올 100%를 첨가하여 20 µL의 혈장으로부터 대사 물질을 추출하였다.

[0124] 랫트 폐혈관 내피 세포의 분리

[0125] 이전에 보고된 바와 같이 (8, 11), 랫트의 폐조직 엽을 가위로 찢고, 콜라게나제 D 용액 (Sigma) 200 µL를 4.8

mL HEPES 버퍼(pH=7.4)에서 2 mg/ml 콜라게나제 D의 최종 농도를 위해 가하였다. 자동 회전으로 37 °C에서 30분 동안 배양한 후, 20 µl의 DNase I (Sigma, 80U/mL DNase I의 최종 농도)을 첨가하고 병 상에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 상기 용액을 70 µm 세포 여과기 (BD Biosciences)로 2회 여과하여 단일 세포 현탁액을 수득하였다. PBS 세척, 세포 펠렛화 및 재현탁의 2 회전 후, 적혈구를 제거하기 위해 ACK 용해 버퍼 (Gibco)를 사용하였다. 남아있는 세포를 마우스 항-랫트-CD31 항체 (BD Pharmigen 555025)로 4 °C에서 30분간 인큐베이션하였다. 세포를 제조사 프로토콜에 따라 PBS로 2회 세척하고 항-마우스 IgG1 마이크로비즈 (Miltenyi Biotec)와 함께 15분 동안 인큐베이션하였다. 단일 CD31-양성 세포를 제조사의 지시(Miltenyi Biotec)에 따라 autoMACS Pro Separator를 사용하여 모았다. CD31 양성 세포의 순도(>95%)는 FITC-접합된 항-CD31(ab33858, Abcam)를 세포 라벨링 후 FACSscan 유동 세포계측기 (BD Biosciences)에 의한 유동 세포계측 분석에 의해 확인하였다.

[0126] 랫트 폐 조직 수거

[0127] 직접 우심실 천자에 의한 생리학적 측정 후 폐혈관을 lcc의 식염수로 부드럽게 플러싱하여 심폐 조직을 채취하기 전에 대부분의 혈액 세포를 제거하였다. 심장을 제거한 후 우심실과 좌심실+격벽(LV+S)의 해부 및 무게 측정을 수행하였다. 이후 장기를 조직학적 준비를 위해 수거하거나 액체 N2에서 플래시 동결시켜 RNA 및/또는 단백질을 균질화하고 추출하였다. 폐조직을 추가로 처리하기 위해, 절제 전에 폐를 우심실 캐놀러를 통해 일정한 저압(약 10 mmHg)으로 PBS로 플러시한 후, 약 20cm H₂O의 압력에서 10% 중성-버퍼 포르말린(시그마-알드리치)으로 기관 팽창(tracheal inflation)시켰다. 절제 및 25 °C에서 10% 중성-버퍼 포르말린으로 16시간 고정시킨 후, 폐 조직을 에탄올-크리렌 탈수 시리즈를 통해 파라핀으로 매립한 후 5 µm 단면으로 절단하였다 (Hypercenter XP System and Embedding Centre, Shandon).

[0128] GLS1 활성 분석

[0129] 제조사 지시(Glutaminase Microplate Assay Kit, Cohesion Biosciences)에 따라, 신선한 냉동 랫트 폐조직(0.1 g/샘플)을 병 상에 분석 버퍼의 1mL에 균질화하고 8000 g 4 °C에서 10분간 원심분리하였다. 단백질 농도를 Bradford 분석법으로 측정하였다. 총 단백질 (100 µg)로 표준화된 샘플을 37 °C에서 1시간 동안 키트 시약과 함께 인큐베이션하고 흡광도를 420 nm에서 측정하였다.

[0130] 폐 절편의 면역조직화학 검사 및 면역형광 검사

[0131] 폐 절편(5µm)을 탈파라핀화시키고 고온 항원 회수를 수행한 후, TBS/BSA 5%, 10% 당나귀 혈청으로 블로킹하고 면역조직화학에 대한 1차 항체 및 비오틴화 2차 항체(Vectastain ABC kit, Vector Labs) 또는 면역형광에 대한 Alexa 488, 568 및 647-접합된 2차 항체(Thermo Fisher Scientific)에 노출시켰다. YAP1(# 4912; 1/200 또는 sc101199; 1/50)에 대한 1차 항체를 각각 셀 시그널링 및 산타 크루즈 바이오테크놀로지로부터 얻었다. Abcam으로부터 GLS1(ab156876; 1/100), PC(ab115579; 1/100), LDHA(ab47010; 1/200) 및 a-SMA(ab32575; 1/1000)에 대한 1차 항체를 구입하였다. CD31 (sc-1506; 1/100)에 대한 1차 항체를 산타 크루즈 바이오테크놀로지에서 구입하였다. PCNA (13-3900, 1/100)에 대한 1차 항체를 써모 피셔 사이언티픽(Thermo Fisher Scientific)에서 구입하였다. 대부분의 경우, 스트렙타비딘-비오틴화된 알칼라인 포스파타제 복합체(Vector Labs)와 벡터 레드 알칼라인 포스파타제 기질 용액 (Vector Labs)을 첨가하여 발색시켰다. 레바미솔을 첨가하여 내인성 알칼리 포스파타제 활성(Vector Labs)을 블로킹하였다. 올림푸스 Bx51 현미경 또는 ZEISS LSM Exciter 공초점 현미경을 사용하여 사진을 얻었다. 기관지 기도와 관련이 없는 주어진 조직 절편 (> 10 혈관/절편)에 존재하는 작은 폐혈관 (<100 µm 직경)을 분석을 위해 선택하였다 (N> 5 동물/그룹). 얼룩의 강도를 ImageJ 소프트웨어(NIH)를 사용하여 정량화하였다. 이전에 기술된 바와 같이 (12), 전체 동맥 폐동맥에 대한 완전히 및 부분적으로 근육화된 말초(100 µm 직경) 폐동맥의 비율을 계산하여 a-SMA에 대해 염색된 파라핀 내장된 폐 절편에서 폐동맥 근육화 정도를 평가하였다. 모든 측정은 맹검 법으로 수행되었다.

[0132] 원자력 현미경

[0133] 랫트 폐를 0.025g의 OCT로 체중 g로 팽창시키고, 액체 질소 증기에서 동결시키고 -80 °C에서 저장하였다. 랫트 폐 슬라이스(10 µm 두께)는 유리 슬라이드에서 잘라내어 상기 샘플이 들어있는 유리 조각을 50 mm 디쉬(Willco Glass Bottom Dish)의 바닥에 붙였다. 측정 전에 상기 샘플을 먼저 행구어 내고 4 ml의 PBS 1x로 덮었다. 샘플의 기계적 성질은 BiScope 촉매 원자력 현미경 (Bruker)과 광학 현미경 (Leica DMI6000B)을 사용하여 연구되었으며, 이는 위상 대비에 의해 관심 영역을 정확하게 나타낼 수 있다. 각 샘플에 대해 5에서 최대 9개의 혈관 (<100 µm 직경)을 "포인트 앤 슈트(Point and Shoot)" 방법을 사용하여 분석하여 35-80점의 힘-거리 곡선을 여러 점에서 수집하였다. 마이크로인덴테이션 실험을 보로실리케이트 글래스 구형 팁(직경 5 µm)과 공칭 스프링 상

수 0.06 N/m (Novascan)의 캔틸레버를 사용하여 PBS로 수행하였다. 인텐테이션을 상대 트리거 모드에서 트리거 임계 값을 2 nN으로 설정하여 속도 2 $\mu\text{m/s}$ 를 사용하여 수행하였다. 겔보기 영 계수는 나노스코프 분석 1.50 소프트웨어 (Bruker)를 사용하여 힘 곡선을 헤르츠 구형 톱니 모양 모델에 맞추고 포이슨'스 비율 0.4를 사용하여 계산하였다. 큰 인텐테이션을 피하기 위해, 전체 힘 곡선의 각각 5% 및 25%의 최소 및 최대 힘 맞춤 경계가 상기 핏에 고려되었다.

[0134] 피크로시리어스(Picrosirius) 레드 염색 및 정량화

[0135] 피크로시리어스 레드 염색은 0.1% 피크로시리어스 레드(Direct Red80, Sigma-Aldrich)로 염색한 5 μL 파라핀 절편을 사용하고 이루어졌으며, Weigert의 헤마톡실린으로 대조 염색하여 섬유소 콜라겐을 나타내었다. 이어서, 분석기 및 편광기가 서로 평행하게 배향된 상태로 단면을 연속으로 이미지화하였다. 현미경 조건(램프 밝기, 콘덴서 열림, 대물렌즈, 줌, 노출 시간 및 게인 파라미터)을 모든 샘플의 이미징을 통해 유지하였다. 섬유성 구조(즉, 흑색 배경으로부터의 잔류 광을 제외함)를 나타내는 직교-배향된 편광기를 통과하는 광(light)만이 포함된 각 실험에 대한 적절한 대조(control) 섹션에 최소 임계치를 설정하였다. 각 실험 내의 모든 조건에서 모든 이미지에 대해 임계치가 유지되었다. 임계 빛에 의해 커버된 전송 영역의 면적을 계산하고 조건당 적어도 10 섹션/혈관을 함께 평균하였다 (NIH ImageJ 소프트웨어).

[0136] 표적화된 LC-MS/MS

[0137] 대사물 추출을 사소한 변형으로 기술된 바와 같이(35) 필수적으로 수행하였다. 간단히 말하면, -80 $^{\circ}\text{C}$ 에서 미리-냉각된 80% 메탄올 수용액을 사용하여 드라이 아이스 상에서 배양된 세포 및 CD31+ 세포로부터 대사물을 추출하였다. 대사물을 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 10분 동안 20,000 x g에서 원심분리하여 미리 제거한 혈장에서 추출하였다. 상등액을 -80 $^{\circ}\text{C}$ 에서 4시간 동안 미리-냉각된 4배량의 100% 메탄올로 추출하였다. 대사물 추출 동안에 [$^{13}\text{C}_4$]-2-옥소글루타레이트 (Cambridge Isotope Laboratories) 내부 표준 물질을 첨가 하였다. 세포 및 혈장 추출물의 불용성 물질을 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 15분 동안 20,000 x g에서 원심분리하여 제거하였다. 상등액을 이전에 기술된 바와 같이(36) 표적화된 LC-MS/MS로 분석하였다. 대사물을 ZIC-HILIC 고정상 (150 mm x 2.1 mm x 3.5 mm, Merck)을 사용하여 분리하였다. MS 파라미터를 글루타민 표준 용액을 사용하여 최적화하였다. 모니터링된 질량 전이는 87 > 87 (피루베이트), 115 > 73+99 (석시네이트), 132 > 88 (아스파테이트), 145 > 101 (20G), 145 > 127 (글루타민), 146 > 128 (글루타메이트), 및 149 > 105([$^{13}\text{C}_4$]-20G)이었다. 질량 전이 및 머무름 시간 윈도우를 깔끔하고 매트릭스가 첨가된 표준 분석으로 확인하였다. 피크 영역을 Xcalibur Software (Thermo)에 의해 정량화하고 수동으로 검토하였다.

[0138] 세포 외 유속 분석

[0139] PAECs (30,000 cells/well) 또는 PSMCs (50,000 cells/well)를 연결 또는 경질 겔 20 μL 로 미리-코팅된 씨홀스 바이오사이언스 24-웰 플레이트에 플레이팅 하였다(Supplemental에 설명되어 있음). 부착을 허용하기 위해 밤새 인큐베이션한 후, 세포를 분석 배지(pH 7.4에서 0.5% 투석된 FBS 및 0.1 mg/mL의 우리딘을 함유하는 페놀 레드 또는 피루베이트가 없는 DMEM; 씨홀스 바이오사이언스 제조)에서 2회 세척하고 500 μL 의 신선한 분석 배지에서 인큐베이션하였다. XF24 또는 XFe24 분석기(Seahorse Biosciences)를 이용하여 산소 소비율(OCR)과 세포 외 산성화율(ECAR, 해당작용의 대리 마커)을 측정하였다. 미토콘드리아 및 해당작용 스트레스 분석을 제조사의 프로토콜에 따라 수행하였다. OCR 및 ECAR을 검정 완료 후 측정된 세포 수로 표준화하였다.

[0140] PH 랫트에서 YAP1 억제

[0141] PH를 유도하기 위해, 수컷 Sprague-Dawley 랫트(10-14주령)에 60 mg/kg 모노크로탈린(Sigma-Aldrich)을 복강 내 주사하였다. 2일 후, 랫트에 5% 디메틸 설폭사이드(DMSO, 시그마-알드리치)에 가용화된 베르테포르핀(Active Biochemicals Company, Ltd) 25 mg/kg을 매일 복강 내 주사하였다. 모노크로탈린 주사 후 21일에 마지막 주사 후 2일째, 우리가 기술하였듯이(2), 우심 도관 삽입 후 OCT(Sigma-Aldrich)로 RNA 또는 단백질 추출, 파라핀 삽입, 또는 동결 보존을 위해 폐조직 및 CD31+ 세포를 채취하였다.

[0142] PH 랫트에서 GLS1 억제

[0143] PH를 유도하기 위해, 수컷 Sprague-Dawley 랫트(10-14주령)에 60 mg/kg 모노크로탈린(Sigma-Aldrich)을 복강 내 주사하였다. 2일 후, 연속 복강 내 주사로 C968 (10 mg/kg, 시그마-알드리치)를 매일 투여하였고, 모노크로탈린 주사 후 7일 후에 매일 CB839(10 mg/kg, Selleck Chemicals)를 연속 복강 내 주사하였다. 모노크로탈린

주사 후 21일에 마지막 주사 후 2일째, 우리가 기술하였듯이(2), 우심 도관 삽입 후 OCT(Sigma-Aldrich)로 RNA 또는 단백질 추출, 파라핀 삽입, 또는 동결 보존을 위해 폐 조직 및 CD31+ 세포를 채취하였다.

[0144] 인간 대상체

[0145] 모든 연구 절차에 대해 사전 동의를 얻었다. 포르말린 고정 파라핀이 삽입된 폐 샘플의 경우, 사용되지 않거나 폐기된 외과용 샘플(표 2)에서 인간 PH 표본을 수집했으며, 그 중 일부는 이전에 기술하였다 (37). 뉴잉글랜드 장기 은행(New England Organ Bank)의 질환이 없는 인간의 폐 표본이 기술되어 있다 (38). 도 8E-G에 기술된 혈장 수거 및 분석을 위해, 개체를 임상적으로 유의한 호흡 곤란으로 선별하였고 미국 메사추세츠 보스턴 브리검 여성 병원에서 올바른 심장 도관 검사를 받았다. (표 3, (26)에 설명된 일부). 대상체를 증가된 평균 폐동맥 압력 > 25 mmHg (mPAP)에 의해 정의된 임상 PH 유무에 따라 계층화하였다. 폐동맥 순응도 측정을 위해 42명의 HIV-감염된 개체군은 HIV 감염자의 폐질환에 대한 지속적인 연구의 일환으로 미국 펜실베이니아 피츠버그의 피츠버그 대학교에서 폐동맥 카테터 삽입술을 받았다. PAH (mPAP > 25 mmHg)의 진단은 11명의 개체에서 이루어졌다 (표 4). 이러한 침습성 혈류 역학 측정에 기초하여, 폐동맥 적합성을 뇌졸중 부피/맥박 압력으로 계산하였다. 마지막으로, 주변 혈장을 순환하는 대사물에 대해 분석한 인간 대상체에서 (표 5), 미국 캘리포니아 주 샌프란시스코 샌디에고 캘리포니아 대학에서 PAH (침습성 폐동맥 카테터 삽입술(mPAP > 25 mmHg)로 평가됨) 또는 PAH가 없는(침습성 폐동맥 카테터 삽입술 (mPAP < 25 mmHg) 또는 폐동맥 수축기 혈압 (<40 mm Hg)의 비침습적 심 초음파 검사로 평가됨) HIV-감염된 개체군을 모집하였다.

[0146] 인간 혈장 샘플링

[0147] 주 폐동맥에서 대상체의 혈액을 채취하기 위해, 임상적으로 제시된 우심 도관 삽입술을 이전에 기술된 바와 같이 (37), 형광 투시 안내 하에서 우측 내 경정맥 접근법을 통한 표준 프로토콜로 수행하였다. 형광 투시 및 혈액 역학 파형에 의해 확인된 대로 카테터를 주 폐동맥에 위치시켰다. 이어서, 말초 카테터 포트에서 혈액을 채취하고 K⁺-EDTA 항응고 인자가 있는 표준 진공채혈기(vacutainer) 튜브에 모았다. 혈액을 표준 원심분리한 후 혈장을 추출하였고, 그런 다음 -80 °C에서 보관하였다. HIV-양성 대상체로부터 정맥 말초 혈액을 채취하기 위해, 이전에 설명한 바와 같이 (40), 정맥혈을 표준 항응고제 (EDTA)-처리된 진공채혈기 튜브에 모았다. 2000xg에서 10분 동안 원심분리를 통해 혈액을 채취한 후 각 혈액 샘플에서 세포 요소를 펠렛화하였다. 상등액 혈장을 분주하고 -80 °C에서 즉시 동결시켰다.

[0148] 통계

[0149] 세포 배양 실험을 적어도 3번 및 각 복제물에 대해 적어도 3회 수행하였다. 각 군의 동물 수는 80%의 파워를 가지는 실험군 및 대조군의 평균값 및 10%의 표준 편차 사이에서 적어도 20%의 차이를 측정하도록 계산되었다. 이 연구에서 유일한 환자 샘플의 수를 임상적 입수가능성에 의해 주로 측정하였다. 설치류와 인간 조직 모두의 *in situ* 발현/조직학적 분석과 마우스와 랫트의 폐혈관 혈류 역학을 맹검법으로 수행하였다. 배양된 세포를 이용한 *in vitro* 실험 또는 전사/miRNA 발현의 *in situ* 정량에 대한 수치적 정량화를 평균±표준 편차(SD)로 나타낸다. 설치류 또는 인간 시약을 이용한 생리학적 실험의 수치적 정량화를 평균±표준 오차(SEM)로 나타낸다. 면역블랏 이미지를 적어도 3번 반복된 실험으로 나타낸다. 현미경 사진을 각 관련 집단의 실험으로 나타낸다. Shapiro Wilk 테스트에 의해 데이터 분포의 규정도를 측정하였다. 대응샘플(paired samples)을 정상 분포 데이터에 대한 2-tailed Student's t test에 의해 비교하였으며, 반면 비정형 분포 데이터에 대해서는 만-휘트니 U 비모수 테스트를 사용하였다. 그룹 간 비교를 위해 one-way ANOVA 및 post-hoc 터키 테스트를 수행하였다. 0.05 미만의 P 값은 유의한 것으로 간주되었다.

[0150] 실시예 2

[0151] 폐혈관 내피 및 평활근 세포에서 대사 리프로그래밍을 조절하는 기계적 자극

[0152] ECM 경직도에 의해 전달되는 기계적/물리적 신호가 혈관 세포 대사를 조절 하는지를 측정하기 위해, 폐혈관 세포 유형의 대사성 스크리닝을 연결 또는 경질 매트릭스 상의 배양으로 수행하였다. 세포 외 유출 분석을 통해 폐동맥 내피세포 (PAECs)에서 산소 소비율(OCR)과 세포 외 산성화 속도(해당작용의 대리 마커)를 평가하였다. 세포 외 산성화 속도 정량화에 의해 반영되는 바와 같이, ECM 경직도는 올리고마이신 A-유도된 세포 외 산성화 속도와 기저 세포 외 산성화 속도 사이의 차이로 계산된, 해당 예비 용량을 감소시키면서 기초 해당작용을 증가시켰다. 따라서, 경질 매트릭스 상의 세포는 연결 매트릭스 상의 세포와 비교하여 최대 속도에 가까운 해당성 플럭스를 나타내었다. 또한, ECM 경직도의 증가는 기저 OCR, ATP 의존성 OCR (기저 OCR과 올리고마이신 A-억제된 OCR의 차이) 및 최대 OCR(카르보닐시아나이드-p-트리플루오로메톡시페닐히드라존, FCCP를 통한 유도에 의해

반영됨)을 유의하게 감소시켰으며, 따라서 미토콘드리아 산화 인산화의 감소를 반영한다. 이러한 대사 변화에 대응하여, 경질 매트릭스는 전체 미토콘드리아 포텐셜을 감소시켰다 (데이터 미도시). 폐동맥 평활근 세포 (PASMCs)에서도 비슷한 결과가 관찰되었다 (데이터 미도시). 종합하면, 경직 상태는 기계적 자극으로서 해당 작용을 증가시키고 미토콘드리아 산화 인산화를 감소시킨다.

[0153] 이 동일한 기계적 조건 하에서 해당작용, 보전(anaplerosis) 및 TCA 주기의 활성을 결정하기 위해, 후보 세포 내 아미노산 및 대사 산물을 PAECs의 액체 크로마토그래피-질량 분석기(LC-MS/MS)로 측정하였다. 경직 조건에서 증가된 해당작용 및 감소된 산화적 인산화와 일치되게, 락테이트/피루베이트 비율의 증가가 관찰되었다. 산화적 인산화가 감소함에 따라 경질 매트릭스가 숙시네이트 수준을 감소시키고 락테이트 생산을 증가시켰다 (데이터 미도시). 중요하게도, ECM 경직은 글루타메이트 및 아스파테이트의 강력한 증가를 동반하는 세포 내 글루타민을 감소시켰으며, 이는 가속화된 해당작용을 수반하는 추정적 보전과 일치하였다. PAECs에서 해당작용(LDHA)과 보전(GLS1 및 PC) 모두에 관여하는 PC의 3가지 주요 효소 -LDHA(lactate dehydrogenase A), GLS1 아이소형(KGA 및 GAC), 및 PC- 수준이 경질 매트릭스에서 증가하였다(데이터 미도시). 상기와 같이, PASMCs에 대해서도 유사한 결과가 얻어졌다 (데이터 미도시). 따라서 경질 매트릭스에 노출되면 해당 과정과 산화적 인산화가 변할 뿐만 아니라 아미노산의 대체적인 보충을 조절한다.

[0154] **실시예 3**

[0155] **ECM 경직도는 YAP/TAZ에 의존하여 대사를 조절한다**

[0156] YAP와 TAZ가 폐혈관 세포에서 역학감응기(mechanosensor)로 작용한다는 이전의 연구 결과를 토대로, YAP/TAZ가 대사 재프로그램에 ECM 경화의 결과를 조절하는데 중요한지 여부가 결정되었다. 경질 매트릭스의 PAECs에서, YAP/TAZ 녹다운 (도 2A)은 해당작용에 대한 조절을 반영하여 락테이트/피루베이트 비율(도 2B)을 감소시켰다. YAP/TAZ 녹다운은 글루타민, 글루타메이트 및 아스파테이트 생산에 대한 경직된 ECM의 보전을 둔화시켰다 (도 2C). 그에 대응하여, 미토콘드리아 멤브레인 잠재력을 또한 경질 매트릭스에서 YAP/TAZ 녹다운 동안 유지하였다 (데이터 미도시). 반대로, 연질 매트릭스에서 성장된 PAECs에서, YAP(pYAP)의 안정한 발현은 락테이트/피루베이트 비율을 증가시켰다; 글루타민 감소시켰고, 글루타메이트 및 아스파테이트 증가시켰다; 그리고 결과적으로 미토콘드리아 멤브레인 잠재력이 감소하였다 (데이터 미도시). 특히, PAECs에서 경직된 ECM에 의해 기계적으로 제어된 해당작용 및 글루타민 분해의 동일한 경로가 PASMCs에서 YAP/TAZ에 의해 활성화되었다 (데이터 미도시).

[0157] 해당작용과 글루타민 분해-LDHA, GLS1 및 PC (도 2A)에 대한 주요 대사 효소의 프로모터 영역의 서열 분석에 의해 YAP/TAZ 복합체 (TEAD 부위)에 대한 몇 가지 추정 결합 부위가 밝혀졌다. ChIP-qPCR은 각 유전자에 대해 적어도 하나의 부위에서 YAP의 직접 결합을 증명하였다 (도 2B). 이에 따라 PAECs (도 2C-E)와 PASMCs (데이터 미도시)에서의 YAP/TAZ의 siRNA 녹다운은 표적 유전자 발현을 감소시켰고, 연질 매트릭스에서 PAECs의 YAP 발현을 증가시켰다 (도 2F-H). 종합하면, YAP/TAZ는 ECM 경직도에 의해 개시되는 메카노-트리거되고, 해당 및 글루타민 분해 대사 재프로그램링 이벤트에 필수적이다.

[0158] **실시예 4**

[0159] **증가된 GLS1 발현 및 글루타민 분해는 경직된 환경에서 해당 작용 및 세포 증식을 유지하는데 중요하다**

[0160] GLS1이 경직 유도 및 YAP/TAZ 의존성 글루타민 분해에 중요한지 여부를 결정하기 위해, PAECs를 연질, 경질 매트릭스에서 배양하였으며, GLS1의 두 가지 아이소형(KGA 및 GAC), BPTES (비스-2-(5-페닐아세트아미도-1,3,4-티아디아졸-2-일) 에틸 설파이드), DON (6-디아조-5-옥소-L-노르류신) 또는 CB-968 (글루타미나제 억제제, 화합물 968, C-968) (도 3A-C) 또는 siRNA (si-GLS; 도 3D-G)의 알려진 억제제에 노출하였다. LC-MS/MS로 정량화하면서, PAECs에서 GLS를 억제하는 것이 경직 유도 글루타민 소비, 글루탐산 생산 및 아스파테이트 생산 과정을 둔화시켰다 (도 3A 및 E). GLS 1 억제는 또한 락테이트/피루베이트의 비율이 감소함에 따라 경질 매트릭스에서 해당 작용을 감소시켰다 (도 3B-C, 도 3F-G). PASMCs에서 GLS1을 억제할 때 대사 활성의 유사한 변화가 관찰되었다 (데이터 미도시).

[0161] GLS1에 의해 조절되는 하향 분자 과정을 확인하기 위해, 경질 매트릭스 세포에서 si-GLS에 노출된 PAECs의 발현 배열 분석 및 경로 강화는 다중 경로, 특히 증식 능력을 조절하는 하향-조절 세포주기 유전자 및 세포 이동을 제어하는 세포 외 기질 조직에 관여하는 인자를 체계적으로 재프로그램하였다 (표 1). 세포 수, BrdU 맥박, 카스파제 3/7 활성 및 PCNA/절단 카스파제-3 이중 염색으로 평가한 바와 같이, GLS1 억제는 세포질에서의 세포 사멸과 증식에 무시할 수 있는 영향을 주었지만 PAECs의 경질 매트릭스에서 증식을 둔화시켰다 (데이터 미도시). 또한, 매트릭스 조직에 영향을 미치는 전사체 결과에 대응하여, siRNA 또는 약리학적 수단을 통해 달성된

GLS 억제제는 세포 이동을 억제하였다 (데이터 미도시). 유사한 효과가 PSMCs에서 관찰되었다 (데이터 미도시).

[0162] 글루타메이트와 아스파테이트의 보전 생산이 GLS1의 확산을 유지하기 위한 작용의 핵심인지 여부를 조사하기 위하여, 글루타메이트 또는 아스파테이트 보충을 GLS1 또는 YAP/TAZ가 결핍된 세포에서 수행하였다. 이러한 결과 및 이전 관찰과 일치하여, GLS1 또는 YAP/TAZ의 siRNA 녹다운은 세포 수 및 증식 마커의 정량, PCNA에 의해 평가된 바와 같이 PAECs 또는 PSMCs에서의 증식을 감소시켰다 (데이터 미도시). 중요하게, 감소된 GLS1 또는 YAP/TAZ를 갖는 세포에서, 세포 증식은 글루타메이트에 의해 적어도 부분적으로 회복되고, 아스파테이트 보충에 의해 더 완전하게 회복되었다 (데이터 미도시). 또한, 아스파테이트 보충은 유사하게 경질 매트릭스에서 GLS1-결핍 PAECs의 감소된 세포 이동을 역전시켰다 (데이터 미도시). 종합적으로, 이러한 결과는 글루타민 분해에 의한 글루타메이트 및 아스파테이트 생산의 GLS1 및 이의 조절이 대사 재프로그래밍 및 경직 매트릭스 노출에 특이한 결과적인 혈관 세포 증식 및 이동에 필수적임을 입증한다.

[0163] 실시예 5

[0164] YAP/TAZ-GLS1 축은 *in vivo* PH의 설치류와 인간인 경우의 혈관 경직도에 노출된 PAECs 및 PSMCs에서 해당 작용과 글루타민 분해를 활성화시킨다

[0165] 염증성 PAH (모노크로탈린-유도된)의 랫트 모델에서, 폐동맥 경직은 최근 병이 있는 폐동맥에서의 YAP/TAZ 발현의 증가를 수반하는 초기 병리학적 이벤트로 기술되었다. 이 동일한 모노크로탈린 랫트 모델에서, 글루타민 분해가 활성화되고 폐동맥 경직, YAP1 활성화 및 PAH와 상관관계가 있는지를 결정하였다. 이전에 보고된 바와 같이, 피크로시리우스 레드 염색은 모노크로탈린-노출된 랫트로 유래된 병이 있는 폐동맥에서 섬유소 콜라겐 침착의 증가를 보여주었으며 원자력 현미경으로 입증된 바와 같이 폐동맥 경직도의 증가와 관련이 있다 (데이터 미도시). 이러한 변화에는 PAH의 혈액학적 증상이 동반되었다. 이들 랫트에서, 비히클 또는 모노크로탈린에 노출된 후 3주째 폐에서 CD31+ 내피세포를 분리하고, LC-MS/MS로 대사물을 정량화하였다 (데이터 미도시). 경질 매트릭스에서 자란 배양된 PAECs에서 보전의 관찰과 일치하여 글루타민이 감소되었고 PAH CD31+ 세포에서 아스파테이트가 증가하였다. 주목할 만하게, 이들 세포에서 글루타메이트 농도의 유의한 변화는 관찰되지 않았으며, 이는 *in vivo* 폐 세포에서 글루타메이트 증가를 나타낼 수 있다. TCA 주기 활성의 감소를 나타내는 숙시네이트의 감소가 관찰되었고 락테이트/피루베이트 비율의 해당성 증가가 나타났다 (데이터 미도시). 그러한 대사물 변화와 일치하여, CD31+ 세포에서 GLS1 발현의 유의한 증가가 관찰되었다 (데이터 미도시). 면역블롯팅은 또한 모노크로탈린 랫트 폐에서 CD31+ 및 CD31- 세포 모두의 단백질 수준에서 GLS1, LDHA 및 PC 발현에 대응하는 증가를 나타내었다 (데이터 미도시). *In situ*, 공초점 면역형광 현미경 검사는 병이 있는 폐동맥의 CD31+ (내피) 및 α-SMA+ (평활근) 구획에서 증가된 GLS1, PC 및 LDHA 염색을 나타내었다.

[0166] 특히, GLS1, LDHA 및 PC 모두의 상향-조절은 병이 있는 폐동맥에서의 YAP1 핵 편재의 증가 및 PCNA/Ki67+ 증식 세포의 상향-조절과 관련이 있다 (데이터 미도시). 질한 진행 중에 이러한 이벤트의 정확한 동역학을 결정하기 위해, *in situ* 공초점 면역형광 현미경 검사를 랫트의 모노크로탈린-유도된 PH의 여러 단계에서 수행하였다. PH의 내피 세포사멸에 관한 이전 이론들과 일치하여, 초기의 일시적인 내피 세포사멸의 유도가 절단된 카스파제-3 *in situ* 염색법과 카스파제 3/7 활성화 (모노크로탈린 주사 후 0-3일)을 통해 반영된 것으로 밝혀졌다. 그 다음, 혈관 GLS1 발현의 증가와 관련하여 세포사멸의 연이은 감소와 평활근과 내피세포 증식의 증가가 뒤따른다. 종합하면, *in vitro* 결과와 일치되게, 이러한 결과는 혈관 손상 후에 그리고 내피 세포사멸의 조기 변동 직후에, 폐혈관 경직도 발달 및 글루타민 분해는 *in vivo*에서 질환이 있는 내피 및 평활근 세포의 증식 증가와 동일한 동역학을 따름을 나타내었다.

[0167] 글루타민 분해 재프로그래밍이 폐혈관 세포 증식을 유지하기 위해 인간 PAH에서 활성 과정인지 조사하였다. 특발성 및 유전성 병인 뿐만 아니라 경피증의 원인에서 비롯된 인간 PAH 환자군 (n=13)을 연구한 결과 (표 2), 외상성 또는 비관련된 원인으로 사망한 비-PAH 환자군 (n=6)과 비교하였다 (2). PAH 경우에서 증가된 동맥주위 (periarteriolar) 콜라겐 재형성과 관련하여, CD31+ (내피 세포) 및 α-SMA+ (평활근) 세포 모두에서 GLS1, PC 및 LDHA의 동시 상향-조절이 관찰되었다 (데이터 미도시). PAH 랫트와 마찬가지로, GLS1은 YAP1 핵 편재와 동시에 증가하였고, YAP1 핵 편재는 증가된 PCNA/Ki67+ 증식 혈관 세포와 관련이 있었다 (데이터 미도시). 망상 (plexiform) 병변-후기 증식성 혈관 병변-활성 증식과 휴지 세포사멸이 일관되게 관찰되었다 (데이터 미도시). 중요하게도, 이러한 대사 효소의 변화는 PH 개체의 메인 폐동맥에서 유래한 샘플에서 LC-MS/MS로 평가된 바와 같이, 순환 혈장의 대사물 프로파일과 상관관계가 있었다 (평균 폐동맥압 [mPAP] > 25 mmHg, 표 3의 환자 통계 정보). 특히 높은 폐동맥 압력 (평균 폐동맥 압력 > 45 mmHg)을 가진 대상체에서, 비-PH 개체군(mPAP <25 mmHg, 데이터 미도시)와 비교하여 상향-조절된 글루타민 분해 및 보전을 나타내는, 글루타민/글루타메이트 비율이 감

소되고 아스파테이트가 증가되는 반면 락테이트/피루베이트 비율이 증가된 해당작용이 반영되어 증가되었다. 종합하면, 이 결과는 *in vivo*에서 설치류와 인간 모두에 질환이 있는 경우 PAH에서 글루타민 분해 대사 스위치와 혈관 증식을 유도하기 위해 혈관 경직이 YAP/TAZ를 활성화시킨다는 아이디어를 뒷받침한다.

[0168] 실시예 6

[0169] YAP/TAZ-GLS1 축은 SIV-PAH를 갖는 영장류와 HIV-유도된 PAH를 갖는 인간에서 해당 과정과 글루타민 분해를 유도한다

[0170] PAH의 설치류 모델은 인간의 질병의 모든 양상을 복제하지 않기 때문에, 직접적인 저산소 자극을 사용하지 않고도 이와 동일한 분자 축이 보다 관련성 있는 모델 유기체에서 활성화되는지 여부가 결정되었다. 이전에, 인간 면역 결핍 바이러스(human immunodeficiency virus, HIV)-유도된 PAH의 비-인간 영장류 모델이 유인원 면역 결핍 바이러스(simian immunodeficiency virus, SIV)에 감염된 히말라야 원숭이에 기술되어 있다. 중요하게도, 그러한 모델은 PAH의 혈액학적 및 조직학적 징후를 반복한다. 또한, PAH를 발생시키는 감염된 원숭이의 50-60%가 불완전한 침투를 보여주며, 따라서 인간에서 HIV 감염으로 인한 PAH의 불완전한 침투와 일치한다. 중요한 것은 모노크로말린-노출된 랫트와 유사하게, PAH의 혈액학적 및 조직학적 증상이 확인된 SIV-감염된 원숭이 집단에서, 피크로시리어스 레드 염색은 비-PAH, SIV-감염된 동물과 비교하여 동맥주위 섬유성 콜라겐의 증가를 보여주었다(데이터 미도시). SIV-PAH 원숭이에서 병이 있는 폐동맥은 또한 증가된 YAP1 핵 편재, PCNA+/Ki67+ 세포 증식, 및 비-세포사멸성, 절단된 카스파제-3-음성 세포와 관련 있는 증가된 GLS1, PC 및 LDHA를 나타내었다(데이터 미도시).

[0171] 마지막으로, 이 연구 결과는 SIV-PAH 원숭이에서 발견되었으며, HIV-PAH를 앓고 있는 인간이 또한 증가된 폐혈관 경직도의 징후 및 혈관 해당작용 및 글루타민 분해의 변화를 나타낼 수 있는지 결정되었다. 폐동맥 카테터 삽입술을 받은 42명의 HIV-감염된 개체군을 연구하였으며 11명의 개체에서 PAH 진단을 받았다(표 4). HIV-PAH 대상체의 침습성 혈액학 자료를 분석한 결과, HIV-감염된 개체, 비-PAH 개체와 비교하여 폐동맥 경직의 증가와 일치하는 폐동맥 순응도의 유의한 감소가 나타났다. 중요한 것은 PAH 유무에 관계 없이 HIV-감염된 사람의 별도 집단에서 말초 정맥 혈장 대사물을 정량화함으로써(표 4) 글루타미네이트/글루타미네이트 비율의 감소 및 아스파테이트의 증가는 HIV-PAH에서 글루타민 분해 및 보존의 상향-조절과 일치하는 반면, 락테이트/피루베이트 비율의 증가는 증가된 해당 작용을 나타내는 것으로 관찰되었다.(데이터 미도시). 결과적으로, 설치류 및 인간 PAH의 다른 사례에서의 분자 발견을 반영하여, HIV-PAH에서 YAP/TAZ-GLS1 활성화에 대한 이러한 관찰은 폐혈관 경직도와 대사 조절 장애 사이의 긴밀한 연관성이 있음은 보여준다.

[0172] 실시예 7

[0173] 폐혈관 경직도 및 YAP/TAZ-의존성 기계적 변환의 조정은 *in vivo*에서 글루타민 분해 및 PH 징후를 조절한다

[0174] 동맥주위 ECM 재형성과 YAP/TAZ가 *in vivo*에서 혈관세포 대사를 조절하는지를 명확히 밝히기 위해, 모노크로말린 랫트 모델에서 YAP/TAZ 의존성 기계적변환(mechanotransduction)의 변화가 글루타민 분해와 PH 발달을 직접적으로 조절하는지를 결정하였다. 첫째, 콜라겐 가교 결합 및 그에 따른 매트릭스 경직을 담당하는 효소인 Lox의 알려진 약리학적 억제제(β -아미노프로피오니트릴, BAPN)를 사용하여, ECM 경직의 억제가 모노크로말린-노출된 랫트에서 관찰된 대사 변화 및 하향 PH 발현을 예방할 수 있는지 여부를 결정하였다(도 4A). BAPN 처리는 원자력 현미경 검사(도 4C-E)에 의해 평가된 바와 같이 좌심실 심장 기능에 부작용 없이 실제로 폐 Lox 활성화 및 결과적으로 동맥주위 ECM 경직을 감소시킨다(데이터 미도시). *in vitro* 결과와 일치하여, BAPN에 의한 ECM 경직의 감소는 직접적인 효소 활성화 측정 및 그에 따른 대사물 발현의 변화에 의해 반영되는 바와 같이 YAP1-의존성 유전자 발현을 감소시키고(도 4E) 하향 GLS 활성을 감소시켰다(도 4F-G). 이러한 대사 효과는 혈관 내피 및 평활근 증식을 더욱 감소시켰으며, *in situ* 세동맥 염색에 의해 반영된 바와 같이(도 4G), PH의 혈액학적 및 조직학적 발현을 개선시키고, 혈관 재형성 및 근육화(도 4g) 및 우심실 수축 압력(RVSP)을 측정하였다(도 4h).

[0175] 둘째, 병렬 방식으로 YAP1의 알려진 약리학적 억제제(verteporfin)를 사용하여 YAP1 활성이 동일한 질환의 랫트 모델(도 4B)에서 혈관 글루타민 분해 및 PH를 활성화시키는데 필수적인지 여부를 조사하였다. 예상대로 베르테포르핀은 좌심실 심장 기능 또는 전신 혈압에 부작용 없이 YAP1-의존성 유전자 발현을 감소시켰다(도 4E). 결과적으로, BAPN과 유사한 방식으로 훨씬 더 견고하게, 베르테포르핀은 하향 대사(GLS1 발현 및 활성화, 도 4F-G), 증식성(도 4G) 및 PH의 말기 발현을 개선시켰으며, 혈관 재형성/근육화, RVSP 및 우심실 재형성(Fulton index)의 감소를 포함하여 PH의 증식성(도 4G) 및 PH의 말기 증상을 보였다(도 4G-1). 결과적으로, 이들 데이

터는 ECM 경직이 폐혈관 글루타민 분해 및 보전, 증식 및 PH를 유도하기 위해 YAP/TAZ-특이적 기계적 변환에 의존한다는 *in vivo* 원인의 근거를 제공한다.

[0176] 실시예 8

[0177] 글루타민 분해의 GLS1-의존 억제는 *in vivo*에서 폐혈관 세포 증식을 감소시키고 PH를 개선시킨다

[0178] 마지막으로, 글루타민 분해 그 자체가 PH에서 폐혈관 증식을 촉진시키는데 필수적인지 여부를 조사하기 위해, 질환 예방 (도 5A) 또는 질환 전환 (도 5B) 투약 프로토콜을 사용하여 모노크로탈린-노출된 랫트에서 GLS1의 2가지 개별 약리학적 억제제 (C968 및 CB-839)를 투여하였다. PH를 유도하기 위해, 수컷 Sprague-Dawley 랫트 (10-14주령)에 60 mg/kg 모노크로탈린(Sigma-Aldrich)을 복강 내 주사하였다. 2일 후, C968 또는 CB-839 (10 mg/kg, Sigma-Aldrich)를 매일 복강 내 주사하고, 모노크로탈린 주사 후 7일 후에 C968 또는 CB-839 (10 mg/kg, Selleck Chemicals)를 매일 복강 내 주사하였다. 모노크로탈린 주사 후 21일에 마지막 주사 후 2일째에 우심 도관 삽입술을 시행한 후 이전에 설명한 바와 같이, RNA 또는 단백질 추출, 파라핀 삽입 또는 OCT (Sigma-Aldrich)로 동결 보존하기 위해 폐 조직 및 CD31+ 세포를 수확하였다 (Bertero T, et al. Cell Reports. 2015; 13 (5) : 1016-32).

[0179] 두 경우 모두, C968 및 CB-839 처리는 좌심실 기능 또는 전신 혈압에 부작용없이 대조군 (도 5C-D)과 비교하여 전체 랫트 폐에서 GLS1 활성을 감소시켰다 (데이터 미도시). 대조적으로, C968 및 CB-839 모두는 대조군 PH 랫트와 비교하여 (도 5E-H) CD31+/vWF+ (내피) 및 α -SMA+ (평활근) 폐동맥 세포에서의 증식 마커 (PCNA+/Ki67+) 의 존재를 감소시켰다 (도 5E-H). 결과적으로 C968과 CB-839 모두는 폐동맥 재형성 (도 6A-B)과 근육화 (도 6C-D), 우심실 수축 혈압(RVSP) (도 6E, 도 6G). 우심실 리모델링 (도 6F, EG 6H)을 유의하게 감소시켰다. 종합하면, 이러한 결과는 GLS1과 글루타민 분해, 즉 ECM 경직에 의존적인 과정을 PH의 폐혈관 증식을 유지하는데 필요한 중요한 대사 매개체와 관련된다.

[0180] 표 1. 경질 매트릭스에서 GLS 녹다운에 반응하여 차별적으로 발현된 PAECs 유전자의 경로 강화

[0181] KEGG, Reactome, NCBI 및 Biocarta 데이터베이스로부터의 데이터를 통합한 Reactome F1 툴 (1)에 의해 수행된 경로 강화

경로	경로 크기	중첩 크기	pval	FDR	중첩 유전자(Up)	중첩 유전자(Down)
NF-kappa B 시그널링 경로 (KEGG)	91	9	<0.0001	2.67E-03	LY96	PTGS2 CXCL2 IL8 CXCL12 BCL2A1 TNFAIP3 DDX58 VCAM1
세포 외 매트릭스 조직 (Reactome)	263	16	<0.0001	3.00E-03	ADAM9 ADAM17 NID2	LTBP1 PLOD2 ADAMTS1 LAMC2 FGF2 VCAN FBLN5 TGFB2 SDC4 VCAM1 FBN2 COL8A1 COL5A2
말라리아 (KEGG)	49	7	<0.0001	3.00E-03	-	CSF3 THBS2 IL8 SELE TGFB2 CCL2 VCAM1
TNF 시그널링 경로 (KEGG)	110	9	0.0001	9.00E-03	-	PTGS2 VEGFC CXCL1 CXCL2 SELE CXCL10 TNFAIP3 CCL2 VCAM1
베타 5 베타 6 베타 7 및 베타 8 인테그린 세포 표면 상호 작용 (NCBI)	17	4	0.0002	1.76E-02	-	EDIL3 PLAUR CYR61 VCAM1
NOD-유사 수용체 시그널링 경로 (KEGG)	57	6	0.0003	2.52E-02	-	CXCL1 CXCL2 IL8 TNFAIP3 CCL2 PYDC1
인터페론 알파 / 베타 시그널링 (Reactome)	63	6	0.0005	3.57E-02	GBP2	OASL MX2 EGR1 IFIT2 IFIT1

[0182]

경로	경로 크기	중첩 크기	pval	FDR	중첩 유전자(Up)	중첩 유전자(Down)
E2F 전사 인자 네트워크 (NCBI)	68	6	0.0007	4.69E-02	-	MYBL2 CCNE1 RBBP8 RRM2 TYMS CDC25A
사이토카인-사이토카인 수용체 상호작용 (KEGG)	265	12	0.0009	5.17E-02	-	VEGFC CXCL1 CSF3 CXCL2 IL8 TNFSF16 CXCL11 CXCL12 TGFB2 CXCL10 CCL2 TNFSF10
유사분열 G1-G1/S 상(Phases) (Reactome)	134	8	0.0012	6.55E-02	-	MYBL2 CCNE1 CDC7 RRM2 PSMD10 WEE1 TYMS CDC25A
ATF-2 전사 인자 네트워크 (NCBI)	58	5	0.0021	1.11E-01	-	IL8 DUSP5 DUSP1 SELE TGFB2
세포 주기 체크포인트 (Reactome)	118	7	0.0024	1.07E-01	UBE2D1	MAD2L1 CCNE1 CDC7 PSMD10 WEE1 CDC25A
AP1 패밀리 멤버인 Fra1 과 Fra2 의 타당한 전사 표적 (NCBI)	36	4	0.0024	1.15E-01	HMOX1	PLAUR IL8 CCL2
베타 1 인테그린 세포 표면 상호작용 (NCBI)	66	5	0.0037	1.48E-01	-	PLAUR LAMC2 THBS2 VCAM1 COL5A2
베타 3 인테그린 세포 표면 상호작용 (NCBI)	43	4	0.0045	1.68E-01	-	EDIL3 PLAUR CYR61 SDC4
AP-1 전사 인자 네트워크 (NCBI)	70	5	0.0047	1.63E-01	-	CYR61 IL8 DUSP1 CCL2 EGR1
알파 9 베타 1 인테그린 시그널링	24	3	0.0062	2.08E-01	-	VEGFC SAT1 VCAM1

[0183]

경로	경로 크기	중첩 크기	pval	FDR	중첩 유전자(Up)	중첩 유전자(Down)
이벤트 (NCBI)						
아메바증 (KEGG)	109	6	0.007	2.22E-01	SERPIN9	LAMC2 CXCL1 IL8 TGFB2 COL5A2
아미노산의 대사 및 유도체(Reactome)	147	7	0.0079	2.38E-01	ENOPH1 NQO1 GCLM	PSMD10 PHGDH GLS SAT1
BARD1 시그널링 이벤트 (NCBI)	29	3	0.0104	2.86E-01	-	CCNE1 RBBP8 BARD1
베타 2 인테그린 세포 표면 상호 작용 (NCBI)	29	3	0.0104	2.86E-01	-	PLAUR CYR61 VCAM1
VEGF 및 VEGFR 시그널링 네트워크 (NCBI)	10	2	0.0106	2.66E-01	PGF	VEGFC
VEGF 에 의한 시그널링 (Reactome)	10	2	0.0106	2.66E-01	PGF	VEGFC
ECM- 수용체 상호 작용 (KEGG)	86	5	0.0109	2.62E-01	-	LAMC2 THBS2 RELN SDC4 COL5A2
세포 주기 (KEGG)	124	6	0.0126	2.90E-01	-	MAD2L1 CCNE1 CDC7 TGFB2 WEE1 CDC25A
류마티스 관절염 (KEGG)	90	5	0.013	2.87E-01	-	CXCL1 IL8 CXCL12 TGFB2 CCL2
신데칸 -4 매개 시그널링 이벤트(NCBI)	32	3	0.0135	2.85E-01	-	FGF2 CXCL12 SDC4

[0184]

경로	경로 크기	중첩 크기	pval	FDR	중첩 유전자(Up)	중첩 유전자(Down)
ATM 경로 (NCBI)	34	3	0.0158	3.20E-01	-	XRCC4 RBBP8 CDC25A
인터페론 감마 시그널링 (Reactome)	63	4	0.0166	3.23E-01	GBP2	OASL GBP1 VCAM1
PI3K-Akt 시그널링 경로 (KEGG)	346	11	0.0181	3.41E-01	PGF PPP2R3A	VEGFC LAMC2 FGF5 CCNE1 FGF2 CSF3 THBS2 RELN COL5A2
ErbB1 하향 시그널링 (NCBI)	100	5	0.0195	3.57E-01	F2RL2	ZFP36 DUSP1 DIAPH3 EGR1
세포사멸을 위한 외인성 경로 (Reactome)	14	2	0.0199	3.53E-01	ADAM17	TNFSF10
p53 시그널링 경로 (KEGG)	68	4	0.0212	3.66E-01	ZMAT3	CCNE1 RRM2 PMAIP1
피리미딘 대사 (KEGG)	105	5	0.0235	3.91E-01	TK2	CDA RRM2 PNPT1 TYMS
세포 접착 분자 (CAMs) (KEGG)	143	6	0.0236	3.81E-01	-	VCAN SELE CD274 SDC4 CDH2 VCAM1
ISG15 항바이러스 대사 (Reactome)	71	4	0.0244	3.82E-01	-	HERC5 MX2 DDX58 IFIT1
케모카인 시그널링 경로 (KEGG)	189	7	0.0272	4.10E-01	-	CXCL1 CXCL2 IL8 CXCL11 CXCL12 CXCL10 CCL2
IFN-알파/베타 경로의 RIG-I / MDA5 매개된 유도 (Reactome)	79	4	0.0341	4.87E-01	UBE2D1	HERC5 TNFAIP3 DDX58
림프구에서	46	3	0.0344	4.66E-01	-	PTGS2 IL8

[0185]

경로	경로 크기	중첩 크기	pval	FDR	중첩 유전자(Up)	중첩 유전자(Down)
칼시뉴린에 의해 조절되는 NFAT 의존성 전사 (NCBI)						EGR1
FGF 시그널링 경로 (NCBI)	46	3	0.0344	4.66E-01	-	PLAUR SPRY2 CDH2
티로신 키나제 신호의 발달 조절 (Biocarta)	19	2	0.0349	4.50E-01	-	SPRY4 SPRY2
클레스테롤 생합성 (Reactome)	19	2	0.0349	4.50E-01	HMGCS1 DHCR24	-
GPCR 리간드 바인딩 (Reactome)	433	12	0.0351	4.42E-01	F2RL2	HTR1B CXCL1 CXCL2 IL8 CXCL11 CXCL12 CXCL10 CCL2 P2RY1 PTGER4 ADRB2
TGF-베타 시그널링 경로 (KEGG)	80	4	0.0354	4.34E-01	-	LTBP1 GDF6 FST TGFB2
분할 클락 (Biocarta)	21	2	0.0418	4.95E-01	ADAM17	DKK2
매트릭스 금속단백분해효소의 억제 (Biocarta)	3	1	0.0449	5.25E-01	-	RECK
이중-스트랜드 브레이크 수복 (Reactome)	22	2	0.0454	5.20E-01	-	XRCC4 BRIP1
축삭 지도 (KEGG)	127	5	0.0468	5.30E-01	-	SEMA6D SEMA3C SEMA3A SLIT2

[0186]

경로	경로 크기	중첩 크기	pval	FDR	중첩 유전자(Up)	중첩 유전자(Down)
						CXCL12
EGFR 에 의한 시그널링 (Reactome)	171	6	0.049	5.48E-01	ADAM17 TNRC6A	FGF5 FGF2 ITPR2 SPRY2
PRL 에 의해 중재된 시그널링 이벤트 (NCBI)	23	2	0.0491	5.38E-01	-	CCNE1 EGR1

[0187]

[0188] 표 2. *in situ* 염색으로 사용된 PAH 환자의 임상적 특징

나이	성별	mPAP (mmHg)	임상적 설명
34	여성	50	심폐 소생 (부검), 특발성
64	여성	55	심폐 소생 (부검), 특발성
68	여성	44	양측 폐 이식, 경피증
12	남성	53	양측 폐 이식, BMPRII 돌연변이
16	남성	62	양측 폐 이식, 특발성
1	남성	50	폐 절제술, Trisomy 21
19	남성	48	폐 절제술, 특발성
51	남성	48	폐 이식, 경피증
42	여성	57	폐 이식, 경피증
67	남성	50	폐 이식, 경피증
60	여성	66	부검 경피증
54	여성	54	부검 경피증
72	여성	53	부검 경피증

[0189]

[0190] 표 3. 폐동맥 도관 삽입 시 메인 폐동맥으로부터 대사물 프로파일링을 위해 혈장이 추출된 PH 환자의 임상적 특징

[0191] 평균 폐동맥 압력 (mPAP), 폐혈관 저항 (PVR).

나이 (세)	성별	mPAP (mmHg)	PVR (dynes.sec.cm ⁻⁵)
73	여성	37	481
88	여성	46	651
65	여성	49	789
44	여성	46	387
67	여성	45	607
83	남성	54	926
81	여성	52	1031
52	남성	56	522
78	여성	51	960
67	여성	49	560
88	여성	45	542
56	남성	56	1396
67	여성	57	658
81	여성	42	663
23	남성	40	957
78	여성	44	536
79	여성	56	897
80	남성	50	826
78	남성	43	803

[0192]

[0193] 표 4. 침입성 폐동맥 카테터 삽입에 의한 폐동맥 순응도를 분석한 HIV-감염된 개체군의 임상적 특징.

[0194] 배출 분율 (EF); 사분위수 범위 (IQR); 평균 폐동맥압 (mPAP); 폐동맥 고혈압 (PAH); 폐모세혈관 췌기압 (PCWP); 폐혈관 저항 (PVR)

변수	No PAH (n=31)	PAH (n=11)	p-value
나이, median (IQR)	54 (46, 61)	45 (41, 54)	0.14
나이, mean ± SD	53 ± 11	47 ± 9	0.11
남성, n (%)	25 (80.6)	7 (63.6)	0.25
백인, n (%)	19 (61.3)	5 (45.5)	0.36
흑인, n (%)	12 (38.7)	6 (54.5)	
흡연 유경험자, n (%)	16 (55.2)	7 (77.8)	0.23
전신성 고혈압, n (%)	14 (48.3)	1 (11.1)	0.046
관상동맥질환, n (%)	7 (23.3)	0 (0.0)	0.11
간장병, n (%)	8 (26.7)	2 (20.0)	0.673
COPD, n (%)	5 (16.7)	1 (11.1)	0.685
mPAP mmHg, median (IQR)	20 (17, 30)	37 (31, 52)	<0.001
PCWP mmHg, median (IQR)	13 (9, 21)	11 (7, 13)	0.2
PVR woods unit, median (IQR)	1.4 (1, 1.9)	3.9 (3.5, 10.8)	<0.001
PVR ≥ 3 woods unit, n (%)	3 (12)	10 (91)	<0.001
EF ≤ 45%, n (%)	4 (13.3)	1 (9)	0.71
심장확장성 기능장애, n (%)	7 (26)	2 (20)	0.7

[0195]

[0196]

[0197]

표 5. PAH를 갖는 HIV-감염된 개체군의 혈압 측정. 말초 정맥 혈장을 대사 물 프로파일링을 위해 추출함. 평균 폐동맥압 (mPAP, 침습성 혈류역학으로 측정); 폐동맥 수축기 압력 (PASP, 심 초음파로 추정).

Age (Year)	mPAP (mmHg)	PASP (mmHg)
44	35	81
37	37	63
36	38	74
60	47	60
35	51	67
37	53	84
48	55	73
45	56	73
41	58	71

[0198]

[0199]

[0200]

[0201]

[0202]

[0203]

서열

SEQ ID NO:1

MNPASAPPPL PPPGQQVIHV TQDLTDLEA LFNSVMNPKP SSWRKKILPE

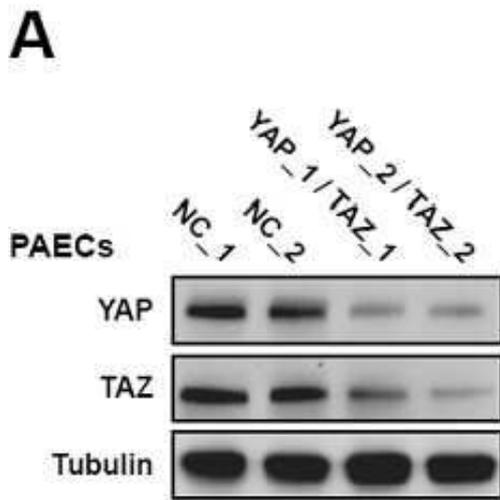
SFFKEPDSGS HSRQSSTDSS GGHPGRLAG GAQHVRSHSS PASLQLGTGA

GAGSPAQQH AHLRQQSYDV TDELPLPPGW EMTFTATGQR YFLNHIEKIT

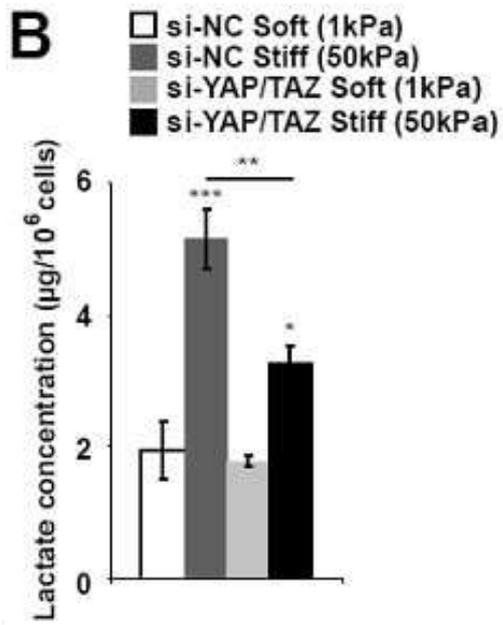
[0204] TWQDPRKAMN QPLNHMNLHP AVSSTPVPQR SMAVSQPNLV MNHQHQQQMA
 [0205] PSTLSQQNHP TQNPPAGLMS MPNALTTQQQ QQQKLRQLRI QMERERIRMR
 [0206] QEELMRQEAA LCRQLPMEAE TLAPVQAAVN PPTMTPDMRS ITNNSSDPFL
 [0207] NGGPYHSREQ STDSGLGLGC YSVPTTPEDF LSNVDEMDTG ENAGQTPMNI
 [0208] NPQQTRFPDF LDCLPGTNVD LGTLESEDLI PLFNDVESAL NKSEPFLTWL
 [0209] SEQ ID NO:2
 [0210] MDPGQQPPPQ PAPQGQGQPP SQPPQGQGPP SGPGQPAPAA TQAAPQAPPA
 [0211] GHQIVHVRGD SETDLEALFN AVMNPKTANV PQTVPMLRKL LPDSFFKPPE
 [0212] PKSHSRQAST DAGTAGALTP QHVRAHSSPA SLQLGAVSPG TLPTGTVVSG
 [0213] PAATPTAQHL RQSSFEPDD VPLPAGWEMA KTSQGQRYFL NHIDQTTTWQ
 [0214] DPRKAMLSQM NVTAPTSPPV QQNMMSASG PLPDGWEQAM TQDGEIYYIN
 [0215] HKNKTTSWLD PRLDPRFAMN QRISQSAPVK QPPPLAPQSP QGGVMGGSNS
 [0216] NQQQQMRLQQ LQMEKERLRL KQELLRQAM RNINPSTANS PKCQELALRS
 [0217] QLPTLEQDGG TQNPVSSPGM SQELRTMTN SSDPFLNSGT YHSRDESTDS
 [0218] GLSMSSYSVP RTPDDFLNSV DEMDTGDTIN QSTLPSQQNR FPDYLEAIPG
 [0219] TNVDLGTLEG DGMNIEGEEL MPQLQEALSS DILNDMESVL AATKLDKESF
 [0220] LTWL
 [0221] SEQ ID NO:3
 [0222] MMRLRGSGML RDLLLRSPAG VSATLRRRAQP LVTLCRRPRG GGRPAAGPAA
 [0223] AARLHPWWGG GGWPAEPLAR GLSSSPSEIL QELGKGSTHP QPGVSPPAAP
 [0224] AAPGPKDGP ETDAFGNSEG KELVASGENK IKQGLLPSLE DLLFYTIAEG
 [0225] QEKIPVHKFI TALKSTGLRT SDPRLKECMD MLRLTLQTTS DGVMLDKDLF
 [0226] KKCQVSNIVL LTQAFRRKFV IPDFMSFTSH IDELYESAKK QSGGKVADYI
 [0227] PQLAKFSPDL WGVSVCTVDG QRHSTGDTKV PFCLQSCVKP LKYAIAVNDL
 [0228] GTEYVHRYVG KEPSGLRFNK LFLNEDDKPH NPMVNAGAIV VTSLIKQGVN
 [0229] NAEKFDYVMQ FLNKMAGNEY VGFSNATFQS ERESGDRNFA IGYLKEKKC
 [0230] FPEGTMVGI LDFYFQLCSI EVTCEASVM AATLANGGFC PITGERVLS
 [0231] EAVRNTLSLM HSCGMYDFSG QFAFHVGLPA KSGVAGGILL VVPNVGMMC
 [0232] WSPPLDKMGN SVKGIHFCHD LVSLCNFHNY DNLRHFAKKL DPRREGDQR
 [0233] VKSVINLLFA AYTGDVSALR RFALSAMDME QRDYDSRTAL HVAEEGHVE
 [0234] VVKFLEACK VNPFPKDRWN NTPMDEALHF GHHDVFKILQ EYQVQYTPQG
 [0235] DSDNGKENQT VHKNLDGLL

도면

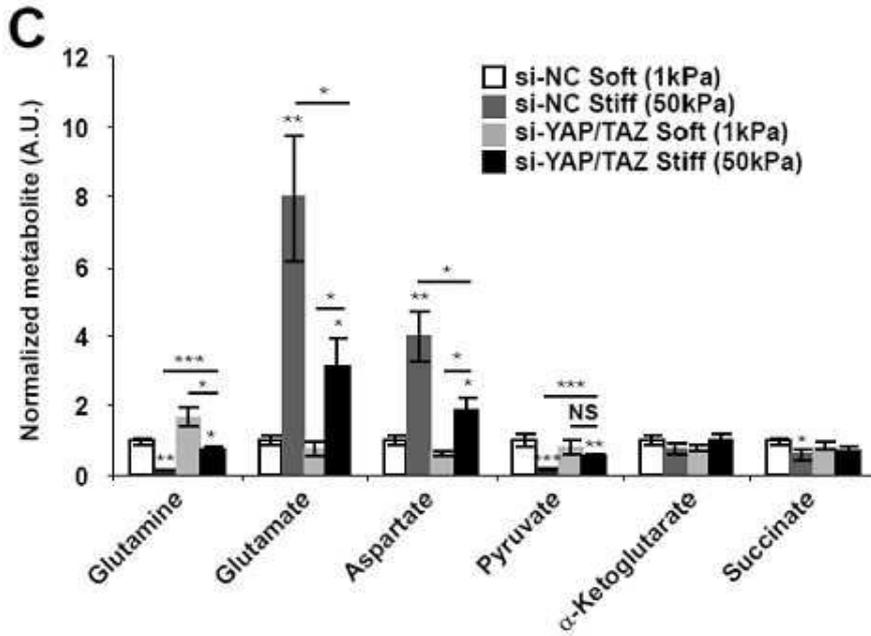
도면1a



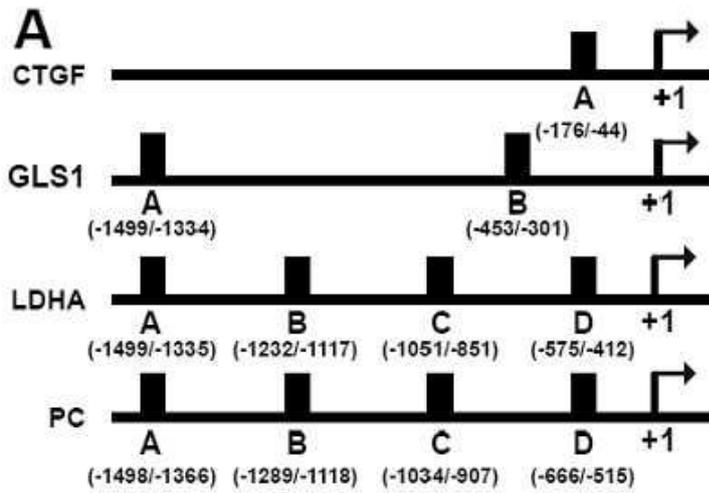
도면1b



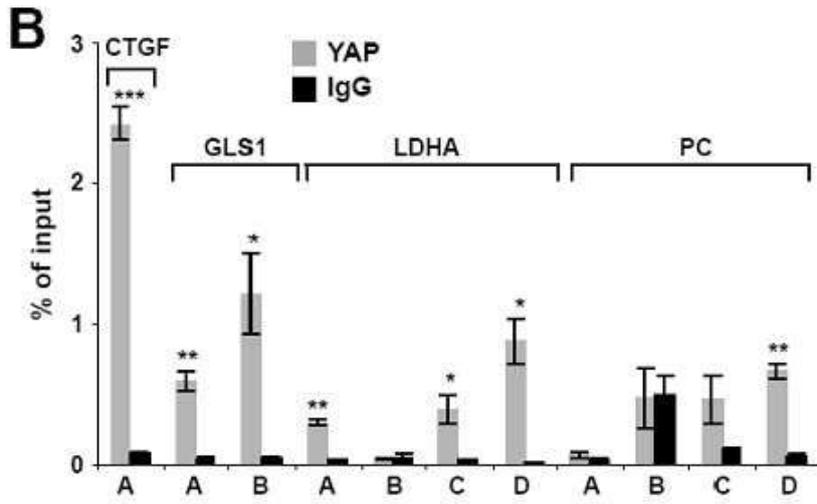
도면1c



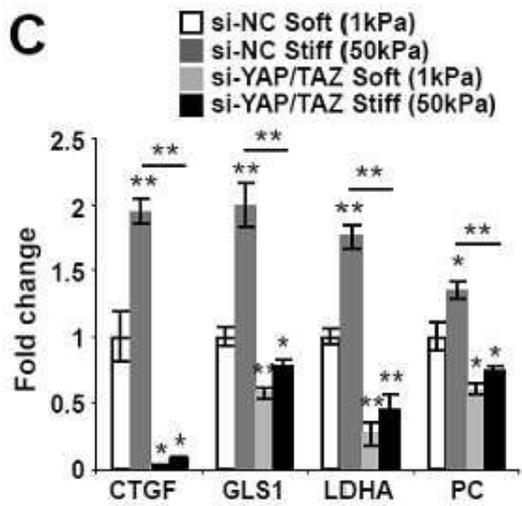
도면2a



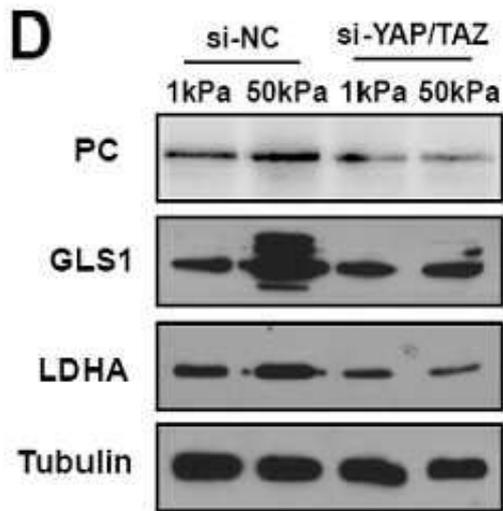
도면2b



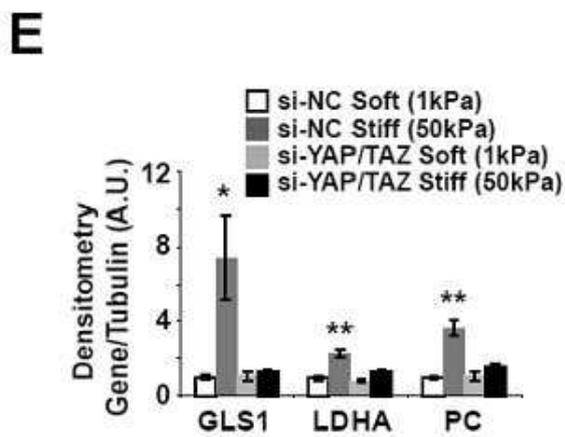
도면2c



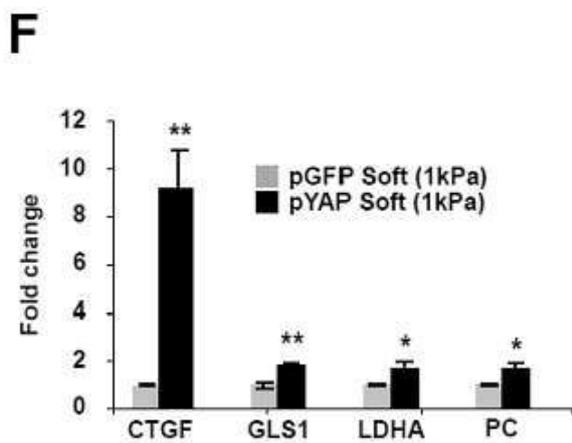
도면2d



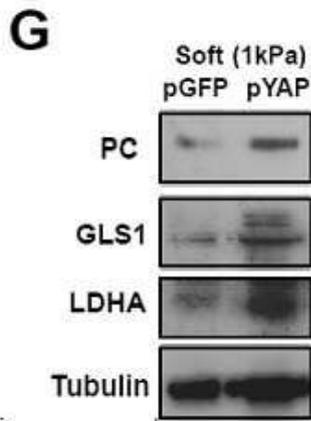
도면2e



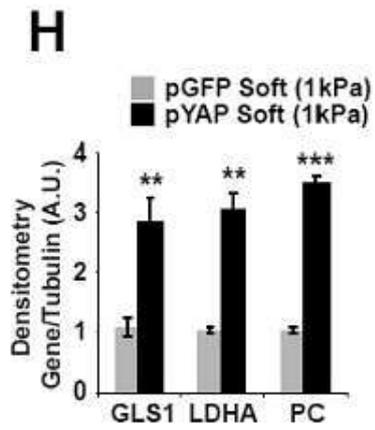
도면2f



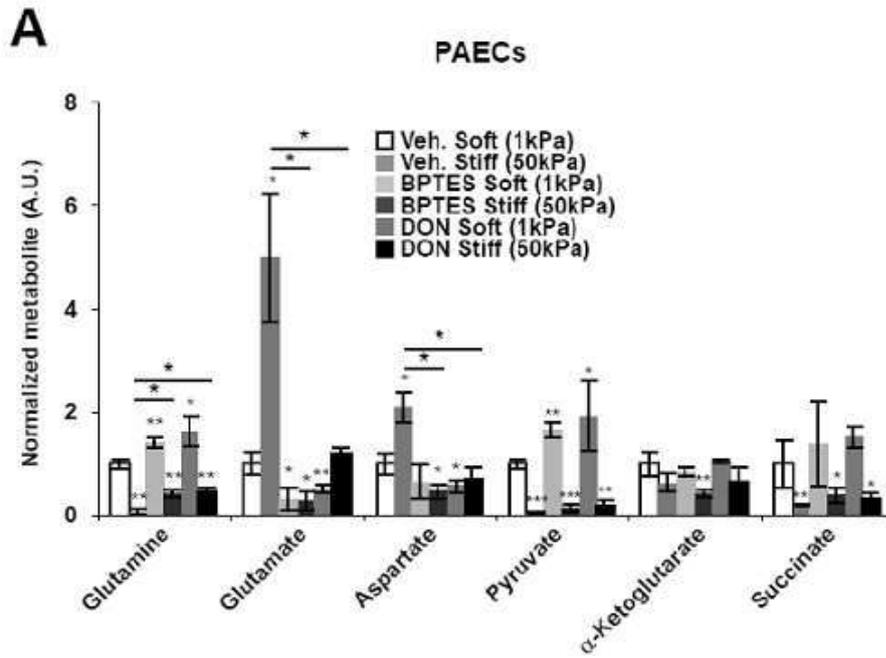
도면2g



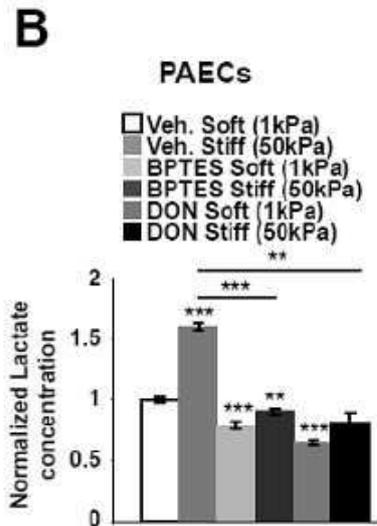
도면2h



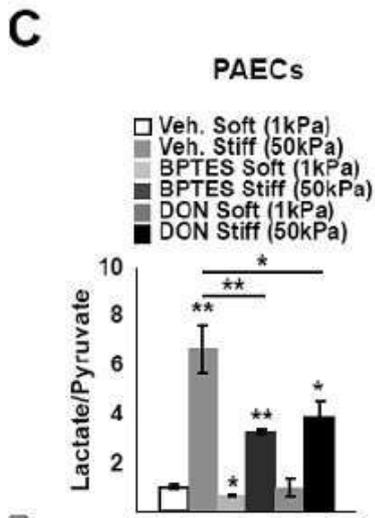
도면3a



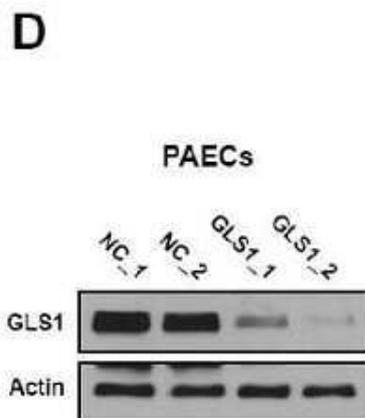
도면3b



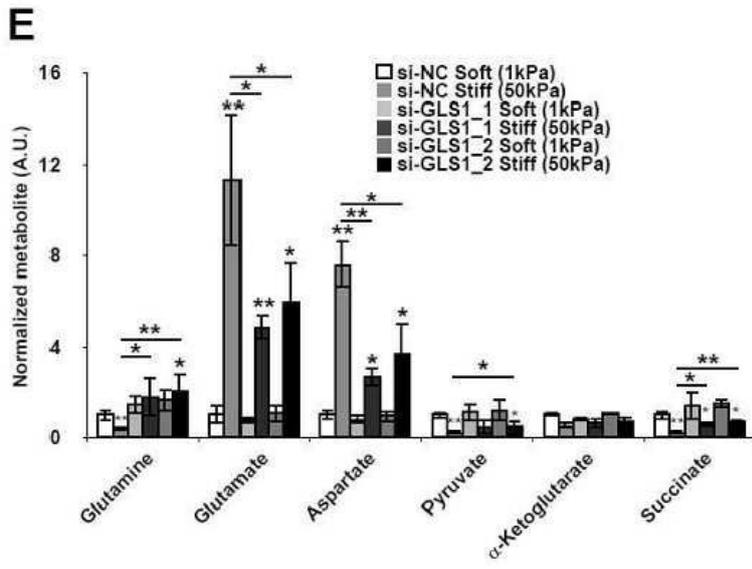
도면3c



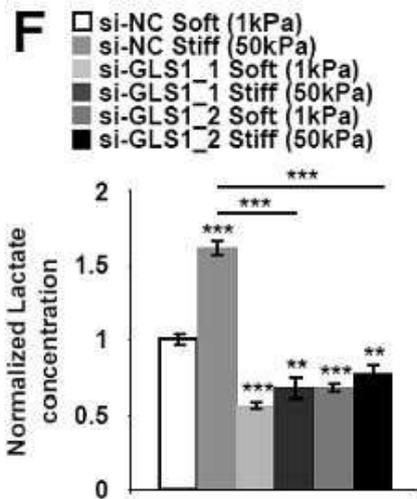
도면3d



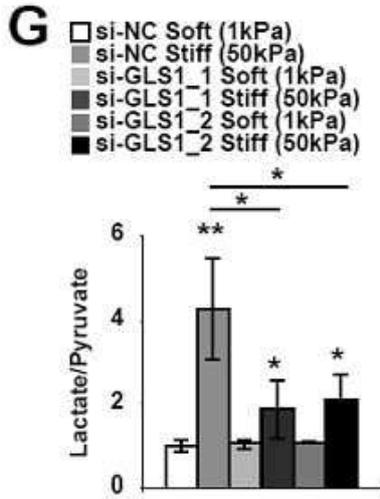
도면3e



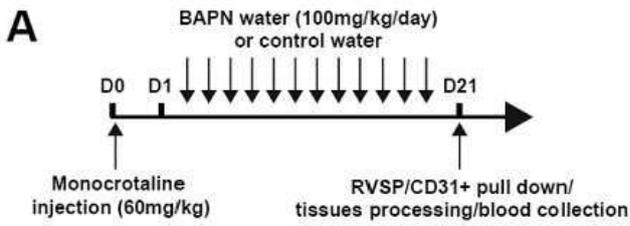
도면3f



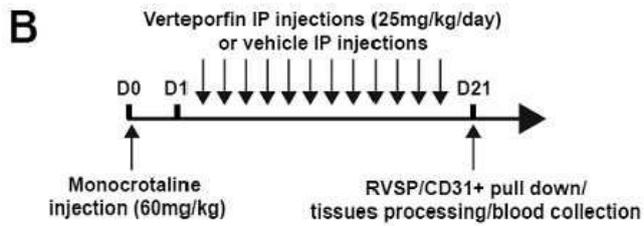
도면3g



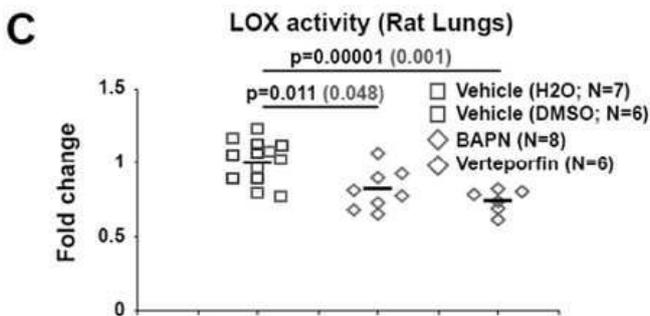
도면4a



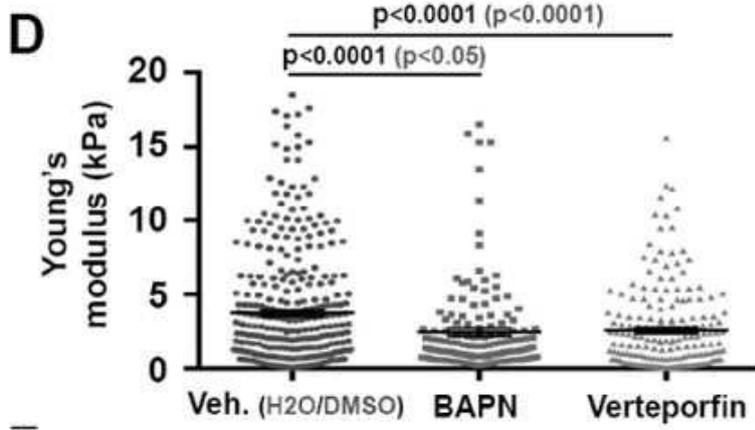
도면4b



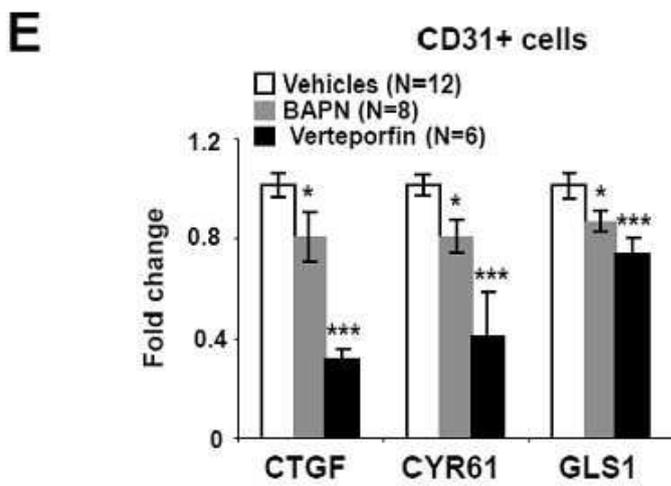
도면4c



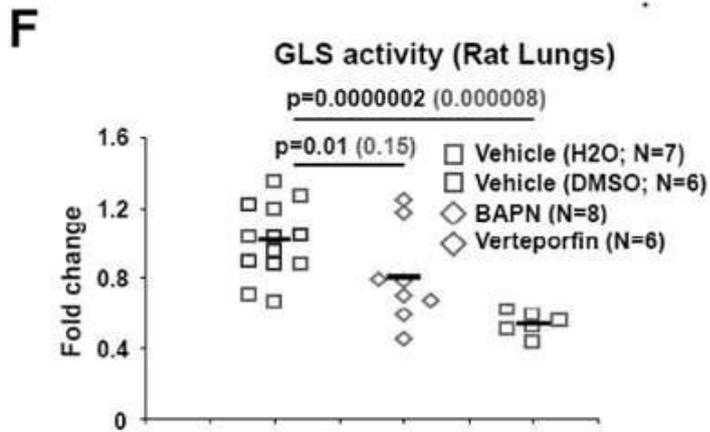
도면4d



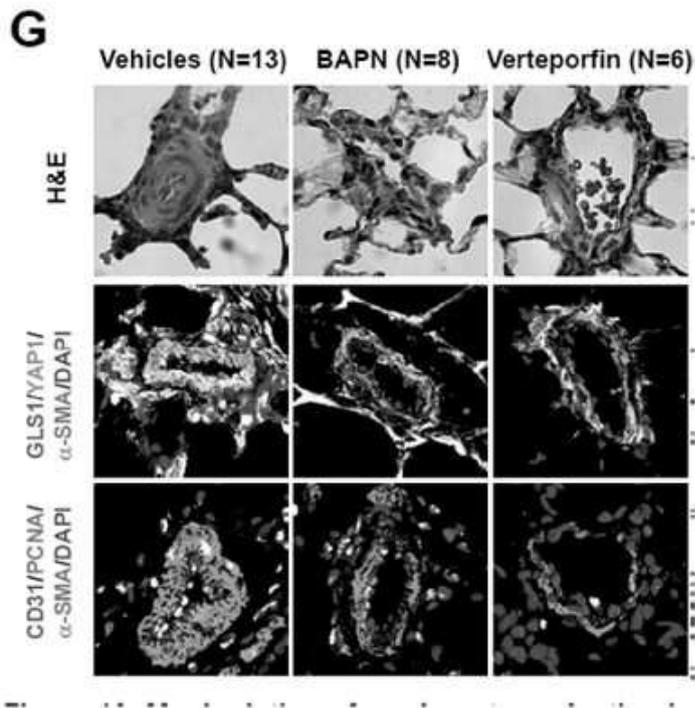
도면4e



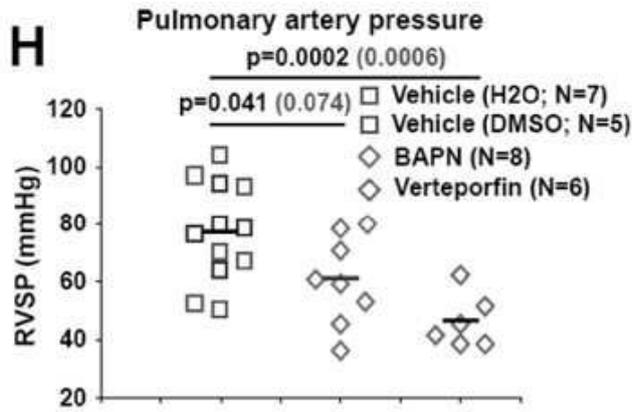
도면4f



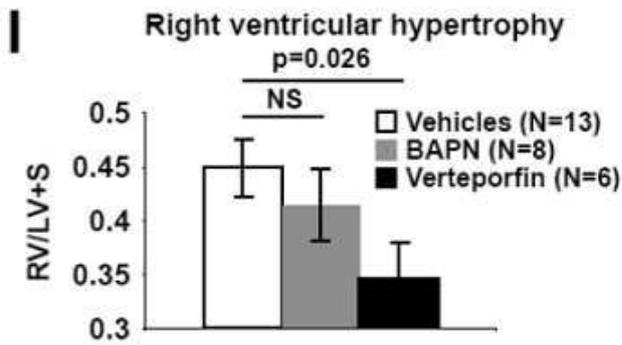
도면4g



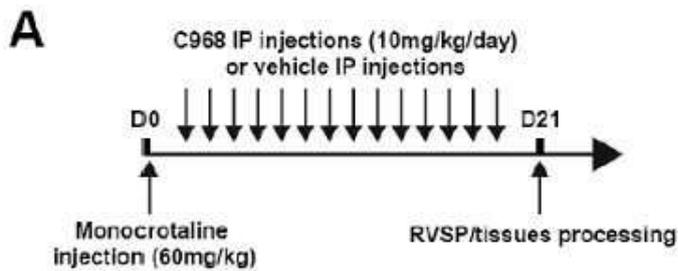
도면4h



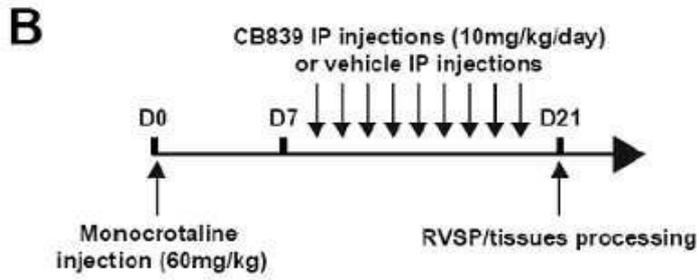
도면4i



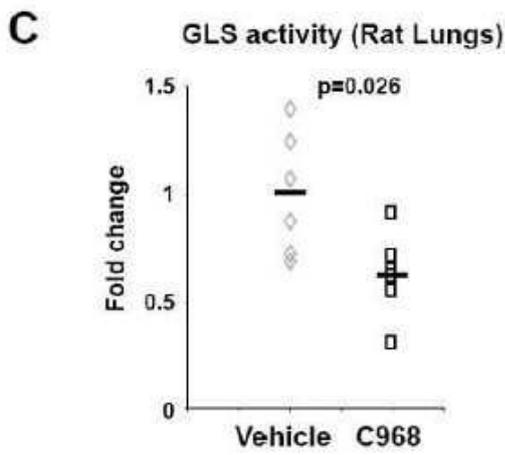
도면5a



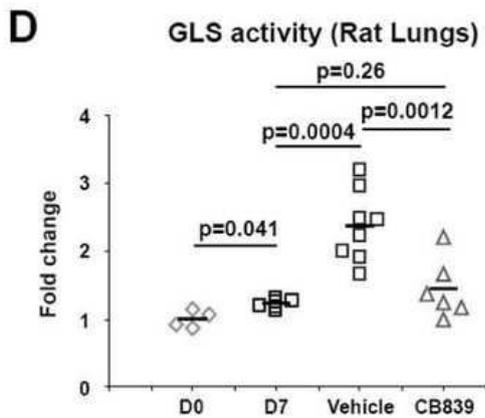
도면5b



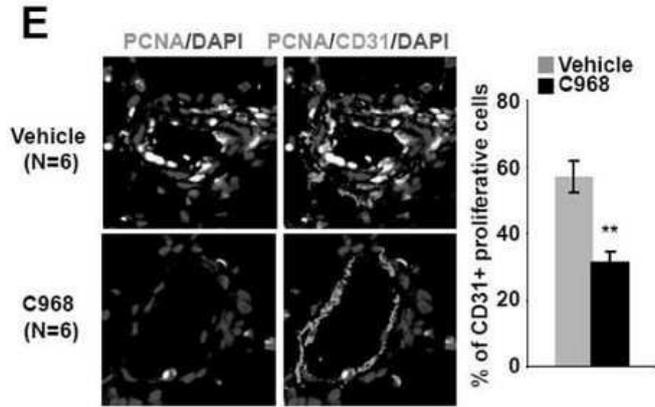
도면5c



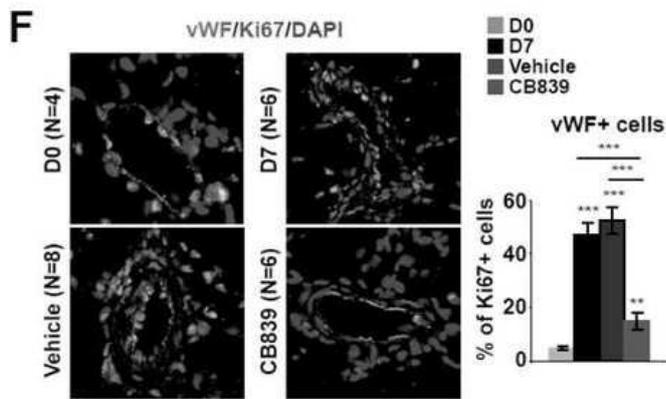
도면5d



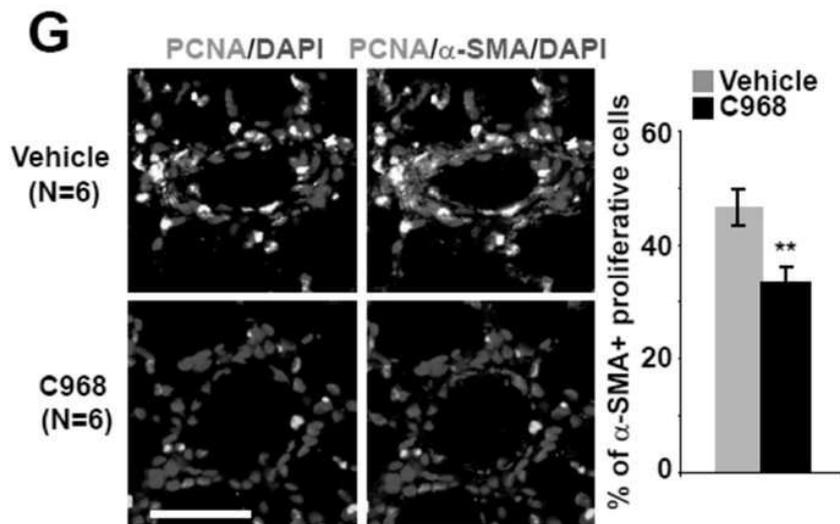
도면5e



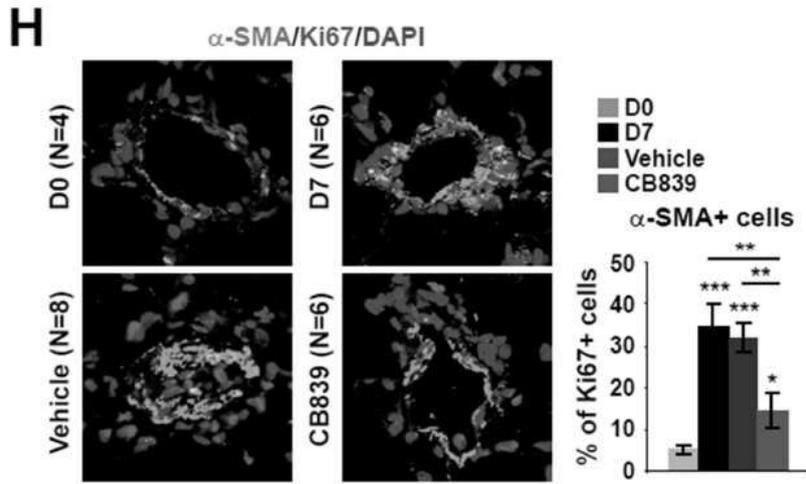
도면5f



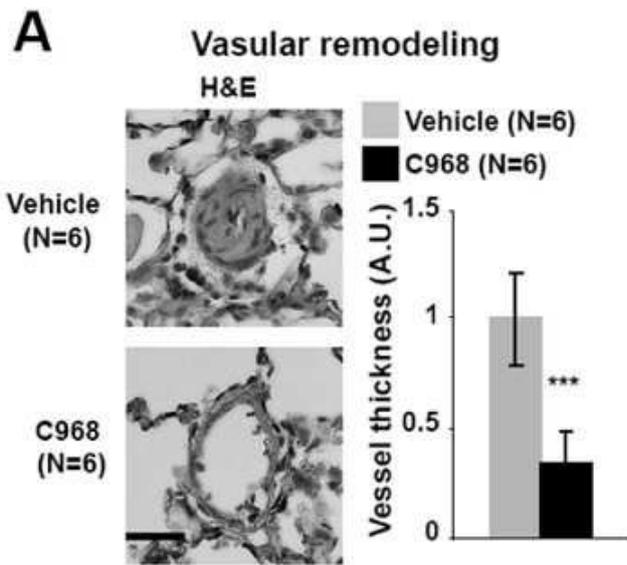
도면5g



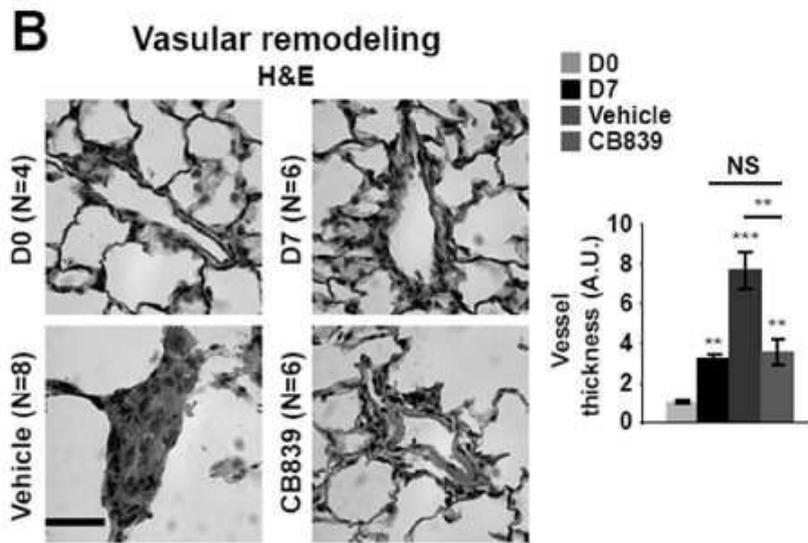
도면5h



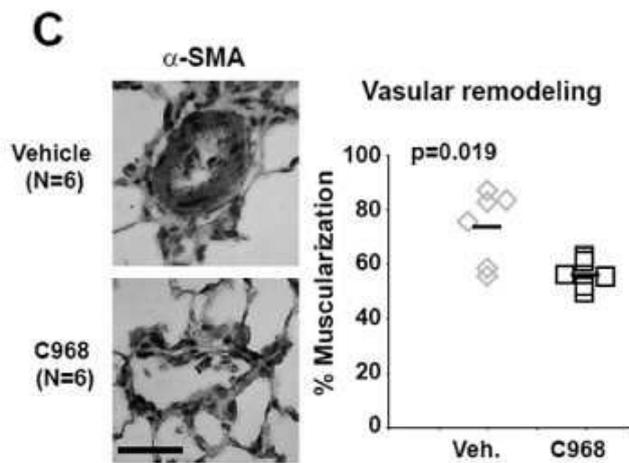
도면6a



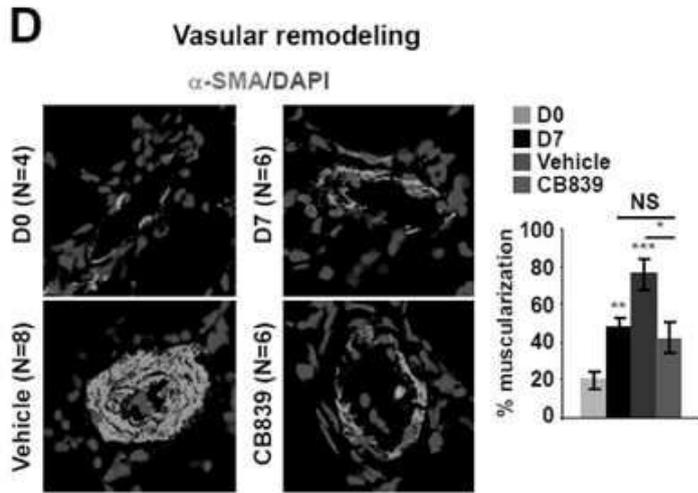
도면6b



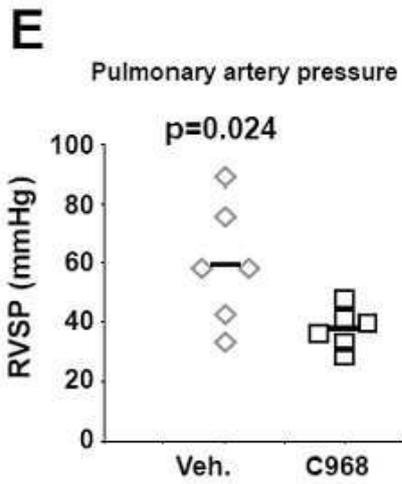
도면6c



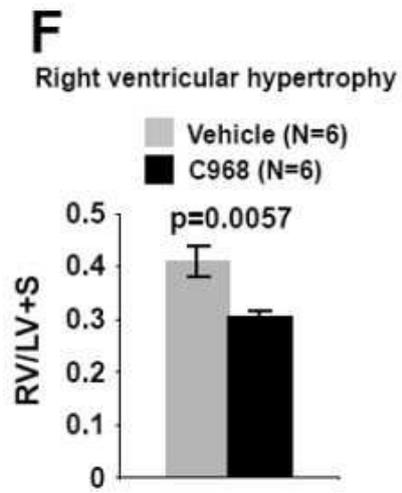
도면6d



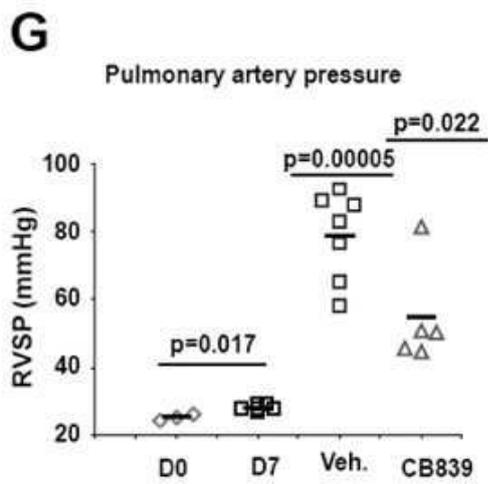
도면6e



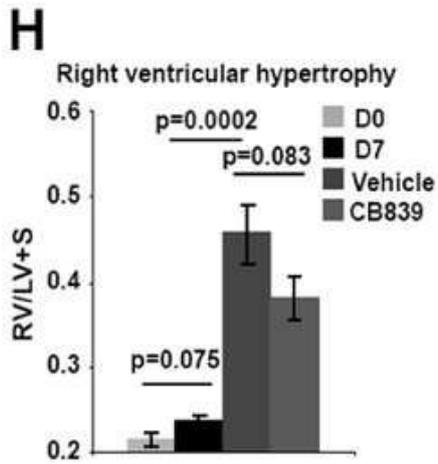
도면6f



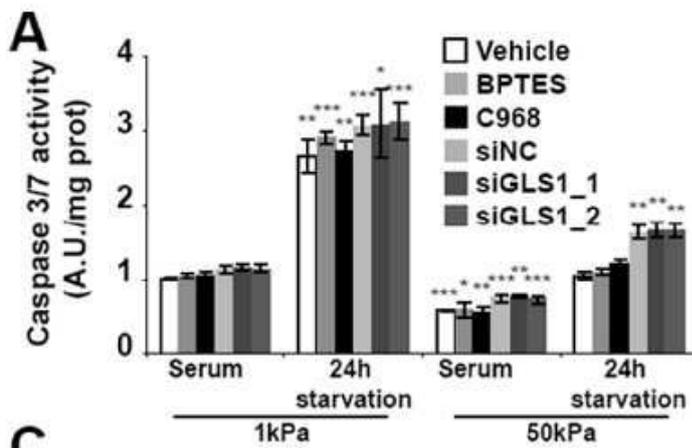
도면6g



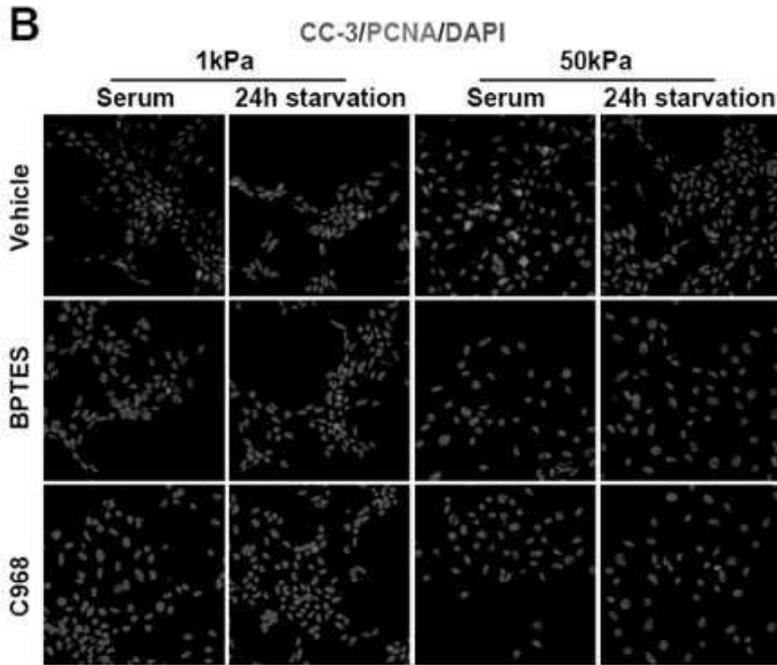
도면6h



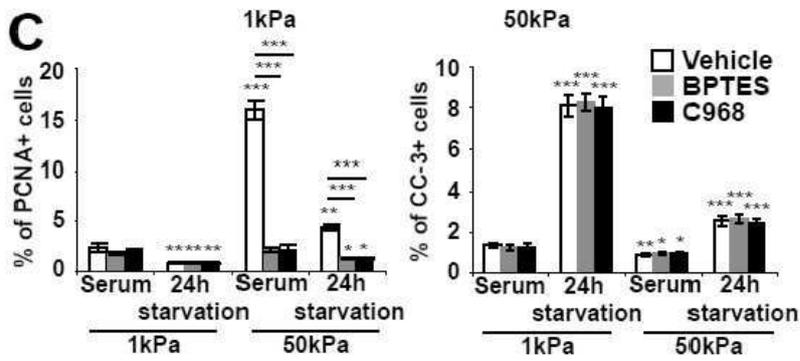
도면7a



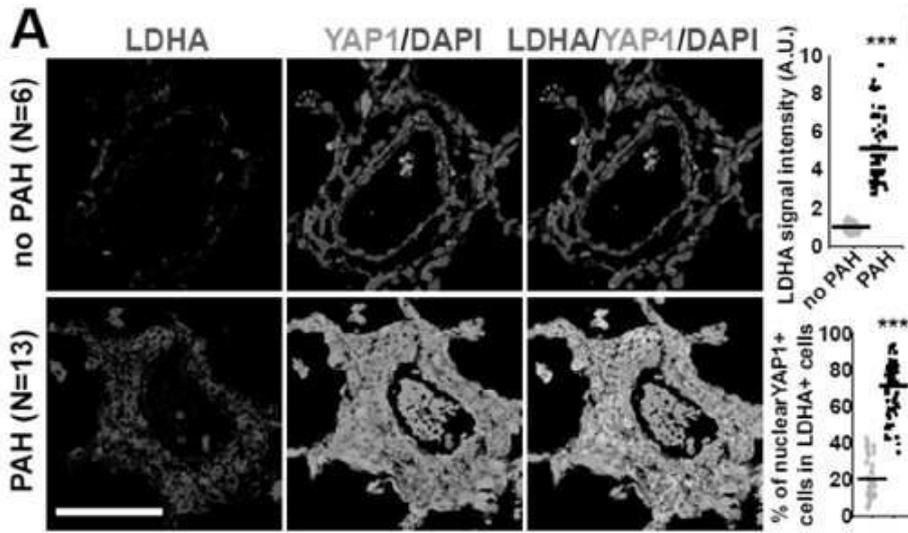
도면7b



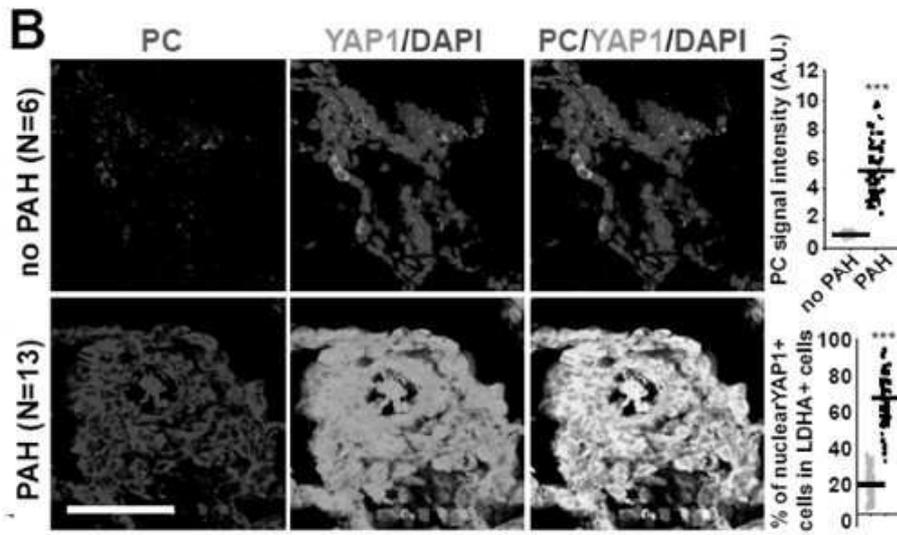
도면7c



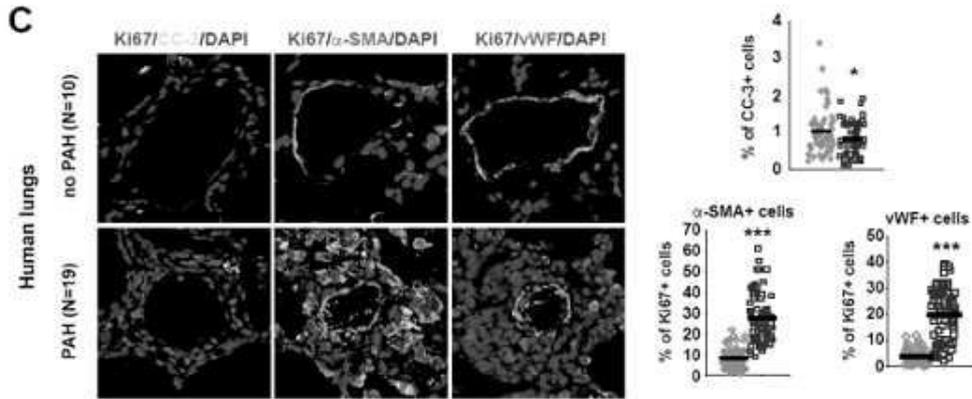
도면8a



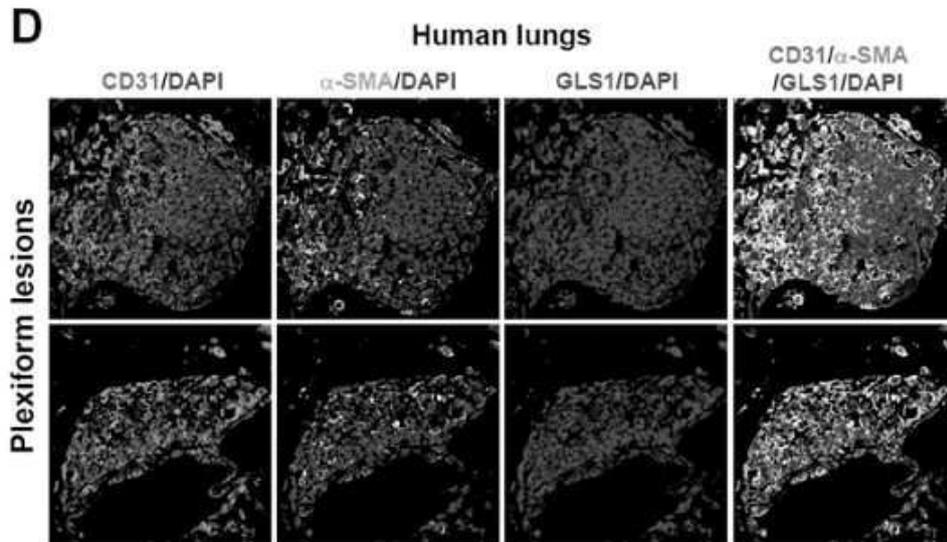
도면8b



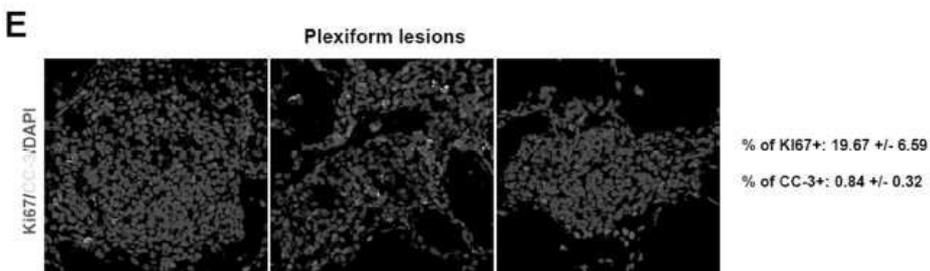
도면8c



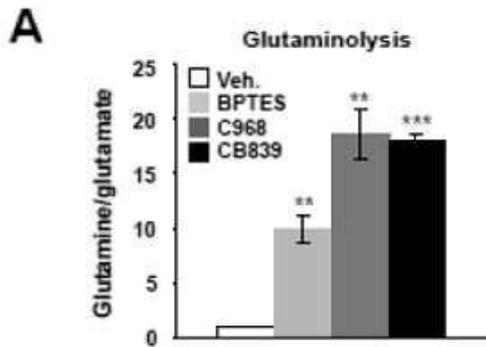
도면8d



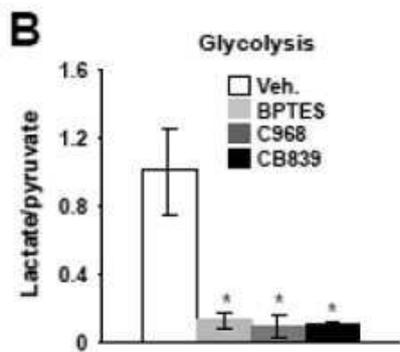
도면8e



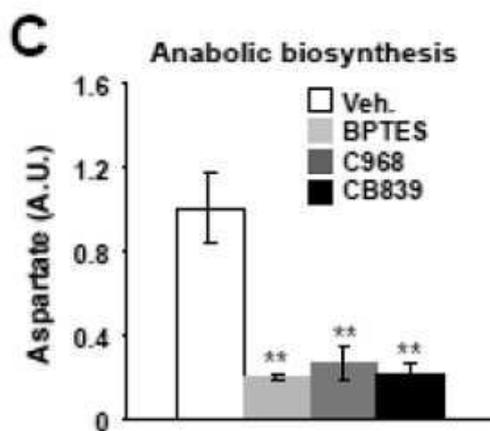
도면9a



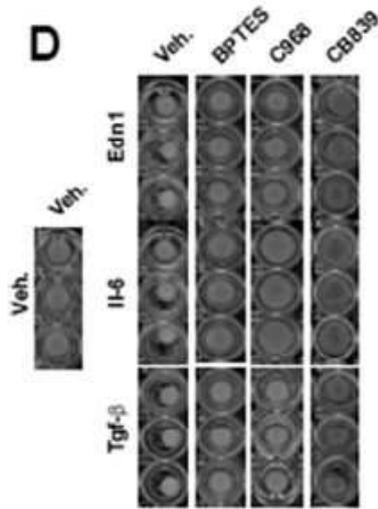
도면9b



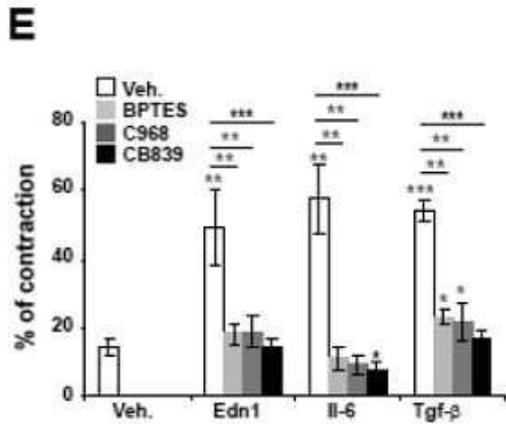
도면9c



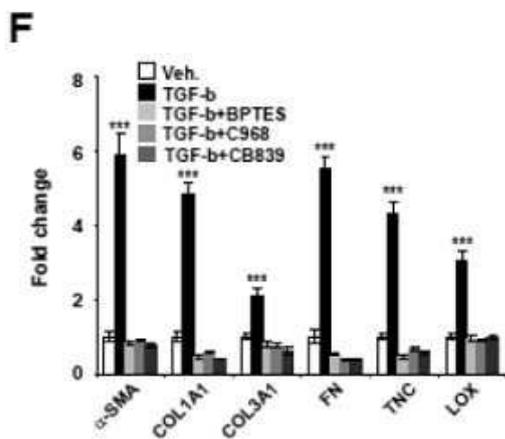
도면9d



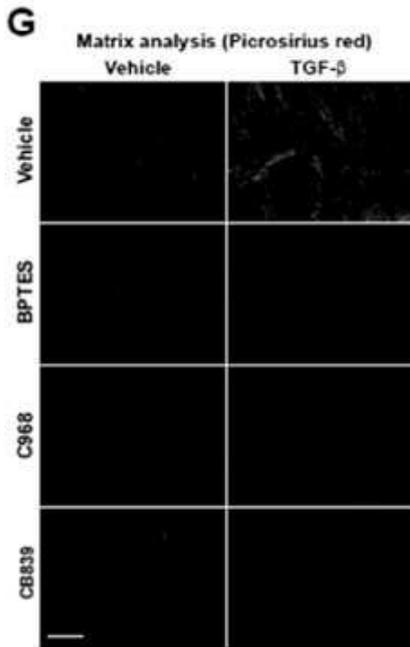
도면9e



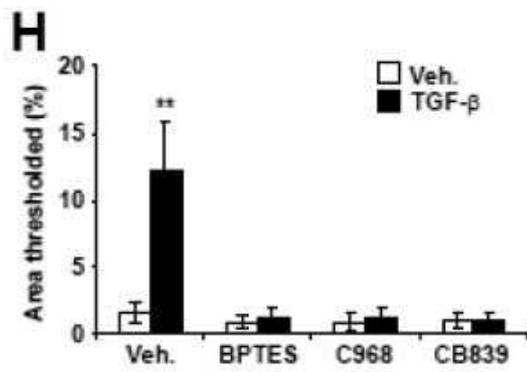
도면9f



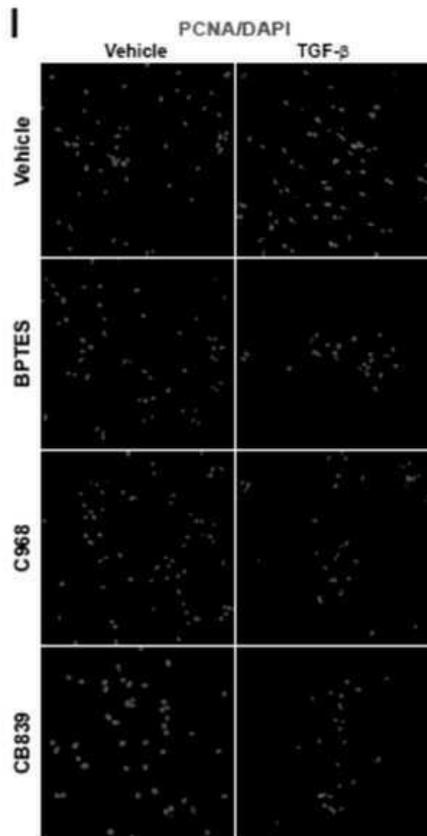
도면9g



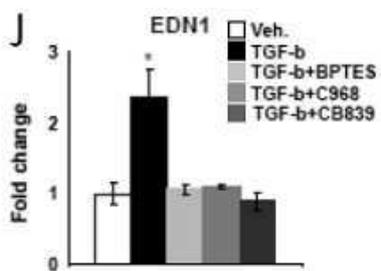
도면9h



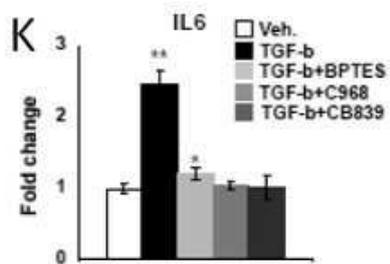
도면9i



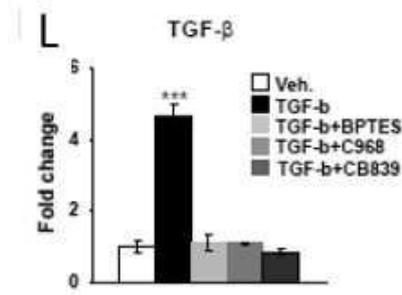
도면9j



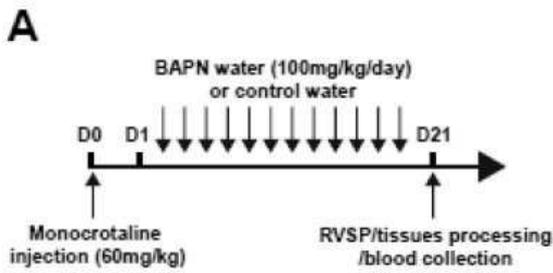
도면9k



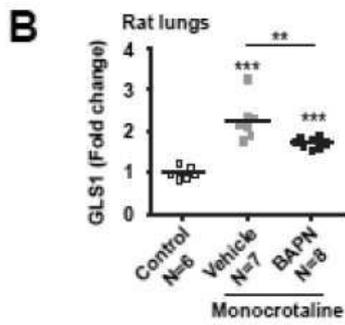
도면9



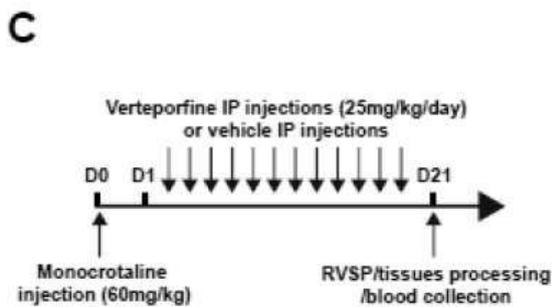
도면10a



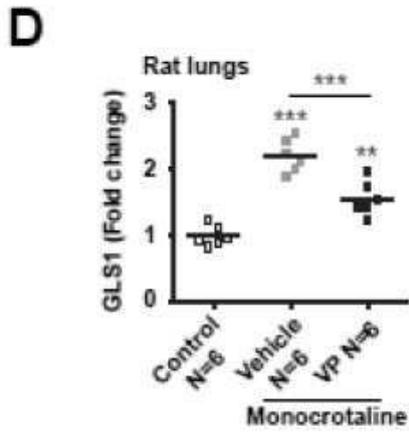
도면10b



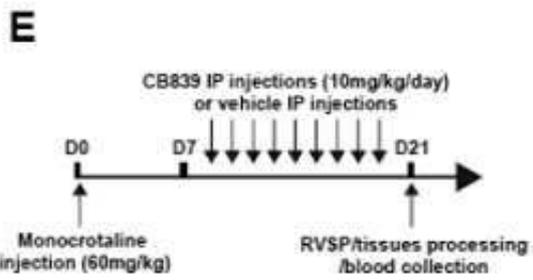
도면10c



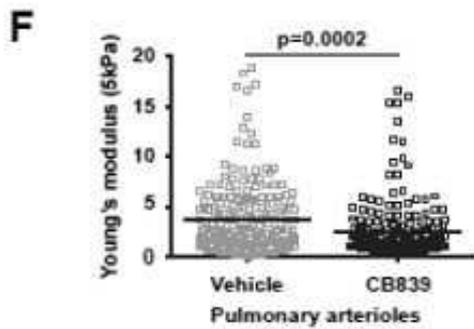
도면10d



도면10e



도면10f



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> UNIVERSITY OF PITTSBURGH - OF THE COMMONWEALTH SYSTEM OF
HIGHER EDUCATION

<120> COMPOSITIONS AND METHODS FOR TREATING PULMONARY VASCULAR DISEASE

<130> 10504-005W01

<160> 3

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 400

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Asn Pro Ala Ser Ala Pro Pro Pro Leu Pro Pro Pro Gly Gln Gln

1 5 10 15

Val Ile His Val Thr Gln Asp Leu Asp Thr Asp Leu Glu Ala Leu Phe

20 25 30

Asn Ser Val Met Asn Pro Lys Pro Ser Ser Trp Arg Lys Lys Ile Leu

35 40 45

Pro Glu Ser Phe Phe Lys Glu Pro Asp Ser Gly Ser His Ser Arg Gln

50 55 60

Ser Ser Thr Asp Ser Ser Gly Gly His Pro Gly Pro Arg Leu Ala Gly

65 70 75 80

Gly Ala Gln His Val Arg Ser His Ser Ser Pro Ala Ser Leu Gln Leu

85 90 95

Gly Thr Gly Ala Gly Ala Ala Gly Ser Pro Ala Gln Gln His Ala His

100 105 110

Leu Arg Gln Gln Ser Tyr Asp Val Thr Asp Glu Leu Pro Leu Pro Pro

115 120 125

Gly Trp Glu Met Thr Phe Thr Ala Thr Gly Gln Arg Tyr Phe Leu Asn

130 135 140

His Ile Glu Lys Ile Thr Thr Trp Gln Asp Pro Arg Lys Ala Met Asn

145 150 155 160

Gln Pro Leu Asn His Met Asn Leu His Pro Ala Val Ser Ser Thr Pro

165 170 175

Val Pro Gln Arg Ser Met Ala Val Ser Gln Pro Asn Leu Val Met Asn

180 185 190

His Gln His Gln Gln Gln Met Ala Pro Ser Thr Leu Ser Gln Gln Asn

1 5 10 15
 Gly Gln Pro Pro Ser Gln Pro Pro Gln Gly Gln Gly Pro Pro Ser Gly
 20 25 30
 Pro Gly Gln Pro Ala Pro Ala Ala Thr Gln Ala Ala Pro Gln Ala Pro
 35 40 45
 Pro Ala Gly His Gln Ile Val His Val Arg Gly Asp Ser Glu Thr Asp
 50 55 60

 Leu Glu Ala Leu Phe Asn Ala Val Met Asn Pro Lys Thr Ala Asn Val
 65 70 75 80
 Pro Gln Thr Val Pro Met Arg Leu Arg Lys Leu Pro Asp Ser Phe Phe
 85 90 95
 Lys Pro Pro Glu Pro Lys Ser His Ser Arg Gln Ala Ser Thr Asp Ala
 100 105 110
 Gly Thr Ala Gly Ala Leu Thr Pro Gln His Val Arg Ala His Ser Ser
 115 120 125

 Pro Ala Ser Leu Gln Leu Gly Ala Val Ser Pro Gly Thr Leu Thr Pro
 130 135 140
 Thr Gly Val Val Ser Gly Pro Ala Ala Thr Pro Thr Ala Gln His Leu
 145 150 155 160
 Arg Gln Ser Ser Phe Glu Ile Pro Asp Asp Val Pro Leu Pro Ala Gly
 165 170 175
 Trp Glu Met Ala Lys Thr Ser Ser Gly Gln Arg Tyr Phe Leu Asn His
 180 185 190

 Ile Asp Gln Thr Thr Thr Trp Gln Asp Pro Arg Lys Ala Met Leu Ser
 195 200 205
 Gln Met Asn Val Thr Ala Pro Thr Ser Pro Pro Val Gln Gln Asn Met
 210 215 220
 Met Asn Ser Ala Ser Gly Pro Leu Pro Asp Gly Trp Glu Gln Ala Met
 225 230 235 240
 Thr Gln Asp Gly Glu Ile Tyr Tyr Ile Asn His Lys Asn Lys Thr Thr
 245 250 255

Ser Trp Leu Asp Pro Arg Leu Asp Pro Arg Phe Ala Met Asn Gln Arg
 260 265 270
 Ile Ser Gln Ser Ala Pro Val Lys Gln Pro Pro Pro Leu Ala Pro Gln
 275 280 285
 Ser Pro Gln Gly Gly Val Met Gly Gly Ser Asn Ser Asn Gln Gln Gln
 290 295 300
 Gln Met Arg Leu Gln Gln Leu Gln Met Glu Lys Glu Arg Leu Arg Leu
 305 310 315 320

 Lys Gln Gln Glu Leu Leu Arg Gln Ala Met Arg Asn Ile Asn Pro Ser
 325 330 335
 Thr Ala Asn Ser Pro Lys Cys Gln Glu Leu Ala Leu Arg Ser Gln Leu
 340 345 350
 Pro Thr Leu Glu Gln Asp Gly Gly Thr Gln Asn Pro Val Ser Ser Pro
 355 360 365
 Gly Met Ser Gln Glu Leu Arg Thr Met Thr Thr Asn Ser Ser Asp Pro
 370 375 380

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

 Pro Gly Thr Asn Val Asp Leu Gly Thr Leu Glu Gly Asp Gly Met Asn
 450 455 460
 Ile Glu Gly Glu Glu Leu Met Pro Ser Leu Gln Glu Ala Leu Ser Ser
 465 470 475 480
 Asp Ile Leu Asn Asp Met Glu Ser Val Leu Ala Ala Thr Lys Leu Asp
 485 490 495
 Lys Glu Ser Phe Leu Thr Trp Leu
 500

<210> 3
 <211> 669
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 3

Met Met Arg Leu Arg Gly Ser Gly Met Leu Arg Asp Leu Leu Leu Arg
 1 5 10 15
 Ser Pro Ala Gly Val Ser Ala Thr Leu Arg Arg Ala Gln Pro Leu Val
 20 25 30
 Thr Leu Cys Arg Arg Pro Arg Gly Gly Gly Arg Pro Ala Ala Gly Pro
 35 40 45
 Ala Ala Ala Ala Arg Leu His Pro Trp Trp Gly Gly Gly Gly Trp Pro
 50 55 60

Ala Glu Pro Leu Ala Arg Gly Leu Ser Ser Ser Pro Ser Glu Ile Leu
 65 70 75 80
 Gln Glu Leu Gly Lys Gly Ser Thr His Pro Gln Pro Gly Val Ser Pro
 85 90 95
 Pro Ala Ala Pro Ala Ala Pro Gly Pro Lys Asp Gly Pro Gly Glu Thr
 100 105 110
 Asp Ala Phe Gly Asn Ser Glu Gly Lys Glu Leu Val Ala Ser Gly Glu
 115 120 125

Asn Lys Ile Lys Gln Gly Leu Leu Pro Ser Leu Glu Asp Leu Leu Phe
 130 135 140
 Tyr Thr Ile Ala Glu Gly Gln Glu Lys Ile Pro Val His Lys Phe Ile
 145 150 155 160
 Thr Ala Leu Lys Ser Thr Gly Leu Arg Thr Ser Asp Pro Arg Leu Lys
 165 170 175
 Glu Cys Met Asp Met Leu Arg Leu Thr Leu Gln Thr Thr Ser Asp Gly
 180 185 190

Val Met Leu Asp Lys Asp Leu Phe Lys Lys Cys Val Gln Ser Asn Ile
 195 200 205

Val Leu Leu Thr Gln Ala Phe Arg Arg Lys Phe Val Ile Pro Asp Phe
 210 215 220
 Met Ser Phe Thr Ser His Ile Asp Glu Leu Tyr Glu Ser Ala Lys Lys
 225 230 235 240
 Gln Ser Gly Gly Lys Val Ala Asp Tyr Ile Pro Gln Leu Ala Lys Phe
 245 250 255

 Ser Pro Asp Leu Trp Gly Val Ser Val Cys Thr Val Asp Gly Gln Arg
 260 265 270
 His Ser Thr Gly Asp Thr Lys Val Pro Phe Cys Leu Gln Ser Cys Val
 275 280 285
 Lys Pro Leu Lys Tyr Ala Ile Ala Val Asn Asp Leu Gly Thr Glu Tyr
 290 295 300
 Val His Arg Tyr Val Gly Lys Glu Pro Ser Gly Leu Arg Phe Asn Lys
 305 310 315 320

 Leu Phe Leu Asn Glu Asp Asp Lys Pro His Asn Pro Met Val Asn Ala
 325 330 335
 Gly Ala Ile Val Val Thr Ser Leu Ile Lys Gln Gly Val Asn Asn Ala
 340 345 350
 Glu Lys Phe Asp Tyr Val Met Gln Phe Leu Asn Lys Met Ala Gly Asn
 355 360 365
 Glu Tyr Val Gly Phe Ser Asn Ala Thr Phe Gln Ser Glu Arg Glu Ser
 370 375 380

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

 Ser Pro Glu Ala Val Arg Asn Thr Leu Ser Leu Met His Ser Cys Gly

