

(19)日本国特許庁(JP)

## (12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7079937号

(P7079937)

(45)発行日 令和4年6月3日(2022.6.3)

(24)登録日 令和4年5月26日(2022.5.26)

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K 31/409 (2006.01)

A 6 1 K 31/409

A 6 1 K 31/501 (2006.01)

A 6 1 K 31/501

A 6 1 K 31/435 (2006.01)

A 6 1 K 31/435

A 6 1 P 9/10 (2006.01)

A 6 1 P 9/10 1 0 1

A 6 1 P 43/00 (2006.01)

A 6 1 P 43/00 1 2 1

請求項の数 6 (全53頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2018-561938(P2018-561938)

(86)(22)出願日 平成29年5月25日(2017.5.25)

(65)公表番号 特表2019-519533(P2019-519533  
A)

(43)公表日 令和1年7月11日(2019.7.11)

(86)国際出願番号 PCT/US2017/034420

(87)国際公開番号 WO2017/205595

(87)国際公開日 平成29年11月30日(2017.11.30)

審査請求日 令和2年5月18日(2020.5.18)

(31)優先権主張番号 62/341,848

(32)優先日 平成28年5月26日(2016.5.26)

(33)優先権主張国・地域又は機関  
米国(US)

(73)特許権者 501102988

ユニバーシティ オブ ピッツバーグ -  
オブ ザ コモンウェルス システム オブ  
ハイヤー エデュケーション  
アメリカ合衆国 ペンシルベニア州 15  
260、ピッツバーグ、サッカレイ ア  
ベニュー 130、ガードナー スティール  
カンファレンス センター ファースト  
フロア  
1st Floor Gardner Steel Conference Cen  
ter, 130 Thackeray A  
venue, Pittsburgh PA  
15260, United States  
of America

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 肺血管疾患を治療するための組成物および方法

## (57)【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

対象における肺血管疾患を治療する方法に用いる医薬組成物であって、前記方法が、Y A P / T A Z 阻害組成物の治療有効量を前記対象に投与することを含み、

前記 Y A P / T A Z 阻害組成物が、ベルテポルフィン、またはその塩であり、

前記 Y A P / T A Z 阻害組成物と組み合わせて G L S 1 阻害組成物が前記対象に投与され、

前記 G L S 1 阻害組成物が、C B - 8 3 9、C - 9 6 8、およびその塩から選択される、  
医薬組成物。

## 【請求項2】

前記肺血管疾患が肺高血圧症である、請求項1に記載の医薬組成物。

## 【請求項3】

前記肺血管疾患が肺動脈高血圧症である、請求項1または2に記載の医薬組成物。

## 【請求項4】

対象における肺血管硬化を低減する方法に用いる医薬組成物であって、前記方法が、Y A P / T A Z 阻害組成物の治療有効量を前記対象に投与することを含み、

前記 Y A P / T A Z 阻害組成物が、ベルテポルフィン、またはその塩であり、

前記 Y A P / T A Z 阻害組成物と組み合わせて G L S 1 阻害組成物が前記対象に投与され、

前記 G L S 1 阻害組成物が、C B - 8 3 9、C - 9 6 8、およびその塩から選択される、  
医薬組成物。

## 【請求項5】

前記 G L S 1 阻害組成物が、C B - 8 3 9 である、請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の医薬組成物。

【請求項 6】

前記 G L S 1 阻害組成物が、C - 9 6 8 である、請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2016年5月26日に出願された米国仮特許出願第62/341,848号明細書の優先権の利益を主張するものであり、この開示は参照により本明細書に明示的に組み込まれる。

【0002】

政府出資の陳述

本発明は、米国国立衛生研究所 (National Institutes of Health) により付与された助成金番号 HL124021 の下で米国政府の支援によりなされた。米国政府は、本発明において一定の権利を有する。

【背景技術】

【0003】

肺高血圧症 (PH) およびその特に重症のサブタイプ、肺動脈高血圧症 (PAH) は、増殖促進性の細胞表現型および有害な肺血管リモデリングを特徴とする、あまり理解されていない血管疾患である。血管細胞外マトリックス (ECM) の変化は、PHの分子的駆動因子として認識が増大している。コラーゲンおよびエラスチン産生の調節異常 (Mecham RP, et al., Science. 1987;237(4813):423-6) は、末期および初期疾患のいずれにおいても (Bertero T, et al., Cell Reports. 2015;13(5):1016-32) ならびに近位および遠位血管のいずれにおいても (Lammers S, et al., Compr Physiol. 2012;2(1):295-319) 観察されている。血管 ECM の薬理的ターゲティングは、PH を改善し得るが (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 メカノトランスダクション (すなわち、細胞が外部機械力を感知し、これに適合できるようになるプロセス) を脈管構造に関連付けるプロセスは、まさに明らかになりつつある。海馬シグナル伝達経路に固有の2つの関連共転写因子、YAP (Yes Associated Protein 1) およびTAZ (またはWWTR1) は、硬いECMによって機械的に活性化され、多臓器にわたる細胞の増殖および生存の中心的調節因子として機能し、ゆえに組織の成長および発達を調節している (Dupont S, et al. Nature. 2011;474(7350):179-83; Pan D. Dev Cell. 2010;19(4):491-505)。最近、肺血管の硬化が疾患初期にYAP/TAZを活性化し、これによりmiR-130/301ファミリーを誘導して、PHにおけるさらなるECMリモデリングをインビボで増大させることがわかった (Bertero T, et al., Cell Reports. 2015;13(5):1016-32)。ECM硬化は、PHにおいて細胞増殖を駆動することもわかったが、これらの機能的関連はかなり重要であるものの、その分子機構は依然として不明なままである。

【0004】

これとは別に、ミトコンドリアの酸化的リン酸化から解糖へのエネルギー生産の慢性的シフトである好氣的解糖が、PHにおける肺動脈内皮および平滑筋増殖ならびに遊走の病原性駆動因子として記載されている (Cottrill KA, and Chan SY. European J. of Clin. Invest. 2013;43(8):855-65により概説されているように)。この代謝シフトに関連したPHの先行機構研究は、歴史的に低酸素疾患モデルに依存してきた (Paulin R, and Michelakis ED. Circ. Res. 2014;115(1):148-64; Zhao L, et al. Nature. 2015;524(7565):356-60)。それにもかかわらず、数例を挙げると素因的遺伝子変異、先天性心臓疾患、強皮症、およびヒト免疫不全ウイルス (HIV) 感染などの特発性または続発性状態

10

20

30

40

50

に関連したPHサブタイプの数多くの形態は、明らかな低酸素傷害の非存在下の重度の代謝調節異常も特徴とする。PHにおいて明白な低酸素ストレスとは無関係に機能する代謝機能不全の分子的調節因子に関して、データがようやく明らかになりつつある (Diebold I, et al. Cell Metabolism. 2015;21(4):596-608)。

#### 【0005】

この観点を踏まえると、増加する証拠は、グルコース消費および好氣的解糖に関連したプロセスを含む、PHを超えた状況でのYAP/TAZ活性と細胞代謝との重要なつながりを示唆している (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)。しかし、解糖の増加だけでは、そのような増殖細胞の代謝要求全てを満たすには不十分である。トリカルボン酸 (TCA) 回路も、グルタミンなどのアミノ酸の酸化を介して主要なエネルギー生産源としての役割を果たしている (Le A, et al. Cell metabolism. 2012;15(1):110-21)。TCA回路の機能の継続には、炭素中間体の補給を必要とする。この補給、またはアナプレロティック反応は、2つの主な経路、グルタミノリシス (酵素グルタミナーゼ [GLS] を介したグルタミンの脱アミド化) およびATP依存性ピルビン酸カルボキシラーゼ (PC) を介したピルビン酸のオキサロ酢酸へのカルボキシル化により達成される。詳細には、GLS活性を介したグルタミノリシスは、特に急速に増殖している細胞において、細胞エネルギー、炭素、および窒素の動員を可能にすることによりアナプレロティック反応に寄与し (Lunt SY, and Vander Heiden MG. Annu Rev Cell Dev Biol. 2011;27(441-64)、細胞増殖および生存能を維持するために酸化リン酸化から解糖へ代謝を切り換えた形質転換細胞における重要なプロセスとして機能を果たす (Zhao Y, et al. Cell Death Dis. 2013;4(e532))。増殖の直接誘導のためにアスパラギン酸生産を支持するグルタミノリシス (および/またはピルビン酸カルボキシル化) の特定の能力が、悪性腫瘍細胞において最近報告されている (Sullivan LB, et al. Cell. 2015;162(3):552-63; Birsoy K, et al. Cell. 2015;162(3):540-51)。PHでは、不全右室心筋細胞におけるグルタミノリシスの調節異常が観察されている (Piao L, et al. Journal of molecular medicine. 2013;91(10):1185-97)。それにもかかわらず、特に肺血管の硬化により駆動される、またはYAP/TAZ活性化の関連でのグルタミン代謝の病因的重要性は定義されていない。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0006】

【図1】ECM硬化により誘導される代謝スイッチが、YAP/TAZの機械的活性化により調整されることを実証する図である (A~C)。A) 免疫プロット分析は、PAECにおいて2つの独立したsiRNA配列によるYAPおよびTAZのノックダウンを確認した。B~E) PAECは、軟らかいまたは硬いマトリックスで培養した。細胞内乳酸は硬いマトリックスで増加したが、そのような増加はYAP/TAZのsiRNAノックダウンにより鈍化した (B)。硬いマトリックスでは、YAP/TAZノックダウンは、アナプレロティックおよび解糖活性を反映する特異的代謝産物変化 (B)、ならびに乳酸/ピルビン酸比 (C) も鈍化させた。データは平均±SEMとして表す (\* P < 0.05; \*\* P < 0.01、\*\*\* P < 0.001)。スケールバー、20 μm (類似の結果がPASMCで見出された、データは示されていない)。

【図2】YAP/TAZが、重要な代謝酵素の転写を制御することを示す図である (A~H)。A) 配列分析は、GLS1、LDHA、およびPCのプロモーター領域のTEAD結合部位 (A~Dとして標識されている) の存在を予測した。B) ChIP-qPCRは、GLS1、LDHA、およびPCプロモーター領域のTEAD/YAP結合部位の存在を確認した。既知のYAP標的、CTGFを陽性対照として使用した。結果は、抗YAPまたは抗IgG対照による免疫沈降前の総インプットDNAのパーセントとして表す。C~E) 免疫プロット分析 (D) および濃度測定 (E) を伴うRT-qPCR (C) は、硬いマトリックス中のPAECにおけるGLS1、LDHA、およびPC発現の増加が、YAP/TAZノックダウンにより鈍化されることを明らかにした。F~H) RT-qPCR

C R ( F ) および免疫ブロッティング / 濃度測定 ( G ~ H ) は、Y A P ( p Y A P ) が、軟らかいマトリックス中の P A E C における G L S 1、L D H A、および P C 発現を増加させることを明らかにした。全てのパネルで、対照群 ( 軟らかいマトリックスで培養された s i N C、p Y A P ) の平均発現に倍数変化 1 を割り当て、これと関連試料を比較した。データは平均  $\pm$  S E M として表す ( \* P < 0 . 0 5 ; \* \* P < 0 . 0 1、\* \* \* P < 0 . 0 0 1 )。スケールバー、2 0  $\mu$  m ( 類似の結果が P A S M C ( 末梢動脈平滑筋細胞 ) で見出された、データは示されていない )。

【図 3】G L S の薬理的または遺伝子的阻害が、硬いマトリックスにおけるグルタミノリシスの上方制御を鈍化させることを実証する図である ( A ~ G )。A ~ C ) P A E C において、ターゲット L C - M S / M S は、G L S ( B P T E S または D O N ) の薬理的阻害が、硬いマトリックスにおける代謝産物発現の変化を鈍化させることを明らかにした。具体的には、硬いマトリックス対照 ( s i - N C 硬 ) と比べて、G L S 1 阻害はグルタミン、ピルビン酸、およびコハク酸を増加させ、グルタミン酸およびアスパラギン酸を減少させ ( A )、乳酸 ( B ) および乳酸 / ピルビン酸比 ( C ) を低下させた。D ) 免疫ブロット分析は、2 つの独立した s i R N A 配列による G L S 1 のノックダウンを確認した。E ~ G ) P A E C において、G L S 1 ノックダウンは、硬いマトリックスにおける代謝産物発現の変化を鈍化させ、グルタミン、ピルビン酸、およびコハク酸を増加させ、グルタミン酸およびアスパラギン酸を減少させ ( E )、乳酸 / ピルビン酸比を低下させた ( F ~ G )。全てのパネルで、対照群 ( 軟らかいマトリックス ) の平均発現に倍数変化 1 を割り当て、これと関連試料を比較した。データは平均  $\pm$  S D として表す ( \* P < 0 . 0 5 ; \* \* P < 0 . 0 1、\* \* \* P < 0 . 0 0 1 )。

【図 4】モノクロタリン曝露ラットにおけるメカノトランスダクションの操作は、グルタミノリシス低下肺血管増殖に影響を与え、P A H を予防することを実証する図である ( A ~ I )。A ~ B ) モノクロタリン曝露後、ラットを、毎日 B A P N もしくはビヒクル ( A ) またはビヒクルもしくはベルテポルフィンの毎日腹腔内注射 ( B ) のどちらかで治療した。C ) B A P N およびベルテポルフィンのいずれも、モノクロタリン曝露ラットの肺の L O X 活性を低下させた。D ) 原子間力顕微鏡法は、B A P N およびベルテポルフィン治療ラットにおける肺細動脈 ( < 1 0 0  $\mu$  m ) 硬化を減少させることを明らかにした。黒い線は中央値を表す；記号は個々の P A 測定値を表す。E ~ F ) P A H C D 3 1 + 細胞の R T - q P C R は、B A P N およびベルテポルフィン治療ラットにおける 2 つの Y A P / T A Z 標的遺伝子、C T G F および C Y R 6 1 の減少、ならびに G L S 発現 ( E ) および活性 ( F ) の低下を明らかにした。G ) ヘマトキシリン / エオシン着色および同時免疫蛍光顕微鏡法 ( co-immunofluorescence microscopy ) は、ビヒクルラットと比べた B A P N およびベルテポルフィン治療ラットにおける血管厚および筋肉化の減少ならびに Y A P 1 + 細胞の減少、G L S 1 血管強度の低下、ならびに C D 3 1 / P C N A および - S M A / P C N A 二重陽性細胞の減少を明らかにした。H ~ I ) ベルテポルフィンおよびより低程度で B A P N は、R V S P により定量化した P A H 重症度を改善した ( I )。全てのパネルで、対照群の平均発現に倍数変化 1 を割り当て、これと関連試料を比較した。\* P < 0 . 0 5 ; \* \* P < 0 . 0 1、\* \* \* P < 0 . 0 0 1。スケールバー、5 0  $\mu$  m。

【図 5】モノクロタリン曝露ラットにおける G L S の薬理的阻害が、グルタミノリシスおよび関連する肺血管細胞増殖を減少させたことを示す図である ( A ~ H )。モノクロタリン疾患誘導後、ラットを、実験プロトコルの模式図に記載されたビヒクル、G L S a s の 2 つの薬理的阻害剤、C 9 6 8 または C B 8 3 9 の毎日腹腔内注射で治療した ( A ~ B )。C ~ D ) C 9 6 8 ( C ) または C B 8 3 9 ( D ) のどちらかは、モノクロタリン曝露ラットの肺における G L S 活性を低下させた。E ~ H ) 同時免疫蛍光顕微鏡法は、疾患肺細動脈における K i 6 7 / P C N A 陽性増殖細胞を明らかにした ( ビヒクル )。C 9 6 8 または C B 8 3 9 のどちらかは、- S M A + 内側 ( G ~ H ) および C D 3 1 / v W F + 内皮 ( E ~ F ) 区画中の K i 6 7 / P C N A 陽性細胞の数を減少させた。全てのパネルで、対照群の平均発現に倍数変化 1 を割り当て、これと関連試料を比較した。データは平均  $\pm$  S E M として表す ( \* P < 0 . 0 5 ; \* \* P < 0 . 0 1、\* \* \* P < 0 . 0 0 1 )

10

20

30

40

50

。スケールバー、50  $\mu\text{m}$ 。

【図6】モノクロタリン曝露ラットにおけるGLSの薬理的障害が、PAH症状発現を改善したことを示す図である(A~H)。予防実験(C968)または反転試験のいずれでも、モノクロタリン注射後、グルタミノリシスの障害は、血管リモデリングにより定量化したPAH重症度(A~B)、細動脈筋肉化(C~D)、RVSP(E~G)、および右室肥大(フルトン指数、RV/LV+S)(H)を改善した。全てのパネルで、対照群の平均発現に倍数変化1を割り当て、これと関連試料を比較した。データは平均 $\pm$ SEMとして表す(\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ 、\*\*\* $P < 0.001$ )。スケールバー、50  $\mu\text{m}$ 。

【図7】GLS1の遺伝子的または薬理的障害が、PAEC増殖を制御するが、アポトーシスは制御しないことを示す図である(A~C)。A~C)PAECを軟らかい(1kPa)または硬い(50kPa)マトリックスにプレーティングし、示された治療に曝露させた。アポトーシス(A~C)および増殖(B~C)をプレーティング48時間後に定量化した。A)酵素アッセイは、軟らかいマトリックスおよび、程度は比較的低い硬いマトリックスにおける血清枯渇24時間後のカスパーゼ3/7活性の増加を明らかにした。対照治療(ビヒクル対照; siRNAスクランブル対照、siNC)と比較して、GLS1の薬理的障害剤(BPTES、C968)の存在下、または2つの独立したsiRNA(si-GLS1\_\_1、siGLS1\_\_2)によるGLS1ノックダウン後、有意な変化は観察されなかった。B~C)免疫蛍光顕微鏡法(B)および定量化(C)により明らかにされたように、増殖はマトリックス硬化により増加した(PCNA+染色に反映された)が、薬理的GLS1障害により減少した。アポトーシス(切断カスパーゼ3染色、CC-3+に反映された)は、軟および硬条件のいずれにおいても血清飢餓により増加したが、GLS1障害による影響を受けなかった。全てのパネルで、対照群(軟らかいマトリックス)の平均発現に倍数変化1を割り当て、これと関連試料を比較した。データは平均 $\pm$ SDとして表す(\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ 、\*\*\* $P < 0.001$ )。

【図8】細動脈周囲の線維性コラーゲンの増加が、PAHの複数の形態に罹患しているヒト患者におけるGLS、グルタミノリシス、およびアスパラギン酸生産の増加と相関していることを示す図である(A~E)。A~B)同時免疫蛍光顕微鏡法および定量化は、細動脈周囲の線維性コラーゲン沈着の増加が、ヒトPAH( $n = 6$ )においてLDHA(A)およびPC(B)発現の増加を伴うことを明らかにした。そのような染色は、疾患肺細動脈におけるYAP1/LDHA(A)およびYAP1/PC(B)二重陽性細胞の増加をさらに実証した。C)これらの変化は、内側(-SMA+)および内皮(vWF+)区画の両方で増殖肺血管細胞(Ki67+)の増加、ならびに血管アポトーシス細胞(CC-3+)の有意な低減を伴った。D~E)類似の変化が網状病変で観察された。

【図9】疾患促進細胞外マトリックス(pro-diseased extracellular matrix)を構築するために、グルタミノリシスが活性化PAAFの代謝要求を維持することを実証する図である(A~L)。A~C)BPTES、C968またはCB839のいずれかによるGLS1の薬理的障害は、グルタミノリシス(A)、解糖(B)、およびアスパラギン酸生産(C)の減少に反映される、硬いマトリックス上で培養したPAAFの代謝活性化を鈍化させた。D~E)BPTES、C968またはCB839のいずれかによるGLS1の薬理的障害は、炎症促進性サイトカイン(EDN1、IL6またはTGF- $\beta$ )により刺激すると、PAAF依存性ECMリモデリングを減少させた。F)RT-qPCRは、C968またはCB839のどちらかによるGLS1の障害が、TGF- $\beta$ 誘導ECM関連遺伝子発現および線維芽細胞活性化マーカー( $\alpha$ -SMA)を減少させることを明らかにした。G~H)ピクロシリウスレッド染色による線維性コラーゲン可視化(G)および定量化(H)は、GLS1障害剤の存在下の活性化PAAF(TGF- $\beta$ )によるECMリモデリングの減少を確認した。I~M)PAAFは示された治療で培養した。細胞を除去し、肺動脈内皮細胞(PAEC)を、PAAFにより合成したマトリックス上で培養した。PCNA染色(I)および定量化は、対照(TGF- $\beta$ )と比べて、TGF- $\beta$ +GLS1障害剤で治療したPAAFによりリモデリングされたマトリックス上の増殖細胞(

10

20

30

40

50

PCNA+)の減少を明らかにした。同じ条件で、RT-qPCRは、対照(TGF- $\beta$ )と比べて、TGF- $\beta$ +GLS1阻害剤で治療したPAAFにより合成したマトリックス上で培養したPAECによる炎症促進性サイトカイン遺伝子発現(J~L)の減少を明らかにした。データは、3通りで行った少なくとも3つの独立した実験の平均 $\pm$ SEMとして表す(\* $P < 0.05$ 、 $\S P < 0.01$ 、 $\# P < 0.001$ )。対試料は両側Student t検定により比較し、一方、一元配置ANOVAおよび事後テューキー検定は群比較に使用した。

【図10】ECMリモデリングまたはGLS1の薬理的阻害が、ECM硬化とグルタミノリシスの間のフィードバックループを明らかにすることを示す図である(A~F)。A~D)モノクロタリン曝露後、ラットを、毎日BAPN( $n = 8$ )対ビヒクル(A~B; $n = 7$ )または別個のベルテポルフィンの毎日i.p.注射( $n = 6$ )対別個のビヒクル(C~D; $n = 6$ )で治療した。RT-qPCRにより評価した場合、BAPNおよびベルテポルフィンのいずれも、モノクロタリン曝露ラットの肺におけるGLS1発現を減少させた。E~F)モノクロタリン曝露後、ラットを毎日CB839( $n = 8$ )対ビヒクル(E~F; $n = 7$ )で治療した。原子間力顕微鏡法(F)は、CB839治療ラットにおける肺細動脈(直径 $< 100 \mu m$ )硬化の減少を明らかにした。横線は中央値を表す;記号は個々の肺動脈測定値を表す。全てのパネルで、対照群の平均発現に倍数変化1を割り当て、これと関連試料を比較した。対試料は両側Student t検定により比較し、一方、一元配置ANOVAおよび事後テューキー検定を群比較に使用した(\* $P < 0.05$ 、 $\# P < 0.001$ )。

【発明を実施するための形態】

【0007】

本明細書において、YAP/TAZ阻害組成物および/またはGLS1阻害組成物の治療有効量を対象に投与することを含む、対象における肺血管疾患を治療するための組成物および方法が、提供される。いくつかの実施形態において、YAP/TAZ阻害組成物は、ベルテポルフィン、その塩、プロドラッグ、または誘導体である。他のまたはさらなる実施形態において、GLS1阻害組成物は、CB-839、その塩、プロドラッグ、または誘導体である。本出願全体を通して使用される用語は、当業者にとって通常のおよび典型的な意味で解釈されるべきである。しかし、本出願者は、以下の用語が以下に定義する特定の定義を与えられることを望む。

【0008】

定義

本明細書および特許請求の範囲で使用される場合、単数形「1つの(a)」、「1つの(an)」、および「その(the)」は、文脈が特に明確に指示しない限り複数の言及を含む。例えば、用語「細胞(a cell)」は、その混合物を含む複数の細胞を含む。

【0009】

用語「投与すること」は、経口、局所、静脈内、皮膚、皮下、経皮(transcutaneous)、経皮(transdermal)、筋肉内、関節内(intra-joint)、非経口、細動脈内、皮内、脳室内、頭蓋内、腹腔内、病巣内、鼻内、直腸、膣である投与、吸入または埋め込みリザーバーによる投与を指す。用語「非経口」は、皮下、静脈内、筋肉内、関節内(intra-articular)、滑液嚢内、胸骨内、莢膜内、肝内、病巣内、および頭蓋内注射または注入手法を含む。一実施形態において、投与は静脈内である。

【0010】

範囲は、「約」1つの特定の値から、および/または「約」別の特定の値までとして本明細書において表され得る。そのような範囲が表される場合、別の態様は、一方の特定の値からおよび/または他方の特定の値までを含む。同様に、値が、先行する「約」を用いて近似値として表される場合、特定の値は別の態様を形成することが理解されよう。各々の範囲の端点は、他方の端点と関連していても、および他方の端点とは無関係でも重要であることがさらに理解されよう。本明細書に開示された、いくつかの値があること、および各値は、該値自体に加えて、その特定の値の「約」としても本明細書に開示されることも

理解される。例えば、値「１０」が開示されるならば、「約１０」もまた開示される。ある値が開示されるとき、該値「以下」、「該値以上」、および値間の考えられる範囲もまた、当業者によって適切に理解されるように開示されることも理解される。例えば、値「１０」が開示されるならば、「１０以下」および「１０以上」もまた開示される。本出願全体を通して、データはいくつかの異なる形式で提供され、このデータは、端点および始点、およびデータ点の任意の組合せに対する範囲を表すことも理解される。例えば、特定のデータ点「１０」および特定のデータ点「１５」が開示されるならば、１０から１５の間だけでなく、１０および１５を超える、１０および１５以上、１０および１５未満、１０および１５以下、ならびに１０および１５と同等も開示されると見なされることが理解される。２つの特定のユニット間の各ユニットもまた開示されることも理解される。例えば、１０および１５が開示されるならば、１１、１２、１３、および１４もまた開示される。

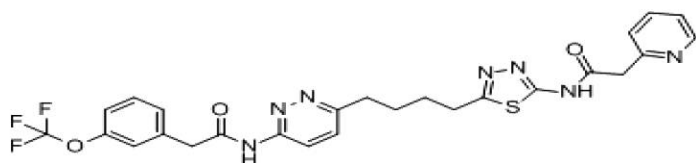
10

#### 【００１１】

用語「ＣＢ－８３９」は、本明細書において、以下に示すような、ならびに／または米国特許第８，６０４，０１６号明細書および／もしくは米国特許第８，８６５，７１８号明細書に記載された化学構造を有する化学組成物を指す。

#### 【００１２】

#### 【化１】



20

#### 【００１３】

「組成物」は、活性剤（例えば、ペルテポルフィンおよび／またはＣＢ－８３９組成物）および不活性（例えば、検出可能な薬剤または標識）またはアジュバントなどの活性な別の化合物または組成物の組合せを含むことが意図される。

#### 【００１４】

本明細書で使用される場合、用語「含む」は、組成物および方法は列挙された要素を含むが、他の要素を排除しないことを意味することが意図される。組成物および方法を定義するのに使用される場合、「から本質的になる」は、該組合せにとって任意の本質的な重要性を持つ他の要素を排除することを意味するものとする。ゆえに、本明細書に定義された要素から本質的になる組成物は、単離および精製方法からの微量の混入物、ならびに例えば、リン酸緩衝食塩水、保存料などの薬学的に許容される担体を排除しない。「からなる」は、他の成分の微量を超える要素および本発明の組成物を投与するための実質的な方法ステップを排除することを意味するものとする。これらの移行用語の各々によって定義される実施形態は、本発明の範囲内である。

30

#### 【００１５】

「対照」は、比較目的で実験において使用される代替の対象または試料である。対照は、「陽性」または「陰性」であり得る。

40

#### 【００１６】

用語「疾患」は、感染、炎症、環境要因、または遺伝的欠損などのさまざまな原因から生じ、徴候、症状、または両方の同定可能な群を特徴とする対象の一部、臓器、または全身の異常状態を指す。いくつかの実施形態において、疾患は癌である。

#### 【００１７】

「有効量」は、有益なまたは所望の結果をもたらすのに十分な量である。有効量は、１つまたは複数の投与、適用または投与量で投与することができる。

#### 【００１８】

用語「ＧＬＳ１阻害組成物」は、本明細書において、対象または血管細胞に投与されると

50

、（部分的または完全に）GLS1を減少または不活性化させる任意の組成物を指す。いくつかの実施形態において、用語「GLS1阻害組成物」は、本明細書において、対象または血管細胞に投与され、GLS1を減少または不活性化させる場合、肺高血圧症、肺動脈高血圧症および／または血管硬化も治療する任意の組成物を指す。GLS1阻害組成物の非限定的な例は、本明細書に記載されたCB-839、C-968、DONおよびBPTEsである。

#### 【0019】

用語「GLS1」は、本明細書において、グルタミナーゼおよびヒトにおけるK-グルタミナーゼとしても知られるGLS1ポリペプチドを指し、GLS遺伝子によりコードされる。用語「GLS1ポリヌクレオチド」は、ポリヌクレオチドをコードするGLS1を指し、その全体またはその断片にGLS遺伝子を含む。いくつかの実施形態において、GLS1ポリペプチドまたはポリヌクレオチドは、次のような1つまたは複数の公表されているデータベースにおいて同定されるものである：HGNC：4331；Entrez Gene：2744；Ensembl：ENSG00000115419；OMIM：138280；およびUniProtKB：O94925。いくつかの実施形態において、GLS1ポリヌクレオチドは、配列番号3の配列（KGAアイソフォームとして知られる）を含むGLS1ポリペプチド、または配列番号3と約80%以上、約85%以上、約90%以上、約95%以上、もしくは約98%以上の相同性を有するポリペプチド配列、または配列番号3の一部分を含むポリペプチドをコードする。配列番号3のGLS1ポリペプチドは、成熟TAZの未成熟型またはプロセシング前型を表してもよく、したがって、本明細書に含まれるのは、配列番号3のGLSポリペプチドの成熟部分またはプロセシング部分である。いくつかの例において、GLS1ポリペプチドは、その配列が配列番号3とは次のように異なるGACアイソフォームである：551～669：VKSVINLLFA・・・TVHKNLDGLL HSFGLDYES・・・YRMESLGEKS。

#### 【0020】

治療目的のための「哺乳動物」は、ヒト、飼育動物および家畜、ヒト以外の霊長類、ならびに例えばイヌ、ウマ、ネコ、ウシなどの動物園動物、競技用動物、または愛玩動物を含む、哺乳動物として分類される任意の動物を指す。

#### 【0021】

「医薬組成物」は、活性剤と、組成物をインビボでまたはエキスビボでの診断的または治療的使用に適したものにする不活性または活性な薬学的に許容される担体との組合せを含むことが意図される。

#### 【0022】

用語「薬学的に許容される担体」は、一般に安全および無毒な医薬組成物を調製する上で有用である担体または賦形剤を意味し、獣医学的および／またはヒトの薬学的用途に許容される担体を含む。本明細書で使用される場合、用語「薬学的に許容される担体」は、リン酸緩衝食塩水溶液、水、および油／水または水／油エマルジョンなどのエマルジョン、およびさまざまなタイプの湿潤剤などの標準的な薬学的担体のいずれをも包含する。本明細書で使用される場合、用語「担体」は、医薬製剤における使用のための、および以下にさらに記載される任意の賦形剤、希釈剤、充填剤、塩、緩衝液、安定剤、可溶化剤、脂質、安定剤、または当技術分野で周知の他の材料を包含する。医薬組成物はまた、保存料も含むことができる。「薬学的に許容される担体」は本明細書および特許請求の範囲で使用される場合、1つまたは1つを超えるそのような担体のいずれをも含む。

#### 【0023】

用語「薬学的有効量」、「治療有効量」、または「治療有効用量」は、研究者、獣医、医師または他の臨床家により探求されている組織、系、動物、またはヒトの生物学的または医学的応答を誘発する、YAP/TAZ阻害組成物および／またはGLS1阻害組成物などの組成物の量を指す。いくつかの実施形態において、所望の応答は、肺高血圧症、肺動脈高血圧症および／または肺血管硬化などの血管疾患の治療である。そのような治療は、右室収縮期圧（RVSP）、右室肥大（フルトン指数、RV/LV+S）、血管リモデリ

10

20

30

40

50



ング、および細動脈筋肉化の1つまたは複数を決定して定量化することができる。

【0024】

いくつかの例において、所望の生物学的または医学的応答は、組成物の複数の投与量を数日、数週、または数年間にわたって対象に投与した後に達成される。用語「薬学的有効量」、「治療有効量」、または「治療有効用量」は、投与されたとき、治療下の疾患の1つもしくは複数の症状の出現を予防する、またはある程度軽減するのに十分な、YAP/TAZ阻害組成物および/またはGLS1阻害組成物などの組成物のその量を含む。治療有効量は、YAP/TAZ阻害組成物および/またはGLS1阻害組成物などの組成物、疾患およびその重症度、投与経路、投与時期、排せつ速度、薬物の組合せ、治療医の判断、剤形、ならびに治療される対象の年齢、体重、全般的健康、性別および/または食生活に  
10  
応じて異なる。本方法との関連において、YAP/TAZ阻害組成物および/またはGLS1阻害組成物の薬学的または治療有効量もしくは用量は、肺高血圧症、肺動脈高血圧症および/または肺血管硬化を治療するのに十分な量を含む。

【0025】

用語「予防する」、「予防すること」、「予防」、およびその文法的変形は、本明細書で使用される場合、疾患および/または1つもしくは複数のその付随症状の発症または再発を部分的または完全に遅延または防止する、あるいは対象が疾患に罹患または再罹患するのを部分的または完全に阻止する、あるいは疾患または1つもしくは複数のその付随症状に罹患または再罹患する対象のリスクを部分的または完全に低減する方法を指す。

【0026】

用語「肺血管疾患」は、肺血管高血圧を指すのに本明細書で使用され、肺高血圧症(PH)および肺動脈高血圧症(PAH)のいずれをも含む。肺血管疾患は、肺血管硬化に起因し得、および/または肺血管硬化を含む。

【0027】

「塩」とは、本明細書に定義されているように水溶性もしくは油溶性または分散性であり、治療的に許容される、本明細書に開示された化合物の両イオン性形態を意味する。塩は、化合物の最終単離および精製中に調製されてもよく、または遊離塩基の形態の適切な化合物を適切な酸と反応させて別個に調製されてもよい。適切な塩のリストは、Remington's Pharmaceutical Sciences, 20th ed., Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 2000, p. 704; および"Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use," P. Heinrich Stahl and Camille G. Wermuth, Eds., Wiley-VCH, Weinheim, 2002に見出される。塩の例としては、アミンなどの塩基性残基の鉍酸塩または有機酸塩、およびカルボン酸などの酸性残基のアルカリ塩または有機塩が挙げられるが、これらに限定されない。

【0028】

代表的な酸付加塩としては、酢酸塩、アジピン酸塩、アルギン酸塩、L-アスコルビン酸塩、アスパラギン酸塩、安息香酸塩、ベンゼンスルホン酸塩(ベシル酸塩)、重硫酸塩、酪酸塩、樟脳酸塩、樟脳スルホン酸塩、クエン酸、ジグルコン酸塩、ギ酸塩、フマル酸塩、ゲンチジン酸塩、グルタル酸塩、グリセロリン酸塩、グリコール酸塩、ヘミ硫酸塩、ヘプタン酸塩、ヘキサノ酸塩、馬尿酸塩、塩酸塩、臭化水素酸塩、ヨウ化水素酸塩、2-ヒドロキシエタンスルホン酸塩(イセチオン酸塩)、乳酸塩、マレイン酸塩、マロン酸塩、DL-マンデル酸塩、メシチレンスルホン酸塩、メタンスルホン酸塩、ナフチレンスルホン酸塩、ニコチン酸塩、2-ナフタレンスルホン酸塩、シュウ酸塩、パモ酸塩、ペクチン酸塩、過硫酸塩、3-フェニルプロピオン酸塩、ホスホン酸塩、ピクリン酸塩、ピバル酸塩、プロピオン酸塩、ピログルタミン酸塩、コハク酸塩、スルホン酸塩、酒石酸塩、L-酒石酸塩、トリクロロ酢酸塩、トリフルオロ酢酸塩、リン酸塩、グルタミン酸塩、重炭酸塩、パラトルエンスルホン酸塩(p-トシレート)、およびウンデカン酸塩が挙げられる。同様に、本明細書に開示された化合物中の塩基性基は、メチル、エチル、プロピル、およびブチルの塩化物、臭化物、ならびにヨウ化物; ジメチル、ジエチル、ジブチル、およびジアミル硫酸塩; デシル、ラウリル、ミリスチル、およびステアリルの塩化物、臭化物  
40  
50

ならびにヨウ化物；ならびにベンジルおよびフェネチルの臭化物で四級化することができる。治療的に許容される付加塩を形成するのに用いることができる酸の例としては、塩酸、臭化水素酸、硫酸、およびリン酸などの無機酸、ならびにシュウ酸、マレイン酸、コハク酸、およびクエン酸などの有機酸が挙げられる。塩は、化合物と、アルカリ金属イオンまたはアルカリ土類イオンとの配位により形成することもできる。それゆえに、本明細書に開示された化合物のナトリウム塩、カリウム塩、マグネシウム塩、およびカルシウム塩などが形成され得る。

#### 【0029】

塩基性付加塩は、金属カチオンの水酸化物、炭酸塩、もしくは重炭酸塩などの適切な塩基、またはアンモニウムもしくは有機第1級アミン、第2級、もしくは第3級アミンとカルボキシ基を反応させて、化合物の最終単離および精製中に調製されてもよい。治療上許容される塩のカチオンとしては、リチウム、ナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム、およびアルミニウム、ならびにアンモニウム、テトラメチルアンモニウム、テトラエチルアンモニウム、メチルアミン、ジメチルアミン、トリメチルアミン、トリエチルアミン、ジエチルアミン、エチルアミン、トリブチルアミン、ピリジン、N, N - ジメチルアニリン、N - メチルピペリジン、N - メチルモルホリン、ジシクロヘキシルアミン、プロカイン、ジベンジルアミン、N, N - ジベンジルフェネチルアミン、1 - エフェナミン、およびN, N' - ジベンジルエチレンジアミンなどの非毒性第4級アミンカチオンが挙げられる。塩基付加塩の形成に有用な他の代表的な有機アミンとしては、エチレンジアミン、エタノールアミン、ジエタノールアミン、ピペリジン、およびピペラジンが挙げられる。

#### 【0030】

「プロドラッグ」とは、生理的条件下で治療的に活性な化合物に変換される化合物を意味する。プロドラッグは、不活性の（または著しく低い活性の）形態で投与される。投与されると、プロドラッグは体内で（インビボで）活性化化合物に代謝される。本明細書に開示されたある特定の化合物は、Hydrolysis in Drug and Prodrug Metabolism: Chemistry, Biochemistry, and Enzymology (Testa, Bernard and Mayer, Joachim M. Wiley-VHCA, Zurich, Switzerland 2003)に記載されているようにプロドラッグとしても存在することができる。本明細書に記載された化合物のプロドラッグは、生理的条件下で容易に化学変化を受けて化合物をもたらす、化合物の構造的に修飾された形態である。さらに、プロドラッグは、エキスビボ環境で化学的または生化学的方法により化合物に変換されてもよい。例えば、プロドラッグは、適切な酵素または化学試薬と共に経皮パッチリザーバーに入れられる場合、化合物にゆっくり変換され得る。プロドラッグは、いくつかの状況において、その化合物または親薬物より投与することが容易であり得るため、しばしば有用である。プロドラッグは、例えば、経口投与により生体利用可能となり得るのに対し、親薬物はそうではない。プロドラッグは、親薬物よりも医薬組成物における改善された可溶性を有することもできる。プロドラッグの加水分解的切断または酸化活性化に依存するものなど、多種多様なプロドラッグ誘導体が当技術分野で知られている。限定するものではないが、プロドラッグの例は、エステル（「プロドラッグ」）として投与されるが、次いで活性実体であるカルボン酸に代謝的に加水分解される化合物である。さらなる例としては、化合物のペプチジル誘導体が挙げられる。

#### 【0031】

適切なプロドラッグを選択および調製するための方法は、例えば、以下に提供されている：T. Higuchi and V. Stella, "Prodrugs as Novel Delivery Systems," Vol. 14, ACS Symposium Series, 1975；H. Bundgaard, Design of Prodrugs, Elsevier, 1985；およびBioreversible Carriers in Drug Design, ed. Edward Roche, American Pharmaceutical Association and Pergamon Press, 1987。活性化化合物のプロドラッグは、従来のエステルであってもよい。プロドラッグとして利用されているいくつかの一般的なエステルは、フェニルエステル、脂肪族（C<sub>7</sub> ~ C<sub>8</sub>またはC<sub>8</sub> ~ C<sub>24</sub>）エステル、コレステロールエステル、アシルオキシメチルエステル、カルバミン酸エステル、およびアミノ酸エステルである。好ましくは、本明細書に開示された化合物のプロドラッグは薬

学的に許容される。

【 0 0 3 2 】

用語「対象」は、霊長類（例えば、ヒト）、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ウマ、イヌ、ネコ、ウサギ、ラット、マウスなどを含むが、これらに限定されない哺乳動物などの動物を含むように本明細書では定義される。いくつかの実施形態において、対象はヒトである。

【 0 0 3 3 】

本明細書で使用される場合、用語「置換された」は、有機化合物の全ての許容される置換基を含むことが企図される。広範な態様において、許容される置換基としては、有機化合物の非環式および環式、分岐および非分岐、炭素環式およびヘテロ環式、ならびに芳香族および非芳香族置換基が挙げられる。例示的置換基としては、例えば、以下に記載されたものが挙げられる。許容される置換基は、1つまたは複数であってもよく（例えば、「二置換された」、「三置換された」などと呼ばれる）、適切な有機化合物に関して同じであってもまたは異なってもよい。本開示の目的のために、窒素および酸素などのヘテロ原子は、水素置換基、および/またはヘテロ原子の原子価を満たす本明細書に記載された有機化合物の任意の許容される置換基を有してもよい。本開示は、有機化合物の許容される置換基によりいかなる形で限定されることを企図しない。同様に、用語「置換」または「～で置換された」は、そのような置換が、置換原子および置換基の許容原子価と一致しており、ならびに置換が安定な化合物、例えば、転位、環化、脱離などによる変換を自発的に受けない化合物をもたらすという暗黙の条件を含む。同様に、本明細書で使用される場合「置換」または「～で置換された」は、1つの置換基が別の置換基に融合される立体配置を包含すると意味される。例えば、アリール基で置換されたアリール基（またはその逆）は、1つのアリール基が単一のシグマ結合を介して第2のアリール基に結合されること、および同様に、2つのアリール基が融合される、例えば、一方のアリール基の2つの炭素が他方のアリール基の2つの炭素と共有されることを意味し得る。

【 0 0 3 4 】

用語「治療する」、「治療すること」、「治療」およびそれらの文法的変形は、本明細書で使用される場合、疾患の1つもしくは複数の付随症状の強度を部分的もしくは完全に遅延、軽減、緩和もしくは低減すること、ならびに/または疾患の1つもしくは複数の原因を軽減、緩和もしくは妨害することを含む。本発明による治療は、予防的、防止的、対症的、または救済的に適用され得る。防止的治療は、発症前（例えば、疾患の明らかな徴候前）、初期発症中（例えば、疾患の最初の徴候および症状時）、または疾患の発生の確立後に対象に投与される。防止的投与は、感染症状の症状発現前に数日から数年にわたって生じ得る。いくつかの例において、用語「治療する」、「治療すること」、「治療」およびそれらの文法的変形は、対象の治療前と比較して、または一般もしくは試験集団におけるそのような症状の発生と比較して、肺高血圧症、肺動脈高血圧症および/または血管硬化を部分的または完全に低減することを含む。低減は、5%、10%、20%、30%、40%以上であってもよい。

【 0 0 3 5 】

用語「YAP/TAZ阻害組成物」は、本明細書において、対象または血管細胞に投与されると、YAPおよび/またはTAZの成分を減少または不活性化させる任意の組成物を指す。いくつかの実施形態において、用語「YAP/TAZ阻害組成物」は、本明細書において、対象または血管細胞に投与され、YAPおよび/またはTAZを減少または不活性化させる場合、肺高血圧症、肺動脈高血圧症および/または血管硬化の低減をもたらす任意の組成物を指す。

【 0 0 3 6 】

用語「TAZ」は、本明細書において、WWTR1またはWW Domain Containing Transcription Regulator Protein 1としても知られるポリペプチドを指す。用語「TAZポリヌクレオチド」は、TAZ/WWTR1コードポリヌクレオチドを指し、その全体またはその断片にTAZ/WWTR1遺伝子を含む。いくつかの実施形態において、TAZ/WWTR1ポリペプチドまたはポリヌ

10

20

30

40

50

クレオチドは、1つまたは複数の公表されているデータベースにおいて次のように同定されるものである：HGNC：24042；Entrez Gene：25937；Ensembl：ENSG0000018408；OMIM：607392；およびUniProtKB：Q9GZV5。いくつかの実施形態において、TAZポリヌクレオチドは、配列番号1の配列、または配列番号1と約80%以上、約85%以上、約90%以上、約95%以上、もしくは約98%以上の相同性を有するポリペプチド配列、あるいは配列番号1の一部分を含むポリペプチドを含むTAZポリペプチドをコードする。配列番号1のTAZポリペプチドは、成熟TAZの未成熟型またはプロセシング前型を表してもよく、したがって、本明細書に含まれるのは、配列番号1中のTAZポリペプチドの成熟部分またはプロセシング部分である。

10

#### 【0037】

用語「YAP」は、本明細書において、YAP1、Yes関連タンパク質1（Yes-associated protein 1）、またはYap65としても知られるYAPポリペプチドを指し、ヒトにおいては、YAP1遺伝子によりコードされる。用語「YAPポリヌクレオチド」は、YAPコードポリヌクレオチドを指し、その全体またはその断片にYAP1遺伝子を含む。いくつかの実施形態において、YAPポリペプチドまたはポリヌクレオチドは、1つまたは複数の公表されているデータベースにおいて次のように同定されるものである：HGNC：16262；Entrez Gene：10413；Ensembl：ENSG00000137693；OMIM：606608；およびUniProtKB：P46937。いくつかの実施形態において、YAPポリヌクレオチドは、配列番号2の配列、または配列番号2と約80%以上、約85%以上、約90%以上、約95%以上、もしくは約98%以上の相同性を有するポリペプチド配列、あるいは配列番号2の一部分を含むポリペプチドを含むYAPポリペプチドをコードする。配列番号2のYAPポリペプチドは、成熟YAPの未成熟型またはプロセシング前型を表してもよく、したがって、本明細書に含まれるのは、配列番号2中のYAPポリペプチドの成熟部分またはプロセシング部分である。

20

#### 【0038】

用語「ベルテボルフィン」は、本明細書において、以下に示すような、ならびに／または米国特許第5,707,608号明細書、米国特許第5,798,345号明細書、および／もしくは米国特許第5,756,541号明細書に記載された化学構造を有する、化学名3-[(23S,24R)-14-エテニル-5-(3-メトキシ-3-オキソプロピル)-22,23-ビス(メトキシカルボニル)-4,10,15,24-テトラメチル-25,26,27,28-テトラアザヘキサシクロ[16.6.1.13,6.18,11.113,16.019,24]オクタコサ-1,3,5,7,9,11(27),12,14,16,18(25),19,21-ドデカエン-9-イル]プロパン酸を有する化学組成物を指す。

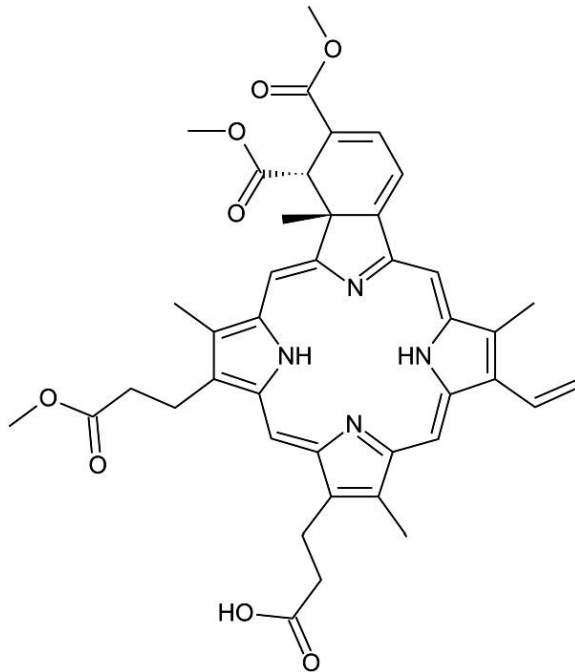
30

#### 【0039】

40

50

## 【化 2】



10

20

## 【 0 0 4 0 】

## 化合物および組成物

本明細書において、肺高血圧症を治療し、肺動脈高血圧症を治療し、血管硬化を低減し、ならびに / または Y A P / T A Z および / もしくは G L S 1 媒介経路を阻害するための化合物が開示される。肺高血圧症を治療し、肺動脈高血圧症を治療し、血管硬化を低減し、ならびに / または Y A P / T A Z および / もしくは G L S 1 媒介経路を阻害するための化合物は、ペルテポルフィン、C B - 8 3 9、またはそれらのプロドラッグ、誘導体、塩、溶媒和物、もしくはそれらの組合せであってもよい。本明細書に記載された化合物の 1 つまたは複数を含む医薬組成物は、薬学的に許容される担体を用いて調製することができる。「薬学的に許容される」担体は、妥当なベネフィット / リスク比に見合った、過度の有害な副作用（毒性、刺激、およびアレルギー応答など）がなく、ヒトおよび / または動物との使用に適したものである。担体は、活性成分以外の医薬組成物中に存在する全ての成分である。担体としては、希釈剤、結合剤、滑沢剤、崩壊薬、p H 調節剤、保存料、抗酸化剤、可溶化促進剤、安定剤、界面活性剤、およびコーティング組成物が挙げられ得るが、これらに限定されない。

30

## 【 0 0 4 1 】

希釈剤は、「充填剤」とも呼ばれており、典型的には、錠剤の圧縮またはビーズ剤および顆粒剤の形成のための実用的なサイズが提供されるように、固体剤形の嵩を増すのに必要である。適切な希釈剤としては、リン酸二カルシウム二水和物、硫酸カルシウム、ラクトース、スクロース、マンニトール、ソルビトール、セルロース、微結晶性セルロース、カオリン、塩化ナトリウム、乾燥デンプン、加水分解デンプン、化デンプン、二酸化シリコン、酸化チタン、ケイ酸マグネシウムアルミニウム、および粉末糖が挙げられるが、これらに限定されない。

40

## 【 0 0 4 2 】

結合剤は、固体投与製剤に粘着性質を与え、ゆえに錠剤またはビーズ剤もしくは顆粒が、該剤形の形成後に元の形を保つことを確保するために使用される。適切な結合剤材料としては、デンプン、化デンプン、ゼラチン、糖（スクロース、グルコース、デキストロース、ラクトース、およびソルビトールを含む）、ポリエチレングリコール、ワックス、アカシア、トラガカントなどの天然および合成ゴム、アルギン酸ナトリウム、ヒドロキシブ

50

ロピルメチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、エチルセルロースを含むセルロース、およびビーガム (veegum)、ならびにアクリル酸およびメタクリル酸コポリマー、メタクリル酸コポリマー、メタクリル酸メチルコポリマー、メタクリル酸アミノアルキルコポリマー、ポリアクリル酸ノポリメタクリル酸、およびポリビニルピロリドンなどの合成ポリマーが挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0043】

滑沢剤は、錠剤の製造を促進するのに使用される。適切な滑沢剤の例としては、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸、ペヘン酸グリセロール、ポリエチレングリコール、タルク、および鉱油が挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0044】

崩壊剤は、投与後の剤形の崩壊または「分解」を促進するのに使用され、デンプン、デンプングリコール酸ナトリウム、カルボキシメチルデンプンナトリウム、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ヒドロキシプロピルセルロース、 化デンプン、粘土、セルロース、アルギニン、ゴム、または架橋PVP (GAF Chemical Corp製のPolyp lasdone XL)などの架橋ポリマーが含まれ得るが、これらに限定されない。

#### 【0045】

安定剤は、例として酸化反応を含み得る薬物分解反応を阻害または遅延させるのに使用される。

#### 【0046】

界面活性剤は、アニオン性、カチオン性、両性または非イオン性界面活性剤であってもよい。適切なアニオン性界面活性剤には、カルボン酸イオン、スルホン酸イオン、および硫酸イオンを含有するものが挙げられ得るが、これらに限定されない。アニオン性界面活性剤の例としては、長鎖アルキルスルホン酸およびアルキルアリールスルホン酸のナトリウム、カリウム、アンモニウム (ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウムなど)、ジアルキルスルホコハク酸ナトリウム (ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウムなど)、ジアルキルスルホコハク酸ナトリウム (ビス - (2 - エチルチオキシル) - スルホコハク酸ナトリウムなど)、ならびにアルキル硫酸塩 (ラウリル硫酸ナトリウム) が挙げられる。カチオン性界面活性剤には、第4級アンモニウム化合物 (塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、臭化セトリモニウム、塩化ステアリルジメチルベンジルアンモニウムなど)、ポリオキシエチレンおよびココナッツアミンが挙げられるが、これらに限定されない。非イオン性界面活性剤の例としては、モノステアリン酸エチレングリコール、ミリスチン酸プロピレングリコール、モノステアリン酸グリセリル、ステアリン酸グリセリル、オレイン酸ポリグリセリル - 4、ソルビタンアシレート、スクロースアシレート、ラウリン酸PEG - 150、モノラウリン酸PEG - 400、モノラウリン酸ポリオキシエチレン、ポリソルベート、ポリオキシエチレンオクチルフェニルエーテル、PEG - 1000セチルエーテル、ポリオキシエチレントリデシルエーテル、ポリプロピレングリコールブチルエーテル、POLOXAMER (商標) 401、ステアロイルモノイソプロパノールアミド、およびポリオキシエチレン水添タロウアミドが挙げられる。両性界面活性剤の例としては、N - ドデシル - アラニンナトリウム、N - ラウリル - イミノジプロピオン酸ナトリウム、ミリストアンホアセテート (myristoamphoacetate)、ラウリルベタインおよびラウリルスルホベタインが挙げられる。

#### 【0047】

コーティング組成物には、可塑剤、顔料、着色剤、安定化剤、および滑剤が挙げられ得る。適切なコーティング材料の例としては、セルロースアセテートフタレート、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレート、およびヒドロキシプロピルメチルセルロースアセテートサクシネートなどのセルロースポリマー；ポリビニルアセテートフタレート、アクリル酸ポリマーおよびコポリマー、ならびに商品名EUDRAGIT (商標) (Roth Pharma、Westers tadt、ドイツ) で市販されているメタクリル樹脂、ゼイン、セラッ

10

20

30

40

50

ク、および多糖が挙げられるが、これらに限定されない。

【 0 0 4 8 】

本明細書に開示された化合物および組成物は、不活性希釈剤などの薬学的に許容される担体、または経口送達用の吸収可能な可食担体と場合により組み合わせて、静脈内または経口投与など全身投与することができる。該組成物は、ハードまたはソフトシエルゼラチンカプセルに封入されてもよく、錠剤に圧縮されてもよく、または患者の食事の食べ物と共に直接取り込まれてもよい。経口治療投与には、活性化合物は、1つまたは複数の賦形剤と組み合わされてもよく、摂取可能な錠剤、口腔錠、トローチ剤、カプセル剤、エリキシル剤、懸濁剤、シロップ剤、ウエハー剤、エアロゾルスプレー剤等の形態で使用されてもよい。

10

【 0 0 4 9 】

錠剤、トローチ剤、丸薬、カプセル剤などは、以下のものを含有することもできる：ガムトラガカント、アカシア、コーンスターチ、またはゼラチンなどの結合剤；リン酸二カルシウムなどの賦形剤；例えばコーンスターチ、ジャガイモデンプン、アルギン酸などの崩壊剤；ステアリン酸マグネシウムなどの滑沢剤；およびスクロース、フルクトース、ラクトースもしくはアスパルテームなどの甘味剤、またはペパーミント、冬緑油、もしくはサクランボ香味料などの香味剤が添加されてもよい。単位剤形がカプセルである場合、上記のタイプの材料に加えて、植物油またはポリエチレングリコールなどの液体担体を含有してもよい。さまざまな他の材料が、コーティング剤として、またはさもなければ固体単位剤形の物理的形態を変更するために存在してもよい。例えば、錠剤、丸薬、またはカプセル剤は、ゼラチン、ワックス、セラック、または糖などでコーティングされてもよい。シロップ剤またはエリキシル剤は、活性化合物、甘味剤としてスクロースまたはフルクトース、保存料としてメチルおよびプロピルパラベン、サクランボまたはオレンジフレーバーなどの色素および香味料を含有してもよい。当然ながら、任意の単位剤形を調製する上で使用される任意の材料は、薬学的に許容され、用いられる量において実質的に無毒であるべきである。さらに、活性化合物は、持続放出調製物およびデバイスに組み込まれてもよい。

20

【 0 0 5 0 】

本明細書に開示された化合物および組成物、それに加えてそれらの薬学的に許容される塩、水和物、プロドラッグ、または誘導体などは、注入または注射により静脈内、筋肉内、または腹腔内に投与することができる。活性剤またはその塩の溶液は、場合により非毒性界面活性剤と混合して、水中で調製することができる。分散液は、グリセロール、液体ポリエチレングリコール、トリアセチン、およびそれらの混合物中、ならびに油中で調製することもできる。貯蔵および使用の通常の条件下、これらの調製物は、微生物の増殖を防ぐための保存料を含有することができる。

30

【 0 0 5 1 】

注射または注入に適した医薬剤形には、場合によりリポソームにカプセル化された、滅菌した注射もしくは注入可能な溶液または分散液の即時調製に適合された、活性成分を含む滅菌水溶液もしくは分散液または滅菌粉末が挙げられ得る。最終的な剤形は、製造および貯蔵の条件下で滅菌、流体および安定であるべきである。液体担体またはビヒクルは、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、液体ポリエチレングリコールなど）、植物油、非毒性グリセリルエステル、およびそれらの適切な混合物を含む溶媒または液体分散媒であってもよい。適当な流動性は、例えば、リポソームの形成、分散液の場合は必要とされる粒径の維持、または界面活性剤の使用により維持され得る。場合により、微生物作用の予防が、さまざまな他の抗菌剤および抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、チメロサルなどによりもたらされ得る。多くの場合、等張化剤、例えば、糖、緩衝液、または塩化ナトリウムを含むことが好ましい。注射可能組成物の持続吸収は、吸収を遅延させる薬剤、例えば、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンの包含によりもたらされ得る。

40

【 0 0 5 2 】

50

滅菌注射可能溶液は、必要量の本明細書に開示された化合物および／または薬剤を、上記に列挙されたさまざまな他の成分と共に適切な溶媒に組み込み、必要に応じて、その後に濾過滅菌することにより調製される。滅菌注射可能溶液の調製のための滅菌粉末の場合、調製の好ましい方法は、以前に滅菌濾過された溶液中に存在する活性成分および任意のさらなる所望の成分の粉末をもたらす、真空乾燥および凍結乾燥法である。

#### 【0053】

薬学的に許容される塩、水和物、プロドラッグ、それらのまたは誘導体を含む、本明細書に開示された化合物および組成物は、放出制御製剤で投与されてもよい。そのような組成物は、本タンパク質および誘導体の物理的状态、安定性、インピボ放出速度、およびインピボクリアランス速度に影響を与え得る。例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, 21st Ed. (2005, Lippincott, Williams & Wilkins, Baltimore, Md. 21201) pages 889-964および“Pharmaceutical dosage form tablets”, eds. Liberman et al. (New York, Marcel Dekker, Inc., 1989)を参照。これらの参考文献は、錠剤およびカプセル剤、ならびに錠剤、カプセル剤、および顆粒剤の遅延放出剤形を調製するための担体、材料、装置およびプロセスに関する情報を提供している。

#### 【0054】

放出制御組成物は、該組成物の投与後、全身への短期または長期放出のために作製され得る。該組成物は、液体形態、乾燥粉末（例えば、凍結乾燥）形態で、またはポリマーデバイス（ロッド、シリンダー、フィルム、ディスク）として調製されてもよい。マトリックスは、活性剤が固体ポリマーマトリックスまたはマイクロカプセル内で分散されるミクロスフェアなどの微粒子の形態であってもよく、微粒子においてコアはポリマーシェルとは異なる材料であり、本来は液体または固体であり得る活性剤がコア中に分散または懸濁される。あるいは、ポリマーは、ナノメートルから4センチメートルの範囲の薄いスラブもしくはフィルム、破碎もしくは他の標準的な手法により製造される粉末、またはさらにはヒドロゲルなどのゲルとして成型されてもよい。

#### 【0055】

非生分解性または生分解性マトリックスのどちらかが、開示された化合物の送達に使用されてもよいが、生分解性マトリックスが好ましい。これらは、天然または合成ポリマーであってもよい。ポリマーは、放出が望まれる期間に基づき選択される。いくつかの場合では線形放出が最も有用であり得るが、他の場合ではパルス放出または「バルク放出」がより有効な結果をもたらす得る。ポリマーは、ヒドロゲルの形態（典型的には水の約90重量%まで吸収）であってもよく、場合により多価イオンまたはポリマーと架橋されてもよい。

#### 【0056】

マトリックスは、溶媒蒸発、噴霧乾燥、溶媒抽出、および当業者に公知他の方法により形成することができる。生体侵食性ミクロスフェアは、例えば、Mathiowitz and Langer, J Controlled Release, 1987, 5:13-22; Mathiowitz, et al., Reactive Polymers, 1987, 6:275-283;およびMathiowitz, et al., J. Appl. Polymer Sci, 1988, 35:755-774に記載されているような、薬物送達用のミクロスフェアを作製するために開発された方法のいずれかを用いて調製することができる。

#### 【0057】

本明細書に開示された化合物および組成物、それに加えてそれらの薬学的に許容される塩、水和物、プロドラッグ、または誘導体などは、拡散または浸出機構（例えば、フィルムまたはゴム）のどちらかによる放出を可能にする不活性マトリックスに組み込まれてもよい。遅延崩壊マトリックス（slowly disintegrating matrix）も該製剤に組み込むことができる。放出制御の別の形態は、浸透圧効果により、水が単一の小さな開口部を通して侵入し、薬物を押し出せるようにする半透膜に薬物が封入されるものである。経口製剤に関して、放出の位置は、胃、小腸（十二指腸、空腸、または回腸）、または大腸であってもよい。好ましくは、放出は、活性剤（または誘導体）の保護により、または腸などに胃環境を超えて活性剤を放出することにより、胃環境の悪影響を回避する。完全な胃耐性を



確保するために、腸溶コーティング（すなわち、少なくとも pH 5.0 まで不透過性である）は不可欠である。これらのコーティングは、混合フィルムとして、または Banner Pharmacaps から入手可能なものなどのカプセル剤として使用することができる。

#### 【0058】

##### 方法

同様に、本明細書においては、血管疾患、肺高血圧症、および/もしくは肺動脈高血圧症を治療し、血管硬化を低減し、ならびに/またはそのような治療を必要としている対象の YAP / TAZ および/もしくは GLS1 媒介経路を阻害する方法が、提供される。方法は、本明細書に記載された1つもしくは複数の化合物または組成物の治療有効量を対象に投与することを含み得る。いくつかの例において、方法は、ベルテポルフィンまたはベルテポルフィンを含む医薬組成物の治療有効量を、対象に投与することを含む。いくつかの例において、方法は、ベルテポルフィン、その塩、プロドラッグ、もしくは誘導体、またはそれらの組合せの治療有効量を対象に投与することを含み得る。他のまたはさらなる例において、方法は、CB-839またはCB-839を含む医薬組成物の治療有効量を、対象に投与することを含む。いくつかの例において、方法は、CB-839の治療有効量を投与することを含み得る。したがって、本明細書に含まれるのは、ベルテポルフィンおよびCB-839の治療有効量を投与する方法であり、この治療有効性は、両方の組成物の投与に起因し得る。

#### 【0059】

これらの方法は、YAP / TAZ 機械的活性化と、好氣的解糖の状況で増殖に対する細胞のエネルギーニーズを調整するのに必要とされるグルタミノリシス酵素（glutaminolytic enzyme）GLS1 との重大なつながりがあることを実証する、本明細書に提供された新規結果を反映している。そのような分子的洞察は、血管コンプライアンスに対する単なる血行動態作用の試験を超えて、むしろ血管リモデリングおよびPH発生の特異的代謝原因として、血管硬化のパラダイムを前進させるものである。これらの結果は、YAP / TAZ を介した共通の調節ヒエラルキーを通じて一体につながったグルタミン代謝および好氣的解糖の両方を明らかにすることにより、直接的低酸素傷害を超えてPH自体における代謝軸の調節異常の基本的理解も変えるものである。最終的に、細胞外環境がどのように肺血管機能障害を指示するかの中核機構としてグルタミノリシスを置くことにより、これらの結果は、YAP1 - GLS1 軸を標的とする新規な治療法を開発するための、またはそれどころか、PHの既に承認されている薬物療法において再利用するための基盤を形成する。

#### 【0060】

最近の研究は、PHにおける血管硬化が、PHの初期のおよび強力な発病トリガーとなるという概念を前進させている。それにもかかわらず、血管増殖との関連を超えて、そのような機械的刺激により影響を受ける下流の分子経路の詳細な特徴付けは欠落している。あるいは、以前の研究は、PHにおける著明なミトコンドリア機能障害および代謝機能障害を実証しているが、そのような代謝イベントの複雑な開始トリガーは、特に低酸素傷害の直接の結果を超えるものは、とらえどころがない。今日まで、そのような代謝表現型は一つには低酸素症により引き起こされ、ピルビン酸デヒドロゲナーゼのピルビン酸デヒドロゲナーゼキナーゼ（PDK）媒介阻害を介した解糖スイッチをもたらすことが知られている。より最近のデータは、非コードRNA、骨形成タンパク質受容体2型（BMPR2）の機能喪失、およびサーチュイン3欠損を、PHにおける全体的なミトコンドリア機能障害と関連付けている。ここで、機械的活性化プロセスとしての、および好氣的解糖により同時調節されるグルタミノリシスの同定は、PHにおいて代謝再プログラミングでみられる調節ヒエラルキーの理解を前進させる。硬化と代謝との間のそのような接点は、マトリックスリモデリングに関連して腫瘍において提案された関連する再プログラミングイベントと類似する点がある。代謝調節異常との直接的な因果関係により、これはまた、単に末期の特徴というよりむしろ、この疾患の開始発病トリガーとしての血管硬化のパラダイム

10

20

30

40

50

も強化する。

【 0 0 6 1 】

血管硬化をグルタミノリシスおよび増殖と関連付ける機能的つながりの解明は、P Hの開始および進行中、多数の血管細胞タイプの間での細胞増殖、遊走、およびアポトーシス間の相互作用に対する基本的な洞察も提供する。他の生物学的関連において記載されているように、硬いマトリックスおよびY A P / T A Z活性化に応答したグルタミノリシスおよびアナプレロティック反応の増加は、特にP A S M Cにおける過剰増殖状態を持続する重要な代謝ニーズに応えるものであり、ゆえにP Hの病的血管リモデリングを引き起こす。P A S M Cを超えて、Y A P / T A Z - m i c r o R N A - 1 3 0 / 3 0 1フィードバックループが最近記載された。これによりマトリックス硬化は増大され、隣接する硬化マトリックスに接するナイーブ線維芽細胞の機械的活性化により、肺脈管構造およびおそらくさらには肺実質を通じて広がる。Y A P / T A Z活性化をグルタミノリシスと関与させる現在の知見を踏まえて、線維芽細胞におけるグルタミノリシスおよびアナプレロティック反応は、マトリックス硬化およびリモデリングの制御と本質的に関連している可能性がある。

10

【 0 0 6 2 】

一方で、硬化およびグルタミノリシスの役割は、P HにおけるP A E Cの依然として不完全に記載されている機能障害を制御する上で、より複雑とある可能性がある。今日まで、P H発病の引き金を引くことにおいてP A E Cアポトーシスは、口火を切る初期の役割を果たすと考えられている。最初のE Cアポトーシスは、次いで疾患進行に不可欠な過剰増殖性および病原性P A E Cの別個の集団を生じさせる。P A E Cアポトーシスおよび増殖のそのような時空間的均衡は、もともとV o e l k e lとその共同研究者によって記載され、それ以来他の人によって記載された。該知見は、P A E Cアポトーシスのこの動力学モデルと一致しており、傷害およびアポトーシスの開始の波は、そのすぐ後にY A P / T A Z - G L S 1活性化およびグルタミノリシスが続き、ゆえにその後、P A E Cの増殖を促進することを示している。特に、このモデルは、他の人によって報告されているように、特によりゆっくり進行するP Hの状況で、P H開始後のより後の時点でさえP A E Cアポトーシスの継続を除外するものではない。しかし、これらのアポトーシスイベントは、明白な血管硬化およびグルタミノリシスがさらにより顕著である場合、増殖性成分（P Hのより重度のモデルにおいてより多く見られることを本発明者らが見出している成分）以外の細胞で起きていなければならない。そのような増殖は、アポトーシスおよび増殖の均衡がP A E C集団でより顕著であったP Hのより初期段階（ラットにおけるモノクロタリン注射後のD 3 ~ D 7によって代表される、データは示されていない）のP A E C代謝回転の増加を反映している可能性がある。しかし、Y A P 1およびG L S 1上方制御が持続していた重度のP Hのより後の段階で、アポトーシスよりP A E C増殖が優位であることは明らかであった。この知見は、Y A P上方制御およびグルタミノリシスプロセスがP A E C様細胞の明らかな異常増殖を伴う、P A Hにおけるヒト網状病変の観察と相関している（データは示されていない）。内皮層が明らかに異常増殖されていない状況においてさえ、過剰増殖性抗アポトーシスP A E Cが、内皮間葉移行 - - 今やP H発病に直接関係しているプロセスであり、さらなる増殖により、内皮細胞が（単に内膜というよりむしろ）内側層の過形成に注ぎ込まれるようになる - - のために再プログラミングされる可能性はある。最後に、P A E Cにおける増殖能の増大と相関して、これらの知見は、マトリックス硬化およびY A P - G L S 1軸により促進された遊走促進性表現型（pro-migratory phenotype）も明らかにした（データは示されていない）。増殖および遊走の障害は、ヒト網状病変で観察されており、P Hにおける過剰増殖性P A E Cのより最近の研究は、付随する遊走性表現型を記載している。そのような遊走の障害は、P Hにおける異常な血管新生に寄与している可能性がある。異常な血管新生は、いくつかの場合では肺細動脈の血管新生促進性および病原性リモデリングに関連し、他の場合では血管新生不全、したがって肺血管樹全体の剪定に関連している。その結果、本明細書に記載された結果は、正確なタイミングで段階特異的な様式で多数の肺血管細胞表現型に影響を与える血管硬化、Y A P /

20

30

40

50

T A Z - G L S 1 軸、およびグルタミノリシスを P H 発病の中心点に置く。

#### 【 0 0 6 3 】

グルタミノリシスの中心的媒介因子としての Y A P / T A Z の機械的活性化も、一般に、海馬シグナル伝達による代謝の複雑な制御の理解を前進させる。特に、データは、少なくともマトリックス硬化に対する内因性応答の状態では、Y A P および T A Z が単独でなく両方一緒に、G L S 1、L D H A、および P C 発現に必要であることを示した ( 図 2 C ~ E )。それにもかかわらず、Y A P 1 単独の過剰発現は、これらの下流遺伝子を増加させることができるため ( 図 2 F ~ H )、Y A P 1 はこの表現型に関して十分であり、グルタミノリシスを調節する上でいくつかの冗長な機能を保持している可能性があることが結論される。しかし、この冗長性は、マトリックス硬化中に T A Z も上方制御される場合は明らかではなく、ゆえに T A Z と一緒に Y A P の活性は、硬条件下でグルタミノリシス誘導を可能にする優先的な協調関係を表すことを示唆している。さらに、以前の研究は、細胞エネルギー状態を、A M P キナーゼ活性化または好氣的解糖を介した Y A P / T A Z の転写活性の直接的促進のどちらかによる Y A P 活性の強力な調節因子として意味付けた。メバロン酸代謝も R h o G T P a s e を活性化し得、これが今度は Y A P / T A Z を脱リン酸化する。特に、Y A P 活性とグルタミン合成酵素 ( G S ) との間のつながりは、G S 発現が優位を占め得る肝臓において具体的に報告されている。それにもかかわらず、肺脈管構造などの他の組織区画では、これらの知見は、Y A P / T A Z が代謝シグナルにตอบสนองするという概念と補完的に、これらの因子を解糖経路およびグルタミノリシス経路を再プログラミングし、細胞増殖と調整する機械的センサーとしてより直接的に定義している。Y A P / T A Z と上流および下流代謝合図との間のこの相互関係は、この経路に固有の調節可能なフィードバック駆動特性を示唆するものであり、E C M リモデリング、P H サブタイプ、重症度、または経時段階の負荷に応じた代謝プログラムの個別化「チューニング」に部分的に関与し得る。さらに、Y A P / T A Z に影響を与える既知の環境合図の拡大するレパートリーを考えると、海馬シグナル伝達の代謝作用は、血管硬化または P H 単独よりさらに広範囲の影響にまで及んでいる可能性がある。確かに、臓器発生および腫瘍発生の観点から、増殖能を効率的なエネルギー生産と均衡させる一次機構としての、グルタミノリシスおよび解糖における海馬シグナル伝達の主要な調節的役割を推測したくなる。

#### 【 0 0 6 4 】

P H 疾病表現型 ( pathophenotype ) の重要な媒介因子としてのグルタミノリシスの同定は、この疾患において好氣的解糖を超えた本質的な調節代謝チェックポイントに注意を移している。結節制御ポイント ( nodal control point ) としての G L S 1 の同定は、一般にグルタミノリシスおよびアナプレロティック反応を、P H および癌の病因の全般的な類似性の根底にある重要な分子的決定因子として際立たせる。これらの知見は、グルタミントランスポーターなどのグルタミン処理の他の側面が関与している可能性があることも示唆し得る。さらに、G L S 1 を超えて、2 つのさらなる酵素 - L D H A およびピルビン酸カルボキシラーゼ - が、解糖およびアナプレロティック反応の硬化媒介変化における関連チェックポイントとしてここで同定された ( 図 1 )。これは、今後の特徴付けを待つ P H の代謝ランドスケープにわたるさらにより幅広いレベルの制御を示すものである。

#### 【 0 0 6 5 】

Y A P / T A Z - G L S 軸と H I V - P A H との機構的つながりも、P H のこの不可解な形態の病因に対する必要とされる洞察に寄与する。H I V 感染個体では P A H の有病率の増加が存在するが、H I V - P A H の分子的病因についてはほとんど知られていない。H I V または S I V 感染に続発する P A H の霊長類およびヒトモデルにおいて Y A P / T A Z および G L S の作用を確立することにより、これらの知見は、組織病理学的関連を超えて、P A H のこのサブタイプで活性な分子および細胞疾病表現型が他の P A H 形態と重複しており、同様の標的化治療法による治療に適する可能性があるという長く待ち望まれた証拠を提供する。

#### 【 0 0 6 6 】

最後に、P H におけるグルタミノリシスの機械的活性化の同定は、P H の新規な臨床管理

戦略を策定する土台づくりをする。これまで、ジクロロ酢酸によるPDKの薬理的阻害は、PHに関する臨床研究下の最も卓越した代謝標的化戦略であった。本明細書に記載した結果は、マトリックスリモデリングおよびグルタミノリシスに関連した一連の機能的につながりのある標的が、さらなるPHの治療法の開発に有望であると示すことを実証する。モノクロタリン曝露ラットにおけるBAPNによるPHの血行動態指数および組織学的指数の改善(図4)は、PH発病におけるコラーゲン架橋およびECMリモデリングの重要性を強化し、慢性低酸素PHにおいてLox(リシルオキシダーゼ)を阻害する先行研究と一致する。しかし、特異的Lox阻害剤単独の治療的使用は、冗長または補完的な機能を示し得るいくつかの他のリシルオキシダーゼの重要性が潜在的に原因となって、わずかな有効性(すなわち、右室リモデリングの改善、図4)に悩まされる可能性がある。それにもかかわらず、下流のYAP1-GLS1代謝軸の標的化と併用される場合、相加的またはおそらく相乗的治疗効果が、肺血管増殖およびリモデリングを阻害する上で出現し得る。YAP1阻害剤ベルテボルフィン単独を使用する場合、肺脈管構造の海馬シグナル伝達を変化させる代謝さえを超える多数の有益な効果の出現、および重度のげっ歯類PHの強固な改善(図4)を考えると、これはYAP1で特に顕著である可能性がある。

10

#### 【0067】

記載された化合物または組成物は、臨床反応に応じて必要な場合に調整され得る適切な投与量で最初に投与することができる。例えば動物テストで決定された予備用量、ヒト投与のための投与量の比例増減は、当技術分野で認められた慣例に従って行われる。例えば、マウスにおける、および他の動物、ヒトに対する有効投与量の推定方法は、当技術分野で公知である。例えば、米国特許第4,938,949号明細書、Freireich et al., Cancer Chemother Reports, 1966, 50(4):219-244を参照。毒性および治療有効性は、細胞培養または実験動物における標準的な薬学的手順(例えば、LD50(集団の50%に致死的な用量)およびED50(集団の50%において治療的に有効な用量)を決定するための)により決定することができる。毒性効果と治療効果との間の用量比は治療指数であり、比LD50/ED50として表すことができる。いくつかの例において、大きな治療指数を示す組成物が使用される。

20

#### 【0068】

治療有効用量は、細胞培養アッセイから最初は推定することができる。用量は、細胞培養アッセイまたは動物モデルで決定されたIC50(すなわち、症状の最大阻害の半分を達成する治療化合物の濃度)を含む循環血漿濃度範囲を達成する動物モデルで開発することができる。血漿中レベルは、例えば、ELISAまたはHPLCにより測定することができる。任意の特定の投与量の効果は、適切なバイオアッセイによりモニターすることができる。投与量の例は、約0.1×IC50、約0.5×IC50、約1×IC50、約5×IC50、10×IC50、約50×IC50、および約100×IC50である。

30

#### 【0069】

本明細書に記載された化合物の治療有効量の例は、化合物および症状の重症度に応じて約1μg/kg~約40mg/kgである。適切な治療有効用量は治療医により選択することができ、いくつかの例において約1μg/kg~約40mg/kg、約1μg/kg~約25mg/kg、約1μg/kg~約10mg/kg、約10μg/kg~約1mg/kg、約10μg/kg~約100μg/kg、または約100μg/kg~約1mg/kgの範囲である。さらに、動物におけるある特定の具体的な投与量が実施例に示される。

40

#### 【0070】

ベルテボルフィンに関して、有効量は約1mg/kg~約50mg/kg(例えば、約2.5mg/kg~約30mg/kgまたは約10mg/kg~約25mg/kg)の範囲であってもよい。有効用量はまた、当業者により認識されているように、投与経路、賦形剤使用、および他の治療剤の使用を含む他の治療的処置との併用の可能性に依存して異なる。いくつかの例において、ベルテボルフィン、その塩、プロドラッグ、もしくは誘導体、またはそれらの組合せの治療有効量は、1日あたり約10~25mg/kgである。

#### 【0071】

50

C - 9 6 8 および C B 8 3 9 に関して、有効量は約 1 m g / k g ~ 約 3 0 m g / k g ( 例  
えば、約 2 . 5 m g / k g ~ 約 2 0 m g / k g または約 5 m g / k g ~ 約 1 5 m g / k g )  
の範囲であってもよい。有効用量はまた、当業者により認識されているように、投与経  
路、賦形剤使用、および他の治療剤の使用を含む他の治療的処置との併用の可能性に依存  
して異なる。いくつかの例において、C - 9 6 8 または C B 8 3 9、それらの塩、プロドラ  
ッグ、もしくは誘導体、またはそれらの組合せの治療有効量は、1 日あたり約 1 0 m g  
/ k g である。

#### 【 0 0 7 2 】

投与量は、医師により決定することができ、必要に応じて、観察された治療効果に適合す  
るように調整することができる。組成物は、投与後、循環レベルを最大長時間最大化する  
ためにボーラス投与として与えられてもよい。連続注入も、ボーラス投与後に使用すること  
ができる。いくつかの例において、化合物または組成物は、2、3、4、または6 等用  
量の個別投与で投与されてもよい。例えば、1 日あたり約 2 5 m g / k g が 2、3、4、  
または 6 等用量の個別投与で投与されてもよい。別の例において、1 日あたり約 1 0 m g  
/ k g が 2、3、4、または 6 等用量の個別投与で投与されてもよい。

10

#### 【 0 0 7 3 】

本明細書に記載れた化合物または組成物は、短期および長期使用に適している。「短期使  
用」は、本明細書で使用される場合、開示された化合物または組成物の約 2 0 回投与以下  
の患者への投与を指し得る。したがって、用語「長期使用」は、本明細書で使用される場  
合、開示された化合物または組成物の約 2 0 回投与を超える患者への投与を指し得る。

20

#### 【 0 0 7 4 】

記載された化合物および組成物は、痛覚、炎症性、機能性、もしくは神経障害性疼痛の治  
療で使用する鎮痛剤、または抗炎症剤などの、単独または 1 つもしくは複数のさらなる  
治療剤と組み合わせて投与することができる。1 つまたは複数のさらなる治療剤は、それ  
だけで投与される場合、治療効果を生んでもまたは生まなくてもよいが、開示された化合  
物または組成物のいずれかと投与される場合、そのような効果 ( 例えば、疼痛低減 ) をも  
たらす。

#### 【 0 0 7 5 】

本明細書に記載れた 1 つまたは複数のさらなる治療剤ならびに化合物および組成物は、同  
時投与を含む任意の順番で、および最大数日離して時間的に間をあけた順番で投与すること  
ができる。本明細書に記載れた 1 つまたは複数のさらなる薬剤ならびに化合物および組  
成物の投与は、同じまたは異なる経路によってもよい。いくつかの例において、1 つまた  
は複数のさらなる薬剤は、本明細書に記載れた化合物および組成物と組み合わせられてもよ  
い。

30

#### 【 0 0 7 6 】

上記は本発明の好ましい実施形態に関すること、および数多くの変更が本発明の範囲から  
逸脱することなくその中でなされ得ることも理解されるべきである。本発明は、その範囲  
に制限を課していると決して解釈されるべきではない以下の例によってさらに例示される  
。それどころか、さまざまな他の実施形態、変更形態、およびそれらの同等物の手段があり得、  
本明細書の記載を読んだ後、本発明の趣旨および / または添付特許請求の範囲から  
逸脱することなく、当業者にこれらを示唆し得ることが明白に理解されるべきである。本  
明細書で参照される全ての特許、特許出願、および刊行物は、あらゆる目的のためにその  
全体が参照により組み込まれる。

40

#### 【 実施例 】

#### 【 0 0 7 7 】

#### [ 実施例 1 ]

#### 実験手順

#### 細胞培養および試薬

H E K 2 9 3 T 細胞 ( A m e r i c a n T y p e C u l t u r e C o l l e c t i o n ) を、1 0 % ウシ胎仔血清 ( F B S ) を含有する D M E M で培養した。初代ヒト肺動脈

50

内皮細胞 (P A E C) を E G M - 2 細胞培養培地 (L o n z a) で増殖させ、実験は 3 ~ 6 継代で行った。初代ヒト肺動脈平滑筋細胞 (P A S M C) を S m G M - 2 細胞培養培地 (L o n z a) で培養し、実験は 3 ~ 9 継代で行った。G L S 1 ( 2 , 3 ) : B P T E S (ビス - 2 - ( 5 - フェニルアセトアミド - 1 , 3 , 4 - チアジアゾール - 2 - イル) エチルスルフィド)、D O N ( 6 - ジアゾ - 5 - オキソ - L - ノルロイシン)、および C 9 6 8 (グルタミナーゼ阻害剤、化合物 9 6 8、5 - ( 3 - ブロモ - 4 - (ジメチルアミノ) フェニル) - 2 , 2 - ジメチル - 2 , 3 , 5 , 6 - テトラヒドロベンゾ[ a ]フェナントリジン - 4 ( 1 H ) - オン) の阻害剤は S i g m a - A l d r i c h から購入し、それぞれ 1 0 μ M、5 μ M および 1 0 μ M の濃度で使用した。グルタミン酸は S i g m a A l d r i c h から購入し、2 m M の濃度で使用した。アスパラギン酸は S i g m a A l d r i c h から購入し、1 0 m M の濃度で使用した。

10

【 0 0 7 8 】

#### オリゴヌクレオチドおよびトランスフェクション

Y A P としての O n T a r g e t P l u s s i R N A ( J - 0 1 2 2 0 0 - 0 7 および J - 0 1 2 2 0 0 - 0 5 )、T A Z ( W W T R 1 ; J - 0 1 6 0 8 3 - 0 5 および J - 0 1 6 0 8 3 - 0 6 )、G L S ( J - 0 0 4 5 4 8 - 0 9、s i - G L S \_ 1 ; J - 0 0 4 5 4 8 - 1 0、s i - G L S \_ 2 )、およびスクランブル対照 D - 0 0 1 8 1 0 - 0 1 および D - 0 0 1 8 1 0 - 0 2 ) は、T h e r m o S c i e n t i f i c / D h a r m a c o n から購入した。s i R N A 実験は、s i Y A P \_ 1 / T A Z \_ 1 または s i Y A P \_ 2 / T A Z \_ 2 のどちらかで得られた結果を代表する。P A E C、および P A S M C を コラーゲンコーティングプラスチック ( 5 0 μ g / m L ) にプレーティングし、製造元の指示書に従って、s i R N A ( 2 5 n M ) および L i p o f e c t a m i n e 2 0 0 0 試薬 ( L i f e T e c h n o l o g i e s ) を用いて、2 4 時間後に 7 0 ~ 8 0 % コンフルエンスでトランスフェクトした。トランスフェクション 8 時間後、細胞をトリプシン処理し、ヒドロゲルに再プレーティングした。

20

【 0 0 7 9 】

#### プラスミド

Y A P 1 コード配列を購入し ( A d d g e n e ; プラスミド # 1 8 8 8 1 )、E c o R I および N o t I 制限部位を用いて p C D H - C M V - M C S - E F 1 - c o p G F P ( S y s t e m B i o s c i e n c e s ) にサブクローニングした。G F P を発現するレンチウイルス親ベクターを対照として使用した。P A E C、および P A S M C におけるこれらの構築物の安定発現は、レンチウイルス導入により達成した。全てのクローン化プラスミドを D N A 配列決定により確認した。

30

【 0 0 8 0 】

#### レンチウイルス作製

H E K 2 9 3 T 細胞を、製造元の指示書に従って、パッケージングプラスミド ( p P A C K、S y s t e m B i o s c i e n c e s ) と一緒にレンチウイルスプラスミドで L i p o f e c t アミン 2 0 0 0 ( L i f e T e c h n o l o g i e s ) を用いてトランスフェクトした。ウイルスを回収し、滅菌濾過し ( 0 . 4 5 μ m )、遺伝子導入のための P A E C、および P A S M C のその後の感染に利用した ( 2 4 ~ 4 8 時間インキュベーション)。

40

【 0 0 8 1 】

#### メッセンジャー RNA 抽出

細胞を 1 m l の Q i a Z o l 試薬 ( Q i a g e n ) 中でホモジナイズした。全 RNA 含量を、製造元の指示書に従って m i R N e a s y キット ( Q i a g e n ) を用いて抽出した。全 RNA 濃度は、N D - 1 0 0 0 マイクロ分光光度計 ( N a n o D r o p T e c h n o l o g i e s ) を用いて決定した。

【 0 0 8 2 】

#### メッセンジャー RNA の定量 R T - P C R

メッセンジャー RNA を、M u l t i s c r i p t R T キット ( L i f e T e c h n o

50

logies)を用いて逆転写してcDNAを生成した。cDNAは、Applied Biosystems 7900HT Fast Real Time PCR デバイスを用いて蛍光標識Taqmanプライマーセットにより増幅させた。2つのGLS1アイソフォーム、KGAおよびGACの相対発現量を特異的に決定するために、TaqMan遺伝子発現アッセイ、Hs01014019\_\_m1およびHs01022166\_\_m1をそれぞれ使用した。RNA種の倍数変化を式( $2^{-C_t}$ )を用いて算出し、RPLP0発現に対して正規化した。

【0083】

#### ChIP - qPCR

PAECをプラスチック上で48時間培養した。細胞は2mMグルタル酸ジスクシンイミジル(DSG)と45分間、次いで1%パラホルムアルデヒドに室温で15分間、二重架橋した。固定化細胞を、0.05%Triton X100、2.5%グリセロールを含有し、1xプロテアーゼ阻害剤カクテル(Roche)を補充した10mlの溶解緩衝液1[50mM HEPES(pH7.5)、140mM NaCl、1mM EDTA、0.1%IGEPAL 630(Sigma Aldrich)]に氷上で10分間溶解し、その後緩衝液2[プロテアーゼ阻害剤を含む0.1M Tris HCl(pH8)および200mM NaCl]中、室温で15分間インキュベートした。クロマチンを振幅30%で10分間(1分の10サイクル)超音波処理した。試料を遠心分離し(2x14,000g、各5分間)、可溶性クロマチンを新鮮なチューブに移した。超音波処理後の架橋DNAを、5μgの抗YAP1抗体(sc-15407X、Santa Cruz Biotechnology)または非免疫ウサギIgG(ab27472、Abcam)で一晩、4℃で沈殿させた。クロマチン/抗体複合体をPureProteome(商標)Protein G Magnetic Beads(Millipore)でプルダウンし、低塩および高塩緩衝液で洗浄した。架橋反転(65℃、4時間)およびプロテイナーゼK処理後、クロマチンをフェノール-クロロホルム抽出およびエタノール沈殿により精製した。沈殿したDNAを、予測したTEAD結合部位または非関連ゲノム領域(対照)用に生成したプライマーを用いてqPCRにより分析した。

【0084】

#### マイクロアレイ

PAECをsiRNA対照(si-NC)またはGLS1に対するsiRNA(si-GLS\_\_1)でトランスフェクトし、軟らかいヒドロゲル(1kPa)または硬いヒドロゲル(50kPa)で培養した。トランスフェクション48時間後、細胞を溶解し、RNAを、Affymetrixマイクロアレイ(HuGene 2.0 ST)でのハイブリダイゼーションのために製造元の指示書に従って抽出した。簡単には、全RNAを、PAEC細胞からmiRNeasyキット(Qiagen)を用いて製造元の指示書に従って抽出した。全RNA濃度は、ND-1000マイクロ分光光度計(NanoDrop Technologies)を用いて決定した。ビオチン化cDNAは、WT Plus増幅キット(Affymetrix)を用いて100ngの全RNAから調製した。断片化後、5.5μgのcDNAをGeneChip Human Gene 2.0 ST Array(Affymetrix)にハイブリダイズした。GeneChipsを洗浄し、Affymetrix Fluidics Station 450で染色し、Affymetrix GeneChip Scanner 3000 7Gを用いてスキャンした。生データをAffymetrix Expression ConsoleでRMAを用いて正規化し、対数形質転換シグナル強度として表した。

【0085】

#### 経路濃縮分析

一元配置ANOVA検定を遺伝子ごとに使用して、軟らかいおよび硬いマトリックスバックグラウンドの両方でsi-GLS1処理とビヒクル処理PAECとの間の差次的発現をテストした。差次的に発現された遺伝子は、0.05のp値カットオフおよび1.5の倍数変化カットオフに基づき選択した。差次的に発現された遺伝子の経路濃縮は、Cyto

10

20

30

40

50

scape 2.8.1環境でReactome FI分析ツールを用いて行った(4)。経路ごとのヒートマップを、TM4 MultiExperiment Viewerを用いて生成した(5)。

#### 【0086】

##### 免疫プロットティングおよび抗体

細胞をLaemmli緩衝液(Boston BioProducts)に溶解した。タンパク質溶解物をSDS-PAGEにより分離し、PVDF膜(Biorad)に移した。膜をTN緩衝液(50mM Tris-HCl pH7.4、150mM NaCl)中5%無脂肪乳、またはTN緩衝液中5%BSAで遮断し、一次および次いで二次抗体の存在下でインキュベートした。0.1%Tweenを含有するTN緩衝液で洗浄後、免疫反応性バンドをECLシステム(Amersham Biosciences)で可視化した。YAP1(#4912; 1/1000)およびYAP/TAZ(#8418; 1/1000)の一次抗体は、Cell Signalingから入手した。GLS1(ab156876; 1/1000)、PC(ab115579; 1/1000)、LDHA(ab47010; 1/1000)の一次抗体は、Abcamから入手した。チューブリンの一次抗体(T4026; 1/5000)は、Sigma Aldrichから入手した。TAZの一次抗体(sc-48805)は、Santa Cruz Biotechnologyから入手した。HRPに結合した適切な二次抗体(抗ウサギ、抗マウス、および抗ヤギ)を使用した(Dako)。

#### 【0087】

##### 免疫蛍光

さまざまな示された処理の後、培養細胞をPBS/PFA 4%で10分間固定し、PBS/Triton 100x0.1%で10分間透過処理した。細胞を次いで抗PCNA(#4912; 1/100; Invitrogen)、抗Ki67(ab15580; 1/200; Abcam)、および/または抗切断カスパーゼ-3(1/200; Cell Signaling)と室温で2時間インキュベートした。Alexa-594および/またはAlexa-488(Thermo Scientific)と結合した二次抗体を1/500で使用した。核をDAPI(Sigma)と対比染色した。

#### 【0088】

##### 細胞計数アッセイ

示された規定の前処理またはトランスフェクションプロトコル後、PAECまたはPASMCを、1ウェルあたり30,000細胞で6ウェルプレートに3通りにプレーティングした。細胞を接着させるために一晚インキュベーションした後、6ウェルを計数して処理時点の最初の計数を決定した(グルタミン酸、アスパラギン酸、BPTES、DON、またはC968)。2日、4日、または6日後、ウェルの内容物をトリプシン処理し、計数し、増殖率を算出した。

#### 【0089】

##### BrdU増殖アッセイ

指数関数的に増殖する細胞を、示されたマトリックスに48時間プレーティングした。増殖アッセイのために、5-プロモ-2-ウリジン(BrdU)を細胞培養培地に1時間添加し、DNAに組み込まれたBrdUを、検出キット(BrdU Cell Proliferation Assay Kit #6813、Cell Signaling)を用いて明らかにした。

#### 【0090】

##### スクラッチアッセイ

集密なPAECにピペット先端を用いて傷をつけ、その後創傷床閉鎖(wound bed closure)を10時間にわたって連続的に行った。明視野像を、Metamorph Software(Roper Scientific)により管理されたCoolSNAPHQ CCD Cameraで106位相差対物レンズにより1時間ごとに撮影した。創傷床領域を、NIH ImageJソフトウェア(<http://rsb.info.nih.gov/ij/>)を用いて定量

10

20

30

40

50



化した。

【0091】

#### ミトコンドリア電位測定

以前に記載されているように(6)、細胞を2 nM TMRM (テトラメチルローダミンメチルエステル、Life Technologies)およびヘキスト(0.1 μg/ml)で30分間、37℃で染色した。1ウェルあたり5~8枚のランダム画像を、Nikon TE2000落射蛍光顕微鏡を用いて記録した。画像ごとの平均細胞蛍光強度をNIH Image Jソフトウェアを用いて決定した。

【0092】

#### カスパーゼ3/7アッセイ

カスパーゼ3/7活性は、Caspase-Glo 3/7 Assay (Promega)を用いて製造元の指示書に従って定量化した。簡単には、細胞を異なる硬さのヒドロゲルにプレATINGし、記載されているように処理した。プレATINGの24時間後、細胞を血清の存在下または非存在下で24時間培養した。細胞を次いで溶解し、10 μgの全タンパク質をカスパーゼ基質と1時間インキュベートし、発光をプレートリーダー(Synergy HTXマルチモードリーダー、Biotek)により定量化した。

【0093】

#### 動物

モノクロタリン治療ラット：本発明者らが以前に記載したように(7、8)、オスのSprague-Dawleyラット(10~14週齢)に60 mg/kgモノクロタリンを0時点で注射し、曝露後0~4週時点で右心カテーテル検査を行い、その後肺組織を、以下に記載するように(セクション：組織回収)、RNA抽出またはパラフィン包埋のために回収した。

【0094】

サル免疫不全ウイルス感染アカゲザル：以前に記載されているように(9)、アカゲザル(RM)、6~10歳は、国立霊長類センターまたはピッツバーグ大学の実験動物研究部門により承認された供給業者から入手した。マカクにSIV B670 (M. Murphy-Corb、ピッツバーグ大学の贈与)を静脈内接種した。血漿ウイルス量および末梢血CD4<sup>+</sup> T細胞を、定量RT-PCRおよびフローサイトメトリーにより決定した。肺動脈カテーテル検査を感染前に行い、感染の6カ月および10~12カ月後に繰り返した。さらに、肺組織を剖検中に得、サルの正体を盲検化された獣医病理学者により肺動脈が調べられた。

【0095】

#### 血漿からの代謝産物抽出

以前に公開されたプロトコル(10)に従って、代謝産物を、内部標準(ISTD)を添加した80 μL低温メタノール100%を添加して20 μLの血漿から抽出した。

【0096】

#### ラット肺血管内皮細胞の単離

以前に報告されているように(8、11)、ラットからの肺葉組織をはさみでさいの目に切り、200 μLのコラゲナーゼD溶液(Sigma)を添加し、4.8 mL HEPES緩衝液(pH=7.4)中、2 mg/mLコラゲナーゼDの最終濃度にした。自動回転で37℃、30分間インキュベーションした後、20 μLのDNase I (Sigma、80 U/mL DNase Iの最終濃度)を添加し、氷上で30分間インキュベートした。溶液を、70 μm細胞ストレーナー(BD Biosciences)により2回濾過して単一の細胞懸濁液を得た。2ラウンドのPBS洗浄、細胞ペレット化、および再懸濁後、ACK溶解緩衝液(Gibco)を使用して赤血球を除去した。残った細胞を、マウス抗ラット-CD31抗体(BD Pharmingen 555025)と4℃で30分インキュベートした。細胞を2回PBS洗浄し、製造元のプロトコルに従って抗マウスIgG1マイクロビーズ(Miltenyi Biotec)と15分インキュベートした。単一CD31陽性細胞を、次いでautoMACS Pro Separatorを用

10

20

30

40

50

いて製造元の指示書 (Miltenyi Biotec) により回収した。CD31 陽性細胞の純度 (>95%) を、FITCコンジュゲート抗CD31 (ab33858、Abcam) による細胞標識後に、FACScanフローサイトメーター (BD Biosciences) によるフローサイトメトリー分析により確かめた。

【0097】

#### ラット肺の組織回収

直接右室穿刺による生理学的測定後、肺血管を1ccの生理食塩水で優しく流して、心肺組織を回収する前に血液細胞の大部分を除去した。心臓を除去し、その後右室 (RV) および左室 + 中隔 (LV + S) を切開および秤量した。臓器を次いで組織プレパラート用に回収し、またはその後のRNAおよび/もしくはタンパク質のホモジナイズあるいは抽出のために液体N<sub>2</sub>に急速冷凍した。肺組織を特異的にさらに処理するために、切除前に、肺にPBSを右室カニューレ挿管により一定低圧 (約10mmHg) で流し、その後約20cm H<sub>2</sub>Oの圧力で10%中性緩衝液ホルマリン (Sigma-Aldrich) を用いて左肺の気管膨張を行なった。切除、および25%、10%中性緩衝ホルマリン中で16時間固定後、肺組織を、5μm切片にスライスする前にエタノール - キシレン脱水シリーズによりパラフィン包埋した (Hyercenter XP SystemおよびEmbedding Center, Shandon)。

【0098】

#### GLS1活性アッセイ

製造元の指示書に従って (Glutaminase Microplate Assay Kit, Cohesion Biosciences)、急速冷凍ラット肺組織 (0.1g / 試料) を氷上の1mLのアッセイ緩衝液中でホモジナイズし、8000gで4分、10分間遠心分離した。タンパク質濃度をブラッドフォードアッセイにより決定した。総タンパク質 (100μg) に対して正規化した試料を、キット試薬と37°Cで1時間インキュベートし、吸光度を420nmで測定した。

【0099】

#### 肺切片の免疫組織化学および免疫蛍光

肺切片 (5μm) を脱パラフィンし、高温抗原回復を行い、その後TBS / BSA 5%、10%口バ血清で遮断し、免疫組織化学については一次抗体およびビオチン化二次抗体 (Vectastain ABCキット、Vector Labs)、または免疫蛍光についてはAlexa 488、568および647コンジュゲート二次抗体 (Thermo Fisher Scientific) に曝露させた。YAP1に対する一次抗体 (#4912; 1/200またはsc101199; 1/50) は、それぞれCell SignalingおよびSanta Cruz Biotechnologyから入手した。GLS1に対する一次抗体 (ab156876; 1/100)、PC (ab115579; 1/100)、LDHA (ab47010; 1/200)、およびα-SMA (ab32575; 1/1000) は、Abcamから購入した。CD31に対する一次抗体 (sc-1506; 1/100) は、Santa Cruz Biotechnologyから購入した。PCNAに対する一次抗体 (13-3900、1/100) は、Thermo Fisher Scientificから購入した。ほとんどの場合、発色はストレプトアビジン - ビオチン化アルカリホスファターゼ複合体 (Vector Labs) と、それに続くVector Redアルカリホスファターゼ基質溶液 (Vector Labs) を添加して達成した。レバミゾールを添加して内因性アルカリホスファターゼ活性 (Vector Labs) を遮断した。写真を、Olympus Bx51顕微鏡またはZEISS LSM Exciter共焦点顕微鏡を用いて得た。所与の組織切片 (>10血管 / 切片) に存在する、気管支気道とは関係ない肺小血管 (直径 < 100 μm) を分析 (N > 5匹 / 群) のために選択した。染色の強度を、ImageJソフトウェア (NIH) を用いて定量化した。肺細動脈筋肉化の程度を、以前に記載されているように (12)、全末梢肺細動脈に対する完全および部分的に筋肉化した末梢 (直径 < 100 μm) 肺細動脈の割合の算出により、α-SMAについて染色したパラフィン包埋肺切片で評価した。全

10

20

30

40

50

での測定は条件を盲検化して行った。

【0100】

#### 原子間力顕微鏡法

ラット肺を、体重 g 単位で 0.025 g の OCT で膨張させ、液体窒素蒸気で凍結し、-80 で貯蔵した。ラット肺スライス (10  $\mu$ m 厚) をガラススライドから切り取り、試料を含有するガラス断片を 50 mm 皿 (Willco のガラス底培養皿) の底に接着させた。測定前にまず試料をすすぎ、その後 4 ml の PBS で 1 回被覆した。試料の機械的特性を、位相差により目的とする領域を正確に示すことができる光学顕微鏡 (Leica DMI 6000 B) と連結した BioScope Catalyst 原子力顕微鏡 (Bruker) を用いて試験した。各試料に対して、5 本から最大 9 本の血管 (直径 < 100  $\mu$ m) を、ちょうど同じ数の離散点で 35 ~ 80 の力 - 距離曲線から集める「自動露出 (Point and Shoot)」法を用いて分析した。微小押込み実験を、ホウケイ酸ガラス球状チップ (直径 5  $\mu$ m) を備えたプローブおよび名目ばね定数 0.06 N/m を有するカンチレバー (Novascan) を用いて PBS で行った。押込みは、相対トリガーモードおよびトリガー閾値を 2 nN に設定して、2  $\mu$ m / 秒の速度を用いて実施した。見かけのヤング率を、力曲線を Hertz の球圧子押込みモデルにフィットさせ、およびポワソン比 0.4 を用いて、NanoScope Analysis 1.50 ソフトウェア (Bruker) を用いて算出した。大きな押込みを避けるために、力曲線全体のそれぞれ 5 % および 25 % の最小および最大 Force Fit Boundary を該フィットに対して考慮した。

【0101】

#### ピクロシリウスレッド染色および定量化

ピクロシリウスレッド染色は、0.1 % ピクロシリウスレッド (Direct Red 80, Sigma-Aldrich) で染色した 5  $\mu$ m パラフィン切片の使用により達成し、ワイゲルトヘマトキシリンで対比染色して線維性コラーゲンを明らかにした。切片を、次いで互いに平行および直角に配向された分析器および偏光子を用いて連続的に撮像した。顕微鏡条件 (ランプ輝度、コンデンサ開口部、対物レンズ、ズーム、曝露時間、およびゲインパラメーター) は、全ての試料のイメージングを通じて維持した。最小閾値は、線維構造を表す直角に配向された偏光子を通過する (すなわち、黒いバックグラウンドからの残留光を除外する) 光のみを含めた、各実験の適切な対照切片に設定した。閾値は、各実験内の全条件にわたって全ての画像について維持した。閾値光により覆われた移動領域の面積を算出し、1 条件につき少なくとも 10 切片 / 血管をまとめて平均化した (NIH ImageJ ソフトウェア)。標的 LC - MS / MS

【0102】

代謝産物抽出は、若干変更して基本的に記載されているように行った (35)。簡単には、代謝産物は、-80 で予冷した 80 % 水性メタノールを用いてドライアイス上で培養細胞および CD31 + 細胞から抽出した。20,000  $\times$  g で 4、10 分間の遠心分離によりプレクリアした血漿から代謝産物を抽出した。上清を、-80 で予冷した 4 つの容積の 100 % メタノールを用いて 4 時間、-80 で抽出した。代謝産物抽出中に内部標準、[<sup>13</sup>C<sub>4</sub>] - 2 - オキソグルタレート (Cambridge Isotope Laboratories) を添加した。細胞および血漿抽出物の両方からの不溶性材料は、20,000  $\times$  g で 4、15 分間の遠心分離により除去した。以前に記載されているように (36)、上清は標的 LC - MS / MS により分析した。代謝産物を、ZIC - HILIC 固定相 (150 mm  $\times$  2.1 mm  $\times$  3.5 mm; Merck) を用いて分離した。MS パラメーターはグルタミン標準溶液を用いて最適化した。モニターした質量移行は、87 > 87 (ピルビン酸)、115 > 73 + 99 (コハク酸)、132 > 88 (アスパラギン酸)、145 > 101 (2OG)、145 > 127 (グルタミン)、146 > 128 (グルタミン酸)、および 149 > 105 ([<sup>13</sup>C<sub>4</sub>] - 2OG) であった。質量移行および保持時間ウィンドウは、そのままのおよびマトリックススパイク標準の分析により確かめた。ピーク面積を Xcalibur Software (Thermo) により

定量化し、手作業で見直した。

#### 【0103】

##### 細胞外フラックス分析

P A E C ( 3 0 , 0 0 0 細胞 / ウェル ) または P A S M C ( 5 0 , 0 0 0 細胞 / ウェル ) を、20  $\mu$  L の軟らかいまたは硬いゲル ( 「補足」に記載された ) でプレコーティングした Seahorse Bioscience 24 ウェルプレートにプレコーティングした。附着させるために一晩インキュベーション後、細胞をアッセイ培地 ( フェノールレッドなしの D M E M または 0 . 5 % 透析 F B S および 0 . 1 m g / m L ウリジン、p H 7 . 4 を含有するピルビン酸 ; Seahorse Biosciences により製造 ) で 2 回洗浄し、500  $\mu$  L の新鮮アッセイ培地でインキュベートした。酸素消費速度 ( O C R ) および細胞外酸性化速度 ( E C A R 、解糖の代理マーカー ) を X F 2 4 または X F e 2 4 Analyzer ( Seahorse Biosciences ) で測定した。ミトコンドリアおよび解糖ストレスアッセイを製造元のプロトコールに従って行った。O C R および E C A R を、アッセイ終了後に測定した細胞計数に対して正規化した測定した。

10

#### 【0104】

##### P H ラットにおける Y A P 1 の阻害

P H を誘導するために、オスの S p r a g u e - D a w l e y ラット ( 1 0 ~ 1 4 週齢 ) に 6 0 m g / k g モノクロタリン ( S i g m a - A l d r i c h ) を腹腔内注射した。2 日後、ラットは、5 % ジメチルスルホキシド ( D M S O 、 S i g m a - A l d r i c h ) に可溶化した 2 5 m g / k g のベルテポルフィン ( A c t i v e B i o c h e m i c a l s C o m p a n y , L t d ) で毎日腹腔内注射を受けた。モノクロタリン注射後 2 1 日目に最後の注射をした 2 日後、右心カテーテル検査を行い、その後、本発明者らが記載したように ( 2 ) 、RNA もしくはタンパク質抽出、パラフィン包埋、または O C T ( S i g m a - A l d r i c h ) による凍結保存のために、肺組織および C D 3 1 + 細胞を回収した。

20

#### 【0105】

##### P H ラットにおける G L S 1 の阻害

P H を誘導するために、オスの S p r a g u e - D a w l e y ラット ( 1 0 ~ 1 4 週齢 ) に 6 0 m g / k g モノクロタリン ( S i g m a - A l d r i c h ) を腹腔内注射した。2 日後、C 9 6 8 ( 1 0 m g / k g 、 S i g m a - A l d r i c h ) の連続腹腔内注射を毎日与え、モノクロタリン注射後の 7 日後、C B 8 3 9 ( 1 0 m g / k g 、 S e l l e c k C h e m i c a l s ) の連続腹腔内注射を毎日与えた。モノクロタリン注射後 2 1 日目に最後の注射をした 2 日後、右心カテーテル検査を行い、その後、本発明者らが記載したように ( 2 ) 、RNA もしくはタンパク質抽出、パラフィン包埋、または O C T ( S i g m a - A l d r i c h ) による凍結保存のために、肺組織および C D 3 1 + 細胞を回収した。

30

#### 【0106】

##### ヒト対象

インフォームドコンセントは全ての試験手順に対して得た。ホルマリン固定パラフィン包埋肺試料に関して、ヒト P H 標本を未使用または廃棄された外科試料 ( 表 2 ) から回収した。そのいくつかを、本発明者らは以前に記載しており ( 3 7 ) 、N e w E n g l a n d O r g a n B a n k からの非疾患ヒト肺標本が記載されている ( 3 8 ) 。図 8 E ~ G に記載された血漿回収および分析に関して、臨床的に重大な呼吸困難を有し、B r i g h a m a n d W o m e n ' s H o s p i t a l 、ボストン、M A 、U S A で右心カテーテル検査を受けている個人を選択した ( 表 3 、その何人かを ( 2 6 ) に記載した ) 。平均肺動脈圧の上昇 > 2 5 m m H g ( m P A P ) により定義された臨床 P H の存在または非存在により、対象を層別化した。肺動脈コンプライアンスの測定に関して、4 2 人の H I V 感染個体のコホートが、H I V 感染者における肺疾患の進行中の研究の一環としてピッツバーグ大学、ピッツバーグ、P A 、U S A で肺動脈カテーテル検査を受けた。P A H ( m P A P > 2 5 m m H g ) の診断は、1 1 人の個体で行った ( 表 4 ) 。これらの侵襲血行動態測定に基づき、肺動脈コンプライアンスを 1 回拍出量 / 脈圧により算出した。最後に、循環

40

50

代謝産物（表 5）について末梢血漿を分析したヒト対象において、文書に記録された P A H あり（侵襲肺動脈カテーテル検査（m P A P > 2 5 m m H g）により評価）、または P A H なし（侵襲肺動脈カテーテル検査（m P A P < 2 5 m m H g または肺動脈収縮期圧 < 4 0 m m H g の非侵襲的心エコー推計）で評価）のどちらかの H I V 感染個体の別のコホートを、カリフォルニア大学、サンフランシスコ校、サンフランシスコ、C A、U S A で補充した。

【 0 1 0 7 】

#### ヒト血漿試料採取

主肺動脈から対象由来の血液を採取するために、臨床適応右心カテーテル処置を、以前に記載されているように（ 3 7 ）蛍光透視ガイド下で右内頸静脈アプローチによる標準的なプロトコールにより行った。カテーテルを、蛍光透視および血行動態波形により確かめた主肺動脈に配置した。次いで、血液を遠位カテーテルポートから引き出し、K + - E D T A 抗凝固薬を含む標準的なバキュテナーチューブに採取した。血漿を血液の標準的な遠心分離後に抽出し、その後 - 8 0 で貯蔵した。本発明者らが以前に記載したように（ 4 0 ）、静脈末梢血を H I V 陽性対象から採取するために、静脈血を標準的な抗凝固薬（E D T A）処置バキュテナーチューブに採取した。細胞要素を、血液採集後、血液試料ごとに 2 0 0 0 × g で 1 0 分間の遠心分離によりベレット化した。上清血漿を次いで等分し、- 8 0 で直ちに凍結した。

【 0 1 0 8 】

#### 統計

細胞培養実験は、反復ごとに少なくとも 3 回および少なくとも 3 通りに行った。各群の動物の数を算出して、パワー 8 0 % および標準偏差 1 0 % で実験群と対照群との間の平均の少なくとも 2 0 % 差を測定した。この試験に固有の患者試料の数は、主に臨床的利用可能性により決定した。げっ歯類およびヒト組織の両方のインサイチュ発現 / 組織学的分析、ならびにマウスおよびラットの肺血管血行動態は、盲検様式で行った。培養細胞を用いたインビトロ実験の数値定量化または転写 / m i R N A 発現のインサイチュ定量化は、平均 ± 標準偏差（S D）を表す。げっ歯類またはヒト試薬を用いた生理学的実験の数値定量化は、平均 ± 平均の標準誤差（S E M）を表す。免疫プロット画像は、少なくとも 3 回反復された実験を代表している。顕微鏡写真は、各関連コホートの実験を代表している。データ分布の正規性はシャピロウィルク検定により決定した。対試料を、正規分布データについては両側 S t u d e n t t 検定により比較し、非正規分布データについてはマンホイットニー U ノンパラメトリック検定を使用した。群間の比較には、一元配置 A N O V A および事後テューキー検定を行った。0 . 0 5 未満の P 値を有意と見なした。

【 0 1 0 9 】

#### [実施例 2]

#### 機械的刺激は肺血管内皮および平滑筋細胞における代謝再プログラミングを調節する

E C M 硬化により伝えられた機械的 / 物理的合図が、血管細胞代謝を調節するかどうかを決定するために、軟らかいまたは硬いマトリックス上での培養により肺血管細胞タイプの代謝スクリーニングを行った。細胞外フラックス分析により、酸素消費速度（O C R）および細胞外酸性化速度（解糖の代理マーカー）を肺動脈内皮細胞（P A E C）で評価した。細胞外酸性化速度定量化に反映されるように、E C M 硬化は、解糖予備能を同時に低下させながら、オリゴマイシン A 誘導細胞外酸性化速度と基礎細胞外酸性化速度との間の差として算出した基礎解糖を増加させた（データは示されていない）。ゆえに、硬いマトリックス上の細胞は、軟らかいマトリックス上の細胞と比べて最大速度により近い解糖フラックスを示した。あるいは、E C M 硬化の増大は、基礎 O C R、A T P 依存性 O C R（基礎 O C R とオリゴマイシン A 阻害 O C R との間の差）、および最大 O C R（カルボニルシアニド - p - トリフルオロメトキシフェニルヒドラゾン、F C C P を介する誘導に反映された）を有意に低下させ、ゆえにミトコンドリアの酸化的リン酸化の減少を反映した。これらの代謝変化に対応して、硬いマトリックスは、全体のミトコンドリア電位を低下させた（データは示されていない）。類似の結果が肺動脈平滑筋細胞（P A S M C）について

観察された（データは示されていない）。まとめると、硬条件は、機械的刺激として作用して解糖を増加させ、ミトコンドリアの酸化的リン酸化を減少させる。

#### 【0110】

これらの同じ機械的条件下の解糖の活性、アナブレロティック反応、およびTCA回路を決定するために、候補細胞内アミノ酸および代謝産物を、PAECで液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析(LC-MS/MS)により測定した。硬条件での解糖の増加および酸化的リン酸化の減少と一致して、乳酸/ピルビン酸比の増大が観察された。さらに酸化的リン酸化の減少と一致して、硬いマトリックスはコハク酸レベルを低下させ、乳酸生産を増加させた（データは示されていない）。重要なことには、ECM硬化は、解糖の加速に付随する推定アナブレロティックプロセスと一致するグルタミン酸およびアスパラギン酸の強固な増加を伴う細胞内グルタミンも減少させた。解糖(LDHA)およびアナブレロティック反応(GLS1およびPC)の両方に関与する、PAEC中の3つの重要な酵素-乳酸デヒドロゲナーゼA(LDHA)、両方のGLS1アイソフォーム(KGAおよびGAC)、およびPCのレベルは、硬いマトリックスで上昇した（データは示されていない）。上記のように、類似の結果がPASCについて得られた（データは示されていない）。ゆえに、硬いマトリックスへの曝露は、解糖および酸化的リン酸化を変えるだけでなく、アミノ酸のアナブレロティック補給も制御する。

10

#### 【0111】

##### [実施例3]

ECM硬化はYAP/TAZに依存して代謝を制御する。

20

YAPおよびTAZは肺血管細胞の機械センサーとして作用するという先行知見を考慮して、YAP/TAZが代謝再プログラミング時のECM硬化の結果を調節する上で重要かどうかを決定した。硬いマトリックス中のPAECでは、YAP/TAZノックダウン(図2A)は乳酸/ピルビン酸比を低下させた(図2B)。これは、解糖に対するその制御を反映するものである。YAP/TAZノックダウンは、グルタミン、グルタミン酸、およびアスパラギン酸生産に対する硬いECMのアナブレロティック作用も鈍化させた(図2C)。それに応じて、ミトコンドリアの膜電位も、硬いマトリックスにおけるYAP/TAZノックダウン中に持続された（データは示されていない）。逆に、軟らかいマトリックスで増殖させたPAECでは、YAPの安定発現(pYAP)は乳酸/ピルビン酸比を増大させ、グルタミンを減少させ、グルタミン酸およびアスパラギン酸を増加させ、その結果、ミトコンドリアの膜電位を低下させた（データは示されていない）。特に、PAECの硬いECMにより機械的に制御された解糖およびグルタミノリシスの同じ経路は、PASCのYAP/TAZにより活性化された（データは示されていない）。

30

#### 【0112】

YAP/TAZ複合体のいくつかの推定結合部位(TEAD部位)を、解糖およびグルタミノリシスに関与する重要な代謝酵素-LDHA、GLS1、およびPCのプロモーター領域の配列分析により明らかにした(図2A)。ChIP-qPCRは、各遺伝子の少なくとも1つの部位におけるYAPの直接結合を実証した(図2B)。それに応じて、PAEC(図2C~E)およびPASC(データは示されていない)におけるYAP/TAZのsiRNAノックダウンは、標的遺伝子発現を減少させたが、軟らかいマトリックス中のPAECにおける強制YAP発現は、そのレベルを増大させた(図2F~H)。まとめると、YAP/TAZは、ECM硬化により開始される機械誘発性解糖およびグルタミノリシス代謝再プログラミングイベントに不可欠である。

40

#### 【0113】

##### [実施例4]

GLS1発現およびグルタミノリシスの増加は硬環境での解糖および細胞増殖の持続に重要である

GLS1が硬化誘導およびYAP/TAZ依存性グルタミノリシスに重要かどうかを決定するために、PAECを軟らかいまたは硬いマトリックス中で培養し、GLS1の2つのアイソフォーム(KGAおよびGAC)、BPES(ビス-2-(5-フェニルアセト

50

アミド - 1, 3, 4 - チアジアゾール - 2 - イル) エチルスルフィド)、DON (6 - ジアゾ - 5 - オキソ - L - ノルロイシン)、またはCB - 968 (グルタミナーゼ阻害剤、化合物968、C - 968)の(図3A~C)またはsiRNA (si - GLS; 図3D~G)の既知の阻害剤に曝露させた。LC - MS / MSにより定量化した場合、PAECにおけるGLSの阻害は、グルタミン消費、グルタミン酸生産、およびアスパラギン酸生産の硬化誘導プロセスを鈍化させた(図3AおよびE)。GLS1阻害は、乳酸ノピルビン酸比の低下により示された硬いマトリックス中の解糖も低下させた(図3B~C、図3F~G)。代謝活性の類似の変化は、PASCでGLS1を阻害したときに観察された(データは示されていない)。

#### 【0114】

GLS1により調節される下流の分子プロセスを同定するために、硬いマトリックス細胞でsi - GLSに曝露したPAECの発現アレイ分析および経路濃縮は、特に増殖能を制御する細胞周期遺伝子および細胞遊走を制御する細胞外マトリックス組織化に因する因子を下方制御する、多数の経路の系統的再プログラミングを明らかにした(表1)。細胞計数、BrdUパルス、カスパーゼ3/7活性、およびPCNA/切断カスパーゼ - 3二重染色により評価した場合、GLS1阻害は、軟らかいマトリックスでのアポトーシスおよび増殖にほとんど影響を与えなかったが、PAECでは硬いマトリックスでの増殖を鈍化させた(データは示されていない)。さらに、マトリックス組織化に影響を与えるトランスクリプトームの結果に対応して、siRNAまたは薬理学的手段により達成されたGLS阻害は、細胞遊走を阻害した(データは示されていない)。類似の効果がPASCで観察された(データは示されていない)。

#### 【0115】

グルタミン酸およびアスパラギン酸のアナプレロティック生産が、増殖を持続するGLS1作用の中心となるかどうかを調べるために、GLS1またはYAP / TAZを欠く細胞でグルタミン酸またはアスパラギン酸補充を行った。これらの結果および以前の観察と一致して、GLS1またはYAP / TAZのsiRNAノックダウンは、細胞計数および増殖マーカー、PCNAの定量により評価したPAECまたはPASCのどちらかにおける増殖を減少させた(データは示されていない)。重要なことには、GLS1またはYAP / TAZが減少した細胞では、細胞増殖がグルタミン酸によって少なくとも部分的に回復し、アスパラギン酸補充によってより完全に回復した(データは示されていない)。さらに、アスパラギン酸補充は、同様に、硬いマトリックスにおけるGLS1欠損PAECの細胞遊走の低減を反転させた(データは示されていない)。まとめると、これらの結果は、GLS1ならびにグルタミノリシスによるグルタミン酸およびアスパラギン酸生産のその制御が、硬いマトリックス曝露に特異的な代謝再プログラミング、ならびに結果としての血管細胞増殖および遊走に不可欠であることを実証している。

#### 【0116】

##### [実施例5]

YAP / TAZ - GLS1軸は、PHのげっ歯類およびヒト例における血管硬化に曝露したPAECおよびPASCの解糖およびグルタミノリシスをインビボで活性化する

炎症性PAH (モノクロタリン誘導) のラットモデルにおいて、肺動脈硬化は、疾患肺細動脈におけるAP / TAZ発現の増加を伴う早期病理学的イベントとして最近記載された。この同じモノクロタリンラットモデルにおいて、グルタミノリシスが活性化され、肺動脈硬化、YAP1活性化、およびPAHと相関しているかどうかを決定した。以前に報告されているように、ピクロシリウスレッド染色は、原子間力顕微鏡法により実証された、モノクロタリン曝露ラットに由来し肺細動脈硬化の増加と相関する、疾患肺細動脈中の線維性コラーゲン沈着の増加を実証した(データは示されていない)。これらの変化は、PAHの血行動態症状発現を伴った。これらのラットから、ビヒクルまたはモノクロタリンに曝露した3週間後の肺由来のCD31 + 内皮細胞を単離し、代謝産物をLC - MS / MSにより定量化した(データは示されていない)。硬いマトリックスで増殖させた培養PAECにおけるアナプレロティック反応の観察と一致して、PAH CD31 + 細胞中の

グルタミンは減少し、アスパラギン酸は増加した。特に、これらの細胞ではグルタミン酸濃度の有意な変化は観察されなかった。これは、インビボでの肺細胞のグルタミン酸代謝回転の上昇を示唆している可能性がある。T C A回路活性の低下を示すコハク酸の減少も観察され、乳酸／ピルビン酸比の解糖的増大が存在した（データは示されていない）。そのような代謝産物変化と一致して、C D 3 1 + 細胞中のG L S 1発現の有意な増加が観察された（データは示されていない）。免疫プロットティングも、モノクロタリンラット肺由来のC D 3 1 + およびC D 3 1 - 細胞の両方におけるタンパク質レベルでのG L S 1、L D H A、およびP C発現の対応する増加を実証した（データは示されていない）。インサイチュでは、共焦点免疫蛍光顕微鏡法が、疾患肺細動脈のC D 3 1 + （内皮）および - S M A + （平滑筋）区画の両方でG L S 1、P C、およびL D H A染色の増加を明らかにした（データは示されていない）。

10

#### 【 0 1 1 7 】

特に、G L S 1、L D H A、およびP C全ての上方制御は、Y A P 1核局在化の増加および結果として得られた、疾患肺細動脈中のP C N A + / K i 6 7 + 増殖細胞の上方制御と相関した（データは示されていない）。疾患進行中のこれらのイベントの正確な動力学決定するために、インサイチュ共焦点免疫蛍光顕微鏡法を、ラットのモノクロタリン誘導P Hのさまざまな段階で行った。P Hにおける内皮アポトーシスの先行理論と一致して、切断カスパーゼ - 3 インサイチュ染色およびカスパーゼ 3 / 7 活性（モノクロタリン注射後0 ~ 3日目）に反映された、内皮アポトーシスの初期ではあるが一時的な誘導が見出された（データは示されていない）。次いで、血管G L S 1発現の増加と相関するその後のアポトーシスの減少と、平滑筋および内皮細胞増殖の増加がこれに続いた。まとめると、およびインビトロでの知見と一致して、これらの結果は、血管傷害後および内皮アポトーシスの初期の波の直後、肺血管硬化およびグルタミノリシスの発生が、インビボで疾患内皮および平滑筋細胞の増殖の増加と同じ動力学をたどることを実証している。

20

#### 【 0 1 1 8 】

グルタミノリシス再プログラミングは、肺血管細胞増殖を持続するためのヒトP A Hの活性プロセスであるかどうかさらに疑問視された。特発性および遺伝性病因ならびに強皮症に及ぶ原因に由来するヒトP A H患者（n = 1 3）のコホートを試験し（表2）、外傷または無関係な原因で死亡した非P A H対象（n = 6）と比較した（2）。P A H症例における細動脈周囲のコラーゲンリモデリングの増加と一致して、G L S 1、P C、およびL D H Aの同時の上方制御がC D 3 1 + （内皮）および - S M A + （平滑筋）細胞の両方で観察された（データは示されていない）。P A Hラットと同様に、G L S 1はY A P 1核局在化と同時に増加し、Y A P 1核局在化はP C N A + / K i 6 7 + 増殖血管細胞の増加と相関した（データは示されていない）。類似の観察が、網状病変 - 活発な増殖および静止状態のアポトーシスが一貫して観察される後期血管病変でなされた（データは示されていない）。重要なことには、これらの代謝酵素の変化は、P H個体（平均肺動脈圧 [ m P A P ] 2 5 m m H g、表3の患者人口統計情報）の主肺動脈に由来する試料でL C - M S / M Sにより評価した、循環血漿中の代謝産物プロファイルと相関した。特に肺動脈圧が高い（平均肺圧 > 4 5 m m H g）対象では、解糖の増加を反映して乳酸／ピルビン酸比は上昇したが、グルタミン／グルタミン酸比は低下し、アスパラギン酸は増加した。これは、非P H個体（m P A P < 2 5 m m H g、データは示されていない）と比較して、グルタミノリシスおよびアナプレティック反応の上方制御を示すものである。まとめると、これらの結果は、げっ歯類およびヒト疾患例の両方にわたってインビボでP A Hにおけるグルタミノリシス代謝スイッチおよび血管増殖を誘導するように、血管硬化がY A P / T A Zを活性化するという考えを支持している。

30

40

#### 【 0 1 1 9 】

##### [実施例6]

Y A P / T A Z - G L S 1軸は、S I V - P A Hを有する霊長類およびH I V誘導P A Hを有する者において解糖およびグルタミノリシスを誘導する

P A Hのげっ歯類モデルはヒトにおける疾患の全ての側面を再現するわけではないため、

50



この同じ分子軸がより関連のあるモデル生物において活発であるかどうかを、直接低酸素刺激を使用することなく決定した。以前に、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）誘導PAHの非ヒト霊長類モデルが、サル免疫不全ウイルス（SIV）に感染したアカゲザルで記載された。重要なことには、そのようなモデルは、PAHの血行動態および組織学的な症状発現を再現する。そのようなモデルは、PAH発症感染マカクの50～60%で不完全な浸透度も示し、ゆえに、ヒトにおけるHIV感染を伴うPAHの不完全な浸透度と一致する。重要なことには、モノクロタリン曝露ラットと同様に、PAHの血行動態および組織学的な症状発現が確認されたSIV感染マカクのコホートにおいて、ピクロシリウスレッド染色は、非PAH、SIV感染動物と比較して細動脈周囲の線維性コラーゲンの増加を実証した（データは示されていない）。SIV-PAHマカクの疾患肺細動脈は、YAP1核局在化の増加、増殖PCNA+/Ki67+細胞、および非アポトーシス、切断カスパーゼ-3陰性細胞と一致する、GLS1、PC、およびLDHAの増加も提示した（データは示されていない）。

10

#### 【0120】

最後に、SIV-PAHマカクにおけるこれらの知見に起因して、HIV-PAHに罹患しているヒトは、肺血管硬化の増加の徴候、ならびに結果として生じる血管解糖およびグルタミノリシスの変化も提示し得るかどうかを決定した。肺動脈カテーテル検査を受けたHIV感染個体42人のコホートを試験し、11個体でPAHの診断に至った（表4）。HIV-PAH対象の侵襲的血行動態データの分析は、HIV感染、非PAH個体と比較して、肺動脈硬化の増加と一致する肺動脈コンプライアンスの有意な低下を明らかにした。重要なことには、PAHを有するおよびPAHがないHIV感染者の別個のコホートからの末梢静脈血漿代謝産物を定量化することにより（表4）、解糖活性の増加を示す乳酸ノピルビン酸比の増大が観察されたが、グルタミンノグルタミン酸比の低下およびアスパラギン酸の増加は、HIV-PAHにおけるグルタミノリシスおよびアナプレロティック反応の上方制御と一致した（データは示されていない）。その結果、げっ歯類およびヒトPAHの他の例における分子的知見を映し出し、HIV-PAHにおけるYAP/TAZ-GLS1活性化のこれらの観察は、肺血管硬化と代謝調節異常との間の緊密に関連したつながりと相関する。

20

#### 【0121】

##### [実施例7]

30

肺血管硬化およびYAP/TAZ依存性メカノトランスダクションの調節は、グルタミノリシスおよびPHの症状発現をインビボで調節する。

細動脈周囲のECMリモデリングおよびYAP/TAZが、インビボで血管細胞代謝を調節するかどうかを明確に確立するために、YAP/TAZ依存性メカノトランスダクションの変化が、モノクロタリンラットモデルにおけるグルタミノリシスおよびPH発症を直接制御するかどうかを決定した。最初に、コラーゲン架橋およびその結果として生じるマトリックス硬化に関与する酵素、Loxの既知の薬理的阻害剤（-アミノプロピオニトリル、BAPN）を用いて、ECM硬化の阻害が、モノクロタリン曝露ラットで観察された代謝変化および下流のPHの症状発現を予防できるかどうかを決定した（図4A）。BAPN治療は、左室心機能に対する有害な作用なしに（データは示されていない）、原子間力顕微鏡法により評価した、肺Lox活性および結果として生じる細動脈周囲のECM硬化を実際に減少させた（図4C～E）。インビトロでの結果と一致して、BAPNによるECM硬化の低減は、YAP1依存性遺伝子発現の減少（図4E）、および直接酵素活性測定および結果として生じる代謝産物発現の変化に反映された、下流のGLS活性の低下（図4F～G）をもたらした。そのような代謝作用は、インサイチュ細動脈染色に反映された血管内皮および平滑筋増殖をさらに減少させ（図4G）、血管リモデリングおよび筋肉化（図4G）、ならびに右室収縮期圧（RVSP）（図4H）により測定したPHの血行動態的および組織学的な症状発現を改善した。

40

#### 【0122】

平行して、第2に、YAP1の既知の薬理的阻害剤（ベルテボルフィン）を使用して、

50

YAP1 活性が、疾患のこの同じラットモデルにおいて血管グルタミノリシスの活性化およびPHにも不可欠であるかどうかをインタロゲートした(図4B)。予想通り、ベルテポルフィン、左室機能または全身血圧に対する有害な作用なしに(データは示されていない)、YAP1 依存性遺伝子発現を減少させた(図4E)。その結果、BAPNと同じように、ただしはるかにより強固な程度で、ベルテポルフィン、下流の代謝(GLS1 発現および活性、図4F~G)、増殖徴候(図4G)、および血管リモデリング/筋肉化の低減を含むPHの末期的な症状発現、RVSP、および右室リモデリング(フルトン指数)(図4G~I)を改善した。その結果、これらのデータは、肺血管グルタミノリシスおよびアナプレロティック反応、増殖、およびPHを誘導するために、ECM硬化はYAP/TAZ 特異的メカノトランスダクションに依存するというインビボでの原因となる証拠を提供している。

10

#### 【0123】

##### [実施例8]

グルタミノリシスのGLS1 依存性阻害はインビボで肺血管細胞増殖を減少させ、PHを改善する

最後に、グルタミノリシス自体が、PHにおける肺血管増殖の促進に不可欠であるかどうかを調べるために、GLS1の2つの別個の薬理的阻害剤(C968およびCB-839)を、疾患予防(図5A)または疾患逆転(図5B)投与プロトコルのどちらかを用いてモノクロタリン曝露ラットに投与した。PHを誘導するために、オスのSprague-Dawleyラット(10~14週齢)に60mg/kgモノクロタリン(Sigma-Aldrich)を腹腔内注射した。2日後、C968またはCB-839(10mg/kg、Sigma-Aldrich)の連続腹腔内注射を毎日与え、モノクロタリン注射後の7日後、C968またはCB-839(10mg/kg、 Selleck Chemicals)の連続腹腔内注射を毎日与えた。モノクロタリン注射後21日目に最後の注射をした2日後、右心カテーテル検査を行い、その後、以前に記載したように(Bertero T, et al. Cell Reports. 2015;13(5):1016-32)、RNAもしくはタンパク質抽出、パラフィン包埋、またはOCT(Sigma-Aldrich)による凍結保存のために、肺組織およびCD31+細胞を回収した。

20

#### 【0124】

両方の場合において、C968およびCB-839治療は、左室機能または全身血圧に対する有害な作用なしに(データは示されていない)、対照と比較したラット肺全体のGLS1 活性を低下させた(図5C~D)。それに応じて、C968およびCB-839はいずれも、対照PHラットと比較して、CD31+/vWF+(内皮)および-SMA+(平滑筋)肺細動脈細胞中の増殖マーカー(PCNA+/Ki67+)の存在を減少させた(図5E~H)。その結果、C968およびCB-839はいずれも、肺細動脈リモデリング(図6A~B)および筋肉化(図6C~D)、右室収縮期圧(RVSP)(図6E、図6G)、および右室リモデリング(図6F、図6H)を有意に減少させた。まとめると、これらの結果は、GLS1およびECM硬化に依存したプロセスであるグルタミノリシスを、PHにおける肺血管増殖の持続に必要な重要な代謝媒介因子として直接意味付けるものである。

30

40

#### 【0125】

## 【表 1 - 1】

**表 1. 硬いマトリックスにおける GLS ノックダウンに応答して差次的に発現される PAEC 遺伝子の経路濃縮。**

KEGG、Reactome、NCBI、および Biocarta データベースからのデータを組み込む Reactome F1 ツール(1)によって行われた経路濃縮。

経路	経路 サイズ	重複 サイズ	pval	FDR	重複遺伝子 (上昇)	重複遺伝子 (下降)
NF-カッパB シグ ナル伝達経路 (KEGG)	91	9	<0.0001	2.67E-03	LY96	PTGS2 CXCL2 IL8 CXCL12 BCL2A1 TNFAIP3 DDX58 VCAM1
細胞外マトリク ス組織化 (Reactome)	263	16	<0.0001	3.00E-03	ADAM9 ADAM17 NID2	LTBP1 PLOD2 ADAMTS1 LAMC2 FGF2 VCAN FBLN5 TGFB2 SDC4 VCAM1 FBN2 COL8A1 COL5A2
マラリア (KEGG)	49	7	<0.0001	3.00E-03	-	CSF3 THBS2 IL8 SELE TGFB2 CCL2 VCAM1
TNF シグナル伝達 経路 (KEGG)	110	9	0.0001	9.00E-03	-	PTGS2 VEGFC CXCL1 CXCL2 SELE CXCL10 TNFAIP3 CCL2 VCAM1
ベータ 5 ベータ 6 ベータ 7 およびベ ータ 8 インテグリン細胞表面相互作用 (NCBI)	17	4	0.0002	1.76E-02	-	EDIL3 PLAUR CYR61 VCAM1
NOD 様受容体シグ ナル伝達経路 (KEGG)	57	6	0.0003	2.52E-02	-	CXCL1 CXCL2 IL8 TNFAIP3 CCL2 PYDC1
インターフェロン アルファ/ベータシ グナル伝達 (Reactome)	63	6	0.0005	3.57E-02	GBP2	OASL MX2 EGR1 IFIT2 IFIT1
E2F 転写因子ネッ トワーク (NCBI)	68	6	0.0007	4.69E-02	-	MYBL2 CCNE1 RBBP8 RRM2 TYMS CDC25A
サイトカイン-サイ トカイン受容体相 互作用 (KEGG)	265	12	0.0009	5.17E-02	-	VEGFC CXCL1 CSF3 CXCL2 IL8 TNFSF15 CXCL11 CXCL12 TGFB2 CXCL10 CCL2 TNFSF10

## 【 0 1 2 6 】

10

20

30

40

50

【表 1 - 2】

経路	経路 サイズ	重複 サイズ	pval	FDR	重複遺伝子 (上昇)	重複遺伝子 (下降)
有糸分裂 G1～ G1/S 期 (Reactome)	134	8	0.0012	6.55E-02	-	MYBL2 CCNE1 CDC7 RRM2 PSMD10 WEE1 TYMS CDC25A
ATF-2 転写因子ネ ットワーク (NCBI)	58	5	0.0021	1.11E-01	-	IL8 DUSP5 DUSP1 SELE TGFB2
細胞周期チェック ポイント (Reactome)	118	7	0.0024	1.07E-01	UBE2D1	MAD2L1 CCNE1 CDC7 PSMD10 WEE1 CDC25A
AP1 ファミリーメ ンバーFra1 および Fra2 の検証されて いる転写標的 (NCBI)	36	4	0.0024	1.15E-01	HMOX1	PLAUR IL8 CCL2
ベータ 1 インテグ リン細胞表面相互 作用 (NCBI)	66	5	0.0037	1.48E-01	-	PLAUR LAMC2 THBS2 VCAM1 COL5A2
ベータ 3 インテグ リン細胞表面相互 作用 (NCBI)	43	4	0.0045	1.68E-01	-	EDIL3 PLAUR CYR61 SDC4
AP-1 転写因子ネ ットワーク (NCBI)	70	5	0.0047	1.63E-01	-	CYR61 IL8 DUSP1 CCL2 EGR1
アルファ 9 ベータ 1 インテグリンシグ ナル伝達イベント (NCBI)	24	3	0.0062	2.08E-01	-	VEGFC SAT1 VCAM1
アメーバ症 (KEGG)	109	6	0.007	2.22E-01	SERPINB9	LAMC2 CXCL1 IL8 TGFB2 COL5A2
アミノ酸および誘 導体の代謝 (Reactome)	147	7	0.0079	2.38E-01	ENOPH1 NQO1 GCLM	PSMD10 PHGDH GLS SAT1
BARD1 シグナル伝 達イベント (NCBI)	29	3	0.0104	2.86E-01	-	CCNE1 RBBP8 BARD1
ベータ 2 インテグ リン細胞表面相互 作用 (NCBI)	29	3	0.0104	2.86E-01	-	PLAUR CYR61 VCAM1
VEGF および VEGFR シグナル伝 達ネットワーク (NCBI)	10	2	0.0106	2.66E-01	PGF	VEGFC
VEGF によるシグ ナル伝達 (Reactome)	10	2	0.0106	2.66E-01	PGF	VEGFC

【 0 1 2 7 】

10

20

30

40

50

【表 1 - 3】

経路	経路 サイズ	重複 サイズ	pval	FDR	重複遺伝子 (上昇)	重複遺伝子 (下降)
ECM 受容体相互作用 (KEGG)	86	5	0.0109	2.62E-01	-	LAMC2 THBS2 RELN SDC4 COL5A2
細胞周期 (KEGG)	124	6	0.0126	2.90E-01	-	MAD2L1 CCNE1 CDC7 TGFB2 WEE1 CDC25A
関節リウマチ (KEGG)	90	5	0.013	2.87E-01	-	CXCL1 IL8 CXCL12 TGFB2 CCL2
シンデカン-4 媒介 シグナル伝達イベ ント (NCBI)	32	3	0.0135	2.85E-01	-	FGF2 CXCL12 SDC4
ATM 経路 (NCBI)	34	3	0.0158	3.20E-01	-	XRCC4 RBBP8 CDC25A
インターフェロン ガンマシグナル伝 達 (Reactome)	63	4	0.0166	3.23E-01	GBP2	OASL GBP1 VCAM1
PI3K-Akt シグナル 伝達経路 (KEGG)	346	11	0.0181	3.41E-01	PGF PPP2R3A	VEGFC LAMC2 FGF5 CCNE1 FGF2 CSF3 THBS2 RELN COL5A2
ErbB1 下流シグナ ル伝達 (NCBI)	100	5	0.0195	3.57E-01	F2RL2	ZFP36 DUSP1 DIAPH3 EGR1
アポトーシスの外 因経路 (Reactome)	14	2	0.0199	3.53E-01	ADAM17	TNFSF10
p53 シグナル伝達 経路 (KEGG)	68	4	0.0212	3.66E-01	ZMAT3	CCNE1 RRM2 PMAIP1
ピリミジン代謝 (KEGG)	105	5	0.0235	3.91E-01	TK2	CDA RRM2 PNPT1 TYMS
細胞接着分子 (CAM) (KEGG)	143	6	0.0236	3.81E-01	-	VCAN SELE CD274 SDC4 CDH2 VCAM1
ISG15 抗ウイルス 機構 (Reactome)	71	4	0.0244	3.82E-01	-	HERC5 MX2 DDX58 IFIT1
ケモカインシグナ ル伝達経路 (KEGG)	189	7	0.0272	4.10E-01	-	CXCL1 CXCL2 IL8 CXCL11 CXCL12 CXCL10 CCL2
IFN-アルファ/ベータ 経路の RIG- I/MDA5 媒介誘導 (Reactome)	79	4	0.0341	4.87E-01	UBE2D1	HERC5 TNFAIP3 DDX58
リンパ球における カルシニューリン 調節 NFAT 依存性 転写 (NCBI)	46	3	0.0344	4.66E-01	-	PTGS2 IL8 EGR1
FGF シグナル伝達 経路 (NCBI)	46	3	0.0344	4.66E-01	-	PLAUR SPRY2 CDH2

【 0 1 2 8 】

10

20

30

40

50

【表 1 - 4】

経路	経路 サイズ	重複 サイズ	pval	FDR	重複遺伝子 (上昇)	重複遺伝子 (下降)
チロシンキナーゼ シグナルの Sprouty 調節 (Biocarta)	19	2	0.0349	4.50E-01	-	SPRY4 SPRY2
コレステロール生 合成 (Reactome)	19	2	0.0349	4.50E-01	HMGCS1 DHCR24	-
GPCR リガンド結 合 (Reactome)	433	12	0.0351	4.42E-01	F2RL2	HTR1B CXCL1 CXCL2 IL8 CXCL11 CXCL12 CXCL10 CCL2 P2RY1 PTGER4 ADRB2
TGF-ベータシグナ ル伝達経路 (KEGG)	80	4	0.0354	4.34E-01	-	LTBP1 GDF6 FST TGFB2
分節時計 (Biocarta)	21	2	0.0418	4.95E-01	ADAM17	DKK2
マトリックスメタ ロプロテイナーゼ の阻害 (Biocarta)	3	1	0.0449	5.25E-01	-	RECK
二本鎖切断修復 (Reactome)	22	2	0.0454	5.20E-01	-	XRCC4 BRIP1
軸索ガイダンス (KEGG)	127	5	0.0468	5.30E-01	-	SEMA6D SEMA3C SEMA3A SLIT2 CXCL12
EGFR によるシグ ナル伝達 (Reactome)	171	6	0.049	5.48E-01	ADAM17 TNRC6A	FGF5 FGF2 ITPR2 SPRY2
PRL により媒介さ れるシグナル伝達 イベント (NCBI)	23	2	0.0491	5.38E-01	-	CCNE1 EGR1

【 0 1 2 9 】

10

20

30

40

50

【表 2】

表 2. インサイチュ染色に使用された PAH 患者の臨床的特徴。

年齢	性別	mPAP (mmHg)	臨床記述
34	女性	50	心肺停止(剖検)、特発性
64	女性	55	心肺停止(剖検)、特発性
68	女性	44	両肺移植、強皮症
12	男性	53	両肺移植、BMPRII 変異
16	男性	62	両肺移植、特発性
1	男性	50	肺切除、21 番染色体トリソミー
19	男性	48	肺切除、特発性
51	男性	48	肺移植、強皮症
42	女性	57	肺移植、強皮症
67	男性	50	肺移植、強皮症
60	女性	66	剖検、強皮症
54	女性	54	剖検、強皮症
72	女性	53	剖検、強皮症

【 0 1 3 0 】

10

20

30

40

50

【表 3】

**表 3. 肺動脈カテーテル検査中に主肺動脈からの代謝産物プロファイリングのために血漿が採取された PH 患者の臨床的特徴。**  
平均肺動脈圧(mPAP)、肺血管抵抗(PVR)。

年齢 (歳)	性別	mPAP (mmHg)	PVR (ダイン.秒.cm <sup>-5</sup> )
73	女性	37	481
88	女性	46	631
65	女性	49	789
44	女性	46	387
67	女性	45	607
83	男性	54	926
81	女性	52	1031
52	男性	56	522
78	女性	51	960
67	女性	49	560
88	女性	45	542
56	男性	56	1396
67	女性	57	658
81	女性	42	663
23	男性	40	957
78	女性	44	536
79	女性	56	897
80	男性	50	826
78	男性	43	803

【 0 1 3 1 】

10

20

30

40

50



## 【表 4】

**表 4. 侵襲肺動脈カテーテル検査により肺動脈コンプライアンスについて分析された HIV 感染個体の臨床的特徴。**

駆出率(EF);四分位範囲(IQR);平均肺動脈圧(mPAP);肺動脈高血圧症(PAH);肺毛細血管楔入圧(PCWP);肺血管抵抗(PVR)

変数	PAH なし (n=31)	PAH (n=11)	p 値
年齢、中央値 (IQR)	54 (46, 61)	45 (41, 54)	0.14
年齢、平均±SD	53 ± 11	47 ± 9	0.11
男性, n (%)	25 (80.6)	7 (63.6)	0.25
白人, n (%)	19 (61.3)	5 (45.5)	0.36
アフリカ系アメリカ人, n (%)	12 (38.7)	6 (54.5)	
元喫煙者, n (%)	16 (55.2)	7 (77.8)	0.23
全身性高血圧, n (%)	14 (48.3)	1 (11.1)	<b>0.046</b>
冠状動脈疾患, n (%)	7 (23.3)	0 (0.0)	0.11
肝臓疾患, n (%)	8 (26.7)	2 (20.0)	0.673
COPD, n (%)	5 (16.7)	1 (11.1)	0.685
mPAPmmHg、中央値 (IQR)	20 (17, 30)	37 (31, 52)	<b>&lt;0.001</b>
PCWP mmHg、中央値 (IQR)	13 (9, 21)	11 (7, 13)	0.2
PVR wood 単位、中央値 (IQR)	1.4 (1, 1.9)	3.9 (3.5, 10.8)	<b>&lt;0.001</b>
PVR≥3 wood 単位, n (%)	3 (12)	10 (91)	<b>&lt;0.001</b>
EF≤45%, n (%)	4 (13.3)	1 (9)	0.71
拡張機能障害, n (%)	7 (26)	2 (20)	0.7

【 0 1 3 2 】

10

20

30

40

50

## 【表 5】

**表 5. 代謝産物プロファイリングのために末梢静脈血漿が採取された PAH を有する HIV 感染個体の血行動態測定値。**

平均肺動脈圧(mPAP、侵襲血行動態により測定); 肺動脈収縮期圧(PASP、心エコー検査により推定)。

年齢(歳)	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

10

20

## 配列

【 0 1 3 3 】

配列番号 1

【化 3】

MNPASAPPPL PPPGQQVIHV TQDLDTDLEA LFNSVMNPKP SSWRKKILPE  
 SFFKEPDSGS HSRQSSTDSS GGHPGPRLAG GAQHVRSHSS PASLQLGTGA  
 GAAGSPAQQH AHLRQQSYDV TDELPLPPGW EMTFTATGQR YFLNHIEKIT  
 TWQDPRKAMN QPLNHMNLHP AVSSTPVPQR SMAVSQPNLV MNHQHQQQMA  
 PSTLSQQNHP TQNPPAGLMS MPNALTTQQQ QQQKLRLQRI QMERERIRMR  
 QEELMRQEAA LCRQLPMEAE TLAPVQAAVN PPTMTPDMRS ITNNSSDPFL  
 NGGPYHSREQ STDGLGLGC YSVPTTPEDF LSNVDEMDTG ENAGQTPMNI  
 NPQQTRFPDF LDCLPGTNVD LGTLESEDLI PLFNDVESAL NKSEPFLTWL

30

【 0 1 3 4 】

配列番号 2

40

50

## 【化 4】

MDPGQQPPPPQ PAPQGQGGQPP SQPPQGQGGPP SGPGQPAPAA TQAAPQAPPA  
 GHQIVHVRGD SETDLEALFN AVMNPKTANV PQTVPMLRK LPDSFFKPPE  
 PKSHSRQAST DAGTAGALTP QHVRAHSSPA SLQLGAVSPG TLTPTGVVSG  
 PAATPTAQLH RQSSFEIPDD VPLPAGWEMA KTSSGQRYFL NHIDQTTTWQ  
 DPRKAMLSQM NVTAPTSPV QQNMMNSASG PLPDGWEQAM TQDGEIYYIN  
 HKNKTTSWLD PRLDPRFAMN QRISQSAPVK QPPPLAPQSP QGGVMGGSNS  
 NQQQQMRLQQ LQMEKERLRL KQQELLRQAM RNINPSTANS PKCQELALRS  
 QLPTLEQDGG TQNPVSSPGM SQELRTMTTN SSDPFLNSGT YHSRDESTDS  
 GLSMSSYSVP RTPDDFLNSV DEMDTGDTIN QSTLPSQQNR FPDYLEAIPG  
 TNVDLGTLEG DGMNIEGEEL MPSLQEALSS DILNDMESVL AATKLDKESF  
 LTWL

10

## 【 0 1 3 5 】

配列番号 3

## 【化 5】

20

MMRLRGSGML RDLLLRSPAG VSATLRRAPQ LVTLCRRPRG GGRPAAGPAA  
 AARLHPWWGG GGWPAEPLAR GLSSSPSEIL QELGKGSTHP QPGVSPPAAP  
 AAPGPKDGP ETDAFGNSEG KELVASGENK IKQGLPSLE DLLFYTIAEG  
 QEKIPVHKFI TALKSTGLRT SDPRLKECMD MLRLTLQTTS DGVMLDKDLF  
 KKCQVQSNIVL LTQAFRRKFV IPDFMSFTSH IDELYESAKK QSGGKVADYI  
 PQLAKFSPDL WGVSVCTVDG QRHSTGDTKV PFCLQSCVKP LKYAIAVNDL  
 GTEYVHRYVG KEPSGLRFNK LFLNEDDKPH NPMVNAGAIV VTSLIKQGVN  
 NAEKFDYVMQ FLNKMAGNEY VGFSNATFQS ERESGDRNFA IGYYLKEKKC  
 FPEGTDMVGI LDFYFQLCSI EVTCESASVM AATLANGGFC PITGERVLSP  
 EAVRNTLSLM HSCGMYDFSG QFAFHVGLPA KSGVAGGILL VVPNVMGMMC  
 WSPPLDKMGN SVKGIHFCHD LVSLCNFHNH DNLRFHAKKL DPRREGGDQR  
 VKSVINLLFA AYTGDVSALR RFALSAMDME QRDYDSRTAL HVAAAEGHVE  
 VVKFLEACK VNPFPKDRWN NTPMDEALHF GHHDVFKILQ EYQVQYTPQG  
 DSDNGKENQT VHKNLDGLL

30

本発明は、下記の態様を含む。

< 1 >

40

対象における肺血管疾患を治療する方法であって、YAP / TAZ 阻害組成物および / または GLS 1 阻害組成物の治療有効量を前記対象に投与することを含む、方法。

< 2 >

前記 YAP / TAZ 阻害組成物が前記対象に投与される、< 1 > に記載の方法。

< 3 >

前記 YAP / TAZ 阻害組成物が、ベルテポルフィン、その塩、プロドラッグ、または誘導体である、< 1 > または < 2 > に記載の方法。

< 4 >

前記肺血管疾患が肺高血圧症である、< 1 > から < 3 > のいずれかに記載の方法。

< 5 >

50

- 前記肺血管疾患が肺動脈高血圧症である、＜１＞から＜３＞のいずれかに記載の方法。
- ＜６＞
- 前記ＧＬＳ１阻害組成物が前記対象に投与される、＜１＞に記載の方法。
- ＜７＞
- 前記ＧＬＳ１阻害組成物が、ＣＢ－９６８、その塩、プロドラッグ、または誘導体である、＜６＞に記載の方法。
- ＜８＞
- 前記肺血管疾患が肺高血圧症である、＜６＞から＜８＞のいずれかに記載の方法。
- ＜９＞
- 前記肺血管疾患が肺動脈高血圧症である、＜６＞から＜８＞のいずれかに記載の方法。
- ＜１０＞
- 前記ＹＡＰ／ＴＡＺ阻害組成物および前記ＧＬＳ１阻害組成物の両方が前記対象に投与される、＜１＞に記載の方法。
- ＜１１＞
- 前記ＹＡＰ／ＴＡＺ阻害組成物が、ベルテポルフィン、その塩、プロドラッグ、または誘導体である、＜１０＞に記載の方法。
- ＜１２＞
- 前記ＧＬＳ１阻害組成物が、ＣＢ－９６８、その塩、プロドラッグ、または誘導体である、＜１０＞または＜１１＞に記載の方法。
- ＜１３＞
- 前記肺血管疾患が肺高血圧症である、＜１０＞から＜１２＞のいずれかに記載の方法。
- ＜１４＞
- 前記肺血管疾患が肺動脈高血圧症である、＜１０＞から＜１２＞のいずれかに記載の方法。
- ＜１５＞
- 対象における肺血管硬化を低減する方法であって、ＹＡＰ／ＴＡＺ阻害組成物および／またはＧＬＳ１阻害組成物の治療有効量を前記対象に投与することを含む、方法。
- ＜１６＞
- 前記ＹＡＰ／ＴＡＺ阻害組成物が前記対象に投与される、＜１５＞に記載の方法。
- ＜１７＞
- 前記ＹＡＰ／ＴＡＺ阻害組成物が、ベルテポルフィン、その塩、プロドラッグ、または誘導体である、＜１５＞または＜１６＞に記載の方法。
- ＜１８＞
- 前記ＧＬＳ１阻害組成物が前記対象に投与される、＜１５＞に記載の方法。
- ＜１９＞
- 前記ＧＬＳ１阻害組成物が、ＣＢ－９６８、その塩、プロドラッグ、または誘導体である、＜１５＞または＜１７＞のいずれかに記載の方法。
- ＜２０＞
- 前記ＹＡＰ／ＴＡＺ阻害組成物および前記ＧＬＳ１阻害組成物の両方が前記対象に投与される、＜１５＞に記載の方法。
- ＜２１＞
- 前記ＹＡＰ／ＴＡＺ阻害組成物が、ベルテポルフィン、その塩、プロドラッグ、または誘導体である、＜２０＞に記載の方法。
- ＜２２＞
- 前記ＧＬＳ１阻害組成物が、ＣＢ－９６８、その塩、プロドラッグ、または誘導体である、＜２０＞または＜２１＞に記載の方法。

10

20

30

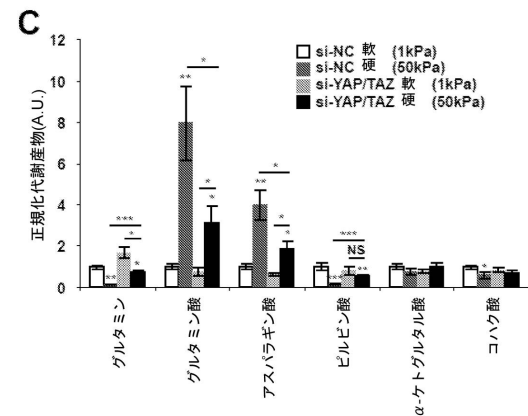
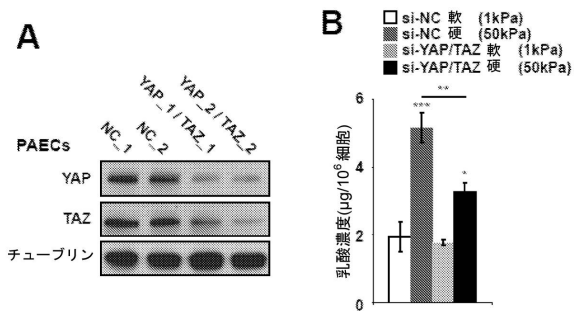
40

50

【図面】

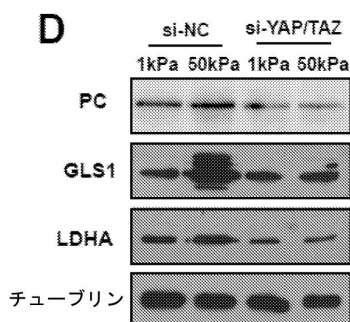
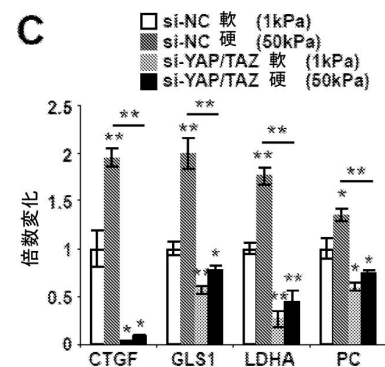
【図 1】

図 1



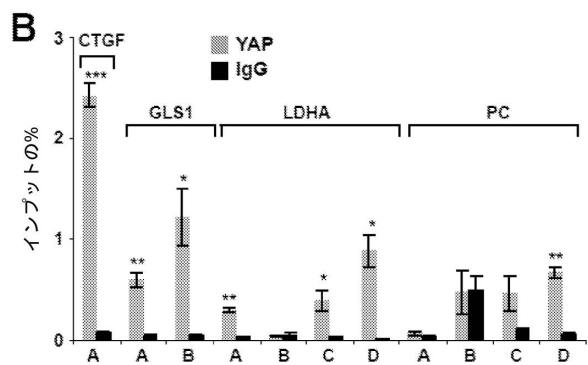
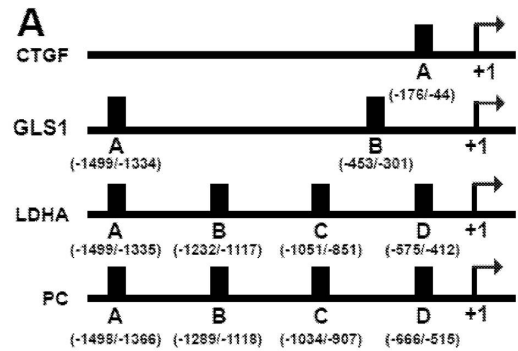
【図 2 - 2】

図 2 続き



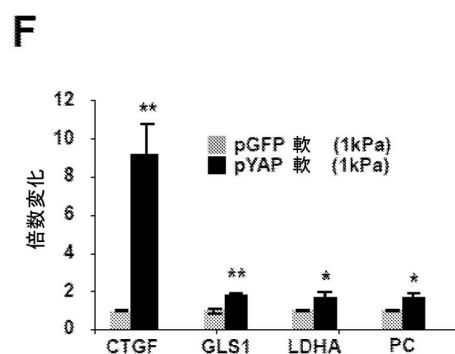
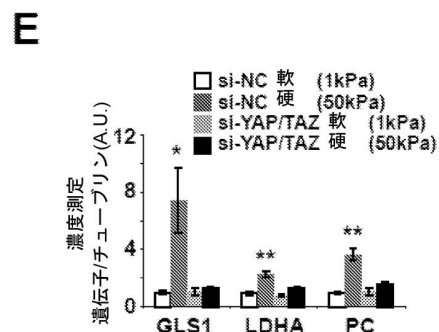
【図 2 - 1】

図 2



【図 2 - 3】

図 2 続き



10

20

30

40

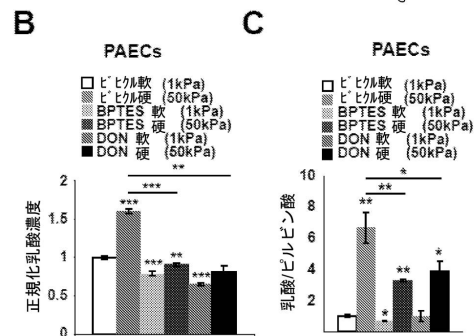
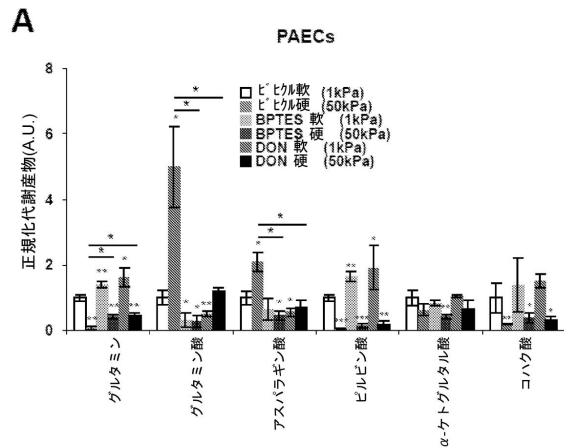
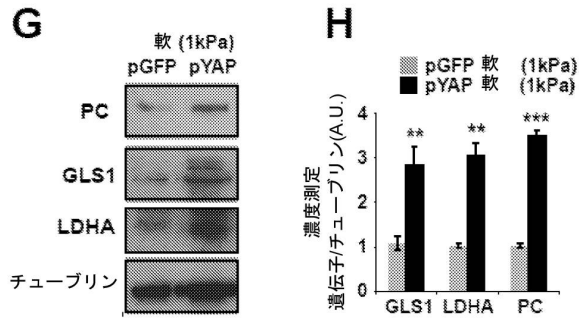
50

【図 2 - 4】

【図 3 - 1】

図 2 続き

図 3

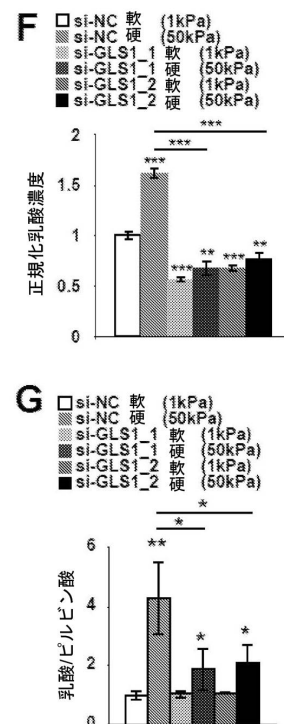
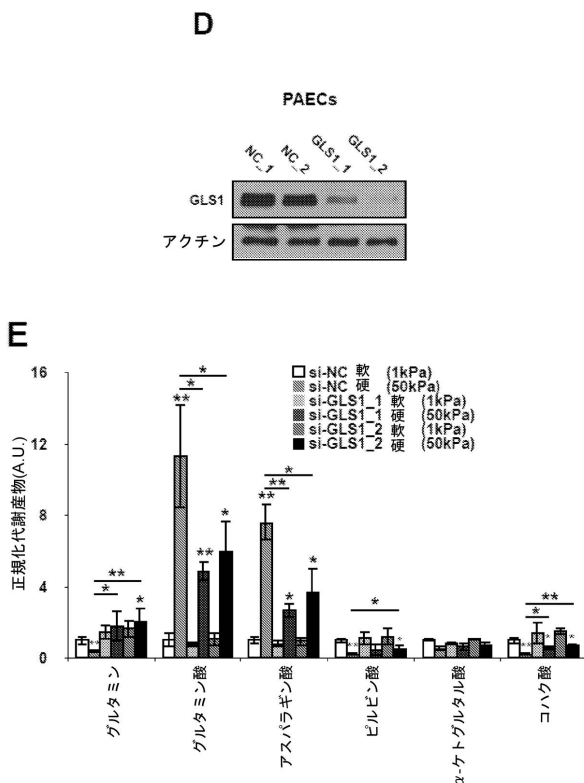


【図 3 - 2】

【図 3 - 3】

図 3 続き

図 3 続き



10

20

30

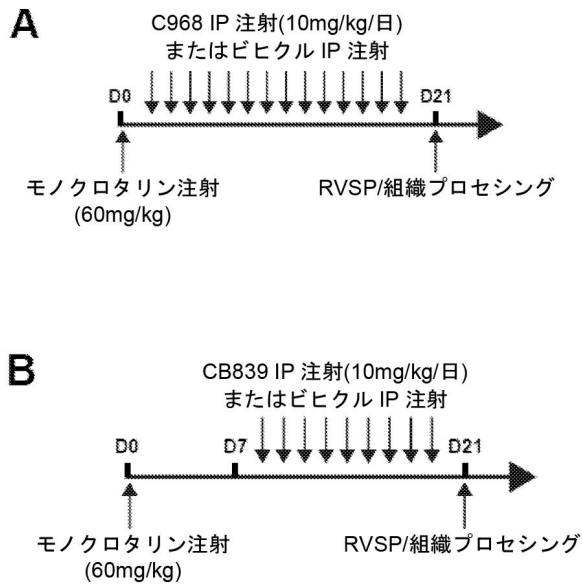
40

50



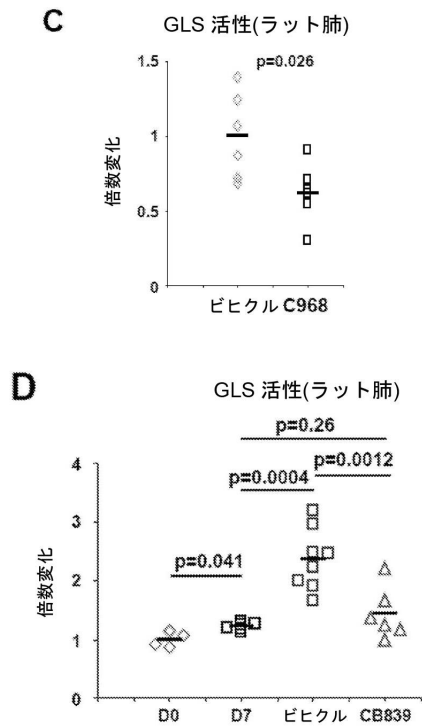
【図 5 - 1】

図 5



【図 5 - 2】

図 5 続き

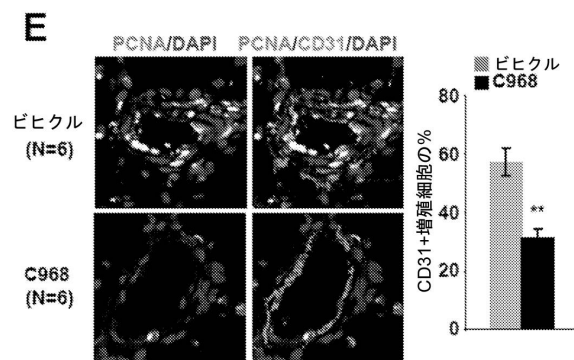


10

20

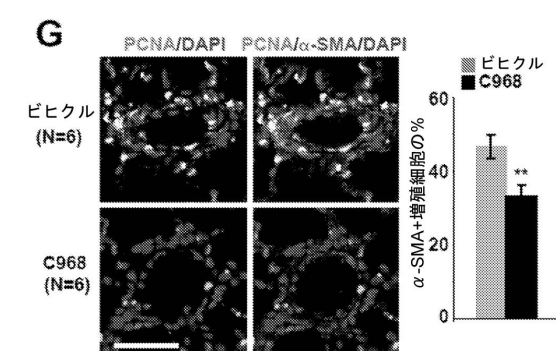
【図 5 - 3】

図 5 続き

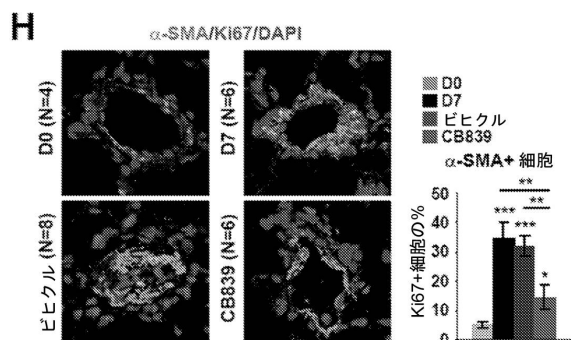
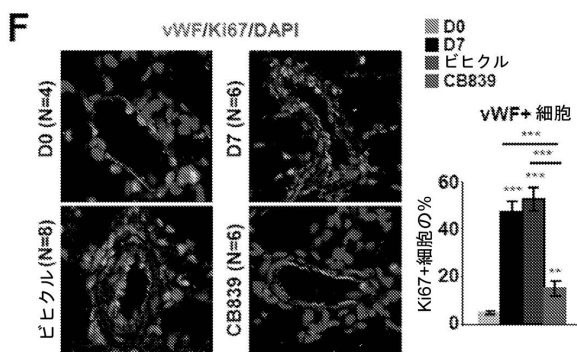


【図 5 - 4】

図 5 続き



30



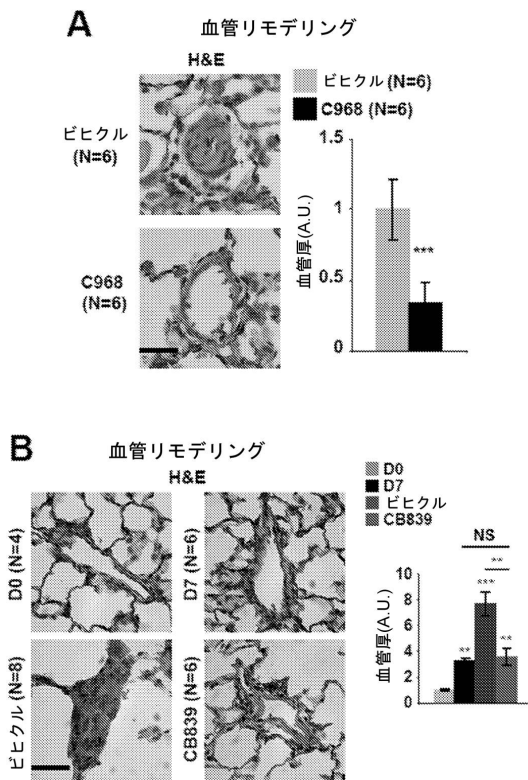
40

50



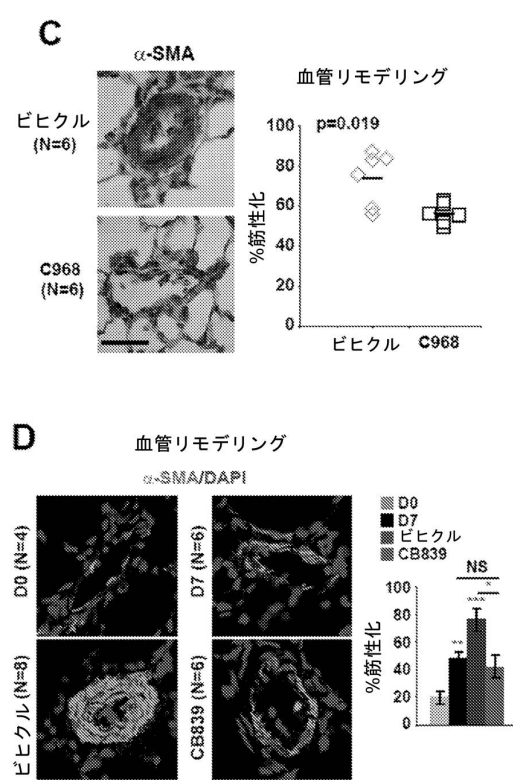
【図 6 - 1】

図 6



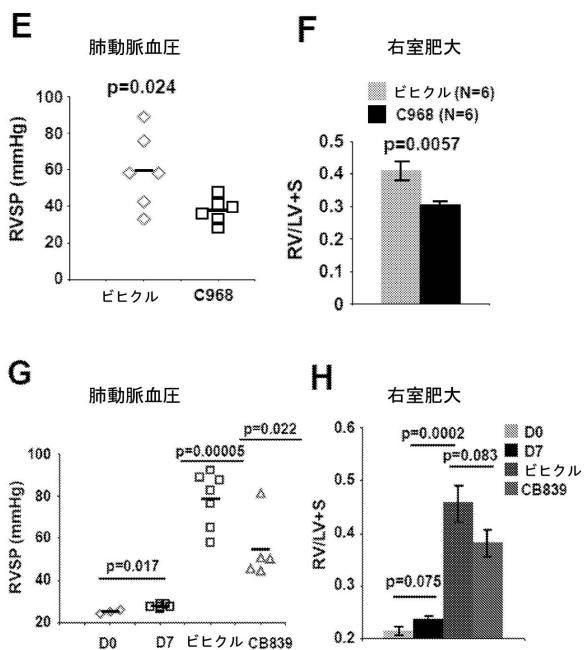
【図 6 - 2】

図 6 続き



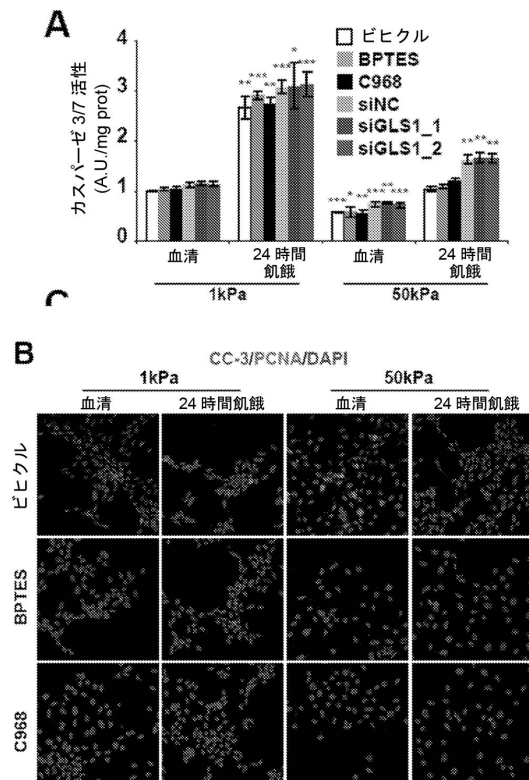
【図 6 - 3】

図 6 続き



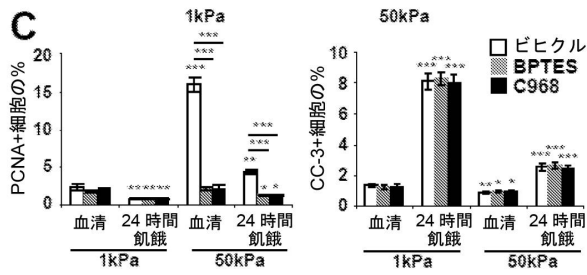
【図 7 - 1】

図 7



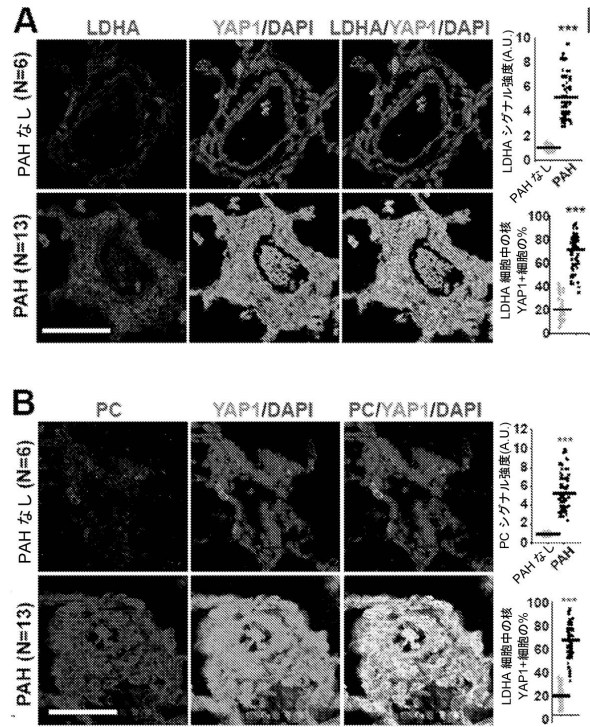
【図 7 - 2】

図 7 続き



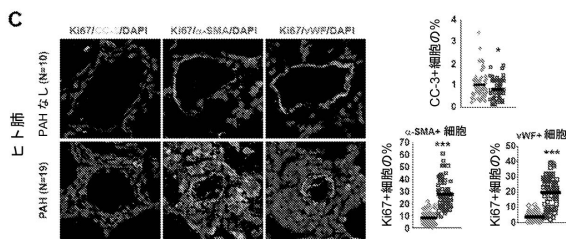
【図 8 - 1】

図 8



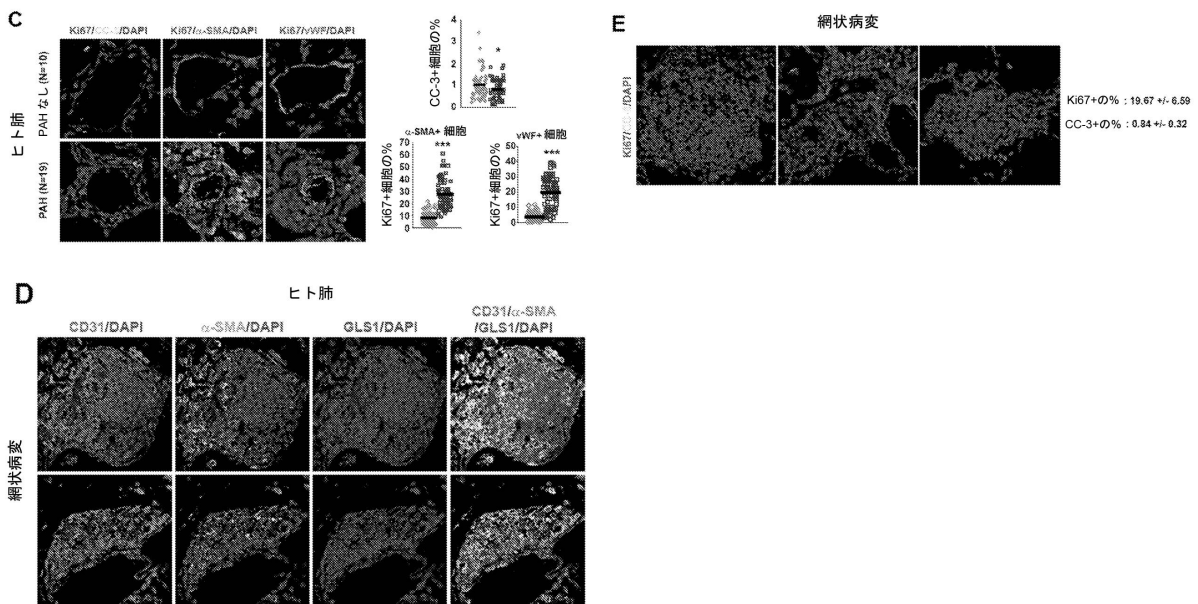
【図 8 - 2】

図 8 続き



【図 8 - 3】

図 8 続き



10

20

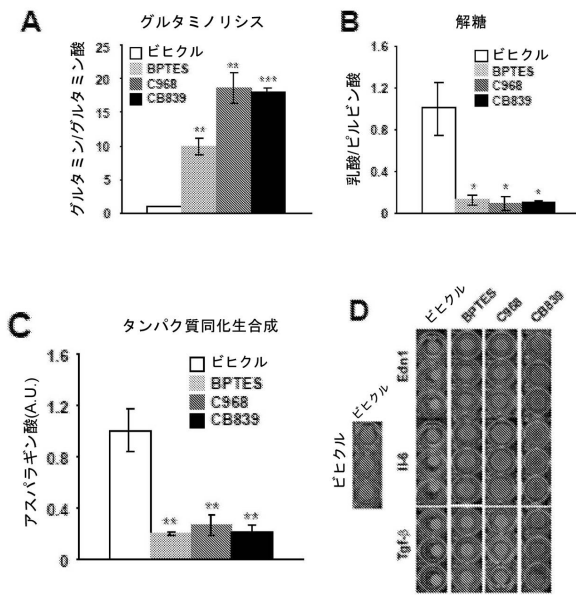
30

40

50

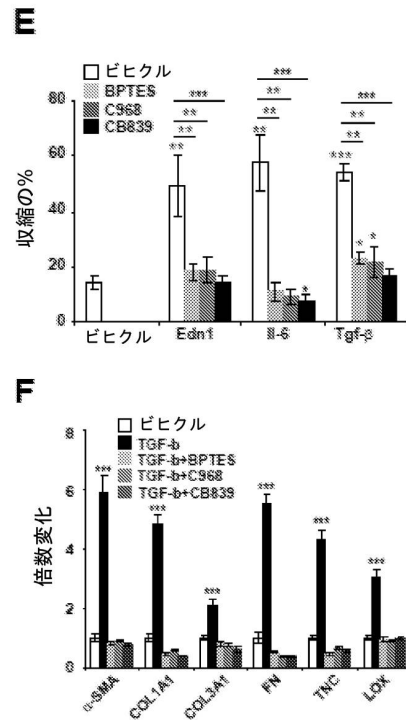
【図 9 - 1】

図 9



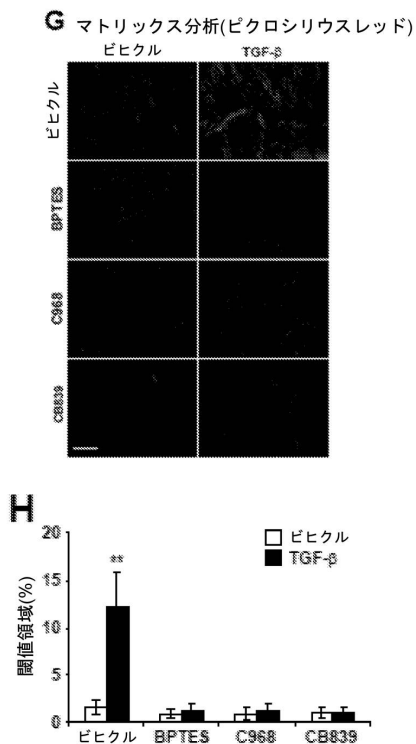
【図 9 - 2】

図 9 続き



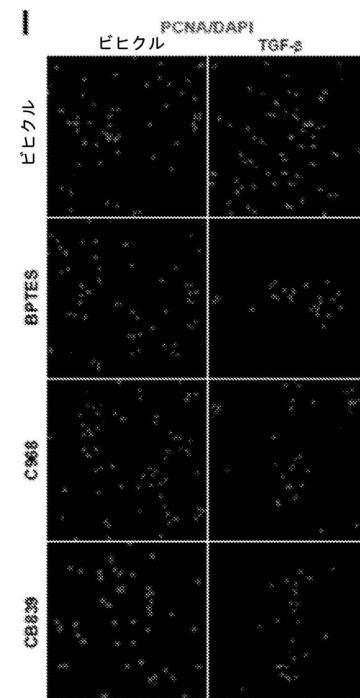
【図 9 - 3】

図 9 続き



【図 9 - 4】

図 9 続き



10

20

30

40

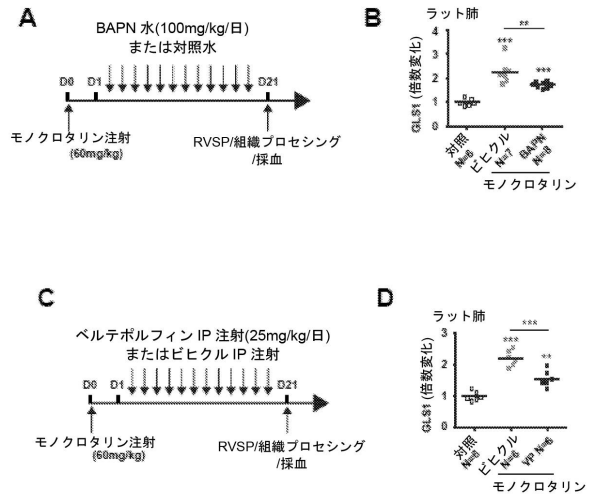
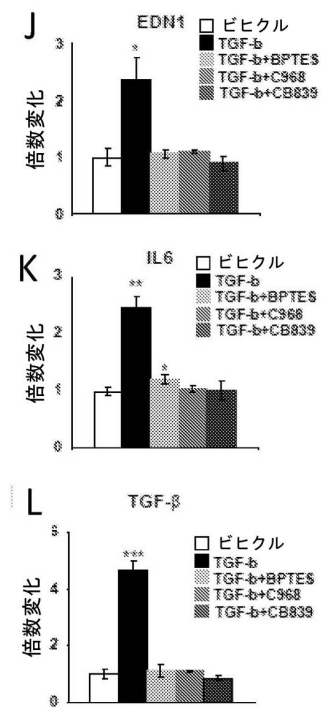
50

【図 9 - 5】

【図 10 - 1】

図 10

図 9 続き

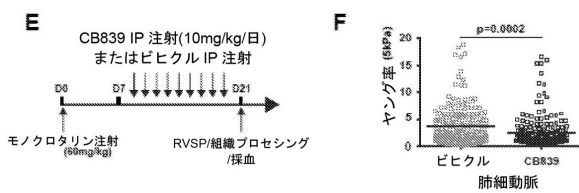


10

20

【図 10 - 2】

図 10 続き



30

【配列表】

0007079937000001.app

40

50

## フロントページの続き

## (51)国際特許分類

C 0 7 K 14/47 (2006.01)

F I

A 6 1 P 43/00 1 1 1

C 0 7 K 14/47 Z N A

## (73)特許権者 503146324

ザ ブリガム アンド ウィメンズ ホスピタル インコーポレイテッド

The Brigham and Women's Hospital, Inc.

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 1 5 ポストン フランシス ストリート 7 5

## (74)代理人 100092783

弁理士 小林 浩

## (74)代理人 100120134

弁理士 大森 規雄

## (74)代理人 100131990

弁理士 大野 玲恵

## (74)代理人 100104282

弁理士 鈴木 康仁

## (72)発明者 チャン, スティーブン ワイ.

アメリカ合衆国 ペンシルバニア州 1 5 2 3 8, ピッツバーグ, ドッグウッド レーン 1 1 1

## (72)発明者 ベルテロ, トーマス

フランス国 ニース 0 6 2 0 0, バット ビー, レジデンス ル パーク ダジュール, アベニュー  
デ マニョリア 2 2

審査官 山村 祥子

## (56)参考文献 国際公開第 2 0 1 6 / 0 7 7 6 3 2 (WO, A 2)

Cell Reports, 2015年, 13, 1016-1032

Am J Cancer Res, 2016年01月01日, 6(1), 27-37

Am J Respir Crit Care Med, 2016年, Vol 194, Iss 7, 866-877

## (58)調査した分野 (Int.Cl., D B 名)

A 6 1 K 4 5 / 0 0

A 6 1 K 3 1 / 0 0

A 6 1 P 9 / 0 0

C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T  
N )

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )