



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110691612 B

(45) 授权公告日 2024. 11. 08

(21) 申请号 201780082981.0

(22) 申请日 2017.11.10

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 110691612 A

(43) 申请公布日 2020.01.14

(30) 优先权数据  
62/420,515 2016.11.10 US  
62/530,533 2017.07.10 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日  
2019.07.10

(86) PCT国际申请的申请数据  
PCT/US2017/061116 2017.11.10

(87) PCT国际申请的公布数据  
W02018/089804 EN 2018.05.17

(73) 专利权人 阿瑞那制药公司  
地址 美国加利福尼亚州  
专利权人 卢西·H·克拉普

(72) 发明人 卢西·H·克拉普 D·P·贝汉  
约翰·W·亚当姆斯

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262

专利代理师 刘晓杰

(51) Int.Cl.  
A61K 45/06 (2006.01)  
A61K 31/192 (2006.01)  
A61K 31/325 (2006.01)  
A61K 31/506 (2006.01)  
A61K 31/513 (2006.01)  
A61K 31/519 (2006.01)  
A61P 9/12 (2006.01)  
A61P 35/00 (2006.01)

(56) 对比文件  
WO 2016065103 A1, 2016.04.28  
Diana Drogalis-Kim等.Right sided heart failure and pulmonary hypertension: New insights into disease mechanisms and treatment modalities.《Progress in Pediatric Cardiology》.2016,第71-80页.

审查员 汤明秀

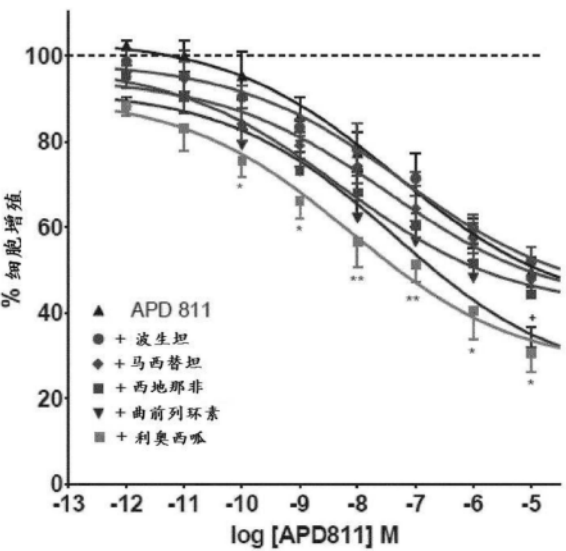
权利要求书3页 说明书24页 附图41页

(54) 发明名称

采用RALINEPAG与其他药剂的组合治疗PAH的方法

(57) 摘要

本公开内容包括ralinepag与cGMP-升高剂或前列腺素如利奥西呱、曲前列环素或伊洛前列素的组合,用于治疗PAH。所公开的组合法提供了诸如提高功效、提高安全性、减少ralinepag和/或利奥西呱的剂量和/或频率、减少ralinepag和/或曲前列环素的剂量和/或频率以及减少ralinepag和/或伊洛前列素的剂量和/或频率等优点。在一些实施方案中,与相应的ralinepag、利奥西呱、曲前列环素和/或伊洛前列素单一疗法所提供的相比,减少剂量组合的临床有效性是相加的或协同的。



1. Ralinepag或其药物学可接受的盐与利奥西呱或其药物学可接受的盐在制备用于治疗PAH的药物中的应用。

2. 如权利要求1所述的应用,其中所述药物配制为利奥西呱的量选自约0.25、0.5、0.75、1、1.25、1.5、1.75、2、2.25、2.5、2.75、3、3.25、3.5、3.75、4、4.25、4.5、4.75和5 mg。

3. 如权利要求1所述的应用,其中所述药物配制为在所述药物中的利奥西呱的量选自0.5、1、1.5、2和2.5mg。

4. 如权利要求1所述的应用,其中所述药物配制为每日一次施用所述利奥西呱。

5. 如权利要求1所述的应用,其中所述药物配制为每日两次施用所述利奥西呱。

6. 如权利要求1所述的应用,其中所述药物配制为每日三次施用所述利奥西呱。

7. 如权利要求1所述的应用,其中滴定所述利奥西呱和ralinepag。

8. 如权利要求1所述的应用,其中所述药物配制为ralinepag的量选自每日0.01 mg、0.02 mg、0.025 mg、0.03 mg、0.04 mg、0.05 mg、0.06 mg、0.065 mg、0.07 mg、0.075 mg、0.08 mg、0.09 mg、0.1 mg、0.12 mg、0.15 mg、0.16 mg、0.2 mg、0.25 mg、0.3 mg、0.35 mg、0.4 mg、0.45 mg、0.5 mg、0.55 mg、0.6 mg、0.65 mg、0.7 mg、0.75 mg、0.8 mg、0.85 mg、0.9 mg、0.95 mg和1.0 mg。

9. 如权利要求1所述的应用,其中所述药物配制为用于每日施用一次ralinepag。

10. 如权利要求1所述的应用,其中所述药物配制为用于每日施用两次ralinepag。

11. 如权利要求1所述的应用,其中所述药物包含ralinepag。

12. 如权利要求1至11之一所述的应用,其中所述PAH选自特发性PAH;家族性PAH;与胶原血管病、先天性心脏病、门静脉高压症、HIV感染、药物或毒素摄入、遗传性出血性毛细血管扩张症、脾切除术、肺静脉闭塞性疾病或肺毛细血管瘤有关的PAH;以及伴有明显静脉或毛细血管受累的PAH。

13. Ralinepag与利奥西呱在制备用于治疗PAH的药物中的应用。

14. 如权利要求13所述的应用,其中所述药物配制为利奥西呱的量选自约0.25、0.5、0.75、1、1.25、1.5、1.75、2、2.25、2.5、2.75、3、3.25、3.5、3.75、4、4.25、4.5、4.75和5 mg。

15. 如权利要求13所述的应用,其中所述药物配制为在所述药物中的利奥西呱的量选自0.5、1、1.5、2和2.5mg。

16. 如权利要求13所述的应用,其中所述药物配制为每日一次施用所述利奥西呱。

17. 如权利要求13所述的应用,其中所述药物配制为每日两次施用所述利奥西呱。

18. 如权利要求13所述的应用,其中所述药物配制为每日三次施用所述利奥西呱。

19. 如权利要求13所述的应用,其中滴定所述利奥西呱和Ralinepag。

20. 如权利要求13所述的应用,其中药物配制为所述ralinepag的量选自约0.01 mg、0.02 mg、0.025 mg、0.03 mg、0.04 mg、0.05 mg、0.06 mg、0.065 mg、0.07 mg、0.075 mg、0.08 mg、0.09 mg、0.1 mg、0.12 mg、0.15 mg、0.16 mg、0.2 mg、0.25 mg、0.3 mg、0.35 mg、0.4 mg、0.45 mg、0.5 mg、0.55 mg、0.6 mg、0.65 mg、0.7 mg、0.75 mg、0.8 mg、0.85 mg、0.9 mg、0.95 mg和1.0 mg。

21. 如权利要求13所述的应用,其中所述药物配制为含有ralinepag的量选自0.01mg、0.02mg、0.03mg、0.04mg、0.05mg、0.06mg、0.07mg、0.08mg、0.09mg、0.1mg、0.11mg、0.12mg、0.13mg、0.14mg、0.15mg、0.16mg、0.17mg、0.18mg、0.19mg、0.2mg、0.21mg、0.22mg、0.23mg、

0.24mg、0.25mg、0.26mg、0.27mg、0.28mg、0.29mg、0.3mg、0.32mg、0.34mg、0.36mg、0.38mg、0.4mg、0.42mg、0.44mg、0.46mg、0.48mg、0.5mg、0.52mg、0.54mg、0.56mg、0.58mg和0.6 mg。

22. 如权利要求13所述的应用,其中所述药物配制为用于每日施用一次ralinepag。

23. 如权利要求13所述的应用,其中所述药物配制为用于每日施用两次ralinepag。

24. 如权利要求13所述的应用,其中所述药物包含ralinepag。

25. 如权利要求13所述的应用,其中所述PAH选自特发性PAH;家族性PAH;与胶原血管病、先天性心脏病、门静脉高压症、HIV感染、药物或毒素摄入、遗传性出血性毛细血管扩张症、脾切除术、肺静脉闭塞性疾病或肺毛细血管瘤有关的PAH;以及伴有明显静脉或毛细血管受累的PAH。

26. Ralinepag或其药物学可接受的盐与曲前列环素或其药物学可接受的盐在制备用于治疗PAH的药物中的应用。

27. 如权利要求26所述的应用,其中所述药物配制为曲前列环素的量选自0.1、0.125、0.2、0.25、0.3、0.35、0.4、0.45、0.5、0.6、0.65、0.7、0.75、0.8、0.85、0.9、0.95、1、0.25、0.5、1.75、2、2.25、2.5、2.75、3、3.25、3.5、3.75、4、4.25、4.5、4.75和5 mg。

28. 如权利要求26所述的应用,其中所述药物配制为曲前列环素的量选自0.1、0.2、0.25、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.75、0.8、0.9、1、2.5、3、4、5、6、7、7.5、8、9和10 mg/ml。

29. 如权利要求26所述的应用,其中药物配制为所述ralinepag的量选自约0.01 mg、0.02 mg、0.025 mg、0.03 mg、0.04 mg、0.05 mg、0.06 mg、0.065 mg、0.07 mg、0.075 mg、0.08 mg、0.09 mg、0.1 mg、0.12 mg、0.15 mg、0.16 mg、0.2 mg、0.25 mg、0.3 mg、0.35 mg、0.4 mg、0.45 mg、0.5 mg、0.55 mg、0.6 mg、0.65 mg、0.7 mg、0.75 mg、0.8 mg、0.85 mg、0.9 mg、0.95 mg和1.0 mg。

30. 如权利要求26所述的应用,其中所述药物配制为含有ralinepag的量选自0.01mg、0.02mg、0.03mg、0.04mg、0.05mg、0.06mg、0.07mg、0.08mg、0.09mg、0.1mg、0.11mg、0.12mg、0.13mg、0.14mg、0.15mg、0.16mg、0.17mg、0.18mg、0.19mg、0.2mg、0.21mg、0.22mg、0.23mg、0.24mg、0.25mg、0.26mg、0.27mg、0.28mg、0.29mg、0.3mg、0.32mg、0.34mg、0.36mg、0.38mg、0.4mg、0.42mg、0.44mg、0.46mg、0.48mg、0.5mg、0.52mg、0.54mg、0.56mg、0.58mg和0.6 mg。

31. 如权利要求26所述的应用,其中所述药物配制为用于每日施用一次ralinepag。

32. 如权利要求26所述的应用,其中所述药物配制为用于每日施用两次ralinepag。

33. 如权利要求26所述的应用,其中滴定所述Ralinepag。

34. 如权利要求26所述的应用,其中所述药物包含ralinepag。

35. 如权利要求26所述的应用,其中所述PAH选自特发性PAH;家族性PAH;与胶原血管病、先天性心脏病、门静脉高压症、HIV感染、药物或毒素摄入、遗传性出血性毛细血管扩张症、脾切除术、肺静脉闭塞性疾病或肺毛细血管瘤有关的PAH;以及伴有明显静脉或毛细血管受累的PAH。

36. Ralinepag与曲前列环素在制备用于治疗PAH的药物中的应用。

37. 如权利要求36所述的应用,其中所述药物配制为曲前列环素的量选自0.1、0.125、0.2、0.25、0.3、0.35、0.4、0.45、0.5、0.6、0.65、0.7、0.75、0.8、0.85、0.9、0.95、1、0.25、0.5、1.75、2、2.25、2.5、2.75、3、3.25、3.5、3.75、4、4.25、4.5、4.75和5 mg。

38. 如权利要求36所述的应用,其中所述药物配制为曲前列环素的量选自0.1、0.2、

0.25、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.75、0.8、0.9、1、2.5、3、4、5、6、7、7.5、8、9和10 mg/ml。

39. 如权利要求36所述的应用,其中药物配制为所述ralinepag的量选自约0.01 mg、0.02 mg、0.025 mg、0.03 mg、0.04 mg、0.05 mg、0.06 mg、0.065 mg、0.07 mg、0.075 mg、0.08 mg、0.09 mg、0.1 mg、0.12 mg、0.15 mg、0.16 mg、0.2 mg、0.25 mg、0.3 mg、0.35 mg、0.4 mg、0.45 mg、0.5 mg、0.55 mg、0.6 mg、0.65 mg、0.7 mg、0.75 mg、0.8 mg、0.85 mg、0.9 mg、0.95 mg和1.0 mg。

40. 如权利要求36所述的应用,其中所述药物配制为含有ralinepag的量选自0.01mg、0.02mg、0.03mg、0.04mg、0.05mg、0.06mg、0.07mg、0.08mg、0.09mg、0.1mg、0.11mg、0.12mg、0.13mg、0.14mg、0.15mg、0.16mg、0.17mg、0.18mg、0.19mg、0.2mg、0.21mg、0.22mg、0.23mg、0.24mg、0.25mg、0.26mg、0.27mg、0.28mg、0.29mg、0.3mg、0.32mg、0.34mg、0.36mg、0.38mg、0.4mg、0.42mg、0.44mg、0.46mg、0.48mg、0.5mg、0.52mg、0.54mg、0.56mg、0.58mg和0.6 mg。

41. 如权利要求36所述的应用,其中所述药物配制为用于每日施用一次ralinepag。

42. 如权利要求36所述的应用,其中所述药物配制为用于每日施用两次ralinepag。

43. 如权利要求36所述的应用,其中滴定所述Ralinepag。

44. 如权利要求36所述的应用,其中所述药物包含ralinepag。

45. 如权利要求36所述的应用,其中所述PAH选自特发性PAH;家族性PAH;与胶原血管病、先天性心脏病、门静脉高压症、HIV感染、药物或毒素摄入、遗传性出血性毛细血管扩张症、脾切除术、肺静脉闭塞性疾病或肺毛细血管瘤有关的PAH;以及伴有明显静脉或毛细血管受累的PAH。



## 采用RALINEPAG与其他药剂的组合治疗PAH的方法

### [0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2016年11月10日提交的美国临时申请号62/420,515和于2017年7月10日提交的美国临时申请号62/530,533的优先权的权益,两份美国临时申请的内容均通过引用以其全文并入本文。

### 技术领域

[0003] 本发明涉及治疗方法以及ralinepag (也称为APD811) 和cAMP升高剂或cGMP升高剂 (例如,可溶性鸟苷酸环化酶(sGC) 刺激剂如利奥西呱(riociguat) 的组合、ralinepag和前列腺素 (例如,曲前列环素) 的组合,或ralinepag和前列环素受体激动剂的组合,其可用于治疗肺动脉高压 (PAH);特发性PAH;家族性PAH;与胶原血管病、先天性心脏病、门静脉高压症、HIV感染、药物或毒素摄入、遗传性出血性毛细血管扩张症、脾切除术、肺静脉闭塞性疾病 (PVOD) 或肺毛细血管瘤 (PCH) 有关的PAH;伴有明显静脉或毛细血管受累的PAH;血小板聚集;冠状动脉疾病;心肌梗死;短暂性脑缺血发作;心绞痛;中风;缺血再灌注损伤;再狭窄;心房颤动;血管成形术或冠状动脉搭桥手术个体或患有心房颤动的个体中的血凝块形成;动脉粥样硬化血栓形成;哮喘或其症状;糖尿病相关病症如糖尿病周围神经病变、糖尿病肾病或糖尿病视网膜病变;青光眼或另一种眼内压异常的眼部疾病;高血压;炎症;银屑病;银屑病关节炎;类风湿性关节炎;克罗恩病 (Crohn's disease);移植排斥;多发性硬化;系统性红斑狼疮 (SLE);溃疡性结肠炎;动脉粥样硬化;痤疮;1型糖尿病;2型糖尿病;脓毒症;以及慢性阻塞性肺疾病 (COPD)。

### 背景技术

[0004] 肺动脉高压 (PAH) 是一种高度增殖的炎性血管重塑疾病,其导致右心衰竭和死亡。由于在治疗PAH中使用依前列醇及其稳定的模拟物,前列环素 (依前列醇) 的肺部药理学仍然是一个相当令人感兴趣的领域。前列腺素化合物伊洛前列素 (静脉内,吸入) 和曲前列环素 (皮下,静脉内,吸入) 广泛用于治疗该疾病。鉴于上述递送途径引起的并发症,正在寻求成功的口服疗法在疾病过程早期使用,其中这类化合物的功效和/或效果得到改善 (McLaughlin等人,2009;Clapp和Gurung,2015)。

[0005] 口服贝前列素 (其含有贝前列素的几种异构体) 仅在日本和韩国获得许可 (Vachiere,2011),并且似乎在临床上具有有限的功效 (Barst等人,2003)。口服曲前列环素最近才获得FDA批准,但目前尚不清楚口服制剂是否会接近皮下或静脉内给药所见的临床疗效 (Tapson等人,2013)。Selexipag (NS-304) 是一种口服的非前列腺素IP受体激动剂 (Skoro-Sajer和Lang,2014;Sitbon等人,2015)。它是一种非前列腺素二苯基吡嗪衍生物,其活性代谢物MRE-269 (也称为ACT-333679) 被报道为一种高选择性的IP受体激动剂 (Kuwano等人,2007)。MRE-269有效结合人IP受体 ( $K_i=20\text{nM}$ ),而selexipag对该受体 ( $K_i=260\text{nM}$ ) 的亲合力小得多;然而,两者对其他前列腺素受体 ( $K_i\geq 2.6\mu\text{M}$ ) 几乎没有结合亲合力。

[0006] 在正常人肺动脉平滑肌细胞(PASMC)中,IP受体通过生成环AMP(cAMP)似乎是对曲前列环素和伊洛前列素的抗增殖反应的主要介质(Wharton等人,2000;Clapp等人,2002;Falcetti等人,2010)。相反,在从IPAH患者分离的人PASMC中,IP受体和cAMP似乎都不是支撑曲前列环素和伊洛前列素的抗增殖作用的主要介质,至少在所研究的浓度下如此(Falcetti等人,2010)。因此,在科学文献中没有明确的迹象表明,对IP受体具有选择性的有效药物在IP受体表达较低的疾病中效果如何,就像在具有PAH的患者中一样(Lai等人,2008;Falcetti等人,2010)。

[0007] Ralinepag (2-(((1r,4r)-4-(((4-氯苯基)(苯基)氨基甲酰氧基)甲基)环己基)甲氧基)乙酸,也称为APD811)是一种口服可用的非前列腺素前列环素(IP)受体激动剂,用于治疗如本文所述的各种病况,例如血管痉挛性疾病如PAH。Ralinepag在美国专利公开号2011/0053958中公开,其通过引用以其全文并入本文用于所有目的。

[0008] Ralinepag目前正被评估为治疗诸如PAH等病况的口服单一疗法。在最近的一项临床试验中,患者接受ralinepag的滴定,以便确定可耐受剂量。施用ralinepag的潜在方法包括以初始的低剂量给药,每日一次或两次,然后通过逐步增加ralinepag剂量和/或给药频率在一段时间内(通常为数周)增加剂量,直至达到最高可耐受的日剂量。

[0009] 剂量增加的需要可延迟向患者递送所需的最高可耐受治疗剂量,从而延迟潜在的临床益处。此外,需要施用多次日剂量是不方便的,并且可能降低患者的依从性。因此,期望提供施用ralinepag的方法,其中减少或消除剂量滴定,以及/或者减少或消除对多次日剂量的需要。此外,期望提供增强ralinepag和/或共同施用的化合物的治疗效果同时使副作用最小化的方法,例如通过在较低剂量的一种或多种化合物下实现临床功效。这样的方法将提供明显的临床益处,以及提高患者的依从性。本公开内容提供了改善的治疗和施用ralinepag的方法,特别是用于治疗PAH和相关病况。

## 发明内容

[0010] 在其各种实施方案中,本发明涉及一种在有需要的患者中减少(例如,肺动脉平滑肌细胞(PASMC)的)细胞增殖的方法,其包括与治疗有效量的一种或多种cGMP升高剂、cAMP升高剂、前列腺素或前列环素受体激动剂组合,施用治疗有效量的ralinepag,或其药学上可接受的盐、水合物或溶剂化物。

[0011] 在各种实施方案中,所述一种或多种cGMP或cAMP升高剂是可溶性鸟苷酸环化酶调节剂。

[0012] 在各种实施方案中,ralinepag与一种或多种cGMP升高剂(例如本文公开的任何cGMP升高剂)组合施用。

[0013] 在各种实施方案中,ralinepag与一种或多种cAMP升高剂(例如本文公开的任何cAMP升高剂)组合施用。

[0014] 在各种实施方案中,ralinepag与前列腺素(例如本文公开的任何前列腺素)组合施用。

[0015] 在各种实施方案中,ralinepag与一种或多种cGMP升高剂、cAMP升高剂、前列腺素或前列环素受体激动剂的共同施用在开始所述共同施用方法时不需要滴定例如ralinepag。在各种实施方案中,ralinepag与一种或多种cGMP升高剂、cAMP升高剂、前列腺

素或前列环素受体激动剂的共同施用不需要滴定例如一种或多种cGMP升高剂、cAMP升高剂、前列腺素或前列环素受体激动剂。例如,在一些实施方案中,ralinepag与利奥西呱的共同施用不需要滴定ralinepag。在一些实施方案中,ralinepag与利奥西呱的共同施用不需要滴定利奥西呱。

[0016] 在各种实施方案中,ralinepag与一种或多种cGMP升高剂、cAMP升高剂、前列腺素或前列环素受体激动剂的共同施用不需要与一种或两种共同施用的药剂的标准滴定方案(例如,针对单一疗法在产品标签上提供的滴定方案)一样多的步骤。在各种实施方案中,ralinepag与一种或多种cGMP升高剂、cAMP升高剂、前列腺素或前列环素受体激动剂的共同施用允许比一种或两种共同施用的药剂的标准滴定方案(例如,针对单一疗法在产品标签上提供的滴定方案)更高的初始剂量。

[0017] 在各种实施方案中,与所述一种或多种cGMP升高剂、cAMP升高剂或前列腺素组合的ralinepag的日剂量比在没有共同施用一种或多种cGMP升高剂、cAMP升高剂或前列腺素的情况下ralinepag的等效治疗量低至少约0.01mg、0.02mg、0.03mg、0.04mg、0.05mg、0.06mg、0.07mg、0.08mg、0.09mg、0.1mg、0.11mg、0.12mg、0.13mg、0.14mg、0.15mg、0.16mg、0.17mg、0.18mg、0.19mg、0.2mg、0.21mg、0.22mg、0.23mg、0.24mg、0.25mg、0.26mg、0.27mg、0.28mg、0.29mg或0.3mg(剂量当量)。

[0018] 在各种实施方案中,ralinepag与一种或多种cGMP升高剂、cAMP升高剂、前列腺素或前列环素受体激动剂的共同施用提供了相对于提供等效临床效果的ralinepag和/或cGMP升高剂、cAMP升高剂、前列腺素或前列环素受体激动剂的日剂量降低的ralinepag和/或cGMP升高剂、cAMP升高剂、前列腺素或前列环素受体激动剂的日剂量,。

[0019] 在各种实施方案中,ralinepag与以下中的一种或多种共同施用:利奥西呱、威利西呱(vericiguat)、阿他西呱(ataciguat)、nelociguat、利非西呱(lificiguat)、IW-1701、IW-1973、IWP-051、IWP-121、IWP-427、IWP-953、BAY-60-2770、A-344905;A-350619、A-778935、BI-684067、BI-703704、BAY-41-2272和BAY-41-8543。

[0020] 在各种实施方案中,ralinepag的量为或约为0.02、0.025、0.04、0.05、0.06、0.075、0.08、0.1、0.12、0.125、0.14、0.15、0.16、0.175、0.18、0.2、0.22、0.24、0.25、0.26、0.275、0.28、0.3、0.32、0.325、0.34、0.35、0.36、0.375、0.38、0.4、0.42、0.44、0.45、0.46、0.48、0.5、0.52、0.54、0.56、0.58、0.6、0.625、0.65、0.675、0.7、0.725、0.75、0.775、0.8、0.825、0.85、0.875、0.9、0.925、0.95、0.975或1.0mg,或任何两种这样的量的范围。例如,在各种实施方案中,ralinepag的量为或约为0.05-0.6mg。在各种实施方案中,ralinepag的量为或约为0.05-0.75mg。

[0021] 在各种实施方案中,ralinepag的量为或约为每日0.02、0.025、0.04、0.05、0.06、0.075、0.08、0.1、0.12、0.125、0.14、0.15、0.16、0.175、0.18、0.2、0.22、0.24、0.25、0.26、0.275、0.28、0.3、0.32、0.325、0.34、0.35、0.36、0.375、0.38、0.4、0.42、0.44、0.45、0.46、0.48、0.5、0.52、0.54、0.56、0.58、0.6、0.625、0.65、0.675、0.7、0.725、0.75、0.775、0.8、0.825、0.85、0.875、0.9、0.925、0.95、0.975或1.0mg,或任何两种这样的量的范围。例如,在各种实施方案中,ralinepag的量为或约为每日0.05-0.6mg。

[0022] 在各种实施方案中,ralinepag的量为或约为0.02、0.025、0.04、0.05、0.06、0.075、0.08、0.1、0.12、0.125、0.14、0.15、0.16、0.175、0.18、0.2、0.22、0.24、0.25、0.26、

0.275、0.28、0.3、0.32、0.325、0.34、0.35、0.36、0.375、0.38、0.4、0.42、0.44、0.45、0.46、0.48、0.5、0.52、0.54、0.56、0.58、0.6mg、0.625、0.65、0.675、0.7、0.725、0.75、0.775、0.8、0.825、0.85、0.875、0.9、0.925、0.95、0.975、或1.0mg每日一次(QD),或任何两种这样的量的范围。例如,在各种实施方案中,ralinepag的量为或约为0.05-0.6mg QD。

[0023] 在各种实施方案中,ralinepag的量为或约为0.01、0.02、0.025、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.075、0.08、0.09、0.1、0.11、0.12、0.125、0.13、0.14、0.15、0.16、0.17、0.175、0.18、0.19、0.2、0.21、0.22、0.23、0.24、0.25、0.26、0.27、0.275、0.28、0.29、0.3、0.325、0.35、0.375、0.4、0.425、0.45、0.475或0.5mg每日两次(BID),或任何两种这样的量的范围。例如,在各种实施方案中,ralinepag的量为或约为0.05-0.3mg BID。

[0024] 在各种实施方案中,ralinepag的量为或约为每隔一天0.01、0.02、0.025、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.075、0.08、0.09或0.1mg。

[0025] 在各种实施方案中,利奥西呱的量为或约为0.25、0.5、0.75、1、1.25、1.5、1.75、2、2.25、2.5、2.75、3、3.25、3.5、3.75、4、4.25、4.5、4.75或5mg,或任何两种这样的量的范围。例如,在各种实施方案中,利奥西呱的量为或约为0.5至2.5mg。

[0026] 在各种实施方案中,利奥西呱的量为或约为每日0.25、0.5、0.75、1、1.25、1.5、1.75、2、2.25、2.5、2.75、3、3.25、3.5、3.75、4、4.25、4.5、4.75或5mg,或任何两种这样的量的范围。例如,在各种实施方案中,利奥西呱的量为或约为每日0.5至2.5mg。

[0027] 在各种实施方案中,利奥西呱的量为或约为0.25、0.5、0.75、1、1.25、1.5、1.75、2、2.25、2.5、2.75、3、3.25、3.5、3.75、4、4.25、4.5、4.75或5mg每日一次(QD),或任何两种这样的量的范围。例如,在各种实施方案中,利奥西呱的量为或约为0.5至2.5mg每日一次。在各种实施方案中,所述利奥西呱每日施用两次。在各种实施方案中,所述利奥西呱每日施用三次。

[0028] 在各种实施方案中,利奥西呱的量为或约为0.25、0.5、0.75、1、1.25、1.5、1.75、2、2.25或2.5mg每日两次(BID),或任何两种这样的量的范围。

[0029] 在各种实施方案中,利奥西呱的量为0.5、1、1.5、2或2.5mg每日三次(TID),或任何两种这样的量的范围。

[0030] 在各种实施方案中,利奥西呱的量小于或等于0.25、0.5、0.75、1、1.25、1.5、1.75、2、2.25、2.5、2.75、3、3.25、3.5、3.75、4、4.25、4.5、4.75或5mg。

[0031] 在各种实施方案中,利奥西呱是吸入形式。在各种实施方案中,利奥西呱是静脉内形式。在各种实施方案中,利奥西呱是口服形式。

[0032] 在各种实施方案中,曲前列环素的量为或约为0.1、0.125、0.2、0.25、0.3、0.35、0.4、0.45、0.5、0.6、0.65、0.7、0.75、0.8、0.85、0.9、0.95、1、0.25、0.5、1.75、2、2.25、2.5、2.75、3、3.25、3.5、3.75、4、4.25、4.5、4.75、5、6、7、8、9或10mg,或任何两种这样的量的范围。例如,在各种实施方案中,曲前列环素的量为或约为0.125-5mg。

[0033] 在各种实施方案中,曲前列环素的量为或约为1、2.5、3、4、5、6、7、7.5、8、9、10、11、12、12.5、13、14、15、16、17、17.5、18、19、20或25mg/ml,或任何两种这样的量的范围。在各种实施方案中,曲前列环素的量以静脉内皮下形式为1-10mg/ml。

[0034] 在各种实施方案中,曲前列环素的量为或约为0.1、0.2、0.25、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.75、0.8、0.9或1mg/ml,或任何两种这样的量的范围。在各种实施方案中,曲前列环素

的量以吸入形式为0.6mg/ml。

[0035] 在各种实施方案中,曲前列环素的量小于或等于0.1、0.125、0.2、0.25、0.3、0.35、0.4、0.45、0.5、0.6、0.65、0.7、0.75、0.8、0.85、0.9、0.95、1、0.25、0.5、1.75、2、2.25、2.5、2.75、3、3.25、3.5、3.75、4、4.25、4.5、4.75或5mg。在各种实施方案中,曲前列环素的量小于或等于1、2.5、3、4、5、6、7、7.5、8、9或10mg/ml。在各种实施方案中,曲前列环素的量小于或等于0.1、0.2、0.25、0.3、0.4、0.5或0.6mg/ml。

[0036] 在各种实施方案中,曲前列环素是吸入形式。在一些实施方案中,曲前列环素是可注射形式。在各种实施方案中,曲前列环素是静脉内形式。在各种实施方案中,曲前列环素是静脉内皮下形式。在各种实施方案中,曲前列环素是口服形式。在各种实施方案中,曲前列环素是透皮形式。在各种实施方案中,曲前列环素是透皮贴剂。在各种实施方案中,曲前列环素每日施用一次。在各种实施方案中,曲前列环素每日施用两次。在各种实施方案中,曲前列环素每日施用三次。

[0037] 在一些实施方案中,ralinepag的治疗有效量是起始剂量。在一些实施方案中,ralinepag的治疗有效量是最高耐受剂量。在一些实施方案中,ralinepag的治疗有效量是最大剂量。在一些实施方案中,ralinepag的治疗有效量是最大耐受剂量。在一些实施方案中,ralinepag的治疗有效量是维持剂量。

[0038] 在一些实施方案中,起始剂量是针对患者的。在一些实施方案中,起始剂量是针对患者群体的。在一些实施方案中,最高耐受剂量是针对患者的。在一些实施方案中,最高耐受剂量是针对患者群体的。在一些实施方案中,最大剂量是针对患者的。在一些实施方案中,最大剂量是针对患者群体的。在一些实施方案中,最大耐受剂量是针对患者的。在一些实施方案中,最大耐受剂量是针对患者群体的。在一些实施方案中,维持剂量是针对患者的。在一些实施方案中,维持剂量是针对患者群体的。

[0039] 在一些实施方案中,ralinepag的起始剂量选自或选自约每日0.01、0.02、0.025、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.075、0.08、0.09或0.1mg。在一些实施方案中,ralinepag的起始剂量为每日0.01mg。在一些实施方案中,ralinepag的起始剂量为每日0.02mg。在一些实施方案中,ralinepag的起始剂量为每日0.05mg。

[0040] 在一些实施方案中,ralinepag的剂量以每周间隔增加每日0.05mg,直至每日最多0.8mg的最高耐受剂量。

[0041] 在一些实施方案中,ralinepag的剂量以每周间隔增加。在一些实施方案中,ralinepag的剂量以每两个月间隔增加。

[0042] 在一些实施方案中,ralinepag的剂量增加选自每日0.02mg、0.05mg和0.75mg以及0.1mg的量。

[0043] 在一些实施方案中,ralinepag的剂量以每周间隔增加选自每日0.02mg、0.05mg、和0.75mg和0.1mg的量。

[0044] 在一些实施方案中,ralinepag的最高耐受剂量选自或选自约每日0.4mg、0.45mg、0.5mg、0.6mg、0.65mg、0.7mg、0.75mg、0.8mg、0.85mg、0.9mg、0.95mg和1.0mg。在一些实施方案中,ralinepag的最高耐受剂量为每日0.6mg。在一些实施方案中,ralinepag的最高耐受剂量为每日0.75mg。在一些实施方案中,ralinepag的最高耐受剂量为每日0.8mg。在一些实施方案中,ralinepag的最高耐受剂量为每日0.4至1.0mg。在一些实施方案中,ralinepag的

最高耐受剂量为每日0.6至1.0mg。在一些实施方案中,ralinepag的最高耐受剂量为每日0.6至0.8mg。在一些实施方案中,ralinepag的最高耐受剂量为每日0.65至1.0mg。在一些实施方案中,ralinepag的最高耐受剂量为每日0.65至0.8mg。在一些实施方案中,ralinepag的最高耐受剂量为每日大于0.4mg。在一些实施方案中,ralinepag的最高耐受剂量为每日大于0.6mg。

[0045] 在一些实施方案中,ralinepag的最大剂量选自或选自约每日0.4mg、0.45mg、0.5mg、0.6mg、0.65mg、0.7mg、0.75mg、0.8mg、0.85mg、0.9mg、0.95mg和1.0mg。在一些实施方案中,ralinepag的最大剂量为每日0.6mg。在一些实施方案中,ralinepag的最大剂量为每日0.75mg。在一些实施方案中,ralinepag的最大剂量为每日0.8mg。在一些实施方案中,ralinepag的最大剂量为每日0.4至1.0mg。在一些实施方案中,ralinepag的最大剂量为每日0.6至1.0mg。在一些实施方案中,ralinepag的最大剂量为每日0.6至0.8mg。在一些实施方案中,ralinepag的最大剂量为每日0.65至1.0mg。在一些实施方案中,ralinepag的最大剂量为每日0.65至0.8mg。在一些实施方案中,ralinepag的最大剂量为每日大于0.4mg。在一些实施方案中,ralinepag的最大剂量为每日大于0.6mg。

[0046] 在一些实施方案中,ralinepag的最大耐受剂量选自或选自约每日0.4mg、0.45mg、0.5mg、0.6mg、0.65mg、0.7mg、0.75mg、0.8mg、0.85mg、0.9mg、0.95mg和1.0mg。在一些实施方案中,ralinepag的最大耐受剂量为每日0.6mg。在一些实施方案中,ralinepag的最大耐受剂量为每日0.75mg。在一些实施方案中,ralinepag的最大耐受剂量为每日0.8mg。在一些实施方案中,ralinepag的最大耐受剂量为每日0.75mg。在一些实施方案中,ralinepag的最大耐受剂量为每日0.8mg。在一些实施方案中,ralinepag的最大耐受剂量为每日0.4至1.0mg。在一些实施方案中,ralinepag的最大耐受剂量为每日0.6至1.0mg。在一些实施方案中,ralinepag的最大耐受剂量为每日0.6至0.8mg。在一些实施方案中,ralinepag的最大耐受剂量为每日0.65至1.0mg。在一些实施方案中,ralinepag的最大耐受剂量为每日0.65至0.8mg。在一些实施方案中,ralinepag的最大耐受剂量为每日大于0.4mg。在一些实施方案中,ralinepag的最大耐受剂量为每日大于0.6mg。

[0047] 在一些实施方案中,剂型中ralinepag的最大剂量选自或选自约每日0.4mg、0.45mg、0.5mg、0.6mg、0.65mg、0.7mg、0.75mg、0.8mg、0.85mg、0.9mg、0.95mg和1.0mg。在一些实施方案中,剂型中ralinepag的最大剂量为0.6mg。在一些实施方案中,剂型中ralinepag的最大剂量为0.75mg。在一些实施方案中,剂型中ralinepag的最大剂量是0.8mg。在一些实施方案中,ralinepag的最大剂量为每日0.4至1.0mg。在一些实施方案中,ralinepag的最大剂量为每日0.6至1.0mg。在一些实施方案中,ralinepag的最大剂量为每日0.6至0.8mg。在一些实施方案中,ralinepag的最大剂量为每日0.65至1.0mg。在一些实施方案中,ralinepag的最大剂量为每日0.65至0.8mg。在一些实施方案中,ralinepag的最大剂量为每日大于0.4mg。在一些实施方案中,ralinepag的最大剂量为每日大于0.6mg。

[0048] 在一些实施方案中,ralinepag的维持剂量选自或选自约每日0.01mg、0.02mg、0.025mg、0.03mg、0.04mg、0.05mg、0.06mg、0.065mg、0.07mg、0.075mg、0.08mg、0.09mg、0.1mg、0.12mg、0.15mg、0.16mg、0.2mg、0.25mg、0.3mg、0.35mg、0.4mg、0.45mg、0.5mg、0.55mg、0.6mg、0.65mg、0.7mg、0.75mg、0.8mg、0.85mg、0.9mg、0.95mg和1.0mg。在一些实施方案中,ralinepag的维持剂量为每日0.4至1.0mg。在一些实施方案中,ralinepag的维持剂

量为每日0.6至1.0mg。在一些实施方案中,ralinepag的维持剂量为每日0.6至0.8mg。在一些实施方案中,ralinepag的维持剂量为每日0.65至1.0mg。在一些实施方案中,ralinepag的维持剂量为每日0.65至0.8mg。在一些实施方案中,ralinepag的维持剂量由耐受性决定。在一些实施方案中,ralinepag的维持剂量为每日大于0.4mg。在一些实施方案中,ralinepag的维持剂量为每日大于0.6mg。

[0049] 在一些实施方案中,在接受不能耐受的ralinepag的剂量的患者中,将ralinepag的剂量降低至先前的耐受剂量。在一些实施方案中,先前的耐受剂量是患者的最大耐受剂量。

[0050] 在一些实施方案中,调节ralinepag的量以解释立即释放形式与延长释放形式之间的生物等效性的差异。例如,在一些实施方案中,提供0.8mg的延长释放剂型的ralinepag缓释剂型,以等同两种0.3mg的立即释放剂型的ralinepag,其中延长释放剂型与立即释放剂型的生物等效性小于100%。

[0051] 在一些实施方案中,治疗有效量适于每日施用一次。在一些实施方案中,治疗有效量适于每日施用两次。在一些实施方案中,治疗有效量每日施用一次。在一些实施方案中,治疗有效量每日施用两次。

[0052] 在各种实施方案中,滴定ralinepag。在各种实施方案中,滴定利奥西呱。在各种实施方案中,滴定ralinepag和利奥西呱二者。在一些实施方案中,根据监管机构批准的产品标签(如美国FDA,参见, **ADEMPAS®** 标签) 滴定利奥西呱,其通过引用并入本文。

[0053] 在各种实施方案中,滴定ralinepag。在各种实施方案中,滴定曲前列环素。在各种实施方案中,滴定ralinepag和曲前列环素二者。在一些实施方案中,根据监管机构批准的产品标签(如美国FDA,参见 **UPTRA VI®** 标签) 滴定曲前列环素,其通过引用并入本文。

[0054] 在各种实施方案中,ralinepag与曲前列环素、伊洛前列素、cisaprost和依前列醇中的一种或多种共同施用。

[0055] 在各种实施方案中,本文公开的共同施用方法可用于治疗PAH,例如特发性PAH;遗传性PAH;家族性PAH;与胶原血管病、先天性心脏病、伴有修复分流的先天性心脏病、门静脉高压症、结缔组织病、HIV感染、药物或毒素摄入、遗传性出血性毛细血管扩张症、脾切除术、肺静脉闭塞性疾病(PVOD)或肺毛细血管瘤(PCH)有关的PAH;以及伴有明显静脉或毛细血管受累的PAH。在一些实施方案中,本文公开的共同施用方法可用于治疗患有症状性PAH的人类受试者。在一些实施方案中,本文公开的共同施用方法可用于治疗患有PAH、WHO功能I级的人类受试者。在一些实施方案中,本文公开的共同施用方法可用于治疗患有PAH、WHO功能II级的人类受试者。在一些实施方案中,本文公开的共同施用方法可用于治疗患有PAH、WHO功能III级的人受试者。在一些实施方案中,本文公开的共同施用方法可用于治疗患有PAH、WHO功能IV级的人类受试者。在一些实施方案中,本文公开的共同施用方法可用于治疗患有PAH、WHO I组的人类受试者。在某些实施方案中,本文公开的共同施用方法可用于治疗具有WHO功能II-III级症状的PAH患者。在各种实施方案中,本文公开的共同施用方法可用于治疗慢性血栓栓塞性肺动脉高压(CTEPH)。在各种实施方案中,本文公开的共同施用方法可用于治疗手术治疗后的持续性/复发性CTEPH(WHO 4组)。在各种实施方案中,本文公开的共同施用方法可用于治疗不可手术的CTEPH,以改善运动能力和/或WHO功能分级。在各种实施方案中,本文公开的共同施用方法可用于治疗PAH(WHO 1组),以改善运动能力。在各

种实施方案中,本文公开的共同施用方法可用于改善WHO功能分级和/或延迟临床恶化。在各种实施方案中,本文公开的共同施用方法可用于延迟疾病进展和/或降低因PAH住院的风险。

### 附图说明

[0056] 图1A-1F示出了ralinepag与100nM利奥西呱组合的抗增殖作用。在不存在或仅存在100nM利奥西呱和SMBM的情况下,将生长停滞细胞在含有9%FBS $\pm$ 0.1%DMSO、FBS加ralinepag和DMSO的人平滑肌基础培养基(SMBM)中温育96小时(时间对照)。将细胞增殖归一化为由FBS和DMSO诱导的生长反应,将其作为FBS和DMSO反应减去时间对照(=4天时100%生长)。在ralinepag和溶剂 $\pm$ 利奥西呱存在下诱导的生长反应表现为相对于单独的FBS反应的细胞增殖的%变化。使用GraphPad中的可变斜率S形曲线拟合程序拟合数据,并显示每个拟合的参数。数据来自5个独立的患者细胞分离物。\*与单独的ralinepag相比,\*= $P<0.05$ ;采用Bonferroni事后检验的双向方差分析。

[0057] 图2示出了在riociguat存在下,ralinepag是来自PAH患者的人PASMC中更有效的血清诱导增殖的抑制剂。在不存在(A)和存在100nM利奥西呱(B)的情况下,增加剂量的ralinepag的平均抗增殖作用。将人PASMC在9%血清(FBS)和0.1%DMSO中生长4天 $\pm$ 药物。将细胞增殖归一化为由FBS和DMSO诱导的生长反应,将其作为FBS反应减去时间对照(=4天时100%生长)。在ralinepag和溶剂 $\pm$ 利奥西呱存在下诱导的生长反应表现为相对于单独的FBS反应的细胞增殖的%变化。图中还示出了在含有溶剂的生长培养基存在下利奥西呱(100nM)的作用。与对照(FBS和DMSO)相比,\*= $P<0.05$ ,\*\*\*= $P<0.001$ ;采用Bonferroni事后检验的单向方差分析( $n=5$ )。

[0058] 图3A-3F示出了ralinepag与100nM西地那非组合的抗增殖作用。在不存在和仅存在100nM西地那非或SMBM的情况下,将生长停滞细胞在含有9%FBS $\pm$ 0.1%DMSO、FBS加ralinepag和DMSO的人平滑肌基础培养基(SMBM)中温育96小时(时间对照)。将细胞增殖归一化为仅由FBS诱导的生长反应,将其作为FBS反应减去时间对照(=4天时100%生长)。在ralinepag加溶剂存在下诱导的生长反应表现为相对于单独的FBS反应的细胞增殖的%变化。使用GraphPad中的可变斜率S形曲线拟合程序拟合数据,并显示每个拟合的参数。数据来自5个独立的患者细胞分离物。

[0059] 图4示出了西地那非对来自PAH患者的人PASMC中ralinepag的抗增殖反应的作用。在不存在(A)和存在100nM西地那非(B)的情况下,增加剂量的ralinepag的平均抗增殖作用。将人PASMC在9%血清(FBS)和0.1%DMSO中生长4天 $\pm$ 药物。将细胞增殖归一化为仅由FBS诱导的生长反应,将其作为FBS反应减去时间对照(=4天时100%生长)。在ralinepag和溶剂 $\pm$ 西地那非存在下诱导的生长反应表现为相对于单独的FBS反应的细胞增殖的%变化。图中示出了在含有溶剂的生长培养基存在下,西地那非(Sild;100nM)的作用。与对照(FBS和DMSO)相比,\*= $P<0.05$ ,\*\*= $P<0.01$ ,\*\*\*= $P<0.001$ ;采用Bonferroni事后检验的单向方差分析( $n=5$ )。

[0060] 图5A-5F示出了ralinepag与100nM曲前列环素组合的抗增殖作用。在不存在和仅存在100nM曲前列环素或SMBM的情况下,将生长停滞细胞在含有9%FBS $\pm$ 0.1%DMSO、FBS加ralinepag和DMSO的人平滑肌基础培养基(SMBM)中温育96小时(时间对照)。将细胞增殖归



一化为仅由FBS诱导的生长反应,将其作为FBS反应减去时间对照(=4天时100%生长)。在ralinepag加溶剂存在下诱导的生长反应表现为相对于单独的FBS反应的细胞增殖的%变化。使用GraphPad中的可变斜率S形曲线拟合程序拟合数据,并显示每个拟合的参数。数据来自5个独立的患者细胞分离物。

[0061] 图6示出了在曲前列环素存在下,ralinepag是来自PAH患者的人PASMC中更有效的血清诱导增殖的抑制剂。在不存在(A)和存在100nM曲前列环素(B)的情况下,增加剂量的ralinepag的平均抗增殖作用。将人PASMC在9%血清(FBS)和0.1%DMSO中生长4天±药物。将细胞增殖归一化为仅由FBS诱导的生长反应,将其作为FBS反应减去时间对照(=4天时100%生长)。在ralinepag和溶剂±曲前列素存在下诱导的生长反应表现为相对于单独的FBS反应的细胞增殖的%变化。图中还示出了在含有溶剂的生长培养基存在下,曲前列环素(Trep;100nM)的作用。与对照(FBS和DMSO)相比,\*= $P<0.05$ ,\*\*= $P<0.01$ ,\*\*\*= $P<0.001$ ;采用Bonferroni事后检验的单向方差分析( $n=5$ )。

[0062] 图7A-7F示出了ralinepag与100nM马西替坦组合的抗增殖作用。在不存在和仅存在100nM马西替坦或SMBM的情况下,将生长停滞细胞在含有9%FBS±0.1%DMSO、FBS加ralinepag和DMSO的人平滑肌基础培养基(SMBM)中温育96小时(时间对照)。将细胞增殖归一化为仅由FBS诱导的生长反应,将其作为FBS反应减去时间对照(=4天时100%生长)。在ralinepag加溶剂存在下诱导的生长反应表现为相对于单独的FBS反应的细胞增殖的%变化。使用GraphPad中的可变斜率S形曲线拟合程序拟合数据,并显示每个拟合的参数。数据来自5个独立的患者细胞分离物。

[0063] 图8示出了马西替坦对来自PAH患者的人PASMC中ralinepag的抗增殖反应的作用。在不存在100nM马西替坦(A)和存在100nM马西替坦(B)的情况下,增加剂量的ralinepag的平均抗增殖作用。将人PASMC在9%血清(FBS)和0.1%DMSO中生长4天±药物。将细胞增殖归一化为仅由FBS诱导的生长反应,将其作为FBS反应减去时间对照(=4天时100%生长)。在ralinepag和溶剂±马西替坦存在下诱导的生长反应表现为相对于单独的FBS反应的细胞增殖的%变化。图中示出了在含有溶剂的生长培养基存在下,马西替坦(Maci;100nM)的作用。与对照(FBS和DMSO)相比,\*= $P<0.05$ ,\*\*= $P<0.01$ ,\*\*\*= $P<0.001$ ;采用Bonferroni事后检验的单向方差分析( $n=5$ )。

[0064] 图9A-9F示出了ralinepag与100nM波生坦组合的抗增殖作用。在不存在和仅存在100nM波生坦或SMBM的情况下,将生长停滞细胞在含有9%FBS±0.1%DMSO、FBS加ralinepag和DMSO的人平滑肌基础培养基(SMBM)中温育96小时(时间对照)。将细胞增殖归一化为仅由FBS诱导的生长反应,将其作为FBS反应减去时间对照(=4天时100%生长)。在ralinepag加溶剂存在下诱导的生长反应表现为相对于单独的FBS反应的细胞增殖的%变化。使用GraphPad中的可变斜率S形曲线拟合程序拟合数据,并显示每个拟合的参数。数据来自5个独立的患者细胞分离物。

[0065] 图10示出了波生坦对来自PAH患者的人PASMC中ralinepag的抗增殖反应的作用。在不存在(A)和存在100nM波生坦(B)的情况下,增加剂量的ralinepag的平均抗增殖作用。将人PASMC在9%血清(FBS)和0.1%DMSO中生长4天±药物。将细胞增殖归一化为仅由FBS诱导的生长反应,将其作为FBS反应减去时间对照(=4天时100%生长)。在ralinepag和溶剂±波生坦存在下诱导的生长反应表现为相对于单独的FBS反应的细胞增殖的%变化。图中

示出了在含有溶剂的生长培养基存在下,波生坦(Bos;100nM)的作用。与对照(FBS和DMSO)相比,\*= $P<0.05$ ,\*\*= $P<0.01$ ,\*\*\*= $P<0.001$ ;采用Bonferroni事后检验的单向方差分析( $n=5$ )。

[0066] 图11A-11E示出了PAH疗法与ralinepag组合对人PASMC细胞中细胞增殖的作用。在来自相同PAH患者和传代的细胞中进行比较,并且所述细胞已在9%血清(FBS)和0.1%DMSO中生长4天并用ralinepag±利奥西呱(A)、西地那非(B)、曲前列环素(C)、马西替坦(D)或波生坦(E)处理。将细胞增殖归一化为由FBS加溶剂诱导的生长反应。使用Graph Pad中的可变斜率S形曲线拟合程序进行拟合,数据显示为拟合中的平均值±S.E.M.,并显示每个拟合的参数。与单独的ralinepag相比,\*= $P<0.05$ ;采用Bonferroni事后检验的单向方差分析( $n=5$ )。

[0067] 图12示出了不同PAH药物与ralinepag组合对来自PAH患者的人PASMC的细胞增殖的比较。数据显示为平均值±S.E.M.,并取自图1、3、5、7和9。当该药物与100nM的波生坦、马西替坦、西地那非、曲前列环素或利奥西呱组合时,比较ralinepag对血清诱导生长的浓度依赖性作用。与ralinepag相比,\*= $P<0.05$ ,\*\*= $P<0.01$ ;采用Bonferroni事后检验的双向方差分析。

### 具体实施方式

[0068] 本公开内容提供了向有需要的患者施用ralinepag的改进方法,特别是对于患有多种形式的PAH的患者,例如特发性PAH;家族性PAH;与胶原血管病、先天性心脏病、门静脉高压症、HIV感染、药物或毒素摄入、遗传性出血性毛细血管扩张症、脾切除术、肺静脉闭塞性疾病(PVOD)或肺毛细血管瘤(PCH)有关的PAH;以及伴有明显静脉或毛细血管受累的PAH。本公开内容的方法还适用于治疗其他病况,如血小板聚集;冠状动脉疾病;心肌梗死;短暂性脑缺血发作;心绞痛;中风;缺血再灌注损伤;再狭窄;心房颤动;血管成形术或冠状动脉搭桥手术个体或心房颤动的个体中的血凝块形成;动脉粥样硬化血栓形成;哮喘或其症状;糖尿病相关病症如糖尿病周围神经病变、糖尿病肾病或糖尿病视网膜病变;青光眼或另一种眼内压异常的眼部疾病;高血压;炎症;银屑病;银屑病关节炎;类风湿性关节炎;克罗恩病;移植排斥;多发性硬化;系统性红斑狼疮(SLE);溃疡性结肠炎;动脉粥样硬化;痤疮;1型糖尿病;2型糖尿病;脓毒症;以及慢性阻塞性肺疾病(COPD)。

[0069] 肺动脉高血压(PAH)是一种危及生命的疾病,其特征在於进行性肺血管病变导致右心室肥大。如果不治疗,会发生右心衰竭。与正常对照相比,PAH患者中的前列环素含量较低,该前列环素对肺血管系统具有血管扩张和抗增殖作用。前列环素或前列环素类似物,例如,前列腺素如曲前列环素、伊洛前列素和贝前列素的外源施用已被用于治疗PAH。然而,前列环素、曲前列环素和伊洛前列素不具有口服活性,并且必须静脉内施用。虽然贝前列素具有口服活性,但尚未在欧洲和美国获得批准。

[0070] Selaxipag(2-{4-[(5,6-二苯基吡嗪-2-基)(丙-2-基)氨基]丁氧基}-N-(甲磺酰基)乙酰胺)及其游离羧酸活性代谢物MRE-269也已知用于治疗PAH。然而,这些药物价格昂贵,并且在体内的半衰期相对较短,分别为约8、3-4和0.5小时(Kuwano等人,2007;Clapp和Gurung,2015)。相反,无论剂量如何,ralinepag的血浆半衰期相对较长。因此,与已知的治疗剂相比,ralinepag在治疗PAH(和如本文所述的相关病况)方面具有提供改善的治疗效果

的潜力。

[0071] ralinepag及其药学上可接受的盐、水合物、多晶型物和溶剂化物的合成,以及药物制剂和治疗方法的一般描述公开在,例如,美国申请号12/933,196(公布为US 2011/0053958;发布为US 8,895,776)中。治疗方法,包括滴定ralinepag的方法公开在PCT/US 2015/056824(公布为WO 2016/065103)中。后一申请详细描述了为需要用ralinepag治疗的患者优化剂量的各种方法。在各种实施方案中,ralinepag的初始剂量相当于0.01mg游离酸形式(称为相当于0.01mg的剂量),并且每日给药一次(QD)或每日给药两次(BID)。如果该剂量是可耐受的,则在第二周增加给药频率(例如,从QD到BID给药),并且/或者增加ralinepag的量,例如,以每周例如0.01mg的增量(剂量当量)从相当于0.01mg BID的初始剂量增加至0.3mg ralinepag的BID剂量。

[0072] 如本文所用,如果向患者施用该剂量不会导致不可接受的不良事件或不良事件的组合,则称患者“耐受”一定剂量的化合物如ralinepag。本领域技术人员将理解,耐受性是主观的,而且一名患者可容忍的量对另一名患者而言可能是无法容忍的。通常,耐受性反映了相对于任何不良事件,剂量的临床益处之间的主观平衡。如本文所述,“不良事件”是指与该化合物治疗相关的不希望的或不需要的临床症状。关于ralinepag,典型的不良事件包括头痛、恶心、呕吐、下颌疼痛、潮红、异常脉率、异常QT间期、坐位收缩压大于约160mmHg、坐位舒张压大于约100mmHg、收缩压低于约90mmHg、腹痛、鼻出血、肌肉酸痛、感觉温暖、心悸、头晕、瘙痒、腹泻、胸闷、关节疼痛、刺痛或刺痛皮肤感觉、胸痛、胸部不适、红斑或任何上述的组合。

[0073] “优化剂量”或“最佳剂量”是指治疗剂量,通常是化合物(或其药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物等)的最高治疗剂量,其能给患者带来最大所期望的临床益处,同时使无法容忍的副作用(例如,不良事件)最小化。本领域技术人员将认识到,最佳剂量可随患者而变化,或者甚至对于特定患者随时间的推移而变化。

[0074] 滴定ralinepag以使副作用最小化并确定优化剂量或最佳剂量的需要可能是耗时的。例如,在许多实施方案中,可能需要二至多达约九周的滴定(即,逐渐增加的给药剂量和/或频率,通常基于每周一次)来确定ralinepag的最佳剂量。在该滴定期间,患者可在相当长的一段时间内保持次优剂量,这是不希望的。考虑到PAH的严重性,非常希望尽可能快地达到最佳剂量。此外,为了改善患者的依从性,期望在QD方案而不是BID给药方案上施用ralinepag。

[0075] 如本文所述,ralinepag与cGMP或cAMP升高剂如利奥西呱的共同施用,或ralinepag与前列环素受体激动剂或与前列腺素如曲前列环素或伊洛前列素的共同施用提供意想不到的优势。具体而言,这些组合提供了实质性改善。在一些实施方案中,与任一单一疗法相比,该改善允许更好的功效。在一些实施方案中,该改善允许减少ralinepag和/或cAMP升高剂、cGMP升高剂、前列环素受体激动剂或前列腺素的剂量。或者,或此外,因为这样的组合提供了实质性的改善,因此可在较低剂量的ralinepag和/或cAMP升高剂、cGMP升高剂、前列环素受体激动剂或前列腺素(与各自的单一疗法相比)获得最佳临床结果,从而提供单一疗法治疗方法的临床益处,但副作用减少。或者,本发明方法的组合可提供改善的临床益处和减少的副作用。

[0076] 所期望的临床益处可通过本领域适合或用于测量患者改善的任何临床指标来测

量。例如,根据公开于Am.J.Respir.Crit.Care Med.第166卷,p.111-117,2002;DOI:10.1164/rccm.166/1/111的美国胸科协会六分钟步行试验指南,临床益处可以是例如通过“六分钟步行试验”(6MWT)测量的至少40米的增加。“等效”或基本相似的临床益处意指通过常规临床指标测量的临床益处,例如如通过6MWT所测量的,当比较ralinepag和本文所述的至少一种cAMP升高剂、cGMP升高剂、前列环素受体激动剂或前列腺素的组合疗法时,与经历相似水平的不良事件或副作用的其他方面相同的患者(类似的生理特征、临床表现和对ralinepag的反应)相比,该指标在其他方面相同的患者或同一患者中提供基本相同的结果。

[0077] 在一些实施方案中,与使用相同或更高剂量的ralinepag的ralinepag单一疗法相比,如本文所述的共同施用的ralinepag和至少一种cAMP升高剂、cGMP升高剂、前列环素受体激动剂或前列腺素提供了临床益处的改善。例如,与使用ralinepag单一疗法(即,没有共同施用的cAMP升高剂、cGMP升高剂、前列环素受体激动剂或前列腺素)施用于其他方面相同的患者的相同日剂量相比,如本文所述的组合疗法可使用至少约5m、至少约10m、至少约15m、至少约20m、至少约25m或至少约30m的6MWT指标表现出临床益处的增加。

[0078] 类似地,如本文所述,共同施用ralinepag与cAMP升高剂、cGMP升高剂、前列环素受体激动剂或前列腺素,这样的cAMP升高剂、cGMP升高剂、前列环素受体激动剂或前列腺素的剂量可相对于在施用这样的cAMP升高剂、cGMP升高剂、前列环素或前列腺素作为单一疗法(即,无ralinepag)的其他方面相同的患者中实现等效治疗效果所需的量而减少。例如,如本文所讨论的,相对于在没有ralinepag的情况下所需的剂量,相应的cAMP升高剂、cGMP升高剂、前列环素受体激动剂或前列腺素的剂量可降低约1%、约5%、约10%、约15%、约20%、约25%、约30%、约35%、约40%、约45%或约50%,同时实现相似水平的临床功效,例如如通过6MWT和/或副作用水平所测量的。或者,与在没有ralinepag的情况下施用相似水平的cAMP升高剂、cGMP升高剂、前列腺素或前列环素受体激动剂的患者相比,ralinepag与cAMP升高剂、cGMP升高剂、前列环素受体激动剂或前列腺素的组合提供功效的改善,例如如通过6MWT(至少约5m、至少约10m、至少约15m、至少约20m、至少约25m或至少约30m)所测量的。

[0079] 在一个实施方案中,当与利奥西呱、前列环素、曲前列环素或伊洛前列素(或其他前列腺素)共同施用ralinepag时,与ralinepag单一疗法在其他方面相同的患者(或同一患者)中实现相同或基本相似的临床益处所需的量相比,可以在组合疗法中施用显著更低剂量的ralinepag。也就是说,ralinepag和利奥西呱、前列环素、曲前列环素或伊洛前列素的组合起协同作用,因此通过共同施用利奥西呱、前列环素、曲前列环素或伊洛前列素,加强或增强ralinepag的临床效果。例如,本文所述的组合疗法中所需的ralinepag的日剂量可比在单一疗法其他方面相同的患者(或同一患者)中实现相同或基本相似的临床益处所需的每日ralinepag剂量低至少约0.01mg、0.02mg、0.03mg、0.04mg、0.05mg、0.06mg、0.07mg、0.08mg、0.09mg、0.1mg、0.15mg、0.2mg、0.225mg、0.25mg或0.275mg或0.3mg。每日剂量可根据QD或BID给药方案提供。

[0080] 在其他实施方案中,当与利奥西呱、前列环素、曲前列环素或伊洛前列素(或其他前列腺素)共同施用ralinepag时,可以在组合疗法中施用相同剂量的ralinepag,该相同剂量的ralinepag可在ralinepag单一疗法中施用。然而,在组合疗法中,提供了显著改善的临

床益处,例如,如通过6MWT(至少约5m、至少约10m、至少约15m、至少约20m、至少约25m或至少约30m)所测量的,具有基本相似的副作用特征(即,在其他方面相同的患者或同一患者中,比较组合疗法与单一疗法)。

[0081] 在其他实施方案中,通过显著更低剂量的ralinepag和减少剂量的利奥西呱、前列环素、曲前列环素或伊洛前列素(或其他前列腺素)的组合,提供等效或基本相似的临床益处。例如,本文所述的组合疗法中所需的ralinepag的日剂量可比单一疗法在其他方面相同的患者(或同一患者)中实现相同或基本相同的临床益处所需的ralinepag剂量低至少约0.01mg、0.02mg、0.03mg、0.04mg、0.05mg、0.06mg、0.07mg、0.08mg、0.09mg、0.1mg、0.15mg、0.2mg、0.225mg、0.25mg或0.275mg或0.3mg。相对于无ralinepag的单一疗法在其他方面相同的患者(或同一患者)中实现相同或基本相同的临床益处所需的剂量,利奥西呱、前列环素、曲前列环素或伊洛前列素(或其他前列腺素)的日剂量可减少约1%、约5%、约10%、约15%、约20%、约25%、约30%、约35%、约40%、约45%或约50%。例如,本文所述的组合疗法中所需的利奥西呱的日剂量可比等效临床益处和/或不良事件特征所需的利奥西呱剂量低至少约0.1mg、0.2mg、0.3mg、0.4mg、0.5mg、0.6mg、0.7mg、0.8mg、0.9mg、1.0mg、1.25mg、1.5mg、1.75mg或2mg。日剂量可根据QD或BID给药方案提供。

[0082] 在一些实施方案中,治疗有效量的ralinepag与一种或多种cAMP升高剂、cGMP升高剂、前列环素受体激动剂或前列腺素同时施用,使得治疗有效量的ralinepag与一种或多种cAMP升高剂、cGMP升高剂、前列环素受体激动剂或前列腺素均存在于患者体内并同时发挥其治疗作用。Ralinepag可以在cAMP升高剂、cGMP升高剂、前列环素受体激动剂或前列腺素之前、同时或之后施用。如果同时施用ralinepag和cAMP升高剂、cGMP升高剂、前列环素受体激动剂或前列腺素,它们可分别以不同剂型施用,或在一些实施方案中以组合剂型施用。当以单独的剂型施用时,ralinepag可以以片剂或胶囊的形式口服施用,并且cAMP升高剂、cGMP升高剂、前列环素受体激动剂或前列腺素可口服施用(如果口服剂型是可用的或可能的)或作为静脉内或皮下剂型施用。在一些实施方案中,ralinepag还可作为可注射或静脉内剂型施用。

[0083] 在一个实施方案中,将ralinepag与利奥西呱共同施用。在另一个实施方案中,将ralinepag与曲前列环素共同施用。在另一个实施方案中,将ralinepag与伊洛前列素共同施用。在又一个实施方案中,将ralinepag与前列环素共同施用。在另一个实施方案中,将ralinepag与利奥西呱和曲前列环素共同施用。在另一个实施方案中,将ralinepag与利奥西呱和伊洛前列素共同施用。

[0084] Ralinepag是高度选择性的IP受体激动剂。在正常人肺动脉平滑肌细胞(PASMC)中,IP受体通过生成环AMP似乎是对曲前列素和伊洛前列素的抗增殖反应的主要介质(Wharton等人,2000;Clapp等人,2002;Falcetti等人,2010)。相反,在从特发性肺动脉高压(IPAH)患者分离的人PASMC中,IP受体和环AMP似乎都不是支撑曲前列环素和伊洛前列素的抗增殖作用的主要介质,至少在所研究的浓度下如此(Falcetti等人,2010)。

[0085] ralinepag在肺动脉或来自正常组织或来自PAH患者的微血管的细胞中的功能性作用以前是未知的,因此此类选择性IP激动剂在肺循环中的药理行为是不可预测的。因此,采用其他前列环素药物(预计通过激活其他靶标,包括其他前列腺素受体具有不同的作用(Clapp和Gurung,2015))对ralinepag进行评估,以确定它如何比较其在从PAH患者分离的

PASMC中生成cAMP和抑制平滑肌增殖能力。

[0086] 实施例

[0087] 本文评估了ralinepag与内皮素-1受体拮抗剂(ERA)、磷酸二酯酶5型(PDE 5)抑制剂或cAMP/cGMP升高剂(例如,可溶性鸟苷酸环化酶活化剂组合)的作用。

[0088] 来自高血压和正常患者的肺组织来源

[0089] 肺组织样品获自患有组1PAH或组3PAH(与肺病相关的PAH)的患者,这些患者在治疗失败后接受移植或者这些患者已经死亡。对于对照样品,使用发现不适合移植的供体肺或用于疑似恶性肿瘤的肺切除用于对照样品(Benyahia等人,2013)。

[0090] 来自PAH患者的远端PASMC原代细胞系来源于如前所述的移植肺(Falcetti等人,2010;Bubb等人,2014)。当在培养物中生长时,这些细胞具有异常的增殖能力(Zhang等人,2007;Falcetti等人,2010)。使冷冻细胞复苏,并在补充有9%胎牛血清(FBS)的人平滑肌基础培养基-2(SMBM;Lonza,Slough,UK)中于37℃下在5%CO<sub>2</sub>的潮湿气氛中生长。达到汇合后,将细胞用磷酸盐缓冲盐水(PBS)洗涤并用胰蛋白酶-EDTA处理以供进一步传代。只有第3代至第10代之间的细胞用于实验。

[0091] 环AMP测定

[0092] 将来自PAH患者的人PASMC在含有9%胎牛血清(FBS)、青霉素(50U/ml)/链霉素(50 μg/ml)的DMEM/F12中的12孔板中生长至70-80%汇合。为了评估cAMP升高的时间过程,用100nM ralinepag刺激细胞不同时间(0.5、1、2、4、8、24、48小时)。选择该剂量的ralinepag是基于它在初步实验中接近于用于cAMP生成的EC<sub>50</sub>。在其他实验中,在不存在和存在1 μM的IP受体拮抗剂R0-1138452的情况下,在完全浓度范围(0.1-10,000nM)内添加IP受体激动剂指定时间(60分钟)。预先添加拮抗剂30分钟,并始终保持。

[0093] 为了提取环AMP,抽吸培养基并将PASMC细胞在冰上在0.1M HCl中温育20分钟,然后在4℃下以1000g离心10分钟。使用基于Bradford的蛋白质测定法(BCA,Novagen,EmD Chemicals,CA,USA)测定上清液中的蛋白质浓度。使用竞争性酶免疫测定96孔板试剂盒(ADI-900-163,Enzo Life Sciences,Exeter,UK)测量细胞内环AMP,并根据制造商的说明书进行测定。每个样品一式两份运行,并且数据表示为每个单独样品的每mg总蛋白质中cAMP的pmol。从每个激动剂浓度数据点中减去基础水平。鉴于来自不同患者样品的cAMP生成的差异较大(约15倍),数据也被归一化为每个细胞分离物中的峰值环AMP反应(指定为100%)。

[0094] 细胞增殖测定

[0095] 在来源于PAH患者的人PASMC上评估IP受体激动剂对细胞增殖的比较浓度依赖性作用。将细胞以 $1 \times 10^4$ 个细胞/ml的密度接种到96孔板上,并在含有9%FBS和青霉素-链霉素(Pen/Strep;50单位/ml)的人平滑肌基础培养基-2(SMBM;Lonza)中中的潮湿CO<sub>2</sub>培养箱中在37℃下生长。24小时后,通过在不添加血清的新鲜培养基中温育48小时使细胞生长停止。随后去除培养基,在不存在和存在IP受体激动剂(ralinepag、伊洛前列素、曲前列环素或MRE-269)的情况下用含有或不含有0.1%DMSO的9%血清的人SMBM替换,并在浓度范围(10<sup>-12</sup>-10<sup>-5</sup>M)内用IP受体激动剂处理细胞4天。在含有IP受体拮抗剂R0-1138452(1 μM)的细胞中直接比较反应,该IP受体拮抗剂在添加IP激动剂之前30-60分钟添加到细胞中,并在整个实验中保持。在相同时间段(4天)内没有添加血清温育的细胞作为时间对照。

[0096] 使用MTS增殖试剂盒 (Promega) 获得细胞增殖,所述MTS增殖试剂盒是用于确定活细胞数目的比色法,其基于通过细胞线粒体脱氢酶将四唑盐MTS切割成甲臜。细胞数的增加导致所形成的甲臜染料量的成比例增加,其通过测量染料溶液在490nm处的吸光度来定量。在每种情况下,通过从所有其他吸光度值中减去“无细胞”对照孔的平均吸光度来校正背景吸光度。

[0097] 然后将细胞增殖归一化为仅由FBS诱导的生长反应,将其作为FBS反应减去时间对照(=4天时100%生长)。相对于所有图中单独的FBS反应,在溶剂±药物存在下诱导的生长反应表现为细胞增殖的%变化。

[0098] 材料、试剂、设备

[0099] • 人平滑肌基础培养基-2 (Lonza, Slough, UK; Cat No. CC-3181)

[0100] • DMEM/F12 (Life Technologies, Paisley, UK; Cat No 11320-074)

[0101] • 南美胎牛血清 (FBS; Invitrogen, Cat No 10270106)

[0102] • 青霉素-链霉素Pen/Strep (5000个单位/ml; Life Technologies, Paisley, UK; Cat No 15070-063)

[0103] • 无菌Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>游离磷酸盐缓冲盐水 (PBS; Life Technologies, Cat No 10010-056)

[0104] • 无菌胰蛋白酶/EDTA溶液 (0.05%; Life Technologies, Cat No 25300-054)

[0105] • 无菌二甲基亚砜 (DMSO; Sigma-Aldrich, Cat No, D2650)

[0106] • MRE-269 ([4-(5,6-二苯基吡嗪基)(1-甲基乙基)氨基]丁氧基]乙酸 (CAY10010412)、伊洛前列素 (50:50R/S异构体; CAY 18215)、曲前列环素 (CAY10162) 和R0-1138452 (IP受体拮抗剂; CAY 10441)、利奥西呱 (Cat No 2644-5)、枸橼酸西地那非 (Cat No 2872-10)、马西替坦 (Cat No M009) 和曲前列环素 (CAY10162) 购自Cambridge Bioscience, UK (Cayman Chemical Co的分销商)。波生坦 (Cat No 11731) 购自Cayman Chemicals Company (USA)。

[0107] • 将伊洛前列素溶于乙酸甲酯中,将乙酸甲酯吹掉并用DMSO代替,以得到10mM的储备溶液。所有其他储备溶液均在DMSO (曲前列环素、R0-1138452、ralinepag、MRE-269) 中制成以达到最终浓度为10mM。将药物在生长培养基中连续稀释,并且无论添加的试剂浓度如何,每个孔中的溶剂浓度保持恒定在0.11%。

[0108] • 竞争性酶免疫测定96孔板cAMP试剂盒 (ADI-900-163, Enzo Life Sciences, Exeter, UK)

[0109] • 细胞增殖测定试剂盒 (MTS, Promega, UK, Cat No G5421)

[0110] • BCA (二喹啉甲酸) 蛋白质测定试剂盒 (Cat No. 71285-3; Novagen, Merck Millipore, Nottingham, UK)

[0111] • Galaxy R CO<sub>2</sub>细胞培养箱 (WolfLabs Ltd, York UK)

[0112] • Tecan Genios微孔板读板机 (Tecan Group Ltd, Männedorf, Germany)

[0113] • OpsysMRTM微孔板读板机 (Dynex Technology, Chantilly, VA, USA)

[0114] 数据与统计分析

[0115] 所有数据均表示为至少5次观察结果的平均值±平均值的标准误差 (S.E.M)。使用GraphPad Prism 4或6 (San Diego, CA, USA) 中的非线性拟合程序构建和拟合激动剂对数浓

度曲线。引起50%最大反应( $E_{\max}$ )的激动剂浓度表示为阴性 $\log(pEC_{50})$ 和计算的平均 $EC_{50}$ 。使用具有事后校正的单向或双向方差分析进行统计分析,如图例所示。 $P$ 值 $<0.05$ 被认为具有统计学意义。

[0116] 实施例1:ralinepag与环GMP和环AMP升高剂或内皮素-1拮抗剂组合的抗增殖作用

[0117] 将来自PAH患者的人肺动脉平滑肌细胞(PASMC)中ralinepag的抗增殖作用与其他前列环素模拟物进行比较,并与内皮素-1受体拮抗剂(ERA)、磷酸二酯酶5型(PDE5)抑制剂或可溶性鸟苷酸环化酶(sGC)活化剂组合进行比较。

[0118] Ralinepag和MRE-269在来自PAH患者的人PASMC中的环AMP和细胞增殖测定中表现为选择性IP受体激动剂,其中ralinepag产生2倍多的环AMP和10倍多的抗增殖作用。与曲前列环素相比,ralinepag和MRE-269在环AMP和细胞增殖测定中产生更弱的最大效应。曲前列环素和伊洛前列素通过IP非依赖性机制表现出对细胞增殖的抑制。

[0119] ralinepag与利奥西呱组合的抗增殖作用

[0120] 图1示出了在9%血清和0.1% DMSO中生长4天的人PASMC中不存在和存在100nM利奥西呱的情况下ralinepag的浓度依赖性抗增殖作用。在五种细胞分离物中的四种中,当利奥西呱与ralinepag组合时,与单独的ralinepag相比,细胞生长受到更大的抑制。从平均数据来看,总体而言,在整个浓度范围(0.01-10,000nM)内在利奥西呱存在下,ralinepag更有效,在10nM及以上明显更有效( $P<0.05$ ,双向方差分析,具有Bonferroni事后校正)。

[0121] 与FBS和DMSO相比,单独的利奥西呱(100nM)引起对细胞增殖的显著抑制( $\sim 15\%$ )。在100nM时,ralinepag抑制生长28%(图2A),这几乎是由相同剂量的利奥西呱诱导的抑制的两倍(图2B)。然而,在100nM利奥西呱存在下,在低于100倍剂量(0.01nM)的ralinepag时发生显著的细胞生长抑制。这表明药剂在不同途径上起作用以通过cGMP增强对利奥西呱增殖的抑制(Lang等人,2012)以及通过IP受体和cAMP生成增强对ralinepag增殖的抑制(在本文提供的实验中IP受体拮抗剂R01138452完全抑制增殖)。在亚纳摩尔浓度的ralinepag中发生增强作用。在较高剂量的ralinepag中,细胞生长的抑制似乎比加性效应预测的更多。

[0122] 已经显示利奥西呱诱导细胞凋亡并抑制与可溶性鸟苷酰表达的上调和增加的环GMP产生相关的肺动脉细胞的增殖(Lang等人,2012)。因此,利奥西呱对ralinepag效应的增强可能是由于响应于PDE3的环GMP依赖性抑制而升高的环AMP水平,所述PDE3是已知调节由IP受体激动剂诱导的cAMP生成的同种型(Knebel等人,2013)。先前的实验表明,与来自PAH患者的人PASMC中的PDE5抑制剂或ERA相比,利奥西呱与曲前列环素组合是最有效的抗增殖组合(Patel等人,2014)。然而,如果是加性的,则组合作用比预测的要低。两种药剂可在不同的途径(环状GMP和IP受体/cAMP途径)上起作用,在生长抑制机制方面具有一些交叉。例如,通过抑制钙依赖性磷酸酶、钙调磷酸酶抑制细胞生长可通过环GMP和环AMP实现(Jabr等人,2007;Lu等人,2013)。

[0123] ralinepag与西地那非组合的抗增殖作用

[0124] 图3示出了在9%血清和0.1% DMSO中生长4天的人PASMC中不存在和存在100nM西地那非的情况下ralinepag的浓度依赖性抗增殖作用。在五种细胞分离物中的四种中,当西地那非与ralinepag组合时,与单独的ralinepag相比,细胞生长受到更大的抑制。在整个浓度范围(0.01-10,000nM)内在西地那非存在下,ralinepag明显更有效( $P<0.001$ ,双向方



差分析), 尽管Bonferroni事后分析未发现单个药物剂量的显著性。图4示出了与对单独的9%血清和0.1%DMSO的反应相比, 在不存在和存在100nM西地那非的情况下ralinepag的平均抗增殖作用。与利奥西呱不同, 西地那非(100nM)未显著抑制血清诱导的生长。然而, 当与ralinepag组合时, 与单独的ralinepag相比, 进一步抑制了细胞生长。在1nM ralinepag时, 在西地那非存在下, 生长抑制由14%上升至27%, 尽管这些变化的幅度在测试的最高剂量(10 $\mu$ M)时较小(细胞生长抑制为56%而不是50%)。

[0125] 发现西地那非的增强作用小于采用利奥西呱观察到的增强作用。这可能是由于利奥西呱是鸟苷酸环化酶的直接激活剂, 从而使环状GMP比西地那非产生更大的上升, 预计这将提高基础环GMP水平。此外, 在五种细胞分离物中的三种中, 药物组合的抗增殖作用在较高剂量的ralinepag下逐渐减弱, 这与PDE5抑制剂和IP受体激动剂的下游机制的一些重叠一致。事实上, 西地那非部分地通过激活PPAR  $\gamma$  来抑制细胞增殖(Wang等人, 2013), 该PPAR  $\gamma$  是一种已知的机制, 构成曲前列环素在这些肺平滑肌细胞中的抗增殖作用的基础(Falcetti等人, 2010)。对于西地那非很可能在这些实验中使用的剂量低于治疗剂量, 因为患者中该药物的上限血浆水平为1500nM(Burgess等人, 2008)。然而, 它远高于对于西地那非报道的PDE5抑制的 $K_i$ , 据报道其为1-3nM(Ballard等人, 1998)。在100nM时, 西地那非也可能抑制PDE1和PDE6活性( $K_i$ 分别为40nM和10nM), 因此其治疗作用方式可能并不完全与PDE5的抑制有关(Bischoff, 2004)。

[0126] ralinepag与曲前列环素组合的抗增殖作用

[0127] 图5示出了在9%血清和0.1%DMSO中生长4天的人PASMC中不存在和存在100nM曲前列环素的情况下ralinepag的抗增殖作用。在五种细胞分离物中的四种中, 当曲前列环素与ralinepag组合时, 与单独的ralinepag相比, 细胞生长受到更大的抑制。从平均数据来看, 在整个浓度范围内在曲前列环素存在下, 总体ralinepag似乎更有效( $P < 0.001$ , 双向方差分析), 尽管在事后检测中曲前列环素仅显著增强了最高剂量(10 $\mu$ M)的ralinepag( $P < 0.05$ , 具有Bonferroni校正的双向方差分析)。

[0128] 图6示出了与对单独的9%血清和0.1%DMSO的反应相比, 在不存在和存在100nM曲前列环素的情况下ralinepag的平均抗增殖作用。与单独的血清和DMSO相比, 曲前列环素在100nM下显著抑制生长。当与ralinepag组合时, 在低于10倍剂量(0.1nM)的ralinepag时发生显著的细胞生长抑制。在测试的最高剂量(10 $\mu$ M)下, ralinepag产生69%的细胞生长抑制, 而在不存在曲前列环素时为50%。这种对血清诱导的细胞增殖的更强抑制可部分地由单独的曲前列环素诱导的抑制程度来解释, 并且表明两种药剂都通过不同的途径抑制细胞增殖。

[0129] 鉴于两种药剂都是IP激动剂并且可能会激活抑制细胞增殖的相同途径, 曲前列环素增强的ralinepag反应可能是令人惊讶的。曲前列环素也是EP2和DP1受体的强激活剂(在Clapp和Gurung, 2015中的综述), 这可以解释在曲前列环素的存在下对ralinepag的反应更强。在本文提供的实验中, 观察到对曲前列环素的抗增殖反应仅被IP受体拮抗剂微弱抑制, 而对ralinepag的那些反应则被完全抑制。

[0130] ralinepag与内皮素-1受体拮抗剂(ERA)组合的抗增殖作用

[0131] 图7示出了在9%血清和0.1%DMSO中生长4天的人PASMC中不存在和存在100nM马西替坦的情况下ralinepag的抗增殖作用。马西替坦(100nM)组合时对ralinepag的反应

只有轻微影响,并且在五种细胞分离物中的两种中,在所研究的任何浓度的ralinepag中都没有增强抗增殖作用。在其他三种细胞分离物中,存在对细胞生长的更大的抑制趋势,该趋势在与100nM马西替坦组合时在较低剂量的ralinepag中更为明显。然而,总体而言,从平均数据来看,与单独的ralinepag相比,在马西替坦存在下,ralinepag没有明显更有效。

[0132] 图8示出了与对单独的9%血清和0.1%DMSO的反应相比,在不存在和存在100nM马西替坦的情况下ralinepag的平均抗增殖作用。与血清和DMSO相比,单独的Macitentan (100nM) 引起对细胞增殖的显著抑制( $\sim 12\%$ )。此外,当与马西替坦组合时,与单独的ralinepag相比,ralinepag以低于10倍的剂量(0.1nM)抑制细胞增殖。在更高浓度的ralinepag(>10nM)时,作用趋同,使得在不存在或存在马西替坦的情况下对ralinepag的反应相似。

[0133] 这两种药物的作用方式可以重叠,因此在组合时不会提供真正的额外益处。马西替坦是一种混合ET-1拮抗剂,抑制与ETA和ETB受体的结合,平均 $IC_{50}$ 值分别为0.5nM和391nM (Iglarz等人,2014)。因此,在使用的浓度下,马西替坦将主要抑制ETA受体,这些受体已知有助于ET-1诱导的远端人PASMC细胞增殖(Zamora等人,1993;Davie等人,2002)。另一方面,前列环素类似物抑制血清或转化生长因子 $\beta$  (TGF- $\beta$ ) 诱导的人远端PASMC中ET-1的释放,并且这种机制被部分地假定为构成前列环素类似物在正常人PASMC中抗增殖作用的基础(Wort等人,2001;Davie等人,2002)。

[0134] 图9示出了在9%血清和0.1%DMSO中生长4天的人PASMC中在不存在和存在100nM波生坦的情况下ralinepag的抗增殖作用。与其他PAH药物相比,在五种细胞分离物中的四种中,波生坦没有增强对ralinepag的抗增殖反应,并且在一种细胞分离物中,实际上降低了其反应。总体而言,从平均数据来看,在整个浓度范围内在波生坦存在下,ralinepag并没有更有效。图4示出了与对单独的9%血清和0.1%DMSO的反应相比,在不存在和存在100nM波生坦的情况下ralinepag的平均抗增殖作用。与马西替坦不同,与单独的血清和DMSO相比,波生坦(100nM)不会引起对细胞增殖的显著抑制。此外,当与ralinepag组合时,与单独的ralinepag相比,波生坦不会增强对细胞增殖的抑制,也没有降低浓度(1nM),其中如使用所有其他药剂(利奥西呱、曲前列环素和马西替坦)所观察到的,ralinepag开始显著抑制细胞增殖。因此,波生坦对细胞增殖的抑制作用似乎比马西替坦更小,这可能与其对ETA受体的效力和/或差异受体ET-1受体选择性较低有关。虽然波生坦类似于马西替坦是一种混合ET-1受体拮抗剂,但其对ETA和ETB受体的效力和选择性比率与其受体动力学有所不同。波生坦的效力比马西替坦低10倍,其中ETA受体的 $K_i$ 为4nM,但ETA/ETB的选择性比率仅为约20 (Davie等人,2009),而对于马西替坦,选择性比率为780 (Iglarz等人,2014)。

[0135] 不同PAH药物与ralinepag组合的比较

[0136] cGMP升高剂和曲前列环素与ralinepag组合似乎提供了更大的抗增殖作用,而ETRA并没有显著增强ralinepag对细胞增殖的作用(图11)。在10nM ralinepag下,当与利奥西呱组合时,生长被抑制45%,而在波生坦存在下,生长仅被抑制21% (图12)。然而,与利奥西呱相比,并与较低程度的曲前列环素相比,西地那非的加强作用更小(即使存在显著的药物相互作用,但与事后检验无显著差异)。在不存在和存在不同PAH疗法的情况下,总结了ralinepag的抗增殖作用,其中获得每个个体拟合的 $EC_{50}$ 和 $E_{Max}$ 值(在表1中,使用图1、3、5、7和9中包含的数据表示为平均值 $\pm$ S.E.M)。表1示出了在利奥西呱和西地那非的存在下,

ralinepag的效力分别为约2.5-5倍 ( $EC_{50}=10\text{nM}$ 和 $5\text{nM}$ )。总体而言,在利奥西呱或曲前列环素存在下,ralinepag产生显著更大的最大反应,但与其他PAH疗法组合时则没有产生显著更大的更大反应。表2呈现了从对平均数据拟合获得的 $EC_{50}$ 和 $E_{\text{Max}}$ 值的分析(图11)。ralinepag的 $EC_{50}$ 略高于个体拟合的 $EC_{50}$ ( $44\text{nM}$ 相对于 $25\text{nM}$ ),虽然在利奥西呱和西地那非的存在下效力仍然增强了8倍。在利奥西呱或曲前列环素存在下,ralinepag仍能产生显著更大的最大反应,而在其他PAH疗法的情况下则不能产生显著更大的最大反应。

[0137] 表1.ralinepag与其他PAH药物组合的平均抗增殖作用(从个体拟合外推 $\log EC_{50}$ 和 $E_{\text{Max}}$ )

APD811 + 100nM 药物	Log $EC_{50}$ (n=5)	$EC_{50}$	$E_{\text{Max}}$ (%抑制)
APD811	$-7.60 \pm 0.52$	25 nM	$58.2 \pm 4.1\%$
+ 波生坦	$-7.69 \pm 0.47$	20 nM	$52.8 \pm 4.9\%$
+ 马西替坦	$-7.42 \pm 0.62$	38 nM	$65.3 \pm 9.8\%$
+ 西地那非	$-8.30 \pm 0.53$	5 nM	$58.5 \pm 4.7\%$
+ 曲前列环素	$-7.29 \pm 0.35$	51 nM	$77.2 \pm 6.6\%$
+ 利奥西呱	$-8.01 \pm 0.55$	10 nM	$76.0 \pm 4.7\%$

[0139] 表2.ralinepag与其他PAH药物组合的平均抗增殖作用(从平均拟合外推 $\log EC_{50}$ 和 $E_{\text{Max}}$ )

药物	Log $EC_{50}$ (n=5)	$EC_{50}$	$E_{\text{Max}}$ (%抑制)
APD811	$-7.35 \pm 0.79$	44 nM	$59.6 \pm 17.3\%$
+ 波生坦	$-7.21 \pm 0.83$	61 nM	$57.1 \pm 15.6\%$
+ 马西替坦	$-7.49 \pm 0.76$	32 nM	$58.5 \pm 13.9\%$
+ 西地那非	$-8.28 \pm 0.72$	5 nM	$59.0 \pm 13.1\%$
+ 曲前列环素	$-7.37 \pm 0.86$	42 nM	$76.1 \pm 20.1\%$
+ 利奥西呱	$-8.12 \pm 0.72$	6 nM	$73.1 \pm 13.1\%$

[0141] 实施例2:临床试验

[0142] 进行为期22周的随机、双盲、安慰剂对照研究,剂量滴定期长达9周。61名患者随机分配2:1的ralinepag和安慰剂。在研究剂量滴定期第1天和第22周之前获得右心导管(RHC)测量。获得并记录以下值:肺动脉压(PAP)(收缩压、舒张压和平均值)、心率(HR)、右房压(RAP)、肺毛细血管楔压(PCWP)、右心室压(RVP)和心输出量(CO)、肺血管阻力(PVR)、动脉和混合静脉血氧饱和度( $FiO_2$ ) (如果适用)。从血压测量值估计系统血管阻力(SVR)。所有患者均接受单独或组合的内皮素受体拮抗剂、磷酸二酯酶5型抑制剂或可溶性鸟苷酸环化酶激活剂的背景PAH治疗。

[0143] 该研究的主要疗效终点是治疗22周后PVR的基线变化。其他分析包括治疗22周后6MWD的基线变化、血流动力学以及安全性和耐受性。Ralinepag以0.01、0.02、0.03、0.04和0.10mg剂量强度作为胶囊施用。

[0144] ralinepag的起始剂量为0.01mg,每日两次。根据患者耐受性滴定ralinepag的剂量。如果初始剂量是耐受的(0.01mg每日两次),则剂量以下列方式每周增加一次:0.02mg每

日两次、0.03mg每日两次、0.04mg每日两次、0.06mg每日两次、0.08mg、0.1mg每日两次、0.2mg每日两次和0.3mg每日两次。剂量任选地提高至可能的最大总日剂量0.6mg (0.3mg每日两次),等待耐受性。如果不能耐受剂量,则将ralinepag任选地降低至先前的剂量水平。如果不能耐受0.01mg每日两次的初始剂量,则任选地降低剂量至0.01mg每日一次。

[0145] 与安慰剂相比,ralinepag在肺血管阻力(PVR)方面达到与基线相比具有统计学显著变化的主要终点。Ralinepag还证明了6分钟步行距离(6MWD)的数值改进。在该研究中观察到的不良事件与用于治疗PAH的其他前列环素治疗一致。接受ralinepag治疗的患者的维持剂量分布如下:0.02mg (n=1)、0.03mg (n=1)、0.04mg (n=0)、0.06mg (n=3)、0.08mg (n=3)、0.12mg (n=5)、0.16mg (n=4)、0.2mg (n=6)、0.4mg (n=12)和0.6mg (n=5)。

[0146] 本文引用的所有文献,包括专利和非专利文献,均通过引用以其全文并入本文用于所有目的。

[0147] 参考文献

[0148] 1.Ballard SA,Gingell CJ,Tang K,Turner LA,Price ME,&Naylor AM(1998).Effects of sildenafil on the relaxation of human corpus cavernosum tissue in vitro and on the activities of cyclic nucleotide phosphodiesterase isozymes.J Urol 159,2164-2171.

[0149] 2.Barst RJ,McGoon M,McLaughlin V,Tapson V,Rich S,Rubin L,Wasserman K,Oudiz R,Shapiro S,Robbins IM,Channick R,Badesch D,Rayburn BK,Flinchbaugh R,Sigman J,Arneson C,&Jeffs R(2003).Beraprost therapy for pulmonary arterial hypertension.J Am Coll Cardiol 41,2119-2125.

[0150] 3.Benyahia C,Boukais K,Gomez I,Silverstein AM,Clapp LH,Fabre A,Danel C,Leseche G,Longrois D,&Norel X(2013).A comparative study of PGI<sub>2</sub> mimetics used clinically on the vasorelaxation of human pulmonary arteries and veins, role of the DP-receptor.Prostaglandins&Other Lipid Mediators 107,48-55.

[0151] 4.Bischoff E(2004).Potency,selectivity,and consequences of nonselectivity of PDE inhibition.Int J Impot Res 16 Suppl 1,S11-S14.

[0152] 5.Bley KR,Bhattacharya A,Daniels DV,Gever J,Jahangir A,O'yang C,Smith S,Srinivasan D,Ford AP,&Jett MF(2006).R01138452 and R03244794: characterization of structurally distinct,potent and selective IP (prostacyclin)receptor antagonists.Br J Pharmacol 147,335-345.

[0153] 6.Bubb KJ,Trinder SL,Baliga RS,Patel J,Clapp LH,MacAllister RJ,&Hobbs AJ(2014).Inhibition of phosphodiesterase 2 augments cGMP and cAMP signaling to ameliorate pulmonary hypertension.Circulation 130,496-507.

[0154] 7.Burgess G,Hoogkamer H,Collings L,&Dingemanse J(2008).Mutual pharmacokinetic interactions between steady-state bosentan and sildenafil.Eur J Clin Pharmacol 64,43-50.

[0155] 8.Clapp LH,Finney PA,Turcato S,Tran S,Rubin LJ,&Tinker A(2002).Differential effects of stable prostacyclin analogues on smooth muscle proliferation and cyclic AMP generation in human pulmonary artery.Am J Respir

Cell Molec Biol 26,194-201.

[0156] 9.Clapp LH&Gurung R(2015).The mechanistic basis of prostacyclin and its stable analogues in pulmonary arterial hypertension:Role of membrane versus nuclear receptors.Prostaglandins Other Lipid Mediat 120,56-71.

[0157] 10.Davie N,Haleen SJ,Upton PD,Polak JM,Yacoub MH,Morrell NW,&Wharton J(2002).ETA and ETB receptors modulate the proliferation of human pulmonary artery smooth muscle cells.Am J Respir Crit Care Med 165,398-405.

[0158] 11.Davie NJ,Schermuly RT,Weissmann N,Grimminger F,&Ghofrani HA(2009).The science of endothelin-1 and endothelin receptor antagonists in the management of pulmonary arterial hypertension:current understanding and future studies.Eur J Clin Invest 39 Suppl 2,38-49.

[0159] 12.Falcetti E,Hall SM,Phillips PG,Patel J,Morrell NW,Haworth SG,&Clapp LH(2010).Smooth muscle proliferation and role of the prostacyclin(IP) receptor in idiopathic pulmonary arterial hypertension.Am J Respir Crit Care Med 182,1161-1170.

[0160] 13.Galie N,Barbera JA,Frost AE,Ghofrani HA,Hoeper MM,McLaughlin VV,Peacock AJ,Simonneau G,Vachiery JL,Grunig E,Oudiz RJ,Vonk-Noordegraaf A,White RJ,Blair C,Tadalafil in Pulmonary Arterial Hypertension.N Engl J Med 373,834-844.

[0161] 14.Grimminger F,Weimann G,Frey R,Voswinckel R,Thamm M,Bolkow D,Weissmann N,Muck W,Unger S,Wensing G,Schermuly RT,&Ghofrani HA(2009).First acute haemodynamic study of soluble guanylate cyclase stimulator riociguat in pulmonary hypertension.Eur Respir J 33,785-792.

[0162] 15.Hoeper MM,Leuchte H,Halank M,Wilkens H,Meyer FJ,Seyfarth HJ,Wensel R,Ripken F,Bremer H,Kluge S,Hoeffken G,&Behr J(2006).Combining inhaled iloprost with bosentan in patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension.Eur Respir J 28,691-694.

[0163] 16.Humbert M,Barst RJ,Robbins IM,Channick RN,Galie N,Boonstra A,Rubin LJ,Horn EM,Manes A,&Simonneau G(2004).Combination of bosentan with epoprostenol in pulmonary arterial hypertension:BREATHE-2.Eur Respir J 24, 353-359.

[0164] 17.Iglarz M,Bossu A,Wanner D,Bortolamiol C,Rey M,Hess P,&Clozel M(2014).Comparison of pharmacological activity of macitentan and bosentan in preclinical models of systemic and pulmonary hypertension.Life Sci 118,333-339.

[0165] 18.Jabr RI,Wilson AJ,Riddervold MH,Jenkins AH,Perrino BA,&Clapp LH(2007).Nuclear translocation of calcineurin A $\beta$  but not calcineurin A $\alpha$  by platelet-derived growth factor in rat aortic smooth muscle.Am J Physiol 292, C2213-C2225.

- [0166] 19.Kam Y,Chow KB,&Wise H(2001).Factors affecting prostacyclin receptor agonist efficacy in different cell types.Cell Signal 13,841-847.
- [0167] 20.Knebel SM,Elrick MM,Bowles EA,Zdanovec AK,Stephenson AH,Ellsworth ML,&Sprague RS(2013).Synergistic effects of prostacyclin analogs and phosphodiesterase inhibitors on cyclic adenosine 3',5'monophosphate accumulation and adenosine 3'5'triphosphate release from human erythrocytes.Exp Biol Med(Maywood)238,1069-1074.
- [0168] 21.Kuwano K,Hashino A,Asaki T,Hamamoto T,Yamada T,Okubo K,&Kuwabara K (2007).2-[4-[(5,6-diphenylpyrazin-2-yl)(isopropyl)amino]butoxy]-N-(methylsulfonyl)acetamide(NS-304),an orally available and long-acting prostacyclin receptor agonist prodrug.J Pharmacol Exp Ther 322,1181-1188.
- [0170] 22.Lai YJ,Pullamsetti SS,Dony E,Weissmann N,Butrous G,Banat GA,Ghofrani HA,Seeger W,Grimminger F,&Schermlu RT(2008).Role of the prostanoid EP4 receptor in iloprost mediated vasodilatation in pulmonary hypertension.Am J Respir Crit Care Med 178,188-196.
- [0171] 23.Lang M,Kojonazarov B,Tian X,Kalymbetov A,Weissmann N,Grimminger F,Kretschmer A,Stasch JP,Seeger W,Ghofrani HA,&Schermlu RT(2012).The soluble guanylate cyclase stimulator riociguat ameliorates pulmonary hypertension induced by hypoxia and SU5416 in rats.PLoS One 7,e43433.
- [0172] 24.Langleben D,Galie N,He J,Huang Y,Humbert M,Keogh A,Rubin LJ,Zhou D,Curram J,Davie N,&Ghofrani HA(2015).Use of clinically relevant responder threshold criteria to evaluate the response to treatment in the phase III PATENT-1 study.J Heart Lung Transplant 34,338-347.
- [0173] 25.Lu J,Wang X,Xie X,Han D,Li S,&Li M(2013).Calcineurin/NFAT signaling pathway mediates endothelin-1-induced pulmonary artery smooth muscle cell proliferation by regulating phosphodiesterase-5.Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao 33,26-29.
- [0174] 26.McLaughlin V,Channick RN,Ghofrani HA,Lemarie JC,Naeije R,Packer M,Souza R,Tapson VF,Tolson J,Al HH,Meyer G,&Hoeper MM (2015).Bosentan added to sildenafil therapy in patients with pulmonary arterial hypertension.Eur Respir J 46,405-413.
- [0175] 27.McLaughlin VV,Archer SL,Badesch DB,Barst RJ,Farber HW,Lindner JR,Mathier MA,McGoon MD,Park MH,Rosenson RS,Rubin LJ,Tapson VF,&Varga J(2009).ACCF/AHA 2009 expert consensus document on pulmonary hypertension a report of the American College of Cardiology Foundation Task Force on Expert Consensus Documents and the American Heart Association developed in collaboration with the American College of Chest Physicians;American Thoracic Society,Inc.;and the Pulmonary Hypertension Association.J Am Coll Cardiol 53,

1573-1619.

[0176] 28.Murray F,Patel HH,Suda RY,Zhang S,Thistlethwaite PA,Yuan JX,&Insel PA(2007).Expression and activity of cAMP phosphodiesterase isoforms in pulmonary artery smooth muscle cells from patients with pulmonary hypertension:role for PDE1.Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 292,L294-L303.

[0177] 29.Orie NN,Ledwozyw A,Williams DJ,Whittle BJ,&Clapp LH(2013).Differential actions of the prostacyclin analogues treprostinil and iloprost and the selexipag metabolite,MRE-269(ACT-333679) in rat small pulmonary arteries and veins.Prostaglandins&Other Lipid Mediators 106,1-7.

[0178] 30.Patel JA,Hall SM,Abraham DJ,Nelsen AC,Silverstein AM,&Clapp LH.Comparison of current therapies to inhibit endothelin-induced growth of pulmonary artery smooth muscle cells(PASMCs)derived from patients with pulmonary arterial hypertension.Eur.Respir.J.44[Suppl.58],P2355.2014.

[0179] 31.Patel JA,Shen L,Hall SM,Norel X,McAnulty RJ,Silverstein AM,Whittle BJ,&Clapp LH.EP2 receptors play a key role in mediating the anti-proliferative activity of treprostinil in smooth muscle cells derived from the lungs of pulmonary hypertensive patients.Am.J.Respir.Crit Care Med.191,A5954.2015.

[0180] 32.Schermuly RT,Pullamsetti SS,Breitenbach SC,Weissmann N,Ghofrani HA,Grimminger F,Nilius SM,Schorr K,Kirchrath JM,Seeger W,&Rose F(2007).Iloprost-induced desensitization of the prostacyclin receptor in isolated rabbit lungs.Respir Res 8,4.

[0181] 33.Schermuly RT,Stasch JP,Pullamsetti SS,Middendorff R,Muller D,Schluter KD,Dingendorf A,Hackemack S,Kolosionek E,Kaulen C,Dumitrascu R,Weissmann N,Mittendorf J,Klepetko W,Seeger W,Ghofrani HA,&Grimminger F(2008).Expression and function of soluble guanylate cyclase in pulmonary arterial hypertension.Eur Respir J 32,881-891.

[0182] 34.Simonneau G,Rubin LJ,Galie N,Barst RJ,Fleming TR,Frost AE,Engel PJ,Kramer MR,Burgess G,Collings L,Cossons N,Sitbon O,&Badesch DB(2008).Addition of sildenafil to long-term intravenous epoprostenol therapy in patients with pulmonary arterial hypertension:a randomized trial.Ann Intern Med 149,521-530.

[0183] 35.Sitbon O,Channick R,Chin KM,Frey A,Gaine S,Galie N,Ghofrani HA,Hoeper MM,Lang IM,Preiss R,Rubin LJ,Di SL,Tapson V,Adzerikho I,Liu J,Moiseeva O,Zeng X,Simonneau G,&McLaughlin VV(2015).Selexipag for the Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension.N Engl J Med 373,2522-2533.

[0184] 36.Skoro-Sajer N&Lang IM(2014).Selexipag for the treatment of pulmonary arterial hypertension.Expert Opin Pharmacother 15,429-436.

[0185] 37.Syed NI&Jones RL(2015).Assessing the agonist profiles of the

prostacyclin analogues treprostinil and naxaprostene, particularly their DP1 activity. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 95,19-29.

[0186] 38. Tapson VF, Jing ZC, Xu KF, Pan L, Feldman J, Kiely DG, Kotlyar E, McSwain CS, Laliberte K, Arneson C, & Rubin LJ (2013). Oral treprostinil for the treatment of pulmonary arterial hypertension in patients receiving background endothelin receptor antagonist and phosphodiesterase type 5 inhibitor therapy (the FREEDOM-C2 study): a randomized controlled trial. Chest 144,952-958.

[0187] 39. Turcato S & Clapp LH. Evidence that vasorelaxation induced by Gs coupled receptors is largely independent of cAMP in guinea-pig aorta. Journal of Molecular and Cellular Cardiology 30, A190. 1998. Ref Type: Abstract

[0188] 40. Vachier JL (2011). Prostacyclins in pulmonary arterial hypertension: the need for earlier therapy. Adv Ther 28, 251-269.

[0189] 41. Wang J, Yang K, Xu L, Zhang Y, Lai N, Jiang H, Zhang Y, Zhong N, Ran P, & Lu W (2013). Sildenafil inhibits hypoxia-induced transient receptor potential canonical protein expression in pulmonary arterial smooth muscle via cGMP-PKG-PPAR  $\gamma$  axis. Am J Respir Cell Mol Biol 49, 231-240.

[0190] 42. Wharton J, Davie N, Upton PD, Yacoub MH, Polak JM, & Morrell NW (2000). Prostacyclin analogues differentially inhibit growth of distal and proximal human pulmonary artery smooth muscle cells. Circulation 102, 3130-3136.

[0191] 43. Whittle BJ, Silverstein AM, Mottola DM, & Clapp LH (2012). Binding and activity of the prostacyclin receptor (IP) agonists, treprostinil and iloprost, at human prostanoid receptors: treprostinil is a potent DP1 and EP2 agonist. Biochem Pharmacol 84, 68-75.

[0192] 44. Wort SJ, Woods M, Warner TD, Evans TW, & Mitchell JA (2001). Endogenously released endothelin-1 from human pulmonary artery smooth muscle promotes cellular proliferation: relevance to pathogenesis of pulmonary hypertension and vascular remodeling. Am J Respir Cell Mol Biol 25, 104-110.

[0193] 45. Zamora MA, Dempsey EC, Walchak SJ, & Stelzner TJ (1993). BQ123, an ETA receptor antagonist, inhibits endothelin-1-mediated proliferation of human pulmonary artery smooth muscle cells. Am J Respir Cell Mol Biol 9, 429-433.

[0194] 46. Zhang S, Patel HH, Murray F, Remillard CV, Schach C, Thistlethwaite PA, Insel PA, & Yuan JX (2007). Pulmonary artery smooth muscle cells from normal subjects and IPAH patients show divergent cAMP-mediated effects on TRPC expression and capacitative  $\text{Ca}^{2+}$  entry. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 292, L1202-L1210.



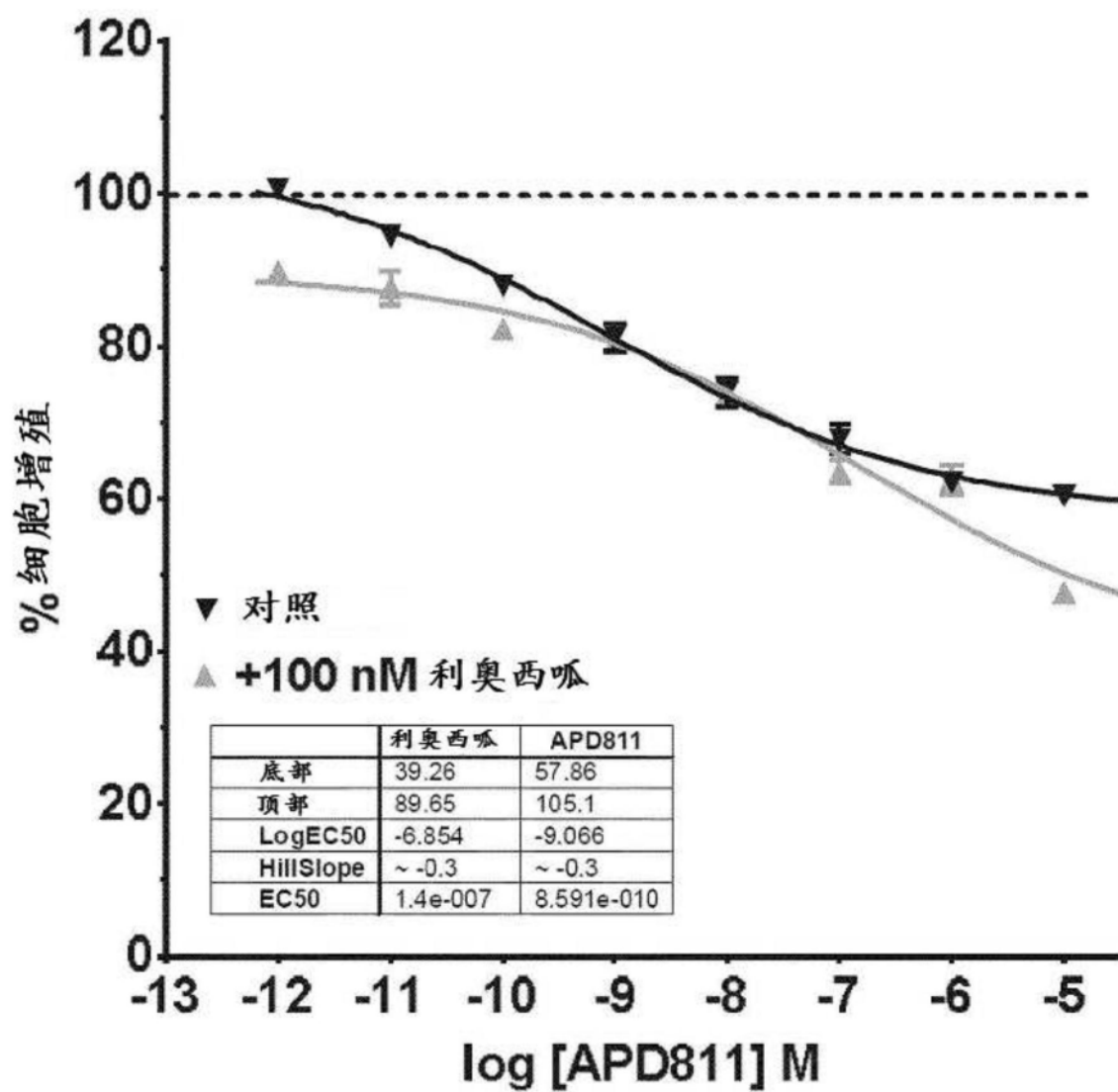


图1A

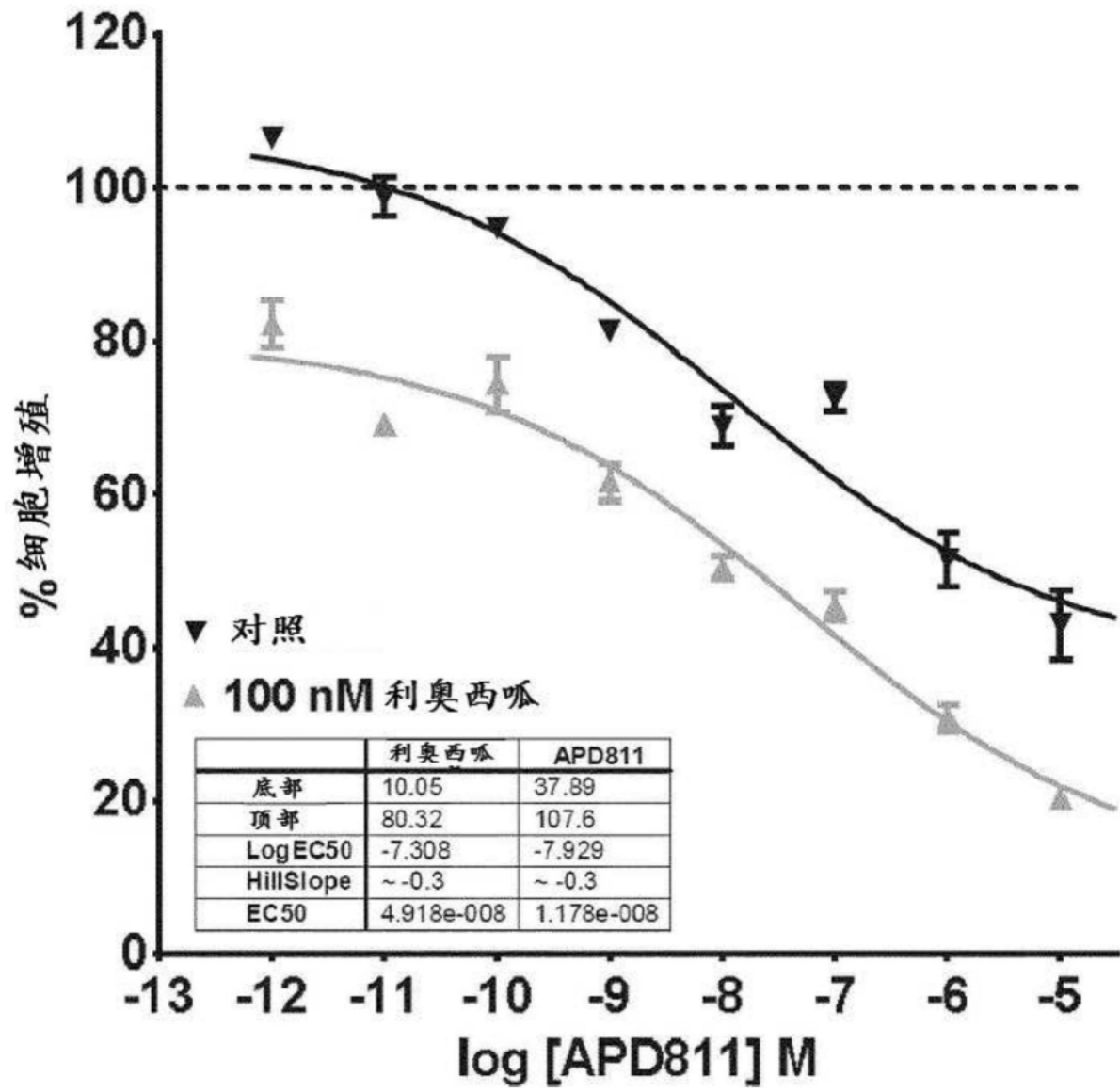


图1B

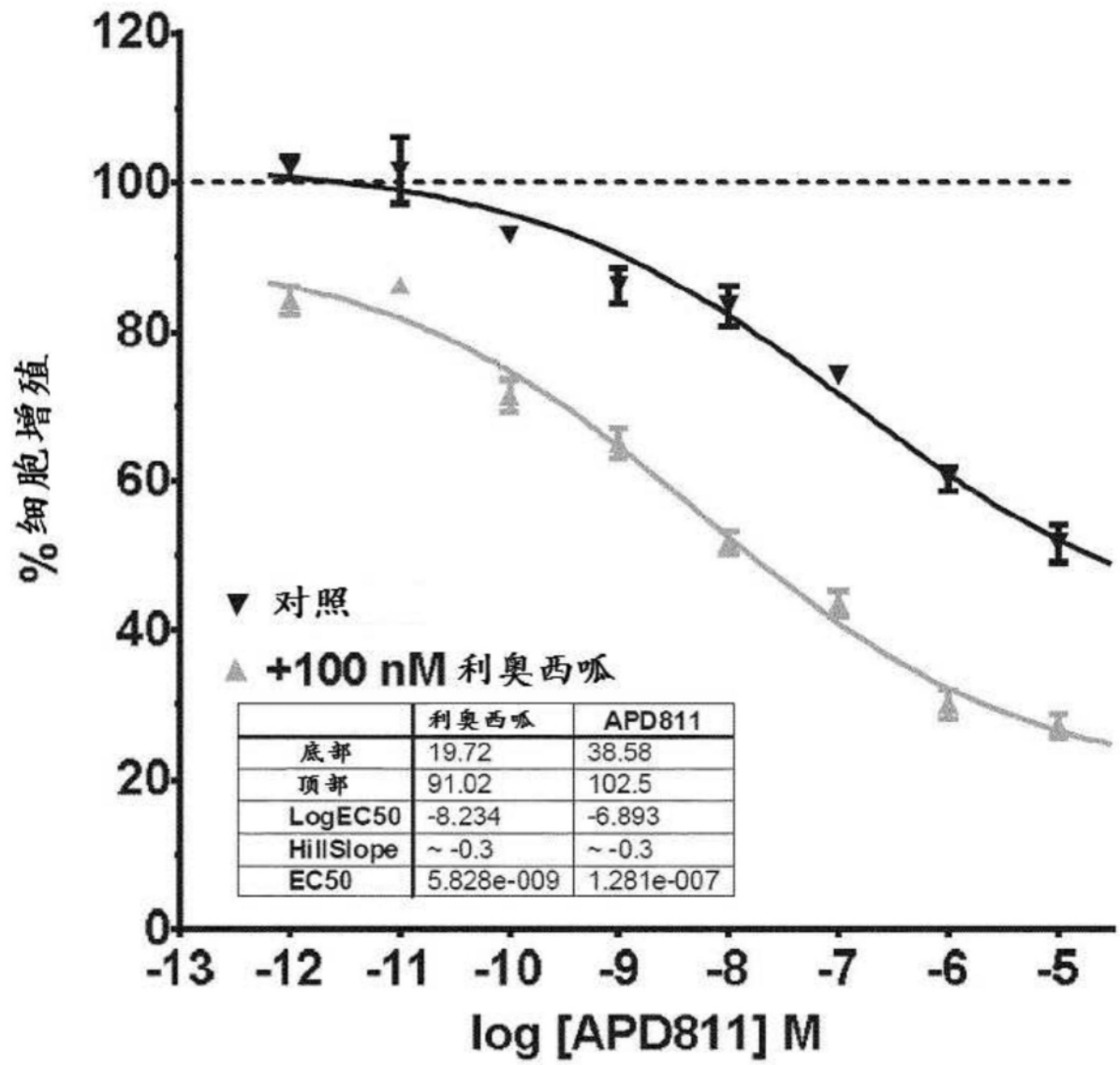


图1C

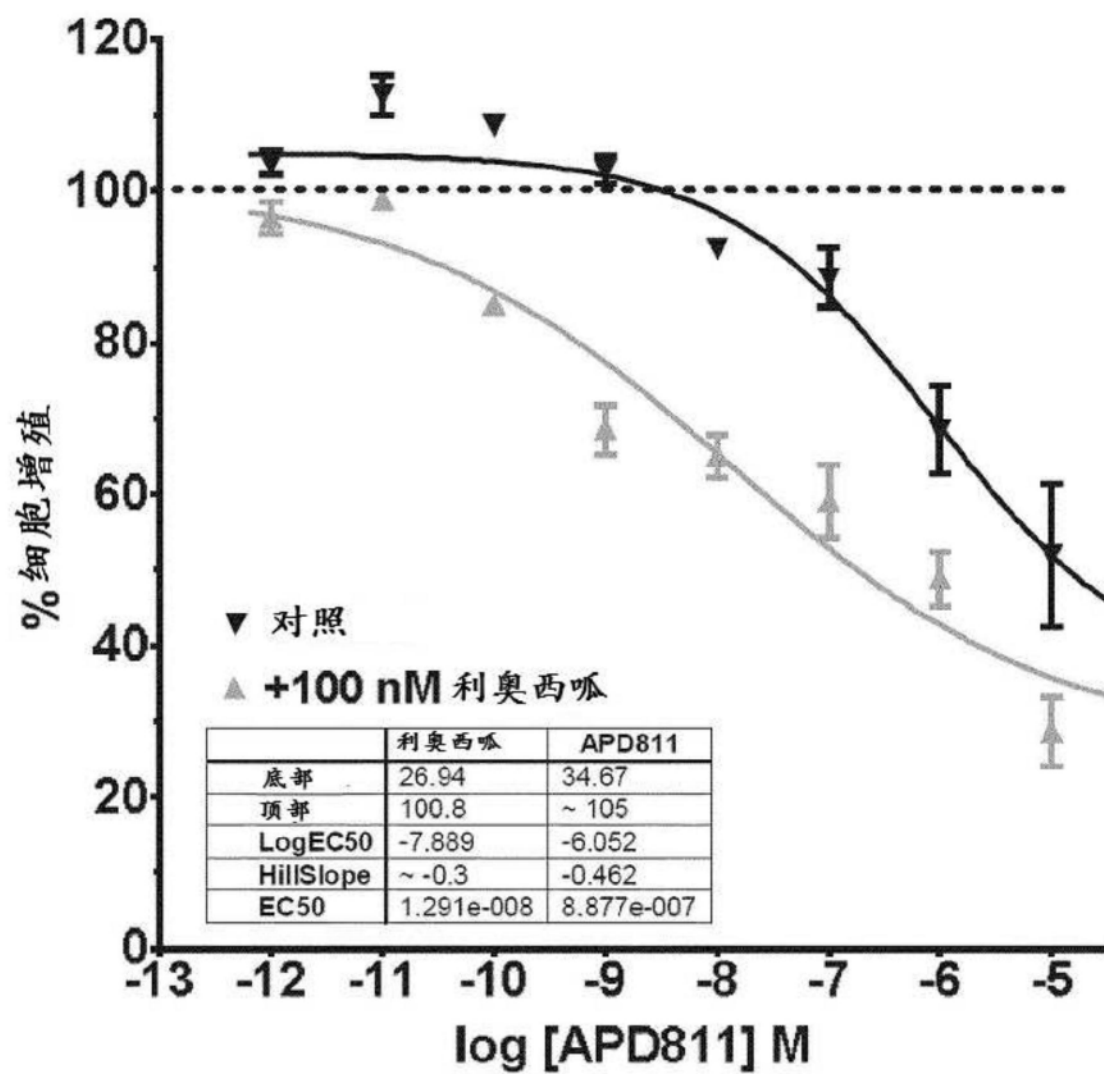


图1D

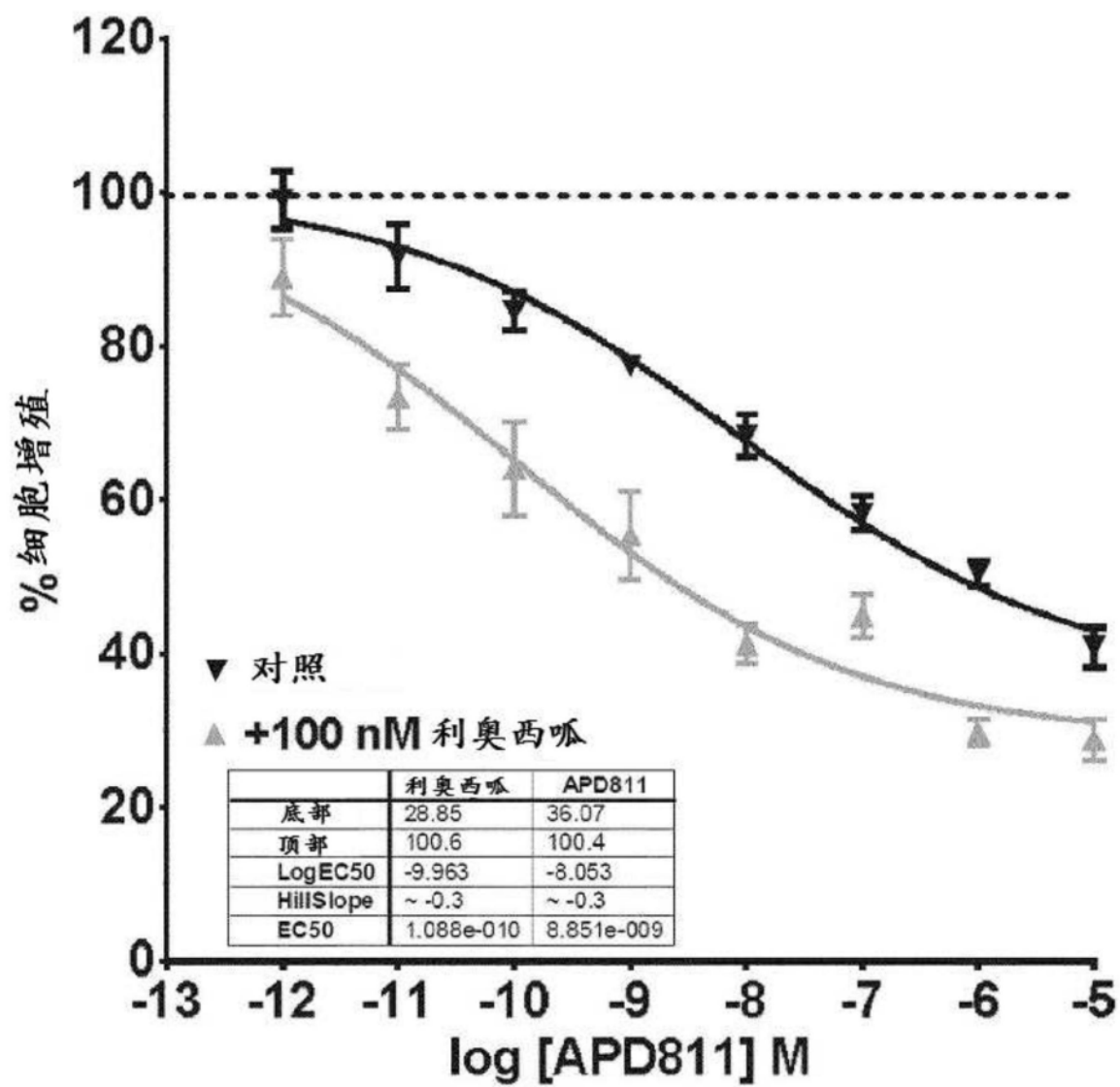


图1E

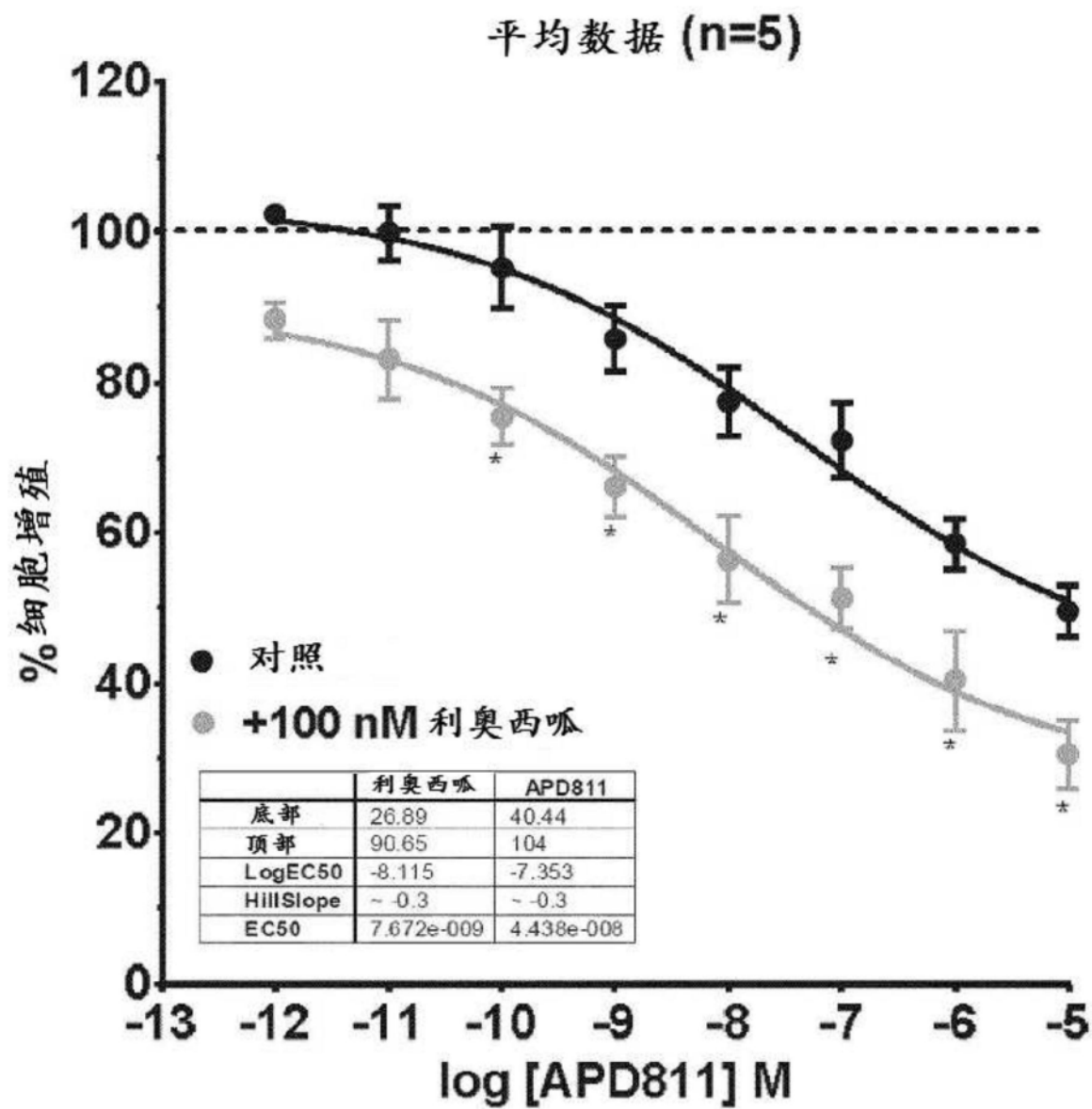


图1F

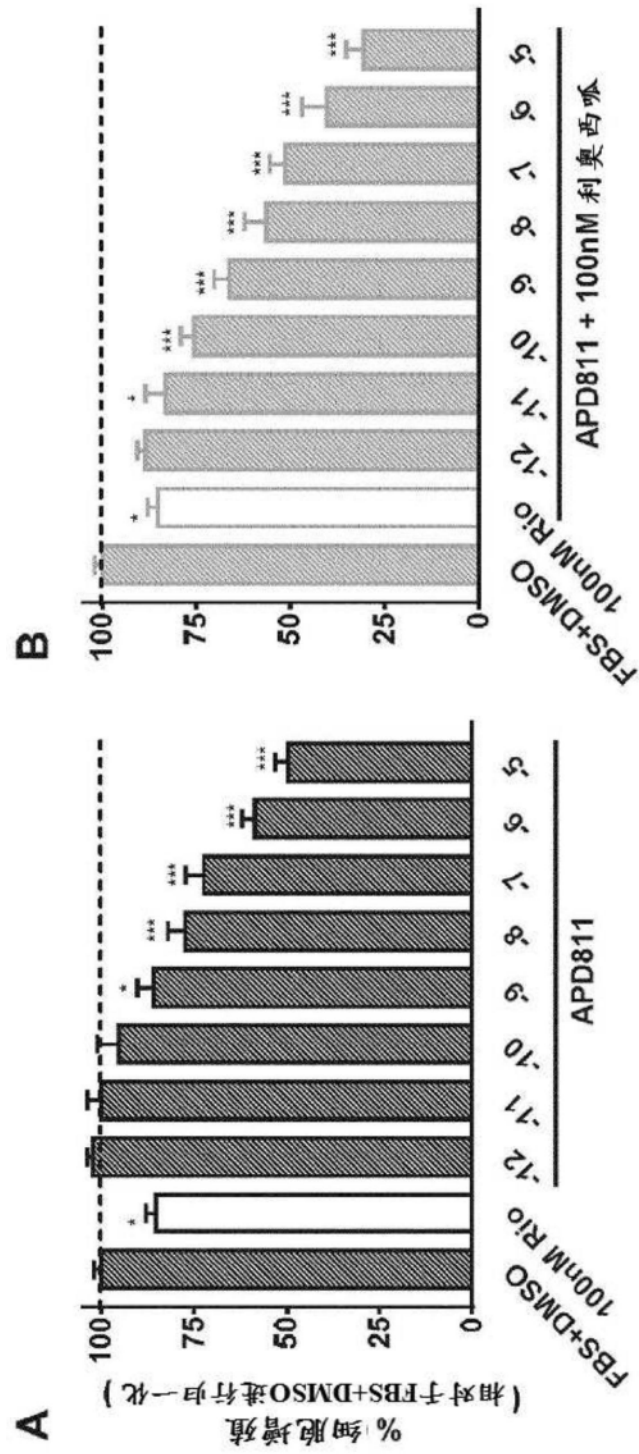


图2

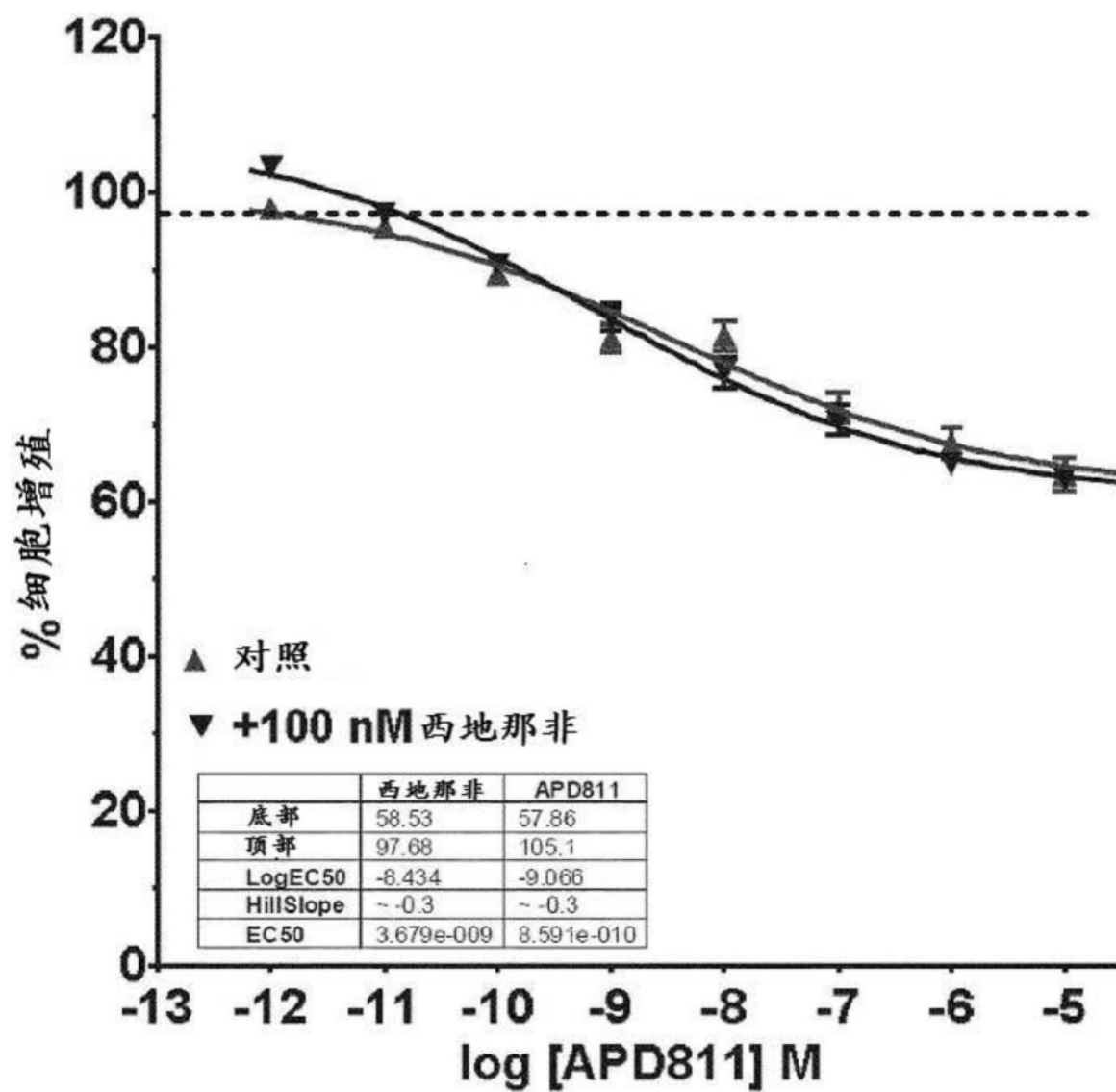


图3A



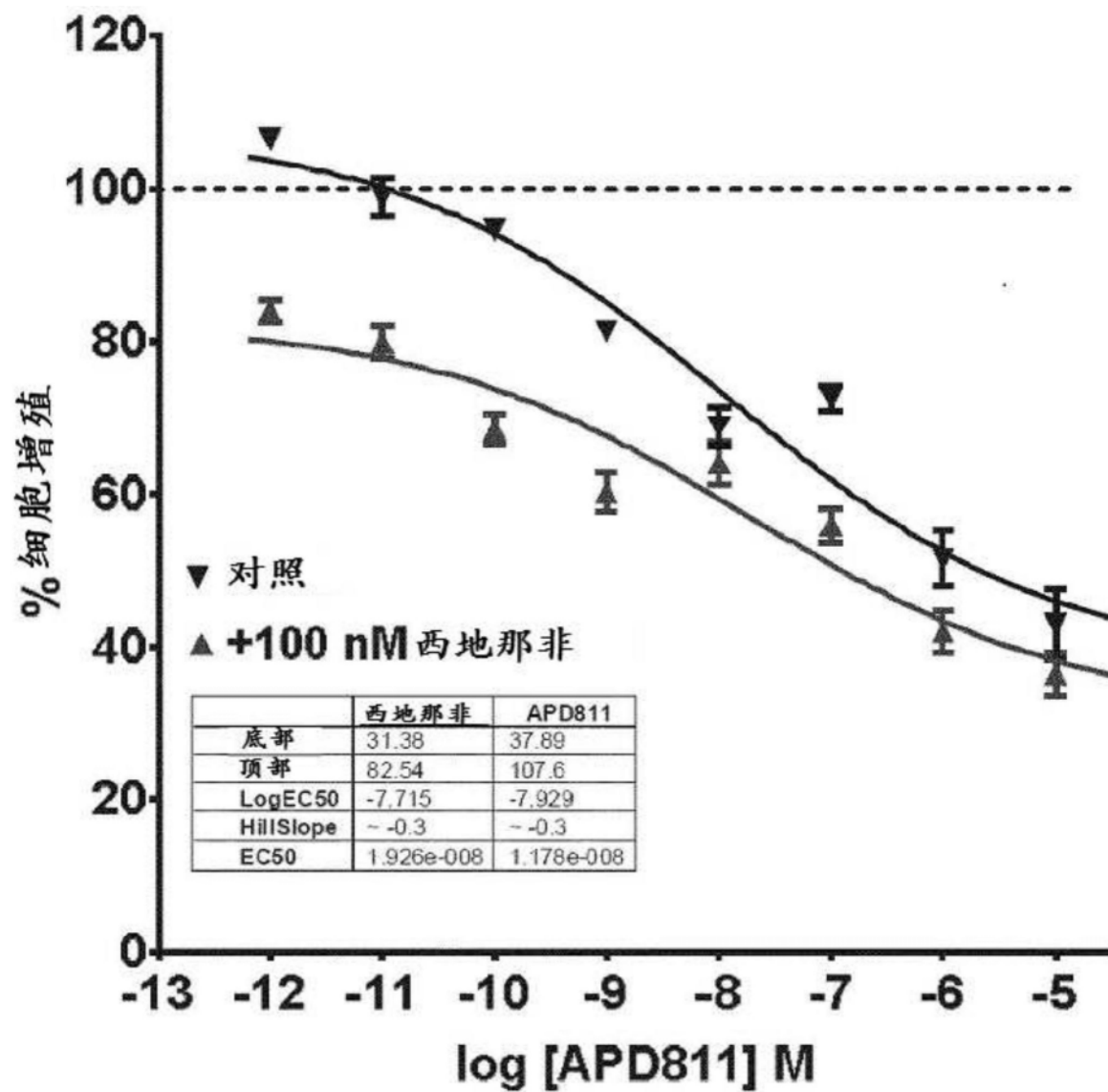


图3B

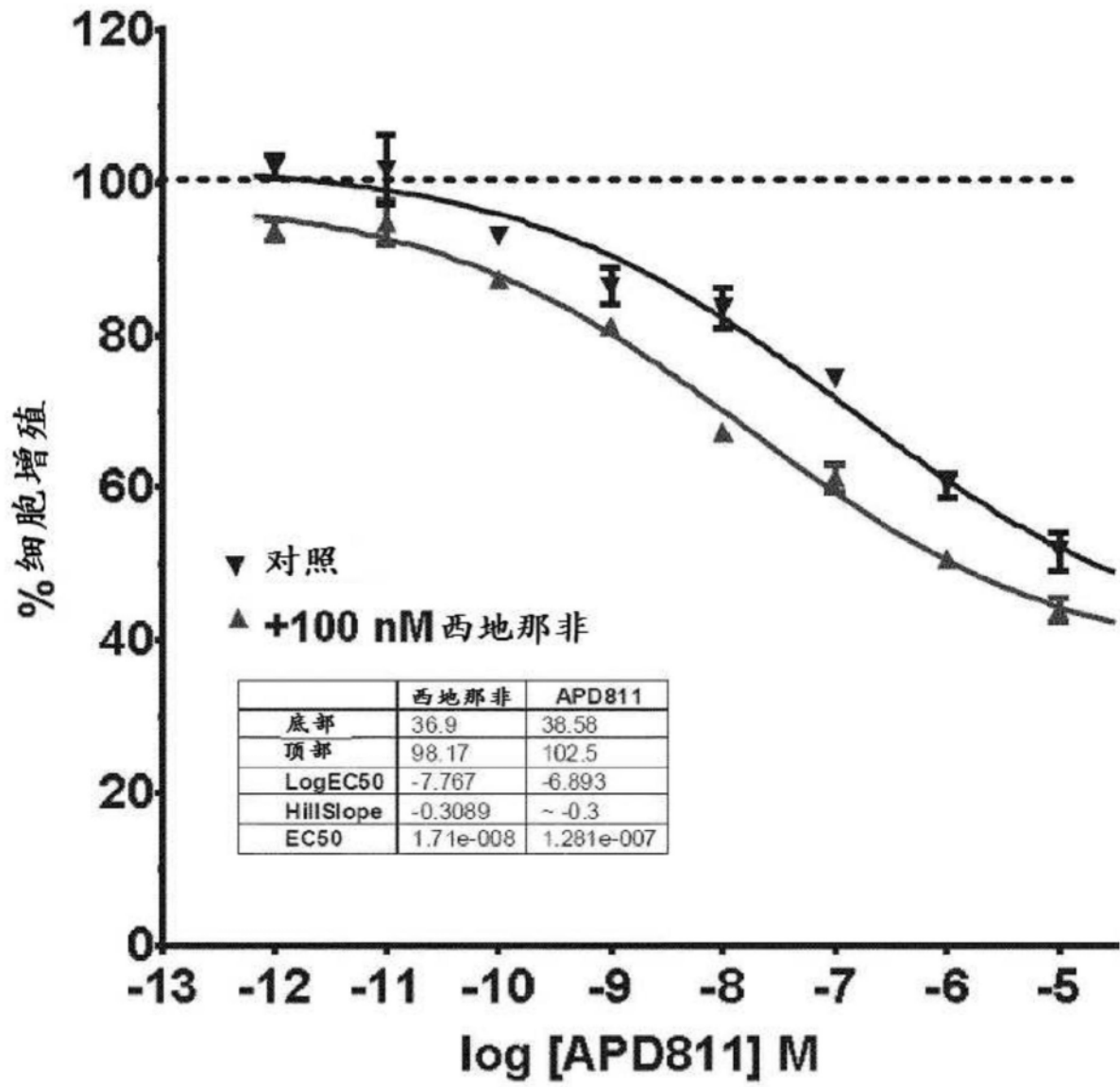


图3C

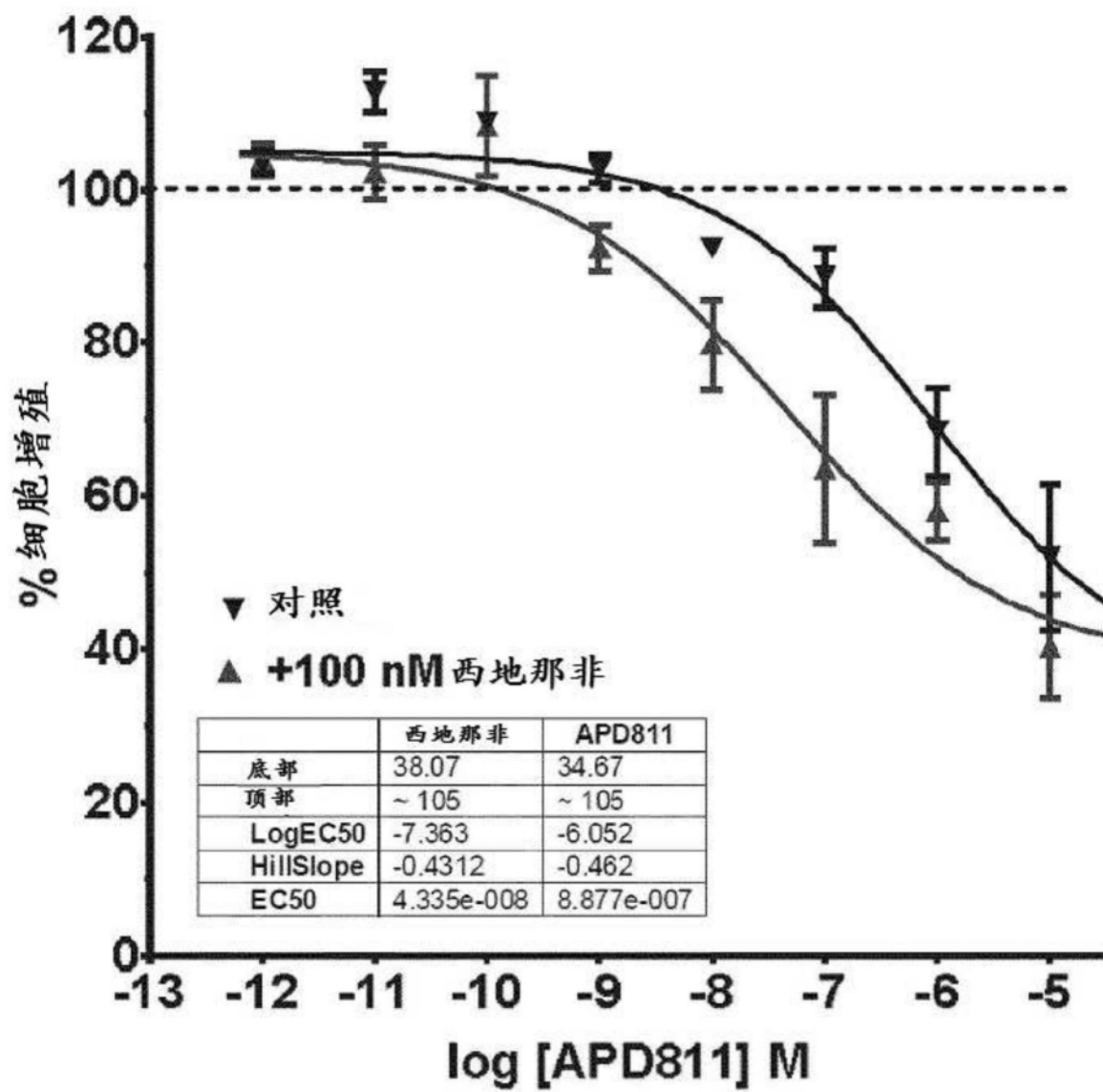


图3D

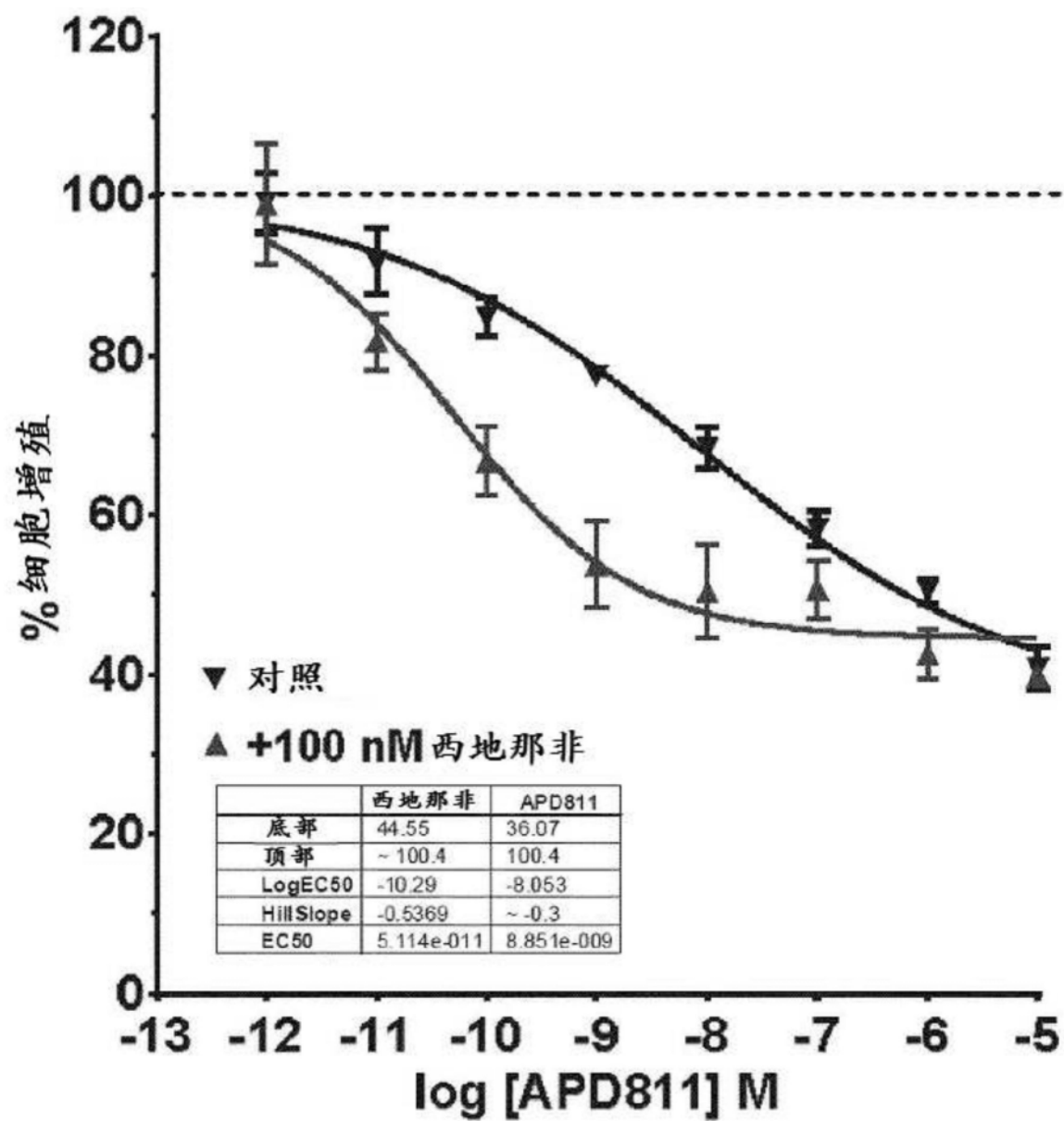


图3E

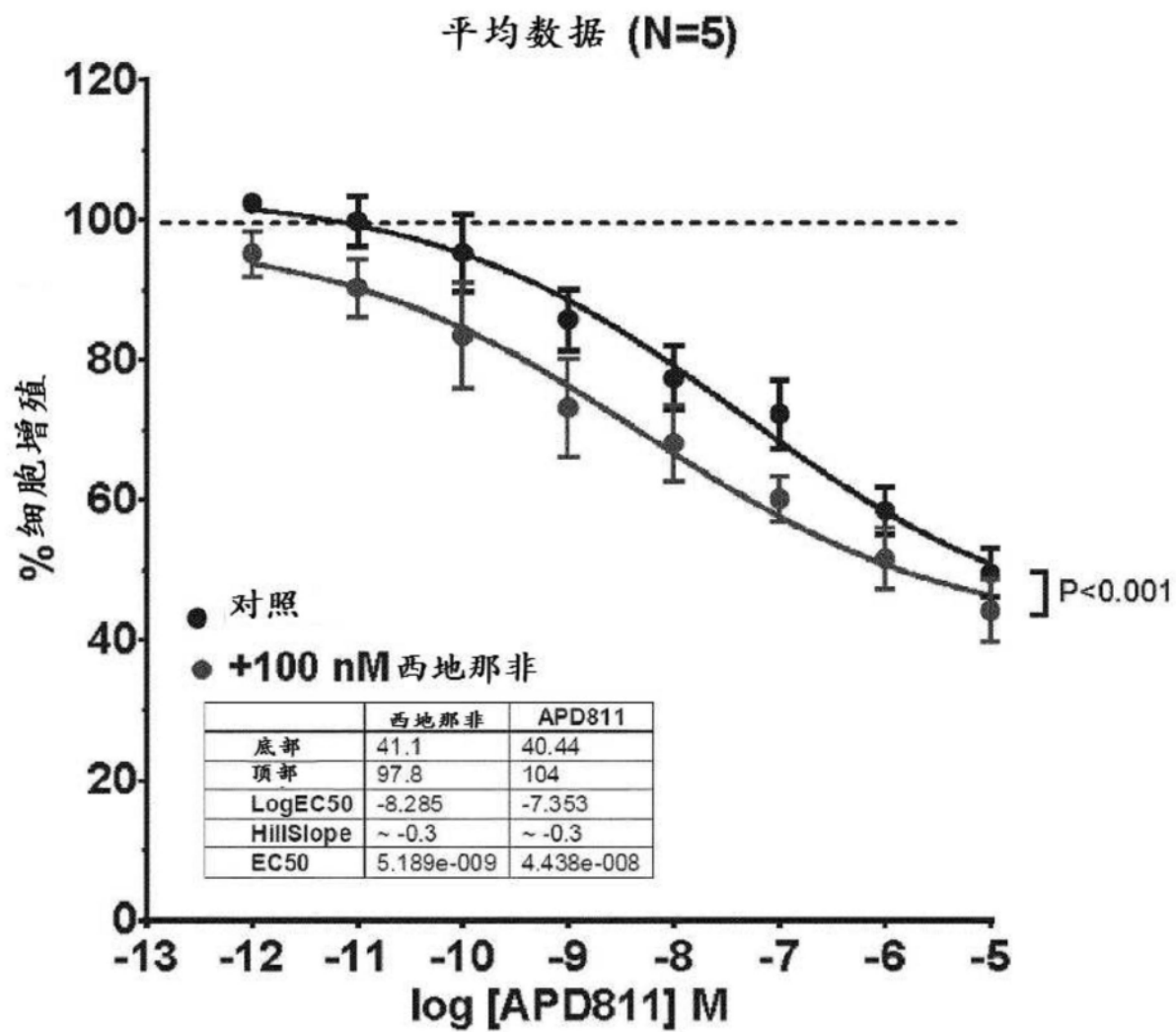


图3F

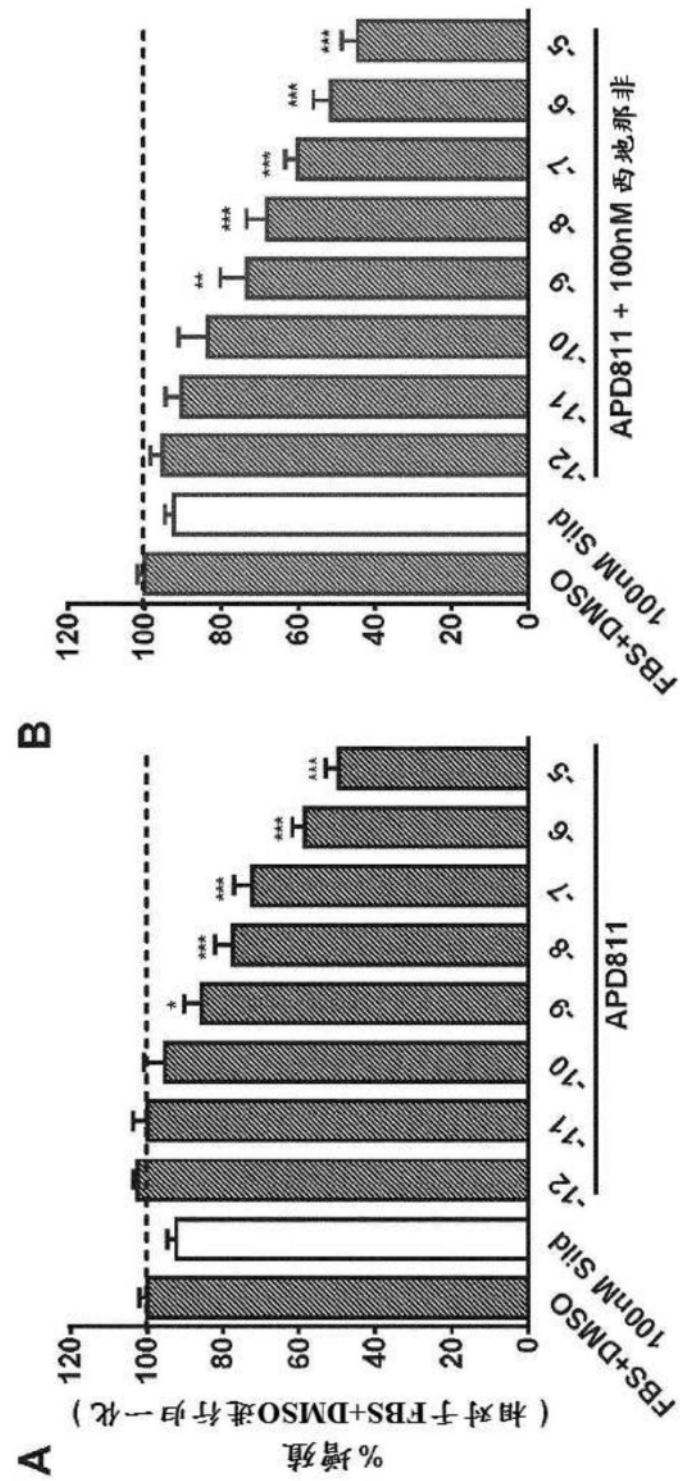


图4

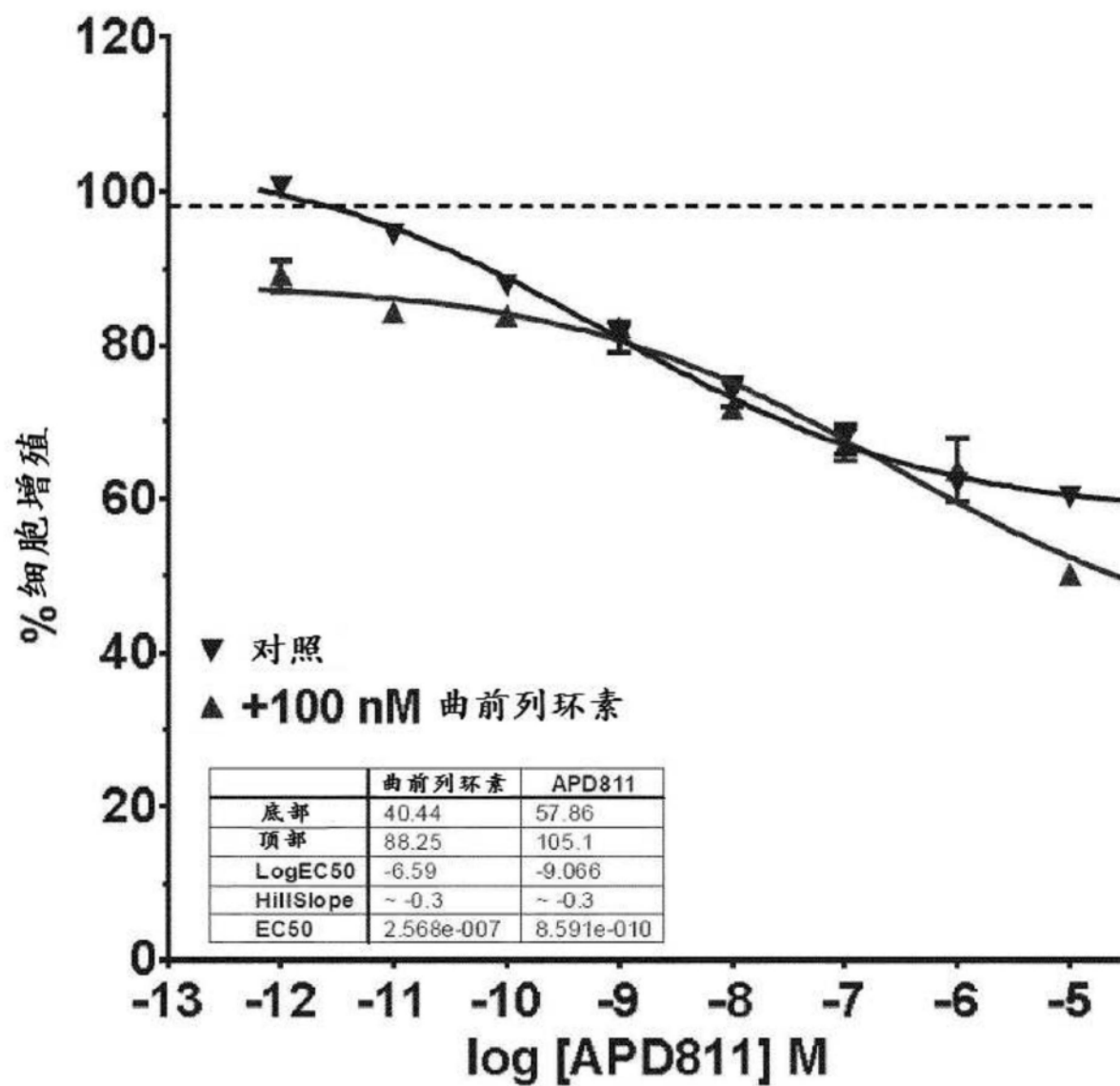


图5A

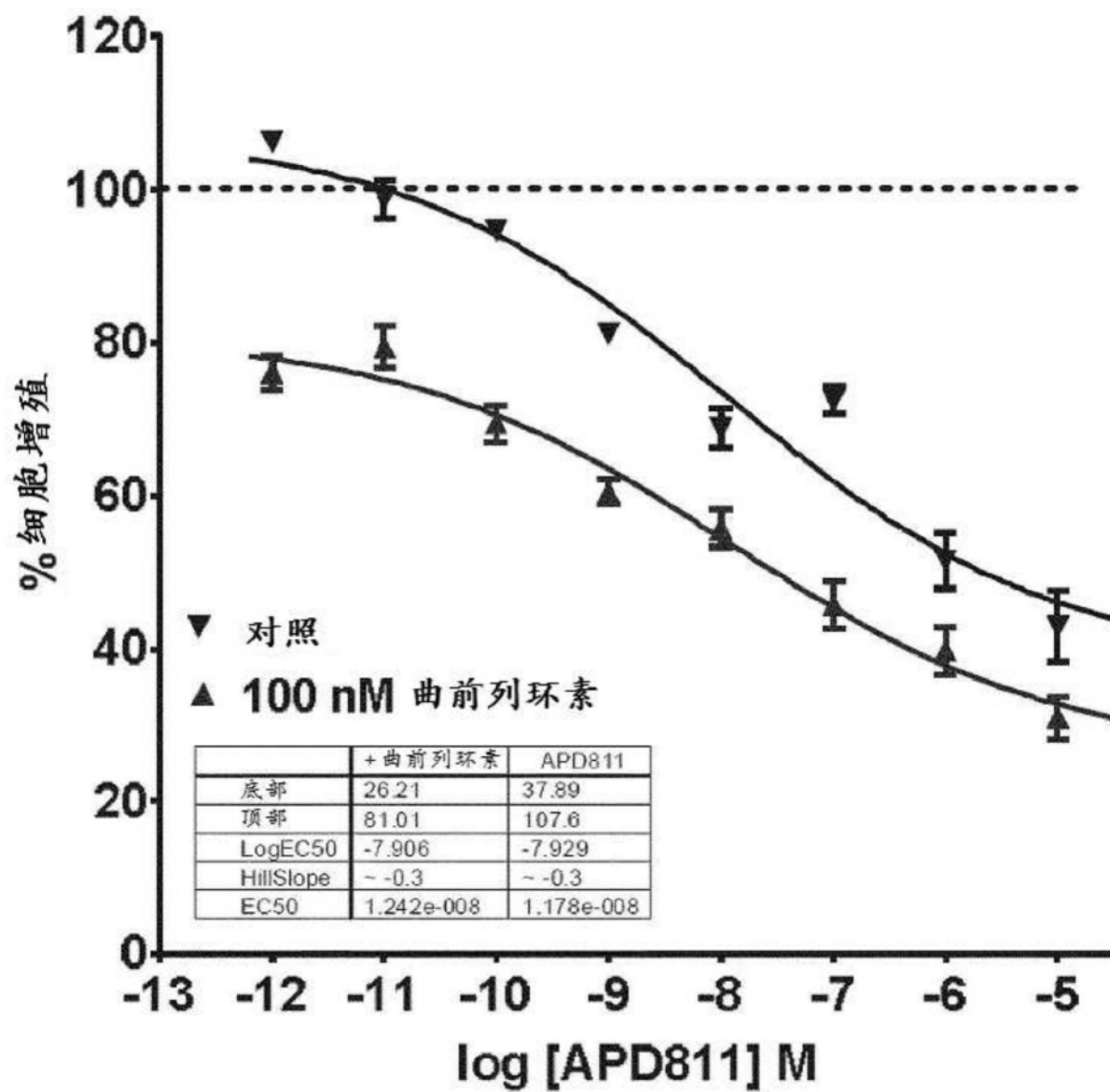


图5B



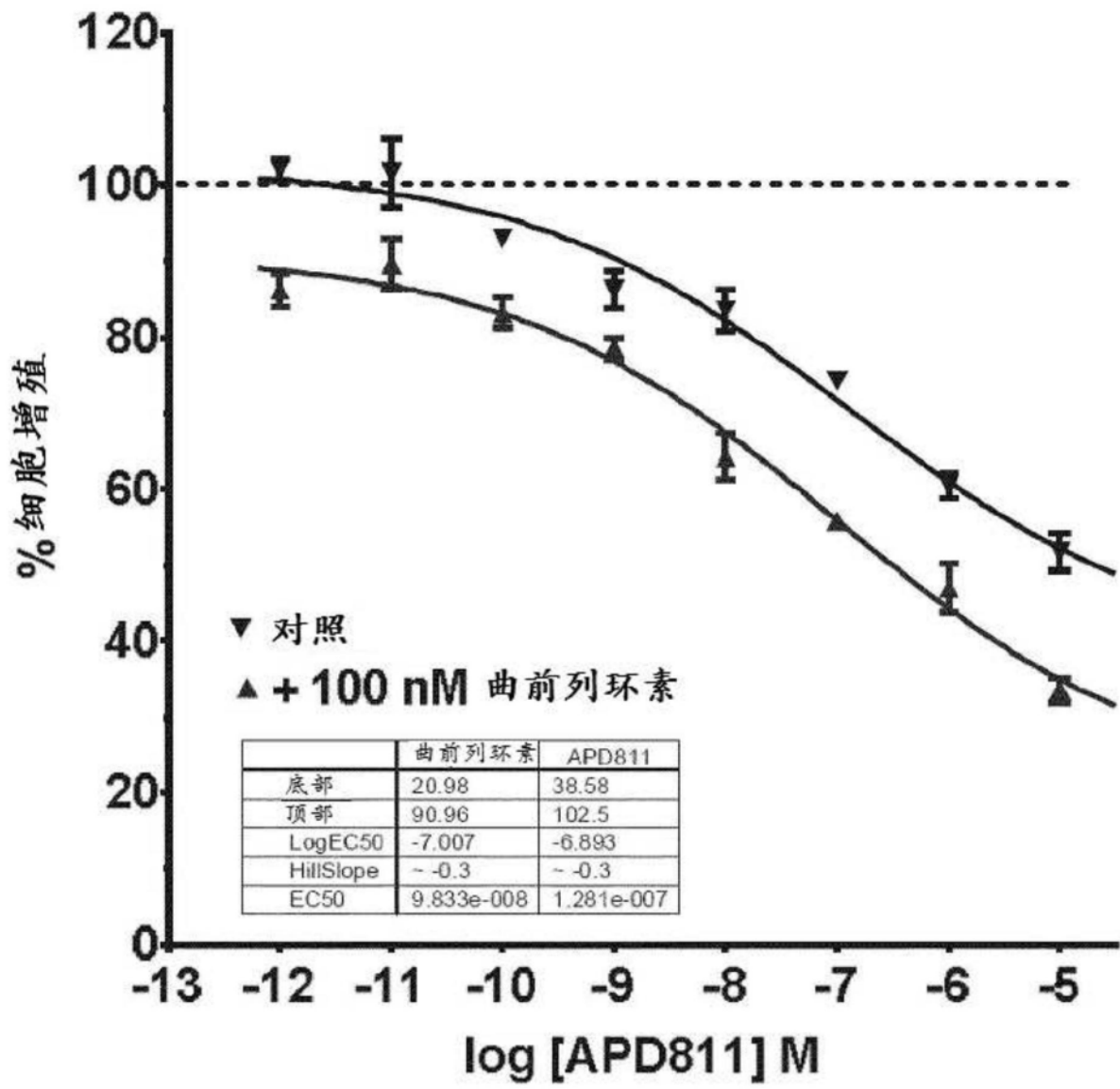


图5C

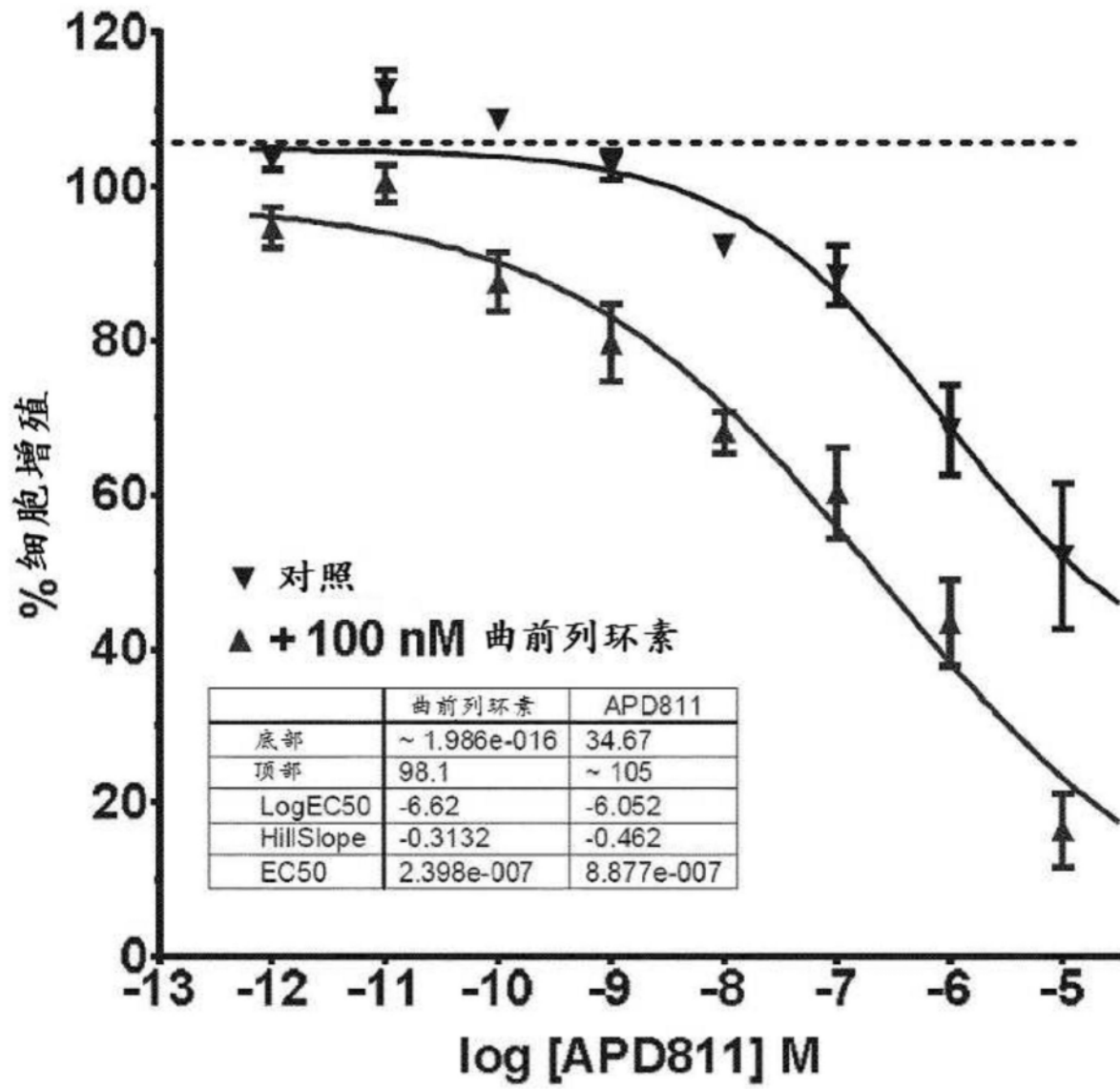


图5D

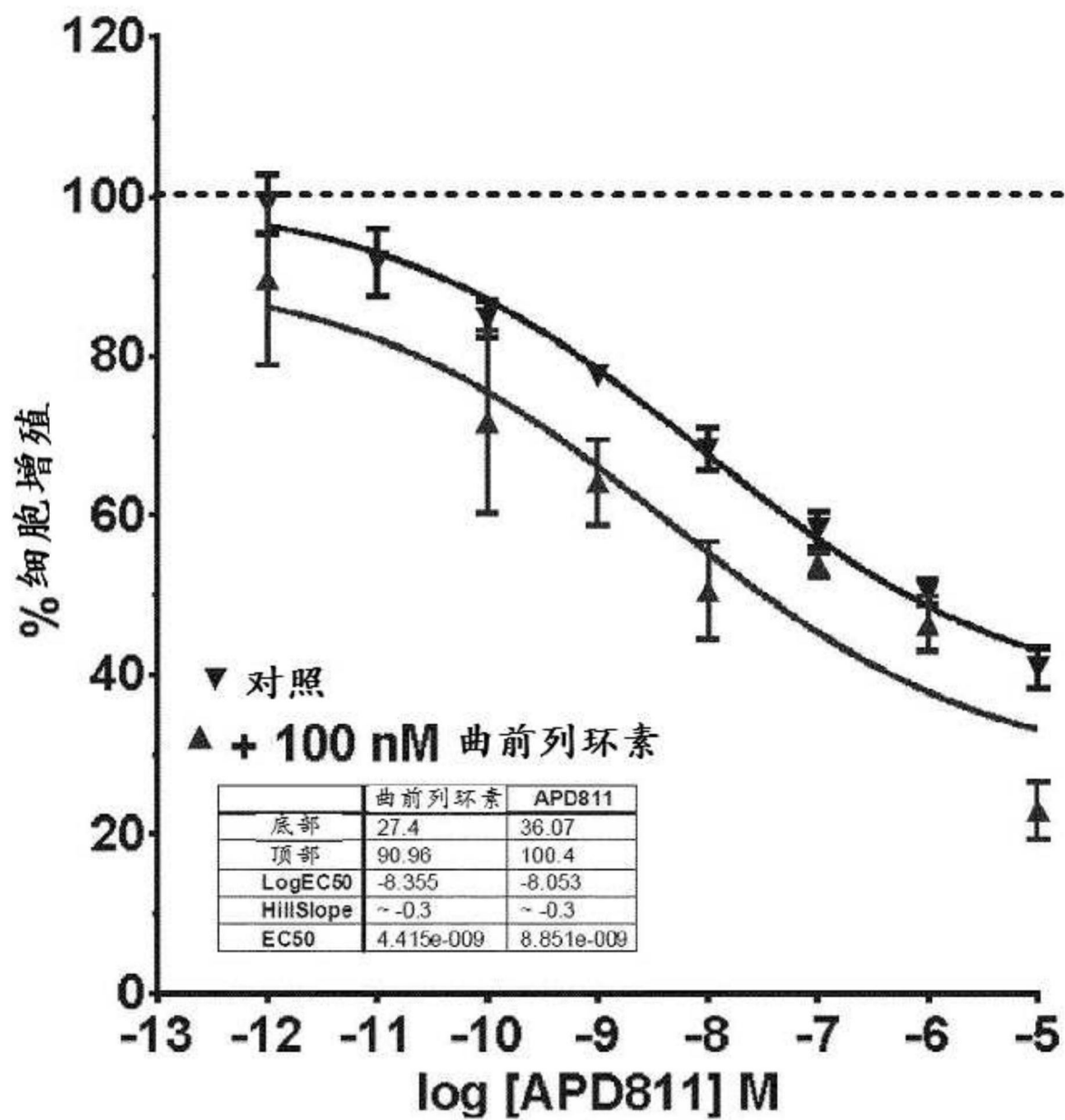


图5E

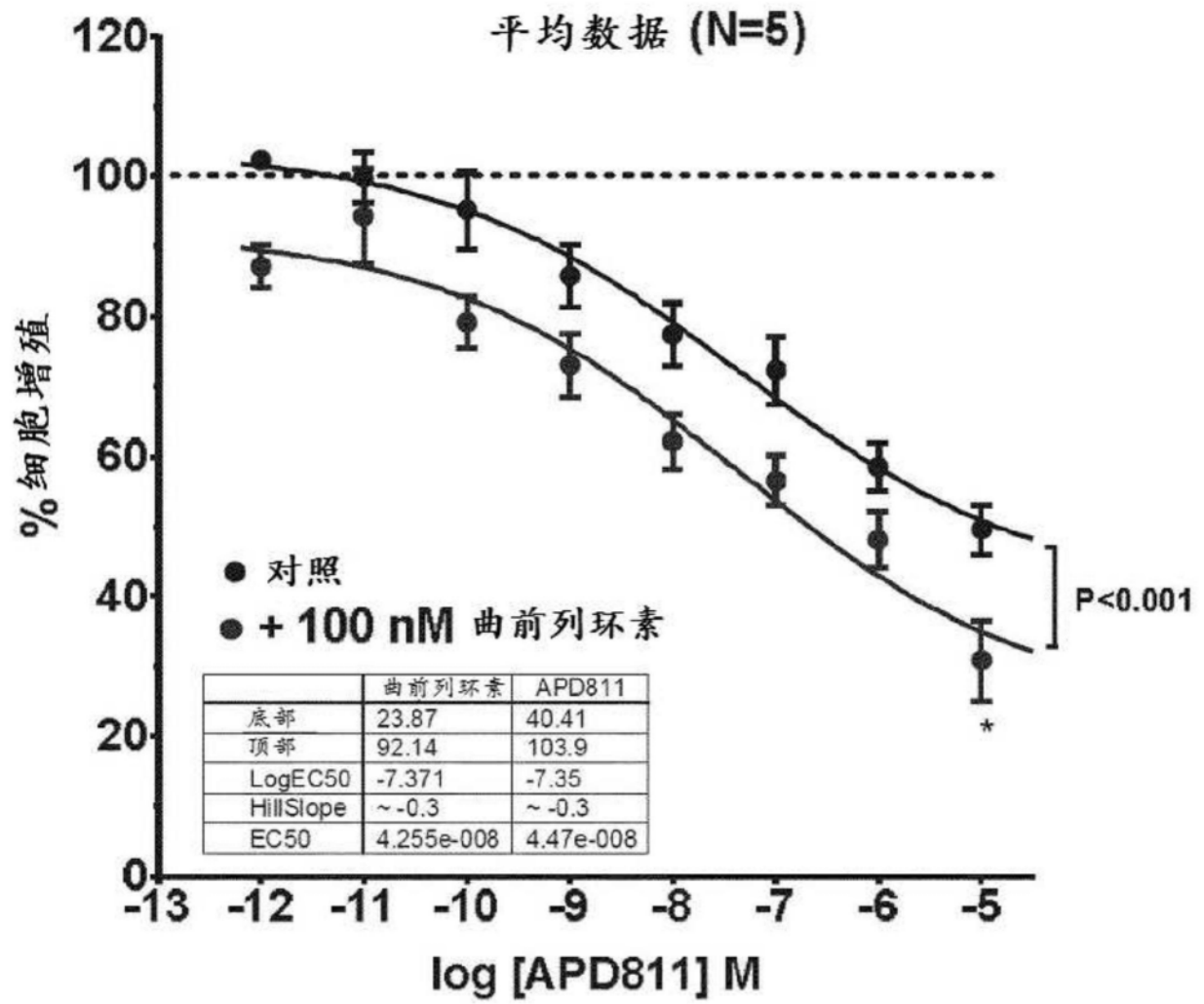


图5F

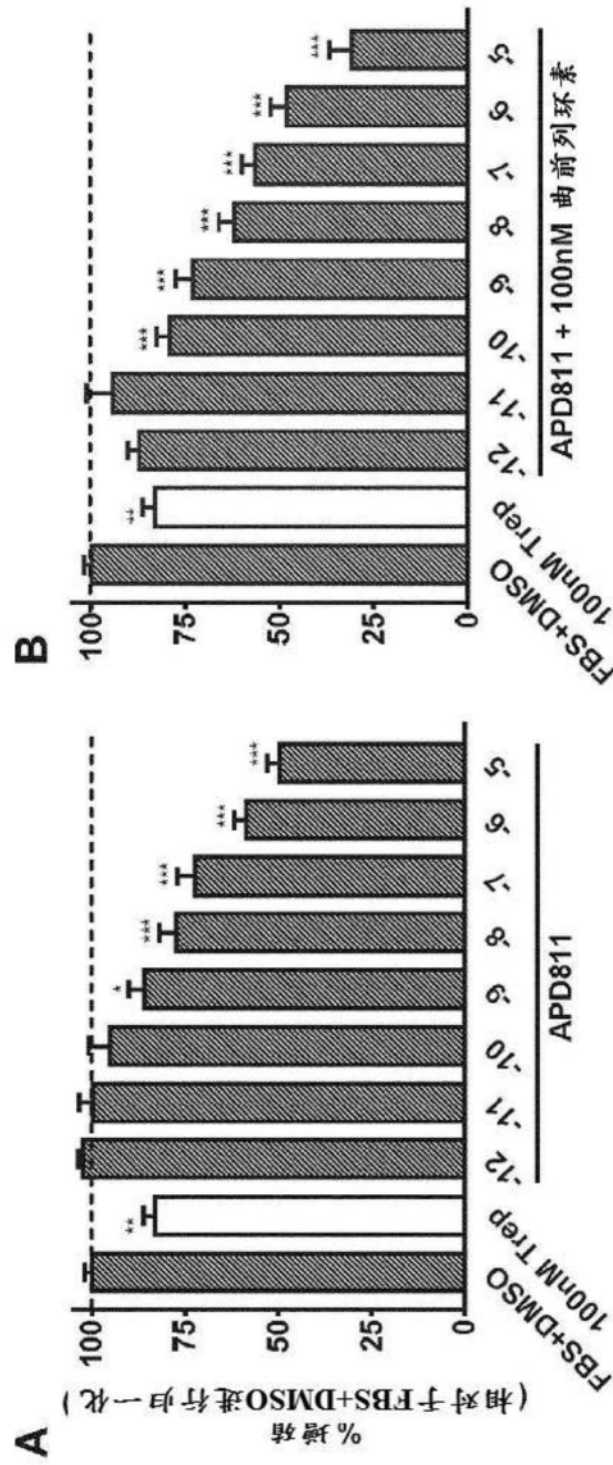


图6

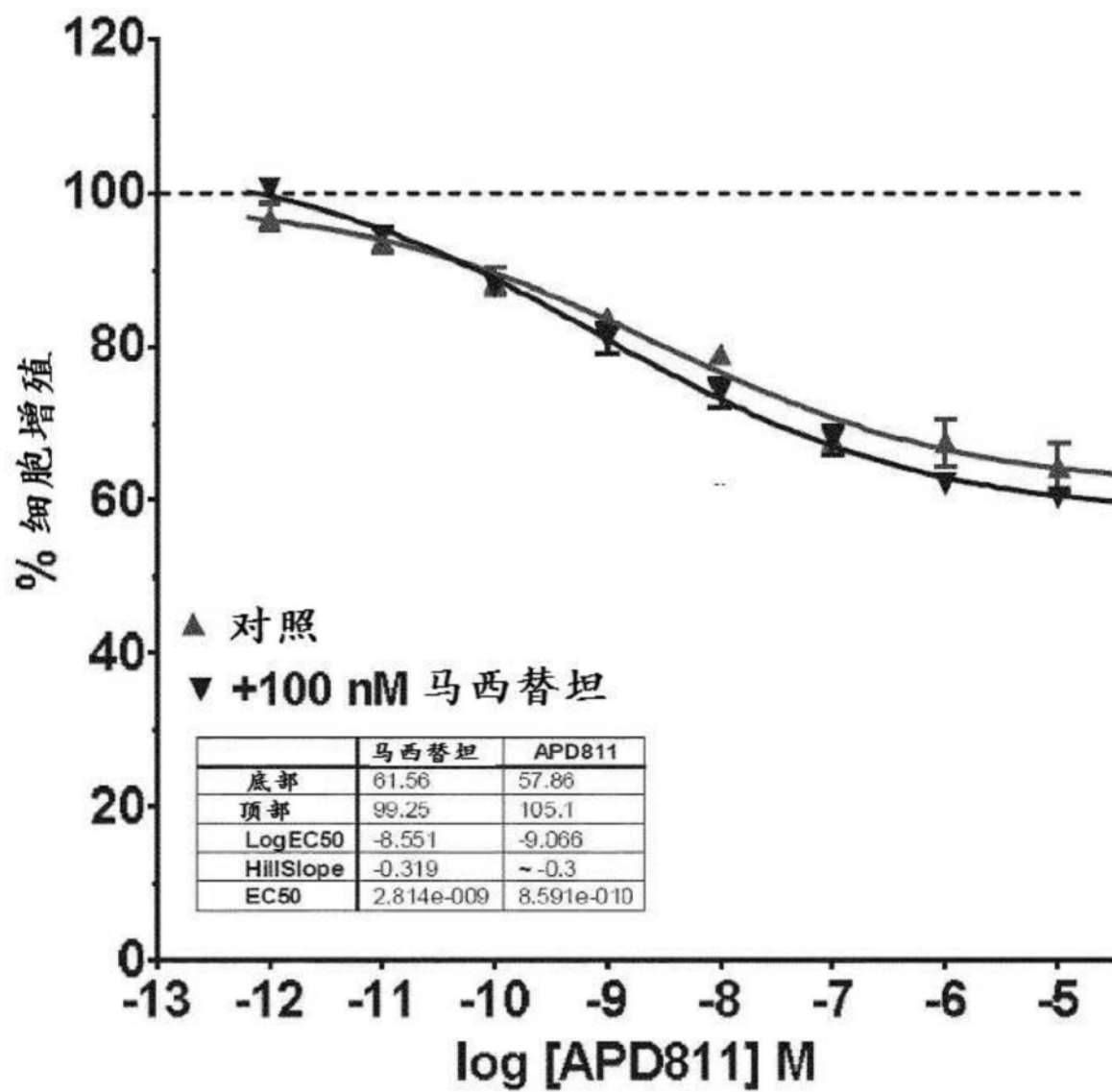


图7A

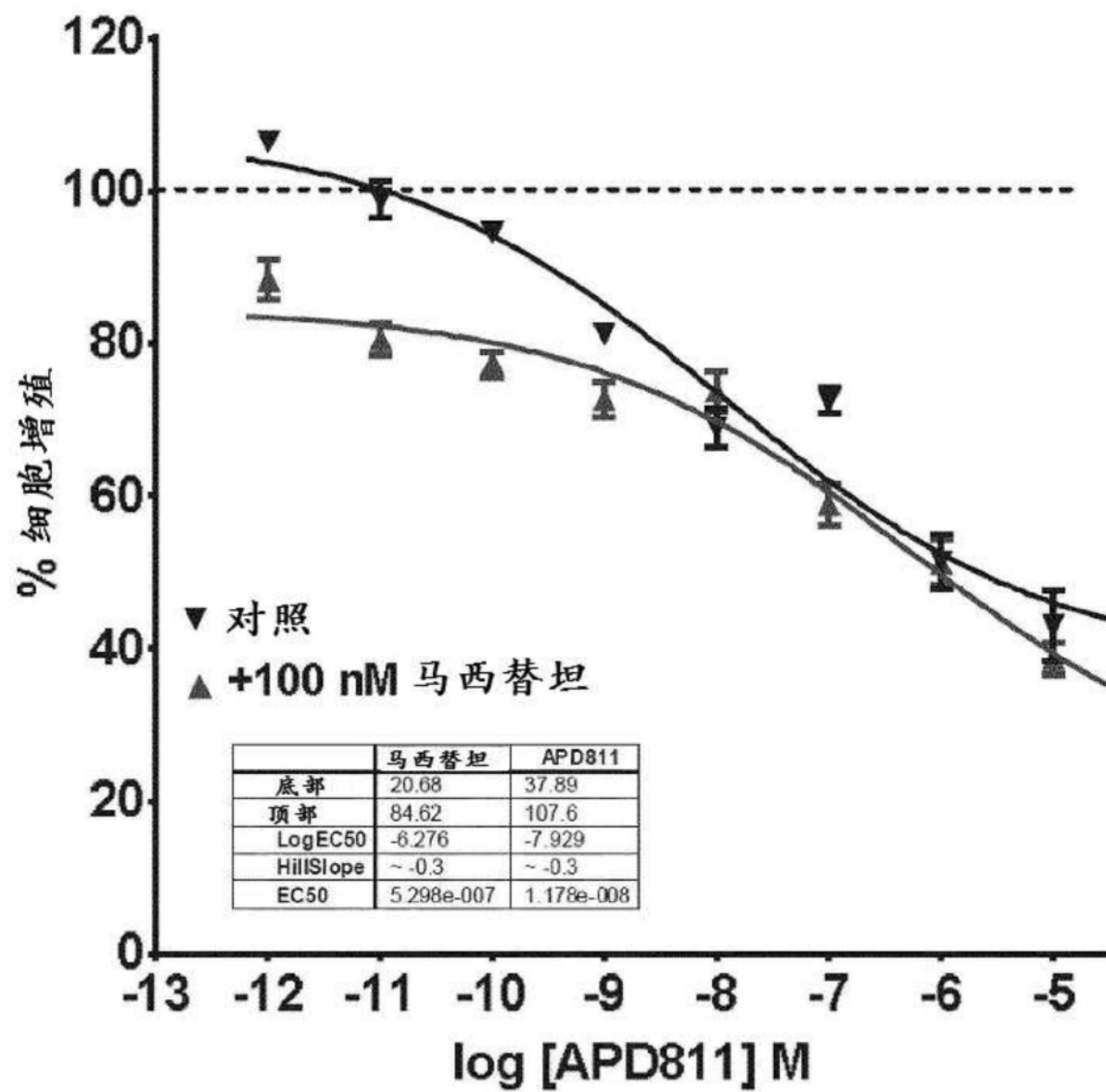


图7B

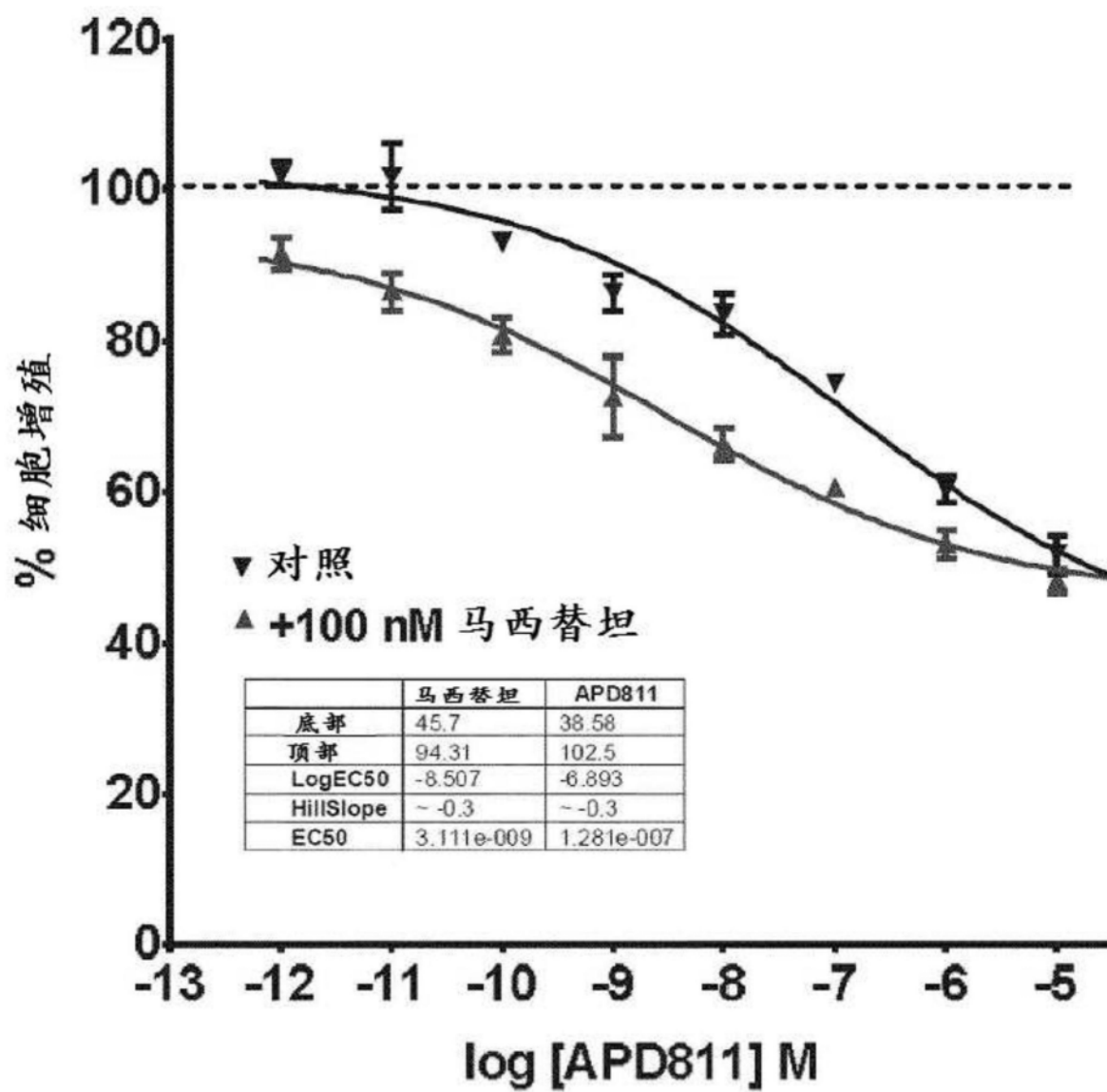


图7C



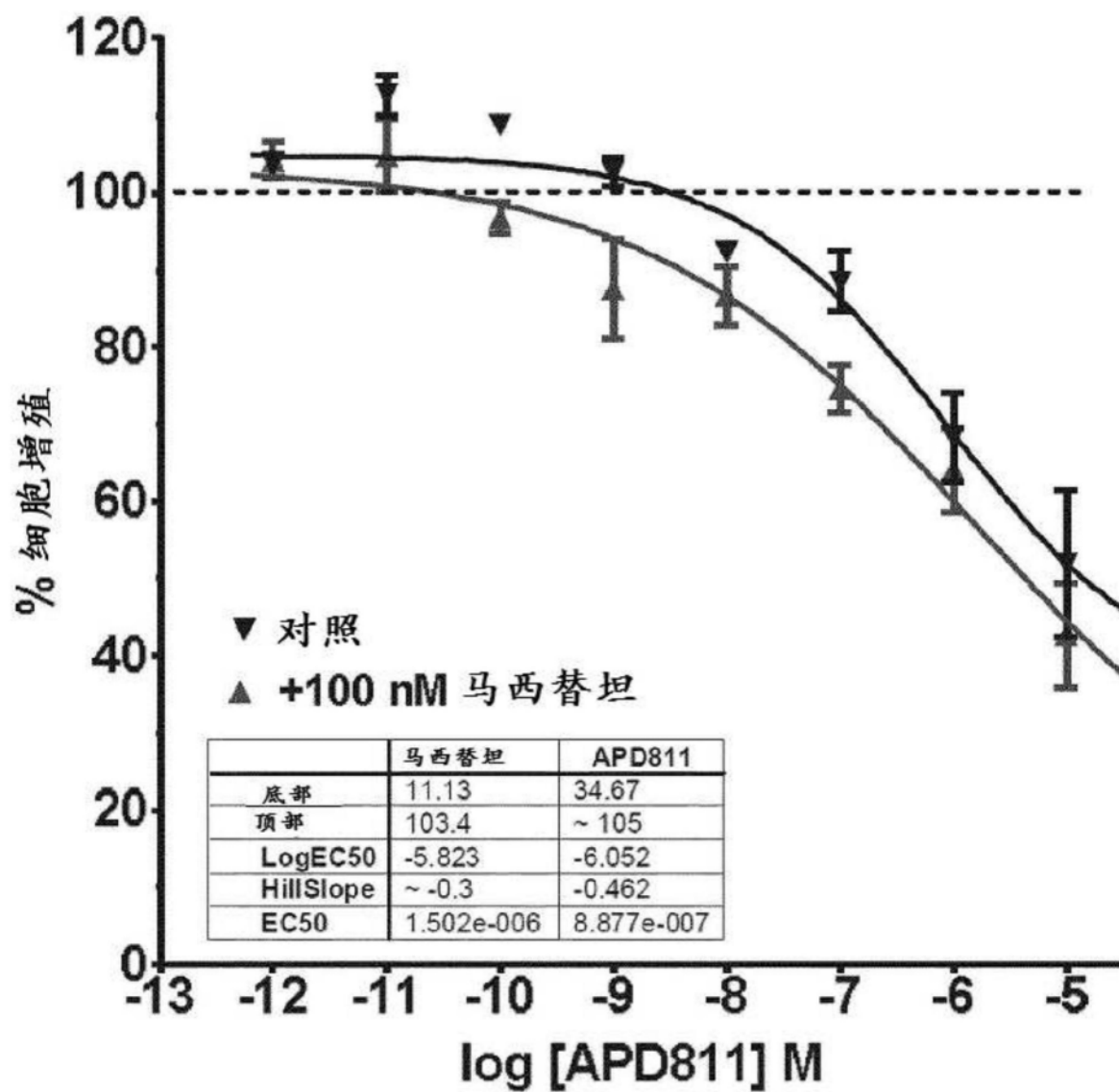


图7D

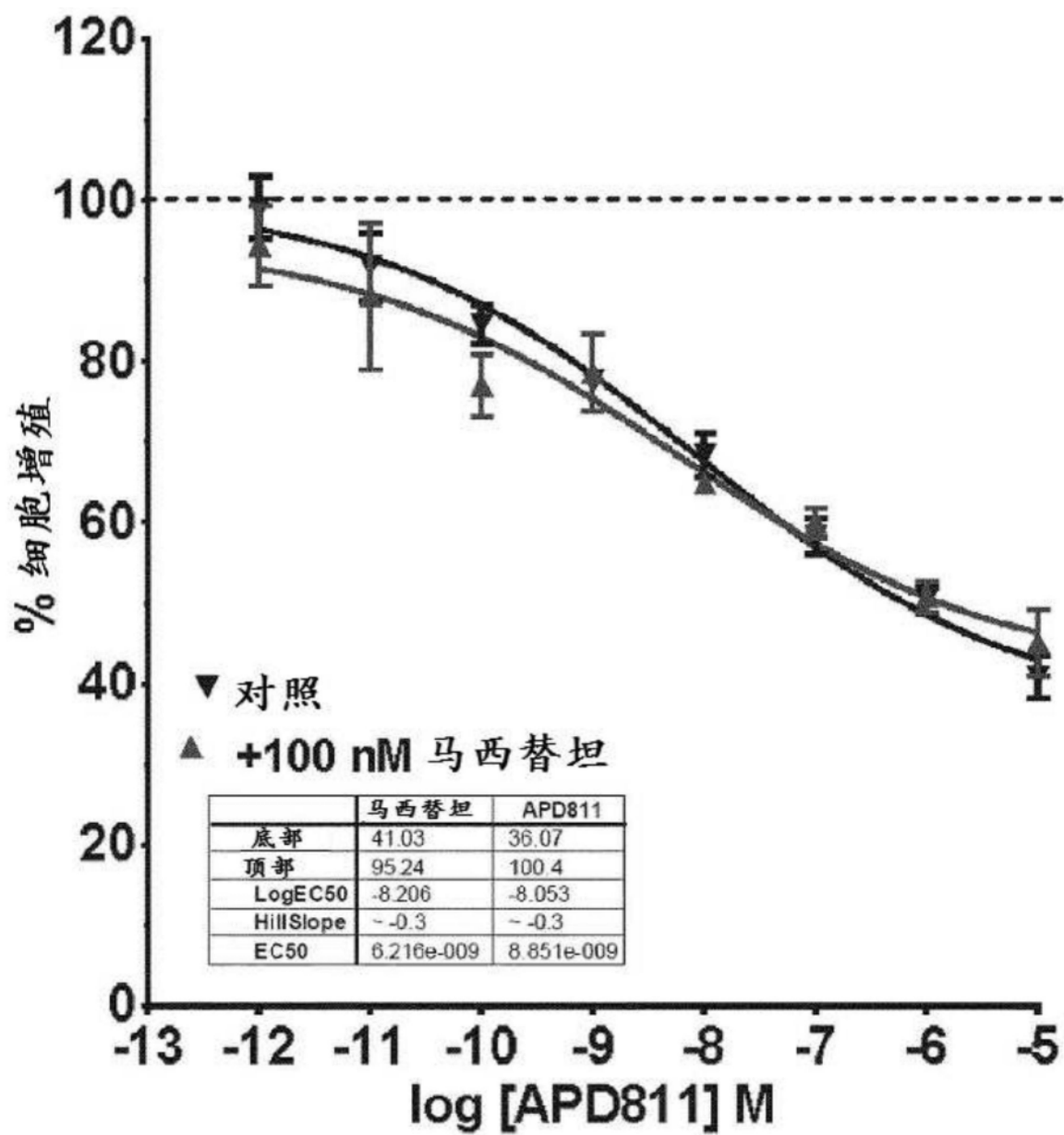


图7E

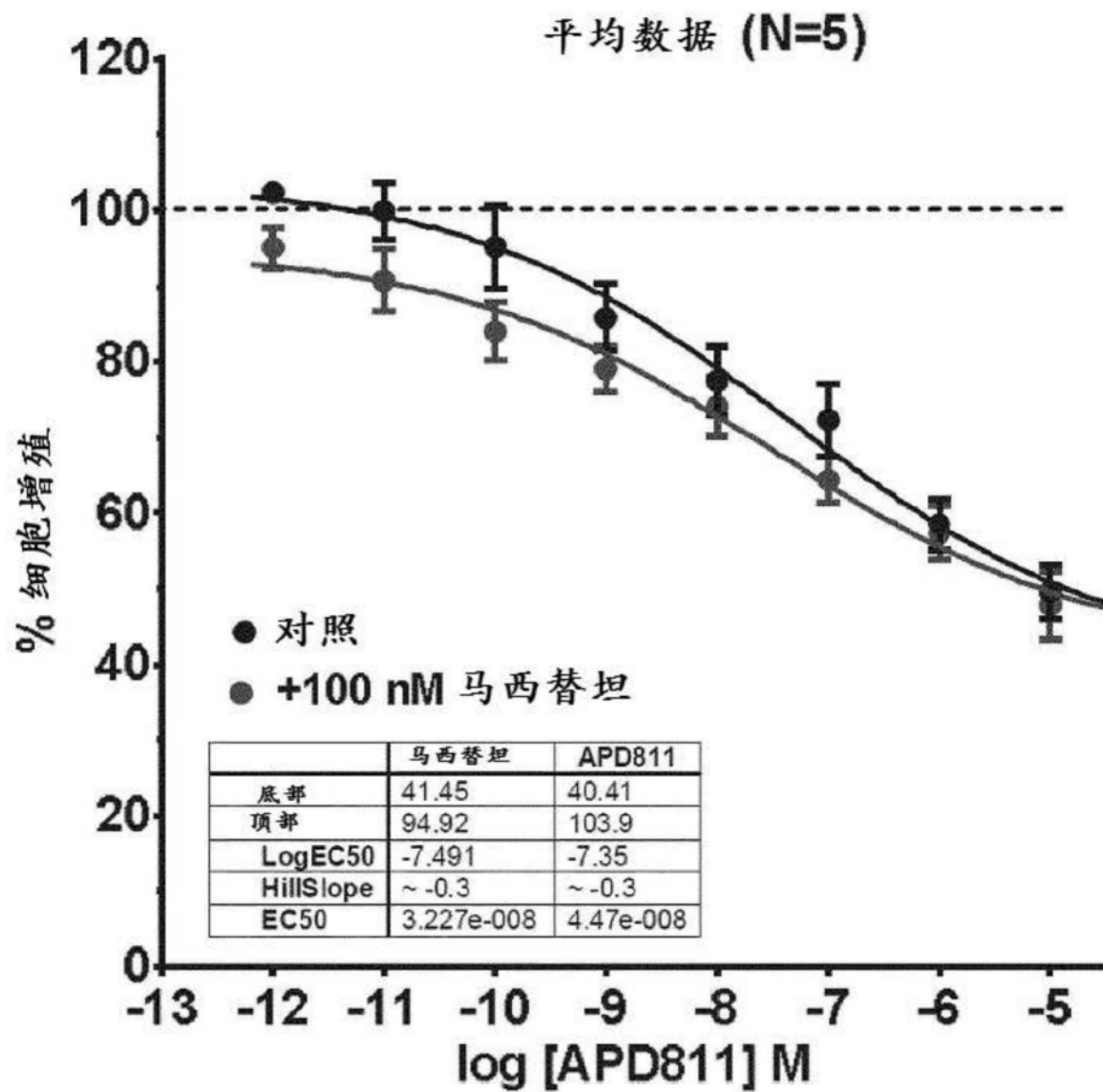


图7F

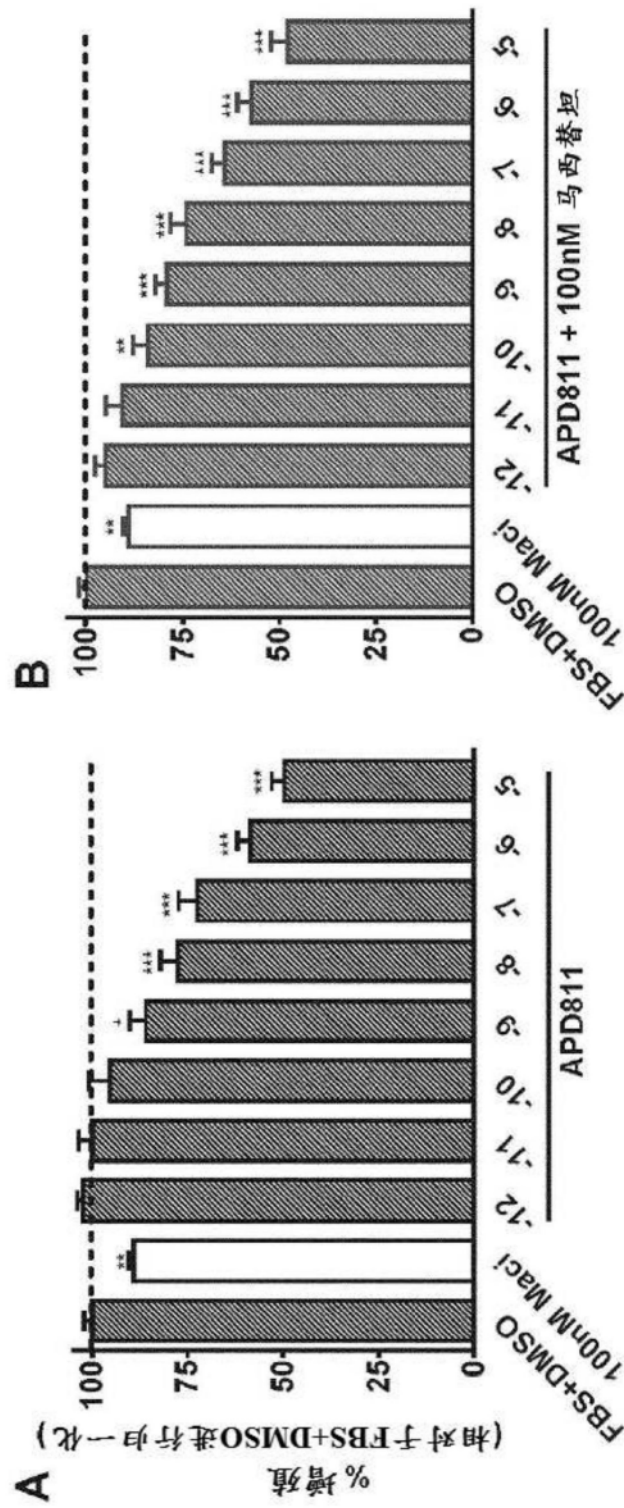


图8

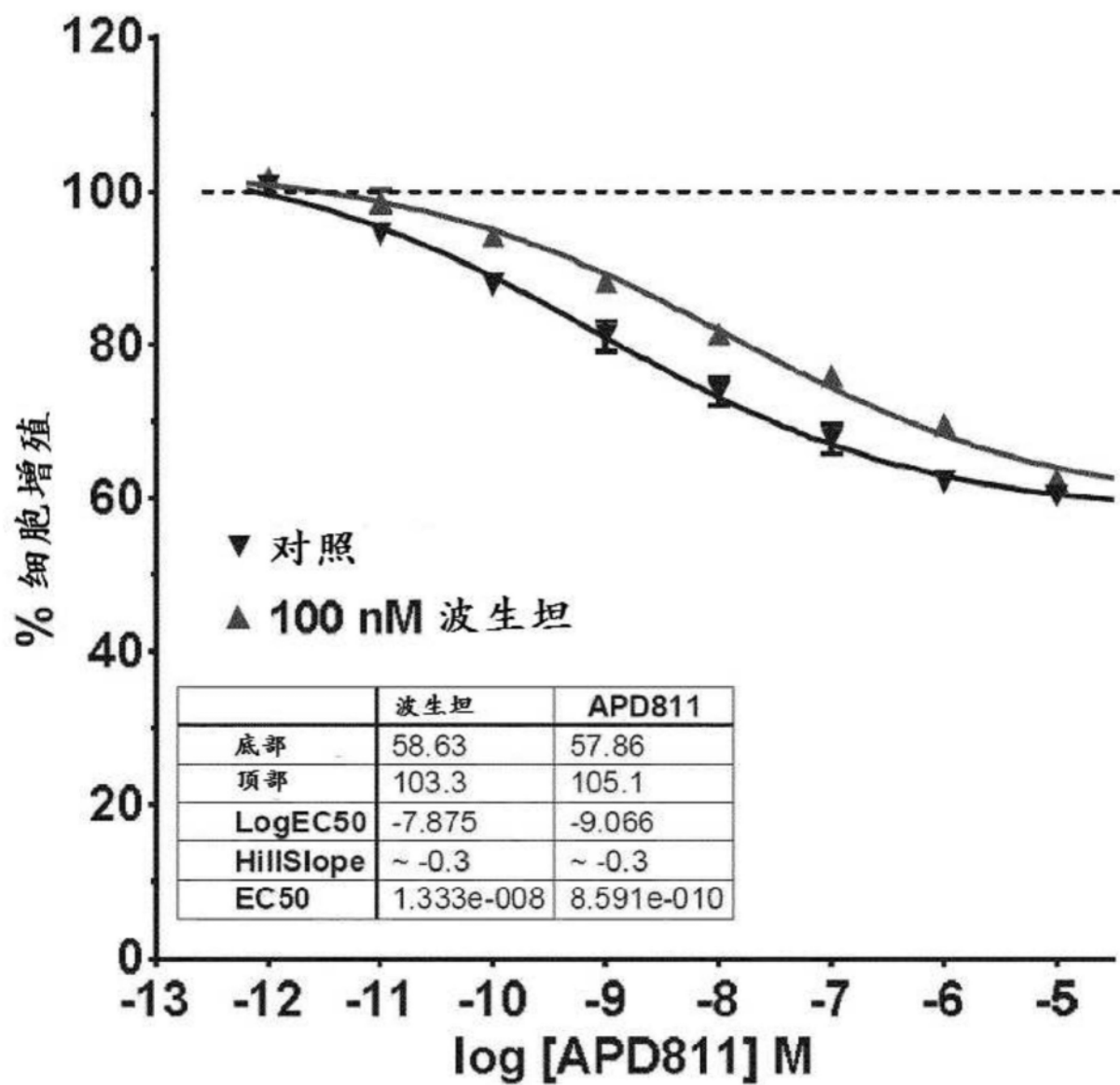


图9A

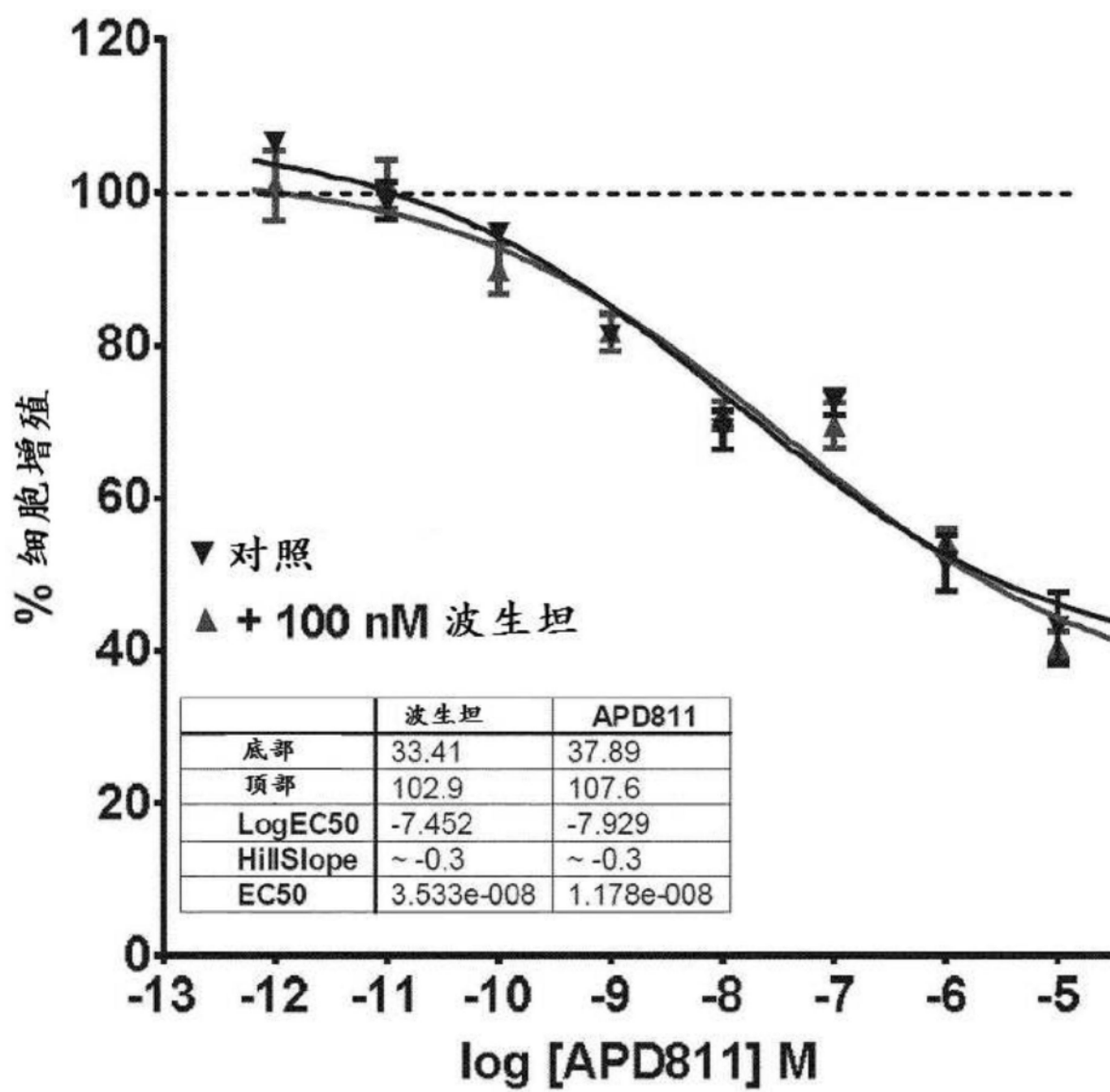


图9B

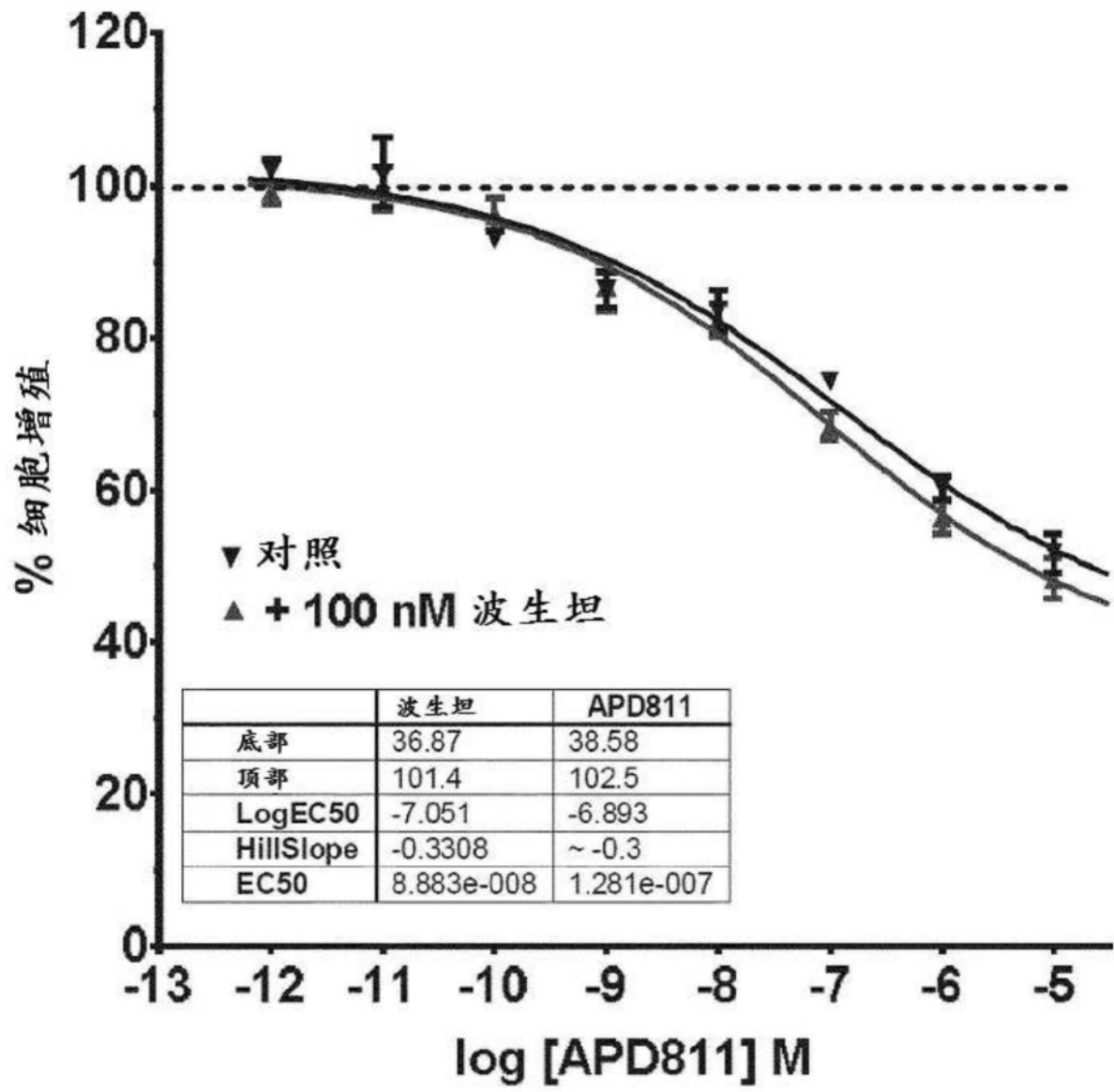


图9C

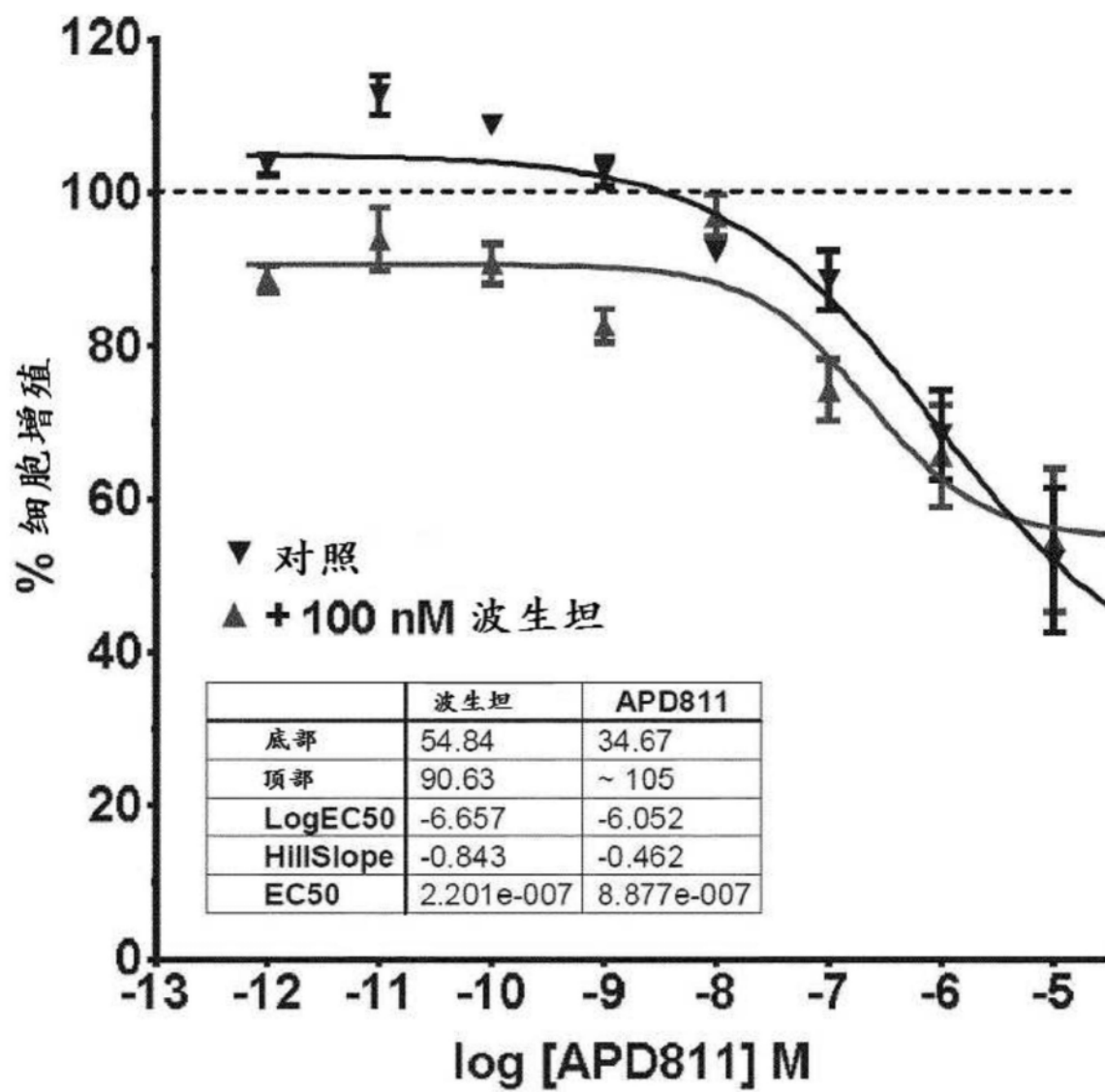


图9D



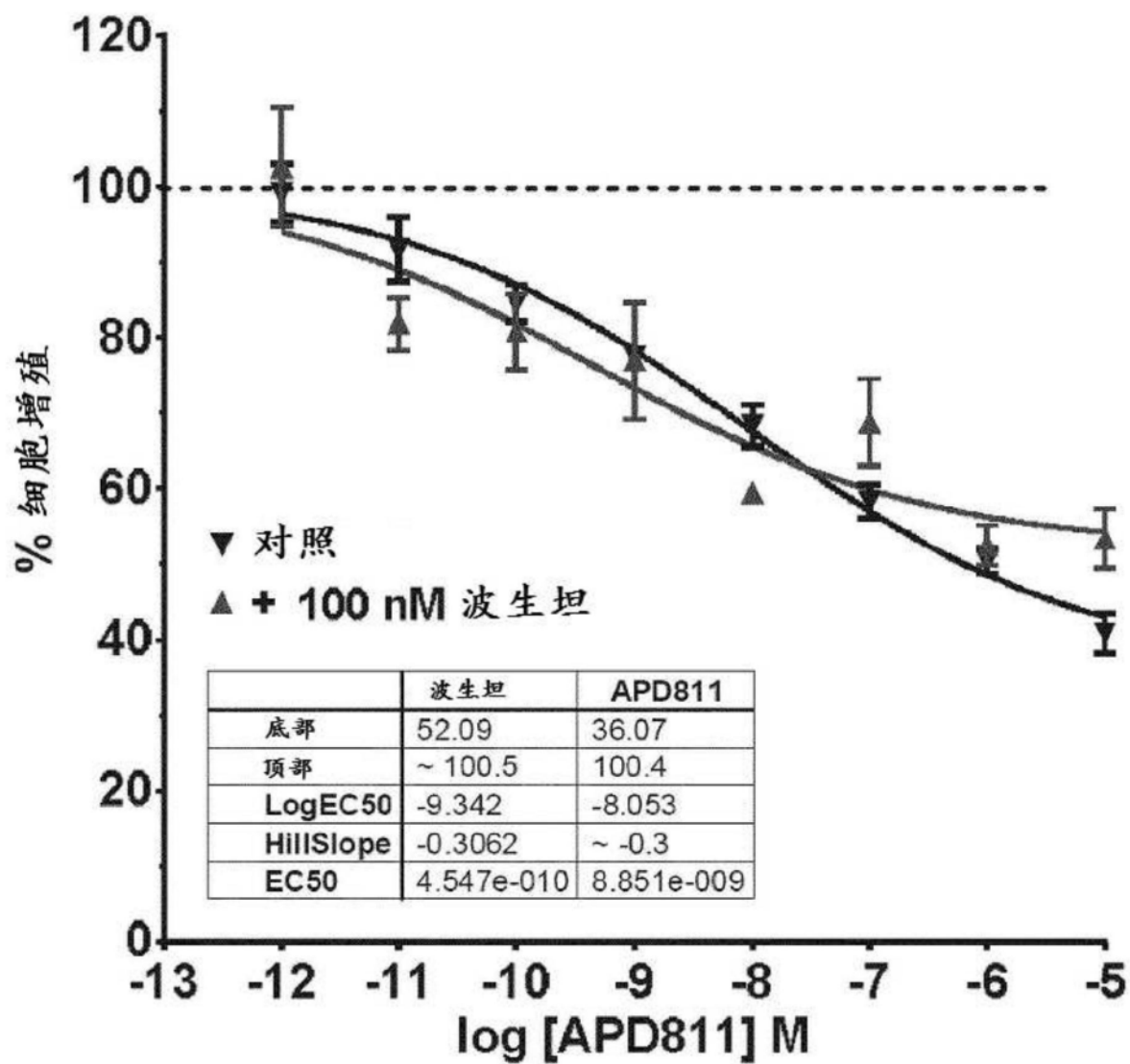


图9E

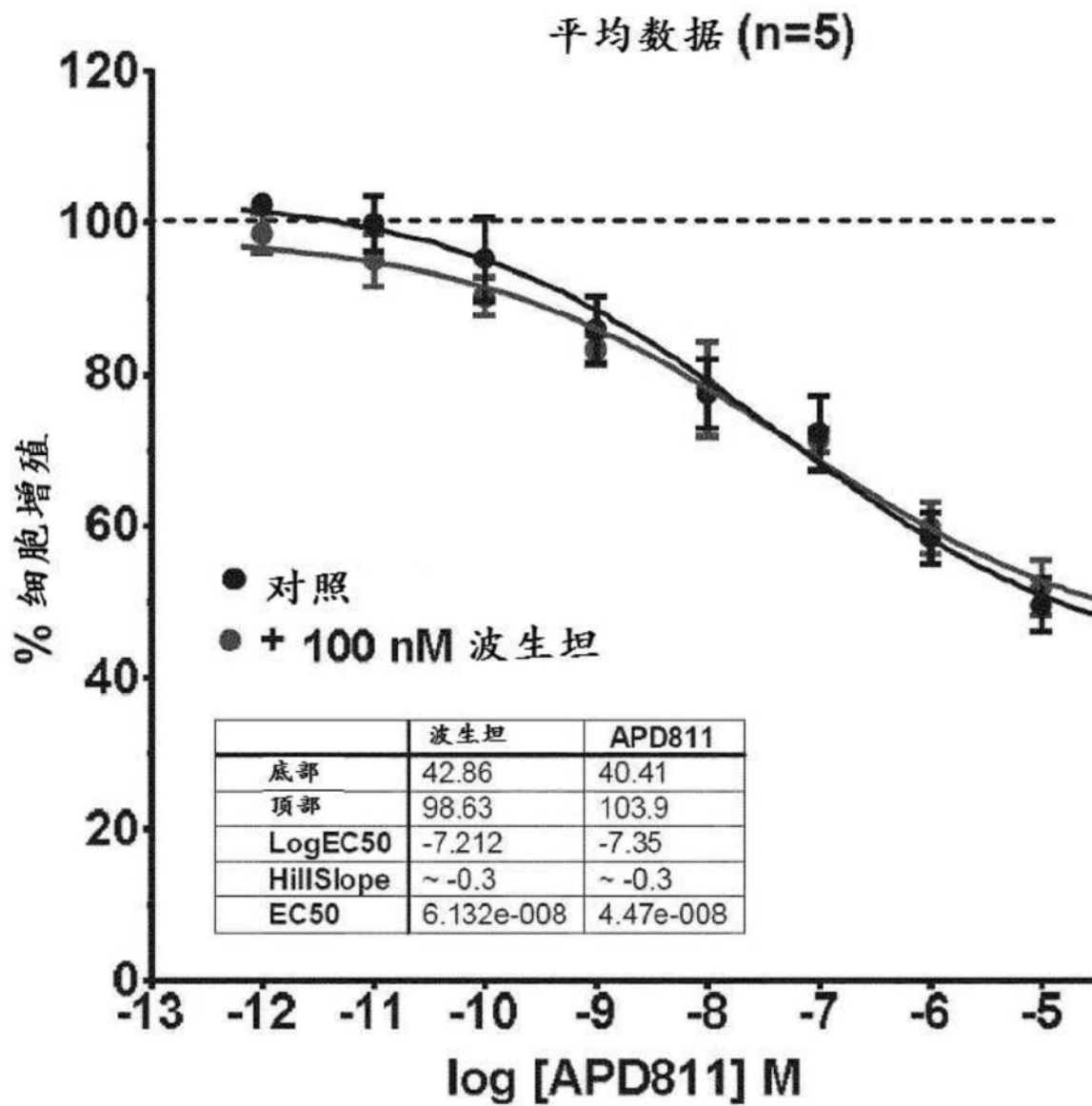


图9F

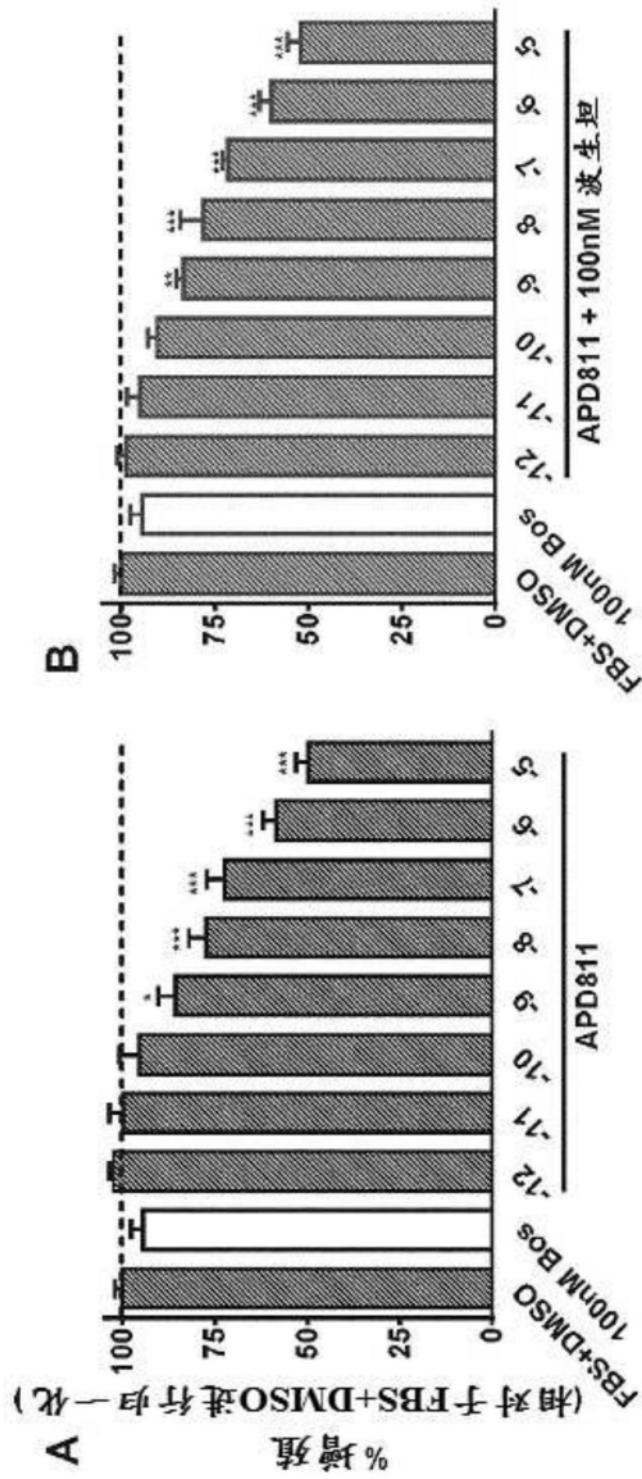


图10

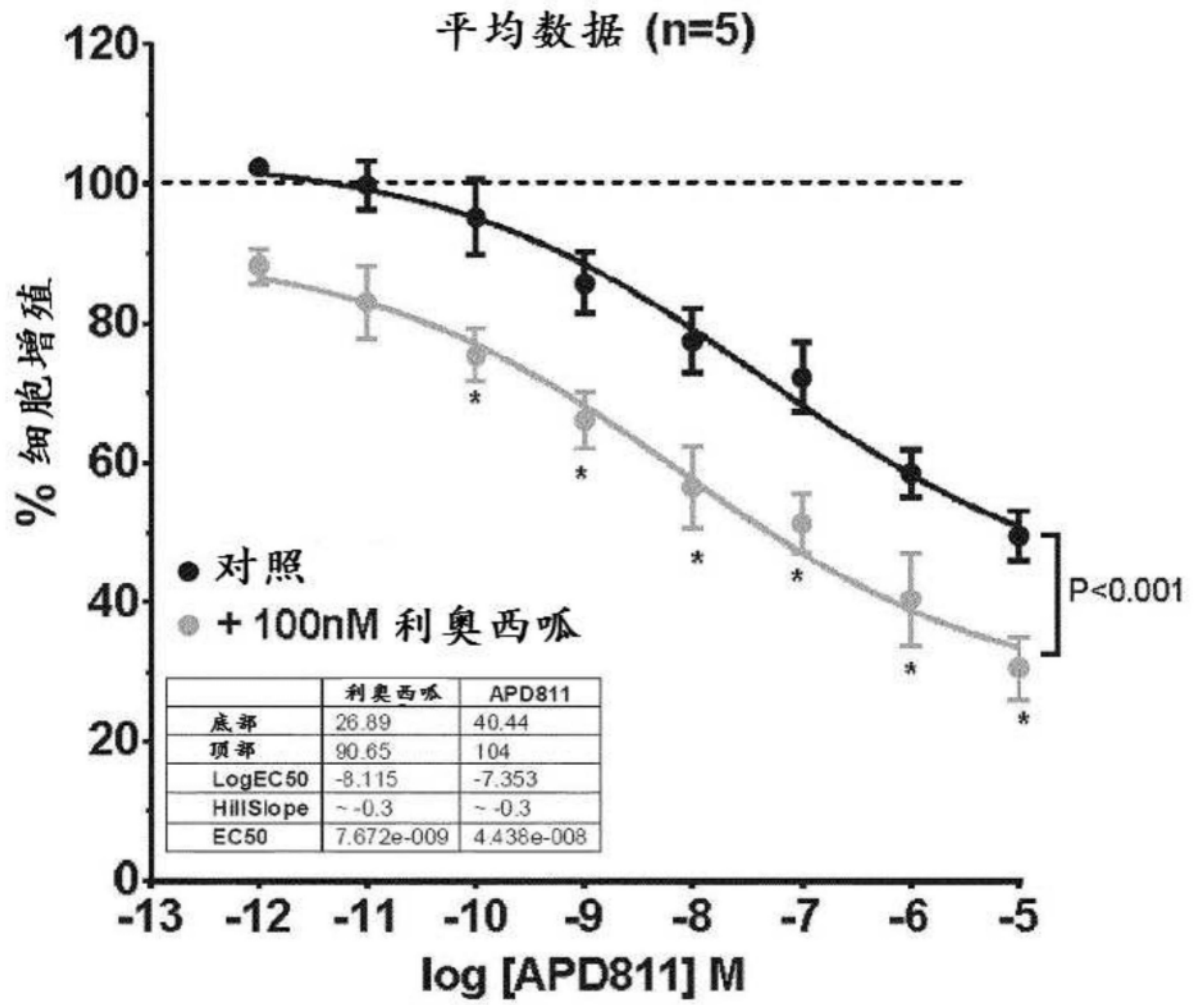


图11A

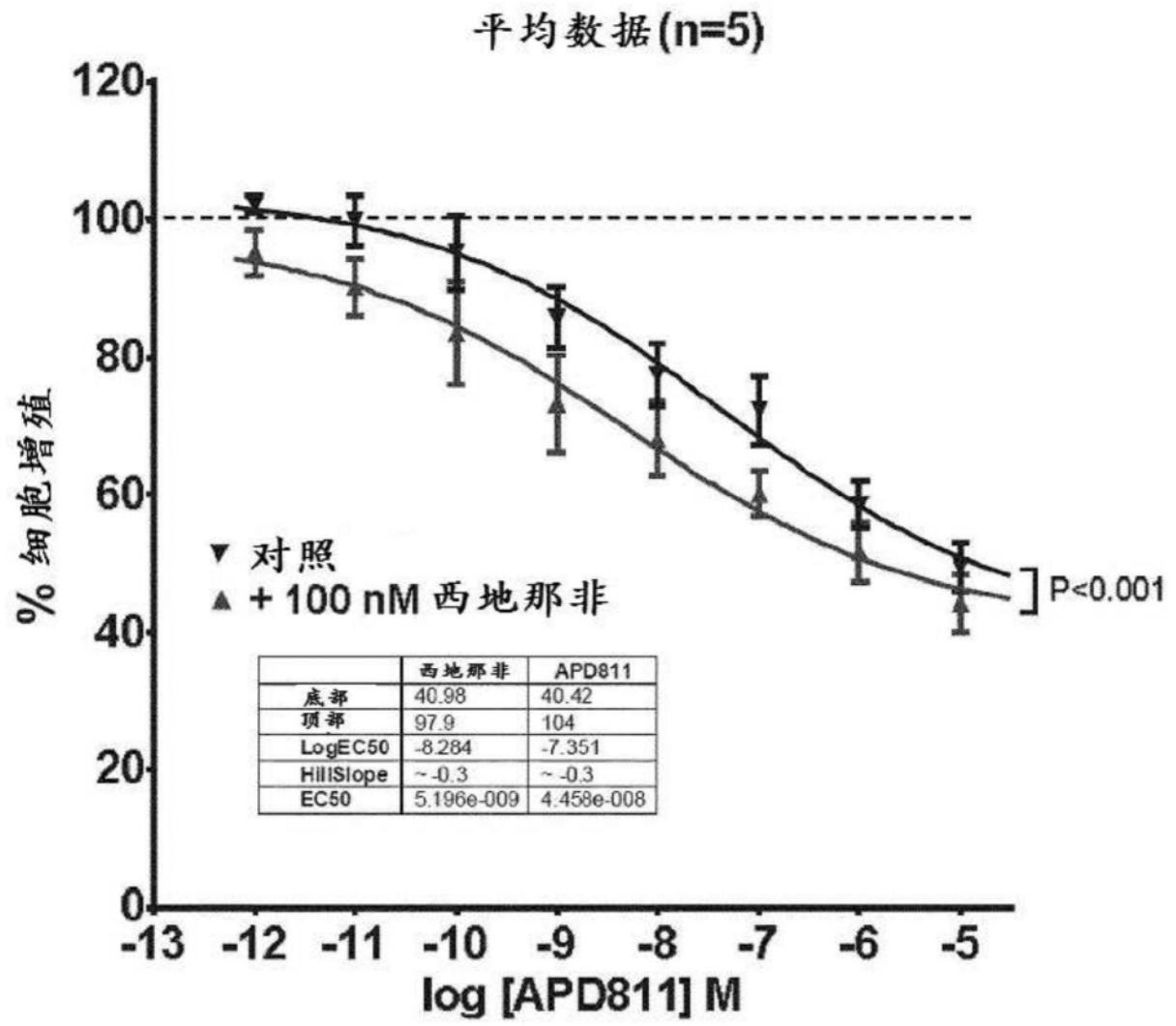


图11B

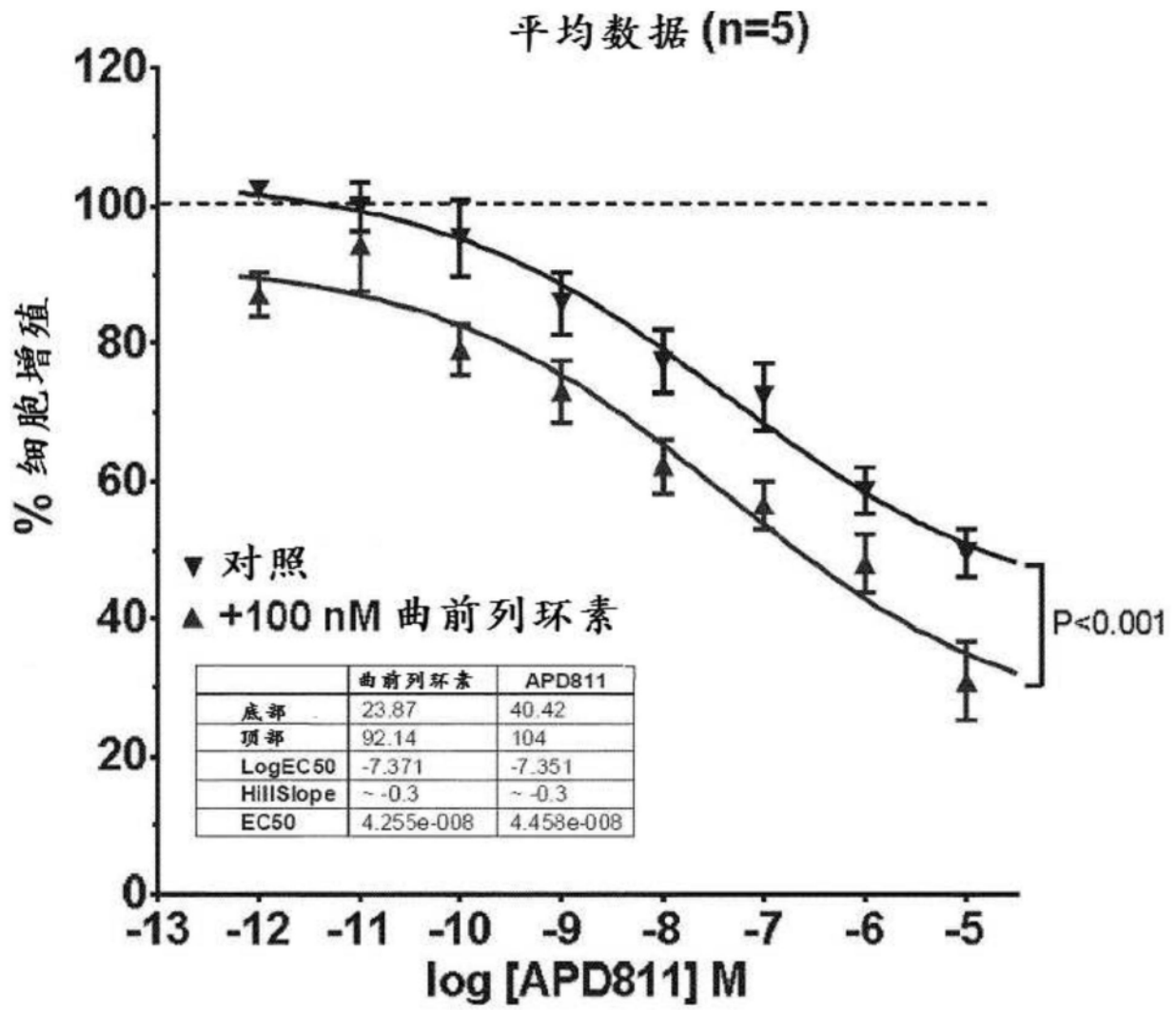


图11C

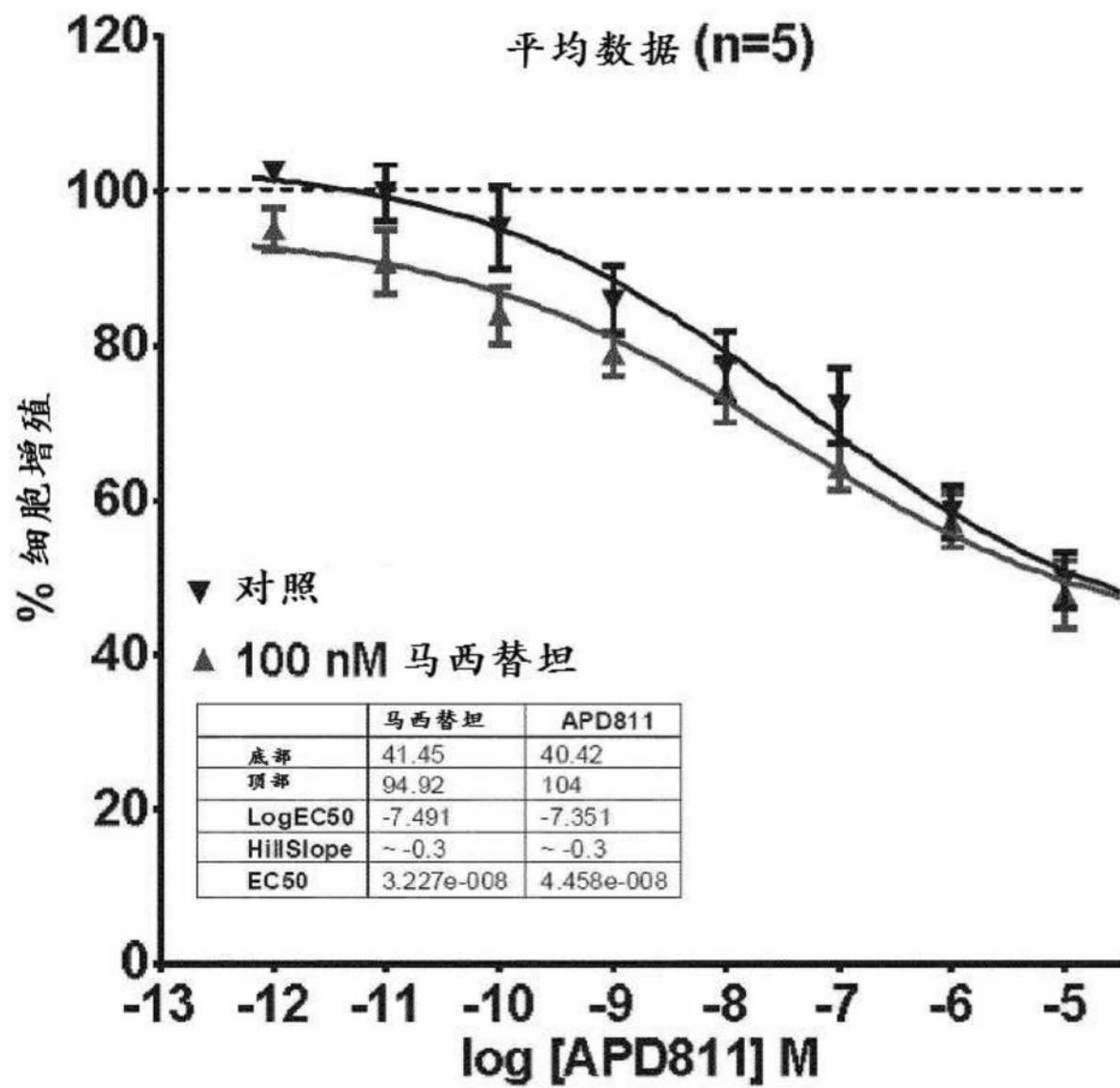


图11D

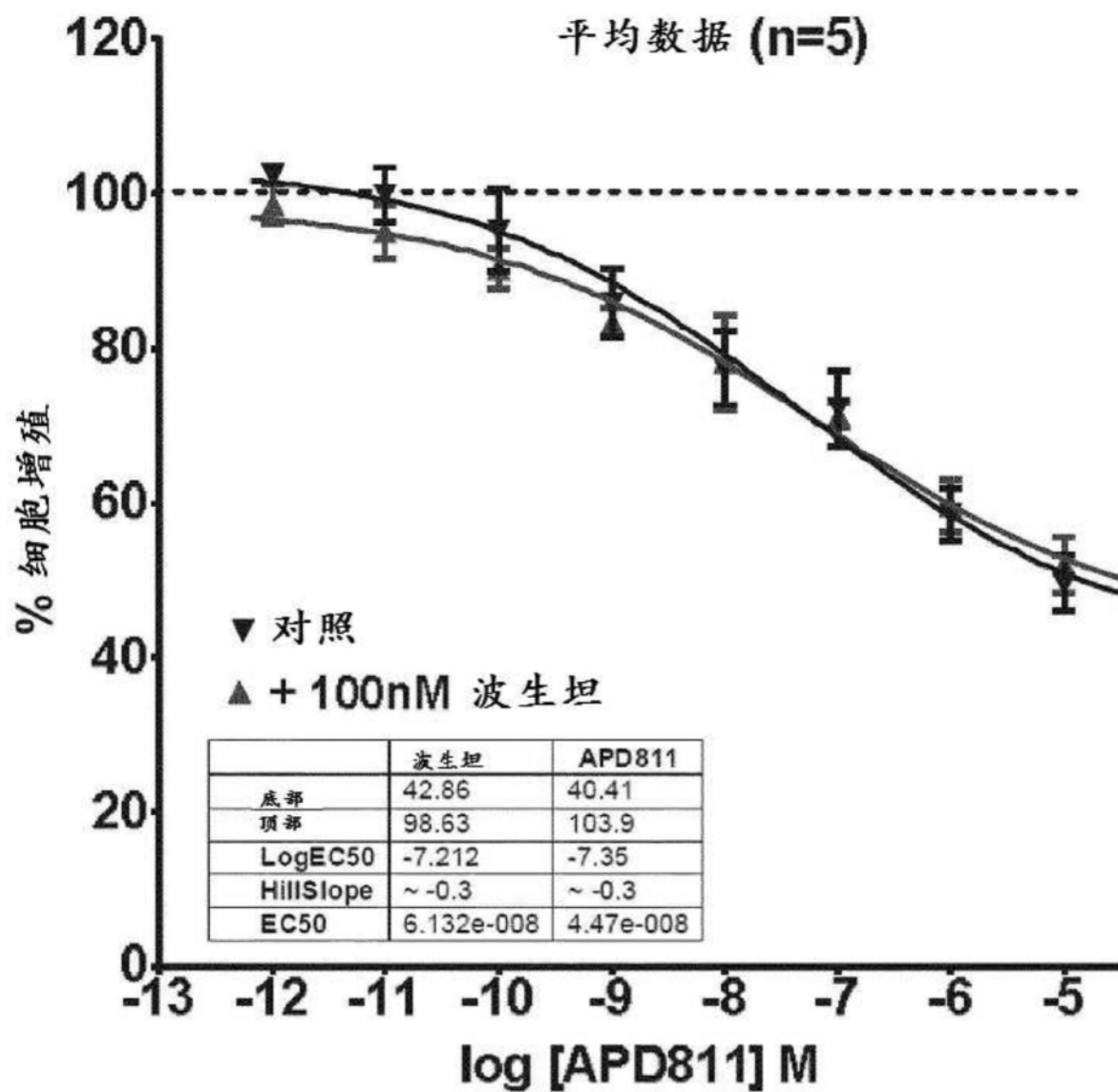


图11E



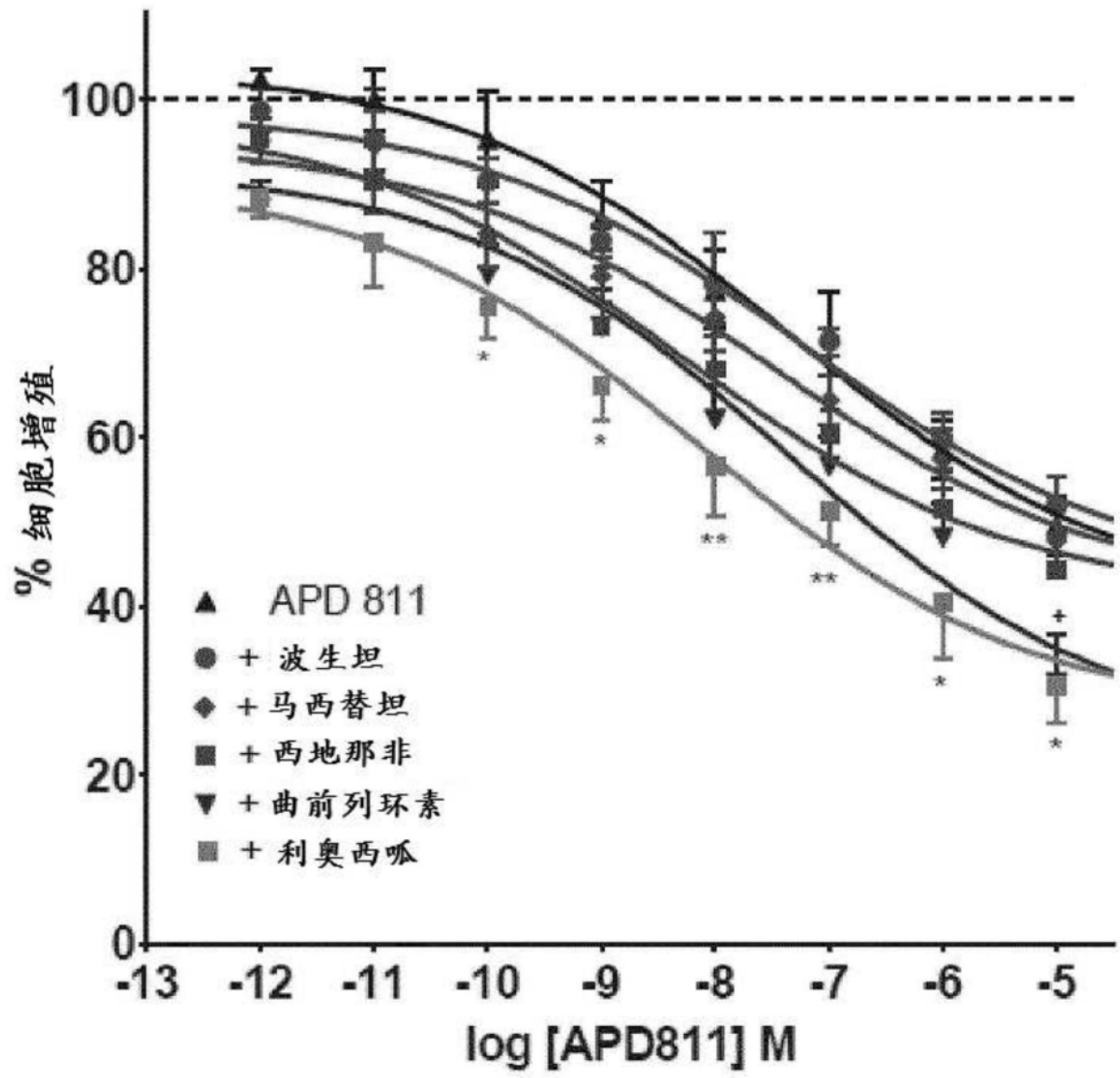


图12