

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7383285号
(P7383285)

(45)発行日 令和5年11月20日(2023.11.20)

(24)登録日 令和5年11月10日(2023.11.10)

(51)国際特許分類

A 6 1 K	31/137 (2006.01)	A 6 1 K	31/137
A 6 1 P	9/12 (2006.01)	A 6 1 P	9/12
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00 1 1 1

F I

請求項の数 14 (全40頁)

(21)出願番号 特願2019-526008(P2019-526008)
 (86)(22)出願日 平成29年11月15日(2017.11.15)
 (65)公表番号 特表2019-536778(P2019-536778)
 A)
 (43)公表日 令和1年12月19日(2019.12.19)
 (86)国際出願番号 PCT/US2017/061854
 (87)国際公開番号 WO2018/093936
 (87)国際公開日 平成30年5月24日(2018.5.24)
 審査請求日 令和2年11月16日(2020.11.16)
 (31)優先権主張番号 62/422,486
 (32)優先日 平成28年11月15日(2016.11.15)
 (33)優先権主張国・地域又は機関
 米国(US)

(73)特許権者 511183973
 ヴァンダービルト ユニバーシティー
 V A N D E R B I L T U N I V E R S
 I T Y
 アメリカ合衆国、テネシー 37240
 、ナッシュビル、ウエスト エンド アベ
 ニュー 2201、パークランド ホール
 305
 305 Kirkland Hall, 2
 201 West End Avenue
 , Nashville, Tennessee 37240, U.S.A.
 (74)代理人 100103034
 弁理士 野河 信久
 (74)代理人 100065248

最終頁に続く

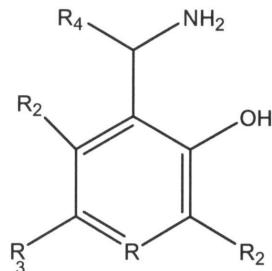
(54)【発明の名称】 肺高血圧症の治療及び予防における2-ヒドロキシベンジルアミンの使用

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

以下の式の化合物：

【化1】



(式中：

RはC-R₅であり；R₂は独立してH、置換もしくは非置換のアルキルであり；R₃は、H、置換または非置換のアルキルであり；R₄は、H、置換または非置換のアルキルであり；R₅は、H、置換または非置換のアルキルである)

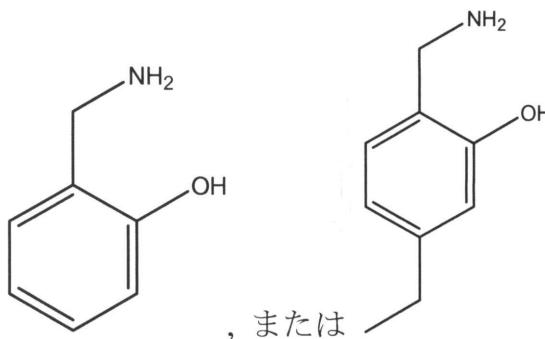
またはその薬学的に許容される塩を含む、BMPR2シグナル伝達の機能不全またはSIRT3

機能の喪失の少なくとも 1 つを有する患者の肺高血圧症の治療、予防、または改善するための医薬組成物。

【請求項 2】

前記化合物が下記式：

【化 2】



であるか、またはその薬学的に許容される塩である、請求項 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 3】

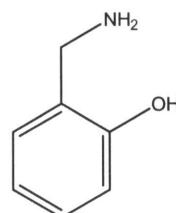
前記化合物が2-ヒドロキシベンジルアミン、メチル2-ヒドロキシベンジルアミン、もしくはエチル2-ヒドロキシベンジルアミンであるか、またはその薬学的に許容される塩である、請求項 1 に記載の医薬組成物。

20

【請求項 4】

前記化合物が下記式：

【化 3】

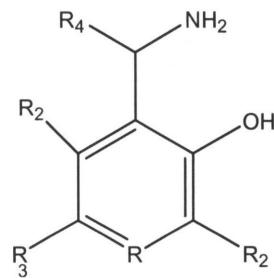


であるか、またはその薬学的に許容される塩である、請求項 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 5】

以下の式の化合物：

【化 4】



(式中：

RはC-R₅であり；

R₂は独立してH、置換もしくは非置換のアルキル、アルコキシ、アルキル-アルコキシであり；

R₃は、H、置換または非置換のアルキル、ハロゲン、アルコキシ、ヒドロキシル、ニト

40

50

口であり；

R_4 は、H、置換または非置換のアルキル、カルボキシリ、カルボン酸、アルキル-カルボン酸であり；

R_5 は、H、置換または非置換のアルキルである）

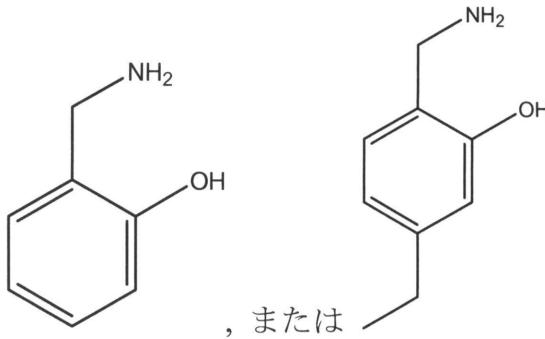
またはその薬学的に許容される塩を含む、WHOグループI肺高血圧症または異常なBMP R2

機能を有する患者の肺高血圧症の治療、予防、または改善するための医薬組成物。

【請求項 6】

前記化合物が下記式：

【化 5】



10

20

であるか、またはその薬学的に許容される塩である、請求項 5 に記載の医薬組成物。

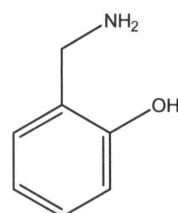
【請求項 7】

前記化合物が2-ヒドロキシベンジルアミン、メチル2-ヒドロキシベンジルアミン、もしくはエチル2-ヒドロキシベンジルアミンであるか、またはその薬学的に許容される塩である、請求項 5 に記載の医薬組成物。

【請求項 8】

前記化合物が下記式：

【化 6】



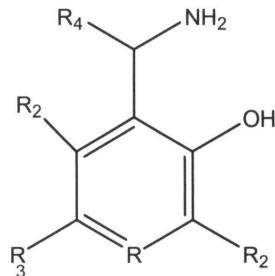
30

であるか、またはその薬学的に許容される塩である、請求項 5 に記載の医薬組成物。

【請求項 9】

以下の式の化合物：

【化 7】



40

50

(式中：

RはC-R₅であり；

R₂は独立してH、置換もしくは非置換のアルキルであり；

R₃は、H、置換または非置換のアルキルであり；

R₄は、H、置換または非置換のアルキルであり；

R₅は、H、置換または非置換のアルキルである)

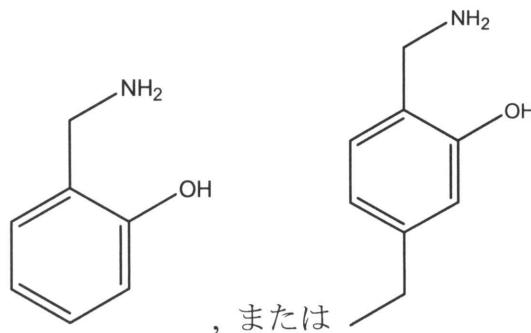
又はその薬学的に許容される塩を含む、BMPR2の機能不全またはSIRT3機能の喪失を有する患者のグルタミン代謝を減少させるための医薬組成物。

【請求項10】

前記化合物が下記式：

【化8】

10



20

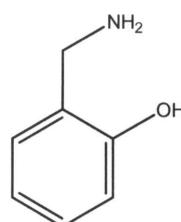
であるか、またはその薬学的に許容される塩である、請求項9に記載の医薬組成物。

【請求項11】

前記化合物が下記式：

【化9】

30



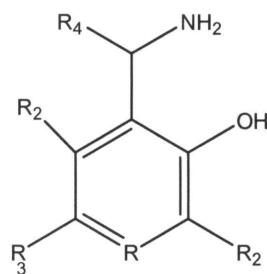
であるか、またはその薬学的に許容される塩である、請求項9に記載の医薬組成物。

【請求項12】

以下の式の化合物：

【化10】

40



(式中：

RはC-R₅であり；

R₂は独立してH、置換もしくは非置換のアルキルであり；

50

R₃は、H、置換または非置換のアルキルであり；

R₄は、H、置換または非置換のアルキルであり；

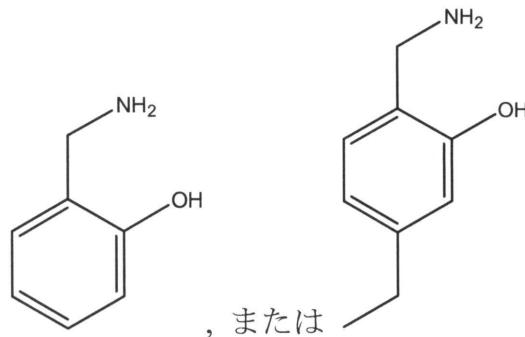
R₅は、H、置換または非置換のアルキルである）

又はその薬学的に許容される塩を含む、BMPR2の機能不全またはSIRT3機能の喪失を有する患者のSIRT3活性を増大させるための医薬組成物。

【請求項 1 3】

前記化合物が下記式：

【化 1 1】



10

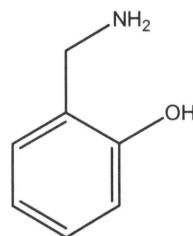
であるか、またはその薬学的に許容される塩である、請求項 1 2 に記載の医薬組成物。

20

【請求項 1 4】

前記化合物が下記式：

【化 1 2】



30

であるか、またはその薬学的に許容される塩である、請求項 1 2 に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

政府支援

本発明は、国立衛生研究所により授与された交付番号K08 HL121174、K23 HL098743、R01 HL095797、P01 HL108800、T32 HL007106-34、T32 HL-007891（契約を識別する）の政府支援によりなされた。政府は本発明において一定の権利を有する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

発明の背景及び概要

肺動脈高血圧症（PAH）は、アミノ酸を含む全ての主要な炭素基質に影響を及ぼす複数の代謝経路の正常な機能の変化によって引き起こされる全身性疾患としてますます認識されている。本発明者らは、ヒト肺高血圧症患者（WHOグループI、PAH）が、罹患肺血管系が対照のグルタミンよりも有意に多くのグルタミンを取り込むことのグルタミン代謝における全身的及び肺特異的変化を示すことを見出した。細胞培養モデル及びPAHを引き起こすBMPR2変異を発現する形質転換マウスを用いて、本発明者らは、PAH中の肺内皮が野生型内皮よりも有意に多いグルタミン炭素をトリカルボン酸（TCA）回路に分流（shunt）することを見出した。TCA回路によるグルタミン代謝の増加は、生存するため、正常な

40

50

エネルギーを維持するため、そして疾患に特徴的な過剰増殖表現型を発現するために、PAHの内皮によって必要とされる。グルタミンに対する厳密な要求は、脂質過酸化の反応生成物による共有結合的修飾によるサーチュイン-3 (SIRT3) 活性の喪失によって促進される。

【 0 0 0 3 】

反応性脂質過酸化生成物の捕捉剤 (scavengers) の2-ヒドロキシベンジルアミン (別名サリチルアミン、SAM、または2HOBAと呼ばれる) を含む本発明の化合物を使用すると、SIRT3機能が保護され、グルタミン代謝が正常化され、BMPR2変異マウスにおけるPAHの発生が防止される。PAHでは、グルタミン代謝を標的とすること、及びグルタミン主導の代謝の再プログラミングの根底にあるメカニズムは、PAH治療の開発のための実行可能な新しい道を示す。

10

【 0 0 0 4 】

様々な細胞型によって利用される通常の代謝戦略の変更は、肺動脈高血圧症における中心的な病原性メカニズムの一部としてますます認識されている^{1,2}。任意の所与の細胞型 - 内皮、平滑筋、心筋、骨格筋など - は、利用可能な炭素源の全て (主に炭水化物、脂肪、及びアミノ酸) の使用と最終結果の総合計である、健康で恒常性の条件下での "代謝プログラム" を表す。細胞の代謝プログラムの詳細は、しばしばその細胞型特有である。たとえば、通常の条件下では、心筋細胞はエネルギー源として脂肪酸を主に酸化するが、内皮細胞はグルコースを酸化的及び非酸化的経路で優先的に使用する^{3,4}。エネルギー生成の増加や高分子合成の増加、または死促進 (pro-death) 刺激への抵抗を細胞に要求するあらゆる接動 (perturbation) は、細胞の炭素資源に負担をかけ、必然的に細胞の代謝プログラムを変えるだろう。逆に、1つまたは複数の炭素基質を使用する細胞の能力を制限するあらゆるものは、分化状態、増殖速度、またはアポトーシスに対する感受性など、細胞の1つまたは複数の基本的特性をたびたび変更する代謝の再プログラミングを誘導し得る。従って、細胞の代謝プログラムは、細胞が健康と病気に果たす役割と密接に関連している。

20

【 0 0 0 5 】

PAHでは、疾患の病因に関する複数の細胞型が、酸化的グルコース代謝を可能にするための十分な酸素供給の存在にもかかわらず、グルコース由来炭素の非酸化的乳酸生成経路への増加した分流によって特徴付けられる代謝の再プログラミングを示すことがよく認識されている^{1,2,5-7}。これは口語で「ワールブルク効果」と呼ばれ、癌細胞の特徴として Otto Warburgによって最初に記述された。しかし、細胞内の代謝経路のネットワークは高度に相互接続されており、1つの経路が単独で変更されることはある。実際、脂肪酸代謝もまたPAHにおいて著しく変化すること、及びグルコースと脂肪酸酸化との間の相互関係 (いわゆる「ランドル回路」) はPAHにおいては異常であり、心臓及び肺双方の血管系の病因に寄与する可能性が高いことがあります認められている⁸⁻¹³。第3の主要な細胞内炭素源 - 一般的にアミノ酸、そして特にグルタミン - は、PAHでは比較的研究されている¹⁴。アミノ酸は大部分の細胞で使用されている第3の主要炭素源であるが、PAHにおいてはアミノ酸の細胞内輸送は主に一酸化窒素合成との関連で研究されている。癌生物学における最近の発見は、一般的にアミノ酸、そして特にグルタミンを合成、細胞のエネルギー過程、及び酸化還元恒常性の中心的役割に置いている¹⁵⁻¹⁸。本発明者らは、骨形態形成タンパク質受容体2型 (BMPR2) を通じての機能不全シグナル伝達の特定の関連で、PAHにおけるグルタミン代謝を調べた。それは、癌で観察されたのと同様の様式で、PAHの肺内皮が一次炭素源としてグルタミン代謝の異常な増加を示すであろうことを示した。

30

【 0 0 0 6 】

新たなデータは、WHOグループI肺高血圧症の大部分が、BMPシグナル伝達の機能不全、特にBMPR2シグナル伝達の機能不全によって引き起こされることを示唆している。本発明者らは、遺伝性PAHに関連するBMPR2の機能喪失遺伝子変異に焦点を合わせたが、BMPR2シグナル伝達の障害の分子的帰結は、WHOグループI疾患の既知の変異体全体において同様である。

40

【発明の概要】

50

【課題を解決するための手段】

【0007】

従って、本発明の実施形態は、WHOグループI肺血管疾患の症例の予防または治療における、サリチルアミンを含む本発明の化合物の使用を含む。

【0008】

米国では、全般的にWHOグループII肺高血圧症が最も一般的な肺高血圧症の形態である。このタイプのPHは、メタボリックシンドロームと酸化ストレスに関連している。最近になって、SIRT3の機能喪失は、WHOグループII PHの発生を推進する重要な分子メカニズムに関係があるとされている。サリチルアミンがサーチュイン アイソフォーム（特にSIRT3）の活性を維持することによって複数の状況で作用するという我々の発見を考慮すると、本発明者らは、サリチルアミンがWHOグループII肺高血圧症の治療または予防において有効性を示すであろうと推定する。

10

【0009】

WHOグループIII肺血管疾患は、慢性または間欠的な低酸素症を引き起こす肺の疾患と関連している。これは、活性酸素種の過剰産生、SIRT3機能の喪失を必要とする経路の活性化、代謝の再プログラミング、及び線維症を含む血管の構造的改編を促進することが知られている刺激である。これらの発病過程の全てが、本発明の化合物、特にサリチルアミンによって少なくとも部分的に改善されることが発見された。従って、本発明の実施形態は、WHOグループIII肺高血圧症の治療及び予防における本明細書に開示されている化合物の使用である。

20

【0010】

WHOグループIV：慢性血栓塞栓性肺高血圧症（CTEPH）は、まれではあるが壊滅的な静脈血栓塞栓症／肺塞栓症の合併症である。これは通常、進行中の新しい血塊の過剰産生とは対照的に、血塊の分解の機能不全を含む疾患である。その根底にある生物学はさらに理解されようとしているが、酸化ストレスと代謝の変化はCTEPHの病因に関係している。従って、本発明の実施形態は、WHOグループIVの疾患の治療及び予防における本明細書に開示されている化合物の使用である。

30

【0011】

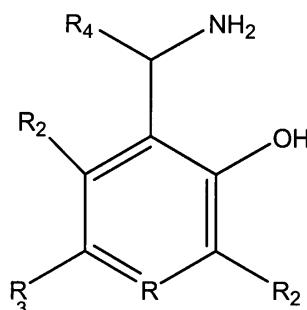
WHOグループV：これは明確で統一的な発病のメカニズムのない肺血管疾患の部類である。しかし、サルコイドーシス、慢性腎臓病、甲状腺疾患、全身性代謝障害、自己免疫性血管炎などのグループVを構成する関連疾患の多くは、全て共通の発病過程として酸化ストレス有している。従って、本発明の実施形態は、グループV肺高血圧症の治療及び予防における、サリチルアミンを含む本発明の化合物の使用である。

30

【0012】

それゆえに、肺高血圧症を治療、予防、または改善を必要とする患者に、本発明の化合物または医薬組成物を投与することを含む、肺高血圧症を治療、予防、または改善する方法が開示される。実施形態は、化合物が以下の式：

【化1】



40

（式中：

RはNまたはC-R₅であり；R₂は独立してH、置換もしくは非置換のアルキル、アルコキシ

50

、アルキル - アルコキシであり；R₃は、H、置換または非置換のアルキル、ハロゲン、アルコキシ、ヒドロキシル、ニトロであり；R₄は、H、置換または非置換のアルキル、カルボキシル、カルボン酸、アルキル - カルボン酸であり；R₅は、H、置換または非置換のアルキルである）

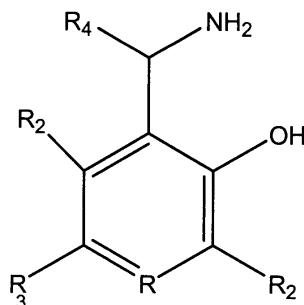
及びその薬学的に許容される塩である方法を含む。

【0013】

グルタミン代謝を減少させることを必要とする患者に、本発明の化合物または医薬組成物を投与することを含む、グルタミン代謝を減少させる方法もまた開示される。実施形態は、化合物が以下の式：

【化2】

10



20

（式中：

RはNまたはC-R₅であり；R₂は独立してH、置換もしくは非置換のアルキル、アルコキシ、アルキル - アルコキシであり；R₃は、H、置換または非置換のアルキル、ハロゲン、アルコキシ、ヒドロキシル、ニトロであり；R₄は、H、置換または非置換のアルキル、カルボキシル、カルボン酸、アルキル - カルボン酸であり；R₅は、H、置換または非置換のアルキルである）

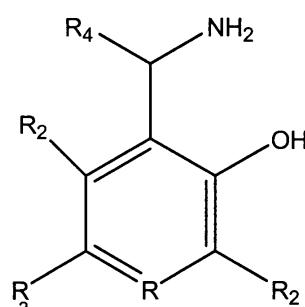
及びその薬学的に許容される塩である方法を含む。

【0014】

SIRT3活性を増大させることを必要とする患者に、本発明の化合物または医薬組成物を投与することを含む、SIRT3活性を増大させる方法もまた開示される。実施形態は、化合物が以下の式：

30

【化3】



40

（式中：

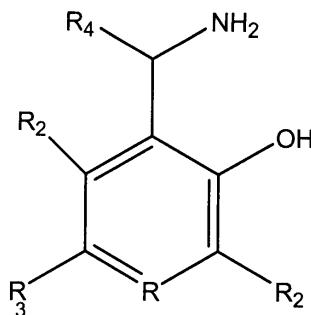
RはNまたはC-R₅であり；R₂は独立してH、置換もしくは非置換のアルキル、アルコキシ、アルキル - アルコキシであり；R₃は、H、置換または非置換のアルキル、ハロゲン、アルコキシ、ヒドロキシル、ニトロであり；R₄は、H、置換または非置換のアルキル、カルボキシル、カルボン酸、アルキル - カルボン酸であり；R₅は、H、置換または非置換のアルキルである）

及びその薬学的に許容される塩である方法を含む。

【0015】

50

上記の方法で使用するための化合物もまた開示されており、それらは以下の式の化合物：
【化4】



10

(式中：

RはNまたはC-R₅であり；R₂は独立してH、置換もしくは非置換のアルキル、アルコキシ、アルキル-アルコキシであり；R₃は、H、置換または非置換のアルキル、ハロゲン、アルコキシ、ヒドロキシル、ニトロであり；R₄は、H、置換または非置換のアルキル、カルボキシル、カルボン酸、アルキル-カルボン酸であり；R₅は、H、置換または非置換のアルキルである)

及びその薬学的に許容される塩である。

【0016】

20

本発明の追加の利点は、以下の説明の一部に記載されており、その説明から部分的に明らかであるか、または本発明の実施によって習得することができる。本発明の利点は、添付の特許請求の範囲において特に指摘された要素及び組み合わせによって実現され達成されるであろう。この説明は例示的なものであり、特許請求の範囲に記載の本発明を限定するものではないことを理解されたい。

【図面の簡単な説明】

【0017】

30

【図1】図1は、PAH及びBMPR2シグナル伝達障害を有するヒトが全身的及び肺血管のグルタミン代謝の再プログラミングを見せる음을示すグラフである。A) 診断されたPAHの有無にかかわらず、BMPR2変異を有するヒトは、WT BMPR2を有する家族と比較して循環グルタミンの統計的に有意な増加を有する。N = 11-24, *p = 0.02。B) 右心カテーテル法で測定された経肺のグルタミン取り込みは、正常な血行動態を有する個体及びWHOグループIII肺高血圧症を有する個体と比較して、WHOグループI PAHを有する患者において有意に増加する。N = 6-11, *p = 0.05。

【図2】図2は、BMPR2変異体PMVECsが、有意により多くのグルタミンをTCA回路に往復で輸送(shuttle)することを示す。A) BMPR2変異体PMVECsについての特異的細胞外グルタミン取り込みの輸送速度は、WT PMVECsについて測定されたものの2倍である。N = 4の独立した実験、両側t検定により*p = 0.005。B) TCA回路への炭素流を測定するための[U-¹³C₅]-L-グルタミン標識化の概念図。C) WTと比較して、BMPR2変異体PMVECsは、質量分析法で定量した¹³C%の原子標識率により、複数のTCA回路中間体(クエン酸塩、リンゴ酸塩、及び-ケトグルタル酸塩の直接の前駆体であるグルタミン酸塩)に組み込まれるグルタミン由来炭素の量を約2倍にする。N = 4、テューキー(Tukey)事後検定による二元配置分散分析により*p = 0.05。D) ¹³C₅-L-グルタミン標識化及び質量分析によるTCA回路中間体の定量化は、リンゴ酸塩のアイソトポマー(同位体異性体)によって例示されるWTと比較して、BMPR2変異体型PMVECにおけるグルタミン由来炭素の細胞内運命の著しい変化(shift)を示す。WT細胞では、M0アイソトポマーで表されるTCA回路炭素の大部分は標識されておらず、標識されていない炭素源(主にグルコース)の使用を示している。対照的に、BMPR2変異体PMVECs中のTCA炭素の60%は、M4アイソトポマーによって表される総リンゴ酸塩プールの40%が完全に標識されている状態で、少なくとも2つの標識炭素の組み込みを示す。WT及びBMPR2変異体につ

40

50

いてそれぞれN = 3である。

【図3】図3は、BMPR2変異体PMVECが、PAHに典型的な過剰増殖挙動を明らかにするためにはグルタミンの利用可能性の増大を必要とすることを示す。A)グルタミン制限条件下(0.2 mM)では、WT PMVECは安定した増殖を維持することができるが、BMPR2 R899X PMVECは培養24時間後に急速に死滅し始める。B)グルタミンがより豊富な条件下(0.5 mM)では、WT PMVECは本質的に影響を受けないが、BMPR2 R899X PMVECはPAHに特徴的な過剰増殖表現型を示す。各時点についてN=6、*p < 0.01、両側t検定により**p < 0.001。

【図4】図4は、PAHの原因となるBMPR2の変異が、ミトコンドリアの機能不全及び代謝の再プログラミングをグルタミンの選択に向かって推進することを示している。A)光学的酸化還元比を計算するために、二光子自己蛍光を用いて生細胞における細胞内NADH及びFAD+プールを定量化することで、炭素源としてグルコース及びグルタミンの利用可能性の制限にもかかわらず、WT培養ヒトPMVECsが細胞内酸化還元状態を維持することによって代謝柔軟性を保持することが示された。対照的に、グルコース及びグルタミンが制限されている場合、変異体BMPR2を発現するPMVECsは酸化還元比の実質的な減少を示す。標準培地ではN = 3、グルコースフリー／グルタミンフリーの培地ではN = 6、テューキー事後検定による二元配置分散分析により*p < 0.05。B-D) WTと比較して、変異体BmpR2を発現する培養マウスPMVECsは、増強されたグルタミン維持ATP産生関連ミトコンドリア呼吸(パネルB、他の全ての群に対しての分散分析により**p < 0.0001)、漏出呼吸の減少(パネルC、他の全ての群に対しての分散分析により**p < 0.0001)、及び結合効率の増加(パネルD、他の全ての群に対しての分散分析により**p < 0.0001)を示す。実験毎に各条件についてN = 8-10測定、実験は同一に2回行った。

【図5】図5は、BMPR2変異体PMVECにおける正常酸素圧HIF(低酸素誘導因子)1活性化が代謝の再プログラミングに寄与することを示す。A-B) HIF1は、PMVECで発現された2つの異なるタイプのBMPR2変異において正常酸素圧条件下で増加し(A)、濃度測定(densitometry)によって定量され(B)、ヒト及びマウスPMVECについてそれぞれN = 3の独立した実験、両側t検定により*p < 0.05でデータを総計で分析。C) HIF1の薬理学的阻害剤である低用量ケトミンによるBMPR2変異体PMVECの処理は、WT PMVECに本質的に影響を与えることなく、グルタミン対グルコース流量比を有意に減少させた。各条件についてN = 3、*p < 0.05。

【図6】図6は、SIRT3がBMPR2 R899Xマウスにおいて不活性化されていることを示す。A) BMPR2 R899Xマウスから単離されたミトコンドリアは、WTと比較して同等のSIRT3含有量を有するが、複数のミトコンドリアタンパク質の過アセチル化を示し(レーン1～2及び5～6)、これはSIRT3機能の喪失を示す。イソケタール(isoketals)の補足剤である2-ヒドロキシベンジルアミン(2HOBA)によるBMPR2 R899Xマウスの処理は、ミトコンドリアタンパク質のアセチル化状態を正常化した(レーン3～4及び7～8)。ウエスタン画像は、指示されたタンパク質に対する抗体でストリッピング及び再プローブした後の同じプロットの別々の連続露光である。B)ミトコンドリア膜に対する酸化的損傷が、イソケタールによる付加(adduction)を介してSIRT3をどのように不活性化するのかと考えられることを示す概略図。C)発光分析(luminescence assay)(Sirt-Glo(登録商標)、Promega社)によって測定された精製組換えヒトSIRT3活性は、イソケタールによって用量依存的に阻害される。D)3連で行われた実験からの4～9匹の動物の濃度測定定量。テューキー事後検定による分散分析により他の全ての群に対して**p < 0.01。

【図7】図7は、BMPR2 R899Xマウスにおいて、2HOBAが循環グルタミンを低下させ、PAHの発症を予防することを示す。A)肝臓ミトコンドリア画分中のグルタミンシンテターゼは、WT(レーン1～2)と比較してBMPR2 R899Xマウス(レーン5～6)において上昇している。2HOBA処理は、BMPR2 R899Xマウスにおけるグルタミンシンテターゼを減少させたが(レーン7～8)、WTでは実質的に減少させなかった(レーン3～4)。ウエスタン画像は、指示されたタンパク質に対する抗体でストリッピング及び再プローブ

10

20

30

40

50

した後の同じプロットの別々の連続露光である。B) 2HOBAによる処理は、2HOBA処理WTマウスと比較して、BMPR2^{R899X}マウスにおける血漿グルタミン利用能を有意に減少させる。N = 6 - 29、*p = 0.05。C) 2HOBA処理は、BMPR2^{R899X}マウスにおける総肺抵抗を、WTと統計的に区別がつかないレベルまで低下させた。N = 5 - 14、テューキー事後検定による分散分析により** p = 0.02。

【図8】図8は、BMPR2媒介代謝再プログラミングの概略図を示す。正常な肺内皮は、その生物エネルギー燃料として主にグルコースに依存している。正常なBMPR2シグナル伝達が失われると、ミトコンドリアの酸化剤損傷は、イソケタールによる付加を介してSIRT3の不活性化を促進する。これは、2-ヒドロキシベンジルアミンで中断することができる。未確認の、しかし継続的な酸化剤損傷とSIRT3不活性化はHIFの安定化につながり、その全てがPAHの発症の根底にある過剰増殖性の、グルタミン過剰の肺内皮表現型を推進する。

【図9】図9は、Seahorse細胞外フラックスアナライザーにおけるミトコンドリア呼吸の測定及び呼吸パラメータの計算の概略図を示す。青い曲線は、培養PMVECにおいて測定された、経時的な酸素消費速度(OCR、pmol / 分)の代表的なデータである。基礎呼吸(1)、オリゴマイシン感受性呼吸(2)、最大呼吸(3)、及び非ミトコンドリア呼吸(4)を表す曲線の特定部分は、示された化合物(オリゴマイシンA、FCCP、アンチマイシンA / ロテノン)の添加により達成される。示されているように、ATP産生関連呼吸、漏出呼吸、及び結合効率は、呼吸グラフ(profile)の様々な部分を利用してそれぞれ計算される。

【図10】図10は、骨格筋におけるグルタミンシンテーゼがBMPR2^{R899X}マウスにおいて上方制御されていることを示す。腓腹筋を固定し、グルタミンシンテーゼに対する抗体(赤)で染色し、DAPI核染色(青)で対比染色した。BMPR2^{R899X}変異の発現は、WT筋肉と比較して、インビボでのグルタミン合成の主要部位の1つである骨格筋におけるグルタミンシンテーゼを上方制御する。目盛尺 = 25ミクロン。

【図11】図11は、BMPR2^{R899X}マウスにおいて、2HOBAが心拍出量及び右心室収縮期圧(RVSP)の両方を改善することを示す。BMPR2^{R899X}変異の発現は、WTと比較して心拍出量を有意に減少させ(A)、RVSPを緩やかに上昇させる(B)。どちらも2HOBA処理WTマウスで測定された値に達していないが、心拍出量の傾向は改善され、RVSPはビヒクル処理された変異体と比較して2HOBAで処理されたBMPR2^{R899X}において減少する傾向がある。

【図12】図12は、グルタミン由来炭素が、BMPR2変異体PMVECのアラニンプールに不均衡に組み込まれていることを示す。細胞内乳酸塩プールは、質量分析法で定量した標識されたグルタミンからの少量の¹³Cの取り込みを示し、WTとBMPR2変異体PMVECsの間での違いはない。対照的に、WTと比較してBMPR2変異体PMVECsではアラニンプール中の標識グルタミンからの実質的な¹³Cの標識率があり、BMPR2変異細胞におけるグルタミン由来炭素の増加は、ピルビン酸塩及びTCA回路から上流の代謝経路に寄与しないことを示しているが、おそらくピルビン酸回路には貢献しているであろう。N = 3、*p = 0.05。

【発明を実施するための形態】

【0018】

発明の説明

本発明の化合物、組成物、物品、システム、装置、及び/または方法が開示及び記載される前に、それらは他に特定されない限り特定の合成方法または他に特定されない限り特定の試薬に限定されないが、もちろん、変わるものもしくは理解されるべきである。本明細書で使用される用語は特定の態様を説明することのみを目的としており、限定することを意図していないことも理解されるべきである。本明細書に記載のものと類似または同等の任意の方法及び材料を本発明の実施または試験に使用することができるが、例示的な方法及び材料をここに記載する。

【0019】

10

20

30

40

50

具体的には以下の「参考文献」と題されたセクションを含む、本明細書で言及される全ての刊行物は、それらの刊行物が引用されることに関連してその方法及び／または材料を開示及び記載するために参照により本明細書に組み込まれる。本明細書で論じられている刊行物は、本出願の出願日より前のそれらの開示のためだけに提供されている。本明細書中のいかなるものも、本発明が先行発明のためにそのような刊行物に先行する権利がないことの承認として解釈されるべきではない。さらに、本明細書に提供される公開日は、実際の公開日とは異なる可能性があり、それらは独自に確認される必要がある。

【 0 0 2 0 】

明細書及び添付の特許請求の範囲で使用されるように、単数形「a」、「an」及び「the」は、文脈が明らかにそうでないことを指示しない限り複数の指示対象を含む。従って、例えば、「(一つの)官能基」、「(一つの)アルキル」、または「(一つの)残基」への言及は、そのような官能基、アルキル、または残基などの2つ以上の混合物を含む。

【 0 0 2 1 】

本明細書では、範囲は、「約」ある特定の値から、及び／または「約」別の特定の値までとして表現することができる。そのような範囲が表現される時、さらなる態様は、ある特定の値から及び／または他の特定の値までを含む。同様に、先行詞「約」を用いて値が近似値として表される場合、特定の値がさらなる態様を形成することが理解されよう。さらに、各範囲の終点は、もう一方の終点と関係しているか、もう一方の終点とは無関係であってもどちらにおいても重要であることが理解されよう。本明細書には開示された多数の値があり、そして各値がまた、その値自体に加えて「約」その特定の値として本明細書に開示されることもまた理解される。例えば、値「10」が開示されている場合、「約10」も開示されている。2つの特定の単位(unit)間の各単位もまた開示されていることも理解される。例えば、10と15が開示されている場合、11、12、13、及び14もまた開示されている。

【 0 0 2 2 】

本明細書で使用される時、用語「任意の」または「任意に」は、後に記載される事象または状況が起こり得る、または起こり得ないこと、及びその記載がその事象または状況が起こる場合、及び起こらない場合を含むことを意味する。

【 0 0 2 3 】

本明細書中で使用される場合、用語「対象(subject)」は投与の標的をいう。本明細書に開示される方法の対象は、哺乳動物、魚類、鳥類、爬虫類、または両生類などの脊椎動物であり得る。従って、本明細書に開示される方法の対象は、ヒト、非ヒト霊長類、ウマ、ブタ、ウサギ、イヌ、ヒツジ、ヤギ、ウシ、ネコ、モルモットまたはげっ歯類であり得る。この用語は特定の年齢や性別を表すものではない。従って、成人でも新生児でも、胎児でも、男性でも女性でも、対象として扱われることを意図している。患者は、疾患または障害に罹患している対象を指す。用語「患者」は、ヒト及び獣医学の対象を含む。

【 0 0 2 4 】

本明細書で使用される時、用語「治療」は、疾患、病理学的状態、または障害を治癒、改善、安定化、または予防することを意図した患者の医学的管理を指す。この用語には、積極的な治療、すなわち、特に疾患、病理学的状態、または障害の改善に向けられた治療が含まれ、原因治療、すなわち関連する疾患、病理学的状態、または障害の原因の除去に向けられた治療も含まれる。さらに、この用語は、緩和治療、すなわち、疾患、病理学的状態、または障害の治癒よりもむしろ症状の軽減のために設計された治療；予防的治療、すなわち、関連する疾患、病理学的状態、または障害の発症を最小限に抑えるか、または部分的もしくは完全に阻害することを目的とした治療；支持療法、すなわち、関連する疾患、病理学的状態、または障害の改善に向けられた、別の特定の療法を補うために採用される療法を含む。

【 0 0 2 5 】

本明細書で使用される時、用語「防止する」または「防止すること」は、特に事前の行動によって、何かが起こるのを排除する、回避する、取り除く、未然に防ぐ、停止する、

10

20

30

40

50

または阻むことを指す。本明細書で減少、抑制または予防が使用される場合、他に具体的に示されない限り、他の 2 つの単語の使用もまた明示的に開示されることが理解される。本明細書に見られるように、治療及び予防の定義には重複がある。

【 0 0 2 6 】

本明細書で使用される時、用語「診断された」は、当業者、例えば、医師による身体検査を受け、本明細書で開示された化合物、組成物、または方法によって診断または治療され得る状態を有することがわかったことを意味する。本明細書で使用されるように、「障害の治療を必要としていると同定される」などの語句は、障害の治療の必要性に基づいて対象を選択することを指す。例えば、ある対象は、当業者による早期の診断に基づいて障害（例えば、炎症に関連する障害）の治療の必要性を有すると同定され得、その後、その障害の治療を受ける。一態様では、その同定は、診断を行っている人とは異なる人によって行われ得ることが企図されている。さらなる態様において、投与は、その後投与を行った人によって行うことができることも企図される。

10

【 0 0 2 7 】

本明細書で使用される時、用語「投与すること」及び「投与」は、医薬製剤を対象に提供するあらゆる方法を指す。そのような方法は当業者に周知であり、経口投与、経皮投与、吸入による投与、経鼻投与、局所投与、膣内投与、眼内投与、耳内投与、脳内投与、直腸投与、及び静脈内投与、動脈内投与、筋肉内投与、及び皮下投与などの注射を含む非経口投与が挙げられるが、これらに限定されない。投与は連続的または断続的であり得る。様々な態様において、製剤は治療的に投与することができる；つまり、既存の病気や状態を治療するために投与される。さらに様々な態様では、製剤は予防的に投与することができる；つまり、病気や状態の予防のために投与される。

20

【 0 0 2 8 】

本明細書中で使用される場合、用語「有効量」とは、所望の結果を達成するため、または望ましくない状態に効果を与えるために十分である量をいう。例えば、「治療的有効量」とは、所望の治療結果を達成するために、または望ましくない症状に効果を与えるために十分であるが、一般に有害な副作用を引き起こすためには不十分である量を指す。任意の特定の患者に対する具体的な治療上有効な用量レベルは、治療されている障害及び障害の重症度；使用される特定の組成物；患者の年齢、体重、一般的な健康状態、性別及び食事；投与の時間；投与経路；使用される特定の化合物の排泄速度；治療期間；使用される特定の化合物と組み合わせてまたは同時に使用される薬剤を含む様々な要因、及び医学分野で周知の因子などによるであろう。例えば、所望の治療効果を達成するために必要とされるレベルより低いレベルで化合物の用量を開始し、そして所望の効果が達成されるまで用量を徐々に増加させることは、十分に当技術分野の範囲内である。所望されれば、有効 1 日量を投与目的のために複数回投与に分割することができる。結果として、単回投与組成物は、そのような量または 1 日量を構成するためにその約数を含有することができる。禁忌の場合には、投与量は個々の医師によって調整することができる。投薬量は変動し得、そして 1 日または数日間、毎日 1 回以上の用量投与で投与され得る。所与の種類 (class) の医薬品に対する適切な投与量についての手引きは文献に見出すことができる。さらに様々な態様において、製剤は「予防有効量」、すなわち、疾患または状態の予防に有効な量で投与することができる。

30

【 0 0 2 9 】

本明細書中で使用される場合、用語「薬学的に許容される担体 (carrier)」とは、滅菌水溶液または非水溶液、分散液、懸濁液またはエマルジョン、ならびに使用直前に滅菌注射用溶液または分散液で戻すための滅菌粉末をいう。適切な水性及び非水性担体、希釈剤、溶剤またはビヒクリの例には、水、エタノール、ポリオール（グリセロール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールなど）、カルボキシメチルセルロース及びそれらの適切な混合物、植物油（オリーブ油など）及びオレイン酸エチルなどの注射可能な有機エステルが含まれる。適切な流動性は、例えばレシチンなどのコーティング材料の使用によって、分散液の場合には必要な粒径の維持によって、及び界面活性剤の使用によって維

40

50

持することができる。これらの組成物は、保存料、湿潤剤、乳化剤及び分散剤などの補助剤も含み得る。微生物の作用の防止は、パラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸などの様々な抗菌剤及び抗真菌剤を含めることによって確実にすることができる。糖類、塩化ナトリウムなどの等張剤を含めることも望ましい場合がある。モノステアリン酸アルミニウム及びゼラチンなどの吸収を遅らせる薬剤を含めることによって、注入用医薬形態の長期吸収をもたらすことができる。注入用デポ(depot)形態は、ポリラクチド-ポリグリコリド、ポリ(オルトエステル)及びポリ(無水物)などの生物分解性ポリマー中に薬物のマイクロカプセルマトリックスを形成することによって製造される。ポリマーに対する薬剤の比率及び使用される特定のポリマーの性質に応じて、薬物放出速度を制御することができる。デポ注入製剤はまた、身体組織と適合性のあるリポソームまたはマイクロエマルジョン中に薬剤を封入することによっても調製される。注射用製剤は、例えば、細菌保持フィルターを通す濾過によって、または使用直前に滅菌水または他の滅菌注射用媒体に溶解または分散することができる滅菌固体組成物の形態の滅菌剤を組み込むことによって滅菌することができる。適切な不活性担体は、ラクトースなどの糖を含み得る。望ましくは、活性成分の粒子の少なくとも95重量%が0.01から10マイクロメートルの範囲の有効粒径を有する。

【0030】

本明細書で使用される時、用語「捕捉剤(scavenger)」または「捕捉する」は、不純物または望ましくない反応生成物を除去または不活性化するために投与することができる化学物質を指す。例えば、イソケタールは、タンパク質上のリジン残基に不可逆的に特異的に付加する。本発明のイソケタール捕捉剤は、それらがリジン残基に付加する前にイソケタールと反応する。従って、本発明の化合物は、イソケタールを「捕捉」し、それによってそれらがタンパク質に付加するのを防止する。

【0031】

本明細書で使用される時、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と企図される。広い局面において、許容される置換基には、有機化合物の非環式及び環式、分岐及び非分岐、炭素環式及び複素環式、ならびに芳香族及び非芳香族置換基が含まれる。例示的な置換基としては、例えば、以下に記載のものが挙げられる。許容される置換基は、適切な有機化合物に対して1つ以上であり、同じでも異なっていてもよい。本開示の目的のために、窒素などのヘテロ原子は、ヘテロ原子の原子価を満たす本明細書に記載の有機化合物の水素置換基及び/または許容される任意の置換基を有することができる。本開示は、いかなる方法であっても、有機化合物の許容される置換基によって決して限定されることを意図しない。また、「置換」または「で置換された」という用語は、そのような置換が置換原子及び置換基の許容原子価と一致すること、及び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然に起こすことのない化合物をもたらすことの暗黙の条件を含む。

【0032】

本明細書で使用される「アルキル」という用語は、メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピル、n-ブチル、イソブチル、s-ブチル、t-ブチル、n-ペンチル、イソペンチル、s-ペンチル、ネオペンチル、ヘキシル、ヘプチル、オクチル、ノニル、デシル、ドデシル、テトラデシル、ヘキサデシル、エイコシル、テトラコシルなどの1~24個の炭素原子の分岐または非分岐飽和炭化水素基である。アルキル基は環式または非環式であり得る。アルキル基は分枝鎖でも非分枝鎖でもよい。アルキル基はまた、置換または非置換であり得る。例えば、アルキル基は、本明細書に記載されているように、任意の置換されたアルキル、シクロアルキル、アルコキシ、アミノ、エーテル、ハライド、ヒドロキシ、ニトロ、シリル、スルホ-オキソ、またはチオールを含む1以上の基で置換することができるが、これらに限定されない。「低級アルキル」基は、1~6個(例えば、1~4個)の炭素原子を含有するアルキル基である。

【0033】

本明細書を通して、「アルキル」は一般に、非置換アルキル基及び置換アルキル基の両

方を指すために使用される；しかしながら、置換アルキル基はまた、アルキル基上の特有の置換基を特定することにより本明細書において特に言及される。例えば、用語「ハロゲン化アルキル」は、具体的には、1つ以上のハライド、例えば、フッ素、塩素、臭素、またはヨウ素で置換されているアルキル基を指す。用語「アルコキシアルキル」は、具体的には、以下に記載されるように、1つ以上のアルコキシ基で置換されているアルキル基を指す。用語「アルキルアミノ」は、具体的には、以下に記載されるように、1つ以上のアミノ基で置換されているアルキル基などを指す。「アルキル」が、ある場合に使用され、「アルキルアルコール」などの特定の用語が別に使用される場合、「アルキル」という用語が「アルキルアルコール」などの特定の用語も指さないことを暗示することを意味するのではない。

10

【0034】

この慣行(practice)は、本明細書に記載の他の基にも用いられる。すなわち、「シクロアルキル」などの用語は、非置換及び置換シクロアルキル部分の両方を指すが、置換部分は、さらに、本明細書において具体的に識別され得る；例えば、特定の置換シクロアルキルは、例えば、「アルキルシクロアルキル」と呼ぶことができる。同様に、置換アルコキシは、例えば、「ハロゲン化アルコキシ」と特に呼ぶことができ、特定の置換アルケニルは、例えば、「アルケニルアルコール」などとすることができます。重ねて、「シクロアルキル」などの一般用語及び「アルキルシクロアルキル」などの特定の用語の使用の慣行は、その一般用語がその特定の用語も含まないことを暗示することを意味するものではない。

20

【0035】

本明細書で使用される「シクロアルキル」という用語は、少なくとも3個の炭素原子からなる非芳香族炭素系環である。シクロアルキル基の例としては、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、ノルボルニルなどが挙げられるが、これらに限定されない。「ヘテロシクロアルキル」という用語は、上で定義されたようなシクロアルキル基の一種であり、「シクロアルキル」という用語の意味に含まれ、ここで環の炭素原子の少なくとも1個は、窒素、酸素、硫黄、またはリンで置換されているが、これらに限定されない。シクロアルキル基及びヘテロシクロアルキル基は、置換または非置換であり得る。シクロアルキル基及びヘテロシクロアルキル基は、本明細書に記載の任意に置換されたアルキル、シクロアルキル、アルコキシ、アミノ、エーテル、ハライド、ヒドロキシ、ニトロ、シリル、スルホ-オキソ、またはチオールを含む1以上の基で置換され得るが、これらに限定されない。

30

【0036】

本明細書で使用される「ポリアルキレン基」という用語は、互いに結合した2個以上の CH_2 基を有する基である。ポリアルキレン基は、式 $-\text{(CH}_2\text{)}_a-$ で表すことができ、ここで「a」は2~500の整数である。

【0037】

本明細書で使用される「アルコキシ」及び「アルコキシリ」という用語は、エーテル結合を介して結合しているアルキルまたはシクロアルキル基を指す；すなわち、「アルコキシ」基は、 $-\text{OA}^1$ として定義することができ、ここで A^1 は、上で定義された通りのアルキルまたはシクロアルキルである。「アルコキシ」には、今説明したようなアルコキシ基のポリマーも含まれる；すなわち、アルコキシは、 $-\text{OA}^1-\text{OA}^2$ または $-\text{OA}^1-\text{(OA}^2\text{)}_a-\text{OA}^3$ のようなポリエーテルであり得る。式において、「a」は1~200の整数であり、そして A^1 、 A^2 、及び A^3 はアルキル及び/またはシクロアルキル基である。

40

【0038】

本明細書で使用される「アミン」または「アミノ」という用語は、式 $\text{NA}^1\text{A}^2\text{A}^3$ で表され、式において、 A^1 、 A^2 、及び A^3 は、独立して、本明細書に記載の水素または任意に置換されたアルキル、シクロアルキル、アルケニル、シクロアルケニル、アルキニル、シクロアルキニル、アリール、またはヘテロアリール基であり得る。

【0039】

50

本明細書で使用される「ヒドロキシル」という用語は、式-OHで表される。

【0040】

本明細書で使用される「ニトロ」という用語は、式-NO₂で表される。

【0041】

「薬学的に許容される」という用語は、生物学的またはその他の点で望ましくないものではない物質、すなわち許容できないレベルの望ましくない生物学的効果を引き起こすことがない、または有害な方法で相互作用することがない物質を表す。

【0042】

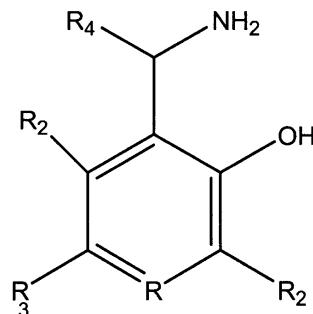
本発明の化合物は、これらの有害な媒介物質 (mediators) を「捕捉」し、酸化的タンパク質修飾を防止するために、アップストリーム療法の代替アプローチとして、-KAs に迅速に結合する。本発明の化合物の1つであるサリチルアミンは、前臨床動物試験において優れた安全性プロフィールを有する天然物である。さらに、サリチルアミンは、アルツハイマー病及び高血圧症の動物モデルにおいて顕著な治療上の利益を伴い、-KAs 及び毒性タンパク質オリゴマーの両方の形成を防止する。本発明者らは、PAH罹病性に関連する細胞モデル及びインビオモデルにおいて、タンパク質オリゴマー及び -KAs の酸化的ストレス / 形成を同定した。重要なことに、本発明者らは、グルタミン代謝を調節しSIRT3の活性を増大させるために、-KAsを捕捉することの有益な効果を実証した。従って、サリチルアミンを含む本発明の化合物は、肺高血圧症を予防及び治療するための全く新しい治療法を示す。

10

【0043】

本発明の化合物の例は、式：

【化5】



30

(式中：

RはNまたはC-R₅であり；

R₂は独立してH、置換もしくは非置換のアルキル、アルコキシ、アルキル-アルコキシであり；

R₃は、H、置換または非置換のアルキル、ハロゲン、アルコキシ、ヒドロキシル、ニトロであり；

R₄は、H、置換または非置換のアルキル、カルボキシル、カルボン酸、アルキル-カルボン酸であり；

R₅は、H、置換または非置換のアルキルである)

及びその薬学的に許容される塩から選択される化合物を含むが、これらに限定されない。

40

【0044】

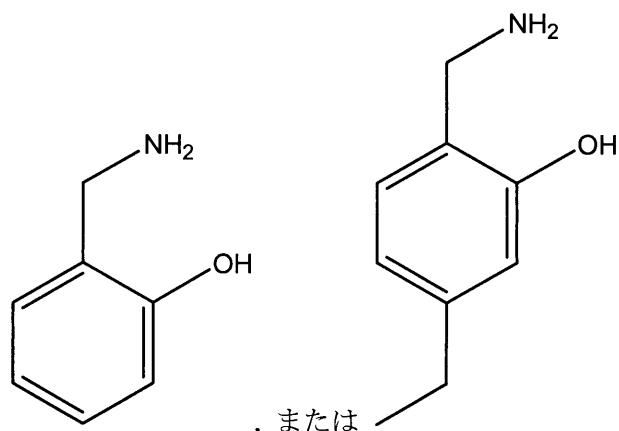
好みの態様において、化合物はサリチルアミン (2-ヒドロキシベンジルアミンまたは2-HOBA) である。

【0045】

化合物は以下から選択することができる：

50

【化6】

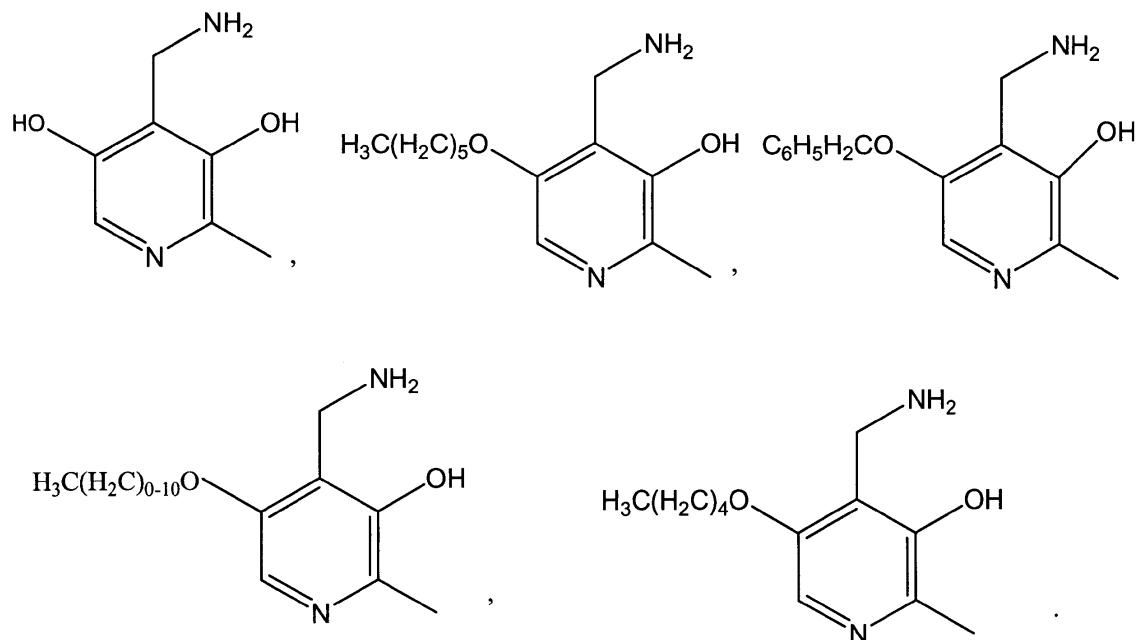


またはその薬学的に許容される塩。

【0046】

化合物はまた以下から選択することもできる：

【化7】



またはその薬学的に許容される塩。

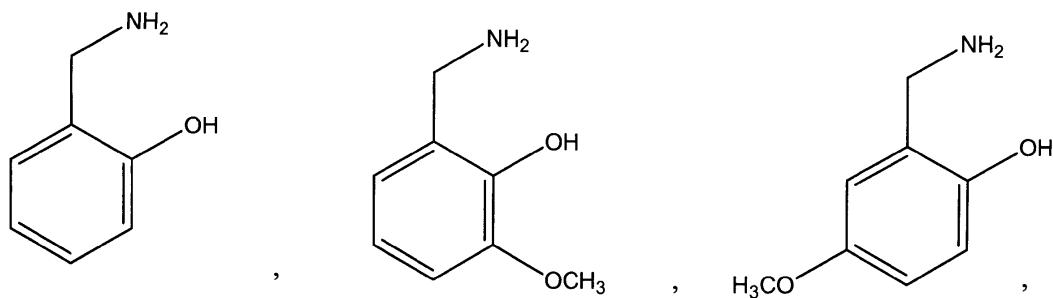
【0047】

化合物または類似体は、また以下から選択されてもよい：

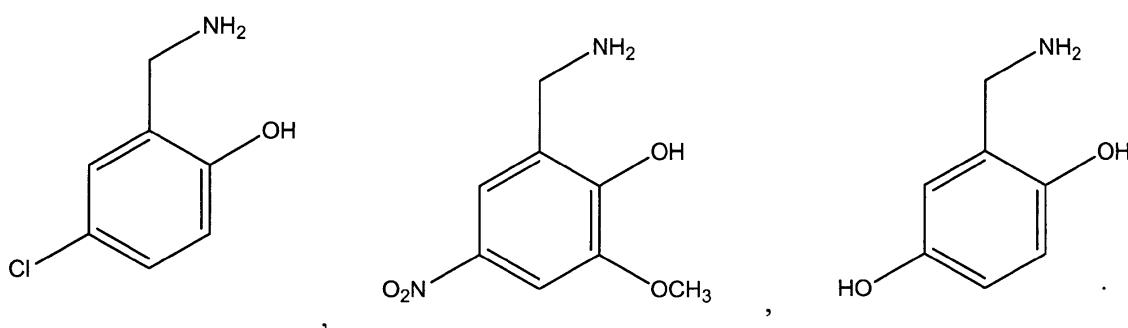
40

50

【化 8】



10



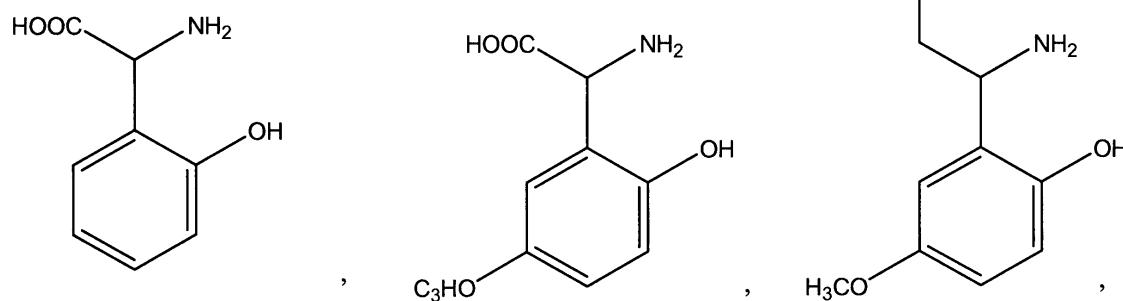
20

またはその薬学的に許容される塩。

【0048】

化合物はまた以下からも選択することもできる：

【化 9】



30

またはその薬学的に許容される塩。

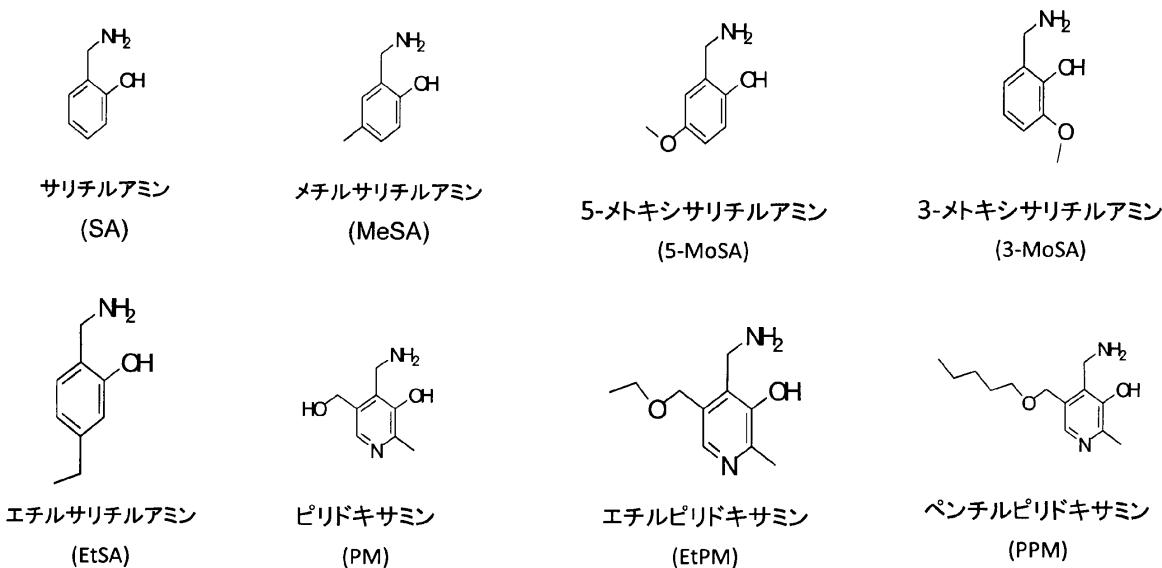
【0049】

化合物はまた以下からも選択され得る：

40

50

【化10】



またはその薬学的に許容される塩。

【0050】

20

本明細書中で使用される場合、用語「薬学的に許容される塩」は、薬学的に許容される無毒性の塩基または酸から調製された塩をいう。本発明の化合物が酸性である場合、その対応する塩は、無機塩基及び有機塩基を含む薬学的に許容される無毒の塩基から従来通り調製することができる。このような無機塩基由来の塩は、アルミニウム、アンモニウム、カルシウム、銅（第二及び第一）、第二鉄、第一鉄、リチウム、マグネシウム、マンガン（第二及び第一）、カリウム、ナトリウム、亜鉛などの塩を含む。アンモニウム、カルシウム、マグネシウム、カリウム及びナトリウム塩が特に好ましい。薬学的に許容される有機非毒性塩基由来の塩には、一級、二級、及び三級アミンの塩、ならびに環状アミンならびに置換アミン、例えば天然及び合成置換アミンの塩が含まれる。塩を形成することができる他の薬学的に許容される有機非毒性塩基には、例えば、アルギニン、ベタイン、カフェイン、コリン、N,N'-ジベンジルエチレンジアミン、ジエチルアミン、2-ジエチルアミノエタノール、2-ジメチルアミノエタノール、エタノールアミン、エチレンジアミン、N-エチルモルホリン、N-エチルピペリジン、グルカミン、グルコサミン、ヒスチジン、ヒドラバミン、イソプロピルアミン、リジン、メチルグルカミン、モルホリン、ピペラジン、ピペリジン、ポリアミン樹脂、プロカイン、プリン、テオプロミン、トリエチルアミン、トリメチルアミン、トリプロピルアミン、トロメタミンなどのイオン交換樹脂が含まれる。

30

【0051】

本発明の他の実施形態は、本明細書に開示されている方法と関連して使用され得る医薬組成物を含む。これらの組成物は、少なくとも1つの本発明の化合物及び薬学的に許容される担体を含む。すなわち、開示された少なくとも1つの化合物または開示された方法の少なくとも1つの生成物及び薬学的に許容される担体の治療上有効量を含む、医薬組成物を提供することができる。

40

【0052】

ある態様において、開示された医薬組成物は、有効成分として開示された化合物（その薬学的に許容される塩を含む）、薬学的に許容される担体、及び任意に他の治療成分または補助剤を含む。本組成物は、経口、直腸、局所、及び非経口（皮下、筋肉内、及び静脈内を含む）投与に適したものを含むが、いずれの場合においても最も適した経路は特定の宿主、ならびに有効成分が投与されているその症状の性質及び重症度に依存する。その医薬組成物は、単位剤形で都合よく提示され、そして薬学の分野で周知の方法のいずれかに

50

よって調製され得る。

【0053】

実際には、本発明の化合物またはその薬学的に許容される塩は、従来の医薬配合技術に従って医薬担体と緊密に混合して活性成分として組み合わせることができる。担体は、投与に望ましい製剤の形態、例えば経口または非経口（静脈内を含む）に応じて、多種多様な形態をとることができる。従って、本発明の医薬組成物は、それぞれ所定の量の活性成分を含有するカプセル剤、カシェ剤または錠剤などの経口投与に適した個別の単位として提供することができる。さらに、組成物は、粉末として、顆粒として、溶液として、水性液体中の懸濁液として、非水性液体として、水中油型エマルジョンとして、または油中水型液体エマルジョンとして提示することができる。上記の一般的な剤形に加えて、本発明の化合物及び／またはその薬学的に許容される塩はまた、制御された放出手段及び／または送達装置によって投与することができる。組成物は、任意の薬学的方法によって調製することができる。一般に、そのような方法は、活性成分を1つ以上の必要な成分を構成する担体と一緒にする工程を含む。一般に、組成物は、活性成分を液体担体または微粉固体担体またはその両方と均一かつ密接に混合することによって調製される。次いで製品を所望の外観に都合よく成形することができる。

【0054】

従って、本発明の医薬組成物は、薬学的に許容される担体、及び本発明の化合物、または本発明の化合物の薬学的に許容される塩を含むことができる。本発明の化合物、またはその薬学的に許容される塩はまた、1つ以上の他の治療上活性な化合物と組み合わせて医薬組成物中に含めることができる。使用される医薬担体は、例えば、固体、液体、または気体であり得る。固体担体の例には、ラクトース、白土、スクロース、タルク、ゼラチン、寒天、ペクチン、アラビアゴム、ステアリン酸マグネシウム、及びステアリン酸が含まれる。液体担体の例は、糖シロップ、落花生油、オリーブ油、及び水である。気体担体の例には、二酸化炭素及び窒素が含まれる。

【0055】

経口剤形用の組成物を調製する際には、任意の都合のよい医薬媒体を使用することができる。例えば、水、グリコール、油、アルコール、香味剤、保存剤、着色剤などを使用して、懸濁液、エリキシル剤及び溶液などの経口液体製剤を形成することができる；一方デンプン、糖、微結晶セルロース、希釈剤、造粒剤、滑沢剤、結合剤、崩壊剤などの担体を使用して、粉末、カプセル及び錠剤などの経口固形製剤を形成することができる。それらの投与の容易さのために、錠剤及びカプセル剤が好ましい経口投与単位であり、それにより固体の薬学的担体が使用される。場合により、錠剤は標準的な水性または非水性技術により被覆することができる。

【0056】

本発明の組成物を含有する錠剤は、場合により1種以上の補助成分または補助剤と共に圧縮または成形することにより製造することができる。圧縮錠剤は、場合により結合剤、滑沢剤、不活性希釈剤、界面活性剤または分散剤と混合した、粉末または顆粒などの易流動性形態の活性成分を適切な機械で圧縮することによって調製することができる。成形錠剤は、不活性液体希釈剤で湿らせた粉末化合物の混合物を、適切な機械で成形することによって製造することができる。

【0057】

本発明の医薬組成物は、有効成分としての本発明の化合物（またはその薬学的に許容される塩）、薬学的に許容される担体、及び任意に1つ以上の追加の治療薬または補助剤を含み得る。本組成物は、経口、直腸、局所、及び非経口（皮下、筋肉内、及び静脈内を含む）投与に適した組成物を含むが、いずれの場合においても最も適した経路は特定の宿主、ならびに有効成分が投与されている症状の性質及び重症度に依存する。医薬組成物は、単位剤形で都合よく提示され、そして薬学の分野で周知の方法のいずれかによって調製され得る。

【0058】

10

20

30

40

50

非経口投与に適した本発明の医薬組成物は、水中の活性化合物の溶液または懸濁液として調製することができる。例えば、ヒドロキシプロピルセルロースなどの適切な界面活性剤を含めることができる。分散液もまた、グリセロール、液体ポリエチレングリコール、及びそれらの油中混合物中で調製することができる。さらに、微生物の有害な増殖を防ぐために防腐剤を含めることができる。

【0059】

注射用途に適した本発明の医薬組成物は、無菌水溶液または分散液を含む。さらに、その組成物は、無菌注射用溶液または分散液のような即時調製用の無菌粉末の形態であり得る。全ての場合において、最終の注射形態は無菌でなければならず、容易な注射器使用可能性のために実際上流動性でなければならない。医薬組成物は製造及び貯蔵の条件下で安定でなければならない；従って、好ましくは細菌及び真菌などの微生物の汚染作用から保護されるべきである。担体は、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及び液体ポリエチレングリコール）、植物油、及びそれらの適切な混合物を含む溶媒または分散媒体であり得る。

10

【0060】

本発明の医薬組成物は、例えばエアロゾル剤、クリーム剤、軟膏剤、ローション剤、散粉剤、洗口剤、うがい薬などの局所使用に適した形態であり得る。さらに、その組成物は、経皮装置での使用に適した形態であり得る。これらの製剤は、本発明の化合物またはその薬学的に許容される塩を利用して、従来の加工方法によって調製することができる。一例として、親水性材料及び水を約5重量%から約10重量%の化合物と共に混合することによって、所望の粘稠度を有するクリームまたは軟膏が調製される。

20

【0061】

本発明の医薬組成物は、担体が固体である直腸投与に適した形態であり得る。混合物が単位用量坐剤を形成することが好ましい。適切な担体は、カカオバター及び当該分野で一般的に使用されている他の材料を含む。坐剤は、最初に組成物を軟化または溶融した担体と混合し、続いて金型中で冷却及び成形することによって都合よく形成することができる。

【0062】

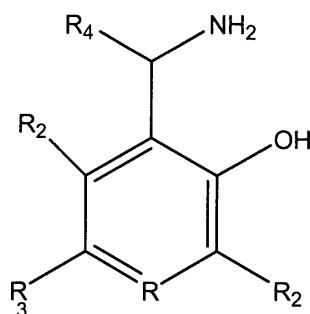
前記の担体成分に加えて、上記の医薬製剤は必要に応じて、希釈剤、緩衝剤、香味剤、結合剤、界面活性剤、増粘剤、滑剤、保存剤（抗酸化剤を含む）などの1つ以上の追加の担体成分を含み得る。さらに、意図するレシピエントの血液と等張にするために、他の補助剤（adjuvants）を製剤化するのに含めることができる。本発明の化合物及び/またはその薬学的に許容される塩を含有する組成物はまた、粉末または液体濃縮物の形態で調製することができる。

30

【0063】

一態様では、本発明は、以下の式の化合物によって表される構造を有する化合物：

【化11】



40

（式中：

RはNまたはC-R₅であり；

R₂は独立してH、置換もしくは非置換のアルキル、アルコキシ、アルキル-アルコキシであり；

50

R_3 は、H、置換または非置換のアルキル、ハロゲン、アルコキシ、ヒドロキシル、ニトロであり；

R_4 は、H、置換または非置換のアルキル、カルボキシル、カルボン酸、アルキル-カルボン酸であり；

R_5 は、H、置換または非置換のアルキルである)；

及び薬学的に許容される塩；

及び薬学的に許容される担体を含む医薬組成物に関する。

【実施例】

【0064】

この実施例は、本発明の実施形態に関する研究を詳述する。

10

【0065】

材料及び方法：

試薬： $^{13}\text{C}_5$ -L-グルタミンは、Sigma-Aldrich (ミズーリ州セントルイス) から購入した。ケトミンはCayman Chemical (ミシガン州アナバー) から購入した。2-ヒドロキシベンジルアミン (2HOBA) は前述のように $^{19}\text{Vanderbilt}$ にて合成した。抗体は以下のように購入した：HIF1 及びグルタミンシンテターゼ、Novus Biologicals (コロラド州リトルトン)、Sirt3、Cell Signaling Technology (マサチューセッツ州ダンバース)；アセチル-リジン、EMD Millipore (マサチューセッツ州ビレリカ)；Cox 4、Abca m (マサチューセッツ州ケンブリッジ)。組換えヒトSIRT3は、R&D Systems (ミネソタ州ミネアポリス) から購入した。Sirt-GloアッセイキットはPromega (ウィスコンシン州マディソン) から購入し、製造元の指示に従って使用した。

20

【0066】

細胞培養：本発明者らは、ImmortalMouseバックグラウンドで作製された条件付き不死化マウス株 (lines) から単離され、前に特徴付けられたWT及びBMPR2変異体 (BMPR2 R899X) 肺微小血管内皮細胞²⁰、及び親株にトランスフェクトされたWTならびにBMPR2変異体のいずれかを安定に発現する親不死化ヒト株からのWT及びBMPR2変異体PMVECs構築物を使用し、G418Sによる選択下で維持した。マウス株については、マウスインターフェロン-ガンマの除去及び37Cへの移行 (33Cから、SV40 large Tの発現を通して条件付き不死表現型を維持する) によって、細胞を一次内皮表現型に戻し、導入遺伝子 (Rosa26-rtTA x TetO7-Bmp2^{R899X}) の構築物であり、動物実験で使用されたものと同じ) の発現を誘導するために、両方とも実験前に少なくとも72時間、培地にドキシサイクリン (300ng / mL) を添加した。ヒト株はWTまたは変異体BMPR2を安定的に発現し、G418Sによる選択は実験前24時間中断した。

30

【0067】

代謝流量 (fluxes) 及び安定同位体標識：グルコース及び乳酸濃度 (levels) は、YSI 2300 Stat Glucose and Lactate Analyzer (オハイオ州イエロー スプリング) を使用して測定した。内部標準としてノルバリンを用いて、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いてアミノ酸濃度を定量した。次いで、アミノ酸試料を前述のように²¹二相クロマトグラフィー法を用いてZorbax Eclipse Plus C18カラム (Agilent) に注入した。同位体トレーサー試験のために、WT及びBMPR2変異体PMVECを、非標識グルタミンの代わりに [$^{13}\text{C}_5$]-グルタミンを2mM含有する培地中で24時間培養した。分析物を氷冷メタノール中に抽出し、クロロホルム : H₂Oが1 : 1中で分離した。次いで、アミノ酸及び有機酸を含有する水相を空気下室温で乾燥させた。試料をMBTSTFA + 1% TBDMCS (Pierce) を用いて誘導体化した。次いで、2 μLの各誘導体化試料を、Agilent 6890N / 5975B GC-MS中の30m DB - 35msキャピラリーカラムに注入した。流速はETAソフトウェアパッケージを用いて計算した²²。

40

【0068】

細胞増殖アッセイ：結果に概説したように、細胞を播種し、特定の培地条件下で増殖させた。トリパンブルー色素排除法を用いて細胞の総数及び生細胞数を計数し、自動計数をCountessセルカウンター (Life Technologies、ニューヨーク州グランド アイランド)

50

を用いて行った。

【 0 0 6 9 】

光学的酸化還元比の二光子自家蛍光測定：前述のように²³二光子画像を取得し分析した。簡単に言うと、細胞をガラス底皿に一定の密度で蒔き、48時間後に画像化した。二光子顕微鏡 (Bruker) 及び40倍油浸対物レンズ (1.3NA) を使用して、同じ視野についてNADH及びFAD自家蛍光画像を取得した。画像をMATLAB (Mathworks) にインポートし、各画素についてNADH強度をFAD強度で割って酸化還元比画像を計算した。各画像にわたり酸化還元比を平均した。

【 0 0 7 0 】

ミトコンドリア機能の研究：培養されたPMVECsにおけるミトコンドリア呼吸を評価するため、細胞をSeahorse Biosciences (マサチューセッツ州ビレリカ) からの96ウェルプレート中の増殖培地中に、ウェル当たり50,000生細胞の播種密度で播種した。翌日、細胞を洗浄し、特定の基質 (1 gm / Lのグルコース、2 mMのL-グルタミン) を追加したSeahorse Assay Mediaに入れた。平衡化した後、酸素消費速度をMito Stress Testプロトコルを用いてSeahorse XFe96アナライザーで測定した。ミトコンドリアタンパク質測定のために、ミトコンドリアは、前記のように²⁴新鮮なマウス肝臓組織から単離された。

10

【 0 0 7 1 】

動物実験：全ての動物実験はVanderbilt IACUCによって承認された。雄及び雌のFVB / Nマウスは10 ~ 16週齢であった。BMPR2^{R899X}マウスを前記のように^{24,25}作成し、維持した。2HOBA研究のために、水の瓶を光から保護し2 ~ 3日毎に水を交換しながら1g / Lを飲料水中で投与した。

20

心拍出量を特定するために、麻酔をかけたマウス (イソフルラン麻酔) に対して心臓エコー検査を行った。麻酔薬としてプロモエタノールを使用して、右心室収縮期圧 (RVSP) を前記のように^{24,25}侵襲的に (invasively) 測定した。

【 0 0 7 2 】

ヒト実験：全てのヒト実験はVanderbilt University、the University of North Carolina at Chapel Hill、及びYale Universityの機関内審査委員会によって承認された。各患者からインフォームドコンセント (告知に基づく同意) を得た。循環グルタミン濃度の測定のために、末梢静脈穿刺により血液試料を得、血漿を分離するために遠心分離し、分析まで -80 °C で保存した。アミノ酸組成は、Vanderbiltの臨床化学研究所にて標準的なCLIA承認の方法を用いて定量化された。経肺測定については、前記のように^{26,27}臨床的に指示された診断用右心カテーテル挿入時にサンプルを採取した。患者は、侵襲的血行動態検査の結果に基づき、病歴によって特定されたWHOグループ間の差異をもって肺高血圧症を有するか否かで分類された

30

【 0 0 7 3 】

統計解析：特に指定のない限り、全ての統計はGraphPad Prism 6.0またはMicrosoft Excelを用いて行った。動物実験では、RVSP 30 mm Hgを示す形質転換動物の約80%を用いて、以前の実験に基づいて標本数を選択した。動物をケージによって無作為に処置群に割り当てた。全ての測定について、研究者はデータ分析まで治療と遺伝子型を知らなかった。示されているように、データは両側t検定、またはテューキー事後検定による二元配置分散分析を用いて分析した。多重比較補正後、有意性を < 0.05 に設定した。

40

【 0 0 7 4 】

結果

グルタミン代謝は、ヒトPAH患者において異常である：PAHがグルタミン代謝の変化を含むという仮説を検証するために、本発明者らは、既知のBMPR2変異を有する遺伝性PAH患者、罹患していない変異保因者 (既知のBMPR2変異を有するがPAHの証拠のない個人)、及び患者や保因者と同じ世帯の既婚の対照における空腹時血清グルタミン濃度を定量化した。本発明者らは、循環グルタミン濃度が、遺伝性PAH患者 (451 +/- 68 umol / L) 及びBMPR2変異保因者 (450 +/- 50 umol / L) の両方において、対照 (399 +/- 82 u

50

mol / L, $p = 0.05$, 図 1 A) と比較して有意に上昇したことを見出した。これまでの研究が、心臓のグルタミン摂取の増加が PAH における異常な代謝プログラムの特徴であることを示唆してきた¹⁴ので、これは予想外であった。肺血管系内のグルタミン代謝をよりよく定量化するために、本発明者らは WHO グループ I の PAH 患者、WHO グループ III の PH 患者、及び正常な肺血行動態を有する個人における経肺グルタミン勾配を測定した。診断用右心カテーテル挿入時に、主肺動脈及び肺毛細管くさび位置から試料を採取した²⁶。各試料におけるグルタミン濃度を定量し、各個体についての PCW 試料と PA 試料間の差異を勾配測定値とした（負の値は正味の取り込みを示し、正の値は正味の放出を示す）。WHO グループ I の PAH 患者は、WHO グループ III の患者及び対照と比較して、肺血管系によるかなりのグルタミン取り込みを示した（図 1 B）。まとめると、これらのデータは、異常な B MPR2 機能を有する PAH 患者が、全身及び肺血管グルタミン代謝の著しい変化を表したことを示した。

【 0 0 7 5 】

BMPR2 変異体内皮は、グルタミン炭素に対する異常な結合活性を示す：本発明者らは、機能不全 BMPR2 を有する肺内皮細胞によるグルタミン取り込みの増加が、それらの細胞の固有の性質であるのか、単にグルタミンの利用可能性の増加によるのかを判定した。このことを評価するために、野生型 (WT) 及び BMPR2 変異体肺微小血管内皮細胞 (PMVEC) を培養中で増殖させ、培地中に生理学的レベルで有意に過剰 (2 mM) のグルタミンを供給した。グルタミン過剰の条件下では、BMPR2 変異体 PMVEC は WT 細胞の 2 倍の速度でグルタミンを取り込んだ（図 2 A）。これは、グルタミン取り込みの増加が機能不全の BMPR2 シグナル伝達を伴う PMVEC に固有であることを示唆する。

【 0 0 7 6 】

グルタミンは、TCA 回路への炭素投入の供給源として使用することができるが、それは細胞内の重要な窒素供給源でもあり、ヌクレオチド合成などの窒素を必要とする工程を供給する。本発明者らは、グルタミンが炭素源として使用されており、それは WT と比較して BMPR2 変異体 PMVEC における TCA 回路に優先的に分流されていると仮定した。この仮説を検証するために、WT 及び BMPR2 変異体 PMVEC を、5 つの炭素原子全てが炭素-13 であるグルタミンの安定同位体であり、質量分析法により検出可能である 2 mM の [U-¹³C₅] -L-グルタミンの存在下で 24 時間培養した（図 2 B の概略図参照）。他の主要な細胞性炭素源（グルコース、脂肪酸）は標識されないままであり、使用された血清は遊離アミノ酸を除去するために透析されていた。WT と比較して、BMPR2 変異体 PMVEC は、TCA 回路の複数の中間体においてグルタミン由来炭素の過剰な取り込みを示した（図 2 C）。さらに、グルタミン由来の炭素原子がいくつ取り込まれたか（リンゴ酸塩については 0、1、2、3、または 4）を特定するために、特定の TCA 中間体（例えば、リンゴ酸塩）をタンデム質量分析によって分解したところ、本発明者らは、存在するリンゴ酸の大部分（40%）は ¹³C の 4 原子を含んでいることを見出した。これは、利用可能な唯一の ¹³C 源であるため、TCA 回路における炭素の大部分がグルタミンから来ていることを示している（図 2 D）。対照的に、WT PMVEC では、存在するリンゴ酸塩の大部分（55%）は ¹³C の原子は含まない。これは、WT 細胞では、TCA 回路における炭素の大部分がグルタミンからではなくむしろ非標識グルコース及び存在する脂肪酸から来ることを示している。

【 0 0 7 7 】

グルタミンは BMPR2 変異体 PMVEC に必要な炭素源である

【 0 0 7 8 】

本発明者らは次に、BMPR2 変異体 PMVEC がグルタミンを絶対的に必要とするかどうか、またはこれが過剰なグルタミンの存在の結果として「便利さの配置」であることを示しているかどうかを特定した。本発明者らは、500 μM (BMPR2 変異患者における血清濃度を模倣している)、及び 200 μM (ヒトにおいて正常と考えられる最低濃度を示している) の 2 つのグルタミン濃度で、WT 及び BMPR2 変異体 PMVEC を培養した。500 μM のグルタミンでは、BMPR2 変異体 PMVEC は 72 時間までの全ての時点で、WT PMVEC の速度を超える正味の増殖を示す（図 3 A）。200 μM のグルタミンでは、WT PMVEC の正味の

10

20

30

40

50

増殖速度は本質的に変化していないが、BMPR2変異体PMVECはグルタミン制限状態に完全に寛容ではなく、そして72時間までに全て死亡した（図3B）。

【0079】

グルタミン利用の詳細及びBMPR2変異体PMVECにおけるグルタミン制限の効果をよりよく理解するために、本発明者らは、TCA回路活動によって制御されている主要な電子担体である内因性NADH及びFADの二光子自己蛍光を用いて、WT及びBMPR2変異体PMVECの全細胞内酸化還元状態を定量した。両種からの蛍光は、より高い比はより多くのTCA回路活性、より減少した細胞内酸化還元環境、及び増加した全体的代謝活性を示し、光学的酸化還元比の計算を可能にする。逆に、光学的酸化還元比の低下は、特にTCA回路による代謝活性の全体的な低下を示す²⁸⁻³⁰。2光子自家蛍光は非常に高い時間分解能を持ち、細胞の代謝と酸化還元状態の急速な変化を検出し定量化することを可能にする。本発明者らは、基礎条件下、ならびにグルタミン及びグルコースの急激な離脱を伴って、WT及びBMPR2変異体PMVECにおける光学的酸化還元比を定量した。ベースラインでは、BMPR2変異体PMVECはWT細胞よりも光学的酸化還元比が低く（図4A）、細胞内酸化還元環境を維持する能力及び全体的な代謝活性が比較的損なわれていることを示している。TCA回路基質が急激に制限されると、WT PMVECは光学的酸化還元比を維持するために、それらの代謝拳動を迅速に適応させることができ（図4A）、一方BMPR2変異体PMVECは光学酸化還元比の有意なさらなる減少を示し（図4A）、急性代謝柔軟性の著しい喪失を示唆している。

10

【0080】

次に、BMPR2変異体PMVECにおけるミトコンドリア機能に対するTCA回路グルタミン依存の影響を調べた。培養されたWT及びBMPR2変異体PMVECには、利用可能な唯一のエネルギー基質としてグルコースまたはグルタミンのいずれかを与えた。Seahorse XFe96アナライザーを使用してミトコンドリアの酸素消費量を定量し、細胞呼吸の特定の成分（ATP産生関連呼吸、プロトン漏出、及びカップリング効率）を酸素消費プロフィールから計算した（概略図については図9を参照）。WT PMVECは、唯一の炭素源としてグルコースまたはグルタミンを用いて同等のATP産生関連呼吸を示すが、BMPR2変異体PMVECはグルコースと比較して、それらの炭素源としてグルタミンを用いたATP産生関連呼吸が増強したことを示す（図4B）。グルタミンを使用した場合、WT PMVECはグルコースを使用した場合と比較して、ミトコンドリアでのプロトン漏出の増加を示すが、BMPR2変異細胞はグルタミンまたはグルコースのどちらでも低レベルのプロトン漏出を維持しており（図4C）、ATP合成を持続（support）させるための燃料としてグルタミンを使用することの全体の有効性は、WTと比較してBMPR2変異体PMVECにおいてはるかに大きいことを示唆している。これと一致して、ATP産生関連呼吸を基礎呼吸と比較すると、WT内皮細胞は、グルタミンを燃料として使用した時に低い結合効率を示したが、BMPR2変異体PMVECは高い結合効率を維持した（図4D）。まとめると、これらのデータは、グルタミンがBMPR2変異体PMVECにおけるエネルギー産生のための好ましい基質であることを示した。

20

【0081】

酸化ストレスは、BMPR2変異体におけるHIF活性化とSIRT3障害を促進する

30

【0082】

本発明者らは次に、グルタミン依存に寄与するBMPR2変異の下流の分子事象を特定することを望んだ。複数のシグナル伝達経路が、様々な疾患の状態において、グルタミン利用の増加を調節していることが示されている^{15,31-35}。可能性のある候補経路の中で、グルタミン代謝も強力に調節するPAHと最も関連性のある経路が、低酸素誘導因子1 - アルファ（HIF1）である。実験及びヒトPAHではHIF1は正常酸素条件下で安定化されることが示されており、HIF1の活性化はグルタミン依存を誘導することができる³⁶⁻³⁹。本発明者らは、培養で増殖させたBMPR2変異体PMVECが、WTと比較してタンパク質レベルでHIF1の有意な正常酸素安定化を示すこと（図5A及び5B）、及びこれが2つの異なるPAH関連BMPR2変異について証明できることを見出した。その後、WT及びBMPR2

40

50

変異体PMVECを、ケトミン、HIFの薬理学的阻害剤で処理し、グルタミンのグルコースに対する細胞外輸送速度 (flux rate) を定量することにより、グルコース及びグルタミンの取り込みを評価した。WT細胞の処理は、グルコース対グルタミン輸送速度に影響を及ぼさなかった (図 5 C)。しかしながら、HIF阻害剤でBMPR2変異体PMVECを処理すると、グルコース対グルタミン輸送速度が有意に減少し (図 5 C)、これは、HIF1活性がBMPR2変異体内皮におけるグルタミン要求量を促進するのに役立つことを示唆する。

【 0 0 8 3 】

HIF1活性化は、BMPR2変異細胞におけるグルタミンの取り込み及び利用に寄与するが、本発明者らは、代謝を制御することが知られているシグナル伝達経路にさらなる変化があると疑った。HIF1自体の活性化はグルタミン代謝を促進することが示されているが、グルタミンは生合成には不均衡に使用されない³⁹⁻⁴¹。もしBMPR2変異体PMVEC中のグルタミンはエネルギー生成に使用されており、明らかに不均衡な生合成には使用されていないのであれば、本発明者らは、グルタミン調節とエネルギー生産の両方に直接関与する代謝制御経路がおそらく変化したと仮定した。ミトコンドリアのエネルギー産生及び酸化還元恒常性に関するリジンデアセチラーゼ (脱アセチル酵素) であるサーチュイン-3 (SIRT3) が、強力な候補として浮上した。SIRT3の喪失はHIF1活性化の上流にあることが示されており、肺高血圧症と関連している^{15,42-44}。

【 0 0 8 4 】

サーチュインの発現及び活性は、基質の利用可能性、栄養素摂取、身体活動、及び器官系間で作用する相互作用シグナル伝達経路によって厳密に調節されているので、BMPR2媒介PAHにおけるSIRT3の役割はマウスモデル系において最もよく研究されている。BMPR2媒介PAHにおけるSIRT3不活性化の役割を調べるために、本発明者らは、8週間ウェスタンダイエット (脂肪から60%カロリー) を与えた野生型及びBMPR2変異体 (BMPR2^{R899X}) マウスからミトコンドリアを単離した。ミトコンドリアプロテオームをリジン残基のアセチル化について評価したところ、SIRT3の不活性化がリジンの過剰アセチル化をもたらした。WTと比較して、BMPR2^{R899X}ミトコンドリアはSIRT3と同等のタンパク質レベルを有していたが、多数のミトコンドリアタンパク質の有意なリジン過剰アセチル化を示しており (図 6 A、WTについて1~2列及び変異体について5~6列、図 6 Dで定量化)、BMPR2^{R899X}マウスにおけるSIRT3活性の喪失と一致している。

【 0 0 8 5 】

SIRT3タンパク質含有量に変化のないミトコンドリアプロテオームの過剰アセチル化は、SIRT3酵素活性の喪失と一致する。本発明者らは、BMPR2^{R899X}マウスのミトコンドリア膜が広範囲の脂質過酸化を示すこと、及びその脂質過酸化が、高い反応性の脂質過酸化産物のサブセットであるタンパク質とイソケタールとの間の共有結合付加物の過剰産生によって特徴付けられることを以前に示していた^{24,25}。従って、本発明者らは、SIRT3がBMPR2^{R899X}マウスのミトコンドリアにおいて酸化的不活性化を受けており、そしてイソケタール捕捉剤2-ヒドロキシベンジルアミン (2HOBA) での処置は、正常なSIRT3活性を回復すると仮定した (図 6 Bの概略図)。本発明者らは、合成的に純粋なイソケタールを組換えヒトSIRT3とインビトロでインキュベートすることによって、この仮説の生化学的妥当性を実証した。イソケタール処理は、Sirt-Gloアッセイによる発光によって測定されるように、濃度依存的方法によりSIRT3を不活性化した (図 6 C)。次に、イソケタール捕捉がSIRT3機能を維持するという仮説を、飲料水中1g/Lの2HOBAでWTマウス及びBMPR2^{R899X}マウスを処置することによって試験した。2HOBAでの処置は、ミトコンドリア中の全SIRT3含有量に影響を与えるに、WTと比較してBMPR2^{R899X}マウスにおけるミトコンドリアプロテオーム中のリジンアセチル化を有意に減少させ (図 6 A、WTについて3~4列及び変異体について7~8列、図 6 Dで定量)、SIRT3触媒活性の維持と一致している。

【 0 0 8 6 】

2HOBAは、インビトロでグルタミン代謝を正常化し、PAHを防止する：損傷したBMPR2機能がSIRT3機能の喪失と関連していること、及び損傷している脂質過酸化生成物を捕捉

10

20

30

40

50

するための2HOBA処置によってこれを防止できることを示したので、本発明者らは、次にインビボでのBMPR2変異の下流の代謝機能障害、PAHとの関係、及び2HOBA治療の効果の評価を望んだ。本発明者らは、2HOBAがBMPR2^{R899X}マウスにおけるPAHの発症を予防し、インビボでのグルタミン代謝に対して有益な調節効果を有すると仮定した。BMPR2^{R899X}対立遺伝子の発現は、WTと比較して骨格筋（図10）及び肝臓ミトコンドリア（図7A）におけるグルタミンシンテーゼの発現増加を促進するのに十分であった。グルタミンシンテーゼの発現増加にもかかわらず、循環グルタミン濃度はビヒクル処理WTマウス及びBMPR2^{R899X}マウスにおいて同等であり（図7B）、このことは、グルタミン合成の増加がBMPR2変異体における消費の増加と一致していることを示唆する。2HOBA処理後、BMPR2^{R899X}マウスは肝臓ミトコンドリアにおけるグルタミンシンテーゼを減少させ（図7A）、処理されたWTマウスと比較して循環グルタミンを有意に低くし（図7B）、変異体におけるグルタミンバランスへの好ましい効果を示唆する。SIRT3及びグルタミン代謝への効果と一致して、2HOBA処理は、ビヒクル処理マウスと比較して、BMPR2^{R899X}マウスにおける総肺抵抗によって測定されるように、肺高血圧症の発症を予防した（図7C）。BMPR2^{R899X}マウスにおける2HOBAによる処理は、心拍出量を中程度に増加させ（図11A）、そしてRVSPを減少させ（図11B）、これらの組み合わせの効果は、総肺抵抗を有意に減少させる。

【0087】

討論

この実施例の一部として、本発明者らは、ヒト及びマウスの細胞培養モデル、形質転換マウス、ならびに生きているPAH患者由来の試料を使用して、機能不全BMPR2シグナル伝達によるグルタミンの代謝プログラムの著しい変化を実証した（図8）。正常なBMPR2機能の喪失は、ミトコンドリアにおけるオキシダント障害及びイソケタールと呼ばれる脂質過酸化の反応生成物の形成をもたらす⁴⁵。イソケタールはSIRT3を不活性化し、それがオキシダントストレスの増加と共にHIF1の安定化をもたらす。まとめると、SIRT3及びHIF1は、一般に細胞代謝の、及び特にグルタミン代謝のための確立された最良の2つの「優れた（master）レギュレーター」経路である。本発明者らは、イソケタールの経口で生物学的に利用可能な捕捉剤 - 2 - ヒドロキシベンジルアミン（2HOBA）- で処理することによって、この過程をインビボで中断することができ、グルタミン中毒をもたらす分子カスケードの中止がPAHの発症を防ぐことを示す。

【0088】

本発明者らの発見は、肺高血圧症の発症及び維持に対する主要な一因として、変化した細胞代謝を意味する証拠の急速に大きくなる重要性を増大させる。PAHに記載された最初の主要な代謝の摂動は、完全なグルコース酸化を可能にするための十分な酸素濃度の存在にもかかわらず、乳酸産生解糖への変化（shift）であった。この知見は、実験的PAH及びヒトPAHの実質的に全ての状況で再現されており、分子基盤が明確にされ続けている^{1,2,6,11,38,46-48}。しかし、癌研究にも当てはまるように、本発明者ら及び他の研究者らは、PAHにおける細胞代謝の状況（landscape）への変化が解糖に限定されず、むしろ主要な代謝経路のほとんどを含むように思われることを見出している。健康な細胞におけるメタボロームの相関性を考えると、これはおそらく驚くべきことではない。実際、本発明者らは以前に、PMVECsにおけるBMPR2の変異体アイソフォームの発現が、多様な代謝経路を再プログラムするのに十分であることを示した⁴⁷。

【0089】

我々の知見は、肺高血圧症の変化した代謝プログラムに関する最近発表された他の幾つかの報告をまとめのに役立つ。Piaoらは、モノクロタリン処理ラットにおいてRVグルタミノリシスの増加を示し、グルタミノリシス増加の徵候がヒトPAH患者由来のRVにも存在することを示した¹⁴。Paulinらは最近、発現低下のメカニズムは完全に明らかになっていないが、タンパク質レベルでの減少によるSIRT3活性の喪失が、マウスにPAHの発症の素因をつくると発表した⁴⁴。これらの知見を拡張して、Laiらはごく最近になって、肺高血圧症におけるSIRT3の重要な役割、及び左心不全に見られる関連する全身性代謝異常を

10

20

30

40

50

、駆出分画が保存されている状態で示している⁴⁹。Dieboldらは、BMPR2発現が減少した肺内皮細胞における代謝リモデリングを報告し、PAH表現型の発現は低酸素への曝露を必要としたが、HIFを含むがSIFT3は含まないことを報告した^{46,50}。本発明に関連する発見は、これら発表された研究の全てが互いに一致し得る可能性のあるメカニズムを提供することによって、これらの研究の不足を補う。

さらに、本発明者らは、動的代謝が実際にモデル系及び死後組織において観察されたのと同様の様式で再プログラムされるという、生きているPAH患者における証拠を提供する。本発明者らはまた、PAHにおける代謝再プログラミングの基礎となるメカニズムの少なくとも1つを標的とすることが、インビオで有益な効果をもたらすことを示し、本発明者らはヒトで使用できる化合物を用いてそれを行った。2-ヒドロキシベンジルアミンは非常に好ましい長期安全性プロフィールを有しており、マウスへの12ヶ月以上の連続投与は有意な毒性を生じない。2-ヒドロキシベンジルアミンは天然に存在する産出物であり、ヒトにおける迅速な原理証明研究を可能にし、その後の研究は改善された薬物動態を有する関連化合物に焦点を合わせている。重要なことに、2HOBAの作用メカニズムは他の疾患モデル及び種を超えて実証されている^{19,51}。

【0090】

参考文献

1. Sutendra G, Michelakis ED. The metabolic basis of pulmonary arterial hypertension. *Cell metabolism*. 2014;19(4):558-573.
2. Ryan JJ, Archer SL. Emerging concepts in the molecular basis of pulmonary arterial hypertension: part I: metabolic plasticity and mitochondrial dynamics in the pulmonary circulation and right ventricle in pulmonary arterial hypertension. *Circulation*. 2015;131(19):1691-1702.
3. Taegtmeyer H, Young ME, Lopaschuk GD, Abel ED, Brunengraber H, Darley-Usmar V, Des Rosiers C, et al. Assessing Cardiac Metabolism: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation research*. 2016;118(10):1659-1701.
4. Eelen G, de Zeeuw P, Simons M, Carmeliet P. Endothelial cell metabolism in normal and diseased vasculature. *Circulation research*. 2015;116(7):1231-1244.
5. Gomez-Arroyo J, Mizuno S, Szczepanek K, Van Tassell B, Natarajan R, dos Remedios CG, Drake JI, et al. Metabolic gene remodeling and mitochondrial dysfunction in failing right ventricular hypertrophy secondary to pulmonary arterial hypertension. *Circ Heart Fail*. 2013;6(1):136-144.

【0091】

6. Ryan J, Dasgupta A, Huston J, Chen KH, Archer SL. Mitochondrial dynamics in pulmonary arterial hypertension. *Journal of molecular medicine*. 2015;93(3):229-242.
7. Obre E, Rossignol R. Emerging concepts in bioenergetics and cancer research: metabolic flexibility, coupling, symbiosis, switch, oxidative tumors, metabolic remodeling, signaling and bioenergetic therapy. *Int J Biochem Cell Biol*. 2015;59:167-181.
8. Chen X, Talati M, Fessel JP, Hemnes AR, Gladson S, French J, Shay S, et al. Estrogen Metabolite 16alpha-Hydroxyestrone Exacerbates Bone Morphogenic Protein Receptor Type II-Associated Pulmonary Arterial Hypertension Through MicroRNA-29-Mediated Modulation of Cellular Metabolism. *Circulation*. 2016;133(1):82-97.
9. Hemnes AR, Brittain EL, Trammell AW, Fessel JP, Austin ED, Penner N, Maynard KB, et al. Evidence for right ventricular lipotoxicity in heritable pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*. 2014;189(3):325-334.

10

20

30

40

50

10. West J, Niswender KD, Johnson JA, Pugh ME, Gleaves L, Fessel JP, Hemnes AR. A potential role for insulin resistance in experimental pulmonary hypertension. *The European respiratory journal*. 2013;41(4):861-871.

【 0 0 9 2 】

11. Dyck JR, Hopkins TA, Bonnet S, Michelakis ED, Young ME, Watanabe M, Kawase Y, Jishage K, Lopaschuk GD. Absence of malonyl coenzyme A decarboxylase in mice increases cardiac glucose oxidation and protects the heart from ischemic injury. *Circulation*. 2006;114(16):1721-1728.

12. Talati MH, Brittain EL, Fessel JP, Penner N, Atkinson J, Funke M, Grueter C, et al. Mechanisms of Lipid Accumulation in the Bone Morphogenic Protein Receptor 2 Mutant Right Ventricle. *Am J Respir Crit Care Med*. 2016.

13. Brittain EL, Talati M, Fessel JP, Zhu H, Penner N, Calcutt MW, West JD, et al. Fatty Acid Metabolic Defects and Right Ventricular Lipotoxicity in Human Pulmonary Arterial Hypertension. *Circulation*. 2016;133(20):1936-1944.

14. Piao L, Fang YH, Parikh K, Ryan JJ, Toth PT, Archer SL. Cardiac glutaminolysis: a maladaptive cancer metabolism pathway in the right ventricle in pulmonary hypertension. *Journal of molecular medicine*. 2013;91(10):1185-1197.

15. Li C, Zhang G, Zhao L, Ma Z, Chen H. Metabolic reprogramming in cancer cells: glycolysis, glutaminolysis, and Bcl-2 proteins as novel therapeutic targets for cancer. *World J Surg Oncol*. 2016;14(1):15.

【 0 0 9 3 】

16. Yang C, Ko B, Hensley CT, Jiang L, Wasti AT, Kim J, Sudderth J, et al. Glutamine oxidation maintains the TCA cycle and cell survival during impaired mitochondrial pyruvate transport. *Molecular cell*. 2014;56(3):414-424.

17. Jiang L, Shestov AA, Swain P, Yang C, Parker SJ, Wang QA, Terada LS, et al. Reductive carboxylation supports redox homeostasis during anchorage-independent growth. *Nature*. 2016;532(7598):255-258.

18. DeBerardinis RJ, Chandel NS. Fundamentals of cancer metabolism. *Sci Adv*. 2016;2(5):e1600200.

19. Kirabo A, Fontana V, de Faria AP, Loperena R, Galindo CL, Wu J, Bikineyeva AT, et al. DC isoketal-modified proteins activate T cells and promote hypertension. *The Journal of clinical investigation*. 2014;124(10):4642-4656.

20. Majka S, Hagen M, Blackwell T, Harral J, Johnson JA, Gendron R, Paradis H, et al. Physiologic and molecular consequences of endothelial Bmpr2 mutation. *Respir Res*. 2011;12:84.

【 0 0 9 4 】

21. Greene J, Henderson JW, Wikswo JP. Rapid and precise determination of cellular amino acid flux rates using HPLC with automated derivatization with absorbance detection. *Agilent Application Notes*. 2009.

22. Murphy TA, Young JD. ETA: robust software for determination of cell specific rates from extracellular time courses. *Biotechnol Bioeng*. 2013;110(6):1748-1758.

23. Shah AT, Demory Beckler M, Walsh AJ, Jones WP, Pohlmann PR, Skala MC. Optical metabolic imaging of treatment response in human head and neck squamous cell carcinoma. *PLoS One*. 2014;9(3):e90746.

24. Fessel JP, Flynn CR, Robinson LJ, Penner NL, Gladson S, Kang CJ, Wasserman DH, Hemnes AR, West JD. Hyperoxia synergizes with mutant bone morphogenic protein receptor 2 to cause metabolic stress, oxidant injury, and pulmonary hypertension. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2013;49(5):778-787.

10

20

30

40

50

25. Johnson JA, Hemnes AR, Perrien DS, Schuster M, Robinson LJ, Gladson S, Loibner H, et al. Cytoskeletal defects in Bmpr2-associated pulmonary arterial hypertension. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology.* 2012;302(5):L474-484.

【 0 0 9 5 】

26. Fares WH, Ford HJ, Ghio AJ, Aris RM. Safety and feasibility of obtaining wedged pulmonary artery samples and differential distribution of biomarkers in pulmonary hypertension. *Pulmonary circulation.* 2012;2(4):477-482.

27. Monahan K, Scott TA, Su YR, Lenneman CG, Zhao DX, Robbins IM, Hemnes AR. Reproducibility of intracardiac and transpulmonary biomarkers in the evaluation of pulmonary hypertension. *Pulmonary circulation.* 2013;3(2):345-349.

10

28. Skala MC, Riching KM, Gendron-Fitzpatrick A, Eickhoff J, Eliceiri KW, White JG, Ramanujam N. In vivo multiphoton microscopy of NADH and FAD redox states, fluorescence lifetimes, and cellular morphology in precancerous epithelia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2007;104(49):19494-19499.

29. Chance B, Schoener B, Oshino R, Itshak F, Nakase Y. Oxidation-reduction ratio studies of mitochondria in freeze-trapped samples. NADH and flavoprotein fluorescence signals. *The Journal of biological chemistry.* 1979;254(11):4764-4771.

20

30. Barlow CH, Harden WR, 3rd, Harken AH, Simson MB, Haselgrove JC, Chance B, O'Connor M, Austin G. Fluorescence mapping of mitochondrial redox changes in heart and brain. *Crit Care Med.* 1979;7(9):402-406.

【 0 0 9 6 】

31. Sanchez EL, Lagunoff M. Viral activation of cellular metabolism. *Virology.* 2015;479-480:609-618.

32. Hough KP, Chisom DA, Weinmann AS. Transcriptional regulation of T cell metabolism. *Mol Immunol.* 2015;68(2 Pt C):520-526.

33. Courtney R, Ngo DC, Malik N, Ververis K, Tortorella SM, Karagiannis TC. Cancer metabolism and the Warburg effect: the role of HIF-1 and PI3K. *Mol Biol Rep.* 2015;42(4):841-851.

30

34. Ryan JJ, Archer SL. The right ventricle in pulmonary arterial hypertension: disorders of metabolism, angiogenesis and adrenergic signaling in right ventricular failure. *Circulation research.* 2014;115(1):176-188.

35. Chen JQ, Russo J. Dysregulation of glucose transport, glycolysis, TCA cycle and glutaminolysis by oncogenes and tumor suppressors in cancer cells. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1826(2):370-384.

【 0 0 9 7 】

36. Tuder RM, Archer SL, Dorfmuller P, Erzurum SC, Guignabert C, Michela kis E, Rabinovitch M, Schermuly R, Stenmark KR, Morrell NW. Relevant issues in the pathology and pathobiology of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol.* 2013;62(25 Suppl):D4-12.

40

37. Pisarcik S, Maylor J, Lu W, Yun X, Undem C, Sylvester JT, Semenza GL, Shimoda LA. Activation of hypoxia-inducible factor-1 in pulmonary arterial smooth muscle cells by endothelin-1. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology.* 2013;304(8):L549-561.

38. Fijalkowska I, Xu W, Comhair SA, Janocha AJ, Mavrakis LA, Krishnamachary B, Zhen L, et al. Hypoxia inducible-factor1alpha regulates the metabolic shift of pulmonary hypertensive endothelial cells. *The American journal of pa*

50

thology. 2010;176(3):1130-1138.

39. Wise DR, Ward PS, Shay JE, Cross JR, Gruber JJ, Sachdeva UM, Platt JM, DeMatteo RG, Simon MC, Thompson CB. Hypoxia promotes isocitrate dehydrogenase-dependent carboxylation of alpha-ketoglutarate to citrate to support cell growth and viability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108(49):19611-19616.

40. Wise DR, DeBerardinis RJ, Mancuso A, Sayed N, Zhang XY, Pfeiffer HK, Nissim I, et al. Myc regulates a transcriptional program that stimulates mitochondrial glutaminolysis and leads to glutamine addiction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008;105(48):18782-18787.

【 0 0 9 8 】

41. Hosios AM, Hecht VC, Danai LV, Johnson MO, Rathmell JC, Steinhauser ML, Manalis SR, Vander Heiden MG. Amino Acids Rather than Glucose Account for the Majority of Cell Mass in Proliferating Mammalian Cells. *Dev Cell*. 2016;36(5):540-549.

42. Haigis MC, Deng CX, Finley LW, Kim HS, Gius D. SIRT3 is a mitochondrial tumor suppressor: a scientific tale that connects aberrant cellular ROS, the Warburg effect, and carcinogenesis. *Cancer Res*. 2012;72(10):2468-2472.

43. Finley LW, Carracedo A, Lee J, Souza A, Egia A, Zhang J, Teruya-Feldstein J, et al. SIRT3 opposes reprogramming of cancer cell metabolism through HIF1alpha destabilization. *Cancer cell*. 2011;19(3):416-428.

44. Paulin R, Dromparis P, Sutendra G, Gurtu V, Zervopoulos S, Bowers L, Harrony A, et al. Sirtuin 3 deficiency is associated with inhibited mitochondrial function and pulmonary arterial hypertension in rodents and humans. *Cell metabolism*. 2014;20(5):827-839.

45. Lane KL, Talati M, Austin E, Hemnes AR, Johnson JA, Fessel JP, Blackwell T, et al. Oxidative injury is a common consequence of BMPR2 mutations. *Pulmonary circulation*. 2011;1(1):72-83.

【 0 0 9 9 】

46. Diebold I, Hennigs JK, Miyagawa K, Li CG, Nickel NP, Kaschwich M, Cao A, et al. BMPR2 Preserves Mitochondrial Function and DNA during Reoxygenation to Promote Endothelial Cell Survival and Reverse Pulmonary Hypertension. *Cell metabolism*. 2015;21(4):596-608.

47. Fessel JP, Hamid R, Wittmann BM, Robinson LJ, Blackwell T, Tada Y, Tanabe N, Tatsumi K, Hemnes AR, West JD. Metabolomic analysis of bone morphogenic protein receptor type 2 mutations in human pulmonary endothelium reveals widespread metabolic reprogramming. *Pulmonary circulation*. 2012;2(2):201-213.

48. Xu W, Koeck T, Lara AR, Neumann D, DiFilippo FP, Koo M, Janocha AJ, et al. Alterations of cellular bioenergetics in pulmonary artery endothelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;104(4):1342-1347.

49. Lai YC, Tabima DM, Dube JJ, Hughan KS, Vanderpool RR, Goncharov DA, St Croix CM, et al. SIRT3-AMP-Activated Protein Kinase Activation by Nitrite and Metformin Improves Hyperglycemia and Normalizes Pulmonary Hypertension Associated With Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. *Circulation*. 2016;133(8):717-731.

50. Waypa GB, Osborne SW, Marks JD, Berkelhamer SK, Kondapalli J, Schumacker PT. Sirtuin 3 deficiency does not augment hypoxia-induced pulmonary

10

20

30

40

50

hypertension. American journal of respiratory cell and molecular biology. 2013;49(6):885-891.

【0100】

51. Nguyen TT, Caiot SW, Zackert WE, West JD, Zhu S, Aschner M, Fessel JP, Roberts LJ, 2nd. Scavengers of reactive gamma-ketoaldehydes extend *Caenorhabditis elegans* lifespan and healthspan through protein-level interactions with SIR-2.1 and ETS-7. *Aging (Albany NY)*. 2016.

52. Bertero T, Oldham WM, Cottrill KA, Pisano S, Vanderpool RR, Yu Q, Zhao J, et al. Vascular stiffness mechanoactivates YAP/TAZ-dependent glutaminolysis to drive pulmonary hypertension. *The Journal of clinical investigation*. 2016.

53. Schoors S, Bruning U, Missiaen R, Queiroz KC, Borgers G, Elia I, Zecchin A, et al. Fatty acid carbon is essential for dNTP synthesis in endothelial cells. *Nature*. 2015;520(7546):192-197.

【0101】

このように本発明を説明したが、本発明の範囲または意図から逸脱することなく本発明に様々な修正及び変形を加えることができるることは、当業者には明らかであろう。本発明の他の観点は、本明細書の考察及び本明細書に開示されている本発明の実施から当業者には明らかであろう。明細書及び実施例は例示としてのみ考慮されることを意図しており、本発明の真の範囲及び意図は特許請求の範囲及びその同等物によって示される。

10

20

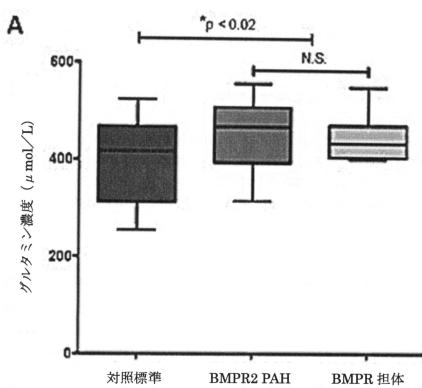
30

40

50

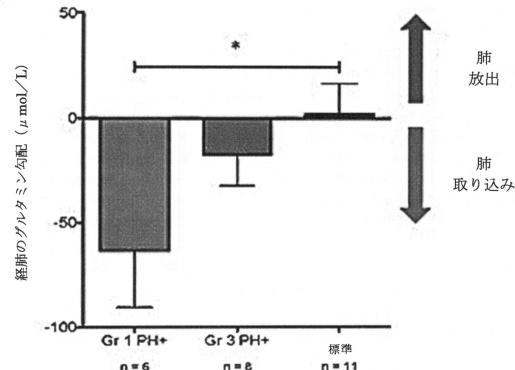
【义面】

【図 1 A】



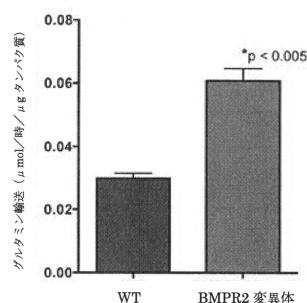
【 図 1 B 】

B



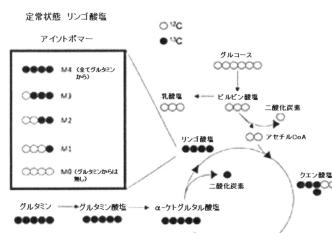
【図2A】

A

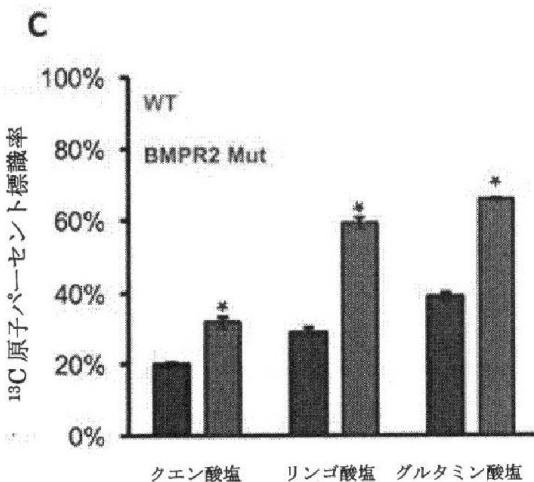


【図2B】

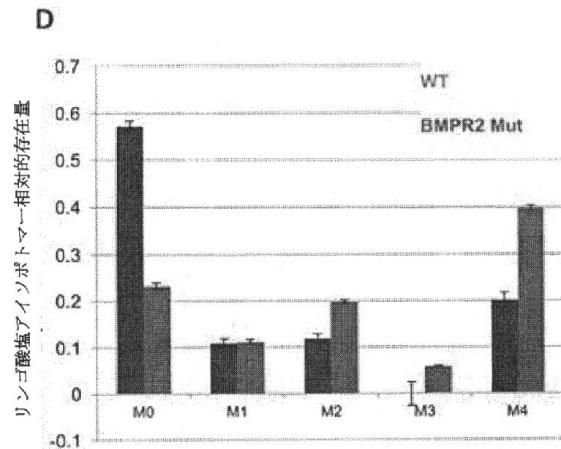
B



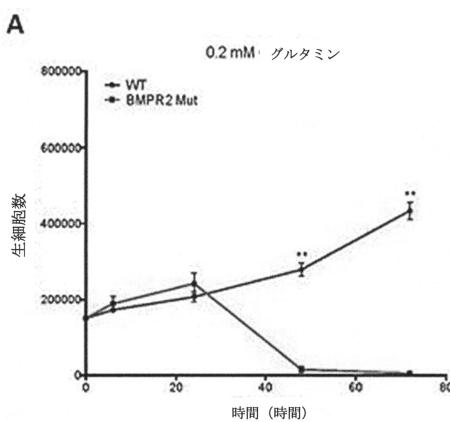
【図 2 C】



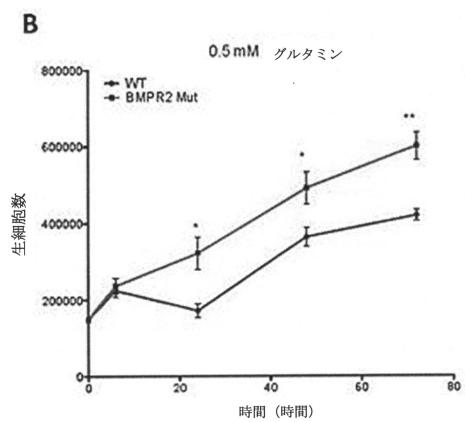
【図 2 D】



【図 3 A】



【図 3 B】



10

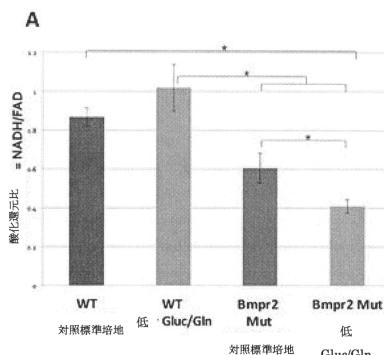
20

30

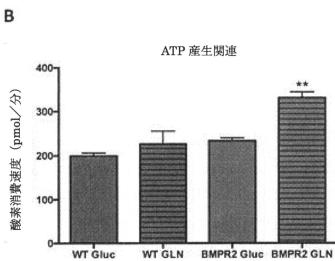
40

50

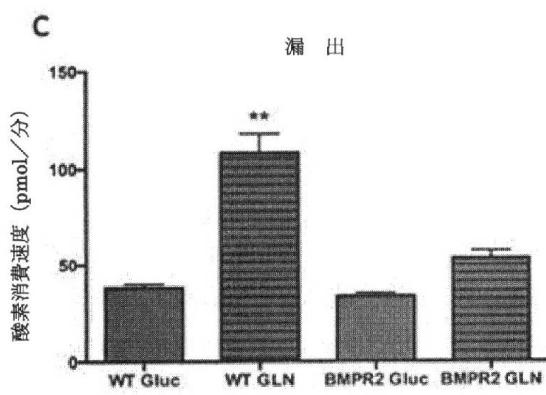
【図 4 A】



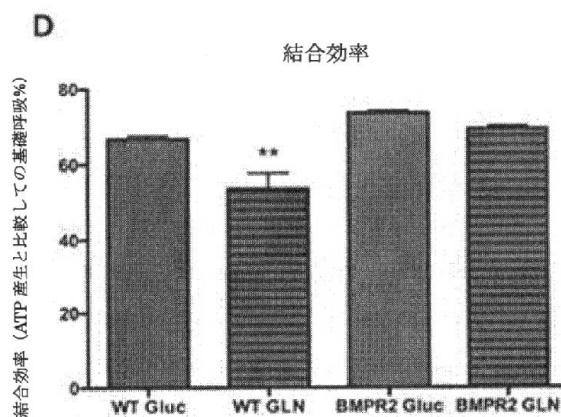
【図 4 B】



【図 4 C】



【図 4 D】



10

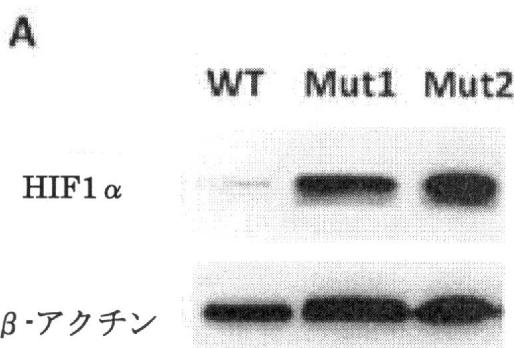
20

30

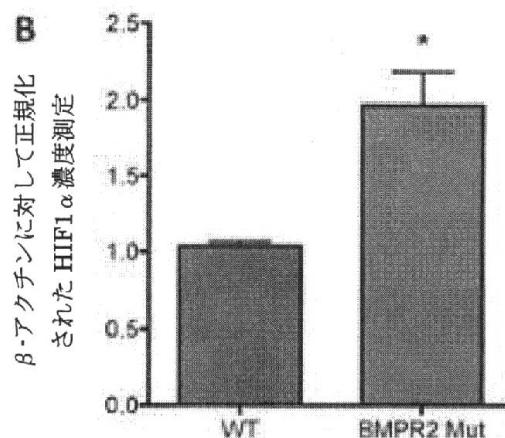
40

50

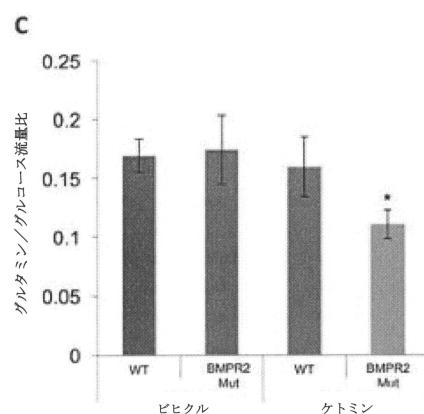
【図 5 A】



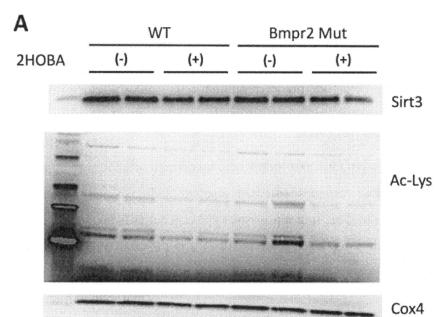
【図 5 B】



【図 5 C】



【図 6 A】



10

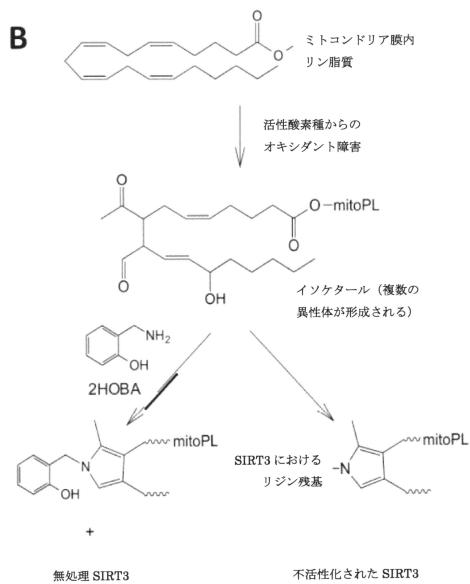
20

30

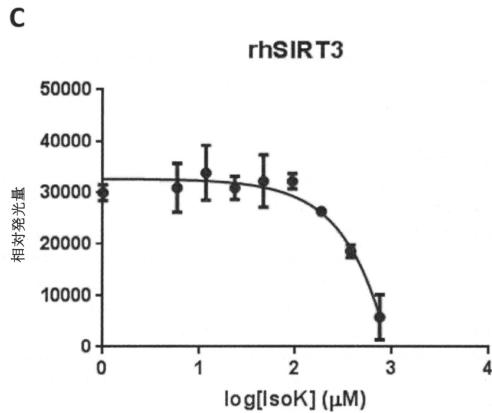
40

50

【図 6 B】



【図 6 C】

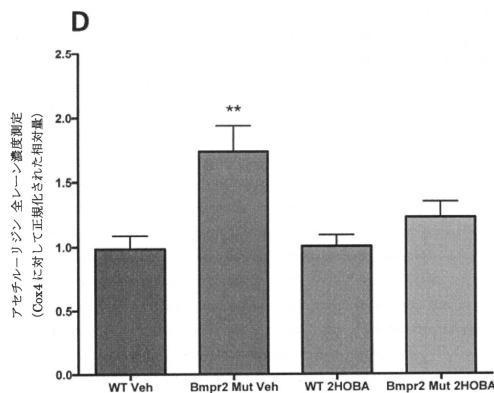


10

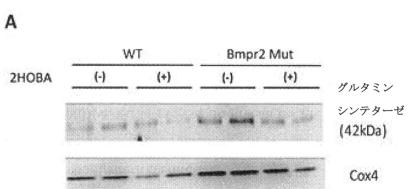
20

30

【図 6 D】



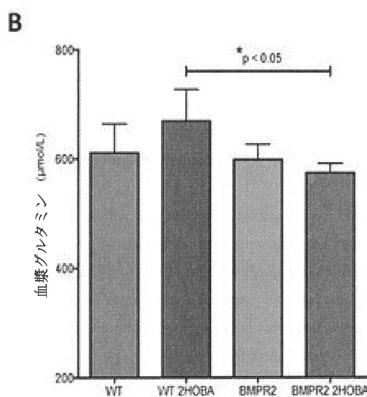
【図 7 A】



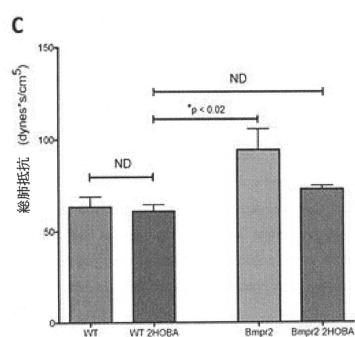
40

50

【図 7 B】

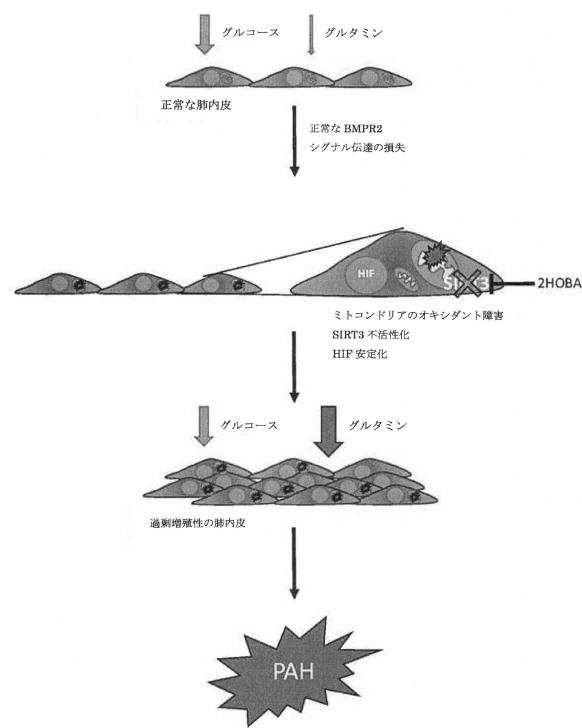


【図 7 C】

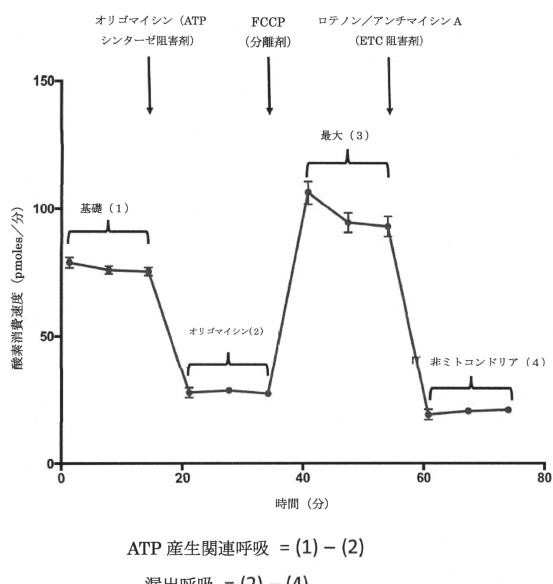


10

【図 8】



【図 9】



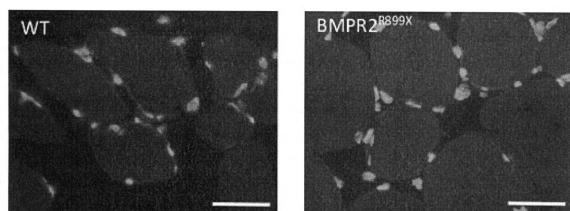
20

30

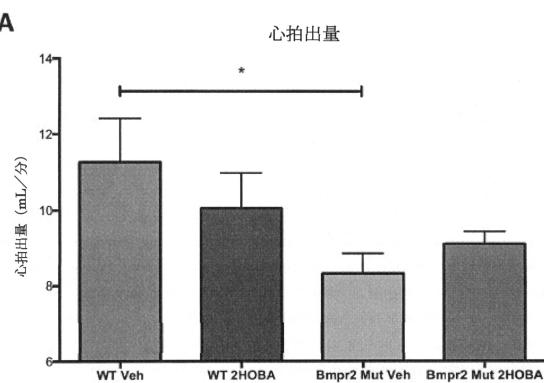
40

50

【図 1 0】

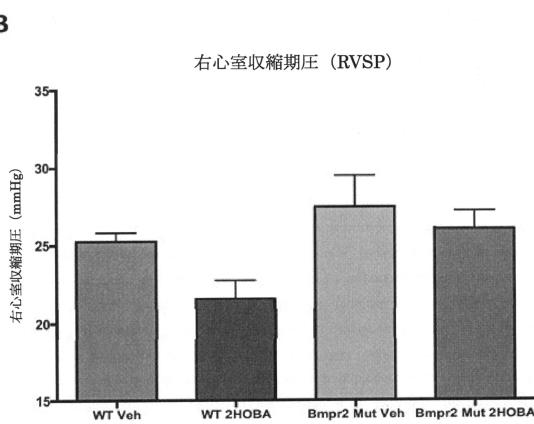


【図 1 1 A】

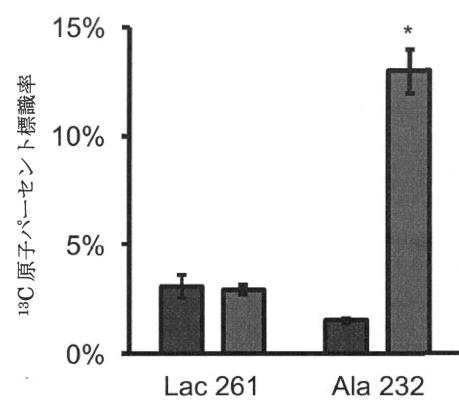


10

【図 1 1 B】



【図 1 2】



20

30

40

50

フロントページの続き

弁理士 野河 信太郎
(74)代理人 100159385
弁理士 甲斐 伸二
(74)代理人 100163407
弁理士 金子 裕輔
(74)代理人 100166936
弁理士 稲本 潔
(74)代理人 100174883
弁理士 富田 雅己
(74)代理人 100213849
弁理士 澄川 広司
(72)発明者 フェッセル, ジョシュア, ピー.
アメリカ合衆国、テネシー 37205、ナッシュビル、ブルック ホロウ ロード 860
(72)発明者 ロバーツ, エル., ジャクソン
アメリカ合衆国、テネシー 37066、ギャラティン、プランテーション ブールバード 965
(72)発明者 ウエスト, ジェームズ
アメリカ合衆国、テネシー 37221、ナッシュビル、ライトナー ドライブ 7409
審査官 金子 亜希
(56)参考文献 特表2014-524918 (JP, A)
米国特許出願公開第2012/0157501 (US, A1)
特表2006-521349 (JP, A)
国際公開第2015/127163 (WO, A1)
米国特許出願公開第2010/0172971 (US, A1)
米国特許出願公開第2012/0015501 (US, A1)
米国特許出願公開第2010/0017971 (US, A1)
Pulmonary Circulation, 2011年, 1(1), 72-83
Antioxid Redox Signal, 2013年, 18(14), 1789-1796
(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)
A 61 K 31 / 137
A 61 P 9 / 12
A 61 P 43 / 00
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)
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)