



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 115192719 B

(45) 授权公告日 2024.03.01

(21) 申请号 202210549523.6  
 (22) 申请日 2017.05.25  
 (65) 同一申请的已公布的文献号  
 申请公布号 CN 115192719 A  
 (43) 申请公布日 2022.10.18  
 (30) 优先权数据  
 62/341,848 2016.05.26 US  
 (62) 分案原申请数据  
 201780044719.7 2017.05.25  
 (73) 专利权人 匹兹堡大学 联邦高等教育系统  
 地址 美国宾夕法尼亚州  
 专利权人 布里格海姆妇女医院公司  
 (72) 发明人 S·Y·陈 T·贝尔泰罗  
 (74) 专利代理机构 北京三友知识产权代理有限公司 11127  
 专利代理师 肖轶 庞东成  
 (51) Int. Cl.  
 A61K 45/06 (2006.01)  
 A61P 11/00 (2006.01)

A61P 43/00 (2006.01)  
 A61P 9/00 (2006.01)  
 A61P 9/10 (2006.01)  
 A61P 9/12 (2006.01)  
 A61K 31/409 (2006.01)  
 A61K 31/473 (2006.01)  
 A61K 31/501 (2006.01)

(56) 对比文件

CA 2956256 A1, 2016.02.04  
 US 2005119330 A1, 2005.06.02  
 Bertero et al..Matrix remodeling promotes pulmonary hypertension through feedback mechanoactivation of the YAP/TAZ-miR-130/301 circuit.《Cell Rep》.2015, 第第13卷卷(第第5期期), 第1016-1032页.  
 刘斌;彭军.氧化应激和肺动脉高压血管重构.中国动脉硬化杂志.2011, (06), 第539-542页.

审查员 屈兴翠

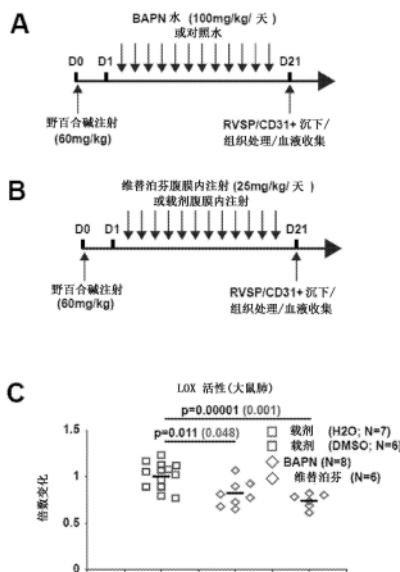
权利要求书1页 说明书34页  
 序列表6页 附图30页

(54) 发明名称

用于治疗肺血管疾病的组合物和方法

(57) 摘要

本发明涉及GLS1抑制组合物在治疗肺血管疾病中的应用,其包括向受试者施用治疗有效量的GLS1抑制组合物和/或YAP/TAZ抑制组合物。



1. GLS1抑制组合物在制备用于治疗肺血管疾病的药物中的应用,其中,所述肺血管疾病是肺高压,并且其中,所述GLS1抑制组合物是C968或CB-839或它们的盐。
2. 如权利要求1所述的应用,其中,所述肺高压是肺动脉高压。
3. 如权利要求1所述的应用,其中,所述GLS1抑制组合物与YAP/TAZ抑制组合物组合施用。
4. 如权利要求1所述的应用,其中,所述GLS1抑制组合物是C968或其盐。
5. 如权利要求1所述的应用,其中,所述GLS1抑制组合物是CB-839或其盐。
6. GLS1抑制组合物在制备用于减少肺血管硬化的药物中的应用,其中,所述GLS1抑制组合物是C968或CB-839或它们的盐。
7. 如权利要求6所述的应用,其中,所述GLS1抑制组合物与YAP/TAZ抑制组合物组合施用。
8. 如权利要求6所述的应用,其中,所述GLS1抑制组合物是C968或其盐。
9. 如权利要求6所述的应用,其中,所述GLS1抑制组合物是CB-839或其盐。

## 用于治疗肺血管疾病的组合物和方法

[0001] 本申请是分案申请,其原申请的国际申请号是PCT/US2017/034420,国际申请日是2017年05月25日,中国国家申请号为201780044719.7,进入中国的日期为2019年01月18日,发明名称为“用于治疗肺血管疾病的组合物和方法”。

### 技术领域

[0002] 本发明涉及肺血管疾病领域,更具体地涉及治疗肺血管疾病的组合物和方法。

[0003] 相关申请的交叉引用

[0004] 本申请要求2016年5月26日提交的美国临时专利申请序列号62/341,848的优先权,其公开内容明确地通过引用并入本文。

[0005] 政府资助声明

[0006] 本发明是在国立卫生研究院授予的拨款HL124021号的政府支持下完成的。政府拥有发明的某些权利。

### 背景技术

[0007] 肺高压(PH)及其特别严重的亚型肺动脉高压(PAH)是了解甚少的血管疾病,其特征在于促增殖细胞表型和不利的肺血管重塑。血管细胞外基质(ECM)的改变越来越多地被认为是PH的分子驱动因素。已经在末期和早期疾病(Bertero T等,Cell Reports.2015;13(5):1016-32)中和在近端和远端血管(Lammers S等,Compr Physiol.2012;2(1):295-319)中观察到失调的胶原蛋白和弹性蛋白产生(Mecham RP等,Science.1987;237(4813):423-6)。血管ECM的药理学靶向可以改善PH(Cowan K等,Nature Medicine.2000;6(6):698-702;Nave AH等,Arteriosclerosis,thrombosis,and vascular biology.2014;34(7):1446-58),但将ECM机械转导(即,使细胞能够感知和适应外部机械力的过程)与脉管系统联系起来的方法才刚刚出现。Hippo信号传导通路固有的两个相关的共转录因子YAP(Yes相关蛋白1)和TAZ(或WWTR1)由硬化ECM机械激活,并作为跨多个器官细胞增殖和存活的中枢调节剂起作用,从而调节组织生长和发育(Dupont S等,Nature.2011;474(7350):179-83;Pan D.Dev Cell.2010;19(4):491-505)。最近,确定肺血管硬化在疾病早期激活YAP/TAZ,从而诱导miR-130/301家族以进一步增强体内PH中的ECM重塑(Bertero T等,Cell Reports.2015;13(5):1016-32)。还确定ECM硬化驱动PH中的细胞增殖,但是虽然这些功能关联具有相当的重要性,但它们的分子机制仍然不清楚。

[0008] 另外,有氧糖酵解,即从线粒体氧化磷酸化到糖酵解的能量产生中的慢性转变,已被描述为PH中肺动脉内皮和平滑肌增殖和迁移的致病驱动者(Cottrill KA和Chan SY的综述,European J.of Clin.Invest.2013;43(8):855-65)。与此代谢转变相关的PH的先前机理研究曾经依赖于缺氧疾病模型(Paulin R和Michelakis ED.Circ.Res.2014;115(1):148-64;Zhao L等,Nature.2015;524(7565):356-60)。然而,与特发性或继发性疾病相关的许多形式的PH-亚型,例如诱病基因突变、先天性心脏病、硬皮病和人类免疫缺陷病毒(HIV)感染等等,其特征还在于显著的代谢失调而缺乏明显的缺氧性损伤。关于独立于PH中的直

接缺氧应激而运作的代谢功能障碍的分子调节剂的数据才刚刚出现 (Diebold I等, Cell Metabolism.2015;21(4):596-608)。

[0009] 考虑到这一观点,越来越多的证据表明YAP/TAZ活性与PH之外背景下的细胞代谢(包括与葡萄糖消耗和有氧糖酵解相关的过程)有着核心关联(Wang W等, Nat Cell Biol.2015;17(4):490-9;Mo JS等, Nat Cell Biol.2015;17(4):500-10;Enzo E等, EMBO J.2015;34(10):1349-70)。然而,仅糖酵解的增加不足以满足这种增殖细胞的总代谢需求。三羧酸(TCA)循环还通过氨基酸(例如谷氨酰胺)的氧化作为能量产生的主要来源(Le A等, Cell metabolism.2012;15(1):110-21)。TCA循环的持续起作用需要补充碳中间体。这种补充或回补(anaplerosis)通过两种主要途径实现:谷氨酰胺分解(通过谷氨酰胺酶[GLS]对谷氨酰胺进行脱酰胺化)和通过ATP依赖性丙酮酸盐羧化酶(PC)将丙酮酸盐羧化成草酰乙酸盐。具体而言,通过GLS活性的谷氨酰胺分解通过允许特别是在快速增殖的细胞中细胞能量、碳和氮的动员而有助于回补(Lunt SY和Vander Heiden MG. Annu Rev Cell Dev Biol.2011;27(441-64)),并且在已经将其代谢从氧化磷酸化转换为糖酵解以维持细胞生长和活力的转化细胞中充当关键过程(Zhao Y等, Cell Death Dis.2013;4(e532))。最近报道了在恶性细胞中谷氨酰胺酶(和/或丙酮酸盐羧化)支持天冬氨酸产生以直接诱导增殖的特别能力(Sullivan LB等, Cell.2015;162(3):552-63;Birsoy K等, Cell.2015;162(3):540-51)。在PH中,观察到衰竭的右心室心肌细胞中谷氨酰胺分解的失调(Piao L等, Journal of molecular medicine.2013;91(10):1185-97)。然而,尚未确定谷氨酰胺代谢的致病重要性,特别是在肺血管硬化的驱动下或在YAP/TAZ激活的情况下谷氨酰胺代谢的致病重要性。

## 发明内容

[0010] 本发明的主要目的在于提供用于治疗肺血管疾病的组合物和方法。

[0011] 在一方面,本发明提供了一种治疗肺血管疾病的方法,其包括施用GLS1抑制组合物。

[0012] 在一些实施方式中,肺血管疾病是肺高压或肺动脉高压。

[0013] 在一些实施方式中,GLS1抑制组合物是C968或CB-839、其盐、前药或衍生物。在其他或进一步的实施方式中,GLS1抑制组合物是C968、其盐、前药或衍生物。在其他或进一步的实施方式中,GLS1抑制组合物是CB-839、其盐、前药或衍生物。

[0014] 在一些实施方式中,GLS1抑制组合物与YAP/TAZ抑制组合物组合施用。

[0015] 在一些实施方式中,YAP/TAZ抑制组合物是维替泊芬、其盐、前药或衍生物。

[0016] 在另一方面,本发明提供了一种减少肺血管硬化的方法,其包括施用GLS1抑制组合物。

[0017] 在一些实施方式中,肺血管疾病是肺高压或肺动脉高压。

[0018] 在一些实施方式中,GLS1抑制组合物是C968或CB-839、其盐、前药或衍生物。在其他或进一步的实施方式中,GLS1抑制组合物是C968、其盐、前药或衍生物。在其他或进一步的实施方式中,GLS1抑制组合物是CB-839、其盐、前药或衍生物。

[0019] 在一些实施方式中,GLS1抑制组合物与YAP/TAZ抑制组合物组合施用。

[0020] 在一些实施方式中,YAP/TAZ抑制组合物是维替泊芬、其盐、前药或衍生物。

## 附图说明

[0021] 图1中的A-C显示由ECM硬化诱导的代谢转换通过YAP/TAZ的机械激活来协调。A) 免疫印迹分析证实了PAEC中2个独立siRNA序列对YAP和TAZ的敲低。B-E) PAEC在软或硬基质(stiff matrix)中培养。细胞内乳酸盐在硬基质中增加,但是这种增加由于YAP/TAZ的siRNA敲低而减弱(B)。在硬基质中,YAP/TAZ敲低也减弱了反映回补和糖酵解活性(B)以及乳酸盐/丙酮酸盐比率(C)的特定代谢物改变。数据表示为平均值±SEM(\*P<0.05;\*\*P<0.01,\*\*\*P<0.001)。比例尺,20μm(在PASMCM中发现了类似的结果,数据未显示)。

[0022] 图2中的A-H显示YAP/TAZ控制关键代谢酶的转录。A) 序列分析预测GLS1、LDHA和PC的启动子区域中TEAD结合位点(标记为A-D)的存在。B) ChIP-qPCR证实在GLS1、LDHA和PC启动子区域中存在TEAD/YAP结合位点。CTGF(已知的YAP靶标)用作阳性对照。结果表示为用抗YAP或抗IgG对照免疫沉淀之前的总输入DNA的百分比。C-E) RT-qPCR(C)连同免疫印迹(D)和光密度测定法(E)揭示,由于YAP/TAZ敲低,硬基质的PAEC中GLS1、LDHA和PC表达的增加被减弱。F-H) RT-qPCR(F)和免疫印迹/光密度测定(G-H)揭示,YAP(pYAP)增加软基质的PAEC中的GLS1、LDHA和PC表达。在所有小图中,指定对照组(在软基质上培养的siNC、pYAP)中的平均表达的倍数变化为1,将相关样品与其进行比较。数据表示为平均值±SEM(\*P<0.05;\*\*P<0.01,\*\*\*P<0.001)。比例尺,20μm(在PASMCM(外周动脉平滑肌细胞)中发现了类似的结果,数据未显示)。

[0023] 图3中的A-G显示GLS的药理学或遗传抑制使硬基质中谷氨酰胺分解的上调减弱。A-C) 在PAEC中,靶向LC-MS/MS显示GLS(BPTES或DON)的药理学抑制减弱了硬基质中代谢物表达的改变。具体而言,与硬基质对照(si-NC Stiff)相比,GLS1抑制增加了谷氨酰胺、丙酮酸盐和琥珀酸盐,降低了谷氨酸盐和天冬氨酸(A),并且降低了乳酸盐(B)以及乳酸盐/丙酮酸盐比率(C)。D) 免疫印迹分析证实了2个独立siRNA序列对GLS1的敲低。E-G) 在PAEC中,GLS1敲低减弱了硬基质中代谢物表达的改变,增加了谷氨酰胺、丙酮酸盐和琥珀酸盐;降低了谷氨酸盐和天冬氨酸盐(E);并降低了乳酸盐/丙酮酸盐比率(F-G)。在所有小图中,指定对照组(软基质)中的平均表达的倍数变化为1,将相关样品与其进行比较。数据表示为平均值±SEM(\*P<0.05;\*\*P<0.01,\*\*\*P<0.001)。

[0024] 图4中的A-I显示了在暴露于野百合碱的大鼠中机械转导的操作影响谷氨酰胺分解降低的肺血管增殖并防止PAH。A-B) 在野百合碱暴露后,每天用BAPN或载体(A)或每天腹膜内注射载体或维替泊芬(B)来治疗大鼠。C) BAPN和维替泊芬降低了暴露于野百合碱的大鼠肺内的LOX活性。D) 原子力显微镜揭示了在BAPN和维替泊芬治疗的大鼠中肺动脉(<100mm)硬化的降低。黑线表示中位数;符号表示单独的PA测量。E-F) PAH CD31+细胞的RT-qPCR揭示在BAPN和维替泊芬治疗的大鼠中CTGF和CYR61两个YAP/TAZ靶基因的降低以及GLS表达(E)和活性(F)的降低。G) 苏木精/曙红着色和共免疫荧光显微术揭示,与载体大鼠相比,在BAPN和维替泊芬治疗的大鼠中血管厚度和肌化减少以及YAP1+细胞减少、GLS1血管密度降低以及CD31/PCNA和α-SMA/PCNA双重阳性细胞减少。H-I) 维替泊芬和较低程度的BAPN改善PAH的严重性,如由RVSP(I)所定量。在所有小图中,指定对照组中的平均表达的倍数变化为1,将相关样品与其进行比较。\*P<0.05;\*\*P<0.01,\*\*\*P<0.001。比例尺,50μm。

[0025] 图5中的A-H显示了在暴露于野百合碱的大鼠中GLS的药理学抑制降低了谷氨酰胺分解和相关的肺血管细胞增殖。在野百合碱疾病诱导后,每天用腹膜内注射载体、C968或

CB839治疗大鼠,C968或CB839是在实验方案(A-B)的示意图中描述的GLSas的两种药理学抑制剂。C-D)C968(C)抑或CB839(D)降低了暴露于野百合碱的大鼠的肺中GLS的活性。E-H)共免疫荧光显微术揭示了在患病的肺动脉(载剂)中的Ki67/PCNA阳性增殖细胞。C968抑或CB839减少了 $\alpha$ -SMA+内侧(G-H)和CD31/vWF+内皮(E-F)区室(compartments)中Ki67/PCNA阳性细胞的数量。在所有小图中,指定对照组中的平均表达的倍数变化为1,将相关样品与其进行比较。数据表示为平均值 $\pm$ SEM(\* $P$ <0.05;\*\* $P$ <0.01,\*\*\* $P$ <0.001)。比例尺,50 $\mu$ m。

[0026] 图6中的A-H显示在暴露于野百合碱的大鼠中GLS的药理学抑制改善了PAH症状。在谷氨酰胺分解的预防实验(C968)或逆转研究抑制中野百合碱注射后,改善了PAH严重性,如通过血管重塑(A-B)、小动脉肌化(C-D)、RVSP(E-G)和右心室肥大(Fulton指数,RV/LV+S)(H)所定量的。在所有小图中,指定对照组中的平均表达的倍数变化为1,将相关样品与其进行比较。数据表示为平均值 $\pm$ SEM(\* $P$ <0.05;\*\* $P$ <0.01,\*\*\* $P$ <0.001)。比例尺,50 $\mu$ m。

[0027] 图7中的A-C显示GLS1的遗传或药理学抑制控制PAEC增殖而不是凋亡。A-C)将PAEC在软(1kPa)或硬(50kPa)基质上铺板并暴露于指定的处理。铺板后48小时定量细胞凋亡(AC)和增殖(BC)。A)酶促测定揭示,在软基质中血清耗竭后24小时半胱天冬酶3/7活性增加,并且在硬基质中以更小的程度增加。与对照处理(载剂对照;siRNA乱序对照,siNC)相比,在存在GLS1的药理学抑制剂(BPTES,C968)下或在通过两种独立的siRNA(si-GLS1\_1,siGLS1\_2)进行GLS1敲低后未观察到显著变化。B-C)如通过免疫荧光显微术(B)和定量(C)所揭示,增殖由于基质硬化而增加(如通过PCNA+染色所反映的),但由于药理学GLS1抑制而降低。细胞凋亡(如通过切割的半胱天冬酶-3染色所反映的,CC-3+)在软和硬条件下通过血清饥饿而增加,但不受GLS1抑制的影响。在所有小图中,指定对照组中的平均表达的倍数变化为1,将相关样品与其进行比较。数据表示为平均值 $\pm$ SEM(\* $P$ <0.05;\*\* $P$ <0.01,\*\*\* $P$ <0.001)。

[0028] 图8中的A-E显示,在罹患多种形式的PAH的人类患者中,外周小动脉纤维状胶原蛋白的增加与GLS、谷氨酰胺分解和天冬氨酸盐产生的增加相关。A-B)共免疫荧光显微术和定量揭示,在人PAH(n=6)中,外周小动脉纤维状胶原蛋白沉积的增加伴随着LDHA(A)和PC(B)表达的增加。这种染色进一步显示了患病肺小动脉中YAP1/LDHA(A)和YAP1/PC(B)双重阳性细胞的增加。C)这些变化伴随着内侧( $\alpha$ -SMA+)和内皮(vWF+)区室中增殖的肺血管细胞(Ki67+)的增加以及血管凋亡细胞(CC-3+)的显著减少。D-E)在丛状损伤中观察到类似的变化。

[0029] 图9中的A-L显示谷氨酰胺分解维持经激活PAAF的代谢需求以构建患病前(pro-diseased)细胞外基质。A-C)BPTES、C968抑或CB839对GLS1的药理学抑制减弱了在硬基质上培养的PAAF的代谢活化,如通过降低的谷氨酰胺分解(A)、糖酵解(B)和天冬氨酸盐产生(C)所反映的。D-E)BPTES、C968或CB839对GLS1的药理学抑制降低了在促炎细胞因子(EDN1、IL6或TGF- $\beta$ )刺激时的PAAF依赖性ECM重塑。F)RT-qPCR揭示C968或CB839对GLS1的抑制降低了TGF- $\beta$ 诱导的ECM相关基因表达以及成纤维细胞活化标记物( $\alpha$ -SMA)。G-H)通过天狼星红染色的纤维状胶原蛋白可视化(G)和定量(H)证实,在GLS1抑制剂存在下通过活化的PAAF(TGF- $\beta$ )减少了ECM重塑。I-M)在指定的处理下培养PAAF。除去细胞并在由PAAF合成的基质上培养肺动脉内皮细胞(PAEC)。PCNA染色(I)和定量揭示,与对照(TGF- $\beta$ )相比,在用TGF- $\beta$ +GLS1抑制剂处理的PAAF重塑的基质上增殖细胞(PCNA+)减少。在相同条件下,RT-qPCR揭

示与对照 (TGF- $\beta$ ) 相比,在由用TGF- $\beta$ +GLS1抑制剂处理的PAAF合成的基质上培养的PAEC使促炎细胞因子基因表达 (J-L) 降低。数据表示为一式三份进行的至少3次独立实验的平均值  $\pm$  SEM (\*P<0.05, §P<0.01, #P<0.001)。通过双尾学生t检验比较配对样本,而单因素ANOVA和事后Tukey检验用于组比较。

[0030] 图10中的A-F显示ECM重塑或GLS1的药理学抑制揭示了ECM硬化和谷氨酰胺分解之间的反馈回路。A-D) 在野百合碱暴露后,每日用BAPN (n=8) 与载剂 (A-B; n=7) 或每天腹膜内注射单独的维替泊芬 (n=6) 与单独的载剂 (CD; n=6) 来处理大鼠。如通过RT-qPCR所评估的, BAPN和维替泊芬均降低野百合碱暴露大鼠的肺中GLS1的表达。E-F) 在野百合碱暴露后,每日用CB839 (n=8) 与载剂 (E-F; n=7) 处理大鼠。原子力显微术 (F) 揭示在CB839处理的大鼠的肺小动脉 (<100 $\mu$ m直径) 硬化降低。水平线表示中位数;符号表示个体肺动脉测量。在所有小图中,指定对照组中的平均表达的倍数变化为1,将相关样品与其进行比较。通过双尾学生t检验比较配对样本,而单因素ANOVA和事后Tukey检验用于组比较 (\*P<0.05, #P<0.001)。

### 具体实施方式

[0031] 本文提供了用于治疗受试者中肺血管疾病的组合物和方法,其包括向受试者施用治疗有效量的YAP/TAZ抑制组合物和/或GLS1抑制组合物。在一些实施方式中,YAP/TAZ抑制组合物是维替泊芬、其盐、前药或衍生物。在其他或进一步的实施方式中,GLS1抑制组合物是CB-839、其盐、前药或衍生物。贯穿本申请使用的术语应被解释为具有本领域普通技术人员的普通和典型含义。然而,申请人期望以下术语被给予如下定义的特定定义。

[0032] 定义

[0033] 如在说明书和权利要求书中所使用的,单数形式“一种”、“一个”和“所述”包括复数指代,除非上下文明确地另有说明。例如,术语“一个细胞”包括多个细胞,包括其混合物。

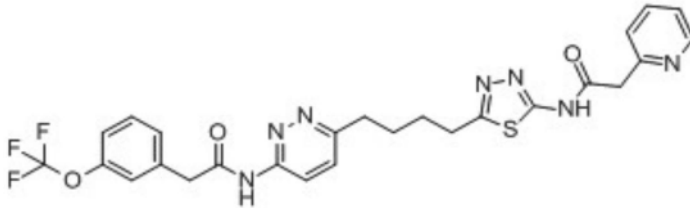
[0034] 术语“施用”是指口服、局部、静脉内、皮肤、皮下、经皮、透皮、肌肉内、关节内、胃肠外、小动脉内、皮内、心室内、颅内、腹膜内、病灶内、鼻内、直肠、阴道、通过吸入或经由植入储库进行的施用。术语“胃肠外”包括皮下、静脉内、肌肉内、关节内、滑膜内、胸骨内、鞘内、肝内、病灶内和颅内注射或输注技术。在一个实施方式中,施用是静脉内施用。

[0035] 范围在本文中 can 表示为从“约”一个特定值,和/或至“约”另一个特定值。当表达这样的范围时,另一方面包括从一个特定值和/或至另一个特定值。类似地,当通过使用先行词“约”将值表示为近似值时,将理解该特定值形成另一方面。将进一步理解,每个范围的端点相对于另一个端点都是重要的,并且独立于另一个端点。还应理解,本文公开了许多值,并且除了值本身之外,每个值在本文中也公开为“约”该特定值。例如,如果公开了值“10”,则还公开了“约10”。还应理解,当公开一个值时,则还公开了“小于或等于”该值,“大于或等于该值”,并且还公开了值之间的可能范围,如本领域技术人员适当理解的。例如,如果公开了值“10”,则还公开了“小于或等于10”以及“大于或等于10”。还应理解,在整个本申请中,数据以多种不同格式提供,并且该数据表示数据点的任何组合的端点和起始点和范围。例如,如果公开了特定数据点“10”和特定数据点“15”,则应理解为公开了大于10和15,大于或等于10和15,小于10和15,小于或等于10和15,并且等于10和15以及10至15。还应该理解,还公开了两个特定单元之间的每个单元。例如,如果公开了10和15,则还公开了11、

12、13和14。

[0036] 术语“CB-839”在本文中是指具有如下所示和/或如美国专利号8,604,016和/或美国专利号8,865,718中所述的化学结构的化学成分。

[0037]



[0038] “组合物”旨在包括活性剂(例如,维替泊芬和/或CB-839组分)和另一化合物或组合物的组合,所述另一种化合物或组合物是惰性(例如,可检测的试剂或标记)或活性的,例如佐剂。

[0039] 如本文所用,术语“包含”旨在表示组合物和方法包括所列举的要素,但不排除它们。当用于定义组合物和方法时,“基本上由.....组成”意味着排除对组合具有任何重要意义的其他要素。因此,基本上由本文定义的要素组成的组合物将不排除来自分离和纯化方法的痕量污染物和药学上可接受的载体,例如磷酸盐缓冲盐水、防腐剂等。“由.....组成”是指排除超出痕量要素的其他成分和用于施用本发明组合物的实质性方法步骤。由这些过渡术语中的每一个定义的实施方式都在本发明的范围内。

[0040] “对照”是用于比较目的的实验的替代主题或样品。对照可以是“阳性”或“阴性”的。

[0041] 术语“疾病”是指受试者的一部分、器官或全身的异常状况,其由各种原因(例如感染、炎症、环境因素或遗传缺陷)导致并且特征在于可识别的征兆和/或症状。在一些实施方式中,疾病是癌症。

[0042] “有效量”是足以实现有益效果或期望结果的量。有效量可以一次或多次施用、应用或按剂量给药。

[0043] 术语“GLS1抑制组合物”在本文中是指当施用于受试者或血管细胞时使GLS1(部分或全部)减少或失活的任何组合物。在一些实施方式中,术语“GLS1抑制组合物”在本文中是指当施用于受试者或血管细胞时使GLS1减少或失活的并且还治疗肺高压、肺动脉高压和/或血管硬化的任何组合物。GLS1抑制组合物的非限制性实例是如本文所述的CB-839、C-968、DON和BPTES。

[0044] 术语“GLS1”在本文中是指GLS1多肽,也称为谷氨酰胺酶,人类中的K-谷氨酰胺酶由GLS基因编码。术语“GLS1多核苷酸”是指编码GLS1的多核苷酸,并且包括GLS基因的全部或其片段。在一些实施方式中,GLS1多肽或多核苷酸是如下在一个或多个公共可获得的数据库中认定的那些:HGNC:4331;Entrez Gene:2744;Ensembl:ENSG00000115419;OMIM:138280;和UniProtKB:094925。在一些实施方式中,GLS1多核苷酸编码包含SEQ ID NO:3(称为KGA同种型)的序列的GLS1多肽,或与SEQ ID NO:3具有约80%以上、约85%以上、约90%以上、约95%以上或约98%以上同源性的多肽序列,或含有SEQ ID NO:3的一部分的多肽。SEQ ID NO:3的GLS1多肽可以代表成熟TAZ的未成熟形式或预处理形式,因此,本文包括的是SEQ ID NO:3中GLS多肽的成熟或处理部分。在一些实例中,GLS1多肽是GAC同种型,其中其序列与SEQ ID NO:3的不同之处如下:551-669:VKSVINLLFA...TVHKNLDGLL→



HSFGPLDYES...YRMESLGEKS。

[0045] 用于治疗目的的“哺乳动物”是指被分类为哺乳动物的任何动物,包括:人类;家养和农场动物;非人灵长类动物;动物园动物、体育动物或宠物动物,例如狗、马、猫、牛等。

[0046] “药物组合物”旨在包括活性剂与药学上可接受的载剂(惰性或活性)的组合,使得该组合物适于体内或离体的诊断或治疗用途。

[0047] 术语“药学上可接受的载体”是指可用于制备药物组合物的载体或赋形剂,其通常是安全且无毒的,并且包括兽医和/或人类药物用途可接受的载体。如本文所用,术语“药学上可接受的载体”包括任何标准药物载体,例如磷酸盐缓冲盐水溶液、水和乳液(例如油/水或水/油乳液),以及各种类型的润湿剂。如本文所用,术语“载体(carrier)”包括任何赋形剂、稀释剂、填充剂、盐、缓冲剂、稳定剂、增溶剂、脂质、稳定剂或本领域熟知的用于药物制剂的其他材料,如下文进一步描述的。药物组合物还可以包括防腐剂。如说明书和权利要求书中所用的“药学上可接受的载体”包括一种和多于一种这样的载体。

[0048] 术语“药物有效量”、“治疗有效量”或“治疗有效剂量”是指组合物(例如YAP/TAZ抑制组合物和/或GLS1抑制组合物)的量,其将引起研究人员、兽医、医生或其他临床医师正在寻求的组织、系统、动物或人的生物或医学响应。在一些实施方式中,期望的响应是治疗血管疾病,例如肺高压、肺动脉高压和/或肺血管硬化。这种治疗可以通过确定右心室收缩压(RVSP)、右心室肥大(Fulton指数, RV/LV+S)、血管重塑和小动脉肌化中的一种或多种来定量。

[0049] 在一些情况下,在数天、数周或数年的时间内向受试者施用多剂量的组合物后,实现了期望的生物或医学响应。术语“药物有效量”、“治疗有效量”或“治疗有效剂量”包括组合物(例如YAP/TAZ抑制组合物和/或GLS1抑制组合物)的量,当施用时,其足以防止所治疗疾病的一种或多种症状的发展或在一定程度上减轻所治疗疾病的一种或多种症状。根据组合物(例如YAP/TAZ抑制组合物和/或GLS1抑制组合物)、疾病及其严重程度、施用途径、施用时间、排泄速率、药物组合、治疗医师的判断、剂型以及待治疗受试者的年龄、体重、一般健康状况、性别和/或饮食,治疗有效量将变化。在本方法的上下文中,YAP/TAZ抑制组合物和/或GLS1抑制组合物的药学有效量或剂量或者治疗有效量或剂量包括足以治疗肺高压、肺动脉高压和/或肺血管硬化的量。

[0050] 如本文所用的术语“预防”、“防止”、“阻止”及其语法变体,是指下述方法,其部分或完全延缓或避免疾病和/或一种或多种其伴随症状的发作或复发,或者阻止受试者获得或重新获得疾病,或者降低受试者获得或重新获得疾病或其一种或多种其伴随症状的风险。

[0051] 术语“肺血管疾病”在本文中用于指肺血管性高血压,并且包括肺高压(PH)和肺动脉高压(PAH)。肺血管疾病可由肺血管硬化引起和/或包括肺血管硬化。

[0052] “盐”是指本文公开的化合物的两性离子形式,其为如本文所定义的水溶性或油溶性或可分散的和治疗上可接受的。盐可以在化合物的最终分离和纯化过程中制备,或者通过使游离碱形式的适当化合物与合适的酸反应而单独制备。合适的盐的列表可参见Remington's Pharmaceutical Sciences,第20版,Lippincott Williams&Wilkins, Baltimore, MD, 2000, 704页;和"Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use," P. Heinrich Stahl和Camille G. Wermuth编, Wiley-VCH, Weinheim,

2002。盐的实例包括但不限于矿物质或碱性残基(例如胺)的有机酸盐;或酸性残基(例如羧酸)的碱式盐或有机盐。

[0053] 代表性的酸加成盐包括乙酸盐、己二酸盐、藻酸盐、L-抗坏血酸盐、天冬氨酸盐、苯甲酸盐、苯磺酸盐(besylate)、硫酸氢盐、丁酸盐、樟脑酸盐、樟脑磺酸盐、柠檬酸盐、二葡萄糖酸盐、甲酸盐、富马酸盐、龙胆酸盐、戊二酸盐、甘油磷酸盐、乙醇酸盐、半硫酸盐、庚酸盐、己酸盐、马尿酸盐、盐酸盐、氢溴酸盐、氢碘酸盐、2-羟基乙磺酸盐(羟乙基磺酸盐)、乳酸盐、马来酸盐、丙二酸盐、DL-扁桃酸盐、均三甲苯磺酸盐、甲磺酸盐、萘磺酸盐、烟酸盐、2-萘磺酸盐、草酸盐、双羟萘酸盐、果胶酸盐、过硫酸盐、3-苯丙酸盐、膦酸盐、苦味酸盐、新戊酸盐、丙酸盐、焦谷氨酸盐、琥珀酸盐、磺酸盐、酒石酸盐、L-酒石酸盐、三氯乙酸盐、三氟乙酸盐、磷酸盐、谷氨酸盐、碳酸氢盐、对甲苯磺酸盐(对甲基苯磺酸盐)和十一酸盐。此外、本文公开的化合物中的碱性基团可以用以下季铵化:甲基、乙基、丙基和丁基氯化物、溴化物和碘化物;二甲基、二乙基、二丁基和二戊基硫酸盐;癸基、月桂基、肉豆蔻基和甾醇基(steryl)氯化物、溴化物和碘化物;以及苄基和苯乙基溴化物。可用于形成治疗上可接受的加成盐的酸的实例包括无机酸,例如盐酸、氢溴酸、硫酸和磷酸;和有机酸,例如草酸、马来酸、琥珀酸和柠檬酸。盐也可以通过化合物与碱金属或碱土金属离子的配位形成。因此、可以形成本文公开的化合物的钠、钾、镁和钙盐等。

[0054] 碱加成盐可以在化合物的最终分离和纯化过程中通过使羧基与合适的碱(例如金属阳离子的氢氧化物、碳酸盐或碳酸氢盐)或者与氨或有机伯、仲或叔胺反应来制备。治疗上可接受的盐的阳离子包括锂、钠、钾、钙、镁和铝,以及无毒的季铵阳离子如铵、四甲铵、四乙铵、甲胺、二甲胺、三甲胺、三乙胺、二乙胺、乙胺、三丁胺、吡啶、N,N-二甲基苯胺、N-甲基哌啶、N-甲基吗啉、二环己胺、普鲁卡因、二苄胺、N,N-二苄基苯乙胺、1-二苄基甲胺和N,N'-二苄基乙二胺。用于形成碱加成盐的其它代表性有机胺包括乙二胺、乙醇胺、二乙醇胺、哌啶和哌嗪。

[0055] “前药”是指在生理条件下转化为治疗活性化合物的化合物。前药以非活性(或显著较低活性)形式施用。一旦施用,前药在身体内(体内)代谢成活性化合物。本文公开的某些化合物也可以作为前药存在,如在Hydrolysis in Drug and Prodrug Metabolism: Chemistry, Biochemistry, and Enzymology (Testa, Bernard and Mayer, Joachim M. Wiley-VHCA, Zurich, Switzerland 2003)中所述。本文所述化合物的前药是化合物的结构修饰形式,其在生理条件下易于发生化学变化以提供化合物。另外,前药可以通过化学或生物化学方法在离体中转化为化合物。例如,当将前药置于具有合适的酶或化学试剂的透皮贴剂储库中时,前药可以缓慢地转化为化合物。前药通常是有用的,因为在某些情况下,它们比化合物或原型药物更容易施用。例如,它们可以通过口服施用而生物可利用,而原型药物则不是。与原型药物相比,前药还可以在药物组合物中具有改善的溶解度。本领域已知多种前药衍生物,例如依赖于前药的水解切割或氧化活化的那些。前药的一个实例(但不限于此)是下述化合物:其作为酯(“前药”)施用,然后代谢水解成羧酸,即活性实体。另外的实例包括化合物的肽基衍生物。

[0056] 用于选择和制备合适的前药的方法例如在以下中提供:T.Higuchi和V.Stella, “Prodrugs as Novel Delivery Systems,”第14卷,ACS Symposium Series,1975; H.Bundgaard, Design of Prodrugs, Elsevier, 1985和Bioreversible Carriers in Drug

Design, Edward Roche 编, American Pharmaceutical Association and Pergamon Press, 1987. 活性化合物的前药可以是常规酯。一些用作前药的常规酯是苯基酯、脂族 ( $C_7-C_8$  或  $C_8-C_{24}$ ) 酯、胆固醇酯、酰氧基甲基酯、氨基甲酸酯和氨基酸酯。优选地, 本文公开的化合物的前药是药学上可接受的。

[0057] 术语“受试者”在本文定义为包括动物, 例如哺乳动物, 包括但不限于灵长类动物(例如, 人)、牛、绵羊、山羊、马、狗、猫、兔、大鼠和小鼠等。在一些实施方式中, 受试者是人。

[0058] 如本文所用, 术语“取代的”包括有机化合物的所有允许的取代基。在广义方面, 允许的取代基包括有机化合物的无环和环状、支链和非支链、碳环和杂环以及芳族和非芳族取代基。说明性取代基包括例如下面描述的那些。允许的取代基可以是一种或多种(例如, 称为“二取代的”, “三取代的”等), 并且对于合适的有机化合物可以是相同或不同的。出于本公开内容的目的, 杂原子(例如氮和氧)可具有氢取代基和/或本文所述的有机化合物的任何允许的取代基, 其满足杂原子的化合价。本公开内容不旨在以任何方式受限于有机化合物的允许取代基。此外, 术语“取代”或“被……取代”包括隐含的条件, 即这种取代与取代的原子和取代基的允许的价态一致, 并且取代产生稳定的化合物, 例如不会例如通过重排、环化, 消除等而自发地进行转化的化合物。此外, 如本文所用, “取代”或“被……取代”意指包括其中一个取代基与另一个取代基稠合的构型。例如, 被芳基取代的芳基(或反之亦然)可以表示一个芳基通过单个 $\sigma$ 键与第二个芳基键合, 也可以指两个芳基稠合, 例如, 一个芳基的两个碳与另一个芳基的两个碳是共享的。

[0059] 如本文中所使用的术语“治疗”、“处理”、“处置”及其语法变体, 包括部分或完全延缓、缓解、减轻或减少疾病的一种或多种伴随症状的强度, 和/或缓解、减轻或阻碍疾病的一个或多个起因。根据本发明的治疗可以预防性地、防治性地, 逐步地或补救性地应用。向受试者在发作前(例如, 在疾病的明显征兆之前), 在早期发作期间(例如, 在疾病的初始征兆和症状时)或在疾病确定发展后施用预防性治疗。预防性施用可在感染症状出现之前数天至数年进行。在一些情况下, 术语“治疗”、“处理”、“处置”及其语法变化, 包括与治疗受试者之前相比或者与一般或研究群体中此类症状的发生率相比, 部分或完全降低肺高压、肺动脉高压和/或血管硬化。可以减少5%、10%、20%、30%、40%或更多。

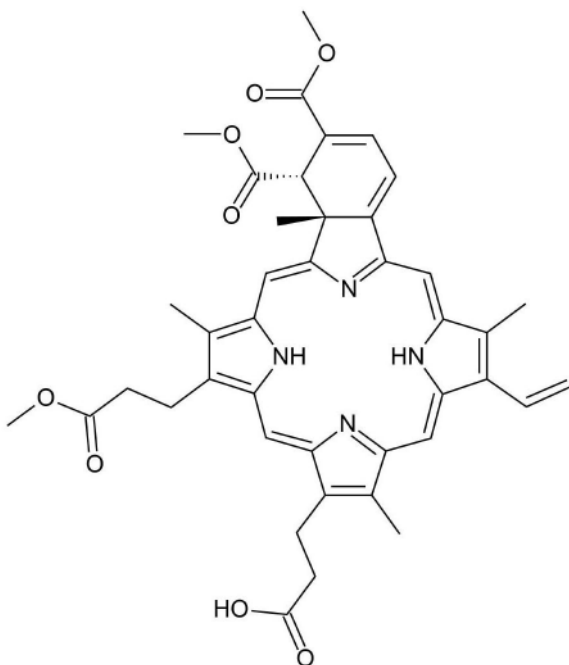
[0060] 术语“YAP/TAZ抑制组合物”在本文中是指当施用于受试者或血管细胞时, 使YAP和/或TAZ中的成分减少或灭活的任何组合物。在一些实施方式中, 术语“YAP/TAZ抑制组合物”在本文中是指当施用于受试者或血管细胞时使YAP和/或TAZ减少或灭活导致肺高压、肺动脉高压和/或血管硬化降低的任何组合物。

[0061] 术语“TAZ”在本文中是指也称为WWTR1或含有WW结构域的转录调节蛋白1的多肽。术语“TAZ多核苷酸”是指编码TAZ/WWTR1的多核苷酸并且包括TAZ/WWTR1基因的全部或其片段。在一些实施方式中, TAZ/WWTR1多肽或多核苷酸是如下在一个或多个公开可获得的数据库中鉴定的那些: HGNC: 24042; Entrez Gene: 25937; Ensembl: ENSG0000018408; OMIM: 607392; 和UniProtKB: Q9GZV5。在一些实施方式中, TAZ多核苷酸编码包含SEQ ID NO: 1的序列的TAZ多肽, 或与SEQ ID NO: 1具有约80%以上、约85%以上、约90%以上、约95%以上或约98%以上同源性的多肽序列, 或含有SEQ ID NO: 1的一部分的多肽。SEQ ID NO: 1的TAZ多肽可以代表成熟TAZ的未成熟形式或预处理形式, 因此, 本文包括的是SEQ ID NO: 1中TAZ多肽的成熟或经处理部分。

[0062] 术语“YAP”在本文中是指也称为YAP1、Yes-相关蛋白1或Yap65的YAP多肽,并且在人类中,由YAP1基因编码。术语“YAP多核苷酸”是指编码YAP的多核苷酸,并且包括YAP1基因的全部或其片段。在一些实施方式中,YAP多肽或多核苷酸是如下在一个或多个公开可获得的数据库中鉴定的那些:HGNC:16262;Entrez Gene:10413;Ensembl:ENSG00000137693;OMIM:606608;和UniProtKB:P46937。在一些实施方式中,YAP多核苷酸编码包含SEQ ID NO:2的序列的YAP多肽,或与SEQ ID NO:2具有约80%以上、约85%以上、约90%以上、约95%以上或约98%以上同源性的多肽序列,或含有SEQ ID NO:2的一部分的多肽。SEQ ID NO:2的YAP多肽可以代表成熟YAP的未成熟形式或预处理形式,因此,本文包括的是SEQ ID NO:2中YAP多肽的成熟或经处理部分。

[0063] 术语“维替泊芬”在本文中是指下述化学组成,其化学名称为3-[(23S,24R)-14-乙炔基-5-(3-甲氧基-3-氧代丙基)-22,23-双(甲氧基羰基)-4,10,15,24-四甲基-25,26,27,28-四氮杂六环[16.6.1.1<sup>3,6</sup>.1<sup>8,11</sup>.1<sup>13,16</sup>.0<sup>19,24</sup>]二十八烷-1,3,5,7,9,11(27),12,14,16,18(25),19,21-十二烷-9-基]丙酸,化学结构如下所示,和/或如美国专利号5,707,608、美国专利号5,798,345和/或美国专利号5,756,541中所述。

[0064]



[0065] 化合物和组合物

[0066] 本文公开了用于治疗肺高压、治疗肺动脉高压、降低血管硬化和/或抑制YAP/TAZ和/或GLS1-介导的途径的化合物。用于治疗肺高压、治疗肺动脉高压、降低血管硬化和/或抑制YAP/TAZ和/或GLS1-介导的途径的化合物可以是维替泊芬、CB-839或其前药、衍生物、盐、溶剂化物或其组合。含有一种或多种本文所述化合物的药物组合物可使用药学上可接受的载体制备。“药学上可接受的”载体是适合由人和/或动物使用而没有与合理的益处/风险比相称的过度不良副作用(例如毒性、刺激和过敏反应)的载体。载体是药物组合物中除活性成分之外存在的所有组分。载体可包括但不限于稀释剂、粘合剂、润滑剂、崩解剂、pH调节剂、防腐剂、抗氧化剂、溶解度增强剂、稳定剂、表面活性剂和包被组合物。

[0067] 稀释剂,也称为“填充剂”,通常是增加固体剂型的体积所必需的,从而提供实际尺寸以用于压制片剂或形成珠和颗粒。合适的稀释剂包括但不限于二水合磷酸二钙、硫酸钙、

乳糖、蔗糖、甘露醇、山梨糖醇、纤维素、微晶纤维素、高岭土、氯化钠、干淀粉、水解淀粉、预胶化淀粉、二氧化硅、氧化钛、镁铝硅酸盐和糖粉。

[0068] 粘合剂用于为固体剂型制剂赋予内聚性质,从而确保片剂或珠或颗粒在剂型形成后保持完整。合适的粘合剂材料包括但不限于淀粉;预胶化淀粉;明胶;糖(包括蔗糖、葡萄糖、右旋糖、乳糖和山梨糖醇);聚乙二醇;蜡;天然和合成树胶,例如阿拉伯树胶;黄蓍胶;藻酸钠;纤维素,包括羟丙基甲基纤维素、羟丙基纤维素、乙基纤维素;和硅酸镁铝;和合成聚合物,例如丙烯酸和甲基丙烯酸共聚物、甲基丙烯酸共聚物、甲基丙烯酸甲酯共聚物、氨基烷基甲基丙烯酸酯共聚物、聚丙烯酸/聚甲基丙烯酸和聚乙烯吡咯烷酮。

[0069] 润滑剂用于促进片剂制造。合适的润滑剂的实例包括但不限于硬脂酸镁、硬脂酸钙、硬脂酸、山萘酸甘油酯、聚乙二醇、滑石和矿物油。

[0070] 崩解剂用于促进施用后剂型崩解或“分解”,并且可以包括但不限于,淀粉、淀粉羟乙酸钠、羧甲基淀粉钠、羧甲基纤维素钠、羟丙基纤维素、预胶化淀粉、粘土、纤维素、藻蛋白碱(alginine)、树胶或交联聚合物,例如交联PVP(来自GAF Chemical Corp的Polyplasdone XL)。

[0071] 稳定剂用于抑制或延迟药物分解反应,所述分解反应可包括例如氧化反应。

[0072] 表面活性剂可以是阴离子、阳离子、两性或非离子表面活性剂。合适的阴离子表面活性剂可包括但不限于含有羧酸根、磺酸根和硫酸根离子的阴离子表面活性剂。阴离子表面活性剂的实例包括长链烷基磺酸盐和烷基芳基磺酸的钠、钾、铵盐,例如十二烷基苯磺酸钠;磺基琥珀酸二烷基钠,例如十二烷基苯磺酸钠;二烷基磺基琥珀酸钠,例如双-(2-乙硫基)-磺基琥珀酸钠;和烷基硫酸盐,例如十二烷基硫酸钠。阳离子表面活性剂包括但不限于季铵化合物,例如苯扎氯铵、苜素氯铵、西曲溴铵、硬脂基二甲基苄基氯化铵、聚氧乙烯和椰子胺。非离子表面活性剂的实例包括乙二醇单硬脂酸酯、丙二醇肉豆蔻酸酯、甘油单硬脂酸酯、甘油基硬脂酸酯、聚甘油-4-油酸酯、脱水山梨糖醇酰化物、蔗糖酰化物、PEG-150月桂酸酯、PEG-400单月桂酸酯、聚氧乙烯单月桂酸酯、聚山梨醇酯、聚氧乙烯辛基苯基醚、PEG-1000十六烷基醚、聚氧乙烯十三烷基醚、聚丙二醇丁基醚、POLOXAMER™ 401、硬脂酰单异丙醇酰胺和聚氧乙烯氢化牛脂酰胺。两性表面活性剂的实例包括N-十二烷基-β-丙氨酸钠、N-月桂基-β-亚氨基二丙酸钠、肉豆蔻酰两性乙酸盐、月桂基甜菜碱和月桂基磺基甜菜碱。

[0073] 包被组合物可以包括增塑剂、颜料、着色剂、稳定剂和助流剂。合适的包被材料的实例包括但不限于纤维素聚合物,例如乙酸邻苯二甲酸纤维素、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、邻苯二甲酸羟丙基甲基纤维素和乙酸琥珀酸羟丙基甲基纤维素;聚乙酸乙烯酯邻苯二甲酸酯、丙烯酸聚合物和共聚物,以及可以以商品名EUDRAGIT™ (Roth Pharma, Westerstadt, 德国) 商购的甲基丙烯酸树脂、玉米醇溶蛋白(zein)、虫胶和多糖。

[0074] 本文公开的化合物和组合物可以全身施用(例如静脉内或口服施用),可选地与药学上可接受的载体(例如惰性稀释剂)或可同化的口服递送用可食用载体组合施用。它们可以封装在硬壳或软壳明胶胶囊中,可以压制成片剂,或者直接引入患者饮食的食物中。对于口服治疗施用,活性化合物可与一种或多种赋形剂组合,并以可摄取的片剂、口含片、锭剂、胶囊、酞剂、悬浮剂、糖浆、糯米纸囊剂(wafers)和气溶胶喷雾剂等形式使用。

[0075] 片剂、锭剂、丸剂和胶囊等也可含有以下物质:粘合剂,例如黄蓍胶、阿拉伯树胶、玉米淀粉或明胶;赋形剂,例如磷酸二钙;崩解剂,例如玉米淀粉、马铃薯淀粉,藻酸等;润滑

剂,例如硬脂酸镁;并且可以加入甜味剂,例如蔗糖、果糖、乳糖或阿斯巴甜;或者调味剂,例如薄荷、冬青油或樱桃调味剂。当单位剂型是胶囊时,除了上述类型的物质外,它还可以含有液体载剂,例如植物油或聚乙二醇。各种其他材料可以作为包衣存在或以其他方式改变固体单位剂型的物理形式。例如,片剂、丸剂或胶囊可以包被有明胶、蜡、虫胶或糖等。糖浆或酞剂可含有活性化合物、作为甜味剂的蔗糖或果糖,作为防腐剂的羟苯甲酸甲酯和对羟基苯甲酸丙酯,染料和调味剂,例如樱桃或橙子调味剂。当然,用于制备任何单位剂型的任何材料应该是药学上可接受的并且在使用的量下基本上无毒。此外,可以将活性化合物引入缓释制剂和装置中。

[0076] 本文公开的化合物和组合物,包括其药学上可接受的盐、水合物、前药或衍生物,可以通过输注或注射而静脉内、肌内或腹膜内施用。活性剂或其盐的溶液可以在水中制备,可选地与无毒表面活性剂混合。分散液也可以在甘油、液体聚乙二醇、三醋精及其混合物中和在油中制备。在通常的储存和使用条件下,这些制品可含有防腐剂以防止微生物的生长。

[0077] 适于注射或输注的药物剂型可包括无菌水溶液或分散液或包含活性成分的无菌粉末,其适于临时制备无菌可注射或可输注溶液或分散液,可选地包封在脂质体中。最终剂型应在制造和储存条件下无菌,流动且稳定。液体载体或载剂可以是溶剂或液体分散介质,包括例如水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇、液体聚乙二醇等),植物油、无毒甘油酯及其合适的混合物。例如,通过形成脂质体,通过在分散体的情况下保持所需的粒径或通过使用表面活性剂,可以保持适当的流动性。可选地,可以通过各种其他抗菌剂和抗真菌剂,例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、山梨酸、硫柳汞等来防止微生物的作用。在许多情况下,优选包括等渗剂,例如糖,缓冲剂或氯化钠。通过包含延迟吸收的试剂,例如单硬脂酸铝和明胶,可以实现可注射组合物的延长吸收。

[0078] 通过将本文公开的化合物和/或试剂以及必要时上面列举的各种其他成分一起以所需的量引入适当的溶剂中,然后过滤灭菌,从而制备无菌可注射溶液。在用于制备无菌可注射溶液的无菌粉末的情况下,优选的制备方法是真空干燥和冷冻干燥技术,其产生活性成分的粉末加上先前无菌过滤的溶液中存在的任何其他所需成分。

[0079] 本文公开的化合物和组合物,包括其药学上可接受的盐、水合物、前药或衍生物,可以以控释制剂形式施用。此类组合物可以影响本发明蛋白质和衍生物的物理状态、稳定性、体内释放速率以及体内清除速率。参见,例如,Remington's Pharmaceutical Sciences,第21版(2005,Lippincott,Williams&Wilins,Baltimore,Md.21201),889-964页;和“Pharmaceutical dosage form tablets”,Lieberman等编(New York,Marcel Dekker,Inc.,1989)。这些参考文献提供了关于用于制备片剂和胶囊的载剂、材料、设备和方法以及片剂、胶囊和颗粒的延迟释放剂型的信息。

[0080] 控释组合物可在组合物施用后全身短期或长期释放。该组合物可以以液体形式、干燥粉末(例如,冻干)形式制备,或作为聚合物装置(棒、圆柱、薄膜、圆盘)制备。基质可以是微粒的形式,例如微球,其中活性剂分散在固体聚合物基质或微胶囊内,其中核心是与聚合物壳不同的材料,并且活性剂分散或悬浮在核心中,其性质上可以是液体或固体。作为选择,聚合物可以铸造成薄的平板或薄膜(范围从纳米到4厘米),通过研磨或其他标准技术生产的粉末,或甚至凝胶,例如水凝胶。

[0081] 尽管优选可生物降解的基质,但是不可生物降解或可生物降解的基质均可用于递

送所公开的化合物。这些可以是天然或合成聚合物。基于期望释放的时间选择聚合物。在某些情况下,线性释放可能是最有用的,但在其他情况下,脉冲释放或“大量释放”可以提供更有效的结果。聚合物可以是水凝胶的形式(通常吸收高达约90%重量的水),并且可以可选地与多价离子或聚合物交联。

[0082] 基质可以通过溶剂蒸发、喷雾干燥、溶剂萃取和本领域技术人员已知的其他方法形成。可以使用为制备药物递送用微球体而开发的任何方法来制备可生物侵蚀的微球体,例如,如以下所述:Mathiowitz和Langer, *J Controlled Release*, 1987, 5:13-22; Mathiowitz等, *Reactive Polymers*, 1987, 6:275-283; 和Mathiowitz等, *J. Appl. Polymer Sci*, 1988, 35:755-774。

[0083] 本文公开的化合物和组合物,包括其药学上可接受的盐、水合物、前药或衍生物,可以引入允许通过扩散或浸出机制释放的惰性基质中,例如膜或树胶。也可以将缓慢崩解的基质引入制剂中。控释的另一种形式是其中药物被包封在半透膜中的形式,所述半透膜允许水进入并且由于渗透作用而将药物通过单个小开口推出。对于口服制剂,释放的位置可以是胃、小肠(十二指肠、空肠或回肠)或大肠。优选地,通过保护活性剂(或衍生物)或通过活性剂释放到胃环境之外(例如在肠中),释放将避免胃环境的有害作用。为了确保完全的胃抵抗力,肠溶包衣(即,到至少pH 5.0不渗透)是必需的。这些包衣可以用作混合膜或作为胶囊,例如从Banner Pharmacaps可获得的那些。

#### [0084] 方法

[0085] 本文还提供了在需要此类治疗的受试者中治疗血管疾病、肺高压和/或肺动脉高压、降低血管硬化和/或抑制YAP/TAZ-和/或GLS1-介导的途径的方法。该方法可以包括向受试者施用治疗有效量的一种或多种本文所述的化合物或组合物。在一些实例中,该方法包括向受试者施用治疗有效量的维替泊芬或包含其的药物组合物。在一些实例中,该方法包括向受试者施用治疗有效量的维替泊芬、其盐、前药或衍生物或者他们的组合。在其他或进一步的实例中,该方法包括向受试者施用治疗有效量的CB-839或包含其的药物组合物。在一些实例中,该方法可以包括施用治疗有效量的CB-839。因此,本文包括施用治疗有效量的维替泊芬和CB-839的方法,其治疗有效性可归因于两种组合物的施用。

[0086] 这些方法反映的本文提供的新结果表明,在有氧糖酵解的环境下,YAP/TAZ机械激活与协调增殖的细胞能量需求所需的谷氨酰胺分解酶GLS1存在关键联系。这种分子认知推动血管硬化的范式超出了仅仅是血流动力学对血管顺应性影响的研究,而是作为血管重塑和PH发展的特定代谢原因。通过揭示出谷氨酰胺代谢和有氧糖酵解通过经由YAP/TAZ的共享调节层级而整体联系,这些结果还改变了除直接缺氧损伤之外PH本身中失调代谢轴的根本理解。最后,通过将谷氨酰胺分解作为细胞外环境如何决定肺血管功能障碍的中心机制,这些结果形成了开发靶向YAP1-GLS1轴的新型治疗药物的基础,或更可能是将PH已经批准的药物重新定位。

[0087] 最近的工作提出了下述概念,即PH中的血管硬化是PH的早期有力致病触发因素。然而,除了与血管增生的关联之外,还缺乏受这种机械刺激影响的下游分子途径的详细表征。此外,虽然之前的研究已经证明PH中存在严重的线粒体和代谢功能障碍,但这种代谢事件的复杂起始触发因素是难以捉摸的,特别是那些超出缺氧损伤直接后果的那些因素。迄今为止,已知此类代谢表型部分地受缺氧驱动,通过丙酮酸脱氢酶激酶(PDK)介导的丙酮酸

脱氢酶抑制导致糖酵解开关。更近期的数据将非编码RNA、骨形态发生蛋白受体2型 (BMPR 2) 的功能丧失以及sirtuin 3缺陷与PH中的全脑线粒体功能障碍 (global mitochondrial dysfunction) 关联起来。此处, 将谷氨酰胺分解鉴定为机械激活过程并且受与有氧糖酵解的共调节推进了对在PH的代谢性重编程中看到的调节层级的理解。硬化和代谢之间的这种界面与和基质重塑相关的肿瘤中提出的相关重编程事件相似。通过其与代谢失调的直接因果关系, 它强化了血管硬化的范式作为该疾病的起始致病触发因素, 而不仅仅是终末期特征。

[0088] 阐明将血管硬化与谷氨酰胺分解和增殖相关联的功能连接还提供了在PH的起始和发展期间多种血管细胞类型之间细胞增殖、迁移和细胞凋亡之间相互作用的基本见解。如在其他生物学背景中所述, 响应于硬化基质和YAP/TAZ活化的增加的谷氨酸分解和回补回应了维持过度增殖状态的关键代谢需要, 特别是在PASMCM中, 并因此驱动PH中的病理性血管重塑。除了PASMCM之外, 最近还描述了YAP/TAZ-microRNA-130/301反馈环, 由此通过机械激活接触相邻硬化基质的初始成纤维细胞, 基质硬化增强并扩散通过肺血管系统并且可能甚至肺实质。鉴于目前的研究结果暗示YAP/TAZ通过谷氨酰胺分解活化, 成纤维细胞中的谷氨酰胺分解和回补可能与基质硬化和重塑有内在关联。

[0089] 另一方面, 硬化和谷氨酰胺分解的作用在控制仍未完全描述的PH中PAEC功能障碍方面可能更复杂。迄今为止, 据认为PAEC凋亡在触发PH发病机制中起着起始性的早期的作用。然后, 起始的EC凋亡产生了对疾病进展至关重要的过度增殖和致病性PAEC的单独群体。这种PAEC细胞凋亡和增殖的时空平衡最初由Voelkel及其同事等描述。该发现与PAEC凋亡动力学模型一致, 表明起始一轮损伤和凋亡之后紧随YAP/TAZ-GLS1激活和谷氨酰胺分解, 从而其后促进PAEC的增殖。值得注意的是, 正如其他人所报道的, 即使在PH开始后的稍后时间点, 该模型也不排除持续的PAEC凋亡, 特别是在进展更缓慢的PH的情况下。然而, 这些凋亡事件必须在除增殖组分以外的细胞中发生, 这种增殖组分据我们发现当显性血管硬化和谷氨酰胺分解是更为明显时在更严重PH的模型中更为普遍。这种增殖可以反映PH早期阶段PAEC周转率的增加(以在大鼠中D3-D7野百合碱注射后表示, 数据未显示), 其中凋亡和增殖的平衡在PAEC群体中更明显。然而, 在严重PH的更后期阶段, 当YAP1和GLS1上调持续时, PAEC增殖相对于凋亡的优势是明确的。该发现与观察到的PAH中人丛状血管损伤相关(数据未显示), 其中YAP上调和谷氨酰胺分解过程伴随PAEC样细胞的明显过度生长。即使在内皮层没有明显过度生长的环境中, 过度增殖、抗凋亡的PAEC也可能被重新编程以用于内皮至间充质转换, 该过程现在已经直接与PH发病机制相关联, 并且其中进一步增殖将允许内皮细胞反馈进入内侧层(而不是简单的内膜)增生。最后, 与PAEC中增加的增殖能力相关联时, 这些发现还揭示了由基质硬化和YAP-GLS1轴促进的促迁移表型(数据未显示)。已经在人丛状血管损伤中观察到增殖和迁移的紊乱, 并且最近对PH中的过度增殖性PAEC的研究描述了伴随的迁移表型。这种紊乱的迁移可能导致PH中的异常血管生成: 在某些情况下, 这与肺小动脉的促血管生成和致病性重塑有关, 而在其他情况下则与血管生成缺陷并进而与整个肺血管树的修剪有关。因此, 本文所述的结果将血管硬化、YAP/TAZ-GLS1轴和谷氨酰胺分解置于PH发病机理的中心点, 其以精确定时和阶段特异性的方式影响多个肺血管细胞表型。

[0090] 作为谷氨酰胺分解的中枢介质的YAP/TAZ的机械活化也促进了通过Hippo信号传导对代谢的复杂控制的一般性理解。值得注意的是, 数据表明, 至少在对基质硬化的内源性



响应的情况下,YAP和TAZ一起而不是单独地对于GLS1、LDHA和PC表达是必需的(图2C-E)。然而,因为单独YAP1的过表达可以增加这些下游基因(图2F-H),论断出YAP1对于这种表型是足够的,并且可能在调节谷氨酰胺分解方面具有一些冗余功能。然而,当TAZ在基质硬化过程中也上调时,这种冗余并不明显,因此表明YAP与TAZ的活性呈现出优先的伙伴关系,以允许在硬化条件下诱导谷氨酰胺分解。此外,先前研究已经暗示细胞能量状态通过AMP激酶活化或经由有氧糖酵解直接促进YAP/TAZ的转录活性而作为YAP活性的有效调节剂。甲羟戊酸代谢也可以激活Rho GTP酶,其进而使YAP/TAZ去磷酸化。值得注意的是,特别是在谷氨酰胺合酶(GS)表达可能占优的肝中,已报道了YAP活性和GS之间的联系。然而,在其他组织隔室(例如肺血管系统)中,作为YAP/TAZ对代谢信号的响应的观点的补充,这些研究结果更直接地将这些因素定义为重编程糖酵解和谷氨酰胺分解途径并协调细胞增殖的机械传感器。YAP/TAZ与上游和下游代谢线索之间的这种相互作用表明该途径固有的可调节的反馈驱动特性,并且可能部分地负责代谢程序的个体化“调整”,这取决于ECM重塑、PH亚型、严重程度或时间阶段的负担。此外,鉴于影响YAP/TAZ的已知环境线索的扩展库,Hippo信号传导的代谢作用可能延伸到比仅血管硬化或PH更广泛的影响范围。当然,在器官发育和肿瘤发生的背景下,不禁会推测Hippo信号传导对谷氨酰胺分解和糖酵解的主要调节作用是平衡增殖能力与有效能量产生的主要机制。

[0091] 将谷氨酰胺分解鉴定为PH致病表型的关键介质,使得将注意力转移到本该疾病中除有氧糖酵解之外的基本调节性代谢检查点。将GLS1鉴定为节点控制点,强调了谷氨酰胺分解和回补作为通常隐藏在PH的发病机理和癌症之间的全局相似性的关键分子决定因素。这些发现也可以表明,可能涉及谷氨酰胺处理的其他方面,例如谷氨酰胺转运蛋白。此外,除了GLS1之外,两种额外的酶(LDHA和丙酮酸羧化酶)在此被鉴定为硬化介导的糖酵解和回补改变的关联检查点(图1),表明对PH中代谢全况的更广泛的控制水平,其有待将来表征。

[0092] YAP/TAZ-GLS轴与HIV-PAH的机械关联还有助于对于这种未解PH形式的发病机理的认知。PAH的患病率在HIV感染个体中增加,但对HIV-PAH的分子发病机制知之甚少。通过建立在继发于HIV或SIV感染的PAH的灵长类动物和人类模型中YAP/TAZ和GLS的作用,这些发现提供了期待已久的证据,除了组织病理学关联之外,PAH的该亚型中的分子和细胞病理表型与其他PAH形式重叠,并且可以适合用类似的靶向治疗剂治疗。

[0093] 最后,鉴定PH中谷氨酰胺分解的机械活化为在PH中开发新的临床管理策略奠定了基础。到目前为止,二氯乙酸对PDK的药理学抑制一直是PH临床研究中最突出的代谢靶向策略。本文所述的结果表明,与基质重塑和谷氨酰胺分解有关的一系列功能相关靶标显示出在PH中进一步治疗开发的希望。在暴露于野百合碱的大鼠中利用BAPN对PH的血流动力学和组织学指标的改善增强了在PH发病机理中胶原蛋白交联和ECM重塑的重要性,并且与先前抑制慢性缺氧PH中Lox(赖氨酰氧化酶)的研究一致。然而,单独治疗上使用特定的Lox抑制剂可能产生适度的疗效(即改善右心室重塑,图4),这可能归因于其他几种可能显示出冗余或补充性功能的赖氨酰氧化酶的重要性。然而,当与下游YAP1-GLS1代谢轴的靶向偶联时,可能出现抑制肺血管增殖和重塑的加合性或可能的协同性治疗益处。考虑到在肺血管系统中除甚至改变HIPPO信号传导的代谢之外的多个潜在有益效果,以及当单独使用YAP1抑制剂维替泊芬时严重啮齿动物PH的稳健改善(图4),对于YAP1而言这可能尤为显著。

[0094] 所述化合物或组合物最初可以合适的剂量施用,所述剂量可根据临床响应根据需

要进行调整。例如,如在动物试验中确定的初步剂量和用于人类施用的剂量的缩放是根据本领域公认的实践进行的。例如,用于将小鼠和其他动物中的有效剂量外推至人类的方法是本领域已知的;例如,参见美国专利号4,938,949, Freireich等, *Cancer Chemother Reports*, 1966, 50(4):219-244。毒性和治疗功效可通过细胞培养物或实验动物中的标准药理学方法确定,例如,用于确定LD<sub>50</sub>(对50%群体致死的剂量)和ED<sub>50</sub>(在50%群体中治疗有效的剂量)的标准药理学方法。毒性效果和治疗效果之间的剂量比是治疗指数,并且可以表示为LD<sub>50</sub>/ED<sub>50</sub>的比率。在一些实例中,使用表现出大治疗指数的组合物。

[0095] 最初可以从细胞培养测定估计治疗有效剂量。可以在动物模型中配制剂量以实现循环血浆浓度范围,其包括如在细胞培养测定或动物模型中测定的IC<sub>50</sub>(即,实现症状的半最大抑制的治疗化合物的浓度)。血浆中的水平可以例如通过ELISA或HPLC测量。可以通过合适的生物测定来监测任何特定剂量的影响。剂量的实例是:约0.1×IC<sub>50</sub>,约0.5×IC<sub>50</sub>,约1×IC<sub>50</sub>,约5×IC<sub>50</sub>,10×IC<sub>50</sub>,约50×IC<sub>50</sub>,约100×IC<sub>50</sub>。

[0096] 本文所述的化合物的治疗有效量的实例为约1μg/kg至约40mg/kg,这取决于化合物和症状的严重程度。适当的治疗有效剂量可由治疗临床医师选择,并且在一些实例中,范围大约为约1μg/kg至约40mg/kg,约1μg/kg至约25mg/kg,约1μg/kg至约10mg/kg,约10μg/kg至约1mg/kg,约10μg/kg至约100μg/kg,或约100μg/kg至约1mg/kg。另外,在实施例中指出动物中的某些特定剂量。

[0097] 对于维替泊芬而言,有效量的范围可以为约1mg/kg至约50mg/kg(例如,约2.5mg/kg至约30mg/kg或约10mg/kg至约25mg/kg)。如本领域技术人员所认识到的,有效剂量也将取决于施用途径、赋形剂的使用,以及与其他治疗性治疗(包括使用其他治疗剂)共同使用的可能性而变化。在一些实例中,维替泊芬、其盐、前药或其衍生物、或它们的组合的治疗量有效量为每天约10mg/kg至25mg/kg。

[0098] 对于C-968和CB839而言,有效量的范围可以为约1mg/kg至约30mg/kg(例如,约2.5mg/kg至约20mg/kg或从约5mg/kg至约15mg/kg)。如本领域技术人员所认识到的,有效剂量也将取决于施用途径、赋形剂的使用,以及与其他治疗性治疗(包括使用其他治疗剂)共同使用的可能性而变化。在一些实例中,C-968或CB839、其盐、前药、或其衍生物、或它们的组合的治疗有效量为每天约10mg/kg。

[0099] 剂量可以由医师确定,并根据需要调整以适应观察到的治疗效果。组合物可以以推注剂量给予,以在给药后最长时间内使循环水平最大化。在推注剂量后也可以使用连续输注。在一些实例中,化合物或组合物可以分别以2、3、4或6个相等剂量的单独施用而施用。例如,每天约25mg/kg可以以2、3、4或6个相等剂量的单独施用而施用。在另一实例中,每天约10mg/kg可以以2、3、4或6个相等剂量的单独施用而施用。

[0100] 本文所述的化合物或组合物适合短期和长期使用。如本文所用,“短期使用”可以指向患者施用不超过约20个剂量的所公开的化合物或组合物。因此,如本文所用,术语“长期使用”可以指向患者施用超过约20个剂量的所公开的化合物或组合物。

[0101] 所述化合物和组合物可以单独施用或与一种或多种另外的治疗剂组合施用,例如用于治疗伤害感觉、炎症、功能或神经性疼痛或抗炎剂的镇痛剂。当单独施用时,一种或多种另外的治疗剂可以产生或不产生治疗效果,但当与任何所公开的化合物或组合物一起施用时,导致这种效果(例如,疼痛减轻)。

[0102] 本文所述的一种或多种另外的治疗剂和化合物和组合物可以以任何顺序施用,包括同时施用,以及间隔长达数天的时间间隔。一种或多种另外的试剂和本文所述的化合物和组合物的施用可以是相同或不同的途径。在一些实例中,一种或多种另外的试剂可与本文所述的化合物和组合物组合。

[0103] 还应该理解,前文涉及本发明的优选实施方式,并且可以在其中进行许多改变而不脱离本发明的范围。通过以下实例进一步说明本发明,所述实例不应以任何方式解释为对其范围造成限制。相反,应该清楚地理解,可以采用各种其他实施方式、修改和等同物,在阅读本文的描述之后,本领域技术人员可以想到这些实施方式、修改和等同物而不脱离本发明的精神和/或所附权利要求的范围。出于所有目的,本文引用的所有专利、专利申请和出版物均通过引用整体并入。

[0104] 实施例

[0105] 实施例1

[0106] 实验步骤

[0107] 细胞培养和试剂

[0108] 将HEK293T细胞(美国典型培养物保藏中心)培养在含有10%胎牛血清(FBS)的DMEM中。原代人肺动脉内皮细胞(PAEC)在EGM-2细胞培养基(Lonza)中生长,实验在第3至6代进行。原代人肺动脉平滑肌细胞(PASMC)在SmGM-2细胞培养基(Lonza)中培养,实验在第3至9代进行。GLS1抑制剂(2,3):BPTES(双-2-(5-苯基乙酰氨基-1,3,4-噻二唑-2-基)乙基硫酸酯)、DON(6-重氨基-5-氧代-L-正亮氨酸)和C968(谷氨酰胺酶抑制剂,化合物968,5-(3-溴-4-(二甲基氨基)苯基)-2,2-二甲基-2,3,5,6-四氢苯并[a]菲啶-4(1H)-酮)购自Sigma-Aldrich并分别以10 $\mu$ M、5 $\mu$ M和10 $\mu$ M的浓度使用。谷氨酸盐购自Sigma Aldrich并以2mM的浓度使用。天冬氨酸盐购自Sigma Aldrich并以10mM的浓度使用。

[0109] 寡核苷酸和转染

[0110] 用于YAP的On Target Plus siRNA(J-012200-07和J-012200-05)、TAZ(WWTR1;J-016083-05和J-016083-06)、GLS(J-004548-09,si-GLS\_1;J-004548-10,si-GLS\_2)和乱序对照D-001810-01和D-001810-02)购自ThermoScientific/Dharmacon。siRNA实验代表了使用siYAP\_1/TAZ\_1或siYAP\_2/TAZ\_2。PAEC获得的结果,并且将PASMC在包被有胶原蛋白的塑料上铺平板(50 $\mu$ g/mL)并在24h后使用siRNA(25nM)和Lipofectamine 2000试剂(Life Technologies)根据制造商的说明在70%-80%汇合时进行转染。转染后8小时,将细胞用胰蛋白酶消化并重新铺在水凝胶上。

[0111] 质粒

[0112] 购买YAP1编码序列(Addgene;质粒#18881),并使用EcoRI和NotI限制性位点亚克隆到pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP(System Biosciences)中。表达GFP的慢病毒亲本载体用作对照。通过慢病毒转导实现这些构建体在PAEC和PASMC中的稳定表达。通过DNA测序确认所有克隆的质粒。

[0113] 慢病毒生产

[0114] 根据制造商的说明,使用Lipofectamine 2000(Life Technologies)利用慢病毒质粒以及包装质粒(pPACK, System Biosciences)转染HEK293T细胞。收获病毒,无菌过滤(0.45 $\mu$ m),以及用于PAEC和PASMC的随后感染(24-48小时温育),以用于基因转导。

### [0115] 信使RNA提取

[0116] 将细胞在1ml QiaZol试剂(Qiagen)中匀质化。使用miRNeasy试剂盒(Qiagen)根据制造商的说明提取总RNA含量。使用ND-1000微分光光度计(NanoDrop Technologies)确定总RNA浓度。

### [0117] 信使RNA的定量RT-PCR

[0118] 使用Multiscript RT试剂盒(Life Technologies)将信使RNA逆转录以产生cDNA。使用Applied Biosystems 7900HT快速实时PCR装置通过荧光标记的Taqman引物组扩增cDNA。为了特异性地确定两个GLS1同种型KGA和GAC的相对表达,分别使用TaqMan基因表达测定法Hs01014019\_m1和Hs01022166\_m1。使用公式( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ )计算RNA物质的倍数变化,并相对于RPLP0表达归一化。

### [0119] ChIP-qPCR

[0120] 将PAEC在塑料上培养48小时。将细胞用2mM的二琥珀酰亚氨基戊二酸酯(DSG)双重交联45分钟,然后在1%多聚甲醛中在室温下交联15分钟。在冰上将固定的细胞在10ml含有0.05% Triton X100、2.5%甘油并补充有1X蛋白酶抑制剂混合物(Roche)的裂解缓冲液1[50mM HEPES(pH 7.5),140mM NaCl,1mM EDTA,0.1% IGEPAL 630(Sigma Aldrich)]中裂解10分钟,然后在室温下在缓冲液2[0.1M Tris HCl(pH 8)和200mM NaCl,具有蛋白酶抑制剂]中温育15分钟。将染色质以30%的振幅超声处理10分钟(1分钟10个循环)。将样品离心(2X 14,000g,每次5分钟),并将可溶性染色质转移到新管中。超声处理后的交联DNA用5 $\mu$ g的抗YAP1抗体(sc-15407X,Santa Cruz Biotechnology)或非免疫兔IgG(ab27472,Abcam)在4 $^{\circ}$ C过夜沉淀。用PureProteome<sup>TM</sup> Protein G Magnetic Beads(Millipore)沉下染色质/抗体复合物,并在低盐和高盐缓冲液中洗涤。在交联逆转(65 $^{\circ}$ C,4小时)和蛋白酶K处理后,通过苯酚-氯仿提取和乙醇沉淀纯化染色质。使用针对预测的TEAD结合位点或非相关基因组区域产生的引物(对照),通过qPCR分析沉淀的DNA。

### [0121] 微阵列

[0122] PAEC用siRNA对照(si-NC)或针对GLS1(si-GLS\_1)的siRNA转染,并在软质水凝胶(1kPa)或硬质水凝胶(50kPa)上培养。转染后48小时,裂解细胞,并根据制造商的说明,在Affymetrix微阵列(HuGene 2.0ST)上提取RNA以用于杂交。简言之,根据制造商的说明,使用miRNeasy试剂盒(Qiagen)从PAEC细胞中提取总RNA。使用ND-1000微分光光度计(NanoDrop Technologies)确定总RNA浓度。使用WT Plus扩增试剂盒(Affymetrix)从100ng总RNA制备生物素化的cDNA。片段化后,将5.5 $\mu$ g的cDNA与GeneChip Human Gene 2.0ST Array(Affymetrix)杂交。将GeneChip洗涤并在Affymetrix Fluidics Station 450中染色,并使用Affymetrix GeneChip Scanner 3000 7G扫描。使用Affymetrix Expression Console中的RMA对原始数据进行归一化,并将其表示为对数转换信号强度。

### [0123] 途径富集分析

[0124] 在逐个基因的基础上使用单因素ANOVA测试来测试在软和硬基质背景上si-GLS1处理的PAEC和载体处理的PAEC之间的差异表达。基于0.05的p值截止值和1.5的倍数变化截止值选择差异表达的基因。使用Cytoscape 2.8.1环境(4)中的Reactome FI分析工具进行差异表达基因的途径富集。使用TM4 MultiExperiment Viewer(5)生成逐条路径热图。

### [0125] 免疫印迹和抗体

[0126] 在Laemmli缓冲液(Boston BioProducts)中裂解细胞。通过SDS-PAGE分离蛋白质裂解物并将其转移到PVDF膜(Biorad)上。将膜在5%脱脂乳的TN缓冲液(50mM Tris-HCl pH 7.4, 150mM NaCl)或5%BSA的TN缓冲液中封闭,并在一抗和二抗存在下温育。在含有0.1% Tween的TN缓冲液中洗涤后,利用ECL系统(Amersham Biosciences)使免疫响应条带可视化。从Cell Signaling获得针对YAP1(#4912;1/1000)和YAP/TAZ(#8418;1/1000)的一抗。从Abcam获得针对GLS1(ab156876;1/1000)、PC(ab115579;1/1000)、LDHA(ab47010;1/1000)的一抗。从Sigma Aldrich获得针对微管蛋白的一抗(T4026;1/5000)。从Santa Cruz Biotechnology获得针对TAZ的一抗(sc-48805)。使用与HRP偶联的合适的二抗(抗兔、抗小鼠和抗山羊)(Dako)。

#### [0127] 免疫荧光

[0128] 在各种指定的处理后,将培养的细胞用PBS/PFA 4%固定10分钟,并用PBS/Triton100X 0.1%透化10分钟。然后将细胞与抗PCNA(#4912;1/100;Invitrogen)、抗Ki67(ab15580;1/200;Abcam)和/或抗经切割的半胱天冬酶-3(1/200;Cell Signaling)在室温下一起温育2小时。与Alexa-594和/或Alexa-488(Thermo Scientific)偶联的二抗以1/500使用。细胞核用DAPI(Sigma)复染。

#### [0129] 细胞计数测定

[0130] 在如所示指定的预处理或转染方案后,将PAEC或PASMCM一式三份铺在6孔板中,每孔30000个细胞。在细胞温育过夜以附着后,计数6个孔以确定处理时的初始计数(谷氨酸盐、天冬氨酸盐、BPTES、DON或C968)。在2天、4天或6天后,将孔的内容物用胰蛋白酶消化并计数,并计算增殖率。

#### [0131] BrdU增殖测定

[0132] 将指数生长的细胞在指定的基质中铺板48小时。对于增殖测定,将5-溴-2-尿苷(BrdU)加入细胞培养基中1小时,并使用检测试剂盒(BrdU Cell Proliferation Assay Kit#6813,Cell Signaling)显示掺入DNA中的BrdU。

#### [0133] 划痕分析

[0134] 使用移液管吸头使汇合的PAEC受伤,并连续10小时对伤口床封闭物进行追踪。使用由Metamorph软件(Roper Scientific)管理的CoolSNAPHQ CCD相机,通过106相差物镜每小时拍摄明亮的图像。使用NIH ImageJ软件(<http://rsb.info.nih.gov/ij/>)将伤口床面积定量。

#### [0135] 线粒体电位测量

[0136] 如之前所述(6),将细胞用的2nM TMRM(四甲基罗丹明甲酯,Life Technologies)和Hoechst(0.1 $\mu$ g/ml)在37 $^{\circ}$ C染色30分钟。使用Nikon TE2000落射荧光显微镜记录每孔5至8个随机图像。使用NIH ImageJ软件确定每个图像的平均细胞荧光强度。

#### [0137] 半胱天冬酶3/7测定

[0138] 根据制造商的说明,使用半胱天冬酶-Glo 3/7 Assay(Promega)将半胱天冬酶3/7活性定量。简言之,将细胞接种在不同硬度的水凝胶上并如所述进行处理。铺板24小时后,在存在或不存在血清的情况下培养细胞24小时。然后裂解细胞,将10 $\mu$ g的总蛋白与半胱天冬酶底物一起温育1小时,并通过读板器(SynergyHTX multi-mode reader,Biotek)对发光进行定量。

[0139] 动物

[0140] 野百合碱处理的大鼠:如之前所述(7,8),雄性Sprague-Dawley大鼠(10-14周龄)在时间0时注射60mg/kg野百合碱;在暴露0-4周后,进行右心导管插入,然后收获肺组织以用于RNA提取或石蜡包埋,如下所述(“组织收获”一节)。

[0141] 猿猴免疫缺陷病毒感染的恒河猴:如之前所述(9),6至10年龄的恒河猴(RM)从国家灵长类动物中心或供应商获得,其经Pittsburgh大学的实验动物研究部批准。猕猴静脉接种SIV  $\Delta$  B670 (Pittsburgh大学M.Murphey-Corb惠赠)。通过定量RT-PCR和流式细胞术确定血浆病毒负载和外周血CD4<sup>+</sup>T细胞。肺动脉导管插入在感染前进行,并在感染后6个月和10-12个月重复。此外,在尸检期间获得肺组织,并且由对猴的身份未知的兽医病理学家检查肺动脉。

[0142] 从血浆中提取代谢物

[0143] 根据先前公布的方案(10),通过添加80 $\mu$ L添加有内标(ISTD)的冷甲醇100%而从20 $\mu$ L血浆中提取代谢物。

[0144] 大鼠肺血管内皮细胞的分离

[0145] 如先前所报道的(8,11),用剪刀切割来自大鼠的肺组织的肺叶,向其中加入200 $\mu$ L胶原蛋白酶D溶液(Sigma),以达到终浓度为在4.8mL HEPES缓冲液(pH=7.4)中2mg/ml胶原蛋白酶D。在37 $^{\circ}$ C自动旋转温育30分钟后,添加20 $\mu$ L DNase I (Sigma,终浓度为80U/mL DNase I),并在冰上温育30分钟。通过70 $\mu$ m细胞过滤器(BD Biosciences)将溶液过滤两次,以得到单细胞悬浮液。经过两轮PBS洗涤后,细胞沉淀,再悬浮,使用ACK溶解缓冲液(Gibco)来除去红细胞。将剩余的细胞在4 $^{\circ}$ C与小鼠抗大鼠-CD31抗体(BD Pharmigen 555025)温育30分钟。将细胞进行两次PBS洗涤,并根据制造商的方案与抗小鼠IgG1 MicroBeads (Miltenyi Biotec)一起温育15分钟。然后根据制造商的说明(Miltenyi Biotec),使用autoMACS Pro Separator收集单个CD31阳性细胞。在用FITC缀合的抗CD31(ab33858,Abcam)标记细胞后,通过FACScan流式细胞仪(BD Biosciences)通过流式细胞术分析证实CD31阳性细胞的纯度(>95%)。

[0146] 大鼠肺的组织收获

[0147] 在通过直接右心室穿刺进行生理测量之后,在收获心肺组织之前,用1cc的盐水轻轻冲洗肺血管以除去大部分血细胞。取出心脏,然后解剖并称重右心室(RV)和左心室+隔膜(LV+S)。然后收获器官以用于组织学制备或在液氮(N<sub>2</sub>)中快速冷冻以用于随后的均质化和RNA和/或蛋白质的提取。为了进一步专门处理肺组织,在切除之前,通过右心腔套管插入在恒定低压(约10mmHg)下用PBS冲洗肺,然后在约20cm水(H<sub>2</sub>O)的压力下用10%中性缓冲福尔马林(Sigma-Aldrich)对左肺进行气管充气。切除并在25 $^{\circ}$ C在10%中性缓冲的福尔马林中固定6小时后,肺组织通过乙醇-二甲苯-脱水系列进行石蜡包埋,然后切成5 $\mu$ m的切片(Hypercenter XP System and Embedding Center,Shandon)。

[0148] GLS1活性测定

[0149] 根据制造商的说明(Glutaminase Microplate Assay Kit,Cohesion Biosciences),在冰上将快速冷冻的大鼠肺组织(0.1克/样品)于1mL测定缓冲液中匀质化,并在4 $^{\circ}$ C以8000g离心10分钟。通过Bradford测定来确定蛋白质浓度。将相对于总蛋白归一化的样品(100 $\mu$ g)与试剂盒试剂在37 $^{\circ}$ C温育1小时,并在420nm波长下测量吸光度。

**[0150] 肺切片的免疫组织化学和免疫荧光**

[0151] 将肺切片(5 $\mu$ m)脱石蜡,并进行高温抗原修复,然后在TBS/BSA 5%、10%驴血清中封闭和暴露于用于免疫组织化学的一抗和生物素化的二抗(Vectastain ABC kit, Vector Labs),或者用于免疫荧光的Alexa 488、568和647-缀合的二抗(Thermo Fisher Scientific)。针对YAP1的一抗(#4912;1/200或sc101199;1/50)分别获自Cell Signaling和Santa Cruz Biotechnology。针对GLS1(ab156876;1/100)、PC(ab115579;1/100)、LDHA(ab47010;1/200)和 $\alpha$ -SMA(ab32575;1/1000)的一抗购自Abcam。针对CD31的一抗(sc-1506;1/100)购自Santa Cruz Biotechnology。针对PCNA的一抗(13-3900,1/100)购自Thermo Fisher Scientific。在大多数情况下,通过添加链亲和素-生物素化的碱性磷酸酶复合物(Vector Labs),然后添加Vector Red碱性磷酸酶底物溶液(Vector Labs)来实现显色。加入左旋咪唑以封闭内源性碱性磷酸酶活性(Vector Labs)。使用Olympus Bx51显微镜或ZEISS LSM Exciter共聚焦显微镜获得图片。选择存在于给定组织切片(>10个血管/切片)且与支气管气道无关的小肺血管(直径<100 $\mu$ m)以用于分析(N>5只动物/组)。使用ImageJ软件(NIH)将染色强度定量。在针对 $\alpha$ -SMA染色的石蜡包埋的肺切片中通过计算完全和部分肌化的外周(直径<100 $\mu$ m)肺小动脉与总外周肺小动脉的比例来评估肺小动脉肌化程度,如之前所述(12)。所有测量均不知情地进行。

**[0152] 原子力显微镜**

[0153] 对大鼠肺按照每g体重0.025g OCT进行充气,在液氮蒸气上冷冻并储存在-80 $^{\circ}$ C。大鼠肺切片(10 $\mu$ m厚)从其载玻片上切下,并将含有样品的玻璃碎片胶粘在50mm培养皿(Willco Glass Bottom Dish)的底部。在测量之前,首先冲洗样品,然后用4ml PBS1x覆盖。使用与通过相位对比能够精确定位感兴趣的区域的光学显微镜(Leica DMI6000B)偶联的BioScope Catalyst原子力显微镜(Bruker),研究样品的机械性能。对于每个样品,使用“指向并发射(Point and Shoot)”方法分析5个至最多9个容器(直径<100 $\mu$ m),在尽可能多的离散点采集35至80条力-距离曲线。显微压痕实验在PBS中使用具有硼硅酸盐玻璃球形尖端(直径5 $\mu$ m)的探针和标称弹簧常数为0.06N/m的悬臂(Novascan)进行。使用2 $\mu$ m/s的速度,在相对触发模式下并通过将触发阈值设置为2nN来施加压痕。使用NanoScope Analysis 1.50软件(Bruker),使力曲线拟合到Hertz球形压痕模型并使用0.4的泊松比计算表观杨氏模量。为了避免大的压痕,对于拟合考虑整个力曲线的最小和最大力拟合边界分别为5%和25%。

**[0154] 天狼猩红染色和定量**

[0155] 通过使用利用0.1%天狼猩红(Direct Red80, Sigma-Aldrich)染色和利用Weigert苏木精复染的5 $\mu$ m石蜡切片来实现天狼猩红染色以显示纤维状胶原蛋白。然后使用分析器和平行且彼此正交取向的分析器和偏振器对切片进行连续成像。在整个所有样品的成像过程中保持显微镜条件(灯亮度、聚光器开度、物镜、变焦、曝光时间和增益参数)。对于每个实验对适当的对照切片设置最小阈值,其中仅包括穿过表示纤维结构的正交取向的偏振器的光(即,排除来自黑色背景的残余光)。在每个实验中的所有条件下对于所有图像维持阈值。计算由阈值光覆盖的转移区域的面积,并将每个条件下至少10个切片/容器一起取平均(NIH ImageJ software)。

**[0156] 靶向LC-MS/MS**

[0157] 代谢物提取基本上如所描述的进行,进行了微小修改(35)。简言之,代谢物使用在-80℃预冷却的80%甲醇水溶液在冰上从培养细胞和CD31+细胞提取。代谢物从通过在4℃以20,000×g离心10分钟而预澄清的血浆中提取。上清液在-80℃用四体积的于-80℃预冷却的100%甲醇提取4小时。作为内标,在代谢物提取期间添加 $[^{13}\text{C}_4]$ -2-氧代戊二酸(Cambridge Isotope Laboratories)。通过在4℃在20,000×g离心15分钟而从细胞和血浆提取物中去除不溶性物质。通过如之前所述(36)的靶向LC-MS/MS来分析上清液。使用ZIC-HILIC固定相(150mm×2.1mm×3.5mm;Merck)分离代谢物。使用谷氨酰胺标准溶液优化MS参数。受监测的质量转变为87>87(丙酮酸盐)、115>73+99(琥珀酸盐)、132>88(天冬氨酸盐)、145>101(20G)、145>127(谷氨酰胺)、146>128(谷氨酸盐)和149>105( $[^{13}\text{C}_4]$ -20G)。通过对纯净和基质加标标准物的分析证实了质量转变和保留时间窗。通过Xcalibur Software(Thermo)定量峰面积并手动检查。

#### [0158] 细胞外通量分析

[0159] 将PAEC(30,000个细胞/孔)或PASC(50,000个细胞/孔)铺板在预先包被有20μL软或硬凝胶的Seahorse Bioscience 24孔板中(如补充中所述)。温育过夜以允许附着后,将细胞在测定培养基(不含酚红或丙酮酸盐的DMEM,其含有0.5%经透析的FBS和0.1mg/mL尿苷,pH7.4;由Seahorse Biosciences制造)中洗涤2次并在500μL新鲜测定培养基中温育。在XF24或XFe24分析仪(Seahorse Biosciences)上测量耗氧率(OCR)和细胞外酸化率(ECAR,糖酵解的替代标志物)。根据制造商的方案进行线粒体和糖酵解应激测定。将OCR和ECAR相对于在测定完成后测量的细胞计数归一化。

#### [0160] PH大鼠中YAP1的抑制

[0161] 为了诱导PH,向雄性Sprague-Dawley大鼠(10-14周龄)腹膜内注射60mg/kg野百合碱(Sigma-Aldrich)。两天后,大鼠每天用25mg/kg溶于5%二甲基亚砜(DMSO,Sigma-Aldrich)中的维替泊芬(Active Biochemicals Company,Ltd)进行腹膜内注射。在野百合碱注射后第21天最后一次注射后两天,进行右心导管插入术,然后收集肺组织和CD31+细胞以用于RNA或蛋白质提取、石蜡包埋或用OCT(Sigma-Aldrich)冷冻保存,如我们所述(2)。

#### [0162] PH大鼠中GLS1的抑制

[0163] 为了诱导PH,向雄性Sprague-Dawley大鼠(10-14周龄)腹膜内注射60mg/kg野百合碱(Sigma-Aldrich)。两天后,每天给予C968(10mg/kg,Sigma-Aldrich)连续腹膜内注射,并且在野百合碱注射后7天后,每天给予CB839(10mg/kg,Selleck Chemicals)连续腹膜内注射。在野百合碱注射后第21天最后一次注射后两天,进行右心导管插入术,然后收集肺组织和CD31+细胞以用于RNA或蛋白质提取、石蜡包埋或用OCT(Sigma-Aldrich)冷冻保存,如我们所述(2)。

#### [0164] 人类受试者

[0165] 所有研究程序均获得知情同意。对于福尔马林固定的石蜡包埋的肺样品,从从未使用的或丢弃的手术样品收集人PH试样(表2),其中一些我们之前已经描述过(37);已经描述了来自New England Organ Bank的非患病人肺试样(38)。对于图8E中描述的血浆收获和分析,选择具有临床显著呼吸困难且正在Brigham and Women's Hospital(Boston,MA,美国)进行右心导管插入的个体(表3,其中一些人在(26)中描述过)。通过临床PH的存在或不存在对受试者进行分级,临床PH由升高的平均肺动脉压>25mmHg(mPAP)所定义。为了测量肺



动脉顺应性,一组42名HIV感染者在University of Pittsburgh,Pittsburgh,PA,USA接受肺动脉导管插入术,作为HIV感染者中肺病持续研究的一部分。在11个个体中进行PAH的诊断( $mPAP > 25\text{mmHg}$ ) (表4)。基于这些侵入性血液动力学测量,肺动脉顺应性由每搏输出量/脉压来计算。最后,在其中针对循环代谢物分析外周血浆的人类受试者中(表5),在University of California(San Francisco,San Francisco,CA,美国)招募了一组单独的HIV感染个体,记录PAH(利用侵入性肺动脉导管插入术( $mPAP > 25\text{mmHg}$ )或无PAH( $mPAP < 25\text{mmHg}$ 或者通过肺动脉收缩压 $< 40\text{mm Hg}$ 的非侵入性超声心动图来评估)。

#### [0166] 人类血浆取样

[0167] 为了对受试者从主肺动脉收集血液,如之前所述(37),通过标准方案经由右侧内部颈静脉方法在荧光透视引导下进行临床上所规定的右心导管插入步骤。如通过荧光透视和血液动力学波形证实的,导管定位在主肺动脉中。然后从远端导管端口抽取血液并收集在具有 $K^+$ -EDTA抗凝血剂的标准真空管中。在对血液进行标准离心后提取血浆,然后储存在 $-80^\circ\text{C}$ 。为了从HIV阳性受试者收集静脉外周血,如我们先前所述(40),在标准抗凝血剂(EDTA)处理的真空管中收集静脉血。抽血后以 $2000\times g$ 离心10分钟,在每个血液样品中沉淀细胞成分。然后将上清液血浆等分并立即在 $-80^\circ\text{C}$ 冷冻。

#### [0168] 统计

[0169] 进行细胞培养实验至少三次并且对于每个重复至少一式三份。计算每组中的动物数量以测量实验组和对照组的手段之间至少20%的差异,功效为80%,标准偏差为10%。本研究的独特患者样品数量主要由临床可用性决定。以盲法进行两种啮齿动物和人类组织的原位表达/组织学分析,以及小鼠和大鼠中肺血管血液动力学。使用培养细胞的体外实验的数值定量或转录物/miRNA表达的原位定量表示平均值 $\pm$ 标准偏差(SD)。使用啮齿动物或人类试剂的生理学实验的数值定量表示平均值 $\pm$ 平均值的标准误差(SEM)。免疫印迹图像代表已经重复至少三次的实验。显微照片代表每个相关群组中的实验。数据分布的正态性通过Shapiro Wilk测试确定。通过双尾学生t检验比较配对样本的正态分布数据,而Mann-Whitney U非参数检验用于非正态分布数据。对于组间比较,进行单因素ANOVA和事后Tukey测试。P值小于0.05认为显著。

#### [0170] 实施例2

##### [0171] 机械刺激调节肺血管内皮细胞和平滑肌细胞的代谢重编程

[0172] 为了确定由ECM硬化传递的机械/物理线索是否调节血管细胞代谢,通过在软或硬基质上培养进行肺血管细胞类型的代谢筛选。通过细胞外通量分析,在肺动脉内皮细胞(PAEC)中评估中氧消耗速率(OCR)和细胞外酸化速率(糖酵解的替代标志物)。如通过细胞外酸化率定量所反映的,ECM硬化增加基础糖酵解,同时伴随降低的糖酵解储备容量,其计算为寡霉素A诱导的细胞外酸化率与基础细胞外酸化率之差(数据未显示)。因此,与在软基质上的细胞相比,在硬基质上的细胞显示出与其最大速率接近的糖酵解通量。此外,增加的ECM硬化显著降低基础OCR、ATP依赖性OCR(基础OCR和寡霉素A抑制的OCR之差)和最大OCR(通过羰基氰化物-对三氟甲氧基苯胺, FCCP诱导而反映),从而反映出线粒体氧化磷酸化的降低。与这些代谢变化相对应,硬基质降低了整体线粒体潜力(数据未显示)。对于肺动脉平滑肌细胞(PASMC)观察到相似的结果(数据未显示)。总之,硬化状况充当机械刺激,以增加糖酵解和减轻线粒体氧化磷酸化。

[0173] 为了确定在这些相同机械条件下的糖酵解、回补和TCA循环的活性,通过PAEC中的液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)测量候选细胞内氨基酸和代谢物。与在硬化状况下增加的糖酵解和降低的氧化磷酸化一致的是,观察到乳酸盐/丙酮酸盐比率的增加。进一步与氧化磷酸化降低一致的是,硬基质降低琥珀酸水平并增加乳酸产量(数据未显示)。重要的是,ECM硬化还降低了细胞内谷氨酰胺,伴随着谷氨酸盐和天冬氨酸盐的强烈增加,这与伴随加速糖酵解的假定的回补过程是一致的。PECEC中涉及糖酵解(LDHA)和回补(GLS1和PC)的三种关键酶乳酸脱氢酶A(LDHA)、GLS1两个同种型(KGA和GAC)和PC在硬基质中升高(数据未显示)。如上所述,对于PASMCM获得了类似的结果(数据未显示)。因此,暴露于硬基质不仅改变糖酵解和氧化磷酸化,而且还控制氨基酸的回补性补充。

[0174] 实施例3

[0175] ECM硬化依赖YAP/TAZ来控制代谢

[0176] 鉴于YAP和TAZ在肺血管细胞中充当机械传感器的先前发现,确定YAP/TAZ是否在调节ECM硬化对代谢重编程的后果中是重要的。在硬基质中的PAEC中,YAP/TAZ敲低(图2中的A)降低了乳酸盐/丙酮酸盐比率(图2中的B),反映了其对糖酵解的控制。YAP/TAZ敲低也减弱了硬ECM对谷氨酰胺、谷氨酸盐和天冬氨酸盐产生的回补作用(图2中的C)。相应地,线粒体膜电位在硬基质中YAP/TAZ敲低期间也得到维持(数据未显示)。相反,在软基质中生长的PAEC中,YAP(pYAP)的稳定表达增加了乳酸盐/丙酮酸盐比率;降低了谷氨酰胺并增加了谷氨酸盐和天冬氨酸盐;因此,线粒体膜电位降低(数据未显示)。值得注意的是,在PASMCM中由YAP/TAZ激活由PAEC中的硬ECM机械控制的糖酵解和谷氨酰胺分解的相同途径(数据未显示)。

[0177] 通过对负责糖酵解和谷氨酰胺分解的关键代谢酶(LDHA、GLS1和PC)的启动子区域进行序列分析,揭示了用于YAP/TAZ复合物(TEAD位点)的几个推定的结合位点(图2中的A)。ChIP-qPCR证明了YAP对各基因的至少一个位点的直接结合(图2中的B)。因此,在PAEC(图2中的C-E)中和在PASMCM中YAP/TAZ的siRNA敲低(数据未显示)降低了靶基因表达,而软基质的PAEC中强制YAP表达增加了它们的水平(图2中的F-H)。总之,YAP/TAZ对于由ECM硬化引发的机械触发的糖酵解性和谷氨酰胺分解性代谢重编程事件是不可缺少的。

[0178] 实施例4

[0179] GLS1表达和谷氨酰胺分解的增加对于在硬化环境中维持糖酵解和细胞增殖至关重要

[0180] 为了确定GLS1是否对硬化诱导和YAP/TAZ依赖性谷氨酰胺分解是至关重要的,将PAEC在软或硬基质中培养,并暴露于已知抑制剂:GLS1的两种同种型(KGA和GAC)、BPTES(双-2-(5-苯基乙酰胺基-1,3,4-噻二唑-2-基)乙基硫醚)、DON(6-重氨基-5-氧代-L-正亮氨酸)或C968(谷氨酰胺酶抑制剂,化合物968,C-968)(图3中的A-C)或siRNA(si-GLS;图3中的D-G)。如通过LC-MS/MS所定量的,PAEC中GLS的抑制减弱了谷氨酰胺消耗、谷氨酸盐产生和天冬氨酸盐产生的硬化诱导过程(图3中的A和E)。GLS1抑制在硬基质也减少糖酵解,如通过乳酸盐/丙酮酸盐比率降低所指示(图3中的B-C,图3中的F-G)。当在PASMCM中抑制GLS1时,观察到代谢活性的类似改变(数据未显示)。

[0181] 为了鉴定由GLS1调节的下游分子过程,暴露于硬基质细胞中的si-GLS的PAEC的表达阵列分析和途径富集揭示了多个途径的系统重编程,特别是下调控制增殖能力的细胞周

期基因和涉及控制细胞迁移的细胞外基质组织化的因子(表1)。如通过细胞计数、BrdU脉冲、半胱天冬酶3/7活性和PCNA/切割的半胱天冬酶-3双重染色所评估的,GLS1抑制在软基质中对凋亡和对增殖的影响可忽略不计,但是在PAEC的硬基质中使增殖减弱(数据未显示)。此外,对应于影响基质组织化的转录组结果,通过siRNA或药理学手段实现的GLS抑制,抑制了细胞迁移(数据未显示)。在PASMCM中观察到类似的效果(数据未显示)。

[0182] 为了研究谷氨酸盐和天冬氨酸盐的回补生成对于GLS1维持增殖的作用是否关键,在缺乏GLS1或YAP/TAZ的细胞中进行谷氨酸盐或天冬氨酸盐补充。与这些结果和先前的观察一致,GLS或YAP/TAZ的siRNA敲低降低了PAEC或PASMCM增殖,如通过细胞计数和增殖标志物PCNA的定量所评估的(数据未显示)。重要的是,在GLS1或YAP/TAZ减少的细胞中,通过补充谷氨酸至少部分地恢复了细胞增殖,而通过补充天冬氨酸更完全地恢复了细胞增殖(数据未显示)。此外,天冬氨酸盐补充类似地逆转在硬基质中GLS1缺陷性PAEC的细胞迁移降低(数据未显示)。综合起来这些结果表明,GLS1及其通过谷氨酰胺分解对谷氨酸盐和天冬氨酸盐的控制对于代谢重编程和随后的血管细胞增殖和对硬基质暴露具有特异性的迁移是必需的。

[0183] 实施例5

[0184] YAP/TAZ-GLS1轴在体内PH的啮齿动物和人类情形中在暴露于血管硬化的PAEC和PASMCM中激活糖酵解和谷氨酰胺分解

[0185] 在炎性PAH(野百合碱诱导)的大鼠模型中,肺动脉硬化最近被描述为伴随在患病肺小动脉中YAP/TAZ表达增加的早期病理事件。在该相同的野百合碱大鼠模型中,确定谷氨酰胺酶是否被激活并且与肺动脉硬化、YAP1活化和PAH相关。如先前报道的,天狼猩红染色显示源自暴露于野百合碱的大鼠的患病肺小动脉中纤维状胶原蛋白沉积增加,并且与肺动脉硬化的增加相关,如原子力显微镜所显示的(数据未显示)。这些变化伴随着PAH的血流动力学表现。从这些大鼠中,在暴露于载体或野百合碱后三周从肺中分离CD31+内皮细胞,并通过LC-MS/MS定量代谢物(数据未显示)。与在硬基质中生长的培养PAEC中的回补观察一致的是,谷氨酰胺减少,并且天冬氨酸盐在PAH CD31+细胞中增加。值得注意的是,在这些细胞中未观察到谷氨酸盐浓度的显著变化,这可能表明体内肺细胞中谷氨酸盐周转增加。还观察到琥珀酸盐减少,表明TCA循环活性降低,并且存在乳酸盐/丙酮酸盐比率的糖酵解增加(数据未显示)。与这样的代谢物的改变一致的是,观察到在CD31+细胞中GLS1表达的显著增加(数据未显示)。免疫印迹还显示,在来自野百合碱大鼠的CD31+和CD31-两种细胞中GLS1、LDHA和PC表达在蛋白质水平的相应增加。原位共聚焦免疫荧光显微镜检查揭示,在患病肺小动脉的CD31+(内皮)和 $\alpha$ -SMA+(平滑肌)区室中GLS1、PC和LDHA染色增加(数据未显示)。

[0186] 值得注意的是,GLS1、LDHA和PC的上调都与在患病的肺动脉中YAP1核定位的增加以及导致的PCNA+/Ki67+增殖细胞的上调相关(数据未显示)。为了确定疾病进展期间这些事件的精确动力学,在大鼠中于野百合碱诱导的PH的各个阶段进行原位共聚焦免疫荧光显微术。与PH中内皮细胞凋亡的先前理论一致的是,如通过原位染色中的经切割半胱天冬酶-3和经由半胱天冬酶3/7活性(野百合碱注射后0-3天)所反映的(数据未显示),发现内皮细胞凋亡的早期但短暂的诱导。然后继之以凋亡随后减少,以及平滑肌和内皮细胞增殖增加,这与血管GLS1表达的增加相关。总之,并且与体外发现一致的是,这些结果表明,血管损伤后并且正好在内皮细胞凋亡早期波后,肺血管硬化和谷氨酰胺分解的发展遵循与体内患病

内皮细胞和平滑肌细胞增殖的增加系统的动力学。

[0187] 进一步质疑了谷氨酰胺分解重编程是否是人PAH中维持肺血管细胞增殖的活跃过程。研究了一组源于特发性和遗传性病因以及硬皮病原因的人类PAH患者(n=13)(表2),并与因创伤或无关原因死亡的非PAH受试者(n=6)进行了比较(2)。与PAH病例中外周小动脉胶原蛋白重塑增加相关,在CD31+(内皮细胞)和 $\alpha$ -SMA+(平滑肌)细胞中均观察到GLS1、PC和LDHA的同时上调(数据未显示)。与PAH大鼠一样,GLS1与YAP1核定位同时增加,并且YAP1核定位与PCNA+/Ki67+增殖血管细胞增加相关(数据未显示)。在丛状病变(晚期血管病变)中进行了类似的观察,其中一致地观察到活跃的增殖和静止的凋亡(数据未显示)。重要的是,这些代谢酶的改变与循环血浆中的代谢物特征相关,如通过LC-MS/MS在源自PH个体的主肺动脉的样品所评估的(平均肺动脉压[mPAP] $\geq$ 25mmHg,,患者人口统计信息在表3中)。在肺动脉压特别高(平均肺压 $>$ 45mm Hg)的受试者中,与非PH个体相比(mPAP $<$ 25mmHg,数据未显示),乳酸盐/丙酮酸盐比率升高反映糖酵解增加,而谷氨酰胺盐/谷氨酸盐比率降低且天冬氨酸增加,表明谷氨酰胺分解和回补上调。总之,这些结果支持以下观点,即血管硬化激活YAP/TAZ,从而在体内对啮齿动物和人类疾病实例中诱导PAH中的谷氨酰胺分解代谢转换和血管增殖。

[0188] 实施例6

[0189] YAP/TAZ-GLS1轴在具有SIV-PAH的灵长类和在具有HIV诱导的PAH的人中诱导糖酵解和谷氨酰胺分解

[0190] 因为PAH的啮齿动物模型不复制人类疾病的所有方面,在没有使用直接缺氧刺激的情况下确定相同的分子轴是否在更相关的模型生物体中是活跃的。此前,在感染猿免疫缺陷病毒(SIV)的恒河猴中描述了人类免疫缺陷病毒(HIV)诱导的PAH的非人灵长类动物模型。重要的是,这种模型复制了PAH的血液动力学和组织学表现。它还表现出不完全的外显率,50%-60%的感染猕猴发展了PAH,因此与人类中具有HIV感染的PAH的不完全外显率一致。重要的是,类似于暴露于野百合碱的大鼠,在一组SIV感染的猕猴中,确认了PAH的血液动力学和组织学表现,天狼猩红染色显示与非PAH、SIV感染的动物相比,外周小动脉纤维状胶原蛋白的增加(数据未显示)。SIV-PAH猕猴中患病肺动脉也显示GLS1、PC和LDHA增加,与YAP1核定位增加相关,使PCNA+/Ki67+细胞以及未凋亡的经切割半胱天冬酶-3阴性细胞增殖(数据未显示)。

[0191] 最后,根据SIV-PAH猕猴的这些发现,确定罹患HIV-PAH的人是否也可能出现肺血管硬化增加的迹象以及随后血管糖酵解和谷氨酰胺分解的变化。研究了一组42名接受肺动脉导管插入术的HIV感染者,导致11个个体的PAH诊断(表4)。对HIV-PAH受试者的侵入性血液动力学数据的分析揭示,与HIV感染的非PAH个体相比,肺动脉顺应性的显著降低与肺动脉硬化增加一致。重要的是,通过将来自单独组的患有和不患有PAH的HIV感染者的外周静脉血浆代谢物定量(表4),观察到乳酸盐/丙酮酸盐比率增加,表明糖酵解活性增加,而谷氨酰胺/谷氨酸盐比率的降低和天冬氨酸盐的增加与HIV-PAH中谷氨酰胺分解和回补的上调一致(数据未显示)。因此,类似于啮齿动物和其他人类PAH的情况下的分子发现,这些对HIV-PAH中YAP/TAZ-GLS1活化的观察与肺血管硬化和代谢失调之间的紧密联系相关。

[0192] 实施例7

[0193] 调控肺血管硬化和YAP/TAZ依赖性机械转导调节体内谷氨酰胺分解和PH表现

[0194] 为了明确确定外周小动脉ECM重塑和YAP/TAZ是否在体内调节血管细胞代谢,确定YAP/TAZ依赖性机械转导的改变是否直接控制在野百合碱大鼠模型中的谷氨酰胺分解和PH发展。首先,使用Lox的已知药理学抑制剂( $\beta$ -氨基丙腈,BAPN),其是负责胶原蛋白交联和随后的基质硬化的酶,确定了抑制ECM硬化是否可以阻止在暴露于野百合碱的大鼠中观察到的代谢变化和下游PH表现(图4中的A)。如通过原子力显微镜(图4中的C-E)所评估的,BAPN治疗确实降低了肺Lox活性和随后的外周小动脉ECM硬化,对左心室心脏功能没有不利影响(数据未显示)。与体外结果一致的是,BAPN减少ECM硬化导致YAP1依赖性基因表达减少(图4中的E)并使下游GLS活性降低,如通过直接酶活性测量和随后代谢物表达改变所反映的(图4中的F-G)。如通过原位小动脉染色(图4中的G)所反映的,这种代谢作用进一步降低血管内皮和平滑肌增殖,并且如通过血管重塑和肌化(图4中的G)以及右心室收缩压(RVSP)(图4中的H)所测量的,PH的血液动力学和组织学表现改善。

[0195] 其次,以平行的方式,使用YAP1的已知药理学抑制剂(维替泊芬)来调查YAP1活性是否对于在该相同的大鼠疾病模型中激活血管谷氨酰胺分解和PH也是必需的(图4中的B)。如所预期的,维替泊芬降低了YAP1依赖性基因表达(图4中的E),而对左心室心脏功能或全身血压没有不良影响(数据未显示)。因此,以与BAPN相似但是稳健度强得多的方式,维替泊芬改善了PH的下游代谢(GLS1表达和活性,图4中的F-G)、增殖(图4中的G)和终末期表现,包括血管重塑/肌化、RVSP和右心室重塑(Fulton指数)降低(图4中的G-I)。因此,这些数据提供了体内的致病证据,即ECM硬化依赖于YAP/TAZ特异性机械转导来诱导肺血管谷氨酰胺分解和回补、增殖和PH。

[0196] 实施例8

[0197] 谷氨酰胺分解的GLS1依赖性抑制降低体内肺血管细胞增殖并改善PH

[0198] 最后,为了研究谷氨酰胺分解本身是否对促进PH中的肺血管增殖至关重要,使用疾病预防(图中的5A)或疾病逆转(图5中的B)给药方案在暴露于野百合碱的大鼠中施用两种单独的GLS1药理学抑制剂(C968和CB-839)。为了诱导PH,向雄性Sprague-Dawley大鼠(10-14周龄)腹膜内注射60mg/kg野百合碱(Sigma-Aldrich)。两天后,每天给予C968或CB-839(10mg/kg,Sigma-Aldrich)的连续腹膜内注射,并且在百合碱注射后七天后,每天给予C968或CB-839的连续腹膜内注射(10mg/kg,Selleck Chemicals)。在百合碱注射后第21天最后一次注射后两天,进行右心导管插入术,然后收集肺组织和CD31+细胞以用于RNA或蛋白质提取,石蜡包埋或用OCT(Sigma-Aldrich)冷冻保存,如先前所描述的(Bertero T等, Cell Reports.2015;13(5):1016-32)。

[0199] 在两种情况下,与对照(图5中的C-D)相比,C968和CB-839治疗降低了整个大鼠肺中的GLS1活性,而对左心室功能或全身血压没有不利影响(数据未显示)。相应地,与对照PH大鼠(图5中的E-H)相比,C968和CB-839均降低CD31+/ $\nu$ WF+(内皮细胞)和 $\alpha$ -SMA+(平滑肌)肺小动脉细胞中增殖标志物(PCNA+/Ki67+)的存在。结果,C968和CB-839均显著降低肺小动脉重塑(图6中的A-B)和肌化(图6中的C-D)、右心室收缩压(RVSP)(图6中的E,图6中的G)和右心室重塑(图6中的F,图6中的H)。总之,这些结果直接暗示GLS1和谷氨酰胺分解是依赖于ECM硬化的过程,是维持PH中肺血管增殖所必需的关键代谢介质。

[0200] 表1. 响应于硬基质中GLS敲低而差异表达的PAEC基因的途径富集

[0201] 由引入来自KEGG、Reactome、NCBI和Biocarta数据库的数据的Reactome F1工具

(1) 进行的途径富集。

[0202]

途径	途径大小	重叠大小	pval	FDR	重叠基因(上)	重叠基因(下)
NF-κ B 信号传导途径 (KEGG)	91	9	<0.0001	2.67E-03	LY96	PTGS2 CXCL2 IL8 CXCL12 BCL2A1 TNFAIP3 DDX58 VCAM1
细胞外基质组织化 (Reactome)	263	16	<0.0001	3.00E-03	ADAM9 ADAM17 NID2	LTBP1 PLOD2 ADAMTS1 LAMC2 FGF2 VCAN FBLN5 TGFB2 SDC4 VCAM1 FBN2 COL8A1 COL5A2
疟疾(KEGG)	49	7	<0.0001	3.00E-03	-	CSF3 THBS2 IL8 SELE TGFB2 CCL2 VCAM1
TNF 信号传导途径 (KEGG)	110	9	0.0001	9.00E-03	-	PTGS2 VEGFC CXCL1 CXCL2 SELE CXCL10 TNFAIP3 CCL2 VCAM1
β5 β6 β7 和 β8 整合素细胞表面相互作用 (NCBI)	17	4	0.0002	1.76E-02	-	EDIL3 PLAUR CYR61 VCAM1
NOD-样受体信号传导途径 (KEGG)	57	6	0.0003	2.52E-02	-	CXCL1 CXCL2 IL8 TNFAIP3 CCL2 PYDC1
干扰素 αβ 信号传导 (Reactome)	63	6	0.0005	3.57E-02	GBP2	OASL MX2 EGR1 IFIT2 IFIT1
E2F 转录因子网络 (NCBI)	68	6	0.0007	4.69E-02	-	MYBL2 CCNE1 RBBP8 RRM2 TYMS CDC25A
细胞因子-细胞因子受体相互作用 (KEGG)	265	12	0.0009	5.17E-02	-	VEGFC CXCL1 CSF3 CXCL2 IL8 TNFSF15 CXCL11 CXCL12 TGFB2 CXCL10 CCL2 TNFSF10
有丝分裂 G1-G1/S 期 (Reactome)	134	8	0.0012	6.55E-02	-	MYBL2 CCNE1 CDC7 RRM2 PSMD10 WEE1 TYMS CDC25A
ATF-2 转录因子网络 (NCBI)	58	5	0.0021	1.11E-01	-	IL8 DUSP5 DUSP1 SELE TGFB2
细胞周期检查点 (Reactome)	118	7	0.0024	1.07E-01	UBE2D1	MAD2L1 CCNE1 CDC7 PSMD10 WEE1 CDC25A
AP1 家族成员 Fra1 和 Fra2 的经验证转录靶标 (NCBI)	36	4	0.0024	1.15E-01	HMOX1	PLAUR IL8 CCL2
β1 整合素细胞表面相互作用 (NCBI)	66	5	0.0037	1.48E-01	-	PLAUR LAMC2 THBS2 VCAM1 COL5A2
β3 整合素细胞表面相互作用 (NCBI)	43	4	0.0045	1.68E-01	-	EDIL3 PLAUR CYR61 SDC4
AP-1 转录因子网络 (NCBI)	70	5	0.0047	1.63E-01	-	CYR61 IL8 DUSP1 CCL2 EGR1
α9 β1 整合素信号传导事件(NCBI)	24	3	0.0062	2.08E-01	-	VEGFC SAT1 VCAM1
阿米巴病(KEGG)	109	6	0.007	2.22E-01	SERPINB9	LAMC2 CXCL1 IL8 TGFB2 COL5A2

[0203]

途径	途径大小	重叠大小	pval	FDR	重叠基因(上)	重叠基因(下)
氨基酸和衍生物的代谢 (Reactome)	147	7	0.0079	2.38E-01	ENOPH1 NQO1 GCLM	PSMD10 PHGDH GLS SAT1
BARD1 信号传导事件 (NCBI)	29	3	0.0104	2.86E-01	-	CCNE1 RBBP8 BARD1
$\beta$ 2 整合素细胞表面相互作用 (NCBI)	29	3	0.0104	2.86E-01	-	PLAUR CYR61 VCAM1
VEGF 和 VEGFR 信号传导网络 (NCBI)	10	2	0.0106	2.66E-01	PGF	VEGFC
通过 VEGF 进行的信号传导 (Reactome)	10	2	0.0106	2.66E-01	PGF	VEGFC
ECM-受体相互作用 (KEGG)	86	5	0.0109	2.62E-01	-	LAMC2 THBS2 RELN SDC4 COL5A2
细胞周期(KEGG)	124	6	0.0126	2.90E-01	-	MAD2L1 CCNE1 CDC7 TGFB2 WEE1 CDC25A
类风湿性关节炎 (KEGG)	90	5	0.013	2.87E-01	-	CXCL1 IL8 CXCL12 TGFB2 CCL2
多配体聚糖-4-介导的信号传导事件(NCBI)	32	3	0.0135	2.85E-01	-	FGF2 CXCL12 SDC4
ATM 途径(NCBI)	34	3	0.0158	3.20E-01	-	XRCC4 RBBP8 CDC25A
干扰素 $\gamma$ 信号传导 (Reactome)	63	4	0.0166	3.23E-01	GBP2	OASL GBP1 VCAM1
PI3K-Akt 信号传导途径 (KEGG)	346	11	0.0181	3.41E-01	PGF PPP2R3A	VEGFC LAMC2 FGF5 CCNE1 FGF2 CSF3 THBS2 RELN COL5A2
ErbB1 下游信号传导 (NCBI)	100	5	0.0195	3.57E-01	F2RL2	ZFP36 DUSP1 DIAPH3 EGR1
凋亡的外在途径 (Reactome)	14	2	0.0199	3.53E-01	ADAM17	TNFSF10
p53 信号传导途径 (KEGG)	68	4	0.0212	3.66E-01	ZMAT3	CCNE1 RRM2 PMAIP1
嘧啶代谢 (KEGG)	105	5	0.0235	3.91E-01	TK2	CDA RRM2 PNPT1 TYMS
细胞附着分子(CAMs) (KEGG)	143	6	0.0236	3.81E-01	-	VCAN SELE CD274 SDC4 CDH2 VCAM1
ISG15 抗病毒机制 (Reactome)	71	4	0.0244	3.82E-01	-	HERC5 MX2 DDX58 IFIT1
趋化因子信号传导途径 (KEGG)	189	7	0.0272	4.10E-01	-	CXCL1 CXCL2 IL8 CXCL11 CXCL12 CXCL10 CCL2
IFN- $\alpha/\beta$ 途径的 RIG-I/MDA5 介导的诱导 (Reactome)	79	4	0.0341	4.87E-01	UBE2D1	HERC5 TNFAIP3 DDX58
淋巴细胞中钙调神经磷酸酶调节的 NFAT 依赖性转录(NCBI)	46	3	0.0344	4.66E-01	-	PTGS2 IL8 EGR1
FGF 信号传导途径 (NCBI)	46	3	0.0344	4.66E-01	-	PLAUR SPRY2 CDH2
酪氨酸激酶信号的 Sprouty 调节 (Biocarta)	19	2	0.0349	4.50E-01	-	SPRY4 SPRY2
胆固醇生物合成 (Reactome)	19	2	0.0349	4.50E-01	HMGCS1 DHCR24	-

途径	途径大小	重叠大小	pval	FDR	重叠基因(上)	重叠基因(下)
GPCR 配体结合 (Reactome)	433	12	0.0351	4.42E-01	F2RL2	HTR1B CXCL1 CXCL2 IL8 CXCL11 CXCL12 CXCL10 CCL2 P2RY1 PTGER4 ADRB2
TGF- $\beta$ 信号传导途径 (KEGG)	80	4	0.0354	4.34E-01	-	LTBP1 GDF6 FST TGFB2
分段时钟(Biocarta)	21	2	0.0418	4.95E-01	ADAM17	DKK2
基质金属蛋白酶的抑制 (Biocarta)	3	1	0.0449	5.25E-01	-	RECK
双链断裂修复 (Reactome)	22	2	0.0454	5.20E-01	-	XRCC4 BRIP1
轴突导向(KEGG)	127	5	0.0468	5.30E-01	-	SEMA6D SEMA3C SEMA3A SLIT2 CXCL12
通过 EGFR 进行的信号传导(Reactome)	171	6	0.049	5.48E-01	ADAM17 TNRC6A	FGF5 FGF2 ITPR2 SPRY2
由 PRL 介导的信号传导事件 (NCBI)	23	2	0.0491	5.38E-01	-	CCNE1 EGR1

[0205] 表2. 用于原位染色的PAH患者的临床特征

年龄	性别	mPAP (mmHg)	临床描述
34	女	50	心肺骤停(尸检), 特发性
64	女	55	心肺骤停(尸检), 特发性
68	女	44	双侧肺移植, 硬皮病
12	男	53	双侧肺移植, BMPRII 突变
16	男	62	双侧肺移植, 特发性
1	男	50	肺切除术, 21 三体性
19	男	48	肺切除术, 特发性
51	男	48	肺移植, 硬皮病
42	女	57	肺移植, 硬皮病
67	男	50	肺移植, 硬皮病
60	女	66	尸检硬皮病
54	女	54	尸检硬皮病
72	女	53	尸检硬皮病

[0207] 表3. 在肺动脉导管插入术期间从主肺动脉抽取血浆以进行代谢物作图的PH患者的临床特征

[0208] 平均肺动脉压 (mPAP), 肺血管阻力 (PVR)



[0209]

年龄 (周岁)	性别	mPAP (mmHg)	PVR (dynes.sec.cm <sup>-5</sup> )
73	女	37	481
88	女	46	631
65	女	49	789
44	女	46	387
67	女	45	607
83	男	54	926
81	女	52	1031
52	男	56	522
78	女	51	960
67	女	49	560
88	女	45	542
56	男	56	1396
67	女	57	658
81	女	42	663
23	男	40	957
78	女	44	536
79	女	56	897
80	男	50	826
78	男	43	803

[0210] 表4. 通过侵入性肺动脉导管插入术针对肺动脉顺应性分析的HIV感染个体的临床特征

[0211] 射血分数(EF);四分位距(IQR);平均肺动脉压(mPAP);肺动脉高压(PAH);肺毛细血管楔压(PCWP);肺血管阻力(PVR)

变量	无 PAH (n=31)	PAH (n=11)	P 值
年龄, 中位数(IQR)	54 (46, 61)	45 (41, 54)	0.14
年龄, 平均值± SD	53 ± 11	47 ± 9	0.11
男, n (%)	25 (80.6)	7 (63.6)	0.25
高加索人, n (%)	19 (61.3)	5 (45.5)	0.36
非裔美国人, n (%)	12 (38.7)	6 (54.5)	
曾经吸烟者, n (%)	16 (55.2)	7 (77.8)	0.23
全身性高血压, n (%)	14 (48.3)	1 (11.1)	<b>0.046</b>
[0212] 冠状动脉疾病, n (%)	7 (23.3)	0 (0.0)	0.11
肝病, n (%)	8 (26.7)	2 (20.0)	0.673
COPD, n (%)	5 (16.7)	1 (11.1)	0.685
mPAP mmHg, 中位数(IQR)	20 (17, 30)	37 (31, 52)	<b>&lt;0.001</b>
PCWP mmHg, 中位数(IQR)	13 (9, 21)	11 (7, 13)	0.2
PVR woods 单位, 中位数 (IQR)	1.4 (1, 1.9)	3.9 (3.5, 10.8)	<b>&lt;0.001</b>
PVR ≥ 3 woods 单位, n (%)	3 (12)	10 (91)	<b>&lt;0.001</b>
EF ≤ 45%, n (%)	4 (13.3)	1 (9)	0.71
舒张功能障碍, n (%)	7 (26)	2 (20)	0.7

[0213] 表5. 抽取了外周静脉血浆以用于代谢物作图的具有PAH的HIV感染个体的血液动力学测量

[0214] 平均肺动脉压 (mPAP, 如通过侵入性血液动力学测量的); 肺动脉收缩压 (PASP, 如通过超声心动图估计的)

[0215] 年龄 (周岁)	mPAP (mmHg)	PASP (mmHg)
44	35	81
37	37	63
36	38	74
60	47	60
35	51	67
37	53	84
48	55	73
45	56	73
41	58	71

[0216] 序列

[0217] SEQ ID NO:1

- MNPASAPPPL PPPGQQVIHV TQDLDTDLEA LFNSVMNPKP SSWRKKILPE  
SFFKEPDSGS HSRQSSTDSS GGHPGPRLAG GAQHVRSHSS PASLQLGTGA  
GAAGSPAQQH AHLRQQSYDV TDELPLPPGW EMTFTATGQR YFLNHIEKIT  
TWQDPRKAMN QPLNHMNLHP AVSSTPVPQR SMAVSQPNLV MNHQHQQQMA  
[0218] PSTLSQQNHP TQNPPAGLMS MPNALTTQQQ QQQKLRQLRI QMERERIRMR  
QEELMRQEAA LCRQLPMEAE TLAPVQAAVN PPTMTPDMRS ITNNSSDPFL  
NGGPYHSREQ STDSGLGLGC YSVPTTPEDF LSNVDEMDTG ENAGQTPMNI  
NPQQTRFPDF LDCLPGTNVD LGTLESEDLI PLFNDVESAL NKSEPFLLTWL  
[0219] SEQ ID NO:2  
MDPGQQPPPQ PAPQQGQPP SQPPQGQPP SGPGQPAPAA TQAAPQAPPA  
GHQIVHVRGD SETDLEALFN AVMNPKTANV PQTVPMLRK LPDSFFKPPE  
PKSHSRQAST DAGTAGALTP QHVRAHSSPA SLQLGAVSPG TLPTGVVSG  
PAATPTAHL RQSSFEIPDD VPLPAGWEMA KTSSGQRYFL NHIDQTTTWO  
DPRKAMLSQM NVTAPTSPV QQNMMNSASG PLPDGWEQAM TQDGEIYYIN  
[0220] HKNKTTSWLD PRLDPRFAMN QRISQSAPVK QPPPLAPQSP QGGVMGGSNS  
NQQQQMRLQQ LQMEKERLRL KQQELLRQAM RNINPSTANS PKCQELALRS  
QLPTLEQDGG TQNPVSSPGM SQELRTMTTN SSDPFLNSGT YHSRDESTDS  
GLSMSSYSVP RTPDDFLNSV DEMDTGDTIN QSTLPSQQNR FPDYLEAIPG  
TNVDLGTLEG DGMNIEGEEL MPSLQEALSS DILNDMESVL AATKLDKESF  
LTWL  
[0221] SEQ ID NO:3  
MMRLRGSML RDLLLRSPAG VSATLRRAPQ LVTLRRRPRG GGRPAAGPAA  
[0222] AARLHPWWGG GGWPAEPLAR GLSSSPSEIL QELGKGSTHP QPGVSPPAAP  
AAPGPKDGP ETDAFGNSEG KELVASGENK IKQGLLPSLE DLLFYTIAEG

QEKIPVHKFI TALKSTGLRT SDPRLKECMD MLRLTLQTTS DGVMLDKDLF  
KKCVQSNIVL LTQAFRRKFV IPDFMSFTSH IDELYESAKK QSGGKVADYI  
PQLAKFSPDL WGVSVCTVDG QRHSTGDTKV PFCLQSCVKP LKYAIAVNDL  
GTEYVHRYVG KEPSGLRFNK LFLNEDDKPH NPMVNAGAIV VTSLIKQGVN  
NAEKFDYVMQ FLNKMAGNEY VGFSNATFQS ERESGDRNFA IGYLKEKKC  
[0223] FPEGTDMVGI LDFYFQLCSI EVTCEASVM AATLANGGFC PITGERVLSP  
EAVRNTLSLM HSCGMYDFSG QFAFHVGLPA KSGVAGGILL VVPNVMGMMC  
WSPPLDKMGN SVKGIHFCHD LVSLCNFHNY DNLRHFAKKL DPRREGGDQR  
VKSVINLLFA AYTGDVSALR RFALSAMDME QRDYDSRTAL HVAAAEGHVE  
VVKFLEACK VNPFPKDRWN NTPMDEALHF GHHDVFKILQ EYQVQYTPQG  
DSDNGKENQT VHKNLDGLL

[0001] 序列表  
 [0002] <110> 匹兹堡大学-联邦高等教育系统  
 [0003] <120> GLS1抑制组合物在治疗肺血管疾病中的应用  
 [0004] <130> 10504-005CN1-D1  
 [0005] <141> 2022-05-20  
 [0006] <160> 3  
 [0007] <170> SIPOSequenceListing 1.0  
 [0008] <210> 1  
 [0009] <211> 400  
 [0010] <212> PRT  
 [0011] <213> 智人  
 [0012] <400> 1  
 [0013] Met Asn Pro Ala Ser Ala Pro Pro Pro Leu Pro Pro Pro Gly Gln Gln  
 [0014] 1 5 10 15  
 [0015] Val Ile His Val Thr Gln Asp Leu Asp Thr Asp Leu Glu Ala Leu Phe  
 [0016] 20 25 30  
 [0017] Asn Ser Val Met Asn Pro Lys Pro Ser Ser Trp Arg Lys Lys Ile Leu  
 [0018] 35 40 45  
 [0019] Pro Glu Ser Phe Phe Lys Glu Pro Asp Ser Gly Ser His Ser Arg Gln  
 [0020] 50 55 60  
 [0021] Ser Ser Thr Asp Ser Ser Gly Gly His Pro Gly Pro Arg Leu Ala Gly  
 [0022] 65 70 75 80  
 [0023] Gly Ala Gln His Val Arg Ser His Ser Ser Pro Ala Ser Leu Gln Leu  
 [0024] 85 90 95  
 [0025] Gly Thr Gly Ala Gly Ala Ala Gly Ser Pro Ala Gln Gln His Ala His  
 [0026] 100 105 110  
 [0027] Leu Arg Gln Gln Ser Tyr Asp Val Thr Asp Glu Leu Pro Leu Pro Pro  
 [0028] 115 120 125  
 [0029] Gly Trp Glu Met Thr Phe Thr Ala Thr Gly Gln Arg Tyr Phe Leu Asn  
 [0030] 130 135 140  
 [0031] His Ile Glu Lys Ile Thr Thr Trp Gln Asp Pro Arg Lys Ala Met Asn  
 [0032] 145 150 155 160  
 [0033] Gln Pro Leu Asn His Met Asn Leu His Pro Ala Val Ser Ser Thr Pro  
 [0034] 165 170 175  
 [0035] Val Pro Gln Arg Ser Met Ala Val Ser Gln Pro Asn Leu Val Met Asn  
 [0036] 180 185 190  
 [0037] His Gln His Gln Gln Gln Met Ala Pro Ser Thr Leu Ser Gln Gln Asn  
 [0038] 195 200 205

[0039]	His Pro Thr Gln Asn Pro Pro Ala Gly Leu Met Ser Met Pro Asn Ala
[0040]	210 215 220
[0041]	Leu Thr Thr Gln Gln Gln Gln Gln Lys Leu Arg Leu Gln Arg Ile
[0042]	225 230 235 240
[0043]	Gln Met Glu Arg Glu Arg Ile Arg Met Arg Gln Glu Glu Leu Met Arg
[0044]	245 250 255
[0045]	Gln Glu Ala Ala Leu Cys Arg Gln Leu Pro Met Glu Ala Glu Thr Leu
[0046]	260 265 270
[0047]	Ala Pro Val Gln Ala Ala Val Asn Pro Pro Thr Met Thr Pro Asp Met
[0048]	275 280 285
[0049]	Arg Ser Ile Thr Asn Asn Ser Ser Asp Pro Phe Leu Asn Gly Gly Pro
[0050]	290 295 300
[0051]	Tyr His Ser Arg Glu Gln Ser Thr Asp Ser Gly Leu Gly Leu Gly Cys
[0052]	305 310 315 320
[0053]	Tyr Ser Val Pro Thr Thr Pro Glu Asp Phe Leu Ser Asn Val Asp Glu
[0054]	325 330 335
[0055]	Met Asp Thr Gly Glu Asn Ala Gly Gln Thr Pro Met Asn Ile Asn Pro
[0056]	340 345 350
[0057]	Gln Gln Thr Arg Phe Pro Asp Phe Leu Asp Cys Leu Pro Gly Thr Asn
[0058]	355 360 365
[0059]	Val Asp Leu Gly Thr Leu Glu Ser Glu Asp Leu Ile Pro Leu Phe Asn
[0060]	370 375 380
[0061]	Asp Val Glu Ser Ala Leu Asn Lys Ser Glu Pro Phe Leu Thr Trp Leu
[0062]	385 390 395 400
[0063]	<210> 2
[0064]	<211> 504
[0065]	<212> PRT
[0066]	<213> 智人
[0067]	<400> 2
[0068]	Met Asp Pro Gly Gln Gln Pro Pro Pro Gln Pro Ala Pro Gln Gly Gln
[0069]	1 5 10 15
[0070]	Gly Gln Pro Pro Ser Gln Pro Pro Gln Gly Gln Gly Pro Pro Ser Gly
[0071]	20 25 30
[0072]	Pro Gly Gln Pro Ala Pro Ala Ala Thr Gln Ala Ala Pro Gln Ala Pro
[0073]	35 40 45
[0074]	Pro Ala Gly His Gln Ile Val His Val Arg Gly Asp Ser Glu Thr Asp
[0075]	50 55 60
[0076]	Leu Glu Ala Leu Phe Asn Ala Val Met Asn Pro Lys Thr Ala Asn Val
[0077]	65 70 75 80

[0078]	Pro	Gln	Thr	Val	Pro	Met	Arg	Leu	Arg	Lys	Leu	Pro	Asp	Ser	Phe	Phe
[0079]					85					90					95	
[0080]	Lys	Pro	Pro	Glu	Pro	Lys	Ser	His	Ser	Arg	Gln	Ala	Ser	Thr	Asp	Ala
[0081]					100					105					110	
[0082]	Gly	Thr	Ala	Gly	Ala	Leu	Thr	Pro	Gln	His	Val	Arg	Ala	His	Ser	Ser
[0083]					115					120					125	
[0084]	Pro	Ala	Ser	Leu	Gln	Leu	Gly	Ala	Val	Ser	Pro	Gly	Thr	Leu	Thr	Pro
[0085]					130					135					140	
[0086]	Thr	Gly	Val	Val	Ser	Gly	Pro	Ala	Ala	Thr	Pro	Thr	Ala	Gln	His	Leu
[0087]	145					150					155					160
[0088]	Arg	Gln	Ser	Ser	Phe	Glu	Ile	Pro	Asp	Asp	Val	Pro	Leu	Pro	Ala	Gly
[0089]					165					170					175	
[0090]	Trp	Glu	Met	Ala	Lys	Thr	Ser	Ser	Gly	Gln	Arg	Tyr	Phe	Leu	Asn	His
[0091]					180					185					190	
[0092]	Ile	Asp	Gln	Thr	Thr	Thr	Trp	Gln	Asp	Pro	Arg	Lys	Ala	Met	Leu	Ser
[0093]					195					200					205	
[0094]	Gln	Met	Asn	Val	Thr	Ala	Pro	Thr	Ser	Pro	Pro	Val	Gln	Gln	Asn	Met
[0095]					210					215					220	
[0096]	Met	Asn	Ser	Ala	Ser	Gly	Pro	Leu	Pro	Asp	Gly	Trp	Glu	Gln	Ala	Met
[0097]	225					230					235					240
[0098]	Thr	Gln	Asp	Gly	Glu	Ile	Tyr	Tyr	Ile	Asn	His	Lys	Asn	Lys	Thr	Thr
[0099]					245					250					255	
[0100]	Ser	Trp	Leu	Asp	Pro	Arg	Leu	Asp	Pro	Arg	Phe	Ala	Met	Asn	Gln	Arg
[0101]					260					265					270	
[0102]	Ile	Ser	Gln	Ser	Ala	Pro	Val	Lys	Gln	Pro	Pro	Pro	Leu	Ala	Pro	Gln
[0103]					275					280					285	
[0104]	Ser	Pro	Gln	Gly	Gly	Val	Met	Gly	Gly	Ser	Asn	Ser	Asn	Gln	Gln	Gln
[0105]					290					295					300	
[0106]	Gln	Met	Arg	Leu	Gln	Gln	Leu	Gln	Met	Glu	Lys	Glu	Arg	Leu	Arg	Leu
[0107]	305					310					315					320
[0108]	Lys	Gln	Gln	Glu	Leu	Leu	Arg	Gln	Ala	Met	Arg	Asn	Ile	Asn	Pro	Ser
[0109]					325					330					335	
[0110]	Thr	Ala	Asn	Ser	Pro	Lys	Cys	Gln	Glu	Leu	Ala	Leu	Arg	Ser	Gln	Leu
[0111]					340					345					350	
[0112]	Pro	Thr	Leu	Glu	Gln	Asp	Gly	Gly	Thr	Gln	Asn	Pro	Val	Ser	Ser	Pro
[0113]					355					360					365	
[0114]	Gly	Met	Ser	Gln	Glu	Leu	Arg	Thr	Met	Thr	Thr	Asn	Ser	Ser	Asp	Pro
[0115]					370					375					380	
[0116]	Phe	Leu	Asn	Ser	Gly	Thr	Tyr	His	Ser	Arg	Asp	Glu	Ser	Thr	Asp	Ser

[0117]	385	390	395	400
[0118]	Gly Leu Ser Met Ser Ser Tyr Ser Val Pro Arg Thr Pro Asp Asp Phe			
[0119]	405	410	415	
[0120]	Leu Asn Ser Val Asp Glu Met Asp Thr Gly Asp Thr Ile Asn Gln Ser			
[0121]	420	425	430	
[0122]	Thr Leu Pro Ser Gln Gln Asn Arg Phe Pro Asp Tyr Leu Glu Ala Ile			
[0123]	435	440	445	
[0124]	Pro Gly Thr Asn Val Asp Leu Gly Thr Leu Glu Gly Asp Gly Met Asn			
[0125]	450	455	460	
[0126]	Ile Glu Gly Glu Glu Leu Met Pro Ser Leu Gln Glu Ala Leu Ser Ser			
[0127]	465	470	475	480
[0128]	Asp Ile Leu Asn Asp Met Glu Ser Val Leu Ala Ala Thr Lys Leu Asp			
[0129]	485	490	495	
[0130]	Lys Glu Ser Phe Leu Thr Trp Leu			
[0131]	500			
[0132]	<210> 3			
[0133]	<211> 669			
[0134]	<212> PRT			
[0135]	<213> 智人			
[0136]	<400> 3			
[0137]	Met Met Arg Leu Arg Gly Ser Gly Met Leu Arg Asp Leu Leu Leu Arg			
[0138]	1	5	10	15
[0139]	Ser Pro Ala Gly Val Ser Ala Thr Leu Arg Arg Ala Gln Pro Leu Val			
[0140]	20	25	30	
[0141]	Thr Leu Cys Arg Arg Pro Arg Gly Gly Gly Arg Pro Ala Ala Gly Pro			
[0142]	35	40	45	
[0143]	Ala Ala Ala Ala Arg Leu His Pro Trp Trp Gly Gly Gly Gly Trp Pro			
[0144]	50	55	60	
[0145]	Ala Glu Pro Leu Ala Arg Gly Leu Ser Ser Ser Pro Ser Glu Ile Leu			
[0146]	65	70	75	80
[0147]	Gln Glu Leu Gly Lys Gly Ser Thr His Pro Gln Pro Gly Val Ser Pro			
[0148]	85	90	95	
[0149]	Pro Ala Ala Pro Ala Ala Pro Gly Pro Lys Asp Gly Pro Gly Glu Thr			
[0150]	100	105	110	
[0151]	Asp Ala Phe Gly Asn Ser Glu Gly Lys Glu Leu Val Ala Ser Gly Glu			
[0152]	115	120	125	
[0153]	Asn Lys Ile Lys Gln Gly Leu Leu Pro Ser Leu Glu Asp Leu Leu Phe			
[0154]	130	135	140	
[0155]	Tyr Thr Ile Ala Glu Gly Gln Glu Lys Ile Pro Val His Lys Phe Ile			



[0156]	145	150	155	160
[0157]	Thr Ala Leu Lys Ser Thr Gly Leu Arg Thr Ser Asp Pro Arg Leu Lys			
[0158]		165	170	175
[0159]	Glu Cys Met Asp Met Leu Arg Leu Thr Leu Gln Thr Thr Ser Asp Gly			
[0160]		180	185	190
[0161]	Val Met Leu Asp Lys Asp Leu Phe Lys Lys Cys Val Gln Ser Asn Ile			
[0162]		195	200	205
[0163]	Val Leu Leu Thr Gln Ala Phe Arg Arg Lys Phe Val Ile Pro Asp Phe			
[0164]		210	215	220
[0165]	Met Ser Phe Thr Ser His Ile Asp Glu Leu Tyr Glu Ser Ala Lys Lys			
[0166]		225	230	235
[0167]	Gln Ser Gly Gly Lys Val Ala Asp Tyr Ile Pro Gln Leu Ala Lys Phe			
[0168]		245	250	255
[0169]	Ser Pro Asp Leu Trp Gly Val Ser Val Cys Thr Val Asp Gly Gln Arg			
[0170]		260	265	270
[0171]	His Ser Thr Gly Asp Thr Lys Val Pro Phe Cys Leu Gln Ser Cys Val			
[0172]		275	280	285
[0173]	Lys Pro Leu Lys Tyr Ala Ile Ala Val Asn Asp Leu Gly Thr Glu Tyr			
[0174]		290	295	300
[0175]	Val His Arg Tyr Val Gly Lys Glu Pro Ser Gly Leu Arg Phe Asn Lys			
[0176]		305	310	315
[0177]	Leu Phe Leu Asn Glu Asp Asp Lys Pro His Asn Pro Met Val Asn Ala			
[0178]		325	330	335
[0179]	Gly Ala Ile Val Val Thr Ser Leu Ile Lys Gln Gly Val Asn Asn Ala			
[0180]		340	345	350
[0181]	Glu Lys Phe Asp Tyr Val Met Gln Phe Leu Asn Lys Met Ala Gly Asn			
[0182]		355	360	365
[0183]	Glu Tyr Val Gly Phe Ser Asn Ala Thr Phe Gln Ser Glu Arg Glu Ser			
[0184]		370	375	380
[0185]	Gly Asp Arg Asn Phe Ala Ile Gly Tyr Tyr Leu Lys Glu Lys Lys Cys			
[0186]		385	390	395
[0187]	Phe Pro Glu Gly Thr Asp Met Val Gly Ile Leu Asp Phe Tyr Phe Gln			
[0188]		405	410	415
[0189]	Leu Cys Ser Ile Glu Val Thr Cys Glu Ser Ala Ser Val Met Ala Ala			
[0190]		420	425	430
[0191]	Thr Leu Ala Asn Gly Gly Phe Cys Pro Ile Thr Gly Glu Arg Val Leu			
[0192]		435	440	445
[0193]	Ser Pro Glu Ala Val Arg Asn Thr Leu Ser Leu Met His Ser Cys Gly			
[0194]		450	455	460

[0195]	Met Tyr Asp Phe Ser Gly Gln Phe Ala Phe His Val Gly Leu Pro Ala
[0196]	465 470 475 480
[0197]	Lys Ser Gly Val Ala Gly Gly Ile Leu Leu Val Val Pro Asn Val Met
[0198]	485 490 495
[0199]	Gly Met Met Cys Trp Ser Pro Pro Leu Asp Lys Met Gly Asn Ser Val
[0200]	500 505 510
[0201]	Lys Gly Ile His Phe Cys His Asp Leu Val Ser Leu Cys Asn Phe His
[0202]	515 520 525
[0203]	Asn Tyr Asp Asn Leu Arg His Phe Ala Lys Lys Leu Asp Pro Arg Arg
[0204]	530 535 540
[0205]	Glu Gly Gly Asp Gln Arg Val Lys Ser Val Ile Asn Leu Leu Phe Ala
[0206]	545 550 555 560
[0207]	Ala Tyr Thr Gly Asp Val Ser Ala Leu Arg Arg Phe Ala Leu Ser Ala
[0208]	565 570 575
[0209]	Met Asp Met Glu Gln Arg Asp Tyr Asp Ser Arg Thr Ala Leu His Val
[0210]	580 585 590
[0211]	Ala Ala Ala Glu Gly His Val Glu Val Val Lys Phe Leu Leu Glu Ala
[0212]	595 600 605
[0213]	Cys Lys Val Asn Pro Phe Pro Lys Asp Arg Trp Asn Asn Thr Pro Met
[0214]	610 615 620
[0215]	Asp Glu Ala Leu His Phe Gly His His Asp Val Phe Lys Ile Leu Gln
[0216]	625 630 635 640
[0217]	Glu Tyr Gln Val Gln Tyr Thr Pro Gln Gly Asp Ser Asp Asn Gly Lys
[0218]	645 650 655
[0219]	Glu Asn Gln Thr Val His Lys Asn Leu Asp Gly Leu Leu
[0220]	660 665

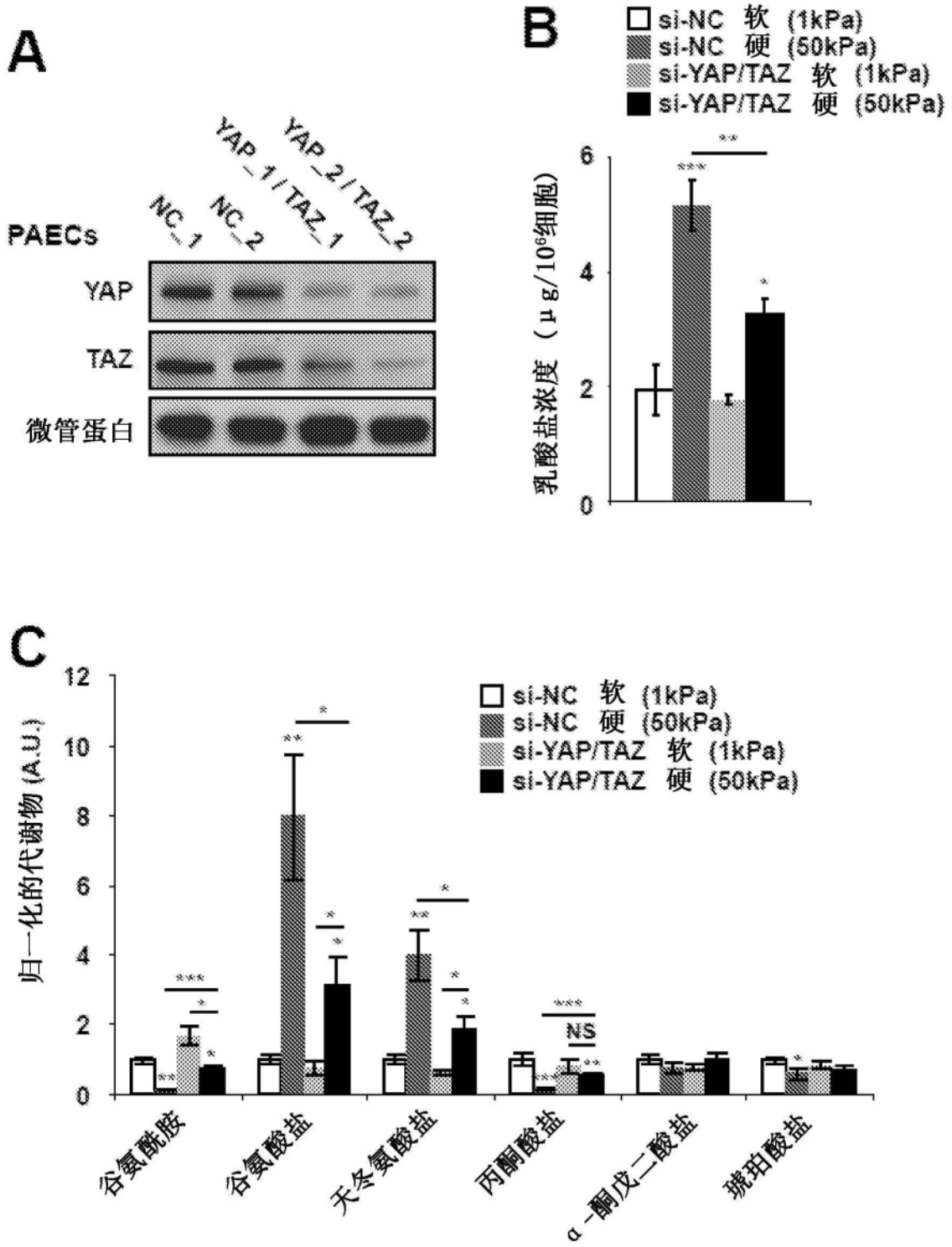


图1

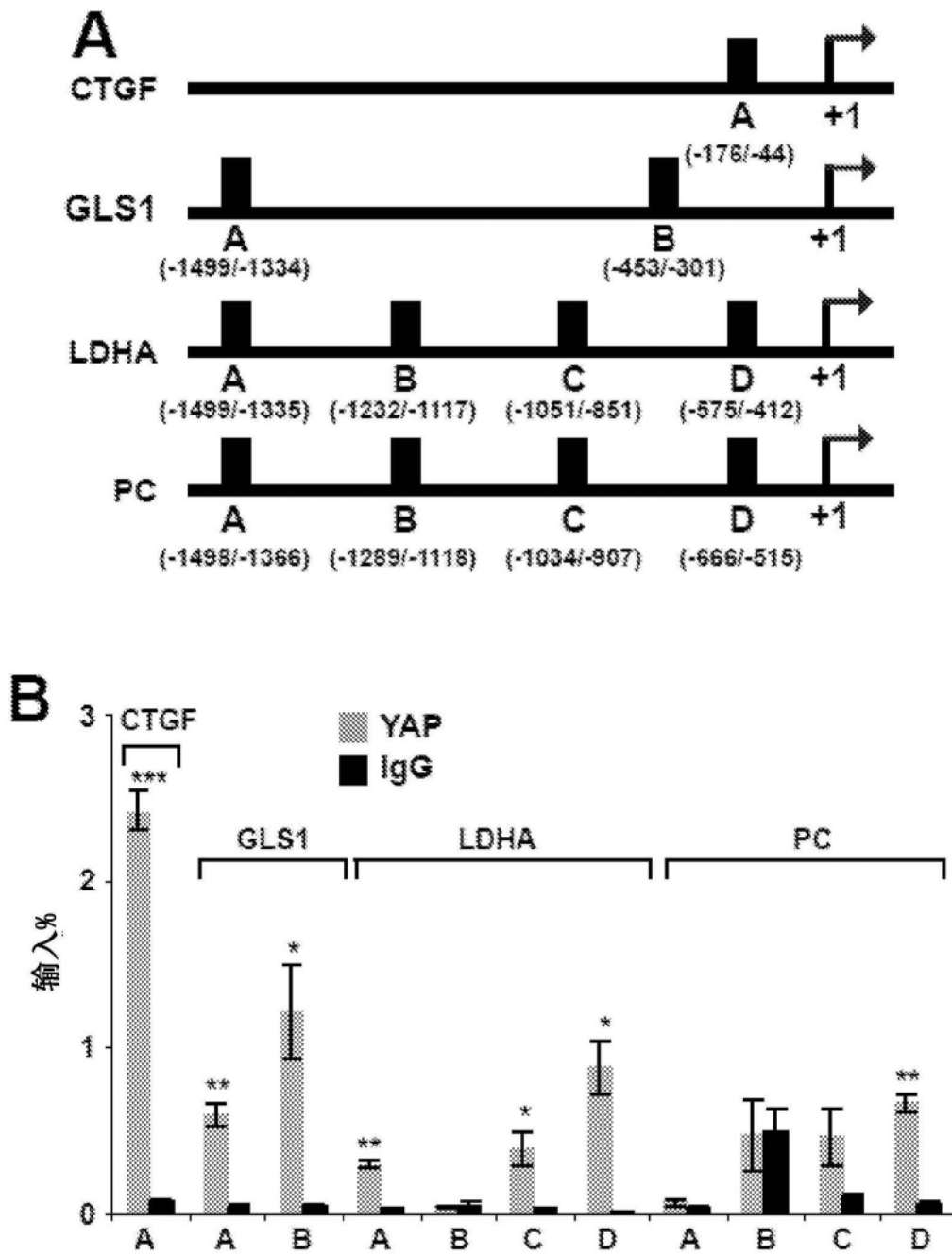


图2

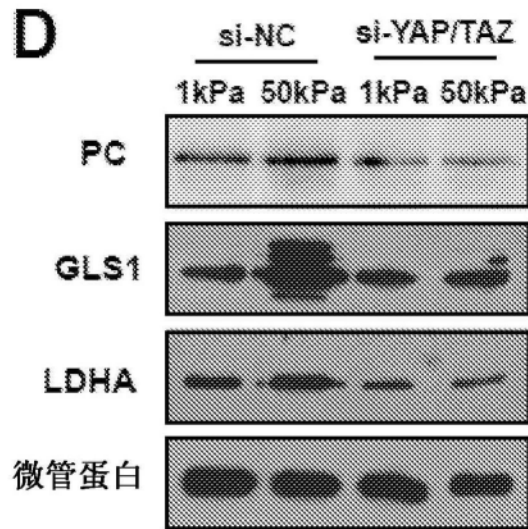
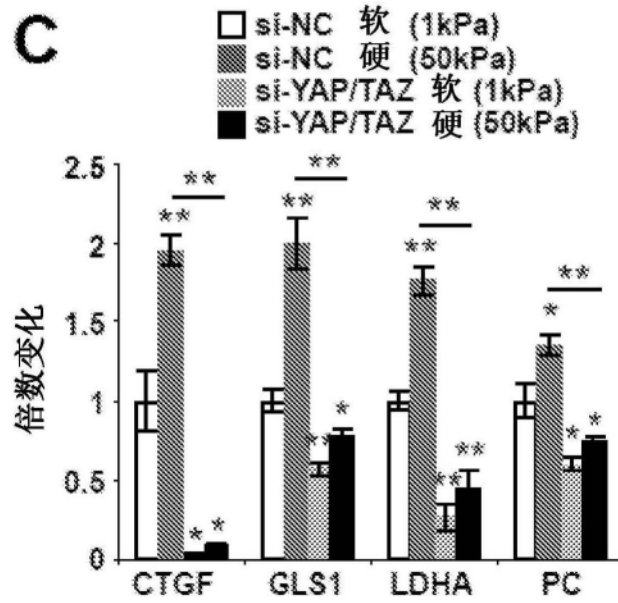
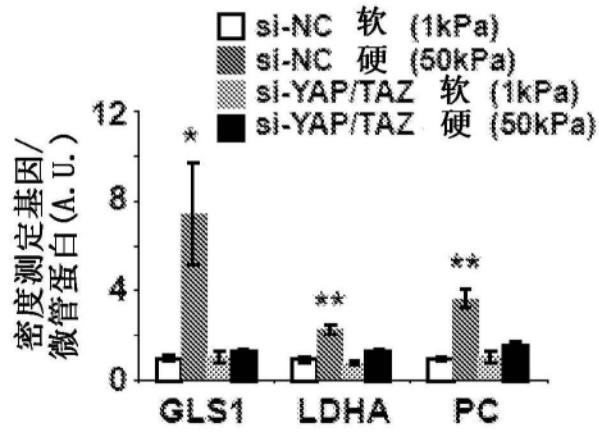


图2续

**E**



**F**

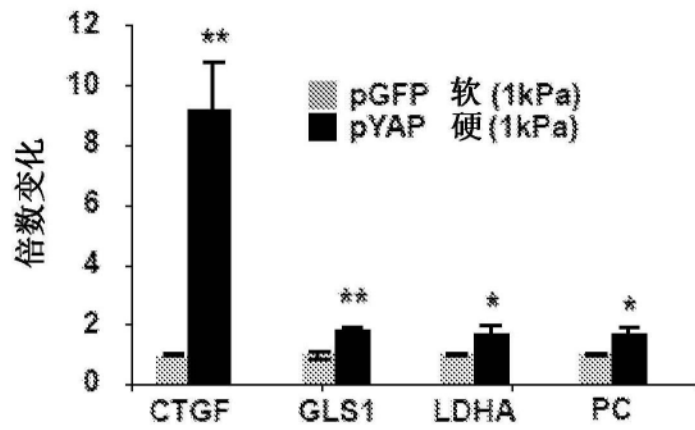


图2续

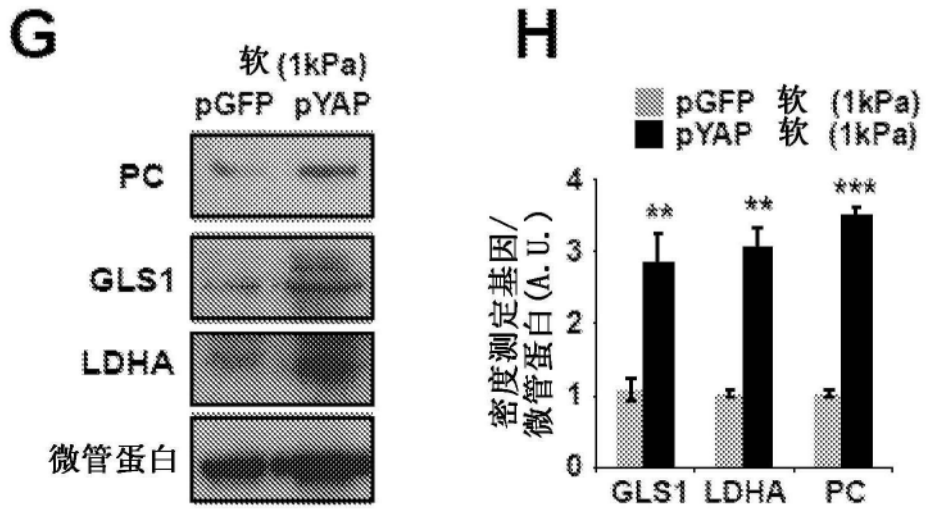


图2续

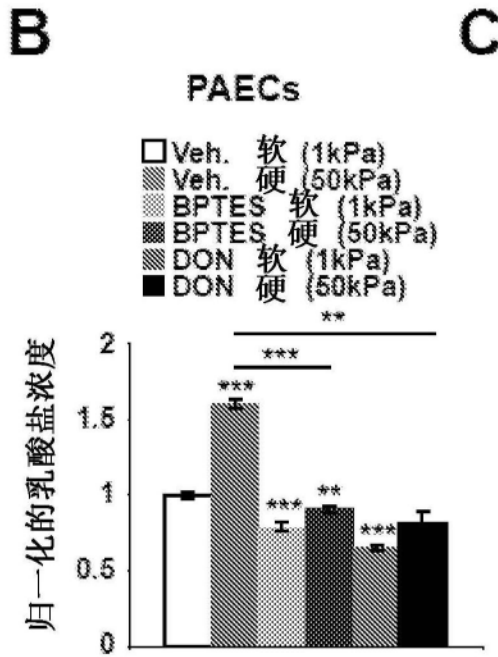
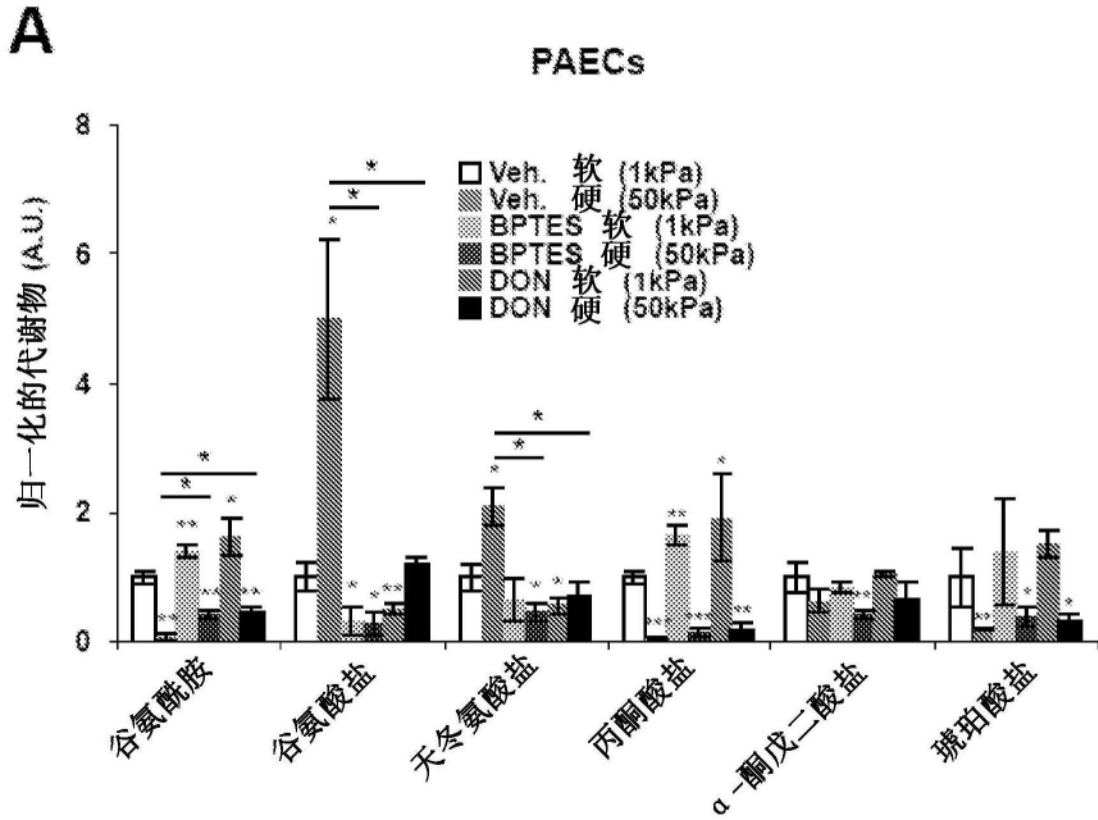


图3



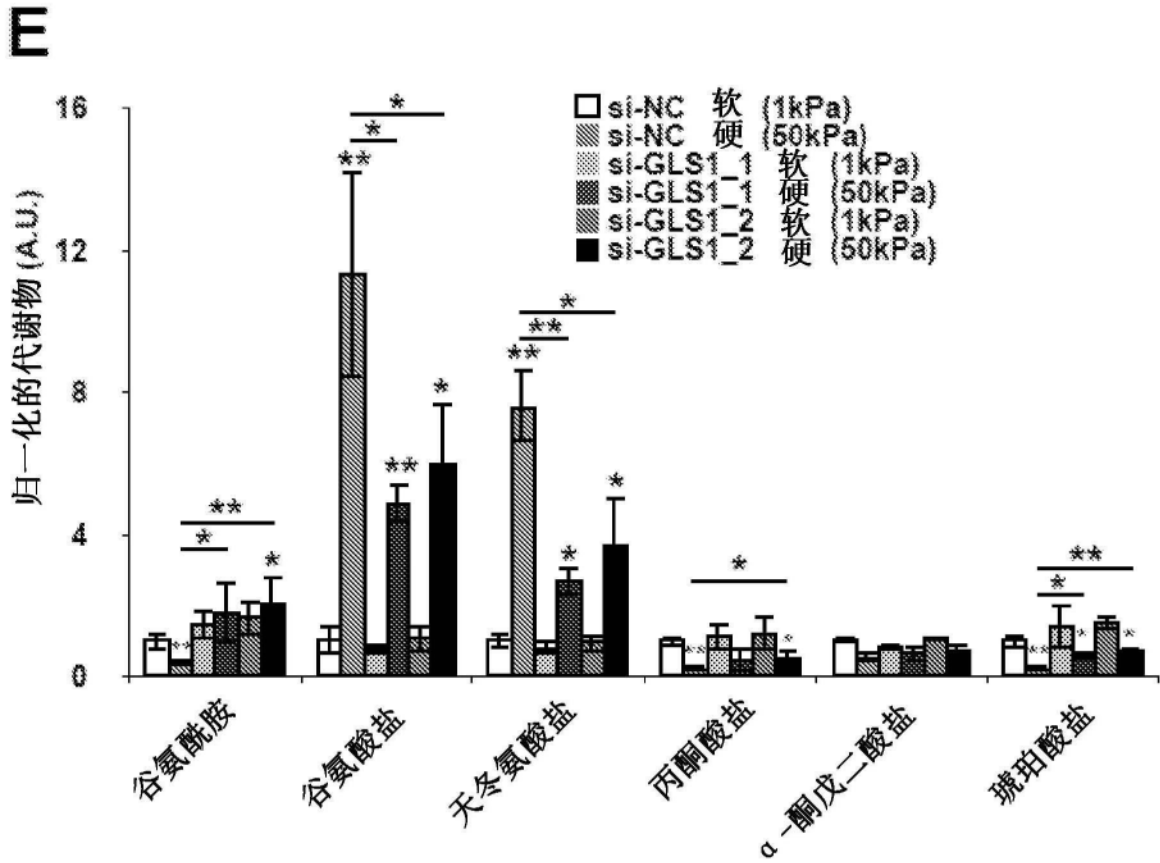
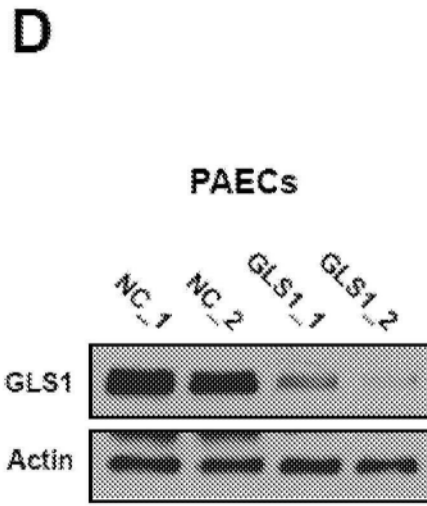


图3续

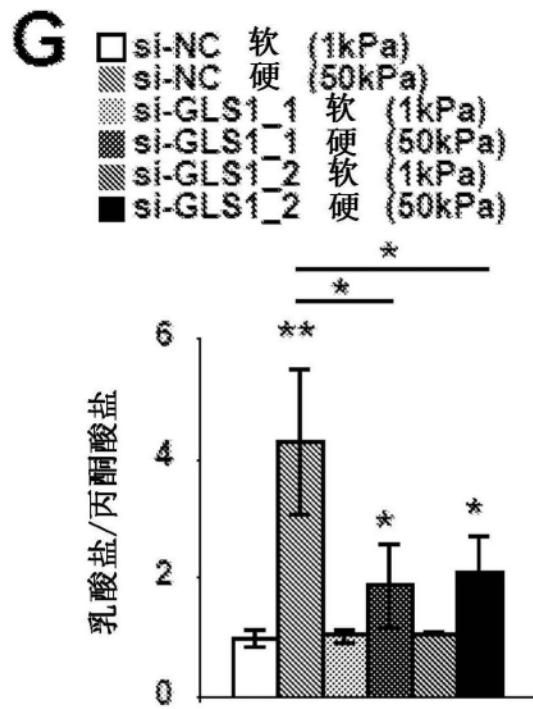
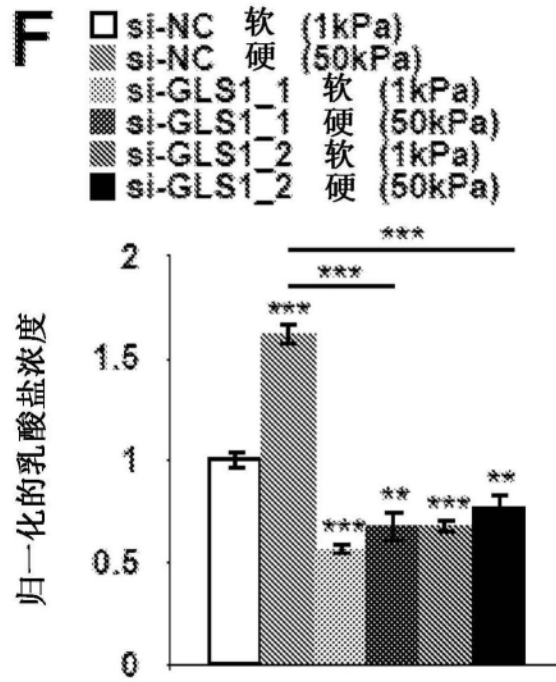


图3续

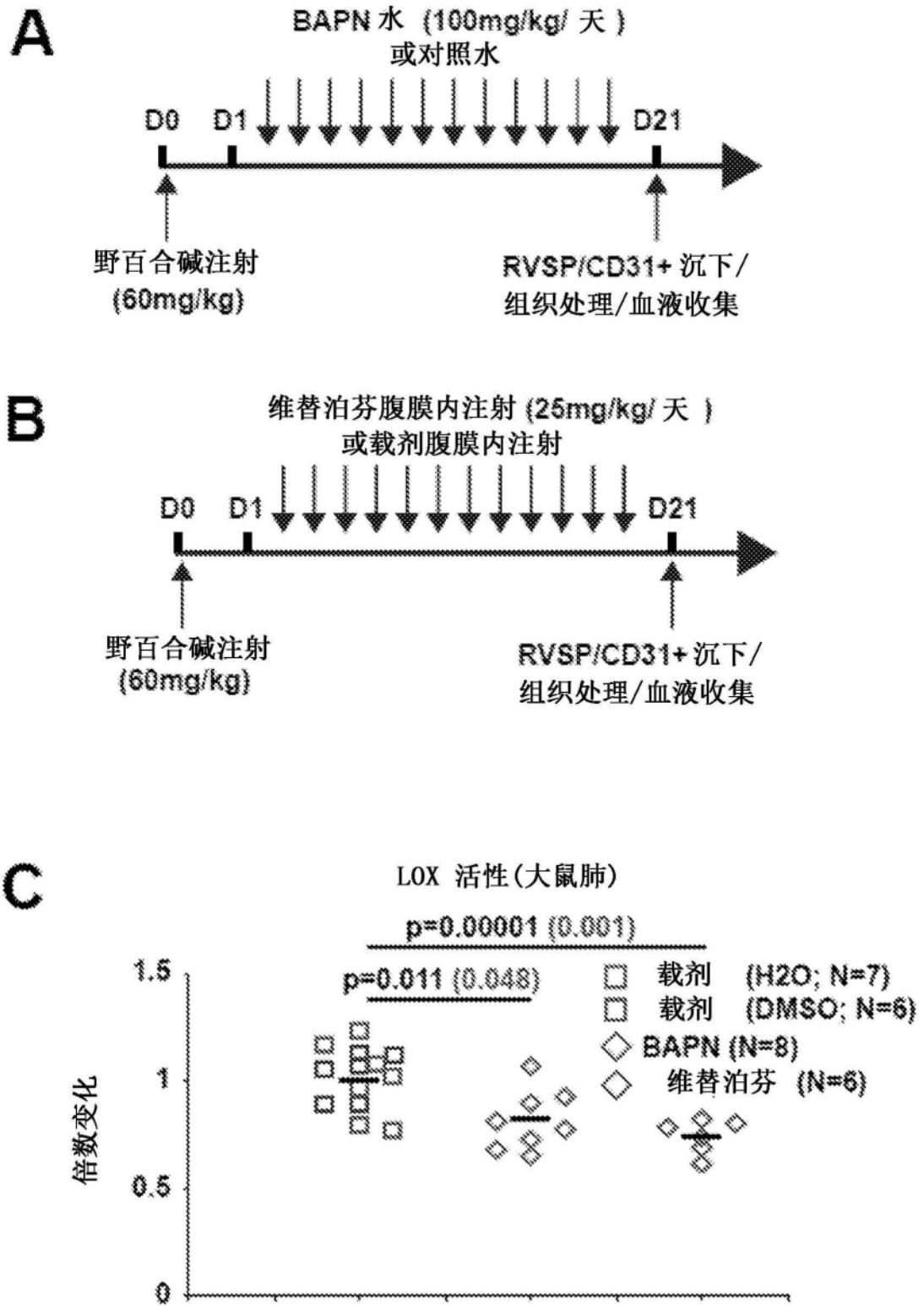


图4

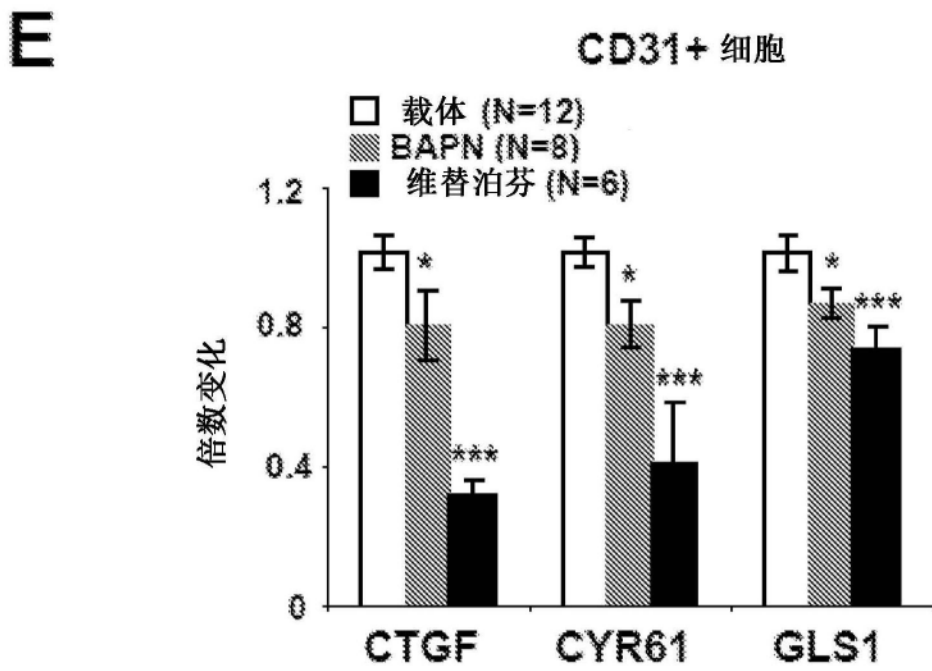
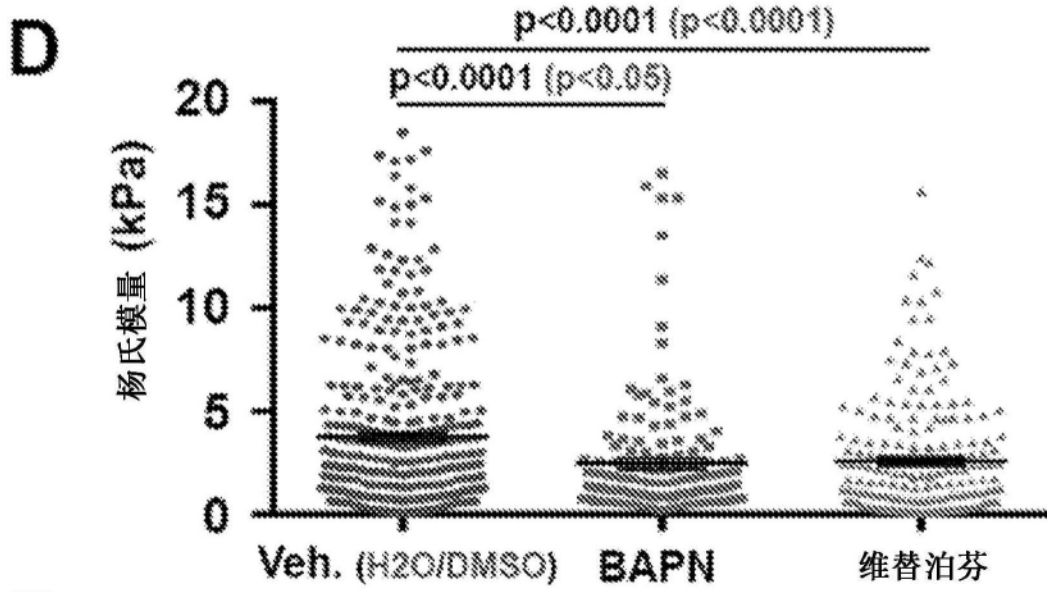


图4续

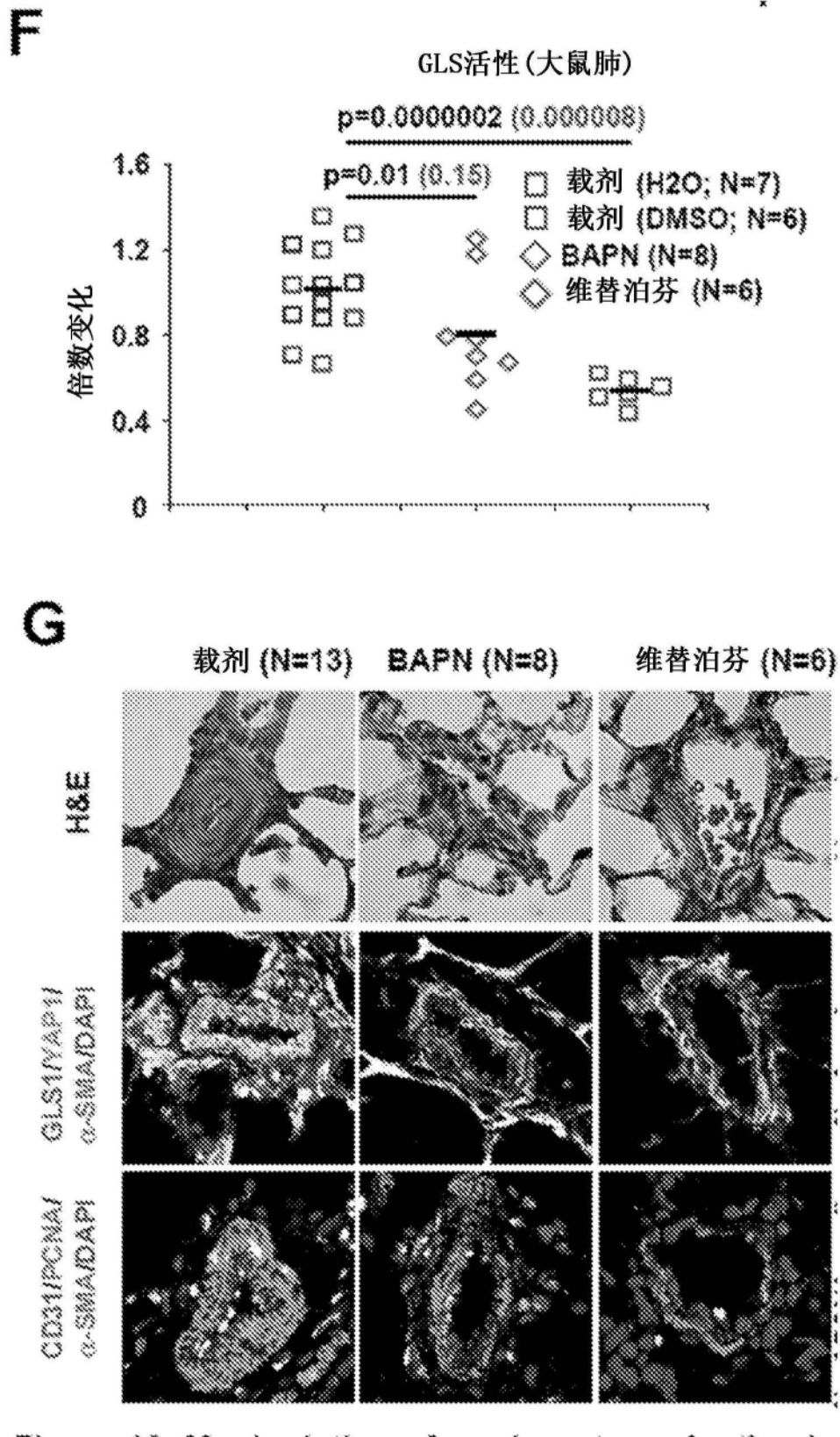


图4续

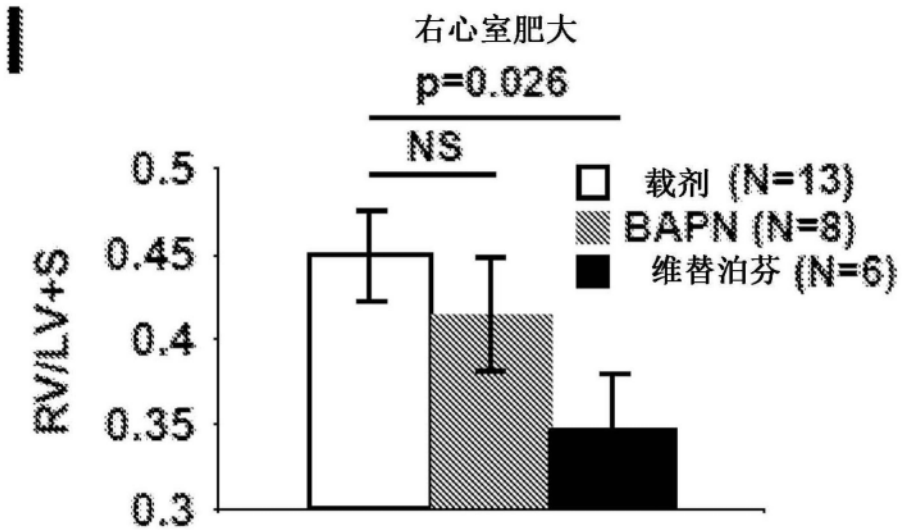
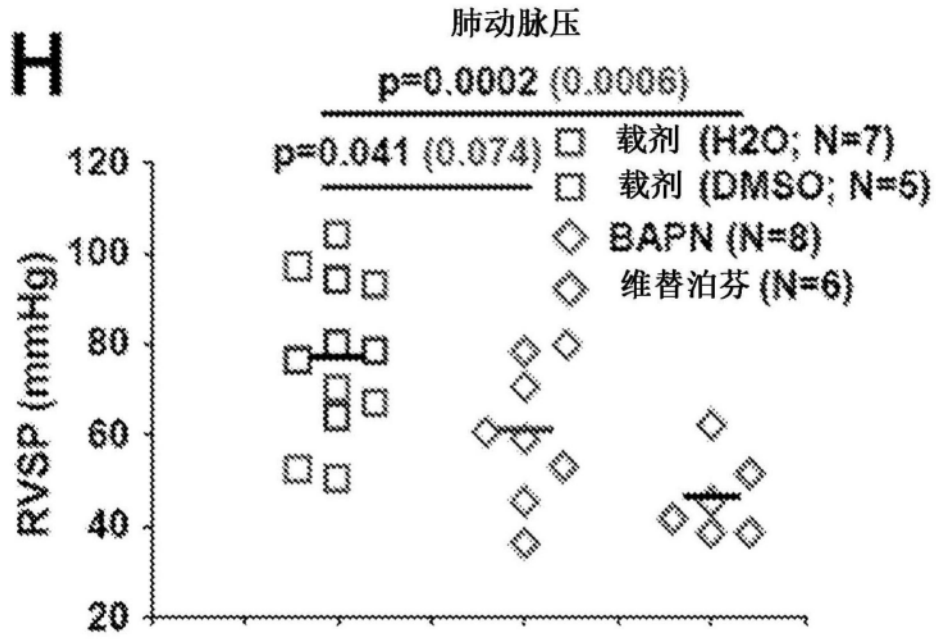


图4续

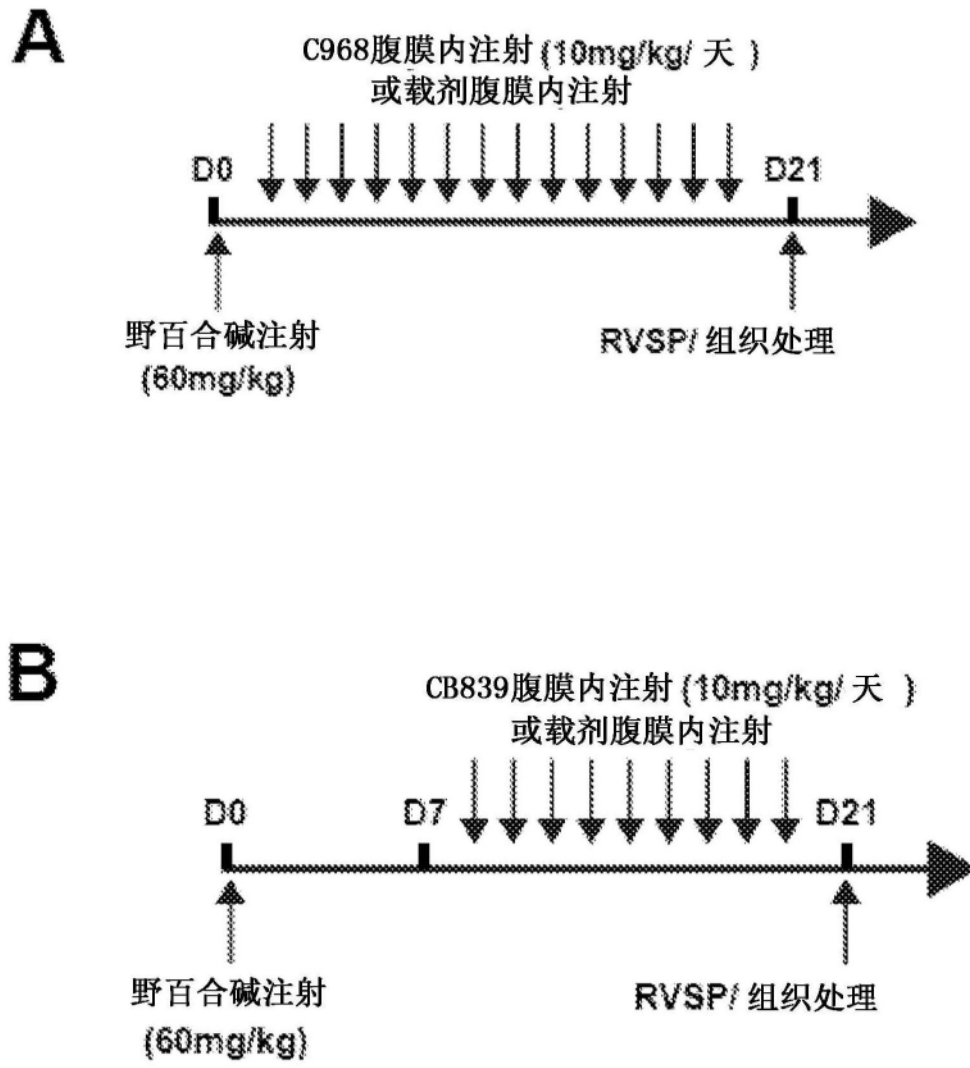


图5

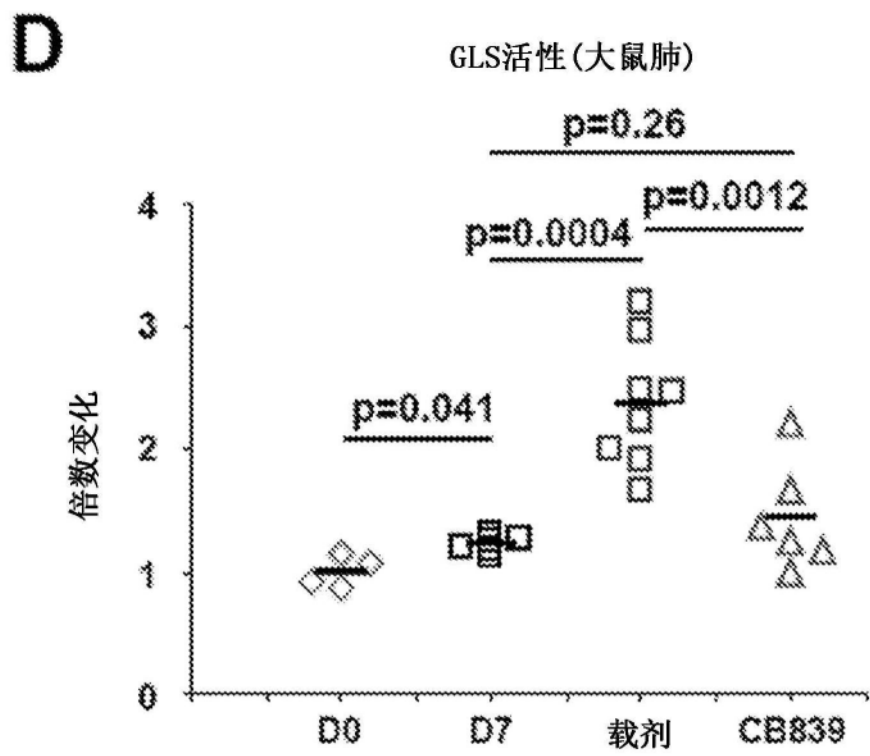
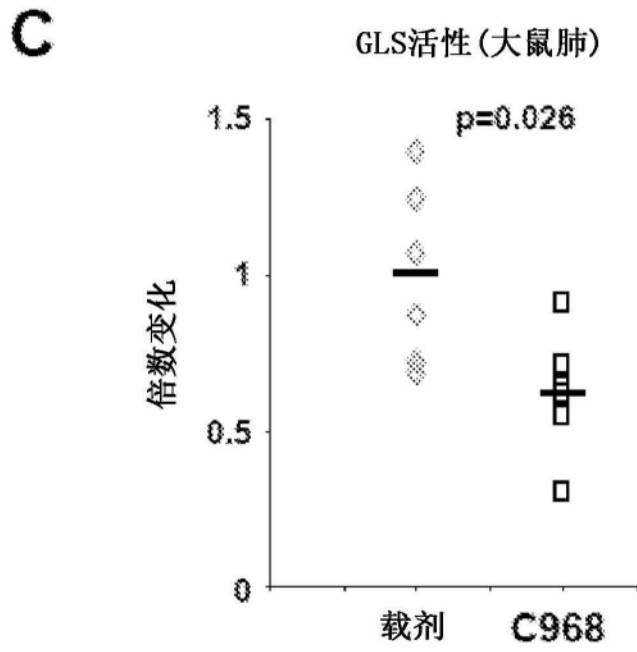


图5续



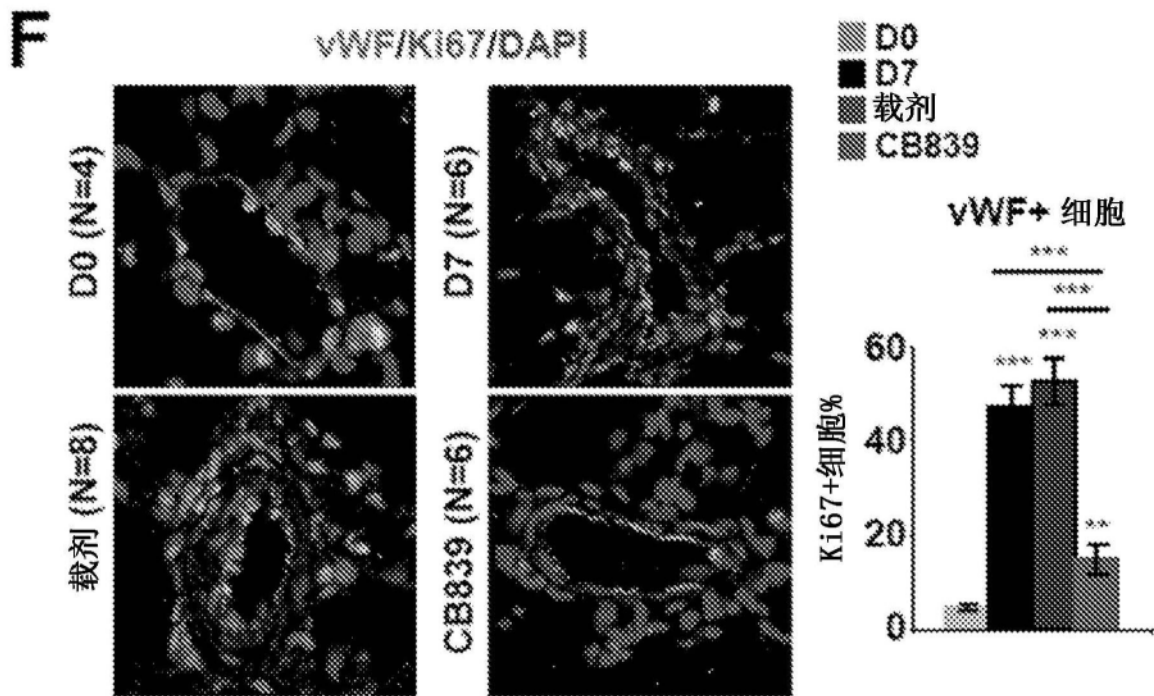
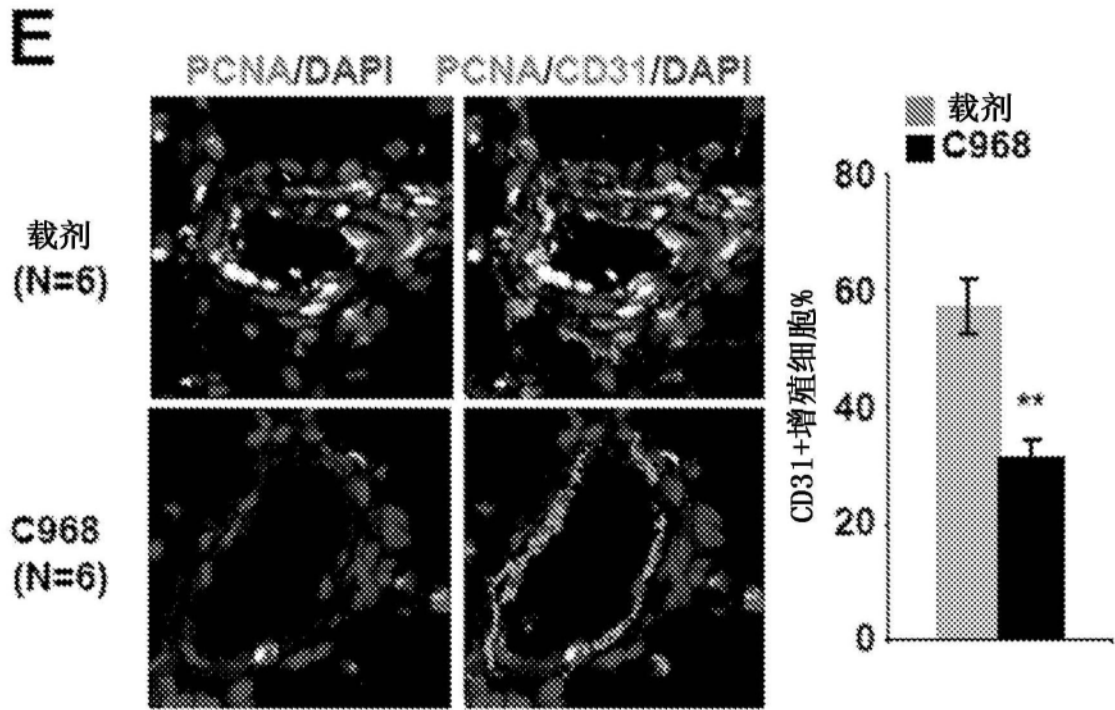


图5续

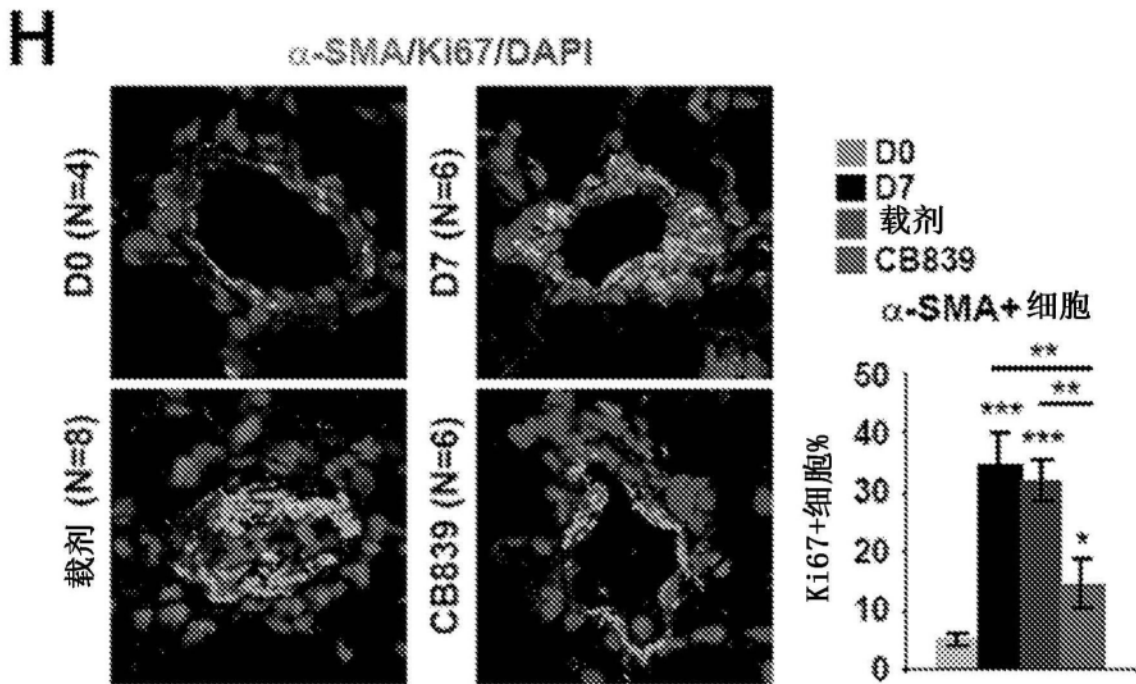
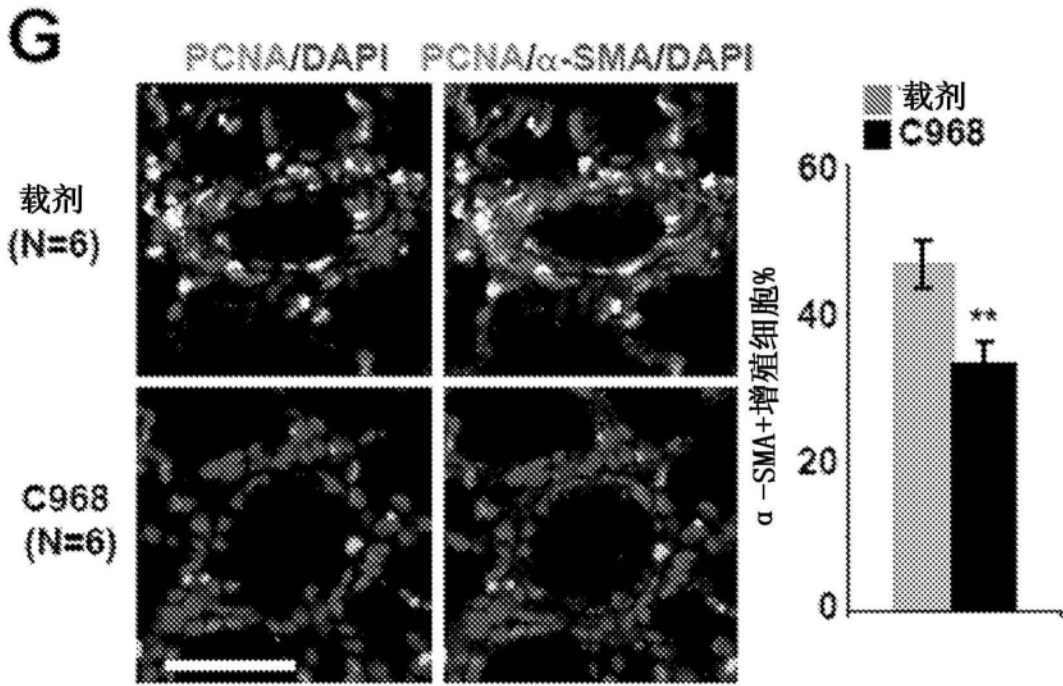


图5续

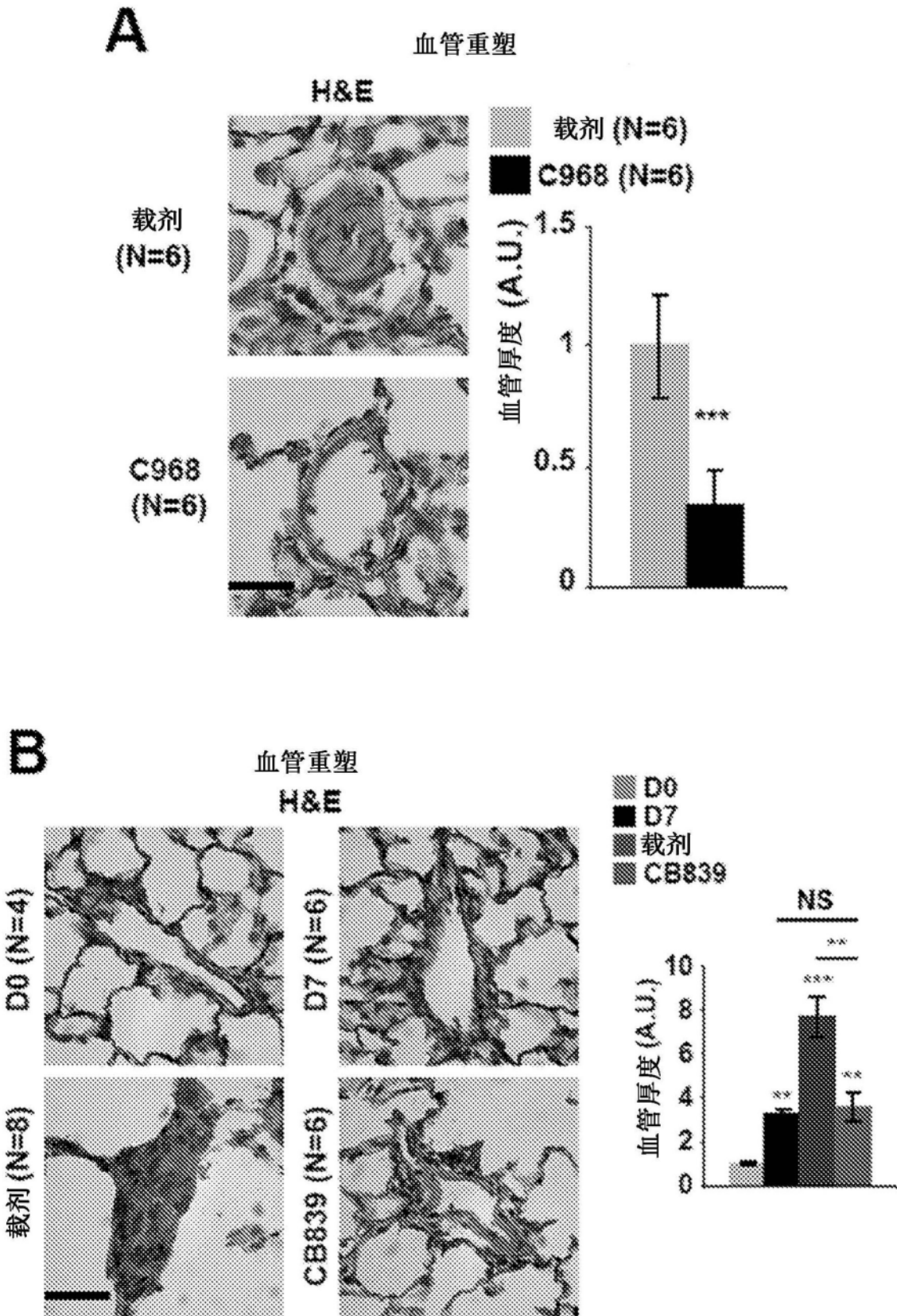


图6

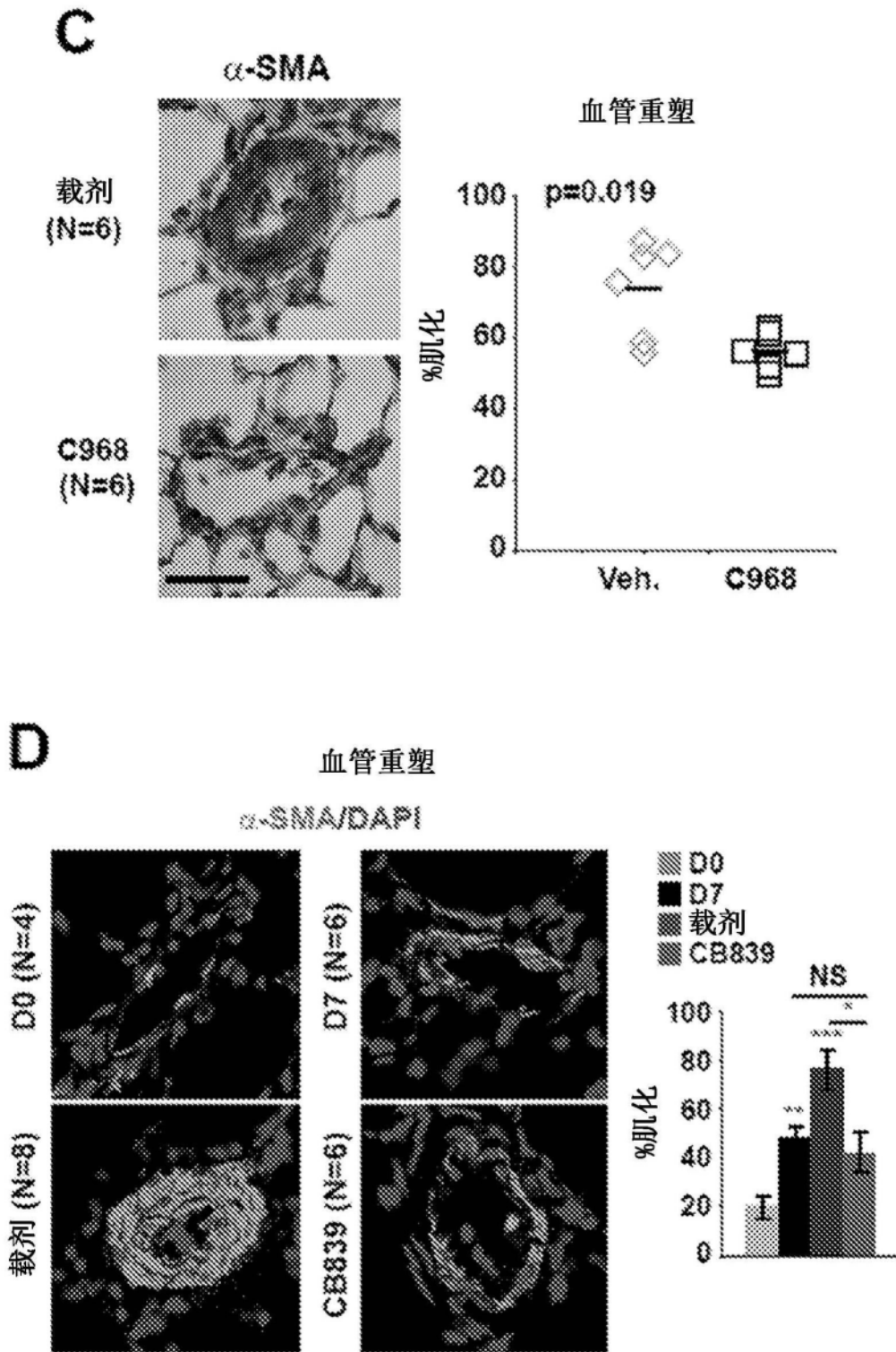


图6续

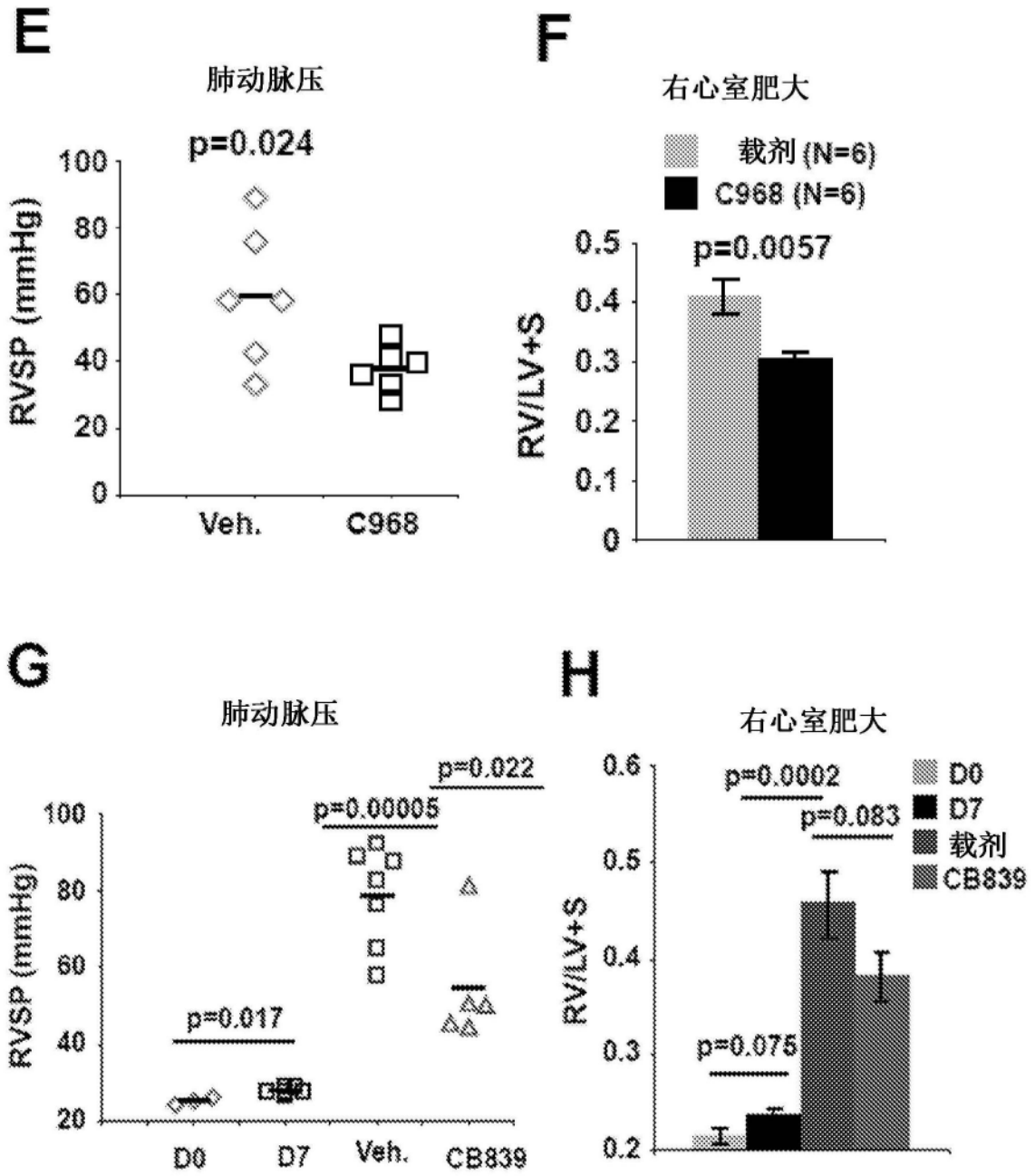


图6续

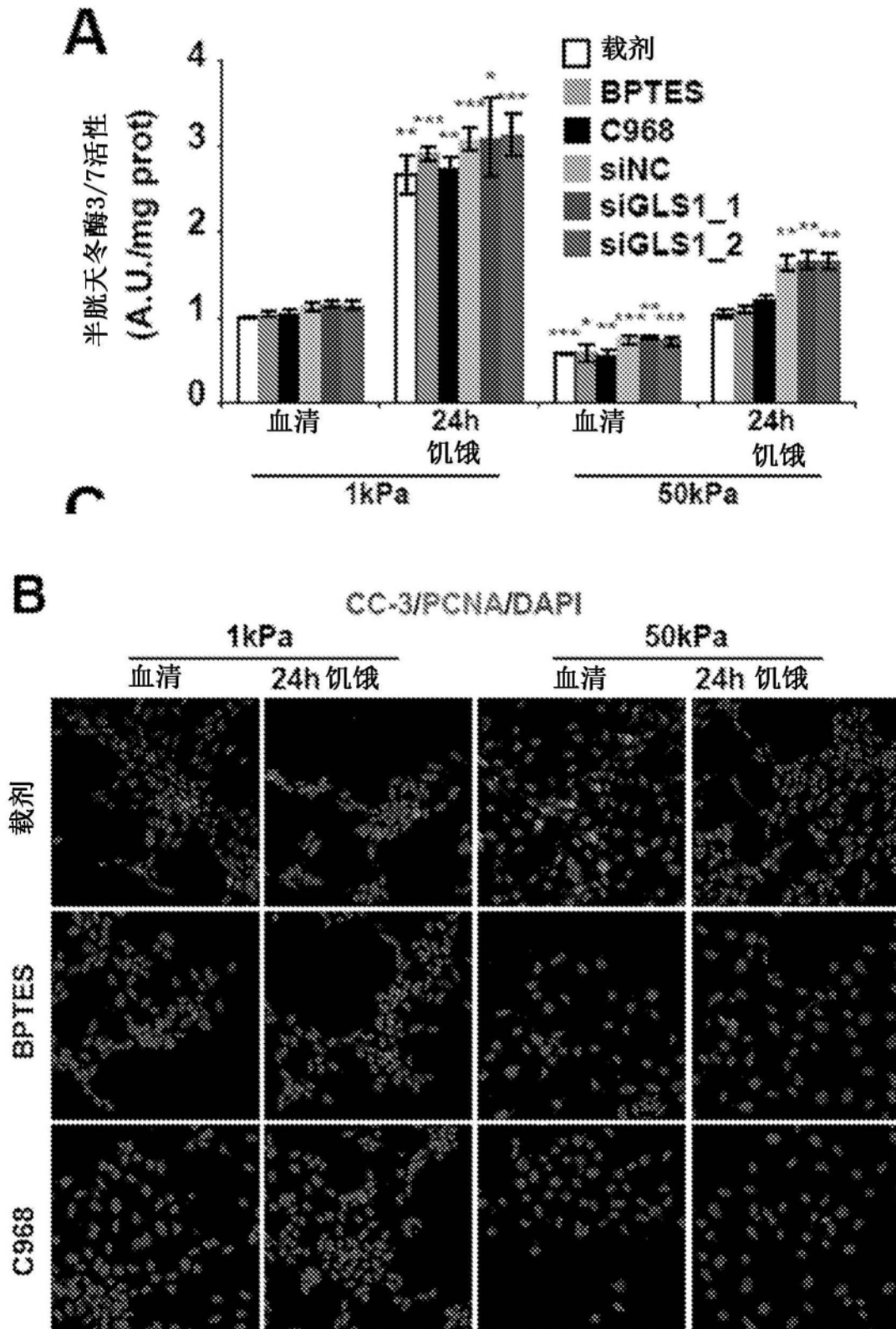


图7

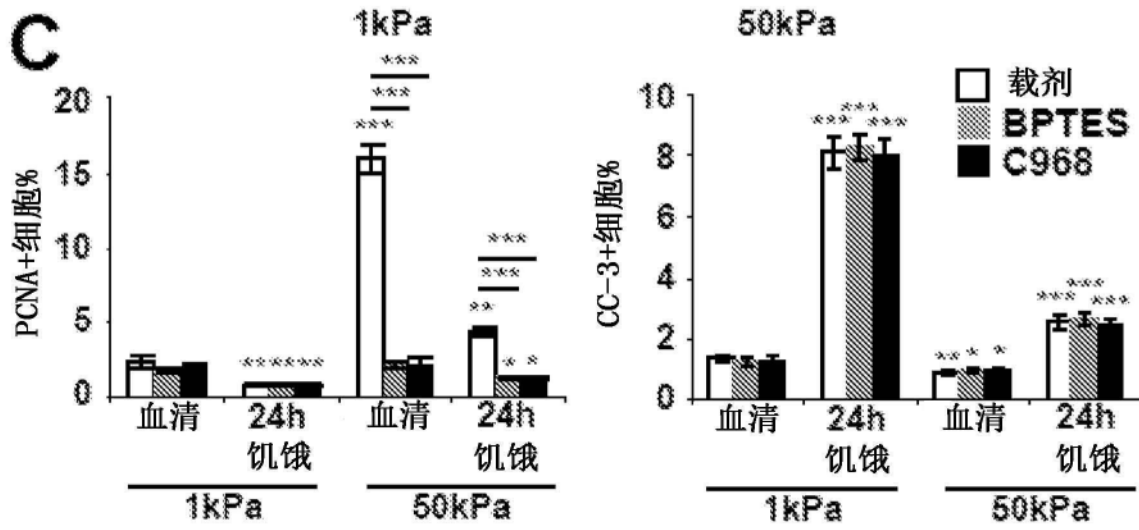


图7续

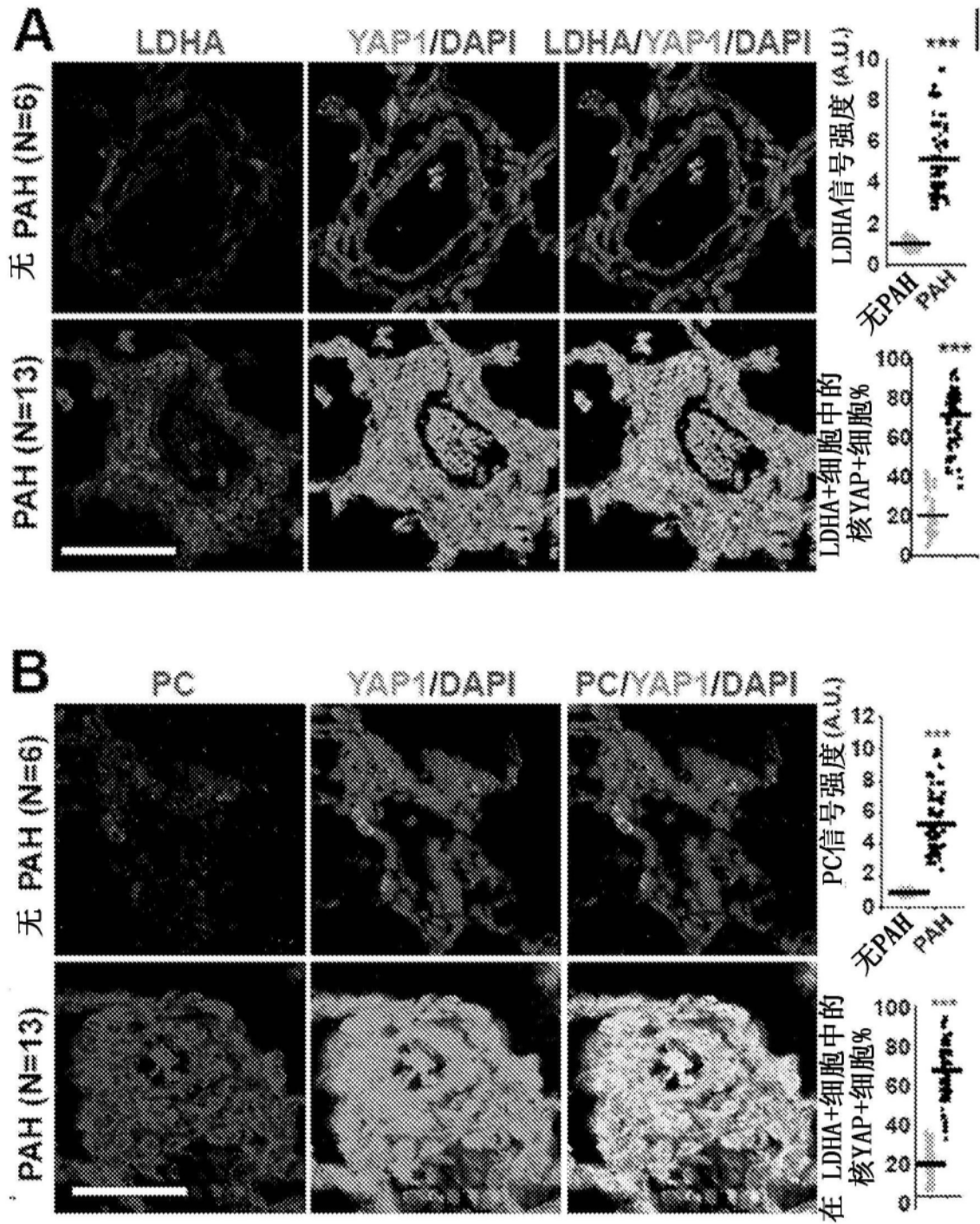


图8



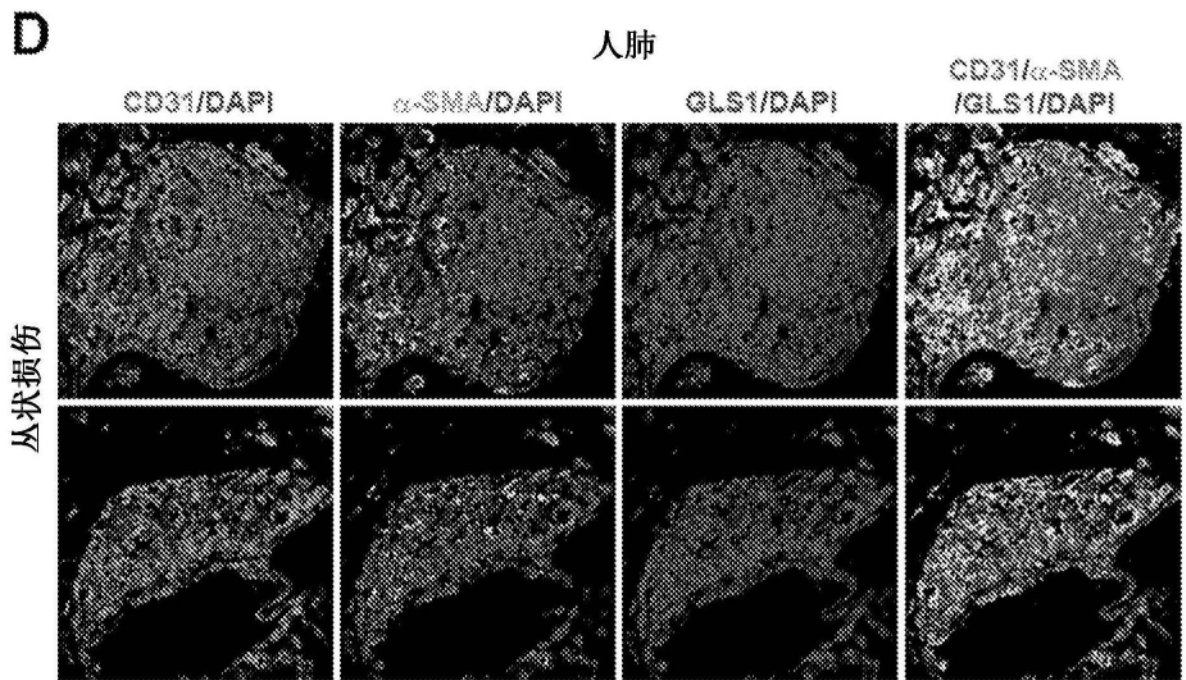
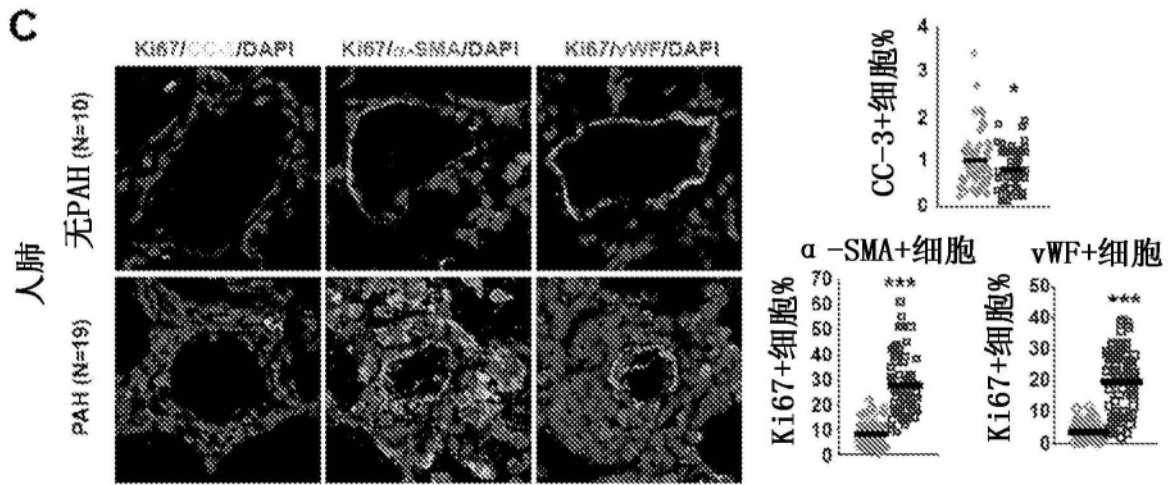


图8续

E

丛状损伤

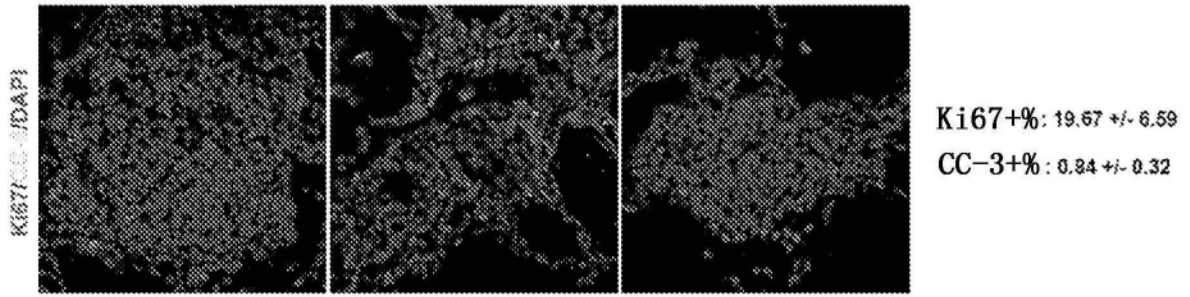


图8续

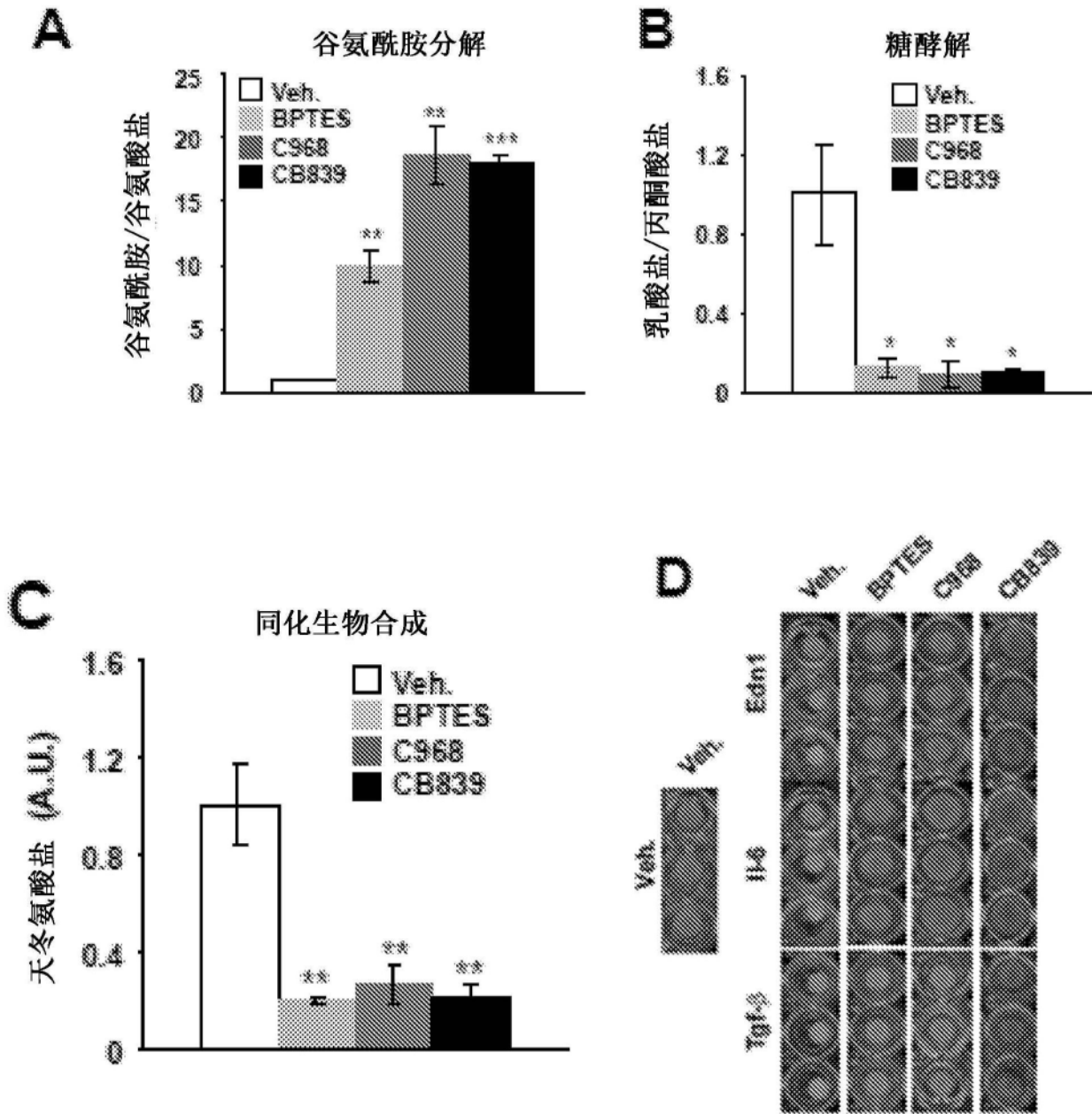


图9

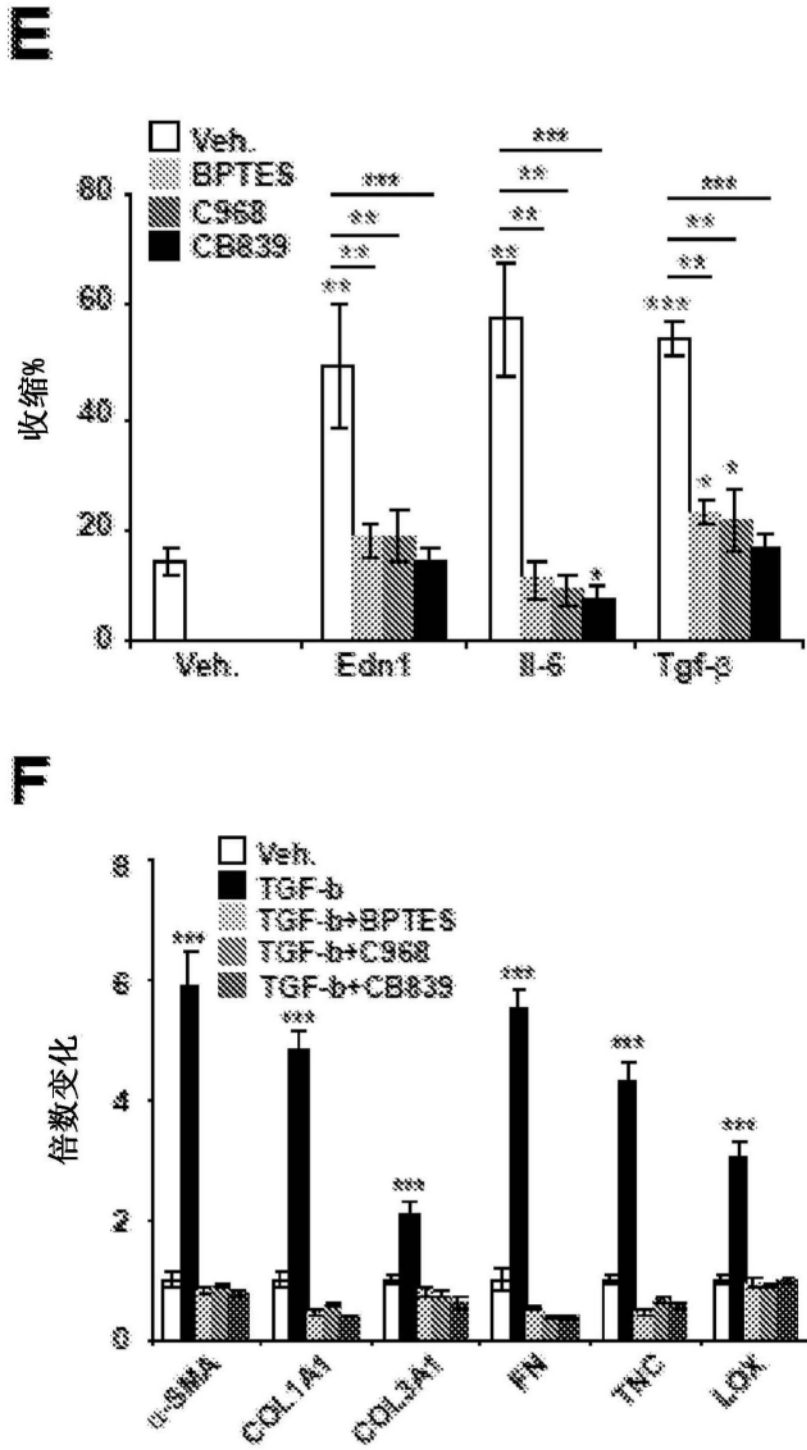


图9续

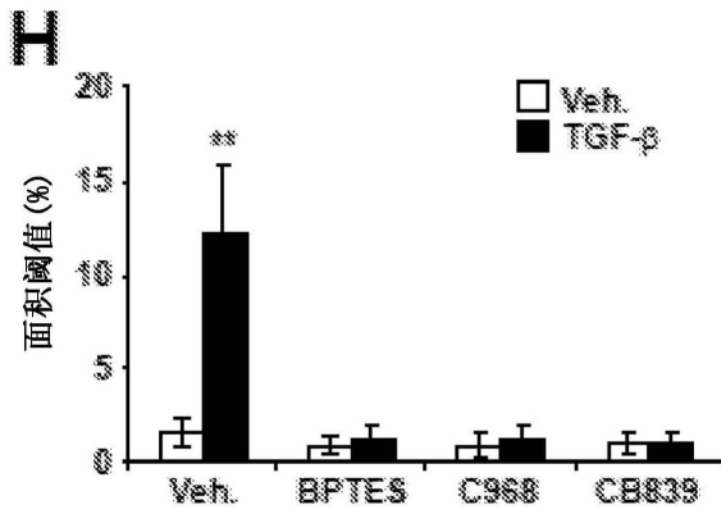
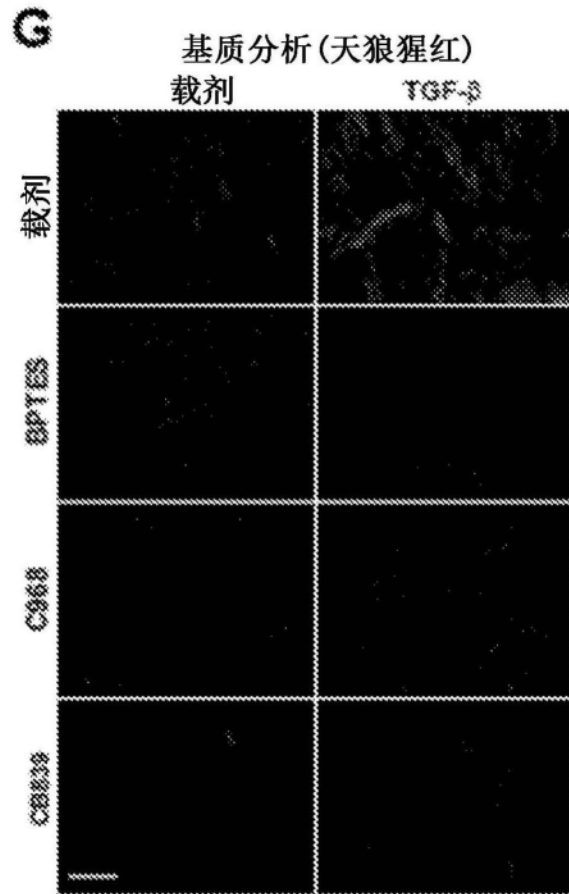


图9续

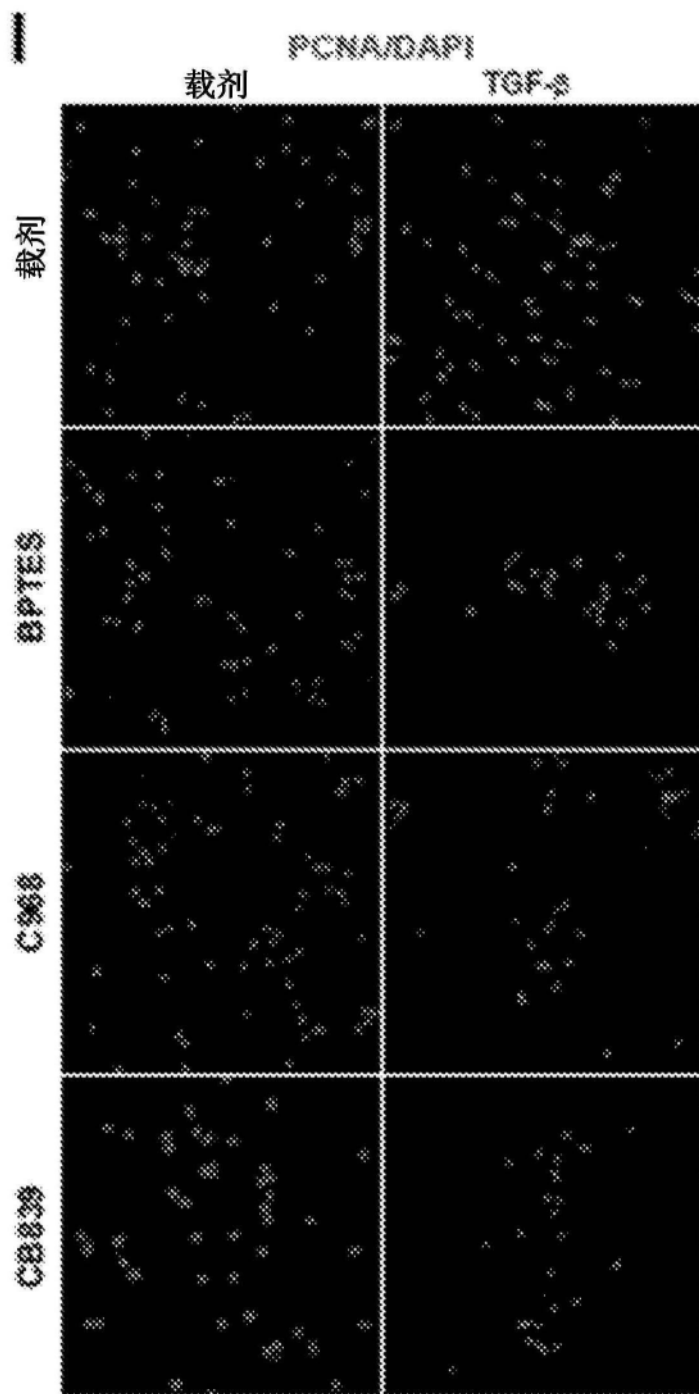


图9续

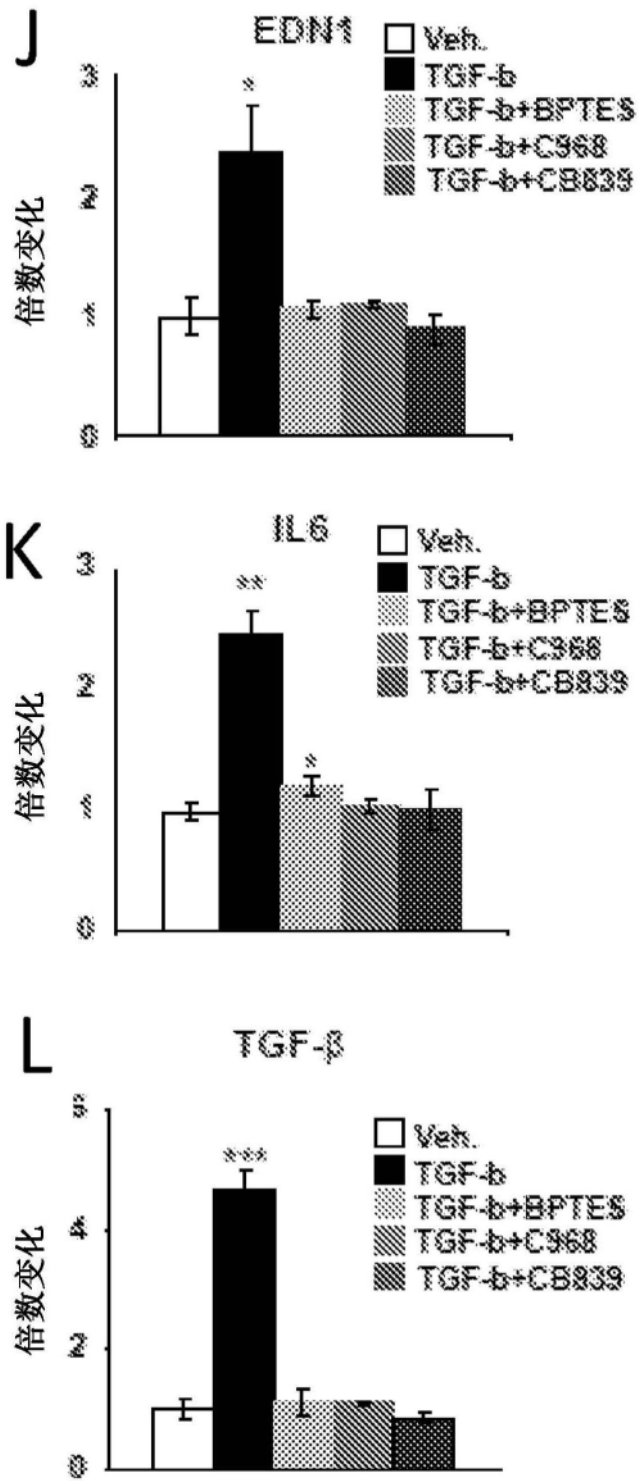


图9续

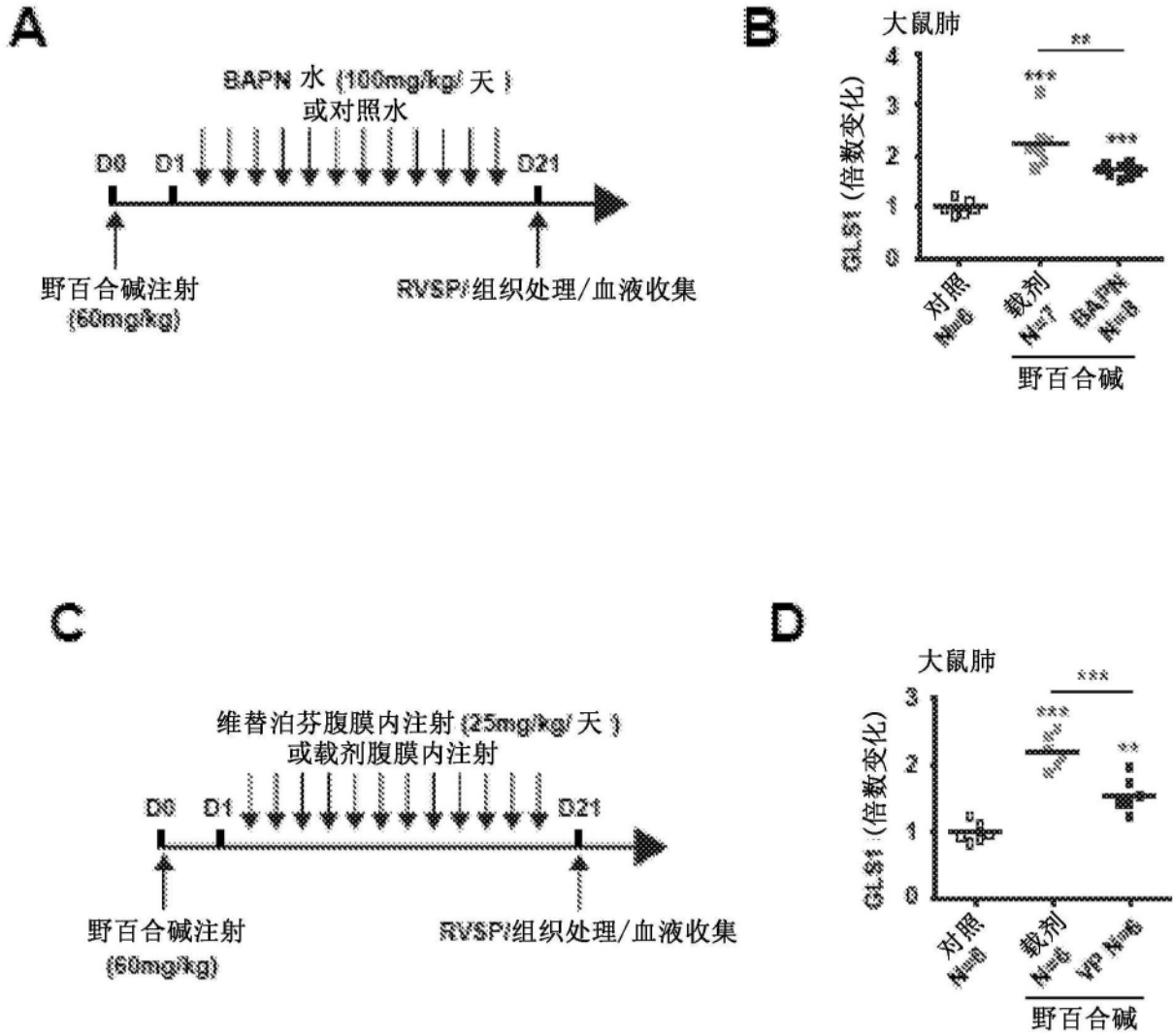


图10

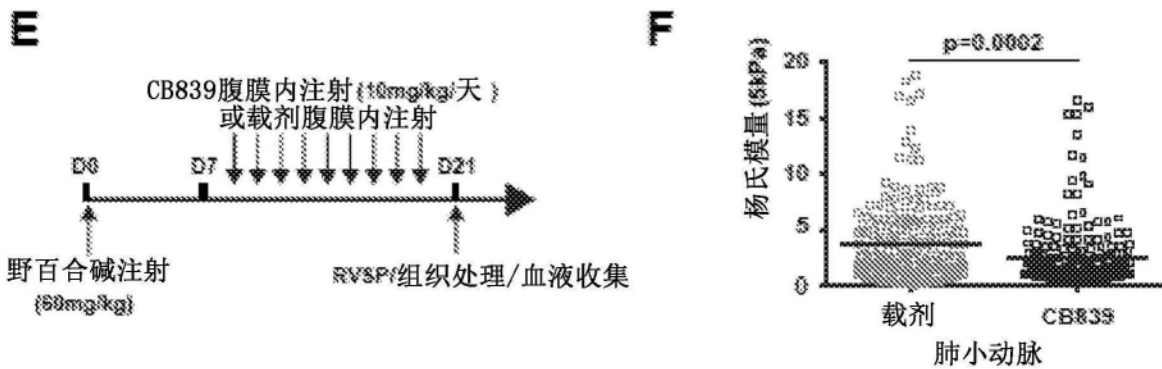


图10续