

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2020-520906

(P2020-520906A)

(43) 公表日 令和2年7月16日 (2020.7.16)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>A 6 1 K 31/4545 (2006.01)</b>	A 6 1 K 31/4545	2 G 0 4 5
<b>A 6 1 P 11/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 11/00	4 B 0 6 3
<b>A 6 1 P 9/12 (2006.01)</b>	A 6 1 P 9/12	4 C 0 8 4
<b>A 6 1 P 43/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 43/00 1 2 1	4 C 0 8 6
<b>A 6 1 K 45/00 (2006.01)</b>	A 6 1 K 45/00	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 94 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2019-563129 (P2019-563129)  
 (86) (22) 出願日 平成30年5月18日 (2018.5.18)  
 (85) 翻訳文提出日 令和2年1月14日 (2020.1.14)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2018/033533  
 (87) 国際公開番号 W02018/213800  
 (87) 国際公開日 平成30年11月22日 (2018.11.22)  
 (31) 優先権主張番号 62/508,881  
 (32) 優先日 平成29年5月19日 (2017.5.19)  
 (33) 優先権主張国・地域又は機関  
 米国 (US)

(71) 出願人 515158308  
 ザ ボード オブ トラストィーズ オブ  
 ザ レランド スタンフォード ジュニア  
 ユニバーシティー  
 アメリカ合衆国, カリフォルニア州 94  
 305-2038, スタンフォード, メイ  
 ン クワッド ビー. オー. ボックス 2  
 0386, オフィス オブ ザ ゼネラル  
 カウンセル ビルディング 170, サ  
 ード フロア  
 (74) 代理人 110001302  
 特許業務法人北青山インターナショナル

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 肺高血圧症の治療のためのエンザスタウリン及び脆弱性ヒスチジン三連構造 (F H I T) 増加剤

## (57) 【要約】

本発明は、F H I Tの活性を増強する薬剤、例えばエンザスタウリンを用いて肺高血圧症及び肺気腫を治療又は予防するための方法を提供する。F H I T及び/又はB M P R 2のレベルを用い、且つF H I T及び/又はB M P R 2における突然変異について調べることにより、治療対象の患者を選択する又は治療の有効性を監視するための方法が含まれる。本発明は、エンザスタウリンにより、動物モデル系において誘導される肺高血圧症を予防し、回復に向かわせる証拠、並びにそれがF H I T及び/又はB M P R 2の上方制御により作用するという証拠に基づく。

【選択図】 図 8

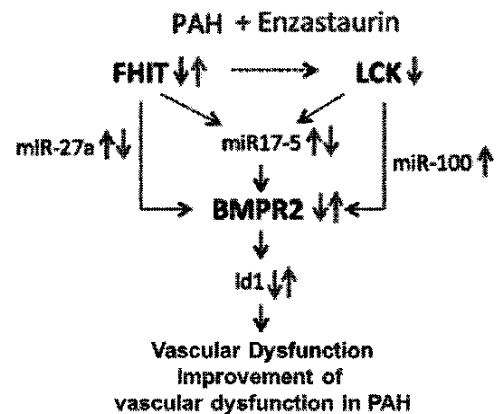


FIG. 8M

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

予防及び／又は治療を必要とする対象における肺高血圧症及び／又は肺気腫を予防及び／又は治療するための方法において、

1) 脆弱性ヒスチジン三連構造 (Fragile Histidine Triad) (F H I T) のレベル及び／若しくは活性を提供若しくは増強する薬剤；及び／又は

2) エンザスタウリン、

を前記対象に有効量で投与するステップを含むことを特徴とする方法。

**【請求項 2】**

請求項 1 に記載の方法において、対象における肺気腫を予防するために用いられることを特徴とする方法。 10

**【請求項 3】**

請求項 1 に記載の方法において、対象における肺気腫を治療するために用いられることを特徴とする方法。

**【請求項 4】**

請求項 1 に記載の方法において、対象における肺高血圧症を予防するために用いられることを特徴とする方法。

**【請求項 5】**

請求項 1 に記載の方法において、対象における肺高血圧症を治療するために用いられることを特徴とする方法。 20

**【請求項 6】**

請求項 4 又は 5 に記載の方法において、前記肺高血圧症が、WHO グループ I の肺動脈高血圧症 (P A H)；WHO グループ I の肺静脈閉塞症 (P V O D) 若しくは肺毛細管腫症 (P C H)；WHO グループ I の新生児の持続性肺高血圧症；WHO グループ I I の左心疾患に続発する肺高血圧症；WHO グループ I I I の肺疾患若しくは慢性低酸素に起因する肺高血圧症、WHO グループ I V の慢性動脈閉塞症；又は WHO グループ V の不明瞭な若しくは多因子機構を有する肺高血圧症に属することを特徴とする方法。

**【請求項 7】**

請求項 6 に記載の方法において、前記対象が、右室収縮期圧 (R V S P) 上昇、右室肥大、心線維症、肺血管リモデリング、例えば、血管欠損、血管筋性化 (m u s c u l a r i z a t i o n) 及び／又は新生内膜形成、又は肺気腫を有することを特徴とする方法。 30

**【請求項 8】**

請求項 6 に記載の方法において、前記肺高血圧症が、肺高血圧症 (P H)、肺動脈高血圧症 (P A H)、慢性閉塞性肺疾患 (C O P D) 又は肺気腫であることを特徴とする方法。

**【請求項 9】**

請求項 1 乃至 8 の何れか 1 項に記載の方法において、前記肺高血圧症又は肺気腫が、対象において自発的に発生する (例えば特発性 P H) ことを特徴とする方法。

**【請求項 10】**

請求項 1 乃至 8 の何れか 1 項に記載の方法において、前記肺高血圧症又は肺気腫が、対象の遺伝的背景に基づいて発生する (例えば家族性 P H) ことを特徴とする方法。 40

**【請求項 11】**

請求項 1 乃至 8 の何れか 1 項に記載の方法において、前記肺高血圧症又は肺気腫が、別の疾患又は障害に起因又は関連して、例えば慢性閉塞性肺疾患 (C O P D) に続発して発生することを特徴とする方法。

**【請求項 12】**

請求項 1 乃至 11 の何れか 1 項に記載の方法において、F H I T、又はその機能断片の生成をもたらす薬剤が有効量で対象に投与されることを特徴とする方法。

**【請求項 13】**

請求項 12 に記載の方法において、前記薬剤が、前記対象において、F H I T、又はそ 50

の機能断片を生成するように設計されるポリヌクレオチドを含むことを特徴とする方法。

【請求項 14】

請求項 13 に記載の方法において、前記ポリヌクレオチドが、F H I T、又はその機能断片をコードする D N A 分子であることを特徴とする方法。

【請求項 15】

請求項 13 に記載の方法において、前記ポリヌクレオチドが、F H I T、又はその機能断片をコードする R N A 分子であることを特徴とする方法。

【請求項 16】

請求項 12 に記載の方法において、前記薬剤が、F H I T、又はその機能断片を含むポリペプチドを含むことを特徴とする方法。

10

【請求項 17】

請求項 1 乃至 11 の何れか 1 項に記載の方法において、薬剤、例えば、m i R N A 17 - 5、マイクロ R N A 24 a、マイクロ R N A 模倣体若しくはマイクロ R N A アンタゴミルなどのマイクロ R N A、又は F H I T、又はその機能断片のレベルを増加させる、デシタピンなどの脱メチル化剤が、有効量で対象に投与されることを特徴とする方法。

【請求項 18】

請求項 17 に記載の方法において、前記薬剤、例えばエンザスタウリンが、前記対象における F H I T、又はその機能断片をコードする D N A 分子の発現を増強することを特徴とする方法。

20

【請求項 19】

請求項 17 に記載の方法において、前記薬剤が、前記対象における F H I T、又はその機能断片をコードする R N A 分子の翻訳を増強することを特徴とする方法。

【請求項 20】

請求項 17 に記載の方法において、前記薬剤が、前記対象における F H I T、又はその機能断片の安定性を増強することを特徴とする方法。

【請求項 21】

請求項 20 に記載の方法において、前記薬剤が、活性化された G q 又は G q の活性化及び G 複合体との解離をもたらす、G q 共役受容体に結合する作動薬を含むことを特徴とする方法。

30

【請求項 22】

請求項 21 に記載の方法において、前記薬剤が、前記対象における F H I T、又はその機能断片の分解を遮断又は低減することを特徴とする方法。

【請求項 23】

請求項 22 に記載の方法において、前記薬剤が、前記対象における F H I T、又はその機能断片のリン酸化、例えば、F H I T の T y r 114 部位での S r c 媒介性リン酸化を遮断又は低減することを特徴とする方法。

【請求項 24】

請求項 1 乃至 11 の何れか 1 項に記載の方法において、F H I T の活性を増強する薬剤が、有効量で対象に投与されることを特徴とする方法。

【請求項 25】

請求項 1 乃至 11 の何れか 1 項に記載の方法において、エンザスタウリンが、有効量で対象に投与されることを特徴とする方法。

40

【請求項 26】

請求項 25 に記載の方法において、対象における肺気腫を予防するため、エンザスタウリンが有効量で前記対象に投与されることを特徴とする方法。

【請求項 27】

請求項 25 に記載の方法において、対象における肺気腫を治療するため、エンザスタウリンが有効量で前記対象に投与されることを特徴とする方法。

【請求項 28】

請求項 25 に記載の方法において、対象における肺高血圧症を予防するため、エンザス

50

タウリンが有効量で前記対象に投与されることを特徴とする方法。

【請求項 29】

請求項 25 に記載の方法において、対象における肺高血圧症を治療するため、エンザスタウリンが有効量で前記対象に投与されることを特徴とする方法。

【請求項 30】

請求項 1 乃至 29 の何れか 1 項に記載の方法において、前記薬剤及び / 又はエンザスタウリンが、対象における F H I T 及び / 又は骨形態形成タンパク質受容体 I I 型 ( B M P R 2 ) を上方制御することを特徴とする方法。

【請求項 31】

請求項 30 に記載の方法において、前記薬剤及び / 又はエンザスタウリンが、前記対象における F H I T 及び / 又は B M P R 2 をマイクロ R N A、例えば m i R 1 7 - 5 及び / 又は m i R 2 7 a を介して上方制御することを特徴とする方法。

10

【請求項 32】

請求項 30 又は 31 に記載の方法において、前記薬剤及び / 又はエンザスタウリンが、前記対象における F H I T 及び B M P R 2 を上方制御することを特徴とする方法。

【請求項 33】

請求項 30 乃至 32 の何れか 1 項に記載の方法において、前記薬剤及び / 又はエンザスタウリンが、前記薬剤及び / 又はエンザスタウリンの対象における F H I T の上方制御と独立して、B M P R 2 を上方制御することを特徴とする方法。

【請求項 34】

20

請求項 1 乃至 33 の何れか 1 項に記載の方法において、前記薬剤及び / 又はエンザスタウリンが、対象における P K C 阻害と独立して、肺高血圧症及び / 又は肺気腫を予防及び / 又は治療することを特徴とする方法。

【請求項 35】

請求項 1 乃至 34 の何れか 1 項に記載の方法において、前記薬剤及び / 又はエンザスタウリンが、対象における右心室収縮期圧 ( R V S P )、R V 肥大、心線維症及び / 又は血管リモデリングを改善することにより、肺高血圧症及び / 又は肺気腫を予防及び / 又は治療することを特徴とする方法。

【請求項 36】

請求項 1 乃至 35 の何れか 1 項に記載の方法において、前記薬剤及び / 又はエンザスタウリンが、対象における R V S P 上昇、R V H 増加、血管希薄化、遠位血管の筋性化及び / 又は新生内膜形成を予防又は低減することにより、肺高血圧症及び / 又は肺気腫を予防及び / 又は治療することを特徴とする方法。

30

【請求項 37】

請求項 1 乃至 36 の何れか 1 項に記載の方法において、有効量の薬剤及び / 又はエンザスタウリンが、末期 P H を有する又は有することが疑われる対象に投与されることを特徴とする方法。

【請求項 38】

請求項 37 に記載の方法において、前記末期 P H が、肺血管閉塞、R V S P 上昇、例えば R V S P > 1 0 0 m m H g、平均 P A P 及び / 又は P V R の増加、右心不全、R V H 増加、R V 機能の低下及び R V 拡大、並びに / 又は間質性線維症の増加によって特徴づけられることを特徴とする方法。

40

【請求項 39】

請求項 37 又は 38 に記載の方法において、前記薬剤及び / 又はエンザスタウリンによる前記治療により、全肺における F H I T 及び / 又は B M P R 2 の発現が増強され、肺血管閉塞が低減されるか若しくは回復に向かい、且つ / 又は小血管及び大血管の筋性化、R V H、R V 線維症、R V 拡大及び R V S P、平均 P A P、P V R の少なくとも 1 つが減少し、並びに R V 機能が増強されることを特徴とする方法。

【請求項 40】

請求項 39 に記載の方法において、前記治療対象において、前記肺動脈平均圧 ( P A P

50

m) 及び前記肺血管抵抗 (PVR) が減少し、且つ前記心拍出量 (CO) が増加することを特徴とする方法。

【請求項 41】

請求項 1 乃至 40 の何れか 1 項に記載の方法において、前記対象が、低レベルの BMPR2 を有する若しくは有することが疑われる、又は BMPR2 突然変異を有する若しくは有することが疑われることを特徴とする方法。

【請求項 42】

請求項 41 に記載の方法において、前記対象が、肺高血圧症及び / 又は肺気腫を有しない対象の BMPR2 レベル以下の BMPR2 レベルを有することを特徴とする方法。

【請求項 43】

請求項 41 に記載の方法において、前記対象が、BMPR2 遺伝子における点突然変異、付加及び / 又は欠失、例えば、BMPR2 のリガンド結合、キナーゼ及び / 又はテイル領域における点突然変異を有することを特徴とする方法。

【請求項 44】

請求項 1 乃至 43 の何れか 1 項に記載の方法において、前記対象が、低レベルの FHIIT を有する若しくは有することが疑われる、又は FHIIT 突然変異を有する若しくは有することが疑われることを特徴とする方法。

【請求項 45】

請求項 44 に記載の方法において、前記対象が、肺高血圧症及び / 又は肺気腫を有しない対象の FHIIT レベル以下の FHIIT レベルを有することを特徴とする方法。

【請求項 46】

請求項 44 に記載の方法において、前記対象が、FHIIT 遺伝子における点突然変異、付加及び / 若しくは欠失、及び / 又は FHIIT 遺伝子の異常なメチル化状態を有することを特徴とする方法。

【請求項 47】

請求項 1 乃至 46 の何れか 1 項に記載の方法において、前記薬剤及び / 又はエンザスタウリンが、約 5 mg / 日 ~ 約 1,000 mg / 日の範囲の用量で投与されることを特徴とする方法。

【請求項 48】

請求項 1 乃至 47 の何れか 1 項に記載の方法において、前記薬剤及び / 又はエンザスタウリンが、インビボレベルを得るための用量、例えば、約 20 ナノモル / L ~ 約 6,000 ナノモル / L の範囲の血清又は血漿濃度で投与されることを特徴とする方法。

【請求項 49】

請求項 1 乃至 48 の何れか 1 項に記載の方法において、薬学的に許容できる担体又は賦形剤を対象に投与することをさらに含むことを特徴とする方法。

【請求項 50】

請求項 1 乃至 49 の何れか 1 項に記載の方法において、対象における肺高血圧症及び / 又は肺気腫を予防及び / 又は治療するための第 2 の予防薬又は治療薬を有効量で投与することをさらに含むことを特徴とする方法。

【請求項 51】

請求項 50 に記載の方法において、肺高血圧症を予防及び / 又は治療するための前記第 2 の予防薬又は治療薬が、血管作用物質、プロスタグランジン、エンドセリン受容体拮抗剤、ホスホジエステラーゼ 5 型阻害剤又は可溶性グアニル酸シクラーゼのアクチベーターであることを特徴とする方法。

【請求項 52】

請求項 50 又は 51 に記載の方法において、肺気腫を予防及び / 又は治療するための前記第 2 の予防薬又は治療薬が、気管支拡張薬、ステロイド薬又は抗生物質であることを特徴とする方法。

【請求項 53】

請求項 1 乃至 52 の何れか 1 項に記載の方法において、前記薬剤及び / 又はエンザスタ

10

20

30

40

50

ウリンが、経口、経鼻、吸入、非経口、静脈内、腹腔内、皮下、筋肉内、皮内、局所、又は直腸経路を介して投与されることを特徴とする方法。

【請求項 5 4】

請求項 1 乃至 5 3 の何れか 1 項に記載の方法において、有効量の前記薬剤及び / 又はエンザスタウリンが、対象に投与されることで、前記対象の全身性血圧を低減することを特徴とする方法。

【請求項 5 5】

請求項 1 乃至 5 4 の何れか 1 項に記載の方法において、前記治療により、前記対象において、平均 P A P 肺動脈圧 ( P A P m ) が 2 0 m m H g 未満に低下し、P V R が 3 W U 未満に低下し、且つ / 又は P A W P ( 肺動脈楔入圧 ) が 1 5 超に上昇することを特徴とする方法。

10

【請求項 5 6】

請求項 1 乃至 5 5 の何れか 1 項に記載の方法において、前記対象が哺乳動物であることを特徴とする方法。

【請求項 5 7】

請求項 5 6 に記載の方法において、前記哺乳動物がヒトであることを特徴とする方法。

【請求項 5 8】

請求項 5 6 に記載の方法において、前記哺乳動物が非ヒト哺乳動物であることを特徴とする方法。

【請求項 5 9】

20

対象における脆弱性ヒスチジン三連構造 ( F H I T ) のレベル及び / 若しくは活性を提供若しくは増強する薬剤及び / 又はエンザスタウリンの、前記対象における肺高血圧症及び / 又は肺気腫を予防及び / 又は治療するための薬剤の製造における有効量での使用。

【請求項 6 0】

1 ) 対象における脆弱性ヒスチジン三連構造 ( F H I T ) のレベル及び / 若しくは活性を提供若しくは増強する薬剤及び / 又はエンザスタウリン ; 並びに

2 ) 肺高血圧症及び / 又は肺気腫を予防及び / 又は治療するための第 2 の予防薬又は治療薬

を含むことを特徴とする組み合わせ。

【請求項 6 1】

30

有効量の請求項 6 0 に記載の組み合わせ、及び薬学的に許容できる担体又は賦形剤を含むことを特徴とする医薬組成物。

【請求項 6 2】

予防及び / 又は治療を必要とする対象における肺高血圧症及び / 又は肺気腫を予防及び / 又は治療するための方法において、有効量の請求項 6 0 に記載の組み合わせ又は請求項 6 1 に記載の医薬組成物を前記対象に投与するステップを含むことを特徴とする方法。

【請求項 6 3】

対象における肺高血圧症及び / 又は肺気腫を評価するための方法において、

a ) 対象からサンプルを準備するステップと ;

b ) 前記対象における肺高血圧症及び / 又は肺気腫を評価するため、前記サンプル中の F H I T 及び / 又は B M P R 2 のレベル及び / 又は活性を評価するステップと、  
を含むことを特徴とする方法。

40

【請求項 6 4】

請求項 6 3 に記載の方法において、前記サンプルが、血液、血清、血漿、若しくは体液サンプル、又はそれらの任意の組み合わせであることを特徴とする方法。

【請求項 6 5】

請求項 6 3 又は 6 4 に記載の方法において、前記対象が哺乳動物であることを特徴とする方法。

【請求項 6 6】

請求項 6 5 に記載の方法において、前記哺乳動物が、非ヒト哺乳動物、例えば、ペット

50

、家畜、コンパニオン動物又は実験動物であることを特徴とする方法。

【請求項 67】

請求項 65 に記載の方法において、前記哺乳動物がヒトであることを特徴とする方法。

【請求項 68】

請求項 63 乃至 67 の何れか 1 項に記載の方法において、ある閾値又は参照値を有すると b) で評価された F H I T 及び / 又は B M P R 2 のレベル及び / 又は活性、例えば正常血圧を有する同等の対象からの F H I T 及び / 又は B M P R 2 のレベル及び / 又は活性と、前記対象が肺高血圧症及び / 又は肺気腫を有する又はそれらを有するというより高いリスクを有することを示す前記閾値又は参照値よりも低いと b) で評価された F H I T 及び / 又は B M P R 2 のレベル及び / 又は活性とを比較するステップをさらに含むことを特徴とする方法。

10

【請求項 69】

請求項 63 乃至 68 の何れか 1 項に記載の方法において、サンプル中の F H I T 及び / 又は B M P R 2 をコードするポリヌクレオチドのレベルが評価されることを特徴とする方法。

【請求項 70】

請求項 69 に記載の方法において、前記ポリヌクレオチドが、F H I T 及び / 又は B M P R 2 をコードする D N A 分子であることを特徴とする方法。

【請求項 71】

請求項 69 に記載の方法において、前記ポリヌクレオチドが、F H I T 及び / 又は B M P R 2 をコードする R N A 分子であることを特徴とする方法。

20

【請求項 72】

請求項 63 乃至 71 の何れか 1 項に記載の方法において、サンプル中の F H I T 及び / 又は B M P R 2 をコードするポリヌクレオチドのレベルが、前記ポリヌクレオチドを増幅すること、ライゲートすること、ハイブリダイズすること、及び / 又は配列決定することを含む手順を用いて評価されることを特徴とする方法。

【請求項 73】

請求項 72 に記載の方法において、前記ポリヌクレオチドが、ポリメラーゼ連鎖反応 ( P C R )、鎖置換増幅 ( S D A )、転写媒介増幅 ( T M A )、リガーゼ連鎖反応 ( L C R )、核酸配列に基づく増幅 ( N A S B A )、プライマー伸長、ローリングサークル増幅 ( R C A )、自己持続配列複製 ( 3 S R )、及びループ介在等温増幅 ( L A M P ) からなる群から選択される手順を用いて増幅されることを特徴とする方法。

30

【請求項 74】

請求項 72 に記載の方法において、前記配列決定が、マクサム・ギルバート配列決定、鎖終結方法、ショットガン配列決定、架橋 P C R、単一分子リアルタイム配列決定、イオン半導体 ( i o n t o r r e n t 配列決定)、合成による配列決定、ライゲーションによる配列決定 ( S O L i D 配列決定)、鎖終結 (サンガー配列決定)、大規模並列シグネチャー配列決定 ( M P S S )、ポロニー配列決定、454 パイロシーケンシング、I l l u m i n a ( S o l e x a ) 配列決定、D N A ナノボール配列決定、ヘリスコープ単一分子配列決定、単一分子リアルタイム ( S M R T ) 配列決定、ナノポア D N A 配列決定、トンネル電流 D N A 配列決定、ハイブリダイゼーションによる配列決定、質量分析を用いた配列決定、マイクロ流体サンガー配列決定、顕微鏡に基づく技術、R N A P 配列決定、及びインビトロウイルスハイスループット配列決定からなる群から選択される形式を用いて実施されることを特徴とする方法。

40

【請求項 75】

請求項 63 乃至 74 の何れか 1 項に記載の方法において、サンプル中の F H I T 及び / 又は B M P R 2 を含むポリペプチドのレベルが評価されることを特徴とする方法。

【請求項 76】

請求項 75 に記載の方法において、サンプル中の F H I T 及び / 又は B M P R 2 を含むポリペプチドの前記レベルが、免疫測定法を用いて評価されることを特徴とする方法。

50

**【請求項 77】**

請求項 76 に記載の方法において、前記免疫測定法が、酵素結合免疫吸着測定 (E L I S A)、免疫プロット、免疫沈降、ラジオイムノアッセイ (R I A)、免疫染色、ラテックス凝集、間接赤血球凝集アッセイ (I H A)、補体結合、間接免疫蛍光アッセイ (I F A)、ネフェロメトリー、フローサイトメトリーアッセイ、表面プラズモン共鳴 (S P R)、化学発光アッセイ、側方流動免疫測定法、u - キャプチャーアッセイ (u - c a p t u r e a s s a y)、阻害アッセイ、及び結合活性アッセイからなる群から選択されることを特徴とする方法。

**【請求項 78】**

請求項 63 乃至 77 の何れか 1 項に記載の方法において、対象における肺高血圧症及び / 又は肺気腫の診断、予後、層別化、リスク評価、又は治療監視のために用いられることを特徴とする方法。

10

**【請求項 79】**

請求項 63 乃至 78 の何れか 1 項に記載の方法において、少なくとも 50 % の感度を有することを特徴とする方法。

**【請求項 80】**

請求項 63 乃至 79 の何れか 1 項に記載の方法において、少なくとも 50 % の特異性を有することを特徴とする方法。

**【請求項 81】**

請求項 63 乃至 80 の何れか 1 項に記載の方法において、前記対象における肺高血圧症及び / 又は肺気腫の前記評価に基づき、前記対象を治療する又は前記対象の治療を変更するステップをさらに含むことを特徴とする方法。

20

**【請求項 82】**

請求項 81 に記載の方法において、前記ヒト患者における肺高血圧症及び / 又は肺気腫の前記評価に基づき、前記ヒト患者を治療する又は前記ヒト患者の治療を変更するステップをさらに含むことを特徴とする方法。

**【請求項 83】**

哺乳動物における肺高血圧症及び肺気腫を減少させる方法において、脆弱性ヒスチジン三連構造 (F H I T) 増加剤エンザスタウリン又は他の F H I T 増加剤を有効量で肺高血圧症又は肺気腫を有する前記哺乳動物に投与するステップを含み、ここで前記投与用量が、1000mg / 日未満であり、且つ前記哺乳動物の血圧を低下させるのに十分である、方法。

30

**【請求項 84】**

低い又は検出不能レベルの F H I T を有する哺乳動物における肺高血圧症又は肺気腫を減少させる方法において、

- a . 前記哺乳動物から血液サンプルを入手するステップと ;
  - b . 前記血液サンプル中の F H I T のレベルを測定するステップと ;
  - c . 前記サンプルが低い又は検出不能レベルの F H I T を有する場合、有効量の F H I T 増加剤エンザスタウリン又は他の F H I T 増加剤を、肺高血圧症又は肺気腫を有する前記哺乳動物に投与するステップと、
- を含むことを特徴とする方法。

40

**【請求項 85】**

低い又は検出不能レベルの F H I T を有する哺乳動物における肺高血圧症又は肺気腫を減少させる方法において、

- a . 前記哺乳動物から組織サンプルを入手するステップと ;
  - b . 前記組織サンプル中の F H I T のレベルを測定するステップと ;
  - c . 前記サンプルが低い又は検出不能レベルの F H I T を有する場合、有効量の F H I T 増加剤エンザスタウリン又は他の F H I T 増加剤を、肺高血圧症又は肺気腫を有する前記哺乳動物に投与するステップと、
- を含むことを特徴とする方法。

50



## 【請求項 86】

低い又は検出不能レベルの B M P R 2 を有する哺乳動物における肺高血圧症又は肺気腫を減少させる方法において、

a . 前記哺乳動物から血液サンプルを入手するステップと；

b . 前記血液サンプル中の B M P R 2 のレベルを測定するステップと；

c . 前記サンプルが低い又は検出不能レベルの B M P R 2 を有する場合、有効量の F H I T 増加剤エンザスタウリン又は他の F H I T 増加剤を、肺高血圧症又は肺気腫を有する前記哺乳動物に投与するステップと、  
を含むことを特徴とする方法。

## 【請求項 87】

10

低い又は検出不能レベルの B M P R 2 を有する哺乳動物における肺高血圧症又は肺気腫を減少させる方法において、

a . 前記哺乳動物から組織サンプルを入手するステップと；

b . 前記組織サンプル中の B M P R 2 のレベルを測定するステップと；

c . 前記サンプルが低い又は検出不能レベルの B M P R 2 を有する場合、有効量の F H I T 増加剤エンザスタウリン又は他の F H I T 増加剤を、肺高血圧症又は肺気腫を有する前記哺乳動物に投与するステップと、  
を含むことを特徴とする方法。

## 【請求項 88】

20

B M P R 2 の突然変異を有する哺乳動物における肺高血圧症又は肺気腫を減少させる方法において、

a . 前記哺乳動物から組織サンプルを入手するステップと；

b . 前記組織サンプルを B M P R 2 の突然変異について分析するステップと；

c . B M P R 2 の突然変異が検出された場合、有効量の F H I T 増加剤エンザスタウリン又は他の F H I T 増加剤を、肺高血圧症又は肺気腫を有する前記哺乳動物に投与するステップと、  
を含むことを特徴とする方法。

## 【請求項 89】

30

B M P R 2 の突然変異を有する哺乳動物における肺高血圧症又は肺気腫を減少させる方法において、

a . 前記哺乳動物から血液サンプルを入手するステップと；

b . 前記血液サンプルを B M P R 2 の突然変異について分析するステップと；

c . B M P R 2 の突然変異が検出された場合、有効量の F H I T 増加剤エンザスタウリン又は他の F H I T 増加剤を、肺高血圧症又は肺気腫を有する前記哺乳動物に投与するステップと、  
を含むことを特徴とする方法。

## 【請求項 90】

F H I T の突然変異を有する哺乳動物における肺高血圧症又は肺気腫を減少させる方法において、

a . 前記哺乳動物から組織サンプルを入手するステップと；

b . 前記組織サンプルを F H I T の突然変異について分析するステップと；

c . F H I T の突然変異が検出された場合、有効量の F H I T 増加剤エンザスタウリン又は他の F H I T 増加剤を、肺高血圧症又は肺気腫を有する前記哺乳動物に投与するステップと、  
を含むことを特徴とする方法。

## 【請求項 91】

F H I T の突然変異を有する哺乳動物における肺高血圧症又は肺気腫を減少させる方法において、

a . 前記哺乳動物から血液サンプルを入手するステップと；

b . 前記血液サンプルを F H I T の突然変異について分析するステップと；

50

c. F H I Tの突然変異が検出された場合、有効量のF H I T増加剤エンザスタウリン又は他のF H I T増加剤を、肺高血圧症又は肺気腫を有する前記哺乳動物に投与するステップと、  
を含むことを特徴とする方法。

【請求項 9 2】

請求項 1 乃至 4 3 の何れか 1 項に記載の方法において、肺高血圧症又は肺気腫が、P K C 阻害に依存しないが、代わりとして前記新規なシグナル伝達分子F H I Tを通じて予防される又は回復に向けられることを特徴とする方法。

【請求項 9 3】

肺高血圧症又は肺気腫を治療するためのF H I T増加剤の使用。

10

【請求項 9 4】

請求項 9 3 に記載の肺高血圧症又は肺気腫を治療するための使用において、前記F H I T増加剤がエンザスタウリンであることを特徴とする使用。

【請求項 9 5】

請求項 9 3 に記載の肺高血圧症を治療するための使用において、前記F H I T増加剤がエンザスタウリンであることを特徴とする使用。

【請求項 9 6】

請求項 9 3 に記載の肺気腫を治療するための使用において、前記F H I T増加剤がエンザスタウリンであることを特徴とする使用。

【発明の詳細な説明】

20

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本願は、2017年5月19日に出願された米国仮特許出願第62/508881号明細書に対する優先権の利益を主張し、その内容はその全体が参照により本明細書中に援用される。

【0002】

政府の権利

本発明は、国立心肺血液研究所(National Heart Lung and Blood Institute)によって授与された契約K08HL107450-01及びR01HL128734-01A1、並びに国立アレルギー・感染症研究所(National Institute of Allergy and Infectious Diseases)によって授与された契約1U19AI109662、U19AI057229、及びU54I117925の下、政府支援でなされた。政府は、本発明における特定の権利を有する。

30

【0003】

本発明は、様々な個体の応答、例えば、肺高血圧症を含む特定の状態を治療するための治療薬の選択及び使用に対する有効性又は有害作用などを予測するための、1つ以上のゲノムバイオマーカー並びにそれに関連する診断方法、装置、試薬、システム、及びキットを適用する、薬理ゲノミクスの分野に関する。それは、エンザスタウリン及び脆弱性ヒスチジン三連構造(Fragile Histidine Triad)(F H I T)を増強又は誘導する他の薬剤の、F H I Tが欠損した状態を治療するための使用に関する。特に、それは、エンザスタウリン及び他のF H I T増加剤を用いての、肺高血圧症、肺気腫、及びF H I Tの減少若しくは不足に関連した他の状態の治療に関連して有用なバイオマーカーに関する。これらのF H I T増加剤は、肺高血圧症、例えば(限定はされないが)、肺高血圧症(P H)、肺動脈高血圧症(P A H)、慢性閉塞性肺疾患(C O P D)及び肺気腫といったW H O分類によって包含される疾患に見出される、右室収縮期圧(R V S P)上昇、右室肥大、心線維症、肺血管リモデリング(即ち血管欠損及び血管筋性化(m u s c u l a r i z a t i o n))又は肺気腫を呈する疾患を治療するのに有用である。

40

【背景技術】

50

## 【0004】

肺動脈高血圧症（PAH）は、最終的に右側心不全及び寿命の大幅な短縮に至る、進行性の閉塞性肺脈管障害（occlusive pulmonary vasculopathy）によって特徴づけられる壊滅的疾患である。骨形態形成受容体Ⅱ型（BMPR2）遺伝子における突然変異は、家族性PAH（FPAH）患者の約75%に存在し（1）、これはBMPR2が該疾患の病態形成に明らかに関与している。BMPR2の突然変異及びBMPR2の発現低下が多くの特発性PAH（IPAH）及びFPAH患者において報告されたが（2～4）、臨床的PAH表現型を発現するのはBMPR2突然変異キャリアの意外にも比較的少ない割合（約20%）にすぎず、さらなる環境若しくは遺伝要因又は「第2のヒット」が、BMPR2シグナル伝達が決定的閾値未満に減少すること、又はPAH病態形成に関連したBMPR2非依存性経路を標的化することの何れかにより、疾患発生に関与することが示唆される。

10

## 【0005】

現行のPAH治療は、大部分の認可されたPAH薬が主に血管拡張薬又は潜在的なRV安定剤として機能し（5）、肺脈管障害の進行が未検査のままになることから不適切である。PAH、及び肺気腫を含む肺高血圧症を治療するための新しい治療方法が必要とされる。本発明は、理論によって拘束されない限り、FHITのレベルを上昇させることによって機能すると考えられる改善された方法を提供する。BMPR2シグナル伝達を治療標的にすることは、BMPR2の変異性状態に依存せずにPAHを改善するための興味深い方法と考えられる（6～9）。というのは、BMPR2シグナル伝達を増強するとして再提起された薬剤FK506を用いると有効であることが示されているからである（10～12）。したがって、我々の目標は、FPAH及びIPAH患者におけるBMPR2シグナル伝達又は発現を増強するためのBMPR2モディファイヤー遺伝子及びFHITの発現又は活性の低下を用いたその他を同定し、薬学的に標的にすることであった。

20

## 【0006】

本明細書に提供されるデータは、BMPR2シグナル伝達を調節する遺伝子の系統的なハイスループットsiRNAスクリーン（HTS）を、公的に利用可能なPAH RNA発現の新規なマルチコホート及び多重組織分析手法と組み合わせている。siRNAスクリーンでは、ID1発現による評価として、ノックダウンされるときにBMPR2シグナル伝達を減少させるBMPR2活性化遺伝子が同定された。これら遺伝子と公的に利用可能なPAH遺伝子発現データセットにおける一貫して下方制御される遺伝子との交差検証により、BMPR2モディファイヤー遺伝子がPAHにおいて臨床的に関連することが示された。その結果によると、これら遺伝子の上方制御によると、肺高血圧症及び類似の障害を有する対象における臨床成績が改善されることが示され、また脆弱性ヒスチジン三連構造（FHIT）が、PAHにおける有望なモディファイヤー遺伝子であり、且つFHIT発現の減少が、インビトロ及びインビボで減少したBMPR2シグナル伝達及び内皮細胞（EC）機能障害に関連したことが示される。

30

## 【0007】

FHITは、複製ストレスとそれに伴う欠失を最も受けやすいヒト共通の脆弱部位である、FRA3B遺伝子座と重複する、染色体3上に位置するヒスチジン三連構造ファミリーのメンバーである（13）。腫瘍抑制遺伝子FHITは、発癌物質又はストレス、例えばタバコ煙及びUV照射への曝露後、容易に失われる（14、15）。FHITは、肺において高度に発現され（16）、一般に肺がん及び他の悪性腫瘍において失われる（17、18）。さらに、FHITは、潜在的にはそれをPAH内皮及び平滑筋細胞（PASMC）において認められる異常な増殖性表現型に関連づける様々な細胞型におけるアポトーシス及び増殖に関与する（19、20）。FHIT及びBMPR2の発現は、リンパ腫再発を予防するための第ⅡⅢ相臨床試験にて試験された安全で且つ十分な耐容性がある薬剤エンザスタウリンによって上方制御された（21）。意外にも、エンザスタウリンによるFHITの増強により、実験的PHの進行が予防され、回復に向かったことが本明細書中に示されている。これは、FHITがPHの病態形成において機構的に重

40

50

要であり、且つエンザスタウリン又は他の F H I T 増加剤が P A H 及び類似の F H I T 欠損状態の臨床的治療において有用となることを示す（（ 2 2 ）要約）。

【 0 0 0 8 】

以下の概要は、主張される主題の範囲を限定するように用いられることは意図されない。主張される主題の他の特徴、詳細、有用性、及び利点は、添付の図面及び添付の特許請求の範囲において開示される態様を含む詳細な説明から明らかになるであろう。

【 発明の概要 】

【 0 0 0 9 】

本発明の一実施形態は、P H の病状の予測用のバイオマーカーとしての F H I T の使用を含む。本発明の別の実施形態は、肺高血圧症又はその症状の発生についてのリスク因子を有する哺乳類における予防的な又は寛解させる治療戦略としての、P K C 阻害に依存しない、F H I T 増加剤エンザスタウリン、又は F H I T 増加剤としての機能に起因した他の F H I T 増加剤の使用を含む。本発明の別の実施形態は、F H I T レベルを上昇させるために F H I T 増加剤エンザスタウリン又は他の F H I T 増加剤を用いる、肺高血圧症の症状を呈する哺乳動物における肺高血圧症を低減する方法を含む。特定の実施形態では、該方法は、F H I T 増加剤エンザスタウリン又は他の F H I T 増加剤を、肺動脈高血圧症を有する哺乳動物に、血圧を低下させ且つ F H I T レベルを上昇させるのに十分な用量で投与することを含む。場合によっては、哺乳動物は、マウス、ラット又はヒトであってもよい。特定の症例では、哺乳動物は、B M P R 2 遺伝子の 1 つの対立遺伝子のノックアウトによって引き起こされる遺伝性の肺動脈高血圧症（例えば F P A H ）を有する。特定の症例では、肺高血圧症は、F H I T 遺伝子の両対立遺伝子でのホモ接合性ノックアウトによって引き起こされた。特定の症例では、肺高血圧症は、例えば、S u g e n 5 4 1 6 の投与及び慢性低酸素への曝露後に実験的肺高血圧症を誘導することによる、F H I T の誘導によって引き起こされた。特定の症例では、F H I T 増加剤エンザスタウリン又は他の F H I T 増加剤は、右室サイズ及び右室収縮期圧における減少を達成するのに十分な用量で経口的に投与されてもよい。

10

20

【 0 0 1 0 】

一態様では、本発明は、予防及び / 又は治療を必要とする対象において肺高血圧症及び / 又は肺気腫を予防及び / 又は治療するための方法において、

1 ) 脆弱性ヒスチジン三連構造 ( F H I T ) のレベル及び / 若しくは活性を提供若しくはは増強する薬剤 ; 及び / 又は

30

2 ) エンザスタウリン

を前記対象に有効量で投与するステップを含むことを特徴とする方法を提供する。この態様は、治療におけるエンザスタウリンの使用、特に肺高血圧症又は肺気腫を治療するためのエンザスタウリンの使用を含む。それはまた、薬剤、特に肺高血圧症又は肺気腫を治療するための薬剤の製造におけるエンザスタウリンの使用を含む。

【 0 0 1 1 】

別の態様では、本発明は、

1 ) 対象における脆弱性ヒスチジン三連構造 ( F H I T ) のレベル及び / 若しくは活性を提供若しくは増強する薬剤及び / 又はエンザスタウリン ; 並びに

40

2 ) 肺高血圧症及び / 又は肺気腫を予防及び / 又は治療するための第 2 の予防薬又は治療薬

を含む、治療的有用性を有する組み合わせを提供する。

【 0 0 1 2 】

別の態様では、本発明は、有効量のエンザスタウリン、又は上記のようなエンザスタウリンを含む組み合わせ、及び薬学的に許容できる担体又は賦形剤を含む医薬組成物を提供する。この態様は、好ましくは薬学的に許容できる担体又は賦形剤を含む、薬剤の製造における、F H I T の活性を増強する薬剤、例えばエンザスタウリンの使用を含む。それは、F H I T の活性を増強する薬剤、例えばエンザスタウリンを含む組み合わせ、及び少なくとも 1 つの薬学的に許容できる担体又は賦形剤の治療における使用をさらに提供し、こ

50

ここで治療における使用は、肺高血圧症又は肺気腫、例えば、F P A H、P A H、及び／又は i P A H など、本明細書に記載のこれら状態の形態などを治療するための使用である。

【0013】

別の態様では、本発明は、予防及び／又は治療を必要とする対象において肺高血圧症及び／又は肺気腫を予防及び／又は治療するための方法において、有効量のエンザスタウリン、又は上記のようなエンザスタウリンを含む組み合わせ、上記のようなエンザスタウリンを含む組み合わせを含む、エンザスタウリンを有効量で含む医薬組成物を、前記対象に投与するステップを含むことを特徴とする方法を提供する。

【0014】

さらに別の態様では、本発明は、対象における肺高血圧症及び／又は肺気腫を評価するための方法において、

10

a) 対象からサンプルを準備するステップと；

b) 前記対象における肺高血圧症及び／又は肺気腫を評価するため、前記サンプル中の F H I T 及び／又は B M P R 2 のレベル及び／又は活性を評価するステップと、を含むことを特徴とする方法を提供する。

【0015】

さらに別の態様では、本発明は、エンザスタウリン又はエンザスタウリンを含む組成物による治療に対する、肺高血圧症を有する対象を選択するための方法において、

a) 対象からサンプルを準備するステップと；

20

b) 前記対象における肺高血圧症及び／又は肺気腫を治療するためのエンザスタウリンの適合性を評価するため、前記サンプル中の F H I T 及び／又は B M P R 2 のレベル及び／又は活性を評価するステップと、

を含むことを特徴とする方法を提供する。対象は、F H I T 及び／又は B M P R 2 のレベルが低い（例えば、正常レベルを少なくとも 50 % 下回る、又は少なくとも 80 % 下回る）又は検出不能である場合、エンザスタウリン又は他の F H I T 増加剤による治療に適すると思われる。

【0016】

さらに別の態様では、本発明は、哺乳動物における肺高血圧症又は肺気腫を減少させる方法において、有効量の脆弱性ヒスチジン三連構造（F H I T）増加剤エンザスタウリン又は他の F H I T 増加剤を、肺高血圧症又は肺気腫を有する哺乳動物に投与することを含み、ここで投与用量が、1000 mg / 日を下回り、且つ前記哺乳動物の血圧を低下させるのに十分である、方法を提供する。

30

【0017】

さらに別の態様では、本発明は、低い又は検出不能レベルの F H I T を有する哺乳動物における肺高血圧症又は肺気腫を減少させる方法において、

哺乳動物から血液サンプルを入手するステップと；

血液サンプル中の F H I T のレベルを測定するステップと；

サンプルが低い又は検出不能レベルの F H I T を有する場合、有効量の F H I T 増加剤エンザスタウリン又は他の F H I T 増加剤を、肺高血圧症又は肺気腫を有する哺乳動物に投与するステップと、

40

を含むことを特徴とする方法を提供する。

【0018】

さらに別の態様では、本発明は、低い又は検出不能レベルの F H I T を有する哺乳動物における肺高血圧症又は肺気腫を減少させる方法において、

a. 哺乳動物から組織サンプルを入手するステップと；

b. 組織サンプル中の F H I T のレベルを測定するステップと；

c. サンプルが低い又は検出不能レベルの F H I T を有する場合、有効量の F H I T 増加剤エンザスタウリン又は他の F H I T 増加剤を、肺高血圧症又は肺気腫を有する哺乳動物に投与するステップと、

を含むことを特徴とする方法を提供する。

50

## 【 0 0 1 9 】

さらに別の態様では、本発明は、低い又は検出不能レベルの B M P R 2 を有する哺乳動物における肺高血圧症又は肺気腫を減少させる方法において、

- a . 哺乳動物から血液サンプルを入手するステップと；
  - b . 血液サンプル中の B M P R 2 のレベルを測定するステップと；
  - c . サンプルが低い又は検出不能レベルの B M P R 2 を有する場合、有効量の F H I T 増加剤エンザスタウリン又は他の F H I T 増加剤を、肺高血圧症又は肺気腫を有する哺乳動物に投与するステップと、
- を含むことを特徴とする方法を提供する。

## 【 0 0 2 0 】

さらに別の態様では、本発明は、低い又は検出不能レベルの B M P R 2 を有する哺乳動物における肺高血圧症又は肺気腫を減少させる方法において、

- a . 哺乳動物から組織サンプルを入手するステップと；
  - b . 組織サンプル中の B M P R 2 のレベルを測定するステップと；
  - c . サンプルが低い又は検出不能レベルの B M P R 2 を有する場合、有効量の F H I T 増加剤エンザスタウリン又は他の F H I T 増加剤を、肺高血圧症又は肺気腫を有する哺乳動物に投与するステップと、
- を含むことを特徴とする方法を提供する。

## 【 0 0 2 1 】

さらに別の態様では、本発明は、B M P R 2 の突然変異を有する哺乳動物における肺高血圧症又は肺気腫を減少させる方法において、

- a . 哺乳動物から組織サンプルを入手するステップと；
  - b . 組織サンプルを B M P R 2 の突然変異について分析するステップと；
  - c . B M P R 2 の突然変異が検出された場合、有効量の F H I T 増加剤エンザスタウリン又は他の F H I T 増加剤を、肺高血圧症又は肺気腫を有する哺乳動物に投与するステップと、
- を含むことを特徴とする方法を提供する。

## 【 0 0 2 2 】

さらに別の態様では、本発明は、B M P R 2 の突然変異を有する哺乳動物における肺高血圧症又は肺気腫を減少させる方法において、

- a . 哺乳動物から血液サンプルを入手するステップと；
  - b . 血液サンプルを B M P R 2 の突然変異について分析するステップと；
  - c . B M P R 2 の突然変異が検出された場合、有効量の F H I T 増加剤エンザスタウリン又は他の F H I T 増加剤を、肺高血圧症又は肺気腫を有する哺乳動物に投与するステップと、
- を含むことを特徴とする方法を提供する。

## 【 0 0 2 3 】

さらに別の態様では、本発明は、F H I T の突然変異を有する哺乳動物における肺高血圧症又は肺気腫を減少させる方法において、

- a . 哺乳動物から組織サンプルを入手するステップと；
  - b . 組織サンプルを F H I T の突然変異について分析するステップと；
  - c . F H I T の突然変異が検出された場合、有効量の F H I T 増加剤エンザスタウリン又は他の F H I T 増加剤を、肺高血圧症又は肺気腫を有する哺乳動物に投与するステップと、
- を含むことを特徴とする方法を提供する。

## 【 0 0 2 4 】

さらに別の態様では、本発明は、F H I T の突然変異を有する哺乳動物における肺高血圧症又は肺気腫を減少させる方法において、

- a . 哺乳動物から血液サンプルを入手するステップと；
- b . 血液サンプルを F H I T の突然変異について分析するステップと；

c. F H I Tの突然変異が検出された場合、有効量のF H I T増加剤エンザスタウリン又は他のF H I T増加剤を、肺高血圧症又は肺気腫を有する哺乳動物に投与するステップと、  
を含むことを特徴とする方法を提供する。

#### 【0025】

先行する実施形態の何れかにおいて、治療は、F H I Tのレベル又は活性を増強する活性を有するビスインドリルマレイミド又はその類似体若しくは誘導体を薬学的有効量で、それを必要とする対象に投与することを含みうる。一実施形態では、ビスインドリルマレイミド又は類似体若しくは誘導体は、エンザスタウリン又はその類似体若しくは誘導体であり、特にビスインドリルマレイミドは、エンザスタウリンの中性化合物又は薬学的に許容できる塩として投与可能であるエンザスタウリンである。

10

#### 【0026】

本発明のさらなる態様及び具体的な実施形態は、本明細書中で説明され、可能になる。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0027】

【図1A】図1Aは、雄F H I T - / - C 5 7 B L / 6マウスは、低酸素への慢性曝露後、実験的P A Hを発生する。

【図1B】図1Bは、雄F H I T - / - C 5 7 B L / 6マウスは、低酸素への慢性曝露後、実験的P A Hを発生する。

【図1C】図1Cは、雄F H I T - / - C 5 7 B L / 6マウスは、低酸素への慢性曝露後、実験的P A Hを発生する。

20

【図1D】図1Dは、雄F H I T - / - C 5 7 B L / 6マウスは、低酸素への慢性曝露後、実験的P A Hを発生する。

【図1E】図1Eは、雄F H I T - / - C 5 7 B L / 6マウスは、低酸素への慢性曝露後、実験的P A Hを発生する。

【図1F】図1Fは、雄F H I T - / - C 5 7 B L / 6マウスは、低酸素への慢性曝露後、実験的P A Hを発生する。

【図1G】図1Gは、雄F H I T - / - C 5 7 B L / 6マウスは、低酸素への慢性曝露後、実験的P A Hを発生する。

【図1H】図1Hは、雄F H I T - / - C 5 7 B L / 6マウスは、低酸素への慢性曝露後、実験的P A Hを発生する。

30

【図1I】図1Iは、雄F H I T - / - C 5 7 B L / 6マウスは、低酸素への慢性曝露後、実験的P A Hを発生する。

【図1J】図1Jは、雄F H I T - / - C 5 7 B L / 6マウスは、低酸素への慢性曝露後、実験的P A Hを発生する。

【図1K】図1Kは、雄F H I T - / - C 5 7 B L / 6マウスは、低酸素への慢性曝露後、実験的P A Hを発生する。

【図2A】図2Aは、雌F H I T - / - C 5 7 B L / 6マウスは、低酸素への慢性曝露後、実験的P A Hを発生する。

【図2B】図2Bは、雌F H I T - / - C 5 7 B L / 6マウスは、低酸素への慢性曝露後、実験的P A Hを発生する。

40

【図2C】図2Cは、雌F H I T - / - C 5 7 B L / 6マウスは、低酸素への慢性曝露後、実験的P A Hを発生する。

【図2D】図2Dは、雌F H I T - / - C 5 7 B L / 6マウスは、低酸素への慢性曝露後、実験的P A Hを発生する。

【図2E】図2Eは、雌F H I T - / - C 5 7 B L / 6マウスは、低酸素への慢性曝露後、実験的P A Hを発生する。

【図2F】図2Fは、雌F H I T - / - C 5 7 B L / 6マウスは、低酸素への慢性曝露後、実験的P A Hを発生する。

【図3A】図3Aは、エンザスタウリンは、C 5 7 B L / 6マウスにおける低酸素誘導性

50

の実験的 P A H の発生を予防する。

【図 3 B】図 3 B は、エンザスタウリンは、C 5 7 B L / 6 マウスにおける低酸素誘導性の実験的 P A H の発生を予防する。

【図 3 C】図 3 C は、エンザスタウリンは、C 5 7 B L / 6 マウスにおける低酸素誘導性の実験的 P A H の発生を予防する。

【図 3 D】図 3 D は、エンザスタウリンは、C 5 7 B L / 6 マウスにおける低酸素誘導性の実験的 P A H の発生を予防する。

【図 3 E】図 3 E は、エンザスタウリンは、C 5 7 B L / 6 マウスにおける低酸素誘導性の実験的 P A H の発生を予防する。

【図 3 F】図 3 F は、エンザスタウリンは、C 5 7 B L / 6 マウスにおける低酸素誘導性の実験的 P A H の発生を予防する。

10

【図 4 A】図 4 A は、エンザスタウリンは、S u g e n 5 4 1 6 / 低酸素ラットにおいて、血管閉塞、肺気腫、心線維症を回復に向かわせ、心拍出量を改善する。

【図 4 B】図 4 B は、エンザスタウリンは、S u g e n 5 4 1 6 / 低酸素ラットにおいて、血管閉塞、肺気腫、心線維症を回復に向かわせ、心拍出量を改善する。

【図 4 C】図 4 C は、エンザスタウリンは、S u g e n 5 4 1 6 / 低酸素ラットにおいて、血管閉塞、肺気腫、心線維症を回復に向かわせ、心拍出量を改善する。

【図 4 D】図 4 D は、エンザスタウリンは、S u g e n 5 4 1 6 / 低酸素ラットにおいて、血管閉塞、肺気腫、心線維症を回復に向かわせ、心拍出量を改善する。

【図 4 E】図 4 E は、エンザスタウリンは、S u g e n 5 4 1 6 / 低酸素ラットにおいて、血管閉塞、肺気腫、心線維症を回復に向かわせ、心拍出量を改善する。

20

【図 4 F】図 4 F は、エンザスタウリンは、S u g e n 5 4 1 6 / 低酸素ラットにおいて、血管閉塞、肺気腫、心線維症を回復に向かわせ、心拍出量を改善する。

【図 5】図 5 は、エンザスタウリンは、肺高血圧症を回復に向かわせるため、F H I T を必要とするが、P K C を必要としない。

【図 6 A】図 6 A は、s i R N A ハイスクリーン及び P A H メタ分析による B M P R 2 調節遺伝子の同定。

【図 6 B】図 6 B は、s i R N A ハイスクリーン及び P A H メタ分析による B M P R 2 調節遺伝子の同定。

【図 6 C】図 6 C は、s i R N A ハイスクリーン及び P A H メタ分析による B M P R 2 調節遺伝子の同定。

30

【図 7 A】図 7 A は、P A H における F H I T の発現減弱は、B M P R 2 の発現低下と相関する。

【図 7 B】図 7 B は、P A H における F H I T の発現減弱は、B M P R 2 の発現低下と相関する。

【図 7 C】図 7 C は、P A H における F H I T の発現減弱は、B M P R 2 の発現低下と相関する。

【図 7 D】図 7 D は、P A H における F H I T の発現減弱は、B M P R 2 の発現低下と相関する。

【図 7 E】図 7 E は、P A H における F H I T の発現減弱は、B M P R 2 の発現低下と相関する。

40

【図 7 F】図 7 F は、P A H における F H I T の発現減弱は、B M P R 2 の発現低下と相関する。

【図 7 G】図 7 G は、P A H における F H I T の発現減弱は、B M P R 2 の発現低下と相関する。

【図 7 H】図 7 H は、P A H における F H I T の発現減弱は、B M P R 2 の発現低下と相関する。

【図 7 I】図 7 I は、P A H における F H I T の発現減弱は、B M P R 2 の発現低下と相関する。

【図 8 A】図 8 A は、s i F H I T P A E C における m R N A の発現及びマイクロ R N

50



Aのプロファイリング。

【図8B】図8Bは、s i F H I T P A E Cにおけるm R N Aの発現及びマイクロR N Aのプロファイリング。

【図8C】図8Cは、s i F H I T P A E Cにおけるm R N Aの発現及びマイクロR N Aのプロファイリング。

【図8D】図8Dは、s i F H I T P A E Cにおけるm R N Aの発現及びマイクロR N Aのプロファイリング。

【図8E】図8Eは、s i F H I T P A E Cにおけるm R N Aの発現及びマイクロR N Aのプロファイリング。

【図8F】図8Fは、s i F H I T P A E Cにおけるm R N Aの発現及びマイクロR N Aのプロファイリング。

【図8G】図8Gは、s i F H I T P A E Cにおけるm R N Aの発現及びマイクロR N Aのプロファイリング。

【図8H】図8Hは、s i F H I T P A E Cにおけるm R N Aの発現及びマイクロR N Aのプロファイリング。

【図8I】図8Iは、s i F H I T P A E Cにおけるm R N Aの発現及びマイクロR N Aのプロファイリング。

【図8J】図8Jは、s i F H I T P A E Cにおけるm R N Aの発現及びマイクロR N Aのプロファイリング。

【図8K】図8Kは、s i F H I T P A E Cにおけるm R N Aの発現及びマイクロR N Aのプロファイリング。

【図8L】図8Lは、s i F H I T P A E Cにおけるm R N Aの発現及びマイクロR N Aのプロファイリング。

【図8M】図8Mは、s i F H I T P A E Cにおけるm R N Aの発現及びマイクロR N Aのプロファイリング。

【図9A】図9Aは、エンザスタウリンは、P A E CにおけるB M P R 2上流のシグナル伝達分子F H I Tの発現を増加させ、F H I T欠損P A E Cにおける管形成におけるP A H特異的な機能的欠損、アポトーシス、DNA損傷及び増殖を回復に向かわせる。

【図9B】図9Bは、エンザスタウリンは、P A E CにおけるB M P R 2上流のシグナル伝達分子F H I Tの発現を増加させ、F H I T欠損P A E Cにおける管形成におけるP A H特異的な機能的欠損、アポトーシス、DNA損傷及び増殖を回復に向かわせる。

【図9C】図9Cは、エンザスタウリンは、P A E CにおけるB M P R 2上流のシグナル伝達分子F H I Tの発現を増加させ、F H I T欠損P A E Cにおける管形成におけるP A H特異的な機能的欠損、アポトーシス、DNA損傷及び増殖を回復に向かわせる。

【図9D】図9Dは、エンザスタウリンは、P A E CにおけるB M P R 2上流のシグナル伝達分子F H I Tの発現を増加させ、F H I T欠損P A E Cにおける管形成におけるP A H特異的な機能的欠損、アポトーシス、DNA損傷及び増殖を回復に向かわせる。

【図9E】図9Eは、エンザスタウリンは、P A E CにおけるB M P R 2上流のシグナル伝達分子F H I Tの発現を増加させ、F H I T欠損P A E Cにおける管形成におけるP A H特異的な機能的欠損、アポトーシス、DNA損傷及び増殖を回復に向かわせる。

【図9F】図9Fは、エンザスタウリンは、P A E CにおけるB M P R 2上流のシグナル伝達分子F H I Tの発現を増加させ、F H I T欠損P A E Cにおける管形成におけるP A H特異的な機能的欠損、アポトーシス、DNA損傷及び増殖を回復に向かわせる。

【図9G】図9Gは、エンザスタウリンは、P A E CにおけるB M P R 2上流のシグナル伝達分子F H I Tの発現を増加させ、F H I T欠損P A E Cにおける管形成におけるP A H特異的な機能的欠損、アポトーシス、DNA損傷及び増殖を回復に向かわせる。

【図9H】図9Hは、エンザスタウリンは、P A E CにおけるB M P R 2上流のシグナル伝達分子F H I Tの発現を増加させ、F H I T欠損P A E Cにおける管形成におけるP A H特異的な機能的欠損、アポトーシス、DNA損傷及び増殖を回復に向かわせる。

【図9I】図9Iは、エンザスタウリンは、P A E CにおけるB M P R 2上流のシグナル

10

20

30

40

50

伝達分子 F H I T の発現を増加させ、F H I T 欠損 P A E C における管形成における P A H 特異的な機能的欠損、アポトーシス、DNA 損傷及び増殖を回復に向かわせる。

【図 9 J】図 9 J は、エンザスタウリンは、P A E C における B M P R 2 上流のシグナル伝達分子 F H I T の発現を増加させ、F H I T 欠損 P A E C における管形成における P A H 特異的な機能的欠損、アポトーシス、DNA 損傷及び増殖を回復に向かわせる。

【図 10 A】図 10 A は、F h i t - / - C 5 7 B L / 6 マウスは、低酸素への慢性曝露後、実験的 P H を発生する。

【図 10 B】図 10 B は、F h i t - / - C 5 7 B L / 6 マウスは、低酸素への慢性曝露後、実験的 P H を発生する。

【図 10 C】図 10 C は、F h i t - / - C 5 7 B L / 6 マウスは、低酸素への慢性曝露後、実験的 P H を発生する。

【図 10 D】図 10 D は、F h i t - / - C 5 7 B L / 6 マウスは、低酸素への慢性曝露後、実験的 P H を発生する。

【図 10 E】図 10 E は、F h i t - / - C 5 7 B L / 6 マウスは、低酸素への慢性曝露後、実験的 P H を発生する。

【図 10 F】図 10 F は、F h i t - / - C 5 7 B L / 6 マウスは、低酸素への慢性曝露後、実験的 P H を発生する。

【図 10 G】図 10 G は、F h i t - / - C 5 7 B L / 6 マウスは、低酸素への慢性曝露後、実験的 P H を発生する。

【図 10 H】図 10 H は、F h i t - / - C 5 7 B L / 6 マウスは、低酸素への慢性曝露後、実験的 P H を発生する。

【図 10 I】図 10 I は、F h i t - / - C 5 7 B L / 6 マウスは、低酸素への慢性曝露後、実験的 P H を発生する。

【図 11 A】図 11 A は、エンザスタウリンは、S U G E N 5 4 1 6 / 低酸素ラットにおける血行動態パラメータ、重度の血管リモデリング、肺気腫、心線維症及び R V H を回復に向かわせる。

【図 11 B】図 11 B は、エンザスタウリンは、S U G E N 5 4 1 6 / 低酸素ラットにおける血行動態パラメータ、重度の血管リモデリング、肺気腫、心線維症及び R V H を回復に向かわせる。

【図 11 C】図 11 C は、エンザスタウリンは、S U G E N 5 4 1 6 / 低酸素ラットにおける血行動態パラメータ、重度の血管リモデリング、肺気腫、心線維症及び R V H を回復に向かわせる。

【図 11 D】図 11 D は、エンザスタウリンは、S U G E N 5 4 1 6 / 低酸素ラットにおける血行動態パラメータ、重度の血管リモデリング、肺気腫、心線維症及び R V H を回復に向かわせる。

【図 11 E】図 11 E は、エンザスタウリンは、S U G E N 5 4 1 6 / 低酸素ラットにおける血行動態パラメータ、重度の血管リモデリング、肺気腫、心線維症及び R V H を回復に向かわせる。

【図 11 F】図 11 F は、エンザスタウリンは、S U G E N 5 4 1 6 / 低酸素ラットにおける血行動態パラメータ、重度の血管リモデリング、肺気腫、心線維症及び R V H を回復に向かわせる。

【図 11 G】図 11 G は、エンザスタウリンは、S U G E N 5 4 1 6 / 低酸素ラットにおける血行動態パラメータ、重度の血管リモデリング、肺気腫、心線維症及び R V H を回復に向かわせる。

【図 11 H】図 11 H は、エンザスタウリンは、S U G E N 5 4 1 6 / 低酸素ラットにおける血行動態パラメータ、重度の血管リモデリング、肺気腫、心線維症及び R V H を回復に向かわせる。

【図 11 I】図 11 I は、エンザスタウリンは、S U G E N 5 4 1 6 / 低酸素ラットにおける血行動態パラメータ、重度の血管リモデリング、肺気腫、心線維症及び R V H を回復に向かわせる。

10

20

30

40

50

【図 1 1 J】図 1 1 J は、エンザスタウリンは、SUGEN 5 4 1 6 / 低酸素ラットにおける血行動態パラメータ、重度の血管リモデリング、肺気腫、心線維症及びRVHを回復に向かわせる。

【図 1 1 K】図 1 1 K は、エンザスタウリンは、SUGEN 5 4 1 6 / 低酸素ラットにおける血行動態パラメータ、重度の血管リモデリング、肺気腫、心線維症及びRVHを回復に向かわせる。

【図 1 2】図 1 2 は、3 週間の慢性低酸素及び 4 週間の再酸素負荷に対する酸素正常状態下の C 5 7 B L / 6 対照と比べての F h i t - / - マウスにおける F H I T タンパク質の発現。

【図 1 3 A】図 1 3 A は、エンザスタウリン処置の 3 週間後に酸素正常状態と S u g e n / 低酸素状態とを比較した、スブラグドローラット肺における P K C 及び p - P K C タンパク質の発現。

10

【図 1 3 B】図 1 3 B は、エンザスタウリン処置の 3 週間後に酸素正常状態と S u g e n / 低酸素状態とを比較した、スブラグドローラット肺における P K C 及び p - P K C タンパク質の発現。

【図 1 3 C】図 1 3 C は、エンザスタウリン処置の 3 週間後に酸素正常状態と S u g e n / 低酸素状態とを比較した、スブラグドローラット肺における P K C 及び p - P K C タンパク質の発現。

【図 1 3 D】図 1 3 D は、エンザスタウリン処置の 3 週間後に酸素正常状態と S u g e n / 低酸素状態とを比較した、スブラグドローラット肺における P K C 及び p - P K C タンパク質の発現。

20

【図 1 4 A】図 1 4 A は、エンザスタウリンによる 2 4 時間処置により、F H I T が s i R N A によって減少した P A E C における F H I T、B M P R 2 及び I d 1 の発現が増強される。

【図 1 4 B】図 1 4 B は、エンザスタウリンによる 2 4 時間処置により、F H I T が s i R N A によって減少した P A E C における F H I T、B M P R 2 及び I d 1 の発現が増強される。

【図 1 4 C】図 1 4 C は、エンザスタウリンによる 2 4 時間処置により、F H I T が s i R N A によって減少した P A E C における F H I T、B M P R 2 及び I d 1 の発現が増強される。

30

【図 1 5 A】図 1 5 A は、エンザスタウリン以外の薬学的 P K C 阻害剤による P K C の阻害により、B M P R 2 のシグナル伝達及び F H I T の発現が増強されない。

【図 1 5 B】図 1 5 B は、エンザスタウリン以外の薬学的 P K C 阻害剤による P K C の阻害により、B M P R 2 のシグナル伝達及び F H I T の発現が増強されない。

【図 1 5 C】図 1 5 C は、エンザスタウリン以外の薬学的 P K C 阻害剤による P K C の阻害により、B M P R 2 のシグナル伝達及び F H I T の発現が増強されない。

【図 1 5 D】図 1 5 D は、エンザスタウリン以外の薬学的 P K C 阻害剤による P K C の阻害により、B M P R 2 のシグナル伝達及び F H I T の発現が増強されない。

【図 1 5 E】図 1 5 E は、エンザスタウリン以外の薬学的 P K C 阻害剤による P K C の阻害により、B M P R 2 のシグナル伝達及び F H I T の発現が増強されない。

40

【図 1 5 F】図 1 5 F は、エンザスタウリン以外の薬学的 P K C 阻害剤による P K C の阻害により、B M P R 2 のシグナル伝達及び F H I T の発現が増強されない。

【図 1 6】図 1 6 は、P K C 阻害剤 L y 3 3 3 5 3 1 でなく、エンザスタウリンにより、P A E C 内でのカスパーゼ 3 / 7 媒介性アポトーシスが低下する。

【図 1 7 A】図 1 7 A は、( B M P R 2 突然変異を有しない ) I P A H 患者からの代表的な免疫組織化学スライド。

【図 1 7 B】図 1 7 B は、( B M P R 2 突然変異を有しない ) I P A H 患者からの代表的な免疫組織化学スライド。

【図 1 8 A】図 1 8 A は、F h i t - / - C 5 7 B L / 6 マウスは、低酸素への慢性曝露後、実験的 P A H を発生する。

50

【図 18 B】図 18 B は、F h i t - / - C 5 7 B L / 6 マウスは、低酸素への慢性曝露後、実験的 P A H を発生する。

【図 18 C】図 18 C は、F h i t - / - C 5 7 B L / 6 マウスは、低酸素への慢性曝露後、実験的 P A H を発生する。

【図 18 D】図 18 D は、F h i t - / - C 5 7 B L / 6 マウスは、低酸素への慢性曝露後、実験的 P A H を発生する。

【図 18 E】図 18 E は、F h i t - / - C 5 7 B L / 6 マウスは、低酸素への慢性曝露後、実験的 P A H を発生する。

【図 18 F】図 18 F は、F h i t - / - C 5 7 B L / 6 マウスは、低酸素への慢性曝露後、実験的 P A H を発生する。

【図 19 A】図 19 A は、健常対照に対する F P A H 及びキャリアにおける B M P R 2 の発現における性別差。

【図 19 B】図 19 B は、健常対照に対する F P A H 及びキャリアにおける B M P R 2 の発現における性別差。

【図 19 C】図 19 C は、健常対照に対する F P A H 及びキャリアにおける B M P R 2 の発現における性別差。

【図 19 D】図 19 D は、健常対照に対する F P A H 及びキャリアにおける B M P R 2 の発現における性別差。

【図 19 E】図 19 E は、健常対照に対する F P A H 及びキャリアにおける B M P R 2 の発現における性別差。

【図 19 F】図 19 F は、健常対照に対する F P A H 及びキャリアにおける B M P R 2 の発現における性別差。

【図 19 G】図 19 G は、健常対照に対する F P A H 及びキャリアにおける B M P R 2 の発現における性別差。

【図 19 H】図 19 H は、健常対照に対する F P A H 及びキャリアにおける B M P R 2 の発現における性別差。

【図 20 A】図 20 A は、エンザスタウリンによる 24 時間処置により、F H I T が s i R N A によって減少した P A E C における F H I T、B M P R 2 及び I d 1 の発現が増強される。

【図 20 B】図 20 B は、エンザスタウリンによる 24 時間処置により、F H I T が s i R N A によって減少した P A E C における F H I T、B M P R 2 及び I d 1 の発現が増強される。

【図 20 C】図 20 C は、エンザスタウリンによる 24 時間処置により、F H I T が s i R N A によって減少した P A E C における F H I T、B M P R 2 及び I d 1 の発現が増強される。

【図 21 A】図 21 A は、F H I T ノックダウンによる P A E C 内での B M P R 2 及び I D 1 の減少は、部分的に m i R 1 7 - 5 依存性である。

【図 21 B】図 21 B は、F H I T ノックダウンによる P A E C 内での B M P R 2 及び I D 1 の減少は、部分的に m i R 1 7 - 5 依存性である。

【図 21 C】図 21 C は、F H I T ノックダウンによる P A E C 内での B M P R 2 及び I D 1 の減少は、部分的に m i R 1 7 - 5 依存性である。

【図 21 D】図 21 D は、F H I T ノックダウンによる P A E C 内での B M P R 2 及び I D 1 の減少は、部分的に m i R 1 7 - 5 依存性である。

【図 22】図 22 は、W T 及び F H I T - / - C 5 7 B L / 6 マウスは、低酸素処置後、R V 線維症を発生しない。

【図 23 A】図 23 A は、エンザスタウリンは、低酸素下の F H I T - / - マウスにおいて、R V S P 上昇から保護し、B M P R 2 / I d 1 m R N A を上方制御する。

【図 23 B】図 23 B は、エンザスタウリンは、低酸素下の F H I T - / - マウスにおいて、R V S P 上昇から保護し、B M P R 2 / I d 1 m R N A を上方制御する。

【図 23 C】図 23 C は、エンザスタウリンは、低酸素下の F H I T - / - マウスにおい

10

20

30

40

50

て、RVSP上昇から保護し、BMPR2 / Id1 mRNAを上方制御する。

【図24A】図24Aは、エンザスタウリンは、C57BL / 6マウスにおける低酸素誘導性の実験的PAHの発生を予防する。

【図24B】図24Bは、エンザスタウリンは、C57BL / 6マウスにおける低酸素誘導性の実験的PAHの発生を予防する。

【図24C】図24Cは、エンザスタウリンは、C57BL / 6マウスにおける低酸素誘導性の実験的PAHの発生を予防する。

【図24D】図24Dは、エンザスタウリンは、C57BL / 6マウスにおける低酸素誘導性の実験的PAHの発生を予防する。

【図24E】図24Eは、エンザスタウリンは、C57BL / 6マウスにおける低酸素誘導性の実験的PAHの発生を予防する。

【図24F】図24Fは、エンザスタウリンは、C57BL / 6マウスにおける低酸素誘導性の実験的PAHの発生を予防する。

【図24G】図24Gは、エンザスタウリンは、C57BL / 6マウスにおける低酸素誘導性の実験的PAHの発生を予防する。

【図25A】図25Aは、FK506及びエンザスタウリンは、低酸素下の野生型C57BL / 6マウスにおいて、BMPR2 / Id1に対してさらなる効果を有するが、FHI T mRNAに対しては有さず、RVSPにおける上昇から保護する。

【図25B】図25Bは、FK506及びエンザスタウリンは、低酸素下の野生型C57BL / 6マウスにおいて、BMPR2 / Id1に対してさらなる効果を有するが、FHI T mRNAに対しては有さず、RVSPにおける上昇から保護する。

【図25C】図25Cは、FK506及びエンザスタウリンは、低酸素下の野生型C57BL / 6マウスにおいて、BMPR2 / Id1に対してさらなる効果を有するが、FHI T mRNAに対しては有さず、RVSPにおける上昇から保護する。

【図25D】図25Dは、FK506及びエンザスタウリンは、低酸素下の野生型C57BL / 6マウスにおいて、BMPR2 / Id1に対してさらなる効果を有するが、FHI T mRNAに対しては有さず、RVSPにおける上昇から保護する。

【図26】図26は、エンザスタウリン処置の3週間後に酸素正常状態とSugen / 低酸素状態とを比較した、スプライングドーリーラット肺における代表的なMOVAT肺組織像。

【発明を実施するための形態】

【0028】

主張される主題の1つ以上の実施形態の詳細な説明が、主張される主題の原則を図示する添付図とともに以下に提供される。主張される主題は、かかる実施形態に関連して記述されるが、何れかの特定の実施形態に限定されない。主張される主題が様々な形態で具体化されてもよく、且つ極めて多数の変更、修飾及び均等物を包含することは理解されるべきである。したがって、本明細書で開示される具体的詳細は、限定するものとしてではなく、むしろ特許請求の範囲における基盤、及び主張される主題を実質的に任意の適切に詳細化されたシステム、構造、又は様式で利用するように当業者を教示するための代表的基盤として解釈されるべきである。本開示の徹底的理解を提供するため、極めて多数の具体的詳細が以下の説明中に示される。これらの詳細は、例示を目的として提供され、主張される主題は、これらの具体的詳細の一部又は全部を伴わない特許請求の範囲に従って実施されてもよい。主張される主題の範囲から逸脱することなく、他の実施形態を用いることができ、且つ構造的変化を設けることができることは理解されるべきである。個別の実施形態の1つ以上において記述される様々な特徴及び機能性が、それらが記述される特定の実施形態に対するそれらの適応性に限定されないことは理解されるべきである。それらは代わりに、単独で又はいくつかの組み合わせにて、本開示の他の実施形態の1つ以上に、かかる実施形態が記載されるか否かにかかわらず、またかかる特徴が記載された実施形態の一部として提示されるか否かにかかわらず適用されうる。明確さを目的として、当該技術分野で公知である技術項目は、主張される主題が詳述されていないことに関係し、主張

10

20

30

40

50

される主題が不明瞭であることが不必要でない。

【0029】

本願中で参照されるすべての出版物は、あたかも各個別の出版物が参照により個別に援用された場合と同程度まで、あらゆる目的でそれら全体が参照により援用される。

【0030】

すべての見出しは、読者の利便性が意図されており、見出しに続くテキストの意味を限定するように、そのように規定されない限り、用いられるべきではない。

【0031】

本開示全体を通じて、主張される主題の様々な態様は、範囲形式で提示される。範囲形式での記述が、あくまで便宜性や簡潔性を意図するものであり、主張される主題の範囲に対する柔軟性のない限定として解釈されるべきでないことは理解されるべきである。したがって、範囲の記述は、すべての考えられる部分範囲及びその範囲内の個別の数値を具体的に開示していると考えられるべきである。例えば、種々の値が提供される場合、各介在値、その範囲の上限と下限との間及びその記述された範囲内の任意の他の記述された値又は介在値が主張される主題の中に包含されることが理解される。これらのより小さい範囲の上限及び下限は、より小さい範囲内に独立して含めてもよく、主張される主題中にさらに包含され、記述された範囲内の任意の具体的に除外された限界値に従う。記述された範囲が限界の一方又は両方を含む場合、それらに含まれる限界の何れか又は双方とも除外する範囲もまた、主張される主題中に含まれる。これは、範囲の幅と無関係に適用される。例えば、1～6などの範囲の記述は、具体的に開示される部分範囲、例えば、1～3、1～4、1～5、2～4、2～6、3～6など、並びにその範囲内の各数値、例えば、1、2、3、4、5、及び6を有すると考えられるべきである。

【0032】

本明細書に記載の方法は、以下：右室収縮期圧上昇、右室肥大、以前の非筋性化血管での肺血管新規筋性化及びそれら周縁における増強、肺血管欠損、肺血管新生内膜形成の増強、肺血管媒体肥厚の増強の何れかを有する患者における肺高血圧症を治療することを目的とする。

【0033】

本発明は、F H I T 増加剤エンザスタウリン又は他のF H I T 増加剤を用いての肺動脈高血圧症の治療と併せて、F H I T を生物学的マーカーとして用いる方法に関する。本発明は、家族性及び特発性肺動脈高血圧症におけるF H I T 増加剤エンザスタウリン又は他のF H I T 増加剤を用いての肺動脈高血圧症の治療に関する。本発明はまた、肺動脈高血圧症で認められる血管閉塞性表現型、肺血管欠損、右室収縮期圧上昇、肺気腫、心線維症及び右室肥大を寛解するための、F H I T 増加剤エンザスタウリン又は他のF H I T 増加剤の単独使用、又は以前に処方された薬物との併用に関する。

【0034】

脆弱性ヒスチジン三連構造(F H I T)は、ヒスチジン三連ファミリーのメンバーであり、且つ潜在的にはそれをP A H 内皮及び平滑筋細胞において認められる異常な増殖性表現型に関連づける、様々な細胞型におけるアポトーシス及び増殖に関与する(A c c o r n e r o e t a l . , 1999; T o l e d o e t a l . , 2004)。F H I T は、S r c キナーゼによるその脱リン酸化後に分解されと考えられる(P e k a r s k y e t a l . , 2004, P r o c N a t l A c a d S c i U S A , 101(11): 3775 - 3779)。

【0035】

F H I T 増加剤エンザスタウリンは、3 - ( 1 - メチル - I H - インドール - 3 - イル ) - 4 - [ 1 - [ 1 - ( ピリジン - 2 - イルメチル ) ピペリジン - 4 - イル ] - 1 H - インドール - 3 - イル ] - 1 H - ピロール - 2 , 5 - ジオンの化学名を有し、米国特許第5,668,152号明細書に開示されており、ここではタンパク質キナーゼC(P K C)の阻害剤として記述されている。それ故、エンザスタウリンの生物学的機能は、P K C によるタンパク質リン酸化のその阻害から生じることが報告されている。その主な標的は、

P K C 活性化の阻害過程にあるが、それは細胞増殖及び細胞生存経路に關与するさらなるタンパク質をさらに阻害する ( G e s c h e r , 1 9 9 8 , G e n P h a r m a c o l . , 3 1 : 7 2 1 - 7 2 8 ; J a r v i s , G r a n t , 1 9 9 9 , I n v e s t N e w D r u g s , 1 7 : 2 2 7 - 2 4 0 ; P a r k e r , 1 9 9 9 , P h a r m a c o l . T h e r . , 8 2 : 2 6 3 - 2 6 7 ) 。 F H I T 増加剤エンザスタウリン又は他の F H I T 増加剤は、様々な細胞型において、細胞成長・増殖を抑制し、且つアポトーシスを誘導する。

#### 【 0 0 3 6 】

第 I I 相試験では、エンザスタウリンは、試験の持続期間における 6 か月間、耐受性を示した ( G r a y e t a l . , C a n c e r 2 0 1 3 1 1 9 ( 5 ) : 1 0 2 3 - 1 0 3 2 ) 。報告された副作用は、発疹、腹部膨満、低ナトリウム血症、D V T 及び低血圧を含んだ。この薬剤で達成される高い耐受性、最小毒性及び低量及び副作用の重症度起因し、肺高血圧症に対する治療及びリスクのある、例えば B M P R 2 の陽性突然変異状態の個体における家族性肺高血圧症の発生の予防としてのその使用がここで示唆される。肺高血圧症の疾患回復のエンザスタウリンによる達成は前例がなく、それ故、エンザスタウリン又は他の F H I T 増加剤は、肺高血圧症に対する治療方法として有用と考えられる。

10

#### 【 0 0 3 7 】

F H I T 増加剤エンザスタウリン又は他の F H I T 増加剤は、単独で、又は P A H を含む P H を治療若しくは予防する他の活性化化合物と組み合わせて投与されてもよい。他の活性化化合物は、F H I T 増加剤エンザスタウリン又は他の F H I T 増加剤と異なる時点で又は同時に投与されてもよく、また特定の実施形態では、F H I T 増加剤エンザスタウリン又は他の F H I T 増加剤及び他の活性化化合物は、同じ製剤中に、又は同じキット内の別々の製剤として存在してもよい。P H を治療する例示的な他の活性化化合物として、例えば、プロスタサイクリン類似体、エンドセリン受容体拮抗剤、ホスホジエステラーゼ - 5 阻害剤、高用量のカルシウムチャネルブロッカー、抗凝固剤、利尿薬又は抗増殖性薬剤が挙げられる。特定の症例では、他の活性化化合物は、例えば、I s o r d i l ( 二硝酸イソソルビド ) 、 R e v a t i o ( シルデナフィル ) 、 T r a c l e e r ( ボセンタン ) 、 L e t a i r i s ( アンプリセンタン ) 、 F l o l a n ( エボプロステノール ) 、 A d c i r c a ( タダラフィル ) 、 R e m o d u l i n ( トレプロスチニル ) V e n t a v i s ( イロprost ) 、 T y v a s o ( トレプロスチニル ) 、 D i l a t r a t e - S R ( 二硝酸イソソルビド ) 、 I s o r d i l T i t r a d o s e ( 二硝酸イソソルビド ) 、 I s o D i t r a t e ( 二硝酸イソソルビド ) 又は I s o c h r o n ( 二硝酸イソソルビド ) であってもよい。

20

30

#### 【 0 0 3 8 】

##### A . 一般的技術

本発明の実施では、特に指示がない限り、当業者の範囲内である、分子生物学 ( 組換え技術を含む ) 、微生物学、細胞生物学、生化学、及び免疫学の通常の技術が用いられることになる。かかる技術は、 “ M o l e c u l a r C l o n i n g : A L a b o r a t o r y M a n u a l ” , s e c o n d e d i t i o n ( S a m b r o o k e t a l . , 1 9 8 9 ) ; “ O l i g o n u c l e o t i d e S y n t h e s i s ” ( M . J . G a i t , e d . , 1 9 8 4 ) ; “ A n i m a l C e l l C u l t u r e ” ( R . I . F r e s h n e y , e d . , 1 9 8 7 ) ; “ M e t h o d s i n E n z y m o l o g y ” ( A c a d e m i c P r e s s , I n c . ) ; “ C u r r e n t P r o t o c o l s i n M o l e c u l a r B i o l o g y ” ( F . M . A u s u b e l e t a l . , e d s . , 1 9 8 7 、及び定期的更新 ) ; “ P C R : T h e P o l y m e r a s e C h a i n R e a c t i o n ” , ( M u l l i s e t a l . , e d s . , 1 9 9 4 ) などの文献において十分に説明される。

40

#### 【 0 0 3 9 】

##### B . 定義

50

特に定義されない限り、本明細書で用いられるすべての科学技術用語は、本発明が属する当業者によって一般に理解されている場合と同じ意味を有する。本明細書で参照されるすべての特許、出願、公開された出願及び他の出版物は、それら全体が参照により援用される。このセクション内で示される定義が、参照により本明細書中に援用される、特許、出願、公開された出願及び他の出版物の中で示される定義に反する、又はそうでなければ矛盾する場合、このセクションで示される定義が参照により本明細書中に援用される定義よりも優先される。

#### 【0040】

本明細書で用いられるとき、単数形「1つの(a)」、「1つの(an)」、及び「その(the)」は、特に指示がない限り、複数の参照対象を含む。例えば、「1つの(a)」二重体は、1つ以上の二量体を含む。

10

#### 【0041】

用語「バイオマーカー」又は「マーカー」は、本明細書で用いられるとき、一般に、分子(遺伝子を含む)、タンパク質、炭水化物構造、又は糖脂質を指し、哺乳動物組織若しくは細胞の内部若しくは表面での、又は分泌されるその発現は、公知の方法(又は本明細書で開示される方法)により検出可能であり、治療計画に対する哺乳動物細胞若しくは組織の感受性として予測的であるか、又は予測する(又は予測を補助する)、またいくつかの実施形態では治療計画に対する個体の応答性を予測する(又は予測を補助する)ため、使用可能である。

#### 【0042】

本明細書で用いられるとき、「薬理ゲノミクスバイオマーカー」は、対象における特定の臨床薬物応答又は感受性と相関する目的のバイオマーカーである(例えば、McLeod et al., Eur. J. Cancer (1999) 35: 1650-1652を参照)。それは、生化学バイオマーカー、又は臨床徴候若しくは症状であってもよい。薬理ゲノミクスマーカーの存在又は量は、対象の、薬剤の投与に先立つ特定の薬剤又は薬剤のクラスに対する予測される応答に関する。対象における1つ以上の薬理ゲノミクスマーカーの存在又は量を評価することにより、対象にとって最適である、又はより大きな奏功度を有することが予測される薬物療法が選択されてもよい。例えば、対象における特定の腫瘍マーカーにおけるDNA、RNA、又はタンパク質の存在又は量に基づき、対象において存在する可能性が高い特定腫瘍の治療にとって最適化された薬剤又は治療経過が選択されてもよい。同様に、特定の配列突然変異又は多型の存在又は不在は、薬物応答と相関してもよい。したがって、薬理ゲノミクスバイオマーカーの使用は、治療を施す必要を伴わないような各対象にとって最適な治療の適用を可能にする。

20

30

#### 【0043】

本明細書で用いられるとき、用語「多型遺伝子座」は、2つ以上の代替ヌクレオチド配列が個体の集団からの核酸サンプル中に有意な数で認められる場合の核酸中の領域を指す。多型遺伝子座は、例えば、2つ以上のヌクレオチドのヌクレオチド配列、挿入されたヌクレオチド若しくはヌクレオチド配列、欠失されたヌクレオチド若しくはヌクレオチド配列、又はマイクロサテライトであってもよい。2つ以上のヌクレオチド長である多型遺伝子座は、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15以上、20以上、30以上、50以上、75以上、100以上、500以上、又は約1000ヌクレオチド長であってもよく、ここでヌクレオチド配列の全部又は一部は該領域内で異なる。多型遺伝子座は、1ヌクレオチド長であることが多く、本明細書中で「一塩基多型」又は「SNP」と称される。いくつかの実施形態では、高密度遺伝子型決定は、SNPを用いることにより実施されてもよい。いくつかの実施形態では、約1,000~5,000,000又はそれ以上のSNPが用いられてもよい。いくつかの実施形態では、高密度遺伝子型決定は、アレイに基づいてもよい。いくつかの実施形態では、高密度遺伝子型決定は、配列決定、例えばハイスループット配列決定を用いることにより、実施されてもよい。

40

#### 【0044】

多型遺伝子座に2、3、又は4つの代替ヌクレオチド配列が存在する場合、各ヌクレオ

50



チド配列は、「多型変異体」又は「核酸変異体」と称される。例えば、2つの多型変異体が存在する場合、集団からの少数のサンプル中に代表的な多型変異体は、時として「マイナー対立遺伝子」と称され、より優位な意味で代表的な多型変異体は、時として「メジャー対立遺伝子」と称される。多数の生物が各染色体（例えばヒト）のコピーを有し、2つのメジャー対立遺伝子又は2つのマイナー対立遺伝子を有する個体は、多型に関して「ホモ接合性」であると称されることが多く、1つのメジャー対立遺伝子及び1つのマイナー対立遺伝子を有する個体は通常、多型に関して「ヘテロ接合性」であると称される。一方の対立遺伝子に関してホモ接合性である個体は、時として、もう一方の対立遺伝子に関してヘテロ接合性又はホモ接合性である個体と比べて異なる表現型の素因になる。

#### 【0045】

一塩基多型は、遺伝子のコード配列内、遺伝子の非コード領域内、又は遺伝子間領域（遺伝子間の領域）内に含まれてもよい。コード配列内のSNPは、遺伝暗号の縮重に起因し、生成されるタンパク質のアミノ酸配列を必ずしも改変しない。

#### 【0046】

コード領域内のSNPは、同義及び非同義SNPという2つのタイプがある。同義SNPは、タンパク質配列に影響しない一方で、非同義SNPは、タンパク質のアミノ酸配列を改変する。非同義SNPは、ミスセンス及びナンセンスという2つのタイプがある。

#### 【0047】

タンパク質コード領域内に含まれないSNPは、さらに、遺伝子スプライシング、転写因子結合、メッセンジャーRNA分解、又は非コードRNAの配列に影響してもよい。SNPのこのタイプによって影響される遺伝子発現は、eSNP（発現SNP）と称され、該遺伝子から上流又は下流で存在してもよい。

#### 【0048】

1つ以上の薬理ゲノミクスバイオマーカーを同定する遺伝的分析では、関連表現型において異なる値を有する個体からのサンプルは、対立形質及び/又は遺伝子型の同定がなされることが多い。用語「対立形質」は、本明細書で用いられるとき、症例及び対照からのプールされたDNAサンプル中、並びに/又は各個別対象からの別々のDNAサンプル中の多型変異体における対立遺伝子頻度を決定するためのプロセスを指す。各群からのDNAの遺伝子型を同定することにより、各群中の各遺伝子座における対立遺伝子頻度が算出される。次に、これらの対立遺伝子頻度は互いに比較される。いくつかの実施形態では、DNAサンプルは、全ゲノムSNPアレイ、例えばAffymetrix（Santa Clara, Calif.）及び/又はIllumina（San Diego, Calif.）によって作製されたもの、例えばAffymetrix 500Kアレイを用いて遺伝子型同定がなされる。Affymetrixアレイに加えて、Illuminaチップ及びSequenom Mass Arrayもまた使用可能である。任意の好適な遺伝子型を要求するアルゴリズムが用いられてもよい。いくつかの実施形態では、遺伝子型の要求は、Mahalanobis Distance Classifierを伴うRobust Linearモデル（RLMM）アルゴリズム、Bayesianステップを伴うRLMM（BRLMM）アルゴリズム、Axiom（商標）GT1アルゴリズム、完全マッチプローブを用いるBRLMM（BRLMM-P）アルゴリズム、又はBirdseedアルゴリズムを用いて作成される（Rabbee et al., Bioinformatics（2006）22:7-12; Korn et al., Nat Genet（2008）40:1253-60）。

#### 【0049】

遺伝子型又は多型変異体は、本明細書で用いられるとき、一緒に遺伝される傾向がある、DNAバリエーションのセット、又は多型を指す、「ハプロタイプ」の観点で表されてもよい。ハプロタイプは、対立遺伝子の組み合わせ又は同じ染色体上に見出されるSNPのセットを指しうる。例えば、2つのSNPは、各SNP位置がシトシンバリエーション及びアデニンバリエーションを含む場合の遺伝子内に存在してもよい。ある集団内の特定の個体は、1つの対立遺伝子（ヘテロ接合性）又はシトシンを各SNP位置に伴う遺伝子

10

20

30

40

50

を有する２つの対立遺伝子（ホモ接合性）を保有してもよい。遺伝子内の各ＳＮＰに対応する２つのシトシンがこれら個体内の一方又は両方の対立遺伝子上で一緒に移動するとき、個体は、遺伝子における２つのＳＮＰに関連してシトシン／シトシンハプロタイプを有するとして特徴づけることができる。

#### 【００５０】

時として、多型変異体は、データベース内で報告され、ここで該変異体は集団の有意な部分中に表れるか否かは判定されていない。これらの報告された多型変異体のサブセットは、集団の統計学的に有意な部分中に表れず、それらの一部は、配列決定エラーであり且つ／又は生物学的に関連しない。したがって、報告された多型変異体が統計学的に有意であるか、又は生物学的に関連するかは、該変異体の存在が個体の集団内で検出され、且つ該変異体の頻度が決定されるまで、未知であることが多い。多型変異体は、集団の１％以上、時として集団の５％以上、１０％以上、１５％以上、又は２０％以上、また多くは集団の２５％以上、３０％以上、３５％以上、４０％以上、４５％以上、又は５０％以上に表れる場合、統計学的に有意である（また任意選択的には生物学的に関連することが多い）。しかし、特定の遺伝的疾患及び／又は希少疾患においては、変異体は、集団の非常に小さい百分率を表してもよいが、依然として生物学的に関連する。

10

#### 【００５１】

用語「サンプル」は、本明細書で用いられるとき、例えば物理的、生化学的、化学的及び／又は生理学的特徴に基づいて特徴づけ及び／又は同定がなされるべき細胞及び／又は他の分子実体を有する目的の対象から入手される又はそれに由来する組成物を指す。例えば、語句「臨床サンプル」又は「疾患サンプル」及びそのバリエーションは、特徴づけられるべき細胞及び／又は分子実体を有することが予想されることになるか又は知られる目的の対象から得られる任意のサンプルを指す。

20

#### 【００５２】

用語「組織又は細胞サンプル」は、対象又は患者の組織から得られる類似する細胞の収集物を指す。組織又は細胞サンプルの供給源は、新鮮な、凍結及び／若しくは保存された臓器又は組織サンプル又は生検又は吸引物に由来する固形組織；血液又は任意の血液成分；脳脊髄液、羊水、腹水又は間質液などの体液；対象の妊娠期又は発生期の任意の時点からの細胞であってもよい。組織サンプルはまた、初代若しくは培養細胞又は細胞株であってもよい。任意選択的には、組織又は細胞サンプルは、疾患組織／臓器から得られる。組織サンプルは、保存剤、抗凝固剤、緩衝液、固定液、栄養剤、抗生物質などの天然組織と天然には混合されない化合物を含有してもよい。

30

#### 【００５３】

本明細書中の生体サンプルは、血漿、血清、全血、又は乾燥血液スポットサンプルでありうる。「プラズマ」又は「血漿」は、本明細書で用いられるとき、細胞外液（細胞外部のすべての体液）の血管内液部分を指す。それは、大部分が水であり、溶解されたタンパク質、グルコース、凝固因子、無機イオン、ホルモン及び二酸化炭素を含有する（プラズマは排泄生成物の輸送用の主な媒体である）。血漿は、抗凝固剤を含有する新鮮な血液のチューブを遠心機内で血球がチューブの底に落ちるまで回転させることにより調製される。次に、血漿は排出されるか又は抜かれる。「血清」は、フィブリノーゲン又は他の凝固因子を有しない血漿（即ち全血から血球と凝固因子の双方を引いたもの）である。

40

#### 【００５４】

「ポリヌクレオチド」又は「核酸」は、本明細書で互換可能に用いられるとき、任意の長さのヌクレオチドのポリマーを指し、ＤＮＡ及びＲＮＡを含む。ヌクレオチドは、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、修飾ヌクレオチド若しくは塩基、及び／又はそれらの類似体、又はＤＮＡ若しくはＲＮＡポリメラーゼによりポリマー中に組み込み可能な任意の基質でありうる。ポリヌクレオチドは、修飾ヌクレオチド、例えばメチル化ヌクレオチド及びそれらの類似体を含んでもよい。存在する場合、ヌクレオチド構造に対する修飾は、ポリマーの構築の前又は後に設けられてもよい。ヌクレオチドの配列は、非ヌクレオチド成分によって中断されてもよい。ポリヌクレオチドは、重合後、例えば標識成

50

分との共役により、さらに修飾されてもよい。修飾の他のタイプとして、例えば、「キャップ」、天然に存在するヌクレオチドの1つ以上と類似体との置換、ヌクレオチド間修飾、例えば、非荷電結合を有するもの（例えば、メチルホスホネート、ホスホトリエステル、ホスホロアミダート、カルバメートなど）及び荷電結合を有するもの（例えば、ホスホロチオエート、ジチオリン酸など）、例えばタンパク質など（例えば、ヌクレアーゼ、毒素、抗体、シグナルペプチド、poly-L-リジンなど）の懸垂部分を有するもの、介入物を有するもの（例えば、アクリジン、ソラレンなど）、キレート剤を有するもの（例えば、金属、放射性金属、ホウ素、酸化金属など）、アルキル化剤を有するもの、修飾結合を有するもの（例えば、アノマー核酸など）、並びにポリヌクレオチドの非修飾形態が挙げられる。さらに、通常は糖中に存在するヒドロキシル基の何れかが、例えば、ホスホン酸塩基、リン酸塩基で置換され、標準保護基によって保護され、若しくは追加的なヌクレオチドに対する追加的結合を調製するように活性化されてもよく、又は固体支持体にコンジュゲートされてもよい。5'及び3'末端OHは、リン酸化され、又は1~20炭素原子のアミン若しくは有機キャッピング基部分で置換されてもよい。他のヒドロキシルはまた、標準保護基に誘導体化されうる。ポリヌクレオチドはまた、一般に当該技術分野で公知であるリボース又はデオキシリボース糖の類似形態、例えば、2'-O-メチル-2'-O-アリル、2'-フルオロ-若しくは2'-アジド-リボース、炭素環糖類似体、アノマー糖、エピマー糖、例えば、アラビノース、キシロース若しくはリキソース、ピラノース糖、フラノース糖、セドヘブツロース、非環式類似体及び脱塩基ヌクレオシド類似体、例えばメチルリボシドなどを有しうる。1つ以上のリン酸ジエステル結合は、代替的な連結基で置換されてもよい。これらの代替的な連結基として、限定はされないが、リン酸が、P(O)S(「チオエート」)、P(S)S(「ジチオエート」)、(O)NR<sub>2</sub>(「アミダート」)、P(O)R、P(O)OR'、CO又はCH<sub>2</sub>(「ホルムアセタール」)(ここで各R又はR'は、独立して、H又は、任意選択的にはエーテル(-O-)結合を有する置換若しくは非置換アルキル(1~20C)、アリール、アルケニル、シクロアルキル、シクロアルケニル又はアラルジルである)で置換される場合の実施形態が挙げられる。ポリヌクレオチド中のすべての結合が同一である必要はない。前記は、RNA及びDNAを含む、本明細書中で参照されるすべてのポリヌクレオチドに適用される。

10

20

30

40

50

#### 【0055】

「オリゴヌクレオチド」は、本明細書で用いられるとき、短い、一般に一本鎖の、必然的ではないが一般に約200ヌクレオチド長より短い、一般には合成のポリヌクレオチドを一般に指す。用語「オリゴヌクレオチド」及び「ポリヌクレオチド」は、相互に排他的でない。ポリヌクレオチドについて上述されることは、オリゴヌクレオチドに等しく且つ完全に適用可能である。

#### 【0056】

「増幅」は、本明細書で用いられるとき、一般に所望される配列の複数のコピーを生成する過程を指す。「複数のコピー」は、少なくとも2コピーを意味する。「コピー」は、鋳型配列に対する完全な配列相補性又は同一性を必ずしも意味しない。例えば、コピーは、デオキシイノシンなどのヌクレオチド類似体、意図的な配列改変(鋳型に対してハイブリダイズ可能であるが相補的でない配列を含むプライマーを通じて導入された配列改変など)、及び/又は増幅中に生じる配列エラーを含みうる。

#### 【0057】

用語「アレイ」又は「マイクロアレイ」は、本明細書で用いられるとき、基板上の、規則正しく配列されたハイブリダイズ可能なアレイ要素、例えばポリヌクレオチドプローブ(例えばオリゴヌクレオチド)、ビーズ、又は結合試薬(例えば抗体)を指す。基板は、固体基板、例えばガラス又はシリカスライド、光ファイバー結合因子、又は半固体基板、例えばニトロセルロース膜でありうる。ヌクレオチド配列は、DNA、RNA、又はそれらの任意の並べ替えでありうる。

#### 【0058】

本明細書で用いられるとき、用語「表現型」は、個体間で比較可能な形質、例えば状態の存在又は不在、個体間の外見における視覚的に観察可能な差異、代謝変動、生理学的変動、生体分子の機能における変動などを指す。表現型は、定性的又は定量的でありうる。表現型の例が、治療、例えば薬剤に対する応答性である。

#### 【0059】

「応答性」は、限定はされないが、(1)疾患進行の緩徐化及び完全停止を含むある程度までの阻害；(2)疾患エピソード及び／若しくは症状における減少；(3)病変サイズの減少；(4)疾患細胞の隣接する末梢臓器及び／若しくは組織への浸潤の阻害（即ち、減少、緩徐化又は完全停止）；(5)疾患伝播の阻害（即ち、減少、緩徐化又は完全停止）；(6)1つ以上の障害に関連する症状のある程度までの軽減；(7)治療後の疾患フリーの提示の長さにおける増加；(8)治療後の所与時点での死亡率低下；及び／又は(9)治療後の有害作用の欠如を含む、患者にとっての利益を示す任意のエンドポイントを用いて評価可能である。応答性はまた、患者に対する副作用及び／又は毒性を示す任意のエンドポイントを用いて評価可能である。

10

#### 【0060】

「治療する」又は「治療」又は「軽減」は、標的となる病的状態若しくは障害を治療しない、又は状態の再発を予防しない場合に対象が緩徐化（緩和）するような治療的処置を指す。対象が、治療量の治療薬を受けてから、特定疾患の1つ以上の徴候及び症状の観察可能及び／若しくは測定可能な減少又はそれらの不在を示す場合、対象は十分に「治療」されている。例えば、がん細胞の数における有意な減少又はがん細胞の不在；腫瘍サイズの減少；腫瘍転移の阻害（即ち、ある程度までの緩徐化及び好ましくは停止）；腫瘍増殖のある程度までの阻害；特定のがんに関連する症状の1つ以上の寛解及び／又は軽減の長さにおけるある程度までの増加；罹患率及び死亡率の低下、及び生活の質上の課題における改善が挙げられる。疾患の徴候又は症状の減少はまた、患者による感覚であってもよい。治療は、がんのあらゆる徴候の消失と定義される完全寛解、又は腫瘍のサイズが好ましくは50パーセント超、より好ましくは75%減少する場合の部分寛解を達成しうる。患者はまた、患者が安定疾患を経験する場合、治療されたと考えられる。いくつかの実施形態では、治療薬による治療は、患者が治療後3か月、好ましくは治療後6か月、より好ましくは1年、さらにより好ましくは2年以上にわたり疾患フリーである状態をもたらすように有効である。疾患における十分な治療及び改善を評価するためのこれらのパラメータは、適切な当業者としての医師にとって馴染みがある通常の手順により容易に測定可能である。

20

30

#### 【0061】

用語「予測」又は「予後」は、患者が薬剤又は薬剤セットに対して有利又は不利の何れかで応答する可能性を指すように本明細書で用いられる。一実施形態では、予測は、それら応答の程度に関する。一実施形態では、予測は、患者が治療、例えば特定の治療薬による治療後、並びに疾患再発を伴わない特定の期間、生存又は改善するか否か及び／又はその確率に関する。本発明の予測方法は、任意の特定患者に対する最適な治療様式を選択することによって治療決定を下すのに、臨床的に用いることができる。本発明の予測方法は、ある患者が治療計画、例えば所与の治療計画、例えば、所与の治療薬又は組み合わせの投与、外科的介入、ステロイド治療などに対して有利に応答する可能性が高いか否かを予測するのに貴重なツールである。

40

#### 【0062】

本明細書で用いられるとき、用語「特異的に結合する」は、特異的結合対の結合特異性を指す。抗体による特定の標的の他の潜在的標的の存在下での認識は、かかる結合の1つの特徴である。特異的結合は、2つの異なる分子であって、分子の一方が第2の分子に化学的又は物理的手段を通じて特異的に結合する場合を含む。該2つの分子は、それらの相互の結合が、該2つの分子がそれらの結合パートナーと類似的特徴を有する他のアッセイ成分とを区別可能であるような程度であるという意味で関連している。結合成分対のメンバーは、リガンドと受容体（抗リガンド）、特異的結合対（SBP）メンバー及びSBP

50

パートナーなどと称される。分子はまた、分子の凝集体におけるS B Pメンバー；例えば第2の抗体の免疫複合体に対して産生される抗体であってもよく、その対応する抗原は、免疫複合体におけるS B Pメンバーであると考えられてもよい。

#### 【0063】

本明細書で用いられるとき、用語「相同体」は、天然に存在する核酸（即ち、「プロトタイプ」又は「野生型」核酸）と、天然に存在する核酸に対するわずかな修飾分だけ異なるが、天然に存在する形態の基本的なヌクレオチド構造を維持する核酸を指すように用いられる。かかる変化として、限定はされないが、1個若しくは数個のヌクレオチドにおける変化、例えば欠失（例えば核酸の切断バージョン）挿入及び/又は置換などが挙げられる。相同体は、天然に存在する核酸と比べて、増強、低減、又は実質的に類似した特性を有しうる。相同体は、天然に存在する核酸に対して、相補的でありうる、又は一致しうる。相同体は、限定はされないが、組換えDNA技術、化学合成などを含む、核酸の生成における当該技術分野で公知の技術を用いて生成されうる。

10

#### 【0064】

本明細書で用いられるとき、「相補的である」又は「一致した」は、2つの核酸配列が少なくとも50%の配列同一性を有することを意味する。好ましくは、2つの核酸配列は、少なくとも60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%若しくは100%の配列同一性を有する。「相補的である又は一致した」はまた、2つの核酸配列が、低、中の及び/又は高ストリンジェンシー条件下でハイブリダイズ可能であることを意味する。

20

#### 【0065】

本明細書で用いられるとき、「実質的に相補的である又は実質的に一致した」は、2つの核酸配列が少なくとも90%の配列同一性を有することを意味する。好ましくは、2つの核酸配列は、少なくとも95%、96%、97%、98%、99%若しくは100%の配列同一性を有する。或いは、「実質的に相補的である又は実質的に一致した」は、2つの核酸配列が高ストリンジェンシー条件下でハイブリダイズ可能であることを意味する。

#### 【0066】

一般に、ハイブリッドの安定性は、イオン濃度と温度の関数である。典型的には、ハイブリダイゼーション反応は、より低いストリンジェンシーの条件下で実施され、その後、変化するがより高いストリンジェンシーで洗浄された。中ストリンジェントハイブリダイゼーションは、プローブなどの核酸分子が相補的な核酸分子に結合することを可能にする条件を指す。ハイブリダイズされた核酸分子は、一般に、少なくとも60%の同一性、例えば少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、若しくは95%の同一性の何れかを有する。中ストリンジェント条件は、42℃で50%ホルムアミド、5×デンハート溶液、5×SSPE、0.2%SDSにおけるハイブリダイゼーションと、その後の42℃で0.2×SSPE、0.2%SDSにおける洗浄に等価な条件である。高ストリンジェンシー条件は、例えば、42℃で50%ホルムアミド、5×デンハート溶液、5×SSPE、0.2%SDSにおけるハイブリダイゼーションと、その後の65℃で0.1×SSPE、及び0.1%SDSにおける洗浄により提供されうる。

30

#### 【0067】

低ストリンジェンシーハイブリダイゼーションは、22℃で10%ホルムアミド、5×デンハート溶液、6×SSPE、0.2%SDSにおけるハイブリダイゼーションと、その後の37℃で1×SSPE、0.2%SDSにおける洗浄に等価な条件を指す。デンハート溶液は、1%フィコール、1%ポリビニルピロリドン、及び1%ウシ血清アルブミン(BSA)を含有する。20×SSPE（塩化ナトリウム、リン酸ナトリウム、エチレンジアミド四酢酸(EDTA)）は、3M塩化ナトリウム、0.2Mリン酸ナトリウム、及び0.025M(EDTA)を含有する。他の好適な中ストリンジェンシー及び高ストリンジェンシーのハイブリダイゼーション緩衝液及び条件は、当業者に周知である。

40

#### 【0068】

本明細書で用いられるとき、用語「アウトプット」は、コンピュータアルゴリズムから

50

生成される値又はスコアを指す。アウトプットは、コンピュータアルゴリズムへのインプットとして本明細書で開示されるバイオマーカーを用いるアッセイ結果に基づいて生成されてもよい。「アウトプット」は、定量的又は定性的の何れかでありえ、コンパニオン診断検査における治療に対する対象の考えられる応答性を判定するために使用可能である。

【0069】

本明細書に記載の本発明の態様及び実施形態が、態様及び実施形態「からなる」及び／又は「から本質的になる」ことを含むことは理解される。

【0070】

本発明の他の目的、利点及び特徴は、添付の図面と併せて解釈される以下の明細書から明白となる。

【0071】

C．列挙される実施形態

以下の列挙される実施形態は、本発明のいくつかの態様を代表する。

【0072】

第1の実施形態では、(1)本発明は、予防及び／又は治療を必要とする対象における肺高血圧症及び／又は肺気腫を予防及び／又は治療するための方法において、

a)脆弱性ヒスチジン三連構造(FHIT)のレベル及び／若しくは活性を提供若しくは増強する薬剤；及び／又は

b)エンザスタウリン

を有効量で前記対象に投与するステップを含むことを特徴とする方法を提供する。

2．対象における肺気腫を予防するために用いられる、実施形態1の方法。

3．対象における肺気腫を治療するために用いられる、実施形態1の方法。

4．対象における肺高血圧症を予防するために用いられる、実施形態1の方法。

5．対象における肺高血圧症を治療するために用いられる、実施形態1の方法。

6．肺高血圧症が、WHOグループIの肺動脈高血圧症(PAH)；WHOグループIの肺静脈閉塞症(PVOD)若しくは肺毛細管腫症(PCH)；WHOグループIの新生児の持続性肺高血圧症；WHOグループIIの左心疾患に続発する肺高血圧症；WHOグループIIIの肺疾患若しくは慢性低酸素に起因する肺高血圧症、WHOグループIVの慢性動脈閉塞症；又はWHOグループVの不明瞭な若しくは多因子機構を有する肺高血圧症に属する、実施形態4又は5の方法。

7．対象が、右室収縮期圧(RVSP)上昇、右室肥大、心線維症、肺血管リモデリング、例えば、血管欠損、血管筋性化及び／又は新生内膜形成、又は肺気腫を有する、実施形態6の方法。

8．肺高血圧症が、肺高血圧症(PH)、肺動脈高血圧症(PAH)、慢性閉塞性肺疾患(COPD)又は肺気腫である、実施形態6の方法。

9．肺高血圧症又は肺気腫が、対象において自発的に発生する(例えば特発性PH)、実施形態1～8の何れか1つの方法。

10．肺高血圧症又は肺気腫が、対象の遺伝的背景に基づいて発生する(例えば家族性PH)、実施形態1～8の何れか1つの方法。

11．肺高血圧症又は肺気腫が、別の疾患又は障害に起因又は関連して、例えば慢性閉塞性肺疾患(COPD)に続発して発生する、実施形態1～8の何れか1つの方法。

12．FHIT、又はその機能断片の生成をもたらす薬剤が、有効量で対象に投与される、実施形態1～11の何れか1つの方法。

13．薬剤が、対象において、FHIT、又はその機能断片を生成するように設計されるポリヌクレオチドを含む、実施形態12の方法。

14．ポリヌクレオチドが、FHIT、又はその機能断片をコードするDNA分子である、実施形態13の方法。

15．ポリヌクレオチドが、FHIT、又はその機能断片をコードするRNA分子である、実施形態13の方法。

16．薬剤が、FHIT、又はその機能断片を含むポリペプチドを含む、実施形態12

10

20

30

40

50

の方法。

17. 薬剤、例えば、miRNA 17-5、マイクロRNA 24a、マイクロRNA 模倣体若しくはマイクロRNA アンタゴニストなどのマイクロRNA、又はFHT、若しくはその機能断片のレベルを増加させる、デシタピンなどの脱メチル化剤が、有効量で対象に投与される、実施形態1~11の何れか1つの方法。

18. 薬剤、例えばエンザスタウリンが、対象におけるFHT、又はその機能断片をコードするDNA分子の発現を増強する、実施形態17の方法。

19. 薬剤が、対象におけるFHT、又はその機能断片をコードするRNA分子の翻訳を増強する、実施形態17の方法。

20. 薬剤が、対象におけるFHT、又はその機能断片の安定性を増強する、実施形態17の方法。

21. 薬剤が、活性化されたGq又はGqの活性化及びGq複合体との解離をもたらす、Gq共役受容体に結合する作動薬を含む、実施形態20の方法 [Hao et al., Cell Communication and Signaling, 11(1):59, August 2013を参照]。

22. 薬剤が、対象におけるFHT、又はその機能断片の分解を遮断又は低減する、実施形態21の方法。

23. 薬剤が、対象におけるFHT、又はその機能断片のリン酸化、例えば、FHTのTyr114部位でのSrc媒介性リン酸化を遮断又は低減する、実施形態22の方法。

24. FHTの活性を増強する薬剤が、有効量で対象に投与される、実施形態1~11の何れか1つの方法。

25. エンザスタウリンが、有効量で対象に投与される、実施形態1~11の何れか1つの方法。

26. 対象における肺気腫を予防するため、エンザスタウリンが有効量で対象に投与される、実施形態25の方法。

27. 対象における肺気腫を治療するため、エンザスタウリンが有効量で対象に投与される、実施形態25の方法。

28. 対象における肺高血圧症を予防するため、エンザスタウリンが有効量で対象に投与される、実施形態25の方法。

29. 対象における肺高血圧症を治療するため、エンザスタウリンが有効量で対象に投与される、実施形態25の方法。

30. 該薬剤及び/又はエンザスタウリンが、対象におけるFHT及び/又は骨形態形成タンパク質受容体II型(BMPR2)を上方制御する、実施形態1~29の何れか1つの方法。

31. 該薬剤及び/又はエンザスタウリンが、対象におけるFHT及び/又はBMPR2をマイクロRNA、例えばmiR17-5及び/又はmiR27aを介して上方制御する、実施形態30の方法。

32. 該薬剤及び/又はエンザスタウリンが、対象におけるFHT及びBMPR2を上方制御する、実施形態30又は31の方法。

33. 該薬剤及び/又はエンザスタウリンが、該薬剤及び/又はエンザスタウリンの対象におけるFHTの上方制御と独立して、BMPR2を上方制御する、実施形態30~32の何れか1つの方法。

34. 該薬剤及び/又はエンザスタウリンが、対象におけるPKC阻害と独立して、肺高血圧症及び/又は肺気腫を予防及び/又は治療する、実施形態1~33の何れか1つの方法。

35. 該薬剤及び/又はエンザスタウリンが、対象における右心室収縮期圧(RVSP)、RV肥大、心線維症及び/又は血管リモデリングを改善することにより、肺高血圧症及び/又は肺気腫を予防及び/又は治療する、実施形態1~34の何れか1つの方法。

36. 該薬剤及び/又はエンザスタウリンが、対象におけるRVSP上昇、RVH増加

10

20

30

40

50

、血管希薄化、遠位血管の筋性化及び／又は新生内膜形成を予防又は低減することにより、肺高血圧症及び／又は肺気腫を予防及び／又は治療する、実施形態１～３５の何れか１つの方法。

３７．有効量の該薬剤及び／又はエンザスタウリンが、末期ＰＨを有する又は有することが疑われる対象に投与される、実施形態１～３６の何れか１つの方法。

３８．末期ＰＨが、肺血管閉塞、ＲＶＳＰ上昇、例えばＲＶＳＰ＞１００ｍｍＨｇ、平均ＰＡＰ及び／又はＰＶＲの増加、右心不全、ＲＶＨ増加、ＲＶ機能の低下及びＲＶ拡大、並びに／又は間質性線維症の増加によって特徴づけられる、実施形態３７の方法。

３９．該薬剤及び／又はエンザスタウリンによる治療により、全肺におけるＦＨＩＴ及び／又はＢＭＰＲ２の発現が増強され、肺血管閉塞が低減されるか若しくは回復に向かい、且つ／又は小血管及び大血管の筋性化、ＲＶＨ、ＲＶ線維症、ＲＶ拡大及びＲＶＳＰ、平均ＰＡＰ、ＰＶＲの少なくとも１つが減少し、並びにＲＶ機能が増強される、実施形態３７又は３８の方法。

４０．治療対象において、肺動脈平均圧（ＰＡＰｍ）及び肺血管抵抗（ＰＶＲ）が減少し、且つ心拍出量（ＣＯ）が増加する、実施形態３９の方法。

４１．対象が、低レベルのＢＭＰＲ２を有する若しくは有することが疑われる、又はＢＭＰＲ２突然変異を有する若しくは有することが疑われる、実施形態１～４０の何れか１つの方法。

４２．対象が、肺高血圧症及び／又は肺気腫を有しない対象のＢＭＰＲ２レベル以下のＢＭＰＲ２レベルを有する、実施形態４１の方法。

４３．対象が、ＢＭＰＲ２遺伝子における点突然変異、付加及び／又は欠失、例えば、ＢＭＰＲ２のリガンド結合、キナーゼ及び／又はテイル領域における点突然変異を有する、実施形態４１の方法。

４４．対象が、低レベルのＦＨＩＴを有する若しくは有することが疑われる、又はＦＨＩＴ突然変異を有する若しくは有することが疑われる、実施形態１～４３の何れか１つの方法。

４５．対象が、肺高血圧症及び／又は肺気腫を有しない対象のＦＨＩＴレベル以下のＦＨＩＴレベルを有する、実施形態４４の方法。

４６．対象が、ＦＨＩＴ遺伝子における点突然変異、付加及び／若しくは欠失、及び／又はＦＨＩＴ遺伝子の異常なメチル化状態を有する、実施形態４４の方法。

４７．該薬剤及び／又はエンザスタウリンが、約５ｍｇ／日～約１，０００ｍｇ／日の範囲の用量で投与される、実施形態１～４６の何れか１つの方法。

４８．該薬剤及び／又はエンザスタウリンが、インビボレベルを得るための用量、例えば、約２０ナノモル／Ｌ～約６，０００ナノモル／Ｌの範囲の血清又は血漿濃度で投与される、実施形態１～４７の何れか１つの方法。特定のこれらの実施形態では、インビボレベルは、約２０ナノモル／Ｌ～約６０００ナノモル／Ｌの血漿濃度である。いくつかのこれらの実施形態では、インビボレベルは、約５００ナノモル／Ｌ～約２５００ナノモル／Ｌ、又は約１００ナノモル／Ｌ～約５００ナノモル／Ｌ、又は約２０ナノモル／Ｌ～約１００ナノモル／Ｌの血漿濃度である。

４９．薬学的に許容できる担体又は賦形剤を対象に投与することをさらに含む、実施形態１～４８の何れか１つの方法。

５０．対象における肺高血圧症及び／又は肺気腫を予防及び／又は治療するための第２の予防薬又は治療薬を有効量で投与することをさらに含む、実施形態１～４９の何れか１つの方法。

５１．肺高血圧症を予防及び／又は治療するための第２の予防薬又は治療薬が、血管作用物質、プロスタグランジン、エンドセリン受容体拮抗剤、ホスホジエステラーゼ５型阻害剤又は可溶性グアニル酸シクラーゼのアクチベーターである、実施形態５０の方法。

５２．肺気腫を予防及び／又は治療するための第２の予防薬又は治療薬が、気管支拡張薬、ステロイド薬又は抗生物質である、実施形態５０又は５１の方法。

５３．該薬剤及び／又はエンザスタウリンが、経口、経鼻、吸入、非経口、静脈内、腹

10

20

30

40

50



腔内、皮下、筋肉内、皮内、局所、又は直腸経路を介して投与される、実施形態 1 ~ 5 2 の何れか 1 つの方法。

54. 有効量の該薬剤及び / 又はエンザスタウリンが、対象に投与されることで、該対象の全身性血圧を低減する、実施形態 1 ~ 5 3 の何れか 1 つの方法。

55. 該治療が、治療対象における P A H の症候性がある少なくとも 1 つのパラメータの改善をもたらす、実施形態 1 ~ 5 4 の何れか 1 つの方法。いくつかの実施形態では、これは、該治療により、対象において、平均 P A P 肺動脈圧 ( P A P m ) が 25 mm H g 未満、好ましくは 20 mm H g 未満に低下し、P V R が 3 W U 未満に低下し、且つ / 又は P A W P ( 肺動脈楔入圧 ) が 15 超に上昇することを意味する。いくつかの実施形態では、P A H の症候性がある少なくとも 1 つのパラメータを改善することは、右心室収縮期圧 ( R V S P ) 又は肺動脈収縮期圧 ( P A S P ) ( 心電計を介して測定される、又は双方とも測定される ) を測定できるほどに改善することを指す。いくつかの実施形態では、P A H の症候性がある少なくとも 1 つのパラメータを改善することは、例えば右心カテーテル法により測定可能である、平均肺動脈圧 ( P A P m )、肺動脈楔入圧 ( P A W P )、心拍出量 ( C O )、及び / 又は肺血管抵抗 ( P V R ) を測定できるほどに改善することを指す。かかる一実施形態では、治療前に P A P m > 25 mm H g を有する対象は、治療後、P A P m < 25 mm H g、好ましくは < 20 mm H g を呈する。別の実施形態では、グループ 1 の P A H を有し、且つ治療前に P A P m > 25、及び P V R > 3 W U、及び P A W P < 15 を呈する対象は、治療後、改善された少なくとも 1 つのパラメータ、例えば、P A P m < 25、及び / 又は P V R > 3 W U、及び / 又は P A W P > 15 を有する。

56. 対象が哺乳動物である、実施形態 1 ~ 5 5 の何れか 1 つの方法。

57. 哺乳動物がヒトである、実施形態 5 6 の方法。

58. 哺乳動物が非ヒト哺乳動物である、実施形態 5 6 の方法。

59. 対象における脆弱性ヒスチジン三連構造 ( F H I T ) のレベル及び / 若しくは活性を提供若しくは増強する薬剤及び / 又はエンザスタウリンの、前記対象における肺高血圧症及び / 又は肺気腫を予防及び / 又は治療するための薬剤の製造における有効量での使用。

60. 1) 対象における脆弱性ヒスチジン三連構造 ( F H I T ) のレベル及び / 若しくは活性を提供若しくは増強する薬剤及び / 又はエンザスタウリン; 並びに

2) 肺高血圧症及び / 又は肺気腫を予防及び / 又は治療するための第 2 の予防薬又は治療薬を含む組み合わせ。

いくつかのかかる実施形態では、第 2 の予防薬又は治療薬は、I s o r d i l ( 二硝酸イソソルビド )、R e v a t i o ( シルデナフィル )、T r a c l e e r ( ボセンタン )、L e t a i r i s ( アンプリセンタン )、F l o l a n ( エボプロステノール )、A d c i r c a ( タダラフィル )、R e m o d u l i n ( トレプロスチニル ) V e n t a v i s ( イロprost )、T y v a s o ( トレプロスチニル )、D i l a t r a t e - S R ( 二硝酸イソソルビド )、I s o r d i l T i t r a d o s e ( 二硝酸イソソルビド )、I s o D i t r a t e ( 二硝酸イソソルビド )、及び I s o c h r o n ( 二硝酸イソソルビド ) から選択される。典型的には、該組み合わせは、少なくとも 1 つ、また好ましくは 2 つ以上の薬学的に許容できる賦形剤を含む。

61. 有効量の実施形態 60 の組み合わせ、及び薬学的に許容できる担体又は賦形剤を含む医薬組成物。

62. 予防及び / 又は治療を必要とする対象における肺高血圧症及び / 又は肺気腫を予防及び / 又は治療するための方法において、有効量の実施形態 60 の組み合わせ又は実施形態 61 の医薬組成物を前記対象に投与するステップを含むことを特徴とする方法。

63. 対象における肺高血圧症及び / 又は肺気腫を評価するための方法において、

a) 対象からサンプルを準備するステップと;

b) 前記対象における肺高血圧症及び / 又は肺気腫を評価するため、前記サンプル中の F H I T 及び / 又は B M P R 2 のレベル及び / 又は活性を評価するステップと、

を含むことを特徴とする方法。

64. 該サンプルが、血液、血清、血漿、若しくは体液サンプル、又はそれらの任意の組み合わせである、実施形態63の方法。

65. 対象が哺乳動物である、実施形態63又は64の方法。

66. 哺乳動物が、非ヒト哺乳動物、例えば、ペット、家畜、コンパニオン動物又は実験動物である、実施形態65の方法。

67. 哺乳動物がヒトである、実施形態65の方法。

68. ある閾値又は参照値を有するとb)で評価されたF H I T及び/又はB M P R 2のレベル及び/又は活性、例えば正常血圧を有する同等の対象からのF H I T及び/又はB M P R 2のレベル及び/又は活性と、前記対象が肺高血圧症及び/又は肺気腫を有する又はそれらを有するというより高いリスクを有することを示す閾値又は参照値よりも低いとb)で評価されたF H I T及び/又はB M P R 2のレベル及び/又は活性とを比較することをさらに含む、実施形態63～67の何れか1つの方法。

69. サンプル中のF H I T及び/又はB M P R 2をコードするポリヌクレオチドのレベルが評価される、実施形態63～68の何れか1つの方法。

70. 該ポリヌクレオチドが、F H I T及び/又はB M P R 2をコードするD N A分子である、実施形態69の方法。

71. 該ポリヌクレオチドが、F H I T及び/又はB M P R 2をコードするR N A分子である、実施形態69の方法。

72. サンプル中のF H I T及び/又はB M P R 2をコードするポリヌクレオチドのレベルが、前記ポリヌクレオチドを増幅すること、ライゲートすること、ハイブリダイズすること、及び/又は配列決定することを含む手順を用いて評価される、実施形態63～71の何れか1つの方法。

73. 該ポリヌクレオチドが、ポリメラーゼ連鎖反応(P C R)、鎖置換増幅(S D A)、転写媒介増幅(T M A)、リガーゼ連鎖反応(L C R)、核酸配列に基づく増幅(N A S B A)、プライマー伸長、ローリングサークル増幅(R C A)、自己持続配列複製(3 S R)、及びループ介在等温増幅(L A M P)からなる群から選択される手順を用いて増幅される、実施形態72の方法。

74. 配列決定が、マクサム・ギルバート配列決定、鎖終結方法、ショットガン配列決定、架橋P C R、単一分子リアルタイム配列決定、イオン半導体(i o n t o r r e n t配列決定)、合成による配列決定、ライゲーションによる配列決定(S O L i D配列決定)、鎖終結(サンガー配列決定)、大規模並列シグネチャー配列決定(M P S S)、ポロニー配列決定、454パイロシーケンシング、I l l u m i n a (S o l e x a)配列決定、D N A ナノボール配列決定、ヘリスコープ単一分子配列決定、単一分子リアルタイム(S M R T)配列決定、ナノポアD N A配列決定、トンネル電流D N A配列決定、ハイブリダイゼーションによる配列決定、質量分析を用いた配列決定、マイクロ流体サンガー配列決定、顕微鏡に基づく技術、R N A P配列決定、及びインビトロウイルスハイスループット配列決定からなる群から選択される形式を用いて実施される、実施形態72の方法。

75. サンプル中のF H I T及び/又はB M P R 2を含むポリペプチドのレベルが評価される、実施形態63～74の何れか1つの方法。

76. サンプル中のF H I T及び/又はB M P R 2を含むポリペプチドのレベルが、免疫測定法を用いて評価される、実施形態75の方法。

77. 免疫測定法が、酵素結合免疫吸着測定(E L I S A)、免疫プロット、免疫沈降、ラジオイムノアッセイ(R I A)、免疫染色、ラテックス凝集、間接赤血球凝集アッセイ(I H A)、補体結合、間接免疫蛍光アッセイ(I F A)、ネフェロメトリー、フローサイトメトリーアッセイ、表面プラズモン共鳴(S P R)、化学発光アッセイ、側方流動免疫測定法、u - キャプチャーアッセイ(u - c a p t u r e a s s a y)、阻害アッセイ、及び結合活性アッセイからなる群から選択される、実施形態76の方法。

78. 対象における肺高血圧症及び/又は肺気腫の診断、予後、層別化、リスク評価、

10

20

30

40

50

又は治療監視のために用いられる、実施形態 63 ~ 77 の何れか 1 つの方法。

79 . 少なくとも 50 % の感度を有する、実施形態 63 ~ 78 の何れか 1 つの方法。

80 . 少なくとも 50 % の特異性を有する、実施形態 63 ~ 79 の何れか 1 つの方法。

81 . 対象における肺高血圧症及び / 又は肺気腫の評価に基づき、対象を治療する又は対象の治療を変更することをさらに含む、実施形態 63 ~ 80 の何れか 1 つの方法。

82 . ヒト患者における肺高血圧症及び / 又は肺気腫の評価に基づき、ヒト患者を治療する又はヒト患者の治療を変更することをさらに含む、実施形態 81 の方法。

83 . 哺乳動物における肺高血圧症及び肺気腫を減少させる方法において、脆弱性ヒスチジン三連構造 ( F H I T ) 増加剤エンザスタウリン又は他の F H I T 増加剤を有効量で肺高血圧症又は肺気腫を有する哺乳動物に投与することを含み、ここで投与用量が、 1000 mg / 日未満であり、且つ前記哺乳動物の血圧を低下させるのに十分である、方法。

84 . 前記哺乳動物がヒトである、実施形態 83 の方法。

85 . 前記用量が、 3500 ナノモル / L 以下の予測された F H I T 増加剤エンザスタウリン又は他の F H I T 増加剤の血清濃度を提供する、実施形態 83 の方法。

86 . 前記投与が経口である、実施形態 83 の方法。

87 . 低い又は検出不能レベルの F H I T を有する哺乳動物における肺高血圧症又は肺気腫を減少させる方法において、

a . 哺乳動物から血液サンプルを入手するステップと ;

b . 血液サンプル中の F H I T のレベルを測定するステップと ;

c . 該サンプルが低い又は検出不能レベルの F H I T を有する場合、有効量の F H I T 増加剤エンザスタウリン又は他の F H I T 増加剤を、肺高血圧症又は肺気腫を有する哺乳動物に投与するステップと、を含むことを特徴とする方法。

88 . 前記哺乳動物がヒトである、実施形態 87 の方法。

89 . 前記用量が、 3500 ナノモル / L 以下の予測された F H I T 増加剤エンザスタウリン又は他の F H I T 増加剤の血清濃度を提供する、実施形態 87 の方法。

90 . 前記投与が経口である、実施形態 87 の方法。

91 . 低い又は検出不能レベルの F H I T を有する哺乳動物における肺高血圧症又は肺気腫を減少させる方法において、

a . 哺乳動物から組織サンプルを入手するステップと ;

b . 組織サンプル中の F H I T のレベルを測定するステップと ;

c . 該サンプルが低い又は検出不能レベルの F H I T を有する場合、有効量の F H I T 増加剤エンザスタウリン又は他の F H I T 増加剤を、肺高血圧症又は肺気腫を有する哺乳動物に投与するステップと、を含むことを特徴とする方法。

92 . 前記哺乳動物がヒトである、実施形態 91 の方法。

93 . 前記用量が、 3500 ナノモル / L 以下の予測された F H I T 増加剤エンザスタウリン又は他の F H I T 増加剤の血清濃度を提供する、実施形態 91 の方法。

94 . 前記投与が経口である、実施形態 91 の方法。

95 . 低い又は検出不能レベルの B M P R 2 を有する哺乳動物における肺高血圧症又は肺気腫を減少させる方法において、

a . 哺乳動物から血液サンプルを入手するステップと ;

b . 血液サンプル中の B M P R 2 のレベルを測定するステップと ;

c . 該サンプルが低い又は検出不能レベルの B M P R 2 を有する場合、有効量の F H I T 増加剤エンザスタウリン又は他の F H I T 増加剤を、肺高血圧症又は肺気腫を有する哺乳動物に投与するステップと、を含むことを特徴とする方法。

96 . 前記哺乳動物がヒトである、実施形態 95 の方法。

97 . 前記用量が、 3500 ナノモル / L 以下の予測された F H I T 増加剤エンザスタウリン又は他の F H I T 増加剤の血清濃度を提供する、実施形態 95 の方法。

98. 前記投与が経口である、実施形態95の方法。

99. 低い又は検出不能レベルのBMPR2を有する哺乳動物における肺高血圧症又は肺気腫を減少させる方法において、

a. 哺乳動物から組織サンプルを入手するステップと；

b. 組織サンプル中のBMPR2のレベルを測定するステップと；

c. 該サンプルが低い又は検出不能レベルのBMPR2を有する場合、有効量のFHI T増加剤エンザスタウリン又は他のFHI T増加剤を、肺高血圧症又は肺気腫を有する哺乳動物に投与するステップと、  
を含むことを特徴とする方法。

100. 前記哺乳動物がヒトである、実施形態99の方法。

101. 前記用量が、3500ナノモル/L以下の予測されたFHI T増加剤エンザスタウリン又は他のFHI T増加剤の血清濃度を提供する、実施形態99の方法。

102. 前記投与が経口である、実施形態99の方法。

103. 低い又は検出不能レベルのBMPR2を有する哺乳動物における肺高血圧症又は肺気腫を減少させる方法において、

a. 哺乳動物から組織サンプルを入手するステップと；

b. 組織サンプル中のBMPR2のレベルを測定するステップと；

c. 該サンプルが低い又は検出不能レベルのBMPR2を有する場合、有効量のFHI T増加剤エンザスタウリン又は他のFHI T増加剤を、肺高血圧症又は肺気腫を有する哺乳動物に投与するステップと、  
を含むことを特徴とする方法。

104. 前記哺乳動物がヒトである、実施形態103の方法。

105. 前記用量が、3500ナノモル/L以下の予測されたFHI T増加剤エンザスタウリン又は他のFHI T増加剤の血清濃度を提供する、実施形態103の方法。

106. 前記投与が経口である、実施形態103の方法。

107. BMPR2の突然変異を有する哺乳動物における肺高血圧症又は肺気腫を減少させる方法において、

a. 哺乳動物から組織サンプルを入手するステップと；

b. 組織サンプルをBMPR2の突然変異について分析するステップと；

c. BMPR2の突然変異が検出された場合、有効量のFHI T増加剤エンザスタウリン又は他のFHI T増加剤を、肺高血圧症又は肺気腫を有する哺乳動物に投与するステップと、  
を含むことを特徴とする方法。

108. 前記哺乳動物がヒトである、実施形態107の方法。

109. 前記用量が、3500ナノモル/L以下の予測されたFHI T増加剤エンザスタウリン又は他のFHI T増加剤の血清濃度を提供する、実施形態107の方法。

110. 前記投与が経口である、実施形態107の方法。

111. BMPR2の突然変異を有する哺乳動物における肺高血圧症又は肺気腫を減少させる方法において、

a. 哺乳動物から血液サンプルを入手するステップと；

b. 血液サンプルをBMPR2の突然変異について分析するステップと；

c. BMPR2の突然変異が検出された場合、有効量のFHI T増加剤エンザスタウリン又は他のFHI T増加剤を、肺高血圧症又は肺気腫を有する哺乳動物に投与するステップと、  
を含むことを特徴とする方法。

112. 前記哺乳動物がヒトである、実施形態111の方法。

113. 前記用量が、3500ナノモル/L以下の予測されたFHI T増加剤エンザスタウリン又は他のFHI T増加剤の血清濃度を提供する、実施形態111の方法。

114. 前記投与が経口である、実施形態111の方法。

115. FHI Tの突然変異を有する哺乳動物における肺高血圧症又は肺気腫を減少さ

10

20

30

40

50

せる方法において、

- a. 哺乳動物から組織サンプルを入手するステップと；
- b. 組織サンプルをF H I Tの突然変異について分析するステップと；
- c. F H I Tの突然変異が検出された場合、有効量のF H I T増加剤エンザスタウリン又は他のF H I T増加剤を、肺高血圧症又は肺気腫を有する哺乳動物に投与するステップと、

を含むことを特徴とする方法。

1 1 6 . 前記哺乳動物がヒトである、実施形態 1 1 5 の方法。

1 1 7 . 前記用量が、3 5 0 0 ナノモル / L 以下の予測されたF H I T増加剤エンザスタウリン又は他のF H I T増加剤の血清濃度を提供する、実施形態 1 1 5 の方法。

10

1 1 8 . 前記投与が経口である、実施形態 1 1 5 の方法。

1 1 9 . F H I Tの突然変異を有する哺乳動物における肺高血圧症又は肺気腫を減少させる方法において、

- a. 哺乳動物から血液サンプルを入手するステップと；
- b. 血液サンプルをF H I Tの突然変異について分析するステップと；
- c. F H I Tの突然変異が検出された場合、有効量のF H I T増加剤エンザスタウリン又は他のF H I T増加剤を、肺高血圧症又は肺気腫を有する哺乳動物に投与するステップと、

を含むことを特徴とする方法。

1 2 0 . 前記哺乳動物がヒトである、実施形態 1 1 9 の方法。

20

1 2 1 . 前記用量が、3 5 0 0 ナノモル / L 以下の予測されたF H I T増加剤エンザスタウリン又は他のF H I T増加剤の血清濃度を提供する、実施形態 1 1 9 の方法。

1 2 2 . 前記投与が経口である、実施形態 1 1 9 の方法。

1 2 3 . 前記化合物「F H I T増加剤エンザスタウリン又は他のF H I T増加剤」が、L Y 3 1 7 6 1 5、D 0 4 0 1 4としても知られる、実施形態 8 3 ~ 1 2 2 の何れか 1 つの方法。

1 2 4 . 肺高血圧症又は肺気腫が、以下：右室収縮期圧（R V S P）上昇、右室肥大、心線維症、肺血管リモデリング（即ち、血管欠損及び血管筋性化）又は肺気腫の何れか 1 つを呈する、実施形態 8 3 ~ 1 2 2 の何れか 1 つの方法。

1 2 5 . 肺高血圧症又は肺気腫が、自発的に発生しうる（特発性 P H）、実施形態 8 3 ~ 1 2 2 の何れか 1 つの方法。

30

1 2 6 . 肺高血圧症又は肺気腫が、遺伝的背景に基づいて発生しうる（家族性 P H）、実施形態 8 3 ~ 1 2 2 の何れか 1 つの方法。

1 2 7 . 肺高血圧症又は肺気腫が、別の疾患に伴い、例えば慢性閉塞性肺疾患（C O P D）に続発して発生しうる、実施形態 8 3 ~ 1 2 2 の何れか 1 つの方法。

1 2 8 . F H I T増加剤エンザスタウリン又は他のF H I T増加剤が、リスク要素（即ち、B M P R 2又はF H I Tについて陽性の突然変異状態）を有する哺乳動物に対する予防策として用いられる、実施形態 8 3 ~ 1 2 2 の何れか 1 つの方法。

1 2 9 . 肺高血圧症又は肺気腫が、W H O分類グループ I（肺動脈高血圧症）、グループ I I（肺静脈高血圧症）、グループ I I I（慢性肺疾患に伴う肺高血圧症）、グループ V（混合型）を指す、実施形態 8 3 ~ 1 2 8 の何れか 1 つの方法。

40

1 3 0 . 肺高血圧症又は肺気腫が、P K C阻害に依存しないが、代わりとして新規なシグナル伝達分子F H I Tを通じて予防される又は回復に向けられる、実施形態 8 3 ~ 1 2 9 の何れか 1 つの方法。

1 3 1 . 薬剤が、技術、例えばC R I S P Rを通じた医薬品、化学物質、バイオ改変治療方法及び遺伝子修飾を指す、実施形態 8 3 ~ 1 3 0 の何れか 1 つの方法。

1 3 2 . 肺高血圧症を治療するためのF H I T増加剤の使用。

1 3 3 . F H I T増加剤がエンザスタウリンである、実施形態 1 3 2 に従う使用。

#### 【0 0 7 3】

本開示の徹底的理解をもたらすため、極めて多数の具体的詳細が下記に示される。これ

50

らの詳細は、例示を目的として提供され、主張される主題は、これらの具体的詳細の一部又は全部を伴わずに特許請求の範囲に従って実施されてもよい。主張される主題の範囲から逸脱することなく、他の実施形態を用いることができ、また構造的変化を設けることができることは理解されるべきである。個別の実施形態の1つ以上に記載される様々な特徴及び機能性が、それらの適応性において、それらが記載される特定の実施形態に限定されないことは理解されるべきである。それらは代わりに、単独で又はいくつかの組み合わせにて、本開示の他の実施形態の1つ以上に、かかる実施形態が記載されるか否かにかかわらず、またかかる特徴が記載された実施形態の一部として提示されるか否かにかかわらず適用されうる。明確さを目的として、当該技術分野で公知である技術項目は、主張される主題が詳述されていないことに関係し、主張される主題が不明瞭であることが不必要でない。

10

#### 【0074】

本発明は、F H I T 増加剤エンザスタウリン又は他のF H I T 増加剤を用いた肺動脈高血圧症の治療と併せて、生物学的マーカーとしてF H I T を用いる方法に関する。本発明は、家族性及び特発性肺動脈高血圧症におけるF H I T 増加剤エンザスタウリン又は他のF H I T 増加剤を用いた肺動脈高血圧症の治療に関する。本発明はまた、肺動脈高血圧症において認められる血管閉塞性表現型、肺血管欠損、右室収縮期圧上昇、肺気腫、心線維症及び右室肥大を寛解するための、F H I T 増加剤エンザスタウリン又は他のF H I T 増加剤の単独使用又は以前に処方された薬物との併用に関する。

20

#### 【0075】

本明細書に記載の方法は、以下：右室収縮期圧上昇、右室肥大、以前の非筋性化血管での肺血管新規筋性化及びそれら周縁における増強、肺血管欠損、肺血管新生内膜形成の増強、及び肺血管媒体肥厚の増強の何れかを有する患者における肺高血圧症を治療するために適用可能である。

#### 【0076】

肺高血圧症に対する治療の有効性又は進歩は、当該技術分野で公知の方法及びパラメータを用いて測定可能である。例えば、P H 状態の間接的尺度としてのR V S P 及びP A S P を測定するため、心電図検査が使用可能である。平均P P A P ( P A P m )、P A W P、心拍出量及びP V R を測定するため、右心カテーテル法が使用可能である。肺高血圧症は、一般にP A P m > 25 mm H g と定義される。グループ1のP A H は、時として、P A P m > 25、P V R > 3 W U とともにP A W P < 15 と定義される。

30

#### 【0077】

第I I 相試験では、F H I T 増加剤エンザスタウリンは、試験の持続期間における6か月間、耐受性を示した(Gray et al., Cancer 2013 119(5): 1023 - 1032)。報告された副作用は、発疹、腹部膨満、低ナトリウム血症、D V T 及び低血圧を含んだ。

#### 【0078】

この薬剤で達成される高い耐受性、最小毒性及び低量及び副作用の重症度に起因し、肺高血圧症に対する治療及びリスクのある、例えばB M P R 2 の陽性突然変異状態の個体における家族性肺高血圧症の発生の予防としてそれは有用である。肺高血圧症の疾患回復のF H I T 増加剤エンザスタウリンによる達成は前例がなく、肺高血圧症に対する治療方法としてのその使用がここで示唆される。さらに、エンザスタウリンの有効性は、他のF H I T 増加剤もまた、かかる治療のために使用可能であることを示す。

40

#### 【0079】

F H I T 増加剤エンザスタウリン又は他のF H I T 増加剤は、単独で又はP H を治療若しくは予防する他の活性化化合物と組み合わせて投与されてもよい。他の活性化化合物は、F H I T 増加剤エンザスタウリン又は他のF H I T 増加剤と異なる時点で又は同時に投与されてもよく、また特定の実施形態では、F H I T 増加剤エンザスタウリン又は他のF H I T 増加剤及び他の活性化化合物は、同じ製剤中に、又は同じキット内の別々の製剤として存在してもよい。P H を治療する例示的な他の活性化化合物として、例えば、プロスタサイク

50

リン類似体、エンドセリン受容体拮抗剤、ホスホジエステラーゼ - 5 阻害剤、高用量のカルシウムチャネルブロッカー、抗凝固剤、利尿薬又は抗増殖性薬剤が挙げられる。特定の症例では、他の活性化合物は、例えば、Isordil (二硝酸イソソルビド)、Revatio (シルデナフィル)、Tracleer (ボセンタン)、Letairis (アンプリセンタン)、Flolan (エボプロステノール)、Adcirca (タダラフィル)、Remodulin (トレプロスチニル)、Ventavis (イロプロスト)、Tyvaso (トレプロスチニル)、Dilatrate - SR (二硝酸イソソルビド)、Isordil Titrados (二硝酸イソソルビド)、IsoDilate (二硝酸イソソルビド) 又は Isochron (二硝酸イソソルビド) であってもよい。

#### 【0080】

BMPR2 シグナル伝達は、PAH 患者において冒されていない突然変異キャリアと比べて著しく障害され (29、42、43)、i) BMPR2 発現又はシグナル伝達の閾値であって、それ未満で PAH が発生するもの、ii) BMPR2 修飾因子の存在、又は iii) PAH の病態形成に寄与するさらなる経路、が示唆される。

#### 【0081】

我々は、新規な BMPR2 モディファイヤー遺伝子として、22,000 を超える遺伝子の大規模 siRNA HTS において FHIT 及び LCK を同定した。PAH における臨床的重要性が高いことを確認するため、我々は、すべての PAH の病因を含む PAH トランスクリプトームデータベースの新規なマルチコホートの多重組織分析において両遺伝子の遺伝子発現を交差検証し、FHIT がすべてのデータセット内で一貫して著しく下方制御されることを確認した。LCK の下方制御がより変動的であったことから、我々は主に、この試験において PAH における FHIT の役割を理解することを重視した。FHIT は、PAH 患者における広範な遺伝子発現のための有効な代替物と考えられる、PBM C において最も一貫して下方制御された (35、42、44、45、46)。我々は、ヒト PAH リンパ球、PAEC 及び肺組織の各々における FHIT の発現低下に関する我々の知見を確認した。

#### 【0082】

我々は、FHIT が、PAH の発生についての多重ヒット理論に合致する BMPR2 突然変異を有する傾向が高い個体における PAH の浸透度の可変性に寄与するモディファイヤー遺伝子であることを提起する。それを支持して、20% (1) という PAH における BMPR2 突然変異の低い浸透度は、同様にわずか 20 ~ 45% の浸透度 (47) を有する BRCA1 突然変異による乳がんの遺伝的素因に匹敵する。FHIT は、孤発性乳がんにおける疾患感作物質 (disease-sensitizer) として役立ち、ここでは BRCA1 及び FHIT の 1 つの対立遺伝子欠損がより侵襲性の高い表現型を伴う予後不良をもたらした (47)。同様に、肺がんにおける FHIT 及び p53 の同時欠損は、増殖促進経路を調節不全にすることにより、侵襲性肺がんにおける素因となる (48)。FHIT の減少は、必要条件であったが、Fhit<sup>-/-</sup> マウスにおけるゲノム不安定性の増加に合致して (50)、インビトロで発がん性 (carcinogenic) 表現型を誘導するのに十分ではなかった (49)。

#### 【0083】

我々が異なる PAH の病因を通じて FHIT の発現低下を測定したと仮定すれば、我々はさらに、低い FHIT レベルがまた、非家族性 PAH 患者において観察された低レベルの BMPR2 に寄与するかもしれないことを提起する。PAH における FHIT の発現低下の機構は未知であり、さらなる研究を保証する。FHIT のエピジェネティックサイレンシング又はヘテロ接合性欠損が、脆弱部位 FRA3B 上のその位置が原因で生じることがあり (13)、ここでは一般に低酸素又は発癌物質、例えばタバコ煙への曝露後に鎖破損が現れる (51 ~ 53)。健常成人における FHIT 発現の FRA3B 部位破損からの非依存性が報告されたにもかかわらず (54)、突然変異原感受性の増加とそれに付随する可能性がある p53 を通じての DNA 損傷修復系における異常 (55) が、PAH 患者が FHIT の減少に至る素因になることがある。或いは、肺がんなどの悪性腫瘍において

10

20

30

40

50

認められる(59~63) F H I T又はそのプロモーターの過剰メチル化(56~58)もまた、P A Hにおける低いF H I Tの発現を理由づけることがある。

【0084】

我々は、F H I TがB M P R 2及びI d 1の上流制御因子であり、且つ以前にF H I Tの発現を増強することが示された薬剤のエンザスタウリン(64)が、P A E CにおいてF H I T、B M P R 2及びI d 1の発現を増強することを確認した。F H I TがB M P R 2シグナル伝達をいかに調節することがあるかを機構的に理解するため、我々は選択されたB M P R 2制御性マイクロRNAの発現を評価した。mi R 17-5とmi R 100の双方は、血管細胞(30、65)とともに非血管細胞(30、65、66)においてB M P R 2を標的にする。Mi R 17-5は、インターロイキン-6 / S T A T 3 媒介性シグナル伝達を介してB M P R 2を下方制御する(67)。F H I Tの発現低下により、エンザスタウリンによって救済される効果として、mi R 17-5が増加する。F H I Tの発現低下により、末期P A H患者のP B M C内で増加することが示されたmi R N Aであるmi R 27aが増加する(11)。Mi R 27aの阻害は、それがP A E Cの増殖を低減し(30)、B M P R 2 / P P A R を介して肺動脈におけるP A S M Cの増殖を阻止した(68)とき、有利であると思われる。mi R 17-5のように、エンザスタウリンは、F H I Tの欠損によって誘導されるmi R 27aにおける増加を救済することができた。mi R 17-5アンタゴニストを阻害することは、s i F H I T誘導性のB M P R 2抑制を救済したが、それ故、類似の手法が近年示している通り、有望な治療戦略を提示するかもしれない(32、69)。しかし、単一のマイクロRNAの標的化が、ヒトP A Hにおける血管リモデリングの有意な改善を達成するための行き過ぎた還元論的手法を表す可能性が高いという警告がなされている。

10

20

30

40

50

【0085】

F h i t - / - マウスは、P A Hの肺の特徴である、小動脈の筋性化及び遠位動脈の希薄化、低酸素後のP Hの悪化、並びに再酸素負荷後の回復不能を発生させる。その点で、F h i t - / - マウスは、B m p r 2の内皮欠失を有するマウスに酷似している(70)。実験全体を通じてのF h i tの発現低下に加えて、F h i t - / - マウスは、C 57マウスと比べて、低酸素下でB M P R 2レベルの低下を発生したが、それは潜在的には低酸素下でのより重篤なP H表現型を理由づけている。B M P R 2レベルが4週間の再酸素負荷後に正常化した一方、F h i t - / - マウスは依然として完全に回復することができず、これはF h i t - / - マウスにおけるより重篤な血管損傷 / 機能障害からのより緩徐な回復又は回復に必要とされるF H I Tの追加的なB M P R 2に依存しない役割の何れかにより説明することができた。図12を参照のこと。

【0086】

P A Hにおける血管機能障害は、肺血管欠損をもたらす内皮損傷及び早期アポトーシス(12)、その後のアポトーシス抵抗性血管細胞の増殖(71)によって開始されと考えられる。疾患発症に先立つことがある(72)、高められたベースラインDNA損傷及びインビボでの突然変異原感受性(26、34、35)は、E Cの脆弱性にさらに寄与する可能性が高い。F H I Tの欠損は、突然変異原の損傷に対する感作増強をもたらし、それ故、血管損傷におけるリスク因子及び回復不能をもたらすかもしれない。本明細書で示されるように、F H I T及びB M P R 2のレベル低下は、血管機能障害に関連し；アポトーシス、障害された管形成及びP A E C内でのDNA損傷の増加、並びにP A S M Cの高められた増殖を引き起こし、それは前がん状態下のF H I Tの欠損時での報告されたDNA損傷の悪化に合致する(73)。他方でB M P R 2シグナル伝達を増強する戦略は(エンザスタウリンを用いることによって示される通り)、これらの血管表現型を改善した(7、12、74、75)。

【0087】

F H I Tは、肺がん細胞におけるE G F R / S r c / E R K / S l u g 調節性の内皮間葉移行(E n d M T)を抑制することが知られている。したがって、F H I Tレベルの低下は、E n d M Tを促進可能であり、低いF H I TレベルでのS M Cの増殖増強と一緒に



、我々が観察している S M A 陽性細胞の増加、遠位肺血管の内側肥厚及び外膜肥厚を説明することができた ( 7 6 ~ 7 8 ) 。 F h i t - / - マウスで認められた血管希薄化は、P A H 患者における循環 E C の数の増加からも明らかなように、遠位動脈における P A E C アポトーシスの増加、細胞間接着における異常、又は P A E C の血管損傷部位への遊走を原因としてもよい ( 7 9 ) 。

#### 【 0 0 8 8 】

B M P R 2 欠損 P A H 患者におけるエンザスタウリンの潜在的使用のための概念実証として、我々はまず、B m p r 2 + / - 及び野生型 C 5 7 B L / 6 マウスにおけるエンザスタウリンを検討し、エンザスタウリン ( 1 5 m g / k g / 日 ) での 2 週間の処置により、R V S P、R V H 及び肺生理における変化による測定として、低酸素誘導性の P H が減弱 10  
されるとい証拠を提供した。潜在的な解釈の妥当性 ( t r a n s l a t i o n a l r e l e v a n c e ) として、我々はマウスにおける F K 5 0 6 処置とエンザスタウリン処置との相加的効果を見出した。

#### 【 0 0 8 9 】

次に我々は、重度の新生内膜形成及び R V 不全 ( 8 0 ) を含むヒト疾患を最も忠実に再現するため、マウスモデルや、主に内側肥厚に起因して重度の P H を発生するモノクロタリンラットモデル ( 8 1 ) よりも優れる、重度の肺血管リモデリングを発生する S U G E N 5 4 1 6 / 低酸素 / 酸素正常状態ラットモデルにおいて、エンザスタウリンの試験を開始した ( 4 1 ) 。幾つかの試験により、S U G E N 5 4 1 6 / 低酸素 / 酸素正常状態ラットにおける確立された P H の回復化が示されている ( 6 、 1 2 、 3 2 、 8 2 、 8 3 ) 。我 20  
々は、低用量エンザスタウリン ( 5 m g / k g / 日 ) が、S U G E N 5 4 1 6 / 低酸素 / 酸素正常状態に誘導された肺及び R V 損傷を、F H I T 及び B M P R 2 シグナル伝達を増強することにより、強力に回復に向かわせることを見出した。その知見の解釈は、小さいサンプルサイズに基づくが、限定される。エンザスタウリンががんにおける P K C 阻害剤として評価される一方 ( 2 1 ) 、我々は、S U G E N 5 4 1 6 / 低酸素 / 酸素正常状態処置ラットのエンザスタウリン処置後の全肺組織において、P K C 活性化における有意な低下をそのリン酸化による測定として認めなかった ( 図 1 3 ) 。我々は、エンザスタウリンがインビトロで低用量 ( 5 ~ 1 5 u M ) で F H I T 及び B M P R 2 を増加させ ( 図 1 4 ) 、且つエンザスタウリンが、F H I T、B M P R 2 及び I D を調節するその能力に関して他の選択的 P K C 及び汎用的 P K C 阻害剤と異なるとともに、P A E C 機能に対して 30  
有効である ( 図 1 5 、 図 1 6 ) ことを確認した。これは、以前の臨床試験 ( 8 4 、 8 5 ) 、インビボ齧歯類試験 ( 8 6 ) 及びインビトロで P K C リン酸化における減少を達成するのに必要とされる用量 ( 8 7 ) と比べての、我々のインビボでの相対的低用量のエンザスタウリン処置に起因するかもしれない。したがって、我々は、我々が認めた血管リモデリング及び F H I T の発現に対するエンザスタウリンの効果が主に P K C 非依存性であることを提起する。エンザスタウリンが F H I T をいかにして増加させるかは未知であるが；1 つの有望な機構が、F H I T リン酸化の S c r 媒介性阻害及びその結果的な分解の予防であつてもよい ( 8 8 、 8 9 ) 。

#### 【 0 0 9 0 】

本明細書中のデータは、B M P R 2 モディファイヤー遺伝子としての P A H の病態形成における F H I T の役割を示し、B M P R 2 の調節及び P A H 介入における機会への洞察をもたらす。F H I T の発現は、P A H において一貫して下方制御される。F H I T レベルの低下により、B M P R 2 の発現及びシグナル伝達が低減され、インビボでの F H I T の欠損は、低酸素に応答した実験的 P H の悪化をもたらす。F H I T の発現は、エンザスタウリンにより容易に増加されうるが、それは B m p r 2 + / - マウス及び S U G E N 5 4 1 6 / 低酸素 / 酸素正常状態ラットにおける実験的 P H の予防及び治療において有利であつた。したがって、該データは、F H I T が P A H における B M P R 2 シグナル伝達構造の新規な潜在的に必須の成分であり、且つ F H I T レベルの低下が P A H の発生の素因になりうることを示す。これらの試験は、P A H に対する有利な治療としてエンザスタウリンを用いるための有効な方法を示す。 40

10

20

30

40

50

## 【実施例】

## 【0091】

以下の実施例は、当業者に本発明の実施及び使用方法に関する十分な開示及び説明を提供するために示され；本発明者が彼らの発明として見なす範囲を限定することは意図されない。特に指示がない限り、部分は重量部であり、分子量は平均分子量であり、温度は摂氏単位であり、圧力は大気圧又はその近傍である。

## 【0092】

この試験では、エンザスタウリン (Selleckchem, Houston, TX) 及び SUGEN 5416 (Tocris, Bristol, UK) を用いた。

## 【0093】

実施例 I . FHIT - / - C57BL / 6 は慢性低酸素に応答して実験的 PAH を発生する

肺動脈高血圧症 (PAH) は、肺動脈圧亢進、右室 (RV) 肥大及び最終的には右心不全によって特徴づけられる進行性肺疾患である。骨形態形成受容体 II 型 (BMPR2) の突然変異又は異常な BMPR2 シグナル伝達は、多くの PAH 患者において報告されており、疾患の病態形成に関連する。BMPR2 シグナル伝達を別用途で用いられた薬剤を用いて調節することは、この壊滅的疾患を治療するための興味深い方法である。siRNA ハイスクリーンにおいて、我々は新規な BMPR2 調節遺伝子としての脆弱性ヒスチジン三連構造 (FHIT) を以前に発見した。我々は、低下された FHIT の発現が内皮細胞機能障害に関連し、PAH 患者の PBMC、PAEC、形質転換リンパ球及び肺組織において低下することを示し、低 FHIT が肺高血圧症及び肺気腫を促進することが示唆された。インビトロでの FHIT 及び BMPR2 の発現は、FHIT 増加剤エンザスタウリン又は他の FHIT 増加剤によると、上方制御可能である。

## 【0094】

FHIT - / - C57BL / 6 とリタメイト野生型 (C57) マウスを、正常酸素圧 (Nx、20% O<sub>2</sub>)、低酸素 (Hx、10% O<sub>2</sub>) 状態で3週間收容し、4週間の低酸素回復 (Rec、3週間の Hx / 4週間の Nx) 期間を設け、7週間の Nx 対照と比較した。雄マウスについての結果を図1A ~ 1Kに示す。図1Aでは、右心室収縮期圧 (RVSP) を肺動脈カテーテル法により測定した (雄、C57 n = 3、FHIT - / - Nx Rec n = 3、FHIT - / - Hx n = 4)。図1Bでは、右室 (RV) 肥大を RV の左室及び中隔に対する重量比 (RV / LV + S) により判定する (雄、C57 Nx Rec n = 3、C57 Hx n = 6、FHIT - / - Nx Hx n = 3、FHIT - / - Rec n = 4)。図1Cは、肺胞壁 (AW) 及び肺胞管 (AD) の肺血管欠損であり、図1Dでは、それらの完全又は部分的な筋性化 (%) を MOVAT 染色した肺切片において評価した (雄、C57 n = 3、FHIT - / - Nx n = 3、FHIT - / - Hx Rec n = 4)。図1Eは、代表的な MOVAT 肺組織像である。矢印は血管位置を示す。図1Fは、Nx C57 及び FHIT - / - マウス (n = 2) からのアガロース膨張した全葉の代表的な深部組織イメージングである。図1Gは、aSMA 及び αvβ3 抗体での肺血管の代表的な IF 染色である。図1Hは、Pアクチンハウスキーピング対照に正規化した、肺組織内での FHIT (図1I) 及び BMPR2 (図1J) タンパク質発現の代表的なイムノプロット及び相対濃度測定分析である (雄、C57 n = 3、FHIT - / - Nx n = 3、FHIT - / - Hx n = 5、FHIT - / - Rec n = 4)。図1Kは、Pアクチンハウスキーピング対照に正規化した、肺組織内での PKC 及び Phospho PKC タンパク質発現の代表的なイムノプロットである (雄、C57 n = 3、FHIT - / - Nx n = 3、FHIT - / - Hx n = 5、FHIT - / - Rec n = 4)。Nx 対照に対して \* p < 0.05、\* \* p < 0.01、\* \* \* \* p < 0.0001、C57 対照に対して # p < 0.05、# # p < 0.01、# # # p < 0.001、二元配置分散分析、ターキーの検定後。

## 【0095】

雌マウスにおける結果を図2A ~ 2Fに示す。FHIT - / - C57BL / 6 とリタメ

10

20

30

40

50

イト野生型 (C57) マウスを、正常酸素圧 (Nx、20% O<sub>2</sub>)、低酸素 (Hx、10% O<sub>2</sub>) 状態で3週間收容し、4週間の低酸素回復 (Rec、3週間のHx / 4週間のNx) 期間を設け、7週間のNx対照と比較した。図2Aでは、右心室収縮期圧 (RVSP) を肺動脈カテーテル法により測定した (雌)。図2Bでは、右室 (RV) 肥大を、RVの左室及び中隔に対する重量比 (RV / LV + S) により示す (雌)。図2Cは、肺胞壁 (AW) 及び肺胞管 (AD) の肺血管欠損であり、図2Dでは、それらの完全又は部分的な筋性化 (%) をMOVAT染色した肺切片において評価した (雌)。図2Eは、血管欠損を表す代表的なMOVAT肺組織像である。矢印は血管位置を示す。図2Fは、血管構造を表す代表的なMOVAT肺組織像である。矢印は血管位置を示す。Nx対照に対して \* p < 0.05、\*\* p < 0.01、\*\*\* p < 0.0001、C57対照に対して # p < 0.05、## p < 0.01、### p < 0.001、二元配置分散分析、ターキーの検定後。

10

#### 【0096】

雄及び雌 FHIT - / - C57BL / 6 マウスが、低酸素に対する慢性曝露後、実験的 PAH を発生した。つまり、FHIT - / - C57BL / 6 とリタメイト野生型 (C57) マウスを、正常酸素圧 (Nx、20% O<sub>2</sub>)、低酸素 (Hx、10% O<sub>2</sub>) 状態で3週間收容し、4週間の低酸素回復 (Rec、3週間のHx / 4週間のNx) 期間を設け、7週間のNx対照と比較した。右室収縮期圧 (RVSP) は、肺動脈カテーテル法により測定し、雄において低酸素に応答して増加し (図1A)、雌において既にベースラインであること (図2A) が見出された。両群において、酸素正常状態への回復時、上昇した RVSP レベルが維持された。同様に、右室 (RV) 肥大が、雄における低酸素状態 (図1B) 及び雌における酸素正常状態と低酸素状態の双方 (図2B) で、RVの左室及び中隔に対する重量比 (RV / LV + S) の増加により示された。両方の場合に、酸素正常状態への回復時、増加した RV / LV + S 比が維持された。

20

#### 【0097】

肺胞壁 (AW) 及び肺胞管 (AD) の肺血管欠損の増加 (図1C、2C、2E) 並びにそれらの完全又は部分的な筋性化 (%) (図1D、1F ~ G、2D、2F) が、すべての試験条件全体を通じて見出された。

#### 【0098】

FHIT、BMPR2、PKC 及びリン酸化 PKC のタンパク質レベルについて試験するためのウェスタンブロットにより、FHIT - / - 動物における FHIT レベルの低下と同時に、低酸素下での BMPR2 レベルの低下が確認された。しかし、総 PKC レベルにおける変化又は PKC のリン酸化の不在が検出され、FHIT が PKC 又は PKC のリン酸化を調節しないことが示唆された。

30

#### 【0099】

この実験は、FHIT が肺高血圧症及び肺気腫の発生における重要な分子であり、且つその効果が PKC レベル及び PKC のリン酸化状態に依存しないことを示す。

#### 【0100】

実施例 II . エンザスタウリンは C57BL / 6 及び BMPR2 + / - C57BL / 6 マウスにおける低酸素誘導性の実験的 PAH の発生を予防する

40

大部分の家族性 PAH 患者は、BMPR2 突然変異を有する。しかし、BMPR2 突然変異の存在は、専ら PAH の発生の素因となるが、単独ではそれを引き起こすことがなく、該疾患の発症に寄与する第2の要素が存在してもよいことが示唆される。FHIT がストレス要因、例えば低酸素やタバコ煙に応答して容易に失われる場合、C57BL / 6 及び BMPR2 欠損 (BMPR2 + / -) C57BL / 6 マウスにおける低酸素誘導性の PAH の発生が、FHIT 増加剤としての FHIT 増強化学物質エンザスタウリンの使用により予防される可能性があることが提起される。

#### 【0101】

BMPR2 + / - マウス及び C57 対照を慢性低酸素に3週間曝露し、FHIT 増加剤エンザスタウリン又は他の FHIT 増加剤を 5 mg / kg で浸透圧ポンプにより毎日投与

50

した。右心室 (RV) 収縮期圧を右頸静脈カテーテル法により測定し、RV 肥大をRVの左室 + 中隔に対する重量比により評価した。肺血管の血管欠損及び筋性をMOVATペンタクローム染色により可視化した。この実験においては、雄野生型及びBMPR2 + / - C57BL / 6 (C57) マウスを、正常酸素圧 (Nx、20% O<sub>2</sub>) 及び低酸素 (Hx、10% O<sub>2</sub>) 状態で3週間収容し、Alzetミニ浸透圧ポンプモデル2006による5 mg / kgのエンザスタウリンの毎日投与の存在下又は不在下で処置した。データを図3A ~ 3Fに提示する。図3Aでは、右心室収縮期圧 (RVSP) を肺動脈カテーテル法により測定した (n = 3、平均 ± 平均値の標準誤差、Nx対照に対して \* \* p < 0.01、一元配置分散分析、シダックの検定後)。図3Bでは、右室 (RV) 肥大がRVの左室及び中隔に対する重量比により示す (n = 3、平均 ± 平均値の標準誤差、媒体対照に対して # p < 0.05、二元配置分散分析、ターキーの検定後)。図3Cは、肺胞壁 (AW) 及び肺胞管 (AD) の肺血管欠損であり、図3Dでは、それらの完全又は部分的な筋性化 (%) をMOVAT染色した肺切片において評価した (n = 3、平均 ± 平均値の標準誤差、C57対照に対して \* p < 0.05、媒体対照に対して ## p < 0.01、### p < 0.001、二元配置分散分析、ターキーの検定後)。図3Eは、血管欠損を表す代表的なMOVAT肺組織像である。矢印は血管位置を示す。図3Fは、血管構造を表す代表的なMOVAT肺組織像である。矢印は血管位置を示す。

#### 【0102】

FHIT増強化学物質エンザスタウリンは、化合物の記述されたKiよりもはるかに高い高用量で、C57BL / 6マウスにおける低酸素誘導性の実験的PAHの発生を予防する。つまり、雄野生型及びBMPR2 + / - C57BL / 6 (C57) マウスを、正常酸素圧 (Nx、20% O<sub>2</sub>) 及び低酸素 (Hx、10% O<sub>2</sub>) 状態で3週間収容し、Alzetミニ浸透圧ポンプモデル2006による5 mg / kgのFHIT増強化学物質エンザスタウリンの毎日投与の存在下又は不在下で処置した。FHIT増強化学物質エンザスタウリンは、低酸素媒体対照と比べて、上昇した右室収縮期圧 (RVSP) レベルの部分的低下を誘導し (図3A)、右室 (RV) 肥大における実質的減少が、RVの左室及び中隔に対する重量比によって示すように、C57BL / 6マウスと低酸素下で収容したBMPR2 + / - C57BL / 6マウスの双方において認められた (図3B)。C57BL / 6マウスとBMPR2 + / - C57BL / 6マウスの双方において、肺胞壁 (AW) 及び肺胞管 (AD) の肺血管欠損が、それらの完全又は部分的な筋性化 (図3D、3F) と同様、FHIT増強化学物質エンザスタウリンによる処置により有意に寛解された (図3C、3E)。

#### 【0103】

FHIT増強化学物質エンザスタウリンは、高用量で血管欠損の予防及び血管筋性化の抑止を通じて肺高血圧症の発生を予防する。BMPR2のレベルが低下したマウスでは、FHIT増強化学物質エンザスタウリン処置は、低酸素に応答した肺高血圧症の発生を予防するための有効な戦略であった。治療効果を得るのに必要とされる高用量は、多くの異なる分子標的の非特異的標的化が高用量でなされることに起因すると考えられる。

#### 【0104】

実施例III. エンザスタウリンはSugen 5416 / 低酸素ラットにおいて実験的PAHを回復に向かわせる

Sugen 5416のラットへの投与とその後の慢性低酸素へのそれらの曝露の結果、不可逆的な肺血管リモデリング及び右心室収縮期圧の上昇、並びにRV肥大がもたらされる。したがって、このモデルは、インビボでの実験的肺高血圧症及び肺気腫の評価用に選択されたモデルである。

#### 【0105】

雄Sascoスブラーグドーリーラットにおいて、20 mg / kg体重のSU5416の皮下注射により実験的PAHを誘導した。動物は、5 mg / kg体重のFHIT増加剤エンザスタウリン又は他のFHIT増加剤又は媒体対照の経口経管栄養による毎日投与を経ながら、低酸素 (Hx、10% O<sub>2</sub>) 状態で3週間収容し、次いで酸素正常状態下 (

Nx、20%O<sub>2</sub>)で5週の期間を設けた。心エコーを実施し、RV肥大及び駆出分画の発生について評価した。右心室(RV)収縮期圧を右頸静脈カテーテル法により測定し、RV肥大をRVの左室+中隔に対する重量比により評価した。肺血管の血管欠損及び筋性をMOVATペンタクローム染色により可視化した。データを図4A~4Fに提示する。図4Aでは、右心室収縮期圧(RVSP)を肺動脈カテーテル法により測定した(n=3、平均±平均値の標準誤差、Nx対照に対して\*\*p<0.01、一元配置分散分析、シダックの検定後)。図4Bでは、右室(RV)肥大を、RVの左室及び中隔に対する重量比により示す(n=3、平均±平均値の標準誤差、媒体対照に対して#p<0.05、二元配置分散分析、ターキーの検定後)。図4Cは、肺胞壁(AW)及び肺胞管(AD)の肺血管欠損であり、図4Dでは、それらの完全又は部分的な筋性化(%)を、MOVAT染色した肺切片において評価した(n=3、平均±平均値の標準誤差、C57対照に対して\*p<0.05、媒体対照に対して##p<0.01、###p<0.001、二元配置分散分析、ターキーの検定後)。図4Eでは、左室駆出分画は、3週間のエンザスタウリンによる処置の前と後での心臓の構造及び機能の心エコー評価を通じて算出した。図4Fは、代表的なMOVAT肺組織像である。

#### 【0106】

エンザスタウリンは、Sugen 5416/低酸素ラットにおいて、血管閉塞、心線維症を回復に向かわせ、心拍出量を改善する。つまり、雄Sascoスブラグドローラットにおいて、20mg/kg体重のSU5416の皮下注射により実験的PAHを誘導した。動物は、5mg/kg体重のFHI T増強化学物質エンザスタウリン又は媒体対照の経口経管栄養による毎日投与を経ながら、低酸素(Hx、10%O<sub>2</sub>)状態下で3週間収容し、次いで酸素正常状態下(Nx、20%O<sub>2</sub>)で5週の期間を設けた。右室収縮期圧(RVSP)(図4A)及び右室肥大(図4B)は、実験的肺動脈高血圧症を有するFHI T増強化学物質エンザスタウリン処置ラットにおいて、実験的PAHを有する媒体処置対照よりも低かった。

#### 【0107】

肺胞壁(AW)及び肺胞管(AD)の肺血管欠損(図4C)並びにそれらの完全又は部分的なリモデリングが、FHI T増強化学物質エンザスタウリンにより実質的且つ有意に回復に向かった(図4D、4F)。これは、FHI T増強化学物質エンザスタウリンによる処置後の心エコーによって算出したLVEF(%)の改善に合致した一方で、実験的肺高血圧症及び肺気腫を有する媒体処置対照における心機能は大幅に劣化した。

#### 【0108】

FHI T増強化学物質エンザスタウリンにより、Sugen 5416/低酸素ラットモデルにおける内皮リモデリング及び実験的PAHが回復に向かい、哺乳類におけるPHに対する強力な治療戦略としてのその使用が示唆された。治療効果を得るのに必要とされる高用量は、多くの異なる分子標的の非特異的標的化が高用量でなされることに起因すると考えられる。

#### 【0109】

実施例IV、FHI T増強化学物質エンザスタウリンは、肺高血圧症を回復に向かわせるのにFHI Tを必要とするが、PKCを必要としない

GAPDHに正規化したFHI TのmRNA発現を、15µMのFHI T増強化学物質エンザスタウリンの存在下又は不在下で24時間インキュベートした、siFHI T又は非特異的対照(Ntsi)プールの4つのsiRNAをトランスフェクトしたPAECにおいて評価した。FHI Tホモ接合性(-/-)及び野生型C57マウスは、酸素正常状態又は慢性低酸素に3週間曝露しており、それは3週間の慢性低酸素への曝露、及び5mg/kgのFHI T増加剤エンザスタウリン又は他のFHI T増加剤の浸透圧ポンプを介した毎日投与の存在下又は不在下である。実験的PAHは、右頸静脈カテーテル法を通じて右心室(RV)収縮期圧測定に基づいて評価することになり、RV肥大は、RVの左室+中隔に対する重量比により評価した。肺血管の血管欠損及び筋性化は、MOVATペンタクローム染色又はSMA及びvWF抗体によるIF染色により可視化することにな

る。

#### 【0110】

結果を図5に示す。A. 15  $\mu$ MのF H I T増強化学物質エンザスタウリンの存在下又は不在下で24時間インキュベートした、s i F H I T又は非特異的対照(N t s i)プールの4つのs i R N AをトランスフェクトしたP A E Cにおける、G A P D Hに正規化したF H I Tの相対的m R N A発現(q P C R、A m a x aヌクレオフェクション、t = 48時間、n = 3、平均 $\pm$ 平均値の標準誤差)。B. F H I TとP K Cとの間の記述された関係の独創性経路分析。C. F H I T増強化学物質エンザスタウリンは、C 5 7 B L / 6 F H I T - / -マウスにおける肺高血圧症の発生から保護することがなく、F H I Tレベルを上昇させない一方で、P K Cレベルを有効に下方制御する。

10

#### 【0111】

F H I Tが欠損したP A E CにおけるF H I T m R N Aの発現は、F H I T増強化学物質エンザスタウリンが、F H I Tの発現を強力に増強するものの、一旦m R N Aがs i R N Aにより抑制されると、P A E C F H I Tレベルに影響を与えることができないことを示した(図5A)。

#### 【0112】

独創性経路分析ツールを用いた公知のタンパク質相互作用の経路分析により、F H I TがP K Cと相互作用すると考えられないが、P K Cと独立に、別々のシグナル伝達経路に關与することが示された。

20

#### 【0113】

F H I Tは、失われると、壊滅的な肺高血圧症表現型の発生をもたらす、決定的な高血圧抑制遺伝子である。したがって、F H I Tの発現を増強する化学物質又は作用剤、例えばエンザスタウリンは、哺乳類における肺高血圧症及び肺気腫の予防及び治療において有効な治療戦略を提供することが期待される。

#### 【0114】

実施例V. ハイスループット(H T S ) s i R N Aスクリーン

250 p mのB M P 4の存在下又は不在下で処置したC 2 C 1 2マウス筋芽細胞腫細胞株におけるI d 1 - B R E Lシフェラーゼレポーターアッセイを用いた> 22, 000遺伝子のハイスループットs i R N Aスクリーンを、S t a n f o r d H i g h - T h r o u g h p u t B i o s c i e n c e C e n t e rにて以前に記載されたように実施した(12)。つまり、C 2 C 1 2筋芽細胞腫細胞は、レポーター細胞株としてルシフェラーゼに連結されたB R E - I d 1を安定にトランスフェクトし(E 1)、72  $\times$  384ウェルのs i R N Aプレート上でスクリーニングした。トランスフェクション条件は、刺激としてB M P 4、対照としてs i B M P R 2及びs i T o x、トランスフェクション試薬としてD h a r m a F e c t 3及びs i R N Aにおける至適濃度(25 n M)及び細胞数/ウェル(1500)を用いて最適化した。標的遺伝子は、I d 1発現をs i B M P R 2と同等の60%に減少させた一方で、70%の一般的な細胞生存度を維持し、細胞死応答遺伝子を排除した。得られた579の遺伝子の内、非特異的遺伝子、例えば、偽遺伝子、R N Aポリメラーゼサブユニット、R N Aスプライシング、輸送因子及びリボソーム単位を二次スクリーニング手法にて排除し、96の遺伝子を得て、それらを標的的特異的なs i R N Aプールにより検証した。ヒットをI d 1発現における60%の減少と規定するとともに、より厳密な細胞生存度基準を少なくとも2つの個別s i R N Aで80%と規定した。これにより、74の遺伝子候補が得られ、それらを下記に検討する新規なメタ分析手法を用いて交差検証した。その過程及び結果を図6にまとめる。

30

40

#### 【0115】

動物モデル。F h i tホモ接合性(- / -)マウスを、K a y F . H u e b n e r (オハイオ大学(O h i o S t a t e U n i v e r s i t y))から入手した。B m p r 2 + / -マウスは、M a r l e n e R a b i n o v i t c h (スタンフォード大学(S t a n f o r d U n i v e r s i t y))から贈呈を受けた。成体野生型C 5 7 B L / 6マウス、B m p r 2 + / -又はF h i t - / -マウス(8 ~ 10週齢)を慢性低酸素

50

下 (10% O<sub>2</sub>) で3週間收容し、次いで酸素正常状態下 (21% O<sub>2</sub>) で4週間の回復期間を設けた。Bmpr2 + / - 及びFhit - / - マウスとリタメイトを、試験の持続時間にわたり、ミニ浸透圧ポンプ投与として、一日量のエンザスタウリン (15及び5mg / kg / 日) 又は媒体で処置した。成体スプラーグドローラット (8週齢、180 ~ 220g) において、実験的PHの発生が、以前に記載された通り (12)、VEGFR - 2阻害剤SUGEN5416 (20mg / kg体重) の皮下投与、次いで慢性低酸素 (10% O<sub>2</sub>) への3週間と酸素正常状態 (21% O<sub>2</sub>) への5週間の曝露を通じて誘導された。SuHxラットとリタメイトは、経口経管栄養を通じた投与として、一日量のエンザスタウリン (5mg / kg体重) 又は媒体で3週間処置した。右心室 (RV) 収縮期圧を、右頸静脈カテーテル法を通じて測定し、RV肥大 (RVH) を、RVの左室及び中隔 (LV + S) に対する重量比により評価した。

10

#### 【0116】

すべての動物実験は、Stanford University Institutional Animal Care and Use Committeeにより認可された。ヒト組織又は誘導された初代細胞を含む実験は、Stanford University Institutional Review Board及びAdministrative Panel on Human Subject Researchにより認可された。

#### 【0117】

ヒトPAH患者からの細胞の単離。IPA H及びFPA H患者の肺移植時のPAECは、以前に記載された通り (12)、CD31 - ABプルダウンビーズを用いて消化された全肺組織から入手した。末梢血単核球 (PBMC) は、フィコールバック密度勾配遠心分離を通じて、陰性BMPR2突然変異状態のPAH患者又は健常ボランティアから単離した (10)。BMPR2<sup>mut</sup> PAH患者及び彼らの非罹患親類からのリンパ球を、以前に記載された通り (23)、勾配遠心分離とその後のウイルス形質転換を用いて全血から単離した。

20

#### 【0118】

組織像及びICC。マウス及びラット肺組織をパラホルムアルデヒド (PFA) 中に48時間固定し、EtOH中に保存した。パラフィン包埋した肺スライドをMovatペンタクローム染色 (Histo-Tec, Hayward, CA) で染色し、ここで肺血管の血管欠損及び筋性を光学顕微鏡により可視化した。肺切片に対する蛍光免疫細胞化学を、抗原賦活化後、フォン・ウィルブランド因子 (vWF) 及び平滑筋アクチン (SMA) に対する一次抗体を用いて脱パラフィン化 (Histo-clear II, National Diagnostics) 組織切片上で実施した。ヒトPAH肺組織を、抗BMPR2 (Ab130206, Abcam) 及び抗FHIT (Kay F. Huebner, Ohio State Universityの寄贈) に対して染色した。線維化形質転換を可視化するため、PFA固定パラフィン包埋心臓組織をトリクローム染色で染色した (Histo-Tec, Hayward, CA)。

30

#### 【0119】

細胞培養。ヒトPAEC (Promocell) 又はヒトPASMC (Promocell) を各々、市販のEC (Promocell) 又はSMC (Promocell) 培地中、ゼラチンコーティングしたディッシュ内で単層として増殖させた。細胞を1:3の比で継代し、3~8継代の実験用に用いた。形質転換リンパ球 (即ちリンパ芽球) を、10~15% FBSを有するRPMI 1640中で培養した。

40

#### 【0120】

ヒトPAH患者からの細胞の単離。IPA H及びFPA H患者の肺移植時のPAECを、以前に記載された通り (E1)、CD31 - ABプルダウンビーズ (Dynabeads; Invitrogen) を用いて、消化した全肺組織から入手した。末梢血単核球 (PBMC) は、以前に記載された通り (E8)、フィコールバック密度勾配遠心分離、デキストラン沈降及びRBC溶解を通じて、陰性BMPR2突然変異状態の末期PAH患者

50

又は健常ボランティアの末梢血から単離した。BMPR2<sup>mut+</sup> PAH患者及び彼らの非罹患親類からのリンパ球を、以前に記載された通り(E1)、勾配遠心分離とその後のウイルス形質転換を用いて全血から単離した。

#### 【0121】

RNA干渉。FHITの発現を、PA内皮細胞(PAEC)内のRNAiにより調節した。BMPR2、FHIT、LCK又は非特異的対照プールにおける4つのsiRNAのプール(Dharmacon)を、RNAi Maxキット(Invitrogen)を用いてPAECに48時間トランスフェクトした。mRNAノックダウン効率をqPCRにより測定した。

#### 【0122】

mRNA及びmiRの発現を検出するためのqPCRアッセイ。mRNAにおいては、RNAeasy Plusキット(Qiagen)を用いて、全RNAを全肺組織から抽出し、製造業者の使用説明書に従い、ランダムプライマーとともにTaqman cDNA逆転写キット(Applied Biosciences)を用いて、cDNAに逆転写した。miRにおいては、Taqman miRNA ABC精製キット(Applied Biosciences)を用いて全miRを、全肺組織から単離し、特異的プライマー及びTaqmanマイクロRNA逆転写キット(Applied Biosciences)を用いて逆転写した。mRNA及びmiRの発現レベルを、標的に対するTaqmanプライマー/プローブセットを用いて定量化し、ハウスキーピング対照に正規化した(mRNA: GAPDH; miR: RNU48)。

#### 【0123】

ウエスタンブロッティング。ウエスタンブロッティングを以前に記載されたように実施した(E1)。BMPR2に対する抗体(Ab130206、モノクローナル、Abcam)、FHITに対する抗体(NBPI-89061、ポリクローナル、Novus Biologicals; Ab180806、ポリクローナル、Abcam)、PKCに対する抗体(Ab76016、モノクローナル、Abcam)、P-PKCに対する抗体(Ab32376、[Y124]、モノクローナル、Abcam)、LCKに対する抗体(NBPI-19840、ポリクローナル、Novus Biologicals)、p38に対する抗体(Ab31828、モノクローナル、Abcam)、Id1に対する抗体(sc133104、モノクローナル、Santa Cruz Biotechnology)、Smad1に対する抗体(#9743、Cell Signaling)、P-Smad1/5/9に対する抗体(#13820P、Cell Signaling)及びアクチンに対する抗体(Sc47778、モノクローナル、Santa Cruz)を用いた。

#### 【0124】

アポトーシス、DNA損傷、MTT増殖及びマトリゲルチューブ形成アッセイ。製造業者の使用説明書に従い、また以前に記載された通り(E1, E9)、アッセイを実施した。

#### 【0125】

深部組織イメージング。アガロース膨張肺の深部組織イメージングを、以前に記載された通り(E10, E11)、Hamamatsu Orca Flash 4.0LTカメラを用いてLeica M205FA蛍光実体顕微鏡上で実施した。アガロース膨張肺の動脈筋性を左葉二次外側気道分岐L4(L:L4)を伴う動脈において評価し(E10)、その二分岐点前の分岐世代1と名付けた。さらに、同様に二分岐又はドメイン分岐によって生成された子孫動脈分岐世代を分岐世代2~12と名付けた。世代数における増加は、Fhit<sup>-/-</sup>マウスにおける世代6~10において明白であった一方で、野生型マウスは、筋性化血管の世代7を越えなかった。

#### 【0126】

統計分析。GraphPad Prismバージョン7.00、GraphPadソフトウェア(La Jolla, CA)を用いて、データを分析した。統計学的検定は、適

10

20

30

40

50



宜実施し、以下に示す通り、スチューデント t 検定、一元配置分散分析及び二元配置分散分析、その後の適切な事後検定を含んだ。差異は、以下： $p < 0.05$ （\* / #）、 $p < 0.01$ （\*\* / ##）、 $p < 0.001$ （\*\*\* / ###）、 $p < 0.0001$ （\*\*\*\* / ####）として統計学的に有意であると見なした。

#### 【0127】

実施例 V I . 公的に利用可能な P A H 遺伝子発現データのメタ分析

N C B I Gene Expression Omnibus ( G E O ) からの 7 つの公的に利用可能なヒト P A H トランスクリプトームデータセット ( 肺 : G S E 1 5 1 9 7、G S E 2 4 9 8 8、G S E 4 8 1 4 9 ; P B M C : G S E 1 9 6 1 7、G S E 2 2 3 5 6、G S E 3 3 4 6 3、G S E 7 0 3 ) 内のマウス筋芽細胞腫の H T S から得られた 7 4 の B M P R 2 モディファイヤー遺伝子候補のリストを交差検証するため、新規な統合メタ分析アルゴリズム及び検証コホートを用いた。すべてのサンプルは、国立医学図書館 ( N a t i o n a l Library of Medicine ) ( N L M ) U n i t e d Medical Language System ( U M L S ) にリンクされた標準化された語彙、Gene Ontology、S N O M E D - C T、I C D - 9、及び I C D - 1 0 を含む親語彙、並びに百を超える他の一般に用いられる標準化された語彙を用いて一律に精選した。7 つの P A H データセットは、P A H 肺 ( 1 5 3 サンプル ) 又は P B M C ( 1 3 8 サンプル ) の何れかからの 2 9 1 のサンプルを含み、それらを用いて P A H データセットを発生させた。我々は、以前に記載された通り ( E 2 ~ E 5 )、各データセットをダウンロードし、手作業で精選した。つまり、以前に公表された方法を用いて ( E 6 )、データ自体を  $\log_2$  に正規化及び変換した。我々は、以前に記載された通り ( E 7 )、( i ) 倍数変化の組み合わせと ( i i ) P 値の組み合わせという 2 つの異なるメタ分析手法を用いた。 ( i ) 特定の偽発見率閾値  $< 10\%$  を有し、且つ ( i i ) 試験の少なくとも 7 5 % において同じ方向に発現される ( 上方又は下方制御される )、差次的に発現される遺伝子を選択した。不均等なサンプル数に起因するデータ優位性を明らかにするため、我々はメタ分析におけるある時点で 1 つのデータセットを除去した。

#### 【0128】

有望な B M P R 2 モディファイヤー遺伝子がヒト P A H サンプル中で重要であることを保証するため、マウス筋芽細胞腫の H T S からの 7 4 の標的をヒト肺及び P B M C P A H データセットにおいて検証した。健常対照対象の可変性を説明し、ヒト疾患に最も関連性があり且つ最も一貫して調節される遺伝子標的を決定するには、二重スクリーニング手法が必要と思われた。

#### 【0129】

H T S s i R N A の結果を P A H 遺伝子発現データセットと比較することに加えて、我々は、本質的に P A H シグネチャーに対する逆の遺伝子発現によって特徴づけられる、抗 P A H シグネチャーを予測した。遺伝子発現特性データセットの薬剤としての有効性は、P A H を治療するのに有利なことがある F D A 承認薬の同定を可能にする。我々は、生理活性小分子で処置された培養ヒト細胞からの遺伝子発現特性の参照コレクションを統合した。データベース L I N C S は、多数の薬剤を多数の細胞株にわたり特性化したものである。L I N C S は、異なる薬剤で処置された培養ヒト細胞の遺伝子発現特性の最大のデータベースである。分析時、L 1 0 0 0 プラットフォーム上で 1 8 の「ゴールド」細胞株にわたり、L I N C S で 2 0 , 4 1 3 の化学的摂動因子 ( c h e m i c a l p e r t u r b a g e n s ) が特性化された ( w w w . l i n c s c l o u d . o r g ) 。このテクニックを用いて、我々は、エンザスタウリン及びダサチニブがどの遺伝子を標的とするか、またいずれの遺伝子発現特性が P A H シグネチャー又は抗シグネチャーにより類似するかを予測した。

#### 【0130】

実施例 V I I . B M P R 2 修飾物質の H T S 及びマルチコホート P A H 遺伝子発現アッセイ

「 B M P R 2 モディファイヤー遺伝子」を見出すため、我々は、B M P R 2 シグナル伝

達における読出しとして以前に記載のようなB R E - I d 1 - L u c レポーター細胞株を用いて(12)、各遺伝子に対する4つのプールされたs i R N Aとともに、22, 124のマウス遺伝子(O R F)を含むマウスゲノムワイドs i R N Aライブラリー(Q i a g e n)を用いてH T Sを実施した。2ステップスクリーニング手法では、標的遺伝子s i R N AがI d 1の発現をs i B M P R 2と同等の60%に減少させた一方で、4つのs i R N Aで70%又は2つのs i R N Aで80%の一般的な細胞生存度を各々維持し、細胞死応答遺伝子を除外した。これにより、74のB M P R 2 - モディファイヤー遺伝子候補が得られ、次にそれらをパブリックドメインから得られたマルチコホートの多重組織P A H遺伝子発現データセットと比較し(24~26)、対照に対してI P A Hにおいて差次的に下方制御される遺伝子のサブセットを同定した(図6A)。我々は、I P A H患者における発現が減少し、それにより、H T S候補のB M P R 2のモディファイヤー遺伝子:P B M CデータセットからのI T G A 6、F H I T、L C K、C D 7及び肺データセットからのP P 1 R 1 5 B、P P M 1 A、G R I N 2 B、D U S P 7と重複する、P A Hにおいて潜在的な臨床的重要性がある、8つの候補遺伝子を同定した(図6B)。P A H病態形成に関連するものとして、F H I T及びL C K(リンパ球に特異的なタンパク質チロシンキナーゼ)が最も有望であると思われる。F H I Tは、最も一貫して減少し( $> 50\%$ ;  $2^{-1}$ )、P A H病理における一貫した役割として納得されるものであった。L C KはP A Hの病態形成に強い関連性があった。というのは、L C Kは、薬剤誘導性P A Hの誘発が報告されている(28)、ダサチニブによって阻害されることが知られている(27)。

10

20

#### 【0131】

我々はさらに、公的に利用可能なP A HトランスクリプトームのP B M Cデータセットから得られたP A H遺伝子発現シグネチャーを比較し、無料の抗P A Hシグネチャーを予測し、両者を、F H I Tを増強することが知られた薬剤であるダサチニブ及びエンザスタウリンという2つの薬剤の遺伝子発現特性と比較した。両薬剤の両特性は、多数の薬剤を多数の細胞株にわたり特性化したL I N C Sデータベース([www.lincscLOUD.org](http://www.lincscLOUD.org))から得られた。F H I Tを含有する遺伝子集団では、エンザスタウリン誘導性の遺伝子調節は、P A H抗シグネチャーと類似した(図6C、ボックス)一方で、ダサチニブ誘導性の遺伝子調節は、P A Hシグネチャーと類似した。これは、P A H遺伝子発現シグネチャーを再現する薬剤、例えばダサチニブが、P A Hに対して有害なことがある一方で、P A Hシグネチャーを逆にした薬剤、例えばエンザスタウリンが、P A Hの治療にとって有用となることを示唆する。

30

#### 【0132】

実施例V I I I . B M P R 2及びそのモディファイヤー遺伝子F H I Tの下方制御がP A H細胞及び肺組織において認められ、F P A Hの疾患浸透度を変更するように思われる

F H I T及びL C KがP B M C遺伝子発現データセットにおいて同定されると、我々はまず、F H I TがP A H患者細胞、即ち末梢血単核球(P B M C)、肺動脈内皮細胞(P A E C)及び形質転換リンパ球、並びに肺組織において一貫して減少するか否かを検討した。

40

#### 【0133】

我々は、B M P R 2突然変異を有しないP A H患者8名からのP B M CにおけるB M P R 2、F H I T及びL C Kの発現を測定し、3つすべての遺伝子の発現が有意に減少することを確認した(図7A~C)。肺移植時に収集したI P A H患者肺から単離した微小血管E C(12)(表1)は、F H I T及びB M P R 2のm R N A発現の間での陽性相関を示した(図7D)。F H I T及びB M P R 2の免疫組織化学染色では、F P A H及びI P A H患者において、ドナー肺と比べて減少した(図7E、表1、図17A~17B)。B M P R 2突然変異の存在下で予想された通り、B M P R 2が強力且つ一律に減少した一方で、F H I Tにおけるより不規則な減少が新生内膜及び内皮下層に限られ(図18A~18F、17A~17B)、血管リモデリングにおけるそれらの遺伝子発現及び潜在的役割に関連した、F H I TとB M P R 2との間での不完全な重複が示唆された。

50

## 【0134】

次に我々は、BMPR2突然変異を有するFPAH患者及び健常な偏性BMPR2キャリアにおけるこれらの遺伝子の発現を判定し、それらがFPAHにおける疾患浸透度を変更することがあるか否かを評価した。BMPR2突然変異を有する7家族のコホート：BMPR2突然変異を有する患者10名（P1～8）、関連の健常な偏性BMPR2突然変異キャリア10名（C1～8）及び非関連の健常対照を選択した（表1）。以前に記載された（29）ように抽出した形質転換リンパ球では、BMPR2及びFHIT mRNAは、患者において、健常キャリア（5/7の家族）よりも一貫して低く、FHITがBMPR2突然変異キャリアにおける疾患浸透度を変更することがあると示唆された（図7F～I、図19G～H）。しかし、BMPR2及びFHITレベルは、家族間で可変であり、男性と女性とで異なり（図7H～I、図19）、PAH病態形成の抑制に要求されるBMPR2又はFHITの閾値が遺伝的背景及び性別により変化することが示唆された。

10

## 【0135】

図7A～7Eは、PAHにおけるFHITの発現減弱がBMPR2の発現低下と関連したことを示す。図7A～Cは、陰性BMPR2突然変異状態を伴う末期PAH患者からのPBMCにおけるBMPR2（図7A）、FHIT（図7B）及びLCK（図7C）のmRNA発現のqPCR分析を健常対照と比べて表す（対照n=12、PAH n=8、平均±平均値の標準誤差、対照に対して\* p<0.05、\*\* p<0.01、\*\*\* p<0.0001、ウエルチt検定）。図7A～7Eは、陰性BMPR2突然変異状態を伴う末期PAH患者からのPBMCにおけるmRNA発現を健常対照と比べて示す（対照n=12、PAH n=8、平均±平均値の標準誤差、対照に対して\* p<0.05、\*\* p<0.01、\*\*\* p<0.0001、ウエルチt検定）。図7Dは、肺移植時のIPA患者のPAECにおけるBMPR2及びFHITのmRNA発現の相関及び線形回帰分析である（対照n=6、IPA n=6、FPAH n=4、対照r=-0.7714、PAH r=0.5410、IPA r=0.5218、スピアマンr、患者人口統計については表1Bを参照）。図7Eは、移植時のPAH患者及びドナー対照肺組織における代表的な肺の抗BMPR2及び抗FHIT IHC（HRP-褐色染色）である（n=3、患者人口統計については表1Cを参照）。図7F～7Gは、FPAH患者、非罹患BMPR2突然変異キャリア及び健常対照からの形質転換リンパ球におけるFHIT及びBMPR2発現のqPCR分析である（n=10、平均±平均値の標準誤差、\* p<0.05、一元配置分散分析、ダネットの検定後、患者人口統計については表1Aを参照）。図7H～7Iは、選択した家族からの形質転換リンパ球におけるFHIT及びBMPR2発現のqPCR分析である（n=5、P=FPAH患者、C=健常な突然変異キャリア、矢印は、FHIT及びBMPR2が一貫して増加したキャリア（彼らのFPAH家族員と比べて）の方を指す、患者人口統計については表1Aを参照）。

20

30

表 1A

患者 ID		性別	試験時の年齢	発見時の年齢	発見以来の生存	%無病の年数	BMP2 NMD 状態	関係
家族 1	P1a	男性	53	43	10	81	NMD+	
	P1b	女性	39	25	14	64	NMD+	P1a のまたいとこ
	C1	女性	74			100	NMD+	P1a 及び P1b の遠いいとこ
	C1b	男性	81			100	NMD+	P1a の父親
家族 2	P2	女性	43	35	8	81	可能性低い, 未確認	
	C2	女性	72			100	可能性低い, 未確認	P2 の母親
家族 3	P3	女性	39	28	11	72	NMD-	
	C3a	男性	39			100	NMD-	P3 の遠いいとこ
	C3b	女性	50			100	NMD-	P3 の叔母
家族 4	P4	男性	50	38	12	76	NMD+	
	C4	女性	56			100	NMD+	P4 の遠いいとこ
家族 5	P5	男性	49	34	15	69	可能性低い, 未確認	
	C5	男性	63			100	可能性低い, 未確認	P5 の叔父
家族 6	P6a	女性	65	28	37	43	NMD+	P6b の姪
	P6b	女性	82	64	18	78	NMD+	
	C6	男性	85			100	NMD+	6b の兄弟, P6a の叔父
家族 7	P7	女性	48	37	11	77	NMD+	
	C7	男性	71			100	NMD+	P7 の叔父
血縁でない	P8	女性	34	29	5	34	NMD-	
	C8	女性	67			100	NMD-	
対照		女性 n=7 男性 n=3						

10

20

30

40

表 1B

群	診断	性別	試験時の年齢	人種的背景
対照		女性 n=3 男性 n=3	38.7 ± 8.1554	白人 n=5 不明 n=1
患者	IPAH n=7 FPAH n=2 N/K n=1	女性 n=7 男性 n=3	35.1 ± 2.8889	白人 n=8 アフリカ系アメリカ人 n=1 ラテンアメリカ系 n=1

10

表 1C

患者 ID	診断	性別	年齢	人種的背景
CC-015	FPAH	女性	33	白人

20

## 【 0 1 3 6 】

実施例 I X . m i R 1 7 - 5 及び m i R 2 7 - a は F H I T / B M P R 2 シグナル伝達を負に調節し、エンザスタウリンによって回復される

次に我々は、F H I T 及び L C K が B M P R 2 の上流制御因子であることを同定した。s i R N A による P A E C における F H I T 及び L C K のノックダウンにより、B M P R 2 の発現とその下流シグナル伝達の双方が低減され、それは標的 I D 1 により測定された ( 図 8 A 、 図 8 B ) 。逆に、s i B M P R 2 は、P A E C における F H I T 及び L C K の発現に影響せず、B M P R 2 が F H I T 及び L C K の下流であることが確認された ( 図 8 C 、 図 8 D ) 。興味深いことに、s i F H I T は L C K の発現を 5 0 % に低下させ、両モディファイヤー遺伝子の潜在的な相互依存性が示唆された ( 図 8 D ) 。

30

## 【 0 1 3 7 】

この試験の結果を図 8 A ~ 8 M に示し、ここで s i F H I T P A E C における m R N A 発現及びマイクロRNA プロファイリングは、エンザスタウリンによって会合されうる F H I T による B M P R 2 シグナル伝達の調節におけるマイクロRNA の m i R 1 7 - 5 及び m i R 2 7 a における潜在的役割を表す。図 8 A ~ 8 D は、s i B M P R 2 、 s i F H I T 、 s i L C K 又は非特異的対照 ( N t s i ) プールの 4 つの s i R N A をトランスフェクトした P A E C における G A P D H に正規化した B M P R 2 ( 図 8 A ) 、 I d 1 ( 図 8 B ) 、 F H I T ( 図 8 C ) 及び L C K ( 図 8 D ) の相対的 m R N A 発現である ( q P C R 、 A m a x a ヌクレオフェクション、t = 4 8 時間、n = 3 、平均 ± 平均値の標準誤差、対照に対して \* \* p < 0 . 0 1 、 \* \* \* p < 0 . 0 0 1 、 \* \* \* \* p < 0 . 0 0 0 1 、一元配置分散分析、ターキーの検定後)。図 8 E ~ 8 F は、s i F H I T 、 s i L C K 又は非特異的対照 ( N t s i ) プールの 4 つの s i R N A をトランスフェクトした P A E C における R N U 4 8 に正規化した m i R 1 7 - 5 ( 図 8 E ) 及び m i R 1 0 0 ( 図 8 F ) の相対的 m i R 発現である ( q P C R 、 t = トランスフェクション後 4 8 時間、n = 3 、平均 ± 平均値の標準誤差、N t s i 対照に対する \* \* p < 0 . 0 1 、 \* \* \* \* p < 0 . 0 0 0 1 、一元配置分散分析、ダネットの検定後)。図 8 G ~ 8 I は、1 5 μ M のエンザ

40

50

スタウリンとともに24時間インキュベートしたPAECにおけるGAPDHに正規化したFHIT(図8G)、BMPR2(図8H)及びId1(図8I)の相対的mRNA発現である(qPCR、t=トランスフェクション後72時間、n=3、平均±平均値の標準誤差、媒体に対して\*\*\* $p < 0.001$ 、\*\*\* $p < 0.0001$ 、独立t検定)。図8Jは、15 $\mu$ Mのエンザスタウリンの存在下又は不在下で24時間処置した、siFHIT又は非特異的対照(Ntsi)プールの4つのsiRNAをトランスフェクトしたPAECにおけるGAPDHに正規化したFHITの相対的mRNA発現である(qPCR、t=トランスフェクション後72時間、RNAimax、n=4、平均±平均値の標準誤差)。図8K~8Lは、siFHIT又は非特異的対照(Ntsi)プールの4つのsiRNAをトランスフェクトした15 $\mu$ Mのエンザスタウリンの存在下又は不在下で24時間処置したPAECにおけるRNU48に正規化したmiR17-5(K)及びmiR27a(図8L)の相対的miR発現である(qPCR、t=トランスフェクション後72時間、n=3、平均±平均値の標準誤差、Ntsi対照に対して\*\* $p < 0.01$ 、\*\*\* $p < 0.0001$ 、二元配置分散分析、ダネットの検定後)。図8Mは、FHITによるBMPR2の提起された調節の図式モデルである。

10

20

30

40

50

#### 【0138】

FHIT及びLCKレベルがBMPR2発現をいかに調節するかは未知である。miRNAがPAHにおけるBMPR2シグナル伝達の調節において主要な役割を担うことが示されていることから(30、31)、我々は選択されたマイクロRNAがFHIT及びLCK媒介性のPAECにおけるBMPR2発現の調節を組織化するものか否かを検討した。我々は、miR17-5及びmiR100(双方ともBMPR2の直接的制御因子)、及びmiR27a(基準のSmadシグナル伝達における読み出し)にフォーカスした(30、32)。FHIT mRNAのsiRNAによる減少がmiR17-5の発現を増強し(3~4倍;図8E、図8K)、且つmiR27-aの発現を増強したが(4倍;図8L)、miR100の発現を増強しなかった(図8G)。LCKの欠損は、miR17-5及びmiR100の発現の双方を、各々8倍又は2倍に強力に増強した(図8E、8F)。

#### 【0139】

エンザスタウリンによる24時間の処置(15 $\mu$ M)により、PAECにおけるFHIT、BMPR2及びId1の発現が増強された(図8G~I、図20A~20C)。興味深いことに、エンザスタウリン(15 $\mu$ M)は、FHIT mRNAのノックダウンを救済することができ(ノックダウンから24時間後の処置、図8J)、エンザスタウリンがFHITの発現を強力に上方制御するという以前の知見が支持された。さらに、エンザスタウリンは、siFHIT媒介性のmiR17-5及びmiR27aにおける増加を阻害し(図8K、8L)、FHIT及びエンザスタウリンがmiRNA発現を調節することによりBMPR2レベルをいかにして制御する可能性があるかについてのいくつかの機制的洞察が得られた(図8M)。我々はさらに、siFHITに加えて、抗miRのトランスフェクションを用いてmiR17-5を低減することにより、BMPR2及びID1の発現が増強されることを示し、FHIT媒介性のBMPR2調節が部分的にはmiR17-5依存性であることが示唆された(図21A~21D)。

#### 【0140】

実施例X. エンザスタウリンはFHIT/BMPR2シグナル伝達を上方制御し、インビトロでFHIT欠損によって誘導される血管機能障害を予防する

PAHが肺血管の喪失によって特徴づけられると仮定し(33)、我々は、FHITの発現が、血管形成の阻害、アポトーシスの増加、DNA損傷(34、35)及びPAECにおける細胞増殖にいかに関連するかを検討した。したがって我々は、PAECにおけるFHIT及びBMPR2の発現低下がEC機能障害を悪化させるか否か、並びにエンザスタウリンによる24時間の処置が該表現型を救済しうるか否かを評価した。

#### 【0141】

この試験の結果を図9A~9Jに示し、それらはエンザスタウリンが、PAECにおけ

るBMPR2上流シグナル伝達分子FHITの発現を増強し、FHIT欠損PAECにおける管形成におけるPAH特異的な機能的欠損、アポトーシス、DNA損傷及び増殖を回復に向かわせることを示す。図9A~9Bは、24時間の15 $\mu$ Mのエンザスタウリンによって救済されたsiFHIT PAECにおけるマトリゲル管形成アッセイである(t=トランスフェクション後48時間、Amxaヌクレオフェクション、Ntsi 43.3 $\pm$ 5.9、siBMPR2 8.7 $\pm$ 1.5、siFHIT 11.0 $\pm$ 2.6管/5フィールドの平均(20倍)、n=3、平均 $\pm$ 平均値の標準誤差、Ntsiに対する\*\*p<0.001、一元配置分散分析、ダネットの検定後、バーは1mmを表す)。図9Cは、15 $\mu$ Mのエンザスタウリンによって救済されたsiBMPR2及びsiFHIT PAECにおけるカスパーゼ3/7発光である(t=トランスフェクション後48時間、RNAimax、カスパーゼ-Glo(登録商標)3/7アッセイ、n=3、平均 $\pm$ 平均値の標準誤差、Ntsiに対して\*\*\*\*p<0.0001、非処置対照に対して#p<0.05、####p<0.0001、一元配置分散分析、ダネットの検定後)。図9D~Eは、24時間の10 $\mu$ Mのエンザスタウリンによって救済されたsiBMPR2及びsiFHIT PAECにおけるH2AX染色である(t=トランスフェクション後72時間、Dharmafect、n=3、平均 $\pm$ 平均値の標準誤差、Ntsiに対して\*\*p<0.01、非処置対照に対して#p<0.05、一元配置分散分析、ダネットの検定後)。定量化領域=自動化ソフトウェアで定量化された核H2AX染色を示す細胞の%(白色核=陽性染色、灰色核=バックグラウンド染色)。図9Fは、可変濃度のエンザスタウリンで培養された全細胞数及び%トリパンブルー+PAEC(n=3、一元配置分散分析、非処置対照に対して\*p<0.05、\*\*p<0.01)。図9G~9Hは、エンザスタウリン処置した(0.5~50 $\mu$ M)、PASMC及びPAEC各々におけるMTT増殖アッセイである。(n=3)。図9I~9Jは、エンザスタウリン処置した(5 $\mu$ M)siFHIT及びsiBMPR2トランスフェクトPASMCの各々におけるNtsi対照と比べてのMTT増殖アッセイである。(n=3)。

#### 【0142】

マトリゲル管形成アッセイ(12)において細胞を播種してから6時間後、対照Ntsiで処置した細胞と比べて、FHIT及びBMPR2の欠損がPAECの管形成を障害した(図9A、図9B)。エンザスタウリン処置により、24時間後、FHIT及びBMPR2欠損PAECにおける管形成の欠損が、この時点でのFHIT発現を増強するその能力に応じて、完全に回復へ向かった(図9J)。

#### 【0143】

累積生存度測定として、我々は、発光カスパーゼ-Glo(登録商標)3/7アッセイ(36)を用いてカスパーゼ3/7活性を、また免疫蛍光によるヒストンH2AXリン酸化及び共焦点顕微鏡による核領域の染色(%)としての定量化を用いてDNA損傷を定量化した(34、35、37)。FHIT及びBMPR2 mRNAの減少により、トランスフェクション後48時間でPAECにおけるカスパーゼが活性化された(図9C)一方で、エンザスタウリンは、siBMPR2及びsiFHIT誘導性のPAECのアポトーシスを減少させた。FHITレベルの低下により、48時間後、DNA損傷がNtsi対照に対して約4倍増加し(図9D、9E)、これはPAH患者に対する以前のPBMC試験(35)にて認められたDNA損傷の程度に匹敵した。FHIT又はBMPR2の欠損により誘導されたDNA損傷は、PAECにおいて、エンザスタウリンにより有意に減弱した。PAECの増殖を、MTT増殖アッセイ及び血球計数器での細胞カウントを介して評価した(36)。エンザスタウリンは、トリパンブルー生存度アッセイにより、細胞毒性を誘発しなかった。むしろ我々は、エンザスタウリン(最大50 $\mu$ M)による処置後に細胞数増加を認めたが、PAEC増殖における増強が検出されなかったことから、それはアポトーシスの減少を反映している可能性が高い(図9F、9G)。

#### 【0144】

PAHにおける内側肥厚及び血管リモデリングにおけるSMCの役割を想定して、我々は、FHITが減少しても(図9H、I)、BMPR2が減少しない(図9J)ことによ

10

20

30

40

50

り、エンザスタウリンによって救済された P A S M C の増殖がインビトロで増強される ( 図 9 I ) と判定した。我々は、これらのデータから、F H I T の欠損が P A E C 及び P A S M C 機能障害を促進し、それは F H I T 及び B M P R 2 に依存した様式でエンザスタウリンにより改善されうると結論づける。P A S M C 機能と比べて、P A E C 機能に対するエンザスタウリンのより強力な有益な効果は、P A E C における B M P R 2 のより強力な発現により説明してもよく、それにより B M P R 2 調節療法に対するそれらの応答性が高まるかもしれない。

#### 【 0 1 4 5 】

実施例 X I : インビボでの F H I T 欠損は低酸素に応答した肺高血圧症悪化の素因になる P A H 患者における F H I T の減少並びに E C 及び S M C 機能における適切な F H I T レベルの重要性により、我々は F H I T の欠損がインビボで P H の素因になるか否かを判定するに至った。F h i t - / - マウス及び W T リタメイト ( 8 週齢、雄 / 雌 ) を慢性低酸素 ( 1 0 % ) に 3 週間曝露し、その後、酸素正常状態下での回復期間を設けた ( 2 1 % 、 4 週 ) ( 3 8 、 3 9 ) 。右頸静脈を通じた R V 収縮期圧 ( R V S P ) の測定により、P H を評価した。3 及び 7 週目に各々、動物を屠殺し、組織を収集した。R V 肥大 ( R V H ) を、R V の左室及び中隔重量に対する重量比 ( R V / L V + S ) を用いてアッセイした。C 5 7 B L / 6 野生型マウスは、低酸素に対するステレオタイプの適応応答を呈し、R V S P における増加 ( 図 1 0 A 、 図 1 8 A ) 、R V H における増加 ( 図 1 0 B 、 図 1 8 B ) 、細動脈及び細静脈における血管希薄化 ( 図 1 0 D 、 1 8 C ) 及び筋性化の増加 ( 図 1 0 E 、 図 1 8 D ) を伴い、室内気に戻る時、すべてが可逆的であった。それに対し、F h i t - / - マウスは、R V S P 及び R V H における過剰な増加、低酸素下での血管希薄化及び筋性化の増加を呈し、酸素正常状態下で 4 週間後、不完全な回復を伴った ( 図 1 0 A ~ 1 0 F 、 図 1 8 A ~ F ) が、R V 線維症を有しなかった ( 図 2 2 ) 。さらに、F h i t - / - マウス ( 7 ~ 1 0 世代 ) において、ベースラインでの筋性化が、リタメイト対照と比べて、より遠位での血管生成に広がり ( 図 1 0 G ~ 1 0 H ) 、ここで 7 世代を超える筋性化血管は認められなかった ( 4 0 ) 。注目すべきことに、我々は、ベースライン R V S P 、 R V H 、血管希薄化及び小血管筋性化の程度における性別差を発見した ( 詳細な説明については付録を参照 ) 。

#### 【 0 1 4 6 】

予想通り、F H I T タンパク質は、あらゆる条件下で F h i t - / - 肺において有意に減少した。慢性低酸素は、F h i t - / - 肺における B M P R 2 タンパク質を減少させ、F h i t - / - マウスにおいて慢性低酸素下で認められた R V S P 及び R V H の増加と関連した ( 図 1 0 I ) 。意外にも、低酸素に曝露させ、エンザスタウリン ( ミニ浸透圧ポンプを介して 5 m g / k g / 日 ) で処置した F h i t - / - マウスは、全肺組織において、P H の改善、並びに B M P R 2 及び I D 1 の発現増強を示した。予想通り、F H I T m R N A の発現は測定不能な程度に低く、B M P R 2 調節に対するエンザスタウリンのさらなる F H I T 非依存性機構が示唆された ( 図 2 3 B ) 。エンザスタウリンは慢性低酸素に曝露されたマウスにおける P H を予防する。

#### 【 0 1 4 7 】

F H I T 及び B M P R 2 レベル並びに内皮及び平滑筋細胞機能障害に対するその有益な効果を増加させるエンザスタウリンの能力を想定して、我々は、インビボ齧歯類モデルにおいてエンザスタウリンを用いて、実験的 P H 及び血管リモデリングを予防する又は回復に向かわせるようなその傾向を評価した。低酸素下での雄 F h i t - / - マウスにおける P H の重症度増加に基づき、我々は雄動物において排他的にエンザスタウリンを用いた。パイロット予防モデルとして、我々は、B m p r 2 + / - マウス及び野生型リタメイト ( 8 週齢 ) を低酸素 ( 1 0 % ) に 3 週間曝露し、皮下に移植したミニ浸透圧ポンプを用いて、1 5 m g / k g / 日のエンザスタウリン又は媒体を供した。エンザスタウリンは、B m p r 2 + / - 及び野生型マウスにおいて、R V S P 及び R V H の増加 ( 図 2 4 A 、 2 4 B ) 、血管希薄化並びに遠位血管の筋性化 ( 図 2 4 C 、 2 4 D ) を予防した。我々はさらに、低酸素に 3 週間曝露した C 5 7 B L 6 マウスを、F K 5 0 6 ( 0 . 0 5 m g / k g / 日



)、エンザスタウリン(5 mg/kg/日)又は双方の組み合わせの何れかで処置し、PH(RVSPによる測定として)の予防、BMPR2及びID1の発現に関連するFK506とエンザスタウリンとの相加的効果を記録した(図25A~25D)。

#### 【0148】

実施例XII. エンザスタウリンはSUGEN5416/低酸素/酸素正常状態ラットにおける実験的PHを回復に向かわせる

回復モデルとして、我々は、大規模な血管リモデリングとともに、ヒト末期PAHを十分に再現するSUGEN5416/低酸素/酸素正常状態ラットモデルを用いた。この実験におけるデータを図11A~11Kにまとめる。

#### 【0149】

以前に記載された通り(41)、スブラグドローラットに、20 mg/kgのSUGEN5416を1回皮下注射し、慢性低酸素下(10%、3週間)、次いで酸素正常状態下に5週間に収容した。皮下へのSUGEN5416注射から8週間後、ラットは毎日、5 mg/kg/日のエンザスタウリン又は媒体対照の経口経管栄養を3週間受けた。動物の血行動態評価(心エコー、右心カテーテル)を屠殺及び組織収集前に実施した。ラットは、管腔閉塞及び右心不全によって特徴づけられる重度の閉塞性「末期」PHを発生した(図11D~H、図26)。組織学的観察結果に一致して、RVSP(>100 mmHg)及びRVHがSUGEN5416注射ラットにおいて著しく増加し(図11A~11B)、間質性線維症の増加がこれら動物におけるRVにおいて認められた(図11I~11K)。

#### 【0150】

この実験におけるデータは、図11A~11Kに示し、エンザスタウリンが、SUGEN5416/低酸素ラットにおいて、血行動態パラメータ、重度の血管リモデリング、肺気腫、心線維症及びRVHを回復に向かわせることを示す。雄スブラグドローラットにおいて、20 mg/kg体重のSUGEN5416の皮下注射により実験的PHが誘導された。動物を、5 mg/kg体重のエンザスタウリン又は媒体対照の経口経管栄養による毎日投与を経ながら、低酸素(Hx、10%O<sub>2</sub>)状態下で3週間収容し、その後、酸素正常状態下(Nx、21%O<sub>2</sub>)での5週間の期間を設けた。図11Aでは、右室収縮期圧(RVSP)を肺動脈カテーテル法により測定した(n=4、平均±平均値の標準誤差、Nx対照に対して\*\*p<0.01、一元配置分散分析、シグダックの検定後)。図11Bでは、右室(RV)肥大を、RVの左室及び中隔に対する重量比により示す(n=4、平均±平均値の標準誤差、Nx対照に対して\*\*p<0.01、媒体対照に対して#p<0.05、二元配置分散分析、ターキーの検定後)。図11Cは、肺胞壁(AW)及び肺胞管(AD)の肺血管の比であり、図11Dは、それらの完全又は部分的な閉鎖(%)であり、また図11Eでは、それらの完全又は部分的な筋性化(%)をMOVAT染色した肺切片において評価した(n=4、平均±平均値の標準誤差、Nx対照に対して\*\*\*\*p<0.0001、媒体対照に対して###p<0.001、####p<0.0001、二元配置分散分析、ターキーの検定後)。図11Fは、代表的なMOVAT肺組織像であり、大きな肺血管を強調している。図11Gは、全肺組織におけるGAPDHに正規化したFHT又はBMPR2の相対的mRNA発現である(qPCR、n=4、平均±平均値の標準誤差、二元配置分散分析)。図11Hは、血管閉塞を示す代表的なMOVAT肺組織像である。図11Iは、RVにおける全組織に対する線維性組織の百分率である(n=4、平均±平均値の標準誤差、Nx対照に対して\*\*p<0.01、媒体対照に対して##p<0.01、二元配置分散分析、ターキーの検定後)。図11J~11Kでは、全RV組織(図11J)及び拡大切片(図11K)の代表的なトリクローム染色を表す。

#### 【0151】

エンザスタウリンによる処置により、全肺におけるFHT及びBMPR2の発現が增強され(図11G)、ほぼ全体的に血管閉塞が回復に向かい(図11D)、小血管及び大血管の筋性化(図11E)、並びにRVH(図11B)及びRV線維症(図11I)が強力に低減された。エンザスタウリンで処置したSUGEN5416/低酸素/酸素正常状

10

20

30

40

50

態ラットにおいて、RVSPが30 mmHg超低下した。

#### 【0152】

実施例XIII. エンザスタウリンはSUGEN 5416 / 低酸素ラットにおける肺気腫を回復に向かわせる

雄Sascoスブラーグドーリーラットにおいて、20 mg / kg体重のSU5416の皮下注射により、実験的PHを誘導した。動物を、5 mg / kg体重のエンザスタウリン又は媒体対照の経口経管栄養による毎日投与を経ながら、低酸素(Hx、10% O<sub>2</sub>)状態下で3週間収容し、その後、酸素正常状態下(Nx、21% O<sub>2</sub>)で5週間の期間を設けた。MOVAT肺組織像の線形切片分析(n = 4、平均±平均値の標準誤差、Nx対照に対する\* p < 0.05、媒体対照に対する## p < 0.01、二元配置分散分析、ターキーの検定後)。気腫性変化(矢印による標識)及び血管閉塞を呈する、代表的なMOVAT肺組織像。図27A及び27Bにおけるデータが示すように、エンザスタウリン処置動物は、気腫性変化及び血管閉塞についての非処置対照よりも有意に低い証拠を示し、エンザスタウリンが肺気腫に伴う肺組織損傷を回復に向かわせうることが示される。

#### 【0153】

追加的な実施例

実施例S1. Fhit - / - C57BL / 6とリタメイト野生型(C57)マウスを、正常酸素圧(Nx、20% O<sub>2</sub>)、低酸素(Hx、10% O<sub>2</sub>)状態下で3週間収容し、4週間の低酸素回復(Rec、3週間のHx / 4週間のNx)期間を設け、7週間のNx対照と比較した。アクチンハウスキーピング対照に正規化した、肺組織内でのFHITタンパク質発現の代表的な濃度測定分析(雄、C57 n = 3、Fhit - / - Nx n = 3、Fhit - / - Hx n = 5、Fhit - / - Rec n = 4)。すべてのバーは平均±平均値の標準誤差を意味する。C57対照に対して\*\*\* p < 0.0001、二元配置分散分析、ターキーの検定後。この実験におけるデータを図12にまとめる。

#### 【0154】

実施例S2. 雄Sascoスブラーグドーリーラットにおいて、20 mg / kg体重のSU5416の皮下注射により、実験的PAHを誘導した。動物を、5 mg / kg体重のエンザスタウリン又は媒体対照の経口経管栄養による毎日投与を経ながら、低酸素(Hx、10% O<sub>2</sub>)状態下に3週間収容し、その後、酸素正常状態下(Nx、20% O<sub>2</sub>)で5週間の期間を設けた。アクチンハウスキーピング対照に正規化した、肺組織内でのPKC(図13A)及びp-PKC(図13B)タンパク質発現(雄、Nx n = 4、Nx Enz n = 4、SuHx n = 3、SuHx Enz n = 5)及びPKCに正規化したp-PKC(図13C)の濃度測定分析。PKC、p-PKC及びアクチンの代表的プロット(図13D)。すべてのバーは平均±平均値の標準誤差を意味する。二元配置分散分析、ターキーの検定後。

#### 【0155】

実施例S3. ヒトPAECを6ウェルプレートに蒔いた。70~80%のコンフルエントであるとき、細胞を、0.5 mM、5 mM及び15 mMのエンザスタウリンで各々、24時間処置した。RNAをRNeasy(登録商標)Plus Miniキット(Qiagen)により単離し、Fhit、BMPR2及びId1遺伝子発現をTaqman(登録商標)遺伝子発現アッセイにより測定した。(図14A)FHITの相対的発現、(図14B)BMPR2の相対的発現、(図14C)ID1の相対的発現。すべてのバーは平均±平均値の標準誤差を意味する。n = 3、一元配置分散分析、ダネットの比較検定、対照と比べて\* p < 0.05、\*\* p < 0.01。

#### 【0156】

実施例S4. 図15A~15Bは、様々な濃度(5 nM~5 µM)の(図15A)選択的PKC阻害剤Ly333531塩酸塩(図15B)又は非選択的PKC阻害剤GF109203Xとともに24時間インキュベートした同調PAECにおけるGAPDHに正規化したBMPR2の相対的mRNA発現である(qPCR、t = 24時間、n = 3、平均±平均値の標準誤差、一元配置分散分析、ダネットの検定後、NS)。図15C~15

10

20

30

40

50

Dは、様々な濃度（5 nM ~ 5 μM）の（図15C）選択的PKC 阻害剤Ly 333531塩酸塩（図15D）又は非選択的PKC - 阻害剤GF 109203X（図15F）とともに24時間インキュベートした同調PAECにおけるGAPDHに正規化したId1の相対的mRNA発現である（qPCR、t = 24時間、n = 3、平均 ± 平均値の標準誤差、一元配置分散分析、ダネットの検定後、NS）。図15E ~ 15Fは、様々な濃度（5 nM ~ 5 μM）の（図15E）選択的PKC 阻害剤Ly 333531塩酸塩（図15F）又は非選択的PKC阻害剤GF 109203X（I）とともに24時間インキュベートした同調PAECにおけるGAPDHに正規化したFHITの相対的mRNA発現である（qPCR、t = 24時間、n = 3、平均 ± 平均値の標準誤差、媒体対照に対して \* \* p < 0.01、一元配置分散分析、ダネットの検定後）。

10

#### 【0157】

実施例S5 . 5 μM若しくは15 μMのエンザスタウリン（灰色バー）及び/又は5 μMの選択的PKC 阻害剤Ly 333531塩酸塩若しくは5 μMの非選択的PKC阻害剤GF 109203Xとともに24時間インキュベートした同調PAECにおけるカスパーゼ3/7発光（t = 24時間、カスパーゼ - Glo（登録商標）3/7アッセイ、n = 3、平均 ± 平均値の標準誤差、非エンザスタウリン処置対照に対して \* p < 0.05、\* \* p < 0.001、\* \* \* p < 0.0001、非処置媒体対照に対して# # # # p < 0.0001、二元配置分散分析、ダネットの検定後）。図16を参照のこと。

#### 【0158】

実施例S6 . (BMPR2突然変異を伴わない) IPA H患者からの代表的な免疫組織化学スライド。図17A : BMPR2の発現、図17B : FHITの発現。FHITの減少は、主に新生内膜に局在化される。

20

#### 【0159】

実施例S7 . 雌Fhit - / - C57BL/6とリタメイト野生型(C57)マウスを、正常酸素圧(Nx、20% O<sub>2</sub>)、低酸素(Hx、10% O<sub>2</sub>)状態で3週間收容し、低酸素回復(Rec、3週間のHx / 4週間のNx)期間を4週間設け、7週間のNx対照と比較した。データを図18A ~ 18Fに示す。図18Aでは、右室収縮期圧(RVSP)を肺動脈カテーテル法により測定した(雌、C57 n = 3、FHIT - / - Nx n = 4、FHIT - / - Hx Rec n = 3)。図18Bでは、右室(RV)肥大をRVの左室及び中隔に対する重量比(RV / LV + S)により示す(雌、C57 n = 3、Fhit - / - Nx n = 4、FHIT - / - Hx n = 3、Fhit - / - Rec n = 5)。図18Cは、肺泡壁(AW)及び肺泡管(AD)の肺血管欠損である。図18Dでは、AW又はAD血管の完全又は部分的な筋性化(%)をMOVAT染色した肺切片にて評価した(雌、C57 n = 3、Fhit - / - Nx n = 4、Fhit - / - Hx Rec n = 3)。図18E ~ 18Fは、小さい遠位血管の血管欠損(図18E)又は血管筋性化(図18F)を表す代表的なMOVAT肺組織像である。矢印は血管位置を示す。Nx対照に対して \* p < 0.05、\* \* p < 0.01、\* \* \* p < 0.001、\* \* \* p < 0.0001、C57対照に対して# p < 0.05、# # # p < 0.001、# # # # p < 0.0001、二元配置分散分析、ターキーの検定後。

30

#### 【0160】

実施例S8 . FHITのqPCR mRNA分析を図19A ~ 19Hにまとめる。女性(図19B、19E)、男性(図19C、19F)及び組み合わせ対象(図19A、19D)について分析した、健常対照と比べての、FPAH患者及び健常な突然変異キャリアを有する選択した家族からの形質転換リンパ球における(図19A ~ 19C)及びBMPR2(図19D ~ F)の発現。N = 10、平均 ± 平均値の標準誤差、\* p < 0.05、一元配置分散分析、ダネットの検定後、患者人口統計については表1を参照。(図19G、19H)FPAH患者におけるBMPR2及びFHIT発現の、同じ家族のキャリアと比べてのグラフィック表示。対応t検定p = 0.0054 BMPR2、p = 0.0026 FHIT。

40

#### 【0161】

50

実施例 S 9 . ヒト P A E C を 6 ウェルプレートに蒔き (  $0.5 \times 10^6$  個の細胞 / ウェル )、それに s i F h i t ( A m b i o n S i l e n c e r ( 登録商標 ) セレクト、P / N 4 3 9 2 4 2 0 )  $100 \text{ nM}$  をトランスフェクトし、次に R N A i M a x ( I n v i t r o g e n ) により  $100 \text{ nM}$  の非特異的 s i R N A で 48 時間処置した。次に、細胞をエンザスタウリン  $15 \text{ uM}$  で 24 時間処置した。R N A を R N e a s y ( 登録商標 ) P l u s M i n i キット ( Q i a g e n ) により単離し、F h i t、B M P R 2 及び I d 1 の遺伝子発現を T a q m a n ( 登録商標 ) 遺伝子発現アッセイにより分析する ( I n v i t r o g e n。F h i t、B M P R 2 及び I d 1 の遺伝子発現は、T a q m a n ( 登録商標 ) 遺伝子発現アッセイを用いて測定した )。図 2 0 A : F H I T の相対的発現、図 2 0 B : B M P R 2、図 2 0 C : I D 1。すべてのバーは平均  $\pm$  平均値の標準誤差を意味する、 $n = 3$ 、一元配置分散分析、シダックの多重比較検定、 $*** p < 0.0001$ 、 $** p < 0.01$  N t s i 対 s i F H I T、 $### p < 0.0005$ 、 $## p < 0.01$  s i F H I T 対 s i F H I T + E n z。

10

20

30

40

50

#### 【0162】

実施例 S 1 0 . F H I T ノックダウンによる P A E C における B M P R 2 及び I D 1 の減少は、部分的には m i R 1 7 - 5 依存性である。ヒト P A E C を 6 ウェルプレートに蒔き (  $0.5 \times 10^6$  個の細胞 / ウェル )、それに s i F h i t ( A m b i o n S i l e n c e r ( 登録商標 ) セレクト、P / N 4 3 9 2 4 2 0 )  $100 \text{ nM}$  及び抗 m i R 1 7 - 5 阻害剤 ( A M 1 2 4 1 2、A m b i o n ) を R N A i M a x により 48 時間トランスフェクトした。抗 m i R M i R N A 阻害剤を陰性対照 ( A M 1 7 0 1 0、A m b i o n ) 1 として用いた。M i R N A を T a q M a n ( 登録商標 ) m i R N A A B C 精製キットにより単離し、単離した m i R N A を、T a q m a n ( 登録商標 ) マイクロ R N A アッセイを用いて分析した。F h i t、B M P R 2 及び I d 1 の遺伝子発現を T a q m a n ( 登録商標 ) 遺伝子発現アッセイを用いて測定し、データを、図 2 1 A : m i R 1 7 . 5 の相対的発現 ; 図 2 1 B : F H I T ; 図 2 1 C : B M P R 2 ; 及び図 2 1 D : I D 1 に示す。すべてのバーは平均  $\pm$  平均値の標準誤差を意味する、 $n = 3$ 、N t s i に対して  $* p < 0.05$ 、 $** p < 0.01$ 、 $*** p < 0.001$ 、一元配置分散分析、ターキーの検定後、N t M i r に対して  $\# p < 0.05$ 、不對スチューデント t 検定。

#### 【0163】

実施例 S 1 1 . W T 及び F H I T - / - C 5 7 B L / 6 マウスは、低酸素処置後、R V 線維症を発生しない。雄野生型及び F H I T - / - C 5 7 B L / 6 ( C 5 7 ) マウスを、低酸素 ( H x、 $10\% \text{ O}_2$  ) 状態下で 3 週間収容し、低酸素回復 ( R e c、3 週間の H x / 4 週間の N x ) 期間を 4 週間設けた。代表的なトリクローム心組織像を示す。線維症は青色によって示す。R V 及び L V + 中隔は、R V / L V + 中隔の重量評価のため、互いから分離する必要があった。図 2 2 を参照のこと。

#### 【0164】

実施例 S 1 2 . エンザスタウリンは、F H I T - / - マウスにおける低酸素下で、R V S P の上昇から保護し、B M P R 2 / I d 1 m R N A を上方制御する。雄 F H I T - / - C 5 7 B L / 6 ( C 5 7 ) マウスを低酸素下 ( H x、 $10\% \text{ O}_2$  ) に 3 週間曝露し、ミニ浸透圧ポンプ ( A l z e t モデル 2 0 0 4 ) により  $5 \text{ mg / kg}$  体重の濃度でエンザスタウリン又は媒体 ( 生理食塩水 ) 対照で処置した。図 2 3 A を参照のこと。右室収縮期圧 ( R V S P ) を肺動脈カテーテル法により測定した (  $n = 3$ 、平均  $\pm$  平均値の標準誤差、シャム対照に対して  $* p < 0.05$ 、不對スチューデント t 検定 )。図 2 3 B ~ 2 3 C は、肺組織における m R N A 発現の C t 分析である (  $n = 3$ 、平均  $\pm$  平均値の標準誤差、シャム対照に対して  $* p < 0.05$ 、 $** p < 0.01$ 、不對スチューデント t 検定 )。略称 : E n z - エンザスタウリン。

#### 【0165】

実施例 S 1 3 . エンザスタウリンは、C 5 7 B L / 6 マウスにおける低酸素誘導性の実験的 P A H の発生を予防する。雄野生型及び B m p r 2 + / - C 5 7 B L / 6 ( C 5 7 ) マウスを、正常酸素圧 ( N x、 $20\% \text{ O}_2$  ) 及び低酸素 ( H x、 $10\% \text{ O}_2$  ) 状態下に 3

週間収容し、経口経管栄養 / A l z e t ミニ浸透圧ポンプモデル 2 0 0 6 により、5 m g / k g のエンザスタウリンの毎日投与の存在下又は不在下で処置した。データを図 2 4 A ~ 2 4 G にまとめる。図 2 4 A では、右室収縮期圧 ( R V S P ) を肺動脈カテーテル法により測定した ( n = 3、平均 ± 平均値の標準誤差、N x 対照に対して \* \* p < 0 . 0 1、一元配置分散分析、シダックの検定後)。図 2 4 B では、右室 ( R V ) 肥大を R V の左室及び中隔に対する重量比により示す ( n = 3、平均 ± 平均値の標準誤差、媒体対照に対して # p < 0 . 0 5、二元配置分散分析、ターキーの検定後)。図 2 4 C は、肺胞壁 ( A W ) 及び肺胞管 ( A D ) の肺血管欠損であり、図 2 4 D では、それらの完全又は部分的な筋性化 ( % ) を M O V A T 染色した肺切片にて評価した ( n = 3、平均 ± 平均値の標準誤差、C 5 7 対照に対して \* p < 0 . 0 5、媒体対照に対して # # p < 0 . 0 1、# p < 0 . 0 0 1、二元配置分散分析、ターキーの検定後)。図 2 4 E は、代表的な M O V A T 肺組織像である。矢印は血管位置を示す。図 2 4 F ~ 2 4 G は各々、大血管 (図 2 4 F) 及び小血管 (図 2 4 G) の代表的な M O V A T 肺組織像である。矢印は血管位置を示す。

10

#### 【 0 1 6 6 】

実施例 S 1 4 . F K 5 0 6 及びエンザスタウリンは、低酸素下の野生型 C 5 7 B L / 6 マウスにおいて、B M P R 2 / I d 1 に対してさらなる効果を有するが、F H I T m R N A に対しては有さず、R V S P における上昇から保護する。雄野生型 C 5 7 B L / 6 ( C 5 7 ) マウスを低酸素 ( H x、1 0 % O<sub>2</sub> ) 下に 3 週間曝露し、ミニ浸透圧ポンプ ( A l z e t モデル 2 0 0 4 ) により、0 . 0 5 m g / k g / 日の F K 5 0 6 の存在下又は不在下で、5 m g / k g 体重のエンザスタウリン又は媒体対照 (生理食塩水) で処置した。結果を図 2 5 A ~ 2 5 D に表す。図 2 5 A では、右室収縮期圧 ( R V S P ) を肺動脈カテーテル法により測定した ( n = 3、平均 ± 平均値の標準誤差、シャム対照に対して \* \* p < 0 . 0 1、一元配置分散分析、ダネットの検定後)。図 2 5 B ~ 2 5 D は、肺組織における m R N A の発現の C t 分析である。 ( n = 3、平均 ± 平均値の標準誤差、シャム対照に対して \* p < 0 . 0 5、\* \* p < 0 . 0 1、\* \* \* p < 0 . 0 0 1、一元配置分散分析、ダネットの検定後)。略称 : F K - F K 5 0 6、E n z - エンザスタウリン。

20

#### 【 0 1 6 7 】

実施例 S 1 5 . エンザスタウリン処置から 3 週間後、酸素正常状態と S u g e n / 低酸素状態とを比較する、スプラーグドーリーラット肺における代表的な M O V A T 肺組織像。

30

#### 【 0 1 6 8 】

雄 S a s c o スプラーグドーリーラットにおいて、2 0 m g / k g 体重の S U 5 4 1 6 の皮下注射により実験的 P A H を誘導した。動物を、5 m g / k g 体重のエンザスタウリン又は媒体対照の経口経管栄養による毎日投与を経ながら、低酸素 ( H x、1 0 % O<sub>2</sub> ) 状態下で 3 週間収容し、その後、酸素正常状態下 ( N x、2 0 % O<sub>2</sub> ) で 5 週間の期間を設けた。小肺血管の代表的な M O V A T 肺組織像を図 2 6 に示す。

#### 【 0 1 6 9 】

#### 参考文献

- 1 . A u s t i n E D , L o y d J E , P h i l l i p s J A . H e r i t a b l e P u l m o n a r y A r t e r i a l H y p e r t e n s i o n . I n : P a g o n R A A M , A r d i n g e r H H , e t a l . , e d i t o r s . , e d i t o r . G e n e R e v i e w s [ I n t e r n e t ] . S e a t t l e ( W A ) : : U n i v e r s i t y o f W a s h i n g t o n , S e a t t l e ; ; 2 0 1 5 .
- 2 . L a n e K B , M a c h a d o R D , P a u c i u l o M W , T h o m s o n J R , P h i l l i p s J A , L o y d J E , N i c h o l s W C , T r e m b a t h R C , C o n s o r t i u m I P . H e t e r o z y g o u s g e r m l i n e m u t a t i o n s i n B M P R 2 , e n c o d i n g a T G F - b e t a r e c e p t o r , c a u s e f a m i l i a l p r i m a r y p u l m o n a r y h y p e r t e n s i o n . N a t G e n e t 2 0 0 0 ; 2 6 : 8 1 - 8 4 .

40

50

3. Fessel JP, Loyd JE, Austin ED. The genetics of pulmonary arterial hypertension in the post-BMPR2 era. *Pulm Circ* 2011;1:305-319.
4. Atkinson C, Stewart S, Upton PD, Machado R, Thomson JR, Trembath RC, Morrell NW. Primary pulmonary hypertension is associated with reduced pulmonary vascular expression of type II bone morphogenetic protein receptor. *Circulation* 2002;105:1672-1678. 10
5. Rich JD, Shah SJ, Swamy RS, Kamp A, Rich S. Inaccuracy of Doppler echocardiographic estimates of pulmonary artery pressures in patients with pulmonary hypertension: implications for clinical practice. *Chest* 2011;139:988-993.
6. Long L, Ormiston ML, Yang X, Southwood M, Graf S, Machado RD, Mueller M, Kinzel B, Yung LM, Wilkinson JM, Moore SD, Drake KM, Aldred MA, Yu PB, Upton PD, Morrell NW. Selective enhancement of endothelial BMPR-II with BMP9 reverses pulmonary arterial hypertension. *Nat Med* 2015;21:777-785. 20
7. Long L, Yang X, Southwood M, Lu J, Marciniak SJ, Dunmore BJ, Morrell NW. Chloroquine prevents progression of experimental pulmonary hypertension via inhibition of autophagy and lysosomal bone morphogenetic protein type II receptor degradation. *Circ Res* 2013;112:1159-1170. 30
8. Brittain EL, Thenappan T, Maron BA, Chan SY, Austin ED, Spiekerkoetter E, Bogaard HJ, Guignabert C, Paulin R, Machado RF, Yu PB. Update in Pulmonary Vascular Disease 2016 and 2017. *Am J Respir Crit Care Med* 2018.
9. Liu D, Yan Y, Chen JW, Yuan P, Wang XJ, Jiang R, Wang L, Zhao QH, Wu WH, Simonneau G, Qu JM, Jing ZC. Hypermethylation of BMPR2 Promoter Occurs in Patients with Heritable Pulmonary Arterial Hypertension and Inhibits BMPR2 Expression. *Am J Respir Crit Care Med* 2017;196:925-928. 40
10. Spiekerkoetter E, Sung YK, Sudheendra D, Scott V, Del Rosario P, Bill M, Haddad F, Long-Boyle J, Hedlin H, Zamanian RT. Randomised placebo-controlled safety and tolerability trial of FK506 (tacrolimus) for pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J* 50

2017;50.

11. Spiekerkoetter E, Sung YK, Sudheendra D, Bill M, Aldred MA, van de Veerdonk MC, Vonk Noordegraaf A, Long-Boyle J, Dash R, Yang PC, Lawrie A, Swift AJ, Rabinovitch M, Zamanian RT. Low-Dose FK506 (Tacrolimus) in End-Stage Pulmonary Arterial Hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2015;192:254-257.
12. Spiekerkoetter E, Tian X, Cai J, Hopper RK, Sudheendra D, Li CG, El-Bizri N, Sawada H, Haghighat R, Chan R, Haghighat L, de Jesus Perez V, Wang L, Reddy S, Zhao M, Bernstein D, Solow-Cordero DE, Beachy PA, Wandless TJ, Ten Dijke P, Rabinovitch M. FK506 activates BMPR2, rescues endothelial dysfunction, and reverses pulmonary hypertension. *J Clin Invest* 2013;123:3600-3613. 10
13. Huebner K, Garrison PN, Barnes LD, Croce CM. The role of the FHIT/FRA3B locus in cancer. *Annu Rev Genet* 1998;32:7-31. 20
14. Sozzi G, Sard L, De Gregorio L, Marchetti A, Musso K, Buttitta F, Tornielli S, Pellegrini S, Veronese ML, Manenti G, Incarbone M, Chella A, Angeletti CA, Pastorino U, Huebner K, Bevilacqua G, Pilotti S, Croce CM, Pierotti MA. Association between cigarette smoking and FHIT gene alterations in lung cancer. *Cancer Res* 1997;57:2121-2123.
15. Thavathiru E, Ludes-Meyers JH, MacLeod MC, Aldaz CM. Expression of common chromosomal fragile site genes, WWOX/FRA16D and FHIT/FRA3B is downregulated by exposure to environmental carcinogens, UV, and BPDE but not by IR. *Mol Carcinog* 2005;44:174-182. 30
16. Kujan O, Abuderman A, Al-Shawaf AZ. Immunohistochemical characterization of FHIT expression in normal human tissues. *Interv Med Appl Sci* 2016;8:7-13. 40
17. Sozzi G, Pastorino U, Moiraghi L, Tagliabue E, Pezzella F, Ghirelli C, Tornielli S, Sard L, Huebner K, Pierotti MA, Croce CM, Pilotti S. Loss of FHIT function in lung cancer and preinvasive bronchial lesions. *Cancer Res* 1998;58:5032-5037.
18. Campiglio M, Pekarsky Y, Menard S, Tagliabue E, Pilotti S, Croce CM. FHIT loss of function in human primary breast cancer correlates with advanced stage of the dis 50

- ease. Cancer Res 1999; 59: 3866 - 3869.
19. Toledo G, Sola JJ, Lozano MD, Soria E, Pardo J. Loss of FHIT protein expression is related to high proliferation, low apoptosis and worse prognosis in non-small-cell lung cancer. Mod Pathol 2004; 17: 440 - 448.
20. Huang Q, Liu Z, Xie F, Liu C, Shao F, Zhu CL, Hu S. Fragile histidine triad (FHIT) suppresses proliferation and promotes apoptosis in cholangiocarcinoma cells by blocking PI3K-Akt pathway. ScientificWorld Journal 2014; 2014: 179698.
21. Robertson MJ, Kahl BS, Vose JM, de Vos S, Laughlin M, Flynn PJ, Rowland K, Cruz JC, Goldberg SL, Musib L, Darstein C, Enas N, Kutok JL, Aster JC, Neuberg D, Savage KJ, LaCasce A, Thornton D, Slapak CA, Shipp MA. Phase II study of enzastaurin, a protein kinase C beta inhibitor, in patients with relapsed or refractory diffuse large B-cell lymphoma. J Clin Oncol 2007; 25: 1741 - 1746.
22. Dannewitz Prosseda S, Suheendra D, Tian X, Kung J, Bohm M, Kumamoto K, Solow-Cordero D, Saldivar J, Austin E, Lloyd JE, Huber K, Khatri, Purvesh., Spiekerkoetter E. Enzastaurin Reverses Pulmonary Arterial Hypertension by Targeting the Novel BMPR2 Modifier FHIT. ATS Conference. Washington D.C.: American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine; 2017. p. A4228.
23. Austin ED, Hamid R, Hemnes AR, Lloyd JE, Blackwell T, Yu C, Phillips Iii JA, Gaddipati R, Gladson S, Gu E, West J, Lane KB. BMPR2 expression is suppressed by signaling through the estrogen receptor. Biol Sex Differ 2012; 3: 6.
24. Khatri P, Roedder S, Kimura N, De Vusser K, Morgan AA, Gong Y, Fischbein MP, Robbins RC, Naesens M, Butte AJ, Sarwal MM. A common rejection module (CRM) for acute rejection across multiple organs identifies novel therapeutics for organ transplantation. J Exp Med 2013; 210: 2205 - 2221.
25. Sweeney TE, Haynes WA, Vallania F, Ioannidis JP, Khatri P. Methods to increase reproducibility in differential gene expression via meta-analysis. Nucleic Acids Res 2017; 45: e1.
26. Li MD, Burns TC, Morgan AA, Khatri P. Int



- egrated multi-cohort transcriptional meta-analysis of neurodegenerative diseases. *Acta Neuropathol Commun* 2014;2:93.
27. Lee KC, Ouwehand I, Giannini AL, Thomas NS, Dibb NJ, Bijlmakers MJ. Lck is a key target of imatinib and dasatinib in T-cell activation. *Leukemia* 2010;24:896-900.
28. Montani D, Bergot E, Gunther S, Savale L, Bergeron A, Bourdin A, Bouvaist H, Canuet M, Pison C, Macro M, Poubreau P, Girerd B, Natali D, Guignabert C, Perros F, O'Callaghan DS, Jais X, Tubert-Bitter P, Zalcman G, Sitbon O, Simonneau G, Humbert M. Pulmonary arterial hypertension in patients treated by dasatinib. *Circulation* 2012;125:2128-2137.
29. Hamid R, Cogan JD, Hedges LK, Austin E, Phillips JA, Newman JH, Lloyd JE. Penetrance of pulmonary arterial hypertension is modulated by the expression of normal BMPR2 allele. *Hum Mutat* 2009;30:649-654.
30. Drake KM, Zygmunt D, Mavrakakis L, Harbor P, Wang L, Comhair SA, Erzurum SC, Aldred MA. Altered MicroRNA processing in heritable pulmonary arterial hypertension: an important role for Smad-8. *Am J Respir Crit Care Med* 2011;184:1400-1408.
31. Caruso P, MacLean MR, Khanin R, McClure J, Soon E, Southgate M, MacDonald RA, Greig JA, Robertson KE, Masson R, Denby L, Dempsey Y, Long L, Morrell NW, Baker AH. Dynamic changes in lung microRNA profiles during the development of pulmonary hypertension due to chronic hypoxia and monocrotaline. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010;30:716-723.
32. Thompson AA, Lawrie A. Targeting Vascular Remodeling to Treat Pulmonary Arterial Hypertension. *Trends Mol Med* 2017;23:31-45.
33. Hislop A, Reid L. New findings in pulmonary arteries of rats with hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Br J Exp Pathol* 1976;57:542-554.
34. Meloche J, Pflieger A, Vaillancourt M, Paulin R, Potus F, Zervopoulos S, Graydon C, Courboulain A, Breuils-Bonnet S, Tremblay E, Couture C, Michelakis ED, Provencher S, Bonnet S. Role for DNA damage signaling in pulmonary arterial hypertension. *Circulat*

ion 2014;129:786-797.

35. Federici C, Drake KM, Rigelisky CM, McNelly LN, Meade SL, Comhair SA, Erzurum SC, Aldred MA. Increased Mutagen Sensitivity and DNA Damage in Pulmonary Arterial Hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2015;192:219-228.

36. de Jesus Perez VA, Alastalo TP, Wu JC, Axelrod JD, Cooke JP, Amieva M, Rabinovitch M. Bone morphogenetic protein 2 induces pulmonary angiogenesis via Wnt-beta-catenin and Wnt-RhoA-Rac1 pathways. *J Cell Biol* 2009;184:83-99.

37. Chen PI, Cao A, Miyagawa K, Tojais NF, Hennigs JK, Li CG, Sweeney NM, Inglis AS, Wang L, Li D, Ye M, Feldman BJ, Rabinovitch M. Amphetamines promote mitochondrial dysfunction and DNA damage in pulmonary hypertension. *JCI Insight* 2017;2:e90427.

38. Fong LY, Fidanza V, Zanesi N, Lock LF, Siracusa LD, Mancini R, Siprashvili Z, Ottey M, Martin SE, Druck T, McCue PA, Croce CM, Huebner K. Muir-Torre-like syndrome in Fhit-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:4742-4747.

39. Zanesi N, Fidanza V, Fong LY, Mancini R, Druck T, Valtieri M, Rudiger T, McCue PA, Croce CM, Huebner K. The tumor spectrum in F H I T - deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:10250-10255.

40. Metzger RJ, Klein OD, Martin GR, Krasnow MA. The branching programme of mouse lung development. *Nature* 2008;453:745-750.

41. Abe K, Toba M, Alzoubi A, Ito M, Fagan KA, Cool CD, Voelkel NF, McMurtry IF, Oka M. Formation of plexiform lesions in experimental severe pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 2010;121:2747-2754.

42. Meyrick BO, Friedman DB, Billheimer DD, Cogan JD, Prince MA, Phillips JA, Loyd JE. Proteomics of transformed lymphocytes from a family with familial pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2008;177:99-107.

43. Gu M, Shao NY, Sa S, Li D, Termglinchan V, Ameen M, Karakikes I, Sosa G, Grubert F, Lee J, Cao A, Taylor S, Ma Y, Zhao Z, Chappell J, Hamid R, Austin ED, Gold JD, Wu JC, Snyder MP, Rabinovitch M. Patient-Specific iPSC-Derived Endothelial Cells Uncover Pathwa

10

20

30

40

50

- ys that Protect against Pulmonary Hypertension in BMPR2 Mutation Carriers. *Cell Stem Cell* 2017;20:490-504.e495.
44. Nicolls MR, Taraseviciene-Stewart L, Rai PR, Badesch DB, Voelkel NF. Autoimmunity and pulmonary hypertension: a perspective. *Eur Respir J* 2005;26:1110-1118.
45. Rabinovitch M, Guignabert C, Humbert M, Nicolls MR. Inflammation and immunity in the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. *Circ Res* 2014;115:165-175. 10
46. Hemnes AR, Trammell AW, Archer SL, Rich S, Yu C, Nian H, Penner N, Funke M, Wheeler L, Robbins IM, Austin ED, Newman JH, West J. Peripheral blood signature of vasodilator-responsive pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 2015;131:401-409; discussion 409.
47. Silva Soares EW, de Lima Santos SC, Bueno AG, Cavalli IJ, Cavalli LR, Fouto Matias JE, de Souza Fonseca Ribeiro EM. Concomitant loss of heterozygosity at the BRCA1 and FHIT genes as a prognostic factor in sporadic breast cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 2010;199:24-30. 20
48. Andriani F, Roz E, Caserini R, Conte D, Pastorino U, Sozzi G, Roz L. Inactivation of both FHIT and p53 cooperate in deregulating proliferation-related pathways in lung cancer. *J Thorac Oncol* 2012;7:631-642 30
49. Pekarsky Y, Zanesi N, Palamarchuk A, Huebner K, Croce CM. FHIT: from gene discovery to cancer treatment and prevention. *Lancet Oncol* 2002;3:748-754.
50. Paisie CA, Schrock MS, Karras JR, Zhang J, Miura S, Ouda IM, Waters CE, Saldivar JC, Druck T, Huebner K. Exome-wide single-base substitutions in tissues and derived cell lines of the constitutive Fhit knock-out mouse. *Cancer Sci* 2016;107:528-535. 40
51. Schiess R, Senn O, Fischler M, Huber LC, Vatandaslar S, Speich R, Ulrich S. Tobacco smoke: a risk factor for pulmonary arterial hypertension? A case-control study. *Chest* 2010;138:1086-1092.
52. Huebner K, Croce CM. FRA3B and other common fragile sites: the weakest links. *Nat Rev Cancer* 2001;1:214-221.
53. Yoo YG, Christensen J, Huang LE. HIF-1 50

- confers aggressive malignant traits on human tumor cells independent of its canonical transcriptional function. *Cancer Res* 2011; 71:1244-1252.
54. Michael D, Rajewsky MF. Induction of the common fragile site FRA3B does not affect FHIT expression. *Oncogene* 2001; 20:1798-1801.
55. Jacquin S, Rincheval V, Mignotte B, Richard S, Humbert M, Mercier O, Londono-Vallejo A, Fadel E, Eddahibi S. Inactivation of p53 Is Sufficient to Induce Development of Pulmonary Hypertension in Rats. *PLoS One* 2015; 10:e0131940.
56. Yan W, Xu N, Han X, Zhou XM, He B. The clinicopathological significance of FHIT hypermethylation in non-small cell lung cancer, a meta-analysis and literature review. *Sci Rep* 2016; 6:19303.
57. Wali A. FHIT: doubts are clear now. *Scientific World Journal* 2010; 10:1142-1151.
58. Guler G, Iliopoulos D, Han SY, Fong LY, Lubet RA, Grubbs CJ, Huebner K. Hypermethylation patterns in the Fhit regulatory region are tissue specific. *Mol Carcinog* 2005; 43:175-181.
59. Tanaka H, Shimada Y, Harada H, Shinoda M, Hatooka S, Imamura M, Ishizaki K. Methylation of the 5' CpG island of the FHIT gene is closely associated with transcriptional inactivation in esophageal squamous cell carcinomas. *Cancer Res* 1998; 58:3429-3434.
60. Zochbauer-Muller S, Fong KM, Maitra A, Lam S, Geradts J, Ashfaq R, Virmani AK, Milchgrub S, Gazdar AF, Minna JD. 5' CpG island methylation of the FHIT gene is correlated with loss of gene expression in lung and breast cancer. *Cancer Res* 2001; 61:3581-3585.
61. Yang Q, Nakamura M, Nakamura Y, Yoshimura G, Suzuma T, Umemura T, Shimizu Y, Mori I, Sakurai T, Kakudo K. Two-hit inactivation of FHIT by loss of heterozygosity and hypermethylation in breast cancer. *Clin Cancer Res* 2002; 8:2890-2893.
62. Dhillon VS, Shahid M, Husain SA. CpG methylation of the FHIT, FANCF, cyclin-D2, BRC A2 and RUNX3 genes in Granulosa cell tumors (GCTs) of ovarian origin. *Mol Cancer* 20

04;3:33.

63. Kim JS, Kim H, Shim YM, Han J, Park J, Kim DH. Aberrant methylation of the FHIT gene in chronic smokers with early stage squamous cell carcinoma of the lung. *Carcinogenesis* 2004;25:2165-2171.

64. Korner A, Mudduluru G, Manegold C, Allgayer H. Enzastaurin inhibits invasion and metastasis in lung cancer by diverse molecules. *Br J Cancer* 2010;103:802-811.

65. Zeng Y, Qu X, Li H, Huang S, Wang S, Xu Q, Lin R, Han Q, Li J, Zhao RC. MicroRNA-100 regulates osteogenic differentiation of human adipose-derived mesenchymal stem cells by targeting BMPR2. *FEBS Lett* 2012;586:2375-2381.

66. Sun Q, Mao S, Li H, Zen K, Zhang CY, Li L. Role of miR-17 family in the negative feedback loop of bone morphogenetic protein signaling in neuron. *PLoS One* 2013;8:e83067.

67. Brock M, Trenkmann M, Gay RE, Michel BA, Gay S, Fischler M, Ulrich S, Speich R, Huber LC. Interleukin-6 modulates the expression of the bone morphogenic protein receptor type II through a novel STAT3-microRNA cluster 17/92 pathway. *Circ Res* 2009;104:1184-1191.

68. Hansmann G, de Jesus Perez VA, Alastalo TP, Alvira CM, Guignabert C, Bekker JM, Schellong S, Urashima T, Wang L, Morrell NW, Rabinovitch M. An antiproliferative BMP-2/PARgamma/apoE axis in human and murine SMCs and its role in pulmonary hypertension. *J Clin Invest* 2008;118:1846-1857.

69. Brock M, Samillan VJ, Trenkmann M, Schwarzwald C, Ulrich S, Gay RE, Gassmann M, Ostergaard L, Gay S, Speich R, Huber LC. Antagomir directed against miR-20a restores functional BMPR2 signalling and prevents vascular remodelling in hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Eur Heart J* 2014;35:3203-3211.

70. Diebold I, Hennigs JK, Miyagawa K, Li CG, Nickel NP, Kaschwich M, Cao A, Wang L, Reddy S, Chen PI, Nakahira K, Alcazar MA, Hopper RK, Ji L, Feldman BJ, Rabinovitch M. BMPR2 preserves mitochondrial function and DNA during reoxygenation to promote endothelial cell survival and reverse pulmonary

10

20

30

40

50

- hypertension. Cell Metab 2015; 21: 596 - 608 .
71. Rabinovitch M. Molecular pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. J Clin Invest 2012; 122: 4306 - 4313 .
72. Aldred MA, Comhair SA, Varella-Garcia M, Asosingh K, Xu W, Noon GP, Thistlethwaite PA, Tudor RM, Erzurum SC, Geraci MW, Coldren CD. Somatic chromosome abnormalities in the lungs of patients with pulmonary arterial hypertension. Am J Respir Crit Care Med 2010; 182: 1153 - 1160 . 10
73. Cirombella R, Montrone G, Stoppacciaro A, Giglio S, Volinia S, Graziano P, Huebner K, Vecchione A. Fhit loss in lung preneoplasia: relation to DNA damage response checkpoint activation. Cancer Lett 2010; 291: 230 - 236 .
74. Drake KM, Dunmore BJ, McNelly LN, Morrell NW, Aldred MA. Correction of nonsense BMP2 and SMAD9 mutations by ataluren in pulmonary arterial hypertension. Am J Respir Cell Mol Biol 2013; 49: 403 - 409 . 20
75. Betapudi V, Shukla M, Alluri R, Merkulov S, McCrae KR. Novel role for p56/Lck in regulation of endothelial cell survival and angiogenesis. FASEB J 2016; 30: 3515 - 3526 .
76. Joannes A, Grelet S, Duca L, Gilles C, Kileztky C, Dalstein V, Birembaut P, Polette M, Nawrocki-Raby B. Fhit regulates EMT targets through an EGFR/Src/ERK/Slug signaling axis in human bronchial cells. Mol Cancer Res 2014; 12: 775 - 783 . 30
77. Joannes A, Bonnomet A, Bindels S, Polette M, Gilles C, Burlet H, Cutrona J, Zahm JM, Birembaut P, Nawrocki-Raby B. Fhit regulates invasion of lung tumor cells. Oncogene 2010; 29: 1203 - 1213 .
78. Suh SS, Yoo JY, Cui R, Kaur B, Huebner K, Lee TK, Aqeilan RI, Croce CM. FHIT suppresses epithelial-mesenchymal transition (EMT) and metastasis in lung cancer through modulation of microRNAs. PLoS Genet 2014; 10: e1004652 . 40
79. Smadja DM, Mauge L, Sanchez O, Silvestre JS, Guerin C, Godier A, Henno P, Gaussem P, Israel-Biet D. Distinct patterns of circulating endothelial cells in pulmonary hypertension. Eur Respir J 2010; 36: 1284 - 129 50

3 .

80. Vitali SH, Hansmann G, Rose C, Fernandez-Gonzalez A, Scheid A, Mitsialis SA, Kourembanas S. The Sugen 5416/hypoxia mouse model of pulmonary hypertension revisited: long-term follow-up. *Pulm Circ* 2014; 4: 619-629.

81. Gomez-Arroyo JG, Farkas L, Alhussaini AA, Farkas D, Kraskauskas D, Voelkel NF, Bogard HJ. The monocrotaline model of pulmonary hypertension in perspective. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2012; 302: L363-369.

82. Dean A, Nilsen M, Loughlin L, Salt IP, MacLean MR. Metformin Reverses Development of Pulmonary Hypertension via Aromatase Inhibition. *Hypertension* 2016; 68: 446-454.

83. Savai R, Al-Tamari HM, Sedding D, Kojonazarov B, Muecke C, Teske R, Capeocchi MR, Weissmann N, Grimminger F, Seeger W, Schermuly RT, Pullamsetti SS. Pro-proliferative and inflammatory signaling converge on FoxO1 transcription factor in pulmonary hypertension. *Nat Med* 2014; 20: 1289-1300.

84. Nwankwo N, Zhang Z, Wang T, Collins C, Resta L, Ermisch S, Day J, Decker R, Kornberg L, Nicol S, Thornton D, Armstrong DK, Carducci MA. Phase I study of enzastaurin and bevacizumab in patients with advanced cancer: safety, efficacy and pharmacokinetics. *Invest New Drugs* 2013; 31: 653-660.

85. Schmidinger M, Szczylik C, Sternberg CN, Kania M, Kelly CS, Decker R, Hamid O, Faelker T, Escudier B. Dose escalation and pharmacokinetics study of enzastaurin and sunitinib versus placebo and sunitinib in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Am J Clin Oncol* 2012; 35: 493-497.

86. Teicher BA, Alvarez E, Menon K, Esterman MA, Considine E, Shih C, Faul MM. Antiangiogenic effects of a protein kinase C $\beta$ -selective small molecule. *Cancer Chemother Pharmacol* 2002; 49: 69-77.

87. Podar K, Raab MS, Zhang J, McMillin D, Breitkreutz I, Tai YT, Lin BK, Munshi N, Hideshima T, Chauhan D, Anderson KC. Targeting PKC in multiple myeloma: in vitro and in vivo effects of the novel, orally available small-molecule inhibitor enzastaurin (LY317615.HCl). *Blood* 2007; 109: 1669-1677.

10

20

30

40

50

88. Bianchi F, Magnifico A, Olgiati C, Zanesi N, Pekarisky Y, Tagliabue E, Croce CM, Menard S, Campiglio M. FHIT-proteasome degradation caused by mitogenic stimulation of the EGF receptor family in cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:18981-18986.
89. Pichiorri F, Okumura H, Nakamura T, Garrison PN, Gasparini P, Suh SS, Druck T, McKell KA, Barnes LD, Croce CM, Huebner K. Correlation of fragile histidine triad (Fhit) protein structural features with effector interactions and biological functions. *J Biol Chem* 2009;284:1040-1049. 10
90. Hao et al., *Cell Communication and Signaling*, 11(1):59, August 2013.
- E1. Spiekerkoetter E, Tian X, Cai J, Hopper RK, Sudheendra D, Li CG, El-Bizri N, Sawada H, Haghighat R, Chan R, Haghighat L, de Jesus Perez V, Wang L, Reddy S, Zhao M, Bernstein D, Solow-Cordero DE, Beachy PA, Wandless TJ, Ten Dijke P, Rabinovitch M. FK506 activates BMPR2, rescues endothelial dysfunction, and reverses pulmonary hypertension. *J Clin Invest* 2013;123:3600-3613. 20
- E2. Chen R, Khatrri P, Mazur PK, Polin M, Zheng Y, Vaka D, Hoang CD, Shrager J, Xu Y, Vicent S, Butte AJ, Sweet-Cordero EA. A meta-analysis of lung cancer gene expression identifies PTK7 as a survival gene in lung adenocarcinoma. *Cancer Res* 2014;74:2892-2902. 30
- E3. Khatrri P, Roedder S, Kimura N, De Vusser K, Morgan AA, Gong Y, Fischbein MP, Robbins RC, Naesens M, Butte AJ, Sarwal MM. A common rejection module (CRM) for acute rejection across multiple organs identifies novel therapeutics for organ transplantation. *J Exp Med* 2013;210:2205-2221.
- E4. Li MD, Burns TC, Morgan AA, Khatrri P. Integrated multi-cohort transcriptional meta-analysis of neurodegenerative diseases. *Acta Neuropathol Commun* 2014;2:93. 40
- E5. Lee KC, Ouwehand I, Giannini AL, Thomas NS, Dibb NJ, Bijlmakers MJ. Lck is a key target of imatinib and dasatinib in T-cell activation. *Leukemia* 2010;24:896-900.
- E6. Draghici S, Sellamuthu S, Khatrri P. Babel's tower revisited: a universal resource for cross-referencing across annotation 50



- databases. *Bioinformatics* 2006; 22: 2934 - 2939.
- E7. Benjamini Y, Draai D, Elmer G, Kafkafi N, Golani I. Controlling the false discovery rate in behavior genetics research. *Behav Brain Res* 2001; 125: 279 - 284.
- E8. Spiekerkoetter E, Sung YK, Sudheendra D, Scott V, Del Rosario P, Bill M, Haddad F, Long-Boyle J, Hedlin H, Zamanian RT. Randomised placebo-controlled safety and tolerability trial of FK506 (tacrolimus) for pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J* 2017; 50.
- E9. Chen PI, Cao A, Miyagawa K, Tojais NF, Hennigs JK, Li CG, Sweeney NM, Inglis AS, Wang L, Li D, Ye M, Feldman BJ, Rabinovitch M. Amphetamines promote mitochondrial dysfunction and DNA damage in pulmonary hypertension. *JCI Insight* 2017; 2: e90427.
- E10. Metzger RJ, Klein OD, Martin GR, Krasnow MA. The branching programme of mouse lung development. *Nature* 2008; 453: 745 - 750.
- E11. Sheikh AQ, Misra A, Rosas IO, Adams RH, Greif DM. Smooth muscle cell progenitors are primed to muscularize in pulmonary hypertension. *Sci Transl Med* 2015; 7: 308ra159.
- E12. Austin ED, Lahm T, West J, Tofovic SP, Johansen AK, Maclean MR, Alzoubi A, Oka M. Gender, sex hormones and pulmonary hypertension. *Pulm Circ* 2013; 3: 294 - 314.
- E13. Hansmann G, Wagner RA, Schellong S, Perez VA, Urashima T, Wang L, Sheikh AY, Suen RS, Stewart DJ, Rabinovitch M. Pulmonary arterial hypertension is linked to insulin resistance and reversed by peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  activation. *Circulation* 2007; 115: 1275 - 1284.
- E14. Said SI, Hamidi SA, Dickman KG, Szema AM, Lyubsky S, Lin RZ, Jiang YP, Chen JJ, Wasek JA, Kort S. Moderate pulmonary arterial hypertension in male mice lacking the vasoactive intestinal peptide gene. *Circulation* 2007; 115: 1260 - 1268.
- E15. Dempsey Y, MacLean MR. The influence of gender on the development of pulmonary arterial hypertension. *Exp Physiol* 2013; 98: 1257 - 1261.
- E16. Czarnecka KH, Migdalska-Sek M, Domanska D, Pastuszak-Lewandoska D, Dutkowska A, K

ordiak J, Nawrot E, Kiszalkiewicz J, Antczak A, Brzezianska-Lasota E. FHIT promoter methylation status, low protein and high mRNA levels in patients with non-small cell lung cancer. *Int J Oncol* 2016; 49: 1175 - 1184.

E17. Zheng H, Tsuneyama K, Takahashi H, Miwa S, Nomoto K, Saito H, Masuda S, Takano Y. Expression of PTEN and FHIT is involved in regulating the balance between apoptosis and proliferation in lung carcinomas. *Anticancer Res* 2007; 27: 575 - 581.

E18. Pugh ME, Hemnes AR. Pulmonary hypertension in women. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2010; 8: 1549 - 1558.

E19. Rabelo RA, Antunes LM, Etchebehere RM, Nomelini RS, Nascentes GA, Murta EF, Pedrosa AL. Loss of heterozygosity in the fragile histidine triad (FHIT) locus and expression analysis of FHIT protein in patients with breast disorders. *Clin Exp Obstet Gynecol* 2013; 40: 89 - 94.

10

20

【図 1 A - 1 E】

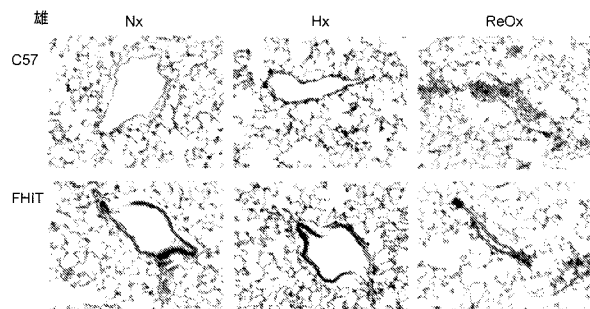
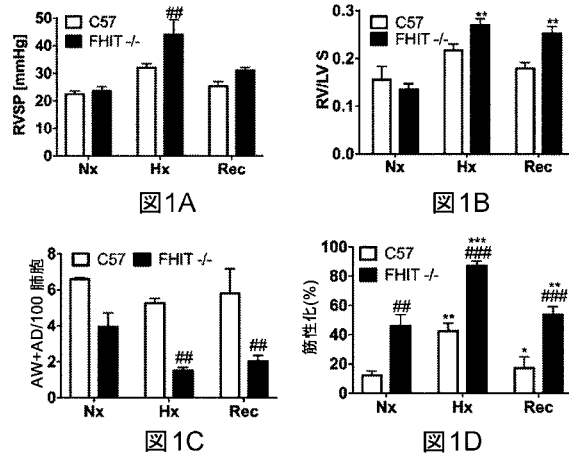


図 1E

【図 1 F】

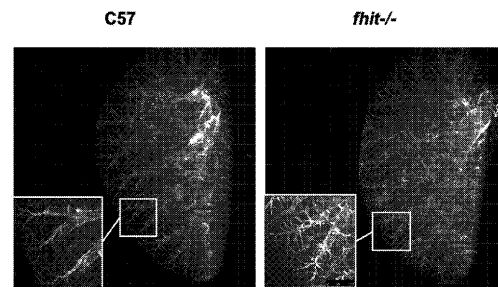


FIG. 1F

【図 1 G】

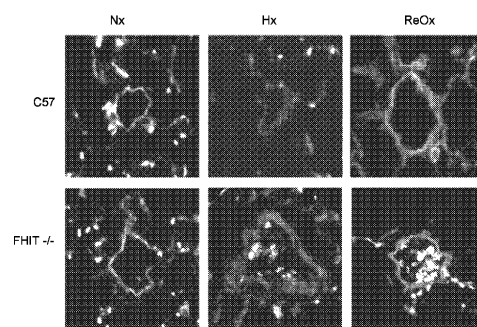


FIG. 1G

【図 1 H - 1 K】



図 1H

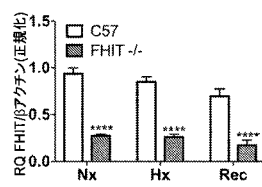


図 1I

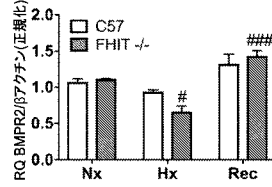


図 1J

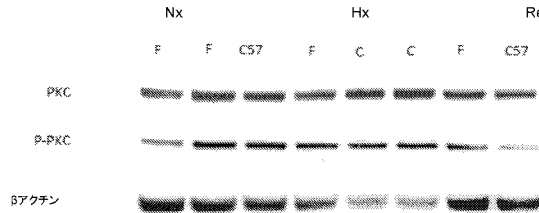


図 1K

【図 2 A - 2 D】

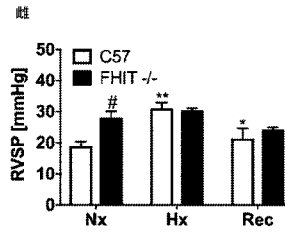


図 2A

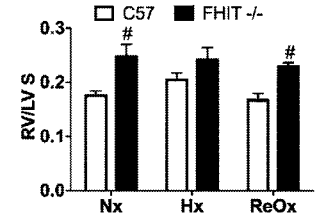


図 2B

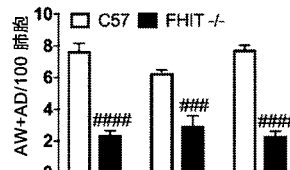


図 2C

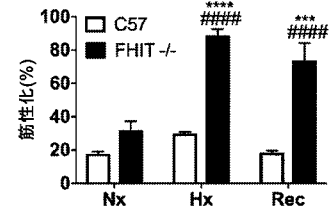


図 2D

【図 2 E】

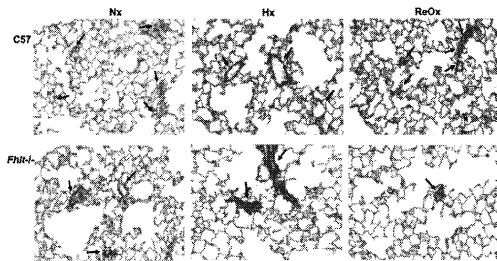


FIG. 2E

【図 2 F】

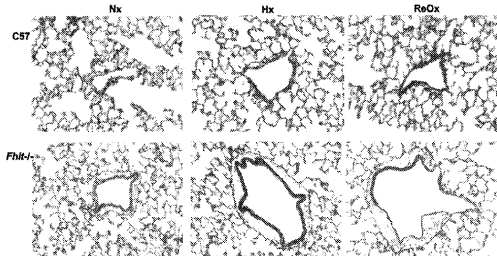


FIG. 2F

【図 3 A - 3 D】

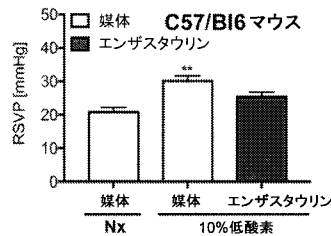


図 3A

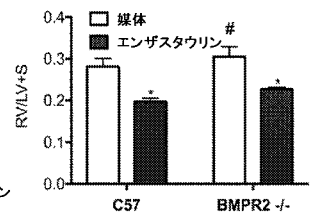


図 3B

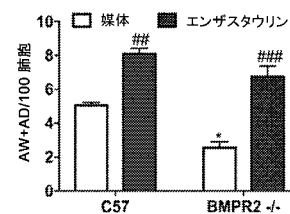


図 3C

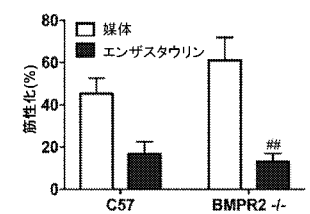


図 3D

【図3E - 3F】

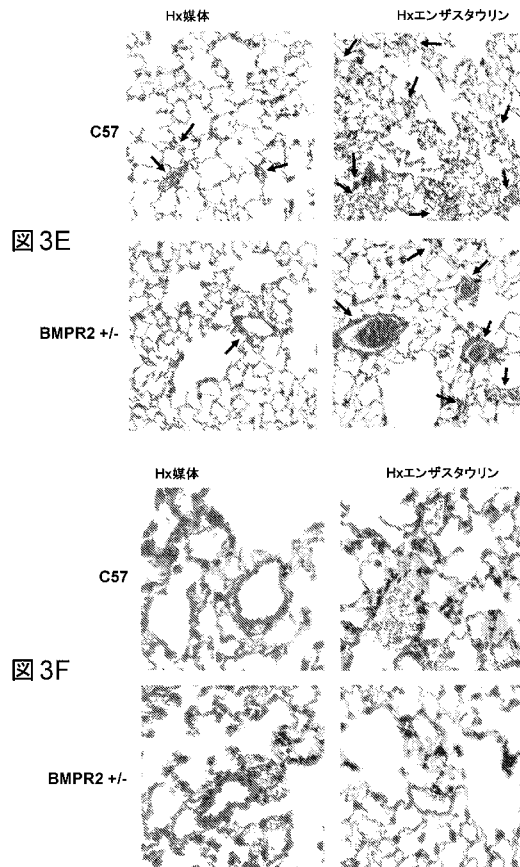


図3E

図3F

【図4A - 4D】

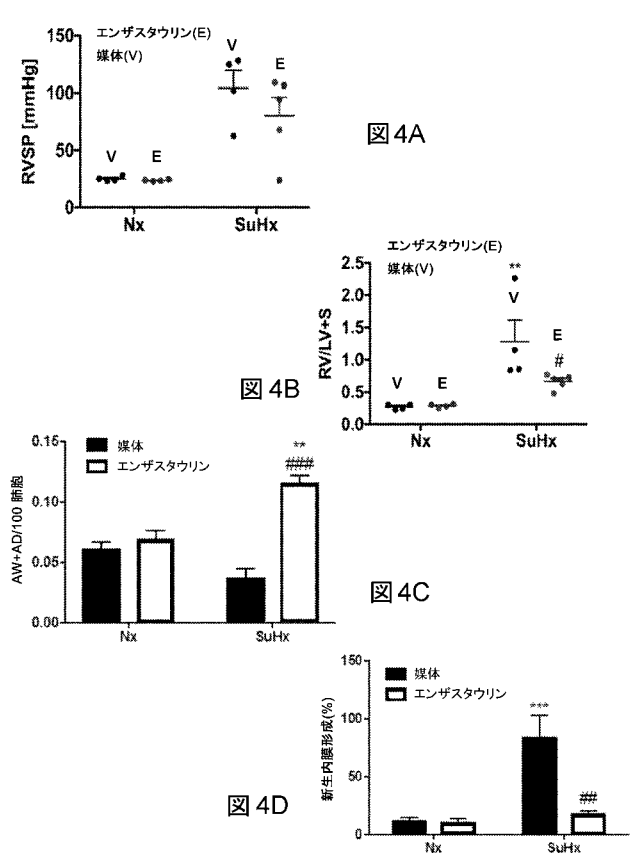


図4A

図4B

図4C

図4D

【図4E - 4F】

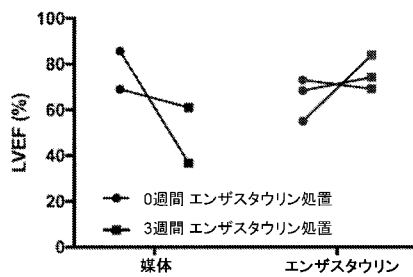


図4E

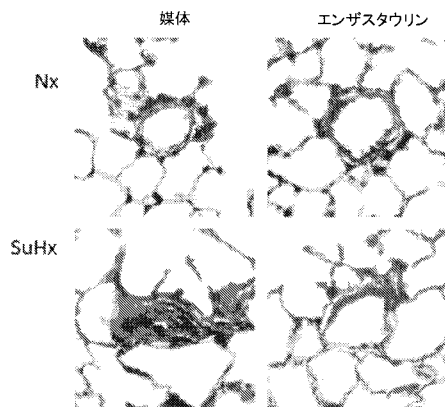


図4F

【図5】

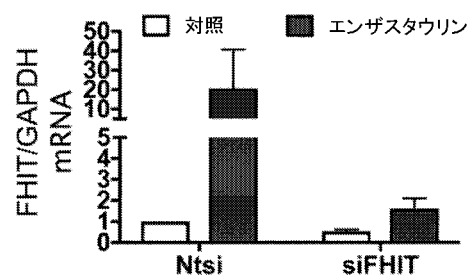


図5

【図 6 A】

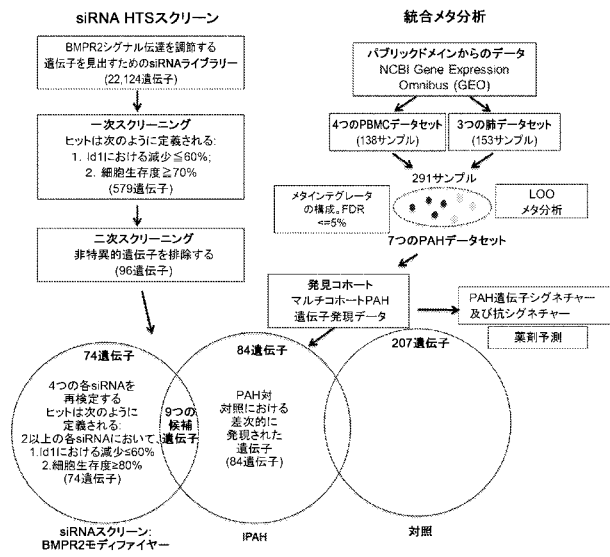


図 6A

【図 6 B】

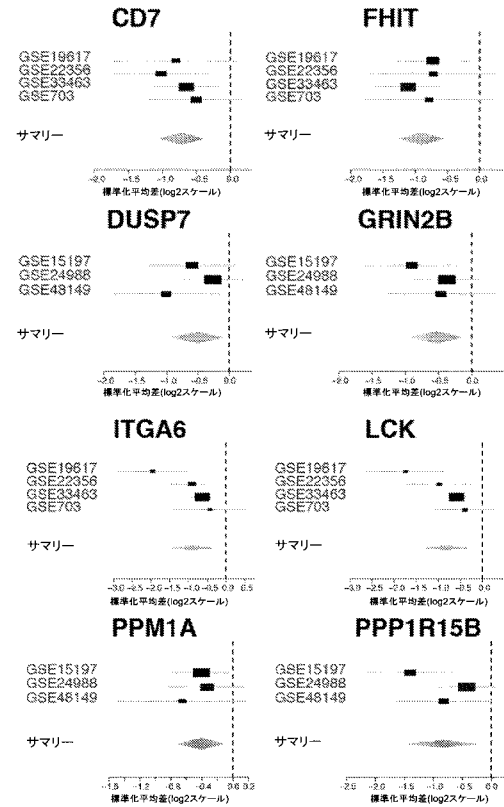


図 6B

【図 6 C】

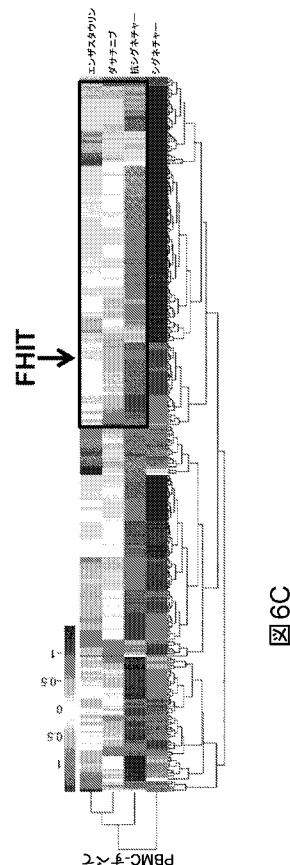
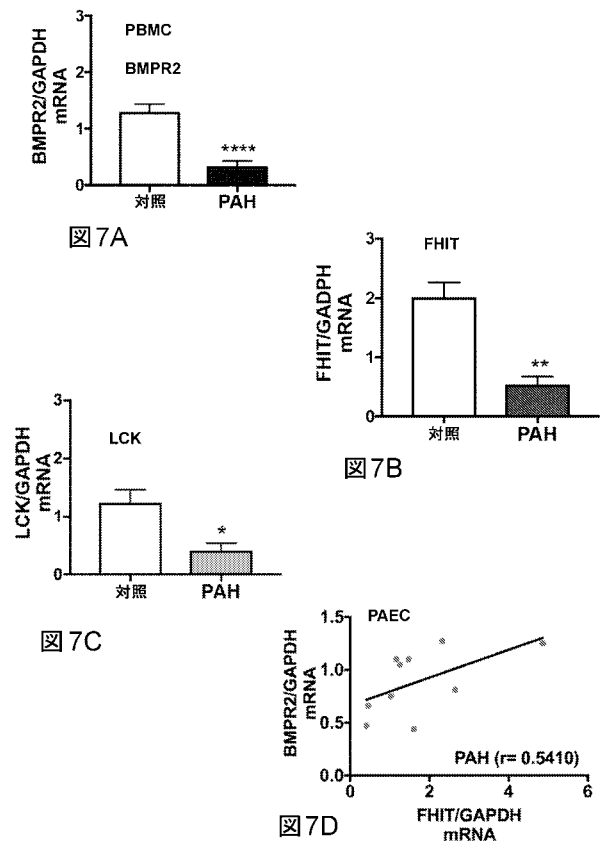


図 6C

【図 7 A - 7 D】



【 図 7 E 】

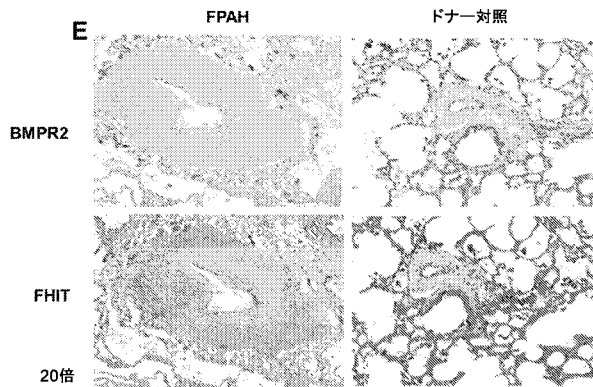
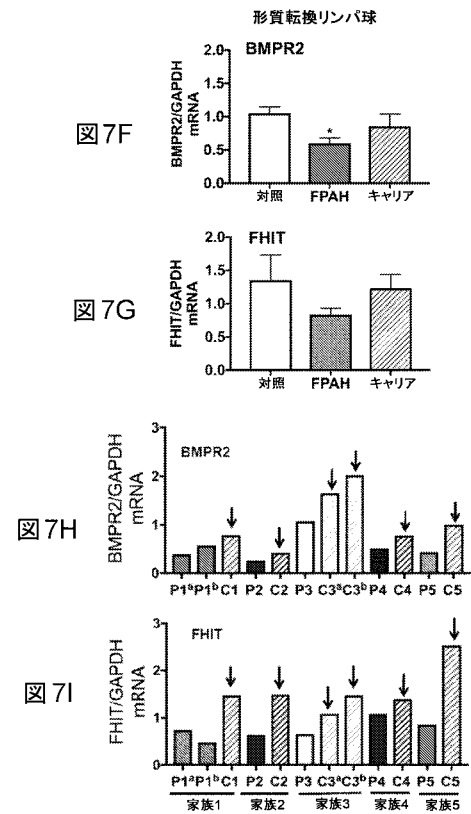
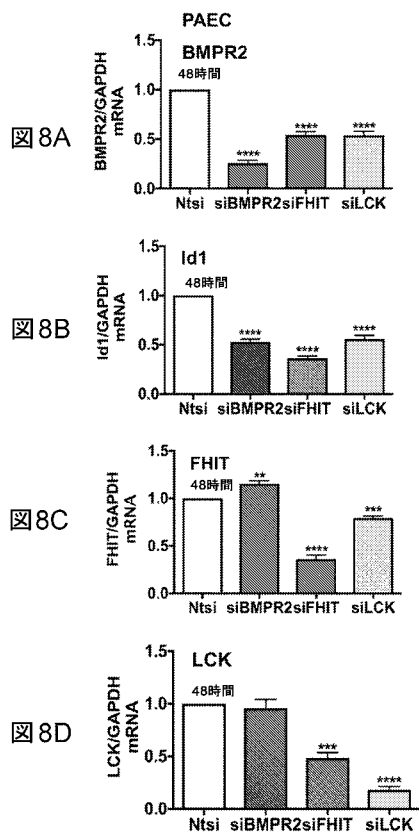


図 7E

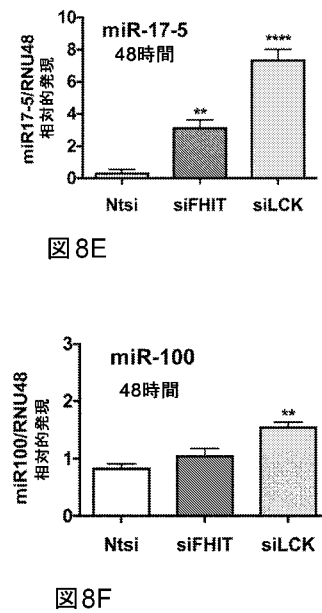
【 図 7 F - 7 I 】



【 図 8 A - 8 D 】



【 図 8 E - 8 F 】



【 図 8 G - 8 J 】

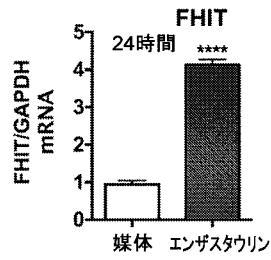


図 8G

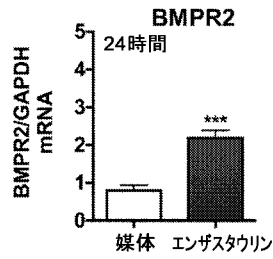


図 8H

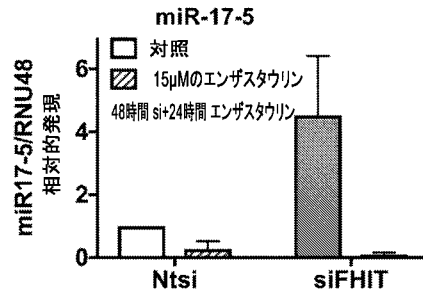


図 8K

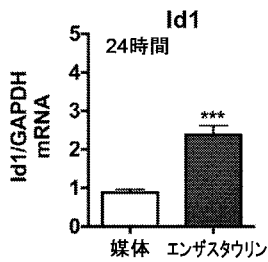


図 8I

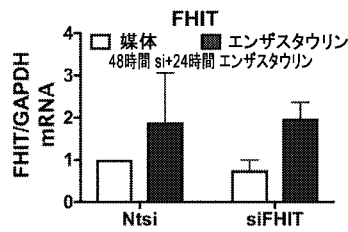


図 8J

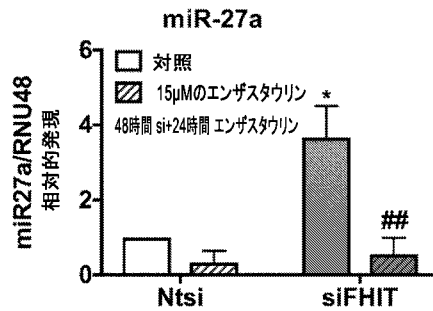


図 8L

【 図 8 M 】

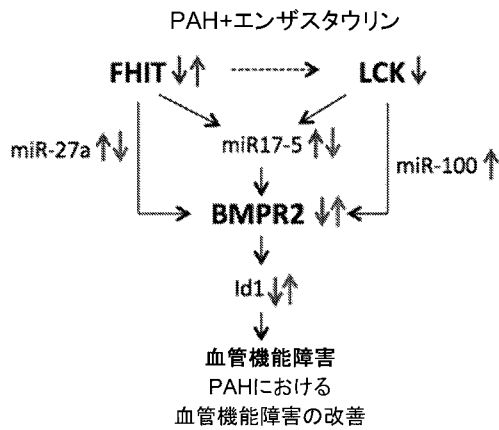


図 8M

【 図 9 A - 9 B 】

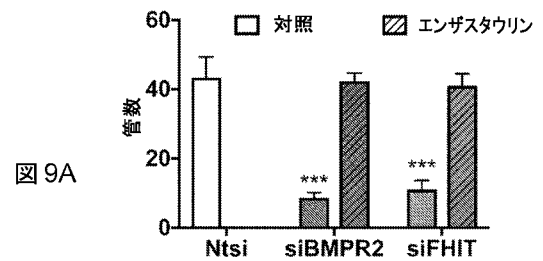
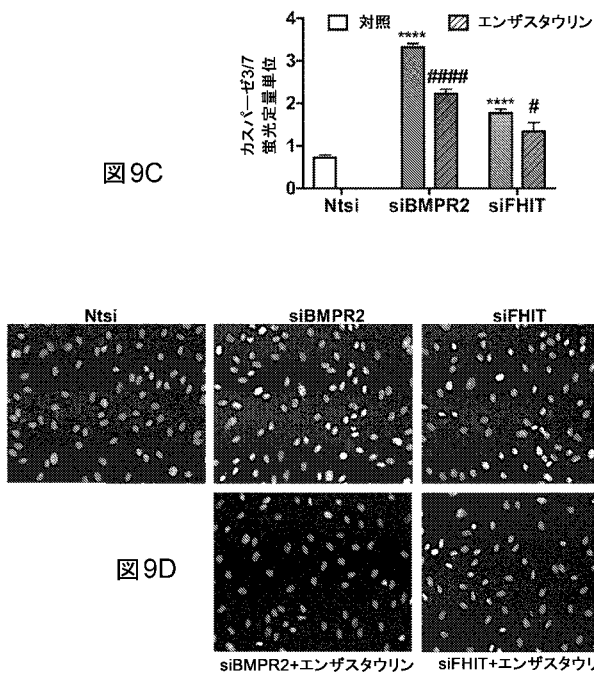


図 9A

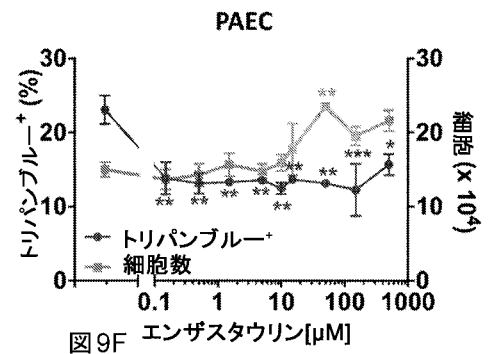
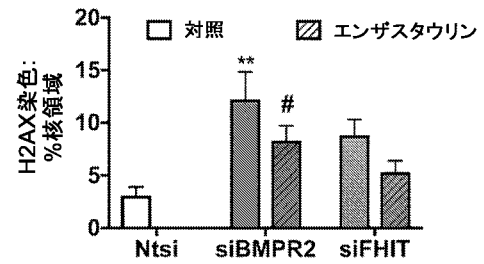


図 9B

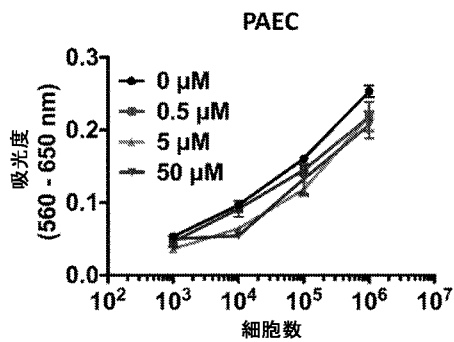
【 図 9 C - 9 D 】



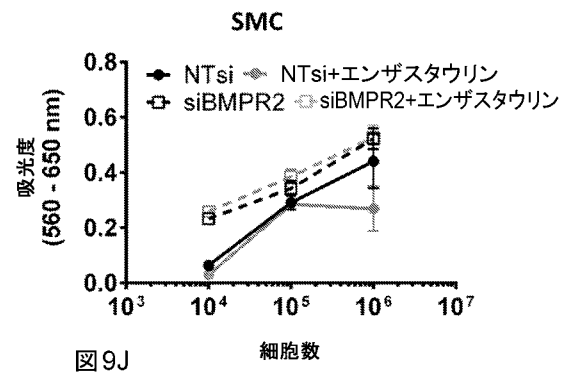
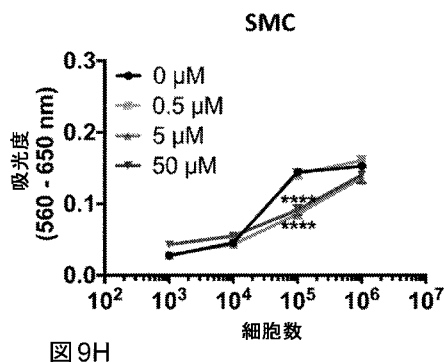
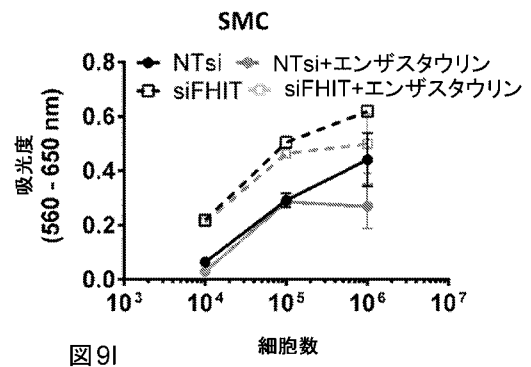
【 図 9 E - 9 F 】



【 図 9 G - 9 H 】



【 図 9 I - 9 J 】





【図10A】

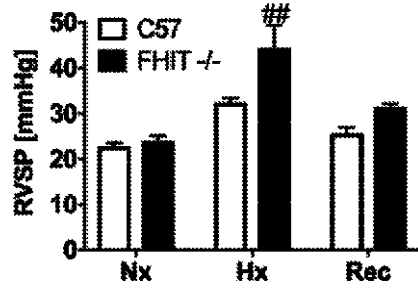


FIG. 10A

【図10B】

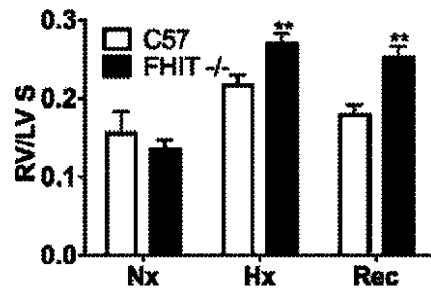


FIG. 10B

【図10D - 10F】

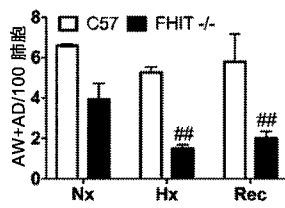


図10D

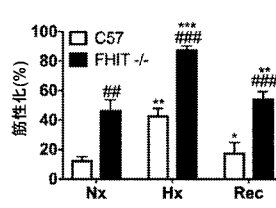


図10E

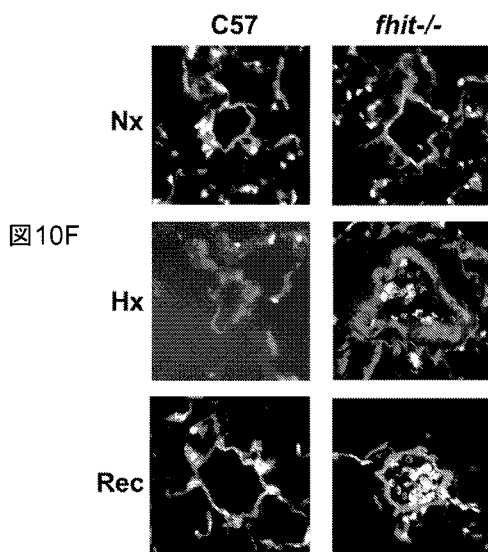


図10F

【図10C】

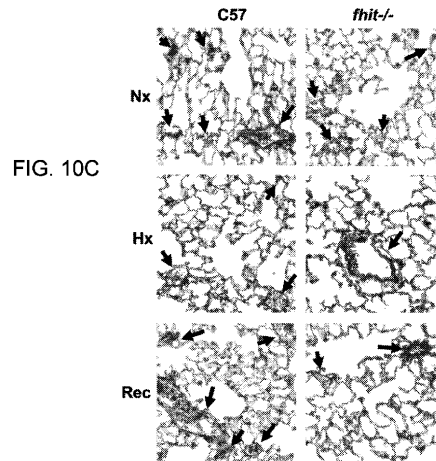


FIG. 10C

【図10G - 10H】

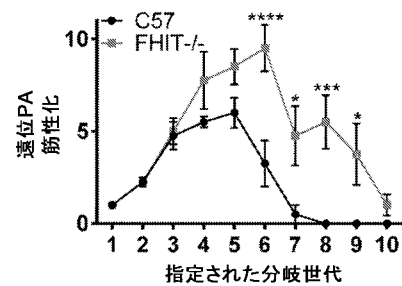


図10G

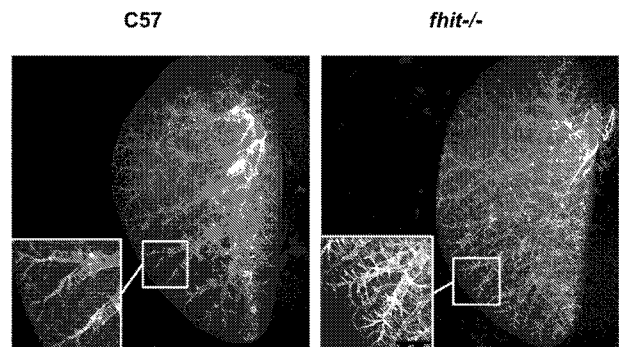


図10H

【図10I】

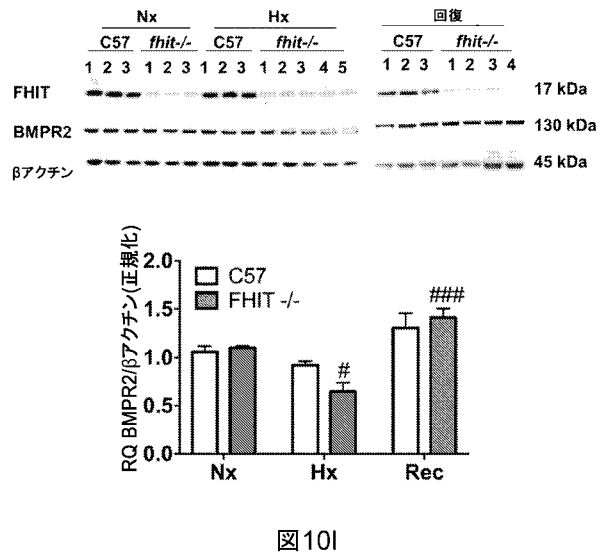


図10I

【図11A - 11B】

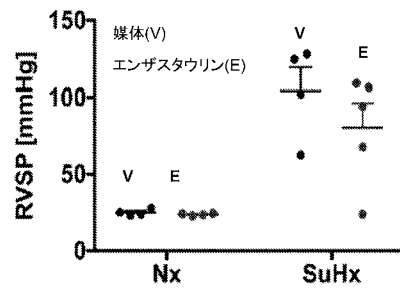


図11A

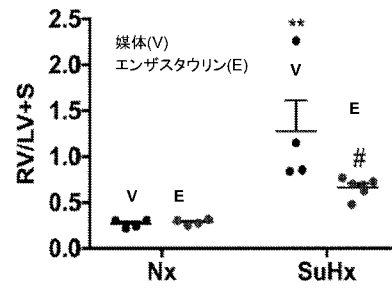


図11B

【図11C - 11E】

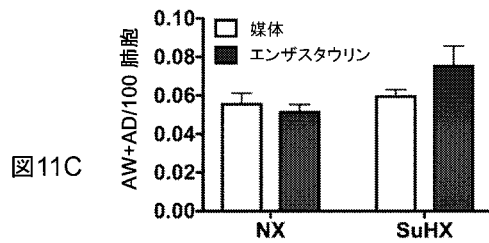


図11C

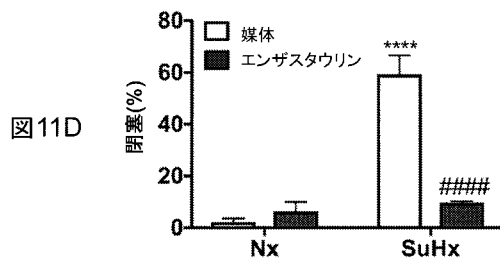


図11D

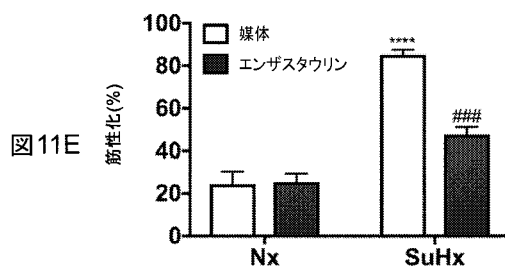


図11E

【図11F】

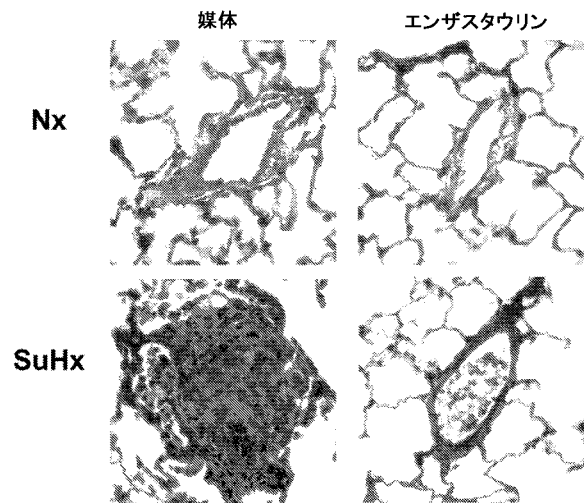


図11F

【図 11 G - 11 H】

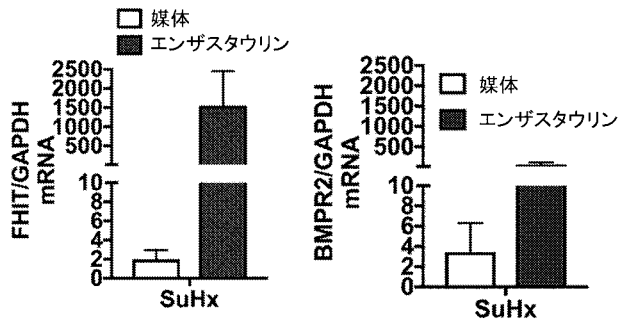


図11G

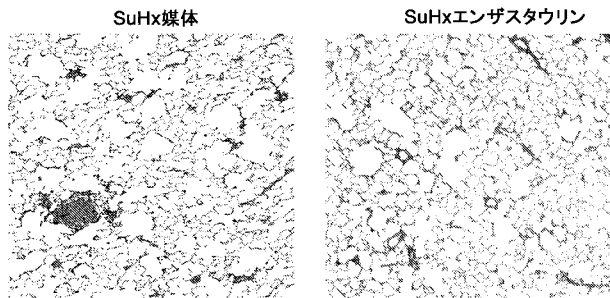


図11H

【図 11 I - 11 K】

図11I

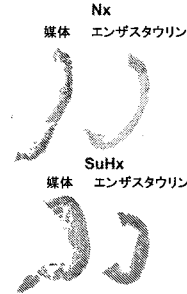
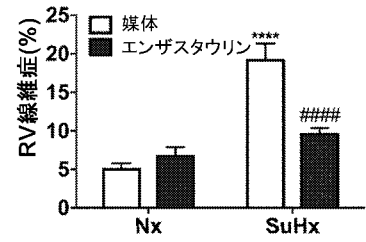


図11J

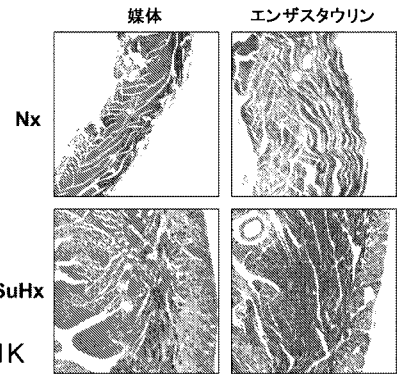


図11K

【図 12】

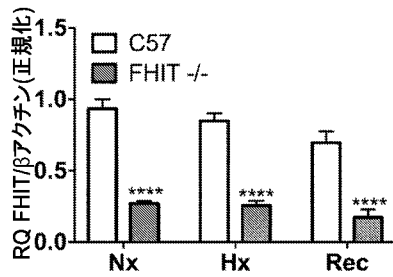


図12

【図 13 A - 13 C】

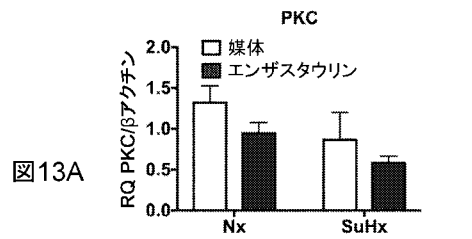


図13A

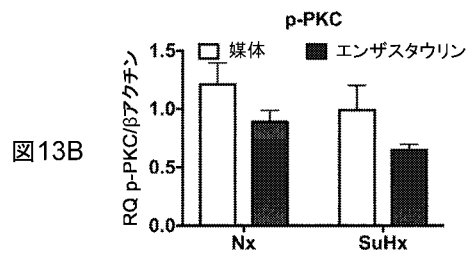


図13B

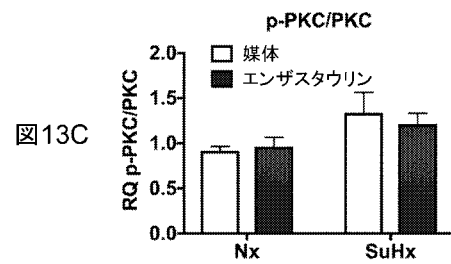


図13C

【 図 1 3 D 】

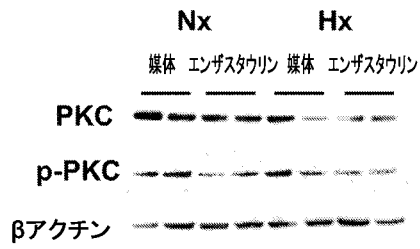


図 13D

【 図 1 4 A - 1 4 C 】

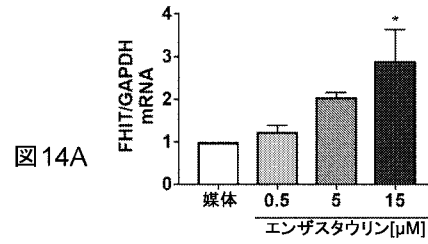


図 14A

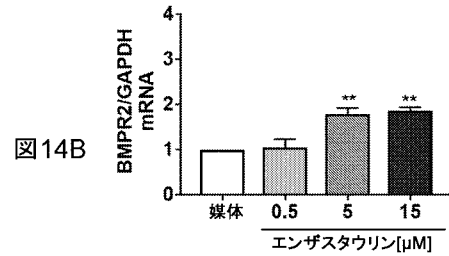


図 14B

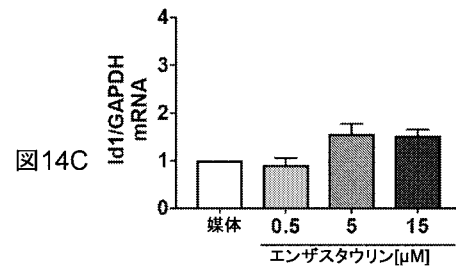


図 14C

【 図 1 5 A - 1 5 F 】

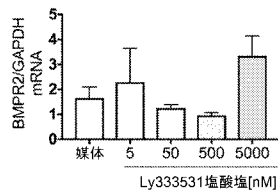


図 15A

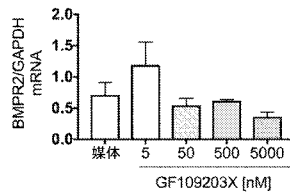


図 15B

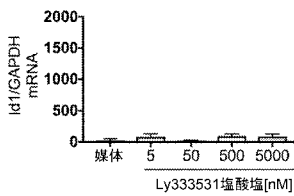


図 15C

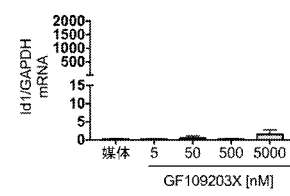


図 15D

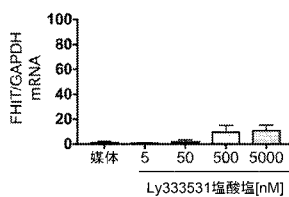


図 15E

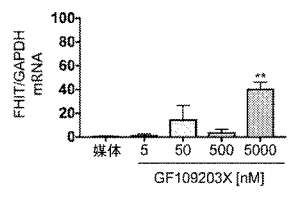


図 15F

【 図 1 6 】

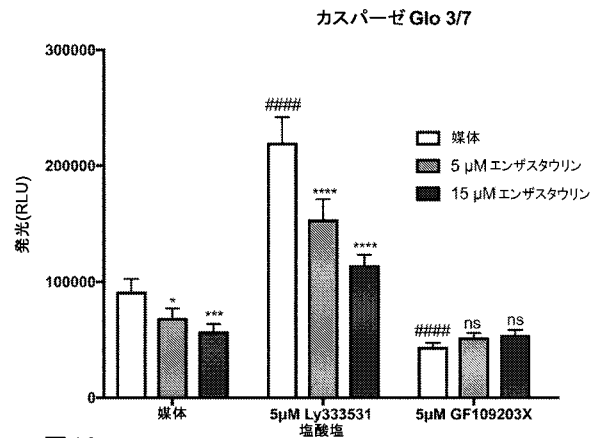


図 16

【 図 17 A 】

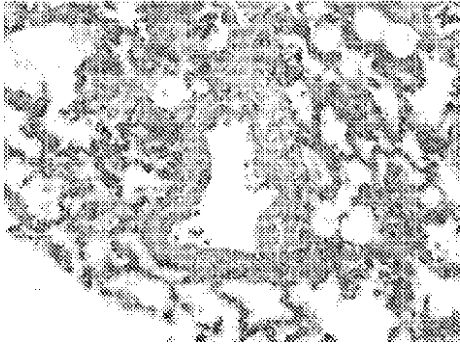


FIG. 17A

【 図 17 B 】

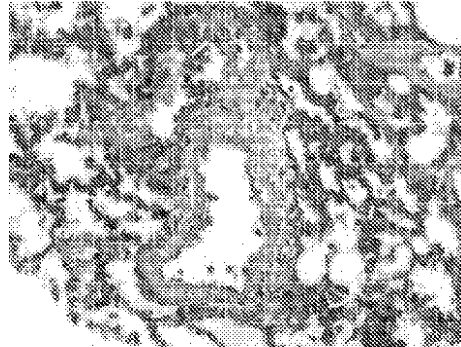


FIG. 17B

【 図 18 A - 18 D 】

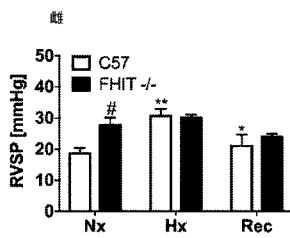


図18A

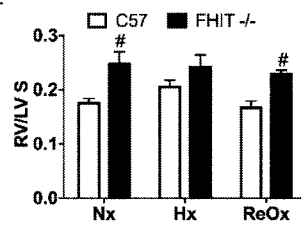


図18B

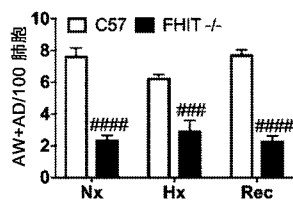


図18C

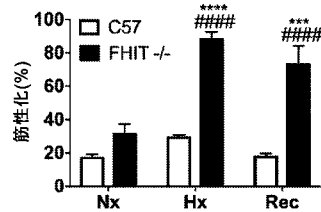


図18D

【 図 18 E 】

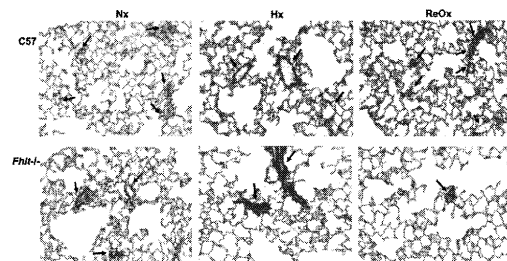


FIG. 18E

【 図 18 F 】

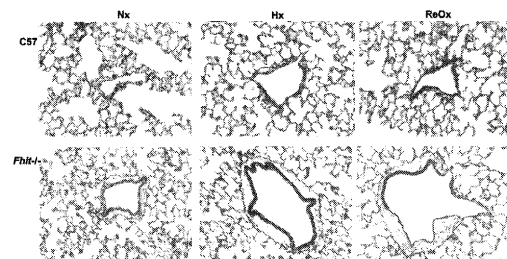
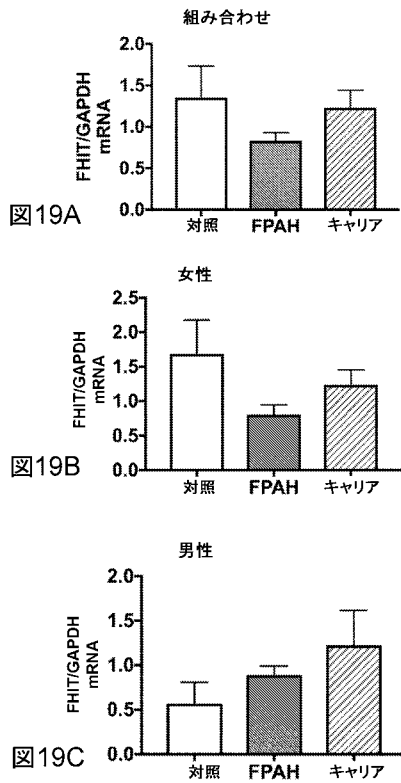
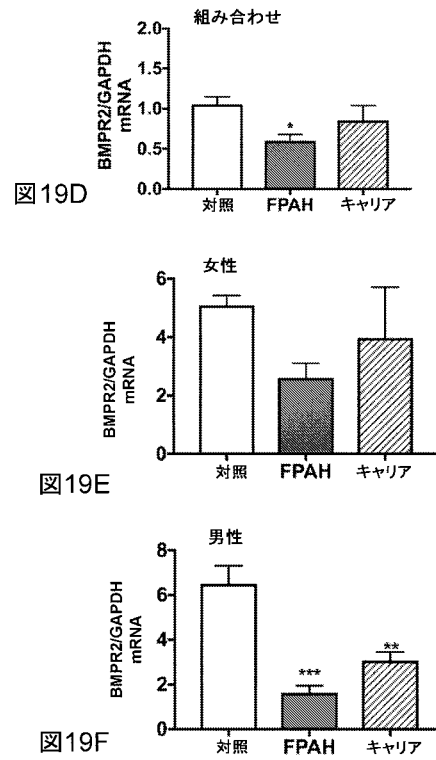


FIG. 18F

【図19A - 19C】



【図19D - 19F】



【図19G - 19H】

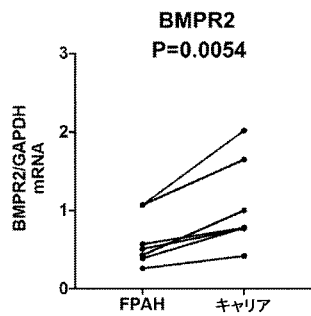


図19G

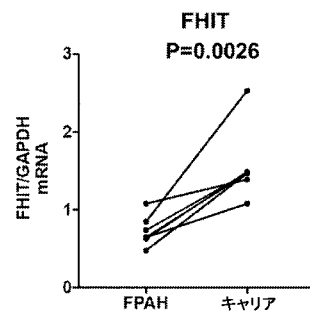
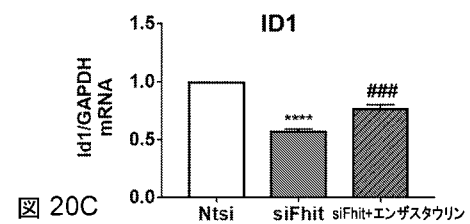
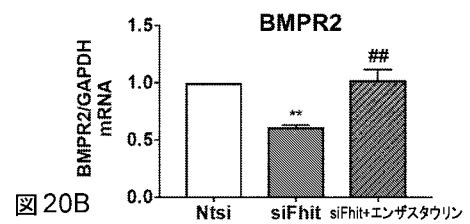
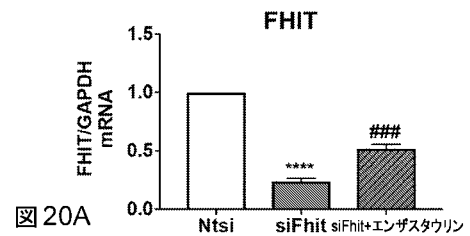


図19H

【図20A - 20C】



【図 2 1 A - 2 1 D】

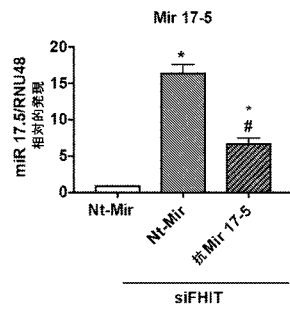


図 21A

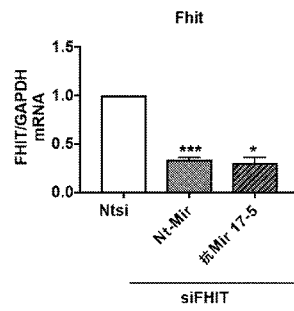


図 21B

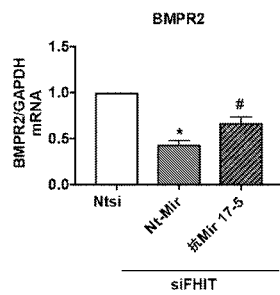


図 21C

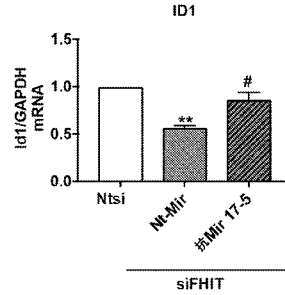


図 21D

【図 2 2】

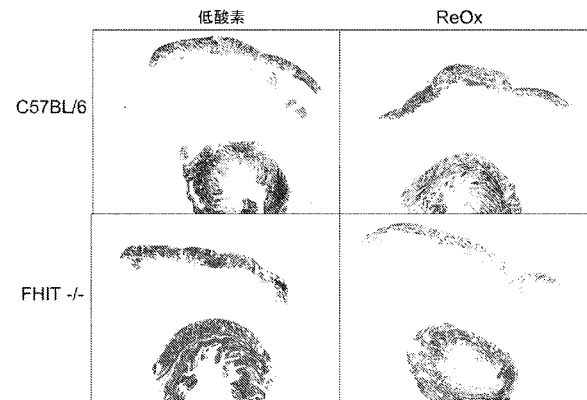


図 22

【図 2 3 A - 2 3 C】

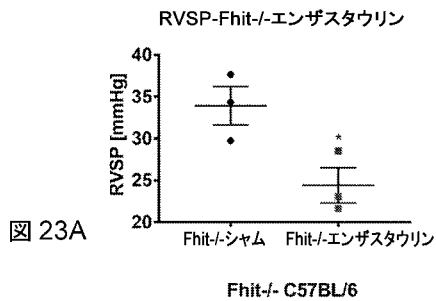


図 23A

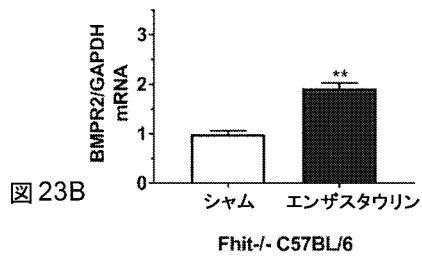


図 23B

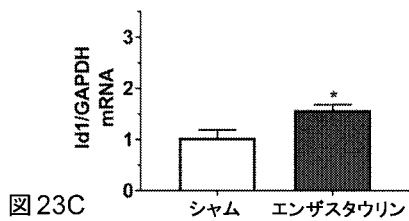


図 23C

【図 2 4 A - 2 4 D】

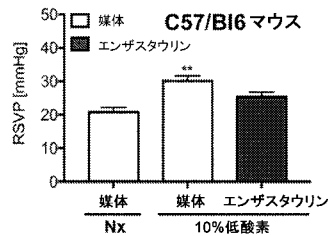


図 24A

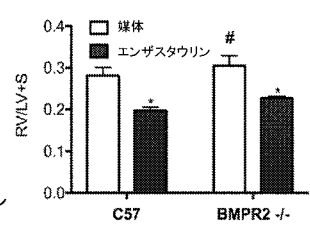


図 24B

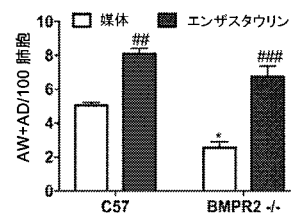


図 24C

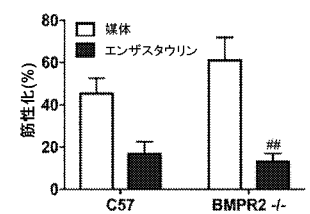
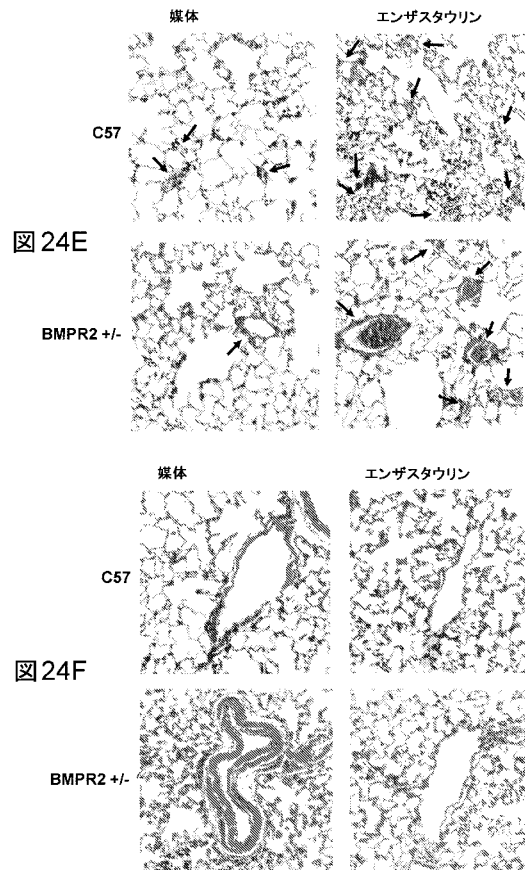


図 24D

【 図 2 4 E - 2 4 F 】



【 図 2 4 G 】

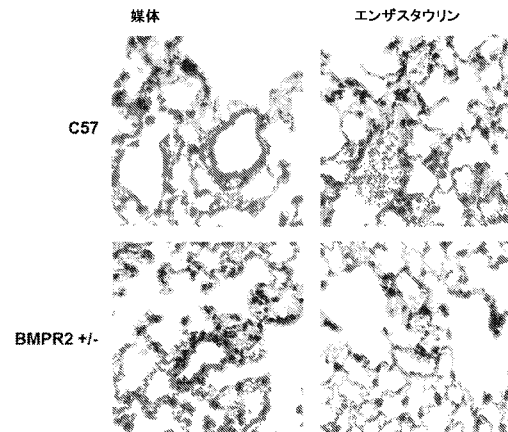
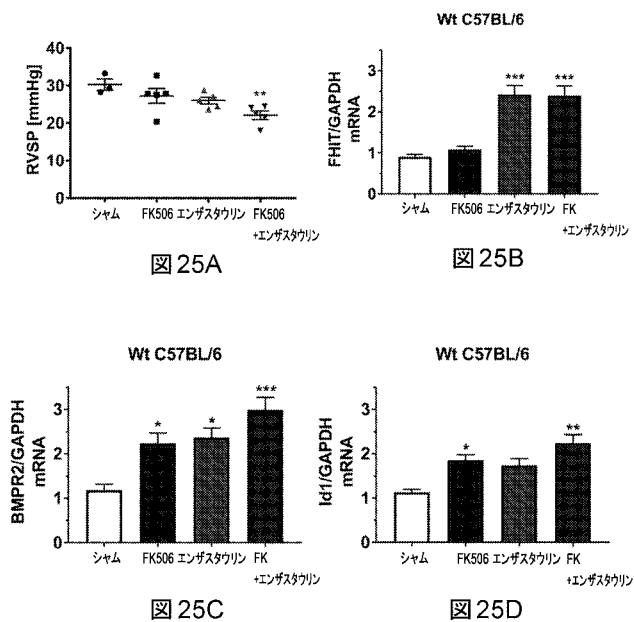


図 24G

【 図 2 5 A - 2 5 D 】



【 図 2 6 】

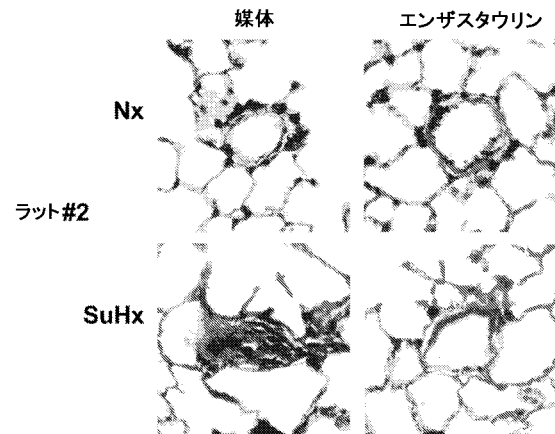


図 26



## 【図 27 A - 27 B】

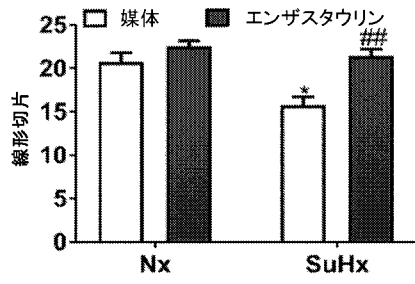


図 27A

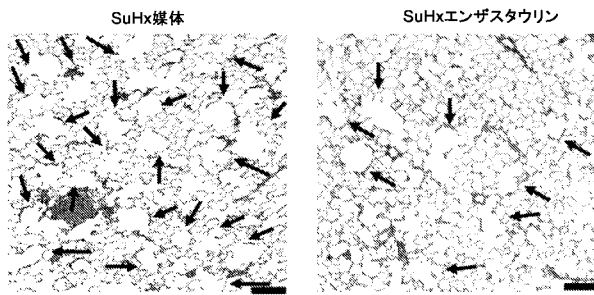


図 27B

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US2018/033533

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(8) - A61K 38/00; A61K 45/00; A61K 45/06; A61P 11/00; G01N 1/00 (2018.01) CPC - A61K 45/06; A61P 11/00; C12Q 2600/106; C12Q 2600/136; C12Q 2600/158 (2018.05)		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) See Search History document		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC - 424/55.7; 514/1.5; 514/15.6 (keyword delimited)		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) See Search History document		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X -- Y	US 2016/0296588 A1 (STC.UNM) 13 October 2016 (13.10.2016) entire document	1-8, 59-62, 93-96 ----- 66
X -- Y	US 2002/0137086 A1 (OLEK et al) 26 September 2002 (26.09.2002) entire document	63-65, 67 ----- 66, 84-89
X	WO 2015/116735 A1 (MAYO FOUNDATION FOR MEDICAL EDUCATION AND RESEARCH) 06 August 2015 (06.08.2015) entire document	83
Y	SUDHEEDRA et al. "A3875: Targeting a Novel BMPR2 Modifier Gene, FHIT, with a Repurposed Drug to Improve Pulmonary Hypertension," American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 16 May 2016 (16.05.2016), Vol. 193, Abstract only, Pg. 1 of 1. entire document	84-89
Y	US 2014/0135358 A1 (SPIEKERKOTTER et al) 15 May 2014 (15.05.2014) entire document	88, 89
A	US 2011/0091421 A1 (MANN) 21 April 2011 (21.04.2011) entire document	1-8, 59-67, 83-91, 93-96
A	SUNG et al. "Novel Approaches to Pulmonary Arterial Hypertension Drug Discovery," Expert Opin Drug Discovery, 27 February 2016 (27.02.2016), Vol.11, Iss. 4, Pgs. 407-414. entire document	1-8, 59-67, 83-91, 93-96
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 09 July 2018		Date of mailing of the international search report <b>09 AUG 2018</b>
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer Blaine R. Copenheaver PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US2018/033533

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, A	PROSEDA et al. "A4228: Enzastaurin Reverses Pulmonary Arterial Hypertension By Targeting The Novel Mnpr2 Modifier Fhit," Am J Respir Crit Care Med, 22 May 2017 (22.05.2017), Vol. 195, Abstract only, Pg. 1 of 1. entire document	1-8, 59-67, 83-91, 93-96

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2018/033533

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claims Nos.: 9-58, 68-82, 92  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード ( 参考 )
A 6 1 P 7/02 (2006.01)	A 6 1 P 7/02	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 K 38/46 (2006.01)	A 6 1 K 38/46	
A 6 1 K 31/7105 (2006.01)	A 6 1 K 31/7105	
A 6 1 K 31/5575 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1	
A 6 1 K 31/56 (2006.01)	A 6 1 K 31/5575	
A 6 1 K 31/706 (2006.01)	A 6 1 K 31/56	
A 6 1 K 45/06 (2006.01)	A 6 1 K 31/706	
G 0 1 N 33/68 (2006.01)	A 6 1 K 45/06	
G 0 1 N 33/50 (2006.01)	G 0 1 N 33/68	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/50 P	
C 1 2 N 15/12 (2006.01)	G 0 1 N 33/53 D	
C 1 2 N 15/113 (2010.01)	C 1 2 N 15/12	
C 1 2 Q 1/6844 (2018.01)	C 1 2 N 15/113 Z	
C 1 2 Q 1/6869 (2018.01)	C 1 2 Q 1/6844 Z	
	C 1 2 Q 1/6869 Z	

(81)指定国・地域 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT

(72)発明者 スピーカーケッター, エッダ  
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 3 0 5 - 2 0 3 8, スタンフォード, メイン クワッド  
, ピー・オー・ボックス 2 0 3 8 6, オフィス オブ ザ ジェネラル カウンセル, ビルディ  
ング 1 7 0, サード フロア

(72)発明者 ダンネヴィッツ, プロッセダ, スヴェニヤ  
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 3 0 5 - 2 0 3 8, スタンフォード, メイン クワッド  
, ピー・オー・ボックス 2 0 3 8 6, オフィス オブ ザ ジェネラル カウンセル, ビルディ  
ング 1 7 0, サード フロア

(72)発明者 ティアン, スーフェイ  
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 3 0 5 - 2 0 3 8, スタンフォード, メイン クワッド  
, ピー・オー・ボックス 2 0 3 8 6, オフィス オブ ザ ジェネラル カウンセル, ビルディ  
ング 1 7 0, サード フロア

(72)発明者 カトリ, プーヴェシ  
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 3 0 5 - 2 0 3 8, スタンフォード, メイン クワッド  
, ピー・オー・ボックス 2 0 3 8 6, オフィス オブ ザ ジェネラル カウンセル, ビルディ  
ング 1 7 0, サード フロア

F ターム(参考) 2G045 AA25 CA25 CB01 DA13 DA36  
4B063 QA13 QA19 QQ02 QQ08 QQ42 QQ52 QR08 QR20 QR32 QR35  
QR55 QR62 QS25 QS32 QX02  
4C084 AA02 AA13 AA17 AA19 AA22 AA23 BA44 CA53 DC22 MA02  
NA05 NA14 ZA362 ZA421 ZA591 ZA612 ZB352 ZC192 ZC202 ZC411  
ZC412 ZC422 ZC751

4C086	AA01	AA02	DA01	DA08	EA16	MA01	MA02	MA03	MA04	MA52
	MA55	MA57	MA59	MA60	MA66	NA05	NA14	ZA42	ZA54	ZA59
	ZC41	ZC61	ZC75							

专利名称(译)	Enzastaurin和易碎的组氨酸三联体(fh1t)增强剂用于治疗肺动脉高压		
公开(公告)号	<a href="#">JP2020520906A</a>	公开(公告)日	2020-07-16
申请号	JP2019563129	申请日	2018-05-18
[标]申请(专利权)人(译)	斯坦福大学		
申请(专利权)人(译)	在利兰·斯坦福初级大学董事会		
发明人	スピーカーケッター,エツダ ダンネヴィッツ,プロッセダ,スヴェニヤ ティアン,スーフェイ カトリ,プーヴェシ		
IPC分类号	A61K31/4545 A61P11/00 A61P9/12 A61P43/00 A61K45/00 A61P7/02 A61K48/00 A61K38/46 A61K31/7105 A61K31/5575 A61K31/56 A61K31/706 A61K45/06 G01N33/68 G01N33/50 G01N33/53 C12N15/12 C12N15/113 C12Q1/6844 C12Q1/6869		
FI分类号	A61K31/4545 A61P11/00 A61P9/12 A61P43/00.121 A61K45/00 A61P7/02 A61K48/00 A61K38/46 A61K31/7105 A61P43/00.111 A61K31/5575 A61K31/56 A61K31/706 A61K45/06 G01N33/68 G01N33/50.P G01N33/53.D C12N15/12 C12N15/113.Z C12Q1/6844.Z C12Q1/6869.Z		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/CA25 2G045/CB01 2G045/DA13 2G045/DA36 4B063/QA13 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ08 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QR08 4B063/QR20 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS32 4B063/QX02 4C084/AA02 4C084/AA13 4C084/AA17 4C084/AA19 4C084/AA22 4C084/AA23 4C084/BA44 4C084/CA53 4C084/DC22 4C084/MA02 4C084/NA05 4C084/NA14 4C084/ZA362 4C084/ZA421 4C084/ZA591 4C084/ZA612 4C084/ZB352 4C084/ZC192 4C084/ZC202 4C084/ZC411 4C084/ZC412 4C084/ZC422 4C084/ZC751 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/DA01 4C086/DA08 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA02 4C086/MA03 4C086/MA04 4C086/MA52 4C086/MA55 4C086/MA57 4C086/MA59 4C086/MA60 4C086/MA66 4C086/NA05 4C086/NA14 4C086/ZA42 4C086/ZA54 4C086/ZA59 4C086/ZC41 4C086/ZC61 4C086/ZC75		
优先权	62/508881 2017-05-19 US		

# 摘要(译)

本发明提供了一种用增强FHIT活性的试剂,例如恩扎他汀治疗或预防肺动脉高压和肺气肿的方法。包括使用FHIT和/或BMP2水平选择患者进行治疗或监测治疗效果以及检查FHIT和/或BMP2突变的方法。本发明基于以下证据:恩扎他汀预防和指导在动物模型系统中诱导的肺动脉高压趋向于恢复,并且它通过上调FHIT和/或BMP2起作用。[选择图]图8M

患者 ID	性別	試験時の年齢	発見時の年齢	発見以来の生存	%無病の年数	BMP2 NMD 状態	関係
家族 1	P1a	男性	53	43	10	81	NMD+
	P1b	女性	39	25	14	64	NMD+
	C1	女性	74			100	NMD+
	C1b	男性	81			100	NMD+
家族 2	P2	女性	43	35	8	81	可能性低い, 未確認
	C2	女性	72			100	可能性低い, 未確認
家族 3	P3	女性	39	28	11	72	NMD-
	C3a	男性	39			100	NMD-
	C3b	女性	50			100	NMD-
家族 4	P4	男性	50	38	12	76	NMD+
	C4	女性	56			100	NMD+
家族 5	P5	男性	49	34	15	69	可能性低い, 未確認
	C5	男性	63			100	可能性低い, 未確認
家族 6	P6a	女性	65	28	37	43	NMD+
	P6b	女性	82	64	18	78	NMD+
	C6	男性	85			100	NMD+
	C7	女性	48	37	11	77	NMD+
家族 7	C7	男性	71			100	NMD+
	P8	女性	34	29	5	34	NMD-
	C8	女性	67			100	NMD-
	対照	女性 n=7 男性 n=3					