

(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 1            | テーマコード (参考) |
|-------------------------------------|----------------|-------------|
| A 61 K 31/4545 (2006.01)            | A 61 K 31/4545 | 2 G 04 5    |
| A 61 P 11/00 (2006.01)              | A 61 P 11/00   | 4 B 06 3    |
| A 61 P 9/12 (2006.01)               | A 61 P 9/12    | 4 C 08 4    |
| A 61 P 43/00 (2006.01)              | A 61 P 43/00   | 4 C 08 6    |
| A 61 K 45/00 (2006.01)              | A 61 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) | (71) 出願人 | 515158308<br>ザ ボード オブ トラスティーズ オブ<br>ザ レランド スタンフォード ジュニ<br>ア エニバーシティー<br>アメリカ合衆国、カリフォルニア州 94<br>305-2038, スタンフォード, メイ<br>ン クワッド ピー. オー. ボックス 2<br>0386, オフィス オブ ザ ゼネラル<br>カウンセル ビルディング 170, サ<br>ード フロア |
| (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) 國際出願番号        | PCT/US2018/033533            |          |  |
| (87) 國際公開番号        | W02018/213800                |          |  |
| (87) 國際公開日         | 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)                       |          |  |
|                    |                              | (74) 代理人 | 110001302<br>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(FHIT)増加剤

## (57) 【要約】

本発明は、FHIT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。FHIT及び/又はBMPR2のレベルを用い、且つFHIT及び/又はBMPR2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FHIT及び/又はBMPR2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

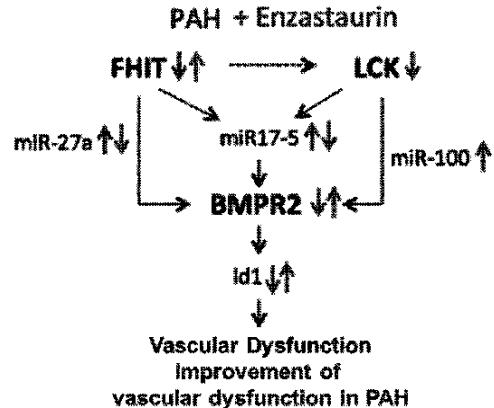


FIG. 8M

**【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) (FHT) 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 10  
とを特徴とする方法。

**【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 10  
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 10  
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 20  
とを特徴とする方法。

**【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 (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 (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 (muscularization) 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 (PH) 、肺動脈高血圧症 (PAH) 、慢性閉塞性肺疾患 (COPD) 又は肺気腫であることを特徴とする方法。 30

**【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 PH）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 PH）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 (COPD) 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、FHT、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、FHT、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、デシタビ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。

40

【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。

【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 II 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 RNA、例えば m i R 17 - 5 及び / 又は m i R 27 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】**

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。 20

**【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 > 100 mmHg 、平均 P A P 及び / 又は P V R の増加、右心不全、 R V H 增加、 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 4 1】

請求項 1 乃至 4 0 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 BMP R 2 を有する若しくは有することが疑われる、又は BMP R 2 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 4 2】

請求項 4 1 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 BMP R 2 レベル以下の BMP R 2 レベルを有することを特徴とする方法。

【請求項 4 3】

請求項 4 1 に記載の方法において、前記対象が、BMP R 2 遺伝子における点突然変異、付加及び／又は欠失、例えば、BMP R 2 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 4 4】

請求項 1 乃至 4 3 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 FHT を有する若しくは有することが疑われる、又は FHT 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 4 5】

請求項 4 4 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 FHT レベル以下の FHT レベルを有することを特徴とする方法。

【請求項 4 6】

請求項 4 4 に記載の方法において、前記対象が、FHT 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 FHT 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 4 7】

請求項 1 乃至 4 6 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 4 8】

請求項 1 乃至 4 7 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、インピ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 4 9】

請求項 1 乃至 4 8 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 5 0】

請求項 1 乃至 4 9 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 5 1】

請求項 5 0 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 5 2】

請求項 5 0 又は 5 1 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 5 3】

請求項 1 乃至 5 2 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。 20

**【請求項 5 9】**

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】**

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。 30

**【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、 40  
を含むことを特徴とする方法。

**【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

、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 6 7】

請求項 6 5 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 6 8】

請求項 6 3 乃至 6 7 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 10  
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。

【請求項 6 9】

請求項 6 3 乃至 6 8 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 7 0】

請求項 6 9 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 7 1】

請求項 6 9 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 7 2】

請求項 6 3 乃至 7 1 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增幅すること、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 7 3】

請求項 7 2 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 7 4】

請求項 7 2 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、 4 5 4 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 ナノポール配列決定、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、ナノボア 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 7 5】

請求項 6 3 乃至 7 4 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 7 6】

請求項 7 5 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 7 7】**

請求項 7 6 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 7 8】**

請求項 6 3 乃至 7 7 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 7 9】**

請求項 6 3 乃至 7 8 の何れか 1 項に記載の方法において、少なくとも 5 0 % の感度を有することを特徴とする方法。

**【請求項 8 0】**

請求項 6 3 乃至 7 9 の何れか 1 項に記載の方法において、少なくとも 5 0 % の特異性を有することを特徴とする方法。

**【請求項 8 1】**

請求項 6 3 乃至 8 0 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 8 2】**

請求項 8 1 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 8 3】**

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、1 0 0 0 m g / 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 8 4】**

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 8 5】**

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 8 6】**

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 . 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BMPR2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BMPR2を有する場合、有効量のFHT増加剤エンザスタウリン又は他のFHT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 8 7】**

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 . 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BMPR2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BMPR2を有する場合、有効量のFHT増加剤エンザスタウリン又は他のFHT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 8 8】**

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 . 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FHT増加剤エンザスタウリン又は他のFHT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 8 9】**

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 . 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FHT増加剤エンザスタウリン又は他のFHT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 0】**

FHT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FHTの突然変異について分析するステップと；
- c . FHTの突然変異が検出された場合、有効量のFHT増加剤エンザスタウリン又は他のFHT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 1】**

FHT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FHTの突然変異について分析するステップと；

10

20

30

40

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】**

**【0 0 0 1】**

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 6 2 / 5 0 8 8 8 1 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考により本明細書中に援用される。

**【0 0 0 2】**

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 K08HL107450-0 30 1 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。

**【0 0 0 3】**

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する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 (muscularization)）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（P A H）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（o c c l u s i v e p u l m o n a r y v a s c u l o p a t h y）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（B M P R 2）遺伝子における突然変異は、家族性P A H（F P A H）患者の約75%に存在し（1）、これはB M P R 2が該疾患の病態形成に明らかに関与している。B M P R 2の突然変異及びB M P R 2の発現低下が多くの特発性P A H（I P A H）及びF P A H患者において報告されたが（2～4）、臨床的P A H表現型を発現するのはB M P R 2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、B M P R 2シグナル伝達が決定的閾値未満に減少すること、又はP A H病態形成に関連したB M P R 2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P A H治療は、大部分の認可されたP A H薬が主に血管拡張薬又は潜在的なR V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。P A H、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、F H I T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。B M P R 2シグナル伝達を治療標的にすることは、B M P R 2の変異性状態に依存せずにP A H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、B M P R 2シグナル伝達を増強するとして再提起された薬剤F K 5 0 6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、F P A H及びI P A H患者におけるB M P R 2シグナル伝達又は発現を増強するためのB M P R 2モディファイイヤー遺伝子及びF H I T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、B M P R 2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s i R N Aスクリーン（H T S）を、公的に利用可能なP A H 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。s i R N Aスクリーンでは、I D 1発現による評価として、ノックダウンされるときにB M P R 2シグナル伝達を減少させるB M P R 2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P A H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、B M P R 2モディファイイヤー遺伝子がP A H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（F H I T）が、P A Hにおける有望なモディファイイヤー遺伝子であり、且つF H I T発現の減少が、インビトロ及びインビボで減少したB M P R 2シグナル伝達及び内皮細胞（E C）機能障害に関連したことが示される。

30

## 【0007】

F H I T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、F R A 3 B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）。腫瘍サプレッサー遺伝子F H I Tは、発癌物質又はストレッサー、例えばタバコ煙及びU V照射への曝露後、容易に失われる（14、15）。F H I T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、F H I Tは、潜在的にはそれをP A H内皮及び平滑筋細胞（P A S M C）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）。F H I T及びB M P R 2の発現は、リンパ腫再発を予防するための第I I I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F H I Tの増強により、実験的P H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、F H I TがP H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（（22）要約）。

#### 【0008】

以下の概要是、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】

#### 【0009】

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

30

40

50

#### 【0010】

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。

#### 【0011】

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

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。

#### 【0012】

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

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、

- 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；
- 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、1000mg／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。

#### 【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、  
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。

10

20

30

40

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BMPR2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BMPR2を有する場合、有効量のFHT増加剤エンザスタウリン又は他のFHT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 】**

10

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 . 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FHT増加剤エンザスタウリン又は他のFHT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 】**

20

さらに別の態様では、本発明は、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FHT増加剤エンザスタウリン又は他のFHT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 】**

30

さらに別の態様では、本発明は、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FHT増加剤エンザスタウリン又は他のFHT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 】**

40

さらに別の態様では、本発明は、FHT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FHTの突然変異について分析するステップと；
- c . FHTの突然変異が検出された場合、有効量のFHT増加剤エンザスタウリン又は他のFHT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 】**

50

さらに別の態様では、本発明は、FHT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FHT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 1 A】図 1 A 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 PAH を発生する。

【図 1 B】図 1 B 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 PAH を発生する。

【図 1 C】図 1 C 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 PAH を発生する。  
20

【図 1 D】図 1 D 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 PAH を発生する。

【図 1 E】図 1 E 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 PAH を発生する。

【図 1 F】図 1 F 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 PAH を発生する。

【図 1 G】図 1 G 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 PAH を発生する。

【図 1 H】図 1 H 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 PAH を発生する。  
30

【図 1 I】図 1 I 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 PAH を発生する。

【図 1 J】図 1 J 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 PAH を発生する。

【図 1 K】図 1 K 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 PAH を発生する。

【図 2 A】図 2 A 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 PAH を発生する。

【図 2 B】図 2 B 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 PAH を発生する。  
40

【図 2 C】図 2 C 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 PAH を発生する。

【図 2 D】図 2 D 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 PAH を発生する。

【図 2 E】図 2 E 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 PAH を発生する。

【図 2 F】図 2 F 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 PAH を発生する。

【図 3 A】図 3 A 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 ハイスループットスクリーン及び 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 ハイスループットスクリーン及び 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 ハイスループットスクリーン及び 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、siFHIT PAECにおけるmRNAの発現及びマイクロRNAのプロファイリング。

【図8C】図8Cは、siFHIT PAECにおけるmRNAの発現及びマイクロRNAのプロファイリング。

【図8D】図8Dは、siFHIT PAECにおけるmRNAの発現及びマイクロRNAのプロファイリング。

【図8E】図8Eは、siFHIT PAECにおけるmRNAの発現及びマイクロRNAのプロファイリング。

【図8F】図8Fは、siFHIT PAECにおけるmRNAの発現及びマイクロRNAのプロファイリング。 10

【図8G】図8Gは、siFHIT PAECにおけるmRNAの発現及びマイクロRNAのプロファイリング。

【図8H】図8Hは、siFHIT PAECにおけるmRNAの発現及びマイクロRNAのプロファイリング。

【図8I】図8Iは、siFHIT PAECにおけるmRNAの発現及びマイクロRNAのプロファイリング。

【図8J】図8Jは、siFHIT PAECにおけるmRNAの発現及びマイクロRNAのプロファイリング。

【図8K】図8Kは、siFHIT PAECにおけるmRNAの発現及びマイクロRNAのプロファイリング。 20

【図8L】図8Lは、siFHIT PAECにおけるmRNAの発現及びマイクロRNAのプロファイリング。

【図8M】図8Mは、siFHIT PAECにおけるmRNAの発現及びマイクロRNAのプロファイリング。

【図9A】図9Aは、エンザスタウリンは、PAECにおけるBMPR2上流のシグナル伝達分子FHITの発現を増加させ、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、アボトーシス、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、PAECにおけるBMPR2上流のシグナル伝達分子FHITの発現を増加させ、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、アボトーシス、DNA損傷及び増殖を回復に向かわせる。 30

【図9C】図9Cは、エンザスタウリンは、PAECにおけるBMPR2上流のシグナル伝達分子FHITの発現を増加させ、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、アボトーシス、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、PAECにおけるBMPR2上流のシグナル伝達分子FHITの発現を増加させ、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、アボトーシス、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、PAECにおけるBMPR2上流のシグナル伝達分子FHITの発現を増加させ、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、アボトーシス、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、PAECにおけるBMPR2上流のシグナル伝達分子FHITの発現を増加させ、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、アボトーシス、DNA損傷及び増殖を回復に向かわせる。 40

【図9G】図9Gは、エンザスタウリンは、PAECにおけるBMPR2上流のシグナル伝達分子FHITの発現を増加させ、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、アボトーシス、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、PAECにおけるBMPR2上流のシグナル伝達分子FHITの発現を増加させ、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、アボトーシス、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、PAECにおけるBMPR2上流のシグナル 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、アボトーシス、D N A 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、アボトーシス、D N A 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。 10

【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。 20

【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。 30

【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。 40

【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。 50

【図11J】図11Jは、エンザスタウリンは、SUGEN5416／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11K】図11Kは、エンザスタウリンは、SUGEN5416／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12】図12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C57BL/6対照と比べてのFhit-/-マウスにおけるFHITタンパク質の発現。

【図13A】図13A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、スプラーグドーリーラット肺におけるPKC及びp-PKCタンパク質の発現。 10

【図13B】図13B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、スプラーグドーリーラット肺におけるPKC及びp-PKCタンパク質の発現。

【図13C】図13C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、スプラーグドーリーラット肺におけるPKC及びp-PKCタンパク質の発現。

【図13D】図13D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、スプラーグドーリーラット肺におけるPKC及びp-PKCタンパク質の発現。 20

【図14A】図14Aは、エンザスタウリンによる24時間処置により、FHITがsiRNAによって減少したPAECにおけるFHIT、BMPR2及びId1の発現が増強される。

【図14B】図14Bは、エンザスタウリンによる24時間処置により、FHITがsiRNAによって減少したPAECにおけるFHIT、BMPR2及びId1の発現が増強される。

【図14C】図14Cは、エンザスタウリンによる24時間処置により、FHITがsiRNAによって減少したPAECにおけるFHIT、BMPR2及びId1の発現が増強される。 30

【図15A】図15Aは、エンザスタウリン以外の薬学的PKC阻害剤によるPKCの阻害により、BMPR2のシグナル伝達及びFHITの発現が増強されない。

【図15B】図15Bは、エンザスタウリン以外の薬学的PKC阻害剤によるPKCの阻害により、BMPR2のシグナル伝達及びFHITの発現が増強されない。

【図15C】図15Cは、エンザスタウリン以外の薬学的PKC阻害剤によるPKCの阻害により、BMPR2のシグナル伝達及びFHITの発現が増強されない。

【図15D】図15Dは、エンザスタウリン以外の薬学的PKC阻害剤によるPKCの阻害により、BMPR2のシグナル伝達及びFHITの発現が増強されない。

【図15E】図15Eは、エンザスタウリン以外の薬学的PKC阻害剤によるPKCの阻害により、BMPR2のシグナル伝達及びFHITの発現が増強されない。 40

【図15F】図15Fは、エンザスタウリン以外の薬学的PKC阻害剤によるPKCの阻害により、BMPR2のシグナル伝達及びFHITの発現が増強されない。

【図16】図16は、PKC阻害剤Ly333531でなく、エンザスタウリンにより、PAEC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17A】図17Aは、(BMPR2突然変異を有しない)IPAH患者からの代表的な免疫組織化学スライド。

【図17B】図17Bは、(BMPR2突然変異を有しない)IPAH患者からの代表的な免疫組織化学スライド。

【図18A】図18Aは、Fhit-/-C57BL/6マウスは、低酸素への慢性曝露後、実験的PAHを発生する。 50

【図18B】図18Bは、Fhit-/-C57BL/6マウスは、低酸素への慢性曝露後、実験的PAHを発生する。

【図18C】図18Cは、Fhit-/-C57BL/6マウスは、低酸素への慢性曝露後、実験的PAHを発生する。

【図18D】図18Dは、Fhit-/-C57BL/6マウスは、低酸素への慢性曝露後、実験的PAHを発生する。

【図18E】図18Eは、Fhit-/-C57BL/6マウスは、低酸素への慢性曝露後、実験的PAHを発生する。

【図18F】図18Fは、Fhit-/-C57BL/6マウスは、低酸素への慢性曝露後、実験的PAHを発生する。

【図19A】図19Aは、健常対照に対するFPAH及びキャリアにおけるBMPR2の発現における性別差。

【図19B】図19Bは、健常対照に対するFPAH及びキャリアにおけるBMPR2の発現における性別差。

【図19C】図19Cは、健常対照に対するFPAH及びキャリアにおけるBMPR2の発現における性別差。

【図19D】図19Dは、健常対照に対するFPAH及びキャリアにおけるBMPR2の発現における性別差。

【図19E】図19Eは、健常対照に対するFPAH及びキャリアにおけるBMPR2の発現における性別差。

【図19F】図19Fは、健常対照に対するFPAH及びキャリアにおけるBMPR2の発現における性別差。

【図19G】図19Gは、健常対照に対するFPAH及びキャリアにおけるBMPR2の発現における性別差。

【図19H】図19Hは、健常対照に対するFPAH及びキャリアにおけるBMPR2の発現における性別差。

【図20A】図20Aは、エンザスタウリンによる24時間処置により、FHTがsiRNAによって減少したPAECにおけるFHT、BMPR2及びId1の発現が増強される。

【図20B】図20Bは、エンザスタウリンによる24時間処置により、FHTがsiRNAによって減少したPAECにおけるFHT、BMPR2及びId1の発現が増強される。

【図20C】図20Cは、エンザスタウリンによる24時間処置により、FHTがsiRNAによって減少したPAECにおけるFHT、BMPR2及びId1の発現が増強される。

【図21A】図21Aは、FHTノックダウンによるPAEC内のBMPR2及びId1の減少は、部分的にmIR17-5依存性である。

【図21B】図21Bは、FHTノックダウンによるPAEC内のBMPR2及びId1の減少は、部分的にmIR17-5依存性である。

【図21C】図21Cは、FHTノックダウンによるPAEC内のBMPR2及びId1の減少は、部分的にmIR17-5依存性である。

【図21D】図21Dは、FHTノックダウンによるPAEC内のBMPR2及びId1の減少は、部分的にmIR17-5依存性である。

【図22】図22は、WT及びFHT-/-C57BL/6マウスは、低酸素処置後、RV線維症を発生しない。

【図23A】図23Aは、エンザスタウリンは、低酸素下のFHT-/-マウスにおいて、RVSP上昇から保護し、BMPR2/Id1 mRNAを上方制御する。

【図23B】図23Bは、エンザスタウリンは、低酸素下のFHT-/-マウスにおいて、RVSP上昇から保護し、BMPR2/Id1 mRNAを上方制御する。

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

10

20

30

40

50

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24A】図24A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PAHの発生を予防する。

【図24B】図24B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PAHの発生を予防する。

【図24C】図24C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PAHの発生を予防する。

【図24D】図24D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PAHの発生を予防する。

【図24E】図24E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PAHの発生を予防する。 10

【図24F】図24F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PAHの発生を予防する。

【図24G】図24G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PAHの発生を予防する。

【図25A】図25Aは、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。

【図25B】図25Bは、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。 20

【図25C】図25Cは、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。

【図25D】図25Dは、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。

【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S u g e n / 低酸素状態とを比較した、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

#### 【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、且つ構造的变化を設けることができる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る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 40

される主題が不明瞭であることが不要でない。

【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】

すべての見出しが、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。

10

20

30

【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。

40

【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 et al . , 1999 ; T o l e d o et al . , 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ると考えられる(P e k a r s k y et al . , 2004 , Proc Natl Acad Sci U S A , 101(11) : 3775 - 3779)。

40

【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、

50

PKC 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関与するさらなるタンパク質をさらに阻害する (Gescher, 1998, Gen Pharmacol., 31: 721 - 728; Jarvis, Grant, 1999, Invest New Drugs, 17: 227 - 240; Parker, 1999, Pharmacol. Ther., 82: 263 - 267)。FHIT 増加剤エンザスタウリン又は他の FHIT 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。

#### 【0036】

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、耐容性を示した (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、DVT 及び低血圧を含んだ。この薬剤で達成される高い耐容性、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 BMPR2 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 FHIT 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

#### 【0037】

FHIT 増加剤エンザスタウリン又は他の FHIT 増加剤は、単独で、又は PAH を含む PH を治療若しくは予防する他の活性化合物と組み合わせて投与されてもよい。他の活性化合物は、FHIT 増加剤エンザスタウリン又は他の FHIT 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、FHIT 増加剤エンザスタウリン又は他の FHIT 増加剤及び他の活性化合物は、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。PH を治療する例示的な他の活性化合物として、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 (アンブリセンタン)、Flolan (エポプロステノール)、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 Titradose (二硝酸イソソルビド)、Isoditrate (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。

20

30

#### 【0038】

##### 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、“Molecular Cloning: A Laboratory Manual”, second edition (Sambrook et al., 1989); “Oligonucleotide Synthesis” (M. J. Gait, ed., 1984); “Animal Cell Culture” (R. I. Freshney, ed., 1987); “Methods in Enzymology” (Academic Press, Inc.); “Current Protocols in Molecular Biology” (F. M. Ausubel et al., eds., 1987、及び定期的更新); “PCR: The Polymerase Chain Reaction”, (Mullis et al., eds., 1994)などの文献において十分に説明される。

40

#### 【0039】

##### 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關する目的のバイオマーカーである（例えば、M c L e o d 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、又は臨床徵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、薬物応答と相關してもよい。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。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、例えばハイスク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

10

20

30

40

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】

10

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】

20

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】

30

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 MassArray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)。

40

## 【0049】

50

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

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 S N P 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 S N P 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。

#### 【 0 0 5 0 】

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

#### 【 0 0 5 1 】

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

#### 【 0 0 5 2 】

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

#### 【 0 0 5 3 】

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

#### 【 0 0 5 4 】

「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、D N A 及び R N A 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 D N A 若しくは R N A 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、「キヤップ」、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、 $\text{p}_1\text{y-L-Lysine}$ 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。<sup>10</sup> 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、セドヘプツロース、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。

## 【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】

「增幅」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、鑄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（鑄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 / 又は增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】

10

20

30

40

50

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

#### 【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。

30

#### 【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（S B P）メンバー及びS B P

40

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產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。

#### 【 0 0 6 3 】

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 D N A 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

#### 【 0 0 6 4 】

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 5 0 % 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 6 0 %、7 0 %、8 0 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % 若しくは 1 0 0 % 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／又は高ストリンジエ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

#### 【 0 0 6 5 】

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 9 0 % 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 9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % 若しくは 1 0 0 % 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エ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。

#### 【 0 0 6 6 】

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エ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エンシーで洗浄された。中ストリンジエ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 6 0 % の同一性、例えば少なくとも 7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、若しくは 9 5 % の同一性の何れかを有する。中ストリンジエント条件は、4 2 度 5 0 % ホルムアミド、5 × デンハート溶液、5 × S S P E、0 . 2 % S D S におけるハイブリダイゼーションと、その後の 4 2 度 0 . 2 × S S P E、0 . 2 % S D S における洗浄に等価な条件である。高ストリンジエンシー条件は、例えば、4 2 度 5 0 % ホルムアミド、5 × デンハート溶液、5 × S S P E、0 . 2 % S D S におけるハイブリダイゼーションと、その後の 6 5 度 0 . 1 × S S P E、及び 0 . 1 % S D S における洗浄により提供されうる。

30

#### 【 0 0 6 7 】

低ストリンジエンシーハイブリダイゼーションは、2 2 度 1 0 % ホルムアミド、5 × デンハート溶液、6 × S S P E、0 . 2 % S D S におけるハイブリダイゼーションと、その後の 3 7 度 1 × S S P E、0 . 2 % S D S 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 ( B S A ) を含有する。2 0 × S S P E ( 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 ( E D T A ) ) は、3 M 塩化ナトリウム、0 . 2 M リン酸ナトリウム、及び 0 . 0 2 5 M ( E D T A ) を含有する。他の好適な中ストリンジエンシー及び高ストリンジエ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

#### 【 0 0 6 8 】

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方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」とび／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。

10

#### 【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。

20

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。

30

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。

40

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

50

の方法。

17. 薬剤、例えば、m i R N A 1 7 - 5、マイクロR N A 2 4 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、若しくはその機能断片のレベルを増加させる、デシタビ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、実施形態17の方法。

19. 薬剤が、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、実施形態17の方法。

20. 薬剤が、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、実施形態17の方法。 10

21. 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、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F H I T、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 1 1 4 部位でのS r c 媒介性リン酸化を遮断又は低減する、実施形態22の方法。 20

24. 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、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。 30

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、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、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F H I T 及びB M P R 2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、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、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 (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、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R V S P 上昇、R V H 増加 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 $RVSP > 100 \text{ mmHg}$ 、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FHT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FHTを有する若しくは有することが疑われる、又はFHT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FHTレベル以下のFHTレベルを有する、実施形態44の方法。

46. 対象が、FHT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FHT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。

5 4 . 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。

5 5 . 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 2 5 mmHg 未満、好ましくは 2 0 mmHg 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 > 2 5 mmHg を有する対象は、治療後、 P A P m < 2 5 mmHg 、好ましくは < 2 0 mmHg 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 > 2 5 、及び P V R > 3 W U 、及び P A W P < 1 5 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 < 2 5 、及び / 又は P V R > 3 W U 、及び / 又は P A W P > 1 5 を有する。

10

20

5 6 . 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。

5 7 . 哺乳動物がヒトである、実施形態 5 6 の方法。

5 8 . 哺乳動物が非ヒト哺乳動物である、実施形態 5 6 の方法。

5 9 . 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。

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

30

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 ( アンブリセンタン ) 、 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 ( イロプロスト ) 、 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。

40

6 1 . 有効量の実施形態 6 0 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。

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、有効量の実施形態 6 0 の組み合わせ又は実施形態 6 1 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。

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、

50

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FHT及び/又はBMPR2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FHT及び/又はBMPR2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FHT及び/又はBMPR2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。  
10

69. サンプル中のFHT及び/又はBMPR2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、FHT及び/又はBMPR2をコードするDNA分子である、実施形態69の方法。

71. 該ポリヌクレオチドが、FHT及び/又はBMPR2をコードするRNA分子である、実施形態69の方法。

72. サンプル中のFHT及び/又はBMPR2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。  
20

73. 該ポリヌクレオチドが、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)、鎖置換増幅(SDA)、転写媒介増幅(TMA)、リガーゼ連鎖反応(LCR)、核酸配列に基づく増幅(NASBA)、プライマー伸長、ローリングサークル増幅(RCA)、自己持続配列複製(3SR)、及びループ介在等温増幅(LAMP)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PCR、単一分子リアルタイム配列決定、イオン半導体(ion torrent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(SOLID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(MPSS)、ポロニー配列決定、454パイラシーケンシング、Illumina(Solexa)配列決定、DNA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(SMRT)配列決定、ナノポアDNA配列決定、トンネル電流DNA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パイオニア配列決定、顕微鏡に基づく技術、RNAP配列決定、及びインビトロウイルスハイスクロ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。  
30

75. サンプル中のFHT及び/又はBMPR2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。  
40

76. サンプル中のFHT及び/又はBMPR2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(ELISA)、免疫プロット、免疫沈降、ラジオイムノアッセイ(RIA)、免疫染色、ラテックス凝集、間接赤血球凝集アッセイ(IHA)、補体結合、間接免疫蛍光アッセイ(IFAT)、ネフェロメトリー、フローサイトメトリー、表面プラズモン共鳴(SPR)、化学発光アッセイ、側方流動免疫測定法、u-capture assay(u-capture assay)、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、  
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。 10

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、 20

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； 30

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、 40

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。 50

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FHT増加剤エンザスタウリン又は他のFHT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。 10

101. 前記用量が、3500ナノモル/L以下の予測されたFHT増加剤エンザスタウリン又は他のFHT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FHT増加剤エンザスタウリン又は他のFHT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。 20

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FHT増加剤エンザスタウリン又は他のFHT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FHT増加剤エンザスタウリン又は他のFHT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。 30

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FHT増加剤エンザスタウリン又は他のFHT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FHT増加剤エンザスタウリン又は他のFHT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。 40

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FHT増加剤エンザスタウリン又は他のFHT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. FHT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 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。

116 . 前記哺乳動物がヒトである、実施形態 115 の方法。

117 . 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 115 の方法。 10

118 . 前記投与が経口である、実施形態 115 の方法。

119 . 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。

120 . 前記哺乳動物がヒトである、実施形態 119 の方法。

121 . 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 119 の方法。 20

122 . 前記投与が経口である、実施形態 119 の方法。

123 . 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、LY317615、D04014としても知られる、実施形態 83～122 の何れか 1 つの方法。

124 . 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 83～122 の何れか 1 つの方法。

125 . 肺高血圧症又は肺気腫が、自発的に発生しうる（特発性 PH）、実施形態 83～122 の何れか 1 つの方法。 30

126 . 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 PH）、実施形態 83～122 の何れか 1 つの方法。

127 . 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 83～122 の何れか 1 つの方法。

128 . 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）を有する哺乳類に対する予防策として用いられる、実施形態 83～122 の何れか 1 つの方法。

129 . 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 II（肺静脈高血圧症）、グループ III（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 83～128 の何れか 1 つの方法。 40

130 . 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かられる、実施形態 83～129 の何れか 1 つの方法。

131 . 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 83～130 の何れか 1 つの方法。

132 . 肺高血圧症を治療するための F H I T 増加剤の使用。

133 . F H I T 増加剤がエンザスタウリンである、実施形態 132 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

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、また構造的变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要でない。

10

## 【0074】

本発明は、FHT増加剤エンザスタウリン又は他のFHT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FHT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FHT増加剤エンザスタウリン又は他のFHT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、FHT増加剤エンザスタウリン又は他のFHT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、PH状態の間接的尺度としてのRVSP及びPASPを測定するため、心電図検査が使用可能である。平均PPAP(PAPm)、PAWP、心拍出量及びPVR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PAPm > 25 mmHgと定義される。グループ1のPAHは、時として、PAPm > 25、PVR > 3 WUとともにPAWP < 15と定義される。

30

## 【0077】

第II相試験では、FHT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、耐容性を示した(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、DVT及び低血圧を含んだ。

40

## 【0078】

この薬剤で達成される高い耐容性、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BMPR2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FHT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FHT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。

## 【0079】

FHT増加剤エンザスタウリン又は他のFHT増加剤は、単独で又はPHを治療若しくは予防する他の活性化合物と組み合わせて投与されてもよい。他の活性化合物は、FHT増加剤エンザスタウリン又は他のFHT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、FHT増加剤エンザスタウリン又は他のFHT増加剤及び他の活性化合物は、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。PHを治療する例示的な他の活性化合物として、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プロッカー、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(シリデナフィル)、Tracleer(ボセンタン)、Letairis(アンブリセンタン)、Fololan(エポプロステノール)、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 Titradose(二硝酸イソソルビド)、Isoditrate(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】

10

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FHTT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、FHTT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FHTTの役割を理解することを重視した。FHTT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FHTTの発現低下に関する我々の知見を確認した。

20

## 【0082】

我々は、FHTT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。FHTT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FHTT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FHTT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)。FHTTの減少は、必要条件であったが、Fhit-/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(carcinogenous)表現型を誘導するのに十分ではなかった(49)。

30

## 【0083】

40

我々が異なるPAHの病因を通じてFHTTの発現低下を測定したと仮定すれば、我々はさらに、低いFHTT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FHTT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。FHTT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FHTT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FHTT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

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。m i R 1 7 - 5 とm i R 1 0 0 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。M i R 1 7 - 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、m i R 1 7 - 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m i R N A であるm i R 2 7 a が増加する（11）。M i R 2 7 a 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。m i R 1 7 - 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m i R 2 7 a における増加を救済することができた。m i R 1 7 - 5 アンタゴニルを阻害することは、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 5 7 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）によって開始されると考えられる。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D N A 損傷及びインビオ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D N A 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D N A 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(76~78)。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のように、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(79)。

#### 【0088】

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(15mg / kg / 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 が減弱されるという証拠を提供した。潜在的な解釈の妥当性(translational relevance)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效果を見出した。

10

#### 【0089】

次に我々は、重度の新生内膜形成及びR V 不全(80)を含むヒト疾患を最も忠実に再現するため、マウスマodel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(81)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(41)。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、12、32、82、83)。我々は、低用量エンザスタウリン(5mg / kg / 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(21)、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13)。我々は、エンザスタウリンがインビトロで低用量(5~15uM)でF H I T 及びB M P R 2 を増加させ(図14)、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 機能に対して有効である(図15、図16)ことを確認した。これは、以前の臨床試験(84、85)、インビボ齧歯類試験(86)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に必要とされる用量(87)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ってもよい(88、89)。

20

#### 【0090】

本明細書中のデータは、B M P R 2 モディファイラー遺伝子としての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った。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。

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 (Seelbeckchem, Houston, TX) 及び SUGEN 5416 (Tocris, Bristol, UK) を用いた。

## 【0093】

実施例 I . F HIT - / - C 57BL / 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 ハイスループット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 (F HIT) を以前に発見した。我々は、低下された F HIT 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 F HIT 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 F HIT 及び BMPR2 の発現は、F HIT 増加剤エンザスタウリン又は他の F HIT 増加剤によると、上方制御可能である。

## 【0094】

F HIT - / - C 57BL / 6 とリタメイト野生型 (C 57) 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。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、C 57 n = 3、F HIT - / - Nx Rec n = 3、F HIT - / - 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、C 57 Nx Rec n = 3、C 57 Hx n = 6、F HIT - / - Nx Hx n = 3、F HIT - / - 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、C 57 n = 3、F HIT - / - Nx n = 3、F HIT - / - 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 C 57 及び F HIT - / - 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、a SMA 及び a vWF 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 F HIT (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、C 57 n = 3、F HIT - / - Nx n = 3、F HIT - / - Hx n = 5、F HIT - / - 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、C 57 n = 3、F HIT - / - Nx n = 3、F HIT - / - Hx n = 5、F HIT - / - Rec n = 4)。Nx 対照に対して \* p < 0.05、\*\* p < 0.01、\*\*\* p < 0.0001、C 57 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。F HIT - / - C 57BL / 6 とリタメ

10

20

30

30

40

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。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。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エスタンプロットにより、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増強剤としての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増強剤エンザスタウリン又は他のFHIT増強剤を5mg/kgで浸透圧ポンプにより毎日投与  
50

した。右心室（R V）収縮期圧を右頸静脈カテーテル法により測定し、R V肥大をR V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をMOVATペニ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>)状態下で3週間収容し、Alzetミニ浸透圧ポンプモデル2006による5mg/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>)状態下で3週間収容し、Alzetミニ浸透圧ポンプモデル2006による5mg/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制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。治療効果を得るため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Sugen5416/低酸素ラットにおいて実験的PAHを回復に向かわせる

Sugen5416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スプーラードーリーラットにおいて、20mg/kg体重のSUG5416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>)状態下で3週間収容し、次いで酸素正常状態下(

10

20

30

40

50

N<sub>x</sub>、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化をMOVATペニ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、N<sub>x</sub>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。

10

#### 【0106】

エンザスタウリンは、Sugen5416/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スプラーードーリーラットにおいて、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FHT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(N<sub>x</sub>、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FHT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。

20

#### 【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、FHT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、FHT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。

30

#### 【0108】

FHT増強化学物質エンザスタウリンにより、Sugen5416/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。

40

#### 【0109】

実施例IV.FHT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FHTを必要とするが、PKCを必要としない

40

GAPDHに正規化したFHTのmRNA発現を、15μMのFHT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、siFHT又は非特異的対照(Nt si)グループの4つのsiRNAをトランスフェクトしたPAECにおいて評価した。FHT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FHT増加剤エンザスタウリン又は他のFHT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た右心室(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ペニ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

50

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、si F H I T 又は非特異的対照(N t s i)プールの4つのsiRNA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mRNA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±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できなく、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 mRNA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mRNAがsiRNA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関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(HTS) siRNAスクリーン

$250\text{pm}$ 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 ル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siRNAスクリーンを、Stanford High - Throughput Bioscience Center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siRNA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si B M P R 2 及びsi 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siRNAにおける至適濃度( $25\text{nM}$ )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si 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、それらを標的特異的なsiRNA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siRNA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

#### 【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

40

50

下（10%O<sub>2</sub>）で3週間収容し、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。成体スプラーグドーリーラット（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。

20

## 【0117】

ヒトPAH患者からの細胞の単離。IPAH及びFPAH患者の肺移植時のPAECは、以前に記載された通り（12）、CD31-ABブ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。末梢血单核球（PBMC）は、フィコールパ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化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・ヴィルブランド因子（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（Histoclear 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FHIIT（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した（Histo-Tec, Hayward, CA）。

30

## 【0119】

細胞培養。ヒトPAEC（Promocell）又はヒトPASM（Promocell 11）を各々、市販のEC（Promocell 11）又はSMC（Promocell 11）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。IPAH及びFPAH患者の肺移植時のPAECを、以前に記載された通り（E1）、CD31-ABブルダウンビーズ（Dynabeads; Invitrogen）を用いて、消化した全肺組織から入手した。末梢血单核球（PBMC）は、以前に記載された通り（E8）、フィコールパ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。FHTの発現を、PA内皮細胞(PAEC)内のRNAiにより調節した。BMPR2、FHT、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、RNaseasy 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)。

10

20

30

#### 【0123】

ウェスタンブロッティング。ウェ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)、FHT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 4.0 LT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化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-/-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。

40

#### 【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

50

宜実施し、以下に示す通り、スチュードント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PAH遺伝子発現データのメタ分析

N C B I G e n e E x p r e s s i o n O m n i b u s ( G E O ) からの 7 つ の  
公的に利用可能なヒト PAH トランскри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 モディファイラ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 L i b r a r y o f M e d i c i n e ) ( N L M ) U n i t e d  
M e d i c a l L a n g u a g e S y s t e m ( U M L S ) にリンクされた標準化さ  
れた語彙、 G e n e O n t o l o g y 、 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 PAH データセットは、 PAH 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 PAH 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 ( ii ) 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 < 1 0 % を有し、且つ ( ii ) 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 モディファイラー遺伝子がヒト PAH 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 PAH 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 PAH 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 PAH 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  
、 PAH 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 PAH 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 PAH 遺伝子発現アッセイ

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

10

20

30

40

50

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(ORF)を含むマウスゲノムワイド s i R N A ライブライマー(Qia gene)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た。F H I T は、最も一貫して減少し(> 50%; 2<sup>-1</sup>)、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

30

40

50

### 【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)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。

### 【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。

### 【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。

## 【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 の発現低下と相關したことを示す。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 IPAH 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、IPAH n = 6、FPAH n = 4、対照 r = -0.7714、PAH r = 0.5410、IPAH 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<br>の年齢 | 発見時<br>の年齢 | 発見以来<br>の生存 | %無病<br>の年数 | BMPR2<br>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<br>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,<br>未確認   |                       |
|           | C2  | 女性                     | 72         |            |             | 100        | 可能性低い,<br>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,<br>未確認   |                       |
|           | C5  | 男性                     | 63         |            |             | 100        | 可能性低い,<br>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<br>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<br>ない | P8  | 女性                     | 34         | 29         | 5           | 34         | NMD-            |                       |
|           | C8  | 女性                     | 67         |            |             | 100        | NMD-            |                       |
| 対照        |     | 女性<br>n=7<br>男性<br>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<br>男性 n=3 | 38.7 ± 8.1554 | 白人 n=5<br>不明 n=1                         |
| 患者 | IPAH n=7<br>FPAH n=2<br>N/K n=1 | 女性 n=7<br>男性 n=3 | 35.1 ± 2.8889 | 白人 n=8<br>アフリカ系アメリカ人 n=1<br>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 IX . 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）。

## 【 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 R N A 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 R N A 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

30

40

40

50

スタウリンとともに 24 時間インキュベートした P A E C における G A P D H に正規化した F H I T ( 図 8 G ) 、 B M P R 2 ( 図 8 H ) 及び I d 1 ( 図 8 I ) の相対的 m R N A 発現である ( q P C R 、 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 8 J は、 15 μM 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、 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 発現である ( q P C R 、 t = トランスフェクション後 72 時間、 R N A i m a x 、 n = 4 、 平均 ± 平均値の標準誤差 ) 。 図 8 K ~ 8 L は、 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 15 μM 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 P A E C における R N U 4 8 に正規化した m i R 17 - 5 ( K ) 及び m i R 27 a ( 図 8 L ) 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 72 時間、 n = 3 、 平均 ± 平均値の標準誤差、 N t s i 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 8 M は、 F H I T による B M P R 2 の提起された調節の図式モデルである。

10

## 【 0138 】

F H I T 及び L C K レベルが B M P R 2 発現をいかに調節するかは未知である。 m i R N A が P A H における B M P R 2 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 R N A が F H I T 及び L C K 媒介性の P A E C における B M P R 2 発現の調節を組織化するものか否かを検討した。 我々は、 m i R 17 - 5 及び m i R 100 ( 双方とも B M P R 2 の直接的制御因子 ) 、及び m i R 27 a ( 基準の S m a d シグナル伝達における読み出し ) にフォーカスした ( 30 、 32 ) 。 F H I T m R N A の s i R N A による減少が m i R 17 - 5 の発現を増強し ( 3 ~ 4 倍 ; 図 8 E 、 図 8 K ) 、且つ m i R 27 - a の発現を増強したが ( 4 倍 ; 図 8 L ) 、 m i R 100 の発現を増強しなかった ( 図 8 G ) 。 L C K の欠損は、 m i R 17 - 5 及び m i R 100 の発現の双方を、各々 8 倍又は 2 倍に強力に増強した ( 図 8 E 、 8 F ) 。

20

## 【 0139 】

エンザスタウリンによる 24 時間の処置 ( 15 μM ) により、 P A E C における F H I T 、 B M P R 2 及び I d 1 の発現が増強された ( 図 8 G ~ I 、 図 20 A ~ 20 C ) 。 興味深いことに、エンザスタウリン ( 15 μM ) は、 F H I T m R N A 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 8 J ) 、エンザスタウリンが F H I T 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、 s i F H I T 媒介性の m i R 17 - 5 及び m i R 27 a における増加を阻害し ( 図 8 K 、 8 L ) 、 F H I T 及びエンザスタウリンが m i R N A 発現を調節することにより B M P R 2 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構的洞察が得られた ( 図 8 M ) 。 我々はさらに、 s i F H I T に加えて、抗 m i R のトランスフェクションを用いて m i R 17 - 5 を低減することにより、 B M P R 2 及び I D 1 の発現が増強されることを示し、 F H I T 媒介性の B M P R 2 調節が部分的には m i R 17 - 5 依存性であることが示唆された ( 国 21 A ~ 21 D ) 。

30

## 【 0140 】

実施例 X . エンザスタウリンは F H I T / B M P R 2 シグナル伝達を上方制御し、インビトロで F H I T 欠損によって誘導される血管機能障害を予防する

P A H 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、 F H I T の発現が、 血管形成の阻害、 アポトーシスの増加、 D N A 損傷 ( 34 、 35 ) 及び P A E C 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、 P A E C における F H I T 及び B M P R 2 の発現低下が E C 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。

40

## 【 0141 】

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

50

るBMPR2上流シグナル伝達分子FHTの発現を増強し、FHT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15μMのエンザスタウリンによって救済されたsiFHT 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、Amaxaヌクレオフェクション、Nt si 43.3±5.9、siBMPR2 8.7±1.5、siFHT 11.0±2.6管/5フィールドの平均(20倍)、n=3、平均±平均値の標準誤差、Nt si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、15μMのエンザスタウリンによって救済されたsiBMPR2及びsiFHT PAECにおけるカスパーーゼ3/7発光である(t=トランスフェクション後48時間、RNAlmax、カスパーーゼ-Glo(登録商標)3/7アッセイ、n=3、平均±平均値の標準誤差、Nt si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10μMのエンザスタウリンによって救済されたsiBMPR2及びsiFHT 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±平均値の標準誤差、Nt si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(0.5～50μM)、PASM C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(5μM)siFHT及びsiBMPR2トランスフェクトPASM Cの各々におけるNt si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Nt siで処置した細胞と比べて、FHT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、FHT及びBMPR2欠損PAECにおける管形成の欠損が、この時点でのFHT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、発光カスパーーゼ-Glo(登録商標)3/7アッセイ(36)を用いてカスパーーゼ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)。FHT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siFHT誘導性のPAECのアポトーシスを減少させた。FHTレベルの低下により、48時間後、DNA損傷がNt si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PBM C試験(35)にて認められたDNA損傷の程度に匹敵した。FHT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50μM)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つたことから、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、FHT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PASM Cの増殖がインビトロで増強される(図9I)と判定した。我々は、これらのデータから、FHITの欠損がPAEC及びPASM C機能障害を促進し、それはFHIT及びBMPR2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。PASM C機能と比べて、PAEC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、PAECにおけるBMPR2のより強力な発現により説明してもよく、それによりBMPR2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。

#### 【0145】

実施例XⅠ：インビボでのFHIT欠損は低酸素に応答した肺高血圧症悪化の素因になる  
PAH患者におけるFHITの減少並びにEC及びSMC機能における適切なFHIT  
レベルの重要性により、我々はFHITの欠損がインビボでPHの素因になるか否かを判  
定するに至った。Fhit-/マウス及びWTリタメイト(8週齢、雄/雌)を慢性低  
酸素(10%)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(21%  
、4週)(38、39)。右頸静脈を通じたRV収縮期圧(RVSP)の測定により、  
PH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。RV肥大(RVH)  
を、RVの左室及び中隔重量に対する重量比(RV/LV+S)を用いてアッセイした。  
C57BL/6野生型マウスは、低酸素に対するステレオタイプ的な適応応答を呈し、  
RVSPにおける増加(図10A、図18A)、RVHにおける増加(図10B、図18  
B)、細動脈及び細静脈における血管希薄化(図10D、18C)及び筋性化の増加(図  
10E、図18D)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、  
Fhit-/マウスは、RVSP及びRVH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10  
A~10F、図18A~F)が、RV線維症を有しなかった(図22)。さらに、Fhit-/マウス(7~10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10G~10H)、ここで7世代を超える  
筋性化血管は認められなかった(40)。注目すべきことに、我々は、ベースラインRV  
SP、RVH、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)。

#### 【0146】

予想通り、FHITタンパク質は、あらゆる条件下でFhit-/肺において有意に  
減少した。慢性低酸素は、Fhit-/肺におけるBMPR2タンパク質を減少させ、  
Fhit-/マウスにおいて慢性低酸素下で認められたRVSP及びRVHの増加と相  
関した(図10I)。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5mg/kg/日)で処置したFhit-/マウスは、全肺組織において、  
PHの改善、並びにBMPR2及びID1の発現増強を示した。予想通り、FHIT mRNA  
の発現は測定不能な程度に低く、BMPR2調節に対するエンザスタウリンのさら  
なるFHIT非依存性機構が示唆された(図23B)。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PHを予防する。

#### 【0147】

FHIT及びBMPR2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PH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Fhit-/マウスにおける  
PH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、Bmpr2+/マウス及び野生型リタメイト(8  
週齢)を低酸素(10%)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  
、15mg/kg/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、Bm  
pr2+/及び野生型マウスにおいて、RVSP及びRVHの増加(図24A、24B)  
、血管希薄化並びに遠位血管の筋性化(図24C、24D)を予防した。我々はさらに  
、低酸素に3週間曝露したC57BL/6マウスを、FK506(0.05mg/kg/日

10

20

30

40

50

)、エンザスタウリン(5mg/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)、スプーラーグドーリーラットに、20mg/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、5mg/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(>100mmHg)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。雄スプーラーグドーリーラットにおいて、20mg/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、5mg/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の発現が増強され(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、R V S P が 3 0 m m H g 超低下した。

#### 【0152】

実施例 X I I I . 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肺気腫を回復に向かわせる

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 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 1 % O<sub>2</sub>) で5週間の期間を設けた。M O V A T 肺組織像の線形切片分析 (n = 4、平均 ± 平均値の標準誤差、N x 対照に対する \* p < 0 . 0 5、媒体対照に対する # # p < 0 . 0 1、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 M O V A T 肺組織像。図 2 7 A 及び 2 7 B 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。

10

#### 【0153】

追加的な実施例

実施例 S 1 . F h i t - / - C 5 7 B L / 6 とリタメイト野生型 (C 5 7) マウスを、正常酸素圧 (N x 、 2 0 % O<sub>2</sub>) 、低酸素 (H x 、 1 0 % O<sub>2</sub>) 状態下で3週間収容し、4週間の低酸素回復 (R e c、3週間のH x / 4週間のN x) 期間を設け、7週間のN x 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 F H I T タンパク質発現の代表的な濃度測定分析 (雄、C 5 7 n = 3、F h i t - / - N x n = 3、F h i t - / - H x n = 5、F h i t - / - R e c n = 4)。すべてのバーは平均 ± 平均値の標準誤差を意味する。C 5 7 対照に対して \* \* \* \* p < 0 . 0 0 0 1、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 1 2 にまとめる。

20

#### 【0154】

実施例 S 2 . 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>) 状態下に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。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 P K C (図 1 3 A) 及び p - P K C (図 1 3 B) タンパク質発現 (雄、N x n = 4、N x E n z n = 4、S u H x n = 3、S u H x E n z n = 5) 及び P K C に正規化した p - P K C (図 1 3 C) の濃度測定分析。P K C 、p - P K C 及び アクチンの代表的プロット (図 1 3 D)。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。

30

#### 【0155】

実施例 S 3 . ヒト P A E C を 6 ウェルプレートに蒔いた。7 0 ~ 8 0 % のコンフルエントであるとき、細胞を、0 . 5 m M 、5 m M 及び 1 5 m M のエンザスタウリンで各々、2 4 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 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測定した。(図 1 4 A) F H I T の相対的発現、(図 1 4 B) B M P R 2 の相対的発現、(図 1 4 C) I D 1 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 . 0 5 、 \* \* p < 0 . 0 1 。

40

#### 【0156】

実施例 S 4 . 図 1 5 A ~ 1 5 B は、様々な濃度 (5 n M ~ 5 μ M) の (図 1 5 A) 選択的 P K C 阻害剤 L y 3 3 3 5 3 1 塩酸塩 (図 1 5 B) 又は非選択的 P K C 阻害剤 G F 1 0 9 2 0 3 X とともに 2 4 時間インキュベートした同調 P A E C における G A P D H に正規化した B M P R 2 の相対的 m R N A 発現である (q P C R、t = 2 4 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、N S )。図 1 5 C ~ 1 5

50

Dは、様々な濃度(5nM~5μM)の(図15C)選択的PKC阻害剤Ly333531塩酸塩(図15D)又は非選択的PKC-阻害剤GF109203X(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(5nM~5μM)の(図15E)選択的PKC阻害剤Ly333531塩酸塩(図15F)又は非選択的PKC阻害剤GF109203X(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FHT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. 5μM若しくは15μMのエンザスタウリン(灰色バー)及び/又は5μMの選択的PKC阻害剤Ly333531塩酸塩若しくは5μMの非選択的PKC阻害剤GF109203Xとともに24時間インキュベートした同調PAECにおけるカスパーゼ3/7発光(t=24時間、カスパーゼ-G1o(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。

20

## 【0158】

実施例S6.(BMPR2突然変異を伴わない)IPAH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:FHTの発現。FHT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>)状態下で3週間収容し、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、FHT-/-Nx n=4、FHT-/-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、FHT-/-Hx n=3、Fhit-/-Rec n=5)。図18Cは、肺胞壁(AW)及び肺胞管(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. FHT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FHT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 FHT。

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 si F h i t ( Amb 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 ) 1 0 0 n M 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 1 0 0 n M の非特異的 s i R N A で 4 8 時間処置した。次に、細胞をエンザスタウリン 1 5 u M で 2 4 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 ± 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

## 【 0 1 6 2 】

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 si F h i t ( Amb 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 ) 1 0 0 n M 及び抗 m i R 1 7 - 5 阻害剤 ( A M 1 2 4 1 2 、 Amb i o n ) を R N A i M a x により 4 8 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 、 Amb 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 ± 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 、不対スチューデント t 検定。

## 【 0 1 6 3 】

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 、 1 0 % O<sub>2</sub> ) 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。

## 【 0 1 6 4 】

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 、 1 0 % O<sub>2</sub> ) 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 m g / k g 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 ± 平均値の標準誤差、シャム対照に対して \* p < 0.05 、不対スチューデント 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 ± 平均値の標準誤差、シャム対照に対して \* p < 0.05 、 \* \* p < 0.01 、不対スチューデント t 検定 ) 。略称 : E n z - エンザスタウリン。

## 【 0 1 6 5 】

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 、 2 0 % O<sub>2</sub> ) 及び低酸素 ( H x 、 1 0 % O<sub>2</sub> ) 状態下に 3

週間収容し、経口経管栄養 / Alzet ミニ浸透圧ポンプモデル 2006 により、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 24A ~ 24G にまとめる。図 24A 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 = 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 24B 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 24C は、肺胞壁 (AW) 及び肺胞管 (AD) の肺血管欠損であり、図 24D 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 24E は、代表的な Movat 肺組織像である。矢印は血管位置を示す。図 24F ~ 24G は各々、大血管 (図 24F) 及び小血管 (図 24G) の代表的な Movat 肺組織像である。矢印は血管位置を示す。

10

20

30

## 【0166】

実施例 S14. 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、FHIT mRNA に対しては有さず、RVSP における上昇から保護する。雄野生型 C57BL/6 (C57) マウスを低酸素 (Hx、10% O<sub>2</sub>) 下に 3 週間曝露し、ミニ浸透圧ポンプ (Alzet モデル 2004) により、0.05 mg / kg / 日の FK506 の存在下又は不在下で、5 mg / kg 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 25A ~ 25D に表す。図 25A 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 = 3、平均 ± 平均値の標準誤差、シャム対照に対して \* \* p < 0.01、一元配置分散分析、ダネットの検定後)。図 25B ~ 25D は、肺組織における mRNA の発現の Ct 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 < 0.05、\* \* p < 0.01、\* \* \* p < 0.001、一元配置分散分析、ダネットの検定後)。略称：FK - FK506、Enz - エンザスタウリン。

30

## 【0167】

実施例 S15. エンザスタウリン処置から 3 週間後、酸素正常状態と Sugeno / 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 Movat 肺組織像。

40

## 【0168】

雄 Sasco スプ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>) 状態下で 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。小肺血管の代表的な Movat 肺組織像を図 26 に示す。

50

## 【0169】

## 参考文献

1. Austin ED, Lloyd JE, Phillips JA. Heritable Pulmonary Arterial Hypertension. In: Pagone RA AM, Ardinger HH, et al., editors., editor. GeneReviews [Internet]. Seattle (WA) : University of Washington, Seattle; ; 2015.
2. Lane KB, Machado RD, Pauciulo MW, Thomson JR, Phillips JA, Lloyd JE, Nichols WC, Trembath RC, Consortium IP. Heterozygous germline mutations in BMPR2, encoding a TGF- $\beta$  receptor, cause familial primary pulmonary hypertension. Nat Genet 2000; 26: 81 - 84.

- 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 , Marcinia k 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 , Spikerkoetter 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 . Spikerkoetter E , Sung YK , Sudheendra D , Scott V , Del Rosario P , Bill M , Haddad F , Long - Boyle J , Hedlin H , Zamanian RT . Randomized 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, Haghishat R, Chan R, Haghishat L, de Jesus Perez V, Wang L, Reddy S, Zhao M, Bernstein D, Sollow-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, Bevilaqua G, Pilotti S, Croce CM, Pierotti MA. Association between cigarettes 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.
17. Sozzi G, Pastorino U, Moiraghi L, Tagliafue 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. 40
18. Campiglio M, Pekarsky Y, Menard S, Tagliafue 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. *ScientificWorldJournal* 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. Dannowitz Prosseda S, Suheendra D, Tian X, Kung J, Bohm M, Kumamoto K, Sollow-Cordero D, Saldivar J, Austin E, Loyd JE, Huber K, Khatri P, Purvesh, Spiekeroetter 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, Loyd 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 50

- egrated multi-cohort transcriptional met  
a-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, Poubeau P, Girerd B, Nataf 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, Loyd JE. Penetrance of pulmonary arterial hypertension is modulated by the expression of normal BMPR 2 allele. Hum Mutat 2009; 30: 649-654.
30. Drake KM, Zygmunt D, Mavrakis 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, Dempsie 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, Courboulin A, Breuils-Bonnet S, Tremblay E, Couture C, Michelakis ED, Provenccher S, Bonnet S. Role for DNA damage signaling in pulmonary arterial hypertension. Circulation 2010; 122: 2128-2137.

ion 2014; 129: 786 - 797.

35. Federici C, Drake KM, Rigeltsky CM, Mc Nelly 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. 10

37. Chen PI, Cao A, Miyagawa K, Tojaais 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. 20

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 Fhit-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 10250 - 10255. 30

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, McMurry 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. 40

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 50

- ys that Protect against Pulmonary Hypertension in BMPR2 Mutation Carriers. *Cell System 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, Astorino 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, Miuma 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. Schieuss 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. Walid A. FHIT: doubts are clear now. *ScientificWorldJournal* 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, Hataoka 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

10

20

30

40

50

0 4 ; 3 : 3 3 .

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. Körner A, Mudduluru G, Manegold C, Allogayyer H. Enzastaurin inhibits invasion and metastasis in lung cancer by diverse molecules. *Br J Cancer* 2010; 103: 802 - 811. 10

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. 20

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. 30

69. Brock M, Samillan VJ, Trenkmann M, Schwarzwald C, Ulrich S, Gay RE, Gassmann M, Ostergaard L, Gay S, Speich R, Huber LC. Antagonism directed against miR-20a restores functional BMPR2 signalling and prevents vascular remodelling in hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Eur Heart J* 2014; 35: 3203 - 3211. 40

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 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. Cirombelli 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 PR2 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, Maugé 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 - 12950

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, Bogaard HJ. The monocrotaline model of pulmonary hypertension in perspective. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2012; 302:L363-L369.

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, Capecci 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, Szczylak C, Sternberg CN, Kania M, Kelly CS, Decker R, Hamid O, Faehlker 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, Pekarsky Y, Tagliabue E, Croce CM, Mendaro 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, McCorkell 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, Khatri 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. 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.
- E4. Li MD, Burns TC, Morgan AA, Khatri 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, Khatri P. Baber's tower revisited: a universal resource for cross-referencing across annotation 50

- databases. Bioinformatics 2006; 22: 2934 - 2  
939.
- E 7 . Benjamini Y , Drai D , Elmer G , Kafkafi N , Golani I . Controlling the false discovery rate in behavior genetics research . Behav Brain Res 2001 ; 125 : 279 - 284 .
- E 8 . Spiekeroetter 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 .
- E 9 . Chen PI , Cao A , Miyagawa K , Tojaais 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 .
- E 10 . Metzger RJ , Klein OD , Martin GR , Krasnow MA . The branching programme of mouse lung development . Nature 2008 ; 453 : 745 - 750 .
- E 11 . 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 .
- E 12 . 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 .
- E 13 . 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 .
- E 14 . Said SI , Hamidi SA , Dickman KG , Szema AM , Lyubsky S , Lin RZ , Jiang YP , Chen JJ , Waschek JA , Kort S . Moderate pulmonary arterial hypertension in male mice lacking the vasoactive intestinal peptide gene . Circulation 2007 ; 115 : 1260 - 1268 .
- E 15 . Dempsie Y , MacLean MR . The influence of gender on the development of pulmonary arterial hypertension . Exp Physiol 2013 ; 98 : 1257 - 1261 .
- E 16 . Czarnecka KH , Migdalska-Sek M , Domanska D , Pastuszak-Lewandoska D , Dutkowska A , K

10

20

40

50

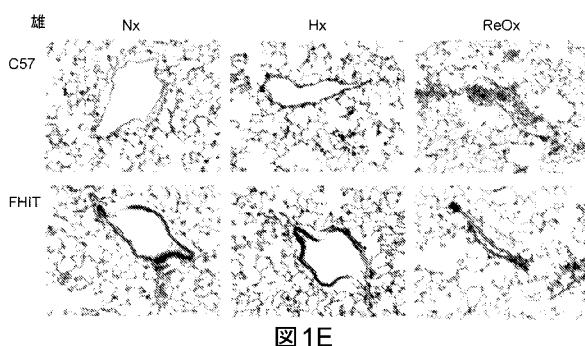
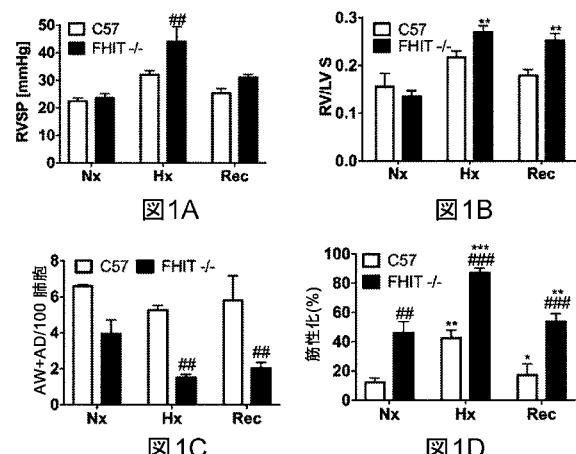
ordiak J, Nawrot E, Kiszalkiewicz J, Antczak A, Brzezińska-Lasota E. FHIT promoter methylation status, low protein and high mRNA levels in patients with non-small cell lung cancer. *Int J Oncol* 2016; 49: 1175-1184.

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. 10

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

E19. Rabelo RA, Antunes LM, Etchebehere RM, Nombelini RS, Nascentes GA, Murta EF, Pedrosa AL. Loss of heterozygosity in the fragile histidine triad (FHIT) locus and expression analysis of FHIT protein in patient with breast disorders. *Clin Exp Obstet Gynecol* 2013; 40: 89-94. 20

【図1A-1E】



【図1F】

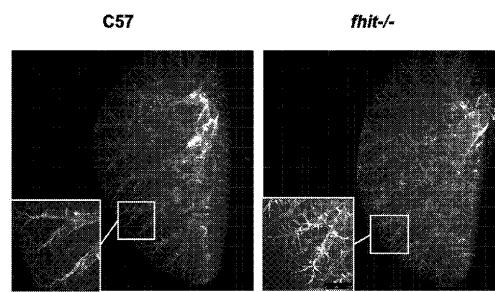


FIG. 1F

【図1G】

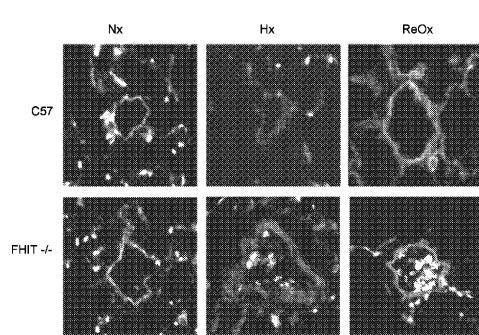


FIG. 1G

【図 1 H - 1 K】

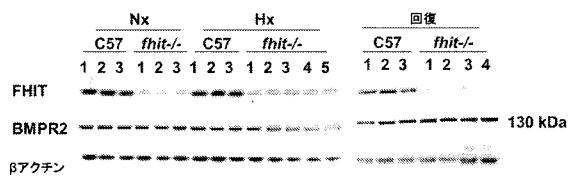


図1H

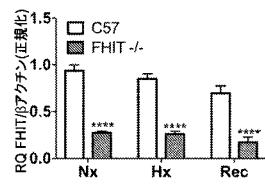


図1I

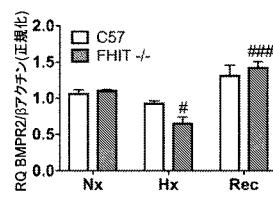


図1J

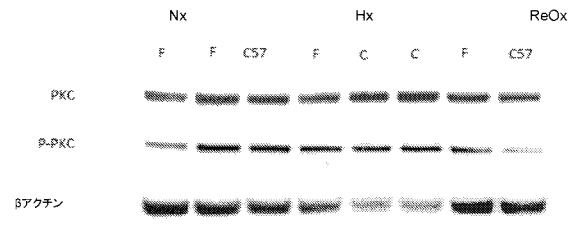


図1K

【図 2 A - 2 D】

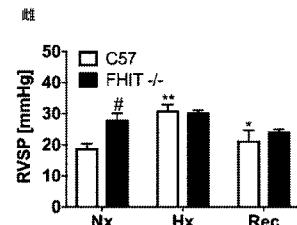


図2A

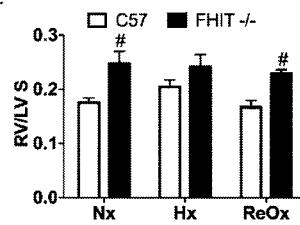


図2B

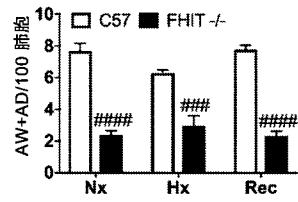


図2C

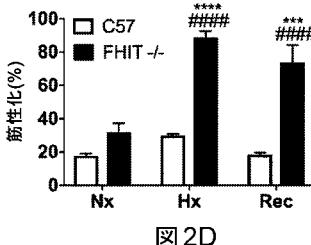


図2D

【図 2 E】

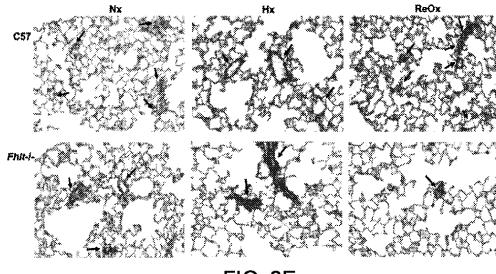


FIG. 2E

【図 2 F】

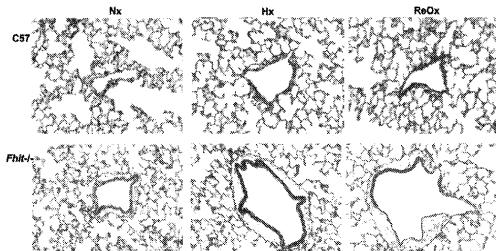


FIG. 2F

【図 3 A - 3 D】

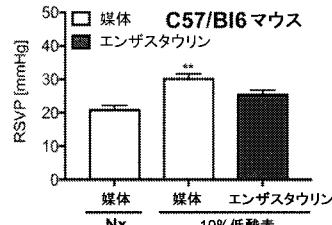


図3A

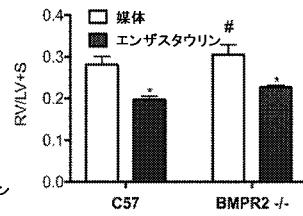


図3B

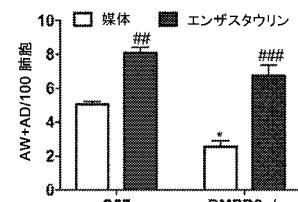


図3C

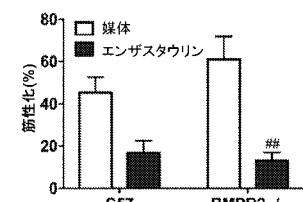
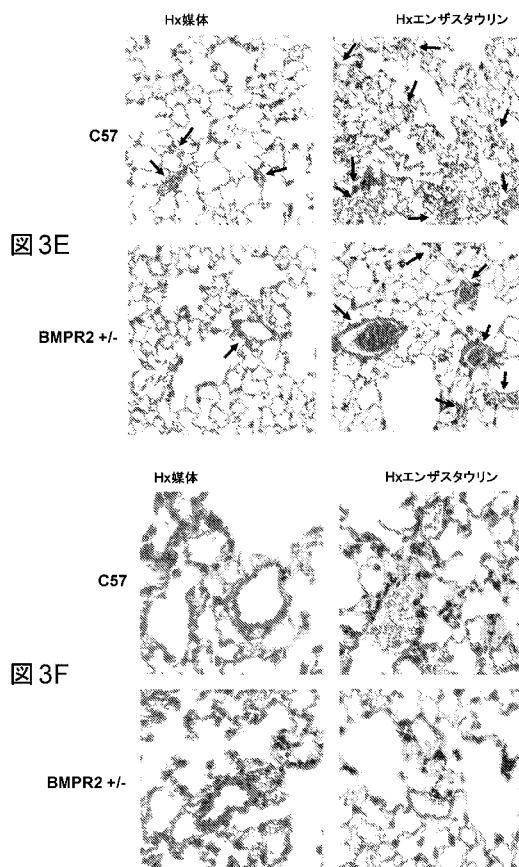
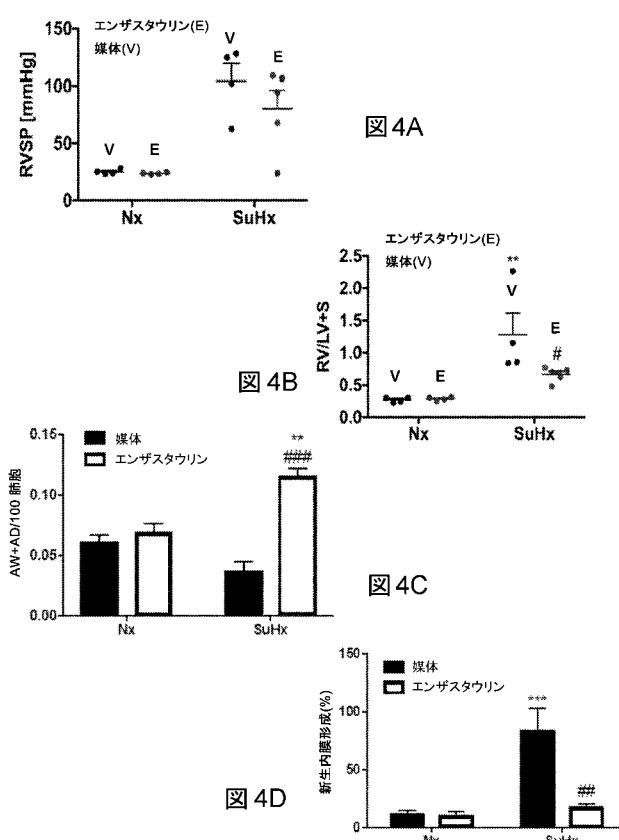


図3D

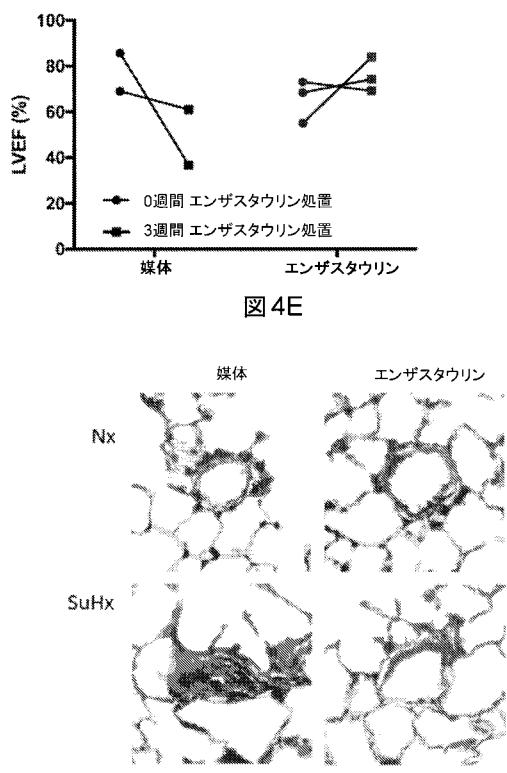
【図 3 E - 3 F】



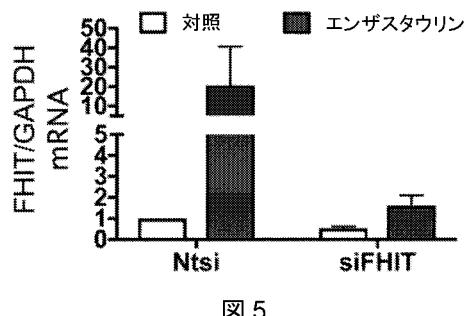
【図 4 A - 4 D】



【図 4 E - 4 F】



【図 5】



【図 6 A】

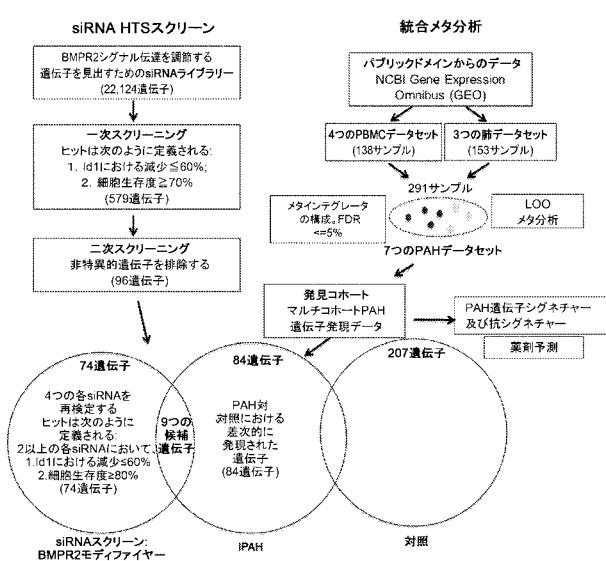


図 6A

【図 6 B】

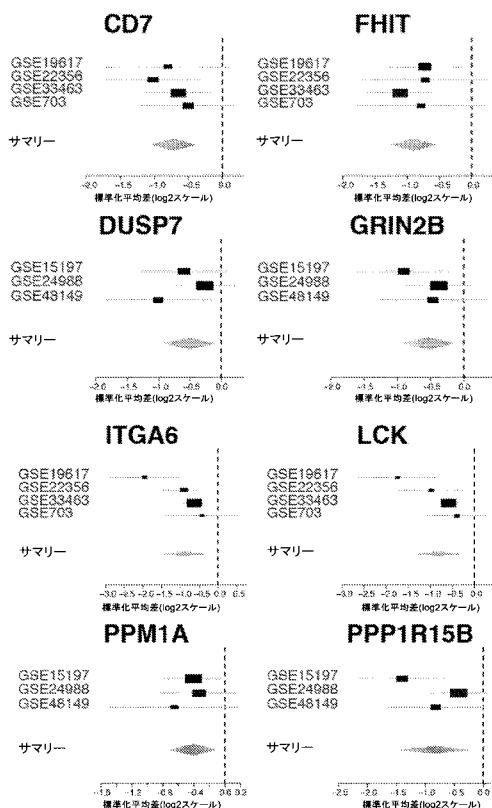


図 6B

【図 6 C】

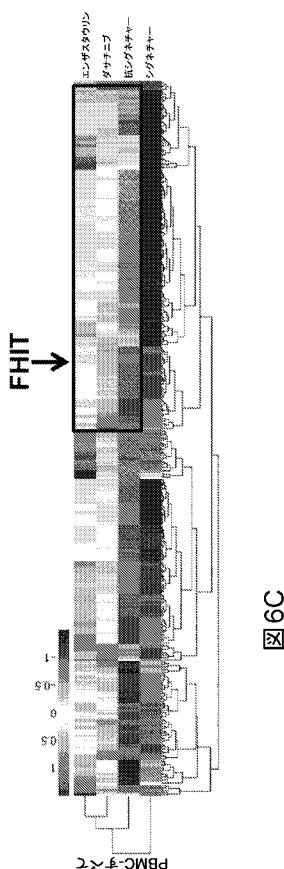


図 6C

【図 7 A - 7 D】

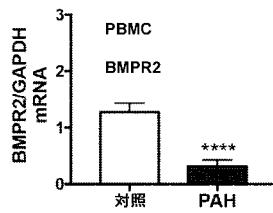


図 7A

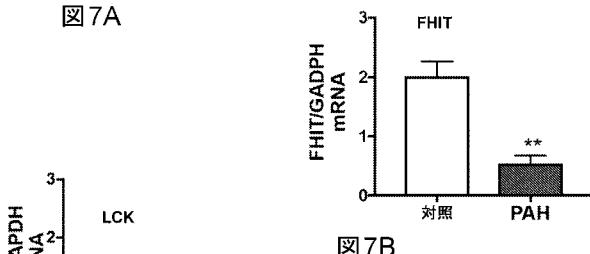


図 7B

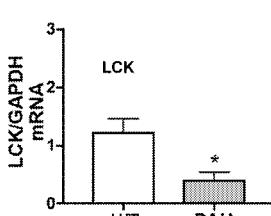


図 7C

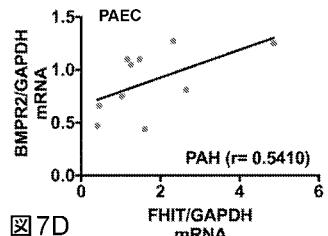


図 7D

【図7E】

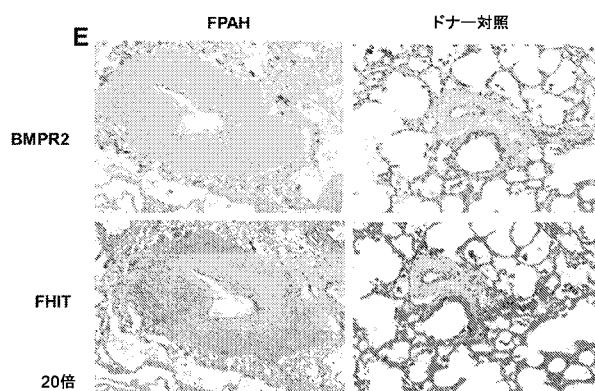
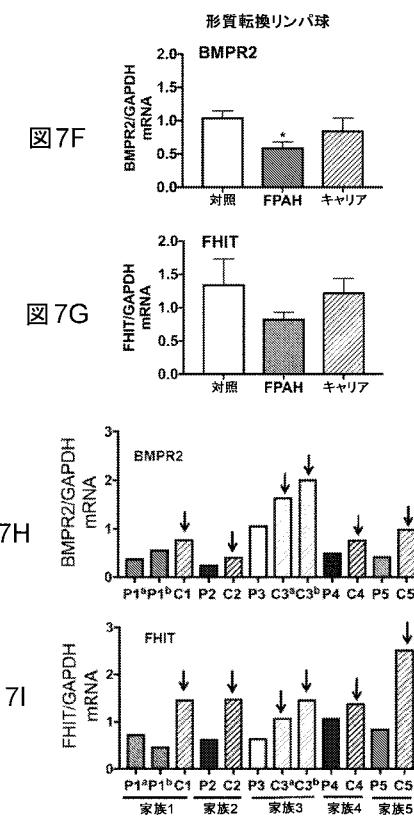
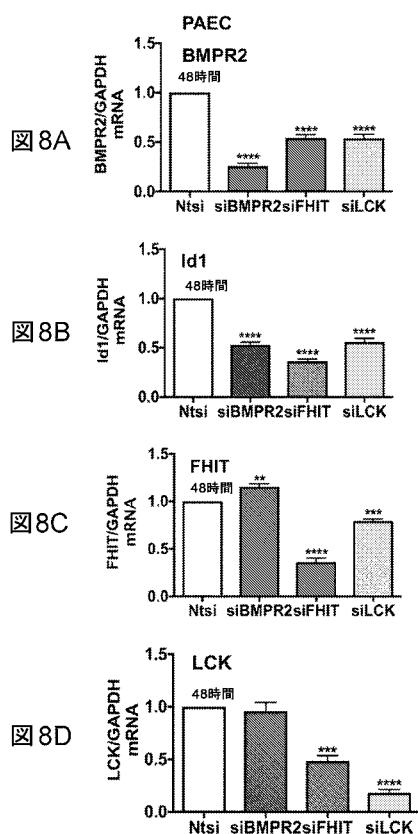


図7E

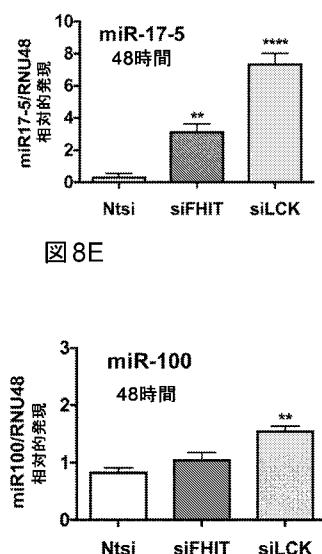
【図7F - 7I】



【図8A - 8D】



【図8E - 8F】



【図 8 G - 8 J】

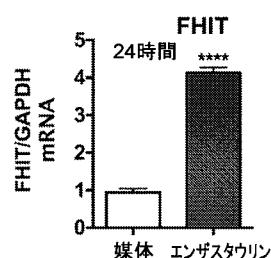


図 8G

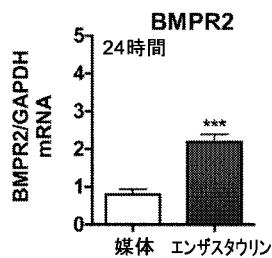


図 8H

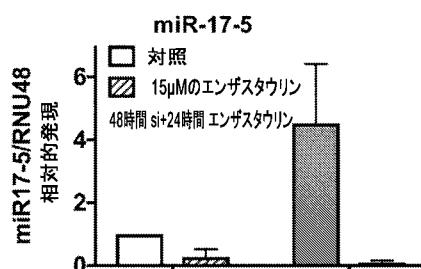


図 8K

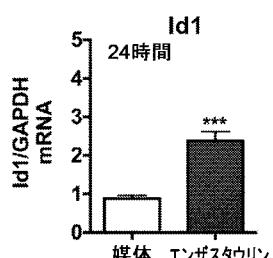


図 8I

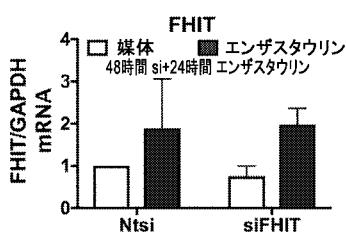


図 8J

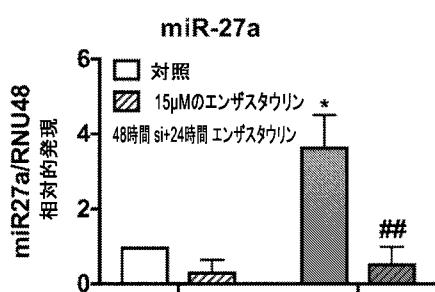


図 8L

【図 8 M】

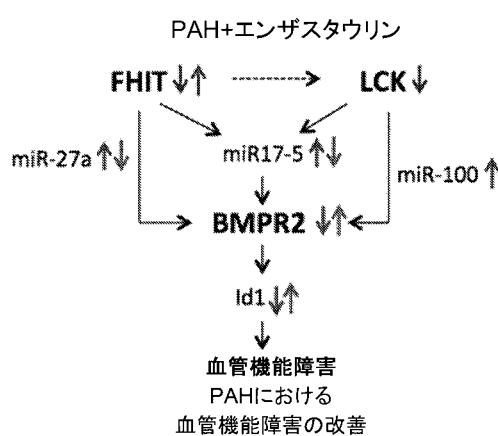


図 8M

【図 9 A - 9 B】

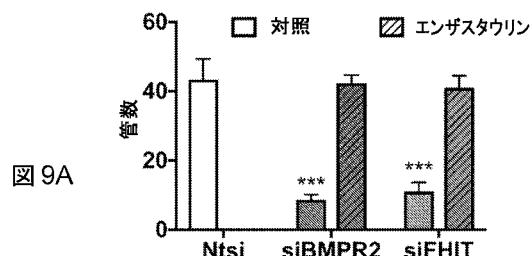


図 9A

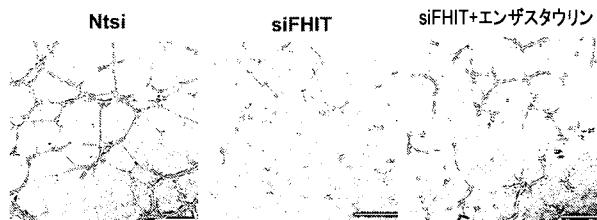
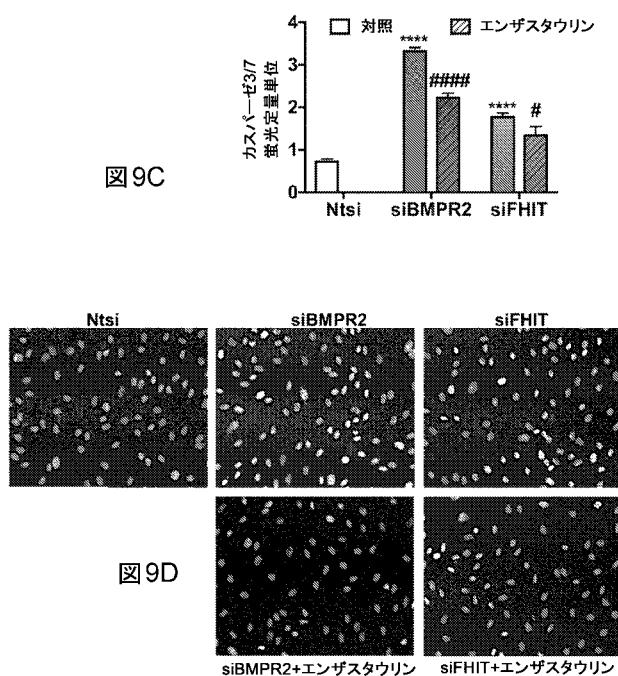
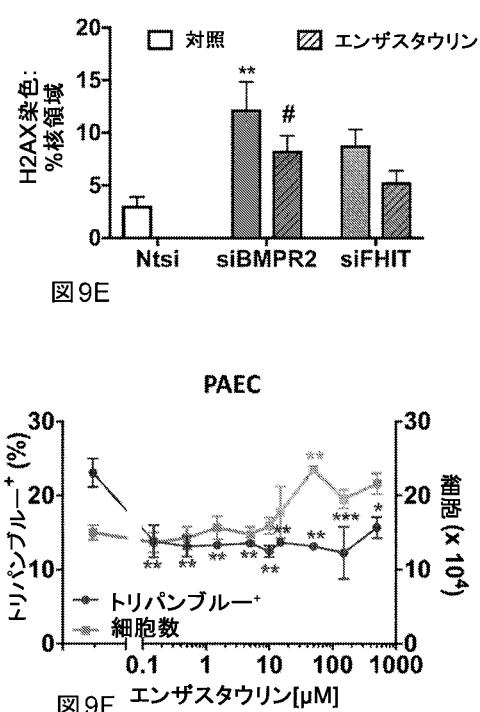


図 9B

【図 9 C - 9 D】



【図 9 E - 9 F】



【図 9 G - 9 H】

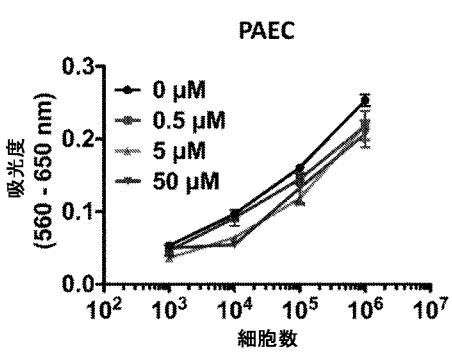


図9G

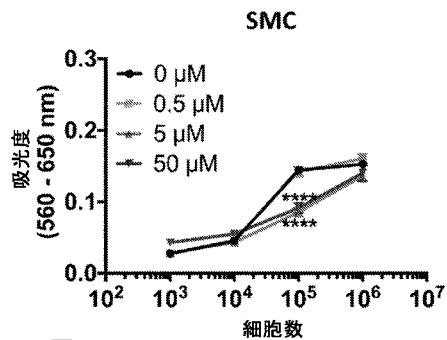


図9H

【図 9 I - 9 J】

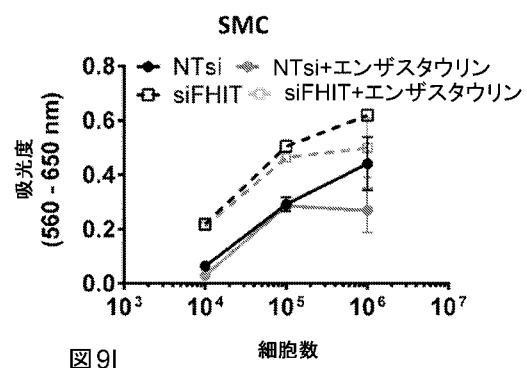


図9I

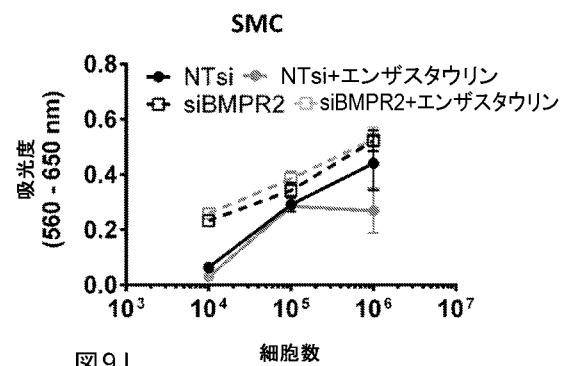


図9J

【図 10A】

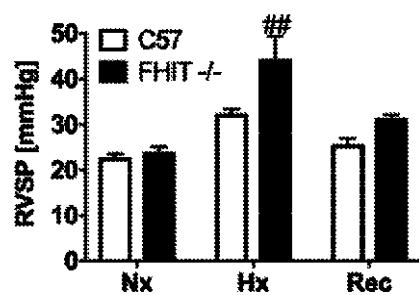
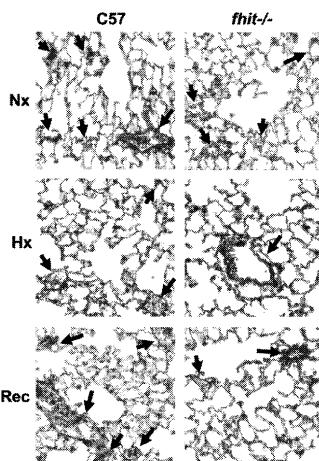


FIG. 10A

【図 10C】



【図 10B】

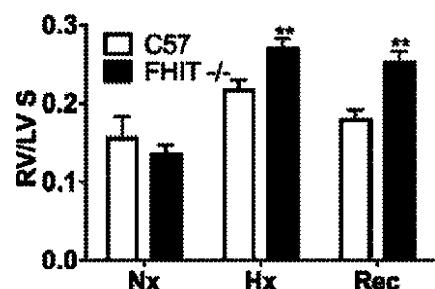


FIG. 10B

【図 10D - 10F】

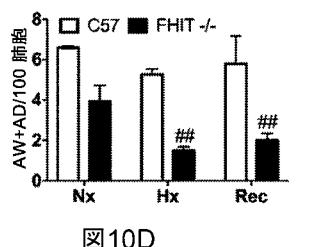


図10D

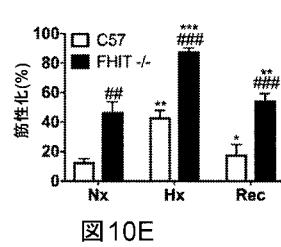


図10E

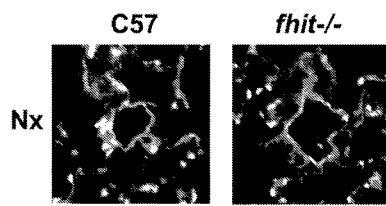


図10F

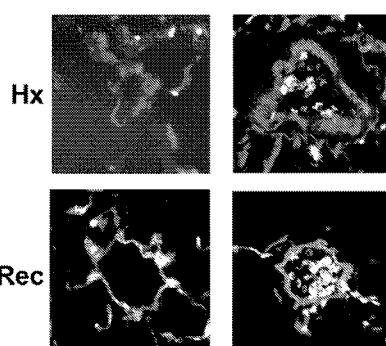


図10F

【図 10G - 10H】

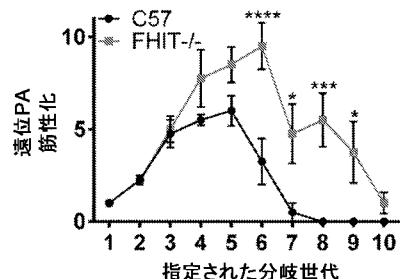


図10G

C57

fhit-/-

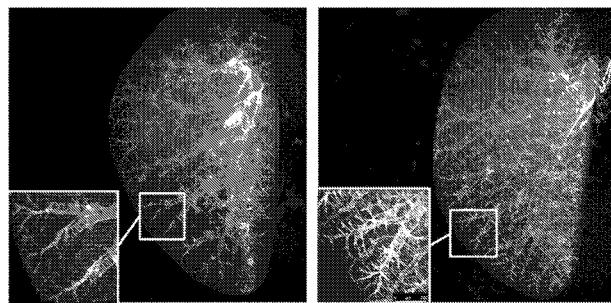


図10H

【図10I】

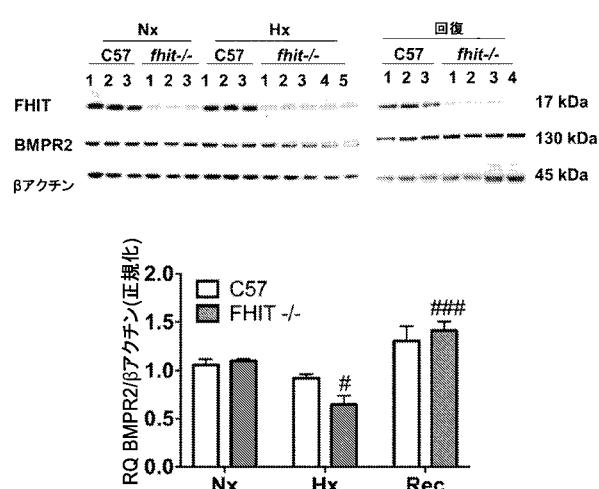


図10I

【図11A - 11B】

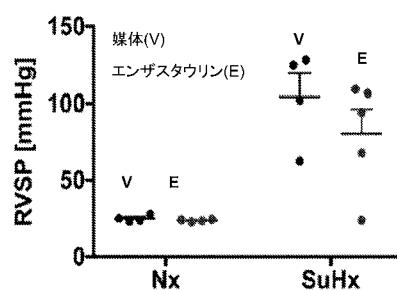


図11A

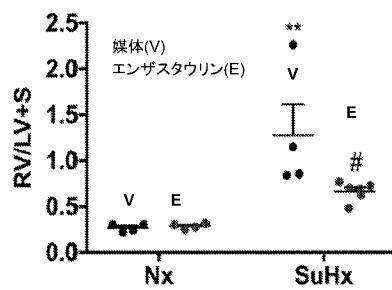
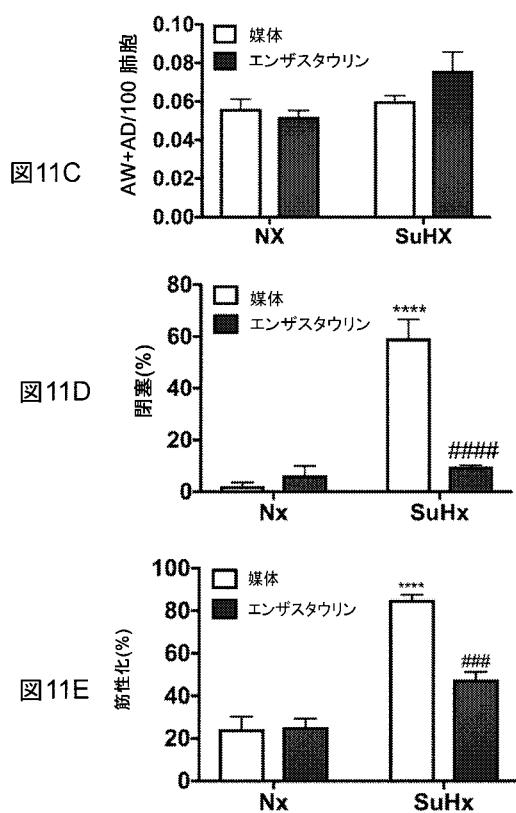


図11B

【図11C - 11E】



【図11F】

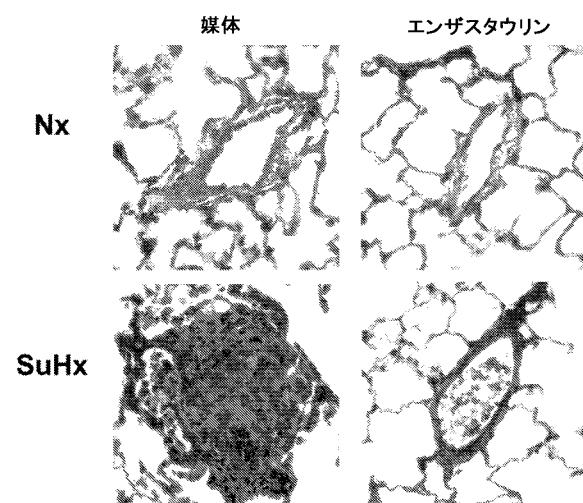


図11F

【図 1 1 G - 1 1 H】

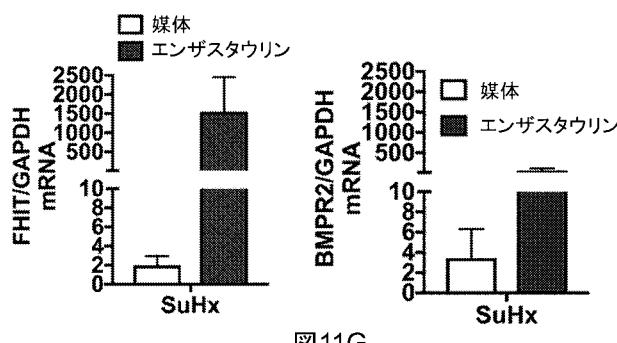


図11G

【図 1 1 I - 1 1 K】

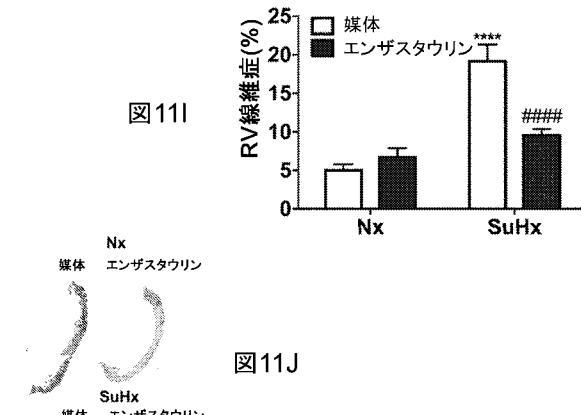


図11J

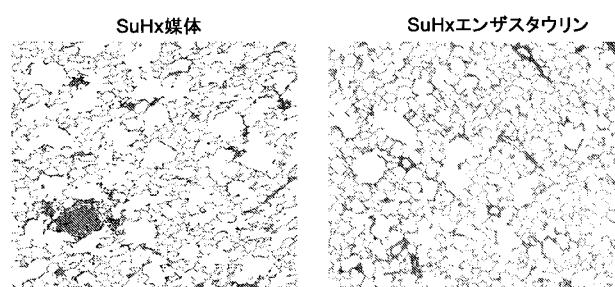


図11H

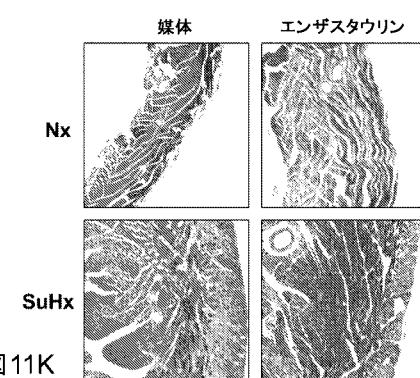


図11K

【図 1 2】

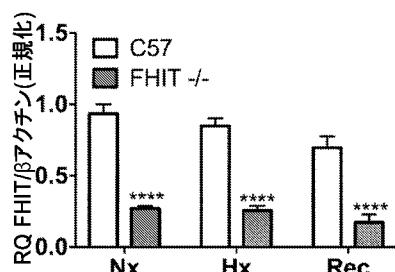
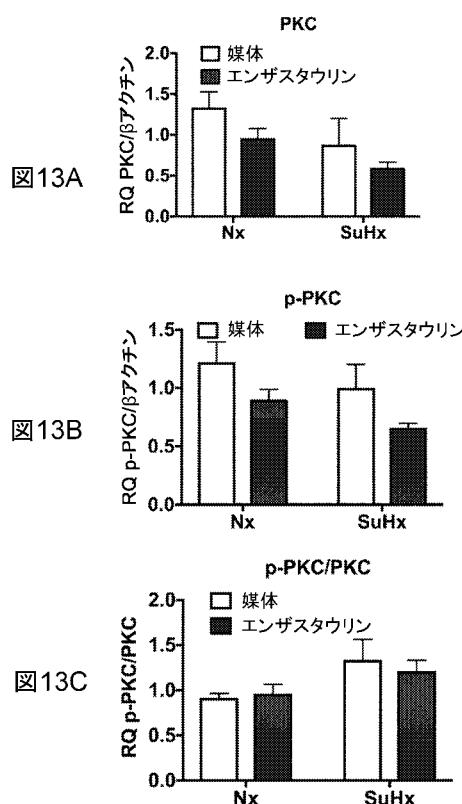


図12

【図 1 3 A - 1 3 C】



【図 13D】

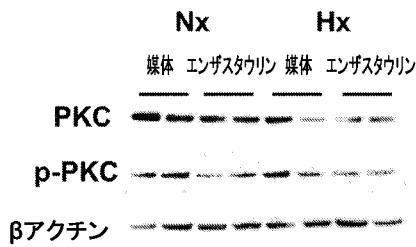
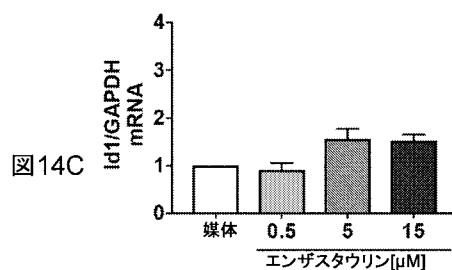
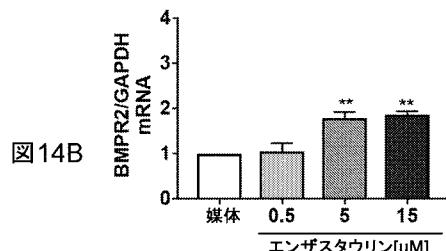
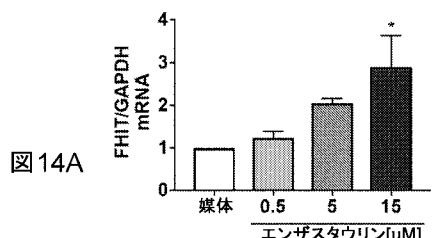


図13D

【図 14 A - 14 C】



【図 15 A - 15 F】

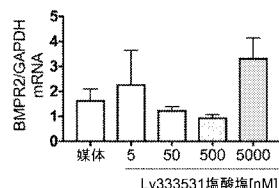


図15A

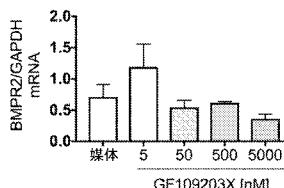


図15B

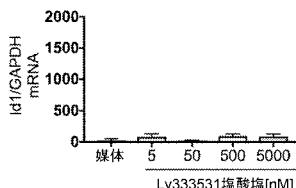


図15C

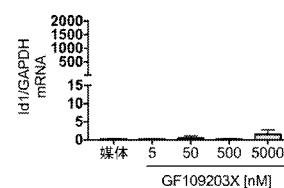


図15D

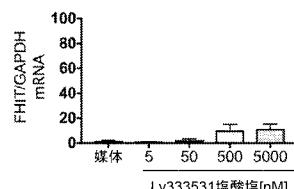


図15E

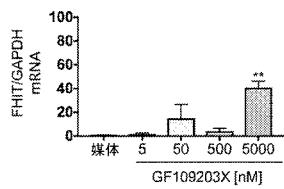
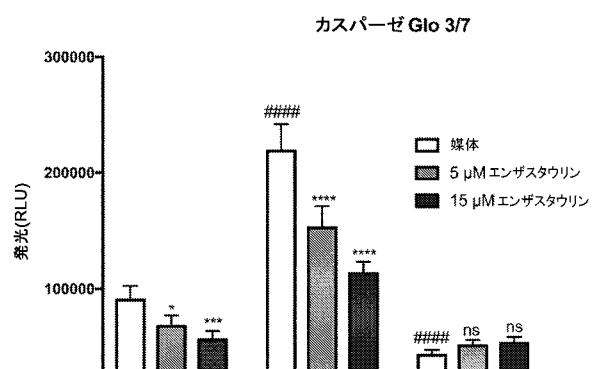


図15F

【図 16】



カスパーゼ Glo 3/7

■ 媒体  
▨ 5  $\mu$ M エンザスタウリン  
■ 15  $\mu$ M エンザスタウリン

【図 17A】

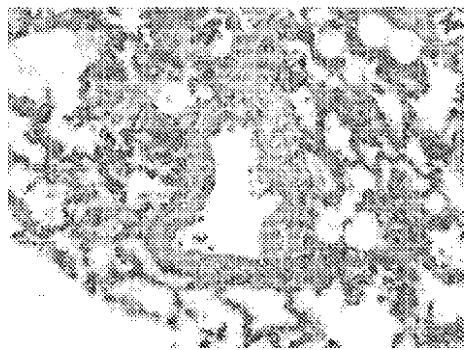


FIG. 17A

【図 17B】

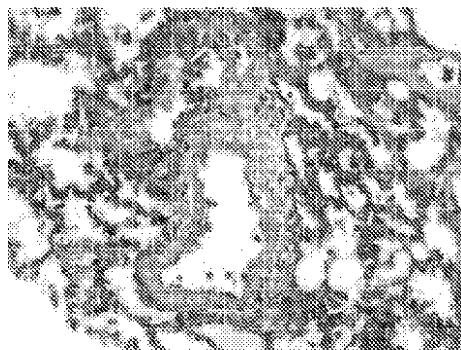


FIG. 17B

【図 18A - 18D】

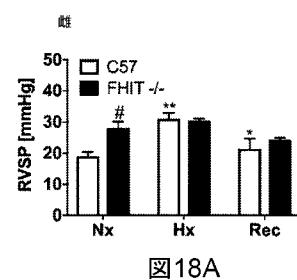


図18A

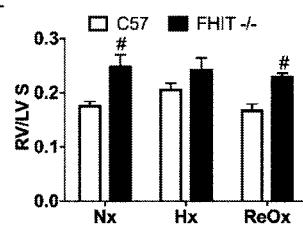


図18B

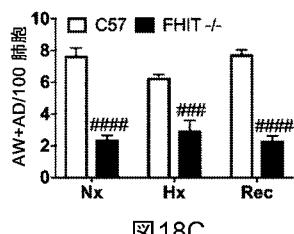


図18C

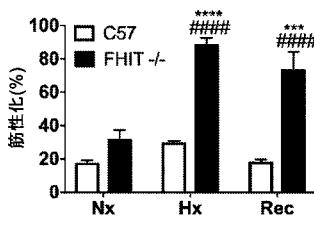


図18D

【図 18E】

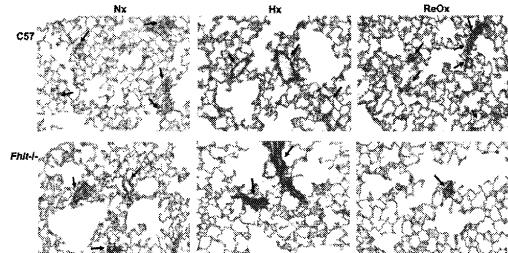


FIG. 18E

【図 18F】

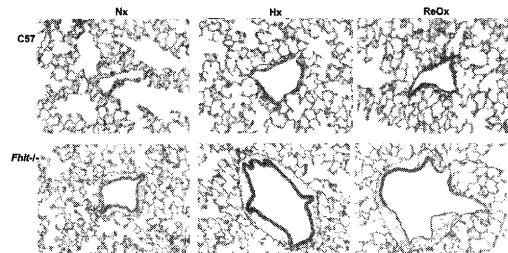
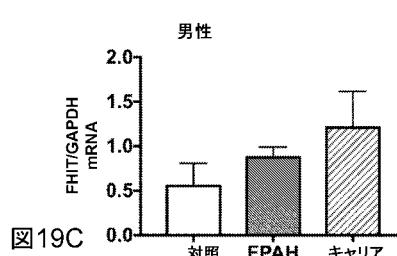
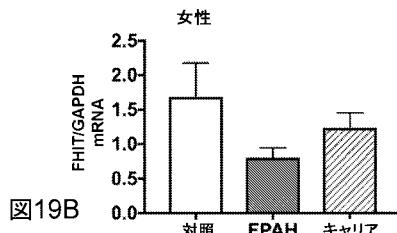
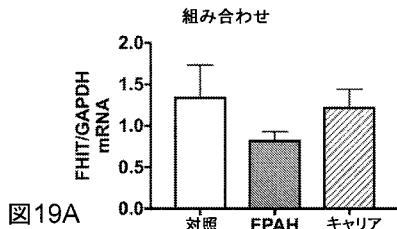
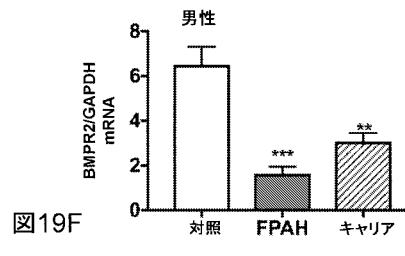
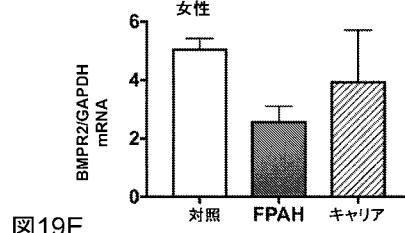
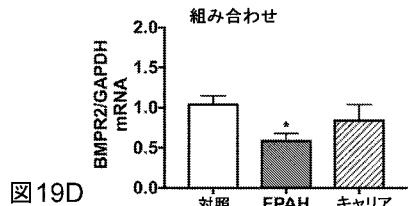


FIG. 18F

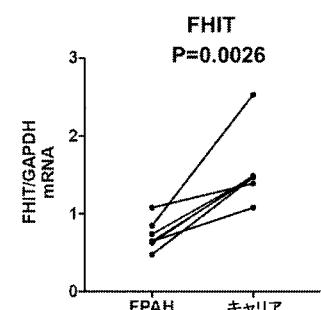
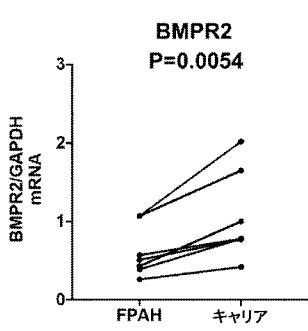
【図 19 A - 19 C】



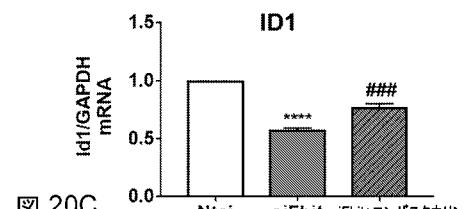
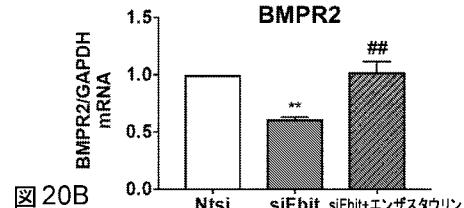
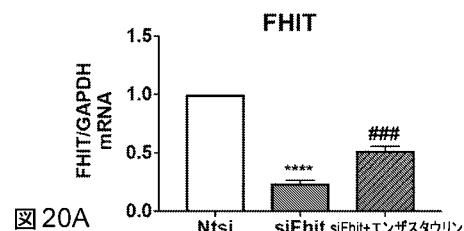
【図 19 D - 19 F】



【図 19 G - 19 H】



【図 20 A - 20 C】



【図 2 1 A - 2 1 D】

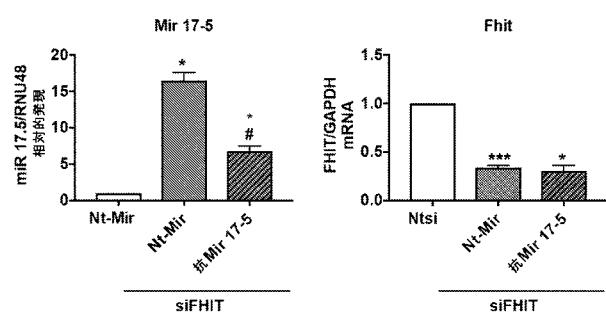


図 21A

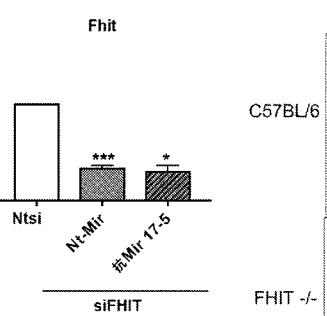


図 21B

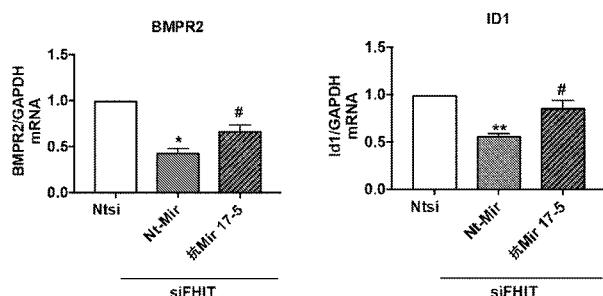


図 21C

図 21D

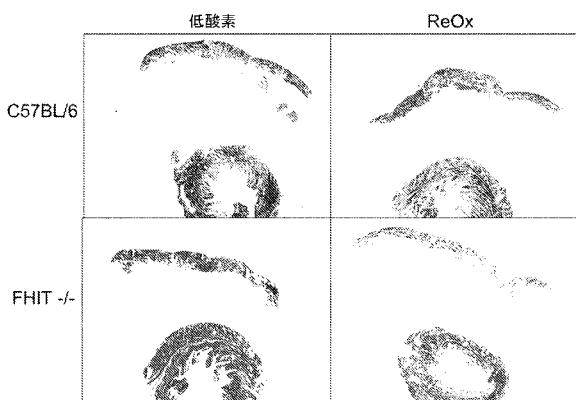


図 22

【図 2 3 A - 2 3 C】

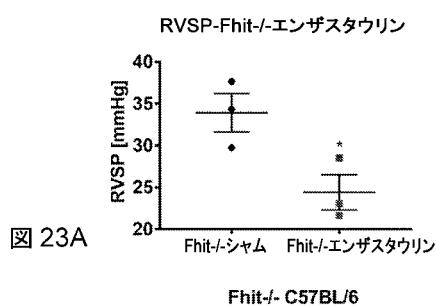


図 23A

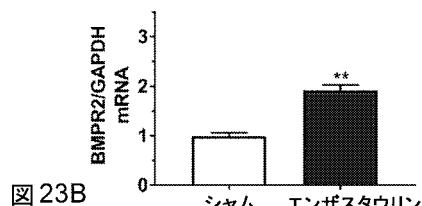


図 23B

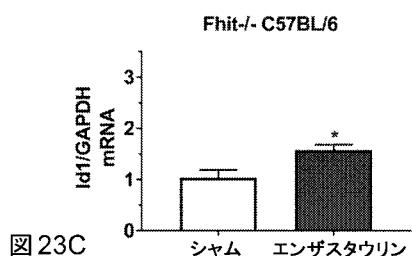


図 23C

【図 2 4 A - 2 4 D】

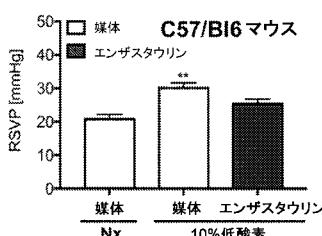


図 24A

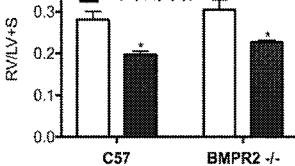


図 24B

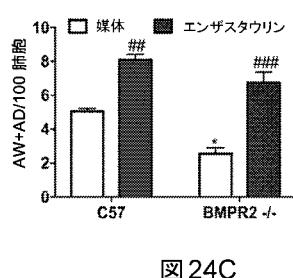


図 24C

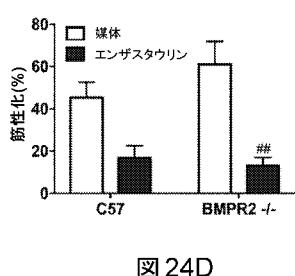


図 24D

【図 24 E - 24 F】

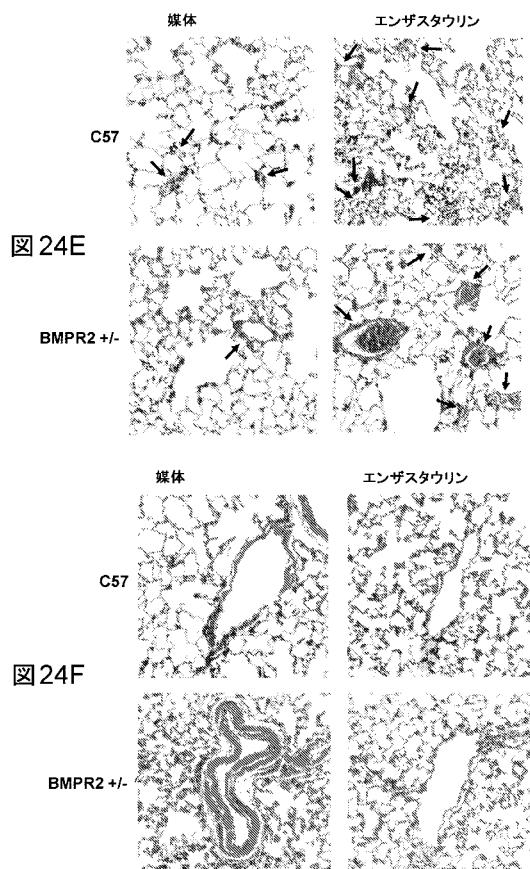


図 24F

【図 24 G】

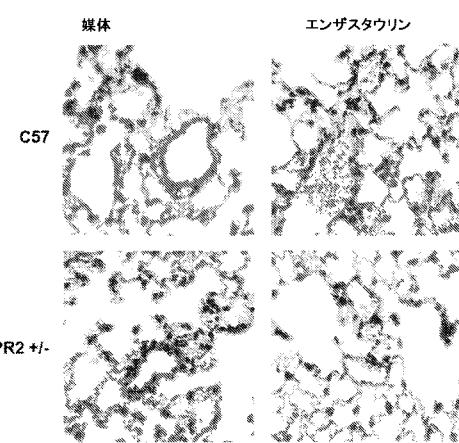


図 24G

【図 25 A - 25 D】

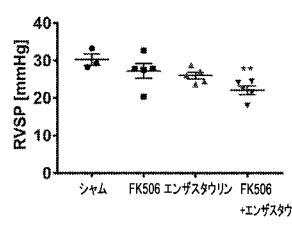


図 25A

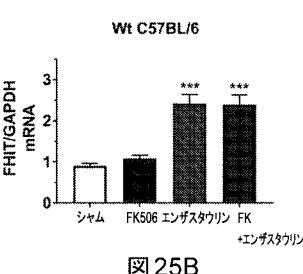


図 25B

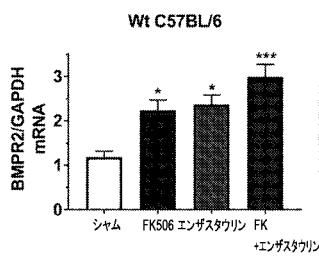


図 25C

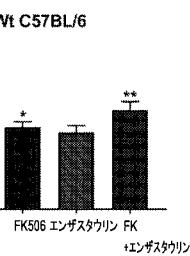


図 25D

【図 26】

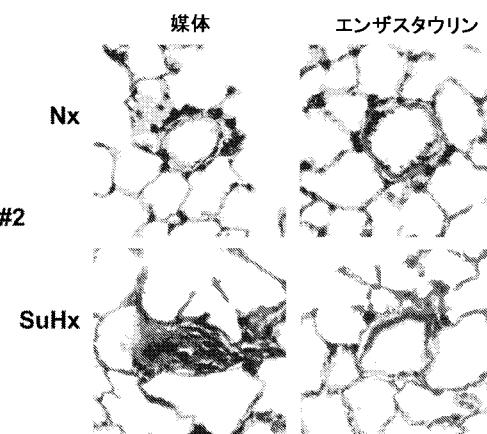


図 26

【図 27A - 27B】

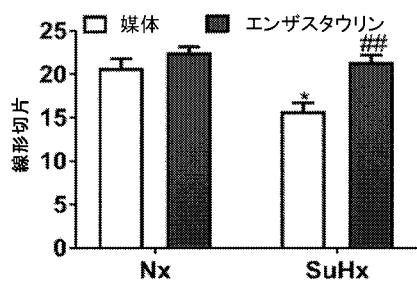


図27A

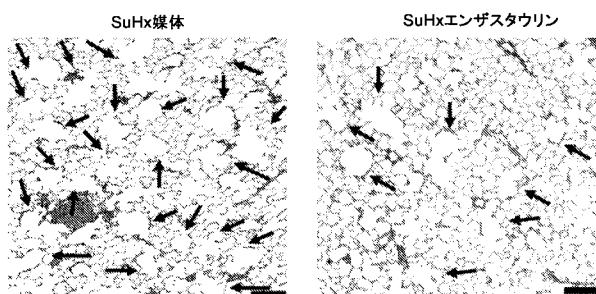


図27B

## 【国際調査報告】

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT  |   | International application No.<br>PCT/US2018/033533 |           |  |                       |   |   |                   |   |  |             |   |  |           |   |  |                    |   |  |    |   |   |       |   |  |        |   |  |                          |   |  |                          |
|--|---|--|-----------|--|-----------------------|---|---|-------------------|---|--|-------------|---|--|-----------|---|--|--------------------|---|--|----|---|---|-------|---|--|--------|---|--|--------------------------|---|--|--------------------------|
| <b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b><br>IPC(8) - A61K 38/00; A61K 45/00; A61K 45/06; A61P 11/00; G01N 1/00 (2018.01)<br>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><br>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)<br>See Search History document  |   |  |           |  |                       |   |   |                   |   |  |             |   |  |           |   |  |                    |   |  |    |   |   |       |   |  |        |   |  |                          |   |  |                          |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched<br>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)<br>See Search History document  |   |  |           |  |                       |   |   |                   |   |  |             |   |  |           |   |  |                    |   |  |    |   |   |       |   |  |        |   |  |                          |   |  |                          |
| <b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left;">Category*</th> <th style="text-align: left;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="text-align: left;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>US 2016/0296588 A1 (STC.UNM) 13 October 2016 (13.10.2016) entire document</td> <td>1-8, 59-62, 93-96</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td></td> <td>-----<br/>66</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>US 2002/0137086 A1 (OLEK et al) 26 September 2002 (26.09.2002) entire document</td> <td>63-65, 87</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td></td> <td>-----<br/>66, 84-89</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>WO 2015/116735 A1 (MAYO FOUNDATION FOR MEDICAL EDUCATION AND RESEARCH) 06 August 2015 (06.08.2015) entire document</td> <td>83</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>- 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</td> <td>84-89</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>US 2014/0135358 A1 (SPIEKERKOETTER et al) 15 May 2014 (15.05.2014) entire document</td> <td>88, 89</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 2011/0091421 A1 (MANN) 21 April 2011 (21.04.2011) entire document</td> <td>1-8, 59-67, 83-91, 93-96</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>- 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</td> <td>1-8, 59-67, 83-91, 93-96</td> </tr> </tbody> </table> |   |  | Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. | X | US 2016/0296588 A1 (STC.UNM) 13 October 2016 (13.10.2016) entire document | 1-8, 59-62, 93-96 | Y |  | -----<br>66 | X | US 2002/0137086 A1 (OLEK et al) 26 September 2002 (26.09.2002) entire document | 63-65, 87 | Y |  | -----<br>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 (SPIEKERKOETTER 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 |
| Category*  | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No.                              |           |  |                       |   |   |                   |   |  |             |   |  |           |   |  |                    |   |  |    |   |   |       |   |  |        |   |  |                          |   |  |                          |
| X  | US 2016/0296588 A1 (STC.UNM) 13 October 2016 (13.10.2016) entire document   | 1-8, 59-62, 93-96                                  |           |  |                       |   |   |                   |   |  |             |   |  |           |   |  |                    |   |  |    |   |   |       |   |  |        |   |  |                          |   |  |                          |
| Y  |   | -----<br>66  |           |  |                       |   |   |                   |   |  |             |   |  |           |   |  |                    |   |  |    |   |   |       |   |  |        |   |  |                          |   |  |                          |
| X  | US 2002/0137086 A1 (OLEK et al) 26 September 2002 (26.09.2002) entire document  | 63-65, 87  |           |  |                       |   |   |                   |   |  |             |   |  |           |   |  |                    |   |  |    |   |   |       |   |  |        |   |  |                          |   |  |                          |
| Y  |   | -----<br>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 (SPIEKERKOETTER 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:<br>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance<br>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date<br>"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)<br>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means<br>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed<br>"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<br>"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<br>"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<br>"&" document member of the same patent family   |   |  |           |  |                       |   |   |                   |   |  |             |   |  |           |   |  |                    |   |  |    |   |   |       |   |  |        |   |  |                          |   |  |                          |
| Date of the actual completion of the international search<br>09 July 2018  | Date of mailing of the international search report<br><b>09 AUG 2018</b>  |  |           |  |                       |   |   |                   |   |  |             |   |  |           |   |  |                    |   |  |    |   |   |       |   |  |        |   |  |                          |   |  |                          |
| Name and mailing address of the ISA/US<br>Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents<br>P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450<br>Facsimile No. 571-273-8300  | Authorized officer<br>Blaine R. Copenheaver<br>PCT Helpdesk: 571-272-4300<br>PCT OSP: 571-272-7774  |  |           |  |                       |   |   |                   |   |  |             |   |  |           |   |  |                    |   |  |    |   |   |       |   |  |        |   |  |                          |   |  |                          |

**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  | PROSSEDA et al. "A4228: Enzastaurin Reverses Pulmonary Arterial Hypertension By Targeting The Novel Mmp2 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 |

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

**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,R0,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,D0,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 94305 - 2038,スタンフォード,メイン クワッド  
,ピー.オー.ボックス 20386,オフィス オブ ザ ジェネラル カウンセル,ビルディング 170,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 94305 - 2038,スタンフォード,メイン クワッド  
,ピー.オー.ボックス 20386,オフィス オブ ザ ジェネラル カウンセル,ビルディング 170,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 94305 - 2038,スタンフォード,メイン クワッド  
,ピー.オー.ボックス 20386,オフィス オブ ザ ジェネラル カウンセル,ビルディング 170,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 94305 - 2038,スタンフォード,メイン クワッド  
,ピー.オー.ボックス 20386,オフィス オブ ザ ジェネラル カウンセル,ビルディング 170,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(fhit)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,エッダ<br>ダンネヴィッツ,プロッセダ,スヴェニヤ<br>ティアン,スーフェイ<br>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BMPR2水平选择患者进行治疗或监测治疗效果以及检查FHIT和/或BMPR2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BMPR2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 | BMPR2 NMD 状態 | 関係                          |
|--------|--------|------------|--------|---------|--------|--------------|-----------------------------|
| 家族 1   | P1a 男性 | 53         | 43     | 10      | 81     | NMD+         | P1a の夫または妻<br>P1a 及び P1b の娘 |
|        | P1b 女性 | 39         | 25     | 14      | 64     | NMD+         |                             |
|        | C1 女性  | 74         |        |         | 100    | NMD+         | P1a の父                      |
| 家族 2   | C1b 男性 | 81         |        |         | 100    | NMD+         | P1a の父親                     |
|        | P2 女性  | 43         | 35     | 8       | 81     | 可能性低い、未確認    |                             |
| 家族 3   | C2 女性  | 72         |        |         | 100    | 可能性低い、未確認    | P2 の母親                      |
|        | P3 女性  | 39         | 28     | 11      | 72     | NMD+         |                             |
| 家族 4   | C3a 男性 | 39         |        |         | 100    | NMD+         | P3 の娘                       |
|        | C3b 女性 | 50         |        |         | 100    | NMD+         |                             |
| 家族 4   | P4 男性  | 50         | 38     | 12      | 76     | NMD+         | P4 の娘                       |
|        | C4 女性  | 56         |        |         | 100    | NMD+         |                             |
| 家族 5   | P5 男性  | 49         | 34     | 15      | 69     | 可能性低い、未確認    | P5 の叔父                      |
|        | 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 の姪                      |
|        | P6b 女性 | 82         | 64     | 18      | 78     | NMD+         |                             |
| 家族 7   | C6 男性  | 85         |        |         | 100    | NMD+         | 6b の兄弟、P6a の叔父              |
|        | P7 女性  | 48         | 37     | 11      | 77     | NMD+         |                             |
| 血縁でない者 | C7 男性  | 71         |        |         | 100    | NMD+         | P7 の叔父                      |
|        | P8 女性  | 34         | 29     | 5       | 34     | NMD-         |                             |
| 対照     | C8 女性  | n=7<br>n=3 | 67     |         | 100    | NMD-         |                             |
|        | 男性     |            |        |         |        |              |                             |