(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 114450027 A
(43)申请公布日 2022.05.06

(21)申请号 202080066541.8

(22)申请日 2020.08.13

(30)优先权数据
62/888,027 2019.08.16 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2022.03.22

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2020/046209 2020.08.13

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2021/034616 EN 2021.02.25

(71)申请人 儿童医院医疗中心
地址 美国俄亥俄州

(72)发明人 哈特穆特·盖格 郑诣

(74)专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理有限责任公司 11204
专利代理师 王达佐 安佳宁

(51)Int.Cl.
A61K 45/00(2006.01)
A61K 45/06(2006.01)
A61P 29/00(2006.01)
A61P 43/00(2006.01)
A61K 31/404(2006.01)
A61K 31/4985(2006.01)

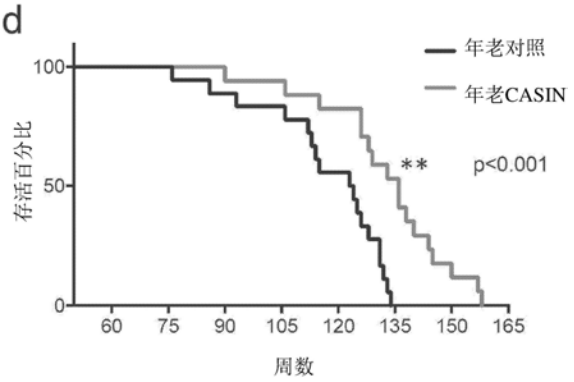
权利要求书8页 说明书49页 附图22页

(54)发明名称

用CDC42特异性抑制剂治疗受试者的方法

(57)摘要

本文公开的实施方案涉及用于延长或调节受试者生命的各个方面或免疫受试者的方法。特别地，提供了用于增加或调节寿命、存活时间、生命期限和健康期限的方法，包括向需要治疗的受试者施用有效量的至少一种Cdc42特异性抑制剂。此外，提供了免疫受试者的方法，包括向需要免疫的受试者施用有效量的至少一种Cdc42特异性抑制剂和向所述受试者施用一种或多种免疫剂量。描述的方法进一步包括将受试者鉴定为将从延长寿命、延长存活时间、延长生命期限、延长健康期限或免疫接种中受益的受试者。基于受试者的年龄、受试者当前的医学状况、受试者的当前医学治疗或受试者的Cdc42活性来鉴定受试者。



CN 114450027 A

1.一种增加受试者寿命的方法,包括:向需要治疗的受试者施用有效量的至少一种Cdc42特异性抑制剂。

2.一种增加受试者存活时间的方法,包括:向需要治疗的受试者施用有效量的至少一种Cdc42特异性抑制剂。

3.一种增加受试者生命期限的方法,包括:向需要治疗的受试者施用有效量的至少一种Cdc42特异性抑制剂。

4.一种增加受试者健康期限的方法,包括:向需要治疗的受试者施用有效量的至少一种Cdc42特异性抑制剂。

5.一种免疫受试者的方法,包括:向需要免疫的受试者施用有效量的至少一种Cdc42特异性抑制剂和向所述受试者施用一种或多种免疫剂量。

6.根据权利要求1-5中任一项所述的方法,进一步包括将受试者鉴定为将从增加寿命、增加存活时间、增加生命期限、增加健康期限或免疫中受益的受试者。

7.根据权利要求6所述的方法,其中已经基于所述受试者的年龄、所述受试者当前的医学状况、所述受试者当前的医学治疗或所述受试者的Cdc42活性鉴定所述受试者。

8.根据权利要求5-7中任一项所述的方法,其中在所述受试者接受一种或多种免疫剂量之前向受试者施用Cdc42特异性抑制剂。

9.根据权利要求1-8中任一项所述的方法,其中在所述受试者接受一种或多种免疫剂量之后向受试者施用Cdc42特异性抑制剂。

10.根据权利要求1-9中任一项所述的方法,其中向所述受试者施用第一次Cdc42特异性抑制剂,所述受试者在施用第一次Cdc42特异性抑制剂后接受第一次免疫剂量,并且所述受试者在接受第一次免疫剂量后接受一次或多次后续免疫剂量。

11.根据权利要求1-10中任一项所述的方法,其中在所述受试者接受第二次免疫剂量之后所述受试者接受第三次免疫剂量。

12.根据权利要求1-11中任一项所述的方法,其中所述受试者接受1-10、1-9、1-8、1-7、1-6、1-5、1-4、1-3、2-10、2-9、2-8、2-7、2-6、2-5、2-4、2-3、3-10、3-9、3-8、3-7次、3-6、3-5、3-4、4-10、4-9、4-8、4-7、4-6、4-5、5-10、5-9、5-8、5-7、5-6、6-10、6-9、6-8、6-7、7-10、7-9、7-8、8-10、8-9或9-10次总免疫剂量以针对单种疾病进行免疫。

13.根据权利要求1-12中任一项所述的方法,其中所述受试者接受2、3、4、5、6、7、8、9或10次总免疫剂量以针对单种疾病进行免疫。

14.根据权利要求1-13中任一项所述的方法,其中所述受试者被针对多种疾病进行免疫。

15.根据权利要求1-14中任一项所述的方法,其中免疫剂量之间的时间段为约1周、约2周、约3周、约1个月、约2个月、约3个月、约4个月、约5个月、约6个月、约7个月、约8个月、约9个月、约10个月、约11个月或约1年。

16.根据权利要求1-15中任一项所述的方法,其中在接受所述第一次免疫剂量之后向所述受试者施用第二次Cdc42特异性抑制剂。

17.根据权利要求1-16中任一项所述的方法,其中在一次或多次免疫剂量之前向所述受试者施用Cdc42特异性抑制剂。

18.根据权利要求1-17中任一项所述的方法,其中在一次或多次免疫剂量之后向所述

受试者施用Cdc42特异性抑制剂。

19.根据权利要求1-18中任一项所述的方法，其中所述第一次和所述第二次Cdc42特异性抑制剂相同或不同。

20.根据权利要求1-19中任一项所述的方法，其中所述第一次和第二次免疫相同或不同。

21.根据权利要求1-20中任一项所述的方法，其中所述受试者的免疫系统受到损害。

22.根据权利要求1-21中任一项所述的方法，其中由于所述受试者的年龄、所述受试者的医学状况或针对所述受试者的医学状况对所述受试者的治疗而损害了所述受试者的免疫系统。

23.根据权利要求1-22中任一项所述的方法，其中所述免疫剂量是疫苗。

24.根据权利要求23所述的方法，其中所述疫苗由疾病控制和预防中心推荐。

25.根据权利要求23-24中任一项所述的方法，其中所述疫苗接种用于选自以下的疾病：流感、百日咳、破伤风、白喉、带状疱疹、肺炎球菌病、人乳头瘤病毒、脑膜炎球菌病、甲型肝炎、乙型肝炎、水痘、麻疹、腮腺炎和风疹。

26.根据权利要求1-22中任一项所述的方法，其中所述免疫不是疫苗。

27.根据权利要求1-26中任一项所述的方法，其中所述施用是全身性的。

28.根据权利要求1-26中任一项所述的方法，其中所述施用是局部的。

29.根据权利要求1-28中任一项所述的方法，其中所述受试者是老年人受试者。

30.根据权利要求1-29中任一项所述的方法，其中所述受试者是年龄超过50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80岁的老年人受试者。

31.根据权利要求1-30中任一项的方法，其中向所述受试者施用Cdc42特异性抑制剂进行一次。

32.根据权利要求1-31中任一项所述的方法，其中施用所述Cdc42特异性抑制剂进行多于一次。

33.根据权利要求1-32中任一项所述的方法，其中施用所述Cdc42特异性抑制剂进行1-10次、1-9次、1-8次、1-7次、1-6次、1-5次、1-4次、1-3次、2-10次、2-9次、2-8次、2-7次、2-6次、2-5次、2-4次、2-3次、3-10次、3-9次、3-8次、3-7次、3-6次、3-5次、3-4次、4-10次、4-9次、4-8次、4-7次、4-6次、4-5次、5-10次、5-9次、5-8次、5-7次、5-6次、6-10次、6-9次、6-8次、6-7次、7-10次、7-9次、7-8次、8-10次、8-9次或9-10次。

34.根据权利要求1-33中任一项所述的方法，其中施用所述Cdc42特异性抑制剂进行2、3、4、5、6、7、8、9或10次。

35.根据权利要求1-34中任一项所述的方法，其中所述施用作为选自下述的每天方案进行：1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天和8天。

36.根据权利要求1-35中任一项所述的方法，其中所述施用作为选自下述的非连续日方案进行：约1周、约2周、约3周、约1个月、约2个月、约3个月、约6个月、约9个月、约1年、约5年、约10年，或约所述受试者的剩余生命。

37.根据权利要求1-36中任一项所述的方法，其中大约每周、大约每月、大约每6个月、大约每9个月、或大约每12个月、大约每2年或大约每5年重复所述方案。

38.根据权利要求1-37中任一项所述的方法，其中在施用所述Cdc42特异性抑制剂之前测定所述受试者中的Cdc42活性。

39.根据权利要求1-38中任一项所述的方法，其中在每次施用所述Cdc42特异性抑制剂之前测定所述受试者中的Cdc42活性。

40.根据权利要求1-39中任一项所述的方法，其中所述方案或施用基于受试者中的Cdc42活性而重复。

41.根据权利要求1-40中任一项所述的方法，其中当所述受试者中的Cdc42活性为在第一次向所述受试者施用Cdc42特异性抑制剂之前所述受试者中Cdc42活性的约25％、约30％、约40％、约50％、约55％、约60％、约70％、约80％、约90％、约100％、约105％、约110％、约115％、约120％或约125％时重复所述Cdc42特异性抑制剂的方案或施用。

42.根据权利要求1-41中任一项所述的方法，其中所述受试者中的Cdc42活性水平恢复到所述受试者中的正常水平。

43.根据权利要求1-42中任一项所述的方法，其中Cdc42在受试者的血液前体细胞中被抑制。

44.根据权利要求43所述的方法，其中所述血液前体细胞是造血细胞。

45.根据权利要求44所述的方法，其中所述造血细胞选自祖细胞和干细胞。

46.根据权利要求1-45中任一项所述的方法，其中所述细胞中的微管蛋白极性被逆转。

47.根据权利要求1-46中任一项所述的方法，其中所述受试者是哺乳动物或人。

48.根据权利要求1-47中任一项所述的方法，其中相对于受试者的预期的寿命、存活时间、生命期限或健康期限，预期的增加为约1％-100％、约1％-90％、约1％-80％、约1％-70％、约1％-60％、约1％-50％、约1％-40％、约1％-30％、约1％-20％或约5％-15％。

49.根据根据权利要求1-48中任一项所述的方法，其中相对于受试者的预期寿命、存活时间、生命期限或健康期限，预期的增加为约5％、约6％、约7％、约8％、约9％、约10％、约11％、约12％、约13％、约14％或约15％。

50.根据权利要求1-49中任一项所述的方法，其中相对于受试者的预期寿命、存活时间、生命期限或健康期限，预期的增加为至少约1-20年、至少约1-19年、至少约1-18年、至少约1-17年、至少约1-16年、至少约1-15年、至少约1-14年、至少约1-13年、至少约1-12年、至少约1-11年、至少约1-10年、至少约1-9年、至少约1-8年、至少约1-7年、至少约1-6年、至少约1-5年、至少约1-4年、至少约1-3年、至少约1-2年或至少约1年。

51.根据权利要求1-50中任一项所述的方法，其中相对于受试者的预期寿命、存活时间、生命期限或健康期限，预期的增加为约1-20年、约1-19年、约1-18年、约1-17年、约1-16年、约1-15年、约1-14年、约1-13年、约1-12年、约1-11年、约1-10年、约1-9年、约1-8年、约1-7年、约1-6年、约1-5年、约1-4年、约1-3年、约1-2年或约1年。

52.根据权利要求1-51中任一项所述的方法，其中相对于受试者的预期寿命、存活时间、生命期限或健康期限，预期的增加为至少约一天至一年、至少约一天至11个月、至少约一天至10个月、至少约一天至9个月、至少约一天至8个月、至少约一天至7个月、至少约一天至6个月、至少约一天至5个月、至少约一天至4个月、至少约一天至3个月、至少约一天至2个月、或至少约一天至一个月。

53.根据权利要求1-52中任一项所述的方法，其中相对于受试者的预期寿命、存活时

间、生命期限或健康期限，预期的增加为至少约1-52周、至少约2-50周、至少约3-45周、至少约4-40周、至少约5-35周、至少约6-30周、至少约5-25周、至少约6-20周、至少约7-19周、至少约8-18周、至少约9-17周、至少约10-16周、至少约11-15周或至少约12-14周。

54.根据权利要求1-53中任一项所述的方法，其中相对于受试者的预期寿命、生存时间、生命期限或健康期限，预期的增加为约1-52周、约2-50周、约3-45周、约4-40周、约5-35周、约6-30周、约5-25周、约6-20周、约7-19周、约8-18周、约9-17周、约10-16周、约11-15周或约12-14周。

55.根据权利要求1-54中任一项所述的方法，其中相对于受试者的预期寿命、存活时间、生命期限或健康期限，预期的增加为约1周、约2周、约3周、约4周、约5周、约6周、约7周、约8周、约9周、约10周、约11周、约12周、约13周、约14周、约15周、约16周、约17周、约18周、约19周、约20周、约21周、约22周、约23周或约21周。

56.根据权利要求1-55中任一项所述的方法，其中相对于受试者的预期寿命、生存时间、生命期限或健康期限，预期的增加为约一天至一年、约一天至11个月、约一天至10个月、约一天至9个月、约一天至8个月、约一天至7个月、约一天至6个月、约一天至5个月、约一天至4个月、约一天至3个月、约一天至2个月、或约一天至一个月。

57.根据权利要求1-56中任一项所述的方法，其中预期的增加在统计上是显著的。

58.根据权利要求1-57中任一项所述的方法，其中所述受试者的预期寿命、存活时间、生命期限或健康期限是相似情况受试者的中值预期。

59.根据权利要求1-58中任一项所述的方法，其中所述受试者的预期寿命、存活时间、生命期限或健康期限是相似情况受试者的平均预期。

60.根据权利要求1-59中任一项所述的方法，其中所述有效量的Cdc42特异性抑制剂不会动员血液前体细胞。

61.根据权利要求1-60中任一项所述的方法，其中所述Cdc42特异性抑制剂作为药学上可接受的组合物施用。

62.根据权利要求61所述的方法，其中所述药学上可接受的组合物选自片剂、混悬剂、溶液和乳剂。

63.根据权利要求61-62中任一项所述的方法，其中所述药学上可接受的组合物是口服施用的。

64.根据权利要求61-62中任一项所述的方法，其中所述药学上可接受的组合物通过注射施用。

65.根据权利要求61-62中任一项所述的方法，其中所述药学上可接受的组合物通过输注施用。

66.根据权利要求61-65中任一项所述的方法，其中所述药学上可接受的组合物包含所述Cdc42特异性抑制剂，其剂量被配制为不会将Cdc42活性降低至低于正常水平。

67.根据权利要求1-66中任一项所述的方法，其中在所述施用之前所述受试者中Cdc42-GTP与总Cdc42水平的比率大于约1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9或3.0。

68.根据权利要求67所述的方法，其中受试者中所述血液前体细胞的至少10％、20％、30％、40％、50％、60％、70％、80％、90％包含所述施用之前所述Cdc42-GTP与总Cdc42水平

的比率。

69.根据权利要求67-68中任一项所述的方法，其中在所述施用之后降低了所述血液前体细胞中Cdc42-GTP与总Cdc42水平的比率。

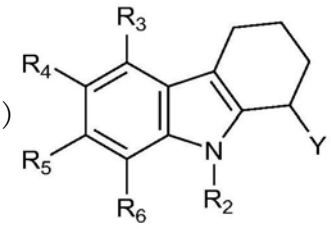
70.根据权利要求1-69中任一项所述的方法，其中在所述施用之后所述血液前体细胞中Cdc42-GTP与总Cdc42水平的比率小于约1.0、1.1、1.2、1.3、1.4或1.5。

71.根据权利要求1-70中任一项所述的方法，其中在所述施用之后所述血液前体细胞或上皮前体细胞中Cdc42-GTP与总Cdc42水平的比率为至少约0.8、0.9、1.0、1.1、1.2或更大。

72.根据权利要求1-71中任一项所述的方法，还包括停止将所述受试者暴露于所述Cdc42特异性抑制剂，其中在停止暴露后维持所述受试者中Cdc42特异性抑制剂介导的变化。

73.根据权利要求1-72中任一项所述的方法，其中所述Cdc42特异性抑制剂是CASIN。

74.根据权利要求1-73中任一项所述的方法，其中所述Cdc42特异性抑制剂包含式(I)的化合物：

(I) 

作为单一对映异构体、对映异构体的混合物、药学上可接受的盐、溶剂合物或其多晶型物，其中：

Y选自$-OR_7$、$-NR_8R_9$和$-NNR_8R_9$；

R_7选自C_{1-6}烷基、$-(CH_2)_uC_{3-7}$环烷基、C_{2-6}烯基、C_{1-6}烷氧基、羟基-C_{1-6}烷基、苯基、被最多5个氟取代的C_{1-6}烷基、被最多5个氟取代的C_{1-6}烷氧基，所述C_{1-6}烷基、$-(CH_2)_uC_{3-7}$环烷基、C_{2-6}烯基、C_{1-6}烷氧基、羟基-C_{1-6}烷基、苯基各自任选被一个或多个取代基取代，该取代基各自独立地选自卤基、-CN、-OH、C_{1-6}烷氧基、杂芳基、R_{19}、和$-OR_{20}$；

R_8和R_9各自分别为氢或R_{20}；或R_8和R_9任选地与它们所连接的氮一起形成二氢吲哚基、吡咯烷基、哌啶基、哌嗪基或吗啉基，各自任选地被一个或多个取代基取代，该取代基各自独立地选自卤基、氰基、硝基、羟基、C_{1-6}烷基、$(CH_2)_uC_{3-7}$环烷基、C_{2-6}烯基、C_{1-6}烷氧基、羟基-C_{1-6}烷基、苯基、被最多5个氟取代的C_{1-6}烷基和被最多5个氟取代的C_{1-6}烷氧基；或R_8和R_2一起成为连接成环的C_{1-3}烷基；

每个R_{20}分别选自C_{1-6}烷基、C_{3-7}环烷基和苯基，所述C_{1-6}烷基、C_{3-7}环烷基和苯基各自任选被一个或多个取代基取代，该取代基独立地选自R_{21}和R_{22}，

每个R_{21}分别选自卤基、氰基、硝基和羟基，

每个R_{22}分别选自C_{1-6}烷基、C_{1-6}烷氧基、$-(CH_2)_uC_{3-7}$环烷基、C_{2-6}烯基、羟基-C_{1-6}烷基、R_{19}和$-OR_{20}$，其各自任选地被一个或多个取代基取代，该取代基各自独立地选自卤基、氰基、硝基、羟基、C_{1-6}烷基和C_{1-6}烷氧基；

每个u独立地为0、1、2、3或4；

R_2是氢，或选自C_{1-6}烷基、C_{3-7}环烷基和苯基，所述C_{1-6}烷基、C_{3-7}环烷基和苯基各自任选地

被一个或多个取代基取代，该取代基各自独立地选自卤基、氰基、硝基、羟基、C_{1-6}烷基、-$(CH_2)_uC_{3-7}$环烷基、C_{2-6}烯基、C_{1-6}烷氧基、羟基-C_{1-6}烷基、苯基、被最多5个氟取代的C_{1-6}烷基、被最多5个氟取代的C_{1-6}烷氧基和-O$(CH_2)_u$苯基，其任选地被一个或多个取代基取代，该取代基选自卤基、氰基、硝基、羟基、C_{1-6}烷基和C_{1-6}烷氧基；或R_8和R_2一起成为连接成环的C_{1-3}烷基；

R_3、R_4、R_5和R_6各自独立地选自氢、卤基、氰基、硝基、羟基、C_{1-6}烷基、$(CH_2)_uC_{3-7}$环烷基、-O$(CH_2)_uC_{3-7}$环烷基、C_{2-6}烯基、C_{1-6}烷氧基、羟基-C_{1-6}烷基、苯基、被最多5个氟取代的C_{1-6}烷基和被最多5个氟取代的C_{1-6}烷氧基，所述C_{1-6}烷基、$(CH_2)_uC_{3-7}$环烷基、-O$(CH_2)_uC_{3-7}$环烷基、C_{2-6}烯基、C_{1-6}烷氧基、羟基-C_{1-6}烷基和苯基各自任选地被一个或多个R_{23}取代，

每个R_{23}独立地选自卤基、氰基、硝基、羟基、C_{1-6}烷基、-$(CH_2)_uC_{3-7}$环烷基、C_{2-6}烯基、C_{1-6}烷氧基、羟基-C_{1-6}烷基、苯基、被最多5个氟取代的C_{1-6}烷基和被最多5个氟取代的C_{1-6}烷氧基，所述苯基任选地被一个或多个取代基取代，该取代基各自独立地选自卤基、氰基、硝基、羟基、C_{1-6}烷基、-$(CH_2)_uC_{3-7}$环烷基、C_{2-6}烯基、C_{1-6}烷氧基、羟基-C_{1-6}烷基、苯基、被最多5个氟取代的C_{1-6}烷基和被最多5个氟取代的C_{1-6}烷氧基；

每个R_{19}独立地是任选地被一个或多个取代基取代的芳基，该取代基各自独立地选自卤基、氰基、硝基、羟基、任选地被至多5个氟取代的C_{1-6}烷基和任选地被至多5个氟取代的C_{1-6}烷氧基；

每个R_{20}独立地是氢或任选地被一个或多个取代基取代的芳基，每个取代基各自独立地选自卤基、氰基、硝基、羟基、任选地被至多5个氟取代的C_{1-6}烷基和任选地被至多5个氟取代的C_{1-6}烷氧基；和

其中当Y是NR_8R_9时，则R_8和R_2任选地一起成为连接成环的C_{1-3}烷基，

附带条件是当R_8和R_2一起成为连接成环的C_{1-3}烷基时，则R_4不被羟基取代。

75.根据权利要求74所述的方法，其中R_3、R_4、R_5和R_6中的一个、两个或三个不是氢。

76.根据权利要求74-75中任一项所述的方法，其中R_4选自C_{1-6}烷基、-$(CH_2)_uC_{3-7}$环烷基、-O$(CH_2)_uC_{3-7}$环烷基、C_{2-6}烯基、C_{1-6}烷氧基、苯基、被最多5个氟取代的C_{1-6}烷基和被最多5个氟取代的C_{1-6}烷氧基，所述C_{1-6}烷基、-$(CH_2)_uC_{3-7}$环烷基、-O$(CH_2)_uC_{3-7}$环烷基、C_{2-6}烯基、C_{1-6}烷氧基和苯基各自任选地被一个或多个取代基取代，该取代基各自独立地选自卤代C_{1-6}烷基、-$(CH_2)_uC_{3-7}$环烷基、C_{2-6}烯基、C_{1-6}烷氧基、羟基-C_{1-6}烷基、苯基、被最多5个氟取代的C_{1-6}烷基和被最多5个氟取代的C_{1-6}烷氧基。

77.根据权利要求74-76中任一项的方法，

其中：

Y是-NR_8R_9，

R_8是氢；并且R_9是任选地被一个或多个各自独立地选自羟基、R_{19}和-OR_{20}的取代基取代的C_{1-6}烷基；

每个R_{19}独立地是任选被一个或多个取代基取代的苯基，该取代基各自独立地选自卤基、氰基、任选地被最多5个氟取代的C_{1-6}烷基和任选地被最多5个氟取代的C_{1-6}烷氧基；和

每个R_{20}独立地为氢或任选被一个或多个取代基取代的苯基，该取代基各自独立地选自卤基、氰基、硝基、羟基、任选地被至多5个氟取代的C_{1-6}烷基和任选地被最多5个氟取代的C_{1-6}烷氧基。

78.根据权利要求74-77中任一项所述的方法或药物组合物，

其中：

每个R_{19}独立地为任选地被一个或多个取代基取代的苯基，该取代基各自独立地选自卤基、C_{1-6}烷基和C_{1-6}烷氧基；和

每个R_{20}独立地是任选地被一个或多个取代基取代的苯基，该取代基各自独立地选自卤基、C_{1-6}烷基和C_{1-6}烷氧基。

79.根据权利要求74-78中任一项所述的方法，其中R_2和R_8是氢。

80.根据权利要求74-79中任一项所述的方法，其中Y是$-NR_8R_9$并且R_8和R_2一起成为一起连接成环的C_{1-3}烷基。

81.根据权利要求74-80中任一项所述的方法，其中R_9是氢。

82.根据权利要求74-80中任一项所述的方法，其中R_9是任选地被一个或多个取代基取代的C_{1-6}烷基，该取代基各自独立地选自羟基、R_{19}或$-OR_{20}$；

每个R_{19}独立地为任选被一个或多个取代基取代的苯基，该取代基各自独立地选自卤基、氰基、任选被最多5个氟取代的C_{1-6}烷基和任选地被最多5个氟取代的C_{1-6}烷氧基；和

每个R_{20}独立地为氢或任选被一个或多个取代基取代的苯基，该取代基各自独立地选自卤基、氰基、硝基、羟基、任选地被至多5个氟取代的C_{1-6}烷基和任选地被最多5个氟取代的C_{1-6}烷氧基。

83.根据权利要求74-80中任一项所述的方法，其中R_9是氢或C_{1-6}烷基，其任选地被一个或多个各自独立地选自羟基、R_{19}和$-OR_{20}$的取代基取代；

每个R_{19}独立地为任选被一个或多个取代基取代的苯基，该取代基各自独立地选自卤基、氰基、任选被最多5个氟取代的C_{1-6}烷基和任选地被最多5个氟取代的C_{1-6}烷氧基；和

每个R_{20}独立地为氢或任选被一个或多个取代基取代的苯基，该取代基各自独立地选自卤基、氰基、硝基、羟基、任选地被至多5个氟取代的C_{1-6}烷基和任选地被最多5个氟取代的C_{1-6}烷氧基。

84.根据权利要求74-83中任一项所述的方法，

其中R_4选自C_{1-6}烷基、$-(CH_2)_uC_{3-7}$环烷基、$-O(CH_2)_uC_{3-7}$环烷基、C_{2-6}烯基、C_{1-6}烷氧基、苯基、被最多5个氟取代的C_{1-6}烷基和被最多5个氟取代的C_{1-6}烷氧基，所述C_{1-6}烷基、$-(CH_2)_uC_{3-7}$环烷基、$-O(CH_2)_uC_{3-7}$环烷基、C_{2-6}烯基、C_{1-6}烷氧基和苯基各自任选地被一个或多个R_{23}取代，

每个R_{23}独立地选自卤基、C_{1-6}烷基、$-(CH_2)_uC_{3-7}$环烷基、C_{2-6}烯基、C_{1-6}烷氧基、苯基、被最多5个氟取代的C_{1-6}烷基和被最多5个氟取代的C_{1-6}烷氧基，所述苯基任选被一个或多个各自独立地选自卤基、C_{1-6}烷基、$-(CH_2)_uC_{3-7}$环烷基、C_{2-6}烯基、C_{1-6}烷氧基、被最多5个氟取代的C_{1-6}烷基和被最多5个氟取代的C_{1-6}烷氧基的取代基取代。

85.根据权利要求74-84中任一项所述的方法，其中R_4选自C_{1-6}烷基、C_{3-7}环烷基、$-OC_{3-7}$环烷基、苯基、被最多5个氟取代的C_{1-6}烷基和被最多5个氟取代的C_{1-6}烷氧基，所述苯基任选被一个或多个各自独立地选自卤基、C_{1-6}烷基、C_{1-6}烷氧基、被最多5个氟取代的C_{1-6}烷基和被最多5个氟取代的C_{1-6}烷氧基的取代基取代。

86.根据权利要求74-85中任一项所述的方法，其中Y是$-NR_8R_9$并且R_8和R_2一起成为一起连接成环的C_{1-3}烷基。

87.根据权利要求74-86中任一项所述的方法，其中R_2是氢或选自C_{1-6}烷基、C_{3-7}环烷基和

苯基，所述C_{1-6}烷基任选被一个或多个卤基取代。

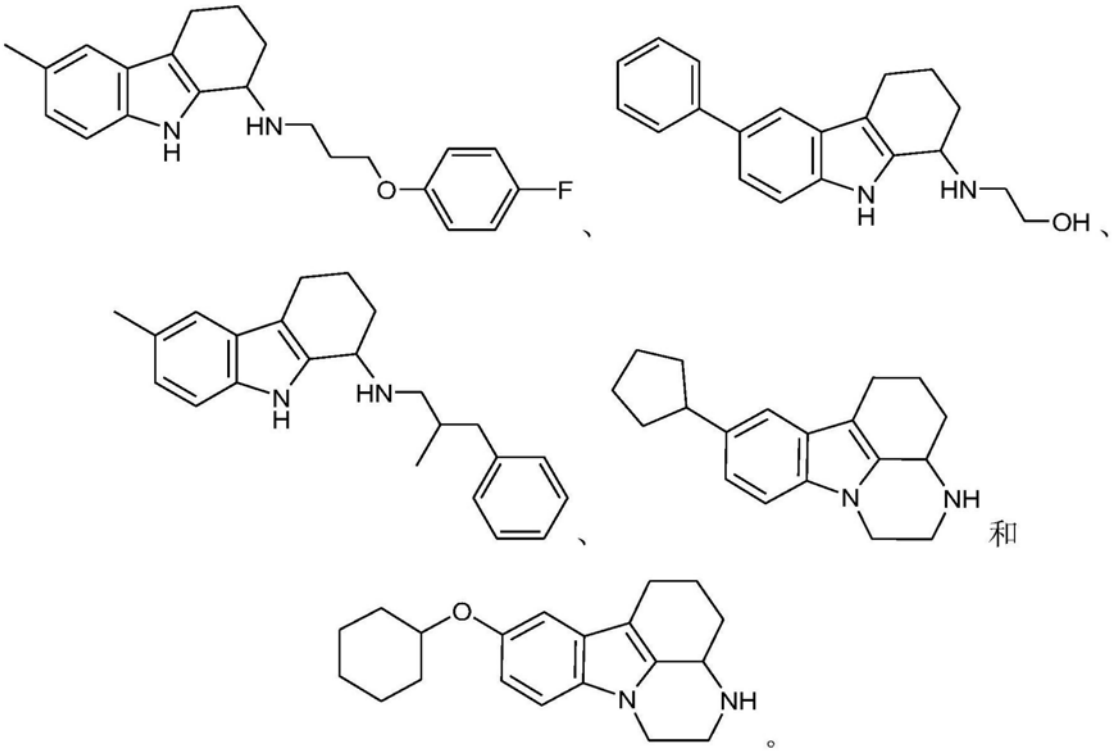
88.根据权利要求74-87中任一项所述的方法，其中R_2是氢。

89.根据权利要求74-88中任一项所述的方法，其中R_9是氢或C_{1-6}烷基，其任选被一个或多个各自独立地选自羟基、R_{19}和-OR_{20}的取代基取代；

每个R_{19}独立地为任选被一个或多个取代基取代的苯基，该取代基各自独立地选自卤基、氰基、任选被最多5个氟取代的C_{1-6}烷基和任选地被最多5个氟取代的C_{1-6}烷氧基；和

每个R_{20}独立地为氢或任选被一个或多个取代基取代的苯基，该取代基各自独立地选自卤基、氰基、硝基、羟基、任选地被至多5个氟取代的C_{1-6}烷基和任选地被最多5个氟取代的C_{1-6}烷氧基。

90.根据权利要求74-89中任一项所述的方法，其中式(I)化合物选自：



91.根据权利要求1-90中任一项所述的方法，其中所述有效量的Cdc42特异性抑制剂减少受试者中一种或多种循环炎性细胞因子的量。

92.根据权利要求1-91中任一项所述的方法，其中所述有效量的Cdc42特异性抑制剂降低受试者中一种或多种选自干扰素γ、白细胞介素1α和白细胞介素1β的循环炎性细胞因子的量。

93.根据权利要求1-92中任一项所述的方法，其中所述有效量的Cdc42特异性抑制剂降低受试者中干扰素γ、白细胞介素1α和白细胞介素1β的量。

94.根据权利要求1-93中任一项所述的方法，其中所述有效量的Cdc42特异性抑制剂增加受试者中循环白细胞介素9的量。

95.根据权利要求1-94中任一项所述的方法，其中所述受试者基于选自Prima1、Hsf4和Kcns1的基因内的CpG位点的甲基化状态进行选择。

96.根据权利要求1-95中任一项所述的方法，其中所述受试者基于Prima1、Hsf4和Kcns1基因的每个内的CpG位点的甲基化状态进行选择。

用CDC42特异性抑制剂治疗受试者的方法

[0001] 关于联邦资助研发的声明

[0002] 本发明是在美国国立卫生研究院授予的批准号HL076604和DK077762下由美国政府支持进行的。美国政府拥有本发明的某些权利。

背景技术

技术领域

[0003] 提供了通过施用至少一种GTP酶抑制剂例如Cdc42 GTP酶抑制剂来延长受试者寿命的各个方面的方法，例如增加寿命、存活时间、生命期限和健康期限。还提供了通过施用至少一种GTP酶抑制剂例如Cdc42 GTP酶抑制剂和一种或多种免疫来免疫受试者的方法。

[0004] 相关技术的描述

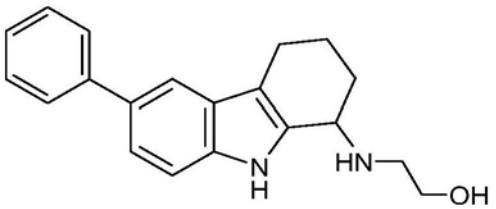
[0005] Rho家族GTP酶是控制信号通路的分子开关，这些信号通路调节细胞骨架重组织、基因表达、细胞周期进程、细胞存活和其他细胞过程(Etienne-Manneville,2002)，其通过引用整体并入本文。

[0006] Rho家族蛋白构成Ras超家族的三个主要分支之一。Rho家族GTP酶抑制剂的开发可能是新治疗化合物的有希望的新途径。

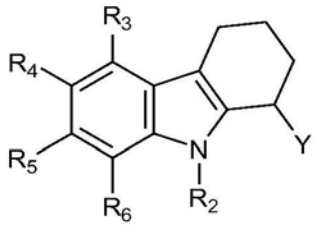
发明内容

[0007] 本文公开的实施方案涉及用于延长受试者生命的方面或免疫受试者的方法。在一些实施方案中，提供用于增加寿命、存活时间、生命期限和健康期限的方法，包括向需要治疗的受试者施用有效量的至少一种Cdc42特异性抑制剂。在一些实施方案中，提供用于免疫受试者的方法，包括向需要免疫的受试者施用有效量的至少一种Cdc42特异性抑制剂和向所述受试者施用一种或多种免疫剂量。在一些实施方案中，所述方法进一步包括将受试者鉴定为将从延长寿命、延长存活时间、延长生命期限、延长健康期限或免疫中受益的受试者。在一些实施方案中，基于受试者的年龄、受试者当前的医学状况、受试者当前的医学治疗、受试者的Cdc42活性和/或受试者中CpG位点的甲基化状态来鉴定受试者。

[0008] 在一些实施方案中，Cdc42特异性抑制剂是小分子。在一些实施方案中，小分子是Cdc42活性特异性抑制剂(CASIN)。在本文所述的实施方案中，CASIN的化学结构是：

[0009] 

[0010] 在一些实施方案中，小分子包含式(I)的化合物：

[0011] 

(I)

[0012] 作为单一对映异构体、对映异构体的混合物、药学上可接受的盐、溶剂合物或其多晶型物，其中：

[0013] Y选自$-OR_7$、$-NR_8R_9$和$-NNR_8R_9$；

[0014] R_7选自C_{1-6}烷基、$-(CH_2)_uC_{3-7}$环烷基、C_{2-6}烯基、C_{1-6}烷氧基、羟基-C_{1-6}烷基、苯基、被最多5个氟取代的C_{1-6}烷基、被最多5个氟取代的C_{1-6}烷氧基，所述C_{1-6}烷基、$-(CH_2)_uC_{3-7}$环烷基、C_{2-6}烯基、C_{1-6}烷氧基、羟基-C_{1-6}烷基、苯基各自任选被一个或多个取代基取代，每个取代基各自独立地选自卤基、-CN、-OH、C_{1-6}烷氧基、杂芳基、R_{19}、和$-OR_{20}$；

[0015] R_8和R_9各自分别为氢或R_{20}；或R_8和R_9任选地与它们所连接的氮一起形成二氢吲哚基、吡咯烷基、哌啶基、哌嗪基或吗啉基，各自任选地被一个或多个取代基取代，所述取代基各自独立地选自卤基、氰基、硝基、羟基、C_{1-6}烷基、$-(CH_2)_uC_{3-7}$环烷基、C_{2-6}烯基、C_{1-6}烷氧基、羟基-C_{1-6}烷基、苯基、被最多5个氟取代的C_{1-6}烷基和被最多5个氟取代的C_{1-6}烷氧基；或R_8和R_2一起成为连接成环的C_{1-3}烷基；

[0016] 每个R_{20}分别选自C_{1-6}烷基、C_{3-7}环烷基和苯基，所述C_{1-6}烷基、C_{3-7}环烷基和苯基各自任选被一个或多个取代基取代，所述取代基独立地选自R_{21}和R_{22}，

[0017] 每个R_{21}分别选自卤基、氰基、硝基和羟基，

[0018] 每个R_{22}分别选自C_{1-6}烷基、C_{1-6}烷氧基、$-(CH_2)_uC_{3-7}$环烷基、C_{2-6}烯基、羟基-C_{1-6}烷基、R_{19}和$-OR_{20}$，其各自任选地被一个或多个取代基取代，每个取代基各自独立地选自卤基、氰基、硝基、羟基、C_{1-6}烷基和C_{1-6}烷氧基；

[0019] 每个u独立地为0、1、2、3或4；

[0020] R_2是氢，或选自C_{1-6}烷基、C_{3-7}环烷基和苯基，所述C_{1-6}烷基、C_{3-7}环烷基和苯基各自任选地被一个或多个取代基取代，所述取代基各自独立地选自卤基、氰基、硝基、羟基、C_{1-6}烷基、$-(CH_2)_uC_{3-7}$环烷基、C_{2-6}烯基、C_{1-6}烷氧基、羟基-C_{1-6}烷基、苯基、被最多5个氟取代的C_{1-6}烷基、被最多5个氟取代的C_{1-6}烷氧基和$-O(CH_2)_u$苯基，其任选地被一个或多个取代基取代，该取代基选自卤基、氰基、硝基、羟基、C_{1-6}烷基和C_{1-6}烷氧基；或R_8和R_2一起成为连接成环的C_{1-3}烷基；

[0021] R_3、R_4、R_5和R_6各自独立地选自氢、卤基、氰基、硝基、羟基、C_{1-6}烷基、$(CH_2)_uC_{3-7}$环烷基、$-O(CH_2)_uC_{3-7}$环烷基、C_{2-6}烯基、C_{1-6}烷氧基、羟基-C_{1-6}烷基、苯基、被最多5个氟取代的C_{1-6}烷基和被最多5个氟取代的C_{1-6}烷氧基，所述C_{1-6}烷基、$(CH_2)_uC_{3-7}$环烷基、$-O(CH_2)_uC_{3-7}$环烷基、C_{2-6}烯基、C_{1-6}烷氧基、羟基-C_{1-6}烷基和苯基各自任选地被一个或多个R_{23}取代，

[0022] 每个R_{23}独立地选自卤基、氰基、硝基、羟基、C_{1-6}烷基、$-(CH_2)_uC_{3-7}$环烷基、C_{2-6}烯基、C_{1-6}烷氧基、羟基-C_{1-6}烷基、苯基、被最多5个氟取代的C_{1-6}烷基和被最多5个氟取代的C_{1-6}烷氧基，所述苯基任选地被一个或多个取代基取代，该取代基各自独立地选自卤基、氰基、硝基、羟基、C_{1-6}烷基、$-(CH_2)_uC_{3-7}$环烷基、C_{2-6}烯基、C_{1-6}烷氧基、羟基-C_{1-6}烷基、苯基、被最多5个

氟取代的C_{1-6}烷基和被最多5个氟取代的C_{1-6}烷氧基；

[0023] 每个R_{19}独立地是任选地被一个或多个取代基取代的芳基，每个取代基各自独立地选自卤基、氰基、硝基、羟基、任选地被至多5个氟取代的C_{1-6}烷基和任选地被至多5个氟取代的C_{1-6}烷氧基；

[0024] 每个R_{20}独立地是氢或任选地被一个或多个取代基取代的芳基，每个取代基各自独立地选自卤基、氰基、硝基、羟基、任选地被至多5个氟取代的C_{1-6}烷基和任选地被至多5个氟取代的C_{1-6}烷氧基；和

[0025] 其中当Y是NR_8R_9时，R_8和R_2任选地一起成为连接成环的C_{1-3}烷基，

[0026] 附带条件是当R_8和R_2一起成为连接成环的C_{1-3}烷基时，则R_4不被羟基取代。

[0027] 本文还提供了一种免疫受试者的方法，其中在所述受试者接受一种或多种免疫剂量之前向受试者施用Cdc42特异性抑制剂。在一些实施方案中，在所述受试者接受一种或多种免疫剂量之后，将Cdc42特异性抑制剂施用于受试者。在一些实施方案中，在所述受试者接受一种或多种免疫剂量之前和之后将Cdc42特异性抑制剂施用于受试者。在一些实施方案中，向所述受试者施用Cdc42特异性抑制剂发生一次或多于一次。在一些实施方案中，针对相同疾病或不同疾病向受试者施用一种或多种免疫剂量。在一些实施方案中，受试者的免疫系统受到损害。在一些实施方案中，在向所述受试者施用Cdc42特异性抑制剂之前测定受试者中的Cdc42活性。

[0028] 本文还提供了一种用于增加寿命、存活时间、生命期限和健康期限的方法，包括向需要治疗的受试者施用有效量的至少一种Cdc42特异性抑制剂，其中寿命、存活时间、生命期限和/或健康期限的预期增加为约1％-100％、约1％-90％、约1％-80％、约1％-70％、约1％-60％、约1％-50％、约1％-40％、约1％-30％、约1％-20％、约5％-15％、约5％、约6％、约7％、约8％、约9％、约10％、约11％、约12％、约13％、约14％、约15％，或以任何上述数字为界的范围，百分比是相对于所述受试者的预期寿命、存活时间、生命期限或健康期限。在一些实施方案中，受试者的预期寿命、存活时间、生命期限或健康期限是类似位置受试者的中值或平均预期。在一些实施方案中，预期的增加在统计上是显著的。

附图说明

[0029] 图1.(a)描述确定Cdc42特异性抑制剂(例如，CASIN)对哺乳动物生命期限影响的体内模型的实验设置的方案；(b)在每24小时连续4天腹膜内注射剂量为25mg/Kg的CASIN的75周龄C57BL/6小鼠中，通过质谱法定量血清中随时间的Cdc42特异性抑制剂浓度(例如，CASIN)。在第4天最后注射后3、24和48小时采血。n＝26用于3小时时间点，12用于24小时时间点，7用于48小时时间点。(c)年轻(10周龄，表示为“对照年轻”)和老年(75周龄，表示为“对照老年”)对照和CASIN处理(表示为“CASIN老年”)C57BL/6小鼠的骨髓细胞中Cdc42总和以及活性(Cdc42GTP)的蛋白质印迹/下拉的代表性图像和量化。n＝4只小鼠；*根据单因素ANOVA分析和Tukey多重比较检验，与老年对照相比，$p<0.05$；(d)老年对照(表示为“老年对照”并且由黑线表示，在大约第75周发散并在第120周和第135周之间的X轴上终止)和CASIN(表示为“老年CASIN”并且由灰线表示，在大约在第75周发散并在第150周和第165周之间的X轴上终止)处理的小鼠的存活曲线。根据小图a中描述的卡通方案进行处理。n＝18用于对照，17用于CASIN；根据Mantel-Cox检验，$p<0.0004$，根据Gehan-Breslow-Wilcoxon检验，p<

0.0032。对照的中位存活期为123.5周，CASIN的为136周；(e)-(h)细胞因子阵列的结果。根据小图a中的方案，在第0天(老年对照)和第7天(老年对照和老年CASIN，在图中用添加描述符“d7”表示)从相同的小鼠收集血清。在第0天，将7只年轻(10周龄)C57BL/6雌性小鼠与老小鼠一起放血，并将血清用于细胞因子阵列年轻对照样品。包括的实验小鼠的数量是n＝7用于年轻对照(表示为“年轻对照”)，27用于老年对照第0天(表示“老年对照”)，9用于老年对照第7天(表示“老年对照d7”)，10用于老年CASIN第7天(表示为“老年+CASIN d7”)。对于所有探测的细胞因子和所有实验组，同时加载血清样品。由于技术原因，一些样品没有产生高于背景的信号，因此被排除在统计分析之外。条代表平均值+/-SEM。*p<0.05；**根据单因素ANOVA分析和Tukey多重比较检验，p<0.01；(i)基于老年对照和老年CASIN处理的小鼠处理后8-9周的血细胞DNA甲基化谱的生物学年龄预测。将该实验重复两次，每组5-6只动物的队列(对照组n＝12，CASIN的为11)。条代表平均值+/-SEM。*p<0.05，根据非配对t检验分析。对于老年对照(“老年对照”)和“老年CASIN”的每一个，左侧提供了“生物学年龄”的条形图，右侧提供了“实际年龄”的条形图，因此存在“老年CASIN”组的生物学年龄和实际年龄之间大约相差9周的差异。

[0030] 图2.(a)使用CASIN注射小鼠的100μL血清样品的LC/MS/MS离子色谱法对小鼠血清中的CASIN进行PK分析；(b)小鼠血清中CASIN的LC/MS/MS标准曲线。CASIN以0、0.5、1.0、5.0μM浓度添加到血清中，随后进行分析；(c)图1(a)中描述的生命期限研究中包括的小鼠的以克为单位的重量；(d-e)图1(a)中描述的生命期限研究中包括的小鼠的白细胞(WBC)计数和红细胞计数(RBC)；(f-h)图1(a)中描述的生命期限研究的小鼠外周血(PB)的流式细胞术分析。数据绘制为所有白细胞(WBC)中B220+、Cd3+和Gr1+、Mac1+和Gr1+Mac1+细胞的百分比；(i-k)图1(a)中描述的生命期限研究的小鼠的淋巴细胞(Ly)、中性粒细胞(NE)和单核细胞(Mo)细胞计数。图2(c)至(k)中的数据被描绘为显示最小值到最大值的箱线图；n＝18用于对照(表示为“对照老年”并由白框表示)，n＝17用于用CASIN治疗的动物(表示为“CASIN老年”并由灰色框表示)。根据图1a中方案的分析天数。

[0031] 图3.来自细胞因子阵列分析的数据。根据图1(a)所示的方案，在第0天(老年对照)和第7天(老年对照和老年CASIN)从小鼠身上收集血清。来自年轻(10周龄)C57BL/6雌性的血液用于细胞因子阵列年轻对照样品。包括的实验小鼠的数量是n＝7用于年轻对照(“年轻对照”)，27用于老年对照第0天(“老年对照”)，9用于老年对照第7天(“老年对照d7”)，10用于老年CASIN第7天(“老年+CASIN d7”)。对于所有探测的细胞因子和所有实验组，同时加载血清样品。由于技术原因，一些样品没有产生高于背景的信号，因此被排除在统计分析之外。条代表平均值+/-SEM。*p<0.05；**根据单因素ANOVA分析和Tukey多重比较检验，p<0.01。

[0032] 图4.汇总说明用Cdc42特异性抑制剂(例如，CASIN)对老年小鼠进行短期全身治疗，延长中位和最大生命期限，减少炎性细胞因子(例如，INFγ、IL-1α、IL-1β)，并拨回(例如，重置)DNA甲基化水平的表观遗传时钟，该水平作为与生物学年龄相比的实际年龄的指示。

[0033] 图5.(A)用于分析疫苗接种反应的实验装置的方案。(B)根据图5(A)的方案，对干扰素γ阳性$CD3^+CD8^+$T细胞进行量化；(C)根据图3(A)的方案，通过流式细胞术测定的脾脏K^b/C_{93-100}-二聚体$^+CD8^+$T细胞频率的量化；(D)根据图3(A)的方案，病毒疫苗接种后的抗体滴

度说明年龄和Cdc42特异性抑制剂治疗的影响。

具体实施方式

[0034] 与衰老相关的免疫系统重塑会损害其功能完整性，并导致老年人发病率和死亡率增加。

[0035] 免疫系统在衰老过程中的表型和功能变化主要是造血干细胞(HSC)在衰老过程中功能变化的结果。HSC的衰老部分是由小RhoGTPase CDC42的活性升高驱动的。直到最近，人们普遍认为老年HSC的表型是固定的，并受细胞内在调节机制支配，无法通过治疗干预逆转。然而，新的研究表明Cdc42活性在HSC衰老中具有新的和关键的机制作用，将Cdc42活性确定为改善HSC衰老的药理学靶点。因此，对老年HSC中升高的Cdc42活性的药理学抑制可能使老年HSC恢复活力。

[0036] Cdc42参与真核细胞的多种和不同功能，包括肌动蛋白细胞骨架重组织、细胞极性和细胞生长。Cdc42在非活动、GDP结合状态和活动、GTP结合状态之间循环。GDP结合形式和GTP结合形式之间的循环由许多不同的调节蛋白严格控制，其活性以及因此Cdc42-GTP水平在老年动物(例如，人类)和老年C57BL/6动物的几种组织(包括心脏、大脑、肺、肝脏、骨髓、脾脏和肾脏)的血液中显著升高。Cdc42 GTPase激活蛋白(Cdc42GAP；也称为p50RhoGAP或ARHGAP1)是一种普遍表达的Cdc42负调节因子，其催化与Cdc42结合的GTP的水解。小鼠中Cdc42GAP的遗传缺失(Cdc42GAP敲除)导致每个组织中Cdc42-GTP水平升高。年轻小鼠中Cdc42活性的这种组成性增加导致过早衰老样表型，其影响多种组织并导致生命期限缩短。

[0037] 本文呈现的是令人惊讶的发现，即将受试者暴露于Cdc42特异性抑制剂可以调节或增加受试者的寿命、存活时间、生命期限和/或健康期限，以及重建具有对疫苗接种产生强烈免疫反应的能力的免疫系统。这些以及其他新颖的方面在下文中更详细地描述。

[0038] 如本文所述，旨在在提供数值范围的情况下，应理解，在该范围的上限和下限之间的每个中间值至下限单位的十分之一，除非上下文另有明确规定，以及在该规定范围内的任何其他规定或中间值都包含在实施方案中。这些较小范围的上限和下限可以独立地包括在较小范围内，也包括在实施方案中，但受所述范围内任何具体排除的界限的影响。在所述范围包括界限之一或两者的情况下，排除那些包括的界限中的任一个的范围也包括在实施方案中。还旨在当针对任何特定值报告一系列整数(例如1、2、3、4、5、6等)时，可以从任何上述整数中枚举范围，例如1-6、2-6、3-5、1-4等。

[0039] 除非另有定义，否则本文中使用的技术和科学术语具有与实施方案所属领域的普通技术人员根据本公开阅读时通常理解的相同含义。尽管与本文描述的那些相似或等效的任何方法和材料也可以用于实施或测试实施方案，但是现在描述优选的方法和材料。本文提及的所有出版物均通过引用明确并入。

[0040] 如在本文中和所附权利要求书中所使用的，单数形式“一个/种(a)”、“和(and)”和“所述(the)”包含复数指代物，除非上下文另有明确指示。因此，例如，提及“方法”时包含多个此类方法并且提及“剂”或“剂量”时包含提及本领域技术人员已知的一种或多种剂量及其等同物等。

[0041] 在一些上下文中，术语“个体”、“宿主”、“受试者”和“患者”可互换使用以指代作为治疗、观察和/或实验受试者的动物。“动物”包括脊椎动物和无脊椎动物，例如鱼、贝类、爬

行动物、鸟类，尤其是哺乳动物。“哺乳动物”包括但不限于小鼠、大鼠、兔子、豚鼠、狗、猫、绵羊、山羊、牛、马、灵长类动物，例如猴子、黑猩猩和猿，并且特别是人类。

[0042] 术语“约”或“大约”意指在本领域普通技术人员确定的特定值的可接受误差范围内，这将部分取决于如何测量或确定值，例如，测量系统的局限性。例如，根据本领域的实践，“约”可以是指在1或大于1个标准偏差内。或者，“约”可以指给定值的至多20％，优选地至多10％，更优选地至多5％，仍更优选地至多1％的范围。或者，特别是对于生物系统或过程，该术语可以指一个值的某一数量级内，优选地5倍内，更优选地2倍内。当在本申请和权利要求书中描述特定值时，除非另外指出，否则应假设术语“约”意指所述特定值在可接受的误差范围内。

[0043] 如本文所用，术语“异源序列或基因”是指核酸(RNA或DNA)序列，其并非天然地与特定分子的核酸序列结合。以下部分更详细地介绍了可用于制备Cdc42抑制剂的一些方法。

[0044] 增加方法

[0045] 本文公开的实施方案涉及向需要治疗的受试者施用有效量的至少一种Cdc42特异性抑制剂。本文所述的具体方法涉及用于增加受试者的寿命、增加存活时间、增加生命期限或增加健康期限的方法，包括向需要治疗的受试者施用有效量的至少一种Cdc42特异性抑制剂。

[0046] “寿命”是指受试者预期活着的时间，基于其出生年份和当前年龄。它还可能包括受试者特定的人口统计数据或决定因素，例如性别、遗传、生活方式(例如吸烟、体育锻炼、日常生活中的活动、饮酒、饮食、自我保健实践、社会交往和工作方式)、文化、政治、宗教和社会经济学。参见，例如“Men,Ageing and Health,”(2001),01/WHO/NMH/NPH 01.2

[0047] “存活时间”是指直到受试者死亡的预期持续时间。它还可能包括受试者特定的人口统计数据或决定因素，例如性别、遗传、生活方式、文化、政治、宗教和社会经济学。

[0048] “生命期限”是指受试者在给定年龄下剩余的预期生命持续时间。它还可能包括受试者特定的人口统计数据或决定因素，例如性别、遗传、生活方式、文化、政治、宗教和社会经济学。

[0049] “健康期限”是指受试者生命中受试者处于相当良好的健康的预期时间长度。在一些实施方案中，受试者的健康考虑身体、精神、社会健康、没有疾病和没有虚弱中的一种或多种。

[0050] 在所公开的实施方案中提到的“增加”是指受试者的“预期增加”，而不是任何特定受试者经历的实际增加。因此，不需要等待受试者的寿命、存活时间、生命期限或健康期限期满来实践所公开的实施方案。预期的增加可以是统计显著的或不显著的，尽管在优选实施方案中任何预期的增加都是统计显著的。有许多已知的计算统计显著性的方法，例如计算“p值”。在一些实施方案中，统计显著性的阈值是p值≤0.2、≤0.15、≤0.1、≤0.05、≤0.01、≤0.005、约≤0.2、约≤0.15、约≤0.1、约≤0.05、约≤0.01或约≤0.005。有时，结果可能在统计上不显著，但结果仍然告知或暗示某些赋予的好处。可以理解，人们对特定结果的重要性程度在普通医师的能力范围内。

[0051] 在一些实施方案中，受试者的预期寿命、存活时间、生命期限或健康期限是类似位置受试者的中值预期。在其他实施方案中，受试者的预期寿命、存活时间、生命期限或健康期限是类似位置受试者的平均预期。可以基于任何一种或多种因素来确定具有相似情况的

受试者，包括但不限于年龄、健康、家族史或Cdc42活性水平。

[0052] 相对于受试者的预期寿命、存活时间、生命期限或健康期限，预期增加可以为1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%，约上述百分比的任一个，或由任何上述百分比限定的范围(例如，约1%-30%、约5%-25%、约5%-20%、约5%-15%或1%-30%、5%-25%、5%-20%、5%-15%)、1%-100%、1%-90%、1%-80%、1%-70%、1%-60%、1%-50%、1%-40%、1%-30%、1%-20%、1%-10%、10%-100%、10%-90%、10%-80%、10%-70%、10%-70%、10%-60%、10%-50%、10%-40%、10%-30%、10%-20%、20%-100%、20%-90%、20%-80%、20%-70%、20%-60%、20%-50%、20%-40%、20%-30%、30%-100%、30%-90%、30%-80%、30%-70%、30%-60%、30%-50%、30%-40%、40%-100%、40%-90%、40%-80%、40%-70%、40%-60%、40%-50%、50%-100%、50%-90%、50%-80%、50%-70%、50%-60%、60%-100%、60%-90%、60%-80%、60%-70%、70%-100%、70%-90%、70%-80%、80%-100%、80%-90%、90%-100%，约任何上述百分比范围(例如，约10%-70%、约30%-60%或约50%-70%)。

[0053] 在一些实施方案中，相对于受试者的预期寿命、生存时间、生命期限或健康期限，预期增加以年为单位并且是1-20年、1-19年、1-18年、1-17年、1-16年、1-15年、1-14年、1-13年1-12年、1-11年、1-10年、1-9年、1-8年、1-7年、1-6年、1-5年、1-4年、1-3年、1-2年、1年、至少上述年(例如，至少1-10年)或大约上述年(例如，约1-2年或至少约1-2年)。

[0054] 相对于受试者的预期寿命、存活时间、生命期限或健康期限，在一些实施方案中，预期增加以天到月为单位，并且是一天到一年、一天到11个月、一天到10个月、一天到9个月、一天到8个月、一天到7个月、一天至6个月、一天至5个月、一天至4个月、一天至3个月、一天至2个月、一天至1个月、至少上述天至月的范围(例如，至少一天至11个月)，或约上述天至月的范围(例如，约一天至6个月或至少约一天至6个月)。

[0055] 在一些实施方案中，相对于受试者的预期寿命、存活时间、生命期限或健康期限，预期增加以周为单位并且是1周、2周、3周、4周、5周、6周、7周、8周、9周、10周、11周、12周、13周、14周、15周、16周、17周、18周、19周、20周、21周、22周、23周、24周、25周、26周、27周、28周、29周、30周、31周、32周、33周、34周、35周、36周、37周、38周、39周、40周、41周、42周、43周、44周、45周、46周、47周、48周、49周、50周、51周、52周，约任何上述周(例如，约15周)、至少约任何上述周(例如，至少约15周)，或以上述任何两个周为界的范围(例如，2-30周或约2-30周，或至少约2-30周)、1-52周、2-50周、3-45周、4-40周、5-35周、6-30周、5-25周、6-20周、7-19周、8-18周、9-17周、10-16周、11-15周、12-14周，至少上述周范围(例如，至少6-20周)或大约上述周范围(例如，约6-20周或至少约6-20周)。

[0056] 在一些实施方案中，相对于受试者的预期寿命、存活时间、生命期限或健康期限，预期增加以天为单位并且是1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天、14天、15天、16天、17天、18天、19天、20天、21天、22天、23天、24天、25天、26天、27天、28天、29天、30天、约31天，约任何上述天(例如，约15天)，至少约任何上述周(例如，至少约15天)，或由上述周中的任何两个限定的范围(例如，2-30天或约2-30天，或至少约2-30天)。

[0057] 所公开的实施方案中所指的“减少”或“降低”是指“实际的”或“预期的”减少或降低。实际或预期的减少或降低可以是统计显著或不显著的，尽管在优选实施方案中任何减

少或降低是统计显著的。有许多已知的计算统计显著性的方法，例如计算“p值”。在一些实施方案中，统计显著性的阈值是p值≤0.2、≤0.15、≤0.1、≤0.05、≤0.01、≤0.005、约≤0.2、约≤0.15、约≤0.1、约≤0.05、约≤0.01或约≤0.005。有时，结果可能在统计上不显著，但结果仍然告知或暗示某些赋予的好处。可以理解，人们对特定结果的重要性程度在普通医师的能力范围内。

[0058] 免疫方法

[0059] 本文公开的实施方案涉及向需要免疫的受试者施用有效量的至少一种Cdc42特异性抑制剂和向受试者施用一种或多种免疫剂量。令人惊讶的是，Cdc42特异性抑制剂在受试者中的直接药理学干预允许在用免疫原攻击时产生强烈的免疫反应。这种直接施用消除了从相容供体获得和纯化HSC、用Cdc42特异性抑制剂预处理HSC并将处理过的供体HSC移植到移植受体中的任何需要。因此，在本文公开的一些实施方案中，Cdc42特异性抑制剂基本上充当一种佐剂，通过改变受试者的免疫系统和免疫反应来增强免疫的效力。在一些实施方案中，将Cdc42特异性抑制剂与免疫剂量组合，然后施用于受试者(例如，受试者接受一种或多种同时包含免疫原和Cdc42特异性抑制剂的免疫剂量)。在一些实施方案中，免疫剂量和Cdc42特异性抑制剂以分开的剂量施用于受试者。

[0060] 在一些实施方案中，在受试者接受一种或多种免疫剂量之前将Cdc42特异性抑制剂施用于受试者。在其他实施方案中，与受试者接受一种或多种免疫剂量的同时施用Cdc42特异性抑制剂给受试者。可以通过在有限时间段内多次施用来实现同时施用(例如，与医生进行一次办公室访问)，或者可以同时或几乎同时进行同时施用。

[0061] 需要接受Cdc42特异性抑制剂以改善免疫反应的受试者不需要总是在接受第一次免疫之前被识别。例如，可以通过对第一次尝试的免疫接种表现出较差的反应来识别受试者。因此，在一些实施方案中，在受试者接受一种或多种免疫剂量之后，将Cdc42特异性抑制剂施用于受试者。

[0062] 通常，受试者没有从单次免疫剂量中获得足够的免疫力，并且需要在获得足够的免疫力之前接受多次免疫剂量。可以容易地和立即设想这样一种方案，其中向受试者施用第一次Cdc42特异性抑制剂，该受试者在施用第一次Cdc42特异性抑制剂后接受第一次免疫剂量，并且受试者在接受第一次免疫剂量后接受一次或多次后续免疫剂量。这样的方案可以继续，使得受试者在受试者接受第二次免疫剂量之后接受第三次免疫剂量。因此，受试者可接受1-10、1-9、1-8、1-7、1-6、1-5、1-4、1-3、2-10、2-9、2-8、2-7、2-6、2-5、2-4、2-3、3-10、3-9、3-8、3-7、3-6、3-5、3-4、4-10、4-9、4-8、4-7、4-6、4-5、5-10、5-9、5-8、5-7、5-6、6-10、6-9、6-8、6-7、7-10、7-9、7-8、8-10、8-9、9-10或2、3、4、5、6、7、8、9或10次总免疫剂量以针对单种疾病进行免疫。一种或多种Cdc42特异性抑制剂可以在第一次免疫剂量之前或在一个或多个后续免疫剂量之前施用。

[0063] 通常，受试者需要针对一种或多种疾病进行免疫接种(例如，受试者在整个儿童期或成年期针对多种疾病进行免疫接种)。这可能是由于受试者的健康状况、即将到来的旅行，或者是由于受试者童年时期没有接种疫苗。一种或多种Cdc42特异性抑制剂可以在第一次免疫剂量之前施用，或者当受试者针对一种或多种疾病或甚至多种疾病进行免疫时，在一次或多种后续免疫剂量之前施用。正如第一次和随后的免疫剂量可以相同或不同(例如，在强度、浓度或免疫原方面)，施用于受试者的一种或多种Cdc42特异性抑制剂可以相同或

不同。

[0064] 在一些情况下，在向受试者施用免疫剂量之间经过一段时间。在一些实施方案中，免疫剂量之间的时间段为约1周、约2周、约3周、约1个月、约2个月、约3个月、约4个月、约5个月、约6个月、约7个月、约8个月、约9个月、约10个月、约11个月或约1年。在一些实施方案中，一种或多种Cdc42特异性抑制剂在受试者施用免疫剂量之间的时间段内施用于受试者。

[0065] 在免疫过程中受益于Cdc42特异性抑制剂的受试者可能具有健康的免疫系统。或者，在一些实施方案中，受试者不具有健康的免疫系统。受试者的免疫系统可能受到损害，特别是由于受试者的年龄、受试者的医学状况或针对受试者的医学状况对受试者的治疗而损害免疫系统。

[0066] 除非另有说明，否则术语“免疫”的全部范围旨在用于本文公开的方法。免疫可以是被动的或主动的。被动免疫是将预先合成的免疫系统元素转移到人身上，这样身体就不需要自己产生这些元素。抗体可用于被动免疫。主动免疫可以在人与微生物接触、减毒或以其他方式接触，或人与微生物的一部分接触时自然发生。然而，免疫原不必是微生物，例如，在一些实施方案中，免疫原是小分子(例如，尼古丁)或大分子(例如，蛋白质，例如癌症蛋白质，或激素，例如生长素释放肽)。

[0067] 免疫剂量也可以是疫苗，尽管如上所述，免疫剂量不必如此受限。因此，在一些实施方案中，免疫剂量不是疫苗。许多疫苗是世界卫生组织或疾病控制和预防中心推荐的。在一些实施方案中，免疫剂量是医学界推荐的疫苗。在一些实施方案中，疫苗由疾病控制和预防中心推荐。该疫苗也可能被世界卫生组织、疾病控制和预防中心或医学界推荐用于成人。在一些实施方案中，疫苗用于与儿童相比对成人的影响不成比例的疾病。在一些实施方案中，疫苗用于诸如流感、百日咳、破伤风、白喉、带状疱疹、肺炎球菌病、人乳头瘤病毒、脑膜炎球菌病、甲型肝炎、乙型肝炎、水痘、麻疹、腮腺炎和风疹中的一种或多种的疾病。

[0068] 受试者识别

[0069] 本文公开的实施方案涉及向需要治疗的受试者施用有效量的至少一种Cdc42特异性抑制剂，其包括Cdc42特异性活性的调节剂。在一些实施方案中，并非每个受试者都是此类施用的候选者，并且治疗受试者的鉴定可能是期望的。可以理解，患者的选择取决于普通医师知识范围内的许多因素。因此，本文公开的一些实施方案进一步包括将受试者识别为将受益于施用有效量的至少一种Cdc42特异性抑制剂以增加寿命、增加存活时间、增加生命期限或改善免疫接种的受试者。可以根据受试者的年龄、目前医学状况、目前医疗、处方医疗、任何受试者Prima1、Hsf4或Kcns1基因内CpG位点的甲基化状态或其任何组合，基于特定于受试者的生理因素，或在优选的实施方案中，基于受试者的Cdc42活性，识别受试者。用于确定受试者的Cdc42活性的测定，特别是在测量受试者血液样品中的这种活性时，在本领域中是已知的。参见，例如Mizukawa et al.,Blood(2017)130:1336-46。

[0070] 在一些实施方案中，医师可以依赖给定受试者的生理因素的组合来鉴定受试者以使用有效量的至少一种Cdc42特异性抑制剂进行治疗。如上所述，受试者的年龄可能是识别需要治疗的受试者的一个因素。例如，受试者可以是老年者(例如，老年人受试者)。在本文所述的一些实施方案中，老年人类受试者是年龄等于或大于50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80岁的受试者，或由上述任何年龄限定的范围(例如，等于或大于50-80、50-70、50-60、55-75、55-75、

55-70、55-65、60-70、52-71、60-79或73-78岁的年龄)。

[0071] 在一些实施方案中,如上文所讨论的,受试者是人。然而,这些方法不限于治疗人类,同样适用于治疗哺乳动物。在治疗非人类哺乳动物的这种情况下,患者的选择取决于普通兽医或研究科学家的知识范围内的许多因素

[0072] Cdc42特异性抑制剂

[0073] 本文公开的实施方案涉及包含至少一种Cdc42特异性抑制剂的化合物、组合物、药物组合物、方法、用途和试剂盒。在一些实施方案中,Cdc42特异性抑制剂可以是化学抑制剂,例如小分子(例如,CASIN)。小分子包括例如具有低分子量(例如,分子量低于2000道尔顿)的化学分子。另外,Cdc42特异性抑制剂可以是siRNA分子、反义分子、小RNA(例如,微小RNA)或修饰的核酸、核酶、抗体(例如中和抗体)或多肽(例如,显性负肽)。可以使用本领域技术人员已知的任何类型的抑制剂。

[0074] 实施方案的另一方面关于涉及GTP酶的生物途径的调节。因此,一些实施方案涉及调节Cdc42 GTP酶活性的所有方面,包括施用有效量的活性剂、有效量的特异性和/或选择性调节Cdc42 GTP酶活性的化合物、或其组合。受调节的Cdc42的活性可以包括:GTP结合、GDP结合、GEF结合、GTP酶活性、整合素结合、Cdc42与受体或效应样分子(例如整合素、生长因子受体、酪氨酸激酶、PI-3K、PIP-5K等)的偶联或结合。增加、减少、拮抗或促进Cdc42可以调节活性。Cdc42的调节可以通过测定GTP水解、与GEF的结合等来测量。有效量是当施用时调节Cdc42活性的任何量。可以在细胞、组织、整个生物体、原位、体外(试管、固体支持物等)、体内或任何期望环境中调节活性。在一些实施方案中,有效量的Cdc42特异性抑制剂是将受试者中的Cdc42活性恢复到正常水平的抑制剂。在一些实施方案中,有效量的Cdc42特异性抑制剂是逆转细胞中微管蛋白非极性、抑制血液前体细胞例如造血细胞、祖细胞或干细胞中的Cdc42活性的抑制剂。在一些实施方案中,有效量的Cdc42特异性抑制剂不会动员血液前体细胞。

[0075] Cdc42介导的信号转导的其他测定可以根据本领域已知的程序来完成,例如,如美国专利5,141,851;5,420,334;5,436,128;和5,482,954中所述,所有这些在允许的情况下通过引用整体并入本文。此外,可以鉴定抑制活性剂和G蛋白(例如Cdc42)之间的相互作用(例如结合)的肽。

[0076] 用于检测Cdc42活性抑制的方法是本领域已知的,例如可从Thermo Fisher Scientific Inc.(Rockford,IL)获得的Active Cdc42下拉和检测试剂盒,如以下实施例部分所述,并由Asnaghi等人,Oncogene(2010)29:2760-2771的并入材料所述。检测抑制可以包括将被测化合物的抑制特性与一种或多种参考化合物的抑制特性进行比较。这种参考化合物可以是例如CASIN或本文所述的其他化合物。

[0077] 调节是指试剂的添加影响活性或结合。可以以各种方式影响结合或活性调节,包括抑制、阻断、阻止、增加、增强或促进它。结合或活性效应不必以特定方式实现,例如,它可以是竞争性的、非竞争性的、变构的、空间位阻的、通过试剂与GEF或GTPase之间的交联等。试剂可以作用于活性剂或GTPase。试剂可以是激动剂、拮抗剂或部分激动剂或拮抗剂。结合的存在或量可以多种方式确定,例如,通过测定由活性剂促进或抑制的活性,例如鸟嘌呤核苷酸交换、GTP水解、致癌转化等。此类测定在上文和下文中描述,并且在本领域中也是已知的。试剂可以从多种来源获得和/或制备,包括天然的和合成的。它可以包含例如氨基酸、脂

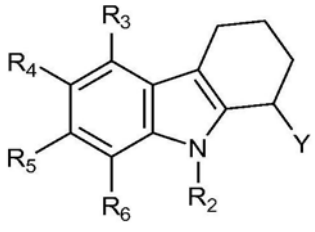
质、碳水化合物、有机分子、核酸、无机分子或它们的混合物。

[0078] 如本领域所理解的，可以在体外或体内进行检测调节。本文提供了体外和体内方法的例子。评价本文提供的化合物的抑制性质的结果可以用本领域理解的术语报告，包括例如IC_{50}、EC_{50}、K_i或本领域已知的其他标准术语。因此，本文提供的评估可以包括评估结果，其中评估结果包括确定被测化合物的抑制性质。在某些情况下，评估结果还包括将被测化合物的抑制特性与一种或多种参考化合物的抑制特性进行比较。这种参考化合物可以是例如CASIN或本文所述的其他化合物。

[0079] 小分子

[0080] 如本文所公开的，小分子抑制剂可用于特异性抑制和/或调节Cdc42。可以使用本领域技术人员已知的任何类型的小分子抑制剂。已知有许多鉴定小分子抑制剂的方法，商业实验室可用于筛选小分子抑制剂。例如，化学品可以从Merck®Research Laboratories(Rahway,N.J.)或类似公司的化合物集合中获得。可以通过以96孔板形式自动机器人筛选来筛选化合物对Cdc42的抑制。例如，化合物可以以约50□M的初始浓度溶解在DMSO中并分配到96孔板中。96孔板测定可包含适当单位数量的Cdc42和靶标(底物)。可以进一步稀释和测试导致Cdc42活性抑制超过50％的化合物，以确定抑制50％活性所需的浓度。在一些实施方案中，筛选将包括Cdc42蛋白和一种或多种其结合蛋白和候选抑制剂。筛选的化合物破坏Cdc42靶标结合的抑制作用可以使用例如用Cdc42或固定在表面上的靶标的ELISA型测试来监测，并且可以检测残余结合，例如使用Cdc42靶标的抗体(结合)-与报道分子缀合的分子(例如碱性磷酸盐)。结合测定也可以使用基于表面等离子共振(SPR)的相互作用筛选进行，包括Cdc42及其结合靶点和抑制剂或任何其他测定筛选蛋白质相互作用(例如酵母两种杂交系统、免疫沉淀、与酶学或FACS检测耦合的免疫捕获实验等)。在一些实施方案中，可以使用本领域已知的测定法测试候选Cdc42抑制剂抑制Cdc42 GTP酶活性的能力。在其他实施方案中，可以使用本领域已知的测定法测试Cdc42抑制剂降低GTP结合的Cdc42的量的能力，例如，相对于GDP结合的Cdc42的量。

[0081] 在本文所述的任何实施方案中，所述Cdc42特异性抑制剂、所述Cdc42抑制剂、所述GTP酶Cdc42抑制剂、所述GTP酶Cdc42抑制剂、所述能够抑制GTP酶Cdc42的试剂或所述特异性抑制Cdc42的试剂包含下式(I)的化合物：

[0082] 

(I)

[0083] 作为单一对映异构体、对映异构体的混合物、药学上可接受的盐、溶剂合物或其多晶型物，其中：

[0084] Y选自$-OR_7$、$-NR_8R_9$和$-NNR_8R_9$；

[0085] R_7选自C_{1-6}烷基、$-(CH_2)_uC_{3-7}$环烷基、C_{2-6}烯基、C_{1-6}烷氧基、羟基-C_{1-6}烷基、苯基、被最多5个氟取代的C_{1-6}烷基和被最多5个氟取代的C_{1-6}烷氧基，所述C_{1-6}烷基、$-(CH_2)_uC_{3-7}$环烷基、C_{2-6}烯基、C_{1-6}烷氧基、羟基-C_{1-6}烷基、苯基、被最多5个氟取代的C_{1-6}烷基和被最多5个氟

取代的C_{1-6}烷氧基各自任选被一个或多个取代基取代，每个取代基各自独立地选自卤基、-CN、-OH、C_{1-6}烷氧基、杂芳基、R_{19}、和-OR_{20}；

[0086] R_8和R_9各自分别为氢或R_{20}；或R_8和R_9任选地与它们所连接的氮一起形成二氢吲哚基、吡咯烷基、哌啶基、哌嗪基或吗啉基，各自任选地被一个或多个取代基取代，所述取代基各自独立地选自卤基、氰基、硝基、羟基、C_{1-6}烷基、-$(CH_2)_uC_{3-7}$环烷基、C_{2-6}烯基、C_{1-6}烷氧基、羟基-C_{1-6}烷基、苯基、被最多5个氟取代的C_{1-6}烷基和被最多5个氟取代的C_{1-6}烷氧基；或R_8和R_2一起成为连接成环的C_{1-3}烷基；

[0087] 每个R_{20}分别选自C_{1-6}烷基、C_{3-7}环烷基和苯基，所述C_{1-6}烷基、C_{3-7}环烷基和苯基各自任选被一个或多个取代基取代，所述取代基独立地选自R_{21}和R_{22}，

[0088] 每个R_{21}分别选自卤基、氰基、硝基和羟基，

[0089] 每个R_{22}分别选自C_{1-6}烷基、C_{1-6}烷氧基、-$(CH_2)_uC_{3-7}$环烷基、C_{2-6}烯基、羟基-C_{1-6}烷基、R_{19}和-OR_{20}，其各自任选地被一个或多个取代基取代，每个取代基各自独立地选自卤基、氰基、硝基、羟基、C_{1-6}烷基和C_{1-6}烷氧基；

[0090] 每个u独立地为0、1、2、3或4；

[0091] R_2是氢，或选自C_{1-6}烷基、C_{3-7}环烷基和苯基，所述C_{1-6}烷基、C_{3-7}环烷基和苯基各自任选地被一个或多个取代基取代，所述取代基各自独立地选自卤基、氰基、硝基、羟基、C_{1-6}烷基、-$(CH_2)_uC_{3-7}$环烷基、C_{2-6}烯基、C_{1-6}烷氧基、羟基-C_{1-6}烷基、苯基、被最多5个氟取代的C_{1-6}烷基、被最多5个氟取代的C_{1-6}烷氧基和-$O(CH_2)_u$苯基，其任选地被一个或多个取代基取代，该取代基选自卤基、氰基、硝基、羟基、C_{1-6}烷基和C_{1-6}烷氧基；或R_8和R_2一起成为连接成环的C_{1-3}烷基；

[0092] R_3、R_4、R_5和R_6各自独立地选自氢、卤基、氰基、硝基、羟基、C_{1-6}烷基、$(CH_2)_uC_{3-7}$环烷基、-$O(CH_2)_uC_{3-7}$环烷基、C_{2-6}烯基、C_{1-6}烷氧基、羟基-C_{1-6}烷基、苯基、被最多5个氟取代的C_{1-6}烷基和被最多5个氟取代的C_{1-6}烷氧基，所述C_{1-6}烷基、$(CH_2)_uC_{3-7}$环烷基、-$O(CH_2)_uC_{3-7}$环烷基、C_{2-6}烯基、C_{1-6}烷氧基、羟基-C_{1-6}烷基和苯基各自任选地被一个或多个R_{23}取代，

[0093] 每个R_{23}独立地选自卤基、氰基、硝基、羟基、C_{1-6}烷基、-$(CH_2)_uC_{3-7}$环烷基、C_{2-6}烯基、C_{1-6}烷氧基、羟基-C_{1-6}烷基、苯基、被最多5个氟取代的C_{1-6}烷基和被最多5个氟取代的C_{1-6}烷氧基，所述苯基任选地被一个或多个取代基取代，该取代基各自独立地选自卤基、氰基、硝基、羟基、C_{1-6}烷基、-$(CH_2)_uC_{3-7}$环烷基、C_{2-6}烯基、C_{1-6}烷氧基、羟基-C_{1-6}烷基、苯基、被最多5个氟取代的C_{1-6}烷基和被最多5个氟取代的C_{1-6}烷氧基；

[0094] 每个R_{19}独立地是任选地被一个或多个取代基取代的芳基，每个取代基各自独立地选自卤基、氰基、硝基、羟基、任选地被至多5个氟取代的C_{1-6}烷基和任选地被至多5个氟取代的C_{1-6}烷氧基；

[0095] 每个R_{20}独立地是氢或任选地被一个或多个取代基取代的芳基，每个取代基各自独立地选自卤基、氰基、硝基、羟基、任选地被至多5个氟取代的C_{1-6}烷基和任选地被至多5个氟取代的C_{1-6}烷氧基；和

[0096] 其中当Y是NR_8R_9时，R_8和R_2任选地一起成为连接成环的C_{1-3}烷基，

[0097] 附带条件是当R_8和R_2一起成为连接成环的C_{1-3}烷基时，则R_4不被羟基取代。

[0098] 在一些实施方案中，R_3、R_4、R_5和R_6中的一个、两个或三个不是氢。

[0099] 在一些实施方案中，R_4选自C_{1-6}烷基、-$(CH_2)_uC_{3-7}$环烷基、-$O(CH_2)_uC_{3-7}$环烷基、C_{2-6}烯

基、C_{1-6}烷氧基、苯基、被最多5个氟取代的C_{1-6}烷基和被最多5个氟取代的C_{1-6}烷氧基，所述C_{1-6}烷基、-$(CH_2)_uC_{3-7}$环烷基、-O$(CH_2)_uC_{3-7}$环烷基、C_{2-6}烯基、C_{1-6}烷氧基和苯基各自任选地被一个或多个取代基取代，该取代基各自独立地选自卤代C_{1-6}烷基、-$(CH_2)_uC_{3-7}$环烷基、C_{2-6}烯基、C_{1-6}烷氧基、羟基-C_{1-6}烷基、苯基、被最多5个氟取代的C_{1-6}烷基和被最多5个氟取代的C_{1-6}烷氧基。

[0100] 在一些实施方案中：Y是-NR_8R_9；R_8是氢；R_9是任选地被一个或多个各自独立地选自羟基、R_{19}和-OR_{20}的取代基取代的C_{1-6}烷基；每个R_{19}独立地为任选地被一个或多个取代基取代的苯基，该取代基各自独立地选自卤基、氰基、任选被最多5个氟取代的C_{1-6}烷基和任选被最多5个氟取代的C_{1-6}烷氧基；并且每个R_{20}独立地是氢或任选地被一个或多个取代基取代的苯基，该取代基各自独立地选自卤基、氰基、硝基、羟基、任选被最多5个氟取代的C_{1-6}烷基和任选被最多5个氟取代的C_{1-6}烷氧基。

[0101] 在一些实施方案中：每个R_{19}独立地是任选地被一个或多个取代基取代的苯基，该每个取代基各自独立地选自卤基、C_{1-6}烷基和C_{1-6}烷氧基；每个R_{20}独立地为任选被一个或多个取代基取代的苯基，该每个取代基各自独立地选自卤基、C_{1-6}烷基和C_{1-6}烷氧基。

[0102] 在一些实施方案中，R_2和R_8是氢。

[0103] 在一些实施方案中，Y是-NR_8R_9并且R_8和R_2一起成为连接成环的C_{1-3}烷基。

[0104] 在一些实施方案中，R_9是氢。

[0105] 在一些实施方案中，R_9是任选地被一个或多个取代基取代的C_{1-6}烷基，该每个取代基各自独立地选自羟基、R_{19}或-OR_{20}；

[0106] 每个R_{19}独立地是任选地被一个或多个取代基取代的苯基，每个取代基各自独立地选自卤基、氰基、任选地被至多5个氟取代的C_{1-6}烷基和任选地被至多5个氟取代的C_{1-6}烷氧基；和

[0107] 每个R_{20}独立地是氢或任选地被一个或多个取代基取代的苯基，每个取代基各自独立地选自卤基、氰基、硝基、羟基、任选地被至多5个氟取代的C_{1-6}烷基和任选地被至多5个氟取代的C_{1-6}烷氧基。

[0108] 在一些实施方案中，R_9是氢或任选地被一个或多个取代基取代的C_{1-6}烷基，该每个取代基各自独立地选自羟基、R_{19}和-OR_{20}；

[0109] 每个R_{19}独立地是任选地被一个或多个取代基取代的苯基，每个取代基各自独立地选自卤基、氰基、任选地被至多5个氟取代的C_{1-6}烷基和任选地被至多5个氟取代的C_{1-6}烷氧基；和

[0110] 每个R_{20}独立地是氢或任选地被一个或多个取代基取代的苯基，每个取代基各自独立地选自卤基、氰基、硝基、羟基、任选地被至多5个氟取代的C_{1-6}烷基和任选地被至多5个氟取代的C_{1-6}烷氧基。

[0111] 在一些实施方案中，R_4选自C_{1-6}烷基、-$(CH_2)_uC_{3-7}$环烷基、-O$(CH_2)_uC_{3-7}$环烷基、C_{2-6}烯基、C_{1-6}烷氧基、苯基、被最多5个氟取代的C_{1-6}烷基和被最多5个氟取代的C_{1-6}烷氧基，所述C_{1-6}烷基、-$(CH_2)_uC_{3-7}$环烷基、-O$(CH_2)_uC_{3-7}$环烷基、C_{2-6}烯基、C_{1-6}烷氧基、苯基各自任选地被一个或多个R_{23}取代，每个R_{23}独立地选自卤基、C_{1-6}烷基、-$(CH_2)_uC_{3-7}$环烷基、C_{2-6}烯基、C_{1-6}烷氧基、苯基、被最多5个氟取代的C_{1-6}烷基和被最多5个氟取代的C_{1-6}烷氧基，所述苯基任选地被一个或多个取代基取代，该每个取代基各自独立地选自卤基、C_{1-6}烷基、-$(CH_2)_uC_{3-7}$环烷

基、C_{2-6}烯基、C_{1-6}烷氧基、被最多5个氟取代的C_{1-6}烷基和被最多5个氟取代的C_{1-6}烷氧基。

[0112] 在一些实施方案中，R_4选自C_{1-6}烷基、C_{3-7}环烷基、-OC_{3-7}环烷基、苯基、被最多5个氟取代的C_{1-6}烷基和被最多5个氟取代的C_{1-6}烷氧基，所述苯基任选地被一个或多个取代基取代，该每个取代基各自独立地选自卤基、C_{1-6}烷基、C_{1-6}烷氧基、被最多5个氟取代的C_{1-6}烷基和被最多5个氟取代的C_{1-6}烷氧基。

[0113] 在一些实施方案中，Y可以是-NR_8R_9并且R_8和R_2一起成为连接成环的C_{1-3}烷基。

[0114] 在一些实施方案中，R_2是氢或选自C_{1-6}烷基、C_{3-7}环烷基和苯基，所述C_{1-6}烷基任选被一个或多个卤基取代。

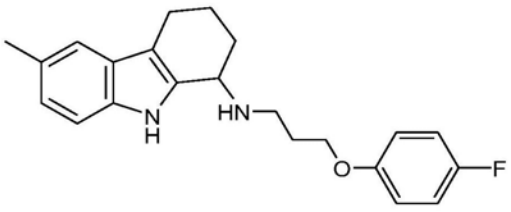
[0115] 在一些实施方案中，R_2是氢。

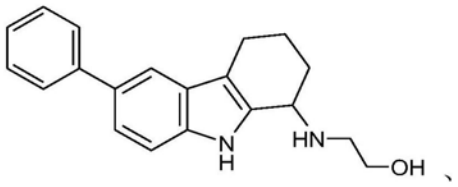
[0116] 在一些实施方案中，R_9是氢或任选地被一个或多个取代基取代的C_{1-6}烷基，该每个取代基各自独立地选自羟基、R_{19}和-OR_{20}；

[0117] 每个R_{19}独立地是任选地被一个或多个取代基取代的苯基，每个取代基各自独立地选自卤基、氰基、任选地被至多5个氟取代的C_{1-6}烷基和任选地被至多5个氟取代的C_{1-6}烷氧基；和

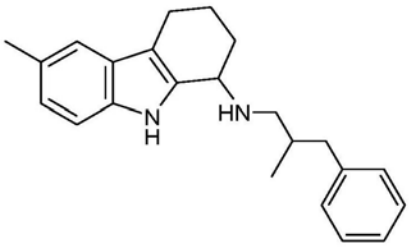
[0118] 每个R_{20}独立地是氢或任选地被一个或多个取代基取代的苯基，每个取代基各自独立地选自卤基、氰基、硝基、羟基、任选地被至多5个氟取代的C_{1-6}烷基和任选地被至多5个氟取代的C_{1-6}烷氧基。

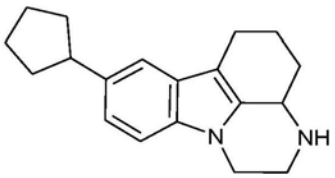
[0119] 在一些实施方案中，式(I)化合物选自：

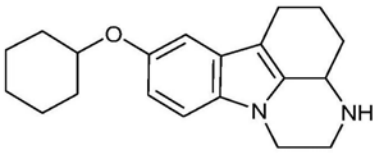


、


、

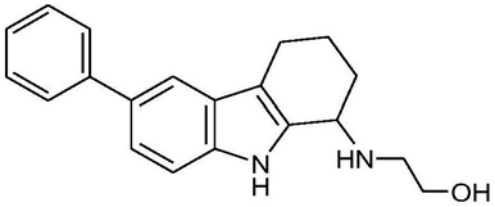
[0120]


、


和


。

[0121] 在一些实施方案中，式(I)化合物是CASIN：

[0122]


[0123] 或其药学上可接受的盐。

[0124] 术语“酯”是指具有式-(R)$_n$-COOR’的化学部分，其中R和R’独立地选自烷基、环烷基、芳基、杂芳基(通过环碳键合)和杂脂环(通过环碳键合)，并且其中n为0或1。

[0125] “酰胺”是具有式-(R)$_n$-C(O)NHR’或-(R)$_n$-NHC(O)R’的化学部分，其中R和R’独立地选自烷基、环烷基、芳基、杂芳基(通过环碳键合)和杂脂环(通过环碳键合)，并且其中n为0或1。酰胺可以是与本发明分子连接的氨基酸或肽分子，从而形成前药。

[0126] 本发明化合物上的任何胺、羟基或羧基侧链可以被酯化或酰胺化。用于实现此目的的程序和特定基团是本领域技术人员已知的，并且可以容易地在参考来源中找到，例如Greene和Wuts,Protective Groups in Organic Synthesis,3rd Ed.,John Wiley&Sons,New York,NY,1999，将其全文并入本文。

[0127] 如本文所用，术语“保护基”和“保护基团”是指添加到分子中以防止分子中的现有基团经历不希望的化学反应的任何原子或原子团。在T.W.Greene和P.G.M.Wuts,Protective Groups in Organic Synthesis,3.Ed.John Wiley&Sons,1999和在J.F.W.McOmie,Protective Groups in Organic Chemistry Plenum Press,1973中描述了保护基部分的例子，两者均通过引用并入本文。可以以这样的方式选择保护基部分，即它们对所应用的反应条件是稳定的并且使用本领域已知的方法在方便的阶段容易地除去。保护基的非限制性列表包括苄基;取代的苄基;烷基羰基(例如，叔丁氧羰基(BOC));芳基烷基羰基(例如，苄氧羰基、苯甲酰基);取代的甲醚(例如甲氧基甲醚);取代的乙醚;取代的苄基醚;四氢吡喃醚;甲硅烷基醚(例如，三甲基甲硅烷基、三乙基甲硅烷基、三异丙基甲硅烷基、叔丁基二甲基甲硅烷基或叔丁基二苯基甲硅烷基);酯类(例如苯甲酸酯);碳酸酯(例如甲氧基甲基碳酸酯);磺酸酯(例如甲苯磺酸酯、甲磺酸酯);无环缩酮(例如二甲基缩醛);环状缩酮(例如，1,3-二噁烷或1,3-二氧戊环);无环缩醛;环状缩醛;无环半缩醛;环状半缩醛;和环状二硫缩酮(例如，1,3-二噻烷或1,3-二硫戊烷)。

[0128] “前药”是指在体内转化为母体药物的药剂。前药通常有用，因为在某些情况下，它们可能比母体药物更容易施用。例如，它们可能通过口服施用具有生物利用度，而母体则不然。与母体药物相比，前药在药物组合物中的溶解度也可能提高。前药的一个非限制性例子是本发明的化合物，其以酯(“前药”)形式施用以促进穿过细胞膜的传递，其中水溶性不利于流动性，但随后被代谢水解成羧酸活性实体，一旦进入细胞内，水溶性是有益的。前药的另一个例子可能是与酸基键合的短肽(聚氨基酸)，其中肽被代谢以显示活性部分。

[0129] 术语“芳族”是指具有至少一个具有共轭π电子系统的环并且包括碳环芳基(例如，苯基)和杂环芳基(例如，吡啶)的芳族基团。该术语包括单环或稠环多环(即共享相邻碳原子对的环)基团。术语“碳环”是指包含一个或多个共价闭合环结构并且形成环骨架的原子都是碳原子的化合物。因此，该术语将碳环与杂环区分开来，在杂环中环骨架包含至少一个不同于碳的原子。术语“杂芳族”是指包含至少一个杂环的芳族基团。

[0130] 如本文所用，术语“烷基”是指脂族烃基。烷基部分可以是“饱和烷基”基团，这意味着它不包含任何烯烃或炔烃部分。烷基部分也可以是“不饱和烷基”部分，这意味着它包含至少一个烯烃或炔烃部分。“烯烃”部分是指由至少两个碳原子和至少一个碳-碳双键组成的基团，“炔烃”部分是指由至少两个碳原子和至少一个碳-碳三键组成的基团。烷基部分，无论是饱和的还是不饱和的，都可以是支链的、直链的或环状的。

[0131] 烷基可具有1至20个碳原子(无论何时出现在本文中，诸如“1至20”的数字范围是

指给定范围内的每个整数;例如,“1至20个碳原子”是指烷基可以由1个碳原子、2个碳原子、3个碳原子等组成,至多并包括20个碳原子,尽管本定义还涵盖了未指定数值范围的术语“烷基”的出现)。烷基还可以是具有1至10个碳原子的中等大小的烷基。烷基也可以是具有1至5个碳原子的低级烷基。本发明化合物的烷基可指定为“C_1-C_4烷基”或类似名称。仅举例来说,“C_1-C_4烷基”表示烷基链中有1至4个碳原子,即烷基链选自甲基、乙基、丙基、异丙基、正丁基、异丁基、仲丁基和叔丁基。

[0132] 烷基可以是取代的或未取代的。当被取代时,取代基是一个或多个单独且独立地选自以下的基团:环烷基、芳基、杂芳基、杂脂环族、羟基、烷氧基、芳氧基、巯基、烷硫基、芳硫基、氰基、卤基、羰基、硫代羰基、O-氨基甲酰基、N-氨基甲酰基、O-硫代氨基甲酰基、N-硫代氨基甲酰基、C-酰氨基、N-酰氨基、S-磺酰氨基、N-磺酰氨基、C-羧基、O-羧基、异氰酸根合、硫氰酸根合、异硫氰酸根合、硝基、甲硅烷基、三卤代甲磺酰基和氨基,包括单取代和双取代的氨基,及其受保护的衍生物。典型的烷基包括但绝不限于甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基、叔丁基、戊基、己基、次乙基(ethenyl)、次丙基(propenyl)、次丁基(butenyl)、环丙基、环丁基、环戊基、环己基等。当取代基被描述为“任选地被取代”时,该取代基可以被上述取代基之一取代。

[0133] 单独出现且没有数字指定的取代基“R”是指选自氢、烷基、环烷基、芳基、杂芳基(通过环碳键合)和杂脂环(通过环碳键合)的取代基。

[0134] “O-羧基”基团是指RC(=O)O-基团,其中R如本文所定义。

[0135] “C-羧基”基团是指-C(=O)OR基团,其中R如本文所定义。

[0136] “乙酰基”基团是指-C(=O)CH_3基团。

[0137] “三卤代甲磺酰基”基团是指$X_3CS(=O)_2$-基团,其中X是卤素。

[0138] “氰基”基团是指-CN基团。

[0139] “异氰酸根合”基团是指-NCO基团。

[0140] “硫氰酸根合”基团是指-CNS基团。

[0141] “异硫氰酸根合”基团是指-NCS基团。

[0142] “亚磺酰基”基团是指-S(=O)-R基团,其中R如本文所定义。

[0143] “S-磺酰氨基”基团是指-$S(=O)_2$NR基团,其中R如本文所定义。

[0144] “N-磺酰氨基”基团是指$RS(=O)_2NH$-基团,其中R如本文所定义。

[0145] “三卤代甲磺酰氨基”基团是指$X_3CS(=O)_2NR$-基团,其中X和R如本文所定义。

[0146] “O-氨基甲酰基”基团是指-$OC(=O)-N(R)_2$基团,其中R如本文所定义。

[0147] “N-氨基甲酰基”基团是指ROC(=O)NH-基团,其中R如本文所定义。

[0148] “O-硫代氨基甲酰基”基团是指-$OC(=S)-N(R)_2$基团,其中R如本文所定义。

[0149] “N-硫代氨基甲酰基”基团是指ROC(=S)NH-基团,其中R如本文所定义。

[0150] “C-酰氨基”基团是指-$C(=O)-N(R)_2$基团,其中R如本文所定义。

[0151] “N-酰氨基”基团是指RC(=O)NH-基团,其中R如本文所定义。

[0152] 术语“全卤代烷基”是指其中所有氢原子被卤原子取代的烷基。

[0153] 术语“酰基烷基”是指RC(=O)R'-基团,其中R如本文所定义,并且R'为双自由基亚烷基。酰基烷基的实例非限制地可以包括$CH_3C(=O)CH_2$-、$CH_3C(=O)CH_2CH_2$-、$CH_3CH_2C(=O)CH_2CH_2$-、$CH_3C(=O)CH_2CH_2CH_2$-等。

[0154] 除非另有说明，当取代基被认为是“任选取代的”时，是指取代基是可以被一个或多个单独且独立地选自以下的基团取代的基团：环烷基、芳基、杂芳基、杂脂环族、羟基、烷氧基、芳氧基、巯基、烷硫基、芳硫基、氰基、卤基、羰基、硫代羰基、O-氨基甲酰基、N-氨基甲酰基、O-硫代氨基甲酰基、N-硫代氨基甲酰基、C-酰氨基、N-酰氨基、S-磺酰氨基、N-磺酰氨基、C-羧基、O-羧基、异氰酸根合、硫氰酸根合、异硫氰酸根合、硝基、甲硅烷基、三卤代甲磺酰基和氨基，包括单取代和双取代的氨基，及其受保护的衍生物。可以形成上述取代基的保护性衍生物的保护基是本领域技术人员已知的并且可以在参考文献例如上述Greene和Wuts中找到。

[0155] 在本文中，术语“环烷基”旨在涵盖仅包含碳原子的三元、四元、五元、六元、七元和八元或更多元环。然而，环烷基可以任选地包含一个或多个不饱和键，其位置使得不产生芳族π电子体系。“环烷基”的一些实例是碳环环丙烷、环丁烷、环戊烷、环戊烯、环戊二烯、环己烷、环己烯、1,3-环己二烯、1,4-环己二烯、环庚烷或环庚烯。

[0156] 如本文所用，“杂环基”是指在环系统主链中包含至少一个杂原子的环状环系统。杂原子独立地选自氧、硫和氮。杂环基可以包括多个稠环。只要环系统中的至少一个环不是芳族的，杂环基可以具有任何饱和度。杂环基可以是取代的或未取代的，并且通过任何可用的化合价，优选任何可用的碳或氮连接到其他基团。优选的单环杂环为5或6元。在六元单环杂环中，杂原子选自氧、硫和氮中的一种至三种，其中当杂环为五元时，优选其具有选自氧、硫和氮中的一种或两种杂原子。

[0157] 杂环基还可以包含一个或多个羰基或硫代羰基官能团，以使该定义包括氧代系统和硫代系统，例如内酰胺、内酯、环状酰亚胺、环状硫代酰亚胺、环状氨基甲酸酯等。

[0158] “杂环基”的一些实例包括但不限于四氢噻喃、4H-吡喃、四氢吡喃、哌啶、1,3-二氧芑、1,3-二噁烷、1,4-二氧芑、1,4-二噁烷、哌嗪、1,3-氧硫杂环己烷、1,4-氧硫杂环己二烯、1,4-氧硫杂环己烷、四氢-1,4-噻嗪、2H-1,2-噁嗪、马来酰亚胺、琥珀酰亚胺、巴比妥酸、硫代巴比妥酸、二氧哌嗪、乙内酰脲(hydantoin)、二氢尿嘧啶、吗啉、三噁烷、六氢-1,3,5-三嗪、四氢噻吩、四氢呋喃、吡咯啉、吡咯烷、吡咯烷酮、吡咯烷二酮、吡唑啉、吡唑烷、咪唑啉、咪唑烷、1,3-间二氧杂环戊烯、1,3-二氧戊环、1,3-二硫杂环戊二烯、1,3-二硫戊环、异噁唑啉、异噁唑烷、噁唑啉、噁唑烷、噁唑烷酮、噻唑啉、噻唑烷和1,3-氧硫戊环(oxathiolane)。杂环基团的连接点可以在氮杂原子的位置或通过杂环的碳原子。

[0159] 在本文中，术语“芳基”旨在表示碳环芳环或环系统。此外，术语“芳基”包括稠环体系，其中至少两个芳基环，或至少一个芳基和至少一个C_{3-8}环烷基共享至少一个化学键。“芳基”环的一些实例包括任选取代的苯基、萘基、菲基、蒽基、四氢化萘基、芴基、茚基和茚满基。术语“芳基”涉及芳族，包括例如苯型基团，其通过成环碳原子之一连接，并且任选带有一个或多个选自以下的取代基：杂环基、杂芳基、卤基、羟基、氨基、氰基、硝基、烷基酰氨基、酰基、C_{1-6}烷氧基、C_{1-6}烷基、C_{1-6}羟烷基、C_{1-6}氨基烷基、C_{1-6}烷基氨基、烷基次磺酰基、烷基亚磺酰基、烷基磺酰基、氨磺酰基或三氟甲基。芳基可以在对位和/或间位被取代。在其他实施方案中，芳基可以在邻位被取代。芳基的代表性实例包括但不限于苯基、3-卤代苯基、4-卤代苯基、3-羟基苯基、4-羟基苯基、3-氨基苯基、4-氨基苯基、3-甲基苯基、4-甲基苯基、3-甲氧基苯基、4-甲氧基苯基、4-三氟甲氧基苯基、3-氰基苯基、4-氰基苯基、二甲基苯基、萘基、羟基萘基、羟甲基苯基、三氟甲基苯基、烷氧基苯基、4-吗啉-4-基苯基、4-吡咯烷-1-基苯

基、4-吡唑基苯基、4-三唑基苯基和4-(2-氧代吡咯烷-1-基)苯基。

[0160] 如本文所用，术语“杂芳基”是指在环骨架中具有一个或多个杂原子(例如，氧、硫或氮)的芳族基团，并且可以包括单环(例如，吡啶)或多个稠环(例如，喹啉)。杂芳基可以带有一个或多个取代基，其各自独立地选自卤基、羟基、氨基、氰基、硝基、环烷基、卤代烷基、芳基、杂环基、巯基、烷基酰氨基、酰基、C_{1-6}-烷氧基、C_{1-6}-烷基、C_{1-6}-羟烷基、C_{1-6}-氨基烷基、C_{1-6}-烷基氨基、烷基次磺酰基、烷基亚磺酰基、烷基磺酰基、氨磺酰基和三氟甲基。杂芳基的代表性实例包括但不限于呋喃、苯并呋喃、噻吩、苯并噻吩、吡咯、吡啶、吲哚、噁唑、苯并噁唑、异噁唑、苯并异噁唑、噻唑、苯并噻唑、异噻唑、咪唑、苯并咪唑、吡唑、吲唑、四唑、喹啉、异喹啉、哒嗪、嘧啶、噁唑和吡嗪的任选取代的衍生物，呋喃，1,2,3-噁二唑，1,2,3-噻二唑，1,2,4-噻二唑，三唑，苯并三唑，蝶啶，苯噁唑，噁二唑，苯并吡唑，喹嗪，肉桂啉，酞嗪，喹唑啉和喹喔啉。在一些实施方案中，取代基可以是卤基、羟基、氰基、OC_{1-6}-烷基、C_{1-6}-烷基、羟基-C_{1-6}-烷基和氨基-C_{1-6}-烷基。

[0161] 反义分子

[0162] 在一些实施方案中，Cdc42特异性抑制剂可以是反义分子。术语“反义”(AS)或“反义片段”是指具有抑制性反义活性的多核苷酸片段(包含脱氧核糖核苷酸、核糖核苷酸或两者的混合物)，其导致相应基因的内源基因组拷贝的表达减少。AS多核苷酸是指包含连续核苷酸的多核苷酸，所述核苷酸具有足够长度的序列并且与靶基因序列内存在的序列同源，以允许AS与基因杂交。许多综述涵盖了反义(AS)技术及其巨大的治疗潜力的主要方面(例如，参见Aboul-Fadl T.,Curr Med.Chem.2005;12(19):2193-214;Crooke S T,Curr Mol.Med.2004August;4(5):465-87;Crooke S T,Annu Rev Med.2004;55:61-95;Vacek M et al.,Cell Mol Life Sci.2003May;60(5):825-33;Cho-Chung Y S,Arch Pharm Res.2003March;26(3):183-91;Moreira J N et al.,Rev Recent Clin Trials 2006Sep;1(3):217-35)。对这项技术的化学(Crooke,1995;Uhlmann et al,1990)、细胞(Wagner,1994)和治疗(Hanania,et al,1995;Scanlon,et al,1995;Gewirtz,1993)方面有进一步的综述。可以通过使用合成的AS寡核苷酸序列来实现对特定基因的表达的反义干预(参见例如Lefebvre-d'Hellencourt et al,1995;Agrawal,1996;LevLehman et al,1997)。

[0163] AS寡核苷酸序列可以是DNA的短序列，通常是15聚体到30聚体，但可小到7聚体(Wagner et al,1996)，其旨在补充感兴趣的靶标mRNA并形成RNA:AS双链体。这种双链体的形成可以阻止相关mRNA的加工、剪接、运输或翻译。此外，某些AS核苷酸序列在与其靶mRNA杂交时可引发细胞RNase H活性，导致mRNA降解(Calabretta et al,1996Semin Oncol.23(1):78-87)。在这种情况下，RNase H将切割双链体的RNA成分，并可能释放AS以进一步与靶标RNA的其他分子杂交。另一种作用方式产生自AS与基因组DNA相互作用以形成三螺旋，该三螺旋可能在转录上无活性。

[0164] 选择反义寡核苷酸的序列靶区段，使得该序列表现出合适的能量相关特征，该特征对于与其互补模板形成寡核苷酸双链体很重要，并且显示出低的自二聚化或自互补潜力(Anazodo et al.,1996)。例如，计算机程序OLIGO®(引物分析软件，版本3.4)可用于确定反义序列解链温度、自由能特性，并估计潜在的自二聚体形成和自互补特性。该程序允许确定这两个参数(潜在的自二聚体形成和自互补)的定性估计，并提供“无潜力”或“一些潜力”或“基本上完全潜力”的指示。使用该程序，通常选择在这些参数中没有潜力的估计的靶标

区段。但是,可以使用在某一类别中具有“一些潜力”的区段。如本领域已知的,在选择中使用参数的平衡。此外,还根据需要选择寡核苷酸,以使类似物取代基本上不影响功能。

[0165] 硫代磷酸酯反义寡核苷酸在有效浓度下通常不会表现出明显的毒性,并且在动物体内表现出足够的药效半衰期(Agarwal et al.,1996)并且是核酸酶抗性的。显示了反义诱导的与细胞发育相关的功能丧失表型用于胶质纤维酸性蛋白(GFAP)、鸡顶盖板形成的建立(Galileo et al.,1991)和N-myc蛋白,负责用于维持神经外胚层培养物中的细胞异质性(上皮细胞与神经母细胞,它们的集落形成能力、致瘤性和粘附性不同)(Rosolen et al.,1990;Whitesell et al,1991)。具有促有丝分裂和血管生成特性的碱性成纤维细胞生长因子(bFgF)的反义寡核苷酸抑制以饱和和特异性的方式抑制了80%的神经胶质瘤细胞的生长(Morrison,1991)。由于疏水性,反义寡核苷酸与磷脂膜相互作用良好(Akhter et al.,1991)。在它们与细胞质膜相互作用后,它们被主动(或被动)转运到活细胞中(Loke et al.,1989),这是一种预计涉及特定受体的饱和机制(Yakubov et al.,1989)。

[0166] siRNA

[0167] 在其他实施方案中,Cdc42特异性抑制剂可以是“小干扰RNA”(siRNA)。siRNA是指减少或沉默(阻止)其内源细胞对应物的基因/mRNA(例如Cdc42)的表达的RNA分子。该术语被理解为包括“RNA干扰”(RNAi)。RNA干扰(RNAi)是指哺乳动物中由小干扰RNA(siRNA,例如短发夹RNA(shRNA))介导的序列特异性转录后基因沉默过程(Fire et al,1998,Nature 391,806)。植物中的相应过程通常称为特异性转录后基因沉默或RNA沉默,在真菌中也称为抑制。RNA干扰反应可以以包含siRNA的核酸内切酶复合物为特征,通常称为RNA诱导的沉默复合物(RISC),其介导具有与siRNA双链体的反义链互补的序列的单链RNA的切割。靶RNA的切割可能发生在与siRNA双链体的反义链互补的区域的中间(Elbashir et al 2001,Genes Dev.,15,188)。有关这些术语和拟议机制的最新信息,参阅Bernstein E.,Denli A M.,Hannon G J:The rest is silence.RNA.2001November;7(11):1509-21;以及Nishikura K.:A short primer on RNAi:RNA-directed RNA polymerase acts as a key catalyst.Cell.2001November 16;107(4):415-8。

[0168] RNAi是一种有效的基因失活方法(Nature Reviews,2002,v.3,p.737-47;Nature,2002,v.418,p.244-51)。作为一种方法,它基于dsRNA物种进入特定蛋白质复合物的能力,然后它会靶向互补的细胞RNA并特异性降解它。更详细地说,dsRNA被III型RNA酶消化成短的(17-29bp)抑制性RNA(siRNA)(DICER,Drosha,etc)(Nature,2001,v.409,p.363-6;Nature,2003,425,p.415-9)。这些片段和互补的mRNA被特定的RISC蛋白复合物识别。整个过程通过核酸内切酶切割靶mRNA而结束(Nature Reviews,2002,v.3,p.737-47;Curr Opin Mol.Ther.2003June;5(3):217-24)。

[0169] 有关如何设计和制备已知基因的siRNA的公开内容,参见例如Chalk A M,Wahlestedt C,Sonnhammer E L.2004Jun.18;319(1):264-74;Sioud M,Leirdal M.,Methods Mol.Biol.2004;252:457-69;Levenkova N,Gu Q,Rux J J.2004Feb.12;20(3):430-2;和Ui-Tei K,Naito Y,Takahashi F,Haraguchi T,Ohki-Hamazaki H,Juni A,Ueda R,Saigo K.,Nucleic Acids Res.2004Feb.9;32(3):936-48。关于生产修饰的/更稳定的siRNA,还参见PCT出版物WO 2004/015107(Atugen)和WO 02/44321(Tuschl et al),以及Chiu Y L,Rana T M.RNA 2003September;9(9):1034-48和U.S.Pat.Nos.5,898,031及6,

107,094(Crooke)。

[0170] 已经开发出能够在细胞内产生siRNA的基于DNA的载体。该方法通常涉及短发夹RNA的转录,这些RNA被有效加工以在细胞内形成siRNA。(参加例如Paddison et al.PNAS 2002,99:1443-1448;Paddison et al.Genes&Dev 2002,16:948-958;Sui et al.PNAS 2002,8:5515-5520;和Brummelkamp et al.Science 2002,296:550-553)。这些报告描述了产生能够特异性靶向许多内源性和外源性表达基因的siRNA的方法。

[0171] 对于与siRNA的递送相关的方法,参见例如Shen et al(FEBS letters 539:111-114(2003)),Xia et al.,Nature Biotechnology 20:1006-1010(2002),Reich et al.,Molecular Vision 9:210-216(2003),Sorensen et al.(J.Mol.Biol.327:761-766(2003),Lewis et al.,Nature Genetics32:107-108(2002)和Simeoni et al.,Nucleic Acids Research 31,11:2717-2724(2003)。siRNA最近已成功用于灵长类动物的抑制;更多细节参见例如Tolentino et al.,Retina 24(1)February 2004pp 132-138。

[0172] 在一些实施方案中,根据本文公开的实施方案的寡核糖核苷酸包含修饰的siRNA。在各种实施方案中,siRNA包括包含第一链和第二链的RNA双链体,其中第一链包含与靶核酸的约18至约40个连续核苷酸至少部分互补的核糖核苷酸序列,并且第二链包含与第一条链至少部分互补的核糖核苷酸序列,并且其中所述第一链和/或所述第二链包含多个修饰的核糖核苷酸组,所述修饰的核糖核苷酸组在糖部分的2'-位具有修饰,由此在每条链中每组修饰的核糖核苷酸在一侧或两侧侧接一组侧翼核糖核苷酸,由此形成侧翼核糖核苷酸组的每个核糖核苷酸选自未修饰的核糖核苷酸或具有与修饰的核糖核苷酸组的修饰不同的修饰的核糖核苷酸。

[0173] 核酶

[0174] 在一些实施方案中,Cdc42特异性抑制剂可以是核酶。术语"核酶"是指具有RNA催化能力并切割靶RNA中特定位点的RNA分子。根据本文公开的实施方案,切割mRNA(例如,Cdc42 mRNA)的核酶可用作抑制剂。在反义治疗受化学计量考虑因素限制的情况下,这可能是必要的(Sarver et al.,1990,Gene Regulation and Aids,pp.305-325)。然后可以使用将靶向与骨髓疾病相关的基因的核酶。被核酶切割的RNA分子的数量大于化学计量预测的数量。(Hampel和Tritz,1989;Uhlenbeck,1987)。

[0175] 核酶催化RNA的磷酸二酯键断裂。已经鉴定了几个核酶结构家族,包括I组内含子、RNase P(丁型肝炎病毒核酶)、锤头状核酶和最初衍生自烟草环斑病毒卫星RNA(sTRSV)负链的发夹核酶(Sullivan,1994;美国专利5,225,347)。后两个家族来源于类病毒和拟病毒,其中核酶被认为将单体与滚环复制过程中产生的寡聚体分开(Symons,1989和1992)。锤头状和发夹状核酶基序最常适用于基因治疗中mRNA的反式切割(Sullivan,1994)。一般而言,核酶具有约30-100个核苷酸的长度。核酶的递送类似于AS片段和/或siRNA分子的递送。

[0176] 如本文所用,术语"核酸"可以是DNA或RNA或其修饰形式。核酸还可以包括允许被聚合酶正确读取并且不改变由该核酸编码的多肽的表达的修饰核苷酸。术语"核酸"和"寡核苷酸"可互换使用,指包含多个核苷酸的分子。如本文所用,这些术语是指寡核糖核苷酸以及寡脱氧核糖核苷酸。该术语还应包括多核苷(例如,减去磷酸盐的多核苷酸)和任何其他含有机碱基的聚合物。核酸包括载体,例如质粒,以及寡核苷酸。核酸分子可以从现有的核酸来源获得,但优选是合成的(例如,通过寡核苷酸合成产生)。

[0177] 根据本文公开的实施方案使用的多核苷酸可以进行修饰以具有改进的治疗特性。可以引入核苷酸的修饰或类似物以改善多核苷酸的治疗特性。改进的特性包括增加的核酸酶抗性和/或增加的渗透细胞膜的能力。需要时，通过本领域已知的任何方法提供核酸酶抗性，该方法不干扰使用和递送方法所需的AS多核苷酸、siRNA、cDNA和/或核酶的生物活性(Iyer et al.,1990;Eckstein,1985;Spitzer和Eckstein,1988;Woolf et al.,1990;Shaw et al.,1991)。可以对寡核苷酸进行的修饰以增强核酸酶抗性包括修饰磷酸骨架中的磷或氧杂原子。这些包括制备膦酸甲酯、硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯和吗啉代低聚物。在一个实施方案中，它是通过在四个至六个3'-末端核苷酸碱基之间具有连接的硫代磷酸酯键来提供的。或者，硫代磷酸酯键连接所有核苷酸碱基。在保留生物活性但对核酸酶的稳定性显著增加的情况下，可以使用本领域已知的其他修饰。

[0178] 多核苷酸的所有类似物或修饰可以与本文公开的实施方案一起使用，条件是所述类似物或修饰基本上不影响多核苷酸的功能。核苷酸可以选自天然存在的或合成的修饰碱基。天然存在的碱基包括腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶、胸腺嘧啶和尿嘧啶。核苷酸的修饰碱基包括肌苷、黄嘌呤、次黄嘌呤、2-氨基腺嘌呤、6-甲基腺嘌呤、2-丙基腺嘌呤和其他烷基腺嘌呤、5-卤代尿嘧啶、5-卤代胞嘧啶、6-氮杂胞嘧啶和6-氮杂胸腺嘧啶、假尿嘧啶、4-硫尿嘧啶(thiuracil)、8-卤代腺嘌呤、8-氨基腺嘌呤、8-硫醇腺嘌呤、8-硫醇烷基腺嘌呤、8-羟基腺嘌呤和其他8-取代腺嘌呤、8-卤代鸟嘌呤、8-氨基鸟嘌呤、8-硫醇鸟嘌呤、8-硫代烷基鸟嘌呤、8-羟基鸟嘌呤和其他取代的鸟嘌呤、其他氮杂和脱氮腺嘌呤、其他氮杂和脱氮鸟嘌呤、5-三氟甲基尿嘧啶和5-三氟胞嘧啶。

[0179] 此外，可以制备多核苷酸的类似物，其中核苷酸的结构发生了根本性的改变，并且更适合作为治疗或实验试剂。核苷酸类似物的一个例子是肽核酸(PNA)，其中DNA(或RNA)中的脱氧核糖(或核糖)磷酸骨架被与肽中发现的相似的聚酰胺骨架取代。PNA类似物已被证明可抵抗酶的降解，并在体内和体外延长寿命。此外，已显示PNA与互补DNA序列的结合比DNA分子更强。该观察结果归因于PNA链和DNA链之间缺乏电荷排斥。可以对寡核苷酸进行的其他修饰包括聚合物骨架、环状骨架或无环骨架，以及LNA("锁定核酸")。

[0180] 本文公开的实施方案还包括可以与Cdc42特异性抑制性核酸具有以下同源性或同一性程度的核酸(例如siRNA)：35％、36％、37％、38％、39％、40％、41％、42％、43％、44％、45％、46％、47％、48％、49％、50％、51％、52％、53％、54％、55％、56％、57％、58％、59％、60％、61％、62％、63％、64％、65％、66％、67％、68％、69％、70％、71％、72％、73％、74％、75％、76％、77％、78％、79％、80％、81％、82％、83％、84％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％，或以上述百分比中的任何两个为界的范围。具有大于或等于35％同源性或同一性的候选Cdc42特异性抑制性核酸可以通过本领域已知的方法鉴定，并且随后可以使用功能测定进行检查，例如本文所述的测定和本领域已知的那些。

[0181] 术语"同源性"是指两个多核苷酸或两个多肽部分之间的同一性百分比。从一个部分到另一个部分的序列之间的对应关系可以通过本领域已知的技术来确定。例如，同源性可以通过比对序列信息和使用容易获得的计算机程序直接比较两个多核苷酸或多肽分子之间的序列信息来确定。或者，同源性可以通过多核苷酸在一定条件下的杂交来确定，这在同源区域之间形成稳定的双链体，然后用单链特异性核酸酶消化，并测定消化片段的大小。

当至少约80％、优选至少约90％、最优选至少约95％的核苷酸或氨基酸在定义的分子长度内匹配时，如使用上述方法确定的，则两个DNA或者两个多肽序列是“基本上同源的”。

[0182] 肽和多肽的制备

[0183] 在一些实施方案中，Cdc42特异性抑制剂可以是多肽(例如，显性失活肽、抗体或亲和体)。例如，可以通过本领域已知的几种方法(例如，合成或通过重组方法)产生多肽。

[0184] 术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”在本文中可互换使用以指代氨基酸残基的聚合物。该术语适用于其中一个或多个氨基酸残基是相应天然存在的氨基酸的类似物或模拟物的氨基酸聚合物，以及天然存在的氨基酸聚合物。可以修饰多肽，例如通过添加碳水化合物残基以形成糖蛋白。术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”包括糖蛋白以及非糖蛋白。多肽产物可以通过例如采用标准固相技术进行生化合成。此类方法包括但不限于排他固相合成、部分固相合成方法、片段浓缩、经典溶液合成。当肽相对较短(例如，10kDa)和/或当它不能通过重组技术产生(例如，不由核酸序列编码)并因此涉及不同的化学时，优选使用这些方法。固相多肽合成程序在本领域中是众所周知的，并且由John Morrow Stewart和Janis Dillaha Young,Solid Phase Peptide Syntheses(2nd Ed.,Pierce Chemical Company,1984)进一步描述。合成的多肽可以任选地通过制备型高效液相色谱纯化[Creighton T.(1983) Proteins,structures and molecular principles.WH Freeman and Co.NY]，之后可以通过氨基酸测序确认它们的组成。在需要大量多肽的情况下，它可以使用重组技术产生，例如Bitter et al.,(1987)Methods in Enzymol.153:516-544,Studier et al.(1990) Methods in Enzymol.185:60-89,Brisson et al.(1984)Nature 310:511-514,Takamatsu et al.(1987)EMBO J.6:307-311,Coruzzi et al.(1984)EMBO J.3:1671-1680和Brogli et al.,(1984)Science 224:838-843,Gurley et al.(1986)Mol.Cell.Biol.6:559-565以及Weissbach&Weissbach,1988,Methods for Plant Molecular Biology,Academic Press,NY,Section VIII,pp 421-463中描述的。

[0185] 在一些实施方案中，制备多肽或其片段的方法是将包含该基因的cDNA的多核苷酸克隆到表达载体中并培养携带该载体的细胞以表达编码的多肽，然后纯化得到的多肽，所有这些都使用本领域已知的方法进行，例如Marshak et al.,“Strategies for Protein Purification and Characterization.A laboratory course manual.”CSHL Press(1996)中描述的(此外，参见例如Bibl Haematol.1965;23:1165-74Appl Microbiol.1967July;15(4):851-6;Can J.Biochem.1968May;46(5):441-4;Biochemistry.1968July;7(7):2574-80;Arch Biochem Biophys.1968Sep.10;126(3):746-72;Biochem Biophys Res Commun.1970Feb.20;38(4):825-30.)。

[0186] 表达载体可以包括用于控制异源材料转录的启动子，并且可以是组成型或诱导型启动子以允许选择性转录。可以任选地包括获得必要转录水平所需的增强子。表达载体还可以包括选择基因。

[0187] 可以通过本领域已知的多种方法中的任何一种将载体引入细胞或组织中。此类方法可在Sambrook et al.,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Cold Springs Harbor Laboratory,New York(1989,1992),in Ausubel et al.,Current Protocols in Molecular Biology,John Wiley and Sons,Baltimore,Md.(1989),Vega et al.,Gene Targeting,CRC Press,Ann Arbor,Mich.(1995),Vectors:A Survey of Molecular

Cloning Vectors and Their Uses,Butterworths,Boston Mass.(1988)以及Gilboa et al.(1986)中找到一般性描述。

[0188] 抗Cdc42抗体的制备

[0189] 可以使用完整的多肽或含有较小多肽的片段作为免疫抗原来制备与Cdc42或其衍生的片段结合的抗体。例如,可能需要产生特异性结合Cdc42的N-或C-末端或任何其他合适结构域的抗体。用于免疫动物的多肽可以来源于翻译的cDNA或化学合成,并且如果需要,可以与载体蛋白结合。这种与多肽化学偶联的常用载体包括匙孔血蓝蛋白(KLH)、甲状腺球蛋白、牛血清白蛋白(BSA)和破伤风类毒素。然后使用偶联的多肽免疫动物。

[0190] 如果需要,可以进一步纯化多克隆或单克隆抗体,例如通过结合到结合了产生抗体的多肽或肽的基质并从基质中洗脱。本领域技术人员知道免疫学中常见的用于纯化和/或浓缩多克隆和单克隆抗体的各种技术(Coligan et al,Unit 9,Current Protocols in Immunology,Wiley Interscience,1994)。

[0191] 制备包括片段在内的所有类型抗体的方法是本领域已知的(参见例如,Harlow和Lane,Antibodies:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory,New York(1988))。免疫方法,包括在合适的佐剂中制备免疫原、确定抗体结合、抗体分离、获得单克隆抗体的方法和单克隆抗体的人源化的所有必要步骤,都是本领域技术人员已知的。

[0192] 抗体可以是人源化抗体或人抗体。抗体可以使用本领域已知的多种技术进行人源化,包括CDR移植(EP239,400:PCT公开WO0.91/09967;美国专利5,225,539;5,530,101;和5,585,089,饰面或表面重修(EP 592,106;EP 519,596;Padlan,Molecular Immunology 28(4/5):489-498(1991);Studnicka et al.,Protein Engineering 7(6):805-814(1994);Roguska et al.,PNAS 91:969-973(1994))和链更替(chain shuffling)(美国专利5,565,332)。

[0193] 所定义的单克隆抗体包括源自一种物种(例如鼠、兔、山羊、大鼠、人等)的抗体以及源自两种(或更多)物种的抗体,例如嵌合抗体和人源化抗体。

[0194] 对于人类患者的治疗性治疗,完全人抗体是特别期望的。人抗体可以通过本领域已知的多种方法制备,包括使用源自人免疫球蛋白序列的抗体文库的噬菌体展示方法。另见美国专利4,444,887和4,716,111;和PCT公布WO 98/46645、WO 98/50433、WO 98/24893、WO 98/16654、WO 96/34096、WO 96/33735和WO 91/10741,它们各自通过引用整体并入本文。

[0195] 关于所有类型的抗体,包括人源化抗体、人抗体和抗体片段的附加信息可以在WO 01/05998中找到,其通过引用整体并入本文。

[0196] 可以通过上述方法制备中和抗体,可能还具有通过例如存活试验筛选中和活性的附加步骤。

[0197] 本文公开的实施方案还涉及亲和体的制备和使用,即通过组合蛋白工程原理开发的非Ig来源的结合蛋白,如例如在Nygren PA 2008FEBS Journal 275:2668-2676中所述。

[0198] 在本文公开的实施方案中使用的多肽也可以被修饰,任选地被化学修饰,以提高它们的治疗活性。“化学修饰的”——当提及多肽时,是指其中至少一个氨基酸残基通过自然过程如加工或其他翻译后修饰,或通过本领域熟知的化学修饰技术修饰的多肽。在众多已知修饰中,典型但非排他性的例子包括:乙酰化、酰化、酰胺化、ADP-核糖基化、糖基化、

GPI锚形成、脂质或脂质衍生物的共价连接、甲基化、十四烷基化、聚乙二醇化、异戊二烯化、磷酸化、泛素化、或任何类似的过程。

[0199] 其他可能的多肽修饰(例如由核酸序列改变产生的修饰)包括取代、缺失和插入。

[0200] “保守取代”是指一个类别中的氨基酸被同一类别的氨基酸取代,其中类别由常见的物理化学氨基酸侧链性质和自然界中发现的同源多肽中的高取代频率定义,如例如由标准Dayhoff频率交换矩阵或BLOSUM矩阵确定的。

[0201] “非保守取代”是指一类中的氨基酸被另一类中的氨基酸取代;例如,用III类残基如Asp、Asn、Glu或Gln取代Ala,即II类残基。

[0202] “缺失”是指核苷酸或氨基酸序列的变化,其中分别地一个或多个核苷酸或氨基酸残基不存在。

[0203] “插入”或“添加”是指核苷酸或氨基酸序列的变化,其中与天然存在的序列相比,该变化分别导致添加一个或多个核苷酸或氨基酸残基。

[0204] “取代”是指将一个或多个核苷酸或氨基酸分别替换为不同的核苷酸或氨基酸。至于氨基酸序列,取代可以是保守的或非保守的。

[0205] 本文公开的实施方案还包括与Cdc42特异性抑制性多肽具有以下同源性或同一性程度的多肽(例如显性失活多肽或抗体):35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%,或以上述百分比中的任何两个为界的范围。具有大于或等于35%同源性或同一性的候选Cdc42特异性抑制性多肽可以通过本领域已知的方法鉴定,并且随后可以使用功能测定进行检查,例如本文所述的测定和本领域已知的那些。

[0206] 药物组合物和施用

[0207] 本文也提供了用于本文提供的方法的药物组合物。在一些实施方案中,药物组合物包含Cdc42特异性抑制剂和药学上可接受的载体。

[0208] 本文所述的化合物或化合物的混合物可以是合成的、天然存在的或其组合。本文所述的化合物或化合物的混合物可包含氨基酸、核苷酸、碳氢化合物、脂质、多糖等。本文所述的化合物或化合物的混合物优选包含Cdc42特异性抑制剂(例如,CASIN)。本文所述的化合物或化合物的混合物可配制成药物组合物,其包含药学上可接受的载体和技术人员显而易见的其他赋形剂。这种组合物可以另外包含有效量的其他化合物,尤其是用于治疗本文所述的病况、疾病和/或病症。

[0209] 一些实施方案包括施用药学有效量的活性剂或其药学上可接受的盐或酯、活性剂类似物或其药学上可接受的盐或酯、或它们的组合。

[0210] 所述组合物和制剂优选包含至少0.1%的活性剂。当然,组合物和制剂的百分比可以变化,并且可以占施用量重量的约2%至60%。优选地,组合物和制剂的百分比可以占施用量重量的约2、5、10或15%至30、35、40、45、50、55或60%。这种药学上有用的组合物和制剂中的活性化合物的量使得将获得合适的剂量。

[0211] 活性剂可形成盐,其也在优选实施方案的范围内。除非另有说明,本文提及的活性

剂化合物应理解为包括提及其盐。如本文所用，术语“盐”表示与无机和/或有机酸和碱形成的酸性和/或碱性盐。此外，当活性剂包含碱性部分(例如但不限于胺或吡啶或咪唑环)和酸性部分(例如但不限于羧酸)时，两性离子(“内盐”)可以形成并包括在本文所用的术语“盐”内。优选药学上可接受的(例如，无毒的、生理学上可接受的)盐，尽管其他盐也是有用的，例如，可以用于制备过程中使用的分离或纯化步骤中。活性剂的化合物的盐可以例如通过使活性剂的化合物与一定量的酸或碱(例如当量)在例如盐沉淀的介质中或在水性介质中反应来形成，然后冻干。

[0212] 含有碱性部分的活性剂，例如但不限于胺或吡啶或咪唑环，可与多种有机酸和无机酸形成盐。示例性的酸加成盐包括乙酸盐(例如与乙酸或三卤乙酸例如三氟乙酸形成的那些)、己二酸盐、藻酸盐、抗坏血酸盐、天冬氨酸盐、苯甲酸盐、苯磺酸盐、硫酸氢盐、硼酸盐、丁酸盐、柠檬酸盐、樟脑酸盐、樟脑磺酸盐、环戊烷丙酸盐、二葡萄糖酸盐、十二烷基硫酸盐、乙磺酸盐、富马酸盐、葡庚糖酸盐、甘油磷酸盐、半硫酸盐、庚酸盐、己酸盐、盐酸盐(与盐酸形成)、氢溴酸盐(与溴化氢形成)、氢碘酸盐、2-羟基乙磺酸盐、乳酸盐、马来酸盐(与马来酸形成)、甲磺酸盐(与甲磺酸形成)、2-萘磺酸盐、烟酸盐、硝酸盐、草酸盐、果胶酸盐、过硫酸盐、3-苯丙酸盐、磷酸盐、苦味酸盐、新戊酸盐、丙酸盐、水杨酸盐、琥珀酸盐、硫酸盐(例如与硫酸形成的那些)、磺酸盐(如本文提及的那些)、酒石酸盐、硫氰酸盐、甲苯磺酸盐如甲苯磺酸盐、十一烷酸盐等。

[0213] 含有酸性部分的活性剂，例如但不限于羧酸，可以与多种有机和无机碱形成盐。示例性的碱式盐包括铵盐，碱金属盐例如钠盐、锂盐和钾盐，碱土金属盐例如钙盐和镁盐，与有机碱(例如有机胺)例如苄星、二环己胺、海巴胺[与N,N-双(脱氢-松香基)乙二胺形成的]、N-甲基-D-葡糖胺、N-甲基-D-葡糖酰胺、叔丁胺的盐以及与氨基酸如精氨酸、赖氨酸等形成的盐。碱性含氮基团可以用诸如低级烷基卤化物(例如甲基、乙基、丙基和丁基氯化物、溴化物和碘化物)、二烷基硫酸盐(例如二甲基、二乙基、二丁基和二戊基硫酸盐)、长链卤化物(例如，癸基、月桂基、肉豆蔻基和硬脂基氯化物、溴化物和碘化物)、芳烷基卤化物(例如，苄基溴和苯乙基溴)等试剂季铵化。

[0214] 优选实施方案的化合物的前药和溶剂化物也包括在本文中。如本文所用，术语“前药”表示一种化合物，其在施用于受试者后，通过代谢或化学过程经历化学转化以产生活性剂的化合物，和/或其盐和/或溶剂化物。活性剂的溶剂化物优选为水合物。

[0215] 活性剂及其盐可以以它们的互变异构形式存在(例如，作为酰胺或亚氨基醚)。所有这些互变异构形式在本文中都被认为是优选实施方案的一部分。

[0216] 本发明化合物的所有立体异构体，例如由于任何取代基上的不对称碳而可以存在的那些，包括对映异构体形式(其甚至可以在不存在不对称碳原子的情况下存在)和非对映异构体形式，都被考虑并且在优选实施方案的范围内。优选实施方案的化合物的单个立体异构体可以例如基本上不含其他异构体，或者可以例如作为外消旋体或与所有其他立体异构体或其他选定的立体异构体混合。优选实施方案的手性中心可以具有如IUPAC 1974建议所定义的S或R构型。

[0217] 当根据优选实施方案的化合物为盐形式时，它们优选为药学上可接受的盐。这样的盐包括药学上可接受的酸加成盐、药学上可接受的碱加成盐、药学上可接受的金属盐、铵盐和烷基化铵盐。酸加成盐包括无机酸和有机酸的盐。合适的无机酸的代表性实例包括盐

酸、氢溴酸、氢碘酸、磷酸、硫酸、硝酸等。合适的有机酸的代表性实例包括甲酸、乙酸、三氯乙酸、三氟乙酸、丙酸、苯甲酸、肉桂酸、柠檬酸、富马酸、乙醇酸、乳酸、马来酸、苹果酸、丙二酸、扁桃酸、草酸、苦味酸、丙酮酸、水杨酸、琥珀酸、甲磺酸、乙磺酸、酒石酸、抗坏血酸、扑酸、双亚甲基水杨酸、乙二磺酸、葡萄糖酸、柠康酸、天冬氨酸、硬脂酸、棕榈酸、EDTA、乙醇酸、对氨基苯甲酸、谷氨酸、苯磺酸、对甲苯磺酸、硫酸盐、硝酸盐、磷酸盐、高氯酸盐、硼酸盐、醋酸盐、苯甲酸盐、羟基萘酸盐、甘油磷酸盐、酮戊二酸盐等。金属盐的实例包括锂、钠、钾、镁盐等。铵盐和烷基化铵盐的实例包括铵、甲基铵、二甲基铵、三甲基铵、乙基铵、羟乙基铵、二乙基铵、丁基铵、四甲基铵盐等。有机碱的实例包括赖氨酸、精氨酸、胍、二乙醇胺、胆碱等。

[0218] 药学上可接受的盐可以通过使活性剂与1至4当量的碱如氢氧化钠、甲醇钠、氢化钠、叔丁醇钾、氢氧化钙、氢氧化镁等在溶剂如醚、THF、甲醇、叔丁醇、二噁烷、异丙醇、乙醇等中反应来制备。可以使用溶剂的混合物。也可以使用有机碱如赖氨酸、精氨酸、二乙醇胺、胆碱、胍及其衍生物等。或者，在适用的情况下，酸加成盐通过用酸如盐酸、氢溴酸、硝酸、硫酸、磷酸、对甲苯磺酸、甲磺酸、fonic acid、乙酸、柠檬酸、马来酸、水杨酸、羟基萘甲酸、抗坏血酸、棕榈酸、琥珀酸、苯甲酸、苯磺酸、酒石酸等在溶剂如乙酸乙酯、醚、醇、丙酮、THF、二噁烷等中处理来制备。也可以使用溶剂的混合物.

[0219] 化合物可以配制成各种形式，包括固体和液体形式，例如片剂、凝胶、糖浆、粉末、气雾剂、乳膏、洗剂、酊剂、泡沫剂等。

[0220] 优选实施方案的组合物可以包含生理上可接受的稀释剂、填充剂、润滑剂、赋形剂、溶剂、粘合剂、稳定剂等。可用于组合物中的稀释剂包括但不限于磷酸二钙、硫酸钙、乳糖、纤维素、高岭土、甘露醇、氯化钠、干淀粉、糖粉和用于缓释片剂的羟丙基甲基纤维素(HPMC)。可用于组合物中的粘合剂包括但不限于淀粉、明胶和填充剂，例如蔗糖、葡萄糖、右旋糖和乳糖。

[0221] 可用于组合物中的天然和合成树胶包括但不限于海藻酸钠、甘地树胶(ghatti)、羧甲基纤维素、甲基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮和胶状硅酸镁铝(veegum)。可用于组合物中的赋形剂包括但不限于微晶纤维素、硫酸钙、磷酸二钙、淀粉、硬脂酸镁、乳糖和蔗糖。可以使用的稳定剂包括但不限于多糖例如阿拉伯胶、琼脂、海藻酸、瓜尔胶和黄蓍胶，两性聚合物例如明胶以及合成和半合成聚合物例如卡波姆树脂、纤维素醚和羧甲基甲壳质。

[0222] 可以使用的溶剂包括但不限于林格氏溶液、水、蒸馏水、二甲基亚砜的50％水溶液、丙二醇(纯净或水中)、磷酸盐缓冲盐水、平衡盐溶液、乙二醇和其他常规流体。

[0223] 施用化合物的剂量和给药方案将根据剂型、施用方式、所治疗的病况和所治疗患者的具体情况而变化。因此，最佳治疗浓度将最好通过常规实验按时间和地点确定。

[0224] 根据优选实施方案的化合物也可以肠内使用。口服地，根据优选实施方案的化合物适合以100μg至100mg/天/kg体重的速率施用。优选地，口服地，根据优选实施方案的化合物适于按约100、150、200、250、300、350、400、450或500μg到约1、5、10、25、50、75、100mg/天/kg体重的速率施用。期望的剂量可以按一份或多份施用。对于口服施用，合适的形式是例如片剂、凝胶剂、气雾剂、丸剂、糖衣丸、糖浆剂、混悬剂、乳剂、溶液剂、粉剂和颗粒剂；施用方法包含使用含有1mg到约500mg活性物质的合适形式。优选地，施用方法包括使用含有约1、2、5、10、25或50mg到约100、200、300、400、500mg活性物质的合适形式。

[0225] 根据优选实施方案的化合物也可以溶液或悬浮液形式胃肠外施用，用于静脉内或肌肉内灌注或注射。在这种情况下，根据优选实施方案的化合物通常以约10μg至10mg/天/kg体重的速率施用；优选的施用方法包括使用每ml含有大约0.01mg至1mg活性物质的溶液或悬浮液。优选地，根据优选实施方案的化合物通常以约10、20、30、40、50、60、70、80、90或100μg至1、2、3、4、5、6、7、8、9或10mg/天/kg体重的速率施用；优选的施用方法包括使用每ml含有大约0.01、0.02、0.03、0.04或0.5mg至0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9或1mg活性物质的溶液或悬浮液。

[0226] 本文公开的实施方案的活性化合物和/或药物组合物可以根据各种途径施用，通常通过注射或口服施用，包括局部或全身施用。此外，如果需要，可以进行重复施用。

[0227] 对于离体施用，活性剂可以通过将维持细胞活力的任何标准方法施用，例如通过将其添加到(适合于靶细胞的)培养基中并将该培养基直接添加到细胞中。如本领域已知的，在该方法中使用的任何介质可以是水性的且无毒的，从而不会使细胞无法存活。此外，如果需要，它可以包含用于维持细胞活力的标准营养素。对于体内施用，可以将复合物加入例如药学上可接受的载体，例如盐水和缓冲盐水中，并通过本领域已知的几种方式中的任何一种方式施用。施用的实例包括肠胃外施用，例如通过静脉内注射，包括通过供应具有靶细胞的组织或器官的血管的局部灌注，或通过吸入气溶胶、皮下或肌肉注射，局部施用，例如至皮肤伤口和损伤，直接转染到例如准备用于移植和随后移植到受试者中的骨髓细胞中，以及直接转染到随后移植到受试者中的器官中。其他施用方法包括口服施用，特别是当活性剂被封装时，或直肠施用，特别是当活性剂为栓剂形式时。

[0228] 考虑这样的靶细胞可以位于受试者或人类患者体内，在这种情况下，将以药理学上可接受的形式向患者施用安全有效量的活性剂。一般而言，考虑优选实施方案的有用药物组合物将包括适宜量的所选活性化合物衍生物，例如约0.001％至约10％(w/w)，其稀释于药理学或生理学可接受的载体例如磷酸盐缓冲盐水中。在这种情况下施用至受试者的施用途径和材料的最终量将取决于预期的应用并且根据以下实施例对本领域技术人员来说是显而易见的。

[0229] 选择的任何组合物都应该对细胞具有低毒性或无毒性。任何给定化合物的毒性可能随所用化合物的浓度而变化。如果所选择的化合物被身体代谢或消除并且这种代谢或消除以不会产生有害毒性的方式进行，这也是有益的。

[0230] 这些实施例说明了用于在此要求保护的方法中的化合物类型；该清单并不详尽。在选择活性化合物时，还优选考虑符合权利要求标准的上述化合物的衍生物。

[0231] 优选地施用化合物以使得治疗有效浓度的化合物与身体的受影响细胞接触。在优选实施方案的上下文中，施用给受试者特别是人的剂量优选足以在合理的时间段内在受试者中产生治疗反应。剂量将由所使用的特定化合物的强度和受试者的状况以及要治疗的受试者的体重来确定。可能伴随特定化合物的施用的任何不良副作用的存在、性质和程度也将决定剂量的大小和对特定患者采用的特定施用途径。一般而言，优选实施方案的化合物在低剂量下是治疗有效的。通常有用的剂量范围为约0.001mM或更少，至约100mM或更多。优选地，有效剂量范围为约0.01、0.05、0.1、0.5、0.6、0.7、0.8或0.9mM至约1、2、3、4、5、6、7、8、9或10mM。因此，化合物通常以低剂量施用。

[0232] 该化合物可以在药学上可接受的载体中施用。药学上可接受的载体是本领域技术

人员熟知的。载体的选择将部分地由特定化合物以及由用于施用组合物的特定方法确定。因此，优选实施方案的药物组合物有多种合适的制剂。

[0233] 化合物可以在剂量单位制剂中口服、局部、肠胃外、通过吸入或喷雾、阴道、直肠或舌下施用。术语“注射施用”包括但不限于：静脉内、关节内、肌肉内、皮下和肠胃外注射，以及使用输注技术。皮肤施用可以包括局部应用或透皮施用。一种或多种化合物可以与一种或多种无毒药学上可接受的载体以及如果需要的其他活性成分结合存在。

[0234] 可以根据本领域已知的用于制备药物组合物的任何合适的方法来制备旨在用于口服的组合物。此类组合物可包含一种或多种选自稀释剂、甜味剂、调味剂、着色剂和防腐剂的试剂以提供可口的制剂。片剂含有与适用于制造片剂的无毒药学上可接受的赋形剂混合的活性成分。这些赋形剂可以是例如惰性稀释剂，例如碳酸钙、碳酸钠、乳糖、磷酸钙或磷酸钠；造粒和崩解剂，例如玉米淀粉或海藻酸；和粘合剂，例如硬脂酸镁、硬脂酸或滑石粉。片剂可以是未包衣的或者它们可以通过已知技术进行包衣以延迟在胃肠道中的崩解和吸收，并且由此在较长时段内提供持续作用。例如，可以使用诸如单硬脂酸甘油酯或二硬脂酸甘油酯的延时材料。这些化合物也可以制成固体、快速释放的形式。

[0235] 口服制剂也可以作为硬明胶胶囊呈递，其中活性成分与惰性固体稀释剂例如碳酸钙、磷酸钙或高岭土混合，或作为软明胶胶囊呈递，其中活性成分与水或油介质例如花生油、液体石蜡或橄榄油混合。

[0236] 也可以使用含有活性物质与赋形剂的水性悬浮液，该赋形剂适合于制备水性悬浮液。此类赋形剂是悬浮剂，例如羧甲基纤维素钠、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、海藻酸钠、聚乙烯吡咯烷酮、黄蓍胶和阿拉伯树胶；分散剂或润湿剂可以是天然存在的磷脂，例如卵磷脂，或环氧烷与脂肪酸的缩合产物，例如聚氧乙烯硬脂酸酯，或环氧乙烷与长链脂肪醇的缩合产物，例如十七亚乙基氧十六烷醇，或环氧乙烷与衍生自脂肪酸和己糖醇的偏酯的缩合产物，例如聚氧乙烯山梨糖醇单油酸酯，或环氧乙烷与衍生自脂肪酸和己糖醇酐的偏酯的缩合产物，例如聚山梨糖醇单油酸酯。水性悬浮液还可以包含一种或多种防腐剂，例如对羟基苯甲酸乙酯或正丙酯，一种或多种着色剂，一种或多种调味剂，和一种或多种甜味剂，例如蔗糖或糖精。

[0237] 适用于通过添加水制备水性悬浮液的可分散粉末和颗粒提供了与分散剂或润湿剂、悬浮剂和一种或多种防腐剂混合的活性成分。合适的分散剂或润湿剂和悬浮剂例如上面已经提到的那些。也可以存在其他赋形剂，例如甜味剂、调味剂和着色剂。

[0238] 化合物也可以是非水液体制剂的形式，例如油性混悬剂，其可以通过将活性成分悬浮在植物油例如花生油、橄榄油、芝麻油或花生油中或在矿物油例如液体石蜡中配制。油性悬浮液可以含有增稠剂，例如蜂蜡、硬石蜡或鲸蜡醇。可添加甜味剂如上述那些和调味剂以提供可口的口服制剂。这些组合物可以通过添加抗氧化剂如抗坏血酸来保存。

[0239] 优选实施方案的化合物也可以使用本领域技术人员已知的方法经皮施用。例如，活性剂在任选含有渗透增强剂的合适的挥发性溶剂中的溶液或悬浮液可以与本领域技术人员已知的附加添加剂例如基质材料和杀菌剂组合。灭菌后，所得混合物可按照已知程序配制成剂型。此外，在用乳化剂和水处理后，活性剂的溶液或悬浮液可配制成洗剂或油膏。

[0240] 用于处理经皮递送系统的合适溶剂是本领域技术人员已知的，包括低级醇如乙醇或异丙醇、低级酮如丙酮、低级羧酸酯如乙酸乙酯、极性醚如四氢呋喃、低级烃例如己烷、环

己烷或苯，或卤代烃，例如二氯甲烷、氯仿、三氯三氟乙烷或三氯氟乙烷。合适的溶剂还可以包括一种或多种选自低级醇、低级酮、低级羧酸酯、极性醚、低级烃、卤代烃的材料的混合物。

[0241] 用于经皮递送系统的合适的渗透增强材料是本领域技术人员已知的，并且包括例如单羟基或多羟基醇如乙醇、丙二醇或苯甲醇，饱和或不饱和C8-C18脂肪醇如月桂醇或鲸蜡醇，饱和或不饱和C8-C18脂肪酸如硬脂酸，最多24个碳原子的饱和或不饱和脂肪酸酯，如乙酸、己酸、月桂酸、肉豆蔻酸、硬脂酸或棕榈酸的甲基、乙基、丙基、异丙基、正丁基、仲丁基、异丁基、叔丁基或单甘油酯，或具有最多约24个碳原子的饱和或不饱和二羧酸的二酯，例如己二酸二异丙酯、己二酸二异丁酯、癸二酸二异丙酯、马来酸二异丙酯或富马酸二异丙酯。另外的渗透增强材料包括磷脂酰衍生物如卵磷脂或脑磷脂、萜烯、酰胺、酮、脲及其衍生物，以及醚如二甲基异山梨醇和二甘醇单乙醚。合适的渗透增强制剂还可以包括一种或多种选自单羟基或多羟基醇、饱和或不饱和C8-C18脂肪醇、饱和或不饱和C8-C18脂肪酸、具有最多24个碳的饱和或不饱和脂肪酯、含有总共最多24个碳的饱和或不饱和二羧酸的二酯、磷脂酰衍生物、萜烯、酰胺、酮、脲及其衍生物和醚的材料的混合物。

[0242] 用于经皮递送系统的合适的粘合材料是本领域技术人员已知的并且包括聚丙烯酸酯、硅氧烷、聚氨酯、嵌段聚合物、苯乙烯丁二烯共聚物以及天然和合成橡胶。纤维素醚、衍生聚乙烯和硅酸盐也可用作基质组分。可以添加额外的添加剂，例如粘性树脂或油，以增加基质的粘度。

[0243] 在一些实施方案中，组合物可以包含例如局部制剂。在一些实施方案中，局部制剂是非经皮组合物，其配制为不渗透超过真皮层。非经皮制剂是本领域已知的，并且包括基质或胶束溶液、绷带、伤口敷料、气溶胶喷雾剂、泡沫、非经皮局部贴剂、酊剂、局部施用剂等。

[0244] 优选实施方案的药物组合物也可以是水包油乳剂的形式。油相可以是植物油，例如橄榄油或花生油，或矿物油，例如液体石蜡或这些的混合物。合适的乳化剂可以是天然存在的树胶，例如阿拉伯树胶或黄蓍胶，天然存在的磷脂，例如大豆、卵磷脂，以及衍生自脂肪酸和己糖醇酐的酯或偏酯，例如脱水山梨糖醇单油酸酯，以及所述偏酯与环氧乙烷的缩合产物，例如聚氧乙烯脱水山梨糖醇单油酸酯。乳剂还可以含有甜味剂和调味剂。糖浆和酏剂可以用甜味剂配制，例如甘油、丙二醇、山梨糖醇或蔗糖。这样的制剂还可以包含缓和剂、防腐剂以及调味剂和着色剂。

[0245] 化合物也可以以栓剂的形式施用，用于药物的直肠或阴道施用。这些组合物可以通过将药物与合适的无刺激性赋形剂混合来制备，该赋形剂在常温下为固体，但在直肠温度或阴道温度下为液体，因此会在直肠或阴道中熔化以释放药物。这种材料包括可可脂和聚乙二醇。

[0246] 对于本文公开的活性剂的所有使用方案，每日口服剂量方案将优选为约0.01至约200mg/Kg总体重。优选地，每日口服剂量方案将优选为约0.01、0.05、0.1、0.5、1、2、3、4或5至约10、50、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190或200mg/Kg总体重。注射施用的日剂量，包括静脉内、肌肉内、皮下和肠胃外注射，以及使用输注技术，优选为0.01-200mg/Kg总体重。优选地，通过注射施用的日剂量，包括静脉内、肌肉内、皮下和肠胃外注射，以及使用输注技术，将优选为约0.01、0.05、0.1、0.5、1、2、3、4或0.05至约10、50、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190或200mg/Kg总体重。每日阴道剂量方案将优选为0.01至

200mg/Kg总体重。每日局部剂量方案将优选为每天1至4次施用0.01至200mg。阴道剂量和局部剂量的浓度优选为维持每日剂量为0.1至200mg/Kg所需的浓度。优选地，每日口服剂量方案将优选为约0.01、0.05、0.1、0.5、1、2、3、4或5至约10、50、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190或200mg/Kg总体重。每日吸入剂量方案将优选为0.01至10mg/Kg总体重。优选地，每日吸入剂量方案将优选为约0.01、0.05、0.1、0.5至约1、2、3、4、5或10mg/Kg总体重。

[0247] 本领域技术人员将理解，具体施用方法将取决于多种因素，所有这些因素在施用治疗剂时都被常规考虑。然而，还应理解，任何给定患者的具体剂量水平将取决于多种因素，包括所用具体化合物的活性、患者年龄、患者体重、患者的一般健康状况、患者的性别、患者的饮食、施用时间、施用途径、排泄率、药物组合以及接受治疗的病症的严重程度。本领域技术人员将进一步理解，最佳治疗过程，即治疗模式和活性剂或其药学上可接受的盐在确定的天数内给予的每日剂量可以是由本领域技术人员使用常规处理试验确定。

[0248] 可以将活性化合物掺入适合施用于受试者例如人的药物组合物中。此类组合物通常包含核酸分子、蛋白质、调节剂或抗体和药学上可接受的载体。

[0249] 如本文所用，语言“药学上可接受的载体”旨在包括与药物施用相容的任何和所有溶剂、分散介质、涂层、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等。此类介质和药剂用于药物活性物质的用途在本领域中是众所周知的。除非任何常规介质或试剂与活性化合物不相容，否则此类介质可用于优选实施方案的组合物中。补充性活性化合物也可以掺入组合物中。优选实施方案的药物组合物被配制成与其预期的施用途径相容。施用途径的实例包括肠胃外，例如静脉内、皮内、皮下、口服(例如吸入)、经皮、非经皮(局部)、经粘膜和直肠施用。用于肠胃外、皮内或皮下应用的溶液或悬浮液可包括以下组分：无菌稀释剂，例如注射用水、盐水溶液、不挥发油、聚乙二醇、甘油、丙二醇或其他合成溶剂；抗菌剂，例如苯甲醇或对羟基苯甲酸甲酯；抗氧化剂，例如抗坏血酸或亚硫酸氢钠；螯合剂如乙二胺四乙酸，缓冲剂如乙酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐和调节张力的试剂如氯化钠或葡萄糖。pH值可以用酸或碱调节，例如盐酸或氢氧化钠。肠胃外制剂可以封装在安瓿、一次性注射器或玻璃或塑料制成的多剂量小瓶中。

[0250] 在一些实施方案中，活性化合物与将保护化合物免于从体内快速消除的载体一起制备，例如控释制剂，其包括植入物和微囊化递送系统。可以使用可生物降解的生物相容性聚合物，例如乙烯乙酸乙烯酯、聚酸酐、聚乙醇酸、胶原蛋白、聚原酸酯和聚乳酸。制备此类制剂的方法对本领域技术人员来说是显而易见的。这些材料也可以从Alza Corporation和Nova Pharmaceuticals,Inc.商购获得。脂质体悬浮液(包括脂质体)也可以用作药学上可接受的载体。这些可以根据本领域技术人员已知的方法制备。

[0251] 将口服或非肠道组合物配制成剂量单位形式是特别有利的，以便于施用和剂量的均匀性。如本文所用的“剂量单位形式”是指适合作为待治疗受试者的单位剂量的物理离散单位，每个单位含有预定量的活性化合物，其经计算可产生与所需药物载体结合的期望治疗效果。优选实施方案的剂量单位形式的规格决定于并且直接取决于活性化合物的独特特性和要实现的特定治疗效果以及在将这种活性化合物复合用于个体治疗的领域中固有的限制。

[0252] 如本文所用，术语“有效量”或“治疗有效量”是指药物组合物或方法的每种活性成

分的总量足以显示有意义的患者益处，例如慢性病的治愈或增加这种疾病的治愈率，或异常病况的减少。这包含治疗和预防性治疗。因此，这些化合物可用于疾病的非常早期阶段，或早期发病之前，或显著进展之后。当应用于单独施用的个体活性成分时，该术语是指所述个体活性成分。当应用于组合时，该术语是指导致治疗效果的活性成分的组合量，无论是以组合方式连续施用还是同时施用。

[0253] 在实施优选实施方案的治疗方法或使用时，将治疗有效量的优选实施方案的一种、两种或更多种活性剂施用于受试者。优选实施方案的活性剂可以根据优选实施方案的方法单独施用或与其他已知疗法组合施用。当与一种或多种其他疗法共同施用时，优选实施方案的活性剂可以与其他治疗同时施用或依次施用。如果顺序施用，主治医师将决定与其他疗法组合施用优选实施方案的活性剂的适当顺序。

[0254] 通常，活性剂的治疗有效量(即，有效剂量)范围为约0.001至5000mg/kg体重，更优选约0.01至1000mg/kg体重，更优选约0.01至500mg/kg体重，更优选约0.01至250mg/kg体重，更优选约0.01至100mg/kg体重，更优选约0.001至60mg/kg体重，更优选约0.01至25mg/kg体重，更优选约0.1至20mg/kg体重，甚至更优选约1至10mg/kg、2至9mg/kg、3至8mg/kg、4至7mg/kg或5-6mg/kg体重。

[0255] 技术人员将理解某些因素会影响有效治疗受试者所需的剂量，包括但不限于疾病或病症的严重程度、先前的治疗、受试者的一般健康和/或年龄，以及存在的其他疾病。此外，用治疗有效量对受试者的治疗可以包括单一治疗，或者优选地，可以包括一系列治疗。在一个优选的例子中，在约0.1至20mg/kg体重的范围内治疗受试者，每周一次，持续约1至10周，优选2至8周，更优选约3至7周，甚至更优选约4、5或6周。还应当理解，用于治疗的有效剂量可以在特定治疗过程中增加或减少。剂量的变化可以从本文所述的诊断测定的结果中产生并变得明显。

[0256] 优选的实施方案包括一种或多种调节Cdc42 GTP酶的表达或活性的额外试剂。例如，试剂可以是小分子。例如，此类小分子包括但不限于肽、肽模拟物、氨基酸、氨基酸类似物、多核苷酸、多核苷酸类似物、核苷酸、核苷酸类似物、分子量小于约10,000克/摩尔的有机或无机化合物(即，包括杂有机和有机金属化合物)、分子量小于约5,000克/摩尔的有机或无机化合物、分子量小于约1,000克/摩尔的有机或无机化合物、分子量小于约500克/摩尔的有机或无机化合物，以及此类化合物的盐、酯和其他药学上可接受的形式。

[0257] 在一个实施方案中，额外的试剂可以是异戊烯化抑制剂，例如美国专利6,649,638,5,420,245;5,574,025;5,523,430;5,602,098;5,631,401;5,705,686;5,238,922;5,470,832;和6,191,147公开的，所有这些都通过引用整体并入本文。

[0258] 在另一个实施方案中，额外的试剂包括法尼基蛋白转移酶(FPTase)、异戊二烯基-蛋白转移酶或香叶基香叶基-蛋白转移酶的一种或多种抑制剂，如美国专利6,572,850;6,458,783;6,423,751;6,387,926;6,242,433;6,191,147;6,166,067;6,156,746;6,083,979;6,011,029;5,929,077;5,928,924;5,843,941;5,786,193;5,629,302;5,618,964;5,574,025;5,567,841;5,523,430;5,510,510;5,470,832;5,447,922,6,596,735;6,586,461;6,586,447;6,579,887;6,576,639;6,545,020;6,539,309;6,535,820;6,528,523;6,511,800;6,500,841;6,495,564;6,492,381;6,458,935;6,451,812;6,441,017;6,440,989;6,440,974;6,432,959;6,426,352;6,410,541;6,403,581;6,399,615;6,387,948;6,

387,905;6,387,903;6,376,496;6,372,747;6,362,188;6,358,968;6,329,376;6,316,462;6,294,552;6,277,854;6,268,394;6,265,382;6,262,110;6,258,824;6,248,756;6,242,458;6,239,140;6,228,865;6,228,856;6,225,322;6,218,401;6,214,828;6,214,827;6,211,193;6,194,438中描述的,通过引用将其全部内容并入本文。

[0259] “法尼基蛋白转移酶抑制剂”或“FPT抑制剂”或“FTI”在本文中定义为:(i)有效抑制FPT(但通常不抑制香叶基香叶基蛋白转移酶I)和(ii)阻断ras的细胞内法尼基化的化合物。FPT催化将异戊二烯脂质部分添加到存在于Ras蛋白羧基末端附近的半胱氨酸残基上。这是翻译后加工途径的第一步,这对于Ras膜结合和Ras诱导的致癌转化都是必不可少的。已经报道了许多FPT抑制剂,包括各种肽模拟物抑制剂以及其他小分子抑制剂。

[0260] 法尼基转移酶抑制剂通常分为两类:法尼基二磷酸酯的类似物;和法尼基转移酶的蛋白质底物。法尼基转移酶抑制剂已在美国专利5,756,528、美国专利5,141,851、美国专利5,817,678、美国专利5,830,868、美国专利5,834,434和美国专利5,773,455中描述,通过引用将其全部并入本文。在显示可有效抑制法尼基部分转移至Ras相关蛋白的法尼基转移酶抑制剂中,有L-739,749(C-A-A-X序列的拟肽类似物)、L-744,832(C-A-A-X序列的拟肽类似物)、SCH 44342(1-(4-吡啶基乙酰基)-4-(8-氯-5,6-二氢-IIH苯并[5,6]环庚烷[1,2-b]吡啶-11-亚基)哌啶)、BZA-5B(一种苯二氮䓬类肽模拟物)、FTI-276(一种C-A-A-X肽模拟物)和B1086(一种C-A-A-X肽模拟物)。法尼基转移酶抑制剂(FTI)的施用通过本领域技术人员已知的标准方法完成,最优选通过施用含有FTI的片剂,并且预计大约在每天约0.1mg/kg体重至约20mg/kg体重的范围内。

[0261] 在另一个实施方案中,额外的药剂包括一种或多种香叶基香叶基-蛋白质转移酶(GGT)抑制剂,如美国专利5,470,832(Gibbs&Graham)中所述,通过引用将其全部并入本文。这些化合物可以0.5mg/kg体重至约20mg/kg体重的剂量施用于个体。或者,向患者施用一种或多种异戊二烯化抑制剂,包括法尼基转移酶(FT)抑制剂和/或香叶基香叶基转移酶抑制剂(GGT)。

[0262] 在另一个实施方案中,额外的试剂包含一种或多种毒素,例如来自艰难梭菌和索氏梭菌致死毒素(LT)的毒素A和B。此外,当Rho被肉毒杆菌毒素和葡萄球菌毒素EDIN之一的C3酶特异性ADP核糖基化时,可以抑制Rac 1和Rac2(Narumiya,S.和Morii,S.,Cell Signal,5,9-19,1993;Sekine,A.et al.,J.Biol.Chem.,264,8602-8605,1989,所有这些都通过引用整体并入本文)。

[0263] 应当理解,小分子试剂的适当剂量取决于普通医师、兽医或研究人员所能理解的许多因素。小分子的剂量将变化,例如,取决于被治疗的受试者或样品的身份、大小和状况,进一步取决于组合物的施用途径(如果适用的话)和从业者希望小分子对优选实施方案的核酸或多肽产生的影响。示例性剂量包括每千克受试者或样品重量的毫克或微克量的小分子(例如,约1微克/千克至约500毫克/千克,约100微克/千克至约5毫克/千克,或约1微克/千克至约50微克/千克。还应理解,小分子的适当剂量取决于小分子在待调节的表达或活性方面的效力。这种合适的剂量可以使用本文所述的测定来确定。当将一种或多种这些小分子施用于受试者(例如人)以调节优选实施方案的多肽或核酸的表达或活性时,例如,医师、兽医或研究人员可以首先开出相对较低的剂量,随后增加剂量,直到获得适当的反应。此外,应当理解,任何特定受试者的具体剂量水平将取决于多种因素,包括所使用的具体化合

物的活性、受试者的年龄、体重、一般健康状况、性别和饮食、施用时间、施用途径、排泄速率、任何药物组合以及要调节的表达或活性程度。

[0264] 活性化合物的合适剂量范围可根据这些考虑而变化，但一般而言，化合物的施用范围为约0.1μg/kg-5mg/kg体重；优选范围为约1μg/kg-300μg/kg体重；更优选约10μg/kg-100μg/kg体重。因此，对于典型的70kg人体受试者，剂量范围为约0.7μg-350mg；优选约700μg-21mg；最优选约700μg-7mg。与例如静脉内施用相比，当口服或经皮施用化合物时剂量可以更高。化合物可以作为单次推注剂量、随时间的剂量施用，如在静脉内或经皮施用中，或以多个剂量施用。

[0265] 待施用的活性化合物的量可以根据技术人员的判断而变化。给予接受者的活性化合物的量在本文所述的范围内。然而，这些量的施用将根据临床医生制定的标准而有所不同。

[0266] 用活性化合物使血液前体细胞、真皮上皮前体细胞或肠上皮前体细胞再生或体重控制的剂量方案基于多种因素，包括损伤类型、年龄、体重、性别、个体医疗状况、病症的严重程度、施用途径和所用的具体化合物。因此，剂量方案可以有很大差异，但可以由医生使用标准方法常规确定。每体重0.1ng/kg至10mg/kg体重的活性化合物的剂量水平可用于本文公开的所有使用方法。

[0267] 治疗方案也将根据所治疗的病况而有所不同，这取决于多种因素，包括损伤类型、年龄、体重、性别、个体医疗状况、病症的严重程度、施用途径和所用的具体化合物。

[0268] 在一个优选的实施方案中，皮下施用活性化合物。活性化合物的合适皮下剂量优选为约0.1ng/kg至约10mg/kg，每天两次施用，持续时间足以增加血液前体细胞、真皮上皮前体细胞或肠上皮前体细胞的再生。这种剂量方案最大限度地提高了治疗的治疗效果，同时最大限度地减少了所需药剂的量。这样的应用使成本和可能的有害副作用最小化。

[0269] 对于皮下施用，活性成分可以占制剂的0.0001％至10％w/w，例如按重量计1％至2％，尽管它可以占多达10％w/w，但优选不超过制剂的5％w/w，更优选0.1％至1％。在最优选的实施方案中，在施用癌症疗法(例如，化学治疗剂)之前一周至之后一周之间开始皮下施用约1至1000μg/kg/天的活性化合物。

[0270] 在所有这些实施方案中，可以在任何其他治疗暴露之前、同时或之后施用化合物。

[0271] 活性化合物可以以含有常规药学上可接受的载体、佐剂和载体的剂量单位制剂通过任何合适的途径施用，包括口服、肠胃外、通过吸入喷雾、直肠或局部。如本文所用的术语肠胃外包括皮下、静脉内、动脉内、肌肉内、胸骨内、腱内、脊柱内、颅内、胸内、输注技术或腹膜内。在一些实施方案中，活性化合物作为贮库施用，该贮库包含经配制用于体内连续递送药剂的生物相容性基质。在一些实施方案中，贮库被配制成随时间降解，从而以连续或接近连续的方式释放药剂。在一些实施方案中，贮库被配制用于在约1天至约1、2、3、4、5、6个月或更长时间的范围内释放药剂。在一些实施方案中，贮库可以是用于局部施用的可注射贮库。在一些实施方案中，可注射贮库被配制用于皮下、静脉内、动脉内、肌内、胸骨内、肌腱内、脊髓内、颅内、胸内、输注技术或腹膜内皮下、静脉内、动脉内、肌内、胸骨内、腱内、脊髓内、颅内、胸内、输注技术或腹腔注射。在一些实施方案中，可注射贮库被配制用于在肠道基质处或附近进行局部注射。

[0272] 活性化合物可以制成固体形式(包括颗粒、粉末或栓剂)或液体形式(例如溶液、悬

浮液或乳液)。这些化合物可以应用于多种溶液中。根据优选实施方案使用的合适溶液是无菌的,溶解足量的肽,并且对所提出的应用无害。在这方面,本文公开的化合物非常稳定,但会被强酸和强碱水解。这些化合物可溶于有机溶剂和pH 5-8的水溶液中。

[0273] 活性化合物可以进行常规制药操作,例如灭菌和/或可以包含常规佐剂,例如防腐剂、稳定剂、润湿剂、乳化剂、缓冲剂等。

[0274] 对于施用,活性化合物通常与一种或多种适用于指定施用途径的佐剂组合。该化合物可以与乳糖、蔗糖、淀粉粉、链烷酸的纤维素酯、硬脂酸、滑石粉、硬脂酸镁、氧化镁、磷酸和硫酸的钠盐和钙盐、阿拉伯胶、明胶、海藻酸钠、聚乙烯吡咯烷和/或聚乙烯醇混合,并压片或封装用于常规施用。或者,本文公开的化合物可以溶解在盐水、水、聚乙二醇、丙二醇、羧甲基纤维素胶体溶液、乙醇、玉米油、花生油、棉籽油、芝麻油、黄蓍胶和/或各种缓冲液中。其他佐剂和施用方式在药学领域是众所周知的。载体或稀释剂可以包括时间延迟材料,例如单硬脂酸甘油酯或二硬脂酸甘油酯单独或与蜡一起,或本领域公知的其他材料。

[0275] 在一些实施方案中,药物组合物包含Cdc42特异性抑制剂,其剂量配制为小于或等于足以将老年的前体细胞中与GTP结合的Cdc42水平降低至大约正常非老年前体细胞中与GTP结合的Cdc42水平的量。在一些实施方案中,药物组合物包含Cdc42特异性抑制剂,其剂量配制为小于足以将造血干细胞和祖细胞从骨髓动员到外周血中的量。

[0276] 额外的施用和方案

[0277] 上文提供了关于施用Cdc422特异性抑制剂的一些细节。本文提供了关于治疗的施用和方案的额外信息。

[0278] 在一些实施方案中,仅需要单次施用Cdc42特异性抑制剂来治疗受试者。如前所述,这可以是由受试者特定特征决定的因素,例如年龄、健康或Cdc42活性。然而,通常受试者可能需要不止一次施用Cdc42特异性抑制剂才能获得期望的治疗结果。因此,在一些实施方案中,对所述受试者施用Cdc42特异性抑制剂发生一次,而在其他实施方案中,施用Cdc42特异性抑制剂发生多于一次。Cdc42特异性抑制剂的施用可以根据治疗功效的需要经常发生,例如在一些实施方案中施用发生1次、2次、3次、4次、5次、6次、7次、8次、9次、10次、1-10次、1-9次、1-8次、1-7次、1-6次、1-5次、1-4次、1-3次、2-10次、2-9次、2-8次、2-7次、2-6次、2-5次、2-4次、2-3次、3-10次、3-9次、3-8次、3-7次、3-6次、3-5次、3-4次、4-10次、4-9次、4-8次、4-7次、4-6次、4-5次、5-10次、5-9次、5-8次、5-7次、5-6次、6-10次、6-9次、6-8次、6-7次、7-10次、7-9次、7-8次、8-10次、8-9次、9-10次,约任何上述施用次数(例如,约3次或约1-3次),或至少任何一种上述施用次数(例如,至少3次、至少约3次或至少约1-3次)。

[0279] 当给予受试者多于一次的Cdc42特异性抑制剂施用时,每次施用可以是相同的Cdc42特异性抑制剂,或者施用可以是不同的Cdc42特异性抑制剂。例如,可以从受试者获取样品并进行筛选以确定在给定施用时间的最佳Cdc42特异性抑制剂(例如,随着治疗的进展,受试者可能对不同的Cdc42特异性抑制剂反应更好)。Cdc42特异性抑制剂的剂量可以在治疗过程中调整,导致受试者在治疗受试者的过程中接受相同或不同剂量的相同或不同Cdc42特异性抑制剂。因此,在一些实施方案中,个性化医疗的原理被用于确定要施用于受试者的Cdc42特异性抑制剂。

[0280] 将Cdc42特异性抑制剂施用于需要治疗的受试者可以作为一种方案进行。在一些实施方案中,施用作为每天方案进行,进行1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、10天、11

天、12天、13天、14天，或由上述任何天界定的范围(例如，1-5天或3-7天)或大约任何上述天(例如，约2天、约1-5天或约3-7天)。在一些实施方案中，施用作为非连续天方案进行。在一些实施方案中，施用在非连续天发生1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、10天、11天、12天、13天、14天、1周、2周、3周、1个月、2个月、3个月、6个月、9个月、1年、5年、10年、受试者的剩余寿命，或由上述天、周或月的任何一项限定的范围，或大约任何上述天、周或月。

[0281] 如上所述，受试者可能需要多于一次施用或甚至多于一种施用方案。因此，在一些实施方案中，将每天方案或非连续天方案重复每天、每周、每月、每6个月、每9个月、每12个月、每2年、每5年、由任何上述时间段界定的范围(例如，每天到每周或每月到每12个月)或大约任何上述时间段(例如，大约每天到每周或大约每月到每12个月)。

[0282] 在一些实施方案中，受试者的Cdc42活性在Cdc42特异性抑制剂的第一次施用之前或任何后续施用之前测定(例如，在第一次施用之前但不是在第二次施用之前确定活性或在第一次施用之前并且在第二次施用之前确定活性或在第一次施用之前而不是在第二次施用之前但在第三次施用之前确定活性)。在一些实施方案中，在每次施用Cdc42特异性抑制剂之前确定受试者的Cdc42活性可能是有益的(例如，在第一次施用之前和第二次施用之前确定活性或在第一次施用之前和第二次施用之前以及第三次施用之前确定活性)。医生利用从确定受试者的Cdc42活性中收集的信息来准备患者特异性方案或提供患者特异性治疗可能是有益的。因此，在一些实施方案中，基于受试者中的Cdc42活性确定Cdc42特异性抑制剂的方案或施用，或重复施用。

[0283] 可以利用Cdc42活性的阈值来决定适当的方案或Cdc42特异性抑制剂的施用。在一些实施方案中，当受试者中的Cdc42活性为第一次施用Cdc42特异性抑制剂至所述受试者之前的Cdc42活性的下述百分比时重复Cdc42特异性抑制剂的方案或施用:1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、105%、110%、115%、120%、125%、130%、135%、140%、145%、150%、160%、170%、180%、190%或200%，约任何上述百分比，或由任何上述百分比界定的范围(例如，约1%-30%、约5%-25%、约5%-20%、约5%-15%或1%-30%、5%-25%、5%-20%、5%-15%)，1%-100%、1%-90%、1%-80%、1%-70%、1%-60%、1%-50%、1%-40%、1%-30%、1%-20%、1%-10%、10%-100%、10%-90%、10%-80%、10%-70%、10%-70%、10%-60%、10%-50%、10%-40%、10%-30%、10%-20%、20%-100%、20%-90%、20%-80%、20%-70%、20%-60%、20%-50%、20%-40%、20%-30%、30%-100%、30%-90%、30%-80%、30%-70%、30%-60%、30%-50%、30%-40%、40%-100%、40%-90%、40%-80%、40%-70%、40%-60%、40%-50%、50%-100%、50%-90%、50%-80%、50%-70%、50%-60%、60%-100%、60%-90%、60%-80%、60%-70%、70%-100%、70%-90%、70%-80%、80%-100%、80%-90%、90%-100%，约任何上述范围百分比(例如，约10%-70%、约30%-60%或约50%-70%)，或约25%、约30%、约40%、约50%、约55%、约60%、约70%、约80%、约90%、约100%、约105%、约110%、约115%、约120%或约125%。

[0284] 除了依赖受试者的Cdc42活性来确定Cdc42特异性抑制剂的方案或施用，或作为这种依赖的替代方案，方案或施用可以通过受试者中Cdc42-GTP与总Cdc42水平的比率来确

定。在一些实施方案中，受试者中Cdc42-GTP与总Cdc42水平的比率在施用前为1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9或3.0，在施用前为约1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9或3.0，在施用前大于1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9或3.0，或在施用前大于约1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9或3.0。在一些实施方案中，至少1％、2％、3％、4％、5％、6％、7％、8％、9％、10％、11％、12％、13％、14％、15％、16％、17％、18％、19％、20％、21％、22％、23％、24％、25％、26％、27％、28％、29％、30％、35％、40％、45％、50％、55％、60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％；至少约1％、2％、3％、4％、5％、6％、7％、8％、9％、10％、11％、12％、13％、14％、15％、16％、17％、18％、19％、20％、21％、22％、23％、24％、25％、26％、27％、28％、29％、30％、35％、40％、45％、50％、55％、60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％；至少10％-90％、10％-80％、10％-70％、10％-70％、10％-60％、10％-50％、10％-40％、10％-30％、10％-20％、20％-100％、20％-90％、20％-80％、20％-70％、20％-60％、20％-50％、20％-40％、20％-30％、30％-100％、30％-90％、30％-80％、30％-70％、30％-60％、30％-50％、30％-40％、40％-100％、40％-90％、40％-80％、40％-70％、40％-60％、40％-50％、50％-100％、50％-90％、50％-80％、50％-70％、50％-60％、60％-100％、60％-90％、60％-80％、60％-70％、70％-100％、70％-90％、70％-80％、80％-100％、80％-90％；或至少10％、20％、30％、40％、50％、60％、70％、80％、90％的受试者血液前体细胞在施用Cdc42特异性抑制剂之前包含Cdc42-GTP与总Cdc42水平的上述比率。在一些实施方案中，在施用Cdc42特异性抑制剂后，受试者血液前体细胞中Cdc42-GTP与总Cdc42水平的比率降低。在一些实施方案中，所述血液前体细胞中Cdc42-GTP与总Cdc42水平的比率在所述施用之后小于1.0、1.1、1.2、1.3、1.4或1.5，或者在施用Cdc42特异性抑制剂后小于约1.0、1.1、1.2、1.3、1.4或1.5。在一些实施方案中，血液前体细胞中Cdc42-GTP与总Cdc42水平的比率在施用Cdc42特异性抑制剂后为至少0.8、0.9、1.0、1.1、1.2或更大，或至少约0.8、0.9、1.0、1.1、1.2或更大。

[0285] 一些受试者可能受益于在受试者的余生中重复施用Cdc42特异性抑制剂，以维持上述CDC42活性的水平和比率。其他受试者可能受益于在医疗计划过程中重复施用Cdc42特异性抑制剂，以维持上述CDC42活性的水平和比率。然而，一些受试者可能不需要持续暴露于Cdc42特异性抑制剂以维持上述CDC42活性的水平和比率。因此，在一些实施方案中，在受试者的余生中施用给受试者Cdc42特异性抑制剂以维持上述CDC42活性的水平和比率。在其他实施方案中，在医疗计划过程中向受试者施用Cdc42特异性抑制剂以维持上述CDC42活性水平和比率。在其他实施方案中，受试者在医疗过程结束时停止暴露于Cdc42特异性抑制剂。在一些实施方案中，受试者停止暴露于Cdc42特异性抑制剂并且在停止暴露后维持所述受试者中Cdc42特异性抑制剂介导的变化。

[0286] 在一些实施方案中，基于受试者的一种或多种循环细胞因子水平选择受试者用Cdc42特异性抑制剂治疗。在一些实施方案中，受试者的一个或多个循环细胞因子水平在Cdc42特异性抑制剂的第一次施用之前或任何后续施用之前测定(例如，在第一次施用之前但不是在第二次施用之前确定活性或在第一次施用之前并且在第二次施用之前确定活性或在第一次施用之前而不是在第二次施用之前但在第三次施用之前确定活性)。在一些实

施方案中，确定的循环细胞因子水平是干扰素γ、白细胞介素1α、白细胞介素1β或白细胞介素9，以及它们的任何组合。在一些实施方案中，受试者的一种或多种循环细胞因子水平用于选择受试者以使用Cdc42特异性抑制剂进行治疗。在一些实施方案中，在每次施用Cdc42特异性抑制剂之前确定受试者的一种或多种循环细胞因子水平可能是有益的(例如，在第一次施用之前和第二次施用之前确定循环细胞因子水平或在第一次施用之前和第二次施用之前以及第三次施用之前确定循环细胞因子水平)。医生利用从确定受试者的一种或多种循环细胞因子水平中收集的信息来准备患者特异性方案或提供患者特异性治疗可能是有益的。因此，在一些实施方案中，基于受试者中的一种或多种循环细胞因子水平活性确定Cdc42特异性抑制剂的方案或施用，或重复施用。

[0287] 在一些实施方案中，受试者的一个或多个循环炎性细胞因子水平在Cdc42特异性抑制剂的第一次施用之前或任何后续施用之前测定(例如，在第一次施用之前但不是在第二次施用之前确定活性或在第一次施用之前并且在第二次施用之前确定活性或在第一次施用之前而不是在第二次施用之前但在第三次施用之前确定活性)。在一些实施方案中，确定的循环炎性细胞因子水平是干扰素γ、白细胞介素1α、或白细胞介素1β，以及它们的任何组合。在一些实施方案中，受试者的一种或多种循环炎性细胞因子水平用于选择受试者以使用Cdc42特异性抑制剂进行治疗。在一些实施方案中，在每次施用Cdc42特异性抑制剂之前确定受试者的一种或多种循环炎性细胞因子水平可能是有益的(例如，在第一次施用之前和第二次施用之前确定炎性循环细胞因子水平或在第一次施用之前和第二次施用之前以及第三次施用之前确定循环细胞因子水平)。医生利用从确定受试者的一种或多种循环炎性细胞因子水平中收集的信息来准备患者特异性方案或提供患者特异性治疗可能是有益的。因此，在一些实施方案中，基于受试者中的一种或多种炎性循环细胞因子水平活性确定Cdc42特异性抑制剂的方案或施用，或重复施用。

[0288] 可以利用循环细胞因子水平或循环炎性细胞因子水平的阈值来识别受试者以进行治疗或决定合适的Cdc42特异性抑制剂的方案或施用。在一些实施方案中，当受试者中的一种或多种确定的循环细胞因子水平或循环炎性细胞因子水平为对照群体中循环细胞因子水平或循环炎性细胞因子水平的下述百分比时选择所述受试者以用Cdc42特异性抑制剂治疗：1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、105%、110%、115%、120%、125%、130%、135%、140%、145%、150%、160%、170%、180%、190%、200%、225%、250%、300%、350%，或约任何上述百分比，或由任何上述百分比界定的范围(例如，约1%-30%、约5%-25%、约5%-20%、约5%-15%或1%-30%、5%-25%、5%-20%、5%-15%)，1%-100%、1%-90%、1%-80%、1%-70%、1%-60%、1%-50%、1%-40%、1%-30%、1%-20%、1%-10%、10%-100%、10%-90%、10%-80%、10%-70%、10%-70%、10%-60%、10%-50%、10%-40%、10%-30%、10%-20%、20%-100%、20%-90%、20%-80%、20%-70%、20%-60%、20%-50%、20%-40%、20%-30%、30%-100%、30%-90%、30%-80%、30%-70%、30%-60%、30%-50%、30%-40%、40%-100%、40%-90%、40%-80%、40%-70%、40%-60%、40%-50%、50%-100%、50%-90%、50%-80%、50%-70%、50%-60%、60%-100%、60%-90%、60%-80%、60%-70%、70%-100%、70%-

90%、70%-80%、80%-100%、80%-90%、90%-100%，约任何上述范围百分比(例如，约10%-70%、约30%-60%或约50%-70%)，或约25%、约30%、约40%、约50%、约55%、约60%、约70%、约80%、约90%、约100%、约105%、约110%、约115%、约120%或约125%。在一些实施方案中，对照群体基于年龄。在一些实施方案中，对照群体的年龄为18、19、20、21、22、23、24、25、30、35、40、45、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80岁，或上述任何年龄界定的范围(例如，年龄等于18-20、25-35、50-80、50-70、50-60、55-75、55-75、55-70、55-65、60-70、52-71、60-79或73-78岁，或年龄大于18-20、25-35、50-80、50-70、50-60、55-75、55-75、55-70、55-65、60-70、52-71、60-79或73-78岁)。在一些实施方案中，确定的循环细胞因子水平是干扰素γ、白细胞介素1α、白细胞介素1β或白细胞介素9，以及它们的任何组合。

[0289] 在一些实施方案中，当受试者中的一种或多种确定的循环细胞因子水平或循环炎性细胞因子水平为对照群体中循环细胞因子水平或循环炎性细胞因子水平的下述百分比时重复Cdc42特异性抑制剂的方案或施用：1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、105%、110%、115%、120%、125%、130%、135%、140%、145%、150%、160%、170%、180%、190%、200%、225%、250%、300%、350%，或约任何上述百分比，或由任何上述百分比界定的范围(例如，约1%-30%、约5%-25%、约5%-20%、约5%-15%或1%-30%、5%-25%、5%-20%、5%-15%)，1%-100%、1%-90%、1%-80%、1%-70%、1%-60%、1%-50%、1%-40%、1%-30%、1%-20%、1%-10%、10%-100%、10%-90%、10%-80%、10%-70%、10%-70%、10%-60%、10%-50%、10%-40%、10%-30%、10%-20%、20%-100%、20%-90%、20%-80%、20%-70%、20%-60%、20%-50%、20%-40%、20%-30%、30%-100%、30%-90%、30%-80%、30%-70%、30%-60%、30%-50%、30%-40%、40%-100%、40%-90%、40%-80%、40%-70%、40%-60%、40%-50%、50%-100%、50%-90%、50%-80%、50%-70%、50%-60%、60%-100%、60%-90%、60%-80%、60%-70%、70%-100%、70%-90%、70%-80%、80%-100%、80%-90%、90%-100%，约任何上述范围百分比(例如，约10%-70%、约30%-60%或约50%-70%)，或约25%、约30%、约40%、约50%、约55%、约60%、约70%、约80%、约90%、约100%、约105%、约110%、约115%、约120%或约125%。在一些实施方案中，对照群体基于年龄。在一些实施方案中，对照群体的年龄为18、19、20、21、22、23、24、25、30、35、40、45、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80岁，或上述任何年龄界定的范围(例如，年龄等于18-20、25-35、50-80、50-70、50-60、55-75、55-75、55-70、55-65、60-70、52-71、60-79或73-78岁，或年龄大于18-20、25-35、50-80、50-70、50-60、55-75、55-75、55-70、55-65、60-70、52-71、60-79或73-78岁)。

[0290] 在一些实施方案中，当受试者中的一种或多种确定的循环细胞因子水平或循环炎性细胞因子水平为第一次施用Cdc42特异性抑制剂至所述受试者之前受试者中循环细胞因子水平或循环炎性细胞因子水平的下述百分比时重复Cdc42特异性抑制剂的方案或施用：1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、35%、40%、

45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、105%、110%、115%、120%、125%、130%、135%、140%、145%、150%、160%、170%、180%、190%、200%、225%、250%、300%、350%，或约任何上述百分比，或由任何上述百分比界定的范围(例如，约1%-30%、约5%-25%、约5%-20%、约5%-15%或1%-30%、5%-25%、5%-20%、5%-15%)，1%-100%、1%-90%、1%-80%、1%-70%、1%-60%、1%-50%、1%-40%、1%-30%、1%-20%、1%-10%、10%-100%、10%-90%、10%-80%、10%-70%、10%-70%、10%-60%、10%-50%、10%-40%、10%-30%、10%-20%、20%-100%、20%-90%、20%-80%、20%-70%、20%-60%、20%-50%、20%-40%、20%-30%、30%-100%、30%-90%、30%-80%、30%-70%、30%-60%、30%-50%、30%-40%、40%-100%、40%-90%、40%-80%、40%-70%、40%-60%、40%-50%、50%-100%、50%-90%、50%-80%、50%-70%、50%-60%、60%-100%、60%-90%、60%-80%、60%-70%、70%-100%、70%-90%、70%-80%、80%-100%、80%-90%、90%-100%，约任何上述范围百分比(例如，约10%-70%、约30%-60%或约50%-70%)，或约25%、约30%、约40%、约50%、约55%、约60%、约70%、约80%、约90%、约100%、约105%、约110%、约115%、约120%或约125%。在一些实施方案中，确定的循环细胞因子水平是干扰素γ、白细胞介素1α、白细胞介素1β或白细胞介素9，以及它们的任何组合。

[0291] 在一些实施方案中，有效量的Cdc42特异性抑制剂减少或降低受试者中一种或多种循环细胞因子水平。在一些实施方案中，相对于第一次施用Cdc42特异性抑制剂至所述受试者之前受试者中循环细胞因子水平或循环炎性细胞因子水平，一种或多种循环细胞因子水平或一种或多种循环炎性细胞因子水平的减少或降低可以是1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、105%、110%、115%、120%、125%、130%、135%、140%、145%、150%、160%、170%、180%、190%、200%、225%、250%、300%、350%，或约任何上述百分比，或由任何上述百分比界定的范围(例如，约1%-30%、约5%-25%、约5%-20%、约5%-15%或1%-30%、5%-25%、5%-20%、5%-15%)，1%-100%、1%-90%、1%-80%、1%-70%、1%-60%、1%-50%、1%-40%、1%-30%、1%-20%、1%-10%、10%-100%、10%-90%、10%-80%、10%-70%、10%-70%、10%-60%、10%-50%、10%-40%、10%-30%、10%-20%、20%-100%、20%-90%、20%-80%、20%-70%、20%-60%、20%-50%、20%-40%、20%-30%、30%-100%、30%-90%、30%-80%、30%-70%、30%-60%、30%-50%、30%-40%、40%-100%、40%-90%、40%-80%、40%-70%、40%-60%、40%-50%、50%-100%、50%-90%、50%-80%、50%-70%、50%-60%、60%-100%、60%-90%、60%-80%、60%-70%、70%-100%、70%-90%、70%-80%、80%-100%、80%-90%、90%-100%，约任何上述范围百分比(例如，约10%-70%、约30%-60%或约50%-70%)。在一些实施方案中，确定的循环细胞因子水平是干扰素γ、白细胞介素1α、或白细胞介素1β，以及它们的任何组合。

[0292] 在一些实施方案中，有效量的Cdc42特异性抑制剂减少或降低受试者中一种或多种循环炎性细胞因子水平。在一些实施方案中，在施用有效量的Cdc42特异性抑制剂之后，相对于对照群体中循环细胞因子水平或循环炎性细胞因子水平，一种或多种循环细胞因子

水平或一种或多种循环炎性细胞因子水平的减少或降低可以是1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、105%、110%、115%、120%、125%、130%、135%、140%、145%、150%、160%、170%、180%、190%、200%、225%、250%、300%、350%，或约任何上述百分比，或由任何上述百分比界定的范围(例如，约1%-30%、约5%-25%、约5%-20%、约5%-15%或1%-30%、5%-25%、5%-20%、5%-15%)，1%-100%、1%-90%、1%-80%、1%-70%、1%-60%、1%-50%、1%-40%、1%-30%、1%-20%、1%-10%、10%-100%、10%-90%、10%-80%、10%-70%、10%-70%、10%-60%、10%-50%、10%-40%、10%-30%、10%-20%、20%-100%、20%-90%、20%-80%、20%-70%、20%-60%、20%-50%、20%-40%、20%-30%、30%-100%、30%-90%、30%-80%、30%-70%、30%-60%、30%-50%、30%-40%、40%-100%、40%-90%、40%-80%、40%-70%、40%-60%、40%-50%、50%-100%、50%-90%、50%-80%、50%-70%、50%-60%、60%-100%、60%-90%、60%-80%、60%-70%、70%-100%、70%-90%、70%-80%、80%-100%、80%-90%、90%-100%，约任何上述范围百分比(例如，约10%-70%、约30%-60%或约50%-70%)。在一些实施方案中，对照群体基于年龄。在一些实施方案中，对照群体的年龄为18、19、20、21、22、23、24、25、30、35、40、45、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80岁，或上述任何年龄界定的范围(例如，年龄等于18-20、25-35、50-80、50-70、50-60、55-75、55-75、55-70、55-65、60-70、52-71、60-79或73-78岁，或年龄大于18-20、25-35、50-80、50-70、50-60、55-75、55-75、55-70、55-65、60-70、52-71、60-79或73-78岁)。在一些实施方案中，确定的循环细胞因子水平是干扰素γ、白细胞介素1α、或白细胞介素1β，以及它们的任何组合。

[0293] 在一些实施方案中，有效量的Cdc42特异性抑制剂增加或提高受试者中一种或多种循环细胞因子水平。在一些实施方案中，在施用有效量的Cdc42特异性抑制剂之后，相对于第一次施用Cdc42特异性抑制剂至所述受试者之前受试者中循环细胞因子水平或循环炎性细胞因子水平，一种或多种循环细胞因子水平的增加或提高是1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、105%、110%、115%、120%、125%、130%、135%、140%、145%、150%、160%、170%、180%、190%、200%、225%、250%、300%、350%，或约任何上述百分比，或由任何上述百分比界定的范围(例如，约1%-30%、约5%-25%、约5%-20%、约5%-15%或1%-30%、5%-25%、5%-20%、5%-15%)，1%-100%、1%-90%、1%-80%、1%-70%、1%-60%、1%-50%、1%-40%、1%-30%、1%-20%、1%-10%、10%-100%、10%-90%、10%-80%、10%-70%、10%-70%、10%-60%、10%-50%、10%-40%、10%-30%、10%-20%、20%-100%、20%-90%、20%-80%、20%-70%、20%-60%、20%-50%、20%-40%、20%-30%、30%-100%、30%-90%、30%-80%、30%-70%、30%-60%、30%-50%、30%-40%、40%-100%、40%-90%、40%-80%、40%-70%、40%-60%、40%-50%、50%-100%、50%-90%、50%-80%、50%-70%、50%-60%、60%-100%、60%-90%、60%-80%、60%-70%、70%-100%、70%-90%、70%-80%、80%-100%、80%-

90%、90%-100%，约任何上述范围百分比(例如，约10%-70%、约30%-60%或约50%-70%)。在一些实施方案中，增加或提高的循环细胞因子水平是白细胞介素9。

[0294] 在一些实施方案中，在施用有效量的Cdc42特异性抑制剂之后，相对于对照群体中循环细胞因子水平或循环炎性细胞因子水平，一种或多种循环细胞因子水平的增加或提高是1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、105%、110%、115%、120%、125%、130%、135%、140%、145%、150%、160%、170%、180%、190%、200%、225%、250%、300%、350%，或约任何上述百分比，或由任何上述百分比界定的范围(例如，约1%-30%、约5%-25%、约5%-20%、约5%-15%或1%-30%、5%-25%、5%-20%、5%-15%)，1%-100%、1%-90%、1%-80%、1%-70%、1%-60%、1%-50%、1%-40%、1%-30%、1%-20%、1%-10%、10%-100%、10%-90%、10%-80%、10%-70%、10%-70%、10%-60%、10%-50%、10%-40%、10%-30%、10%-20%、20%-100%、20%-90%、20%-80%、20%-70%、20%-60%、20%-50%、20%-40%、20%-30%、30%-100%、30%-90%、30%-80%、30%-70%、30%-60%、30%-50%、30%-40%、40%-100%、40%-90%、40%-80%、40%-70%、40%-60%、40%-50%、50%-100%、50%-90%、50%-80%、50%-70%、50%-60%、60%-100%、60%-90%、60%-80%、60%-70%、70%-100%、70%-90%、70%-80%、80%-100%、80%-90%、90%-100%，约任何上述范围百分比(例如，约10%-70%、约30%-60%或约50%-70%)。在一些实施方案中，对照群体基于年龄。在一些实施方案中，对照群体的年龄为18、19、20、21、22、23、24、25、30、35、40、45、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80岁，或上述任何年龄界定的范围(例如，年龄等于18-20、25-35、50-80、50-70、50-60、55-75、55-75、55-70、55-65、60-70、52-71、60-79或73-78岁，或年龄大于18-20、25-35、50-80、50-70、50-60、55-75、55-75、55-70、55-65、60-70、52-71、60-79或73-78岁)。在一些实施方案中，增加或提高的循环细胞因子水平是白细胞介素9。

[0295] 除了依赖循环细胞因子水平的一种或多种组合来选择受试者或确定Cdc42特异性抑制剂的方案或施用外，在一些实施方案中，受试者、方案或施用还由受试者中两种或多种循环细胞因子水平的比率确定。在一些实施方案中，循环细胞因子是干扰素γ、白细胞介素1α、白细胞介素1β和/或白细胞介素9中的一种或多种。在一些实施方案中，该比率是干扰素γ、白细胞介素1α或白细胞介素1β比白细胞介素9中的一种或多种。在一些实施方案中，受试者中循环细胞因子水平的比率在施用前为1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9或3.0，在施用前为约1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9或3.0，在施用前大于1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9或3.0，或在施用前大于约1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9或3.0。在一些实施方案中，至少1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%；至少约1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、

10％、11％、12％、13％、14％、15％、16％、17％、18％、19％、20％、21％、22％、23％、24％、25％、26％、27％、28％、29％、30％、35％、40％、45％、50％、55％、60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％；至少10％-90％、10％-80％、10％-70％、10％-70％、10％-60％、10％-50％、10％-40％、10％-30％、10％-20％、20％-100％、20％-90％、20％-80％、20％-70％、20％-60％、20％-50％、20％-40％、20％-30％、30％-100％、30％-90％、30％-80％、30％-70％、30％-60％、30％-50％、30％-40％、40％-100％、40％-90％、40％-80％、40％-70％、40％-60％、40％-50％、50％-100％、50％-90％、50％-80％、50％-70％、50％-60％、60％-100％、60％-90％、60％-80％、60％-70％、70％-100％、70％-90％、70％-80％、80％-100％、80％-90％；或至少10％、20％、30％、40％、50％、60％、70％、80％、90％的受试者血液前体细胞在施用Cdc42特异性抑制剂之前包含循环细胞因子水平的上述比率。在一些实施方案中，在施用Cdc42特异性抑制剂后，受试者血液前体细胞中循环细胞因子水平的比率降低。在一些实施方案中，所述血液前体细胞中循环细胞因子水平的比率在所述施用之后小于1.0、1.1、1.2、1.3、1.4或1.5，或者在施用Cdc42特异性抑制剂后小于约1.0、1.1、1.2、1.3、1.4或1.5。在一些实施方案中，血液前体细胞中循环细胞因子水平的比率在施用Cdc42特异性抑制剂后为至少0.8、0.9、1.0、1.1、1.2或更大，或至少约0.8、0.9、1.0、1.1、1.2或更大。

[0296] 在一些实施方案中，基于一个或多个CpG位点的甲基化状态，选择受试者以用Cdc42特异性抑制剂治疗。CpG位点或CG位点是DNA的区域，其中在碱基的线性序列中沿其5’→3’方向，胞嘧啶核苷酸后面是鸟嘌呤核苷酸。CpG二核苷酸中的胞嘧啶可以被DNA甲基转移酶甲基化，形成5-甲基胞嘧啶。将基因内的胞嘧啶甲基化可以改变其表达，并且与表观遗传学和基因调控有关。在一些实施方案中，CpG位点内胞嘧啶的甲基化用于选择用Cdc42特异性抑制剂治疗的受试者。年龄对CpG位点内胞嘧啶的DNA甲基化水平也有强的影响，因此可以为受试者定义一个高度准确的生物钟(称为表观遗传时钟或DNA甲基化年龄)。在一些实施方案中，“表观遗传时钟”用于选择受试者以使用Cdc42特异性抑制剂进行治疗。

[0297] 在一些实施方案中，CpG位点在Prima1、Hsf4和Kcns1基因中的一个或多个内，包括它们的组合。在一些实施方案中，在第一次施用之前或任何后续施用Cdc42特异性抑制剂之前，确定Prima1、Hsf4和Kcns1(包括其组合)内的一个或多个CpG位点的甲基化状态(例如，在第一次施用之前但不是在第二次施用之前确定水平或在第一次施用之前并且在第二次施用之前确定水平或在第一次施用之前而不是在第二次施用之前但在第三次施用之前确定水平)。在一些实施方案中，Prima1、Hsf4和Kcns1(包括它们的组合)基因内的一个或多个CpG位点的甲基化状态用于选择用Cdc42特异性抑制剂治疗的受试者。在一些实施方案中，在每次施用Cdc42特异性抑制剂之前确定Prima1、Hsf4和Kcns1基因(包括其组合)中一个或多个CpG位点的甲基化状态可能是有益的(例如，在第一次施用之前和第二次施用之前确定胞嘧啶甲基化水平或在第一次施用之前和第二次施用之前以及第三次施用之前确定胞嘧啶甲基化水平)。医生利用从确定Prima1、Hsf4和Kcns1基因(包括其组合)中一个或多个CpG位点的甲基化状态收集的信息来准备患者特异性方案或提供患者特异性治疗可能是有益的。因此，在一些实施方案中，基于受试者的Prima1、Hsf4和Kcns1基因(包括其组合)中一个或多个CpG位点的甲基化状态，确定Cdc42特异性抑制剂的方案或施用，或重复施用。

[0298] 可以利用一个或多个CpG位点的甲基化状态的阈值来识别要治疗的受试者或决定

Cdc42特异性抑制剂的合适方案或施用。在一些实施方案中，利用受试者的Prima1、Hsf4和Kcns1基因(包括其组合)中一个或多个CpG位点的甲基化状态来鉴定受试者以进行治疗或决定Cdc42特异性抑制剂的适当的方案或施用。在一些实施方案中，当受试者中一个或多个CpG位点的甲基化状态相对于对照群体为一个或多个CpG位点的甲基化状态的下述百分比时选择受试者以使用Cdc42特异性抑制剂治疗：1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、105%、110%、115%、120%、125%、130%、135%、140%、145%、150%、160%、170%、180%、190%、200%、225%、250%、300%、350%，或约任何上述百分比，或由任何上述百分比界定的范围(例如，约1%-30%、约5%-25%、约5%-20%、约5%-15%或1%-30%、5%-25%、5%-20%、5%-15%)，1%-100%、1%-90%、1%-80%、1%-70%、1%-60%、1%-50%、1%-40%、1%-30%、1%-20%、1%-10%、10%-100%、10%-90%、10%-80%、10%-70%、10%-70%、10%-60%、10%-50%、10%-40%、10%-30%、10%-20%、20%-100%、20%-90%、20%-80%、20%-70%、20%-60%、20%-50%、20%-40%、20%-30%、30%-100%、30%-90%、30%-80%、30%-70%、30%-60%、30%-50%、30%-40%、40%-100%、40%-90%、40%-80%、40%-70%、40%-60%、40%-50%、50%-100%、50%-90%、50%-80%、50%-70%、50%-60%、60%-100%、60%-90%、60%-80%、60%-70%、70%-100%、70%-90%、70%-80%、80%-100%、80%-90%、90%-100%，约任何上述范围百分比(例如，约10%-70%、约30%-60%或约50%-70%)，或约25%、约30%、约40%、约50%、约55%、约60%、约70%、约80%、约90%、约100%、约105%、约110%、约115%、约120%或约125%。在一些实施方案中，一个或多个CpG位点在Prima1、Hsf4和Kcns1基因内，包括它们的组合。在一些实施方案中，所提及的甲基化状态是胞嘧啶的甲基化。在一些实施方案中，对照群体基于年龄。在一些实施方案中，对照群体的年龄为18、19、20、21、22、23、24、25、30、35、40、45、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80岁，或上述任何年龄界定的范围(例如，年龄等于18-20、25-35、50-80、50-70、50-60、55-75、55-75、55-70、55-65、60-70、52-71、60-79或73-78岁，或年龄大于18-20、25-35、50-80、50-70、50-60、55-75、55-75、55-70、55-65、60-70、52-71、60-79或73-78岁)。

[0299] 在一些实施方案中，当受试者中一个或多个CpG位点的甲基化状态相对于对照群体为一个或多个CpG位点的甲基化状态的下述百分比时重复Cdc42特异性抑制剂的方案或施用：1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、105%、110%、115%、120%、125%、130%、135%、140%、145%、150%、160%、170%、180%、190%、200%、225%、250%、300%、350%，约任何上述百分比，或由任何上述百分比界定的范围(例如，约1%-30%、约5%-25%、约5%-20%、约5%-15%或1%-30%、5%-25%、5%-20%、5%-15%)，1%-100%、1%-90%、1%-80%、1%-70%、1%-60%、1%-50%、1%-40%、1%-30%、1%-20%、1%-10%、10%-100%、10%-90%、10%-80%、10%-70%、10%-70%、10%-60%、10%-50%、10%-40%、10%-30%、10%-20%、20%-100%、20%-

90%、20%-80%、20%-70%、20%-60%、20%-50%、20%-40%、20%-30%、30%-100%、30%-90%、30%-80%、30%-70%、30%-60%、30%-50%、30%-40%、40%-100%、40%-90%、40%-80%、40%-70%、40%-60%、40%-50%、50%-100%、50%-90%、50%-80%、50%-70%、50%-60%、60%-100%、60%-90%、60%-80%、60%-70%、70%-100%、70%-90%、70%-80%、80%-100%、80%-90%、90%-100%，约任何上述范围百分比(例如，约10%-70%、约30%-60%或约50%-70%)，或约25%、约30%、约40%、约50%、约55%、约60%、约70%、约80%、约90%、约100%、约105%、约110%、约115%、约120%或约125%。在一些实施方案中，一个或多个CpG位点在Prima1、Hsf4和Kcns1基因内，包括它们的组合。在一些实施方案中，所提及的甲基化状态是胞嘧啶的甲基化。在一些实施方案中，对照群体基于年龄。在一些实施方案中，对照群体的年龄为18、19、20、21、22、23、24、25、30、35、40、45、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80岁，或上述任何年龄界定的范围(例如，年龄等于18-20、25-35、50-80、50-70、50-60、55-75、55-75、55-70、55-65、60-70、52-71、60-79或73-78岁，或年龄大于18-20、25-35、50-80、50-70、50-60、55-75、55-75、55-70、55-65、60-70、52-71、60-79或73-78岁)。

[0300] 在一些实施方案中，当受试者中一个或多个CpG位点的甲基化状态为第一次施用Cdc42特异性抑制剂至所述受试者之前受试者中一个或多个CpG位点的甲基化状态的下述百分比时重复Cdc42特异性抑制剂的方案或施用：1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、105%、110%、115%、120%、125%、130%、135%、140%、145%、150%、160%、170%、180%、190%、200%、225%、250%、300%、350%，约任何上述百分比，或由任何上述百分比界定的范围(例如，约1%-30%、约5%-25%、约5%-20%、约5%-15%或1%-30%、5%-25%、5%-20%、5%-15%)，1%-100%、1%-90%、1%-80%、1%-70%、1%-60%、1%-50%、1%-40%、1%-30%、1%-20%、1%-10%、10%-100%、10%-90%、10%-80%、10%-70%、10%-70%、10%-60%、10%-50%、10%-40%、10%-30%、10%-20%、20%-100%、20%-90%、20%-80%、20%-70%、20%-60%、20%-50%、20%-40%、20%-30%、30%-100%、30%-90%、30%-80%、30%-70%、30%-60%、30%-50%、30%-40%、40%-100%、40%-90%、40%-80%、40%-70%、40%-60%、40%-50%、50%-100%、50%-90%、50%-80%、50%-70%、50%-60%、60%-100%、60%-90%、60%-80%、60%-70%、70%-100%、70%-90%、70%-80%、80%-100%、80%-90%、90%-100%，约任何上述范围百分比(例如，约10%-70%、约30%-60%或约50%-70%)，或约25%、约30%、约40%、约50%、约55%、约60%、约70%、约80%、约90%、约100%、约105%、约110%、约115%、约120%或约125%。在一些实施方案中，一个或多个CpG位点在Prima1、Hsf4和Kcns1基因内，包括它们的组合。在一些实施方案中，所提及的甲基化状态是胞嘧啶的甲基化。

[0301] 在一些实施方案中，有效量的Cdc42特异性抑制剂减少或降低受试者中一个或多个CpG位点的甲基化状态。在一些实施方案中，相对于第一次施用Cdc42特异性抑制剂至所述受试者之前或者最后施用Cdc42特异性抑制剂至所述受试者之前受试者中一个或多个

CpG位点的甲基化状态，有效量的Cdc42特异性抑制剂的方案或施用将受试者中一个或多个CpG位点的甲基化状态减少或降低1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、105%、110%、115%、120%、125%、130%、135%、140%、145%、150%、160%、170%、180%、190%、200%、225%、250%、300%、350%，或约任何上述百分比，或由任何上述百分比界定的范围(例如，约1%-30%、约5%-25%、约5%-20%、约5%-15%或1%-30%、5%-25%、5%-20%、5%-15%)，1%-100%、1%-90%、1%-80%、1%-70%、1%-60%、1%-50%、1%-40%、1%-30%、1%-20%、1%-10%、10%-100%、10%-90%、10%-80%、10%-70%、10%-70%、10%-60%、10%-50%、10%-40%、10%-30%、10%-20%、20%-100%、20%-90%、20%-80%、20%-70%、20%-60%、20%-50%、20%-40%、20%-30%、30%-100%、30%-90%、30%-80%、30%-70%、30%-60%、30%-50%、30%-40%、40%-100%、40%-90%、40%-80%、40%-70%、40%-60%、40%-50%、50%-100%、50%-90%、50%-80%、50%-70%、50%-60%、60%-100%、60%-90%、60%-80%、60%-70%、70%-100%、70%-90%、70%-80%、80%-100%、80%-90%、90%-100%，约任何上述范围百分比(例如，约10%-70%、约30%-60%或约50%-70%)。在一些实施方案中，一个或多个CpG位点在Prima1、Hsf4和Kcns1基因内，包括它们的组合。在一些实施方案中，所提及的甲基化状态是胞嘧啶的甲基化。

[0302] 在一些实施方案中，相对于对照群体中一个或多个CpG位点的甲基化状态，有效量的Cdc42特异性抑制剂的方案或施用将受试者中一个或多个CpG位点的甲基化状态减少或降低1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、105%、110%、115%、120%、125%、130%、135%、140%、145%、150%、160%、170%、180%、190%、200%、225%、250%、300%、350%，或约任何上述百分比，或由任何上述百分比界定的范围(例如，约1%-30%、约5%-25%、约5%-20%、约5%-15%或1%-30%、5%-25%、5%-20%、5%-15%)，1%-100%、1%-90%、1%-80%、1%-70%、1%-60%、1%-50%、1%-40%、1%-30%、1%-20%、1%-10%、10%-100%、10%-90%、10%-80%、10%-70%、10%-70%、10%-60%、10%-50%、10%-40%、10%-30%、10%-20%、20%-100%、20%-90%、20%-80%、20%-70%、20%-60%、20%-50%、20%-40%、20%-30%、30%-100%、30%-90%、30%-80%、30%-70%、30%-60%、30%-50%、30%-40%、40%-100%、40%-90%、40%-80%、40%-70%、40%-60%、40%-50%、50%-100%、50%-90%、50%-80%、50%-70%、50%-60%、60%-100%、60%-90%、60%-80%、60%-70%、70%-100%、70%-90%、70%-80%、80%-100%、80%-90%、90%-100%，约任何上述范围百分比(例如，约10%-70%、约30%-60%或约50%-70%)。在一些实施方案中，对照群体基于年龄。在一些实施方案中，对照群体的年龄为18、19、20、21、22、23、24、25、30、35、40、45、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80岁，或上述任何年龄界定的范围(例如，年龄等于18-20、25-35、50-80、50-70、50-60、55-75、55-75、55-70、55-65、60-70、52-71、60-79或73-78岁，或年龄大于18-20、25-35、50-

80、50-70、50-60、55-75、55-75、55-70、55-65、60-70、52-71、60-79或73-78岁)。在一些实施方案中,一个或多个CpG位点在Prima1、Hsf4和Kcns1基因内,包括它们的组合。在一些实施方案中,所提及的甲基化状态是胞嘧啶的甲基化。

[0303] 在引用的参考文献中描述了关于补充在此阐述的那些的程序或其他细节的信息,该参考文献特别通过引用并入本文。

[0304] 上述各种方法和技术提供了许多实施本发明的方法。当然,应当理解,并非所有描述的目标或优点都可以根据本文描述的任何特定实施方案来实现。因此,例如,本领域技术人员将认识到,可以以实现或优化如本文所教导的一个优点或一组优点的方式执行该方法,而不必实现如本文所教导或建议的其他目标或优点。

[0305] 此外,本领域技术人员将认识到来自不同实施方案的各种特征的可互换性。类似地,本领域普通技术人员可以混合和匹配以上讨论的各种特征和步骤,以及每个这样的特征或步骤的其他已知等效物,以执行根据本文描述的原理的方法。

[0306] 尽管已经在某些实施方案和实例的上下文中公开了本发明,但是本领域技术人员将理解,本发明超出具体公开的实施方案延伸到其他替代实施方案和/或用途及其明显的修改和等同物。因此,本发明不旨在受本文优选实施方案的具体公开内容的限制,而是通过参考所附权利要求来限制。

[0307] 以下实施例提供了本文描述的一些实施方案的说明,但不旨在限制本发明。

[0308] 一般实验程序

[0309] 除非另有说明,否则采用以下一般程序:

[0310] 老鼠.研究中包括的小鼠是雌性C57BL/6,获得自内部部门储备(源自从Jackson Laboratory和NIA/Charles River获取的C57BL/6j小鼠以及Janvier的C57BL/6JRj小鼠)。对于本文所述的寿命研究,在70周龄时随机选择40只小鼠。在治疗开始前(第0天)和第7天和第35天对小鼠进行称重和取血。未能从采血中恢复的小鼠和因实验室错误而死亡的小鼠被排除在外。根据我们批准的用于评估小鼠健康状况的动物许可协议,因为它们被评为"虚弱且即将死亡"而需要安乐死的小鼠仍然是数据集的一部分。随机分配到对照组或治疗组(每个实验组20只小鼠)。

[0311] 通过Prism GraphPad v7.0c计算中位生命期限、95%置信区间和存活分析。注意,对照组的中位生命期限与在各种近交系小鼠品系的大量生命期限研究中获得的C57BL/6j小鼠的数据相匹配。年轻的C57BL/6小鼠10周大,与年老小鼠放在同一房间和环境中。根据保护用于实验和其他科学目的的脊椎动物的欧洲公约(ETS 123)的建议饲养动物。将动物以每笼最多4只动物为一组饲养在Macrolon II型(长)笼中,该笼配有垫料和纸筑巢材料。动物可以随意获取食物(V1124-3,ssniff®)和水。在整个实验过程中,动物保持12/12小时的昼夜节律。小鼠实验是按照欧洲和德国的实验动物福利法进行的,并根据批准的协议,得到了乌尔姆大学机构审查委员会以及巴登-符腾堡州图宾根Regierungspraesidium Tuebingen的批准。

[0312] CASIN溶液和IP处理.CASIN在注射前通过将药物直接溶解在β-环糊精溶液(Sigma#H5784)中新鲜制备。在小鼠75周龄期间连续4天在早晨每24小时进行一次IP注射。对照小鼠注射等体积的溶剂。从第7天出血点制备细胞因子阵列的血清。用于CASIN水平质谱分析的血清通过在治疗结束后3小时、24小时和48小时对一组相同(针对性别、品系、起源

和年龄)的小鼠进行放血来制备。整个研究使用相同的CASIN储备。CASIN作为冻干粉提供。

[0313] 外周血(PB)的流式细胞术.根据标准程序进行PB细胞免疫染色,并在LSRII流式细胞仪(BD Biosciences)上分析样品。对于PB谱系分析,使用的抗体来自eBioscience:抗CD3ε(克隆145-2C11)、抗B220(克隆RA3-6B2)、抗Mac-1(克隆M1/70)和抗Gr-1(克隆RC57BL/6-8C5)。将谱系FACS分析数据绘制为总白细胞中B220+、CD3+和骨髓(Gr-1+、Mac-1+和Gr-1+Mac-1+)细胞的百分比。WBC(白细胞)、RBC(红细胞)、Ly(淋巴细胞)、NE(中性粒细胞)和Mo(单核细胞)计数是使用美国DREW SCIENTIFIC Inc(FL 33014)的血细胞计数器Hemavet 950生成的。

[0314] 小鼠血清中CASIN药代动力学的液相色谱-质谱(LC-MS/MS)测量.采用LC/MS/MS离子色谱方案,通过比较不同时间i.p.注射小鼠的血清CASIN与通过体外加标具有确定剂量的CASIN的小鼠血清得出的标准曲线,测量范围为0.1-10μM的血清CASIN浓度。使用带盖的自动进样器最大回收率样品瓶(Waters)、UPLC-MS系统(配备ACQUITY UPLC系统的Waters Quattro Premier XE质谱仪)、Acquity BEH C18 UPLC色谱柱(2.1×75mm,1.7μm)(Waters)和Acquity BEH C18 UPLC保护柱(Waters)。对于LC梯度,溶剂A含有乙腈/水(5/95)和2mM乙酸铵,溶剂B含有乙腈/水(90/10)。梯度流动相在2分钟内从60%溶剂A切换到57%溶剂A,在2.1分钟内切换到50%溶剂A,在9.9分钟内切换到46%溶剂A,然后在12.1分钟内改变为30%、在5.9分钟内为1%溶剂A,然后在18.1分钟为60%溶剂A,并保持2分钟。柱温保持在25℃。电喷雾负(ES-)模式的毛细管电压为3KV,锥孔电压为45V,碰撞30V,去溶剂化温度350℃;去溶剂化气体流量为600L/h;源温度为120℃;MRM跃迁m/z为305.1->244。

[0315] 细胞因子阵列.Lumimex方法.根据制造商的方案,使用MilliplexTM Multiplex试剂盒(MilliporeSigma,Darmstadt,德国)测定样品上清液中的细胞因子浓度。简而言之,在96孔黑色板中,一式两份的25μL样品与25μL抗体包被的珠子在板振荡器上于4℃温育过夜。然后使用BioTek 405TS(BioTek,Winooski,VT)将板洗涤2次,加入25μL二抗并在室温下摇动温育1小时。最后,将25μL链霉亲和素-RPE直接添加到二抗中,并在室温下振荡温育30分钟。然后将板再洗涤2次并加入150μL鞘液。将板摇动5分钟,然后在Milliplex Analyzer(MilliporeSigma,Darmstadt,德国)上使用luminex技术进行读数。使用重组蛋白从标准曲线计算浓度,并以pg/ml表示。

[0316] Cdc42-GTPase效应物结构域下拉分析.GTP结合的Cdc42的相对水平由效应物下拉测定法确定。简而言之,在含有10%甘油、25mM氟化钠、1mM原钒酸钠和蛋白酶抑制剂混合物(Roche Diagnostics)的Mg^{2+}裂解/洗涤缓冲液(北部细胞信号传导溶液)中裂解谱系耗尽的BM细胞(10^6)。将样品与PAK-1结合域/琼脂糖珠一起温育,并通过用抗Cdc42抗体(Millipore,兔多克隆)进行免疫印迹来探测结合(活化)和未结合(非活化)的Cdc42级分。将活化的蛋白质归一化至总蛋白质和/或β-肌动蛋白(Sigma),并通过光密度测定法量化相对量。

[0317] 表观遗传老年特征分析.通过将DMSO溶解至100mM的浓度,然后在环糊精溶液(Sigma#H5784)中稀释,在注射前新鲜制备CASIN(Xcessbio#M60040)。从77-86周龄开始,连续4天在上午进行25mg/kg的IP注射。对照小鼠注射等体积的溶剂。处理后8-9周处死小鼠并通过心脏穿刺收集血液。如前所述,在三种与年龄相关的CG二核苷酸(CpG)上分析了DNA甲基化水平的分析。简而言之,从血样中分离基因组DNA,将亚硫酸氢盐转化,并通过焦磷酸测

序分析三个基因(Prima1、Hsf4、Kcns1)内的DNA甲基化。这些位点的DNA甲基化结果被整合到B6小鼠表观遗传年龄预测的多变量模型中,并与实际年龄相关联。使用非配对t检验比较CASIN治疗小鼠和对照小鼠的时间和生物学年龄。由于数据不呈正态分布,因此在进行统计分析之前对所有数据进行增强以获得正态分布。

[0318] 实施例1

[0319] 为了确定用Cdc42特异性抑制剂对老年动物进行短期全身治疗会调节生命期限,每24小时连续4天对75周大的雌性C57BL/6小鼠i.p.施用CASIN(图1a)。通过液相色谱-质谱法监测血清中的CASIN水平(图2a和2b)。50mg/kg的单剂量最初导致血清中的浓度约为10μM(数据未显示)。因此,选择了25mg/kg的剂量,老年小鼠血清的质谱数据显示注射后3小时CASIN的水平在5μM的预期范围内(图2b)。CASIN浓度在48小时分析窗口内下降,3小时后检测到约2μM浓度,2小时后检测到约1μM,在48小时窗口结束时血清中几乎没有CASIN残留。

[0320] 连续注射四天没有引起急性毒性,并且在CASIN注射后4周内没有一只被治疗的小鼠死亡。因此,不太可能出现来自施用抑制剂的慢性毒性问题。在第5天最后一次注射后24小时对Cdc42活性的定量表明,老年骨髓细胞中的Cdc42-GTP降低至年轻时的水平(图1c),证实CASIN在全身性体内治疗后确实降低了Cdc42活性。如图1c所示,CASIN治疗使Cdc42活性降低了大约一半,而与小鼠的年龄无关。此外,CASIN治疗将老年小鼠组中的Cdc42活性逆转至年轻小鼠对照组中的大致活性水平。因此,CASIN治疗通常将老年小鼠中的Cdc42活性水平恢复到年龄大约年轻60周的小鼠中存在的水平。

[0321] 注意,用CASIN治疗仅连续4天的老年小鼠的平均和最大生命期限均延长(图1d)。因此,尽管在停止药物治疗后不久就从血液中清除(例如,短期治疗的长期影响),但使用Cdc42特异性抑制剂治疗对延长生命期限具有出乎意料的效果,从而说明了药物治疗的持久益处。

[0322] 同样值得注意的是,体重(图2c)、白细胞计数(WBC)(图2d)、红细胞计数(RBC)(图2e)以及外周血(PB)中骨髓和淋巴细胞的频率和计数在短期(例如,治疗开始后第7天)和长期(例如,治疗开始后第35天)均未响应于CASIN治疗而改变(图2f-k)。进行细胞因子阵列分析以研究老年小鼠血清中与衰老相关的炎性细胞因子受CASIN治疗影响的程度。数据显示INFγ、IL-1β和IL-1α的浓度在衰老时显著增加,并且在CASIN治疗老年动物后这些细胞因子的浓度与年轻动物的浓度相似(图1e-g)。因此,CASIN治疗降低了这些细胞因子的浓度,并且不受任何理论的束缚,这种与衰老相关的炎性细胞因子的减少可能有助于在这些动物中观察到的生命期限延长。有趣的是,IL-9是唯一一种在CASIN治疗后血清浓度增加的被分析的细胞因子(图1h)。IL-6、IL-2、GM-CSF、LIF、IL-4、IL-7的浓度在老年小鼠中没有明显升高的趋势,并且一些(GM-CSF、IL-2)也显示出被CASIN降低的趋势,而对于大量细胞因子,它们的浓度不会因年老或CASIN治疗而改变(图3)。

[0323] 基因Prima1、Hsf4和Kcns1内CpG(5'-C-磷酸-G-3')位点的DNA甲基化状态可能是C57BL/6小鼠生物学年龄的预测因子。因此,这些CpG的DNA甲基化谱被研究为生物表观遗传时钟。将这种C57BL/6训练的DNA甲基化标记组被应用于治疗9周后用CASIN治疗的老年动物的血细胞,并且观察到表观遗传年龄预测与老年对照动物的实际年龄不再相关。相反,用Cdc42特异性抑制剂治疗导致生物学年龄预测平均比小鼠的实际年龄年轻9周(图1i)。因此,用Cdc42特异性抑制剂(例如,CASIN)治疗的小鼠表现出表观遗传变化,不受任何理论约

束,这些变化可能影响观察到的老年CASIN治疗小鼠的延长的寿命。

[0324] 此外,许多与年龄有关的疾病,如肥胖、代谢综合征、糖尿病、心血管疾病、癌症、抑郁症和阿尔茨海默病,都有炎症的发病机制;炎症通路的激活似乎与肌肉减少症和虚弱的病理生理有关。不受任何理论的束缚,在这些实验中检测到的干扰素γ浓度升高可能是衰老的保守标志,并且可能在功能上与生命期限有关。同样,白细胞介素1α和白细胞介素1β都与许多与衰老相关的表型和疾病有关。至于在CASIN治疗后显示血清浓度增加的IL-9,IL-9是一种多效性细胞因子,主要由T辅助细胞9(Th9)细胞产生,对淋巴细胞、肥大细胞和常驻肺细胞产生有记录的影响。不受任何理论的束缚,本文描述的数据表明这些细胞因子浓度升高对于调节生命期限的作用。数据进一步表明,血细胞中Prima1、Hsf4和Kcns1基因内CpG位点的甲基化状态与生物学年龄密切相关,可作为C57BL/6小鼠衰老的有效生物标志物。

[0325] 如上所述,本文的数据表明老年小鼠中Cdc42活性的降低确实延长了生命期限。注意,CASIN对Cdc42活性的抑制和雷帕霉素对mTOR的抑制是仅有的已报道的对小鼠生命期限有显著影响的药物治疗,这些药物治疗在生命十分晚期(75周龄或更长)已经给予且仅是暂时性的(CASIN仅4天;雷帕霉素90天)。这说明CDC42特异性抑制剂的作用机制不同于其他针对生命期限的药理学干预,后者通常在生命早期给予和/或长时间连续提供以达到显著效果。

[0326] 实施例2.

[0327] 图5(A)中提供了用于疫苗接种反应实验的实验装置。简而言之,每24小时对75周龄C57BL/6小鼠(在结果中称为“老年”)和12-16周龄小鼠(在结果中称为“年轻”)以感兴趣的剂量(例如,25mg/kg)进行腹膜内(“IP”)注射四天Cdc42特异性抑制剂(例如,CASIN)或作为对照组的溶剂(在结果中称为“溶剂”)。在第五天,用5-氟尿嘧啶(“5-FU”)治疗小鼠。研究了两种疫苗接种方法。

[0328] 对于DNA疫苗接种:移植后12周,用编码乙型肝炎病毒(“HBV”)核心抗原的pCI/CDNA对受体小鼠进行免疫。图5(B)提供了在免疫后13天用HBV核心抗原进行DNA疫苗接种和卵清蛋白(“Ova”)特异性免疫反应的结果。分析了干扰素γ阳性$CD3^+CD8^+$T细胞的频率,这是DNA疫苗接种方案成功的既定替代测量。如图5(B)所示,在用HBV核心抗原免疫后,所有小鼠都表现出干扰素γ阳性$CD3^+CD8^+$T细胞的频率增加。用CASIN治疗的老年小鼠的免疫反应在统计学上显著增加。n=每个实验至少3个。*老年溶剂vs.老年CASIN的$p<0.05$。在图5(C)中,用HBV核心抗原免疫后13天,通过流式细胞术测定脾脏K^b/C_{93-100}-二聚体$^+CD8^+$T细胞频率。这些T细胞频率是抗原特异性T细胞的直接测量值。用CASIN治疗的老年小鼠的抗原特异性T细胞在统计学上显著增加。n=每个实验至少3个。*老年溶剂vs.老年CASIN的$p<0.05$。

[0329] 对于病毒疫苗接种,CASIN治疗后12周,将动物以4周的间隔用灭活流感病毒(10μg H3N2+10μL $Al(OH)_3$)i.m.免疫两次。在第二次接种疫苗后21天,使用ELISA技术测定血清中的抗体滴度。n=每个实验至少3个。这些结果在图5(D)中提供,其突出显示了相对于作为对照组的用溶剂处理的老年小鼠,用CASIN治疗的老年小鼠的抗体滴度增加。结果表明,无论该组中的CASIN治疗如何,用CASIN治疗的老年小鼠的抗体滴度与年轻小鼠的抗体滴度大致相等。

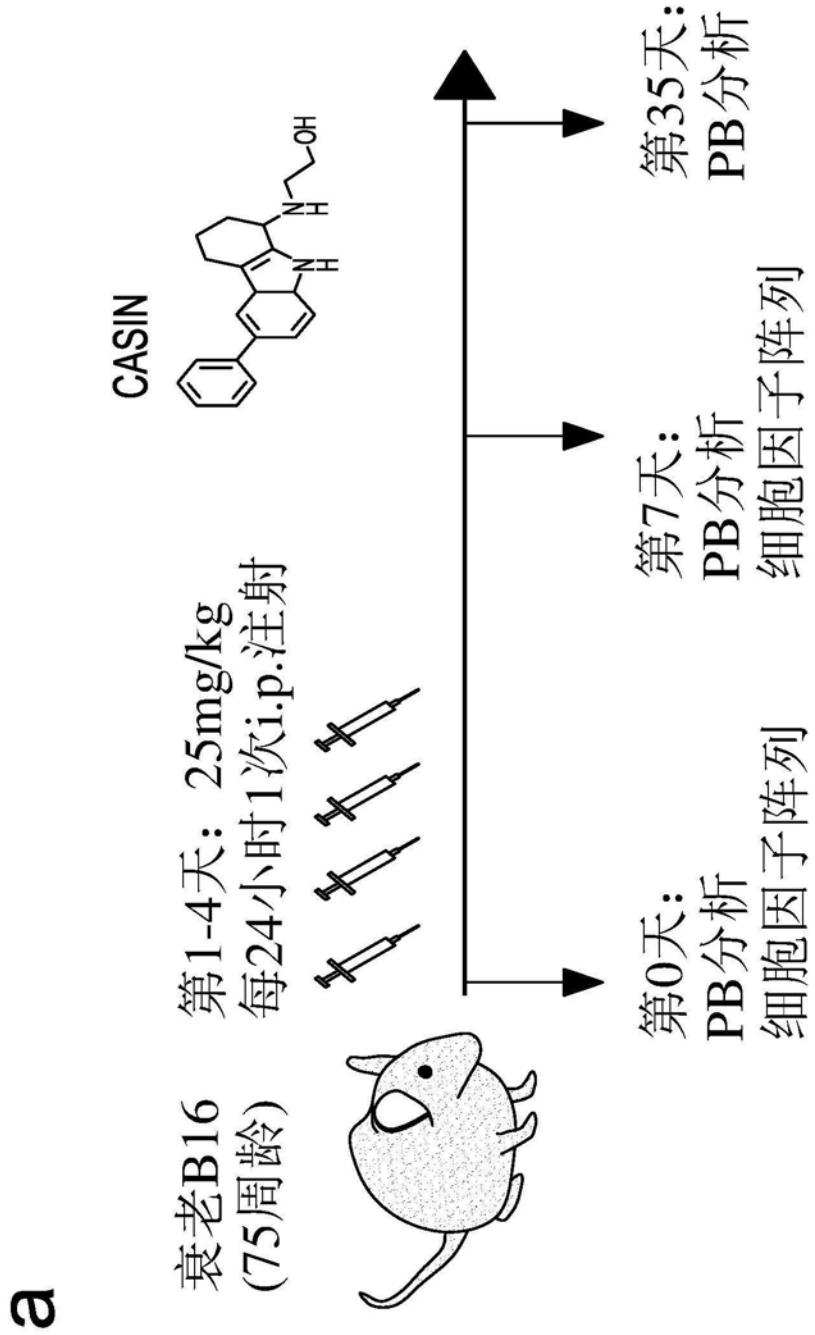

a
衰老B16
(75周龄)
第1-4天：25mg/kg
每24小时1次i.p.注射
CASIN
第0天：
PB分析
细胞因子阵列
第7天：
PB分析
细胞因子阵列
第35天：
PB分析

图1(a)

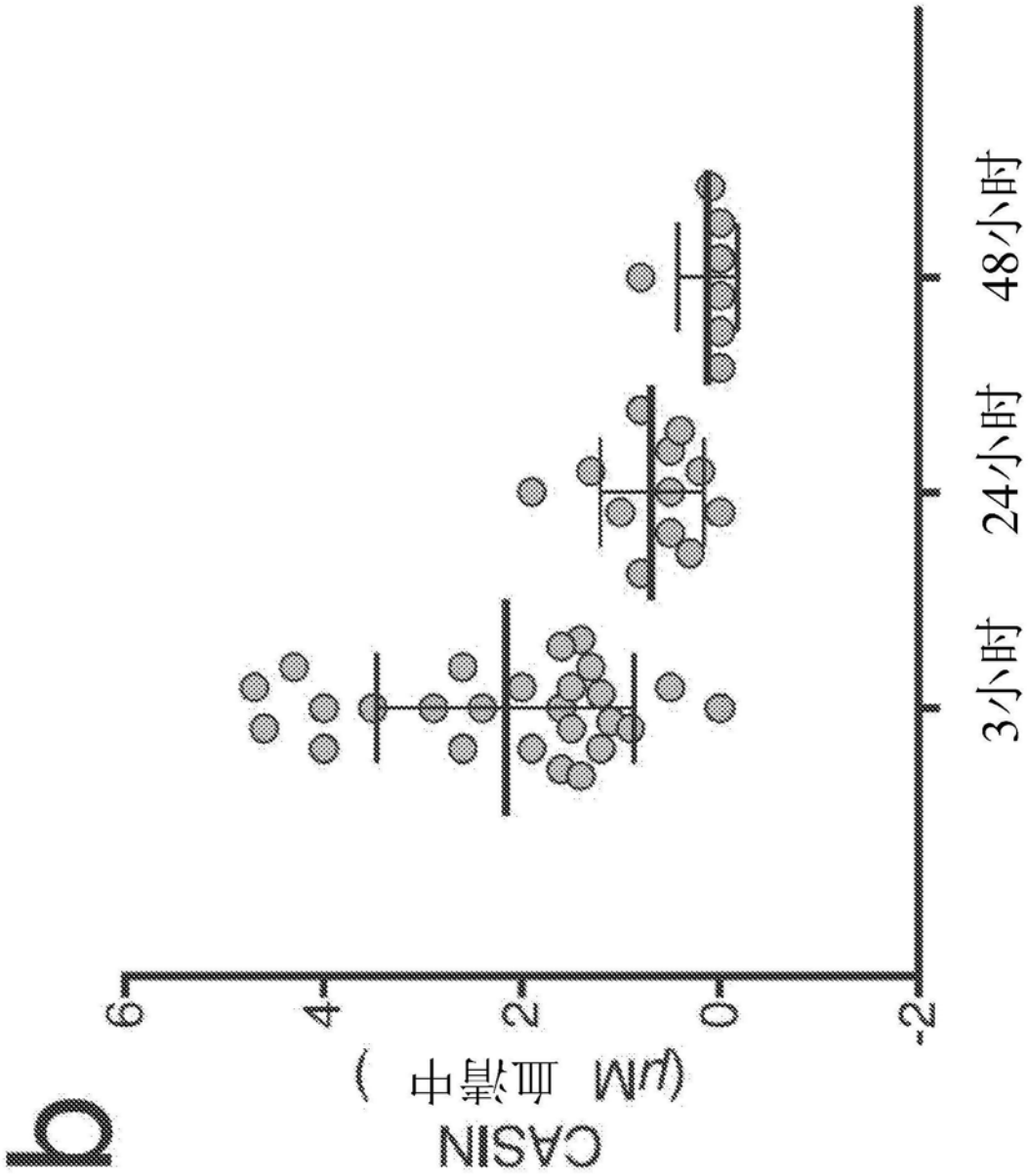


图1(b)

Cdc42GTP/Cdc42 总计
0
2
4
6
8
10
骨髓
*
*
对照 年轻
对照 年老
CASIN年老
C
Cdc42tot
Cdc42GTP
肌动蛋白
对照 年轻
对照 年老
CASIN年老

图1(c)

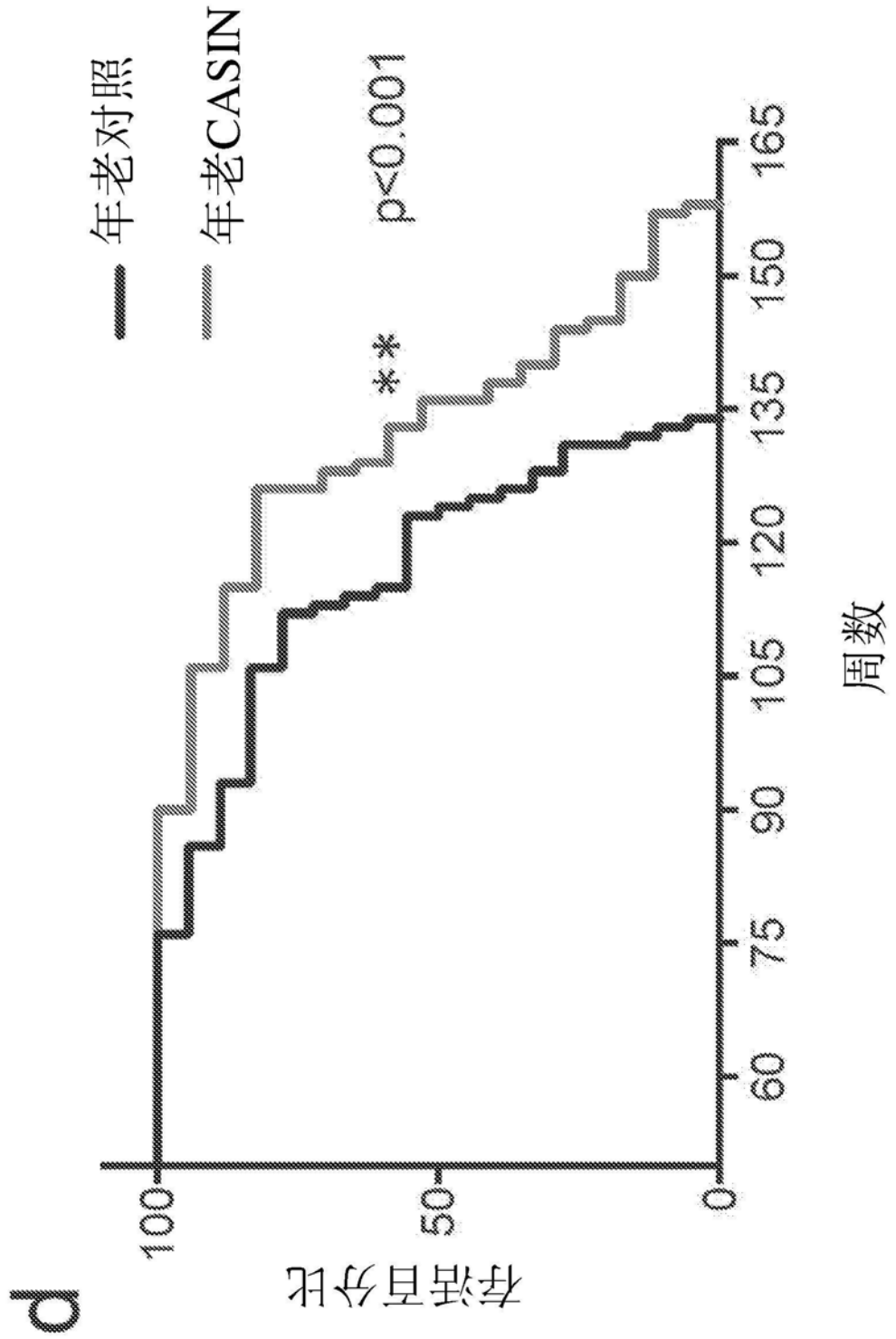
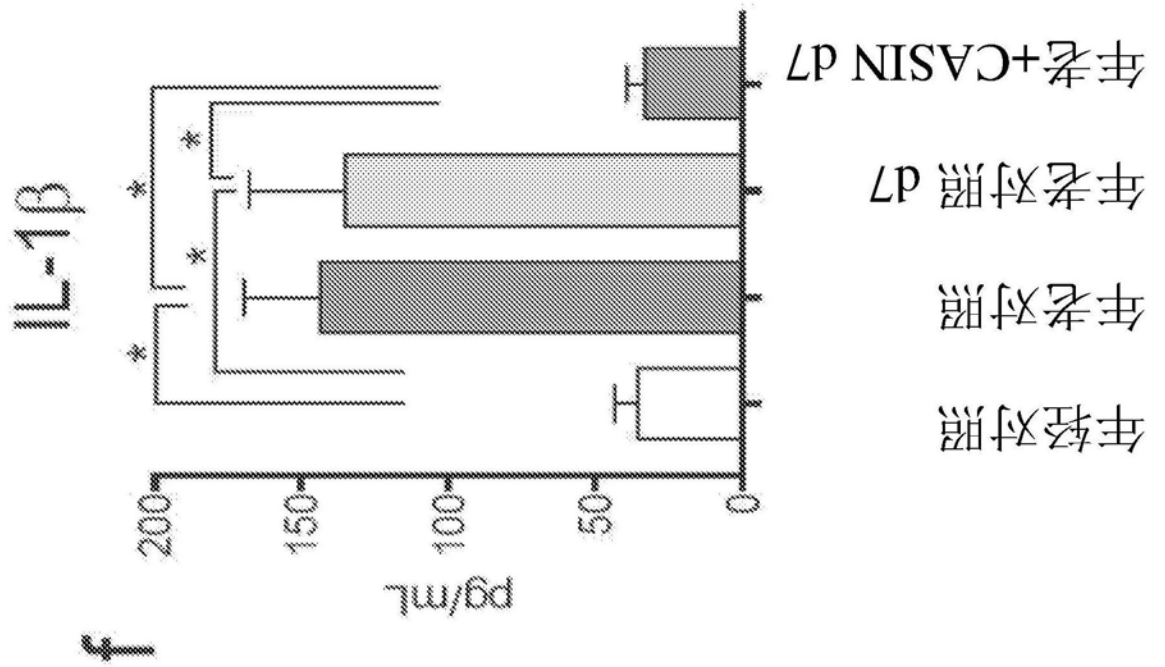

d
存活百分比
100
50
0
60
75
90
105
120
135
150
165
周数
**
p<0.001
年老CASIN
年老对照

图1(d)


IL-1β
pg/mL
200
150
100
50
0
*
*
*
f
年轻对照
年老对照
年老对照 d7
年老+CASIN d7

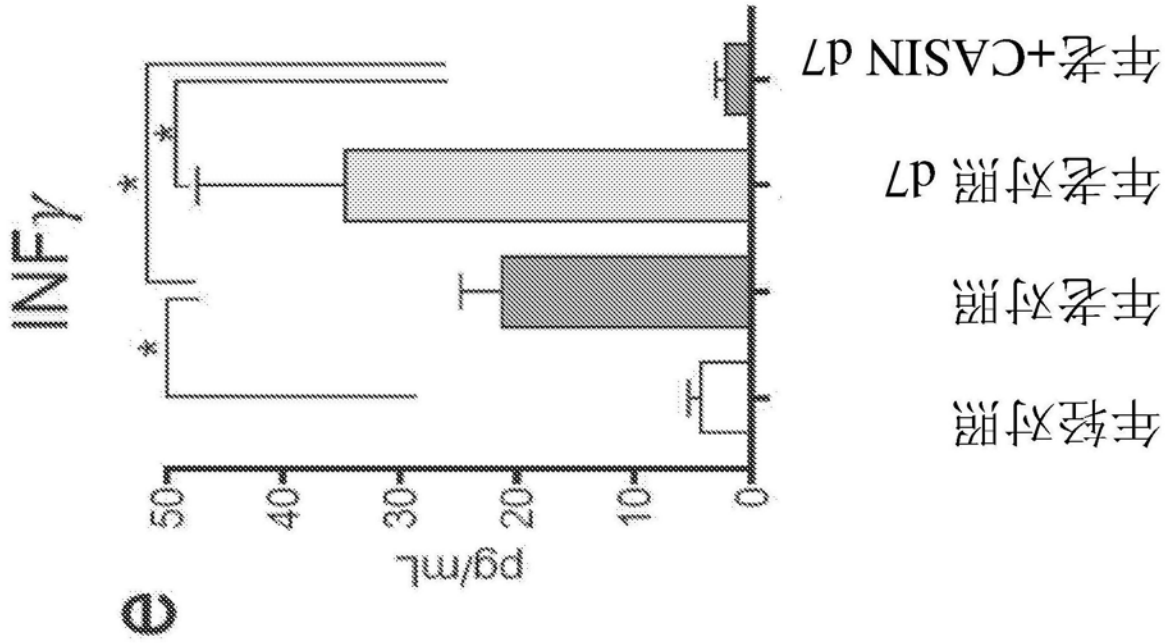

INFγ
pg/mL
50
40
30
20
10
0
*
*
*
e
年轻对照
年老对照
年老对照 d7
年老+CASIN d7

图1(e)&(f)

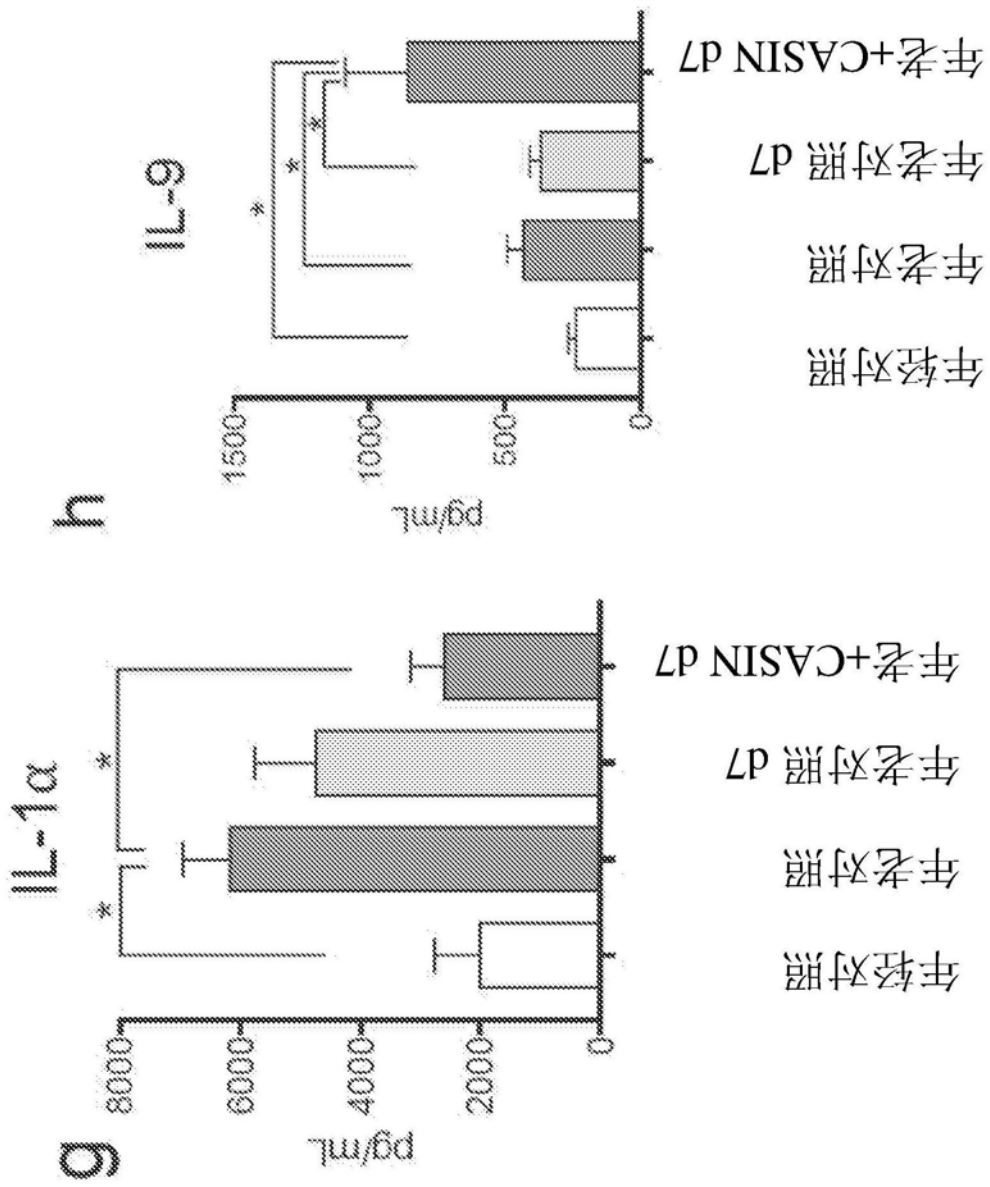

h
IL-6
pg/mL
0
500
1000
1500
年轻对照
年老对照
年老对照 d7
年老+CASIN d7
g
IL-1α
pg/mL
0
2000
4000
6000
8000
年轻对照
年老对照
年老对照 d7
年老+CASIN d7

图1 (g) & (h)

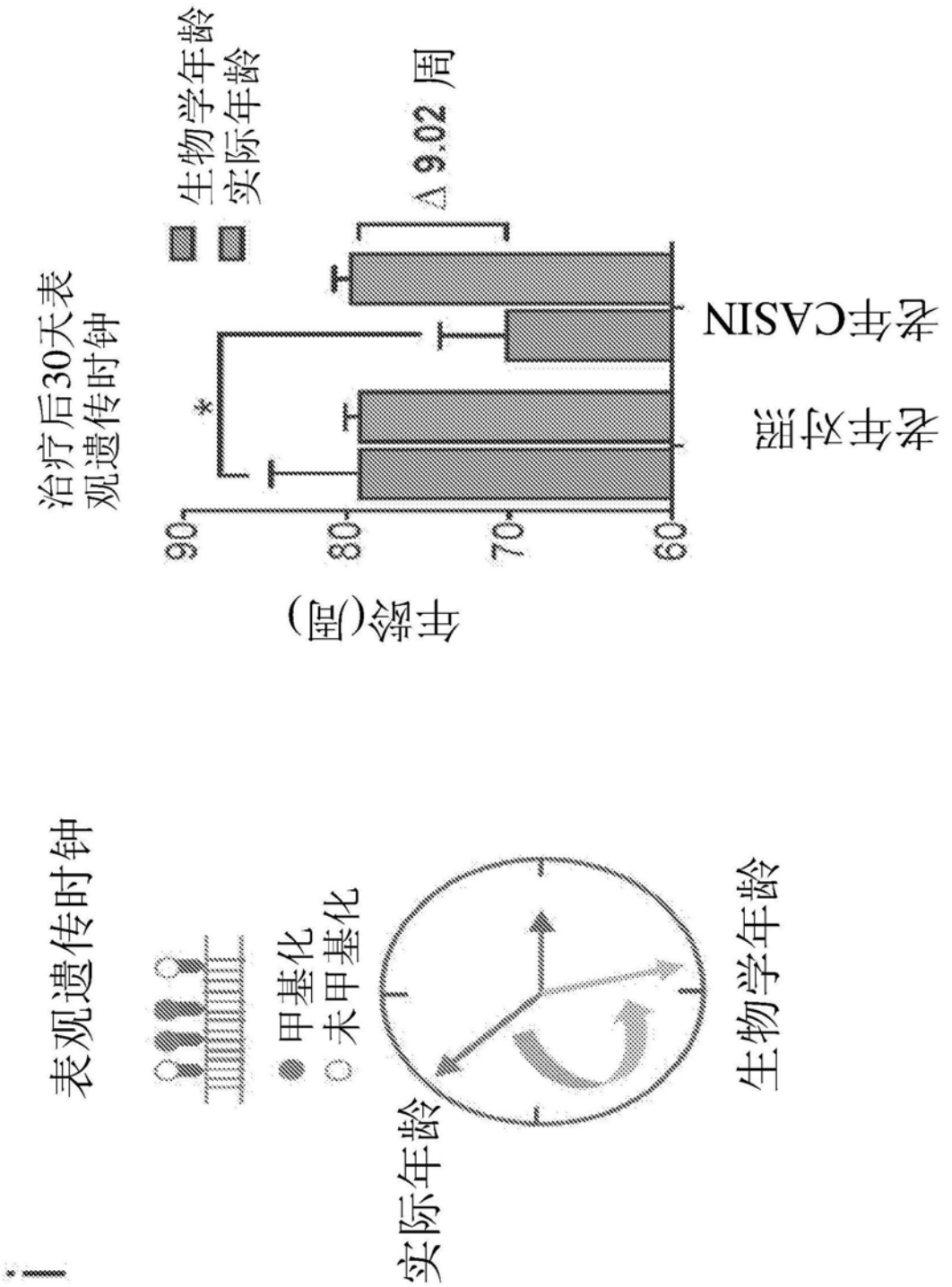

治疗后30天表观遗传时钟
生物学年龄
实际年龄
Δ 9.02 周
年龄(周)
90
80
70
60
*
老年对照
老年CASIN
表观遗传时钟
甲基化
未甲基化
实际年龄
生物学年龄

图1(i)

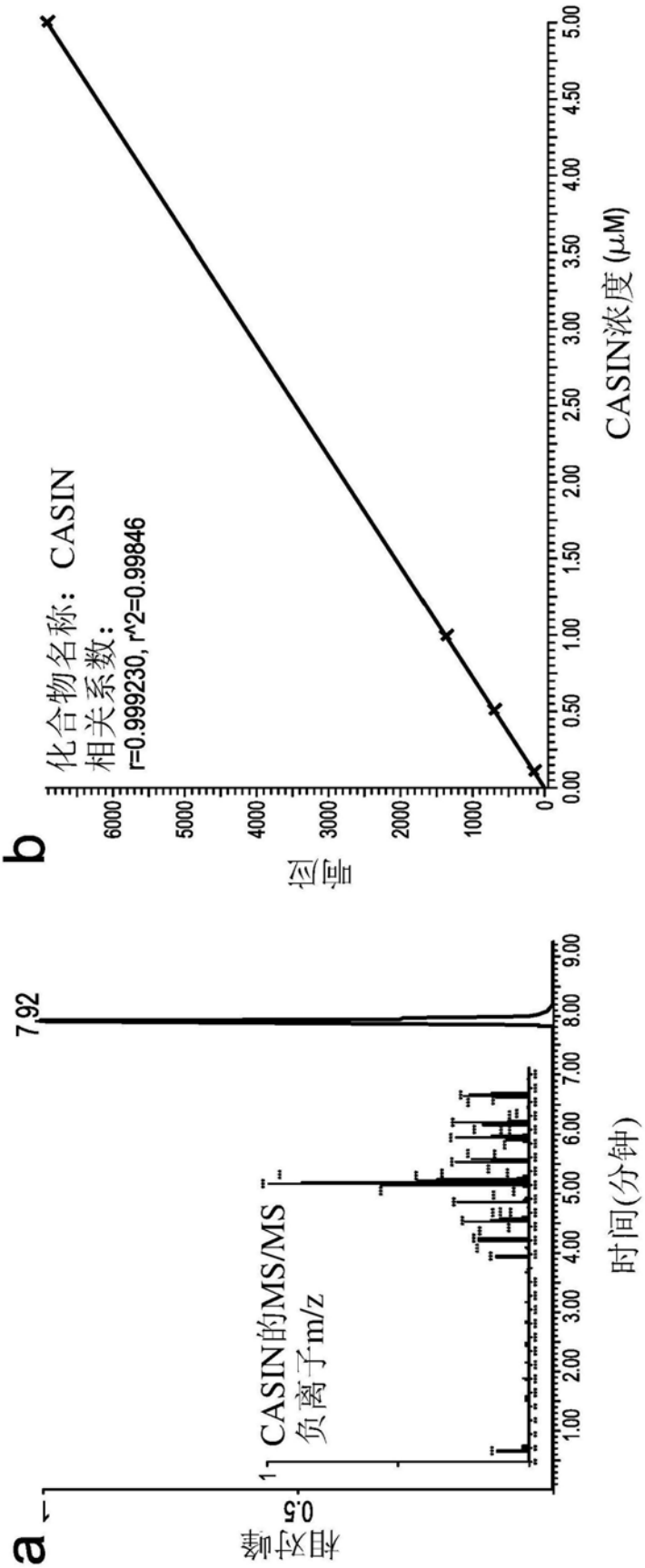

a
相对丰度
1
CASIN的MS/MS
负离子m/z
7.92
时间(分钟)
b
响应
化合物名称：CASIN
相关系数：
r=0.999230, r^2=0.99846
CASIN浓度 (μM)

图2 (a) & (b)

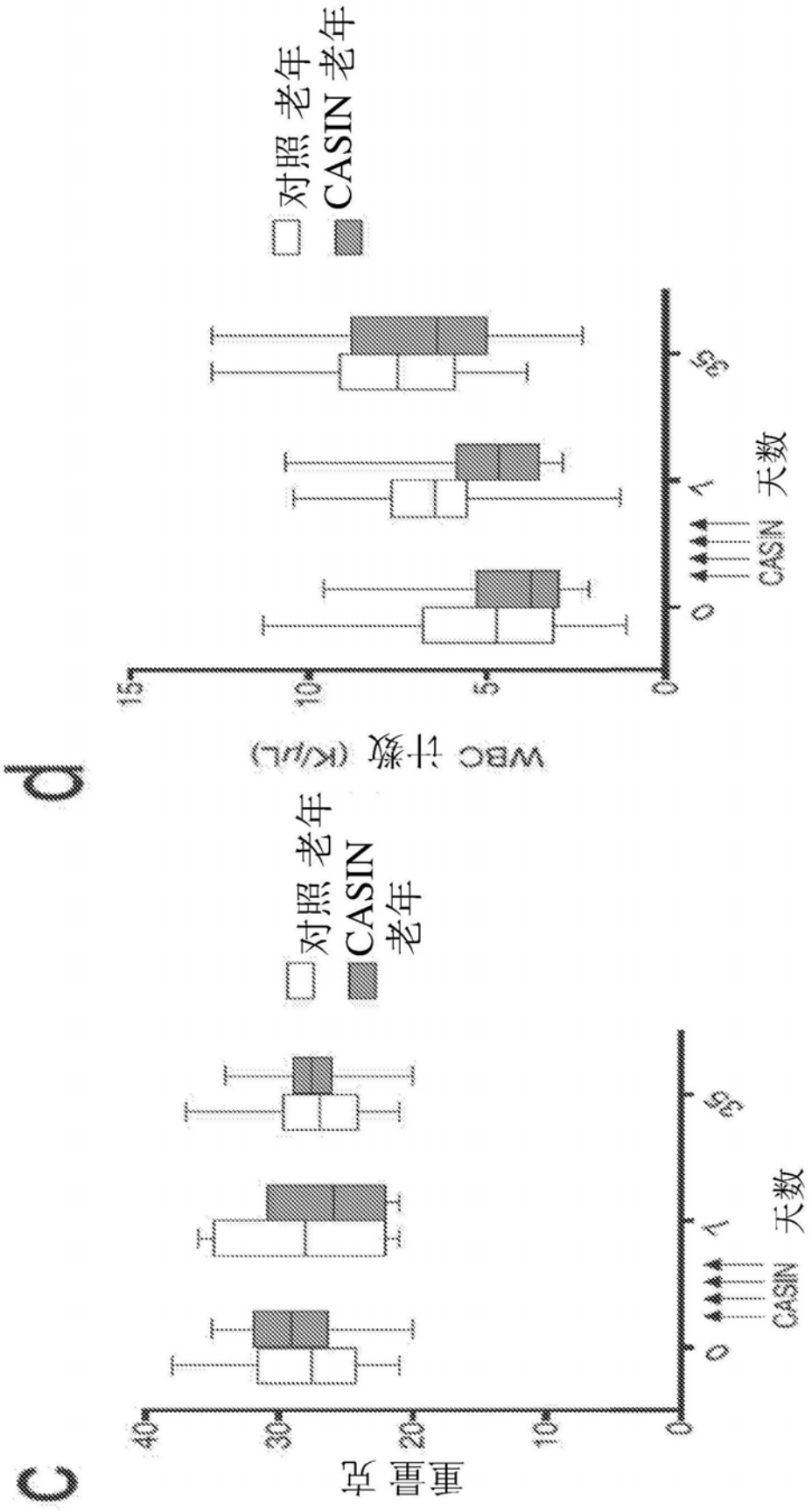

d
□对照 老年
■CASIN 老年
WBC 计数 (K/μL)
15
10
5
0
0
1
5
CASIN 天数
c
□对照 老年
■CASIN 老年
重量 克
40
30
20
10
0
0
1
5
CASIN 天数

图2(c) & (d)

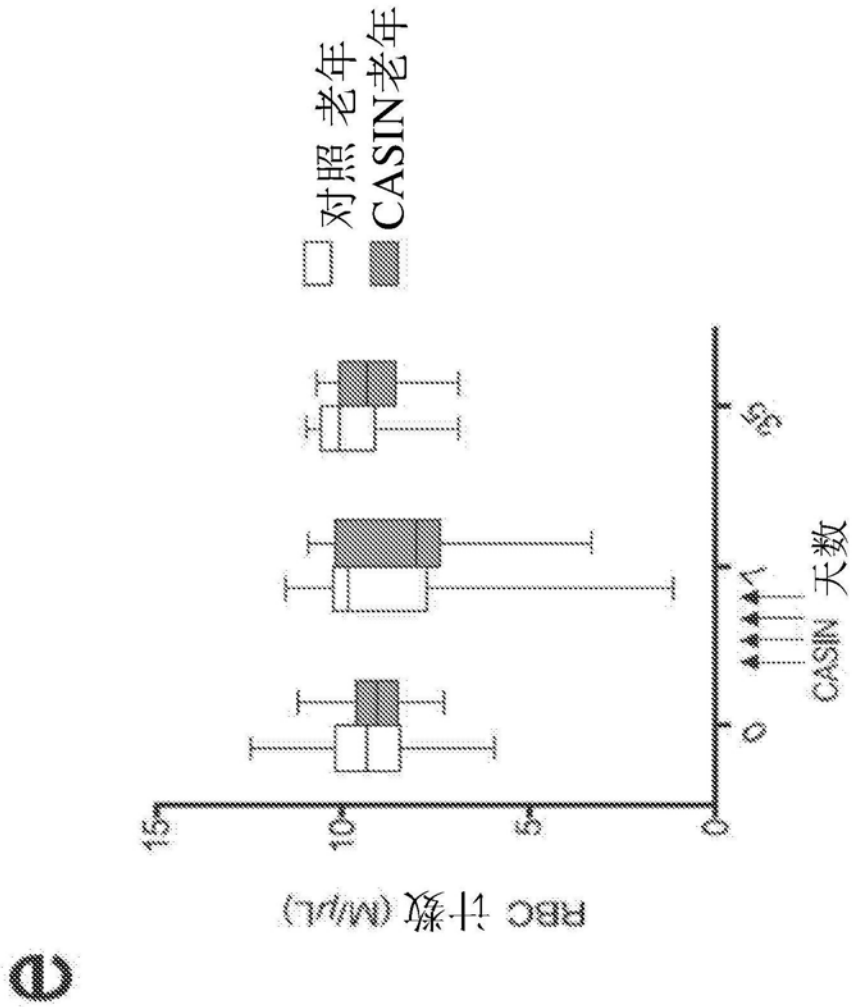


图2(e)

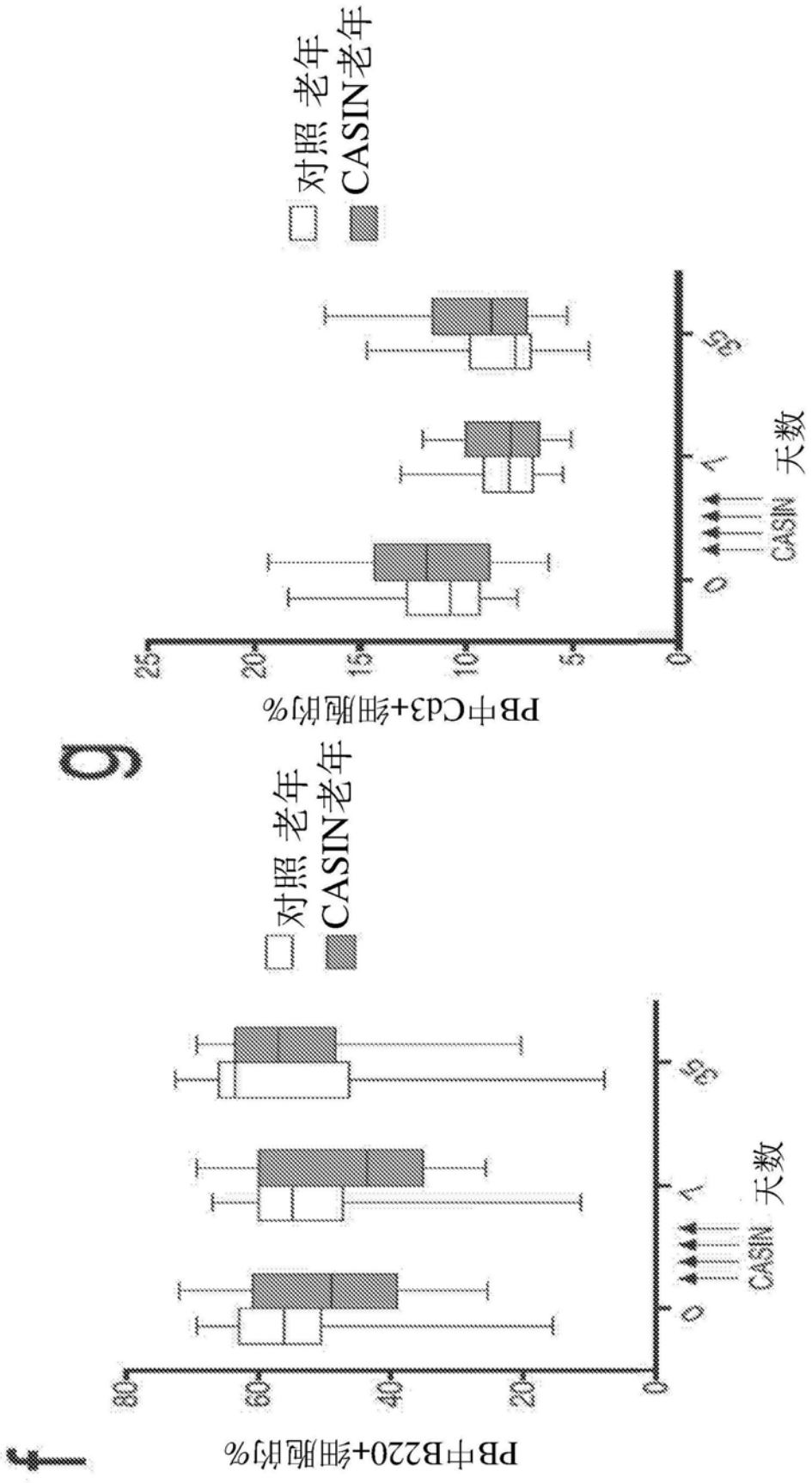

f
PB中B220+细胞的%
80
60
40
20
0
0
1
2
CASIN 天数
对照 老年
CASIN老年
g
PB中Cd3+细胞的%
25
20
15
10
5
0
0
1
2
CASIN 天数
对照 老年
CASIN老年

图2(f)&(g)

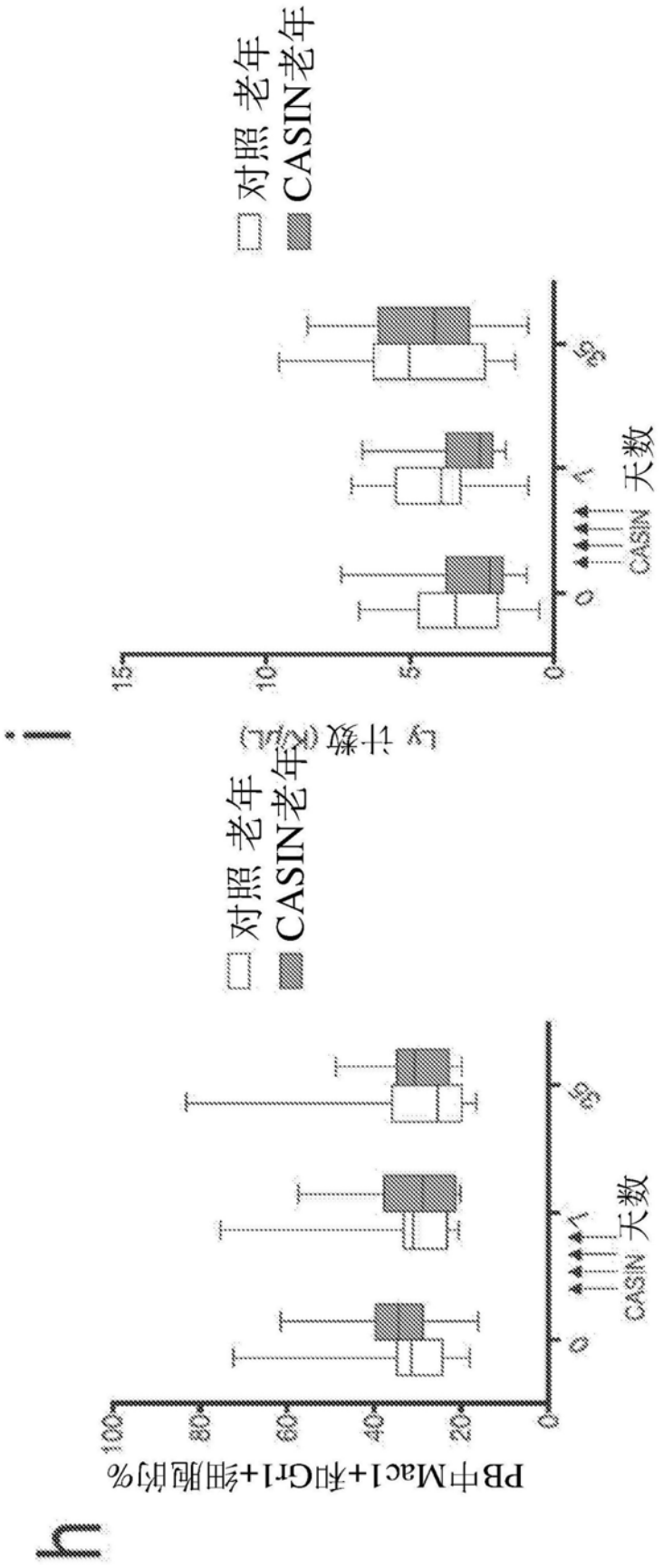

h
PB中Mac1+和Gr1+细胞的%
100
80
60
40
20
0
0
1
7
28
CASIN 天数
□ 对照 老年
■ CASIN老年
i
y 计数 (%)
15
10
5
0
0
1
7
28
CASIN 天数
□ 对照 老年
■ CASIN老年

图2(h) & (i)

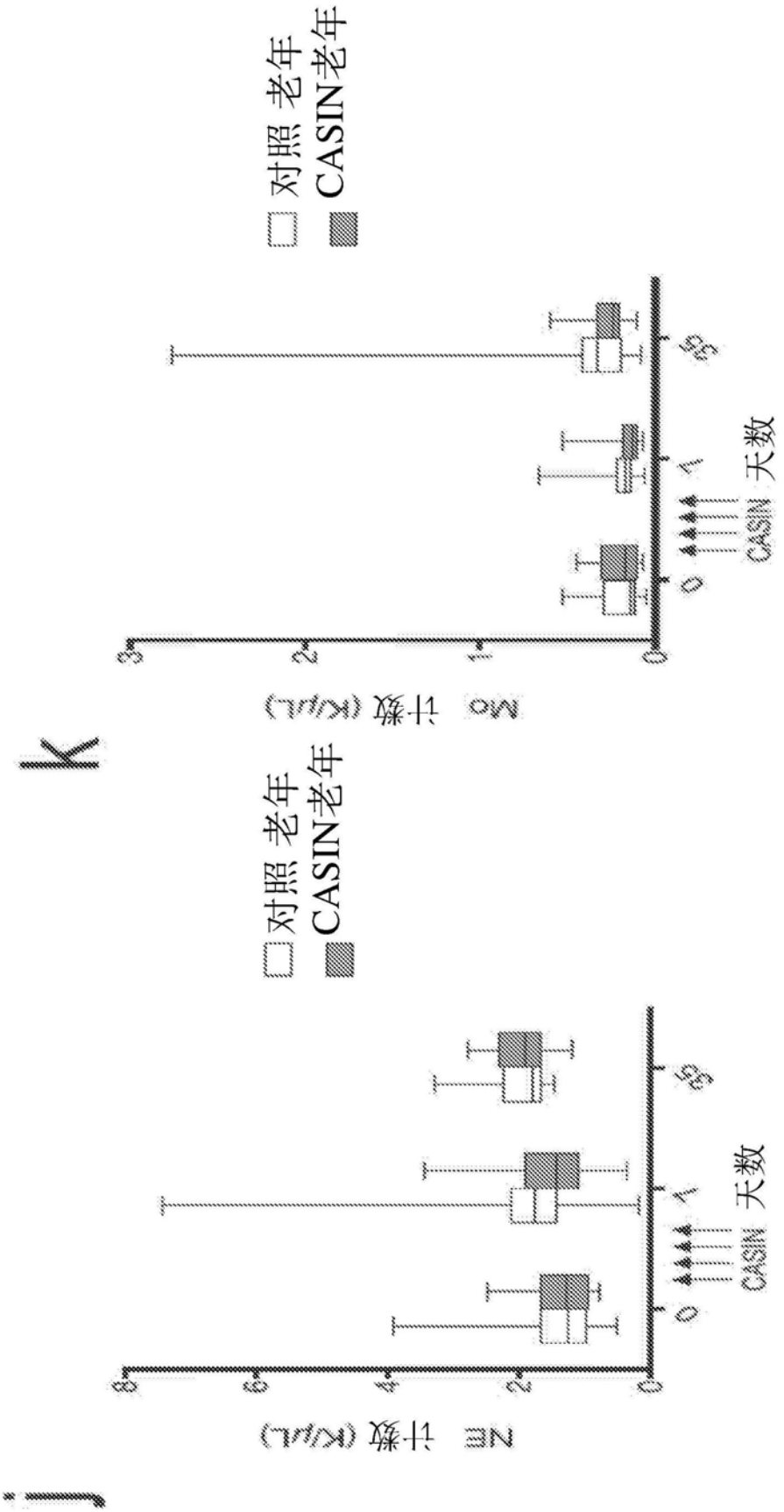

K
□对照 老年
CASIN老年
Mo 计数 (K/μL)
CASIN 天数
□对照 老年
CASIN老年
NE 计数 (K/μL)
CASIN 天数

图2(j) & (k)

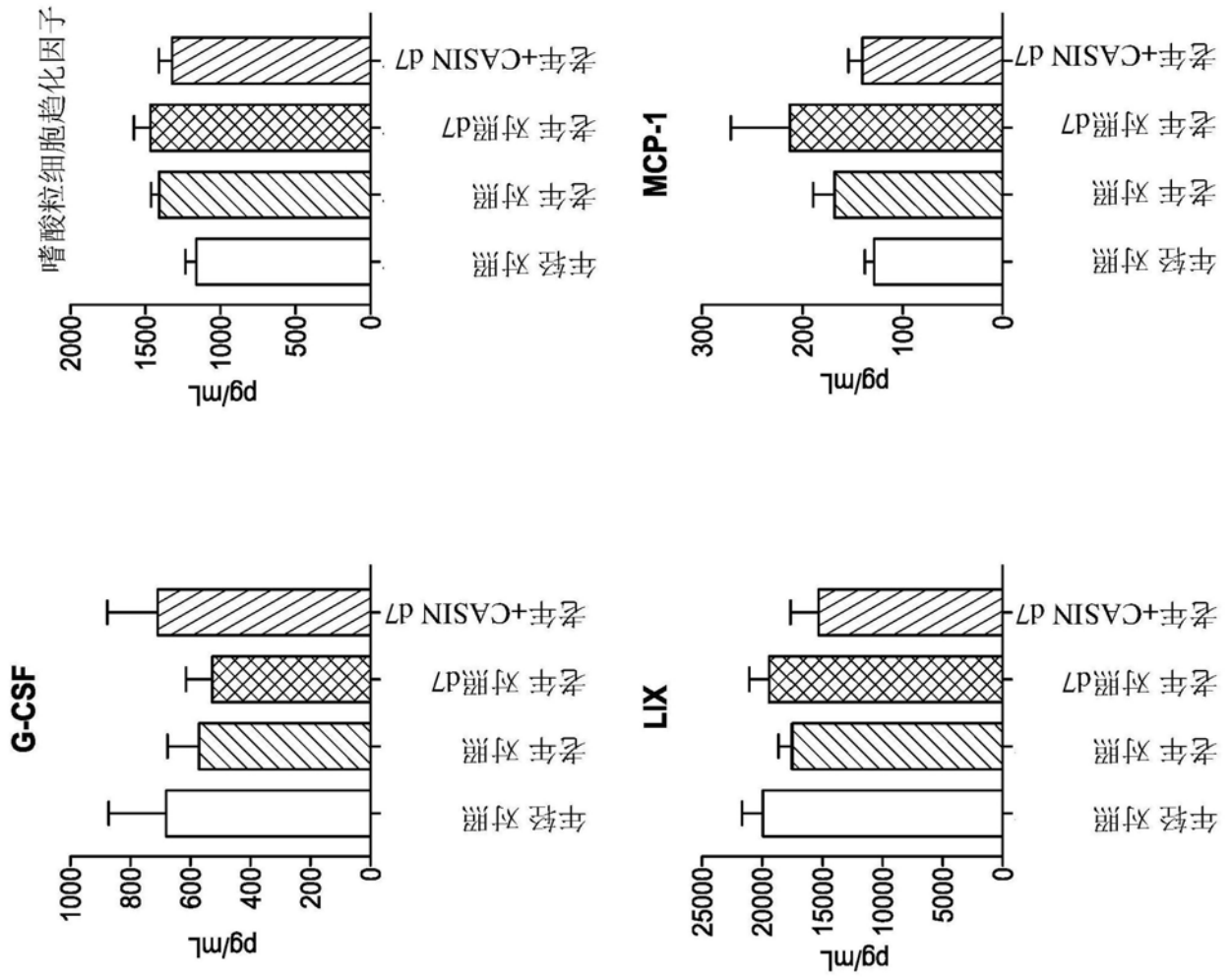

嗜酸粒细胞趋化因子
pg/mL
2000
1500
1000
500
0
年轻 对照
老年 对照
老年 对照d7
老年+CASIN d7
MCP-1
pg/mL
300
200
100
0
年轻 对照
老年 对照
老年 对照d7
老年+CASIN d7
G-CSF
pg/mL
1000
800
600
400
200
0
年轻 对照
老年 对照
老年 对照d7
老年+CASIN d7
LIX
pg/mL
25000
20000
15000
10000
5000
0
年轻 对照
老年 对照
老年 对照d7
老年+CASIN d7

图3

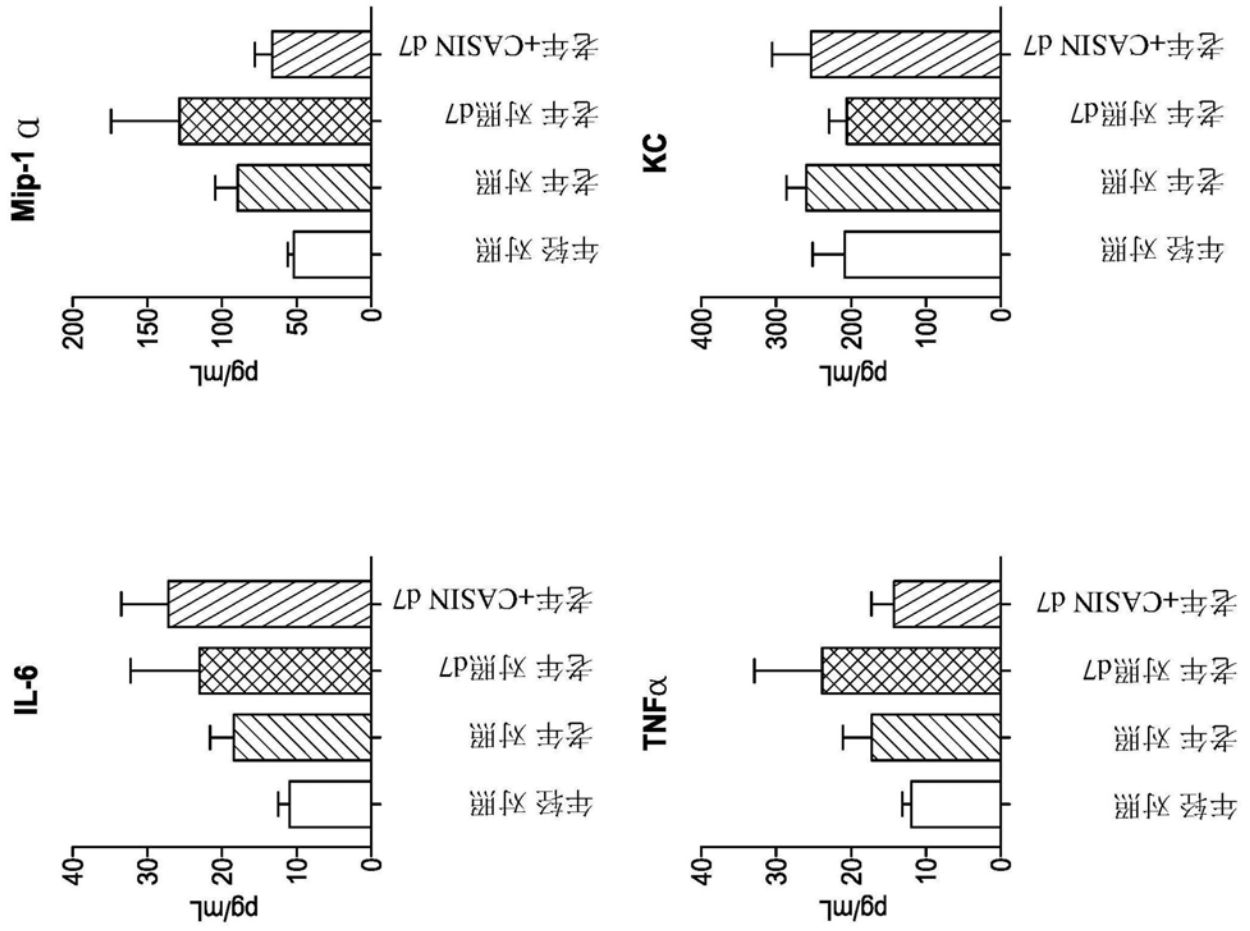


图3(续)

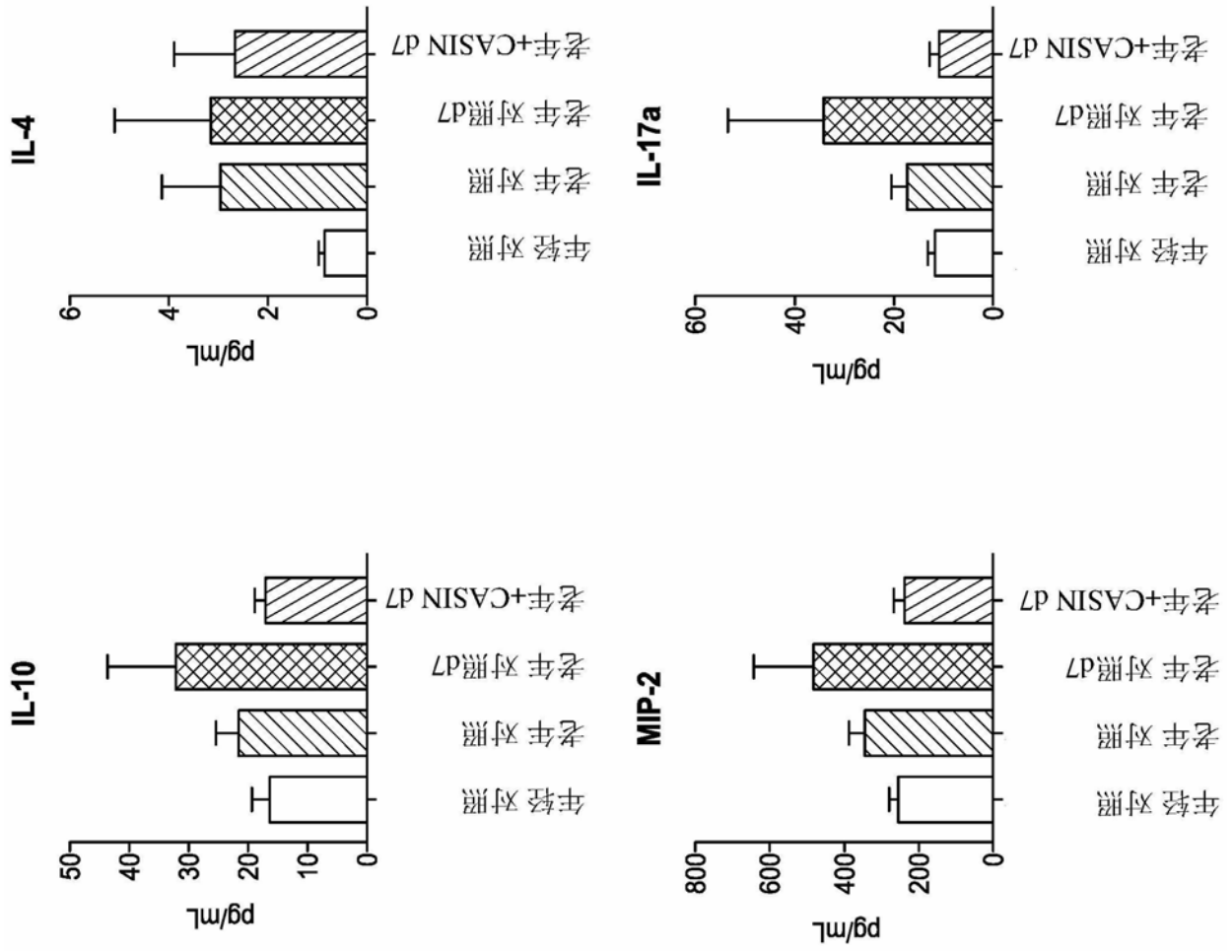

IL-4
pg/mL
0
2
4
6
年轻 对照
老年 对照
老年 对照d7
老年+CASIN d7
IL-17a
pg/mL
0
20
40
60
年轻 对照
老年 对照
老年 对照d7
老年+CASIN d7
IL-10
pg/mL
0
10
20
30
40
50
年轻 对照
老年 对照
老年 对照d7
老年+CASIN d7
MIP-2
pg/mL
0
200
400
600
800
年轻 对照
老年 对照
老年 对照d7
老年+CASIN d7

图3(续)

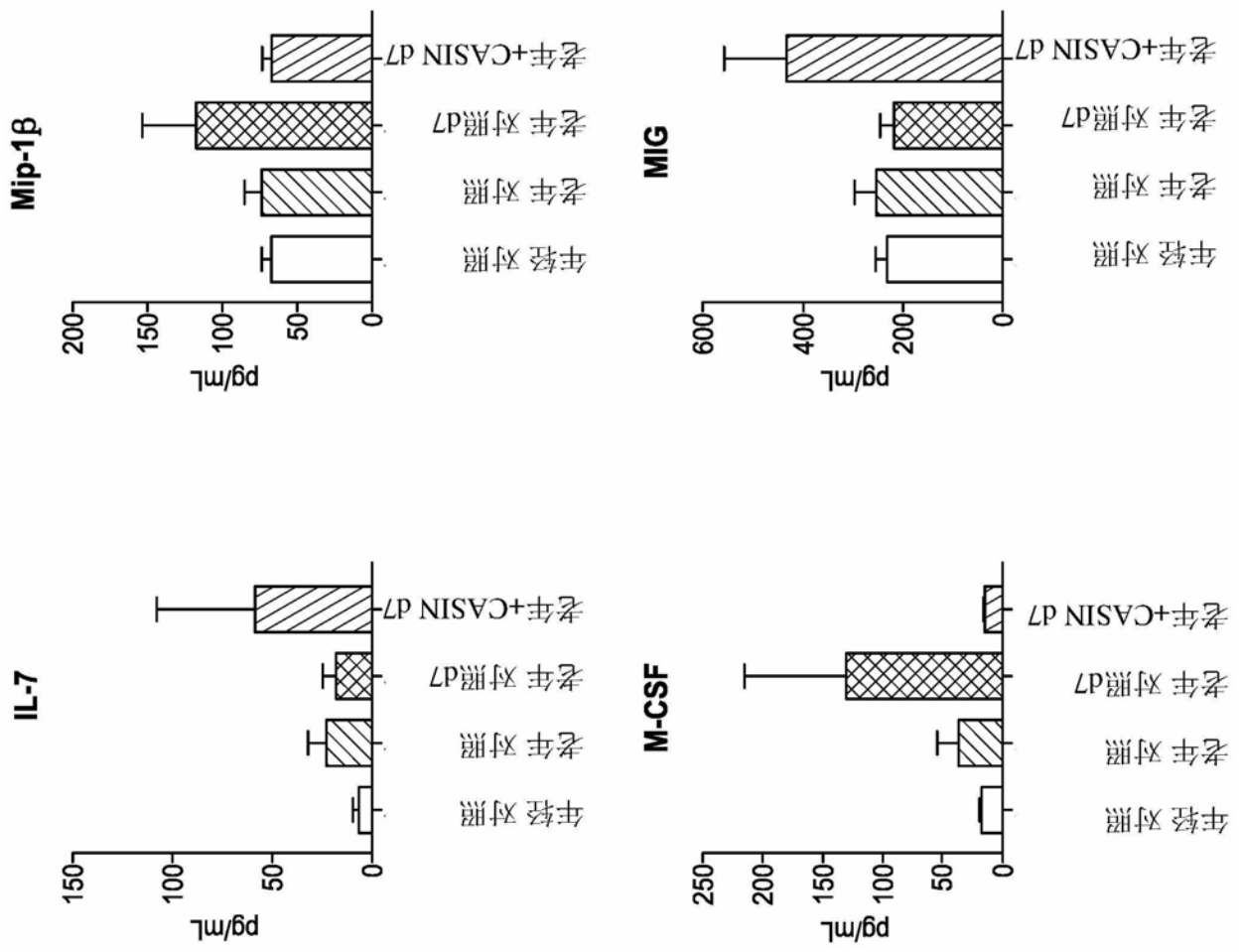

Mip-1β
pg/mL
0
50
100
150
200
年轻 对照
老年 对照
老年 对照d7
老年+CASIN d7
MIG
pg/mL
0
200
400
600
年轻 对照
老年 对照
老年 对照d7
老年+CASIN d7
IL-7
pg/mL
0
50
100
150
年轻 对照
老年 对照
老年 对照d7
老年+CASIN d7
M-CSF
pg/mL
0
50
100
150
200
250
年轻 对照
老年 对照
老年 对照d7
老年+CASIN d7

图3(续)

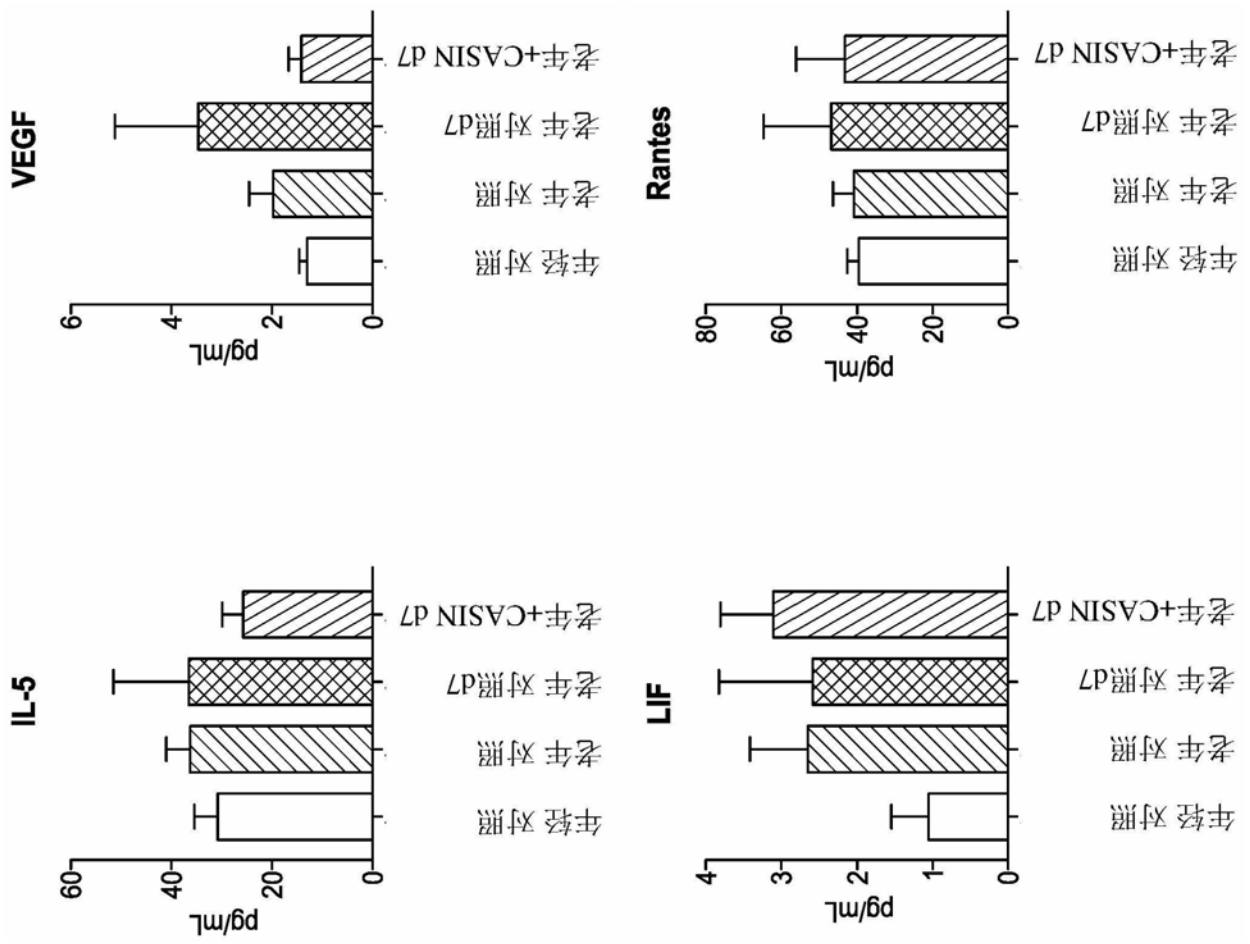

VEGF
pg/mL
0
2
4
6
年轻 对照
老年 对照
老年 对照d7
老年+CASIN d7
Rantes
pg/mL
0
20
40
60
80
年轻 对照
老年 对照
老年 对照d7
老年+CASIN d7
IL-5
pg/mL
0
20
40
60
年轻 对照
老年 对照
老年 对照d7
老年+CASIN d7
LIF
pg/mL
0
1
2
3
4
年轻 对照
老年 对照
老年 对照d7
老年+CASIN d7

图3(续)

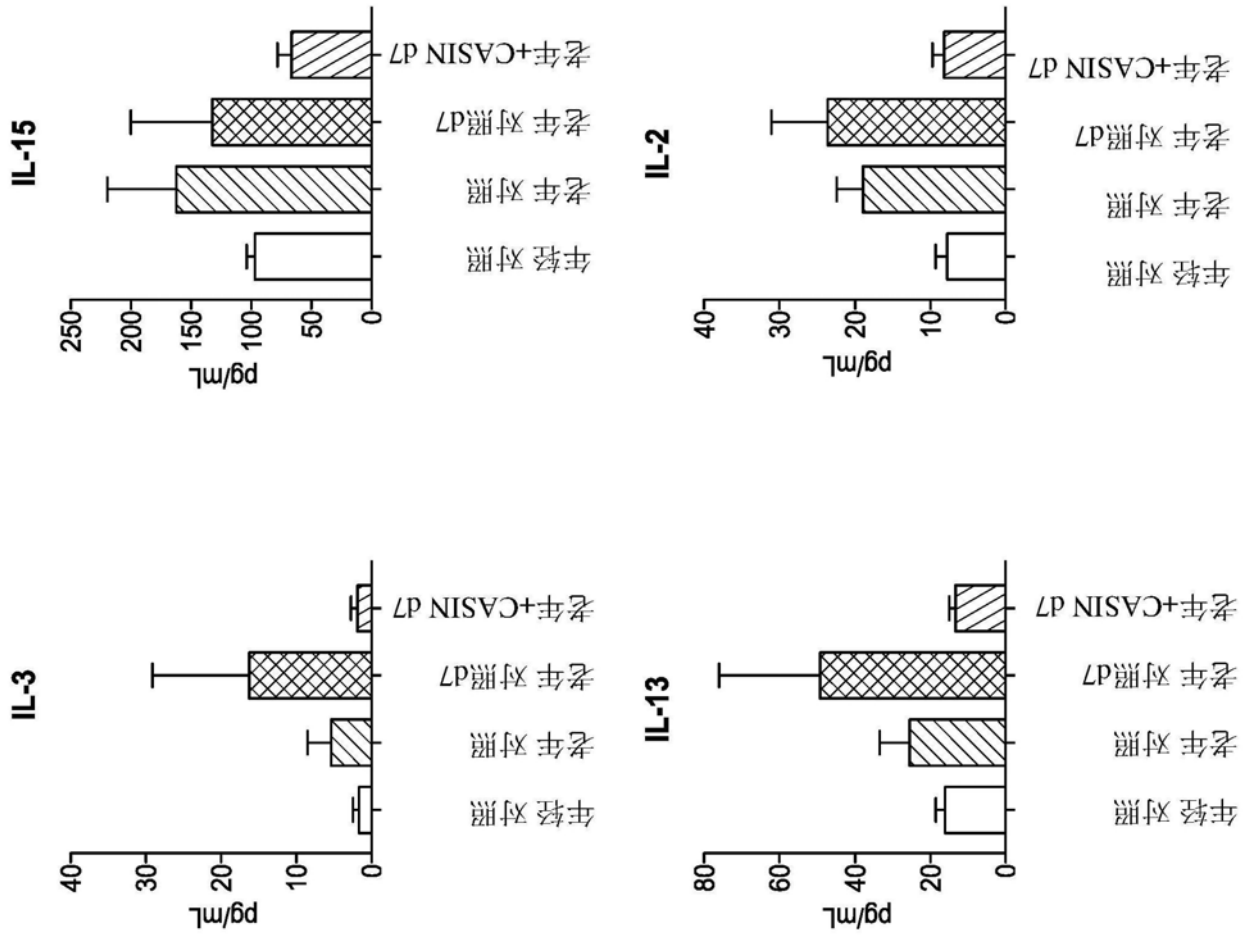


图3(续)

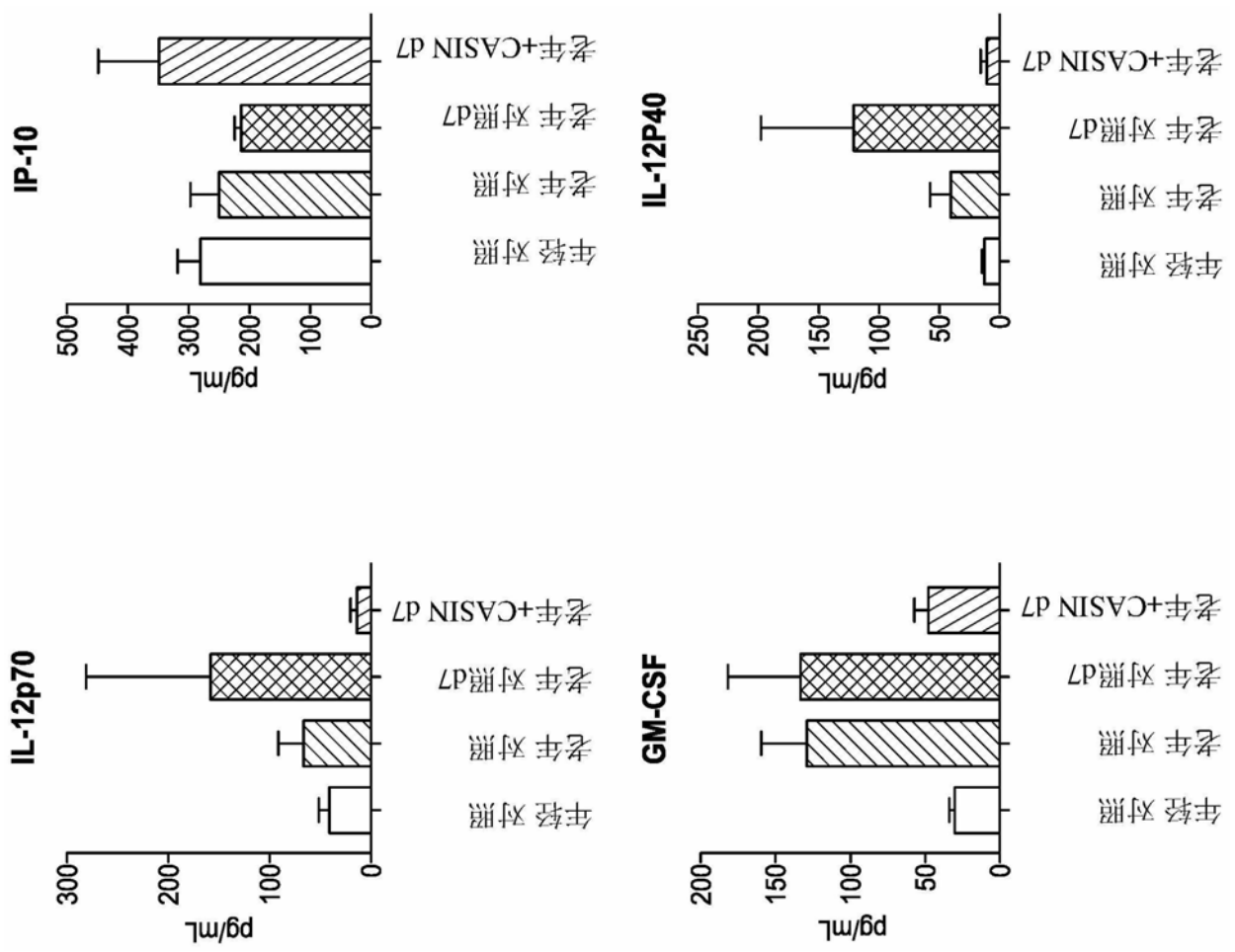

IP-10
pg/mL
0
100
200
300
400
500
年轻 对照
老年 对照
老年 对照d7
老年+CASIN d7
IL-12P40
pg/mL
0
50
100
150
200
250
年轻 对照
老年 对照
老年 对照d7
老年+CASIN d7
IL-12p70
pg/mL
0
100
200
300
年轻 对照
老年 对照
老年 对照d7
老年+CASIN d7
GM-CSF
pg/mL
0
50
100
150
200
年轻 对照
老年 对照
老年 对照d7
老年+CASIN d7

图3(续)

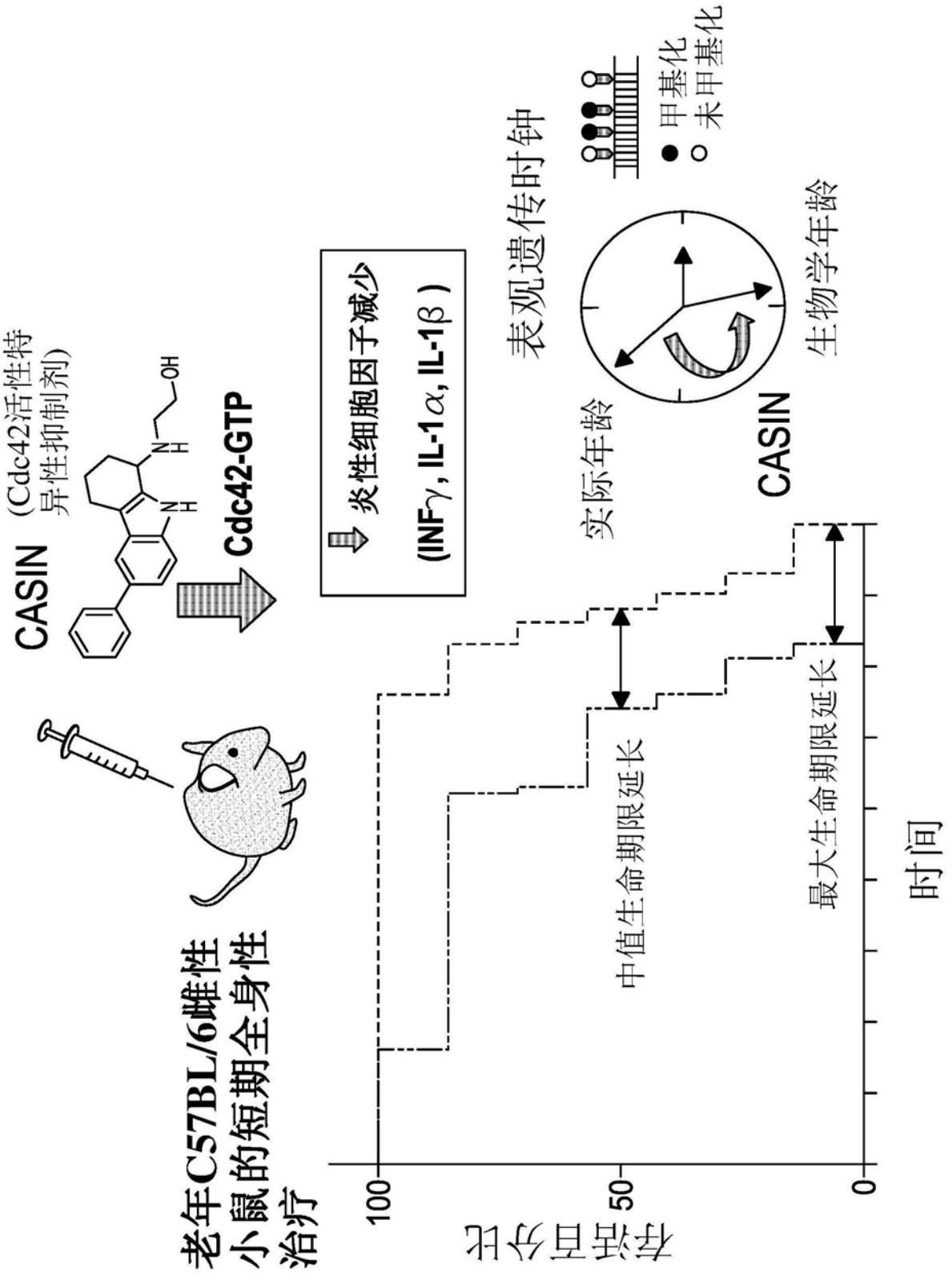

老年C57BL/6雌性
小鼠的短期全身性
治疗
CASIN
(Cdc42活性特
异性抑制剂)
Cdc42-GTP
炎性细胞因子减少
(INFγ, IL-1α, IL-1β)
表观遗传时钟
甲基化
未甲基化
实际年龄
生物学年龄
CASIN
中值生命期限延长
最大生命期限延长
存活百分比
100
50
0
时间

图4

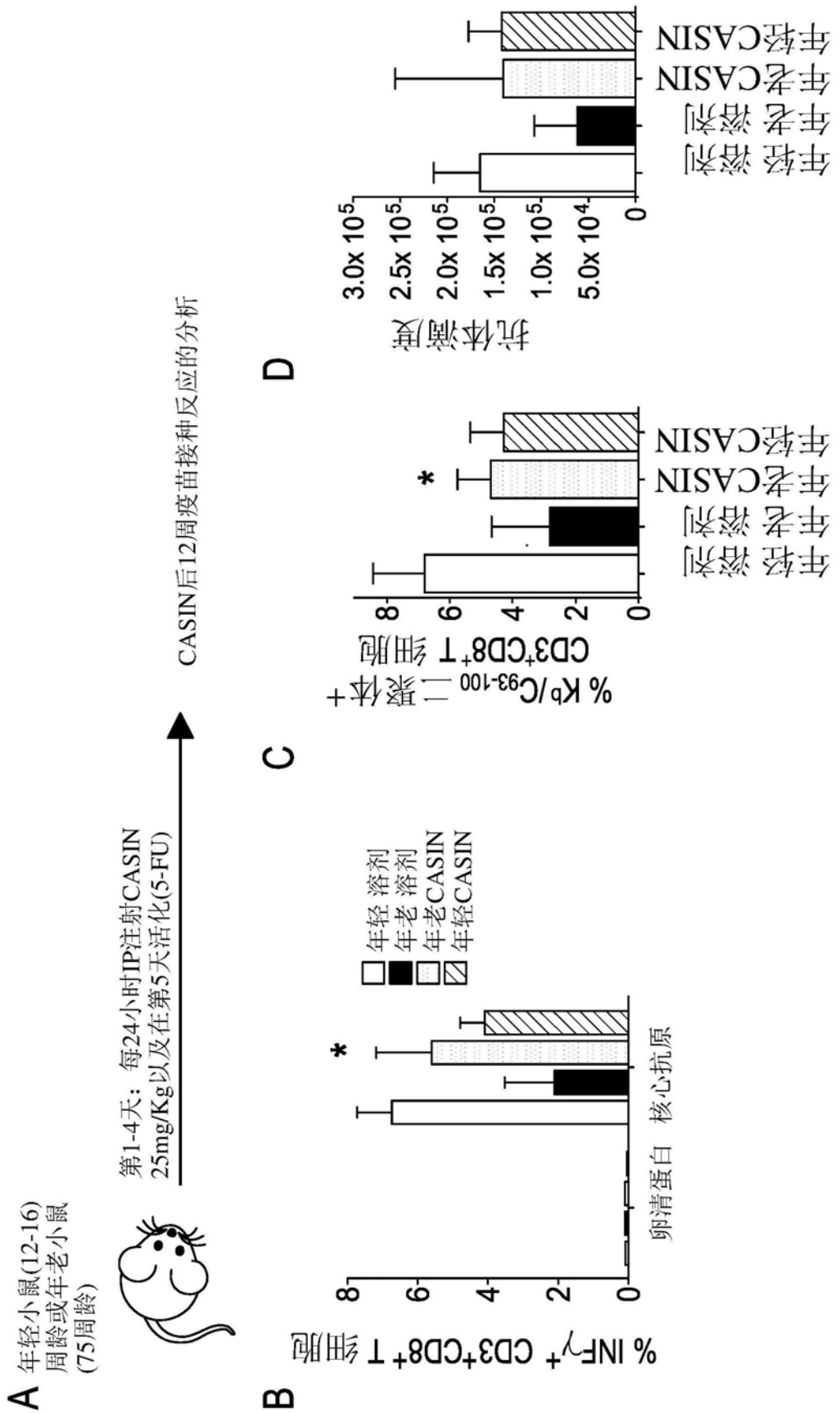

A
年轻小鼠(12-16)
周龄或年老小鼠
(75周龄)
第1-4天：每24小时IP注射CASIN
25mg/Kg以及在第5天活化(5-FU)
CASIN后12周疫苗接种反应的分析
B
% INFγ+ CD3+CD8+ T 细胞
卵清蛋白 核心抗原
年轻 溶剂
年老 溶剂
年老CASIN
年轻CASIN
C
% Kb/C93-100 二聚体+
CD3+CD8+ T 细胞
D
抗体滴度
3.0x 10^5
2.5x 10^5
2.0x 10^5
1.5x 10^5
1.0x 10^5
5.0x 10^4
0

图5