(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 115645534 A
(43)申请公布日 2023.01.31

(21)申请号 202211246255.7
(22)申请日 2016.09.19
(30)优先权数据
62/232,228 2015.09.24 US
(62)分案原申请数据
201680065172.4 2016.09.19
(71)申请人 德雷克塞尔大学
地址 美国宾夕法尼亚州
(72)发明人 C·赛尔 T·拿卡瑞丽 A·阿扎尔
(74)专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245
专利代理师 董志勇
(51)Int.Cl.
A61K 45/00(2006.01)
A61P 17/00(2006.01)

权利要求书2页 说明书30页 附图36页

(54)发明名称

治疗或预防皮肤障碍的新型组合物和方法

(57)摘要

本发明的名称是治疗或预防皮肤障碍的新型组合物和方法。本发明包括用于治疗或预防某些皮肤障碍的组合物和方法,所述皮肤障碍包括皮肤萎缩、假性瘢痕、光化性角化症、脂溢性或光化性角化症、着色斑、局灶性区域皮肤增厚和粗大皱纹。在某些实施方式中,在本发明内有用的组合物包括治疗有效量的mTORC1抑制剂和皮肤病学可接受的运载体。

CN 115645534 A

1.治疗或预防有需要的哺乳动物对象中年龄相关的皮肤障碍的方法,所述方法包括给所述对象外部施用包括治疗有效量的mTORC1抑制剂,或其盐、溶剂化物、对映异构体或非对映异构体的组合物,其中所述年龄相关的皮肤障碍是选自皮肤萎缩、脂溢性或光化性角化症、假性瘢痕、着色斑、局灶性区域皮肤增厚和粗大皱纹中的至少一种。

2.权利要求1所述的方法,其中所述mTORC1抑制剂是选自BEZ235、雷帕霉素、依维莫司、AZD8055、替西罗莫司、KU-0063794、PI-103、拓克尼布、他克莫司、地磷莫司、INK-128、沃他利塞、Torin-1、奥米利塞、OSI-027、PF-04691502、阿哌利塞、GSK1059615、WYE-354、吉达利塞、AZD-2014、Torin-2、WYE-125132、BGT226、Palomid-529、PP121、WYE-687、CH5132799、Way-600、ETP-46464、GDC-0349、XL388和佐他莫司,或其盐、溶剂化物、对映异构体或非对映异构体中的至少一种。

3.权利要求1所述的方法,其中所述mTORC1抑制剂是选自雷帕霉素、地磷莫司和依维莫司,或其盐、溶剂化物、对映异构体或非对映异构体中的至少一种。

4.权利要求1所述的方法,其中所述mTORC1抑制剂是雷帕霉素,或其盐、溶剂化物、对映异构体或非对映异构体。

5.权利要求1所述的方法,其中所述对象是人。

6.权利要求1所述的方法,其中所述组合物包括按重量计大约0.001-1%的所述mTORC1抑制剂,或其盐、溶剂化物、对映异构体或非对映异构体。

7.权利要求6所述的方法,其中所述mTORC1抑制剂是雷帕霉素,或其盐、溶剂化物、对映异构体或非对映异构体。

8.权利要求1所述的方法,其中所述组合物进一步包括皮肤病学可接受的运载体。

9.权利要求8所述的方法,其中所述皮肤病学可接受的运载体是选自溶剂、润滑剂、皮肤缓和剂、乳化剂、润肤剂、增稠蜡、软化剂、香料、防腐剂和人工色素中的至少一种。

10.权利要求8所述的方法,其中所述皮肤病学可接受的运载体包括凡士林。

11.增加哺乳动物成纤维细胞的寿命的方法,所述方法包括将所述成纤维细胞与包括有效量的mTORC1抑制剂,或其盐、溶剂化物、对映异构体或非对映异构体的组合物接触。

12.保留哺乳动物成纤维细胞的细胞组织的方法,所述方法包括将所述成纤维细胞与包括有效量的mTORC1抑制剂,或其盐、溶剂化物、对映异构体或非对映异构体的组合物接触。

13.阻止或最小化哺乳动物成纤维细胞的老化的方法,所述方法包括将所述成纤维细胞与包括有效量的mTORC1抑制剂,或其盐、溶剂化物、对映异构体或非对映异构体的组合物接触。

14.权利要求11-13中任一项所述的方法,其中所述mTORC1抑制剂是选自BEZ235、雷帕霉素、依维莫司、AZD8055、替西罗莫司、KU-0063794、PI-103、拓克尼布、他克莫司、地磷莫司、INK-128、沃他利塞、Torin-1、奥米利塞、OSI-027、PF-04691502、阿哌利塞、GSK1059615、WYE-354、吉达利塞、AZD-2014、Torin-2、WYE-125132、BGT226、Palomid-529、PP121、WYE-687、CH5132799、Way-600、ETP-46464、GDC-0349、XL388和佐他莫司,或其盐、溶剂化物、对映异构体或非对映异构体中的至少一种。

15.权利要求11-13中任一项所述的方法,其中所述mTORC1抑制剂包括雷帕霉素,或其盐、溶剂化物、对映异构体或非对映异构体。

16.权利要求11-13中任一项所述的方法,其中所述成纤维细胞是皮肤成纤维细胞。

17.权利要求16所述的方法,其中所述皮肤成纤维细胞是在体内并且是哺乳动物对象皮肤的一部分。

18.权利要求11-13中任一项所述的方法,其中所述组合物被外部应用至所述对象的皮肤。

19.治疗或预防有需要的哺乳动物对象中年龄相关的皮肤障碍的试剂盒,所述试剂盒包括:包括治疗有效量的mTORC1抑制剂或其盐、溶剂化物、对映异构体或非对映异构体的组合物,敷料器,和用于将所述组合物外部施用至所述对象的说明书,其中所述皮肤障碍是选自皮肤萎缩、假性瘢痕、脂溢性或光化性角化症、着色斑、局灶性区域皮肤增厚和粗大皱纹中的至少一种。

20.权利要求19所述的试剂盒,其中所述mTORC1是雷帕霉素,或其盐、溶剂化物、对映异构体或非对映异构体。

治疗或预防皮肤障碍的新型组合物和方法

[0001] 本申请是分案申请,原申请的申请日为2016年9月19日、申请号为2016800651724、发明名称为“治疗或预防皮肤障碍的新型组合物和方法”。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请根据35U.S.C.§119(e)要求了2015年9月24日提交的美国临时专利申请号62/232,228的优先权,其通过引用以其全部被并入本文。

[0004] 关于联邦赞助的研究或研发的声明

[0005] 本申请在由国家衰老研究所/国家卫生研究院授予的基金号AG039799下政府支持完 成。政府在本发明中具有某些权利。

背景技术

[0006] 皮肤的衰老是衰老过程的最显著特征,其由多种因素比如内在衰老过程和UV光暴露 引起。年龄相关的皮肤障碍包括例如皮肤萎缩、光化性角化症、假性瘢痕(pseudoscars)、着色斑、局灶性区域皮肤增厚(focal areas of dermal thickening)和粗大皱纹(coarse wrinkle)。

[0007] 皮肤萎缩,也被称为皮萎缩或萎缩,是由于皮下组织减少而显现皮肤变薄或压抑的障 碍。皮肤萎缩是老年人群中的主要临床问题。皮肤完整性的损失导致皮肤增加的脆性并且 在许多情况下妨碍静脉置管(intravenous line)的使用。创伤愈合中的损害是皮肤完整性减小 的重要临床后遗症,导致在伤害之后感染和并发症的数目的增加。假性瘢痕是在老年个体 中自发地出现的星形病变,其可以以高龄和早老形式出现。这些病变可以发现于超过70 岁的患者的20%中。着色斑(或雀斑)是着色过度的区域,其随着年龄出现并且可以代表恶 性小痣和黑素瘤的前期病变。它们可以随着年龄增加并且在中年和老年个体中变得普遍。脂溢性或光化性角化症,其包括表皮增厚的焦斑面积,可以发生,可能代表对损害的反应。类似地,粗大皱纹被认为起因于损害反应。当前,用于年龄相关的皮肤萎缩和年龄相关的 障碍的疗法包括皮下透明质酸注射、肉毒杆菌毒素的注射或抗氧化剂的外部应用,所述抗 氧化剂比如维生素C、绿茶提取物和辅酶Q,但是这些药剂不能完全地治疗这些病症。

[0008] 细胞老化是由在暴露于几种创伤时由哺乳动物细胞激活的应激反应,所述创伤比如氧 化应激、基因毒应激、端粒消减或异常的有丝分裂信号传导。这些应激通过触发两种途径 激活老化反应:p53/$p21^{CIP1/WAF1}$和$p16^{INK4A}$/Rb途径,其对于建立和维持老化反应是需要的。诱发老化的刺激物可以引起DNA损伤并触发持续的DNA损伤反应(DDR):响应于持续的、未解决的DNA损伤,共济失调性毛细血管扩张突变(ATM)激酶激活p53和其转录目标 $p21^{CIP1/WAF1}$,其通过抑制细胞周期依赖性激酶停滞细胞增殖。此外,相同的诱发老化的刺 激物可以触发与DNA损伤无关的应激激活蛋白激酶p38 MAPK的激活。p38 MAPK然后 可以通过激活转录因子HBP1(其增加$p16^{INK4A}$的表达)促进细胞周期的停滞和建立老化。这两种途径看起来利用不同的动力学建立老化:DDR途径通常通过增加$p21^{CIP1/WAF1}$的水 平介导最初停滞,并且仅在稍后的时间,通过$p16^{INK4A}$的表达加强老化。而且,p53和p38 MAPK途径似乎主要彼此独

立并且因而是冗余的,即使在它们之间可能存在交叉对话。

[0009] 雷帕霉素(mTOR)的哺乳动物/机制性靶标是细胞内蛋白质复合物,其响应于生长因子 和营养物可用性二者,并且其还影响线粒体功能。其由TOR激酶(最初在酵母中被鉴定, 并且在哺乳动物中被称为mTOR)、辅助蛋白和下游介体组成,所述下游介体包括核糖体S6激酶(p70S6K)(TOR的关键下游靶标)。TOR信号传导途径在真核生物中是高度保守的 并且在功能上被限定为高度特异性抗真菌剂雷帕霉素的靶标。

[0010] 包括核心mTOR复合物的蛋白质是ser-thr激酶mTOR,其也被称为FKBP-12-雷帕霉素相关蛋白(FRAP1),和具有SEC13蛋白8(mLST8)的哺乳动物致死因子。这些核心组分 具有形成两种复合物mTORC1或mTORC2的任一种的能力,这两种复合物可以通过它们 对雷帕霉素的敏感性区别。雷帕霉素敏感性mTORC1包含支架蛋白mTOR的调控相关蛋 白(Raptor),而雷帕霉素敏感性复合物mTORC2包含支架蛋白mTOR的雷帕霉素敏感性伴 侣(Rictor)。这些支架的功能是引导mTORC1和mTORC2至它们各自的靶标。额外组分对 于每种复合物是唯一的。例如,富含脯氨酸的Akt/PKB底物40KDa(PRAS40)是与mTORC1 缔合的抑制蛋白,而应激激活的MAP激酶相互作用蛋白1(Sin1)和利用Rictor-1(proctor) 蛋白观察到的蛋白质与mTORC2缔合。归因于mTOR复合物的主要功能是细胞增殖和细 胞生长的促进。

[0011] 因而,在本领域中存在对于新型组合物和方法的需要,所述新型组合物和方法可以被 用于治疗或预防有需要的哺乳动物对象比如人中的某些年龄相关的皮肤病症。本发明满足 了这种需要。

发明内容

[0012] 本发明提供了治疗或预防有需要的哺乳动物对象中的年龄相关的皮肤障碍的方法。本 发明进一步提供了增加哺乳动物成纤维细胞的寿命的方法。本发明进一步提供了保留哺乳 动物成纤维细胞的细胞组织的方法。本发明进一步提供了阻止或最小化哺乳动物成纤维细 胞的老化的方法。本发明进一步提供了用于治疗或预防有需要的哺乳动物对象中的年龄相 关的皮肤障碍的试剂盒。

[0013] 在某些实施方式中,方法包括给对象外部施用组合物,该组合物包括治疗有效量的 mTORC1抑制剂或其盐、溶剂化物、对映异构体或非对映异构体。

[0014] 在某些实施方式中,方法包括将成纤维细胞与组合物接触,该组合物包括治疗有效量 的mTORC1抑制剂或其盐、溶剂化物、对映异构体或非对映异构体。

[0015] 在某些实施方式中,年龄相关的皮肤障碍是选自皮肤萎缩、脂溢性或光化性角化症、假性瘢痕、着色斑、局灶性区域皮肤增厚和粗大皱纹中的至少一种。

[0016] 在某些实施方式中,mTORC1抑制剂是选自BEZ235、雷帕霉素、依维莫司(everolimus)、 AZD8055、替西罗莫司(Temsirolimus)、KU-0063794、PI-103、拓克尼布(Torkinib)、他克莫 司(Tacrolimus)、地磷莫司(Ridaforolimus)、INK-128、沃他利塞(Voxtalisib)、Torin-1、奥米 利塞(Omipalisib)、OSI-027、PF-04691502、阿哌利塞(Apitolisib)、GSK1059615、WYE-354、 吉达利塞(Gedatolisib)、AZD-2014、Torin-2、WYE-125132、BGT226、Palomid-529、PP121、 WYE-687、CH5132799、Way-600、ETP-46464、GDC-0349、XL388和佐他莫司(Zotarolimus), 或其盐、溶剂化物、对映异构体或非对映异构体中的至少一种。在其它实施方式中,mTORC1 抑制剂是选自雷帕霉素、地磷莫司和依维莫司,或

其盐、溶剂化物、对映异构体或非对映 异构体中的至少一种。在又其它实施方式中，mTORC1是雷帕霉素，或其盐、溶剂化物、 对映异构体或非对映异构体。

[0017] 在某些实施方式中，对象是人。在其它实施方式中，组合物被外部应用至对象的皮肤。

[0018] 在某些实施方式中，组合物包括按重量计大约0.001-1％的mTORC1抑制剂，或其盐、 溶剂化物、对映异构体或非对映异构体。在其它实施方式中，mTORC1抑制剂是雷帕霉素， 或其盐、溶剂化物、对映异构体或非对映异构体。在又其它实施方式中，组合物进一步包 括皮肤病学可接受的运载体。在又其它实施方式中，皮肤病学可接受的运载体是选自溶剂、 润滑剂、皮肤缓和剂、乳化剂、润肤剂、增稠蜡、软化剂、香料、防腐剂和人工色素中的至少一种。在又其它实施方式中，皮肤病学可接受的运载体包括凡士林。

[0019] 在某些实施方式中，成纤维细胞是皮肤成纤维细胞。在其它实施方式中，皮肤成纤维 细胞在体内并且是哺乳动物对象皮肤的一部分。

[0020] 在某些实施方式中，试剂盒包括组合物，该组合物包括治疗有效量的 mTORC1抑制剂，或其盐、溶剂化物、对映异构体或非对映异构体。在其它实施方式中， 试剂盒进一步包括敷料器。在又其它实施方式中，试剂盒进一步包括用于外部施用组合物 至对象的说明书。

附图说明

[0021] 为了阐明本发明的目的，在附图中描绘了本发明的某些实施方式。但是，本发明不限 于在附图中描绘的实施方式的精确布置和手段。

[0022] 图1A-1I是图解线粒体参数响应于NRTI和雷帕霉素的改变的一组图。人心肌成纤维 细胞在有或没有雷帕霉素(1nM)的情况下被维持。在暴露于NRTI 7天之后，检查线粒体状 态和功能的参数。灰色条表示在标准培养条件下维持的细胞并且黑色条表示在存在雷帕霉 素的情况下维持的细胞。图1A是图解通过四甲基罗丹明乙酯、高氯酸盐(TMRE)染色评估 的线粒体膜电势的条形图。图1B是图解线粒体ROS水平的条形图。图1C是图解线粒体 质量的条形图。图1D是图解总细胞ROS的条形图。图1E是图解在添加线粒体抑制剂寡 霉素、羰基氰对三氟甲氧基苯腙(FCCP)或鱼藤酮与抗霉素A的组合之后，耗氧量/细胞随 时间变化的曲线图。图1F是图解计算的基础呼吸速率的条形图。图1G是图解计算的最大 呼吸速率的条形图。图1H是图解计算的与ATP关联的呼吸速率的条形图。图1I是图解计 算的质子泄漏速率的条形图。每个测量表示一式三份培养物的最小值并且所有测量在具有 类似结果的情况下最少重复2次。用星号标注的条表示在$P<0.05$下显著地不同于相对对照 值的值并且用#标注的条表示在相同处理组(对照或暴露于NRTI)内雷帕霉素处理的和未处 理的细胞之间显著不同的值。

[0023] 图2A-2H图解电子传递链亚基和线粒体蛋白的稳态水平。图2A描绘指示的电子传递 链(ETC)蛋白连同线粒体外膜蛋白电压依赖性阴离子通道(VDAC)的稳态水平，其通过免疫 印迹在暴露于NRTI的心肌成纤维细胞中评估。图2B描绘Pink1、Pink1裂解产物和Parkin的稳态水平。图2C描绘p62和肌动蛋白的稳态水平。图2D描绘在NADH脱氢酶(泛醌)1 β亚复合物8(NDUFB8)(复合物1)中包含的ETC亚基的mRNA水平的nanostring分析的 结果。图2E描绘在泛醇-细胞色素c还原酶核心蛋白II(UQCRC2)(复合物3)中包含的ETC 亚基的mRNA水平

的nanostring分析的结果。图2F描绘在琥珀酸脱氢酶(泛醌)铁硫亚基 (SDHB)(复合物2)中包含的ETC亚基的mRNA水平的nanostring分析的结果。图2G描绘 在细胞色素c氧化酶亚基I(mt-Co1)(复合物4)中包含的ETC亚基的mRNA水平的 nanostring分析的结果。图2H描绘在ATP5A1(复合物5)中包含的ETC亚基的mRNA水平 的nanostring分析的结果。每个免疫印迹表示具有类似结果的最少两个独立实验。灰色条 表示来自对照培养物的数据,而黑色条表示来自雷帕霉素处理的培养物的数据。用星号标 注的条表示在P<0.05下显著地不同于相对对照值的值并且用#标注的条表示在相同处理组 (对照或暴露于NRTI)内雷帕霉素处理的和未处理的细胞之间显著不同的值。Nanostring结 果代表2个独立实验。

[0024] 图3A-3F图解如下发现:NRTI暴露诱发老化反应,其通过雷帕霉素阻止。人心肌成纤维细胞在暴露于NRTI持续7天之后在有或没有雷帕霉素(1nM)的情况下被维持。检查 老化的标记。图3A图解来自人心肌成纤维细胞的数据,其示出了已知为在老化反应期间 改变的p16、p21、p53、核纤层蛋白B1和IL-6的稳态水平。肌动蛋白水平作为加样对照 存在。图3B是图解对SA-β半乳糖苷酶活性的细胞染色阳性的百分比的条形图。图3C是 图解在暴露于NRTI的细胞中由nanostring分析测定的p21的稳态mRNA水平的条形图。 图3D是图解在暴露于NRTI的细胞中由nanostring分析测定的核纤层蛋白B1的稳态mRNA 水平的条形图。图3E是图解p21的比较分析的条形图,将早期传代细胞与已经经历复制 老化的细胞以及在包含雷帕霉素的介质中维持(使得寿命延长)的细胞进行比较。图3F是核 纤层蛋白B1的比较分析的条形图,将早期传代细胞与已经经历复制老化的细胞以及在包 含雷帕霉素的介质中维持(使得寿命延长)的细胞进行比较。灰色条表示在标准培养条件下 维持的细胞并且黑色条表示在存在雷帕霉素的情况下维持的细胞。用星号标注的条表示在 P<0.05下显著地不同于相对对照值的值并且用#标注的条表示在相同处理组(对照或暴露于 NRTI)内雷帕霉素处理的和未处理的细胞之间显著不同的值。

[0025] 图4A-4E图解如下发现:ROS清除剂阻止在暴露于NRTI的细胞中老化标记的表达。人心肌成纤维细胞在暴露于NRTI期间利用线粒体ROS清除剂mito-Q处理。图4A描绘已 知为在老化反应期间改变的p16、p21、p53和核纤层蛋白B1的稳态水平。图4B是图解对 溶酶体SA-β半乳糖苷酶活性的细胞染色阳性的百分比的条形图。图4C描绘免疫印迹分析 的结果,其示出了在人心肌成纤维细胞在暴露于NRTI期间被表达mt-过氧化氢酶蛋白的腺 病毒载体或空载体感染之后,已知为在老化反应期间改变的p16、p21、p53、肌动蛋白和 过氧化氢酶的稳态水平。免疫印迹表示具有类似结果的最少两个独立实验。图4D是图解 在人心肌成纤维细胞在暴露于NRTI期间被表达mt-过氧化氢酶蛋白的腺病毒载体或空载 体感染之后,对溶酶体SA-β半乳糖苷酶活性的细胞染色阳性的百分比的条形图。图4E描 绘与老化相关联的p16、p21和核纤层蛋白B1的稳态水平。灰色条表示在标准培养条件下 维持的细胞并且黑色条表示在存在雷帕霉素的情况下维持的细胞。用星号标注的条表示在 P<0.05下显著地不同于相对对照值的值并且用#标注的条表示在相同处理组(对照或暴露于 NRTI)内雷帕霉素处理的和未处理的细胞之间显著不同的值。

[0026] 图5A-5D图解响应于NRTI暴露的核糖体S6蛋白和MDM2的磷酸化。图5A描绘响 应于NRTI暴露的核糖体S6蛋白和MDM2的磷酸化状态,其通过免疫印迹分析在人心肌 成纤维细胞中评估。来自在标准培养条件下维持的培养物的提取物在左边3个泳道中示出, 而在存在1nM雷帕霉素的情况下维持的培养物在2个右边泳道(line)中示出。在对照培养 的情况

下使培养物暴露于10或20μM NRTI持续7天,而雷帕霉素处理的培养物暴露于20 μM NRTI持续7天。图5B描绘在细胞暴露于NRTI持续7天,接着利用靶向p70 S6激酶 (PF-4708671)或MEK1/2(U0126)的特异性激酶抑制剂培育最后2小时之后,核糖体S6蛋 白和MDM2的磷酸化状态。图5C描绘在细胞暴露于NRTI持续7天,接着利用靶向MEK1/2 (U0126)、Raf(GW5047)或p90RSK(BI-D1870)的特异性激酶抑制剂培育最后2小时之后, 核糖体S6蛋白和MDM2的磷酸化状态。额外组的培养物在暴露于NRTI期间利用自由基 清除剂Trolox和N-乙酰半胱氨酸组合处理。图5D描绘在细胞在暴露于NRTI期间利用特 异性p38 MAPK抑制剂(SB203580)处理之后,核糖体S6蛋白和MDM2的磷酸化状态。除 了图5D以外,每个免疫印迹表示具有类似结果的最少两个独立实验。每个免疫印迹在肌 动蛋白作为加样对照的情况下被示出。

[0027] 图6A-6G图解响应于NRTI,Mito-Q和mt-过氧化氢酶对核糖体S6和MDM2磷酸化 以及线粒体活性的作用。图6A描绘在mito-Q或失活运载体硫胺素焦磷酸(TPP)的存在下 培养(持续NRTI暴露的时间段)的心肌成纤维细胞中核糖体S6蛋白和MDM2的磷酸化状 态的免疫印迹分析。图6B描绘在NRTI暴露之前在心肌成纤维细胞中核糖体S6蛋白和 MDM2的磷酸化的免疫印迹分析,所述心肌成纤维细胞被包埋表达mt-过氧化氢酶的构建 体的腺病毒颗粒或空病毒载体感染。每个免疫印迹表示具有类似结果的最少两个独立实验 并且在肌动蛋白作为加样对照的情况下被示出。图6C是Seahorse Bioanalyzer分析,其图 解在暴露于NRTI期间心肌成纤维细胞利用mito-Q或TPP处理之后的计算的基础呼吸速 率。图6D是Seahorse Bioanalyzer分析,其图解在暴露于NRTI期间心肌成纤维细胞利用 mito-Q或TPP处理之后的计算的最大呼吸速率。图6E是Seahorse Bioanalyzer分析,其图 解在暴露于NRTI期间心肌成纤维细胞利用mito-Q或TPP处理之后的计算的ATP关联的 呼吸速率。图6F是Seahorse Bioanalyzer分析,其图解在暴露于NRTI期间心肌成纤维细 胞利用mito-Q或TPP处理之后的计算的质子泄漏速率。图6G是图解线粒体ROS的平均 荧光强度的条形图。用星号标注的条表示在P<0.05下显著地不同于相对对照值的值并且用 #标注的条表示在相同处理组(对照或暴露于NRTI)内TPP和mito-Q处理的细胞之间显著不 同的值。

[0028] 图7A-7B图解响应于氧化应激的核糖体S6蛋白和MDM2的磷酸化状态。图7A描绘 在除去血清的心肌成纤维细胞暴露于增加浓度的过氧化氢持续2小时之后,核糖体S6蛋 白和MDM2的磷酸化状态。血清刺激的培养物包含在右边泳道中,作为核糖体S6磷酸化 的生长因子刺激的阳性对照。图7B描绘在暴露于指定浓度的鱼藤酮持续16小时的细胞中 核糖体S6蛋白的磷酸化状态。除去血清的心肌成纤维细胞被暴露于在1至50nM范围内 浓度的鱼藤酮。肌动蛋白的稳态水平作为相等蛋白加样的对照存在。

[0029] 图8A-8C图解在NRTI的存在下Raptor相对于线粒体的定位。图8A是图解被包埋表达构建体的腺病毒构建体感染的细胞的一组图像,该表达构建体产生融合至线粒体引导肽的GFP蛋白(绿色)。将这些细胞固定和利用识别Raptor的抗体染色(红色),并且利用4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)复染以显现DNA(蓝色)。图8B是对照成纤维细胞(未暴露于NRTI)的代表性共焦图像,其图解在暴露于NRTI持续7天之后表达线粒体GFP的成纤维细胞中 的共定位事件。图8C是图解通过共焦和去褶合显微术二者测定的共定位事件的定量的条 形图。用星号标注的条表示在P<0.05下显著地不同于相对对照值的值并且用#标注的条表 示在相同处理组(对照或暴露于NRTI)内雷帕霉素处理的和未处理的细胞之间显著不同的值。共定位实验由四个独立的评估者经由检查Raptor和mt-GFP共定位的一系列实验通过

共焦显微术和去褶合显微术二者执行。定量数据使用去褶合显微术由计数生成。

[0030] 图9A-9I图解如下发现:成纤维细胞表现老化提高的线粒体ROS和增强的核糖体S6蛋白和MDM2的磷酸化。图9A是图解在早期传代和老化的心肌成纤维细胞中线粒体ROS 的水平的条形图。图9B是图解在早期传代和老化的心肌成纤维细胞中总细胞ROS的水平 的条形图。灰色条表示在标准培养条件下维持的细胞并且黑色条表示在存在1nM雷帕霉 素的情况下维持的细胞。图9C是图解在添加线粒体抑制剂寡霉素、FCCP或鱼藤酮与抗霉 素A的组合之后归一化为细胞数目的氧消耗速率作为时间的函数的图。图9D是图解人心 肌成纤维细胞中线粒体功能的基础呼吸的Seahorse Bioanalyzer分析。图9E是图解人心肌 成纤维细胞中线粒体功能的最大呼吸的Seahorse Bioanalyzer分析。图9F是图解人心肌成 纤维细胞中线粒体功能的ATP关联的呼吸的Seahorse Bioanalyzer分析。图9G是图解人心 肌成纤维细胞中线粒体功能的质子泄漏的Seahorse Bioanalyzer分析。图9H描绘在增加的 群体加倍下衍生自细胞的蛋白溶解产物,其针对老化标记p21和p16以及核糖体S6和 MDM2蛋白的磷酸化形式探测。图9I描绘在完全老化的培养物利用ROS清除剂Trolox和 N-乙酰半胱氨酸(p90RSK抑制剂BI-D1870)处理,或者被包埋表达mt-过氧化氢酶蛋白的 构建体的腺病毒颗粒或空载体对照感染之后,针对核糖体S6蛋白和MDM2的磷酸化状态 探测的蛋白溶解产物。用星号标注的条表示在P<0.05下显著地不同于相对对照值的值,并 且用#标注的条表示相同处理组(对照或暴露于NRTI)的值。

[0031] 图10是生成生长反应或老化停滞的多种信号的mTORC1整合的模型的示意图。如本文所证明的,至mTORC1的额外输入以细胞氧化还原态和线粒体功能的形式存在,其可以 重定向mTORC1以通过MDM2和p53活性的p70 S6激酶介导的调节支持老化生长停滞。这些联系以红色示出(mTORC1→p7056K—|MDM2—|p53→稳定化→p53→老化)。

[0032] 图11A-11F图解在暴露于NRTI的人心肌成纤维细胞培养物中和在雷帕霉素处理的培 养物中p53的状态。图11A是图解暴露于NRTI或过氧化氢(其作为阳性对照)的细胞的彗星试验结果的条形图。白色条表示对照数据;灰色条表示来自暴露于10或20μg/ml NRTI 持续7天的细胞的数据;和黑色条表示来自暴露于200μM过氧化氢持续2小时的细胞的 数据。星号表示在P<0.05下显著地不同于相对对照值的值。图11B描绘使用针对p53的 抗体的免疫沉淀实验的结果。来自对照和雷帕霉素处理的培养物的细胞溶解产物,有或没 有NRTI暴露持续7天,经历使用抗p53抗体的免疫沉淀,接着针对MDM2并且随后针对 p53的免疫印迹分析。图11C描绘在用于图11A中的免疫沉淀的样品中p53、MDM2和磷 酸化MDM2的水平。图11D描绘在对照和雷帕霉素处理的培养物暴露于NRTI持续7天, 接着利用MG132培育2小时以抑制蛋白酶体活性之后的p53的水平。修饰的p53指的是 由抗p53抗体识别的较高分子量形式。图11E是图解在不暴露于NRTI的情况下MDM2的 胞质水平的图像和图解在暴露于NRTI的情况下MDM2的胞质水平的图像。细胞的代表性 显微照片针对MDM2染色(红色)和针对DNA复染(蓝色)。图11F是图解通过Image J Analysis测定的胞质MDM2染色的相对强度的条形图。

[0033] 图12A-12D是图解Raptor的线粒体关联的一组图像。图12A-12B描绘在对照条件下表达针对Raptor(红色)染色的mt-GFP蛋白(绿色)的细胞的代表性显微照片。图12C-12D 描绘在暴露于NRTI之后,表达针对Raptor染色的mt-GFP蛋白的细胞的代表性显微照片。通过箭头指示共定位事件。

[0034] 图13是图解如下发现的图:雷帕霉素处理提供了人成纤维细胞的寿命延长。人成纤 维细胞在有或没有雷帕霉素(1nM)的培养基中生长。每7天分裂培养物并且每周在相同细 胞数目/cm^2下再接种。正常人成纤维细胞的寿命通过细胞加倍次数计数。雷帕霉素处理的 生长良好,超越这些细胞的正常寿命。

[0035] 图14图解如下发现:雷帕霉素保留在人成纤维细胞的衰老期间的细胞组织。人成纤 维细胞在维持有序生长模式的低剂量雷帕霉素的存在下维持,而未处理的成纤维细胞失去 它们随着年龄适当地定向其自身的能力。组织能力是正常成纤维细胞功能的关键要素并促 进正常组织的组织完整性。随着年龄出现的组织破坏促进功能衰退。

[0036] 图15是图解如下发现的一组图像:雷帕霉素在面对破坏的情况下保留线粒体网络。 图片A描绘表达线粒体中荧光蛋白的人成纤维细胞表现绿色线粒体网络。图片B描绘雷帕 霉素处理的细胞具有正常线粒体网络。图片C描绘线粒体网络通过暴露于线粒体毒素溴化 乙锭(EthBr)而被破坏。图片D描绘雷帕霉素处理的细胞能够在暴露于EthBr之后维持它们 的线粒体网络。

[0037] 图16是图解如下发现的条形图:雷帕霉素增加在线粒体应激之后人成纤维细胞的存 活。人成纤维细胞被暴露于溴化乙锭持续7天并且在那时测量细胞存活。

[0038] 图17是图解如下发现的条形图:雷帕霉素阻止引起老化的基因的表达。p21基因形成 对人成纤维细胞的老化关键的蛋白质。在雷帕霉素的存在下的细胞生长随着它们衰老不产 生p21,而对照细胞表达p21并且进入老化。

[0039] 图18是图解如下发现的条形图:雷帕霉素阻止与炎症相关的基因的表达。IL-6基因形 成激活免疫系统以募集免疫细胞进入组织破坏区域的蛋白质。在雷帕霉素的存在下的细胞 生长随着它们衰老不产生IL-6,而对照细胞表达IL-6并且进入老化。

[0040] 图19是图解如下发现的条形图:雷帕霉素增加萎缩皮肤中的皮肤厚度。在乳化凝胶 制剂中雷帕霉素处理14天之后,在0.001mm的认证精确度下使用Mitoutoyo数显卡尺测量皮肤厚度。

[0041] 图20是在乳化凝胶制剂(与在图19中的相同)中利用10μM雷帕霉素处理21天之前和 之后脂溢性角化症病变的照片。病变严重性的显著降低在目测时是明显的。

具体实施方式

[0042] 在一方面,本发明涉及如下意料之外的发现:本发明的组合物和方法可以被用于治疗 或预防年龄相关的皮肤障碍,包括但不限于皮肤萎缩、脂溢性角化症、光化性角化症、假 性瘢痕、着色斑、局灶性区域皮肤增厚和粗大皱纹。在某些实施方式中,本发明的组合物和方法可用于治疗或预防有需要的对象中的皮肤萎缩。在其它实施方式中,本发明的组合物包括治疗有效量的至少一种mTORC1抑制剂。在又其它实施方式中,本发明的组合物包 括mTORC1抑制剂,其作为对年龄相关的皮肤病症有活性的仅有成分。在又其它实施方式 中,mTORC1抑制剂也是mTORC2抑制剂。

[0043] 本发明的组合物和方法增强成纤维细胞的寿命并且改善正常成纤维细胞的生长和应 激抗性。不希望受任何理论的限制,这可以与炎性细胞因子产生的降低相关联。在某些实 施方式中,将治疗有效量的mTORC1抑制剂递送至皮层诱发影响皮肤稳态的间充质反应。 在其它实施方式中,将治疗有效量的mTORC1抑制剂递送至皮层产生皮肤厚度的增加和

皮 肤功能的改善。

[0044] 如本文所证明的,线粒体ROS被鉴定为mTORC1的新型输入。基于两种荧光指示剂和ROS清除剂的影响,本结果支持如下发现:线粒体生成的ROS用于激活mTORC1(图 10)。这通过在实验环境中观察到的核糖体S6蛋白和MDM2二者的增加磷酸化反映。通过 雷帕霉素抑制mTORC1阻止这些反应,与旨在降低线粒体ROS的干预一样,比如线粒体 靶向的过氧化氢酶的表达或利用ROS清除剂处理。氧消耗作为线粒体活性的量度的分析揭 示了在两种环境(暴露于NRTI的细胞以及在复制老化的那些中)中基础和ATP关联的呼吸 的增加。类似地,在两种环境中,质子泄漏和线粒体ROS产生增加。这些发现暗示了线粒 体ROS的生成充当用于激活mTORC1的触发因素。该解释得到如下事实的支持:设计以 降低线粒体ROS的干预降低了核糖体S6蛋白的磷酸化。

[0045] 在mTORC1/p70S6K活性的线粒体ROS诱导的下游结果方面,MDM2磷酸化好像导 致p53的稳定化和下游靶点比如p21的增加表达。与此一致,p53与MDM2的减少缔合通 过在暴露于NRTI的细胞中的共免疫沉淀和增加的胞质MDM2示出。此外,观察到在暴露 于NRTI的细胞中p53的高分子量形式的减少,而雷帕霉素处理的细胞包含p53的这些高 分子量形式的升高水平,其仅在蛋白酶体的抑制之后可见。雷帕霉素对p53的这种作用可 以支持雷帕霉素处理的细胞中p53靶基因比如p21的激活的缺乏,并且促进延迟的老化, 其在足以影响mTORC1信号传导但是不足以完全阻断增殖的浓度下在雷帕霉素的存在下 培养细胞时观察到。

[0046] 在某些方面,本结果显示了通过p70S6K的mTORC1信号传导可以响应于由线粒体生成的ROS。mTORC1/p70S6K的激活在线粒体功能障碍、复制老化和衰老组织的环境中发 生。雷帕霉素减少线粒体ROS产生并阻断mTORC1/p70S6K反应二者。雷帕霉素的这些作 用支持在雷帕霉素治疗之后,在长寿方面和在年龄相关的障碍比如皮肤萎缩中观察到的有 益效果。

[0047] 定义

[0048] 如本文所使用,下列术语中的任一种具有与其在本章节中相关联的含义。

[0049] 除非另有定义,本文中使用的所有技术和科学术语通常具有与本发明所属领域的普通 技术人员通常理解的相同含义。通常,本文中使用的命名法以及细胞培养、分子遗传学和 化学中的实验室程序是本领域中熟知和通常采用的那些。

[0050] 如本文所用,冠词“一个(a,an)”指的是一个或多于一个(即,至少一个)该冠词的语法 对象。举例而言,“一个要素”意思是一个要素或多个一个要素。

[0051] 如本文所使用,术语“大约”将被本领域普通技术人员理解并且将在其被使用的环境 下在一定程度上改变。如本文所使用,当提及可测量的值比如量、时间段等时,术语“大约”意思是涵盖与该规定值的±20%或±10%、±5%、±1%或±0.1%的变化,因为这些变化适 合于执行公开的方法。

[0052] 如本文所使用,“皮肤病学可接受的运载体”或“皮肤病学可接受的赋形剂”指的是这些组合物或成分:其适合于与人角质组织接触,而没有异常毒性、不相容性、不稳定性、过敏反应等。

[0053] “疾病”是动物的健康状态,其中动物不能维持稳态,并且其中如果疾病得不到改善, 动物的健康继续恶化。动物中的“障碍”是健康状态,其中动物能够维持稳态,但是其中

动物的健康状态与其在没有障碍的情况下相比是不利的。如果不治疗,障碍不一定引起动物健康状态的进一步降低。

[0054] 如本文所使用,术语化合物的“有效量”或“治疗有效量”或“药学有效量”可交换地被用于指足以将有益效果提供给该化合物被施用的对象的化合物量。如本文所使用,术语“治疗”意思是降低患者或对象经历症状的频率,或者施用药剂或化合物以降低经历症状的严重性。在任何个别情况中的适合治疗量可以由本领域普通技术人员使用常规实验确定。

[0055] 如本文所使用,术语“FTC”指的是恩曲他滨(emtricitabine)或其盐或溶剂化物。

[0056] 如本文所使用,“指导材料”包括出版物、记录、图表或任何其它表达介质,该表达介质可以被用于传达本发明的化合物、组合物、分析或方法在用于抑制或降低对象中的全身免疫反应的试剂盒中的有用性。例如,本发明的试剂盒的指导材料可以贴附至包含本发明的鉴定的化合物、组合物、分析或方法的容器或者与包含鉴定的化合物、组合物、分析 或方法的容器一起运送。可选地,指导材料可以与容器分开运送,目的是指导材料与化合 物、组合物、分析或方法被接受者合作地使用。

[0057] 如本文所使用,术语“调节”意思是关于与将本发明的化合物结合至在本发明中考虑 的受体相关联的疾病状态或病症,直接地或间接地产生病症或疾病状态的改善或减轻,所 述病症或疾病状态在施用根据本发明的化合物之前是次佳的并且在一些实施方式中虚弱 并甚至威胁生命。调节可以借助于激动剂活性、拮抗剂活性或混合的激动剂/拮抗剂活性发 生(取决于受体部位)。

[0058] 如本文所使用,术语“NRTI”指的是核苷酸/核苷逆转录酶抑制剂。

[0059] 如本文所使用,术语“药学可接受的”指的是物质比如运载体或稀释剂,其不废除组 合物的生物学活性或性质,并且是相对无毒的,即,该物质可以被施用至个体而不以有毒 方式与该物质被包含在其中的组合物的成分中的任一种引起不期望的生物学作用或相互 作用。

[0060] 如本文所使用,术语“药物组合物”或“组合物”指的是在本发明内有用的至少一种化合物与其它化学成分的混合物,所述其它成分比如运载体、稳定剂、稀释剂、分散剂、 悬浮剂、增稠剂和/或赋形剂。药物组合物促进化合物施用至有机体。本领域中存在多种 施用化合物的技术,包括但不限于:静脉内、口服、气溶胶、肠胃外、眼部、肺部、颅内 和外部施用。在某些实施方式中,施用包括外部施用。

[0061] 如本文所使用,“对象”指的是人或非人哺乳动物。非人哺乳动物包括,例如,家畜和宠物,比如绵羊、牛、猪、犬、猫科和鼠科哺乳动物。在某些实施方式中,对象是人。

[0062] 如本文所使用,术语“TDF”指的是富马酸替诺福韦二吡呋酯,或其盐或溶剂化物。

[0063] 如本文所使用,“外部施用”或“外部应用”指的是应用至身体表面比如皮肤或粘膜的药物。

[0064] 如本文所使用,术语“治疗(treatment,treating)”被限定为应用或施用治疗剂即在本发 明内有用的组合物(单独或与另一种药剂组合)至对象,或者应用或施用治疗剂至来自对象 的分离组织或细胞系(例如,用于诊断或体外应用),该对象具有疾病或障碍、疾病或障碍 的症状或发展疾病或障碍的可能性,目的是治愈、愈合、减轻、缓解、改变、补救、改良、 改善或影响该疾病或障碍、该疾病或障碍的症状或者发展该疾病或障碍的可能性。

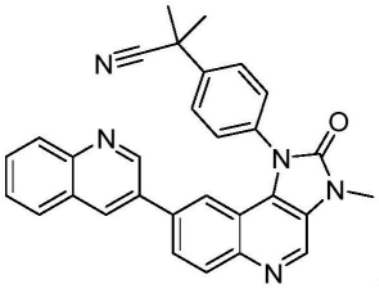
这样的 治疗可以基于由药物基因组学领域获得的知识被具体地调整或修改。

[0065] 遍及本公开内容,本发明的各个方面可以以范围形式呈现。应当理解,以范围形式的 描述仅仅出于方便和简洁并且不应当被解释为对本发明范围的僵硬限制。因此,范围的描 述应当被视为已经具体地公开了所有可能的子范围以及在那个范围内的单个数值。例如, 范围比如从1至6的描述应当被视为已经具体地公开了子范围比如从1至3、从1至4、 从1至5、从2至4、从2至6、从3至6等,以及在那个范围内的单个数字,例如 1、2、2.7、3、4、5、5.3和6。不管范围的宽度如何,这都适用。

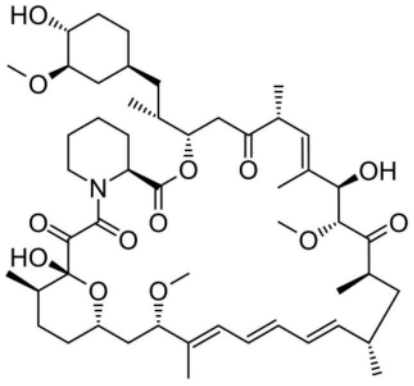
[0066] 组合物

[0067] 本发明的组合物包括治疗有效量的mTORC1抑制剂或其盐、溶剂化物、对映异构体或 非对映异构体。在某些实施方式中,mTORC1抑制剂是选自BEZ235、雷帕霉素、依维莫 司、AZD8055、替西罗莫司、KU-0063794、PI-103、拓克尼布、他克莫司、地磷莫司、INK-128、 沃他利塞、Torin-1、奥米利塞、OSI-027、PF-04691502、阿哌利塞、GSK1059615、WYE-354、 吉达利塞、AZD-2014、Torin-2、WYE-125132、BGT226、Palomid-529、PP121、WYE-687、 CH5132799、Way-600、ETP-46464、GDC-0349、XL388和佐他莫司中的至少一种。

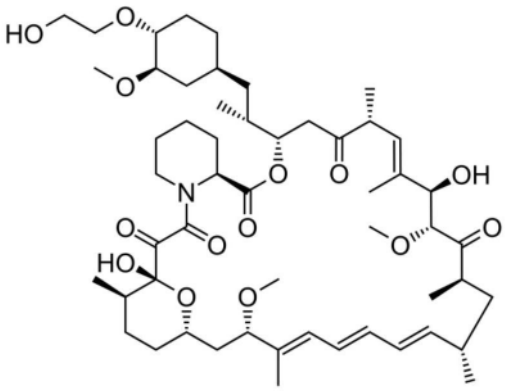
[0068] BEZ235也被称为2-甲基-2-(4-(3-甲基-2-氧-8-(喹啉-3-基)-2,3-二氢咪唑并[4,5-c]喹啉-1- 基)苯基)丙腈,并且具有下式:

[0069] 

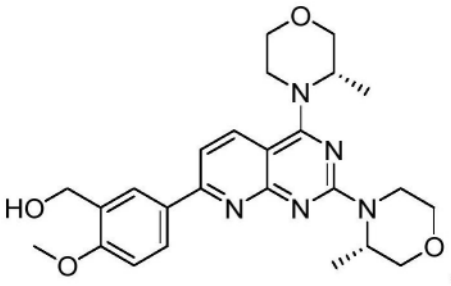
[0070] 雷帕霉素也被称为(3S,6R,7E,9R,10R,12R,14S,15E,17E,19E,21S,23S,26R,27R,34aS)- 9,10,12,13,14,21,22,23,24,25,26,27,32,33,34,34a-十六氢-9,27-二羟基 -3-[(1R)-2-[(1S,3R,4R)-4-羟基-3-甲氧环己基]-1-甲基乙基]-10,21-二甲氧基-6,8,12,14,20,26- 六甲基-23,27-环氧-3H-吡啶并[2,1-c][1,4-氧杂氮杂三十一环烯-1,5,11,28,29(4H,6H,31H)-戊 酮,并且具有下式:

[0071] 

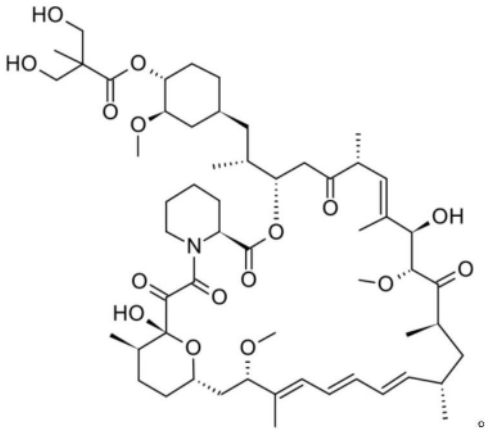
[0072] 依维莫司也被称为二羟基-12-[(2R)-1-[(1S,3R,4R)-4-(2-羟基乙氧基)-3-甲氧环己基]丙 -2-基]-19,30-二甲氧基-15,17,21,23,29,35-六甲基-11,36-二氧杂-4-氮杂三环[30.3.1.0三十六 -16,24,26,28-四烯-2,3,10,14,20-戊酮,并且具有下式:

[0073] 

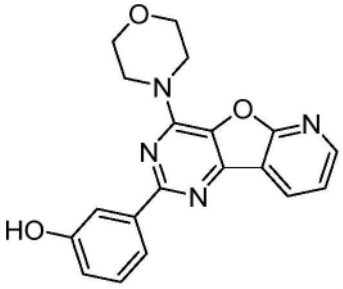
[0074] AZD8055也被称为5-(2,4-双((S)-3-甲基吗啉代)吡啶并[2,3-d]嘧啶-7-基)-2-甲氧基苯 基)甲醇,并具有下式：

[0075] 

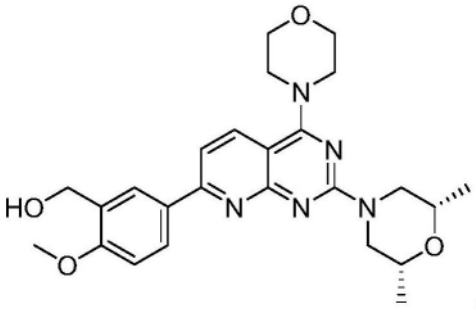
[0076] 替西罗莫司也被称为42-[3-羟基-2-(羟基甲基)-2-甲基丙酸]-雷帕霉素,并具有下式：

[0077] 

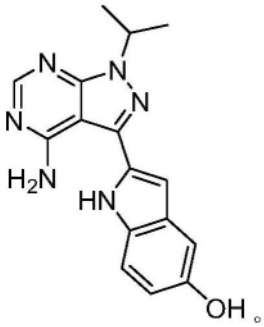
[0078] PI-103也被称为3-[4-(4-吗啉基)吡啶并[3',2':4,5]呋喃并[3,2-d]嘧啶-2-基]-苯酚,并具有 下式：

[0079] 

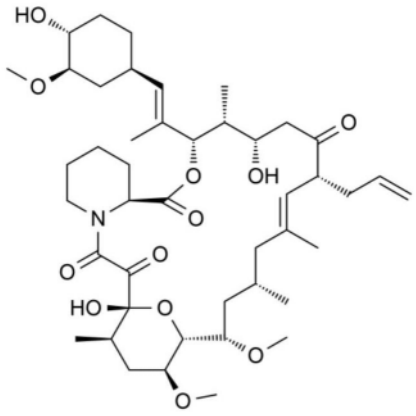
[0080] KU-0063794也被称为(5-(2-((2R,6S)-2,6-二甲基吗啉代)-4-吗啉代吡啶并[2,3-d]嘧啶 -7-基)-2-甲氧基苯基)甲醇,并具有下式：

[0081] 

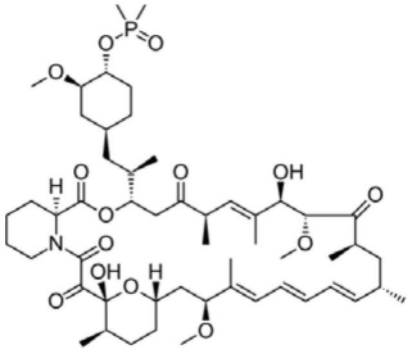
[0082] 拓克尼布也被称为2-(4-氨基-1-异丙基-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-3-基)-1H-吲哚-5-醇,并 具有下式:

[0083] 

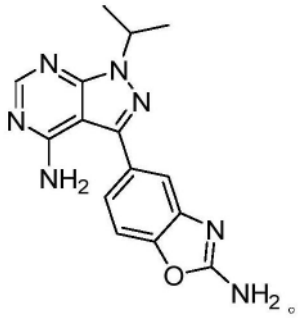
[0084] 他克莫司也被称为3S-[3R*[E(1S*,3S*,4S*)],4S*,5R*,8S*,9E,12R*,14R*,15S*,16R*, 18S*,19S*,26aR*-5,6,8,11,12,13,14,15,16,17,18,19,24,25,26,26a-十六氢-5,19-二羟基-3-[2-(4- 羟基-3-甲氧环己基)-1-甲基乙烯基]-14,16-二甲氧基-4,10,12,18-四甲基-8-(2-丙烯基)-15,19- 环氧-3H-吡啶并[2,1-c][1,4]氧杂氮杂二十三环烯-1,7,20,21(4H,23H)-四酮,并具有下式:

[0085] 

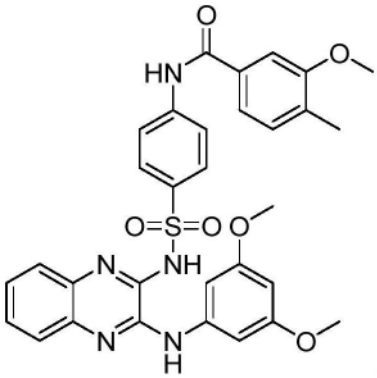
[0086] 地磷莫司也被称为42-(二甲基次膦酸)-雷帕霉素,并具有下式:

[0087] 

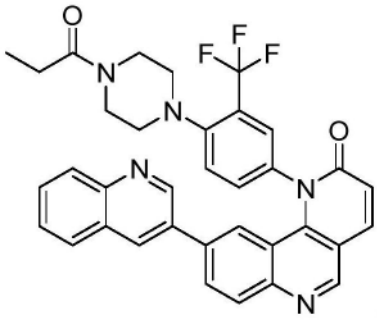
[0088] INK-128也被称为3-(2-氨基苯并[d]噁唑-5-基)-1-异丙基-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-4-胺，并具有下式：

[0089] 

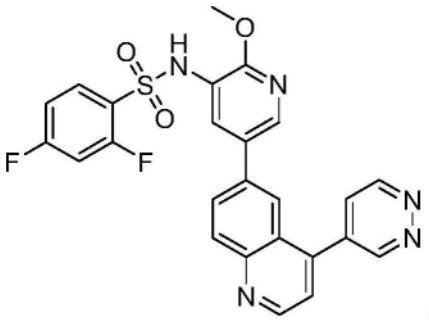
[0090] 沃他利塞也被称为N-[4-[[[3-[(3,5-二甲氧基苯基)氨基]-2-喹喔啉基]氨基]磺酰基]苯 基]-3-甲氧基-4-甲基-苯甲酰胺,并具有下式：

[0091] 

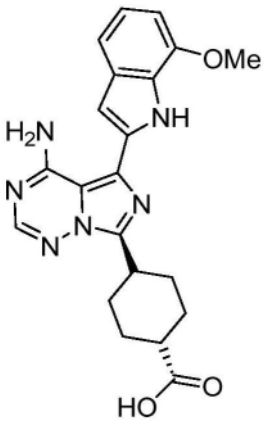
[0092] Torin-1也被称为1-[4-[4-(1-氧丙基)-1-哌嗪基]-3-(三氟甲基)苯基]-9-(3-喹啉基)-苯并 [h]-1,6-萘啶-2(1H)-酮,并具有下式：

[0093] 

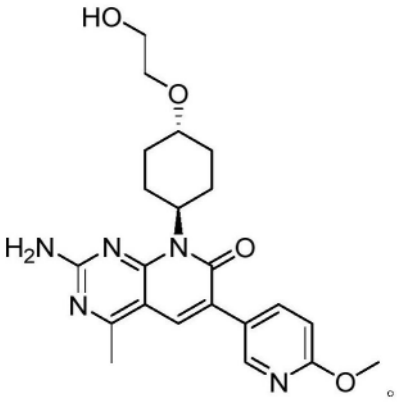
[0094] 奥米利塞也被称为2,4-二氟-N-(2-甲氧基-5-(4-(哒嗪-4-基)喹啉-6-基)吡啶-3-基)苯磺酰 胺,并具有下式：

[0095] 

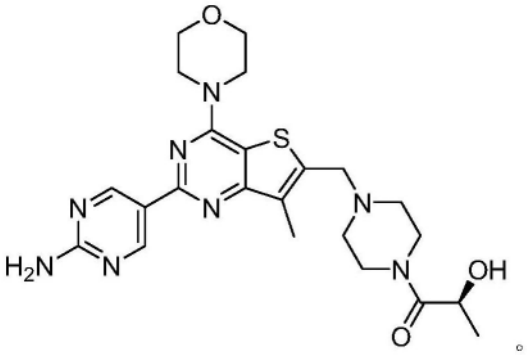
[0096] OSI-027也被称为(1r,4r)-4-(4-氨基-5-(7-甲氧基-1H-吲哚-2-基)咪唑并[5,1-f][1,2,4]三嗪 -7-基)环己烷-1-羧酸,并具有下式:

[0097] 

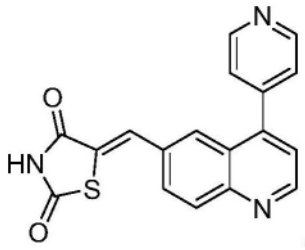
[0098] PF-04691502也被称为2-氨基-8-((1r,4r)-4-(2-羟基乙氧基)环己基)-6-(6-甲氧基吡啶-3- 基)-4-甲基吡啶并[2,3-d]嘧啶-7(8H)-酮,并具有下式:

[0099] 

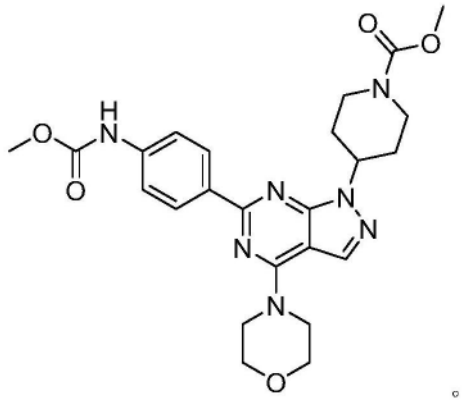
[0100] 阿哌利塞也被称为(S)-1-(4-((2-(2-氨基嘧啶-5-基)-7-甲基-4-吗啉代噻吩并[3,2-d]嘧啶-6- 基)甲基)哌嗪-1-基)-2-羟基丙烷-1-酮,并具有下式:

[0101] 

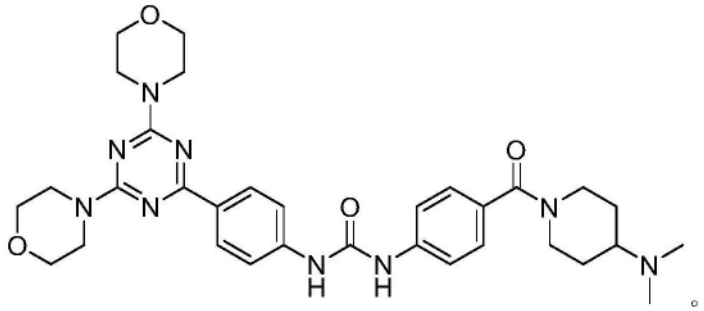
[0102] GSK1059615也被称为(Z)-5-((4-(吡啶-4-基)喹啉-6-基)亚甲基)四氢噻唑-2,4-二酮,并具 有下式:

[0103] 

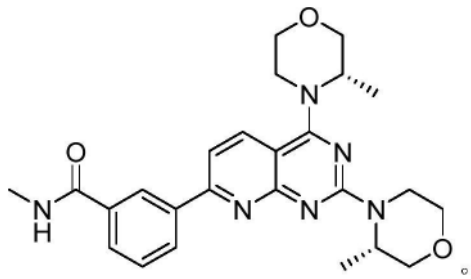
[0104] WYE-354也被称为4-[6-[4-[(甲氧基羰基)氨基]苯基]-4-(4-吗啉基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧 啶-1-基]-1-哌啶羧酸甲酯,并具有下式:

[0105] 

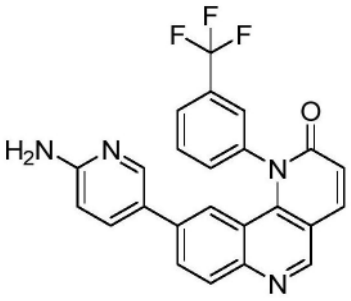
[0106] 吉达利塞也被称为1-(4-(4-(二甲基氨基)哌啶-1-羰基)苯基)-3-(4-(4,6-二吗啉代-1,3,5-三 嗪-2-基)苯基)脲,并具有下式:

[0107] 

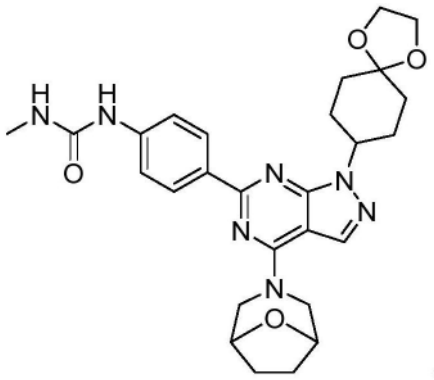
[0108] AZD-2014也被称为3-(2,4-双((S)-3-甲基吗啉代)吡啶并[2,3-d]嘧啶-7-基)-N-甲基苯甲 酰胺,并具有下式:

[0109] 

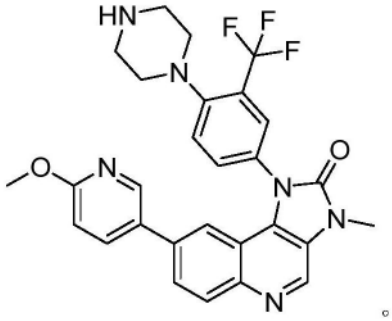
[0110] Torin-2也被称为9-(6-氨基-3-吡啶基)-1-[3-(三氟甲基)苯基]-苯并[h]-1,6-萘啶-2(1H)- 酮,并具有下式:

[0111] 

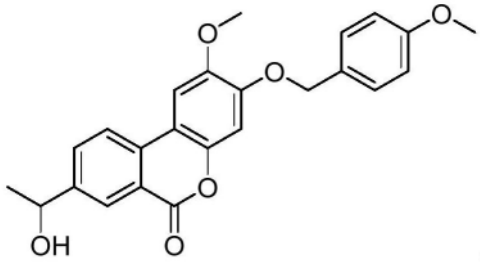
[0112] WYE-125132也被称为N-[4-[1-(1,4-二氧杂螺[4.5]癸-8-基)-4-(8-氧杂-3-氮杂双环[3.2.1] 辛-3-基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-6-基]苯基]-N’-甲基-脲,并具有下式：

[0113] 

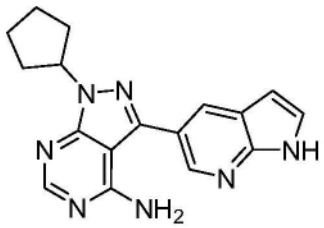
[0114] BGT226也被称为8-(6-甲氧基吡啶-3-基)-3-甲基-1-(4-(哌嗪-1-基)-3-(三氟甲基)苯 基)-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-2(3H)-酮,并具有下式：

[0115] 

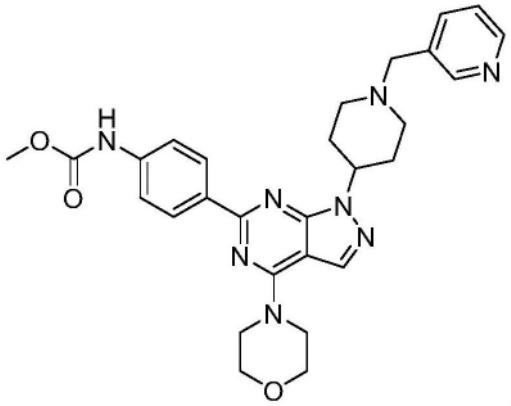
[0116] Palomid-529也被称为3-(4-甲氧基苄氧基)-8-(1-羟基乙基)-2-甲氧基-6H-苯并[c]色烯-6- 酮,并具有下式：

[0117] 

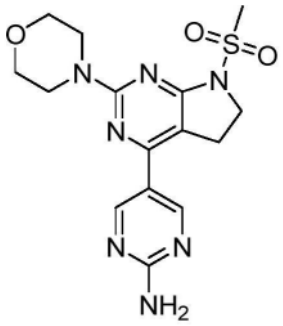
[0118] PP121也被称为1-环戊基-3-(1H-吡咯并[2,3-b]吡啶-5-基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-4-胺，并具有下式：

[0119] 

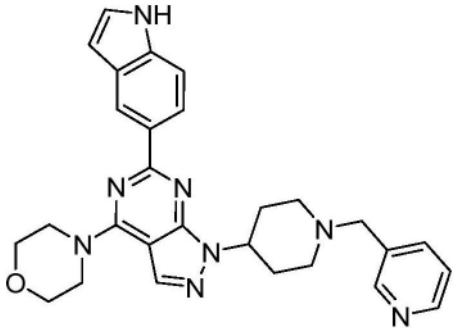
[0120] WYE-687也被称为甲基4-(4-吗啉代-1-(1-(吡啶-3-基甲基)哌啶-4-基)-1H-吡唑并[3,4-d] 嘧啶-6-基)苯基氨基甲酸酯,并具有下式:

[0121] 

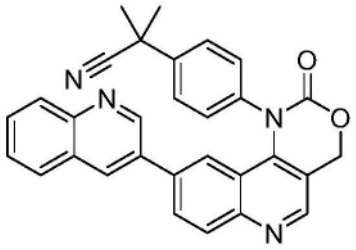
[0122] CH5132799也被称为5-(7-(甲基磺酰基)-2-吗啉代-6,7-二氢-5H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基) 嘧啶-2-胺,并具有下式:

[0123] 

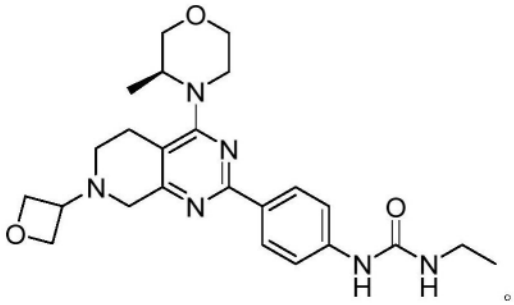
[0124] WAY-600也被称为6-(1H-吲哚-5-基)-4-吗啉代-1-(1-(吡啶-3-基甲基)哌啶-4-基)-1H-吡 唑并[3,4-d]嘧啶,并具有下式:

[0125] 

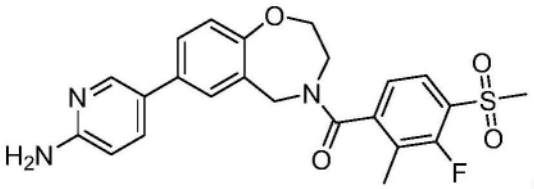
[0126] ETP-46464也被称为α,α-二甲基-4-[2-氧-9-(3-喹啉基)-2H-[1,3]噁嗪并[5,4-c]喹啉 -1(4H)-基]-苯乙腈,并具有下式:

[0127] 

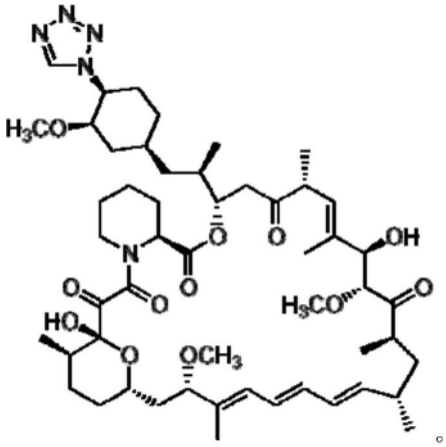
[0128] GDC-0349也被称为N-乙基-N’-[4-[5,6,7,8-四氢-4-[(3S)-3-甲基-4-吗啉基]-7-(3-氧杂环 丁烷基(oxetanyl))吡啶并[3,4-d]嘧啶-2-基]苯基]-脲,并具有下式:

[0129] 

[0130] XL388也被称为[7-(6-氨基-3-吡啶基)-2,3-二氢-1,4-苯并噁嗪(benzoxazepin)-4(5H)- 基][3-氟-2-甲基-4-(甲基磺酰基)苯基]-甲酮,并具有下式:

[0131] 

[0132] 佐他莫司也被称为42-脱氧-42-(1H-四唑-1-基)-(42S)-雷帕霉素,并具有下式:

[0133] 

[0134] 在某些实施方式中,在本发明中考虑的mTORC1抑制剂是雷帕霉素。在其它实施方式 中,mTORC1抑制剂可以是雷帕霉素的修饰形式,其改善递送至特定细胞内区室或细胞器,比如线粒体、细胞核、溶酶体和/或内质网。

[0135] 在某些实施方式中,组合物中治疗有效量的mTORC1抑制剂在按重量计大约0.001% 至大约1%的范围内。在其它实施方式中,组合物中治疗有效量的mTORC1抑制剂在按重 量计大约0.002%至大约0.75%、大约0.005%至大约0.5%、大约0.008%至大约0.25%、大 约0.01%至大约0.2%、大约0.02%至大约0.15%或大约0.03%至大约0.1%的

范围内。

[0136] 在某些实施方式中，本发明的组合物进一步包括皮肤病学可接受的运载体。本发明的 组合物可以包括从大约60％至大约99.9％、可选地从大约70％至大约95％和可选地从大约 80％至大约90％的皮肤病学可接受的运载体。在某些实施方式中，皮肤病学可接受的运载 体是选自溶剂、润滑剂、皮肤缓和剂、乳化剂、润肤剂、增稠蜡、软化剂、香料、防腐剂和人工色素(一种或多种)中的至少一种。在其它实施方式中，皮肤病学可接受的运载体是选自水、脂肪醇和挥发性有机醇中的至少一种。皮肤病学可接受的运载体的一个非限制性实例是凡士林。

[0137] 方法

[0138] 在一方面，本发明提供了增加哺乳动物成纤维细胞的寿命的方法。在另一方面，本发 明提供了保留哺乳动物成纤维细胞中的细胞组织的方法。在又另一方面，本发明提供了阻 止或最小化哺乳动物成纤维细胞中的老化的方法。在又另一方面，本发明提供了治疗或预 防哺乳动物对象中年龄相关的皮肤障碍的方法，所述皮肤障碍包括皮肤萎缩、假性瘢痕、 脂溢性或光化性角化症、着色斑、局灶性区域皮肤增厚和粗大皱纹。

[0139] 在某些实施方式中，本发明的方法包括给对象外部施用治疗有效量的mTORC1抑制剂，其任选地在皮肤可接受的组合物中配制。在其它实施方式中，本发明的组合物包括治疗有效量的mTORC1抑制剂。在又其它实施方式中，组合物进一步包括皮肤病学可接受的 运载体。在又其它实施方式中，组合物被外部应用至对象的受侵袭皮肤区域。

[0140] 在某些实施方式中，在本发明内考虑的组合物的外用制剂被用于治疗皮肤萎缩。在其 它实施方式中，本发明提供了用于治疗或预防皮肤萎缩的包括治疗有效量的雷帕霉素的外 用霜剂。

[0141] 在某些实施方式中，通过利用校准的数显卡尺测量皮层而对皮层进行测量来评估皮肤 萎缩。在其它实施方式中，通过1-4的研究者评价等级量表评估脂溢性角化症、着色斑、假性瘢痕、粗大皱纹和表皮增厚的改善，其中1是正常的，没有病变迹象；2表示轻微病变；3表示相对于正常皮肤具有显著特征的病变；和4表示具有高严重性的病变。在又其 它实施方式中，病变可以视觉地检查或者借助于图像分析软件检查，比如Image J，一种可 得自国家卫生研究院的开放源图像分析软件。在又其它实施方式中，通过使用病变的手动 测量进行面积测量或者通过分析由研究者或研究人员得到的图像来评估病变。

[0142] 制剂

[0143] 本发明的药物组合物中活性成分、皮肤病学可接受的运载体和任何额外成分的相对量 可以取决于治疗对象的身份、大小和状况改变。举例而言，组合物可以包括在大约0.001％ 和大约1％(w/w)之间的mTORC1抑制剂。在其它实施方式中，组合物中按重量计治疗有 效量的mTORC1抑制剂在大约0.002％至大约0.75％、大约0.005％至大约0.5％、大约0.008％ 至大约0.25％、大约0.01％至大约0.2％、大约0.02％至大约0.15％或大约0.03％至大约0.1％ 的范围内。

[0144] 虽然本文提供的药物组合物的描述主要涉及适合于伦理施用至人的药物组合物，但是 本领域技术人员将理解，这些组合物通常适合于施用至各种动物。很好地理解对适合于施 用至人的药物组合物进行修饰以便于使这些组合物适合于施用至各种动物，并且一般熟练 的兽医药理学家可以仅仅普通的设计并执行这样的修饰，如果需要，进行实验。本

发明的 药物组合物考虑施用至的对象包括但不限于人和其它灵长类、哺乳动物，其包括商业相关 的哺乳动物，比如牛、猪、马、绵羊、猫和狗。

[0145] 本发明的组合物可以每天几次的频率被施用至哺乳动物，或者其可以较不频繁地被施 用，比如每天一次、每周一次、每两周一次、每月一次或者更不频繁，比如每几个月一次 或者甚至每年一次或更少。

[0146] 用于施用本发明的组合物的给药方案可以是每天一次或每天两次。应用的频率和活性 剂的浓度取决于皮肤状况和皮肤的反应。应用可以继续以对皮肤实现期望效果并且应用频 率可以在已经获得满意结果之后降低。在某些实施方式中，施用持续最少2周以实现结果。 应用可以继续超过最初的2周时期以获得持续改善并且一旦已经实现该结果，可以降低应 用频率。应用可以持续几年的过程，其中应用的水平可以基于在任何时候下的病变相对严 重性改变。

[0147] 应理解，在非限制性实例中，可以每天、每隔一天、每2天、每3天、每4天或每5 天施用每天给药的本发明的组合物的量。给药频率对于本领域技术人员将是显而易见的并 且将取决于许多因素，比如但不限于，正治疗的疾病的类型和严重性、动物的类型和年龄 等。

[0148] 在某些实施方式中，使用一种或多种皮肤病学可接受的赋形剂或运载体配制本发明的 组合物。在某些实施方式中，本发明的药物组合物包括治疗有效量的mTORC1抑制剂和皮 肤病学可接受的运载体。有用的皮肤病学可接受的运载体包括但不限于甘油、水、生理盐 水、乙醇和其它皮肤病学可接受的盐溶液，比如磷酸盐和有机酸的盐。这些和其它皮肤病 学可接受的运载体的实例在Remington's Pharmaceutical Sciences(1991,Mack Publication Co.,New Jersey)中描述。

[0149] 本发明的组合物可以包括从大约60％至大约99.9％、可选地从大约70％至大约95％和 可选地从大约80％至大约90％的皮肤病学可接受的运载体。在某些实施方式中，皮肤病学 可接受的运载体至少选自溶剂、润滑剂、皮肤缓和剂、乳化剂、润肤剂、增稠蜡、软化剂、 香料、防腐剂和人工色素(一种或多种)。在其它实施方式中，皮肤病学可接受的运载体是 选自水、脂肪醇和挥发性有机醇中的至少一种。皮肤病学可接受的运载体的一个非限制性 实例是凡士林。

[0150] 运载体可以是溶剂或分散介质，包括例如水、乙醇、多元醇(例如，甘油、丙二醇和液 体聚乙二醇等)、其适合的混合物和植物油。例如，可以通过利用包衣比如卵磷脂，通过在 分散的情况下维持需要的颗粒大小和通过利用表面活性剂，维持适当流动性。可以通过各 种抗菌剂和抗真菌剂实现微生物活动的阻止，例如，对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、抗坏血酸、硫柳汞等。在许多情况下，在组合物中包括等渗剂将是优选的，所述等渗剂例如 糖类、氯化钠或多元醇，比如甘露醇和山梨醇。可注射组合物的延长吸收可以通过在组合 物中包括延迟吸收的药剂(例如，单硬脂酸镁或明胶)引起。

[0151] 制剂可以应用在与本领域已知的常规赋形剂(即适合于外部施用的药学可接受的有机 或无机运载体物质)的混合物中。药物制品可以被灭菌并且如果需要，可以与助剂混合，所 述助剂例如润滑剂、防腐剂、稳定剂、湿润剂、乳化剂、用于影响渗透压的盐、缓冲剂、着色剂、调味和/或芳香物质等。在需要的情况下，它们也可以与其它活性剂例如其它镇痛剂组合。

[0152] 如本文所使用，“额外成分”包括但不限于下列的一种或多种：赋形剂；表面活性

剂； 分散剂;惰性稀释剂;粒化或崩解剂;粘合剂;润滑剂;着色剂;防腐剂;生理学可降解组合物比如明胶;水性媒介和溶剂;油性媒介和溶剂;悬浮剂;分散或湿润剂;乳化剂； 缓和剂;缓冲剂;盐;增稠剂;填料;乳化剂;抗氧化剂;抗生素;抗真菌剂;稳定剂； 和药学可接受的聚合或疏水材料。可以包含在本发明的药物组合物中的其它“额外成分” 在本领域中是已知的并且例如在Genaro,ed.(1985,Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co.,Easton,PA)中描述,该文献通过引用被并入本文。

[0153] 本发明的组合物可以包括按组合物的总重量计从大约0.005%至2.0%的防腐剂。防腐 剂被用于阻止在暴露于环境中的污染物的情况下的腐败。根据本发明有用的防腐剂的实例 包括但不限于选自苄醇、山梨酸、对羟基苯甲酸酯、咪脲和其组合的那些。特别优选的防 腐剂是大约0.5%至2.0%苄醇和0.05%至0.5%山梨酸的组合。

[0154] 组合物优选地包括抗氧化剂和螯合剂。对于一些化合物优选的抗氧化剂是按组合物的 总重量计在大约0.01%至0.3%的优选范围内的BHT、BHA、α-生育酚和抗坏血酸,和更优 选地在0.03%至0.1%的范围内的BHT。优选地,螯合剂以按组合物的总重量计从0.01%至 0.5%的量存在。特别优选的螯合剂包括按组合物的总重量计在大约0.01%至0.20%的重量 范围内和更优选地在0.02%至0.10%的范围内的氨基聚羧酸盐(例如乙二胺四乙酸二钠)和 柠檬酸。螯合剂可用于螯合组合物中的金属离子,这些金属离子对于制剂的保质期是不利 的。

[0155] 外部施用

[0156] 药物的外部施用的障碍是表皮的角质层。角质层是高抵抗层,其由蛋白质、胆固醇、 鞘脂类、游离脂肪酸和各种其它脂质组成,并且包括角化细胞和活细胞。限制化合物通过 角质层的穿透率(流量)的因素之一是可以被加样或应用至皮肤表面上的活性物质的量。每 单位面积皮肤应用的活性物质的量越大,皮肤表面和皮肤低层之间的浓度梯度越大,并且 通过皮肤的活性物质的扩散力也越大。因此,在所有其它因素相同的情况下,包含较大浓 度的活性物质的制剂与具有较低浓度的制剂相比更可能导致活性物质穿透通过皮肤,并且 其越多,速率越一致。

[0157] 适合于外部施用的制剂包括但不限于液体或半液体制品比如擦剂、洗剂、水包油或油 包水乳剂(比如霜剂、药膏或糊剂)和溶液或悬浮液。这样的制剂可以直接地或者通过使用 棉签、敷料器、蜡刀等以及以经皮贴片的形式被应用至皮肤。在某些实施方式中,贴片最 小化药物通过皮肤的洗涤、摩擦、擦伤和/或擦洗导致的药物损失。在其它实施方式中,贴 片增加通过皮肤的药物的吸收,同时使得皮肤暴露于药物最小化。

[0158] 例如,在本发明内考虑的可外部施用的制剂可以包括从大约0.001%至大约1%(w/w) 的mTORC1抑制剂,但是mTORC1抑制剂的浓度可以高达溶剂中活性成分的溶解限度。用于外部施用的制剂可以进一步包括一种或多种本文描述的额外成分。

[0159] 可以使用渗透增强剂。这些物质增加药物穿过皮肤的穿透率。本领域中典型的增强剂 包括乙醇、甘油单月桂酸酯、PGML(聚乙二醇单月桂酸酯)、二甲基亚砜等。其它增强剂包括油酸、油醇、乙氧基二甘醇、月桂氮䓬酮、链烷羧酸、二甲基亚砜、极性脂质或N- 甲基-2-吡咯烷酮。

[0160] 用于局部递送本发明的一些组合物的一种可接受的媒介可以包含脂质体。脂质体的组 合物和它们的用途在本领域中是已知的(例如,美国专利号6,323,219)。

[0161] 在可选实施方式中，外用制剂进一步包括其它成分比如佐剂、抗氧化剂、螯合剂、表 面活性剂、发泡剂、湿润剂、乳化剂、增粘剂、缓冲剂、防腐剂等。在其它实施方式中，渗透或穿透增强剂包含在制剂中并且相对于缺乏渗透增强剂的组合物在改善活性成分经 皮穿透进入并且通过角质层方面是有效的。各种渗透增强剂对于本领域技术人员是已知 的，包括油酸、油醇、乙氧基二甘醇、月桂氮䓬酮、链烷羧酸、二甲基亚砜、极性脂质或 N-甲基-2-吡咯烷酮。在另一方面，外用制剂可以进一步包括水溶助长剂，其功能是增加角 质层结构的紊乱，并且因而使得增加穿过角质层的运输。各种水溶助长剂对于本领域技术 人员是已知的，比如异丙醇、丙二醇或二甲苯磺酸钠。

[0162] 外用制剂中的额外非活性成分在本领域中是熟知的。这些成分包括但不限于保湿剂、皮肤缓和剂、pH稳定剂、螯合剂、胶凝剂、增稠剂、乳化剂、粘合剂、缓冲剂、运载体、抗氧化剂等。这些成分的另外实例包含在U.S.Food&Drug Administration,Inactive Ingredients for Approved Drugs中，其可在网上获得。可以包含在制剂中的附加讨论和潜在 非活性成分可以发现于"The Science and Practice of Pharmacy",21st Edition,Lippincott Williams&Wilkins,Philadelphia,Pa.(2006)中。

[0163] 在某些实施方式中，本发明的凝胶制剂包括大约0.001％至大约1％(w/w)的mTORC1 抑制剂、大约20-50％(w/w)二甲基亚砜(DMSO)、大约10-20％(w/w)聚丙二醇、大约10-40％ (w/w)聚乙二醇(PEG)(其具有100-800的分子量(PEG100-PEG800))、大约1-2％(w/w)胶凝 剂和大约0-50％水。

[0164] 在其它实施方式中，本发明的凝胶制剂包括大约0.001％至大约1％(w/w)的雷帕霉素、大约20-50％(w/w)二甲基亚砜(DMSO)、大约10-20％(w/w)聚丙二醇、大约10-40％(w/w)聚 乙二醇(PEG)(其具有100-800的分子量(PEG100-PEG800))、大约1-2％(w/w)胶凝剂和大约 0-50％水。

[0165] 在又其它实施方式中，本发明的溶液或喷雾制剂包括在水溶液中大约0.001％至大约 1％(w/w)的mTORC1抑制剂，该水溶液具有大约10-50％(w/w)的DMSO和大约10-50％(w/w)的PEG。

[0166] 在又其它实施方式中，本发明的溶液或喷雾制剂包括在水溶液中大约0.001％至大约 1％(w/w)的雷帕霉素，该水溶液具有大约10-50％(w/w)的DMSO和大约10-50％(w/w)的 PEG。

[0167] 在又其它实施方式中，本发明的霜剂或洗剂制剂包括大约0.001％至大约1％(w/w)的 mTORC1抑制剂、矿物油、任何类型的醇、非离子型洗涤剂比如TritonX-100、乳化蜡、单硬脂酸甘油酯(GMS)、十四酸异丙酯(IPM)和大约60-80％水。

[0168] 在又其它实施方式中，本发明的霜剂或洗剂制剂包括大约0.001％至大约1％(w/w)的 雷帕霉素、矿物油、任何类型的醇、非离子型洗涤剂比如Triton X-100、乳化蜡、单硬脂 酸甘油酯(GMS)、十四酸异丙酯(IPM)和大约60-80％水。

[0169] 在又其它实施方式中，本发明的药膏制剂包括在水溶液中大约0.001％至大约1％(w/w) 的mTORC1抑制剂，该水溶液具有大约10-50％(w/w)的DMSO和大约10-50％(w/w)的PEG 和大约1-60％(w/w)凡士林。

[0170] 在又其它实施方式中，本发明的药膏制剂包括在水溶液中大约0.001％至大约1％(w/w) 的雷帕霉素，该水溶液具有大约10-50％(w/w)的DMSO和大约10-50％(w/w)的PEG和

大 约1-60％(w/w)凡士林。

[0171] 控释制剂和药物递送系统

[0172] 本发明的药物组合物的控释或缓释制剂可以使用常规技术制造。在一些情况下，待使 用的剂型可以被提供为一种或多种活性成分的缓释或控释，在其中使用例如羟丙基甲基纤 维素、其它聚合物基体、凝胶、渗透膜、渗透系统、多层包衣、微粒、脂质体或微球或其 组合以提供改变比例的期望释放概况。本领域普通技术人员已知的适合控释制剂，包括本 文描述的那些，可以容易地被选择与本发明的药物组合物一起使用。因而，本发明包括适 合于外部施用的单一单位剂型，比如擦剂、洗剂、水包油或油包水乳剂(比如霜剂、药膏或 糊剂)、经皮贴片和适合于控释的溶液或悬浮液。

[0173] 大多数控释药物产品与由它们的非控释对应物实现的相比具有改善药物疗法的共同 目标。理想地，在医疗中使用最佳设计的控释制品的特征在于被采用从而以最小时间量治 愈或控制病症的药物物质的最小化。控释制剂的优势包括延长的药物活性、降低的剂量频 率和增加的患者依从性。此外，控释制剂可以被用于影响行动或其它特征比如药物的血液 浓度的开始时间，并且因而可以影响副作用的发生。

[0174] 大多数控释制剂被设计以最初释放立即地产生期望治疗效果的药物量，并且逐步地和 持续地释放其它药物量以在延长的时间段内维持该水平的治疗效果。为了维持体内药物的 这种恒定水平，药物必须以将代替正在被代谢和从身体排泄的药物量的速率从剂型释放。

[0175] 活性成分的控释可以通过各种诱导物刺激，例如pH、温度、酶、水或其它生理学条件 或化合物。在本发明的背景下，术语“控释成分”在本文中被限定为化合物(一种或多种)，包括但不限于聚合物、聚合物基体、凝胶、渗透膜、脂质体或微球或促进活性成分的控释 的其组合。

[0176] 在某些实施方式中，本发明的制剂可以是但不限于短期的、快速偏移的(rapid-offset)以及控制的，例如持续释放、延迟释放和脉冲释放制剂。

[0177] 术语持续释放以其常规意义被用于指如此药物制剂：其在延长的时间段内提供药物的 逐步释放，并且可以(但不一定)在延长时间段内导致基本上恒定的药物血液浓度。时间段 可以长达一个或多个月并且与以单次快注形式被施用的相同量的药剂相比应当是更长的 释放。

[0178] 对于持续释放，化合物可以利用为化合物提供持续释放性质的适合聚合物或疏水性物 质配制。

[0179] 在本发明的某些实施方式中，使用持续释放制剂将本发明的组合物单独或与另一种药 剂组合施用至患者。

[0180] 术语延迟释放在本文中以其常规意义被用于指如此药物制剂：其在药物施用后的一些 延迟之后提供药物的最初释放，并且可以(但不一定)包括从大约10分钟多至大约12小时 的延迟。

[0181] 术语脉冲释放在本文中以其常规意义被用于指如此药物制剂：其以在药物施用之后以 产生药物的脉冲血浆概况的方式提供药物的释放。

[0182] 术语立即释放以其常规意义被用于指如此药物制剂：其在药物施用之后立即提供药物 的释放。

[0183] 如本文所使用,短期指的是在药物施用之后至多并且包括大约8小时、大约7小时、大约6小时、大约5小时、大约4小时、大约3小时、大约2小时、大约1小时、大约40 分钟、大约20分钟、或大约10分钟和其任何或所有全部或部分增量的任何时间段。

[0184] 如本文所使用,快速偏移指的是在药物施用之后至多并且包括大约8小时、大约7小 时、大约6小时、大约5小时、大约4小时、大约3小时、大约2小时、大约1小时、大 约40分钟、大约20分钟、或大约10分钟和其任何和所有全部或部分增量的任何时间段。

[0185] 本领域技术人员将认识到或者能够使用仅仅常规实验确定与本文描述的具体程序、实 施方式、权利要求和实施例的众多等价物。这些等价物被视为在本发明的范围内并且由所 附权利要求书覆盖。例如,应当认识到,利用本领域公知的替代方案和使用仅仅常规实验 的反应条件的改变在本申请的范围内,包括但不限于反应时间、反应大小/体积和实验试剂, 比如溶剂、催化剂、压力、大气条件(例如氮气氛)和还原/氧化剂。

[0186] 将理解,在本文提供值和范围的地方,由这些值和范围包括的所有值和范围意欲包含 在本发明的范围内。而且,落入这些范围内的所有值以及值的范围的上限或下限也由本申 请考虑。

[0187] 下列实施例进一步阐明了本发明的方面。但是,它们绝不是对本文陈述的本发明的教 导或公开内容的限制。

[0188] 实施例

[0189] 现在参照下列实施例描述本发明。仅出于说明的目的提供这些实施例并且本发明不限 于这些实施例,而是涵盖由于本文提供的教导而变得显而易见的所有变化。

[0190] 材料和方法

[0191] 除非另有说明,所有细胞系、起始材料、试剂和细胞系获得自商业供应商并且在无需 进一步操作的情况下使用。

[0192] 细胞培养和细胞培养试剂

[0193] 利用NRTI的细胞培养实验具有下列设计。根据这些细胞的标准培养方案培育人肺或 心肌成纤维细胞的培养物(Cristofalo,et al.,Journal of Tissue Culture Methods 1980, 6:117-121)。在正常生长培养基中或在添加有1nM雷帕霉素的正常生长培养基中维持平行 组的培养物。在暴露于NRTI之前,利用1nM雷帕霉素(Enzo Biologicals)维持培养物持续 两周。在独立实验中在指定浓度下(通常10-20μg/ml)将细胞培养物暴露于NRTI持续7天, 在第4天时更换培养基和新鲜的NRTI。在该7天时期结束时进行线粒体测量、生物分析 仪测量、蛋白质表达和磷酸化状态的免疫印迹、和老化试验。

[0194] 除非指出,细胞培养试剂来自Cellgro。将WI-38胎儿肺初级人成纤维细胞或人心肌成 纤维细胞在补充有10%胎牛血清、1% L-谷氨酰胺、MEM维生素和MEM非必需氨基酸的MEM中生长。使细胞在37℃下在5% CO_2保温箱中维持。对于处理研究,在利用NRTI 处理之前,利用1nM雷帕霉素(Enzo Biologicals)处理细胞持续两周。通过每7至10天胰 蛋白酶化并且以$1x10^4/cm^2$的细胞密度再接种来维持细胞。恩曲他滨(FTC)和富马酸替诺 福韦二吡呋酯(TDF)由NIH AIDS Research&Reference Reagent program友情提供。在暴露 于NRTI的7天期间,将药理学抑制剂PD98059(10μM,Santa Cruz Biotechnologies)、BI-D1870、GW5074和SB203580(10μM,Enzo Biologicals)在最后48小时期间添加至培养 基或持续最后2小时,这取决于实验。在暴露于NRTI的7天期间,每隔一天添加Trolox(500 μM)和N-乙酰

半胱氨酸(100μM,Acros Organics)。Mito-Q(20nM)和TPP(20nM)由the University of Pennsylvania School of Veterinary Medicine的Dr.Brett Kaufmann友情提供。载体和mt-过氧化氢酶腺病毒(MOI为25、50和75)购买自来自University of Iowa的Gene Transfer Vector Core。

[0195] 蛋白质印迹和共免疫沉淀

[0196] 利用放射免疫沉淀试验(RIPA)缓冲液(其包含蛋白酶抑制剂混合物(Sigma-Aldrich)和磷 酸酶抑制剂)、NaF和原钒酸钠通过提取制备细胞蛋白质提取物。蛋白质浓度使用二喹啉甲 酸(BCA)试验(Pierce Biotechnology)定量。使用15至30μg蛋白质提取物进行蛋白质印迹分 析,所述蛋白质提取物在SDS-PAGE上运行并且被转移至硝化纤维(Biorad)膜上。根据制 造商的指示培育具有特异于下列的抗体的印迹:β-肌动蛋白(Sigma-Aldrich)、TFAm、 parkin、p16、磷酸(S82)HSP27、HSP27(Santa Cruz Biotechnologies)、p53、21、过氧化氢 酶、MDM2(EMD Millipore)、VDAC、磷酸(S235/236)-核糖体蛋白S6、核糖体蛋白S6、 磷酸(S166)-MDM2、磷酸(S473)-AKT、AKT、β-微管蛋白(Cell Signaling)、p62(Enzo Biologicals)、IL-6(NeoBiolab)、核纤层蛋白B1、PINK1和Mitoprofile Total OXPHOS Cocktail (复合物I-NDUFB8亚基、CII-SDHB亚基、CIIIUQCRC2亚基和CIV-线粒体COX1亚基) (Abcam)。使用IRDye 680和800LI-COR二次抗体,在LI-COR Odyssey上使用LI-COR Odyssey软件版本3.0(LI-COR Biosciences)可视化蛋白质印迹。为了共免疫沉淀,将细胞蛋 白质提取物在包含蛋白酶抑制剂混合物的HNTG缓冲液中制备并使用BCA试验量化。利 用蛋白A/G珠(Santa Cruz Biologicals)预清除在0.5mg浓度下的蛋白质提取物持续30分钟。 在2,000rpm、4℃下离心5分钟之后,在制造商推荐的浓度下在4℃下过夜培育具有一 次抗体的上清液。IgG抗体(Cell Signaling)被用作非特异性对照。使用100μl蛋白A/G珠 在4℃下过夜沉淀免疫复合物。将结合至珠的免疫复合物在2000rpm、4℃下离心5分 钟并且使用HNTG缓冲液洗涤三次。在添加2X样品缓冲液并在100℃下煮沸之后,蛋白 质样品被用于蛋白质印迹。

[0197] 总ROS、线粒体膜电势、线粒体质量和超氧阴离子评估

[0198] 通过利用25nM TMRE(Molecular Probes)培育细胞检测线粒体膜电势。通过利用100 nM Mitotracker Green FM(Molecular Probes)培育细胞评估线粒体质量。通过利用5μM MitoSox Red(Molecular Probes)培育细胞检测线粒体超氧阴离子水平。通过利用在1%胎牛 血清补充的MEM中的10μM 2',7'-二氯荧光黄二乙酸盐(DCF-DA;Sigma-Aldrich)培育细胞 并在培育周期之后利用Krebs Ringer磷酸盐葡萄糖缓冲液(145mM NaCl、5.7mM NaH_2PO_4、 4.86mM KCL、0.54mM $CaCl_2$、1.22mM $MgSO_4$和5.5mM葡萄糖)洗涤两次来检测ROS的总细胞水平。为了上述评估,在37℃下在5% CO_2中进行培育持续30分钟并且在具有 含血清培养基的2.5%胰蛋白酶-EDTA中收获细胞。利用Guava EasyCyte Mini采用Guava Express Plus程序(Guava Technologies)立即分析细胞。

[0199] 线粒体呼吸测量

[0200] 使用XF细胞线粒体应激测试试剂盒(cell mito stress test kit)在Seahorse XF24 Bioanalyzer(Seahorse Bioscience)上测量线粒体功能。在XF24微量培养板中以15,000个细 胞/孔的密度接种细胞。在获得之后,在适用情况下,基于使用Guava EasyCyte Mini (Millipore)计数的10^6个细胞标准化结果。将板加样至Bioanalyzer,其已经预加样

有包含寡 霉素、羰基氰对三氟甲氧基苯腙(FCCP)和鱼藤酮/抗霉素A的传感器盒。在连续加入寡霉 素、FCCP和鱼藤酮/抗霉素A之前和之后,一式三份测量氧消耗。呼吸速率和质子泄漏评 估为在公开的方法(Hill,et al.,Biological chemistry 2012,393:1485-1512)中概述的。基于来自 在至少一式四份中接种的细胞的一式三份的氧消耗速率测量值计算线粒体呼吸。基础呼吸 表示最初氧消耗速率测量值并且最大呼吸表示在FCCP添加之后的氧消耗速率测量值。ATP 关联的呼吸表示为基础氧消耗速率的寡霉素敏感型氧改变。质子泄漏表示寡霉素敏感型氧 消耗速率。通过标准化为鱼藤酮/抗霉素A敏感型氧消耗速率测量值减去氧消耗的非线粒 体来源。通过在线粒体评估完成时计数每个孔中的细胞将所有数据标准化为细胞数目。老化相关联的β-半乳糖苷酶检测

[0201] 通过在低密度($0.5x10^4/cm^2$)下的各自处理之后平板培养细胞进行SA-β-gal活性的评 估,以防止已知在高密度培养物中出现的假阳性染色。在NRTI处理一周之后进行接种用 于SA-β-gal染色并且在接种之后进行染色24小时。利用PBS洗涤细胞,利用2%甲醛-0.2% 戊二醛在室温下固定5分钟,利用PBS洗涤一次,并且在37℃下在包含50mg/ml X-gal、100mM铁氰化钾、100mM亚铁氰化钾、5M NaCl、1M $MgCl_2$和0.2M柠檬酸/磷酸盐缓 冲液(pH 6.0)的染色溶液中培育过夜。在培育之后,利用PBS洗涤细胞三次并且对于每个 样品一式三份计数至少500个细胞。阳性细胞(蓝色细胞)表达为总细胞的百分比。

[0202] 免疫荧光

[0203] 在指定处理之后以标准密度将细胞接种至酸洗涤的盖玻片上。在24小时之后,细胞 使用4%多聚甲醛固定,使用0.1% Triton-PBS渗透化,并且利用可适用的动物血清封闭。进行免疫荧光以使用细胞色素C抗体(EMD Millipore)可视化线粒体并且利用FRAP抗体 (Santa Cruz)共染色。线粒体也使用线粒体标记的GFP(Vector Core,University of Pittsburg) 的慢病毒转导可视化并且使用嘌呤霉素选择。在可适用的实验处理之后,在表达线粒体的 细胞上使用Raptor抗体(Bethyl Laboratories)进行免疫荧光。在一次抗体培育之后,使用 Alexa-Flour Secondaries(LICOR Biosciences)和DAPI作为核染色剂(10ng/ml)进行染色并且 利用VectaShield mounting media(Fisher Scientific)保存。使用去褶合或共聚焦显微术成像细 胞用于共定位事件量化。

[0204] 统计学分析

[0205] 结果代表至少三个独立实验并且使用未配对双尾学生t检验测定统计显著性。使数据 集经历正规性检验以验证数据的正态分布。在适当的时候,对涉及对照、NRTI、雷帕霉素 和雷帕霉素NRTI的多个比较组进行利用Bonferroni事后分析(post-hoc analysis)的单因素方 差分析。

[0206] 制剂

[0207] 本发明的示例性非限制性乳剂制剂(在下文被称为“制剂R”)包括大约0.001%至大约 1%(w/w)的雷帕霉素、大约4-6%的棕榈酸盐、大约6-8%的甘油和余量的水。

[0208] 施用至患者

[0209] 呈现给医师的诊断患有皮肤萎缩、脂溢性角化症、光化性角化症、着色斑、老年性假 性瘢痕或粗大皱纹的患者被选择用于施用本发明的组合物。使用具有0.001mm的认证精确度的Mitoutoyo数显卡尺量化皮肤厚度。利用研究者严重性评价等级量表评估病变(光化性角化症、假性瘢痕(psuedoscar)、粗大皱纹)。根据每天施用1-2次持续最初的2周时期,

将制剂R提供给患者。在应用区域中出现任何不良反应的情况下，建议患者停止应用制剂R。在2周应用时期之后，每周监测皮肤厚度和病变严重性。

[0210] 实施例1：核苷/核苷酸类似物的线粒体作用通过雷帕霉素缓解。

[0211] 利用TDF和FTC(简称为NRTI)的组合治疗的效果在与接受抗逆转录病毒疗法的患者 中的血清水平相关的浓度下，在人心肌和肺成纤维细胞二者中的线粒体上检查。平行培养 物在额外存在1nM雷帕霉素的情况下生长。该浓度的雷帕霉素被发现延长复制寿命并且改善人成纤维细胞的线粒体概况。暴露于NRTI持续7天导致人心肌成纤维细胞中线粒体 膜电势、线粒体ROS产生和线粒体质量的显著增加(图1A-1C)。类似的结果在人肺成纤维 细胞中观察到。另外，在暴露于NRTI之后，在两种成纤维细胞群体中总细胞ROS显著增 加(图1D)。在雷帕霉素存在的情况下生长的培养物在暴露于NRTI之后不展现相同水平的 线粒体膜电势、线粒体ROS或总细胞ROS的增加。

[0212] 使用Seahorse Bioanalyzer利用在标准培养基中维持或在雷帕霉素存在下维持的培养物 进行线粒体活性的间接评估。当人心肌成纤维细胞暴露于NRTI时，基础呼吸、最大呼吸、 与ATP关联的呼吸和质子泄漏的计算速率显著地增加(图1E-1I)。当暴露于NRTI时，雷帕 霉素治疗的细胞具有显著降低的基础呼吸并且不展现基础或最大呼吸的增加(图1F-1G)。 与ATP关联的呼吸通过NRTI暴露增加并且在雷帕霉素治疗的培养物中减少(图1H)。此外， 雷帕霉素治疗的细胞在暴露于NRTI之后不展现质子泄漏的增加(图1I)。当经历相同分析 时，人肺成纤维细胞给出类似结果(即，基础和最大呼吸显著增加，与在利用NRTI治疗的 细胞中的质子泄漏一样)。与心肌成纤维细胞类似，雷帕霉素治疗的肺成纤维细胞在暴露于 NRTI之后不展现这些参数的增加。

[0213] 实施例2：电子传递链成分响应于核苷/核苷酸类似物和雷帕霉素的改变

[0214] 检查NRTI暴露对电子传递链蛋白质的子集的稳态水平的作用。在暴露于NRTI之后， 复合物I的NADH脱氢酶(泛醌)1β亚复合物8(NDUFB8)、复合物II的琥珀酸脱氢酶(泛醌)铁硫亚基(SDHB)、复合物III的泛醇-细胞色素c还原酶核心蛋白II(UQCRC2)和复合物IV的细胞色素c氧化酶亚基I(mt-CO1)的水平都增加(图2A)。类似地，外膜电压依赖性通 道(VDAC)的稳态水平在暴露于NRTI的细胞中增加，而相比之下，ATP合酶α亚基1 (ATP5A)的稳态水平未改变(图2A)。

[0215] 利用雷帕霉素治疗的细胞表达低稳态水平的NDUFB8、SDHB、UQCRC2和mt-CO1， 而ATP5A的水平类似于对照细胞。另外，当雷帕霉素治疗的细胞暴露于NRTI时，ETC蛋 白质水平不升高(图2A)。

[0216] 也检查在线粒体清除中涉及的蛋白质Pink 1和Parkin的水平(图2B)。暴露于NRTI使 得Pink1和Pink1的裂解形式的增加，以及Parkin的减少。自噬货物装载蛋白p62/SQSTM1的水平响应于NRTI增加，但是响应于雷帕霉素减少(图2C)。

[0217] 线粒体有关的基因表达的差别使用nanostring途径检查，该途径使得在缺乏扩增下 mRNA物种的多重评价并且提供mRNA分子的直接计数。mRNA水平与在蛋白质水平中 观察到的改变平行，因为所有亚基的mRNA水平在暴露于NRTI的细胞中增加同时雷帕霉 素降低所有亚基的mRNA水平(图2D-2H)。

[0218] 实施例3：对线粒体功能紊乱的老化反应和通过雷帕霉素防护

[0219] 在暴露于NRTI之后检查老化程序的分子标记(图3A-3F)。p53、p21和p16的水平在

暴露于NRTI的成纤维细胞中增加,而在雷帕霉素治疗的细胞中,这些老化相关联蛋白质 的水平不增加(图3A)。此外,核纤层蛋白B1(其已知为在老化期间减少)的水平在暴露于 NRTI的细胞中减少。雷帕霉素阻止这种减少(图3A)。另外,IL-6(其是老化相关联的分泌 程序的组分)的细胞内水平在暴露于NRTI之后增加。与在老化程序中的阻断一致,雷帕霉 素治疗的细胞在暴露于NRTI之后不显示IL-6水平的增加(图3A)。检查在暴露于NRTI之 后表达老化标记(老化相关联的β-半乳糖苷酶(SA-β-gal))的细胞群体的百分比。观察到表达 SA-β-gal的心肌成纤维细胞的百分比的剂量依赖性增加(在对照细胞中9%,与分别暴露于 10或20ug/ml的NRTI的细胞中的28%和48%相比,图3B)。相比之下,雷帕霉素治疗的 培养物不显示SA-β-gal的增加(图3B)。通过nanostring的p21和核纤层蛋白B1的mRNA 水平的分析揭示了稳态mRNA水平与蛋白质水平平行改变,p21 mRNA响应于NRTI显著 增加,而核纤层蛋白B1 mRNA水平显著减少(图3C-3D),其与在复制老化期间对p21和核 纤层蛋白B1的表达的作用类似(图3E-3F)。

[0220] 在老化标记和通过雷帕霉素治疗赋予的防护方面,肺成纤维细胞显示了响应于NRTI 的相同改变。如通过活体染色排斥试验在测试条件的任一种下判断的,在暴露于NRTI的 细胞活力方面不存在降低,并且没有明显的细胞凋亡标记,比如胱天蛋白酶裂解。碱性彗 星试验没有显示增加的DNA损伤的证据,这表明对NRTI的反应主要地是生长抑制并且不是由于DNA损伤。也在NRTI暴露之后检查p53和其关键调节物MDM2之间的相互作用。暴露于NRTI降低p53和MDM2之间的关联并且增加丝氨酸166处的MDM2磷酸化。另 外,蛋白酶体抑制剂的使用揭示了p53的高分子量形式,其在雷帕霉素治疗的培养物中是 显著的但是在NRTI暴露之后降低。

[0221] 线粒体ROS在NRTI诱发的老化反应中的作用通过利用mito-Q(一种靶向线粒体ROS的ROS清除剂)治疗对照培养物(在没有雷帕霉素下生长),或通过将线粒体靶向的过氧化氢酶(mt-过氧化氢酶)引入心肌成纤维细胞检查。Mito-Q改善在暴露于NRTI后的线粒体ROS产生和老化相关联的蛋白质p53、p21和p16的增加二者(图4A)。此外,对SA-β-gal染色 阳性的细胞的百分比在利用mito-Q治疗的细胞中降低(图4B)。当细胞被mt-过氧化氢酶构 建体感染时,获得类似结果。在NRTI暴露之后老化相关联的蛋白质p16和p21的增加被 阻止并且对SA-β-gal染色阳性的细胞的百分比显著地降低(图4C-4D)。利用抗氧化剂trolox 和N-乙酰半胱氨酸(trolox/NAC)的组合治疗暴露于NRTI的细胞也阻止老化的诱发。老化 的标记(包括SA-β-gal表达以及p16和p21的水平)降低,同时核纤层蛋白B1的水平被维 持,与老化程序的抑制一致(图4E)。

[0222] 实施例4:老化中mTORC1/p70S6K信号传导的激活

[0223] 调查如下可能性:由p70S6K介导的MDM2磷酸化是对NRTI的细胞反应的组成。首 先验证暴露于NRTI增加p70S6K活性(通过检查核糖体S6蛋白的磷酸化状态)和MDM2的 磷酸化状态二者。核糖体S6蛋白和MDM2二者的磷酸化在暴露于NRTI的心肌成纤维细 胞中增加(图5A)。与老化的抑制一致,雷帕霉素治疗的培养物显示了核糖体S6磷酸化的 完全缺乏和MDM2磷酸化的不增加(图5A)。在该环境中,p70S6K在MDM2磷酸化中的 作用使用特异性p70S6K抑制剂PF-4708671检查。MDM2响应于NRTI的磷酸化被 PF-4708671抑制,与核糖体S6蛋白(其充当该抑制剂的阳性对照)的磷酸化一样(图5B)。

[0224] 也检查在暴露于NRTI的细胞中MAPK的抑制剂对核糖体S6和MDM2磷酸化的影响。

暴露于NRTI的细胞利用MAPK信号传导途径的3种成员的抑制剂MEK1(U0126)、Raf1(GW5047)和p90RSK(BI-D1870)治疗。所有3种MAPK抑制剂引起核糖体S6磷酸化的一 些降低,但是p90RSK抑制剂BI-D1870具有最大影响(图5C)。相比之下,p38应激激活激 酶的抑制剂SB-203580对核糖体蛋白S6或MDM2的磷酸化没有作用(图5D)。雷帕霉素、p70 S6激酶抑制剂、p90RSK的抑制剂和Trolox/NAC对响应于NRTI的核糖体S6和MDM2 磷酸化事件的作用在人肺成纤维细胞中验证。

[0225] 通过利用trolox/N-乙酰半胱氨酸治疗暴露于NRTI的细胞并检查核糖体S6磷酸化检查 NRTI诱发的p70S6K活性对ROS的依赖性。当利用trolox/N-乙酰半胱氨酸治疗暴露于NRTI 的细胞时,核糖体S6磷酸化和MDM2磷酸化二者降低(图5C)。使用apocyanin(一种NADPH 氧化酶的抑制剂)检查NADPH氧化酶系统的介入。但是,利用apocyanin治疗NRTI暴露的细胞不阻止核糖体S6磷酸化的增加。当人肺成纤维细胞暴露于NRTI时,在p7-S6激酶 和MDM磷酸化方面获得类似结果。

[0226] 为了检查线粒体ROS在mTOR活性的激活中的潜在作用,在NRTI暴露期间利用mito-Q或者在暴露于NRTI之前利用mt-过氧化氢酶腺病毒治疗细胞。这些干预中的两者mito-Q和mt-过氧化氢酶的表达降低了在暴露于NRTI之后的核糖体S6磷酸化和MDM2 磷酸化(图6A-6B)。另外,通过Seahorse Bioanalyzer检查mito-Q治疗的细胞以评估线粒体 活性。该分析揭示了mito-Q治疗部分地减轻基础呼吸、ATP关联的呼吸和质子泄漏的增加, 同时最大呼吸较少受影响(图6C-6F)。此外,当暴露于NRTI时,mito-Q治疗的细胞展现较 低水平的线粒体ROS(图6G)。

[0227] 为了确定增加的ROS是否可以直接地诱发核糖体S6蛋白的磷酸化,将心肌成纤维细 胞置于无血清培养基中48小时以废除可能影响mTORC1活性的生长因子信号传导。然后将细胞暴露于在1至400μM范围的浓度下的过氧化氢持续2小时。在较低浓度的过氧化 氢下,核糖体S6磷酸化和MDM2磷酸化二者增加,其中在50μM最大激活并且在高于 100μM的浓度下出现核糖体S6磷酸化和MDM2磷酸化二者的抑制(图7A)。对过氧化氢 的反应与血清反应不同,血清反应与复制反应一致,其导致核糖体S6蛋白而非MDM2的 磷酸化(图7A,最右)。为了确定线粒体ROS的诱发是否可以导致mTOR信号传导的激活, 将细胞暴露于一系列浓度的鱼藤酮并且检查核糖体S6蛋白的磷酸化。使细胞暴露于纳摩 尔浓度的鱼藤酮导致增加的S6磷酸化,其中在50nM处出现S6磷酸化的强烈抑制(图7B)。

[0228] 实施例5:mTORC1与线粒体响应于线粒体应激的缔合

[0229] 使用表达融合至线粒体-导向序列(mt-GFP)的绿色荧光蛋白的人心肌成纤维细胞检查 当细胞暴露于NRTI时与mTORC1复合物的线粒体缔合增强的可能性。使这些细胞暴露于 NRTI并且使用识别mTORC1特异性成分Raptor的抗体固定用于荧光染色。在暴露于NRTI的细胞中,Raptor以与在未治疗的细胞中相比更大程度与线粒体缔合(图8A-8C)。

[0230] 线粒体ROS在老化中的作用通过利用线粒体ROS清除剂mito-Q治疗老化的心肌成纤 维细胞或通过引入线粒体靶向的过氧化氢酶检查。最初,线粒体和总细胞ROS的水平在晚 期传代细胞中检查。该评估揭示了线粒体ROS和总细胞ROS在晚期传代细胞中的升高水平(图9A-9B)。通过Seahorse Bioanalyzer的线粒体活性的评估揭示了升高的呼吸,与在老化细胞中使用分离的线粒体的先前研究一致。Bioanalyzer分析表明基础和ATP关联的呼吸速率二者在老化细胞中显著增加(与早期传代细胞相比),与质子泄漏相同(图9C-9G)。

[0231] 在心肌成纤维细胞中验证在复制老化期间核糖体S6和MDM2磷酸化的递增(图9H)。为了测试老化细胞中核糖体S6蛋白对ROS的磷酸化的依赖性,利用ROS清除剂trolox和 N-乙酰半胱氨酸治疗老化细胞。并行地,将mt-过氧化氢酶引入老化细胞以降低线粒体ROS 产生。这些干预中的两者降低老化成纤维细胞典型的核糖体S6磷酸化的高基础水平并且 降低磷酸化的MDM2的水平。此外,利用p90RSK抑制剂BI-D1870治疗也降低老化细胞 中核糖体S6和MDM2磷酸化二者(图9I)。

[0232] 实施例6:雷帕霉素的体内外部应用

[0233] 进行单点开放式标记研究(single site open label study)。对于制剂R的应用,评估在手 上呈现皮肤萎缩和光化性角化症区域的患者。具有类似皮肤厚度但是没有光化性角化症的 对侧手被用作对照。根据每天两次应用的指令为患者提供制剂R。

[0234] 在2周(14天)时期之后,光化性角化症和皮肤增厚二者显示改善迹象,如通过患者自 我报告的和通过研究人员发现的。皮肤厚度的评估揭示了～20％的皮肤厚度的增加(1.6 SD 0.13未治疗的相对于1.9 SD 0.19治疗的)。光化性角化症从等级3改善为等级2。14天的 随访患者没有观察到或报告不良反应的证据。继续应用制剂R超过最初的14天时期提供 了持续的益处,同时施用不含雷帕霉素的运载体制剂对于对侧手中的皮肤厚度没有影响。

[0235] 本文引用的每个专利、专利申请和出版物的公开内容在此通过引用以其全部被并入本 文。

[0236] 虽然已经参照具体实施方式公开了本发明,但是明显的是,本发明的其它实施方式和 变化可以由本领域技术人员设计而不背离本发明的真实精神和范围。所附权利要求书意欲 被解释为包括所有这样的实施方式和等价变化。

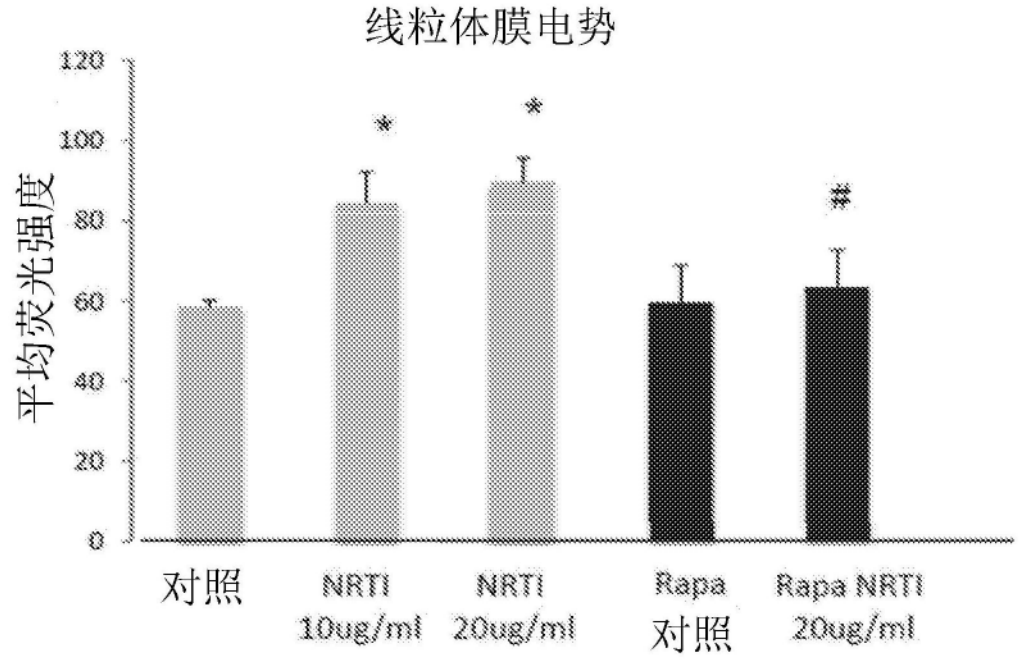

线粒体膜电势
平均荧光强度
120
100
80
60
40
20
0
*
*
#
对照
NRTI 10ug/ml
NRTI 20ug/ml
Rapa 对照
Rapa NRTI 20ug/ml

图1A

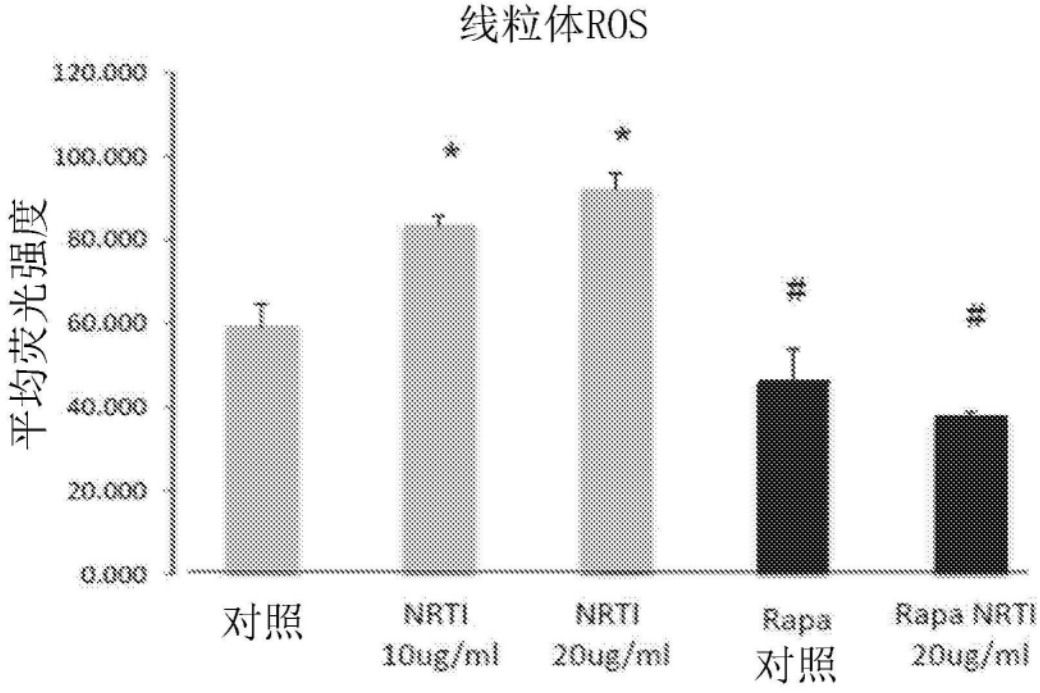

线粒体ROS
平均荧光强度
120.000
100.000
80.000
60.000
40.000
20.000
0.000
*
*
#
#
对照
NRTI 10ug/ml
NRTI 20ug/ml
Rapa 对照
Rapa NRTI 20ug/ml

图1B

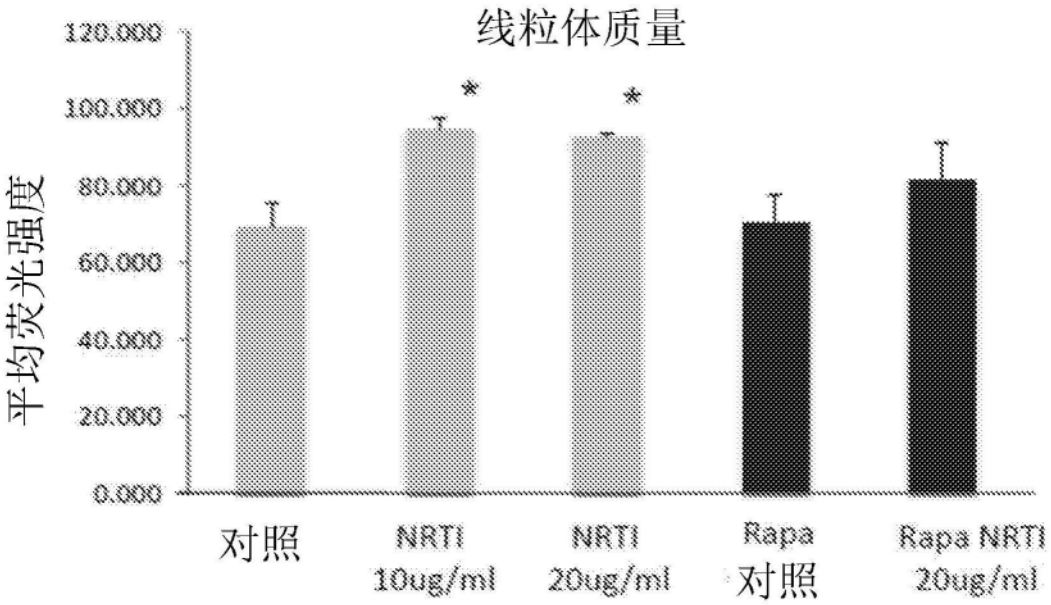

线粒体质量
平均荧光强度
120.000
100.000
80.000
60.000
40.000
20.000
0.000
*
*
对照
NRTI 10ug/ml
NRTI 20ug/ml
Rapa 对照
Rapa NRTI 20ug/ml

图1C

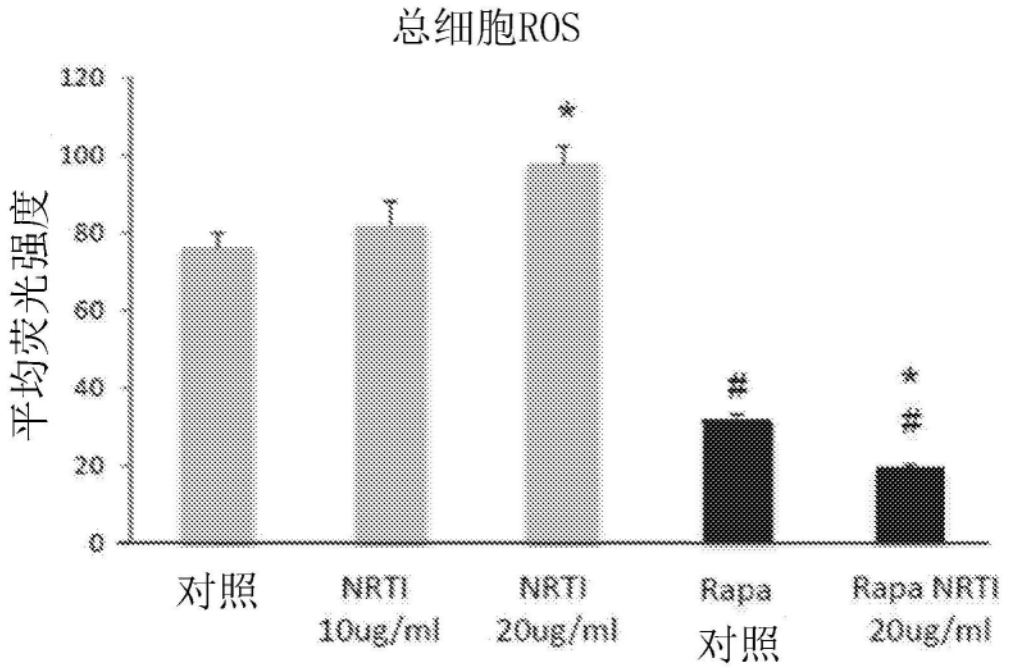

总细胞ROS
平均荧光强度
120
100
80
60
40
20
0
*
#
*
#
对照
NRTI 10ug/ml
NRTI 20ug/ml
Rapa 对照
Rapa NRTI 20ug/ml

图1D

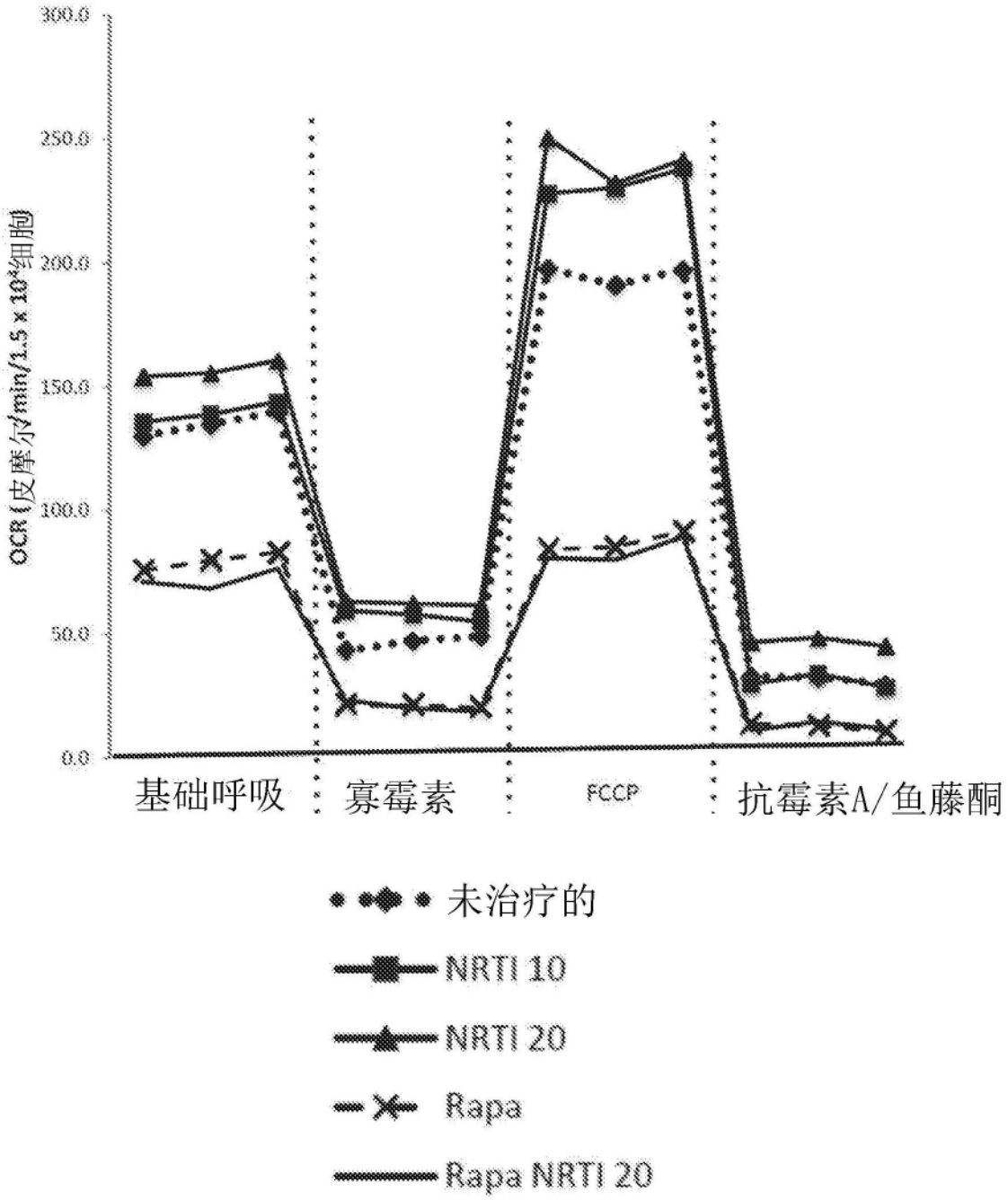

300.0
250.0
200.0
150.0
100.0
50.0
0.0
OCR (皮摩尔/min/1.5 x 10⁴细胞)
基础呼吸
寡霉素
FCCP
抗霉素A/鱼藤酮
未治疗的
NRTI 10
NRTI 20
Rapa
Rapa NRTI 20

图1E

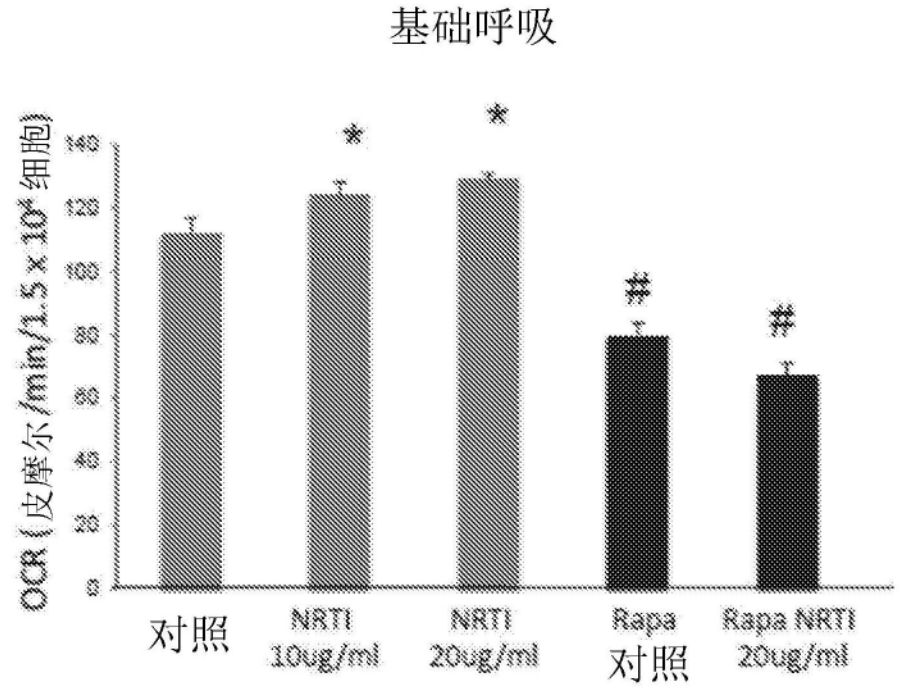

基础呼吸
OCR(皮摩尔/min/1.5 x 10⁴细胞)
0
20
40
60
80
100
120
140
*
*
#
#
对照
NRTI 10ug/ml
NRTI 20ug/ml
Rapa
对照
Rapa NRTI 20ug/ml

图1F

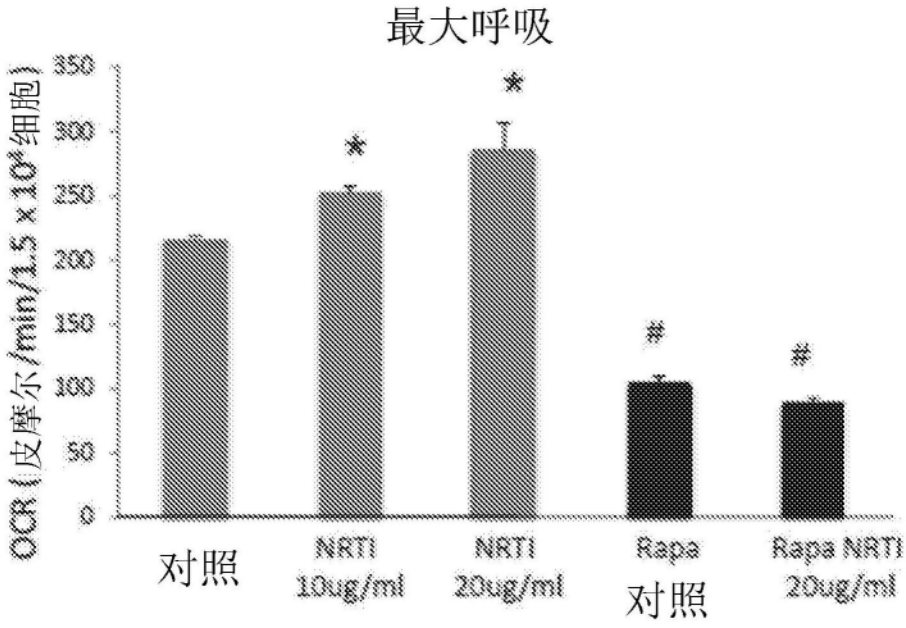

最大呼吸
OCR(皮摩尔/min/1.5 x 10⁴细胞)
0
50
100
150
200
250
300
350
*
*
#
#
对照
NRTI 10ug/ml
NRTI 20ug/ml
Rapa
对照
Rapa NRTI 20ug/ml

图1G

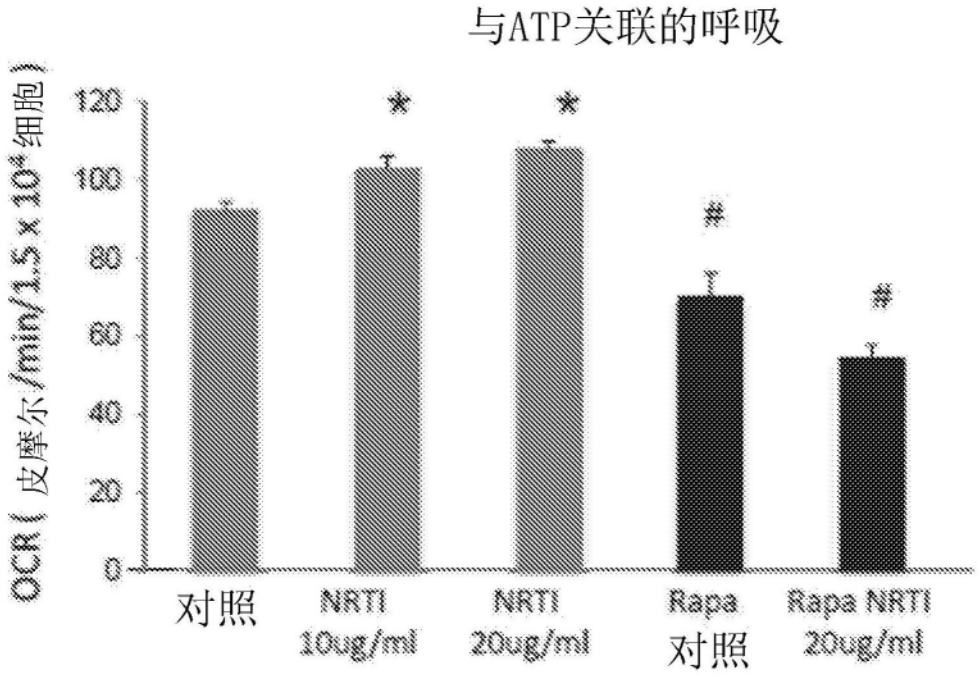

与ATP关联的呼吸
OCR(皮摩尔/min/1.5 x 10⁴细胞)
120
100
80
60
40
20
0
*
*
#
#
对照
NRTI 10ug/ml
NRTI 20ug/ml
Rapa
对照
Rapa NRTI 20ug/ml

图1H

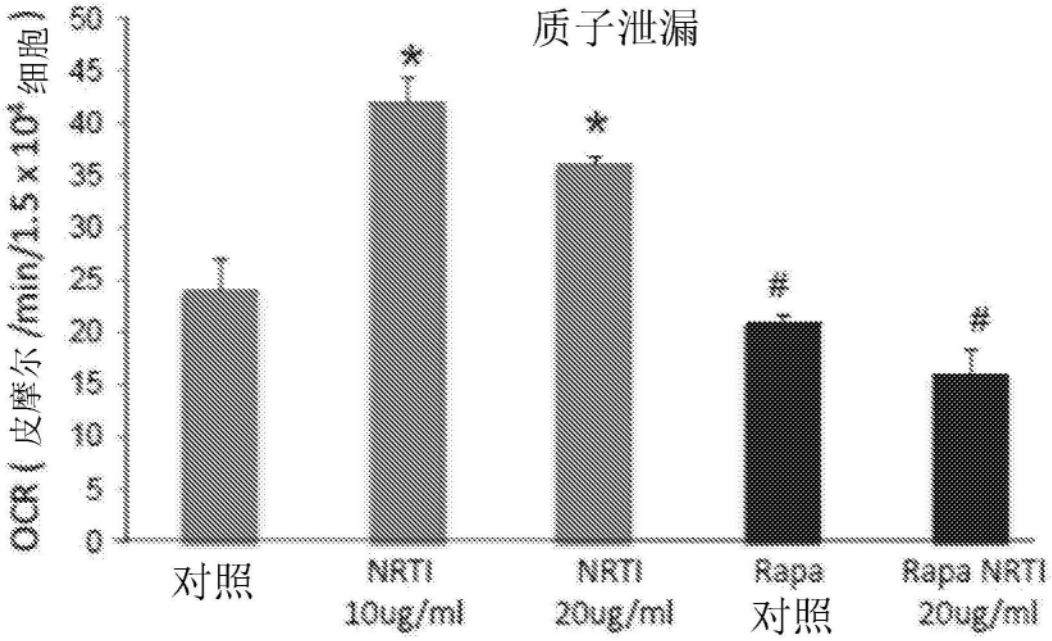

质子泄漏
OCR(皮摩尔/min/1.5 x 10⁴细胞)
50
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
*
*
#
#
对照
NRTI 10ug/ml
NRTI 20ug/ml
Rapa
对照
Rapa NRTI 20ug/ml

图1I

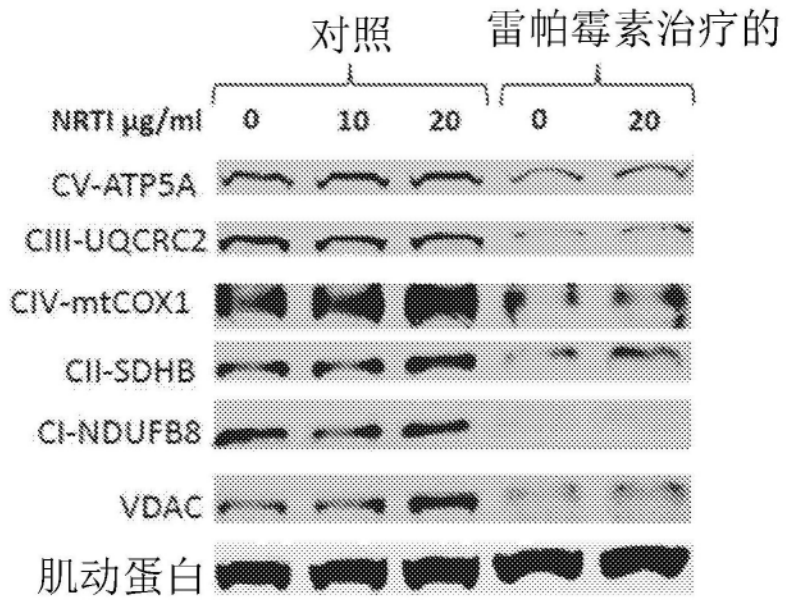

对照
雷帕霉素治疗的
NRTI μg/ml
0
10
20
0
20
CV-ATP5A
CIII-UQCRC2
CIV-mtCOX1
CII-SDHB
CI-NDUFB8
VDAC
肌动蛋白

图2A

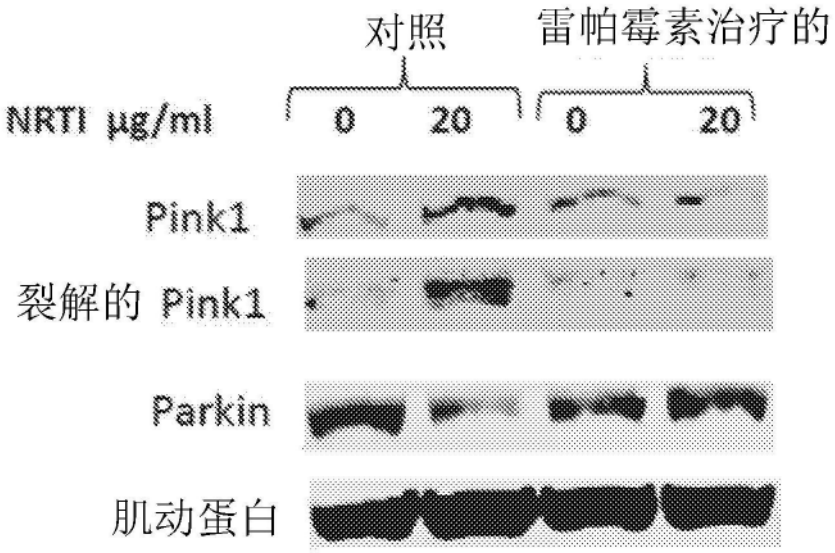

对照
雷帕霉素治疗的
NRTI μg/ml
0
20
0
20
Pink1
裂解的 Pink1
Parkin
肌动蛋白

图2B

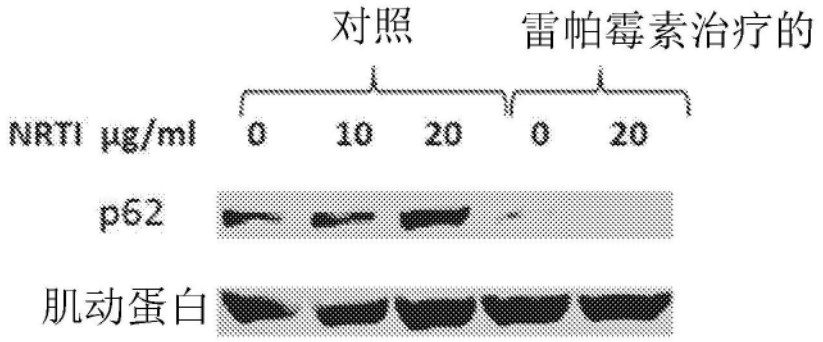

对照
雷帕霉素治疗的
NRTI μg/ml
0
10
20
0
20
p62
肌动蛋白

图2C

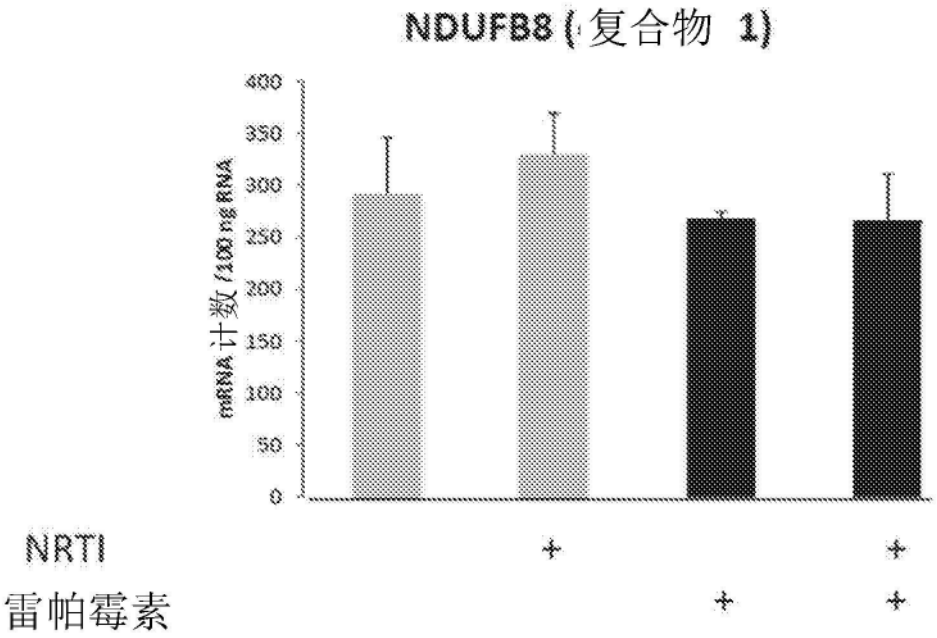

NDUFB8 (复合物 1)
mRNA 计数/100 ng RNA
400
350
300
250
200
150
100
50
0
NRTI
雷帕霉素
+
+
+
+

图2D

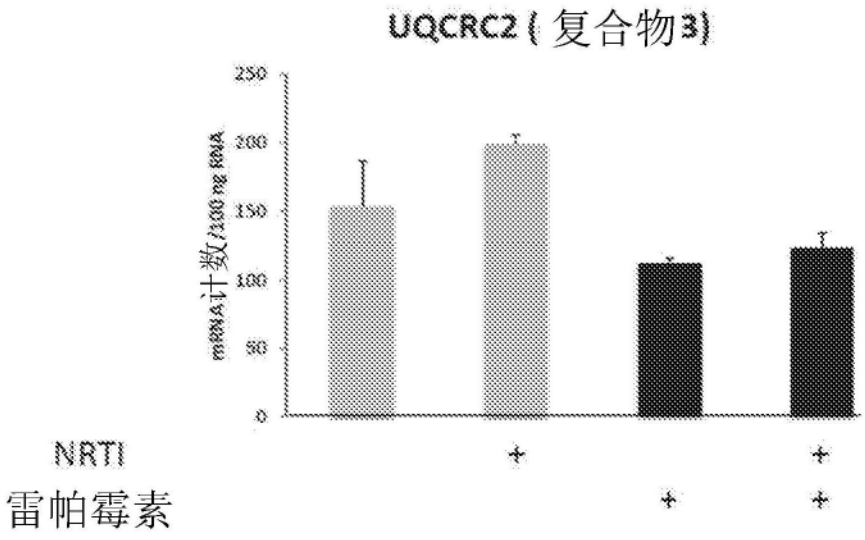

UQCRC2 (复合物3)
mRNA计数/100 ng RNA
250
200
150
100
50
0
NRTI
+
+
雷帕霉素
+
+

图2E

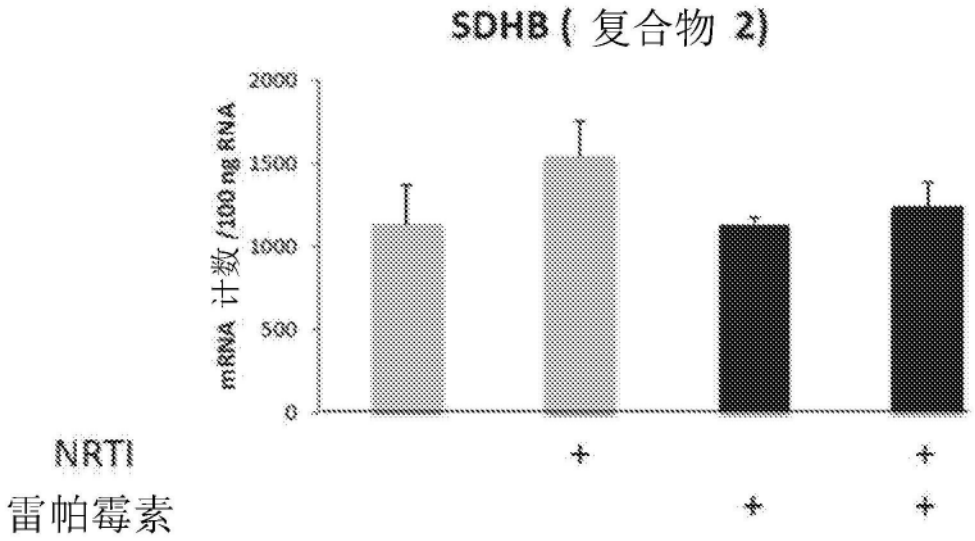

SDHB (复合物 2)
mRNA 计数/100 ng RNA
2000
1500
1000
500
0
NRTI
+
+
雷帕霉素
+
+

图2F

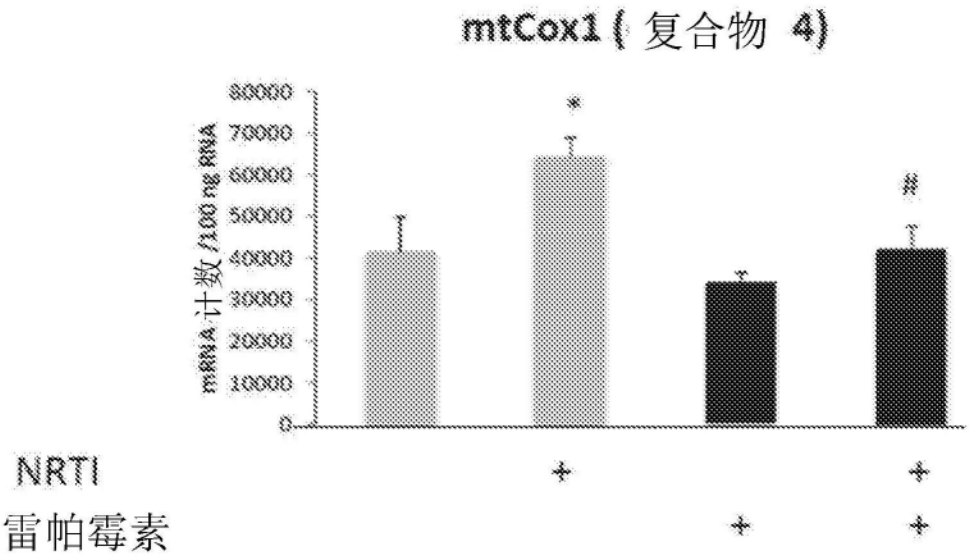

mtCox1 (复合物 4)
mRNA 计数 /100 ng RNA
80000
70000
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
*
#
NRTI
雷帕霉素
+
+
+
+

图2G

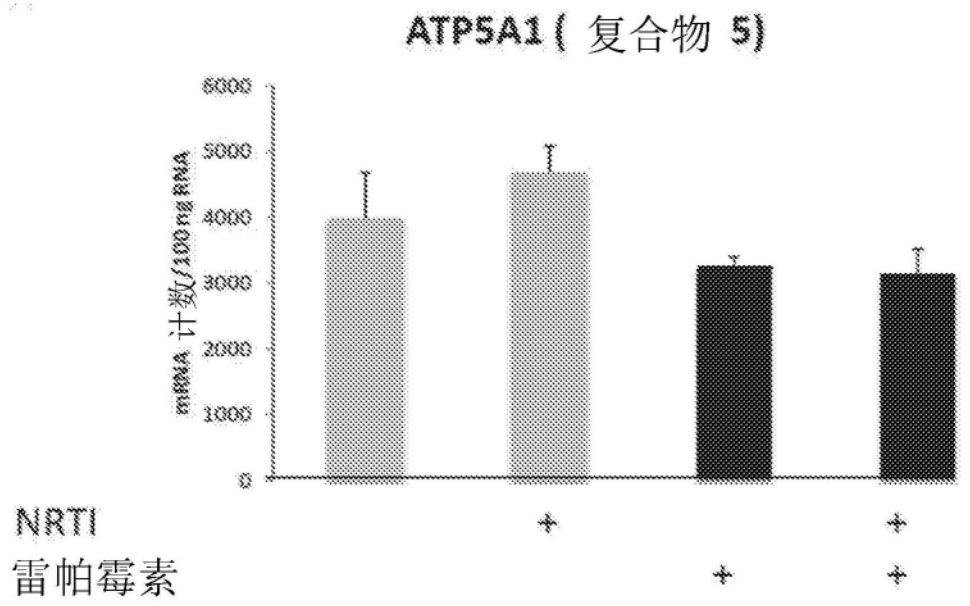

ATP5A1 (复合物 5)
mRNA 计数/100 ng RNA
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
NRTI
雷帕霉素
+
+
+
+

图2H

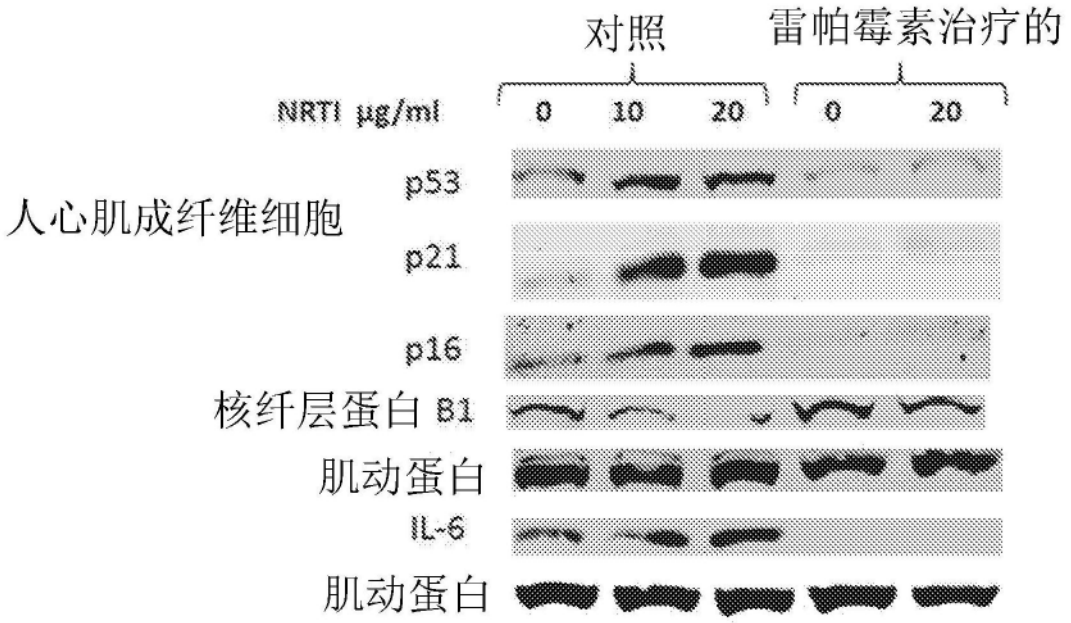

对照
雷帕霉素治疗的
NRTI μg/ml
0
10
20
0
20
人心肌成纤维细胞
p53
p21
p16
核纤层蛋白 B1
肌动蛋白
IL-6
肌动蛋白

图3A

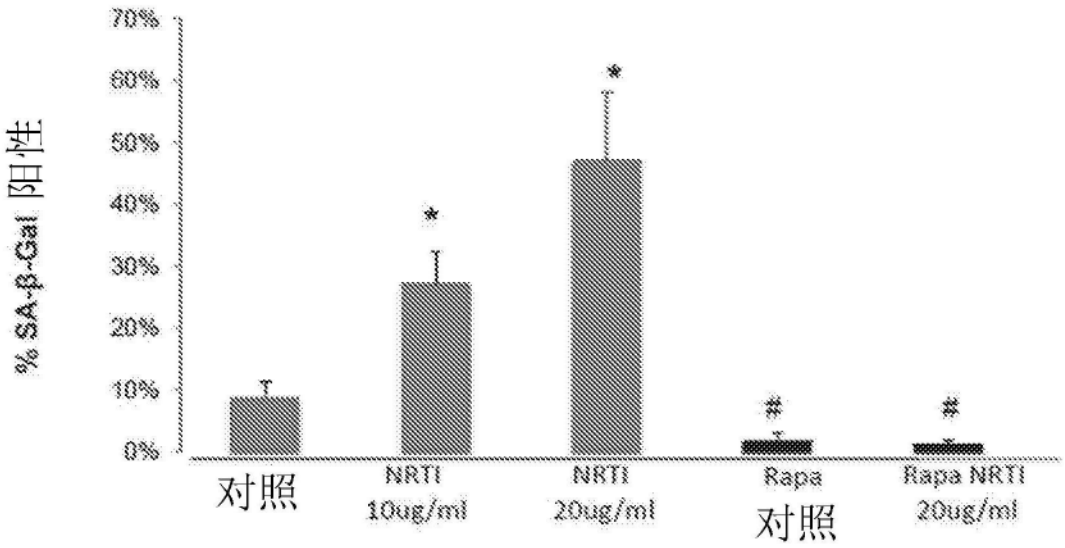

% SA-β-Gal 阳性
70%
60%
50%
40%
30%
20%
10%
0%
*
*
#
#
对照
NRTI 10ug/ml
NRTI 20ug/ml
Rapa
Rapa NRTI 20ug/ml
对照

图3B

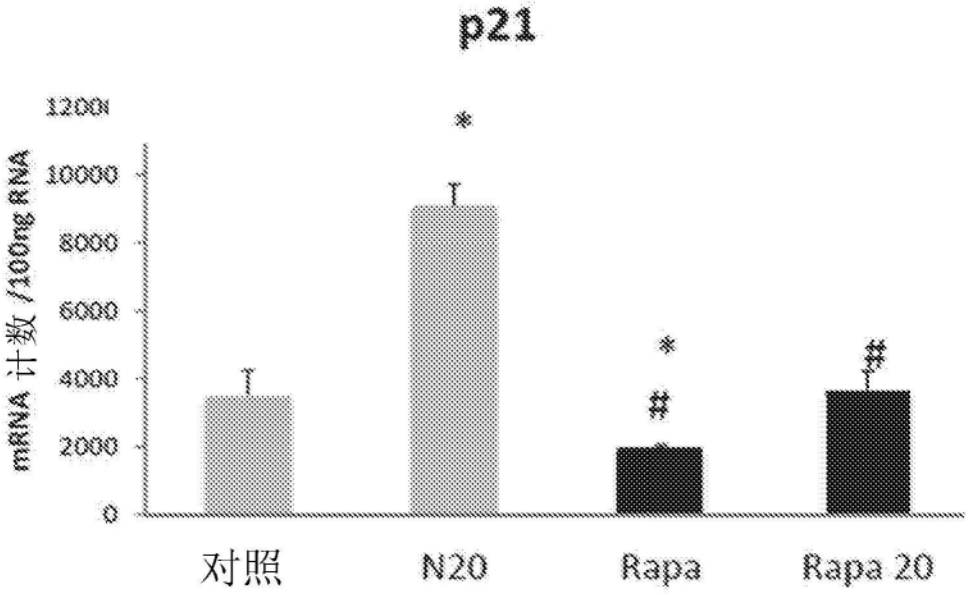

p21
mRNA 计数 /100ng RNA
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
*
*
#
#
对照
N20
Rapa
Rapa 20

图3C

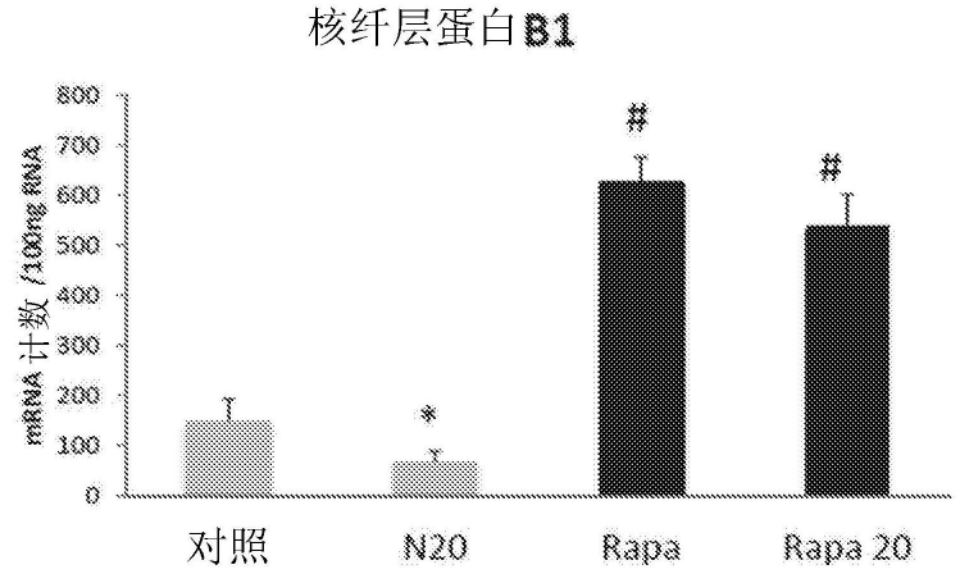

核纤层蛋白B1
mRNA 计数 /100ng RNA
800
700
600
500
400
300
200
100
0
*
#
#
对照
N20
Rapa
Rapa 20

图3D

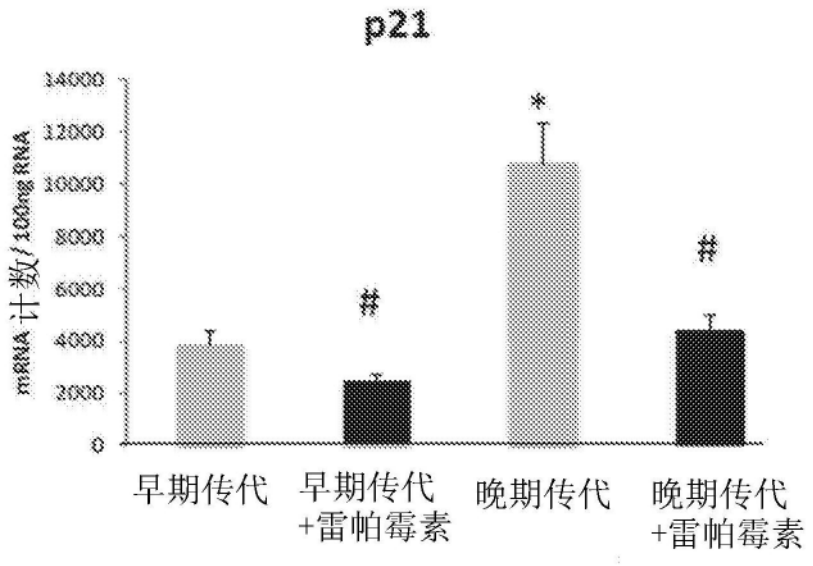

p21
mRNA 计数/100ng RNA
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
*
#
#
早期传代
早期传代
+雷帕霉素
晚期传代
晚期传代
+雷帕霉素

图3E

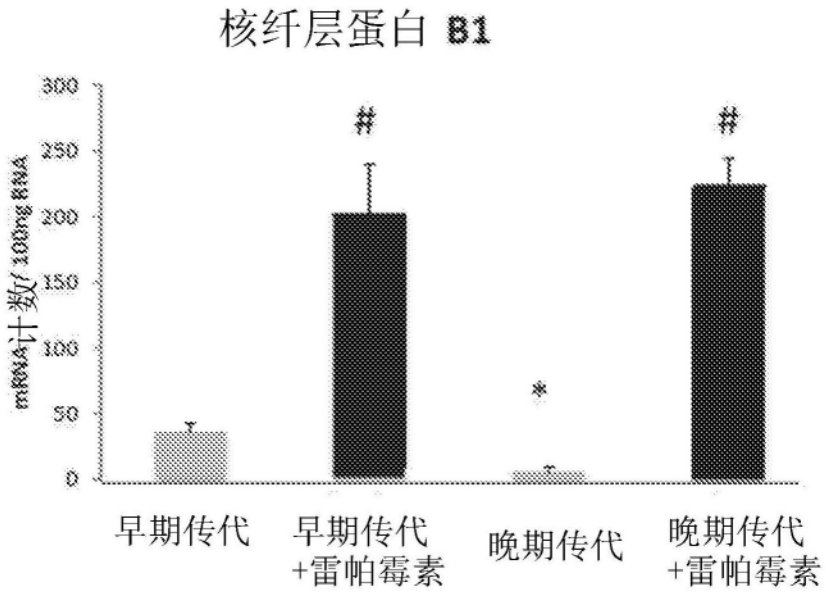

核纤层蛋白 B1
mRNA计数/100ng RNA
300
250
200
150
100
50
0
#
*
#
早期传代
早期传代
+雷帕霉素
晚期传代
晚期传代
+雷帕霉素

图3F

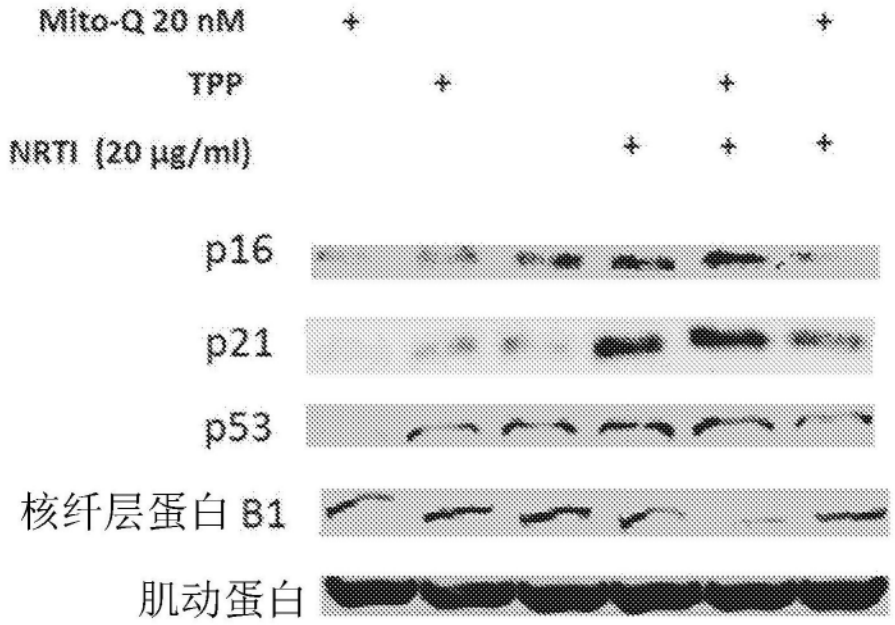

Mito-Q 20 nM
TPP
NRTI (20 μg/ml)
p16
p21
p53
核纤层蛋白 B1
肌动蛋白

图4A

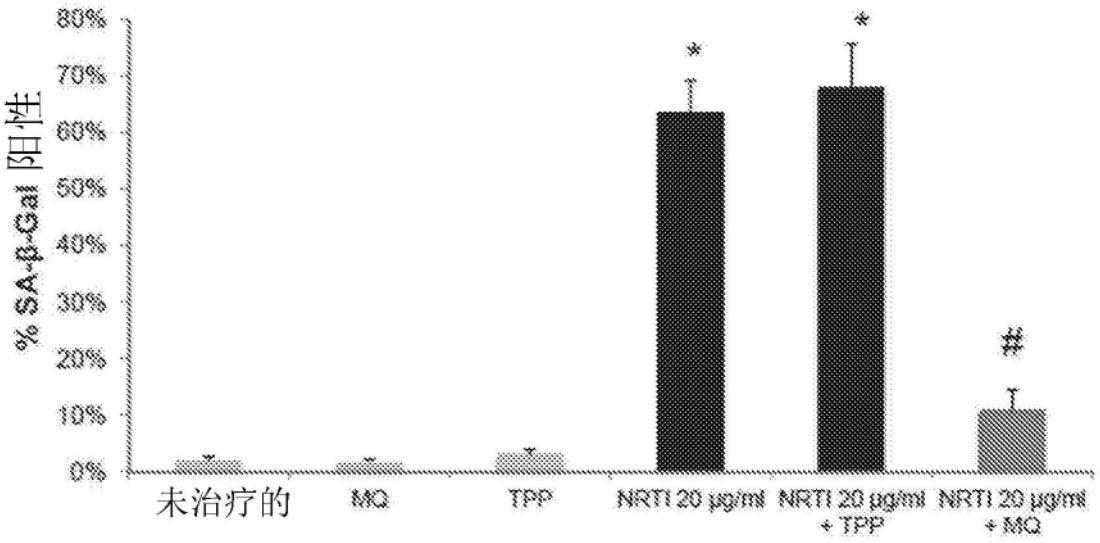

% SA-β-Gal 阳性
80%
70%
60%
50%
40%
30%
20%
10%
0%
*
*
#
未治疗的
MQ
TPP
NRTI 20 μg/ml
NRTI 20 μg/ml + TPP
NRTI 20 μg/ml + MQ

图4B

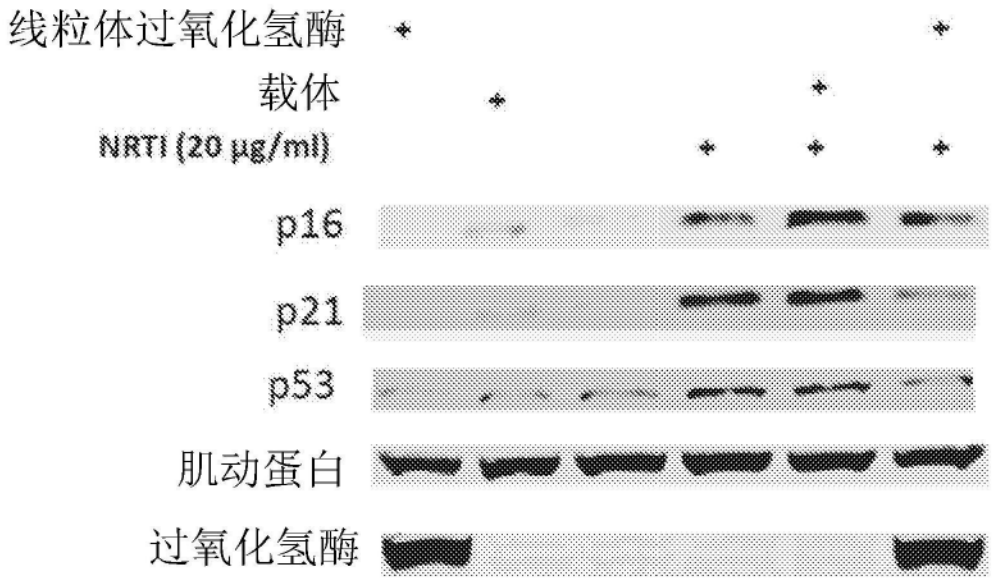

线粒体过氧化氢酶
载体
NRTI (20 μg/ml)
p16
p21
p53
肌动蛋白
过氧化氢酶

图4C

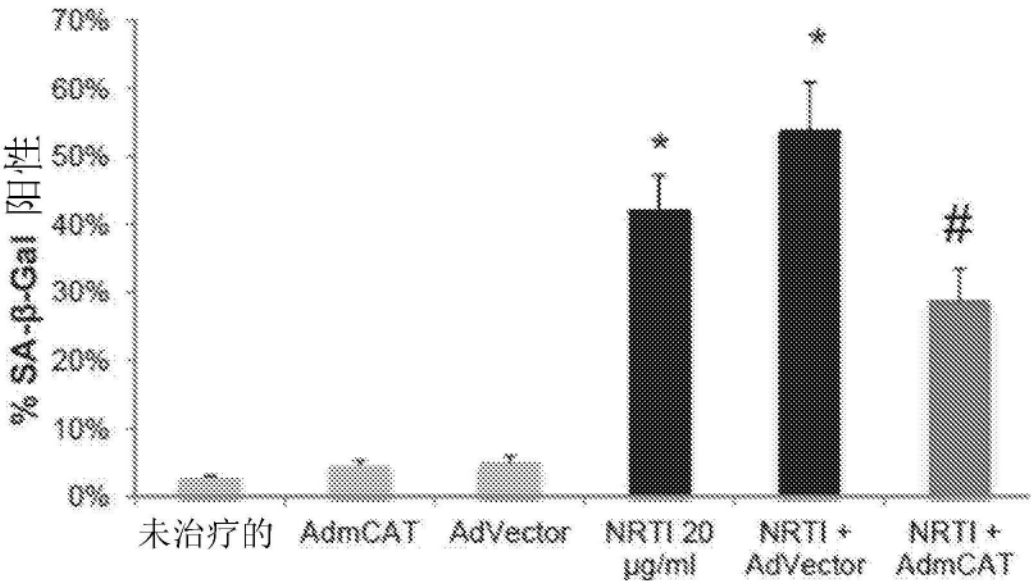

% SA-β-Gal 阳性
70%
60%
50%
40%
30%
20%
10%
0%
*
*
#
未治疗的
AdmCAT
AdVector
NRTI 20 μg/ml
NRTI + AdVector
NRTI + AdmCAT

图4D

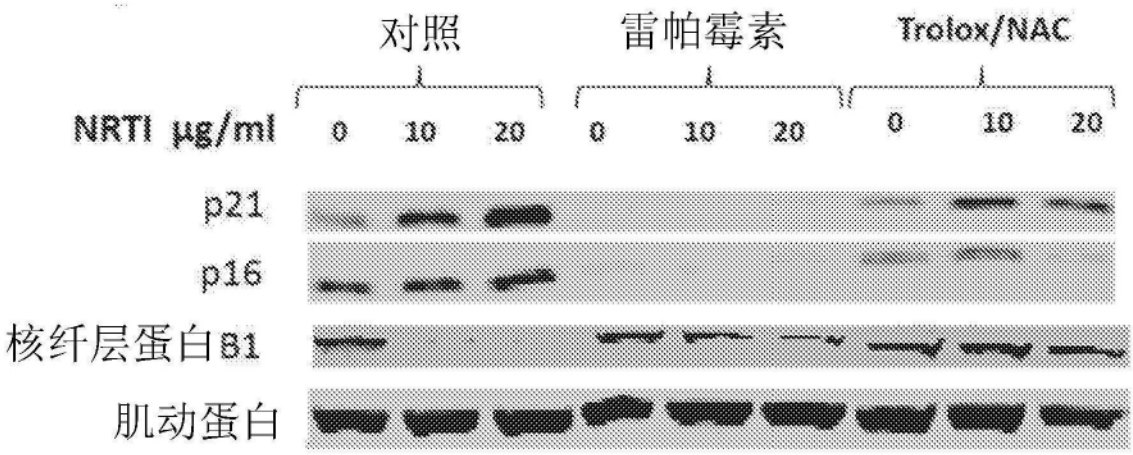

对照
雷帕霉素
Trolox/NAC
NRTI μg/ml
0
10
20
0
10
20
0
10
20
p21
p16
核纤层蛋白B1
肌动蛋白

图4E

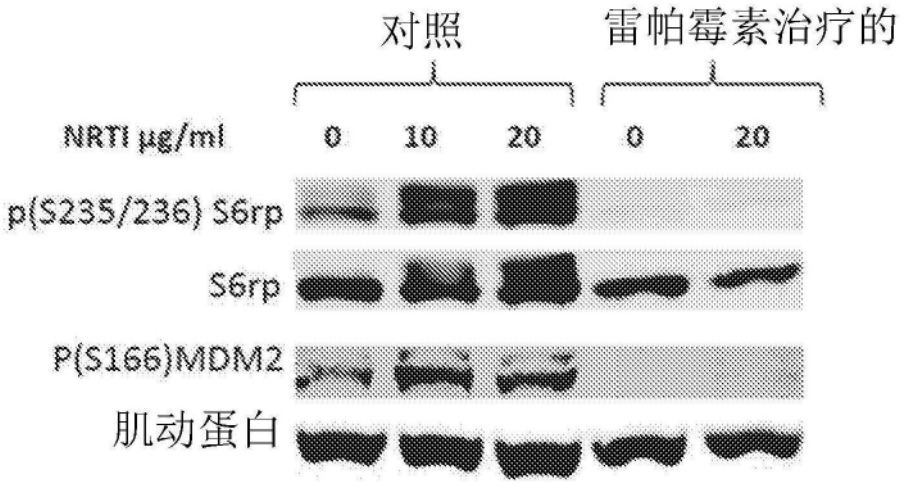

对照
雷帕霉素治疗的
NRTI μg/ml
0
10
20
0
20
p(S235/236) S6rp
S6rp
P(S166)MDM2
肌动蛋白

图5A

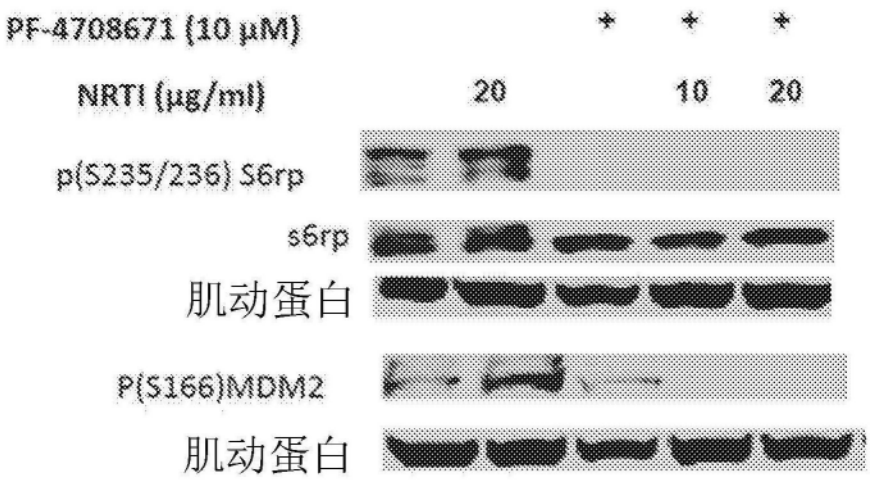

PF-4708671 (10 μM)
+
+
+
NRTI (μg/ml)
20
10
20
p(S235/236) S6rp
s6rp
肌动蛋白
P(S166)MDM2
肌动蛋白

图5B

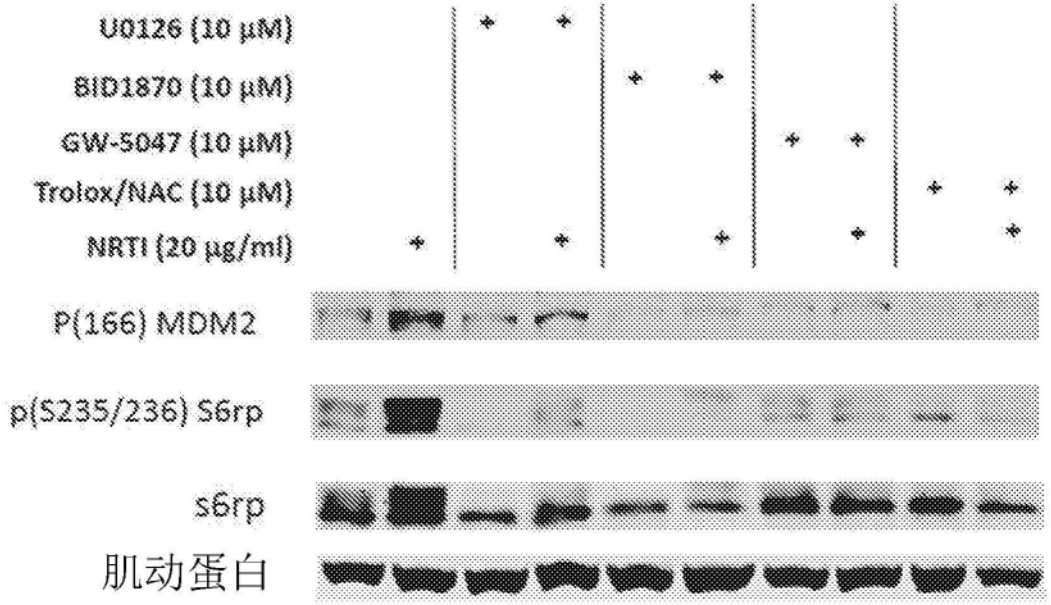

U0126 (10 μM)
BID1870 (10 μM)
GW-5047 (10 μM)
Trolox/NAC (10 μM)
NRTI (20 μg/ml)
P(166) MDM2
p(S235/236) S6rp
s6rp
肌动蛋白

图5C

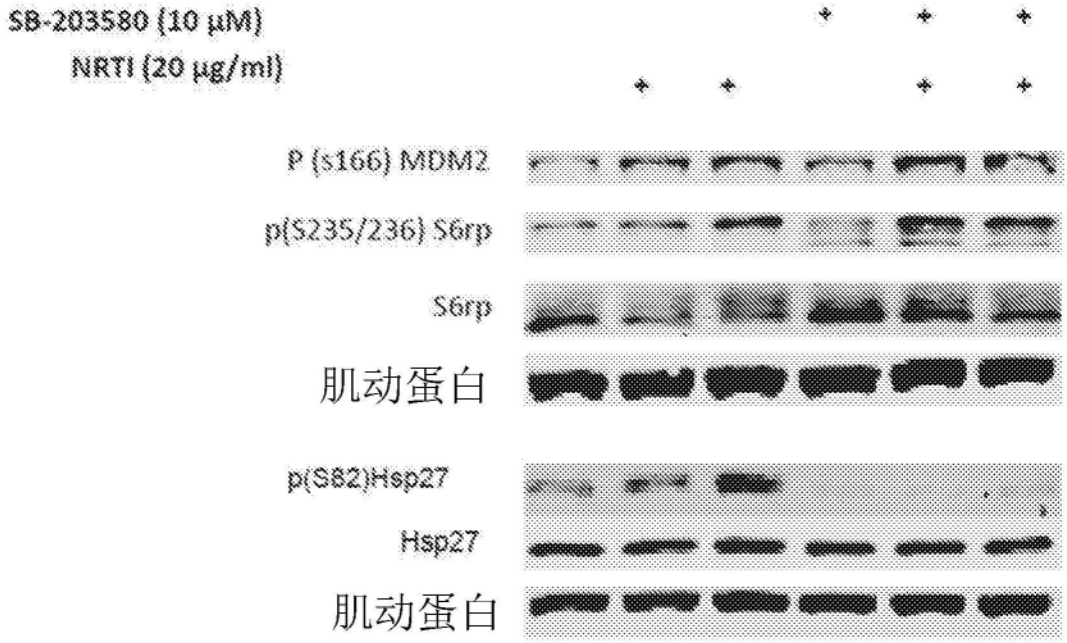

SB-203580 (10 μM)
NRTI (20 μg/ml)
P (s166) MDM2
p(S235/236) S6rp
S6rp
肌动蛋白
p(S82)Hsp27
Hsp27
肌动蛋白

图5D

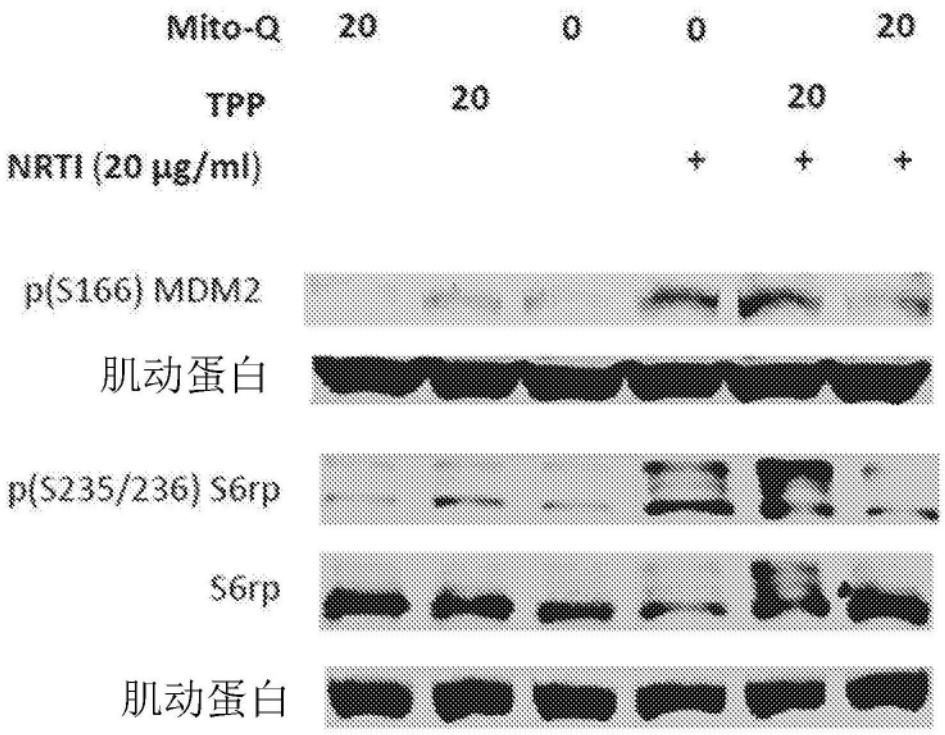

Mito-Q 20 0 0 20
TPP 20 20
NRTI (20 μg/ml) + + +
p(S166) MDM2
肌动蛋白
p(S235/236) S6rp
S6rp
肌动蛋白

图6A

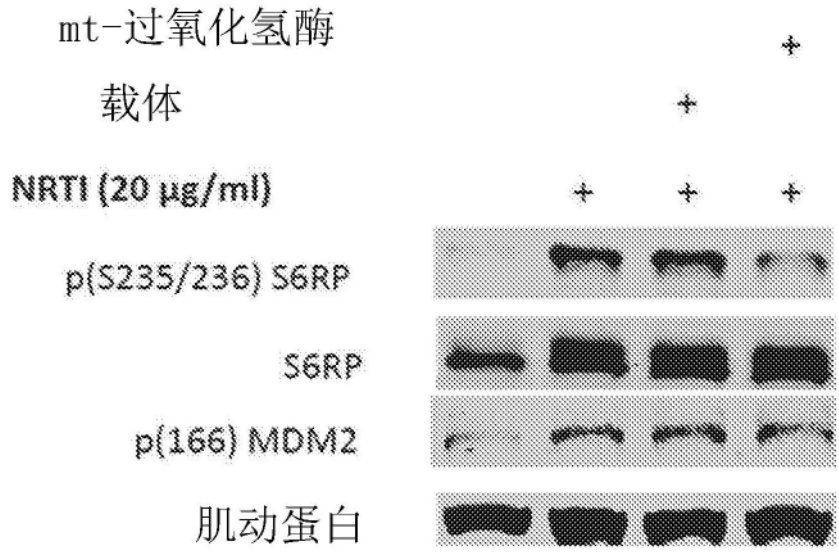

mt-过氧化氢酶 +
载体 +
NRTI (20 μg/ml) + + +
p(S235/236) S6RP
S6RP
p(166) MDM2
肌动蛋白

图6B

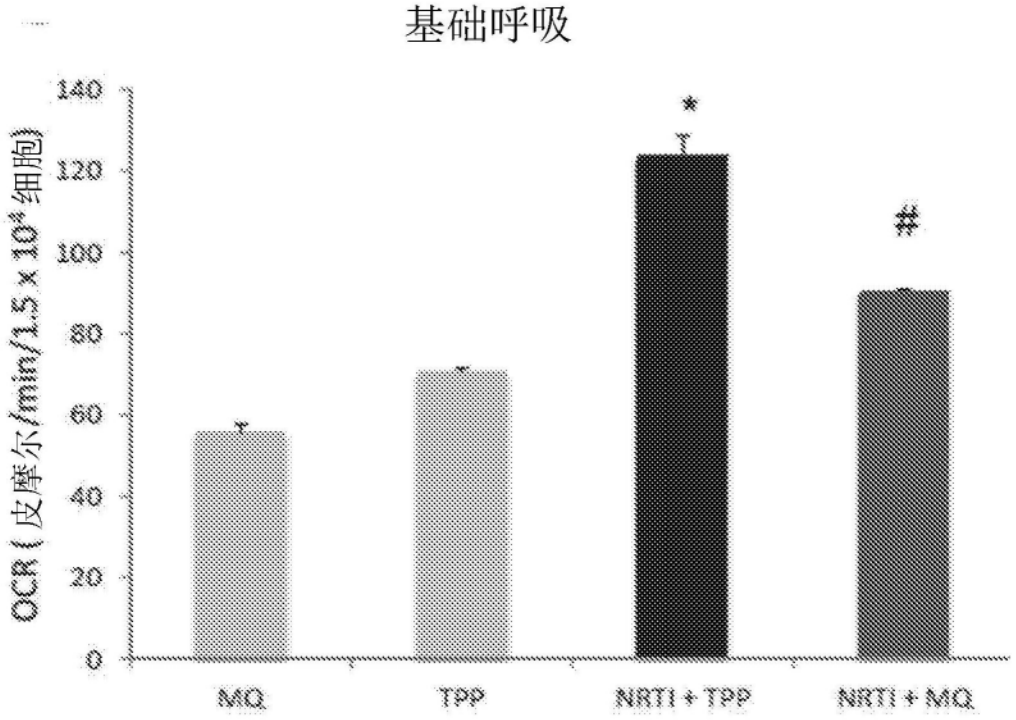

基础呼吸
OCR (皮摩尔/min/1.5 x 10⁴细胞)
140
120
100
80
60
40
20
0
*
#
MQ
TPP
NRTI + TPP
NRTI + MQ

图6C

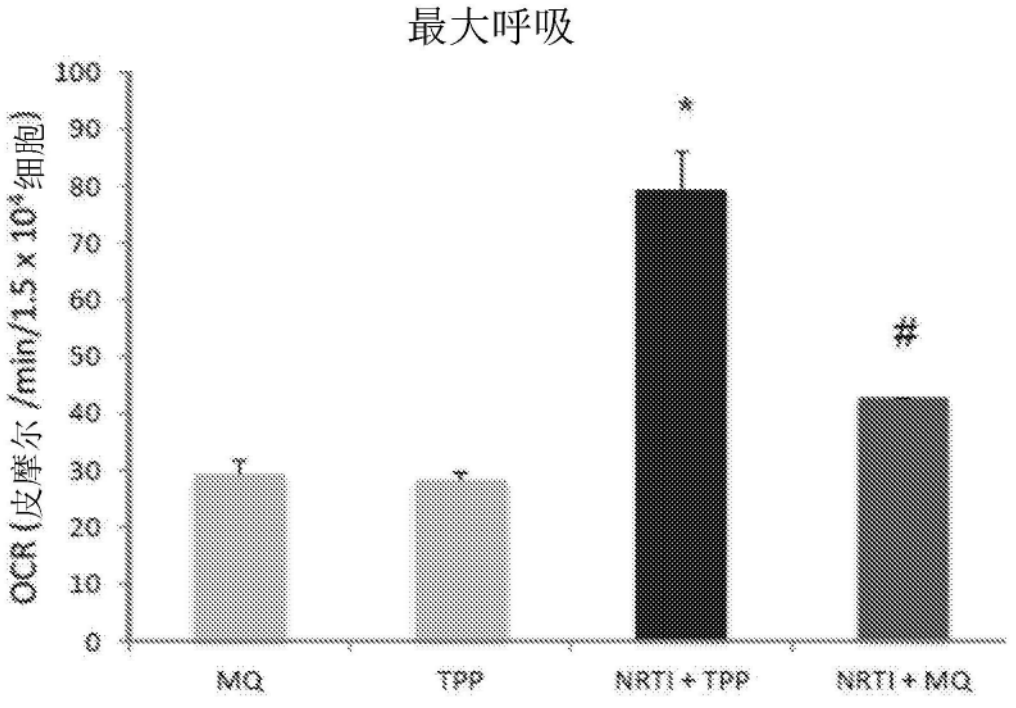

最大呼吸
OCR (皮摩尔/min/1.5 x 10⁴细胞)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
*
#
MQ
TPP
NRTI + TPP
NRTI + MQ

图6D

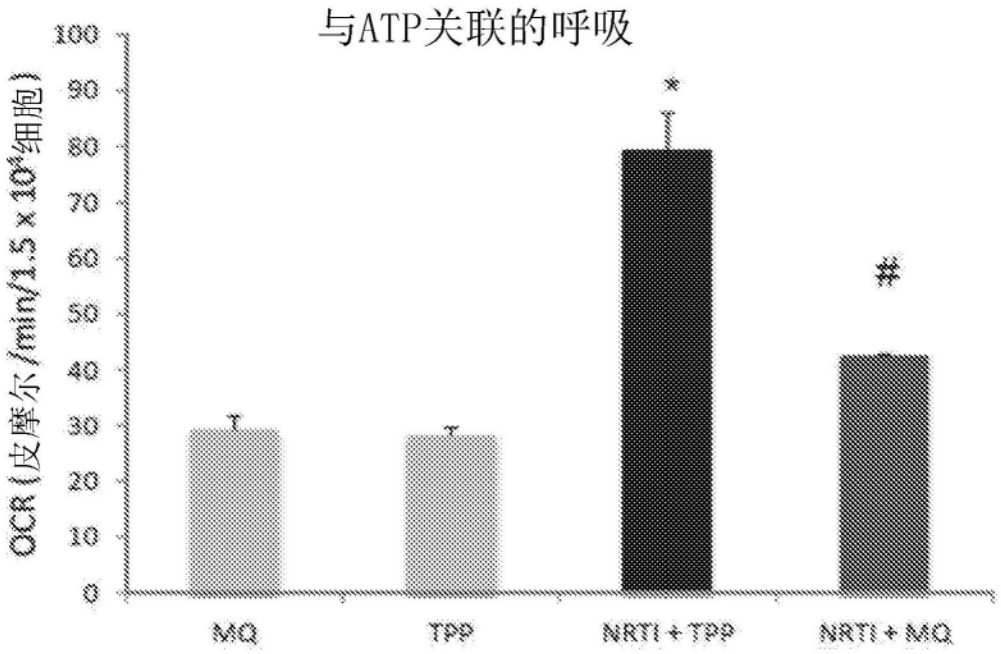

与ATP关联的呼吸
OCR (皮摩尔/min/1.5 x 10⁴细胞)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
*
#
MQ
TPP
NRTI + TPP
NRTI + MQ

图6E

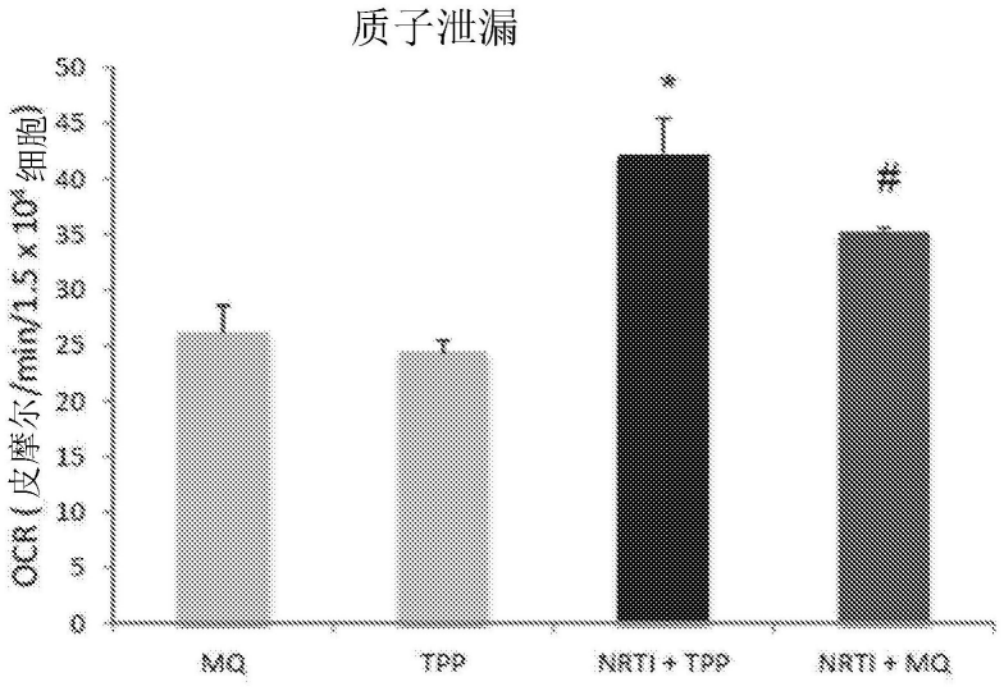

质子泄漏
OCR (皮摩尔/min/1.5 x 10⁴ 细胞)
50
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
*
#
MQ
TPP
NRTI + TPP
NRTI + MQ

图6F

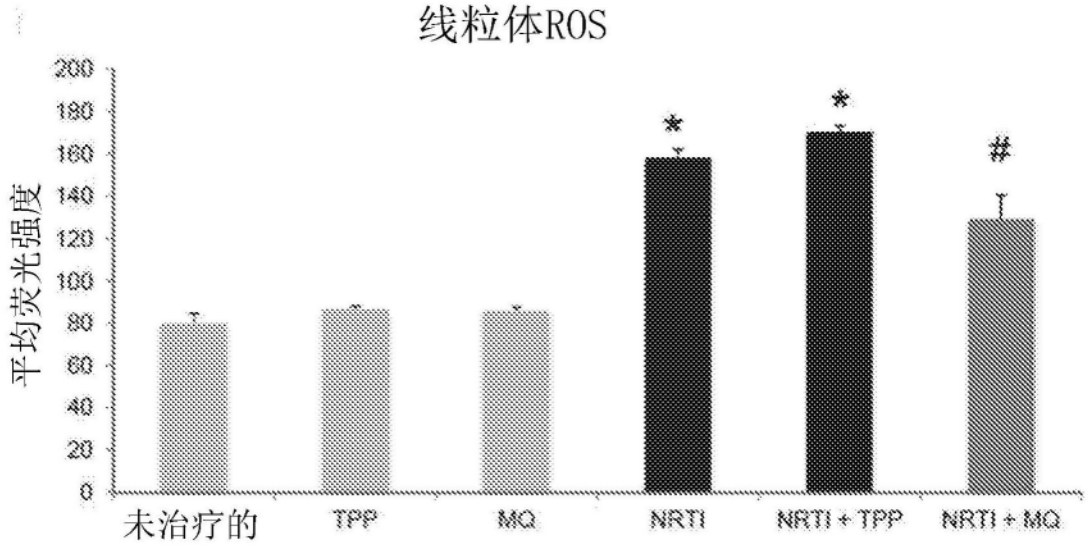

线粒体ROS
平均荧光强度
200
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
*
*
#
未治疗的
TPP
MQ
NRTI
NRTI + TPP
NRTI + MQ

图6G

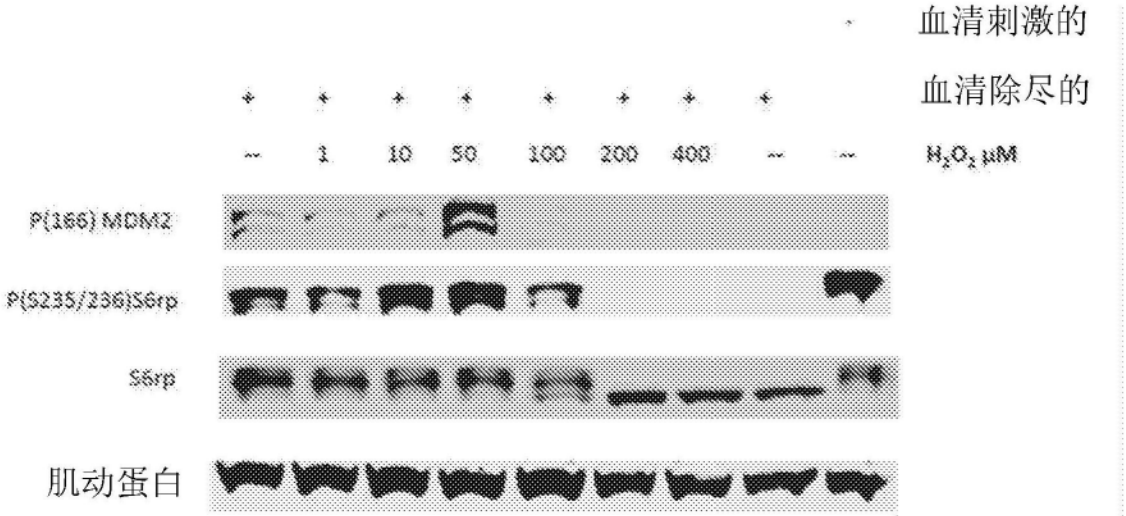

血清刺激的
血清除尽的
+ + + + + + + +
– 1 10 50 100 200 400 – –
H_2O_2 μM
P(166) MDM2
P(S235/236)S6rp
S6rp
肌动蛋白

图7A

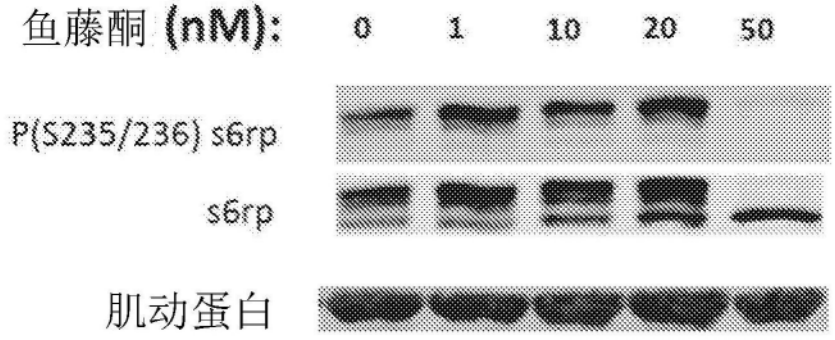

鱼藤酮 (nM): 0 1 10 20 50
P(S235/236) s6rp
s6rp
肌动蛋白

图7B

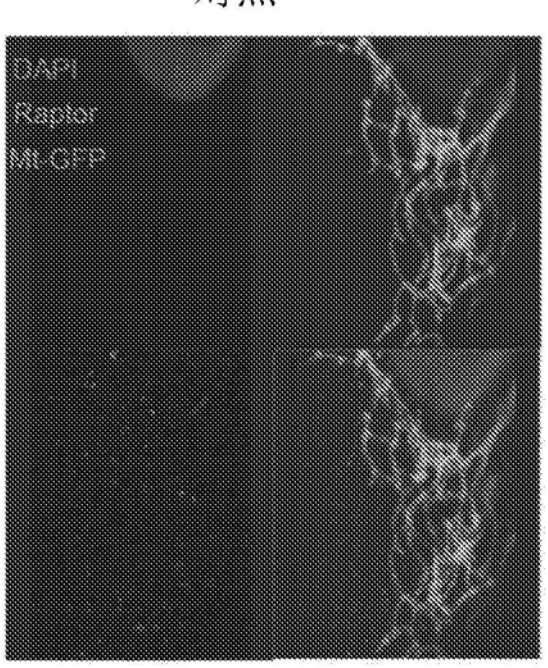


图8A

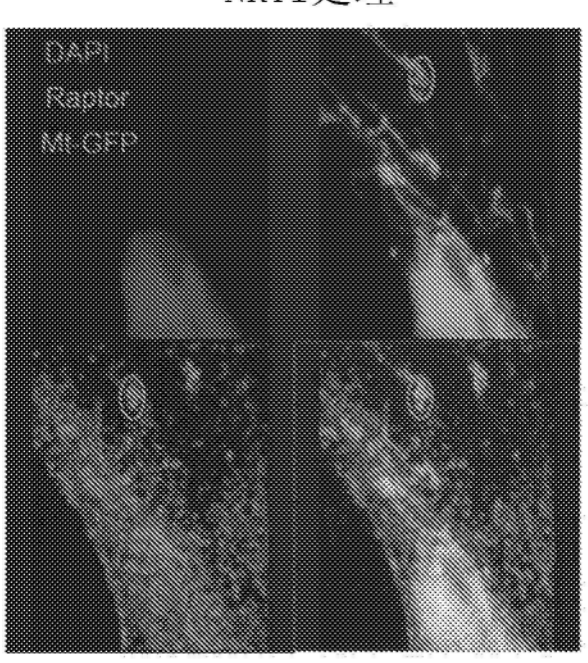


图8B

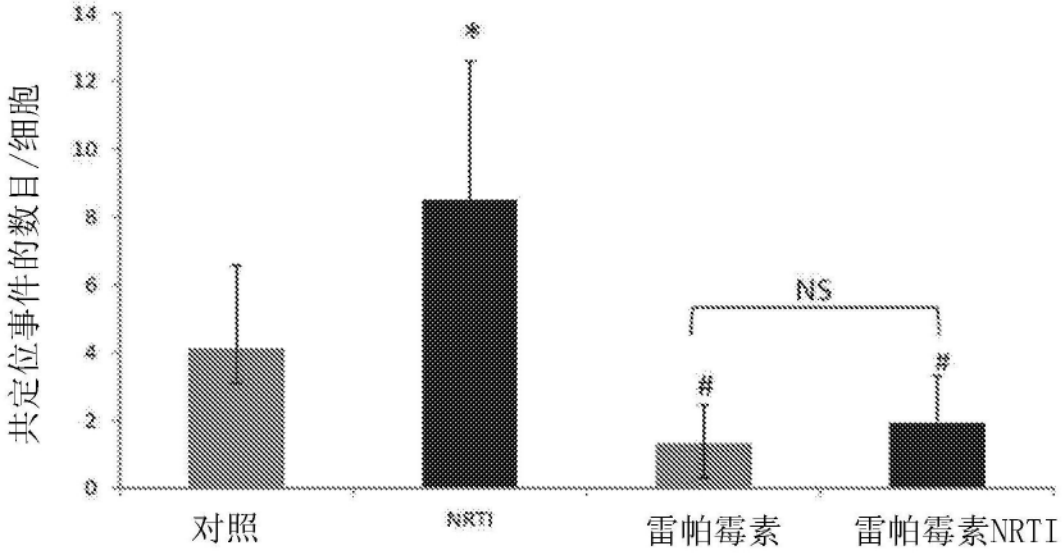

共定位事件的数目/细胞
14
12
10
8
6
4
2
0
*
NS
#
#
对照
NRTI
雷帕霉素
雷帕霉素NRTI

图8C

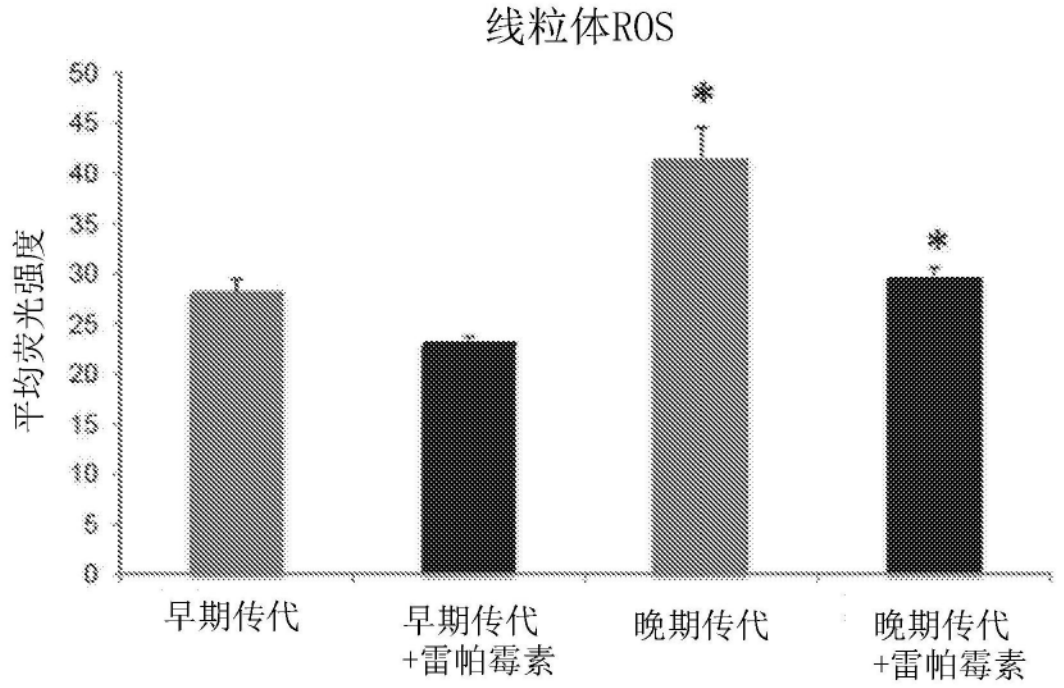

线粒体ROS
平均荧光强度
50
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
*
*
早期传代
早期传代
+雷帕霉素
晚期传代
晚期传代
+雷帕霉素

图9A

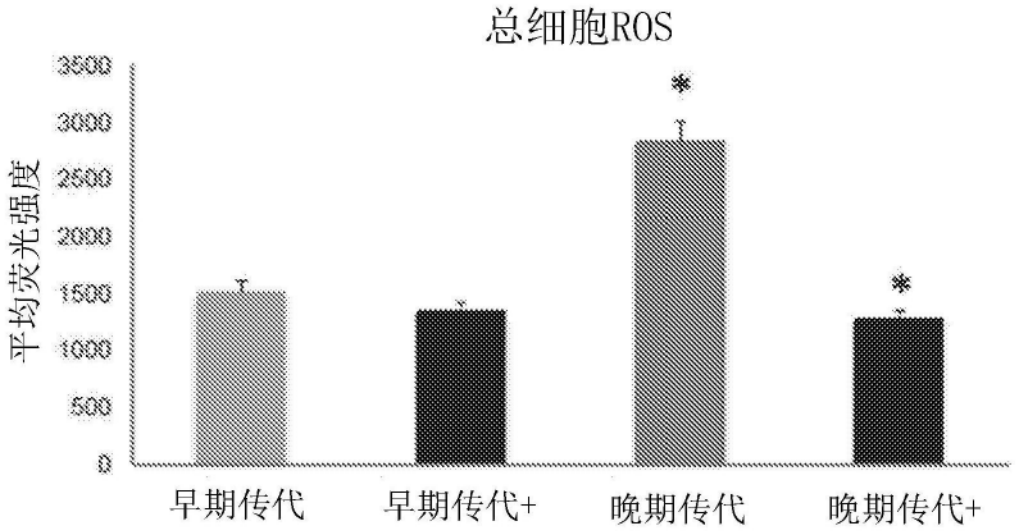

总细胞ROS
平均荧光强度
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
*
*
早期传代
早期传代+
晚期传代
晚期传代+

图9B

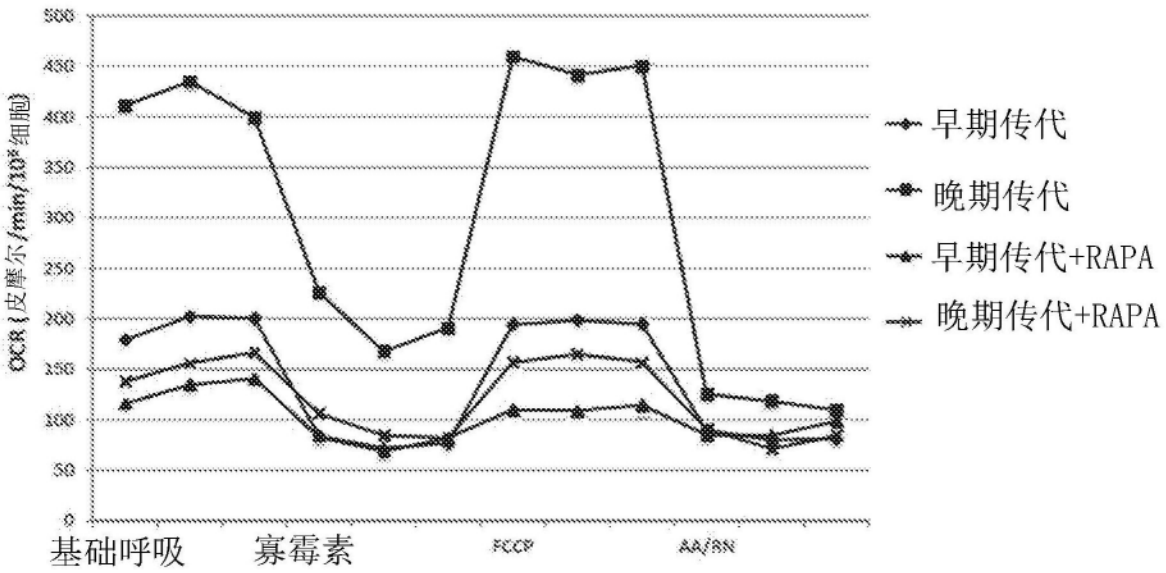

OCR(皮摩尔/min/10⁵细胞)
500
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
基础呼吸
寡霉素
FCCP
AA/RN
早期传代
晚期传代
早期传代+RAPA
晚期传代+RAPA

图9C

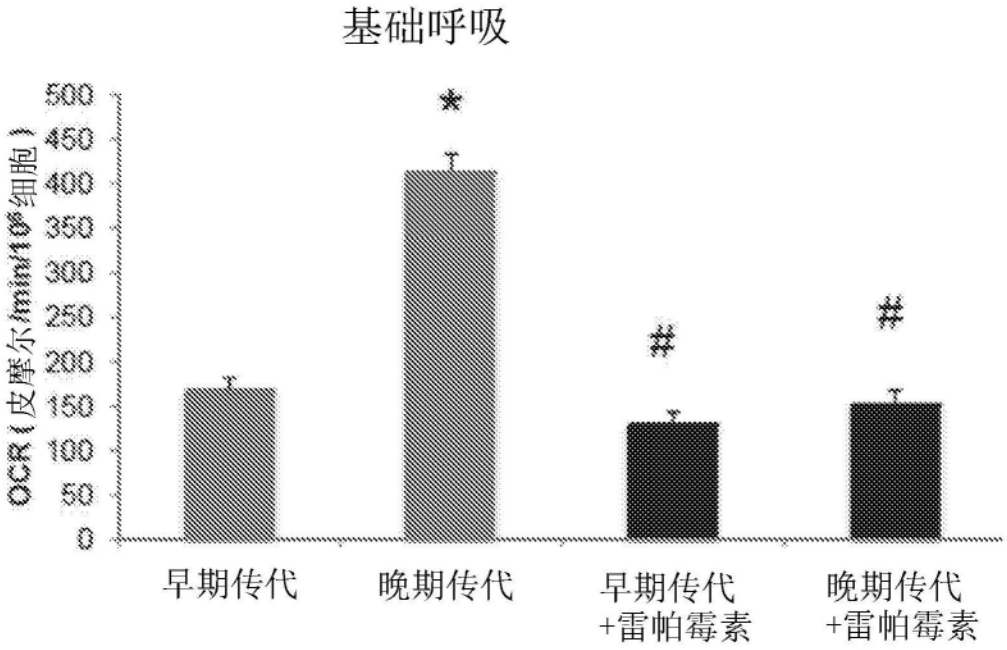

基础呼吸
OCR(皮摩尔/min/10⁶细胞)
500
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
*
#
#
早期传代
晚期传代
早期传代
+雷帕霉素
晚期传代
+雷帕霉素

图9D

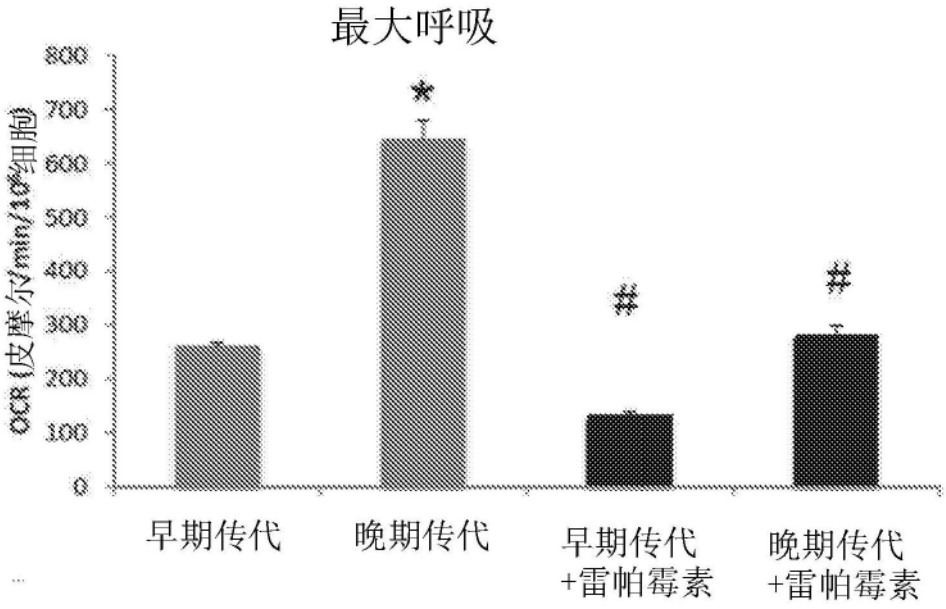

最大呼吸
OCR(皮摩尔/min/10⁶细胞)
800
700
600
500
400
300
200
100
0
*
#
#
早期传代
晚期传代
早期传代
+雷帕霉素
晚期传代
+雷帕霉素

图9E

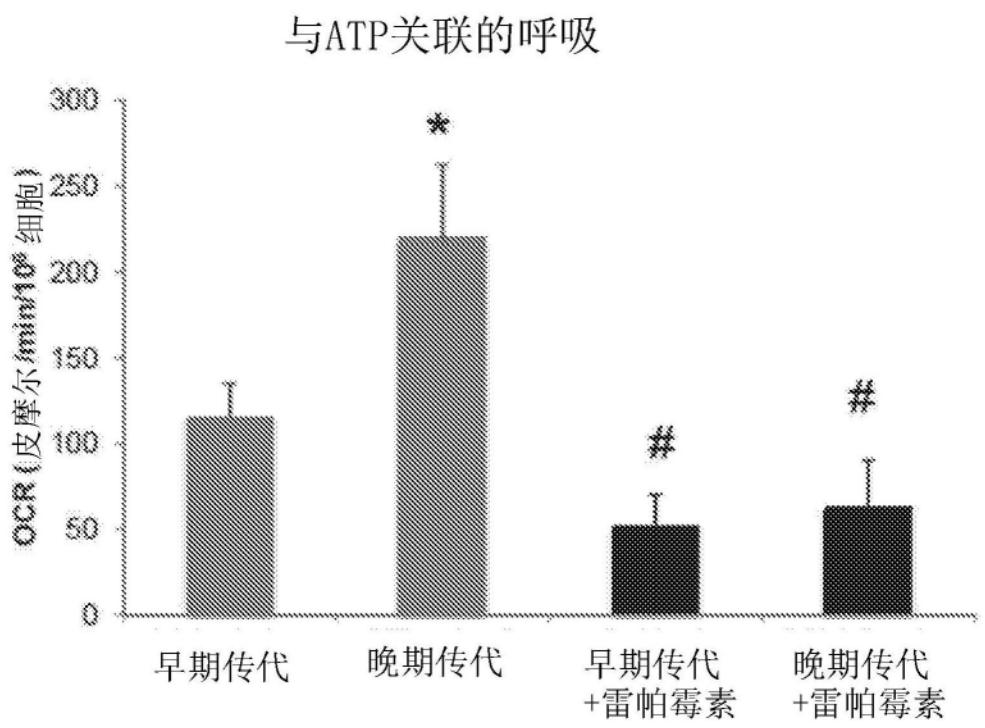

与ATP关联的呼吸
OCR(皮摩尔/min/10⁶细胞)
300
250
200
150
100
50
0
*
#
#
早期传代
晚期传代
早期传代
+雷帕霉素
晚期传代
+雷帕霉素

图9F

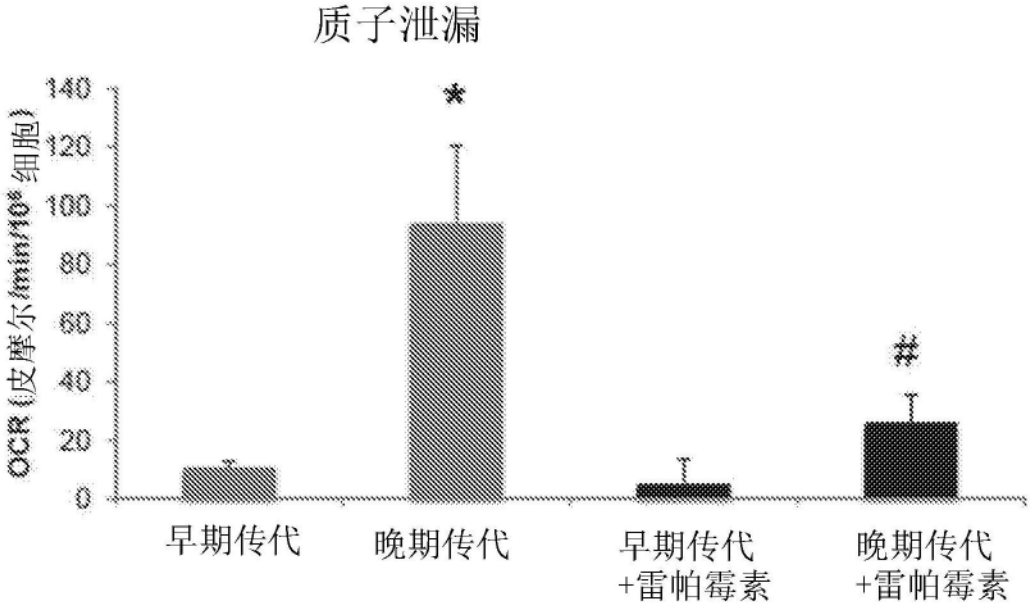

质子泄漏
OCR(皮摩尔/min/10⁶细胞)
140
120
100
80
60
40
20
0
*
#
早期传代
晚期传代
早期传代
+雷帕霉素
晚期传代
+雷帕霉素

图9G

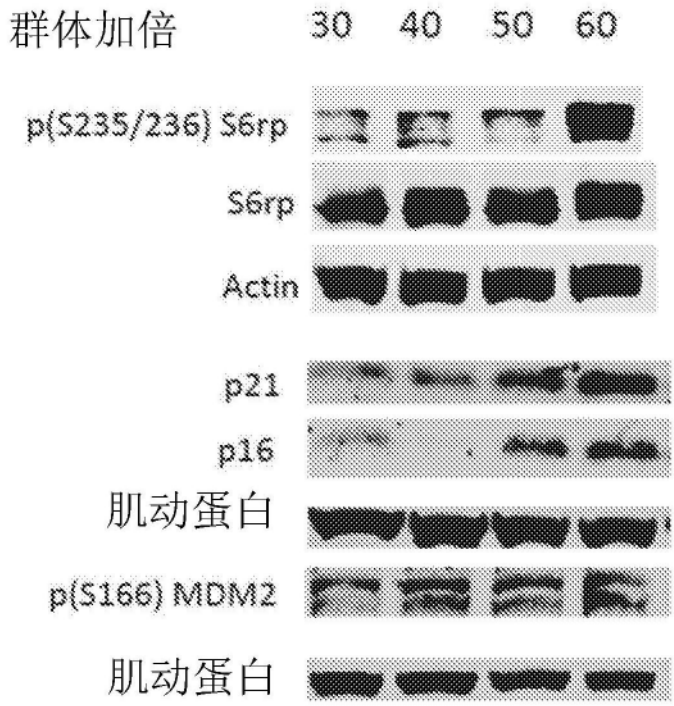

群体加倍
30
40
50
60
p(S235/236) S6rp
S6rp
Actin
p21
p16
肌动蛋白
p(S166) MDM2
肌动蛋白

图9H

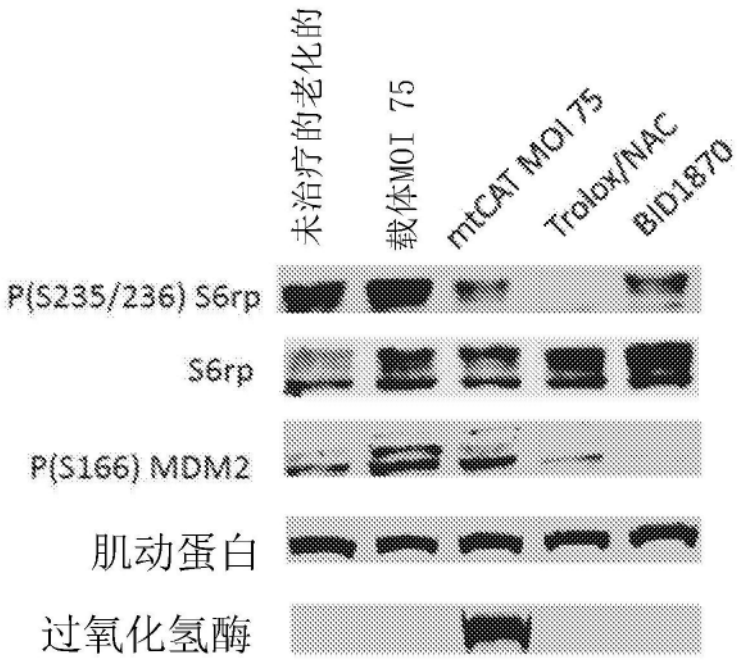

未治疗的老化的
载体MOI 75
mtCAT MOI 75
Trolox/NAC
BID1870
P(S235/236) S6rp
S6rp
P(S166) MDM2
肌动蛋白
过氧化氢酶

图9I

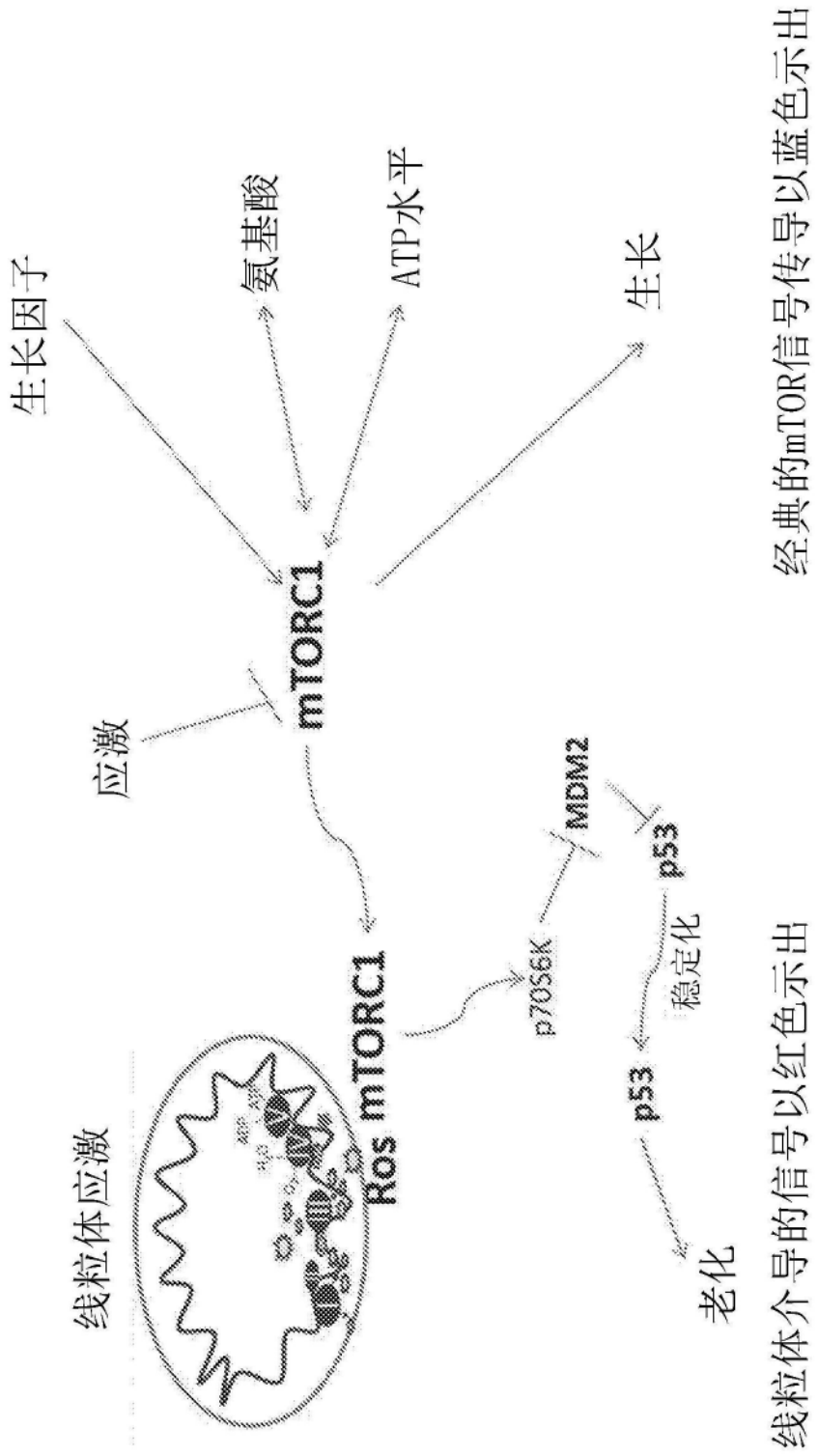

生长因子
氨基酸
ATP水平
生长
经典的mTOR信号传导以蓝色示出
应激
mTORC1
MDM2
p53
p70S6K
稳定化
线粒体应激
Ros mTORC1
p53
老化
线粒体介导的信号以红色示出

图10

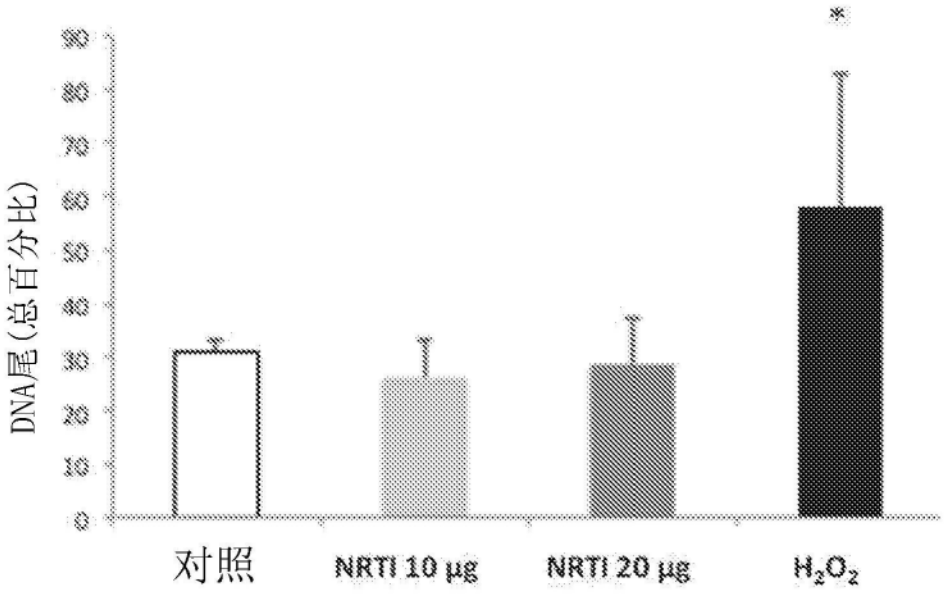


图11A

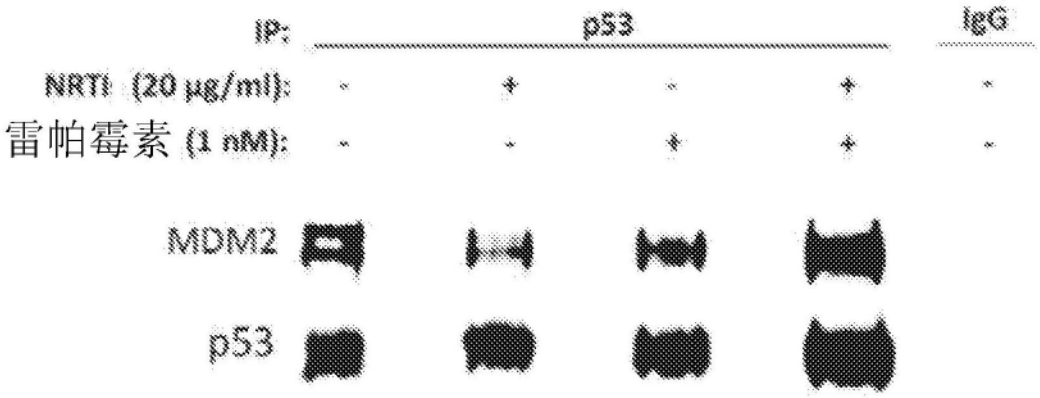


图11B

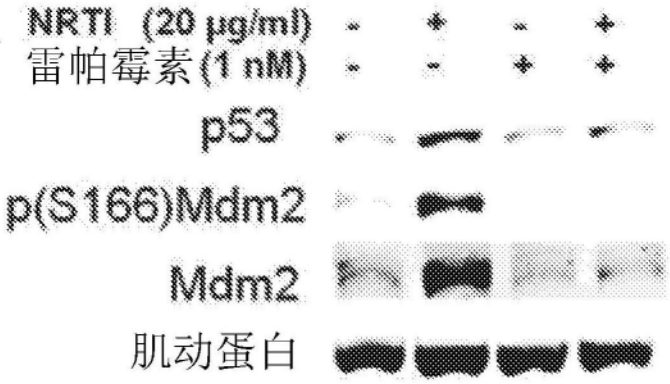


图11C

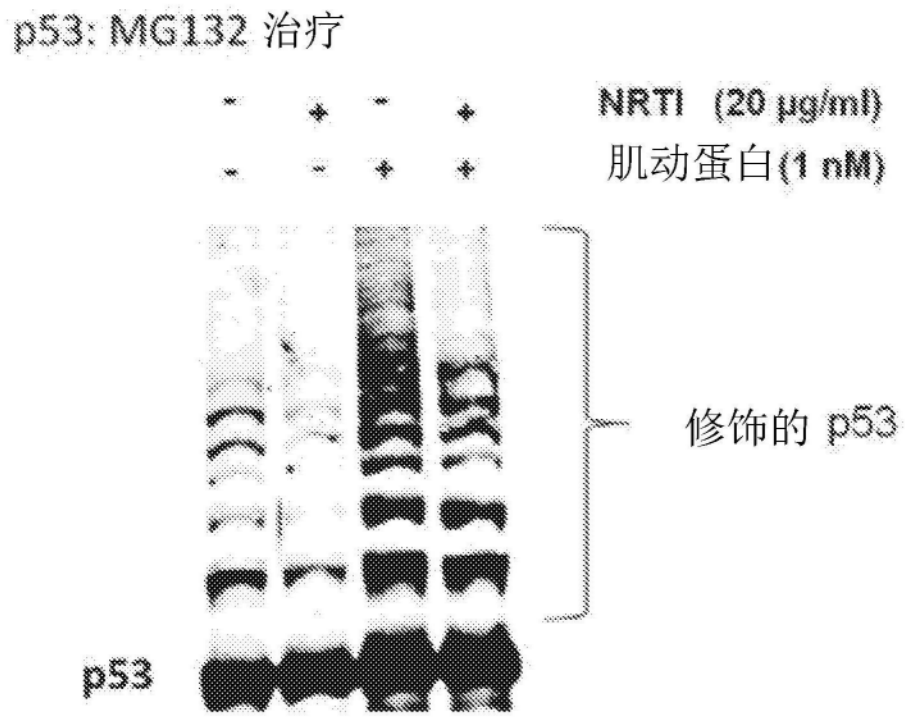


图11D

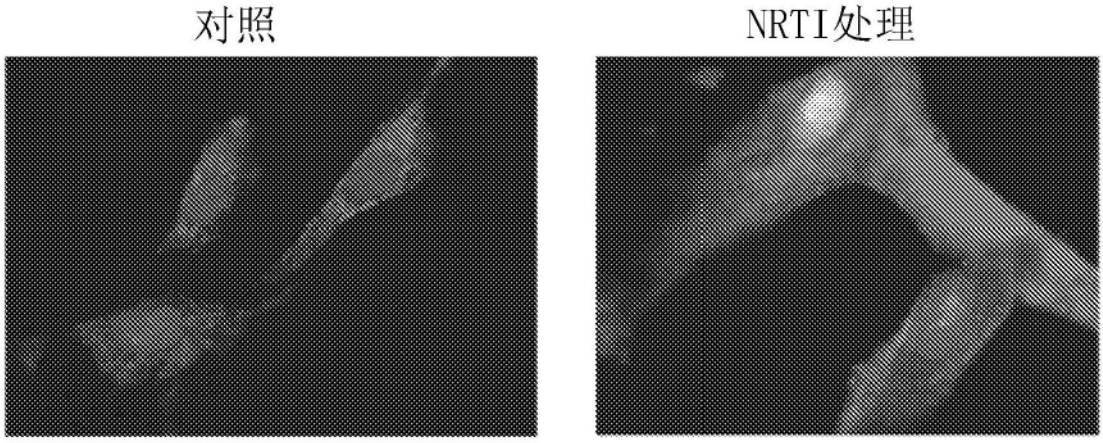


图11E

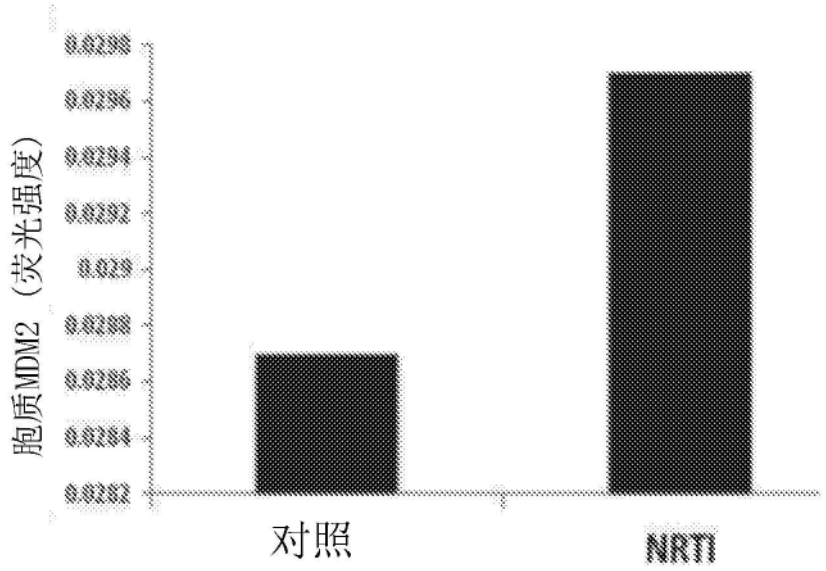

胞质MDM2（荧光强度）
0.0298
0.0296
0.0294
0.0292
0.029
0.0288
0.0286
0.0284
0.0282
对照
NRTI

图11F

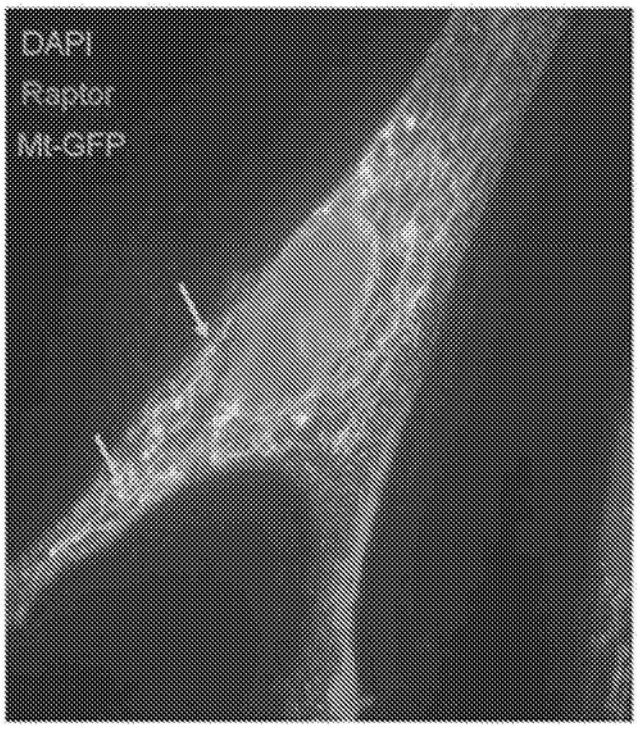

DAPI
Raptor
Mt-GFP

图12A

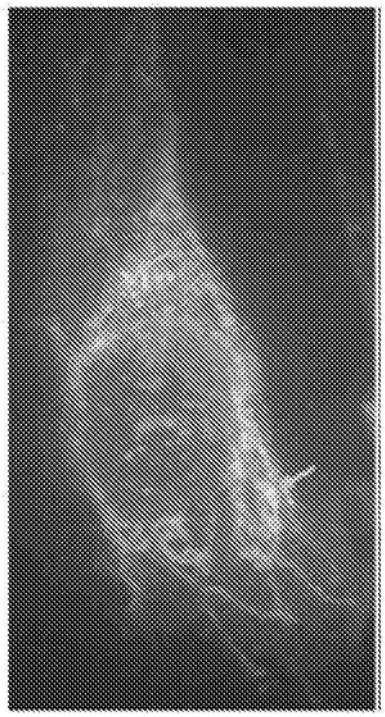


图12B

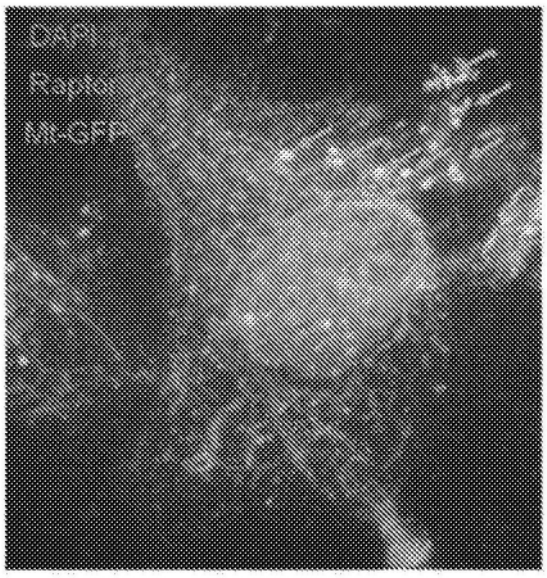


图12C

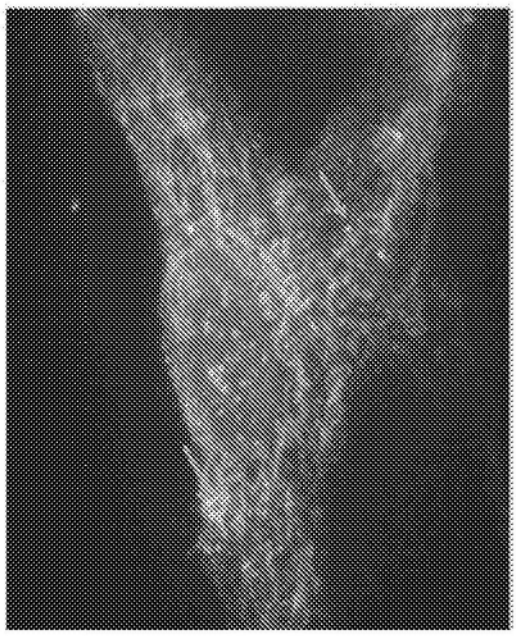


图12D

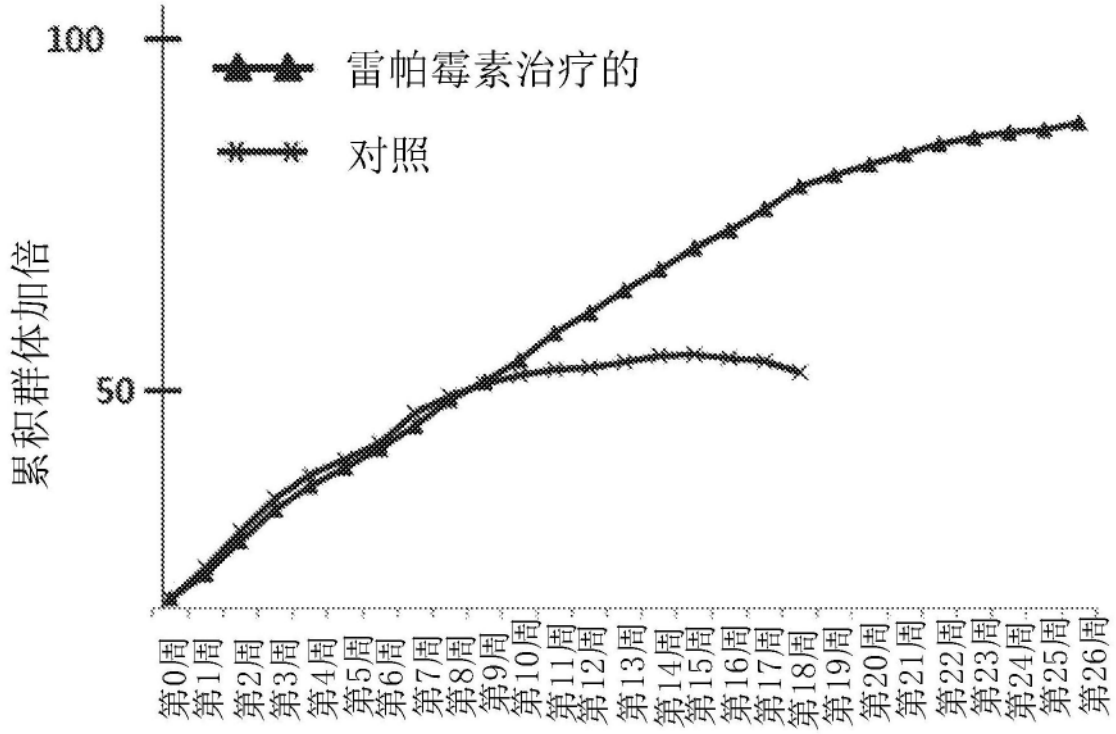

100
50
累积群体加倍
雷帕霉素治疗的
对照
第0周
第1周
第2周
第3周
第4周
第5周
第6周
第7周
第8周
第9周
第10周
第11周
第12周
第13周
第14周
第15周
第16周
第17周
第18周
第19周
第20周
第21周
第22周
第23周
第24周
第25周
第26周

图13

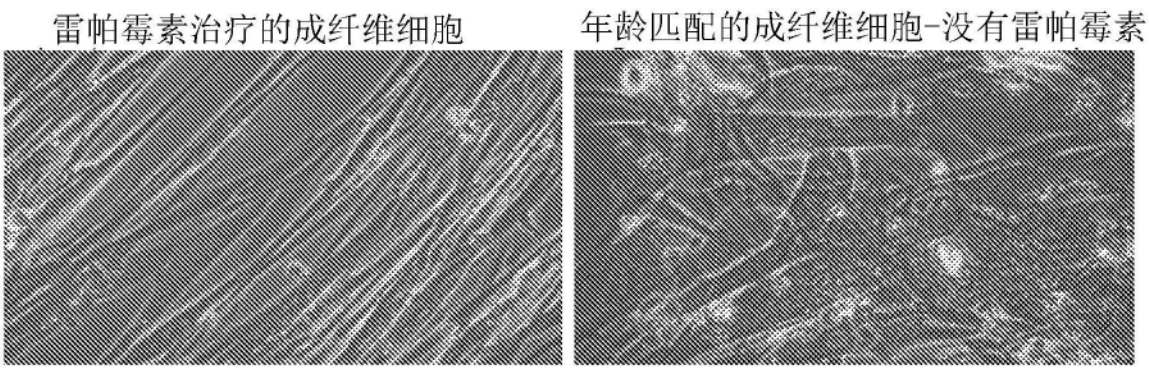

雷帕霉素治疗的成纤维细胞
年龄匹配的成纤维细胞-没有雷帕霉素

图14

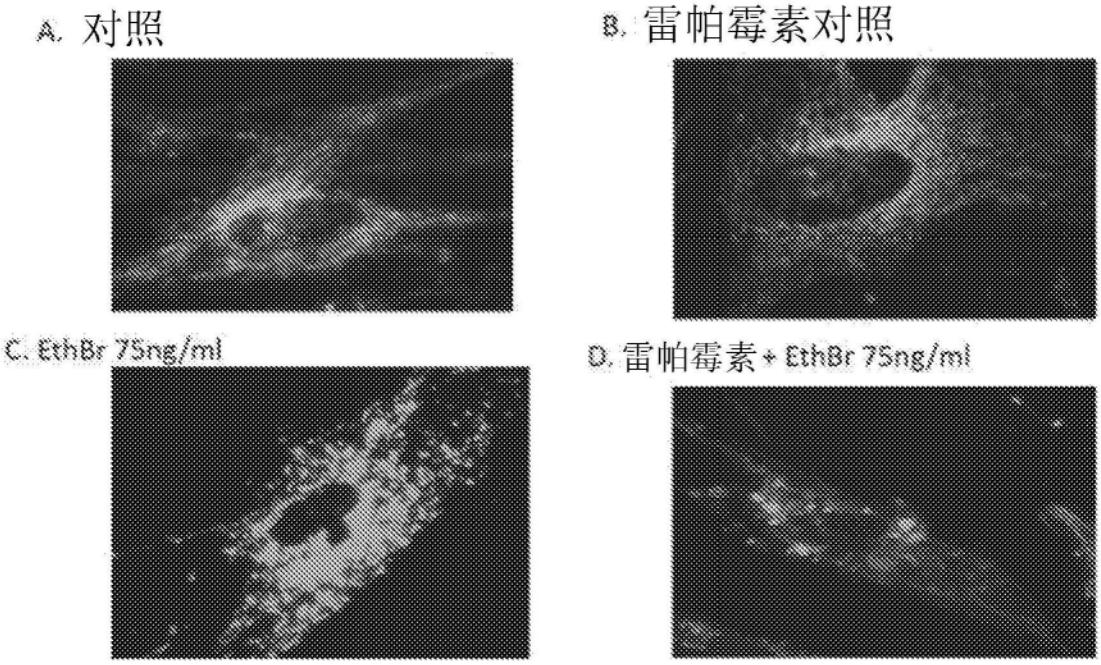

A. 对照
B. 雷帕霉素对照
C. EthBr 75ng/ml
D. 雷帕霉素 + EthBr 75ng/ml

图15

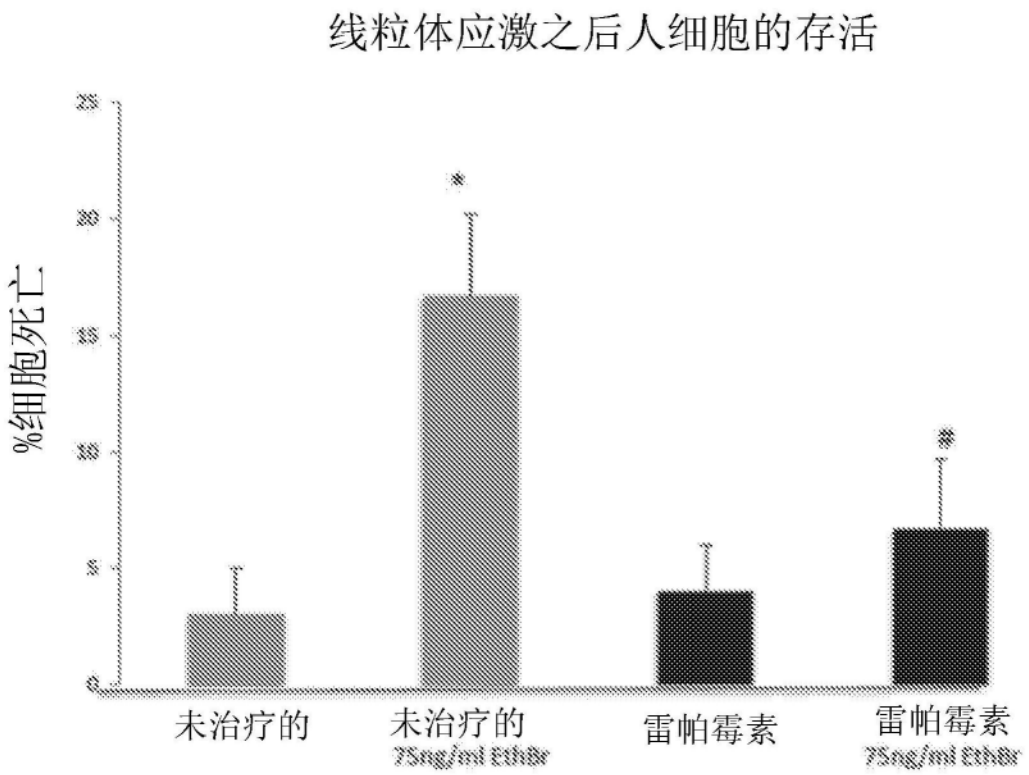

线粒体应激之后人细胞的存活
%细胞死亡
未治疗的
未治疗的
75ng/ml EthBr
雷帕霉素
雷帕霉素
75ng/ml EthBr

图16

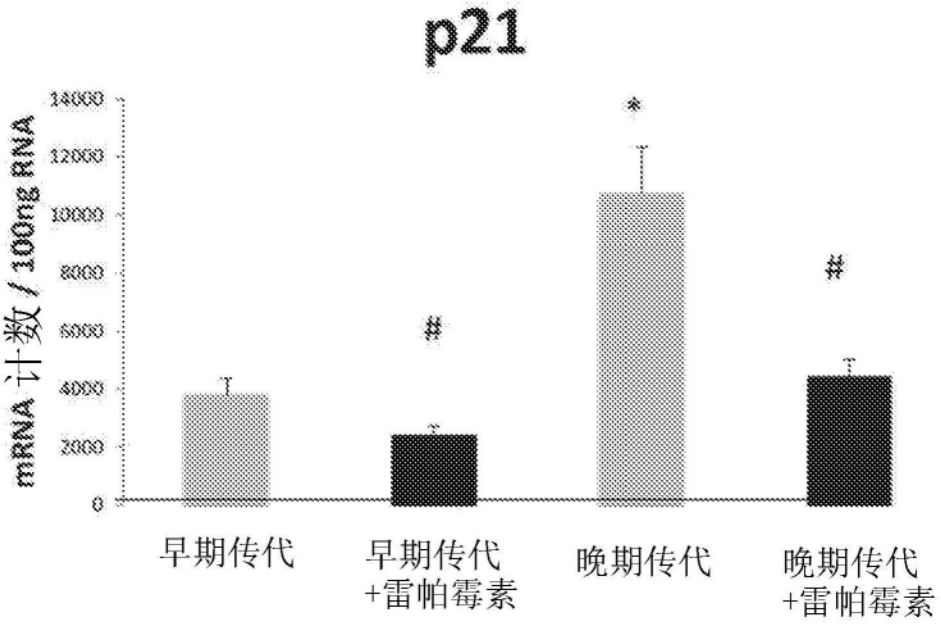

p21
mRNA 计数 / 100ng RNA
早期传代
早期传代
+雷帕霉素
晚期传代
晚期传代
+雷帕霉素

图17

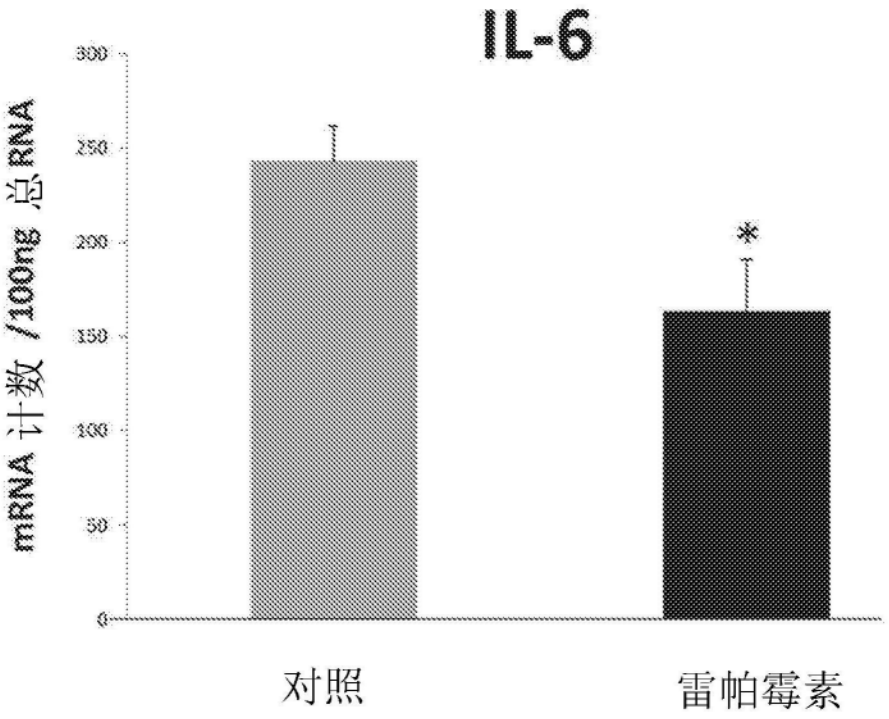

IL-6
mRNA 计数 /100ng 总 RNA
300
250
200
150
100
50
0
*
对照
雷帕霉素

图18

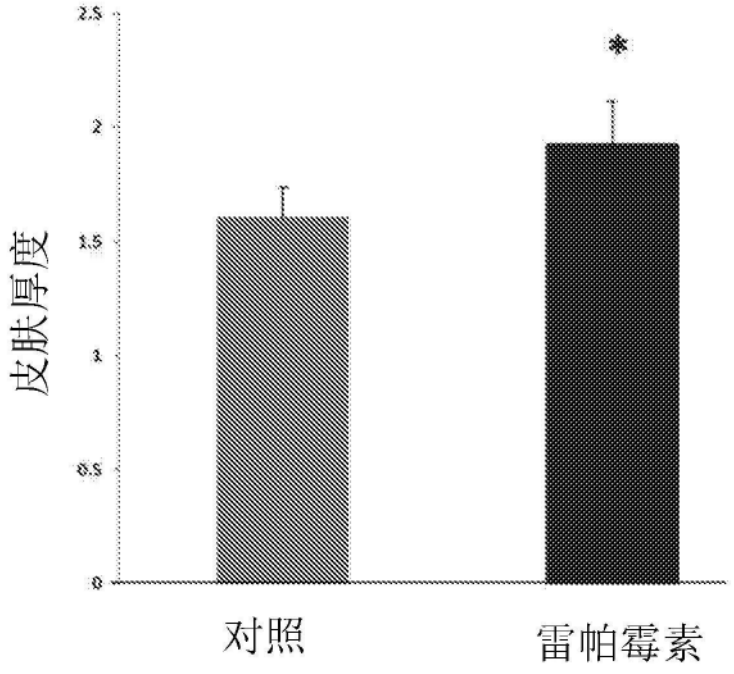

皮肤厚度
2.5
2
1.5
1
0.5
0
*
对照
雷帕霉素

图19

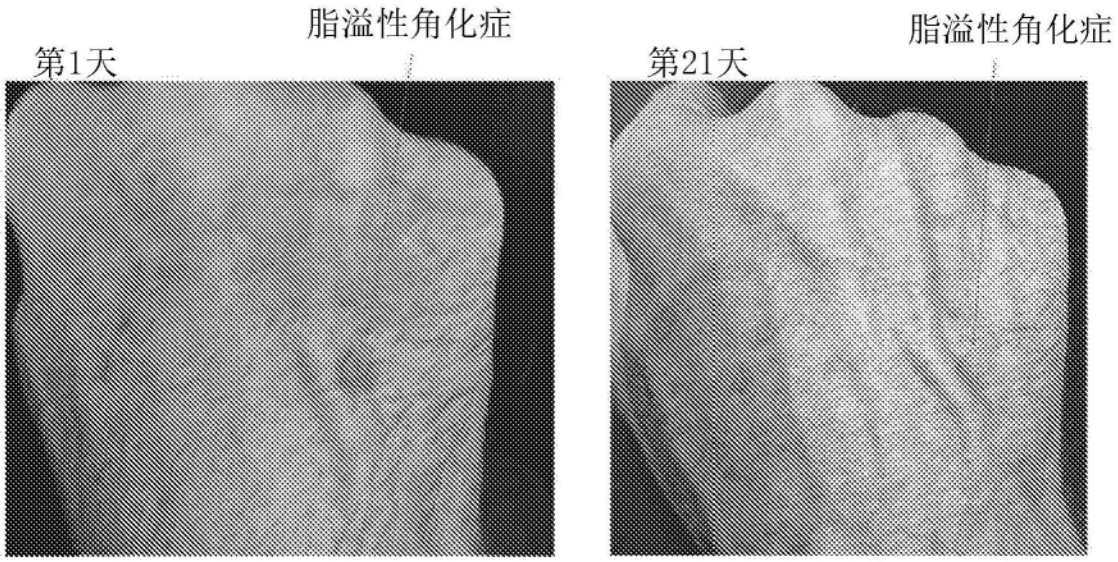


图20