



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106163557 B

(45)授权公告日 2020.07.14

(21)申请号 201580017167.1

(51)Int.Cl.

(22)申请日 2015.01.28

A61K 45/00(2006.01)

(续)

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 106163557 A

(56)对比文件

(43)申请公布日 2016.11.23

US 2012115880 A1,2012.05.10,

CN 101679382 A,2010.03.24,

WO 2008106507 A2,2008.09.04,

WO 2006039704 A2,2006.04.13,

(30)优先权数据

KR 20130139512 A,2013.12.23,

61/932,704 2014.01.28 US (续)

US 2012156197 A1,2012.06.21,

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

CN 101641338 A,2010.02.03,

2016.09.28

CN 101528223 A,2009.09.09,

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2015/013387 2015.01.28

US 2006122150 A1,2006.06.08,

WO 2008014216 A1,2008.01.31,

(87)PCT国际申请的公布数据

W02015/116740 EN 2015.08.06

Tanaka, Yuta;Aikawa, Katsuji;Nishida,

(73)专利权人 巴克老龄化研究所

Goushi;等..《Discovery of Potent Mcl-1/

地址 美国加利福尼亚州

Bcl-xL Dual Inhibitors by Using a

专利权人 尤尼蒂生物技术公司

Hybridization Strategy Based on

梅奥医学教育和研究基金会

Structural Analysis of Target Proteins》.

《JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY》.2013,第

56卷(第23期),

(续)

(续)

审查员 丁海

(72)发明人 瑞米-马丁·拉伯奇

朱迪思·坎皮斯 (续)

(74)专利代理机构 上海胜康律师事务所 31263

权利要求书1页 说明书101页

代理人 樊英如 李献忠

序列表7页 附图73页

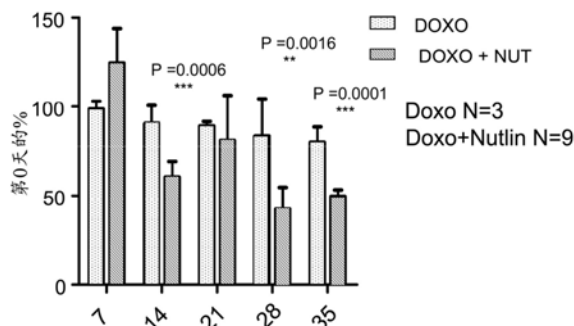
(54)发明名称

用于杀死衰老细胞和用于治疗衰老相关疾病和病症的方法和组合物

(57)摘要

本文提供了用于选择性地杀死衰老细胞和用于通过施用衰老清除剂治疗衰老相关疾病和病症的方法。通过本文所述的使用衰老清除剂的方法可治疗的衰老相关疾病和病症包括心血管疾病以及以下疾病相关或由以下疾病引起的病症：动脉硬化，如动脉粥样硬化；特发性肺纤维化；慢性阻塞性肺疾病；骨关节炎；衰老相关眼疾病和病症；以及衰老相关皮肤疾病和病症。

发光



[接上页]

(30) 优先权数据

61/932,711 2014.01.28 US
61/979,911 2014.04.15 US
62/002,709 2014.05.23 US
62/042,708 2014.08.27 US
62/044,664 2014.09.02 US
62/057,820 2014.09.30 US
62/057,825 2014.09.30 US
62/057,828 2014.09.30 US
62/061,627 2014.10.08 US
62/061,629 2014.10.08 US

(73) 专利权人 约翰霍普金斯大学

(72) 发明人 艾伯特·黛沃洛斯

马可·德马利亚 纳撒尼尔·大卫

阿兰·菲利普·瓦赛洛特

达伦·J·贝克

本内特·G·蔡尔兹

詹姆斯·L·柯克兰德

塔马·蒂驰科尼亚

简·M·A·范德尔森 朱毅

詹尼弗·叶利谢耶夫 金载奎

全玉熙

(51) Int. Cl.

A61K 31/496(2006.01)

A61P 19/02(2006.01)

A61P 29/00(2006.01)

A61P 19/08(2006.01)

A61P 9/10(2006.01)

A61P 9/00(2006.01)

A61P 11/00(2006.01)

(56) 对比文件

庄春林等.《干扰p53-MDM2蛋白相互作用的小分子抑制剂的研究进展》.《中国药物化学杂志》.2010,第20卷(第5期),

James A. Martin.《Chondrocyte Senescence, Joint Loading and Osteoarthritis》.《CLINICAL ORTHOPAEDICS AND RELATED RESEARCH》.2004,S96-S103.

沈行良等.《p53和MDM2基因》.《中国热带医学》.2007,第7卷(第1期),103-105.

Yujun Zhao等.《Small Molecule Inhibitors of MDM2-p53 and MDMX-p53 Interactions as New Cancer Therapeutics》.《BioDiscovery》.2013,第8卷(第4期),

Shingo Hashimoto等.《Role of p53 in Human Chondrocyte Apoptosis in Response to Shear Strain》.《ARTHRITIS & RHEUMATISM》.2009,第60卷(第8期),2340-2349.

A. Shane Anderson等.《Why is osteoarthritis an age-related disease?》.《Best Practice & Research Clinical Rheumatology》.2010,15-26.

1. MDM2抑制剂在制备用于治疗骨关节炎的药物中的用途,其中所述MDM2抑制剂是顺式咪唑啉,所述顺式咪唑啉选自Nutlin-3和RG-7112。

2. 如权利要求1所述的用途,其中所述MDM2抑制剂是4-[[(4S,5R) -4,5-双(4-氯苯基)-4,5-二氢-2-[4-甲氧基-2-(1-甲基乙氧基) 苯基]-1H-咪唑-1-基]羰基]-2-哌嗪酮或其药学可接受的盐。

3. 如权利要求1-2中任一项所述的用途,其中所述药物配制成施用给骨关节炎关节。

用于杀死衰老细胞和用于治疗衰老相关疾病和病症的方法和组合物

[0001] 政府利益的声明

[0002] 本发明是根据由国立卫生研究院授予的第AG009909、AG017242、AG41122和AG046061号基金在政府支持下做出的。政府在本发明中具有某些权利。

[0003] 关于序列表的声明

[0004] 与本申请相关的序列表以文本格式而非以纸质副本提供，并在此通过引用并入本说明书。含有序列表的文本文件的名称为200201_419WO_SEQUENCE_LISTING.txt。该文本文件为5.2KB，创建于2015年1月27日，并且经由EFS-Web以电子方式提交。

[0005] 背景

技术领域

[0006] 本文的公开内容总的涉及用于治疗 and 预防衰老细胞相关疾病和病症的方法。

[0007] 相关技术的描述

[0008] 衰老细胞随着个体变老而在个体的组织和器官中积累，并且被发现于与年龄相关的病理部位。衰老细胞被认为对于抑制功能障碍性细胞或受损细胞的增殖，尤其对于遏制恶性肿瘤的发展至关重要（参见，例如，Campisi, Curr. Opin. Genet. Dev. 21:107-12 (2011)；Campisi, Trends Cell Biol. 11:S27-31 (2001)；Prieur等人, Curr. Opin. Cell Biol. 20:150-55 (2008)）；然而，个体中衰老细胞的存在可促成老化和与老化相关的功能障碍（参见，例如，Campisi, Cell 120:513-22 (2005)）。考虑到与年龄相关的健康衰退的某些方面已归因于衰老细胞，并且衰老细胞可促成某些疾病，并且还作为必要的维持生命的化疗和放射治疗的结果而诱发，衰老细胞的存在可能对世界范围的数百万名患者产生有害影响。然而，鉴定并开发通过选择性消除衰老细胞对此类疾病和状况的治疗一直是一项艰巨的任务。本公开内容满足了这些需求并提供了相关的优势。

发明内容

[0009] 本文提供了用于通过施用衰老清除剂 (senolytic agent) 治疗衰老相关疾病的方法。以下是本文更详细地描述的某些实施方案。如本文所述，施用足以选择性地杀死衰老细胞的量的衰老清除剂持续足以选择性地杀死衰老细胞的时间。本文还提供了用于选择性地杀死患有衰老相关疾病或病症的受试者的衰老细胞的方法，在某些实施方案中，该衰老相关疾病或病症不是癌症，并且根据本文所述的施用方法将本文所述的衰老清除剂施用于有需要的受试者。

[0010] 在一个实施方案中，提供了用于治疗衰老相关疾病或病症的方法，该方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的小分子衰老清除剂，该衰老清除剂相对于非衰老细胞选择性地杀死衰老细胞；其中所述衰老相关疾病或病症不是癌症，其中在至少两个治疗周期中施用所述衰老清除剂，其中每个治疗周期独立地包括1天至3个月的治疗疗程以及随后至少2周的非治疗间隔；条件是如果所述衰老清除剂是MDM2抑制剂，则所述MDM2抑制剂作为单

一疗法施用,并且每个治疗疗程的长度为至少5天,在此期间施用所述MDM2抑制剂至少5天。在某些实施方案中,所述衰老清除剂选自MDM2抑制剂;一个或多个BCL-2抗凋亡蛋白家族成员的抑制剂,其中该抑制剂至少抑制BCL-xL;以及Akt特异性抑制剂。在特定的实施方案中,所述MDM2抑制剂为顺式咪唑啉化合物、螺-羟吡啶化合物或苯并二氮杂萘化合物。在特定的实施方案中,所述顺式咪唑啉化合物为nutlin化合物。在特定的实施方案中,所述衰老清除剂为MDM2抑制剂并且为Nutlin-3a或RG-1172。在特定的实施方案中,所述nutlin化合物为Nutlin-3a。在特定的实施方案中,所述顺式咪唑啉化合物为RG-7112、RG7388、R05503781,或者二氢咪唑并噻唑化合物。在特定的实施方案中,所述二氢咪唑并噻唑化合物为DS-3032b。在特定的实施方案中,所述MDM2抑制剂为选自MI-63、MI-126、MI-122、MI-142、MI-147、MI-18、MI-219、MI-220、MI-221、MI-773和3-(4-氯苄基)-3-((1-(羟甲基)环丙基)甲氧基)-2-(4-硝基苄基)异吡啶啉-1-酮的螺-羟吡啶化合物。在特定的实施方案中,所述MDM2抑制剂为色德美坦(Serdemetan);哌啶酮化合物;CGM097;或也抑制MDMX并且选自R0-2443和R0-5963的MDM2抑制剂。在特定的实施方案中,所述哌啶酮化合物为AM-8553。在特定的实施方案中,一个或多个BCL-2抗凋亡蛋白家族成员的抑制剂为BCL-2/BCL-xL抑制剂;BCL-2/BCL-xL/BCL-w抑制剂;或BCL-xL选择性抑制剂。在特定的实施方案中,所述衰老清除剂为一个或多个BCL-2抗凋亡蛋白家族成员的抑制剂,其中该抑制剂至少抑制Bcl-xL并且选自ABT-263、ABT-737、WEHI-539和A-1155463。在特定的实施方案中,所述BCL-xL选择性抑制剂为苯并噻唑-脒化合物、氨基吡啶化合物、苯并咪唑化合物、四氢喹啉化合物或苯氧基化合物。在特定的实施方案中,所述苯并噻唑-脒化合物为WEHI-539。在特定的实施方案中,所述一个或多个BCL-2抗凋亡蛋白家族成员的抑制剂为A-1155463、ABT-263或ABT-737。在特定的实施方案中,Akt抑制剂为MK-2206。在特定的实施方案中,所述衰老清除剂为MDM2抑制剂或为一个或多个BCL-2抗凋亡蛋白家族成员的抑制剂,其中该抑制剂至少抑制BCL-xL并且对癌细胞具有细胞毒性,在每个治疗周期中施用的衰老清除剂的总剂量为对于治疗癌症无效的量。在特定的实施方案中,所述衰老清除剂为MDM2抑制剂或为一个或多个BCL-2抗凋亡蛋白家族成员的抑制剂,其中该抑制剂至少抑制BCL-xL并且对癌细胞具有细胞毒性,并且其中在两个或更多个治疗周期中施用所述衰老清除剂,在所述两个或更多个治疗周期中施用的衰老清除剂的总剂量为小于癌症治疗有效量的量。在特定的实施方案中,所述MDM2抑制剂为Nutlin-3a;RG-7112;RG7388;R05503781;DS-3032b;MI-63;MI-126;MI-122;MI-142;MI-147;MI-18;MI-219;MI-220;MI-221;MI-773;和3-(4-氯苄基)-3-((1-(羟甲基)环丙基)甲氧基)-2-(4-硝基苄基)异吡啶啉-1-酮;色德美坦;AM-8553;CGM097;或也抑制MDMX并且选自R0-2443和R0-5963的MDM2抑制剂。在特定的实施方案中,一个或多个BCL-2抗凋亡蛋白家族成员的抑制剂为ABT-263、ABT-737、A-1155463或WEHI-539。在另一个实施方案中,所述受试者患有癌症并且其中所述衰老相关疾病或病症为化疗副作用或放射治疗副作用,其中在化疗或放射治疗的施用周期后至少第六天开始并且不与化疗或放射治疗同时的一天或多天向所述受试者施用所述衰老清除剂,并且其中所述衰老清除剂不是用于治疗所述癌症的化疗剂,并且其中所述衰老清除剂为小分子且选自MDM2抑制剂;一个或多个BCL-2抗凋亡蛋白家族成员的抑制剂,其中该抑制剂至少抑制BCL-xL,并选自BCL-2/BCL-xL抑制剂;BCL-2/BCL-xL/BCL-w抑制剂;以及BCL-xL选择性抑制剂;以及Akt特异性抑制剂。在另一个特定的实施方案中,所述化疗副作用选自胃肠毒性、周围神经病变、疲劳、不适、低体力活动、血

液毒性、肝毒性、脱发、疼痛、粘膜炎、液体潴留和皮肤毒性。在另一个特定的实施方案中,所述化疗副作用为疲劳。在另一个特定的实施方案中,所述化疗副作用包括心脏毒性。在另一个特定的实施方案中,所述衰老相关疾病或病症为骨关节炎、动脉粥样硬化、慢性阻塞性肺疾病或特发性肺纤维化。在另一个特定的实施方案中,所述衰老清除剂的施用包括三个或更多个治疗周期。在另一个特定的实施方案中,施用所述衰老清除剂一天、两天、三天或四天,条件是所述衰老清除剂不是MDM2抑制剂。在另一个特定的实施方案中,所述衰老清除剂作为单一疗法施用。

[0011] 在另一个实施方案中,提供了用于治疗非癌症的衰老相关疾病或病症的方法,该方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的小分子衰老清除剂,该衰老清除剂相对于非衰老细胞选择性地杀死衰老细胞并且该药剂对癌细胞具有细胞毒性,其中在至少一个治疗周期内所述衰老清除剂作为单一疗法施用,该治疗周期包括治疗疗程以及随后的非治疗间隔;并且其中在治疗周期中施用的衰老清除剂的总剂量为小于癌症治疗有效量的量,其中所述衰老清除剂为(a) Bcl-2抗凋亡蛋白家族成员的抑制剂,该抑制剂至少抑制Bcl-xL; (b) MDM2抑制剂;或(c) Akt特异性抑制剂。在某些实施方案中,在两个或更多个治疗周期中施用所述衰老清除剂,并且其中在所述两个或更多个治疗周期中施用的衰老清除剂的总剂量为小于癌症治疗有效量的量。

[0012] 在以上和本文中所述方法的其他特定实施方案中,每个治疗疗程不长于(a)一个月,或(b)不长于两个月,或(c)不长于3个月。在特定的实施方案中,每个治疗疗程不长于(a) 5天, (b) 7天, (c) 10天, (d) 14天, 或(e) 21天。在特定的实施方案中,每个治疗疗程中每两天或每三天施用所述衰老清除剂。在特定的实施方案中,所述治疗疗程为一天、两天、三天或四天。在另一个特定的实施方案中,在每个治疗疗程中每天施用所述衰老清除剂。在另一个特定的实施方案中,所述非治疗间隔为至少两周、至少一个月、至少2个月、至少3个月、至少6个月、至少9个月或至少1年。在另一个特定的实施方案中,所述治疗疗程为一天。在另一个特定的实施方案中,所述衰老相关疾病或病症为选自动脉粥样硬化、心绞痛、心律失常、心肌病、充血性心力衰竭、冠状动脉疾病、颈动脉疾病、心内膜炎、冠状动脉血栓形成、心肌梗死、高血压、主动脉瘤、心脏舒张功能障碍、高胆固醇血症、高脂血症、二尖瓣脱垂、周围血管疾病、心脏应激抗性(cardiac stress resistance)、心肌纤维化、脑动脉瘤和中风的心血管疾病。在另一个特定的实施方案中,所述衰老相关疾病或病症为选自骨关节炎、骨质疏松症、口腔粘膜炎、炎性肠病、脊柱后凸和椎间盘突出的炎性或自身免疫疾病或病症。在另一个特定的实施方案中,所述衰老相关疾病或病症为选自阿尔茨海默病、帕金森病、亨廷顿病、痴呆、轻度认知障碍和运动神经元功能障碍的神经变性疾病。在另一个特定的实施方案中,所述衰老相关疾病或病症为选自糖尿病、糖尿病性溃疡、代谢综合征和肥胖症的代谢病。在另一个特定的实施方案中,所述衰老相关疾病或病症为选自肺纤维化、慢性阻塞性肺疾病、哮喘、囊性纤维化、肺气肿、支气管扩张和年龄相关肺功能丧失的肺疾病。在另一个特定的实施方案中,所述衰老相关疾病或病症为选自黄斑变性、青光眼、白内障、老视和视力损失的眼疾病或病症。在另一个特定的实施方案中,所述衰老相关疾病或病症为选自肾疾病、肾衰竭、虚弱、听力损失、肌肉疲劳、皮肤状况、皮肤伤口愈合、肝纤维化、胰纤维化、口腔粘膜下纤维化和少肌症(sarcopenia)的年龄相关病症。在另一个特定的实施方案中,所述衰老相关疾病或病症为选自湿疹、银屑病、色素沉着过度、痣、皮疹、特应性皮炎、荨麻疹、与

光过敏或光老化相关的疾病和病症、皱纹；瘙痒；感觉迟钝；湿疹爆发；嗜酸性皮肤病；反应性嗜中性皮肤病；天疱疮；类天疱疮；免疫大疱性皮肤病；皮肤纤维组织细胞增殖；皮肤淋巴瘤；和皮肤狼疮的皮肤疾病或病症。在另一个特定的实施方案中，所述衰老相关疾病或病症为动脉粥样硬化；骨关节炎；肺纤维化；高血压或慢性阻塞性肺疾病。在另一个特定的实施方案中，直接向包含衰老清除细胞的器官或组织施用所述衰老清除剂。在另一个特定的实施方案中，将所述衰老清除剂与至少一种药学上可接受的赋形剂组合来配制药学上可接受的组合物，以提供所述衰老清除剂的定时释放。在另一个特定的实施方案中，所述衰老清除剂作为团输注(bolus infusion)施用。在另一个特定的实施方案中，所述衰老相关疾病或病症为骨关节炎并且将所述衰老清除剂直接施用于骨关节炎关节。在另一个特定的实施方案中，将所述衰老清除剂关节内施用于骨关节炎关节。在另一个特定的实施方案中，局部、经皮或皮内施用所述衰老清除剂。在另一个特定的实施方案中，所述衰老相关疾病或病症为骨关节炎并且所述衰老清除剂诱导关节中II型胶原的产生。在另一个特定的实施方案中，所述衰老相关疾病或病症为骨关节炎，并且所述衰老清除剂抑制关节中蛋白聚糖层的消蚀(erosion)。在另一个特定的实施方案中，所述衰老相关疾病或病症为骨关节炎，并且所述衰老清除剂抑制关节的骨的消蚀。在另一个特定的实施方案中，肺纤维化为特发性肺纤维化。在另一个特定的实施方案中，所述衰老清除剂减少了肺中纤维化肺组织的量。在另一个特定的实施方案中，鼻内、通过吸入、气管内或通过插管术施用所述衰老清除剂。在另一个特定的实施方案中，所述衰老相关疾病或病症为动脉粥样硬化，并且其中所述衰老清除剂提高了动脉粥样硬化斑块的稳定性。在另一个特定的实施方案中，所述衰老相关疾病或病症为动脉粥样硬化，并且其中所述衰老清除剂抑制受试者的血管中动脉粥样硬化斑块的形成。在另一个特定的实施方案中，所述衰老相关疾病或病症为动脉粥样硬化，并且其中所述衰老清除剂减少了受试者的血管中动脉粥样硬化斑块的脂质含量。在另一个特定的实施方案中，所述衰老相关疾病或病症为动脉粥样硬化，并且其中所述衰老清除剂增加了所述斑块的纤维帽厚度。在另一个特定的实施方案中，所述衰老细胞为衰老的前脂肪细胞、衰老的内皮细胞、衰老的成纤维细胞、衰老的神经元、衰老的上皮细胞、衰老的间充质细胞、衰老的平滑肌细胞、衰老的巨噬细胞或衰老的软骨细胞。在另一个特定的实施方案中，在包含与衰老相关疾病或病症相关的衰老细胞的器官或组织中，所述衰老清除剂杀死至少20%的衰老细胞，并且杀死不多于5%的非衰老细胞。在另一个特定的实施方案中，在包含与衰老相关疾病或病症相关的衰老细胞的器官或组织中，所述衰老清除剂杀死至少25%的衰老细胞。

[0013] 在一个实施方案中，提供了用于治疗受试者的骨关节炎的方法，该方法包括向所述受试者施用治疗有效量的小分子衰老清除剂，该衰老清除剂相对于非衰老细胞选择性地杀死衰老细胞，其中(a)在至少两个治疗周期中施用所述衰老清除剂，其中每个治疗周期独立地包括1天至3个月的治疗疗程以及随后的非治疗间隔，并且其中所述非治疗间隔为至少两周；或(b)直接向骨关节炎关节施用所述衰老清除剂。在另一个特定的实施方案中，所述衰老清除剂诱导骨关节炎关节中II型胶原产生。在另一个特定的实施方案中，所述衰老清除剂抑制骨关节炎关节中蛋白聚糖层的消蚀。在另一个特定的实施方案中，所述衰老清除剂抑制骨关节炎关节的骨的消蚀。本文在实施方案中还提供了用于诱导II型胶原的产生的方法，该方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的衰老清除剂，该衰老清除剂相对于

非衰老细胞选择性地杀死衰老细胞,其中(a)在至少两个治疗周期中施用所述衰老清除剂,其中每个治疗周期独立地包括1天至3个月的治疗疗程以及随后的非治疗间隔,其中所述非治疗间隔为至少两周;或(b)直接向骨关节炎关节施用所述衰老清除剂。在另一个特定的实施方案中,关节内施用所述衰老清除剂。在另一个特定的实施方案中,局部、经皮或皮内施用所述衰老清除剂。在另一个特定的实施方案中,所述衰老清除剂作为团输注施用。在另一个特定的实施方案中,将所述衰老清除剂与至少一种药物赋形剂组合来配制提供所述衰老清除剂的定时释放的药物组合物。在另一个特定的实施方案中,所述衰老清除剂抑制骨关节炎关节中蛋白聚糖层的消蚀。在另一个特定的实施方案中,所述衰老清除剂抑制骨关节炎关节的骨的消蚀。在另一个特定的实施方案中,在骨关节炎关节中所述衰老清除剂杀死至少20%的衰老细胞,并且杀死不多于5%的非衰老细胞。在另一个特定的实施方案中,在骨关节炎关节中所述衰老清除剂杀死至少25%的衰老细胞。

[0014] 在一个实施方案中,提供了用于治疗受试者的衰老相关肺疾病或病症的方法,该方法包括向所述受试者施用治疗有效量的小分子衰老清除剂,该衰老清除剂相对于非衰老细胞选择性地杀死衰老细胞,其中在至少两个治疗周期中所述衰老清除剂作为单一疗法施用,其中每个治疗周期独立地包括1天至3个月的治疗疗程以及随后的非治疗间隔,其中所述非治疗间隔为至少2周。在另一个特定的实施方案中,提供了用于治疗受试者的衰老相关肺疾病或病症的方法,该方法包括向所述受试者施用衰老清除剂,该衰老清除剂为选择性地杀死衰老细胞的小分子化合物,其中在至少两个治疗周期中施用所述衰老清除剂,每个周期包含治疗疗程和非治疗间隔,并且其中所述非治疗间隔为至少2个月。在特定的实施方案中,所述衰老相关肺疾病或病症为肺纤维化。在另一个特定的实施方案中,肺纤维化为特发性肺纤维化。在另一个特定的实施方案中,所述衰老相关肺疾病或病症为慢性阻塞性肺疾病(COPD)。在另一个特定的实施方案中,所述衰老相关肺疾病或病症选自年龄相关肺功能丧失、囊性纤维化、支气管扩张、肺气肿和哮喘。在另一个特定的实施方案中,直接向包含衰老细胞的受影响肺组织施用所述衰老清除剂。在另一个特定的实施方案中,通过吸入、鼻内、气管内或通过插管术施用所述衰老清除剂。在另一个特定的实施方案中,所述衰老清除剂作为团输注施用。在另一个特定的实施方案中,将所述衰老清除剂与至少一种药物赋形剂组合来配制提供所述衰老清除剂的定时释放的药物组合物。在另一个特定的实施方案中,在受试者的肺中所述衰老清除剂杀死至少20%的衰老细胞,并且杀死不多于5%的非衰老细胞。在另一个特定的实施方案中,在受试者的肺中所述衰老清除剂杀死至少25%的衰老细胞。

[0015] 在一个实施方案中,提供了用于治疗受试者的由动脉硬化引起的或与动脉硬化相关的心血管疾病或病症的方法,该方法包括向所述受试者施用治疗有效量的小分子衰老清除剂,该衰老清除剂相对于非衰老细胞选择性地杀死衰老细胞,其中在至少两个治疗周期中施用所述衰老清除剂,其中每个治疗周期独立地包括1天至3个月的治疗疗程以及随后的非治疗间隔,其中所述非治疗间隔为至少2周。在特定的实施方案中,所述受试者患有动脉粥样硬化、充血性心力衰竭、周围血管疾病、高血压或冠状动脉疾病。在另一个特定的实施方案中,所述心血管疾病或病症为动脉粥样硬化。在另一个特定的实施方案中,所述衰老清除剂提高了动脉粥样硬化斑块的稳定性。在另一个特定的实施方案中,所述衰老清除剂减少了受试者的血管中动脉粥样硬化斑块的脂质含量。在另一个特定的实施方案中,所述衰

老清除剂增加了所述斑块的纤维帽厚度。在另一个特定的实施方案中,所述衰老清除剂抑制受试者的血管中动脉粥样硬化斑块的形成。在另一个特定的实施方案中,降低了心肌梗死、心绞痛、中风、颈动脉血栓形成或冠状动脉血栓形成发生的可能性。在另一个实施方案中,提供了用于提高受试者的血管中存在的动脉粥样硬化斑块的稳定性的方法,该方法包括向所述受试者施用治疗有效量的小分子衰老清除剂,该衰老清除剂相对于非衰老细胞选择性地杀死衰老细胞,其中在至少两个治疗周期中施用所述衰老清除剂,其中每个治疗周期独立地包括1天至3个月的治疗疗程以及随后的非治疗间隔,其中所述非治疗间隔为至少2周。在特定的实施方案中,所述受试者患有选自动脉粥样硬化、充血性心力衰竭、周围血管疾病、高血压或冠状动脉疾病的心血管疾病。在另一个特定的实施方案中,所述心血管疾病或病症为动脉粥样硬化。在另一个特定的实施方案中,所述衰老清除剂减少了受试者的血管中动脉粥样硬化斑块的脂质含量。在另一个特定的实施方案中,所述衰老清除剂增加了所述斑块的纤维帽厚度。在另一个特定的实施方案中,所述衰老清除剂抑制受试者的血管中动脉粥样硬化斑块的形成。在另一个特定的实施方案中,所述衰老清除剂减少了受试者的血管中动脉粥样硬化斑块的量。在另一个特定的实施方案中,肠胃外或口服施用所述衰老清除剂。在另一个特定的实施方案中,直接向包含衰老细胞的动脉施用所述衰老清除剂。在另一个特定的实施方案中,所述衰老清除剂作为团输注施用。在另一个特定的实施方案中,将所述衰老清除剂与至少一种药物赋形剂组合来配制提供所述衰老清除剂的定时释放的药物组合物。在另一个特定的实施方案中,在受试者的动脉硬化动脉中所述衰老清除剂杀死至少20%的衰老细胞,并且杀死不多于5%的非衰老细胞。在另一个特定的实施方案中,在受试者的动脉硬化动脉中所述衰老清除剂杀死至少25%的衰老细胞。

[0016] 在以上和本文中所述方法的某些实施方案中,所述治疗疗程不长于一个月或不长于两个月。在另一个特定的实施方案中,所述治疗疗程(a)不长于5天,(b)不长于7天,(c)不长于10天,(d)不长于14天,或(e)不长于21天。在另一个特定的实施方案中,在所述治疗疗程中每两天或每三天施用所述衰老清除剂。在另一个特定的实施方案中,所述治疗疗程为一天、两天、三天或四天。在另一个特定的实施方案中,在所述治疗疗程中每天施用所述衰老清除剂。在另一个特定的实施方案中,所述非治疗间隔为(a)至少一个月,(b)至少2个月,(c)至少3个月,(d)至少6个月,(e)至少9个月,或(f)至少1年。在另一个特定的实施方案中,所述治疗疗程为一天并且所述非治疗间隔为0.5-12个月。在其他特定的实施方案中,当施用MDM2抑制剂时,所述治疗疗程为至少5天。在另一个特定的实施方案中,所述衰老清除剂作为单一疗法施用。在另一个特定的实施方案中,在三个或更多个治疗周期中施用所述衰老清除剂。

[0017] 在涉及以上和本文所述方法的某些实施方案中,所述衰老清除剂选自MDM2抑制剂;一个或多个BCL-2抗凋亡蛋白家族成员的抑制剂,其中该抑制剂至少抑制BCL-xL;和Akt特异性抑制剂。在另一个特定的实施方案中,所述MDM2抑制剂为顺式咪唑啉化合物、螺-羟吡啶化合物或苯并二氮杂萘化合物。在另一个特定的实施方案中,所述顺式咪唑啉化合物为nutlin化合物。在另一个特定的实施方案中,所述nutlin化合物为Nutlin-3a。在另一个特定的实施方案中,所述顺式咪唑啉化合物为RG-7112、RG7388、R05503781,或者二氢咪唑并噻唑化合物。在另一个特定的实施方案中,所述二氢咪唑并噻唑化合物为DS-3032b。在另一个特定的实施方案中,所述MDM2抑制剂为选自MI-63、MI-126、MI-122、MI-142、MI-147、

MI-18、MI-219、MI-220、MI-221、MI-773和3-(4-氯苯基)-3-((1-(羟甲基)环丙基)甲氧基)-2-(4-硝基苄基)异吲哚啉-1-酮的螺-羟吲哚化合物。在另一个特定的实施方案中,所述MDM2抑制剂为色德美坦;哌啶酮化合物;CGM097;或也抑制MDMX并且选自RO-2443和RO-5963的MDM2抑制剂。在另一个特定的实施方案中,所述哌啶酮化合物为AM-8553。在另一个特定的实施方案中,一个或多个BCL-2抗凋亡蛋白家族成员的抑制剂为BCL-2/BCL-xL抑制剂;BCL-2/BCL-xL/BCL-w抑制剂;或BCL-xL选择性抑制剂。在另一个特定的实施方案中,所述BCL-xL选择性抑制剂为苯并噻唑-脲化合物、氨基吡啶化合物、苯并咪唑化合物、四氢喹啉化合物或苯氧基化合物。在另一个特定的实施方案中,所述苯并噻唑-脲化合物为WEHI-539。在另一个特定的实施方案中,所述一个或多个BCL-2抗凋亡蛋白家族成员的抑制剂为A-1155463、ABT-263或ABT-737。在另一个特定的实施方案中,Akt抑制剂为MK-2206。在另一个特定的实施方案中,当所述衰老清除剂为MDM2抑制剂或为一个或多个BCL-2抗凋亡蛋白家族成员的抑制剂,其中该抑制剂至少抑制BCL-xL并且对癌细胞具有细胞毒性时,在每个治疗周期中施用的衰老清除剂的总剂量为对于治疗癌症无效的量。在另一个特定的实施方案中,所述MDM2抑制剂为Nutlin-3a;RG-7112;RG7388;R05503781;DS-3032b;MI-63;MI-126;MI-122;MI-142;MI-147;MI-18;MI-219;MI-220;MI-221;MI-773;和3-(4-氯苯基)-3-((1-(羟甲基)环丙基)甲氧基)-2-(4-硝基苄基)异吲哚啉-1-酮;色德美坦;AM-8553;CGM097;或也抑制MDMX并且选自RO-2443和RO-5963的MDM2抑制剂。在另一个特定的实施方案中,一个或多个BCL-2抗凋亡蛋白家族成员的抑制剂为ABT-263、ABT-737、A-1155463或WEHI-539。

[0018] 在另一个实施方案中,本文还提供了用于治疗受试者的衰老相关疾病或病症的方法,该方法包括向所述受试者施用衰老清除剂,该衰老清除剂为相对于非衰老细胞选择性地杀死衰老细胞的小分子MDM2抑制剂,其中所述衰老清除剂作为单一疗法施用,其中在至少两个治疗周期中施用所述衰老清除剂,其中每个治疗周期独立地包括治疗疗程以及随后的非治疗间隔,其中所述治疗疗程的长度为至少5天并且不长于三个月,在该治疗疗程中施用所述MDM2抑制剂至少5天,并且其中所述衰老相关疾病或病症不是癌症。在特定的实施方案中,所述治疗疗程的长度为至少9天。在另一个特定的实施方案中,所述治疗疗程不长于一个月或不长于两个月。在另一个特定的实施方案中,所述治疗疗程不长于10、14或21天。在另一个特定的实施方案中,每天施用所述MDM2抑制剂。在另一个特定的实施方案中,在所述治疗疗程中每两天或每三天施用所述MDM2抑制剂。在另一个特定的实施方案中,所述非治疗间隔为至少2周、至少一个月、至少2个月、至少6个月、至少9个月或至少1年。在另一个特定的实施方案中,向所述受试者施用MDM2抑制剂包括三个或更多个治疗周期。在另一个特定的实施方案中,所述MDM2抑制剂为顺式咪唑啉化合物、螺-羟吲哚化合物或苯并二氮杂萘化合物。在另一个特定的实施方案中,所述顺式咪唑啉化合物为nutlin化合物。在另一个特定的实施方案中,所述nutlin化合物为Nutlin-3a。在另一个特定的实施方案中,所述顺式咪唑啉化合物为RG-7112、RG7388或R05503781,或者二氢咪唑并噻唑化合物。在另一个特定的实施方案中,所述二氢咪唑并噻唑化合物为DS-3032b。在另一个特定的实施方案中,所述MDM2抑制剂为选自MI-63、MI-126、MI-122、MI-142、MI-147、MI-18、MI-219、MI-220、MI-221、MI-773和3-(4-氯苯基)-3-((1-(羟甲基)环丙基)甲氧基)-2-(4-硝基苄基)异吲哚啉-1-酮的螺-羟吲哚化合物。在另一个特定的实施方案中,所述MDM2抑制剂为色德美坦;哌啶

酮化合物；也抑制MDMX并且选自RO-2443和RO-5963的MDM2抑制剂；或CGM097。在另一个特定的实施方案中，所述嘧啶酮化合物为AM-8553。在另一个特定的实施方案中，所述方法进一步包括向所述受试者施用mTOR、NFκB、PI3-k和AKT途径中的一个或多个的小分子抑制剂。在另一个特定的实施方案中，所述方法进一步包括向所述受试者施用Akt特异性抑制剂。在另一个特定的实施方案中，所述方法进一步包括AKT抑制剂为MK-2206。

[0019] 在一个实施方案中，提供了用于治疗受试者的衰老相关疾病或病症的方法，该方法包括向所述受试者施用衰老清除剂，该衰老清除剂为一个或多个BCL-2抗凋亡蛋白家族成员的小分子抑制剂，其中该抑制剂至少抑制BCL-XL，其中所述衰老清除剂相对于非衰老细胞选择性地杀死衰老细胞，其中在至少两个治疗周期中施用所述衰老清除剂，其中每个治疗周期独立地包括1天至3个月的治疗疗程以及随后至少2周的非治疗间隔，并且其中所述衰老相关疾病或病症不是癌症。在另一个特定的实施方案中，一个或多个BCL-2抗凋亡蛋白家族成员的抑制剂为BCL-2/BCL-xL抑制剂；BCL-2/BCL-xL/BCL-w抑制剂；或BCL-xL选择性抑制剂。在另一个特定的实施方案中，所述一个或多个BCL-2抗凋亡蛋白家族成员的抑制剂为苯并噻唑-脲化合物、氨基吡啶化合物、苯并咪唑化合物、四氢喹啉化合物或苯氧基化合物。在另一个特定的实施方案中，所述苯并噻唑-脲化合物为WEHI-539。在另一个特定的实施方案中，所述一个或多个BCL-2抗凋亡蛋白家族成员的抑制剂为A-1155463、ABT-263或ABT-737。在另一个特定的实施方案中，所述方法进一步包括向所述受试者施用mTOR、NFκB、PI3-k和AKT途径中的一个或多个的小分子抑制剂。在另一个特定的实施方案中，所述方法进一步包括向所述受试者施用Akt特异性抑制剂。在另一个特定的实施方案中，所述方法进一步包括AKT抑制剂为MK-2206。

[0020] 在一个实施方案中，提供了用于治疗受试者的衰老相关疾病或病症的方法，该方法包括向所述受试者施用衰老清除剂，该衰老清除剂为AKT的小分子特异性抑制剂，其中所述衰老清除剂相对于非衰老细胞选择性地杀死衰老细胞，其中在至少两个治疗周期中所述衰老清除剂作为单一疗法施用，其中每个治疗周期独立地包括1天至3个月的治疗疗程以及随后至少2周的非治疗间隔，并且其中所述衰老相关疾病或病症不是癌症。在另一个特定的实施方案中，AKT抑制剂为MK-2206。在另一个特定的实施方案中，所述方法进一步包括向所述受试者施用mTOR、NFκB和PI3-k途径中的一个或多个的小分子抑制剂。

[0021] 在以上和本文所述方法的其他特定的实施方案中，每个治疗疗程不长于一个月或不长于两个月。在另一个特定的实施方案中，每个治疗疗程 (a) 不长于5天，(b) 不长于7天，(c) 不长于10天，(d) 不长于14天，或 (e) 不长于21天。在另一个特定的实施方案中，在所述治疗疗程中每两天或每三天施用所述衰老清除剂。在另一个特定的实施方案中，每个治疗疗程为一天、两天、三天或四天。在另一个特定的实施方案中，在所述治疗疗程中每天施用所述衰老清除剂。在另一个特定的实施方案中，所述非治疗间隔为至少两周、一个月、至少2个月、至少6个月、至少9个月或至少1年。在另一个特定的实施方案中，向所述受试者施用所述衰老清除剂包括三个或更多个治疗周期。在另一个特定的实施方案中，所述衰老清除剂作为单一疗法施用。在另一个特定的实施方案中，所述衰老相关疾病或病症为选自动脉粥样硬化、心绞痛、心律失常、心肌病、充血性心力衰竭、冠状动脉疾病、颈动脉疾病、心内膜炎、冠状动脉血栓形成、心肌梗死、高血压、主动脉瘤、心脏舒张功能障碍、高胆固醇血症、高脂血症、二尖瓣脱垂、周围血管疾病、心脏应激抗性、心肌纤维化、脑动脉瘤和中风的心血管疾

病。在另一个特定的实施方案中,所述受试者患有选自动脉粥样硬化、充血性心力衰竭、周围血管疾病、高血压或冠状动脉疾病的心血管疾病。在另一个特定的实施方案中,所述衰老相关疾病或病症为选自骨关节炎、骨质疏松症、口腔粘膜炎、炎性肠病、脊柱后凸和椎间盘突出性的炎性或自身免疫疾病或病症。在另一个特定的实施方案中,所述衰老相关疾病或病症为选自阿尔茨海默病、帕金森病、亨廷顿病、痴呆、轻度认知障碍和运动神经元功能障碍的神经变性疾病。在另一个特定的实施方案中,所述衰老相关疾病或病症为选自糖尿病、糖尿病性溃疡、代谢综合征和肥胖症的代谢病。在另一个特定的实施方案中,所述衰老相关疾病或病症为选自特发性肺纤维化、慢性阻塞性肺疾病、哮喘、囊性纤维化、肺气肿、支气管扩张和年龄相关肺功能丧失的肺疾病。在另一个特定的实施方案中,所述衰老相关疾病或病症为选自黄斑变性、青光眼、白内障和视力损失的眼疾病或病症。在另一个特定的实施方案中,所述衰老相关疾病或病症为选自肾疾病、肾衰竭、虚弱、听力损失、肌肉疲劳、皮肤状况、皮肤伤口愈合、肝纤维化、胰纤维化、口腔粘膜下纤维化和少肌症的年龄相关病症。在另一个特定的实施方案中,所述衰老相关疾病或病症为选自湿疹、银屑病、色素沉着过度、痣、皮疹、特应性皮炎、荨麻疹、与光过敏或光老化相关的疾病和病症、皱纹;瘙痒;感觉迟钝;湿疹爆发;嗜酸性皮肤病;反应性嗜中性皮肤病;天疱疮;类天疱疮;免疫大疱性皮肤病;皮肤纤维组织细胞增殖;皮肤淋巴瘤;和皮肤狼疮的皮肤疾病或病症。在另一个特定的实施方案中,所述衰老相关疾病或病症为动脉粥样硬化;骨关节炎;特发性肺纤维化;或慢性阻塞性肺疾病。在另一个特定的实施方案中,所述衰老相关疾病或病症为骨关节炎并且将所述衰老清除剂直接施用于骨关节炎关节。在另一个特定的实施方案中,将所述衰老清除剂关节内施用于骨关节炎关节。在另一个特定的实施方案中,局部、经皮或皮内施用所述衰老清除剂。在另一个特定的实施方案中,所述衰老相关疾病或病症为骨关节炎,并且所述衰老清除剂诱导关节中II型胶原的产生。在另一个特定的实施方案中,所述衰老相关疾病或病症为骨关节炎,并且所述衰老清除剂抑制关节中蛋白聚糖层的消蚀。在另一个特定的实施方案中,所述衰老相关疾病或病症为骨关节炎并且所述衰老清除剂抑制关节的骨的消蚀。在另一个特定的实施方案中,所述衰老相关疾病或病症为特发性肺纤维化,并且所述衰老清除剂减少了肺中纤维化肺组织的量。在另一个特定的实施方案中,鼻内、通过吸入、气管内或通过插管术施用所述衰老清除剂。在另一个特定的实施方案中,将所述衰老清除剂与至少一种药学上可接受的赋形剂组合来配制药学上可接受的组合物,以提供所述衰老清除剂的定时释放。在另一个特定的实施方案中,所述衰老清除剂作为团输注施用。在另一个特定的实施方案中,所述衰老相关疾病或病症为动脉粥样硬化,并且其中所述衰老清除剂提高了动脉粥样硬化斑块的稳定性。在另一个特定的实施方案中,所述衰老相关疾病或病症为动脉粥样硬化,并且其中所述衰老清除剂抑制受试者的血管中动脉粥样硬化斑块的形成。在另一个特定的实施方案中,所述衰老相关疾病或病症为动脉粥样硬化,并且其中所述衰老清除剂减少了受试者的血管中动脉粥样硬化斑块的脂质含量。在另一个特定的实施方案中,所述衰老相关疾病或病症为动脉粥样硬化,并且其中所述衰老清除剂增加了所述斑块的纤维帽厚度。在另一个特定的实施方案中,所述衰老相关疾病或病症为动脉粥样硬化,并且其中降低了心肌梗死、心绞痛、中风、颈动脉血栓形成或冠状动脉血栓形成发生的可能性。在另一个特定的实施方案中,所述衰老细胞为衰老的前脂肪细胞、衰老的内皮细胞、衰老的成纤维细胞、衰老的神经元、衰老的上皮细胞、衰老的间充质细胞、衰老的平滑肌细胞、

衰老的巨噬细胞或衰老的软骨细胞。在另一个特定的实施方案中,所述衰老清除剂杀死至少20%的衰老细胞,并且杀死不多于5%的非衰老细胞。在另一个特定的实施方案中,所述衰老清除剂杀死至少25%的衰老细胞。

[0022] 在一个实施方案中,本文提供了用于抑制患有癌症的受试者的转移的方法,该方法包括向所述受试者施用相对于非衰老细胞选择性地杀死衰老细胞的单一小分子衰老清除剂,其中在化疗的施用周期后至少第六天开始且不与化疗同时的一天或多天向所述受试者施用所述衰老清除剂,并且其中所述衰老清除剂不是用于治疗所述癌症的化疗剂,并且其中所述衰老清除剂选自MDM2抑制剂;一个或多个BCL-2抗凋亡蛋白家族成员的抑制剂,其中该抑制剂至少抑制BCL-XL,并选自BCL-2/BCL-xL抑制剂;BCL-2/BCL-xL/BCL-w抑制剂;和BCL-xL选择性抑制剂;以及Akt特异性抑制剂。在特定的实施方案中,转移是黑素瘤细胞、前列腺癌细胞、睾丸癌细胞、乳腺癌细胞、脑癌细胞、胰腺癌细胞、结肠癌细胞、甲状腺癌细胞、胃癌细胞、肺癌细胞、卵巢癌细胞、卡波西肉瘤细胞、皮肤癌细胞、肾癌细胞、头或颈癌细胞、喉癌细胞、鳞癌细胞、膀胱癌细胞、骨肉瘤细胞、宫颈癌细胞、子宫内膜癌细胞、食管癌细胞、肝癌细胞或肾癌细胞的转移。在另一个特定的实施方案中,向所述受试者施用所述MDM2抑制剂包括三个或更多个治疗周期。在另一个特定的实施方案中,所述MDM2抑制剂为顺式咪唑啉化合物、螺-羟吡啶化合物或苯并二氮杂萘化合物。在另一个特定的实施方案中,所述顺式咪唑啉化合物为nutlin化合物。在另一个特定的实施方案中,所述nutlin化合物为Nutlin-3a。在另一个特定的实施方案中,所述顺式咪唑啉化合物为RG-7112、RG7388或R05503781,或者二氢咪唑并噻唑化合物。在另一个特定的实施方案中,所述二氢咪唑并噻唑化合物为DS-3032b。在另一个特定的实施方案中,所述MDM2抑制剂为选自MI-63、MI-126、MI-122、MI-142、MI-147、MI-18、MI-219、MI-220、MI-221、MI-773和3-(4-氯苯基)-3-((1-(羟甲基)环丙基)甲氧基)-2-(4-硝基苄基)异吡啶啉-1-酮的螺-羟吡啶化合物。在另一个特定的实施方案中,所述MDM2抑制剂为色德美坦;哌啶酮化合物;也抑制MDMX并且选自R0-2443和R0-5963的MDM2抑制剂;或CGM097。在另一个特定的实施方案中,所述哌啶酮化合物为AM-8553。在另一个特定的实施方案中,一个或多个BCL-2抗凋亡蛋白家族成员的抑制剂为BCL-2/BCL-xL抑制剂;BCL-2/BCL-xL/BCL-w抑制剂;或BCL-xL选择性抑制剂。在另一个特定的实施方案中,所述一个或多个BCL-2抗凋亡蛋白家族成员的抑制剂为苯并噻唑-脞化合物、氨基吡啶化合物、苯并咪唑化合物、四氢喹啉化合物或苯氧基化合物。在另一个特定的实施方案中,所述苯并噻唑-脞化合物为WEHI-539。在另一个特定的实施方案中,所述一个或多个BCL-2抗凋亡蛋白家族成员的抑制剂为A-1155463、ABT-263或ABT-737。在另一个特定的实施方案中,衰老清除剂为AKT抑制剂。在又一个特定的实施方案中,所述AKT抑制剂为MK-2206。

[0023] 在另一个实施方案中,提供了用于鉴定衰老清除剂的方法,该方法包括(a)诱导细胞衰老以提供建成的衰老细胞;(b)使衰老细胞的样品与候选试剂接触,并使对照非衰老细胞的样品与候选试剂接触;(c)确定衰老细胞的存活率水平和非衰老细胞的存活率水平,其中当衰老细胞的存活率水平小于非衰老细胞的存活率水平时,所述候选试剂为衰老清除剂。在特定的实施方案中,所述方法进一步包括使步骤(c)中鉴定的衰老清除剂与能够产生胶原的细胞接触;并确定由所述细胞产生的胶原的水平,从而鉴定用于治疗骨关节炎的衰老清除剂。在特定的实施方案中,能够产生胶原的细胞为软骨细胞。在特定的实施方案中,

产生的胶原为2型胶原。在特定的实施方案中,所述方法进一步包括向在关节中具有骨关节炎病变的非人动物施用所述衰老清除剂,并确定以下的一项或多项:(a)所述关节中衰老细胞的水平;(b)所述动物的躯体功能;(c)一个或多个炎症标志物的水平;(d)所述关节的组织学;和(e)产生的2型胶原的水平,从而确定所述衰老清除剂的治疗功效,其中与未采用所述衰老清除剂治疗的动物相比,在经治疗的动物中观察到以下的一项或多项:(i)经治疗的动物的关节中衰老细胞的水平的降低;(ii)经治疗的动物的改善的躯体功能;(iii)经治疗的动物中一个或多个炎症标志物的水平的降低;(iv)经治疗的动物的关节中增加的组织学常态;以及(v)经治疗的动物中产生的2型胶原的水平的增加。在特定的实施方案中,所述方法进一步包括向动脉粥样硬化动物模型的非人动物施用所述衰老清除剂,该动物具有动脉粥样硬化斑块,并确定以下的一项或多项:(a)一个或多个炎症标志物的水平;和(b)动脉粥样硬化斑块的水平,从而确定所述衰老清除剂的治疗功效,其中与未采用所述衰老清除剂治疗的动物相比,在经治疗的动物中观察到以下的一项或多项:(i)经治疗的动物中一个或多个炎症标志物的水平的降低;和(ii)经治疗的动物中动脉粥样硬化斑块的水平的降低;从而鉴定用于治疗动脉粥样硬化的衰老清除剂。在特定的实施方案中,所述方法进一步包括向肺疾病动物模型的非人动物施用所述衰老清除剂,该动物具有肺纤维化组织,并确定以下的一项或多项:(a)一个或多个炎症标志物的水平;和(b)肺纤维化组织的水平,从而确定所述衰老清除剂的治疗功效,其中与未采用所述衰老清除剂治疗的动物相比,在经治疗的动物中观察到以下的一项或多项:(i)经治疗的动物中一个或多个炎症标志物的水平的降低;和(ii)经治疗的动物中肺纤维化组织的水平的降低,从而鉴定用于治疗衰老相关肺疾病的衰老清除剂。

[0024] 在另一个实施方案中,提供了用于治疗受试者的衰老相关疾病或病症的方法,该方法包括:(a)检测所述受试者的衰老细胞的水平;和(b)向所述受试者施用选择性地杀死衰老细胞的衰老清除剂,其中所述衰老清除剂选自小分子并且选自MDM2抑制剂;Akt特异性抑制剂;一个或多个BCL-2抗凋亡蛋白家族成员的抑制剂,其中该抑制剂至少抑制BCL-xL。在特定的实施方案中,所述方法进一步包括一个或多个BCL-2抗凋亡蛋白家族成员的抑制剂为Bcl-2/Bcl-xL/Bcl-w抑制剂、Bcl-2/Bcl-xL抑制剂、Bcl-xL/Bcl-w抑制剂或Bcl-xL选择性抑制剂。

[0025] 在其他特定的实施方案中,提供了用于在患有衰老细胞相关疾病或病症或具有发展衰老细胞相关疾病或病症的至少一个诱发因素的受试者中治疗衰老细胞相关疾病或病症,降低衰老细胞相关疾病或病症发生的可能性,或延迟衰老细胞相关疾病或病症的发作的方法,该方法包括向所述受试者施用改变衰老细胞中细胞存活信号传导途径和炎症途径之一或两者的衰老清除剂,从而促进衰老细胞的死亡,条件是如果所述受试者患有癌症,则所述衰老清除剂不是用于治疗所述癌症的首选疗法(primary therapy),其中所述衰老清除剂每0.5-12个月施用一次,并且其中所述衰老细胞相关疾病或病症为心血管疾病或病症、炎性疾病或病症、肺疾病或病症、神经疾病或病症、化疗副作用、放射治疗副作用或转移。在另一个特定的实施方案中,提供了用于在患有衰老细胞相关疾病或病症或具有发展衰老细胞相关疾病或病症的至少一个诱发因素的受试者中治疗衰老细胞相关疾病或病症,降低衰老细胞相关疾病或病症发生的可能性,或延迟衰老细胞相关疾病或病症的发作的方法,该方法包括向所述受试者施用改变衰老细胞中细胞存活信号传导途径和炎症途径之一

或两者的衰老清除剂,从而促进衰老细胞的死亡,其中所述衰老清除剂每4-12个月施用一次。

[0026] 本文还提供了本文所述衰老清除剂的用途。在一个实施方案中,提供了衰老清除剂用于治疗衰老相关疾病或病症的用途,其中治疗有效量的相对于非衰老细胞选择性地杀死衰老细胞的小分子衰老清除剂适合于在至少两个治疗周期中施用,其中每个治疗周期独立地包括1天至3个月的治疗疗程以及随后至少2周的非治疗间隔;条件是如果所述衰老清除剂为MDM2抑制剂,则所述MDM2抑制剂作为单一疗法施用,并且每个治疗疗程的长度为至少5天,在此期间施用所述MDM2抑制剂至少5天;其中所述衰老相关疾病或病症不是癌症。可以使用本文所述衰老清除剂生产用于治疗如本文所述的衰老相关疾病或病症的药物。

[0027] 在以下的描述中,阐述某些具体的细节以便提供对不同实施方案的透彻理解。然而,本领域技术人员应理解,在没有这些细节的情况下可以实施本发明。在其他情况下,未示出或详细地描述众所周知的结构以避免对实施方案的不必要的模糊描述。除非上下文另有要求,否则在说明书和其后的权利要求的各个部分,词语“包含”及其变化形式如“包括”和“含有”应被解释为开放的、包含性含义,即,如“包括但不限于”。此外,术语“包含”(和相关术语如“包括”或“具有”或“含有”)并不旨在排除在其他某些实施方案,例如,本文所述的物质、组合物、方法或过程等的任何组成的实施方案可以“由所述特征组成”或“基本上由所述特征组成”。本文提供的标题仅为了方便起见,并非解释所要求保护的实施方案的范围或含义。

[0028] 在本说明书全文中提及“一个实施方案”或“实施方案”意味着关于该实施方案所述的特定特征、结构或特性被包含在至少一个实施方案中。因此,在本说明书通篇各个部分的不同位置出现的用语“在一个实施方案中”或“在实施方案中”不一定全部是指相同的实施方案。此外,在一个或多个实施方案中所述特定的特征、结构或特性可以以任何合适的方式组合。

[0029] 而且,除非上下文另有明确规定,否则如本说明书和所附权利要求中所用的,单数形式“一个”、“一种”和“该”包括复数指示对象。因此,例如,提及“一个非人动物”可以指一个或多个非人动物或多个这样的动物,而提及“一个细胞”或“该细胞”包括提及一个或多个细胞和本领域技术人员已知的其等同物(例如,多个细胞),等等。当描述或要求保护方法的步骤并且所述步骤被描述为以特定的顺序发生时,第一步“先于”(即,在前)第二步发生(或进行)的描述与如果重写描述为所述第二步在所述第一步“之后”发生(或进行)具有相同的含义。术语“约”在指数字或数值范围时意指所提及的数字或数值范围是实验变化性以内(或统计实验误差以内)的近似值,因此该数字或数值范围可以在所述数字或数值范围的1%至15%之间变化。例如,“约X”的使用应包括值X的+/-1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%和15%。还应当指出,除非上下文另有明确规定,否则术语“或”通常以其包括“和/或”的含义使用。例如,当提及至少一种化合物或至少一种组合物时,术语“至少一种”具有与术语“一种或多种”相同的含义和理解。

附图说明

[0030] 图1提供了用Nutlin-3a (Nut) 处理 (1) 通过辐照诱导衰老的细胞 (Sen (IR)) ; (2) 通过多柔比星处理来诱导衰老的细胞 (Sen (Doxo)) ; 和 (3) 非衰老细胞 (Non Sen) 的一般时间

线和程序的示意图。

[0031] 图2A-D显示了Nutlin-3a对通过辐照诱导衰老的成纤维细胞的存活率的影响。图2A示出了在0、2.5或10 μ M下的Nutlin-3a处理9天后(D9)对经辐照(IR)的衰老包皮成纤维细胞(Sen(IR)HCA2)的影响。图2B显示了经所示浓度下的Nutlin-3a处理的经辐照的BJ细胞(Sen(IR)BJ)的百分比存活率。图2C显示了经辐照的肺成纤维细胞(Sen(IR)IMR90)的百分比存活率,并且图2D显示了用Nutlin-3a处理的经辐照的小鼠胚胎成纤维细胞(MEF)的百分比存活率。

[0032] 图3A-B示出了Nutlin-3a对通过多柔比星处理来诱导衰老的细胞的存活率的影响。用Nutlin-3a处理HCA2细胞9天(D9),并用Nutlin-3a处理主动脉内皮细胞11天(D11),并随后确定百分比存活率。图3A显示了Nutlin-3a对多柔比星处理(Doxo)的衰老包皮成纤维细胞(HCA2)的影响。图3B示出了Nutlin-3a对多柔比星处理(Doxo)的衰老主动脉内皮细胞(Endo Aort)的影响(图3B)。

[0033] 图4A-C显示了用Nutlin-3a处理的非衰老成纤维细胞的增长百分比。用Nutlin-3a处理细胞9天并确定增长百分比(D9)。Nutlin-3a对非衰老包皮成纤维细胞(Non Sen HCA2)是无毒的(如图4A所示),对非衰老肺成纤维细胞(Non Sen IMR90)是无毒的(如图4B所示),并且对非衰老肺小鼠胚胎成纤维细胞(Non Sen MEF)是无毒的(如图4C所示)。

[0034] 图5A-B示出了用Nutlin-3a处理的非衰老主动脉内皮细胞和非衰老前脂肪细胞的增长百分比。用Nutlin-3a处理细胞11天并确定增长百分比(D11)。图5A和图5B显示Nutlin-3a分别对非衰老主动脉内皮细胞(Non Sen Endo Aort)和非衰老前脂肪细胞(Non Sen Pread)是无毒的。

[0035] 图6显示了用Nutlin-3a处理p16-3MR小鼠并对该小鼠成像分析的时间线的示意图。在第35天,将小鼠处死并收集脂肪和皮肤以供提取RNA,并收集肺并将其急速冷冻以用于免疫显微术。针对SASP因子(mmp3, IL-6)和衰老标志物(p21、p16和p53)的表达分析RNA。分析冷冻的肺组织中的DNA损伤标志物(γ H2AX)。

[0036] 图7显示了p16-3MR转基因插入的示意图。3MR(三形态(tri-modality)报道基因)是含有合成的海肾萤光素酶(LUC)、单体红色荧光蛋白(mRFP)和截短的单链疱疹病毒(HSV)-1胸苷激酶(tTK)的功能域的融合蛋白,它允许被更昔洛韦(GCV)杀死。将3MR cDNA以与p16合框(in frame)的方式插入外显子2中,创建含有p16的前62个氨基酸,但不包含全长野生型p16蛋白的融合蛋白。3MR cDNA的插入还在外显子2中的p19^{ARF}阅读框中引入了终止密码子。

[0037] 图8示出了在小鼠中多柔比星诱导的衰老的发光强度的降低。用多柔比星(DOXO)处理雌性C57/B16 p16-3MR小鼠。10天后测量发光并将其用作每个小鼠的基线(100%强度)。在多柔比星处理后第10天至第24天每天腹膜内施用Nutlin-3a(NUT)(N=9)。随后在Nutlin-3a处理后第7、14、21、28、35天测量发光,并将最终值计算为基线值的百分比。给对照动物(DOXO)注射等体积的PBS(N=3)。

[0038] 图9A-E示出了在用单独多柔比星(DOXO)或多柔比星加Nutlin-3a(DOXO+NUT)处理后,在来自动物的皮肤和脂肪中内源性mmp-3、IL-6、p21、p16和p53的mRNA的水平。所述值代表与未处理的对照动物相比,特定mRNA的诱导倍数。图9A:p21;图9B:p16^{INK4a}(p16);图9C:p53;图9D:mmp-3;和图9E:IL-6。从多柔比星处理的小鼠(Doxo N=3)和多柔比星+Nutlin-

3a处理的小鼠 (Doxo+Nutlin N=6) 中获得数据。

[0039] 图10A-B显示了示出Nutlin-3a减少了具有多柔比星诱导的DNA损伤的细胞数目的数据。图10A显示了通过与对 γ H2AX具有特异性的兔多克隆一抗结合,然后与山羊抗兔二抗一起温育并且随后用DAPI复染色,对来自多柔比星处理的动物 (DOXO) (左图) 以及多柔比星和Nutlin-3a处理的小鼠 (DOXO+NUTLIN) 的肺切片检测的免疫荧光显微术。图10B显示了计算并表示为细胞总数的百分比的来自免疫荧光显微术的阳性细胞百分比。从多柔比星处理的小鼠 (Doxo N=3) 和多柔比星+Nutlin-3a处理的小鼠 (Doxo-Nutlin N=3) 中获得数据。

[0040] 图11显示了Nutlin-3a处理减少了来自首先用多柔比星处理的动物的脂肪活检物的衰老相关 (SA) β -半乳糖苷酶 (β -gal) 强度。用多柔比星处理雌性C57/BL6 p16-3MR小鼠。一部分经多柔比星处理的动物在多柔比星处理后第10天至第24天每天接受Nutlin-3a (NUT) 或PBS (DOXO)。Nutlin-3a处理后三周,将小鼠处死并立即将脂肪活检物固定并用含有X-Gal的溶液染色。未处理的动物用作阴性对照 (CTRL)。

[0041] 图12A-12C显示了对在用Nutlin-3a处理的非衰老 (NS) 细胞和经辐照 (IR) 的衰老细胞的细胞核中IL-6产生的检测。在第-6天辐照原代人成纤维细胞 (IMR90) 并在第0天至第9天在培养基中用10 μ M Nutlin-3a或DMSO (媒介物对照) 处理。在没有Nutlin-3a或DMSO的培养基中将细胞另外培养6天 (第12天至第15天)。在第9天和在第12天用抗IL-6抗体检测细胞的细胞核中的IL-6。每一个经辐照的Nutlin-3a处理的细胞和DMSO处理的细胞中的IL-6阳性细胞核百分比示于图12A中。表达用抗IL-6抗体检测的IL-6的细胞的免疫荧光示于图12B中。图12C示出了在第9、12和15天 (分别为D9、D12、D15) 在Nutlin-3a (Sen (IR) Nut3a10 μ M) 或媒介物 (Sen (IR) DMSO) 处理的衰老细胞中IL-6分泌的相对水平。示出了相比于非衰老细胞的倍数增加 (倍数NS, y轴)。

[0042] 图13A-13F示出了用Nutlin-3a处理的非衰老 (NS) 细胞和经辐照的衰老细胞表达的衰老相关蛋白质 (p21、p16和IL-1a) 和SASP因子 (CXCL-1、IL-6和IL-8) 的水平。在第-6天辐照IMR90细胞并在第0天至第9天在培养基中用10 μ M Nutlin-3a或DMSO (媒介物对照) 处理。在没有Nutlin-3a或DMSO的培养基中将细胞另外培养6天 (第12天至第15天), 在第12天更换培养基。进行定量PCR,并在非衰老细胞 (NS (即, 第-7天)) 中和在第9天 (d9) 和第12天 (d12) 在用Nutlin-3a (Sen (IR) Nut3A) 或媒介物 (Sen (IR) DMSO) 处理的衰老细胞中检测p21 (图13A, p21/肌动蛋白, y轴为对数尺度); p16 (图13B); IL-1a (图13C); CXCL-1 (图13D); IL-6 (图13E); 和IL-8 (图13F) 表达的水平。数据以相对于肌动蛋白的表达显示。

[0043] 图14显示了检测用Nutlin-3a处理的衰老细胞中蛋白质的产生的免疫印迹。在第-6天辐照IMR90细胞并在第0天至第9天在培养基中用Nutlin-3a或DMSO (媒介物对照) 处理。在没有Nutlin-3a或DMSO的培养基中将细胞另外培养6天 (第12天至第15天), 在第12天更换培养基。使用可商购的抗体检测每种蛋白质的水平。显示了在10 μ M Nutlin-3a (+) 或媒介物 (-) 中培养的在第9、12和15天 (分别为Xd9、Xd12和Xd15) 的非衰老细胞 (NS) 和衰老细胞的数据。

[0044] 图15描绘了针对细胞计数测定衰老 (经辐照的细胞) 和非衰老细胞 (未经辐照的细胞) 的示例性时间线和处理方案。

[0045] 图16描绘了显示ABT-263 (“Navi”) 处理对非衰老IMR90细胞 (Non Sen IMR90) 的影响的图。

- [0046] 图17描绘了显示ABT-263处理对衰老IMR90细胞 (Sen (IR) IMR90) 的影响的图。
- [0047] 图18描绘了在细胞活力测定 (CellTiter-Glo® (CTG)) 中衰老细胞 (经辐照的细胞) 和非衰老细胞 (未经辐照的细胞) 的示例性时间线和处理方案。
- [0048] 图19示出了显示ABT-263处理对非衰老和衰老IMR90细胞的影响的图。
- [0049] 图20示出了显示ABT-263处理对非衰老和衰老肾上皮细胞的影响的图。
- [0050] 图21示出了显示ABT-263处理对非衰老和衰老包皮成纤维细胞 (HCA2) 的影响的图。
- [0051] 图22示出了显示ABT-263处理对非衰老和衰老肺成纤维细胞 (IMR90) 的影响的图。
- [0052] 图23示出了显示ABT-263处理对非衰老和衰老前脂肪细胞的影响的图。
- [0053] 图24示出了显示ABT-263处理对非衰老和衰老小鼠胚胎成纤维细胞 (MEF) 的影响的图。
- [0054] 图25示出了显示ABT-263处理对非衰老和衰老平滑肌细胞 (Smt h Msc1) 的影响的图。
- [0055] 图26示出了显示ABT-199处理对非衰老和衰老IMR90细胞的影响的图。
- [0056] 图27示出了显示ABT-199处理对非衰老和衰老IMR90细胞的影响的图。
- [0057] 图28示出了显示奥巴克拉 (Obatoclax) 处理对非衰老和衰老IMR90细胞的影响的图。
- [0058] 图29A和图29B:图29A示出了显示ABT-263 (Navi) 处理与10nM MK-2206相组合对非衰老和衰老IMR90细胞的影响的图。图29B示出了当仅暴露于MK-2206时非衰老IMR90细胞 (IMR90NS) 和衰老IMR90细胞 (IMR90Sen (IR)) 的存活率百分比。
- [0059] 图30A-B示出了WEHI-539对衰老的经辐照的肺成纤维细胞 (Sen (IR) IMR90)) 的存活率百分比 (图30A) 和经辐照的肾细胞 (Sen (IR)) 的存活率百分比 (图30B) 的影响。NS=非衰老细胞,其未被暴露于辐射中。
- [0060] 图31示出了在胱天蛋白酶抑制剂 (泛胱天蛋白酶抑制剂, Q-VD-OPh) 的存在下, WEHI-539的衰老清除活性被抑制。图31的左侧示出了WEHI-539对杀死衰老细胞 (IMR90Sen (IR)) 的作用。方框区域内的数据点描绘了在存在或不存在Q-VC-OPh的情况下在非衰老细胞 (NS) 和衰老细胞 (Sen (IR)) 所暴露的1.67 μ M和5 μ M的WEHI-539浓度下,衰老细胞的杀死。在存在和不存在泛-胱天蛋白酶抑制剂 (在图中为Q-VD) 的情况下非衰老细胞和衰老细胞的存活率百分比示于图中的右下方。
- [0061] 图32显示了特异性shRNA分子对衰老细胞的存活率的影响。用包含对编码BCL-2、BCL-xL和BCL-w的多核苷酸中的每一个具有特异性的shRNA分子的慢病毒载体转导衰老细胞和非衰老IMR90细胞。显示了对于每个shRNA,衰老细胞存活率与非衰老细胞存活率之比。每个柱状代表一式三份的平均值。引入到细胞中的shRNA序列如下 (从左至右): BCL-2:SEQ ID NO:1,3,3,5; BCL-XL:SEQ ID NO:7,9,11,13; BCL-w:SEQ ID NO:15,17,19,21; 两个非转导 (NT) 样品。
- [0062] 图33示出了ABT-737对非衰老肺成纤维细胞 (IMR90) (IMR90NS) 和衰老肺成纤维细胞 (IMR90) (IMR90Sen (IR)) 的活力的影响。
- [0063] 图34示出了在胱天蛋白酶抑制剂 (泛胱天蛋白酶抑制剂, Q-VD-OPh) 的存在下, ABT-263的衰老清除活性被抑制。图34的左上侧示出了ABT-263对杀死衰老细胞 (IMR90Sen

(IR))的作用。在存在或不存在泛-胱天蛋白酶抑制剂Q-VC-OPh的情况下,将非衰老细胞(NS)和衰老细胞(Sen(IR))暴露于0.33 μ M和1 μ M浓度下的ABT-263中。在存在和不存在泛-胱天蛋白酶抑制剂(在图中为Q-VD)的情况下非衰老细胞和衰老细胞的存活率百分比示于图34的右下方。

[0064] 图35描绘了用于评估通过Nutlin-3A处理(在C57BL6/J小鼠中)或通过GCV处理(在3MR小鼠中)去除衰老细胞在抑制骨关节炎的指征和进展方面的功效的动物研究设计。第1组动物(16x C57BL6/J小鼠;1x 3MR小鼠)代表经历切除一个后肢的ACL的手术(ACL手术或骨关节炎手术(OA))以诱导骨关节炎的前交叉韧带(ACL)对照组。第1组动物在手术后第2周期间每天接受媒介物的关节内注射(10 μ l)持续5天,并在手术后第4周接受任选的第二个处理周期,这与测试动物中的GCV处理并行。第2组动物(3x 3MR小鼠)代表一个处理组,其接受ACL手术,并在手术后第2周期间每天接受GCV的关节内注射(2.5 μ g/关节)持续5天,并在手术后第4周接受任选的第二个处理周期。第3组动物(12x C57BL6/J)代表第二处理组,其接受ACL手术,并在手术后第3周开始每隔一天接受Nutlin-3A的关节内注射(5.8 μ g/关节)持续2周。第4组动物代表第二对照组,其经历没有切断ACL的假手术,并且在手术后第2周期间每天接受媒介物的关节内注射(10 μ l)持续5天,并在手术后第4周接受任选的第二个处理周期,这与GCV处理的3MR小鼠并行。该研究设计如给药量和给药时间表(例如,天数)可以适合于其他衰老清除剂。

[0065] 图36描绘了图35中所述的动物研究设计的时间线。

[0066] 图37A-C示出了由来自经历骨关节炎手术(OA手术)的小鼠的关节,经历OA手术并接受Nutlin-3A处理的小鼠(Nutlin-3A)的关节,接受假手术的关节和没有接受任何手术的对照小鼠的关节(对照)的细胞表达的衰老相关蛋白质(p16)和SASP因子(IL-6和MMP13)的水平。进行定量PCR,并检测从经历OA手术的小鼠,经历OA手术和Nutlin-3A处理的小鼠,接受假手术和对照(没有手术)小鼠的关节中提取的细胞中p16(图37A);IL-6(图37B);和MMP13(图37C)表达的水平。数据以相对于肌动蛋白的表达显示。数据显示Nutlin-3A处理从关节中清除衰老细胞。

[0067] 图38示出了由来自经历骨关节炎手术(OA手术)的小鼠的关节,经历OA手术并接受Nutlin-3A处理的小鼠(Nutlin-3A)的关节,接受假手术的关节和没有接受任何手术的对照小鼠的关节的细胞表达的2型胶原的水平。进行定量PCR,并检测从经历OA手术的小鼠,经历OA手术和Nutlin-3A处理的小鼠,接受假手术和对照(没有手术)小鼠的关节中提取的细胞中2型胶原的水平。数据以相对于肌动蛋白的表达显示。数据显示Nutlin-3A处理驱使在OA关节中从头开始产生胶原。

[0068] 图39示出了在骨关节炎手术后4周通过检测小鼠偏爱使用哪条腿的负重测试测得的平衡(incapacitance)测量结果。将小鼠放置在隔室中,在每个尺度上以1只后爪站立。随后在3秒期间内测量置于每个后肢上的重量。在每个时间点对每个动物做出至少3个单独的测量,并将结果表示为置于手术肢上的重量/置于对侧未手术肢上的重量的百分比。

[0069] 图40描绘了图39显示的负重测试的结果。骨关节炎导致小鼠偏爱未手术腿超过手术腿(Δ)。用Nutlin-3A清除衰老细胞避免了这种影响(∇)。

[0070] 图41描绘了热板分析的结果以提供对疼痛刺激的敏感性和反应的评估。在骨关节炎(OA)手术后4周测量由放置于55 $^{\circ}$ C平台后达到疼痛阈值引起的手术后肢的舔爪(Paw-

lick) 反应时间 (以秒测量)。数据显示与未处理的OA手术小鼠 (■) 相比, Nutlin-3A处理缩短了OA手术小鼠 (▲) 的反应时间。

[0071] 图42显示了来自未通过手术处理的动物(无手术(C57B));接受骨关节炎手术并接受媒介物的动物(OA手术(3MR));和接受OA手术并用Nutlin-3a处理的动物(OA手术+Nutlin-3a)的组织病理学结果。箭头指向关节中完整或破坏的蛋白聚糖层。

[0072] 图43A-B示出了以高脂饮食(HFD)喂养的LDLR^{-/-}转基因小鼠的两个动脉粥样硬化动物模型研究的示意图。图43A中示出的研究评估了用衰老清除剂(例如, Nutlin-3A)从LDLR^{-/-}小鼠的斑块中清除衰老细胞使斑块负荷降低的程度。图43B中示出的研究评估了从LDLR^{-/-}/3MR双转基因小鼠中基于更昔洛韦清除衰老细胞将预先存在的致动脉粥样硬化疾病改善的程度。

[0073] 图44A-D描绘了在Nutlin-3A或媒介物的一个处理周期之后以HFD喂养的LDLR^{-/-}小鼠的血浆脂质水平的图。图44A显示了与以非HFD喂养的LDLR^{-/-}相比, 媒介物或Nutlin-3A处理的LDLR^{-/-}小鼠的总胆固醇水平。图44B显示了与以非HFD喂养的LDLR^{-/-}相比, 媒介物或Nutlin-3A处理的LDLR^{-/-}小鼠的HDL水平。图44C显示了与以非HFD喂养的LDLR^{-/-}相比, 媒介物或Nutlin-3A处理的LDLR^{-/-}小鼠的甘油三酯水平。图44D显示了与以非HFD喂养的LDLR^{-/-}相比, 媒介物或Nutlin-3A处理的LDLR^{-/-}小鼠的vLDL/LDL/IDL水平。

[0074] 图45A-D示出了在Nutlin-3A或媒介物的一个处理周期后, 以HFD喂养的LDLR^{-/-}小鼠的主动脉弓中SASP因子和衰老标志物的RT-PCR分析。图45A示出了主动脉弓(方框内)。图45B-C显示了SASP因子和衰老标志物的表达水平, 其相对于GAPDH归一化并表示为相对于非HFD、媒介物处理的年龄匹配的LDLR^{-/-}小鼠的倍数变化。图45D显示了图45B-C的数字形式的数据。

[0075] 图46A-C示出了在Nutlin-3A或媒介物的两个处理周期后, 以HFD喂养的LDLR^{-/-}小鼠的主动脉弓中SASP因子和衰老标志物的RT-PCR分析。图46A-B显示了SASP因子和衰老标志物的表达水平, 其相对于GAPDH归一化并表示为相对于非HFD、媒介物处理的年龄匹配的LDLR^{-/-}小鼠的倍数变化。图46C显示了图46A-B的数字形式的数据。

[0076] 图47A-C示出了在Nutlin-3A或媒介物的三个处理周期之后以HFD喂养的LDLR^{-/-}小鼠中主动脉斑块的染色分析。图47A示出了主动脉。图47B显示了斑块中覆盖的主动脉的百分比。图47C显示了主动脉的苏丹IV(Sudan IV)染色以使斑块可视化并将每个样品中脂质斑块覆盖的面积表示为主动脉的总表面积的百分比。

[0077] 图48A-B描绘了在Nutlin-3A或媒介物的三个处理周期后, 来自以HFD喂养的LDLR^{-/-}小鼠的血小板计数(图48A)和淋巴细胞计数(图48B)的图。

[0078] 图49A-B分别描绘了在Nutlin-3A或媒介物的三个处理周期后, 以HFD喂养的LDLR^{-/-}小鼠的体重和体脂肪/瘠瘦组织组成(%)的图。

[0079] 图50描绘了在以HFD喂养的LDLR^{-/-}和LDLR^{-/-}/3MR小鼠中用更昔洛韦清除衰老细胞的效果的图, 如由斑块中覆盖的主动脉的百分比测得的。

[0080] 图51描绘了在以HFD喂养的LDLR^{-/-}和LDLR^{-/-}/3MR小鼠中用更昔洛韦清除衰老细胞的效果的图, 如由主动脉的斑块横截面积测得的。

[0081] 图52显示了衰老细胞清除对伴随老化的心脏应激抗性的作用。对FVB x 129Sv/E x C57BL/6混合或C57BL/6纯遗传背景中的12个月大的INK-ATTAC转基因小鼠每周三次注射

AP20187 (分别为混合组0.2mg/kg和C57BL/6组2mg/kg)。在18个月时,使来自每个组的雄性和雌性小鼠的亚组经受心脏压力测试并记录心跳骤停的时间。对照组接受媒介物的注射。

[0082] 图53显示了图52中描述的雌性INK-ATTAC转基因小鼠中Sur2a表达的RT-PCR分析。

[0083] 图54A-C示出了在经更昔洛韦的100天处理期后,以HFD喂养的LDLR^{-/-}/3MR双转基因小鼠和LDLR^{-/-}对照小鼠的主动脉斑块的染色分析。图54A-B显示了主动脉的苏丹IV染色以分别使LDLR^{-/-}对照小鼠和LDLR^{-/-}/3MR小鼠中的斑块可视化。图54C显示了如由苏丹IV染色的面积测得的斑块中覆盖的主动脉的百分比。

[0084] 图55A-D示出了在经更昔洛韦的100天处理期后,以HFD喂养的LDLR^{-/-}/3MR双转基因小鼠和LDLR^{-/-}对照小鼠的斑块形态学分析。图55的A和C显示了主动脉的苏丹IV染色以分别使LDLR^{-/-}对照小鼠和LDLR^{-/-}/3MR小鼠中的斑块可视化。收获圈出的斑块并切成横断面,并染色以表征动脉粥样硬化斑块的一般架构(图55的B和D)。“#”表示位于主动脉外部的脂肪。

[0085] 图56显示了SA-β-GAL晶体局限于来自以高脂饮食喂养的小鼠的动脉粥样硬化动脉的承载脂质的泡沫细胞。巨噬泡沫细胞由白色虚线轮廓线显示,并且与巨噬泡沫细胞邻近的是平滑肌泡沫细胞。将巨噬泡沫细胞中的左方框中的区域放大并显示在右上侧以显示出具有SA-β-GAL晶体的溶酶体。将平滑肌泡沫细胞内的方框中的区域放大并显示在图的右下侧。

[0086] 图57显示了来自以高脂饮食喂养的小鼠的动脉粥样硬化动脉的巨噬泡沫细胞。含SA-β-GAL晶体的承载脂质的溶酶体由箭头指示。图58显示了SA-β-GAL晶体局限于以高脂饮食喂养的小鼠的动脉粥样硬化动脉中的平滑肌泡沫细胞的溶酶体。将图示的左下侧部分中的方框中的区域放大并显示在左上侧的插图中。

[0087] 图59显示了衰老细胞清除对暴露于博来霉素的小鼠中的外周毛细血管氧饱和度(SpO₂)的影响。

[0088] 图60A-C示出了用更昔洛韦清除衰老细胞对暴露于博来霉素的3MR小鼠的肺功能的影响。图60A显示了更昔洛韦处理对暴露于博来霉素的3MR小鼠的肺弹性的影响。图60B显示了更昔洛韦处理对暴露于博来霉素的3MR小鼠的动态肺柔顺性(compliance)的影响。图60C显示了更昔洛韦处理对暴露于博来霉素的3MR小鼠的静态肺柔顺性的影响。

[0089] 图61显示了在香烟烟雾(CS)中暴露2个月和4个月后,衰老细胞清除对小鼠中的外周毛细血管氧饱和度(SpO₂)的影响。AP=AP20187;GAN=更昔洛韦;Navi=Navitoclax (ABT-263);和Nutlin=Nutlin 3A。

[0090] 图62示出了RG-7112(结构示于图62的顶部)对衰老的经辐照的肺成纤维细胞IMR90((IMR90) Sen (IR))和非衰老IMR90细胞的存活率百分比的影响,所述非衰老IMR90细胞(IMR90NS)在处理3天后(左下侧)和用RG-7112处理六天后(右下侧)没有暴露于辐射中。

[0091] 图63A-B示出了在p16-3MR小鼠中紫杉醇诱导衰老。用20mg/kg紫杉醇或媒介物每两天三次处理小鼠的组(n=4)。用紫杉醇处理的小鼠中的发光水平示于图63A中。针对用紫杉醇处理的动物中的目标基因:p16、3MR转基因和IL-6中的每一个,确定皮肤中mRNA的水平,如图63B所示。

[0092] 图64显示了ABT-263对最初用紫杉醇处理的小鼠的影响。在3MR小鼠中进行的实验的示意图示于图的右边。将小鼠首先用紫杉醇处理,然后用媒介物、更昔洛韦(gcv)或ABT-

263处理。针对用紫杉醇+媒介物 (pacli+媒介物);紫杉醇+更昔洛韦 (pacli+gcv);紫杉醇+ABT-263 (pacli+ABT-263) 处理的小鼠的每一组 (n=4) 和没有接受紫杉醇的对照动物,测量旋转轮计数 (Wheel count) (参见图64的左侧的图)。

[0093] 图65显示了在用化疗药物:沙利度胺 (100mg/kg;每天7次注射);罗米地辛 (1mg/kg;3次注射);泊马度胺 (5mg/kg;每天7次注射);来那度胺 (50mg/kg;每天7次注射);5-氮杂胞苷 (5mg/kg;3次注射) 和多柔比星 (10mg/kg;每周2-4次注射) 处理的p16-3MR动物组 (n=4) 中诱导的衰老的水平。测量用所述药物处理的动物中发光的水平。

[0094] 图66显示了示出衰老和非衰老的人腹部皮下前脂肪细胞中不同细胞蛋白的水平免疫印迹。如实施例28所述诱导衰老。在诱导衰老后的若干个时间点制备裂解物,并在24小时和第3、5、8、11、15、20和25天 (D3、D5、D8、D11、D15、D20、和D25) 检测该裂解物中每种蛋白质的水平。

[0095] 图67显示了与以常规食物饮食喂养 (食物喂养) 的小鼠 (n=6) 相比,以高脂饮食 (高脂) 喂养四个月的p16-3MR小鼠组 (n=6) 具有增加的衰老细胞数目。

[0096] 图68示出了与用媒介物处理的小鼠相比,在以高脂饮食喂养四个月并随后用更昔洛韦处理的p16-3MR小鼠的脂肪组织中的衰老细胞减少。通过SA- β -Gal染色检测到肾周、附睾 (Epi) 或皮下腹股沟 (Ing) 脂肪组织中衰老细胞的存在。

[0097] 图69A-C显示了更昔洛韦处理对以高脂饮食喂养的p16-3MR小鼠的葡萄糖耐量的影响。在时间零点给予葡萄糖的团注,并监测血糖持续最长2小时以确定葡萄糖利用的功效 (图69A)。这被量化为曲线下面积 (AUC),其中较高的AUC表示葡萄糖耐受不良。用更昔洛韦处理的小鼠的葡萄糖耐量测试 (GTT) AUC示于图69B中。血红蛋白A1c示于图69C中。n=9;ANOVA。

[0098] 图70A-70B显示了在更昔洛韦施用后以高脂饮食喂养的p16-3MR小鼠的胰岛素敏感性 (胰岛素耐量测试 (ITT))。在时间零点施用葡萄糖团注后的0、14、30、60和120分钟测量血糖水平 (参见图70A)。当向野生型小鼠施用更昔洛韦时在胰岛素耐量测试中没有观察到变化 (参见图70B)。

[0099] 图71示出了A-1155463对衰老的经辐照的肺成纤维细胞 (Sen (IR) IMR90) 的存活率百分比和非衰老IMR90细胞 (Sen (IR)) 的存活率百分比的影响。NS=非衰老细胞,其未被暴露于辐射中。

具体实施方式

[0100] 老化是大多数慢性疾病、失能和健康衰退的危险因素。衰老细胞——停止复制的细胞,随着个体的老化而积累,并且可部分地或显著地导致引起老化和年龄相关疾病的细胞和组织恶化。细胞也可能在暴露于环境、化学或生物损害之后或由于疾病而变衰老。本文提供了用于选择性地杀死与多种病理和疾病 (包括年龄相关病理和疾病) 相关的衰老细胞的方法和药剂。如本文所公开的,可以通过施用至少一种衰老清除剂来治疗或预防 (即,降低发生或发展的可能性) 衰老细胞相关疾病和病症。由本文所述的药剂和方法治疗或预防的衰老细胞相关疾病或病症包括心血管疾病或病症、炎性或自身免疫疾病或病症、肺疾病或病症、神经疾病或病症、皮肤疾病或病症、化疗副作用、放射治疗副作用或转移或代谢病,所有这些均在本文中进行了更详细的描述。在某些特定的实施方案中,由本文描述的衰老

清除剂和方法治疗或预防的衰老细胞相关疾病或病症包括,例如,特发性肺纤维化 (IPF)、慢性阻塞性肺疾病 (COPD)、骨关节炎以及与动脉硬化如动脉粥样硬化相关的心血管疾病和病症。在某些实施方案中,所述衰老相关疾病或病症不是癌症。如本文更详细地描述的,衰老清除剂包括,例如,MDM2抑制剂(例如,nutlin 3a、RG-7112);一个或多个BCL-2抗凋亡蛋白家族成员的抑制剂,该抑制剂至少抑制抗凋亡蛋白BCL-xL的功能(例如,ABT-263、ABT-737、WEHI-539、A-1155463);和Akt特异性抑制剂(例如,MK-2206)。

[0101] 本文所述的衰老清除剂足以杀死显著数目的衰老细胞。虽然在治疗的受试者中细胞持续变衰老,但如由衰老相关分泌表型 (SASP) 的存在所显示的,衰老的建立经若干天发生(参见,例如,Laberge等人,Aging Cell 11:569-78 (2012);Coppe等人,PLoS Biol 6:2853-68 (2008);Coppe等人PLoS One 5:39188 (2010);Rodier等人,Nat.Cell Biol.11:973-979;Freund等人,EMBO J.30:1536-1548 (2011))。因此,本文所述的衰老清除剂的使用提供了这样的优点,即,与治疗这些疾病和病症常用的许多治疗剂相比,这些药剂可以以较低频率、间歇地和/或以较低剂量施用。本文所述的方法描述了诸如衰老清除剂这样的药剂的用途,与所述药剂用于治疗癌症或其他疾病时相比,该药剂可以以较低频率、间歇地和/或以较低剂量施用。

[0102] 衰老清除剂

[0103] 如本文使用的衰老清除剂是“选择性地”(优先地或在较大程度上)破坏、杀死、去除或促进选择性破坏衰老细胞的药剂。换言之,与其破坏或杀死非衰老细胞的能力相比,衰老清除剂以在生物学上、临床上和/或统计学上显著的方式破坏或杀死衰老细胞。使用衰老清除剂的量和持续时间足以选择性地杀死建成的衰老细胞,但是不足以以临床上显著或生物学上显著的方式杀死(破坏,引起死亡)非衰老细胞。在某些实施方案中,本文所述的衰老清除剂以诱导(引发、刺激、触发、激活、促进)和导致(即,引起,造成)衰老细胞死亡的方式改变至少一种信号传导途径。例如,通过拮抗在衰老细胞中细胞存活和/或炎症途径内的蛋白质,衰老清除剂可以改变例如细胞存活信号传导途径(例如,Akt途径)或炎症途径之一或两者。

[0104] 不希望受特定理论的束缚,本文所述的抑制剂和拮抗剂选择性地杀死衰老细胞的机理是通过诱导(激活、刺激、去除造成细胞死亡的凋亡途径的抑制)造成细胞死亡的凋亡途径。非衰老细胞可以是增殖细胞或者可以是休眠细胞。在某些情况下,非衰老细胞暴露于如在本文所述方法中使用的衰老清除剂可以暂时降低非衰老细胞增殖的能力;然而,并没有诱导凋亡途径并且没有破坏非衰老细胞。

[0105] 可以在本文所述方法中使用的某些衰老清除剂已被描述为对于治疗癌症是有用的;然而,在用于治疗衰老相关病症或疾病的方法中,以将被认为是不同的且对于治疗癌症很可能无效的方式施用衰老清除剂。用于采用本文所述衰老清除剂治疗衰老相关疾病或病症的方法可以包括与癌症治疗所需的药剂剂量相比减少日剂量、减少单个治疗周期内的累积剂量或减少来自多个治疗周期的的药剂累积剂量中的一种或多种;因此,降低了一种或多种不良反应(即,副作用)发生的可能性,该不良反应与根据为治疗癌症而优化的方案治疗受试者有关。相反,作为衰老清除剂,可以以本领域目前所述的较低剂量或以选择性地杀死衰老细胞的方式(例如,间歇给药)施用本文所述化合物。在某些实施方案中,可以以每个治疗疗程或治疗周期较低的累积剂量施用本文所述的衰老清除剂,该累积剂量将很可能对

癌细胞具有不足以有效治疗所述癌症的细胞毒性。换言之,根据本文所述的方法,不以本领域技术人员理解为用于治疗癌症的首选疗法的方式使用所述衰老清除剂,不论是单独地还是与一种或多种附加化疗剂或放射治疗一起施用所述药剂来治疗所述癌症。虽然不足以被认为是首选癌症疗法的方式使用在本文所述方法中所用的药剂,但可以以对于抑制转移有用的方式(例如,短期疗程)使用本文所述的方法和衰老清除组合。如本文所用的“癌症的首选疗法”意指当可单独地或与一种或多种药剂一起使用的药剂旨在或已知为针对癌症的有效治疗(如医学和肿瘤学领域技术人员所确定的)时,使用该药剂治疗该癌症的施用方案已被设计为实现有关的癌症相关目的。为了进一步降低毒性,可以在接近衰老细胞(非肿瘤细胞)或与该衰老细胞接触的部位施用衰老清除剂。本文更详细地描述了衰老清除剂的局部递送。

[0106] 本文所述的衰老清除剂改变(即,干扰、影响)在细胞的衰老过程中被激活的一种或多种细胞途径。衰老清除剂可以改变衰老细胞中的细胞存活信号传导途径(例如,Akt途径)或炎症途径,或者改变细胞存活信号传导途径和炎症途径两者。在衰老过程中某些细胞途径的激活降低或抑制该细胞诱导并最终经历凋亡的能力。不希望受理论的束缚,衰老清除剂选择性地杀死衰老细胞的机理是通过诱导(激活、刺激、去除造成细胞死亡的凋亡途径的抑制)造成细胞死亡的凋亡途径。通过与一种或多种途径中的一种、两种或更多种靶蛋白相互作用,衰老清除剂可以改变衰老细胞中的一种或多种信号传导途径,这导致去除或减少细胞死亡途径如凋亡途径的抑制。使衰老细胞接触或暴露于衰老清除剂以改变衰老细胞中的一种、两种或更多种细胞途径可以恢复细胞的引发凋亡的机理和途径。在某些实施方案中,衰老清除剂是改变衰老细胞中的信号传导途径的药剂,它转而抑制对于衰老细胞的存活而言重要的一种或多种基因产物的分泌和/或表达。衰老清除剂可以抑制对于衰老细胞的存活而言重要的基因产物的生物活性。或者,衰老细胞中基因产物的水平的减少或降低可以改变另一细胞组分的生物活性,这触发、引发、激活或刺激凋亡途径或者去除或降低凋亡途径的抑制。如本文所述,衰老清除剂是生物学活性剂,并且能够在不存在与细胞毒性部分(例如,毒素或细胞毒性肽或细胞毒性核酸)连接或缀合的情况下选择性地杀死衰老细胞。在不存在与选择性结合衰老细胞的靶向部分(例如,抗体或其抗原结合片段;细胞结合肽)连接或缀合的情况下,衰老清除剂在选择性地杀死衰老细胞方面也是有活性的。

[0107] 可以区分细胞死亡的两种替代模式:凋亡和坏死。Kerr和同事(Br. J. Cancer 26: 239-57 (1972))首次使用术语凋亡将该现象描述为在形态学上不同于凝固性坏死的一种细胞死亡模式。通常,凋亡的特征为细胞变圆、染色质凝聚(核固缩)、核碎裂(核破裂)和被相邻细胞吞食(参见,例如,Kroemer等人,Cell Death Differ. 16:3-11 (2009))。若干种分子测定已经被开发并在本领域中使用;然而,通过光学显微术和电子显微术检测到的形态学变化在本领域被认为是区分细胞死亡的两种不同模式的最佳技术(参见,例如,Kroemer等人,同上)。还表征了替代的细胞死亡模式,如不依赖胱天蛋白酶的凋亡样程序性细胞死亡(PCD)、自噬、坏死样PCD和有丝分裂障碍(参见,例如,Golstein, Biochem. Sci. 32:37-43 (2007); Leist等人, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2:589-98 (2001))。参见,例如,Caruso等人, Rare Tumors 5 (2):68-71 (2013); 2013年6月7日在线发表.doi:10.3081/rt.2013.e18。可使用本文所述和本领域常规实施的技术和方法(例如,TUNEL)来证明与本文所述的衰老清除剂接触引起凋亡性细胞死亡。

[0108] 在某些实施方案中,如本文所述方法中所用的衰老清除剂是小分子化合物。这些为小分子的衰老清除剂在本文中还可以被称为衰老清除化合物。在某些实施方案中,小分子的衰老清除剂包括激活的衰老清除剂或作为被细胞内的酶转化为活性形式的前药的衰老清除剂。在更具体的实施方案中,将前药转化为活性衰老清除形式的酶是在衰老细胞中比在非衰老细胞中以更高水平表达的酶。

[0109] 可以改变至少一种信号传导途径的本文所述衰老清除剂包括抑制该途径内至少一种靶蛋白的活性的药剂。衰老清除剂可以是一个或多个BCL-2抗凋亡蛋白家族成员的特异性抑制剂,其中该抑制剂至少抑制BCL-xL(例如,Bcl-2/Bcl-xL/Bcl-w抑制剂;选择性Bcl-xL抑制剂;Bcl-xL/Bcl-w抑制剂);Akt激酶特异性抑制剂;或MDM2抑制剂。在实施方案中,诸如槲皮素(及其类似物)、恩扎妥林和达沙替尼等分子被排除在外,并且不是本文所述的方法和组合物中使用的化合物。在其他特定的实施方案中,方法包括使用至少两种衰老清除剂,其中至少一种衰老清除剂和第二种衰老清除剂各自不同,并且独立地改变衰老细胞中存活信号传导途径和炎症途径之一或两者。

[0110] 小分子

[0111] 可以在用于治疗或预防衰老相关疾病或病症的方法中使用的衰老清除剂包括小的有机分子。小的有机分子(在本文中也称为小分子或小分子化合物)通常具有小于 10^5 道尔顿、小于 10^4 道尔顿或小于 10^3 道尔顿的分子量。在某些实施方案中,小分子衰老清除剂不违反以下标准多于一次:(1)不多于5个氢键供体(氮-氢和氧-氢键的总数);(2)不多于10个氢键受体(全部氮或氧原子);(3)分子量小于500道尔顿;(4)辛醇-水分配系数 $[5] \log P$ 不大于5。

[0112] MDM2抑制剂

[0113] 在某些实施方案中,所述衰老清除剂可以是MDM2抑制剂。可在用于选择性地杀死衰老细胞和治疗或预防衰老相关疾病或病症(即,降低或减小衰老相关疾病或病症发生或发展的可能性)的方法中使用的MDM2(鼠双微体2)抑制剂可以是属于以下化合物种类中的任意一种的小分子化合物:例如,顺式咪唑啉化合物、螺-羟吡啶化合物、苯并二氮杂萘化合物、哌啶酮化合物、色胺化合物和CGM097以及相关类似物。在某些实施方案中,该MDM2抑制剂还能够结合并抑制MDMX(鼠双微体X,其在人类中也被称为HDMX)的活性。MDM2的人类同源物在本领域中被称为HDM2(人双微体2)。因此,当本文所述方法治疗的受试者是人类受试者时,本文所述化合物如MDM2抑制剂还抑制HDM2与其一种或多种配体的结合。

[0114] MDM2在本领域中描述为E3泛素连接酶,它可以通过靶向肿瘤抑制蛋白如p53以通过26S蛋白酶体进行蛋白酶体降解来促进肿瘤形成(参见,例如,Haupt等人,Nature 387:296-299 1997;Honda等人,FEBS Lett 420:25-27 (1997);Kubbutat等人,Nature 387:299-303 (1997))。MDM2还通过直接与p53的N-末端结合来影响p53,从而抑制p53的转录激活功能(参见,例如,Momand等人,Cell 69:1237-1245 (1992);Oliner等人,Nature 362:857-860 (1993))。p53反过来调节Mdm2;p53反应元件位于Mdm2基因的启动子中(参见,例如,Barak等人,EMBO J 12:461-68 (1993));Juven等人,Oncogene 8:3411-16 (1993));Perry等人,Proc.Natl.Acad.Sci.90:11623-27 (1993))。p53与Mdm2之间的这种负反馈回路的存在已由单细胞研究所证实(参见,例如,Lahav,Exp.Med.Biol.641:28-38 (2008))。还参见Manfredi,Genes&Development 24:1580-89 (2010)。

[0115] 有报道已描述了MDM2的几种活性和生物功能。这些报道的活性包括以下活性：用作针对其自身和ARRB1的泛素连接酶E3；允许p53的核输出；促进视网膜母细胞瘤RB1蛋白的依赖于蛋白酶体、不依赖于泛素的降解；通过诱导其泛素化和降解来抑制DAXX介导的凋亡；参与使p53稳定的TRIM28/KAP1-MDM2-p53复合物的组分；使生长因子与DNA损伤反应途径连接的TRIM28/KAP1-ERBB4-MDM2复合物的组分；介导细胞核中DYRK2的泛素化和随后的蛋白酶体降解；使IGF1R和SNAIL1泛素化并促使它们进行蛋白酶体降解。还报道了MDM2诱导转录因子FOXO4的单泛素化（参见，例如，Brenkman等人，PLoS One 3 (7) :e2819, doi:10.1371/journal.pone.0002819）。本文所述MDM2抑制剂可以破坏MDM2与任何一种或多种上述细胞组分之间的相互作用。

[0116] 在一个实施方案中，可用于本文所述方法的化合物是顺式咪唑啉小分子抑制剂。顺式咪唑啉化合物包括在本领域中被称为nutlin的化合物。类似于本文所述的其他MDM2抑制剂，nutlin是MDM2与p53之间相互作用的顺式咪唑啉小分子抑制剂（参见，Vassilev等人，Science 303 (5659) :844-48 (2004)）。可在选择性地杀死衰老细胞和治疗或预防衰老相关疾病或病症（即，降低或减小衰老相关疾病或病症发生或发展的可能性）的方法中使用的示例性顺式咪唑啉化合物描述于美国专利号6,734,302、6,617,346、7,705,007和美国专利申请公开号2005/0282803、2007/0129416、2013/0225603中。在某些实施方案中，本文所述方法包括使用被称为Nutlin-1的nutlin化合物；或被称为Nutlin-2的nutlin化合物；或被称为Nutlin-3的Nutlin化合物（参见CAS登记号675576-98-4和548472-68-0）。Nutlin-3 (4-[[4S,5R]-4,5-双(4-氯苯基)-4,5-二氢-2-[4-甲氧基-2-(1-甲基乙氧基)苯基]-1H-咪唑-1-基]羰基]-2-哌嗪酮)的活性对映体在本领域中被称为Nutlin-3a。在某些实施方案中，本文所述方法包括使用Nutlin-3a来选择性地杀死衰老细胞。

[0117] Nutlin-3在本领域中描述为p53途径的非遗传毒性激活剂，并且p53的激活受鼠双微体2 (MDM2) 基因的控制。MDM2蛋白是一种E3泛素连接酶，并且通过泛素依赖性降解控制p53半衰期。在临床前研究（例如，针对儿科癌症）和临床试验中研究了Nutlin-3a对于某些癌症（例如，视网膜母细胞瘤）的治疗。至今，采用Nutlin-3的体外和临床前研究已表明该化合物对暴露于该化合物的细胞的功能具有可变的生物效应。例如，据报道Nutlin-3增加包括B细胞恶性肿瘤在内的血液恶性肿瘤中癌细胞凋亡的程度（参见，例如，Zauli等人，Clin.Cancer Res.17:762-70 (2011)；于2010年11月24日在线发表）以及其中引用的参考文献），并且与其他化疗药物如达沙替尼联合时，细胞毒性效应呈协同作用（参见，例如，Zauli等人，同上）。

[0118] 用于选择性地杀死衰老细胞的另一种示例性顺式咪唑啉小分子化合物是RG-7112 (Roche) (CAS号:939981-39-2; IUPAC名称: ((4S,5R)-2-(4-(叔丁基)-2-乙氧基苯基)-4,5-双(4-氯苯基)-4,5-二甲基-4,5-二氢-1H-咪唑-1-基) (4-(3-(甲基磺酰基)丙基)哌嗪-1-基)甲酮。参见美国专利号7,851,626; Tovar等人, Cancer Res.72:2587-97 (2013)。

[0119] 在另一个特定的实施方案中，所述MDM2抑制剂是被称为RG7338 (Roche) (IUPAC名称: 4-((2R,3S,4R,5S)-3-(3-氯-2-氟苯基)-4-(4-氯-2-氟苯基)-4-氰基-5-新戊基吡咯烷-2-甲酰氨基)-3-甲氧基苯甲酸) (CAS1229705-06-9) 的顺式咪唑啉化合物; Ding等人, J.Med.Chem.56 (14) :5979-83. Doi:10.1021/jm400487c. Epub 2013年7月16日; Zhao等人, J.Med.Chem.56 (13) :5553-61 (2013) doi:10.1021/jm4005708. Epub2013年6月20日)。另一

种示例性nutlin化合物是R05503781。其他有效的顺式咪唑啉小分子化合物包括由Miyazaki (参见,例如,Miyazaki等人,Bioorg.Med.Chem.Lett.23 (3):728-32 (2013) doi:10.1016/j.bmcl.2012.11.091.Epub 2012年12月1日;Miyazaki等人,Bioorg.Med.Chem.Lett.22 (20):6338-42 (2012) doi:10.1016/j.bmcl.2012.08.086.Epub 2012年8月30日;国际专利申请公开号W0 2009/151069 (2009)) 描述的二氢咪唑并噻唑化合物(例如,DS-3032b;Daiichi Sankyo)。

[0120] 在其他实施方案中,可在本文所述方法中使用的顺式咪唑啉化合物是二氢咪唑并噻唑化合物。

[0121] 在其他实施方案中,所述MDM2小分子抑制剂是螺-羟吡啶化合物。参见,例如,在Ding等人,J.Am.Chem.Soc.2005;127:10130-31;Shangary等人,Proc Natl Acad Sci USA 2008;105:3933-38;Shangary等人,Mol Cancer Ther 2008;7:1533-42;Shangary等人,Mol Cancer Ther 2008;7:1533-42;Hardcastle等人,Bioorg.Med.Chem.Lett.15:1515-20 (2005);Hardcastle等人,J.Med.Chem.49 (21):6209-21 (2006);Watson等人,Bioorg.Med.Chem.Lett.21 (19):5916-9 (2011) doi:10.1016/j.bmcl.2011.07.084.Epub 2011年8月9日中描述的化合物。作为MDM2抑制剂的螺-羟吡啶化合物的其他实例在本领域中被称为MI-63、MI-126、MI-122、MI-142、MI-147、MI-18、MI-219、MI-220、MI-221和MI-773。另一种具体的螺-羟吡啶化合物是3-(4-氯苯基)-3-((1-(羟甲基)环丙基)甲氧基)-2-(4-硝基苄基)异吡啶-1-酮。另一种化合物被称为MI888 (参见,例如,Zhao等人,J.Med.Chem.56 (13):5553-61 (2013);国际专利申请公开号W0 2012/065022)。

[0122] 在其他实施方案中,可在本文所述方法中使用的MDM2小分子抑制剂是苯并二氮杂萘二酮(参见,例如,Grasberger等人,J Med Chem 2005;48:909-12;Parks等人,Bioorg Med Chem Lett 2005;15:765-70;Raboison等人,Bioorg.Med.Chem.Lett.15:1857-61 (2005);Koblish等人,Mol.Cancer Ther.5:160-69 (2006))。可在本文所述方法中使用的苯并二氮杂萘二酮化合物包括1,4-苯并二氮杂萘-2,5-二酮化合物。苯并二氮杂萘二酮化合物的实例包括5-[(3S)-3-(4-氯苯基)-4-[(R)-1-(4-氯苯基)乙基]-2,5-二氧化-7-苯基-1,4-二氮杂萘-1-基]缬草酸和5-[(3S)-7-(2-溴苯基)-3-(4-氯苯基)-4-[(R)-1-(4-氯苯基)乙基]-2,5-二氧化-1,4-二氮杂萘-1-基]缬草酸(参见,例如,Raboison等人,同上)。其他苯并二氮杂萘二酮化合物在本领域中被称为TDP521252 (IUPAC名称:5-[(3S)-3-(4-氯苯基)-4-[(1R)-1-(4-氯苯基)乙基]-7-乙炔基-2,5-二氧化-3H-1,4-苯并二氮杂萘-1-基]戊酸)和TDP665759 (IUPAC名称:(3S)-4-[(1R)-1-(2-氨基-4-氯苯基)乙基]-3-(4-氯苯基)-7-碘-1-[3-(4-甲基哌嗪-1-基)丙基]-3H-1,4-苯并二氮杂萘-2,5-二酮)(参见,例如,Parks等人,同上;Koblish等人,同上)(Johnson&Johnson,New Brunswick,NJ)。

[0123] 在又一个实施方案中,所述MDM2小分子抑制剂是三联苯(参见,例如,Yin等人,Angew Chem Int Ed Engl 2005;44:2704-707;Chen等人,Mol Cancer Ther 2005;4:1019-25)。在又一个特定的实施方案中,可在本文所述方法中使用的MDM2抑制剂是quilinol (参见,例如,Lu等人,J Med Chem 2006;49:3759-62)。在又一个特定实施方案中,该MDM2抑制剂是查耳酮(参见,例如,Stoll等人,Biochemistry 2001;40:336-44)。在又一个特定实施

方案中,该MDM2抑制剂是磺酰胺(例如,NSC279287)(参见,例如,Galatin等人,J Med Chem 2004;47:4163-65)。

[0124] 在其他实施方案中,可在本文所述方法中使用的化合物是色胺,如色德美坦(JNJ-26854165;化学名称:N1-(2-(1H-吡啶-3-基)乙基)-N4-(吡啶-4-基)苯-1,4-二胺;CAS号881202-45-5)(Johnson&Johnson,New Brunswick,NJ)。色德美坦是一种激活p53并充当HDM2泛素连接酶拮抗剂的色胺衍生物(参见,例如,Chargari等人,Cancer Lett.312(2):209-18(2011)doi:10.1016/j.canlet.2011.08.011.Epub 2011年8月22日;Kojima等人,Mol.Cancer Ther.9:2545-57(2010);Yuan等人,J.Hematol.Oncol.4:16(2011))。

[0125] 在其他特定的实施方案中,可在本文所述方法中使用的MDM2小分子抑制剂包括在Rew等人,J.Med.Chem.55:4936-54(2012);Gonzalez-Lopez de Turiso等人,J.Med.Chem.56:4053-70(2013);Sun等人,J.Med.Chem.57:1454-72(2014);Gonzalez等人,J.Med.Chem.2014年3月4日[电子版先于印刷版];Gonzalez等人,J.Med.Chem.2014年3月6日[电子版先于印刷版]中描述的那些抑制剂。

[0126] 在其他实施方案中,所述MDM2抑制剂是哌啶酮化合物。强效MDM2哌啶酮抑制剂的实例是AM-8553({(3R,5R,6S)-5-(3-氯苯基)-6-(4-氯苯基)-1-[(2S,3S)-2-羟基-3-戊烷基]-3-甲基-2-氧代-3-哌啶基}乙酸;CAS号1352064-70-0)(Amgen,Thousand Oaks,California)。

[0127] 在其他特定的实施方案中,可在本文所述方法中使用的MDM2抑制剂是哌啶(Merck,Whitehouse Station,NJ)(参见,例如,国际专利申请公开号WO 2011/046771)。在其他实施方案中,可在所述方法中使用的MDM2抑制剂是咪唑-吡啶化合物(Novartis)(参见,例如,国际专利申请公开号WO 2008/119741)。

[0128] 与MDM2和MDMX结合并可在本文所述方法中使用的化合物的实例包括R0-2443和R0-5963((Z)-2-(4-((6-氯-7-甲基-1H-吡啶-3-基)亚甲基)-2,5-二氧化咪唑烷-1-基)-2-(3,4-二氟苯基)-N-(1,3-二羟基丙烷-2-基)乙酰胺)(参见,例如,Graves等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 109:11788-93(2012);还参见,例如,Zhao等人,2013,BioDiscovery,同上)。

[0129] 在另一个特定的实施方案中,可在本文所述方法中使用在本领域中被称为CGM097的MDM2抑制剂,以选择性地杀死衰老细胞和治疗衰老相关疾病或病症。

[0130] BCL-2抗凋亡蛋白家族的抑制剂

[0131] 在某些实施方案中,所述衰老清除剂可以是BCL-2家族中一种或多种蛋白质的抑制剂。在某些实施方案中,所述至少一种衰老清除剂选自一个或多个BCL-2抗凋亡蛋白家族成员的抑制剂,其中该抑制剂至少抑制BCL-xL。BCL-2抗凋亡蛋白家族的抑制剂至少改变细胞存活途径。经由通过细胞表面死亡受体的激活而引发的外源性途径或通过发育诱因和不同细胞内应激引发的内源性途径,可发生凋亡激活。该内源性途径——也被称为应激途径或线粒体途径——主要由BCL-2家族调节,BCL-2家族是由以下物质组成的一类胱天蛋白酶激活的关键调节物:具有BH1-BH4域的抗凋亡(促存活)蛋白(BCL-2(即,BCL-2抗凋亡蛋白家族的BCL-2蛋白成员)、BCL-xL、BCL-w、A1、MCL-1和BCL-B);具有BH1、BH2和BH3域的促凋亡蛋白(BAX、BAK和BOK);以及促凋亡的仅BH3蛋白(pro-apoptotic BH3-only protein)(BIK、BAD、BID、BIM、BMF、HRK、NOXA和PUMA)(参见,例如,Cory等人,Nature Reviews Cancer 2:

647-56 (2002); Cory等人, *Cancer Cell* 8:5-6 (2005); Adams等人, *Oncogene* 26:1324-1337 (2007)。BCL-2抗凋亡蛋白阻碍促凋亡多域蛋白BAX和BAK的激活(参见,例如,Adams等人, *Oncogene* 26:1324-37 (2007))。尽管凋亡调节的确切机理是未知的,但假定由细胞内应激信号释放的仅BH3蛋白经由抗凋亡蛋白上的BH1-3区形成的“受体”BH3结合沟的BH3“配体”与抗凋亡BCL-2样蛋白结合,从而中和所述抗凋亡蛋白(参见,例如,Letai等人, *Cancer Cell* 2:183-92 (2002); Adams等人, *Oncogene*, 同上)。BAX和BAK可随后在线粒体膜中形成寡聚物,导致膜透化、细胞色素C释放、胱天蛋白酶激活和最终凋亡(参见,例如,Adams等人, *Oncogene*, 同上)。

[0132] 如本文所用且除非另有说明,由本文所述药剂抑制的BCL-2家族成员是促存活(抗凋亡)家族成员。在本文所述方法中使用的衰老清除剂抑制BCL-2抗凋亡蛋白BCL-xL(在本文和本领域中还可以书写成Bcl-xL、BCL-XL、Bcl-xl或Bcl-XL)的一种或多种功能。在某些实施方案中,除了抑制BCL-xL功能以外,该抑制剂还可以抑制BCL-2的一种或多种功能和/或与其相互作用(即,BCL-xL/BCL-2抑制剂)。在又一特定实施方案中,将在本文所述方法中使用的衰老清除剂归类为BCL-xL和BCL-w中的每一个的抑制剂(即,BCL-xL/BCL-w抑制剂)。在另一个特定的实施方案中,抑制BCL-xL的在本文所述方法中使用的衰老清除剂还可以抑制BCL-2(即,BCL-2蛋白)和BCL-w中的每一个的一种或多种功能并与其相互作用(即,BCL-xL/BCL-2/BCL-w抑制剂),从而导致选择性地杀死衰老细胞。在某些实施方案中,BCL-2抗凋亡蛋白抑制剂干扰BCL-2抗凋亡蛋白家族成员(包括至少BCL-xL)与在不存在该抑制剂的情况下将与BCL-2抗凋亡蛋白家族成员结合的一个或多个配体或受体之间的相互作用。在其他特定的实施方案中,一个或多个BCL-2抗凋亡蛋白家族成员的抑制剂(其中该抑制剂至少抑制BCL-xL)仅与BCL-xL、BCL-2、BCL-w中的一个或多个特异性地结合,而不与其他Bcl-2抗凋亡Bcl-2家族成员如Mcl-1和BCL2A1特异性结合。

[0133] 在另一个实施方案中,在本文所述方法中使用的衰老清除剂是BCL-xL选择性抑制剂并且抑制BCL-xL的一种或多种功能。作为BCL-xL选择性抑制剂的这样的衰老清除剂不以生物学上或统计学上显著的方式抑制一种或多种其他BCL-2抗凋亡蛋白的功能。BCL-xL在本文和本领域中还可以被称为BCL2L1、BCL2样1、BCLX、BCL2L、BCLxL或BCL-X。在一个实施方案中,BCL-xL选择性抑制剂改变(例如,降低、抑制、减弱、阻止)BCL-xL的一种或多种功能,但不显著抑制BCL-2抗凋亡蛋白家族中其他蛋白质(例如,BCL-2或BCL-w)的一种或多种功能。在某些实施方案中,BCL-xL选择性抑制剂干扰BCL-xL与在不存在该抑制剂的情况下将与BCL-xL结合的一个或多个配体或受体之间的相互作用。在某些特定的实施方案中,抑制BCL-xL的一种或多种功能的衰老清除剂与人BCL-xL选择性地结合,而不与BCL-2家族中的其他蛋白质选择性地结合,从而实现选择性地杀死衰老细胞。

[0134] BCL-xL是BCL-2蛋白家族的一个抗凋亡成员。BCL-xL还在自噬与凋亡之间的串扰(crosstalk)中发挥重要作用(参见,例如,Zhou等人, *FEBS J.* 278:403-13 (2011))。BCL-xL还似乎在生物能量代谢(包括线粒体ATP产生、Ca²⁺通量和蛋白质乙酰化)以及在若干其他细胞和生物过程如有丝分裂、血小板聚集和突触效率中发挥作用(参见,例如,Michels等人, *International Journal of Cell Biology*, vol.2013, 文章ID 705294, 10页, 2013. doi: 10.1155/2013/705294)。在某些实施方案中,本文所述BCL-xL抑制剂可以破坏BCL-xL与任何一种或多种上述的仅BH3蛋白之间的相互作用以促进细胞凋亡。

[0135] 在某些实施方案中,BCL-xL抑制剂是选择性抑制剂,意味着它相对于其他抗凋亡BCL2家族成员(例如,BCL-2、MCL-1、BCL-w、BCL-b和BFL-1/A1)优先与BCL-xL结合。在某些实施方案中,BCL-XL选择性抑制剂显示出相对于BCL-2蛋白或核酸至少5倍、10倍、50倍、100倍、1000倍、10000倍、20000倍或30000倍的结合BCL-XL蛋白或核酸的选择性。在某些实施方案中,BCL-XL选择性抑制剂显示出相对于MCL-1蛋白或核酸至少5倍、10倍、50倍、100倍、1000倍、10000倍、20000倍或30000倍的结合BCL-XL蛋白或核酸的选择性。在某些实施方案中,BCL-XL选择性抑制剂显示出相对于BCL-w蛋白或核酸至少5倍、10倍、50倍、100倍、1000倍、10000倍、20000倍或30000倍的结合BCL-XL蛋白或核酸的选择性。在某些实施方案中,BCL-XL选择性抑制剂显示出相对于BCL-B蛋白或核酸至少5倍、10倍、50倍、100倍、1000倍、10000倍、20000倍或30000倍的结合BCL-XL蛋白或核酸的选择性。在某些实施方案中,BCL-XL选择性抑制剂显示出相对于A1蛋白或核酸至少5倍、10倍、50倍、100倍、1000倍、10000倍、20000倍或30000倍的结合BCL-XL蛋白或核酸的选择性。如本文所述,在某些实施方案中,一个或多个BCL-2抗凋亡蛋白家族成员的抑制剂没有与MCL-1或BCL2A1可检测地结合,其中该抑制剂至少抑制BCL-xL(例如,BCL-xL选择性抑制剂)。

[0136] 用于测量BCL-xL抑制剂对于BCL-2家族蛋白的结合亲和力的方法是本领域已知的。举例来说,可以使用竞争荧光偏振试验来确定BCL-xL抑制剂的结合亲和力,在该试验中存在或不存在浓度增加的BCL-XL抑制剂的情况下如先前所述将荧光BAK BH3域肽与BCL-xL蛋白(或其他BCL-2家族蛋白)一起温育(参见,例如,美国专利公开号20140005190;Park等人,Cancer Res.73:5485-96(2013);Wang等人,Proc.Natl.Acad.Sci USA 97:7124-9(2000);Zhang等人,Anal.Biochem.307:70-5(2002);Bruncko等人,J.Med.Chem.50:641-62(2007))。可以通过下式确定抑制百分比: $1 - [(\text{孔的mP值} - \text{阴性对照}) / \text{范围}] \times 100\%$ 。由下式确定抑制常数(K_i)的值: $K_i = [I]_{50} / ([L]_{50} / K_d + [P]_0 / K_d + 1)$,如Bruncko等人,J.Med.Chem.50:641-62(2007)所述(还参见,Wang,FEBS Lett.360:111-114(1995))。

[0137] 在本文所述方法中使用的选择性地杀死衰老细胞的药剂(例如,BCL-xL选择性抑制剂、BCL-xL/BCL-2抑制剂、BCL-xL/BCL-2/BCL-w抑制剂、BCL-xL/BCL-w抑制剂)包括例如小分子。

[0138] 在特定的实施方案中,所述BCL-xL抑制剂是属于以下化合物种类的小分子化合物:例如苯并噻唑-脲化合物、氨基吡啶化合物、苯并咪唑化合物、四氢喹啉化合物和苯氧基化合物以及相关类似物中任何一种。

[0139] 在一个实施方案中,可用于本文所述方法的BCL-xL选择性抑制剂是苯并噻唑-脲小分子抑制剂。苯并噻唑-脲化合物包括WEHI-539(5-[3-[4-(氨基甲基)苯氧基]丙基]-2-[(8E)-8-(1,3-苯并噻唑-2-基亚胍基)-6,7-二氢-5H-萘-2-基]-1,3-噻唑-4-羧酸),它是一种选择性靶向BCL-xL的BH3肽模拟物(参见,例如,Lessene等人,Nature Chemical Biology 9:390-397(2013))。在某些实施方案中,本文所述方法包括使用WEHI-539以选择性地杀死衰老细胞。

[0140] 在其他实施方案中,所述BCL-xL选择性抑制剂是氨基吡啶化合物。可用作选择性BCL-xL抑制剂的氨基吡啶化合物是BXI-61(3-[(9-氨基-7-乙氧基吡啶-3-基) 二氮烯基]吡啶-2,6-二胺)(参见,例如,Park等人,Cancer Res.73:5485-96(2013);美国专利公开号2009-0118135)。在某些实施方案中,本文所述方法包括使用BXI-61以选择性地杀死衰老细

胞。

[0141] 在其他实施方案中,可在本文所述方法中使用的BCL-xL选择性抑制剂是苯并咪唑化合物。可用作选择性BCL-XL抑制剂的苯并咪唑化合物的实例是BXI-72 (2'-(4-羟基苯基)-5-(4-甲基-1-哌嗪基)-2,5'-双(1H-苯并咪唑)三盐酸盐)(参见,例如,Park等人,同上)。在某些实施方案中,本文所述方法包括使用BXI-72以选择性地杀死衰老细胞。

[0142] 在又一个实施方案中,所述BCL-xL选择性抑制剂是四氢喹啉化合物(参见,例如,美国专利公开号2014-0005190)。可用作选择性BCL-xL抑制剂的四氢喹啉化合物的实例示于美国专利公开号2014-0005190的表1中并在其中进行了描述。除BCL-xL以外,其中描述的其他抑制剂还可以抑制其他BCL-2家族成员(例如,BCL-2)。

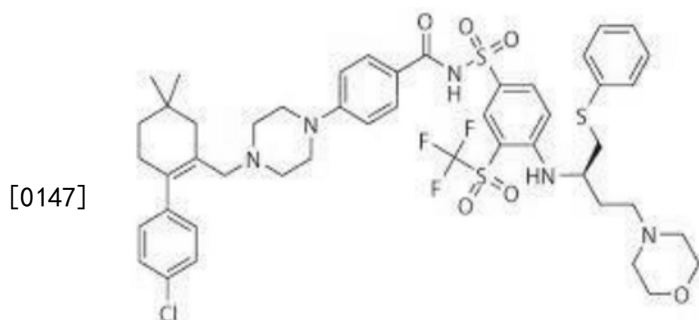
[0143] 在其他实施方案中,BCL-xL选择性抑制剂是苯氧基化合物。可用作选择性BCL-xL抑制剂的苯氧基化合物的实例是2[[3-(2,3-二氯苯氧基)丙基]氨基]乙醇(2,3-DCPE)(参见,Wu等人,Cancer Res.64:1110-1113(2004))。在某些实施方案中,本文所述方法包括使用2,3-DCPE以选择性地杀死衰老细胞。

[0144] 在另一个实施方案中,至少抑制BCL-xL的Bcl-2抗凋亡家族成员的抑制剂描述于美国专利号8,232,273中。在特定的实施方案中,该抑制剂是被称为A-1155463的BCL-xL选择性抑制剂(参见,例如,Tao等人,ACS Med.Chem.Lett.,2014,5(10):1088-1093)。

[0145] 在其他实施方案中,感兴趣的衰老清除剂还抑制除BCL-xL以外的其他BCL-2抗凋亡家族成员。例如,本文所述方法包括使用BCL-xL/BCL-2抑制剂、BCL-xL/BCL-2/BCL-w抑制剂和BCL-xL/BCL-w抑制剂及其类似物。在某些实施方案中,所述抑制剂包括抑制BCL-2和BCL-xL的化合物,该抑制剂还可抑制BCL-w。这些抑制剂的实例包括ABT-263 (4-[4-[[2-(4-氯苯基)-5,5-二甲基环己烯-1-基]甲基]哌嗪-1-基]-N-[4-[[[(2R)-4-吗啉-4-基-1-苯基硫基丁烷-2-基]氨基]-3-(三氟甲基磺酰基)苯基]磺酰基苯甲酰胺或IUPAC, (R)-4-(4-((4'-氯-4,4-二甲基-3,4,5,6-四氢-[1,1'-联苯]-2-基)甲基)哌嗪-1-基)-N-((4-((4-吗啉基-1-(苯硫基)丁烷-2-基)氨基)-3-((三氟甲基)磺酰基)苯基)磺酰基)苯甲酰胺)(参见,例如,Park等人,2008,J.Med.Chem.51:6902;Tse等人,Cancer Res.,2008,68:3421;国际专利申请公开号W0 2009/155386;美国专利号7390799,7709467,7906505,8624027),和ABT-737 (4-[4-[(4'-氯[1,1'-联苯]-2-基)甲基]-1-哌嗪基]-N-[4-[[[(1R)-3-(二甲基氨基)-1-[(苯硫基)甲基]丙基]氨基]-3-硝基苯基]磺酰基]苯甲酰胺,苯甲酰胺,4-[4-[(4'-氯[1,1'-联苯]-2-基)甲基]-1-哌嗪基]-N-[4-[[[(1R)-3-(二甲基氨基)-1-[(苯硫基)甲基]丙基]氨基]-3-硝基苯基]磺酰基]-或4-[4-[[2-(4-氯苯基)苯基]甲基]哌嗪-1-基]-N-[4-[[[(2R)-4-(二甲基氨基)-1-苯基硫基丁烷-2-基]氨基]-3-硝基苯基]磺酰基]苯甲酰胺)(参见,例如,Oltersdorf等人,Nature,2005,435:677;美国专利号7973161;美国专利号7642260)。在其他实施方案中,该BCL-2抗凋亡蛋白抑制剂是喹啉磺酰胺化合物(参见,例如,Sleebbs等人,2011,J.Med.Chem.54:1914)。在另一个实施方案中,该BCL-2抗凋亡蛋白抑制剂是如Zhou等人,J.Med.Chem.,2012,55:4664所述的小分子化合物(参见,例如,化合物21 (R)-4-(4-氯苯基)-3-(3-(4-(4-(4-((4-(二甲基氨基)-1-(苯硫基)丁烷-2-基)氨基)-3-硝基苯基磺酰氨基)苯基)哌嗪-1-基)苯基)-5-乙基-1-甲基-1H-吡咯-2-羧酸)和Zhou等人,J.Med.Chem.,2012,55:6149所述的小分子化合物(参见,例如,化合物14 (R)-5-(4-氯苯基)-4-(3-(4-(4-(4-((4-(二甲基氨基)-1-(苯硫基)丁烷-2-基)氨基)-3-硝基苯基磺酰氨基

基) 苯基) 哌嗪-1-基) 苯基)-1-乙基-2-甲基-1H-吡咯-3-羧酸; 化合物15(R)-5-(4-氯苯基)-4-(3-(4-(4-(4-((4-(二甲基氨基)-1-(苯硫基) 丁烷-2-基) 氨基)-3-硝基苯基磺酰氨基) 苯基) 哌嗪-1-基) 苯基)-1-异丙基-2-甲基-1H-吡咯-3-羧酸)。在其他实施方案中, 该BCL-2抗凋亡蛋白抑制剂是BCL-2/BCL-xL抑制剂如BM-1074(参见, 例如, Aguilar等人, 2013, J. Med. Chem. 56:3048); BM-957(参见, 例如, Chen等人, 2012, J. Med. Chem. 55:8502); BM-1197(参见, 例如, Bai等人, PLoS One 2014 Jun 5; 9(6):e99404. Doi:10.1371/journal.pone.009904); 美国专利申请号2014/0199234; N-酰基磺酰胺化合物(参见, 例如, 国际专利申请公开号W0 2002/024636、国际专利申请公开号W0 2005/049593、国际专利申请公开号W0 2005/049594、美国专利号7767684、美国专利号7906505)。在另一个实施方案中, 该BCL-2抗凋亡蛋白抑制剂是小分子大环化合物(参见, 例如, 国际专利申请公开号W0 2006/127364, 美国专利号7777076)。在又一个实施方案中, 该BCL-2抗凋亡蛋白抑制剂是异噁唑烷化合物(参见, 例如, 国际专利申请公开号W0 2008/060569、美国专利号7851637、美国专利号7842815)。

[0146] 在某些实施方案中, 所述衰老清除剂是作为Bcl-2、Bcl-w和Bcl-xL的抑制剂的化合物, 如ABT-263或ABT-737。在某些特定的实施方案中, 所述衰老清除剂是如下示出的化合物或其药学上可接受的盐、立体异构体、互变异构体或前药, 其描绘了ABT-263的结构。ABT-263在本领域中也称为Navitoclax。



ABT-263

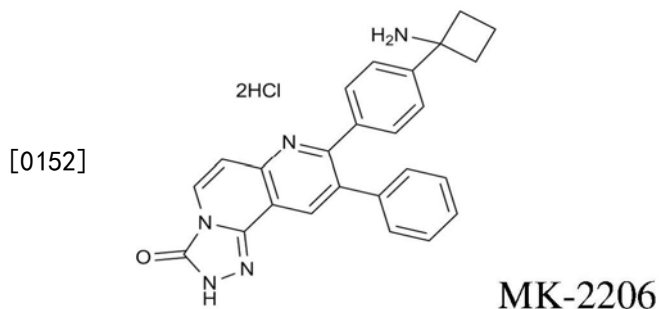
[0148] Akt激酶抑制剂

[0149] 在某些实施方案中, 所述衰老清除剂是Akt激酶抑制剂。例如, 衰老清除剂可以是抑制Akt的小分子化合物及其类似物。在一些实施方案中, 所述衰老清除剂是相对于其他蛋白激酶选择性抑制Akt1、Akt2和Akt3的化合物。

[0150] Akt抑制剂(还可以被称为Akt激酶抑制剂或AKT激酶抑制剂)可基于它们的作用机理分成六大类(参见, 例如, Bhutani等人, Infectious Agents and Cancer 2013, 8:49 doi:10.1186/1750-9378-8-49)。Akt在本领域中还被称为蛋白激酶B(PKB)。第一类包括Akt的ATP竞争性抑制剂并且包括抑制Akt2和Akt1的化合物如CCT128930和GDC-0068。该类别还包括泛-Akt激酶抑制剂如GSK2110183(afuresertib)、GSK690693和AT7867。第二类包括通过抑制由PI3K生成PIP3起作用的基于脂质的Akt抑制剂。磷脂酰肌醇类似物如Calbiochem Akt抑制剂I、II和III或其他PI3K抑制剂如PX-866采用这一机理。该类别还包括诸如哌立福辛(KRX-0401)(Aeterna Zentaris/Keryx)等化合物。第三类包括被称为假底物抑制剂的一组化合物。它们包括诸如AKTide-2T和FOXO3杂合体等化合物。第四类由AKT激酶域的变构抑制剂组成, 并且包括诸如MK-2206(8-[4-(1-氨基环丁基)苯基]-9-苯基-2H-[1,2,4]三唑并

[3,4-f][1,6]萘啶-3-酮;二盐酸盐)(Merck&Co.) (参见,例如,美国专利号7576209)等化合物。第五类由抗体组成并且包括诸如GST-抗-Akt1-MTS等分子。最后一类包括与Akt的PH域相互作用的化合物,并且包括曲西立滨和PX-316。充当AKT抑制剂的本领域所述的其他化合物包括例如GSK-2141795 (GlaxoSmithKline)、VQD-002、米替福新、AZD5363、GDC-0068和API-1。用于确定AKT抑制剂的活性的技术由本领域技术人员常规地实施。

[0151] 在特定的实施方案中,所述衰老清除剂是作为Akt激酶抑制剂的化合物,它具有如下所示的结构(在本文和本领域中也被称为MK-2206),8-[4-(1-氨基环丁基)苯基]-9-苯基-2H-[1,2,4]三唑并[3,4-f][1,6]萘啶-3-酮)或其药学上可接受的盐、立体异构体、互变异构体或前药。示出了二盐酸盐。



[0153] 在某些实施方案中,至少一种衰老清除剂可以与至少一种其他衰老清除剂一起施用,该两种或更多种衰老清除剂叠加地或协同地作用以选择性地杀死衰老细胞。在特定的实施方案中,提供了使用衰老清除剂的方法,其中在衰老细胞中该衰老清除剂改变细胞存活信号传导途径或炎症途径,或者改变细胞存活信号传导途径和炎症途径两者。在其他特定的实施方案中,方法包括使用至少两种衰老清除剂,其中至少一种衰老清除剂和第二种衰老清除剂各自不同并且独立地改变衰老细胞中存活信号传导途径和炎症途径之一或两者。为了方便起见,当本文将两种或更多种衰老清除剂描述为联合使用时,一种衰老清除剂将被称为第一衰老清除剂,另一种衰老清除剂将被称为第二衰老清除剂,等等。在其他的某些实施方案中,本文所述方法包括施用至少三种衰老清除剂(第一衰老清除剂、第二衰老清除剂和第三衰老清除剂)。本文中的形容词第一、第二、第三等仅为了方便而使用,并不应被解释为描述施用、偏好或衰老清除活性水平或其他参数的顺序,除非另外清楚地描述。在特定的实施方案中,当在本文所述方法中使用两种或更多种衰老清除剂时,每一种衰老清除剂均是小分子。在其他的某些实施方案中,本文所述方法包括施用至少三种衰老清除剂(第一衰老清除剂、第二衰老清除剂和第三衰老清除剂)。在某些实施方案中,与使用单独每一种衰老清除剂相比,使用至少两种衰老清除剂导致杀死显著增多的衰老细胞。在其他的特定实施方案中,与使用单独每一种衰老清除剂相比,使用至少两种衰老清除剂导致显著杀死衰老细胞,并且该作用可能是叠加的或协同的。在某些实施方案中,所述至少两种衰老清除剂各自不同并且选自(1)一个或多个BCL-2抗凋亡蛋白家族成员的抑制剂,其中该抑制剂至少抑制BCL-xL; (例如,Bcl-2/Bcl-xL/Bcl-w抑制剂;Bcl-2/Bcl-xL抑制剂、选择性Bcl-xL抑制剂或Bcl-xL/Bcl-w抑制剂);Akt激酶特异性抑制剂;MDM2抑制剂。在一个特定的实施方案中,当向有需要的受试者施用的至少一种衰老清除剂是一个或多个BCL-2抗凋亡蛋白家族成员的抑制剂,其中该抑制剂至少抑制BCL-XL (例如,Bcl-2/Bcl-xL/Bcl-w抑制剂、Bcl-2/Bcl-xL抑制剂、选择性Bcl-xL抑制剂或Bcl-xL/Bcl-w抑制剂) 时,施用第二衰老清除剂。

在其他的某些实施方案中,所述两种衰老清除剂之一是一个或多个BCL-2抗凋亡蛋白家族成员的抑制剂,其中该抑制剂至少抑制Bcl-xL,并且第二衰老清除剂是MDM2抑制剂。在更具体的实施方案中,当向有需要的受试者施用的至少一种衰老清除剂是选择性Bcl-xL抑制剂时,施用第二衰老清除剂。在更具体的实施方案中,当向有需要的受试者施用的至少一种衰老清除剂是MDM2抑制剂时,施用第二衰老清除剂。在更具体的实施方案中,当向有需要的受试者施用的至少一种衰老清除剂是Akt激酶抑制剂时,施用第二衰老清除剂。在甚至更具体的实施方案中,一个或多个BCL-2抗凋亡蛋白家族成员的抑制剂——其中该抑制剂至少抑制BCL-xL——单独地或与另一种也作为一个或多个BCL-2抗凋亡蛋白家族成员的抑制剂的衰老清除剂联合使用,其中该抑制剂至少抑制BCL-xL或者是本文所述的不同衰老清除剂。在特定的实施方案中,一个或多个BCL-2抗凋亡蛋白家族成员的抑制剂——其中该抑制剂至少抑制Bcl-xL——与Akt激酶的抑制剂联合。举非限制性的实例而言,Bcl-2/Bcl-xL/Bcl-w抑制剂ABT-263可以与Akt激酶抑制剂(例如,MK2206)联合使用。

[0154] 在其他特定的实施方案中,在用于治疗衰老相关疾病或病症的方法中,作为衰老清除剂的MDM2抑制剂与至少一种其他衰老清除剂联合使用;该其他衰老清除剂(为了方便起见,可以将其称为第二衰老清除剂)可以是另一种MDM2抑制剂或者可以是非MDM2抑制剂的衰老清除剂。在一个实施方案中,至少抑制BCL-xL的Bcl-2抗凋亡家族成员的抑制剂与AKT抑制剂联合使用。在更具体的实施方案中,Bcl-2抗凋亡家族成员的抑制剂是ABT-263、ABT-737或WEHI-539,并且AKT抑制剂是MK-2206。

[0155] 在其他的某些实施方案中,本文所述方法包括施用至少三种衰老清除剂(第一衰老清除剂、第二衰老清除剂和第三衰老清除剂)。

[0156] mTOR、NFκB和PI3-k途径抑制剂:在用于选择性地杀死衰老细胞和治疗衰老相关疾病或病症的方法中可与本文所述衰老清除剂一起使用的小分子化合物可以是抑制mTOR、NFκB和PI3-k途径中的一种或多种的小分子化合物。如本文所述,还提供了用于选择性地杀死衰老细胞和治疗衰老相关疾病或病症的方法,其中所述方法包括向有需要的受试者施用至少一种衰老清除剂,所述方法可以进一步包括施用mTOR、NFκB和PI3-k途径中的一种或多种的抑制剂。这些途径的抑制剂是本领域已知的。

[0157] mTOR抑制剂的实例包括西罗莫司、坦西莫司(temsirolimus)、依维莫司、地磷莫司、32-脱氧雷帕霉素、佐他莫司、PP242、INK128、PP30、Torin1、Ku-0063794、WAY-600、WYE-687和WYE-354。NFκB途径的抑制剂包括例如消除NFκB活性的TPCA-1(一种IKK2抑制剂);BAY11-7082(IKK抑制剂,对于IKK1和IKK2的选择性较差);和MLN4924(NEDD8激活酶(NAE)-抑制剂);和MG132。

[0158] 也可抑制mTOR或AKT途径的PI3-k的抑制剂的实例包括哌立福辛(KRX-0401)、idelalisib、PX-866、IPI-145、BAY 80-6946、BEZ235、RP6530、TGR 1201、SF1126、INK1117、GDC-0941、BKM120、XL147(SAR245408)、XL765(SAR245409)、Palomid 529、GSK1059615、GSK690693、ZSTK474、PWT33597、IC87114、TG100-115、CAL263、RP6503、PI-103、GNE-477、CUDC-907、AEZS-136、BYL719、BKM120、GDC-0980、GDC-0032和MK2206。

[0159] 小分子化合物一盐和一般的合成程序。本文描述为衰老清除剂的小分子化合物包括衰老清除剂的生理学上可接受的盐(即,药学上可接受的盐)、水合物、溶剂化物、多晶型物、代谢物和前药。可从The Pharmacological Basis of Therapeutics,第9版,McGraw-

Hill (1996) 中获得关于代谢的进一步信息。可以通过向宿主施用化合物并分析来自该宿主的组织样品,或通过将化合物与肝细胞一起体外温育并分析所得化合物来鉴定本文公开的化合物的代谢物。这两种方法均是本领域公知的。

[0160] 本文所述的化合物通常可以作为游离酸或游离碱使用。或者,所述化合物可以以酸或碱加成盐的形式使用。游离碱氨基化合物的酸加成盐可以根据本领域公知的方法制备,并且可以由有机酸和无机酸形成。合适的有机酸包括(但不限于)马来酸、富马酸、苯甲酸、抗坏血酸、琥珀酸、甲磺酸、乙酸、草酸、丙酸、酒石酸、水杨酸、柠檬酸、葡萄糖酸、乳酸、扁桃酸、肉桂酸、天冬氨酸、硬脂酸、棕榈酸、乙醇酸、谷氨酸、丙二酸和苯磺酸。合适的无机酸包括(但不限于)盐酸、氢溴酸、硫酸、磷酸和硝酸。本文所述化合物的游离酸化合物的碱加成盐也可以根据本领域公知的方法制备,并且可以由有机碱和无机碱形成。另外的盐包括抗衡离子为阳离子的那些盐。合适的无机碱包括(但不限于)钠、钾、锂、铵、钙、钡、镁、铁、锌、铜、锰、铝等的氢氧化物或其他盐,以及有机碱如取代的铵盐(例如,二苄基铵、苄基铵、2-羟乙基铵)。其他盐包括抗衡离子为阴离子的那些盐,如己二酸盐、藻酸盐、抗坏血酸盐、天冬氨酸盐、苯磺酸盐、苯甲酸盐、硫酸氢盐、硼酸盐、丁酸盐、樟脑酸盐、樟脑磺酸盐、柠檬酸盐、环戊烷丙酸盐、二葡萄糖酸盐、十二烷基硫酸盐、乙磺酸盐、甲酸盐、富马酸盐、葡庚糖酸盐、甘油磷酸盐、葡萄糖酸盐、半硫酸盐、庚酸盐、己酸盐、氢碘酸盐、2-羟基-乙磺酸盐、乳糖醛酸盐、乳酸盐、月桂酸盐、月桂基硫酸盐、苹果酸盐、马来酸盐、丙二酸盐、甲磺酸盐、2-萘磺酸盐、烟酸盐、硝酸盐、油酸盐、草酸盐、棕榈酸盐、巴莫酸盐、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、硬脂酸盐、琥珀酸盐、硫酸盐、酒石酸盐、硫氰酸盐、对甲苯磺酸盐、十一烷酸盐和戊酸盐。因此,本文所述术语化合物的“药学上可接受的盐”旨在涵盖任何和全部药学上合适的盐形式。

[0161] 有时可将化合物描述为阴离子种类。本领域普通技术人员将认识到所述化合物以阳离子的等摩尔比值存在。例如,本文所述化合物可以以完全质子化的形式,或以盐如钠、钾、铵或与上述任何无机碱组合的形式存在。当描述多于一个阴离子种类时,每个阴离子种类可以作为质子化种类或作为盐种类独立存在。在一些特定的实施方案中,本文所述化合物作为钠盐存在。在其他特定的实施方案中,本文所述化合物作为钾盐存在。

[0162] 此外,本文所述的任何化合物的一些结晶形式可以作为多晶型物存在,它们也是本公开内容所包含并考虑的。另外,一些化合物可与水或其他有机溶剂形成溶剂化物。结晶通常产生所公开化合物的溶剂化物。如本文所用的,术语“溶剂化物”是指包含任何所公开化合物的一个或多个分子与一个或多个溶剂分子的聚集体。该溶剂可以是水,在这种情况下该溶剂化物可以是水合物。或者,该溶剂可以是有机溶剂。因此,本文公开的化合物可以作为包括一水合物、二水合物、半水合物、倍半水合物、三水合物、四水合物等水合物以及相应的溶剂化形式存在。所述化合物的某些实施方案可以是真正的溶剂化物,而在其他情况下,所述化合物的一些实施方案可以仅保持外来水或者仅是水加上一些外来溶剂的混合物。

[0163] 通常,可以根据本领域技术人员已知的有机合成技术从可商购的化学品种/或从化学文献所述的化合物开始,制成在本文所述方法中使用的化合物。还可以通过由可在大多数公共和大学图书馆中得到的美国化学学会的化学文摘服务(Chemical Abstract Service of the American Chemical Society)制作的已知化学品索引以及通过在线-数

据库(可以联系美国化学学会, Washington, D.C.以得到更多细节)鉴定特定的和类似的反应物。目录中的已知但非可商购的化学品可以由定制化学品合成室制备,其中许多标准化化学品供应室(例如,以上列出的那些)提供定制合成服务。本公开内容的药用盐的制备和选择的参考文献是P.H.Stahl&C.G.Wermuth“Handbook of Pharmaceutical Salts,”Verlag Helvetica Chimica Acta,Zurich,2002。可通过各种参考书和数据库鉴定本领域普通技术人员已知的方法。合适的参考书和论文详述了在本文所述化合物的制备中有用的反应物的合成,或者给描述该制备的文章提供了参考文献。

[0164] 本文更详细地描述了用于鉴定衰老清除剂的试验和技术。另外,为了鉴定和选择作为衰老清除剂的小化合物,药物化学领域的技术人员还可以考虑小分子的其他性质,如溶解度、生物利用度、药代动力学、Lipinski五规则等。

[0165] 多肽、抗体和核酸

[0166] 在其他的某些实施方案中,衰老清除剂可以是多肽、肽、抗体、抗原结合片段(即,包含至少一个互补决定区(CDR)的肽和多肽)、肽体(peptibody)、重组病毒载体或核酸。在某些实施方案中,衰老清除剂是反义寡核苷酸、siRNA、shRNA或肽。例如,衰老清除剂如多肽、抗体、核酸等包括例如MDM2抑制剂、BCL-2家族抑制剂或Akt激酶抑制剂。在其他实施方案中,在用于表征或监测小分子衰老清除剂的使用的试验和方法中,可以使用与本文所述小分子衰老清除剂的配体或靶蛋白特异性结合的多肽、肽、抗体(包括其抗原结合片段)。

[0167] 与编码细胞(其为衰老细胞或疾病微环境中的细胞)的靶蛋白(例如,Bcl-xL、Bcl-2、Bcl-w、MDM2、Akt)的mRNA的一部分特异性杂交的多核苷酸或寡核苷酸可以通过老化、生物损伤(即,细胞损伤)药物治疗或环境刺激来诱导所述细胞衰老。在其他实施方案中,靶蛋白可以是在细胞存活途径或炎症途径或凋亡途径下游或上游的配体或蛋白质。多核苷酸和寡核苷酸可与编码靶多肽的核苷酸序列的至少一部分互补(例如,短干扰核酸、反义多核苷酸、核酶或肽核酸),并且可用于改变基因和/或蛋白质表达。可以使用本领域可得的核苷酸序列制备与编码靶多肽的核酸分子特异性结合或杂交的这些多核苷酸。在另一个实施方案中,核酸分子如非序列特异性的适体也可以用来改变基因和/或蛋白质表达。

[0168] 反义多核苷酸与核酸如mRNA或DNA以序列特异性方式结合。鉴定用作反义剂的寡核苷酸和核酶和鉴定编码用于靶向递送的靶基因的DNA包括本领域公知的方法。例如,这样的寡核苷酸的所需性质、长度和其他特征是众所周知的。反义技术可用于通过干扰聚合酶、转录因子或其他调节分子的结合来控制基因表达(参见,例如,Gee等人,In Huber and Carr,Molecular and Immunologic Approaches,Futura Publishing Co.(Mt.Kisco,NY;1994))。

[0169] 短干扰RNA可用于调节(减少或抑制)编码感兴趣的靶多肽的基因的表达(参见,例如,本文的实施例)。可以根据本文所述方法使用小核酸分子如短干扰RNA(siRNA)、微RNA(miRNA)和短发夹RNA(shRNA)分子来调节靶蛋白的表达。siRNA多核苷酸优选包含双链RNA(dsRNA),但可以包含单链RNA(参见,例如,Martinez等人,Cell 110:563-74(2002))。siRNA多核苷酸可以包含如本文提供的和本领域技术人员已知并使用的其他天然存在的、重组或合成的单链或双链的核苷酸聚合物(核糖核苷酸或脱氧核糖核苷酸或两者的组合)和/或核苷酸类似物。

[0170] 除非另外指出,术语“siRNA”是指双链干扰RNA。通常,siRNA是包含两条核苷酸链

的双链核酸分子,每条链均具有约19至约28个核苷酸(即,约19、20、21、22、23、24、25、26、27或28个核苷酸)。在某些实施方案中,每条链为19、20、21、22或23个核苷酸。在其他的特定实施方案中,siRNA包含两条核苷酸链,每条链均具有约15、16、17或18个核苷酸。在其他的某些实施方案中,双链siRNA的一条链至少长出两个核苷酸,例如,一条链可以在一端(通常为3'末端)具有两个碱基的突出端(如TT)。

[0171] 短发夹干扰RNA分子包含茎环或发夹结构的干扰RNA(例如,shRNA)的有义链和反义链。shRNA可由DNA载体表达,其中编码有义干扰RNA链的DNA寡核苷酸与编码反向互补反义干扰RNA链的DNA寡核苷酸通过短间隔区连接。如果需要的话,可以添加形成限制位点的3'末端T和核苷酸。所得RNA转录物向后折叠到其自身上以形成茎环结构。

[0172] 除siRNA分子以外,其他干扰RNA和RNA样分子也可与RISC和沉默基因表达相互作用,如短发夹RNA(shRNA)、单链siRNA、微RNA(miRNA)和切酶(dicer)-底物27-聚体双链体。这样的RNA样分子可以含有一个或多个化学修饰的核苷酸、一个或多个非核苷酸、一个或多个脱氧核糖核苷酸和/或一个或多个非磷酸二酯键。可在基因表达中与RISC相互作用并参与RISC相关变化的RNA或RNA样分子在本文中可被称为“干扰RNA”或“干扰RNA分子”。在某些情况下,单链干扰RNA引起mRNA沉默,但效率低于双链RNA。

[0173] 本领域技术人员还将认识到,RNA分子如siRNA、miRNA、shRNA可以经化学修饰以赋予针对核酸酶降解的稳定的稳定性,同时保持与细胞中可能存在的靶核酸结合的能力。可以在该分子的任何位置修饰RNA,只要经修饰的RNA与感兴趣的靶序列结合并抵抗酶降解即可。siRNA的修饰可以在核苷酸碱基、核糖或磷酸中。举例来说,可以修饰核糖的2'位置,该修饰可以使用本领域通常实施的多种不同方法中的任何一种来实现。RNA可以通过添加卤代如氟代进行化学修饰。已用于修饰RNA分子的其他化学部分包括甲基、甲氧基乙基和丙基基团(参见,例如,美国专利号8,675,704)。

[0174] 在特定的实施方案中,可以通过已并入感兴趣的多核苷酸或寡核苷酸的重组载体递送多核苷酸或寡核苷酸(例如,包括shRNA)。在其他实施方案中,该重组病毒载体可以是重组表达载体,该重组表达载体中插入编码抑制细胞存活途径或炎症途径中的蛋白质(包括本文所述的蛋白质如Bcl-xL、Bcl-2、Bcl-w、MDM2和Akt)的抗体、抗原结合片段、多肽或肽的多核苷酸序列,使得该编码序列与一个或多个调节控制序列可操作地连接,以驱动该多肽、抗体、抗原结合片段或肽的表达。该重组载体或重组表达载体可以是病毒重组载体或病毒重组表达载体。示例性的病毒载体包括而限于慢病毒载体基因组、痘病毒载体基因组、痘苗病毒载体基因组、腺病毒载体基因组、腺病毒相关病毒载体基因组、疱疹病毒载体基因组和 α 病毒载体基因组。病毒载体可以是活的、减毒的、条件复制型或复制缺陷型的,并且通常是非致病(缺陷型)、可复制的病毒载体。用于设计和产生这样的病毒载体的程序和技术是本领域技术人员公知并且通常实施的。

[0175] 在某些特定的实施方案中,可在本文所述方法中使用的衰老清除剂是反义寡核苷酸。举非限制性实例而言,在本文所述方法中可以使用先前描述的BCL-xL特异性反义寡核苷酸(参见,例如,PCT公开号W0 00/66724;Xu等人,Int'l.J.Cancer 94:268-74(2001);Olie等人,J.Invest.Dermatol.118:505-512(2002);以及Wacheck等人,Br.J.Cancer89:1352-1357(2003))。

[0176] 在某些实施方案中,可用于本文所述方法的衰老清除剂是肽。举例来说并且在某

些实施方案中,BCL-xL选择性肽抑制剂是BH3肽模拟物。BCL-xL选择性BH3肽模拟物的实例包括先前描述的那些(参见,例如,Kutski等人,J. Am. Chem. Soc. 124:11838-39 (2002); Yin等人,Bioorg. Med. Chem. Lett. 22:1375-79 (2004); Matsumura等人,FASEB J. 7:2201 (2010))。

[0177] 在某些实施方案中,可用于本文所述方法的衰老清除剂不包括编码外切核酸酶、EXO1或包含编码EXO1酶的多核苷酸的载体(包括病毒载体)的多核苷酸或其片段(即,编码EXO1酶的多核苷酸、该多核苷酸的片段或含有这种多核苷酸的载体被排除在外)。可用于本文所述方法的衰老清除剂也不包括EXO1酶多肽(即,EXO1酶被排除在外)或生物活性肽或其多肽片段。此外,这样的分子不是细胞信号传导途径如炎症途径或细胞存活途径之一或两者的抑制剂;相反,EXO1编码降解加帽缺陷型端粒的5' -3' 外切核酸酶(参见,例如,国际专利申请号WO 2006/018632)。

[0178] 本文所述的衰老清除剂可以是多肽,该多肽是抗体或抗原结合片段。抗原结合片段可以是F(ab')₂、Fab、Fab'、Fv和Fd,并且还包括包含至少一个互补决定区(CDR)的肽或多肽。该抗体可以是经由与靶蛋白的相互作用由衰老细胞内化的内化抗体或抗原结合片段。

[0179] 通常可以使用本领域普通技术人员可容易执行的方法确定并评估抗体与其同源抗原的结合特性(参见,例如,Harlow等人,Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988))。如本文所用的,如果抗体与多肽在可检测的水平下反应,则该抗体被认为对抗原“具有免疫特异性”、“具有特异性”或与抗原“特异性结合”。可以使用常规技术例如Scatchard等人(Ann. N. Y. Acad. Sci. USA 51:660 (1949))描述的那些技术,以及通过表面等离子体共振(SPR; BIAcore™, Biosensor, Piscataway, NJ)容易地确定抗体与其抗原结合片段的亲和力。

[0180] 所述抗体可以是多克隆或单克隆的。可从抗原结合片段或肽文库中鉴定并分离出可变区或一个或多个互补决定区(CDR)。抗体或抗原结合片段可以重组工程化和/或重组产生。抗体可以属于任何免疫球蛋白类别,例如IgG、IgE、IgM、IgD或IgA,并且可以获自或来源于动物,例如家禽(例如,鸡)和哺乳动物,包括但不限于小鼠、大鼠、仓鼠、兔或其他啮齿动物、牛、马、绵羊、山羊、骆驼、人或其他灵长类。为了在人类受试者中使用,抗体和抗原结合片段通常是人的、人源化的或嵌合的,以减少受试者对非人的肽和多肽序列的免疫原性反应。

[0181] 所述抗体可以是单克隆抗体,该单克隆抗体是人抗体、人源化抗体、嵌合抗体、双特异性抗体或由其制备或衍生的抗原结合片段(例如,F(ab')₂、Fab、Fab'、Fv和Fd)。抗原结合片段还可以是任何合成的或基因工程化的蛋白质(参见,例如,Hayden等人,Curr Opin. Immunol. 9:201-12 (1997); Coloma等人,Nat. Biotechnol. 15:159-63 (1997); 美国专利号5,910 573; Holliger等人,Cancer Immunol. Immunother. 45:128-30 (1997); Drakeman等人,Expert Opin. Investig. Drugs 6:1169-78 (1997); Koelemij等人,J. Immunother. 22:514-24 (1999); Marvin等人,Acta Pharmacol. Sin. 26:649-58 (2005); Das等人,Methods Mol. Med. 109:329-46 (2005); 国际专利申请号PCT/US91/08694和PCT/US91/04666),并来自噬菌体展示肽文库(参见,例如,Scott等人,Science 249:386 (1990); Devlin等人,Science 249:404 (1990); Cwirla等人,Science 276:1696-99 (1997); 美国专利号5,223,409; 美国专利号5,733,731; 美国专利号5,498,530; 美国专利号5,432,018; 美

国专利号5,338,665;1994;美国专利号5,922,545;国际申请公开号WO 96/40987和WO 98/15833)。作为最小识别单位或CDR(即,在重链可变区中存在的三个CDR中的任意一个或多个和/或在轻链可变区中存在的三个CDR中的一个或多个)的肽可通过计算机建模技术鉴定,该计算机建模技术可用于比较和预测将与感兴趣的靶蛋白特异性结合的肽序列(参见,例如,Bradley等人,Science 309:1868(2005);Schueler-Furman等人,Science 310:638(2005))。本领域描述了用于设计人源化抗体的有用的策略(参见,例如,Jones等人,Nature 321:522-25(1986);Riechmann等人,Nature 332:323-27(1988);Padlan等人,FASEB9:133-39(1995);Chothia等人,Nature,342:377-83(1989))。

[0182] 衰老细胞

[0183] 本文所述的衰老清除剂可用于以临床上显著或生物学上显著的方式选择性地杀死或破坏衰老细胞。如本文详细讨论的,所述一种或多种衰老清除剂的用量和持续时间足以选择性地杀死已确立的衰老细胞,但不足以以临床上显著或生物学上显著的方式杀死非衰老细胞(破坏非衰老细胞,引起非衰老细胞的死亡)。所述衰老清除剂可以选择性地杀死一种或多种类型的衰老细胞(例如,衰老的前脂肪细胞、衰老的内皮细胞、衰老的成纤维细胞、衰老的神经元、衰老的上皮细胞、衰老的间充质细胞、衰老的平滑肌细胞、衰老的巨噬细胞或衰老的软骨细胞)。

[0184] 衰老细胞可展现出以下七个特征中的任意一个或多个。(1)衰老生长停滞基本上是永久性的并且不能被已知的生理刺激逆转。(2)衰老细胞大小增加,有时相对于非衰老对应物的大小扩大超过两倍。(3)衰老细胞表达部分地反映溶酶体质量增加的衰老相关 β -半乳糖苷酶(SA- β -gal)。(4)大多数衰老细胞表达p16INK4a,p16INK4a一般不由休眠或终末分化细胞表达。(5)具有持续性DDR信号传导的衰老的细胞携带持续性细胞核聚集点,被称为具有加强衰老的染色质改变的DNA区段(DNA-SCARS)。这些聚集点含有激活的DDR蛋白并且可区别于瞬态损伤聚集点。DNA-SCARS包括功能失调端粒或端粒功能失调诱导的聚集点(TIF)。(6)衰老细胞表达并且可以分泌与衰老相关的分子,在某些情况下可以在持续性DDR信号传导的存在下观察到该分子,该分子的表达在某些情况下可能依赖于持续性DDR信号传导。(7)衰老细胞的细胞核失去结构蛋白如核纤层蛋白B1或染色质相关蛋白质如组蛋白和HMGB1。参见,例如,Freund等人,Mol.Biol.Cell 23:2066-75(2012);Davalos等人,J.Cell Biol.201:613-29(2013);Ivanov等人,J.Cell Biol.DOI:10.1083/jcb.201212110,1-15页;2013年7月1日在线发表;Funayama等人,J.Cell Biol.175:869-80(2006))。

[0185] 可通过本领域所述的技术和程序检测衰老细胞和衰老细胞相关分子。例如,可通过检测衰老标志物SA- β 半乳糖苷酶(SA- β gal)的组织化学或免疫组织化学技术分析组织中衰老细胞的存在(参见,例如,Dimri等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 92:9363-9367(1995))。可通过本领域实施的多种免疫化学方法中的任意一种如免疫印迹分析来确定衰老细胞相关多肽p16的存在。可通过本领域实施的多种技术,包括定量PCR,来测量细胞中p16mRNA的表达。可以通过使用自动化的高通量试验,如本领域所述的自动化Luminex阵列试验,来确定衰老细胞相关多肽(例如,SASP的多肽)的存在和水平(参见,例如,Coppe等人,PLoS Biol 6:2853-68(2008))。

[0186] 还可以通过检测衰老细胞相关分子来确定衰老细胞的存在,该分子包括生长因

子、蛋白酶、细胞因子(例如,炎性细胞因子)、趋化因子、细胞相关代谢物、活性氧(例如, H_2O_2) 以及刺激炎症和/或其他可促进或加剧受试者的潜在疾病的生物作用或反应的其他分子。衰老细胞相关分子包括在本领域被描述为包含衰老相关分泌表型(SASP,即,它包括可组成衰老细胞的促炎性表型的分泌因子)、传递衰老信息的分泌蛋白质组和DNA损伤分泌程序(DDSP)的那些分子。如本领域所述,衰老细胞相关分子的这些分组含有共同的分子,而非旨在描述分子的三个单独不同的分组。衰老细胞相关分子包括某些表达和分泌的生长因子、蛋白酶、细胞因子和可具有有效自分泌和旁分泌活性的其他因子(参见,例如,Coppe等人,同上;Coppe等人.J.Biol.Chem.281:29568-74(2006);Coppe等人.PLoS One 5:39188(2010);Krtolica等人.Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.98:12072-77(2001);Parrinello等人.J.Cell Sci.118:485-96(2005))。ECM相关因子包括炎性蛋白质和ECM重建的介质,并且它们在衰老细胞中被强烈诱导(参见,例如,Kuilman等人,Nature Reviews 9:81-94(2009))。其他衰老细胞相关分子包括共同描述为DNA损伤分泌程序(DDSP)的细胞外多肽(蛋白质)(参见,例如,Sun等人,Nature Medicine 18:1359-1368(2012))。衰老细胞相关蛋白质还包括在衰老细胞上表达的细胞表面蛋白质(或受体),该蛋白质包括以可检测到的较低量存在或不存在于非衰老细胞的细胞表面上的蛋白质。

[0187] 衰老细胞相关分子包括可以组成衰老细胞的促炎性表型的分泌因子(例如,SASP)。这些因子包括而不限于GM-CSF、 $GR\alpha$ 、 $GR\alpha,\beta$ 、 γ 、IGFBP-7、IL-1 α 、IL-6、IL-7、IL-8、MCP-1、MCP-2、MIP-1 α 、MMP-1、MMP-10、MMP-3、双调蛋白、ENA-78、嗜酸细胞活化趋化因子-3、GCP-2、GITR、HGF、ICAM-1、IGFBP-2、IGFBP-4、IGFBP-5、IGFBP-6、IL-13、IL-1 β 、MCP-4、MIF、MIP-3 α 、MMP-12、MMP-13、MMP-14、NAP2、制癌蛋白M、骨保护素、PIGF、RANTES、sgp130、TIMP-2、TRAIL-R3、Acrp30、血管生成素、Axl、bFGF、BLC、BTC、CTACK、EGF-R、Fas、FGF-7、G-CSF、GDNF、HCC-4、I-309、IFN- γ 、IGFBP-1、IGFBP-3、IL-1R1、IL-11、IL-15、IL-2R- α 、IL-6R、I-TAC、瘦素、LIF、MMP-2、MSP-a、PAI-1、PAI-2、PDGF-BB、SCF、SDF-1、sTNF RI、sTNF RII、血小板生成素、TIMP-1、tPA、uPA、uPAR、VEGF、MCP-3、IGF-1、TGF- β 3、MIP-1-delta、IL-4、FGF-7、PDGF-BB、IL-16、BMP-4、MDC、MCP-4、IL-10、TIMP-1、Fit-3配体、ICAM-1、Axl、CNTF、INF- γ 、EGF、BMP-6。另外的鉴定的因子——包括在本领域有时被称为传递衰老信息的分泌组(SMS)因子的那些因子(其中一些包含在SASP多肽的列表中),包括而不限于IGF1、IGF2和IGF2R、IGFBP3、IDFBP5、IGFBP7、PA11、TGF- β 、WNT2、IL-1 α 、IL-6、IL-8和CXCR2结合趋化因子。细胞相关分子还包括而不限于Sun等人,Nature Medicine(同上)中描述的因子,并且包括例如基因MMP1、WNT16B、SFRP2、MMP12、SPINK1、MMP10、ENPP5、EREG、BMP6、ANGPTL4、CSGALNACT、CCL26、AREG、ANGPT1、CKK、THBD、CXCL14、NOV、GAL、NPPC、FAM150B、CST1、GDNF、MUCL1、NPTX2、TMEM155、EDN1、PSG9、ADAMTS3、CD24、PPBP、CXCL3、MMP3、CST2、PSG8、PCOLCE2、PSG7、TNFSF15、C17orf67、CALCA、FGF18、IL8、BMP2、MATN3、TFP1、SERPINI 1、TNFRSF25和IL23A的产物。衰老细胞相关蛋白质还包括在衰老细胞上表达的细胞表面蛋白质(或受体),该细胞表面蛋白质包括以可检测到的较低量存在或不存在于非衰老细胞的细胞表面上的蛋白质。

[0188] 在某些实施方案中,至少选择性地杀死衰老的前脂肪细胞的衰老清除剂可用于治疗糖尿病(特别是2型糖尿病)、代谢综合征或肥胖症。在其他实施方案中,衰老清除剂至少能够选择性地杀死衰老的内皮细胞、衰老的平滑肌细胞和/或衰老的巨噬细胞。这样的衰老清除剂可用于治疗心血管疾病(例如,动脉粥样硬化)。在其他特定的实施方案中,衰老清除

剂至少能够选择性地杀死衰老的成纤维细胞。在另一个实施方案中,衰老清除剂至少可选择性地杀死衰老的神经元,包括产生多巴胺的神经元。在另一个实施方案中,衰老清除剂至少可杀死衰老的视网膜色素上皮细胞或其他衰老的上皮细胞(例如,肺的衰老上皮细胞或衰老的肾(肾脏)上皮细胞)。至少选择性地杀死衰老的肺上皮细胞可用于治疗肺疾病如慢性阻塞性肺疾病或特发性肺纤维化。在其他实施方案中,衰老清除剂至少可选择性地杀死衰老的免疫细胞(如衰老的巨噬细胞)。在另一个实施方案中,衰老清除剂至少可杀死衰老的软骨细胞,这可用于治疗炎性病症如骨关节炎。

[0189] 用于选择性地杀死衰老细胞的方法

[0190] 本文提供了用于选择性地杀死衰老细胞从而治疗或预防衰老相关疾病或病症(降低衰老相关疾病或病症发生的可能性)的方法,并且该方法包括使用如本文所述的衰老清除剂。如本文所述,这些衰老清除剂以被认为对于治疗癌症无效的方式施用。因为采用本文所述衰老清除剂治疗衰老相关疾病的方法包括与癌症治疗所需的量相比减少日剂量、减少单个治疗周期内的累积剂量或减少多个治疗周期内衰老清除剂(例如,MDM2抑制剂;至少抑制Bcl-xL的至少一个Bcl-2抗凋亡家族成员的抑制剂;Akt抑制剂)的累积剂量中的一种或多种,所以降低了一种或多种不良反应(即,副作用)发生的可能性,该不良反应与根据为了治疗癌症而优化的方案来治疗受试者有关。

[0191] 用于治疗衰老相关疾病或病症的方法的治疗方案包括以足以选择性地杀死衰老细胞的时间和量施用衰老清除剂。在某些实施方案中,该衰老清除剂在治疗周期内施用,该治疗周期包括治疗疗程以及随后的非治疗间隔。施用的治疗疗程在本文中是指有限的时间范围,在此时间范围内施用一个或多个剂量的衰老清除剂一天或多天。该有限的时间范围在本文中还可被称为治疗窗口。

[0192] 在一个实施方案中,本文提供了用于治疗非癌症的衰老相关疾病或病症的方法,该方法包括向有需要的受试者施用小分子衰老清除剂,该衰老清除剂选择性地杀死衰老细胞并在治疗周期内施用。在特定的实施方案中,所述方法包括在至少两个治疗周期内施用所述衰老清除剂。在特定的实施方案中,非治疗间隔可以为至少约2周或至少约0.5-12个月,如至少约一个月、至少约2个月、至少约3个月、至少约4个月、至少约5个月、至少约6个月、至少约7个月、至少约8个月、至少约9个月、至少约10个月、至少约11个月或至少约12个月(即,1年)。在其他某些特定的实施方案中,非治疗间隔为1-2年或1-3年或更长。在某些实施方案中,每个治疗疗程不长于约1个月、不长于约2个月或不长于约3个月;或不长于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、26、27、28、29、30或31天。

[0193] 在某些实施方案中,治疗窗口(即,治疗疗程)仅为一天。在其他的某些实施方案中,单个治疗疗程在不长于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、26、27、28、29、30或31天内发生。在这样的治疗窗口期间,可施用衰老清除剂至少两天(即,两天或更长),其中在施用的所述至少两天之间存在不施用所述药剂的可变天数。换言之,在施用衰老清除剂两天或更多天的治疗疗程内,该治疗疗程可具有不施用衰老清除剂的一天或多天的一个或多个间隔。举非限制性实例而言,当在不超过21天的治疗疗程期间施用衰老清除剂2天或更多天时,可施用该药剂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、26、27、28、29、30或31天的任意总天数。在

某些实施方案中,在3天或更长的治疗疗程期间向受试者施用衰老清除剂,并且可以每两天(即,每隔一天)施用该药剂。在其他的某些实施方案中,当向受试者施用衰老清除剂4天或更长的治疗窗口时,可以每三天(即,每隔两天)施用该衰老清除剂。在一个实施方案中,在至少2天且不多于约21天(即,约2-21天)、至少2天且不长于约14天(即,约2-14天)、至少2天且不长于约10天(即,约2-10天)或至少2天且不长于约9天(即,约2-9天)或至少2天且不长于约8天(即,约2-8天)的治疗疗程期间施用衰老清除剂至少两天(即,2天或更长)。在其他特定的实施方案中,在至少2天且不长于约7天(即,约2-7天)、至少2天且不长于约6天(即,约2-6天)或至少2天且不多于约5天(即,约2-5天)或至少2天且不长于约4天(即,约2-4天)的治疗窗口期间施用衰老清除剂至少两天(即,2天或更长)。在又一个实施方案中,该治疗窗口为至少2天且不长于3天(即,2-3天)或2天。在某些特定的实施方案中,治疗疗程不长于3天。在其他实施方案中,治疗疗程不长于5天。在其他特定的实施方案中,治疗疗程不长于7天、10天或14天或21天。在某些实施方案中,在至少2天且不长于约11天(即,2-11天)的治疗窗口期间施用衰老清除剂至少两天(即,2天或更多天);或在至少2天且不长于约12天(即,2-12天)的治疗窗口期间施用衰老清除剂至少两天(即,2天或更多天);或在至少2天且不多于约13天(即,2-13天)的治疗窗口期间施用衰老清除剂至少两天(即,2天或更多天);或在至少2天且不多于约15天(即,2-15天)的治疗疗程期间施用衰老清除剂至少两天(即,2天或更多天);或在至少2天且不长于约16天、17天、18天、19天或20天(即,分别为2-16、2-17、2-18、2-19、2-20天)的治疗疗程期间施用衰老清除剂至少两天(即,2天或更多天)。在其他实施方案中,衰老清除剂可在至少3天且不长于3至21天之间任意天数的治疗疗程内施用至少3天;或在至少4天且不长于4至21天之间任意天数的治疗疗程内施用至少4天;或在至少5天且不长于5至21天之间任意天数的治疗疗程内施用至少5天;或在至少6天且不长于6至21天之间任意天数的治疗疗程内施用至少6天;或在至少7天且不长于7至21天之间任意天数的治疗疗程内施用至少7天;或在分别为至少8或9天且不长于分别为8或9天至21天之间任意天数的治疗疗程内施用至少8或9天;或在至少10天且不长于10至21天之间任意天数的治疗疗程内施用至少10天;或在至少14天且不长于14至21天之间任意天数的治疗疗程内施用至少14天;或在分别为至少11或12天且不长于分别为11或12天至21天之间任意天数的治疗疗程内施用至少11或12天;或在分别为至少15或16天且不长于分别为15或16天至21天之间任意天数的治疗疗程内施用至少15或16天。举另外的实例而言,当治疗疗程不长于14天时,可在分别为至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13和14天且不长于14天的治疗窗口内施用衰老清除剂至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13和14天。当治疗疗程不长于10天时,可在分别为至少2、3、4、5、6、7、8、9或10天且不长于10天的治疗窗口内施用衰老清除剂至少2、3、4、5、6、7、8、9或10天。类似地,当治疗疗程不长于7天时,可在分别为至少2、3、4、5、6或7天且不长于7天的治疗窗口内施用衰老清除剂至少2、3、4、5、6或7天。在另一个实例中,当治疗疗程不长于5天时,可在分别为至少2、3、4或5天且不长于5天的治疗窗口内施用衰老清除剂至少2、3、4或5天。

[0194] 对于三天或更多天的治疗疗程,衰老清除剂的剂量可以施用比在该特定治疗窗口内的总天数少的天数。举非限制性实例而言,当治疗疗程具有不多于7、10、14或21天的治疗疗程时,可施用衰老清除剂的天数分别为2天至7、10、14或21天之间的任意天数,并且以适合于正在治疗的特定疾病、正在施用的衰老清除剂、患者的健康状况和本文更详细讨论的

其他有关因素的任意间隔进行。本领域技术人员将容易理解,当在治疗窗口内施用衰老清除剂两天或更多天时,该药剂可被递送所述窗口的最小天数、所述窗口的最大天数或最小值与最大值之间的任意天数。

[0195] 在某些特定的实施方案中,治疗疗程为一天或治疗疗程为不超过2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14天的长度,这些是疗程的实例,其中在分别不超过(即,不长于)2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14天的治疗疗程内施用衰老清除剂两天或更多天。在其他的某些实施方案中,治疗疗程为约2周(约14天或0.5个月)、约3周(约21天)、约4周(约1个月)、约5周、约6周(约1.5个月)、约2个月(或约60天)或约3个月(或约90天)。在特定的实施方案中,治疗疗程为衰老清除剂的单次每日给药。在其他实施方案中,对于任何治疗疗程,衰老清除剂的日剂量可以作为单次施用或该剂量可以分成2、3、4或5次单独施用以提供该药剂的总日剂量。

[0196] 如本文所述,在某些特定的实施方案中,在施用衰老清除剂两天或更多天的治疗窗口内,该治疗疗程可具有不施用衰老清除剂的一天或多天的一个或多个间隔。仅作为非限制性实例,当治疗窗口为两天至七天时,可以在治疗窗口的第一天施用第一剂量,并在该疗程的第三天施用第二剂量并在该治疗窗口的第七天施用第三剂量。本领域技术人员将理解,可以在特定的治疗窗口期间使用不同的给药时间表。在其他特定的实施方案中,在治疗疗程期间连续每天施用衰老清除剂。日剂量可以作为单次剂量施用或该日剂量可以分成2、3或4或5次单独施用以提供衰老清除剂的总日剂量。

[0197] 在某些实施方案中,治疗疗程包含每天施用衰老清除剂的时间长度。在一个特定的实施方案中,每天施用衰老清除剂持续2天。在另一个特定的实施方案中,每天施用衰老清除剂持续3天。在又一个特定的实施方案中,每天施用衰老清除剂持续4天。在一个特定的实施方案中,每天施用衰老清除剂持续5天。在又一个特定的实施方案中,每天施用衰老清除剂持续6天。在另一个特定的实施方案中,每天施用衰老清除剂持续7天。在又一个特定的实施方案中,每天施用衰老清除剂持续8天。在又一个特定的实施方案中,每天施用衰老清除剂持续9天。在又一个特定的实施方案中,每天施用衰老清除剂持续10天。在又一个特定的实施方案中,每天施用衰老清除剂持续11天。在又一个特定的实施方案中,每天施用衰老清除剂持续12天。在又一个特定的实施方案中,每天施用衰老清除剂持续13天。在又一个特定的实施方案中,每天施用衰老清除剂持续14天。以上每个实例的治疗窗口(即,疗程)分别不长于2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14天。

[0198] 在其他特定的实施方案中,每两天(即,每隔一天)施用衰老清除剂持续3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14天。在其他特定的实施方案中,每三天(即,一天接受所述药剂,随后两天不接受所述药剂)施用衰老清除剂持续4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14天。在其他特定的实施方案中,可以在3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14天的治疗窗口期间每2-3天施用衰老清除剂。在其他的实施方案中,可以在5、6、7、8、9、10、11、12、13或14天的治疗疗程期间每四天;或在6、7、8、9、10、11、12、13或14天的治疗疗程期间每五天施用衰老清除剂。本领域技术人员可以容易理解当在本文所述的有限天数的治疗窗口内每六天、每七天等施用衰老清除剂时治疗窗口的最小天数。

[0199] 在某些特定的实施方案中,可每天施用衰老清除剂长于14天的持续时间,并且可以施用至少15、16、17、18、19、20或至少21天。在其他特定的实施方案中,可以每天施用衰老

清除剂持续15、16、17、18、19、20或21天中的每一个天数。在另一个特定的实施方案中,可以在15、16、17、18、19、20或21天的治疗窗口期间每两天施用衰老清除剂。在另一个特定的实施方案中,可以在15、16、17、18、19、20或21天的治疗窗口期间每三天施用衰老清除剂。在其他特定的实施方案中,可以在15、16、17、18、19、20或21天的治疗窗口期间每2-3天施用衰老清除剂。在其他的实施方案中,可以在15、16、17、18、19、20或21天的治疗疗程期间每四天;或在15、16、17、18、19、20或21天的治疗疗程期间每五天施用衰老清除剂。本领域技术人员可以容易理解当在本文所述的有限天数的治疗窗口内每六天、每七天等施用衰老清除剂时治疗窗口的最小天数。

[0200] 在另一个特定的实施方案中,可每天施用衰老清除剂长于14天的持续时间,并且可以施用至少15、16、17、18、19、20或至少21天。在其他特定的实施方案中,可以每天施用衰老清除剂持续15、16、17、18、19、20或21天中的每一个天数。在另一个特定的实施方案中,可以在15、16、17、18、19、20或21天的治疗窗口期间每两天施用衰老清除剂。在另一个特定的实施方案中,可以在15、16、17、18、19、20或21天的治疗窗口期间每三天施用衰老清除剂。在其他特定的实施方案中,可以在15、16、17、18、19、20或21天的治疗窗口期间每2-3天施用衰老清除剂。在其他的实施方案中,可以在15、16、17、18、19、20或21天的治疗疗程期间每四天;或在15、16、17、18、19、20或21天的治疗疗程期间每五天施用衰老清除剂。本领域技术人员可以容易理解当在本文所述的有限天数的治疗窗口内每六天、每七天等施用衰老清除剂时治疗窗口的最小天数。

[0201] 在另一个特定的实施方案中,可以在治疗疗程中每天施用衰老清除剂长于14天或21天的持续时间,并且可以在约一个月、约两个月或约三个月的治疗疗程中施用。在其他特定的实施方案中,可以在一个月、两个月或三个月治疗疗程中的每一个治疗疗程每天施用衰老清除剂。在另一个特定的实施方案中,可以在约一个月、约两个月或约三个月的治疗疗程期间每两天施用衰老清除剂。在另一个特定的实施方案中,可以在约一个月、约两个月或约三个月的治疗疗程期间每三天施用衰老清除剂。在其他特定的实施方案中,可以在约一个月、约两个月或约三个月的治疗疗程期间每2-3天施用衰老清除剂。在其他的实施方案中,可以在约一个月、约两个月或约三个月的治疗疗程期间每四天;或在约一个月、约两个月或约三个月的治疗疗程期间每五天施用衰老清除剂。本领域技术人员可以容易理解当在本文所述的有限天数的治疗窗口内每六天、每七天等施用衰老清除剂时治疗疗程的最小天数。

[0202] 举非限制性实例而言,减少每日剂量的较长的治疗窗口可能是受试者的治疗选择。在其他特定的实施方案中并举例来说,衰老相关疾病或病症的阶段或严重性或其他临床因素可表明较长期的疗程可提供临床益处。在某些实施方案中,在约1-2周(例如,约5-14天)、约1-3周(例如,约5-21天)、约1-4周(例如,约5-28天)、约5-36天或约5-42天、7-14天、7-21天、7-28天、7-36天或7-42天;或9-14天、9-21天、9-28天、9-36天或9-42天的治疗疗程期间,每天或任选每隔一天(每两天)或每三天或以更长的间隔(即,每四天、每五天、每六天)施用衰老清除剂。在其他某些实施方案中,治疗疗程为约1-3个月。在特定的实施方案中,每天施用衰老清除剂持续至少五天,并且在另一个特定的实施方案中,每天施用衰老清除剂持续5-14天。在其他特定的实施方案中,施用衰老清除剂至少七天,例如7-14、7-21、7-28天、7-36天或7-42天。在其他特定的实施方案中,施用衰老清除剂至少九天,例如9-14天、

9-21天、9-28天、9-36天或9-42天。

[0203] 虽然如本文和以上所讨论的,包含施用衰老清除剂的治疗疗程提供了临床益处,但在其他某些实施方案中,治疗疗程伴随着在各个治疗疗程之间不施用衰老清除剂的时间间隔(即,非治疗间隔、停药治疗)而重复。如本文和本领域所述的治疗周期包括治疗疗程和随后的非治疗间隔。可根据需要频繁地重复治疗周期。例如,治疗周期可以重复至少一次、至少两次、至少三次、至少四次、至少五次或根据需要更频繁地重复。在某些特定的实施方案中,治疗周期重复一次(即,衰老清除剂的施用包括2个治疗周期)。在其他某些实施方案中,治疗周期重复两次或重复3次或更多次。因此,在某些实施方案中,进行采用衰老清除剂的治疗的一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个或更多个治疗周期。在特定的实施方案中,治疗疗程或治疗周期可以重复,如当衰老相关疾病或病症复发时,或当通过如上所述的一个治疗疗程显著减轻的所述疾病或病症的症状或后遗症已经增加或可检测时,或当所述疾病或病症的症状或后遗症加剧时,可以重复治疗疗程。在其他的实施方案中,当向受试者施用衰老清除剂以预防衰老相关疾病或病症(即,降低衰老相关疾病或病症发生或发展的可能性)或推迟衰老相关疾病或病症的发作、进展或严重性时,受试者可以在两个或更多个治疗周期内接受衰老清除剂。因此,在某些实施方案中,在一个治疗周期后为随后的治疗周期。一个治疗周期的每个治疗疗程或两个或更多个治疗周期的每个治疗疗程通常在衰老清除剂的持续时间和给药方面是相同的。在其他的实施方案中,治疗周期的每个治疗疗程期间衰老清除剂的持续时间和给药可以根据例如正在治疗的特定疾病或病症、正在施用的衰老清除剂、患者的健康状况和本文更详细讨论的其他有关因素,如医学领域技术人员所确定的进行调整。因此,第二个或任何随后的治疗周期的治疗疗程可以如医学上认为必要或谨慎的进行缩短或延长。换言之,如本领域技术人员将理解,两个或更多个治疗周期的每个治疗疗程是独立且相同或不同的;并且每个治疗周期的每个非治疗间隔是独立且相同或不同的。

[0204] 如本文所述,治疗周期中的每个治疗疗程由没有用衰老清除剂治疗的数天、数周或数月的时间间隔(即,非治疗时间间隔或停药间隔;在本文被称为非治疗间隔)隔开。一个治疗疗程与随后的治疗疗程之间的非治疗间隔(如数天、数周、数月)通常大于治疗疗程中施用的任意两天之间的最长时间间隔(即,天数)。举例来说,如果治疗疗程不长于14天并且在该治疗疗程期间每隔一天施用所述药剂,则两个治疗疗程之间的非治疗间隔多于2天,如3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14天或约3周、约4周、约6周或约2个月或如本文所述的更长时间。在特定的实施方案中,两个治疗疗程之间的非治疗间隔为约5天、约1周、约2周、约3周、约1个月、约6周、约2个月(8周)、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、约12个月(约1年)、约18个月(约1.5年)或更长。在某些特定的实施方案中,非治疗间隔为约2年或约3年。在某些特定的实施方案中,非治疗时间间隔为至少约14天、至少约21天、至少约1个月、至少约2个月、至少约3个月、至少约4个月、至少约5个月、至少约6个月或至少约1年。在某些实施方案中,约每14天(即,约每2周)(即,14天没用衰老清除剂治疗)、约每21天(即,约每3周)、约每28天(即,约每4周)、约每个月、约每36天、约每42天、约每54天、约每60天或约每个月(约每30天)、约每两个月(约每60天)、约每季度(约每90天)或约每半年(约每180天)施用治疗疗程(无论每天、每隔一天、每三天或以如上所述的治疗疗程内的施用之间的其他间隔(例如,1-14天、2-14天、2-21天或1-21天))。在

其他某些实施方案中,每28天、每36天、每42天、每54天、每60天或每个月(约每30天)、每两个月(约每60天)、每季度(约每90天)或每半年(约每180天)或约每年(约12个月)施用治疗疗程(例如,举非限制性实例而言,在约2-21天、约2-14天、约5-14天、约7-14天、约9-14天、约5-21天、约7-21天、约9-21天的疗程期间施用至少一天或至少两天)。在其他的实施方案中,每36天、42天、54天、60天或每个月(约每30天)、每两个月(约每60天)、每季度(约每90天)或每半年(约每180天)施用治疗疗程(举非限制性实例而言,例如,持续约5-28天、约7-28天或约9-28天,无论每天、每隔一天、每三天或以治疗疗程内的施用之间的其他间隔)。在其他特定的实施方案中,每42天、54天、60天或每个月(约每30天)、每两个月(约每60天)、每季度(约每90天)或每半年(约每180天)或约每年(约12个月)施用治疗疗程(例如,持续约5-36天、7-36天或9-36天,无论每天、每隔一天、每三天或以治疗疗程内的施用之间的其他间隔)。

[0205] 在特定的实施方案中,治疗疗程为一天,并且非治疗间隔为至少约14天、约21天、约1个月、约2个月(8周)、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、约12个月(约1年)、约18个月(约1.5年)或更长。在其他的某些实施方案中,治疗疗程为至少两天或至少3天且不长于10天,并且非治疗间隔为至少约14天、约21天、约1个月、约2个月(8周)、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、约12个月(约1年)、约18个月(约1.5年)或更长。在又一个实施方案中,治疗疗程为至少三天且不长于10天、不长于14天或不长于21天,并且非治疗间隔为至少约14天、约21天、约1个月、约2个月(8周)、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、约12个月(约1年)、约18个月(约1.5年)或更长。在又一个实施方案中,每42天、60天或每一个月(约每30天)、每两个月(约每60天)、每季度(约每90天)或每半年(约每180天)或约每年(约12个月)施用治疗疗程(例如,持续约5-42、7-42或9-42天,无论每天、每隔一天、每三天或以治疗疗程内的施用之间的其他间隔)。在特定的实施方案中,每14天(约每2周)或每21-42天每天施用衰老清除剂持续5-14天。在另一个特定的实施方案中,每季度每天施用衰老清除剂持续5-14天。在另一个特定的实施方案中,每21-42天每天施用衰老清除剂持续7-14天。在另一个特定的实施方案中,每季度每天施用衰老清除剂持续7-14天。在其他特定的实施方案中,每季度每21-42天或每9-14天每天施用衰老清除剂持续9-14天。在其他的实施方案中,非治疗间隔可以在治疗疗程之间变化。举非限制性实例而言,非治疗间隔可以为第一个治疗疗程之后14天并且可以为第二、第三或第四个(或更多个)治疗疗程之后21天或更长。在其他特定的实施方案中,每0.5-12个月向有需要的受试者施用衰老清除剂一次。在其他的某些实施方案中,每4-12个月向有需要的受试者施用衰老清除剂一次。

[0206] 在某些实施方案中,向受试者施用衰老清除剂以减小该受试者将发展特定病症的可能性或风险,或推迟衰老相关疾病或病症的一个或多个症状的发作。在某些实施方案中,每3、4、5、6、7、8、9、10、11或12个月施用衰老清除剂持续一天或多天(例如,包括2-3、-4、-5、-6、-7、-8、-9、-10、-11、-12、-13、-14、-15、-16、-17、-18、-19、-20和2-21天的任意连续天数)。在特定的实施方案中,每5或6个月施用衰老清除剂持续一天或多天(例如,包括1-9天的任意连续天数)。

[0207] 不希望受到任何特定理论的束缚,衰老清除剂的周期性施用杀死了新形成的衰老

细胞并从而降低(减小、减少)了该受试者中积累的衰老细胞的总数。在另一个实施方案中,通过每周一次或两次或按照上述其他治疗疗程中的任一个施用衰老清除剂减小或抑制受试者中积累的衰老细胞的总数。在每天施用衰老清除剂的总日剂量可以作为单次剂量或作为多次剂量递送。在其他某些特定的实施方案中,当施用衰老清除剂多个周期时,只要目的是施用单个治疗疗程则单日施用的衰老清除剂的剂量可少于施用的日剂量。

[0208] 在某些实施方案中,用于治疗衰老相关疾病或病症的方法包括向有需要的受试者施用选择性地杀死衰老细胞的小分子衰老清除剂;其中所述衰老相关疾病或病症不是癌症,并且其中所述衰老清除剂在一个或两个治疗周期,通常为两个治疗周期内施用。在某些特定的实施方案中,非治疗间隔为至少2周并且每个治疗疗程不长于3个月。

[0209] 本文还提供了用于选择性地杀死衰老细胞的方法,该方法包括使衰老细胞与本文所述衰老清除剂以足以杀死衰老细胞的时间和条件接触(即,促进相互作用或以某种方式使所述衰老细胞与衰老清除剂相互作用)。在这样的实施方案中,所述药剂相对于非衰老细胞选择性地杀死衰老细胞(即,与杀死非衰老细胞相比,所述药剂选择性地杀死衰老细胞)。在某些实施方案中,有待杀死的衰老细胞存在于受试者(例如,人或非人动物)中。按照以上和本文所述的治疗周期、治疗疗程和非治疗间隔向所述受试者施用衰老清除剂。

[0210] 在特定的实施方案中,向所述受试者施用单一(即,唯一、单独)衰老清除剂以治疗衰老相关疾病或病症。在某些实施方案中,单一衰老清除剂的施用可足以并且临床上有益于治疗衰老相关疾病或病症。因此,在某些特定的实施方案中,衰老清除剂作为单一疗法施用并且是施用于所述受试者以治疗状况和疾病的单一(即,唯一,单独)活性药剂。当衰老清除剂作为单一疗法施用向受试者施用不必排除的药物包括,举非限制性实例而言,用于其他目的如姑息治疗或安慰的药物(例如,阿司匹林、对乙酰氨基酚、布洛芬或处方镇痛药;局部止痒药物)或用于治疗不同疾病或状况的药物,尤其是如果所述其他药物不是衰老清除剂,如用于降低胆固醇的药物、他汀类、眼湿润剂和医学领域技术人员熟悉的其他这样的药物。

[0211] 在特定的实施方案中,如果衰老清除剂是MDM2抑制剂,则该MDM2抑制剂作为单一疗法(即,唯一的活性治疗剂)施用,并且每个治疗疗程为至少5天长,在该疗程期间施用MDM2抑制剂至少5天。在某些其他实施方案中,施用MDM2抑制剂至少9天。在更具体的实施方案中,所述MDM2抑制剂是Nutlin-3a。

[0212] 可以根据受试者对衰老清除剂的反应、疾病的阶段、受试者的总体健康状况以及本文和本领域所述的其他因素,如本领域技术人员所确定的,检查和修改或调整、继续或中断给药方案、治疗疗程和治疗周期。

[0213] 如本文所述,在所述方法中使用的某些衰老清除剂可能已被描述为对于治疗癌症是有用的或潜在有用的;然而,在用于治疗衰老相关病症或疾病的方法的实施方案中,以将被认为不同于且对于治疗癌症很可能无效的方式施用衰老清除剂。因此,本文所述方法对于治疗衰老相关病症或疾病是有用的,但不描述为也与治疗癌症的首选疗法(单独地或与另一种化疗剂或放射治疗一起)同样有用。在一个实施方案中,用于采用衰老清除剂治疗衰老相关疾病或病症的方法可包括与癌症治疗所需要的药剂的日剂量相比减少的日剂量。在另一个实施方案中,用于采用本文所述衰老清除剂治疗衰老相关疾病或病症的方法可包括与癌症治疗所需要的药剂的累积剂量相比在单个治疗周期内减少的累积剂量。在又一个实

施方案中,用于采用本文所述衰老清除剂治疗衰老相关疾病或病症的方法可包括与多个癌症治疗周期所需要的药剂的剂量相比在多个治疗周期内减少的施用药剂的累积剂量。

[0214] 举例来说,在某些实施方案中,当衰老清除剂是一种可能对癌细胞具有细胞毒性并且可以以治疗癌症的方式用于肿瘤学领域的药剂(例如,MDM2抑制剂(例如,Nutlin-3a; RG-7112),或一个或多个BCL-2抗凋亡蛋白家族成员的抑制剂并且该抑制剂抑制至少Bcl-xL(例如,ABT-263、ABT-737、WEHI-539、A-1155463))时,用于治疗衰老相关疾病或病症的方法包括在一个或两个或更多个治疗周期中施用衰老清除剂,并且在每个治疗疗程、每个治疗周期期间和/或在两个或更多个治疗周期内累积施用的衰老清除剂的总剂量为小于癌症治疗有效量的量。在给定时间段(如一周、两周、一个月、六个月、一年)内施用于受试者以治疗衰老相关疾病或病症的这种衰老清除剂的量可以为与向接受用于治疗癌症的药剂的受试者施用的相同药剂的总量相比例如约20倍减少至约5000倍减少的总量。在给定时间段(即,天数、月数、年数)内施用以治疗衰老相关疾病或病症的衰老清除剂的量的倍数减少(即,减少的量)可以为与在相同时间长度内施用于受试者以治疗癌症的所述药剂的量相比约20倍减少、约25倍减少、约30倍减少、约40倍减少、约50倍减少、约60倍减少、约75倍减少、约100倍减少、约125倍减少、约150倍减少、约175倍减少、约200倍减少、约300倍减少、约400倍减少、约500倍减少、约750倍减少、约1000倍减少、约1250倍减少、约1500倍减少、约1750倍减少、约2000倍减少、约2250倍减少、约2500倍减少、约2750倍减少、约3000倍减少、约3250倍减少、约3500倍减少、约3750倍减少、约3000倍减少、约3500倍减少、约4000倍减少、约4500倍减少或约5000倍减少。治疗衰老相关疾病所需的较低剂量也可以归因于给药途径。例如,当衰老清除剂用于治疗衰老相关肺疾病或病症(例如,COPD、IPF)时,可将衰老清除剂直接递送至肺(例如,通过吸入、通过插管术、鼻内或气管内),并且与口服施用所述药剂时相比每天和/或每个治疗疗程需要较低的剂量。而且,举另一个实例,当衰老清除剂用于治疗骨关节炎或衰老相关皮肤疾病或病症时,可将衰老清除剂以每天和/或每个治疗疗程低于口服施用衰老清除剂的剂量分别直接递送至骨关节炎关节(例如,关节内、皮内、局部、经皮)或皮肤(例如,局部、皮下、皮内、经皮)。当口服递送衰老清除剂时,例如,每天衰老清除剂的剂量可以是与施用于患者以治疗癌症的相同的量;然而,在治疗疗程或治疗周期内递送的所述药剂的量显著少于向接受适当量的用于治疗癌症的药剂的受试者施用的量。

[0215] 在某些实施方案中,本文所述方法包括使用一定量的衰老清除剂,该量为与当所述药剂用于治疗癌症时可全身性地例如口服或静脉内递送至接受衰老清除剂的受试者的量相比减少的量。在某些特定的实施方案中,通过选择性地杀死衰老细胞治疗衰老相关疾病或病症的方法包括以一定剂量施用衰老清除剂,该剂量为在治疗疗程、治疗周期或形成癌症治疗方案(即,方案(regimen))的两个或更多个治疗周期期间施用于患有癌症的受试者以杀死癌细胞的剂量的至少10%(即,十分之一)、至少20%(五分之一)、25%(四分之一)、30%-33%(约三分之一)、40%(五分之二)或至少50%(一半)。在其他特定的实施方案中,用于本文所述方法的衰老清除剂的剂量为向患有癌症的受试者施用的剂量的至少60%、70%、80%、85%、90%或95%。治疗方案——包括衰老清除剂的剂量和可用于治疗衰老相关病症或疾病的施用时间表和方式——也是不足以对非衰老细胞具有显著细胞毒性的方案。

[0216] 在某些实施方案中,用于治疗非癌症的衰老相关疾病或病症的方法包括向有需要

的受试者施用治疗有效量的小分子衰老清除剂,该衰老清除剂选择性地杀死衰老细胞(即,相对于非衰老细胞或与非衰老细胞相比选择性地杀死衰老细胞),并且该药剂对癌细胞具有细胞毒性,其中在至少一个治疗周期内施用所述衰老清除剂,该治疗周期包括治疗疗程,该治疗疗程之后为非治疗间隔。在所述治疗疗程期间施用的衰老清除剂的总剂量,和/或在所述治疗周期期间施用的衰老清除剂的总剂量,和/或在两个或更多个治疗周期期间施用的衰老清除剂的总剂量为小于癌症治疗有效量的量。在某些实施方案中,所述衰老清除剂为抑制至少Bcl-xL的Bcl-2抗凋亡蛋白家族成员的抑制剂;MDM2抑制剂;或Akt特异性抑制剂。本文描述了这些抑制剂的实例。在其他某些实施方案中,衰老清除剂作为单一疗法施用,并且是施用于所述受试者以治疗所述疾病或病症的单一活性衰老清除剂。本文详细描述了治疗疗程和治疗间隔的天数。

[0217] 在一个实施方案中,本文提供了用于治疗衰老相关疾病或病症的方法,其中所述衰老相关疾病不是癌症并且所述方法包括向有需要的受试者施用选择性地杀死衰老细胞的衰老清除剂或小分子衰老清除化合物,并且所述施用持续短的持续时间(例如,比可用于治疗癌症的特定药剂的持续时间短),如一天、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天或15天。在这些特定的实施方案中,1-15天之间任意天数的该治疗疗程是单个治疗疗程并且不重复。在另一个特定的实施方案中,施用衰老清除剂持续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天或31天(作为非重复的单个治疗疗程)。

[0218] 在某些特定的实施方案中,衰老清除剂是ABT-263 (navitoclax)。在一些实施方案中,在包含21天的治疗窗口中施用navitoclax。在一些实施方案中,每天施用navitoclax持续14天,随后停用7天。在一些实施方案中,每天施用navitoclax持续13天,随后停用8天。在一些实施方案中,每天施用navitoclax持续12天,随后停用9天。在一些实施方案中,每天施用navitoclax持续11天,随后停用10天。在一些实施方案中,每天施用navitoclax持续10天,随后停用11天。在一些实施方案中,每天施用navitoclax持续9天,随后停用12天。在一些实施方案中,每天施用navitoclax持续8天,随后停用13天。在一些实施方案中,每天施用navitoclax持续7天,随后停用14天。在一些实施方案中,每天施用navitoclax持续6天,随后停用15天。在一些实施方案中,每天施用navitoclax持续5天,随后停用16天。在一些实施方案中,每天施用navitoclax持续4天,随后停用17天。在一些实施方案中,每天施用navitoclax持续3天,随后停用18天。在一些实施方案中,每天施用navitoclax持续2天,随后停用19天。在一些实施方案中,施用navitoclax 1天,随后停用20天。

[0219] 在一些实施方案中,每天以约150mg至325mg的剂量施用navitoclax达21天。在一些实施方案中,每天以约150mg至300mg的剂量施用navitoclax达21天。在一些实施方案中,每天以约150mg至275mg的剂量施用navitoclax达21天。在一些实施方案中,每天以约150mg至250mg的剂量施用navitoclax达21天。在一些实施方案中,每天以约150mg至225mg的剂量施用navitoclax达21天。在一些实施方案中,每天以约150mg至200mg的剂量施用navitoclax达21天。在一些实施方案中,每天以约150mg至175mg的剂量施用navitoclax达21天。在一些实施方案中,每天以约150mg的剂量施用navitoclax达21天。在一些实施方案中,每天以约125mg的剂量施用navitoclax达21天。在一些实施方案中,每天以约100mg的剂量施用navitoclax达21天。在一些实施方案中,每天以约75mg的剂量施用navitoclax达21

天。在一些实施方案中,每天以约50mg的剂量施用navitoclax达21天。在一些实施方案中,每天以约25mg的剂量施用navitoclax达21天。

[0220] 在一些实施方案中,每天以约150mg至325mg的剂量施用navitoclax达14天。在一些实施方案中,每天以约150mg至300mg的剂量施用navitoclax达14天。在一些实施方案中,每天以约150mg至275mg的剂量施用navitoclax达14天。在一些实施方案中,每天以约150mg至250mg的剂量施用navitoclax达14天。在一些实施方案中,每天以约150mg至225mg的剂量施用navitoclax达14天。在一些实施方案中,每天以约150mg至200mg的剂量施用navitoclax达14天。在一些实施方案中,每天以约150mg至175mg的剂量施用navitoclax达14天。在一些实施方案中,每天以约150mg的剂量施用navitoclax达14天。在一些实施方案中,每天以约125mg的剂量施用navitoclax达14天。在一些实施方案中,每天以约100mg的剂量施用navitoclax达14天。在一些实施方案中,每天以约75mg的剂量施用navitoclax达14天。在一些实施方案中,每天以约50mg的剂量施用navitoclax达14天。在一些实施方案中,每天以约25mg的剂量施用navitoclax达14天。

[0221] 在一些实施方案中,每天以约150mg至325mg的剂量施用navitoclax达7天。在一些实施方案中,每天以约150mg至300mg的剂量施用navitoclax达7天。在一些实施方案中,每天以约150mg至275mg的剂量施用navitoclax达7天。在一些实施方案中,每天以约150mg至250mg的剂量施用navitoclax达7天。在一些实施方案中,每天以约150mg至225mg的剂量施用navitoclax达7天。在一些实施方案中,每天以约150mg至200mg的剂量施用navitoclax达7天。在一些实施方案中,每天以约150mg至175mg的剂量施用navitoclax达7天。在一些实施方案中,每天以约150mg的剂量施用navitoclax达7天。在一些实施方案中,每天以约125mg的剂量施用navitoclax达7天。在一些实施方案中,每天以约100mg的剂量施用navitoclax达7天。在一些实施方案中,每天以约75mg的剂量施用navitoclax达7天。在一些实施方案中,每天以约50mg的剂量施用navitoclax达7天。在一些实施方案中,每天以约25mg的剂量施用navitoclax达7天。在其他特定的实施方案中,每天施用以上剂量达1、2、3、4、5或6天、8、9、10、11、12、13、15、16、17、18、19或20天。

[0222] 在一些实施方案中,衰老清除剂是nutlin-3a。在一些实施方案中,在包含28天的治疗窗口中施用nutlin-3a。在一些实施方案中,每天施用nutlin-3a达10天,随后停用18天。在一些实施方案中,每天施用nutlin-3a达9天,随后停用19天。在一些实施方案中,每天施用nutlin-3a达8天,随后停用20天。在一些实施方案中,每天施用nutlin-3a达7天,随后停用21天。在一些实施方案中,每天施用nutlin-3a达6天,随后停用22天。在一些实施方案中,每天施用nutlin-3a达5天,随后停用23天。在一些实施方案中,每天施用nutlin-3a达4天,随后停用24天。在一些实施方案中,每天施用nutlin-3a达3天,随后停用25天。在一些实施方案中,每天施用nutlin-3a达2天,随后停用26天。在一些实施方案中,施用nutlin-3a 1天,随后停用27天。

[0223] 在一些特定的实施方案中,每天以约20mg/m²的剂量施用nutlin-3a达10天。在一些实施方案中,每天以约19mg/m²的剂量施用nutlin-3a达10天。在一些实施方案中,每天以约18mg/m²的剂量施用nutlin-3a达10天。在一些实施方案中,每天以约17mg/m²的剂量施用nutlin-3a达10天。在一些实施方案中,每天以约16mg/m²的剂量施用nutlin-3a达10天。在一些实施方案中,每天以约15mg/m²的剂量施用nutlin-3a达10天。在一些实施方案中,每天

以约14mg/m²的剂量施用nutlin-3a达10天。在一些实施方案中,每天以约13mg/m²的剂量施用nutlin-3a达10天。在一些实施方案中,每天以约12mg/m²的剂量施用nutlin-3a达10天。在一些实施方案中,每天以约11mg/m²的剂量施用nutlin-3a达10天。在一些实施方案中,每天以约10mg/m²的剂量施用nutlin-3a达10天。在一些实施方案中,每天以约9mg/m²的剂量施用nutlin-3a达10天。在一些实施方案中,每天以约8mg/m²的剂量施用nutlin-3a达10天。在一些实施方案中,每天以约7mg/m²的剂量施用nutlin-3a达10天。在一些实施方案中,每天以约6mg/m²的剂量施用nutlin-3a达10天。在一些实施方案中,每天以约5mg/m²的剂量施用nutlin-3a达10天。在一些实施方案中,每天以约4mg/m²的剂量施用nutlin-3a达10天。在一些实施方案中,每天以约3mg/m²的剂量施用nutlin-3a达10天。在一些实施方案中,每天以约2mg/m²的剂量施用nutlin-3a达10天。在一些实施方案中,每天以约1mg/m²的剂量施用nutlin-3a达10天。在一些实施方案中,每天以约0.75mg/m²的剂量施用nutlin-3a达10天。在一些实施方案中,每天以约0.5mg/m²的剂量施用nutlin-3a达10天。在一些实施方案中,每天以约0.25mg/m²的剂量施用nutlin-3a达10天。在一些实施方案中,每天以约0.1mg/m²的剂量施用nutlin-3a达10天。在一些实施方案中,每天以约0.01mg/m²的剂量施用nutlin-3a达10天。在某些实施方案中,以上述剂量施用nutlin-3a达5、6、7、8、9、11、12、13或14天。

[0224] 衰老相关疾病或病症

[0225] 本文提供了用于治疗与细胞衰老有关、相关或由其引起的病状、疾病或病症的方法,其包括有需要的受试者的年龄相关的疾病或病症。衰老相关疾病或病症在本文还可以被称为衰老细胞相关疾病或病症。衰老相关疾病或病症包括例如,心血管疾病和病症、炎症性疾病和病症、自身免疫性疾病和病症、肺疾病和病症、眼疾病和病症、代谢疾病和病症、神经系统疾病和病症(例如,神经变性疾病和病症);由衰老引起的年龄相关的疾病和病症;皮肤病状;年龄相关的疾病;皮肤疾病和病症;和移植相关的疾病和病症。老化的突出特征是在分子、细胞、组织和生物水平上发生的功能逐渐丧失或退化。年龄相关的退化引起公认的病理,如肌肉萎缩、动脉粥样硬化和心力衰竭、骨质疏松症、肺动脉瓣关闭不全、肾功能衰竭、神经变性(包括黄斑变性、阿尔茨海默病和帕金森病)和许多其他疾病。尽管不同的哺乳动物物种对于特定年龄相关的病理的易感性不同,但是总体来说,年龄相关的病理学通常从物种特异性寿命的大致中点(例如,对于人类是50-60岁)开始按近似指数动力学升高(参见,例如,Campisi, *Annu. Rev. Physiol.* 75:685-705 (2013); Naylor等人, *Clin. Pharmacol. Ther.* 93:105-16 (2013))。

[0226] 根据本文所述方法可通过施用本文所述任意一种衰老清除剂治疗的衰老相关病状、病症或疾病的实例包括认知疾病(例如,轻度认知障碍(MCI)、阿尔茨海默病和其他痴呆;亨廷顿病);心血管疾病(例如,动脉粥样硬化、心脏舒张功能障碍、主动脉瘤、心绞痛、心律失常、心肌病、充血性心力衰竭、冠状动脉疾病、心肌梗死、心内膜炎、高血压、颈动脉疾病、周围血管疾病、心脏应激抗性、心肌纤维化);代谢疾病和病症(例如,肥胖、糖尿病、代谢综合征);运动功能疾病和病症(例如,帕金森病、运动神经元功能障碍(MND);亨廷顿病);脑血管疾病;肺气肿;骨关节炎;良性前列腺肥大;肺疾病(例如,特发性肺纤维化、慢性阻塞性肺病(COPD)、肺气肿、阻塞性细支气管炎、哮喘);炎症/自身免疫性疾病和病症(例如,骨关节炎、湿疹、银屑病、骨质疏松症、粘膜炎、移植相关的疾病和病症);眼疾病或病症(例如,年龄相关的黄斑变性、白内障、青光眼、视力减退、老视);糖尿病性溃疡;转移;化学疗法副作

用、放射疗法副作用；老化相关的疾病和病症（例如，脊柱后凸、肾功能不全、虚弱、脱发、听力损伤、肌肉疲劳、皮肤病状、肌肉萎缩和椎间盘突出）和由衰老引起的其他年龄相关的疾病（例如，由辐照、化学疗法、吸用烟草、食用高脂肪/高糖饮食和环境因素导致的疾病/病症）；伤口愈合；皮肤痣；纤维化疾病和病症（例如，囊性纤维化、肾纤维化、肝纤维化、肺纤维化、口腔粘膜下纤维化、心肌纤维化和胰纤维化）。在某些实施方案中，可将以上或本文所述疾病或病症中的任何一种或多种排除在外。

[0227] 在更特定的实施方案中，提供了用于通过施用衰老清除剂杀死与患有所述疾病或病症的受试者的疾病或病症相关的衰老细胞（即，已确定的衰老细胞）来治疗衰老相关疾病或病症的方法，其中所述疾病或病症是骨关节炎；特发性肺纤维化；慢性阻塞性肺病（COPD）或动脉粥样硬化。

[0228] 可受益于包括施用衰老清除剂的本文所述方法的使用的受试者（即，患者、个体（人或非人动物））包括也可能患有癌症的那些受试者。通过这些方法治疗的受试者可以被认为是部分或完全缓解（也被称为癌症缓解）。如本文详细讨论的，在选择性杀死衰老细胞的方法中使用的衰老清除剂不是旨在用作癌症的治疗，也就是说，并不是以统计学上显著的方式杀死或破坏癌细胞的方式使用。因此，本文公开的方法不涵盖以将被认为是治疗癌症的首选疗法的方式使用衰老清除剂。虽然不以足以被认为是首选癌症疗法的方式单独地或与其他化学疗法或放射疗法药剂一起使用衰老清除剂，但是可以以对于抑制转移有用的方式（例如，短期疗程）使用本文所述的方法和衰老清除剂。在其他某些实施方案中，有待采用衰老清除剂治疗的受试者没有患癌症（即，该受试者未被医学领域的技术人员诊断为患有癌症）。

[0229] 心血管疾病和病症。在另一个实施方案中，本文所述方法治疗的衰老相关疾病或病症是心血管疾病。心血管疾病可以是心绞痛、心律失常、动脉粥样硬化、心肌病、充血性心力衰竭、冠状动脉疾病（CAD）、颈动脉疾病、心内膜炎、心脏病发作（冠状动脉血栓形成、心肌梗死[MI]）、高血压（high blood pressure）/高血压（hypertension）、主动脉瘤、脑动脉瘤、心肌纤维化、心脏舒张功能障碍、高胆固醇血症/高脂血症、二尖瓣脱垂、周围血管疾病（例如，外周动脉疾病（PAD））、心脏应激抗性和中风中的任意一种或多种。

[0230] 在某些实施方案中，提供了用于治疗与动脉硬化（即，动脉的硬化）相关或由其引起的衰老相关心血管疾病的方法。心血管疾病可以是动脉粥样硬化（例如，冠状动脉疾病（CAD）和颈动脉疾病）；心绞痛、充血性心力衰竭和周围血管疾病（例如，外周动脉疾病（PAD））中的任意一种或多种。用于治疗与动脉硬化相关或由其引起的心血管疾病的方法可降低发生高血压（high blood pressure）/高血压（hypertension）、心绞痛、中风和心脏病发作（即，冠状动脉血栓形成、心肌梗死（MI））的可能性。在某些实施方案中，提供了使受试者的血管（例如，动脉）中粥样硬化斑块稳定的方法，从而推迟了血栓形成事件如中风或MI的发生或降低其发生的可能性。在某些实施方案中，包括施用衰老清除剂的这些方法降低（即，引起减少）所述受试者的血管（例如，动脉）中粥样硬化斑块的脂质含量，和/或增加纤维帽厚度（即，导致增强、强化或促进纤维帽的增厚）。

[0231] 动脉粥样硬化的特征在于侵占中型动脉和大动脉的管腔的补丁状的内膜斑块（粥样斑）；所述斑块含有脂质、炎性细胞、平滑肌细胞和结缔组织。动脉粥样硬化可侵袭大动脉和中型动脉（包括冠状动脉、颈动脉和脑动脉）、主动脉和它的分支以及骨端的主要动脉。动

脉粥样硬化的特征在于侵占中型动脉和大动脉的管腔的补丁状的内膜斑块(粥样斑);所述斑块含有脂质、炎性细胞、平滑肌细胞和结缔组织。

[0232] 在一个实施方案中,提供了用于通过施用衰老清除剂抑制粥样硬化斑块形成(或降低、减少、导致减小粥样硬化斑块的形成)的方法。在其他的实施方案中,提供了用于降低(减小、减少)斑块的量(即,水平)的方法。例如,可通过所述斑块的表面积的减小或通过血管(例如,动脉)阻塞的范围和程度(例如,百分比)的减小来确定血管(例如,动脉)中斑块的降低量,这可通过血管造影术或心血管领域中使用的其他可视化方法来确定。本文还提供了用于增强(或改善、促进、强化稳定性)在受试者的一个或多个血管(例如,一个或多个动脉)中存在的粥样硬化斑块的稳定性的方法,所述方法包括向该受试者施用任何一种本文所述的衰老清除剂。

[0233] 动脉粥样硬化通常被称为动脉的“硬化”或积垢,并且它是由动脉内多个粥样斑块的形成引起的。动脉粥样硬化(在本文和本领域也被称为动脉硬化性血管病或ASVD)是动脉壁增厚的动脉硬化的一种形式。当所述斑块的生长或破裂降低或阻碍血液流动时形成症状;并且所述症状可根据哪个动脉受到侵袭而变化。粥样硬化斑块可以是稳定的或不稳定的。稳定的斑块退化、保持静止或缓慢地有时经历数十年的生长,直到它们可能引起狭窄或阻塞。不稳定的斑块易受到自发的侵蚀、裂隙或破裂的影响,这早在它们引起在血流动力学上显著的狭窄之前引起急性血栓形成、阻塞和梗死形成。大多数临床事件由不稳定的斑块导致,它们在血管造影术上看似并不严重;因此,斑块稳定化可以是降低发病率和死亡率的一种方法。斑块破裂或侵蚀可导致主要的心血管事件如急性冠状动脉综合征和中风(参见,例如,Du等人,BMC Cardiovascular Disorders 14:83 (2014);Grimm等人,Journal of Cardiovascular Magnetic Resonance 14:80 (2012))。发现瓦解的斑块具有较高含量的脂质、巨噬细胞并且具有比完整斑块薄的纤维帽(参见,例如,Felton等人,Arteriosclerosis,Thrombosis,and Vascular Biology 17:1337-45 (1997))。

[0234] 动脉粥样硬化是主要由动脉壁中白细胞的慢性炎症反应引起的侵袭动脉血管的综合征。该综合征在不通过功能性高密度脂蛋白(HDL)从巨噬细胞中充分去除脂肪和胆固醇的情况下由低密度脂蛋白(LDL,携带胆固醇和甘油三酯的血浆蛋白)促进。动脉粥样硬化的最早的可见病变是“脂肪纹”,它是动脉的内膜层中负载脂质的泡沫细胞积累。动脉粥样硬化的特点是粥样硬化斑块,它是所述脂肪纹的演变并且具有三种主要组分:脂质(例如,胆固醇和甘油三酯);炎性细胞和平滑肌细胞;和可含有在组织化的不同阶段的血栓和钙沉积物的结缔组织基质。在最外部的和最老的斑块内,可发现来自死亡细胞的钙和其他结晶组分(例如,微钙化)。微钙化和与其相关的性质也被认为通过增加斑块应力而有助于斑块不稳定性(参见,例如,Bluestein等人,J.Biomech. 41 (5):1111-18 (2008);Cilla等人,Journal of Engineering in Medicine 227:588-99 (2013))。脂肪纹降低动脉壁的弹性,但是在数年内可能不影响血液流动,因为动脉肌肉壁通过在斑块的位置处的扩大而适应。富含脂质的粥样斑具有斑块破裂和血栓形成增加的风险(参见,例如,Felton等人,上述;Fuster等人,J.Am.Coll.Cardiol. 46:1209-18 (2005))。报道发现在所有的斑块组分中脂质核显示出最高的血栓形成活性(参见,例如,Fernandez-Ortiz等人,J.Am.Coll.Cardiol. 23:1562-69 (1994))。在晚期疾病中的主要动脉内,壁硬化(stiffening)还可最终增加脉压。

[0235] 易损斑块可导致血栓形成事件(中风或MI),并且有时被描述为由薄的纤维帽覆盖的巨大柔软的脂质池(参见,例如,Li等人,Stroke37:1195-99(2006);Trivedi等人,Neuroradiology 46:738-43(2004))。晚期粥样硬化斑块的晚期特征是由炎性细胞、细胞外脂质(粥样斑)和纤维组织(硬化)使动脉内膜不规则增厚(参见,例如,Newby等人,Cardiovasc.Res.345-60(1999))。认为纤维帽形成是由于血管平滑肌细胞的迁移和增殖以及由于基质沉积而发生的(参见,例如,Ross,Nature 362:801-809(1993);Sullivan等人,J.Angiology at dx.doi.org/10.1155/2013/592815(2013))。薄的纤维帽有助于所述斑块的不稳定性和增加破裂的风险(参见,例如,Li等人,上述)。

[0236] 在动脉硬化斑块中可发现促炎性巨噬细胞(M1)和抗炎性巨噬细胞(M2)两者。这两种类型对斑块不稳定性的贡献是活跃研究的课题,其中结果表明M1类型相对于M2类型的增加的水平与斑块的增加的不稳定性相关联(参见,例如,Medbury等人,Int.Angiol.32:74-84(2013);Lee等人,Am.J.Clin.Pathol.139:317-22(2013);Martinet等人,Cir.Res.751-53(2007))。

[0237] 可使用心血管疾病领域已知的标准诊断方法鉴定患有心血管疾病的受试者。通常,动脉粥样硬化和其他心血管疾病的诊断基于患者的症状(例如,胸痛或胸闷(心绞痛)、臂和腿的麻木或乏力、讲话困难或言语不清、面部肌肉下垂、腿痛、高血压、肾衰竭和/或勃起功能障碍)、病史和/或身体检查。可通过血管造影术、超声波检查法或其他影像学检查来证实诊断。具有形成心血管疾病风险的受试者包括具有易感因素中的任意一种或多种如心血管疾病的家族史的那些受试者以及具有其他危险因素(即,易感因素)如高血压、血脂异常、高胆固醇、糖尿病、肥胖和吸烟、久坐的生活方式以及高血压的那些受试者。在某个实施方案中,作为衰老细胞相关疾病/病症的心血管疾病是动脉粥样硬化。

[0238] 医学和临床领域技术人员可以容易地确定用于治疗或预防(即,降低或减小发生或形成的可能性)心血管疾病(例如,动脉粥样硬化)的一种或多种衰老清除剂的效果。诊断方法(包括身体检查、临床症状的评估和监测)和进行本文所述和本领域实施的分析试验以及方法(例如,血管造影术、心电描记术、应激试验、非应激试验)之一或其任何组合可用于监测受试者的健康状况。可以使用本领域已知的技术分析衰老清除剂或包含衰老清除剂的药物组合物的治疗效果,如比较已接受所述治疗的患有心血管疾病或具有心血管疾病风险的受试者的症状与未治疗或具有安慰剂治疗的患者的那些症状。

[0239] 炎性和自身免疫性疾病和病症。在某些实施方案中,衰老相关疾病或病症为可根据包括施用衰老清除剂的本文所述方法治疗或预防(即,降低发生的可能性)的炎性疾病或病症,例如举非限制性实例而言,骨关节炎。可通过施用衰老清除剂如本文所述的抑制剂和拮抗剂治疗的其他炎性或自身免疫性疾病或病症包括骨质疏松、银屑病、口腔粘膜病、类风湿性关节炎、炎性肠病、湿疹、脊柱后凸、椎间盘突出,以及肺病、COPD和特发性肺纤维化。

[0240] 骨关节炎变性关节病的特征在于高机械应力部位处软骨的原纤维化(fibrillation)、骨硬化,以及滑膜和关节囊变厚。原纤维化是软骨浅层的分解(splitting)的局部表面组织破坏(disorganization)。早期的分解与软骨表面呈切向,沿着主要胶原束的轴。软骨内的胶原变得错乱,并且软骨表面失去蛋白聚糖。在关节中没有蛋白聚糖的保护和润滑作用的情况下,胶原纤维变得易于降解,并且接着发生机械破坏。发展出骨关节炎的诱发风险因素包括年龄增加、肥胖、先前关节损伤、关节过度使用、大腿肌肉

无力和遗传。它是老年人中慢性残疾的常见原因。骨关节炎的症状包括不活动或过度使用之后的疼痛或关节僵硬(特别是臀部、膝盖和下背部);运动后消失的休息后僵硬;以及活动后或接近一天结束时更剧烈的疼痛。骨关节炎还经常影响颈部,小手指关节,拇指、踝和大脚趾的根部。

[0241] 慢性炎症被认为是导致骨关节炎的主要的年龄相关因素。与老化组合起来,关节过度使用和肥胖似乎会促进骨关节炎。

[0242] 意外地,通过选择性地杀死衰老细胞,衰老清除剂防止(即,降低发生的可能性)、减少或抑制关节中蛋白聚糖的损失或消蚀、减少受影响关节中的炎症,并促进(即,刺激、增强、诱导)胶原(例如,2型胶原)的产生。衰老细胞的去除导致关节中产生的炎症因子如IL-6的量(即,水平)降低,因此炎症减轻。本文提供了通过向受试者施用至少一种衰老清除剂(其可以与至少一种药学上可接受的赋形剂组合以形成药物组合物)来治疗骨关节炎、选择性地杀死受试者的骨关节炎关节中的衰老细胞和/或诱导有需要的受试者的关节中胶原(如2型胶原)产生的方法。衰老清除剂还可用于减少(抑制、降低)降解关节中的胶原的金属蛋白酶13(MMP-13)的产生,以及用于恢复蛋白聚糖层或抑制蛋白聚糖层的损失和/或降解。由此,用衰老清除剂治疗还防止(即,降低发生的可能性)、抑制或减少消蚀,或减缓(即,降低速率)骨的消蚀。如本文中详细描述,在某些实施方案中,衰老清除剂直接施用至骨关节炎关节(例如,通过关节内、局部、经皮、皮内或皮下递送)。用衰老清除剂治疗还可恢复、改善或抑制关节强度的恶化。此外,包括施用衰老清除剂的方法可减轻关节疼痛,因此对骨关节炎关节的疼痛控制是有用的。

[0243] 医学和临床领域的技术人员可以很容易地确定一种或多种衰老清除剂用于治疗或预防受试者的骨关节炎的有效性以及对接受一种或多种衰老清除剂的受试者的监测。诊断方法的一种或任意组合可用于监测受试者的健康状态,该诊断方法包括体检(如确定受影响关节的压痛、肿胀或发红)、临床症状(如疼痛、僵硬、可动性)的评价和监测、本文所述和本领域实践的分析试验和方法的表现(例如,确定炎症因子或趋化因子的水平;用来确定如通过关节中骨之间的间隙变窄示出的软骨损失的X射线图像;提供包括软骨在内的骨和软组织的详细图像的磁共振成像(MRI))。可通过将已接受治疗的罹患炎症性疾病或病症如骨关节炎或存在其风险的患者症状与未接受这种治疗或接受安慰剂治疗的患者症状进行比较来分析一种或多种衰老清除剂的治疗效果。

[0244] 在某些实施方案中,衰老清除剂可用于治疗和/或预防(即,减少或降低发生的可能性)类风湿性关节炎(RA)。类风湿性关节炎(RA)的特征在于先天性和适应性免疫应答的调节异常,是一种自身免疫性疾病,并且其发病率随着年龄而增加。类风湿性关节炎是一种通常影响手和足中的小关节的慢性炎症病症。骨关节炎至少部分由关节的磨损造成,而类风湿性关节炎影响关节的内衬(lining),导致可能引起骨消蚀和关节变形的疼痛肿胀。RA有时还可能影响身体的其他器官,如皮肤、眼睛、肺和血管。RA可出现在任何年龄的受试者中;但是,RA通常在40岁以后开始发展。该病症在女性中更为常见。在本文所述的方法的某些实施方案中,RA被排除在外。

[0245] 慢性炎症还可导致其他年龄相关或老化相关的疾病和病症,如脊柱后凸和骨质疏松。脊柱后凸是脊柱的严重弯曲,并且其经常与正常和过早老化一起被观察到(参见,例如,Katzman等人,(2010) J.Orthop.Sports Phys.Ther.40:352-360)。年龄相关的脊柱后凸通

常在骨质疏松弱化脊柱骨达到其破裂和压缩的点之后出现。少数种类的脊柱后凸见于婴儿或青少年。严重的脊柱后凸可影响肺、神经和其他组织及器官,导致疼痛及其他问题。脊柱后凸与细胞衰老有关。对衰老清除剂治疗脊柱后凸的能力的表征可以在本领域中使用的临床前动物模型中确定。举例来说,TTD小鼠发展出脊柱后凸(参见,例如,de Boer等人,(2002) *Science* 296:1276-1279);可使用的其他小鼠包括BubR1^{H/H}小鼠,其也已发展出脊柱后凸(参见,例如,Baker等人,(2011) *Nature* 479:232-36)。随时间目测脊柱后凸的形成。可通过经由例如SA- β -Gal染色检测一种或多种衰老细胞相关的标志物的存在来确定通过衰老清除剂治疗降低的衰老细胞水平。

[0246] 骨质疏松是一种进行性骨病,其特征在于骨质量和密度的降低,可导致骨折的风险增加。骨矿物质密度(BMD)降低,骨微结构恶化,并且骨中蛋白质的量和多样性改变。通常通过骨矿物质密度检测来诊断和监测骨质疏松。绝经后女性或雌激素减少的女性是风险最大的。超过75岁的男性和女性都存在风险,但女性发展为骨质疏松的可能性是男性的两倍。可通过经由例如SA- β -Gal染色检测一种或多种衰老细胞相关的标志物的存在来确定通过衰老清除剂治疗降低的衰老细胞水平。

[0247] 在其他实施方案中,可通过本文所述的衰老清除剂治疗或预防(即,降低发生的可能性)的炎性/自身免疫性病症包括肠易激综合征(IBS)和炎性肠病,如溃疡性结肠炎和克罗恩病。炎性肠病(IBD)涉及部分或全部消化道的慢性炎症。除了由IBD导致的危及生命的并发症外,该疾病可能是疼痛和使人虚弱的。溃疡性结肠炎是一种导致部分消化道中长期炎症的炎性肠病。症状通常随时间发展,而非突发。溃疡性结肠炎通常仅影响大肠(结肠)和直肠的最内层内衬。克罗恩病是一种在沿着消化道衬里的任何位置导致炎症的炎性肠病,并且通常延伸深入受影响的组织中。这可以导致腹痛、严重腹泻和营养不良。由克罗恩病引起的炎症可以累及消化道的不同区域。该疾病的诊断和监测根据本领域中常规实施的方法和诊断试验进行,包括血液检验、结肠镜检查、可屈性乙状结肠镜检查、钡灌肠、CT扫描、MRI、内窥镜检查和小肠成像。

[0248] 在其他实施方案中,本文所述的方法可以对治疗患有椎间盘突出的受试者有用。具有突出的椎间盘的受试者表现出血液和血管壁中细胞衰老的存在增加(参见,例如,Roberts等人,(2006) *Eur. Spine J.* 15 Suppl 3: S312-316)。椎间盘突出的症状可包括疼痛、麻木或麻刺感,或手臂或腿的虚弱。在老化和退化的椎间盘组织中也发现了促炎性分子和基质金属蛋白酶水平的升高,表明其对衰老细胞的作用(参见例如,Chang-Qing等人,(2007) *Ageing Res. Rev.* 6: 247-61)。可使用动物模型表征衰老清除剂在治疗椎间盘突出中的有效性;通过压缩和升高的椎间盘强度在小鼠中诱发椎间盘的退化(参见例如,Lotz等人,(1998) *Spine (Philadelphia Pa. 1976)* .23:2493-506)。

[0249] 可通过使用衰老清除剂治疗或预防(即,降低发生的可能性)的其他炎性或自身免疫性疾病包括湿疹、银屑病、骨质疏松和肺病(例如,慢性阻塞性肺病(COPD)、特发性肺纤维化(IPF)、哮喘)、炎性肠病以及粘膜病(包括口腔粘膜病,其在某些情况下是由辐射诱导的)。器官的某些纤维化或纤维化病况如肾纤维化、肝纤维化、胰纤维化、心脏纤维化、皮肤伤口愈合和口腔粘膜下纤维化可使用衰老清除剂来治疗。

[0250] 在某些实施方案中,衰老细胞相关的病症为可根据包括施用衰老清除剂的本文所述方法治疗或预防(即,降低发生的可能性)的皮肤炎性病症,例如举非限制性实例而言,银

屑病和湿疹。银屑病的特征在于异常大量和快速的皮肤表皮层生长。银屑病的诊断通常基于皮肤的外观。银屑病的典型皮肤特征为红色鳞状斑、丘疹,或可能疼痛和瘙痒的皮肤斑块。在银屑病中,观察到多种促炎细胞因子如SASP的关键组分IL-6的皮肤过表达和全身过表达。湿疹是皮肤的炎症,其特征发于发红、皮肤肿胀、瘙痒和干燥、结痂、剥落、起泡、开裂、渗出或出血。医学或临床领域的技术人员可以很容易地确定衰老清除剂用于治疗银屑病和湿疹的有效性以及对接受这种衰老清除剂的受试者的监测。诊断方法的一种或任意组合包括体检(如皮肤外观)、临床症状(如瘙痒、肿胀和疼痛)的评价或监测,以及本文所述和本领域实施的分析试验和方法的表现(即,确定促炎细胞因子的水平)。

[0251] 可使用衰老清除剂治疗或预防(即,降低发生的可能性)的其他免疫疾病或病况包括由宿主对器官移植物(例如,肾、骨髓、肝、肺或心脏移植物)的免疫应答导致的状况,如移植器官的排斥。衰老清除剂可用于治疗移植物抗宿主病或降低其发生的可能性。

[0252] 肺部疾病和病症。在一个实施方案中,提供了通过经由施用衰老清除剂杀死患有疾病或病症的受试者中与该疾病或病症有关的衰老细胞(即,确定的衰老细胞)来治疗或预防(即,降低发生的可能性)为肺部疾病或病症的衰老相关疾病或病症的方法。衰老相关的肺部疾病和病症包括例如特发性肺纤维化(IPF)、慢性阻塞性肺疾病(COPD)、哮喘、囊性纤维化、支气管扩张和肺气肿。

[0253] COPD是定义为持续性气流不佳的肺疾病,其由肺组织的破坏(肺气肿)和小气道的功能障碍(阻塞性细支气管炎)导致。COPD的主要症状包括呼吸短促、气喘、胸闷、慢性咳嗽和过量的痰产生。来自香烟烟雾激活的嗜中性粒细胞和巨噬细胞的弹性蛋白酶使肺泡结构的细胞外基质分解,从而导致空气空间增大和呼吸容量的损失(参见,例如,Shapiro等人,Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.32,367-372(2005))。COPD最常由烟草烟雾(包括香烟烟雾、雪茄烟雾、二手烟、烟斗烟雾)、职业性暴露(例如,暴露于粉尘、烟雾或烟气)和污染引起,经数十年发生,由此暗示老化是发展为COPD的风险因素。

[0254] 引起肺损伤涉及的过程包括例如由烟草烟雾中高浓度自由基产生的氧化应激;由于对气道中刺激物的炎症反应引起的细胞因子释放;以及烟草烟雾和自由基对于抗蛋白酶的酶的损害,从而使得蛋白酶伤害肺部。遗传易感性也可有助于该疾病。在约1%的患有COPD的人中,该疾病由导致肝脏中 α -1-抗胰蛋白酶产生水平较低的遗传病引起。该酶通常被分泌至血流中,以帮助保护肺部。

[0255] 肺纤维化是一种慢性和进行性肺病,其特征发于肺的硬化和结疤,这可能导致呼吸衰竭、肺癌和心力衰竭。纤维化与上皮的修复有关。成纤维细胞被激活,细胞外基质蛋白的产生增加,并且向可收缩肌成纤维细胞的转分化(transdifferentiation)有助于伤口收缩。临时的基体堵塞该受伤的上皮并为上皮细胞迁移提供支架,涉及上皮-间充质转化(EMT)。与上皮损伤有关的失血诱导血小板激活、生长因子产生和急性炎症反应。通常,上皮屏障愈合并且炎症反应消退。然而,在纤维化疾病中,成纤维细胞反应继续,导致未消退的伤口愈合。成纤维细胞病灶的形成是该疾病的特征,反映出持续性纤维发生的位置。正如其名称所蕴含的,IPF的病因学是未知的。根据疾病的发生率随年龄增加以及IPF患者中的肺组织富集有SA- β -Gal-阳性细胞并且含有升高水平的衰老标志物p21的观察,表明细胞衰老与IPF有关(参见,例如,Minagawa等人,Am.J.Physiol.Lung Cell.Mol.Physiol.300:L391-L401(2011);还参见,例如,Naylor等人,同上)。短的端粒是对IPF和细胞衰老二者常见的风

险因素(参见,例如,Alder等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 105:13051-56(2008))。不希望被理论约束,根据衰老细胞的SASP组分如IL-6、IL-8和IL-1 β 促进成纤维细胞向肌成纤维细胞分化和上皮-间充质转变,从而导致肺泡和间质间隙的细胞外基质的大量重塑的报道,暗示了细胞衰老对IPF的贡献(参见,例如,Minagawa等人,同上)。

[0256] 存在发展为肺纤维化风险的受试者包括暴露于环境或职业性污染物的那些,如石棉肺和矽肺;吸烟的受试者;患有一些典型的结缔组织疾病如类风湿性关节炎、SLE和硬皮病的受试者;患有累及结缔组织的其他疾病如结节病和韦格纳肉芽肿的受试者;患有感染的受试者;使用某些药物(例如,胺碘酮、博来霉素、白消安、氨甲蝶呤和呋喃妥因)的受试者;接受对胸部的放疗的受试者;以及家庭成员患有肺纤维化的那些受试者。

[0257] COPD的症状可包括以下的任一种:呼吸短促,特别是身体活动时;气喘;胸闷;由于肺中过量的黏液,早晨第一件事必须清理喉咙;产生可以为透明、白色、黄色或浅绿色的痰液的慢性咳嗽;口唇或指甲床发蓝(发绀);频繁的呼吸系统感染;精神不振;非有意的体重减轻(在疾病的后期观察到)。患有COPD的受试者还可经历加重,其间症状恶化并持续数日或更长。肺纤维化的症状是本领域已知的,并且包括呼吸短促,特别是运动时;干咳;快而浅的呼吸;逐步非有意的体重减轻;疲劳;关节和肌肉疼痛;以及杵状肥大(手指或脚趾尖的变宽和变圆)。

[0258] 可使用本领域中常规实践的标准诊断方法鉴别罹患COPD或肺纤维化的受试者。可使用常用于诊断的方法监测施用至患有或存在发展为肺病的风险的受试者的一种或多种衰老清除剂的效果。通常,可以进行以下检查或测试的一种或多种:体检、患者的病史、患者的家族病史、胸部x线、肺功能试验(如肺量测定法)、血液检验(例如,动脉血气分析)、支气管肺泡灌洗、肺活检、CT扫描和运动试验。

[0259] 可通过使用衰老清除剂治疗的其他肺部疾病或病症包括例如肺气肿、哮喘、支气管扩张和囊性纤维化(参见,例如,Fischer等人,Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.304(6):L394-400(2013))。这些疾病还可以被烟草烟雾(包括香烟烟雾、雪茄烟雾、二手烟、烟斗烟雾)、职业性暴露(例如,暴露于粉尘、烟雾或烟气)、感染和/或诱导细胞进入衰老并由此造成炎症的污染物加重。肺气肿有时被认为是COPD的亚组。

[0260] 支气管扩张是由导致气道变宽并变得松弛和有疤痕的气道损伤造成的。支气管扩张通常由损害气道壁或抑制气道清除黏液的医学病况引起。这样的病况的实例包括囊性纤维化和原发性纤毛运动障碍(PCD)。当只有一部分的肺受到影响时,该病症可能是由堵塞而不是医学病况导致的。

[0261] 用于治疗或预防(即,降低发生的可能性)衰老相关肺部疾病或病症的本文所述的方法还可用于治疗正在老化并具有肺功能丧失(或退化)(即,与较年轻的受试者相比肺功能降低或受损)以及/或者肺组织的退化的受试者。呼吸系统随着年龄经历各种解剖学、生理学和免疫学的变化。该结构变化包括胸壁和胸椎变形,其可损害总的呼吸系统柔顺性,导致呼吸更费力。呼吸系统随着年龄经历结构上、生理学和免疫学的变化。与年轻的成年人相比,年老的成年人的支气管肺泡灌洗液(BAL)中可发现比例增加的嗜中性粒细胞和较低百分比的巨噬细胞。下呼吸道的持续低度炎症可对肺基质造成蛋白水解和氧化剂介导的损伤,导致肺泡单位的损失以及随老化观察到的跨越肺泡膜的气体交换受损。下呼吸道的持续炎症可使老年人倾向于对毒性环境暴露的易感性增加,以及肺功能下降加速。(参见,例

如,Sharma等人,Clinical Interventions in Aging 1:253-60 (2006))。在老化中,氧化应激使炎症恶化(参见,例如,Brod,Inflamm Res2000;49:561-570;Hendel等人,Cell Death and Differentiation (2010) 17:596-606)。在老化中,氧化还原平衡的改变和氧化应激的增加促使细胞因子、趋化因子和粘附分子以及酶表达(参见,例如,Chung等人,Ageing Res Rev2009;8:18-30)。巨噬细胞、T细胞和肥大细胞的组成型活化和召集促进导致细胞外基质降解、细胞死亡、重塑以及其他事件的蛋白酶的释放,这可以在慢性炎症期间导致组织和器官损伤(参见,例如,Demedts等人,Respir Res 2006;7:53-63)。通过向老龄的受试者(其包括无症状的中年人)施用衰老清除剂,可通过从呼吸道杀死和去除衰老细胞来减缓或抑制肺功能的下降。

[0262] 衰老清除剂的有效性可通过医学和临床领域的技术人员容易地确定。诊断方法的一种或任意组合可用于监控受试者的健康状态,该诊断方法包括体检、临床症状的评价和监测,以及本文所述的分析测试和方法的表现。可使用本领域已知的技术,如将已接受治疗的罹患肺病或存在肺病风险的患者症状与未接受这样的治疗或接收安慰剂治疗的患者症状进行比较来分析衰老清除剂或包含该药剂的药物组合物治疗的效果。此外,可以实施评估肺的机械功能性的方法和技术,例如测量肺容量、弹性和气道超敏反应的技术。为确定肺功能并监测整个治疗中的肺功能,可获得多种量度的任一种,补呼气量(ERV)、用力肺活量(FVC)、用力呼气量(FEV)(例如,一秒内的FEV,FEV1)、FEV1/FEV比、用力呼气流量25%至75%,以及最大随意通气量(MVV)、最大呼气流量(PEF)、慢肺活量(SVC)。肺总容积包括肺总气量(TLC)、肺活量(VC)、残气量(RV)和功能残气量(FRC)。可以使用一氧化碳扩散能力(DLCO)来测量穿过肺泡毛细血管膜的气体交换。还可以测量末梢毛细血管血氧饱和度(SpO₂);正常氧气水平通常在95%与100%之间。低于90%的SpO₂水平表明受试者患有低氧血症。低于80%的值被认为是危险的,并且需要干预以维持大脑和心脏功能并避免心脏或呼吸骤停。

[0263] 神经性疾病和病症。可通过施用本文所述的衰老清除剂治疗的衰老相关疾病或病症包括神经性疾病或病症。这样的衰老相关疾病和病症包括帕金森病、阿尔茨海默病(及其他痴呆症)、运动神经元功能障碍(MND)、轻度认知障碍(MCI)、亨廷顿病,以及眼部的疾病和病症,如年龄相关的黄斑变性。与年龄增加有关的其他眼部疾病为青光眼、视力减退、老视和白内障。

[0264] 帕金森病(PD)是第二大常见的神经变性疾病。它是大脑的失能状态,特征在于行动缓慢(运动徐缓)、摇晃、僵硬,并且在晚期失去平衡。这些症状中许多是由于大脑中某些神经的丧失导致,该丧失导致多巴胺缺乏。此疾病的特征在于神经变性,如黑质致密部中约50%至70%的多巴胺能神经元丧失、纹状体中多巴胺的大量丧失,和/或主要由 α -突触核蛋白和泛素组成的胞质内内含物(路易小体)的存在。帕金森病还具有运动缺陷的特征,如震颤、强直、运动徐缓和/或姿势不稳。存在发展为帕金森病风险的受试者包括具有帕金森病家族史的那些和暴露于杀虫剂(例如,鱼藤酮或百草枯)、除草剂(例如,橙剂)或重金属的那些。产生多巴胺的神经元的衰老被认为是通过产生活性氧物质导致PD中观察到的细胞死亡(参见,例如,Cohen等人,J.Neural Transm.Suppl.19:89-103 (1983));因此,本文所述的方法和衰老清除剂对帕金森病的治疗和预防是有用的。

[0265] 用于检测、监测或定量与帕金森病有关的神经变性缺陷和/或运动缺陷的方法是

本领域已知的,如组织学研究、生化研究和行为评价(参见,例如,美国申请公开号2012/0005765)。帕金森病的症状是本领域已知的,并且包括但不限于开始或结束随意运动困难、抽动、动作僵硬、肌肉萎缩、摇晃(震颤),以及心跳速率变化但正常反射、运动徐缓和姿势不稳。人们越来越认识到,诊断患有帕金森病的人除了其身体症状之外可能具有认知障碍,包括轻度认知障碍。

[0266] 阿尔茨海默病(AD)是神经变性疾病,其显示出缓慢进行性的智力减退,伴随有记忆减退、定向障碍和意识错乱,导致严重痴呆。年龄是发展出AD的唯一最大的诱发风险因素,其是老年人中痴呆的首要原因(参见,例如,Hebert,等人,Arch.Neurol.60:1119-1122(2003))。早期的临床症状与轻度认知障碍(见下文)显示出显著的相似性。随着疾病进展,出现判断力失准、意识混乱、行为改变、定向障碍以及行走和吞咽困难。

[0267] 阿尔茨海默病的特征在于组织学样本中神经原纤维缠结和淀粉样(衰老的)斑块的存在。该疾病主要累及大脑的边缘和皮质区。含有淀粉样前体蛋白(APP)的成淀粉样A β 片段的嗜银斑块散布在整个大脑皮质和海马体上。神经原纤维缠结在主要位于新皮质、海马体和麦纳尔(Meynert)基底核中的锥体神经元中发现。观察到其他变化,如海马体的锥体细胞中的颗粒空泡变性,以及皮质和海马体中的神经元丧失和神经胶质增生。存在发展出阿尔茨海默病风险的受试者包括高龄的那些、具有阿尔茨海默病家族史的那些、具有遗传风险基因(例如,ApoE4)或确定性基因突变(例如,APP、PS1或PS2)的那些,以及具有头部创伤或心脏/血管病史(例如,高血压、心脏病、中风、糖尿病、高胆固醇)的那些。

[0268] 用于评估阿尔茨海默病表型、用于表征治疗剂和评价治疗的一些行为和组织病理学测试是本领域已知的。组织学分析通常在死后进行。可使用硫磺素-S进行A β 水平的组织学分析。刚果红,或抗-A β 染色(例如,4G8、10D5或6E10抗体)将切片的脑组织上的A β 沉积可可视化(参见,例如,Holcomb等人,1998,Nat.Med.4:97-100;Borchelt等人,1997,Neuron19:939-945;Dickson等人,1988,Am.J.Path.132:86-101)。将转基因小鼠中的A β 沉积物可视化的体内方法也已得到描述。BSB((反式,反式)-1-溴-2,5-双-(3-羟基羰基-4-羟基)苯乙烯基苯)和PET示踪物¹¹C-标记的Pittsburgh化合物-B(PIB)与A β 斑块结合(参见,例如,Skovronsky等人,2000,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 97:7609-7614;Klunk等人,2004,Ann.Neurol.55:306-319)。含¹⁹F的亲淀粉样蛋白刚果红型化合物FSB((E,E)-1-氟-2,5-双-(3-羟基羰基-4-羟基)苯乙烯基苯)允许通过MRI将A β 斑块可视化(参见,例如,Higuchi等人,2005,Nature Neurosci.8:527-533)。放射性标记的、腐胺修饰的淀粉样蛋白- β 肽体内标记阿尔茨海默病的小鼠模型中的淀粉样沉积物(参见,例如,Wengenack等人,2000,Nat.Biotechnol.18:868-872)。

[0269] 由星形胶质细胞而增加的胶质原纤维酸性蛋白(GFAP)是神经变性期间星形胶质激活和胶质增生的标志物。A β 斑块与GFAP阳性的活化星形胶质细胞有关,并且可通过GFAP染色可视化(参见,例如,Nagele等人,2004,Neurobiol.Aging 25:663-674;Mandybur等人,1990,Neurology40:635-639;Liang等人,2010,J.Biol.Chem.285:27737-27744)。神经原纤维缠结可通过使用硫磺素-S荧光显微术和Gallyas银染色的免疫组织化学鉴别(参见,例如,Gotz等人,2001,J.Biol.Chem.276:529-534;美国专利6,664,443)。轴突运输和通过电子显微术的轴突染色研究可用于神经元变性(参见,例如,Ishihara等人,1999,Neuron 24:751-762)。

[0270] 可使用针对阿尔茨海默病的本领域已知的标准诊断方法来鉴别罹患阿尔茨海默病的受试者。通常,阿尔茨海默病的诊断是基于患者的症状(例如,记忆功能进行性下降、正常活动的逐步放弃和受挫、冷漠、躁动或易怒、攻击性、焦虑、睡眠障碍、心烦、异常运动行为、去抑制、社交退缩、食欲下降、幻觉、痴呆)、病史、神经心理学测试、神经和/或身体检查。还可以测试脑脊髓液中与阿尔茨海默病理学有关的多种蛋白质,包括tau、淀粉样β肽和AD7C-NTP。基因测试也可用于早发性家族性阿尔茨海默病(eFAD)、常染色体显性遗传性疾病。临床基因测试可用于具有AD症状的个体或具有早发型疾病患者的风险家族成员。在美国,可根据临床实验室改进修正案,在临床或联邦政府批准的临床实验室中测试PS2的突变和APP。PS1突变的商业测试也是可用的(Elan Pharmaceuticals)。

[0271] 医学和临床领域的专业人员可以很容易地确定本文所述的一种或多种衰老清除剂的有效性和对接受一种或多种衰老清除剂的受试者的监测。包括体检在内的诊断方法的一种或任意组合、临床症状的评价和监测,以及本文所述的分析检测和方法的表现,可用于监控受试者的健康状态。可使用本领域已知的技术,如将已接受治疗的罹患阿尔茨海默病或存在阿尔茨海默病风险的患者的症状与未接受这样的治疗或接受安慰剂治疗的患者的症状进行比较来分析施用一种或多种衰老清除剂的效果。

[0272] 轻度认知障碍(MCI)。MCI是一种脑功能综合征,其涉及超过根据个体的年龄和教育而预期的认知障碍的发作和进展,但其显著性不足以干扰该个体的日常活动。MCI是认知老化的一个方面,其被认为是正常老化与其可能转变成的痴呆之间的过渡状态(参见,Pepeu,Dialogues in Clinical Neuroscience 6:369-377,2004)。主要影响记忆的MCI被称为“遗忘型MCI”。患有遗忘型MCI的患者可能开始忘记其之前会很容易记起的重要信息,如最近的事件。遗忘型MCI常见于阿尔茨海默病的前驱期。影响思考技能而不是记忆的MCI被称为“非遗忘型MCI”。此类型的MCI影响思考技能,如作出正确决策、判断完成复杂任务所需的步骤顺序或时间或知视的能力。据信,患有非遗忘型MCI的个体更可能转变成其他类型的痴呆(例如,具有路易氏体的痴呆)。

[0273] 医学领域的人员逐渐认识到,诊断患有帕金森病的人除其体症外还可能患有MCI。最新研究表明,20-30%患有帕金森病的人患有MCI,并且其MCI趋向于为非遗忘型。患有MCI的帕金森病患者有时将进一步发展成全面痴呆(具有痴呆的帕金森病)。

[0274] 用于检测、监测、定量或评价与MCI相关的神经病理学缺陷的方法是本领域已知的,包括星形胶质细胞形态分析、乙酰胆碱释放、用于评价神经变性的银染色,以及用于检测β淀粉样蛋白沉积物的PiB PET成像(参见,例如,美国申请公开号2012/0071468;Pepeu,2004,同上)。用于检测、监测、定量或评价与MCI相关的行为缺陷的方法也是本领域已知的,包括八组径向迷宫范例、非样本匹配任务、水迷宫中的非自我位置确定任务、莫里斯迷宫测试、视觉空间任务以及延迟响应空间记忆任务、嗅觉新颖试验(参见,同上)。

[0275] 运动神经元功能障碍(MND)。MND是一类进行性神经性病症,其破坏运动神经元,即,控制必要随意肌活动如说话、行走、呼吸和吞咽的细胞。根据变性是否影响上运动神经元、下运动神经元或二者来对其进行分类。MND的实例包括但不限于肌萎缩侧索硬化症(ALS),也被称为卢伽雷病(Lou Gehrig's Disease)、进行性延髓麻痹、假性延髓麻痹、原发性侧索硬化、进行性肌萎缩、下运动神经元疾病,和脊髓性肌萎缩(SMA)(例如,SMA1也称为Werdnig-Hoffmann病,SMA2、SMA3也称为Kugelberg-Welander病和肯尼迪病(Kennedy's

disease))、脊髓灰质炎后综合征和遗传性痉挛性截瘫。在成年人中,大多数常见的MND是肌萎缩侧索硬化症(ALS),其同时影响上运动神经元和下运动神经元。其可以影响手臂、腿或面部肌肉。原发性侧索硬化是上运动神经元的疾病,而进行性肌萎缩仅影响脊髓中的下运动神经元。在进行性延髓麻痹中,脑干的最底下的运动神经元受影响最大,导致言语不清以及咀嚼和吞咽困难。手臂和腿中几乎一直存在轻度异常的体征。MND患者展现出帕金森病的表型(例如,具有震颤、强直、运动迟缓和/或姿势不稳)。用于检测、监测或定量与帕金森病相关的运动和/或其他缺陷如MND的方法是本领域已知的(参见,例如,美国申请公开号20120005765)。

[0276] 用于检测、监测、定量或评价与MND相关的运动缺陷和组织病理学缺陷的方法也是本领域已知的,包括组织病理学、生物化学和电生理学研究以及运动活动分析(参见,例如, Rich等人, *J Neurophysiol* 88:3293-3304, 2002; Appel等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 647-51, 1991)。在组织病理学上, MND的特征在于运动神经元的死亡、含有SOD1和泛素的耐去污剂聚集体的进行性积累,以及变性运动神经元中的异常神经丝积累。此外,在病变组织中经常检测到反应性星形神经胶质和小神经胶质。MND患者显示出一种或多种运动缺陷,包括肌无力和萎缩、不可控制的抽搐、痉挛、运动缓慢吃力,以及过度活跃的肌腱反射。

[0277] 眼科疾病和病症:在某些实施方案中,衰老相关的疾病或病症是眼部疾病、病症或病况,例如,老视、黄斑变性或白内障。在某些其他实施方案中,衰老相关的疾病或病症是青光眼。黄斑变性是导致视网膜中央部(被称为黄斑)中感光细胞损失的神经变性疾病。黄斑变性通常被分为两类:干型和湿型。干型比湿型更常见,约90%年龄相关的黄斑变性(ARMD或AMD)患者被诊断患有干型。该疾病的湿型通常导致更严重的视力损失。然而年龄相关黄斑变性的确切病因仍是未知的,衰老的视网膜色素上皮(RPE)细胞数目随年龄增加。年龄和某些遗传因素以及环境因素是发展成ARMD的风险因素(参见,例如, Lyengar等人, *Am. J. Hum. Genet.* 74:20-39 (2004) (Epub 2003 December 19); Kenealy等人, *Mol. Vis.* 10: 57-61 (2004); Gorin等人, *Mol. Vis.* 5:29 (1999))。环境发病诱因包括 ω -3脂肪酸摄入(参见,例如, Christen等人, *Arch Ophthalmol* 129:921-29 (2011)); 雌激素暴露(参见,例如, Feshanich等人, *Arch Ophthalmol* 126(4):519-24 (2008)); 以及维生素D的血清水平提高(参见,例如, Millen, 等人, *Arch Ophthalmol* 129(4):481-89 (2011))。遗传诱发风险因素包括干型AMD患者的眼睛中Dicer1(与微RNA成熟有关的酶)水平降低,而减少的微RNA有助于衰老细胞谱;并且DICER1消融引起早衰(参见,例如, Mudhasani J. *Cell. Biol.* (2008))。

[0278] 干型ARMD与RPE层的萎缩有关,后者导致感光细胞的损失。干型ARMD可能由于黄斑组织老化和变薄以及黄斑中的色素沉积造成。衰老似乎抑制RPE的复制和迁移,导致干型AMD患者的黄斑中RPE永久性耗尽(参见,例如, Iriyama等人, *J. Biol. Chem.* 283:11947-953 (2008))。对于湿型ARMD,新的血管在视网膜下方生长并渗漏出血液和流体。这种非正常渗漏的脉络膜新血管形成导致视网膜细胞死亡,产生中央视觉盲点。黄斑变性的不同形式也可以在年轻患者中发生。非年龄相关病因可能与遗传、糖尿病、营养不足、头部损伤、感染或其他因素有关。

[0279] 被患者或在常规眼睛检查期间被眼科医生注意到的视力下降可能是黄斑变性的最初指征。黄斑的布鲁赫膜下渗出物的形成或“玻璃疣”往往是黄斑变性可能发展的最初体征。症状包括直线感知失真,并且在一些情况下,视野中心似乎比场景的其余部分更加扭

曲;黑暗、模糊区域或“涂白”出现在视野中心;并且/或者色觉变化或减损。患有黄斑变性的受试者的诊断和监测可以由眼科领域的技术人员根据本领域公认的周期性眼部检查程序以及受试者对症状的报告来完成。

[0280] 老视是年龄相关的病况,其中由于正常眼睛的适应速度和幅度随年龄增长而降低,眼睛表现出聚焦近物的能力逐渐降低。晶状体弹性丧失和睫状肌收缩力丧失已被推定为其病因(参见,例如,Heys等人,2004,Mol.Vis.10:956-63;Petrash,2013,Invest.Ophthalmol.Vis.Sci.54:ORSF54-ORSF59)。晶状体前囊和晶状体后囊的机械性能的年龄相关变化提示晶状体后囊的机械强度随着年龄显著降低(参见,例如,Krag等人,Invest.Ophthalmol.Vis.Sci.44:691-96(2003);Krag等人,Invest.Ophthalmol.Vis.Sci.38:357-63(1997))。

[0281] 该囊的层状结构也发生变化,并且至少部分由组织的组成变化造成(参见,例如,Krag等人,1997,同上,及其中引用的参考文献)。晶状体囊的主要结构组分是组织成为三维分子网络的基底膜IV型胶原(参见,例如,Cummings等人,Connect.Tissue Res.55:8-12(2014);Veis等人,Coll.Relat.Res.1981;1:269-86)。IV型胶原由缔合成为异源三聚IV胶原原体的6条同源 α 链($\alpha 1-6$)组成,其中每个原体均包含 $\alpha 112$ 、 $\alpha 345$ 或 $\alpha 556$ 的特定链组合(参见,例如,Khoshnoodi等人,Microsc.Res.Tech.2008;71:357-70)。原体与Gly-X-Y的三肽序列享有三螺旋胶原域的结构相似性(Timpl等人,Eur.J.Biochem.1979;95:255-263),在被称为非胶原1(NC1)域的球状C-末端区中结束。该N-末端由被称为7S域的螺旋域组成(参见,例如,Risteli等人,Eur.J.Biochem.1980;108:239-250),其也涉及原体-原体相互作用。

[0282] 研究揭示,IV胶原影响细胞功能,这是从上皮层下的基底膜的定位以及支持IV胶原在组织稳定化中作用的数据推断出的(参见,例如,Cummings等人,同上)。在白内障手术后的几年中约20-40%的患者中,后囊膜混浊(PCO)将作为并发症发展(参见,例如,Awasthi等人,Arch Ophthalmol.2009;127:555-62)。PCO由沿着后囊的残留晶状体上皮细胞在类似于伤口愈合的响应中的增殖和活性造成(参见,例如,Awasthi等人,Arch Ophthalmol.2009;127:555-62)。生长因子如成纤维细胞生长因子、转化生长因子 β 、表皮生长因子、肝细胞生长因子、胰岛素样生长因子和白介素IL-1和IL-6也可以促进上皮细胞迁移(参见,例如,Awasthi等人,同上;Raj等人,同上)。如上文讨论的,由衰老细胞产生的这些因子和细胞因子有助于SASP。相反,体外研究表明,IV胶原促进晶状体上皮细胞的粘附(参见,例如,Olivero等人,Invest.Ophthalmol.Vis.Sci.1993;34:2825-34)。IV胶原、纤连蛋白和层粘连蛋白向眼内晶状体的粘附抑制细胞迁移并可能降低PCO的风险(参见,例如Raj等人,Int.J.Biomed.Sci.2007;3:237-50)。

[0283] 不希望被任何特定理论约束,通过本文所述的衰老清除剂选择性杀死衰老细胞可减缓或阻碍(延缓、抑制、延迟)IV型胶原网络的结构解体(disorganization)。衰老细胞的去除以及由此SASP的炎性作用的去除可减少或抑制上皮细胞迁移,并且还可延缓(抑制)老视的发作,或降低或减缓病况的逐步加重(如将进展从中度减缓到轻度,或从重度减缓到中度)。本文所述的衰老清除剂还可用于白内障手术后,以降低PCO复发的可能性。

[0284] 虽然没有从人类研究中获得细胞衰老与白内障发展相关的直接证据,但是BubR1亚效等位基因小鼠在生命早期发展出双侧后囊下白内障,暗示着衰老可能起一定作用(参见,例如,Baker等人,Nat.Cell Biol.10:825-36(2008))。白内障是眼睛的晶状体混浊,导

致视力模糊,并且如果不治疗可能导致失明。手术是有效的,并且定期进行手术去除白内障。一种或多种本文所述的衰老清除剂的施用可导致白内障复发的可能性降低,或者可以减缓或抑制白内障的进展。白内障的存在和严重性可通过由眼科领域技术人员使用常规方法进行的眼睛检查来检测。

[0285] 在某些实施方案中,可将至少一种选择性杀死衰老细胞的衰老清除剂施用至处于发展出老视、白内障或黄斑变性风险的受试者。可以在人类受试者至少40岁时开始用衰老清除剂的治疗,以延缓或抑制白内障、老视和黄斑变性的发作或发展。因为几乎所有人发展出老视,在某些实施方案中,可以在人类受试者到达40岁后将衰老清除剂以如本文所述的方法施用至该受试者,以减缓或抑制老视的发作或发展。

[0286] 在某些实施方案中,衰老相关的疾病或病症是青光眼。青光眼是用来描述引起视野损失的一组疾病的广义术语,其往往没有任何其他明显的症状。症状的缺乏常常导致青光眼诊断延误,直到该疾病的末期。即使患有青光眼的受试者也不会变失明,但其视力常常严重受损。通常,透明流体流入和流出被称为前房的眼球前部。在具有广角青光眼的个体中,这种流体排出太慢,导致眼内压增加。如果不治疗,这种高压随后损坏视神经并可能导致完全失明。周边视觉的损失是由视网膜中神经节细胞的死亡引起的。神经节细胞是将眼睛与大脑连接的一种特殊类型的投射神经元。当流体外流所需的细胞网络受到SA- β -Gal染色时,在青光眼患者中观察到衰老增加四倍(参见,例如,Liton等人,Exp.Gerontol.40:745-748(2005))。

[0287] 为了监测疗法对抑制青光眼进展的效果,最广泛使用的技术是标准自动化视野测量(视野检查)。此外,已经开发了用于进展监测的几种算法(参见,例如,Wesselink等人,Arch Ophthalmol.127(3):270-274(2009),以及其中的参考文献)。其他的方法包括前房角镜检查(检查小梁网和液体排出眼睛的角度);成像技术,例如激光断层扫描仪(例如,HRT3)、激光偏振测定(例如,GDX),和眼部相干断层扫描术;检眼镜检查;以及确定角膜中心厚度的测厚仪测量。

[0288] 代谢疾病或病症。可通过施用衰老清除剂治疗的衰老相关疾病或病症包括代谢疾病或病症。此类衰老细胞相关的疾病和病症包括糖尿病、代谢综合征、糖尿病性溃疡和肥胖症。

[0289] 糖尿病的特征在于由于胰岛素产生、胰岛素作用或同时二者的缺陷导致的高水平血糖。成年人中绝大多数(90至95%)糖尿病的诊断案例是2型糖尿病,其特征在于通过胰腺的胰岛素生产逐渐丧失。糖尿病是肾衰竭、非创伤性下肢截肢以及美国成年人中失明新案例的首要原因。糖尿病是心脏病和中风的重要原因,并且在美国是第七大死亡原因(参见,例如,Centers for Disease Control and Prevention,National diabetes fact sheet:national estimates and general information on diabetes and pre-diabetes in the United States,2011(“Diabetes fact sheet”)。本文所述的衰老清除剂可用于治疗2型糖尿病,特别是年龄、饮食和肥胖相关的2型糖尿病。

[0290] 已经揭示,在代谢疾病如肥胖症和2型糖尿病中衰老细胞的参与作为对受伤或代谢功能障碍的响应(参见,例如,Tchkonia等人,Aging Cell19:667-684(2010))。来自肥胖小鼠的脂肪组织显示出衰老标志物SA- β -Gal、p53和p21的诱导(参见,例如,Tchkonia等人,同上;Minamino等人,Nat.Med.15:1082-1087(2009))。在相同的脂肪组织中观察到促炎细胞

因子如肿瘤坏死因子- α 和Ccl2/MCP1的伴随上调(参见,例如,Minamino等人,同上)。因为还暗示着促炎SASP组分有助于2型糖尿病,所以肥胖症中衰老细胞的诱导可能具有临床意义(参见,例如,Tchkonia等人,同上)。衰老标志物和SASP组分的相似模式的上调与小鼠和人中的糖尿病有关(参见,例如,Minamino等人,同上)。因此,包含施用衰老清除剂的本文所述的方法可以对2型糖尿病以及肥胖症和代谢综合征的治疗或预防有用。不希望被理论约束,由此将衰老前脂肪细胞与衰老清除剂接触而杀死衰老前脂肪细胞可以为具有任一种糖尿病、肥胖症或代谢综合征的人提供临床和健康益处。

[0291] 可使用针对2型糖尿病的本领域已知标准诊断方法来鉴别罹患2型糖尿病的受试者。通常,2型糖尿病的诊断基于患者的症状(例如,口渴和尿频增加、饥饿增加、体重减轻、乏力、视力模糊、伤口愈合缓慢或反复感染,以及/或者皮肤变黑的区域)、病史和/或身体检查。处于发展出2型糖尿病风险的受试者包括具有2型糖尿病家族史的人,以及具有其他风险因素如超重、体脂分布、不活跃、种族、年龄、前驱糖尿病和/或妊娠糖尿病的人。

[0292] 衰老清除剂的有效性可通过医学和临床领域的技术人员容易地确定。包括体检在内的诊断方法的一种或任意组合、临床症状的评价和监测,以及分析测试和方法(如本文所述的那些)的表现可用于监控受试者的健康状态。例如,通过确定葡萄糖和胰岛素耐受、能量消耗、身体组成、脂肪组织、骨骼肌,和肝脏炎症,以及/或者脂毒性(肌肉和肝脏脂质通过体内成像测定而肌肉、肝脏、骨髓和胰腺 β 细胞脂质积累和炎症通过组织学测定),监测接受一种或多种本文所述的衰老清除剂以治疗或预防糖尿病的受试者。2型糖尿病的其他特性特征或表型是已知的,并且可以如本文所述的和通过使用本领域已知及常规应用的其他方法和技术进行确定。

[0293] 可将肥胖症和肥胖症相关的病症用于指代体重测量大于相对于其身高和体格(frame)理想体重的受试者病况。身体质量指数(BMI)是用于确定超重体重的测量手段,并且由受试者的身高和体重计算得到。当人具有25-29的BMI时,其被认为是超重的;当人具有30-39的BMI时,其被认为是肥胖的;而当人具有 ≥ 40 的BMI时,其被认为是严重肥胖的。因此,术语肥胖和肥胖相关是指具有超过30、超过35或超过40的身体质量指数值的人类受试者。一类未被BMI概括的肥胖在本领域中被称为“腹型肥胖”,其涉及在受试者的腰部附近发现额外的脂肪,即使与BMI无关,其也是健康的重要因素。腹型肥胖的最简单和最常用的量度是腰围。通常女性的腹型肥胖被定义为腰围35英寸或更大,而在男性中被定义为腰围40英寸或更大。用于确定肥胖的更加复杂的方法需要特殊的设备,如磁共振成像或双能X射线吸收测量机器。

[0294] 一种与糖尿病和衰老有关的病况或病症是糖尿病性溃疡(即,糖尿病创面)。溃疡是皮肤的破损,其可以延伸至涉及皮下组织或甚至是肌肉或骨。这些损伤特别在下肢上出现。患有糖尿病静脉性溃疡的患者表现出在慢性伤口部位处细胞衰老的存在增加(参见,例如,Stanley等人,(2001) J.Vas.Surg.33:1206-1211)。还在慢性伤口部位处观察到慢性炎症,如糖尿病性溃疡(参见,例如,Goren等人,(2006) Am.J.Pathol.7 168:65-77;Seitz等人,(2010) Exp.Diabetes Res.2010:476969),则说明衰老细胞的促炎细胞因子表型对病理学具有作用。

[0295] 患有2型糖尿病或处于发展出2型糖尿病的风险的受试者可能患有代谢综合征。人的代谢综合征通常与肥胖症有关,并且其特征在于心血管疾病、肝脏脂肪变性、高血脂、糖

尿病和胰岛素抵抗的一种或多种。患有代谢综合征的受试者可呈现出一系列代谢紊乱或异常,其可以包括例如高血压、2型糖尿病、高脂血症、血脂异常(例如,高甘油三酯血症、高胆固醇血症)、胰岛素抵抗、肝脂肪变性(脂肪性肝炎)、高血压、动脉粥样硬化以及其他代谢紊乱。

[0296] 肾功能不全:肾脏学病状如肾小球病在中老年人出现。肾小球性肾炎的特征在于肾脏的炎症和两种蛋白IL1 α 和IL1 β 的表达(参见,例如,Niemir等人,(1997) *Kidney Int.* 52:393-403)。IL1 α 和IL1 β 被认为是SASP的主调节物(参见,例如,Coppe等人,(2008) *PLoS.Biol.* 6:2853-68)。肾小球疾病与衰老细胞存在的增加,特别是在纤维变性的肾脏中的增加有关(参见,例如,Sis等人,(2007) *Kidney Int.* 71:218-226)。

[0297] 皮肤疾病或病症。可通过施用本文所述的衰老清除剂治疗的衰老相关疾病或病症包括皮肤疾病或病症。这样的衰老细胞相关疾病和病症包括银屑病和湿疹,其同样是炎症疾病并且在上文中更详细地讨论过。与衰老有关的其他皮肤疾病和病症包括皱纹(由于老化的皱纹);瘙痒症(与糖尿病和老化有关的);感觉迟钝(与糖尿病和多发性硬化有关的化疗副作用);银屑病(如上所述的)以及其他丘疹鳞屑性病症,例如,红皮病、扁平苔癣和苔藓样皮肤病;特应性皮炎(湿疹的一种形式并且与炎症有关);湿疹样皮疹(常在老年患者中观察到并且与某些药物的副作用有关)。与衰老有关的其他皮肤疾病和病症包括嗜酸性皮肤病(与某些类型的血液学癌症有关);反应性嗜中性皮肤病(与潜在疾病如炎症肠综合征有关);天疱疮(自身免疫性疾病,其中自身抗体针对桥粒芯蛋白而形成);类天疱疮及其他免疫大疱性皮肤病(皮肤的自身免疫性起泡);皮肤的纤维组织细胞增殖,其与老化有关;以及在老年人群中更常见的皮肤淋巴瘤。可根据本文所述的方法治疗的其他皮肤疾病包括皮肤狼疮,其是红斑狼疮的一种症状。晚发型狼疮可能与与老化相关的T细胞和B细胞功能降低(即,下降)以及细胞因子(免疫衰老)有关。

[0298] 转移。在特定的实施方案中,提供了用于治疗或预防(即,降低发生或发展的可能性)衰老细胞相关疾病(或病症或病况)即转移的方法。还可根据本文所述的方法将本文所述的衰老清除剂用于治疗或预防(即,降低发生或发展的可能性)体内一个器官或组织向另一个器官或组织的转移(即,癌症或肿瘤细胞的扩散和传播)。

[0299] 衰老细胞相关的疾病或病症包括转移,并且患有癌症的受试者可从如本文所述用于抑制转移的衰老清除剂的施用受益。当根据本文所述的方法施用至患有癌症的受试者时,此类衰老清除剂可以抑制肿瘤增生。当癌细胞(即,肿瘤细胞)扩散超过原始的解剖学位置并开始移生于受试者整个体内的其他区域时,癌症转移发生。肿瘤增生可通过肿瘤大小确定,其可以以本领域技术人员熟悉的多种方式确定,诸如例如通过PET扫描、MRI、CAT扫描、活检。治疗剂对肿瘤增生的效果还可以通过检查肿瘤细胞的分化来评估。

[0300] 如本文和本领域中所用的,术语癌症或肿瘤是临床上的描述性术语,其包括通常特征在于细胞表现出异常细胞增生的疾病。术语癌症通常用于描述恶性肿瘤或由肿瘤导致的疾病状态。可替代地,在本领域中异常生长可被称为赘生物。如参考组织时,术语肿瘤通常是指任何异常的组织生长,其特征至少部分在于过量和异常的细胞增生。肿瘤可以转移性的,并且能够扩散超过其原始的解剖学位置并开始移生于受试者整个体内的其他区域。癌症可包括实体瘤或可包括“液体”瘤(例如,白血病及其他血液癌症)。

[0301] 细胞被癌症疗法如辐射和某些化疗药物诱导衰老。衰老细胞的存在使炎症分子的

分泌增加(参见文本的衰老细胞的描述)、促进肿瘤演进,该肿瘤演进可包括促进肿瘤生长和增加肿瘤大小、促进转移以及改变分化。当衰老细胞被破坏时,肿瘤演进被显著抑制,导致肿瘤尺寸小,并且未观察到或观察到较少的转移生长(参见,例如,国际申请公开号W02013/090645)。

[0302] 在一个实施方案中,提供了通过施用如本文所述的衰老清除剂,用于防止(即,降低发生的可能性)、抑制或延迟患有癌症的受试者中的转移的方法。在特定的实施方案中,衰老清除剂在不超过7天或14天的治疗窗口(即,疗程)内的一天或多天施用。在其他实施方案中,该疗程不长于2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或不长于21天。在其他实施方案中,该疗程是一天。在某些实施方案中,衰老清除剂在不超过7天或14天的治疗窗口内的两天或更多天施用、在不超过7天或14天的治疗窗口内的3天或更多天施用;在不超过7天或14天的治疗窗口内的4天或更多天施用;在不超过7天或14天的治疗窗口内的5天或更多天施用;在不超过7天或14天的治疗窗口内的6、7、8、9、10、11、12、13或14天施用。在某些实施方案中,当至少一种衰老清除剂被施用至受试者持续3天或更长的治疗窗口时,该药剂可以每2天(即,每隔一天)施用。在某些其他实施方案中,当至少一种衰老清除剂被施用至受试者持续4天或更长的治疗窗口时,该药剂可以每3天(即,每隔三天)施用。

[0303] 因为细胞被癌症疗法如辐射和某些化疗药物(例如,多柔比星;紫杉醇;吉西他滨;泊马度胺;来那度胺)诱导衰老时,可在该化疗或放疗后使用本文所述的衰老清除剂以杀死(或促进杀死)这些衰老细胞。如本文讨论和本领域中理解的,衰老的确立(如通过衰老相关分泌表型(SASP)的存在示出的)经过数天出现;因此,当衰老确立时开始施用衰老清除剂以杀死衰老细胞,并由此降低发生的可能性或降低转移的程度。如本文讨论的,用于施用衰老清除剂的以下疗程可在如本文所述用于治疗或预防(即,降低发生的可能性或降低严重性)化疗或放疗副作用的方法中使用。

[0304] 在某些实施方案中,当化疗或放疗以至少一天处于治疗(即,化疗或放疗),随后至少3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14(或约2周)、15、16、17、18、19、20、21天(或约3周),或约4周(约一个月)非治疗(即,非化疗或放疗)的治疗周期施用时,衰老清除剂在非治疗时间间隔(时间段)期间的一天或多天施用,其中该一天或多天在非治疗时间间隔的第二天或之后开始并在非治疗时间间隔的最后一天或之前结束。通过说明性实例的方式,如果n是非治疗天数,则衰老清除剂在非治疗时间间隔的至少一天和不超过n-1天施用。在某些特定的实施方案中,当化疗或放疗以至少一天处于治疗(即,化疗或放疗),随后至少一周非治疗的治疗周期施用时,衰老清除剂在非治疗时间间隔期间的一天或多天施用,其中该一天或多天在非治疗时间间隔的第二天或之后开始并在非治疗时间间隔的最后一天或之前结束。在更具体的实施方案中,当化疗或放疗以至少一天处于治疗(即,化疗或放疗),随后至少一周非治疗的治疗周期施用时,衰老清除剂在非治疗时间间隔的第六天施用。在其他具体的实施方案中,当化疗或放疗以至少一天处于治疗(即,化疗或放疗),随后至少两周非治疗的治疗周期施用时,衰老清除剂在不化疗或不放疗时间间隔的第六天开始施用,并在后续化疗或放疗疗程的第一天之前的至少一天或至少两天结束施用。通过示例的方式,如果不化疗或不放疗时间间隔为两周,则可以在化疗或放疗疗程结束后的第六天(即,不化疗放疗间隔的第六天)开始,在非治疗时间间隔的至少一天且不超过7天(即,1、2、3、4、5、6或7天)施用衰老清除剂。当不化疗或不放疗时间间隔为至少三周时,可以在化疗或放疗疗程结束后的第六

天开始,在非治疗时间间隔的至少一天且不超过14天(即,1-14天:1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14天)施用衰老清除剂。在其他实施方案中,根据不化疗不放疗间隔,衰老清除剂疗程为至少一天且不长于2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20天或不超过21天(即,1-21天),条件是衰老清除剂的施用不与化疗或放疗同时发生。在某些实施方案中,该衰老清除剂疗程为一天。在某些实施方案中,衰老清除剂在不超过14天的治疗窗口内的两天或更多天施用、在不超过14天的治疗窗口内的3天或更多天施用;在不超过14天的治疗窗口内的4天或更多天施用;在不超过14天的治疗窗口内的5天或更多天施用;在不超过14天的治疗窗口内的6、7、8、9、10、11、12、13或14天施用。在某些实施方案中,当至少一种衰老清除剂在3天或更长疗程期间施用至受试者时,该药剂可以每2天(即,每隔一天)施用。在某些其他实施方案中,当至少一种衰老清除剂在4天或更长疗程期间施用至受试者时,该药剂可以每3天(即,每隔三天)施用。

[0305] 许多化疗和放疗治疗方案包含用药治疗随后停药治疗的有限数目的周期,或包含在其中施用化疗或放疗的有限时间范围。这样的癌症治疗方案还可被称为治疗方案。该方案可通过临床试验、药物标签和临床人员结合待治疗的受试者确定。化疗或放疗的周期次数或化疗或放疗的总时长可根据患者对该癌症疗法的反应而变化。由肿瘤学领域的技术人员很容易地确定这样的治疗方案的时间范围。在用于治疗转移的另一实施方案中,可在化疗或放疗治疗方案完成后施用衰老清除剂。在特定的实施方案中,在化疗或放疗完成后,在不超过14天的治疗窗口(即,衰老清除剂疗程)内的一天或多天施用衰老清除剂。在其他实施方案中,该衰老清除剂疗程不长于2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或不超过21天。在其他实施方案中,该疗程为一天。在某些实施方案中,衰老清除剂在不超过14天的治疗窗口内的两天或更多天施用、在不超过14天的治疗窗口内的3天或更多天施用;在不超过14天的治疗窗口内的4天或更多天施用;在不超过14天的治疗窗口内的5天或更多天施用;在不超过14天的治疗窗口内的6、7、8、9、10、11、12、13或14天施用。在某些实施方案中,当至少一种衰老清除剂在化疗或放疗后施用至受试者持续3天或更长的治疗窗口时,该药剂可以每2天(即,每隔一天)施用。在某些其他实施方案中,当至少一种衰老清除剂被施用至受试者持续4天或更长的治疗窗口时,该药剂可以每3天(即,每隔三天)施用。在一个实施方案中,用衰老清除剂治疗可以在癌症治疗方案完成后的至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14天或之后开始。在更具体的实施方案中,用衰老清除剂治疗可以在癌症治疗方案完成后的至少6、7、8、9、10、11、12、13或14天或之后开始。可以紧接着任何其他疗程和本文所述衰老清除剂施用的治疗周期,以在化疗或放疗方案完成后抑制受试者中的转移。

[0306] 化疗可被称为化疗、化疗剂或化疗药物。许多化疗剂是被称为有机小分子的化合物。化疗是这样的术语,其还用于描述施用以治疗特定癌症的组合化疗药物。如本领域技术人员理解的,化疗还可以指协同给药的两种或更多种化疗分子的组合,并且其也可被称为组合化疗。多种化疗药物在肿瘤学领域使用,并且其包括但不限于烷化剂;抗代谢物;蒽环类、植物生物碱;以及拓扑异构酶抑制剂。

[0307] 可以转移的癌症可以是实体瘤或者可以是液体瘤(例如,血液癌症例如白血病)。液体瘤的癌症在本领域中被分类为存在于血液、骨髓和淋巴结中发生的那些,并且通常包括白血病(髓性和淋巴细胞性)、淋巴瘤(例如,霍奇金淋巴瘤)和黑素瘤(包括多发性骨髓

瘤)。白血病包括例如急性淋巴细胞白血病(ALL)、急性髓细胞性白血病(AML)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、慢性髓性白血病(CML)和毛细胞白血病。实体瘤癌症并且在人类中更频繁出现的癌症包括例如前列腺癌、睾丸癌、乳腺癌、脑癌、胰腺癌、结肠癌、甲状腺癌、胃癌、肺癌、卵巢癌、卡波西肉瘤、皮肤癌(包括鳞状细胞皮肤癌)、肾癌、头颈癌、咽喉癌、在鼻、口腔、咽喉等的湿润粘膜内衬上形成的鳞癌、膀胱癌、骨肉瘤(骨癌)、宫颈癌、子宫内膜癌、食管癌、肝癌以及肾癌。在某些特定实施方案中,通过本文所述的方法治疗或预防(即,发生或发展的可能性降低)的衰老细胞相关疾病或病症为黑素瘤细胞、前列腺癌细胞、睾丸癌细胞、乳腺癌细胞、脑癌细胞、胰腺癌细胞、结肠癌细胞、甲状腺癌细胞、胃癌细胞、肺癌细胞、卵巢癌细胞、卡波西肉瘤细胞、皮肤癌细胞、肾癌细胞、头颈癌细胞、咽喉癌细胞、鳞癌细胞、膀胱癌细胞、骨肉瘤细胞、子宫颈癌细胞、子宫内膜癌细胞、食管癌细胞、肝癌细胞、或肾癌细胞的转移。

[0308] 本文所述的方法还对抑制、延迟或减缓医学领域中描述的任一种肿瘤类型的转移性癌症的进展有用。癌症(肿瘤)的类型包括:肾上腺皮质癌、儿童肾上腺皮质癌、艾滋病相关的癌症、肛门癌、阑尾癌、基底细胞癌、儿童基底细胞癌、膀胱癌、儿童膀胱癌、骨癌、脑肿瘤、儿童星形细胞瘤、儿童脑干胶质瘤、儿童中枢神经系统非典型畸胎样/横纹肌样瘤、儿童中枢神经系统胚胎性肿瘤、儿童中枢神经系统生殖细胞肿瘤、儿童颅咽管瘤脑肿瘤、儿童室管膜瘤脑肿瘤、乳腺癌、儿童支气管肿瘤、类癌瘤、儿童类癌瘤、胃肠道类癌瘤、原发灶不明癌、儿童原发灶不明癌、儿童期心脏(心脏)肿瘤、宫颈癌、儿童宫颈癌、儿童脊索瘤、慢性骨髓增生性疾病、大肠癌、结肠直肠癌、儿童结肠直肠癌、肝外胆道癌、原位导管癌(DCIS)、子宫内膜癌、食道癌、儿童食道癌、儿童成感觉神经细胞瘤、眼癌、骨恶性纤维组织细胞瘤、胆囊癌、胃(胃)癌、儿童胃癌(胃)癌、胃肠道间质瘤(GIST)、儿童胃肠道间质瘤(GIST)、儿童颅外生殖细胞瘤、性腺外生殖细胞瘤、妊娠滋养细胞肿瘤、胶质瘤、头颈癌、儿童头颈癌、肝细胞(肝)癌、下咽癌、肾癌、肾细胞肾癌、肾母细胞瘤(威尔姆氏瘤)、儿童期肾脏肿瘤、Langerhans细胞组织细胞增生症、喉癌、儿童喉癌、白血病、急性淋巴细胞性白血病(ALL)、急性髓细胞性白血病(AML)、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、慢性髓性白血病(cml)、毛细胞白血病、唇癌、肝癌(原发性)、儿童肝癌(原发性)、小叶原位癌(LCIS)、肺癌、非小细胞肺癌、小细胞肺癌、淋巴瘤、艾滋病相关淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、皮肤T细胞淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、原发性中枢神经系统淋巴瘤(CNS)、黑素瘤、儿童黑素瘤、眼内(眼)黑素瘤、Merkel细胞癌、恶性间皮瘤、儿童恶性间皮瘤、隐匿性原发性转移性鳞癌颈部癌、累及NUT基因的中线道癌(midline tract carcinoma involving NUT gene)、口腔癌、儿童多发性内分泌腺瘤综合征、蕈样肉芽肿、骨髓增生异常综合征、骨髓增生异常肿瘤、骨髓增殖性肿瘤、多发性骨髓瘤、鼻腔癌、鼻咽癌、儿童鼻咽癌、神经母细胞瘤、口腔癌、儿童口腔癌、口咽癌、卵巢癌、儿童卵巢癌、卵巢上皮癌、低度恶性潜能肿瘤卵巢癌、胰腺癌、儿童胰腺癌、胰腺神经内分泌肿瘤(胰岛细胞瘤)、儿童乳头状瘤病、副神经节瘤、副鼻窦癌、甲状旁腺癌、阴茎癌、咽癌、嗜铬细胞瘤、垂体瘤、浆细胞肿瘤、儿童期胸膜母细胞瘤、前列腺癌、直肠癌、肾盂移行细胞癌、视网膜母细胞瘤、唾液腺癌、儿童唾液腺癌、肿瘤的尤文肉瘤家族、卡波西肉瘤、骨肉瘤、横纹肌肉瘤、儿童横纹肌肉瘤、软组织肉瘤、子宫肉瘤、Sézary综合征、儿童皮肤癌、非黑色素瘤皮肤癌、小肠癌、鳞状细胞癌、儿童鳞状细胞癌、睾丸癌、儿童睾丸癌、咽喉癌、胸腺瘤和胸腺癌、儿童胸腺瘤和胸腺癌、甲状腺癌、儿童甲状腺癌、输尿管移行细胞癌、

尿道癌、子宫内膜子宫癌、阴道癌、外阴癌、**Waldenström**巨球蛋白血症。

[0309] 化疗和放疗副作用。在另一实施方案中,衰老细胞相关的病症或病况是化疗剂副作用或放疗副作用。诱发非癌细胞衰老的化疗剂的实例包括蒽环类药物(如多柔比星、柔红霉素);泰素(例如,紫杉醇);吉西他滨;泊马度胺;和来那度胺。如本文所述施用的衰老清除剂的一种或多种可用于治疗和/或预防(即,降低发生的可能性)化疗剂副作用或放疗副作用。衰老细胞的去除或破坏可改善化疗或放疗的急性毒性,包括包含能量不平衡的急性毒性。急性毒性副作用包括但不限于胃肠道毒性(例如,恶心、呕吐、便秘、厌食、腹泻)、周围神经病变、疲劳、心神不安、身体活动力降低、血液学毒性(例如,贫血)、肝毒性、脱发(脱发)、疼痛、感染、粘膜炎、流体潴留、皮肤毒性(如皮疹、皮炎、色素沉着、荨麻疹、光敏、指甲变化)、口(例如,口腔粘膜炎)、牙床或咽喉问题,或由化疗或放疗导致的任何毒副作用。例如,由放疗或化疗导致的毒副作用(参见,例如,国家癌症研究所网站)可通过本文所述的方法减轻。因此,在某些实施方案中,提供了用于在接受该疗法的受试者中减轻(降低、抑制或防止发生(即,降低发生的可能性))急性毒性,或降低化疗或放疗或同时二者的毒副作用(即,有害副作用)的严重性的方法,其中该方法包括向受试者施用选择性地杀死、去除或消灭衰老细胞,或促进衰老细胞的选择性破坏的药剂。施用衰老清除剂以治疗或降低发生的可能性,或降低化疗或放疗副作用的严重性可通过上文针对转移的治疗/防止描述的相同疗程实现。如针对治疗或预防(即,降低发生的可能性)转移所描述的,在不化疗或不放疗时间间隔期间或在化疗或放疗治疗方案完成之后施用衰老清除剂。

[0310] 在更加具体的实施方案中,急性毒性是包含能量不平衡的急性毒性,并且可以包括体重减轻、内分泌变化(例如,激素失衡、激素信号传导变化)以及身体组成的变化中的一种或多种。在某些实施方案中,正如通过与在未接受该医学疗法的受试者中将观察到的相比能量消耗下降或减少所表明,包含能量不平衡的急性毒性与受试者身体活动能力下降或降低有关。通过非限制性实例的方式,包含能量不平衡的这种急性毒性效果包括身体活动能力下降。在其他特定的实施方案,能量不平衡包括疲劳或心神不安。

[0311] 在一个实施方案中,待通过衰老清除剂治疗或预防(即,降低发生的可能性)的化疗副作用是心脏毒性。可以用降低、减轻或减少蒽环类药物的心脏毒性的一种或多种衰老清除剂来治疗经蒽环类药物(如多柔比星、柔红霉素)治疗的患有癌症的受试者。如医疗领域中是公知的,由于与蒽环类药物相关的心脏毒性,即使癌症对该药物是响应性的,受试者可接受的最高终身剂量也是有限的。一种或多种衰老清除剂的施用可降低心脏毒性,使得可以向受试者施用额外量的蒽环类药物,从而导致与癌症疾病相关的预后改善。在一个实施方案中,心脏毒性由蒽环类药物如多柔比星的施用导致。多柔比星是蒽环类拓扑异构酶,其被批准用于在基于铂的疗法失败后治疗患有卵巢癌的患者;用于在主要全身化疗失败或对该疗法耐受后治疗患有卡波西肉瘤的患者;或与硼替佐米组合用于治疗之前未接受硼替佐米或已接受至少一种先前疗法的患者。多柔比星可导致心肌损伤,如果患者的总终身剂量超过 $550\text{mg}/\text{m}^2$,该心肌损伤可导致充血性心力衰竭。如果患者还接受了纵隔照射或另一种心脏毒性药物,则心脏毒性可能在甚至更低的剂量下发生。参见药物产品插页(例如,DOXIL、ADRIAMYCIN)。

[0312] 在其他实施方案中,本文所述的衰老清除剂可在如本文提供的方法中使用,以改善慢性或长期副作用。慢性副作用通常由经过一段较长时间的化疗或放疗的施用或多重暴

露所导致。某些毒性作用在治疗后的较长时间发生(也被称为后期毒性作用),并且是由于疗法对器官或系统的损伤所导致。已经在童年时治疗癌症的患者中观察到器官功能障碍(例如,神经、肺、心血管和内分泌功能障碍)(参见,例如,Hudson等人,JAMA309:2371-81(2013))。不希望受任何特定理论的约束,通过消灭衰老细胞、已被化疗或放疗诱导衰老的特殊正常细胞,可以降低慢性副作用发生的可能性,或者可以降低或减弱慢性副作用的严重性,或者可以延迟慢性副作用发作的时间。通过非限制性实例的方式,在接受化疗或放疗的受试者中出现的慢性和/或后期毒副作用包括心肌病、充血性心脏病、炎症、绝经期提前、骨质疏松症、不孕症、认知功能受损、周围神经病变、继发性癌、白内障及其他视力问题、听力损失、慢性疲劳、肺活量减少以及肺病。

[0313] 此外,通过经由施用衰老清除剂杀死或去除患有癌症的受试者中的衰老细胞,相比于未施用衰老清除剂的情况,在临床上或统计学上显著地提高了对化疗或放疗的敏感性。换句话说,当将衰老清除剂施用至经各自的化疗或放疗治疗的受试者时,可以抑制化疗或放疗抗性的发展。

[0314] 年龄相关的疾病和病症。衰老清除剂还可用于治疗或预防(即,降低发生的可能性)作为自然老化过程的一部分出现或当受试者暴露于衰老诱导剂或因子(例如,辐射、化疗、吸食烟草、高脂肪/高糖饮食、其他环境因素)时出现的年龄相关疾病或病症。年龄相关病症或疾病或年龄敏感的特质可能与衰老诱导的刺激有关。本文所述的治疗方法的效力可通过减少与衰老诱导刺激有关的年龄相关病症或年龄敏感特质的症状数量、降低一种或多种症状的严重性,或延迟与衰老诱导刺激有关的年龄相关病症或年龄敏感特质的进展来证明。在其他的特定实施方案中,防止与衰老诱导刺激有关的年龄相关病症或年龄敏感特质是指防止(即,降低发生的可能性)或延迟与衰老诱导刺激有关的年龄相关病症或年龄敏感特质的发作,或与衰老诱导刺激有关的一种或多种年龄相关病症或年龄敏感特质的复发。年龄相关疾病或病况包括例如肾功能障碍、脊柱后凸、椎间盘突出、虚弱、脱发、听力损伤、视力损伤(失明或视力受损)、肌肉疲劳、皮肤病况、皮肤痣、糖尿病、代谢综合征以及少肌症。视力损伤是指之前有视力的受试者的视力缺乏。已经发展出基于视觉灵敏度用于描述视力和视力损伤程度的多种尺度。年龄相关疾病和病况还包括皮肤疾病,例如但不限于,治疗以下病况的一种或多种:皱纹,包括浅表细纹;色素沉着过度;伤疤;瘢痕疙瘩;皮炎;银屑病;湿疹(包括脂溢性湿疹);酒渣鼻;白癜风;寻常型鱼鳞病;皮炎;以及光化性角化病。

[0315] 虚弱已被定义为临床可识别的脆弱性增加的状态,其由跨越多个生理系统的储备和功能的老化相关的减少导致,所述减少降低了受试者应付日常压力因素或急性压力因素的能力。虚弱的特征可为受损能量特性,如握力低、低能、行走速度缓慢、体力活动力低和/或非预期的体重下降。研究表明,当观察到五个上述特征三个时,可诊断患者患有虚弱(参见,例如,Fried等人,J.Gerontol.A Biol.Sci.Med.Sci.200156(3):M146-M156;Xue,Clin.Geriatr.Med.2011;27(1):1-15)。在某些实施方案中,可通过施用衰老清除剂治疗或预防(即,降低发生的可能性)老化和与老化相关的疾病和病症。衰老清除剂可抑制成年干细胞的衰老或抑制积累、杀死已经变得衰老的成年干细胞或促进其去除。参见,例如,Park等人,J.Clin.Invest.113:175-79(2004)和Sousa-Victor,Nature 506:316-21(2014),其描述了防止干细胞的衰老对维持组织的再生能力的重要性。

[0316] 衰老清除剂对于治疗本文所述的衰老相关疾病或病症的有效性可通过医学和临

床领域的技术人员容易地确定。适合用于该特定疾病或病症的本领域技术人员公知的诊断方法(包括体检、病人自我评价、临床症状的评价和监测、包括例如临床实验室测试、体能测试和探查性手术在内的分析试验和方法的执行)的一种或任意组合,可用于监测受试者的健康状态和衰老清除剂的有效性。可使用本领域已知的技术分析本文所述的治疗方法的效果,如将已接受包含衰老清除剂的药物组合物的罹患或存在特定疾病或病症风险的患者症状与未用衰老清除剂治疗或接受安慰剂治疗的患者症状进行比较。

[0317] 如医学领域的技术人员理解的,术语“治疗”和“处理”是指受试者(即,患者)的疾病、病症或病况的医学控制(参见,例如,Stedman's Medical Dictionary)。通常,合适剂量和治疗方案以足以提供治疗和/或预防益处的量来提供衰老清除剂。经施用本文所述衰老清除剂的受试者的治疗益处包括例如改善的临床结果,其中目的在于防止或减缓或延迟(减轻)与该疾病有关的不期望的生理学变化,或防止或减缓或延迟(减轻)这样的疾病的扩张或严重性。如本文讨论的,一种或多种衰老清除剂的有效性可包括有益或期望的临床结果,该临床结果包括但不限于由待治疗疾病导致或与其有关的症状的减少、减轻或缓解;症状发生减少;生活质量提高;无疾病状态更长(即,在进行了疾病诊断的基础上减少受试者将存在症状的可能性或倾向);疾病的程度降低;疾病状态稳定(即,未变坏);疾病进展的延迟或减缓;疾病状态的减轻或缓和;和缓解(无论是部分还是全部),无论可检测还是不可检测;以及/或者总生存期。本文所述的衰老清除剂的有效性还可以指与如果受试者未接受选择性杀死衰老细胞的衰老清除剂所预期的生存期相比延长的生存期。

[0318] 与如果受试者未接受治疗所预期的生存期相比,本文所述的衰老清除剂的施用可以延长生存期。需要治疗的受试者包括已经患有疾病或病症的人,以及易于患有或存在发展出该疾病或病症风险的受试者,以及将要预防性地治疗疾病、病况或病症的人。受试者可具有发展出将从衰老细胞的清除受益的疾病或病症的遗传易感性,或者可以为接受衰老清除剂将会提供临床益处以延迟疾病发展或降低疾病(包括年龄相关的疾病或病症)严重性的某个年龄。

[0319] 在另一实施方案中,提供了用于治疗衰老相关疾病或病症的方法,其进一步包括鉴别将会从用本文所述的衰老清除剂治疗受益的受试者(即,表型分析;个性化治疗)。此方法包括首先检测受试者中,如特别是受试者的器官或组织中的衰老细胞水平。可以从受试者获得生物样品,例如,来自受试者的血液样品、血清或血浆样品、活检标本、体液(例如,肺灌洗液、腹水、粘膜洗涤液、滑液、玻璃体液、脊髓液)、骨髓、淋巴结、组织外植体、器官培养物或任何其他组织或细胞制剂。可根据任何本文所述的体外测定或技术来确定衰老细胞水平。例如,可通过形态学(例如,如通过显微术观察的);衰老相关的标志物如衰老相关的 β -半乳糖苷酶(SA- β -gal)、p16INK4a、p21、PAI-1或任一种或多种SASP因子(例如,IL-6、MMP3)的产生来检测衰老细胞。生物样品的衰老细胞和未衰老细胞还可用于体外细胞测定,其中细胞被暴露于本文所述衰老清除剂的任一种以确定该衰老清除剂杀死受试者的衰老细胞而对未衰老细胞没有不期望的毒性的能力。作为这些测定中的阳性对照,该测定可以包含本文所述衰老清除剂(例如,Nutlin-3a、RG-7112、ABT-263、ABT-737、WEHI-539、A-1155463、MK-2206)的任一种。然后可以用适当的衰老清除剂治疗受试者,该衰老清除剂可以是MDM2抑制剂;一个或多个Bcl-2抗凋亡蛋白家族成员的抑制剂,其中该抑制剂至少抑制Bcl-xL(例如,Bcl-xL选择性抑制剂、Bcl-2/Bcl-xL/Bcl-w抑制剂、Bcl-2/Bcl-xL或Bcl-xL/Bcl-w

抑制剂) ;或Akt特异性抑制剂。此外,这些方法还可用于在用衰老清除剂治疗受试者之前、期间和之后监测受试者中衰老细胞的水平。在某些实施方案中,可以检测衰老细胞的存在(例如,通过确定例如mRNA的衰老细胞标志物表达的水平),并且可以相应地调整疗程和/或无治疗间隔。

[0320] 需要用如本文所述的衰老清除剂治疗的受试者、患者或个体可以为人类,或者可以是已发展出衰老细胞相关疾病或病症的症状或处于发展出衰老细胞相关疾病或病症的风险的非人类灵长动物或其他动物(即,兽用)。可以治疗的非人动物包括哺乳动物,例如,非人类灵长动物(例如,猴子、黑猩猩、大猩猩等)、啮齿动物(例如,大鼠、小鼠、沙鼠、仓鼠、雪貂、兔)、兔类动物、猪(例如,猪、小型猪)、马、犬、猫、牛、大象、熊及其他国内、农场和动物园的动物。

[0321] 用于表征和鉴别衰老清除剂的方法

[0322] 表征衰老清除剂可使用本文或本领域中描述并且本领域技术人员熟悉的一种或多种基于细胞的测定以及一种或多种动物模型来确定。衰老清除剂是一种以统计学显著、临床显著或生物学显著的方式选择性地杀死或消灭衰老细胞的药剂。衰老清除剂可选择性地杀死一种或多种类型的衰老细胞(例如,衰老的前脂肪细胞、衰老的内皮细胞、衰老的成纤维细胞、衰老的神经元、衰老的上皮细胞、衰老的间充质细胞、衰老的平滑肌细胞、衰老的巨噬细胞或衰老的软骨细胞)。在某些特定的实施方案中,衰老清除剂能够至少选择性地杀死衰老的成纤维细胞。

[0323] 表征药剂如衰老清除剂可使用本文或本领域中描述的一种或多种基于细胞的测定以及一种或多种动物模型来实现。本领域技术人员将容易地理解,表征药剂如衰老清除剂和确定通过药剂的杀伤水平可通过将测试药剂的活性与合适的阴性对照(例如,仅媒介物或稀释剂,和/或本领域已知的不杀死衰老细胞的组合物或化合物)以及合适的阳性对照进行比较而实现。用于表征衰老清除剂的体外基于细胞测定还包括用于确定该药剂对未衰老细胞(例如,静止细胞或增殖细胞)的影响的对照。与一种或多种阴性对照相比,衰老清除剂降低(即,减少)多种衰老细胞的存活百分比(即,以一些方式降低动物或基于细胞的测定中的活衰老细胞的量)。特定体外测定条件包括温度、缓冲液(包括盐、阳离子、介质)以及其他组分,所述其他组分将保持测定中使用的测试药剂和试剂的完整性并且是本领域技术人员熟悉并且/或者可容易地确定的。

[0324] 用于测定的衰老细胞的来源可以是原代细胞培养物或培养物适应的细胞系,包括但不限于,可含有染色体整合或附加型重组的核酸序列的基因工程化细胞系、永生化或可永生化的细胞系、体细胞杂交细胞系、分化或可分化的细胞系、转化的细胞系,等等。在特定的实施方案中,将衰老细胞从生物样品分离,其中该生物样品从具有衰老细胞相关的疾病或病症的宿主或受试者获得。在其他实施方案中,可从受试者获得或可以为培养物适应的细胞系的未衰老细胞可被使用,并可通过本文和本领域中描述的方法如通过暴露于辐射或化疗剂(例如,多柔比星)来诱导衰老。生物样品可以为来自受试者的血液样品、活检标本、体液(例如,肺灌洗液、腹水、粘膜洗涤液、滑液)、骨髓、淋巴结、组织外植体、器官培养物或任何其他组织或细胞制剂。样品可以为组织或细胞制剂,其中已通过例如解剖、离解、溶解、分级、匀化、生物化学或化学萃取、粉碎、冷冻干燥、超声或用于对来源于受试者或生物来源的样品进行处理的任何其他手段将形态完整性或物理状态破坏。该受试者可以为人或非人

类动物。

[0325] 如本文和本领域中描述的转基因动物模型可用于确定衰老细胞的杀死或去除(参见,例如,Baker等人,同上;Nature,479:232-36(2011);国际专利申请公开号W0/2012/177927;国际专利申请公开号W02013/090645)。示例性的转基因动物模型含有这样的转基因,其包含允许衰老细胞(例如,p16^{ink4a}阳性衰老细胞)的控制清除的核酸作为阳性对照。转基因动物中衰老细胞的存在和水平可通过测量在该动物的衰老细胞中表达的可检测标记水平来确定。该转基因核苷酸序列包含可检测的标记,例如,一种或多种红色荧光蛋白;绿色荧光蛋白;和一种或多种萤光素酶,以检测衰老细胞的清除。

[0326] 本文或本领域中描述的动物模型包括用于确定衰老清除剂用于治疗或预防(即,降低发生的可能性)特定衰老相关疾病或病症的有效性的本领域接受的模型,如动脉粥样硬化模型、骨关节炎模型、COPD模型和IPF模型。如本文所述的,肺病鼠模型,如博来霉素肺纤维化模型和慢性吸烟模型可适用于疾病如COPD,并且可以通过本领域技术人员常规地实践。用于确定衰老清除剂用于治疗和/或预防(即,降低发生的可能性)化疗和放疗副作用模型,或用于治疗或预防(即,降低发生的可能性)转移的有效性的动物模型在国际专利申请公开号W0 2013/090645和W0 2014/205244中描述,其通过引用全文并入本文。用于确定用于治疗眼部疾病特别是年龄相关黄斑变性的药剂的有效性的动物模型也是本领域中常规使用的(参见,例如,Pennesi等人,Mol.Aspects Med.33:487-509(2012);Zeiss等人,Vet.Pathol.47:396-413(2010);Chavala等人,J.Clin.Invest.123:4170-81(2013))。

[0327] 通过非限制性实例的方式和如本文所述的,已研发出骨关节炎动物模型。可通过例如向关节诱导损伤,例如通过手术部分或完全切断前交叉韧带在膝盖中诱导损伤,而在动物中诱导骨关节炎。骨关节炎动物模型可用于评价衰老清除剂用于治疗或预防(即,降低发生的可能性)骨关节炎和导致蛋白聚糖消蚀减少、以及用于诱导(即,刺激、增强)胶原(如2型胶原)产生、以及用于减少具有ACL手术的动物的疼痛的有效性。可进行免疫组织学以检查关节中组织和细胞的完整性和组成。还可以使用本文所述并且可通过本领域技术人员常规实践的方法和技术,实施免疫组织学和/或分子生物学技术,如用于确定炎症分子(例如,IL-6)水平的测定和用于确定如上文提到的衰老标志物的水平的测定。

[0328] 通过另一非限制性实例的方式和如本文所述的,已研发出动脉粥样硬化动物模型。可通过例如给动物喂食高脂肪饮食,或通过使用高度易于发展出动脉粥样硬化的转基因动物来在动物中诱导动脉粥样硬化。动物模型可用于确定衰老清除剂用于减少斑块的量或用于抑制动脉粥样硬化的动脉中斑块形成、用于降低动脉粥样硬化斑块的脂质含量(即,降低、减少斑块中脂质的量)、以及用于提高斑块的纤维帽厚度或引起其斑块增加的有效性。可将苏丹染色用于检测动脉粥样硬化血管中的脂质水平。可根据本文所述并且本领域中常规实践的方法,将免疫组织学和免疫化学以及分子生物学测定(例如,用于确定炎症分子(例如,IL-6)水平和用于确定如上文提到的衰老标志物的水平)全部实施。

[0329] 在又一实例中,并且如本文所述的,用于确定药剂用于治疗IPF有效性的小鼠模型(其中动物用博来霉素治疗)已得到描述(参见,例如,Peng等人,PLoS One 2013;8(4):e59348.doi:10.1371/journal.pone.0059348.Epub 2013Apr 2;Mouratis等人,Curr.Opin.Pulm.Med.17:355-61(2011))。在肺病动物模型(例如,博来霉素动物模型、烟暴露动物模型,等)中,可以采取呼吸测量来确定弹性(elastance)、柔顺性、静态柔顺性和末

梢毛细血管血氧饱和度 (SpO_2)。可根据本文所述并且本领域中常规实践的方法,将免疫组织学和免疫化学以及分子生物学测定(例如,用于确定炎症分子(例如,IL-6)水平和用于确定如上文提到的衰老标志物的水平)全部实施。

[0330] 可使用技术人员将熟悉的一种或多种统计学分析进行衰老清除剂用于在动物模型中选择性杀死如本文所述的衰老细胞的有效性的确定。通过示例的方式,统计学分析如双向方差分析(ANOVA)可用于确定用药剂治疗的动物组与未用该药剂治疗的那些(即,阴性对照组,其可以仅包含媒介物和/或非衰老清除剂)之间差异的统计学显著性。统计软件包如SPSS、MINITAB、SAS、Statistika、Graphpad、GLIM、Genstat和BMDP是容易获得且是动物模型领域技术人员常规使用的。

[0331] 本领域技术人员将容易地理解,表征衰老清除剂和确定通过衰老清除剂的杀伤水平可通过将测试药剂的活性与合适的阴性对照(例如,仅媒介物,和/或本领域已知的不杀死衰老细胞的组合物、药剂或化合物)和合适的阳性对照进行比较而实现。用于表征该药剂的体外基于细胞的测定还包括用于确定该药剂对未衰老细胞(例如,静止细胞或增殖细胞)的影响的对照。与一种或多种阴性对照相比,有用的衰老清除剂降低(即,减少)衰老细胞的存活百分比(即,以一些方式降低动物或基于细胞的测定中的活衰老细胞的量)。因此,与非衰老细胞的杀伤相比,衰老清除剂将选择性地杀死衰老细胞(这在本文中可称为选择性地杀死衰老细胞而不是未衰老细胞)。在某些实施方案中(在体外测定或体内测定中(在人或非人类动物中)),至少一种衰老清除剂杀死至少20%的衰老细胞并且杀死不超过5%的非衰老细胞。在其他特定的实施方案中(在体外测定或体内测定中(在人或非人类动物中)),至少一种衰老清除剂杀死至少约25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%或65%的衰老细胞并且杀死不超过约5%或10%的非衰老细胞。在其他特定的实施方案中(在体外测定或体内测定中(在人或非人类动物中)),至少一种衰老清除剂杀死至少约30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%或65%的衰老细胞并且杀死不超过约5%、10%或15%的非衰老细胞。在其他特定的实施方案中(在体外测定或体内测定中(在人或非人类动物中)),至少一种衰老清除剂杀死至少约40%、45%、50%、55%、60%或65%的衰老细胞并且杀死不超过约5%、10%、15%、20%或25%的非衰老细胞。在其他特定的实施方案中(在体外测定或体内测定中(在人或非人类动物中)),至少一种衰老清除剂杀死至少约50%、55%、60%或65%的衰老细胞并且杀死不超过约5%、10%、15%、20%、25%或30%的非衰老细胞。换句话说,相比于对非衰老细胞,衰老清除剂对杀死衰老细胞具有至少5-25、10-50或10-100倍($5x-25x$ 、 $10x-50x$ 或 $10x-100x$)的选择性(例如,至少 $5x$ 、 $10x$ 、 $20x$ 、 $25x$ 、 $30x$ 、 $40x$ 、 $50x$ 、 $60x$ 、 $75x$ 、 $80x$ 、 $90x$ 或 $100x$)。就用于治疗衰老相关疾病或病症的本文所述方法的特定实施方案而言,杀死的衰老细胞百分比可以指在包含导致该疾病或病症发作、进展和/或加重的衰老细胞的组织或器官中杀死的衰老细胞的百分比。通过非限制性实例的方式,大脑的组织、眼睛的组织或部分、肺组织、心脏组织、血管、关节、皮肤和肌肉可包含衰老细胞,该衰老细胞可通过本文所述的衰老清除剂而减少如上所述的百分比并由此提供治疗效果。而且,从感染的器官或组织选择性地去除至少20%或至少25%的衰老细胞可具有临床显著的治疗效果。就本文所述方法的特定实施方案(如用于治疗与动脉硬化如动脉粥样硬化有关的心血管疾病或病症)而言,通过施用衰老清除剂(即,参考上述体内方法),杀死的衰老细胞的百分比可以指,相对于在动脉斑块中杀死的非衰老细胞,在含有斑块的感染动脉中杀死的衰老细

胞的百分比。在某些特定实施方案中,在用于治疗如本文所述的心血管疾病如动脉粥样硬化的方法中,至少一种衰老清除剂在动脉中杀死至少20%的衰老细胞并且杀死不超过5%的非衰老细胞。在其他特定实施方案中,衰老清除剂选择性地杀死动脉硬化动脉中衰老细胞的至少25%。在另一个实施方案中,就用于通过施用衰老清除剂治疗骨关节炎的本文所述的方法而言,杀死的衰老细胞的百分比可以指,相对于在骨关节炎关节中杀死的非衰老细胞,在骨关节炎关节中杀死的衰老细胞的百分比。在某些特定实施方案中,在用于治疗如本文所述的骨关节炎的方法中,至少一种衰老清除剂在骨关节炎关节中杀死至少20%的衰老细胞并且杀死不超过5%的非衰老细胞。在其他特定实施方案中,衰老清除剂选择性地杀死骨关节炎关节中衰老细胞的至少25%。在又一个实施方案中,就用于通过施用至少一种衰老清除剂治疗衰老相关的肺部疾病或病症(例如,COPD、IPF)的本文所述的方法而言,杀死的衰老细胞的百分比可以指,相对于在肺的感染肺组织中杀死的非衰老细胞,在感染的肺组织中杀死的衰老细胞的百分比。在某些特定实施方案中,在用于治疗如本文所述的衰老相关肺部疾病和病症的方法中,衰老清除剂在感染的肺组织中杀死至少20%的衰老细胞并且杀死不超过5%的非衰老细胞。在其他特定实施方案中,衰老清除剂选择性地杀死感染的肺组织中衰老细胞的至少25%。

[0332] 在某些实施方案中,提供了用于鉴别(即,筛选)对治疗或预防(即,降低发生的可能性)衰老相关疾病或病症有用的衰老清除剂的方法。在一个实施方案中,用于鉴定用于治疗此类疾病和病症的衰老清除剂的方法包括诱导细胞衰老以提供确定的衰老细胞。用于诱导细胞衰老的方法如本文和本领域中描述,并且包括例如暴露于辐射(例如,10Gy通常是足够的)或化疗剂(例如,多柔比星或其他蒽环类药物)。在暴露于该药剂后,将细胞在合适的条件(例如,对给定细胞类型或细胞系合适的培养基、温度、CO₂/O₂水平)下培养合适的时间,以允许衰老形成。如本文讨论的,细胞的衰老可通过如下述因素确定,即,任意数目的特征,如形态变化(例如,如通过显微术观察的);例如衰老相关的 β -半乳糖苷酶(SA- β -gal)、p16INK4a、p21或任一种或多种SASP因子(例如,IL-6、MMP3)的产生。然后将衰老细胞的样品与候选试剂接触(即,与其混合、合并,或在一些实施方案中允许细胞与该药剂相互作用)。本领域技术人员将理解,该测定将包括历史的或同时进行的合适的阴性和阳性对照。例如,将已与衰老细胞类似地培养但未暴露于衰老诱导剂的对照非衰老细胞的样品与候选药剂接触。确定了衰老细胞的存活水平,并与非衰老细胞的存活水平相比较。当衰老细胞的存活水平低于非衰老细胞的存活水平时,鉴别出衰老清除剂。

[0333] 在特定的实施方案中,上述鉴别衰老清除剂的方法可进一步包括用于鉴别该衰老清除剂是否对治疗骨关节炎有用的步骤。该方法可进一步包括将鉴别的衰老清除剂与能够产生胶原的细胞接触;以及确定该细胞所产生的胶原水平。在特定实施方案中,该细胞为软骨细胞并且该胶原为2型胶原。该方法可进一步包括向关节中具有关节炎损失的非人类动物施用候选衰老清除剂并确定以下的一项或多项:(a) 关节中衰老细胞的水平;(b) 动物的身体机能;(c) 一种或多种炎症标志物的水平;(d) 关节的组织学;以及(e) 所产生的2型胶原的水平,由此确定该衰老清除剂的治疗效力,其中相比于未用该衰老清除剂治疗的动物,在治疗的动物中观察到以下的一项或多项:(i) 治疗动物的关节中衰老细胞水平的降低;(ii) 治疗动物身体机能的改善;(iii) 治疗动物中一种或多种炎症标志物水平的降低;(iv) 治疗动物的关节中组织学正常状态增加;以及(v) 治疗动物中产生的2型胶原水平的增加。如本

文和本领域中描述的,可通过这样的技术确定动物的身体机能,该技术通过例如动物对在感染的肢体上负重的耐受性,或动物从难受的刺激如热或冷离开的能力来确定腿对诱发或自然的骨关节炎病况的敏感性。可使用技术人员将熟悉的一种或多种统计学分析进行药剂在动物模型中杀死如本文所述的衰老细胞的有效性的确定。如本文所述和本领域常规实践的统计学分析可用于分析数据。

[0334] 在另一个特定实施方案中,上述鉴别衰老清除剂的方法可进一步包括用于鉴别该衰老清除剂是否对治疗由动脉硬化引起或与其相关的心血管疾病有用的步骤。因此,该方法可进一步包括在动物模型的非人类动物中施用衰老清除剂候选药剂,以确定药剂用于减少斑块的量、用于抑制动脉粥样硬化的动脉中斑块形成、用于降低动脉粥样硬化斑块的脂质含量(即,降低、减少斑块中脂质的量),以及/或者用于提高斑块的纤维帽厚度或引起其斑块增加的有效性。可将苏丹染色用于检测动脉粥样硬化血管中的脂质水平。可根据本文所述且本领域中常规实践的方法,将免疫组织学、用于确定炎症分子(例如,IL-6)水平的测定和/或用于确定如上文提到的衰老标志物水平的测定全部实施。在具体的实施方案中,用于鉴别衰老清除剂的本文所述方法可进一步包括向具有动脉粥样硬化斑块的非人类动物施用候选衰老清除剂并确定以下的一项或多项:(a) 动脉中衰老细胞的水平;(b) 动物的身体机能;(c) 一种或多种炎症标志物的水平;(d) 感染血管(动脉)的组织学;并由此确定该衰老清除剂的治疗效力,其中相比于未用该衰老清除剂治疗的动物,在治疗的动物中观察到以下的一项或多项:(i) 治疗动物的动脉中衰老细胞水平的降低;(ii) 治疗动物身体机能的改善;(iii) 治疗动物中一种或多种炎症标志物水平的降低;(iv) 治疗动物的动脉中组织学正常状态增加。如本文和本领域中描述的,可通过测量身体活动力来确定动物的身体机能。如本文所述和本领域常规实践的统计学分析可用于分析数据。

[0335] 在一个实施方案中,用于鉴别衰老清除剂的本文所述方法可包括向非人类动物肺病模型如博来霉素模型或烟暴露动物模型施用候选衰老清除剂并确定以下的一项或多项:(a) 肺中衰老细胞的水平;(b) 动物的肺功能;(c) 一种或多种炎症标志物的水平;(d) 肺组织的组织学,由此确定该衰老清除剂的治疗效力,其中相比于未用该衰老清除剂治疗的动物,在治疗的动物中观察到以下的一项或多项:(i) 治疗动物的肺和肺组织中衰老细胞水平的降低;(ii) 治疗动物肺功能改善;(iii) 治疗动物中一种或多种炎症标志物水平的降低;以及(iv) 治疗动物的肺组织中组织学正常状态增加。可以采取呼吸测量来确定弹性(elastance)、柔顺性、静态柔顺性和末梢毛细血管血氧饱和度(SpO_2)。可通过确定多种测量的任一种,如补呼气量(ERV)、用力肺活量(FVC)、用力呼气量(FEV)(例如,一秒内的FEV, FEV1)、FEV1/FEV比、用力呼气流量25%至75%,以及最大通气量(MVV最大呼气流量(PEF))、慢肺活量(SVC)来评估肺功能。肺总容积包括肺总气量(TLC)、肺活量(VC)、残气量(RV)和功能残气量(FRC)。可以使用一氧化碳扩散能力(DLCO)来测量穿过肺泡毛细血管膜的气体交换。还可以测量末梢毛细血管血氧饱和度(SpO_2)。如本文所述和本领域常规实践的统计学分析可用于分析数据。

[0336] 用于鉴别和表征衰老清除剂的本文所述的体外测定和体内测定(例如,动物模型)可包括任一种本文所述的衰老清除剂(例如,Nutlin-3a、RG-7112、ABT-263、ABT-737、WEHI-539、A-1155463、MK-2206)作为阳性对照。特定体外测定条件包括温度、缓冲液(包括盐、阳离子、介质)以及保持测定中使用的测试药剂和试剂的完整性并且本领域技术人员熟悉并

且/或者可容易地确定的其他组分(例如,细胞)。本文所述的测定和技术还可用于在药物研发期间常规进行且用于质量保证的毒理学分析方法、质量控制测定等。这些方法和目的动物模型可包括适合用于确定衰老清除剂的安全性及效力的非人类灵长动物模型、狗模型、啮齿动物模型或其他动物模型。

[0337] 药物组合物

[0338] 本文还提供了包含如本文所述的衰老清除剂(例如,MDM2抑制剂;一个或多个Bcl-2抗凋亡蛋白家族成员的抑制剂,其中该抑制剂至少抑制Bcl-xL(例如,Bcl-xL选择性抑制剂、Bcl-2/Bcl-xL/Bcl-w抑制剂、Bcl-2/Bcl-xL或Bcl-xL/Bcl-w抑制剂);或Akt特异性抑制剂)和至少一种药学上可接受的赋形剂的药物组合物,其中该药学上可接受的赋形剂也可被称为药学上合适的赋形剂或载体(即,不干扰活性成分的活性的非毒性物质)。药物组合物可以为无菌水溶液或非水性溶液、悬浮液或乳液(例如,微乳液)。本文所述的赋形剂是示例,并且根本不是限制性的。有效量或治疗有效量是指作为单剂量或作为一系列剂量的一部分,有效产生期望治疗效果的施用至受试者的一种或多种衰老清除剂的量。

[0339] 当将两种或更多种衰老清除剂施用于受试者以用于治疗本文所述的疾病或病症时,可将每一种衰老清除剂配制成单独的药物组合物。可以制备包含该单独药物组合物的每一种(为方便可将其称为例如分别包含第一和第二衰老清除剂的每一种的第一药物组合物和第二药物组合物)的药物制剂。所述制剂中的每一种药物组合物可在同一时间(即,同时)通过相同的给药途径施用,或可在不同时间通过相同或不同的给药途径施用。可替代地,可将两种或更多种衰老清除剂一起配制在单个药物组合物中。

[0340] 在其他实施方案中,可将至少一种衰老清除剂与至少一种mTOR、NFκB或PI3-k途径的抑制剂的组合施用至有需要的受试者。当至少一种衰老清除剂与至少一种mTOR、NFκB或PI3-k途径的抑制剂都一起在本文所述的方法中使用以选择性地杀死衰老细胞时,可将每一种药剂配制成相同的药物组合物或配制成单独的药物组合物。可以制备包含该单独药物组合物的每一种的药物制剂,其中为了方便,可将该单独药物组合物的每一种称为例如分别包含衰老清除剂和至少一种mTOR、NFκB或PI3-k途径的抑制剂的每一种的第一药物组合物和第二药物组合物。所述制剂中的每一种药物组合物可在同一时间通过相同的给药途径施用,或可在不同时间通过相同或不同的给药途径施用。

[0341] 在特定的实施方案中,单一衰老清除剂被施用至受试者,并且其是用于治疗病况或疾病的单(即,仅有的、唯一的)活性衰老清除剂(即,单一疗法)。当衰老清除剂为单一衰老清除剂时,不一定排除用于其他目的的药物使用,如姑息性药物或为了舒适而使用的药物;或用于治疗特定疾病或病况但不是衰老清除剂的药物,如用于降低胆固醇的药物或眼部润湿剂,以及医学领域技术人员熟悉的其他这类药物。通过非限制性实例的方式,可施用至患有肺病(例如,COPD)的受试者的其他药剂和药物的实例包括支气管扩张剂(例如,抗胆碱能药物;β-2激动剂);止痛药物;可施用至患有骨关节炎的受试者的药剂和药物包括透明质酸、止痛药(包括外用药物)和类固醇。可施用至患有心血管疾病的受试者的其他药剂和药物包括他汀、β阻滞剂、硝酸甘油、阿司匹林。

[0342] 通常可使用适合用于待治疗病况的测定和方法来监测受试者的治疗有效性,该测定将是对本领域普通技术人员熟悉并且是本文所述的。可通过确定衰老清除剂在生物流体例如血液、血液成分(例如,血清)和/或尿液,以及/或者来自受试者的其他生物样品或生物

组织中的水平,来监测施用至受试者的衰老清除剂(或一种或多种其代谢物)的药代动力学。用于检测该药剂的本领域实践和本文所述的任何方法均可用于测量疗程期间衰老清除剂的水平。

[0343] 用于治疗衰老细胞相关疾病或病症的本文所述衰老清除剂的剂量可取决于受试者的状况,即,疾病的阶段、由该疾病引起的症状的严重性、总体健康状况,以及年龄、性别和体重,以及对医学领域技术人员显见的其他因素。可以以如通过医学领域技术人员确定的、对待治疗疾病合适的方式施用药物组合物。除了关于用于治疗衰老相关疾病或病症的衰老清除剂的使用的上文所述因素外,还可以通过下述因素如患者的状况、患者疾病的类型和严重性、活性成分的具体形式,以及施用方法来确定或调整合适的衰老清除剂施用持续时间与频率。通常可使用实验模型和/或临床试验来确定药剂的最佳剂量。该最佳剂量可取决于受试者的身体质量、重量或血液量。使用足以提供有效治疗的最低量通常是优选的。本文所述衰老清除剂的临床前和临床研究的设计和(包括为了预防性益处施用)是完全在相关领域技术人员的技能范围内的。当两个或更多个衰老清除剂被施用以治疗衰老相关疾病或病症时,每种衰老清除剂的最佳剂量可以是不同的,如低于每种药剂作为单药剂疗法单独施用时的剂量。在某些特定的实施方案中,两种衰老清除剂组合起到协同或叠加作用,因此每种药剂可以以比单独施用更低的量使用。例如,可每天施用的衰老清除剂的量,按体重计,可以在约0.01mg/kg至100mg/kg之间(例如,约0.1至1mg/kg之间)、约1至10mg/kg之间、约10-50mg/kg之间、约50-100mg/kg之间。在其他实施方案中,可每天施用的衰老清除剂的量,按体重计,在约0.01mg/kg至1000mg/kg之间、约100-500mg/kg之间,或约500-1000mg/kg之间。在特定实施方案中,每个治疗周期MDM2抑制剂(例如,Nutlin-3a)的总量、每疗程施用的衰老清除剂的总量不超过2100mg/kg;在其他实施方案中,每疗程施用的总量不超过1400mg/kg。对于待治疗的衰老相关疾病或病症,最佳剂量(每天或每疗程)可以是不同的,并且还可以根据给药途径和治疗方案变化。

[0344] 可通过使用本领域常规实践的技术,以适合用于递送方法的方式配制包含衰老清除剂的药物组合物。该组合物可以为固体(例如,片剂、胶囊)、半固体(例如,凝胶)、液体或气体(气溶胶)的形式。在某些其他特定实施方案中,衰老清除剂(或包含其的药物组合物)作为静脉团输注施用。在某些实施方案中,当衰老清除剂通过输注递送时,根据医学领域技术人员常规进行的技术经由血管将衰老清除剂递送至包含待杀死衰老细胞的器官或组织中。

[0345] 药学上可接受的赋形剂是药学领域中公知的,并且在例如Rowe等人,Handbook of Pharmaceutical Excipients:A Comprehensive Guide to Uses,Properties,and Safety,5th Ed.,2006和Remington:The Science and Practice of Pharmacy(Gennaro, 21st Ed.Mack Pub.Co.,Easton,PA(2005))中描述。示例性药学上可接受的赋形剂包括无菌盐水和在生理pH下的磷酸盐缓冲盐水。可以在药物组合物中提供防腐剂、稳定剂、染料、缓冲液,等。此外,还可以使用抗氧化剂和悬浮剂。通常,根据给药模式以及活性成分的化学组成来选择赋形剂的类型。可替代地,可将本文所述的组合物配制为冷冻干燥物。本文所述的组合物可以是冷冻干燥的,或使用用于在给药时溶解和/或稀释组合物的药剂的一种或多种合适的赋形剂溶液,以其他方式配制为冷冻干燥的产物。在其他实施方案中,使用本领域已知和实践的技术,将该药剂封装在脂质体内。在某些特定实施方案中,衰老清除剂(例如,

ABT-263) 未配制在脂质体内,以应用于用于治疗高度但非完全堵塞动脉的支架。可针对本文和本领域中描述的任何合适的施用方式来配制药物组合物。

[0346] 可通过本领域技术人员已知的若干种途径的任一种将药物组合物递送至有需要的受试者。通过非限制性实例的方式,该组合物可口服、静脉内、腹膜内、通过输注(例如,静脉团输注)、皮下、肠内、直肠、鼻内、通过吸入、口腔、舌下、肌内、经皮、皮内、局部、眼内、阴道、直肠或通过颅内注射递送,或其任意组合。在某些特定实施方案中,如上所述的剂量的施用经由静脉内、腹膜内直接进入目标组织或器官,或经由皮下途径。在某些实施方案中,递送方法包括药物包覆或渗透的支架,其中该药物为衰老清除剂。适用于这样的递送方法的制剂在本文中更详细地描述。

[0347] 在某些特定实施方案中,将衰老清除剂(其可以与至少一种药学上可接受的赋形剂合并以形成药物组合物)直接施用至包含导致疾病或病况显现的衰老细胞的目标组织或器官。在具体实施方案中,在治疗骨关节炎时,将至少一种衰老清除剂直接施用至有需要的受试者的骨关节炎关节(即,关节内)在其他具体实施方案中,可经由局部、经皮、皮内或皮下途径将衰老清除剂施用至关节。在某些其他实施方案中,本文提供了用于通过直接施用至动脉中,治疗与动脉硬化有关的心血管疾病或病症如动脉粥样硬化的方法。在另一个特定实施方案中,用于治疗衰老相关肺部疾病或病症的衰老清除剂(其可以与至少一种药学上可接受的赋形剂合并以形成药物组合物)可通过吸入、鼻内、通过插管或气管内施用,以例如更直接地向感染的肺组织提供衰老清除剂。通过另一个非限制性实例的方法,可通过注射(例如,眼内或玻璃体内)或通过乳膏、软膏、凝胶或滴眼剂的眼睑下方的结膜应用,向眼睛直接递送衰老清除剂(或包含衰老清除剂的药物组合物)。在更加特定的实施方案中,衰老清除剂或包含衰老清除剂的药物组合物可被配制为延时释放(也称为持续释放、控制释放)组合物或可作为静脉团输注施用。

[0348] 药物组合物(例如,用于口服施用或用于注射、输注、皮下递送、肌肉内递送、腹膜内递送或其他方法)可以为液体的形式。例如,液体药物组合物可包含以下的一种或多种:无菌稀释剂如水、盐水溶液(优选生理盐水)、林格氏溶液、等渗氯化钠、可作为溶剂或悬浮介质的固定油、聚乙二醇、甘油、丙二醇或其他溶剂;抗菌剂;抗氧化剂;螯合剂;用于调节渗透压的缓冲液和药剂如氯化钠或葡萄糖。可将肠胃外组合物包封在安瓿、一次性注射器或由玻璃或塑料制成的多剂量小瓶中。生理盐水的使用是优选的,并且可注射的药物组合物是优选无菌的。在另一实施方案中,为治疗眼科病况或疾病,可将液体药物组合物以滴眼剂的形式施用于眼睛。液体药物组合物可以口服递送。

[0349] 对于口服制剂,至少一种本文所述的衰老清除剂可单独使用或与合适的添加剂组合使用以制备片剂、粉末、颗粒或胶囊,并且如果期望,与稀释剂、缓冲剂、润湿剂、防腐剂、着色剂和调味剂组合使用。可以用缓冲液配制将该化合物,以提供对该化合物的保护以免受胃环境的低pH,和/或与肠溶衣一起配制。包含在药物组合物中的衰老清除剂可以与例如液体、固体或半固体制剂中的调味剂配制,和/或与肠溶衣配制,以供口服递送。

[0350] 可将包含本文所述衰老清除剂的任一种的药物组合物配制用于持续释放或缓慢释放(也称为延时释放或控制释放)。这样的组合物通常可使用公知的技术制备,并通过例如口服、直肠、皮内或皮下植入施用,或通过期望的目标部位处的植入而施用。缓释制剂可含有分散在载体基体中和/或包含在被速率控制膜包围的储液室内的化合物。此类制剂

内使用的赋形剂是生物性相容的,并且还可以是生物可降解的;优选地,该制剂提供相对恒定的活性组分释放水平。包含在缓释制剂内的活性药剂的量取决于植入的部位、释放的速率和预期时长,以及待治疗或预防的病况、疾病或病症的性质。

[0351] 在某些实施方案中,将包含衰老清除剂的药物组合物配制用于经皮、皮内或局部施用。可使用注射器、绷带、透皮贴剂、插入物,或注射器样敷涂器,以粉末/滑石或其他固体、液体、喷雾、气溶胶、软膏、泡沫、乳膏、凝胶、糊剂的形式施用该组合物。这优选地是以局部施用或直接注射(皮内或皮下地)至待治疗区域内或附近的皮肤的控释制剂或缓释制剂的形式。活性组分还可以经由离子电渗疗法递送。防腐剂可用于防止真菌及其他微生物的生长。合适的防腐剂包括但不限于苯甲酸、尼泊金丁酯、尼泊金乙酯、尼泊金甲酯、尼泊金丙酯、苯甲酸钠、丙酸钠、苯扎氯铵、苄索氯铵、苯甲醇、西吡氯铵、氯丁醇、苯酚、苯乙醇、硫柳汞,及其组合。

[0352] 可将包含衰老清除剂的药物组合物配制为用于局部施用的乳液。乳液含有分散在第二种液体的主体中的一种液体。乳液可以是水包油乳液或油包水乳液。油相和水相的任一种或两者都可含有一种或多种表面活性剂、乳化剂、乳液稳定剂、缓冲剂以及其他赋形剂。油相可含有其他药学上容许的油性赋形剂。合适的表面活性剂包括但不限于阴离子表面活性剂、非离子表面活性剂、阳离子表面活性剂和两性表面活性剂。用于局部应用的组合物还可包含至少一种合适的悬浮剂、抗氧化剂、螯合剂、润肤剂,或保湿剂。

[0353] 例如,通过添加合适的增稠剂和/或胶凝剂,可用水性或油性基质配制软膏和乳膏。可以用水性或油性基质配制洗剂,并且该洗剂通常还将含有一种或多种乳化剂、稳定剂、分散剂、悬浮剂、增稠剂或着色剂。液体喷雾可经由例如特殊形状的封闭件从加压包装递送。水包油乳液还可用于组合物、贴片、绷带和制品。这些体系是半固体乳液、微乳液或泡沫乳液体系。

[0354] 在一些实施方案中,可以用含油基质或软膏配制衰老清除剂,以形成具有期望形状的半固体组合物。除了衰老清除剂之外,这些半固体组合物可含有溶解和/或悬浮的杀菌剂、防腐剂和/或缓冲体系。可包含的矿脂组分可以是粘度从包含异丁烯、胶体二氧化硅或硬脂酸盐的矿物油至固体石蜡的任何石蜡。吸收基质可以与含油体系一起使用。添加剂可包括胆固醇、羊毛脂(羊毛脂衍生物、蜂蜡、脂肪醇、羊毛蜡醇、低HLB(亲水亲油平衡值)乳化剂,以及各种离子和非离子表面活性剂(单独或组合)。

[0355] 控释或缓释透皮或局部制剂可通过添加本领域可用的延时释放添加剂,如聚合物结构、基体而实现。例如,可通过使用热熔融挤出制品(如生物粘附性热熔融挤出膜)施用组合物。制剂可包含交联的聚羧酸聚合物制剂。交联剂可以以这样的量存在,其中该量提供充分的粘附力以允许该体系与目标上皮或内皮细胞表面附接足够的时间,以允许化合物的期望释放。

[0356] 插入物、透皮贴片、绷带或制品可包含聚合物的混合物或涂层,其提供长时间恒定速率的活性药剂释放。在一些实施方案中,该制品、透皮贴片或插入物包含可以与非水溶性聚合物混合的水溶性造孔剂如聚乙二醇(PEG),以增加插入物的耐久性并延长活性成分的释放。

[0357] 透皮装置(插入物、贴片、绷带)也可包含非水溶性聚合物。速率控制聚合物可以对向部位给药有用,其中pH变化可用于实现释放。可以在与活性化合物喷涂和干燥的过程期

间使用连续的涂覆膜施加这些速率控制聚合物。在一个实施方案中,涂覆制剂被用于涂覆包含被压缩以形成固体生物可降解插入物的活性成分的丸剂。

[0358] 聚合物制剂还可用于提供控制或持续释放。可以使用本领域中描述的生物粘附性聚合物。通过示例的方式,可以将缓释凝胶和化合物掺入聚合物基体如疏水性聚合物基体中。聚合物基体的实例包括微粒。微粒可以是微球,并且核心可以是与聚合物壳不同的材料。可替代地,可将聚合物铸造成薄板或薄膜、通过研磨或其他标准技术产生的粉末,或凝胶如水凝胶。该聚合物还可以是绷带、支架、导管、血管移植或其他装置的涂层或一部分的形式,以促进衰老清除剂的递送。该基质可以通过溶剂蒸发、喷雾干燥、溶剂萃取以及本领域技术人员已知的其他方法形成。

[0359] 在用于治疗与动脉硬化有关或由其导致的心血管疾病的本文所述方法的某些实施方案中,可经由支架将一种或多种衰老清除剂直接递送至血管(例如,动脉)中。在特定的实施方案中,支架被用于将衰老清除剂递送至动脉粥样硬化血管(动脉)。支架通常是管状金属装置,其具有薄金属网样架构,并且其以压缩形式插入并随后在目标部位扩张。支架旨在为扩张的血管提供长期的支撑。本领域中描述了用于制备药物涂覆和药物包埋的支架的若干种方法。例如,可将衰老清除剂掺入应用于支架的聚合物层中。可使用单一类型的聚合物,并且可将衰老清除剂渗透的聚合物的一层或多层施于裸金属支架,以形成衰老清除剂包覆的支架。还可将衰老清除剂加入金属支架自身的孔中,其在本文中也可被称为衰老清除剂渗透的支架或衰老清除剂包埋的支架。在某些特定的实施方案中,可将衰老清除剂配制在脂质体内并施于支架;在其他特定实施方案中,例如,当衰老清除剂为ABT-263时,ABT-263未配制在脂质体中。动脉粥样硬化动脉中支架的放置通过医学领域的技术人员进行。衰老清除剂涂覆或包埋的支架不仅扩张感染的血管(例如,动脉),还可对(1)减少斑块的量,(2)抑制斑块形成,和(3)增加斑块的稳定性(例如,通过降低斑块的脂质含量;和/或造成纤维盖厚度的增加)的一项或多项有效,特别是对靠近药剂涂覆或药剂包埋的支架的斑块有效。

[0360] 在一个特定的实施方案中,施用至患有眼部衰老相关疾病或病症的受试者的衰老清除剂可眼内或玻璃体内递送。在其他具体实施方案中,可通过结膜途径,将衰老清除剂施加至上眼睑、下眼睑或二者的粘膜和组织来将衰老清除剂施用至眼睛。任何这些施用均可以使团输注。在其他特定的实施方案中,可将包含本文所述衰老清除剂的任一种的药物组合物配制用于持续或缓慢释放(其也可被称为延时释放或控制释放),该制剂在本文中更详细地描述。在某些实施方案中,本文提供了用于治疗或预防(即,降低发生的可能性;延迟发作或发展;或抑制、延迟、减缓或阻碍进展或严重性)眼部疾病、病症或病况(例如,老视、白内障、黄斑变性);用于选择性地杀死受试者眼睛中衰老细胞,和/或通过向眼睛直接施用至少一种衰老清除剂(其可以与至少一种药学上可接受的赋形剂合并以形成药学组合物),诱导有需要的受试者的眼睛中胶原(如IV型胶原)产生的方法。

[0361] 对于包含核酸分子的药物组合物,该核酸分子可以存在于本领域普通技术人员已知的多种递送系统内,该递送系统包括核酸和细菌、病毒以及哺乳动物表达系统,诸如例如如本文提供的重组表达构建体。用于将DNA并入这样的表达系统的技术是本领域普通技术人员公知的。例如,如Ulmer等人,Science 259:1745-49,1993中描述并由Cohen, Science 259:1691-92,1993综述的,该DNA也可被称为“裸的”。可通过将该DNA涂覆至被有效

地运送至细胞中的生物可降解珠子上来增加裸DNA的摄入。可根据本领域中描述的若干种方法的任一种将核酸分子递送至细胞中(参见,例如,Akhtar等人,Trends Cell Bio.2:139 (1992);Delivery Strategies for Antisense Oligonucleotide Therapeutics, ed.Akhtar,1995、Maurer等人,Mol.Membr.Biol.16:129-40 (1999);Hofland等人,Handb.Exp.Pharmacol.137:165-92 (1999);Lee等人,ACS Symp.Ser.752:184-92 (2000);美国专利号6,395,713;国际专利申请公开号W0 94/02595;Selbo等人,Int.J.Cancer 87: 853-59 (2000);Selbo等人,Tumour Biol.23:103-12 (2002);美国专利公开号2001/0007666和2003/077829)。

[0362] 提供了一种具有一种或多种本文所述药剂的单位剂量(通常为口服或可注射剂量)的试剂盒。此类试剂盒包含含有该单位剂量的容器、描述该药物在治疗衰老细胞相关疾病时的使用和伴随益处的信息包装插页,并任选地包含用于递送该组合物的器具或装置。

[0363] 实施例

[0364] 实施例1

[0365] 用于确定Nutlin-3a的衰老清除活性的体外细胞测定

[0366] 将包皮成纤维细胞系HCA2和BJ、肺成纤维细胞系IMR90和小鼠胚胎成纤维细胞接种在六孔板中,并通过10Gy的电离辐射(IR)或用多柔比星(Doxo)处理24hr来诱导衰老。允许衰老表型发展至少7天,在该时间点进行细胞计数以确定细胞的基线数目。然后开始Nutlin-3a处理,为期至少9天。至少每三天酌情更新具有药物的培养基或仅培养基。在测定时期结束时,对细胞进行计数。将每种情况接种在三个平板孔中并独立地计数。初始的细胞计数充当对照,以与无nutlin处理的最后一天计数相比确定衰老的诱导。初始的无衰老细胞计数充当用于确定Nutlin-3a毒性的代表(proxy)。图1示出了实验设计的图示。

[0367] 将包皮成纤维细胞系HCA2和BJ、肺成纤维细胞系IMR90和小鼠胚胎成纤维细胞暴露于10Gy的电离辐射(IR)以诱导衰老。辐照后七天,用不同浓度的Nutlin-3a(0、2.5 μ M和10 μ M)处理细胞为期9天,其中至少每3天更新该药物。存活百分比以[Nutlin-3a处理第9天的细胞计数/Nutlin-3a处理第一天的初始细胞计数]计算。结果在图2A-D示出,其显示,Nutlin-3a降低了衰老的包皮成纤维细胞(HCA2和BJ)、肺成纤维细胞(IMR90)和小鼠胚胎成纤维细胞(MEF)的细胞存活,表明Nutlin-3a是衰老清除剂。

[0368] 用多柔比星(250nM)处理包皮成纤维细胞(HCA2)和主动脉内皮细胞(Endo Aort)持续一天(24小时),以诱导衰老(参见图1)。多柔比星处理后八天,开始Nutlin-3a处理。将HCA2细胞暴露于Nutlin-3a持续9天,并将主动脉内皮细胞暴露于Nutlin-3a持续11天。至少每3天更新含有该化合物的培养基或对照培养基。存活百分比以[Nutlin-3a处理最后一天的细胞计数/Nutlin-3a处理第一天的初始细胞计数]计算。结果在图3A-B中示出,其显示,多柔比星诱导的衰老细胞对Nutlin-3a敏感。

[0369] 将未衰老的包皮成纤维细胞(HCA2)、肺成纤维细胞(IMR90)和小鼠胚胎成纤维细胞(MEF)用不同浓度(0、2.5 μ M和10 μ M)的Nutlin-3a处理为期9天,以评价Nutlin-3a毒性。在Nutlin-3a处理的开始(NS开始)和结束时进行细胞计数。未用Nutlin-3a处理的细胞在第9天(NS 0)的计数与在第0天(NS开始)确定的细胞计数之间的差异反映了经过指定时间段的细胞生长。结果在图4A-C中示出,其显示,Nutlin-3a处理使增生减少,但对非衰老细胞是无毒性的。Nutlin-3a处理未将细胞数目减少至低于起始水平,表明没有毒性。NS 0与NS 2.5

之间和NS 0与NS 10之间的明显存活的降低反映了细胞生长的减少。不希望受理论的约束，Nutlin-3a可以稳定p53，从而导致细胞周期生长受阻。

[0370] 如上所述的，还将非衰老的主动脉内皮 (Endo Aort) 细胞和前脂肪细胞 (Pread) 用不同浓度 (0、2.5 μ M和10 μ M) 的Nutlin-3a处理为期11天，以评价Nutlin-3a毒性。在Nutlin-3a处理的第0天开始 (NS开始) 和结束 (NS 0) 时进行细胞计数。未用Nutlin-3a处理的细胞在第11天 (NS 0) 的计数与来自NS开始的细胞计数之间的差异反映了经过指定时间段的细胞生长。结果在图5A-B中示出，说明Nutlin-3a处理使增生减少，但对非衰老细胞是无毒性的。如通过成纤维细胞观察到的，Nutlin-3a处理未将细胞数目减少至低于起始水平，表明没有毒性。NS 0与NS 2.5之间和NS 0与NS 10之间的明显存活的降低反映了细胞生长的减少。

[0371] 实施例2

[0372] p16-3MR转基因小鼠的Nutlin-3a处理

[0373] 在转基因p16-3MR小鼠中确定Nutlin-3a体内去除衰老细胞的能力 (参见，例如，国际申请公开号W02013/090645)。实验方案的图示在图6中提供。该转基因小鼠包含与三形态 (trimodal) 融合蛋白可操作连接的p16^{Ink4a} 启动子，用于检测衰老细胞和用于这些转基因小鼠中衰老细胞的选择性清除，该启动子在图7中示出。在衰老细胞中具转录活性但在非衰老细胞中不具转录活性的启动子p16^{Ink4a} (参见，例如，Wang等人，J. Biol. Chem. 276:48655-61 (2001)；Baker等人，Nature 479:232-36 (2011)) 被工程化入核酸构建体。3MR (三形态报告子) 是含有合成海肾萤光素酶 (LUC)、单体的红色荧光蛋白 (mRFP) 和截短的单纯疱疹病毒 (HSV)-1胸苷激酶 (tTK) 的功能性结构域的融合蛋白，其允许通过更昔洛韦 (GCV) 杀死 (参见，例如，Ray等人，Cancer Res. 64:1323-30 (2004))。3MR cDNA以与外显子16合框的形式被插入外显子2中，产生含有p16的前62个氨基酸的融合蛋白，而非全长野生型p16蛋白。3MR cDNA的插入还导致终止密码子在外显子2的p19^{ARF} 阅读框中出现，由此也阻止了全长p19^{ARF} 从BAC表达。将p16^{Ink4a} 基因启动子 (约10万个碱基对) 引入至编码三形态报告子融合蛋白的核苷酸序列的上游。可替代地，可使用截短的p16^{Ink4a} 启动子 (参见，例如，Baker等人，Nature，同上；国际申请公开号W02012/177927；Wang等人，同上)。因此，3MR的表达仅由衰老细胞中的p16^{Ink4a} 启动子驱动。可检测的标志物LUC和mRFP允许分别通过生物发光和荧光来检测衰老细胞。tTK的表达允许通过暴露于前药更昔洛韦 (GCV) (其被tTK转化成具细胞毒性的部分) 选择性地杀死衰老细胞。使用用于向动物引入转基因的已知程序确立并繁殖了具有C57B16背景的转基因奠基者 (founder) 动物 (参见，例如，Baker等人，Nature 479:232-36 (2011))。

[0374] 将雌性C57/BL6 p16-3MR小鼠随机化至多柔比星+Nutlin-3a处理的组或仅多柔比星处理的组 (参见图6)。通过在Nutlin-3a施用前十天 (第-10天) 向小鼠腹膜内施用10mg/kg的多柔比星来诱导衰老。从多柔比星处理后的第10天到第24天，每日腹膜内施用Nutlin-3a (25mg/kg) (组=9只小鼠)。用等体积的PBS注射对照小鼠 (多柔比星处理的) (组=3只小鼠)。发光成像 (Xenogen成像系统) 在第0天 (即，多柔比星处理后10天) 进行，作为每只小鼠的基线 (100%强度)。

[0375] 在Nutlin-3a处理开始后第7、14、21、28和35天进行小鼠的发光成像。将发光 (L) 的减少计算为： $L = (\text{Nutlin-3a处理后成像}) / (\text{基线成像}) \%$ 。如果L大于等于100%，则衰老细胞的数目未减少。如果L小于100%，则衰老细胞的数目减少。每只小鼠独立计算，并且将背

景从每个样品减去。结果如图8中所示,其表明用Nutlin-3a处理减少了与多柔比星诱导的衰老有关的发光。在Nutlin-3a处理的动物中,经统计,在第14天、第28天和第35天观察到发光统计上显著减少。

[0376] 进行了实验以确定Nutlin-3a处理对与衰老有关的基因的表达的影响。如上所述的雌性C57/BL6 p16-3MR的组。Nutlin-3a处理结束后三周(第35天),将多柔比星处理的小鼠(对照)(N=3)和多柔比星+Nutlin-3a处理的小鼠(N=6)处死。收集了皮肤和脂肪活检以供RNA提取;收集了脂肪活检以检测衰老相关的 β -半乳糖苷酶;并将肺急速冷冻在低温防护剂OCT介质中以便恒冷箱切片。

[0377] 使用用于实时PCR测定的Roche Universal Probe Library,相对于肌动蛋白mRNA(cDNA量的对照),分析了RNA的内源衰老标志物(p21、p16^{INK4a}(p16)和p53)和SASP因子(mmp-3和IL-6)的mRNA水平。结果如图9A-E所示,其表明,Nutlin-3a处理使SASP因子和与多柔比星诱导的衰老有关的衰老标志物的表达减少。该值代表相对于未处理的对照动物,相应mRNA的诱导倍数。

[0378] 将冷冻的肺组织切片成10 μ M厚,并用抗 γ H2AX的兔多克隆一抗(Novus Biologicals, LLC)染色,其中 γ H2AX为细胞中双链断裂(DNA损坏)的标志物。然后将切片用ALEXAFLUOR®染料标记的山羊抗兔二抗(Life Technologies)染色,并用4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)(Life Technologies)复染。使用ImageJ图像处理程序(National Institutes of Health,参见因特网imagej.nih.gov/ij/index.html)计算阳性细胞的数量,并将其表示为细胞总数的百分比。结果如图10A-B所示,其显示,nutlin-3A处理降低了具有由多柔比星诱导的DNA损伤的细胞数目。图10A示出了与仅用多柔比星处理相比,多柔比星+Nutlin-3a处理的细胞中的 γ H2AX染色减少。图10B示出了与仅用多柔比星处理相比,多柔比星+Nutlin-3a处理的细胞中的 γ H2AX阳性细胞百分比下降。

[0379] 收集时,将脂肪活检立即固定在4%福尔马林中并然后用含有X-gal的溶液染色,以检测衰老相关 β -半乳糖苷酶(β -gal)的存在。将脂肪活检在37℃下X-gal溶液中温育过夜,并在次日拍照。将来自未处理动物的脂肪活检用作阴性对照(CTRL)。结果如图11所示,其显示,与仅用多柔比星处理的小鼠相比,Nutlin-3a处理降低了来自具有多柔比星诱导的衰老的动物的脂肪活检中的衰老相关 β -gal强度,该强度与未处理的阴性对照相似。

[0380] 实施例3

[0381] MDM2抑制剂去除具有确立的SASP的衰老细胞

[0382] 通过施加10Gy的辐照将原代人成纤维(IMR90)细胞诱导衰老。辐照后七天(第0天),将细胞用10 μ M Nutlin-3a或媒介物(DMSO)处理九天(第9天)。每三天更新药物或媒介物。在第9天去除药物/媒介物,并将细胞额外培养三天(第12天)。然后将细胞用4%多聚甲醛固定并用特异性抗-IL-6抗体(R&D, AF-206-NA)通过免疫荧光染色。用DAPI复染细胞以供细胞核可视化。IL-6阳性细胞百分比在图12A中示出。IL-6阳性细胞免疫荧光的实例在图12B中示出。使用CellProfiler软件以公正的(unbiased)方式确定IL-6阳性细胞。评价了三种不同的培养物。非衰老细胞没有可检测的细胞IL-6产生,而在媒介物(DMSO)处理后的第9天(辐照后16天),衰老细胞为约8%阳性。Nutlin-3a处理将IL-6阳性细胞百分比降低至低于5%的水平。三天后,在第12天,将Nutlin-3a去除,在辐照后19天,媒介物对照中IL-6阳性细胞为约9%,而Nutlin3a处理的细胞低于1%为IL-6阳性。

[0383] 在另一个实验中,通过辐照(10Gy)将IMR90细胞诱导衰老。辐照后七天,将细胞用10 μ M Nutlin-3a或媒介物(DMSO)处理九天(第9天)。每三天更新药物或媒介物。在第9天去除药物/媒介物,并将细胞额外培养六天。收集了来自处理的细胞的条件培养基,并通过ELISA进行了IL-6测量(Perkin Elmer, AL223F)。依照制造商的说明(AL223F, Perkin Elmer),使用试剂盒通过ELISA确定培养基中的IL-6水平。将细胞用4%多聚甲醛固定并用特异性抗-IL-6抗体(R&D, AF-206-NA)通过免疫荧光染色。将通过ELISA确定的IL-6水平相对于每个孔中细胞的数目归一化。数据在图22C中以与非衰老细胞(NS)中的水平相比,处理的细胞中IL-6的相对水平呈现。数据以三个不同细胞样品的平均值呈现。

[0384] 衰老细胞中IL-6的水平为非衰老细胞中的水平的10-40倍高。Nutlin-3a处理的衰老细胞具有与DMSO处理的细胞相比低至5-9倍的IL-6水平。在Nutlin-3a处理后存活的细胞具有更低的IL-6分泌,并且通过外推,其具有更低的SASP,表明Nutlin-3a优先杀死具有完全确立的SASP的衰老细胞。

[0385] 实施例4

[0386] MDM2抑制剂去除具有确立的SASP的衰老细胞:

[0387] SASP因子表达

[0388] 通过施加10Gy的辐照将原代人成纤维(IMR90)细胞诱导衰老。辐照后七天(第0天),将细胞用10 μ M Nutlin-3a或媒介物(DMSO)处理九天(第9天)。每三天更新药物或媒介物。在第9天去除药物/媒介物,并将细胞在没有药物或DMSO的培养基中额外培养三天(第12天)。然后收集细胞、提取mRNA并制备cDNA。然后进行定量PCR(qPCR)以检测不同基因的表达。还在药物/媒介物已被去除3天后,于第12天收集细胞。数据以三个样品的平均值呈现。将数据相对于肌动蛋白归一化,并以与非衰老细胞的比例示出。数据在图13A-13F中呈现。

[0389] 衰老细胞中的p21水平为高至约10倍,并且当将细胞用Nutlin-3a处理时p21水平更高(约90倍)。Nutlin-3a使p53稳定,而p53是激活细胞周期依赖性激酶抑制剂p21的表达的转录因子。在第12天,DMSO处理的细胞中的p21水平与第9天的水平相当,其还与第12天Nutlin-3a处理的细胞中的水平相当。这些数据表明,Nutlin-3a对细胞的急性作用在药物暴露去除后的三天后消除。另一种衰老标志物P16的水平在辐照的细胞中增加,但在Nutlin-3a的存在下没有变化。药物去除后三天(第12天),观察到p16水平降低。SASP的调节物IL-1 α 的水平仅在Nutlin-3a去除后降低。CXCL-1、IL-6和IL-8是三种其他的SASP因子。当Nutlin-3a存在时,全部三种因子的水平都是降低的,并且在药物去除后保持得更低。这些数据显示,经Nutlin-3a处理存活的细胞具有更低的p16水平,表明Nutlin-3a优先杀死为高p16表达者的细胞。类似地,SASP因子在存活的细胞中降低,同样表明Nutlin-3a优先杀死具有更高SASP的细胞。

[0390] 实施例5

[0391] MDM2抑制剂去除具有提高的DNA损伤反应的衰老细胞

[0392] 通过施加10Gy的辐照将原代人成纤维(IMR90)细胞诱导衰老。辐照后七天(第0天),将细胞用10 μ M Nutlin-3a或媒介物(DMSO)处理九天(第9天)。每三天更新药物或媒介物。在第9天去除药物/媒介物,并将细胞在没有药物或DMSO的培养基中额外培养六天,其中每三天更换培养基。在第0天(非衰老细胞)、第9天、第12天和第15天收集细胞,并提取和处理蛋白质以供免疫印迹(Western印迹)。在每个时间点处理两个样品;一个样品的结果在图

14中提供。

[0393] 数据显示,在已被Nutlin-3a处理的细胞中,即使在该药物已被去除时,激酶ATM的磷酸化更低(参见pATM S1981)。类似地,在Nutlin 3A处理后以及同样在药物去除后,ATM的底物H2AX的磷酸化水平降低(参见 γ H2AX)。在衰老细胞中,IkBa在NF- κ B途径被激活时降解,这产生SASP。数据显示,在药物去除后,Nutlin-3a处理的细胞中IkBa的水平接近非衰老细胞中IkBa的水平。在Nutlin-3a处理的样品中,MDM2、p53和p21的每一种的水平均升高,并且在药物被去除时降低。

[0394] 这些数据还支持Nutlin-3a优先杀死具有更高SASP的细胞。此外,因为在药物处理后的存活细胞中产生了更低水平的激活的ATM,所以这些数据表明,DNA损伤反应激活的衰老细胞是对Nutlin-3a敏感的细胞。

[0395] 实施例6

[0396] 使用细胞计数测定的ABT-263对衰老细胞的选择性毒性

[0397] 为确定相比于非衰老细胞,ABT-263是否对衰老细胞是选择性毒性的,将细胞计数测定用于确定用ABT-263处理后的细胞存活。细胞计数测定的一般时间线和程序在图15中示出。将IMR90细胞(人原代肺成纤维细胞(IMR90)(IMR-90(ATCC®CCL-186TM, Mannassas, Virginia)))接种在六孔板中,并通过10Gy的电离辐射(IR)诱导衰老(第0天)。每3天更新培养基。允许衰老表型发展7天,在该时间点进行细胞计数以确定细胞的基线数目。在衰老细胞(辐照的)和非衰老细胞(未辐照的细胞)中,将3 μ M ABT-263引入至培养基。作为对照,向一些细胞施用不含任何ABT-263的培养基,以针对任何ABT-263毒性。将每种情况接种在三个孔中并独立地计数。在暴露于ABT-263(或对照培养物)24小时后对细胞进行计数。

[0398] 图16显示了测量为24小时后存活细胞百分比的ABT-263对非衰老细胞的影响。向非衰老细胞(中间的柱形)添加ABT-263不会将细胞生长降低至低于起始水平(最左侧的柱形),表明在非衰老细胞中不存在毒性。ABT-263未处理的细胞作为对照示出于最右侧。

[0399] 图17显示了测量为24小时后存活细胞百分比的ABT-263对衰老细胞的影响。向衰老细胞(中间的柱形)添加ABT-263将细胞生长降低至低于起始水平细胞的数目(最左侧的柱形)。ABT-263处理的细胞具有ABT-263处理前28%的细胞计数。ABT-263未处理的细胞作为对照示出于最右侧。

[0400] 实施例7

[0401] 使用CellTiter-Glo®细胞活力测定的ABT-263对衰老细胞的选择性毒性

[0402] 为确定相比于非衰老细胞,ABT-263是否对衰老细胞是选择性毒性的,将细胞活力测定用于评价用ABT-263处理后的细胞存活。细胞计数测定的一般时间线和程序在图18中示出。将IMR90细胞(人原代肺成纤维细胞(IMR90)(IMR-90(ATCC®CCL-186TM, Mannassas, Virginia)))接种在六孔板中,并通过10Gy的电离辐射(IR)诱导衰老(第0天)。每3天更新培养基。允许衰老表型发展7天,在该时间点进行细胞计数以确定细胞的基线数目,随后接种至96孔板中。在第8天,将衰老细胞(辐照的)和非衰老细胞(非辐照细胞)暴露于ABT-263的连续稀释为期3天。ABT-263浓度在0.5nM至3 μ M的范围内。将每种情况以一式三份接种。

[0403] 在三天的处理后(第11天),使用可商购的CellTiter-Glo® (CTG) Luminescent

Cell Viability Assay (Promega Corporation, Madison, Wisconsin) 分析细胞的细胞存活。该测定根据存在的ATP的定量来确定培养基中活细胞的数目,其中ATP是代谢活性细胞的指示物。

[0404] 图19显示了衰老细胞和非衰老细胞中ABT-263的IC₅₀曲线。IC₅₀曲线是通过细胞活力测定确定的ABT-263处理后细胞存活百分比的图。该图显示了不同浓度水平的ABT-263对细胞存活的影响。ABT-263对非衰老细胞的IC₅₀为2.4 μ M, 相比而言对衰老细胞的IC₅₀为140nM, 证实了ABT-263对衰老细胞的选择性毒性。观察到体外理论治疗指数为17。

[0405] 实施例8

[0406] ABT-263对各种细胞类型的衰老细胞的选择性毒性的评价

[0407] 在其他的细胞株中重复了实施例7的方法。细胞株包括原代肾皮质细胞, ATCC Cat#PCS-400-011 (图20)、HCA2包皮成纤维细胞 (图21)、原代小气道上皮细胞, ATCC Cat#PCS-301-010 (肺) (图22)、来自患者的人合并前脂肪细胞 (Pread) (图23)、从C57B16小鼠提取的小鼠胚胎成纤维细胞 (MEF) (图24)、原代冠状动脉平滑肌, ATCC Cat#PCS-100-021 (SmtH Msc1) (图25)。

[0408] 在这些其他细胞株中进行的实验基本上如实施例7所述的进行。如图20所示, ABT-263对非衰老细胞的IC₅₀为430nM, 相比而言对衰老细胞的IC₅₀为25nM, 证实了ABT-263对肾上皮细胞中的衰老细胞的选择性毒性。

[0409] 如图21所示, ABT-263对非衰老细胞的IC₅₀在直到3 μ M时都是非毒性的, 相比而言对衰老细胞的IC₅₀为410nM, 证实了ABT-263对HCA2细胞中的衰老细胞的选择性毒性。

[0410] 实施例9

[0411] ABT-263及其他Bcl-2抑制剂对衰老的人原代肺成纤维细胞的选择性毒

[0412] 性的评价

[0413] 为确定其他Bcl-2抑制剂是否对衰老细胞表现出超过对非衰老细胞的选择性毒性, 将细胞用ABT-199处理 (Selleckem Cat#S8048, Houston, TX) 或Obatoclax (Selleckem Cat#S1057)。ABT-199和Obatoclax是已知的Bcl-2抑制剂。

[0414] 为评价这些其他Bcl-2抑制剂的作用而进行的实验基本上如实施例7所述的进行。将细胞暴露于在15nM至100 μ M范围的系列稀释浓度下的ABT-199中 (图26和27)。将细胞暴露于在1.4nM至9 μ M范围的浓度下的Obatoclax中 (图28)。

[0415] 如图26-27所示, 与衰老细胞中6.9 μ M-12.4 μ M的IC₅₀相比, ABT-199在非衰老细胞中具有6 μ M-15.8 μ M的IC₅₀值。如图28所示, 与衰老细胞中125nM的IC₅₀相比, Obatoclax在非衰老细胞中具有75nM的IC₅₀值。图26-28证实ABT-199和Obatoclax没有相对于非衰老细胞选择性地靶向衰老细胞的能力。

[0416] 对Bcl-2A1特异性的化合物也没有选择性地杀死衰老细胞。如实施例7中所述的, 通过辐照将IMR90细胞诱导衰老。然后将辐照的IMR90细胞和非衰老的IMR90细胞暴露于被称为ML214的化合物, 该化合物是Bcl-2A1特异性抑制剂。衰老细胞的杀死水平与非衰老细胞的杀死水平相当。

[0417] 实施例10

[0418] 单独的Akt抑制剂MK-2206以及其与ABT-263组合对衰老细胞的选择性毒性

[0419] 针对IMR90细胞中衰老细胞与非衰老细胞相比的选择性毒性, 测试了ABT-263与

Akt抑制剂MK-2206组合的效果。重复了实施例7的方法,不过除了暴露于ABT-263的系列稀释液,还暴露于10nM MK-2206 (Selleckem, Cat#S1078)。

[0420] 图29A示出了ABT-263处理与10nM MK-2206组合对衰老细胞和非衰老细胞的剂量依赖性图线。ABT-263+MK-2206处理的衰老细胞具有0.083 μ M的IC₅₀值,而非衰老细胞中的ABT-263+MK-2206细胞具有>3 μ M的IC₅₀值,得到对衰老细胞>36的选择性指数。

[0421] 通过将衰老的IMR90细胞和非衰老的IMR90细胞暴露于MK-2206的系列稀释中(参见实施例7中的程序),确定了单独的MK-2206的衰老清除效果。存活百分比得以确定,并且结果如图29B所示。

[0422] 实施例11

[0423] 用于确定ABT-263在小鼠中的衰老清除效果的动物研究

[0424] 衰老清除剂例如ABT-263的衰老清除效果可以在衰老的动物模型中评价。这样的动物研究的实例描述于此。可通过施用多柔比星诱导动物的衰老,接着进行衰老清除剂的处理。在第35天,将小鼠处死,并收集脂肪和皮肤以供RNA分析,同时收集肺并急速冷冻以供免疫显微术分析。分析了RNA的SASP因子(mmp3, IL-6)和衰老标志物(p21、p16和p53)的表达。对于冷冻的肺组织的DNA损伤标志物(γ H2AX)进行分析。

[0425] 待测试的小鼠含有p16-3MR的转基因插入。3MR(三形态报告子)是含有合成海肾萤光素酶(LUC)、单体的红色荧光蛋白(mRFP)和截短的单纯疱疹病毒(HSV)-1胸苷激酶(tTK)的功能性结构域的融合蛋白,其允许通过更昔洛韦(GCV)杀死。3MR cDNA以与p16合框(in frame)的方式被插入外显子2中,产生含有p16的前62个氨基酸的融合蛋白,但不包含全长野生型p16蛋白。3MR cDNA的插入还在外显子2中的p19^{ARF}阅读框中引入终止密码子。

[0426] 通过发光强度的降低分析了ABT-263的效果。将雌性C57/B16p16-3MR小鼠用多柔比星处理。在10天后测量发光,并用作每个小鼠的基线(100%强度)。从多柔比星处理后的第10天到第24天,每日腹膜内施用ABT-263。然后,在ABT-263处理后的第7、14、21、28、35天测量发光,并将最终值计算为基线值的%。用等体积的PBS注射对照动物(DOX0)。

[0427] 将来自仅用多柔比星(DOX0)处理或多柔比星加ABT-263处理后的动物的皮肤和脂肪中内源mmp-3、IL-6、p21、p16和p53的mRNA水平作图。该值代表与未处理的对照动物相比,特定mRNA的诱导倍数。

[0428] 可通过与对 γ H2AX特异性的兔多克隆一抗结合,随后与山羊抗兔二抗温育,并然后用DAPI复染,对来自多柔比星处理(DOX0)以及多柔比星和ABT-263处理的动物的肺切片进行免疫荧光显微术。计算了来自免疫荧光显微术的阳性细胞百分比,并可将其表示为细胞总数的百分比。可以从多柔比星处理的小鼠(Doxo)以及多柔比星+ABT-263处理的小鼠获得数据。

[0429] 可以针对来自首先用多柔比星处理的动物的脂肪活检的衰老相关(SA) β -半乳糖苷酶(β -gal)强度的降低来分析ABT-263。将雌性C57/BL6p16-3MR小鼠用多柔比星处理。在多柔比星处理后的第10至第24天,一部分多柔比星处理的动物每日接受ABT-263或PBS(DOX0)。ABT-263处理后三周,将小鼠处死并立即固定脂肪活检,并用含有X-Gal的溶液染色。将未处理的动物用作阴性对照(CTRL)。

[0430] 实施例12

[0431] 用于确定WEHI-539的衰老清除活性的体外细胞测定

[0432] 将肺成纤维细胞系IMR90 (人原代肺成纤维细胞, ATCC®CCL-186TM, Manassas, Virginia) 和肾细胞系 (原代肾皮质细胞, ATCC目录号PCS-400-011) 接种在六孔板中, 并通过10Gy的电离辐射 (IR) 诱导衰老。允许衰老表型发展至少7天。

[0433] 在衰老表型发展后, 将细胞重新接种至96孔板中, 并将衰老细胞 (辐照的) 和非衰老细胞 (未辐照的细胞) 暴露于WEHI-539的三倍系列稀释为期3天。WEHI-539浓度在0.0075 μ M至15 μ M的范围内。三天后, 使用可商购的CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay (Promega Corporation, Madison, Wisconsin) 确定细胞存活。该测定根据存在的ATP的定量来确定培养基中活细胞的数目, 其中ATP是代谢活性细胞的指示物。图30示出了IMR90细胞存活 (参见图30A) 和肾细胞存活 (参见图30B)。

[0434] 实施例13

[0435] p16-3MR转基因小鼠的WEHI-539处理

[0436] 此实施例描述了对确定衰老清除剂体内选择性杀死衰老细胞的能力有用的动物模型。在转基因p16-3MR小鼠中确定WEHI-539或另一种衰老清除剂体内去除衰老细胞的能力 (参见, 例如, 国际申请公开号W02013/090645)。以与图6中提供的图示中的程序说明类似的方式进行实验。该转基因小鼠包含与三形态融合蛋白可操作连接的p16^{Ink4a}启动子, 用于检测衰老细胞和用于这些转基因小鼠中衰老细胞的选择性清除, 该启动子在图7中示出。在衰老细胞中具转录活性但在非衰老细胞中不具转录活性的启动子p16^{Ink4a} (参见, 例如, Wang等人, J. Biol. Chem. 276:48655-61 (2001); Baker等人, Nature 479:232-36 (2011)) 被工程化入核酸构建体。3MR (三形态报告子) 是含有合成海肾萤光素酶 (LUC)、单体的红色荧光蛋白 (mRFP) 和截短的单纯疱疹病毒 (HSV)-1胸苷激酶 (tTK) 的功能性结构域的融合蛋白, 其允许通过更昔洛韦 (GCV) 杀死 (参见, 例如, Ray等人, Cancer Res. 64:1323-30 (2004))。3MR cDNA以与p16合框的形式被插入外显子2中, 产生含有p16的前62个氨基酸的融合蛋白, 而非全长野生型p16蛋白。3MR cDNA的插入还导致终止密码子在外显子2的p19^{ARF}阅读框中出现, 由此也阻止了全长p19^{ARF}从BAC表达。将p16^{Ink4a}基因启动子 (约10万个碱基对) 引入至编码三形态报告子融合蛋白的核苷酸序列的上游。可替代地, 可使用截短的p16^{Ink4a}启动子 (参见, 例如, Baker等人, Nature, 同上; 国际申请公开号W02012/177927; Wang等人, 同上)。因此, 3MR的表达仅由衰老细胞中的p16^{Ink4a}启动子驱动。可检测的标志物LUC和mRFP允许分别通过生物发光和荧光来检测衰老细胞。tTK的表达允许通过暴露于前药更昔洛韦 (GCV) (其被tTK转化成细胞毒性的部分) 选择性地杀死衰老细胞。使用用于向动物引入转基因的已知程序确立并培育了具有C57B16背景的转基因奠基者动物 (参见, 例如, Baker等人, Nature 479:232-36 (2011))。

[0437] 为确定药剂如WEHI-539的衰老清除活性, 将雌性C57/BL6p16-3MR小鼠随机分成多柔比星+WEHI-539处理组或仅多柔比星处理的组。通过在WEHI-539施用前十天 (第-10天) 向小鼠腹膜内施用10mg/kg的多柔比星来诱导衰老。从多柔比星处理后的第10天到第24天, 每日腹膜内施用WEHI-539 (组=9只小鼠)。用等体积的PBS注射对照小鼠 (多柔比星处理的) (组=3只小鼠)。发光成像 (Xenogen成像系统) 在第0天 (即, 多柔比星处理后10天) 进行, 作为每只小鼠的基线 (100%强度)。

[0438] 在WEHI-539处理开始后第7、14、21、28和35天进行小鼠的发光成像。将发光 (L) 的减少计算为: $L = (\text{WEHI-539处理后成像}) / (\text{基线成像}) \%$ 。如果L大于等于100%, 则衰老细胞

的数目未减少。如果L小于100%，则衰老细胞的数目减少。每只小鼠独立计算，并且将背景从每个样品减去。

[0439] 进行了实验以确定WEHI-539处理对与衰老有关的基因的表达的影响。如上所述的处理雌性C57/BL6 p16-3MR的组。WEHI-539处理结束后三周(第35天)，将多柔比星处理的小鼠(对照)(N=3)和多柔比星+WEHI-539处理的小鼠(N=6)处死。收集了皮肤和脂肪活检以供RNA提取；收集了脂肪活检以检测衰老相关的 β -半乳糖苷酶；并将肺急速冷冻在低温防护剂OCT介质中以供冷冻切片。

[0440] 使用用于实时PCR测定的Roche Universal Probe Library，相对于肌动蛋白mRNA(cDNA量的对照)，分析了RNA的内源衰老标志物(例如，p21、p16^{INK4a}(p16)和p53)和SASP因子(例如，mmp-3和IL-6)的mRNA水平。

[0441] 将冷冻的肺组织切片成10 μ m厚，并用抗 γ H2AX的兔多克隆一抗(Novus Biologicals, LLC)染色，其中 γ H2AX为细胞中双链断裂(DNA损坏)的标志物。然后将切片用ALEXA**FLUOR**®染料标记的山羊抗兔二抗(Life Technologies)染色，并用4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)(Life Technologies)复染。使用ImageJ图像处理程序(National Institutes of Health, 参见因特网imagej.nih.gov/ij/index.html)计算阳性细胞的数量，并将其表示为细胞总数的百分比。

[0442] 收集时，将脂肪活检立即固定在4%福尔马林中并然后用含有X-gal的溶液染色，以检测衰老相关 β -半乳糖苷酶(β -gal)的存在。将脂肪活检在37℃下X-gal溶液中温育过夜，并在次日拍照。将来自未处理动物的脂肪活检用作阴性对照(CTRL)。

[0443] 实施例14

[0444] BCL-XL抑制剂去除具有确立的SASP的衰老细胞的能力

[0445] 此实施例描述了用于确定衰老清除剂杀死具有确立的SASP的衰老细胞的效果的方法。通过施加10Gy的辐照将原代人成纤维(IMR90)细胞诱导衰老。辐照后七天(第0天)，将细胞用10 μ M BCL-XL抑制剂(例如，WEHI-539)或BCL-2/BCL-XL抑制剂或媒介物(DMSO)处理九天(第9天)。每三天更新药物或媒介物。在第9天去除药物/媒介物，并将细胞额外培养三天(第12天)。然后将细胞用4%多聚甲醛固定并用特异性抗-IL-6抗体(R&D, AF-206-NA)通过免疫荧光染色。用DAPI复染细胞以供细胞核可视化。使用CellProfiler软件以公正的方式确定IL-6阳性细胞。

[0446] 在另一个实验，通过辐照(10Gy)将IMR90细胞诱导衰老。辐照后七天，将细胞用衰老清除剂(例如，BCL-XL抑制剂(例如，WEHI-539)或BCL-2/BCL-XL抑制剂；MDM2抑制剂；Akt抑制剂)或媒介物(DMSO)处理九天(第9天)。每三天更新药物或媒介物。在第9天去除药物/媒介物，并将细胞额外培养六天。收集了来自处理的细胞的条件培养基，并通过ELISA进行了IL-6测量(Perkin Elmer, AL223F)。依照制造商的说明(AL223F, Perkin Elmer)，使用试剂盒通过ELISA确定培养基中的IL-6水平。将细胞用4%多聚甲醛固定并用特异性抗-IL-6抗体(R&D, AF-206-NA)通过免疫荧光染色。将通过ELISA确定的IL-6水平相对于每个孔中细胞的数目归一化。

[0447] 实施例15

[0448] 衰老清除剂去除具有确立的SASP的衰老细胞的能力：SASP因子表达

[0449] 此实施例描述了用于确定衰老清除剂对SASP因子表达的影响的方法。通过施加

10Gy的辐照将原代人成纤维 (IMR90) 细胞诱导衰老。辐照后七天 (第0天), 将细胞用衰老清除剂 (例如, BCL-XL抑制剂 (例如, WEHI-539) 或BCL-2/BCL-XL抑制剂;MDM2抑制剂;Akt抑制剂) 或媒介物 (DMSO) 处理九天。每三天更新药物或媒介物。在将药物/媒介物在第9天评估SASP表达之前去除之后, 将细胞在没有药物或DMSO的培养基中额外培养三天。然后收集细胞、提取mRNA并制备cDNA。然后进行定量PCR (qPCR) 以检测不同基因的表达。还在药物/媒介物已被去除三天后, 于第12天收集细胞。将数据相对于肌动蛋白归一化, 并以与未衰老细胞的比例示出。

[0450] 实施例16

[0451] 衰老清除剂去除具有提高DNA损伤反应的衰老细胞的能力

[0452] 此实施例描述了用于确定衰老清除剂选择性杀死具有提高DNA损伤反应的衰老细胞效果的方法。通过施加10Gy的辐照将原代人成纤维 (IMR90) 细胞诱导衰老。辐照后七天 (第0天), 将细胞用衰老清除剂 (例如, BCL-XL抑制剂 (例如, WEHI-539) 或BCL-2/BCL-XL抑制剂;MDM2抑制剂;Akt抑制剂) 或媒介物 (DMSO) 处理九天 (第9天)。每三天更新药物或媒介物。在第9天去除药物/媒介物, 并将细胞在没有药物或DMSO的培养基中额外培养六天, 其中每三天更换培养基。在第0天 (非衰老细胞)、第9天、第12天和第15天收集细胞, 并提取和处理蛋白质以供免疫印迹 (Western印迹)。在每个时间点处理两个样品。

[0453] 实施例17

[0454] BCL-XL选择性抑制剂经由凋亡杀死衰老细胞

[0455] 如实施例12所述的, 将肺成纤维细胞系IMR90 (人原代肺成纤维细胞, ATCC® CCL-186TM, Manassas, Virginia) 接种在六孔板中, 并通过10Gy的电离辐射 (IR) 诱导衰老。在确立衰老后, 将细胞重新接种在96孔板中。将泛胱天蛋白酶抑制剂Q-VD-OPh (20μM) 添加至衰老细胞 (辐照的) (IMR90Sen (IR)) 的孔, 并添加至含有非衰老细胞 (未辐照的细胞) (IMR90NS) 的孔。四小时后, 将衰老细胞和非衰老细胞各自暴露至1.67或5μM WEHI-539为期3天。在测定时期结束时, 对细胞进行计数。将每种情况接种在三个平板孔中并独立地计数。初始的细胞计数充当对照, 以与无WEHI-539处理的最后一天计数相比确定衰老的诱导。初始的非衰老细胞计数充当用于确定WEHI-539毒性的代表 (proxy)。使用可商购的 CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay (Promega Corporation, Madison, Wisconsin) 确定细胞存活。该测定根据存在的ATP的定量来确定培养基中活细胞的数目, 其中ATP是代谢活性细胞的指示物。图31 (左侧) 是WEHI-539选择性杀死衰老细胞 (参见实施例12) 的图示, 并且其示出了此实验中所用的WEHI-539浓度。在泛胱天蛋白酶抑制剂的存在下, 存活的衰老细胞的百分比增加 (图31, 右侧)。

[0456] 实施例18

[0457] 通过抑制BCL-XL有效杀死衰老细胞

[0458] 此实施例说明, BCL-XL是对衰老细胞的凋亡重要的BCL-2抗凋亡家族成员。制备了包含对BCL-2、BCL-XL (也被称为BCL2L1) 和BCL-w (也被称为BCL2L2) 特异的序列的短发夹RNA (shRNA), 并将其引入至慢病毒载体中。针对BCL-XL和BCL-w的每一种的四种不同shRNA以及针对BCL-2的三种shRNA由Broad Institute of MIT and Harvard (Cambridge, MA) 合成。包含每种相应的shRNA的慢病毒载体从Sigma Aldrich (St. Louis, MO) 购买。shRNA序列和靶序列在下表中提供。每种蛋白质的核苷酸序列可以从公共数据库 (参见, 例如, 在

GenBank NM_001191.2和NM_138578.1处的Bcl-xL (BCL2-样1 (BCL2L1)) ;在GenBank NM_004050.3处的Bcl-w (BCL2-样2 (BCL2L2)) ;和在NM_000633.2、NM_000657处的Bcl-2 (B-细胞 CLL/淋巴瘤2 (BCL2)) 容易地获得。

[0459] 根据本领域实践的方法,将一式三份的衰老细胞和非衰老细胞的样品用不同慢病毒载体的每一种以及两个对照载体转导。对样品包含未用慢病毒转导 (NT) 的衰老细胞和非衰老细胞。如实施例12中所述的,通过暴露于10Gy的电离辐射 (IR) 将IMR90细胞诱导衰老。在衰老表型发展后,将细胞重新接种在96孔板中并添加shRNA。24hr后,去除shRNA并更新培养基。3天后再次更新培养基。在最后一次培养基更新后 (shRNA去除后6天),通过CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay测量存活率。

[0460] 表:shRNA序列

[0461]

符号	编码的蛋白质	shRNA 序列	靶序列
BCL2	Bcl-2	CCGGCCGGGAGATAGTGATGAAG TACTCGAGTACTTCATCACTATCTC CCGGTTTTTG (SEQ ID NO:1)	CCGGGAGATA GTGATGAAGT A (SEQ ID NO:2)
BCL2	Bcl-2	CCGGGTGATGAAGTACATCCATTA TCTCGAGATAATGGATGTACTTCA TCACTTTTTG (SEQ ID NO:3)	GTGATGAAGT ACATCCATTAT (SEQ ID NO:4)
BCL2	Bcl-2	CCGGGTGATGAAGTACATCCATTA TCTCGAGATAATGGATGTACTTCA TCACTTTTTG (SEQ ID NO:3)	GTGATGAAGT ACATCCATTAT (SEQ ID NO:4)
BCL2	Bcl-2	CCGGAGAGTGACAGTGGATTGCAT TCTCGAGAATGCAATCCACTGTCA CTCTTTTTTG (SEQ ID NO:5)	AGAGTGACAG TGGATTGCATT (SEQ ID NO:6)
BCL2L1	Bcl-xL	CCGGGCTCACTCTTCAGTCGGAAA TCTCGAGATTTCGACTGAAGAGT GAGCTTTTTG (SEQ ID NO:7)	GCTCACTCTTC AGTCGGAA (SEQ ID NO:8)

[0462]

符号	编码的蛋白质	shRNA 序列	靶序列
BCL2L1	Bcl-xL	CCGGGTGGAACCTCTATGGGAACAA TCTCGAGATTGTTCCCATAGAGTT CCACTTTTTG (SEQ ID NO:9)	GTGGAACCTCTA TGGAACA (SEQ ID NO:10)
BCL2L1	Bcl-xL	CCGGGTTTAGTGATGTGGAAGAGA ACTCGAGTTCTCTCCACATCACT AAACTTTTTG (SEQ ID NO:11)	GTTTAGTGATG TGGAAGAG (SEQ ID NO:12)
BCL2L1	Bcl-xL	CCGGGCTCACTCTTCAGTCGGA TCTCGAGATTTCGACTGAAGAGT GAGCTTTTTG (SEQ ID NO:13)	GCTCACTCTTC AGTCGGAAT (SEQ ID NO:14)
BCL2L2	Bcl-w	CCGGTGGCAGACTTTGTAGGTTAT ACTCGAGTATAACCTACAAAGTCT GCCATTTTTG (SEQ ID NO:15)	TGGCAGACTTT GTAGGTTA (SEQ ID NO:16)
BCL2L2	Bcl-w	CCGGGTCAACAAGGAGATGGAAC CACTCGAGTGGTTCATCTCCTTGT TGACTTTTTG (SEQ ID NO:17)	GTCAACAAGG AGATGGAAC (SEQ ID NO:18)
BCL2L2	Bcl-w	CCGGCAGAAGGGTTATGTCTGTGG ACTCGAGTCCACAGACATAACCCT TCTGTTTTTG (SEQ ID NO:19)	CAGAAGGGTT ATGTCTGTG (SEQ ID NO:20)
BCL2L2	Bcl-w	CCGGCCATTAGATGAGTGGGATTT ACTCGAGTAAATCCCACTCATCTA ATGGTTTTTG (SEQ ID NO:21)	CCATTAGATGA GTGGGATTTA (SEQ ID NO:22)

[0463] 然后,对于每种测试的shRNA,一式三份地确定了衰老细胞和非衰老细胞的存活。在表中按顺序列出的shRNA在图中从左至右呈现。对BCL-2特异性的第二和第三shRNA序列是相同的。每种shRNA的衰老细胞存活与非衰老细胞存活的比例在图32中呈现。1.0的比例表示衰老细胞的存活比例与非衰老细胞相比没有差异。与其中引入了Bcl-w或BCL-2特异性shRNA的衰老细胞相比,四种BCL-XL特异性shRNA分子的三种向衰老细胞中的引入导致显著的衰老细胞死亡。数据显示,BCL-XL表达对衰老细胞的存活是重要的。

[0464] 实施例19

[0465] 通过抑制Bcl-2抗凋亡蛋白家族成员有效杀死衰老细胞

[0466] 为确定相比于非衰老细胞,其他Bcl-2/Bcl-xL/Bcl-w抑制剂是否对衰老细胞是选择性毒性的,将细胞活力测定用于评价通过ABT-737处理后的细胞存活。细胞计数测定的一般时间线和程序在图18中示出并且在实施例7中描述。将IMR90细胞(人原代肺成纤维细胞)接种在六孔板中,并通过10Gy的电离辐射(IR)诱导衰老(第0天)。每3天更新培养基。允许衰老表型发展7天,在该时间点进行细胞计数以确定细胞的基线数目,随后接种至96孔板中。在第8天,将衰老细胞(辐照的)和非衰老细胞(非辐照细胞)暴露于ABT-737的系列稀释液中达3天的时间段。将ABT-737浓度从50 μ M开始连续稀释。将每种情况以一式三份接种。

[0467] 在三天的处理后(第11天),使用**CellTiter-Glo®**(CTG) Luminescent Cell Viability Assay分析细胞的细胞存活。该测定根据存在的ATP的定量来确定培养基中活细胞的数目,其中ATP是代谢活性细胞的指示物。

[0468] 图33显示了衰老细胞和非衰老细胞中ABT-737的IC₅₀曲线。IC₅₀曲线是通过细胞活力测定确定的ABT-737处理后细胞存活百分比的图。该图显示了不同浓度水平的ABT-737对细胞存活的影响。

[0469] 实施例20

[0470] BCL-2/BCL-xL/BCL-w抑制剂经由凋亡杀死衰老细胞

[0471] 进行了如实施例17中所述的实验,以确定一个或多个BCL-2抗凋亡家族成员的其他抑制剂是否通过凋亡杀死衰老细胞。如实施例12所述的,将肺成纤维细胞系IMR90(人原代肺成纤维细胞, **ATCC®** CCL-186TM, Manassas, Virginia) 接种在六孔板中,并通过10Gy的电离辐射(IR)诱导衰老。在确立衰老后,将细胞重新接种在96孔板中。将泛胱天蛋白酶抑制剂Q-VD-OPh (20 μ M) 添加至衰老细胞(辐照的)(IMR90Sen (IR))的孔,并添加至含有非衰老细胞(未辐照的细胞)(IMR90NS)的孔。四小时后,将衰老细胞和非衰老的细胞各自暴露至0.33或1 μ M ABT-263 (Navitoclax) 为期3天。在测定时期结束时,对细胞进行计数。将每种情况接种在三个平板孔中并独立地计数。初始的细胞计数充当对照,以与无ABT-263处理的最后一天计数相比确定衰老的诱导。初始的非衰老细胞计数充当用于确定ABT-263毒性的代表(proxy)。使用**CellTiter-Glo®** Luminescent Cell Viability Assay (Promega Corporation, Madison, Wisconsin) 确定细胞存活。该测定根据存在的ATP的定量来确定培养基中活细胞的数目,其中ATP是代谢活性细胞的指示物。图34(上图)是ABT-263选择性杀死衰老细胞的图示,并且示出了此实验中所用的ABT-263浓度。在泛胱天蛋白酶抑制剂的存在下,存活的衰老细胞的百分比增加(图34,下图)。

[0472] 实施例21

[0473] 骨关节炎的动物模型中衰老细胞去除的效果

[0474] 两种骨关节炎小鼠模型研究设计的表和图示分别在图35和36中呈现。设计了两种治疗研究,以确定骨关节炎的动物模型中衰老细胞去除的效果。

[0475] 进行了平行研究。一项研究调查了在3MR小鼠中用更昔洛韦(GCV)消除衰老细胞的效果。使小鼠经历手术以切除一个后肢的前交叉韧带,从而诱发该下肢的关节中的骨关节炎。在手术后第2周中,通过关节内注射使3MR小鼠的手术关节每日接受2.5 μ g GCV,持续5天,伴随着在手术后第4周的第2次处理(每日2.5 μ g GCV,持续5天)。在手术后4周结束时,监

测小鼠的手术关节的衰老细胞存在、评价其功能、监测炎症的标志物,并对其进行组织学评价。

[0476] 在平行研究中,使C57BL/6J小鼠经历手术以切除一个后肢的前交叉韧带,从而诱发该下肢的关节中的骨关节炎。在手术后的第3周和第4周,通过关节内注射用每个经手术的膝盖 $5.8\mu\text{g}$ 的Nutlin-3A ($n=7$) 处理小鼠,隔日一次持续2周。在手术后4周结束时,监测小鼠关节的衰老细胞存在、评价其功能、监测炎症的标志物,并对其进行组织学评价。

[0477] 所进行的研究中包括两个小鼠对照组:一组包含已经历假手术(即,除切除ACL外均依照手术程序)以及与GCV-处理组平行的关节内媒介物注射的C57BL/6J或3MR小鼠 ($n=3$);和一组包含已经历ACL手术并与GCV-处理组平行地接受了关节内媒介物注射的C57BL/6J或3MR小鼠 ($n=5$)。

[0478] 分析了来自小鼠(来自Nutlin-3A处理的小鼠)的手术关节的RNA的SASP因子(mmp3, IL-6)和衰老标志物(p16)表达。进行qRT-PCR以检测mRNA水平。如图37A-C所示,用Nutlin-3A处理将衰老细胞从该关节清除。还分析了来自小鼠的手术关节的RNA的2型胶原的表达,并与作为对照的肌动蛋白的表达相比较。如图38所示,与未处理的小鼠相比,在已经历骨关节炎手术的小鼠中通过Nutlin-3A的处理驱使胶原产生。

[0479] 在手术后4周,通过负重测试确定小鼠喜欢使用哪只腿来评价肢体的功能(图39)。在采取测量前,允许小鼠在至少3种场合下适应腔室。使小鼠在腔室内行进,以在每个尺度上以1只后爪站立。经过3秒的时间段测量放置在每个后肢上的重量。在每个时间点,对每个动物进行至少3次独立的测量。将结果表达为放置在手术肢体上的重量与对侧的未手术肢体的百分比。如图40所示,已经历骨关节炎手术的未处理小鼠喜欢使用未手术的后肢胜过手术后的后肢(Δ)。然而,用Nutlin-3A清除衰老细胞使已经历手术的小鼠(∇)中的此影响消失。

[0480] 还在手术后4周通过热板(hotplate)分析评价了该肢体的功能,以说明对疼痛刺激的敏感性和反应。简单来说,将小鼠放置在 55°C 的热板上。当被放置在热的平板表面上时,由于达到疼痛阈值,小鼠将会抬起并舔它们的爪子(舔爪反应)。将后肢反应(舔爪反应)的滞后时间记录为反应时间。如图41所示,与未被手术改变的正常小鼠(■)相比,已经历骨关节炎手术的未处理小鼠具有增加的反应时间。然而,用Nutlin-3A处理已经历骨关节炎手术的小鼠使反应时间以显著的方式下降(▲)。

[0481] 通过ACL手术诱导的骨关节炎的组织病理学显示,蛋白聚糖层被破坏。通过Nutlin-3A清除衰老细胞使此影响完全消失。衰老细胞从用杀死衰老细胞的GCV处理的3MR小鼠中的清除对骨关节炎的病理生理学的影响与Nutlin-3A相同。参见图42。

[0482] 实施例22

[0483] 动脉粥样硬化的动物模型中衰老细胞去除的效果

[0484] 两种动脉粥样硬化小鼠模型的图示在图43A-B中呈现。图43A中示出的研究评价了衰老细胞通过Nutlin-3A从LDLR^{-/-}小鼠的斑块中的清除使斑块负荷降低的程度。从第0周开始并贯穿整个研究,对两组LDLR^{-/-}小鼠(10周)喂食42%卡路里来自脂肪的高脂肪饮食(HFD)(Harlan Teklad TD.88137)。对两组LDLR^{-/-}小鼠(10周)喂食正常食物(-HFD)。从第0至第2周,将HFD小鼠和-HFD小鼠的一组用Nutlin-3A处理(25mg/kg ,腹腔内)。一次处理周期为14天处理,14天无处理。向HFD小鼠的一组 and -HFD小鼠的一组施用媒介物。在第4周(时间

点1),将一组小鼠处死,以评价斑块中衰老细胞的存在。对于剩余小鼠中的一些,从第4至第6周重复Nutlin-3A和媒介物施用。在第8周(时间点2),将该小鼠处死,以评价斑块中衰老细胞的存在。从第8至第10周,用Nutlin-3A或媒介物处理剩余的小鼠。在第12周(时间点3),将该小鼠处死,以评价斑块的水平以及斑块中衰老细胞的数目。

[0485] 在时间点1,测量了与喂食-HFD的小鼠相比,喂食HFD并用Nutlin-3A或媒介物处理的LDLR^{-/-}小鼠中的血浆脂质水平(每组n=3)。下午三点左右(mid-afternoon)收集血浆,并对循环脂质和脂蛋白进行分析。数据在图44A-D中示出。

[0486] 在时间点1结束时,将喂食HFD并用Nutlin-3A或媒介物处理的LDLR^{-/-}小鼠处死(n=3,所有组),并解剖主动脉弓以供SASP因子和衰老细胞标志物的RT-PCR分析。将值相对于GAPDH归一化,并表达为相对于正常饮食下年龄相仿、媒介物处理的LDLR^{-/-}小鼠的倍数变化。数据显示,在1个处理周期后(参见图45A-D),在喂食HFD的LDLR^{-/-}小鼠中通过Nutlin-3A清除衰老细胞使几种SASP因子和衰老细胞标志物(MMP3、MMP13、PAI1、p21、IGFBP2、IL-1A和IL-1B)的表达降低。

[0487] 在时间点2结束时,将喂食HFD并用Nutlin-3A或媒介物处理的LDLR^{-/-}小鼠(所有组的n=3)处死,并解剖主动脉弓以供SASP因子和衰老细胞标志物的RT-PCR分析。将值相对于GAPDH归一化,并表达为相对于正常饮食下年龄相仿、媒介物处理的LDLR^{-/-}小鼠的倍数变化。数据显示了HFD小鼠内主动脉弓中的一些SASP因子和衰老细胞标志物的表达(图46A-C)。在喂食HFD的LDLR^{-/-}小鼠中通过多个处理周期的Nutlin-3A清除衰老细胞使大多数标志物的表达降低(图46A-B)。

[0488] 在时间点3结束时,将喂食HFD并用Nutlin-3A或媒介物处理的LDLR^{-/-}小鼠(所有组的n=3)处死,并将主动脉解剖并用苏丹IV染色以检测脂质的存在。通过MRI分析小鼠的身体组成,并通过Hemavet对循环血细胞进行计数。数据显示,通过Nutlin-3A的处理使降主动脉中的斑块减少约45%(图47A-C)。如图48A-B所示,在Nutlin-3A和媒介物处理的小鼠中,血小板和淋巴细胞计数是相等的。如图49A-B所示,通过Nutlin-3A的处理还使喂食HFD的小鼠的质量和体脂组成下降。

[0489] 图43B中示出的研究评价了从LDLR^{-/-}/3MR双转基因小鼠中基于阿昔洛韦的衰老细胞清除改善了预先存在的动脉粥样硬化性疾病的程度。从第0周开始直到第12周,为LDLR^{-/-}/3MR双转基因小鼠(10周)和LDLR^{-/-}单转基因小鼠(10周)喂食高脂肪饮食。从第12至13周以及第14至15周,向两组的小鼠施用更昔洛韦(25mg/kg,腹膜内)。在第16周,确定了斑块的水平和斑块中衰老细胞的数目。如图50所示,与LDLR^{-/-}小鼠/HFD对照(n=9)相比,在喂食HFD的LDLR^{-/-}/3MR双转基因小鼠(n=10)中通过GCV清除衰老细胞使被斑块覆盖的主动脉的%下降。如图51所示,与LDLR^{-/-}小鼠/HFD对照(n=5)相比,通过GCV清除衰老细胞还使喂食HFD的LDLR^{-/-}/3MR双转基因小鼠(n=3)中的斑块横截面积减小。

[0490] 实施例23

[0491] 衰老细胞清除保持老化的心脏应激耐受性

[0492] 为研究衰老细胞清除对健康和寿命的影响,建立了在FVB x 129Sv/E x C57BL/6混合或C57BL/6纯基因背景下的INK-ATTAC转基因小鼠群组。在12个月大时,向每个群组的一半小鼠一周三次地注射AP20187,以诱导p16阳性衰老细胞的凋亡(混合和纯C57BL/6群组分别为0.2mg/kg和2mg/kg AP20187),而每个群组的另一半接受媒介物。在18个月大时,使

来自每个群组的雄性和雌性的小鼠子集经受心脏应激试验,其中小鼠被注射致死剂量的异丙肾上腺素(680mg/kg)并记录心脏停搏的时间。与12个月大的对照小鼠相比,18个月大的未处理(媒介物)小鼠一致地显示出心脏停搏的明显加速,而AP20187处理的小鼠针对异丙肾上腺素维持了年轻心脏保护,无论性别和基因背景如何(参见图52)。

[0493] 已知,心脏保护信号传导途径提供对代谢应激如缺血和缺氧衰退(decline)的耐受性(Granfeldt等人,2009,Cardiovasc.Res.83:234-246)。然而,心脏保护信号传导随着老化退化,因此使心脏的功能和适应性储备能力下降(Ogawa等人,1992,Circulation 86:494-503;Wiebe等人,1998,Clin.J.Sport Med.8:272-279)。ATP依赖性K通道(KATP)在心脏保护信号传导中起核心作用(Gross和Auchampach,1992,Cardiovasc.Res.26:1011-1016)。这些KATP通道由成孔亚基Kir6.2/Kir6.1、调控亚基Sur2a和其他辅助蛋白构成。由于Sur2a的表达降低,KATP通道被认为是随着老化衰退的(Du等人,2006,FASEB J.20:1131-1141;Jovanovic和Jovanovic,2009,Curr.Opin.Pharmacol.9:189-193;Ranki等人,2002,Mech.Ageing Dev.123:695-705)。已显示,通过饮食改变(Sukhodub等人,2011,J.Cell.Mol.Med.15:1703-1712)或转基因途径(Sudhir等人,2011,Biogerontology 12:147-155)的Sur2a表达的提高保持年老小鼠中的心脏应激耐受性。因此,衰老细胞对Sur2a表达的年龄相关衰退的贡献在18个月龄AP20187处理和媒介物处理的小鼠受到前述的心脏应激试验时检查到。的确,18个月龄AP20187处理的雌性动物中的异丙肾上腺素应激测试的年轻表现与持续的Sur2a表达一致地相关(参见图53)。总之,这些实验表明,随着老化的衰老细胞的存在不利地影响了KATP途径功能,而衰老细胞清除是反制此退化的有效疗法。持续的心脏性能可有助于在AP20187处理的INK-ATTAC小鼠中观察到的中值寿命延长。

[0494] 实施例24

[0495] 衰老细胞的清除改善LDLR^{-/-}/3MR小鼠中的动脉粥样硬化

[0496] 在LDLR^{-/-}/3MR双转基因小鼠中研究了衰老细胞清除对成熟的动脉粥样硬化斑块的稳定性和大小的影响。从10周龄开始,从第0周开始直到第12.5周,对LDLR^{-/-}/3MR双转基因小鼠(10周)和LDLR^{-/-}单转基因小鼠(对照)喂食42%卡路里来自脂肪的高脂肪饮食(Harlan Teklad TD.88137),第12.5周后为小鼠换回正常饮食。在第12.5周后接下来的100天,将两组小鼠用更昔洛韦处理,其中每个处理周期包含5天的更昔洛韦(每日25mg/kg,静脉内)和14天无处理。在100天处理期结束时,将小鼠处死,收集血浆和组织并将测量动脉粥样硬化的量。

[0497] 将降主动脉解剖并用苏丹IV染色,以将斑块脂质可视化。如图54A-B所示,更昔洛韦处理的LDLR^{-/-}/3MR双转基因小鼠比喂食HFD的LDLR^{-/-}对照小鼠具有更少的动脉粥样硬化斑块,并且染色强度更低。如通过苏丹IV染色的面积测量的,与LDLR^{-/-}对照小鼠相比,更昔洛韦处理的LDLR^{-/-}/3MR小鼠中的斑块中覆盖的主动脉的%也明显更低(参见图54C)。

[0498] 取得了来自更昔洛韦处理的LDLR^{-/-}对照小鼠和LDLR^{-/-}/3MR小鼠的斑块(分别参见图55A-B中虚线圆的斑块),并将其切成横截面并染色,以表征动脉粥样硬化斑块的总体构造。“#”表示位于主动脉外侧上的脂肪(参见图55A)。在图55A和B中分别用“*”及“**”标记的斑块在图55B和D中分别以染色的横截面示出。如图55B和D所示的,与LDLR^{-/-}对照小鼠相比,更昔洛韦处理的LDLR^{-/-}/3MR小鼠中衰老细胞的清除对斑块形态学有影响。来自对照小鼠的斑块内积累有可识别的“脂质口袋”。来自更昔洛韦处理的LDLR^{-/-}/3MR小鼠的斑块显

示出厚纤维蛋白帽的存在并且不存在脂质口袋。富脂质斑块的帽的破坏或撕裂是通过斑块血栓形成组分向血小板以及血液的凝血组分暴露而造成的冠状动脉事件的契机。由于快速脂质沉积而更快生长并且具有较薄纤维蛋白帽的斑块容易破裂。具有成熟的纤维蛋白帽的缓慢生长斑块趋于稳定化,并且不容易破裂。总之,这些实验表明,衰老细胞的去除可影响动脉粥样硬化斑块的构造并具有稳定作用。

[0499] 制备了动脉粥样硬化斑块的组织切片并染色,以检测SA- β -GAL。X-GAL晶体位于带有脂质的巨噬细胞泡沫细胞和平滑肌泡沫细胞的溶酶体中(参见图56-58)。

[0500] 实施例25

[0501] 肺疾病模型中衰老细胞清除的作用

[0502] 一项动物模型研究评估了在具有博来霉素诱导肺损伤的转基因小鼠系3MR中衰老细胞清除的作用。在特发性肺纤维化的博来霉素损伤模型中,小鼠在博来霉素处理后的7-14天内发展出肺纤维化(参见,例如,Limjunyawong等人,2014,Physiological Reports 2:e00249;Daniels等人,2004,J.Clin.Invest.114:1308-1316)。如Daniels等人(2004,J.Clin.Invest.114:1308-1316)所述,使用微型喷雾器注射器(Penn-Century, Inc.)通过气管内吸入向麻醉的6-8周龄的3MR小鼠施用博来霉素(50 μ l PBS中的2.5U/kg博来霉素)。向对照小鼠施用盐水。博来霉素处理后第二天,施用更昔洛韦(GCV)(在PBS中25mg/kg)。经由连续5天腹膜内注射更昔洛韦处理3MR小鼠,随后休息5天,然后接着连续5天的处理周期。未处理的小鼠接受等体积的媒介物。在博来霉素处理后第7、14和21天,使用MouseSTATPhysioSuite脉搏氧饱和度仪(Kent Scientific)通过监测氧饱和度来评估肺功能。用异氟醚(1.5%)麻醉动物并施加趾夹。监测小鼠30秒并计算在此期间的平均外周毛细血管氧饱和度(SpO₂)测量值。如图59所示,博来霉素施用显著降低了经媒介物处理的小鼠的SpO₂水平,并且衰老细胞的去除导致较高的SpO₂水平,它靠近博来霉素施用后21天时的正常水平。博来霉素处理后21天,检验小鼠的气道高敏性(AHR)。通过乙酰甲胆碱激发测量小鼠的AHR,而使用SCIREQ flexiVent通气机测定肺功能的其他参数(气道力学、肺容积和肺柔顺性)。当处于氯胺酮/甲苯噻嗪麻醉并经由气管造口术(19Fr钝Luer插管)经历气管的套管插入术时,如Aravamudan等人(Am.J.Physiol.Lung Cell.Mol.Physiol. (2012) 303:L669-L681)所述,在基线处和针对增加经由喷雾(AeroNeb)递送的乙酰甲胆碱浓度(在PBS中0至50mg/ml)的响应评估小鼠的气道阻力(弹性)和柔顺性(compliance)。使动物维持在37°C,并且同时处于肌肉麻痹(泮库溴铵);通过使用封装在Stable 8中的FlexiVent™通气机和肺力学系统(SCIREQ, Montreal, Quebec, Canada)测量气道功能。如图60A所示,在经媒介物处理的小鼠中,博来霉素施用增加了肺弹性,而更昔洛韦处理降低了肺弹性。如图60B-C所示,博来霉素施用降低了经媒介物处理的小鼠中的静态柔顺性和(动态)柔顺性。在博来霉素暴露的小鼠中用更昔洛韦清除衰老细胞显著改善了柔顺性值(图60B-C)。尽管因为动物组规模太小而不是统计学上显著的,但数据表明用衰老清除剂(Nutlin-3A)清除衰老细胞也降低了博来霉素暴露的小鼠中的肺弹性并增加了肺柔顺性。通过腹膜内注射戊巴比妥使小鼠安乐死。获得并分析支气管肺泡灌洗(BAL)液和肺。如Christensen等人(1999, Am.J.Pathol.155:1773-1779)所述,测量肺的羟脯氨酸含量,并进行定量组织病理学。从肺组织中提取RNA以通过qRT-PCR测量经处理的和对照小鼠中的衰老细胞标志物。

[0503] 还可以在上述研究设计中的INK-ATTAC转基因小鼠中研究在IPF的博来霉素诱导

的肺损伤模型中清除衰老细胞的作用。

[0504] INK-ATTAC (通过靶向激活胱天蛋白酶酶的p16^{Ink4a}凋亡) 转基因小鼠具有在p16^{Ink4a}启动子控制下的FK506-结合蛋白(FKBP)-半胱天冬酶8(Casp8)融合多肽(参见,例如,Baker等人,Nature,同上;国际专利申请公开号W0/2012/177927)。在AP20187——一种诱导膜结合十四烷基化FKBP-Casp8融合蛋白的二聚的合成药物——的存在下,经由p16^{Ink4a}启动子特异性表达FKBP-Casp8融合蛋白的衰老细胞经历程序性细胞死亡(凋亡)(参见,例如,Baker,Nature,同上,在图1中)。

[0505] 第二项研究还评估了在具有博来霉素诱导的肺损伤的C57BL6/J小鼠中使用衰老清除剂清除衰老细胞的作用。向6周龄的如上所述C57BL6/J小鼠施用博来霉素。在博来霉素处理后的第一和第三周期间施用衰老清除剂。用媒介物处理对照小鼠。在博来霉素处理后21天,评估衰老细胞的清除和肺功能/组织病理学。

[0506] 在肺疾病(例如,COPD)的第二个动物模型中,将小鼠暴露于香烟烟雾中。通过衰老细胞清除、肺功能和组织病理学评估衰老清除剂对暴露于烟雾中的小鼠的作用。

[0507] 将六周龄3MR (n=35) 或INK-ATTAC (n=35) 小鼠长期暴露于由Teague TE-10系统生成的香烟烟雾中,所述系统是一种在隔室中产生测流和主流香烟烟雾的组合的自动控制吸烟机,所述烟雾的组合被传送至收集和混合隔室中,在其中使不同量的空气与烟雾混合物混合。所述COPD规程改编自约翰霍普金斯大学的COPD核心设施(因特网网址jhu.edu/Biswal/exposure_core/copd.html#Cigarette_Smoke) (Rangasamy等人,2004, J.Clin.Invest.114:1248-1259;Yao等人,2012, J.Clin.Invest.122:2032-2045)。小鼠在6个月中每周5天每天接受总计6个小时的香烟烟雾暴露。每支点燃的香烟(3R4F研究香烟的每支香烟含有10.9mg的总颗粒物(TPM)、9.4mg的焦油和0.726mg的尼古丁以及11.9mg的一氧化碳[University of Kentucky, Lexington, KY]) 喷烟2秒,并且每分钟一次总计8次喷烟以提供35cm³的标准喷烟,其中流速为1.05L/mi。调整所述烟雾机以通过一次阴燃2支香烟产生测流烟雾(89%)和主流烟雾(11%)的混合物。监测所述烟雾隔室空气中的总悬浮颗粒(80-120mg/m³) 和一氧化碳(350ppm)。在第7天开始,分别用AP20187(每周3次)或更昔洛韦(连续5天处理,随后16天停药,重复直到实验结束)处理(10只) INK-ATTAC和(10只) 3MR小鼠。相等数目的小鼠接受相应的媒介物。其余30只小鼠(15只INK-ATTAC和15只3MR) 被均匀地分组,其中每个遗传修饰的株系的5只被放入三个不同的处理组中。一组(n=10) 接受Nutlin-3A (25mg/kg溶解于在PBS中的10%DMSO/3%吐温(Tween)-20,连续处理14天,随后14天停药,重复直到实验结束)。一组(n=10) 接受ABT-263 (Navitoclax) (100mg/kg溶解于15%DMSO/5%吐温-20,连续处理7天,随后14天停药,重复直到实验结束),并且最后一组(n=10) 按照与ABT-263相同的处理方案仅接受用于ABT-263的媒介物(15%DMSO/5%吐温-20)。未接受暴露于香烟烟雾的另外70只动物用作实验的对照。

[0508] 在香烟烟雾暴露两个月后,使用MouseSTAT Physio Suite脉搏氧饱和度仪(Kent Scientific)通过监测氧饱和度来评估肺功能。用异氟醚(1.5%)麻醉动物并施加趾夹。监测小鼠30秒并计算在此期间的平均外周毛细血管氧饱和度(SpO₂) 测量值。如图61所示,2个月的香烟烟雾暴露之后在小鼠中经由AP20187、更昔洛韦、ABT-263 (Navi) 或Nutlin-3A清除衰老细胞导致SpO₂水平与未处理的对照相比在统计学上显著的提高。

[0509] 在实验阶段的最后,如上所述,使用SCIREQ flexiVent通风机和肺力学系统检查

小鼠对乙酰甲胆碱激发的气道高敏性 (AHR)。AHR测量之后,如先前所述通过腹膜内注射戊巴比妥杀死小鼠以深入分析肺组织病理学 (Rangasamy等人,2004,J.Clin.Invest.114:1248-1259)。简而言之,在25cm的恒压下用0.5%低熔点琼脂糖使肺膨胀。收集部分肺组织以提取RNA并对衰老标志物进行qRT-PCR分析。将肺的其他部分固定在10%缓冲的福尔马林中并包埋在石蜡中。用苏木精和曙红对切片 (5 μ m) 染色。用Image Pro Plus软件 (Media Cybernetics) 通过计算机辅助形态计量法测定平均肺泡直径、肺泡长度和平均线性截距。

[0510] 可以在3MR或INK-ATTAC小鼠中评估在COPD完全形成之后清除衰老细胞的潜在治疗作用。如上所述,将六周龄的3MR或INK-ATTAC小鼠长期暴露于香烟烟雾中达6个月。在开始烟雾暴露后6个月时,分别用更昔洛韦 (连续处理5天,随后16天停药) 或AP20187 (3次/周) 处理3MR或INK-ATTAC小鼠,直到开始烟雾暴露后9个月,此时进行衰老细胞清除、肺功能和组织病理学的评估。

[0511] 实施例26

[0512] 用于确定MDM2抑制剂RG-7112的衰老清除活性的体外细胞试验

[0513] 将肺成纤维细胞细胞系IMR90 (人原代肺成纤维细胞, **ATCC®** CCL-186TM, Manassas, Virginia) 接种于六孔平板中并用10Gy的电离辐射 (IR) 诱导衰老。使衰老表型形成至少7天。

[0514] 在衰老表型形成之后,将细胞再接种至96孔平板中,并且将衰老细胞 (经辐照的) 和非衰老细胞 (未经辐照的) 暴露于的MDM2抑制剂RG-7112 (参见图62A中的结构) 的开始于100 μ M的八个两倍系列稀释液中达3或6天的时间段。三天后,使用可商购的 **CellTiter-Glo®** Luminescent Cell Viability Assay (Promega Corporation, Madison, Wisconsin) 确定细胞存活率。该测定根据对存在的ATP定量来确定培养物中的活细胞的数目,所述ATP是代谢活性细胞的指示物。图62示出了在暴露于RG-7112 3天后 (参见图62B) 和六天后 (参见图62C) 的IMR90细胞存活率。

[0515] 实施例27

[0516] 通过ABT-263清除衰老细胞对降低化疗相关副作用的作用

[0517] 在p16-3MR转基因小鼠中检验了衰老清除剂如ABT-263降低化疗相关副作用如疲劳的能力。除多柔比星以外,当向动物施用紫杉醇时也诱导细胞衰老。对于p16-3MR转基因小鼠模型的描述参见实施例2。

[0518] 紫杉醇在p16-3MR转基因小鼠中诱导衰老和SASP。用20mg/kg紫杉醇或媒介物每两天三次处理小鼠的组 (n=4)。如图所示通过发光观察经紫杉醇处理的小鼠的衰老 (参见图63A)。针对目标基因:p16、3MR转基因和IL-6中的每一个,测定了皮肤中mRNA的水平。如图63B所示,与经媒介物处理的动物相比,在经紫杉醇处理的动物中p16、3MR和IL-6中每一个的mRNA水平均得到提高。

[0519] 图64示出了该实验的示意图。在该实验中,每两天向p16-3mr小鼠的组 (n=4) 施用紫杉醇三次。紫杉醇的第三次给药后两天,每天以25mg/kg腹膜内施用更昔洛韦达三天 (第1、2和3天)。紫杉醇施用后每天腹膜内施用ABT-263 (100mg/kg) 达七天。ABT-263的最后一次给药后两天,将全部的动物组安置在代谢笼中 (promethion, sable systems international, Las Vegas, NV) 以监测如通过旋转轮计数确定的自发活动。两天后收集数据并分析。数据示于图64 (左侧)。用ABT-263和更昔洛韦清除衰老细胞使得由化疗处理

导致的旋转轮计数降低恢复了约70%。

[0520] 实施例28

[0521] 诱导衰老的化学治疗药物

[0522] 为了检验由不同化学治疗药物诱导的衰老,用沙利度胺(100mg/kg;每天注射7次);罗米地辛(1mg/kg;3次注射);泊马度胺(5mg/kg;每天注射7次);来那度胺(50mg/kg;每天注射7次);5-氮杂胞苷(5mg/kg;3次注射)处理p16-3MR动物的组(n=4)并与多柔比星(10mg/kg,7天内2-4次注射)进行比较。经所述药物处理的动物中的发光水平示于图65。采用泊马度胺(omalidomide)、来那度胺和多柔比星处理动物导致显著水平的衰老细胞($p < 0.05$)。

[0523] 实施例29

[0524] 衰老相关途径

[0525] 通过纳米LC MS/MS对衰老或非衰老的人腹部皮下前脂肪细胞的裂解物进行蛋白质组学分析。从九个不同的健康肾移植供者的脂肪组织中通过胶原酶消化提取前脂肪细胞,它是人体中易衰老的最丰富的细胞类型之一。事先获得了供者的同意。通过10Gy放射或通过系列传代培养诱导衰老。使用生物信息学方法鉴定易受现有药物影响和能够介导细胞死亡的途径。

[0526] 使用衰老相关 β -半乳糖苷酶(SA- β gal)活性评估经辐照的细胞培养物中存在的衰老细胞的百分比。要在该实验中被认为是衰老培养物,需要75%或更多的细胞表现SA- β gal活性。收集全细胞裂解物和细胞上清液。将蛋白质在1D SDS-PAGE上分离。使凝胶的切片脱色、还原、烷基化以及用胰蛋白酶消化。在THERMO SCIENTIFIC™Q Exactive质谱仪上通过纳米-LC-MS/MS分析提取的肽。使用LC Progenesis软件(Nonlinear Dynamics,UK)鉴定并定量蛋白质。随后将数据提交至Ingenuity、Metacore、Cytoscape和其他用于途径和蛋白质网络分析的软件。在衰老期间改变的途径中是参与细胞存活信号传导和炎性途径的那些。这些途径至少包括PI3K/AKT、Src激酶信号传导、胰岛素/IGF-1信号传导、p38/MAPK、NF- κ B信号传导、TGF β 信号传导和以及mTOR/蛋白质翻译。

[0527] 图66显示放射后在不同时间处(24小时;3、6、8、11、15、20和25天)这些途径以及相关途径中涉及的蛋白质的确证性(confirmatory)蛋白质免疫印迹。使用对于图66中所示的多肽具特异性的辣根过氧化物酶标记的抗体(Cell Signaling Technology,Danvers,MA)检测衰老细胞样品中的磷酸化多肽。在这些细胞中衰老在第25天至第30天之间完全确立。

[0528] 实施例30

[0529] 在P16-3MR小鼠中通过衰老清除剂降低高脂肪喂养诱导的衰老

[0530] 针对四个月的小鼠以高脂肪饮食(60%脂肪)或常规食物饮食喂养p16-3MR小鼠的组(n=6)。通过测量发光确定衰老细胞(即,p16阳性细胞)的存在。如图67所示,与常规食物喂养的动物相比,以高脂肪饮食喂养的动物具有增加数目的衰老细胞。

[0531] 随后用更昔洛韦或媒介物处理动物以测定衰老细胞的清除是否减少了脂肪组织中衰老细胞的存在。用更昔洛韦或媒介物处理动物的组。连续五天每天施用更昔洛韦(25mg/kg)。肾周(perirenal)、附睾或皮下腹股沟脂肪组织中衰老细胞的存在由SA- β -Gal染色来检测。通过ANOVA分析数据。结果示于图68中。观察到在附睾脂肪中衰老细胞的存在显著减少。 $p = < 0.004$ 。

[0532] 实施例31

[0533] 衰老细胞的清除改善葡萄糖耐量和胰岛素敏感性。

[0534] 针对四个月的小鼠以高脂肪饮食或常规食物饮食喂养p16-3MR小鼠的组 (n=9)。随后用更昔洛韦(连续五天每天施用3轮25mg/kg更昔洛韦)或媒介物处理动物。在时间零点给予葡萄糖团注,并在递送葡萄糖之后在20、30、60和120分钟处监测血糖以测定葡萄糖利用(参见图69A)。这也被量化为“曲线下面积”(AUC)(参见图69B和69C),其中较高的AUC值表示葡萄糖耐受不良。经更昔洛韦处理的小鼠的AUC显著低于经媒介物处理的对应小鼠,但是不和食物喂养的动物一样低。经更昔洛韦处理的小鼠中的血红蛋白A1c较低(参见图69C),这表明动物较长期的葡萄糖处理也得到改善。

[0535] 还确定了胰岛素敏感性(胰岛素耐量试验(ITT))。结果示于图70中。在时间零点处施用葡萄糖团注后,在0、14、30、60和120分钟处经更昔洛韦处理的小鼠显示更大的血糖降低(参见图70A),这表明衰老细胞清除改善了胰岛素敏感性。当向野生型小鼠施用更昔洛韦时在胰岛素耐量试验中没有观察到变化(参见图70B)。

[0536] 还监测了体重、身体组成和食物摄取量的变化。通过更昔洛韦处理不改变体重、通过脂肪百分比监测到的身体组成或食物摄取量(以克/周测量)。

[0537] 实施例32

[0538] BCL-2/BCL-XL抑制剂的衰老清除活性

[0539] 使用细胞生存力测定来评估经A-1155463处理后的细胞存活率。细胞计数测定的一般时间线和程序示于图18并描述在实施例7中。将IMR90细胞(人原代肺成纤维细胞)接种在六孔平板中,并用10Gy的电离辐射(IR)(第0天)诱导细胞衰老。每3天更新培养基。使衰老表型发展7天,在此时间点处进行细胞计数以确定细胞的基线数目,随后接种至96孔平板。在第8天,将衰老细胞(经辐照的)和非衰老细胞(未经辐照的)暴露于A-1155463的系列稀释液中达24小时的时间段。将每种情况以一式三份接种。使用**CellTiter-Glo®**(CTG) Luminescent Cell Viability Assay确定细胞的细胞存活。该测定根据存在的ATP的定量来确定培养基中活细胞的数目,其中ATP是代谢活性细胞的指示物。

[0540] 图72显示了在衰老细胞和非衰老细胞中A-1155463的IC₅₀曲线。IC₅₀曲线是处理后细胞存活的百分比的图。

[0541] 上述不同的实施方案可进行组合以提供进一步的实施方案。本说明书提到的和/或申请数据表中列出的全部美国专利、美国专利申请出版物、美国专利申请、外国专利、外国专利申请和非专利出版物,其包括2014年1月28日提交的美国临时专利系列号61/932,704;2014年1月28日提交的61/932,711;2014年4月15日提交的61/979,911;2014年5月23日提交的62/002,709;2014年8月27日提交的62/042,708;2014年9月2日提交的62/044,664;2014年9月30日提交的62/057,820;2014年9月30日提交的62/057,825;2014年9月30日提交的62/057,828;2014年10月8日提交的62/061,627;和2014年10月8日提交的62/061,629,通过引用它们的全文并入本文。必要时可以修改实施方案的各个方面以采用不同专利、申请和出版物的概念来提供进一步的实施方案,。

[0542] 可以根据以上详述对所述实施方案作出这些和其他改变。通常,在所附权利要求中,所用术语不应被解释为将权利要求限制为本说明书和权利要求所公开的特定的实施方案,而应当被解释为包含所有可能的实施方案以及这样的权利要求授权的等同物的全部范

围。因此,权利要求不受本公开内容的限制。

- <110> 巴克老龄化研究所
森尼克西斯公司
梅奥医学教育和研究基金会
瑞米-马丁·拉伯奇
马可·德马利亚
朱迪思·坎皮斯
艾伯特·黛沃洛斯
纳撒尼尔·大卫
阿兰·菲利普·瓦赛洛特
达伦·J·贝克
本内特·G·蔡尔兹
詹姆斯·L·柯克兰德
塔马·蒂驰科尼亚
简·M·A·范德尔森
朱毅
- <120> 用于杀死衰老细胞和用于治疗衰老相关疾病和病症的方法和组合物
- <130> 200201.419W0
- <140> PCT
<141> 2015-01-28
- [0001] <150> US 61/932,704
<151> 2014-01-28
- <150> US 61/932,711
<151> 2014-01-28
- <150> US 61/979,911
<151> 2014-04-15
- <150> US 62/002,709
<151> 2014-05-23
- <150> US 62/042,708
<151> 2014-08-27
- <150> US 62/044,664
<151> 2014-09-02
- <150> US 62/057,820
<151> 2014-09-30
- <150> US 62/057,825
<151> 2014-09-30
- <150> US 62/057,828

	<151> 2014-09-30	
	<150> US 62/061,627	
	<151> 2014-10-08	
	<150> US 62/061,629	
	<151> 2014-10-08	
	<160> 22	
	<170> 用于 Windows 版本 4.0 的 FastSEQ	
	<210> 1	
	<211> 58	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> shRNA 序列	
	<400> 1	
	ccggccggga gatagtgatg aagtactcga gtacttcac actatctccc ggtttttg	58
[0002]	<210> 2	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> shRNA 序列	
	<400> 2	
	ccgggagata gtgatgaagt a	21
	<210> 3	
	<211> 58	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> shRNA 序列	
	<400> 3	
	ccgggtgatg aagtacatcc attatctcga gataatggat gtacttcac actttttg	58
	<210> 4	
	<211> 21	
	<212> DNA	

	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> shRNA 序列	
	<400> 4	
	gtgatgaagt acatccatta t	21
	<210> 5	
	<211> 58	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> shRNA 序列	
	<400> 5	
	ccggagagtg acagtggatt gcattctcga gaatgcaatc cactgtcact cttttttg	58
	<210> 6	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
[0003]	<220>	
	<223> shRNA 序列	
	<400> 6	
	agagtgcacg tggattgcat t	21
	<210> 7	
	<211> 58	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> shRNA 序列	
	<400> 7	
	ccgggctcac tcttcagtcg gaaatctcga gatttccgac tgaagagtga gctttttg	58
	<210> 8	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> shRNA 序列	

	<p><400> 8 gctcactctt cagtcggaa</p>	19
	<p><210> 9 <211> 58 <212> DNA <213> 人工序列</p>	
	<p><220> <223> shRNA 序列</p>	
	<p><400> 9 ccgggtggaa ctctatggga acaatctcga gattgttccc atagagttcc actttttg</p>	58
	<p><210> 10 <211> 19 <212> DNA <213> 人工序列</p>	
	<p><220> <223> shRNA 序列</p>	
[0004]	<p><400> 10 gtggaactct atgggaaca</p>	19
	<p><210> 11 <211> 58 <212> DNA <213> 人工序列</p>	
	<p><220> <223> shRNA 序列</p>	
	<p><400> 11 ccgggttttag tgatgtggaa gagaactcga gttctcttcc acatcactaa actttttg</p>	58
	<p><210> 12 <211> 19 <212> DNA <213> 人工序列</p>	
	<p><220> <223> shRNA 序列</p>	
	<p><400> 12 gttttagtgat gtggaagag</p>	19

	<210> 13	
	<211> 58	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> shRNA 序列	
	<400> 13	
	ccgggctcac tcttcagtcg gaaatctcga gatttccgac tgaagagtga gctttttg	58
	<210> 14	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> shRNA 序列	
	<400> 14	
	gctcactctt cagtcggaaa t	21
[0005]	<210> 15	
	<211> 58	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> shRNA 序列	
	<400> 15	
	ccggtggcag actttgtagg ttatactcga gtataaccta caaagtctgc catttttg	58
	<210> 16	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> shRNA 序列	
	<400> 16	
	tggcagactt tgtaggtta	19
	<210> 17	
	<211> 58	
	<212> DNA	

	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> shRNA 序列	
	<400> 17	
	ccgggtcaac aaggagatgg aaccactcga gtggttccat ctcttgttg actttttg	58
	<210> 18	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> shRNA 序列	
	<400> 18	
	gtcaacaagg agatggaac	19
	<210> 19	
	<211> 58	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
[0006]	<220>	
	<223> shRNA 序列	
	<400> 19	
	ccggcagaag ggttatgtct gtggactcga gtccacagac ataacccttc tgtttttg	58
	<210> 20	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> shRNA 序列	
	<400> 20	
	cagaagggtt atgtctgtg	19
	<210> 21	
	<211> 59	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> shRNA 序列	

	<400> 21 ccggccatta gatgagtggg atttactcga gtaaattcca ctcatctaatt ggttttttg	59
	<210> 22 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列	
[0007]	<220> <223> shRNA 序列	
	<400> 22 ccattagatg agtgggattt a	21

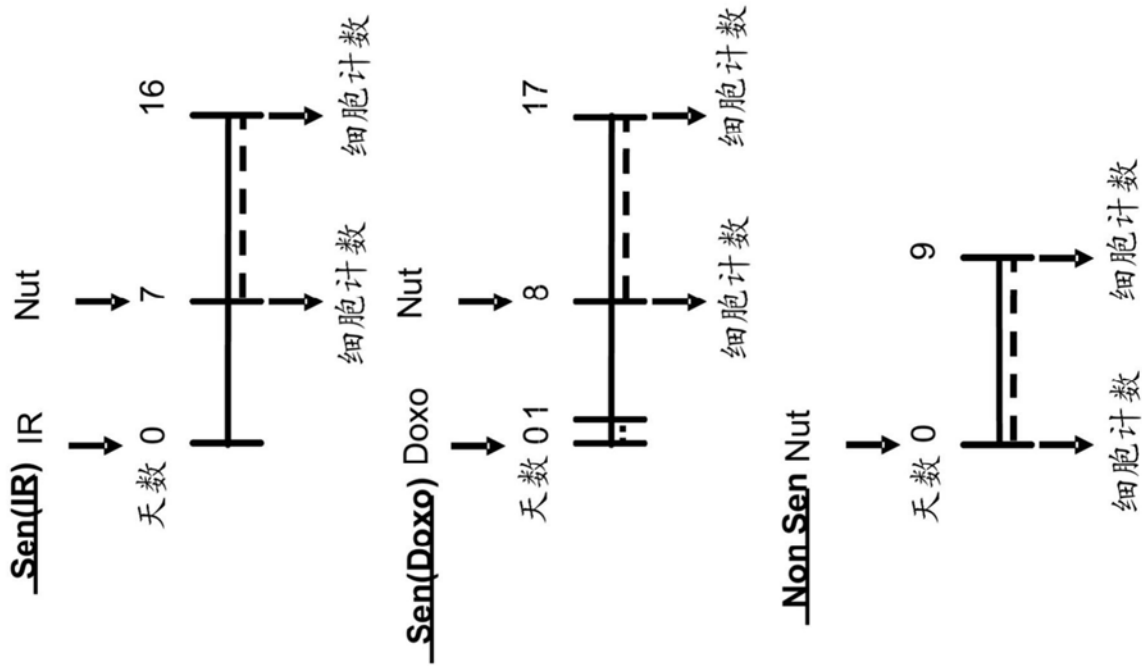


图1

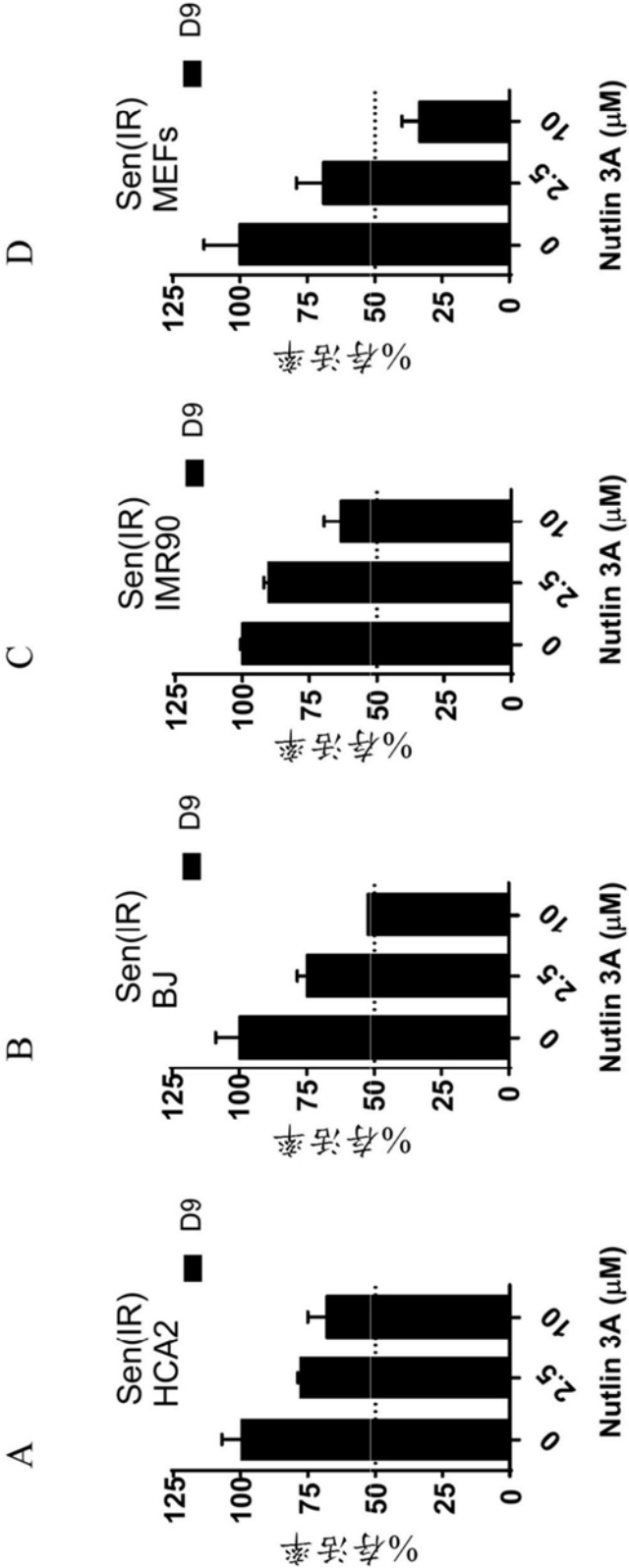


图2

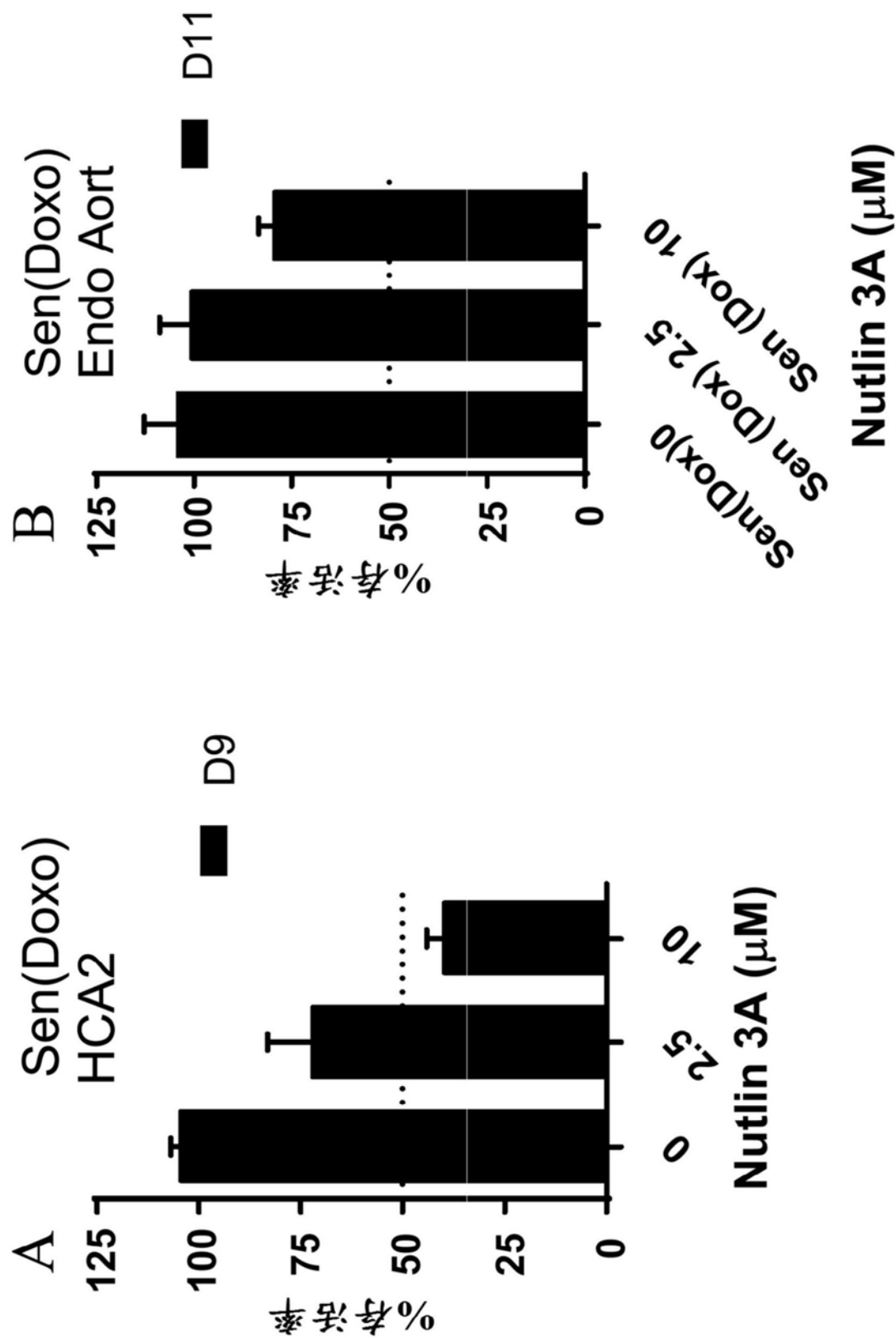


图3

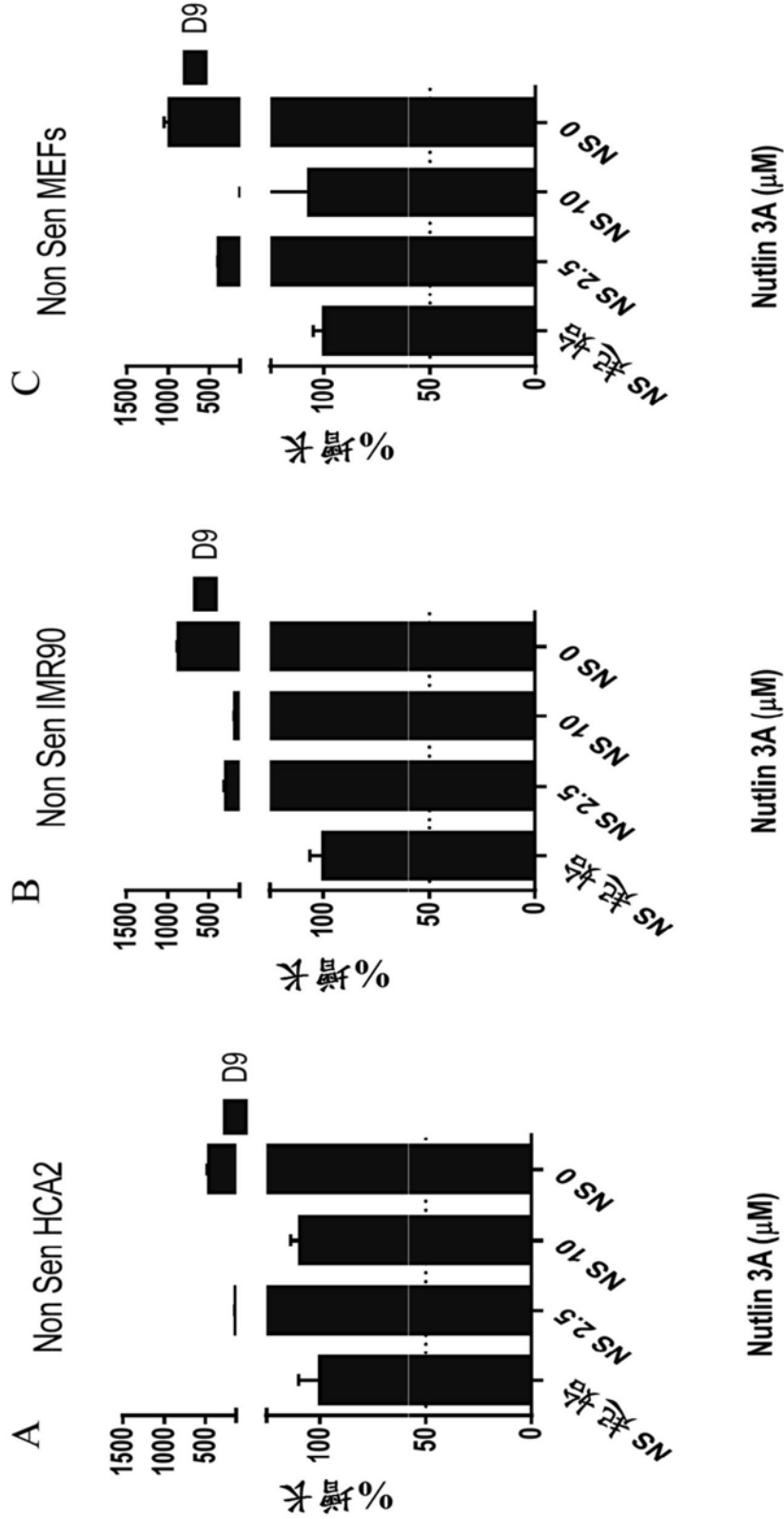


图4

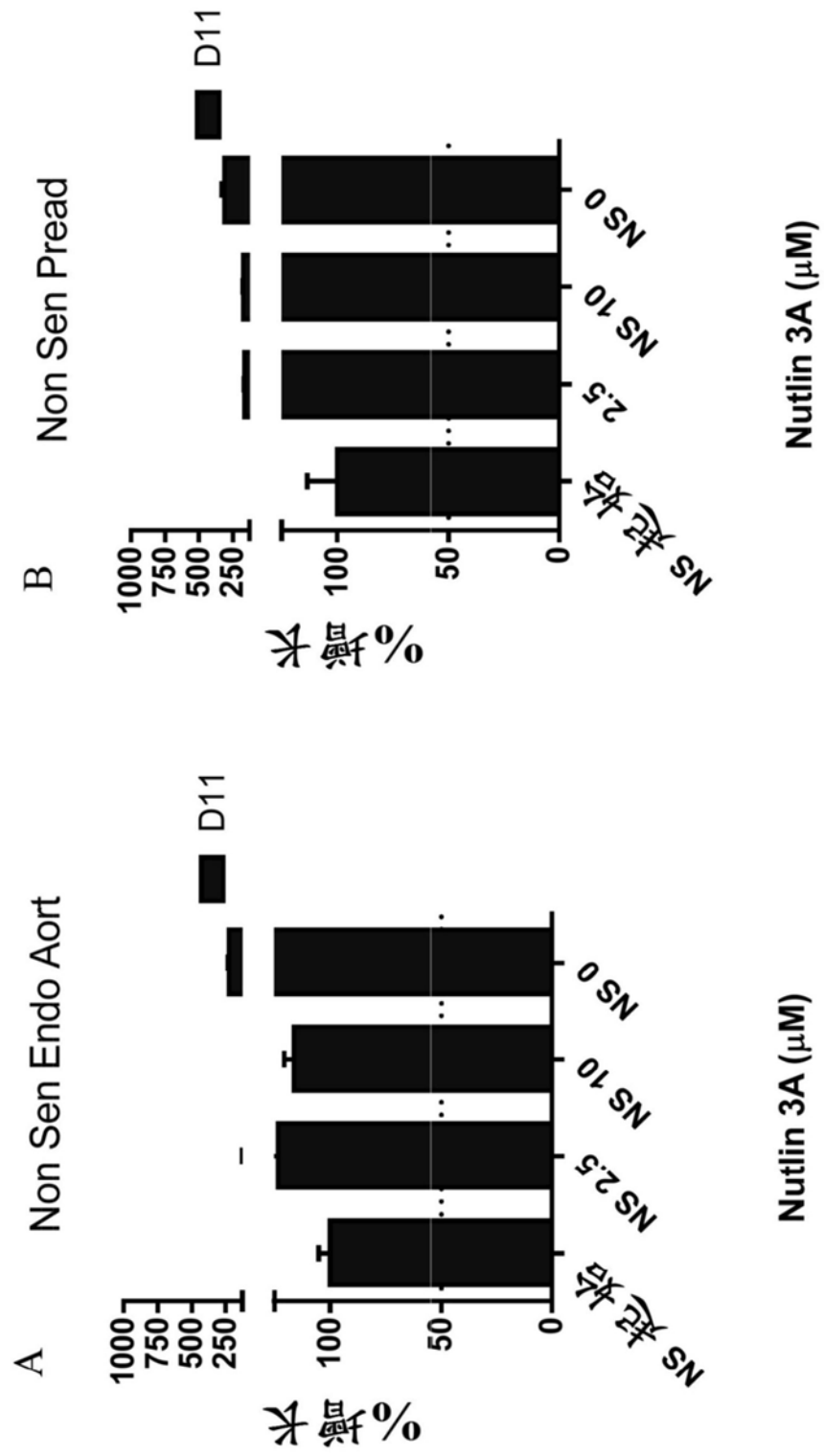


图5

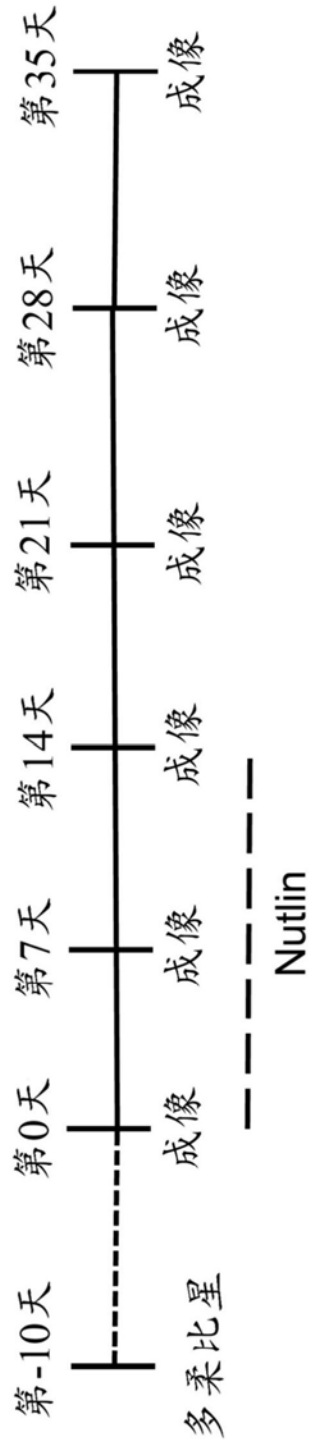


图6

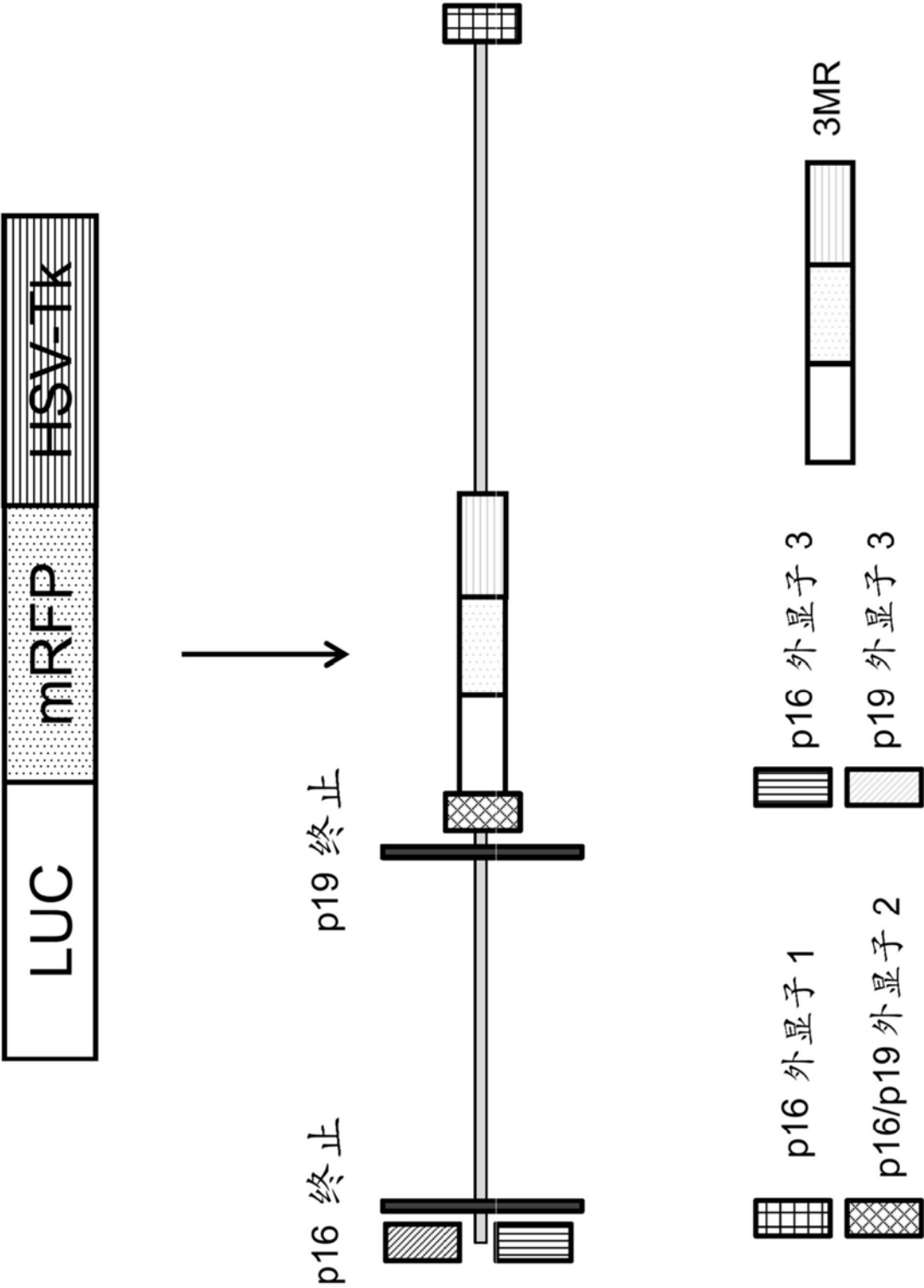


图7

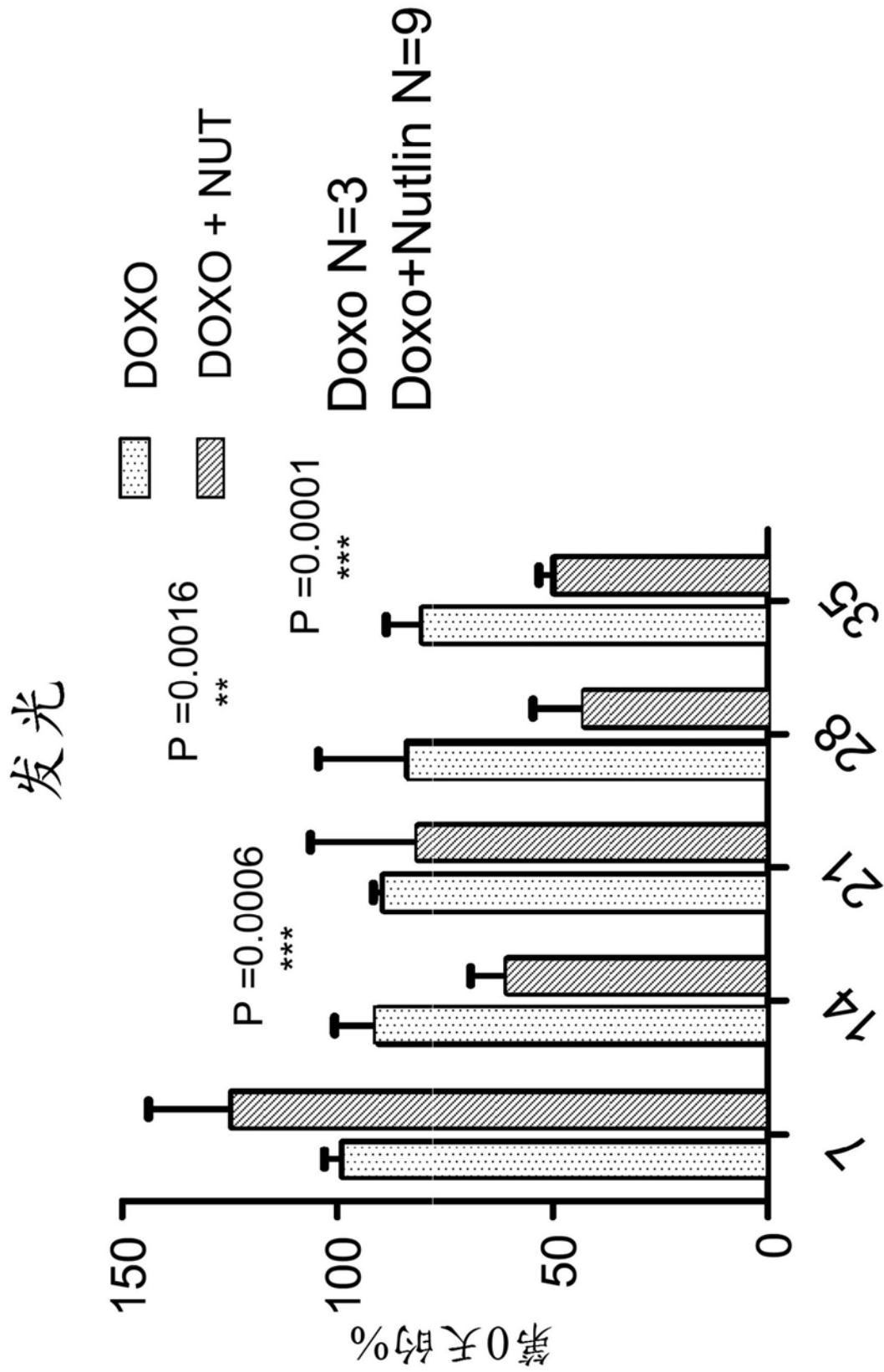


图8

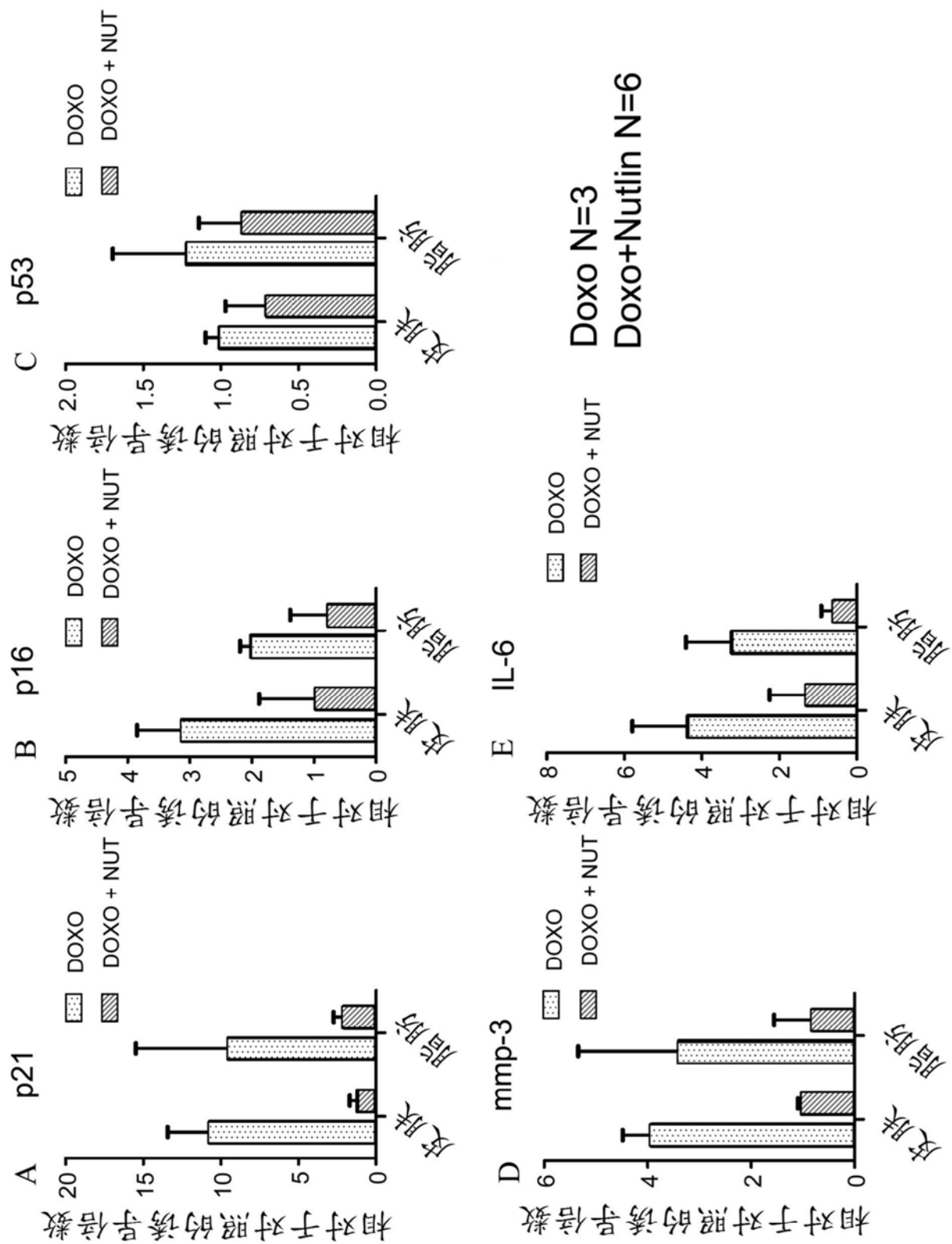


图9

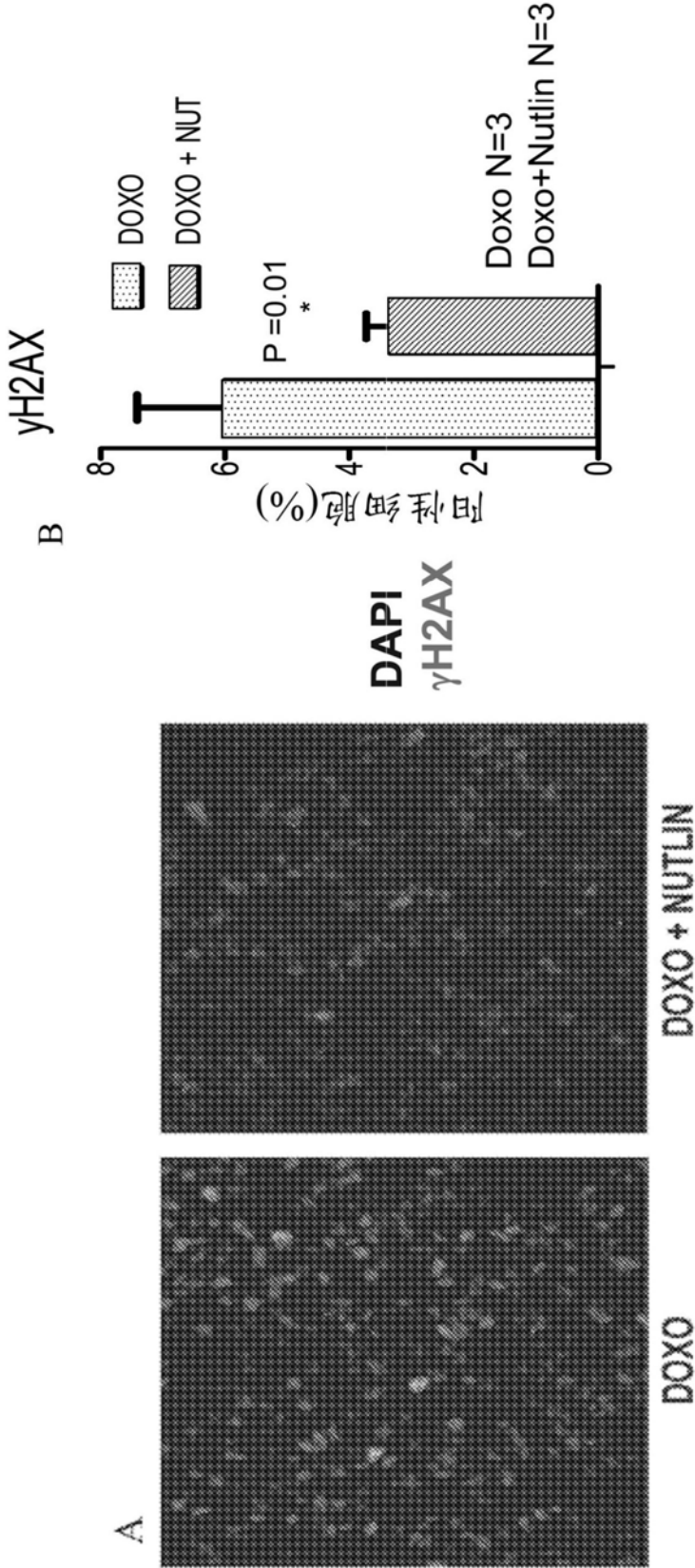


图10

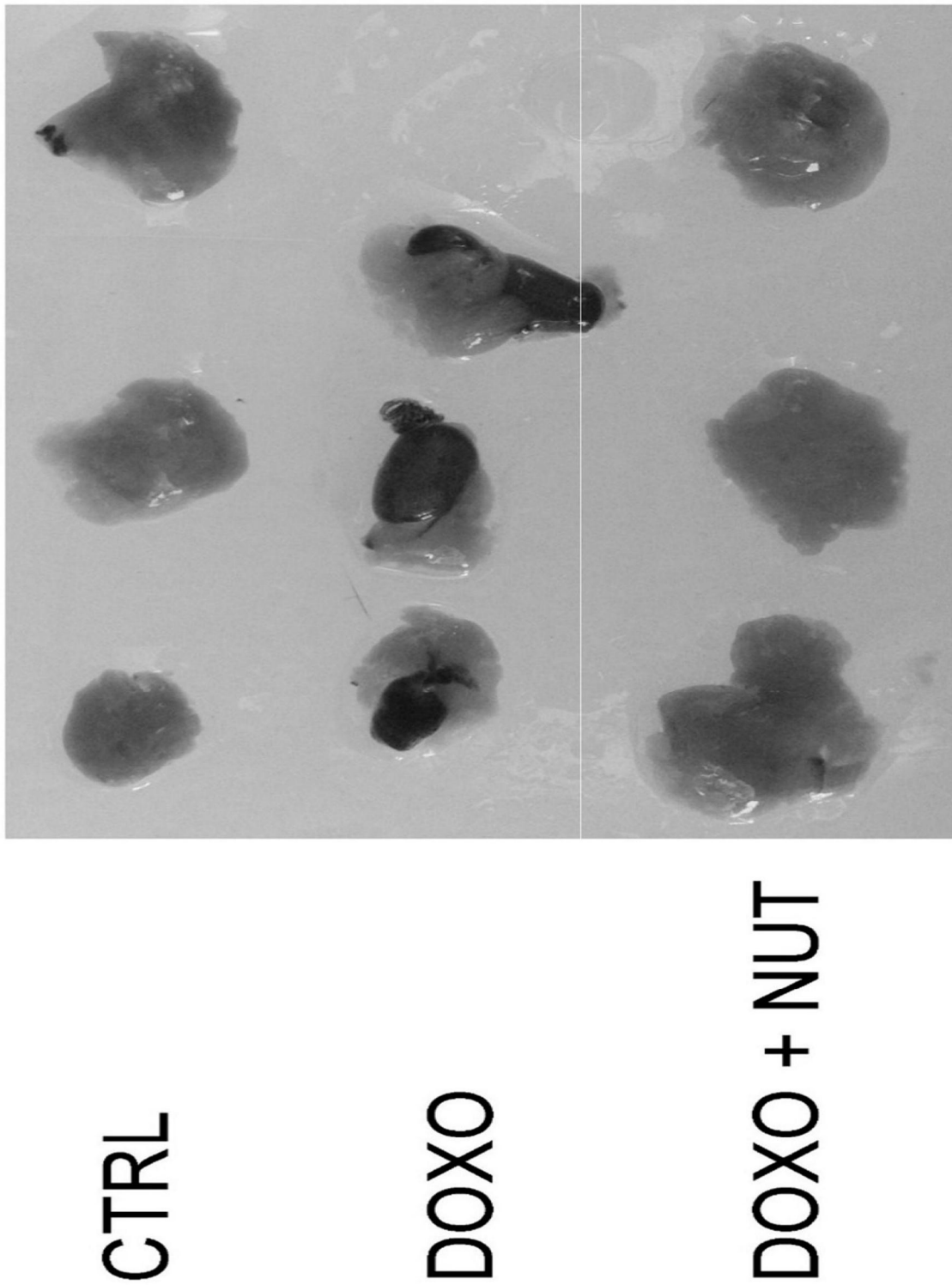


图11

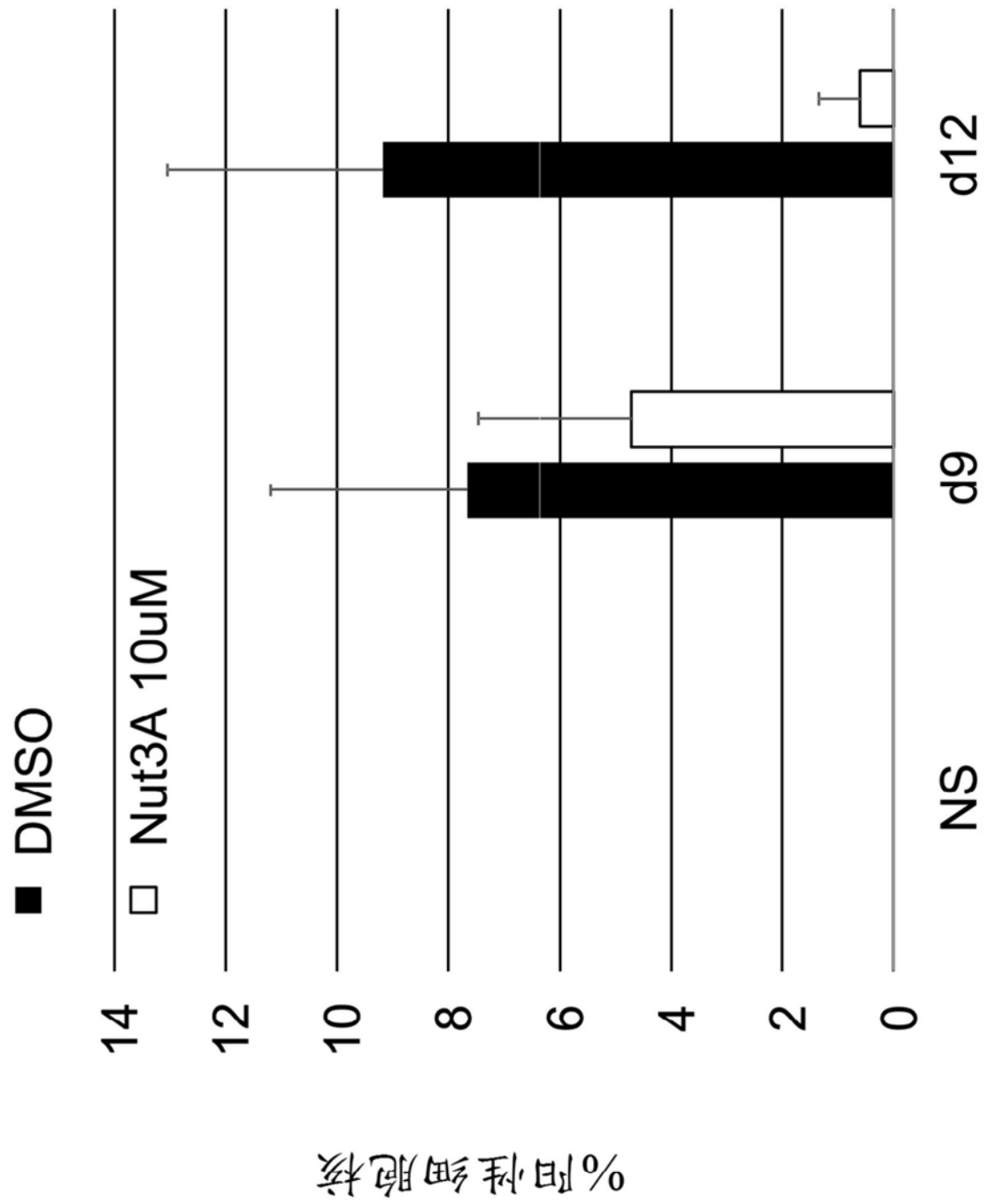


图12A

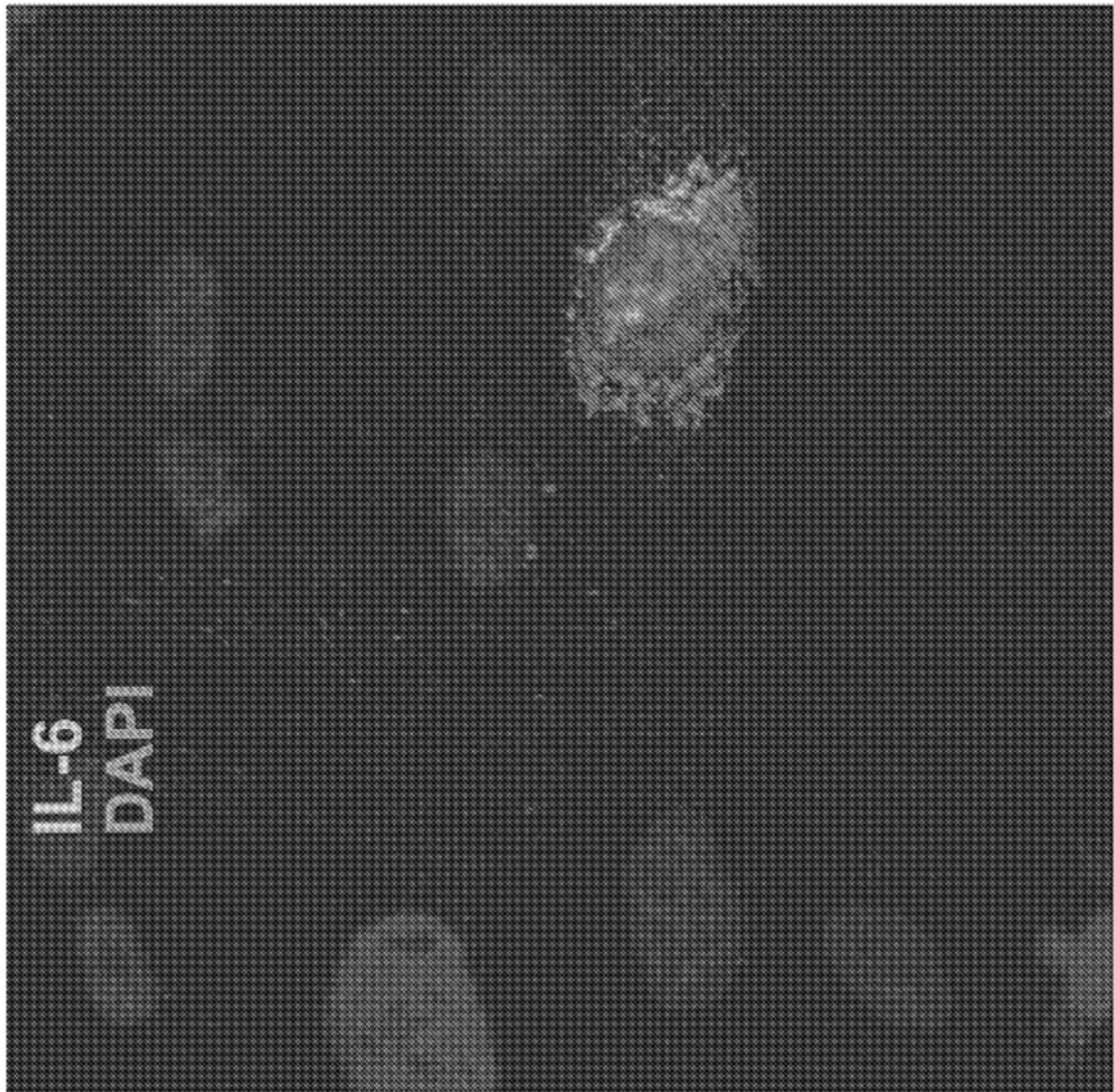


图12B

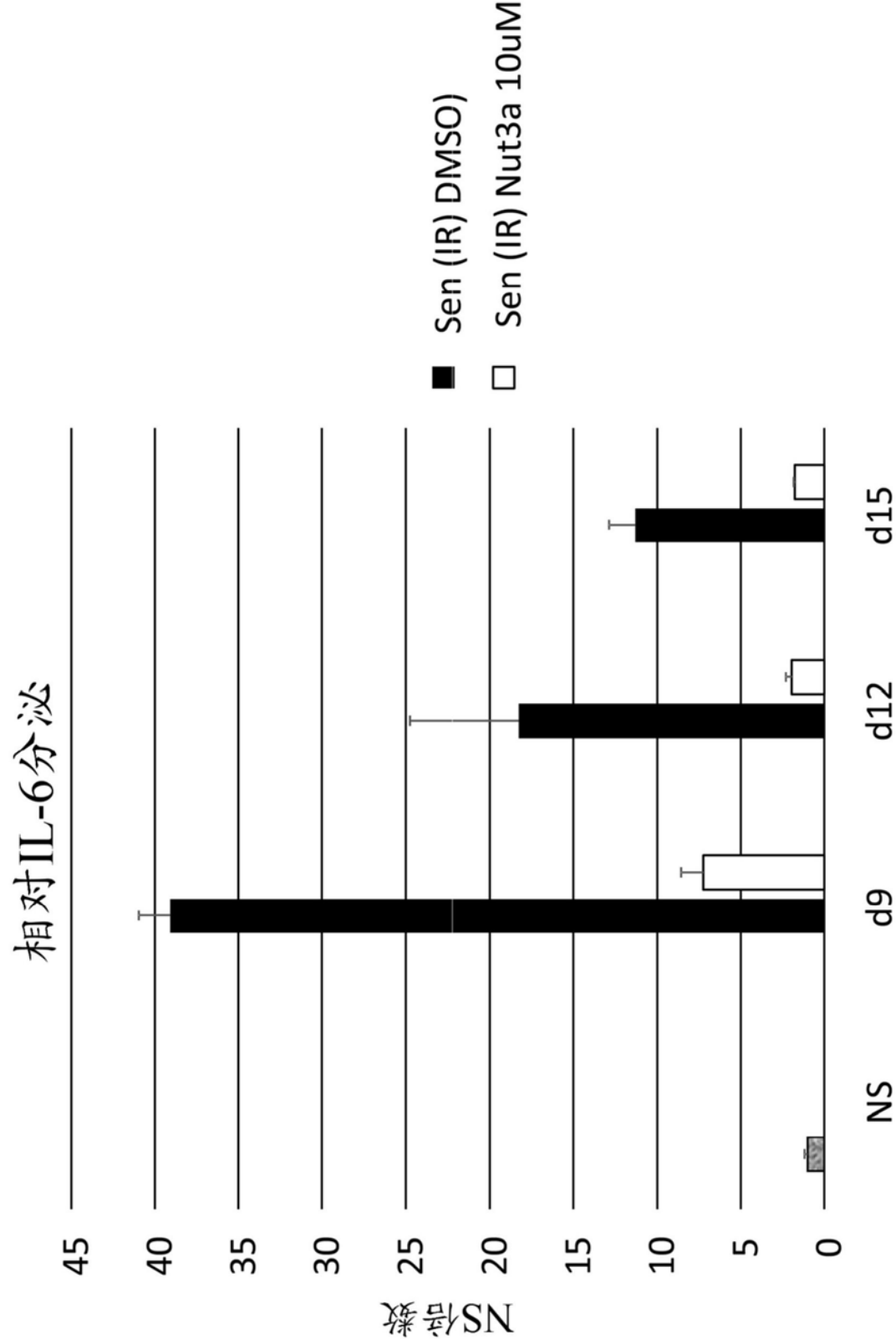


图12C

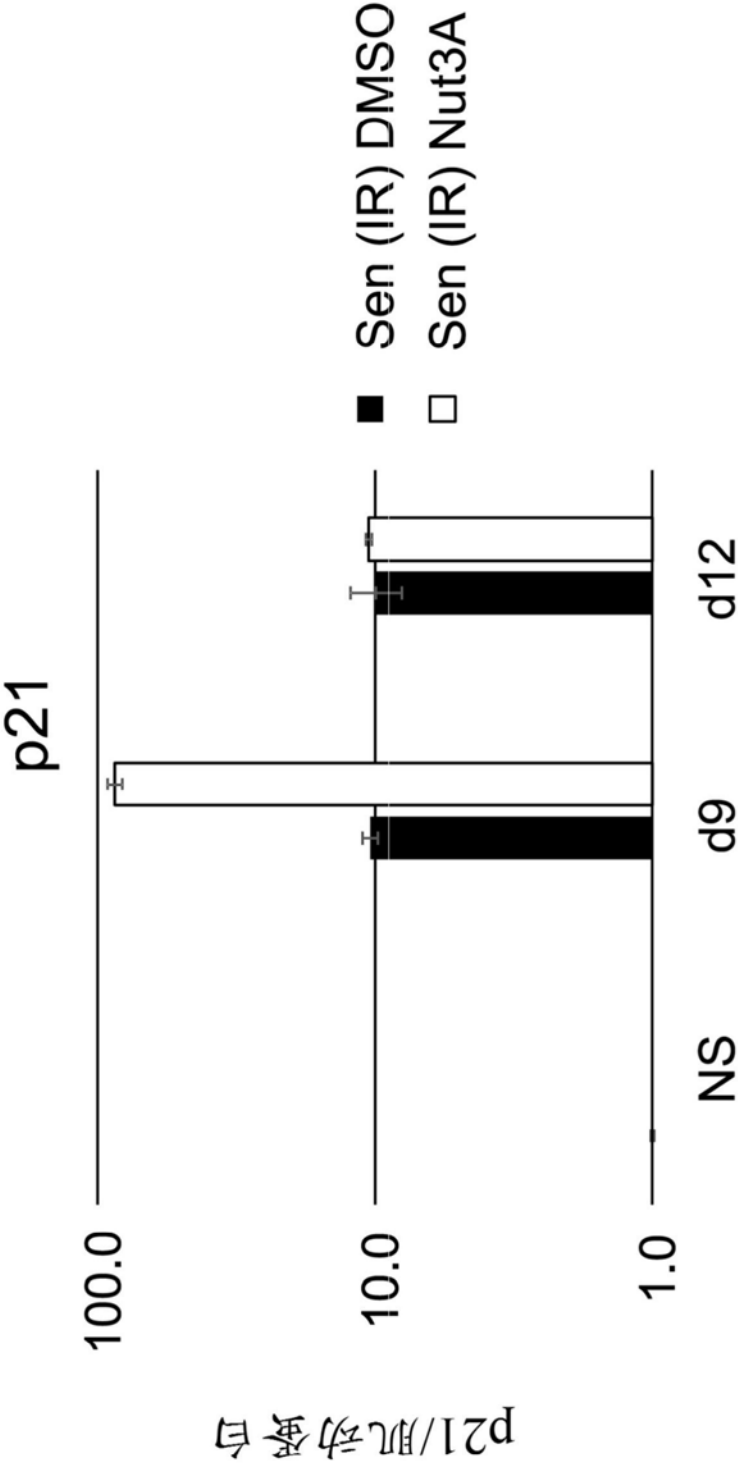


图13A

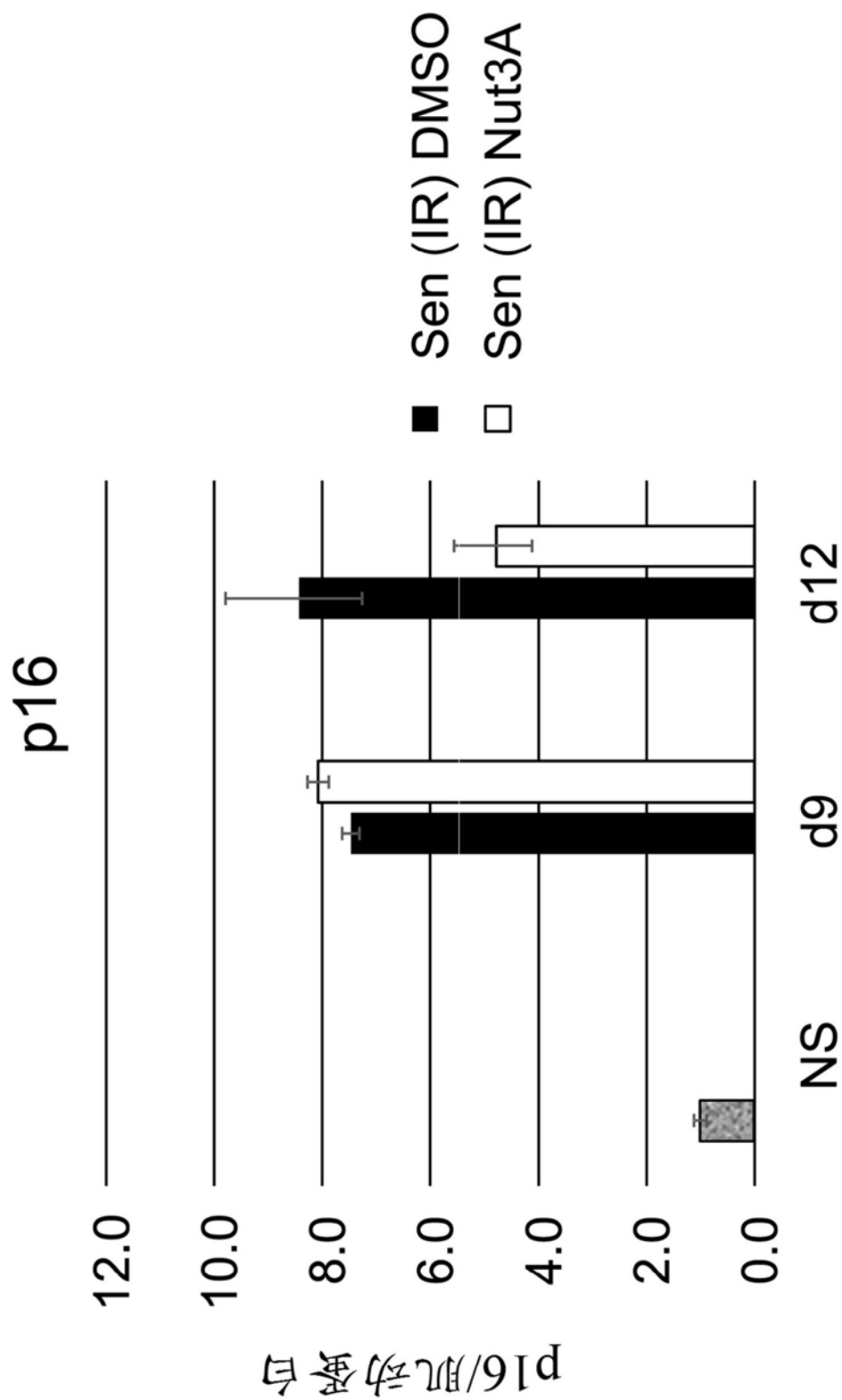


图13B

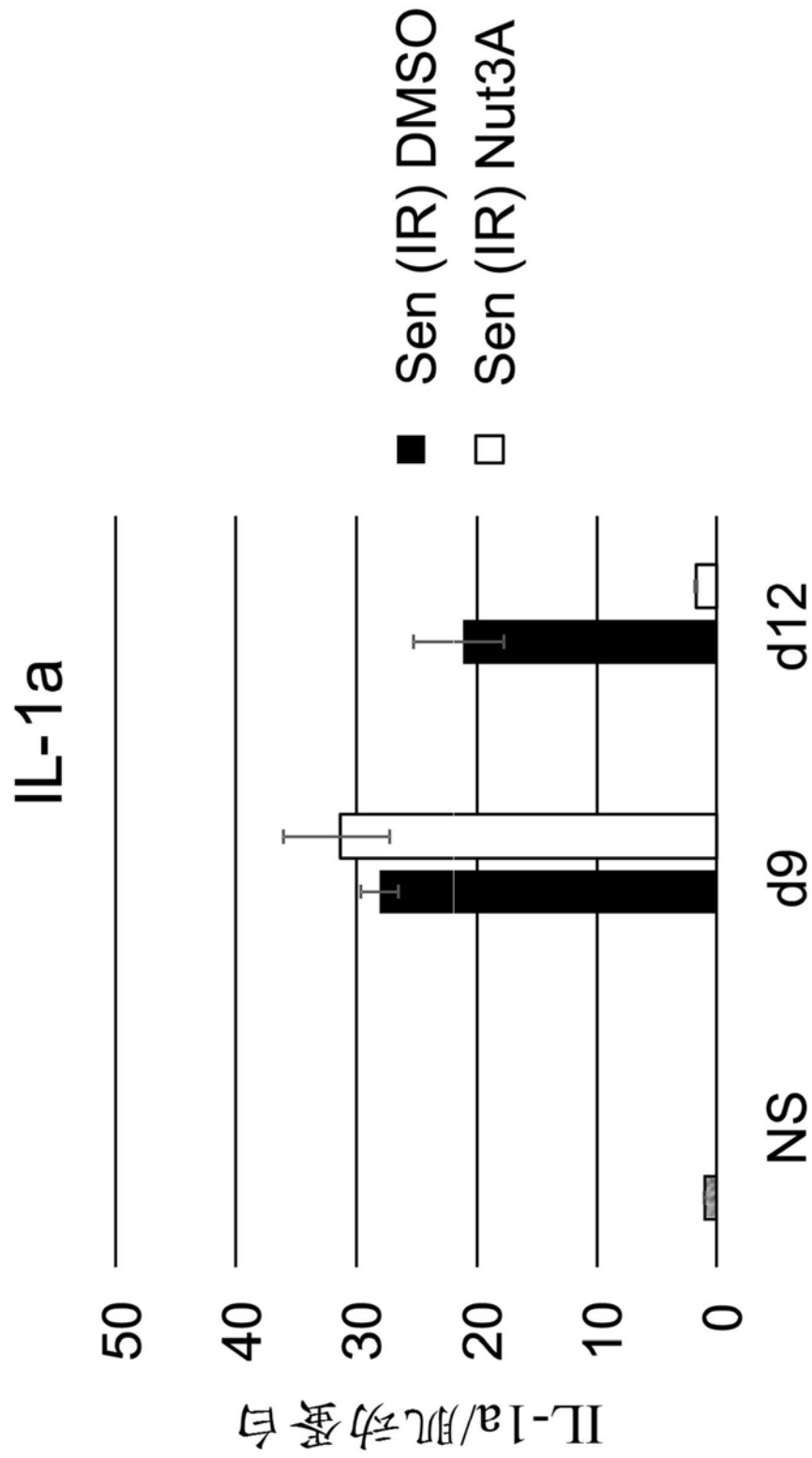


图13C

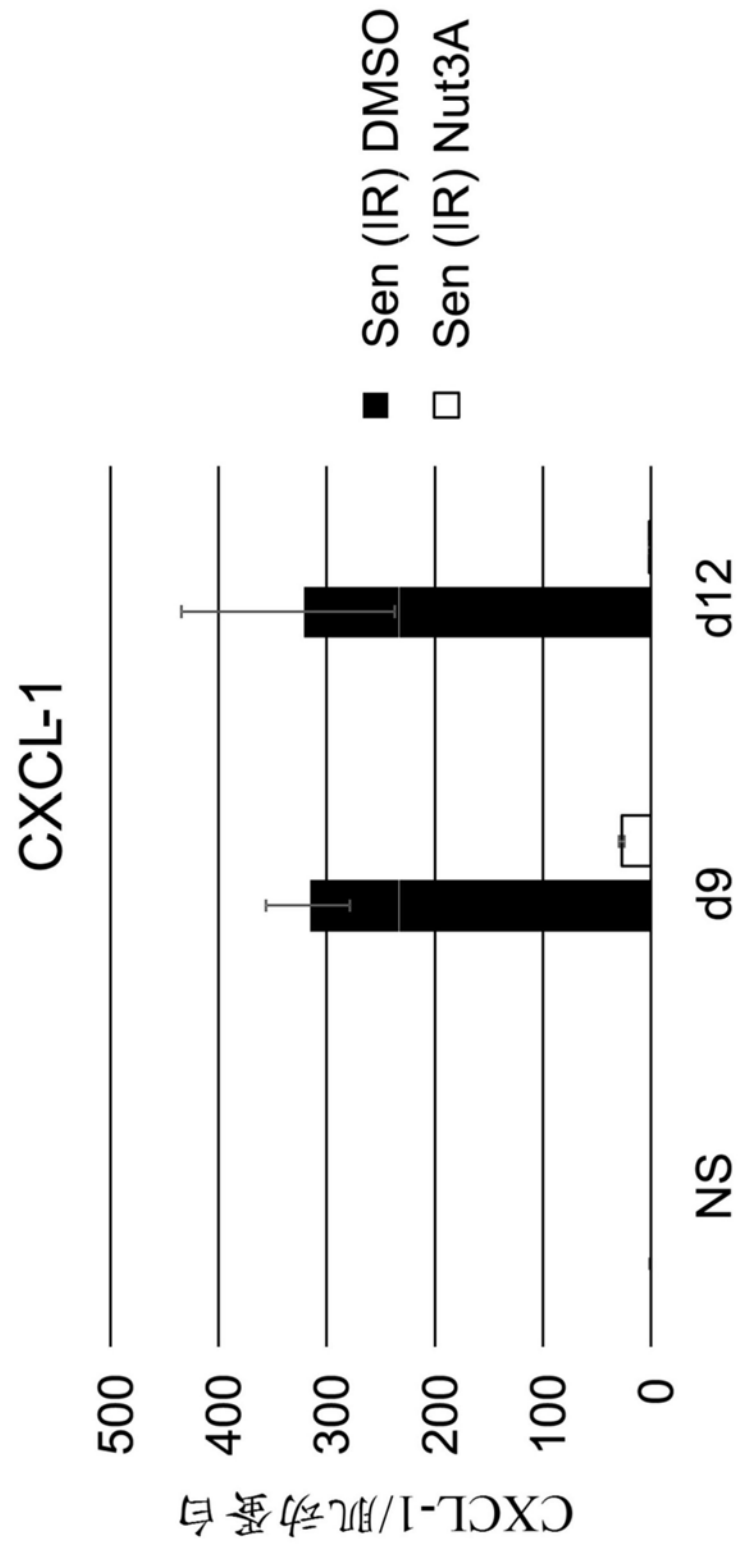


图13D

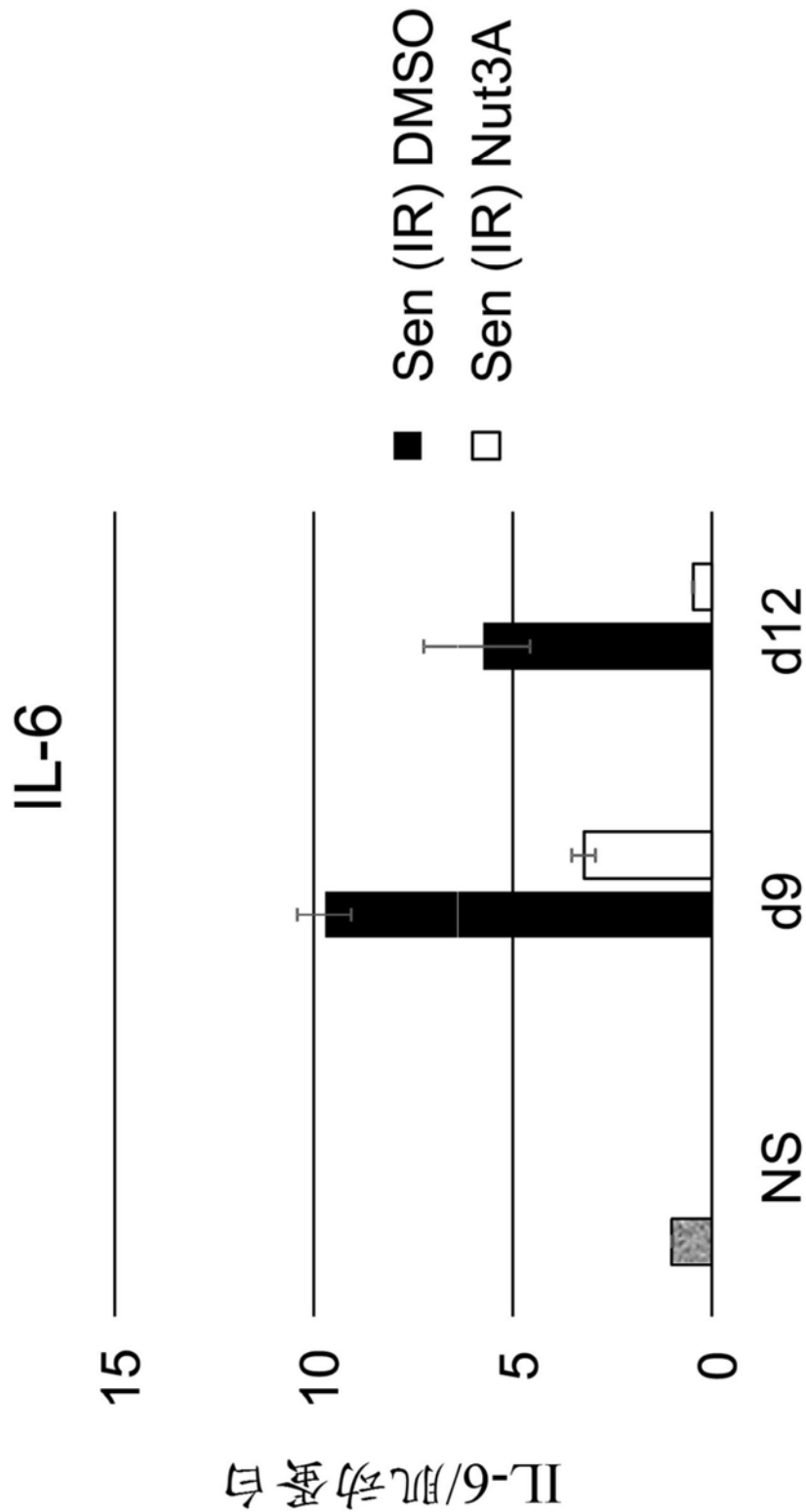


图13E

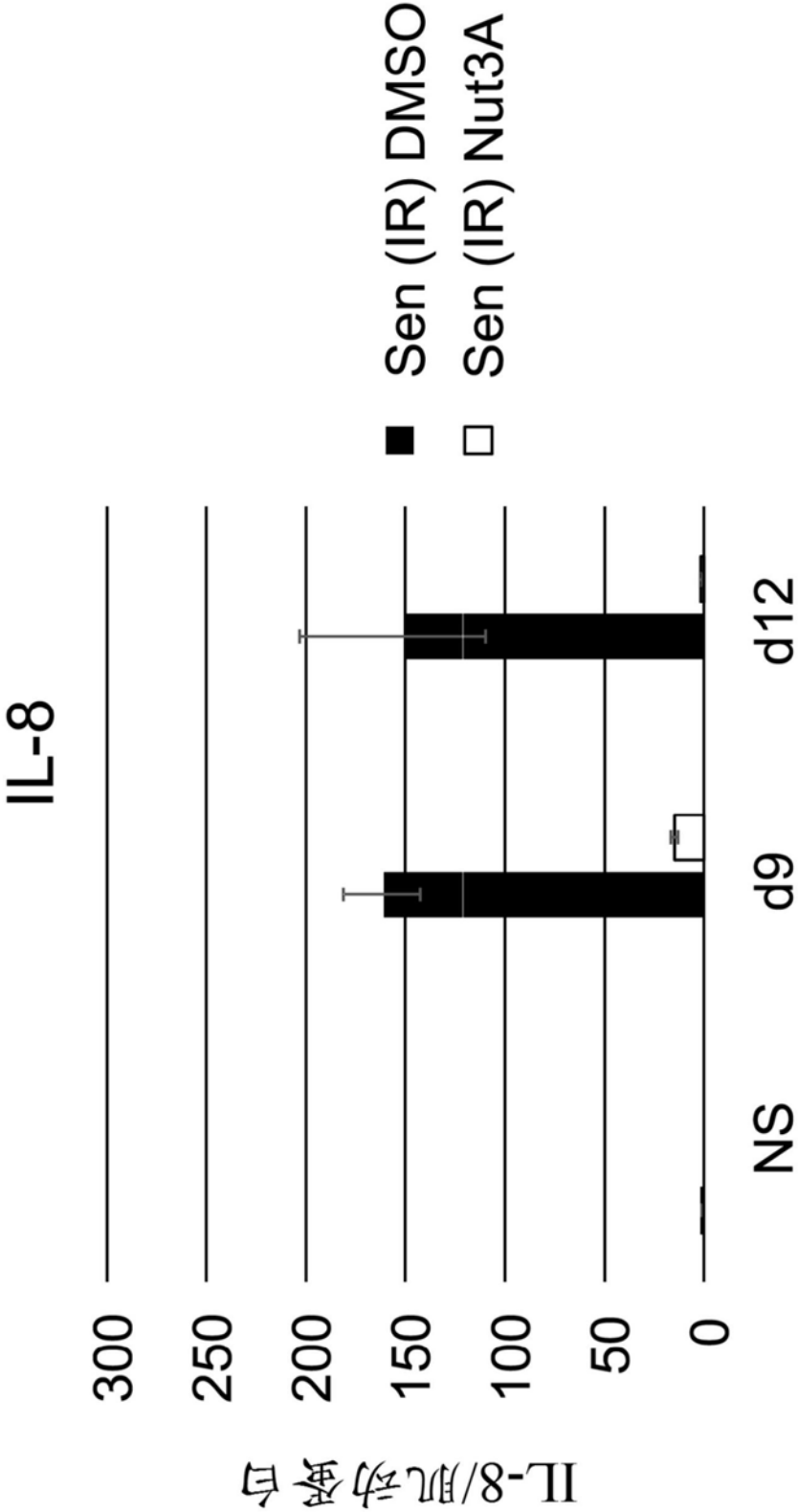


图13F

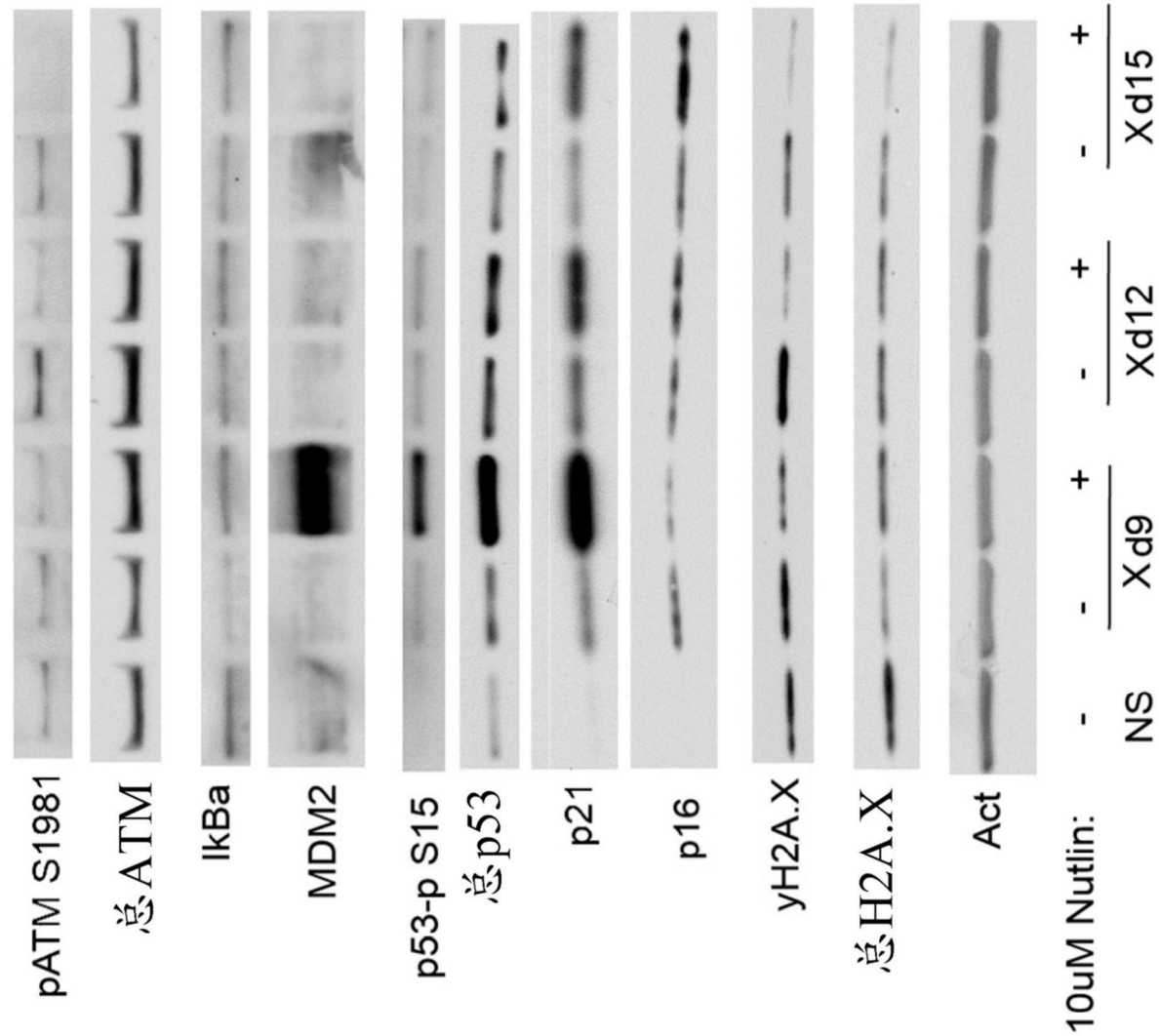
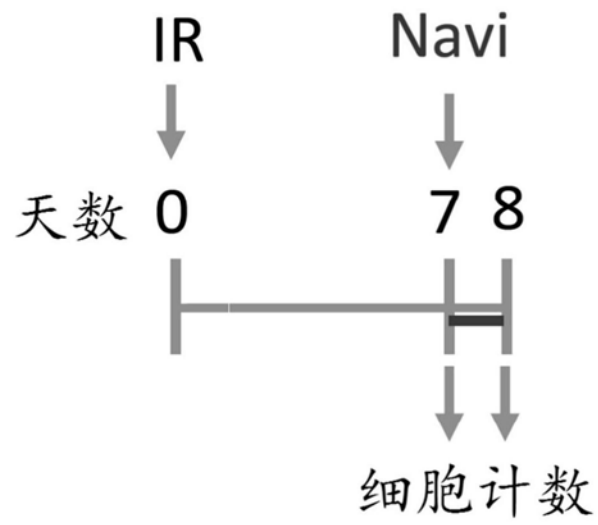


图14

Sen(IR)



Non Sen

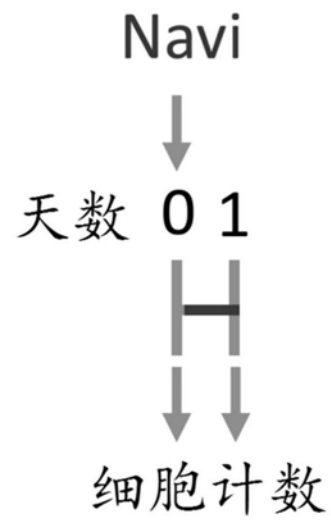


图15

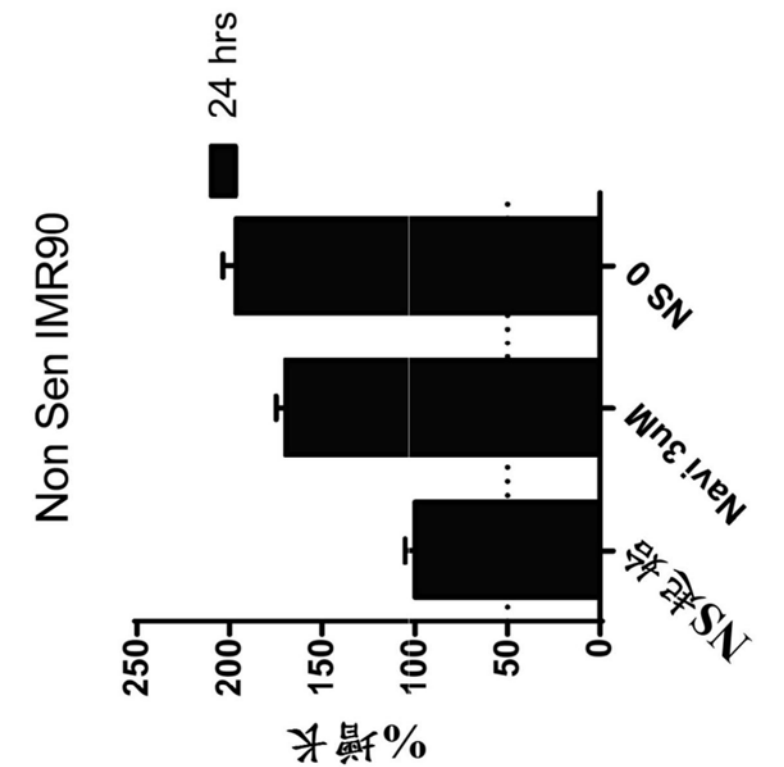


图16

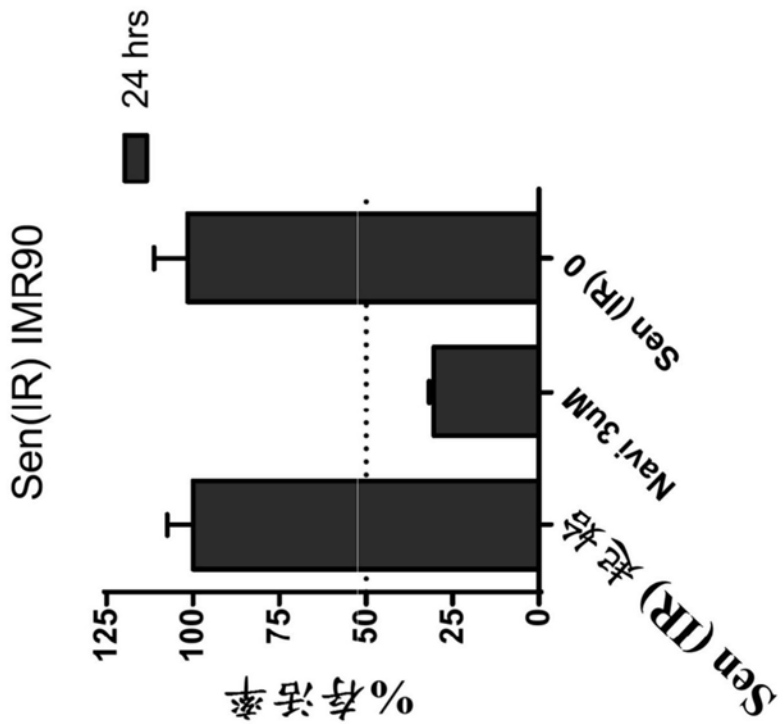


图17

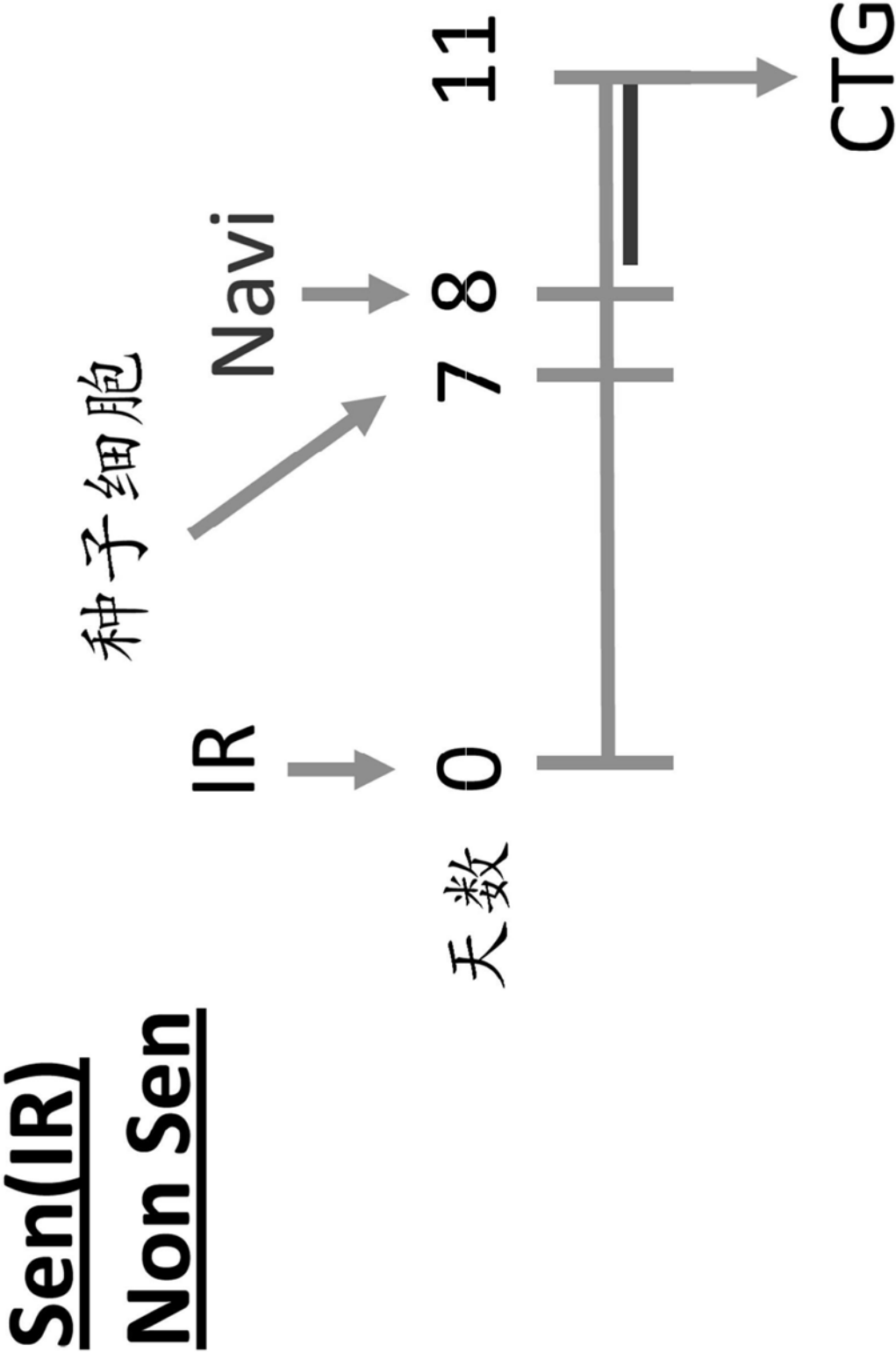


图18

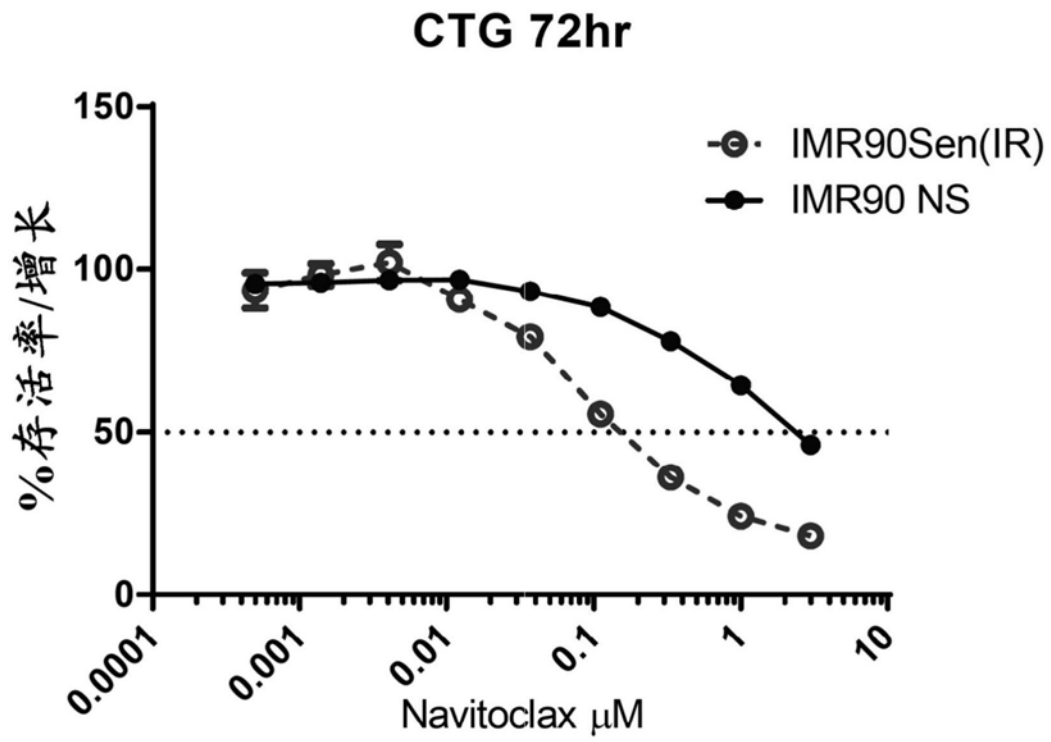


图19

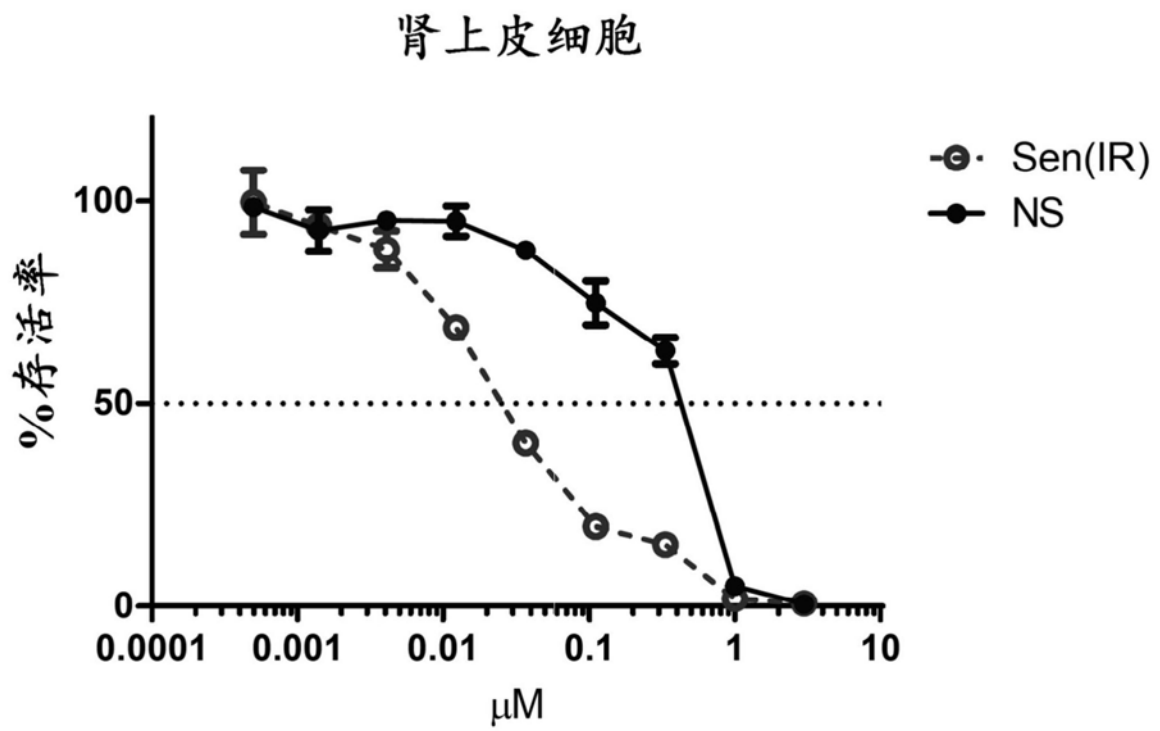


图20

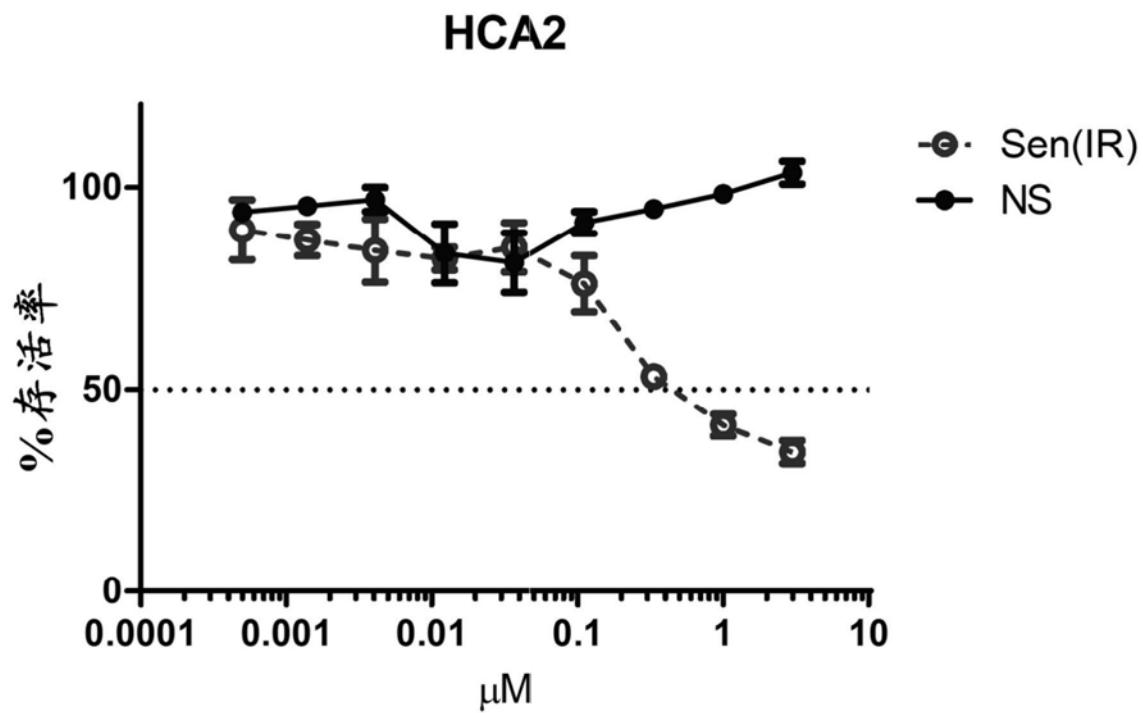


图21

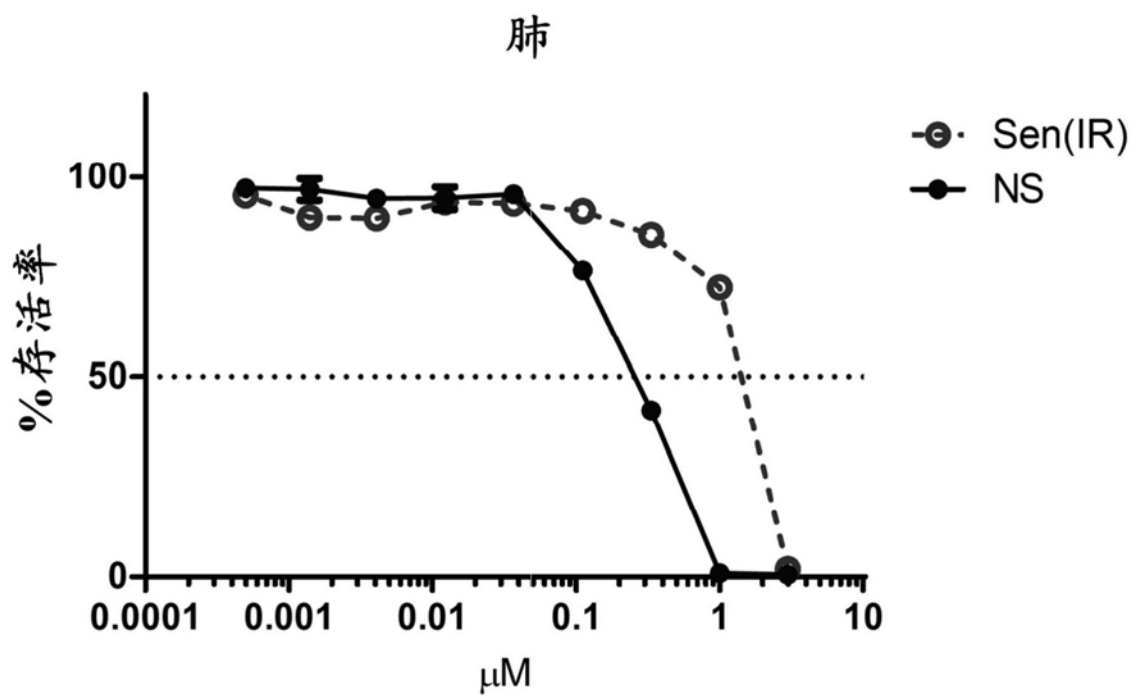


图22

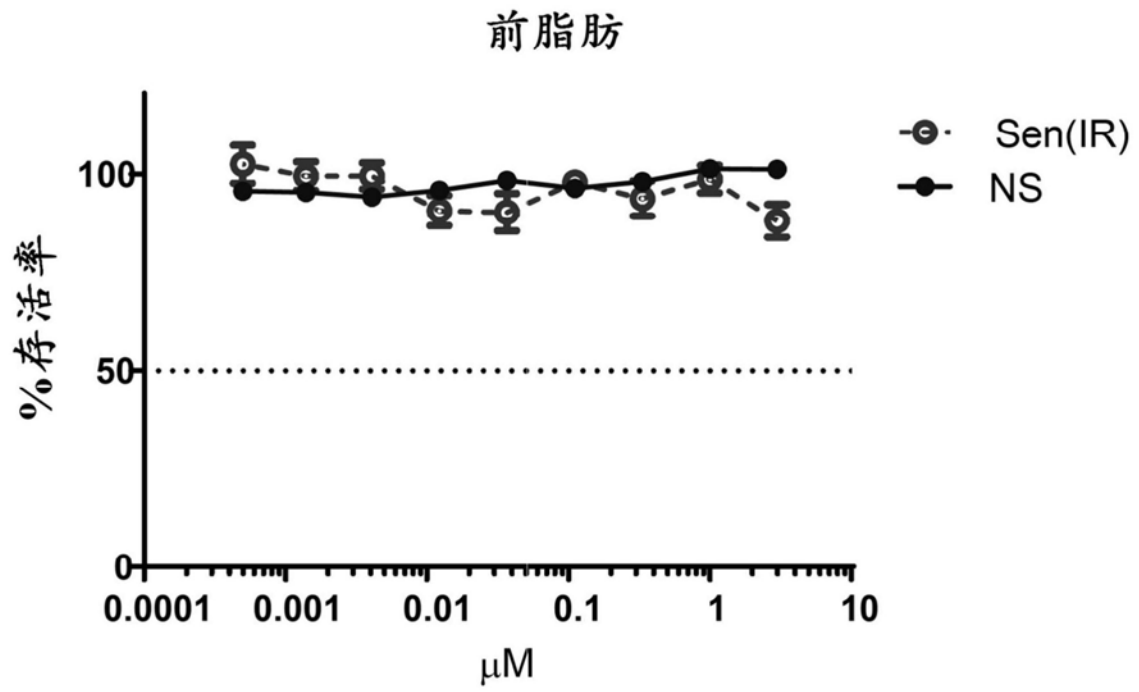


图23

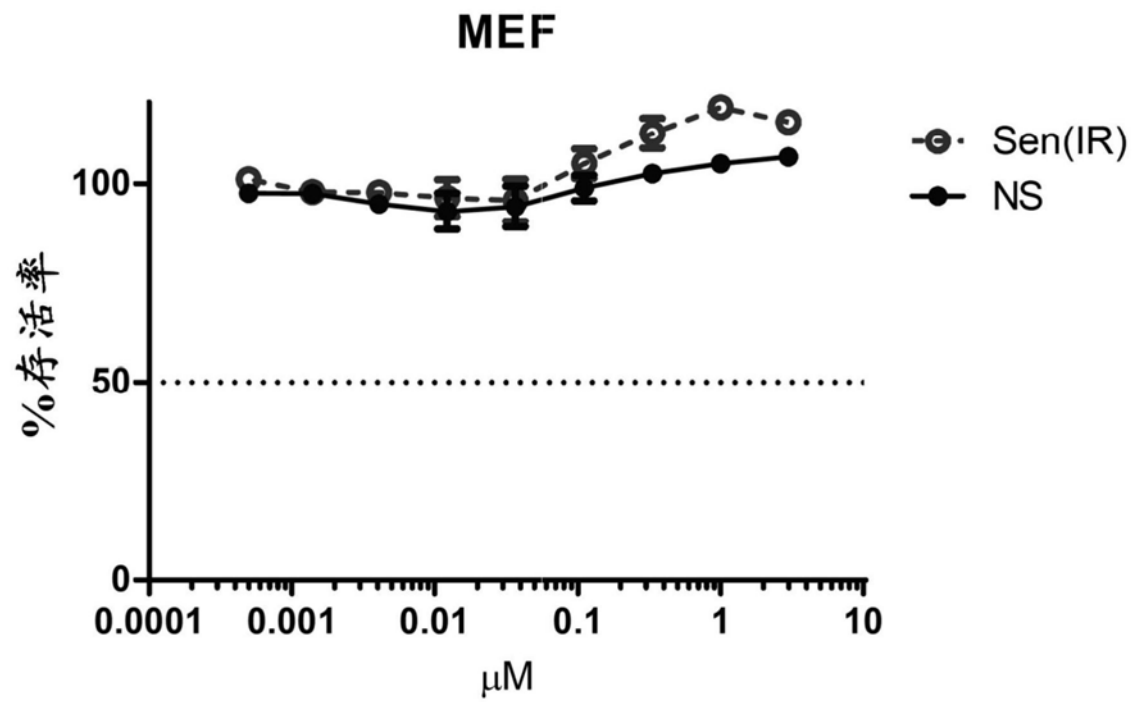


图24

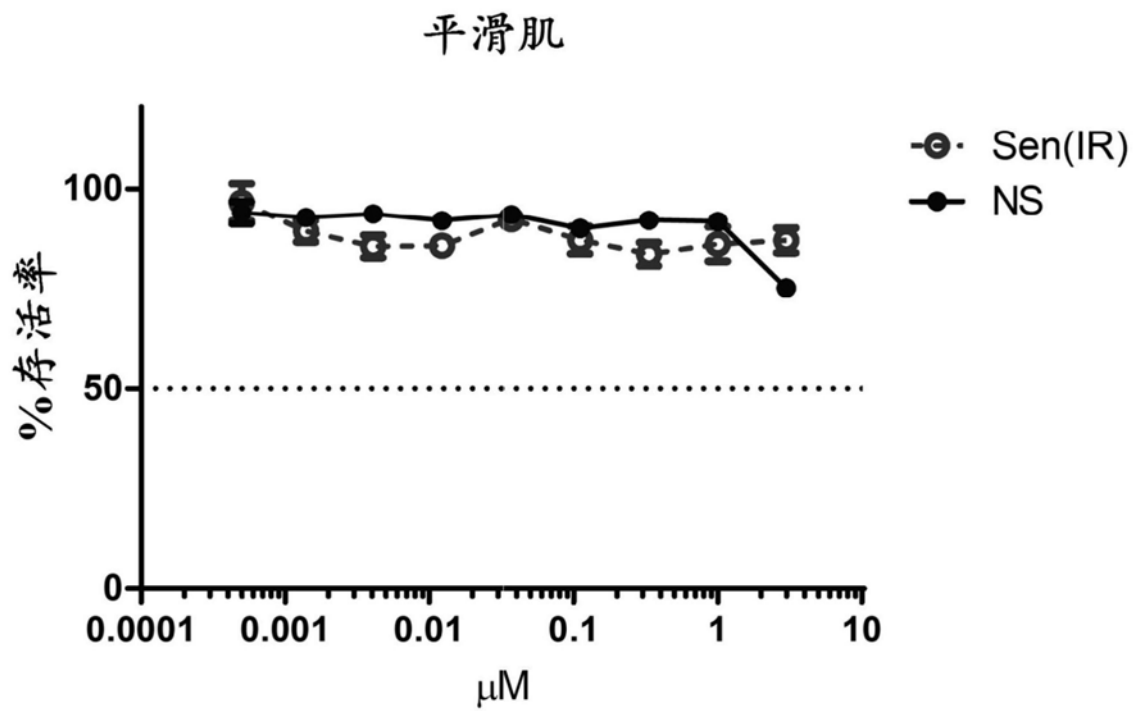


图25

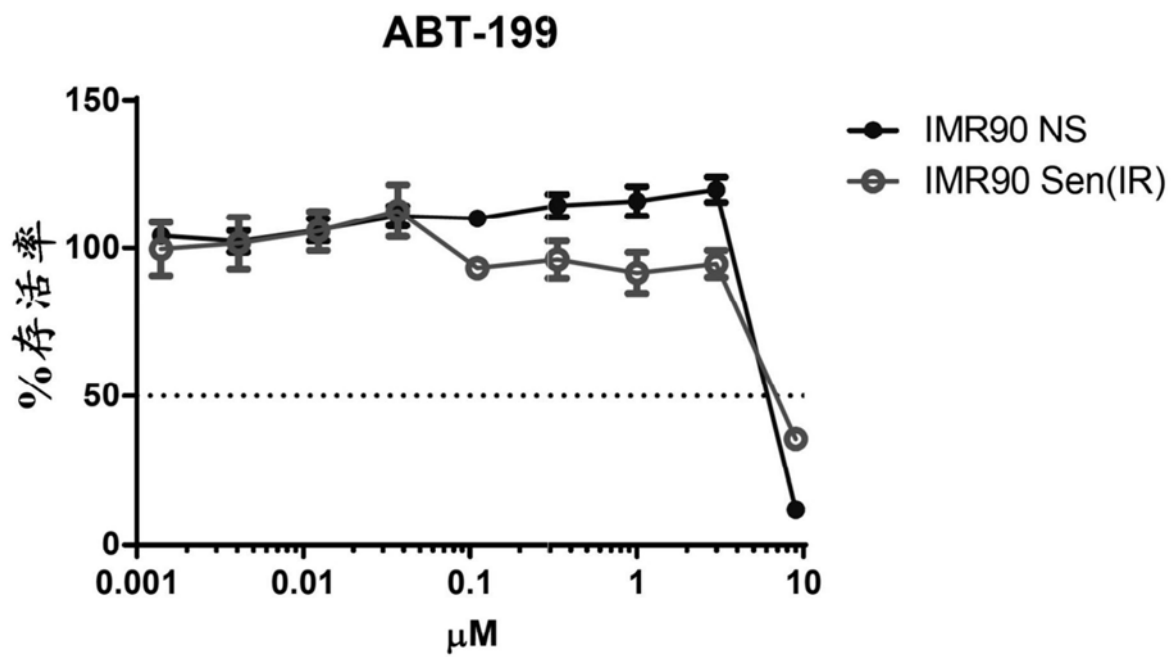


图26

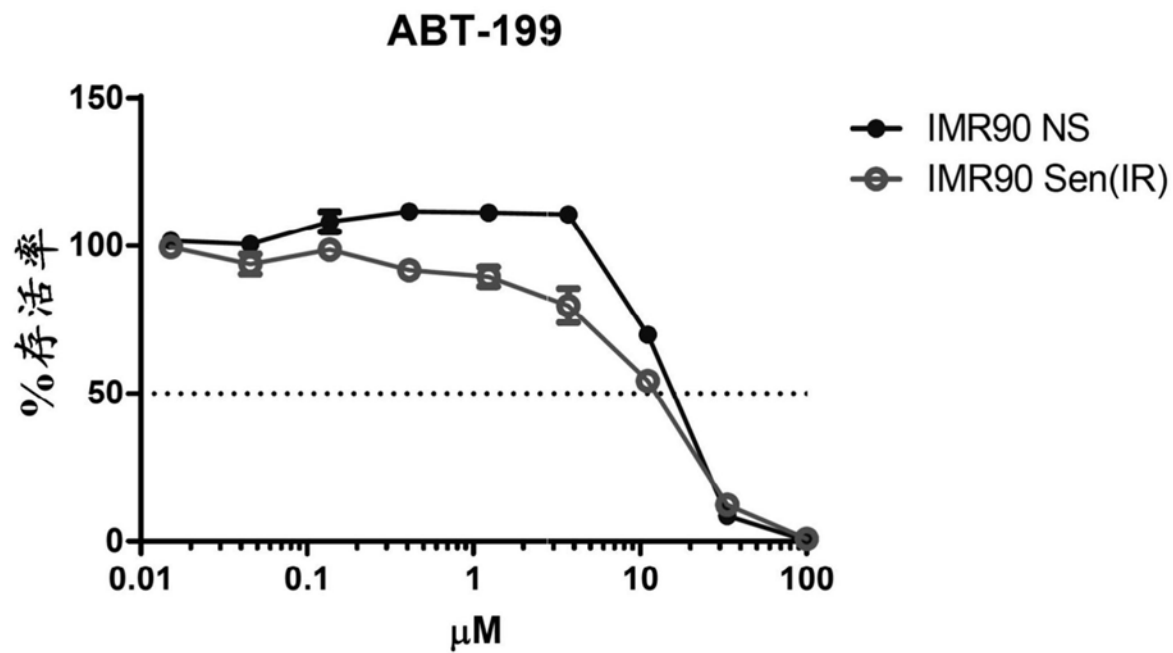


图27

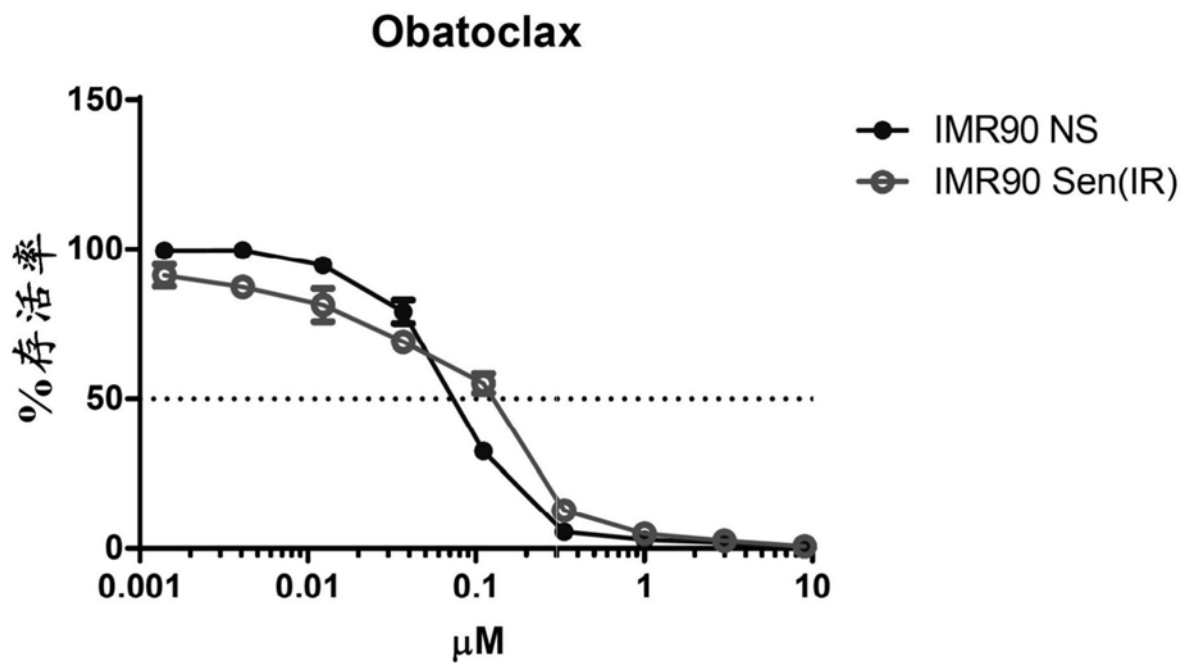


图28

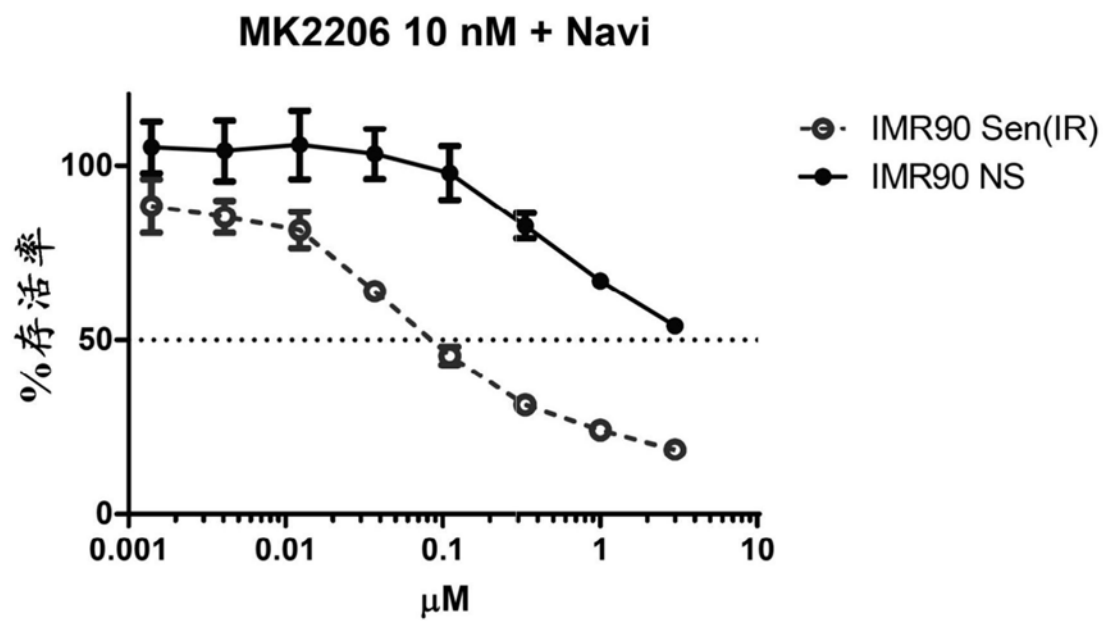


图29A

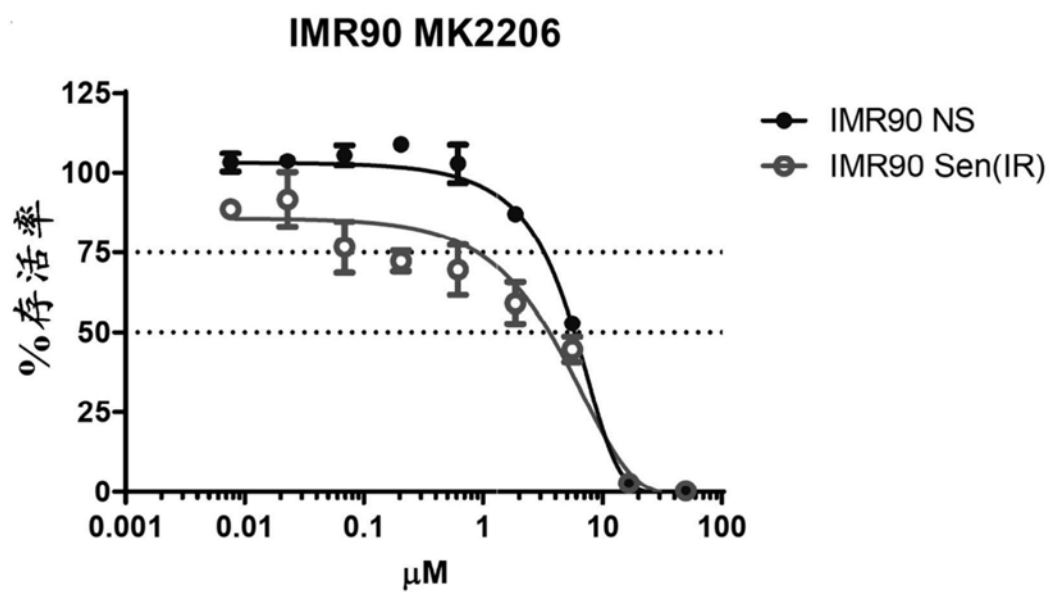


图29B

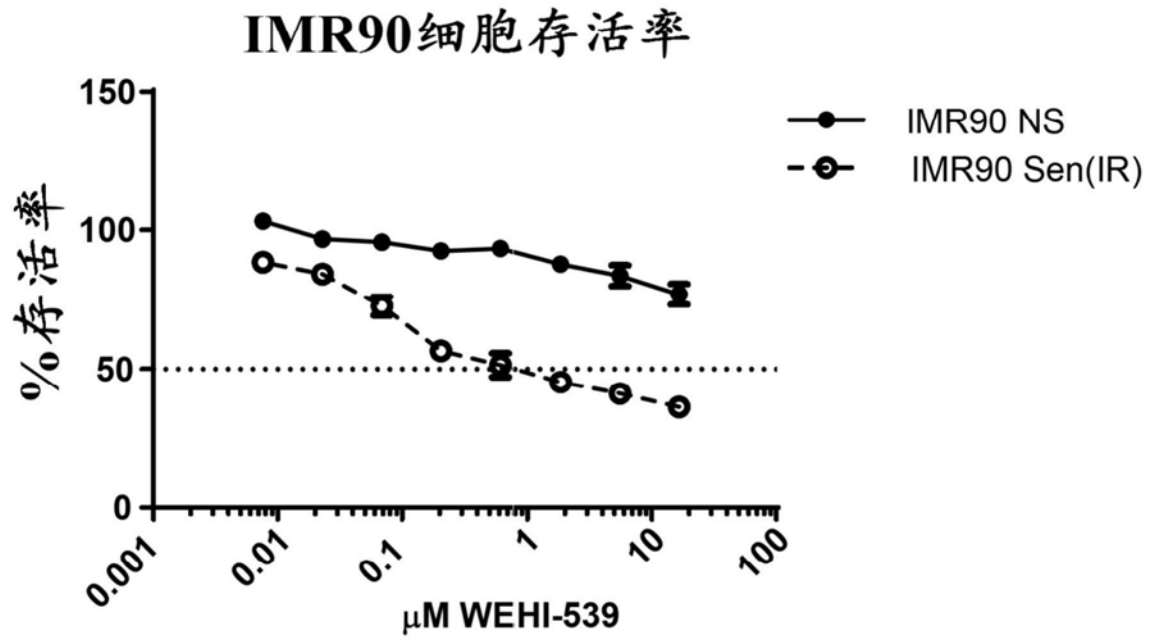


图30A

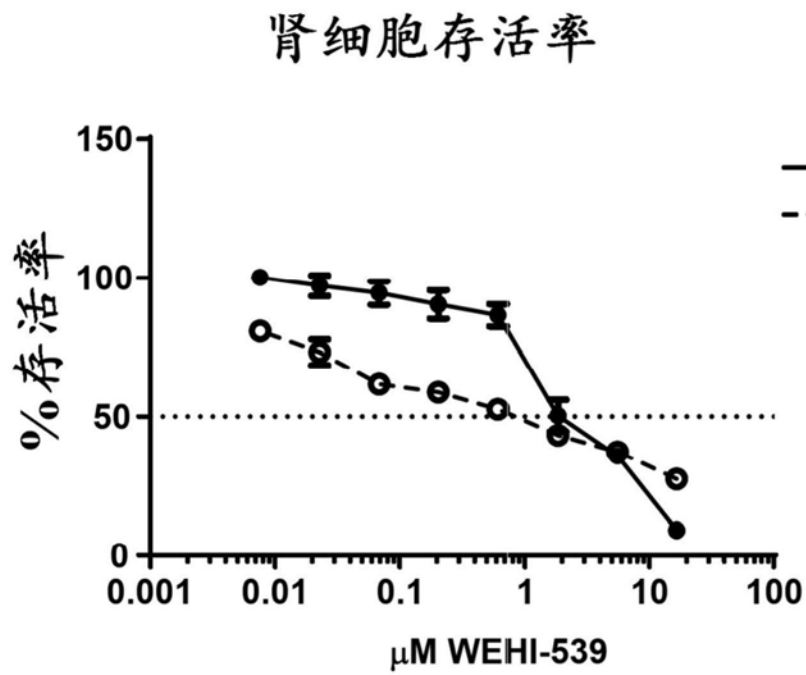


图30B

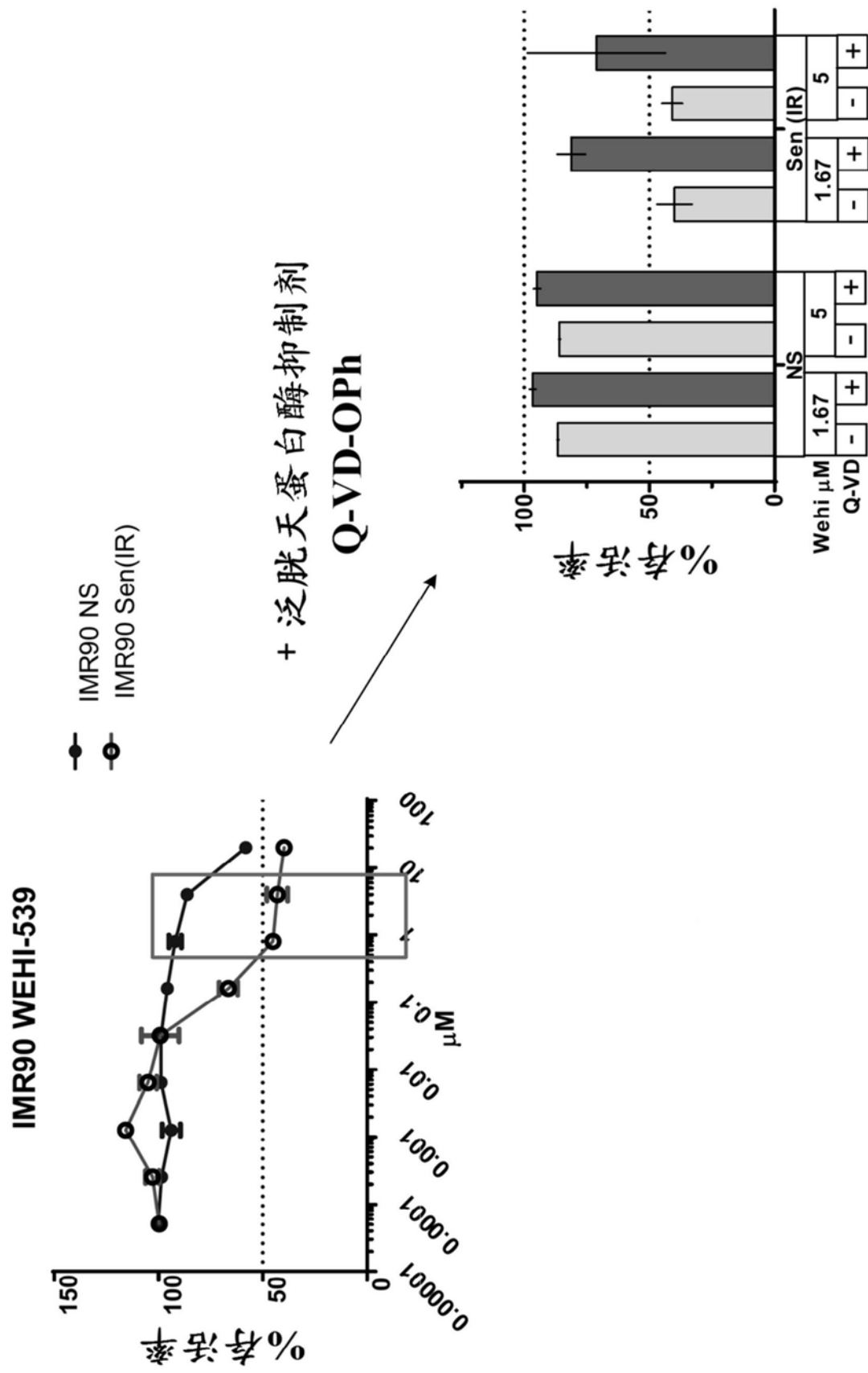


图31

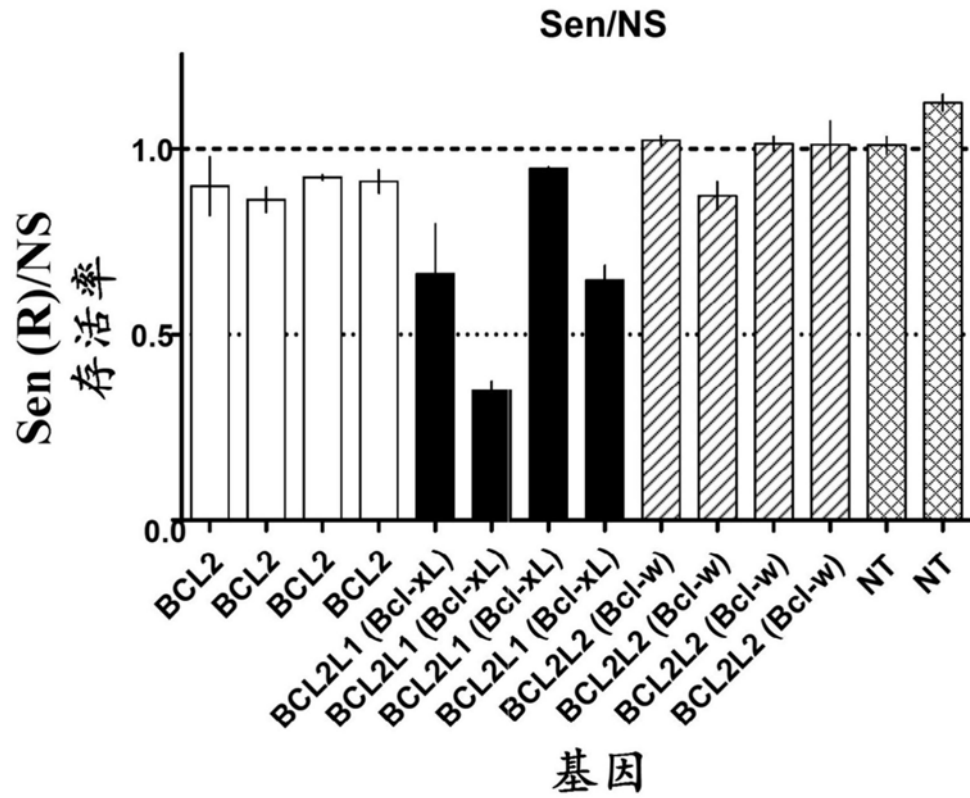


图32

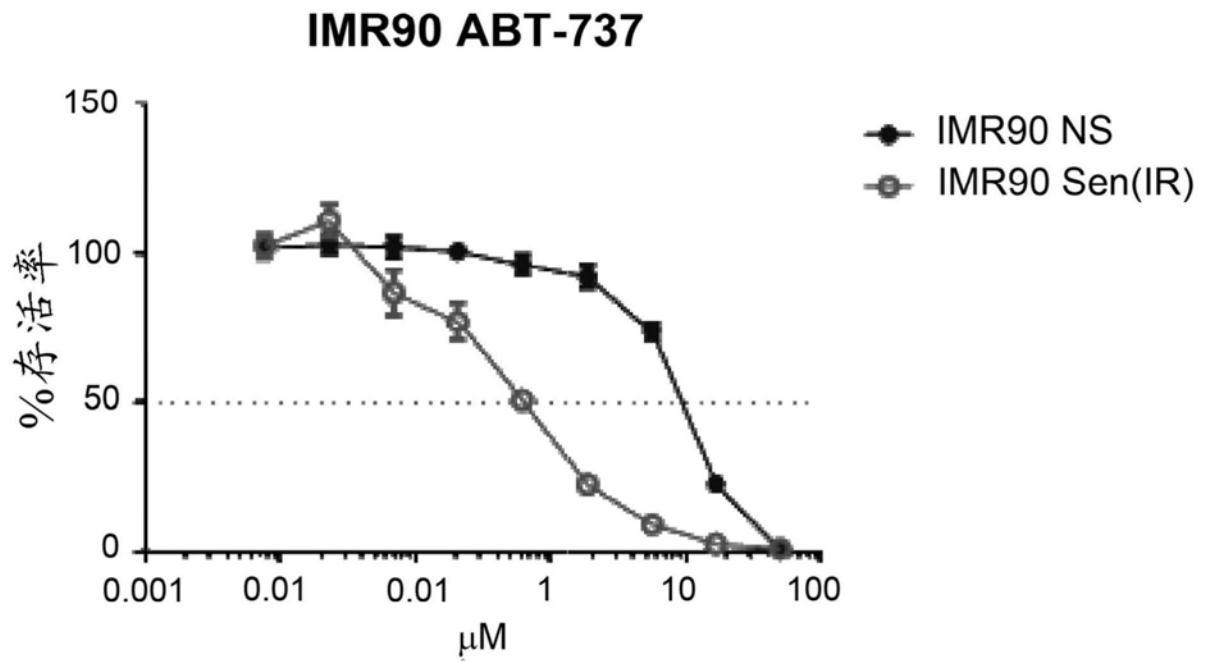


图33

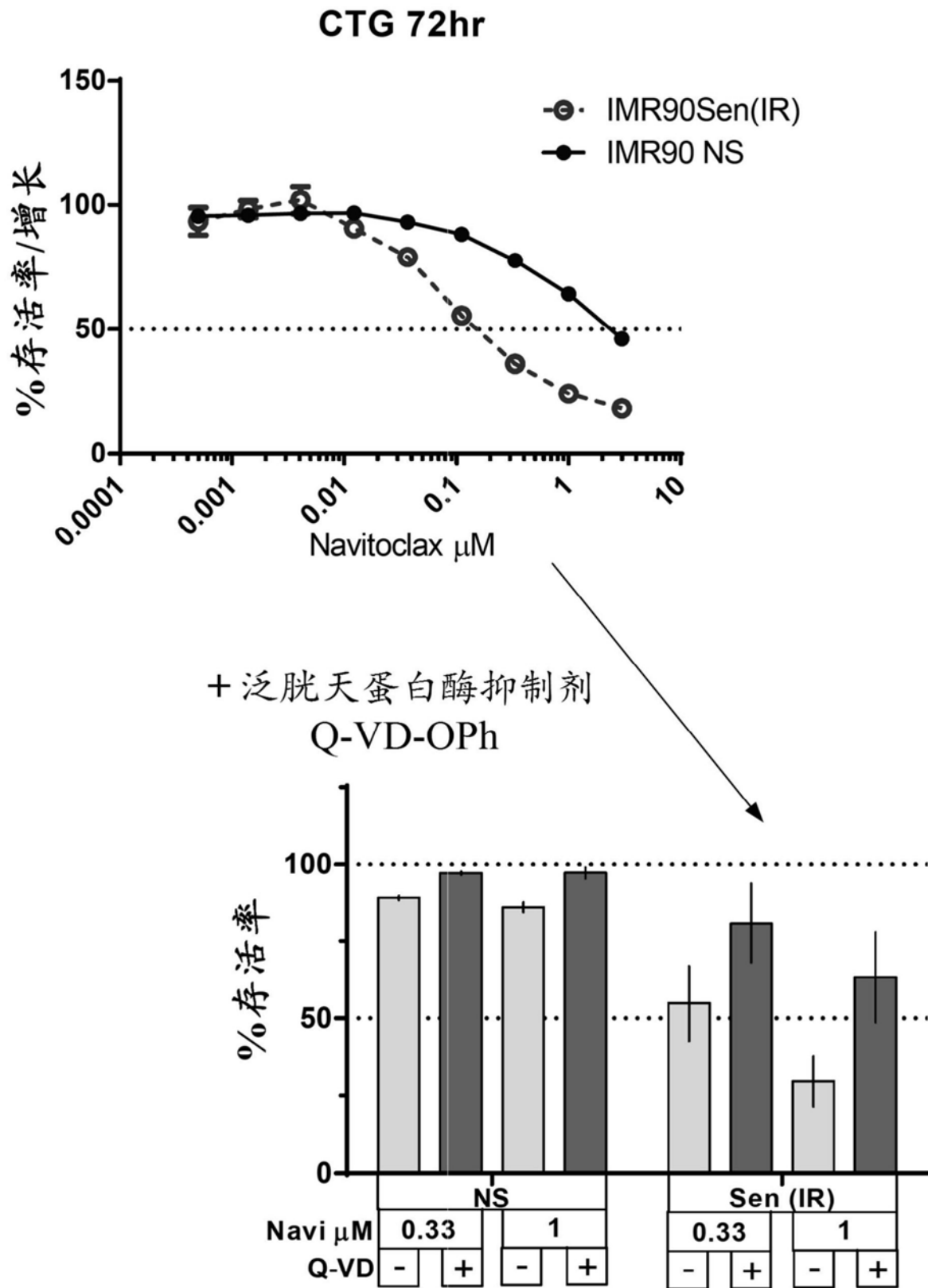


图34

组		动物	程序	处理	读出
1	ACL对照	16 x C57Blk 1 x 3MR	ACL手术 平行媒介物IA注射 GCV组 GCV处理的对照组	每日注射一次媒介物(10 µl)持续5天, 任选第二个周期	qPCR和组织学
2	GCV	3 x 3MR	ACL手术 GCV的IA注射	每日注射一次GCV(每次膝盖注射2.5 µg)持续5天, 任选第二个周期	发光 qPCR和组织学
3	Nutlin	12 C57Blk	ACL手术 nutlin-3a 的IA注射	隔日注射一次Nutlin-3a(每次膝盖注射5.8 µg)持续2周	qPCR和组织学
4	假手术对照	4 C57Blk (n=3 PCR, n=1 组织学)	假手术 平行媒介物IA注射 GCV组 [膝盖注射的对照组]	每日注射一次媒介物(10 µl)持续5天, 任选第二个周期	qPCR和组织学

图35

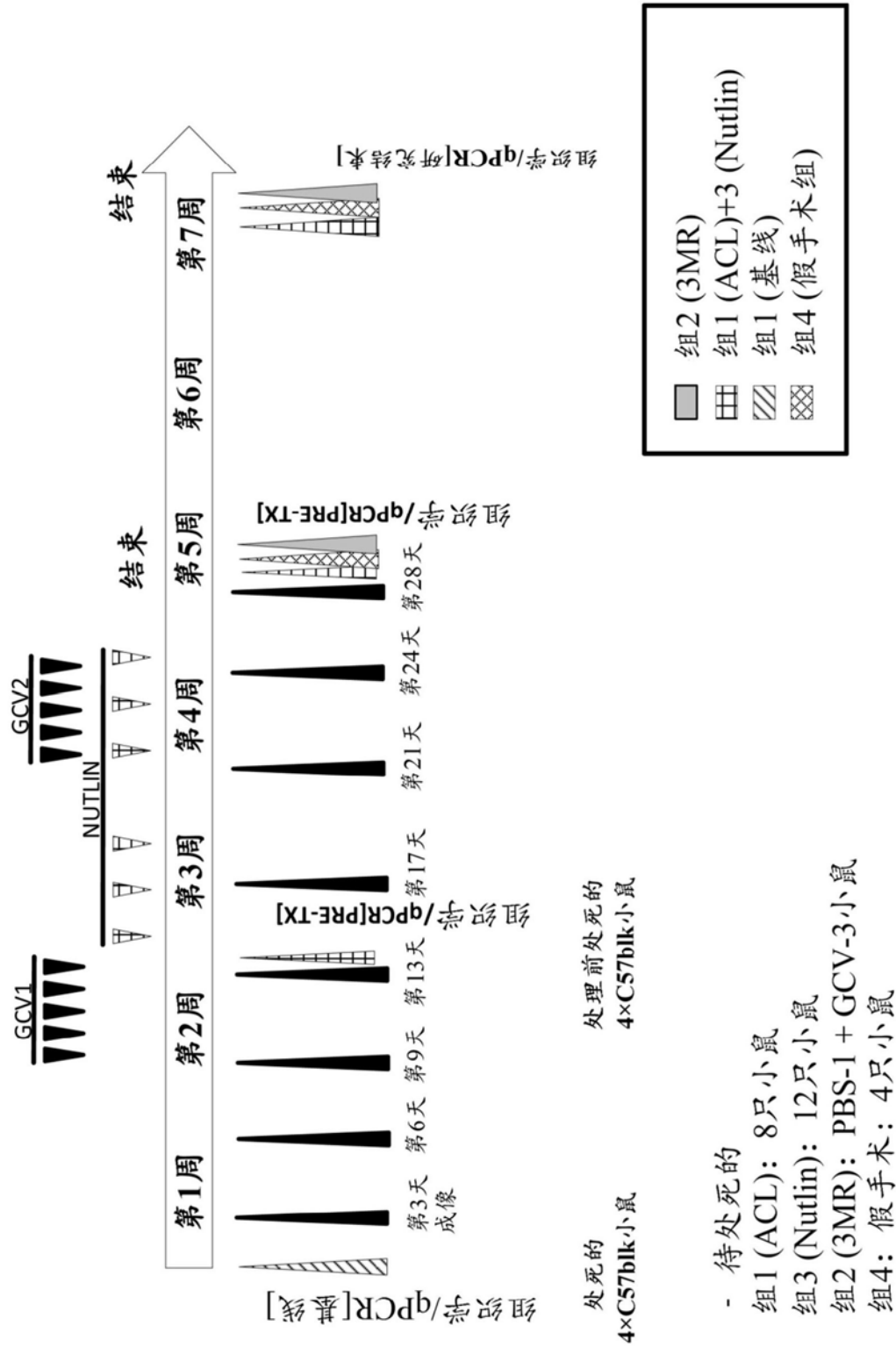


图36

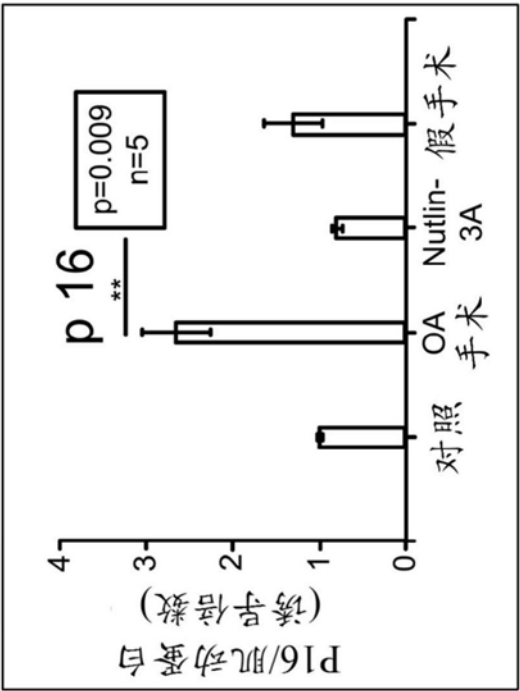


图37A

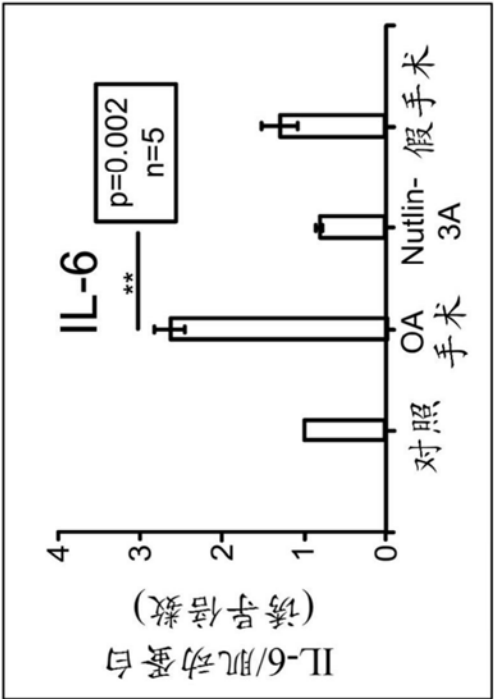


图37B

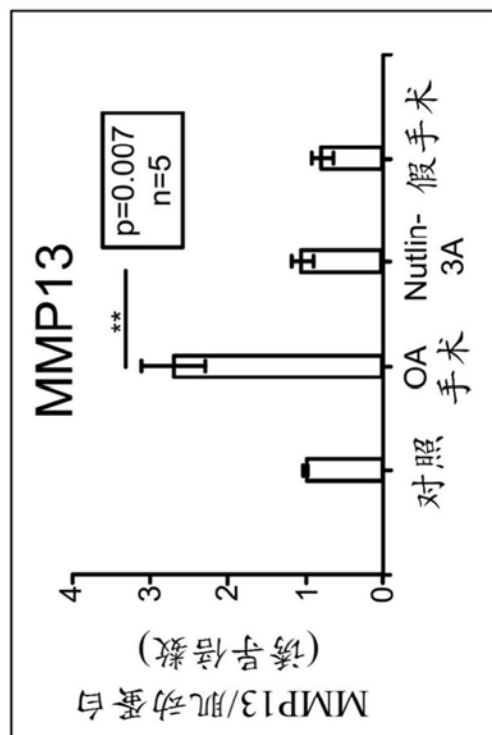


图37C

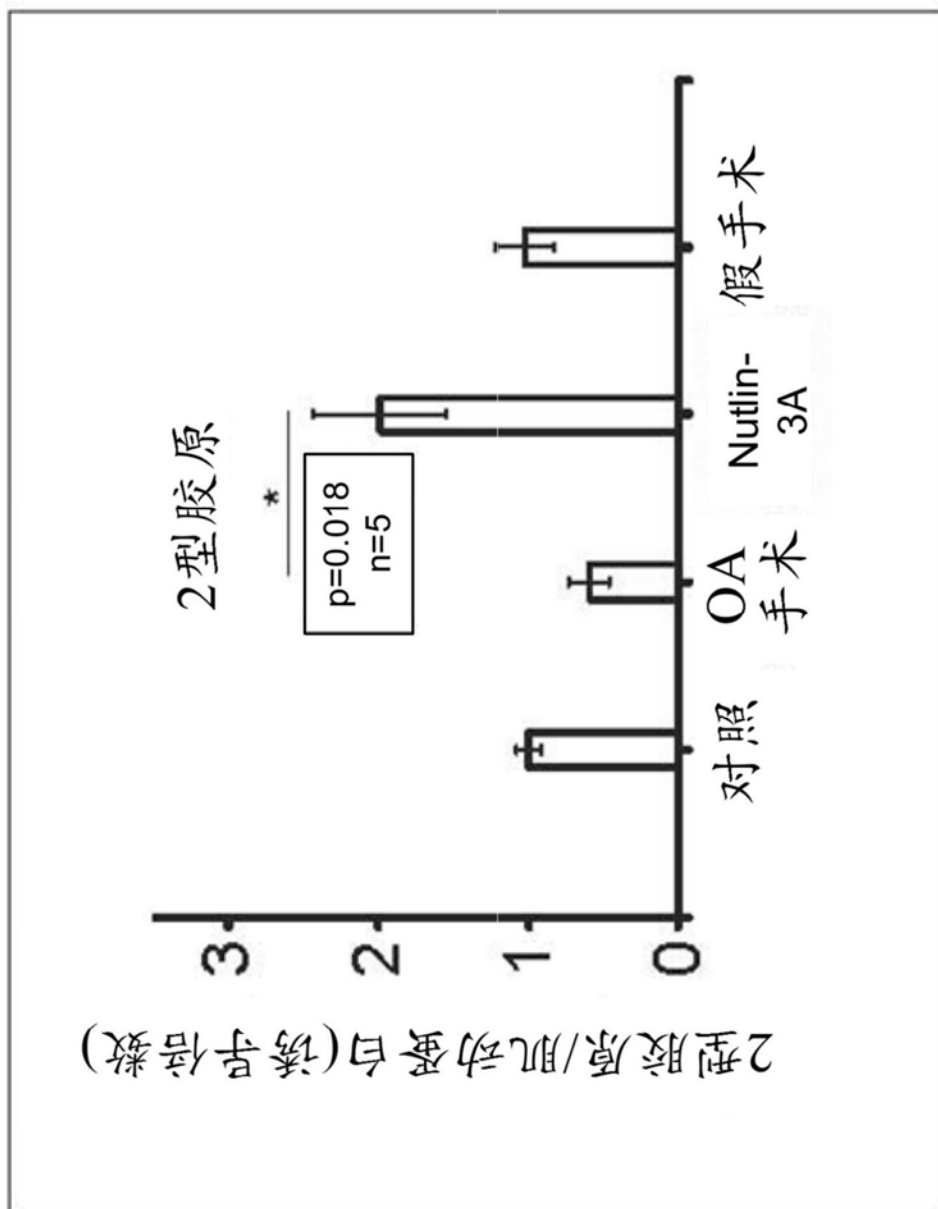


图38

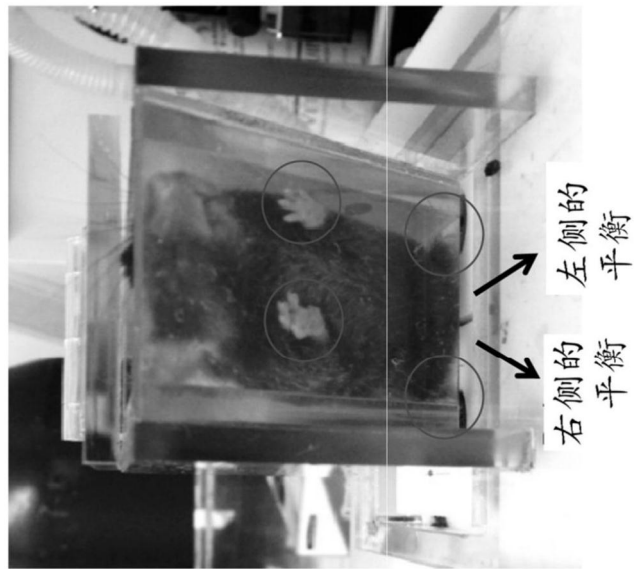


图39

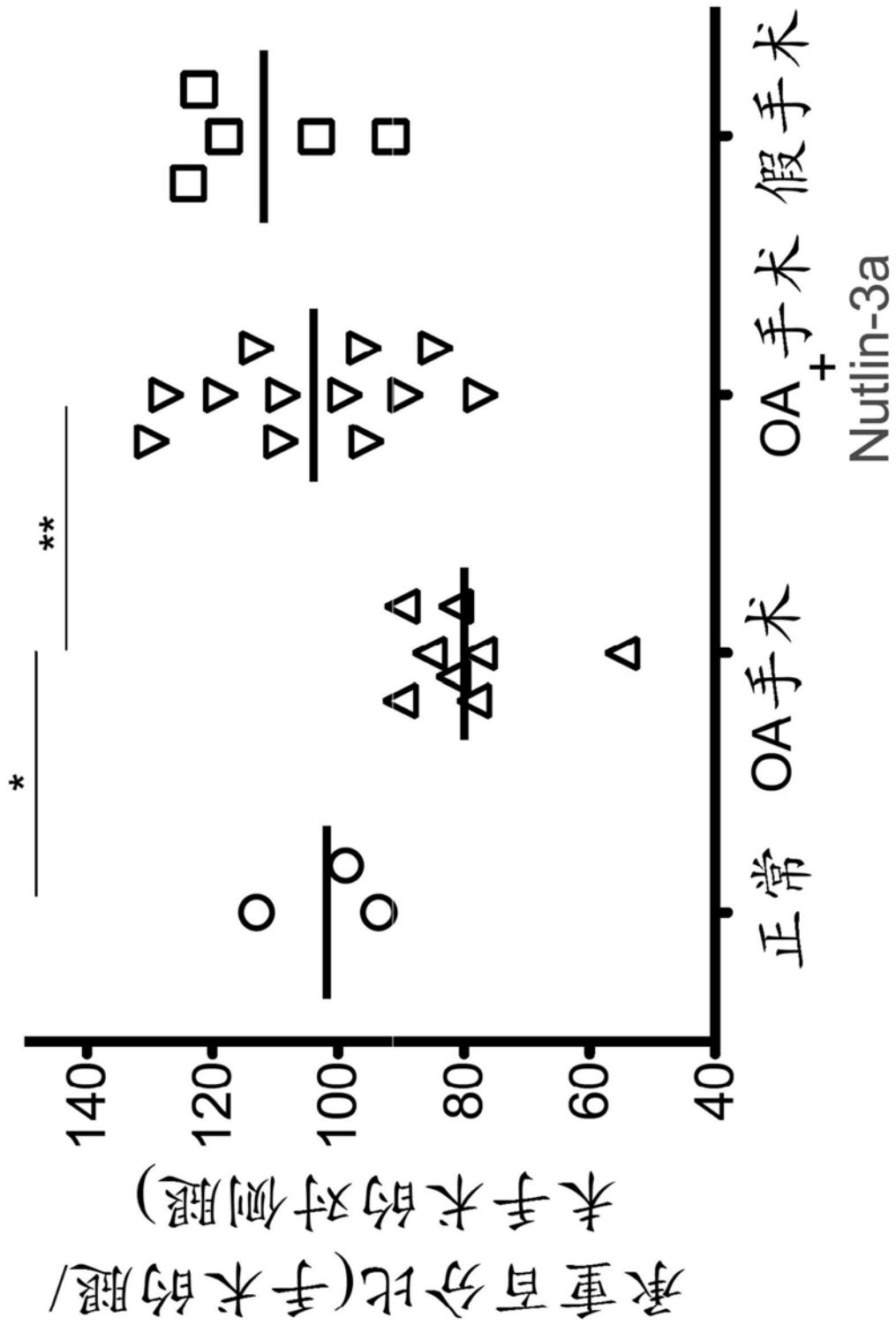


图40

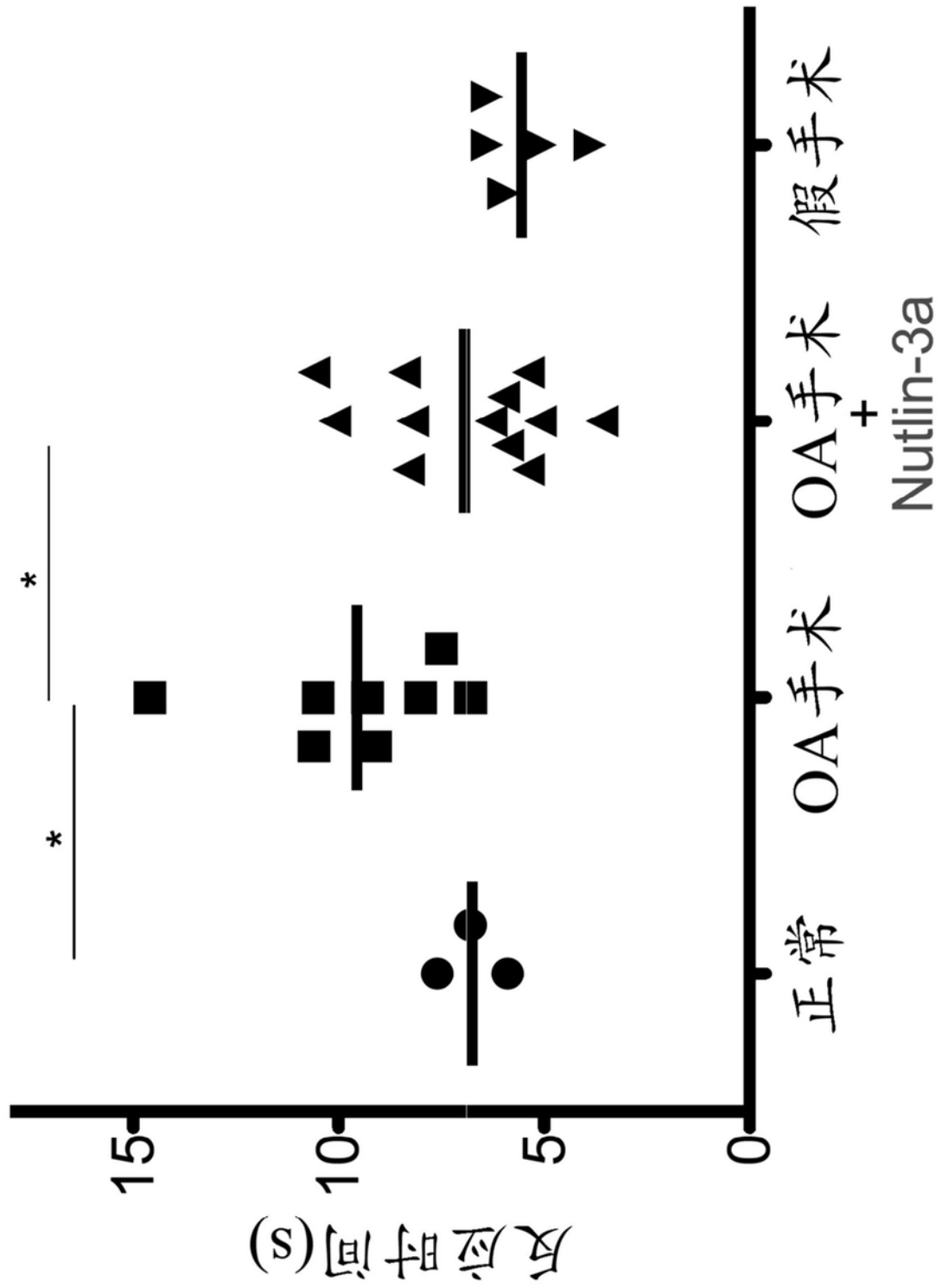


图41

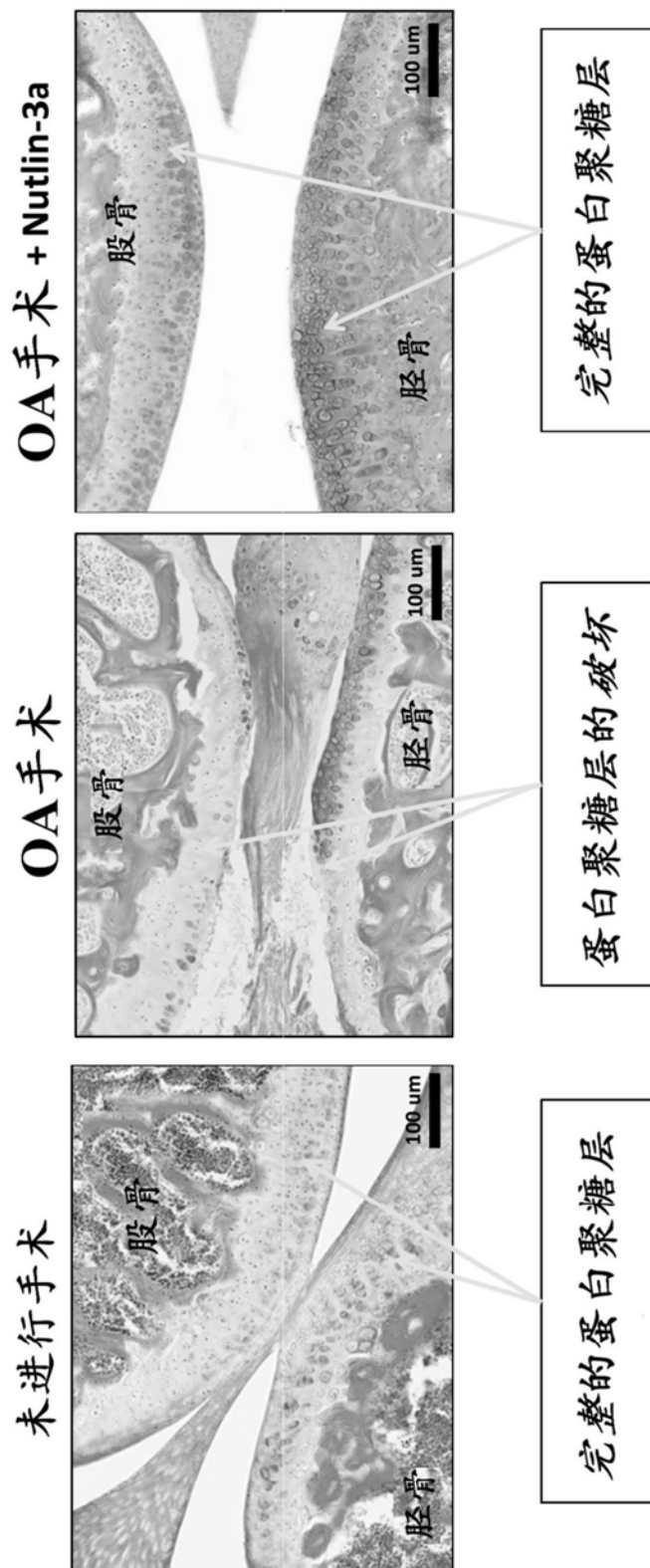


图42

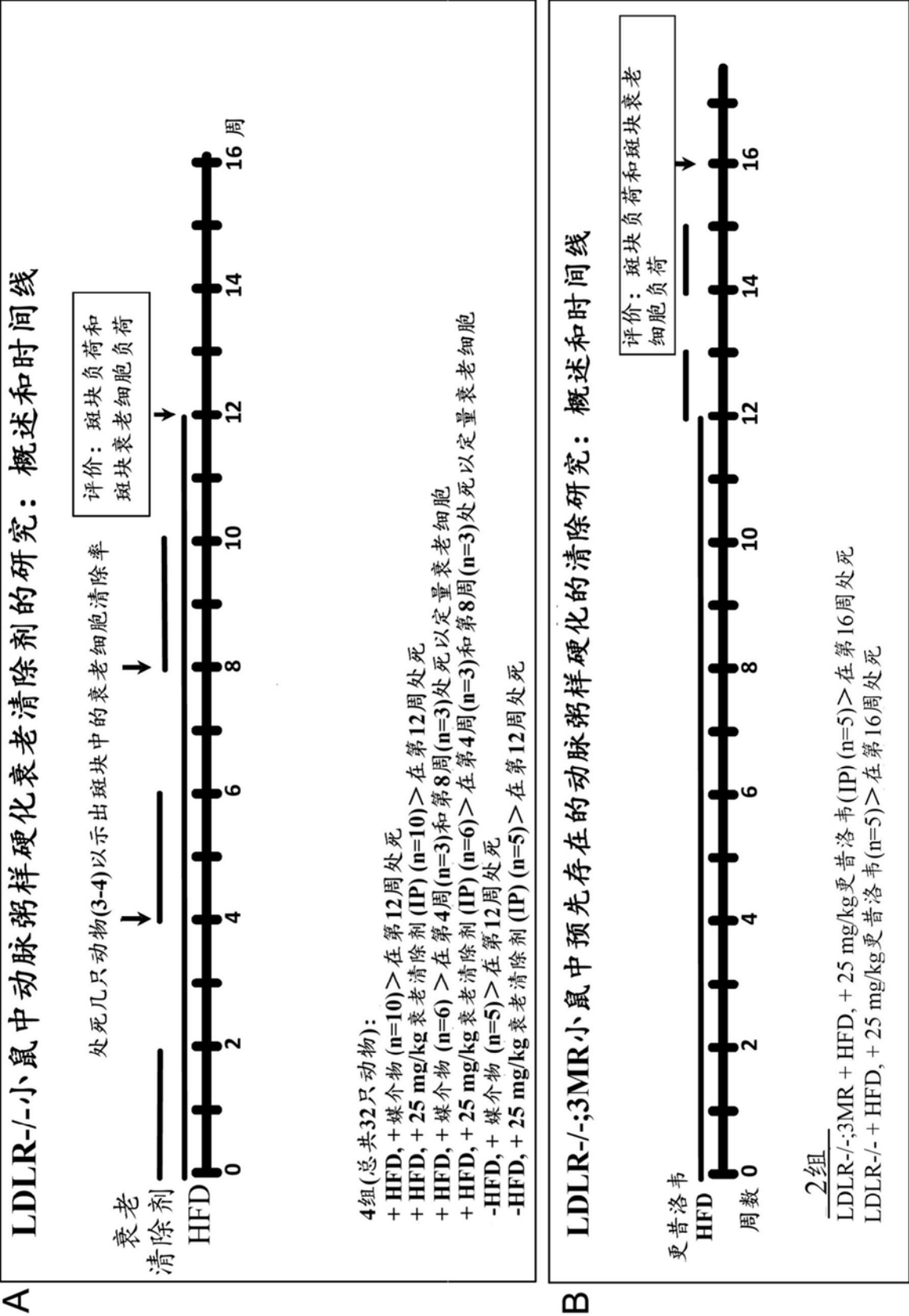


图43

155

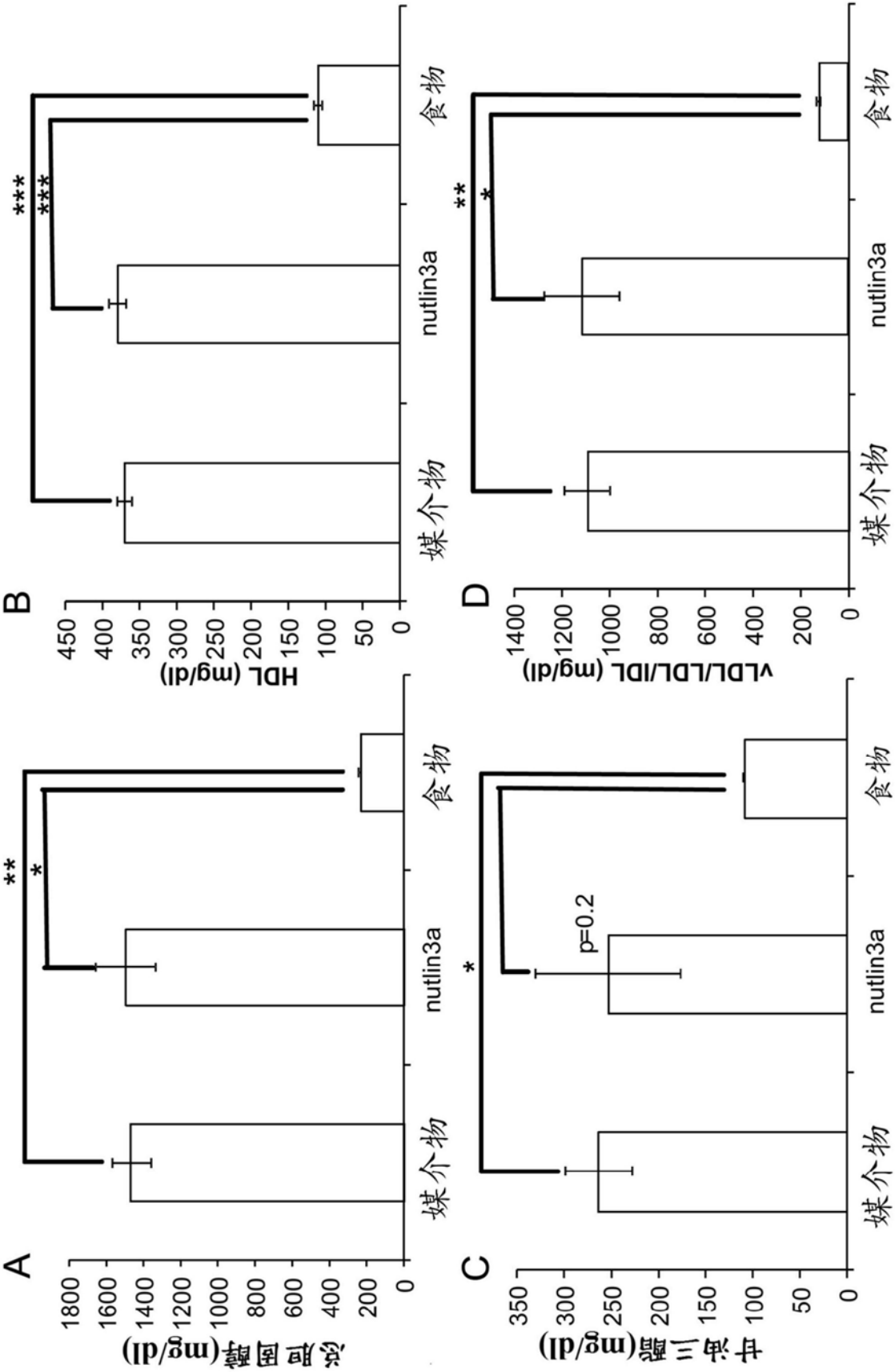


图44

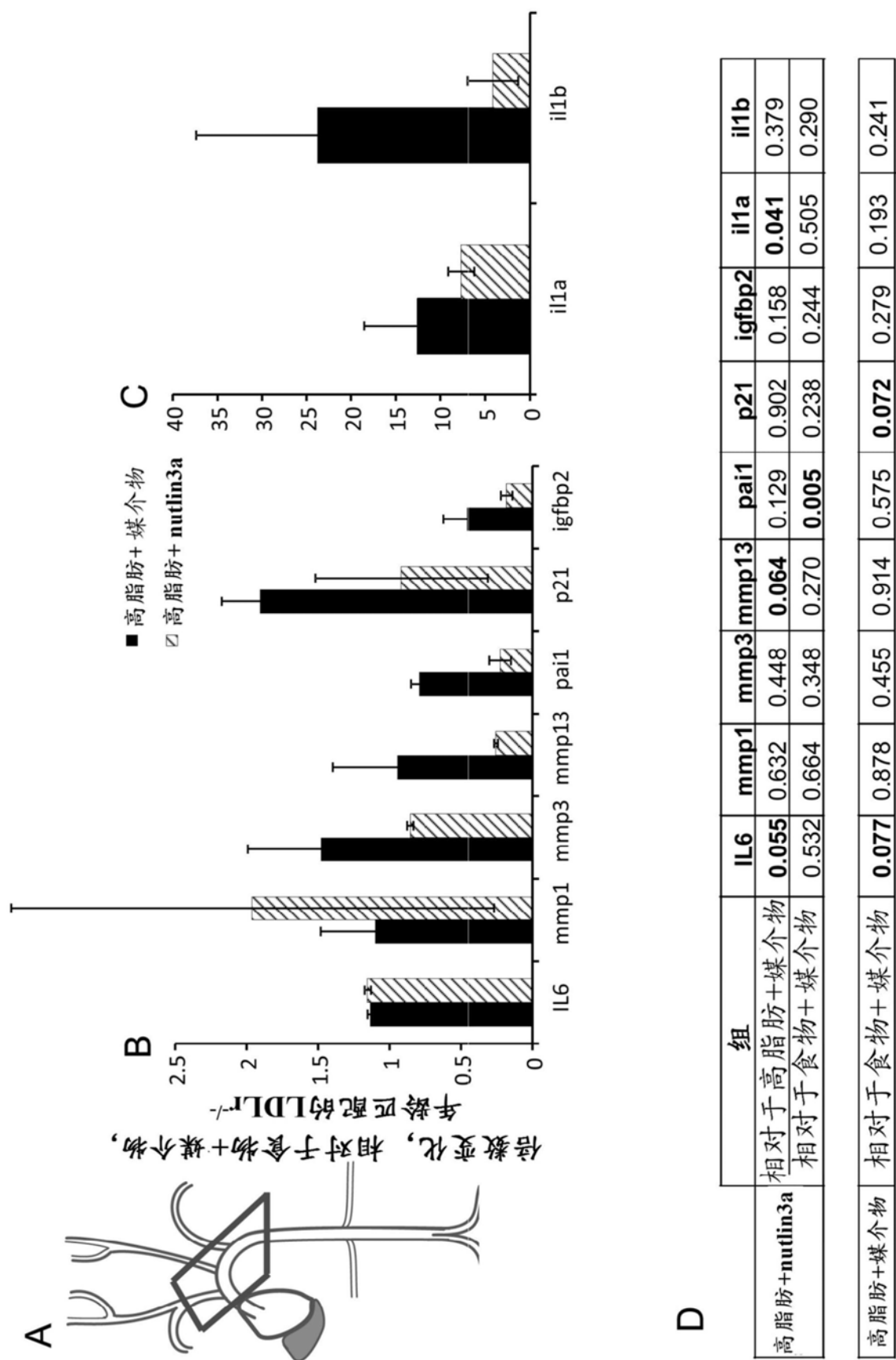
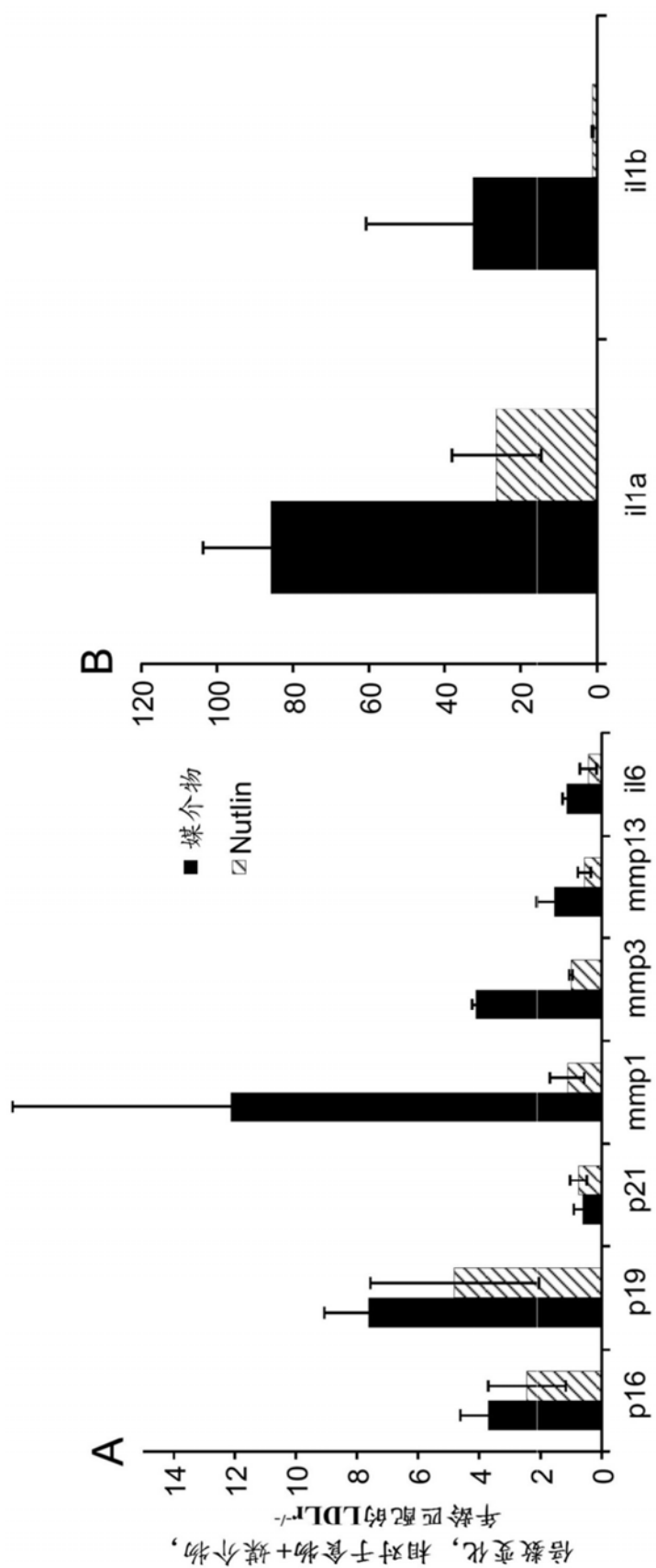


图45



C

高脂肪+ Nutlin3A	组						
	相对于高脂肪+媒介物	p16	p19	p21	il1a	il1b	il6
		0.4643	0.4307	0.7635	0.0583	0.3803	0.1048
	相对于食物+媒介物	0.3754	0.2989	0.5981	0.1617	0.4710	0.4106
高脂肪+媒介物	相对于食物+媒介物	0.0833	0.0355	0.4376	0.0414	0.3787	0.7756

图46

158

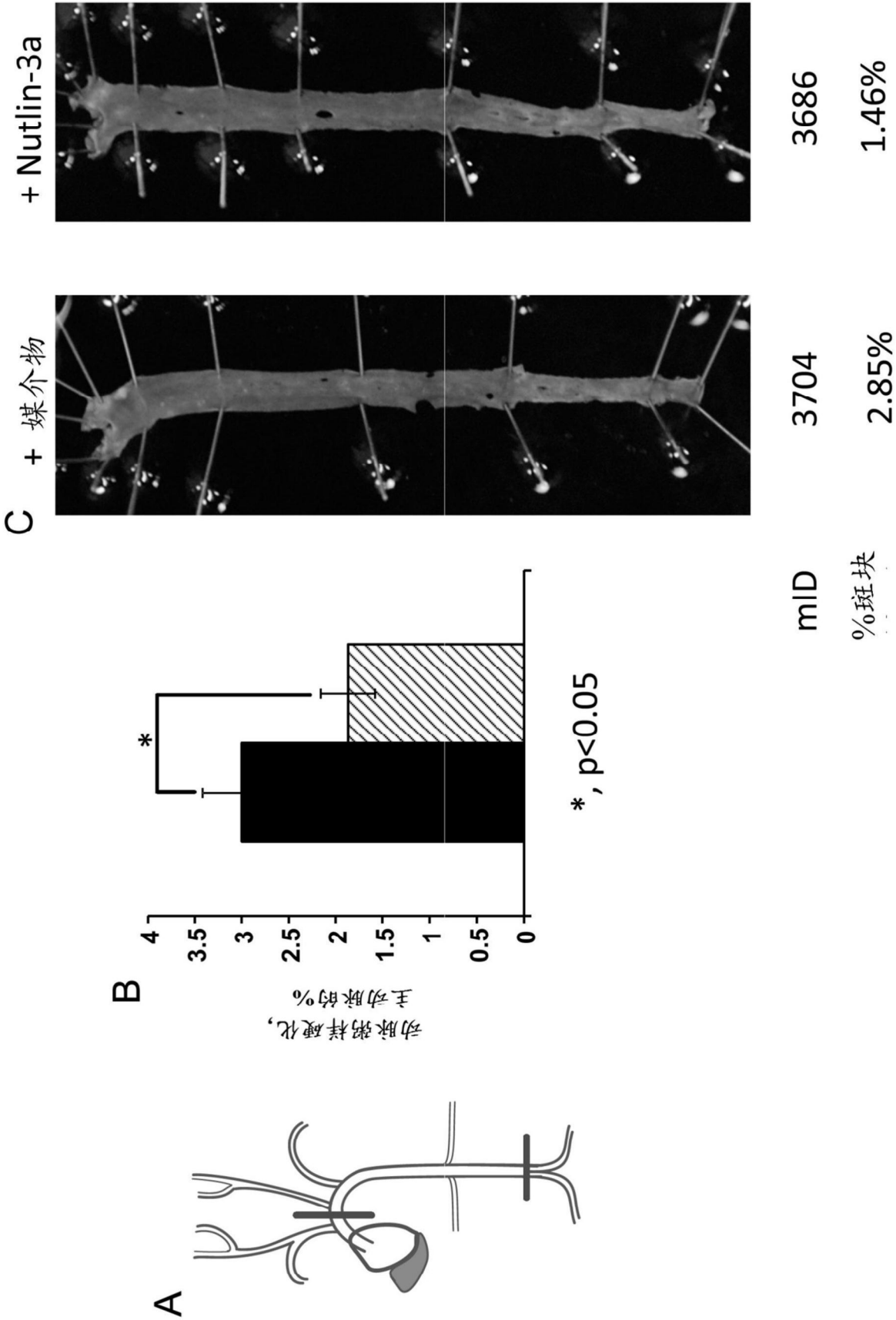


图47

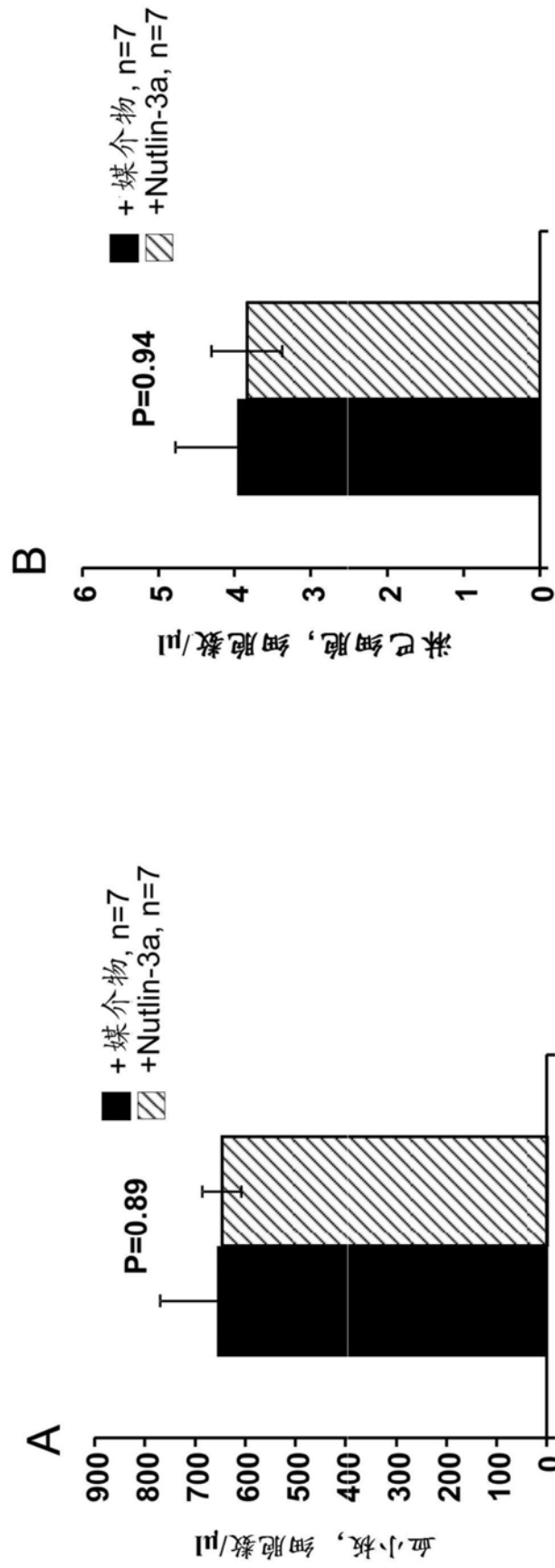


图48

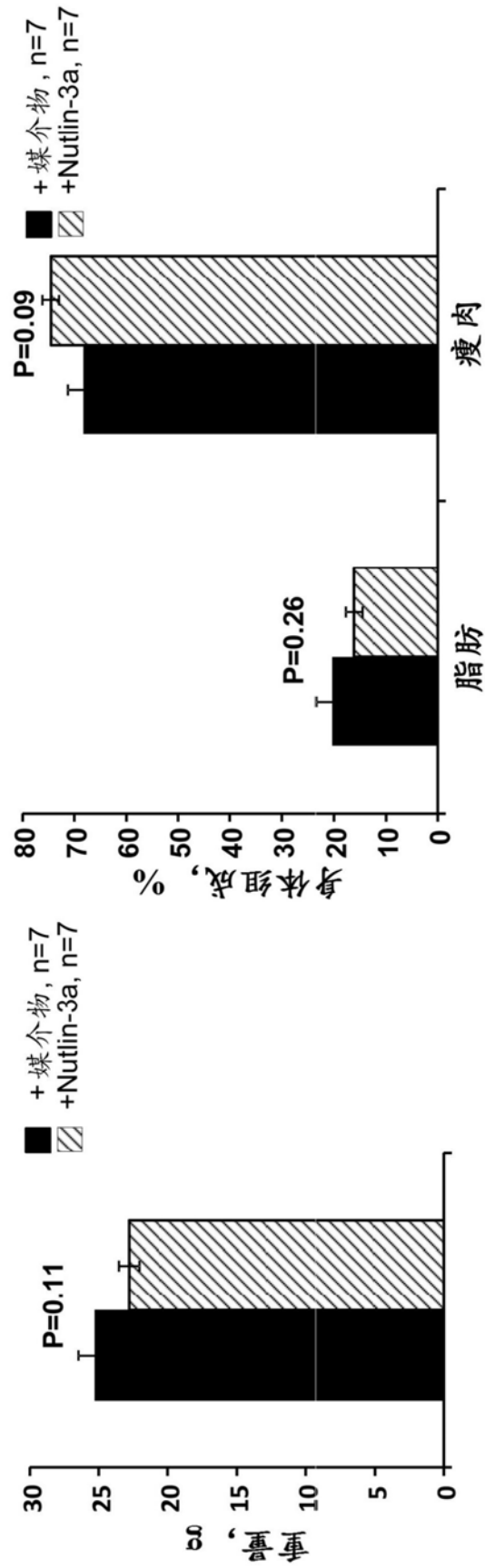


图49

组成性清除

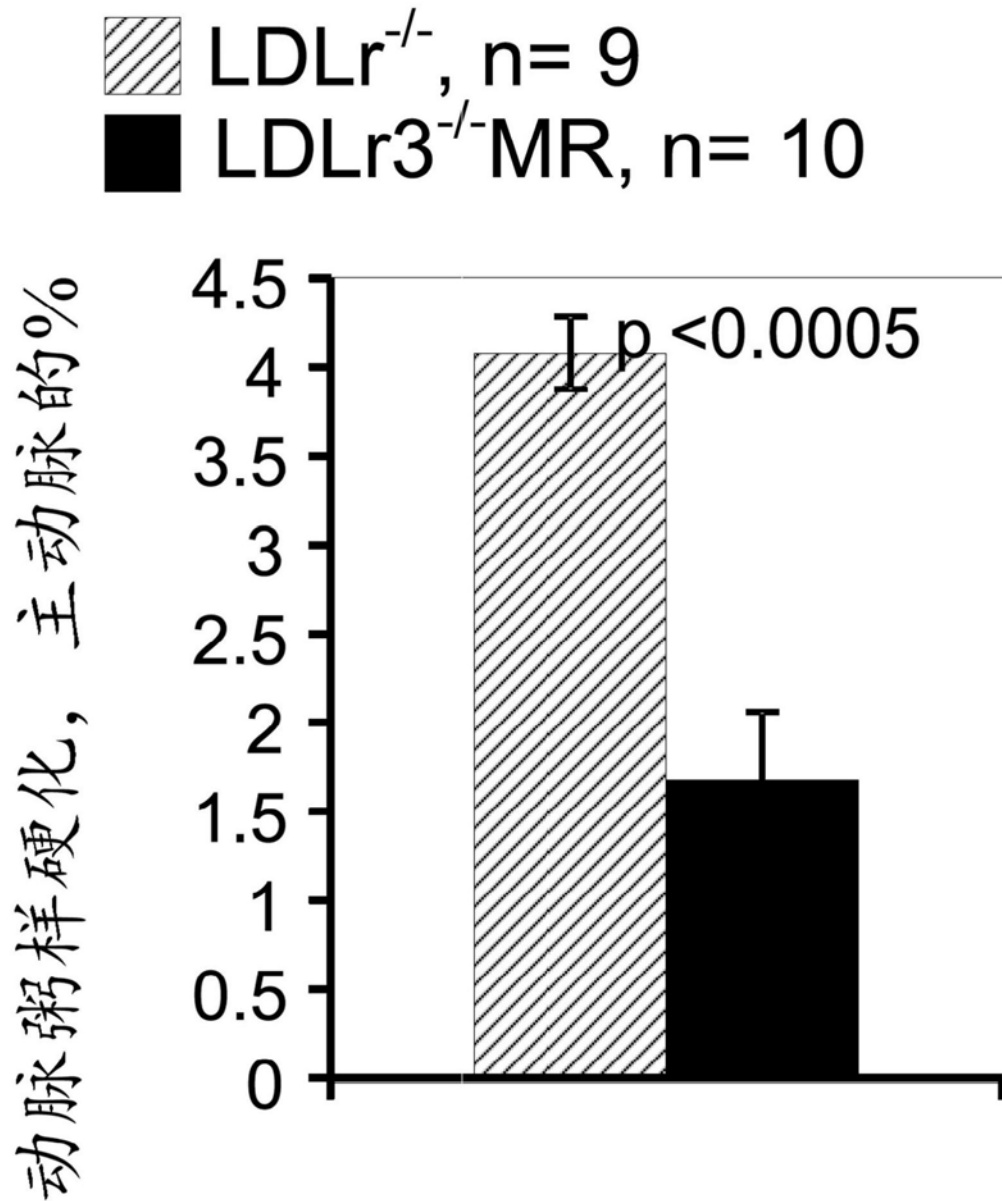


图50

组成性清除

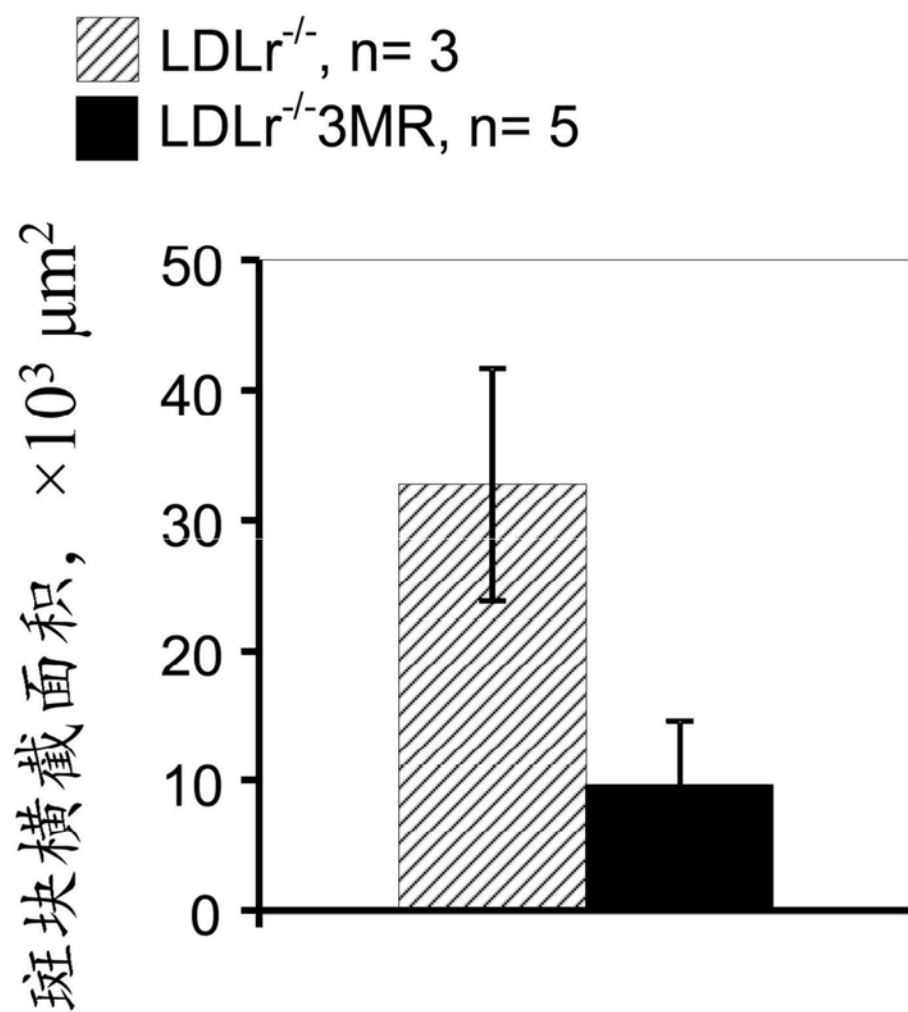


图51

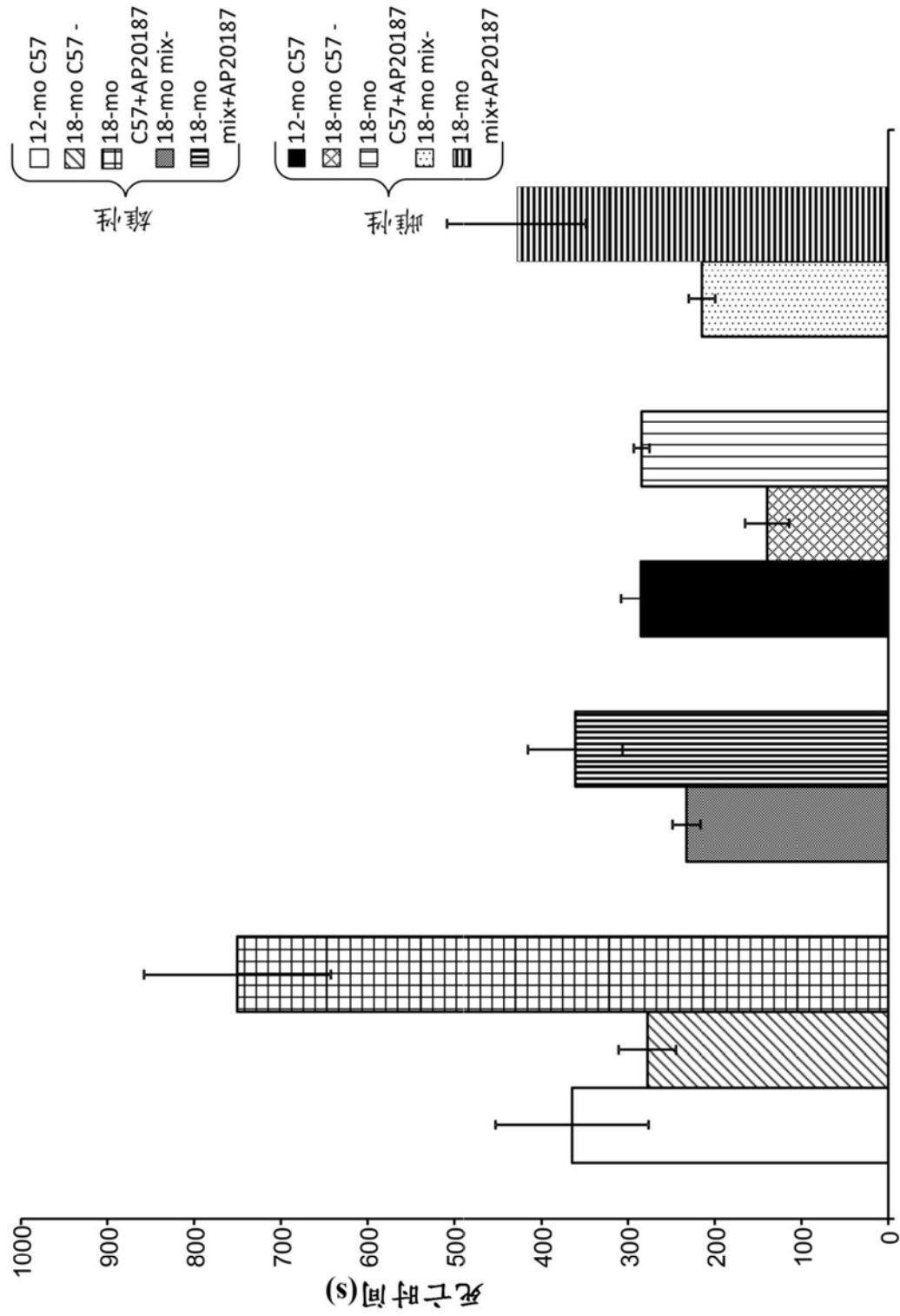


图52

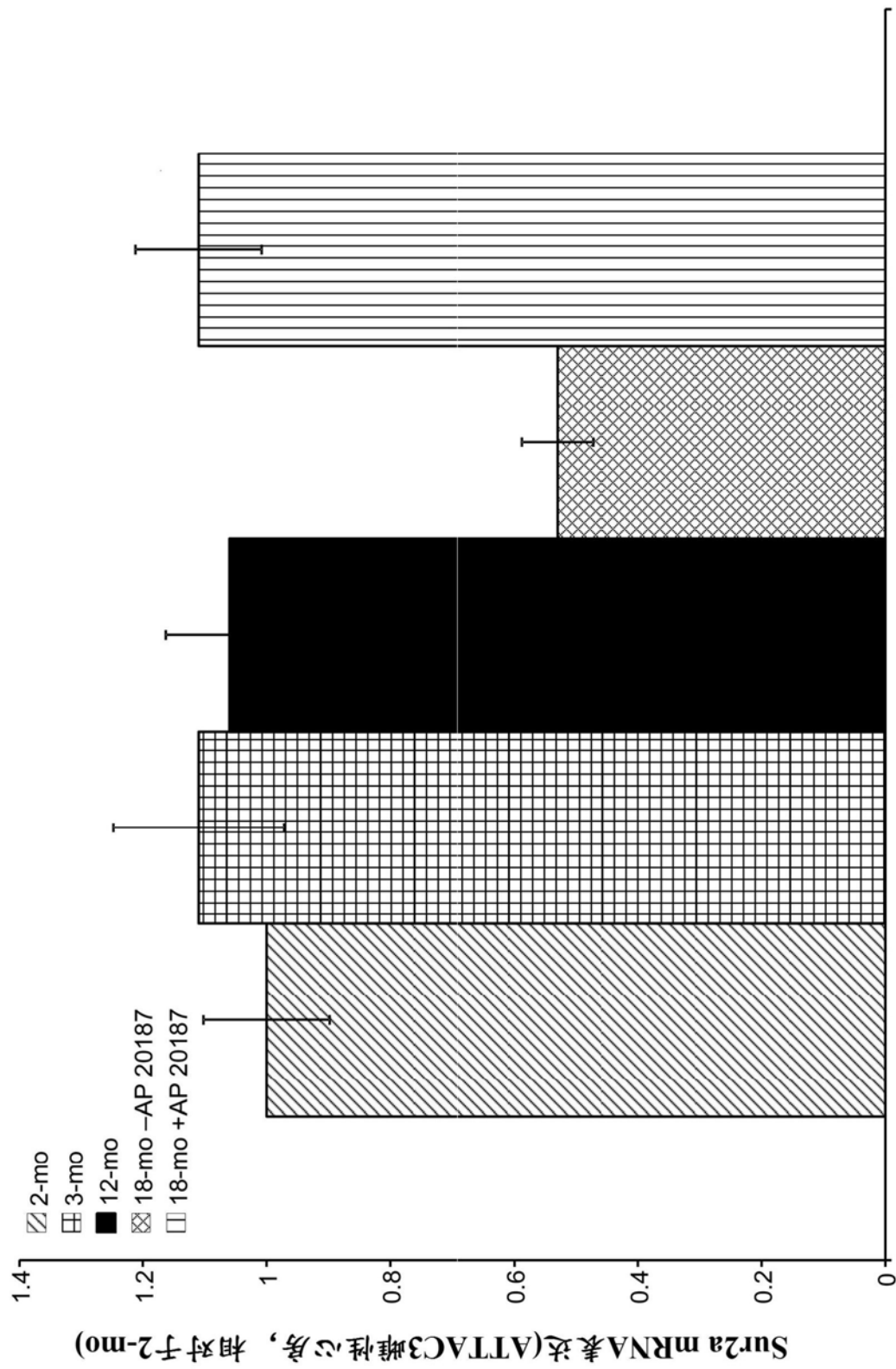


图53

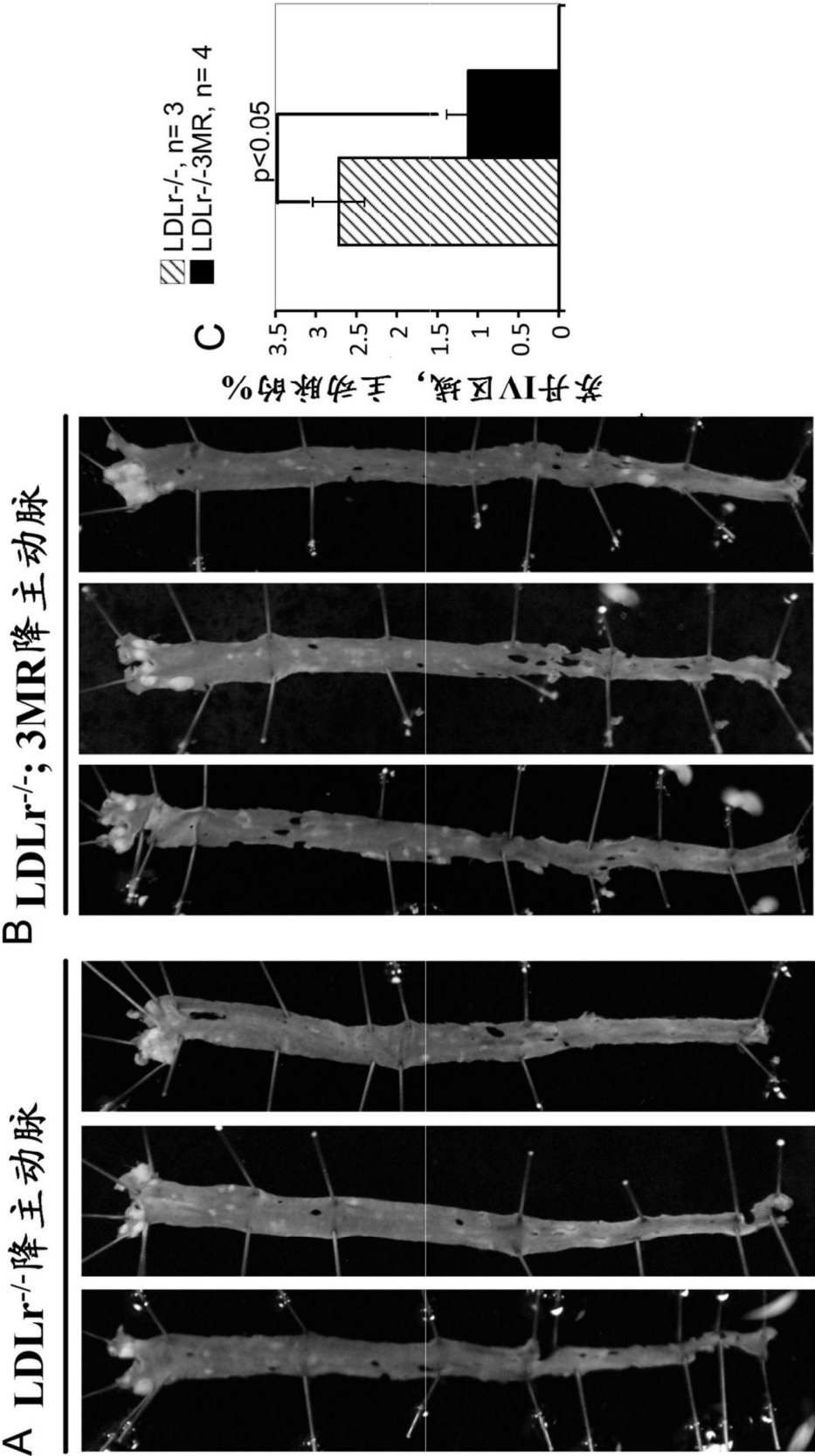


图54

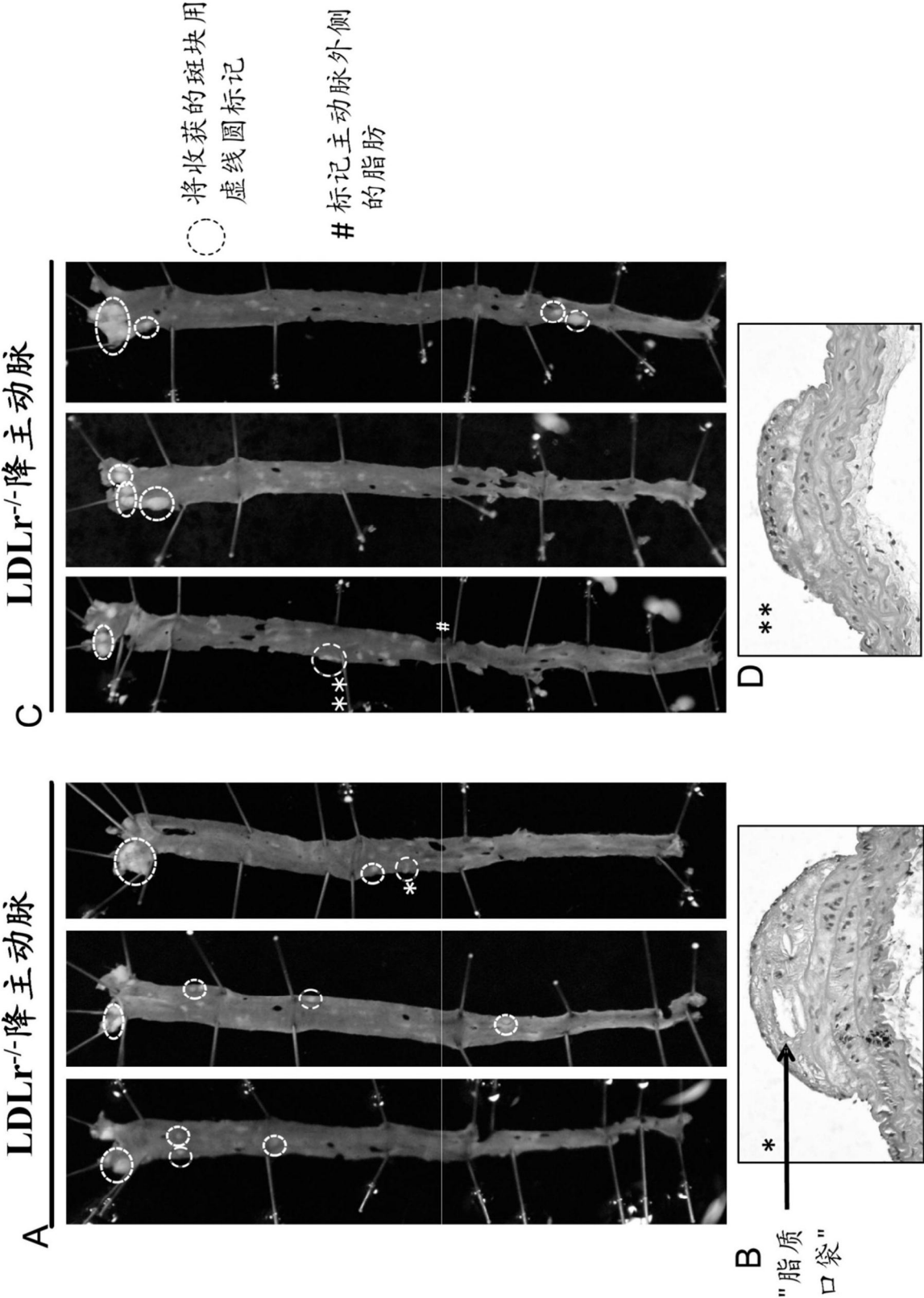


图55

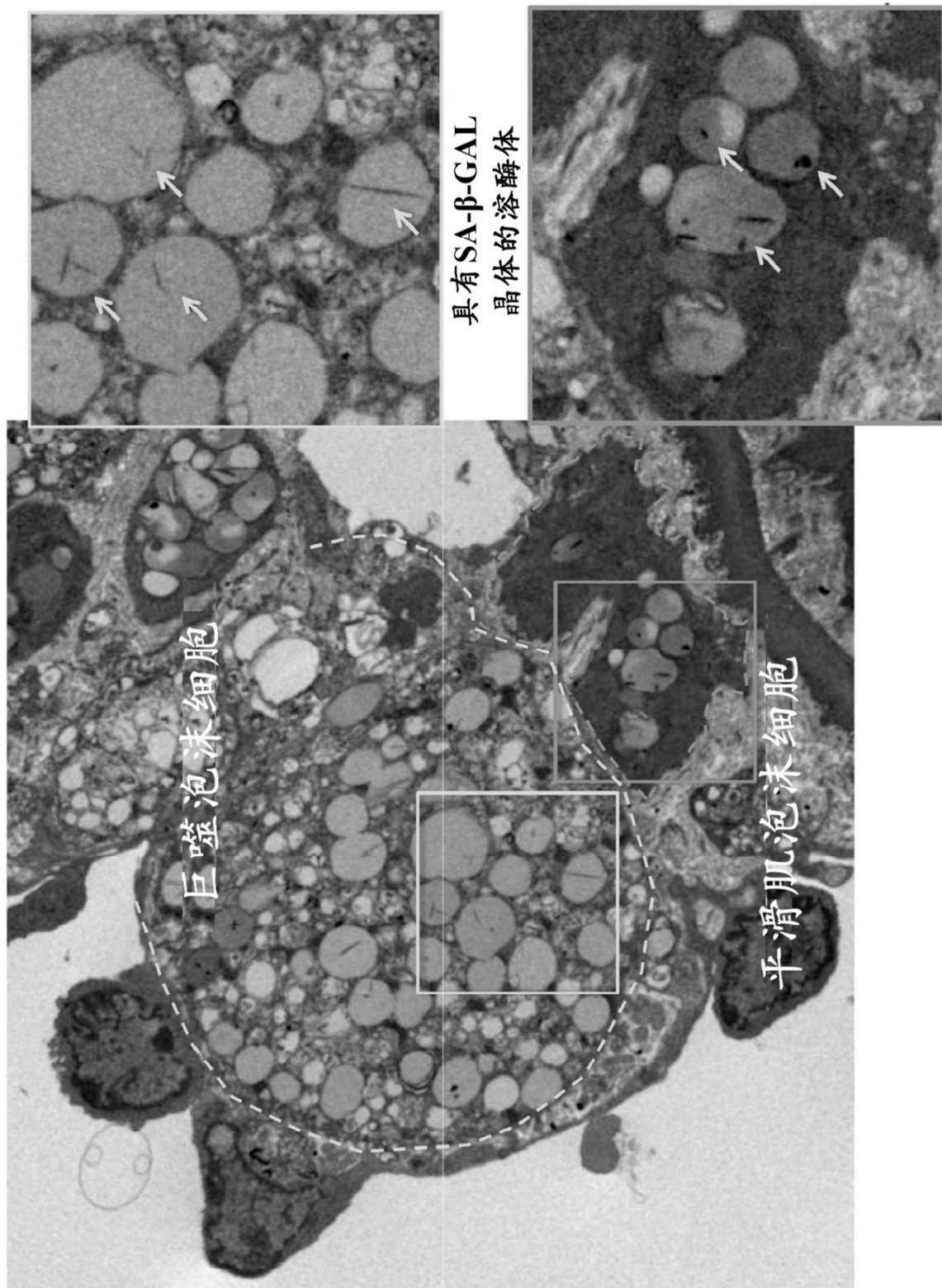


图56



图57

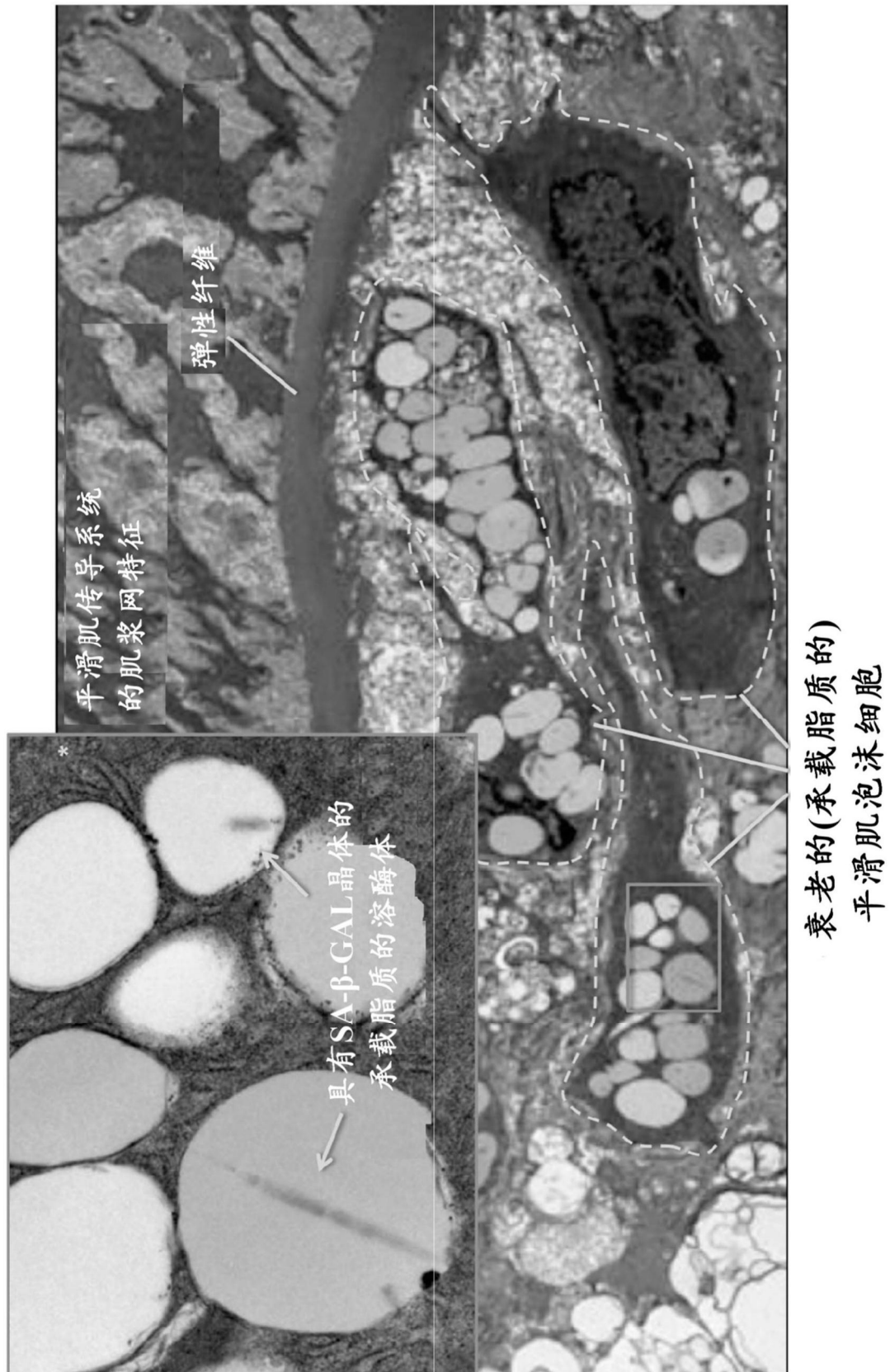


图58

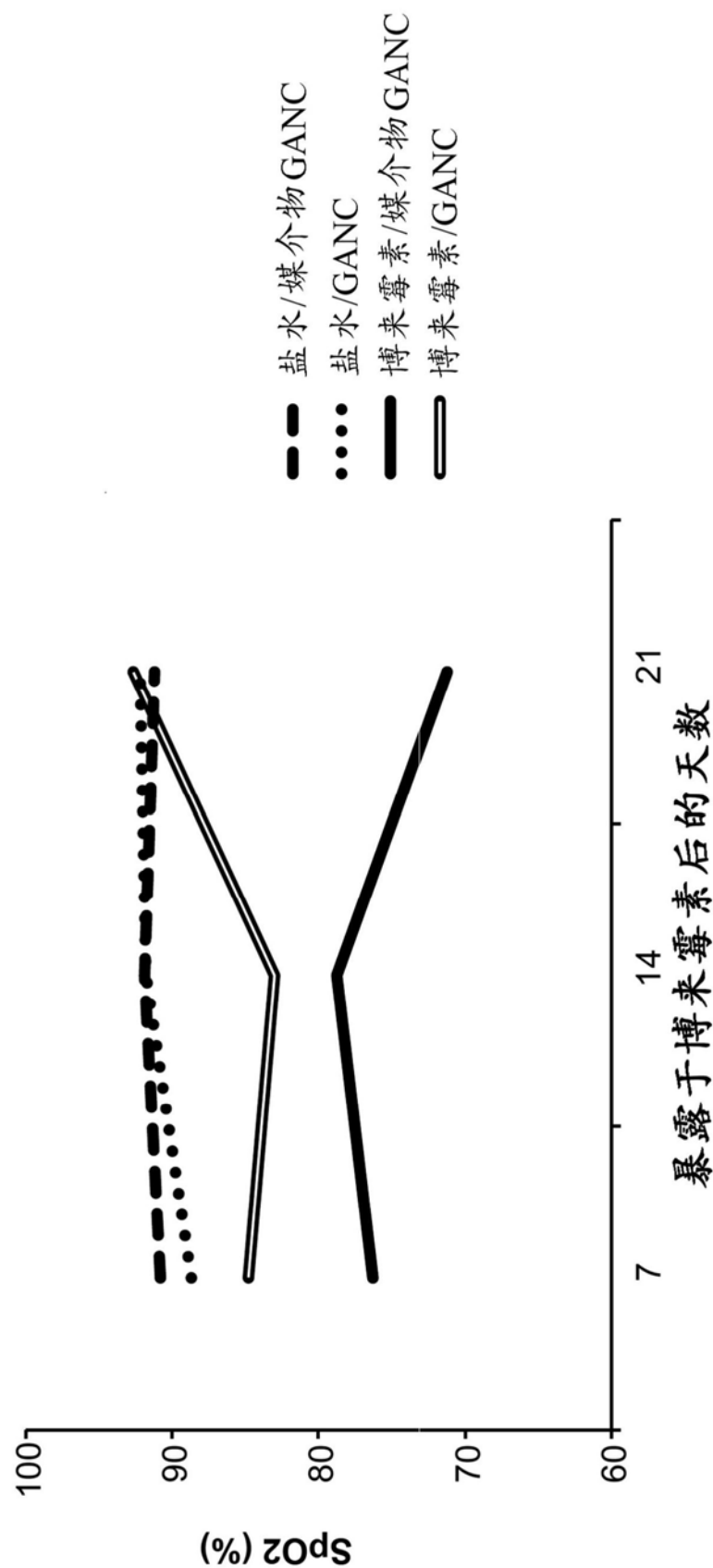


图59

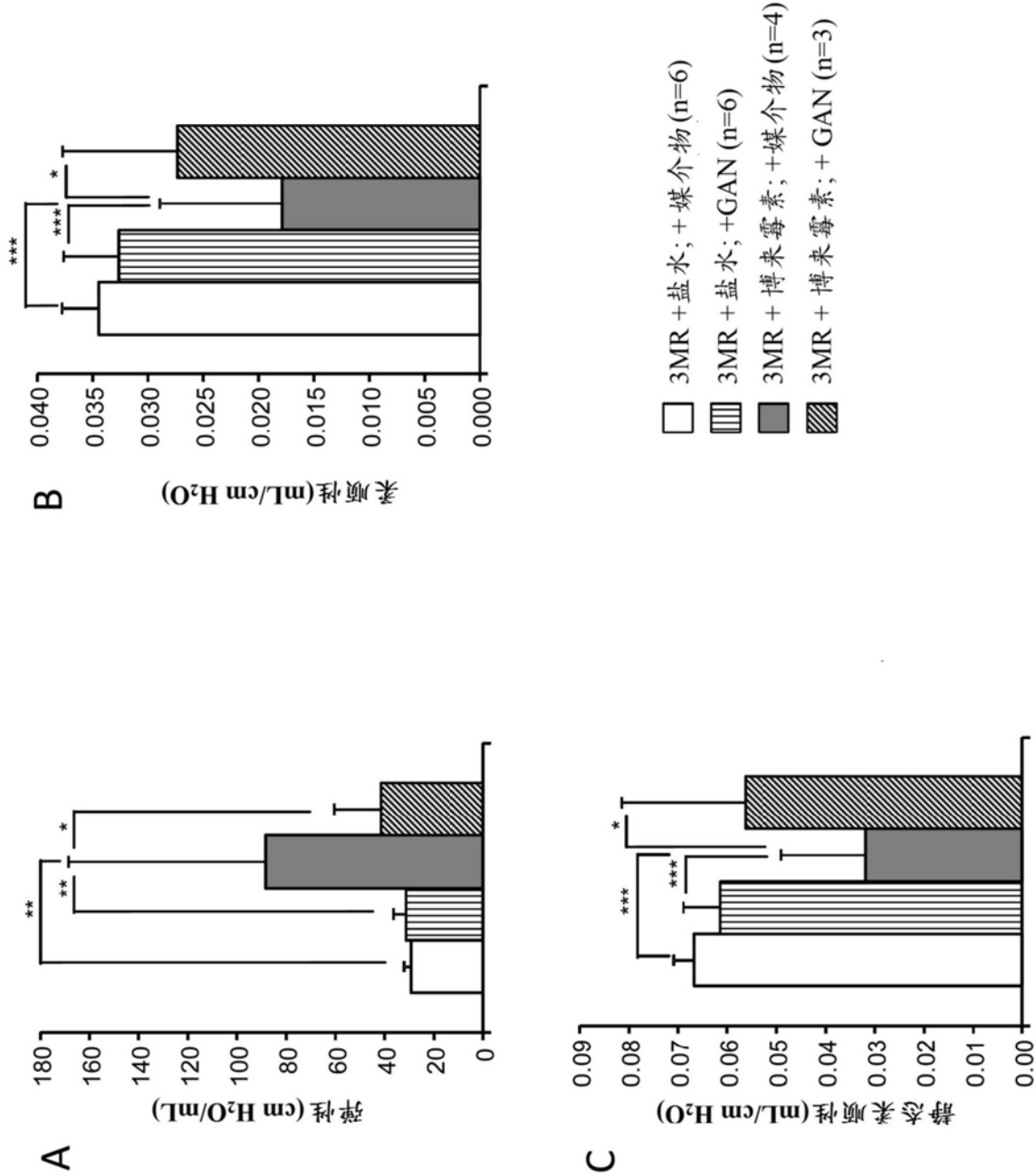


图60

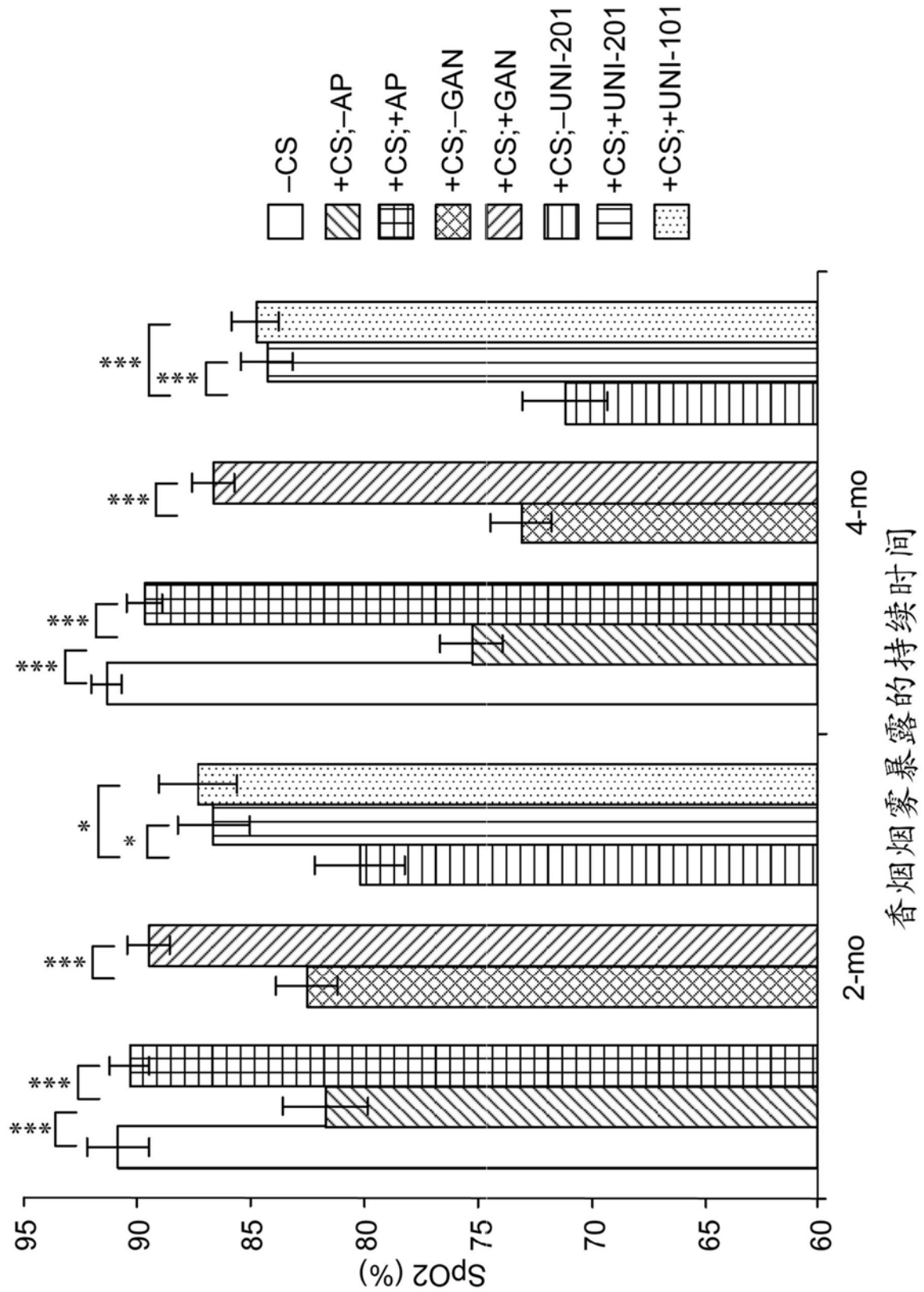


图61

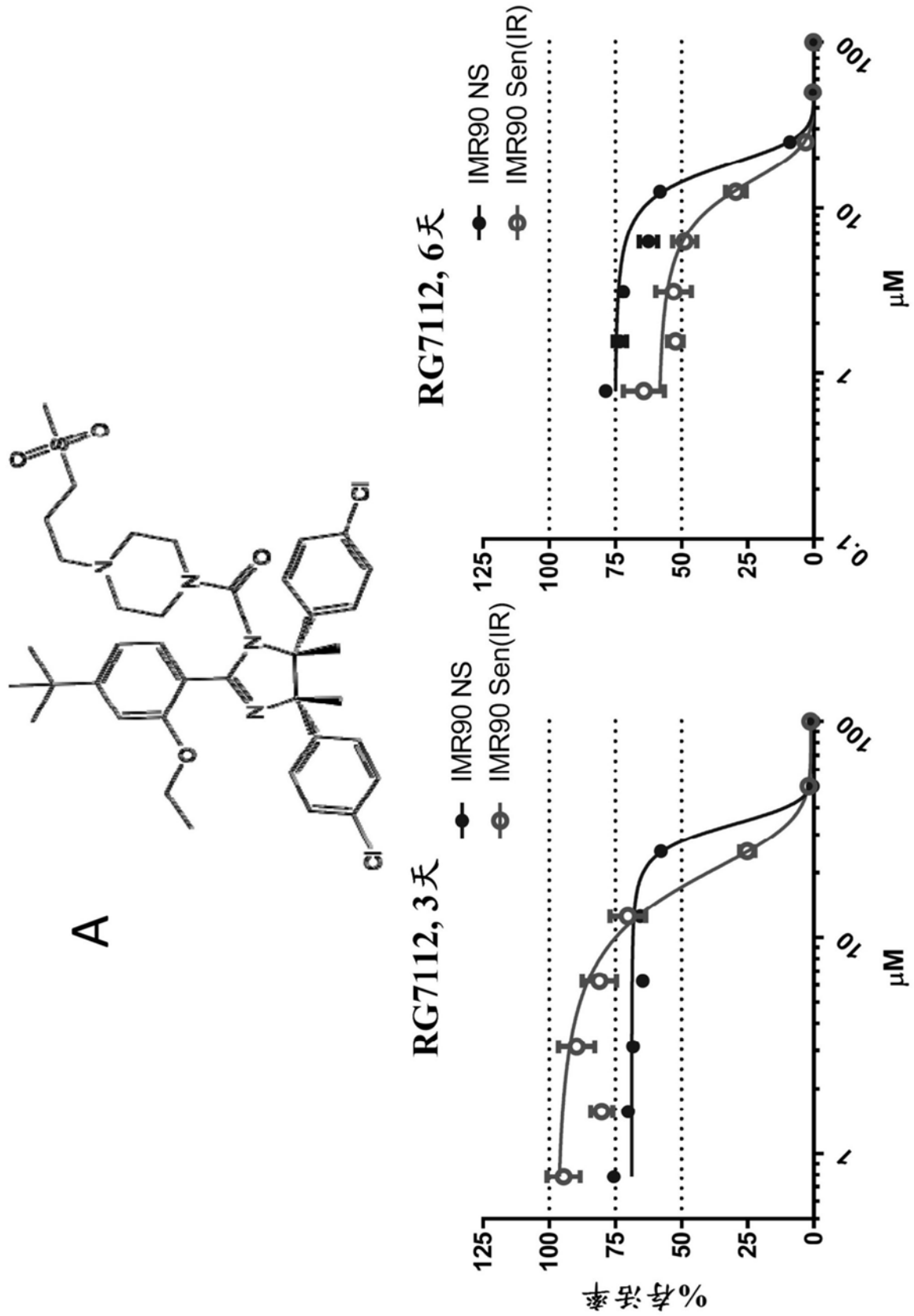


图62

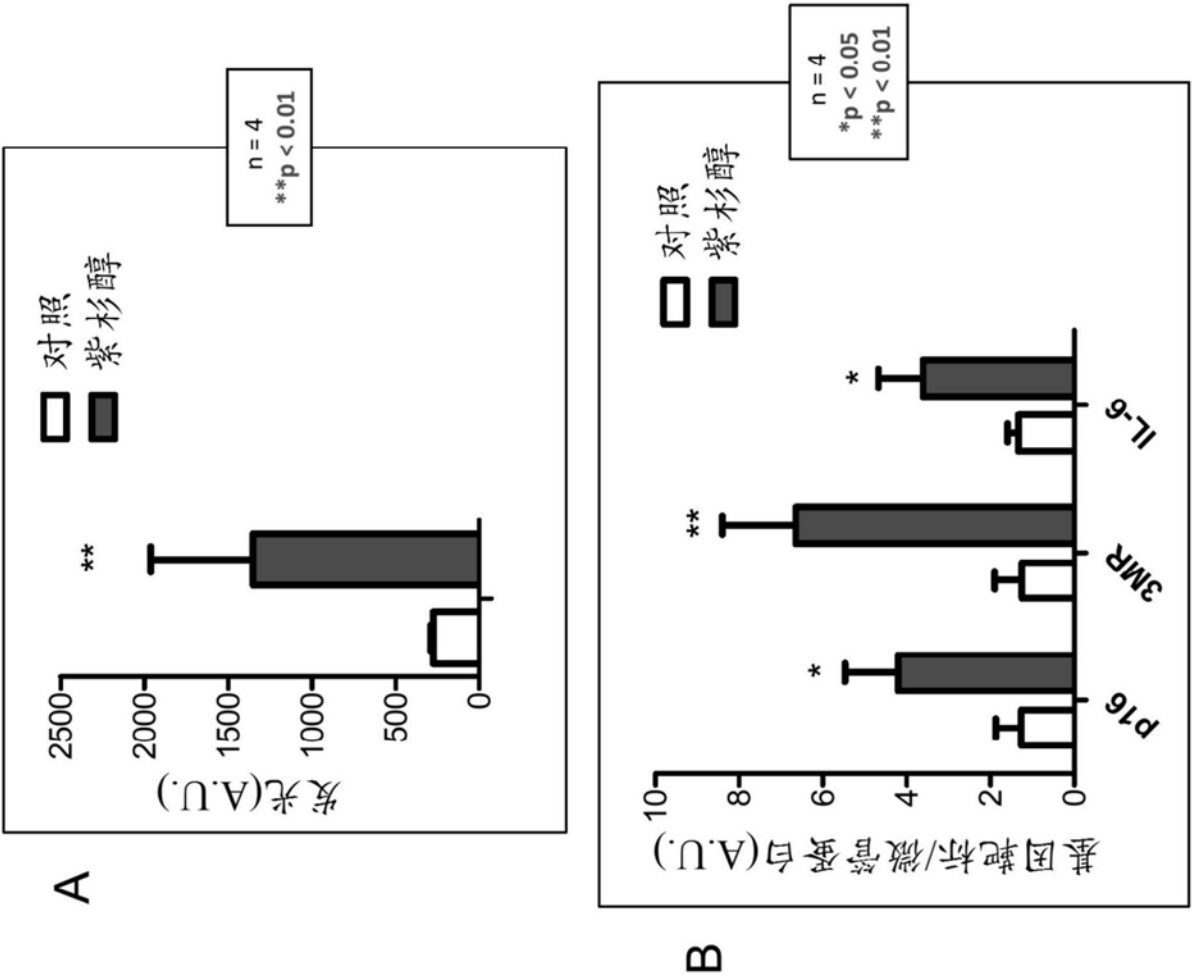


图63

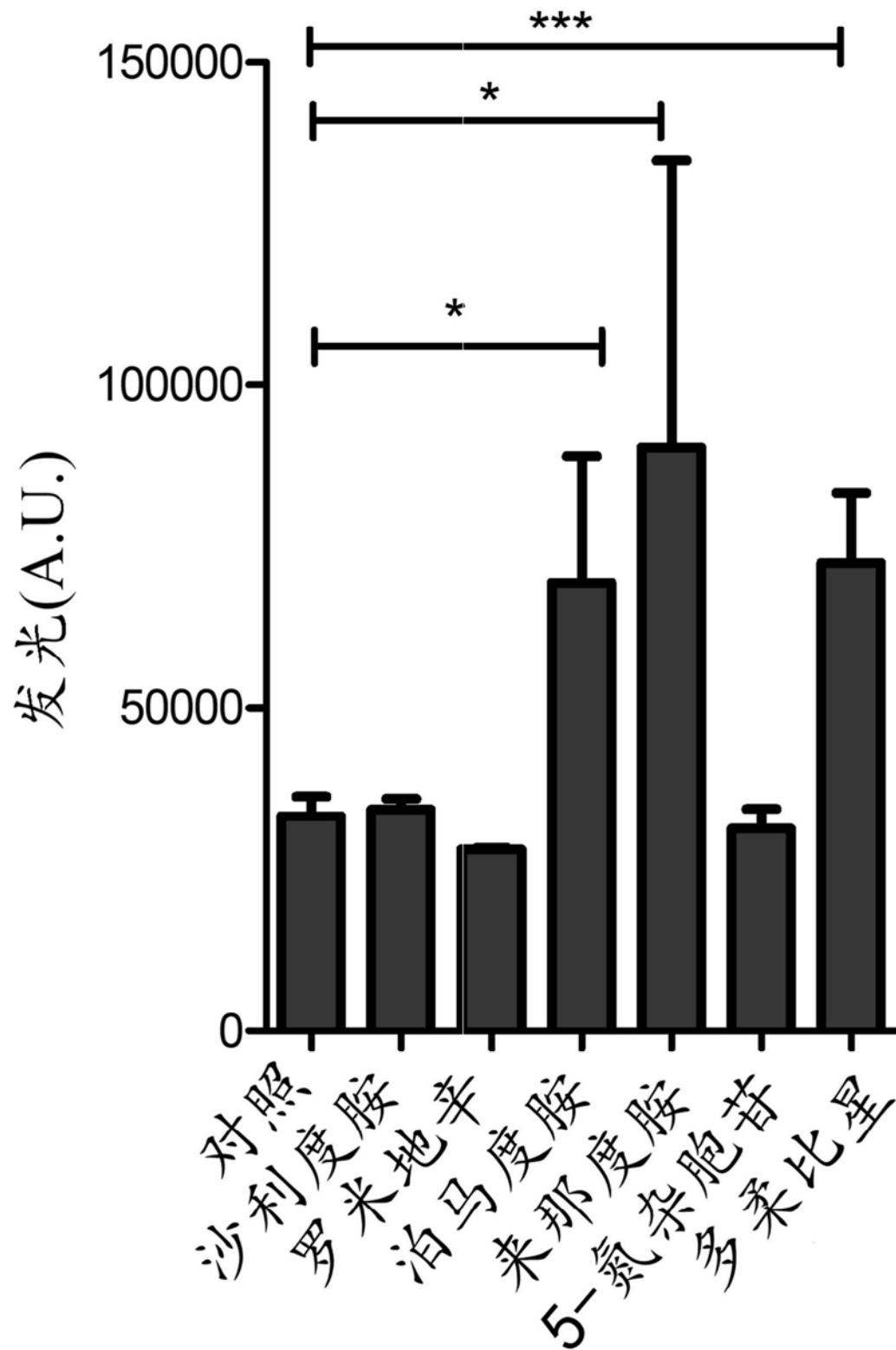


图65

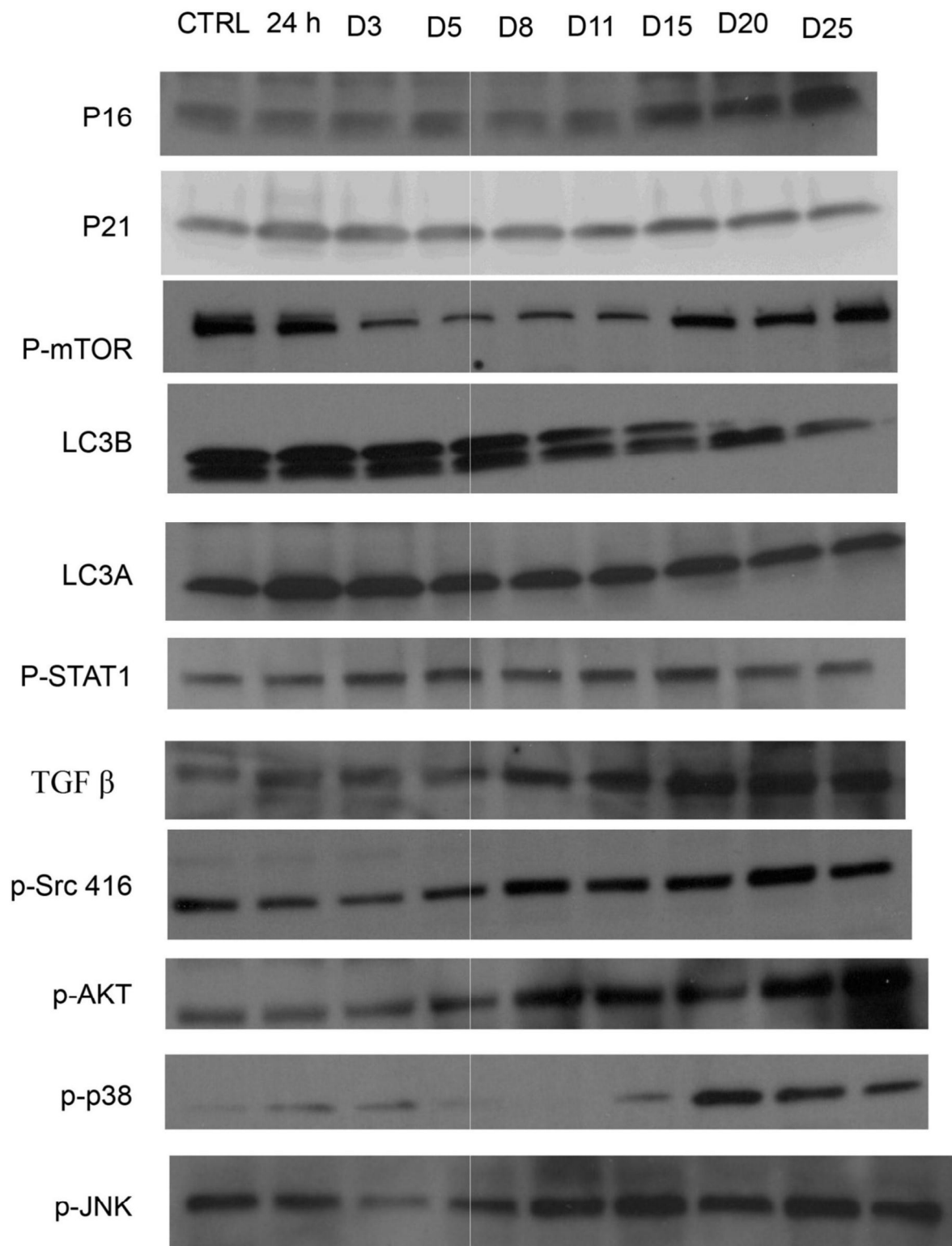


图66

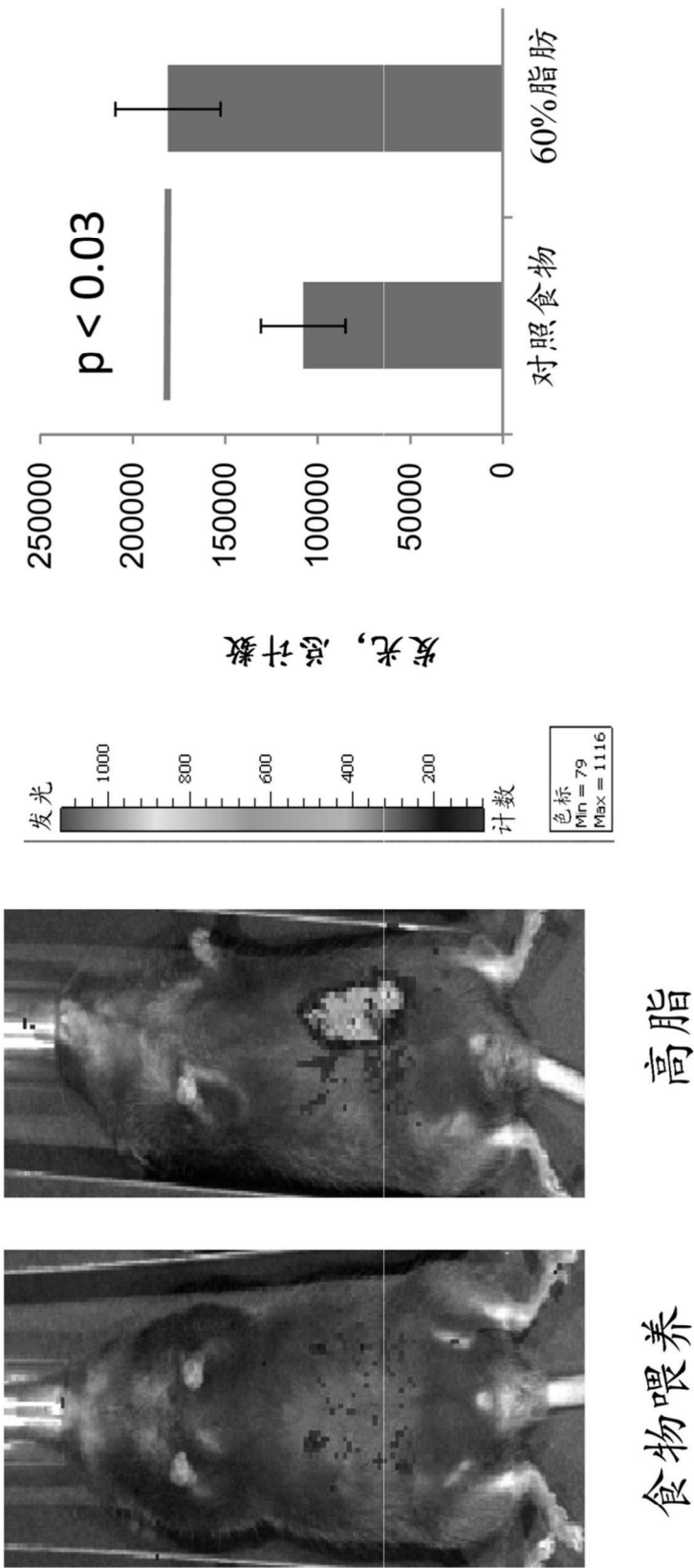


图67

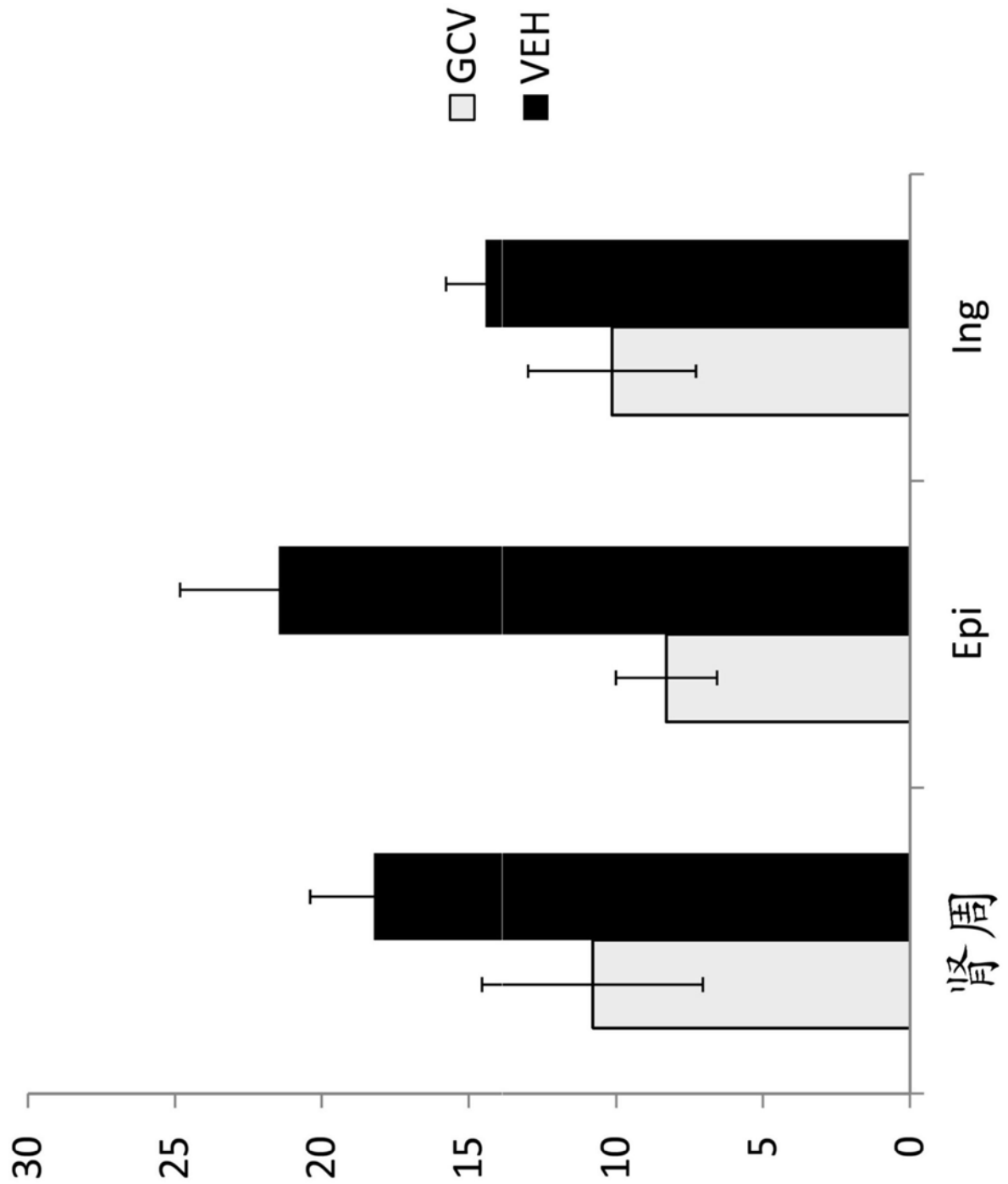


图68

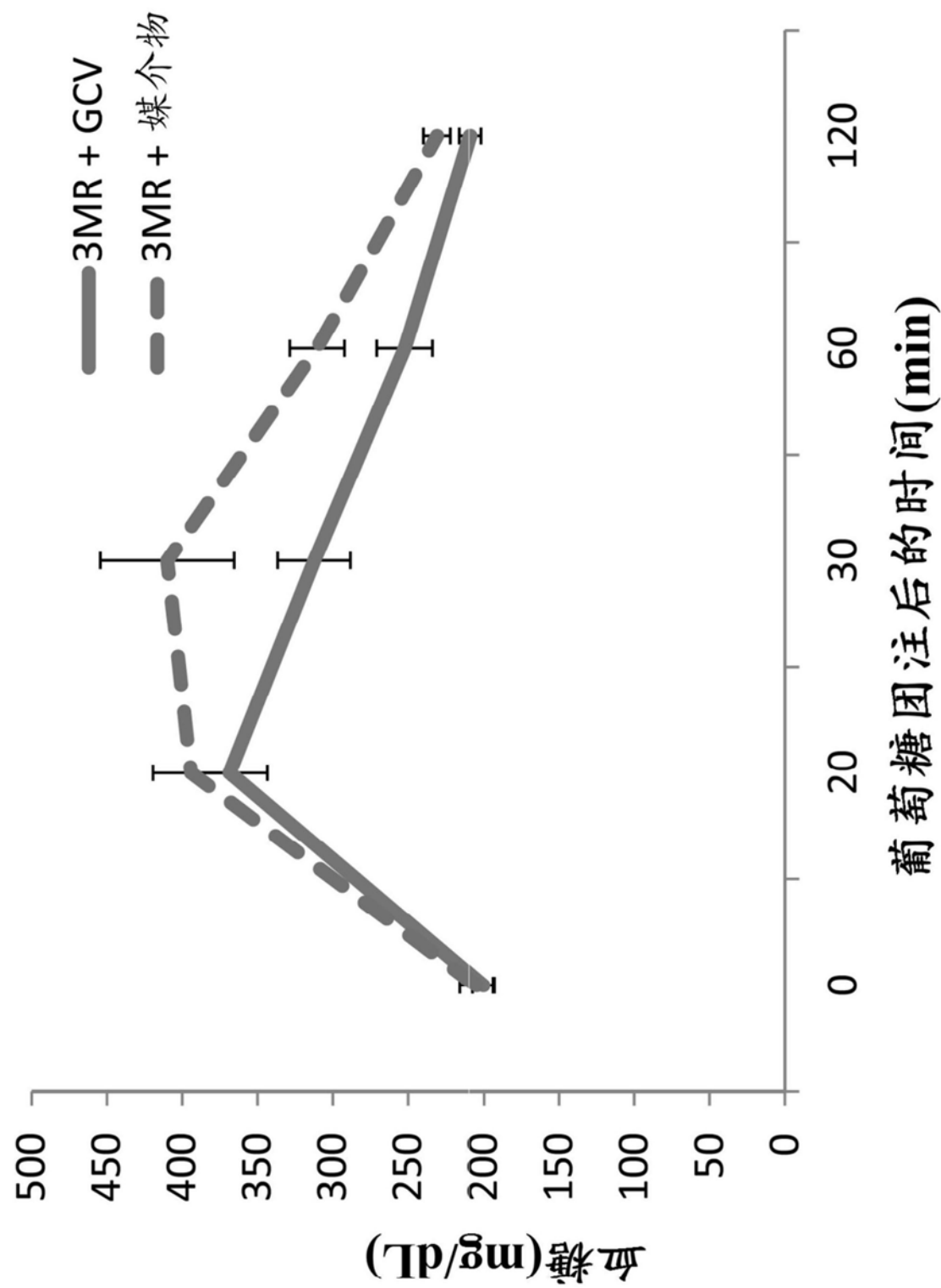


图69A

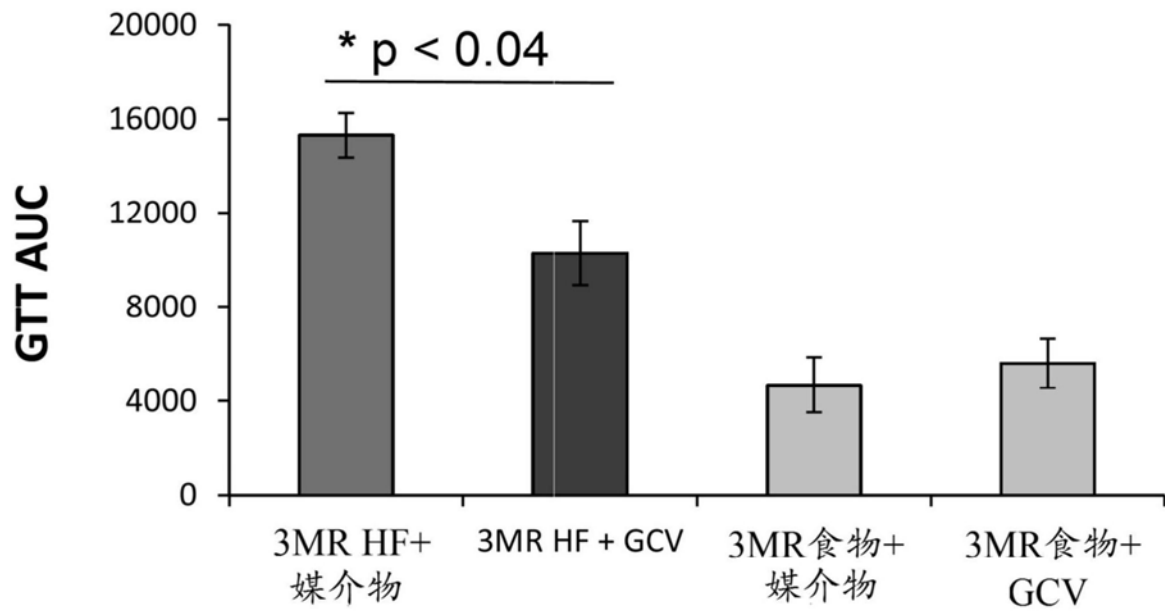


图69B

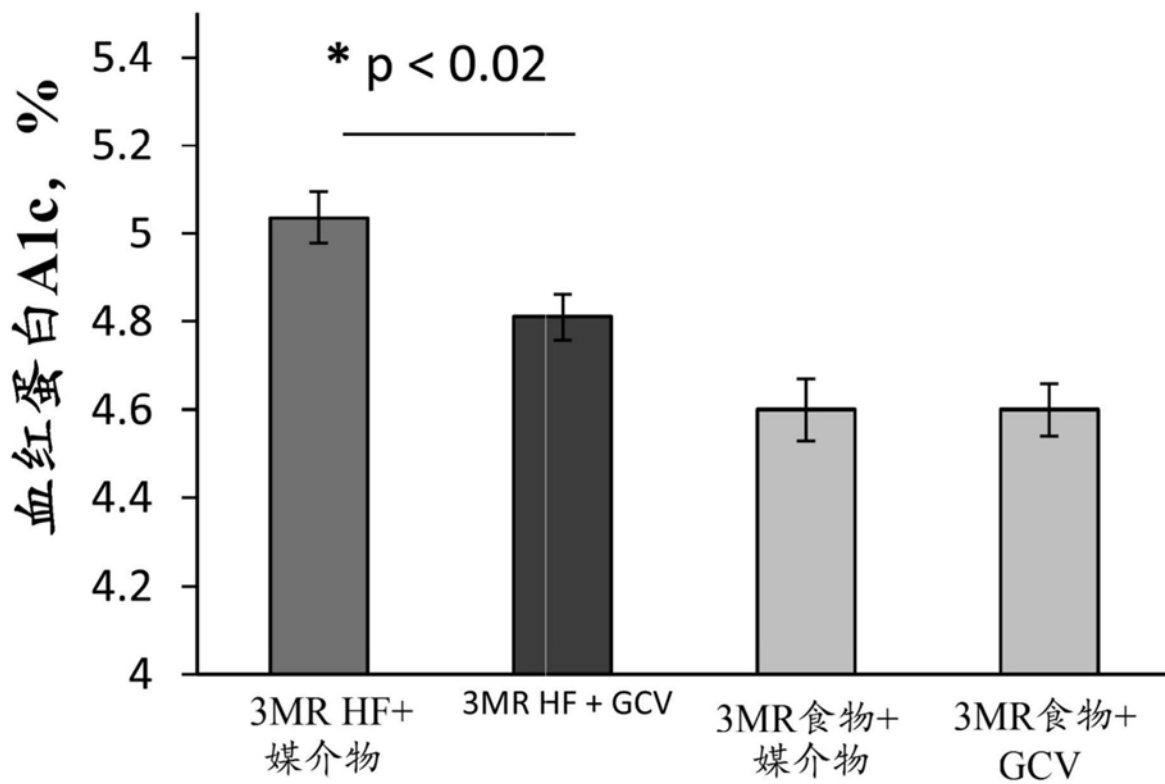


图69C

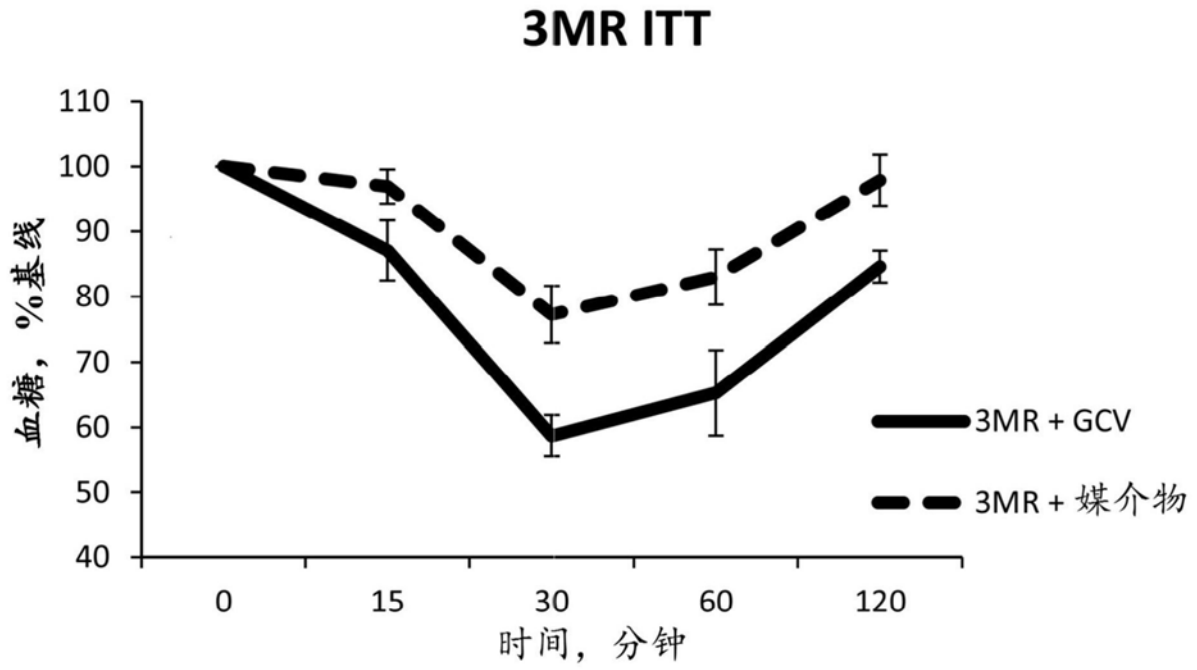


图70A

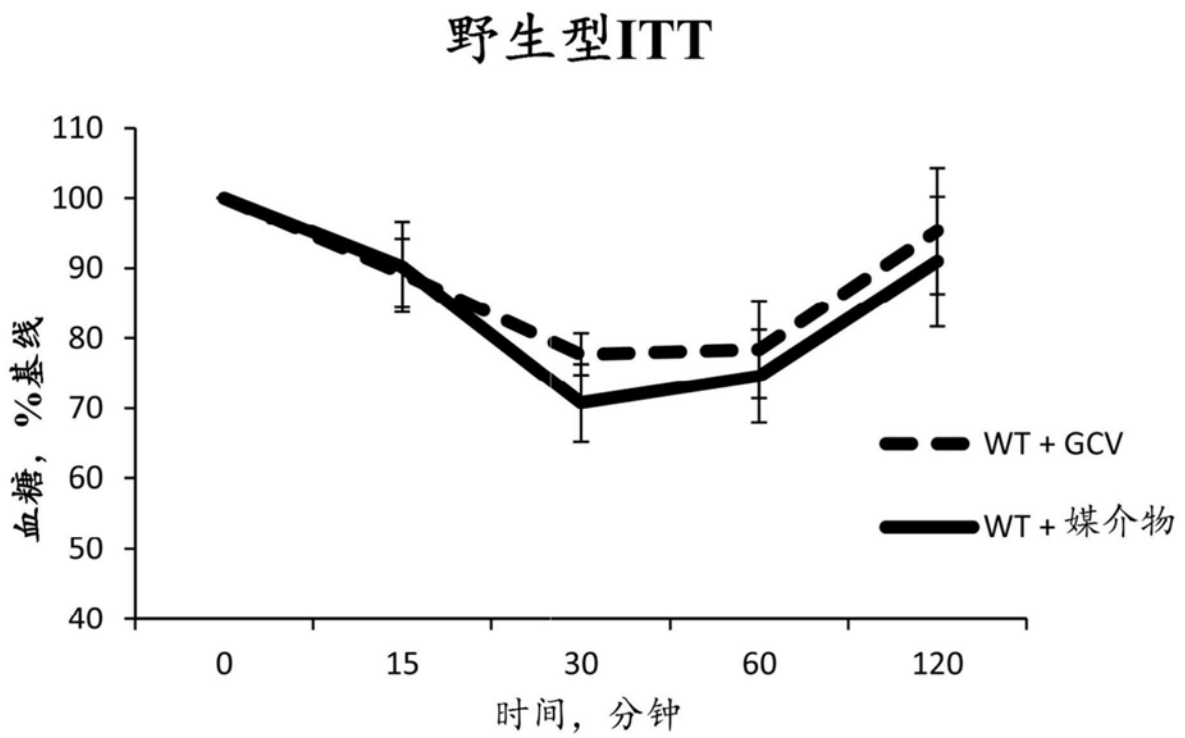


图70B

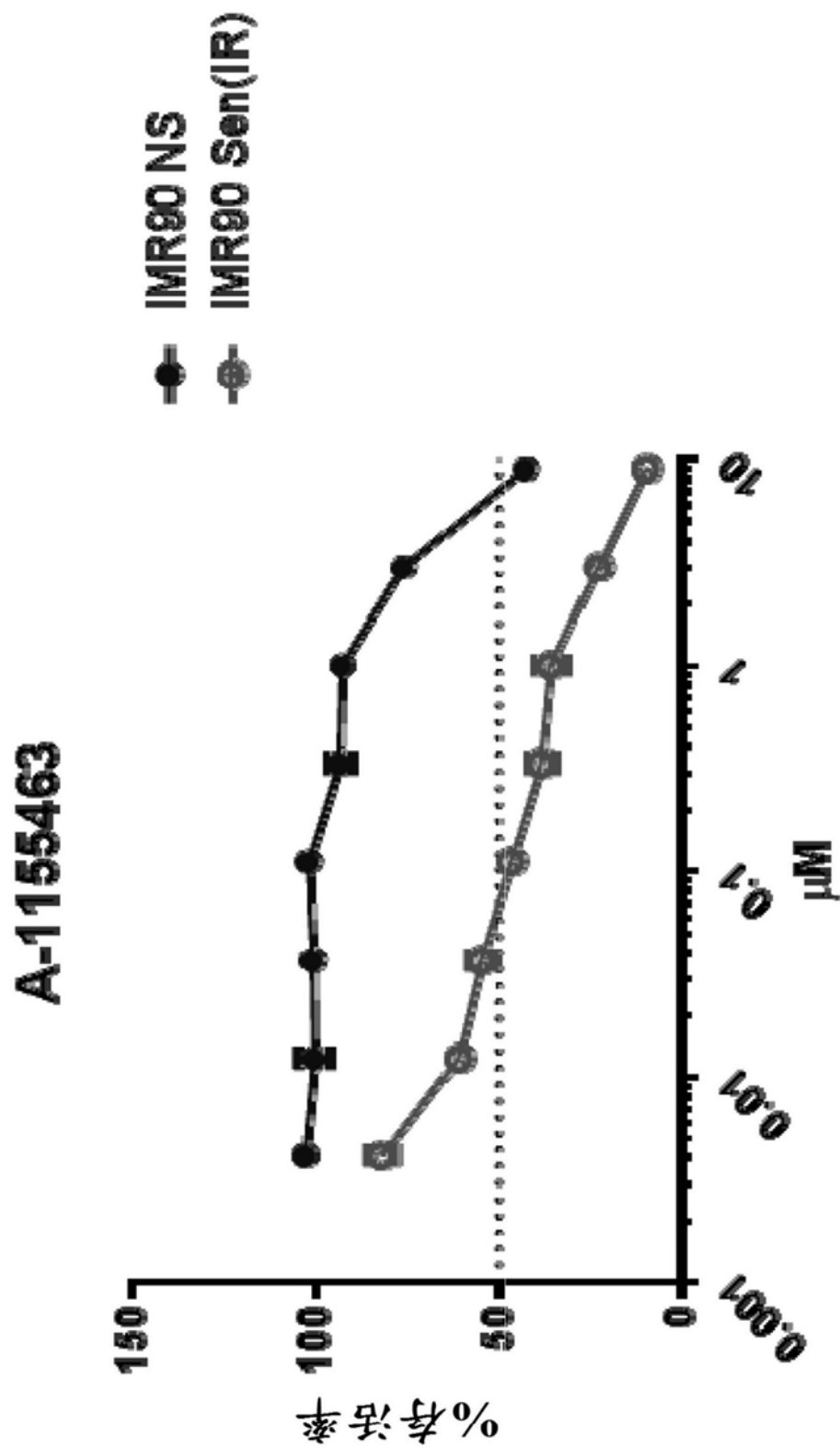


图71