



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103391780 A

(43) 申请公布日 2013. 11. 13

(21) 申请号 201280009288. 8

A61K 31/52(2006. 01)

(22) 申请日 2012. 02. 14

A61K 31/5377(2006. 01)

(30) 优先权数据

A61K 45/06(2006. 01)

61/443, 493 2011. 02. 16 US

A61P 25/00(2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

2013. 08. 16

(86) PCT申请的申请数据

PCT/IB2012/050669 2012. 02. 14

(87) PCT申请的公布数据

W02012/110953 EN 2012. 08. 23

(71) 申请人 诺瓦提斯公司

地址 瑞士巴塞尔

(72) 发明人 I • 加里姆博迪 L • 墨菲

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

代理人 陈润杰 黄革生

(51) Int. Cl.

A61K 31/436(2006. 01)

A61K 31/4745(2006. 01)

A61K 31/496(2006. 01)

权利要求书4页 说明书21页 附图3页

(54) 发明名称

用于治疗神经变性疾病的治疗剂的组合物

(57) 摘要

本发明涉及用于预防或治疗神经变性疾病如亨廷顿舞蹈病的变构 mTOR 抑制剂和催化 mTOR 抑制剂的组合, 以及包含用于此类组合、用于预防或治疗神经变性疾病的产品和药物组合物。

1. 变构 mTOR 抑制剂和催化 mTOR 抑制剂的组合,其用于治疗或预防神经变性疾病。
2. 根据权利要求 1 的组合,其用于治疗或预防神经变性疾病,其中所述变构 mTOR 抑制剂选自 RAD001、西罗莫司、坦罗莫司和 Deferolimus,且所述催化 mTOR 抑制剂选自 BEZ235、CCG168、Ku-0063794、WYE-354 和 8-(6-甲氧基-吡啶-3-基)-3-甲基-1-(4-哌嗪-1-基-3-三氟甲基-苯基)-1,3-二氢-咪唑并[4,5-c]喹啉-2-酮。
3. 根据权利要求 2 的组合,其用于治疗或预防神经变性疾病,其中所述变构 mTOR 抑制剂是 RAD001 且所述催化 mTOR 抑制剂是 BEZ235 或 CCG168。
4. 根据权利要求 3 的组合,其用于治疗或预防神经变性疾病,其中:
  - 以 1.4 和 1.6mg/kg/天之间的剂量施用所述 RAD001 并以 2.4 和 2.6mg/kg/天之间的剂量施用所述 BEZ235 或 CCG168;
  - 以 1.3 和 1.7mg/kg/天之间的剂量施用所述 RAD001 并以 2.3 和 2.7mg/kg/天之间的剂量施用所述 BEZ235 或 CCG168;
  - 以 1.2 和 1.8mg/kg/天之间的剂量施用所述 RAD001 并以 2.2 和 2.8mg/kg/天之间的剂量施用所述 BEZ235 或 CCG168;
  - 以 1.1 和 1.9mg/kg/天之间的剂量施用所述 RAD001 并以 2.1 和 2.9mg/kg/天之间的剂量施用所述 BEZ235 或 CCG168;
  - 以 1.0 和 2.0mg/kg/天之间的剂量施用所述 RAD001 并以 2.0 和 3.0mg/kg/天之间的剂量施用所述 BEZ235 或 CCG168;
  - 以 0.8 和 2.2mg/kg/天之间的剂量施用所述 RAD001 并以 1.8 和 2.6mg/kg/天之间的剂量施用所述 BEZ235 或 CCG168;
  - 以 0.6 和 2.4mg/kg/天之间的剂量施用所述 RAD001 并以 1.6 和 2.8mg/kg/天之间的剂量施用所述 BEZ235 或 CCG168;
  - 以 0.4 和 2.6mg/kg/天之间的剂量施用所述 RAD001 并以 1.4 和 3.0mg/kg/天之间的剂量施用所述 BEZ235 或 CCG168;
  - 以 0.2 和 2.8mg/kg/天之间的剂量施用所述 RAD001 并以 1.0 和 3.5mg/kg/天之间的剂量施用所述 BEZ235 或 CCG168;
  - 以 0.01 和 3.0mg/kg/天之间的剂量施用所述 RAD001 并以 0.5 和 4.0mg/kg/天之间的剂量施用所述 BEZ235 或 CCG168;
  - 以 0.01 和 5.0mg/kg/天之间的剂量施用所述 RAD001 并以 0.01 和 5.0mg/kg/天之间的剂量施用所述 BEZ235 或 CCG168;或者
  - 以 0.01 和 10.0mg/kg/天之间的剂量施用所述 RAD001 并以 0.01 和 10.0mg/kg/天之间的剂量施用所述 BEZ235 或 CCG168。
5. 根据权利要求 3 的组合,其用于治疗或预防神经变性疾病,其中以约 1.5mg/kg/天的剂量施用所述 RAD001 且以约 2.5mg/kg/天的剂量施用所述 BEZ235 或 CCG168。
6. 根据权利要求 1 至 5 中任一项的组合,其用于治疗或预防神经变性疾病,其中所述神经变性疾病选自亨廷顿舞蹈病、帕金森病、脊髓小脑性共济失调 3 型、阿尔茨海默病、运动神经元病和周围神经病变。
7. 根据权利要求 6 的组合,其用于治疗或预防亨廷顿舞蹈病。
8. 根据权利要求 1 至 7 中任一项的组合,其用于治疗或预防神经变性疾病,其中所述变

构 mTOR 抑制剂和所述催化 mTOR 抑制剂经口服施用。

9. 用于在需要此类治疗或预防的对象中治疗或预防神经变性疾病的方法,所述方法包括向此类对象施用有效量的变构 mTOR 抑制剂和催化 mTOR 抑制剂的组合。

10. 根据权利要求 9 的方法,其中所述变构 mTOR 抑制剂选自 RAD001、西罗莫司、坦罗莫司和 Deferolimus,且所述催化 mTOR 抑制剂选自 BEZ235、CCG168、Ku-0063794、WYE-354 和 8-(6-甲氧基-吡啶-3-基)-3-甲基-1-(4-哌嗪-1-基-3-三氟甲基-苯基)-1,3-二氢-咪唑并[4,5-c]喹啉-2-酮。

11. 根据权利要求 10 的方法,其中所述变构 mTOR 抑制剂是 RAD001 且所述催化 mTOR 抑制剂是 BEZ235 或 CCG168。

12. 根据权利要求 11 的方法,其中:

- 以 1.4 和 1.6mg/kg/天之间的剂量施用所述 RAD001 并以 2.4 和 2.6mg/kg/天之间的剂量施用所述 BEZ235 或 CCG168;

- 以 1.3 和 1.7mg/kg/天之间的剂量施用所述 RAD001 并以 2.3 和 2.7mg/kg/天之间的剂量施用所述 BEZ235 或 CCG168;

- 以 1.2 和 1.8mg/kg/天之间的剂量施用所述 RAD001 并以 2.2 和 2.8mg/kg/天之间的剂量施用所述 BEZ235 或 CCG168;

- 以 1.1 和 1.9mg/kg/天之间的剂量施用所述 RAD001 并以 2.1 和 2.9mg/kg/天之间的剂量施用所述 BEZ235 或 CCG168;

- 以 1.0 和 2.0mg/kg/天之间的剂量施用所述 RAD001 并以 2.0 和 3.0mg/kg/天之间的剂量施用所述 BEZ235 或 CCG168;

- 以 0.8 和 2.2mg/kg/天之间的剂量施用所述 RAD001 并以 1.8 和 2.6mg/kg/天之间的剂量施用所述 BEZ235 或 CCG168;

- 以 0.6 和 2.4mg/kg/天之间的剂量施用所述 RAD001 并以 1.6 和 2.8mg/kg/天之间的剂量施用所述 BEZ235 或 CCG168;

- 以 0.4 和 2.6mg/kg/天之间的剂量施用所述 RAD001 并以 1.4 和 3.0mg/kg/天之间的剂量施用所述 BEZ235 或 CCG168;

- 以 0.2 和 2.8mg/kg/天之间的剂量施用所述 RAD001 并以 1.0 和 3.5mg/kg/天之间的剂量施用所述 BEZ235 或 CCG168;

- 以 0.01 和 3.0mg/kg/天之间的剂量施用所述 RAD001 并以 0.5 和 4.0mg/kg/天之间的剂量施用所述 BEZ235 或 CCG168;

- 以 0.01 和 5.0mg/kg/天之间的剂量施用所述 RAD001 并以 0.01 和 5.0mg/kg/天之间的剂量施用所述 BEZ235 或 CCG168;或者

- 以 0.01 和 10.0mg/kg/天之间的剂量施用所述 RAD001 并以 0.01 和 10.0mg/kg/天之间的剂量施用所述 BEZ235 或 CCG168。

13. 根据权利要求 11 的方法,其中以约 1.5mg/kg/天的剂量施用所述 RAD001 且以约 2.5mg/kg/天的剂量施用所述 BEZ235 或 CCG168。

14. 根据权利要求 9 至 13 中任一项的方法,其中所述神经变性疾病选自亨廷顿舞蹈病、帕金森病、脊髓小脑性共济失调 3 型、阿尔茨海默病、运动神经元病和周围神经病变。

15. 根据权利要求 14 的方法,其中所述神经变性疾病是亨廷顿舞蹈病。

16. 根据权利要求 9 至 15 中任一项的方法,其中所述变构 mTOR 抑制剂和所述催化 mTOR 抑制剂经口服施用。

17. 组合产品,其包含变构 mTOR 抑制剂和催化 mTOR 抑制剂,其用于在神经变性疾病的治疗或预防中同时、分别或依次使用。

18. 根据权利要求 17 的组合产品,其用于在神经变性疾病的治疗或预防中同时、分别或依次使用,其中所述变构 mTOR 抑制剂选自 RAD001、西罗莫司、坦罗莫司和 Deferolimus,且所述催化 mTOR 抑制剂选自 BEZ235、CCG168、Ku-0063794、WYE-354 和 8-(6-甲氧基-吡啶-3-基)-3-甲基-1-(4-哌嗪-1-基-3-三氟甲基-苯基)-1,3-二氢-咪唑并[4,5-c]喹啉-2-酮。

19. 根据权利要求 18 的组合产品,其用于在神经变性疾病的治疗或预防中同时、分别或依次使用,其中所述变构 mTOR 抑制剂是 RAD001 且所述催化 mTOR 抑制剂是 BEZ235 或 CCG168。

20. 根据权利要求 19 的组合产品,其包含一个或多个剂量的 90 至 110mg RAD001 和 165 至 185mg BEZ235 或 CCG168 ;80 至 120mg RAD001 和 155 至 195mg BEZ235 或 CCG168 ;70 至 130mg RAD001 和 145 至 205mg BEZ235 或 CCG168 ;60 至 140mg RAD001 和 135 至 215mg BEZ235 或 CCG168 ;50 至 150mg RAD001 和 125 至 225mg BEZ235 或 CCG168 ;50 至 200mg RAD001 和 100 至 300mg BEZ235 或 CCG168 ;25 至 175mg RAD001 和 100 至 250mg BEZ235 或 CCG168 ;1 至 200mg RAD001 和 50 至 300mg BEZ235 或 CCG168 ;1 至 300mg RAD001 和 1 至 500mg BEZ235 或 CCG168 ;或 1 至 500mg RAD001 和 1 至 800mg BEZ235 或 CCG168 ;其作为单独的制剂或作为组合的制剂用于在神经变性疾病的治疗或预防中同时、分别或依次使用。

21. 根据权利要求 19 的组合产品,其包含一个或多个剂量的约 100mg RAD001 和约 175mg BEZ235 或 CCG168,其作为单独的制剂或作为组合的制剂用于在神经变性疾病的治疗或预防中同时、分别或依次使用。

22. 根据权利要求 17 至 21 中的任一项的组合产品,其用于在神经变性疾病的治疗或预防中同时、分别或依次使用,其中所述神经变性疾病选自亨廷顿舞蹈病、帕金森病、脊髓小脑性共济失调 3 型、阿尔茨海默病、运动神经元病和周围神经病变。

23. 根据权利要求 22 的组合产品,其用于在亨廷顿舞蹈病的治疗或预防中同时、分别或依次使用。

24. 根据权利要求 17 至 23 中任一项的用于在神经变性疾病的所述治疗或预防中同时、分别或依次使用的组合产品,其中所述变构 mTOR 抑制剂和所述催化 mTOR 抑制剂经口服施用。

25. 药物组合物,其包含变构 mTOR 抑制剂、催化 mTOR 抑制剂和药学上可接受的载体或稀释剂,其用于治疗或预防神经变性疾病。

26. 根据权利要求 25 的用于治疗或预防神经变性疾病的药物组合物,其中所述变构 mTOR 抑制剂选自 RAD001、西罗莫司、坦罗莫司和 Deferolimus,且所述催化 mTOR 抑制剂选自 BEZ235、CCG168、Ku-0063794、WYE-354 和 8-(6-甲氧基-吡啶-3-基)-3-甲基-1-(4-哌嗪-1-基-3-三氟甲基-苯基)-1,3-二氢-咪唑并[4,5-c]喹啉-2-酮。

27. 根据权利要求 26 的用于治疗或预防神经变性疾病的药物组合物,其中所述变构 mTOR 抑制剂是 RAD001 且所述催化 mTOR 抑制剂是 BEZ235 或 CCG168。

28. 根据权利要求 27 的药物组合物,其包含 90 至 110mg RAD001 和 165 至 185mg BEZ235 或 CCG168 ;80 至 120mg RAD001 和 155 至 195mg BEZ235 或 CCG168 ;70 至 130mg RAD001 和 145 至 205mg BEZ235 或 CCG168 ;60 至 140mg RAD001 和 135 至 215mg BEZ235 或 CCG168 ;50 至 150mg RAD001 和 125 至 225mg BEZ235 或 CCG168 ;50 至 200mg RAD001 和 100 至 300mg BEZ235 或 CCG168 ;25 至 175mg RAD001 和 100 至 250mg BEZ235 或 CCG168 ;1 至 200mg RAD001 和 50 至 300mg BEZ235 或 CCG168 ;1 至 300mg RAD001 和 1 至 500mg BEZ235 或 CCG168 ;或 1 至 500mg RAD001 和 1 至 800mg BEZ235 或 CCG168 ;以及药学上可接受的载体和稀释剂,用于治疗 and 预防神经变性疾病。

29. 根据权利要求 27 的药物组合物,其包含:

- 约 100mg RAD001 ;
- 约 175mg BEZ235 或 CCG168 ;以及
- 药学上可接受的载体或稀释剂 ;

用于治疗或预防神经变性疾病。

30. 根据权利要求 25 至 29 中任一项的药物组合物,其用于治疗或预防神经变性疾病,其中所述神经变性疾病选自亨廷顿舞蹈病、帕金森病、脊髓小脑性共济失调 3 型、阿尔茨海默病、运动神经元病和周围神经病变。

31. 根据权利要求 30 的药物组合物,其用于治疗或预防亨廷顿舞蹈病。

32. 根据权利要求 25 至 31 中任一项的用于治疗或预防神经变性疾病的药物组合物,其中所述变构 mTOR 抑制剂和所述催化 mTOR 抑制剂经口服施用。

## 用于治疗神经变性疾病的治疗剂的组合物

### 发明领域

[0001] 本发明涉及用于预防或治疗神经变性疾病如亨廷顿舞蹈病 (Huntington's Disease) 的治疗剂的组合, 以及包含此类组合、用于预防或治疗此类神经变性疾病的产品和药物组合物。

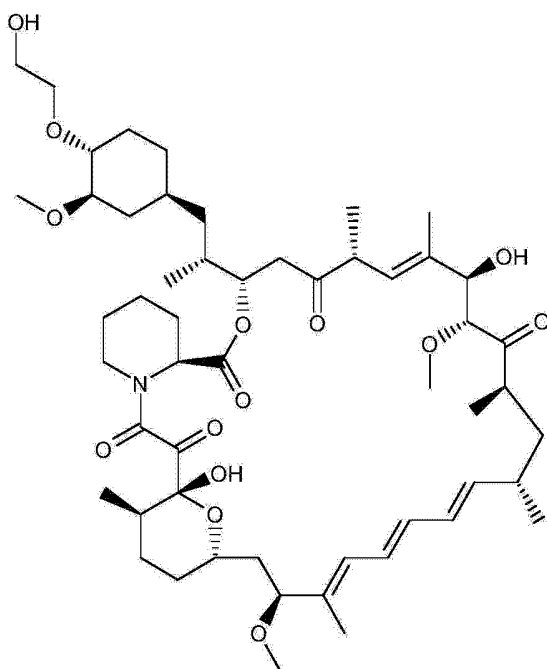
[0002] 在哺乳动物细胞中, 雷帕霉素 (mTOR) 激酶的靶标作为多蛋白复合体 (描述为 mTORC1 复合体或 mTORC2 复合体) 存在, 其感测营养物和能量的可利用性并且整合来自生长因子和应激信号传导的输入。mTORC1 复合体对变构 mTOR 抑制剂如雷帕霉素敏感, 其由 mTOR、GβL 以及 mTOR 的调控相关蛋白 (raptor) 组成, 并且结合于肽基-脯氨酰异构酶 FKBP12 蛋白 (一种 FK506-结合蛋白 1A, 12kDa)。相反, mTORC2 复合体由 mTOR、GβL 和 mTOR 的雷帕霉素-不敏感性伴侣蛋白 (rictor) 组成, 并且在体外不结合于 FKBP12 蛋白。

[0003] 已经显示 mTORC1 复合体参与蛋白翻译控制, 起到用于生长和增殖调控的生长因子和营养物敏感性装置的作用。mTORC1 经由两种关键下游底物来调节蛋白翻译: S6 激酶, 其继而磷酸化核糖体蛋白 S6; 以及真核翻译起始因子 4E 结合蛋白 1 (4EBP1), 其在调节 eIF4E 调节的帽依赖性翻译中起关键作用。mTORC1 复合体调节响应于细胞的能量和营养物平衡的细胞生长, 并且 mTORC1 的失调是多种人类癌症中所常见的。mTORC2 的功能涉及经由 Akt 的磷酸化的细胞存活的调控, 和肌动蛋白细胞骨架动力学的调节。

[0004] mTORC1 复合体对变构 mTOR 抑制剂如雷帕霉素以及衍生物敏感, 这很大程度上是由于雷帕霉素的作用模式, 其涉及与 FKBP12 形成细胞内复合体以及结合于 mTOR 的 FKBP12-雷帕霉素结合 (FRB) 结构域。这导致 mTORC1 的构象改变, 据认为这改变并减弱与其支架蛋白 raptor 的相互作用, 进而阻止底物如 S6K1 接近 mTOR 并被磷酸化。通过抑制与良性和恶性增殖病症两者有关的 mTOR 的超活化, 雷帕霉素和雷帕霉素类似物 (rapalogues) 如 RAD001 已获得临床认可。

[0005] RAD001 也称为依维莫司 (**Afinitor®**), 具有化学名 (1R, 9S, 12S, 15R, 16E, 18R, 19R, 21R, 23S, 24E, 26E, 28E, 30S, 32S, 35R)-1, 18-二羟基-12-[(1R)-2-[(1S, 3R, 4R)-4-(2-羟基乙氧基)-3-甲氧基环己基]-1-甲基乙基]-19, 30-二甲氧基-15, 17, 21, 23, 29, 35-六甲基-11, 36-二氧杂-4-氮杂-三环 [30.3.1.0<sup>4,9</sup>] 三十六碳-16, 24, 26, 28-四烯-2, 3, 10, 14, 20-戊酮和以下化学结构

[0006]

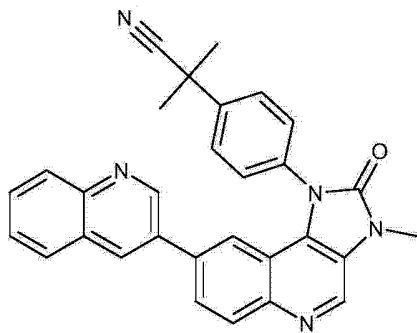


[0007] 依维莫司是FDA批准用于治疗晚期肾癌的药物,并且还在数项其它III期临床试验中被用于肿瘤学方面的研究。临床前研究已经显示,依维莫司能够抑制多种肿瘤细胞系在体外和体内的增殖,这大概是通过抑制雷帕霉素敏感性mTORC1的功能。作为雷帕霉素的衍生物,依维莫司是在抑制部分mTORC1功能,即S6激酶(S6K)以及下游S6K底物S6方面高度强效的变构mTOR抑制剂。然而,依维莫司(以及其它雷帕霉素类似物)在抑制4EBP1(T37/46)中的启动磷酸化事件方面几乎没有或没有作用,所述4EBP1涉及肿瘤发生和维持中的关键驱动因子。变构mTOR抑制剂如依维莫司(以及其它雷帕霉素类似物)在抑制mTORC2通路,或其所导致的Akt信号传导的活化方面几乎没有或没有作用。变构mTOR抑制剂的另外实例包括西罗莫司(雷帕霉素,AY-22989),40-[3-羟基-2-(羟基甲基)-2-甲基丙酸酯]-雷帕霉素(也称为坦罗莫司(Temsirolimus)或CCI-779)和Deferolimus(AP-23573/MK-8669)。

[0008] 可选地,已发现催化、ATP-竞争性mTOR抑制剂直接靶向mTOR激酶结构域并且靶向mTORC1和mTORC2两者。这些是比这类变构mTOR抑制剂如雷帕霉素还更有效的mTORC1抑制剂,因为它们调节雷帕霉素-抗性mTORC1输出,例如4EBP1-T37/46磷酸化和帽依赖性翻译。

[0009] BEZ235是催化mTOR抑制剂,其化学名为2-甲基-2-[4-(3-甲基-2-氧代-8-喹啉-3-基-2,3-二氢-咪唑并[4,5-c]喹啉-1-基)-苯基]-丙腈和以下化学结构

[0010]

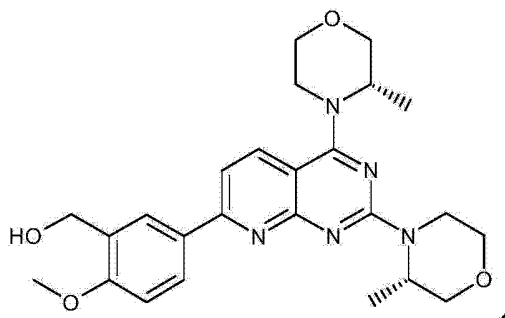


[0011] BEZ235 也可以以其单甲苯磺酸盐形式使用。W02006/122806 描述了 BEZ235 的合成。

[0012] 作为催化 mTOR 抑制剂, BEZ235 能够停止 mTORC1 复合体的全部功能, 包括雷帕霉素敏感性 (S6K 的磷酸化, 以及随后 S6 的磷酸化) 和雷帕霉素不敏感性 (4EBP1 的磷酸化) 功能。根据所用药物浓度, BEZ235 具有差异作用, 其中 mTOR 抑制在低浓度 (低于 100nmol/L) 时占优势, 而双重 PI3K/mTOR 抑制在相对较高浓度 (约 500nmol/L) 时占优势, Serra 等, 2008。

[0013] 文献中描述的另外的催化 mTOR 抑制剂是 CCG168 (也称为 AZD-8055, Chresta 等, 2010), 其化学名为 {5-[2, 4-双-((S)-3-甲基-吗啉-4-基)-吡啶并 [2, 3d] 嘧啶-7-基]-2-甲氧基-苯基}-甲醇和以下化学结构

[0014]



[0015] 催化 mTOR 抑制剂的另外实例包括 8-(6-甲氧基-吡啶-3-基)-3-甲基-1-(4-哌嗪-1-基-3-三氟甲基-苯基)-1, 3-二氢-咪唑并 [4, 5-c] 喹啉-2-酮 (W02006/122806), Ku-0063794 (Garcia-Martinez 等, 2009) 和 WYE-354 (Yu 等, 2009)。

[0016] 亨廷顿舞蹈病 (HD) 的特征在于皮质和纹状体中的选择性神经元细胞死亡, 其导致进展性痴呆、运动损伤和人格改变。HD 的主要分子特性是胞质和核 polyQ 包涵体的逐渐出现, 这与疾病发作和进展是平行运行的。在纹状体中, 中型多刺神经元 (MN) 表现出 polyQ 包涵体的逐渐增加, DARPP-32 的降低和总体轴突变性 (The Huntington's Disease Collaborative Research Group, 1993; Davies 等, 1997; Bibb 等, 2000; Luthi-Carter 等, 2000)。为跟踪纹状体变性, 已经使用来自 R6/2 小鼠模型的皮质纹状体切片培养物开发了亨廷顿舞蹈病的离体模型。该方法基于界面法 (interface method) 并且得到可维持数周的切片培养物 (Galimberti 等, 2006; Gogolla 等, 2006; Galimberti 等, 2010)。当在不同的周体外研究 R6/2 切片时, 观察到纹状体中 polyQ 包涵体逐渐增加、DARPP-32 降低以及总体神经丝损失。



[0017] 如本文所述,进行了 R6/2 切片研究,以考察突变体亨廷顿 (mHtt) 的清除是否足以保护纹状体变性。特别地,在体外自 14 至 21 天 (DIV) 通过抑制 mTOR 通路来诱导自噬。mTOR 抑制诱导了自噬,减少了 polyQ 包涵体并且保持了纹状体中的 DARPP-32 和神经丝损失。有趣的是,与 250nM RAD001 和 50nM BEZ235 单个治疗相比,变构 mTOR 抑制剂 (RAD001) 和催化 mTOR 抑制剂 (BEZ235 或 CCG168) 的低剂量组合协同地作用。此外,250nM RAD001/30nM BEZ235 的组合 mTOR 抑制,以低 10 倍的 BEZ235 浓度保护了纹状体变性。因此,本文描述的结果表明:变构 mTOR 抑制剂和催化 mTOR 抑制剂的低剂量组合减少 R6/2 切片中的纹状体变性,并且代表 HD 治疗的治疗时机。这一意想不到的协同相互作用允许减少所需剂量,这导致副作用更少且临床疗效增强。

[0018] 除 HD 以外,由易聚合蛋白引起的其它神经变性疾病也可通过自噬诱导、经由 mTOR 通路抑制来治疗,例如帕金森病、脊髓小脑性共济失调 3 型 (也称为马查多-约瑟夫病 (Machado-Joseph disease))、阿尔茨海默病、由超氧化物歧化酶 1 中的突变引起的运动神经元病以及由外周髓鞘蛋白 22 中的突变引起的周围神经病变的形式。对于自噬和神经变性之间联系的进一步描述参见 Rubinsztein DC 等,2007 和 Sarkar S 等,2009。

## 发明概要

[0019] 在本发明的第一方面,因此提供了用于治疗或预防神经变性疾病的变构 mTOR 抑制剂和催化 mTOR 抑制剂的组合。

[0020] 另一方面,本发明涉及变构 mTOR 抑制剂和催化 mTOR 抑制剂用于制备用于治疗或预防神经变性疾病的药剂的用途。

[0021] 另一方面,本发明涉及变构 mTOR 抑制剂和催化 mTOR 抑制剂的组合作为药剂中的活性药物成分用于治疗或预防神经变性疾病的用途。

[0022] 本发明的另一方面,提供了在需要此类治疗或预防的对象中治疗或预防神经变性疾病的方法,所述方法包括向此类对象施用有效量的变构 mTOR 抑制剂和催化 mTOR 抑制剂的组合。

[0023] 在本发明的另一方面,提供了组合产品,其包含变构 mTOR 抑制剂和催化 mTOR 抑制剂,用于在神经变性疾病的治疗或预防中同时、分别或依次使用。

[0024] 在本发明的另一方面,提供了药物组合物,其包含:

[0025] - 变构 mTOR 抑制剂;

[0026] - 催化 mTOR 抑制剂;以及

[0027] - 药学上可接受的载体或稀释剂;

[0028] 用于治疗或预防神经变性疾病。

[0029] 附图详细描述

[0030] 图 1:RAD001/BEZ235 或 CCG168 组合诱导 R6/2 脑切片中的自噬

[0031] (A) 脑切片中治疗的示意性描述。出生后第 7 天 (P7) 制备切片并在 DIV14 至 DIV21 用 RAD001、BEZ235 和 CCG168 处理。

[0032] (B) mTORC1 活性 (p-S6S240/244)、自噬诱导 (LC3-II/I 转化) 和 B-肌动蛋白的生物化学分析。用 50nM BEZ235 治疗不会减少 p-S6S240/244 并且对增加 LC3-II/I 转化 (LC3-II/I 比例) 无作用。然而,250nM RAD001 和 250nM RAD001/50nM BEZ235 减少了

p-S6S240/244 并且两者的组合还增加了 LC3-II 水平。

[0033] (C)LC3-II/I 转化 (LC3-II/I 比例) 的定量分析。注意, 与单个低浓度相比, RAD001/BEZ235 的组合诱导了显著 LC3-II/I 转化。300nM BEZ235 和 300nM CCG168 达到类似的功效, 这表明 BEZ235 或 CCG168 与 RAD001 一起协同诱导自噬 (N = 5 切片 / 病状, 单向 ANOVA\*\*p < 0.01, Post hoc Student t 检验, \*\*\*p < 0.001)

[0034] 图 2: RAD001/BEZ235 或 CCG168 组合减少 R6/2 脑切片中的 polyQ 包涵体。

[0035] 对 DIV7 至 DIV21 的 polyQ 密度以及 DIV21 时不同治疗下的 polyQ 密度进行定量。与 DIV21R6/2DMSO 处理的切片相比, RAD001/BEZ235 的组合减少了 polyQ 密度的 40%±11, 而 250nM RAD001 和 50nM BEZ235 单个浓度未显示作用。与 DIV21R6/2DMSO 处理的切片相比, RAD001/CCG168 的组合也减少了 polyQ 密度。(N = 5 切片 / 病状, 单向 ANOVA\*p < 0.05, Post hoc Student t 检验, \*\*\*p < 0.001)

[0036] 图 3: RAD001/BEZ235 或 CCG168 组合预防 R6/2 脑切片中的纹状体变性, 如通过在 DIV21 时 DARPP-32 强度的定量分析所评估。

[0037] 与对照 R6/2 切片相比, RAD001/BEZ235 的组合保持了 DARPP-32 水平的 80%±5。RAD001/CCG168 的组合在保持 DARPP-32 水平方面同样有效。(N = 5 切片 / 病状, 单向 ANOVA\*\*p < 0.01, Post hoc Student t 检验, \*\*p < 0.01 ; \*\*\*p < 0.001)

[0038] 图 4: RAD001/BEZ235 或 CCG168 组合预防 R6/2 脑切片中的纹状体变性, 如通过在 DIV21 时神经丝强度的定量分析所评估。

[0039] 与对照 R6/2 切片相比, RAD001/BEZ235 的组合保持了神经丝水平的 95%±12。RAD001/CCG168 的组合在保持神经丝水平方面同样有效。(N = 5 切片 / 病状, 单向 ANOVA\*\*p < 0.01, Post hoc Student t 检验, \*\*p < 0.01 ; \*\*\*p < 0.001)。

[0040] 发明详述

[0041] 因此, 在本发明的第一方面, 提供了用于治疗或预防神经变性疾病的变构 mTOR 抑制剂和催化 mTOR 抑制剂的组合。

[0042] 在一个实施方案中, 提供了用于治疗或预防神经变性疾病的变构 mTOR 抑制剂和催化 mTOR 抑制剂的组合, 其中变构 mTOR 抑制剂选自 RAD001、西罗莫司、坦罗莫司和 Deferolimus, 且催化 mTOR 抑制剂选自 BEZ235、CCG168、Ku-0063794、WYE-354 和 8-(6-甲氧基-吡啶-3-基)-3-甲基-1-(4-哌嗪-1-基-3-三氟甲基-苯基)-1,3-二氢-咪唑并 [4,5-c] 喹啉-2-酮。

[0043] 在一个实施方案中, 提供了用于治疗或预防神经变性疾病的 RAD001 和 BEZ235 或 CCG168 的组合物。

[0044] 在一个实施方案中, 提供了用于治疗或预防神经变性疾病的 RAD001 和 BEZ235 或 CCG168 的组合, 其中以约 1.5mg/kg/ 天的剂量施用 RAD001 或 CCG168 且以约 2.5mg/kg/ 天的剂量施用 BEZ235。

[0045] 在一个实施方案中, 提供了用于治疗或预防神经变性疾病的 RAD001 和 BEZ235 或 CCG168 的组合, 其中:

[0046] - 以 1.4 和 1.6mg/kg/ 天之间的剂量施用 RAD001 并以 2.4 和 2.6mg/kg/ 天之间的剂量施用 BEZ235 或 CCG168 ;

[0047] - 以 1.3 和 1.7mg/kg/ 天之间的剂量施用 RAD001 并以 2.3 和 2.7mg/kg/ 天之间的

剂量施用 BEZ235 或 CCG168 ;

[0048] - 以 1.2 和 1.8mg/kg/ 天之间的剂量施用 RAD001 并以 2.2 和 2.8mg/kg/ 天之间的剂量施用 BEZ235 或 CCG168 ;

[0049] - 以 1.1 和 1.9mg/kg/ 天之间的剂量施用 RAD001 并以 2.1 和 2.9mg/kg/ 天之间的剂量施用 BEZ235 或 CCG168 ;

[0050] - 以 1.0 和 2.0mg/kg/ 天之间的剂量施用 RAD001 并以 2.0 和 3.0mg/kg/ 天之间的剂量施用 BEZ235 或 CCG168 ;

[0051] - 以 0.8 和 2.2mg/kg/ 天之间的剂量施用 RAD001 并以 1.8 和 2.6mg/kg/ 天之间的剂量施用 BEZ235 或 CCG168 ;

[0052] - 以 0.6 和 2.4mg/kg/ 天之间的剂量施用 RAD001 并以 1.6 和 2.8mg/kg/ 天之间的剂量施用 BEZ235 或 CCG168 ;

[0053] - 以 0.4 和 2.6mg/kg/ 天之间的剂量施用 RAD001 并以 1.4 和 3.0mg/kg/ 天之间的剂量施用 BEZ235 或 CCG168 ;

[0054] - 以 0.2 和 2.8mg/kg/ 天之间的剂量施用 RAD001 并以 1.0 和 3.5mg/kg/ 天之间的剂量施用 BEZ235 或 CCG168 ;

[0055] - 以 0.01 和 3.0mg/kg/ 天之间的剂量施用 RAD001 并以 0.5 和 4.0mg/kg/ 天之间的剂量施用 BEZ235 或 CCG168 ;

[0056] - 以 0.01 和 5.0mg/kg/ 天之间的剂量施用 RAD001 并以 0.01 和 5.0mg/kg/ 天之间的剂量施用 BEZ235 或 CCG168 ;或者

[0057] - 以 0.01 和 10.0mg/kg/ 天之间的剂量施用 RAD001 并以 0.01 和 10.0mg/kg/ 天之间的剂量施用 BEZ235 或 CCG168。

[0058] 在一个实施方案中,提供了用于治疗或预防神经变性疾病的 RAD001 和 BEZ235 或 CCG168 的组合,其中以 0.01 和 10.0mg/kg/ 天之间的剂量施用 RAD001,且以 0.01 和 10.0mg/kg/ 天之间的剂量施用 BEZ235 或 CCG168。

[0059] 在另一方面,本发明涉及变构 mTOR 抑制剂和催化 mTOR 抑制剂用于制备用于治疗或预防神经变性疾病的药剂的用途。

[0060] 在一个实施方案中,本发明涉及变构 mTOR 抑制剂和催化 mTOR 抑制剂用于制备用于治疗或预防神经变性疾病的药剂的用途,其中变构 mTOR 抑制剂选自 RAD001、西罗莫司、坦罗莫司和 Deferolimus,且催化 mTOR 抑制剂选自 BEZ235、CCG168、Ku-0063794、WYE-354 和 8-(6-甲氧基-吡啶-3-基)-3-甲基-1-(4-哌嗪-1-基-3-三氟甲基-苯基)-1,3-二氢-咪唑并[4,5-c]喹啉-2-酮。

[0061] 在一个实施方案中,本发明涉及 RAD001 和 BEZ235 或 CCG168 用于制备用于治疗或预防神经变性疾病的药剂的用途。

[0062] 在一个实施方案中,本发明涉及 RAD001 和 BEZ235 或 CCG168 用于制备用于治疗或预防神经变性疾病的药剂的用途,其中以约 1.5mg/kg/ 天的剂量施用 RAD001 且以约 2.5mg/kg/ 天的剂量施用 BEZ235 或 CCG168。

[0063] 在一个实施方案中,本发明涉及 RAD001 和 BEZ235 或 CCG168 用于制备用于治疗或预防神经变性疾病的药剂的用途,其中:

[0064] - 以 1.4 和 1.6mg/kg/ 天之间的剂量施用 RAD001 并以 2.4 和 2.6mg/kg/ 天之间的

剂量施用 BEZ235 或 CCG168 ;

[0065] - 以 1.3 和 1.7mg/kg/ 天之间的剂量施用 RAD001 并以 2.3 和 2.7mg/kg/ 天之间的剂量施用 BEZ235 或 CCG168 ;

[0066] - 以 1.2 和 1.8mg/kg/ 天之间的剂量施用 RAD001 并以 2.2 和 2.8mg/kg/ 天之间的剂量施用 BEZ235 或 CCG168 ;

[0067] - 以 1.1 和 1.9mg/kg/ 天之间的剂量施用 RAD001 并以 2.1 和 2.9mg/kg/ 天之间的剂量施用 BEZ235 或 CCG168 ;

[0068] - 以 1.0 和 2.0mg/kg/ 天之间的剂量施用 RAD001 并以 2.0 和 3.0mg/kg/ 天之间的剂量施用 BEZ235 或 CCG168 ;

[0069] - 以 0.8 和 2.2mg/kg/ 天之间的剂量施用 RAD001 并以 1.8 和 2.6mg/kg/ 天之间的剂量施用 BEZ235 或 CCG168 ;

[0070] - 以 0.6 和 2.4mg/kg/ 天之间的剂量施用 RAD001 并以 1.6 和 2.8mg/kg/ 天之间的剂量施用 BEZ235 或 CCG168 ;

[0071] - 以 0.4 和 2.6mg/kg/ 天之间的剂量施用 RAD001 并以 1.4 和 3.0mg/kg/ 天之间的剂量施用 BEZ235 或 CCG168 ;

[0072] - 以 0.2 和 2.8mg/kg/ 天之间的剂量施用 RAD001 并以 1.0 和 3.5mg/kg/ 天之间的剂量施用 BEZ235 或 CCG168 ;

[0073] - 以 0.01 和 3.0mg/kg/ 天之间的剂量施用 RAD001 并以 0.5 和 4.0mg/kg/ 天之间的剂量施用 BEZ235 或 CCG168 ;

[0074] - 以 0.01 和 5.0mg/kg/ 天之间的剂量施用 RAD001 并以 0.01 和 5.0mg/kg/ 天之间的剂量施用 BEZ235 或 CCG168 ;或者

[0075] - 以 0.01 和 10.0mg/kg/ 天之间的剂量施用 RAD001 并以 0.01 和 10.0mg/kg/ 天之间的剂量施用 BEZ235 或 CCG168。

[0076] 在一个实施方案中,本发明涉及 RAD001 和 BEZ235 或 CCG168 用于制备用于治疗或预防神经变性疾病的药剂的用途,其中以 0.01 和 10.0mg/kg/ 天之间的剂量施用 RAD001 且以 0.01 和 10.0mg/kg/ 天之间的剂量施用 BEZ235 或 CCG168。

[0077] 另一方面,本发明涉及变构 mTOR 抑制剂和催化 mTOR 抑制剂的组合作为药剂中的活性药物成分用于治疗或预防神经变性疾病的用途。

[0078] 在一个实施方案中,本发明涉及变构 mTOR 抑制剂和催化 mTOR 抑制剂的组合作为药剂中的活性药物成分用于治疗或预防神经变性疾病的用途,其中变构 mTOR 抑制剂选自 RAD001、西罗莫司、坦罗莫司和 Deferolimus,且催化 mTOR 抑制剂选自 BEZ235、CCG168、Ku-0063794、WYE-354 和 8-(6-甲氧基-吡啶-3-基)-3-甲基-1-(4-哌嗪-1-基-3-三氟甲基-苯基)-1,3-二氢-咪唑并[4,5-c]喹啉-2-酮。

[0079] 在一个实施方案中,本发明涉及 RAD001 和 BEZ235 或 CCG168 的组合作为药剂中的活性药物成分用于治疗或预防神经变性疾病的用途。

[0080] 在一个实施方案中,本发明涉及 RAD001 和 BEZ235 或 CCG168 的组合作为药剂中的活性药物成分用于治疗或预防神经变性疾病的用途,其中以约 1.5mg/kg/ 天的剂量施用 RAD001 且以约 2.5mg/kg/ 天的剂量施用 BEZ235 或 CCG168。

[0081] 在一个实施方案中,本发明涉及 RAD001 和 BEZ235 或 CCG168 的组合作为药剂中的

活性药物成分用于治疗或预防神经变性疾病的用途,其中:

[0082] - 以 1.4 和 1.6mg/kg/ 天之间的剂量施用 RAD001 并以 2.4 和 2.6mg/kg/ 天之间的剂量施用 BEZ235 或 CCG168;

[0083] - 以 1.3 和 1.7mg/kg/ 天之间的剂量施用 RAD001 并以 2.3 和 2.7mg/kg/ 天之间的剂量施用 BEZ235 或 CCG168;

[0084] - 以 1.2 和 1.8mg/kg/ 天之间的剂量施用 RAD001 并以 2.2 和 2.8mg/kg/ 天之间的剂量施用 BEZ235 或 CCG168;

[0085] - 以 1.1 和 1.9mg/kg/ 天之间的剂量施用 RAD001 并以 2.1 和 2.9mg/kg/ 天之间的剂量施用 BEZ235 或 CCG168;

[0086] - 以 1.0 和 2.0mg/kg/ 天之间的剂量施用 RAD001 并以 2.0 和 3.0mg/kg/ 天之间的剂量施用 BEZ235 或 CCG168;

[0087] - 以 0.8 和 2.2mg/kg/ 天之间的剂量施用 RAD001 并以 1.8 和 2.6mg/kg/ 天之间的剂量施用 BEZ235 或 CCG168;

[0088] - 以 0.6 和 2.4mg/kg/ 天之间的剂量施用 RAD001 并以 1.6 和 2.8mg/kg/ 天之间的剂量施用 BEZ235 或 CCG168;

[0089] - 以 0.4 和 2.6mg/kg/ 天之间的剂量施用 RAD001 并以 1.4 和 3.0mg/kg/ 天之间的剂量施用 BEZ235 或 CCG168;

[0090] - 以 0.2 和 2.8mg/kg/ 天之间的剂量施用 RAD001 并以 1.0 和 3.5mg/kg/ 天之间的剂量施用 BEZ235 或 CCG168;

[0091] - 以 0.01 和 3.0mg/kg/ 天之间的剂量施用 RAD001 并以 0.5 和 4.0mg/kg/ 天之间的剂量施用 BEZ235 或 CCG168;

[0092] - 以 0.01 和 5.0mg/kg/ 天之间的剂量施用 RAD001 并以 0.01 和 5.0mg/kg/ 天之间的剂量施用 BEZ235 或 CCG168;或者

[0093] - 以 0.01 和 10.0mg/kg/ 天之间的剂量施用 RAD001 并以 0.01 和 10.0mg/kg/ 天之间的剂量施用 BEZ235 或 CCG168。

[0094] 在一个实施方案中,本发明涉及 RAD001 和 BEZ235 或 CCG168 的组合作为药剂中的活性药物成分用于治疗或预防神经变性疾病的用途,其中以 0.01 和 10.0mg/kg/ 天之间的剂量施用 RAD001 且以 0.01 和 10.0mg/kg/ 天之间的剂量施用 BEZ235 或 CCG168。

[0095] 本发明的另一方面,提供了用于在需要此类治疗或预防的对象中治疗或预防神经变性疾病的方法,所述方法包括向此类对象施用有效量的变构 mTOR 抑制剂和催化 mTOR 抑制剂的组合。

[0096] 在一个实施方案中,提供了在需要此类治疗或预防的对象中治疗或预防神经变性疾病的方法,所述方法包括向此类对象施用有效量的变构 mTOR 抑制剂和催化 mTOR 抑制剂的组合,其中变构 mTOR 抑制剂选自 RAD001、西罗莫司、坦罗莫司和 Deferolimus,且催化 mTOR 抑制剂选自 BEZ235、CCG168、Ku-0063794、WYE-354 和 8-(6-甲氧基-吡啶-3-基)-3-甲基-1-(4-哌嗪-1-基-3-三氟甲基-苯基)-1,3-二氢-咪唑并[4,5-c]喹啉-2-酮。

[0097] 在一个实施方案中,提供了用于在需要此类治疗或预防的对象中治疗或预防神经变性疾病的方法,所述方法包括向此类对象施用有效量的 RAD001 和 BEZ235 或 CCG168 的组

合。

[0098] 在一个实施方案中,提供了用于在需要此类治疗或预防的对象中治疗或预防神经变性疾病的方法,所述方法包括向此类对象施用有效量的 RAD001 和 BEZ235 或 CCG168 的组合,其中以约 1.5mg/kg/ 天的剂量施用 RAD001 且以约 2.5mg/kg/ 天的剂量施用 BEZ235 或 CCG168。

[0099] 在一个实施方案中,提供了用于在需要此类治疗或预防的对象中治疗或预防亨廷顿舞蹈病(一种神经变性疾病)的方法,所述方法包括向此类对象施用有效量的 RAD001 和 BEZ235 或 CCG168 的组合,其中:

[0100] - 以 1.4 和 1.6mg/kg/ 天之间的剂量施用 RAD001 并以 2.4 和 2.6mg/kg/ 天之间的剂量施用 BEZ235 或 CCG168;

[0101] - 以 1.3 和 1.7mg/kg/ 天之间的剂量施用 RAD001 并以 2.3 和 2.7mg/kg/ 天之间的剂量施用 BEZ235 或 CCG168;

[0102] - 以 1.2 和 1.8mg/kg/ 天之间的剂量施用 RAD001 并以 2.2 和 2.8mg/kg/ 天之间的剂量施用 BEZ235 或 CCG168;

[0103] - 以 1.1 和 1.9mg/kg/ 天之间的剂量施用 RAD001 并以 2.1 和 2.9mg/kg/ 天之间的剂量施用 BEZ235 或 CCG168;

[0104] - 以 1.0 和 2.0mg/kg/ 天之间的剂量施用 RAD001 并以 2.0 和 3.0mg/kg/ 天之间的剂量施用 BEZ235 或 CCG168;

[0105] - 以 0.8 和 2.2mg/kg/ 天之间的剂量施用 RAD001 并以 1.8 和 2.6mg/kg/ 天之间的剂量施用 BEZ235 或 CCG168;

[0106] - 以 0.6 和 2.4mg/kg/ 天之间的剂量施用 RAD001 并以 1.6 和 2.8mg/kg/ 天之间的剂量施用 BEZ235 或 CCG168;

[0107] - 以 0.4 和 2.6mg/kg/ 天之间的剂量施用 RAD001 并以 1.4 和 3.0mg/kg/ 天之间的剂量施用 BEZ235 或 CCG168;

[0108] - 以 0.2 和 2.8mg/kg/ 天之间的剂量施用 RAD001 并以 1.0 和 3.5mg/kg/ 天之间的剂量施用 BEZ235 或 CCG168;

[0109] - 以 0.01 和 3.0mg/kg/ 天之间的剂量施用 RAD001 并以 0.5 和 4.0mg/kg/ 天之间的剂量施用 BEZ235 或 CCG168;

[0110] - 以 0.01 和 5.0mg/kg/ 天之间的剂量施用 RAD001 并以 0.01 和 5.0mg/kg/ 天之间的剂量施用 BEZ235 或 CCG168;或者

[0111] - 以 0.01 和 10.0mg/kg/ 天之间的剂量施用 RAD001 并以 0.01 和 10.0mg/kg/ 天之间的剂量施用 BEZ235 或 CCG168。

[0112] 在一个实施方案中,提供了用于在需要此类治疗或预防的对象中治疗或预防亨廷顿舞蹈病(一种神经变性疾病)的方法,所述方法包括向此类对象施用有效量的 RAD001 和 BEZ235 或 CCG168 的组合,其中以 0.01 和 10.0mg/kg/ 天之间的剂量施用 RAD001 且以 0.01 和 10.0mg/kg/ 天之间的剂量施用 BEZ235 或 CCG168。

[0113] 在本发明的另一方面,提供了组合产品,其包含变构 mTOR 抑制剂和催化 mTOR 抑制剂,用于在神经变性疾病的治疗或预防中同时、分别或依次使用。

[0114] 在一个实施方案中,提供了组合产品,其包含变构 mTOR 抑制剂和催化 mTOR 抑制

剂,用于在神经变性疾病的治疗或预防中同时、分别或依次使用,其中变构 mTOR 抑制剂选自 RAD001、西罗莫司、坦罗莫司和 Deferolimus,且催化 mTOR 抑制剂选自 BEZ235、CCG168、Ku-0063794、WYE-354 和 8-(6-甲氧基-吡啶-3-基)-3-甲基-1-(4-哌嗪-1-基-3-三氟甲基-苯基)-1,3-二氢-咪唑并[4,5-c]喹啉-2-酮。

[0115] 在一个实施方案中,提供了包含 RAD001 和 BEZ235 或 CCG168 的组合产品,其用于在神经变性疾病的治疗或预防中同时、分别或依次使用。

[0116] 在一个实施方案中,提供了组合产品,其包含一个或多个剂量的约 100mg RAD001 和约 175mg BEZ235 或 CCG168,其作为单独的制剂或作为组合的制剂用于在神经变性疾病的治疗或预防中同时、分别或依次使用。

[0117] 在一个实施方案中,提供了组合产品,其包含一个或多个剂量的 90 至 110mg RAD001 和 165 至 185mg BEZ235 或 CCG168 ;80 至 120mg RAD001 和 155 至 195mg BEZ235 或 CCG168 ;70 至 130mg RAD001 和 145 至 205mg BEZ235 或 CCG168 ;60 至 140mg RAD001 和 135 至 215mg BEZ235 或 CCG168 ;50 至 150mg RAD001 和 125 至 225mg BEZ235 或 CCG168 ;50 至 200mg RAD001 和 100 至 300mg BEZ235 或 CCG168 ;25 至 175mg RAD001 和 100 至 250mg BEZ235 或 CCG168 ;1 至 200mg RAD001 和 50 至 300mg BEZ235 或 CCG168 ;1 至 300mg RAD001 和 1 至 500mg BEZ235 或 CCG168 ;或 1 至 500mg RAD001 和 1 至 800mg BEZ235 或 CCG168 ;其作为单独的制剂或作为组合的制剂用于在神经变性疾病的治疗或预防中同时、分别或依次使用。

[0118] 在本发明的另一方面,提供了药物组合物,其包含:

[0119] - 变构 mTOR 抑制剂;

[0120] - 催化 mTOR 抑制剂;以及

[0121] - 药学上可接受的载体或稀释剂;

[0122] 用于治疗或预防神经变性疾病。

[0123] 在一个实施方案中,提供了药物组合物,其包含:

[0124] - 选自 RAD001、西罗莫司、坦罗莫司和 Deferolimus 的变构 mTOR 抑制剂;- 选自 BEZ235、CCG168、Ku-0063794、WYE-354 和 8-(6-甲氧基-吡啶-3-基)-3-甲基-1-(4-哌嗪-1-基-3-三氟甲基-苯基)-1,3-二氢-咪唑并[4,5-c]喹啉-2-酮的催化 mTOR 抑制剂;以及

[0125] - 药学上可接受的载体或稀释剂;

[0126] 用于治疗或预防神经变性疾病。

[0127] 在一个实施方案中,提供了药物组合物,其包含:

[0128] -RAD001;

[0129] -BEZ235 或 CCG168 ;以及

[0130] - 药学上可接受的载体或稀释剂;

[0131] 用于治疗或预防神经变性疾病。

[0132] 在一个实施方案中,提供了药物组合物,其包含:

[0133] - 约 100mg RAD001;

[0134] - 约 175mg BEZ235 或 CCG168 ;以及

[0135] - 药学上可接受的载体或稀释剂;

- [0136] 用于治疗或预防神经变性疾病。
- [0137] 在一个实施方案中,提供了药物组合物,其包含:
- [0138] -90 至 110mg RAD001;
- [0139] -165 至 185mg BEZ235 或 CCG168;以及
- [0140] - 药学上可接受的载体或稀释剂;
- [0141] 用于治疗或预防神经变性疾病。
- [0142] 在一个实施方案中,提供了药物组合物,其包含:
- [0143] -80 至 120mg RAD001;
- [0144] -155 至 195mg BEZ235 或 CCG168;以及
- [0145] - 药学上可接受的载体或稀释剂;
- [0146] 用于治疗或预防神经变性疾病。
- [0147] 在一个实施方案中,提供了药物组合物,其包含:
- [0148] -70 至 130mg RAD001;
- [0149] -145 至 205mg BEZ235 或 CCG168;以及
- [0150] - 药学上可接受的载体或稀释剂;
- [0151] 用于治疗或预防神经变性疾病。
- [0152] 在一个实施方案中,提供了药物组合物,其包含:
- [0153] -60 至 140mg RAD001;
- [0154] -135 至 215mg BEZ235 或 CCG168;以及
- [0155] - 药学上可接受的载体或稀释剂;
- [0156] 用于治疗或预防神经变性疾病。
- [0157] 在一个实施方案中,提供了药物组合物,其包含:
- [0158] -50 至 150mg RAD001;
- [0159] -125 至 225mg BEZ235 或 CCG168;以及
- [0160] - 药学上可接受的载体或稀释剂;
- [0161] 用于治疗或预防神经变性疾病。
- [0162] 在一个实施方案中,提供了药物组合物,其包含:
- [0163] -50 至 200mg RAD001;
- [0164] -100 至 300mg BEZ235 或 CCG168;以及
- [0165] - 药学上可接受的载体或稀释剂;
- [0166] 用于治疗或预防神经变性疾病。
- [0167] 在一个实施方案中,提供了药物组合物,其包含:
- [0168] -25 至 175mg RAD001;
- [0169] -100 至 250mg BEZ235 或 CCG168;以及
- [0170] - 药学上可接受的载体或稀释剂;
- [0171] 用于治疗或预防神经变性疾病。
- [0172] 在一个实施方案中,提供了药物组合物,其包含:
- [0173] -1 至 200mg RAD001;
- [0174] -50 至 300mg BEZ235 或 CCG168;以及



- [0175] - 药学上可接受的载体或稀释剂；
- [0176] 用于治疗或预防神经变性疾病。
- [0177] 在一个实施方案中，提供了药物组合物，其包含：
- [0178] -1 至 300mg RAD001；
- [0179] -1 至 500mg BEZ235 或 CCG168；以及
- [0180] - 药学上可接受的载体或稀释剂；
- [0181] 用于治疗或预防神经变性疾病。
- [0182] 在一个实施方案中，提供了药物组合物，其包含：
- [0183] -1 至 500mg RAD001；
- [0184] -1 至 800mg BEZ235 或 CCG168；以及
- [0185] - 药学上可接受的载体或稀释剂；
- [0186] 用于治疗或预防神经变性疾病。
- [0187] 在本发明的一个优选的实施方案中，口服施用变构 mTOR 抑制剂和催化 mTOR 抑制剂。
- [0188] 在本发明的另一优选的实施方案中，神经变性疾病选自亨廷顿舞蹈病、帕金森病、脊髓小脑性共济失调 3 型、阿尔茨海默病、运动神经元病和周围神经病变。
- [0189] 在本发明的进一步的优选的实施方案中，神经变性疾病是亨廷顿舞蹈病。
- [0190] 如本文所使用，本发明上下文（尤其是权利要求的上下文）中使用的术语“一个”、“一种”、“所述”及类似术语解释为涵盖单数和复数，除非本文另外说明或上下文中明显矛盾。
- [0191] 如本文所使用，关于特定药物剂量的术语“约”应当具有在标称药物剂量的  $\pm 10\%$ ，优选  $\pm 5\%$ ，更优选  $\pm 2.5\%$ ，或更加优选  $\pm 1\%$  范围内的药物剂量的含义。作为实例，约 100mg 活性成分的标称药物剂量可含有 90 至 110mg，优选 95 至 105mg，更优选 97.5 至 102.5mg，或更加优选 99 至 101mg 活性成分 / 剂量。
- [0192] 如本文所使用，术语“变构 mTOR 抑制剂”是指通过结合于 mTORC1 复合体的变构结合位点如 FKBP12- 雷帕霉素结合位点 (FRB) 来靶向、降低或抑制 mTOR 激酶的活性 / 功能的化合物。变构 mTOR 抑制剂的实例包括西罗莫司（雷帕霉素，AY-22989）、RAD001、40-[3-羟基-2-(羟基甲基)-2-甲基丙酸酯]-雷帕霉素（也称为坦罗莫司或 CCI-779）以及 Deferolimus (AP-23573/MK-8669)。对本文任何特定变构 mTOR 抑制剂的称谓还包含其任何药学上可接受的盐、立体异构体、互变异构体、溶剂化物、水合物和多晶型物。可使用本领域技术人员熟知的标准酶动力学分析来评估特定物质是否是 mTOR 的变构抑制剂，Childs 等，(1976)，Fersth A. (1985) 和 Dixon M. 可使用以下描述的时间分辨荧光共振能量转移 (TR-FRET) 测定来评估特定物质是否通过结合于 mTORC1 复合体的 FRB 起变构抑制剂的作用。
- [0193] 如本文所使用，术语“BEZ235”还包含其任何药学上可接受的盐、立体异构体、互变异构体、溶剂化物、水合物和多晶型物。例如，在本发明的一个实施方案中，BEZ235 以其单甲苯磺酸盐形式提供。
- [0194] 如本文所使用，术语“催化 mTOR 抑制剂”是指通过结合于其 ATP 结合位点来靶向、降低或抑制 mTOR 的催化活性 / 功能的化合物。如本文所使用的术语“催化 mTOR 抑

制剂”包括双重催化 PI3K/mTOR 抑制剂和选择性催化 mTOR 抑制剂两者。催化 mTOR 抑制剂的实例包括 BEZ235、8-(6-甲氧基-吡啶-3-基)-3-甲基-1-(4-哌嗪-1-基-3-三氟甲基-苯基)-1,3-二氢-咪唑并[4,5-c]喹啉-2-酮 (WO2006/122806)、AZD-8055、Ku-0063794 (Garcia-Martinez 等, 2009) 和 WYE-354 (Yu 等, 2009)。本文对任何特定催化 mTOR 抑制剂的称谓还包含其任何药学上可接受的盐、立体异构体、互变异构体、溶剂化物、水合物和多晶型物。可使用本领域技术人员熟知的标准酶动力学分析来评估特定物质是否是 mTOR 的催化抑制剂, Childs 等, (1976), Fersth A. (1985) 和 Dixon M. (2000)。

[0195] 如本文所使用, 术语“CCG168”还包含其任何药学上可接受的盐、立体异构体、互变异构体、溶剂化物、水合物和多晶型物。

[0196] 如本文所使用, 术语“组合”是指可用于治疗或预防神经变性疾病如亨廷顿舞蹈病的变构 mTOR 抑制剂和催化 mTOR 抑制剂的任何组合。任何此类组合可同时或依次施用。术语“组合”还包括“组合产品”。

[0197] 如本文所使用, 术语“组合产品”是指包含变构 mTOR 抑制剂和催化 mTOR 抑制剂两者的任何产品, 例如组合的固定剂量药物组合物, 其包含变构 mTOR 抑制剂和催化 mTOR 抑制剂作为活性成分; 或包含适用于同时、分别或依次施用的形式的变构 mTOR 抑制剂和催化 mTOR 抑制剂的单独的或组合的制剂的试剂盒。组合的固定剂量药物组合物包含单个药物组合物中的变构 mTOR 抑制剂和催化 mTOR 抑制剂两者, 例如包含 RAD001 和 BEZ235 或 CCG168 的单个丸剂或片剂。

[0198] 如本文所使用, 如果此类对象可在生物学上、医学上或在生活质量上受益于此类治疗, 则对象“需要”治疗。

[0199] 如本文所使用, 术语“抑制”是指给定病状、症状或病症或疾病的减少或抑制, 或生物活性或过程的基线活性的显著降低。

[0200] 如本文所使用, 术语“mg/kg/天”是指 mg 化合物/kg 对象体重/天。

[0201] 如本文所使用, 术语“变构 mTOR 抑制剂和催化 mTOR 抑制剂的制剂”包括变构 mTOR 抑制剂和催化 mTOR 抑制剂的药物组合物。术语“变构 mTOR 抑制剂和催化 mTOR 抑制剂的单独的制剂”是指变构 mTOR 抑制剂和催化 mTOR 抑制剂的单独制剂, 而“变构 mTOR 抑制剂和催化 mTOR 抑制剂的组合的制剂”是指包含变构 mTOR 抑制剂和催化 mTOR 抑制剂两者的单个制剂, 例如包含变构 mTOR 抑制剂和催化 mTOR 抑制剂两者的组合的固定剂量药物组合物, 例如在单个丸剂或片剂中的 RAD001 和 BEZ235 或 CCG168。

[0202] 如本文所使用, 术语“药学上可接受的载体”包括任何和全部溶剂、分散介质、包衣、表面活性剂、抗氧化剂、防腐剂 (例如抗细菌剂、抗真菌剂)、等渗剂、吸收延迟剂、盐、防腐剂、药物稳定剂、粘合剂、赋形剂、崩解剂、润滑剂、甜味剂、调味剂、染料等及其组合, 如本领域技术人员所知 (参见例如 Remington's Pharmaceutical Sciences, 第 18 版 Mack Printing Company, 1990, 第 1289-1329 页)。除非任何常规载体与活性成分不相容, 预期将其用于治疗或药物组合物。

[0203] 如本文所使用, 术语任何特定疾病或病症的“预防”是指在该疾病或病症的任何症状变为明显之前向对象施用本发明化合物。

[0204] 如本文所使用, 术语“RAD001”还包含其任何药学上可接受的盐、立体异构体、互变异构体、溶剂化物、水合物和多晶型物。

[0205] 如本文所使用,术语“对象”是指动物。通常所述动物是哺乳动物。对象还指例如灵长类(例如人,男性或女性)、牛、绵羊、山羊、马、犬、猫、兔、大鼠、小鼠、鱼、鸟等。在某些实施方案中,对象是灵长类。在另外的其它实施方案中,对象是人。

[0206] 术语本发明化合物的“治疗有效量”是指将会引起对象的生物或医疗响应的本发明化合物的量,例如减少或抑制酶或蛋白活性,或缓和症状、缓解病状、减缓或延迟疾病进展,或预防疾病等。

[0207] 如本文所使用,在一个实施方案中,术语任何疾病或病症的“治疗/处理(treat/treating/treatment)”是指通过施用根据本发明的组合来改善对象中的疾病或病症(即减缓或阻止或减少疾病或至少其临床症状之一的发展)。在另一实施方案中,“治疗/处理”是指缓解或改善至少一个物理参数,包括患者可能无法识别的那些。在又一实施方案中,“治疗/处理”是指在物理上(例如可识别的症状的稳定)、生理上(例如物理参数的稳定)或两者来调节疾病或病症。

[0208] 本文描述的所有方法可以以任何合适的顺序进行,除非本文另外指出或与上下文明显矛盾。本文提供的任何和所有的实例或示例性语言(如“例如”)的使用仅仅意图更好地阐明本发明,并且不会对以其它方式要求保护的本发明范围构成限制。

[0209] 本发明组合的化合物可同时或依次被施用。本发明组合的化合物也可通过相同或不同施用途径分别施用,或在相同药物组合物中一起施用。

[0210] 本发明的试剂盒包含用于分别容纳变构 mTOR 抑制剂和催化 mTOR 抑制剂的单独或组合制剂的工具,如容器、分隔的瓶或分隔的箔包。此类试剂盒的实例是泡罩包装,如通常用于片剂、胶囊等的包装。

[0211] 本发明的试剂盒也可用于施用不同剂型,例如口服或胃肠外,用于在不同剂量间隔施用单独组合物,或用于对单独组合物彼此滴定。为支持依从性,本发明的试剂盒通常包含施用说明书。

[0212] 也可将本发明组合的变构 mTOR 抑制剂和催化 mTOR 抑制剂一起加入组合治疗:(i) 在组合产品放行至医生之前(例如在试剂盒的情况下);(ii) 由医生本人(或在医生指导下)在施用前不久;或(iii) 患者本人,例如在依次施用变构 mTOR 抑制剂和催化 mTOR 抑制剂期间。

[0213] 本发明的药物组合物可被配制用于特定施用途径,例如口服施用、胃肠外施用和直肠施用等。在本发明的一个优选的实施方案中,变构 mTOR 抑制剂和催化 mTOR 抑制剂经口服施用。此外,本发明的药物组合物可被制成固体形式(包括但不限于胶囊、片剂、丸剂、颗粒剂、散剂或栓剂),或液体形式(包括但不限于溶液、混悬剂或乳剂)。可对药物组合物进行常规药物操作如灭菌和/或所述药物组合物可含有常规惰性稀释剂、润滑剂或缓冲剂,以及佐剂如防腐剂、稳定剂、润湿剂、乳化剂和缓冲液等。

[0214] 通常,药物组合物为片剂或明胶胶囊,其包含活性成分以及

[0215] a) 稀释剂,例如乳糖、右旋糖、蔗糖、甘露醇、山梨醇、纤维素和/或甘氨酸;

[0216] b) 润滑剂,例如二氧化硅、滑石、硬脂酸、其镁或钙盐和/或聚乙二醇;对于片剂还有

[0217] c) 粘合剂,例如硅酸镁铝、淀粉糊、明胶、黄蓍胶、甲基纤维素、羧甲基纤维素钠和/或聚乙烯吡咯烷酮;如果需要

[0218] d) 崩解剂,例如淀粉、琼脂、藻酸或其钠盐,或泡腾剂混合物;和/或

[0219] e) 吸附剂、着色剂、调味剂和甜味剂。

[0220] 根据本领域已知的方法,片剂可以是薄膜包衣的或肠溶包衣的。

[0221] 用于口服施用的适合的组合物包括有效量的本发明化合物,其形式为片剂、锭剂,水性或油性混悬剂、可分散散剂或颗粒剂、乳剂、硬胶囊或软胶囊,或糖浆剂或酏剂。根据本领域已知的用于制备药物组合物的任何方法来制备预期用于口服用途的组合物,并且此类组合物可含有选自甜味剂、调味剂、着色剂和防腐剂的一种或多种试剂以便提供药学上优良且可口的制剂。片剂可含有与适用于制备片剂的无毒药学上可接受的赋形剂混合的活性成分。这些赋形剂是例如惰性稀释剂,例如碳酸钙、碳酸钠、乳糖、磷酸钙或磷酸钠;制粒和崩解剂,例如玉米淀粉或藻酸;粘合剂,例如淀粉、明胶或阿拉伯胶;以及润滑剂,例如硬脂酸镁、硬脂酸或滑石。片剂未包衣或通过已知技术包衣以延缓在胃肠道中的崩解和吸收,并因此在更长的时间内提供持久的作用。例如,可以采用延时材料如单硬脂酸甘油酯或甘油二硬脂酸酯。用于口服用途的制剂也可以硬明胶胶囊的形式存在,其中使活性成分与惰性固体稀释剂如碳酸钙、磷酸钙或高岭土混合;或以软明胶胶囊的形式存在,其中使活性成分与水或油介质如花生油、液体石蜡或橄榄油混合。

[0222] 单独的包含 BEZ235 的药物组合物也可作为用于口服施用的包含 5、25 或 100mg BEZ235 的硬明胶胶囊提供。赋形剂可以是:乳糖、交联聚维酮、聚乙烯吡咯烷酮 K30、淀粉、Aerosil 和硬脂酸镁。5 和 25mg 胶囊可使用 4 号大小的胶囊壳;100mg 胶囊可使用 1 号胶囊壳。

[0223] RAD001 是 FDA 批准的药物,因此包含 RAD001 的适合的单独药物组合物可商购获得。例如,RAD001 可以以用于口服施用的片剂形式施用,包含适合量的 RAD001 和丁基羟基甲苯(BHT)、硬脂酸镁、羟丙基甲基纤维素、交联聚维酮和乳糖作为赋形剂。RAD001 也可作为包含适合量的 RAD001 和 BHT、硬脂酸镁、羟丙基甲基纤维素、交联聚维酮、无水胶体二氧化硅和乳糖作为赋形剂的可分散片剂施用。

[0224] 某些可注射的组合物是水性等渗溶液或混悬剂,栓剂是由脂肪乳剂或混悬剂有利地制备。所述组合物可以是灭菌的和/或含有佐剂,例如防腐剂、稳定剂、润湿剂或乳化剂、增溶剂、用于调节渗透压的盐和/或缓冲液。此外,它们也可含有其它治疗学上有价值的物质。所述组合物分别是根据常规混合、制粒或包衣方法来制备,并且含有约 0.1-75% 或含有约 1-50% 的活性成分。

[0225] 用于透皮应用的适合组合物包括有效量的本发明化合物与适合的载体。适用于透皮递送的载体包括可吸收的药理学可接受的溶剂以辅助通过宿主皮肤。例如,透皮装置为绷带形式,其包括背衬膜、含有任选具有载体的化合物储库、任选的速率控制屏障以在受控的、预定速率下在延长的时期内递送化合物至宿主皮肤,以及将装置固定至皮肤的工具。

[0226] 适于局部应用于例如皮肤和眼睛的组合物包括水溶液、混悬液、软膏剂、乳膏剂、凝胶剂或可喷雾的制剂,例如用于通过气雾剂等来递送。此类局部递送系统将特别适合于真皮应用,例如用于皮肤癌的治疗,例如用于防晒霜、洗剂、喷雾剂等中的预防性用途。因此它们特别适于局部使用,包括化妆品,本领域熟知的制剂。此类可含有增溶剂、稳定剂、张力促进剂、缓冲液和防腐剂。

[0227] 如本文所使用,局部应用也可涉及吸入或鼻内应用。它们可以方便地以干粉(单

独,作为混合物,例如与乳糖的干混合物,或者例如与磷脂的混合成分微粒)的形式从干粉吸入器递送,或从加压容器、泵、喷雾、雾化器或喷雾器中以气雾剂喷雾呈递,使用或未使用适合的抛射剂。

[0228] 本发明进一步提供了包含变构 mTOR 抑制剂和催化 mTOR 抑制剂作为活性成分的无水药物组合物和剂型,因为水可促进某些化合物的降解。

[0229] 可使用无水或低含水量成分以及低水分或低湿度条件来制备本发明的无水药物组合物和剂型。可制备并贮藏无水药物组合物使得其保持无水性质。因此,使用已知防水的材料来包装无水组合物,使得它们可被包括在适合的配制试剂盒中。适合包装的实例包括但不限于气密密封的箔、塑料、单位剂量容器(例如小瓶)、泡罩包装和条状包装。

[0230] 本发明进一步提供了包含一种或多种试剂的药物组合物和剂型,所述试剂减少作为活性成分的本发明化合物的降解速率。在本文中,此类试剂是指“稳定剂”。

[0231] 本发明的药物组合物和组合的变构 mTOR 抑制剂和催化 mTOR 抑制剂的剂量取决于对象的物种、体重、年龄和个体状况,或所治疗疾病的严重性。普通技能的医生、临床医生或兽医可容易地确定预防、治疗或抑制疾病进展所必需的各活性成分的有效量。

[0232] 可有利地使用哺乳动物如小鼠、大鼠、犬、猴或分离器官、组织及其制备物在体外和体内测试中证明上述引用的剂量性质。本发明组合的化合物可以以溶液例如水溶液的形式在体外、和经肠、胃肠外、有利地静脉内例如作为混悬液或水溶液在体内应用。RAD001 的体外剂量浓度可在 1 至 500nM、100 至 350nM、200 至 200nM,或约 250nM 范围内,而 BEZ235 或 CCG168 的体外剂量浓度可在 1 至 200nM、1 至 100nM、25 至 75nM,或约 50nM 范围内。前文提供了体内剂量浓度。

## 实施例

[0233] **实施例 1**:RAD001 和 BEZ235 或 CCG168 的低剂量组合诱导 R6/2 脑切片中的自噬

[0234] 最近的研究已显示,自噬是 mHtt 积累的关键清除通路,并且 mTOR 通路的抑制足以诱导自噬。具体而言,mTOR 通路的抑制剂已显示在亨廷顿舞蹈病的不同的动物、细胞、苍蝇(fly)模型中诱导自噬、降低 mHtt 积累并且保护免受神经变性(Ravikumar 等,2004; Ravikumar 等,2006;Levine 等,2008;Sakar 等,2009)。为评估变构和催化 mTOR 抑制剂是否能诱导自噬和防止纹状体变性,使用 RAD001、BEZ235 和 CCG168(5-[2,4-双-((S)-3-甲基-吗啉-4-基)-吡啶并[2,3-d]嘧啶-7-基]-2-甲氧基-苯基)-甲醇)从 DIV14 至 DIV21 处理 R6/2 切片,并分析在 DIV21 时的 mTOR 活性和 LC3-II/I 转化(图 1)。300nM BEZ235 和 300nM CCG168 诱导了自噬,而 250nM RAD001 和 50nM BEZ235 没有作用。有趣的是,与 250nM RAD001 和 250nM RAD001/50nM BEZ235 相反,50nM BEZ235 没有减少 p-S6S240/244 的水平。令人惊讶地,与 250nM RAD001 和 50nM BEZ235 单个浓度相比,250nM RAD001/50nM BEZ235 和 250nM RAD001/50nM CCG168 的组合物足以诱导自噬,这表明 BEZ235 和 CCG168 与 RAD001 在增加 LC3-II 水平方面协同地作用(图 1)。

[0235] **实施例 2**:RAD001 和 BEZ235 或 CCG168 的低剂量组合减少 R6/2 脑切片中的 polyQ 包涵体

[0236] 为研究 RAD001/BEZ235 的组合是否能在减少 polyQ 包涵体方面协同作用,通过对比 R6/2 切片中 PolyQ 包涵体和细胞核的免疫组织化学检测来测量在 DIV21 时处理的 R6/2

切片的 polyQ 密度。与对照 R6/2 相比,用 250nM RAD001 或 50nM BEZ235 处理的切片表现出类似的 polyQ 分布,而 RAD001/BEZ235 的组合物和 RAD001/CCG168 的组合减少了 polyQ 密度。观察到单个低浓度的 RAD001 和 BEZ235 没有减少 polyQ 包涵体,而组合具有显著作用,并且与 R6/2 切片相比减少了 polyQ 密度的  $40\% \pm 11$ 。此外,有效单个浓度的 300nM BEZ235 导致类似的降低,这表明 BEZ235 以及 RAD001 在减少 polyQ 密度方面协同地作用(图 2)。

[0237] 实施例 3:RAD001 和 BEZ235 或 CCG168 的低剂量组合预防 R6/2 脑切片中的纹状体变性

[0238] HD 进展的特征在于逐渐损失纹状体 DARPP-32 和轴突变性(The Huntington's Disease Collaborative Research Group,1993;Davies 等,1997;Bibb 等,2000;Luthi-Carter 等,2000)。在 R6/2 切片中,监测到在 DIV21 开始的纹状体 DARPP-32 和神经丝的逐渐损失。因此,为评估 RAD001/BEZ235 的组合是否能协同地防止进行中纹状体变性,通过 WT 和 R6/2 切片中 DARPP-32 和神经丝的免疫组织化学检测来分析在 DIV21 时 DARPP-32 和神经丝染色。RAD001 和 BEZ235 的单个低浓度在保持 DARPP-32 和神经丝水平方面无效。然而,组合保持了神经丝水平的  $95\% \pm 12$  和 DARPP-32 水平的  $80\% \pm 5$ 。250nM RAD001/30nM BEZ235 是最低有效组合浓度(图 3 和 4)。250nM RAD001 和 50nM CCG168 的组合在保持 DARPP-32 和神经丝水平方面同样有效。

[0239] 结论

[0240] 这些结果共同表明,变构 mTOR 抑制剂和催化 mTOR 抑制剂的组合,例如 RAD001/BEZ235 或 CCG168,协同地作用以诱导自噬、减少 polyQ 包涵体并防止纹状体变性,并且令人惊讶地,与单独的催化 mTOR 抑制剂相比,允许在较低浓度下获得功效,例如与 300nM BEZ235 相比低 10 倍的浓度。因此,变构 mTOR 抑制剂和催化 mTOR 抑制剂的低剂量组合代表了用减少的药物暴露来治愈由易聚合蛋白引起的 HD 和其它神经变性疾病的可能性。

[0241] 实验方案

[0242] 使用以下实验方案来进行上述实施例 1 至 3

[0243] 小鼠和切片培养物

[0244] 将表达人亨廷顿外显子-1Q200 的转基因小鼠(Davies 等 1997 中描述的 R6/2 小鼠模型)在温度-控制室中饲养,并维持 12 小时光照/黑暗循环。自由进食和饮水,并根据实验动物护理与使用的地方授权指南进行实验。根据 Stoppini 和同事(Stoppini 等,1991 和 Gogolla 等,2006)描述的方法来建立切片培养物,并采用特定切割角来产生具有保存的皮质-纹状体通路的脑切片。最后,选择切片,置于 Millicel(Millipore,PICM03050)并在 6-孔培养皿中、在  $35^{\circ}\text{C}$  和  $5\%\text{CO}_2$  下、在 1ml 培养基存在下培养。

[0245] 用 mTOR 抑制剂处理

[0246] 从 DIV14 至 DIV21 用不同 mTOR 抑制剂处理切片。每两天更换培养基,并向新鲜培养基中加入药物。我们使用这一方案来评估以下 mTOR 抑制剂的作用:BEZ235(在 DMSO 中 50 和 300nM),RAD001(在 DMSO 中 250nM)、CCG168(在 DMSO 中 300nM)、RAD001+BEZ235(在 DMSO 中 25010、25030 和 25050nM)和 RAD001+CCG168(在 DMSO 中 250 和 50nM)。

[0247] 生物化学

[0248] 在 PBS 中洗涤切片并在含有 Complete Mini(Roche,04693124001)和 PhosSTOP(Roche,04906837001)的  $1\%\text{Triton X-100/PBS}$  中裂解。将裂解物超声处理并通过

蛋白质印迹进行 B- 肌动蛋白 (Sigma, A5441)、pS6Ser240/244 (Cell Signalling, 2215) 和 LC3B (Cell Signalling, 2775) 分析。用 ECL 检测试剂 (Amersham Biosciences) 显影免疫印迹。

[0249] 免疫组织化学

[0250] 将切片在 4%PFA 中固定 10 分钟,在 PBS 中洗涤并在室温在 0.3%Triton X-100/20% 马血清 /PBS (封闭液) 中阻断 4 小时。将 DARPP-32 (Cell Signaling, 2306S, 1:200)、神经丝 (NeuF, Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa; 2H3, 1:200) 和 EM48 (Millipore, MAB5374, 1:200) 的抗体在 4°C 在封闭液中孵育 48 小时。然后,将切片在 PBS 中洗涤,在 0.3%Triton X-100/PBS 中与缀合有 Alexa488 (Invitrogen, 1:500) 和 Alexa555 (Invitrogen, 1:500) 的第二抗体孵育 2 小时。最后,在 PBS 中洗涤切片,用 DAPI (Invitrogen, D13061:10000) 孵育 10 分钟并使用 ProLong (Invitrogen, P36934) 包埋于玻璃培养皿。

[0251] 显微镜检查和定量

[0252] 在正置 Zeiss LSM700 共焦显微镜上,使用 Plan-Neofluar40x/1.3 油浸物镜来获得高分辨率图像。为定量 PolyQ 密度和 DARPP-32/NeuF 信号强度,在用于每次实验的纹状体中获得至少三个共焦 3D 堆叠 / 切片 (5 个切片 / 病状),并使用 Imaris4.2 (Bitplane AG) 和 Image J 软件进行分析。

[0253] 统计学分析

[0254] 所有数据均表示为平均值  $\pm$  SEM。通过分析方差 (ANOVA),接着进行 Student t 检验来实施统计学分析 (Excel, Microsoft, USA)。将显著水平设定为  $p < 0.05$ 。

[0255] 通过 TR-FRET 的 mTOR 测定

[0256] 试剂和仪器:TR-FRET mTOR 结合测定组分可购自 Invitrogen Corporation (Carlsbad/CA, USA):GFP-FKBP12 (样品 691-145-3B, 47  $\mu$ M, MW = 38KDa)、Tb<sup>3+</sup>- $\alpha$ -GST 抗体 (目录号 PV4216)、专有 TR-FRET 稀释缓冲液 (目录号 PV3574)、GFP-4EBP1 (目录号 PV4759)。DMSO (Fluka, 目录号 41644)。可使用来自 Biotek Instruments, Winooski, Vermont (获自 Witec, Switzerland) 的 Synergy2 微板读数仪,其具有以下设置:检测方法为时间分辨荧光法,光源为氙气闪光灯,读取类型为终点,读取速度为正常,平板移动后延迟为 100 毫秒,收集数据前延迟为 100  $\mu$ s,测量 / 数据点为 10,数据收集时间为 200  $\mu$ s,灵敏度为自动,激发滤光片为 340/30,发射滤光片为 520/25 和 495/10。

[0257] 用于 TR-FRET mTOR 结合测定的 384- 孔黑色未结合聚苯乙烯平板可获自 Corning (低容量,圆底,目录号 NBS#3676)。

[0258] 样品抑制剂化合物新鲜制备为 DMSO 中的 10mM 溶液。

[0259] 首先将来自 10mM 贮备液的化合物稀释于 DMSO 中,然后稀释于 TR-FRET 缓冲液中。

[0260] 测定平板:将化合物直接稀释于 384- 孔测定平板,并将 DMSO 最终浓度恒定保持在 1%。将化合物稀释液与 10  $\mu$ L GFP-FKBP-12、Tb<sup>3+</sup>- $\alpha$ -GST 抗体和 GST-mTOR 混合。测定平板中的最终体积为 20  $\mu$ L。

[0261] 原理:时间分辨荧光共振能量转移 (TR-FRET) 是基于两个相邻染料之间的能量转移的技术,其通过共振从一个染料中的激发电子 (供体) 向相邻染料的电子 (受体) 转移,然后作为光子释放。通过受体的荧光发射增加,以及供体的荧光发射降低来检测该能量转

移。

[0262] TR-FRET 测定使用长寿命镧系元素螯合物或穴状化合物作为供体种类,通过引入由闪光灯激发源激发后的延迟,克服了来自化合物自体荧光的干扰或来自沉淀化合物的光散射。结果通常表示为受体和供体荧光团强度的比例 (520nm/495nm)。此类数值的比率性质对孔间测定体积的差值进行校正,以及对着色化合物引起的猝灭作用进行校正。

[0263] 通过 TR-FRET 的 mTOR 结合测定:将 10  $\mu$  L 抑制剂化合物稀释液与 10  $\mu$  L GFP-FKBP12、Tb<sup>3+</sup>- $\alpha$ -GST 抗体和 GST-mTOR 在 TR-FRET 缓冲液中混合并在室温避光孵育 60 分钟,然后读数。在 Synergy2 读取仪中使用 200  $\mu$  s 的积分时间和 100  $\mu$  s 的延迟来读取平板。实施以下对照以给出基本信号,包括含有 2%DMSO (不含化合物) 的测定、不含 GST-mTOR 的测定、含有 GFP-4EBP1 (不含 GFP-FKBP12) 的测定。

[0264] 当与结合于 mTORC1 复合体的 FRB 的变构 mTOR 抑制剂如雷帕霉素复合时, GFP-FKBP12 结合于 mTOR。mTOR 结合测定使用标记有 Tb<sup>3+</sup> 的特异性抗 -GST-Ab, 其可识别 GST 标记的 mTOR。TR-FRET 测定使用该长寿命 Tb<sup>3+</sup> 螯合物作为供体种类以转移能量至 GFP-FKBP12, 这导致分别为 520nm 和 495nm 的受体和供体发射。结果均表示为受体与供体荧光团的强度比例。

[0265] EC<sub>50</sub> 的测定:通过将 S 形剂量反应曲线 (可变斜率) 拟合于测定读出对比抑制剂浓度的图, 可得到各潜在变构 mTOR 抑制剂化合物的抑制 % 的 EC<sub>50</sub> 值。

[0266] 人 GST-mTOR 和 GFP-FKBP12 的表达和纯化

[0267] 人 TOR UniProtKB/Swiss-Prot :P42345 ;NCBI/Protein Database :NP002638

[0268] FKBP12 UniProtKB/Swiss-Prot :P62942

[0269] 4-EBP1 UniProtKB/Swiss-Prot :Q13541

[0270] GST-mTOR (1360-2549):N 末端标记的 GST-mTOR 和 GFP-FKBP12 购自 Invitrogen。重组人 N- 末端截短的 (氨基酸 1360-2549)GST- 标记的 mTOR 在昆虫细胞中表达并且获自 Invitrogen (PV4753, MW = 163.9kDa)。

[0271] His-GFP-FKBP12:GFP-FKBP12 也获自 Invitrogen (样品 691-145-3B, 47  $\mu$  M, MW = 43kDa)。

[0272] His-GFP-4-EBP1:GFP-4-EBP1 也由 Invitrogen 获得 (目录号 PV4759, MW = 45kDa)。

[0273] 参考文献

[0274] Bibb JA, Yan Z, Svenningsson P, Snyder GL, Pieribone VA, Horiuchi A, Nairin AC, Messers A 和 Greengard P. (2000). Severe deficiencies in dopamine signaling in presymptomatic Huntington's disease mice. PNAS97 : (12)6809-6814.

[0275] Chresta CM, Davies BR, Hickson I, Harding T, Cosulich S, Critchlow SE, Vincent JP, Ellston R, Jones D, Sini P, James D, Howard Z, Dudley P, Hughes G, Smith L, Maguire S, Hummersone M, Malagu K, Menear K, Jenkins R, Jacobsen M, Smith GCM, Guichard S 和 Pass M. (2010). AZD8055 Is a Potent, Selective, and Orally Bioavailable ATP-Competitive Mammalian Target of Rapamycin Kinase Inhibitor with In vitro and In vivo Antitumor Activity. Cancer Research70 (1), 288-298.

[0276] Davies SW, Turmaine M, Cozens BA, DiFiglia M, Sharp AH, Ross CA, Scherzinger



E, Wanker EE, Mangiarini L 和 Bates GP. (1997). Formation of neuronal intranuclear inclusions underlies the neurological dysfunction in mice transgenic for the HD mutation. *Cell* 90 :537-48.

[0277] Galimberti I, Bednarek E, Donato F 和 Caroni P (2010). EphA4 signaling in juveniles establishes topographic specificity of structural plasticity in the Hippocampus. *Neuron*. 65, 627-642.

[0278] Galimberti I, Gogolla N, Alberi S, Santos AF, Muller D 和 Caroni P (2006). Long-term rearrangements of hippocampal mossy fiber terminal connectivity in the adult regulated by experience. *Neuron*. 50, 749-763.

[0279] Garcia-Martinez JM, Moran J, Clarke RG, Gray A, Cosulich SC, Chresta CM 和 Alessi DR (2009). Ku-0063794 is a specific inhibitor of the mammalian target of rapamycin (mTOR). *Biochem J.* 421(1), 29-42.

[0280] Gogolla N, Galimberti I, DePaola V 和 Caroni P (2006a). Preparation of organotypic hippocampal slice cultures for long-term live imaging. *Nat. Protoc.* 1, 1165-1171.

[0281] Hara T, Nakamura K, Matsui M, Yamamoto A, Nakahara Y, Suzuki-Migishima R, Yokoyama M, Mishima K, Saito I, Okano H, Mizushima N (2006). Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature*. 441, 885-9.

[0282] Levine B 和 Kroemer G (2008). Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* 132, 27-42.

[0283] Luthi-Carter R, A Strand, NL Peters, SM Solano, ZR Hollingsworth, AS Menon, AS Frey, BS Spektor, EB Penney, GS chilling, CA Ross, DR Borchelt, SJ Tapscott, AB Young, JH Cha 和 JM Olson (2000). Decreased expression of striatal signaling genes in a mouse model of Huntington's disease. *Hum. Mol. Genet.* 9, 1259-1271.

[0284] Ravikumar B, Vacher C, Berger Z, Davies J. E, Luo S, Oroz, L. G, Scaravilli F, Easton D. F, Duden R, O' Kane C. J 和 Rubinsztein D. C (2004). Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease. *Nat. Genet.* 36, 585-595.

[0285] Ravikumar B 和 D. C. Rubinsztein (2006). Role of autophagy in the clearance of mutant huntingtin : a step towards therapy ? *Mol. Aspects Med.* 27, 520-527.

[0286] Rubinsztein DC, Gestwicki JE, Murphy LO, Klionsky DJ (2007). Potential therapeutic applications of autophagy. *Nat Rev Drug Discov.* 6, 304-12.

[0287] Sarkar S, Ravikumar B, Rubinsztein DC (2009). Autophagic clearance of aggregate-prone proteins associated with neurodegeneration. *Methods Enzymol.* 453, 83-110.

[0288] Sarkar S, Rubinsztein DC (2008). Huntington's disease : degradation of mutant huntingtin by autophagy. *FEBS J.* 275, 4263-70.

- [0289] Serra V, Markman B, Scaltriti M, Eichhorn P, Valero V, Guzman M, Botero ML, Llonch E, Atzori F, Di Cosimo S, Maira M, Garcia-Echeverria C, Parra JL, Arribas J, Baselga J (2008). NVP-BEZ235, a dual PI3K/mTOR inhibitor, prevents PI3K signaling and inhibits the growth of cancer cells with activating PI3K mutations. *Cancer Res.* 68(19), 8022-8030.
- [0290] Stoppini L, Buchs PA 和 Muller D (1991). A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *J. Neurosci. Methods.* 37, 173-182.
- [0291] The Huntington's Disease Collaborative Research Group (1993). A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell.* 72, 971-983.
- [0292] Tsvetkov AS, Miller J, Arrasate M, Wong JS, Pleiss MA, Finkbeiner S (2010). A small-molecule scaffold induces autophagy in primary neurons and protects against toxicity in a Huntington disease model. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107, 16982-16987.
- [0293] Yu K, Toral-Barza L, Shi C, Zhang WG, Lucas J, Shor B, Kim J, Veheijen J, Curran K, Malwitz DJ, Cole DC, Ellingboe J, Ayral-Kaloustian S, Mansour TS, Gibbons JJ, Abraham RT, Nowak P 和 Zask A (2009). Biochemical, Cellular, and In vivo Activity of Novel ATP-Competitive and Selective Inhibitors of the Mammalian Target of Rapamycin. *Cancer Res.* 69(15) :6232-6240.
- [0294] Yu L, McPhee CK, Zheng L, Mardones GA, Rong Y, Peng J, Mi N, Zhao Y, Liu Z, Wan F, Hailey DW, Oorschot V, Klumperman J, Baehrecke EH, Lenardo MJ. (2010). Termination of autophagy and reformation of lysosomes regulated by mTOR. *Nature.* 465, 942-6.

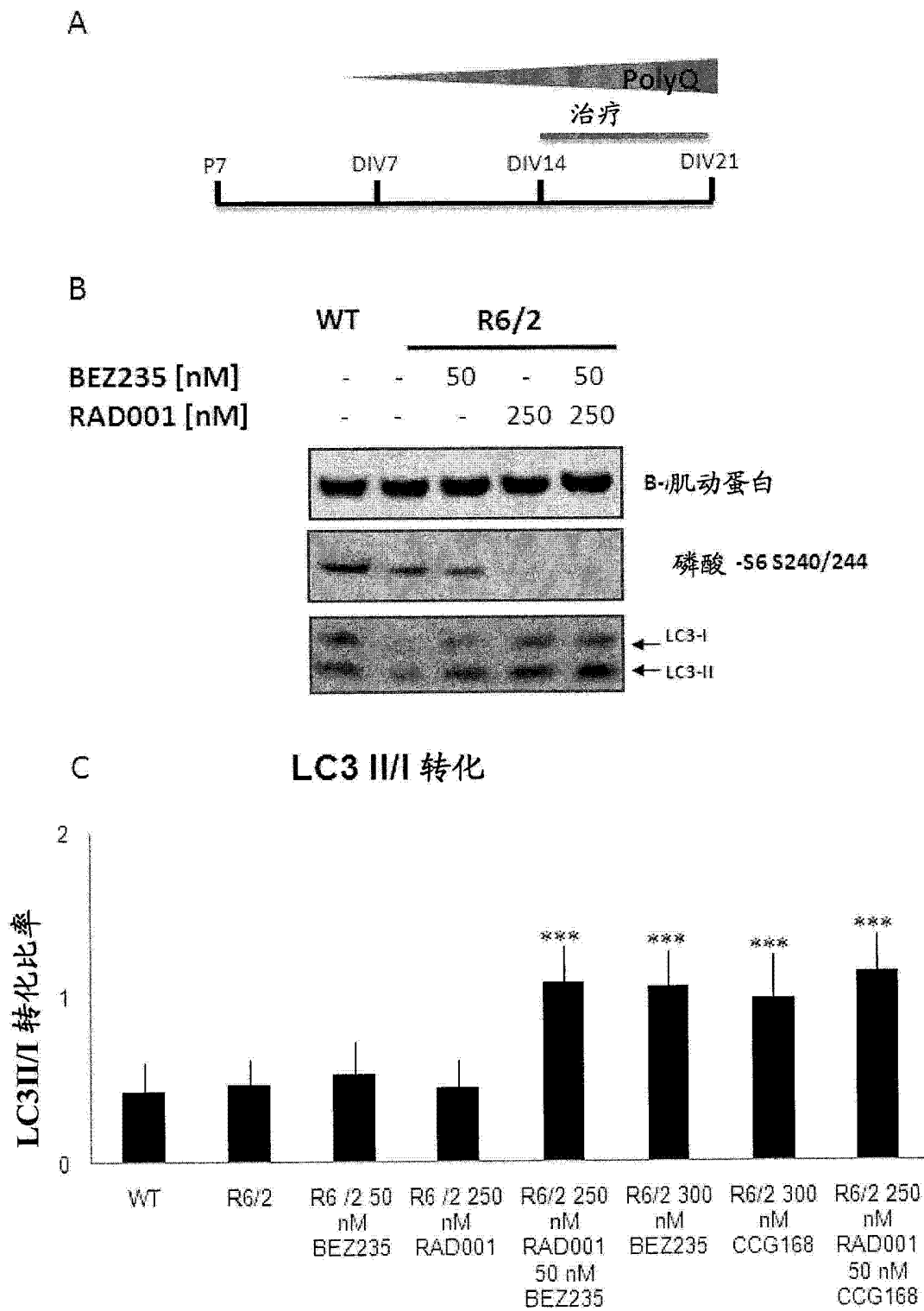


图1:RAD001/BEZ235 或 CCG168 组合诱导 R6/2 脑切片中的自噬。

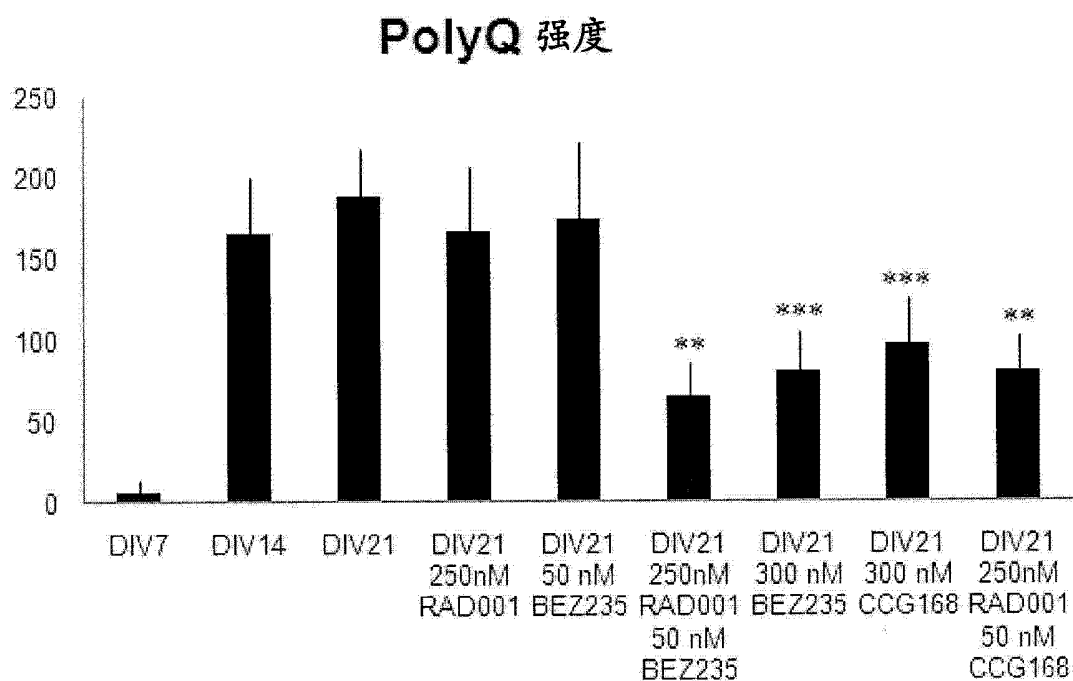


图 2: RAD001/BEZ235 或 CCG168 组合减少 R6/2 脑切片中的 polyQ 包涵体。  
在 DIV21 时的 DARPP-32

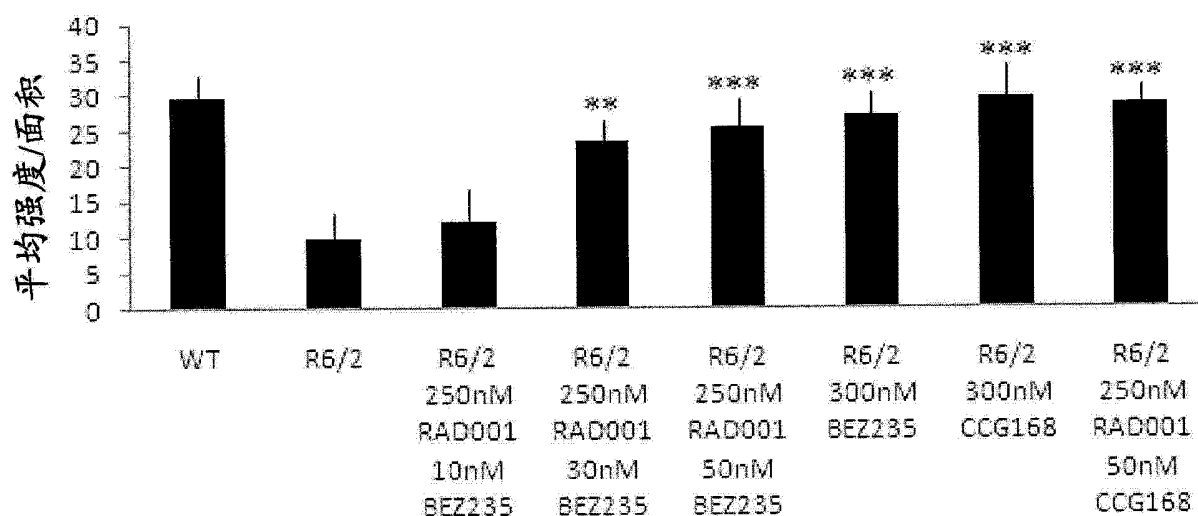


图 3: RAD001/BEZ235 或 CCG168 组合防止 R6/2 脑切片中的纹状体变性, 如通过在 DIV21 时 DARPP-32 强度的定量分析所评估。

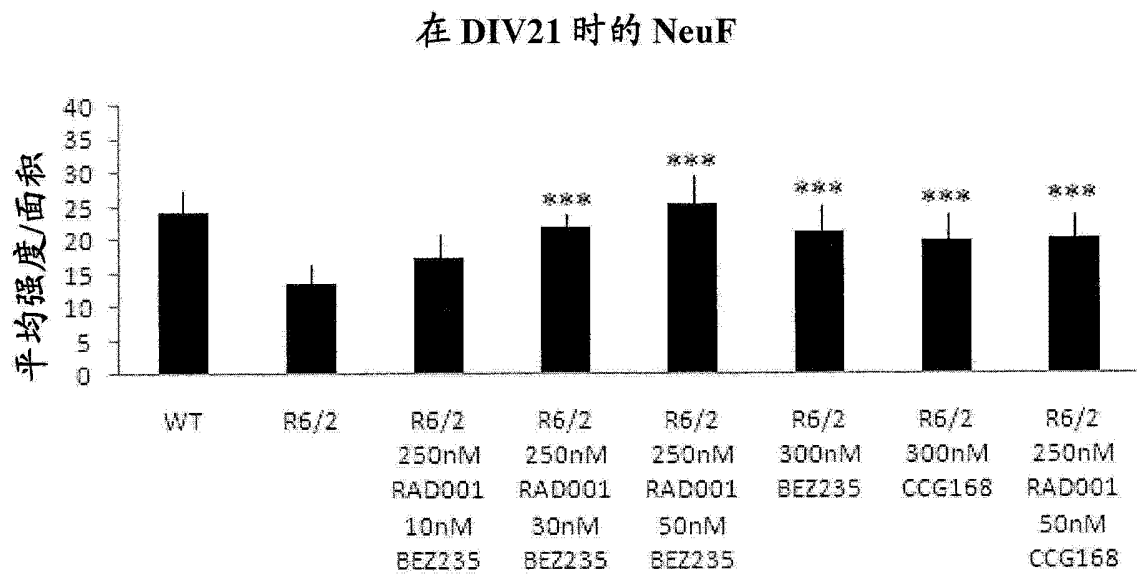


图 4: RAD001/BEZ235 或 CCG168 组合防止 R6/2 脑切片中的纹状体变性, 如通过在 DIV21 时神经丝强度的定量分析所评估。