(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0024175
(43) 공개일자 2024년02월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/47 (2006.01) *A61K 31/4184* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/47 (2013.01)
A61K 31/4184 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2024-7000745
(22) 출원일자(국제) 2022년06월09일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2024년01월08일
(86) 국제출원번호 PCT/GB2022/051442
(87) 국제공개번호 WO 2022/258972
국제공개일자 2022년12월15일
(30) 우선권주장
2108224.3 2021년06월09일 영국(GB)

(71) 출원인
힐렉스 엘티디
영국, 캠브릿지 캠브릿지 캠브릿지셔 씨비2 1엘에이, 힐스 로드 66-68, 차터 하우스
(72) 발명자
브라운, 데이빗
영국, 캠브릿지 캠브릿지 캠브릿지셔 씨비2 1엘에이, 힐스 로드 66-68, 차터 하우스, 힐렉스 엘티디
(74) 대리인
특허법인(유한) 대아

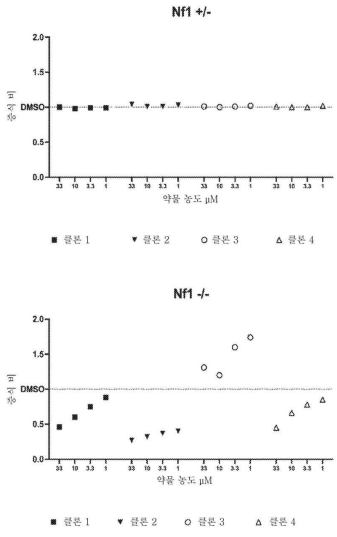
전체 청구항 수 : 총 21 항

(54) 발명의 명칭 **피부 신경섬유종의 치료에 사용하기 위한 니트록솔린**

(57) 요 약

본 발명은, 피부 신경섬유종의 치료 또는 예방에 사용하기 위한, 니트록솔린 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 포함하는 조성물에 관한 것이다.

대 표 도 - 도2



(52) CPC특허분류
A61P 35/00 (2018.01)
A61K 2300/00 (2023.05)

명 세 서

청구범위

청구항 1

피부 신경섬유종의 치료 또는 예방에 사용하기 위한, 니트록솔린 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 포함하는, 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 피부 신경섬유종의 치료에 사용하기 위한, 조성물.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 치료 또는 예방의 대상은 신경섬유종증 1형을 갖는, 조성물.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 치료 또는 예방의 대상은 인간인, 조성물.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 조성물은, 니트록솔린의 30 mg 내지 600 mg, 바람직하게는 50 mg 내지 500 mg, 보다 바람직하게는 100 mg 내지 400 mg, 보다 더 바람직하게는 150 mg 내지 350 mg, 가장 바람직하게는 200 mg 내지 300 mg을 포함하는, 조성물.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 투여량이 하루 2회 투여되는, 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서, 투여량은 니트록솔린의 45 mg 내지 900 mg, 바람직하게는 75 mg 내지 750 mg, 보다 바람직하게는 150 mg 내지 600 mg, 보다 더 바람직하게는 225 mg 내지 525 mg, 가장 바람직하게는 300 mg 내지 450 mg인, 조성물.

청구항 8

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 투여량은 하루 3회 투여되는, 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서, 투여량은 니트록솔린의 30 mg 내지 600 mg, 바람직하게는 50 mg 내지 500 mg, 보다 바람직하게는 100 mg 내지 400 mg, 보다 더 바람직하게는 150 mg 내지 350 mg, 가장 바람직하게는 200 mg 내지 300 mg인, 조성물.

청구항 10

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 투여량은 하루 4회 투여되는, 조성물.

청구항 11

제10항에 있어서, 투여량은 니트록솔린의 15 mg 내지 500 mg, 바람직하게는 50 mg 내지 400 mg, 보다 바람직하게는 100 mg 내지 300 mg, 보다 더 바람직하게는 125 mg 내지 225 mg, 가장 바람직하게는 150 mg 내지 200 mg인, 조성물.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 경구로 또는 정맥으로 투여되는, 조성물.

청구항 13

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 비경구, 경피, 설하, 직장, 또는 흡입 투여에 의해 투여되는, 조성물.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 니트록솔린 또는 약학적으로 허용되는 염이 조성물의 유일한 활성 성분인, 조성물.

청구항 15

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 조성물은 셀루메티닙 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 추가로 포함하는, 조성물.

청구항 16

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 셀루메티닙 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 포함하는 제2 조성물과 조합하여 사용되며, 두 개의 조성물은 대상에게 동시에, 개별적으로, 또는 순차적으로 투여되는, 조성물.

청구항 17

제15항 또는 제16항에 있어서, 셀루메티닙의 양은 1 mg 내지 75 mg, 바람직하게는 5 mg 내지 50 mg, 보다 바람직하게는 10 mg 내지 35 mg, 가장 바람직하게는 15 mg 내지 30 mg인, 조성물.

청구항 18

피부 신경섬유종의 치료 또는 예방에 사용하기 위한 약제의 제조를 위한 니트록솔린 또는 이의 약학적으로 허용되는 염의 용도.

청구항 19

제18항에 있어서, 제2항 내지 제17항의 추가 특징부 중 임의의 것을 갖는 용도.

청구항 20

니트록솔린 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 포함하는 조성물을 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 피부 신경섬유종을 치료 또는 예방하는 방법.

청구항 21

제20항에 있어서, 제2항 내지 제17항의 추가 특징부 중 임의의 것을 갖는, 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 니트록솔린의 새로운 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 신경섬유종은 말초신경계에서 발생하는 양성 신경초 종양이다. 사례의 90%의 경우, 단독 종양으로서 발견되는 반면, 나머지는 상염색체-우성 유전 질환인 신경섬유종증 1형(NF1) 환자에게서 발견된다. 신경섬유종은 신체적 기형과 통증 내지 인지 장애에 이르기까지 다양한 증상을 유발할 수 있으며 악성 종양으로 변할 수 있다.

[0003] 피부의(또는 진피) 신경섬유종(cNF)은 피부의 신경에서 발생하며 통상적으로 단일 말초 신경에 연관된다. 모든 신경섬유종은 NF1 돌연변이 슈반 세포(SC)와 축삭, 섬유아세포, 비만세포, 대식세포 및 내피세포와 같은 기타 신경 섬유 요소의 혼합물로 구성된다. 세 가지 종류의 cNF가 구별되는데, 1) 별개의 cNF; 살이 많고 부드럽지

않으며 크기가 다양할 수 있는 피부 상의 고착성 또는 유두상 종괴, 2) 별개의 하위 cNF; 아래에 누워 피부에 돌기처럼 보임(때때로 따가울 수 있음), 및 3) 심부 결절성 신경섬유종; 진피 아래의 조직과 기관을 침범하지만, 그 외에는 피부 및 피하 신경섬유종과 유사하다.

[0004] NF1은 뉴로파이브로민 단백질을 암호화하는 NF1 종양 억제 유전자의 생식선 돌연변이로 인해 발생한다. 뉴로파이브로민은, GTPase-활성화(GAP) 단백질로서 기능하며, 활성 GTP-결합 형태를 비활성 GDP-결합 형태로 전환함으로써 세포내 신호 전달 단백질 Ras를 비활성화한다. 이는 결국 Ras 활성의 하향 조절로 이어진다. 뉴로파이브로민 활성의 손실은 Ras 활성을 증가시키며, 이는 다시 세포 성장과 증식에 필요한 다수의 유전자의 전사를 촉진한다. 피부 신경섬유종은 NF1 환자의 적어도 99%에서 나타나며, 진피의 슈반 세포 계통으로부터 유래한다.

[0005] cNF는 통상적으로 사춘기에 나타나며, 평생 동안 그 수가 증가하는 경향이 있어, 수천 개에 이를 수 있다. 이러한 종양은, 양성이지만, 모양이 좋지 않고 종종 가려움증과 통증을 유발하여, 삶의 질에 심각한 영향을 미친다.

[0006] 또한, 피부 신경섬유종을 치료하기 위한 약리학적 표적을 식별하려는 상당한 노력이 있어왔다. 특히, 피부 신경섬유종은 용도 변경 노력과 개발 중인 약물의 재배치의 빈번한 표적이 되어 왔다. 이 작업에는 다양한 표준과 방법이 적용되어 왔다. 많은 경우, 용도 변경 후보는 주로 임상 패턴 일치에 기초하여 식별된 한편, 다른 경우에는 기본적인 질병 메커니즘을 광범위하게 연구하여 치료 표적을 식별한 후 철저한 전임상 검증을 거쳤다.

[0007] 현재, cNF에 대해 승인된 약물은 없다. 물리적인 제거는 cNF를 치료하는 가장 효과적인 방법으로 남아 있으며, 즉, CO_2 레이저를 이용한 외과적 절제 또는 파괴, 전기박막술, 절제가 있다. 제거에 있어서 직면하고 있는 과제는 불완전한 절제로 인한 종영 재성장, 심각한 흉터 남기, 및 비용 부담을 포함한다. 신경섬유종증 1형 및 피부 신경섬유종의 환자 치료에 있어서 셀루메티닙에 대한 파일럿 2상 시험 연구가 진행 중이다. 그러나, 이것이 얼마나 성공적일지는 현재로서는 불분명하다. 셀루메티닙은, 미토겐-활성화된 단백질 키나제 키나제(MAPK 키나제, MEK, MAP2K 및 MAPKK)의 선택적 억제제이며, 6-(4-bromo-2-chloroanilino)-7-fluoro-N-(2-hydroxyethoxy)-3-methylbenzimidazole-5-carboxamide라는 전신 명칭을 갖는다.

[0008] 전반적으로, 피부 신경섬유종을 치료하려는 노력은 몇 가지 흥미로운 가능성을 이루었지만, 많은 노력에도 불구하고, 확실한 성공은 없었다. 이는 새로운 치료법의 필요성을 강조하였다.

[0009] 니트록솔린은 인간에게 항생제로서 사용되며, 널리 사용되지는 않지만, 1960년대부터 시판되었다. 이것은 요로 감염과 같은 생물막 감염의 치료 또는 예방에 사용된다. 이것은 생물막을 파괴하는 데 특히 효과적이며 이러한 작용을 담당하는 것으로 여겨지는 것은 금속 양이온 킬레이트화 속성이다. 니트록솔린은 간에서 해당 황산염 및 글루쿠로니드 대사물로 대사된다. 대사산물이 모두 항균 활성을 공유한다는 증거가 있다. 또한, 이것은 항증식 작용을 통해 항암 환경에서도 사용되었다. 니트록솔린의 전신 명칭은 5-nitroquinolin-8-ol이다.

발명의 내용

[0010] 본 발명은 피부 신경섬유종의 치료 또는 예방에 사용하기 위한 니트록솔린 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 포함하는 조성물이다. 아래에 제시된 시험관내 데이터에서 명백하듯이, 니트록솔린은 피부 신경섬유종의 치료 및 예방에 효과적이다.

[0011] 본 발명의 제1 양태는 피부 신경섬유종의 치료 또는 예방에 사용하기 위한 니트록솔린 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 포함하는 조성물이다.

[0012] 본 발명의 제2 양태는 피부 신경섬유종의 치료 또는 예방에 사용하기 위한 약제의 제조를 위한 니트록솔린 또는 이의 약학적으로 허용되는 염의 용도이다.

[0013] 본 발명의 제3 양태는 니트록솔린 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 포함하는 조성물을 환자에게 투여하는 단계를 포함하는 피부 신경섬유종을 치료 또는 예방하는 방법을 제공한다.

도면의 간단한 설명

[0014] 도 1은 시험관내 연구를 위한 부동 구체 배양물의 준비 및 통과를 도시한다.

도 2는 Tom+ NF1+/- 및 Tom+ NF1-/- 세포의 증식에서 니트록솔린의 용량 반응 효과를 도시한다.

도 3은 Tom+ NF1+/- 및 Tom+ NF1-/- 세포의 세포 사멸을 유도하는 니트록솔린의 용량 반응 효과를 도시한다.

도 4는 저전력(5x) 배율을 사용하는 마우스 피부의 형광 cNF 종양 세포를 도시한다. A-D: 매개체 치료 1개월 후

마우스 두 마리의 Tom+ 세포의 대표적인 화상이고, E-H: 니트록솔린 치료 1개월 후의 마우스 두 마리의 Tom+ 세포의 대표적인 화상이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015] 본 발명에서, 그리고 하기 생체외 및 생체내 데이터에 의해 입증된 바와 같이, 니트록솔린은, NF1-/- 쥐 모델로부터 유래된 피부 신경섬유종으로부터 분리된 종양 세포에서 세포 증식을 억제하고 세포 사멸을 증가시키므로, 피부 신경섬유종의 효과적인 치료이다. 바람직하게, 니트록솔린은, 신경섬유종증 1형을 앓고 있는 대상의 피부 신경섬유종의 치료 또는 예방에 사용된다.

[0016] 본원에 사용되는 바와 같은 "치료" 또는 "치료하는"이라는 용어는, 피부 신경섬유종의 크기 또는 cNF의 수를 감소시키는 것을 포함하는 치료적(완치적) 치료 및/또는 개선 치료(환자 상태의 개선)를 지칭한다. 본원에서 사용된 용어 "예방" 또는 "예방하는"이라는 용어는 cNF 형성을 방지하기 위한 "예방적" 치료를 의미한다. 이는 NF1이 있으나 피부 신경섬유종이 발생하지 않은 환자 또는 cNF가 있지만 더 이상 발생하는 것을 방지하는 것이 목표인 환자에게 본 발명의 조성물을 투여하는 것을 포함한다.

[0017] "환자" 및 "대상"은 상호교환적으로 사용되며, 니트록솔린이 투여될 대상을 의미한다. 바람직하게, 대상은 인간이다. 적합하게, 대상은 신경섬유종증 1형을 앓고 있다. 일 실시예에서, 대상은 성인이다. "성인"이란 18세 이상의 사람을 말한다. 다른 일 실시예에서, 대상은 사춘기를 겪고 있으며, 예를 들어, 대상은 8세 내지 18세이다.

[0018] 일 실시예에서, 니트록솔린은 피부 신경섬유종의 치료 또는 예방에 사용되며, 환자는 피부 신경섬유종의 일부 또는 전부를 제거하기 위한 수술을 받았거나 받을 예정이다. 이는 피부 신경섬유종이 크고/크거나 조직 경계를 넘어 확장되는 경우 특히 유리할 수 있으므로, 수술로 모두 제거하기 어렵고/어렵거나 적어도 일부를 빠르게 제거하는 것이 바람직하다/유익하다.

[0019] "수술"이라는 용어는 해당 분야에서 일반적인 의미를 갖는다. 수술은 진단 또는 치료의 이유로 장기/기관계/조직에 물리적 개입을 한다는 기본 원리를 지닌 침습적 기술이다.

[0020] 본원에서 사용되는 바와 같이, 약학적으로 허용되는 염은 약학적으로 허용되는 산 또는 염기와의 염이다. 약학적으로 허용되는 산은, 염산, 황산, 인산, 이인산, 브롬화수소산 또는 질산과 같은 무기산, 및 시트르산, 푸마르산, 말레산, 말산, 아스코르브산, 숙신산, 타르타르산, 벤조산, 아세트산, 메탄술폰산, 에탄술폰산, 살리실산, 스테아르산, 벤젠술폰산 또는 p-톨루엔술폰산과 같은 유기산을 모두 포함한다. 약학적으로 허용되는 염기는, 알칼리 금속(예를 들어, 나트륨 또는 칼륨) 및 알칼리 토금속(예를 들어, 칼슘 또는 마그네슘) 수산화물, 및 유기 염기(예를 들어, 알킬 아민, 아릴 아민 또는 헤테로시클릭 아민)를 포함한다.

[0021] 본 발명은 피부 신경섬유종의 치료 또는 예방에 사용하기 위한 니트록솔린 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 포함하는 조성물에 관한 것이다.

[0022] 대체 실시예에서, 본 발명은, 피부 신경섬유종의 치료 또는 예방에 사용하기 위한 니트록솔린 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 포함하는 조성물에 관한 것이며, 여기서 니트록솔린은 조성물 중 유일한 활성제이다. 활성제만으로라는 것은, 조성물이 피부 신경섬유종의 치료 또는 예방에 사용될 수 있는 다른 성분을 함유하지 않는다는 것을 의미한다. 대체 실시예에서, 조성물은 피부 신경섬유종을 치료하기 위한 제2 활성제를 추가로 포함하며, 바람직하게, 제2 활성제는 셀루메티닙 또는 이의 약학적으로 허용되는 염이다.

[0023] 대체 실시예에서, 본 발명은, 셀루메티닙 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 포함하는 제2 조성물과 조합하여 사용하기 위한 니트록솔린 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 포함하는 조성물에 관한 것으로서, 여기서 두 개의 조성물은 대상에게 동시에, 개별적으로, 또는 순차적으로 투여된다.

[0024] 본원에서 사용되는 바와 같이, "개별적" 투여는, 약물들이 동일한 전체 투여 요법(많은 날을 포함할 수 있음)의 일부로서 투여되지만 바람직하게는 동일한 날에 투여되는 것을 의미한다. 본원에서 사용되는 바와 같이, "동시에"는 약물들이 함께 복용되거나 단일 조성물로서 제제화됨을 의미한다. 본원에서 사용되는 바와 같이, "순차적으로"는 약물들이 거의 동시에, 바람직하게는 서로 약 1시간 이내에 투여되는 것을 의미한다. 바람직하게, 약물들은 동시에 투여되며, 즉, 함께 복용하거나 단일 조성물로서 제제화된다. 가장 바람직하게는, 약물들은 단일 조성물로서 제제화된다.

[0025] 본 발명의 조성물은 약학적으로 허용되는 담체를 함유할 수 있다. "약학적으로 허용되는 담체"는, 조성물의 다

른 성분과 상용성이 있고 수용자에게 해롭지 않은 충전제 또는 결합제와 같은 임의의 희석제 또는 부형제를 의미한다. 약학적으로 허용되는 담체는 표준 약학 관행에 따라 원하는 투여 경로에 기초하여 선택될 수 있다.

[0026] 본 발명에서, 조성물은 다양한 투여 형태로 투여될 수 있다. 일 실시예에서, 조성물은 경구, 직장, 비경구, 비강내 또는 경피 투여 또는 흡입 또는 좌제 투여에 적합한 형식으로 제제화될 수 있다.

[0027] 조성물은, 예를 들어, 태블릿, 트로키제, 로젠지제, 수성 또는 유성 현탁액, 분산성 분말 또는 과립으로서 경구 투여될 수 있다. 바람직하게, 조성물은 경구 투여, 예를 들어, 태블릿 및 캡슐에 적합하도록 제제화된다. 태블릿 및 캡슐은, 시럽, 아카시아, 젤라틴, 소르비톨, 트라가칸트, 셀룰로오스 또는 폴리비닐피롤리돈과 같은 결합제; 유당, 수크로스, 옥수수 전분, 인산칼슘, 소르비톨 또는 글리신과 같은 충전제; 스데아린산 마그네슘, 탈크, 폴리에틸렌글리콜, 실리카와 같은 윤활제; 및 라우릴황산나트륨과 같은 계면활성제로 제조될 수 있다.

[0028] 현탁제, 예를 들어, 소르비톨 시럽, 메틸 셀룰로오스, 설탕 시럽, 젤라틴, 카르복시메틸-셀룰로오스 또는 식용 지방; 레시틴 또는 아카시아와 같은 유화제와 계면활성제; 아몬드 오일, 코코넛 오일, 대구 간유 또는 땅콩 오일과 같은 식물성 오일; 부틸화 히드록시아니솔(BHA) 및 부틸화 히드록시톨루엔(BHT)과 같은 방부제 등의 종래의 첨가제를 함유할 수 있다. 액체 조성물은, 예를 들어, 젤라틴에 캡슐화되어 단위 투여 형태를 제공할 수 있다.

[0029] 조성물은, 또한, 피하, 정맥내, 근육내, 흉골내, 경피 또는 주입 기술의 여부에 의해 비경구적으로 투여될 수 있다.

[0030] 조성물은, 또한, 흡입에 의해 투여될 수 있다. 흡입 약물의 장점은 경구 경로로 복용되는 많은 약물에 비해 혈액 공급이 풍부한 부위에 직접 전달된다는 것이다. 따라서, 폐포가 표면적이 거대하고 혈액 공급이 풍부하며 1차 통과 대사가 우회되므로 흡수가 매우 빠르다.

[0031] 본 발명은, 또한, 본 발명의 조성물을 함유하는 흡입 장치를 제공한다. 통상적으로, 장치는 약물을 흡입기의 밖으로 밀어내기 위해 약학적으로 허용되는 화학적 추진제를 함유하는 정량 흡입기(MDI)이다.

[0032] 조성물은, 또한, 비강내 투여에 의해 투여될 수 있다. 비강의 투과성이 높은 조직은 약물을 잘 받아들이고 신속하고 효율적으로 흡수한다. 비강 약물 전달은 주사보다 덜 고통스럽고 침습적이어서, 환자의 불안을 덜 유발한다. 이 방법을 사용하면, 흡수가 매우 빠르고 일반적으로 1차 통과 대사가 우회되므로, 환자간 변동성을 줄인다.

[0033] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 조성물을 함유하는 비강내 장치도 제공한다.

[0034] 조성물은, 또한, 경피 투여에 의해 투여될 수 있다. 국소 전달의 경우, 경피 및 경점막 패치, 크림, 연고, 젤리, 용액 또는 현탁액 또는 미세 바늘이 사용될 수 있다. 따라서, 본 발명은, 또한, 조성물을 함유하는 경피 패치를 제공한다.

[0035] 조성물은, 또한, 설하 투여에 의해 투여될 수 있다. 따라서, 본 발명은, 또한, 조성물을 포함하는 설하 태블릿을 제공한다.

[0036] 조성물은, 또한, 환자의 정상적인 대사 이외의 과정에 의한 물질의 분해를 감소시키는 제제, 예를 들어, 항박테리아제, 또는 환자, 또는 환자 내부에 살고 있는 공생하거나 기생하는 유기체에 존재할 수 있으며 화합물을 분해할 수 있는 프로테아제 효소의 억제제와 함께 제제화될 수 있다.

[0037] 경구 투여용 액체 분산액은 시럽, 유제, 및 현탁액일 수 있다.

[0038] 현탁액 및 유제는, 예를 들어, 천연 검, 한천, 알긴산 나트륨, 펙틴, 메틸셀룰로오스, 카르복시메틸셀룰로오스 또는 폴리비닐 알코올을 담체로서 함유할 수 있다. 근육내 주사를 위한 현탁액 또는 용액은, 약학적으로 허용되는 담체, 예를 들어, 멸균수, 올리브 오일, 에틸 올레이트, 글리콜, 예컨대, 프로필렌 글리콜, 및 필요하다면 적당량의 리도카인 염산염을 활성 화합물과 함께 함유할 수 있다.

[0039] 주사 또는 주입용 용액은, 예를 들어, 멸균수를 담체로서 함유할 수 있거나, 바람직하게는 멸균, 수성, 등장성의 식염수 용액의 형태일 수 있다.

[0040] 본 발명의 일 실시예에서, 조성물은 피부 신경섬유종을 치료 또는 예방하기 위한 유효량으로 투여된다. 유효량은, 통상의 기술자에게 명백할 것이며, 의사가 결정할 수 있는 연령, 성별, 체중을 포함하는 수많은 인자에 따라 달라진다.

[0041] 바람직한 일 실시예에서, 조성물은 니트록솔린의 30 mg 내지 600 mg, 바람직하게는 50 mg 내지 500 mg, 더 바람직하게는 100 mg 내지 400 mg, 더 바람직하게는 150 mg 내지 350 mg, 가장 바람직하게는 200 mg 내지 300 mg을 포함한다.

[0042] 조성물은 1일 1회, 1일 2회, 1일 3회 또는 1일 4회 투여될 수 있다.

[0043] 본 발명의 일 실시예에서, 조성물은 1일 1회 이상 투여된다. 바람직하게, 조성물은 1일 1회 투여량으로 투여된다. 바람직하게, 1일 1회 투여량은 니트록솔린의 90 mg 내지 1800 mg, 바람직하게는 150 mg 내지 1500 mg, 더 바람직하게는 300 mg 내지 1200 mg, 더 바람직하게는 450 mg 내지 1050 mg, 가장 바람직하게는 600 mg 내지 900 mg이다.

[0044] 본 발명의 일 실시예에서, 조성물은 1일 2회 투여된다. 바람직하게, 각 투여량은 니트록솔린의 45 mg 내지 900 mg, 바람직하게는 75 mg 내지 750 mg, 더 바람직하게는 150 mg 내지 600 mg, 더 바람직하게는 225 mg 내지 525 mg, 가장 바람직하게는 300 mg 내지 450 mg이다.

[0045] 본 발명의 일 실시예에서, 조성물은 1일 3회 투여된다. 바람직하게, 각 투여량은 니트록솔린의 30 mg 내지 600 mg, 바람직하게는 50 mg 내지 500 mg, 더 바람직하게는 100 mg 내지 400 mg, 더 바람직하게는 150 mg 내지 350 mg, 가장 바람직하게는 200 mg 내지 300 mg이다.

[0046] 본 발명의 일 실시예에서, 조성물은 1일 4회 투여된다. 바람직하게, 각 투여량은 니트록솔린의 15 mg 내지 500 mg, 바람직하게는 50 mg 내지 400 mg, 더 바람직하게는 100 mg 내지 300 mg, 더 바람직하게는 125 mg 내지 225 mg, 가장 바람직하게는 150 mg 내지 200 mg이다.

[0047] 바람직하게, 투여 요법은 니트록솔린의 일일 총 투여량이 1500 mg을 초과하지 않도록 하는 것이다.

[0048] 적합하게, 니트록솔린의 유효량은 세포내 농도가 1 ㎛ 내지 75 ㎛, 바람직하게는 5 ㎛ 내지 50 ㎛, 더 바람직하게는 10 ㎛ 내지 40 ㎛이 되도록 한다.

[0049] 적합하게, 니트록솔린을 포함하는 조성물 및 제2 활성제, 바람직하게는 셀루메티닙을 포함하는 제2 조성물이 1일 1회 투여량이다. 적합하게는, 두 개의 조성물이 동시에 투여되는데, 즉, 니트록솔린과 셀루메티닙이 함께 복용된다. 조성물들은, 또한, 순차적으로, 즉, 대략 동시에, 바람직하게는 서로 약 1시간 이내에 투여될 수 있다.

[0050] 조성물이 셀루메티닙을 포함하거나 셀루메티닙을 포함하는 제2 조성물과 조합하여 사용하기 위한 실시예에서, 적합하게는, 셀루메티닙을 포함하는 조성물이 1 mg 내지 75 mg의 셀루메티닙, 바람직하게는 5 mg 내지 50 mg의 셀루메티닙, 더 바람직하게는 10 mg 내지 35 mg의 셀루메티닙, 가장 바람직하게는 15 mg 내지 30 mg의 셀루메티닙을 포함한다.

[0051] 적합하게는, 대상에게 투여되는 셀루메티닙의 유효량은 셀루메티닙의 1 mg/m^2 내지 75 mg/m^2, 바람직하게는 셀루메티닙의 5 mg/m^2 내지 50 mg/m^2, 더 바람직하게는 셀루메티닙의 10 mg/m^2 내지 35 mg/m^2, 가장 바람직하게는 셀루메티닙의 15 mg/m^2 내지 30 mg/m^2이다.

[0052] 피부 신경섬유종을 치료 또는 예방하기 위해, 니트록솔린을 포함하는 조성물은 만성 투여 요법, 즉, 만성 장기 치료에 사용된다. 적합하게, 요법은 적어도 1개월 동안 지속되며, 적합하게는 적어도 2개월, 예를 들어, 적어도 3개월 동안 지속된다.

[0053] 본 발명은, 또한, (i) 적어도 1회 투여량의 니트록솔린 또는 이의 약학적으로 허용되는 염; 및 선택적으로 (ii) 피부 신경섬유종의 치료 또는 예방에 있어서 동시, 개별 또는 순차적 사용을 위한 적어도 1회 투여량의 셀루메티닙 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 포함하는 키트에 관한 것이다.

[0054] 본 발명은, 또한, 피부 신경섬유종의 치료 또는 예방에 사용하기 위한 약제의 제조를 위한 니트록솔린 또는 이의 약학적으로 허용되는 염의 용도에 관한 것이다. 본 발명의 본 실시예는 위에서 설명한 특징들 중 임의의 특징을 가질 수 있다.

[0055] 본 발명은, 또한, 니트록솔린 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 포함하는 조성물을 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 피부 신경섬유종을 치료 또는 예방하는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 본 실시예는 상술한 특징들 중 임의의 특징을 가질 수 있다. 투여 방법은 상술한 경로들 중 임의의 경로에 따를 수 있다.

[0056] 의심의 여지를 피하기 위해, 본 발명은, 또한, 생체내에서 반응하여 본 발명의 화합물을 제공하는 전구약물을

포함한다.

[0057] 실험 섹션

[0058] **실시예 1 - cNF의 기원에서 토마토(Tom)+ 줄기형 신경교세포를 이용하는 생체외 약물 테스트**

[0059] 이 연구는 인간 질병을 충실하게 재현하는 피부 신경섬유종(cNF)을 발생시키는 Nf1-KO 쥐 계통(Prss56Cre/+, R26tdTom/+, NF1f1/f1)을 사용한다(Radomska et a., 2019). 이 모델에서는, Nf1의 동시 이중 대립유전자 손실과 토마토 형광 리포터의 발현이 cNF의 기원에서 신경교줄기 유사 세포로 표적화되었다. 분석은 피부로부터 Nf1-/- 및 Nf1+/- 줄기 유사 세포를 발현하는 토마토가 증폭될 수 있는 비부착성 세포를 사용하여 생체외에서 수행되었으며, 이들의 특성은 추가로 특성화되었다. 이 실험 조건에서는, 모든 분화된 세포가 빠르게(24h) 죽는 반면, cNF의 기원에 있는 신경교줄기 유사 세포는 생존하고 증식하여 장기간 전파될 수 있는 신경구(다세포 콤팩트 구조)를 형성하므로, 생체내 특성을 보존한다. 이 시스템에서, Nf1-/- 세포는 (RAS 경로의 영구적 활성화로 인해 예상되는 바와 같은) 높은 수준의 p-ERK를 발현하고, 대조군에 비해 훨씬 빠르게 증식하며, 해리 및 재도금 후 구체를 재형성하는 능력을 보존한다. 또한, Nf1-/- 및 Nf1+/- 세포를 셀루메티닙(MEK1/2 억제제)과 함께 배양하면, 증식 활성을 감소시키고 Nf1+/- 세포에 영향을 주지 않고 돌연변이의 사멸을 촉진하여, 약물 스크리닝 연구를 수행하도록 생체외 시스템의 견고성을 뒷받침하는 것을 관찰하였다.

[0060] 이 모델은 Nf1-/- 종양 세포의 증식 및 세포 사멸에 대한 니트록솔린의 효과를 평가하는 데 사용되었다.

[0061] *모델 특성화*

[0062] 이 생체외 배양 시스템은 장기간 증폭 및 증식이 가능한 cNF의 기원에서 토마토(Tom)+ 줄기형 신경교세포를 사용한다. 간략하게, 어린 돌연변이(NF1-/-) 및 대조군(NF1+/-) 쥐의 피부를 해부하고 해리한 후 두 개의 유사분열물질인 FGF와 EGF가 존재하는 비부착 조건에서 세포 현탁액을 배양하였다. 이러한 조건에서는, 줄기 유사 세포만이 생존하고 증식하여, 신경구라고 불리는 조밀한 다세포 부유 구조를 형성한다. 피부에는 Tom+ 신경교 줄기 유사 세포 외에도 다양한 종류의 줄기세포(Tom-)가 포함되어 있으므로, 신경구는 Tom+ 세포와 Tom- 세포가 혼합되어 구성된다. 돌연변이 조건에서 신경구는 Tom+, Nf1-/- 및 Tom-, Nf1+/+ 세포를 포함하지만, Nf1+/- 제어 조건에서 신경구는 Tom+, Nf1+/- 및 Tom-, Nf1+/+ 세포로 구성된다. 본 연구에서는, NF1-/- 및 NfF1+/- 쥐의 Tom+에 대한 약물 효과를 분석하였다.

[0063] *실험 설계*

[0064] **세포 준비, 클론 확장 및 약물 치료**

[0065] 본 연구에서는, 신생 쥐 피부로부터 분리한 Nf1+/-(Prss56Cre, R26Tom, Nf1flox/+) 및 Nf1-/-(Prss56Cre, R26Tom, Nf1flox/flox) 신경교세포의 부유구 배양물을 사용하였다. 이것들은 이어서 독립적으로 도금 및 치료 및 분석된다. 이러한 의도로, Nf1+/- 및 Nf1-/- 구체는 통로 3까지 증폭되었다(통로 1은 배양 7일에 해당한다). P0(10일)의 종료 시, 세포를 4개의 동일한 배치 (클론 1-4)로 분할하고 P3으로 증폭하였다(도 1).

[0066] P3의 종료 시, 각 클론의 구체를 해리하고 세포를 두 개의 12웰 플레이트(well plate)로 옮겼다. 6개의 상이한 농도(100 ㎛, 33 ㎛, 10 ㎛, 3 ㎛, 1 ㎛ 및 0 ㎛)의 약물을 첨가하고 세포를 72h 동안 배양하였다. DMSO(약물 재현탁에 사용되는 매개체)가 포함된 세포를 포함하는 추가 12웰 판을 결과의 정규화를 위한 기준으로서 사용하였다. 72h 후에, 고정되지 않은 세포에 대한 분석인, 증식 및 세포 사멸 분석이 수행되었다.

[0067] **결과**

[0068] *증식 활동*

[0069] 증식 활동의 분석을 위해, 세포 추적기 친유성 염료(Cell Trace Proliferation Kit, Thermo Fishers)를 사용하였다. 세포 택커가 약물과 동시에 첨가되었다. 세포를 72h 동안 배양하고 LSR Fortessa X20(BD Biosciences)을 사용하여 세포계측 분석으로 증식 활성을 측정하였다. 이 방법은 각 조건에 대한 평균 형광 강도(MIF)를 측정한다. DMSO를 사용한 조건은 참조로서 사용되었다.

[0070] 비 : MIF(DMSO) IMIF(치료) =

[0071] 비 < 1인 경우: DMSO에 비해 증식 감소

[0072] 비 > 1인 경우: DMSO에 비해 증식 증가

[0073] 분석에서 테스트된 니트록솔린의 최고 농도인 100 ㎛은 NF1+/- 및 Nf1-/- 세포의 대규모 비특이적 사멸을 촉진

하므로, 분석에서 제외되었다. 33 ㎛ 내지 1 ㎛ 범위의 농도의 니트록솔린은 NF1-/- 세포(클론 3 제외)의 증식 활성을 감소시켰으나, NF1+/- 세포의 증식은 영향을 받지 않았다(도 3).

[0074] 더 높은 농도인 33 ㎛: 비 MIFmean = 0.39 +/- 0.11 및 10 ㎛: 비 MIFmean = 0.5 +/- 0.18에서, NF1-/- 세포의 증식은 더 낮은 농도인 3 ㎛: MIFmean 비 = 0.60 +/- 0.22 및 1 ㎛: MIFmean 비 = 0.7 +/- 0.26에 비해 더 많은 영향을 받으며, 이는 NF1-/- 세포의 증식 속도가 약물 투여량에 의존적이며 이 분석의 33 ㎛ 및 10 ㎛ 농도가 최고의 효능/독성 비를 나타냄을 시사한다.

[0075] *세포 사멸*

[0076] 배양 72h, DAPI(4',6-디아미디노-2-페닐인돌)를 사용하여 세포 사멸의 정량화를 위해 세포를 표지하였다. 표지된 세포는 LSR Fortessa X20(BD Biosciences)를 사용하여 세포 계측법으로 분석되었다.

[0077] 비: % 죽은 세포(치료) / % 죽은 세포(DMSO) =

[0078] 비 > 1인 경우: DMSO에 비해 죽은 세포가 더 많다.

[0079] 비 < 1인 경우: DMSO에 비해 죽은 세포가 적다.

[0080] 100 ㎛의 니트록솔린은 독성 효과로 인해 NF1-/- 및 NF1+/- 세포의 대량 세포 사멸을 촉진하므로, 분석에서 제외되었다. 흥미롭게도, 33 ㎛의 니트록솔린은 NF1+/- 세포에 영향을 주지 않고 NF1-/-(죽은 세포 비 평균 = 8.86 +/- 0.66)의 세포 사멸을 촉진하였다. 더 낮은 농도의 니트록솔린은 대조군 조건에 영향을 주지 않고 돌연변이 세포의 사멸을 약간 촉진한다(10 ㎛: 죽은 세포 비 평균 = 2.04 +/-0.63).

[0081] **실시예 2 - Nf1-KO 쥐에서의 생체내 약물 테스트**

[0082] *동물*

[0083] 이 연구는 생체외 테스트에 사용된 것과 동일한 쥐 모델인 Prss56Cre/+, R26tdTom/+, NF1fl/fl 쥐를 사용한다(Radomska et a., 2019). 본 연구는 연구 전반에 걸쳐 종단적 종말점이 아닌 종말점을 갖는 현장에서의 표준 실험 설계이다.

[0084] 본원에서 Nf1-KO 쥐라고 지칭되는 Prss56Cre/+, R26tdTom/+, NF1fl/fl은 1세 후에 cNF가 발생한다. 그러나, cNF 발달은 정상적인 쥐 행동인 쥐의 싸움으로 인한 피부 손상 후 더 이른 나이에 발생한다. 이 실험에서는, 최소 5마리의 6주령 Nf1-KO 수컷 쥐들을 우리에 함께 넣고, 일단 쥐가 싸움을 통해 피부 손상을 입으면 우리에서 꺼내어 모니터링하였다. 약 3개월 쯤에, 싸움 부상을 입은 쥐에서는 여러 cNF가 발생하였다. Nf1이 결실된 세포에서는 형광 리포터 유전자가 활성화되므로, 표면형광 현미경(Leica MZ75)을 사용한 피부의 형광 촬상을 통해 cNF 발달을 모니터링할 수 있다. 쥐의 설정된 1개월 내지 2개월 후, 성숙한 cNF가 약물 치료 연구에 등록되었다. 쥐를 경구 위관 영양법(80% 옥수수유 중 20% DMSO)을 통해 매개체로 치료하거나 1개월 동안 하루에 한 번(5일 투여, 2일 휴무) 경구 위관 영양법을 통해 120mg/kg의 니트록솔린으로 치료하였다.

[0085] *생체외 분석*

[0086] 쥐는 치료 한 달 후에 희생되었다. cNF가 존재하는 피부 부위의 해부를 안내하기 위해 표면형광 촬상이 사용되었다. cNF를 펀치 생검(5 mm)으로 해부하고 4% PFA에 밤새 고정한 다음 30% 수크로스에 동결 보호하였다. 마지막으로, 샘플을 젤라틴/자당(15%/7.5%)에 삽입하였다. cNF를 냉동절편하고(14 um) 형광 Tom+ 세포를 형광 현미경(Leica M165FC)을 사용하여 촬상하였다.

[0087] **결과**

[0088] *생체내 효능*

[0089] Nf1-null인 슈반 세포는, 또한, 형광 리포터 토마토(Tom+)를 발현한다. cNF는 Tom+인 Nf1-null SC로부터 유래되므로, 형광을 사용하여 종양을 식별할 수 있다. 발명자들은, 저배율(5x) 확대를 사용하여, 쥐 피부에서 형광성 cNF 종양 세포를 시각화할 수 있었다(도 4). 니트록솔린으로 치료된 쥐(E-H)의 종양이 치료 1개월 후의 매개체로 처리된 쥐(A-D)의 종양보다 작다는 점을 이러한 화상들에서 알 수 있다. 따라서, 이러한 화상들은 니트록솔린을 1일 1회 120 mg/kg으로 치료하면 피부의 cNF 종양 세포의 전체 양이 감소한다는 것을 나타낸다.

[0090] **결론**

[0091] 니트록솔린(10 ㎛ 내지 33 ㎛)은 NF1-/- 쥐 모델로부터 유래된 피부 신경섬유종에서 분리된 종양 세포의 증식을

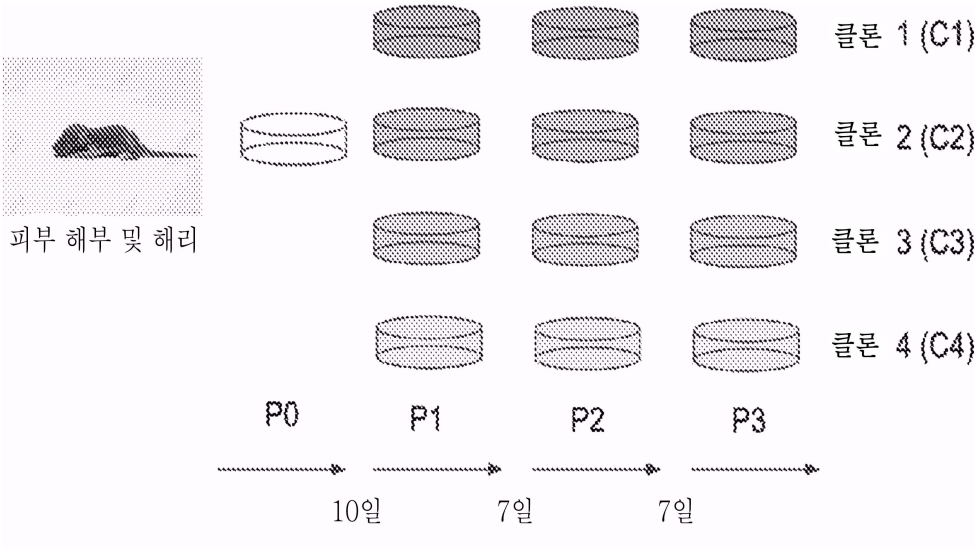
억제하고 세포 사멸을 유도한다. 이 효과는 NF1+/- 쥐의 세포에서는 관찰되지 않았는데, 이는 니트록솔린 효과가 뉴로파이브로민의 완전한 결실에 의존한다는 것을 시사한다. 생체외 발견에 더하여, 본 발명자들은, 또한, 니트록솔린이 쥐에서 발생하는 cNF의 종양 세포의 (생체내의) 수를 감소시킬 수 있음을 보여준다. 따라서, 니트록솔린은 피부 신경섬유종을 감소, 치료 및 예방할 것으로 예상된다.

[0092] **참조 문헌**

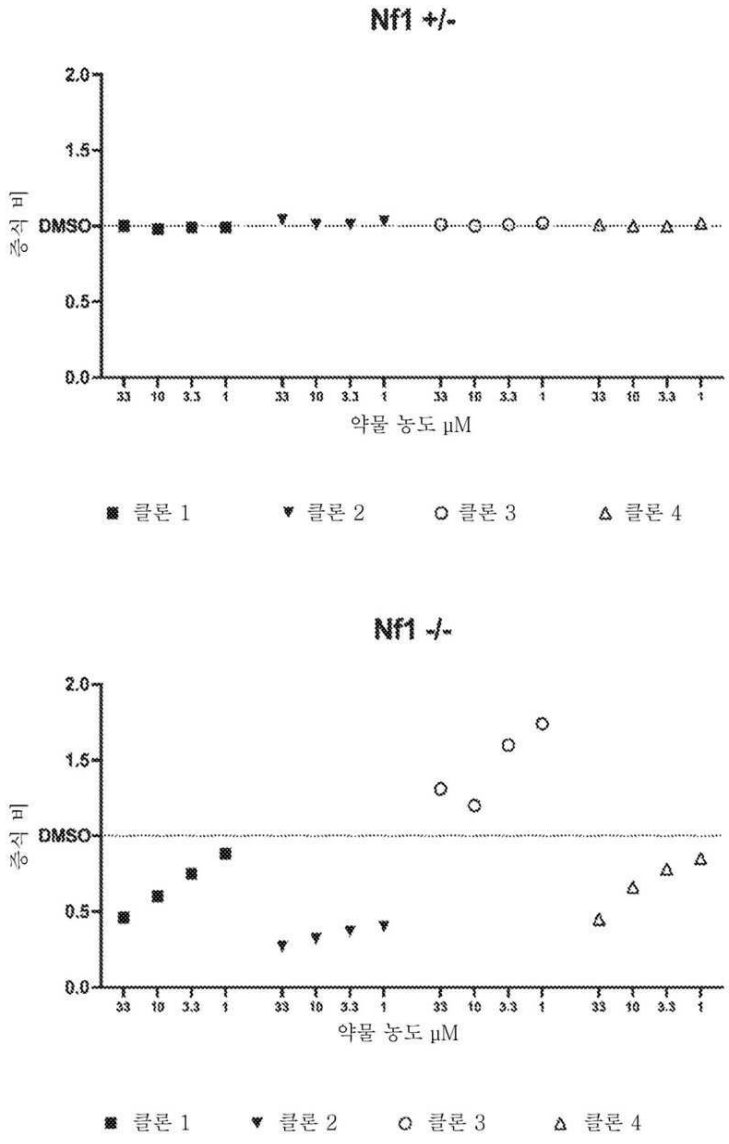
[0093] Radomska KJ, Coulpier F, Gresset A, Schmitt A, Debbiche A, Lemoine S, Wolkenstein P, Vallat JM, Charnay P, Topilko P. Cellular Origin, Tumor Progression, and Pathogenic Mechanisms of Cutaneous Neurofibromas Revealed by Mice with Nf1 Knockout in Boundary Cap Cells. Cancer Discov. 2019 Jan;9(1):130-147.

도면

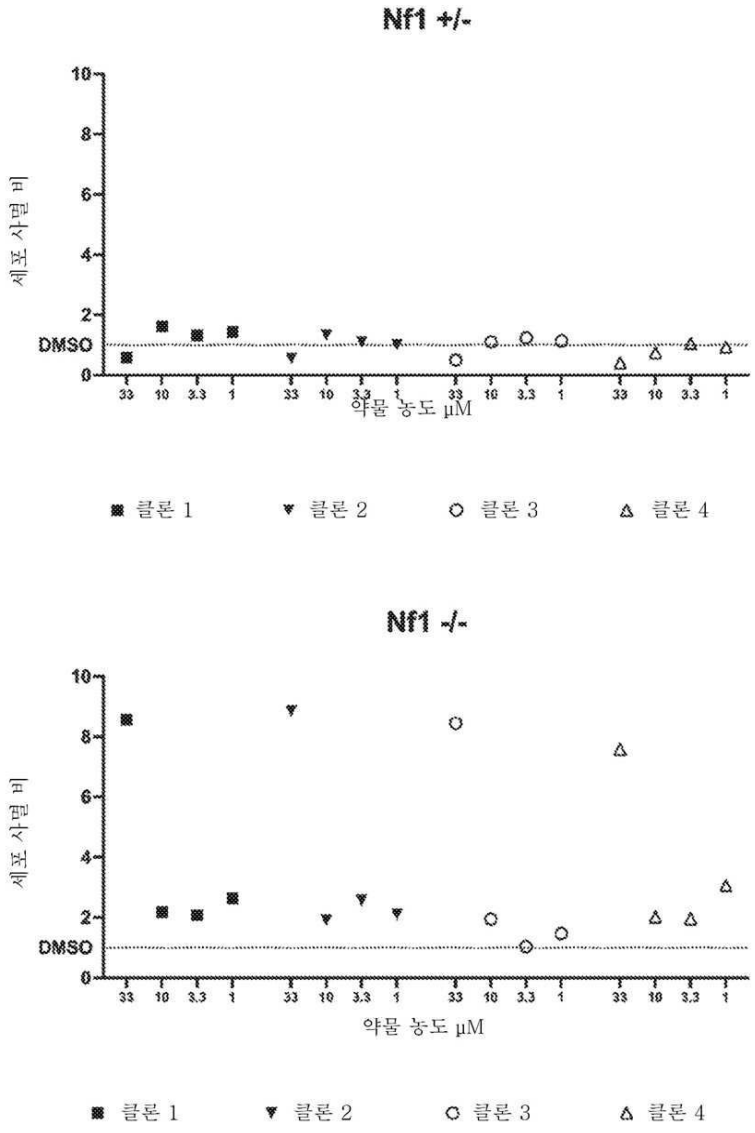
도면1



도면2


Nf1 +/-
2.0
1.5
DMSO
0.5
0.0
33 10 3.3 1 33 10 3.3 1 33 10 3.3 1 33 10 3.3 1
약물 농도 μM
클론 1
클론 2
클론 3
클론 4
Nf1 -/-
2.0
1.5
DMSO
0.5
0.0
33 10 3.3 1 33 10 3.3 1 33 10 3.3 1 33 10 3.3 1
약물 농도 μM
클론 1
클론 2
클론 3
클론 4

도면3


Nf1 +/-
세포 사멸 비
DMSO
약물 농도 μM
클론 1
클론 2
클론 3
클론 4
Nf1 -/-
세포 사멸 비
DMSO
약물 농도 μM
클론 1
클론 2
클론 3
클론 4

도면4

