



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118215479 A

(43) 申请公布日 2024.06.18

(21) 申请号 202280074138.9

(22) 申请日 2022.11.18

(30) 优先权数据

2116743.2 2021.11.19 GB

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.05.07

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/GB2022/052933 2022.11.18

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/089328 EN 2023.05.25

(71) 申请人 海利科斯有限公司

地址 英国剑桥郡

(72) 发明人 戴维·布朗

(74) 专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理有限公司 11204

专利代理师 王达佐 何可

(51) Int.Cl.

A61K 31/47 (2006.01)

A61K 31/4184 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

权利要求书2页 说明书7页 附图2页

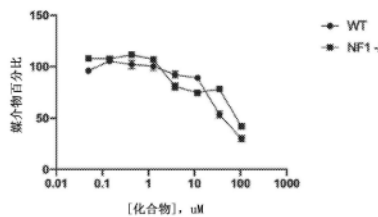
(54) 发明名称

用于在丛状神经纤维瘤的治疗或预防中使用的硝羟喹啉

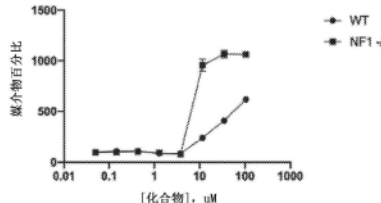
(57) 摘要

本发明涉及一种包含硝羟喹啉或其药学上可接受的盐的组合物,所述组合物用于在丛状神经纤维瘤的治疗或预防中使用。

增殖



细胞凋亡



1. 一种包含硝羟喹啉或其药学上可接受的盐的组合物,所述组合物用于在丛状神经纤维瘤的治疗或预防中使用。
2. 根据权利要求1所述使用的组合物,组合物用于丛状神经纤维瘤的治疗。
3. 根据权利要求1或2所述使用的组合物,其中所述治疗或预防的受试者患有I型神经纤维瘤病。
4. 根据任一前述权利要求所述使用的组合物,其中所述治疗或预防的受试者是人。
5. 根据任一前述权利要求所述使用的组合物,其中所述组合物包含30mg至600mg、优选地50mg至500mg、更优选地100mg至400mg、还更优选地150mg至350mg、最优选地200mg至300mg的硝羟喹啉。
6. 根据任一前述权利要求所述使用的组合物,其中以每天两次的剂量进行施用。
7. 根据权利要求6所述使用的组合物,其中所述剂量是45mg至900mg、优选地75mg至750mg、更优选地150mg至600mg、还更优选地225mg至525mg、最优选地300mg至450mg的硝羟喹啉。
8. 根据权利要求1至4中任一项所述使用的组合物,其中以每天三次的剂量进行施用。
9. 根据权利要求8所述使用的组合物,其中所述剂量是30mg至600mg、优选地50mg至500mg、更优选地100mg至400mg、还更优选地150mg至350mg、最优选地200mg至300mg的硝羟喹啉。
10. 根据权利要求1至4中任一项所述使用的组合物,其中以每天四次的剂量进行施用。
11. 根据权利要求10所述使用的组合物,其中所述剂量是15mg至500mg、优选地50mg至400mg、更优选地100mg至300mg、还更优选地125mg至225mg、最优选地150mg至200mg的硝羟喹啉。
12. 根据任一前述权利要求所述使用的组合物,所述组合物经口服或静脉内施用。
13. 根据权利要求1至11中任一项所述使用的组合物,所述组合物通过肠胃外、经皮、舌下、直肠或吸入施用进行施用。
14. 根据任一前述权利要求所述使用的组合物,其中硝羟喹啉或所述药学上可接受的盐是所述组合物中的唯一活性剂。
15. 根据权利要求1至13中任一项所述使用的组合物,其中所述组合物进一步包含司美替尼或其药学上可接受的盐。
16. 根据权利要求1至14中任一项所述使用的组合物,所述组合物用于与包含司美替尼或其药学上可接受的盐的第二组合物组合使用,其中两种组合物被同时地、单独地或循序地施用于所述受试者。
17. 根据权利要求15或16所述使用的组合物,其中司美替尼的量介于1mg与75mg之间、优选地介于5mg与50mg之间、更优选地介于10mg与35mg之间、最优选地介于15mg与30mg之间。
18. 硝羟喹啉或其药学上可接受的盐用于制备药物的用途,所述药物用于在丛状神经纤维瘤的治疗或预防中使用。
19. 根据权利要求18所述的用途,其具有权利要求2至17的附加特征中的任何附加特征。
20. 一种治疗或预防丛状神经纤维瘤的方法,所述方法包括:向患者施用包含硝羟喹啉

或其药学上可接受的盐的组合物。

21. 根据权利要求20所述的方法, 其具有权利要求2至17的附加特征中的任何附加特征。

用于在丛状神经纤维瘤的治疗或预防中使用的硝羟喹啉

技术领域

[0001] 本发明涉及硝羟喹啉的新用途。

背景技术

[0002] 神经纤维瘤是周围神经系统中的良性神经鞘肿瘤。在90%的病例中,它们作为独立肿瘤被发现,而其余的在患有I型神经纤维瘤病(NF1)的人中发现,I型神经纤维瘤病为常染色体显性遗传性疾病。神经纤维瘤可导致从身体变形和疼痛到认知障碍的一系列症状,并且可转变为恶性肿瘤。

[0003] 丛状神经纤维瘤在早期发展期间从皮肤中的神经或从更多内部神经束(诸如脑神经或近端大周围神经鞘)产生。丛状神经纤维瘤由雪旺细胞(SC)、成纤维细胞、脱颗粒肥大细胞和血管细胞组成(Hirota S等人,Arch Pathol Lab Med.1993;117(10):996-9)。丛状神经纤维瘤可进行性地扩展并构成终生发病率和死亡率的来源,其中一生中转化为恶性周围神经鞘瘤的发生率为10%-15%。

[0004] NF1是由编码蛋白质神经纤维瘤蛋白的NF1肿瘤抑制基因的种系突变引起的。神经纤维瘤蛋白充当GTP酶激活(GAP)蛋白,并且通过将活性GTP结合形式转化为其非活性GDP结合形式来灭活细胞内信号转导蛋白Ras。这继而导致Ras活性的下调。神经纤维瘤蛋白活性的丧失增加Ras活性,这继而促进对于细胞生长和增殖而言所需的许多基因的转录。丛状神经纤维瘤出现在大约15%至40%的NF1患者中。

[0005] 内部丛状神经纤维瘤很难通过手术完全切除,因为它们延伸穿过多层组织,并且尝试会损害健康的组织或器官。丛状神经纤维瘤可引起毁容、神经系统缺陷和其他临床缺陷,包括具有引起严重的临床并发症的可能,如果丛状神经纤维瘤发生在某些区域的话。

[0006] 人们也付出了相当大的努力来识别治疗丛状神经纤维瘤的药理学靶点。特别是丛状神经纤维瘤一直是开发中药物的重新利用和重新定位的常见靶点。许多不同的标准和方法已应用于这项任务。在许多情况下,已主要基于临床模式匹配来识别再利用候选物,而在其他情况下,已对基本疾病机制进行了广泛研究以识别治疗靶标,之后是进行彻底的临床前验证。

[0007] 目前,手术仍然是主要的治疗选择。然而,切除是困难的,因为它们可能是大的并且跨越组织边界。2020年,FDA批准了MEK抑制剂Koselugo(司美替尼)用于两岁及以上的患有有症状、无法手术的丛状神经纤维瘤的NF1儿科患者的治疗。然而,并非所有患者都对治疗有反应,并且肿瘤也只是部分地缩小。司美替尼是丝裂原激活蛋白激酶激酶(MAPK激酶、MEK、MAP2K和MAPKK)的选择性抑制剂,并且具有系统名称6-(4-溴-2-氯苯胺基)-7-氟-N-(2-羟基乙氧基)-3-甲基苯并咪唑-5-甲酰胺。

[0008] 总体而言,治疗丛状神经纤维瘤的努力已经带来了一些令人兴奋的可能性,但是,尽管付出了很多努力,但尚未取得明确的成功。这已凸显了对于新疗法的需求。

[0009] 硝羟喹啉在人类中用作抗生素,其没有被广泛使用,但自20世纪60年代以来就已上市。其被用于生物膜感染(诸如泌尿道感染)的治疗或预防中。其在破坏生物膜方面特别

有效,并且据信正是金属阳离子螯合特性造成了这种作用。硝羟喹啉在肝脏中代谢为对应的硫酸盐和葡萄糖苷酸代谢物。有证据表明这两种代谢物都具有抗微生物活性。其也已经由抗增殖作用被用于抗癌环境中。硝羟喹啉具有系统名称5-硝基喹啉-8-醇。

发明内容

[0010] 本发明是一种包含硝羟喹啉或其药学上可接受的盐的组合物,该组合物用于在丛状神经纤维瘤的治疗或预防中使用。如从下文呈现的体外数据将显而易见的,硝羟喹啉在治疗和预防丛状神经纤维瘤中有效。

[0011] 本发明的第一方面是一种包含硝羟喹啉或其药学上可接受的盐的组合物,该组合物用于在丛状神经纤维瘤的治疗或预防中使用。

[0012] 本发明的第二方面是硝羟喹啉或其药学上可接受的盐用于制备药物的用途,该药物用于在丛状神经纤维瘤的治疗或预防中使用。

[0013] 本发明的第三方面提供了一种治疗或预防丛状神经纤维瘤的方法,该方法包括:向患者施用包含硝羟喹啉或其药学上可接受的盐的组合物。

附图说明

[0014] 图1示出在体外测定中WT和NF1缺陷型雪旺细胞的增殖(顶部)和细胞凋亡(底部)中的硝羟喹啉剂量反应。

[0015] 图2示出硝羟喹啉治疗对丛状神经纤维瘤的Postn-Cre⁺Nf1^{f1/f1}小鼠模型中近端神经体积(A)和肿瘤数量(B)的影响(n=6,*=p值<0.05 Fisher LSD测试/Dunnett测试)。

[0016] 图3示出肿瘤/神经宽度的图形以及如何用卡尺测量。

具体实施方式

[0017] 仅表达NF1基因(“肿瘤抑制基因”)的失活版本从而导致功能性神经纤维蛋白的表达的完全丧失的非髓鞘雪旺细胞是丛状神经纤维瘤的起源。NF1基因编码调节细胞生长的蛋白质。存在两种雪旺细胞:有髓鞘雪旺细胞和非髓鞘雪旺细胞。有髓鞘雪旺细胞用髓磷脂覆盖大直径(>1微米)周围神经系统(PNS)轴突,而非髓鞘雪旺细胞用其胞质突起包裹小直径PNS轴突。在非突变非髓鞘雪旺细胞中,它们围绕轴突的聚集被称为雷马克束。然而,突变非髓鞘雪旺细胞不会形成正常的雷马克束。相反,它们无法正确包围和隔离引起丛状神经纤维瘤的靶轴突。此外,一旦非髓鞘雪旺细胞的NF1基因失活,它就会开始迅速增殖。

[0018] 据推测,增殖的非髓鞘雪旺细胞分泌促进NF1基因杂合的不同种类细胞迁移到由非髓鞘雪旺细胞产生的增生性病变中的化学引诱物。这些细胞种类包括成纤维细胞、神经束膜细胞、内皮细胞和肥大细胞。然后肥大细胞分泌改变发展中的肿瘤微环境并导致神经纤维瘤形成的有丝分裂原或生存因子。

[0019] 在本发明中,并且如通过下面的体外数据所证明的,硝羟喹啉在NF1缺陷型雪旺细胞中抑制细胞增殖并增加细胞凋亡,并且因此是对丛状神经纤维瘤的有效治疗。优选地,硝羟喹啉用于丛状神经纤维瘤的治疗或预防,其中受试者患有I型神经纤维瘤病。

[0020] 如本文所用,提到术语“治疗(treatment)”或“治疗(treating)”,我们是指治疗性(治愈性)治疗,其包括减小皮肤神经纤维瘤的大小。蛋白质黑色素瘤抑制活性的血液测试

可用于检测神经纤维瘤的存在。如本文所用,提到术语“预防(prevention)”或“预防(preventing)”,我们是指“预防性”治疗,其包括向具有突变(例如NF1缺陷型)非髓鞘雪旺细胞但尚未发展成丛状神经纤维瘤的患者施用本发明的组合物。突变(例如,NF1缺陷型)非髓鞘雪旺细胞可能已经开始增殖,诸如快速增殖。

[0021] “患者”和“受试者”可互换地使用,并且是指要被施用硝羟喹啉的受试者。优选地受试者是人。合适地,受试者患有I型神经纤维瘤病。在一个实施方案中,患者为儿科患者,优选2岁及以上的儿科患者,优选患有NF1的儿科患者。

[0022] 在一个实施方案中,硝羟喹啉用于丛状神经纤维瘤的治疗或预防,其中患者已经或将要进行手术以切除一些或全部丛状神经纤维瘤。如果丛状神经纤维瘤是大的和/或跨越组织边界扩展,因此很难通过手术将其全部切除和/或将至少其中一些快速切除是期望的/有益的,则这可能是特别有利的。

[0023] 术语“手术”具有其在本领域中的普通含义。手术是一种侵入性技术,其基本原理是出于诊断或治疗原因而对器官/器官系统/组织进行物理干预。

[0024] 如本文所用,药学上可接受的盐是与药学上可接受的酸或碱形成的盐。药学上可接受的酸包括无机酸和有机酸两者,无机酸诸如盐酸、硫酸、磷酸、二磷酸、氢溴酸或硝酸,有机酸诸如柠檬酸、富马酸、马来酸、苹果酸、抗坏血酸、琥珀酸、酒石酸、苯甲酸、乙酸、甲烷磺酸、乙烷磺酸、水杨酸、硬脂酸、苯磺酸或对甲苯磺酸。药学上可接受的碱包括碱金属(例如钠或钾)和碱土金属(例如钙或镁)氢氧化物以及有机碱(诸如烷基胺、芳基胺或杂环胺)。

[0025] 本发明涉及一种包含硝羟喹啉或其药学上可接受的盐的组合物,该组合物用于在丛状神经纤维瘤的治疗或预防中使用。

[0026] 在替代性实施方案中,本发明涉及一种包含硝羟喹啉或其药学上可接受的盐的组合物,该组合物用于在丛状神经纤维瘤的治疗或预防中使用,其中硝羟喹啉是该组合物中的唯一活性剂。提到唯一活性剂,其意指组合物不含可在丛状神经纤维瘤的治疗或预防中使用的其他组分。在替代性实施方案中,组合物进一步包含用于治疗丛状神经纤维瘤的第二活性剂,优选地其中第二活性剂是司美替尼或其药学上可接受的盐。

[0027] 在替代性实施方案中,本发明涉及一种包含硝羟喹啉或其药学上可接受的盐的组合物,该组合物用于与包含司美替尼或其药学上可接受的盐的第二组合物组合使用,其中这两种组合物被同时地、单独地或循序地施用于受试者。

[0028] 如本文所用,“单独”施用意指药品作为同一总体剂量方案(其可包括许多天)的一部分(但优选地在同一天)被施用。如本文所用,“同时地”意指药品应被一起服用或被配制为单一组合物。如本文所用,“循序地”意指药品在约同一时间(并且优选地在彼此的约1小时内)被施用。优选地,药品被同时地施用,即被一起服用或被配制为单一组合物。最优选地,它们被配制为单一组合物。

[0029] 本发明的组合物可含有药学上可接受的载体。提到“药学上可接受的载体”是意指与组合物的其他成分相容并且对接受者无害的任何稀释剂或赋形剂,诸如填充剂或粘结剂。可根据标准药学实践基于所期望的施用途径来选择药学上可接受的载体。

[0030] 在本发明中,组合物可以多种剂型来施用。在一个实施方案中,组合物可被配制为适用于口服、直肠、肠胃外、鼻内或经皮施用或者通过吸入或通过栓剂施用的形式。

[0031] 组合物可口服施用,例如作为片剂、锭剂、糖锭、水性或油性悬浮液、可分散粉末或

颗粒剂。优选地,组合物被配制为使得其适用于口服施用,例如片剂和胶囊。片剂和胶囊剂可以用以下制备:粘合剂,例如糖浆、阿拉伯胶、明胶、山梨糖醇、黄蓍胶、纤维素或聚乙烯吡咯烷酮;填充剂,诸如乳糖、蔗糖、玉米淀粉、磷酸钙、山梨糖醇或甘氨酸;润滑剂,诸如硬脂酸镁、滑石粉、聚乙二醇或二氧化硅;以及表面活性剂,诸如十二烷基硫酸钠。液体组合物可以含有常规添加剂,诸如悬浮剂,例如山梨糖醇糖浆、甲基纤维素、转化糖浆、明胶、羧甲基纤维素或食用脂肪;乳化剂和表面活性剂,诸如卵磷脂或阿拉伯胶;植物油,诸如杏仁油、椰子油、鱼肝油或花生油;防腐剂,诸如丁基羟基苯甲醚(BHA)和丁基羟基甲苯(BHT)。液体组合物可被封装在例如明胶中以提供单位剂型。

[0032] 组合物也可肠胃外施用,无论是皮下、静脉内、肌内、胸骨内、经皮还是通过输注技术。

[0033] 组合物也可通过吸入进行施用。与许多通过口服途径服用的药物相比,吸入药物的优点是其直接递送到血液供应丰富的区域。因此,由于肺泡具有巨大的表面积和丰富的血液供应,所以吸收非常快,并且绕过了首过代谢。

[0034] 本发明也提供了含有本发明组合物的吸入装置。通常,所述装置是定量吸入器(MDI),其含有药学上可接受的化学推进剂以将药物推出吸入器。

[0035] 组合物也可通过鼻内施用进行施用。鼻腔的高渗透性组织非常容易接受药物,并且快速和有效地吸收药物。与注射相比,鼻药品递送的疼痛和侵入性较小,从而减少了患者的焦虑。通过这种方法,吸收非常快,并且通常绕过首过代谢,因而减少患者间的差异。另外,本发明也提供了一种含有根据本发明的组合物的鼻内装置。

[0036] 组合物也可通过经皮施用进行施用。对于局部递送,可采用经皮和穿粘膜贴剂、乳膏、软膏、凝胶剂、溶液或悬浮液。因此,本发明也提供了一种含有组合物的经皮贴剂。

[0037] 组合物也可通过舌下施用进行施用。因此,本发明也提供了一种包含组合物的舌下片剂。

[0038] 组合物也可用通过除患者的正常代谢之外的过程来减少物质降解的药剂(诸如抗菌剂或蛋白酶(其可能存在于患者中或生活在患者体表或体内的共生或寄生生物中,并且其能够降解化合物)的抑制剂)进行配制。

[0039] 用于口服施用的液体分散剂可以是糖浆、乳剂和悬浮液。

[0040] 悬浮液和乳剂可含有作为载体的例如天然树胶、琼脂、海藻酸钠、果胶、甲基纤维素、羧甲基纤维素或聚乙烯醇。用于肌肉注射的悬浮液或溶液可与活性化合物一起含有药学上可接受的载体,例如无菌水、橄榄油、油酸乙酯、乙二醇(例如丙二醇)以及(如果期望的话)适量的盐酸利多卡因。

[0041] 用于注射或输注的溶液可包含作为载体的例如无菌水,或者优选地其可以呈无菌水性等渗盐溶液的形式。

[0042] 在本发明的实施方案中,组合物以有效量进行施用以治疗或预防丛状神经纤维瘤。有效剂量对于本领域中的技术人员而言将是显而易见的并且取决于许多因素,包括年龄、性别、体重,医疗从业者将能够确定这些因素。

[0043] 在优选的实施方案中,组合物包含30mg至600mg、优选地50mg至500mg、更优选地100mg至400mg、还更优选地150mg至350mg、最优选地200mg至300mg硝羟喹啉。

[0044] 组合物可每天一次、每天两次、每天三次或每天四次进行施用。

[0045] 在本发明的实施方案中,组合物每天至少一次进行施用。优选地,其作为单个每日剂量进行施用。优选地,单个每日剂量为90mg至1800mg、优选地150mg至1500mg、更优选地300mg至1200mg、还更优选地450mg至1050mg、最优选地600mg至900mg的硝羟喹啉。

[0046] 在本发明的实施方案中,组合物每日两次进行施用。优选地,每个剂量为45mg至900mg、优选地75mg至750mg、更优选地150mg至600mg、还更优选地225mg至525mg、最优选地300mg至450mg的硝羟喹啉。

[0047] 在本发明的实施方案中,组合物每日三次进行施用。优选地,每个剂量为30mg至600mg、优选地50mg至500mg、更优选地100mg至400mg、还更优选地150mg至350mg、最优选地200mg至300mg的硝羟喹啉。

[0048] 在本发明的实施方案中,组合物每日四次进行施用。优选地,每个剂量为15mg至500mg、优选地50mg至400mg、更优选地100mg至300mg、还更优选地125mg至225mg、最优选地150mg至200mg的硝羟喹啉。

[0049] 优选地,剂量方案为使得硝羟喹啉的总每日剂量不超过1500mg。

[0050] 合适地,硝羟喹啉的剂量可以在50mg/kg与250mg/kg之间,更优选地在60mg/kg与200mg/kg之间,甚至更优选地在80mg/kg与170mg/kg之间,诸如在100mg/kg与150mg/kg之间。

[0051] 合适地,硝羟喹啉的有效剂量导致细胞中 $1\mu\text{M}$ 至 $150\mu\text{M}$ 、优选地 $10\mu\text{M}$ 至 $100\mu\text{M}$ 、更优选地 $25\mu\text{M}$ 至 $50\mu\text{M}$ 的浓度。

[0052] 合适地,包含硝羟喹啉的组合物和包含第二活性剂(优选地司美替尼)的第二组合物为单个每日剂量。合适地,这两种组合物同时地进行施用,即硝羟喹啉和司美替尼被一起服用。组合物也可循序地(即约同时,并且优选地在彼此的约1小时内)进行施用。

[0053] 在其中组合物包含司美替尼或组合物用于与包含司美替尼的第二组合物组合使用的实施方案中,合适地,包含司美替尼的组合物包含介于1mg与75mg之间的司美替尼、优选地介于5mg与50mg之间的司美替尼、更优选地介于10mg与35mg之间的司美替尼、最优选地介于15mg与30mg之间的司美替尼。

[0054] 合适地,施用于受试者的司美替尼的有效剂量为介于 $1\text{mg}/\text{m}^2$ 与 $75\text{mg}/\text{m}^2$ 之间的司美替尼、优选地介于 $5\text{mg}/\text{m}^2$ 与 $50\text{mg}/\text{m}^2$ 之间的司美替尼、更优选地介于 $10\text{mg}/\text{m}^2$ 与 $35\text{mg}/\text{m}^2$ 之间的司美替尼、最优选地介于 $15\text{mg}/\text{m}^2$ 与 $30\text{mg}/\text{m}^2$ 之间的司美替尼。

[0055] 为了治疗或预防丛状神经纤维瘤,包含硝羟喹啉的组合物以慢性剂量方案(即慢性、长期治疗)进行使用。合适地,方案持续至少一个月、合适地至少两个月,诸如至少三个月。

[0056] 本发明还涉及一种试剂盒,其包含:(i)至少一个剂量的硝羟喹啉或其药学上可接受的盐;以及任选地(ii)至少一个剂量的司美替尼或其药学上可接受的盐,其用于同时、单独或依次在丛状神经纤维瘤的治疗或预防中使用。

[0057] 本发明也涉及硝羟喹啉或其药学上可接受的盐用于制备药物的用途,该药物用于在丛状神经纤维瘤的治疗或预防中使用。本发明的该实施方案可具有上述优选特征中的任何优选特征。

[0058] 本发明也涉及一种治疗或预防丛状神经纤维瘤的方法,该方法包括:向患者施用包含硝羟喹啉或其药学上可接受的盐的组合物。本发明的该实施方案可具有上述优选特征

中的任何优选特征。施用的方法可根据上述途径中的任何途径。

[0059] 为了避免疑问,本发明也包括在体内反应以产生本发明的化合物的前体药物。

[0060] 实验部分

[0061] 实例1-利用WT和NF1缺陷型雪旺细胞进行体外药物测试

[0062] 在该研究中,利用永生化野生型(WT)和NF1缺陷型(Nf1^{-/-})雪旺细胞(SC)研究了硝羟喹啉的功效及其减少细胞增殖、增加细胞凋亡和整体细胞活力的能力。

[0063] Nf1^{-/-}SC在体外具有增加的存活和增殖,与体内表型一致(Kim HA等人,Mol Cell Biol.1997;17(2):862-72)。当前研究利用WT(ipn02.3λ)和NF1^{-/-}(ipNF95.6)永生化人源SC系。比较NF1^{-/-}与WT细胞之间硝羟喹啉的选择性。

[0064] 用从105μM开始连续稀释的硝羟喹啉处理细胞并孵育48小时。孵育期后,如下所述进行增殖、活力和细胞凋亡测定:

[0065] ●使用测量ATP消耗的CellTiter-Glo测定(Promega)评估细胞增殖。简言之,将WT和Nf1^{-/-}细胞在10,000个细胞/孔的浓度下一式三份铺板在96孔培养皿中,在100μl含有1%谷氨酰胺、10% FBS、2%碳酸氢钠和1%青霉素/链霉素的DMEM中,在37°C、5% CO2湿润培养箱中,添加或不添加硝羟喹啉,持续48小时。孵育之后,向每个孔添加100μl CellTiterGlo试剂。10分钟后,使用96孔微孔板光度计对板进行读数。

[0066] ●使用Caspase-Glo 3/7试剂盒(Promega)评估细胞凋亡。简言之,将WT和Nf1^{-/-}细胞在10,000个细胞/孔的浓度下一式三份铺板在96孔培养皿中,在100μl含有1%谷氨酰胺、10% FBS、2%碳酸氢钠和1%青霉素/链霉素的DMEM中,在37°C、5% CO2湿润培养箱中,添加或不添加硝羟喹啉,持续48小时。孵育之后,向每个孔添加100μl Caspase-Glo 3/7试剂。10分钟后,使用96孔光度计对板进行读数并测量半胱天冬酶3/7活性。

[0067] 结果

[0068] 硝羟喹啉以剂量反应方式抑制细胞增殖并增加细胞凋亡,如图1所示。在WT和Nf1^{-/-}雪旺细胞中,在大于1μM的浓度下可观察到抗增殖作用。在两种SC中,在大于3μM的浓度下,细胞凋亡的诱导是明显的,但在大于10μM的浓度下,Nf1^{-/-}SC中增加的幅度显著更大。

[0069] 实例2-Nf1-KO小鼠中的体内药物测试

[0070] 该研究的目的是评估硝羟喹啉对1型神经纤维瘤病小鼠模型(更具体地说是发展为丛状神经纤维瘤的模型)的影响。该研究与AstraZeneca批准司美替尼治疗pNF时使用的研究相同。

[0071] 动物

[0072] 该研究使用丛状神经纤维瘤的Postn-Cre⁺Nf1^{f1/f1}小鼠模型。这些小鼠中出现的神经纤维瘤忠实地再现了人类疾病(Burks等人2019)。4个月大时,当小鼠(雄性和雌性)患有确定的丛状神经纤维瘤时,将它们随机分为三个治疗组,并经由口腔灌胃施用硝羟喹啉120mg/kg QD、120mg/kg BD或媒介物(10% DMSO溶于90%玉米油)。将小鼠治疗12周然后处死。将小鼠灌注并固定在10%中性缓冲福尔马林中。

[0073] 神经体积

[0074] 将整个身体在5%甲酸中脱钙,解剖脊髓近端神经树,并经由卡尺(如图3所示)测量每只小鼠跨越四根神经的神经宽度(包括沿其形成的肿瘤)。随后使用球体计算来计算神

经体积:0.52x(宽度)2w长度。

[0075] 肿瘤数量

[0076] 为了量化肿瘤数量,神经被加工成石蜡块,切片,并使用马森三色染色对胶原蛋白进行染色。临床医生根据这些载玻片对肿瘤数量进行评分。

[0077] 统计分析

[0078] 使用GraphPad Prism(版本9)生成图表和数据统计分析。

[0079] 结果

[0080] 与媒介物治疗的对照小鼠相比,以两种剂量方案(120mg/kg QD和120mg/kg BD)用硝羟喹啉治疗的小鼠的近端神经体积较低(图2)。丛状肿瘤沿着近端神经形成,因此近端神经体积的减少可以解释为丛状肿瘤尺寸的减少。与媒介物对照组相比,除了总神经体积的减少之外,在硝羟喹啉治疗的小鼠中还观察到沿着神经的肿瘤数量的减少(图2)。

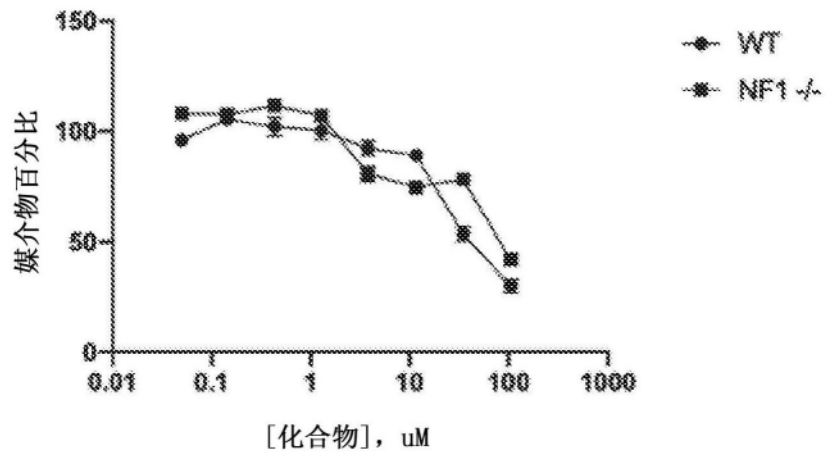
[0081] 结论

[0082] 硝羟喹啉在Nf1^{-/-}雪旺细胞中体外抑制细胞增殖并增加细胞凋亡。在丛状神经纤维瘤小鼠模型中,与媒介物对照动物相比,硝羟喹啉治疗的小鼠具有较低的近端神经体积和较少的肿瘤。因此,预计硝羟喹啉将减少、治疗和预防丛状神经纤维瘤。

[0083] 参考文献

[0084] Burks CA,Rhodes SD,Bessler WK,Chen S,Smith A,Gehlhausen JR,Hawley ET,Jiang L,Li X,Yuan J,Lu Q,Jacobsen M,Sandusky GE,Jones DR,Clapp DW,Blakeley JO. 酮替芬调节肥大细胞对试剂盒配体的趋化性,但不影响Nf1缺陷型小鼠的神经纤维瘤中的肥大细胞数量、脱颗粒或肿瘤行为(Ketotifen Modulates Mast Cell Chemotaxis to Kit-Ligand,but Does Not Impact Mast Cell Numbers,Degranulation,or Tumor Behavior in Neurofibromas of Nf1-Deficient Mice).《分子癌症治疗》(Mol Cancer Ther).2019年12月;18(12):2321-2330。

增殖



细胞凋亡

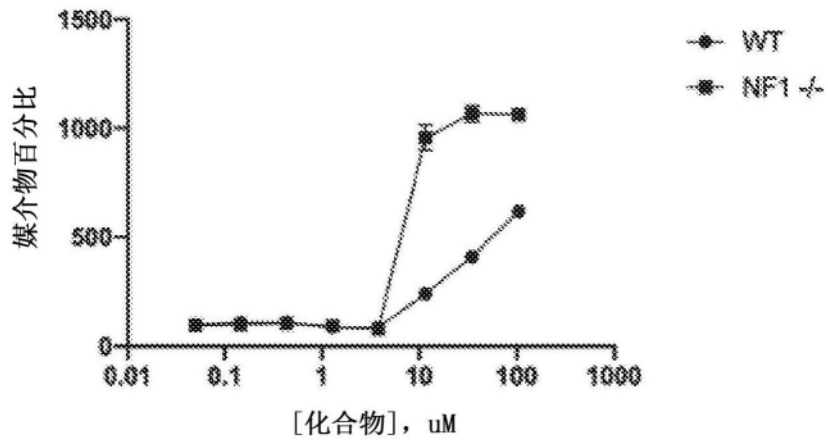


图1

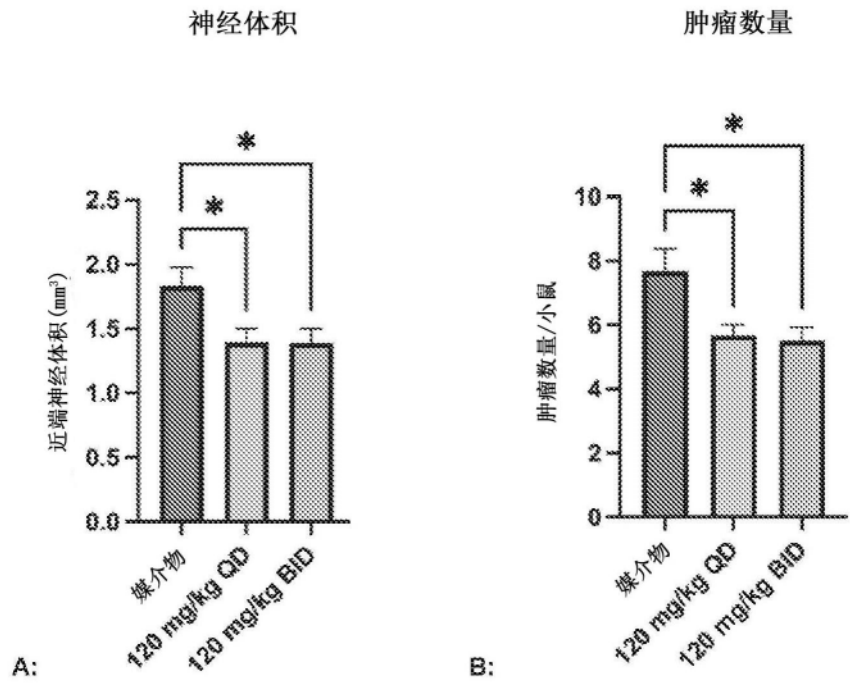


图2



图3