(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2025 년 3 월 13 일 (13.03.2025)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2025/053613 A1

(51) 국제특허분류:
A61K 48/00 (2006.01) *A61K 31/4184* (2006.01)
A61K 31/713 (2006.01) *A61K 45/06* (2006.01)
A61K 31/496 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
A61K 31/415 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2024/013339

(22) 국제출원일: 2024 년 9 월 4 일 (04.09.2024)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

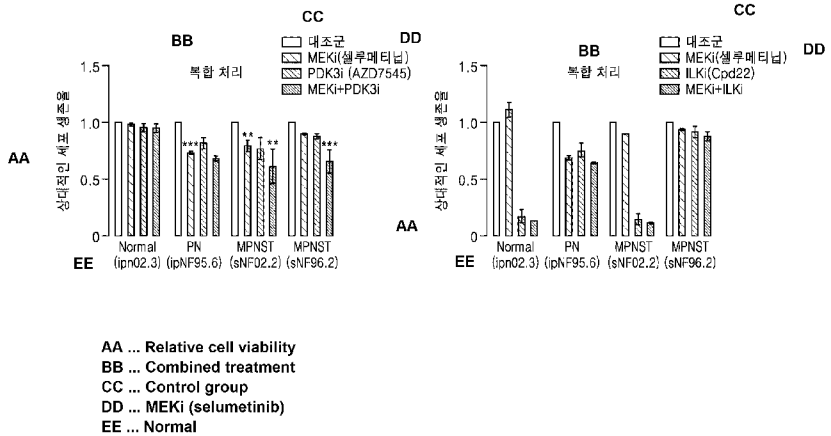
(30) 우선권정보:
10-2023-0118270 2023 년 9 월 6 일 (06.09.2023) KR

(71) 출원인: 재단법인 아산사회복지재단 (**THE ASAN FOUNDATION**) [KR/KR]; 05505 서울특별시 송파구 올림픽로43길 88, Seoul (KR). 울산대학교 산학협력단 (**UNIVERSITY OF ULSAN FOUNDATION FOR INDUSTRY COOPERATION**) [KR/KR]; 44610 울산광역시 남구 대학로 93, Ulsan (KR). (주)휴먼스케이프 (**HUMANSCAPE INC.**) [KR/KR]; 06163 서울특별시 강남구 봉은사로86길 6, 601호, Seoul (KR).

(72) 발명자: 이범희 (**LEE, Beom Hee**); 05530 서울특별시 송파구 올림픽로 525, 104동 1605호, Seoul (KR). 김경곤 (**KIM, Kyung Gon**); 05507 서울특별시 송파구 올림픽로 435, 108동 2302호, Seoul (KR). 김종재 (**KIM, Chong Jai**); 05392 서울특별시 강동구 천호옛길 30, 1006호, Seoul (KR). 도효상 (**DO, Hyo Sang**); 05505 서울특별시 송파구 올림픽로43길 88, 융합연구관 4층, Seoul (KR). 김소영 (**KIM, So Young**); 05505 서울특별시 송파구 올림픽로43길 88, 융합연구관 4층, Seoul (KR). 장민후 (**CHANG, Min-Hoo**); 06163 서울특별시 강남구 봉은사로86길 6, 601호, Seoul (KR).

(54) **Title:** PHARMACEUTICAL COMPOSITION FOR PREVENTING OR TREATING PERIPHERAL NERVE TUMOR COMPRISING ILK INHIBITOR AND USE THEREOF

(54) 발명의 명칭: ILK 저해제를 포함하는 말초신경종양 예방 또는 치료용 약학 조성물 및 이의 용도



(57) **Abstract:** The present invention relates to a pharmaceutical composition for preventing or treating peripheral nerve tumor, comprising an integrin-linked kinase (ILK) inhibitor, and a use thereof. The composition according to one aspect has a synergistic anticancer effect when co-administered with a mitogen-activated protein kinase kinase 1 (MEK) inhibitor.

(57) 요약서: ILK(Integrin-Linked Kinase) 저해제(inhibitor)를 포함하는 말초신경종양(Peripheral Nerve Tumor) 예방 또는 치료용 약학 조성물 및 이의 용도에 관한 것으로, 일 양상에 따른 조성물은 MEK(mitogen-activated protein kinase kinase 1) 저해제와의 병용투여시 항암 상승(synergy) 효과가 있다.

WO 2025/053613 A1

[다음 쪽 계속]

(74) 대리인: 특허법인더웨이브 (THEWAVE IP LAW FIRM); 06097 서울특별시 강남구 선릉로 602 6층, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: ILK 저해제를 포함하는 말초신경 종양 예방 또는 치료용 약학 조성물 및 이의 용도

기술분야

[1] ILK 저해제를 포함하는 말초신경종양 예방 또는 치료용 약학 조성물 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경기술

[2] 제1형 신경섬유종증(Neurofibromatosis Type1, NF1)은 말초신경을 따라 종양을 형성하는 상염색체 우성유전 질환으로 약 3,500명 중 1명의 비율로 발생한다. 종양은 신경이 있는 신체 어느 부위에나 발생할 수 있고, 그 수가 한 개 이상으로 생기는 다발성이기 때문에 '신경섬유종증'이라고 한다.

[3] 제1형 신경섬유종증(NF1) 환자의 약 10%에서 총상신경섬유종(plexiform neurofibroma, PN)이 악성종양인 악성말초신경초종(malignant peripheral nerve sheath tumor, MPNST)으로 발전하는 것으로 알려져 있다. 제1형 신경섬유종증(NF1) 환자에서 양성종양의 악성전개(malignant progression)는 급속도로 진행되기 때문에 매우 높은 치사율을 나타낸다. 악성말초신경초종(MPNST)으로 악성화가 전개된 경우, 종양의 절제 등의 대중요법만이 유일한 치료법이나, 종양의 위치에 따라 수술이 불가능한 경우가 많아 암의 진행 시기에 관계없이 악성말초신경초종(MPNST)의 발생은 환자의 생명과 직결된다.

[4] 제1형 신경섬유종증(NF1)에서 악성말초신경초종(MPNST)의 발생 기전은 종양내 제1형 신경섬유종증(NF1)의 완전 소실, RAS-MAPK 신호의 과도한 활성화, CDKN2A 유전자의 소실, polycomb repressive complex 2 (PRC2)의 구성 유전자 SUZ12 와 EED의 소실, 종양억제유전자 TP53 의 소실, PI3K-AKT-mTOR 신호체계의 비정상적 항진, epidermal growth factor receptor (EGFR), Platelet-derived growth factor receptor, Vascular endothelial growth factor receptor 등의 비정상적 활성화가 관여하는 것으로 알려져 왔다.

[5] 그러나, 제1형 신경섬유종증(NF1)에서 악성말초신경초종(MPNST)의 발생 기전에 기반하여 악성말초신경초종(MPNST)의 다양한 임상 연구가 진행되어 왔으나, 뚜렷한 치료효과를 내는 연구 성과는 없었다. 대표적인 치료방법으로 방사선요법, 외과적 수술 절제, 세포 독성약 등이 사용되고 있으나 장기간의 효과는 미비하여 새로운 치료법의 개발이 필요한 실정이다.

[6] 따라서, 새로운 접근법을 이용한 새로운 치료 표적 및 후보 물질이 필요한 실정이다.

[7] 이에, 제1형 신경섬유종증(NF1)과 악성말초신경초종(MPNST)의 새로운 치료 표적을 발굴하고, 상기 치료 표적 저해제(inhibitor)가 MEK 저해제와 항암 상승(synergy) 효과를 보이는 새로운 치료제로써의 활용가능성을 확인하였다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[8] 일 양상은 ILK(Integrin-Linked Kinase)의 발현 또는 활성 저해제(inhibitor)를 포함하는 말초신경종양(Peripheral Nerve Tumor) 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 것이다.

[9] 다른 양상은 ILK(Integrin-Linked Kinase) 저해제(inhibitor)를 포함하는 말초신경종양(Peripheral Nerve Tumor) 예방 또는 치료용 키트을 제공하는 것이다.

[10] 또 다른 양상은 말초신경종양(Peripheral Nerve Tumor)을 예방 또는 치료하기 위한 ILK(Integrin-Linked Kinase)의 발현 또는 활성 저해제(inhibitor)를 포함하는 조성물의 용도를 제공하는 것이다.

[11] 또 다른 양상은 유효량의 ILK(Integrin-Linked Kinase)의 발현 또는 활성 저해제(inhibitor)를 포함하는 조성물을 그를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는 말초신경종양(Peripheral Nerve Tumor) 예방 또는 치료 방법을 제공하는 것이다.

[12] 또 다른 양상은 말초신경종양(Peripheral Nerve Tumor) 예방 또는 치료용 의약 제조에 사용하기 위한 ILK(Integrin-Linked Kinase)의 발현 또는 활성 저해제(inhibitor)를 포함하는 조성물의 용도를 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

[13] 일 양상은 ILK(Integrin-Linked Kinase)의 발현 또는 활성 저해제(inhibitor)를 포함하는 말초신경종양(Peripheral Nerve Tumor) 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[14] 본 명세서의 용어, "말초신경종양(Peripheral Nerve Tumor)"은 말초신경계에서 발생하는 종양으로, 손가락, 손목, 발목 등의 신경과 근육, 피부 등 신체의 끝단과 조직들을 연결하는 신경계에 발생하는 종양을 의미한다. 상기 말초신경종양은 다양한 종류의 종양으로 분류되며, 주로 양성 종양으로 분류되지만, 악성 종양일 수도 있다. 일부 말초신경종양은 특정 유전적인 질환인 신경섬유종증(Neurofibromatosis)과 관련될 수 있다.

[15] 상기 말초신경종양(Peripheral Nerve Tumor)은 신경섬유종(Neurofibroma), 신경절종(Ganglioneuroma), 신경절간질종(Ganglioneuroblastoma), 신경원추종(Neuroma), 신경단종(Neurilemoma), 신경원추종(Neuroma), 말초신경초기절제종(Peripheral Primitive Neuroectodermal Tumor, PNET), 신경절외신경원종(Extra-adrenal Paraganglioma), 신경섬유육종 (Neurofibrosarcoma), 신경절외신경섬유종(Extra-adrenal Neurofibroma), 제1형 신경섬유종증(Neurofibromatosis Type1, NF1), 제2형 신경섬유종증(Neurofibromatosis Type2, NF2), 총상신경섬유종(plexiform neurofibroma, PN), 악성말초신경초종(malignant peripheral nerve sheath tumor, MPNST) 등을 포함할 수 있다.

[16] 상기 "악성말초신경초종(malignant peripheral nerve sheath tumor, MPNST)"은 말초신경에서 기원한 방추세포육종(spindle cell sarcoma)으로, 고도로 악성화된 전이암으로 높은 사망률을 나타낸다. 진단 후 수술적 절제를 요하지만, 수술 후에도 약 50%는 재발의 위험이 있다. 또한 화학 요법, 방사선 요법 등에 낮은 반응을 보여 악성말초신경초종(MPNST) 환자들의 5년 생존률은 20-50%에 머문다.

[17] 일 구체예에 있어서, 상기 악성말초신경초종은 총상신경섬유종(plexiform neurofibroma, PN)의 악성화로 유발되는 것을 특징으로 하는 것일 수 있다.

[18] 본 명세서의 용어 "ILK 발현 또는 활성 저해제(Integrin-Linked Kinase inhibitor)"는 ILK 유전자 또는 단백질에 직접 결합하거나, ILK의 리간드에 결합하거나 또는 ILK와 이의 리간드에 결합하는 것을 저해하는 것일 수 있다. 이를 통해 ILK의 발현 또는 활성을 억제하거나 저해할 수 있으며, 종국적으로 종양의 성장을 저해하거나 사멸시킬 수 있다. ILK 저해제 효능은 예를 들어, 50% (반-최대 억제제 농도 또는 IC_{50})에서 ILK 저해제 농도에 의해 측정될 수 있다.

[19] 상기 리간드(ligand)는 생물학적 목적을 수행하기 위해 수용체 단백질 등의 생체 분자에 결합하여 복합체를 형성하는 물질을 의미하며, 기질(substrate), 활성제(activator), 신호전달 지질(signaling lipid), 신경전달물질(neurotransmitter) 등을 포함한다.

[20] 상기 "저해제(inhibitor)"는 "억제제"와 상호교환적으로 사용될 수 있으며, "저해" 또한 "억제"와 상호교환적으로 사용될 수 있다. 상기 "저해"또는 "억제"는 폴리펩티드의 활성, 결합 또는 발현 감소를 지칭한다.

[21] 본 명세서의 용어, "예방"은 본 발명에 따른 약학 조성물의 투여에 의해 암을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미한다. 또한, 본 명세서의 용어, "치료"는 본 발명에 따른 약학 조성물의 투여에 의해 암이 호전되거나 완치되는 모든 행위를 의미한다.

[22] 일 구체예에 따르면, 상기 ILK 발현 저해제는 ILK의 DNA 또는 mRNA에 상보적으로 결합하는 안티센스 핵산, siRNA, shRNA, miRNA 및 리보자임으로 이루어진 그룹에서 선택되는 어느 하나 이상인 것일 수 있다.

[23] 본 명세서의 용어, "발현 저해"는 유전자 전사의 억제 및 단백질로의 번역 억제를 포함한다. 또한, 유전자 발현이 완전히 정지된 것뿐만 아니라 발현이 감소된 것도 포함된다.

[24] 본 명세서에서 용어, "안티센스 핵산"은 특정 mRNA의 서열에 대해 상보적인 핵산 서열을 함유하고 있는 DNA, RNA 또는 이들의 단편 또는 유도체를 의미하며, mRNA의 서열에 상보적으로 결합 또는 혼성화하여 mRNA의 단백질로의 번역을 저해하는 작용할 수 있다.

[25] 본 명세서에서 용어, "siRNA(small interfering RNA)"는 특정 mRNA의 절단(cleavage)을 통해 RNAi(RNA interference)를 유도할 수 있는 짧은 이중사슬 RNA를 의미한다. siRNA는 표적 유전자의 mRNA와 상동인 서열을 갖는 센스 RNA 가닥과 이와 상보적인 서열을 갖는 안티센스 RNA 가닥을 포함한다. siRNA는 표적

유전자의 발현을 억제할 수 있으므로, 유전자 넉다운 방법 또는 유전자치료 방법 등에 사용될 수 있다.

[26] 일 구체예에 있어서, ILK 발현 저해제로 사용될 수 있는 siRNA는 서열번호 1 내지 4의 서열로 이루어진 그룹에서 선택되는 어느 하나 이상인 것일 수 있다.

[27] 본 명세서에서 용어, "shRNA(short hairpin RNA)"는 단일가닥 RNA로서 수소결합에 의해 이중가닥 부분을 형성하는 줄기(stem) 부분과 고리 형태를 띄는 루프(loop) 부분으로 구분되는 RNA를 의미한다. 다이서(Dicer) 등의 단백질에 의해 프로세싱되어 siRNA로 변환되고 siRNA와 동일한 기능을 수행할 수 있다.

[28] 본 명세서에서 용어, "miRNA(microRNA)"는 표적 RNA의 분해를 촉진시키거나 또는 이들의 번역을 억제시킴으로써 유전자 발현을 전사 후에 조절하는 21 내지 23개의 비코딩 RNA를 의미한다.

[29] 본 명세서에서 용어, "리보자임(ribozyme)"은 특정 염기 서열을 인식하여 자체적으로 이를 절단하는 효소와 같은 기능을 가진 RNA 분자를 의미한다. 리보자임은 타겟 전령 RNA 가닥의 상보적인 염기서열로 특이성을 가지고 결합하는 영역과 타겟 RNA를 절단하는 영역으로 구성될 수 있다.

[30] 상기 ILK의 DNA 또는 mRNA에 상보적으로 결합하는 안티센스 핵산, siRNA, shRNA, miRNA, 리보자임 등은 ILK 및/또는 ILK 리간드의 전사(transcription), 세포질 내로의 전위(translocation), 성숙(maturation) 또는 번역(translation) 등 다른 임의의 ILK 및/또는 ILK의 리간드의 생물학적 기능에 대한 필수적인 활성을 저해할 수 있다.

[31] 일 구체예에 따르면, 상기 ILK 활성 저해제는 ILK의 단백질에 특이적으로 결합하는 화합물, 펩티드, 펩티드 미메틱스, 융합 단백질, 항체, 앱타머 및 항체-약물 복합체(ADC; Antibody Drug Conjugate)로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 약학 조성물일 수 있다.

[32] 본 명세서에서 용어, "특이적"은 세포 내에서 다른 단백질에 영향을 미치지 않고 목적 단백질에만 결합하는 능력을 의미한다.

[33] 본 명세서에서 용어, "펩티드"는 단백질을 구성하는 작은 단위로서, 2개 이상의 아미노산이 펩티드 결합을 통해 연결된 구조를 가지고 있는 화합물을 의미한다.

[34] 본 명세서에서 용어, "펩티드 미메틱스(Peptide Minetics)"는 생체 분자의 구조와 기능을 모방하거나 개선하여 만들어진 인공적인 펩티드 분자를 의미한다. 상기 펩티드 미메틱스는 기존의 펩티드 분자와 비슷한 구조를 가지지만, 몇 가지 키워드를 변경하거나 추가함으로써 생체 내에서의 안정성, 생물활성, 특이성 등을 향상시킨 것을 포함한다.

[35] 본 명세서에서 용어, "융합 단백질(Chimeric protein)"은 단백질에 한 개 이상의 다른 단백질의 유전자를 연결시킨 후 발현시키는 인공 재조합 단백질을 의미한다.

[36] 본 명세서에서 용어, "항체"는 항원과 특이적으로 결합하여 항원-항체 반응을 일으키는 물질을 의미한다. 상기 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체

길이의 중쇄를 가지는 완전한 형태뿐만 아니라, 항체 분자의 기능적인 단편을 포함할 수 있다. 상기 항체 분자의 기능적인 단편이란 적어도 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 의미하며, 예를 들어 Fab, F(ab'), F(ab')2 또는 Fv 등일 수 있다. 또한 상기 항체는 다클론 항체, 단클론 항체 및 재조합 항체를 모두 포함한다. 또한 상기 항체는 당 업계에 널리 공지된 기술을 이용하여 용이하게 제조될 수 있다.

[37] 본 명세서에서 용어, "앱타머 (Aptamer)"는 그 자체로 안정된 삼차구조를 가지면서 표적분자에 높은 친화성과 특이성으로 결합할 수 있는 특징을 가진 단일가닥 핵산(DNA, RNA 또는 변형핵산)을 의미한다.

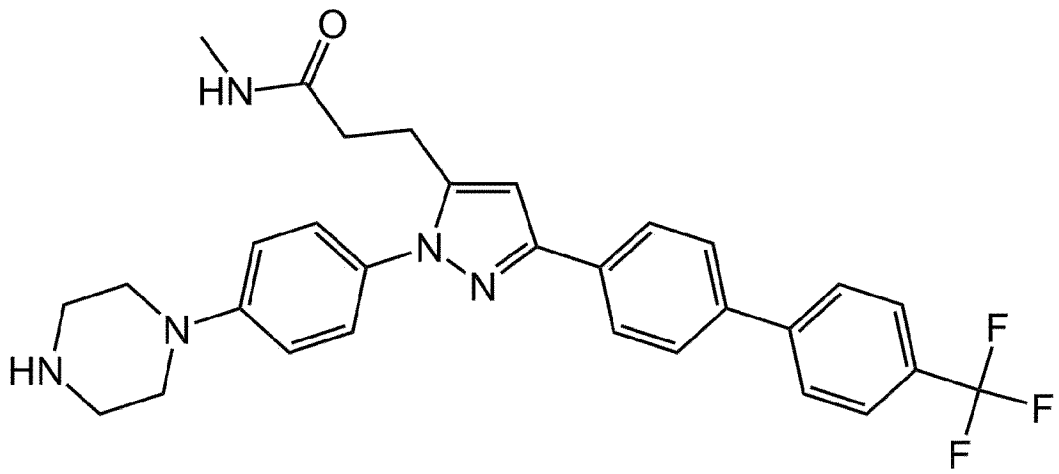
[38] 본 명세서의 용어, "항체-약물 복합체(ADC; Antibody Drug Conjugate)"는 표적 특이성을 지닌 항체에 링커(linker)를 통해 특정 약리기전을 갖는 저분자 약물을 탑재한 형태를 가지는 물질을 의미한다.

[39] 상기 ILK의 단백질에 특이적으로 결합하는 화합물, 펩티드, 펩티드 미메틱스, 융합 단백질, 항체, 앱타머 및 항체-약물 복합체(ADC; Antibody Drug Conjugate) 등은 ILK의 생물학적 기능에 대한 필수적인 활성을 저해할 수 있다.

[40] 일 구체예에 따르면, 상기 ILK 저해제는 Cpd 22 또는 QLT-0267일 수 있다.

[41] 상기 Cpd22(CAS 번호 : 2070015-22-2)는 ILK 저해제로서, OSU-T315 또는 ILK-IN-1으로 불리우기도 하며, 정식 명칭은 N-Methyl-3-(1-(4-(piperazin-1-yl)phenyl)-3-(4'-(trifluoromethyl)-[1,1'-biphenyl]-4-yl)-1H-pyrazol-5-yl)propanamide이고, 하기 화학식 1의 구조를 갖는 물질이다.

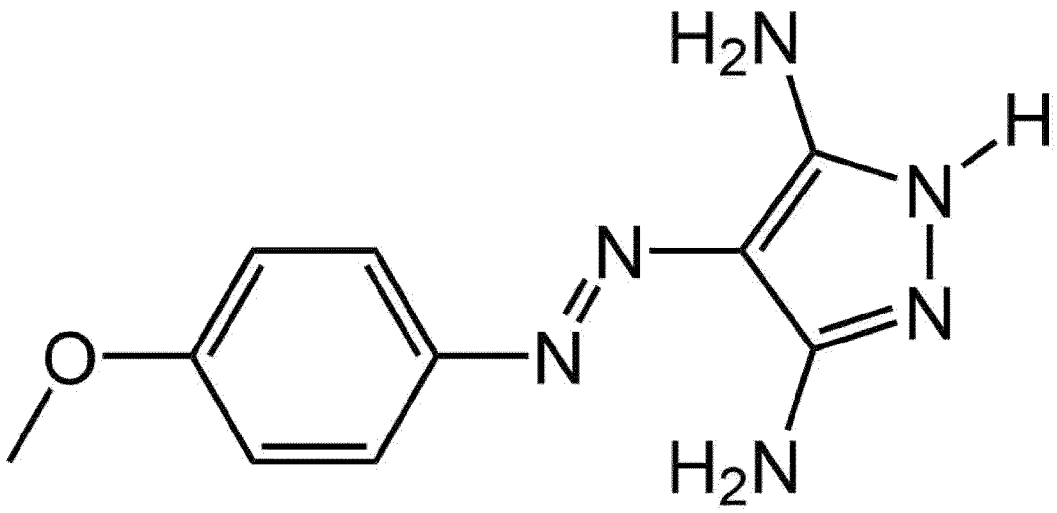
[42] [화학식 1]

[43] 

[44] 상기 QLT-0267(CAS 번호 : 6975-75-3)은 ILK 저해제로서, ILK-IN-3로 불리우기도 하며, 정식 명칭(Formal Name) 은 4-((4-methoxyphenyl)diazenyl)-1H-pyrazole-3,5-diamine이고, 하기 화학식 2의 구조를 갖는 물질이다.

[45] [화학식 2]

[46]



[47] 일 구체예에 있어서, 상기 ILK 저해제를 포함하는 약학 조성물은 SMAD3(Mothers Against Decapentaplegic Homolog 3), CFL1(Cofilin-1), PDK3(Pyruvate Dehydrogenase Kinase 3), PACSIN3(Protein Kinase C and Casein Kinase Substrate in Neurons 3) 및 MEK1(mitogen-activated protein kinase kinase 1)로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상 것의 발현 또는 활성 저해제를 더 포함하거나 병용투여되는 것일 수 있다.

[48] 본 명세서의 용어, "투여"는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 다양한 방법 및 전달 시스템 중 임의의 것을 사용하여 조성물을 대상체에게 물리적으로 도입하는 것을 의미한다.

[49] 본 명세서의 용어, "병용투여"는 두 개 이상의 약물 또는 치료 방법을 동시에 사용하여 질환을 치료하거나 관리하는 것을 의미한다. 상기 병용투여는 상기 ILK 발현 또는 활성 저해제와 SMAD3, CFL1, PACSIN3 및 MEK1으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상 것의 발현 또는 활성 저해제를 동시에 (simultaneous), 동반하여(concurrent), 순차적으로, 연속적으로, 교대로 또는 별도로 투여하는 것일 수 있다.

[50] 상기 동시(simultaneous) 투여는 실질적으로 동일 시간에 투여하는 것을 포함한다. 이러한 형태의 투여는 또한 "공동적(concomitant)" 투여로서 지칭될 수 있다. 상기 동반(concurrent) 투여는 활성제를 동일한 일반적인 기간내에, 예를 들어, 동일 날짜(들)에 투여하는 것을 포함하지만, 반드시 동시에 투여하는 것은 아니다. 상기 교대적 투여는, 특정 기간 동안, 예를 들어, 수일 또는 일주일 동안 하나의 제제를 투여한 후, 후속 기간 동안, 예를 들어, 수일 또는 일주일 동안 나머지 제제를 투여하고, 이어서 1 이상의 주기 동안 상기 패턴을 반복하는 것을 포함한다. 상기 순차적 또는 연속적 투여는 1 이상의 용량을 사용하여 제1 기간 동안 (예를 들어, 수일 또는 일주일 동안) 하나의 제제를 투여한 후, 1 이상의 용량을 사용하여 제2 및/또는 추가 기간 동안 (예를 들어, 수일 또는 일주일 동안) 나머지 제제(들)을 투여하는 것을 포함한다. 반드시 규칙적인 순서에 따르지 않고 치료 기간 동안 상이한 날에 활성제를 투여하는 것을 포함하는 중복 스케줄도 사용할 수 있

다. 예를 들어, 사용되는 제제 및 대상의 상태에 따라 이러한 일반적인 지침에 대한 변형이 사용할 수 있다.

[51] 일 구체예에 있어서, 상기 발현 저해제는 SMAD3(Mothers Against Decapentaplegic Homolog 3), CFL1(Cofilin-1), PDK3(Pyruvate Dehydrogenase Kinase 3), PACSIN3(Protein Kinase C and Casein Kinase Substrate in Neurons 3) 및 MEK1(mitogen-activated protein kinase kinase 1)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 DNA 또는 mRNA에 상보적으로 결합하는 안티센스 핵산, siRNA, shRNA, miRNA 및 리보자임으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상인 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 siRNA는 서열번호 5 내지 24의 서열로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상인 것일 수 있다.

[52] 일 구체예에 있어서, 상기 활성 저해제는 SMAD3, CFL1, PDK3, PACSIN3 및 MEK1으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 단백질에 특이적으로 결합하는 화합물, 펩티드, 펩티드 미메틱스, 융합 단백질, 항체, 앱타머 및 항체-약물 복합체(ADC; Antibody Drug Conjugate)로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 것일 수 있다.

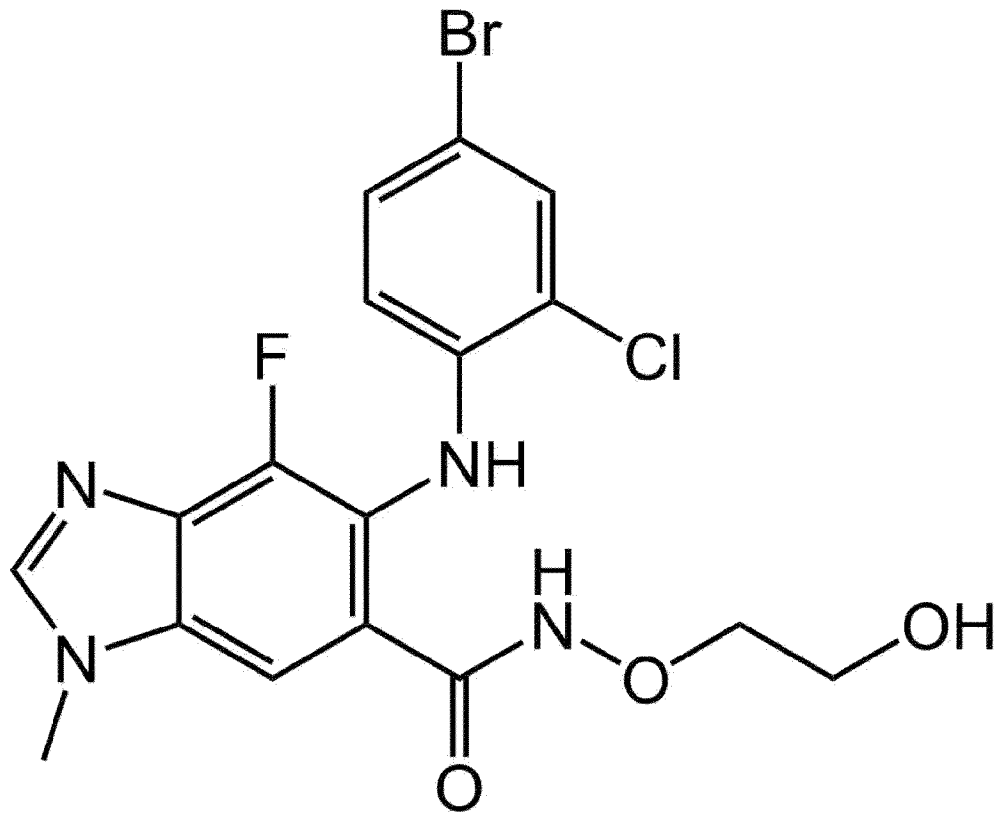
[53] 상기 말초신경종양, 악성말초신경초종, 저해제, 안티센스 핵산, siRNA, shRNA, miRNA , 리보자임, 펩티드, 펩티드 미메틱스, 융합 단백질, 항체, 앱타머 및 항체-약물 복합체(ADC) 등의 정의는 전술한 바와 같다.

[54] 일 구체예에 있어서, 상기 MEK1저해제는 셀루메티닙(selumetinib), 트라메티닙(trametinib), 피마서팁(pimasertib), 미르다메티닙(Mirdametinib), 레파메티닙(Refametinib), AZD8330 및 E6201등으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상인 것일 수 있다.

[55] 상기 셀루메티닙(selumetinib)은 선택적 MEK1/MEK2 키나아제 억제제로서, 코셀루고(Koselugo)라는 상표명으로 판매되고 있으며, 하기 화학식 3의 구조를 갖는 물질이다.

[56] [화학식 3]

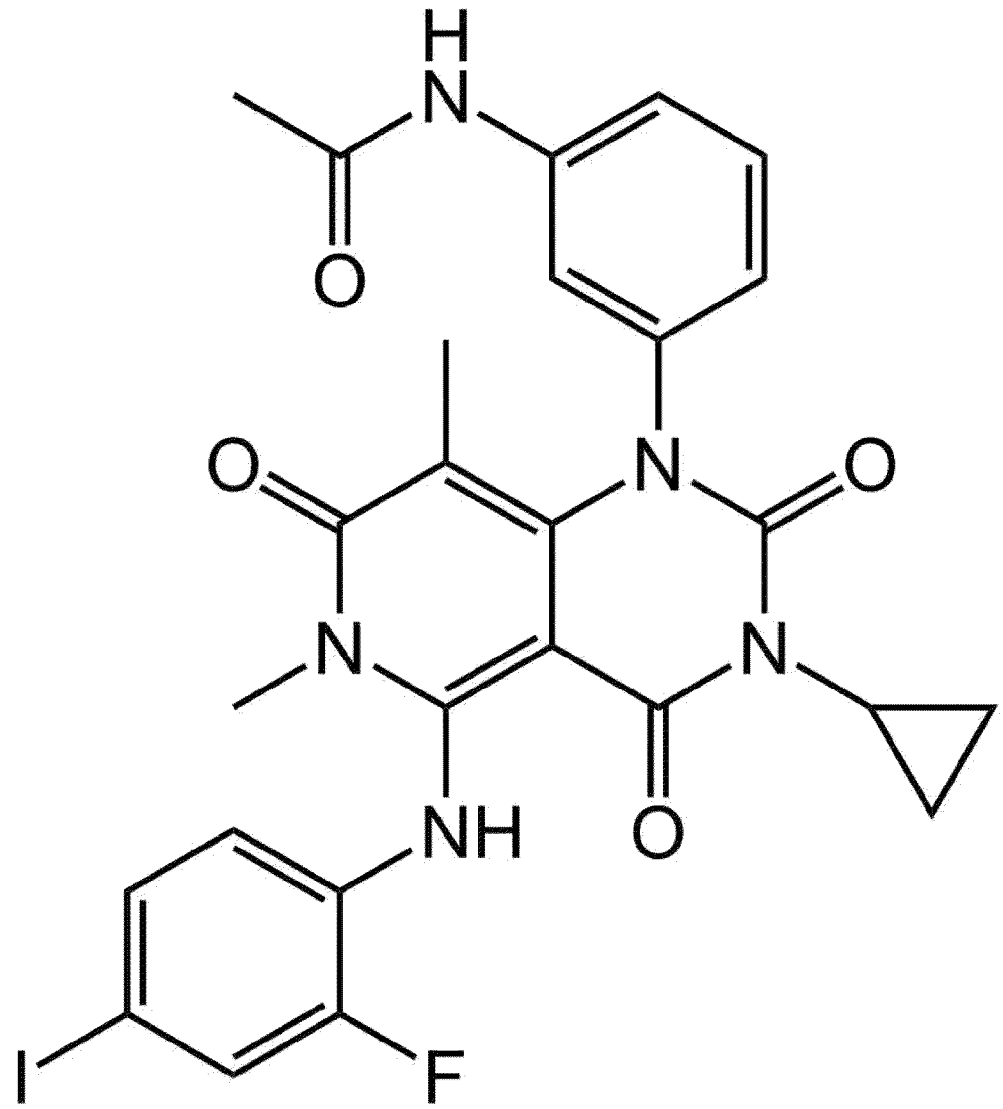
[57]



[58] 상기 트라메티닙(trametinib)은 MEK1/MEK2를 억제하는 경구활성 억제제로서, 하기 화학식 4의 구조를 갖는 물질이다.

[59] [화학식 4]

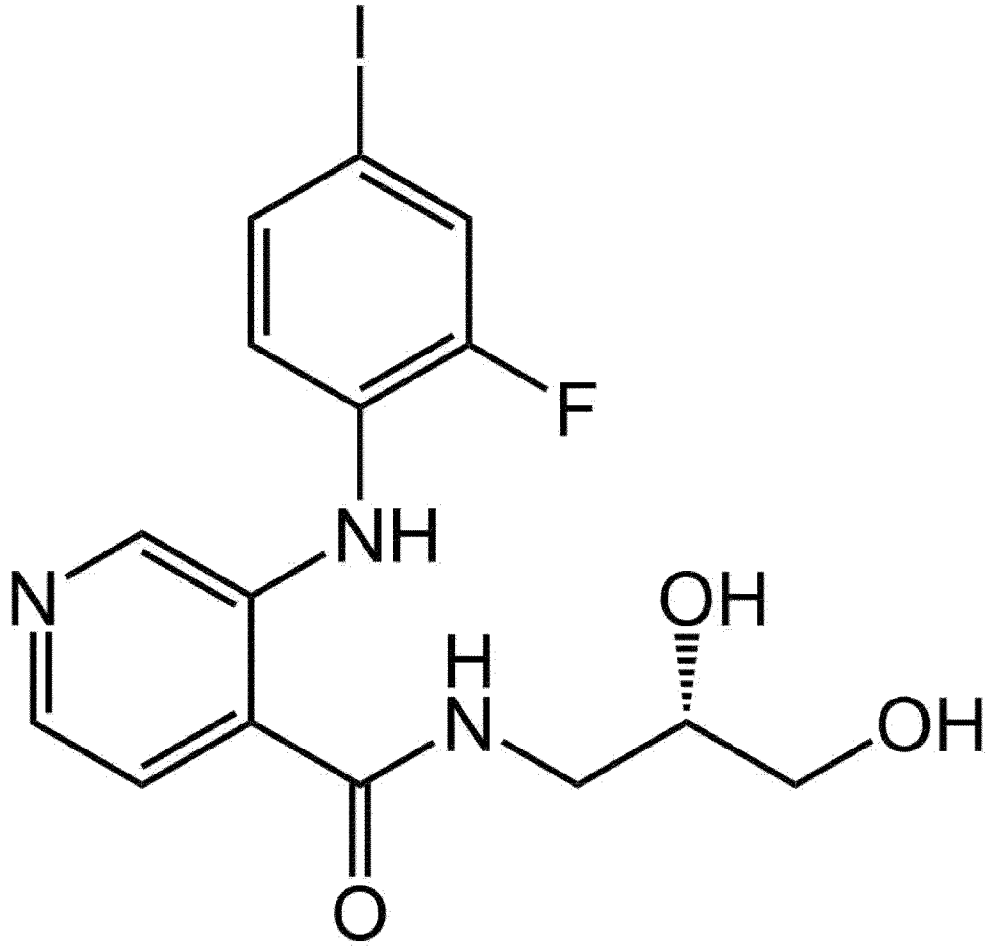
[60]



[61] 상기 피마서팁(pimasertib)은 선택적 ATP 비경쟁적 알로스테릭 경구용 MEK1/MEK2 저해제로서, 하기 화학식 5의 구조를 갖는 물질이다.

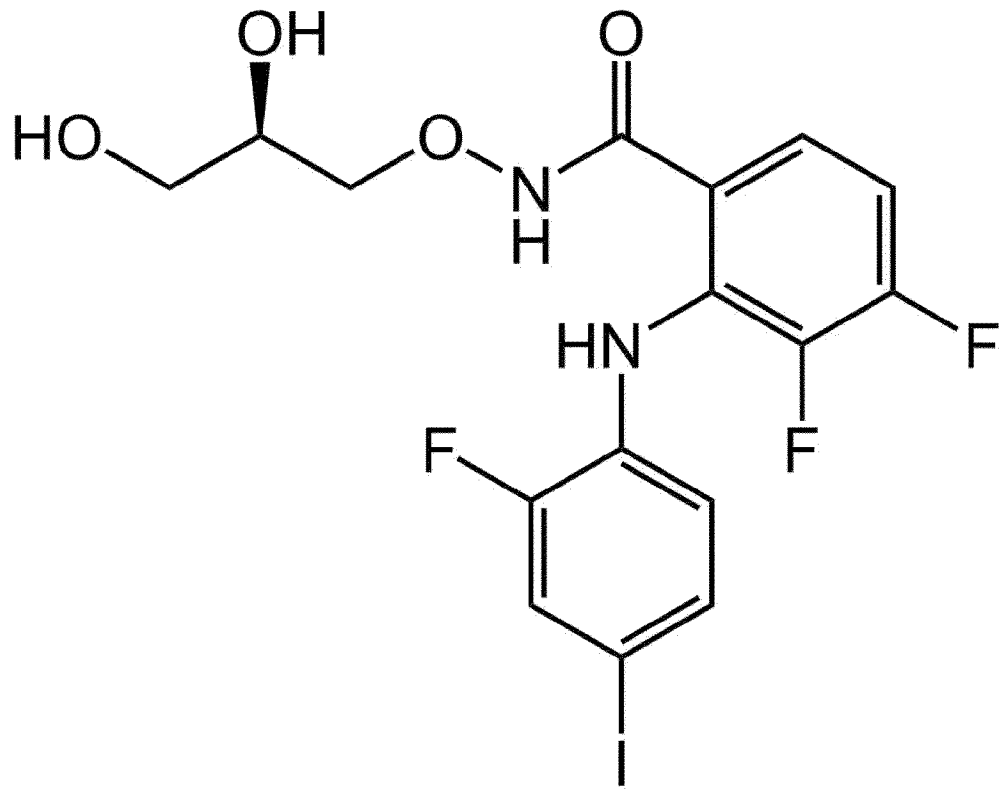
[62] [화학식 5]

[63]



[64] 상기 미르다메티닙(Mirdametinib)은 경구 활성, 선택적 및 ATP 비경쟁적 MEK 억제제로서, 하기 화학식 6의 구조를 갖는 물질이다.

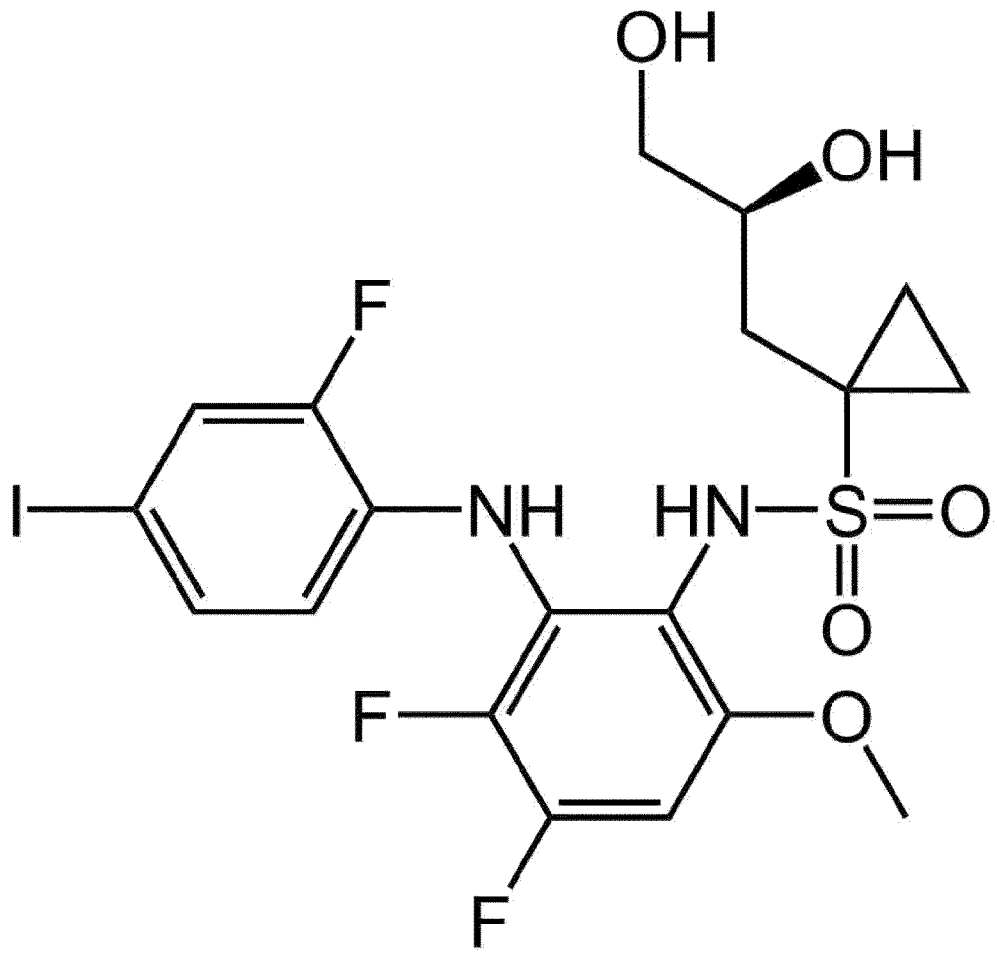
[65] [화학식 6]

[66] 

[67] 상기 레파메티닙(Refametinib)은 선택적, ATP 비경쟁적 알로스테릭 MEK1/MEK2 억제제로서, 하기 화학식 7의 구조를 갖는 물질이다.

[68] [화학식 7]

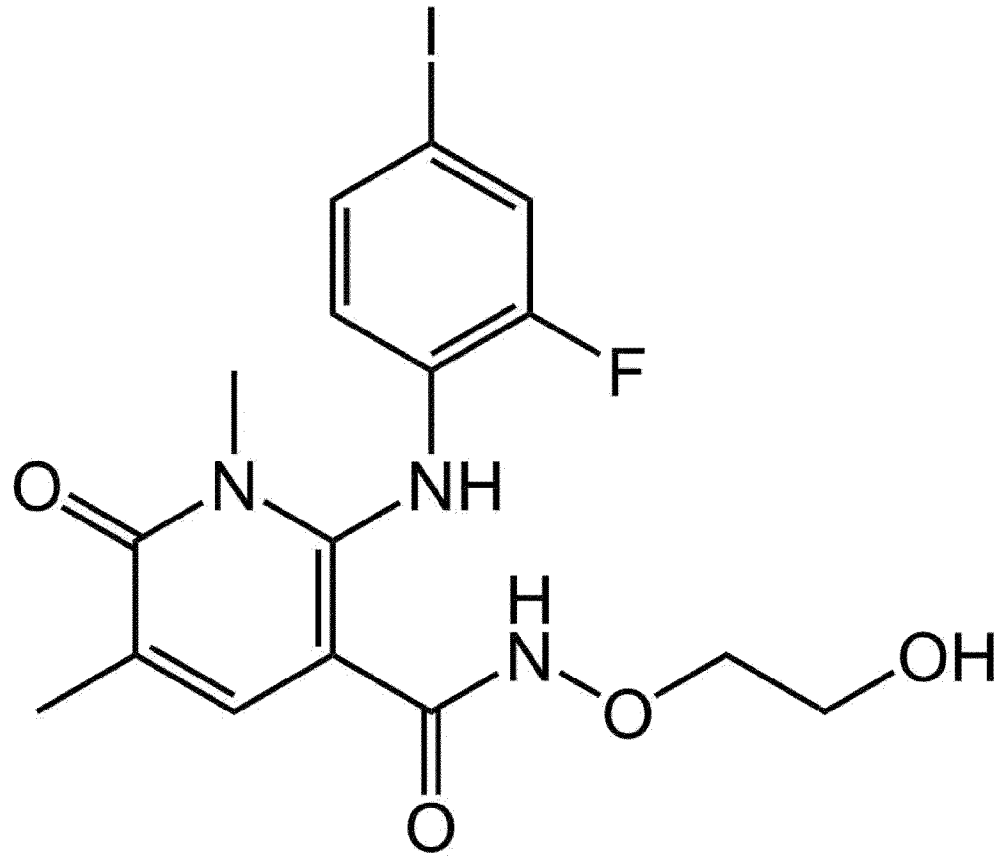
[69]



[70] 상기 AZD8330(CAS 번호호:869357-68-6)은 MEK1/MEK2 억제제로서, 하기 화학식 8의 구조를 갖는 물질이다.

[71] [화학식 8]

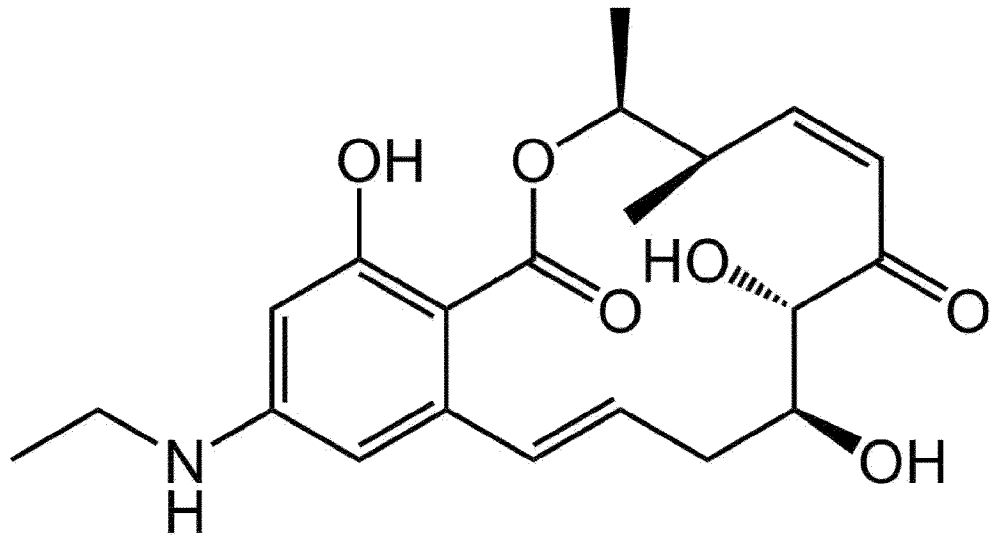
[72]



[73] 상기 E6201(CAS 번호:603987-35-5)은 MEK1 및 FLT3의 ATP 경쟁적 이중 키나제 억제제로서, 하기 화학식 9의 구조를 갖는 물질이다.

[74] [화학식 9]

[75]



[76] 본 발명의 약학 조성물은 투여를 위하여, 상기 기재한 저해제(inhibitor) 이외에 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 포함할 수 있다. 상기 담체, 부형제 및 희석제로는 락토오스, 덱스트로오스, 수크로오스, 소르비톨, 만니톨, 자일리 톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오

스, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다

[77] 본 발명의 약학 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 또는 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용할 수 있다. 구체적으로, 제형화할 경우 통상 사용하는 충진제, 중량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구투여를 위한 고형 제제로는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 이러한 고형 제제는 상기 유효성분 외에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘 카보네이트, 수크로오스, 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구를 위한 액상물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등을 첨가하여 조제될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제는 멸균된 수용액, 비수성 용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제 및 과제를 포함한다. 비수성 용제 및 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 오일, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[78] 본 발명에 따른 약학 조성물은 ILK(Integrin-Linked Kinase) 또는 이의 리간드의 저해제를 유효량으로 포함하여, 악성말초신경초종의 예방 또는 치료를 필요로 하는 대상체에게 투여될 수 있다.

[79] 상기 유효량은 "치료 유효량" 또는 "예방 유효량"일 수 있다. 상기 "치료 유효량"은 약물 또는 치료제가 단독으로 또는 다른 치료제와 조합되어 사용되는 경우, 질환 증상의 중증도 감소, 질환 증상이 없는 기간의 빈도 및 지속기간의 증가, 또는 질환 고통으로 인한 손상 또는 장애의 방지를 나타낼 수 있는 임의의 양을 의미한다. 상기 "예방 유효량"은 개체에서 암의 발생 또는 재발을 억제하는 임의의 양을 의미한다. 상기 유효량의 수준은 대상체의 중증도, 연령, 성별, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소 등에 따라 결정될 수 있다.

[80] 상기 "대상체"는 인간 또는 임의의 비인간 동물을 포함하며, 상기 비인간 동물은 척추동물, 예컨대 영장류, 개, 소, 말, 돼지, 설치류, 예컨대 마우스, 래트, 기니피그 등일 수 있다. 본 명세서에서, 상기 "대상체"는 "개체" 및 "환자"와 상호교환적으로 사용된다.

[81]

[82] 다른 양상은 ILK 저해제를 포함하는 악성말초신경초종(malignant peripheral nerve sheath tumor, MPNST) 예방 또는 치료용 키트를 제공한다.

[83] 일 구체예에 있어서, 상기 키트는 SMAD3(Mothers Against Decapentaplegic Homolog 3), CFL1(Cofilin-1), PDK3(Pyruvate Dehydrogenase Kinase 3), PACSIN3(Protein Kinase C and Casein Kinase Substrate in Neurons 3) 및 MEK1(mitogen-activated protein kinase kinase 1)로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상 것의 발현 또는 활성 저해제를 더 포함하는 것일 수 있다.

[84] 상기 악성말초신경초종, 저해제, 안티센스 핵산, siRNA, shRNA, miRNA , 리보자임, 펩티드, 펩티드 미메틱스, 융합 단백질, 항체, 앱타머 및 항체-약물 복합체(ADC) 등의 정의는 전술한 바와 같다.

[85] 또 다른 양상은 말초신경종양(Peripheral Nerve Tumor)을 예방 또는 치료하기 위한 ILK(Integrin-Linked Kinase)의 발현 또는 활성 저해제(inhibitor)를 포함하는 조성물의 용도를 제공한다.

[86] 또 다른 양상은 유효량의 ILK(Integrin-Linked Kinase)의 발현 또는 활성 저해제(inhibitor)를 포함하는 조성물을 그를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는 말초신경종양(Peripheral Nerve Tumor) 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

[87] 또 다른 양상은 말초신경종양(Peripheral Nerve Tumor) 예방 또는 치료용 의약 제조에 사용하기 위한 ILK(Integrin-Linked Kinase)의 발현 또는 활성 저해제(inhibitor)를 포함하는 조성물의 용도를 제공한다.

[88] 상기 발명에 대해 기술한 용어 및 방법 등은 각 발명들 간에 동일하게 적용된다.

발명의 효과

[89] 일 양상에 따른 ILK 저해제를 포함하는 말초신경종양(Peripheral Nerve Tumor) 예방 또는 치료용 조성물은 MEK 저해제와의 병용투여시 항암 상승 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[90] 도 1은 신경섬유종(PN) 세포주인 ipNF95.6과 악성말초신경초종(Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumors, MPNST) 세포주인 sNF02.2와 sNF96.2에서 신호전달체계(TGF-β 신호전달체계, RAS-MEK 신호전달체계)의 주요 조절인자들인 p-ERK1/2, ERK 1/2, p-SMAD3, SMAD3, 및 p-MEK1의 단백질 발현양 및 후보 kinase인 PDK3, ILK, PACSIN3, CFL1의 단백질양을 확인한 결과이다.

[91] 도 2는 각 치료표적 유전자(SMAD3, MEK1, CFL1, ILK, PDK3, PACSIN3)의 siRNA를 처리한 신경섬유종(PN) 세포주(ipNF95.6)와 악성말초신경초종(MPNST) 세포주(sNF02.2, sNF96.2)에서 각 치료표적 유전자(SMAD3, MEK1, CFL1, ILK, PDK3, PACSIN3)의 mRNA 발현량을 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.

[92] 도 3은 표적 유전자들(SMAD3, CFL1, ILK, PDK3, PACSIN3, MEK1)의 siRNA를 처리한 신경섬유종(PN) 세포주 및 악성말초신경초종(MPNST) 세포주의 세포 생존률을 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.

[93] 도 4는 표적 유전자들(SMAD3, CFL1, ILK, PDK3, PACSIN3, MEK1)의 siRNA를 처리한 신경섬유종(PN) 세포주 및 악성말초신경초종(MPNST) 세포주에서 apoptosis의 활성을 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.

[94] 도 5는 MEK1/MAP2K1에 대한 siRNA를 단독으로 처리한 세포주(siMAP2K1_only)와 표적 유전자들(SMAD3, CFL1, ILK, PDK3, PACSIN3)중 어느 하나 및 MEK1에 대한 siRNA를 함께 처리한 세포주의 세포 생존률을 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.

[95] 도 6은 MEK1에 대한 siRNA를 단독으로 처리한 세포주(siMAP2K1_only)와 표적 유전자들(SMAD3, CFL1, ILK, PDK3, PACSIN3)중 어느 하나 및 MEK1에 대한 siRNA를 함께 처리한 세포주의 apoptosis 활성을 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.

[96] 도 7은 각 치료표적 유전자(SMAD3, ILK, PDK3, MEK1)를 과발현시킨 신경섬유종(PN) 세포주(ipNF95.6)의 세포 생존률과 apoptosis 활성 측정 결과를 나타낸 그래프이다.

[97] 도 8은 신경섬유종(PN) 세포주(ipNF95.6)에 치료 표적 유전자들(SMAD3, ILK, PDK3, MEK1)을 과발현시켰을 경우의 세포증식력 측정 결과를 나타낸 그래프이다.

[98] 도 9는 ILK 저해제(Cpd22, 시그마알드리치) 및 PDK3 저해제(AZD7545, 아스트라제네카)를 각각 농도별로 처리한 normal schwann 세포주 (ipn02.3), 신경섬유종(PN) 세포주(ipNF95.6) 및 악성말초신경초종(MPNST) 세포주(sNF02.2, sNF96.2)의 세포 생존률을 나타낸 그래프이다.

[99] 도 10은 Normal schwann 세포주 (ipn02.3), 신경섬유종 세포주(ipNF95.6), 악성말초신경초종(MPNST) 세포주(sNF02.2, sNF96.2)에 PDK3 저해제(AZD7545) 또는 ILK 저해제(Cpd22)를 각각 단독 처리한 군과 MEK 저해제(Selumetinib)과 PDK3 저해제(AZD7545) 또는 ILK 저해제(Cpd22)을 함께 처리한 군 각각의 세포 생존율을 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.

발명의 실시를 위한 형태

[100] 이하 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[101]

[102] **실시예 1. 시료 준비 및 단백질 발현양 확인**

[103] **1.1 시료준비(세포 배양)**

[104] 신경섬유종(PN) 및 악성말초신경초종(MPNST) 세포주를 준비하였다. 신경섬유종(PN) 세포주로는 ipNF95.6을 사용하였고, 악성말초신경초종(MPNST) 세포주로는 sNF02.2 및 sNF96.2을 사용하였다.

[105] 구체적으로, 상기 세포주는 Dulbecco's Modified Eagle Medium에 10% Fetal Bovine Serum를 첨가한 배지로 37℃ 인큐베이터에서 배양하였다.

[106] **1.2 단백질 발현양 확인**

[107] 신경섬유종(PN) 및 악성말초신경초종(MPNST) 세포주에서 유의미한 차이를 보이는 kinase와 이와 연관된 신호전달체계의 주요 조절인자의 단백질 발현을 웨스턴 블랏(Western blot)으로 확인하였다.

[108] 구체적으로, 상기 세포주에서 RIPA 버퍼를 이용하여 단백질을 추출하고, 이 단백질을 10.5% SDS-PAGE 젤에 전기영동하였다. Nitrocellulose membrane으로 단백질을 옮긴 후, 5% BSA로 Blocking하였다. 이 membrane에 특정 단백질을 인지하는 일차항체로 반응시킨 후 세척하였고, Horseradish peroxidase가 달려있는 이차항체를 이용하여 반응시킨 후 세척하였다. ECL 시약을 이용하여 단백질양을 CHEMI-DOC 이미지 시스템을 이용하여 분석하였다.

[109]

[110] **실시예 2. 악성말초신경초종(MPNST)의 새로운 치료 표적 발굴**

[111] **2.1 신호전달체계의 주요 조절인자들 및 Kinase의 단백질 발현양 확인**

[112] 실시예 1.2의 방법으로, 신경섬유종(PN) 세포주인 ipNF95.6과 악성말초신경초종(MPNST) 세포주인 sNF02.2와 sNF96.2에서 TGF-β 신호전달체계 (pSMAD3, SMAD3), RAS-MEK 신호전달체계 (p-ERK1/2, ERK 1/2 및 p-MEK1)의 주요 조절인자들의 단백질 발현양 및 후보 kinase인 PDK3, ILK, PACSIN3, CFL1의 단백질양을 확인하여 그 결과를 도 1에 나타내었다.

[113] 도 1은 신경섬유종(PN) 세포주인 ipNF95.6과 악성말초신경초종(MPNST) 세포주인 sNF02.2와 sNF96.2에서 신호전달체계(TGF-β 신호전달체계, RAS-MEK 신호전달체계)의 주요 조절인자들인 p-ERK1/2, ERK 1/2, p-SMAD3, SMAD3, 및 p-MEK1의 단백질 발현양 및 후보 kinase인 PDK3, ILK, PACSIN3, CFL1의 단백질양을 확인한 결과이다.

[114] 도 1에 나타낸 바와 같이, 신호전달체계 의 주요 조절인자들 중 p-ERK1/2, p-SMAD3 및 p-MEK1의 경우, 신경섬유종(PN) 세포주인 ipNF95.6에서보다 악성말초신경초종(MPNST) 세포주인 sNF02.2와 sNF96.2에서 발현량이 증가하였고, sNF02.2 세포주에서 보다 sNF96.2 세포주에서 더 발현량이 많은 것을 확인하였다.

[115] 또한, 후보 kinase인 CFL1, ILK, PDK3, PACSIN3의 경우, 신경섬유종(PN) 세포주인 ipNF95.6에서보다 악성말초신경초종(MPNST) 세포주인 sNF02.2와 sNF96.2에서 발현량이 증가하였고, sNF02.2 세포주에서 보다 sNF96.2 세포주에서 더 발현량이 많은 것을 확인하였다.

[116] 이는 신호전달체계의 주요 조절인자들 중 p-ERK1/2, p-SMAD3 및 p-MEK1이 신경섬유종(PN) 및 악성말초신경초종(MPNST) 세포주에서 유의미한 발현 차이가 있는 것으로, 상기 조절인자들이 악성말초신경초종(MPNST)의 새로운 치료 표적으로서의 가능성이 있음을 의미한다. 또한 후보 kinase인 CFL1, ILK, PDK3,

PACSIN3이 신경섬유종(PN) 및 악성말초신경초종(MPNST) 세포주에서 유의미한 발현 차이가 있는 것으로, 상기 조절인자들이 악성말초신경초종(MPNST)의 새로운 치료 표적으로서의 가능성이 있음을 의미한다.

[117]

[118] **2.2. 악성말초신경초종(MPNST)의 새로운 치료 표적 확인**

[119] 실시예 2.1에서 발굴한 신경섬유종(PN) 및 악성말초신경초종(MPNST)의 잠재적인 치료표적들인 SMAD3, MEK1, CFL1, ILK, PDK3, PACSIN3의 항암 효과를 평가하기 위해, 각 치료표적 유전자들에 대한 siRNA를 디자인하여 녹다운(knockdown) 실험을 진행하였다.

[120] 구체적으로, 각 치료표적 유전자 별로 siRNA를 디자인하여 신경섬유종(PN) 세포주인 ipNF95.6과 악성말초신경초종(MPNST) 세포주인 sNF02.2와 sNF96.2에 각각의 siRNA 처리하였다. 각 치료표적 유전자 별 siRNA서열은 표 1에 나타내었다.

[121] [표1]

표적 유전자	siRNA name	siRNA 서열(5'->3')	서열 번호
ILK	siILK_1S	GUCAUGGACACCGUGAUAUUGUACA	1
	siILK_1A	UACAAUAUCACGGUGUCCAUGAAU	2
	siILK_2S	GAAUCACUCUGGAGAGCUAUGGAA	3
	siILK_2A	CCAUAGCUCUCCAGAGUGAUUAU	4
CFL1	siCFL1_2S	CAUCAAGGUGUUCAACGACAUGAAG	5
	siCFL1_2A	UCAUGUCGUUGAACACCUUGAUAU	6
	siCFL1_3S	CAAGGACGCCAUCAAGAAGAAGCUG	7
	siCFL1_3A	GCUUCUUCUUGAUGGCGUCCUUAA	8
SMAD3	siSMAD3_1S	GAGAAACCAGUGACCACCAGAUGAA	9
	siSMAD3_1A	CAUCUGGUGGUCACUGGUUUCUAU	10
	siSMAD3_2S	GGAUGCAACCUGAAGAUCUUCAACA	11
	siSMAD3_2A	UUGAAGAUCUUCAGGUUGCAUCAU	12
PDK3	siPDK3_1S	GCAUCUCUUUCCGCAUGCUUAUUAA	13
	siPDK3_1A	AAUAAGCAUGCGGAAAGAGAUGAU	14

	siPDK3_2S	GUUGAAGAAUUCAAUGCCAAAGCGC	15
	siPDK3_2A	GCUUUGGCAUUGAAUUCUUCAAAU	16
PACSIN3	siPACSIN3_1S	GGUUGAGGCUUCCAAGAAAAGCUAC	17
	siPACSIN3_1A	AGCUUUUCUUGGAAGCCUCAACAU	18
	siPACSIN3_2S	CAGCAGUGAGAAGUUCCAUGAACU	19
	siPACSIN3_2A	UUCAUGGAACUUCUCACUGCUAU	20
MEK1/MAP2K1	siMEK1_1S	GGUCAUGGCCAGAAAGCUAAUUCA	21
	siMEK1_1A	AAUUAGCUUUCUGGCCAUGACAU	22
	siMEK1_2S	GAUCAUAAGGGAGCUGCAGGUUCU	23
	siMEK1_2A	AACCUGCAGCUCCCUUAUGAUAU	24

[122]

[123] 각 치료표적 유전자의 siRNA 처리한 신경섬유종(PN) 세포주(ipNF95.6)와 MPNST 세포주(sNF02.2및 sNF96.2)에서 상기기 표적 유전자의 발현이 감소됨을 Reverse Transcription-Quantitative PCR를 이용하여 검증하였다.

[124] 구체적으로, 신경섬유종(PN) 와 MPNST 세포주를 6-well plate에 심고, 각각의 표적유전자들에 대해 디자인된 siRNA 50pmol를 Lipofectamine이용하여 세포 안으로 넣고, 72시간 배양하였다. 이 세포들을 수집하여 표적 유전자의 발현이 성공적으로 녹다운되었는지 확인하기 위해, RNA를 추출하였다. TRIzol 시약을 이용하여 RNA를 추출한 후, oligo dT 프라이머와 reverse transcriptase 효소를 이용하여 cDNA로 합성하였다. 합성된 cDNA에 SYBR green 시약을 이용하여 Quantitative PCR 시스템으로 특정 유전자를 증폭하여 분석하였다.

[125] 표 1의 siRNA 처리한 신경섬유종(PN) 세포주(ipNF95.6)와 악성말초신경초종(MPNST) 세포주(sNF02.2 및 sNF96.2)에서 상기 표적 유전자들의 발현이 감소된 결과를 도 2에 나타내었다.

[126] 도 2는 각 치료표적 유전자(SMAD3, MEK1, CFL1, ILK, PDK3, PACSIN3)의 siRNA를 처리한 신경섬유종(PN) 세포주(ipNF95.6)와 악성말초신경초종(MPNST) 세포주(sNF02.2, sNF96.2)에서 각 치료표적 유전자(SMAD3, MEK1, CFL1, ILK, PDK3, PACSIN3)의 mRNA 발현량을 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.

[127] 도 2에 나타낸 바와 같이, siRNA를 처리하지 않은 control군에 비하여 각 표적 유전자의 siRNA를 처리한 세포주에서 각 표적 유전자의 mRNA 발현량이 감소한

것을 확인하였다. 이는 표 1나타낸 siRNA가 각 표적 유전자의 발현을 효과적으로 저해하는 것을 의미한다.

[128]

[129] **실시예 3. RNAi system을 이용한 후보표적들의 발현감소가 신경섬유종(PN) 및 악성말초신경초종(MPNST) 세포주에서 항암효과 확인.**

[130] **3.1 세포생존율 감소 확인**

[131] 실시예 2.2의 방법으로 신경섬유종(PN) 세포주 및 악성말초신경초종(MPNST) 세포주에 특정 표적 유전자들(SMAD3, CFL1, ILK, PDK3, PACSIN3, MEK1)에 대한 siRNA를 처리하고 72시간 후, 세포 생존을 측정할 수 있는 CCK-8 assay를 수행하였다.

[132] 구체적으로, 신경섬유종과 MPNST세포주를 96-well plate에 심고, 각각의 siRNA을 처리하여 72시간 후, Dojindo laboratories사의 CCK-8 assay 시약 10 ul를 각 well에 넣고 3시간 동안 37°C 인큐베이터 안에서 반응시킨 후, microplate reader로 450 nm 흡광도를 측정하였다. 측정된 값으로 계산하여 세포생존율을 분석하였다.

[133] 상기 표적 유전자들(SMAD3, CFL1, ILK, PDK3, PACSIN3, MEK1)에 대한 siRNA를 처리한 세포주의 세포 생존률을 측정한 결과를 도 3에 나타내었다.

[134] 도 3은 표적 유전자들(SMAD3, CFL1, ILK, PDK3, PACSIN3, MEK1)의 siRNA를 처리한 신경섬유종(PN) 세포주 및 악성말초신경초종(MPNST) 세포주의 세포 생존률을 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.

[135] 도 3에 나타낸 바와 같이, 치료 표적 유전자들(SMAD3, CFL1, ILK, PDK3, PACSIN3, MEK1)에 대한 siRNA를 처리한 신경섬유종(PN) 세포주 및 악성말초신경초종(MPNST) 세포주의 세포 생존률이 siRNA를 처리하지 않은 신경섬유종(PN) 세포주 및 악성말초신경초종(MPNST) 세포주(control)의 세포 생존률에 비하여 감소하였다. SMAD3에 대한 siRNA를 처리한 경우를 제외하고, 나머지 표적 유전자들에 대한 siRNA를 처리한 경우, 신경섬유종(PN) 세포주(ipNF95.6)에 비하여 악성말초신경초종(MPNST) 세포주(sNF02.2, sNF96.2)의 세포 생존률이 더욱 감소하였다.

[136] 또한, 치료 표적 유전자들(SMAD3, CFL1, ILK, PDK3, PACSIN3, MEK1)에 대한 siRNA를 처리한 경우, 신경섬유종(PN) 세포주(ipNF95.6)에 비하여 악성말초신경초종(MPNST) 세포주 중 그 악성의 정도가 더 심한 sNF96.2의 세포 생존률이 더욱 감소함을 확인하였다.

[137] 이는 선별된 치료 표적들(SMAD3, CFL1, ILK, PDK3, PACSIN3, MEK1/MAP2K1)이 siRNA처리로 그 발현량이 저해되는 경우, 악성말초신경초종(MPNST) 세포주(sNF02.2, sNF96.2)에서 통계적으로 유의미하게 항암효과가 나타남을 의미한다. 특히 좀 더 심각한 악성인 sNF96.2 세포주에서 더욱 효과적인 항암 효과가 나타남을 의미한다.

[138]

[139] **3.2 apoptosis 활성 증가 확인**

[140] 신경섬유종(PN) 및 악성말초신경초종(MPNST) 세포주에 실시예 2.2의 방법으로 특정 표적 유전자들(SMAD3, CFL1, ILK, PDK3, PACSIN3, MEK1)에 대한 siRNA를 처리하고 72시간 후, apoptosis의 활성을 확인할 수 있는 caspase 3/7 assay를 수행하였다.

[141] 구체적으로, 신경섬유종과 MPNST세포주를 불투명하고 하얀 96-well plate에 심고, 각각의 siRNA을 처리하여 72시간 후, Promega사의 caspase 3/7-glo 시약 50 ul를 각 well에 넣고 30분 동안 반응시켰다. 이러한 형광물질을 탐지할 수 있는 luminometer을 이용하여 caspase 3/7의 수준을 측정하였다. 측정된 값으로 계산하여 apoptosis의 활성을 평가하였다.

[142] 상기 표적 유전자들(SMAD3, CFL1, ILK, PDK3, PACSIN3, MEK1)의 siRNA를 처리한 세포주의 apoptosis의 활성을 측정한 결과를 도 4에 나타내었다.

[143] 도 4는 표적 유전자들(SMAD3, CFL1, ILK, PDK3, PACSIN3, MEK1)의 siRNA를 처리한 신경섬유종(PN) 세포주 및 악성말초신경초종(MPNST) 세포주에서 apoptosis의 활성을 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.

[144] 도 4에 나타낸 바와 같이, 특정 표적 유전자들(SMAD3, CFL1, ILK, PDK3, PACSIN3, MEK1)에 대한 siRNA를 처리한 신경섬유종(PN) 세포주 및 악성말초신경초종(MPNST) 세포주의 apoptosis의 활성이 siRNA를 처리하지 않은 신경섬유종(PN) 세포주 및 악성말초신경초종(MPNST) 세포주(control)의 apoptosis의 활성에 비하여 증가하였다. CFL1에 대한 siRNA를 처리한 경우를 제외하고, 나머지 표적 유전자들에 대한 siRNA를 처리한 경우, 신경섬유종(PN) 세포주(ipNF95.6)에 비하여 악성말초신경초종(MPNST) 세포주(sNF02.2, sNF96.2)에서 apoptosis의 활성이 더욱 증가하였다.

[145] 또한, 상기 치료 표적 유전자들(SMAD3, CFL1, ILK, PDK3, PACSIN3, MEK1)에 대한 siRNA를 처리한 경우, 신경섬유종(PN) 세포주(ipNF95.6)에 비하여 악성말초신경초종(MPNST) 세포주 중 그 악성의 정도가 더 심한 sNF96.2 세포주에서 apoptosis의 활성이 더욱 증가함을 확인하였다.

[146] 이는 상기 치료 표적 유전자들(SMAD3, CFL1, ILK, PDK3, PACSIN3, MEK1)이 siRNA처리로 그 발현량이 저해되는 경우, 악성말초신경초종(MPNST) 세포주(sNF02.2, sNF96.2)에서 통계적으로 유의미하게 항암효과가 나타남을 의미한다. 특히 악성말초신경초종(MPNST) 세포주 중 더 심각한 악성인 sNF96.2 세포주에서 더욱 효과적인 항암 효과가 나타남을 의미한다.

[147]

[148] **실시예 4. 악성말초신경초종(MPNST) 세포주에서 MEK 저해제와 선별된 후보 표적들의 저해제 병용투여시 상승된 항암효과 확인**

[149] **4.1 세포생존율 감소 확인**

[150] 신경섬유종(PN) 세포주 및 악성말초신경초종(MPNST) 세포주에 치료 표적 유전자들(SMAD3, CFL1, ILK, PDK3, PACSIN3, MEK1)에 대한 siRNA를 처리하고

72시간 후, 실시예 3.1의 방법으로, 세포 생존을 측정할 수 있는 CCK-8 assay를 수행하였다.

[151] 구체적으로, MEK1에 대한 siRNA를 단독으로 처리하여 녹다운(knockdown)시키거나(siMAP2K1_only로 표기), MEK1에 대한 대한 siRNA와 상기 치료 표적 유전자들에 대한 siRNA를 함께 처리하여 두 특정 유전자를 함께 녹다운 시키고 세포 생존률을 측정하였고, 그 결과를 도 5에 나타내었다.

[152] 도 5는 MEK1에 대한 siRNA를 단독으로 처리한 세포주(siMAP2K1_only)와 치료 표적 유전자들(SMAD3, CFL1, ILK, PDK3, PACSIN3)중 어느 하나 및 MEK1에 대한 siRNA를 함께 처리한 세포주의 세포 생존률을 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.

[153] 도 5에 나타낸 바와 같이, 신경섬유종(PN) 세포주 및 악성말초신경초종(MPNST) 세포주에 MEK1에 대한 siRNA를 단독으로 처리한 경우(siMAP2K1_only)와 치료 표적 유전자들(SMAD3, CFL1, ILK, PDK3, PACSIN3) 중 어느 하나 및 MEK1에 대한 siRNA를 함께 처리한 경우 모두, siRNA를 처리하지 않은 신경섬유종(PN) 세포주 및 악성말초신경초종(MPNST) 세포주(control)에 비하여 세포 생존률이 감소하였다. 또한 MEK1에 대한 siRNA를 단독으로 처리한 경우(siMAP2K1_only)와 치료 표적 유전자들(SMAD3, CFL1, ILK, PDK3, PACSIN3)중 어느 하나 및 MEK1에 대한 siRNA를 함께 처리한 경우 모두, 신경섬유종(PN) 세포주(ipNF95.6)에 비하여 악성말초신경초종(MPNST) 세포주(sNF02.2 및 sNF96.2)에서 세포 생존률이 더욱 감소하였다.

[154] 더욱이 MEK1에 대한 siRNA를 단독으로 처리한 경우(siMAP2K1_only)에 비하여 표적 유전자들(SMAD3, CFL1, ILK, PDK3, PACSIN3)중 어느 하나 및 MEK1에 대한 siRNA를 함께 처리한 경우, 모든 신경섬유종(PN) 세포주 및 악성말초신경초종(MPNST) 세포주의 세포 생존률이 감소함을 확인하였다.

[155] 이는 신경섬유종증의 치료제인 MEK 저해제(selumetinib)와 치료 표적 유전자들(SMAD3, CFL1, ILK, PDK3 또는 PACSIN3)의 발현이 함께 저해되는 경우 항암 상승효과가 나타남을 의미한다. 특히, MEK1에 대한 siRNA를 단독으로 처리한 경우(siMAP2K1_only)에 비하여 치료 표적 유전자들(SMAD3, CFL1, ILK, PDK3, PACSIN3)중 어느 하나 및 MEK1에 대한 siRNA를 함께 처리한 경우에 신경섬유종(PN) 세포주(ipNF95.6)에 비하여 악성말초신경초종(MPNST) 세포주(sNF02.2 및 sNF96.2)의 세포 생존률이 현저히 감소한 것은 치료 표적 유전자들(SMAD3, CFL1, ILK, PDK3, PACSIN3)의 저해제와 MEK 저해제(selumetinib)의 병용투여가 악성말초신경초종(MPNST)에 치료제로 활용될 수 있음을 의미한다.

[156]

[157] **4.2 apoptosis 활성 증가 확인**

[158] 신경섬유종(PN) 세포주 및 악성말초신경초종(MPNST) 세포주에 치료 표적 유전자들(SMAD3, CFL1, ILK, PDK3, PACSIN3, MEK1)에 대한 siRNA 처리하고 72

시간 후, 실시예 3.2의 방법으로, apoptosis의 활성을 확인할 수 있는 caspase 3/7 assay를 수행하였다.

[159] 구체적으로, MEK1에 대한 siRNA를 단독으로 처리하여 녹다운(knockdown) 시키거나(siMAP2K1_only로 표기), MEK1에 대한 siRNA와 각 치료 표적들에 대한 siRNA를 함께 처리하여 두 특정 유전자를 함께 녹다운 시키고 apoptosis의 활성을 측정하였다.

[160] 상기 MEK1에 대한 siRNA를 단독으로 처리한 세포주(siMAP2K1_only)와 치료 표적 유전자들(SMAD3, CFL1, ILK, PDK3, PACSIN3)중 어느 하나 및 MEK1에 대한 siRNA를 함께 처리한 세포주의 apoptosis 활성을 측정한 결과를 도 6에 나타내었다.

[161] 도 6은 MEK1에 대한 siRNA를 단독으로 처리한 세포주(siMAP2K1_only)와 표적 유전자들(SMAD3, CFL1, ILK, PDK3, PACSIN3)중 어느 하나 및 MEK1에 대한 siRNA를 함께 처리한 세포주의 apoptosis 활성을 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.

[162] 도 6에 나타낸 바와 같이, 신경섬유종(PN) 세포주 및 악성말초신경초종(MPNST) 세포주에 MEK1에 대한 siRNA를 단독으로 처리한 경우(siMAP2K1_only)와 치료 표적 유전자들(SMAD3, CFL1, ILK, PDK3, PACSIN3)중 어느 하나 및 MEK1에 대한 siRNA를 함께 처리한 경우 모두 siRNA를 처리하지 않은 신경섬유종(PN) 세포주 및 악성말초신경초종(MPNST) 세포주(control)에 비하여 apoptosis의 활성이 증가하였다.

[163] MEK1에 대한 siRNA를 단독으로 처리한 경우(siMAP2K1_only)에 비하여, 치료 표적 유전자들 중 CFL1, ILK 및 PACSIN3 중 어느 하나와 MEK1에 대한 siRNA를 함께 처리한 경우에 신경섬유종(PN) 세포주(ipNF95.6)에서 apoptosis의 활성이 더욱 증가하였다.

[164] MEK1에 대한 siRNA를 단독으로 처리한 경우(siMAP2K1_only)에 비하여, 치료 표적 유전자들 중 SMAD3 또는 PACSIN3와 MEK1/MAP2K1에 대한 siRNA를 함께 처리한 경우 악성말초신경초종(MPNST) 세포주(sNF02.2)에서 apoptosis의 활성이 더욱 증가하였다.

[165] MEK1에 대한 siRNA를 단독으로 처리한 경우(siMAP2K1_only)에 비하여, 치료 표적 유전자들 중 SMAD3 또는 ILK와 MEK1에 대한 siRNA를 함께 처리한 경우에 악성말초신경초종(MPNST) 세포주(sNF96.2)에서 apoptosis의 활성이 더욱 증가하였다.

[166] 이는 신경섬유종증의 치료제인 MEK 저해제(selumetinib)와 치료 표적 유전자들(SMAD3, CFL1, ILK, PDK3 또는 PACSIN3)의 발현이 함께 저해되는 경우 항암 상승효과가 나타남을 의미한다. 또한 치료 표적 유전자들(SMAD3, CFL1, ILK, PDK3, PACSIN3)의 저해제와 MEK 저해제 (selumetinib)의 병용투여가 악성말초신경초종(MPNST)에 치료제로 활용될 수 있음을 의미한다.

[167]

[168] **실험예 1. 신경섬유종(PN) 세포주(ipNF95.6)에서 SMAD3, ILK, PDK3, MEK1의 과발현이 종양 악성화에 미치는 영향 확인**

[169] **1.1 각 치료 표적 유전자들이 클로닝된 벡터 제작**

[170] 각 치료 표적 유전자들(SMAD3, ILK, PDK3, MEK1)이 신경섬유종(PN) 세포주(ipNF95.6)에서 과발현될 수 있도록 벡터를 제작하였다. 구체적으로, SMAD3, ILK, PDK3, MEK1 유전자들의 각각의 코딩지역을 mammalian 발현 벡터(pcDNA3.1)에 클로닝하여 신경섬유종(PN) 세포주(ipNF95.6)에 각 유전자들이 클로닝된 플라스미드를 transfection하였다.

[171] **1.2 신경섬유종(PN) 세포주(ipNF95.6)에서 각 치료표적 유전자를 과발현시킨 후, 세포 생존률 및 apoptosis 활성 측정**

[172] 신경섬유종(PN) 세포주(ipNF95.6)에서 각 치료표적 유전자(SMAD3, ILK, PDK3, MEK1)를 과발현시킨 후, 실시예 3과 동일한 방법으로 세포 생존률 및 apoptosis 활성을 측정하였다.

[173] 각 치료표적 유전자(SMAD3, ILK, PDK3, MEK1)를 과발현시킨 신경섬유종(PN) 세포주(ipNF95.6)의 세포 생존률과 apoptosis 활성 측정 결과를 도 7에 나타내었다.

[174] 도 7은 각 치료표적 유전자(SMAD3, ILK, PDK3, MEK1)를 과발현시킨 신경섬유종(PN) 세포주(ipNF95.6)의 세포 생존률과 apoptosis 활성 측정 결과를 나타낸 그래프이다.

[175] 도 7에 나타낸 바와 같이, 치료표적 유전자(SMAD3, ILK, PDK3, MEK1) 중 ILK를 과발현시킨 세포주가 과발현시키지 않은 세포주(control)에 비해 통계적으로 유의미하게 세포 생존율이 증가한 반면 apoptosis 활성이 감소하였음을 확인하였다.

[176] 이는 신경섬유종(PN) 세포주(ipNF95.6)에서 ILK가 과발현되면 세포 생존율이 증가하고, apoptosis 활성이 감소되는 것을 확인함으로써 ILK가 신경섬유종(PN)의 치료표적이 될 수 있음을 의미한다.

[177] **1.3 세포배양 시간에 따른 세포증식율을 측정**

[178] 신경섬유종(PN)에서 악성말초신경초종(MPNST)으로 악성화가 진행되면서 나타나는 특징 중 하나는 세포증식력이 증가하는 것이다. 치료 표적 유전자들(SMAD3, ILK, PDK3, MEK1)을 신경섬유종(PN) 세포주(ipNF95.6)에서 과발현시켰을 때의 악성화 진행여부를 평가하기 위해 세포증식력을 측정하였다.

[179] 구체적으로 신경섬유종(PN) 세포주(ipNF95.6)에 실시예 5.1의 방법에 따라 제작된 각 치료 표적 유전자들(SMAD3, ILK, PDK3, MEK1)을 클로닝한 벡터를 각각 transfection한 후, 세포배양 시간에 따라 세포증식률을 측정하였다.

[180] 세포 증식률은 신경섬유종 및 MPNST 세포주를 96-well plate에 심고, 각 치료표적 유전자들을 클로닝한 벡터를 각각 transfection한후, 세포배양 시간에 따라 Dojindo laboratories사의 CCK-8시약을 이용하여 살아있는 세포양을 측정하였다. 측정된 값으로 세포배양 전의 양을 기준으로 세포증식률을 분석하였다.

[181] 신경섬유종(PN) 세포주(ipNF95.6)에 치료 표적 유전자들(SMAD3, ILK, PDK3, MEK1)을 과발현시켰을 경우의 세포증식력 측정 결과를 도 8에 나타내었다.

[182] 도 8은 신경섬유종(PN) 세포주(ipNF95.6)에 치료 표적 유전자들(SMAD3, ILK, PDK3, MEK1)을 과발현시켰을 경우의 세포증식력 측정 결과를 나타낸 그래프이다.

[183] 도 8에 나타낸 바와 같이, 신경섬유종(PN) 세포주(ipNF95.6)에 ILK, MEK1, SMAD3 및 PDK3 중 어느 하나의 유전자가 과발현되면 과발현시키지 않은 세포주(control)에 비하여 세포 증식력이 증가하는 것을 확인하였다. 이는 ILK, MEK1, SMAD3 및 PDK3 유전자가 신경섬유종(PN)의 악성화와 관련 있다는 것으로, 상기 유전자가 신경섬유종(PN) 및 악성말초신경초종(MPNST)의 치료표적이 될 수 있음을 의미한다.

[184]

[185] **실험예 2. ILK 또는 PDK3 저해제로써 개발되어 있는 저분자화합물 (small molecules)을 이용하여 신경섬유종 세포주에서 치료제로써의 활용도를 평가**

[186] MEK 저해제 (Selumetinib, 아스트라제네카), ILK 저해제(Cpd22, 시그마알드리치) 및 PDK3 저해제(AZD7545, 아스트라제네카)를 각각 농도별로 처리한 normal schwann 세포주 (ipn02.3), 신경섬유종(PN) 세포주(ipNF95.6) 및 악성말초신경초종(MPNST) 세포주(sNF02.2, sNF96.2)에서 실시예 3.1의 방법으로 세포 생존율을 측정하였고, 그 결과를 도 9에 나타내었다.

[187] 도 9는 ILK 저해제(Cpd22, 시그마알드리치) 및 PDK3 저해제(AZD7545, 아스트라제네카)를 각각 농도별로 처리한 normal schwann 세포주 (ipn02.3), 신경섬유종(PN) 세포주(ipNF95.6) 및 악성말초신경초종(MPNST) 세포주(sNF02.2, sNF96.2)의 세포 생존률을 나타낸 그래프이다.

[188] 도 9에 나타낸 바와 같이, normal schwann 세포주 (ipn02.3), 신경섬유종(PN) 세포주(ipNF95.6) 및 악성말초신경초종(MPNST) 세포주(sNF02.2, sNF96.2)에 MEK 저해제 (Selumetinib, 아스트라제네카), ILK 저해제(Cpd22), PDK3 저해제(AZD7545)를 각각 농도별로 처리하는 경우, 각 저해제의 농도가 증가함에 따라 신경섬유종(PN) 세포주(ipNF95.6) 및 악성말초신경초종(MPNST) 세포주(sNF02.2, sNF96.2)의 세포생존율이 감소하는 것을 확인하였다.

[189] 특히 신경섬유종(PN) 세포주(ipNF95.6) 및 악성말초신경초종(MPNST) 세포주(sNF02.2, sNF96.2)에 ILK 저해제(Cpd22)또는 PDK3 저해제(AZD7545)를 5μM 또는 10μM 농도로 처리하는 경우, 신경섬유종(PN) 세포주(ipNF95.6) 및 악성말초신경초종(MPNST) 세포주(sNF02.2, sNF96.2)의 세포 생존률이 현저히 감소하는 것을 확인하였다.

[190] 이는 신경섬유종증(PN)의 치료제로 활용되고 있는 MEK 저해제 (Selumetinib)와 더블어, ILK 저해제(Cpd22) 및 PDK3 저해제(AZD7545)가 신경섬유종(PN) 및 악성말초신경초종(MPNST)의 새로운 치료제로 활용가능성이 있음을 의미한다.

[191]

[192] **실험예 3. 저분자 화합물인 ILK 저해제(Cpd22) 또는 PDK3 저해제(AZD7545)와 MEK 저해제(Selumetinib)의 병용투여시 항암 효과 상승확인**

[193] Normal schwann 세포주 (ipn02.3), 신경섬유종 세포주(ipNF95.6), 악성말초신경초종(MPNST) 세포주(sNF02.2, sNF96.2)에 PDK3 저해제 (AZD7545) 또는 ILK 저해제 (Cpd22)를 각각 단독 처리한 경우와 MEK 저해제(Selumetinib)와 PDK3 저해제(AZD7545) 또는 ILK 저해제(Cpd22)를 함께 처리한 경우의 각 세포 생존률을 실시예 3의 방법으로 측정하였다.

[194] 구체적으로, PDK3 저해제(AZD7545) 1 μM 또는 ILK 저해제(Cpd22) 2 μM 를 각각 단독 처리한 군과 MEK 저해제(Selumetinib) 1 μM과 PDK3 저해제(AZD7545) 1 μM 또는 ILK 저해제(Cpd22) 2 μM을 함께 처리한 군 각각의 세포 생존율을 측정하였고, 그 결과를 도 10에 나타내었다.

[195] 도 10은 Normal schwann 세포주 (ipn02.3), 신경섬유종 세포주(ipNF95.6), 악성말초신경초종(MPNST) 세포주(sNF02.2, sNF96.2)에 PDK3 저해제(AZD7545) 또는 ILK 저해제(Cpd22)를 각각 단독 처리한 군과 MEK 저해제(Selumetinib)과 PDK3 저해제(AZD7545) 또는 ILK 저해제(Cpd22)을 함께 처리한 군 각각의 세포 생존율을 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.

[196] 도 10에 나타낸 바와 같이, 악성말초신경초종(MPNST) 세포주(sNF02.2, sNF96.2)에서 MEK 저해제(Selumetinib)를 단독으로 처리한 경우 항암효과가 나타나지 않은 것에 비하여, 새로운 치료표적인 PDK3 저해제(AZD7545) 또는 ILK 저해제(Cpd22)를 MEK 저해제(Selumetinib)와 함께 처리하였을 때 세포 생존률이 감소함을 확인하였다.

[197] 이는 PDK3 저해제(AZD7545) 또는 ILK 저해제(Cpd22)를 MEK 저해제(Selumetinib)와 함께 처리하였을 경우 악성말초신경초종(MPNST)에 대하여 항암효과가 있음을 의미한다. 또한, PDK3 저해제 및 ILK 저해제가 악성말초신경초종(MPNST)의 새로운 치료법으로 활용가능성이 높음을 의미하는 것이다.

청구범위

[청구항 1] ILK(Integrin-Linked Kinase)의 발현 또는 활성 저해제(inhibitor)를 포함하는 말초신경종양(Peripheral Nerve Tumor) 예방 또는 치료용 약학 조성물.

[청구항 2] 청구항 1에 있어서,
상기 ILK 발현 저해제는 ILK의 DNA 또는 mRNA에 상보적으로 결합하는 안티센스 핵산, siRNA, shRNA, miRNA 및 리보자임으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상인 것인, 약학 조성물.

[청구항 3] 청구항 2에 있어서,
상기 siRNA는 서열번호 1 내지 4의 서열로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상인 것인, 약학 조성물.

[청구항 4] 청구항 1에 있어서,
상기 ILK 활성 저해제는 ILK의 단백질에 특이적으로 결합하는 화합물, 펩티드, 펩티드 미메틱스, 융합 단백질, 항체, 앱타머 및 항체-약물 복합체(ADC; Antibody Drug Conjugate)로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 것인, 약학 조성물.

[청구항 5] 청구항 1에 있어서,
상기 ILK 저해제는 Cpd 22 또는 QLT-0267인 것인, 약학 조성물.

[청구항 6] 청구항 1에 있어서,
상기 약학 조성물은 SMAD3(Mothers Against Decapentaplegic Homolog 3), CFL1(Cofilin-1), PDK3(Pyruvate Dehydrogenase Kinase 3), PACSIN3(Protein Kinase C and Casein Kinase Substrate in Neurons 3) 및 MEK1(mitogen-activated protein kinase kinase 1)로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 발현 또는 활성 저해제를 더 포함하는 것인, 약학 조성물.

[청구항 7] 청구항 1에 있어서, 상기 약학 조성물은 SMAD3, CFL1, PDK3, PACSIN3 및 MEK1으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 발현 또는 활성 저해제와 병용투여되는 것인, 약학 조성물.

[청구항 8] 청구항 6에 있어서,
상기 발현 저해제는 SMAD3, CFL1, PDK3, PACSIN3 및 MEK1으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 DNA 또는 mRNA에 상보적으로 결합하는 안티센스 핵산, siRNA, shRNA, miRNA 및 리보자임으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상인 것인, 약학 조성물.

[청구항 9] 청구항 6에 있어서,
상기 활성 저해제는 SMAD3, CFL1, PDK3, PACSIN3 및 MEK1으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 단백질에 특이적으로 결합하는 화합물, 펩티드, 펩티드 미메틱스, 융합 단백질, 항체, 앱타머 및 항체-약물 복합체(ADC; Antibody Drug Conjugate)로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 것인, 약학 조성물.

[청구항 10] 청구항 6에 있어서,
상기 MEK1저해제는 셀루메티닙(selumetinib), 트라메티닙(trametinib), 피마서팁(pimasertib), 미르다메티닙(Mirdametinib), 레파메티닙(Refametinib), AZD8330 및 E6201으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 것인, 약학 조성물.

[청구항 11] 청구항 8에 있어서,
상기 siRNA는 서열번호 5 내지 24의 서열로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상인 것인, 약학 조성물.

[청구항 12] 청구항 1에 있어서,
말초신경종양(Peripheral Nerve Tumor)은 신경섬유종(Neurofibroma), 신경절종(Ganglioneuroma), 신경절간질종(Ganglioneuroblastoma), 신경원추종(Neuroma), 신경단종(Neurilemoma), 신경원추종(Neuroma), 말초신경초기절제종(Peripheral Primitive Neuroectodermal Tumor, PNET), 신경절외신경원종(Extra-adrenal Paraganglioma), 신경섬유육종 (Neurofibrosarcoma), 신경절외신경섬유종(Extra-adrenal Neurofibroma), 제1형 신경섬유종증(Neurofibromatosis Type1, NF1), 제2형 신경섬유종증(Neurofibromatosis Type2, NF2), 총상신경섬유종(plexiform neurofibroma, PN) 및 악성말초신경초종(malignant peripheral nerve sheath tumor, MPNST)으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인 것인, 약학적 조성물.

[청구항 13] 청구항 12에 있어서,
상기 악성말초신경초종(malignant peripheral nerve sheath tumor, MPNST)은 총상신경섬유종(plexiform neurofibroma, PN)의 악성화로 유발되는 것을 특징으로 하는 것인, 약학 조성물.

[청구항 14] ILK(Integrin-Linked Kinase) 발현 또는 활성 저해제(inhibitor)를 포함하는 말초신경종양(Peripheral Nerve Tumor) 예방 또는 치료용 키트.

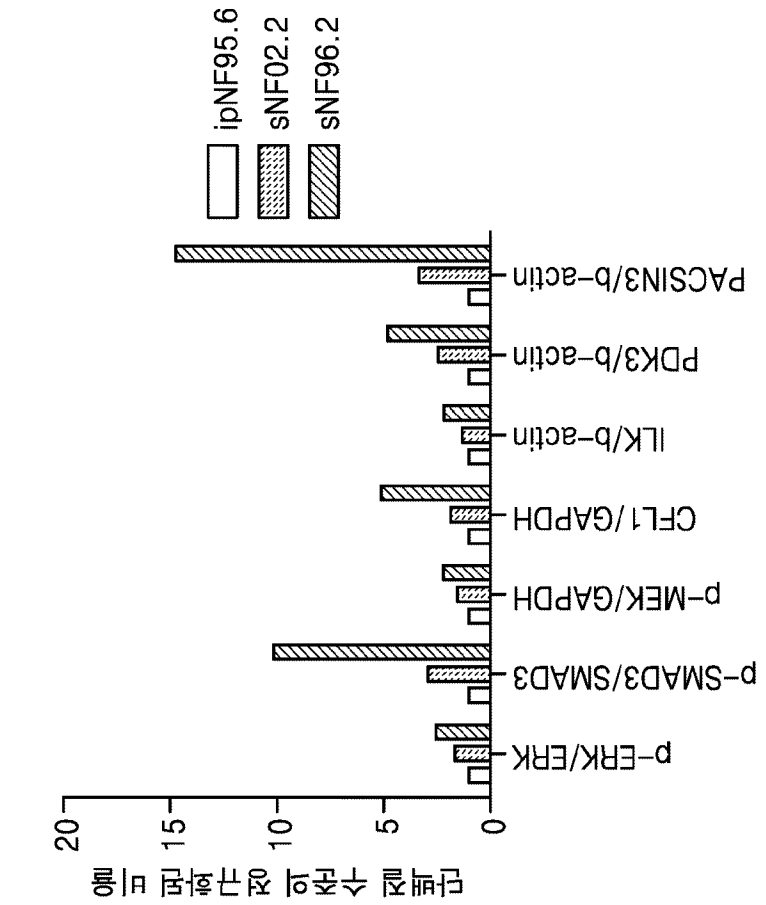
[청구항 15] 청구항 14에 있어서,
상기 키트는 SMAD3(Mothers Against Decapentaplegic Homolog 3), CFL1(Cofilin-1), PDK3(Pyruvate Dehydrogenase Kinase 3), PACSIN3(Protein Kinase C and Casein Kinase Substrate in Neurons 3) 및 MEK1(mitogen-activated protein kinase kinase 1)로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 발현 또는 활성 저해제를 더 포함하는, 키트.

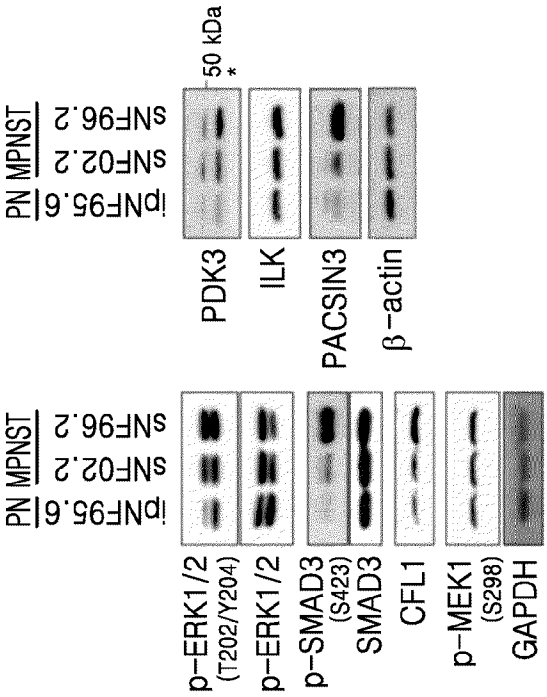
[청구항 16] 말초신경종양(Peripheral Nerve Tumor)을 예방 또는 치료하기 위한 ILK(Integrin-Linked Kinase)의 발현 또는 활성 저해제(inhibitor)를 포함하는 조성물의 용도.

[청구항 17] 유효량의 ILK(Integrin-Linked Kinase)의 발현 또는 활성 저해제(inhibitor)를 포함하는 조성물을 그를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는 말초신경종양(Peripheral Nerve Tumor) 예방 또는 치료 방법.

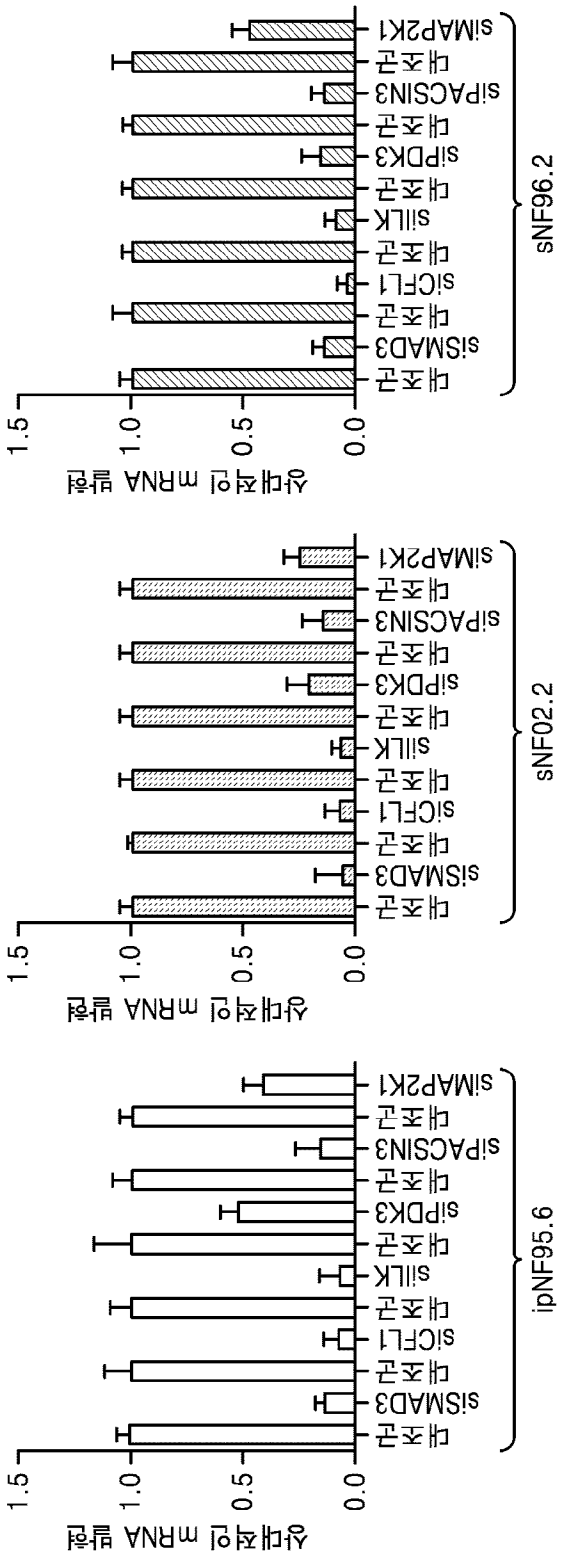
[청구항 18] 말초신경종양(Peripheral Nerve Tumor) 예방 또는 치료용 의약 제조에 사용하기 위한 ILK(Integrin-Linked Kinase)의 발현 또는 활성 저해제(inhibitor)를 포함하는 조성물의 용도.

[도1]

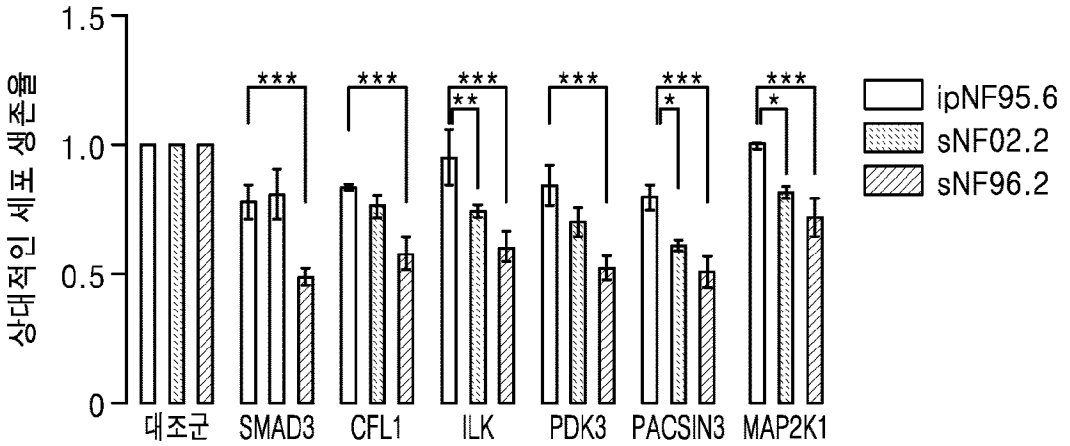

ipNF95.6
sNF02.2
sNF96.2
PACSIN3/b-actin
PDK3/b-actin
ILK/b-actin
CFL1/GAPDH
p-MEK/GAPDH
p-SMAD3/SMAD3
p-ERK/ERK
0
5
10
15
20
단백질 수준의 정규화된 비율


PN MPNST
ipNF95.6
sNF02.2
sNF96.2
50 kDa
*
PDK3
ILK
PACSIN3
β-actin
p-ERK1/2 (T202/Y204)
p-ERK1/2
p-SMAD3 (S423)
SMAD3
CFL1
p-MEK1 (S298)
GAPDH

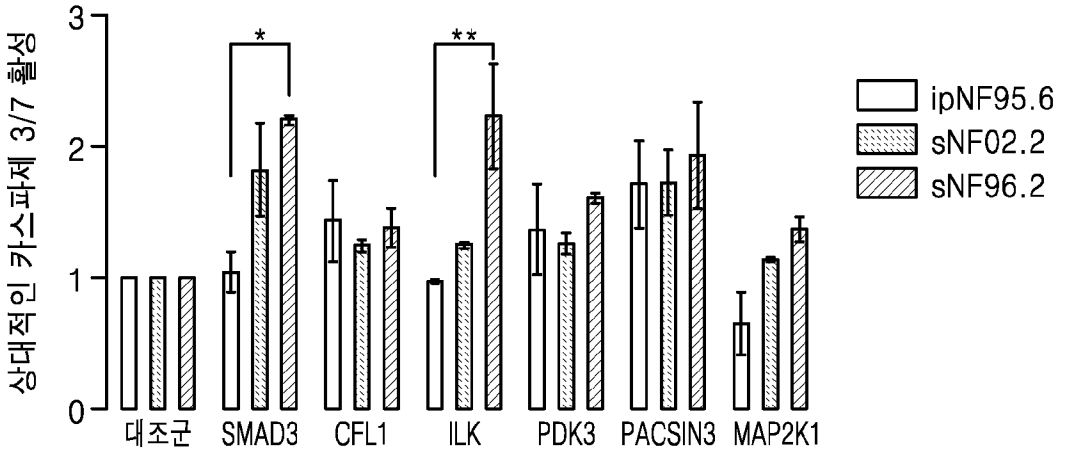
[도2]


상대적인 mRNA 발현
0.0
0.5
1.0
1.5
대조군
siMAP2K1
대조군
siPACSIN3
대조군
siPDK3
대조군
siILK
대조군
siCFL1
대조군
siSMAD3
대조군
ipNF95.6
sNF02.2
sNF96.2

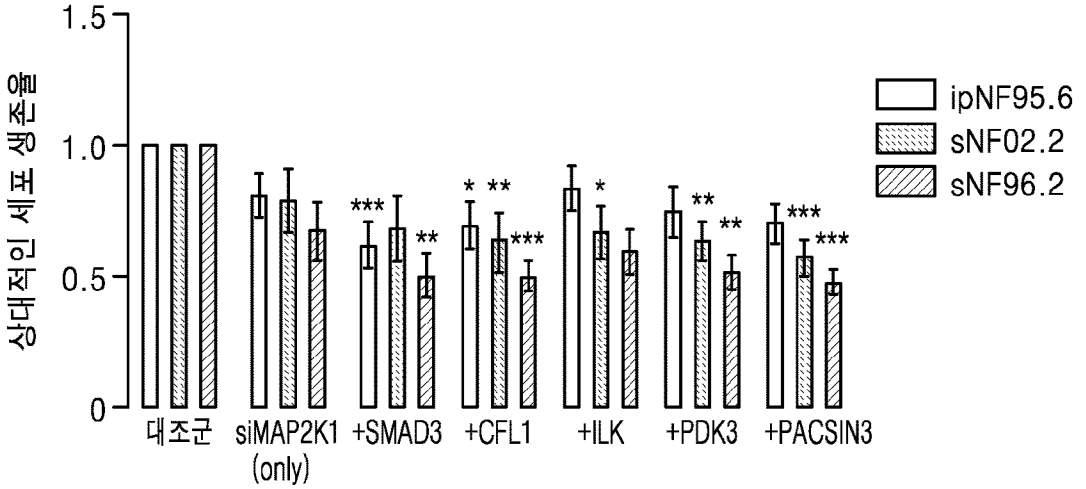
[도3]


상대적인 세포 생존율
1.5
1.0
0.5
0
***
**
*
대조군
SMAD3
CFL1
ILK
PDK3
PACSIN3
MAP2K1
ipNF95.6
sNF02.2
sNF96.2

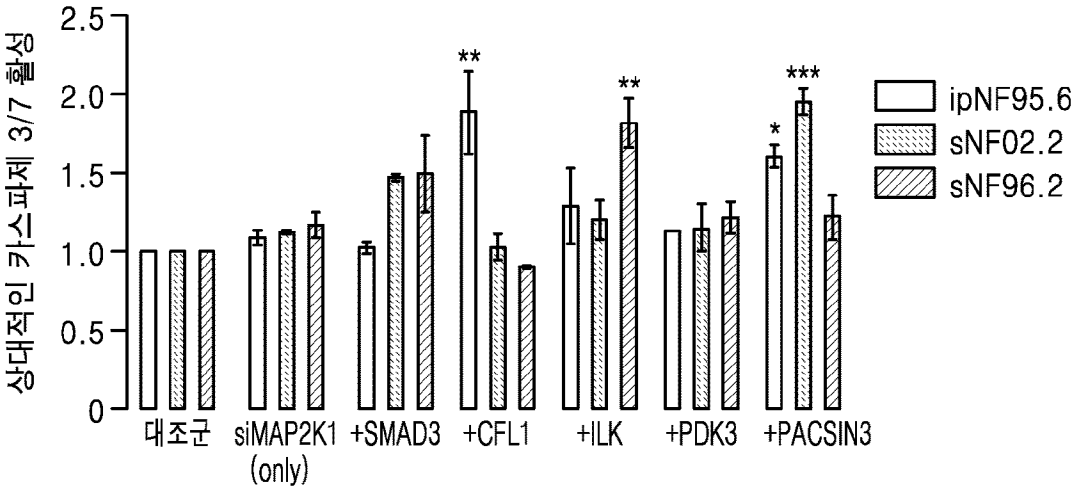
[도4]


상대적인 카스파제 3/7 활성
3
2
1
0
*
**
대조군
SMAD3
CFL1
ILK
PDK3
PACSIN3
MAP2K1
ipNF95.6
sNF02.2
sNF96.2

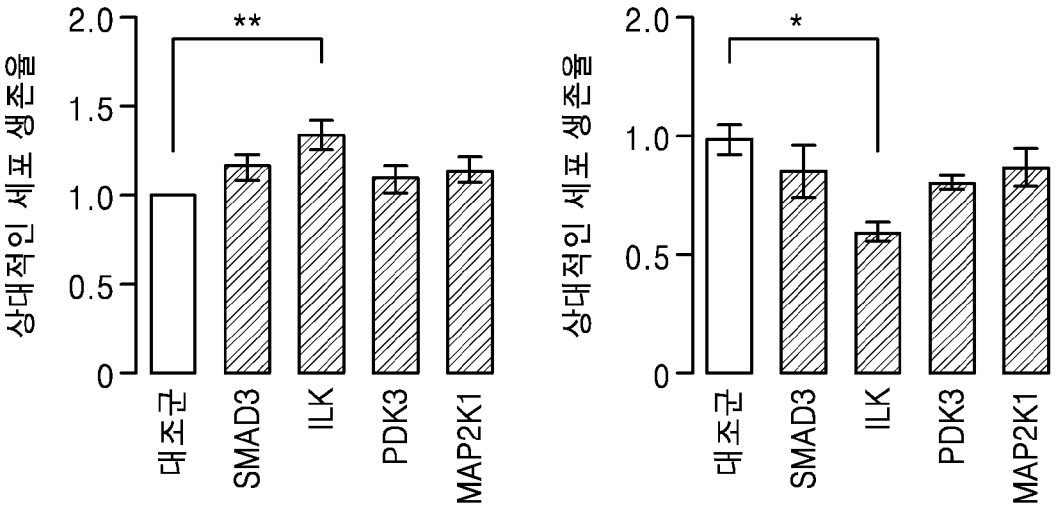
[도5]


상대적인 세포 생존율
1.5
1.0
0.5
0
***
**
*
대조군
siMAP2K1 (only)
+SMAD3
+CFL1
+ILK
+PDK3
+PACSIN3
ipNF95.6
sNF02.2
sNF96.2

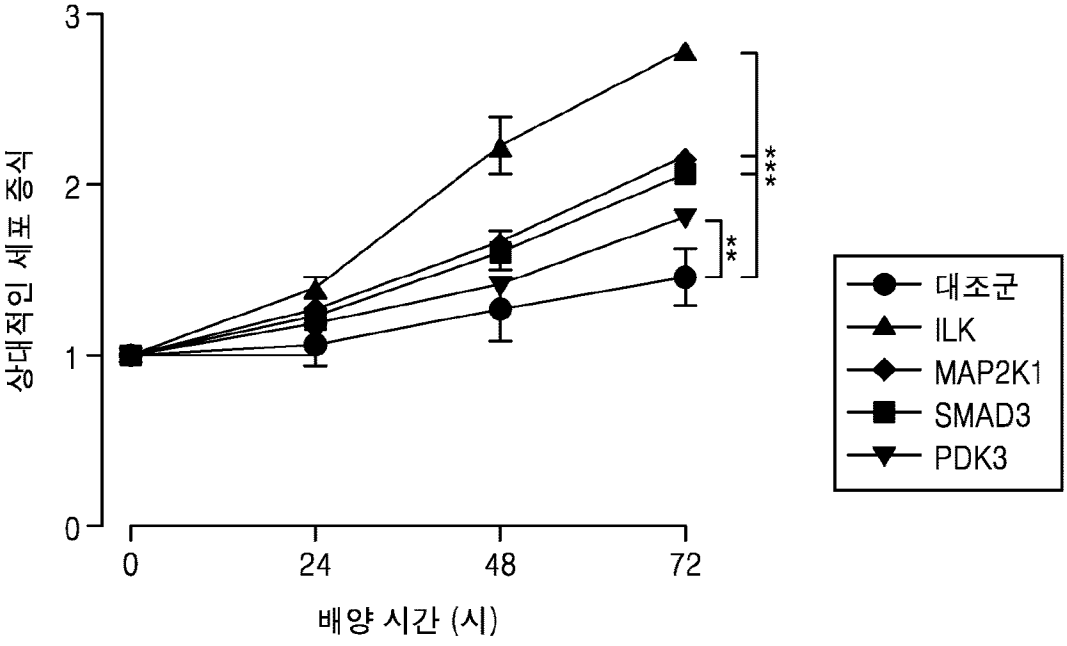
[도6]


상대적인 카스파제 3/7 활성
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0
**
**
*
***
ipNF95.6
sNF02.2
sNF96.2
대조군
siMAP2K1 (only)
+SMAD3
+CFL1
+ILK
+PDK3
+PACSIN3

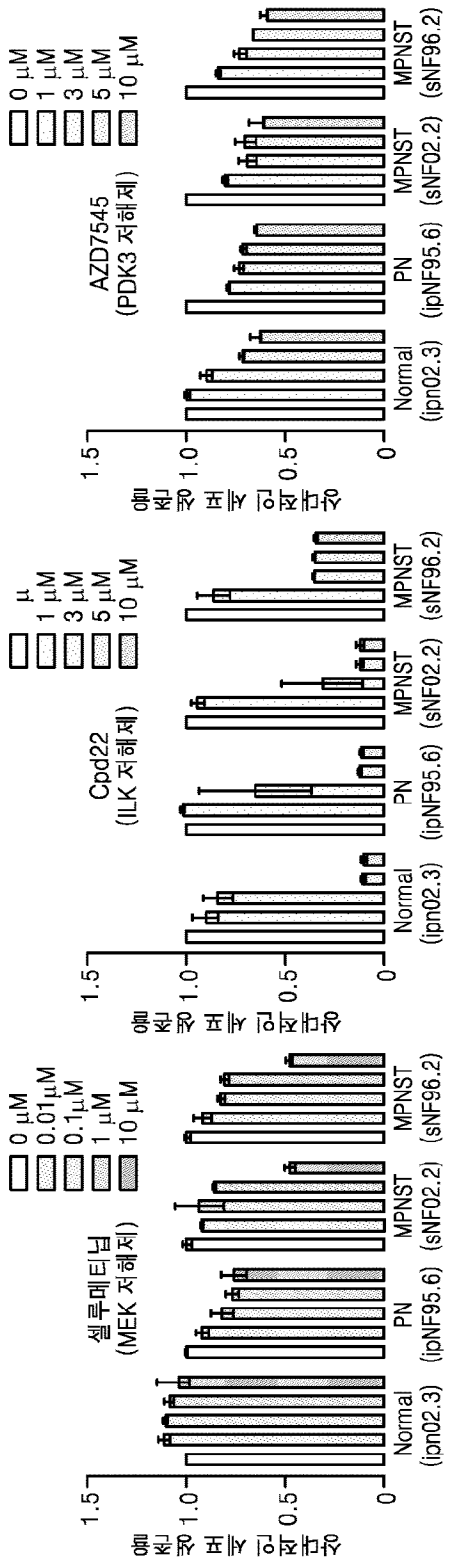
[도7]


상대적인 세포 생존율
2.0
1.5
1.0
0.5
0
**
대조군
SMAD3
ILK
PDK3
MAP2K1
상대적인 세포 생존율
2.0
1.0
0.5
0
*
대조군
SMAD3
ILK
PDK3
MAP2K1

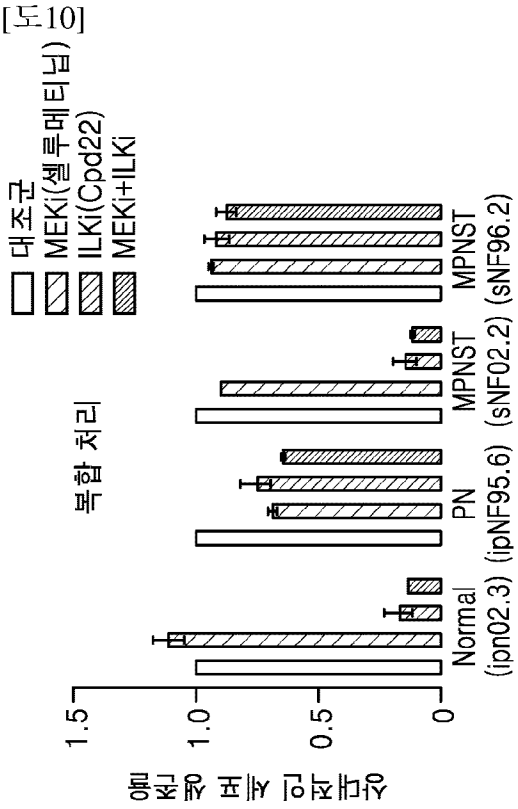
[도8]

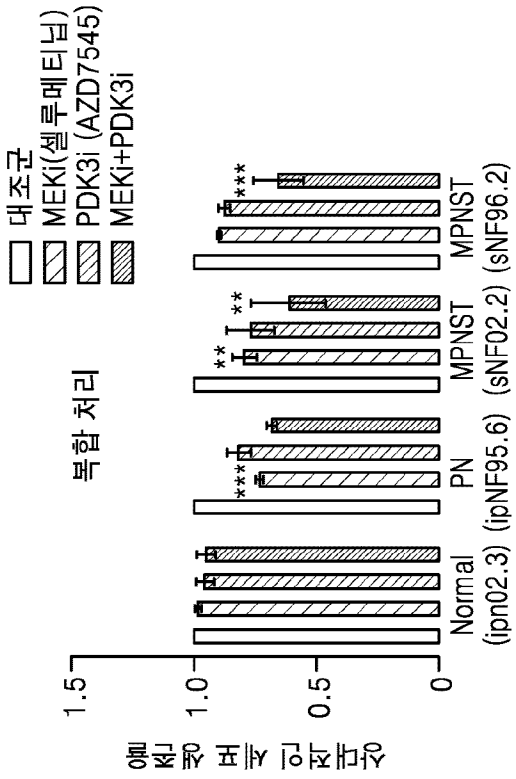

상대적인 세포 증식
3
2
1
0
***
**
0
24
48
72
배양 시간 (시)
대조군
ILK
MAP2K1
SMAD3
PDK3

[도9]


셀루메티닙
(MEK 저해제)
0 μM
0.01μM
0.1μM
1 μM
10 μM
Cpd22
(ILK 저해제)
0 μM
1 μM
3 μM
5 μM
10 μM
AZD7545
(PDK3 저해제)
0 μM
1 μM
3 μM
5 μM
10 μM
상대적 표적 단백 발현
1.5
1.0
0.5
0
Normal (ipn02.3)
PN (ipNF95.6)
MPNST (sNF02.2)
MPNST (sNF96.2)

[도10]


대조군
MEKi(셀루메티닙)
ILKi(Cpd22)
MEKi+ILKi
복합 처리
상대적인 세포 생존율
1.5
1.0
0.5
0
Normal (ipn02.3)
PN (ipNF95.6)
MPNST (sNF02.2)
MPNST (sNF96.2)


대조군
MEKi(셀루메티닙)
PDK3i (AZD7545)
MEKi+PDK3i
복합 처리
상대적인 세포 생존율
1.5
1.0
0.5
0
Normal (ipn02.3)
PN (ipNF95.6)
MPNST (sNF02.2)
MPNST (sNF96.2)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2024/013339

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 48/00(2006.01)i; **A61K 31/713**(2006.01)i; **A61K 31/496**(2006.01)i; **A61K 31/415**(2006.01)i; **A61K 31/4184**(2006.01)i; **A61K 45/06**(2006.01)i; **A61P 35/00**(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K 48/00(2006.01); A61K 31/167(2006.01); A61K 31/635(2006.01); A61K 31/713(2006.01); A61K 39/395(2006.01); A61K 45/00(2006.01); A61P 35/00(2006.01); G01N 33/68(2006.01)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean utility models and applications for utility models: IPC as above
Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & keywords: ILK(integrin-linked kinase), 저해제(inhibitor), 말초신경종양(peripheral nerve tumor), 악성말초신경초종(malignant peripheral nerve sheath tumor), 유전자(gene), 핵산(nucleic acid)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2022-203314 A2 (THE ASAN FOUNDATION et al.) 29 September 2022 (2022-09-29) See claims 1 and 5; and paragraphs [0005], [0032]-[0040], [0129], [0130] and [0163].	1,2,4,12-16,18
Y		3,5,6-11
Y	NCBI. Reference Sequence Accession No. XM_053560554.1. PREDICTED: Nycticebus coucang integrin linked kinase (ILK), transcript variant X4, mRNA. 05 March 2023. See entire document.	3
Y	JP 2015-074643 A (NATIONAL CANCER CENTER) 20 April 2015 (2015-04-20) See claim 1; and paragraph [0025].	5
Y	US 2022-0125807 A1 (MAX-DELBRÜCK-CENTRUM FÜR MOLEKULARE MEDIZIN IN DER HOLMHOLTZ-GEMEINSCHAFFT et al.) 28 April 2022 (2022-04-28) See abstract; and claims 1, 5 and 9.	6-11

☑ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"D" document cited by the applicant in the international application
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
16 December 2024	**16 December 2024**

Name and mailing address of the ISA/KR	Authorized officer
Korean Intellectual Property Office **Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon 35208**	
Facsimile No. **+82-42-481-8578**	Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	NCBI. Reference Sequence Accession No. XM_011720871.2. PREDICTED: Macaca nemestrina cofilin 1 (CFL1), transcript variant X3, mRNA. 24 April 2018. See entire document.	11
A	KR 10-2010-0038377 A (TAKEDA PHARMACEUTICAL COMPANY LIMITED) 14 April 2010 (2010-04-14) See claim 1; and paragraph [0101].	1-16,18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2024/013339

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
   a. ☑ forming part of the international application as filed.
   b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13*ter*.1(a)),
      ☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2024/013339

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☑ Claims Nos.: **17**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claim 17 pertains to a method for treatment of the human body, and thus pertains to a subject matter on which the International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2024/013339

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
WO 2022-203314 A2	29 September 2022	EP 4317979 A2	07 February 2024
		JP 2024-510839 A	11 March 2024
		US 2024-0175872 A1	30 May 2024
		WO 2022-203314 A3	10 November 2022
JP 2015-074643 A	20 April 2015	None	
US 2022-0125807 A1	28 April 2022	CA 3128968 A1	27 August 2020
		EP 3927333 A1	29 December 2021
		JP 2022-521407 A	07 April 2022
		WO 2020-169812 A1	27 August 2020
KR 10-2010-0038377 A	14 April 2010	AU 2008-264469 A1	24 December 2008
		AU 2008-264469 A2	28 January 2010
		BR PI0813402 A2	30 December 2014
		CA 2691251 A1	24 December 2008
		CN 101778641 A	14 July 2010
		EP 2163258 A1	17 March 2010
		IL 202718 A	30 June 2010
		RU 2010101416 A	27 July 2011
		US 2010-0183604 A1	22 July 2010
		WO 2008-156153 A1	24 December 2008
		ZA 201000021 B	30 March 2011

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2024/013339

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 48/00(2006.01)i; **A61K 31/713**(2006.01)i; **A61K 31/496**(2006.01)i; **A61K 31/415**(2006.01)i; **A61K 31/4184**(2006.01)i; **A61K 45/06**(2006.01)i; **A61P 35/00**(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61K 48/00(2006.01); A61K 31/167(2006.01); A61K 31/635(2006.01); A61K 31/713(2006.01); A61K 39/395(2006.01); A61K 45/00(2006.01); A61P 35/00(2006.01); G01N 33/68(2006.01)

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: ILK(integrin-linked kinase), 저해제(inhibitor), 말초신경종양(peripheral nerve tumor), 악성말초신경초종(malignant peripheral nerve sheath tumor), 유전자(gene), 핵산(nucleic acid)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	WO 2022-203314 A2 (THE ASAN FOUNDATION 등) 2022.09.29 청구항 1, 5; [0005], [0032]-[0040], [0129], [0130], [0163]	1,2,4,12-16,18
Y		3,5,6-11
Y	NCBI, Reference Sequence Accession No. XM_053560554.1, "PREDICTED: Nycticebus coucang integrin linked kinase (ILK), transcript variant X4, mRNA", 2023.03.05 전체 문헌	3
Y	JP 2015-074643 A (NATIONAL CANCER CENTER) 2015.04.20 청구항 1; 단락 [0025]	5
Y	US 2022-0125807 A1 (MAX-DELBRÜCK-CENTRUM FÜR MOLEKULARE MEDIZIN IN DER HOLMHOLTZ-GEMEINSCHAFFT 등) 2022.04.28 요약; 청구항 1, 5, 9	6-11

☑ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☑ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌
"D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌
"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌
"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌
"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌
"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌
"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌
"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.
"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.
"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일
2024년12월16일(16.12.2024)	**2024년12월16일(16.12.2024)**

ISA/KR의 명칭 및 우편주소	심사관
대한민국 특허청 **(35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사)**	**허주형**
팩스 번호 **+82-42-481-8578**	전화번호 **+82-42-481-5373**

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	NCBI, Reference Sequence Accession No. XM_011720871.2, "PREDICTED: Macaca nemestrina cofilin 1 (CFL1), transcript variant X3, mRNA", 2018.04.24 전체 문헌	11
A	KR 10-2010-0038377 A (다케다 야쿠힌 고교 가부시키가이샤) 2010.04.14 청구항 1; 단락 [0101]	1-16,18

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2024/013339

제1기재란 핵산염기 및/또는 아미노산 서열(첫 번째 용지의 1.c의 계속)

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 다음에 기초하여 수행되었습니다.

   a. ☑ 출원시 국제출원의 일부를 구성하는 서열목록

   b. ☐ 국제조사를 목적으로 국제출원일 이후에 제출된 서열목록(규칙 13의3.1(a))

      ☐ 서열목록이 출원시 국제출원의 개시 범위를 넘지 않는다는 취지의 진술서를 첨부

2. ☐ 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열에 대해, 본 보고서는 WIPO 표준 ST.26을 준수하는 서열목록이 없이 유효한 조사를 할 수 있는 범위에서 작성되었습니다

3. 추가 의견:

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2024/013339

제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. ☑ 청구항: **17**
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,

청구항 17은 인체의 치료방법에 관한 것이므로 PCT 제17조(2)(a)(i) 및 규칙 39.1(iv)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제 조사할 의무가 없는 대상에 해당됩니다.

2. ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,

3. ☐ 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

국 제 조 사 보 고 서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2024/013339

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
WO 2022-203314 A2	2022/09/29	EP 4317979 A2	2024/02/07
		JP 2024-510839 A	2024/03/11
		US 2024-0175872 A1	2024/05/30
		WO 2022-203314 A3	2022/11/10
JP 2015-074643 A	2015/04/20	없음	
US 2022-0125807 A1	2022/04/28	CA 3128968 A1	2020/08/27
		EP 3927333 A1	2021/12/29
		JP 2022-521407 A	2022/04/07
		WO 2020-169812 A1	2020/08/27
KR 10-2010-0038377 A	2010/04/14	AU 2008-264469 A1	2008/12/24
		AU 2008-264469 A2	2010/01/28
		BR PI0813402 A2	2014/12/30
		CA 2691251 A1	2008/12/24
		CN 101778641 A	2010/07/14
		EP 2163258 A1	2010/03/17
		IL 202718 A	2010/06/30
		RU 2010101416 A	2011/07/27
		US 2010-0183604 A1	2010/07/22
		WO 2008-156153 A1	2008/12/24
		ZA 201000021 B	2011/03/30