



# (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117769419 A

(43) 申请公布日 2024. 03. 26

(21) 申请号 202280040639.5

(22) 申请日 2022.06.09

(30) 优先权数据

2108224.3 2021.06.09 GB

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.12.06

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/GB2022/051442 2022.06.09

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/258972 EN 2022.12.15

(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  
有限责任公司 11204

专利代理师 王达佐 何可

(51) Int.Cl.

A61K 31/47 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61K 31/4184 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

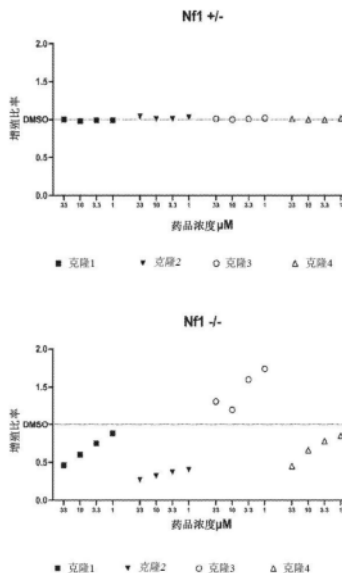
权利要求书2页 说明书8页 附图4页

## (54) 发明名称

用于在皮肤神经纤维瘤的治疗中使用的硝羟喹啉

## (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,所述组合物用于在皮肤神经纤维瘤的治疗或预防中使用。



1. 一种包含硝羟喹啉或其药学上可接受的盐的组合物,所述组合物用于在皮肤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,所述组合物用于皮肤神经纤维瘤的治疗。
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,所述药物用于在皮肤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. 一种治疗或预防皮肤神经纤维瘤的方法,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。

## 用于在皮肤神经纤维瘤的治疗中使用的硝羟喹啉

### 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,它们被发现为独立的肿瘤,而其余的则发现于患有I型神经纤维瘤病(NF1)(这是一种常染色体显性遗传的基因遗传疾病)的人中。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] 皮肤(或真皮)神经纤维瘤(cNF)起源于皮肤中的神经,并且通常与单个周围神经相关联。所有神经纤维瘤都包括NF1突变Schwann细胞(SC)与其他神经纤维元素(诸如轴突、成纤维细胞、肥大细胞、巨噬细胞和内皮细胞)的混合物。cNF的三个种类分为:1) 离散cNF;皮肤上无蒂或有蒂的团块,其为肉质且无触痛,并且大小可有所不同,2) 离散子cNF;位于下方并且看起来像皮肤上的肿块,其有时可能会有触痛,以及3) 深层结节性神经纤维瘤;累及真皮下的组织和器官,但在其他方面类似于皮肤和皮下神经纤维瘤。

[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。皮肤神经纤维瘤在至少99%的患有NF1的患者中出现,并且起源于真皮中的Schwann细胞谱系。

[0005] cNF通常在青春期出现,并且往往终身在数量上增加,使得其可能达到数千个。尽管具有良性的性质,但这些肿瘤有损容貌,并且经常发痒和疼痛,因而显著影响生活质量。

[0006] 人们也已付出了相当大的努力来识别治疗皮肤神经纤维瘤的药理学靶标。特别是皮肤神经纤维瘤已是对开发中的药品的再利用努力以及再定位的常见靶标。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,尚不存在被批准用于cNF的药品。物理去除仍然是用于治疗cNF的最有效方法:通过CO<sub>2</sub>激光、电干燥和消融来进行手术切除或破坏。去除面临的挑战包括:不完全切除导致的肿瘤再生长、显著的瘢痕以及成本负担。存在正在进行的关于司美替尼治疗患有I型神经纤维瘤病和皮肤神经纤维瘤的患者的试点II期试验研究。然而,目前尚不清楚这会取得多大成功。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,对于治疗皮肤神经纤维瘤的努力已带来了一些令人兴奋的可能性,但是尽管付出了很多努力,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,该组合物用于在皮肤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显而易见的,硝羟喹啉有效治疗和预防皮肤神经纤维瘤。

[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,该组合物用于在皮肤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,该药物用于在皮肤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皮肤神经纤维瘤的方法,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示出了用于体外研究的浮球培养物的制备和传代。

[0015] 图2示出了硝羟喹啉在Tom+NF1+/-和Tom+NF1-/-细胞的增殖中的剂量应答效应。

[0016] 图3示出了硝羟喹啉诱导Tom+NF1+/-和Tom+NF1-/-细胞的细胞死亡的剂量应答效应。

[0017] 图4示出了使用低倍(5x)放大率的情况下的小鼠皮肤中的荧光cNF肿瘤细胞。A至D:媒介物治疗一个月之后两只小鼠中的Tom+细胞的代表性图像;E至H:硝羟喹啉治疗一个月之后两只小鼠中的Tom+细胞的代表性图像。

### 具体实施方式

[0018] 在本发明中,并且如下文体外和体内数据所表明的,硝羟喹啉在从源自NF1-/-小鼠模型的皮肤神经纤维瘤分离的肿瘤细胞中抑制细胞增殖并增加细胞凋亡,并且因此是对皮肤神经纤维瘤的有效治疗。优选地,硝羟喹啉用于皮肤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。

[0019] 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)治疗和/或缓解治疗(患者状况的改善),其包括减小皮肤神经纤维瘤的大小或cNF的数量。如本文所用,提到术语“预防(prevention)”或“预防(preventing)”,我们是指防止cNF形成的“预防性”治疗。这包括向患有NF1但皮肤神经纤维瘤尚未发展的患者,或者向患有cNF但目的是防止更多cNF发展的患者施用本发明的组合物。

[0020] “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,受试者是成年人。“成年人”是18岁或更大年龄的人。在另一实施方案中,受试者正在经历青春期,诸如受试者年龄介于8岁与18岁之间。

[0021] 在一个实施方案中, 硝羟喹啉用于皮肤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去除一些或全部皮肤神经纤维瘤。这在以下情况下可以是特别有利的: 皮肤神经纤维瘤很大和/或跨组织边界扩展, 因此难以通过手术将其全部去除和/或快速去除至少一些是所期望的/有益的。

[0022] 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。

[0023] 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)。

[0024] 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, 该组合物用于在皮肤神经纤维瘤的治疗或预防中使用。

[0025] 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, 该组合物用于在皮肤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皮肤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皮肤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。

[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。

[0027] 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。

[0028] 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。

[0029] 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。

[0030] 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。片剂和胶囊可利用以下来制备: 粘结剂, 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, 诸如月桂基硫酸钠。液体组合物可含有常规添加剂, 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, 诸如丁基羟基茴香醚(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。

[0031] 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。

[0032] 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。

[0033] 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。

[0034] 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。

[0035] 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、溶液或悬浮液或者微针。因此,本发明也提供了一种含有组合物的经皮贴剂。

[0036] 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。

[0037] 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。

[0038] 用于口服施用的液体分散剂可以是糖浆、乳剂和悬浮液。

[0039] 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。用于肌内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。

[0040] 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。

[0041] 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皮肤神经纤维瘤。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。

[0042] 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。

[0043] 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。

[0044] 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。

[0045] 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。

[0046] 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。

[0047] 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。

[0048] 优选地,剂量方案为使得硝羟喹啉的总每日剂量不超过1500mg。

[0049] 合适地,硝羟喹啉的有效剂量导致细胞中 $1\mu\text{M}$ 至 $75\mu\text{M}$ 、优选地 $5\mu\text{M}$ 至 $50\mu\text{M}$ 、更优选地 $10\mu\text{M}$ 至 $40\mu\text{M}$ 的浓度。

[0050] 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。

[0051] 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。

[0052] 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。

[0053] 为了治疗或预防皮肤神经纤维瘤,包含硝羟喹啉的组合物以慢性给药方案(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。

[0054] 本发明也涉及一种试剂盒,该试剂盒包含:(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,用于在皮肤神经纤维瘤的治疗或预防中同时、单独或循序使用。

[0055] 本发明也涉及硝羟喹啉或其药学上可接受的盐用于制备用于在皮肤神经纤维瘤的治疗或预防中使用的药物的用途。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。

[0056] 本发明也涉及一种治疗或预防皮肤神经纤维瘤的方法,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。

[0057] 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。

#### [0058] 实验部分

[0059] 实施例1—利用Tomato (Tom)+cNF起源处的干细胞样神经胶质细胞的体外药品测试

[0060] 该研究使用Nf1-KO小鼠品系(Prss56Cre/+、R26tdTom/+、Nf1f1/f1)发展出忠实地重现人类疾病的皮肤神经纤维瘤(cNF)(Radomska等人,2019)。在该模型中,Nf1的同时双等位基因丢失和Tomato荧光报告基因的表达被靶向到cNF起源处的神经胶质干细胞样细胞中。使用非贴壁细胞来离体执行测定,其中可扩增来自皮肤的表达Tomato的Nf1-/-和Nf1

+/-干细胞样细胞,并且进一步表征了它们的特性。虽然在该实验条件下,所有分化细胞都快速地死亡(24h),但cNF起源处的神经胶质干细胞样细胞存活、增殖并形成可长时间繁殖的神经球(多细胞致密结构),因此保留其体内特性。在该系统中,Nf1<sup>-/-</sup>细胞表达高水平的p-ERK(如预期的那样,由于RAS通路的永久性激活),与对照相比增殖快得多,并且保留在分离和重新平板接种之后重新形成球体的能力。此外,我们观察到,Nf1<sup>-/-</sup>和Nf1<sup>+/-</sup>细胞与司美替尼(MEK1/2的抑制剂)一起孵育降低了增殖活性并促进了突变体的死亡,而不影响Nf1<sup>+/-</sup>细胞支持体外系统执行药品筛选研究的稳健性。

[0061] 该模型用于评估硝羟喹啉对Nf1<sup>-/-</sup>肿瘤细胞的增殖和细胞死亡的影响。

[0062] 模型表征

[0063] 该体外培养系统使用cNF起源处可长时间扩增和繁殖的Tomato(Tom)<sup>+</sup>干细胞样神经胶质细胞。简而言之,从年轻突变体(NF1<sup>-/-</sup>)和对照(NF1<sup>+/-</sup>)小鼠解剖、分离皮肤,并且在存在两种丝裂原FGF和EGF的非贴壁条件下孵育细胞悬浮液。在此类条件下,仅干细胞样细胞存活、增殖并形成被称为神经球的致密多细胞漂浮结构。因为除Tom<sup>+</sup>神经胶质干细胞样细胞之外,皮肤还含有各种其他类型的干细胞(Tom<sup>-</sup>),所以神经球由混合的Tom<sup>+</sup>和Tom<sup>-</sup>细胞构成。虽然在突变条件下,神经球含有Tom<sup>+</sup>、Nf1<sup>-/-</sup>和Tom<sup>-</sup>、Nf1<sup>+/+</sup>细胞,但在Nf1<sup>+/-</sup>对照条件下,神经球由Tom<sup>+</sup>、Nf1<sup>+/-</sup>和Tom<sup>-</sup>、Nf1<sup>+/+</sup>细胞构成。在该研究中,我们已分析了来自NF1<sup>-/-</sup>和Nf1<sup>+/-</sup>小鼠的Tom<sup>+</sup>中的药品作用。

[0064] 实验设计

[0065] 细胞制备、克隆扩增和药品治疗

[0066] 在本研究中,使用了从新生小鼠皮肤分离的Nf1<sup>+/-</sup>(Prss56Cre、R26Tom、Nf1<sup>flox/+</sup>)和Nf1<sup>-/-</sup>(Prss56Cre、R26Tom、Nf1<sup>flox/flox</sup>)神经胶质细胞的浮球培养物。然后对它们独立地进行平板接种和处理以及分析。为此,Nf1<sup>+/-</sup>和Nf1<sup>-/-</sup>球体被扩增直至第3传代(第1传代对应于培养的7天)。在P0结束时(10天),细胞被分成4个相同的批次(克隆1至4)并且被扩增至P3(图1)。

[0067] 在P3结束时,分离来自每个克隆的球体并且将细胞转移到两个12孔板中。添加6种不同浓度(100 $\mu$ m、33 $\mu$ m、10 $\mu$ m、3 $\mu$ m、1 $\mu$ m和0 $\mu$ m)的药品,并且将细胞孵育达72h。将带有DMSO(用于药品重悬的媒介物)的含有细胞的附加的12孔板用作针对结果的归一化的参考。在72h之后,对非固定细胞执行分析:增殖和细胞死亡测定。

[0068] 结果

[0069] 增殖活性

[0070] 为了分析增殖活性,使用了细胞示踪剂亲脂性染料(CellTrace Proliferation Kit,赛默飞世尔公司(Thermo Fishers))。将细胞示踪剂与药品同时添加。将细胞孵育达72h,并且使用LSR Fortessa X20(BD Biosciences)通过细胞计量术分析来测量增殖活性。该方法测量针对每种条件的平均荧光强度(MIF)。将带有DMSO的条件用作参考。

[0071] 比率:MIF(DMSO)/MIF(处理) =

[0072] 如果比率<1:与DMSO相比增殖减少

[0073] 如果比率>1:与DMSO相比增殖增加

[0074] 测定中所测试的硝羟喹啉的最高浓度100 $\mu$ M促进NF1<sup>+/-</sup>和Nf1<sup>-/-</sup>细胞的大量非特异性死亡,并且因此被排除在分析之外。浓度范围为从33 $\mu$ M到1 $\mu$ M的硝羟喹啉降低NF1<sup>-/-</sup>细

胞(克隆3除外)的增殖活性,而NF1<sup>+/</sup>-细胞的增殖不受影响(图3)。

[0075] 在较高浓度下,33 $\mu$ M:MIF比率平均值=0,39 $\pm$ 0,11以及10 $\mu$ M:MIF比率平均值=0,5 $\pm$ 0,18,与较低浓度3 $\mu$ M:MIF比率平均值=0,60 $\pm$ 0,22以及1 $\mu$ M:MIF比率平均值=0,7 $\pm$ 0,26相比,NF1<sup>-/-</sup>细胞的增殖受到更大影响,表明NF1<sup>-/-</sup>细胞的增殖速率是药品剂量依赖性的,并且该测定中的33 $\mu$ M和10 $\mu$ M浓度呈现出最佳功效/毒性比率。

[0076] 细胞死亡

[0077] 在培养72h时,使用DAPI(4',6-二脒基-2-苯基吲哚)标记细胞以对细胞死亡进行定量。利用LSR Fortessa X20(BD Biosciences)通过细胞计量术对经标记的细胞进行分析。

[0078] 比率:死亡细胞%(处理)/死亡细胞%(DMSO) =

[0079] 如果比率>1:与DMSO相比死亡细胞更多

[0080] 如果比率<1:与DMSO相比死亡细胞更少

[0081] 100 $\mu$ M的硝羟喹啉促进NF1<sup>-/-</sup>和NF1<sup>+/</sup>-细胞的大量细胞死亡,可能是由于其毒性作用,并且因此被排除在分析之外。有趣的是,33 $\mu$ M的硝羟喹啉促进NF1<sup>-/-</sup>的细胞死亡(死亡细胞比率平均值=8,86 $\pm$ 0,66),而不影响NF1<sup>+/</sup>-细胞。较低浓度的硝羟喹啉略微促进突变细胞的死亡,而不影响对照条件(10 $\mu$ M:死亡细胞比率平均值=2,04 $\pm$ 0,63)。

[0082] 实施例2—Nf1-KO小鼠中的体内药品测试

[0083] 动物

[0084] 该研究使用与用于体外测试相同的小鼠模型Prss56Cre<sup>+/</sup>、R26tdTom<sup>+/</sup>、NF1f1/f1小鼠(Radomska等人,2019)。该研究是本领域中的标准实验设计,其中终点是终端,并且在整个研究过程中不是纵向的。

[0085] 在本文中被称为Nf1-KO小鼠的Prss56Cre<sup>+/</sup>、R26tdTom<sup>+/</sup>、NF1f1/f1在一岁之后发展出cNF。然而,cNF发展发生在由小鼠打斗(这是正常的小鼠行为)引起的皮肤损伤之后的较早年龄。在该实验中,至少五只六周龄Nf1-KO雄性小鼠被一起放在笼子里,一旦小鼠因打斗而受到一定程度的皮肤损伤,它们就会被从笼子移走并进行监视。在约三月龄时,受到打斗损伤的小鼠发展出若干cNF。当已缺失Nf1的细胞中荧光报告基因被开启时,可使用落射荧光显微镜(Leica MZ75)经由对皮肤的荧光成像来监视cNF发展。在1个月至2个月之后,已建立成熟cNF的小鼠然后被纳入药品治疗研究。小鼠或者经由口服灌胃用媒介物(80%玉米油中20% DMSO)进行治疗,要么经由口服灌胃用120mg/kg硝羟喹啉进行治疗,每天一次(5天用药,2天停药),持续一个月。

[0086] 离体分析

[0087] 在治疗一个月之后处死小鼠。落射荧光成像用于指导对存在cNF的皮肤区域的解剖。cNF通过穿刺活检进行解剖(5mm),并且在4% PFA中固定过夜,然后在30%蔗糖中冷冻保护。最后,将样品包埋在明胶/蔗糖(15%/7.5%)中。对cNF进行冷冻切片(14 $\mu$ m),并且使用荧光显微镜(Leica M165FC)对荧光Tom<sup>+</sup>细胞进行成像。

[0088] 结果

[0089] 体内功效

[0090] Nf1缺失的Schwann细胞也表达荧光报告基因tomato(Tom<sup>+</sup>)。cNF源自Nf1缺失的SC(其为Tom<sup>+</sup>),因此荧光可用于识别肿瘤。使用低倍(5x)放大率,发明人能够使小鼠皮肤中的

荧光cNF肿瘤细胞可视化(图4)。在这些图像中可以看到,在治疗一个月之后,经硝羟喹啉治疗的小鼠中的肿瘤(E至H)比经媒介物治疗的小鼠(A至D)中的肿瘤小。因此,这些图像表明,每日一次120mg/kg硝羟喹啉治疗减少皮肤中cNF肿瘤细胞的总体丰度。

[0091] 结论

[0092] 硝羟喹啉(10 $\mu$ M至33 $\mu$ M)在从源自NF1<sup>-/-</sup>小鼠模型的皮肤神经纤维瘤分离出的肿瘤细胞中抑制增殖并且诱导细胞死亡。在来自NF1<sup>+/-</sup>小鼠的细胞中未观察到该效应,这表明硝羟喹啉效应依赖于神经纤维瘤蛋白的完全缺失。除体外发现之外,发明人也表明硝羟喹啉能够(体内)减少小鼠中发展出的cNF中的肿瘤细胞的数量。因此,预计硝羟喹啉将减少、治疗和预防皮肤神经纤维瘤。

[0093] 参考文献

[0094] 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年1月;9(1):130-147。

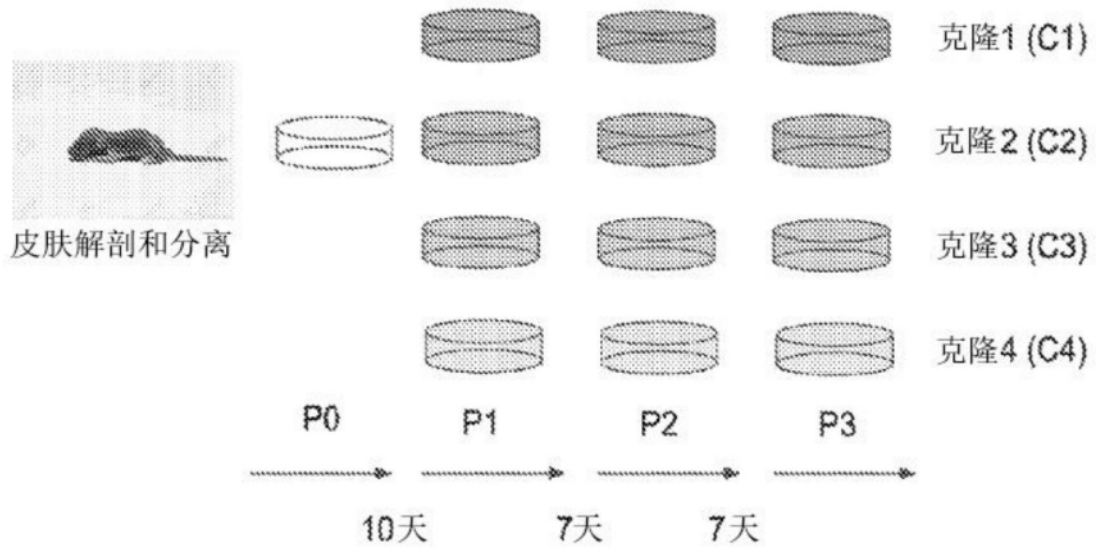


图1

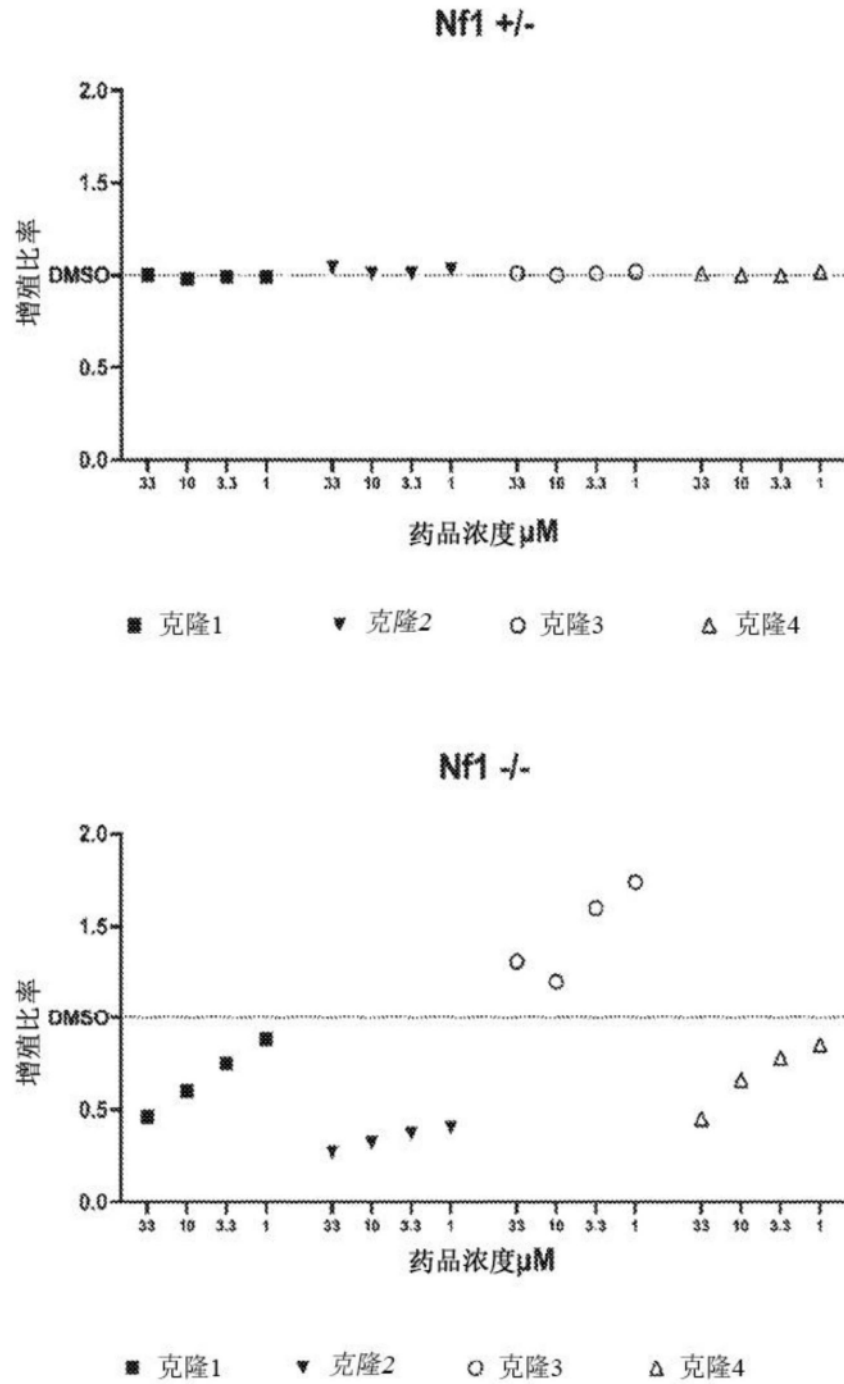


图2

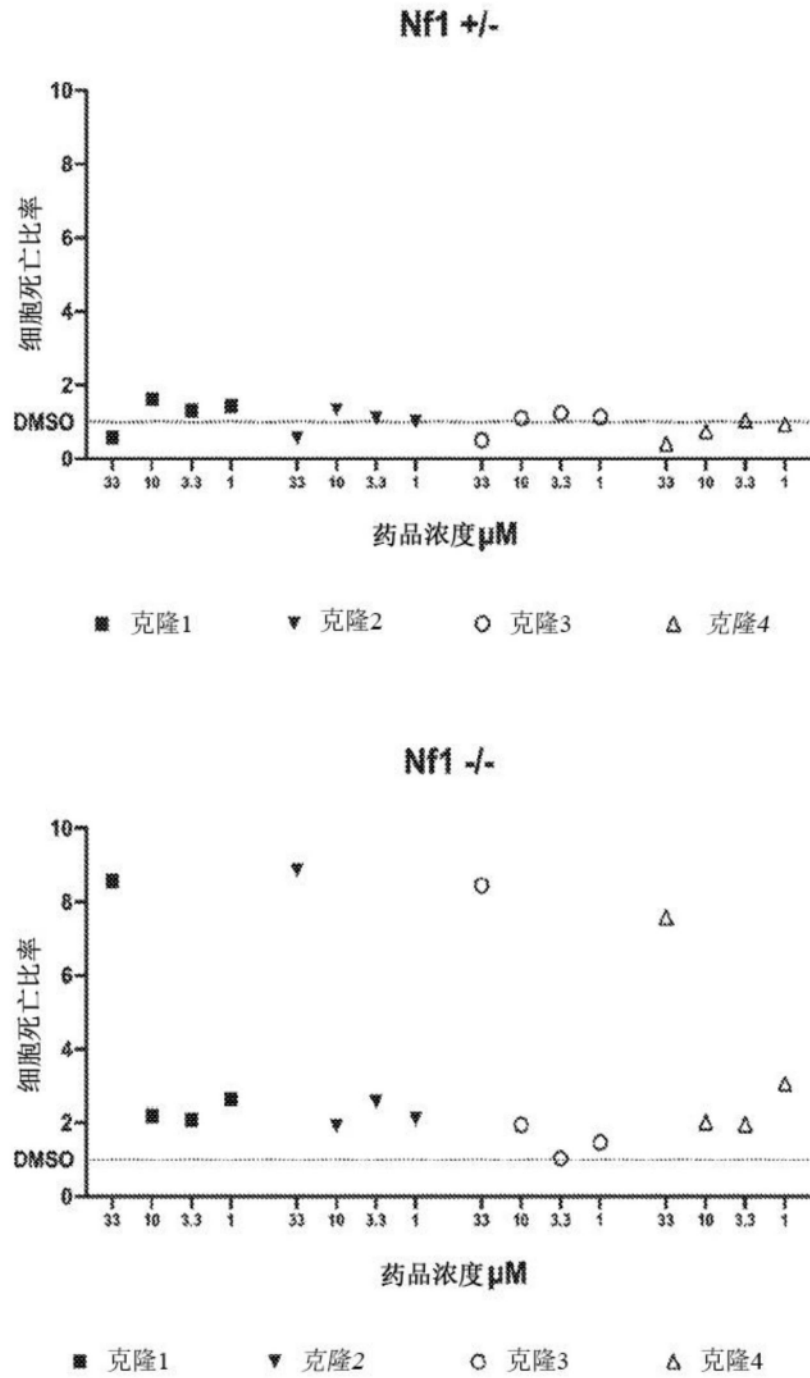


图3

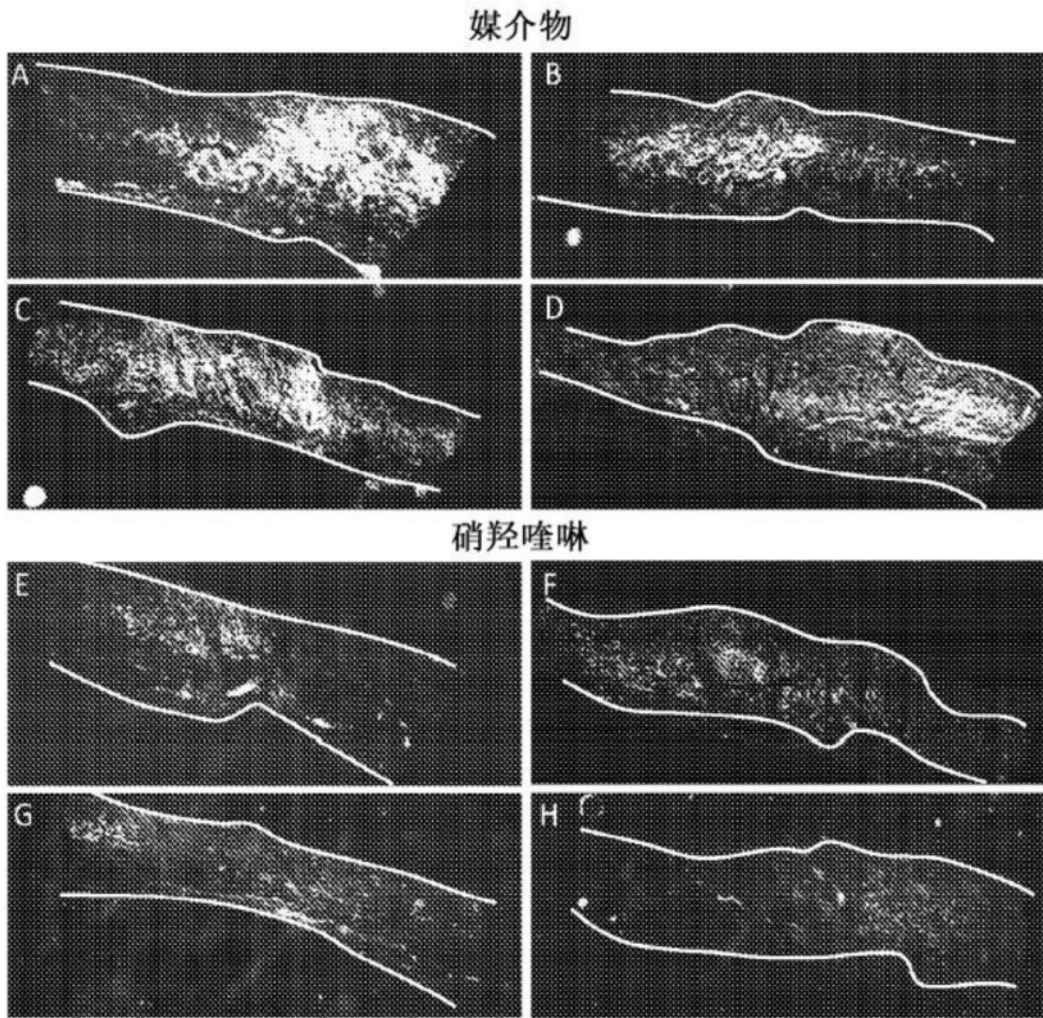


图4