



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0081501
(43) 공개일자 2018년07월16일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/395 (2006.01) A61K 31/436 (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01) C07K 16/28 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 39/395 (2013.01)
A61K 31/436 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2018-7011292
- (22) 출원일자(국제) 2016년09월19일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2017년04월20일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2016/052442
- (87) 국제공개번호 WO 2017/053222
국제공개일자 2017년03월30일
- (30) 우선권주장
62/232,228 2015년09월24일 미국(US)

- (71) 출원인
드렉셀유니버시티
미국 펜실베이니아주 19104 필라델피아 체스트넛 스트리트 3141
- (72) 발명자
셸 크리스티안
미국, 펜실베이니아 19428, 콘쇼호켄, 42 코르슨 로드
- 나카렐리 티모시
미국, 펜실베이니아 19403, 노리스타운, 2995 그린릿지 드라이브
- 아자르 애슬리
미국, 펜실베이니아 19454, 노스 웨일즈, 117 투도르 드라이브
- (74) 대리인
손민

전체 청구항 수 : 총 20 항

(54) 발명의 명칭 **진피 장애를 치료하거나 예방하는 신규한 조성물 및 방법**

(57) 요약

본 발명은 진피 위축, 가성반흔, 광선 각화증, 지루 또는 광선 각화증, 흑자, 진피 비후의 병소 영역, 및 거친 주름을 포함하는 특정 진피 장애를 치료하거나 예방하는 조성물 및 방법을 포함한다. 특정 양태에서, 본 발명에서 유용한 조성물은 치료적 유효량의 mTORC1 억제제 및 피부학적으로 허용 가능한 담체를 포함한다.

대표도 - 도20



(52) CPC특허분류

A61P 17/00 (2018.01)

C07K 16/28 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

치료 또는 예방을 필요로 하는 포유동물 대상체에서 연령-관련된 진피 장애를 치료하거나 예방하기 위한 방법으로서, 치료적 유효량의 mTORC1 억제제, 또는 이의 염, 용매화물, 거울상 이성질체 또는 부분 입체 이성질체를 포함하는 조성물을 상기 대상체에게 국소적으로 투여하는 단계를 포함하고, 여기서 상기 연령-관련된 진피 장애는 진피 위축(dermal atrophy), 지루(seborrheic) 또는 광선 각화증(actinic keratosis), 가성반흔(pseudoscars), 흑자(lentigines), 진피 비후의 병소 영역(focal areas of dermal thickening), 및 거친 주름(coarse wrinkles)으로 구성된 군에서 선택된 적어도 하나인 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 mTORC1 억제제는 BEZ235, 라파마이신(rapamycin), 에베롤리무스(everolimus), AZD8055, 템시롤리무스(Temsirolimus), KU-0063794, PI-103, 토르키넵(Torkinib), 타크롤리무스(Tacrolimus), 리다포롤리무스(Ridaforolimus), INK-128, 복스탈리십(Voxtalisisb), 토린-1(Torin-1), 오미팔리십(Ompalisib), OSI-027, PF-04691502, 아피톨리십(Apitolisib), GSK1059615, WYE-354, 제다톨리십(Gedatolisib), AZD-2014, 토린-2(Torin-2), WYE-125132, BGT226, 팔로미드-529(Palomid-529), PP121, WYE-687, CH5132799, Way-600, ETP-46464, GDC-0349, XL388, 및 조타롤리무스(Zotarolimus)로 구성된 군에서 선택된 적어도 하나, 또는 이의 염, 용매화물, 거울상 이성질체 또는 부분 입체 이성질체인 방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 mTORC1 억제제는 라파마이신, 리다포롤리무스, 및 에베롤리무스로 구성된 군에서 선택된 적어도 하나, 또는 이의 염, 용매화물, 거울상 이성질체 또는 부분 입체 이성질체인 방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 mTORC1 억제제는 라파마이신, 또는 이의 염, 용매화물, 거울상 이성질체 또는 부분 입체 이성질체인 방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 대상체는 인간인 방법.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 조성물은 약 0.001 내지 1 중량%의 mTORC1 억제제, 또는 이의 염, 용매화물, 거울상 이성질체 또는 부분 입체 이성질체를 포함하는 방법.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 mTORC1 억제제는 라파마이신, 또는 이의 염, 용매화물, 거울상 이성질체 또는 부분입체 이성질체인 방법.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 조성물은 피부학적으로 허용 가능한 담체를 추가로 포함하는 방법.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 피부학적으로 허용 가능한 담체는 용매, 윤활제, 완화제(emollient), 유화제, 보습제, 증점 왁스, 연화제(softener), 향료, 방부제, 및 인공 색소로 구성된 군에서 선택된 적어도 하나인 방법.

청구항 10

제8항에 있어서,

상기 피부학적으로 허용 가능한 담체는 페트롤라툼(petrolatum)을 포함하는 방법.

청구항 11

포유동물 섬유아세포의 수명을 연장시키는 방법으로서, 유효량의 mTORC1 억제제 또는 이의 염, 용매화물, 거울상 이성질체 또는 부분 입체 이성질체를 포함하는 조성물과 섬유아세포를 접촉시키는 단계를 포함하는 방법.

청구항 12

포유동물 섬유아세포의 세포 질서(cell organization)를 보존하는 방법으로서, 유효량의 mTORC 억제제 또는 이의 염, 용매화물, 거울상 이성질체 또는 부분 입체 이성질체를 포함하는 조성물과 상기 섬유아세포를 접촉시키는 단계를 포함하는 방법.

청구항 13

포유동물 섬유아세포의 노화를 방지하거나 최소화하는 방법으로서, 유효량의 mTORC1 억제제, 또는 이의 염, 용매화물, 거울상 이성질체 또는 부분 입체 이성질체를 포함하는 조성물과 상기 섬유아세포를 접촉시키는 단계를 포함하는 방법.

청구항 14

제11항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 mTORC1 억제제는 BEZ235, 라파마이신, 에베롤리무스, AZD8055, 템시롤리무스, KU-0063794, PI-103, 토르키닙, 타크롤리무스, 리다포롤리무스, INK-128, 복스탈리십, 토린-1, 오미팔리십, OSI-027, PF-04691502, 아피톨리십, GSK1059615, WYE-354, 제다톨리십, AZD-2014, 토린-2, WYE-125132, BGT226, 팔로미드, PP121, WYE-687, CH5132799, Way-600, ETP-46464, GDC-0349, XL388, 및 조타롤리무스로 구성된 군에서 선택된 적어도 하나, 또는 이의 염, 용매화물, 거울상 이성질체 또는 부분 입체 이성질체인 방법.

청구항 15

제11항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 mTORC1 억제제는 라파마이신, 또는 이의 염, 거울상 이성질체 또는 부분 입체 이성질체인 방법.

청구항 16

제11항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 섬유아세포는 진피 섬유아세포인 방법.

청구항 17

제16항에 있어서,

상기 진피 섬유아세포는 생체내에 존재하고 포유동물 대상체의 피부의 일부인 방법.

청구항 18

제11항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 조성물은 상기 대상체의 피부에 국소적으로 적용되는 것인 방법.

청구항 19

치료 또는 예방을 필요로 하는 포유동물 대상체에서 연령-관련된 진피 장애를 치료하거나 예방하기 위한 키트로서, 치료적 유효량의 mTORC 억제제 또는 이의 염, 용매화물, 거울상 이성질체 또는 부분 입체 이성질체를 포함하는 조성물, 어플리케이터, 및 상기 조성물을 상기 대상체에 국소적으로 투여하는 것을 위한 지침을 포함하고, 여기서 상기 진피 장애는 진피 위축, 가성반흔, 지루 또는 광선 각화증, 흑자, 진피 비후의 병소 영역, 및 거친 주름으로 구성된 군에서 선택된 적어도 하나인 키트.

청구항 20

제19항에 있어서,

상기 mTORC 억제제는 라파마이신, 또는 이의 염, 용매화물, 거울상 이성질체 또는 부분 입체 이성질체인 키트.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 출원은 2015년 9월 24일에 출원되었고 본원에 전체로 참고 문헌으로 인용된 미국 가 특허출원 제 62/232,228 호에 대한 우선권을 35 U.S.C. § 119(e) 하에 주장한다.

[0002] 본 발명은 국립 노화 기관/국립 보건원에 의해 수여된 AG039799 부여 번호로 정부의 지원을 받아 이루어졌다. 정부는 발명에 대해 특정 권리를 갖는다.

배경 기술

[0003] 피부의 노화는 노화 과정의 가장 두드러지는 특징이며, 내인성 노화 과정 및 UV광 노출과 같은 다수의 요소들에 의해 유발된다. 연령-관련된 진피 장애는 예를 들어 진피 위축(dermal atrophy), 광선 각화증(actinic keratosis), 가성반흔(pseudoscars), 흑자(lentigines), 진피 비후의 병소 영역(focal areas of dermal thickening), 및 거친 주름(coarse wrinkles)을 포함한다.

[0004] 진피 위축은 피부 위축 또는 위축으로도 불리며, 기저 조직(underlying tissue)의 감소로 인한 피부의 얇아짐 또는 오목해짐(depression)을 나타내는 장애이다. 진피 위축은 노인 인구의 주요 임상 문제다. 진피 완전성의 손실은 피부의 증가된 취약성을 야기하고, 많은 경우에 정맥 주사 라인의 사용을 배제한다. 상처 치유 손상(impairment)은 부상 후의 감염 및 합병증의 수의 증가를 야기하는 감소된 진피 완전성의 중요한 임상적 후유증이다. 가성반흔은 노인에서 자발적으로 발생하는 성상(stellate) 병변이며, 노인성(senile) 및 초로성(presenile) 형태로 발생할 수 있다. 이러한 병변은 70세 이상인 환자의 20%에서 발견될 수 있다. 흑자(또는 간 반점)은 연령에 따라 발생하는 과색소 침착(hyperpigmentation)의 영역이며, 악성 흑색점(lentigo maligna) 및 흑색종(melanoma)의 전구체 병변을 나타낼 수 있다. 그들은 연령에 따라 증가할 수 있고, 중년 및 노인에게 흔해진다. 지루(seborrheic) 또는 광선 각화증은 상피 비후의 병소 영역을 포함하고, 손상에 대한 반응을 나타내며 발생할 수 있다. 유사하게, 거친 주름은 손상 반응에 의해 발생하는 것으로 고려된다. 현재, 연령-관련된 진피 위축 및 관련된 장애의 치료는 피하 히알루론산 주사, 보툴리눔 독소 주사, 또는 비타민 C, 녹차 추출물, 및 코엔자임 Q와 같은 항산화제의 국소적 적용을 포함하지만, 이러한 제제들은 이러한 상태를 완전히 치료할 수 없다.

[0005] 세포 노화는 산화 스트레스, 유전 독성 스트레스, 텔로미어 소모, 또는 불규칙 분열촉진 신호 전달과 같은 여러 공격에 노출되는 포유동물 세포에 의해 활성화되는 스트레스 반응이다. 이러한 스트레스들은 2개의 경로를 촉발시켜 노화 반응을 활성화한다: 노화 반응을 수립하고 유지하기 위해 요구되는 p53/p21^{CIP1}/WAF1 및 p16^{INK4A}/Rb 경로. 노화-유발 자극은 DNA 손상을 야기하고 지속적인 DNA 손상 반응(DNA damage response, DDR)을 촉발한다: 지속적인 미해결의 DNA 손상에 반응하여, Ataxia Telangiectasia Mutant(ATM) 인산화효소는 p53 및 세포 주기 의존 인산화효소를 억제함으로써 세포 증식을 저지하는 이의 전사 표적 p21^{CIP1}/WAF1을 활성화시킨다. 또한, 동일한 노화-유발 자극은 DNA 손상과 독립적으로 스트레스-활성화된 단백질 인산화효소 p38 MAPK의 활성화를 촉발할

수 있다. 그 다음, p38 MAPK는 세포 주기의 저지를 촉진할 수 있고, p16^{INK4A}의 발현을 증가시키는 전사 인자 HBP1을 활성화시켜 노화를 수립할 수 있다. 이러한 2개의 경로는 상이한 동역학으로 노화를 수립하는 것으로 보인다: DDR 경로는 주로 p21^{CIP1/WAF1}의 수준을 증가시켜 초기 저지를 매개하고, 후기에만 p16^{INK4A}의 발현에 의해 노화가 강화된다. 더욱이, p53 및 p38 MAPK 경로는 그들 사이에 크로스토크(cross-talk)가 존재할 수 있지만, 주로 서로 독립적인 것으로 나타나므로 중복된다.

[0006] 라파마이신의 포유동물의/기계론적 표적(mTOR)은 성장 인자 및 영양소 이용 가능성 둘 다에 반응하며 미토콘드리아 기능에 영향을 미치기도 하는 세포 내 단백질 복합체이다. 이는 TOR 인산화효소(원래 효모에서 발견되었고, 포유동물에서는 mTOR로 알려짐), 부속 단백질, 및 TOR의 핵심 하류 표적인 리보솜 S6 인산화효소(p70S6K)를 포함하는 하류 매개체로 구성된다. TOR 신호 전달 경로는 진핵 세포에서 고도로 보존되고, 고도로 특이적인 항진균제인 라파마이신의 표적으로서 기능적으로 정의된다.

[0007] 코어 mTOR 복합체를 포함하는 단백질은 FKBP-12-라파마이신 연관된 단백질(FRAP1)으로도 알려진 ser-thr 인산화효소 mTOR 및 포유동물 치사 SEC13 단백질 8(mammalian lethal with SEC13 protein 8: mLST8)이다. 이러한 코어 성분들은 라파마이신에 대한 감도에 의해 구별 가능한 2개의 복합체 중 하나인, mTORC1 또는 mTORC2를 형성하는 능력을 가진다. 라파마이신에 민감한 mTORC1는 mTOR의 조절-연관된 단백질(regulatory-associated protein of mTOR: Raptor)인 스캐폴딩 단백질(scaffolding protein)을 함유하는 반면, 라파마이신에 둔감한 복합체 mTORC2는 mTOR의 라파마이신-둔감한 동반자(rapamycin-insensitive companion of mTOR: Rictor)인 스캐폴딩 단백질을 함유한다. 이 스캐폴딩 단백질들은 mTORC1 및 mTORC2를 각각의 표적으로 유도하는 기능을 한다. 부가적인 성분은 각 복합체에 고유하다. 예를 들어, 프롤린-풍부 Akt/PKB 기질 40 KDa(PRAS40)은 mTORC1과 연관된 억제 단백질인 반면, 스트레스-활성화된 MAP 인산화효소-상호작용 단백질 1(stress-activated MAP kinase-interacting protein 1: Sin1) 및 Rictor-1에서 관찰된 단백질(protein observed with Rictor-1: proctor)은 mTORC2와 연관된다. mTOR 복합체에 기여하는 제1 기능은 세포 증식 및 세포 성장의 촉진이다.

[0008] 따라서, 인간과 같은, 치료 또는 예방을 필요로 하는 포유동물 대상체에서 특정 연령-연관된 진피 상태를 치료하거나 예방하는 데 사용될 수 있는 신규한 조성물 및 방법에 대한 당해 기술의 수요가 존재한다. 본 발명은 이러한 수요를 충족시킨다.

발명의 내용

[0009] 본 발명은 치료 또는 예방을 필요로 하는 포유동물 대상체에서 연령-관련된 진피 장애를 치료하거나 예방하는 방법을 제공한다. 본 발명은 포유동물 섬유아세포(fibroblast)의 수명을 증가시키는 방법을 추가로 제공한다. 본 발명은 포유동물 섬유아세포의 세포 질서(cell organization)를 보존하는 방법을 추가로 제공한다. 본 발명은 포유동물 섬유아세포의 노화를 방지하거나 최소화하는 방법을 추가로 제공한다. 본 발명은 치료 또는 예방을 필요로 하는 포유동물 대상체에서 연령-관련된 진피 장애를 치료하거나 예방하기 위한 키트(kit)를 추가로 제공한다.

[0010] 특정 양태에서, 방법은 치료적 유효량의 mTORC1 억제제, 또는 이의 염, 용매화물, 거울상 이성질체 또는 부분 입체 이성질체를 포함하는 조성물을 대상체에게 국소적으로 투여하는 단계를 포함한다.

[0011] 특정 양태에서, 방법은 치료적 유효량의 mTORC1 억제제, 또는 이의 염, 용매화물, 거울상 이성질체 또는 부분 입체 이성질체를 포함하는 조성물을 섬유아세포와 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0012] 특정 양태에서, 연령-관련된 진피 장애는 진피 위축, 지루 또는 광선 각화증, 가성반흔, 흑자, 진피 비후의 병소 영역, 및 거친 주름으로 구성된 군에서 선택된 적어도 하나이다.

[0013] 특정 양태에서, mTORC1 억제제는 BEZ235, 라파마이신, 에베롤리무스(everolimus), AZD8055, 템시롤리무스(Temsirolimus), KU-0063794, PI-103, 토르키닙(Torikinib), 타크롤리무스(Tacrolimus), 리다포롤리무스(Ridaforolimus), INK-128, 복스탈리십(Voxtalisis), 토린-1(Torin-1), 오미팔리십(Ompalisib), OSI-027, PF-04691502, 아피톨리십(Apitolisib), GSK1059615, WYE-354, 제다톨리십(Gedatolisib), AZD-2014, 토린-2(Torin-2), WYE-125132, BGT226, 팔로미드-529(Palomid-529), PP121, WYE-687, CH5132799, Way-600, ETP-46464, GDC-0349, XL388, 및 조타롤리무스(Zotarolimus)로 구성된 군에서 선택된 적어도 하나, 또는 이의 염, 용매화물, 거울상 이성질체 또는 부분 입체 이성질체이다. 다른 양태에서, mTORC1 억제제는 라파마이신, 리다포롤리무스 및 에베롤리무스로 구성된 군에서 선택된 적어도 하나, 또는 이의 염, 용매화물, 거울상 이성질체 또는 부분 입체 이성질체이다. 또 다른 양태에서, mTORC1 억제제는 라파마이신, 또는 이의 염, 용매화물, 거울상 이성질체 또는

부분 입체 이성질체이다.

- [0014] 특정 양태에서, 대상체는 인간이다. 다른 양태에서, 조성물은 대상체의 피부에 국소적으로 적용된다.
- [0015] 특정 양태에서, 조성물은 약 0.001 내지 1 중량%의 mTORC1 억제제, 또는 이의 염, 용매화물, 거울상 이성질체, 부분 입체 이성질체를 포함한다. 다른 양태에서, 상기 mTORC1 억제제는 라파마이신, 또는 이의 염, 용매화물, 거울상 이성질체, 부분 입체 이성질체이다. 또 다른 양태에서, 조성물은 피부학적으로 허용 가능한 담체를 추가로 포함한다. 또 다른 양태에서, 피부학적으로 허용 가능한 담체는 용매, 윤활제, 연화제(emollient), 유화제, 보습제, 증점 왁스, 연화제(softner), 향료, 방부제, 및 인공 색소로 구성된 군에서 선택된 적어도 하나이다. 또 다른 양태에서, 피부학적으로 허용 가능한 담체는 페트롤라툼(petrolatum)을 포함한다.
- [0016] 특정 양태에서, 섬유아세포는 진피 섬유아세포이다. 다른 양태에서, 진피 섬유아세포는 생체내에 존재하고, 포유동물 대상체의 피부의 일부이다.
- [0017] 특정 양태에서, 키트는 치료적 유효량의 mTORC1 억제제, 또는 이의 염, 용매화물, 거울상 이성질체 또는 부분 입체 이성질체를 포함하는 조성물을 포함한다. 다른 양태에서, 키트는 어플리케이터(applicator)를 추가로 포함한다. 또 다른 양태에서, 키트는 조성물을 대상체에 국소적으로 투여하는 것을 위한 지침을 추가로 포함한다.

도면의 간단한 설명

- [0018] 본 발명을 설명하기 위한 목적으로, 본 발명의 특정 양태가 도면에 도시되어 있다. 그러나, 본 발명은 도면에 도시된 양태의 정확한 배열 및 수단에 한정되지 않는다.

도 1A 내지 1I는 NRTI 및 라파마이신에 반응하는 미토콘드리아 매개변수의 변화를 나타내는 그래프의 집합이다. 인간 심장 섬유아세포는 라파마이신(1 nM) 존재 또는 부재 하에 유지되었다. NRTI에 대한 노출 7일 후, 미토콘드리아 상태 및 기능의 매개변수가 조사되었다. 회색 막대는 표준 배양 조건 하에서 유지되는 세포를 나타내고, 검정색 막대는 라파마이신의 존재 하에 유지되는 세포를 나타낸다. 도 1A는 테트라메틸로다민 에틸 에스테르, 과염소산(TMRE) 염색에 의해 평가된 미토콘드리아 막 전위를 나타내는 막대 그래프이다. 도 1B는 미토콘드리아 ROS 수준을 나타내는 막대 그래프이다. 도 1C는 미토콘드리아 양을 나타내는 막대 그래프이다. 도 1D는 전체 세포 ROS를 나타내는 막대 그래프이다. 도 1E는 미토콘드리아 억제제인 올리고마이신, 카보닐 시아나이드 p-트리플루오로메톡시페닐하이드라존(FCCP), 또는 로테논 및 안티마이신 A의 조합의 첨가에 따른 시간의 함수로 세포 당 산소 소비를 나타내는 그래프이다. 도 1F는 계산된 기저 호흡률(rate of basal respiration)을 설명하는 막대 그래프이다. 도 1G는 계산된 최대 호흡률(rate of maximal respiration)을 나타내는 막대 그래프이다. 도 1H는 계산된 ATP-연결된 호흡률(rate of ATP-linked respiration)을 나타내는 그래프이다. 도 1I는 계산된 양성자 누출률(rate of proton leak)을 나타내는 그래프이다. 각 측정은 최소 3중의 배양을 나타내며, 모든 측정은 유사한 결과를 가지며 최소 2회 반복되었다. 별표로 표시된 막대는 P<0.05에서 상대적인 대조군 값과 유의적으로 상이한 값을 나타내고, #으로 표시된 막대는 동일한 처리군(대조군 또는 NRTI에 노출된 군) 내에서 라파마이신-처리된 세포와 처리되지 않은 세포 사이에서 유의적으로 상이한 값을 나타낸다.

도 2A 내지 2H는 전자 전달 사슬 서브유닛 및 미토콘드리아 단백질의 정상 상태 수준을 나타낸다. 도 2A는 NRTI에 노출된 심장 섬유아세포의 면역 블롯에 의해 평가된 미토콘드리아 외막 단백질 전압-의존성 음이온 채널(Voltage-dependent anion channel: VDAC)과 함께 지지된 전자 전달 사슬(Electron transport chain: ETC) 단백질의 정상 상태 수준을 도시한다. 도 2B는 Pink1, Pink1 절단 생성물, 및 Parkin의 정상 상태 수준을 도시한다. 도 2C는 p62 및 액틴의 정상 상태 수준을 도시한다. 도 2D는 NADH 탈수소효소(유비퀴논) 1 베타 하위 복합체 8(NDUFB8)(복합체 1)에 포함된 ETC 서브유닛에 대한 mRNA 수준의 나노스트링(nanostring) 분석의 결과를 도시한다. 도 2E는 유비퀴놀-시토크롬 c 환원효소 코어 단백질 II(UQCRC2)(복합체 3)에 포함된 ETC 서브유닛에 대한 mRNA 수준의 나노스트링 분석의 결과를 도시한다. 도 2F는 숙시네이트 탈수소효소(유비퀴논) 황화철(iron-sulfur) 서브유닛(SDHB)(복합체 2)에 포함된 ETC 서브유닛에 대한 mRNA 수준의 나노스트링 분석의 결과를 도시한다. 도 2G는 시토크롬 c 산화효소 서브유닛 I(mt-Co1)(복합체 4)에 포함된 ETC 서브유닛에 대한 mRNA 수준의 나노스트링 분석의 결과를 도시한다. 도 2H는 ATP5A1(복합체 5)에 포함된 ETC 서브유닛에 대한 mRNA 수준의 나노스트링 분석의 결과를 도시한다. 각 면역블롯은 유사한 결과를 갖는 최소 2회의 독립적인 실험을 도시한다. 회색 막대는 대조군 배양으로부터의 데이터를 나타내지만, 검정색 막대는 라파마이신-처리된 배양으로부터의 데이터를 도시한다. 별표로 표시된 막대는 P<0.05에서 상대적인 대조군 값과 유의적으로 상이한 값을 나타내고, #으로 표시된 막대는 동일한 처리군(대조군 또는 NRTI에 노출된 군) 내에서 라파마이신-처리된 세포와 처리되지 않은 세포 사이에서 유의적으로 상이한 값을 나타낸다. 나노스트링 결과는 2회의 독립적 실험의 대표이다.

도 3A 내지 3F는 NRTI에 대한 노출은 라파마이신에 의해 방지되는 노화 반응을 유도한다는 발견을 나타낸다. 인간 심장 섬유아세포는 7일 동안의 NRTI에 대한 노출 후 라파마이신(1 nM)의 존재 또는 부재 하에 유지되었다. 노화의 마커(marker)가 조사되었다. 도 3A는 노화 반응 동안 변경되는 것으로 알려진 p16, p21, p53, 라민 B1, 및 IL-6의 정상 상태 수준을 나타내는 인간 심장 섬유아세포로부터의 데이터를 나타낸다. 액틴 수준은 로딩 대조군(loading control)으로서 제시된다. 도 3B는 SA-β-갈락토스분해효소 활성에 대해 양성인 세포 염색의 백분율을 나타내는 막대 그래프이다. 도 3C는 NRTI에 노출된 세포의 나노스트링 분석에 의해 결정된 p21에 대한 정상 상태 mRNA 수준을 나타내는 막대 그래프이다. 도 3D는 NRTI에 노출된 세포의 나노스트링 분석에 의해 결정된 라민 B1에 대한 정상 상태 mRNA 수준을 나타내는 막대 그래프이다. 도 3E는 p21의 비교 분석을 나타내는 막대 그래프이며, 초기 계대 세포(early passage cell)를 복제성 노화를 겪는 세포뿐만 아니라 수명 연장을 허용하는 라파마이신 함유 배지(media)에서 유지된 세포와 비교한다. 도 3F는 라민 B1의 비교 분석을 나타내는 막대 그래프이며, 초기 계대 세포를 복제성 노화를 겪은 세포뿐만 아니라 수명 연장을 허용하는 라파마이신 함유 배지에서 유지된 세포와 비교한다. 회색 막대는 표준 배양 조건 하에서 유지되는 세포를 나타내고, 검정색 막대는 라파마이신의 존재 하에 유지된 세포를 나타낸다. 별표로 표시된 막대는 P<0.05에서 상대적인 대조군 값과 유의적으로 상이한 값을 나타내고, #으로 표시된 막대는 동일한 처리군(예를 들어, 대조군 또는 NRTI에 노출된 군) 내에서 라파마이신-처리된 세포와 처리되지 않은 세포 사이에서 유의적으로 상이한 값을 나타낸다.

도 4A 내지 4E는 ROS 스캐빈저(scavenger)가 NRTI에 대해 노출된 세포의 노화 마커의 발현을 방지한다는 발견을 나타낸다. 인간 심장 섬유아세포는 NRTI에 대한 노출 동안 미토콘드리아 ROS 스캐빈저인 mito-Q로 처리되었다. 도 4A는 노화 반응 동안 변경되는 것으로 알려진 p16, p21, p53, 및 라민 B1의 정상 상태 수준을 도시한다. 도 4B는 리소좀 SA-β 갈락토스분해효소 활성에 대해 양성인 세포 염색의 백분율을 나타내는 막대 그래프이다. 도 4C는 인간 심장 섬유아세포가 NRTI에 대한 노출 동안 mt-과산화수소분해효소 단백질을 발현하는 아데노바이러스 벡터 또는 빈 벡터에 감염된 후 노화 반응 동안 변경되는 것으로 알려진 p16, p21, p53, 액틴, 및 과산화수소분해효소의 정상 상태 수준을 나타내는 면역블롯 분석의 결과를 나타낸다. 면역블롯은 유사한 결과를 갖는 최소 2회의 독립적인 실험을 나타낸다. 도 4D는 인간 심장 섬유아세포가 NRTI에 대한 노출 동안 mt-과산화수소분해효소 단백질을 발현하는 아데노바이러스 벡터 또는 빈 벡터에 감염된 후에 리소좀 SA-β 갈락토스분해효소 활성에 대해 양성인 세포 염색의 백분율을 나타내는 막대 그래프이다. 도 4E는 노화와 연관된 p16, p21, 및 라민 B1의 정상 상태 수준을 도시한다. 회색 막대는 표준 배양 조건 하에서 유지된 세포를 나타내고, 검정색 막대는 라파마이신의 존재 하에 유지된 세포를 나타낸다. 별표로 표시된 막대는 P<0.05에서 상대적인 대조군 값과 유의적으로 상이한 값을 나타낸다. #으로 표시된 막대는 동일한 처리군(대조군 또는 NRTI에 노출된 군) 내에서 라파마이신-처리된 세포와 처리되지 않은 세포 사이에서 유의적으로 상이한 값을 나타낸다.

도 5A 내지 5D는 NRTI에 대한 노출에 반응하는 리보솜 S6 단백질 및 MDM2의 인산화를 나타낸다. 도 5A는 인간 심장 섬유아세포에서 면역블롯 분석에 의해 평가된 바와 같이 NRTI에 대한 노출에 반응하는 리보솜 S6 단백질 및 MDM2의 인산화 상태를 도시한다. 표준 배양 조건 하에서 유지된 배양으로부터의 추출물은 좌측 3개 레인(lane)에 나타나지만, 1 nM 라파마이신의 존재 하에 유지된 배양은 우측 2개 레인에 나타난다. 대조군 배양의 경우 배양은 7일 동안 10 또는 20 μM NRTI에 노출되었지만, 라파마이신 처리된 배양은 7일 동안 20 μM NRTI에 노출되었다. 도 5B는 최종 2시간 동안 p70 S6 인산화효소(PF-4708671) 또는 MEK1/2(U0126)을 표적하는 특정 인산화효소 억제제와의 배양 후 세포가 7일 동안 NRTI에 노출된 다음의 리보솜 S6 단백질 및 MDM2의 인산화 수준을 도시한다. 도 5C는 최종 2시간 동안 MEK1/2(U0126), Raf(GW5047), 또는 p90RSK(BI-D1870)를 표적하는 특정 인산화효소 억제제와의 배양 후 7일 동안 NRTI에 노출된 다음의 리보솜 S6 단백질 및 MDM2의 인산화 수준을 나타낸다. 배양의 부가적인 집합은 NRTI에 대한 노출 동안 자유 라디칼 스캐빈저인 트롤록스 및 N-아세틸시스테인의 조합으로 처리되었다. 도 5D는 세포가 NRTI에 대한 노출 동안 특정 p38 MAPK 억제제(SB203580)로 처리된 다음의 리보솜 S6 단백질 및 MDM2의 인산화 수준을 도시한다. 도 5D를 예외로 하고, 각 면역블롯은 유사한 결과를 갖는 최소 2회의 독립적인 실험을 나타낸다. 각 면역블롯은 로딩 대조군으로서 액틴과 함께 나타난다.

도 6A 내지 6G는 NRTI에 반응하는 Mito-Q 및 mt-과산화수소분해효소의 리보솜 S6 및 MDM2 인산화와 미토콘드리아 활성의 효과를 나타낸다. 도 6A는 NRTI에 대한 노출 기간 동안 mito-Q 또는 비활성 담체 티아민 피로포스페이트(TPP)의 존재 하에 배양된 심장 섬유아세포의 리보솜 S6 단백질 및 MDM2의 인산화 상태를 위한 면역블롯 분석을 도시한다. 도 6B는 NRTI에 대한 노출 전 mt-과산화수소분해효소를 발현하는 구조체 또는 빈 바이러스 벡터를 보유하는 아데노바이러스 입자에 감염된 심장 섬유아세포의 리보솜 S6 단백질 및 MDM2의 인산화에 대한 면역블롯 분석을 도시한다. 각각의 면역블롯은 유사한 결과를 갖는 최소 2회의 독립적인 실험을 나타내며, 로딩 대조군으로서 액틴과 함께 나타난다. 도 6C는 심장 섬유아세포가 NRTI에 대한 노출 동안 mito-Q 또는 TPP로 처

리된 후의 계산된 기저 호흡률을 나타내는 Seahorse 바이오분석기 분석이다. 도 6D는 심장 섬유아세포가 NRTI에 대한 노출 동안 mito-Q 또는 TPP로 처리된 후의 계산된 최대 호흡률을 나타내는 Seahorse 바이오분석기 분석을 나타낸다. 도 6E는 심장 섬유아세포가 NRTI에 대한 노출 동안 mito-Q 또는 TPP로 처리된 후의 계산된 ATP-연결된 호흡률을 나타내는 Seahorse 바이오분석기 분석이다. 도 6F는 심장 섬유아세포가 NRTI에 대한 노출 동안 mito-Q 또는 TPP로 처리된 후의 계산된 양성자 누출률을 나타내는 Seahorse 바이오분석기 분석이다. 도 6G는 미토콘드리아 ROS의 평균 형광 강도를 나타내는 막대 그래프이다. 별표로 표시된 막대는 $P < 0.05$ 에서 상대적인 대조군 값과 유의적으로 상이한 값을 나타내며, #으로 표시된 막대는 동일한 처리군(대조군 또는 NRTI에 노출된 군) 내에서 TPP와 mito-Q-처리된 세포 사이에서 유의적으로 상이한 값을 나타낸다.

도 7A 및 7B는 산화 스트레스에 반응하는 리보솜 S6 단백질 및 MDM2의 인산화 상태를 나타낸다. 도 7A는 혈청-결핍된 심장 섬유아세포가 증가하는 농도의 과산화수소에 2시간 동안 노출된 후의 리보솜 S6 단백질 및 MDM2의 인산화 상태를 도시한다. 혈청-자극된 배양은 리보솜 S6 인산화의 성장 인자 자극을 위한 양성 대조군으로서 우측 레인에 포함된다. 도 7B는 지시된 농도의 로테논에 16시간 동안 노출된 세포의 리보솜 S6 단백질의 인산화 상태를 도시한다. 혈청 결핍된 심장 섬유아세포는 1 내지 50 nM 범위의 농도에서 로테논에 노출되었다. 액틴의 정상 상태 수준은 동일 단백질 로딩을 위한 대조군으로서 제시된다.

도 8A 내지 8C는 NRTI의 존재 하에 Raptor가 미토콘드리아에 위치되는 것을 나타낸다. 도 8A는 미토콘드리아를 표적하는 서열(초록색)에 융합된 GFP 단백질을 생성하는 표현 구조체를 포함하는 아데노바이러스 구조체에 감염된 세포를 나타내는 이미지의 집합이다. 이러한 세포는 고정되고, Raptor(붉은색)를 인식하는 항체로 염색되었고, 반대로 4',6-디아미디노-2-페닐인돌(DAPI)로 DNA(파란색)를 시각화하기 위해 염색되었다. 도 8B는 7일 동안의 NRTI에 대한 노출 후 미토콘드리아 GFP를 발현하는 섬유아세포의 동시 위치 사건을 나타내는 대조군 섬유아세포(NRTI에 노출되지 않음)의 대표적인 공초점 이미지를 나타낸다. 도 8C는 공초점 및 디컨벌루션 현미경(deconvolution microscopy) 둘 다에 의해 결정된 바와 같이 동시 위치 사건의 정량화를 나타내는 막대 그래프이다. 별표로 표시된 막대는 $P < 0.05$ 에서 상대적인 대조군 값과 유의적으로 상이한 값을 나타내며, #으로 표시된 막대는 동일한 처리군(대조군 또는 NRTI에 노출된 군) 내에서 라파마이신-처리된 세포와 처리되지 않은 세포 사이에서 유의적으로 상이한 값을 나타낸다. 동시 위치 실험은 공초점 현미경 및 디컨벌루션 현미경 둘 다에 의해 Raptor 및 mt-GFP 동시 위치를 조사하는 일련의 실험을 통해 4개의 독립적인 평가자에 의해 수행되었다. 정량적인 데이터는 디컨벌루션 현미경을 사용하여 계수를 통해 생성되었다.

도 9A 내지 9I는 섬유아세포가 미토콘드리아 ROS를 상승시키고 리보솜 S6 단백질 및 MDM2의 인산화를 향상시키는 노화를 나타낸다는 발견을 나타낸다. 도 9A는 초기 계대 및 노화된 심장 섬유아세포의 미토콘드리아 ROS의 수준을 나타내는 막대 그래프이다. 도 9B는 초기 계대 및 노화된 심장 섬유아세포의 전체 세포 ROS의 수준을 나타내는 막대 그래프이다. 회색 막대는 표준 배양 조건 하에 유지된 세포를 나타내며, 검정색 막대는 1 nM 라파마이신 존재 하에 유지된 세포를 나타낸다. 도 9C는 세포 수에 의해 정상화된 산소 소비율을 미토콘드리아 억제제인 올리고마이신, FCCP, 또는 로테논 및 안티마이신 A의 조합을 첨가함에 따른 시간의 함수로서 나타내는 그래프이다. 도 9D는 인간 심장 섬유아세포의 미토콘드리아 기능의 기저 호흡을 나타내는 Seahorse 바이오분석기 분석이다. 도 9E는 인간 심장 섬유아세포의 미토콘드리아 기능의 최대 호흡을 나타내는 Seahorse 바이오분석기 분석이다. 도 9F는 인간 심장 섬유아세포의 미토콘드리아 기능의 ATP-연결된 호흡을 나타내는 Seahorse 바이오분석기 분석이다. 도 9G는 인간 심장 섬유아세포의 미토콘드리아 기능의 양성자 누출을 나타내는 Seahorse 바이오분석기 분석이다. 도 9H는 p21 및 p16뿐만 아니라 리보솜 S6 및 MDM2의 인산화된 형태의 노화의 마커를 위해 조사된 증가하는 집단 배양에서 세포로부터 유도된 단백질 용해물을 도시한다. 도 9I는 완전히 노화된 배양이 ROS 스캐빈저인 트롤록스 및 N-아세틸시스테인, p90RSK 억제제인 BI-D1870로 처리되었거나, mt-과산화수소분해 효소 단백질을 발현하는 구조체 또는 빈 벡터 대조군을 보유하는 아데노바이러스 입자에 감염된 후의 리보솜 S6 단백질 및 MDM2의 인산화 수준에 대해 조사된 단백질 용해물을 도시한다. 별표로 표시된 막대는 $P < 0.05$ 에서 상대적인 대조군 값과 유의적으로 상이한 값을 나타내며, #으로 표시된 막대는 동일한 처리군(대조군 또는 NRTI에 노출된 군)인 값을 나타낸다.

도 10은 성장 반응 또는 노화 저지를 생성하는 다수의 신호의 mTORC1 통합에 대한 모델의 개략도이다. 본원에서 입증된 바와 같이, mTORC1에 대한 부가적인 입력은 세포 환원 상태의 형태, 및 MDM2 및 p53 활성의 p70 S6 인산화 효소 매개된 조절을 통해 노화된 성장 저지를 지원하기 위한 mTORC1을 전용할 수 있는 미토콘드리아 기능의 형태로 존재한다. 이러한 연결은 붉은색으로 나타난다(mTORC1 → p70S6K - | MDM2 - | p53 → 안정화 → p53 → 노화).

도 11A 내지 11F는 NRTI에 노출된 인간 심장 섬유아세포 배양 및 라파마이신 처리된 배양의 p53의 상태를 나타

낸다. 도 11A는 양성 대조군으로서 NRTI 또는 과산화수소에 노출된 세포에 대한 코멧 검정 결과를 나타내는 막대 그래프이다. 흰색 막대는 대조군 데이터를 나타내고; 회색 막대는 10 또는 20 $\mu\text{g/ml}$ NRTI에 7일 동안 노출된 세포로부터의 데이터를 나타내며; 검정색 막대는 200 μM 과산화수소에 2시간 동안 노출된 세포로부터의 데이터를 나타낸다. 별표로 표시된 막대는 $P < 0.05$ 에서 상대적인 대조군 값과 유의적으로 상이한 값을 나타낸다. 도 11B는 p53에 대한 항체를 사용하는 면역침전 실험의 결과를 도시한다. 대조군 및 라파마이신-처리된 배양으로부터의 세포 용해물은 7일 동안의 NRTI에 대한 노출의 존재 또는 부재 하에 항-p53 항체를 사용한 면역침전을 받은 후 MDM2 및 이어서 p53에 대한 면역블롯 분석이 이어졌다. 도 11C는 도 11A의 면역침전에 사용된 샘플에서 p53, MDM2, 및 인산화된 MDM2의 수준을 도시한다. 도 11D는 대조군 및 라파마이신-처리된 배양은 NRTI에 7일 동안 노출되고, 그 후 프로테아좀 활성을 억제하기 위해 2시간 동안 MG132와 함께 배양된 후의 p53의 수준을 도시한다. 개질된 p53은 항-p53 항체에 의해 인식되는 더 높은 분자량 형태를 지칭한다. 도 11E는 NRTI에 대한 노출 없이 MDM2의 세포질 수준을 나타내는 이미지이며, NRTI에 대한 노출이 있는 MDM2의 세포질 수준을 나타내는 이미지이다. MDM2(붉은색)를 위해 염색된 세포 및 반대로 DNA(푸른색)를 위해 염색된 세포의 대표적인 현미경 사진이다. 도 11F는 Image J 분석에 의해 결정된 바와 같이 세포질 MDM2 염색의 상대적인 강도를 나타내는 막대 그래프이다.

도 12A 내지 12D는 Raptor의 미토콘드리아 연관을 나타내는 이미지의 집합이다. 도 12A 및 12B는 대조군 조건 하에서 Raptor(붉은색)를 위해 염색된 mt-GFP 단백질(초록색)을 발현하는 세포의 대표적인 현미경 사진을 도시한다. 도 12C 및 12D는 NRTI에 대한 노출 후 Raptor를 위해 염색된 mt-GFP 단백질을 발현하는 세포의 대표적인 현미경 사진을 도시한다. 동시-위치 사진은 화살표로 표시된다.

도 13은 라파마이신 치료가 인간 섬유아세포에서 수명 연장을 제공한다는 발견을 나타내는 그래프이다. 인간 섬유아세포는 라파마이신(1 nM)의 존재 또는 부재 하에 배양 배지에서 성장되었다. 배양은 7일마다 나누어졌고, 동일한 세포 수/cm²로 각 주에 재접종되었다. 정상 인간 섬유아세포의 수명은 세포가 2배가 되는 횡수로 계수되었다. 라파마이신 처리군은 이러한 세포의 정상 수명을 넘어 잘 성장했다.

도 14는 라파마이신은 인간 섬유아세포의 노화 동안 세포 질서를 보존한다는 발견을 나타낸다. 낮은 투여량의 라파마이신의 존재 하에 유지된 인간 섬유아세포는 규칙적인 성장 패턴을 유지했지만, 처리되지 않은 섬유아세포는 연령에 맞춰 스스로 적합하게 적응하는 능력을 상실했다. 질서를 잡는 능력은 정상 섬유아세포 기능의 중요한 요소이며, 정상 조직에서 조직 완전성에 기여한다. 연령에 따라 발생하는 무질서는 기능적 저하에 기여한다.

도 15는 라파마이신이 손상 면에서 미토콘드리아 네트워크를 보존한다는 발견을 나타내는 이미지의 집합이다. 패널 A는 미토콘드리아에서 형광 단백질을 발현하는 인간 섬유아세포가 초록색 미토콘드리아 네트워크를 나타내는 것을 도시한다. 패널 B는 라파마이신 처리된 세포는 정상 미토콘드리아 네트워크를 가진다는 것을 도시한다. 패널 C는 미토콘드리아 네트워크는 미토콘드리아 독소, 에티뮴 브로마이드(EthBr)에 노출됨으로써 파괴된다는 것을 도시한다. 패널 D는 라파마이신 처리된 세포가 EthBr 노출 후 미토콘드리아 네트워크를 유지할 수 있다는 것을 도시한다.

도 16은 라파마이신은 미토콘드리아 스트레스 후 인간 섬유아세포의 생존을 증가시킨다는 발견을 나타내는 막대 그래프이다. 인간 섬유아세포는 7일 동안 에티뮴 브로마이드에 노출되었고 그 때 세포 생존력이 측정되었다.

도 17은 라파마이신이 노화를 야기하는 유전자의 발현을 방지한다는 발견을 나타내는 막대 그래프이다. p21 유전자는 인간 섬유아세포의 노화에 중요한 단백질을 생성한다. 라파마이신의 존재 하에 성장된 세포는 나이 들에 따라 p21을 생성하지 않지만, 대조군 세포는 p21을 발현하고 노화에 돌입한다.

도 18은 라파마이신이 염증과 관련된 유전자의 발현을 방지한다는 발견을 나타낸다. IL-6 유전자는 조직 손상의 영역에 면역 세포를 모집하는 면역 시스템을 활성화하는 단백질을 생성한다. 라파마이신의 존재 하에 성장된 세포는 나이 들에 따라 IL-6을 생성하지 않지만, 대조군 세포는 IL-6을 발현하고 노화에 돌입한다.

도 19는 라파마이신이 위축성 피부에서 진피 두께를 증가시킨다는 발견을 나타내는 막대 그래프이다. 진피 두께는 유화된 겔 제제(gel preparation)에서 14일 동안의 라파마이신 처리 후에 0.001 mm까지 정확도가 입증된 Mitoutoyo 디지털 캘리퍼스를 사용하여 측정되었다.

도 20은 도 19와 같이 유화된 겔 제조물(gel preparation)에서 10 μM 라파마이신의 21일 동안의 처리 전후의 지루 각화증 병변의 사진이다. 병변의 중증도의 유의적인 감소는 육안 검사 시 명백했다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0019] 본 발명은 한 양태에서, 본 발명의 조성물 및 방법이 진피 위축, 지루 각화증, 광선 각화증, 가성반흔, 흑자, 진피 비후의 병소 영역, 및 거친 주름과 같지만 이에 한정되지 않는 연령-관련된 진피 장애를 치료하거나 예방하는 데 사용될 수 있다는 예기치 않은 발견에 관한 것이다. 특정 양태에서, 본 발명의 조성물 및 방법은 치료 또는 예방을 필요로 하는 대상체에서 진피 위축을 치료하거나 예방하는 데 유용하다. 다른 양태에서, 본 발명의 조성물은 적어도 하나의 mTORC1 억제제의 치료적 유효량을 포함한다. 또 다른 양태에서, 본 발명의 조성물은 mTORC1 억제제를 상기 연령-관련된 진피 상태에 대해 활성인 유일한 성분으로서 포함한다. 또 다른 양태에서, 상기 mTORC1 억제제는 mTORC2 억제제이기도 하다.
- [0020] 본 발명의 조성물 및 방법은 섬유아세포의 수명을 향상시키고 정상 섬유아세포의 성장 및 스트레스 저항성을 개선했다. 어떤 이론에 제한시키고자 하는 것은 아니지만, 이는 염증성 시토카인 생산의 감소와 연관될 수 있다. 특정 양태에서, mTORC1 억제제의 치료적 유효량의 진피층으로의 전달은 진피 항상성에 영향을 미치는 중간엽 반응을 유발한다. 다른 양태에서, mTORC1 억제제의 치료적 유효량의 진피층으로의 전달은 진피 두께의 증가와 피부 기능의 개선을 생성한다.
- [0021] 본원에서 입증된 바와 같이, 미토콘드리아 ROS는 mTORC1에 대한 신규한 입력으로 확인되었다. 형광 표지 둘 다 및 ROS 스캐빈저의 영향에 기반하여, 본 발명 결과는 미토콘드리아-생성된 ROS가 mTORC1를 활성화시키는 역할을 한다는 발견을 뒷받침한다(도 10). 이는 실험적 환경에서 관찰된 리보솜 S6 단백질 및 MDM2 둘 다의 증가된 인산화에 의해 반영된다. mTORC1의 라파마이신에 의한 억제는, 간섭이 미토콘드리아-표적된 과산화수소분해효소의 발현 또는 ROS 스캐빈저로의 치료와 같은 미토콘드리아 ROS 감소를 표적으로 한 것처럼 이러한 반응들을 방지했다. 미토콘드리아 활성의 측정으로서의 산소 소비량의 분석은 NRTI에 노출된 세포는 물론 복제성 노화(replicative senescence)의 세포의 환경 둘 다에서 기저(basal) 및 ATP-연결된 호흡량(ATP-linked respiration)의 증가를 나타냈다. 유사하게, 상기 설정 둘 다에서 양성자 유출 및 미토콘드리아 ROS 생산이 증가했다. 이러한 발견은 미토콘드리아 ROS 생성이 mTORC1의 활성화를 위한 방아쇠 역할을 한다는 것을 시사한다. 이러한 해석은 미토콘드리아 ROS를 감소시키기 위해 설계된 간섭이 리보솜 S6 단백질의 인산화를 감소시킨다는 사실에 의해 뒷받침된다.
- [0022] mTORC1/p70S6K 활성의 미토콘드리아 ROS 유도 하류 결과의 측면에서, MDM2 인산화는 p53의 안정화 및 p21과 같은 하류 표적의 발현 증가를 생성하는 것으로 나타났다. 이와 일치하게, p53의 MDM2와의 연관 감소는 NRTI에 노출된 세포에서 동시면역침전(co-immunoprecipitation) 및 세포질 MDM2 증가에 의해 나타난다. 또한, NRTI에 노출된 세포에서 p53의 더 높은 분자량 형태의 감소가 관찰된 반면, 라파마이신-처리된 세포는 상기 프로테아좀 억제 후에만 볼 수 있었던 p53의 이러한 더 높은 분자량 형태의 증가된 수준을 함유한다. p53에 대한 라파마이신의 이러한 효과는 라파마이신-처리된 세포에서 p21과 같은 p53 표적 유전자의 활성화의 부족의 기저를 이룰 수 있고, mTORC1 신호 전달에 영향을 미치기에 충분하지만 증식을 완전히 차단하기에 충분하지는 않은 농도의 라파마이신의 존재 하에 세포가 배양되었을 때 관찰된 노화 지연에 기여할 수 있다.
- [0023] 특정 양태에서, 본 결과는 p70S6K를 통한 mTORC1 신호 전달이 미토콘드리아에 의해 생성된 ROS에 반응할 수 있음을 나타낸다. mTORC1/p70S6K의 활성화는 미토콘드리아 기능 장애, 복제성 노화 및 노화된 조직의 환경에서 발생했다. 라파마이신은 미토콘드리아 ROS 생산 둘 다를 개선하고 mTORC1/p70S6K 반응을 차단했다. 라파마이신의 이러한 효과는 장수의 측면에서 및 라파마이신 치료 후의 진피 위축과 같은 연령-관련된 장애에서 관찰되는 유의한 효과를 뒷받침한다.
- [0024] **정의**
- [0025] 본원에 사용된 바와 같이, 다음 각각의 용어는 이 단락의 의미와 연관된 의미를 가진다.
- [0026] 달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어는 일반적으로 이 발명이 속하는 기술 분야의 통상의 기술자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다. 일반적으로, 본원에 사용된 명명법 및 세포 배양에서 실험 절차, 분자 유전학, 및 화학은 당업계에 널리 공지되어 있고 일반적으로 사용된다.
- [0027] 본원에 사용된 바와 같이, 관사 "한(a)" 및 "하나(an)"는 관사의 문법적 대상의 1개 또는 1개 이상(즉, 적어도 1개)을 지칭한다. 예로서, "한 요소"는 1개 요소 또는 1개 이상의 요소를 의미한다 .
- [0028] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "약"은 당업자에 의해 이해될 것이며, 그것이 사용된 맥락에서 어느 정도 변할 것이다. 양, 지속 시간 등과 같은 측정 가능한 값을 지칭할 때 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "약"은 특정된

값으로부터의 $\pm 20\%$ 또는 $\pm 10\%$, $\pm 5\%$, $\pm 1\%$, 또는 $\pm 0.1\%$ 의 변동을 포함하는 것을 의미하는데, 그 이유는 이러한 변동이 개시된 방법을 수행하는 데 적절하기 때문이다.

- [0029] 본원에 사용된 바와 같이, "피부학적으로 허용 가능한 담체" 또는 "피부학적으로 허용 가능한 부형제"는 과도한 독성, 비혼화성(incompatibility), 불안정성, 알레르기 반응 등 없이 인간 각질 조직과 접촉하여 사용되는 데 적합한 조성물 또는 성분을 지칭한다.
- [0030] "질환"은 동물의 건강 상태이며, 여기서 동물은 항상성을 유지할 수 없으며, 여기서 질환이 호전되지 않으면 동물의 건강은 계속 악화된다. 동물의 "장애"는 동물이 항상성을 유지할 수 있으나 장애가 없을 때보다 덜 유리한 동물의 건강 상태이다. 장애는 치료하지 않고 방치했을 때 동물의 건강 상태가 추가로 하락하는 것을 필수적으로 야기하지 않는다.
- [0031] 본원에서 사용된 바와 같이, 화합물의 "유효량" 또는 "치료적 유효량" 또는 "약학적 유효량"이라는 용어는 상기 화합물이 투여되는 대상체에 유익한 효과를 제공하기에 충분한 화합물의 양을 지칭하기 위해 교환하여 사용될 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이 용어 "치료하다"는 환자 또는 대상체가 경험하는 증상의 빈도를 감소시키는 것 또는 증상이 경험되는 중증도를 감소시키기 위해 제제 또는 화합물을 투여하는 것을 의미한다. 어떤 개별 경우에서 적절한 치료량은 통상적인 실험을 사용하여 당업자에 의해 결정될 수 있다.
- [0032] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "FTC"는 엠트리시타빈(emtricitabine) 또는 이의 염 또는 용매화물을 지칭한다.
- [0033] 본원에 사용된 바와 같이, "설명 자료(instructional material)"는 출판물, 기록물, 도식, 또는 대상체의 전신 면역 반응을 억제하거나 감소시키기 위한 키트 내의 본 발명의 화합물, 조성물, 검정(assay), 및 방법의 유용성을 전달하는데 사용될 수 있는 어떤 다른 표현의 매개체를 포함한다. 본 발명의 키트의 설명 자료는 예를 들어 확인된 화합물, 조성물, 검정, 또는 방법을 함유하는 용기에 부착되거나, 상기 확인된 화합물, 조성물, 검정, 또는 방법을 함유하는 용기와 함께 수송될 수 있다. 대안으로, 상기 설명 자료는 상기 설명 자료 및 상기 화합물, 조성물, 검정, 또는 방법이 수령인에 의해 협력하여 사용되는 것을 의도해 용기와 별도로 수송될 수 있다.
- [0034] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "조절하다(modulate)"는 본 발명의 화합물이 본 발명에서 고려되는 수용체에 결합하는 것과 연관된 질병 상태(state) 또는 조건(condition)과 관련하여, 본 발명에 따른 화합물의 투여 전에는 최적 이하이고 많은 경우에 쇠약하며 심지어 생명을 위협하는 상태 또는 질병 상태의 개선 또는 경감을 직접적으로 또는 간접적으로 생성하는 것을 의미한다. 조절은 작용제 활성화, 길항제 활성화, 또는 혼합된 작용제/길항제 활성화(수용체 부위에 의존)에 의해 발생할 수 있다.
- [0035] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "NRTI"는 뉴클레오타이드/뉴클레오사이드 역전자 효소 억제제를 지칭한다.
- [0036] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "약학적으로 허용 가능한"은 조성물의 생물학적 활성 또는 특성을 배제하지 않고 상대적으로 독성이 없는, 즉, 물질이 바람직하지 않은 생물학적 효과를 야기하거나 그것이 포함되어 있는 조성물의 어떤 성분과 유해한 방식으로 상호작용하지 않으면서 개인에게 투여될 수 있는, 담체 또는 희석제(diluent)와 같은 물질을 지칭한다.
- [0037] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "약학적 조성물" 또는 "조성물"은 본 발명에서 유용한 적어도 하나의 화합물과, 담체, 안정화제, 희석제, 분산제, 현탁화제, 증점제, 및/또는 부형제와 같은 다른 화학적 성분의 혼합물을 지칭한다. 상기 약학적 조성물은 유기체에 대한 화합물의 투여를 용이하게 한다. 정맥내(intravenous), 구강(oral), 에어로졸(aerosol), 비경구(parenteral), 눈(ophthalmic), 폐(pulmonary), 두개내(intracranial) 및 국소적(topical) 투여를 포함하지만 이에 한정되지 않는 화합물을 투여하는 다수의 기술이 당업계에 존재한다. 특정 양태에서, 상기 투여는 국소적 투여를 포함한다.
- [0038] 본원에서 사용된 바와 같이, "대상체"는 인간 또는 비인간 포유동물을 지칭한다. 비인간 포유동물은 예를 들어 양, 소, 돼지, 개, 고양이, 및 쥐 포유동물과 같은 가축 및 애완 동물을 포함한다. 특정 양태에서, 상기 대상체는 인간이다.
- [0039] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "TDF"는 테노포비르 디소프록실 푸마레이트, 또는 이의 염 또는 용매화물을 지칭한다.
- [0040] 본원에 사용된 바와 같이, "국소적 투여" 또는 "국소적 적용"은 피부 또는 점막과 같은 신체 표면에 적용되는 치료 행위를 지칭한다.
- [0041] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "치료" 또는 "치료하는 것"은 치료적 제제, 즉, 본 발명에서 유용한 조성물(단

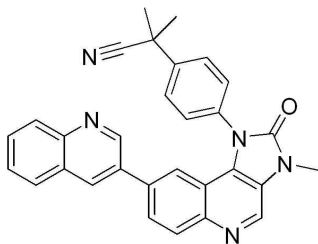
독으로 또는 다른 약학적 제제와 조합으로)의 대상체에 대한 적용 또는 투여, 또는 질환 또는 장애, 질환 또는 장애의 증상, 또는 질환 또는 장애를 발생시킬 가능성을 가지는 대상체로부터 분리된 조직 또는 세포주(cell line)에 치료적 제제를 적용 또는 투여상기 질환 또는 장애, 질환 또는 장애의 증상, 또는 질환 또는 장애를 발생시킬 가능성을 치료, 치유, 경감, 완화, 변경, 교정, 개선, 또는 향상시키거나 영향을 미칠 목적으로 약학적 제제를 적용 또는 투여하는 것으로 정의된다. 이러한 치료는 약물 유전학 분야에서 얻어지는 지식을 기반으로 특별히 맞춤화되거나 개질될 수 있다.

[0042] 본 개시 전체에 걸쳐, 본 발명의 다양한 양태가 범위 형식으로 제시될 수 있다. 범위 형식은 단지 편의와 간략화를 위한 것이며 본 발명의 범위에 대한 융통성 없는 제한으로 해석되어서는 안된다는 것이 이해되어야 한다. 따라서, 범위에 대한 설명은 모든 가능한 하위 범위 및 해당 범위 내의 개별 수치를 구체적으로 개시한 것으로 간주되어야 한다. 예를 들어, 1 내지 6과 같은 범위의 설명은 1 내지 3, 1 내지 4, 1 내지 5, 2 내지 4, 2 내지 6, 3 내지 6 등과 같은 하위 범위뿐만 아니라 예를 들어 1, 2, 2.7, 3, 4, 5, 5.3, 및 6과 같은 해당 범위 내의 개별 숫자를 구체적으로 개시한 것으로 이해되어야 한다. 이는 범위의 폭과 무관하게 적용된다.

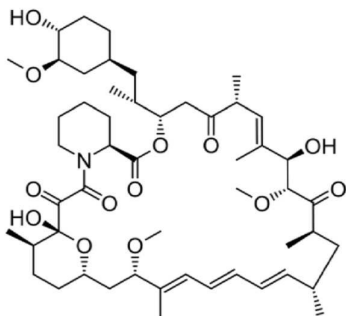
[0043] **조성물**

[0044] 본 발명의 조성물은 치료적 유효량의 mTORC1 억제제, 또는 이의 염, 용매화물, 거울상 이성질체 또는 부분 입체 이성질체를 포함한다. 특정 양태에서, 상기 mTORC1 억제제는 BEZ235, 라파마이신, 에베롤리무스(everolimus), AZD8055, 템시롤리무스(Temsirolimus), KU-0063794, PI-103, 토르키닙(Torikinib), 타크롤리무스(Tacrolimus), 리다포롤리무스(Ridaforolimus), INK-128, 복스탈리십(Voxtalisisib), 토린-1(Torin-1), 오미팔리십(Ompalisib), OSI-027, PF-04691502, 아피톨리십(Apitolisib), GSK1059615, WYE-354, 제다톨리십(Gedatolisib), AZD-2014, 토린-2(Torin-2), WYE-125132, BGT226, 팔로미드-529(Palomid-529), PP121, WYE-687, CH5132799, Way-600, ETP-46464, GDC-0349, XL388, 및 조타롤리무스(Zotarolimus)로 구성된 군에서 선택된 적어도 하나이다.

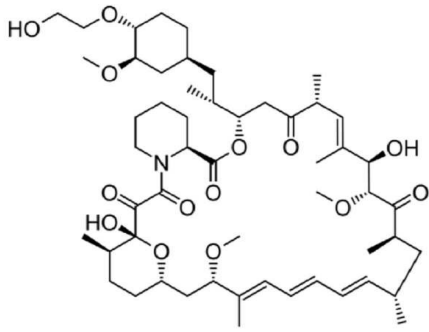
[0045] BEZ235는 2-메틸-2-(4-(3-메틸-2-옥소-8-(퀴놀린-3-일)-2,3-디하이드로이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일)페닐)프로판나이트릴로도 알려져 있으며, 하기와 같은 화학식을 가진다:



[0046] 라파마이신은 (3S,6R,7E,9R,10R,12R,14S,15E,17E,19E,21S,23S, 26R,27R,34aS)-9,10,12,13,14,21,22,23,24,25,26,27,32,33,34,34a-헥사테카하이드로-9,27-디하이드록시-3-[(1R)-2-[(1S,3R,4R)-4-하이드록시-3-메톡시사이클로헥실]-1-메틸에틸]-10,21-디메톡시-6,8,12,14,20,26-헥사메틸-23,27-에폭시-3H-피리도[2,1-c][1,4-옥사아자사이클로 헨트리아콘틴-1,5,11,28,29(4H,6H,31H)-헨톤으로도 알려져 있으며, 하기와 같은 화학식을 가진다:

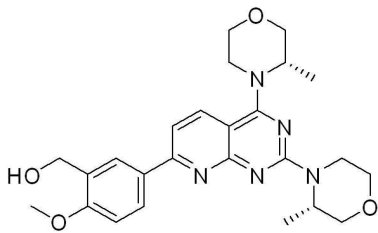


[0048] 에베롤리무스는 디하이드록시-12-[(2R)-1-[(1S,3R,4R)-4-(2-하이드록시 에톡시)-3-메톡시사이클로헥실]프로판-2-일]-19,30-디메톡시-15,17,21,23,29,35-헥사메틸-11,36-디옥사-4-아자트리사이클로[30.3.1.0 헥사트리아콘타-16,24,26,28-테트라엔-2,3,10,14,20-헨톤으로도 알려져 있으며, 하기와 같은 화학식을 가진다:



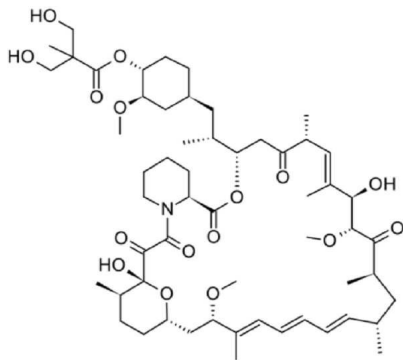
[0050]

[0051] AZD8055은 5-(2,4-비스((S)-3-메틸모르폴리노)피리도[2,3-d]피리미딘-7-일)-2-메톡시페닐)메탄올로도 알려져 있으며, 하기와 같은 화학식을 가진다:



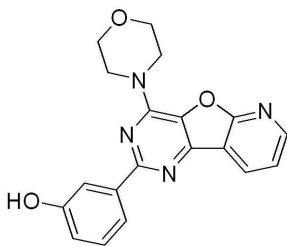
[0052]

[0053] 템시롤리무스는 42-[3-하이드록시메틸)2-메틸 프로파노에이트]-라파마이신으로도 알려져 있으며, 하기와 같은 화학식을 가진다:



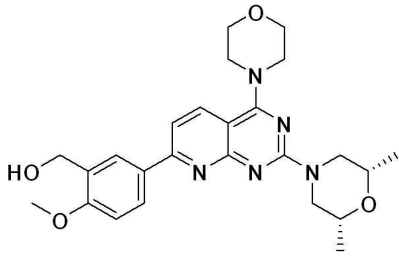
[0054]

[0055] PI-103은 3-[4-(4-모르폴리닐)피리도[3',2':4,5]푸로[3,2-d]피리미딘-2-일]-페놀으로도 알려져 있으며, 하기와 같은 화학식을 가진다:



[0056]

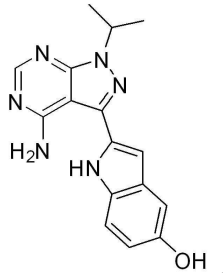
[0057] KU-0063794는 (5-(2-((2R,6S)-2,6-디메틸모르폴리노)-4-모르폴리노피리도[2,3-d]피리미딘-7-일)-2-메톡시페닐)메탄올로도 알려져 있으며, 하기와 같은 화학식을 가진다:



[0058]

[0059]

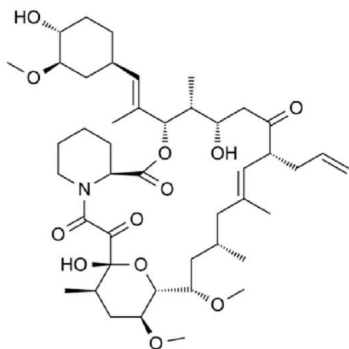
토르키넵은 2-(4-아미노-1-이소프로필-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-3-일)-1H-인돌-5-올로도 알려져 있으며, 하기와 같은 화학식을 가진다



[0060]

[0061]

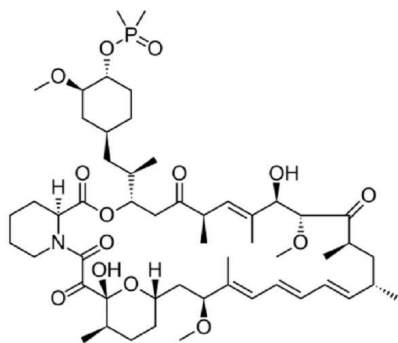
타크롤리무스는 $3S-[3R^*[E(1S^*,3S^*,4S^*)],4S^*,5R^*,8S^*,9E,12R^*,14R^*,15S^*,16R^*,18S^*,19S^*,26aR^*-5,6,8,11,12,13,14,15,16,17,18,19,24,25,26,26a\text{-}\text{헥사데카하이드로-5,19-디하이드로-3-[2-(4-하이드록시-3-메톡시사이클로헥실)-1-메틸에테닐]-14,16-디메톡시-4,10,12,18-테트라메틸-8-(2-프로페닐)-15,19-에톡시-3H-피리도[2,1-c][1,4]옥사아자사이클로트리코신-1,7,20,21(4H,23H)-테트론}으로도 알려져 있으며, 하기와 같은 화학식을 가진다:$



[0062]

[0063]

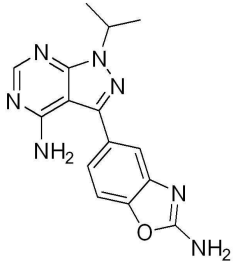
리다포롤리무스는 42-(디메틸포스피네이트)-라파마이신으로도 알려져 있으며, 하기와 같은 화학식을 가진다:



[0064]

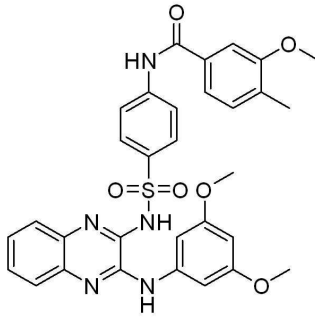
[0065]

INK-128은 3-(2-아미노벤조[d]옥사졸-5-일)-1-이소프로필-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-4-아민으로도 알려져 있으며, 하기와 같은 화학식을 가진다:



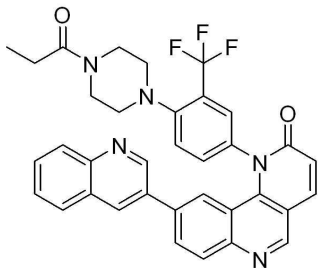
[0066]

[0067] 복스탈리십은 N-[4-[[[3-[(3,5)-디메톡시페닐]아미노]-2-퀴녹살리닐]아미노]설포닐]페닐]-3-메톡시-4-메틸-벤자미드으로도 알려져 있으며, 하기와 같은 화학식을 가진다:



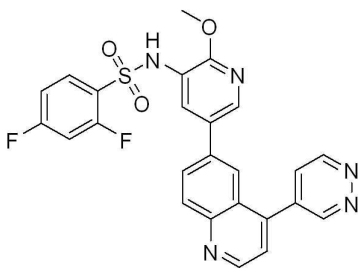
[0068]

[0069] 토란-1은 1-[4-[4-(1-옥소프로필)-1-피페라지닐]-3-(트리플루오로메틸)페닐]-9-(3-퀴놀리닐)-벤조[h]-1,6-나프티리딘-2(1H)-온으로도 알려져 있으며, 하기와 같은 화학식을 가진다:



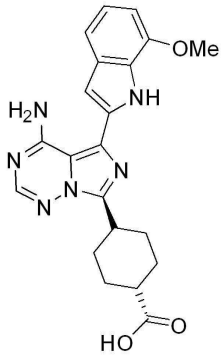
[0070]

[0071] 오미팔리십은 2,4-디플루오로-N-(2-메톡시-5-(4-(피리다진-4-일)퀴놀린-6-일)피리딘-3-일)벤젠설포나미드으로도 알려져 있으며, 하기와 같은 화학식을 가진다:



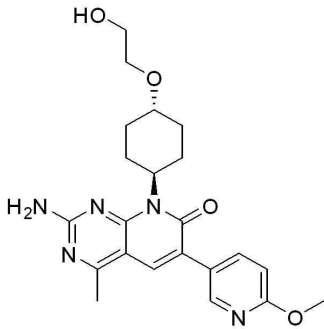
[0072]

[0073] OSI-027은 (1r,4r)-4-(4-아미노-5-(7-메톡시-1H-인돌-2-일)이미다조[5,1-f][1,2,4]트리아진-7-일)사이클로헥산-1-카르복실산으로도 알려져 있으며, 하기와 같은 화학식을 가진다:



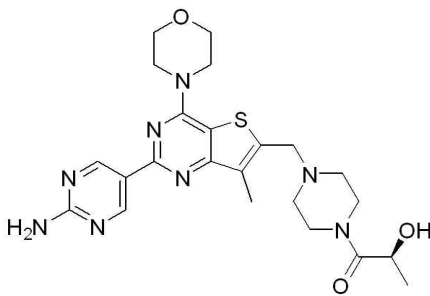
[0074]

[0075] PF-04691502은 2-아미노-8-((1r,4r)-4-(2-(4-메톡시페록시)사이클로헥실)-6-(6-메톡시피리딘-3-일)-4-메틸피리도[2,3-d]피리미딘-7(8H)-온으로도 알려져 있으며, 하기와 같은 화학식을 가진다:



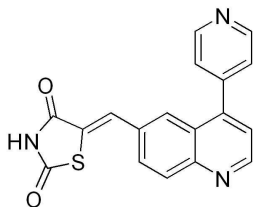
[0076]

[0077] 아피톨리십은 (S)-1-(4-((2-(2-아미노피리미딘-5-일)-7-메틸-4-모르폴리노티에노[3,2-d]피리미딘-6-일)메틸)피페라진-1-일)-2-하이드록시프로판-1-온으로도 알려져 있으며, 하기와 같은 화학식을 가진다:



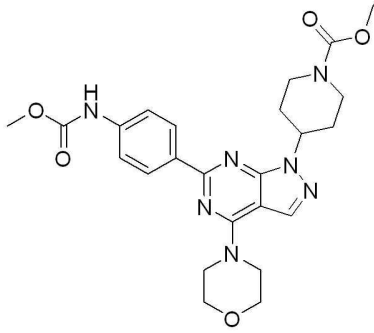
[0078]

[0079] GSK1059615는 (Z)-5-((4-(피리딘-4-일)퀴놀린-6-일)메틸렌)티아졸리딘-2,4-디온으로도 알려져 있으며, 하기와 같은 화학식을 가진다:



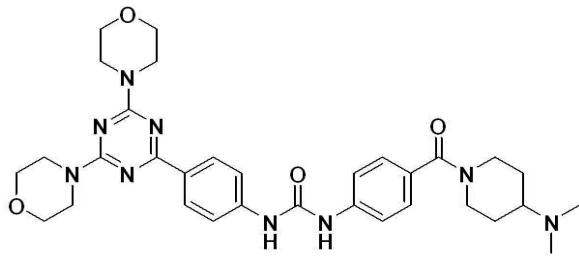
[0080]

[0081] WYE-354는 4-[6-[4-[(메톡시카르보닐)아미노]페닐]-4-(4-모르폴리닐)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일]-1-피페리딘 카르복실산 메틸 에스테르로도 알려져 있으며, 하기와 같은 화학식을 가진다:



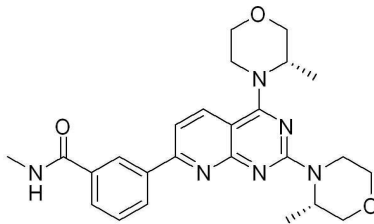
[0082]

[0083] 제다톨리십은 1-(4-(4-(디메틸아미노)피페리딘-1-카르보닐)페닐)-3-(4-(4,6-디모르폴리노-1,3,5-트리아진-2-일)페닐)우레아로도 알려져 있으며, 하기와 같은 화학식을 가진다:



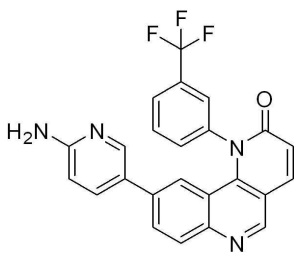
[0084]

[0085] AZD-2014는 3-(2,4-비스((S)-3-메틸모르폴리노)피리도[2,3-d]피리미딘-7-일)-N-메틸벤자미드으로도 알려져 있으며, 하기와 같은 화학식을 가진다:



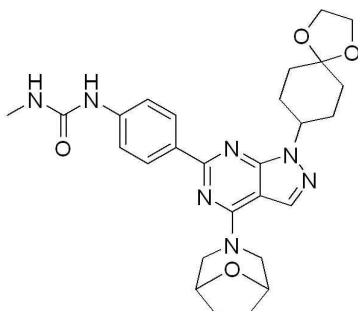
[0086]

[0087] 토린-2는 9-(6-아미노-3-피리디닐)-1-[3-(트리플루오로메틸)페닐]-벤조[h]-1,6-나프티리딘-2(1H)-온으로도 알려져 있으며, 하기와 같은 화학식을 가진다:



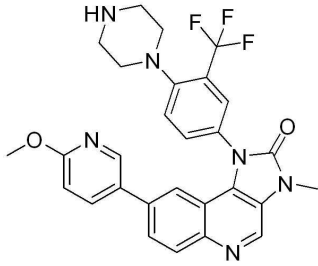
[0088]

[0089] WYE-125132는 N-[4-[1-(1,4-디옥사스피로[4.5]데스-8-일)-4-(8-옥사-3-아자비사이클로[3.2.1]옥트-3-일)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-6-일]페닐]-N'-메틸-우레아로도 알려져 있으며, 하기와 같은 화학식을 가진다:



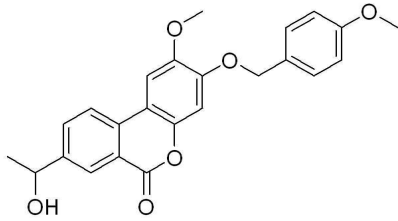
[0090]

[0091] BGT226은 8-(6-메톡시피리딘-3-일)-3-메틸-1-(4-(피페라진-1-일)-3-(트리플루오로메틸)페닐)-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-2(3H)-온으로도 알려져 있으며, 하기와 같은 화학식을 가진다:



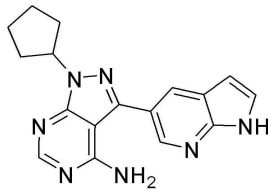
[0092]

[0093] 팔로미드-529는 3-(4-메톡시벤질옥시)-8-(1-하이드록시에틸)-2-메톡시-6H-벤조[c]크로멘-6-온으로도 알려져 있으며, 하기와 같은 화학식을 가진다:



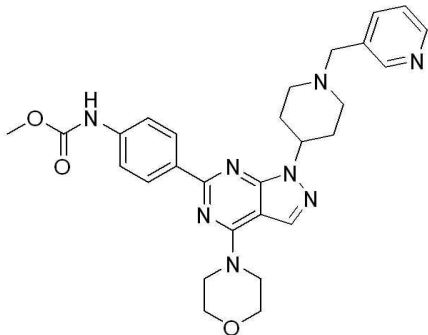
[0094]

[0095] PP121은 1-사이클로펜틸-3-(1H-피롤로[2,3-b]피리딘-5-일)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-4-아민으로도 알려져 있으며, 하기와 같은 화학식을 가진다:



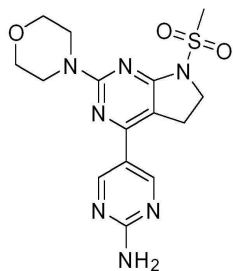
[0096]

[0097] WYE-687은 메틸 4-(4-모르폴리노-1-(1-(피리딘-3-일메틸)피페리딘-4-일)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-6-일)페닐 카르바메이트로도 알려져 있으며, 하기와 같은 화학식을 가진다:



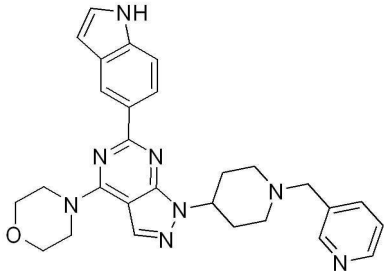
[0098]

[0099] CH5132799는 5-(7-(메틸설포닐)-2-모르폴리노-6,7-디하이드로-5H-피롤로[2,3-d]피리미딘-4-일)피리미딘-2-아민으로도 알려져 있으며, 하기와 같은 화학식을 가진다:



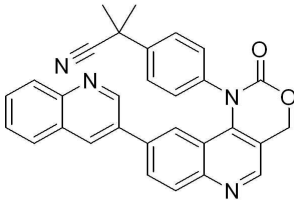
[0100]

[0101] WAY-600은 6-(1H-인돌-5-일)-4-모르폴리노-1-(1-(피리딘-3-일메틸)피페리딘-4-일)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘으로도 알려져 있으며, 하기와 같은 화학식을 가진다:



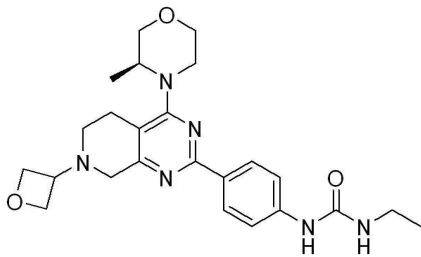
[0102]

[0103] ETP-46464는 α, α -디메틸-4-[2-옥소-9-(3-퀴놀리닐)-2H-[1,3]옥사지노[5,4-c]퀴놀린-1(4H)-일]-벤젠아세트나 트릴로도 알려져 있으며, 하기와 같은 화학식을 가진다:



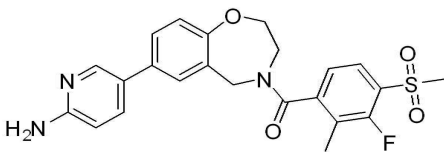
[0104]

[0105] GDC-0349은 N-에틸-N'-[4-[5,6,7,8-테트라하이드로-4-[(3S)-3-메틸-4-모르폴리닐]-7-(3-옥세타닐)피리도[3,4-d]피리미딘-2-일]페닐]-우레아로도 알려져 있으며, 하기와 같은 화학식을 가진다:



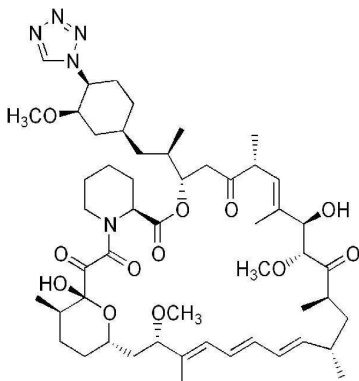
[0106]

[0107] XL388은 [7-(6-아미노-3-피리디닐)-2,3-디하이드로-1,4-벤조사제핀-4(5H)-일][3-플루오로-2-메틸-4-(메틸설포닐)페닐]-메타논으로도 알려져 있으며, 하기와 같은 화학식을 가진다:



[0108]

[0109] 조타롤리무스는 42-데옥시-42-(1H-테트로졸-1-일)-(42S)-라파마이신으로도 알려져 있으며, 하기와 같은 화학식을 가진다:



[0110]

- [0111] 특정 양태에서, 본 발명에서 고려되는 mTORC1 억제제는 라파마이신이다. 다른 양태에서, 상기 mTORC1 억제제는 미토콘드리아, 핵, 리소좀, 및/또는 소포체와 같은 특정 세포내 구획 또는 세포 기관으로의 전달이 향상된, 개질된 형태의 라파마이신일 수 있다.
- [0112] 특정 양태에서, 조성물 중 mTORC1 억제제의 치료적 유효량은 약 0.001 중량% 내지 약 1 중량%의 범위이다. 다른 양태에서, 조성물 중 mTORC1 억제제의 치료적 유효량은 약 0.002 중량% 내지 약 0.75 중량%, 약 0.005 중량% 내지 약 0.5 중량%, 약 0.008 중량% 내지 약 0.25 중량%, 약 0.01 중량% 내지 약 0.2 중량%, 약 0.02 중량% 내지 약 0.15 중량%, 또는 약 0.03 중량% 내지 약 0.1 중량%의 범위이다.
- [0113] 특정 양태에서, 본 발명의 조성물은 피부학적으로 허용 가능한 담체를 추가로 포함한다. 본 발명의 조성물은 약 60% 내지 약 99.9%, 대안적으로 약 70% 내지 약 95%, 및 대안적으로 약 80% 내지 약 90%의 피부학적으로 허용 가능한 담체를 포함할 수 있다. 특정 양태에서, 상기 피부학적으로 허용 가능한 담체는 용매, 윤활제, 연화제, 유화제, 보습제, 증점 약스, 연화제, 향료, 방부제, 및 인공 색소로 구성된 군에서 선택된 적어도 하나이다. 다른 양태에서, 상기 피부학적으로 허용 가능한 담체는 물, 지방성 알코올, 및 휘발성 유기 알코올로 구성된 군에서 선택된 적어도 하나이다. 상기 피부학적으로 허용 가능한 담체의 한정되지 않는 예는 페트롤라툼이다.
- [0114] **방법**
- [0115] 한 양태에서, 본 발명은 포유동물 섬유아세포의 수명을 연장시키는 방법을 제공한다. 다른 양태에서, 본 발명은 포유동물 섬유아세포의 세포 질서를 보존하는 방법을 제공한다. 또 다른 양태에서, 본 발명은 포유동물 섬유아세포의 노화를 방지하거나 최소화하는 방법을 제공한다. 또 다른 양태에서, 본 발명은 포유동물 대상체의 진피 위축, 가성반흔, 지루 또는 광선 각화증, 흑자, 진피 비후의 병소 영역, 및 거친 주름을 포함하는 연령-관련된 진피 장애를 치료하거나 예방하는 방법을 제공한다.
- [0116] 특정 양태에서, 본 발명의 방법은 진피적으로 허용 가능한 조성물로 제형화된 치료적 유효량의 mTORC1 억제제를 대상체에 국소적으로 투여하는 단계를 포함한다. 다른 양태에서, 본 발명의 조성물은 치료적 유효량의 mTORC1 억제제를 포함한다. 또 다른 양태에서, 상기 조성물은 피부학적으로 허용 가능한 담체를 추가로 포함한다. 또 다른 양태에서, 상기 조성물은 대상체의 병에 걸린 피부 영역에 국소적으로 적용된다.
- [0117] 특정 양태에서, 본 발명에서 고려되는 조성물의 국소적 제형(topical formulation)은 진피 위축을 치료하는 데 사용된다. 다른 양태에서, 본 발명은 진피 위축을 치료하거나 예방하기 위해 치료적 유효량의 라파마이신을 포함하는 국소적 크림(topical cream)을 제공한다.
- [0118] 특정 양태에서, 진피 위축은 진피층의 눈금 디지털 캘리퍼스 측정을 활용하여 진피층을 측정함으로써 평가된다. 다른 양태에서, 지루 각화증, 흑자, 가성반흔, 거친 주름, 및 진피 비후의 개선은 1 내지 4의 조사자 평가 등급 척도를 통해 평가되었고, 여기서 1은 병변의 징후가 없는 정상이고; 2는 경미한 병변을 나타내고; 3은 정상 피부에 비해 뚜렷한 특징을 나타내며; 4는 중증도의 병변을 나타낸다. 또 다른 양태에서, 병변은 시각적으로 또는 국립 보건원에서 입수 가능한 오픈 소스 이미지 분석 소프트웨어인 ImageJ와 같은 이미지 분석 소프트웨어의 도움으로 조사될 수 있다. 또 다른 양태에서, 병변은 병변의 수동 측정을 이용해 또는 조사자 또는 연구 조사 직원에 의해 촬영된 이미지의 분석을 통해 평가된다.
- [0119] **제형**
- [0120] 본 발명의 약학적 조성물 중 활성 성분, 피부학적으로 허용 가능한 담체, 및 임의의 부가적인 성분의 상대적인 양은 치료되는 대상체의 정체성(identity), 크기, 및 상태에 따라 다양할 것이다. 예로서, 조성물은 약 0.001 중량% 내지 약 1 중량%의 mTORC1 억제제를 포함할 수 있다. 다른 양태에서, 조성물 중 mTORC1 억제제의 치료적 유효량은 약 0.002 중량% 내지 약 0.75 중량%, 약 0.005 중량% 내지 약 0.5 중량%, 약 0.008 중량% 내지 약 0.25 중량%, 약 0.01 중량% 내지 약 0.2 중량%, 약 0.02 중량% 내지 약 0.15 중량%, 또는 약 0.03 중량% 내지 약 0.1 중량%의 범위이다.
- [0121] 본원에서 제공되는 약학적 조성물의 설명은 주로 인간에게의 윤리적인 투여에 적합한 약학적 조성물에 관한 것이지만, 이러한 조성물은 일반적으로 모든 종류의 동물에게의 투여에 일반적으로 적합하다는 것이 숙련자에 의해 이해될 것이다. 다양한 동물에게의 투여에 적합하도록 인간에게의 투여에 적합한 약학적 조성물을 개질하는 것은 잘 알려져 있으며, 통상의 숙련된 약리학자는 단지 통상적인 실험(존재한다면)으로 그러한 개질을 설계하고 수행할 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물의 투여가 고려되는 대상은 인간, 및 다른 영장류, 소, 돼지, 말, 양, 고양이, 및 개와 같은 상업적으로 관련된 포유동물을 포함한 포유동물을 포함하나 이에 한정되지 않는다.

- [0122] 본 발명의 조성물은 매일 수회 빈번하게 포유동물에게 투여될 수 있고, 또는 1일에 1회, 1주일에 1회, 2주마다 1회, 1달에 1회와 같이 덜 빈번하게, 또는 몇 달에 1회 또는 심지어 1년에 1회 또는 그보다 적은 것과 같이 심지어 덜 빈번하게 투여될 수 있다.
- [0123] 본 발명의 조성물을 투여하기 위한 투여 양생법(regimen)은 1일 1회 또는 1일 2회일 수 있다. 상기 적용의 빈도 및 상기 활성 제제의 농도는 피부 상태 및 진피의 반응에 의존한다. 적용은 진피의 바람직한 효과를 달성하기 위해 계속될 수 있으며, 적용의 빈도는 만족스러운 결과를 얻게된 후 감소될 수 있다. 특정 양태에서, 투여는 결과를 달성하기 위해 최소 2주는 지속된다. 적용은 지속적인 개선을 얻기 위해 초기 2주 기간을 넘어서 계속될 수 있으며, 적용의 빈도는 이 결과를 달성하면 감소될 수 있다. 적용은 어느 한 순간에 병변의 상대적인 중증도에 따라 적용의 다양한 수준으로 수년 동안 계속될 수 있다.
- [0124] 1일당 투여되는 본 발명의 조성물의 양은 한정되지 않는 예에서, 매일 격일마다, 2일마다, 3일마다, 4일마다, 5일마다 투여될 수 있다는 것이 이해된다. 투여의 빈도는 숙련자에게 쉽게 명백하고, 치료되는 질환의 유형 및 중증도, 동물의 유형 및 연령 등과 같지만 이에 한정되지 않는 임의의 수의 인자에 의존할 것이다.
- [0125] 특정 양태에서, 본 발명의 조성물은 하나 이상의 피부학적으로 허용 가능한 부형제 또는 담체를 사용하여 제형화될 것이다. 특정 양태에서, 본 발명의 약학적 조성물은 치료적 유효량의 mTORC1 억제제 및 피부학적으로 허용 가능한 담체를 포함한다. 유용한 피부학적으로 허용 가능한 담체는 글리세롤, 물, 살린, 에탄올, 및 인산염 및 유기산의 염과 같은 다른 피부학적으로 허용 가능한 염 용액을 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 이들 및 다른 피부학적으로 허용 가능한 담체의 예는 Remington's Pharmaceutical Sciences(1991, Mack Publication Co., New Jersey)에 기술되어 있다.
- [0126] 본 발명의 조성물은 약 60% 내지 약 99.9%, 대안적으로 약 70% 내지 약 95%, 및 대안적으로 약 80% 내지 약 90%의 피부학적으로 허용 가능한 담체를 포함할 수 있다. 특정 양태에서, 상기 피부학적으로 허용 가능한 담체는 용매, 윤활제, 연화제, 유화제, 보습제, 증점 왁스, 연화제, 향료, 방부제, 및 인공 색소로 구성된 군에서 선택된 적어도 하나이다. 다른 양태에서, 상기 피부학적으로 허용 가능한 담체는 물, 지방성 알코올, 및 휘발성 유기 알코올로 구성된 군에서 선택된 적어도 하나이다. 상기 피부학적으로 허용 가능한 담체의 한정되지 않는 예는 페트롤라텀이다.
- [0127] 상기 담체는 예를 들어, 물, 에탄올, 폴리올(예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리세롤, 및 액체 폴리에틸렌 글리콜 등), 이들의 적합한 혼합물, 및 식물성 오일을 함유하는 용매 또는 분산 매질일 수 있다. 적합한 유동성은 예를 들어, 레시틴과 같은 코팅(coating)의 사용, 분산의 경우에 요구되는 입자 크기의 유지, 및 계면 활성제의 사용에 의해 유지될 수 있다. 미생물 작용의 방지는 예를 들어, 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 아스코르브 산, 티메로살 등과 같은 항균 및 항진균제에 의해 달성될 수 있다. 많은 경우에, 예를 들어, 당, 염화나트륨, 또는 만니톨 및 소르비톨과 같은 폴리알코올과 같은 등장성(isotonic) 제제를 조성물에 포함시키는 것이 바람직할 것이다. 주사 가능한 조성물의 장기적인 흡수는 예를 들어, 알루미늄 모노스테아레이트 또는 젤라틴과 같은 흡수를 지연시키는 제제를 조성물에 포함시킴으로써 초래될 수 있다.
- [0128] 제형은 통상적인 부형제, 즉, 당업계에 공지된 국소적 투여에 적합한 약학적으로 허용 가능한 유기 또는 무기 담체 물질과의 혼합물로 사용될 수 있다. 상기 약학적 제제는 멸균될 수 있으며 필요하다면 예를 들어, 윤활제, 방부제, 안정화제, 습윤제, 유화제, 삼투압 완충액에 영향을 미치는 염, 착색제, 향료 및/또는 방향족 물질 등의 보조적인 제제와 혼합될 수 있다. 이들은 필요한 경우, 예를 들어, 다른 진통제와 같은 다른 활성 제제와 혼합될 수도 있다.
- [0129] 본원에 사용된 바와 같이, "부가적인 성분"은 다음 중 하나 이상을 포함하지만 이에 한정되지는 않는다: 부형제; 계면 활성제; 분산제; 불활성 희석제; 과립화제(granulating agent) 및 분해제(disintegrating agent); 결합제; 윤활제; 착색제; 방부제; 젤라틴과 같은 생리학적으로 분해 가능한 조성물; 수성 비히클(aqueous vehicle) 및 용매; 유성 비히클 및 용매; 현탁제; 분산제 또는 습윤제; 유화제; 완화제(demulcent); 완충액; 염; 증점제; 필러; 유화제; 향산화제; 향생제; 항진균제; 안정화제; 및 약학적으로 허용 가능한 증합제 성 또는 소수성 물질. 본 발명의 약학적 조성물에 포함될 수 있는 다른 "부가적인 성분"은 당업계에 공지되거나, 예를 들어, 본원에 참고 문헌으로 포함된 Genaro, ed.(1985, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, PA)에, 기술되어 있다.
- [0130] 본 발명의 조성물은 당해 조성물 전체 중량의 약 0.005% 내지 2.0%의 방부제를 포함할 수 있다. 방부제는 환경의 오염물질에 노출되는 경우 부패(spoilage)를 방지하게 위해 사용된다. 본 발명에 따라 유용한 방부제의 예는

벤질 알코올, 소르브산, 파라벤, 이미두레아, 및 이들의 조합으로 구성된 군에서 선택된 것을 포함하지만 이에 한정되지는 않는다. 특히 바람직한 방부제는 약 0.5% 내지 2.0% 벤질 알코올 및 0.05% 내지 0.5% 소르브산의 조합물이다.

- [0131] 조성물은 항산화제 및 킬레이트제(chelating)를 바람직하게 포함한다. 일부 화합물을 위한 바람직한 항산화제는 조성물 전체 중량의 약 0.01% 내지 0.3%의 바람직한 범위의 BHT, BHA, α -토코페롤, 및 아스코르브산이고, 더 바람직하게 0.03% 내지 0.1%의 범위의 BHT이다. 바람직하게, 상기 킬레이트제는 조성물 전체 중량의 0.01 중량% 내지 0.5 중량%의 양으로 존재한다. 특히 바람직한 킬레이트제는 아미노폴리카르복실산 염(예를 들어, 디소듐 에틸렌디아민테트라아세트산) 및 시트르산을 약 0.01 중량% 내지 0.20 중량% 범위로 포함하고, 더 바람직하게 조성물 전체 중량의 0.02 중량% 내지 0.10 중량%의 범위로 포함한다. 상기 킬레이트제는 제형의 저장 수명(shelf life)에 해로울 수 있는 조성물 중의 금속 이온을 킬레이트화하는 데 유용하다.
- [0132] 국소적 투여
- [0133] 약품의 국소적 투여에 대한 장애는 상피의 각질층이다. 상기 각질은 단백질, 콜레스테롤, 스펅고지질, 유리 지방산, 및 다양한 다른 지질으로 구성된 고도 저항층(highly resistant layer)이며, 각질화된 세포 및 살아 있는 세포를 포함한다. 각질을 통한 화합물의 투과율(유량)을 제한하는 인자 중 하나는 피부 표면 상에 적체되거나 적용될 수 있는 활성 물질의 양이다. 피부의 단위 면적당 적용되는 활성 물질의 양이 커질수록, 피부 표면과 피부의 하부층 사이 농도 구배가 더 커지며, 결국 피부를 통한 활성 물질의 확산력(diffusion force)이 더 커진다. 따라서, 더 큰 농도의 활성 물질을 함유하는 제형은 다른 모든 것들이 동등하다면 더 적은 농도를 갖는 제형보다 피부를 통한 활성 물질의 침투를 더 많이 더 일정한 비율로 초래할 가능성이 높다.
- [0134] 국소적 투여에 적합한 제형은 액체, 또는 리니먼트(liniment)와 같은 반액체 제제, 로션, 수중유, 또는 연고(ointment), 또는 페이스트와 같은 유중수 에멀전, 및 용액 또는 현탁액을 포함하지만 이에 한정되지는 않는다. 이러한 제형은 피부에 직접적으로 적용될 수 있고, 면봉, 어플리케이터, 스프라틀라 등의 사용에 의해 적용될 수 있을 뿐만 아니라, 경피(transderma) 패치와 같은 형태로도 적용될 수 있다. 특정 양태에서, 상기 패치는 피부의 세척, 마찰, 긁힘, 및/또는 문지름에 의한 약품의 손실을 최소화한다. 다른 양태에서, 상기 패치는 약품에 대한 피부의 노출을 최소화하면서 피부를 통한 약품의 흡수를 증가시킨다.
- [0135] 본 발명에서 고려된 국소적으로 투여 가능한 제형은, 예를 들어, 약 0.001 중량% 내지 약 1 중량%의 mTORC1 억제제를 포함할 수 있지만, mTORC1 억제제의 농도는 용매의 활성 성분의 용해도 한계만큼 높을 수 있다. 국소적 투여를 위한 제형은 본원에 기술된 하나 이상의 부가적인 성분을 추가로 포함할 수 있다.
- [0136] 침투 개선제가 사용될 수 있다. 이러한 물질은 피부를 통한 약물의 침투율을 증가시킨다. 당업계의 통상적인 개선제는 에탄올, 글리세롤 모노라우레이트, PGML(폴리에틸렌 글리콜 모노라우레이트), 디메틸설폭사이드 등을 포함한다. 다른 개선제는 올레산, 올레일 알코올, 에톡시디글리세롤, 라우로카프람, 알칸카르복실산, 디메틸설폭사이드, 극성 지질, 또는 N-메틸-2-피롤리돈을 포함한다.
- [0137] 본 발명의 조성물 일부의 국소적 전달을 위한 하나의 허용 가능한 비히클은 리포솜을 함유할 수 있다. 리포솜의 조성물 및 그의 용도는 당업계에 공지되어 있다(예를 들어, 미국 특허 제 6,323,219호).
- [0138] 대안적인 양태에서, 상기 국소적 제형은 보조제, 항산화제, 킬레이트제, 계면 활성제, 발포제, 습윤제, 유화제, 점성제, 완충액, 방부제 등과 같은 다른 성분을 추가로 포함한다. 다른 양태에서, 투과 또는 침투 개선제가 제형에 포함되고, 이는 투과 개선제가 없는 조성물에 비해 각질 내로 또는 각질을 통한 활성 성분의 경피(percutaneous) 침투를 개선하는 데 효과적이다. 올레산, 올레일 알코올, 에톡시디글리콜, 라우로카프람, 알칸카르복실산, 디메틸설폭사이드, 극성 지질, 또는 N-메틸-2-피롤리돈을 포함하는 다양한 투과 개선제는 당업자에게 공지되어 있다. 다른 양태에서, 국소적 제형은 각질의 구조에서 무질서를 증가시키는 작용을 하는 하이드로트로픽(hydropic) 제제를 추가로 포함할 수 있으므로, 각질을 가로지르는 수송 증가를 허용한다. 이소프로필 알코올, 프로필렌 글리콜, 또는 소듐 자일렌 설포네이트와 같은 다양한 하이드로트로픽 제제는 당업자에게 공지되어 있다.
- [0139] 국소적 제형 중의 추가적인 비활성 성분은 당업계에 잘 알려져 있다. 이러한 성분은 습윤제(humectant), 연화제, pH 안정화제, 킬레이트제, 겔화제, 증점제, 유화제, 결합제, 완충액, 담체, 항산화제 등을 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 이러한 성분의 추가적인 예는 온라인에서 사용 가능한 미국 식품 의약국(U.S. Food & Drug Administration)의 승인된 약품을 위한 비활성 성분(Inactive Ingredients for Approved Drugs)에 포함되어 있다. 추가 논의 및 제형에 포함될 수 있는 잠재적인 비활성 성분은 "The Science and Practice of

Pharmacy", 21st Edition, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa.(2006)에서 찾을 수 있다.

- [0140] 특정 양태에서, 본 발명의 겔 제형은 약 0.001 중량% 내지 약 1 중량%의 mTORC1 억제제, 약 20 내지 50 중량%의 디메틸 설펝사이드(DMSO), 약 10 내지 20 중량%의 폴리프로필렌 글리콜, 약 10 내지 40 중량%의 100 내지 800의 분자량(PEG100 내지 PEG800)을 갖는 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 약 1 내지 2 중량%의 겔화제, 및 약 0 내지 50%의 물을 포함한다.
- [0141] 다른 양태에서, 본 발명의 겔 제형은 약 0.001 중량% 내지 약 1 중량%의 라파마이신, 약 20 내지 50 중량%의 디메틸 설펝사이드(DMSO), 약 10 내지 20 중량%의 폴리프로필렌 글리콜, 약 10 내지 40 중량%의 100 내지 800의 분자량(PEG100 내지 PEG800)을 갖는 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 약 1 내지 2 중량%의 겔화제, 및 약 0 내지 50%의 물을 포함한다.
- [0142] 또 다른 양태에서, 본 발명의 용액 또는 분무 제형은 약 0.001 중량% 내지 약 1 중량%의 mTORC1 억제제를 10 내지 50 중량%의 DMSO 및 약 10 내지 50 중량%의 PEG를 갖는 수용액에 포함한다.
- [0143] 또 다른 양태에서, 본 발명의 용액 또는 분무 제형은 약 0.001 중량% 내지 약 1 중량%의 라파마이신을 10 내지 50 중량%의 DMSO 및 약 10 내지 50 중량%의 PEG를 갖는 수용액에 포함한다.
- [0144] 또 다른 양태에서, 본 발명의 크림 또는 로션 제형은 약 0.001 중량% 내지 약 1 중량%의 mTORC1 억제제, 미네랄 오일, 임의의 유형의 알코올, Triton X-100과 같은 비이온성 세제, 유화 왁스, 글리세롤 모노스테아레이트(GMS), 이소프로필 미리스테이트(IPM), 및 약 60 내지 80%의 물을 포함한다.
- [0145] 또 다른 양태에서, 본 발명의 크림 또는 로션 제형은 약 0.001 중량% 내지 약 1 중량%의 라파마이신, 미네랄 오일, 임의의 유형의 알코올, Triton X-100과 같은 비이온성 세제, 유화 왁스, 글리세롤 모노스테아레이트(GMS), 이소프로필 미리스테이트(IPM), 및 약 60 내지 80%의 물을 포함한다.
- [0146] 또 다른 양태에서, 본 발명의 연고 제형은 약 0.001 중량% 내지 약 1 중량%의 mTORC1 억제제를 약 10 내지 50 중량%의 DMSO 및 약 10 내지 50 중량%의 PEG, 및 약 1 내지 60 중량%의 페트롤라툼을 갖는 수용액에 포함한다.
- [0147] 또 다른 양태에서, 본 발명의 연고 제형은 약 0.001 중량% 내지 약 1 중량%의 라파마이신을 약 10 내지 50 중량%의 DMSO 및 약 10 내지 50 중량%의 PEG, 및 약 1 내지 60 중량%의 페트롤라툼을 갖는 수용액에 포함한다.
- [0148] 제어 방출(*controlled release*) 제형 및 약물 전달 시스템
- [0149] 본 발명의 약학적 조성물의 제어-방출 또는 지속 방출(*sustained-release*) 제형은 통상적인 기술을 사용하여 제조될 수 있다. 일부 경우, 사용되는 투여 형태는 다양한 비율로 원하는 방출 프로파일을 제공하기 위해, 예를 들어, 하이드로프로필메틸 셀룰로스, 다른 중합체 매트릭스, 겔, 투과성 막, 삼투성 시스템, 다층 코팅, 미세 입자, 리포솜, 또는 미소구(*microsphere*), 또는 이들의 조합물을 사용하여 하나 이상의 활성 성분의 느린 방출 또는 제어 방출로 제공될 수 있다. 당업자에게 공지된 적합한 제어-방출 제형은 본원에 기술된 것들을 포함하여 본 발명의 약학적 조성물과 함께 사용하기 위해 쉽게 선택될 수 있다. 따라서, 리니먼트, 로션, 수중유, 또는 크림, 연고, 또는 페이스트와 같은 유중수 에멀전, 경피 패치, 및 제어-방출을 위해 개조된 용액 또는 현탁액과 같은 국소적 투여에 적합한 단일 단위 투여 형태가 본 발명에 의해 포함된다.
- [0150] 대부분의 제어-방출 약학적 제품은 제어되지 않은 대응품에 의해 달성되는 것보다 약물 치료법을 향상시키는 공통 목표를 가진다. 이상적으로, 의학적 치료에서의 최적으로 설계된 제어-방출 제제의 사용은 최소한의 시간 동안 상태를 치료하거나 조절하는 데 사용되는 최소의 약물 물질을 특징으로 한다. 제어-방출 제형의 이점은 약물의 활성 연장, 투여 빈도 감소, 및 환자 순응도 증가를 포함한다. 또한, 제어-방출 제형은 작용의 개시 시기 또는 약물의 혈중 농도와 같은 다른 특징에 영향을 미치는 데 사용될 수 있으므로, 부작용의 발생에 영향을 미칠 수 있다.
- [0151] 대부분의 제어-방출 제형은 원하는 치료적 효과를 신속하게 생성하기 위한 약물의 양을 초기에 방출하고, 이러한 치료의 수준을 장기간 동안 유지하기 위해 약물의 다른 양을 점진적, 지속적으로 방출하기 위해 설계된다. 체내에서 약물의 이러한 일정한 수준을 유지하기 위해, 약물은 몸에서 대사되고 배출되는 약물의 양을 대체할 수 있는 비율로 투여 형태에서 배출되어야 한다.
- [0152] 활성 성분의 제어-방출은, 예를 들어, pH, 온도, 효소, 물, 또는 다른 생리학적 조건, 또는 화합물과 같은 다양한 유도제에 의해 자극될 수 있다. 본 발명의 맥락에서, 용어 "제어-방출 성분"은 중합체, 중합체 매트릭스, 겔, 투과 가능한 막, 리포솜, 또는 미소구, 또는 활성 성분의 제어-방출을 용이하게 하는 이들의 조합을 포함하

나 이에 한정되지 않는 화합물 또는 화합물들로 본원에 정의된다.

- [0153] 특정 양태에서, 본 발명의 제형은 단기적이고, 신속-상쇄(rapid-offset)될 뿐만 아니라, 예를 들어, 지속 방출, 지연 방출, 및 박동(pulsatile) 방출 제형과 같이 제어되지만 이에 한정되지 않는다.
- [0154] 지속 방출이라는 용어는 통상적인 의미로, 장기간에 걸쳐 약물의 점진적 방출을 제공하며 필수적이지는 않지만 약물의 장기간에 걸쳐 실질적으로 일정한 혈중 수준을 초래할 수 있는 약물 제형을 지칭하는 데 사용된다. 기간은 한 달 이상 길 수 있으며, 일시 형태로 투여되는 제제의 동일한 양보다 더 긴 방출이어야 한다.
- [0155] 지속 방출을 위해, 화합물은 화합물에 지속 방출 특성을 제공하는 적합한 중합체 또는 소수성 물질로 제형화될 수 있다.
- [0156] 본 발명의 특정 양태에서, 본 발명의 조성물은 지속 방출 제형을 사용하여 단독으로 또는 다른 약학적 제제와 조합하여 환자에게 투여된다.
- [0157] 지연 방출이라는 용어는 본원에서 통상적인 의미에서 약물 투여 후 약간의 지연 후에 약물의 초기 방출을 제공하며 필수적이지는 않지만 약 10분 내지 최대 약 12시간의 지연을 포함하는 약물 제형을 지칭한다.
- [0158] 박동 방출이라는 용어는 본원에서 통상적인 의미에서 약물 투여 후 약물의 맥동 혈장(pulsed plasma) 프로파일을 생성하는 방식으로 약물의 방출을 제공하는 약물 제형을 지칭하는 데 사용된다.
- [0159] 즉시 방출이라는 용어는 통상적인 의미에서 약물 투여 직후에 약물의 방출을 제공하는 약물 제형을 지칭하는 데 사용된다.
- [0160] 본원에 사용된 바와 같이, 단기란 약물 투여 후 최대 약 8시간, 약 7시간, 약 6시간, 약 5시간, 약 4시간, 약 3시간, 약 2시간, 약 1시간, 약 40분, 약 20분, 또는 약 10분, 및 이들의 임의적 또는 전체적 또는 부분적 증가를 포함하는 임의의 기간을 지칭한다.
- [0161] 본원에 사용된 바와 같이, 신속-상쇄는 최대 약 8시간, 약 7시간, 약 6시간, 약 5시간, 약 4시간, 약 3시간, 약 2시간, 약 1시간, 약 40분, 약 20분, 또는 약 10분, 및 이들의 임의적 또는 전체적 또는 부분적 증가를 포함하는 임의의 기간을 지칭한다.
- [0162] 당업자는 일상적인 실험 이상을 사용하지 않고 본원에 기술된 특정 절차, 양태, 청구범위, 및 실시예의 다수의 균등물을 인식하거나 확인할 수 있을 것이다. 이러한 균등물은 본 발명의 범위 내로 간주되었고 여기에 첨부된 청구범위에 의해 포함되었다. 예를 들어, 반응 시간, 반응 크기/부피, 및 용매, 촉매, 압력, 예를 들어, 질소 압력과 같은 대기 조건, 및 환원/산화제와 같은 실험적 시약을 포함하지만 이에 한정되지 않는, 일상적인 실험 이상을 사용하지 않고 기술적으로 인정된 대안을 사용한 반응 조건의 변형은 본 출원의 범위 내에 있음을 이해해야 한다.
- [0163] 값 또는 범위가 본원에서 제공되는 경우, 이러한 값 또는 범위에 의해 포함되는 모든 값 또는 범위는 본 발명의 범위 내에 포함되는 것을 의미한다는 것이 이해되어야 한다. 또한, 값의 범위의 상한 또는 하한뿐만 아니라 이러한 범위 내에 속하는 모든 값도 본 출원에 의해 고려된다.
- [0164] 다음 실시예는 본 발명의 양태를 추가로 나타낸다. 그러나, 이들은 본원에 명시된 바와 같이 본 발명의 교시 내용 또는 개시 내용을 한정하는 것이 아니다.
- [0165] **실시예**
- [0166] 이제 본 발명은 하기 실시예를 참조하여 기술된다. 이러한 실시예는 설명 목적으로만 제공되며, 발명은 이러한 실시예에 의해 한정되지 않고 오히려 본원에 제공된 교시 내용의 결과로서 명백한 모든 변형을 포함한다.
- [0167] **재료 및 방법**
- [0168] 달리 명시되지 않는 한, 모든 세포주, 출발 물질, 시약 및 세포주는 상업적 공급자로부터 입수했으며 추가적인 조작 없이 사용되었다.
- [0169] *세포 배양 및 세포 배양 시약*
- [0170] NRTI를 활용한 세포 배양 실험은 다음과 같은 설계로 이루어졌다. 인간 폐 또는 심장 섬유아세포의 배양은 이러한 세포의 일반적인 배양 프로토콜(Cristofalo, et al., Journal of Tissue Culture Methods 1980, 6:117-121)에 따라 배양되었다. 배양의 평행군(parallel set)은 정상 성장 배지 또는 1 nM 라파마이신을 첨가한 정상

성장 배지에서 유지되었다. 배양은 1 nM 라파마이신(Enzo Biologicals)과 함께 NRTI에 대한 노출 전 2주 동안 유지되었다. 세포 배양은 개별 실험(일반적으로 10 내지 20 $\mu\text{g/ml}$)에서 지시된 농도로 7일 동안 NRTI에 노출되었고, 4일째에 배지 및 신선한 NRTI가 변경되었다. 미토콘드리아 측정, 바이오분석기 측정, 단백질 발현 및 인산화 상태에 대한 면역 블로팅, 및 노화에 대한 검정은 이 7일 기간의 끝에서 수행되었다.

[0171] 나타내지 않는 한, 세포 배양 시약은 Cellgro에서 얻어졌다. WI-38 태아-폐 1차 인간 섬유아세포 또는 인간 심장 섬유아세포는 10% 소 태아 혈청, 1% L-글루타민, MEM 비타민, 및 MEM 비필수 아미노산이 보충된 MEM에서 성장시켜졌다. 세포는 5% CO₂ 배양기에서 37°C로 유지되었다. 치료 연구를 위해, 세포는 NRTI 처리 전 2주 동안 1 nM 라파마이신(Enzo Biologicals)으로 처리되었다. 세포는 트립신 처리 및 재접종에 의해 $1 \times 10^4/\text{cm}^2$ 의 세포 밀도로 7 내지 10일마다 유지되었다. 엠트리시타빈(FTC) 및 테노포비르 디소프록실 푸마레이트(TDF)는 NIH AIDS Research & Reference Reagent 프로그램에 의해 친절하게 제공되었다. NRTI에 대한 7일 노출 동안, 약리학적 억제제 PD98059(10 μM , Santa Cruz Biotechnologies), BI-D1870, GW5074, 및 SB203580(10 μM , Enzo Biologicals)는 실험에 따라 최종 48시간 동안 또는 최종 2시간 동안 배양 배지에 첨가되었다. NRTI에 대한 7일 노출 동안, 트롤록스(500 μM) 및 N-아세틸시스테인(100 μM , Acros Organics)은 격일로 첨가되었다. Mito-Q(20 nM) 및 TPP(20 nM)는 펜실베이니아 수의과 대학 소속의 Brett Kaufmann 박사에 의해 친절하게 제공되었다. 벡터 및 mt-과산화수소분해효소 아테노마이네스(MOI의 25, 50, 및 75)는 아이오와 대학의 Gene Transfer Vector Core에서 구입했다.

[0172] 웨스턴 블로팅 및 동시면역침전

[0173] 세포 단백질 추출물은 단백질분해효소 억제제 카테일(Sigma-Aldrich) 및 인산분해효소 억제제인 NaF 및 소듐 오르토바나테이트를 함유하는 방사면역침전 검정(radioimmunoprecipitation assay: RIPA) 완충액으로 추출되어 제조되었다. 단백질 농도는 BCA(bicinchoninic acid) 검정(Pierce Biotechnology)을 사용하여 정량화되었다. 웨스턴 블로팅 분석은 SDS-PAGE 상에서 수행되고 니트로셀룰로스(Biorad) 멤브레인 상으로 옮겨진 단백질 추출물의 15 내지 30 μg 을 사용하여 수행되었다. 블로팅은 제조업자의 설명에 따르면 베타-액틴(Sigma-Aldrich), TFAM, Parkin, p16, 포스포(S82)HSP27, HSP27(Santa Cruz Biotechnologies), p53, 21, 과산화수소분해효소, MDM2(EMD Millipore), VDAC, 포스포(S235/236)-리보솜 단백질 S6, 리보솜 단백질 S6, 포스포(S166)-MDM2, 포스포(S473)-AKT, AKT, 베타-튜블린(Cell Signaling), p62(Enzo Biologicals), IL-6(NeoBiolab), 라민 B1, PINK1, 및 미토프로파일 전체 OXPHOS 카테일(I-NDUFB8 복합체 소단위, CII-SDHB 소단위, CIIUQCRC2 소단위, 및 미토콘드리아 COX1 소단위)(Abcam)에 특이적인 항체와 함께 배양되었다. 웨스턴 블로팅은 LI-COR Odyssey 소프트웨어 버전 3.0(LI-COR Biosciences)를 사용하여 LI-COR Odyssey 상의 IRDye 680 및 800 LI-COR 2차 항체를 사용하여 시각화되었다. 동시면역침전을 위해, 세포 단백질 추출물은 단백질분해효소 억제제 카테일을 함유하는 HNTG 완충액에서 제조되었고 BCA 검정을 이용해 정량화되었다. 0.5 mg 농도에서의 단백질 추출물은 단백질 A/G 비드(Santa Cruz Biologicals)로 30분 동안 사전 세척되었다. 4°C에서 5분 동안의 2,000 rpm에서의 원심 분리 후, 상등액(supernatant)은 제조업자 권장 농도의 1차 항체와 함께 4°C에서 하룻밤 동안 배양되었다. IgG 항체(Cell Signaling)는 비특이적 대조군으로서 사용되었다. 면역 복합체는 100 μl 의 단백질 A/G 비드를 사용하여 4°C에서 하룻밤 동안 침전되었다. 비드에 결합된 면역 복합체는 4°C에서 5분 동안 2000 rpm에서 원심 분리되었고 HNTG 완충액을 사용하여 3회 세척되었다. 2 \times 샘플 완충액의 첨가 및 100°C에서의 비등 후, 단백질 샘플은 웨스턴 블로팅을 위해 사용되었다.

[0174] 전체 ROS, 미토콘드리아 막 전위, 미토콘드리아 양, 및 슈퍼옥사이드 음이온 평가

[0175] 미토콘드리아 막 전위는 25 nM TMRE(Molecular Probes)와 함께 세포를 배양함으로써 검출되었다. 미토콘드리아 양은 100 nM Mitotracker Green FM(Molecular Probes)와 함께 세포를 배양함으로써 평가되었다. 미토콘드리아 슈퍼옥사이드 음이온 수준은 5 μM MitoSox Red(Molecular Probes)과 함께 세포를 배양함으로써 검출되었다. ROS의 전체 세포 수준은 1% 소 태아 혈청이 보충된 MEM 중의 10 μM 2',7'-디클로로플루오로신 디아세테이트(DCF-DA; Sigma-Aldrich)와 함께 세포를 배양하고, 배양 기간 후에 Krebs Ringer 인산염 글루코오스 완충액(145 mM NaCl, 5.7 mM NaH₂PO₄, 4.86 mM KCL, 0.54 mM CaCl₂, 1.22 mM MgSO₄, 및 5.5 mM 글루코오스)로 2회 세척함으로써 검출되었다. 상기 언급한 평가를 위해, 배양은 37°C에서 30분 동안 5% CO₂에서 수행되었고, 세포는 혈청-함유 배지가 있는 2.5% 트립신-EDTA에서 수확되었다. 세포는 Guava Express Plus 프로그램(Guava Technologies)을 활용하여 Guava EasyCyte Mini로 즉시 분석되었다.

[0176] 미토콘드리아 호흡 측정

- [0177] 미토콘드리아 기능은 Seahorse XF24 바이오분석기(Seahorse Bioscience) 상의 XF 세포 미토 스트레스 테스트를 이용하여 측정되었다. 세포는 XF24 마이크로 플레이트에서 웰(well)당 15,000개 세포의 밀도로 접종되었다. 획득 후, 결과는 적용 가능한 경우 Guava EasyCyte Mini(Millipore)를 사용하여 계수한 10^6 개 세포를 기반으로 정규화되었다. 플레이트는 올리고마이신, 카르보닐-트리플루오로메톡시페닐하이드라진(FCCP), 및 로테논/안티마이신 A를 함유하는 센서 카트리지와 함께 사전 로딩된 바이오분석기에 로딩되었다. 산소 호흡은 올리고마이신, FCCP, 및 로테논/안티마이신 A의 순차적인 첨가 전후에 3회 측정되었다. 호흡 및 양성자 유출은 발표된 방법(Hill, et al., Biological chemistry 2012, 393:1485-1512)에 요약된 바와 같이 평가되었다. 미토콘드리아 호흡은 최소 4회 접종된 세포로부터의 3종의 산소 호흡률 측정을 기반으로 계산되었다. 기저 호흡은 초기 산소 호흡률 측정을 나타내고, 최대 호흡은 FCCP 첨가 후 산소 소비율 측정을 나타낸다. ATP-연결된 호흡은 올리고마이신-민감 산소 변화 대 기저 산소 호흡률로 나타내진다. 양성자 유출은 올리고마이신 둔감 산소 소비율을 나타낸다. 미토콘드리아 이외의 산소 소비원은 로테논/안티마이신 A-둔감 산소 소비율 측정으로 정규화함으로써 감해졌다. 모든 데이터는 미토콘드리아 평가 완료 시 각 웰의 세포를 카운팅함으로써 세포 수로 정규화되었다.
- [0178] 노화-연관된 베타-갈락토스분해효소 검출
- [0179] SA- β -gal 활성의 평가는 고밀도 배양에서 발생하는 것으로 알려진 거짓 양성 염색을 방지하기 위하여 저밀도 ($0.5 \times 10^4 / \text{cm}^2$)에서 각각의 처리 후 플레이팅(plating)함으로써 수행되었다. 접종은 1주 동안의 NRTI 처리 후 SA- β -gal 염색을 위해 수행되었고, 염색은 접종 후 24시간 동안 수행되었다. 세포는 PBS로 세척되었고, 2% 포름알데하이드-0.2% 글루타르알데하이드에서 4분 동안 상온에서 고정되었고, PBS로 1회 더 세척되었으며, 50 mg/ml X-gal, 100 mM 포타슘 페리시아나이드, 100 mM 포스포포타슘 페로시아나이드, 5M NaCl, 1M MgCl₂, 및 0.2M 시트르산/인산염 완충액(pH 6.0)을 함유하는 염색 용액에서 하룻밤 동안 37°C에서 배양되었다. 배양 후, 세포는 PBS로 3회 세척되었고, 적어도 500개의 세포는 각 샘플마다 3회 계수되었다. 양성 세포(파란색 세포)는 전체 세포의 백분율로 나타내졌다.
- [0180] 면역형광법
- [0181] 세포는 지정된 처리 후 일반적인 밀도로 산-세척된 커버슬립(cover slip) 상에 씨딩(seeding)되었다. 24시간 후, 세포는 4% 포름알데하이드를 사용하여 고정되었고, 0.1% 트리톤-PBS를 사용하여 투과성화되었으며, 적용 가능한 동물 혈청으로 차단되었다. 면역형광은 시트코름 C 항체(EMD Millipore)를 사용하여 미토콘드리아를 시각화하기 위해 수행되었으며, FRAP 항체(Santa Cruz)로 동시 염색되었다. 미토콘드리아도 미토콘드리아표지된 (mitochondrialtagged) GFP(Vector Core, University of Pittsburg)의 렌티바이러스 형질 도입을 사용하여 시각화되었고, 푸로마이신을 사용하여 선택되었다. 적용 가능한 실험 처리 후, 면역형광은 Raptor(Bethyl Laboratories)를 사용하여 미토콘드리아-발현 세포 상에서 수행되었다. 1차 항체 배양 후, 염색은 Alexa-Fluor Secondaries(LICOR Biosciences) 및 핵 염색제로서의 DAPI(10 ng/ml)를 사용하여 수행되었고, VectaShield 장착 배지(Fisher Scientific)를 사용하여 보존되었다. 세포는 동시 위치 사건(co-localization event)의 정량화를 위해 디콘볼루션 또는 공초점 현미경을 사용하여 이미지화되었다.
- [0182] 통계 분석
- [0183] 결과는 적어도 3개의 독립적인 실험의 대표이며, 통계적 유의성은 쌍을 이루지 않은 투-테일드 스튜던트 t-테스트(unpaired two-tailed Student's t-test)을 이용하여 결정되었다. 데이터 집합은 데이터의 정규성 분포를 검증하기 위해 정규성 테스트를 받았다. 본페로니 사후 분석(Bonferroni post-hoc analysis)을 이용한 일원분산분석(One-way Anova)는 대조군, NRTI, 라파마이신, 및 적절한 경우 라파마이신 NRTI가 포함된 여러 비교군 상에서 수행되었다.
- [0184] 제형
- [0185] 본 발명의 예시적인 제한되지 않는 예멸전 제형(이하, "제형 R"이라 칭함)은 약 0.001 중량% 내지 약 1 중량%의 라파마이신, 약 4 내지 6%의 팔미테이트, 약 6 내지 8%의 글리세린, 및 물로 구성된 나머지를 포함한다.
- [0186] 환자에게 투여
- [0187] 진피 위축, 지루 각화증, 광선 각화증, 흑자, 가성반흔, 또는 거친 주름이 진단된, 의사에게 보여진 환자가 본 발명의 조성물의 투여를 위해 선택되었다. 진피 두께는 0.001 mm까지 정확도가 입증된 Mitoutoyo 디지털 캘리퍼스를 사용하여 정량화되었다. 병변(광선 각화증, 가성반흔, 거친 주름)은 중증도에 대한 조사자 평가 등급

(Investigator evaluation rating scale)을 활용하여 평가되었다. 제형 R은 초기 2주 기간 동안 1일당 1 내지 2회 투여를 위한 지시와 함께 환자에게 제공되었다. 환자는 적용 영역에 어떠한 부작용의 징후가 나타날 때 제형 R의 적용을 중단할 것을 권고받았다. 초기 2주 동안의 적용 기간 후, 진피 두께 및 병변 중증도는 매주 모니터링되었다.

[0188] 실시예 1: 뉴클레오사이드/뉴클레오타이드 유사체의 미토콘드리아 효과는 라파마이신에 의해 완화된다.

[0189] TDF 및 FTC(단순화를 위해 NRTI로 칭함)과의 병용 치료의 효과는 인간 심장 및 폐 섬유아세포 둘 다에서, 항-레트로바이러스 치료를 받고 있는 환자의 미토콘드리아 상의 혈청 수준과 관련된 농도에서 평가되었다. 평행 배양물은 1 nM 라파마이신의 부가적인 존재 하에 성장되었다. 이러한 라파마이신의 농도는 복제 수명을 연장시키고, 인간 섬유아세포의 미토콘드리아 프로파일을 향상시키는 것으로 밝혀졌다. 7일 동안의 NRTI에 대한 노출은 인간 심장 섬유아세포의 미토콘드리아 막 전위, 미토콘드리아 ROS 생성, 및 미토콘드리아 양의 유의적인 증가를 생성했다(도 1A 내지 1C). 유사한 결과는 인간 폐 섬유아세포에서 관찰되었다. 또한, 전체 세포 ROS는 섬유아세포 집단 둘 다에서 NRTI에 대한 노출 후에 유의하게 증가되었다(도 1D). 라파마이신의 존재 하에 성장된 배양물은 NRTI에 대한 노출 후 미토콘드리아 막 전위, 미토콘드리아 ROS, 또는 전체 세포 ROS의 동일한 수준의 증가를 보이지 않았다.

[0190] 미토콘드리아 활성의 간접적인 평가는 라파마이신의 존재 하에 표준 배양 배지에서 유지되거나 라파마이신의 존재 하에 유지되는 배양을 사용하여 Seahorse 바이오분석기를 사용해 수행되었다. 계산된 기저 호흡률, 최대 호흡률, ATP-연결된 호흡률, 및 양성자 유출률은 인간 심장 섬유아세포가 NRTI에 노출되었을 때 유의하게 증가되었다(도 1E-1I). 라파마이신-처리된 세포는 NRTI에 노출되었을 때 유의하게 더 낮은 기저 호흡률을 가졌고 기저 또는 최대 호흡률의 증가는 보이지 않았다(도 1F 내지 1G). ATP-연결된 호흡은 NRTI에 대한 노출에 의해 증가되었고, 라파마이신-처리된 배양에서는 감소되었다(도 1H). 또한, 라파마이신-처리된 세포는 NRTI에 대한 노출 후 양성자 유출의 증가를 보이지 않았다(도 1I). 인간 폐 섬유아세포는 동일한 분석을 받을 때 유사한 결과(즉, 기저 및 최대 호흡이 유의하게 증가했고, NRTI로 처리된 세포의 양성자 유출과 마찬가지로)를 나타냈다. 심장 섬유아세포와 유사하게, 라파마이신-처리된 폐 섬유아세포는 NRTI에 대한 노출 후 이러한 매개변수의 증가를 나타내지 않았다.

[0191] 실시예 2: 뉴클레오사이드/뉴클레오타이드 유사체 및 라파마이신에 반응한 전자 전달 사슬 성분의 변경

[0192] 전자 전달 사슬 단백질의 서브세트(subset)의 정상 상태 수준에 대한 NRTI에 대한 노출의 영향이 조사되었다. 복합체 I의 NADH 탈수소효소(유비퀴논) 1 베타 하위 복합체 8(NDUFB8), 복합체 II의 숙시네이트 탈양성자효소(유비퀴논) 황화철 서브유닛(SDHB), 복합체 III의 유비퀴놀-시토크롬 c 환원 효소 코어 단백질 II(UQCRC2), 및 복합체 IV의 시토크롬 c 산화 효소 서브유닛 I(mt-CO1)의 수준은 모두 NRTI에 대한 노출 후 증가하였다(도 2A). 유사하게, 외막 전압 의존성 채널(VDAC)의 정상 상태 수준은 NRTI에 노출된 세포에서 증가한 반면, 대조적으로 ATP 합성효소 알파 서브유닛 1(ATP5A)의 정상 상태 수준은 변하지 않았다(도 2A).

[0193] 라파마이신 처리된 세포는 NDUFB8, SDHB, UQCRC2, 및 mt-CO1의 더 낮은 정상 상태 수준을 나타내지만, ATP5A의 수준은 대조군 세포와 유사했다. 또한, 라파마이신-처리된 세포가 NRTI에 노출되었을 때 ETC 단백질 수준은 상승하지 않았다(도 2A).

[0194] 미토콘드리아 소거(clearance)에 관여되는 단백질인 Pink 1 및 Parkin의 수준도 조사되었다(도 2B). NRTI에 대한 노출은 Pink1 및 Pink1의 절단된 형태의 증가뿐만 아니라 Parkin의 감소도 야기했다. 오토파지 카르고 로딩 단백질인 p62/SQSTM1의 수준은 NRTI에 반응하여 증가했지만, 라파마이신에 반응하여 감소했다(도 2C).

[0195] 미토콘드리아-관련된 유전자 발현의 차이는 증폭의 부재 하에 mRNA 종의 다중 평가를 허용하고 mRNA 분자의 직접적인 계수를 제공하는 나노스트링 접근법을 사용하여 조사되었다. 모든 서브유닛에 대한 mRNA 수준이 NRTI에 노출된 세포에서 증가한 바와 같이 mRNA 수준은 단백질 수준에서 관찰된 변화와 평행한 반면, 라파마이신은 모든 서브유닛에 대한 mRNA 수준을 감소시켰다(도 2D 내지 2H).

[0196] 실시예 3: 미토콘드리아 기능 장애에 대한 노화 반응 및 라파마이신에 의한 보호

[0197] 노화 프로그램의 분자 마커는 NRTI에 대한 노출 후 조사되었다(도 3A 내지 3F). p53, p21, 및 p16의 수준은 NRTI에 노출된 섬유아세포에서 증가한 반면, 라파마이신 처리된 세포에서는 이러한 노화 연관된 단백질의 수준은 증가하지 않았다(도 3A). 또한, 노화 동안 감소하는 것으로 알려진 라민 B1의 수준은 NRTI에 대해 노출된 세포에서 감소되었다. 라파마이신은 이러한 감소를 방지했다(도 3A). 또한, 노화 연관된 분비 프로그램의 성분인 IL-6의 세포 내 수준은 NRTI에 대한 노출 후 증가했다. 노화 프로그램의 블록과 일치하게, 라파마이신 처리된

세포는 NRTI에 대한 노출 후 IL-6의 수준 증가를 나타내지 않았다(도 3A). NRTI에 대한 노출 후 노화 마커인 노화 연관된 β -갈락토스분해효소(SA- β -gal)을 발현하는 세포 집단의 비율이 조사되었다. SA- β -gal을 발현하는 심장 섬유아세포의 비율의 투여량 의존성 증가가 관찰되었다(10 또는 20 ug/ml의 NRTI에 노출된 세포에서의 각각의 28% 및 48%와 비교하여 대조군 세포에서의 9%, 도 3B). 대조적으로 라파마이신 처리된 배양은 SA- β -gal의 증가를 나타내지 않았다(도 3B). p21 및 라민 B1에 대한 mRNA 수준의 나노스트링에 의한 분석은 정상 상태 mRNA 수준이 단백질 수준과 평행하게 변화했고, 라민 B1 mRNA 수준은 유의하게 감소한 반면, p21 mRNA가 유의하게 NRTI에 반응하여 증가했다는 것을 보여줬고(도 3C 내지 3D), 이는 복제성 노화 동안 p21 및 라민 B1에 대한 영향과 유사했다(도 3E 내지 3F).

[0198] 폐 섬유아세포는 노화 마커 및 라파마이신 치료로 인한 보호 면에서 NRTI에 대한 반응의 동일한 변화를 나타냈다. 임의의 테스트된 조건 하에서 생체 염료 배제 검정(vital dye exclusion assay)에 의해 판정된 바와 같이 NRTI에 노출된 세포의 생존력은 감소하지 않았고, 카스파제 분해와 같은 세포자멸사(apoptosis)의 뚜렷한 마커는 없었다. 알칼리성 코멧 검정(alkaline comet assay)은 DNA 손상 증가의 증거를 나타내지 않았으며, 이는 NRTI에 대한 반응이 DNA 손상으로 인한 것이 아니라 주로 성장 억제였음을 나타낸다. p53과 이의 주요 조절자인 MDM2 사이의 상호작용도 NRTI에 대한 노출 후 조사되었다. NRTI에 대한 노출은 p53과 MDM2 사이의 연관을 감소시켰고, 세린 166에서 MDM2 인산화를 증가시켰다. 또한, 프로테아좀 억제제의 사용은 라파마이신-처리된 배양에서 현저했지만 NRTI에 대한 노출 후 감소된 p53의 높은 분자량 형태를 보였다.

[0199] NRTI-유도된 노화 반응에서 미토콘드리아 ROS의 역할은, 대조군 배양(라파마이신 없이 성장된)을 미토콘드리아 ROS를 표적하는 ROS 스캐빈저인 mito-Q로 처리하거나 미토콘드리아 표적된 과산화수소분해효소(mt-과산화수소분해효소)를 심장 섬유아세포로 도입하여 처리함으로써 조사되었다. Mito-Q는 NRTI에 대한 노출 후 미토콘드리아 ROS 생산 및 노화-연관된 단백질인 p53, p21, 및 p16의 증가 둘 다를 개선시켰다(도 4A). 또한, SA- β -gal 염색에 양성인 세포의 비율은 mito-Q로 처리된 세포에서 감소되었다(도 4B). mt-과산화수소분해효소 구조체에 의해 감염되었을 때 유사한 결과가 얻어졌다. NRTI에 대한 노출 후 노화-연관된 단백질인 p16 및 p21의 증가가 방지되었고, SA- β -gal에 양성인 세포 염색의 비율이 유의하게 감소되었다(도 4C 내지 4D). 항산화제 트롤록스 및 N-아세틸시스테인의 조합(트롤록스/NAC)으로의 NRTI에 대해 노출된 세포의 처리는 노화의 유도도 방지했다. 노화의 마커는 SA- β -gal 발현과 p16 및 p21의 수준을 포함하여 감소된 반면, 라민 B1의 수준은 노화 프로그램의 억제와 일치하게 유지되었다(도 4E 내지 4F).

[0200] **실시예 4: 노화에서의 mTORC1/p70S6K 신호 전달의 활성화**

[0201] p70S6K에 의해 매개되는 MDM2 인산화가 NRTI에 대한 세포 내 반응의 성분일 가능성이 조사되었다. NRTI에 대한 노출은 p70S6K 활성화(리보솜 S6 단백질의 인산화 상태를 조사함으로써) 및 MDM2의 인산화 상태 둘 다를 증가시켰다는 것이 먼저 확인되었다. 리보솜 S6 단백질 및 MDM2 둘 다의 인산화는 NRTI에 대한 노출 후 심장 섬유아세포에서 증가되었다(도 5A). 노화의 억제와 일치하게, 라파마이신-처리된 배양은 리보솜 S6 인산화의 완전한 결핍을 나타냈고, MDM2 인산화의 증가를 나타내지 않았다(도 5A). 이러한 환경에서 MDM2 인산화에서 p70S6K의 역할은 특정한 p70S6K 억제제인 PF-4708671을 사용하여 조사되었다. NRTI에 반응한 MDM2의 인산화는 억제제의 양성 대조군으로서 작용하는 리보솜 S6 단백질의 인산화와 마찬가지로 PF-4708671에 의해 억제되었다(도 5B).

[0202] NRTI에 노출된 세포에서 리보솜 S6 및 MDM2 인산화 상의 MAPK의 억제제의 영향도 조사되었다. NRTI에 노출된 세포는 MAPK 신호 전달 경로의 3종의 억제제인 MEK1(U0126), Raf1(GW5047), 및 p90RSK(BI-D1870)로 처리되었다. 3개의 MAPK 억제제 모두는 리보솜 S6 인산화의 일부 감소를 야기했지만, p90RSK 억제제인 BI-D1870은 가장 큰 영향을 가졌다(도 5C). 대조적으로, p38 스트레스 활성화된 인산화효소인 SB-203580은 리보솜 단백질 S6 또는 MDM2의 인산화에 영향을 미치지 않았다(도 5D). NRTI에 반응하여, 라파마이신, p70 S6 인산화효소 억제제, p90RSK의 억제제, 및 트롤록스/NAC의 리보솜 S6 및 MDM2 인산화 사건에 대한 영향은 인간 폐 섬유아세포에서 확인되었다.

[0203] ROS에 대한 NRTI-유도된 p70S6K 활성화의 의존성은 NRTI에 노출된 세포를 트롤록스/N-아세틸시스테인으로 처리하고 리보솜 S6 인산화로 조사함으로써 조사되었다. 리보솜 S6 인산화 및 MDM2 인산화 둘 다는 NRTI에 노출된 세포가 트롤록스/N-아세틸시스테인으로 처리될 때 감소되었다(도 5C). NADPH 산화효소 시스템의 관여는 NADPH 산화효소의 억제제인 아포시아닌을 사용하여 조사되었다. 그러나, NRTI-노출된 세포의 아포시아닌으로의 처리는 리보솜 S6 인산화의 증가를 방지하지 않았다. p7-S6 인산화효소 및 MDM 인산화 면에서 유사한 결과는 인간 폐 섬유아세포가 NRTI에 노출되었을 때 얻어졌다.

[0204] mTOR 활성화의 활성화에서 미토콘드리아 ROS의 잠재적인 역할을 조사하기 위해, 세포는 NRTI에 대한 노출 동안

mito-Q로 또는 NRTI에 대한 노출 전에 mt-과산화수소분해효소 아데노마이러스로 처리되었다. 이러한 개입, mito-Q 및 mt-과산화수소분해효소의 발현 둘 다는 NRTI에 대한 노출 후 리보솜 S6 인산화 및 MDM2 인산화를 감소시켰다(도 6A 내지 6B). 또한, mito-Q 처리된 세포는 미토콘드리아 활성을 평가하기 위해 Seahorse 바이오분석기로 평가되었다. 이러한 평가는 mito-Q 처리가 기저 호흡, ATP-연결된 호흡, 및 양성자 누출의 증가를 부분적으로 완화시킨 반면, 최대 호흡은 덜 영향받았다는 것을 나타냈다(도 6C 내지 6F). 또한, mito-Q 처리된 세포는 NRTI에 노출되었을 때 미토콘드리아 ROS의 더 낮은 수준을 나타냈다(도 6G).

[0205] 증가된 ROS가 리보솜 S6 단백질의 인산화를 직접적으로 유도할 수 있는지 여부를 결정하기 위해, 심장 섬유아세포는 mTORC 활성에 영향을 미칠 수 있는 성장 인자 신호 전달을 파괴하기 위해 무혈청 배지에서 48시간 동안 위치되었다. 그 다음 세포는 과산화수소에 1 내지 400 μM 범위 내의 농도에서 2시간 동안 노출되었다. 리보솜 S6 인산화 및 MDM2 인산화 둘 다는 과산화수소의 낮은 농도에서 증가되었고, 50 μM 에서 최대 활성을 가졌으며, 리보솜 S6 인산화 및 MDM2 인산화의 역제는 100 μM 초과 농도에서 발생했다(도 7A). 증식 반응과 일치하는 혈청 반응과 다른 과산화수소에 대한 반응은 MDM2가 아니라 리보솜 S6 단백질의 인산화를 유도했다(도 7A, 맨 오른쪽). 미토콘드리아 ROS의 도입이 mTOR 신호 전달의 활성화를 유도할 수 있는지 여부를 결정하기 위해, 세포는 일정 농도 범위의 로테논에 노출되었으며, 리보솜 S6 단백질의 인산화가 조사되었다. 나노 몰 농도의 로테논에 대한 세포의 노출은 50 nM에서 발생하는 S6 인산화의 급격한 억제에 갖는 S6 인산화 증가를 유도한다(도 7B).

[0206] **실시예 5: 미토콘드리아 스트레스에 반응하는 mTORC1과 미토콘드리아의 연합**

[0207] 미토콘드리아의 mTORC1 복합체와의 연합이 세포가 NRTI에 노출되었을 때 향상될 가능성은 미토콘드리아-표적 서열(mt-GFP)에 융합된 초록색 형광 단백질을 발현하는 인간 섬유 아세포를 사용하여 조사되었다. 이러한 세포는 NRTI에 노출되었으며, mTORC1-특이적 성분인 Raptor를 인식하는 항체를 사용하여 면역형광을 위해 고정되었다. NRTI에 노출된 세포에서, Raptor는 처리되지 않은 세포에서보다 더 높은 정도로 미토콘드리아와 연합되었다(도 8A 내지 8C).

[0208] 노화에서의 미토콘드리아 ROS의 역할은 노화된 심장 섬유아세포를 미토콘드리아 ROS 스캐빈저인 mito-Q로 또는 미토콘드리아 표적된 과산화수소분해효소를 도입하여 처리함으로써 조사되었다. 처음에, 미토콘드리아 및 전체 세포 ROS의 수준은 후기 계대 세포에서 조사되었다. 이러한 평가는 후기 계대 세포에서 미토콘드리아 ROS 및 전체 세포 ROS의 상승된 수준을 나타냈다(도 9A 내지 9B). 미토콘드리아 활성의 Seahorse 바이오분석기에 의한 평가는 고립된 미토콘드리아를 사용한 노화된 세포에서의 이전의 연구와 일치하는 상승된 호흡을 나타냈다. 바이오분석기 분석은 기저 및 ATP-연결된 호흡률은 양성자 누출과 마찬가지로 초기 계대 세포와 비교할 때 노화된 세포에서 유의하게 증가했음을 나타냈다(도 9C 내지 9G).

[0209] 복제성 노화 동안 리보솜 S6 및 MDM2 인산화의 점진적인 증가는 심장 섬유아세포에서 확인되었다(도 9H). 노화된 세포에서 리보솜 S6 단백질의 인산화의 ROS에 대한 의존성을 테스트하기 위해, 노화된 세포는 ROS 스캐빈저인 트롤록스 및 N-아세틸시스테인으로 처리되었다. 동시에, mt-과산화수소분해효소는 미토콘드리아 ROS 생성을 낮추기 위해 노화된 세포로 도입되었다. 이러한 개입 둘 다는 노화된 섬유아세포의 전형적인 리보솜 S6 인산화의 높은 기저 수준을 감소시켰고 인산화된 MDM2의 수준을 감소시켰다. 또한, p90RSK 억제제인 BI-D1870으로의 처리도 노화된 세포에서 리보솜 S6 및 MDM2 둘 다를 감소시켰다(도 9I).

[0210] **실시예 6: 라파마이신의 생체 내 국소 적용**

[0211] 단일 위치 개방 표지 연구(single site open label study)가 수행되었다. 손 상에 진피 위축 및 광선 각화증의 영역을 보인 환자는 제형 R의 적용에 대하여 평가되었다. 진피 두께는 유사하지만 광선 각화증이 없는 반대편 손이 대조군으로서 사용되었다. 환자는 1일 2회 적용을 지시와 함께 제형 R을 제공받았다.

[0212] 2주(14일) 기간 후, 광선 각화증 및 진피 비후 둘 다는 환자에 의해 스스로 보고되고 연구 직원에 의해 발견된 개선의 징후를 나타냈다. 진피 두께의 평가는 약 20%의 진피 두께 증가를 나타냈다(1.6 SD 0.13 비처리군 대 1.9 SD 0.19 처리군). 광선 각화증은 3점에서 2점으로 개선되었다. 14일 후속 방문 시 부작용의 증거는 관찰되지 않았고 환자에 의해 보고되지 않았다. 초기 14일 기간을 넘어서의 제형 R의 지속적인 적용은 지속적인 이익을 제공하지만, 라파마이신이 없는 담체 제형의 투여는 반대편 손의 진피 두께에 영향을 미치지 않는다.

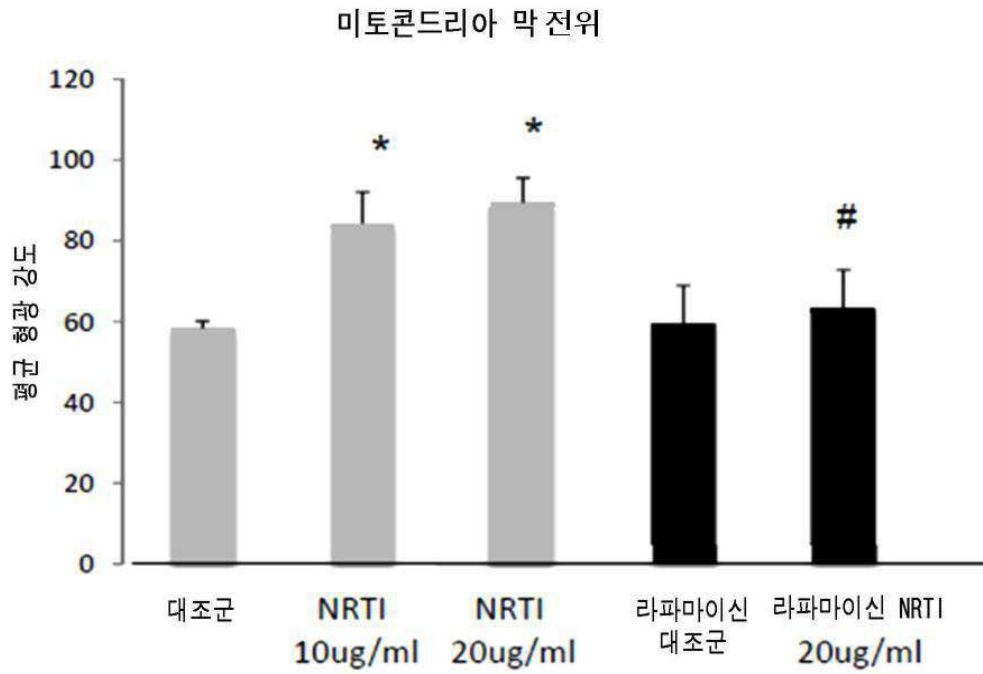
[0213] 본원에 인용된 각각의 및 모든 특허, 특허 출원, 및 공개 문헌의 개시는 그 전체가 본원에 참고로 포함된다.

[0214] 본 발명은 특정 양태를 참조로 하여 개시되었지만, 본 발명의 다른 양태 및 변형이 본 발명의 진정한 사상 및 범위를 벗어나지 않고 당업자에 의해 고안될 수 있다는 것은 자명하다. 첨부된 청구범위는 이러한 모든 양태 및

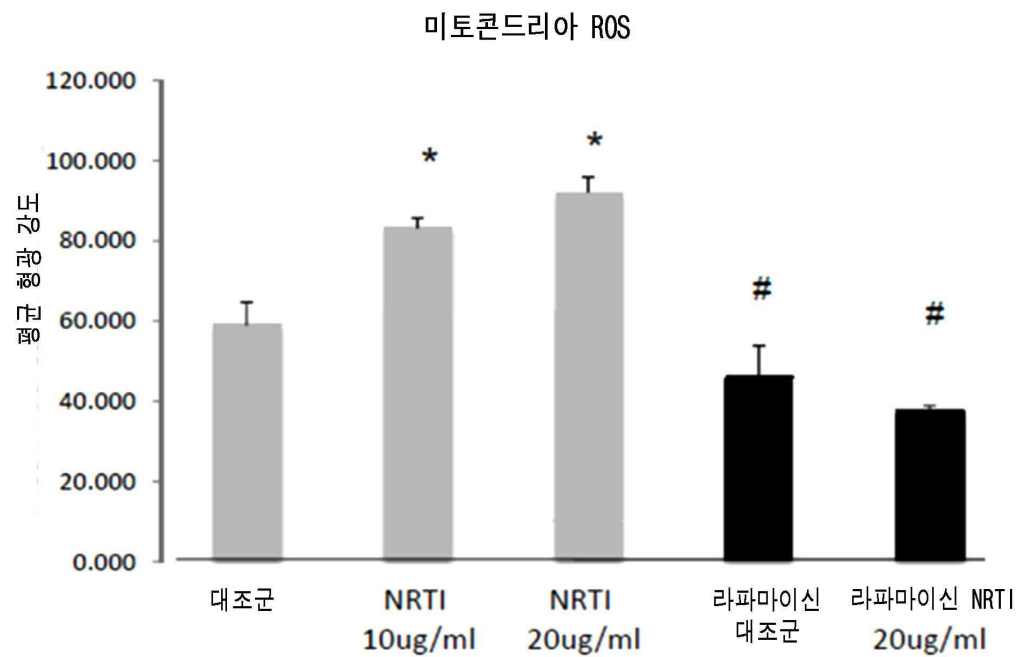
균등한 변형을 포함하는 것으로 해석되도록 의도된다.

도면

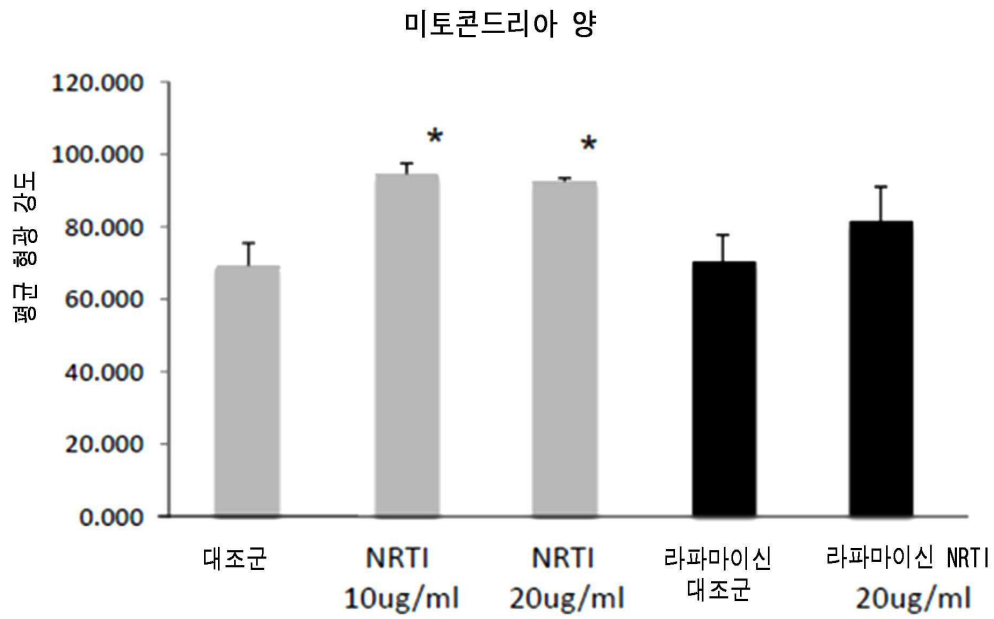
도면1a



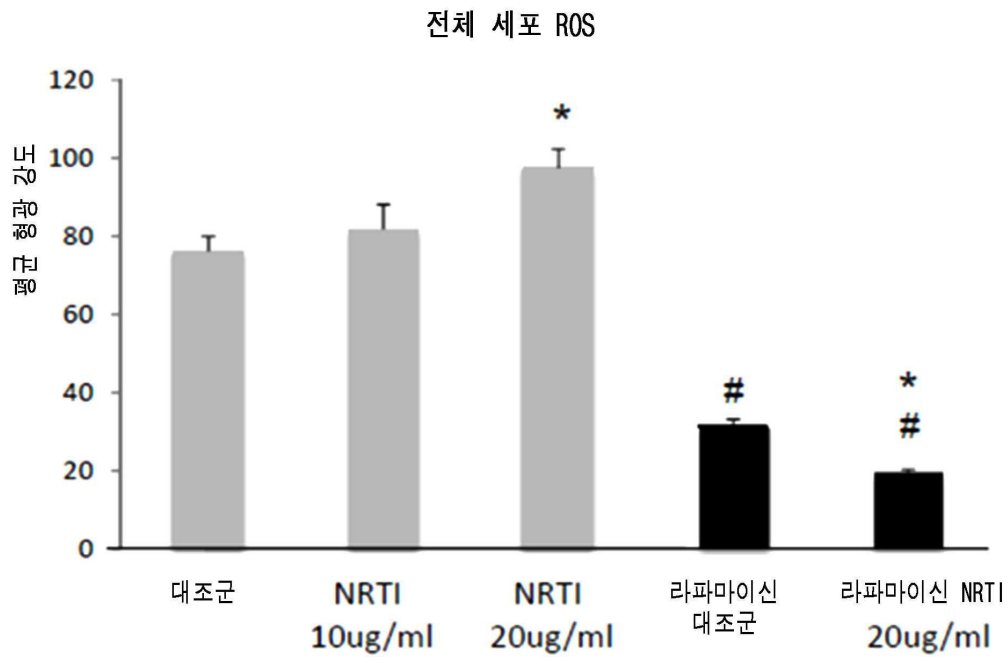
도면1b



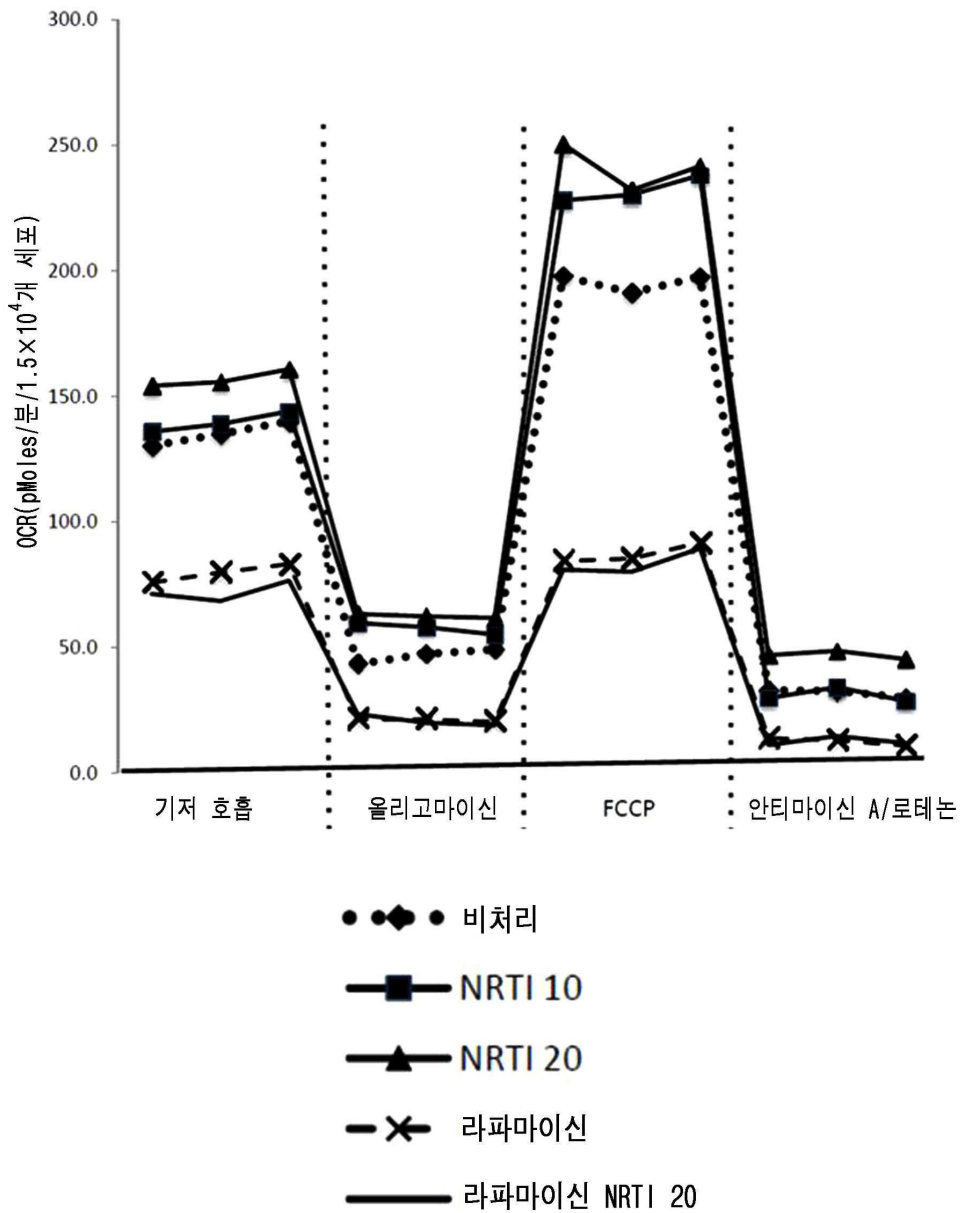
도면1c



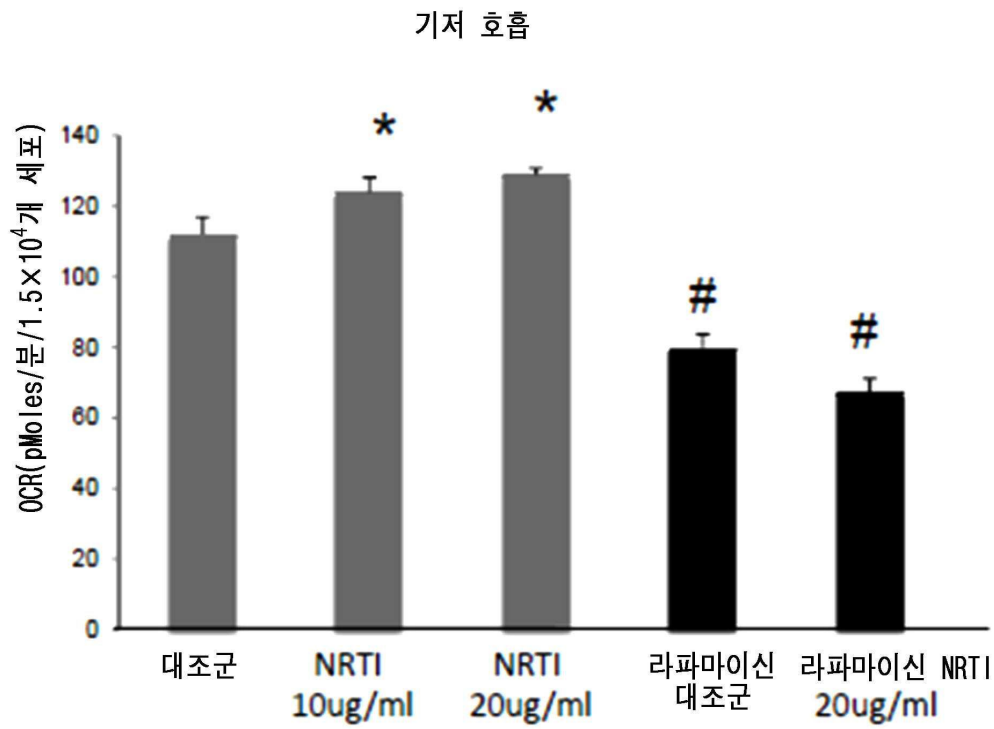
도면1d



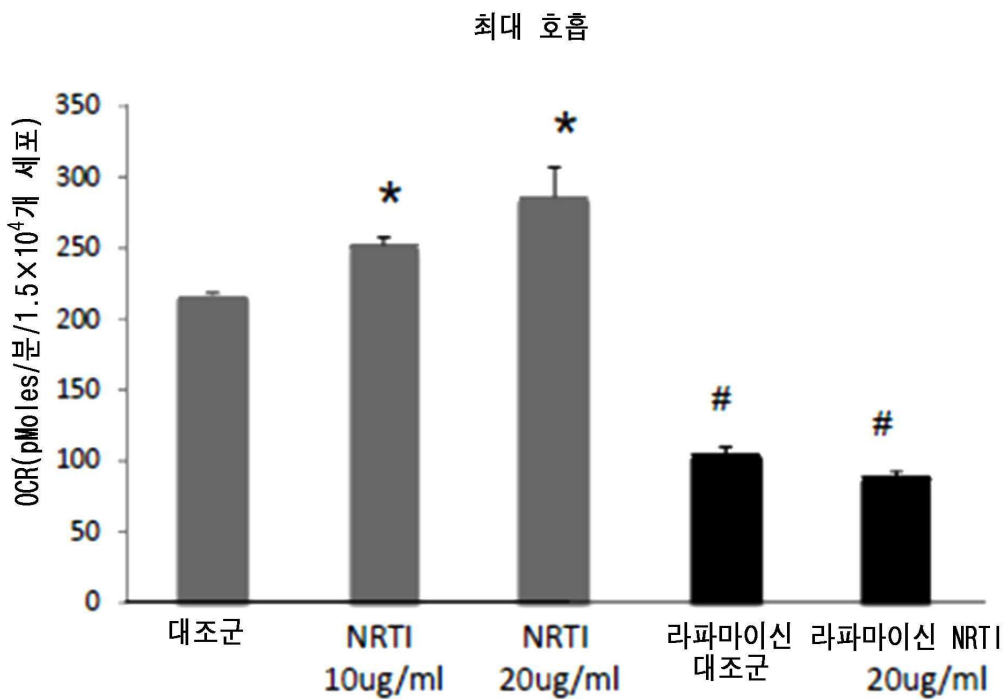
도면1e



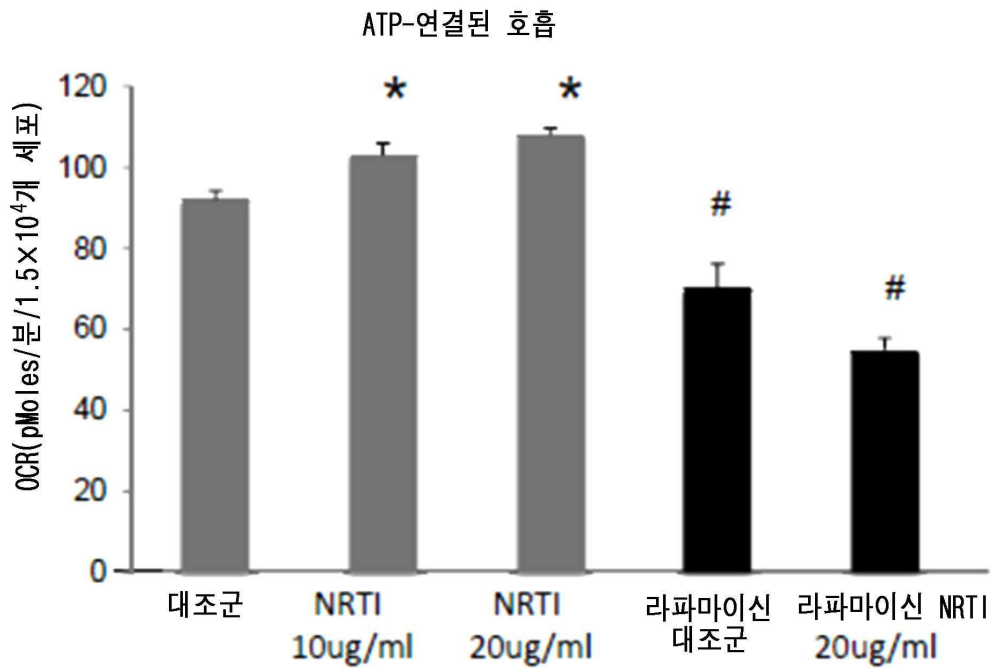
도면1f



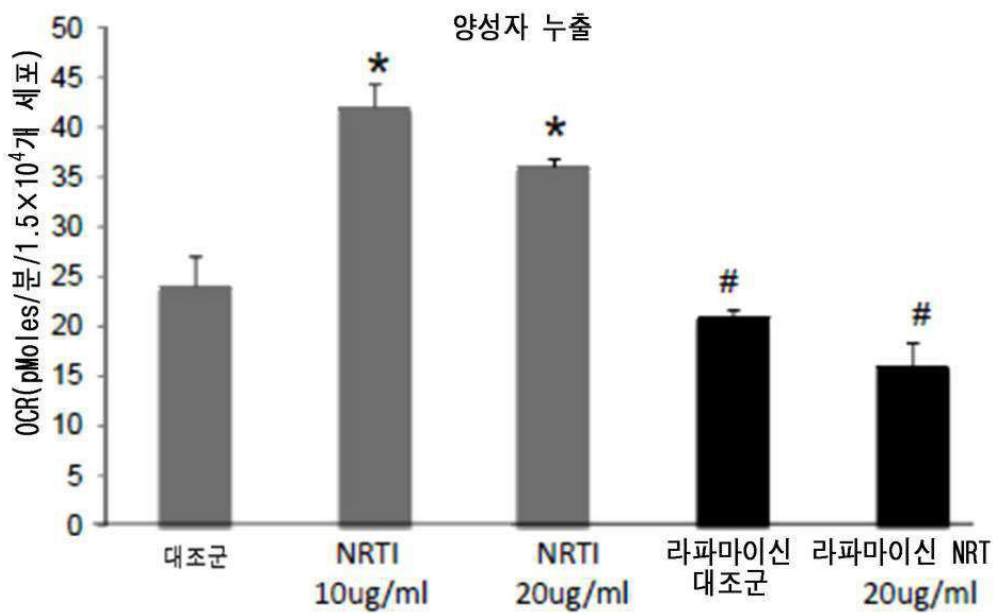
도면1g



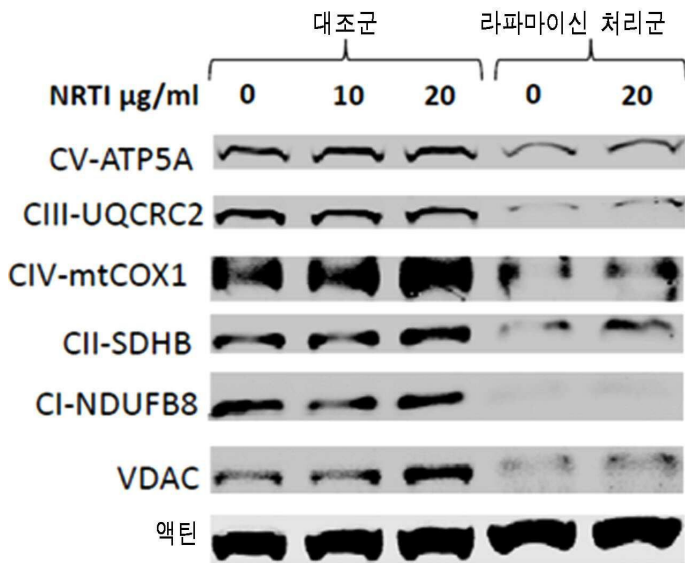
도면1h



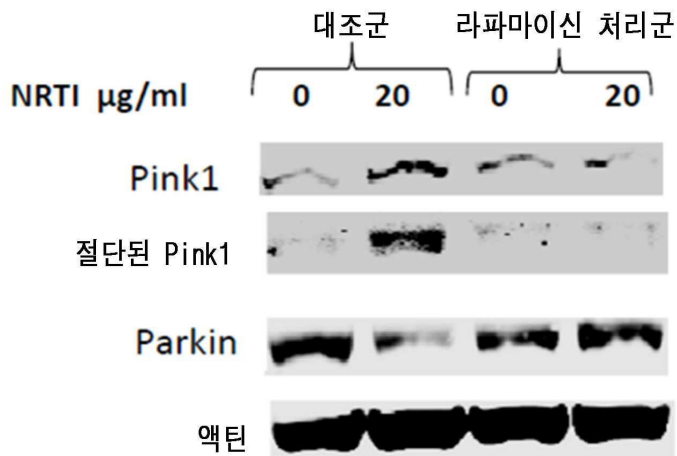
도면1i



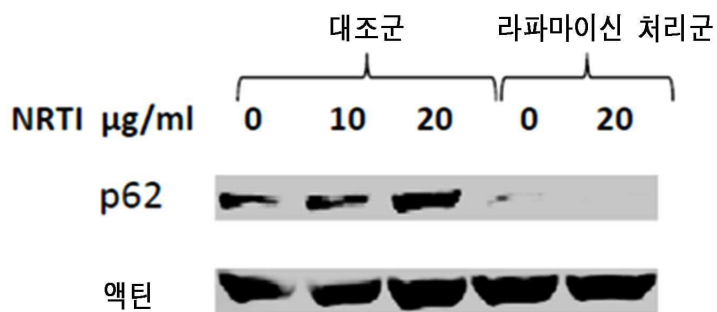
도면2a



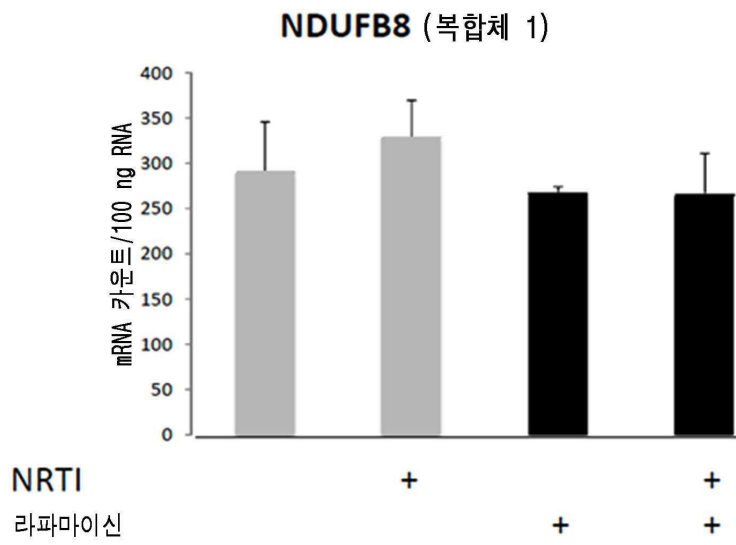
도면2b



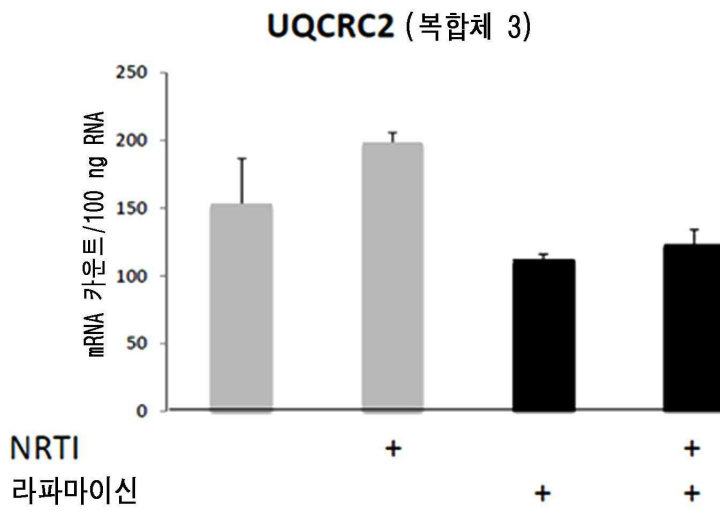
도면2c



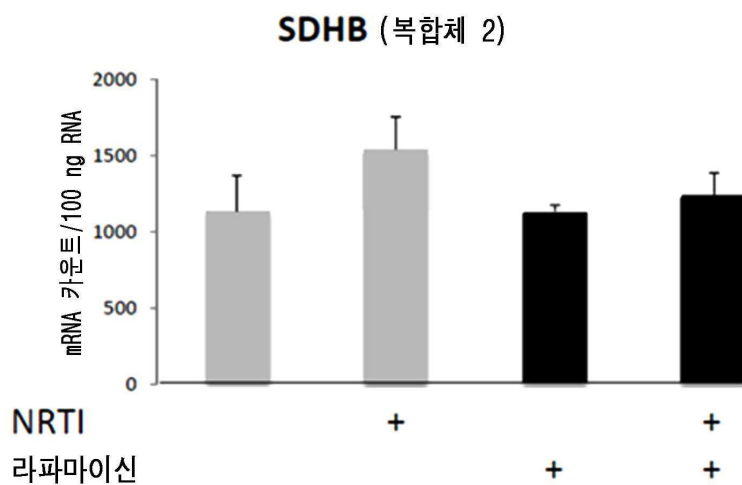
도면2d



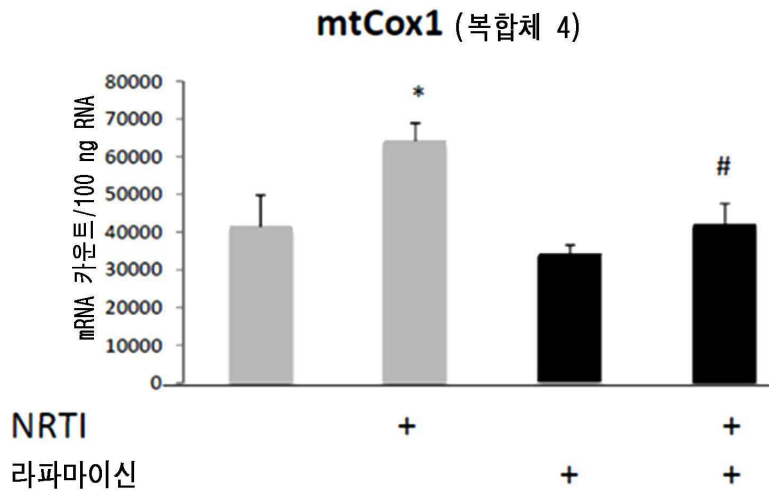
도면2e



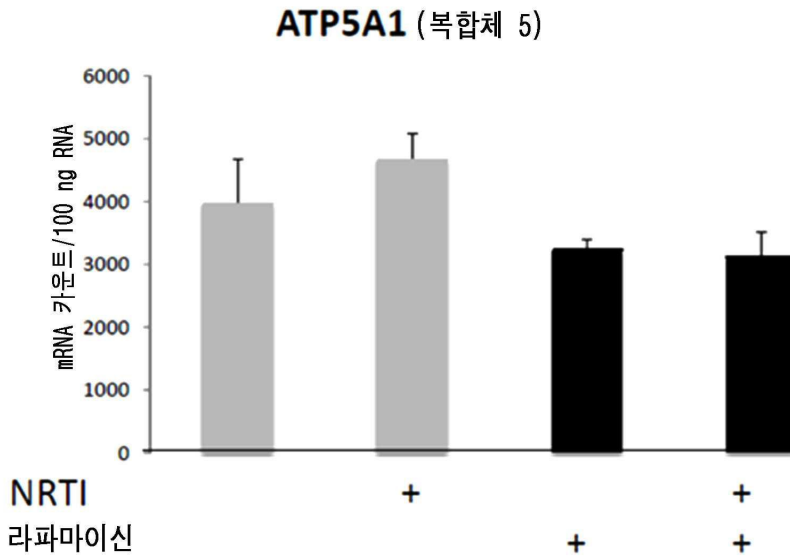
도면2f



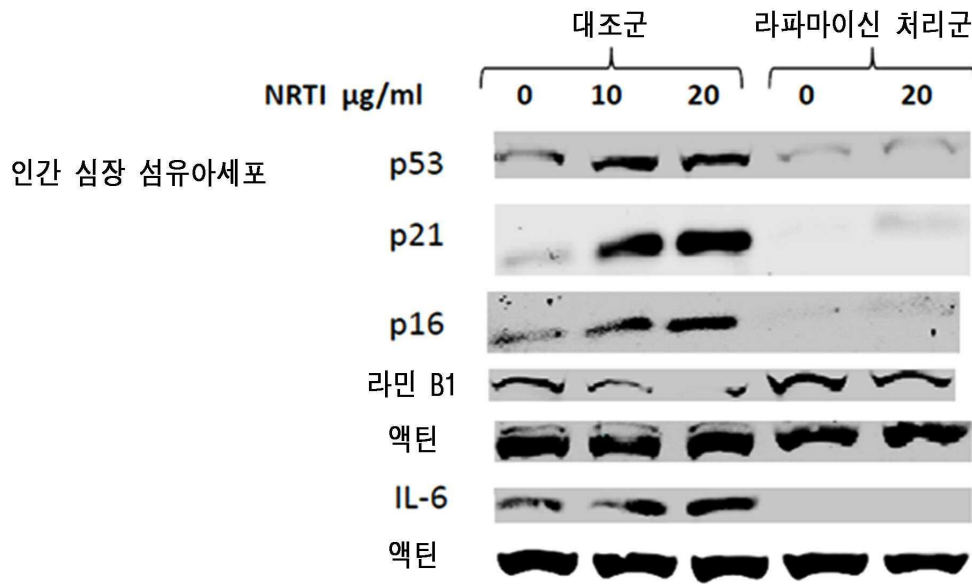
도면2g



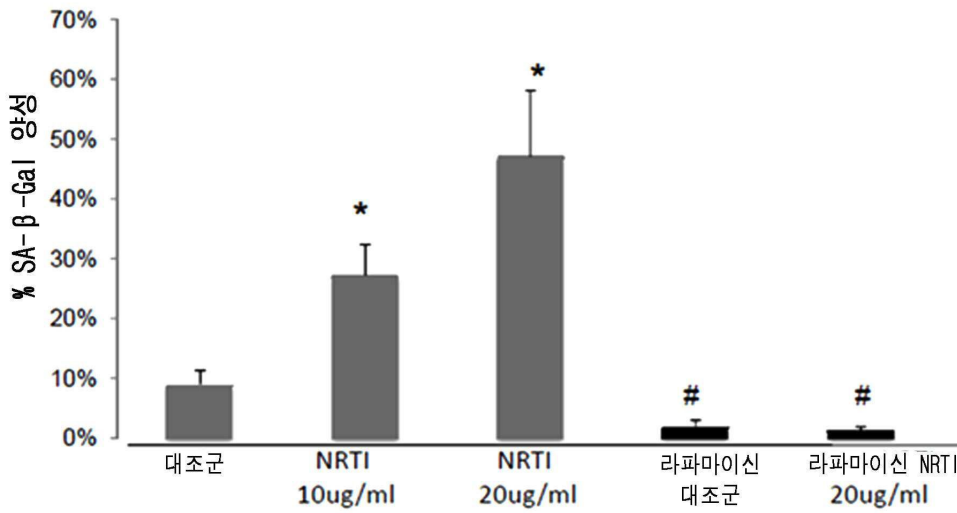
도면2h



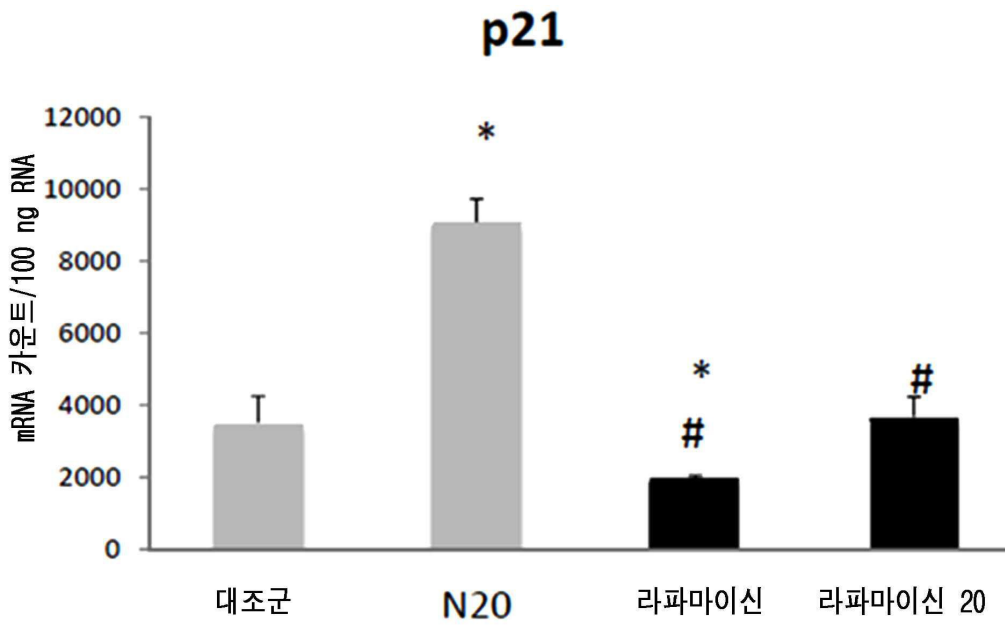
도면3a



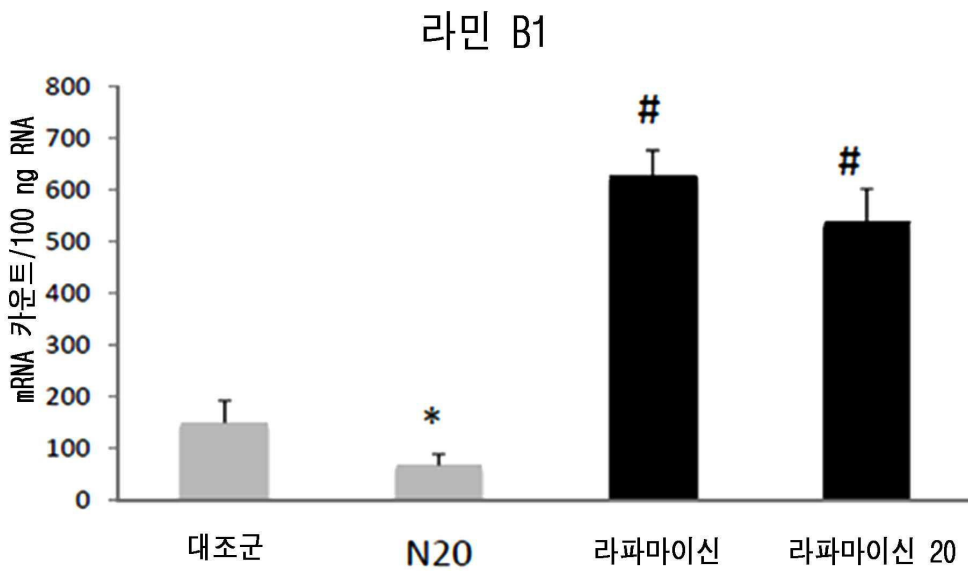
도면3b



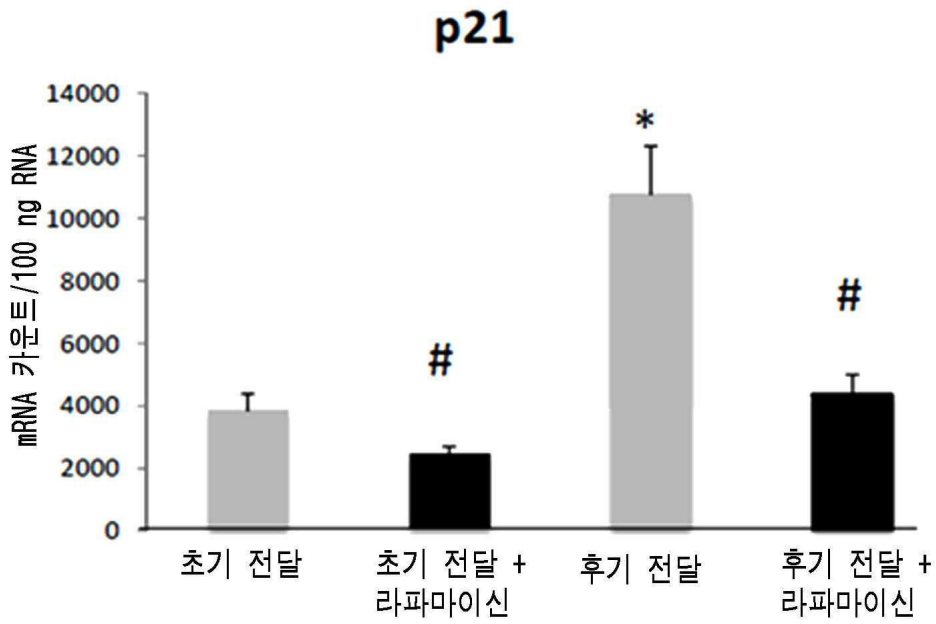
도면3c



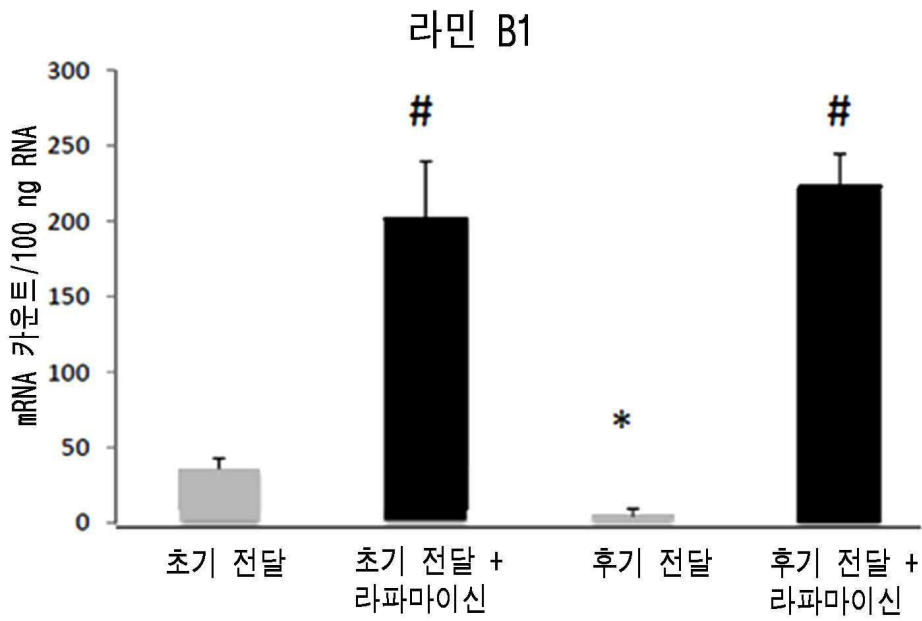
도면3d



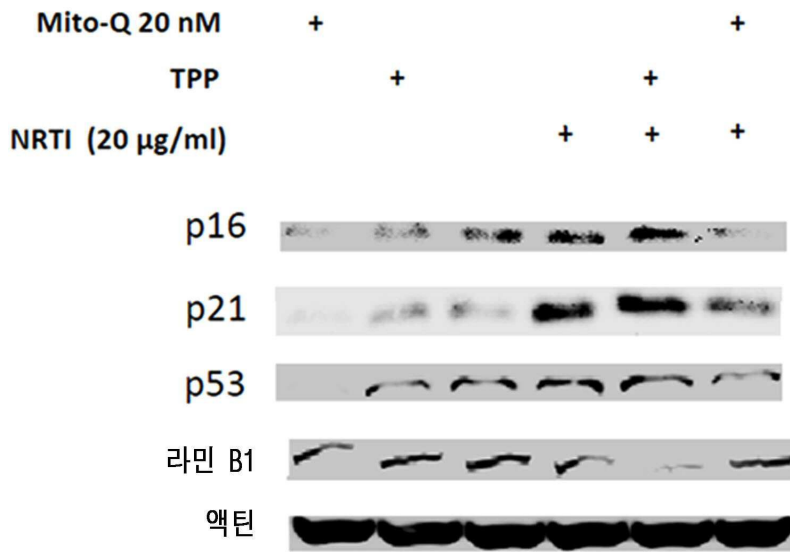
도면3e



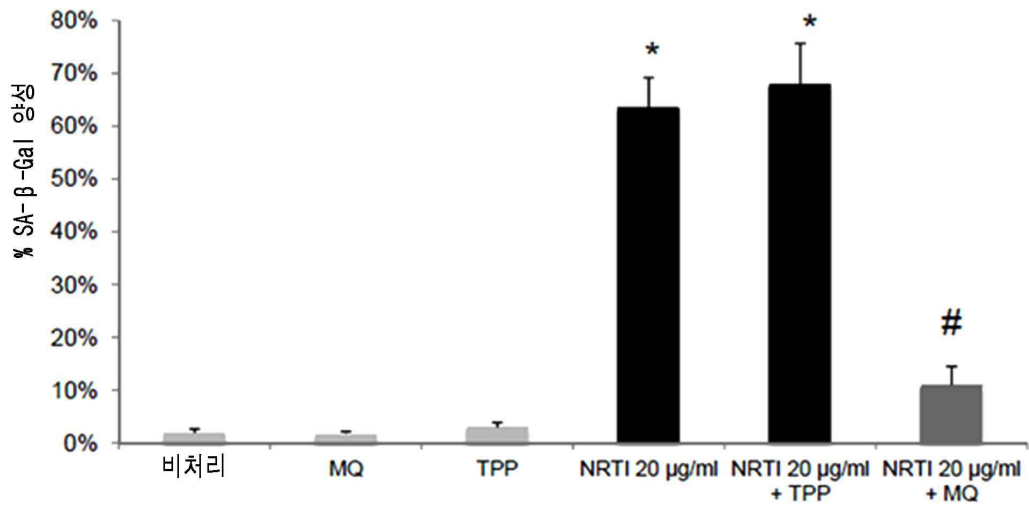
도면3f



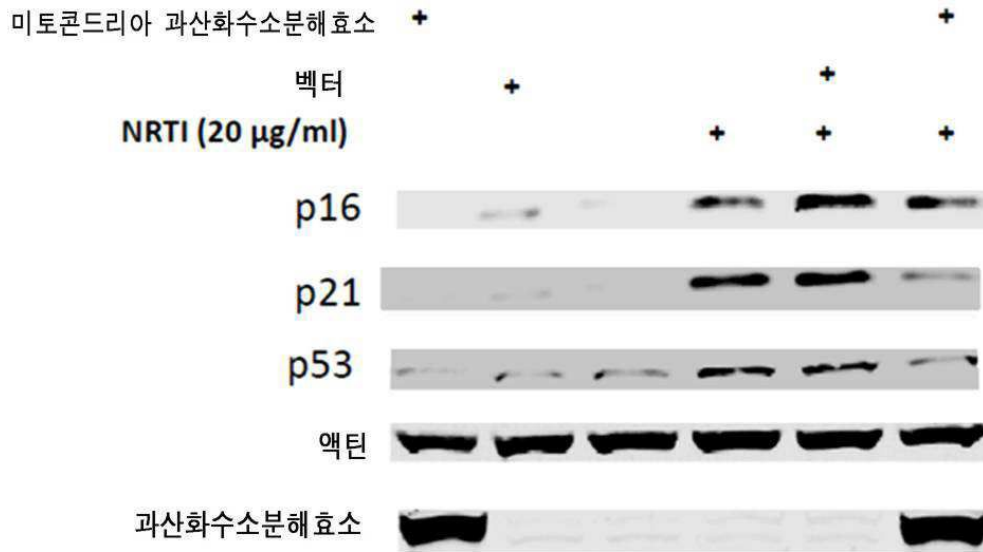
도면4a



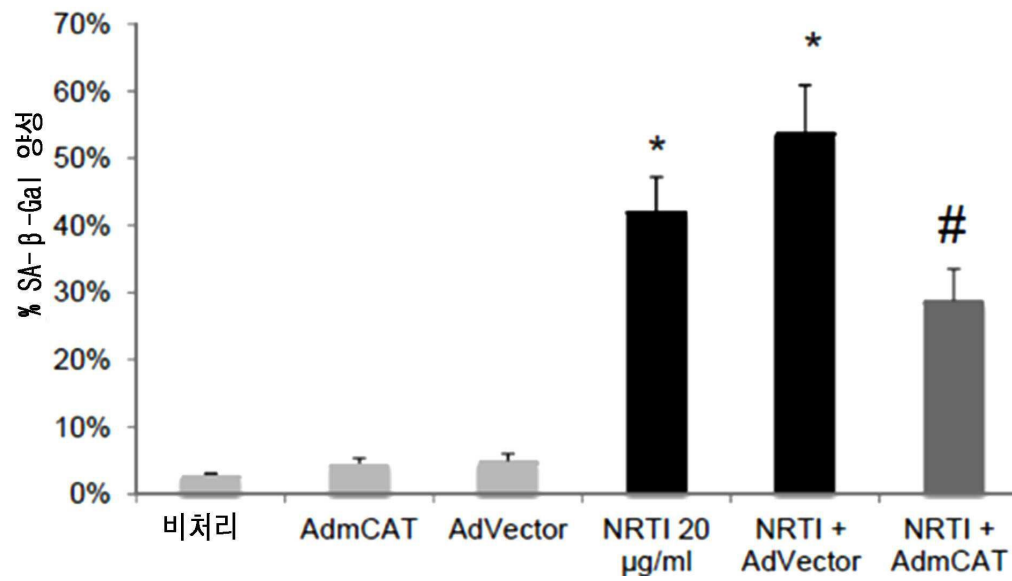
도면4b



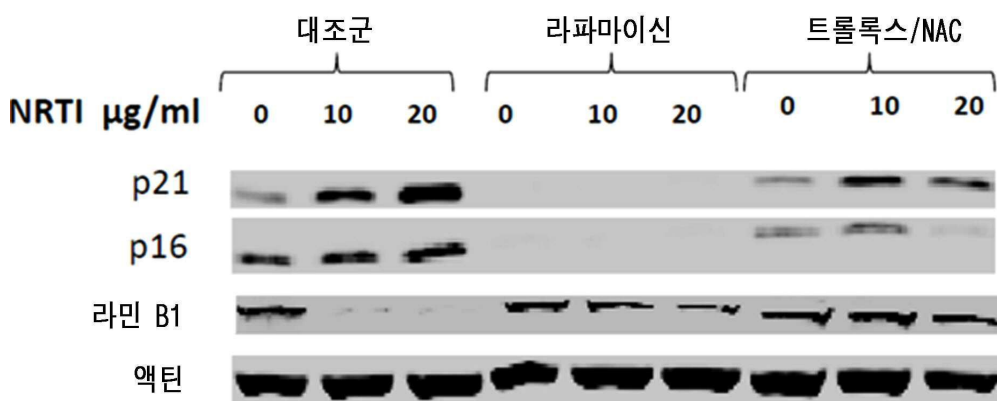
도면4c



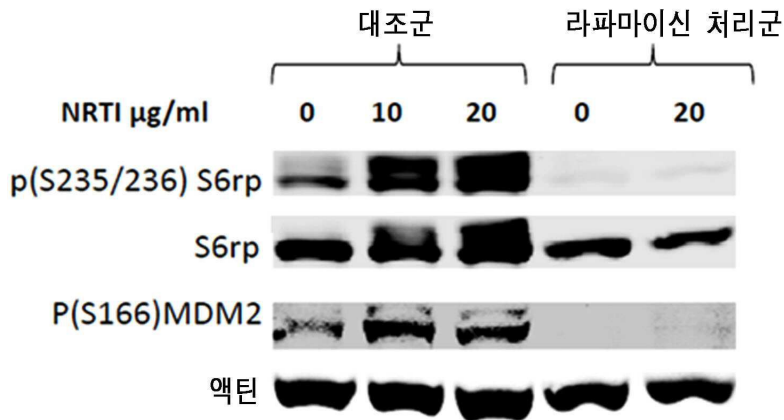
도면4d



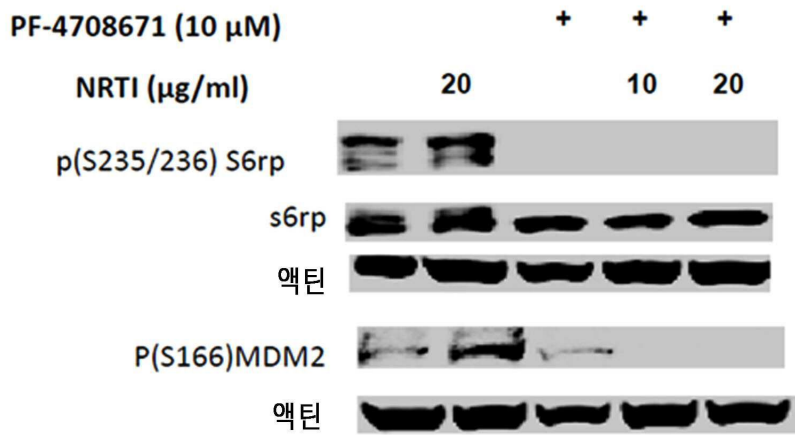
도면4e



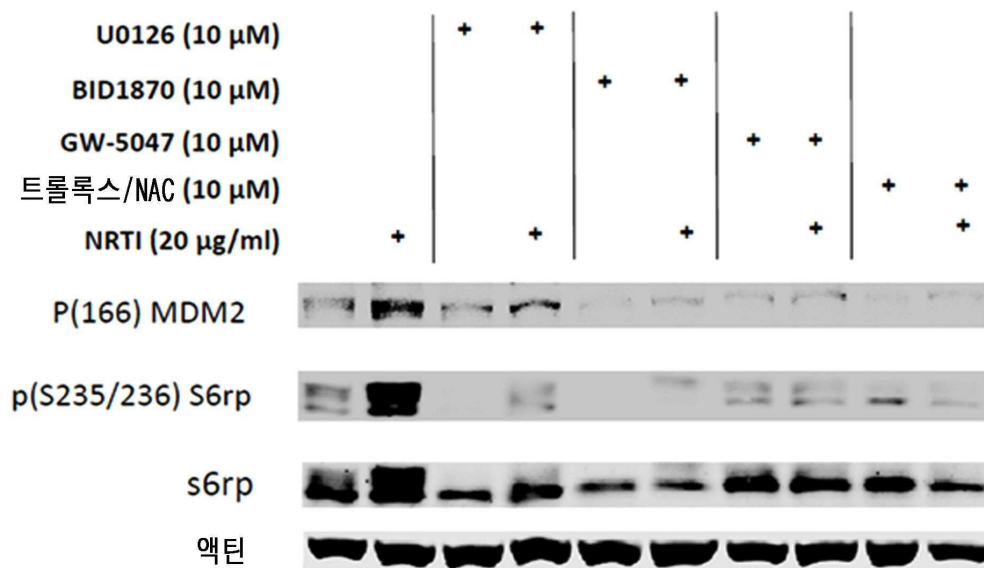
도면5a



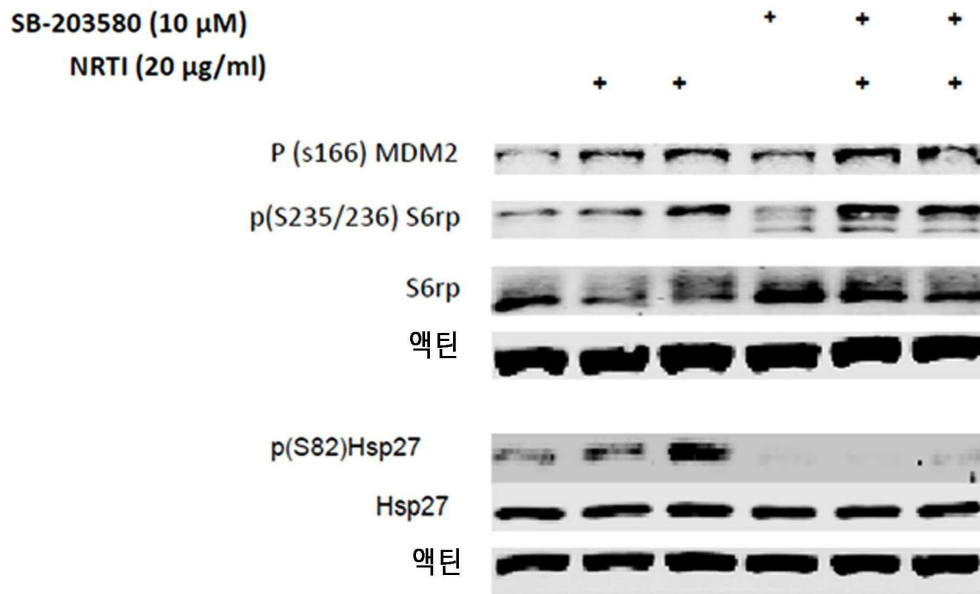
도면5b



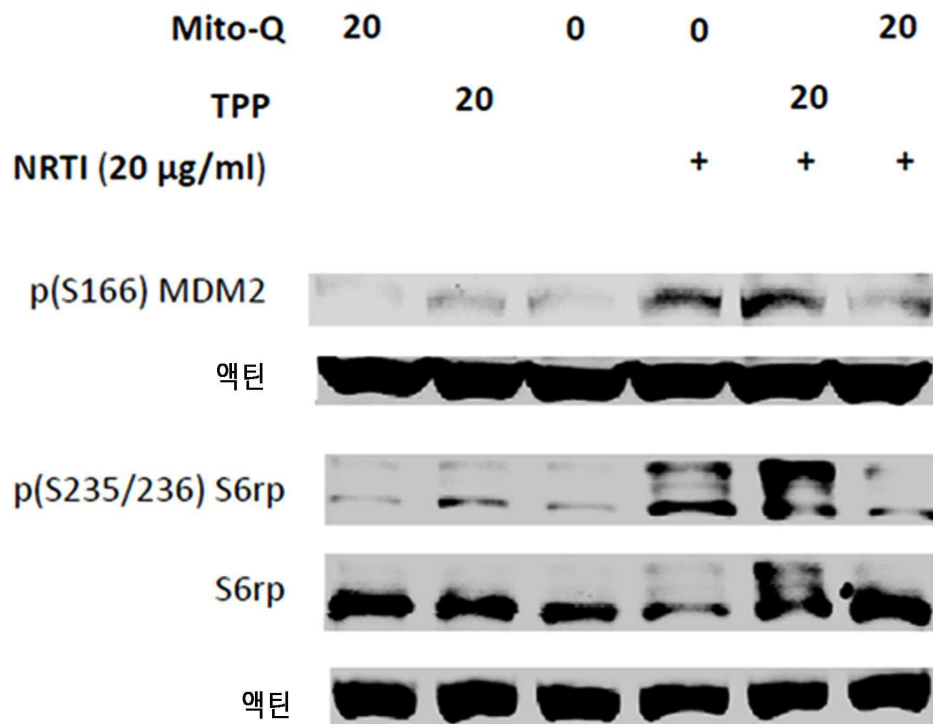
도면5c



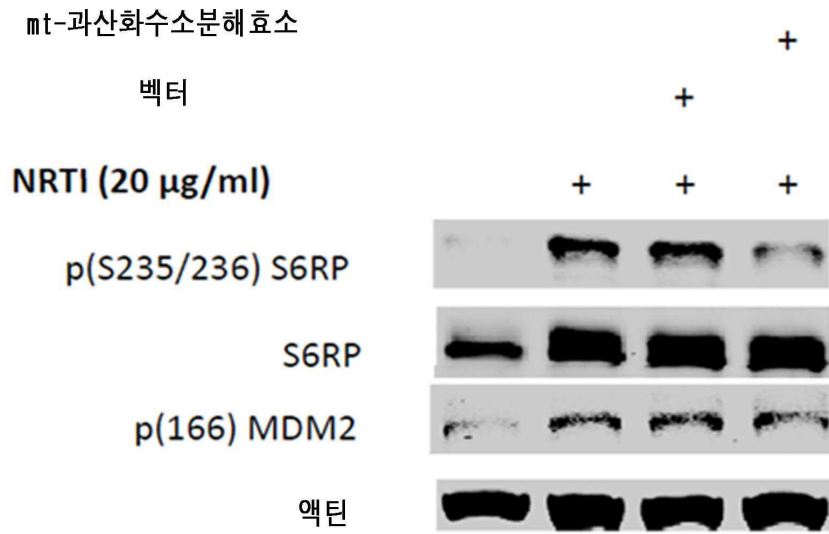
도면5d



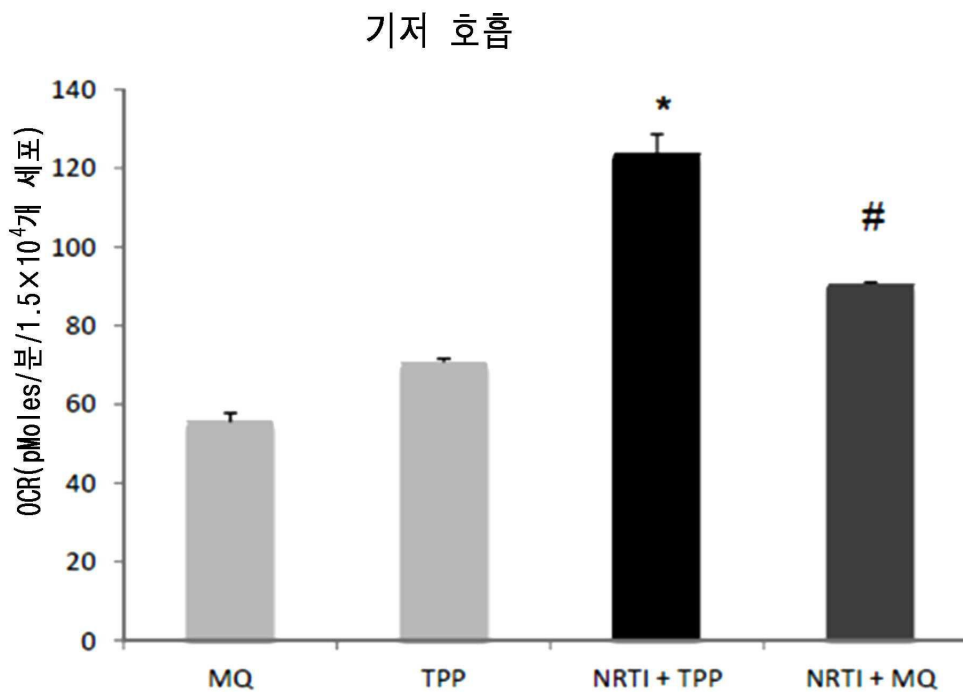
도면6a



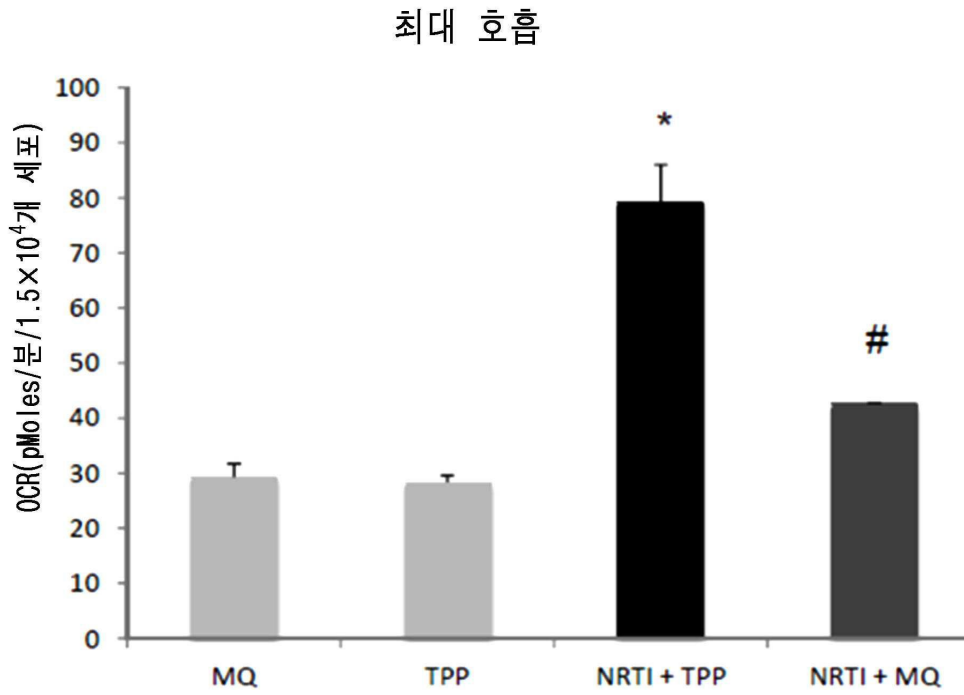
도면6b



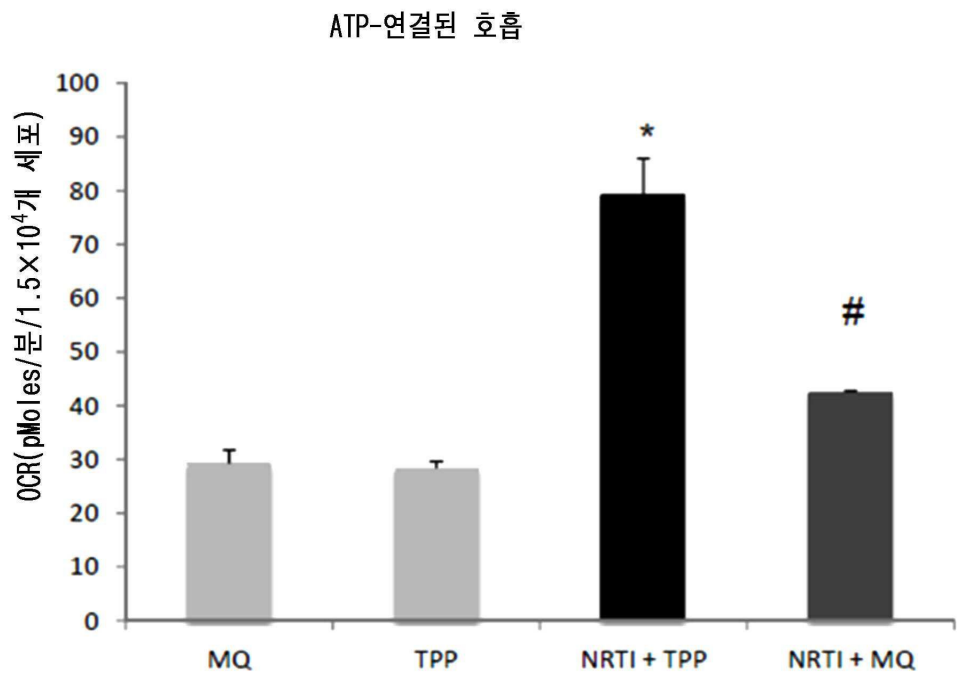
도면6c



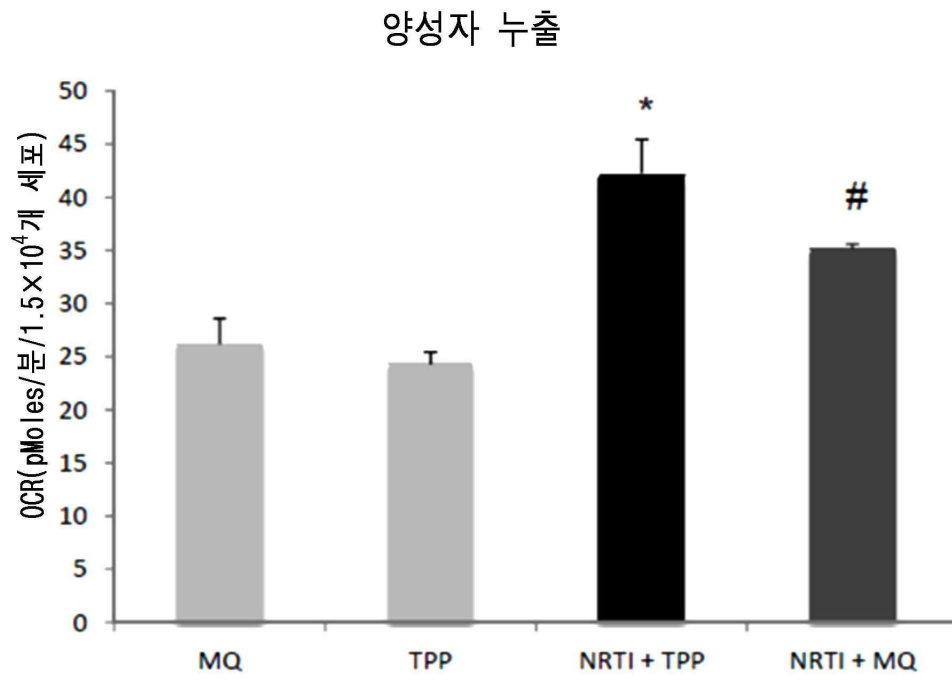
도면6d



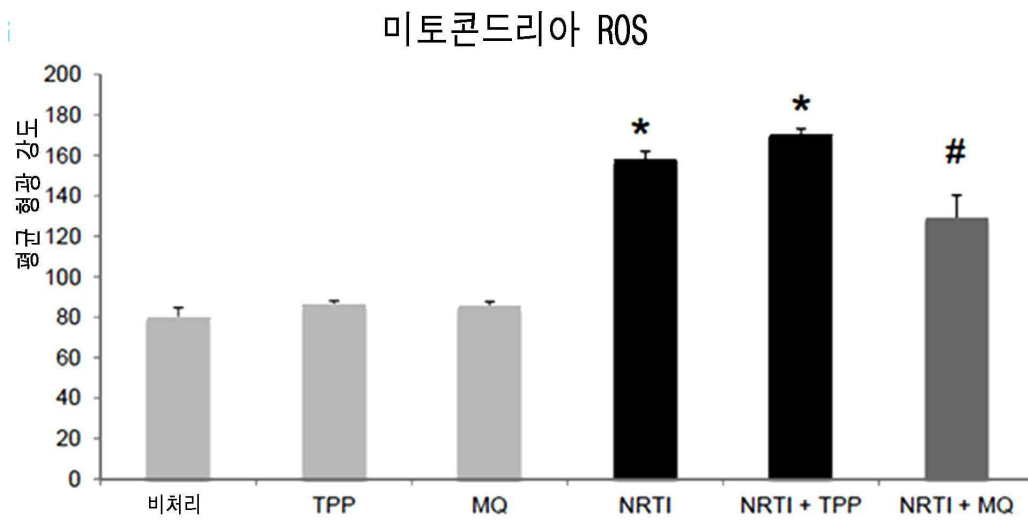
도면6e



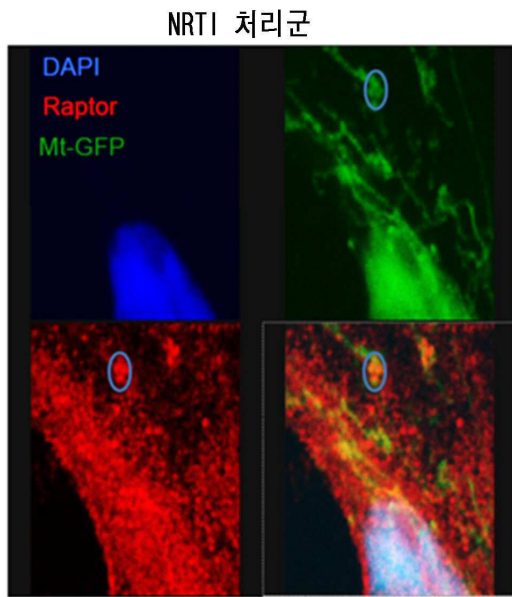
도면6f



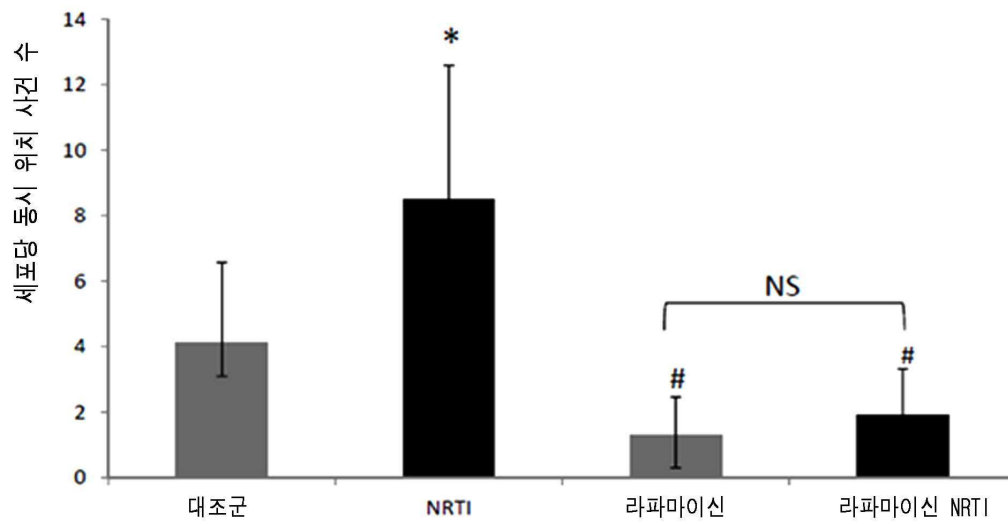
도면6g



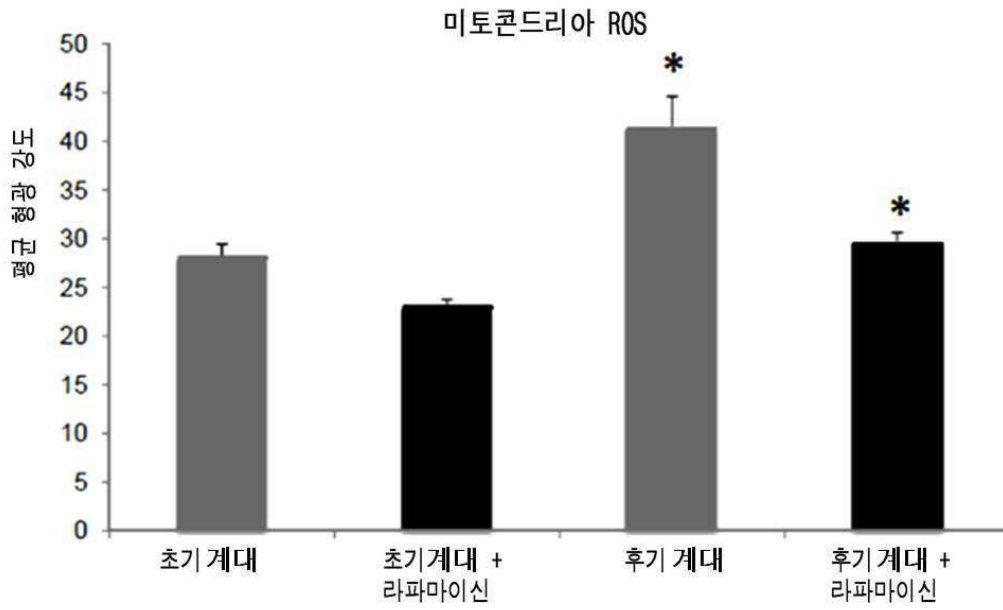
도면8b



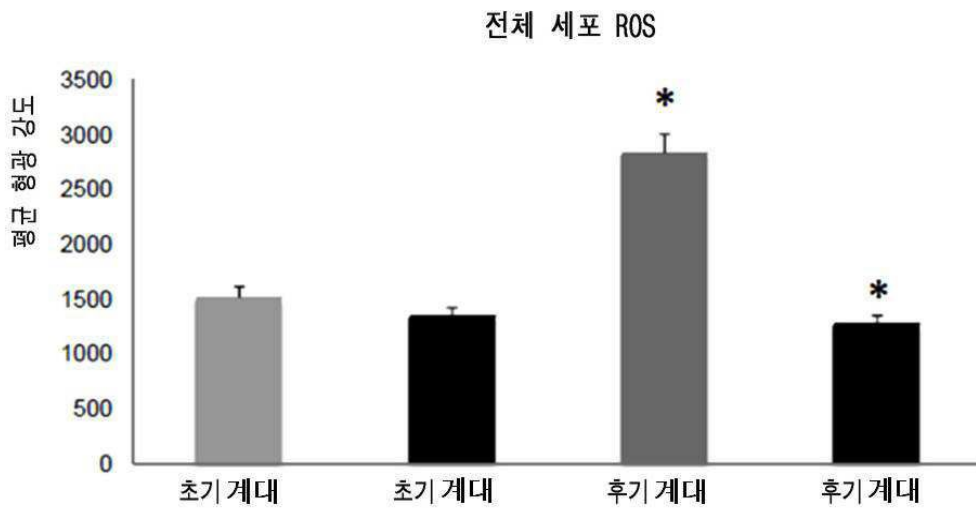
도면8c



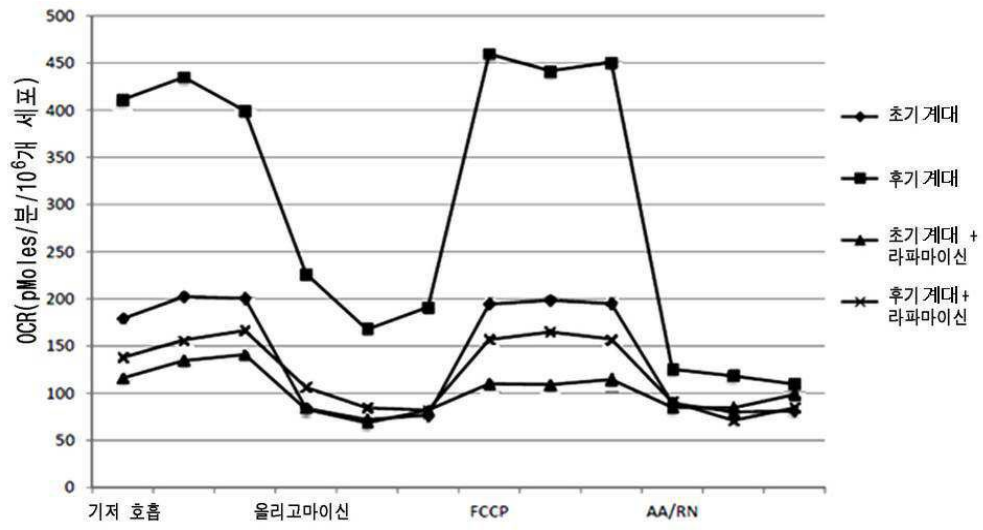
도면9a



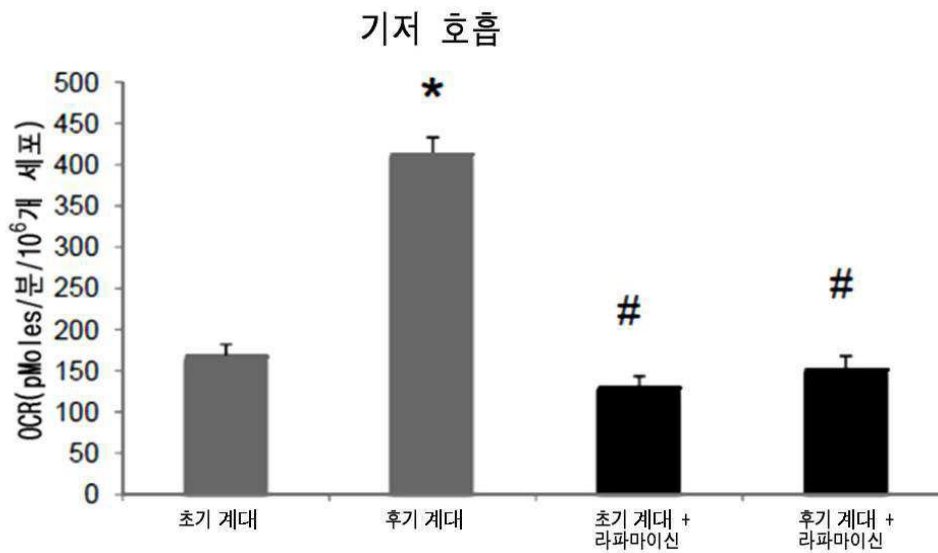
도면9b



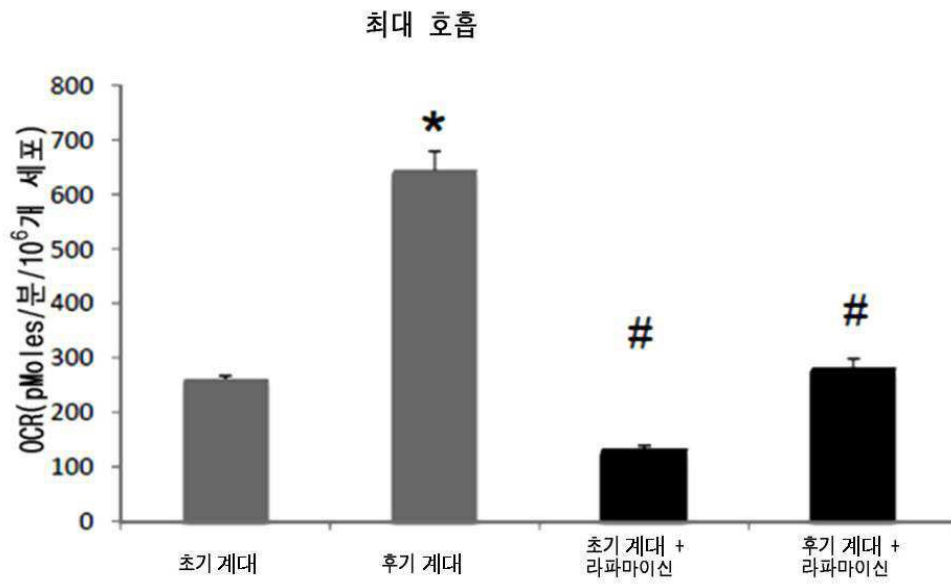
도면9c



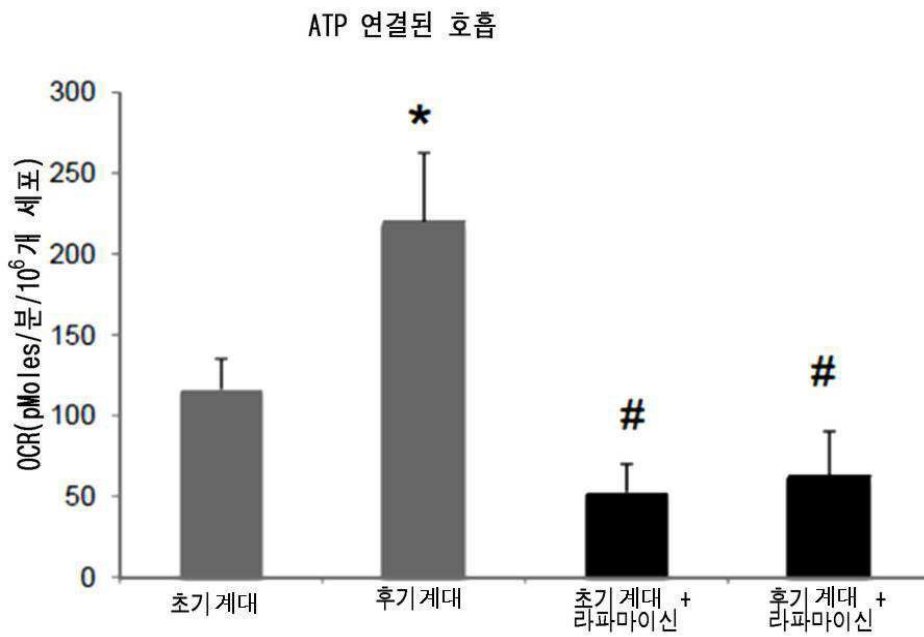
도면9d



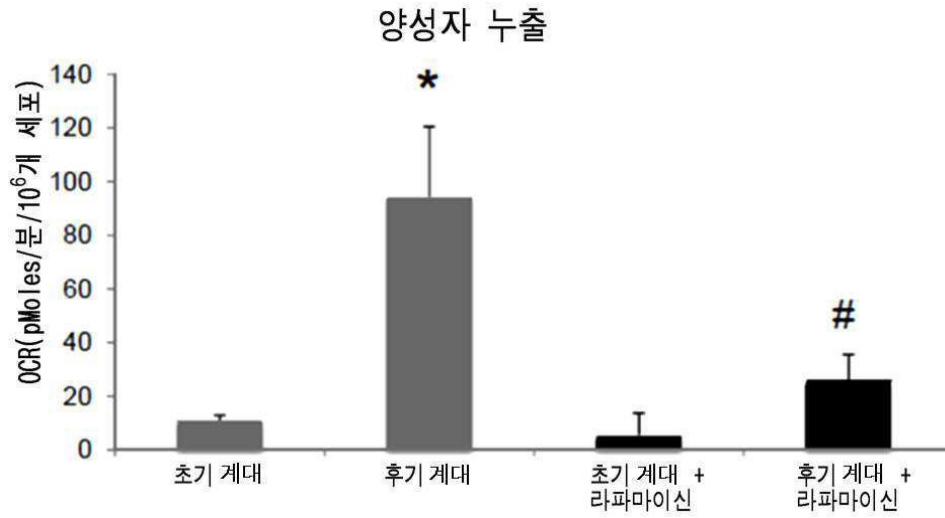
도면9e



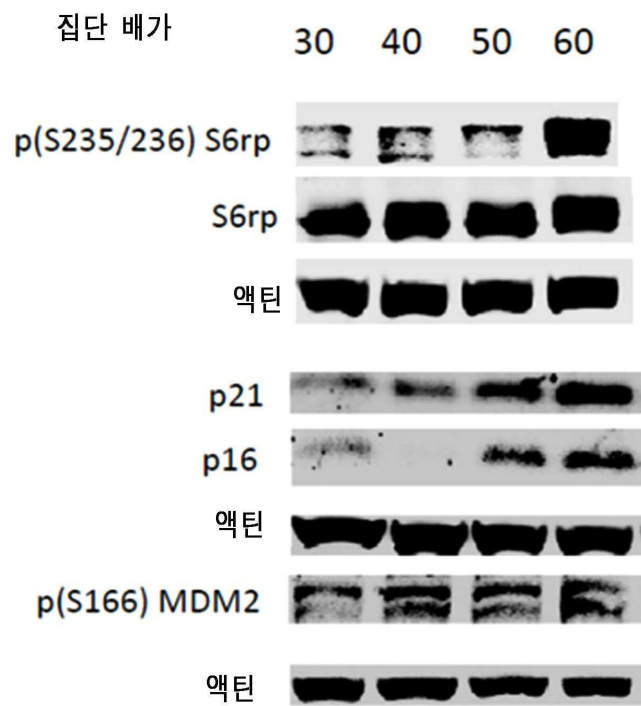
도면9f



도면9g



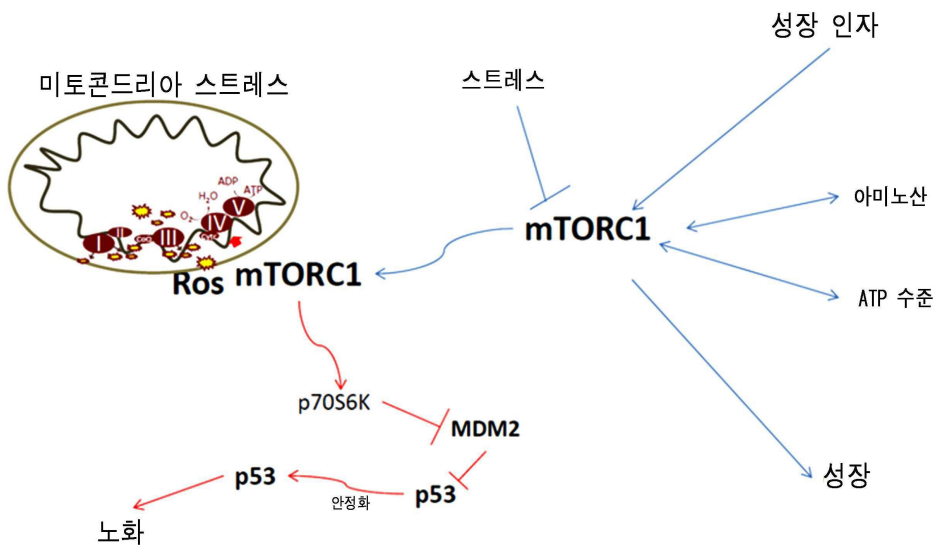
도면9h



도면9i



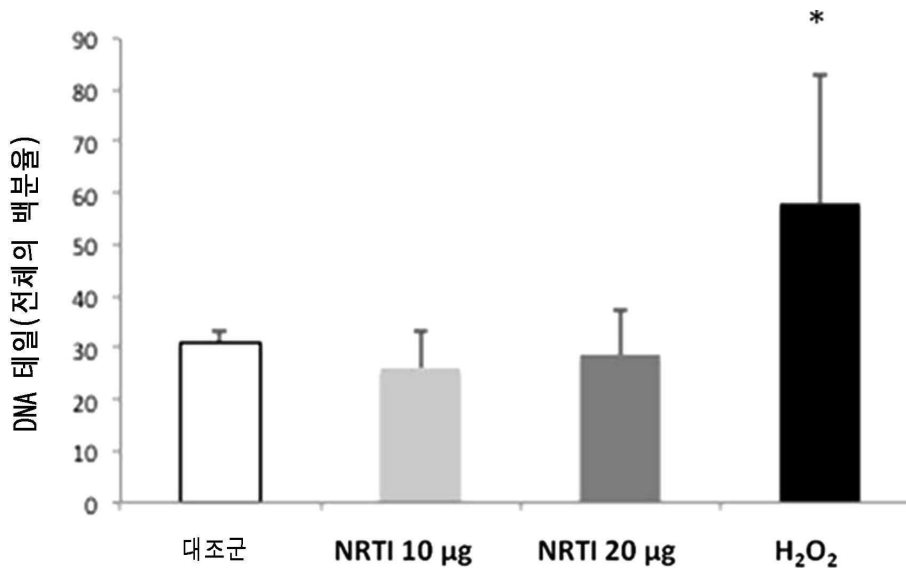
도면10



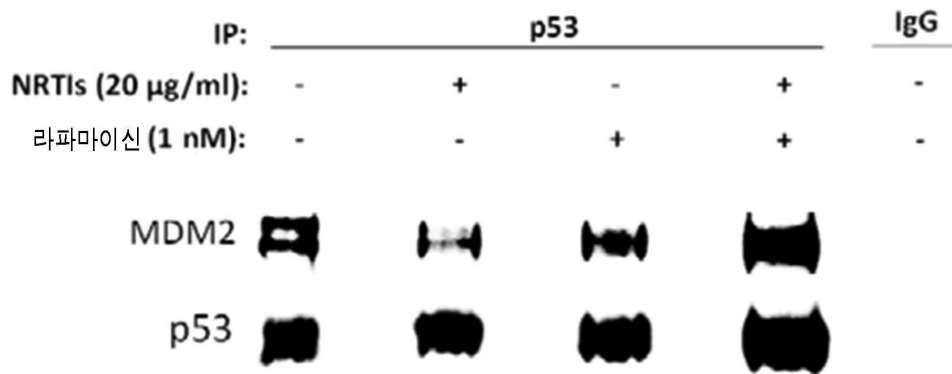
미토콘드리아-매개된 신호는 붉은색으로 나타내진다

전형적인 mTORC 신호 전달은 푸른색으로 나타내진다

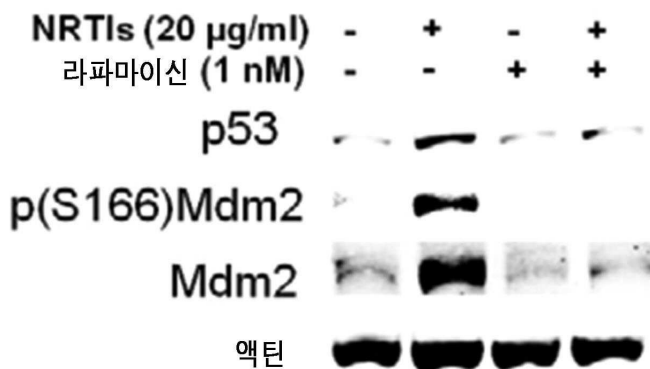
도면11a



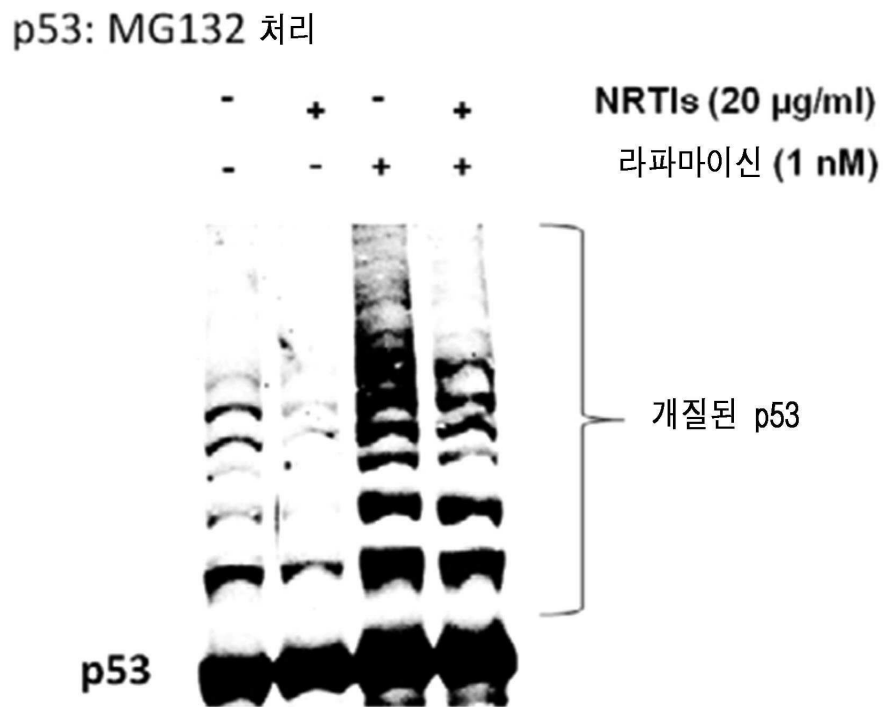
도면11b



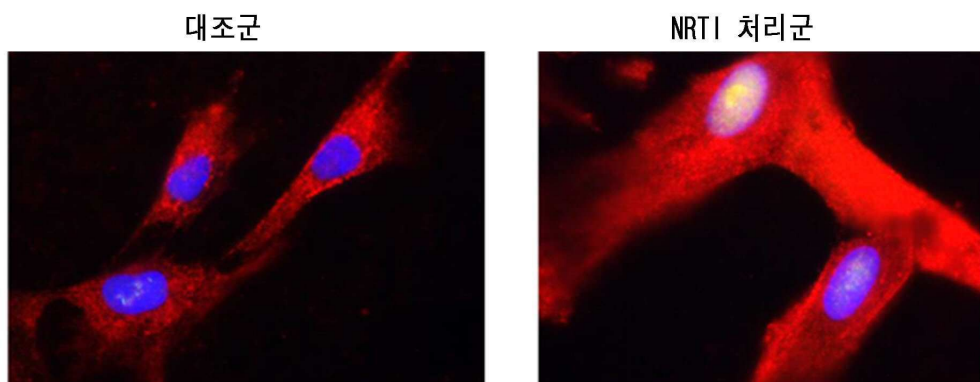
도면11c



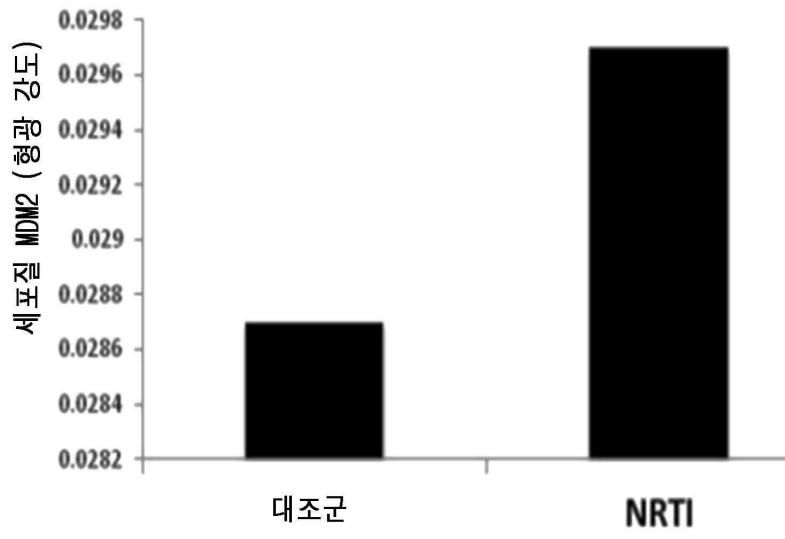
도면11d



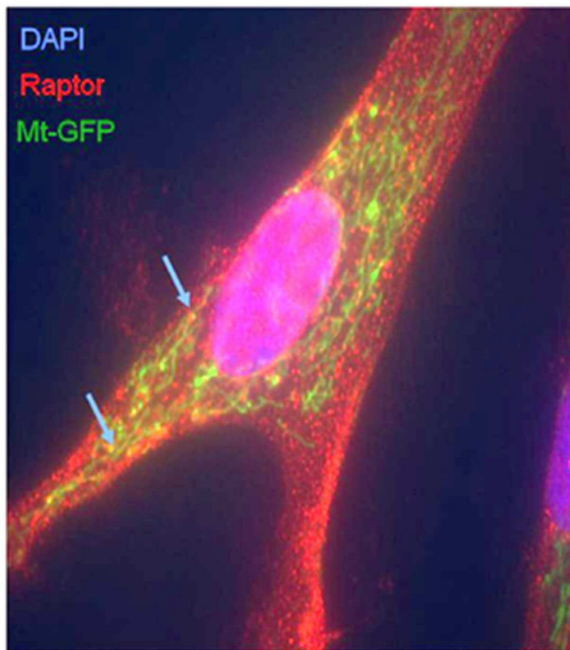
도면11e



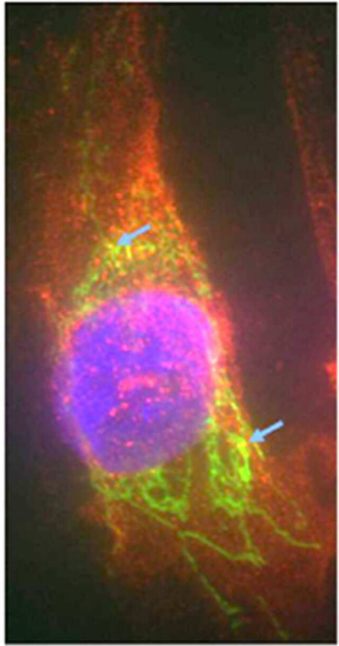
도면11f



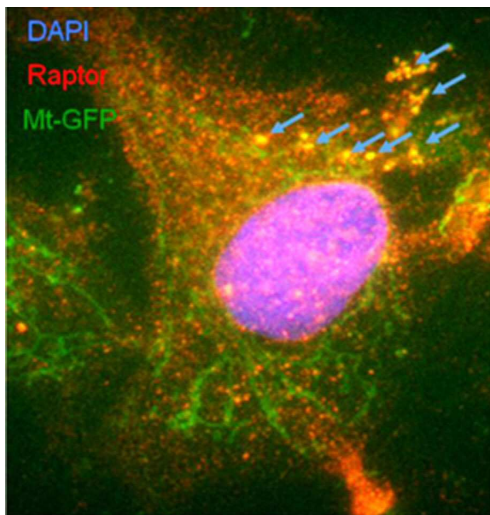
도면12a



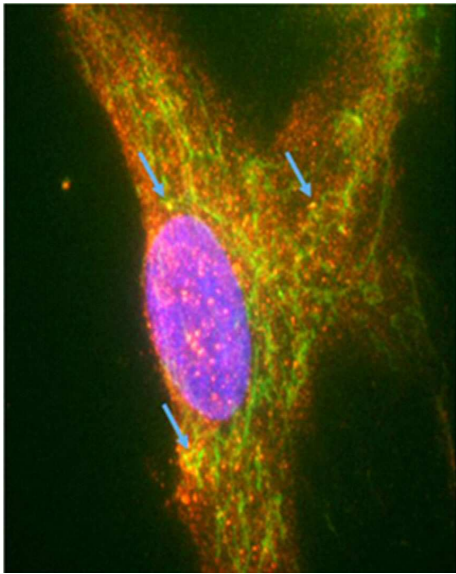
도면12b



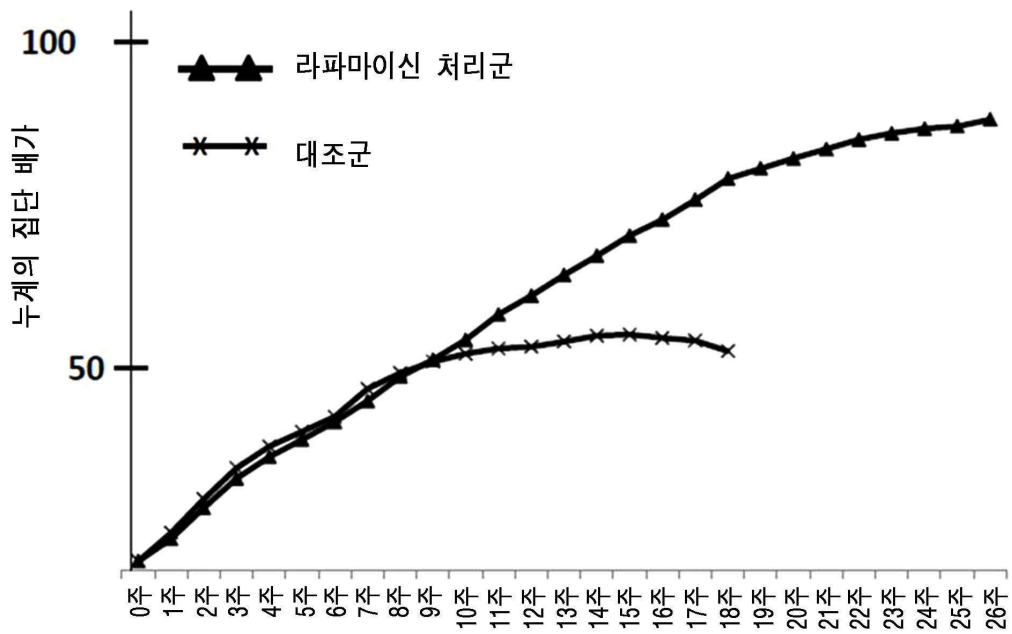
도면12c



도면12d

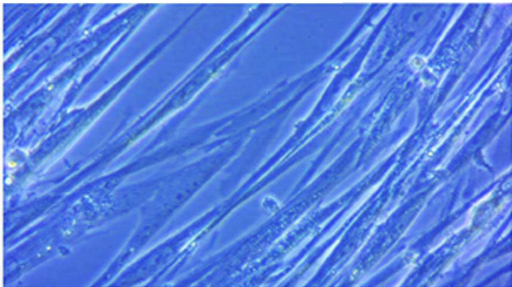


도면13

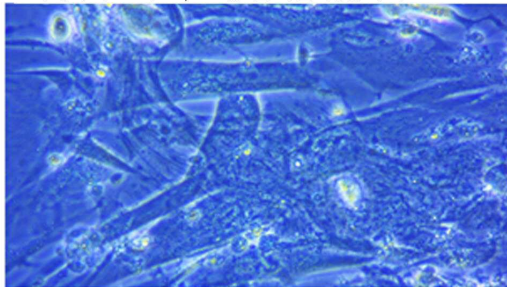


도면14

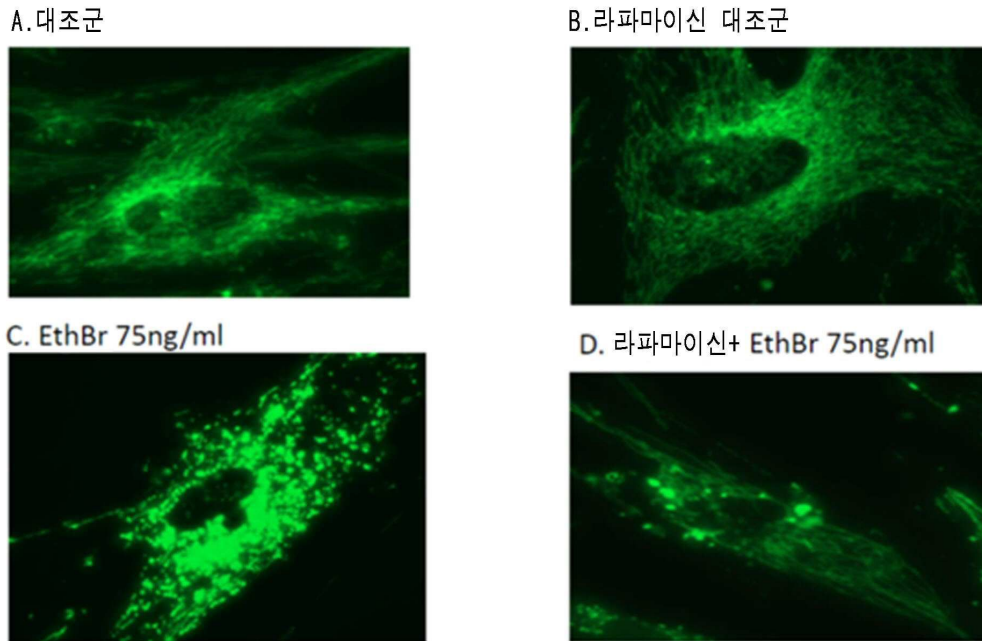
라파마이신 처리된 섬유아세포



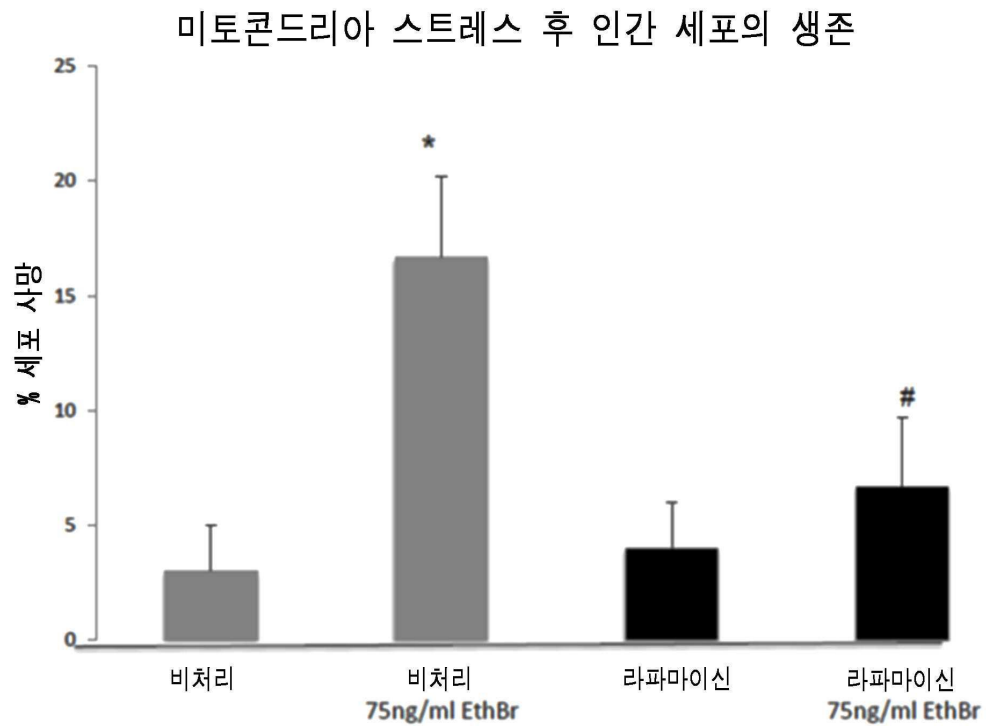
라파마이신 없는, 연령 일치된 섬유아세포



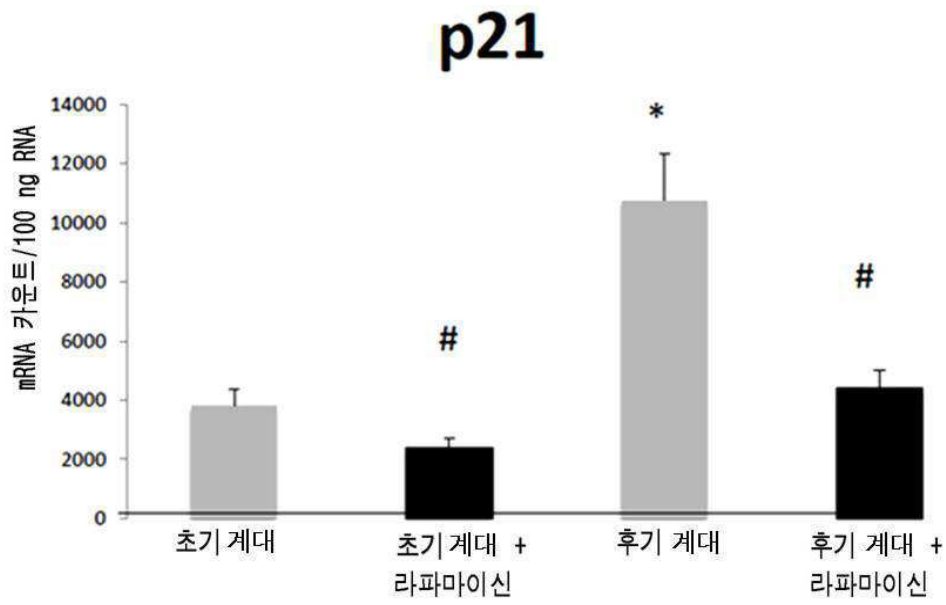
도면15



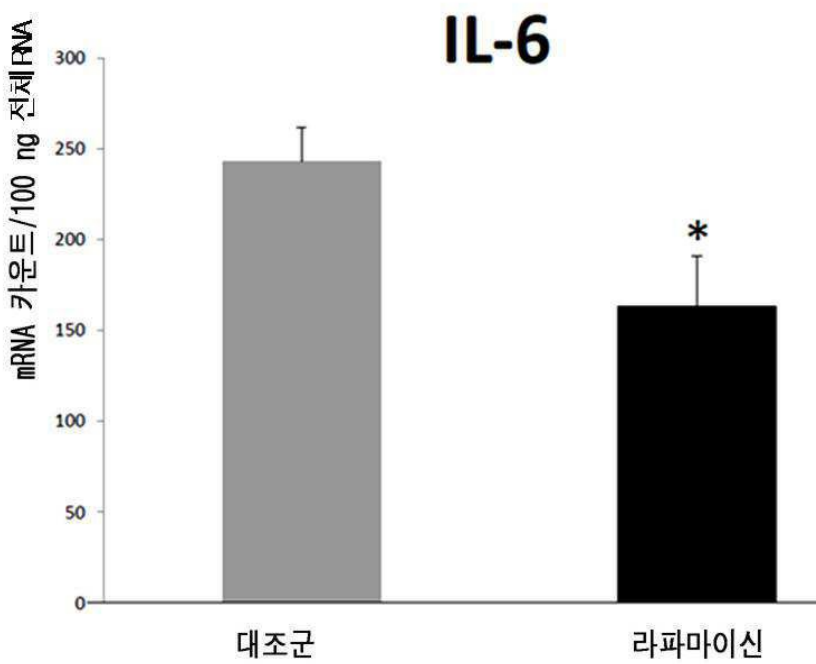
도면16



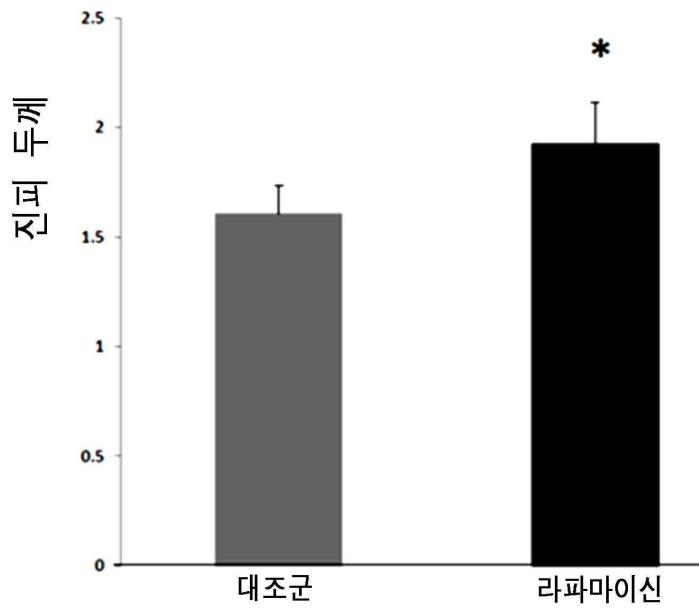
도면17



도면18



도면19



도면20

