

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **045198**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.10.31

(21) Номер заявки
202190799

(22) Дата подачи заявки
2019.09.17

(51) Int. Cl. *A61K 39/00* (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61K 47/55 (2017.01)
A61K 47/60 (2017.01)
A61P 31/00 (2006.01)

(54) МАКРОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ ПРОЛЕКАРСТВА НА ПОЛИМЕРНОЙ ОСНОВЕ

(31) 62/732,199

(32) 2018.09.17

(33) US

(43) 2021.06.22

(86) PCT/US2019/051457

(87) WO 2020/061007 2020.03.26

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ДЗЕ ЧИЛДРЕН'З ХОСПИТАЛ ОФ
ФИЛАДЕЛЬФИЯ (US)**

(72) Изобретатель:
**Чорни Майкл, Алферьев Иван,
Бродер Гарретт М. (US)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) ULBRICH et al.: Targeted Drug Delivery with Polymers and Magnetic Nanoparticles: Covalent and Noncovalent Approaches, Release Control, and Clinical Studies, Chemical Reviews, Vol. 116, 25 April 2016 [retrieved 23 October 2019]. Retrieved from Internet: <URL: <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/acs.chemrev.5b00589>> Pgs. 5338-5377
UPENN. Biomedical Graduate Studies, Garrett M. Brodeur, M.D., 26 August 2018 [retrieved on 24 October 2019]. Retrieved from Internet:<URL: <https://web.archive.org/web/20180826085138/https://www.med.upenn.edu/apps/faculty/index.php/g20000320/p4318>> entire document
WO-A1-1999052861
US-B2-8617558

(57) Предложены макромолекулярные пролекарства, в которых аналоги камптотецина ковалентно связаны с полимерами через сложноэфирные связи, которые являются лабильными в физиологических условиях. Также предложены способы лечения рака, в частности нейроblastомы, макромолекулярными пролекарствами.

B1

045198

**045198
B1**

Перекрестная ссылка на родственную заявку (заявки)

В настоящей заявке испрашивается преимущество даты подачи предварительной заявки США с серийным номером 62/732199, поданной 17 сентября 2018 г., содержание которой полностью включено в настоящий документ посредством ссылки для всех целей.

Область, к которой относится изобретение

Предложены макромолекулярные пролекарства, в которых аналоги камптотецина ковалентно связаны с полимерами через сложноэфирные связи, которые являются лабильными в физиологических условиях. Также предложены способы лечения рака, в частности нейробластомы, макромолекулярными пролекарствами.

Предпосылки создания изобретения

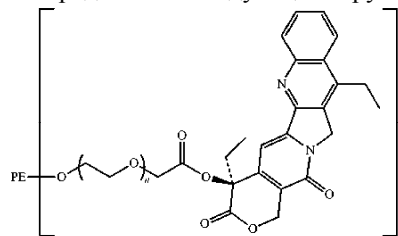
Нейробластома (NB) остается самой распространенной и смертельно опасной солидной опухолью детского возраста, на которую приходится 8-10% всех детских раковых заболеваний и 15% случаев смерти от рака у детей. Несмотря на улучшение показателей излечения других детских новообразований, выживаемость пациентов с NB отстает.

Интенсивная мультимодальная терапия, используемая в настоящее время в клинике, терпит неудачу более чем у половины пациентов (у 50-60% пациентов наблюдается рецидив без каких-либо приводящих к выздоровлению методов консервативной терапии), причем наиболее серьезную терапевтическую проблему представляет подгруппа пациентов с отсутствием реакции на лечение, которую определяют как категорию "сверхвысокого" риска. В настоящее время к NB высокого риска с ее очень разнообразной этиологией и преобладанием биологически неблагоприятных вариантов применяют мощные противораковые средства в качестве лечения первой линии, включая ингибиторы топоизомеразы I семейства камптотецинов: топотекан и иринотекан. Однако их клиническое использование в контексте агрессивного заболевания остается неоптимальным, давая плохие результаты у пациентов с рецидивирующей или рефрактерной NB из-за дозолимитирующих побочных эффектов и приобретенной устойчивости к лекарственным средствам. Важно отметить, что неэффективность лечения у этих пациентов была связана с увеличением пороговых уровней лекарственных средств, необходимых для эффективного подавления роста NB клеток, на 1-3 порядка, достигая значений, недостижимых клинически.

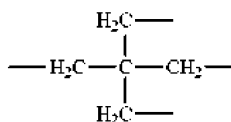
Таким образом, для борьбы с рефрактерной NB необходимы альтернативные терапевтические подходы, которые могут заметно усилить внутриопухолевую доставку и продлить присутствие лекарственного средства на терапевтически эффективных уровнях без увеличения системного воздействия. Описанные в настоящей заявке варианты осуществления направлены на удовлетворение этой потребности.

Сущность изобретения

В первом варианте осуществления представлено макромолекулярное пролекарство, которое представляет собой PEG-[SN22]₄, который представлен следующей структурой:



в котором
n=110 в среднем и
PE представляет собой



В другом варианте осуществления представлен способ лечения нейробластомы путем введения эффективного количества макромолекулярного пролекарства, как определено выше, нуждающемуся в этом субъекту.

В другом варианте осуществления представлен способ лечения субъекта с солидной опухолью путем введения эффективного количества макромолекулярного пролекарства, как определено выше, нуждающемуся в этом субъекту.

В другом варианте осуществления представлен способ лечения субъекта с опухолью головного мозга, путем введения эффективного количества макромолекулярного пролекарства, как определено выше, нуждающемуся в этом субъекту.

В другом варианте осуществления нуждающимся в этом субъектом является человек.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1: Ингибирование роста хеморезистентных NB клеток [BE(2)C] пролекарством PF108-(SN22)₂ по сравнению с SN22 с или без Плуороника F-108 (дозы, эквивалентные 100 нМ SN22). Клетки, необра-

ботанные или обработанные простым химически немодифицированным Плюронином F-108, были включены в качестве контроля. Протестированная продолжительность воздействия составила 24 ч и 30 мин (А и В соответственно). Рост клеток отслеживали с течением времени при помощи билюминесценции. Результаты показаны как среднее значение \pm SD (стандартное отклонение).

Фиг. 2: Внутриопухолевые уровни SN22, доставленного в качестве пролекарства на основе полочсамера, в сравнении с SN38, вводимым в виде иринотекана, его клинически используемого водорастворимого предшественника (4 ч - 3 дня). Анализ осуществляли на модели ортотопического ксенотрансплантата рефрактерной NB. Бестимусным голым мышам (nu/nu) (n=5) инокулировали в надпочечниковую жировую подушку BE(2)C клетки (10^6 на животное), суспендированные в 20% Плюроник F-127 (50 мкл). Опухолям давали достичь размера $1,0 \pm 0,4$ см³ под контролем методом билюминесцентной визуализации. PF108-(SN22)₂ или иринотекан (120 мкл) вводили при помощи инъекции в хвостовую вену в дозе, эквивалентной 10 мг/кг SN22 или SN38 соответственно. Опухоли собирали, взвешивали и анализировали при помощи ВЭЖХ для определения внутриопухолевых уровней лекарственного средства через 4, 24 и 72 ч. Нормализованные по массе концентрации лекарственного средства представлены в сравнении для двух групп как среднее значение \pm SD.

Фиг. 3: Терапевтическая эффективность PF108-(SN22)₂ на ортотопической модели рефрактерной NB высокого риска. Мышам инокулировали 10^6 клеток BE(2)C, стабильно экспрессирующих люциферазу, в соответствии с процедурой, описанной в [44]. Лечение при помощи PF108-(SN22)₂ осуществляли путем внутривенного введения в дозе, эквивалентной 10 мг/кг SN22 один раз в неделю в течение 4 недель. Иринотекан, вводимый два раза в неделю в дозе 10 мг/кг SN38, был включен в качестве положительного контроля. Физиологический раствор или химически немодифицированный Плюроник F-108 использовали в качестве отрицательных контролей. Опухоль-ассоциированный сигнал контролировали при помощи количественного билюминесцентного анализа (репрезентативные изображения, полученные через 0-5 недель, показаны на (А). Количественные данные, представленные графически на (В), выражены как среднее значение \pm SD. Кривые выживаемости для соответствующих групп животных в течение 5-недельного периода в этом исследовании показаны на (С).

Фиг. 4: Исследование антипролиферативного эффекта пролекарства PF108-(SN22)₂ по сравнению со свободным SN22 с/без холостого Плюроника F-108. Реакцию на лечение сравнивали между NB клетками, проявляющими хемо-наивный фенотип по сравнению с хеморезистентным (IMR32 (А) и BE(2)C (В), соответственно), в зависимости от продолжительности воздействия (0,5, 4 и 24 ч) и дозы (эквивалентной 20, 40 и 80 нг SN22 на лунку). Ответ представлен как % ингибирования роста (среднее значение \pm SD) через 7 дней после лечения.

Фиг. 5: Распределение по органам и внутриопухолевые уровни SN22, доставленного в виде PF108-(SN22)₂ (4 ч - 3 дня). Анализ осуществляли в ортотопических ксенотрансплантатах BE(2)C, которым давали достичь размера $1,0 \pm 0,4$ см³, под контролем методом билюминесцентной визуализации. Пролкарство вводили при помощи инъекции в хвостовую вену в дозе, эквивалентной 10 мг/кг SN22. Анализ осуществляли флуориметрическим методом. Количество лекарственного средства показано как % введенной дозы на орган, представленное как среднее значение \pm SD.

Фиг. 6: Терапевтическая эффективность PF108-(SN22)₂ на ортотопической модели хемо-наивной, MYCN-амплифицированной NB. Мышам инокулировали 10^6 экспрессирующих люциферазу клеток IMR-32. Лечение иринотеканом или PF108-(SN22)₂ (10 мг лекарственного средства на кг, 2 \times и 1 \times в неделю, соответственно, в течение 4 недель) начинали через 3 недели после инокуляции (А). Альтернативно, PF108-(SN22)₂ вводили один раз в неделю в течение 3 недель животным, у которых NB опухоли были в 10 раз больше (В). Опухоль-ассоциированный сигнал контролировали при помощи количественного билюминесцентного анализа. Количественные данные представлены как среднее значение \pm SD.

Фиг. 7: Экспрессия ABCG2 и рост NLF и трансфицированных клонов. (А) Вестерн-анализ осуществляли на NLF и трех одноклеточных клонов с антителом ABCG2 (Santa Cruz) по сравнению с активным контролем. Клоны 1, 2 и 3 имели следовые, низкие и промежуточные уровни экспрессии ABCG2, соответственно. (В) Рост NLF и ABCG2-экспрессирующих клонов в присутствии SN38 или SN22 (50 нг/мл). Рост показан на 4-й день.

Фиг. 8: Лечение ортотопической модели NB. Хеморезистентные, трансфицированные люциферазой SKNBE(2)C клетки (107) инъецировали в периренальную жировую подушку голых мышей. Мышей разделяли на пять групп: отсутствие лечения, или лечение холостым PEG, CPT-11, PEG-[SN38]₄ или PEG-[SN22]₄ (10 животных на группу). Лечение начинали, когда опухоль достигала около 0,2 см³. Лечение при помощи либо PEG-[SN38]₄, либо PEG-[SN22]₄ приводило к регрессии опухоли, но только лечение при помощи PEG-[SN22]₄ вызывало полное исчезновение опухоли.

Фиг. 9: Эффективность PEG-[SN22]₄ и PEG-[SN38]₄ в модели трансгенных мышей TH-MYCN. Мышей обрабатывали физиологическим раствором (N=8), CPT-11 (15 мг/кг/доза; N=7), PEG-[SN38]₄ (10 мг/кг/доза; N=6) или PEG-[SN22]₄ (10 мг/кг/доза; N=6) в/в(внутривенно) через хвостовую вену один раз в неделю \times 4 недели. Лечение начинали, когда мышам было около 5 недель с размером опухоли около 1-2 см³. Мышей исключали из исследования, когда у них проявлялись признаки дистресса из-за опухолевой

нагрузки. PEG-[SN22]₄ имел быструю регрессию опухоли, и при вскрытии через 180-200 дней опухоль не была обнаружена.

Фиг. 10: Выживание ксенотрансплантатов EWS и RMS, обработанных PEG[SN22]₄. Мышей обрабатывали физиологическим раствором, CPT-11 (15 мг/кг/доза) или PEG-[SN22]₄ (10 мг/кг/доза) (N=10 для всех) в/в через хвостовую вену один раз в неделю × 4 недели. Слева: Выживаемость животных с ксенотрансплантатами в боковой области EWS клеточной линии TC-71 (хеморезистентные) после 4 недель лечения. Ни у одного из получавших PEG-[SN22]₄ животных не было рецидива. Справа: Выживаемость животных с ксенотрансплантатами в боковой области альвеолярной (фьюжн-положительной) RMS клеточной линии Rh30 после 4 недель лечения. У двух животных, получавших PEG-[SN22]₄, был поздний рецидив, и у одного была небольшая, медленно растущая опухоль, но у 7 других опухоль отсутствовала через 180-200 дней.

Фиг. 11: Внутритропухолевые уровни SN-38, доставленного в виде NET-нацеленного макромолекулярного пролекарства, разработанного с использованием 8-цепочечного PEG (40 кДа) в качестве носителя и BG в качестве таргетирующего лиганда ([PEG-SN38-BG]₈). Анализ осуществляли на модели ортотопического ксенотрансплантата рефрактерной NB. Бестимусным голым мышам (nu/nu) (n=5) инокулировали в надпочечниковую жировую подушку BE(2)C клетки (10⁶ на животное), суспендированные в 20% Плуороник F-127 (50 мкл). Опухолям давали достичь размера 1,0±0,4 см³ под контролем методом биоломинесцентной визуализации. [PEG-SN38-BG]₈ вводили при помощи инъекции в хвостовую вену в дозе, эквивалентной 10 мг/кг SN-38. Опухоли собирали, взвешивали и анализировали при помощи ВЭЖХ. Нормализованные по массе концентрации лекарственного средства представлены как среднее значение ± SD.

Фиг. 12: Терапевтическая эффективность [PEG-SN38-BG]₈ на ортотопической модели рефрактерной NB высокого риска. Бестимусным голым мышам (nu/nu) инокулировали BE(2)C клетки (10⁶), стабильно экспрессирующие люциферазу. Лечение при помощи [PEG-SN38-BG]₈ осуществляли путем внутривенного введения в дозе, эквивалентной 10 мг/кг SN-38, два раза в неделю в течение 4 недель. Иринотекан, вводимый два раза в неделю в дозе 15 мг/кг, был включен в качестве положительного контроля. Группу мышей, которым вводили физиологический раствор (без лечения), использовали в качестве отрицательного контроля. В дополнительной группе пролекарство вводили по той же схеме животным, которым давали достичь в 10 раз большего размера опухоли (2,0 см³, 'большие опухоли'). Опухоль-ассоциированный сигнал контролировали при помощи количественного биоломинесцентного анализа. Данные, представленные графически на (A), выражены как среднее значение ± SD. Кривые выживаемости для соответствующих групп животных в течение 190-дневного периода показаны на (B).

Фиг. 13: Оценка потенцирующего эффекта вориностата на антипролиферативные активности [PEG-SN38-BG]₈ и SN-38 ((A) и (B), соответственно) в хеморезистентных NB клетках BE(2)C. В соответствии с вориностат-индуцированной NET экспрессией, которая, согласно сообщениям, достигала пика через 6 часов, для настоящего эксперимента был выбран период воздействия 6 часов. BE(2)C клетки инокулировали с [PEG-SN38-BG]₈ или SN-38 при концентрациях, эквивалентных 25-100 нМ SN-38, с/без вориностата (1,25-5,0 мкМ). Рост клеток измеряли при помощи биоломинесценции. Данные BE(2)C-клеточного выживания через 6 дней после лечения анализировали на гиперрадикальность с применением модели $z=z_0+A \cdot x+B \cdot y+C \cdot [x \cdot y]$ и определения значимости члена C, характеризующего взаимодействие.

Фиг. 14: Антипролиферативный эффект [PEG-SN38-BG]₈ пролекарства на NET-экспрессирующие хеморезистентные NB клетки, BE(2)C. Эффект на кинетику роста клеток исследовали в сравнении со свободным SN-38 или двухкомпонентным [PEG-SN38]₈ без функционализации посредством BG (A). Клетки в течение 4 ч подвергали воздействию эквивалентных концентраций соединений, соответствующих 125 нМ SN-38. В дополнительном эксперименте (B), ответ на лечение [PEG-SN38-BG]₈ исследовали с/без HDAC1-специфического ингибитора энтиностага (0-5 мкМ). Дозы пролекарства were варьировались в диапазоне, эквивалентном 0-100 нМ SN-38, и длительность воздействия фиксировали на уровне 6 часов. Рост клеток контролировали при помощи биоломинесценции. Ответ представлен как % клеточного выживания (среднее значение ± SD) через 6 дней после лечения. Экспериментальные данные анализировали на гиперрадикальность с использованием модели $z=z_0+A \cdot x+B \cdot y+C \cdot [x \cdot y]$ и определения значимости члена C, характеризующего взаимодействие.

Фиг. 15: Терапевтическая эффективность [PEG-SN38-BG]₈ в модели ортотопического ксенотрансплантата хемо-наивной, MYCN-амплифицированной NB. Мышам инокулировали 10⁶ экспрессирующих люциферазу IMR-32 клеток. Лечение водорастворимым предшественником SN-38 (иринотекан) или [PEG-SN38-BG]₈ при дозах, эквивалентных 10 мг SN-38 на кг, 2× в неделю в течение 4 недель, начинали в день 21 после инокуляции. Опухоль-ассоциированный сигнал контролировали при помощи количественного биоломинесцентного анализа. Данные в (A) представлены как среднее значение ± SD. Репрезентативные биоломинесцентные изображения для каждой группы включены в (B).

Фиг. 16: Терапевтическая эффективность [PEG-SN38-BG]₈ на ортотопической модели рефрактерной NB высокого риска. Бестимусным голым мышам (nu/nu) инокулировали BE(2)C клетки (10⁶), стабильно экспрессирующие люциферазу. Лечение при помощи [PEG-SN38-BG]₈ осуществляли путем внутривен-

ного введения в дозе, эквивалентной 10 мг/кг SN-38, два раза в неделю в течение 4 недель. Иринотекан (15 мг/кг) и эквивалентную дозу двухкомпонентного [PEG-SN38]₄, вводимую два раза в неделю, включали для сравнения. Группы мышей, которым вводили либо холостой PEG, либо физиологический раствор (без лечения), использовали в качестве отрицательных контролей (A). В эксперименте "спасение" пролекарство вводили с использованием такой же схемы введения животным, которых изначально лечили иринотеканом (15 мг/кг, 2×/неделя), у которых опухоли достигали 2,0 см³ через 2 недели (B). Опухоль-ассоциированный сигнал контролировали при помощи количественного билюминесцентного анализа. Данные представлены как среднее значение ± SD.

Фиг. 17: Терапевтическая эффективность [PEG-SN38-BG]₈ на модели ортотопического ксенотрансплантата хемо-наивной, MYCN-амплифицированной NB. Мышам инокулировали 10⁶ экспрессирующих люциферазу IMR-32 клеток. Лечение водорастворимым предшественником SN-38 (иринотекан) или [PEG-SN38-BG]₈ при дозах, эквивалентных 10 мг SN-38 на кг, 2×/неделя в течение 4 недель начинали в день 21 после инокуляции. Опухоль-ассоциированный сигнал контролировали при помощи количественного билюминесцентного анализа. Данные в (A) представлены как среднее значение ± SD. Репрезентативные изображения включены в (B).

Фиг. 18: Терапевтическая эффективность [PEG-SN38-BG]₈ в модели метастатической рефрактерной NB. Мышам вводили 10⁶ экспрессирующих люциферазу BE(2)C клеток через хвостовую вену. Лечение начинали в день 25 иринотеканом (15 мг/кг) или [PEG-SN38-BG]₈ в дозе, эквивалентной 10 мг SN-38 на кг (4 недели, 2×/неделя). Опухоль-ассоциированный сигнал контролировали при помощи количественного билюминесцентного анализа ((A), данные показаны как среднее значение ± SD). Репрезентативные изображения включены в (B).

Фиг. 19: Антипролиферативный эффект PF68-SN38-BG пролекарства по сравнению с двухкомпонентным (не-таргетированным) PF68-SN38 и свободным SN-38 в качестве контролей. Ответ NB клеток, демонстрирующих приобретенную MDR (множественную лекарственную резистентность) [BE(2)C], после 15 мин воздействия показан в виде кривых роста (A) и в виде % ингибирования роста (B) через 6 дней после лечения как функция SN-38 эквивалентной дозы (0-25 нМ). Рост клеток контролировали при помощи билюминесценции. Результаты показаны как среднее значение ± SD.

Фиг. 20: NET-селективность антипролиферативного действия PF68-SN38-BG на хеморезистентные NB клетки BE(2)C. Рост клеток исследовали с/без NET ингибирования с использованием низоксетина (1 мкМ), в сравнении с двухкомпонентным PF68-SN38 без функционализации посредством BG (A). Клетки подвергали воздействию эквивалентных концентраций соединений в течение 15 мин. Экспериментальные данные через 6 дней после лечения анализировали методом ANOVA с использованием апостериорного критерия Тьюки.

Фиг. 21: Терапевтическая эффективность NET-направленной доставки в модели рефрактерной NB. Мышей инокулировали в надпочечниковую жировую подушку 10⁶ экспрессирующих люциферазу BE(2)C клеток. Лечение начинали либо иринотеканом (15 мг/кг), либо двухкомпонентной и трехкомпонентной конструкцией в дозе, эквивалентной 10 мг SN-38 на кг (4 недели, 2×/неделя, (A)). Альтернативно, опухолям давали достичь 2 см³ перед началом терапии (B). Прогрессирование заболевания контролировали при помощи количественного билюминесцентного анализа. Данные роста опухоли показаны как среднее значение ± SD.

Фиг. 22: Хеморезистентные люцифераза-трансфицированные SKNB(2)C клетки (10⁷) инъецировали в периренальную жировую подушку голых мышей и наблюдали развитие опухоли. Мышей разделяли на пять групп: отсутствие лечения, или лечение холостым PEG, CPT-11, PEG-[SN22]₄ или PEG-[SN38]₄ (10 животных на группу). Лечение начинали, когда опухоль достигала около 0,2 см³. Размер опухоли быстро увеличивался в течение 2 недель в двух контрольных группах, и рост лишь немного задерживался при введении CPT-11. Лечение либо PEG-[SN22]₄, либо PEG-[SN38]₄ замедляло рост и затем опухоли регрессировали. Только PEG-[SN22]₄ лечение вызывало полное исчезновение опухоли ((A) = визуализация; (B) = количественное определение).

Подробное описание изобретения

Первый вариант осуществления

В первом варианте осуществления описанного выше пролекарства по меньшей мере две молекулы аналога камптотецина ковалентно связаны с полоксамерным полимером через сложноэфирные связи, которые являются лабильными в физиологических условиях (например, 22°C, pH=7,2).

Аналоги камптотецина хорошо известны в данной области как ингибиторы топоизомеразы. Камптотecin как таковой представляет собой (S)-4-этил-4-гидрокси-1H-пирано[3',4':6,7]индолизино[1,2-b]-хинолин-3,14-(4H,12H)-дион. Термин "аналог камптотецина" включает камптотecin. Предпочтительные аналоги камптотецина включают SN22 (7-этил-камптотecin), SN38 (7-этил-10-гидроксикамптотecin) или их комбинацию.

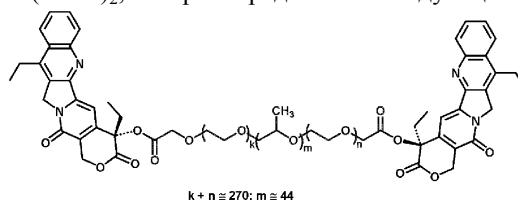
Полоксамеры представляют собой неионные триблок-сополимеры, состоящие из центральной гидрофобной цепи полиоксипропилен (поли(пропиленоксида)), фланкированной двумя гидрофильными цепями полиоксиэтилен (поли(этиленоксида)). Общее количество цепей полиоксиэтилена может состав-

лять от 2 до 130. Количество оксипропиленовых звеньев может составлять от 15 до 67. Предпочтительно молекулярная масса полуксамера ниже порога клубочковой фильтрации (30-50 кДа). Эти полимеры имеют историю безопасного применения для людей и доступны в виде веществ фармацевтической категории (Kolliphor® P). Ряд полуксамеров был одобрен FDA в качестве эксципиентов и в настоящее время используется в клинической практике для различных целей. Все эти полуксамеры подходят для вариантов осуществления, описанных в настоящей заявке.

Биологически значимые свойства полуксамеров, такие как размер молекул и гидрофильный/липофильный баланс, регулируют путем регулирования длины гидрофильных (А) и гидрофобных (В) блоков [А=поли(этиленоксид) (PEO) и В=поли(пропиленоксид) (PPO)], и их молярного соотношения. В отличие от химически гомогенных поли(этиленоксидов) АВА триблок-полуксамеры, сочетающие промежуточные длины средних PPO блоков со сравнительно высокими значениями гидрофильного/липофильного баланса, способны стабильно связываться с клеточными мембранами, что обеспечивает эффективный механизм проникновения в опухоли и расширение внутриопухолевого присутствия. Примеры полуксамеров включают Kolliphor® P188, P338 и P407.

Аналоги камптотецина ковалентно связаны с полуксамерным полимером через сложноэфирные связи, которые являются лабильными в физиологических условиях (например, 22°C, pH=7,2). В одном варианте осуществления сложноэфирные связи представляют собой оксиацетатные сложноэфирные связи. Аналоги камптотецина предпочтительно связаны с полуксамерным полимером через гидроксильную группу в положении, соответствующем положению 20 в камптотецине.

В другом варианте осуществления две молекулы аналога камптотецина ковалентно связаны с полуксамерным полимером. В предпочтительном варианте осуществления макромолекулярное пролекарство представляет собой PF108-(SN22)₂, который представлен следующей структурой:



Второй вариант осуществления

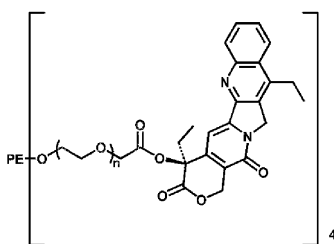
Во втором варианте осуществления описанного выше пролекарства по меньшей мере две молекулы аналога SN22 ковалентно связаны с PEG полимером через сложноэфирные связи, которые являются лабильными в физиологических условиях.

Полиэтиленгликолевые (PEG) полимеры хорошо известны в данной области. PEG полимеры могут быть линейными и представлены формулой H-(O-CH₂-CH₂)_n-OH. В другом варианте осуществления PEG полимер представляет собой полимер с разветвленной структурой. PEG полимеры с разветвленной структурой содержат от трех до десяти цепей PEG, исходящих из центральной сердцевинной группы. Особенно предпочтительны четыре PEG цепи. Предпочтительные центральные сердцевинные группы включают группу пентаэритрита и группу трипентаэритрита. PEG полимеры могут иметь молекулярную массу от 1000 до 100000 дальтон, включая все значения и поддиапазоны между ними, включая 2000, 5000, 10000, 25000, 35000, 50000, 75000 и 85000 дальтон.

В другом варианте осуществления две молекулы SN22 ковалентно связаны с линейным PEG полимером. В другом варианте осуществления четыре молекулы SN22 ковалентно связаны с PEG полимером с разветвленной структурой, имеющим четыре PEG цепи. В другом варианте осуществления более четырех и до восьми молекул SN22 ковалентно связаны с PEG полимером с разветвленной структурой. Предпочтительно, молекула SN22 ковалентно связана с каждой из цепей PEG в этих вариантах осуществления.

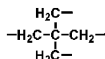
SN22 группы ковалентно связаны с PEG полимером через сложноэфирные связи, которые являются лабильными в физиологических условиях (например, 22°C, pH=7,2). В одном варианте осуществления сложноэфирные связи представляют собой оксиацетатные сложноэфирные связи. Аналоги камптотецина предпочтительно связаны с PEG полимером через гидроксильную группу в положении, соответствующем положению 20 в камптотецине.

В предпочтительном варианте осуществления макромолекулярное пролекарство представляет собой PEG-[SN22]₄, который представлен следующей структурой:



$n \approx 110$ в среднем

PE = сердцевина
пентаэритрита



В другом варианте осуществления пациент мог ранее получить лечение Темозоломидом (TMZ), который представляет собой пероральное химиотерапевтическое лекарственное средство. Такой предшествующий курс может обеспечить дополнительную эффективность, но может усилить проникновение в опухоль пролекарства. Темозоломид можно вводить в дозе от 20 до 250 мг/кг/день п/о (перорально) в течение нескольких дней, например, 5 дней, с последующим лечением пролекарством, например, начиная с 7 дня. Доза 100 мг/кг/день п/о является предпочтительной.

Третий вариант осуществления

В третьем варианте осуществления описанного выше пролекарства по меньшей мере две молекулы аналога камптотецина ковалентно связаны с полимером через сложноэфирные связи, которые являются лабильными в физиологических условиях, при этом по меньшей мере один аналог камптотецина функционализирован по меньшей мере одним лигандом NE транспортера (NET).

Аналог камптотецина может представлять собой SN22 (7-этил-камптотецин), SN38 (7-этил-10-гидрокси-камптотецин) или их комбинацию. SN38 является особенно предпочтительным.

В другом варианте осуществления от двух до восьми молекул аналога камптотецина ковалентно связаны с полимером. Этот диапазон включает все конкретные значения и поддиапазоны между ними, такие как две, три, четыре, пять, шесть и семь молекул аналога камптотецина. Особенно предпочтительны восемь молекул аналога камптотецина, ковалентно связанных с полимером.

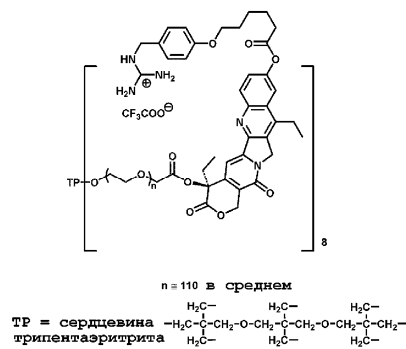
Полимер может представлять собой полоксамерный полимер или PEG полимер, как описано выше. Предпочтительным является PEG полимер с разветвленной структурой. В этом варианте осуществления PEG полимеры с разветвленной структурой содержат от трех до десяти PEG цепей, исходящих из центральной сердцевинной группы. От четырех до восьми PEG цепей являются особенно предпочтительными, особо предпочтительны восемь PEG цепей. Предпочтительные центральные сердцевинные группы включают группу пентаэритрита и группу трипентаэритрита. Группа трипентаэритрита особенно предпочтительна в качестве центральной сердцевинной группы.

Аналоги камптотецина ковалентно связаны с полоксамерным полимером через сложноэфирные связи, которые являются лабильными в физиологических условиях (например, 22°C, pH=7,2). В одном варианте осуществления сложноэфирные связи представляют собой оксиацетатные сложноэфирные связи. Аналоги камптотецина предпочтительно связаны с полоксамерным полимером через гидроксильную группу в положении, соответствующем положению 20 в камптотецине.

В этом варианте осуществления по меньшей мере один аналог камптотецина функционализирован по меньшей мере одним лигандом для транспортера норэпинефрина (NE), т.е. лигандом NE транспортера (NET). В одном варианте осуществления лиганд NE транспортера (NET) представляет собой фенэтилгуанидин, бензилгуанидин (BG) или тирамин. Бензилгуанидин особенно предпочтителен.

В другом варианте осуществления лиганд NE транспортера (NET) ковалентно связан с аналогом камптотецина через сложноэфирную связь, которая является лабильной в физиологических условиях. В предпочтительном варианте осуществления сложноэфирная связь между лигандом NE транспортера (NET) и аналогом камптотецина представляет собой оксигексаноиловый эфир. В другом варианте осуществления сложноэфирная связь между лигандом NE транспортера (NET) и аналогом камптотецина представляет собой оксипропаноиловый или окситоксипропаноиловый эфир.

В предпочтительном варианте осуществления макромолекулярное пролекарство представляет собой [PEG-SN38-BG]₈, который представлен следующей структурой:



Способы лечения

Как описано выше, макромолекулярное пролекарство можно использовать в способе лечения нейробластомы путем введения эффективного количества макромолекулярного пролекарства нуждающемуся в этом субъекту.

Макромолекулярное пролекарство, как описано выше, также можно использовать в способе лечения субъекта с солидной опухолью путем введения эффективного количества макромолекулярного пролекарства нуждающемуся в этом субъекту.

Макромолекулярное пролекарство, как описано выше, также можно использовать в способе лечения субъекта с опухолью головного мозга путем введения эффективного количества макромолекулярного пролекарства нуждающемуся в этом субъекту.

Макромолекулярное пролекарство, как описано выше, также можно использовать в способе лечения рака путем введения эффективного количества макромолекулярного пролекарства, как определено выше, нуждающемуся в этом субъекту.

В этих вариантах осуществления нуждающийся в этом субъект предпочтительно представляет собой млекопитающее, особенно предпочтительно человека.

Макромолекулярное пролекарство можно вводить любым способом, обычно используемым в данной области. Способы введения включают парентеральный (внутривенный, внутримышечный и подкожный), пероральный, назальный, внутриглазной, трансмукозальный (буккальный, вагинальный и ректальный) и трансдермальный пути введения.

Макромолекулярное пролекарство можно вводить в любой дозе, эффективной для лечения описанных в настоящей заявке состояний. Дозировка макромолекулярного пролекарства может составлять от 0,5 до 200 мг/кг на дозу.

Примеры

Пример 1. PF108-(SN22)₂

1. Двухстадийный синтез пролекарства.

Окисление полоксамеров реактивом Джонса (CrO₃/H₂SO₄) в THF при 22-25°C преобразует концевые группы CH₂OH полимеров в концевые алкоксиацетат-карбоксильные группы, которые затем можно использовать для обратимого ковалентного связывания различных гидроксилсодержащих лекарственных средств через гидролизуемые сложноэфирные связи. Окисление Плюроник F-108 (Kolliphor P338) в условиях, описанных выше, приводило к получению полимера, содержащего 0,18 ммоль/г карбоксильных групп, как было определено с использованием ¹H ЯМР по сигналу OCH₂CO протонов. Аналогично, окисление Плюроник F-68 приводило к полимеру, содержащему 0,23 ммоль/г концевых карбоксильных групп. Дальнейшее конъюгирование карбоксилированного Плюроник F-108 с SN22 с использованием 1,3-дициклогексилкарбодиимида (DCC) в качестве активирующего агента для карбоксильных групп, 4-диметиламинопиридин тозилата (DPTS) в качестве катализатора и CH₂Cl₂ в качестве растворителя приводило к образованию полимерного конъюгата, содержащего 0,13 ммоль/г или 4,8 мас.% лекарственного средства. ¹H ЯМР продемонстрировал, что SN-22 был ковалентно связан с полимером через сложноэфирные связи между карбоксильными группами карбоксилированного плюроника и 20-ОН молекулы SN22. Плюроники сорта Kolliphor (табл. 1) и SN22 (чистота: ≥97%, ВЭЖХ) доступны от Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) и AK Scientific (Union City, CA), соответственно.

Для получения пролекарств SN38 с карбоксилированными Плюрониками 10-ОН фенола в SN38 (чистота: ≥97%, AstaTech, Bristol, PA) сначала защищали 10-трет-бутилдифенилсилильной группой (TBDPS) воздействием трет-бутил(хлор)дифенилсилана (TBDPS-Cl) в присутствии имидазола в N-метилпирролидоне. В эксперименте, проводимом с целью определения осуществимости, полученный 10-TBDPS-защищенный SN38 (полученный с выходом 97%) подвергали взаимодействию, как указано выше, с карбоксилированным Плюроником F-68, получая после снятия защиты (с использованием фторида пиридиния в CH₂Cl₂) целевой конъюгат, который, согласно данным ¹H ЯМР содержал 0,17 ммоль/г или 6,6 мас.% SN38, ковалентно связанного через сложноэфирные связи посредством 20-ОН.

Таблица 1. Полоксамерные полимеры фармацевтической категории, используемые для получения конъюгатов пролекарств, описанных в настоящей заявке

<i>Полоксамер</i>	<i>Этиленоксидные звенья</i>	<i>Пропиленоксидные звенья</i>	<i>Молекулярная масса</i>	<i>Значение ГЛБ</i>
Kolliphor	150-170	25-40	7680-9510	> 24
Kolliphor	274-292	42-51	12700-17400	> 24
Kolliphor	190-210	54-60	9840-14600	18-23

2. Полоксамер-SN22 пролекарство ингибирует рост хеморезистентных NB клеток.

Рефрактерная NB характеризуется сдвигом пороговых уровней лекарственного средства, необходимых для ингибирования роста NB клеток. Этот сдвиг, показанный во всех тестируемых парах клеточных линий, полученных от одних и тех же пациентов с прогрессирующим заболеванием во время индукционной терапии, по сравнению с моментом постановки диагноза до терапии, одновременно влияет на ответ на химиотерапевтические средства из разных химических и фармакологических семейств. PF108-(SN22)₂ пролекарство, созданное из Плуороника F-108 (Kolliphor P338) фармацевтической категории и SN22, испытывали против клеточной линии BE(2)C, демонстрирующей лекарственно-резистентный фенотип, связанный с приобретением мутации TP53 на кодоне 135 и потерей функции p53.

После 24-часового воздействия PF108-(SN22)₂ эффективно ингибировал рост клеток BE(2)C в течение 7 дней с эффективностью, аналогичной эффективности SN22 отдельно или в комбинации с химически немодифицированным Плуороником F-108 (PF108+SN22), тогда как при применении Pluronic F-108 без лекарственного средства никакого ингибирования роста клеток не наблюдали (фиг. 1A). Эффект PF108-(SN22)₂ был заметно менее выражен, когда воздействие было ограничено 30 минутами (фиг. 1B), что позволяет предположить, что пролекарство в значительной степени остается интактным в этой временной шкале.

Для сравнения, при испытании против хемо-наивных NB клеток (IMR-32), пролекарство было равномерно эффективным в диапазоне доз, соответствующем 20-80 нМ SN22, и длительности воздействия от 30 мин до 24 ч, вызывая сильное ингибирование роста клеток IMR-32 (см. фиг. 4A). Это согласуется с отсутствием первичной резистентности в этой клеточной линии, полученной от ранее нелеченного пациента, что делает ее чувствительной к антипролиферативному эффекту активного SN22, присутствующего на значительно более низких уровнях. Важно отметить, что хотя свободный SN22 был включен в качестве положительного контроля в эксперименты с культурами клеток, он несовместим с фармацевтически приемлемыми носителями.

3. Доставка SN22 в качестве пролекарства с полоксамером достигает длительного воздействия в ортотопических BE(2)C опухолях.

Сравнение между клетками BE(2)C, полученными при рецидиве после химиорадиотерапии, и клетками BE(1), полученными от того же пациента при постановке диагноза, продемонстрировало увеличение на порядок концентрации аналога камптотецина, SN38, необходимой для достижения ингибирования роста клеток на 90%: 25 по сравнению с 2 нг/мл соответственно. Важно отметить, что, как было показано, соответствующий внутриопухольный уровень SN38 не может поддерживаться с использованием обычного лечения его предшественником, иринотеканом (CPT-11). Неспособность поддерживать эффективные местные уровни лекарственного средства без превышения максимально переносимой дозы является основной причиной неэффективности клинически используемых камптотецинов и других химиотерапевтических средств в условиях рецидивирующей и рефрактерной NB высокого риска. В соответствии с этими сообщениями, эти результаты показывают менее 25 нг/г и 2 нг/г SN38 в больших ($\geq 1 \text{ см}^3$) BE(2)C ортотопических ксенотрансплантатах через 24 и 72 ч соответственно, после введения иринотекана (10 мг/кг). Для сравнения, SN22, доставляемый в эквивалентной дозе в качестве PF108-(SN22)₂ стабильно присутствовал в опухолях на многократно более высоких уровнях: 2180 ± 850 нг/г, 2140 ± 520 нг/г и 1570 ± 580 нг/г через 4, 24 и 72 часа, соответственно (фиг. 2), что свидетельствует о том, что доставка на основе полоксамерного пролекарства может поддерживать стабильные терапевтически эффективные уровни SN22, таким образом выполняя предварительное условие для длительного подавления роста NB опухоли.

4. Полоксамер-SN22 пролекарство сильно подавляет рост опухоли, продлевая выживаемость при лекарственно-резистентной NB.

В соответствии с его устойчивым присутствием на внутриопухольных уровнях выше 1,5 мкг/г, SN22, сформулированный и вводимый один раз в неделю в виде пролекарства на основе полоксамера, вызывал регрессию опухоли и сильно подавлял повторный рост ортотопических BE(2)C ксенотрансплантатов (фиг. 3A и B). Это, в свою очередь, приводило к значительному увеличению выживаемости животных (фиг. 3C), в отличие от незначительного противоопухолевого эффекта иринотекана, который в этом исследовании применяли в два раза чаще. Незначительный эффект иринотекана в этой модели NB (фиг. 3) демонстрирует адекватность подхода доклинической оценки, резюмируя серьезную проблему в достижении длительного терапевтического ответа в условиях агрессивной рефрактерной NB человека. Примечательно, что, в отличие от иринотекана, PF108-(SN22)₂ был способен вызывать как уменьшение опу-

холи, так и стабилизировать заболевание, при этом не наблюдали прогрессирования во время и после периода лечения, состоящего только из четырех слабых доз (последнюю дозу PF108-(SN22)₂ вводили на 21 день; показано на фиг. 3B). Замечательное противораковое действие полксамер-SN22 пролекарства не сопровождалось признаками системной токсичности, такими как диарея, натяжение кожи (из-за обезвоживания), изъязвления кожи, анорексия, кахексия или замедление набора веса.

5. Пролекарство полксамер-SN22: количественные исследования антипролиферативных эффектов на MYCN-амплифицированных NB клетках.

Чтобы продемонстрировать возможность сравнительного изучения антипролиферативного эффекта полимерных пролекарств на NB-клетки с различными (хемо-наивными по сравнению с хеморезистентными) фенотипами, сравнивали эффект PF108-(SN22)₂ на две клеточные линии, представляющие агрессивное MYCN-амплифицированное заболевание, до начала лечения и при рецидиве после интенсивной химио-радиотерапии (IMR-32 и BE(2)C соответственно).

Наблюдали сильное различие в паттернах ответа между хемо-наивными и хеморезистентными клетками: хотя рост IMR-32 ингибировался равномерно с высокой эффективностью при всех исследуемых диапазонах доз и продолжительности воздействия (фиг. 4A), BE(2)C клетки показали только ограниченное ингибирование роста при применении PF108-(SN22)₂ при дозах ≤ 40 нг лекарственного средства на лунку или длительность воздействия ≤ 4 ч. Примечательно, что чувствительность этих клеток к свободному SN22 с химически немодифицированным псороником F-108 или без него также сильно смещалась по сравнению с IMR-32 в сторону более высоких доз и более длительных воздействий, что согласуется с хеморезистентным фенотипом BE(2)C, демонстрирующим потерю функции p53 и пониженную чувствительность к различным семействам химиотерапевтических средств, как показано в предыдущих исследованиях.

6. Сравнительное поглощение и удержание опухолью SN22, сформулированного в виде пролекарства с полксамером.

Эффективность подхода к доставке с использованием пролекарств на основе полксамера продемонстрирована данными, показывающими быстрое поглощение опухолью и длительное внутриопухолевое удерживание SN22, вводимого в виде конъюгата PF108-(SN22)₂ (фиг. 2 и 5). PF108-(SN22)₂ обеспечивает пролонгированное присутствие лекарственного средства в ортотопических опухолях NB на уровнях примерно на два порядка выше, чем указанная в сообщениях эффективная локальная концентрация, необходимая для подавления роста хеморезистентных NB клеток.

Анализ распределения в органах подтвердил быстрое накопление и длительное удержание SN22, доставляемого в виде пролекарства, с относительно небольшими количествами лекарственного средства, поглощаемыми органами ретикулоэндотелиальной системы, печенью и селезенкой. Значительное количество SN22, вводимого в виде PF108-(SN22)₂, определено в крови через 4 и 24 ч после введения, что соответствует продолжающемуся накоплению лекарственного средства в опухоли в течение этого периода времени (фиг. 5). Это контрастирует с быстрым выведением лекарственного средства, наблюдаемым в периферических органах, селезенке, легких и почках. Важно отметить, что ингибиторы топоизомеразы I высокоспецифичны для делящихся клеток (S-фаза), в отличие от других химиотерапевтических средств, которые могут быть высоко цитотоксичными даже в отсутствие активной репликации.

Наряду с ограниченной дистрибуцией и быстрым выведением лекарственного средства из периферических органов, наблюдаемым при доставке пролекарства на основе полксамера, фармакологически селективный способ действия потенциально дополнительно снижает риск значительной системной токсичности, что согласуется с отсутствием симптомов острой системной токсичности (диарея, язвы, анорексия, кахексия или потеря массы тела).

7. Полксамер-SN22 пролекарство вызывает сокращение и подавляет повторный рост малых и больших опухолей NB, демонстрируя транзистентный ответ на иринотекан.

Эффективность стратегии пролекарства на основе полксамера в обеспечении устойчивых противораковых эффектов на малые и большие опухоли NB была продемонстрирована экспериментально с использованием схемы введения PF108-(SN22)₂ один раз в неделю (модель ортотопического ксенотрансплантата IMR-32, фиг. 6). Примечательно, что, несмотря на свой хемо-наивный фенотип, ортотопические NB опухоли, установленные с использованием MYCN-амплифицированных клеток IMR-32, показали только транзистентный ответ на иринотекан (вводимый $\times 2$ раза в неделю). Вместе с результатами, демонстрирующими эффективность пролекарственного подхода в модели BE(2)C ксенотрансплантата рефрактерного заболевания (фиг. 3), это обеспечивает убедительное доказательство в поддержку доставки на основе полксамерного пролекарства в контексте NB высокого риска, демонстрируя ограниченный или неограниченный ответ на обычную химиотерапию.

Пример 2. PEG-[SN22]₄

1. Синтез PEG-[SN22]₄

Конъюгирование карбоксилированного 4-цепочечного PEG (JenKem Technology, Mn=20,553 Да) с SN22 с использованием 1,3-дициклогексилкарбодиимида (DCC) в качестве активирующего агента для карбоксильных групп, 4-диметиламинопиридин тозилата (DPTS) в качестве катализатора и CH₂Cl₂ в ка-

честве растворителя приводило к образованию полимерного конъюгата, содержащего 0,17 ммоль/г или 6,4 мас.% лекарственного средства. ^1H ЯМР показал, что SN-22 был ковалентно связан с полимером сложноэфирными связями между карбоксильными группами карбоксилированного полимера и 20-OH SN22.

2. Результаты экспериментов

Для оценки восприимчивости SN38 и SN22 к оттоку ABCG2 была идентифицирована ABCG2-ноль NB клеточная линия, NLF. NLF трансфицировали вектором экспрессии ABCG2, а затем отбирали одно-клеточные клоны со следовыми, низкими и промежуточными уровнями экспрессии ABCG2 (фиг. 7A). Далее оценивали чувствительность NLF и ABCG2-экспрессирующих клонов к различным концентрациям SN38 или SN22 и непрерывно отслеживали рост с использованием системы анализа живых клеток IncuCyte® S3. Клоны с более высокими уровнями ABCG2 становились все более резистентными к SN38, при этом они оставались полностью чувствительными к SN22 (фиг. 7B). Это предполагает, что эндогенная экспрессия ABCG2, которая характеризует агрессивные NB и стволовые клетки NB, способствует лекарственной резистентности к иринотекану/SN38 и, возможно, другим химиотерапевтическим средствам, чувствительным к оттоку ABCG2.

Для исследования различных схем SN22 при NB *in vivo*, осуществляли исследование с использованием модели NB ксенотрансплантата в боковой области мышцы, субклона хемо-наивной SH-SY5Y NB линии у иммунодефицитных nu/nu мышей. В предварительном эксперименте оценивали две разные схемы лечения PEG-[SN22]₄ (10 мг/кг/доза) по сравнению с CPT-11 (25 мг/кг/доза) в/в два раза в неделю в течение 4 недель. PEG-[SN22]₄ вводили либо два раза в неделю в течение двух недель, либо один раз в неделю в течение четырех недель (по 4 дозы). Несмотря на то, что вводили вдвое большие дозы CPT-11 при 2,5× более высокой дозе = PEG-[SN22]₄ был намного более эффективным в индукции ремиссии и увеличении периода выживания.

Далее PEG-[SN22]₄, PEG-[SN38]₄ и CPT-11 в мышечной модели NB ортотопического ксенотрансплантата с хеморезистентной линией NB SKNBE(2)C. BE(2)C клетки трансфицировали вектором экспрессии люциферазы для возможности биолюминесцентной визуализации. Мышей обрабатывали один раз в неделю в течение 4 недель либо PEG-[SN22]₄ (10 мг/кг/доза), PEG-[SN38]₄ (10 мг/кг/доза), либо CPT-11 (15 мг/кг/доза). В этой хеморезистентной модели CPT-11 не имел никакого эффекта, при этом как PEG-[SN22]₄, так и PEG-[SN38]₄ были чрезвычайно эффективны в уменьшении опухоли (фиг. 8). В то время как опухоли быстро возобновляли рост после прекращения лечения у мышей, получавших PEG-[SN38]₄, лечение PEG-[SN22]₄ приводило к полному исчезновению опухолей и длительному ингибированию их роста после окончания периода лечения, что позволяет предположить, что PEG-[SN22]₄ обладает превосходной эффективностью против рефрактерных заболеваний, предположительно из-за его способности преодолевать приобретенную лекарственную резистентность.

PEG-[SN22]₄ также использовали для лечения *de novo* NB в TH-MYCN трансгенной мышечной модели. Спонтанные опухоли развиваются в параспинальных ганглиях или надпочечниках к 4-5 неделям почти у всех мышей с двумя копиями трансгена. После пальпации опухоли (4-5 недель) мышей разделяли на 4 группы: контроль - без лечения; лечение CPT-11 (15 мг/кг/доза), PEG-[SN38]₄ (10 мг/кг/доза) или PEG-[SN22]₄ (10 мг/кг/доза). Мышей обрабатывали один раз в неделю в течение 4 недель. Опухоли быстро прогрессировали у животных, не получавших лечения, и рост опухоли лишь немного задерживался при лечении CPT-11. Мышей умерщвляли, когда у них появились клинические признаки опухолевой нагрузки. Однако, все опухоли регрессировали при лечении PEG-[SN22]₄ и становились непальпируемыми в течение 1-2 недель лечения (фиг. 9). Они оставались непальпируемыми у всех мышей в течение более 180 дней после начала лечения SN22. Несколько таких мышей умерщвляли и место опухоли исследовали макроскопически и микроскопически, но никаких признаков опухоли не было обнаружено ни у одной из мышей. Эти данные свидетельствуют о том, что PEG-[SN22]₄ чрезвычайно эффективен против спонтанных опухолей, возникающих у иммунокомпетентных мышей, и даже четырех еженедельных доз было достаточно для обеспечения долговременной ремиссии и излечения у всех животных.

PEG-[SN22]₄ использовали для лечения двух репрезентативных сарком, растущих как ксенотрансплантаты, аналогичным образом. Осуществляли обработку линии TC-71 хеморезистентной саркомы Юинга (EWS) и линии Rh30 альвеолярной (фьюжн-положительной) рабдомиосаркомы (RMS). Через 180 дней у всех EWS мышей не было пальпируемых опухолей, но у двух мышей с ксенотрансплантатами RMS рост опухоли возобновился примерно через 150 дней, и их пришлось умертвить (фиг. 10). Поскольку эти мышей обрабатывали только 4 еженедельными дозами одного лекарственного средства, возможно, что этих рецидивов можно было бы избежать с использованием более длительного лечения или комбинации с другим средством. Тем не менее, эти результаты в EWS и RMS демонстрируют, что эффективность PEG-[SN22]₄ не ограничивается NB или уникальна для NB, но применима к другим солидным опухолям.

Представленные выше результаты показывают значительную эффективность PEG-[SN22]₄ в уничтожении опухолей из NB ксенотрансплантатов, а также спонтанных NB, возникающих у иммунокомпетентных трансгенных животных. Большинство животных были "вылечены", как было определено по бес-

событийной выживаемости (EFS) в течение 180-200 дней от начала лечения. Аналогичные результаты были получены при обработке одной хеморезистентной EWS линии и одной фьюжн-положительной RMS линии в качестве ксенотрансплантатов в боковой области. Таким образом, PEG-[SN22]₄ эффективен в качестве единственного средства для получения долгосрочной EFS в этих животных моделях агрессивных солидных опухолей у детей и других состояний, как описано в настоящей заявке.

Клеточные линии. Панель из 4 клеточных линий NB, представляющих основные генотипы (MYCN амплификация, делеция 1p36, мутация ALK) NB высокого риска, а также как хемо-наивные, так и хеморезистентные опухоли (SY5Y, IMR5, NLF, SKNBE2C), можно использовать для всех исследований *in vitro* и *in vivo*. Клетки выращивают в RPMI-1640 (Gibco) с 10% фетальной телячьей сывороткой (Cellgro) и поддерживают в увлажненной атмосфере, состоящей из 95% воздуха и 5% CO₂. Клетки собирают с использованием 0,02% Na₄ EDTA в фосфатно-солевом буфере (PBS). Используемые RMS линии представляют собой RH18 и RH30 (эмбриональные, альвеолярные); EWS линии представляют собой TC32 и TC71 (диагностика, рецидив); и OS линии представляют собой U2OS и SAOS2.

Мыши

Используют мышей Foxn1^{nu}/Foxn1^{nu} (JAX stock #007850) шестинедельного возраста от Jackson Laboratories. Мышей содержат в условиях контролируемой влажности и температуры в режиме свет/темнота с 12-часовыми интервалами. Эти мыши находятся в фоновом генотипе 129-SvJ. У мышей, гомозиготных по трансгену, обычно развивались опухоли в течение 4-5 недель.

Вводимые в бок ксенотрансплантаты

Мышам вводят SQ в правый бок 1×10^7 клеток NB, суспендированных в 0,1 мл матригеля (Corning, Tewksbury, MA). Опухоли измеряют вручную 2 раза в неделю в двух направлениях (мм) с использованием штангенциркуля. Объем (см³) рассчитывается следующим образом: $[(0,523 \times L \times W^2)/1000]$, где L > W. Массу тела определяют 2х/неделя, и лечебные дозы корректируют, если изменение массы тела >10%. Мышей (n=10 на группу) обрабатывают при помощи PEG-[SN22]₄ путем инъекции в хвостовую вену 1х/неделя в течение 4 недель, как только объемы опухоли достигают 0,2 см³ (2). PEG-[SN22]₄ вводят в количестве 10 мг/кг/доза; CPT-11 (CPT-11; 15 мг/кг) или только носитель используют в качестве положительного и отрицательного контролей.

Ортогипические ксенотрансплантаты

NB клетки, стабильно экспрессирующие люциферазу, имплантируют в количестве 10^6 клеток на животное в надпочечниковую жировую подушку голых бестимусных мышей (nu/nu). Опухоль проверяют и опухолевую нагрузку после этого контролируют два раза в неделю методом биолюминесцентной визуализации с использованием системы визуализации Xenogen IVIS (Perkin Elmer, Santa Clara, CA) в сочетании с программным обеспечением Living Image (Caliper Life Sciences, Hopkinton, MA, USA). После достижения размера опухоли 1 см³ (~28 дней после инокуляции) мышей с опухолями рандомизируют на группы по 10 животных и вводят в/в однократную дозу 120 мкл PEG-(SN22)₄, CPT-11 или носителя, как указано выше.

Фармакокинетический анализ PEG-[SN22]₄ и CPT-11

Мышам (n=3 на группу, на момент времени) с ксенотрансплантатами в боковой области вводят разовую дозу PEG-[SN22]₄ в концентрации 10 мг/кг, или CPT-11 в концентрации 15 мг/кг в/в через хвостовую вену. Используют более низкую дозу, потому что CPT-11 является пролекарством, которое требует преобразования в активный SN38 в печени. Получают ретроорбитальную и терминальную кровь и собирают в пробирки объемом 2 мл, содержащие гепарин натрия (BD). Ткани (опухоль, легкое, печень, селезенка, почки) собирают после умерщвления через 4, 12, 24, 48 и 72 ч после перфузии сердца холодным физиологическим раствором и анализируют при помощи CHOP Pharmacology Core. Общие уровни SN38, SN22 и CPT-11 анализируют в крови мышей (разбавленной водой 1:1) и гомогенатах тканей методом СВЭЖХ-МС/МС.

Пример 3. [PEG-SN38-BG]₈

1. Синтез трехкомпонентного пролекарства на полимерной основе

Пролекарства, как описано в настоящей заявке, несут либо восемь, либо две гибридных молекулы лекарственного средства-лиганд, связанных с разветвленным или линейным PEG носителем, соответственно, через расщепляемую *in situ* сложноэфирную связь. Их гидролитическая лабильность и скорость активации увеличены по сравнению с обычными (ациловыми) сложными эфирами из-за сильного эффекта электронного замещения алкоксиацетильной группы.

Сначала N-Вос-защищенную аминотетрагидрофурановую кислоту конъюгировали с SN-38 (AsaTech, Bristol, PA) с выходом 85% с использованием 4-N,N-диметиламинопиридин тозилата (DPTS) в качестве катализатора, 1,3-дициклогексилкарбодиимида (DCC) в качестве активирующего агента для карбоксильных групп и дихлорметана в качестве растворителя. Защитную группу удаляли трифторуксусной кислотой и конъюгат подвергали взаимодействию в смеси тетрагидрофурана и дихлорметана с 1,3-ди-Вос-2-(трифторметилсульфонил)гуанидином в качестве гуанидинилирующего агента (выход: 75%). Низкомолекулярный конъюгат Вос-защищенного BG и SN-38, соединенный через гидролитически расщепляемый 6-гексаноиловый спейсер, затем присоединяли к карбоксилированному 8-цепочечному

PEG (JenKem Technology, $M_n=37390$ Да, $PDI=1,06$), также с использованием DPTS, DCC и дихлорметана в качестве катализатора, активатора и растворителя, соответственно.

Для очистки полимер осаждали диэтиловым эфиром из раствора в бензоле, а остаточный DPTS удаляли промыванием водным сульфатом натрия (21% мас./мас.). Отсутствие подвижных соединений подтверждали на этой стадии анализом ТСХ (силикагель, хлороформ-ацетонитрил, 7:3). Наконец, защитные группы удаляли из гуанидиновых фрагментов обработкой трифторуксусной кислотой. Полученный полимер [PEG-SN38-BG]₈ промывали диэтиловым эфиром и сушили в вакууме. Структуру и эффективность функционализации продукта анализировали при помощи ¹H ЯМР, показывавшем 0,18 ммоль/г (7,1% по массе) SN-38 и эквивалентное количество BG, связанного с полимером. Чистоту подтверждали анализом ТСХ и ¹H ЯМР.

2. Поглощение для таргетной терапии опухолей.

SN-38, доставленный в виде BG-функционализированного пролекарства на основе 8-цепочечного PEG [PEG-SN38-BG]₈, в эквивалентной дозе, соответствующей 10 мг SN-38 на кг, стабильно присутствовал в опухолях при концентрациях во много раз выше: $2,82 \pm 0,53$ мкг/г, $4,46 \pm 1,59$ мкг/г и $2,63 \pm 0,85$ мкг/г через 1, 4 и 24 ч соответственно (фиг. 11), из чего можно сделать вывод, что доставка пролекарства на полимерной основе может обеспечить стабильные терапевтически эффективные уровни лекарственного средства, необходимые для подавления роста рефрактерных опухолей, не отвечающих на стандартные методы лечения.

В соответствии с устойчивым внутриопухолевым присутствием SN-38 на уровнях, на два порядка превышающих заявленный терапевтический порог 25 нг/мл для лекарственно-резистентной NB клеточной линии BE(2)C, лекарственное средство, сформулированное и введенное в виде [PEG-SN38-BG]₈, вызывало быструю регрессию опухоли и сильно подавляло повторный рост малых и больших ортотопических BE(2)C ксенотрансплантатов (фиг. 12A). Долговременный противораковый эффект пролекарства заметно увеличил бессобытийную выживаемость животных ($t_{50\% \text{ выживаемость}}$ 130 и 88 дней, соответственно, по сравнению с 12 днями для животных, не получавших лечения, фиг. 12B), в отличие от незначительного терапевтического эффекта и увеличения выживаемости при использовании иринотекана, вводимого в эквивалентной дозе в этом исследовании ($t_{50\% \text{ выживаемость}}$ в течение 20 дней).

Важно отметить, что незначительный эффект иринотекана в этой модели демонстрирует адекватность подхода доклинической оценки, резюмируя терапевтическую задачу достижения длительного клинически значимого ответа в условиях агрессивной, рефрактерной NB человека. В то же время, [PEG-SN38-BG]₈ был способен вызывать быстрое уменьшение опухоли и стабилизировать заболевание без прогрессирования, наблюдаемого во время и после периода лечения, состоящего из восьми доз (последнюю дозу вводили на 24 день). Примечательно, что во время лечения пролекарством [PEG-SN38-BG]₈ не наблюдали никаких признаков системной токсичности, таких как диарея, натяжение кожи (из-за обезвоживания), изъязвления кожи, анорексия, кахексия или замедление набора веса.

3. Средства, усиливающие экспрессию NET, могут дополнительно улучшать эффективность нацеленных на поглощение-1 пролекарств.

Воринонат, являющийся сильным ингибитором рап-HDAC с профилем токсичности, который в значительной степени не перекрывается с профилем ингибиторов топоизомеразы I, как было показано, существенно увеличивал экспрессию NET в опухолях NB и сенсibilizировал опухолевые клетки к препаратам камптотецина путем ингибирования экспрессии ферментов для репарации разрывов ДНК и стимулирования индуцированного повреждением ДНК апоптоза [44], оба эффекта имеют значение для усиления таргетной терапии нейроэндокринных опухолей с использованием BG-функционализированных пролекарств SN-38. Исследовали потенцирующий эффект вориноната на ингибирование роста клеток BE(2)C при помощи [PEG-SN38-BG]₈ по сравнению с SN-38.

Воринонат заметно усиливал антипролиферативный эффект [PEG-SN38-BG]₈ ($p < 0,0001$ для члена взаимодействия C в выражении $z=z_0+A \cdot x+B \cdot y+C \cdot [x \cdot y]$, фиг. 13A), но также имел умеренный синергизм с химически немодифицированным SN-38 ($P=0,087$ для C, фиг. 13B). Это согласуется с комбинированными, связанными и не связанными с экспрессией NET механизмами потенцирования лекарственного средства, демонстрируемыми воринонатом, добавляя еще большее усиление ингибирования роста клеток NB BG-функционализированным пролекарством. Примечательно, что в диапазоне низких микромолярных концентраций (1-5 мкМ), где воринонат сильно усиливал действие пролекарства, его собственный эффект ингибирования роста клеток BE(2)C был только умеренным (фиг. 13A), что согласуется с умеренной монотерапевтической активностью вориноната в доклинических моделях NB.

4. Опосредованное пролекарством ингибирование роста хеморезистентных NB клеток и его фармакологическое потенцирование.

Чтобы оценить специфический вклад таргетирующего лиганда, включенного в структуру пролекарства, активность ингибирования клеточного роста [PEG-SN38-BG]₈ на NET-экспрессирующих хеморезистентных клетках NB сравнивали с контрольной молекулой, [PEG-SN38]₈, сконструированной аналогичным образом, но без BG фрагмента. Кроме того, установив, что ингибитор рап-HDAC, который, как показано, положительно регулирует экспрессию NET и усиливает поглощение-1 в NB клетках и ксе-

нотрансплантатах опухоли, сильно усиливает антипролиферативный эффект [PEG-SN38-BG]₈ на NET-экспрессирующих клетках NB (фиг. 13), была рассмотрена гипотеза о том, что селективный ингибитор HDAC со специфичностью для подсемейства HD типа 1 (энтинонат) также будет синергетически взаимодействовать с [PEG-SN38-BG]₈.

Сильное различие в способности подавлять пролиферацию хеморезистентных NB клеток наблюдали между трехкомпонентным пролекарством и двухкомпонентной контрольной конструкцией, собранной без лиганда BG. В то время как рост NET-экспрессирующих клеток BE(2)C ингибировался [PEG-SN38-BG]₈ с высокой эффективностью, сопоставимой с активностью свободного SN-38 в *in vitro* условиях прямого контакта лекарственное средство-клетка, двухкомпонентная конструкция, [PEG-SN38]₈, была заметно менее эффективна (фиг. 14A), указывая на важность трехкомпонентной конструкции и роли BG в усилении антипролиферативного ответа. В отдельном исследовании сильный потенцирующий эффект на опосредованное пролекарством подавление роста клеток NB был показан для HDAC1-специфического блокатора энтиноната (фиг. 14B, $p < 0,001$ для члена взаимодействия C). Интересно, что это открытие предполагает, что энтинонат, высокоселективное нехимиотерапевтическое средство с эпигенетическим механизмом действия, может синергетически взаимодействовать с BG-функционализированными терапевтическими средствами, возможно за счет усиления их поглощения, подобно химически отличному ингибитору рап-HDAC вориностату.

5. Сравнительное поглощение и удержание опухолью SN-38, сформулированного в виде NET-нацеленного пролекарства.

Эффективность терапевтической стратегии на основе пролекарств была продемонстрирована в исследованиях, показывающих быстрое поглощение опухолью и длительное внутриопухолевое удержание SN-38, доставленного в виде трехкомпонентного пролекарства [PEG-SN38-BG]₈ (фиг. 11 и табл. 2). В отличие от SN-38, вводимого в форме его клинически используемого фармакологически неактивного предшественника (иринотекана), доставка на основе пролекарства обеспечивает локализацию и устойчивое внутриопухолевое присутствие SN-38 на уровнях примерно на два порядка выше, чем указанная в сообщениях концентрация SN-38, требуемая для подавления роста хеморезистентных NB клеток BE(2)C. Анализ осуществляли в больших ортотопических ксенотрансплантатах BE(2)C ($1,0 \pm 0,4 \text{ см}^3$, $n=5$) с использованием анализа ВЭЖХ.

Таблица 2. Внутриопухолевые уровни лекарственного средства, выраженные как % дозы на грамм опухоли (представлены как среднее значение \pm SD)

Время после введения	Иринотекан (15 мг/кг)		[PEG-SN38-BG] ₈ (10 мг SN-38 на кг)
	SN-38	Иринотекан	Всего SN-38
4 часа	0,075 \pm 0,019	0,142 \pm 0,031	1,78 \pm 0,28
24 часа	0,012 \pm 0,005	0,004 \pm 0,001	1,05 \pm 0,15

6. Пролекарство [PEG-SN38-BG]₈ вызывает регрессию опухоли и достигает "излечения" в модели агрессивной NB, демонстрируя только временный ответ на обычную терапию.

Эффективность стратегии трехкомпонентного пролекарства в обеспечении устойчивых противоопухолевых эффектов против агрессивных NB опухолей была экспериментально показана на модели ортотопического ксенотрансплантата IMR-32 (фиг. 15). [PEG-SN38-BG]₈, вводимый два раза в неделю в течение 4 недель, вызывал быстрое уменьшение опухоли без последующего повторного роста в модели хемо-наивного MYCN-амплифицированного заболевания. Это контрастирует с опухолями, которые начинают повторно расти сразу после прекращения лечения, в группе животных, получавших предшественник SN-38 иринотекан (фиг. 15A, B). Вместе с результатами, демонстрирующими эффективность пролекарственного подхода в BE(2)C модели ксенотрансплантата рефрактерного заболевания (фиг. 12), это обеспечивает убедительное доказательство в поддержку доставки на основе трехкомпонентного пролекарства в контексте NB высокого риска, демонстрируя ограниченный или отсутствие ответа на обычную химиотерапию.

7. Трехкомпонентные конструкции демонстрируют потенциал для лечения мультилекарственно-резистентной нейробластомы высокого риска.

SN-38, сформулированный и вводимый в течение 4 недель (2×/неделя) в виде Транспортёр норэпинефрина (NET)-нацеленного полимер-связанного пролекарства, вызывал быструю регрессию опухоли, полностью подавлял повторный рост хеморезистентных ортотопических ксенотрансплантатов BE(2)C и значительно увеличивал бессобытийную выживаемость (> 14 недель, фиг. 16A). Это отличается от иринотекана, не имеющего противоопухолевого эффекта в этой модели, а также является значительным улучшением по сравнению с двухкомпонентным контролем [PEG-SN38]₄, который ингибировал рост опухоли только на время периода лечения (фиг. 16A). Кроме того, перевод животных, у которых во время лечения иринотеканом быстро развились большие опухоли (2 см³), на [PEG-SN38-BG]₈ вызывал уменьшение размеров их опухолей и оставлял их неопределяемыми в течение > 12 недель (исследование "спасения", фиг. 16B).

Важно отметить, что отсутствие противоопухолевого эффекта, проявляемого иринотеканом, анало-

гично отсутствию ответа, наблюдаемого у пациентов с NB ультравысокого риска, показывает, что доклинические модели точно воспроизводят клиническое поведение рефрактерной NB. Примечательно, что длительный и сильный терапевтический эффект, наблюдаемый при использовании [PEG-SN38-BG]₈, не сопровождался признаками системной токсичности (диарея, натяжение кожи или изъязвления, анорексия, хахексия или замедление набора массы тела).

При испытании в экспериментальных условиях, моделирующих менее терапевтически сложное хемо-наивное заболевание, иринотекан был способен подавлять рост опухоли на протяжении лечения (4 недели), тогда как [PEG-SN38-BG]₈, вводимый в течение того же периода времени, полностью устранял NB опухоли (нет заметного повторного роста через 30 недель, фиг. 17). Эти результаты свидетельствуют о том, что NET-нацеленная доставка с пролекарством, связанным с полимерным носителем, может быть оптимизирована для успешного лечения различных стадий (впервые диагностированной или рецидивирующей) агрессивной MYCN-амплифицированной NB.

8. Пролекарство [PEG-SN38-BG]₈ вызывает регрессию и подавляет повторный рост диссеминированных опухолевых отложений в модели метастатической лекарственно-резистентной NB.

Эффективность NET-нацеленной доставки лекарственного средства на основе трехкомпонентного пролекарства в достижении длительных терапевтических эффектов против диссеминированной хеморезистентной NB оценивали на мышинной модели метастатического рефрактерного заболевания (фиг. 18). [PEG-SN38-BG]₈, вводимый в течение 4 недель, вызывал быстрое устранение установленных многоочаговых опухолевых отложений без заметного повторного роста в течение более 15 недель. Напротив, иринотекан, вводимый два раза в неделю в дозе 15 мг/кг, не оказывал значительного влияния на прогрессирование заболевания (фиг. 18А, В). В совокупности с экспериментально продемонстрированной эффективностью NET-нацеленного трехкомпонентного пролекарства против ортотопических рефрактерных опухолей (фиг. 16) эти результаты убедительно подтверждают обоснованность стратегии разработки пролекарства и ее терапевтический потенциал против как локализованных, так и диссеминированных заболеваний высокого риска, не отвечающих на традиционную терапию.

9. Опосредованное пролекарством ингибирование роста MYCN-амплифицированных мультилекарственно-резистентных NB клеток.

Наблюдали сильное различие в паттернах ответа, когда хеморезистентные NB клетки [BE(2)C] обрабатывали NET-нацеленным трехкомпонентным пролекарством (PF68-SN38-BG), по сравнению с не-таргетированным двухкомпонентным контролем (PF68-SN38) и свободным SN-38. В соответствии с хеморезистентным фенотипом BE(2)C, демонстрирующим потерю функции p53, рост клеток BE(2)C незначительно подавлялся свободным SN-38. Он также показал ограниченный и транзитный ответ на PF68-SN38. Холостой Плюроник F-68 не влиял на рост клеток. Однако 15-минутное воздействие PF68-SN38-BG в дозах ≥ 5 нМ SN-38 приводило к сильному и продолжительному антипролиферативному эффекту (фиг. 19).

Для оценки специфического вклада аффинности к NET, встроенной в дизайн пролекарства, ингибирующую рост BE(2)C активность PF68-SN38-BG испытывали с/без специфического блокатора NET (низоксетин, 1 мкМ). Двухкомпонентный PF68-SN38, включенный в качестве контроля, показал самую низкую ингибирующую активность при дозах ≤ 20 нМ SN-38. Эффект трехкомпонентного PF68-SN38-BG был заметно сильнее ($P=0,020$), но частично обратим посредством блокады NET (фиг. 20), подтверждая роль таргетирования NET.

В соответствии с этими результатами трехкомпонентное NET-нацеленное пролекарство, синтезированное аналогично с использованием Плюроника F-108 и вводимое в течение 4 недель (2×/неделя), вызывало быструю регрессию ортотопических BE(2)C опухолевых ксенотрансплантатов, в отличие от незначительного эффекта иринотекана в этой модели рефрактерной NB (фиг. 21А 20А). Также в отличие от двухкомпонентного PF108-SN38, трехкомпонентное пролекарство стабилизировало заболевание без прогрессирования в течение всего периода лечения. Кроме того, животные, быстро приближающиеся к конечной точке, демонстрировали заметное уменьшение опухоли при лечении пролекарством (исследование "спасение", фиг. 21В).

10. Сравнение PEG-[SN22]4 с PEG-[SN38]4 в ортотопическом ксенотрансплантате NB

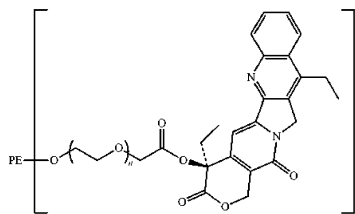
PEG-[SN22]4 сравнивали с PEG-[SN38]4 в ортотопическом ксенотрансплантате NB с хеморезистентной NB линией SKNBE(2)C. BE(2)C клетки трансфицировали вектором экспрессии люциферазы для возможности билюминесцентной визуализации. Мышей обрабатывали один раз в неделю в течение четырех недель либо PEG-[SN22]4 (10 мг/кг/доза), PEG-[SN38]4 (10 мг/кг/доза), либо СРТ-11 (15 мг/кг/доза). В этой хеморезистентной модели СРТ-11 имел очень небольшой эффект, тогда как и PEG-[SN22]4 и PEG-[SN38]4 были чрезвычайно эффективны в уменьшении опухоли (фиг. 22). Лечение при помощи PEG-[SN22]4 приводило к полному исчезновению опухоли к 2-3 неделям, но небольшая опухоль оставалась видимой у мышей, обработанных PEG-[SN38]4. Это говорит о том, что PEG-[SN22]4 имеет более высокую эффективность в этой мышинной модели NB ксенотрансплантата человека.

Хотя изобретение проиллюстрировано и описано в настоящей заявке со ссылкой на конкретные варианты осуществления, изобретение не предназначено для ограничения описанными выше деталями.

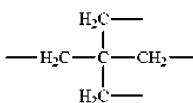
Напротив, возможно осуществление различных модификаций в деталях в пределах объема и диапазона эквивалентов формулы изобретения и без отклонения от изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

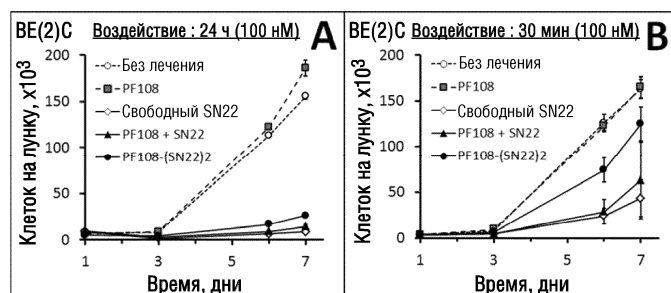
1. Макромолекулярное пролекарство, которое представляет собой PEG-[SN22]₄, который представлен следующей структурой:



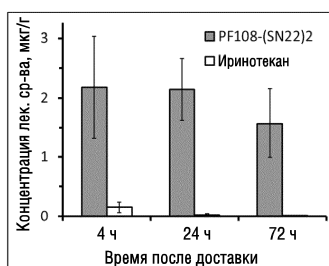
в котором
n=110 в среднем и
PE представляет собой



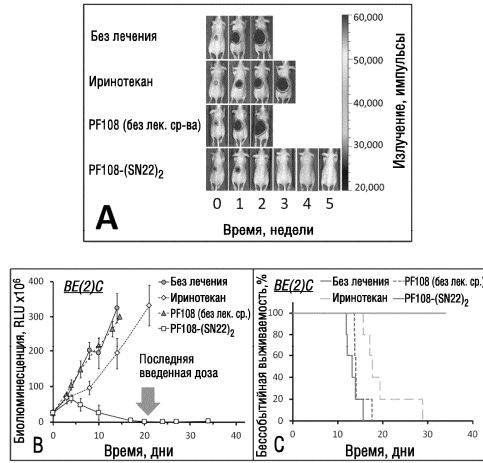
2. Способ лечения нейробластомы, включающий введение эффективного количества макромолекулярного пролекарства по п.1 нуждающемуся в этом субъекту.
3. Способ по п.2, где субъект представляет собой человека.
4. Способ лечения субъекта с солидной опухолью, включающий введение эффективного количества макромолекулярного пролекарства по п.1 нуждающемуся в этом субъекту.
5. Способ по п.4, где субъект представляет собой человека.
6. Способ лечения субъекта с опухолью головного мозга, включающий введение эффективного количества макромолекулярного пролекарства по п.1 нуждающемуся в этом субъекту.
7. Способ по п.6, где субъект представляет собой человека.



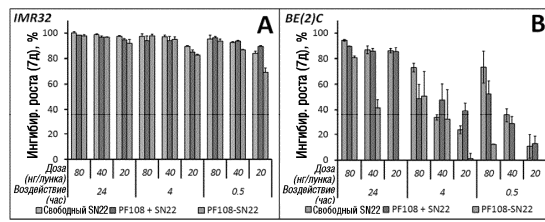
Фиг. 1



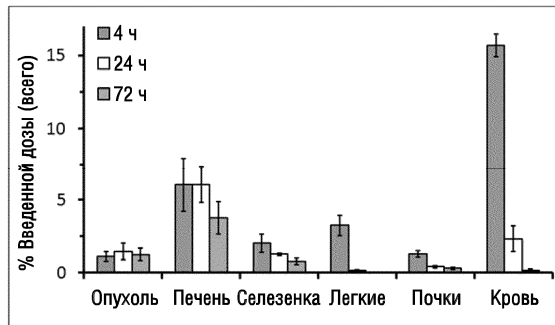
Фиг. 2



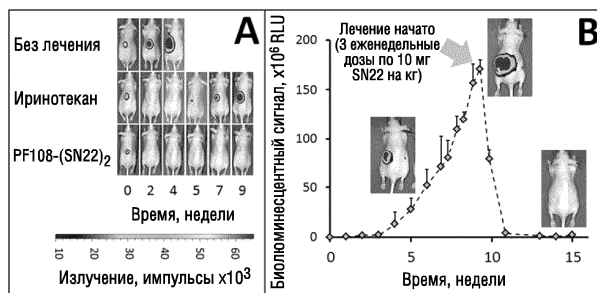
Фиг. 3



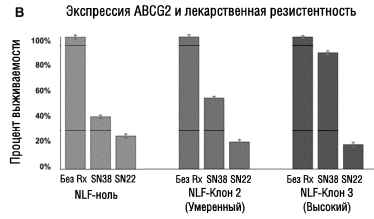
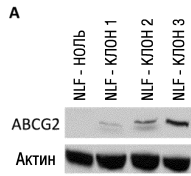
Фиг. 4



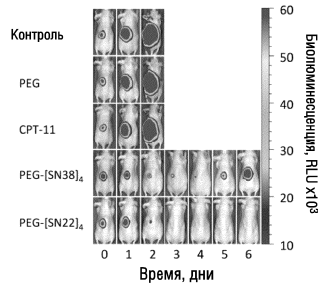
Фиг. 5



Фиг. 6

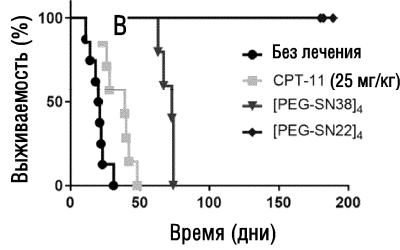


Фиг. 7

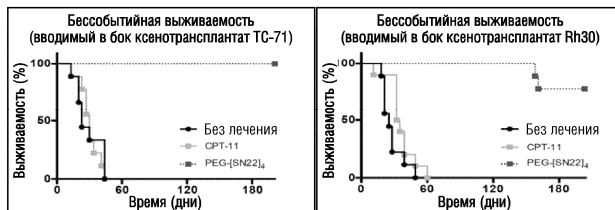


Фиг. 8

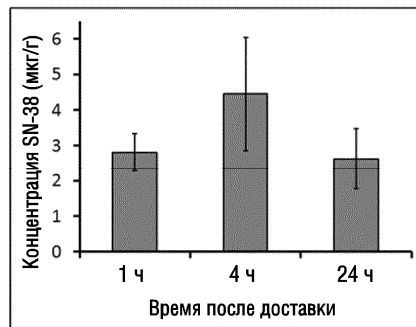
Бессобытийная выживаемость (трансгенных мышей TH-MYCN)



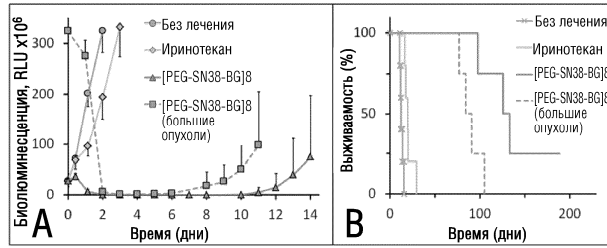
Фиг. 9



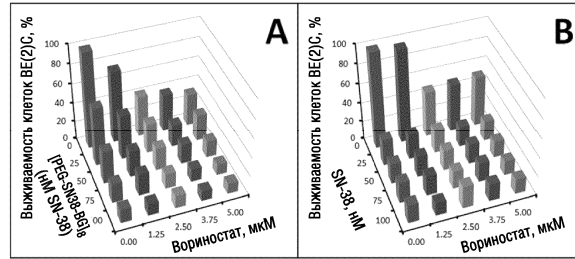
Фиг. 10



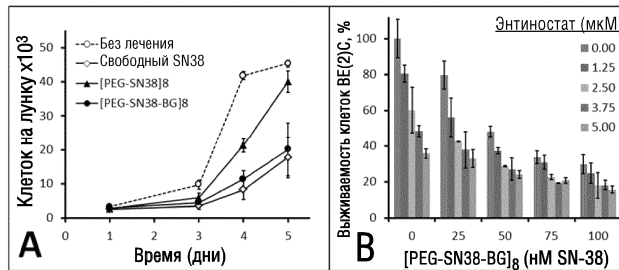
Фиг. 11



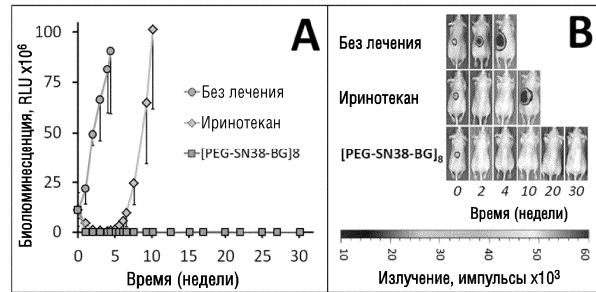
Фиг. 12



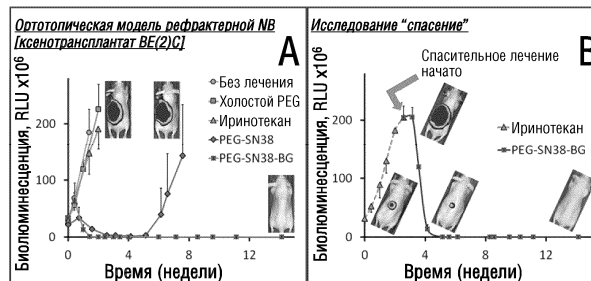
Фиг. 13



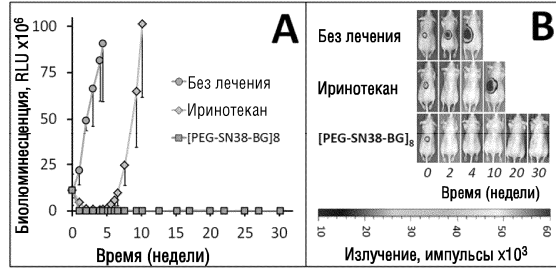
Фиг. 14



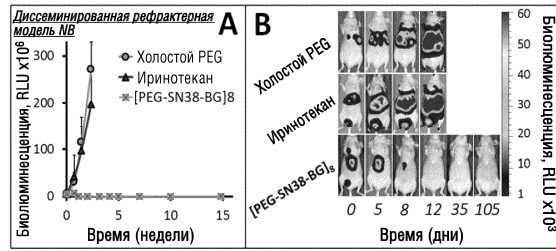
Фиг. 15



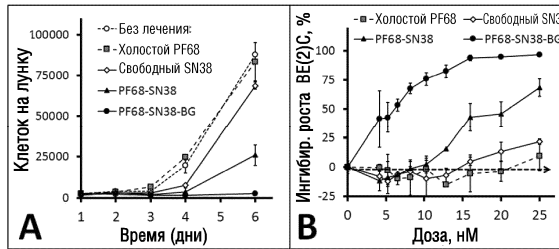
Фиг. 16



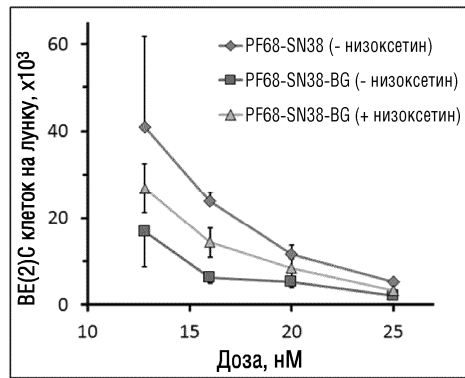
Фиг. 17



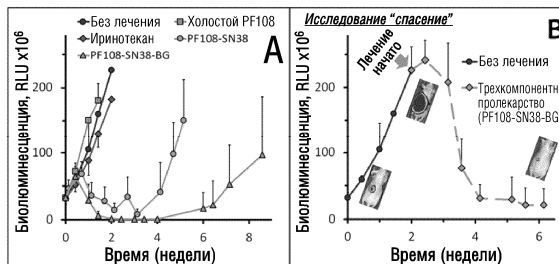
Фиг. 18



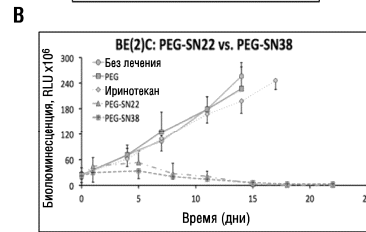
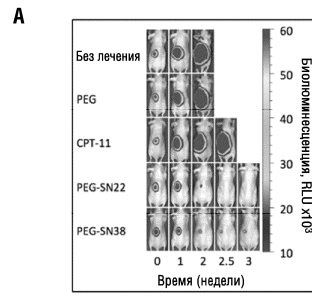
Фиг. 19



Фиг. 20



Фиг. 21



Фиг. 22