



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 119950749 A

(43) 申请公布日 2025. 05. 09

(21) 申请号 202510008384.X

A61K 47/54 (2017.01)

(22) 申请日 2019.09.17

A61P 35/00 (2006.01)

(30) 优先权数据

A61K 31/4745 (2006.01)

62/732,199 2018.09.17 US

(62) 分案原申请数据

201980060783.3 2019.09.17

(71) 申请人 费城儿童医院

地址 美国宾夕法尼亚州

(72) 发明人 M·乔尔内 I·阿尔费里夫

G·M·布罗德

(74) 专利代理机构 隆天知识产权代理有限公司

72003

专利代理师 于磊

(51) Int. Cl.

A61K 47/60 (2017.01)

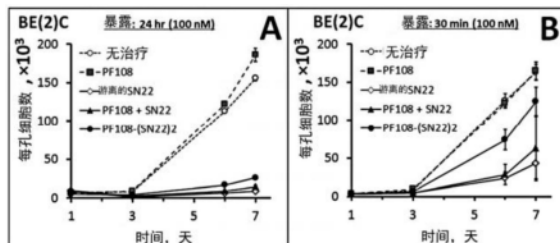
权利要求书1页 说明书17页 附图13页

(54) 发明名称

基于聚合物的大分子前药

(57) 摘要

提供了基于聚合物的大分子前药,其中喜树碱类似物通过在生理条件下不稳定的酯键与聚合物共价键合。还提供了用大分子前药治疗癌症,尤其是成神经细胞瘤的方法。



1. 一种大分子前药,其中至少两分子喜树碱类似物分子通过在生理条件下不稳定的酯键与泊洛沙姆聚合物共价键合。
2. 一种大分子前药,其中至少两分子的SN22类似物通过在生理条件下不稳定的酯键与PEG聚合物共价键合。
3. 一种大分子前药,其中至少两分子的喜树碱类似物通过在生理条件下不稳定的酯键与聚合物共价键合,其中至少一个喜树碱类似物被至少一个NE转运蛋白(NET)配体功能化。
4. 根据权利要求1或3所述的大分子前药,其中所述喜树碱类似物是SN22(7-乙基-喜树碱)、SN38(7-乙基-10-羟基喜树碱)或其组合。
5. 根据权利要求3所述的大分子前药,其中所述聚合物是泊洛沙姆聚合物。
6. 根据权利要求3所述的大分子前药,其中所述聚合物是聚乙二醇(PEG)聚合物。
7. 根据权利要求2或3所述的大分子前药,其中所述聚合物是多臂PEG聚合物。
8. 如上所定义的大分子前药,其中两分子的喜树碱类似物与所述聚合物共价键合。
9. 如上所定义的大分子前药,其中四分子的喜树碱类似物与所述聚合物共价键合。
10. 如上所定义的大分子前药,其中两至四分子的喜树碱类似物与所述聚合物共价键合。
11. 根据权利要求3所述的大分子前药,其中所述NE转运蛋白(NET)配体通过在生理条件下不稳定的酯键与所述喜树碱类似物共价键合。
12. 根据权利要求3所述的大分子前药,其中所述喜树碱类似物是SN-38。
13. 根据权利要求3所述的大分子前药,其中所述NE转运蛋白(NET)配体是苜蓿基胍(BG)。
14. 根据权利要求3所述的大分子前药,其中所述NE转运蛋白(NET)配体是苯乙基胍或酪胺。
15. 根据权利要求3所述的大分子前药,其中所述NE转运蛋白(NET)配体与所述喜树碱类似物之间的酯键是氧基己酰基酯。
16. 根据权利要求3所述的大分子前药,其中所述NE转运蛋白(NET)配体与所述喜树碱类似物之间的酯键是氧基乙氧基丙酰基酯或氧基乙氧基乙氧基丙酰基酯。
17. 如上所定义的大分子前药,其中所述酯键是氧基乙酸酯键。
18. 根据权利要求1至17中任一项所述的大分子前药在制备用于治疗受试者的成神经细胞瘤的药物中的用途。
19. 根据权利要求1至17中任一项所述的大分子前药在制备用于治疗受试者的实体瘤的药物中的用途。
20. 根据权利要求1至17中任一项所述的大分子前药在制备用于治疗受试者的脑肿瘤的药物中的用途。
21. 根据权利要求1至17中任一项所述的大分子前药在制备用于治疗受试者的癌症的药物中的用途。
22. 根据权利要求18至21中任一项所述的用途,其中所述受试者是人。

基于聚合物的大分子前药

[0001] 本申请是申请日为2019年9月17日、申请号为201980060783.3、发明名称为“基于聚合物的大分子前药”的申请的分案申请。

[0002] 与相关申请的交叉引用

[0003] 本申请要求于2018年9月17日提交的美国临时申请序列号62/732,199的申请日的权益,出于所有目的,该申请的内容通过引用整体并入本文。

[0004] 领域

[0005] 提供了大分子前药,其中喜树碱类似物通过在生理条件下不稳定的酯键与聚合物共价键合。还提供了用大分子前药治疗癌症,尤其是成神经细胞瘤(neuroblastoma)的方法。

背景

[0007] 成神经细胞瘤(NB)仍然是儿童期最常见且致命的实体瘤,占有儿童期癌症的8-10%,儿童因癌症死亡的15%。尽管其他儿科肿瘤的治愈率有所提高,但是NB患者的存活率已被落在后面。

[0008] 目前在临床上使用的密集、多模式疗法在超过一半的患者中不起作用(50-60%的患者经历了复发,没有治愈性的救助治疗选择),无响应的患者亚组提出了最严峻的治疗挑战,被定义为“超高”风险类别。具有高度多样性的病因学和普遍存在生物学上不利的变体的高风险NB目前已被作为一线治疗的有效抗癌剂逐渐解决,包括作为拓扑异构酶I抑制剂的喜树碱家族:拓扑替康(topotecan)和伊立替康(irinotecan)。然而,它们在侵袭性疾病方面的临床应用仍然欠佳,由于剂量限制性副作用和获得性耐药性在复发性或难治性NB患者中产生不良结果。重要的是,已表明对这些患者的治疗无效与有效抑制NB细胞生长所需的阈值药物水平增加1-3个数量级相关,达到临床上无法达到的水平。

[0009] 因此,为了对抗难治性NB,需要替代治疗方法,其可以明显增强肿瘤内递送并以治疗有效的药物水平扩展药物的存在而不增加全身暴露。本文描述的实施方案解决了这种需要。

发明内容

[0010] 在第一实施方案中,提供了一种大分子前药,其中至少两分子的喜树碱类似物通过在生理条件下(例如22°C,pH=7.2)不稳定的酯键与泊洛沙姆聚合物共价键合。

[0011] 在第二实施方案中,提供了一种大分子前药,其中至少两分子的SN22类似物通过在生理条件下不稳定的酯键与PEG聚合物共价键合。

[0012] 在第三实施方案中,提供了一种大分子前药,其中至少两分子的喜树碱类似物通过在生理条件下不稳定的酯键与聚合物共价键合,其中至少一个喜树碱类似物被至少一个NE转运蛋白(NET)配体功能化。

[0013] 在另一个实施方案中,喜树碱类似物是SN22(7-乙基-喜树碱)、SN38(7-乙基-10-羟基-喜树碱)或其组合。

- [0014] 在另一个实施方案中,聚合物是泊洛沙姆聚合物。
- [0015] 在另一个实施方案中,聚合物是聚乙二醇 (PEG) 聚合物。
- [0016] 在另一个实施方案中,聚合物是多臂PEG聚合物。
- [0017] 在另一个实施方案中,两分子的喜树碱类似物与聚合物共价键合。
- [0018] 在另一个实施方案中,四分子的喜树碱类似物与聚合物共价键合。
- [0019] 在另一个实施方案中,两至八分子的喜树碱类似物与聚合物共价键合。
- [0020] 在另一个实施方案中,NE转运蛋白 (NET) 配体通过在生理条件下不稳定的酯键与喜树碱类似物共价键合。
- [0021] 在另一个实施方案中,喜树碱类似物是SN 38。
- [0022] 在另一个实施方案中,NE转运蛋白 (NET) 配体是苜基胍 (BG)。
- [0023] 在另一个实施方案中,NE转运蛋白 (NET) 配体是苯乙基胍或酪胺。
- [0024] 在另一个实施方案中,NE转运蛋白 (NET) 配体和喜树碱类似物之间的酯键是氧基己酰基酯。
- [0025] 在另一个实施方案中,NE转运蛋白 (NET) 配体与喜树碱类似物之间的酯键为氧基乙氧基丙酰基或氧基乙氧基乙氧基丙酰基酯。
- [0026] 在另一个实施方案中,大分子前药是 $[\text{PEG-SN38-BG}]_8$ 。
- [0027] 在另一个实施方案中,大分子前药是 PF108-(SN22)_2 。
- [0028] 在另一个实施方案中,大分子前药是 PEG-[SN22]_4 。
- [0029] 在另一个实施方案中,酯键是氧基乙酸酯键。
- [0030] 在另一个实施方案中,提供了通过向有此需要的受试者施用有效量的如上所定义的大分子前药来治疗成神经细胞瘤的方法。
- [0031] 在另一个实施方案中,提供了通过向有此需要的受试者施用有效量的如上所定义的大分子前药来治疗患有实体瘤的受试者的方法。
- [0032] 在另一个实施方案中,提供了通过向有此需要的受试者施用有效量的如上所定义的大分子前药来治疗患有脑肿瘤的受试者的方法。
- [0033] 在另一个实施方案中,提供了通过向有此需要的受试者施用有效量的如上所定义的大分子前药来治疗癌症的方法。
- [0034] 在另一个实施方案中,有此需要的受试者是人。

附图简要说明

[0036] 图1:比较 PF108-(SN22)_2 前药与存在或不存在Pluronic F-108 (剂量等于100nM SN22) 的SN22对化疗耐药性 (chemoresistant) NB细胞 [BE (2) C] 的生长抑制作用。包括未经处理或用普通的未经化学修饰的Pluronic F-108处理的细胞作为对照。测试的暴露时间包括24小时和30分钟 (分别为A和B)。通过生物发光监测细胞随着时间的生长。结果显示为平均值 \pm SD。

[0037] 图2:与作为依立替康 (SN38的临床上使用的水溶性前体) 施用的SN38相比,作为基于泊洛沙姆的前药递送的SN22的肿瘤内水平 (4小时-3天)。该分析是在难治性NB的原位异种移植模型中进行的。在肾上脂肪垫中用悬浮在20%Pluronic F-127 (50 μ l) 中的BE (2) C细胞 (每只动物 10^6 个) 对无胸腺裸 (nu/nu) 小鼠 (n=5) 进行接种。在生物发光成像的控制下,

使肿瘤达到 $1.0 \pm 0.4 \text{cm}^3$ 的大小。以分别相当于 10mg/kg SN22或SN38的剂量通过尾静脉注射施用PF108- (SN22)₂或伊立替康($120 \mu\text{l}$)。收获肿瘤,称重并通过HPLC分析4、24和72小时时的肿瘤内药物水平。对两组以比较方式给出重量标准化的药物浓度,以平均值 \pm SD表示。

[0038] 图3:PF108- (SN22)₂在难治性高风险NS的原位模型中的治疗功效。根据[44]中所述的程序,对小鼠接种 10^6 个稳定表达荧光素酶的BE (2) C细胞。每周一次以相当于 10mg/kg SN22的剂量静脉内施用PF108- (SN22)₂治疗,持续4周。将每周两次以 10mg/kg SN38施用伊立替康作为阳性对照。盐水或未经化学修饰的Pluronic F-108用作阴性对照。通过定量生物发光监测肿瘤相关信号(在(A)中显示了0-5周时拍摄的代表性图像。在(B)中以图形方式显示的定量数据用平均值 \pm SD表示。在(C)中显示了本研究中各个动物组在5周内的生存曲线。

[0039] 图4:测试PF108- (SN22)₂前药与存在/不存在空白Pluronic F-108情况下的游离SN22的抗增殖作用。在表现出未接受化疗的(chemo-naïve)表型与化疗耐药性表型(分别为IMR32(A)和BE (2) C(B))的NB细胞之间以暴露持续时间(0.5、4、24小时)和剂量(相当于每孔20、40和80ng SN22)的函数比较了对治疗的反应。反应以治疗后7天的生长抑制百分比(平均值 \pm SD)显示。

[0040] 图5:作为PF108- (SN22)₂递送的SN22的器官分布和肿瘤内水平(4小时-3天)。分析是在原位BE (2) C异种移植物中进行的,在生物发光成像的控制下使该异种移植物达到 $1.0 \pm 0.4 \text{cm}^3$ 的大小。通过尾静脉注射以相当于 10mg/kg SN22的剂量施用前药。通过荧光测定法进行分析。药物量显示为每器官注射剂量百分比,用平均值 \pm SD表示。

[0041] 图6:PF108- (SN22)₂在未接受化疗的、MYCN扩增的NB的原位模型中的治疗功效。用 10^6 个表达荧光素酶的IMR-32细胞接种小鼠。接种后3周开始用伊立替康或PF108- (SN22)₂(10mg 药物/kg,分别为每周2次和1次,在4周内)治疗(A)。或者,在3周内每周一次将PF108- (SN22)₂施用于具有大10倍的NB肿瘤的动物(B)。通过定量生物发光监测肿瘤相关的信号。定量数据显示为平均值 \pm SD。

[0042] 图7:ABCG2表达以及NLF和转染克隆的生长。(A)与肌动蛋白对照相比,使用ABCG2抗体(Santa Cruz)对NLF和三个单细胞克隆进行了Western分析。克隆1、2和3分别具有痕量、低水平和中等水平的ABCG2表达。(B)在SN38或SN22(50ng/ml)的存在下NLF和表达ABCG2的克隆的生长。在第4天显示生长。

[0043] 图8:原位NB模型的治疗。将化疗耐药性、荧光素酶转染的SKNBE (2) C细胞(107)注射到裸鼠的肾周脂肪垫中。将小鼠分为五组:无治疗,或用空白PEG、CPT-11、PEG-[SN38]4或PEG-[SN22]4治疗(每组10只动物)。当肿瘤达到约 0.2cm^3 时开始治疗。用PEG-[SN38]4或PEG-[SN22]4治疗产生肿瘤消退,但仅PEG-[SN22]4治疗导致完全的肿瘤消失。

[0044] 图9:PEG-[SN22]4和PEG-[SN38]4在TH-MYCN转基因小鼠中的功效。每周一次x 4周通过尾静脉IV用盐水(N=8)、CPT-11(15mg/kg /剂量;N=7)、PEG-[SN38]4(10mg/kg /剂量;N=6)或PEG-[SN22]4(10mg/kg /剂量;N=6)治疗小鼠。当小鼠为约5周大且肿瘤大小为约 $1-2 \text{cm}^3$ 时开始治疗。当小鼠由于肿瘤负荷而显示痛苦体征时,将其从研究中移除。PEG-[SN22]4具有快速的肿瘤消退,并且在180-200天的尸检中未发现肿瘤。

[0045] 图10:用PEG[SN22]4治疗的EWS和RMS异种移植物的生存率。每周一次x 4周,用盐水、CPT-11(15mg/kg /剂量)或PEG-[SN22]4(10mg/kg /剂量)(全部为N=10)通过尾静脉IV对

小鼠进行治疗。左图:治疗4周后,具有EWS细胞系TC-71(化疗耐药性)的肋腹异种移植物的动物的生存率。PEG-[SN22]₄动物无一复发。右图:治疗4周后,肺泡(融合阳性)RMS细胞系Rh30的肋腹异种移植物的动物的生存率。用PEG-[SN22]₄治疗的动物中有两只在后期复发,而一只具有小的生长缓慢的肿瘤,而其余7只在180-200天无肿瘤。

[0046] 图11:作为使用8臂(40kDa)PEG作为载体和BG作为靶向配体设计的靶向NET的大分子前药([PEG-SN38-BG]₈)递送的SN-38的肿瘤内水平。在难治性NB的原位异种移植模型中进行分析。用悬浮在20%Pluronic F-127(50 μ l)中的BE(2)C细胞(每只动物10⁶个)在肾上腺脂肪垫中对无胸腺裸(nu/nu)小鼠(n=5)进行接种。在生物发光成像的控制下,使肿瘤达到1.0 \pm 0.4cm³的大小。通过尾静脉注射以相当于10mg/kg SN-38的剂量施用[PEG-SN38-BG]₈。收获肿瘤,称重,并通过HFLC进行分析。重量标准化的药物浓度用平均值 \pm SD表示。

[0047] 图12:[PEG-SN38-BG]₈在难治性高风险NB模型中的治疗功效。用稳定表达荧光素酶的BE(2)C细胞(10⁶)对无胸腺裸(nu/nu)小鼠进行接种。每周两次以相当于10mg/kg SN-38的剂量静脉内施用[PEG-SN38-BG]₈治疗,持续4周。每周两次以15mg/kg施用的伊立替康作为阳性对照。施用盐水(无治疗)的一组小鼠用作阴性对照。在另一组中,以相同的方案将前药施用于达到大10倍的肿瘤大小(2.0cm³,‘大肿瘤’)的动物。通过定量生物发光监测肿瘤相关信号。(A)中以图形方式表示的数据用平均值 \pm SD表示。(B)中显示了各个动物组在190天时间内的生存曲线。

[0048] 图13:评价伏立诺他在化疗耐药性NB细胞BE(2)C中对[PEG-SN38-BG]₈和SN-38的抗增殖活性的增强作用(分别见(A)和(B))。根据报道的伏立诺他诱导的NET表达在6小时时达到峰值,本实验选择6小时的暴露期。在存在/不存在伏立诺他(1.25-5.0 μ M)的情况下,将BE(2)C细胞与浓度相当于25-100nM SN-38的[PEG-SN38-BG]₈或SN-38一起孵育。通过生物发光测量细胞生长。通过应用模型 $z = z_0 + A \cdot x + B \cdot y + C \cdot [x \cdot y]$ 和测定相互作用项C的显著性来分析治疗后6天时的BE(2)C细胞生存数据的超加性(hyperadditivity)。

[0049] 图14:[PEG-SN38-BG]₈前药对表达NET的化疗耐药性NB细胞BE(2)C的抗增殖作用。与游离SN-38或缺少BG功能化的由两部分组成的[PEG-SN38]₈进行比较,研究了对细胞生长动力学的影响(A)。将细胞暴露于对应于125nM SN-38的当量浓度的化合物4小时。在另一个实验(B)中,在存在/不存在HDAC1特异性抑制剂恩替诺特(0-5 μ M)的情况下考查了对[PEG-SN38-BG]₈治疗的反应。前药的剂量在相当于0-100nM SN-38的范围内变化,并且暴露持续时间固定为6小时。通过生物发光监测细胞的生长。反应显示为治疗后6天时的细胞存活率%(平均值 \pm SD)。使用模型 $z = z_0 + A \cdot x + B \cdot y + C \cdot [x \cdot y]$ 并确定相互作用项C的显著性分析实验数据的超加性。

[0050] 图15:[PEG-SN38-BG]₈在未接受化疗的MYCN扩增的NB的原位异种移植模型中的治疗功效。用10⁶个表达荧光素酶的IMR-32细胞对小鼠进行接种。在接种后第21天开始用SN-38的水溶性前体(伊立替康)或[PEG-SN38-BG]₈以相当于10mg SN-38/kg的剂量进行治疗,每周2次,历经四周。通过定量生物发光监测肿瘤相关信号。(A)中的数据以平均值 \pm SD显示。(B)中包括每组的代表性生物发光图像。

[0051] 图16:[PEG-SN38-BG]₈在难治性、高风险NB的原位模型中的治疗功效。用稳定表达荧光素酶的BE(2)C细胞(10⁶)对无胸腺裸(nu/nu)小鼠进行接种。每周两次以相当于10mg/kg SN-38的剂量静脉内施用[PEG-SN38-BG]₈治疗,持续4周。包括每周两次施用伊立替康

(15mg/kg) 和当量剂量的由两部分组成的 [PEG-SN38]₄, 用于比较。施用空白 PEG 或盐水的小鼠组 (无治疗) 用作阴性对照 (A)。在“挽救”实验中, 对最初用伊立替康 (15mg/kg, 2次/周) 治疗的动物使用相同的方案施用前药, 该动物的肿瘤在 2 周时达到 2.0cm³ (B)。通过定量生物发光监测肿瘤相关信号。数据表示为平均值 ± SD。

[0052] 图17: [PEG-SN38-BG]₈ 在未接受化疗的 MYCN 扩增的 NB 的原位异种移植模型中的治疗功效。用 10⁶ 个表达荧光素酶的 IMR-32 细胞对小鼠进行接种。在接种后第 21 天开始用 SN-38 的水溶性前体 (伊立替康) 或 [PEG-SN38-BG]₈ 以相当于 10mg SN-38/kg 的剂量进行治疗, 每周 2 次, 历经四周。通过定量生物发光监测肿瘤相关信号。(A) 中的数据以平均值 ± SD 显示。代表性图像包括在 (B) 中。

[0053] 图18: [PEG-SN38-BG]₈ 在转移性难治性 NB 模型中的治疗功效。通过尾静脉向小鼠注射 10⁶ 个表达荧光素酶的 BE (2) C 细胞。在第 25 天开始用伊立替康 (15mg/kg) 或 [PEG-SN38-BG]₈ 以相当于 10mg SN-38/kg 的剂量治疗 (4 周, 2 次/周)。通过定量生物发光监测肿瘤相关信号 (A), 数据显示为平均值 ± SD。代表性图像包括在 (B) 中。

[0054] 图19: PF68-SN38-BG 前药与作为对照的由两部分组成的 (非靶向) PF68-SN38 和游离 SN-38 的抗增殖作用。在 15-min 暴露后表现出获得性 MDR [BE (2) C] 的 NB 细胞的反应显示为生长曲线 (A) 和随 SN-38 当量剂量 (0-25nM) 变化的治疗后 6 天时的生长抑制百分比 (B)。通过生物发光监测细胞生长。结果显示为平均值 ± SD。

[0055] 图20: PF68-SN38-BG 对化疗耐药性 NB 细胞 BE (2) C 的抗增殖作用的 NET-选择性。与缺少 BG 功能化的由两部分组成的 PF68-SN38 (A) 相比, 在存在或不存在使用尼索西汀 (1μM) 进行 NET 抑制的情况下考查细胞生长。将细胞暴露于当量浓度的化合物 15 分钟。通过 ANOVA 与 Tukey 事后检验分析治疗后 6 天的实验数据。

[0056] 图21: 指向 NET 的递送在难治性 NB 模型中的治疗功效。在肾上脂肪垫中用 10⁶ 个表达荧光素酶的 BE (2) C 细胞对小鼠进行接种。用伊立替康 (15mg/kg) 或用由两部分组成的构建体和由三部分组成的构建体以相当于 10mg SN-38/kg 的剂量 (4 周, 2 次/周, (A)) 开始治疗。或者, 在开始疗法之前使肿瘤达到 2cm³ (B)。通过定量生物发光监测疾病进展。肿瘤生长数据显示为平均值 ± SD,

[0057] 图22: 在裸鼠的肾周脂肪垫中注射化疗耐药性、荧光素酶转染的 SKNBE (2) C 细胞 (10⁷), 然后进行肿瘤发展。将小鼠分为五组: 无治疗, 或用空白 PEG、CPT-11、PEG-[SN22]₄ 或 PEG-[SN38]₄ 治疗 (每组 10 只动物)。当肿瘤达到约 0.2cm³ 时开始治疗。在两个对照组中, 肿瘤大小在 2 周内快速增加, 通过 CPT-11 仅略微延迟了生长。用 PEG-[SN22]₄ 或 PEG-[SN38]₄ 治疗减缓生长, 然后肿瘤消退。只有 PEG-[SN22]₄ 治疗引起肿瘤完全消失 ((A) = 成像; (B) = 定量)。

发明详述

[0059] 第一实施方案

[0060] 在上述前药的第一实施方案中, 至少两分子的喜树碱类似物通过在生理条件下 (例如 22°C, pH=7.2) 不稳定的酯键与泊洛沙姆聚合物共价键合。

[0061] 喜树碱类似物作为拓扑异构酶抑制剂是本领域众所周知的。喜树碱本身是 (S)-4-乙基-4-羟基-1H-吡喃并 [3', 4':6, 7] 吲喹啉并 [1, 2-b]-喹啉-3, 14-(4H, 12H)-二酮。术语“喜

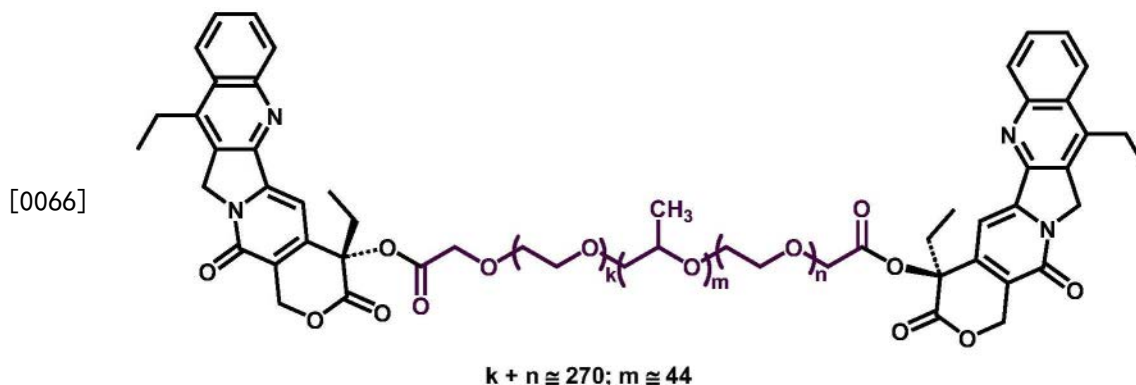
树碱类似物”包括喜树碱。优选的喜树碱类似物包括SN22 (7-乙基喜树碱)、SN38 (7-乙基-10-羟基喜树碱),或其组合。

[0062] 泊洛沙姆是非离子型三嵌段共聚物,由聚氧丙烯(聚(环氧丙烷))的中央疏水链与两侧的两个聚氧乙烯(聚(环氧乙烷))亲水链组成。聚氧乙烯链的总数可以在2至130的范围内。氧丙烯单元的数目可以在15-67的范围内。优选地,泊洛沙姆的分子量低于肾小球滤过阈值(30-50kDa)。这些聚合物具有在人类中安全使用的历史,并且可以作为药物级材料(Kolliphor®P)获得。多种泊洛沙姆已被FDA批准作为赋形剂,目前已在临床上用于多种应用。所有这些泊洛沙姆均适用于本文所述的实施方案。

[0063] 通过调整亲水性(A)和疏水性(B)嵌段[A=聚(环氧乙烷)(PEG)和B=聚(环氧丙烷)(PPG)]的长度及其摩尔比,控制泊洛沙姆的生物学相关的性质,例如分子大小和亲水/亲脂平衡。与化学均相的聚(环氧乙烷)不同,将中等长度的中间PPG嵌段与相对较高的亲水/亲脂平衡值结合在一起的ABA三嵌段泊洛沙姆能够稳定地与细胞膜结合,为肿瘤渗透和延长肿瘤内存在提供了有效的机制。泊洛沙姆的实例包括Kolliphor®P188、P338和P407。

[0064] 喜树碱类似物通过在生理条件(例如22°C, pH=7.2)下不稳定的酯键共价键合至泊洛沙姆聚合物。在一个实施方案中,酯键是氧基乙酸酯键。喜树碱类似物优选通过喜树碱中的20位所对应的位置处的羟基键合至泊洛沙姆聚合物。

[0065] 在另一个实施方案中,两分子的喜树碱类似物共价键合至泊洛沙姆聚合物。在一个优选的实施方案中,大分子前药是PF108-(SN22)₂,其由以下结构表示:



[0067] 第二实施方案

[0068] 在上述前药的第二实施方案中,至少两分子的SN22类似物通过在生理条件下不稳定的酯键共价键合至PEG聚合物。

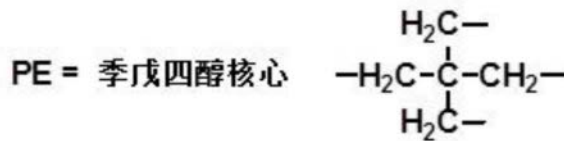
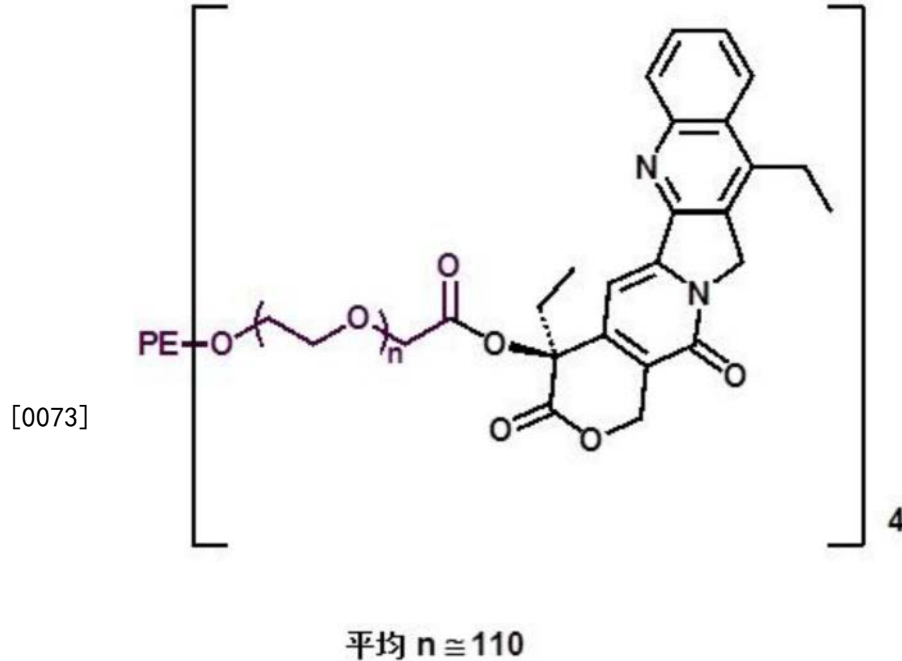
[0069] 聚乙二醇(PEG)聚合物是本领域众所周知的。PEG聚合物可以是线性的,并由式H-(O-CH₂-CH₂)_n-OH表示。在另一个实施方案中,PEG聚合物是多臂聚合物。多臂PEG聚合物具有3到10条从中央核心基团发出的PEG链。四条PEG链是特别优选的。优选的中央核心基团包括季戊四醇基团和季季戊四醇基团。PEG聚合物的分子量可以为1,000至100,000道尔顿,包括其间的所有值和子范围,包括2,000、5,000、10,000、25,000、35,000、50,000、75,000和85,000道尔顿。

[0070] 在另一个实施方案中,两分子的SN22共价键合至线性PEG聚合物。在另一个实施方案中,四分子的SN22共价键合至具有四条PEG链的多臂PEG聚合物。在另一个实施方案中,多于四分子且最多八分子的SN22共价键合至多臂PEG聚合物。优选地,在这些实施方案中,

SN22分子共价键合至每条PEG链。

[0071] S22部分通过在生理条件(例如22°C, pH=7.2)下不稳定的酯键共价键合至PEG聚合物。在一个实施方案中,酯键是氧基乙酸酯键。喜树碱类似物优选通过在与喜树碱中的20位相对应的位置处的羟基与PEG聚合物键合。

[0072] 在一个优选的实施方案中,大分子前药是PEG-[SN22]₄,其由以下结构表示;



[0074] 在另一个实施方案中,可以用替莫唑胺(Temozolomide, TMZ)(其是一种口服化疗药物)对患者进行预处理。这样的预处理可以提供附加的功效,但是可能增强前药的肿瘤渗透。可以以20至250mg/kg/天PO的剂量施用替莫唑胺几天(例如5天),然后进行前药处理,例如在第7天开始。100mg/kg/天PO的剂量是优选的。

[0075] 第三实施方案

[0076] 在上述前药的第三实施方案中,至少两分子的喜树碱类似物通过在生理条件下不稳定的酯键共价键合至聚合物,其中至少一个喜树碱类似物被至少一个NE转运蛋白(NET)配体功能化。

[0077] 喜树碱类似物可以是SN22(7-乙基-喜树碱)、SN38(7-乙基-10-羟基喜树碱)或其组合。SN38是特别优选的。

[0078] 在另一个实施方案中,两至八分子的喜树碱类似物共价键合至聚合物。该范围包括其间的所有具体值和子范围,例如两、三、四、五、六和七分子的喜树碱类似物。八分子喜树碱类似物共价键合至聚合物是特别优选的。

[0079] 如上所述,聚合物可以是泊洛沙姆聚合物或PEG聚合物,例如上文所述的。多臂PEG聚合物是优选的。在本实施方案中,多臂PEG聚合物具有从中央核心基团发出的三至十条PEG链。四至八条PEG链是特别优选的,并且八条PEG链是特别优选的。优选的中央核心基团

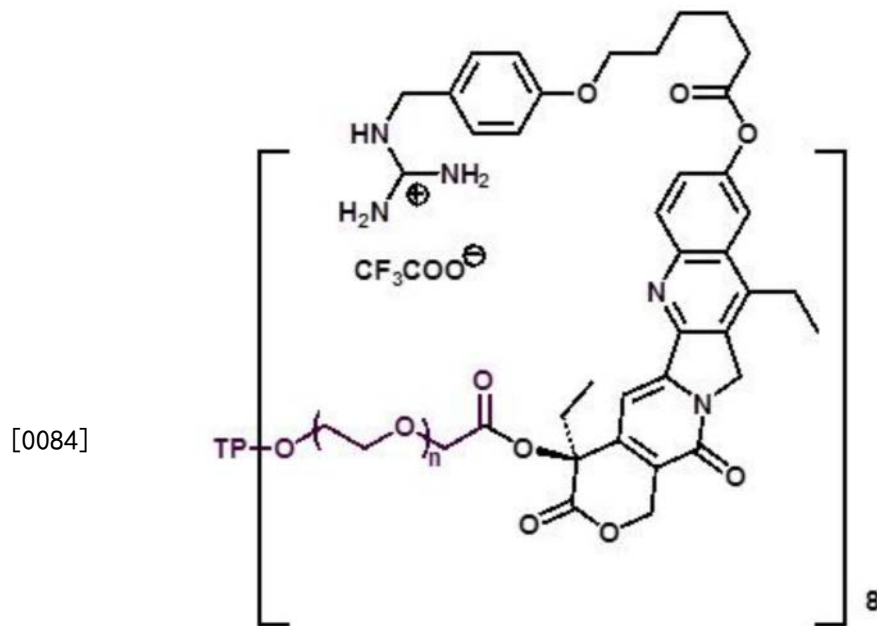
包括季戊四醇基团和三季戊四醇基团。三季戊四醇基团作为中央核心基团是特别优选的。

[0080] 喜树碱类似物通过在生理条件(例如22°C, pH=7.2)下不稳定的酯键共价键合至泊洛沙姆聚合物。在一个实施方案中,酯键是氧基乙酸酯键。喜树碱类似物优选通过与喜树碱中20位相对应的位置处的羟基键合至泊洛沙姆聚合物。

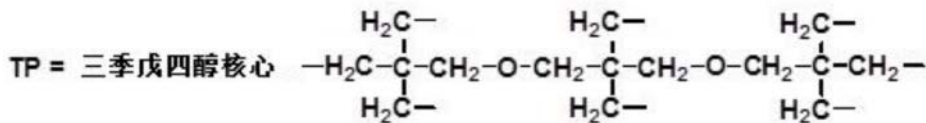
[0081] 在本实施方案中,至少一个喜树碱类似物被去甲肾上腺素(NE)转运蛋白的至少一种配体(即NE转运蛋白(NET)配体)功能化。在一个实施方案中,NE转运蛋白(NET)配体是苯乙基胍、苄基胍(BG)或酪胺。苄基胍是特别优选的。

[0082] 在另一个实施方案中,NE转运蛋白(NET)配体通过在生理条件下不稳定的酯键与喜树碱类似物共价键合。在一个优选的实施方案中,NE转运蛋白(NET)配体与喜树碱类似物之间的酯键是氧基己酰基酯。在另一个实施方案中,NE转运蛋白(NET)配体与喜树碱类似物之间的酯键是氧基乙氧基丙酰基或氧基乙氧基乙氧基丙酰基酯。

[0083] 在一个优选的实施方案中,大分子前药是[PEG-SN38-BG]₈,其由以下结构表示:



平均 $n \approx 110$



[0085] 治疗方法

[0086] 如上所述,通过将有效量的大分子前药施用于有此需要的受试者,可将大分子前药用于治疗神经细胞瘤的方法中。

[0087] 通过将有效量的大分子前药施用于有此需要的受试者,还可以将如上所述的大分子前药用于治疗实体瘤的方法中。

[0088] 通过将有效量的大分子前药施用于有此需要的受试者,还可以将如上所述的大分子前药用于治疗患有脑肿瘤的受试者的方法中。

[0089] 通过将有效量的如上所定义的大分子前药施用于有此需要的受试者,还可以将如

上所述的大分子前药用于治疗癌症的方法中。

[0090] 在这些实施方案中,有此需要的受试者优选为哺乳动物,尤其优选为人。

[0091] 大分子前药可以通过本领域通常使用的任何方法来施用。施用方法包括肠胃外(静脉内、肌内和皮下)、经口、经鼻、经眼、透粘膜(经颊、阴道和直肠)和透皮施用途径。

[0092] 可以以有效治疗本文所述状况的任何剂量施用大分子前药。大分子前药的剂量可以是每剂量0.5至200mg/kg。

实施例

[0093] 实施例1:PF108-(SN22)₂

[0094] 1. 两步前药合成。

[0095] 在22-25°C下,用Jones试剂(CrO₃/H₂SO₄) 在THF中氧化泊洛沙姆,将聚合物的末端CH₂OH转化为末端烷氧基乙酸酯羧基,然后可将其用于通过可水解酯键可逆地共价结合各种含羟基的药物。在上述条件下氧化Pluronic F-108(Kolliphor P338) 得到含有0.18mmol/g羧基的聚合物,如使用¹H NMR通过OCH₂CO质子信号所确定的。类似地,氧化Pluronic F-68产生含有0.23mmol/g末端羧基的聚合物。使用1,3-二环己基碳二亚胺(DCC) 作为羧基的活化剂、4-二甲基氨基吡啶甲苯磺酸盐(DPTS) 作为催化剂以及CH₂Cl₂作为溶剂,使羧基化的Pluronic F-108与SN22进一步缀合,形成含0.13mmol/g或4.8重量%的药物的聚合缀合物。¹H NMR表明,SN-22通过羧基化的Pluronic的羧基与SN22分子的20-OH之间的酯键与聚合物共价结合。Kolliphor级Pluronics(表1) 和SN22(纯度:≥97%,HPLC) 分别购自Sigma-Aldrich(St.Louis,MO) 和AK Scientific(Union City,CA)。

[0096] 为了用羧基化的Pluronics制备SN38的前药,首先通过在N-甲基吡咯烷酮中在咪唑的存在下叔丁基(氯) 二苯基硅烷(TBDPS-Cl) 的作用将SN38(纯度:≥97%,AstaTech, Bristol,PA) 的酚10-OH用10-叔丁基二苯基甲硅烷基(TBDPS) 基团保护。在可行性实验中,使得到的10-TBDPS保护的SN38(以97%的收率获得) 与羧基化的Pluronic F-68如上反应,在随后的脱保护后(在CH₂Cl₂中使用吡啶鎓氟化物) 得到目标缀合物,根据¹H NMR,该目标结合物含有0.17mmol/g或6.6重量%wt.的通过酯键与20-OH共价键合的SN38。

[0097] 表1:用于制备本文所述的前药缀合物的药物级泊洛沙姆聚合物。

[0098]

泊洛沙姆	环氧乙烷单元	环氧丙烷单元	分子量	HLB值
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

[0099] 2. 泊洛沙姆-SN22前药抑制化疗耐药性NB细胞的生长。

[0100] 难治性NB通过抑制NB细胞生长所需的阈值药物水平的变化来表征。在从患有进展性疾病的同一患者在诱导治疗期间以及治疗之前在诊断时得到的所有测试细胞系对中均显示出这种变化,其同时影响对不同化学和药理学家族的化学治疗药物的反应。针对BE(2) C细胞系测试了PF108-(SN22)₂(由药物级Pluronic F-108(Kolliphor P338) 和SN22构建的前药),所述细胞系表现出与在密码子135上获得TP53突变并丧失p53功能相关的耐药表型。

[0101] 暴露24小时后,PF108-(SN22)₂在7天内有效抑制BE(2) C细胞的生长,效力类似于

SN22单用或与未经化学修饰的Pluronic F-108联合使用(PF108+SN22),而在没有药物的情况下施加Pluronic F-108则未观察到细胞生长抑制作用(图1A)。当暴露时间限制为30分钟时,PF108-(SN22)₂的作用明显不太明显(图1B),表明在此时间范围内前药在很大程度上仍保持完整。

[0102] 相比之下,当针对未接受化疗的NB细胞(IMR-32)进行测试时,前药在相当于20-80nM SN22的剂量范围内均有效,暴露持续时间从30分钟到24小时,从而引起明显的IMR-32细胞生长抑制(见图4A)。这与从以前未经治疗的患者获得的这种细胞系缺乏内在抗性是一致的,从而使其响应于以实质上较低的水平存在的活性SN22的抗增殖作用。重要的是,尽管游离的SN22被包括在细胞培养实验中作为阳性对照,但它与药学上可接受的溶媒不相容。

[0103] 3. 作为泊洛沙姆前药的SN22递送实现了在原位BE(2)C肿瘤中延长的暴露。

[0104] 在化学放射疗法后复发时得到的BE(2)C细胞与诊断时从同一患者得到的BE(1)细胞之间的比较表明,实现细胞生长抑制率达90%所需的喜树碱类似物SN38的浓度增加了一个数量级:分别为25与2ng/ml。重要的是,显示出使用其前体伊立替康(CPT-11)进行常规治疗无法保持相应的肿瘤内SN38的水平。在复发性和难治性高风险NB的环境下,在不超过最大耐受剂量的情况下无法保持有效的局部药物水平是导致临床使用的喜树碱和其他化学治疗药物无效的主要原因。与这些报告一致,这些结果表明,在施用伊立替康(10mg/kg)后,在24小时和72小时时,在大的($\geq 1\text{cm}^3$)BE(2)C原位异种移植物中的SN38分别少于25ng/g和2ng/g。相比之下,以等效剂量的PF108-(SN22)₂递送的SN22在肿瘤中以高出许多倍的水平稳定存在:在4、24和72hr时分别为 $2180 \pm 850\text{ng/g}$ 、 $2140 \pm 520\text{ng/g}$ 和 $1570 \pm 580\text{ng/g}$ (图2),表明基于泊洛沙姆前药的递送可以维持稳定的治疗有效水平的SN22,因此解决了持续抑制NB肿瘤生长的先决条件。

[0105] 4. 泊洛沙姆-SN22前药强效抑制肿瘤生长,延长耐药性NB的生存期。

[0106] 与其以高于 $1.5\mu\text{g/g}$ 的肿瘤内水平持续存在相符,作为基于泊洛沙姆的前药配制并一周一次施用的SN22引起肿瘤消退并强效抑制原位BE(2)C异种移植物的再生长(图3A和B)。这进而转化为明显延长的动物生存期(图3C),与在本研究中更频繁地给予两次伊立替康的轻微抗肿瘤作用形成对照。伊立替康在这种NB模型中的轻微作用(图3)证明了概括了在侵袭性、难治性人类NB的环境下实现持续治疗反应所面临的重大挑战的临床前评价方法的充分性。值得注意的是,与伊立替康不同,PF108-(SN22)₂既能够引起肿瘤缩小,又能够使疾病稳定,在治疗期期间及之后均未观察到进展,治疗期仅由四个每周一次剂量组成(在第21天施用PF108-(SN22)₂的最后一次剂量;如图3B所示)。泊洛沙姆-SN22前药的明显抗癌作用未伴有全身毒性的体征,例如腹泻、皮肤隆起(由于脱水)、皮肤溃疡、食欲缺乏、恶病质或重量增加迟缓。

[0107] 5. 泊洛沙姆-SN22前药:对MYCN扩增的NB细胞的抗增殖作用的定量研究。

[0108] 为证明比较研究聚合前药对具有不同的(未接受化疗的或化疗耐药性)表型的NB细胞的抗增殖作用的可行性,比较了PF108-(SN22)₂对代表治疗开始之前和强化化学放疗后复发的侵袭性MYCN扩增的疾病的两种细胞系(分别为IMR-32和BE(2)C)的作用。

[0109] 在未接受化疗的细胞和化疗耐药性细胞之间观察到了很大的响应模式差异:尽管在整个研究剂量和持续时间暴露范围内,IMR-32的生长始终被高效地抑制(图4A),PF108-(SN22)₂在每孔 $\leq 40\text{ng}$ 药物的剂量下或暴露持续时间 $\leq 4\text{hr}$ 时对BE(2)C细胞仅表现出有限

的生长抑制作用。值得注意的是,这些细胞对存在或不存在未经化学修饰的Pluronic F-108情况下的游离的SN22的反应性与IMR-32相比也强烈地向更高的剂量和更长的暴露持续时间变化,这与如以前的研究所示的BE (2) C的化学耐性表型表现出p53功能丧失以及对不同化学治疗剂家族的敏感性降低相一致。

[0110] 6. 配制为泊洛沙姆前药的SN22的比较性肿瘤摄取和保留。

[0111] 使用基于泊洛沙姆的前药的递送方法的有效性已被数据证实,所述数据显示出作为PF108-(SN22)₂缀合物施用的SN22的快速肿瘤摄取和持续的肿瘤内保留(图2和5)。PF108-(SN22)₂实现了在原位NB肿瘤中延长药物的存在,其水平比所报道的抑制化疗耐药性NB细胞生长所需的有效局部浓度大了两个数量级。

[0112] 器官分布分析证实了作为前药递送的SN22的快速积累和延长的保留时间,并且网状内皮系统的器官、肝脏和脾脏摄取了相对较低的药物量。在施用后4和24小时在血液中测量到显著量作为PF108-(SN22)₂施用的SN22,这与该时间段内肿瘤中不断的药物蓄积相一致(图5)。这与在外周器官、脾、肺和肾中观察到的快速药物消除形成对照。重要的是,拓扑异构酶I抑制剂对周期中细胞具有高度特异性(S期依赖性),这不同于其他化学治疗剂,其他化学治疗剂甚至在没有主动复制的情况下也可能具有高度的细胞毒性。

[0113] 结合采用基于泊洛沙姆前药的递送观察到的有限的分布以及从外周器官快速的药物清除,药理学上选择性作用方式有可能进一步降低发生严重全身毒性的风险,这与缺少急性全身毒性症状(腹泻、溃疡、食欲缺乏、恶病质或体重减轻)一致。

[0114] 7. 泊洛沙姆-SN22前药导致收缩,并抑制小和大的NB肿瘤的再生长,表明对伊立替康有短暂的反应。

[0115] 采用一周一次的PF108-(SN22)₂给药方案,通过实验方法表明了基于泊洛沙姆的前药策略在对小和大的NB肿瘤提供持续的抗癌作用方面的有效性(原位IMR-32异种移植模型,图6)。值得注意的是,尽管具有未接受化疗的表型,但使用MYCN扩增的IMR-32细胞建立的原位NB肿瘤仅表现出对伊立替康的短暂反应(每周给予2次)。结合证明了前药方法在难治性疾病的BE (2) C异种移植模型中的有效性的结果(图3),这为支持在对常规化学疗法显示出有限的反应或无反应的高风险NB的背景下递送基于泊洛沙姆前药提供了有力的证据。

[0116] 实施例2:PEG-[SN22]₄

[0117] 1. PEG-[SN22]₄的合成

[0118] 使用1,3-二环己基碳二亚胺(DCC)作为羧基的活化剂、4-二甲基氨基吡啶甲苯磺酸盐(DPTS)作为催化剂以及CH₂Cl₂作为溶剂,使羧基化的4臂PEG(JenKem Technology, Mn=20,553Da)与SN22缀合,形成含0.17mmol/g或6.4重量%的药物的聚合缀合物。1H NMR表明,SN-22通过羧基化的聚合物的羧基与SN22的20-OH之间的酯键与聚合物共价结合。

[0119] 2. 实验结果

[0120] 为了评价SN38和SN22对ABCG2流出物的敏感性,鉴定了无ABCG2的NB细胞系NLF。用ABCG2表达载体转染NLF,然后选择具有痕量、低和中等水平ABCG2表达的单细胞克隆(图7A)。接下来,评估表达NLF和ABCG2的克隆对不同浓度的SN38或SN22的敏感性,并使用IncuCyte® S3活细胞分析系统连续监测生长。ABCG2水平较高的克隆对N38的耐药性不断增加,而它们对SN22保持完全敏感(图7B)。这表明表征侵袭性NB和NB干细胞的内源性ABCG2

表达导致对伊立替康/SN38以及可能的易受ABCG2流出物影响的其他化学治疗剂的耐药性。

[0121] 为了探索在体内SN22在NB中的不同计划,在免疫缺陷nu/nu小鼠中使用NB肋腹异种移植小鼠模型(未接受化疗的SH-SY5Y NB系中的亚克隆)进行测试。在初步实验中评价了与CPT-11 (25mg/kg/剂量) IV每周两次持续4周进行比较的两种不同的PEG-[SN22]4 (10mg/kg/剂量) 治疗计划。PEG-[SN22]4每周两次施用持续两周,或每周一次施用持续四周(每种4次剂量)。尽管以2.5倍更高的剂量施用CPT-11剂量多达两次,但是PEG-[SN22]4在诱导缓解和延长生存期方面有效得多。

[0122] 接下来,在采用化疗耐药性NB系SKNBE (2) C的NB原位异种移植小鼠模型中测试PEG-[SN22]4、PEG-[SN38]4和CPT-11。将BE (2) C细胞用荧光素酶表达载体转染,以允许生物发光成像。每周一次用PEG-[SN22]4 (10mg/kg/剂量)、PEG-[SN38]4 (10mg/kg/剂量) 或CPT-11 (15mg/kg/剂量) 治疗小鼠,持续4周。在这种化疗耐药性模型中,CPT-11没有作用,而PEG-[SN22]4和PEG-[SN38]4在缩小肿瘤方面都极其有效(图8)。在PEG-[SN38]4治疗的小鼠中,肿瘤在治疗停止后会迅速再生长,而PEG-[SN22]4治疗导致肿瘤完全消失,并在治疗期间之外仍持续抑制其生长,表明PEG-[SN22]4对难治性疾病具有极好的功效,推测是由于其能够克服获得性耐药性。

[0123] PEG-[SN22]4也被用于治疗TH-MYCN转基因小鼠模型中的新生NB。在几乎所有的具有两个转基因拷贝的小鼠中,在4至5周内椎旁神经节或肾上腺中出现自发性肿瘤。一旦肿瘤变成可触知的(4-5周),将小鼠分成4组:对照-无治疗;CPT-11治疗(15mg/kg/剂量);PEG-[SN38]4 (10mg/kg/剂量);或PEG-[SN22]4 (10mg/kg/剂量)。每周对小鼠进行一次治疗,持续4周。在未经治疗的动物中,肿瘤进展迅速,而通过CPT-11治疗,肿瘤的生长仅略有延迟。当小鼠因肿瘤负荷而出现症状时将其处死。然而,采用PEG-[SN22]4治疗,所有肿瘤都消退,并在治疗1-2周内变成不可触知的(图9)。在SN22治疗开始后,它们在所有小鼠中都保持不可触知的,持续超过180天。将这些小鼠中的几只处死,并通过肉眼和显微镜检查肿瘤的部位,但是在任何小鼠中都没有发现肿瘤的迹象。这些数据表明,PEG-[SN22]4对免疫活性小鼠中产生的自发性肿瘤极其有效,甚至4个每周一次剂量也足以在所有动物中产生长期缓解和治愈。

[0124] 以类似的方式将PEG-[SN22]4用于治疗作为异种移植物生长的两种代表性肉瘤。治疗了化疗耐药性尤因肉瘤(Ewing sarcoma,EWS)系TC-71和肺泡(融合阳性)横纹肌肉瘤(RMS)系Rh30。180天后,所有EWS小鼠都没有可触知的肿瘤,但是两只具有RMS异种移植物的小鼠在150天左右有肿瘤再生长,必须处死(图10)。由于这些小鼠仅用4个每周一次剂量的单一药物治疗,因此有可能通过更长的治疗时间或与另一种药物联用避免这些复发。尽管如此,EWS和RMS中的这些结果证明PEG-[SN22]4的功效不局限于NB或不特别用于NB,而是适用于其他实体瘤。

[0125] 上面给出的结果表明,PEG-[SN22]4在根除来自NB异种移植物的肿瘤以及在免疫活性转基因动物中产生的自发性NB方面具有相当大的功效。大多数动物被“治愈”,其通过从治疗开始无事件生存(EFS)180-200天来定义。在治疗作为肋腹异种移植物的单个化疗耐药性EWS系和单个融合阳性RMS系方面获得了类似的结果。因此,在这些侵袭性儿童实体瘤动物模型以及本文所述的其他状况中,PEG-[SN22]4作为单一药剂在获得长期EFS方面是有效的。

[0126] 细胞系。一组代表高风险NB的主要基因型(MYCIN扩增;1p36缺失,ALK突变)以及未接受化疗和化疗耐药性肿瘤的4种NB细胞系(SY5Y、IMR5、NLF、SKNBE2C)可用于所有体外和体内研究。细胞在含10%胎牛血清(Cellgro)的RPMI-1640(Gibco)中生长,并保持在95%空气和5%CO₂的加湿气氛中。用0.02%Na₄ EDTA的磷酸盐缓冲盐水(PBS)收获细胞。所使用的RMS系为RH18和RH30(胚胎、肺泡);EWS系为TC32和TC71(诊断、复发);OS系为U2OS和SAOS2。

[0127] 小鼠。使用来自Jackson Laboratories的六周大的Foxn1^{nu}/Foxn1^{nu}(JAX货号#007850)小鼠。将小鼠保持在设定为12小时间隔的亮/暗循环中控制湿度和温度的条件下。这些小鼠处于129-SvJ背景中。转基因纯合的小鼠通常在4-5周内出现肿瘤。

[0128] 肋腹异种移植物。在右肋腹中向小鼠SQ注射悬浮在0.1ml Matrigel(Corning, Tewksbury, MA)中的1x 10⁷个NB细胞。使用卡尺以每周两次在2个维度(mm)上手动测量肿瘤。如下计算体积(cm³):[(0.523x L xW²)/1000],其中L>W。每周两次获得体重,如果体重变化>10%,则调整治疗剂量。一旦肿瘤体积达到0.2cm³,则通过一周一次尾静脉注射,用PEG-[SN22]4治疗小鼠(每臂n=10),持续4周(2)。以10mg/kg/剂量给予PEG-[SN22]4;使用CPT-11(CPT-11;15mg/kg)或仅溶媒作为阳性和阴性对照。

[0129] 原位异种移植物。将稳定表达荧光素酶的NB细胞以每只动物10⁶个细胞植入无胸腺裸(nu/nu)小鼠的肾上脂肪垫中。验证肿瘤并在之后每周两次使用与Living Image Software(Caliper Life Sciences, Hopkinton, MA, USA)联合的Xenogen IVIS成像系统(Perkin Elmer, Santa Clara, CA)通过生物发光成像监测肿瘤负荷。达到1cm³的肿瘤大小后(接种后~28天),将荷瘤小鼠随机分配到具有10只动物的组中,并如上以单次120-μl剂量的PEG-(SN22)4、CPT-11或溶媒IV施用。

[0130] PEG-[SN22]4和CPT-11的药代动力学分析。通过尾静脉IV给予具有肋腹异种移植物的鼠(每个时间点每臂n=3)单次剂量的10mg/kg PEG-[SN22]4和15mg/kg CPT-11。剂量较低,因为CPT-11是一种前药,需要肝脏将其转化为活性SN38。通过眼眶后采血和尾部采血获得血液,并收集到2ml的含有肝素钠(BD)的收集管中。在用冷盐水进行心脏灌注后在4、12、24、48和72小时处死后收集组织(肿瘤、肺、肝、脾、肾),并通过CHOP Pharmacology Core进行分析。通过UPLC-MS/MS分析小鼠血液(用水1:1稀释)和组织匀浆中的SN38、SN22和CPT-11总水平。

[0131] 实施例3:[PEG-SN38-BG]₈。

[0132] 1. 基于由三部分组成的聚合物的前药的合成

[0133] 本文所述的前药带有通过原位可裂解酯键分别与多臂或线性PEG载体连接的八个或两个药物-配体杂交分子。由于烷氧基乙酰基基团的强电子位移效应,它们的水解不稳定性和活化速率与普通(酰基)酯相比增加。

[0134] 首先,使用4-N,N-二甲基氨基吡啶甲苯磺酸盐(DPTS)作为催化剂、1,3-二环己基碳二亚胺(DCC)作为羧基的活化剂以及二氯甲烷作为溶剂,将N-Boc-保护的氨基甲基苯氧基己酸与SN-38(AstaTech, Bristol, PA)缀合,产率为85%。用三氟乙酸除去保护基,并且使缀合物在四氢呋喃和二氯甲烷的1:1混合物中与作为胍基化试剂的1,3-二-Boc-2-(三氟甲基磺酰基)胍反应(产率:75%)。然后也使用DPTS、DCC和二氯甲烷分别作为催化剂、活化剂和溶剂,将通过可水解裂解的6-己酰基间隔基连接的Boc保护的BG和SN-38的小分子缀合物连接至羧基化的8臂PEG(JenKem Technology, M_n=37390Da, PDI=1.06)。

[0135] 为了纯化,用乙醚从苯溶液中沉淀出聚合物,并通过用硫酸钠水溶液(21% w/w)洗涤除去残留的DPTS。在该步骤通过TLC分析(硅胶,氯仿-乙腈,7:3)证实不存在可移动的化合物。最后,通过用三氟乙酸处理从胍部分除去保护基。将获得的[PEG-SN38-BG]₈聚合物用乙醚洗涤并真空干燥。通过¹H NMR分析产物的结构和功能化效率,显示0.18mmol/g(7.1重量%)的SN-38和当量的与聚合物缔合的BG。通过TLC和¹H NMR分析均证实了其纯度。

[0136] 2. 摄取用于靶向肿瘤疗法。

[0137] 以相当于10mg SN-38/kg的当量剂量,作为基于8臂PEG和BG功能化的前药[PEG-SN38-BG]₈递送的SN-38在肿瘤中以高出许多倍的浓度稳定存在:在1小时、4小时和24小时时分别为 $2.82 \pm 0.53 \mu\text{g/g}$ 、 $4.46 \pm 1.59 \mu\text{g/g}$ 和 $2.63 \pm 0.85 \mu\text{g/g}$ (图11),表明基于聚合前药的递送可提供抑制对标准治疗没有反应的难治性肿瘤的生长所需的稳定的治疗有效的药物水平。

[0138] 与SN-38以比所报道的耐药性NB细胞系BE(2)C的治疗阈值25ng/ml大两个数量级的水平保持在肿瘤内存在相符,作为[PEG-SN38-BG]₈配制和施用的药物导致肿瘤快速消退并强效抑制了小和大的原位BE(2)C异种移植物的再生长(图12A)。前药的持久抗癌作用明显延长了无事件动物生存期($t_{50\% \text{生存率}}$ 分别为130天和88天,而未经治疗的动物为12天,图12B),与在本研究中以同等剂量施用的伊立替康引起的轻微治疗作用和存活期延长($t_{50\% \text{生存率}}$ 为20天)形成对照。

[0139] 重要的是,伊立替康在本模型中的轻微作用证明了概括了在侵袭性、难治性人类NB的环境下实现持续的临床有意义的反应所面临的治疗挑战的临床前评价方法的充分性。同时,[PEG-SN38-BG]₈能够引起快速的肿瘤缩小并使疾病稳定,在由八次剂量(在第24天施用最后一次剂量)组成的治疗期期间及其以后未观察到进展。值得注意的是,在用[PEG-SN38-BG]₈前药治疗期间,未观察到全身毒性的体征,例如腹泻、皮肤隆起(由于脱水)、皮肤溃疡、食欲缺乏、恶病质或体重增加迟缓。

[0140] 3. NET表达增强剂可进一步改善摄取-1(uptake-1)靶向的前药的性能。

[0141] 伏立诺他(Vorinostat)是一种有效的泛HDAC抑制剂(pan-HDAC inhibitor),其毒性特征在很大程度上与拓扑异构酶I抑制剂的毒性特征不重叠,已表明伏立诺他通过抑制DNA断裂修复酶的表达并促进DNA损伤诱导的细胞凋亡,大幅增加NB肿瘤中的NET表达并使肿瘤细胞对喜树碱药物敏感[44],这两种作用均与采用SN-38的BG功能化前药增强神经内分泌肿瘤的靶向疗法有关。考查了伏立诺他对[PEG-SN38-BG]₈与SN-38的BE(2)C细胞生长抑制的增强作用。

[0142] 伏立诺他明显增强了[PEG-SN38-BG]₈的抗增殖作用(对于 $z = z_0 + A \cdot x + B \cdot y + C \cdot [x \cdot y]$ 中的相互作用项C, $p < 0.0001$,图13A),但与未经化学修饰的SN-38具有适度的协同作用(对于C, $P = 0.087$,图13B)。这与伏立诺他表现出的合并的NET表达相关和不相关的药物增强机制相一致,从而对BG功能化前药对NB细胞生长抑制进行更大的增强。值得注意的是,在伏立诺他强烈增强前药作用的低微摩尔浓度范围(1-5 μM)中,其自身的BE(2)C细胞生长抑制作用仅为中等的(图13A),与伏立诺他在NB临床前模型中的适度单药活性相符。

[0143] 4. 前药介导的化疗耐药性NB细胞的生长抑制及其药理学增强。

[0144] 为了评价并入在前药结构中的靶向配体的具体贡献,对[PEG-SN38-BG]₈对表达NET的化疗耐药性NB细胞的细胞生长抑制活性与类似构建的但不含BG部分的对照分子

[PEG-SN38]₈进行比较。此外,已确定泛HDAC抑制剂在NB细胞和肿瘤异种移植物中显示出上调NET表达并增强摄取-1的作用,有力地增强了[PEG-SN38-BG]₈对表达NET的NB细胞的抗增殖作用,提出了以下预期:对HD 1型亚家族(恩替诺特(entinostat))具有特异性的选择性HDAC抑制剂也将与[PEG-SN38-BG]₈具有协同作用。

[0145] 在由三部分组成的前药与没有BG配体组装的由两部分组成的对照构建体之间,观察到抑制化疗耐药性NB细胞增殖的能力存在很大差异。然而,表达NET的BE(2)C细胞的生长被[PEG-SN38-BG]₈以高效力抑制,该效力与游离的SN-38在直接药物-细胞接触的体外条件下的效力相当,由两部分组成的构建体[PEG-SN38]₈明显不太有效(图14A),指出由三部分组成的设计的重要性以及BG在增强抗增殖反应中的作用。在一项单独的研究中,显示了HDAC1特异性阻断剂恩替诺特对前药介导的NB细胞生长抑制的强增强作用(图14B,对于相互作用项C, $p < 0.001$)。有趣的是,这一发现表明恩替司他(一种具有表观遗传作用方式的高度选择性非化学治疗剂)可与BG功能化的治疗剂协同作用,可能是通过增强它们的摄取,与化学上独特的泛HDAC抑制剂伏立诺他相似。

[0146] 5. 比较配制为NET靶向前药的SN-38的肿瘤摄取和保留。

[0147] 在表明作为由三部分组成的前药[PEG-SN38-BG]₈递送的SN-38具有快速的肿瘤摄取和持续的肿瘤内保留的研究中证明了基于前药的治疗策略的有效性(图11和表2)。与其临床上使用的、药理学上无活性的前体(伊立替康)的形式施用的SN-38相比,基于前药的递送实现了SN-38的定位和持续的肿瘤内存在,其存在水平比所报道的抑制化疗耐药性NB细胞BE(2)C的生长所需的SN-38浓度高约两个数量级。使用HPLC测定法在大的原位BE(2)C异种移植物($1.0 \pm 0.4 \text{ cm}^3$, $n=5$)中进行分析。

[0148] 表2. 肿瘤内药物水平,以每克肿瘤的剂量百分比表示(表示为平均值 \pm SD)

施用后时间	伊立替康 (15 mg/kg)		[PEG-SN38-BG] ₈ (10 mg SN-38/kg)
	SN-38	伊立替康	总 SN-38
4 hr	0.075 \pm 0.019	0.142 \pm 0.031	1.78 \pm 0.28
24 hr	0.012 \pm 0.005	0.004 \pm 0.001	1.05 \pm 0.15

[0150] 6. [PEG-SN38-BG]₈前药在对常规疗法仅显示出短暂反应的侵袭性NB模型中导致肿瘤消退并实现“治愈”。

[0151] 在原位IMR-32异种移植物模型中,通过实验表明了由三部分组成的前药策略在针对侵袭性NB肿瘤提供持续的抗癌作用中的有效性(图15)。在未接受化疗的MYCN-扩增的疾病模型中,在4周内每周两次施用[PEG-SN38-BG]₈,导致快速的肿瘤缩小,并且随后没有再生长。与此形成对照的是,在用SN-38前体伊立替康治疗的动物组中,停止治疗后肿瘤立即开始再生长(图15A、B)。结合证明了前药方法在难治性疾病的BE(2)C异种移植物模型中的有效性的结果(图12),这为支持在对常规化学疗法显示有限的反应或无反应的高风险NB的背景下递送基于由三部分组成的前药提供了有力的证据。

[0152] 7. 由三部分组成的构建体显示出治疗多药耐药性高风险成神经细胞瘤的潜力。

[0153] 在4周内(每周两次)作为靶向去甲肾上腺素转运蛋白(NET)的聚合物连接的前药

配制和施用的SN-38导致肿瘤快速消退,完全抑制化疗耐药性原位BE(2)C异种移植物的再生长,并明显延长无事件生存期(>14周,图16A)。这与伊立替康在这种模型中没有抗肿瘤作用相反,并且相对于由两部分组成的对照[PEG-SN38]₄也具有显著的改善,[PEG-SN38]₄仅在治疗期间抑制肿瘤生长(图16A)。此外,将虽然用伊立替康治疗但仍快速出现大肿瘤(2cm³)的动物换成[PEG-SN38-BG]₈,导致其肿瘤缩小并保持检测不到持续>12周(“挽救”研究,图16B)。

[0154] 重要的是,伊立替康表现出缺少抗肿瘤作用,类似于在超高风险NB患者中见到的缺少反应,表明临床前模型忠实地概括了难治性NB的临床行为。值得注意的是,采用[PEG-SN38-BG]₈见到的持续和深刻的治疗作用,并未伴随全身毒性的体征(腹泻、皮肤隆起或溃疡、食欲缺乏、恶病质或重量增加迟缓)。

[0155] 在对治疗挑战较小的未接受化疗的疾病建模的实验环境中进行测试时,伊立替康能够在治疗期间(4周)抑制肿瘤生长,而在同一时期内施用[PEG-SN38-BG]₈完全消除了NB肿瘤(30周后无可检测到的再生长,图17)。这些结果提供了证据,证明可优化采用聚合物载体连接的前药的靶向NET的递送,以成功治疗侵袭性MYCN-扩增的NB的不同阶段(新诊断的或复发的)。

[0156] 8. [PEG-SN38-BG]₈前药在转移性耐药性NB模型中引起弥散的肿瘤沉积物消退并抑制其再生长。

[0157] 在转移性难治性疾病的小鼠模型中评价基于由三部分组成的前药、靶向NET的药物递送在针对弥散性化疗耐药性NB实现持续的治疗作用方面的有效性(图18)。在4周内施用[PEG-SN38-BG]₈导致快速消除已确定的多灶性肿瘤沉积物,在>15周内未检测到再生长。相比之下,每周两次以15mg/kg的剂量给予伊立替康对疾病进展没有显著的作用(图18A、B)。结合通过实验表明的靶向NET的由三部分组成的前药对原位难治性肿瘤的有效性(图16),这些结果有力地支持了前药设计策略的原理及其针对对常规疗法无反应的局部和弥散性高风险疾病的治疗潜力。

[0158] 9. 前药介导的MYCN扩增的多药耐药性NB细胞的生长抑制。

[0159] 当用靶向NET的由三部分组成的前药(PF68-SN38-BG)与非靶向的由两部分组成的对照(PF68-SN38)和游离的SN-38治疗化疗耐药性NB细胞[BE(2)C]时,观察到反应模式的巨大差异。与表现出p53功能丧失的BE(2)C的化疗耐药性表型相符,BE(2)C细胞生长被游离的SN-38轻微抑制。其对PF68-SN38也表现出有限的且短暂反应。空白的Pluronic F-68对细胞生长没有作用。但是,以≥5nM SN-38的剂量暴露于PF68-SN38-BG 15分钟产生有效且持久的抗增殖作用(图19)。

[0160] 为了评价构建到前药设计中的NET亲和力的具体贡献,在存在/不存在特定的NET阻滞剂(尼索西汀(nisoxetine),1μM)的情况下测试了PF68-SN38-BG的BE(2)C生长抑制活性。作为对照包括在内的由两部分组成的PF68-SN38在≤20nM SN-38的剂量下显示出最低的生长抑制活性。由三部分组成的PF68-SN38-BG的作用明显更强(P=0.020),但可被NET阻断部分逆转(图20),证实了NET靶向的作用。

[0161] 与这些结果一致的是,使用Pluronic F-108类似地合成并在4周内(每周两次)施用的由三部分组成的靶向NET的前药引起原位BE(2)C异种移植肿瘤的快速消退,与伊立替康在这种难治性NB模型中的轻微作用(图21A)形成对照。也不同于由两部分组成的PF108-

SN38,由三部分组成的前药使疾病稳定,在整个治疗期间都没有进展。此外,当用前药治疗时,快速接近终点的动物表现出明显的肿瘤缩小(“挽救”研究,图21B)。

[0162] 10. 在原位NB异种移植物中比较PEG-[SN22]4与PEG-[SN38]4

[0163] 在具有化疗耐药性NB系SKNBE (2) C的原位NB异种移植物中将PEG-[SN22]4与PEG-[SN38]4进行比较。将BE (2) C细胞用荧光素酶表达载体转染,以允许生物发光成像。每周一次用PEG-[SN22]4 (10mg/kg/剂量)、PEG-[SN38]4 (10mg/kg/剂量) 或CPT-11 (15mg/kg/剂量) 治疗小鼠,持续四周。在这种化疗耐药性模型中,CPT-11具有非常小的作用,而PEG-[SN22]4和PEG-[SN38]4在缩小肿瘤方面都极其有效(图22)。PEG-[SN22]4导致到2-3周时肿瘤完全消失,但是在PEG-[SN38]4治疗的小鼠中仍保留可见的小肿瘤。这表明PEG-[SN22]4在这种人NB异种移植小鼠模型中具有更好的功效。

[0164] 尽管本文参照特定的实施方案示出和描述了本发明,但是本发明并不旨在限于上述细节。而是,可以在权利要求的等同方案的范围内在细节上进行各种修改,而不脱离本发明。

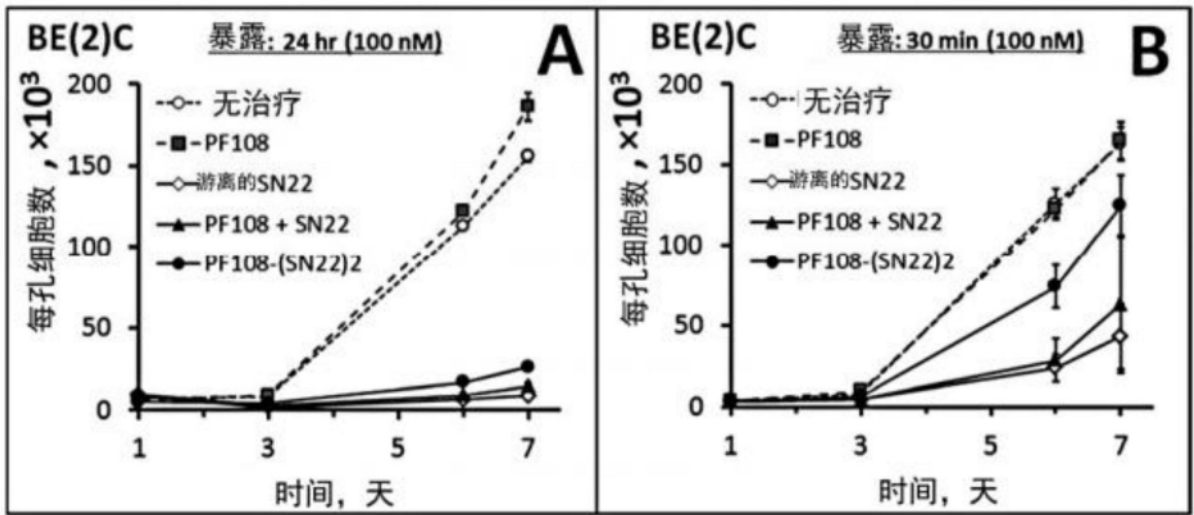


图1

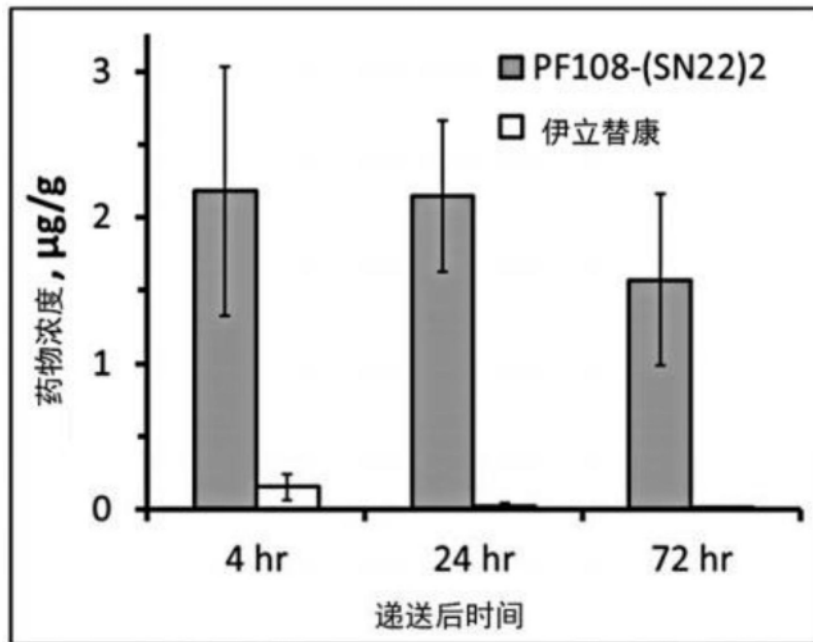


图2

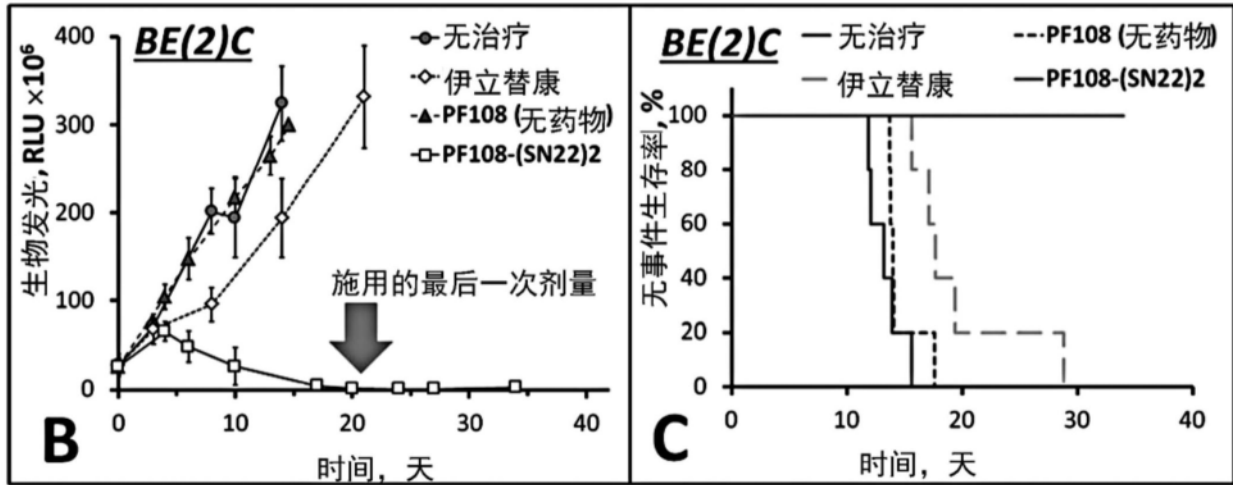
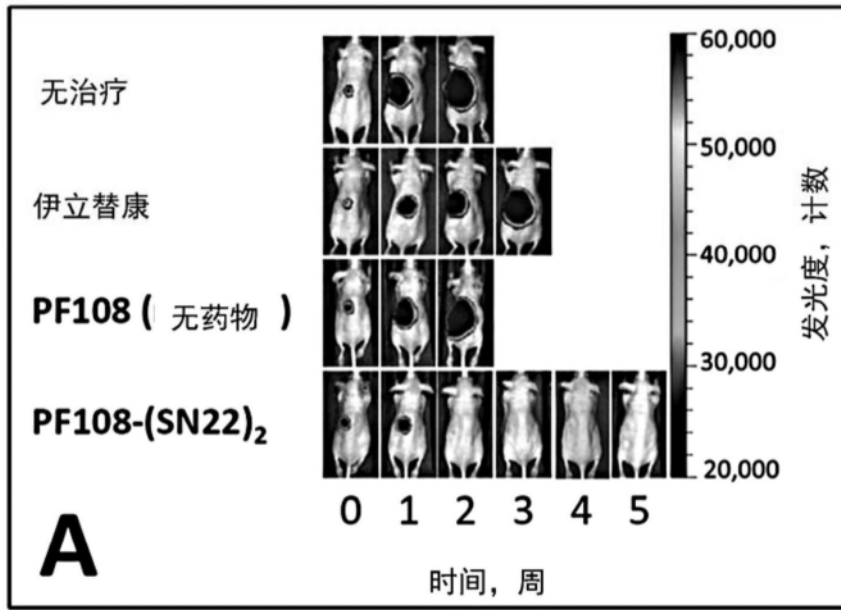


图3

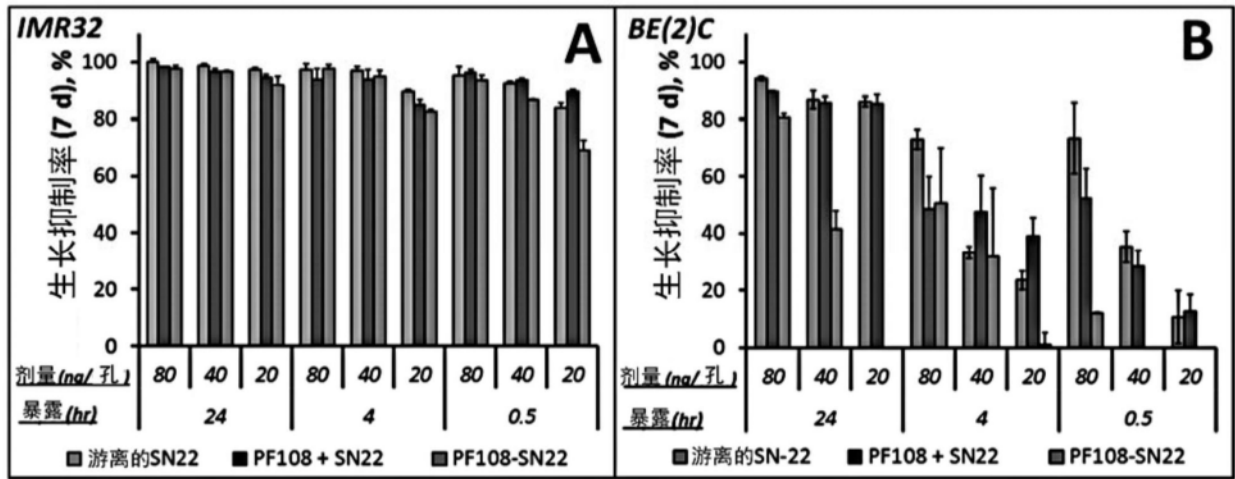


图4

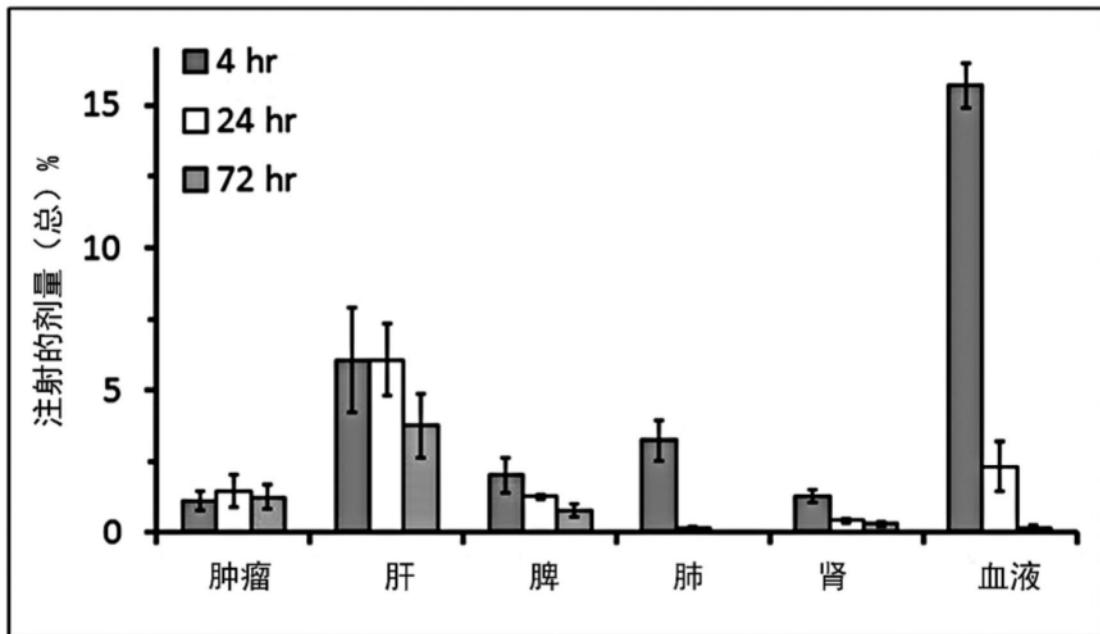


图5

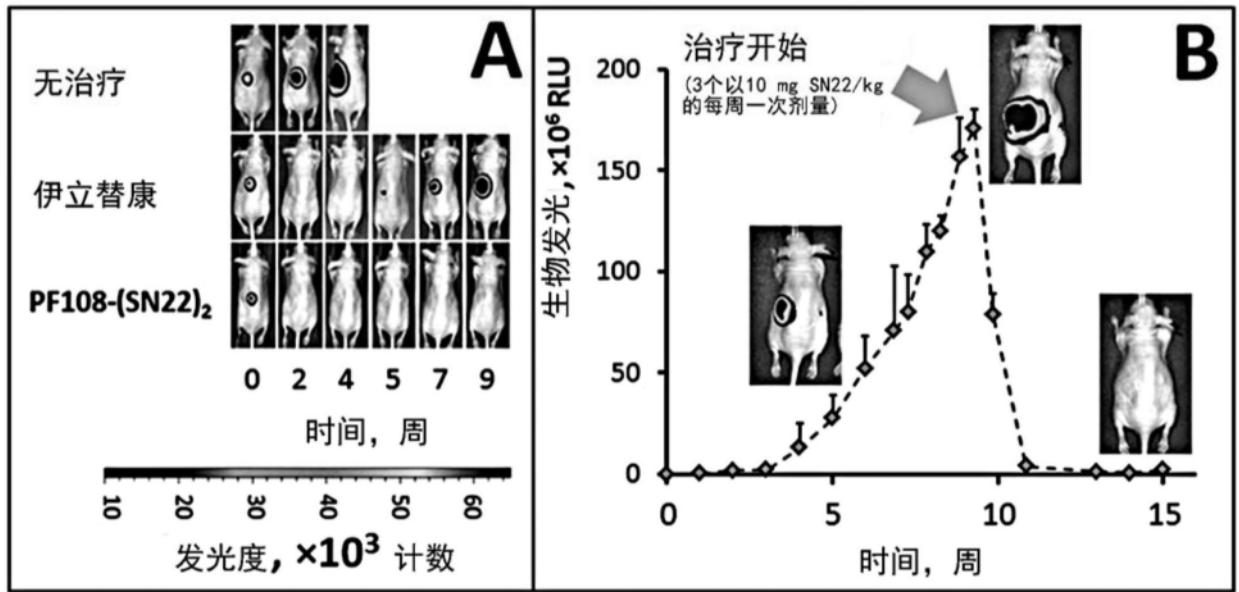
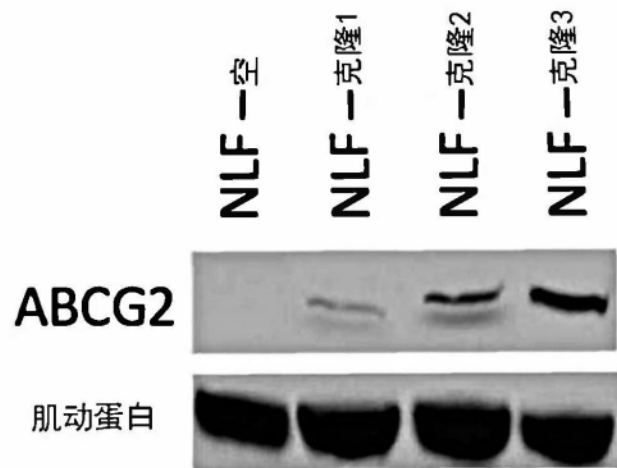


图6

A



B

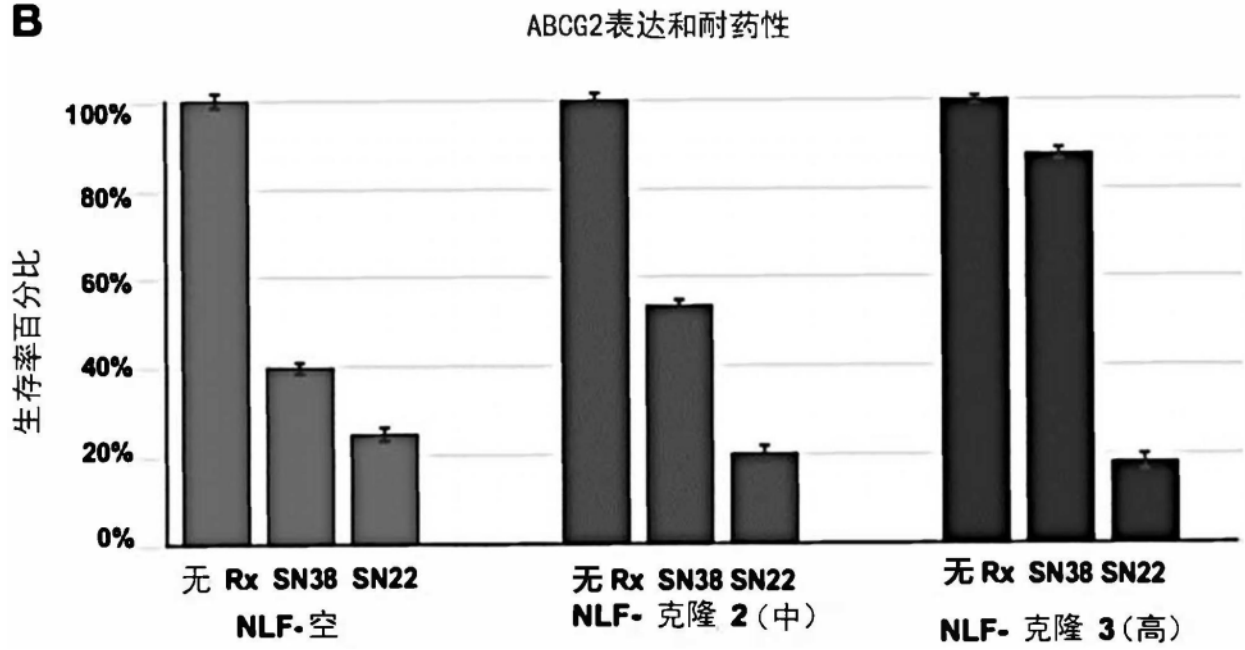


图7

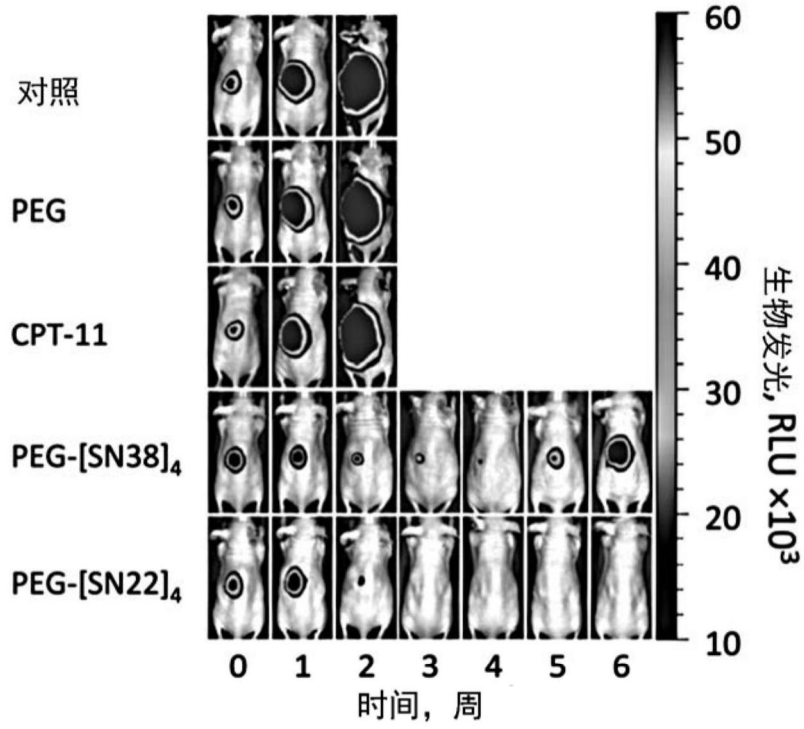


图8

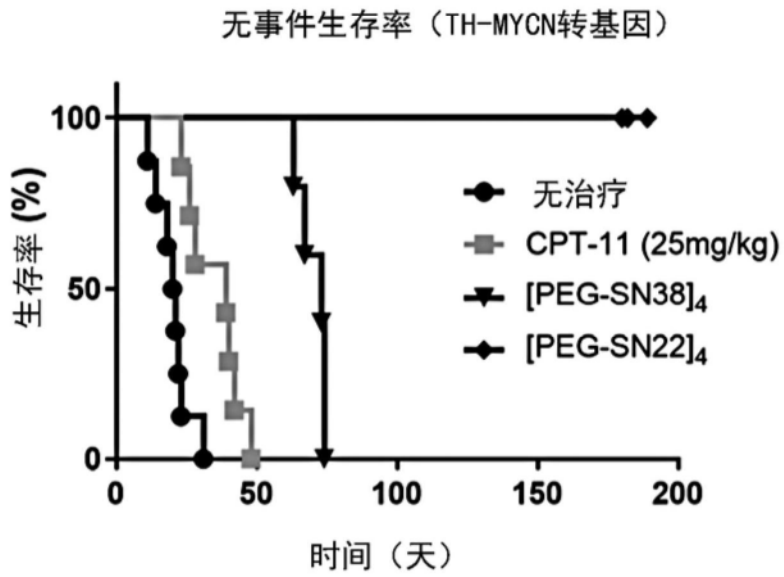


图9

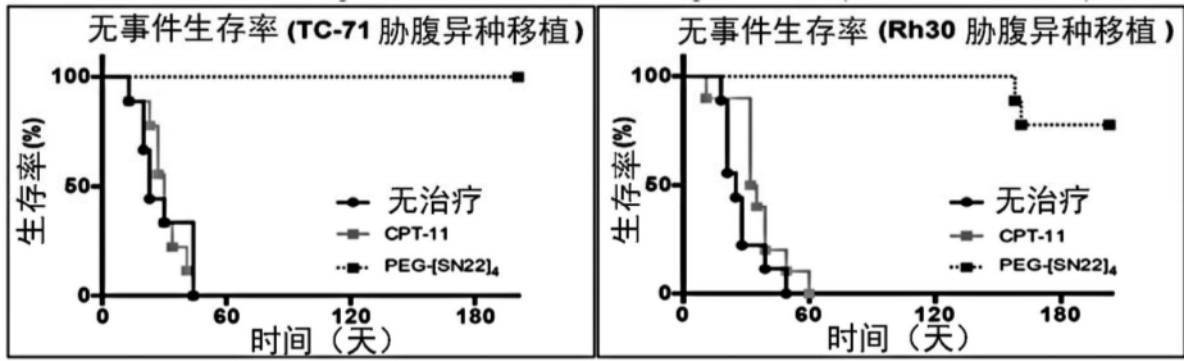


图10

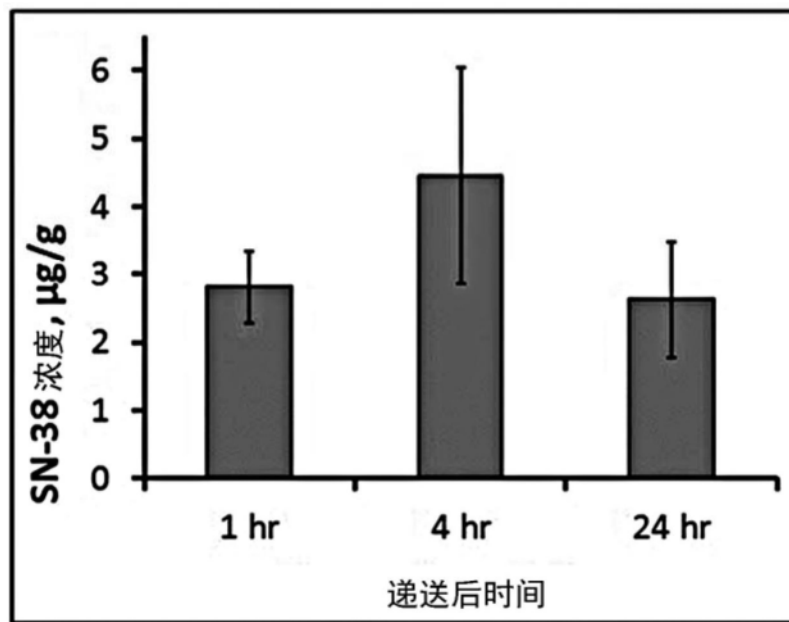


图11

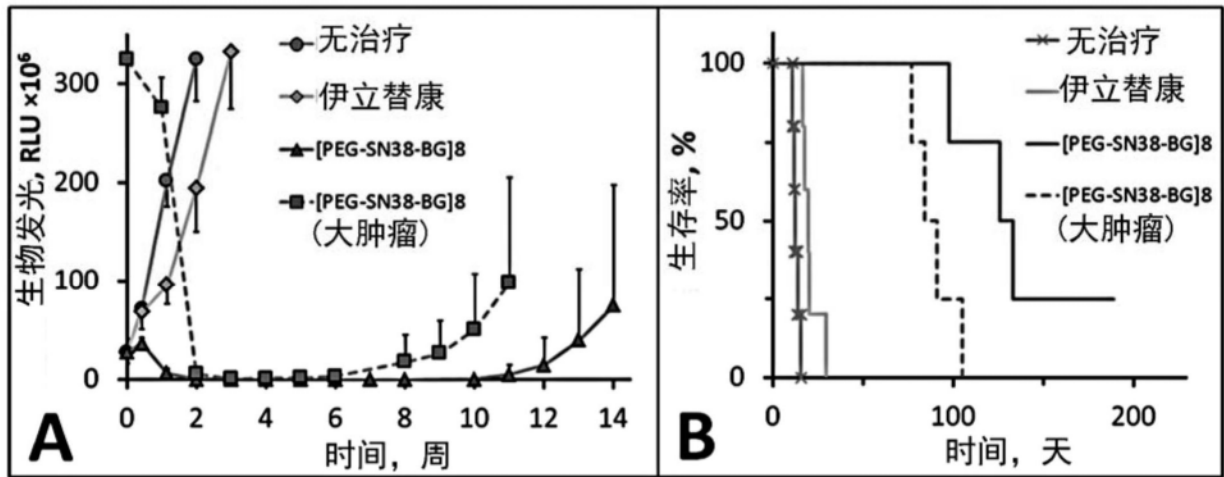


图12

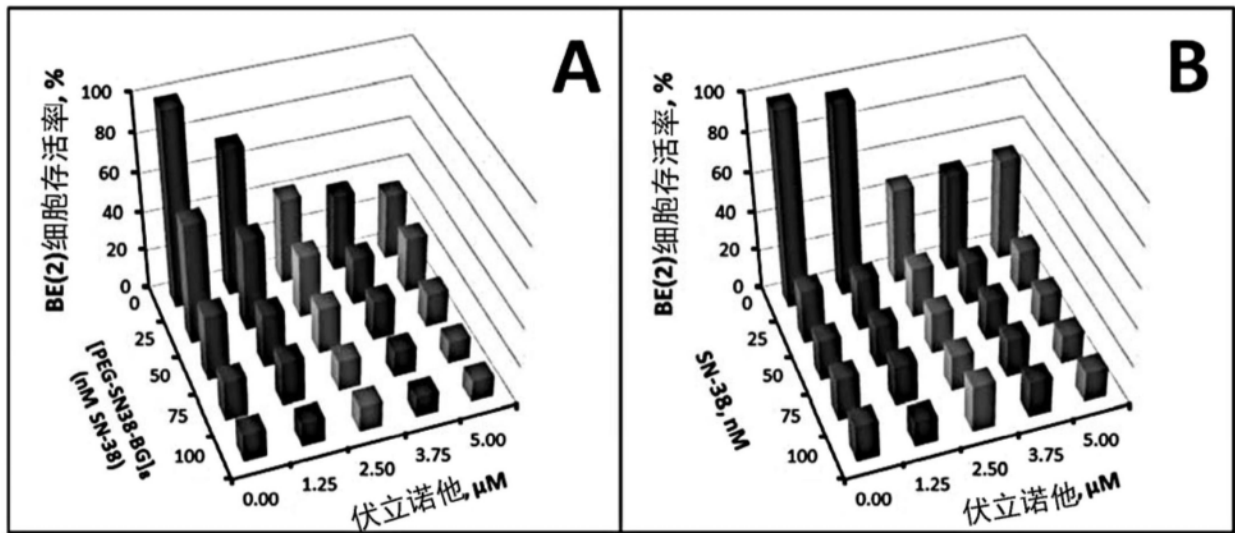


图13

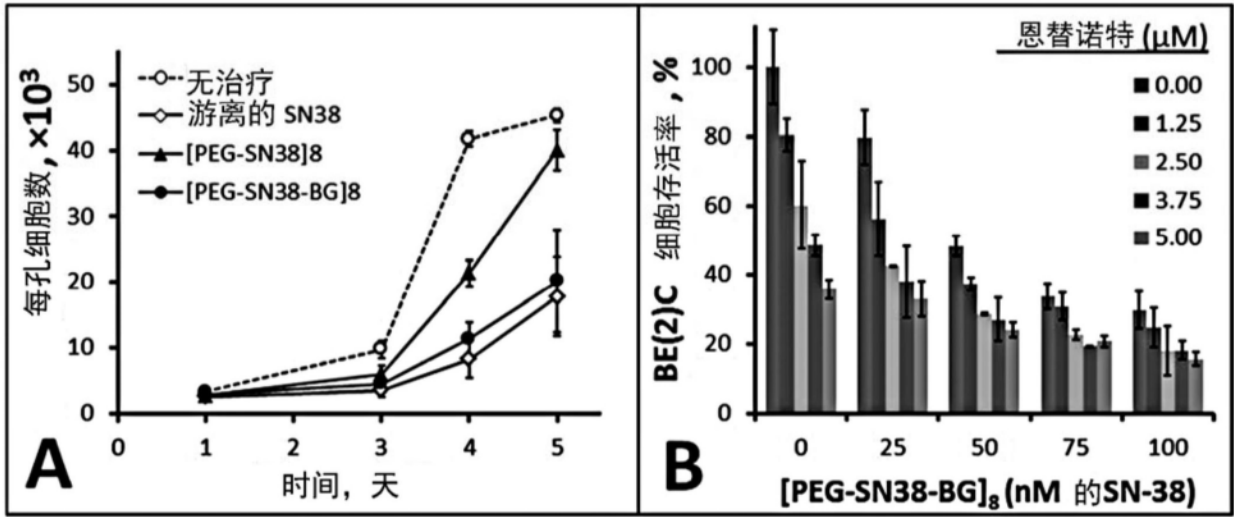


图14

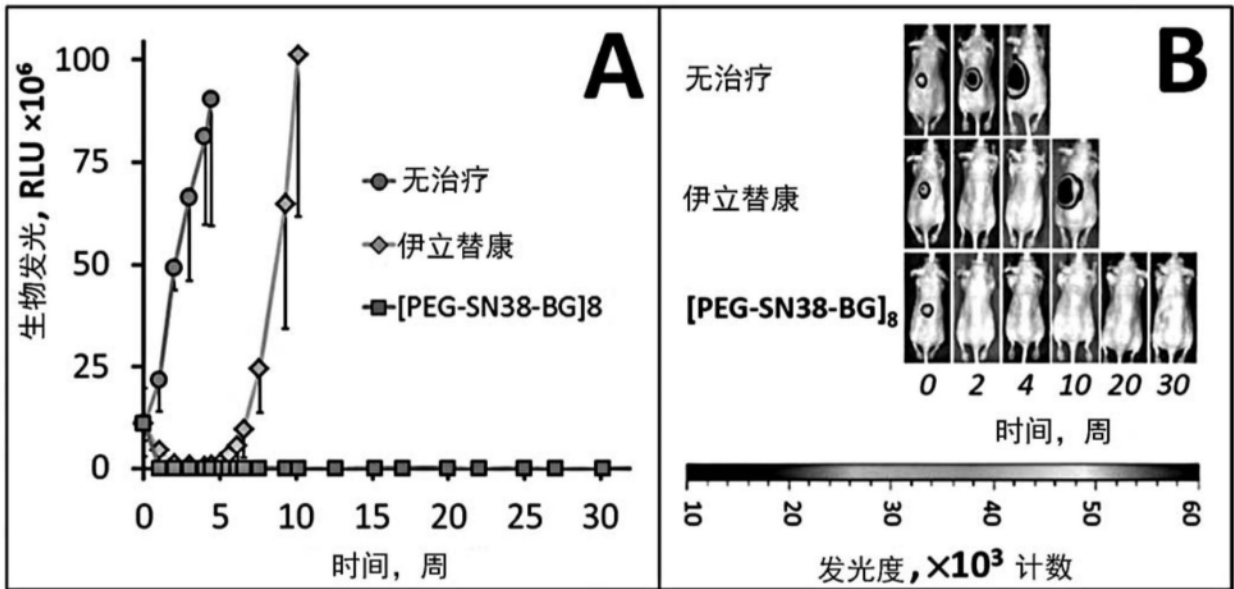


图15

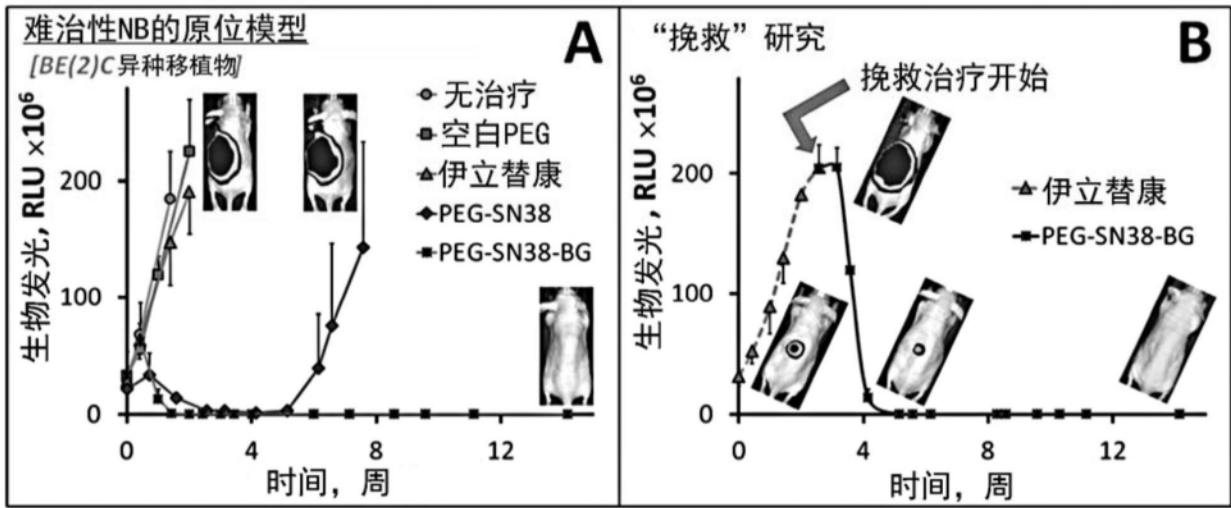


图16

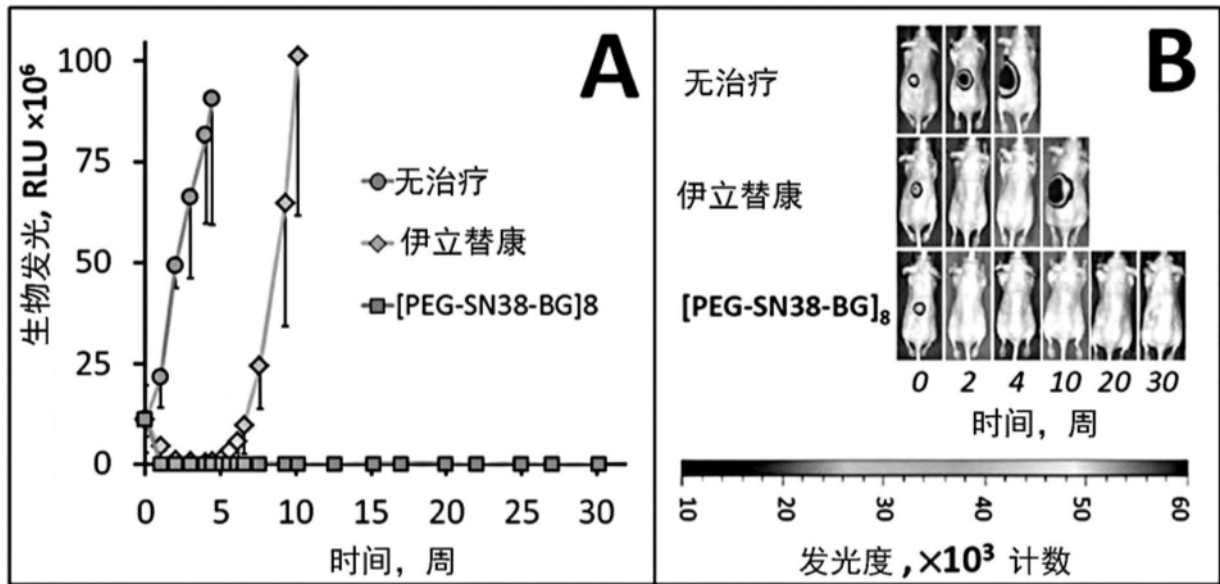


图17

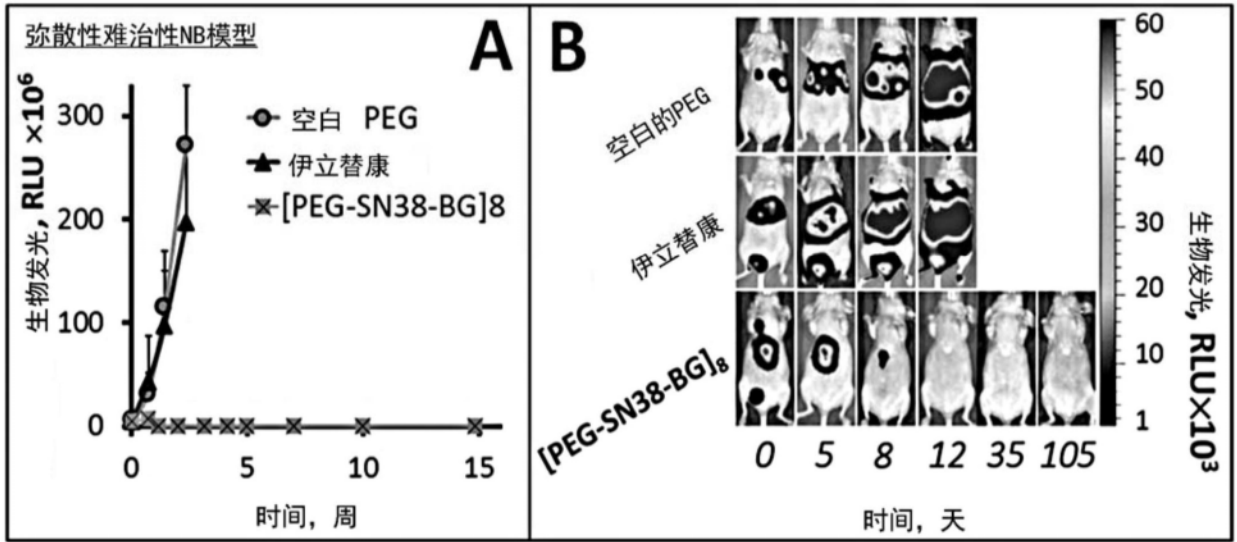


图18

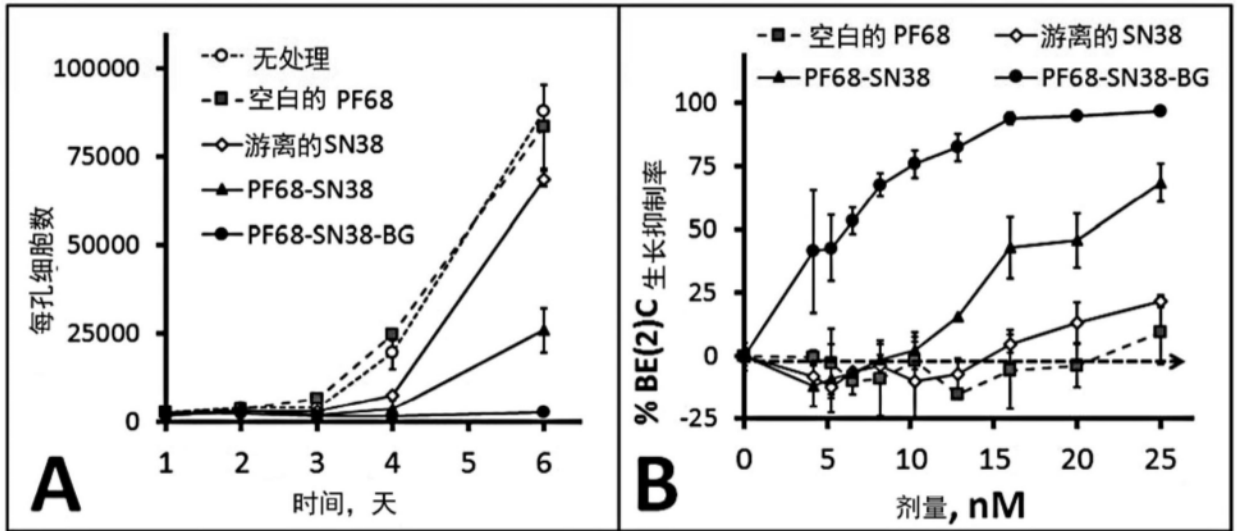


图19

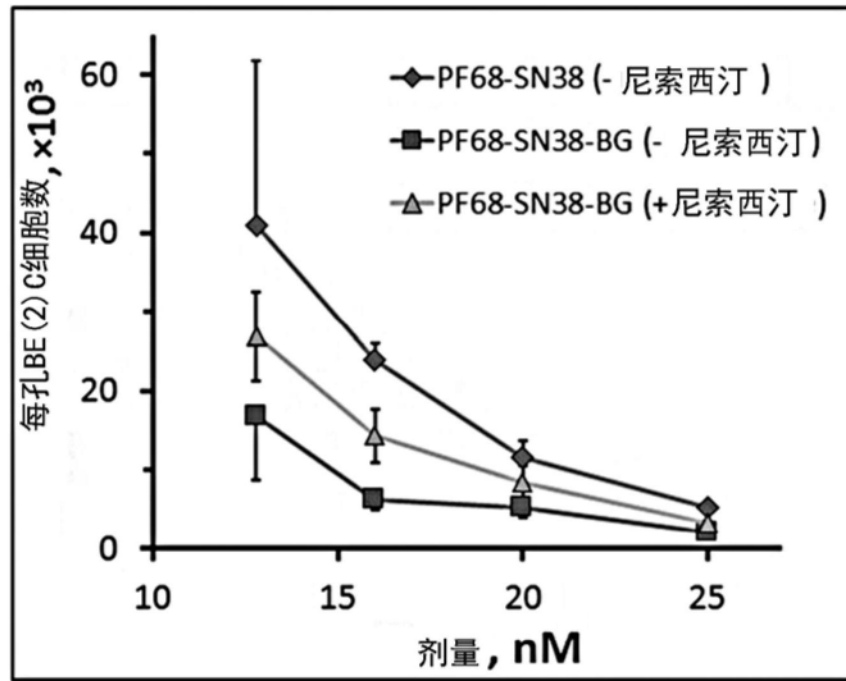


图20

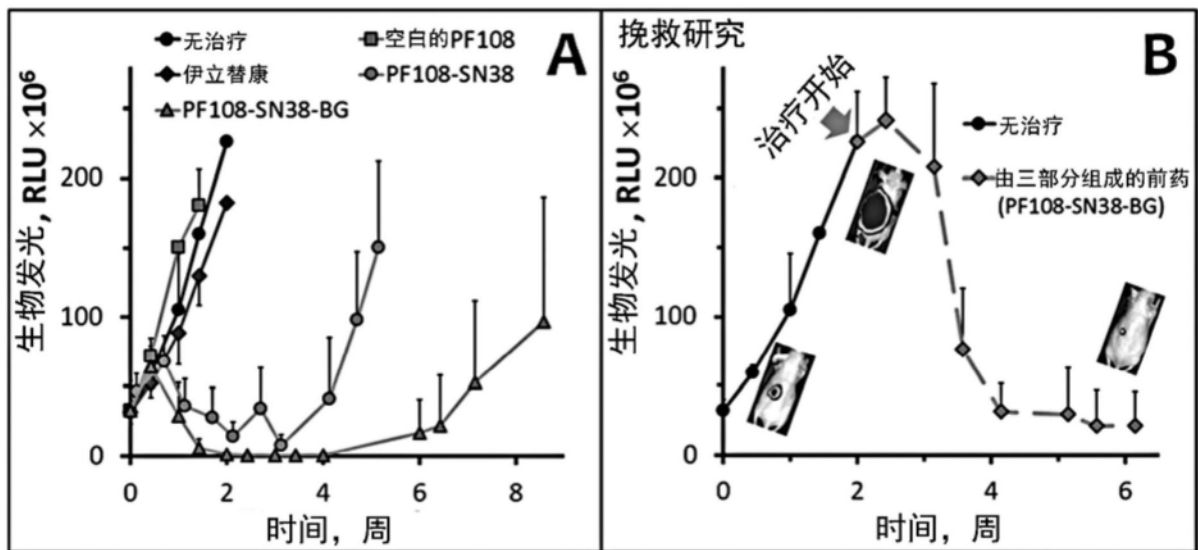
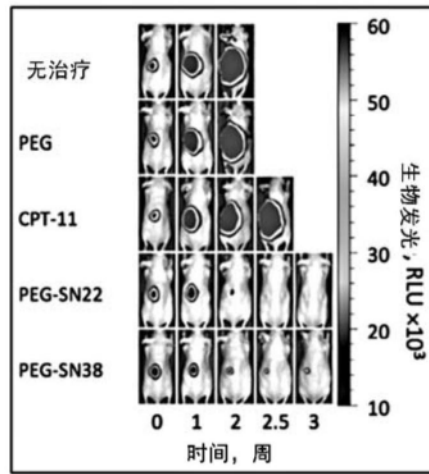


图21

A



B

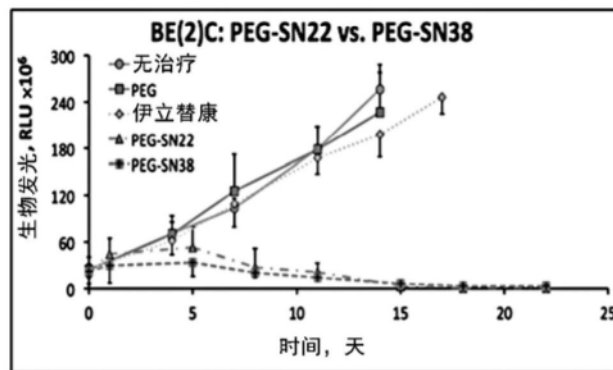


图22