

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **201992157** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2020.02.04

(51) Int. Cl. *A61K 38/14* (2006.01)
A61K 49/00 (2006.01)
A61K 9/14 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2018.03.13

(54) **РАСЩЕПЛЯЕМЫЕ СЛОЖНЫЕ ЭФИРЫ ДЛЯ ТЕРАПИИ РАКА НА ОСНОВЕ
НАНОСИТЕЛЕЙ**

(31) **62/471,027**

(32) **2017.03.14**

(33) **US**

(86) **PCT/US2018/022146**

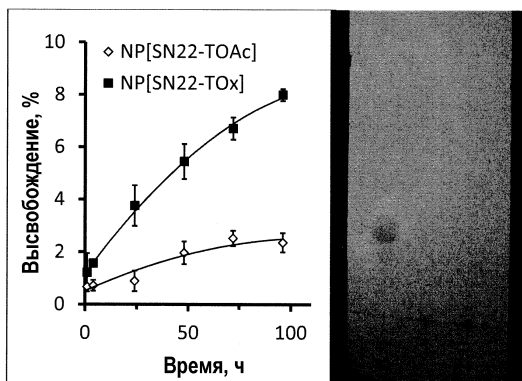
(87) **WO 2018/169934 2018.09.20**

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

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

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

(57) Комбинированное лекарственное средство, представленное формулой (I) или формулой (II) $R-X-NH-CO-CO-OR^1$ (I), $R-X-CO-O-CH_2-CO-OR^1$ (II), где R представляет собой фрагмент токола, фрагмент, являющийся аналогом токола, или фрагмент капсаициноида; X представляет собой простую связь или связывающую группу; и OR^1 представляет собой остаток противоракового или антирестеноического средства, содержащий по меньшей мере одну гидроксильную группу, посредством которой образуется $CO-OR^1$ сложноэфирная связь. Также представлены наночастицы, которые включают указанное выше комбинированное лекарственное средство, а также способ лечения пациента со злокачественной опухолью, который включает введение эффективного количества комбинированного лекарственного средства или наночастиц.



201992157 A1

201992157

A1

**РАСЩЕПЛЯЕМЫЕ СЛОЖНЫЕ ЭФИРЫ ДЛЯ ТЕРАПИИ РАКА НА ОСНОВЕ
НАНОНОСИТЕЛЕЙ**

Информация, касающаяся продолжающейся заявки

По настоящей заявке испрашивается приоритет с даты подачи предварительной заявки США, серийный номер 62/471027, поданной 14 марта 2017 года, содержание которой полностью включено в настоящую заявку посредством ссылки.

Предпосылки создания изобретения

Нейробластома (NB) остается самой распространенной и смертельно опасной опухолью в детском возрасте, на которую приходится 8–10% всех случаев рака у детей и 15% случаев смерти от рака у детей. Несмотря на улучшения в эффективности лечения других педиатрических новообразований, выживаемость для пациентов с NB сильно отстает.

Интенсивная мультимодальная терапия, используемая в настоящее время в клинике, неэффективна более чем у половины пациентов (у 50–60% пациентов наблюдается рецидив без вариантов резервной терапии), при этом наиболее серьезная терапевтическая проблема для подгруппы пациентов с отсутствием клинического ответа, определяется как "сверхвысокая" категория риска.

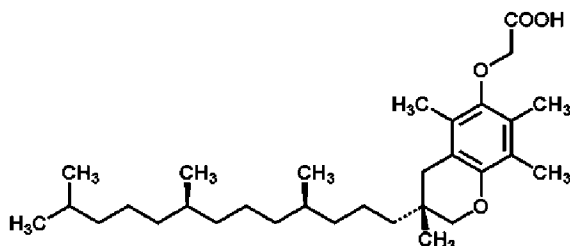
В настоящее время к проблеме NB высокого риска с ее очень разнообразной этиологией и распространенностью биологически неблагоприятных вариантов подходят с использованием сильных противораковых средств в качестве лечения первой линии, включая ингибиторы топоизомеразы I семейства камптотецина: топотекан и иринотекан. Однако их клиническое применение в контексте агрессивного заболевания остается неоптимальным, что дает плохие результаты у пациентов с рецидивирующими или рефрактерными NB из-за дозоограничивающих побочных эффектов и приобретенной лекарственной резистентности.

Важно отметить, что неудача лечения у этих пациентов, как было показано, связана с увеличением пороговых уровней лекарственного средства, необходимых для эффективного подавления роста NB клеток, на 1–3 порядка, доходя до значений, которые клинически не достижимы. Таким образом, для борьбы с рефрактерным NB и другими формами рака существует потребность в альтернативных терапевтических подходах, которые могут заметно увеличить внутриопухолевую доставку и расширить присутствие

лекарственного средства на терапевтически эффективных уровнях лекарственного средства без увеличения системного воздействия.

Редокс-молчащие митоканы включают множество структур, способных проявлять противораковую активность и взаимодействующих с различными типами химиотерапевтических средств *in vitro* и *in vivo*. Большинство редокс-молчащих митоканов представляют собой карбоновые кислоты, включающие высокогидрофобный токоферол, в котором фенольная гидроксильная группа блокирована, что делает соединения редокс-молчащими. При использовании в качестве части конъюгата комбинированного лекарственного средства они могут легко увеличивать гидрофобность до значений $\text{LogP}_{o/w} > 9$ и промотировать совместимость с матрицей наночастиц, используемых для их доставки. Эффект гидрофобизации важен для предотвращения быстрой и полной диссоциации из носителя, при этом считается, что кислотная карбоксилатная функция является необходимым условием для фармакологической активности.

Например, токоферилоксиуксусная кислота, как сообщалось, является митоканом, который устойчив к разблокированию фенольной гидроксильной группы, таким образом, сохраняя редокс-сайленсинг.

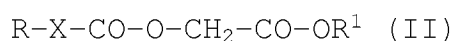
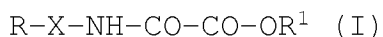


D- α -Токоферилоксиуксусная кислота

Хотя токоферилоксиуксусная кислота и другие производные токоферола подают надежды в качестве противораковых и антипролиферативных средств, усиливая эффекты редокс-молчащих митоканов с фармакологически-комплементарными соединениями и обеспечивая возможность их эффективной доставки в активной форме, проблема остается, и улучшения в этом направлении будут приветствоваться.

Сущность изобретения

В одном варианте осуществления комбинированное лекарственное средство представлено формулой (I) или формулой (II):



где

R представляет собой фрагмент токола, фрагмент, являющийся аналогом токола, или фрагмент капсаициноида;

X представляет собой простую связь или связывающую группу;
и

OR¹ представляет собой остаток противоракового или антирестенотического средства, содержащий по меньшей мере одну гидроксильную группу, посредством которой образуется CO-OR¹ сложноэфирная связь.

В другом варианте осуществления X представляет собой связывающую группу.

В другом варианте осуществления X представляет собой разветвленную или неразветвленную углеводородную группу, которая необязательно может включать один или более содержащихся в цепи или боковых гетероатомных заместителей и/или циклических групп.

В другом варианте осуществления X представляет собой $[O(CH_2)_2]_n$, где n представляет собой целое число, имеющее значение от 1 до 1000.

В другом варианте осуществления n имеет значение 1.

В другом варианте осуществления X представляет собой $O-CO(CH_2)_2[O(CH_2)_2]_n$, где n представляет собой целое число, имеющее значение от 1 до 1000.

В другом варианте осуществления X представляет собой $O-CO(CH_2)_m$, где m представляет собой целое число, имеющее значение от 1 до 12.

В другом варианте осуществления m имеет значение 2.

В другом варианте осуществления комбинированное лекарственное средство представлено формулой (I).

В другом варианте осуществления комбинированное лекарственное средство представлено формулой (II).

В другом варианте осуществления OR¹ представляет собой остаток SN-22.

В другом варианте осуществления R представляет собой фрагмент, являющийся аналогом токола.

В другом варианте осуществления R представляет собой фрагмент капсаициноида.

В другом варианте осуществления комбинированное лекарственное средство представлено формулой $R-O-CO(CH_2)_2-CO-O-CH_2-CO-OR^1$, в которой R представляет собой α -токофероловый фрагмент, а OR¹ представляет собой остаток SN-22.

В другом варианте осуществления комбинированное лекарственное средство представлено формулой $R-O(CH_2)_2-NH-CO-CO-OR^1$, в которой R представляет собой α -токофероловый фрагмент, а OR^1 представляет собой остаток SN-22.

В другом варианте осуществления комбинированное лекарственное средство представлено формулой $R-O(CH_2)_2-NH-CO-CO-OR^1$, в которой R представляет собой α -токофероловый фрагмент, а OR^1 представляет собой остаток подофиллотоксина.

В другом варианте осуществления OR^1 представляет собой остаток подофиллотоксина.

Другой вариант осуществления направлен на композицию, содержащую:

(а) первое комбинированное лекарственное средство, описанное выше, представленное формулой (I) или формулой (II), где $-OR^1$ первого комбинированного лекарственного средства представляет собой остаток SN-22; и

(В) второе комбинированное лекарственное средство, описанное выше, представленное формулой (I) или формулой (II), где $-OR^1$ второго комбинированного лекарственного средства представляет собой остаток подофиллотоксина.

В другом варианте осуществления первое комбинированное лекарственное средство и второе комбинированное лекарственное средство композиции, описанной выше, содержатся в наночастицах.

Другой вариант осуществления направлен на наночастицы, содержащие комбинированное лекарственное средство, описанное выше.

Другой вариант осуществления направлен на способ лечения пациента со злокачественной опухолью, включающий введение пациенту со злокачественной опухолью эффективного количества комбинированного лекарственного средства, описанного выше.

В другом варианте осуществления пациентом со злокачественной опухолью является человек.

В другом варианте осуществления пациент имеет нейробластому.

В другом варианте осуществления способ лечения пациента со злокачественной опухолью включает введение пациенту эффективного количества композиции, описанной выше.

В другом варианте осуществления способ лечения пациента со злокачественной опухолью включает введение пациенту эффективного количества наночастиц, описанных выше.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1 показывает характер высвобождения SN-22 комбинированных лекарственных средств с разной гидролитической лабильностью, измеренной в условиях достаточного разбавления.

Фиг. 2 показывает сравнительные антипролиферативные эффекты наночастиц с нагрузкой SN22-TOAc против SN22-TOx на клетки нейробластомы с амплификацией MYCN.

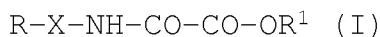
Фиг. 3 показывает терапевтическую эффективность наночастиц с нагрузкой SN22-TOx в ортотопической мышинной модели нейробластомы высокого риска.

Подробное описание изобретения

Авторы настоящего изобретения обнаружили, что комбинированные лекарственные средства, представленные формулой (I) и формулой (II), описанными выше, являются особенно подходящими для использования в качестве противораковых средств, и в частности, для лечения нейробластомы.

В частности, авторы настоящего изобретения обнаружили, что оксаматные сложноэфирные связи являются исключительно подходящими для создания быстроактивируемых связанных сложноэфирными связями конъюгатов комбинированных лекарственных средств между токолом, аналогами токола или капсаициноидами и противораковыми и/или антирестеноотическими средствами, содержащими гидроксильные функциональные группы, доступные для этерификации. Ускоренная гидролитическая активация таких конъюгатов является специфическим свойством оксаматных сложных эфиров, которое не было обнаружено в исследованных ранее конъюгатах комбинированных лекарственных средств.

Конъюгаты комбинированных лекарственных средств в соответствии с настоящим описанием включают оксаматные сложные эфиры, представленные формулой (I),



где R представляет собой токол или фрагмент, являющийся аналогом токола, или фрагмент капсаициноида, X представляет собой простую связь или связывающую группу, и OR^1 представляет собой остаток противоракового или антирестеноотического средства, содержащий по меньшей мере одну гидроксильную группу, посредством которой образуется $CO-OR^1$ сложноэфирная связь. Все такие конъюгаты комбинированных лекарственных средств можно получить с использованием способов, аналогичных тем, которые раскрыты в Примерах, и/или других способов, известных из уровня

техники, и все такие конъюгаты и их терапевтические применения предусматриваются настоящим изобретением.

Неограничивающие примеры подходящих противоопухолевых или антирестенотических средств включают паклитаксел, доцетаксел, камптотецин, 7-этил-10-гидроксикамптотецин (SN-38), 7-этилкамптотецин (SN-22), этопозид, фенретинид и лестауртиниб. Гидроксильная группа, из которой происходит группа OR^1 , может представлять собой фенольную или алифатическую гидроксильную группу. Другим подходящим противораковым средством является подофиллотоксин (PPT), который можно использовать в качестве противоракового средства в формуле (I) или формуле (II).

В контексте настоящей заявки термин "остаток" соединения, если не указано иное, относится к органическому радикалу, представляющему формальное удаление активного атома водорода из гидроксильной группы в соединении. Примером является удаление атома водорода из карбоновой кислоты или спирта или фенола при образовании сложного эфира. Термин применим независимо от того, действительно ли органический радикал получен из указанных химических веществ.

Токол представляет собой 2-метил-2-(4,8,12-триметилтридецил)-хроман-6-ол. Аналоги токола включают все соединения, содержащие 2-метил-2-(4,8,12-триметилтридецил)хроман-6-ол фрагмент, включая их модификации, в которых одна или более метильных групп присутствуют на бензольном кольце и/или в которых 4,8,12-триметилтридецильная группа модифицирована и включает одну или более олефиновых двойных связей в цепи. Например, могут быть три метильные группы на бензольном кольце и/или могут быть три олефиновые двойные связи в цепи. Аналоги токола включают любую группу из 8 встречающихся в природе жирорастворимых соединений с активностью витамина Е. Примеры включают токоферолы и токотриенолы, и конкретными примерами являются α , β , γ и δ -токоферол и α , β , γ и δ -токотриенол.

Термины "фрагмент токола", "фрагмент, являющийся аналогом токола" и "токофероловый фрагмент" и т.д. и их незначительные вариации относятся к органическим радикалам, представляющим формальное удаление группы 6-ОН из токола, аналога токола и токоферола и т.п.

Термин "фрагмент капсаициноида" и его незначительные вариации относятся к органическим радикалам, представляющим формальное удаление группы 4-ОН из капсаициноида, в том числе из

самого капсаицина. Неограничивающие примеры капсаициноидов, отличных от капсаицина, включают дигидрокапсаицин, нордигидрокапсаицин, гомодигидрокапсаицин, гомокапсаицин и нонивамид.

Когда X представляет собой связывающую группу, это может быть разветвленная или неразветвленная углеводородная группа, которая необязательно может включать один или более содержащихся в цепи или боковых гетероатомных заместителей и/или циклических групп. Типично, углеводородная группа включает от 1 до 30 атомов углерода, или от 1 до 20, или от 1 до 10, или от 1 до 6. Количество атомов углерода может составлять 1, 2, 3, 4 или 5. Неограничивающие примеры X включают $[O(CH_2)_2]_n$ и $O-CO(CH_2)_2[O(CH_2)_2]_n$, где n в обоих случаях представляет собой целое число с нижним пределом 1, 2, 3 или 4 и верхним пределом 1000, 500, 200, 100, 50, 25 или 10. Группа X может представлять собой $O-CO(CH_2)_m$, где m представляет собой любое целое число, имеющее значение от 1 до 12 или находящееся в любом суб-диапазоне указанного диапазона.

Авторы настоящего изобретения обнаружили, что в контексте конструирования комбинированных лекарственных средств для доставки на основе наночастиц (NP) сила образующей комбинированное лекарственное средство кислоты непосредственно коррелирует с кинетикой расщепления сложноэфирной связи, обеспечивая, таким образом, эффективный инструмент для контроля метаболизма комбинированного лекарственного средства и делая возможной его подходящую активацию. Таблица 1 иллюстрирует эффект силы кислоты на скорость гидролитического расщепления для некоторых модельных соединений.

Таблица 1

Тип сложноэфирной связи	Модельное соединение	$T_{1/2}$ для гидролитического расщепления (pH 7)	pKa кислоты
Ацил	CH_3COOEt	~ 200 дней	4,7
Оксиацетил	CH_3OCH_2COOEt	22 дней	3,6
Ацилоксиацетил	CH_3COOCH_2COOEt	9 дней	2,7
Оксамоил	$CH_3NHCOCOEt$	17 часов	1,8

Диссоциация комбинированного лекарственного средства приведет к образованию двух исходных средств с соответствующим $\log P_{O/W}$ ниже порогового значения, необходимого для стабильного

удерживания в парентерально вводимых композициях ($\log P_{o/w} \geq 9$). Высвобожденные преждевременно, они утратят защиту, обеспечиваемую носителем, от разложения и инактивации, а их фармакокинетика вернет себе неконтролируемый (не-носитель) паттерн. Следовательно, скорость расщепления комбинированного лекарственного средства должна быть точно подобрана так, чтобы обеспечить максимальное восстановление лекарственного средства в ткани-мишени при ограничении нецелевой дистрибуции и потери фармакологической активности.

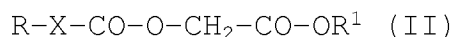
Редокс-молчащие токол/аналоги токола/капсаиноидные соединения, конъюгированные с противоопухолевыми или антитрестенотическими средствами через гидролитически расщепляемую связь, образуют комбинированное лекарственное средство, которое выполняет две взаимодополняющие задачи. Они (1) усиливают опосредованную наночастицами доставку путем модификации стабильности наночастица-груз ассоциации и обеспечения контроля скорости высвобождения и активации комбинированного лекарственного средства (то есть химического фрагмента для обратимой гидрофобизации), и (2) функционируют в качестве фармакотерапевтического средства семейства митоканов (то есть нацеленное на митохондрии лекарственное средство), которое работает совместно с противораковым соединением R^1 .

В одном примере конъюгата комбинированного лекарственного средства, представленного формулой (I), указанного в настоящей заявке как SN22-TOx, R представляет собой альфа-токофероловый фрагмент, X представляет собой $O(CH_2)_2$ и OR^1 представляет собой SN-22 остаток. Использование SN-22 может помочь решить проблему множественной лекарственной резистентности (MDR), наблюдаемой для других производных камптотецина, содержащих фенольные гидроксильные группы, например, у пациентов с нейробластомой высокого риска (NB), у которых раковые клетки экспрессируют белок "резистентности рака молочной железы" ABCG2, который играет важную роль в образовании MDR. SN-22 значительно менее склонен, чем фенольные аналоги камптотецина к ABCG2-опосредованной резистентности.

Дополнительное значительное преимущество SN-22 в качестве основы для разработки комбинированного лекарственного средства обусловлено его потенциально более благоприятной локализацией в организме и длительным удерживанием в ткани-мишени. Не имея фенольной гидроксильной группы, он не подвергается

ферментативной глюкуронидации, что является одним из основных путей быстрого выведения фенольных аналогов (например, SN-38) из организма. Важно отметить, что уридиндифосфат-глюкуронозилтрансфераза, фермент, ответственный за глюкуронидацию в нормальных тканях, также присутствует в различных солидных опухолях. Это уменьшает накопление и удержание лекарственного средства в раковых клетках и, таким образом, способствует резистентности к химиотерапевтическому лекарственному средству. Таким образом, авторы изобретения полагают, что наночастицы, нагруженные комбинированными лекарственными средствами на основе SN-22, будут особенно эффективны для поддержания терапевтически адекватных локальных уровней лекарственного средства в течение длительных периодов, что, в свою очередь, должно снижать системную токсичность, позволяя использовать меньшие дозы или менее частое дозирование. Авторы изобретения также полагают, что комбинированные лекарственные средства, включающие SN-22 фрагменты, в частности, могут предложить значительное терапевтическое преимущество, помогая преодолеть множественную лекарственную резистентность (MDR).

Другой вариант осуществления обеспечивает конъюгат комбинированного лекарственного средства с использованием ацилоксиацетатной связи, представленный формулой (II)



где R, R¹ и X могут представлять собой любую комбинацию любых вариантов, описанных выше применительно к оксаматным сложным эфирам формулы (I). Гидроксильная группа, из которой происходит OR¹ группа, может представлять собой фенольную или алифатическую гидроксильную группу. В частности, OR¹ может представлять собой остаток SN-22, и X может представлять собой O-CO(CH₂)_m, где m имеет значение 2. В одном примере комбинированное лекарственное средство R-O-CO(CH₂)₂-CO-O-CH₂-CO-OR¹, в котором R представляет собой α-токофероловый фрагмент и OR¹ представляет собой SN-22 остаток.

В другом варианте осуществления -OR¹ представляет собой PPT остаток. В частности, OR¹ может представлять собой PPT остаток, X может представлять собой O-CO(CH₂)_m, где m имеет значение 2. В одном примере комбинированное лекарственное средство R-O-CO(CH₂)₂-CO-O-CH₂-CO-OR¹, в котором R представляет собой α-токофероловый фрагмент, а OR¹ представляет собой SN-22 остаток.

В частности, предпочтительным вариантом осуществления является такой, когда комбинированное лекарственное средство представлено формулой (I). В частности, в этом варианте осуществления X представляет собой простую связь. Альтернативно, X может представлять собой $O-CO(CH_2)_m$, где m имеет значение 2. В любом из этих вариантов осуществления OR^1 представляет собой SN-22 остаток, или OR^1 представляет собой PPT остаток.

Как обсуждается в настоящей заявке, комбинированные лекарственные средства могут быть включены в наночастицы. Использование наночастиц для доставки лекарств хорошо известно в данной области. Как таковая, природа наночастиц, которые можно использовать, конкретно не ограничена. Пегилированные биоразлагаемые наночастицы являются предпочтительными. Наночастицы также могут содержать носитель. Например, поли (D, L-лактид) или поли (D, L-лактид)-поли(этиленгликоль) блок-сополимер являются полезными носителями. Наночастицы также можно использовать в сочетании с одной или более добавками. Примеры подходящих добавок включают трегалозу и гидроксипропил- β -циклодекстрин.

В одном варианте осуществления композиция содержит два или более комбинированных лекарственных средств, представленных формулой (I) и/или формулой (II). В предпочтительном примере этого варианта осуществления используют по меньшей мере два разных комбинированных лекарственных средства, каждое из которых представлено формулой (I). В предпочтительном примере такого варианта осуществления OR^1 первого комбинированного лекарственного средства представляет собой SN-22 остаток, а второе комбинированное лекарственное средство представляет собой остаток подофиллотоксина (PPT). SN22-TOx и PPT-TOx, описанные выше, особенно полезны в такой композиции. Массовое соотношение комбинированных лекарственных средств может варьироваться в широких пределах, например, 50:1, 20:1, 10:1, 5:1, 2:1, 1:1, 1:2, 5:1, 10:1, 20:1 и 50:1, включая все конкретные промежуточные значения и субдиапазоны. Комбинированные лекарственные средства могут быть включены в наночастицы, как обсуждалось выше.

Настоящее изобретение также направлено на способ лечения рака с использованием комбинированных лекарственных средств и композиций, описанных выше. Использование нагруженных комбинированным лекарственным средством наночастиц, как

обсуждается выше, представляет собой особенно предпочтительный вариант осуществления. Пациент может представлять собой человека, но также может представлять собой животное, поэтому способ также можно использовать в ветеринарии. Рак может представлять собой нейробластома. Необходимую для введения дозу комбинированного лекарственного средства (средств) легко можно определить с использованием методов, хорошо известных из уровня техники.

ПРИМЕРЫ

Комбинированное лекарственное средство $R-O-CO(CH_2)_2-CO-O-CH_2-CO-OR^1$, в котором R представляет собой α -токофероловый фрагмент, а OR^1 представляет собой SN-22 остаток, можно получить следующим способом. Сначала получают 3-(D- α -токоферилоксикарбонил)пропионилоксиуксусную кислоту из коммерчески доступной D- α -токоферилгемиянтарной кислоты. Вкратце, тетрабутиламмоний D- α -токоферилгемисукцинат подвергают взаимодействию с трет-бутилбромацетатом в 1-метил-2-пирролидоне (1-MP), с последующим удалением трет-бутильной группы при помощи трифторуксусной кислоты/триэтилсилана в дихлорметане с получением кислоты. SN-22 затем конъюгируют с этой кислотой в соответствии со стандартной процедурой с использованием 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид гидрохлорида (EDC) в качестве промотора и 4-N, N-диметиламино-пиридинтозилата (DPTS) в качестве катализатора в дихлорметане в качестве растворителя.

SN22-TOx получали с использованием аналогичного способа. PPT-TOx также можно получить таким способом. Сначала получали N-(2-D- α -токоферилокси)этилоксаминовую кислоту с общим выходом 79% из D- α -токоферола, который сначала обрабатывали гидроксидом тетрабутиламмония и подвергали взаимодействию с бромацетонитрилом в 1-MP. Полученный D- α -токоферилоксиацетонитрил затем восстанавливали до 2-(D- α -токоферилокси)этиламина с использованием литийалюминийгидрида в этиловом эфире. Амин подвергали ацилированию метилхлороксоацетатом с получением метил N-(2-D- α -токоферилокси)этилоксамата, который гидролизировали водой/карбонатом калия с получением N-(2-D- α -токоферилокси)этилоксаминовой кислоты.

Затем SN-22 конъюгировали с N-(2-D- α -токоферилокси)этилоксаминовой кислотой в соответствии со стандартной процедурой с использованием EDC в качестве промотора

и DPTS в качестве катализатора в дихлорметане в качестве растворителя, и эту структуру и чистоту подтверждали методом ^1H ЯМР и ТСХ (выход: 63%).

SN-22 эфир токоферилоксиуксусной кислоты (SN22-TOAc) получали путем ацилирования SN-22 D- α -токоферилоксиуксусной кислотой с выходом 95% в соответствии со стандартной процедурой, используя 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)-карбодиимид гидрохлорид (EDC) в качестве промотора и 4-N, N-диметиламино-пиридинтозилат (DPTS) в качестве катализатора. Структуру и чистоту подтверждали методом ^1H ЯМР и ТСХ.

Наночастицы (NP), содержащие SN22-TOAc и SN22-Tox, каждые получали с 90–95% выходом (что соответствовало нагрузке 16–17% масс/масс или 4,0–4,2 мг на мл) и охарактеризовывали, как описано ранее. См. Alferiev IS, Iyer R, Croucher JL, Adamo RF, Zhang K, Mangino JL, Kolla V, Fishbein I, Brodeur GM, Levy RJ, Chorny M. Nanoparticle-mediated delivery of a rapidly activatable prodrug of SN-38 for neuroblastoma therapy. *Biomaterials* 2015;51:22–29, и Iyer R, Croucher JL, Chorny M, Mangino JL, Alferiev IS, Levy RJ, Kolla V, Brodeur GM.

Пегилированные биоразлагаемые наночастицы были получены с использованием модифицированного метода нанопреципитации, оптимизированного для получения ультрамалых частиц. 20 мг порцию конъюгата SN22 с токоферол оксоацетатом или оксаматом (SN22-TOAc или SN22-Tox соответственно), 100 мг поли(D, L-лактид)-b-поли(этиленгликоля) (5 кДа:5 кДа) и 20 мг поверхностно-активного вещества PLURONIC® F-68 растворяли в 8 мл ацетона и к органической фазе добавляли 12 мл этанола. Органическую фазу быстро добавляли к 50 мл воды при перемешивании магнитной мешалкой. Смесь переносили в испарительную колбу и растворители удаляли путем постепенного снижения давления от 130 мбар до 40 мбар при 30°C. Композицию дополнительно концентрировали, к суспензии наночастиц добавляли трегалозу и гидроксипропил- β -циклодекстрин (5% и 7% масс/об, соответственно) и объем доводили до 5,0 мл. Полученные наночастицы стерилизовали, пропуская их через фильтр 0,22 мкм, а затем лиофилизировали в стерильных контейнерах.

Пустые NP использовали в качестве отрицательного контроля, а немодифицированный SN-22, разведенный в клеточной культуральной среде из исходного DMSO раствора, использовали в качестве положительного контроля.

Исследования высвобождения с использованием метода просачивания наружу показали сильно отличающиеся поведения, с заметно более высокой скоростью, наблюдаемой для более лабильного SN22-TOx ($p < 0,0001$, анализ регрессии).

Фиг. 1 показывает характер высвобождения SN-22 комбинированных лекарственных средств с разной гидролитической лабильностью, измеренной в условиях достаточного разбавления (37°C , акцепторная среда: гептан/метил-трет-бутиловый эфир, 1:1 об/об; левая панель). Высвобождаемые образцы также анализировали методом ТСХ (правая панель). Результаты предполагают, что расщепление комбинированного лекарственного средства способствует более быстрому высвобождению, наблюдаемому с NP [SN22-TOx] (полоса 3 против 2). Свободный SN-22 включен в полосу 1.

Результаты исследований высвобождения (Фиг. 1) согласуются с концепцией, что более быстрое высвобождение из наночастиц должно быть результатом использования более гидролитически лабильных конструкций комбинированного лекарственного средства, вследствие ускоренного расщепления комбинированного лекарственного средства с образованием исходного соединения, в котором отсутствует требуемая гидрофобность для стабильного удержания в наночастицах. Действительно, более быстрое высвобождение, демонстрируемое NP[SN22-TOx] по сравнению с NP [SN22-TOAc], сопровождалось заметно большими количествами SN-22, наблюдаемыми в соответствующих образцах акцепторной среды (Фиг. 1, правая панель; сравните полосы 3 и 2).

Фиг. 2 показывает сравнительные антипролиферативные эффекты наночастиц с нагрузкой SN22-TOAc против SN22-TOx на NB-клетки с амплификацией MYCN (*IMR-32*, ATCC CCL-127™). Кривые клеточного роста NB-клеток, обработанных наночастицами, нагруженными комбинированным лекарственным средством, в дозах, соответствующих 5 нг SN-22 на лунку (96-луночные планшеты) в течение 24 часов, показаны в сравнении с "отсутствием обработки", наночастицами без лекарственного средства и свободным SN-22 (верхняя панель). Показано ингибирование роста клеток (%), определенное через 6 дней после обработки, для наночастиц, нагруженных комбинированным лекарственным средством и не содержащих никакого лекарственного средства (контрольных), в зависимости от дозы и продолжительности воздействия (нижняя панель).

В соответствии с наблюдаемыми различиями в кинетике высвобождения и активации лекарственного средства, NP[SN22-TOx], наносимый на NB-клетки с амплификацией MYCN (IMR-32, ATCC CCL-127™), почти полностью ингибировал пролиферацию, тогда как только частичное (зависимое от дозы и длительности воздействия) ингибирование роста наблюдали с NP[SN22-TOAc] (Фиг.2). Эквивалентные дозы свободного SN-22 (5-20 нг на лунку) или не содержащих лекарственное средство (чистых) наночастиц приводили к полностью ингибированному клеточному росту и незначительному антипролиферативному эффекту, соответственно (Фиг. 2). Вместе с результатами исследований высвобождения эти данные подтверждают более стабильное удержание менее гидролитически лабильного SN22-TOAc в наночастицах, по сравнению с гораздо более быстрым высвобождением SN22 из NP[SN22-TOx] вследствие быстрого гидролиза SN22-TOx.

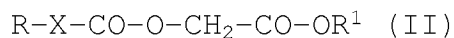
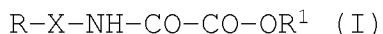
Фиг. 3 показывает терапевтическую эффективность NP[SN22-TOx] в ортотопической мышинной модели NB высокого риска. Мышей инокулировали клетками IMR-32, стабильно экспрессирующими люциферазу. Обработку NP[SN22-TOx] (в сравнении с физиологическим раствором в качестве контроля) начинали с дозы, эквивалентной 200 мкг SN-22 на в/в инъекцию, один раз в неделю в течение 4 недель. Опухоль-ассоциированный сигнал контролировали еженедельно методом биолуминесценции. Изображения, полученные через 28 дней после начала лечения, представлены на верхней панели. Данные, показанные на нижней панели, представлены как среднее значение $\pm$ стандартное отклонение. Опухоль-ассоциированный сигнал быстро снижался у животных, получавших еженедельные внутривенные инъекции NP[SN22-TOx] (доза, эквивалентная 200 мкг SN-22 на инъекцию), и оставался равномерно низким в течение курса лечения и еще через 21 неделю после лечения прекращался (Фиг. 3). Это резко контрастирует с постоянным увеличением сигнала и ростом легко пальпируемых опухолей, наблюдаемым у контрольных животных, которым вводили физиологический раствор.

Эти результаты подтверждают, что наночастицы, нагруженные обратимо гидрофобизированным комбинированным лекарственным средством SN-22, могут доставлять, высвобождать и поддерживать терапевтически адекватные количества активных исходных соединений в опухоли, вызывая регрессию и ингибируя возобновление роста MYCN-амплифицированных ортотопических

ксенотрансплантатов, демонстрируя осуществимость подхода, сочетающего SN22 комбинированное лекарственное средство с наночастицами, для лечения NB высокого риска. Кроме того, любое из комбинированных лекарственных средств, описанных в настоящей заявке, можно использовать для лечения NB или раковых заболеваний в целом с включением или без включения комбинированных лекарственных средств в наночастицы. Если комбинированное лекарственное средство включено в наночастицы, наночастицы могут также включать носитель, например, поли(D, L-лактид) или поли(D, L-лактид)-поли(этиленгликоль) блок-сополимер. Настоящее изобретение, следовательно, обеспечивает способ лечения больного раком путем введения эффективного количества комбинированного лекарственного средства или введения наночастиц, содержащих такие комбинированные лекарственные средства.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Комбинированное лекарственное средство, представленное формулой (I) или формулой (II):



где

R представляет собой фрагмент токола, фрагмент, являющийся аналогом токола, или фрагмент капсаициноида;

X представляет собой простую связь или связывающую группу;
и

OR^1 представляет собой остаток противоракового или антирестенотического средства, содержащий по меньшей мере одну гидроксильную группу, посредством которой образуется $CO-OR^1$ сложноэфирная связь.

2. Комбинированное лекарственное средство по п. 1, где X представляет собой связывающую группу.

3. Комбинированное лекарственное средство по п. 1, где X представляет собой разветвленную или неразветвленную углеводородную группу, которая необязательно может включать один или более содержащихся в цепи или боковых гетероатомных заместителей и/или циклических групп.

4. Комбинированное лекарственное средство по п. 1, где X представляет собой $[O(CH_2)_2]_n$, где n представляет собой целое число, имеющее значение от 1 до 1000.

5. Комбинированное лекарственное средство по п. 4, где n имеет значение 1.

6. Комбинированное лекарственное средство по п. 1, где X представляет собой $O-CO(CH_2)_2[O(CH_2)_2]_n$, где n представляет собой целое число, имеющее значение от 1 до 1000.

7. Комбинированное лекарственное средство по п. 1, где X представляет собой $O-CO(CH_2)_m$, где m представляет собой целое число, имеющее значение от 1 до 12.

8. Комбинированное лекарственное средство по п. 7, где m имеет значение 2.

9. Комбинированное лекарственное средство по п. 1, где комбинированное лекарственное средство представлено формулой (I).

10. Комбинированное лекарственное средство по п. 1, где комбинированное лекарственное средство представлено формулой (II).

11. Комбинированное лекарственное средство по п. 1, где OR^1 представляет собой остаток SN-22.

12. Комбинированное лекарственное средство по п. 1, где R представляет собой фрагмент, являющийся аналогом токола.

13. Комбинированное лекарственное средство по п. 1, где R представляет собой фрагмент капсаициноида.

14. Комбинированное лекарственное средство по п. 1, которое представлено формулой $R-O-CO(CH_2)_2-CO-O-CH_2-CO-OR^1$, в которой R представляет собой α -токофероловый фрагмент, а OR^1 представляет собой SN-22 остаток.

15. Комбинированное лекарственное средство по п.1, которое представлен формулой $R-O(CH_2)_2-NH-CO-CO-OR^1$, в которой R представляет собой α -токофероловый фрагмент, а OR^1 представляет собой остаток SN-22.

16. Комбинированное лекарственное средство по п. 1, которое представлено формулой $R-O(CH_2)_2-NH-CO-CO-OR^1$, в которой R представляет собой α -токофероловый фрагмент, а OR^1 представляет собой подофиллотоксиновый остаток.

17. Комбинированное лекарственное средство по п. 1, где OR^1 представляет собой остаток подофиллотоксина.

18. Композиция, содержащая:

(а) первое комбинированное лекарственное средство по п. 1, где OR^1 первого комбинированного лекарственного средства представляет собой остаток SN-22; и

(В) второе комбинированное лекарственное средство по п. 1, где OR^1 второго комбинированного лекарственного средства представляет собой остаток подофиллотоксина.

19. Композиция по п. 18, где первое комбинированное лекарственное средство и второе комбинированное лекарственное средство содержатся в наночастицах.

20. Наночастицы, содержащие комбинированное лекарственное средство по п. 1.

21. Способ лечения пациента со злокачественной опухолью, включающий введение пациенту со злокачественной опухолью эффективного количества комбинированного лекарственного средства по п. 1.

22. Способ по п. 21, где пациентом со злокачественной опухолью является человек.

23. Способ по п. 21, где пациент имеет нейробластому.

24. Способ лечения пациента со злокачественной опухолью,

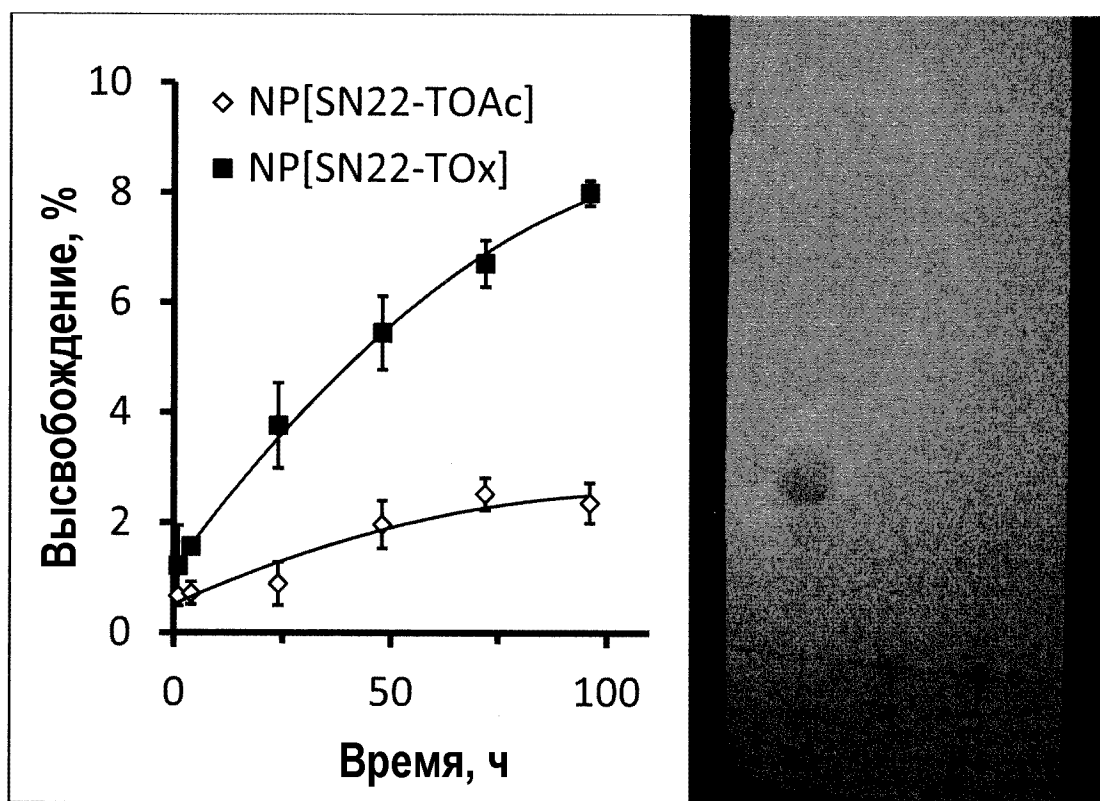
включающий введение пациенту со злокачественной опухолью эффективного количества композиции по п. 18.

25. Способ лечения пациента со злокачественной опухолью, включающий введение пациенту со злокачественной опухолью эффективного количества композиции по п. 18.

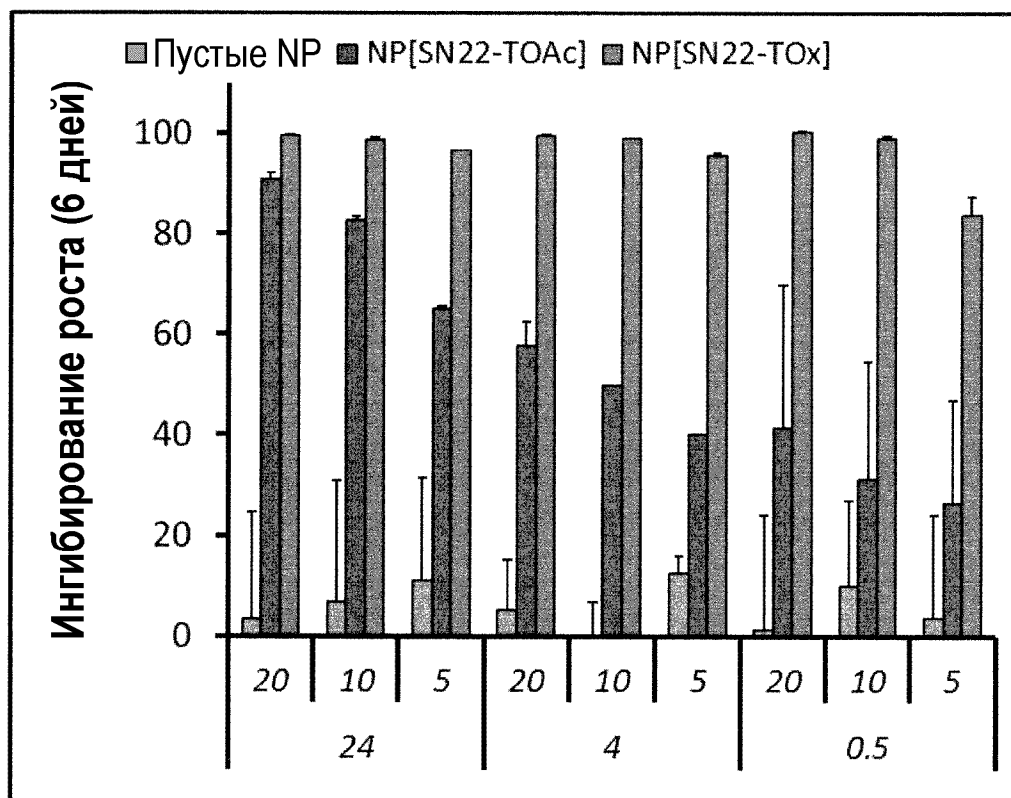
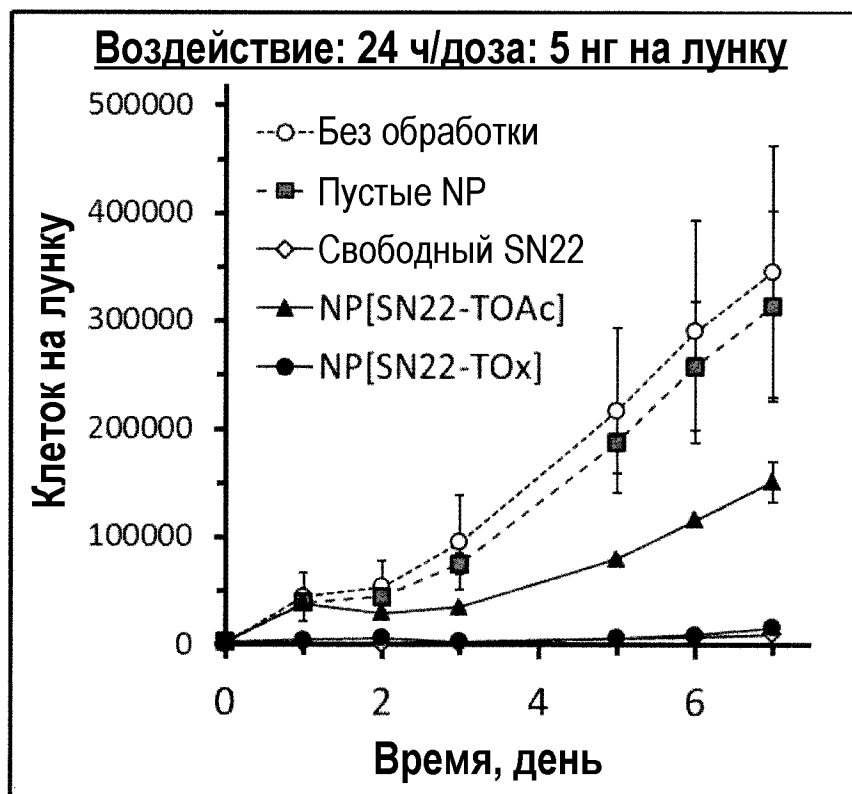
26. Способ лечения пациента со злокачественной опухолью, включающий введение пациенту со злокачественной опухолью эффективного количества наночастиц по п. 20.

По доверенности

ФИГ.1



ФИГ.2



ФИГ.3

