

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6796586号
(P6796586)

(45) 発行日 令和2年12月9日 (2020. 12. 9)

(24) 登録日 令和2年11月18日 (2020. 11. 18)

(51) Int. Cl.	F 1
A 6 1 K 31/4184 (2006. 01)	A 6 1 K 31/4184
A 6 1 K 31/473 (2006. 01)	A 6 1 K 31/473
A 6 1 K 31/192 (2006. 01)	A 6 1 K 31/192
A 6 1 K 45/00 (2006. 01)	A 6 1 K 45/00
A 6 1 K 9/16 (2006. 01)	A 6 1 K 9/16

請求項の数 35 (全 22 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2017-541687 (P2017-541687)	(73) 特許権者	501335771
(86) (22) 出願日	平成28年2月8日 (2016. 2. 8)		ザ・ジョンズ・ホプキンス・ユニバーシテ
(65) 公表番号	特表2018-504440 (P2018-504440A)		ィ
(43) 公表日	平成30年2月15日 (2018. 2. 15)		アメリカ合衆国 メリーランド州 2 1 2
(86) 国際出願番号	PCT/US2016/016968		1 8 バルティモアーノース・チャールズ
(87) 国際公開番号	W02016/127168		・ストリート 3 4 0 0
(87) 国際公開日	平成28年8月11日 (2016. 8. 11)	(74) 代理人	100147485
審査請求日	平成31年1月16日 (2019. 1. 16)		弁理士 杉村 憲司
(31) 優先権主張番号	62/112, 706	(72) 発明者	レン ユアン バイ
(32) 優先日	平成27年2月6日 (2015. 2. 6)		アメリカ合衆国 メリーランド州 2 1 0
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		8 5 ジョッパ マッキントッシュ サー
			クル 4 3 6
前置審査			
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 腫瘍の治療および予防のためのメベンダゾール多形

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

メベンダゾールを含む、脳腫瘍を治療するための医薬製剤であって、該製剤中のメベンダゾールの少なくとも90%が多形Cであり、該製剤が顆粒化されている、医薬製剤。

【請求項 2】

前記顆粒化された製剤が被覆されている、請求項 1 に記載の医薬製剤。

【請求項 3】

前記メベンダゾールの少なくとも95%が多形Cである、請求項 1 に記載の医薬製剤。

【請求項 4】

前記メベンダゾールの少なくとも98%が多形Cである、請求項 1 に記載の医薬製剤。

【請求項 5】

前記メベンダゾールの少なくとも99%が多形Cである、請求項 1 に記載の医薬製剤。

【請求項 6】

P-糖タンパク質の阻害剤をさらに含む、請求項 1 に記載の医薬製剤。

【請求項 7】

前記P-糖タンパク質の阻害剤がエラクリダールである、請求項 6 に記載の医薬製剤。

【請求項 8】

非ステロイド性抗炎症薬 (NSAID) をさらに含む、請求項 1 に記載の医薬製剤。

【請求項 9】

前記NSAIDがスリダクである、請求項 8 に記載の医薬製剤。

10

20

【請求項 1 0】

多形CのメベンダゾールとP-糖タンパク質の阻害剤とを含む、医薬製剤であって、製剤中の少なくとも90%のメベンダゾールが多形Cである、脳腫瘍を治療するための医薬製剤。

【請求項 1 1】

前記製剤が顆粒化されている、請求項 1 0 に記載の医薬製剤。

【請求項 1 2】

前記製剤が被覆されている、請求項 1 1 に記載の医薬製剤。

【請求項 1 3】

前記P-糖タンパク質の阻害剤がエラクリダールである、請求項 1 0 に記載の医薬製剤。

10

【請求項 1 4】

メベンダゾールとNSAIDとを含む医薬製剤であって、製剤中の少なくとも90%のメベンダゾールが多形Cである、脳腫瘍を治療するための医薬製剤。

【請求項 1 5】

前記製剤が顆粒化されている、請求項 1 4 に記載の医薬製剤。

【請求項 1 6】

前記製剤が被覆されている、請求項 1 5 に記載の医薬製剤。

【請求項 1 7】

前記NSAIDがスリンドクである、請求項 1 4 に記載の医薬製剤。

【請求項 1 8】

20

請求項 1、1 0 および 1 4 のいずれか一項に記載の脳腫瘍を治療するための医薬製剤の抗がん効力をモニタリングする方法であって、

前記医薬製剤をアッセイし、多形Cの量および多形Aの量を測定することを含む方法。

【請求項 1 9】

前記アッセイの工程が赤外分光法を含む、請求項 1 8 に記載の方法。

【請求項 2 0】

前記アッセイの工程が複数回実施される、請求項 1 8 に記載の方法。

【請求項 2 1】

ヒトの脳腫瘍を治療するためのまたは発生させるリスクを低下させるための、請求項 1、1 0 および 1 4 のいずれか一項に記載の経口用医薬製剤。

30

【請求項 2 2】

前記脳腫瘍が髄芽腫である、請求項 2 1 に記載の医薬製剤。

【請求項 2 3】

前記脳腫瘍が神経膠腫である、請求項 2 1 に記載の医薬製剤。

【請求項 2 4】

脳腫瘍を治療するまたは脳腫瘍のリスクを低下させるためのキットであって、メベンダゾールと、

P-糖タンパク質の阻害剤または非ステロイド性抗炎症薬と、を含む、

40

前記メベンダゾールのうち、少なくとも90%が多形Cである、キット。

【請求項 2 5】

P-糖タンパク質の阻害剤を含む、請求項 2 4 に記載のキット。

【請求項 2 6】

NSAIDを含む、請求項 2 4 に記載のキット。

【請求項 2 7】

前記P-糖タンパク質の阻害剤がエラクリダールである、請求項 2 5 に記載のキット。

【請求項 2 8】

前記NSAIDがスリンドクである、請求項 2 6 に記載のキット。

50

【請求項 29】

ヒトの脳腫瘍を治療するか、またはそのリスクを低下させるための薬剤の製造における

メベンダゾールの多形Cと、

P-糖タンパク質の阻害剤または非ステロイド性抗炎症薬と、

の使用であって、

前記薬剤中の前記メベンダゾールのうち、少なくとも90%が多形Cである、使用。

【請求項 30】

前記P-糖タンパク質の阻害剤がエラクリダールである、請求項29に記載の使用。

【請求項 31】

前記脳腫瘍が髄芽腫である、請求項29に記載の使用。

【請求項 32】

前記脳腫瘍が神経膠腫である、請求項29に記載の使用。

【請求項 33】

NSAIDをさらに含む、請求項29に記載の使用。

【請求項 34】

前記NSAIDがスリダクである、請求項33に記載の使用。

【請求項 35】

ヒトの脳腫瘍のリスクを低下させるための薬剤の製造における、

メベンダゾールと、

非ステロイド性抗炎症薬と、の使用であって、

前記薬剤中の前記メベンダゾールのうち、少なくとも90%が多形Cである、使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、国立神経疾患・脳卒中研究所から与えられたR25NS065729と、国立衛生研究所からのP30-CA006973、UL1-RR025005および1S10RR026824-01の下での政府支援によりなされた。政府は、本発明に一定の権利を有する。

【0002】

本発明は、薬理学の分野に関する。特に、それはがん治療剤に関する。

【背景技術】

【0003】

全身投与された治療薬のほとんどが頭蓋内腫瘍において有効濃度に達しないため、中枢神経系（CNS）がんは治療が困難である（1）。これは、血液脳関門（BBB）によって部分的に説明される。CNSにおいて、BBBは、密着結合からなる全ての毛細血管に沿って存在し、それにより、大きな親水性分子がCNS組織に移動するのを阻止する。小分子薬物の約2%のみが、効果的にBBBを通過できると推定されている（2）。

【0004】

メベンダゾール（MBZ）は、40年以上にわたり抗寄生虫剤としてヒトに安全に使用されており、頭蓋内蠕虫感染症に対する有効性を示す。本発明者らは近年、同所性神経膠腫および髄芽細胞腫のげっ歯類モデルにおいてMBZ前臨床効果を実証した（3,4）。MBZは、脳腫瘍を有するマウスの腫瘍成長を有意に低下させ、生存率を有意に向上させた。これらの結果に基づいて、新たに診断された高悪性度神経膠腫患者のMBZの用量漸増を伴う第I相臨床試験が開始された（NCT01729260）。MBZには、チューブリン結合、キナーゼ阻害、抗血管新生およびプロアポトーシスを含むいくつかの抗がん機構を裏付ける証拠が生み出されている（3-8）。しかしながら、MBZの脳内浸透および薬物動態の重要な特徴は、依然として不明である。この理解は、MBZの臨床使用を潜在的に改善するために重要である。

【0005】

MBZは高度に疎水性であり、結晶化条件に基づいて3つの異なる多形を形成することがで

10

20

30

40

50

きる(9)。多形A、BおよびC(MBZ-A、BおよびC)は、溶解性、毒性および駆虫用途での治療効果において顕著な特徴を示した(10~12)。3つの多形の抗腫瘍効果の差は未だ調査されていないが、薬物製剤は異なる量または組み合わせの種々の多形を含有することがあるため、この情報は将来のMBZがん療法にとって重要であり得る。さらなる調査のための別の重要な理由は、駆虫薬使用において最も有効な多形である多形Cが、特により高い温度および湿度で、より有効性の低い多形Aに経時的に変換し得ることである(13)。多形は固体形態でのみ存在し、MBZは経口薬物専用であるため、異なる多形の関連する抗腫瘍特性を研究することは、MBZ多形の経口投与による動物モデルにおける生物学的利用能および有効性を決定することによって最も良好に達成される。がん、特に脳腫瘍を治療するための、より効果的であり、より着実であり、およびより安全である治療薬を同定することが、当該技術分野において継続して必要とされている。

10

【0006】

本発明の一態様によれば、メベンダゾールの医薬製剤が提供される。製剤中のメベンダゾールの少なくとも90%は多形Cであり、製剤は顆粒化される。

【0007】

本発明の別の態様によれば、多形CおよびP-糖タンパク質の阻害剤を含むメベンダゾールの医薬製剤が提供される。

【0008】

本発明の別の態様によれば、メベンダゾールおよび非ステロイド性抗炎症薬(NSAID)を含む医薬製剤が提供される。

20

【0009】

本発明の別の態様は、医薬メベンダゾール製剤を投与する方法である。医薬メベンダゾール製剤は、製剤中のメベンダゾールの少なくとも90%が多形Cである顆粒製剤であってもよく、または多形CおよびP-糖タンパク質の阻害剤との組み合わせ製剤であってもよく、または多形CおよびNSAIDを含むメベンダゾールの製剤であってもよい。本方法によれば、製剤は食品の摂取前に食品に加えられる。

【0010】

本発明のさらに別の態様によれば、メベンダゾール医薬製剤の抗がん効力をモニタリングする方法が提供される。メベンダゾールを含む医薬製剤はアッセイされ、多形Cの量および多形Aの量が測定される。

30

【0011】

本発明の別の態様は、腫瘍を治療するか、またはヒトの腫瘍を発生させるリスクを低下させる方法である。メベンダゾールの医薬製剤は、メベンダゾールの少なくとも90%が多形Cである顆粒製剤であれ、または多形CとP-糖タンパク質の阻害剤との組み合わせ製剤であれ、または多形CとNSAIDとの組み合わせ製剤であれ、ヒトに経口摂取として投与または投薬される。該ヒトは、腫瘍を有するか、または腫瘍を発生させるリスクが高い。

【0012】

本発明のさらなる態様は、腫瘍を治療するか、または腫瘍(単数または複数)を発生させるリスクを低下させるためのキットである。本キットは、(a)メベンダゾール(任意に多形Cを含む)および(b)P-糖タンパク質の阻害剤またはNSAIDを含む。

40

【0013】

本発明のさらに別の態様は、ヒトの腫瘍を治療するか、または腫瘍を発生させるリスクを低下させる方法である。メベンダゾール(任意に多形Cを含む)およびP-糖タンパク質の阻害剤またはNSAIDのいずれかは、ヒトに経口摂取として投与または投薬される。

【0014】

本明細書を読めば当業者に明らかなこれらのおよび他の実施形態は、高度に難治性のがんに対抗するための手段を当該技術分野に提供する。

【図面の簡単な説明】**【0015】**

【図1】図1のA~E。MBZ-Cは、毒性がわずかな最も有効な多形である。図1のAおよ

50

びBは、異なる供給業者からのMBZ多形およびMBZ錠剤の赤外スペクトルを示す図である：S2015およびS2017（Aurochem）、Teva（室温で2年間の貯蔵後）、MedleyおよびJanssen。2つのピークは、分子中の-NHおよび-C=O基を表す。黒い矢印の頭部は、MBZ-C対照のピークを示す。図1のCは、カプランマイヤー生存曲線およびルシフェラーゼカウントを示す図である。GL261-luc神経腫瘍を移植し、異なるMBZ多形（A、BおよびC）で処置したマウスのカプランマイヤー生存曲線。GL261-luc神経腫瘍を有するマウス脳の冠状切断によるH&E染色を示した。腫瘍移植の5日後に、マウスをMBZで強制経口投与し、対照動物に賦形剤を与えた。MBZ-B群の1匹のマウスは、脳内に有意な腫瘍は見られなかったため、薬物毒性で死亡したと推定されている。対照対MBZ-Bおよび対照対MBZ-Cのp値が示されている。MBZ-B対MBZ-Cのp値は0.72である。m：平均生存日数。対照：n=6；MBZ-A：n=5；MBZ-B：n=6；MBZ-C：n=6。図1のDは、Xenogenによって測定されたルシフェラーゼカウントは、MBZ多形で20日間処置したマウスのGL261-luc脳腫瘍の大きさを反映していたことを示す図である。図1のEは、異なる供給業者からのMBZ錠剤で処置したGL261-lucを有するマウスの生存曲線を示す図である。対照：n=6；S2015：n=5；S2017：n=6；Medley：n=5；Janssen：n=5。

【図2】図2のA～F。MBZ多形の血漿および脳分布。図2のAは、50mg/kgのMBZ-A、BまたはCの強制経口投与後の、C57BL6マウスにおけるMBZ血漿レベルの経時変化を示す図である。図2のBは、50mg/kgの強制経口投与後の経時変化におけるMBZ-Cの脳および血漿レベルを示す図である。全ての脳分布試験のために、動物をPBSで完全に灌流した。図2のCは、MBZ-Cの脳／血漿（B/P）比を示す図である。各時点で3匹のマウスからデータを収集した。図2のDは、強制経口投与（50mg/kg）の6時間後のMBZ多形の脳および血漿レベルを示す図である。強制経口投与の6時間後のMBZ多形のB/P比。図2のEは、MBZ-Aの平均B/P比は0.32、MBZ-Bでは0.64、およびMBZ-Cでは0.80であることを示す図である。図2のFは、MBZ-Cは、脳および脳腫瘍に等しく分布していたことを示す図である。マウス前頭葉の右側に移植したGL261腫瘍を切除し、対側の正常な脳組織と比較した。

【図3】図3のA～D。MBZ代謝産物の分布。MBZおよびその代謝産物、MBZ-OH（racジヒドロメベンダゾール、CAS 60254-95-7）およびMBZ-NH₂（2-アミノ-5-ベンゾイルベンズイミダゾール、CAS 52329-60-9）の血漿内（図3のAおよびC）ならびに脳内（図3のBおよびD）のレベルを、50mg/kgのMBZ-Cの強制経口投与後に分析した図である。図3のDは、MBZおよびその代謝産物によるGL261の阻害（IC₅₀曲線）を示す。

【図4】図4のA～C。MBZとエラクリダールの併用図4のAは、GL261神経腫瘍細胞のエラクリダール（ELD）でのIC₅₀曲線を示す図である。IC₅₀=5.8 μM。図4のBは、MBZ（0.25 μM）、ELD（1もしくは5 μM）またはそれらの併用によるGL261細胞の阻害を示す図である。細胞を表示の薬物と共に72時間インキュベートし、生存細胞は比色アッセイによって測定した。図4のCは、ELDは、マウスのMBZの平均B/P比を上昇させたことを示す図である。

【図5】図5Aは、MBZとエラクリダールの併用は、有効性を改善した。ルシフェラーゼをトランスフェクトしたGL261細胞をC57BL6マウスに移植し、移植5日後に処置を開始したことを示す図である。図5Bは、エラクリダール（ELD）を、処置の最初の7または14日間、MBZ投与（50mg/kg）の2時間前に、50mg/kgで強制経口投与した。その後、MBZを、残りの処置の間、同じ用量で週5日与えた。ELD単独群に、ELDを1日14回強制経口投与した。MBZおよびELDによって処置した動物を、Xenogenにより、腫瘍ルシフェラーゼシグナルについて、腫瘍移植の25日後からモニタリングした。図5Cは、425髄芽腫細胞をマウス小脳に移植し、小脳腫瘍が形成されたことを示す図である（H&E染色）。図5Dは、腫瘍移植の5日後、マウスを、賦形剤で（対照）、7日間の50mg/kgのエラクリダールで（ELD）、7日間のELDと週5日の50mg/kgのMBZ-Cとの併用で（MBZ-ELD）、またはMBZ-C単独（MBZ）で処置した。

【図6】図6のA～B。表1：マウスにおけるMBZ多形の薬物動態。図6のAは、LS-MS、MBZならびに代謝産物MBZ-NH₂およびMBZ-OHを、表示のMBZ多形で強制経口投与したマウスの血漿試料において測定したことを示す図である。血漿AUC24時間に関して、p<0.05でB

10

20

30

40

50

>C>Aである。図6のBは、MBZまたはMBZとエラクリダール（ELD）との併用で強制経口投与したマウスにおける、MBZ-Cおよび代謝物の薬物動態を示す図である。

【図7】GL261神経腫瘍マウスモデルにおけるベンズイミダゾールの試験を示す図である。GL261-luc神経腫瘍を有するマウスを、チアベンダゾール（TBZ）、フルベンダゾール（FLZ）、オキシフェンダゾール（OXZ）、フェンベンダゾール（FBZ）で100mg/kgで、腫瘍移植後5日目から強制経口投与で処置した。Mantel-Cox検定では、全ての生存率の差は有意ではなかった。n：マウス数；m：平均生存日数。

【図8】メベンダゾールを製造するための合成スキームを示す図である。

【図9】経口メベンダゾールは、2つの異なる結腸がん側腹細胞株異種移植片における成長および増殖を阻害することを示す図である。2つのヒト結腸直腸癌細胞株、HT29およびSW480を、ヌードマウスの側腹に皮下移植し、50mg/kgのMBZを強制経口投与で4週間処置した。腫瘍容積を毎週2回測定し、平均し、実験の過程にわたってプロットした。HT29異種移植片（A）およびSW480異種移植片（B）成長阻害曲線。各群からの切除した側腹部腫瘍を実験終了時に秤量し、未処置の対照と比較した（C、D）。パラフィン包埋した側腹部腫瘍組織を、Ki67増殖マーカーで染色した。MBZ処置組織は、両方のモデルにおいて有意に少ない陽性（茶色核）染色を示した（E）。各スライドから無作為に選択した5つの部位を、Ki67陽性細胞x100/細胞総数の百分率として定量化し、5匹の動物の平均±SEMを表す。*、P<0.05。

【図10】図10Aは、メベンダゾールは、APC min/+マウスの腸におけるポリープの形成を減少させる。化学予防試験の終わりに、APC min/+マウスの小腸および結腸を分析し、ポリープの総数/マウスを平均し、処置群間で比較した。図10Bは、対照対MBZ+スリンダク併用処置からのAPC min/+の小腸の中央部および末端の代表的な画像である。図10Cは、対照（左）およびMBZ +スリンダク併用処置（右）からの代表的なH&E染色されたスイスロール型の腸である。図10Dは、結果を、各処置群におけるポリープの数および位置について表にした。

【図11A】図11Aは、メベンダゾールとスリンダクの併用は、APC min/+マウスの腸の全ての部位における腫瘍の発生と大きさの両方を相乗的に減少させている。各処置群のポリープの平均数を、小腸ならびに結腸の近位、中央部および末端についてグラフ化した。

【図11B】個々のポリープを測定し、大きさに基づいて分類した。スリンダク対MBZ+スリンダクの併用の平均ポリープ数を、腸の各部位について別々に分析した。

【図11C】統計分析を示す。

【図12】メベンダゾールは、処置したMinマウスのポリープおよび側腹異種移植片において、抗炎症ならびに抗血管新生効果を示す。側腹腫瘍組織およびAPC minポリープのパラフィン包埋切片を、c-myc、COX-2、およびCD31抗体を用いた免疫組織化学によって分析した。代表的な画像を各々について示す（A）。個々のHT29（対照n=5、MBZ n=5）およびSW480（対照n=5、MBZ n=4）の側腹異種移植片組織からの溶解物を、c-mycおよびBcl-2タンパク発現について分析し（B）、MBZ処理のほとんどの場合でこれらのタンパクの減少を示した。同様に、ポリープで、minマウスにおいてc-mycの減少があり、特に併用療法でBcl-2の減少があった。各処置群を代表するAPC min/+マウス腸組織を、c-mycおよびBcl-2について調査した（C）。C1=対照、M1、M2=MBZ処置、S1、S2 =スリンダク処置、M/S1、M/S2=MBZ+スリンダク併用処置。GAPDHをローディング対照として用いた。

【図13】メベンダゾールとスリンダクの併用は、APC min/+の腸における炎症性サイトカインおよび血管新生因子を、いずれかの薬物単独よりも減少させる。TNF α 、IL-6、VEGF、MCP-1、IL-1 β 、G-CSF、GM-CSF、およびFGF β に対して反応性の比色分析マウスELISAストリップを用いて、各処置群における前炎症性マーカーの減少を測定した。相対吸光度値を平均し、値の百分率差を、未処置対照マウス（各処置群について平均したn=3マウス）の結果と比較した。

【発明を実施するための形態】

【0016】

10

20

30

40

50

本発明者らは、腫瘍、特に脳、乳房、および肺の腫瘍を治療するのに有効かつ安全な製剤を開発した。結腸直腸腫瘍、卵巣腫瘍、肉腫、胃腫瘍、食道腫瘍、前立腺腫瘍、膵臓腫瘍、肝臓腫瘍および甲状腺腫瘍を含むが、これらに限定されない他の腫瘍も治療され得る。

【0017】

メベンダゾールの多形Cは、腫瘍を治療するための多形の中で最も強力であることが見出されている。しかしながら、しばしば、多形Cの損失または他の多形への変換のために、調製物の効力が経時的に低下するようである。好ましくは、本発明で使用するメベンダゾールの調製物は、少なくとも90%の多形Cである。場合によっては、少なくとも91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の多形Cであってもよい。メベンダゾールは、任意に顆粒化され得る。これは、食料品に加えること、および口当たりの良い薬剤を提供することに適した製剤を提供する。また、それは胃吸収を高める可能性もある。任意に、顆粒化形態は被覆され得る。これは、薬剤の美味しさを高める可能性がある。腸溶性コーティングに使用される典型的な材料には、脂肪酸、ワックス、シェラック、プラスチック、および植物繊維が含まれる。当該技術分野で使用される任意のそのような腸溶性コーティングが使用され得る。

【0018】

P-糖タンパク質 (P-gp)、透過性糖タンパク質または血漿糖タンパク質は、活性、排出、膜結合輸送タンパク質ポンプである。それは、ATP結合カセット (ABC) スーパーファミリーのメンバーである。それは、ABCB1、MDR1、PGY1、およびCD243を含む多くの名前を通っている。それは、腫瘍における多剤耐性に関与する。この文脈において、それは多剤耐性ポンプと呼ばれ得る。エラクリダール、プロゲステロン、ゴマシンA、ピペリン、アボシアニン、アンプレナビル、キニジン、およびバルスポダールを含むが、これらに限定されない任意のP-gpの阻害剤を、メベンダゾールとの製剤に使用することができる。P-gp阻害剤を、メベンダゾールと一緒に共被覆してもよく、またはP-gp阻害剤を被覆しなくてもよく、または別々に被覆してもよい。2つの薬剤を、同時に、併用して、または別々に投与してもよい。2つの薬剤は、併用投与計画の一部として、互いに数日または数週間以内に送達され得る。

【0019】

いくつかの製剤において、および予防用途などのいくつかの用途では、多形Cは、非ステロイド性抗炎症薬と共に製剤化され得る。これらには、限定されないが、アスピリン、コリンおよびサリチル酸マグネシウム、サリチル酸コリン、セレコキシブ、ジクロフェナクカリウム、ジクロフェナクナトリウム、ミソプロストール併用ジクロフェナクナトリウム、ジフルニサル、エトドラク、フェノプロフェンカルシウム、フルルビプロフェン、イブプロフェン、インドメタシン、ケトプロフェン、サリチル酸マグネシウム、メクロフェナム酸ナトリウム、メフェナム酸、メロキシカム、ナブメトン、ナプロキセン、ナプロキセンナトリウム、オキサプロジン、ピロキシカムロフェコキシブ、サルサラート、サリチル酸ナトリウム、スリンダク、トルメチンナトリウム、およびバルデコキシブが含まれる。併用は、予防効果に強力である。

【0020】

結腸直腸がんを発症するリスクが高い個体は、様々な環境的、行動的および遺伝的要因のいずれかを有する個体である。これらには、限定されないが、体重超過または肥満、運動不足、赤身肉 (牛肉、豚肉、子羊または肝臓など) および加工肉の多い食事、喫煙、アルコールの大量摂取、結腸直腸ポリープまたは結腸直腸がんの既往歴、炎症性腸疾患の既往歴、結腸直腸がんまたは腺腫性ポリープの家族歴、家族がん症候群、家族性腺腫様ポリープ症 (FAP)、リンチ症候群、軽症型FAP、ターコット症候群、ポイツ・ジェガース症候群：MUTYH関連ポリポーシスおよび2型糖尿病が含まれる。これらの個体は、メベンダゾール、特に多形Cによる予防から、より詳細にはメベンダゾールと非ステロイド性抗炎症薬の併用療法から恩恵を受ける可能性がある。2つの薬剤を、同時に、併用して、または別々に投与してもよい。2つの薬剤は、予防の併用投与計画の一部として、互いに数日また

は数週間以内に送達され得る。メベンダゾールのラセミ混合物、または多形AもしくはBをCよりも多く含む組成物でさえも、予防的および／または治療的抗がん治療に使用され得る。

【0021】

製剤の食品への添加は、当該技術分野で知られている任意の手段を包含し得る。例えば、振りかけ、振とう、スプレー、ダウジングまたは混合を使用して、製剤を食品に加えることができる。製剤の経口摂取としての投与または投薬は、例えば、カップ中、プレート上、または被験体の口の中に直接供給することを含み得る。

【0022】

治療され得る脳腫瘍には、星状細胞腫；非定型奇形性白質腫瘍（ATRT）；軟骨肉腫；脈絡叢；頭蓋咽頭腫；嚢胞；上衣腫；胚細胞腫瘍；神経膠芽細胞腫；神経膠腫；血管腫；脂肪腫；リンパ腫；髄芽細胞腫；髄膜腫；転移性脳腫瘍；神経線維腫；神経細胞系および混合神経細胞・膠細胞腫瘍；乏突起細胞腫；乏突起神経膠腫；松果体腫瘍；下垂体腫瘍；PNET；および神経鞘腫が含まれる。

【0023】

本製剤で治療され得るヒト腫瘍には、急性リンパ芽球性白血病（ALL）；急性骨髄性白血病（AML）；青年期、以下のがん；副腎皮質癌；小児期；エイズ関連がん；カポジ肉腫；リンパ腫；肛門がん；虫垂がん；星状細胞腫、小児期；非定型奇形腫／横紋筋様腫瘍、小児期、中枢神経系；基底細胞癌 - 皮膚がん（非黒色腫性）を参照；小児期；胆管がん、肝外；膀胱がん；小児期；骨がん；ユーイング肉腫家族腫瘍；骨肉腫および悪性線維性組織球腫；脳幹神経膠腫、小児期；脳腫瘍；星状細胞腫、小児期；脳および脊髄の腫瘍の治療の概要、小児期；脳幹神経膠腫、小児期；中枢神経系非定型奇形腫／横紋筋様腫瘍、小児期；中枢神経系胚腫瘍、小児期；中枢神経系胚細胞腫瘍、小児期；頭蓋咽頭腫、小児期；上衣腫、小児期；乳がん；小児期；男性；妊娠、乳がんおよび；気管支腫瘍、小児期；パーキットリンパ腫 - 非ホジキンリンパ腫を参照；カルチノイド腫瘍；小児期；胃腸；原発不明癌腫；小児期；心臓（心臓）腫瘍、小児期；中枢神経系；非定型奇形腫／横紋筋様腫瘍、小児期；胚性腫瘍、小児期；胚細胞腫瘍、小児期；リンパ腫、原発性；子宮頸がん；小児期；小児がん；脊索腫、小児期；慢性リンパ球性白血病（CLL）；慢性骨髄性白血病（CML）；慢性骨髄増殖性新生物；結腸がん；結腸直腸がん；小児期；頭蓋咽頭腫、小児期；皮膚T細胞リンパ腫 - 菌状息肉腫およびセザリ症候群を参照；肝外胆管；非浸潤性乳管がん（DCIS）；胚性腫瘍、中枢神経系、小児期；子宮内膜がん；上衣腫、小児期；食道がん；小児期；鼻腔神経芽細胞腫、小児期；ユーイング肉腫；頭蓋外胚細胞腫瘍、小児期；性腺外胚細胞腫瘍；肝外胆管胚がん；眼がん；眼内黒色腫；網膜芽細胞腫；卵管がん - 卵巣上皮、卵管、および原発性腹膜がんを参照；骨、悪性および骨肉腫の線維性組織球腫；胆嚢がん；胃（胃）がん；小児期；消化管カルチノイド腫瘍；消化管間質腫瘍（GIST）；小児期；胚細胞腫瘍；中枢神経系、小児期；頭蓋外、小児期；性腺外；卵巣；精巣；妊娠性絨毛性疾患；神経膠腫 - 脳腫瘍を参照；小児期の脳幹；毛状細胞白血病；頭頸部がん；小児期；心臓がん、小児期；肝細胞（肝臓）がん；組織球増殖症、ランゲルハンス細胞；ホジキンリンパ腫；下咽頭がん；眼内黒色腫；島細胞腫瘍、膵臓神経内分泌腫瘍；カポジ肉腫；腎臓；腎細胞；ウィルムス腫瘍および他の小児腎腫瘍；ランゲルハンス細胞組織球増殖症；喉頭がん；小児期；白血病；急性リンパ芽球性（ALL）；急性骨髄性（AML）；慢性リンパ球性（CLL）；慢性骨髄性（CML）；毛様細胞；口唇および口腔がん；肝がん（原発性）；小児期；肺がん；小児期；非小細胞；小細胞；リンパ腫；エイズ関連；パーキット - 非ホジキンリンパ腫を参照；皮膚T細胞 - 菌状息肉腫およびセザリ症候群を参照；ホジキン；非ホジキン；原発性中枢神経系（CNS）；マクログロブリン血症、ヴァルデンストレーム；男性乳がん；骨および骨肉腫の悪性線維性組織球腫；黒色腫；小児期；眼内（眼）；メルケル細胞癌；中皮腫、悪性；小児期；原発不明の転移性頸部扁平上皮がん；NUT遺伝子に関与する正中管癌；口腔がん；多発性内分泌腫瘍症候群、小児期；多発性骨髄腫／血漿細胞腫瘍；菌状息肉腫；骨髄異形成症候群；骨髄異形成／骨髄増殖性新生物；骨髄性白血病、慢性（CML）；骨髄性白血病、急性（AML）；骨髄腫

10

20

30

40

50

、多発性；骨髓増殖性新生物、慢性；鼻腔および副鼻腔がん；鼻咽頭がん；小児期；神経芽細胞腫；非ホジキンリンパ腫；非小細胞肺癌；口腔がん；小児期；口腔がん、唇および；卵黄腺がん；骨肉腫および骨の悪性線維性組織球腫；卵巣がん；小児期；上皮；胚細胞腫瘍；低悪性度腫瘍；膵臓がん；小児期；膵臓神経内分泌腫瘍（島細胞腫瘍）；乳頭腫症、小児期；傍神経節腫；小児期；副鼻腔および鼻腔がん；副甲状腺がん；陰茎癌；咽頭がん；褐色細胞腫；小児期；下垂体腫瘍；血漿細胞腫瘍／多発性骨髄腫；胸膜肺芽腫、小児期；妊娠および乳がん；原発性中枢神経系（CNS）リンパ腫；前立腺がん；直腸がん；腎細胞（腎臓）がん；腎盂および尿管、移行細胞がん；網膜芽細胞腫；横紋筋肉腫、小児期；唾液腺がん；小児期；肉腫；ユーイング；カボシ；骨肉腫（骨がん）；横紋筋肉腫；軟組織；子宮内；セザリー症候群；皮膚がん；小児期；黒色腫；メルケル細胞癌；非黒色腫；小細胞肺癌；小腸がん；軟組織肉腫；扁平上皮細胞癌 - 皮膚がん（非黒色腫）を参照；小児期；原発不明の頸部扁平上皮がん、転移性；胃（胃）がん；小児期；T細胞リンパ腫、皮膚 - 菌状息肉腫およびセザリー症候群を参照；精巣がん；小児期；咽喉がん；胸腺腫および胸腺癌；小児期；甲状腺がん；小児期；腎盂および尿管の移行細胞がん；原発不明の以下の癌腫；小児期；小児期の異常がん；腎盂および尿管、移行細胞がん；尿道がん；子宮がん、子宮内膜症；子宮肉腫；膣がん；小児期；卵巣がん；ヴァルデンストレームマクログロブリン血症；およびウィルムス腫瘍が含まれる。

10

【0024】

キットは、2つ以上の品目を1つの容器に梱包する手段である。キットは、成分を分離した状態に保つための複数の内部容器を含んでいてもよい。キットは、標準曲線などの、使用を容易にする指示書または他の印刷物を含んでいてもよい。情報は、ディスクまたはドライブなどの電子記憶媒体上に提供されてもよい。情報は、ウェブサイトへの参照によって提供されてもよい。がんの治療に有用な追加成分も提供されてもよい。投与用の器具が含まれていてもよい。成分を混合するための容器が、キット内に提供されてもよい。

20

【0025】

メベンダゾールは、当該技術分野で知られている任意の手段によって調製することができる。ある方法では、p-クロロトルエンを出発物質として使用する。図8を参照。典型的には、精製用に、多形Cを、メタノールを用いて室温で結晶化させる。メベンダゾールは市販されている。

【0026】

30

この研究では、本発明者らは、MBZが、有意な濃度および高い脳対血漿比で、脳組織に到達することができることを示す。経口投与後1～8時間の間、MBZ-Cは、脳レベルを $0.767 \mu\text{g/g}$ ($2.7 \mu\text{M}$ に相当) より上に維持し、 C_{max} は $2,016 \mu\text{g/g}$ ($7.1 \mu\text{M}$ に相当) であった。これらは、*in vitro*でのVEGFR2キナーゼに対するMBZの IC_{50} ($4.3 \mu\text{M}$) ならびに組織培養における一連の神経膠腫および髄芽腫細胞系の IC_{50} ($0.11 \sim 1 \mu\text{M}$) を超えた(3,4)。さらに、MBZ-Cは、最も効率的な多形として浮上し、 $\text{AUC}_{0-24\text{h}}$ B/P比0.82を達成した。高悪性度神経膠腫の標準的治療法であるテモゾロミドが、マウスにおいてB/P比0.408およびヒトにおいて脳脊髄液（CSF）/血漿比0.2を有することが測定されたので、これは有望である(21,22)。我々の研究では、GL261脳腫瘍および正常脳組織におけるMBZの分布は、著しくは異ならなかった。GL261神経膠腫の高度な成長は、他の神経膠腫モデルと同様に、腫瘍内に相当量の血液をもたらし、徹底した灌流は、MBZの血液からの汚染を排除するために不可欠であることに言及することは重要である。

40

【0027】

3つの多形のうち、MBZ-Aは、GL261神経膠腫モデルにおいて有効性を示さず、MBZ-Cで測定された $\text{AUC}_{0-24\text{h}}$ のわずか19%の非常に低い血漿存在によって説明される。MBZ-Aの生物学的利用能が低く、抗腫瘍効果が劣るということは、抗寄生虫剤の性能が低いという以前の報告と一致している(10,12)。これと比較して、MBZ-Bは、血漿中において165%のMBZ-Cの $\text{AUC}_{0-24\text{h}}$ に達することができたが、6時間での測定で証明された同様の脳濃度を示した。これは、抗脳腫瘍効果がMBZ-Cと比較して本質的に同じままであったため、GL261神経膠腫を有するマウスにおけるMBZ-Bの上昇した毒性を説明することができた。したがって、

50

本発明者らは、MBZ-Cが脳腫瘍治療においてより良い選択であることを示唆している。実際の問題として、TevaブランドのMBZ錠剤は、多形Aへの変換のために3年以内に標準的な室温条件下でその有効性を失っている可能性があるため、MBZ-Cによって製造された錠剤は低温（13）で貯蔵されるべきであるが、以前の研究（3）で有効であったこれらの錠剤中の多形Cの元の濃度はわかっていない。

【0028】

MBZの小さなサイズ（295ダルトン）および親油性の性質は、脳内浸透に有利である（2）。類似の物理的性質を共有するアルベンダゾール、チアベンダゾール、フルベンダゾール、オキシフェンダゾールおよびフェンベンダゾールなどのこれまでに試験された他のベンズイミダゾールは、MBZよりも高用量であっても、GL261神経膠腫を有するマウスの生存を損なうかわずかに改善したのみであったことは注目に値する（補足図1）（3）。本発明者らはこれまで、飼料中のフェンベンダゾールが無胸腺ヌードマウスにおける髄芽細胞腫細胞株の移植摂取を損なうという観察を行ったが（3）、GL261神経膠腫モデルでは、移植5日後に強制経口投与することにより、非常にわずかで統計的に有意でない生存率の改善が見られたのみであった。様々なベンズイミダゾールを用いた脳腫瘍治療における著しい相違に潜在的に寄与するいくつかの要因がある。MBZ多形Aで示されるように、低い吸収によると考えられる低い生物学的利用能は、このクラスの薬物の治療性能に有害であり得る。第2に、これらのベンズイミダゾールの脳内浸透は十分に研究されておらず、有意な治療効果としては不十分であり得る。さらに、最近の報告では、MBZは複数のチロシンキナーゼを阻害することに関与しているが、アルベンダゾールはそのような能力の欠如を示し、ベンズイミダゾール間の抗腫瘍機構の違いを示している（4,7,8）。

【0029】

P糖タンパク質（P-gp、ABCB1）は、ATP結合カセット（ABC）輸送体であり、脳への薬物取り込みを制限する重要な役割を果たす（23）。エラクリダールはP-gp排出輸送体の第3世代阻害剤であり、BBBのもう一つの重要な流出輸送体である乳がん耐性タンパク質（BCRP、ABCG2）をも阻害する（24）。以前の研究は、げっ歯類におけるエラクリダールの同時投与が、スニチニブ、パゾパニブ、エルロチニブおよびクリゾチニブなどの多数の抗がん剤の脳分布を著しく数倍増加させたことを実証し、それらを*in vitro*および動物実験により、P-gpおよびABCG2の基質として決定した（25~28）。さらに、エラクリダールは第I相臨床試験で安全であることが判明している（19）。この研究では、潜在的にその治療効果を高めるエラクリダールとMBZとの併用療法を調査した。本発明者らは、この併用により、2つの同所性脳腫瘍モデルの生存率が大幅に改善されることを発見した。しかし、この限られた研究では、MBZのB/P比および脳AUC_{0-8h}は、脳がんを有するマウスの生存を有意に増加させるその能力にもかかわらず、エラクリダールの同時投与と統計的に有意な差異を示さなかった。代謝産物を分析した際、げっ歯類とヒトの2つの主要代謝産物のうちの1つであるMBZ-NH₂（20）は、エラクリダールの同時投与の結果、B/P比（2.5倍）およびAUC_{0-8h}（2.4倍）に関して有意に上昇した。また、MBZ-NH₂は、正常脳組織に対してGL261脳腫瘍に優先的に蓄積したという我々の発見が注目される。これらのデータは、MBZ-NH₂がP-gpおよび／またはABCG2の潜在的基質であることを示し得るが、この発見の意義はこの時点では不明である。MBZ-NH₂の考えられる直接的な細胞毒性効果は、さらなる試験が培養GL261細胞でわずかな細胞毒性しか示さなかったため、ないようである。しかしながら、酸性腫瘍環境におけるMBZ-NH₂の優先的蓄積による毒性の増加は排除することができず、さらなる調査が必要である。さらなる調査には、MBZとの併用をよりよく理解し、改善するために、MBZとエラクリダールの相互作用、特に排出輸送体のMBZとの潜在的な基質プロファイルの研究が含まれる。

【0030】

MBZ-Cは、脳腫瘍治療において最も有効な多形である。MBZ-Cと、p-糖タンパク質阻害剤であるエラクリダールとの併用は、有効性を大きく改善することができる。この併用は、とりわけ、高悪性度神経膠腫および／または髄芽細胞腫を治療するために使用され得る。その併用は、治療計画の一部として、同時投与または別々に投与されてもよい。

【0031】

上記の開示は、全体として、本発明を説明する。本明細書中に開示される全ての参考文献は、参照により明確に組み込まれる。以下の具体的な実施例を参照することにより、より完全な理解を得ることができるが、これらは本明細書において例示のみを目的として提供されており、本発明の範囲を限定するものではない。

【実施例】

【0032】

(実施例1)

(材料および方法)

化学薬品および薬物

10

Janssen Pharmaceuticals (パンテルミン (登録商標)) および Medley Pharmaceuticals の MBZ 錠剤 (500mg) は、2013 年にブラジルの地元薬局から購入し、-20°C の冷凍庫に保存した。Teva Pharmaceuticals USA の MBZ 錠剤 (100mg) は、2011 年にジョーンズ・ホプキンス病院の外来薬局で購入し、室温 (RT) で保存した。Teva は、米国市場における MBZ の製造を 2011 年 10 月以来中止している。Aurochem Laboratories LTD. (ムンバイ、インド) は、通常混合多形を有する現在の有効活性成分 (API) を含有する S2015 と、特定の公開されている API を有する S2017 (多形 C) の MBZ 錠剤 (500mg) を製造した。Aurochem は、親切にも、MBZ 多形 A、B、C を本発明者らに供給した。エラクリダール (ELD; GF120918; N-(4-(2-(1,2,3,4-テトラヒドロ-6,7-ジメトキシ-2-イソキノリニル)エチル)フェニル)-9,10-ジヒドロ-5-メトキシ-9-オキソ-4-アクリジンカルボキサミド) は Sigma (セントルイス、ミズーリ、アメリカ) から購入した。チアベンダゾール (TBZ)、フルベンダゾール (FLZ)、オキシフェンダゾール (OXZ) および フェンベンダゾール (FBZ) は、Sigma (セントルイス、ミズーリ、アメリカ) から購入した。

20

【0033】

細胞株および組織培養

この研究用の細胞系は、前述の通り得た：マウス神経膠腫細胞株 GL261 および ヒト髄芽腫異種移植片 D425Med (D425) (3,14)。GL261 および D425 細胞を、10% ウシ胎仔血清と抗生物質とを補充した DMEM 培地において、37°C、5% CO₂ を含む加湿空気中で維持した。ホタルルシフェラーゼを発現する GL261-luc 細胞は前述されている (3)。

【0034】

MBZ 多形の赤外分光

30

Direct Detect (商標) 赤外線 (IR) 分光計を使用した (Millipore、ビルリカ、マサチューセッツ、アメリカ)。製造者の指示に従って、MBZ 粉末または粉末に粉碎された錠剤を最初に水と混合し、カードに塗布し、空気乾燥させた。前述のように (9)、-C=O および -NH のスペクトルを分析し、比較した。

【0035】

頭蓋内マウスモデル

全ての動物試験は、ジョーンズ・ホプキンス大学の動物管理・使用委員会 (ACUC) によって承認された。マウス脳の前頭葉における GL261-luc および 小脳における D425 細胞の頭蓋内移植は、前述の手順 (3,4) に従った。腫瘍移植の 5 日後、マウスに 50mg/kg の MBZ または他のベンズイミダゾールを週 5 日 強制経口投与した。MBZ および 他のベンズイミダゾールは、パウダー (粉末) を PBS および ゴマ油 (1:1, v:v) (Sigma) と混合するか、または錠剤を粉碎して粉末にし、前述の PBS/ゴマ油混合物に再懸濁することによって調製した。エラクリダールを、前述と同様に (15)、PBS 中 0.5% ヒドロキシプロピルメチルセルロース および 0.5% Tween80 中の 10mg/ml 懸濁液として調製した。

40

【0036】

MBZ 薬物動態試験

5~6 週齢のメス C57BL6 マウスを、NCI から購入した。動物実験は、承認された IACUC プロトコールの下で実施され、地方および国のガイドラインを順守した。全ての MBZ 多形および錠剤を、強制経口投与によって 50mg/kg の用量で投与した。エラクリダールを、MBZ-C 投

50

与の2時間前に50mg/kgの強制経口投与によって投与した。最初に、滅菌した0.9%NaCl溶液中に、ケタミン塩酸塩（75mg/kg）（100mg/ml；ケタミンHCl；Abbot Laboratories、シカゴ、イリノイ、アメリカ）およびキシラジン（7.5mg/kg）（100mg/ml；Xyla-ject（登録商標）；Phoenix Pharmaceutical、セントジョーセフ、ミズーリ、アメリカ）を含有する保存溶液60 μ lを腹腔内注射し、マウス（3匹／時点）を麻酔した。次いで、血液試料を、左心室に穿刺し、吸引することにより採取した。血液試料を5mM EDTAと混合し、10000gで5分間遠心分離し、さらなる分析用の血漿を得た。

【0037】

脳分布試験用に、20 μ lの0.02%ヘパリンを補充した20mlの氷冷生理食塩水で、20ゲージ針を用いて左心室にゆっくりと注入することにより、麻酔下でマウスを灌流した。右心房は、血液が流出する前に切開した。腎臓の黄色は、脳組織から血液を枯渇させるのに不可欠な良好な灌流品質を示していた。GL261腫瘍を有するマウスにおいて、GL261腫瘍は、色および陰影の容易に認識できる差異によって正常脳と区別された。GL261腫瘍をメスで分離し、対側脳半球から正常脳組織を切断した。全ての脳試料を計量し、処理する前に-80℃で保存した。

【0038】

血液、脳および脳腫瘍組織を、MBZ投与後の時間に応じて採取した。MBZ多形の薬物動態を比較するために、3つの群のマウスそれぞれに50mg/kgの単回用量を強制経口投与によって投与した。最初の比較試験用に、MBZ投与の1、2.5、4、6、8、15および24時間後に血漿試料を得て、一方で脳組織は6時間後にのみ採取した。多形CのELD有りまたは無しでの比較研究用に、MBZ投与の2.5、4、および8時間後に、血漿および脳組織試料を得た。脳腫瘍組織試料も、多形C単独用を得た。

【0039】

MBZと代謝産物の測定

MBZと2つの代謝産物、2-アミノ-5-ベンゾイル-ベンゾイミダゾール（MBZ-NH₂、CAS 523 29-60-9）およびracジヒドロメベンダゾール（MBZ-OH、CAS 60254-95-7）を、血漿、脳および脳腫瘍組織において定量した。組織ホモジネートを、血漿中に200mg/mlの濃度で抽出前に調製した。メベンダゾールおよび代謝産物を、0.5 μ g/mlの内部標準A620223.69を含有する0.1mlのメタノールで、50 μ lの血漿または組織ホモジネートから抽出した。遠心分離後、上清（60 μ l）を水（40 μ l）と混合し、次いで自動試料バイアルに移した。分離は、室温でAtlantis dC18（2.1×100mm、3 μ m）カラムで、0.1%ギ酸を含むメタノール／水移動相（60:40、v:v）により、0.25ml/分のアイソクラティックフローを5分間使用して達成した。ポジティブモードで動作するエレクトロスプレーイオン化を使用して、AB Sciex triple quadrupole（商標）5500質量分析検出器（Applied Biosystems、フォスターシティ、カリフォルニア、アメリカ）を用いて分析物を観測した。MBZ、MBZ-NH₂、MBZ-OH、およびA620223.69の[MH⁺]イオンが、それぞれm/z 296.0、238.0、298.0、および287.2で第1四重極（Q1）を通過し、衝突セル（Q2）に入るように、分光器をプログラムした。MBZ（m/z 263.9）、MBZ-NH₂（m/z 105.1）、MBZ-OH（m/z 266.0）、およびA620223.69（m/z 124.1）の娘イオンを、第3四重極（Q3）に通して観測した。MBZおよび代謝産物の校正曲線は、1:100（v:v）までの希釈度で、5～500ng/ml（MBZ）および1～500ng/ml（代謝産物）の範囲にわたる1/x加重関数を有する二次方程式を使用することにより、分析の面積比ピークを内部標準に用いて計算した。1つ以上の濃度が定量限界未満であった場合、薬物動態計算には定量限界の1/2の値を割り当てた。2つの連続する時点が定量限界未満であった場合、最後の時点は分析から除外した。

【0040】

MBZおよびその代謝産物の両方について、平均血漿および脳濃度を各時点で計算した。1.045g/mlを、平均湿潤げっ歯類脳組織密度（16）として用いた。薬物動態パラメータは、Phoenix（登録商標）WinNonlin（登録商標）バージョン6.3（Pharsight Corp.、マウンテンビュー、カリフォルニア）で分析した非コンパートメント法を用いて、平均MBZおよびその代謝産物濃度-時間データから計算した。C_{max}およびT_{max}は、平均濃度データからの

観測値であった。 AUC_{last} は、対数線形台形法を用いて計算した。 λ_z は、濃度-時間プロファイルの終期相の傾きから決定した。終末半減期 ($T_{1/2}$) は、0.693を λ_z で割って決定した。 λ_z の r^2 が <0.9 であれば、 $T_{1/2}$ は報告されなかった。MBZに対する相対的全身ばく露は、 AUC_{last} ：代謝物の AUC_{last} /MBZの AUC_{last} を用いて計算した。血漿と比較した脳または脳腫瘍における相対的全身ばく露は、 AUC_{last} ：脳または脳腫瘍の AUC_{last} /血漿の AUC_{last} を用いて計算した。

【0041】

統計分析

動物生存データは、GraphPad Prism 5.0により分析した。p値は、Mantel-Cox検定によって決定した。0.05未満のp値は、統計的に有意であると認められた。

10

【0042】

多形またはELDとの投与の比較の薬物動態学的研究のために、各時点における平均濃度の計算された分散を考慮して、Bailerの方法を用いて AUC_{last} の分散を推定した(17)。これに続いて、Z試験を用いて一対比較を行い、 AUC_{last} で表されるMBZばく露間に有意差があるかどうかを判定した(18)。個々のデータの比較は、All Pairs Tukey-Kramer検定を用いたポストホック分析でのノンパラメトリックのウィルコクソン符号付き順位検定を使用して実施した。有意水準は $P<0.05$ であった。

【0043】

(実施例2)

多形Cは、マウスの脳腫瘍の治療に最も有効であった

20

本発明者らは、市販されているいくつかの錠剤(Janssen、MedleyおよびTeva)と、2つの受注生産の錠剤(Aurochem S2015は、典型的には多形が混在する現在のAPIを使用し、S2017は純粋なMBZ-Cとして指定された)との多形含有量を、それらのIRプロファイルを個々のMBZ多形と比較することによって調べた(図1のAおよびB)。-C=Oおよび-NH結合のIRピークに基づいて、本発明者らは、JanssenおよびMedley錠剤は主にMBZ-CならびにAurochem S2017で作られていると判断した。室温で2年間貯蔵されたAurochem S2015およびTeva錠剤は、主にMBZ-Aのプロファイルを示した。対照として、多形A、BおよびCをDMSOに溶解し、GL261神経膠腫細胞と個別にインキュベートしたが、これは同等の細胞毒性を示した(データは示さず)。

【0044】

30

MBZ-Aは、頭蓋内GL261神経膠腫を有するマウスの治療に効果がないようであったが、一方でMBZ-Cは最良の有効性を示した(図1のC)。MBZ-BはMBZ-Cと同様の生存率を示したが、それは6匹の処置したマウスの1回の処置関連死でより毒性を生じた(図1のC)。S2015は効果がなく、MBZ-Cからなる他の錠剤は全て、対照群の29日間から平均生存期間を42~50日間延長することによって有意な有効性を示したという意味では、有効性のデータは、MBZ錠剤の多形組成をよく反映していた(図1のE)。

【0045】

(実施例3)

MBZは有意なレベルで脳に達した

40

50mg/kgの経口投与後、MBZ-Cは $16,039\text{h}\cdot\text{ng/ml}$ の血漿 $AUC_{0-24\text{h}}$ を達成した(図2のAおよび図6のA)。それに比べて、MBZ-Bは $26,474\text{h}\cdot\text{ng/ml}$ の血漿 $AUC_{0-24\text{h}}$ に達したが、MBZ-A血漿 $AUC_{0-24\text{h}}$ はわずか $3,052\text{h}\cdot\text{ng/ml}$ に達しただけであり、3つ全ての多形の中で断然最も低かった(MBZ-B>-C>-Aで、 $AUC_{0-24\text{h}}$ について $P<0.05$;図6のA)。徹底的な灌流後の脳組織の測定は、血漿MBZレベルと密接に関連しているMBZ-Cの有意な存在を経時的に明らかにし、脳/血漿(B/P)比は平均して0.75であり、それは8時間の間比較的安定していた(図2のB~C)。強制経口投与の6時間後の多形を比較すると、MBZ-Cおよび-Bは、MBZ-Bのより高いレベルおよび血漿中の $AUC_{0-24\text{h}}$ にもかかわらず、同様の脳レベルを達成し(図2のDおよび図6のA)、MBZ-BよりもMBZ-Cの平均B/P比がやや良好になったことを、本発明者らは発見した(Cについて0.80対Bについて0.64、およびAについて0.29、 $p=0.055$) (図2のE)。これは、MBZ-Bと-Cとが、GL261モデル(平均生存率：MBZ-Bの45日間対M

50

BZ-Cの48.5日)において同様の生存利益を示した図1のCの有効性データとよく一致する。しかし、MBZ-Bがより大きな毒性を示し、6匹の処置動物のうち1匹のマウスの早期死亡をもたらしたことは注目に値する(図2のD)。GL261脳腫瘍および対側脳組織の分析は、脳腫瘍および正常脳組織におけるMBZ-Cの等分布を示した(図2のD)。

【0046】

(実施例4)

MBZ代謝産物の薬物動態

本発明者らは、MBZ多形の主要代謝産物であるMBZ-NH₂およびMBZ-OHの血漿レベルを測定した(MBZ-B>C>Aで、MBZ-NH₂のAUC_{0-24h}についてP<0.05; MBZ-BおよびC>Aで、MBZ-OHのAUC_{0-24h}についてP<0.05; 図6のA)。血漿および脳におけるMBZ-Cの代謝産物のレベルは、通常、MBZ-Cの濃度と同じパターンに従った(図3のAおよびB)。MBZ-NH₂は、血漿中のMBZ-OHよりも高いレベルを示し(図3のA)、AUC_{0-24h}は、5,781h*ng/mlのMBZ-OH(図6のA)と比較して、10,516h*ng/mlであった。特に、逆のパターンでは、MBZ-NH₂は、C_{max}およびAUC_{0-24h}に関して、脳のMBZ-OHよりもずっと低いレベルで測定された(図3のBおよび図6のA)。興味深いことに、GL261神経膠腫において、MBZ-NH₂は、対側脳より有意に高いレベルに達した(図3のC)。MBZ代謝産物の抗腫瘍作用を解明するために、本発明者らは、GL261細胞におけるMBZ、MBZ-OHおよびMBZ-NH₂のIC₅₀を比較し、MBZ-NH₂がin vitroで細胞毒性が最も低いMBZの誘導体であると判定した(図3のD)。

【0047】

(実施例5)

MBZとエラクリダールの併用

腫瘍および周囲脳組織において十分な治療濃度を達成することは、ほぼ全ての脳がん治療が直面する重要な課題である。経口投与から4時間後、本発明者らは、MBZ-C脳濃度が2,016ng/g(7.1μMに相当)に達することを見出し(図6のA)、それは培養神経膠腫および髄芽細胞腫細胞(0.11~1μM)のIC₅₀よりもはるかに高く、in vitroで4.3μMのVEGFR2キナーゼを用いたMBZ阻害IC₅₀よりも高かった(3、4)。比較的高い脳濃度は、脳腫瘍モデルにおけるMBZの有効性を説明するのに役立つかもしれない。次に、本発明者らは、MBZの脳分布のさらなる増加が、治療効果を高める可能性があるため望ましいと推論した。純粋な機械的障害の他に、BBBは、P-糖タンパク質(P-gp)などの、薬剤侵入を制限するための能動的排出機構を採用する。エラクリダール(ELD)は、P-gpならびに乳がん耐性タンパク質(BCRP)を阻害する強力な第3世代阻害剤であり、エラクリダールの同時投与はいくつかの薬物の脳内浸透を増加させた(15、19)。本発明者らはまず、GL261マウス神経膠腫細胞におけるエラクリダールの細胞毒性を調べ、IC₅₀を5.8μMと決定した(図4のA)。エラクリダールを0.25μMのMBZと併用すると、in vitroで細胞毒性がわずかに増加した(図4のB)。MBZ-Cの2時間前の50mg/kgのエラクリダールの経口投与は、AUC_{0-8h}に関してMBZの脳濃度を有意に変化はさせず、一方で2.5、4および8時間のB/P比の平均は、0.75から1.03にわずかに上昇したが、これは、統計学的に有意ではなかった(図6のBおよび図4のC)。興味深いことに、これは、エラクリダールとMBZ-Cとの併用で処置した場合、B/P比が脳内で0.12から0.30に上昇するとともに、MBZ-NH₂の有意な増加を伴う(図6のB)。

【0048】

(実施例6)

エラクリダールとの併用により、MBZの治療が改善された

エラクリダールとMBZの併用療法は、GL261同系神経膠腫およびD425異種移植髄芽腫モデルにおける生存利益を増加させた(図5A~図5D)。これは、50mg/kgの標準MBZ(MBZ-C)投与計画に、7日または14日の50mg/kgエラクリダール処置を加えることによって達成された。具体的には、GL261において、併用療法は、治療期間の長さに依存して、平均生存期間を92.5および110.5日に改善し、これは、MBZ単独の53日ならびに29.5日(対照)および34日(エラクリダール単独)から急激な増加である(図5B)。同様に、同所性D425髄芽腫異種移植モデルでは、エラクリダールとMBZとの併用により、平均生存期間が77日

10

20

30

40

50

に増加した（図5D）。これは、53日間の生存期間のMBZ単独での治療、およびこの特定の動物モデルにおいて9日間のわずかな生存利益を示したエラクリダール単独での治療からの有意な改善である。

【0049】

エラクリダールとMBZでの長期の治療経過が試みられたが、重度の体重減少および死亡率などの毒性増加のため、これらの研究を制限した（データは示さず）。

【0050】

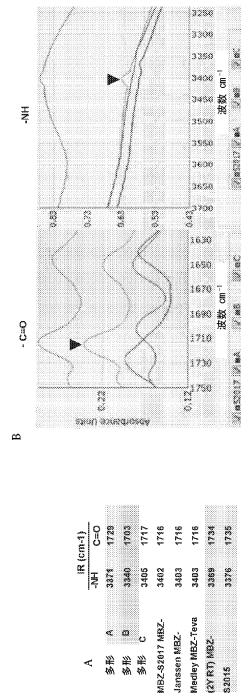
参考文献

引用された各参考文献の開示は、明示的に本明細書に組み込まれる。

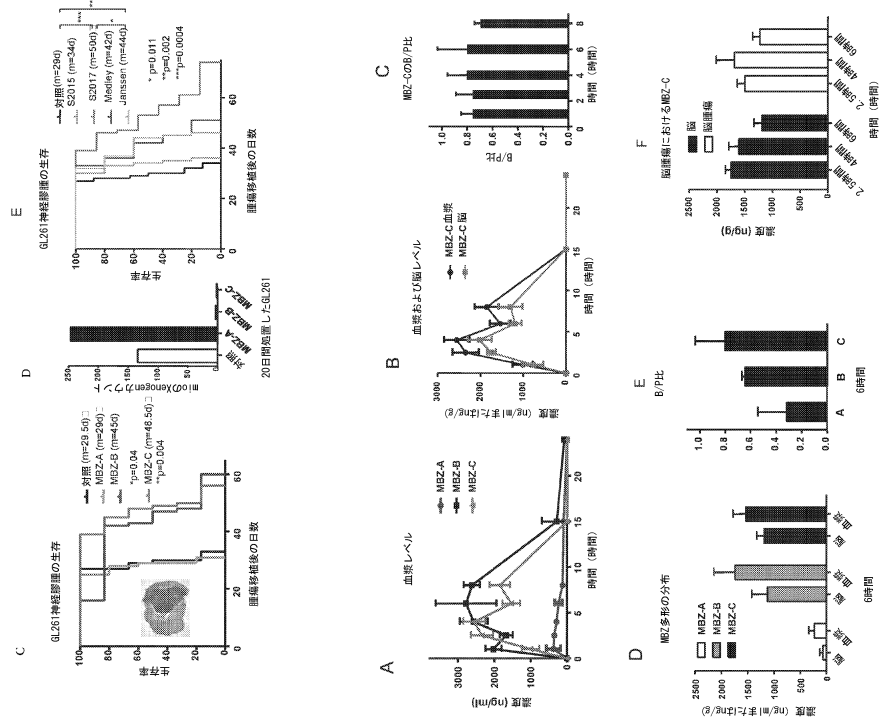
1. Bai RY, Staedtke V, Riggins GJ. Molecular targeting of glioblastoma: Drug discovery and therapies. *Trends Mol Med* 2011;17: 301-12. 10
2. Chico LK, Van Eldik LJ, Watterson DM. Targeting protein kinases in central nervous system disorders. *Nat Rev Drug Discov* 2009;8: 892-909.
3. Bai RY, Staedtke V, Aprhys CM, Gallia GL, Riggins GJ. Antiparasitic mebendazole shows survival benefit in 2 preclinical models of glioblastoma multiforme. *Neuro Oncol* 2011;13: 974-82.
4. Bai RY, Staedtke V, Rudin CM, Bunz F, Riggins GJ. Effective treatment of diverse medulloblastoma models with mebendazole and its impact on tumor angiogenesis. *Neuro Oncol* 2014, Sep 24;Epub ahead of print.
5. Doudican N, Rodriguez A, Osman I, Orlow SJ. Mebendazole induces apoptosis via Bcl-2 inactivation in chemoresistant melanoma cells. *Mol Cancer Res* 2008;6: 1308-15. 20
6. Doudican NA, Byron SA, Pollock PM, Orlow SJ. XIAP downregulation accompanies mebendazole growth inhibition in melanoma xenografts. *Anticancer Drugs* 2013;24: 181-8.
7. Dakshanamurthy S, Issa NT, Assefnia S, et al. Predicting new indications for approved drugs using a proteochemometric method. *J Med Chem* 2012;55: 6832-48.
8. Nygren P, Fryknas M, Agerup B, Larsson R. Repositioning of the anthelmintic drug mebendazole for the treatment for colon cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2013;139: 2133-40. 30
9. Liebenberg W, Dekker TG, Lotter AP, de Villiers MM. Identification of the mebendazole polymorphic form present in raw materials and tablets available in South Africa. *Drug Dev Ind Pharm* 1998;24: 485-8.
10. Rodriguez-Caabeiro F, Criado-Fornelio A, Jimenez-Gonzalez A, et al. Experimental chemotherapy and toxicity in mice of three mebendazole polymorphic forms. *Chemotherapy* 1987;33: 266-71.
11. Swanepoel E, Liebenberg W, de Villiers MM. Quality evaluation of generic drugs by dissolution test: changing the USP dissolution medium to distinguish between active and non-active mebendazole polymorphs. *Eur J Pharm Biopharm* 2003;55: 345-9. 40
12. Charoenlarp P, Waikagul J, Muennoo C, Srinophakun S, Kitayaporn D. Efficacy of single-dose mebendazole, polymorphic forms A and C, in the treatment of hookworm and *Trichuris* infections. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1993;24: 712-6.
13. Brits M, Liebenberg W, de Villiers MM. Characterization of polymorph transformations that decrease the stability of tablets containing the WHO essential drug mebendazole. *J Pharm Sci* 2010;99: 1138-51.
14. Bai RY, Staedtke V, Lidov HG, Eberhart CG, Riggins GJ. OTX2 Represses Myogenic and Neuronal Differentiation in Medulloblastoma Cells. *Cancer Res* 2012;72: 5988-6001. 50

15. Sane R, Agarwal S, Elmquist WF. Brain distribution and bioavailability of elacridar after different routes of administration in the mouse. *Drug Metab Dispos* 2012;40: 1612-9.
16. DiResta GR, Lee J, Lau N, Ali F, Galicich JH, Arbit E. Measurement of brain tissue density using pycnometry. *Acta Neurochir Suppl (Wien)* 1990;51: 34-6.
17. Bailer AJ. Testing for the equality of area under the curves when using destructive measurement techniques. *J Pharmacokinet Biopharm* 1988;16: 303-9.
18. Yuan J. Estimation of variance for AUC in animal studies. *J Pharm Sci* 1993;82: 761-3.
19. Werle M, Takeuchi H, Bernkop-Schnurch A. New-generation efflux pump inhibitors. *Expert Rev Clin Pharmacol* 2008;1: 429-40. 10
20. Dayan AD. Albendazole, mebendazole and praziquantel. Review of non-clinical toxicity and pharmacokinetics. *Acta Trop* 2003;86: 141-59.
21. Zhou Q, Gallo JM. Differential effect of sunitinib on the distribution of temozolomide in an orthotopic glioma model. *Neuro Oncol* 2009;11: 301-10.
22. Ostermann S, Csajka C, Buclin T, et al. Plasma and cerebrospinal fluid population pharmacokinetics of temozolomide in malignant glioma patients. *Clin Cancer Res* 2004;10: 3728-36.
23. Redzic Z. Molecular biology of the blood-brain and the blood-cerebrospinal fluid barriers: similarities and differences. *Fluids Barriers CNS* 2011;8: 3. 20
24. Shukla S, Ohnuma S, Ambudkar SV. Improving cancer chemotherapy with modulators of ABC drug transporters. *Curr Drug Targets* 2011;12: 621-30.
25. Tang SC, Lagas JS, Lankheet NA, et al. Brain accumulation of sunitinib is restricted by P-glycoprotein (ABCB1) and breast cancer resistance protein (ABCG2) and can be enhanced by oral elacridar and sunitinib coadministration. *Int J Cancer* 2012;130: 223-33.
26. Minocha M, Khurana V, Qin B, Pal D, Mitra AK. Enhanced brain accumulation of pazopanib by modulating P-gp and Bcrp1 mediated efflux with canertinib or erlotinib. *Int J Pharm* 2012;436: 127-34.
27. Agarwal S, Manchanda P, Vogelbaum MA, Ohlfest JR, Elmquist WF. Function of the blood-brain barrier and restriction of drug delivery to invasive glioma cells: findings in an orthotopic rat xenograft model of glioma. *Drug Metab Dispos* 2013;41: 33-9. 30
28. Tang SC, Nguyen LN, Sparidans RW, Wagenaar E, Beijnen JH, Schinkel AH. Increased oral availability and brain accumulation of the ALK inhibitor crizotinib by coadministration of the P-glycoprotein (ABCB1) and breast cancer resistance protein (ABCG2) inhibitor elacridar. *Int J Cancer* 2014;134: 1484-94.

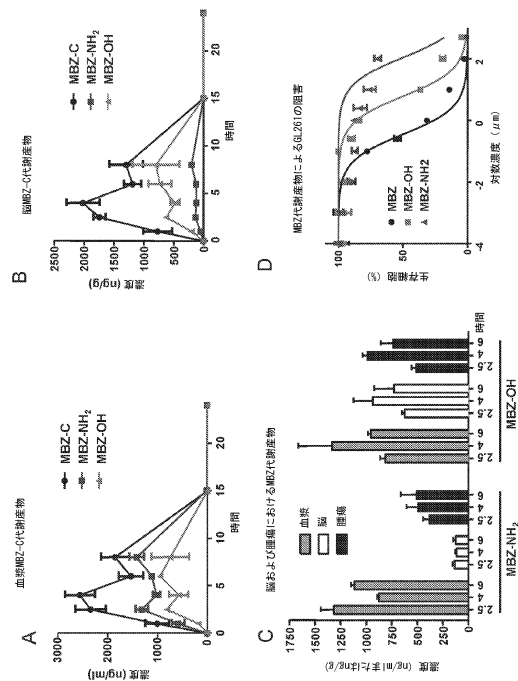
【図 1】



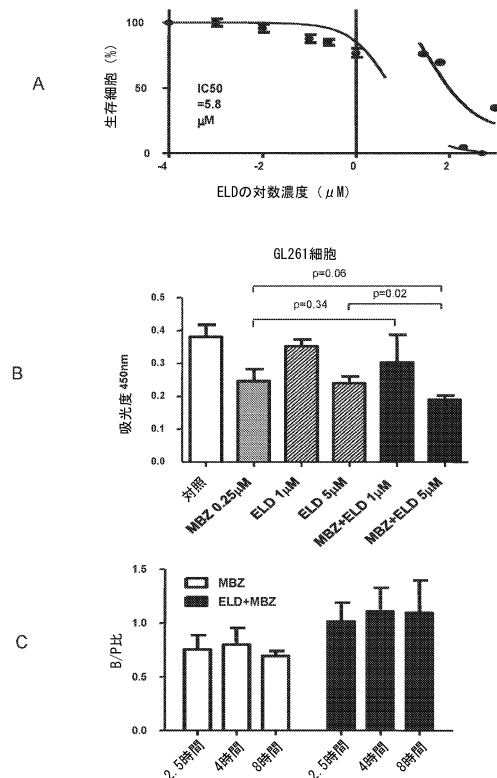
【図 2】



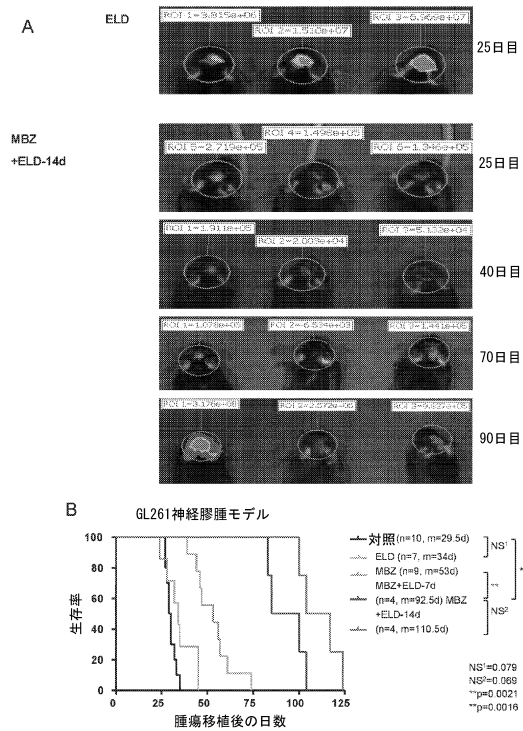
【図 3】



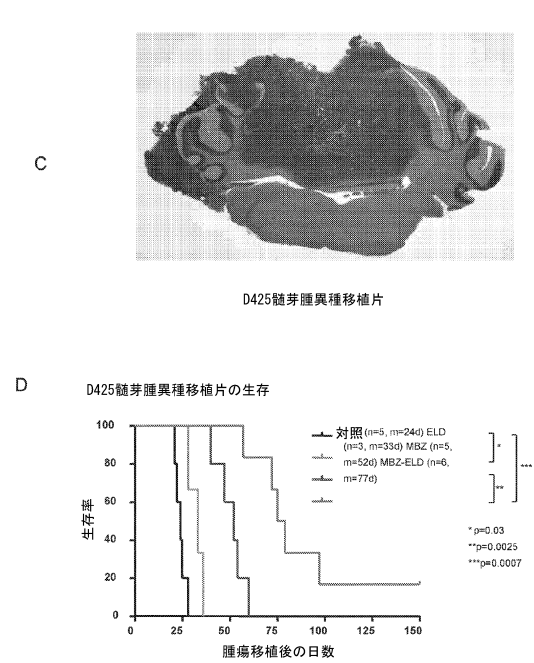
【図 4】



【図 5-1】



【図 5-2】



【図 6】

A

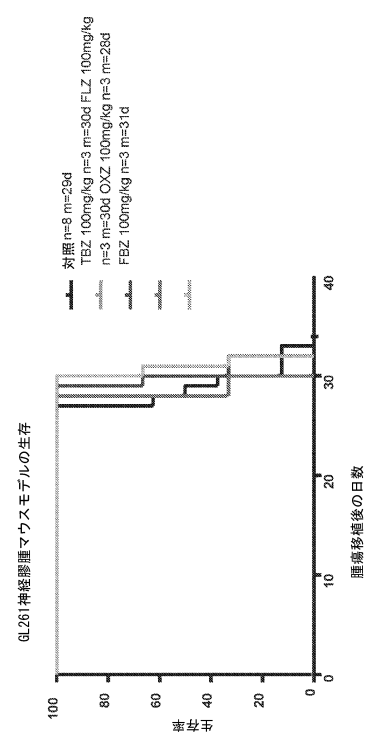
多形	検出	血漿				脳				
		T _{1/2} (時間)	T _{max} (時間)	C _{max} (ng/ml)	AUC _{0-24h} (h・ng/ml)	T _{1/2} (時間)	T _{max} (時間)	C _{max} (ng/g)	AUC _{0-24h} (h・ng/g)	B/P
A	MBZ	3.23	1	378.3	3052					
B	MBZ	3.18	6	2776.3	28474					
C	MBZ	0.90	4	2553.3	16039	1.64	4	2016	1313.4	0.92
A	MBZ+NH ₂		2.5	201.3	2841					
B	MBZ+NH ₂		8	1656.7	18583					
C	MBZ+NH ₂		8	1416.7	10516			8	201.8	1338
A	MBZ+OH		1	32.1	247					
B	MBZ+OH		8	744.7	4870					
C	MBZ+OH		8	951.7	5781			8	764.3	5427

0.94

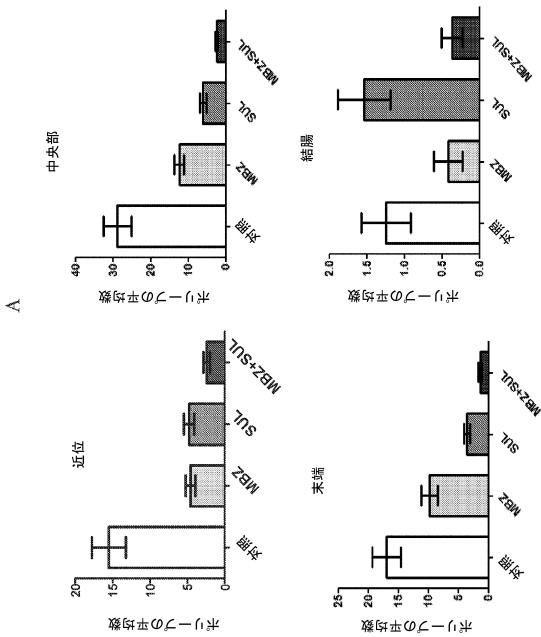
B

薬物	検出	血漿				脳					
		T _{1/2} (時間)	T _{max} (時間)	C _{max} (ng/mL)	AUC _{0-24h} (h・ng/mL)	T _{1/2} (時間)	T _{max} (時間)	C _{max} (ng/g)	AUC _{0-24h} (h・ng/g)	B/P	有意？
MBZ	MBZ	4	2.5	2553.3	15340	4	2.5	2016.0	1151.0	0.75	はい
ELD+MBZ	MBZ	2.5	2.5	1453.3	8636	2.5	2.5	1459.7	8904	1.03	はい
MBZ	MBZ+NH ₂	8	2.5	1416.7	8264	8	2.5	201.6	1010	0.12	はい
ELD+MBZ	MBZ+NH ₂	2.5	2.5	1191.7	7826	8	2.5	387.8	2386	0.30	はい
MBZ	MBZ+OH	2.5	2.5	810.0	4679	8	2.5	784.3	4135	0.88	はい
ELD+MBZ	MBZ+OH	2.5	2.5	491.0	2680	2.5	2.5	712.8	3475	1.30	はい

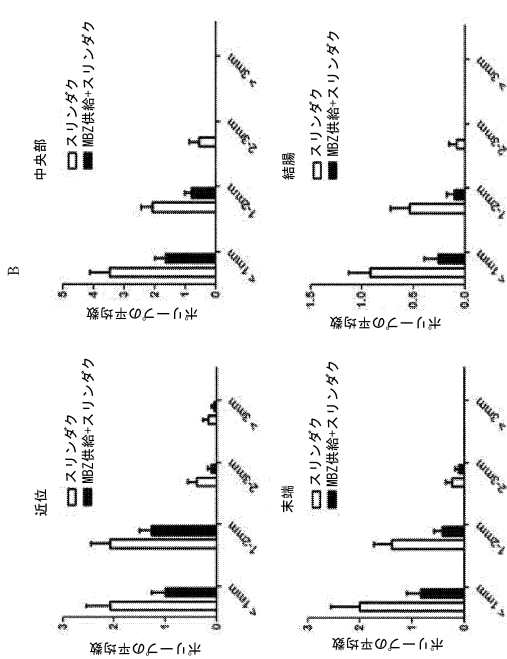
【図 7】



【図 1 1 A】



【図 1 1 B】



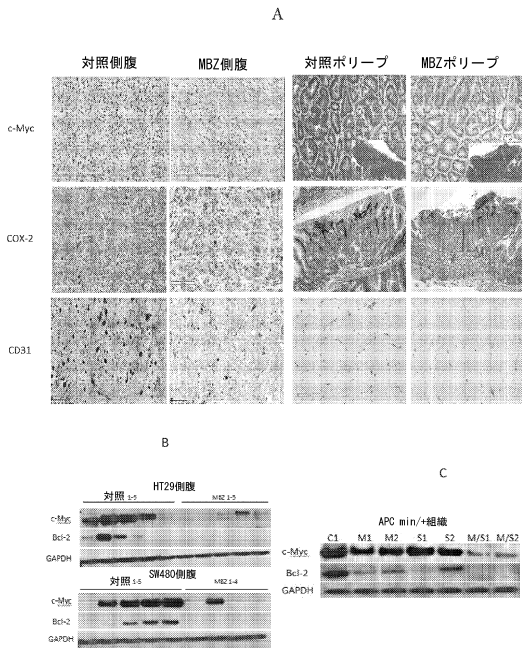
【図 1 1 C】

C

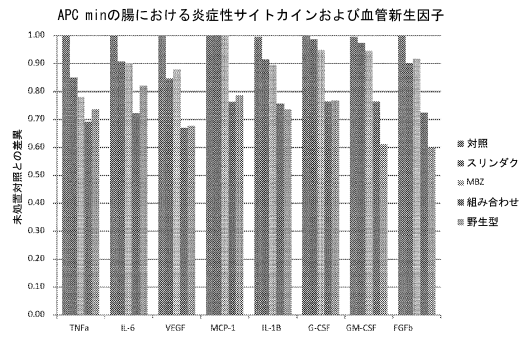
追加の統計分析

	近位	中央部	末端	結腸	p値
未処置対照	15.5 (± 2.28)	28.82 (± 3.74)	16.92 (± 2.37)	1.25 (± 0.33)	
35mg/kg MBZ 供給	4.58 (± 0.65)	13.42 (± 1.22)	9.83 (± 1.40)	0.42 (± 0.19)	0.0397
150 ppm スリダク	4.77 (± 0.68)	6.08 (± 0.94)	3.62 (± 0.53)	1.54 (± 0.35)	0.5562
35mg/kg MBZ + 150ppm スリダク	2.42 (± 0.41)	2.42 (± 0.37)	1.37 (± 0.29)	0.37 (± 0.14)	0.0083
Sul vs MBZ/Sul	0.0037	0.0003	0.0003	Sul vs MBZ/Sul	0.0014

【図 1 2】



【図 13】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
 A 6 1 P 35/00 (2006.01) A 6 1 P 35/00
 G 0 1 N 33/15 (2006.01) G 0 1 N 33/15 Z

(72)発明者 ヴェレーナ ステドク
 アメリカ合衆国 メリーランド州 2 1 2 2 4 ボルチモア ボストン ストリート 2 8 0 9
 アpartment 2 2 0

(72)発明者 アバドハット ディー ジョシー
 アメリカ合衆国 ワシントン州 9 8 0 0 5 ベルビュー ノースイースト ナインス プレイス
 1 2 7 0 1 ディー 1 1 0

(72)発明者 グレゴリー ジェイ リギンズ
 アメリカ合衆国 メリーランド州 2 1 1 6 1 バーナウディー ロード 1 1 1 7 ホワイト
 ホール

(72)発明者 タラ ウィリアムソン
 アメリカ合衆国 メリーランド州 2 1 1 4 6 セバーナ パーク ミシュナー コート イース
 ト 2 7 7

審査官 鳥居 福代

(56)参考文献 Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2 0 1 0 年, Vol.51, No.3, pp.512-520
 Neuro-Oncology, 2 0 1 1 年, Vol.13, No.9, pp.974-982
 Neuro-Oncology, 2 0 1 4 年 9 月 2 4 日, Vol.17, No.4, pp.545-554
 Clinical Cancer Research, 2 0 0 2 年, Vol.8, pp.2963-2969
 Journal of Pharmaceutical Sciences, 2 0 1 0 年, Vol.99, No.3, pp.1138-1151
 Journal of Pharmaceutical Sciences, 2 0 0 9 年, Vol.98, No.7, pp.2336-2344
 TRENDS in Pharmacological Sciences, 2 0 0 6 年, Vol.27, No.1, pp.17-24
 Frontiers in Oncology, 2 0 1 3 年, Vol.3, Article 181(18pages)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
 A 6 1 K 3 1 / 0 0 - 3 3 / 4 4
 G 0 1 N 3 3 / 1 5
 C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S / W P I D S
 (STN)