

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 907 468**

51 Int. Cl.:

A23L 33/10 (2006.01)
A61K 31/192 (2006.01)
A61K 31/473 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61K 31/4184 (2006.01)
A61K 9/16 (2006.01)
A61K 9/28 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.02.2016** **PCT/US2016/016968**
87 Fecha y número de publicación internacional: **11.08.2016** **WO16127168**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.02.2016** **E 16747414 (7)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.12.2021** **EP 3253384**

54 Título: **Polimorfo de mebendazol para el tratamiento y la prevención de tumores**

30 Prioridad:

06.02.2015 US 201562112706 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.04.2022

73 Titular/es:

THE JOHNS HOPKINS UNIVERSITY (100.0%)
3400 North Charles Street
Baltimore, MD 21218, US

72 Inventor/es:

BAI, REN-YUAN;
STAEDTKE, VERENA;
JOSHI, AVADHUT D.;
RIGGINS, GREGORY J. y
WILLIAMSON, TARA

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 907 468 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Polimorfo de mebendazol para el tratamiento y la prevención de tumores

Esta invención se realizó con el apoyo del gobierno bajo R25NS065729 otorgado por el Instituto Nacional de Trastornos Neurológicos y Accidentes Cerebrovasculares, y P30-CA006973, UL1-RR025005 y 1S10RR026824-01 de los Institutos Nacionales de Salud. El gobierno tiene ciertos derechos en la invención.

Campo técnico de la invención

Esta invención está relacionada con el área de la farmacología. En particular, se refiere a la terapéutica del cáncer.

Antecedentes de la invención

Los cánceres del sistema nervioso central (SNC) son difíciles de tratar porque la mayoría de los tratamientos administrados por vía sistémica no logran alcanzar concentraciones eficaces en los tumores intracraneales (1). Esto se explica parcialmente por la barrera hematoencefálica (BHE). En el SNC, la BHE existe a lo largo de todos los capilares que consisten en uniones estrechas, lo que bloquea el paso de moléculas grandes e hidrófilas a los tejidos del SNC. Se estima que solo aproximadamente el 2 % de los fármacos de molécula pequeña son capaces de atravesar la BHE de forma eficaz (2).

El mebendazol (MBZ) se ha utilizado de manera segura como antiparasitario en seres humanos durante más de cuatro décadas y muestra eficacia contra las infecciones por helmintos intracraneales. Recientemente se demostró la eficacia preclínica de MBZ en modelos en roedores de glioma ortotópico y meduloblastoma (3, 4). El MBZ redujo significativamente el crecimiento tumoral y mejoró la supervivencia de los ratones con tumores cerebrales. En base a estos resultados, se inició un ensayo clínico de Fase I con un aumento de la dosis de MBZ para pacientes recién diagnosticados con glioma de alto grado (NCT01729260). Se ha generado evidencia que respalda varios mecanismos anticancerígenos para MBZ, incluida la unión a tubulina, la inhibición de cinasas, la antiangiogénesis y la proapoptosis (3-8). Sin embargo, quedan por determinar las características importantes de la penetración cerebral y la farmacocinética de MBZ. Esta comprensión es importante para mejorar potencialmente el uso clínico de MBZ.

El MBZ es altamente hidrófobo y puede formar tres polimorfos diferentes en base a las condiciones de cristalización (9). Los polimorfos A, B y C (MBZ-A, B y C) mostraron características distintas en solubilidad, toxicidad y efectos terapéuticos en aplicaciones antihelmínticas (10-12). Aún no se ha investigado la diferencia en la eficacia antitumoral de los tres polimorfos; sin embargo, esta información podría ser crucial para futuras terapias contra el cáncer con MBZ, ya que las formulaciones de fármacos pueden contener diversos polimorfos en diferentes cantidades o combinaciones. Otra razón crítica para una investigación más extensa es que el polimorfo C, el polimorfo más eficaz en el uso antihelmíntico, puede transformarse con el tiempo en el polimorfo A menos eficaz, especialmente con temperaturas y humedad más altas (13). Dado que los polimorfos solo existen en forma sólida y el MBZ es exclusivamente un fármaco oral, el estudio de las propiedades antitumorales relevantes de diferentes polimorfos se logra mejor determinando la biodisponibilidad y la eficacia en modelos animales mediante la administración oral de polimorfos de MBZ. Existe una necesidad continua en la técnica de identificar terapias más eficaces, más consistentes y más seguras para tratar cánceres, en particular cánceres de cerebro.

Resumen de la invención

La presente invención se refiere a una formulación farmacéutica que comprende mebendazol, en la que al menos el 90 % del mebendazol en la formulación es el polimorfo C y en la que la formulación está granulada.

También se proporciona un procedimiento para supervisar la potencia anticancerígena de una formulación farmacéutica de mebendazol, que comprende: ensayar la formulación farmacéutica y determinar la cantidad de polimorfo C y la cantidad de polimorfo A, preferentemente en el que la etapa de ensayo comprende espectroscopía infrarroja.

Aún más se proporciona la formulación farmacéutica de la invención para su uso en el tratamiento o la reducción del riesgo de desarrollar un tumor en un ser humano.

Las realizaciones preferidas de la invención se exponen en las reivindicaciones dependientes.

Los procedimientos asociados también se describen en el presente documento para ayudar en la comprensión de la invención, pero estos no forman parte de la invención reivindicada. Los ejemplos o realizaciones descritos en el presente documento que no están dentro de la definición de las reivindicaciones no forman parte de la presente invención.

Breve descripción de los dibujos

Figuras 1A-1E. MBZ-C es el polimorfo más eficaz con toxicidad limitada

Figura 1A y figura 1B. Espectros infrarrojos de polimorfos de MBZ y comprimidos de MBZ de diferentes proveedores: S2015 y S2017 (Aurochem), Teva (después de 2 años de almacenamiento a temperatura ambiente), Medley y Janssen. Dos picos representan los grupos -NH y —C=O en las moléculas. Las puntas de flecha negras indican los

picos del control MBZ-C.

Figura 1C. Curvas de supervivencia de Kaplan Meier y recuentos de luciferasa. Curvas de supervivencia de Kaplan Meier de ratones implantados con glioma GL261-luc y tratados con diferentes polimorfos de MBZ (A, B y C). Se mostró una tinción con H&E del cerebro de ratón portador de glioma GL261-luc por corte coronal. 5 días después de la implantación del tumor, a los ratones se les administró por sonda MBZ y los animales de control fueron alimentados con vehículos. Presuntamente, un ratón del grupo de MBZ-B murió a causa de la toxicidad del fármaco, ya que no se encontró ningún tumor significativo en el cerebro. Se indican los valores p de Con frente a MBZ-B y Con frente a MBZ-C. El valor p de MBZ-B frente a MBZ-C es 0,72. m: mediana de supervivencia en días. Con: n=6; MBZ-A: n=5; MBZ-B: n=6; MBZ-C: n=6.

Figura 1D. Los recuentos de luciferasa medidos por Xenogen reflejaron el tamaño del tumor cerebral GL261-luc en ratones tratados con polimorfos de MBZ durante 20 días.

Figura 1E. Curvas de supervivencia de ratones portadores de GL261-luc tratados con comprimidos de MBZ de diferentes proveedores. Con: n=6; S2015: n=5; S2017: n=6; Medley: n=5; Jansen: n=5.

Figuras 2A-2F. Distribuciones plasmática y cerebral de polimorfos de MBZ

Figura 2A. Una evolución temporal de los niveles plasmáticos de MBZ en ratones C57BL6 después de la administración por sonda oral de MBZ-A, B o C a 50 mg/kg.

Figura 2B. Niveles cerebrales y plasmáticos de MBZ-C en una evolución temporal después de la administración por sonda oral a 50 mg/kg. Los animales se perfundieron completamente con PBS para todos los estudios de distribución cerebral.

Figura 2C. Proporciones cerebro/plasma (C/P) de MBZ-C. Los datos se recopilaron de tres ratones en cada punto temporal.

Figura 2D. Niveles cerebrales y plasmáticos de polimorfos de MBZ a las 6 h después de la administración por sonda oral (50 mg/kg). Proporción C/P de polimorfos de MBZ a las 6 h después de la administración por sonda oral.

Figura 2E. La proporción C/P media de MBZ-A es 0,32, de MBZ-B es 0,64 y de MBZ-C es 0,80.

Figura 2F. MBZ-C se distribuyó por igual en el cerebro y en el tumor cerebral. Los tumores GL261 implantados en el lado derecho del lóbulo frontal del ratón se resecaron y se compararon con el tejido cerebral normal contralateral.

Figuras 3A-3D. Distribución de metabolitos de MBZ

Figura 3A-figura 3D. Los niveles plasmáticos (figura 3A y figura 3C) y cerebrales (figura 3B y figura 3C) de MBZ y sus metabolitos, MBZ-OH (rac dihidro mebendazol, CAS 60254-95-7) y MBZ-NH₂ (2-amino-5-benzoyl-benzimidazol, CAS 52329-60-9), se analizaron después de la administración por sonda oral de 50 mg/kg de MBZ-C. La figura 3D muestra la inhibición (curva de CI₅₀) de GL261 por MBZ y sus metabolitos.

Figuras 4A-4C. Combinación de MBZ con elacridar

Figura 4A. Curva de CI₅₀ de células de glioma GL261 con elacridar (ELD). CI₅₀=5,8 µM.

Figura 4B. Inhibición de células de GL261 por MBZ (0,25 µM), ELD (1 o 5 µM) o la combinación. Las células se incubaron con los fármacos indicados durante 72 h y las células vivas se midieron mediante el ensayo colorimétrico.

Figura 4C. ELD elevó las proporciones C/P promedio de MBZ en ratones.

Figuras 5A-5D. La combinación de MBZ con elacridar mejoró la eficacia

Figura 5A y figura 5B. Se implantaron células GL261 transfectadas con luciferasa en ratones C57BL6 y los tratamientos se iniciaron 5 días después de la implantación. Se administró elacridar (ELD) por vía oral a 50 mg/kg 2 horas antes de la administración de MBZ (50 mg/kg) durante los primeros 7 o 14 días de tratamiento. Posteriormente, se administró MBZ cinco días a la semana en la misma dosis durante el resto de la terapia. Al grupo de ELD solo se le administró por sonda ELD durante 14 dosis diarias. Los animales tratados con MBZ y ELD fueron supervisados por Xenogen en busca de señales de luciferasa tumoral a partir de 25 días después de la implantación del tumor (figura 5A).

Figura 5C y figura 5D. Se implantaron células de meduloblastoma D425 en el cerebelo de ratón y formaron un tumor cerebeloso (figura 5C, tinción H&E). Cinco días después de la implantación del tumor, los ratones fueron tratados con vehículo (Con), 7 días de 50 mg/kg de elacridar (ELD), 7 días de ELD con 50 mg/kg de MBZ-C cinco días a la semana (MBZ-ELD) o MBZ-C solo (MBZ).

Figuras 6A-6B. (Tabla 1.) Tabla 1. Farmacocinética de polimorfos de MBZ en ratones.

Figura 6 A. Utilizando LS-MS, MBZ y los metabolitos MBZ-NH₂ y MBZ-OH se midieron en muestras de plasma de

ratones a los que se administraron por sonda por vía oral los polimorfos de MBZ indicados. En términos del AUC_{24h} del plasma, es B>C>A con $p<0,05$.

Figura 6 B. Farmacocinética de MBZ-C y metabolitos en ratones a los que se administró por sonda MBZ o la combinación de MBZ y elacridar (ELD).

5 Figura 7. Prueba de bencimidazoles en modelo en ratón de glioma GL261. Los ratones portadores de glioma GL261-luc se trataron con tiabendazol (TBZ), flubendazol (FLZ), oxfendazol (OXZ), fenbendazol (FBZ) a 100 mg/kg mediante administración por sonda oral, a partir del día 5 después de la implantación del tumor. Todas las diferencias en la supervivencia no son significativas en la prueba de Mantel-Cox. n: número de ratones; m: mediana de supervivencia en días.

10 Figura 8. Un esquema de síntesis para preparar mebendazol.

Figuras 9A-9E. El mebendazol oral inhibe el crecimiento y la proliferación en dos xenoinjertos diferentes de líneas celulares de cáncer de colon en el costado. Dos líneas celulares de carcinoma colorrectal humano, HT29 y SW480, se implantaron por vía subcutánea en los costados de ratones desnudos y se trataron durante cuatro semanas con 50 mg/kg de MBZ mediante administración por sonda oral. Los volúmenes de los tumores se midieron dos veces por semana, se promediaron y se representaron en el transcurso del experimento. Curvas inhibitorias del crecimiento del xenoinjerto de HT29 (figura 9A) y del xenoinjerto de SW480 (B). Los tumores del costado resecados de cada grupo se pesaron al final del experimento y se compararon con el control no tratado (figura 9C, figura 9D). Los tejidos tumorales del costado incluidos en parafina se tiñeron para el marcador de proliferación Ki67. El tejido tratado con MBZ mostró una tinción significativamente menos positiva (núcleos marrones) en ambos modelos (figura 9E). Cinco campos seleccionados aleatoriamente de cada portaobjetos se cuantificaron como el porcentaje de células positivas para Ki67 x 100/número total de células y representan la media + SEM de cinco animales. *, $P < 0,05$.

Figuras 10A-10D. El mebendazol reduce la formación de pólipos en el intestino de ratones APC min/+. Al final del estudio de quimiopreención, se analizaron el intestino delgado y el colon de ratones APC min/+ y se promedió el número total de pólipos/ratón y se comparó entre los grupos de tratamiento (figura 10A); imágenes representativas de intestino delgado medio y distal de APC min/+ de control frente a tratamiento de combinación de MBZ + sulindaco (figura 10B); intestino enrollado como un brazo de gitano teñido con H&E representativo del control (figura 10C, izquierda) y tratamiento de combinación de MBZ + sulindaco (figura 10C, derecha). Los resultados se tabulan para el número y la ubicación de los pólipos en cada grupo de tratamiento (figura 10D).

Figuras 11A-11C. La combinación de mebendazol y sulindaco es sinérgica al reducir tanto la aparición como el tamaño de los tumores en todos los segmentos del intestino de ratón APC min/+. El número promedio de pólipos para cada grupo de tratamiento se representó gráficamente para el intestino delgado proximal, medio y distal y el colon (figura 11A). Los pólipos individuales se midieron y clasificaron según el tamaño. El número promedio de pólipos para sulindaco frente a la combinación de MBZ + sulindaco se analizó por separado para cada sección del intestino (figura 11B). El análisis estadístico se muestra en la figura 11C.

Figuras 12A-12C. El mebendazol muestra un efecto antiinflamatorio y antiangiogénico en pólipos de ratón Min tratados y en xenoinjertos del costado. Las secciones incluidas en parafina de tejido tumoral del costado y pólipos de APC min se analizaron mediante inmunohistoquímica utilizando anticuerpos c-myc, COX-2 y CD31. Se muestran imágenes representativas para cada uno (figura 12A). Los lisados de tejido de xenoinjerto del costado individuales de HT29 (control n = 5, MBZ n = 5) y SW480 (control n = 5, MBZ n = 4) se analizaron para determinar la expresión de proteína de c-myc y Bcl-2 (figura 12B) mostrando una reducción de estas proteínas en la mayoría de los casos con tratamiento con MBZ. De manera similar, en los pólipos del ratón min hubo una reducción de c-myc y Bcl-2 en particular con el tratamiento de combinación. El tejido intestinal de ratón APC min/+ que representa cada grupo de tratamiento se sondeó para c-myc y Bcl-2 (figura 12C). C1=control, M1,M2 = tratado con MBZ, S1,S2 = tratado con sulindaco, M/S1, M/S2 = tratamiento de combinación de MBZ + sulindaco. Se usó GAPDH como control de carga.

Figura 13. La combinación de mebendazol más sulindaco disminuye las citocinas inflamatorias y los factores angiogénicos en el intestino de APC min/+ más que cualquiera de los dos fármacos por separado. Se utilizó una tira colorimétrica de ELISA de ratón reactiva a TNF α , IL-6, VEGF, MCP-1, IL-1B, G-CSF, GM-CSF y FGF β para medir la reducción de marcadores proinflamatorios en cada grupo de tratamiento. Se promediaron los valores de absorbancia relativa y se comparó la diferencia porcentual en los valores con los resultados de los ratones de control no tratados (n = 3 ratones promediados para cada grupo de tratamiento).

Descripción detallada de la invención

Los inventores han desarrollado formulaciones eficaces y seguras para tratar tumores, particularmente tumores de cerebro, mama y pulmón. También se pueden tratar otros tumores, incluidos los tumores colorrectales, de ovario, sarcomas, gástricos, esofágicos, de próstata, pancreáticos, hepáticos y tiroideos.

55 Se ha descubierto que el polimorfo C de mebendazol es el más potente de los polimorfos para tratar tumores. Sin embargo, a menudo parece que la potencia de una preparación disminuye con el tiempo debido a la pérdida del polimorfo C o a la conversión en otros polimorfos. La formulación farmacéutica que comprende mebendazol que se

usa en la invención es al menos el 90 % polimorfo C. Aunque al menos el 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % polimorfo C también se describe en el presente documento. La formulación que comprende mebendazol se granula. Esto proporciona una formulación adecuada para añadir a alimentos y proporcionar un medicamento de sabor agradable. También puede aumentar la absorción gástrica. Opcionalmente, la forma granulada se puede recubrir. Esto puede aumentar la palatabilidad del medicamento. Los materiales típicos usados para recubrimientos entéricos incluyen ácidos grasos, ceras, goma laca, plásticos y fibras vegetales. Puede usarse cualquiera de dichos recubrimientos entéricos usados en la técnica.

La glucoproteína P (P-gp), la glucoproteína de permeabilidad o glucoproteína plasmática es una bomba de proteína de transporte unida a la membrana, de eflujo activo. Es un miembro de la superfamilia de casetes de unión a ATP (ABC). Tiene muchos nombres, incluidos ABCB1, MDR1, PGY1 y CD243. Está involucrada en la resistencia a múltiples fármacos en los tumores. En ese contexto, puede denominarse bomba resistente a múltiples fármacos. Cualquier inhibidor de la P-gp se puede usar en formulaciones con mebendazol, incluidos elacridar, progesterona, gomasina A, piperina, apocianina, amprenavir, quinidina y valspodar. El inhibidor de la P-gp puede recubrirse conjuntamente junto con el mebendazol o el inhibidor de la P-gp puede estar sin recubrir o recubrirse por separado. Los dos agentes pueden administrarse al mismo tiempo, en combinación o por separado. Los dos agentes pueden administrarse con días o semanas de diferencia como parte de un régimen combinado.

En algunas formulaciones y para algunos usos, tales como los usos profilácticos, el polimorfo C se puede formular con un fármaco antiinflamatorio no esteroideo. Estos incluyen aspirina, salicilatos de colina y magnesio, salicilato de colina, celecoxib, diclofenaco potásico, diclofenaco sódico, diclofenaco sódico con misoprostol, diflunisal, etodolaco, fenoprofeno cálcico, flurbiprofeno, ibuprofeno, indometacina, ketoprofeno, salicilato de magnesio, meclofenamato sódico, ácido mefenámico, meloxicam, nabumetona, naproxeno, naproxeno sódico, oxaprozina, piroxicam, rofecoxib, salsalato, salicilato de sodio, sulindaco, tolmetina sódica y valdecoxib. La combinación tiene un potente efecto profiláctico.

Los individuos que tienen un mayor riesgo de desarrollar cáncer colorrectal son aquellos que tienen una variedad de factores ambientales, conductuales y genéticos. Estos incluyen sobrepeso u obesidad, inactividad física, una dieta rica en carnes rojas (tales como vacuno, cerdo, cordero o hígado) y carnes procesadas, tabaquismo, consumo excesivo de alcohol, antecedentes personales de pólipos colorrectales o cáncer colorrectal, antecedentes personales de enfermedad intestinal inflamatoria, antecedentes familiares de cáncer colorrectal o pólipos adenomatosos, síndromes de cáncer familiar, poliposis adenomatosa familiar (PAF), síndrome de Lynch, PAF atenuada, síndrome de Turcot, síndrome de Peutz-Jeghers, poliposis asociada a MUTYH y diabetes tipo 2. Estos individuos pueden beneficiarse de la profilaxis con mebendazol, en particular con polimorfo C, y más particularmente con terapias de combinación de mebendazol y fármacos antiinflamatorios no esteroideos. Los dos agentes pueden administrarse al mismo tiempo, en combinación o por separado. Los dos agentes pueden administrarse con días o semanas de diferencia como parte de un régimen combinado de profilaxis. Una mezcla racémica de mebendazol o incluso una composición que comprenda más polimorfos A o B que C puede usarse para tratamientos profilácticos y/o terapéuticos contra el cáncer.

La aplicación de una formulación a los alimentos puede abarcar cualquier medio conocido en la técnica. Para aplicar la formulación al alimento, por ejemplo, se puede usar rociado, agitación, pulverización, esparcimiento o mezcla. La administración o dispensación de una formulación para ingestión oral puede comprender, por ejemplo, suministro en una taza, en un plato o directamente en la boca del sujeto.

Los tumores cerebrales que pueden tratarse incluyen astrocitoma; tumor rabdoide teratoide atípico (TRTA); condrosarcoma; plexo coroideo; craneofaringioma; quistes; ependimoma; tumor de células germinales; glioblastoma; glioma; hemangioma; lipomas; linfoma; meduloblastoma; meningioma; tumor cerebral metastásico; neurofibroma; tumores neuronales y mixtos neuronales-gliales; oligoastrocitoma; oligodendroglioma; tumores pineales; tumores pituitarios; TNEP; y schwannoma.

Los tumores humanos que pueden tratarse con las formulaciones incluyen leucemia linfoblástica aguda (LLA); leucemia mieloide aguda (LMA); cáncer en adolescentes; carcinoma adrenocortical; en la infancia; cánceres relacionados con el SIDA; sarcoma de Kaposi; linfoma; cáncer de ano; cáncer de apéndice; astrocitomas, en la infancia; tumor teratoide/rabdoide atípico, en la infancia, sistema nervioso central; carcinoma de células basales: véase cáncer de piel (no melanoma); en la infancia; cáncer de las vías biliares, extrahepático; cáncer de vejiga; en la infancia; cáncer de hueso; la familia de tumores del sarcoma de Ewing; osteosarcoma e histiocitoma fibroso maligno; glioma de tronco encefálico en la infancia; tumor cerebral; astrocitomas, en la infancia; descripción general del tratamiento de los tumores de encéfalo y de la médula espinal, en la infancia; glioma de tronco encefálico, en la infancia; tumor teratoide/rabdoide atípico del sistema nervioso central en la infancia; tumores embrionarios del sistema nervioso central, en la infancia; tumores de células germinales del sistema nervioso central, en la Infancia; craneofaringioma, en la infancia; ependimoma, en la infancia; cáncer de mama; en la infancia; masculino; embarazo, cáncer de Mama y; tumores bronquiales, en la infancia; linfoma de Burkitt - véase linfoma no Hodgkin; tumor carcinoide; en la infancia; gastrointestinal; carcinoma de origen primario desconocido; en la infancia; tumores cardíacos (del corazón), en la infancia; sistema nervioso central; tumor teratoide/rabdoide atípico en la infancia; tumores embrionarios. en la infancia; tumor de células germinales, en la infancia; linfoma, primario; cáncer de cuello uterino; en la infancia; cánceres infantiles; cordoma, en la infancia; leucemia linfocítica crónica (LLC); leucemia mielógena crónica (LMC); neoplasias mieloproliferativas crónicas; cáncer de colon; cáncer colorrectal; en la infancia; craneofaringioma, en la infancia; linfoma cutáneo de células T - véase micosis fungoide y síndrome de Sézary; conducto biliar extrahepático; carcinoma

ductal in situ (CDIS); tumores embrionarios, sistema nervioso central, en la infancia; cáncer endometrial; ependimoma, en la infancia; cáncer de esófago; en la infancia; estesioneuroblastoma, en la infancia; sarcoma de Ewing; tumor extracraneal de células germinales, en la infancia; tumor extragonadal de células germinales; cáncer de vías biliares extrahepáticas; cáncer de ojo; melanoma intraocular; retinoblastoma; cáncer de las trompas de Falopio - véase cáncer epitelial de ovario, de las trompas de Falopio y primario de peritoneo; histiocitoma fibroso de hueso, maligno y osteosarcoma; cáncer de vesícula biliar; cáncer gástrico (de estómago); en la infancia; tumor carcinoide gastrointestinal; tumores del estroma gastrointestinal (TEGI); en la infancia; tumor de células germinales; sistema nervioso central, en la infancia; extracraneal, en la infancia; extragonadal; ovárico; testicular; enfermedad trofoblástica gestacional; glioma - véase tumor cerebral; tronco encefálico en la infancia; leucemia de células pilosas; cáncer de cabeza y cuello; en la infancia; cáncer de corazón, en la infancia; cáncer hepatocelular (hígado); histiocitosis, células de Langerhans; linfoma de Hodgkin; cáncer de hipofaringe; melanoma intraocular; tumores de células de los islotes, tumores neuroendocrinos pancreáticos; sarcoma de Kaposi; riñón; célula renal; tumor de Wilms y otros tumores renales infantiles; histiocitosis de células de Langerhans; cáncer de laringe; en la infancia; leucemia; linfoblástica aguda (LLA); mieloide aguda (LMA); linfocítica crónica (LLC); mielógena crónica (LMC); célula pilosa; cáncer de labio y cavidad bucal; cáncer de hígado (primario); en la infancia; cáncer de pulmón; en la infancia; no microcítico; microcítico; linfoma; relacionados con el SIDA; Burkitt - véase linfoma no Hodgkin; cutáneo de células T - véase micosis fungoide y síndrome de Sézary; Hodgkin; no Hodgkin; sistema nervioso central primario (SNC); macroglobulinemia de Waldenström; Cáncer de mama masculino; histiocitoma fibroso maligno de hueso y osteosarcoma; melanoma; en la infancia; intraocular (Ojo); carcinoma de células de Merkel; mesotelioma, maligno; en la infancia; cáncer de cuello escamoso metastásico con origen primario oculto; carcinoma de las vías de la línea medias que implica al gen NUT; cáncer de boca; síndromes de neoplasia endocrina múltiple, en la infancia; mieloma múltiple/neoplasia de células plasmáticas; micosis fungoide; síndromes mielodisplásicos; neoplasias mielodisplásicas/mieloproliferativas; leucemia mielógena, crónica (LMC); leucemia mieloide, aguda (LMA); mieloma, múltiple; neoplasias mieloproliferativas, crónicas; cáncer de cavidad nasal y seno paranasal; cáncer de nasofaringe; en la infancia; neuroblastoma; linfoma no Hodgkin; cáncer de pulmón no microcítico; cáncer bucal; en la infancia; cáncer de labio y cavidad bucal; cáncer orofaríngeo; osteosarcoma e histiocitoma fibroso maligno de hueso; cáncer de ovarios; en la infancia; epitelial; tumor de células germinales; tumor de bajo potencial maligno; cáncer de páncreas; en la infancia; tumores neuroendocrinos pancreáticos (tumores de células de los islotes); papilomatosis, en la infancia; paraganglioma; en la infancia; cáncer de seno paranasal y cavidad nasal; cáncer de paratíroides; cáncer de pene; cáncer de faringe; feocromocitoma; en la infancia; tumor pituitario; neoplasia de células plasmáticas/mieloma múltiple; blastoma pleuropulmonar, en la infancia; embarazo y cáncer de mama; linfoma primario del sistema nervioso central (SNC); cáncer de próstata; cáncer de recto; cáncer de células renales (riñón); pelvis renal y uréter, cáncer de células de transición; retinoblastoma; rabdomiosarcoma, en la infancia; cáncer de glándulas salivales; en la infancia; sarcoma; Ewing; Kaposi; osteosarcoma (cáncer de hueso); rabdomiosarcoma; tejido blando; uterino; síndrome de Sézary; cáncer de piel; en la infancia; melanoma; carcinoma de células de Merkel; no melanoma; cáncer de pulmón microcítico; cáncer de intestino delgado; sarcoma de tejido blando; carcinoma de células escamosas - véase cáncer de piel (no melanoma); en la infancia; Cáncer de cuello escamoso con origen primario oculto, metastásico; cáncer de estómago (gástrico); en la infancia; linfoma cutáneo de células T - véase micosis fungoide y síndrome de Sézary; cáncer testicular; en la infancia; cáncer de garganta; timoma y carcinoma tímico; en la infancia; cáncer de tiroides; en la infancia; cáncer de células de transición de pelvis renal y uréter; carcinoma de origen primario desconocido; en la infancia; cánceres Inusuales de la Infancia; uréter y pelvis renal, cáncer de células de transición; cáncer de uretra; cáncer uterino, endometrial; sarcoma uterino; cáncer de vagina; en la infancia; cáncer de vulva; macroglobulinemia de Waldenström; y tumor de Wilms.

Los kits también se describen en el presente documento y son medios para envasar dos o más artículos en un solo recipiente. El kit puede comprender múltiples recipientes internos para mantener los componentes separados. El kit puede comprender instrucciones u otro material impreso para facilitar el uso, tales como curvas patrón. La información también se puede proporcionar en un medio de almacenamiento electrónico, tal como un disco o una unidad. La información se puede proporcionar mediante referencia a un sitio web. También se pueden proporcionar componentes adicionales que son útiles para tratar cánceres. Pueden estar incluidas herramientas para la administración. Se pueden proporcionar recipientes para mezclar componentes en el kit.

El mebendazol se puede preparar mediante cualquier medio conocido en la técnica. En un procedimiento, se usa p-clorotolueno como material de partida. Véase la figura 8. Típicamente, para la purificación, el polimorfo C se cristaliza utilizando metanol a temperatura ambiente. El mebendazol está disponible comercialmente.

En este estudio, se demostró que el MBZ puede alcanzar el tejido cerebral en concentraciones significativas y con proporciones altas de cerebro a plasma. Entre 1 y 8 horas después de la administración oral, MBZ-C mantuvo los niveles cerebrales por encima de 0,767 µg/g (equivalente a 2,7 µM), con una $C_{m\acute{a}x}$ de 2,016 µg/g (equivalente a 7,1 µM). Estos excedieron la CI_{50} (4.3 µM) de MBZ en la cinasa VEGFR2 *in vitro* y la CI_{50} (0,11-1 µM) en una serie de líneas celulares de glioma y meduloblastoma en cultivo tisular (3, 4). Además, MBZ-C emergió como el polimorfo más eficiente, logrando un AUC_{0-24h} proporción C/P de 0,82. Esto es alentador ya que se midió que la temozolomida, el tratamiento estándar para los gliomas de alto grado, tenía una proporción C/P de 0,408 en ratones y una proporción líquido cefalorraquídeo (LCR)/plasma de 0,2 en seres humanos (21, 22). En el estudio de los inventores, las distribuciones de MBZ en el tumor cerebral GL261 y en el tejido cerebral normal no difirieron significativamente. Vale la pena mencionar que el crecimiento avanzado del glioma GL261 da como resultado una cantidad sustancial de sangre en el tumor, de manera similar a otros modelos de glioma y una perfusión completa fue esencial para eliminar

la contaminación de MBZ de la sangre.

Entre los tres polimorfos, MBZ-A no mostró eficacia en el modelo de glioma GL261, lo que se explica por la muy baja presencia en plasma de solo el 19 % del AUC_{0-24h} medida con MBZ-C. La baja biodisponibilidad y la eficacia antitumoral inferior de MBZ-A están en línea con los informes anteriores de su bajo rendimiento en aplicaciones antiparasitarias (10, 12). En comparación, MBZ-B pudo alcanzar el 165 % del AUC_{0-24h} de MBZ-C en el plasma, mientras que muestra una concentración cerebral similar demostrada por la medición a las 6 h. Esto podría explicar la toxicidad elevada de MBZ-B en ratones portadores de glioma GL261, ya que la eficacia contra el tumor cerebral se mantuvo esencialmente igual en comparación con MBZ-C. Por tanto, se sugiere que MBZ-C es una mejor opción en la terapia de tumores cerebrales. Como cuestión práctica, los comprimidos fabricados con MBZ-C deben almacenarse a una temperatura más baja (13), ya que los comprimidos de MBZ de la marca Teva pueden haber perdido su eficacia bajo la condición de temperatura ambiente estándar dentro de los 3 años, probablemente debido a la conversión al polimorfo A, aunque no se conoce la concentración original del polimorfo C en estos comprimidos que solían ser eficaces en el estudio anterior de los inventores (3).

El pequeño tamaño de MBZ (295 daltons) y la propiedad lipófila favorecen la penetración en el cerebro (2). Cabe señalar que otros benzimidazoles probados hasta ahora, tales como albendazol, tiabendazol, flubendazol, oxifendazol y fenbendazol que comparten propiedades físicas similares, no consiguieron o solo mejoraron marginalmente la supervivencia de ratones portadores de glioma GL261, incluso a dosis más altas que MBZ (figura 1 complementaria) (3). Como anteriormente se hizo la observación de que el fenbendazol en el alimento perjudicó la ingesta de la implantación de una línea celular de meduloblastoma en ratones desnudos atímicos (3), solo logró una mejora de supervivencia muy marginal y estadísticamente insignificante en el modelo de glioma GL261 mediante administración por sonda 5 días después de la implantación. Hay varios factores que contribuyen potencialmente a la marcada discrepancia en la terapia del tumor cerebral con diversos benzimidazoles. Para uno, como se muestra con el polimorfo A de MBZ, la baja biodisponibilidad probablemente debida a la mala absorción podría ser perjudicial para el rendimiento terapéutico de esta clase de fármacos. En segundo lugar, la penetración cerebral de estos benzimidazoles no ha sido bien estudiada y podría ser insuficiente para efectos terapéuticos significativos. Además, se ha implicado a MBZ en la inhibición de múltiples tirosina cinasas en informes recientes, mientras que el albendazol mostró una falta de dicha capacidad, lo que indica diferencias en los mecanismos antitumorales entre los benzimidazoles (4, 7, 8).

La glucoproteína P (P-gp, ABCB1) es un transportador de casete de unión a ATP (ABC) y juega un papel importante en la limitación de la captación de fármacos en el cerebro. (23) Elacridar es un inhibidor de 3ª generación de transportadores de eflujo P-gp y también inhibe la proteína resistente al cáncer de mama (BCRP, ABCG2) que es otro transportador de eflujo clave en la BHE (24). Estudios previos demostraron que la administración conjunta de elacridar en roedores ha aumentado notablemente en múltiples veces la distribución en el cerebro de una serie de fármacos contra el cáncer, tales como sunitinib, pazopanib, erlotinib y crizotinib, que se determinaron como sustratos de P-gp y ABCG2 mediante estudios *in vitro* y con animales (25-28). Además, se ha descubierto que elacridar es seguro en ensayos clínicos de Fase I (19). En este estudio, se investigó la combinación de elacridar con MBZ para mejorar potencialmente su eficacia terapéutica. Se descubrió que la combinación mejoró en gran medida la supervivencia en dos modelos de tumores cerebrales ortotópicos. Sin embargo, en este estudio limitado, la proporción C/P y el AUC_{0-8h} cerebral de MBZ no mostró diferencias estadísticamente significativas con la administración conjunta de elacridar, a pesar de su capacidad para aumentar significativamente la supervivencia en ratones portadores de cáncer cerebral. Al analizar los metabolitos, MBZ-NH₂, uno de los dos metabolitos principales en roedores y seres humanos (20), se elevó significativamente en términos de proporción C/P (2,5 veces) y AUC_{0-8h} (2,4 veces) como resultado de la coadministración de elacridar. También es notable el hallazgo de que MBZ-NH₂ se acumuló preferentemente en el tumor cerebral GL261 frente a los tejidos cerebrales normales. Aunque estos datos podrían indicar que MBZ-NH₂ es un sustrato potencial de P-gp y/o ABCG2, la importancia de este hallazgo no está clara en este punto. Un posible efecto citotóxico directo de MBZ-NH₂ parece poco probable ya que las pruebas posteriores mostraron solo una citotoxicidad marginal con células GL261 cultivadas. Sin embargo, no se puede excluir el aumento de la toxicidad a través de la acumulación preferencial de MBZ-NH₂ en el entorno ácido del tumor y requiere más investigaciones. Otras investigaciones incluyen el estudio de las interacciones de MBZ y elacridar, particularmente el perfil de sustrato potencial de los transportadores de eflujo con MBZ, para comprender mejor y, por lo tanto, mejorar la combinación con MBZ.

MBZ-C es el polimorfo más eficaz en la terapia de tumores cerebrales. La combinación de MBZ-C con elacridar, un inhibidor de la glucoproteína p, puede mejorar en gran medida la eficacia. Esta combinación se puede usar para tratar, entre otros, glioma y/o meduloblastoma de alto grado. La combinación puede administrarse conjuntamente o por separado como parte de un régimen de tratamiento.

La invención se describirá ahora con más detalle con referencia a los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1

Materiales y procedimientos

Productos químicos y fármacos

Comprimidos de MBZ (500 mg) de Janssen Pharmaceuticals (Pantelmin®) y Medley Pharmaceuticals se adquirieron

de farmacias locales en Brasil en 2013 y se almacenaron en un congelador a -20 °C. Comprimidos de MBZ (100 mg) de Teva Pharmaceuticals USA se adquirieron de la Farmacia para pacientes ambulatorios del Hospital Johns Hopkins en 2011 y se almacenaron a temperatura ambiente (TA). Teva ha dejado de comercializar MBZ en el mercado estadounidense desde octubre de 2011. Aurochem Laboratories LTD. (Mumbai, India) fabricó comprimidos de MBZ (500 mg) S2015 que contienen el principio activo farmacéutico (PAF) actual que generalmente tiene polimorfos mixtos, y S2017 (polimorfo C) con PAF específico revelado. Aurochem también nos suministró amablemente polimorfo A, B y C de MBZ. Elacridar (ELD; GF120918; N-(4-(2-(1,2,3,4-tetrahidro-6,7-dimetoxi-2-isoquinolinil)etil)fenil)-9,10-dihidro-5-metoxi-9-oxo-4-acridina carboxamida)) se adquirió de Sigma (St. Louis, MO, EE. UU.). Tiabendazol (TBZ), flubendazol (FLZ), oxifendazol (OXZ) y fenbendazol (FBZ) se adquirieron de Sigma (St. Louis, MO, EE. UU.).

Líneas celulares y cultivo tisular

Las líneas celulares para este estudio se obtuvieron como se describió anteriormente: línea celular de glioma de ratón GL261 y el xenoinjerto de meduloblastoma humano D425Med (D425). (3, 14) Las células de GL261 y D425 se mantuvieron en medio DMEM complementado con suero bovino fetal al 10 % y antibióticos a 37 °C en aire humidificado que contenía CO₂ al 5 %. Las células de GL261-luc que expresan luciferasa de luciérnaga se describieron previamente (3).

Espectrometría infrarroja de polimorfos de MBZ

Se utilizó un espectrómetro infrarrojo (IR) Direct Detect™ (Millipore, Billerica, MA, EE. UU.). El polvo o los comprimidos molidos a polvo de MBZ se mezclaron primero con agua, se aplicaron a la tarjeta y se secaron al aire siguiendo las instrucciones del fabricante. Los espectros de —C=O y —NH se analizaron y compararon como se describió anteriormente. (9)

Modelos intracraneales en ratón

Todos los estudios en animales fueron aprobados por el Comité de Uso y Cuidado de Animales (ACUC) de la Universidad Johns Hopkins. La implantación intracraneal de GL261-luc en el lóbulo frontal y de células de D425 en el cerebelo del cerebro de ratón siguió el procedimiento descrito anteriormente (3, 4). Cinco días después de la implantación del tumor, los ratones recibieron mediante administración por sonda MBZ u otros bencimidazoles a 50 mg/kg cinco días a la semana. El MBZ y otros benzimidazoles se prepararon mezclando el polvo con PBS y aceite de sésamo (1:1, v:v) (Sigma) o moliendo los comprimidos hasta convertirlos en polvo y resuspendiendo en la mezcla de PBS/aceite de sésamo mencionada anteriormente. El elacridar se preparó como una suspensión de 10 mg/ml en hidroxipropilmetilcelulosa al 0,5 % y Tween 80 al 0,5 % en PBS de forma similar a la descrita anteriormente (15).

Estudios farmacocinéticos de MBZ

Se adquirieron ratones C57BL6 hembra, de 5 a 6 semanas de edad, del NCI. La experimentación con animales se realizó bajo un protocolo IACUC aprobado y cumplió con las directrices locales y nacionales. Todos los polimorfos y comprimidos de MBZ se administraron por sonda oral a una dosis de 50 mg/kg. Elacridar se administró por sonda oral a 50 mg/kg 2 horas antes de la administración de MBZ-C. Primero se anestesiaron ratones (3 animales/punto temporal) mediante inyección intraperitoneal de 60 µl de una solución madre que contenía clorhidrato de ketamina (75 mg/kg) (100 mg/ml; Ketamina HCl; Abbot Laboratories, Chicago, IL, EE. UU.) y xilazina (7,5 mg/kg) (100 mg/ml; Xyla-ject®; Phoenix Pharmaceutical, St. Joseph, MO, EE. UU.) en una solución estéril de NaCl al 0,9 %. A continuación se tomaron las muestras de sangre por punción y aspiración del ventrículo izquierdo del corazón. Las muestras de sangre se mezclaron con EDTA 5 mM y se centrifugaron a 10000 g durante 5 min para obtener el plasma para su posterior análisis.

Para los estudios de distribución cerebral, los ratones se perfundieron bajo anestesia con 20 ml de solución salina helada complementada con 20 µl de heparina al 0,02 % inyectándolos lentamente en el ventrículo izquierdo del corazón usando una aguja de calibre 20. La aurícula derecha se abrió antes para permitir la salida de sangre. El color amarillo del riñón indicaba una buena calidad de perfusión que era esencial para agotar la sangre del tejido cerebral. En ratones con tumor GL261, el tumor GL261 se distinguió del cerebro normal por diferencias fácilmente reconocibles en color y sombreado. El tumor GL261 se separó con un bisturí y el tejido cerebral normal se cortó del hemisferio contralateral. Todas las muestras de cerebro se pesaron y almacenaron a -80 °C antes del procesamiento.

Se recogieron tejidos de sangre, cerebro y tumor cerebral en función del tiempo después de la administración de MBZ. Para comparar la farmacocinética de los polimorfos de MBZ, a cada una de tres cohortes de ratones se les administró una dosis única de 50 mg/kg por sonda oral. Para los estudios de comparación iniciales, se obtuvieron muestras de plasma a las 1, 2,5, 4, 6, 8, 15 y 24 horas después de la administración de MBZ, mientras que el tejido cerebral se recogió solamente a las 6 horas. Para los estudios de comparación del polimorfo C con o sin ELD, se obtuvieron muestras de plasma y tejido cerebral a las 2,5, 4 y 8 horas después de la administración de MBZ. También se obtuvieron muestras de tejido de tumor cerebral para el polimorfo C solo.

Medición de MBZ y metabolitos

El MBZ y los dos metabolitos, 2-amino-5-benzoil-bencimidazol (MBZ-NH₂, CAS 52329-60-9) y rac dihidro mebendazol (MBZ-OH, CAS 60254-95-7), se cuantificaron en plasma, tejido cerebral y de tumor cerebral. Se prepararon

homogeneizados de tejido a una concentración de 200 mg/ml en plasma antes de la extracción. El mebendazol y los metabolitos se extrajeron de 50 µl de plasma u homogeneizados de tejidos con 0,1 ml de metanol que contenía 0,5 µg/ml del patrón interno A620223.69. Después de la centrifugación, el sobrenadante (60 µl) se mezcló con agua (40 µl) y a continuación se transfirió a viales de automuestreador. La separación se logró con una columna Atlantis dC18 (2,1 x 100 mm, 3 µm) a temperatura ambiente con una fase móvil de metanol/agua (60:40, v:v) que contenía ácido fórmico al 0,1 % usando un flujo isocrático a 0,25 ml/min durante 5 minutos. Los analitos se supervisaron usando un detector espectrométrico de masas AB Sciex triple quadrupole™ 5500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE. UU.) que usa ionización por electropulverización operando en modo positivo. El espectrómetro se programó para permitir que los iones [MH⁺] de MBZ, MBZ-NH₂, MBZ-OH y A620223.69 a m/z 296,0, 238,0, 298,0 y 287,2, respectivamente, atravesasen el primer cuadrupolo (Q1) y entren en la celda de colisión (Q2). Los iones hijos de MBZ (m/z 263,9), MBZ-NH₂ (m/z 105,1), MBZ-OH (m/z 266,0) y A620223.69 (m/z 124,1) fueron supervisados a través del tercer cuadrupolo (Q3). Las curvas de calibración para el MBZ y los metabolitos se calcularon utilizando el pico de relación de área del análisis con respecto al patrón interno mediante una ecuación cuadrática con una función de ponderación 1/x en el intervalo de 5 a 500 ng/ml (MBZ) y de 1 a 500 ng/ml (metabolitos) con diluciones de hasta 1:100 (v:v). Si una o más concentraciones estaban por debajo de los límites de cuantificación, se asignaba un valor de ½ el límite de cuantificación para los cálculos farmacocinéticos. Si dos puntos temporales consecutivos estaban por debajo de los límites de cuantificación, el último se excluía del análisis.

Se calcularon las concentraciones plasmáticas y cerebrales medias en cada punto temporal tanto para MBZ como para sus metabolitos. Se usó 1,045 g/ml como la densidad de tejido cerebral de roedor húmedo promedio (16). Los parámetros farmacocinéticos se calcularon a partir de datos de concentración-tiempo media de MBZ y sus metabolitos utilizando procedimientos no compartimentales como se analizó en Phoenix.® WinNonlin® versión 6.3 (Pharsight Corp., Mountain View, CA). C_{máx} y T_{máx} fueron los valores observados a partir de los datos de concentración media. El AUC_{última} se calculó utilizando el método trapezoidal log-lineal. λ_z se determinó a partir de la pendiente de la fase terminal del perfil de concentración-tiempo. La semivida terminal (T_{1/2}) se determinó dividiendo 0,693 por λ_z. Si la r² de λ_z fue <0,9, la T_{1/2} no se notificó. La exposición sistémica relativa a MBZ se calculó usando el AUC_{última}: AUC_{última} de metabolitos/ AUC_{última} de MBZ. La exposición sistémica relativa en tejido cerebral o de tumor cerebral en comparación con el plasma se calculó usando el AUC_{última}: AUC_{última} en cerebro o tumor cerebral/AUC_{última} en plasma.

Análisis estadístico

Los datos de supervivencia de los animales se analizaron con GraphPad Prism 5.0. Los valores de p se determinaron mediante una prueba de Mantel-Cox. Se aceptó como estadísticamente significativo un valor de p inferior a 0,05.

Para los estudios farmacocinéticos que comparan los polimorfos o la administración con ELD, se utilizó el Método de Bailer para estimar la varianza de AUC_{última} dada la varianza calculada de la concentración media en cada punto temporal (17). A esto le siguió una comparación por pares utilizando una prueba de la Z para determinar si había una diferencia significativa entre la exposición a MBZ expresada por el AUC_{última} (18). Las comparaciones de datos individuales se realizaron utilizando la prueba no paramétrica de rangos con signo de Wilcoxon con análisis post-hoc utilizando una prueba de Tukey-Kramer para todos los pares. El nivel de significación fue P<0,05.

Ejemplo 2

El polimorfo C fue el más eficaz para tratar tumores cerebrales en ratones

Se examinó el contenido de polimorfos de varios comprimidos disponibles comercialmente (Janssen, Medley y Teva) y dos comprimidos hechos bajo pedido (Aurochem S2015 usó el PAF actual que generalmente tiene polimorfos mixtos y S2017 se especificó como MBZ-C puro) al comparar sus perfiles IR con los polimorfos de MBZ individuales (figura 1A y B). Basándose en los picos de IR de los enlaces —C=O y -NH, se determinó que los comprimidos de Janssen y Medley estaban hechos principalmente de MBZ-C, así como los de Aurochem S2017. Los comprimidos de Aurochem S2015 y Teva que se almacenaron a temperatura ambiente durante 2 años mostraron principalmente los perfiles de MBZ-A. Como control, los polimorfos A, B y C se disolvieron en DMSO y se incubaron individualmente con células de glioma GL261, que mostraron la misma citotoxicidad (no se muestran los datos).

MBZ-A pareció ser ineficaz en el tratamiento de ratones portadores de glioma intracraneal GL261, mientras que MBZ-C mostró la mejor eficacia (figura 1C). Aunque MBZ-B mostró una supervivencia similar a MBZ-C, causó más toxicidad con 1 muerte relacionada con el tratamiento entre 6 ratones tratados (figura 1C). Los datos de eficacia reflejaron bien la composición de polimorfo de los comprimidos de MBZ en el sentido de que S2015 fue ineficaz y otros comprimidos hechos de MBZ-C mostraron todos una eficacia significativa al prolongar la supervivencia media a 42-50 días desde los 29 días del grupo de control (figura 1E).

Ejemplo 3

MBZ llegó al cerebro a niveles significativos

Después de una dosis oral de 50 mg/kg, MBZ-C alcanzó un AUC_{0-24h} en plasma de 16.039 h*ng/ml (figura 2A y tabla 1A). En comparación, MBZ-B alcanzó un AUC_{0-24h} en plasma de 26.474 h*ng/ml, mientras que el AUC_{0-24h} en plasma de MBZ-A alcanzó solo 3.052 h*ng/ml, con mucho el más bajo entre los tres polimorfos (P<0,05 para ABC_{0-24h} con

MBZ-B>-C>-A; tabla 1A). Las mediciones de los tejidos cerebrales después de una perfusión completa revelaron una presencia significativa de MBZ-C a lo largo de la evolución temporal, lo que se correlaciona estrechamente con los niveles de MBZ en plasma con una proporción cerebro/plasma (C/P) de 0,75 en promedio que se mantuvo relativamente estable durante las 8 horas. (figuras 2B-2C). Al comparar los polimorfos a las 6 h después de la administración por sonda oral, se descubrió que MBZ-C y -B alcanzaron niveles cerebrales similares, a pesar de los niveles más altos de MBZ-B y AUC_{0-24h} en el plasma (figura 2D y Figura 6, tabla 1A), lo que da como resultado una proporción C/P media ligeramente favorable de MBZ-C sobre MBZ-B (0,80 para C frente a 0,64 para B y 0,29 para C, $p=0,055$) (figura 2E). Esto corrobora bien con los datos de eficacia en la figura 1C, donde MBZ-B y -C demostraron un beneficio de supervivencia similar en el modelo de GL261 (supervivencia media: 45 días de MBZ-B frente a 48,5 días de MBZ-C). Sin embargo, cabe señalar que MBZ-B mostró una mayor toxicidad, lo que dio como resultado la muerte prematura de un ratón entre los seis animales tratados (figura 2D). El análisis del tumor cerebral GL261 y los tejidos cerebrales contralaterales indicó una distribución igual de MBZ-C en el tumor cerebral y los tejidos cerebrales normales (figura 2D).

Ejemplo 4

Farmacocinética de los metabolitos de MBZ

Se determinaron los niveles plasmáticos de los principales metabolitos NMZ-NH₂ y MBZ-OH de polimorfos de MBZ ($P<0,05$ para ABC_{0-24h} de MBZ-NH₂ con MBZ-B>C>A; $P<0,05$ para ABC_{0-24h} de MBZ-OH con MBZ-B y C>A; tabla 1A). Los niveles de metabolitos de MBZ-C en plasma y cerebro generalmente siguieron el mismo patrón de concentración de MBZ-C (figura 3A y B). MBZ-NH₂ mostró niveles más altos que MBZ-OH en el plasma (figura 3A), con un AUC_{0-24h} de 10.516 h*ng/ml en comparación con 5.781 h*ng/ml de MBZ-OH (tabla 1A). En particular, en un patrón inverso, MBZ-NH₂ se midió a niveles mucho más bajos que MBZ-OH en el cerebro en términos de $C_{m\acute{a}x}$ y ABC_{0-24h} (figura 3B y tabla 1A). Curiosamente, en el glioma GL261, MBZ-NH₂ alcanzó niveles significativamente más altos que en el cerebro contralateral (figura 3C). Para dilucidar el papel antitumoral de los metabolitos de MBZ, se compararon las CI_{50} de MBZ, MBZ-OH y MBZ-NH₂ en células de GL261 y se determinó que MBZ-NH₂ es el derivado menos citotóxico de MBZ *in vitro* (figura 3D).

Ejemplo 5

Combinación de MBZ con elacridar

Lograr una concentración terapéutica suficiente en el tumor y el tejido cerebral circundante es un desafío crítico al que se enfrentan casi todas las terapias contra el cáncer cerebral. Cuatro horas después de la administración oral, se descubrió que la concentración cerebral de MBZ-C alcanzó un máximo de 2.016 ng/g (equivalente a 7,1 μ M) (tabla 1A), que estaba muy por encima de las CI_{50} de células cultivadas de glioma y meduloblastoma (0,11-1 μ M) y también por encima de la CI_{50} inhibidora de MBZ con VEGFR2 cinasa a 4,3 μ M *in vitro* (3, 4). La concentración cerebral relativamente alta podría ayudar a explicar la eficacia de MBZ en modelos de tumores cerebrales. A continuación, se razonó que sería deseable un aumento adicional en la distribución cerebral de MBZ, ya que puede aumentar la eficacia terapéutica. Además de una barrera mecánica pura, la BHE emplea mecanismos de eflujo activos para limitar la entrada de fármacos, tales como la glucoproteína P (P-gp). El elacridar (ELD) es un potente inhibidor de tercera generación que inhibe la P-gp así como la proteína de resistencia del cáncer de mama (BCRP) y la administración conjunta de elacridar ha aumentado la penetración cerebral de varios fármacos (15, 19). Primero se examinó la citotoxicidad de elacridar en células de glioma de ratón GL261 y se determinó que la CI_{50} es de 5,8 μ M (figura 4A). La combinación de elacridar con MBZ 0,25 μ M sólo aumentó marginalmente la citotoxicidad *in vitro* (figura 4B). La administración oral de 50 mg/kg de elacridar dos horas antes de MBZ-C no cambió significativamente la concentración cerebral de MBZ en términos de AUC_{0-8h} , mientras que el promedio de la proporción C/P de 2,5, 4 y 8 h se desplazó ligeramente hacia arriba de 0,75 a 1,03, lo que, sin embargo, no fue estadísticamente significativo (tabla 1B y figura 4C). Curiosamente, esto fue acompañado por un aumento significativo en MBZ-NH₂ junto con una elevación de la proporción C/P de 0,12 a 0,30 en el cerebro cuando se trató con una combinación de elacridar y MBZ-C (tabla 1B).

Ejemplo 6

La combinación con elacridar mejoró el tratamiento de MBZ

La terapia de combinación de elacridar y MBZ aumentó el beneficio de supervivencia en modelos de glioma singénico GL261 y meduloblastoma de xenoinjerto D425 (figura 5). Esto se logró añadiendo 7 o 14 días de tratamiento con 50 mg/kg de elacridar al régimen estándar de MBZ (MBZ-C) de 50 mg/kg. Específicamente, en GL261, la terapia de combinación mejoró la mediana de supervivencia a 92,5 y 110,5 días dependiendo de la duración del tratamiento, lo que es un marcado aumento de 53 días de MBZ solo, así como 29,5 días (control) y 34 días (elacridar solo) (figura 5B). De manera similar, en el modelo de xenoinjerto de meduloblastoma ortotópico D425, la combinación de elacridar con MBZ aumentó la mediana de supervivencia a 77 días (figura 5D). Esta es una mejora significativa respecto al tratamiento sólo con MBZ con 53 días de supervivencia y elacridar solo, que mostró un beneficio de supervivencia marginal de 9 días en este modelo animal en particular.

Se intentó un ciclo de tratamiento prolongado con elacridar y MBZ, sin embargo, el aumento de la toxicidad, tal como pérdida de peso severa y mortalidad, limitaron esos estudios (no se muestran los datos).

Referencias

1. Bai RY, Staedtke V, Riggins GJ. Molecular targeting of glioblastoma: Drug discovery and therapies. *Trends Mol Med* 2011; 17: 301-12.
- 5 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.
- 10 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, 24 de septiembre; publicación electrónica previa a la impresión.
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.
6. Doudican NA, Byron SA, Pollock PM, Orlow SJ. XIAP downregulation accompanies mebendazole growth inhibition in melanoma xenografts. *Anticancer Drugs* 2013; 24: 181-8.
- 15 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.
- 20 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.
- 25 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.
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.
- 30 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.
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.
- 35 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.
- 40 19. Werle M, Takeuchi H, Bernkop-Schnurch A. New-generation efflux pump inhibitors. *Expert Rev Clin Pharmacol* 2008; 1: 429-40.
20. Dayan AD. Albendazole, mebendazole and praziquantel. Review of non-clinical toxicity and pharmacokinetics. *Acta Trop* 2003; 86: 141-59.
- 45 21. Zhou Q, Gallo JM. Differential effect of sunitinib on the distribution of temozolomide in an orthotopic glioma model. *NeuroOncol* 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.
24. Shukla S, Ohnuma S, Ambudkar SV. Improving cancer chemotherapy with modulators of ABC drug transporters. *Curr Drug Targets* 2011; 12: 621-30.
- 5 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.
- 10 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.
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.
- 15

REIVINDICACIONES

1. Una formulación farmacéutica que comprende mebendazol, en la que al menos el 90 % del mebendazol en la formulación es el polimorfo C y en la que la formulación está granulada.
2. La formulación farmacéutica de la reivindicación 1, en la que la formulación granulada está recubierta.
- 5 3. La formulación farmacéutica de la reivindicación 1, en la que al menos el 95 % de todo el mebendazol en la formulación es el polimorfo C.
4. La formulación farmacéutica de la reivindicación 1, que comprende además un inhibidor de la glucoproteína P.
5. La formulación farmacéutica de la reivindicación 1, que comprende además un fármaco antiinflamatorio no esteroideo (AINE).
- 10 6. La formulación farmacéutica de la reivindicación 4, en la que la formulación está granulada y recubierta.
7. La formulación farmacéutica de la reivindicación 4 o 6, en la que el inhibidor de la glucoproteína P es elacridar.
8. La formulación farmacéutica de la reivindicación 5, en la que la formulación está granulada y recubierta.
9. La formulación farmacéutica de la reivindicación 5 u 8, en la que el AINE es sulindaco.
- 15 10. Un procedimiento para supervisar la potencia anticancerígena de una formulación farmacéutica de mebendazol, que comprende:
ensayar la formulación farmacéutica y determinar la cantidad de polimorfo C y la cantidad de polimorfo A, preferentemente en el que la etapa de ensayo comprende espectroscopía infrarroja.
11. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que la etapa de ensayo se realiza en una pluralidad de tiempos.
- 20 12. La formulación farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 4, 5, 6 y 8 para su uso en el tratamiento o la reducción del riesgo de desarrollar un tumor en un ser humano.
13. La formulación farmacéutica para su uso según la reivindicación 12, en la que el tumor tiene una bomba resistente a múltiples fármacos.
14. Una composición oral para su uso en el tratamiento o la reducción del riesgo de un tumor en un ser humano, que comprende:
25 mebendazol en el que al menos el 90 % del mebendazol en la formulación es el polimorfo C, y
un inhibidor de la glucoproteína P o un fármaco antiinflamatorio no esteroideo.
15. Una composición oral para su uso según la reivindicación 14, en la que el inhibidor de la glucoproteína P es elacridar.
- 30 16. Una composición oral para su uso según la reivindicación 14, en la que el tumor se selecciona de entre un tumor cerebral, un meduloblastoma, un glioma; tumores de mama, colorrectales y de pulmón.

Fig. 1B

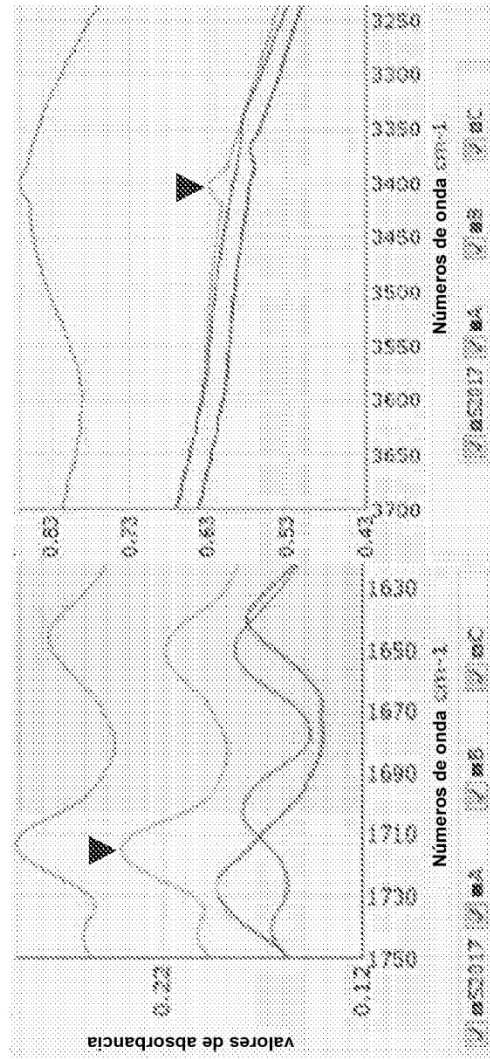


Fig. 1A

	IR (cm⁻¹)	
	-NH	C=O
Polimorfo A	3374	1729
Polimorfo B	3340	1703
Polimorfo C	3405	1717
MBZ-S2017 MBZ-	3402	1716
Janssen MBZ-	3403	1716
Medley MBZ-Teva	3403	1716
(2Y RT) MBZ-	3369	1734
S2015	3376	1735

Fig. 1C

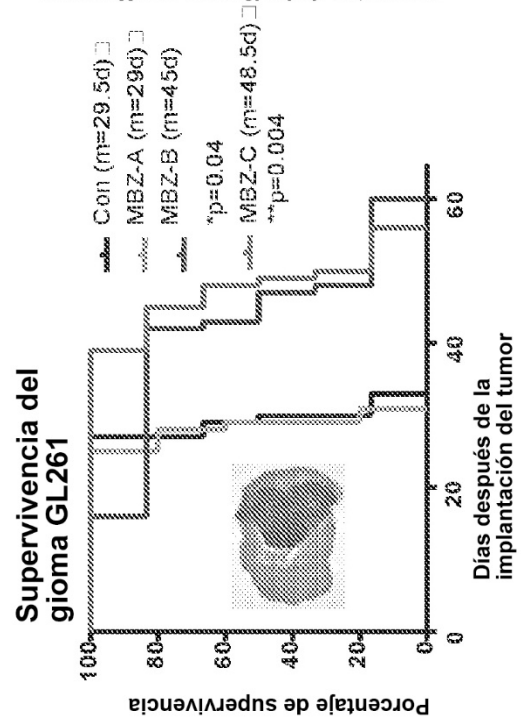


Fig. 1D

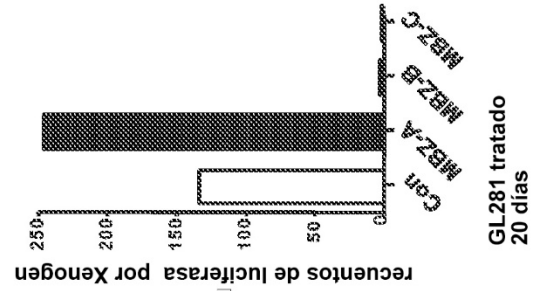


Fig. 1E

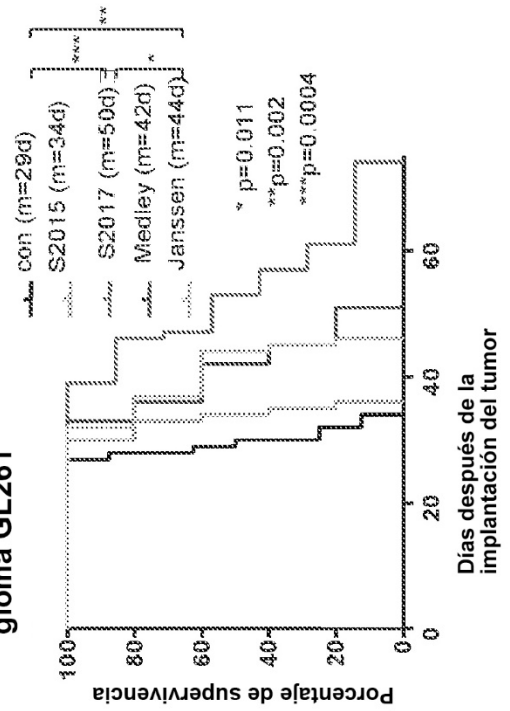


Fig. 2A

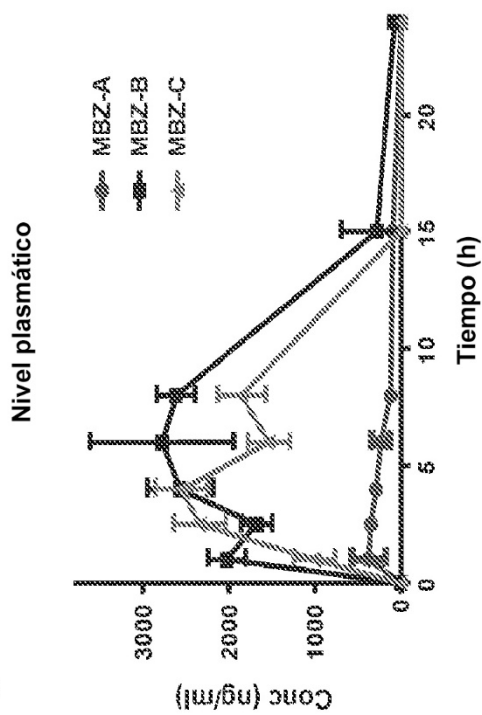


Fig. 2B

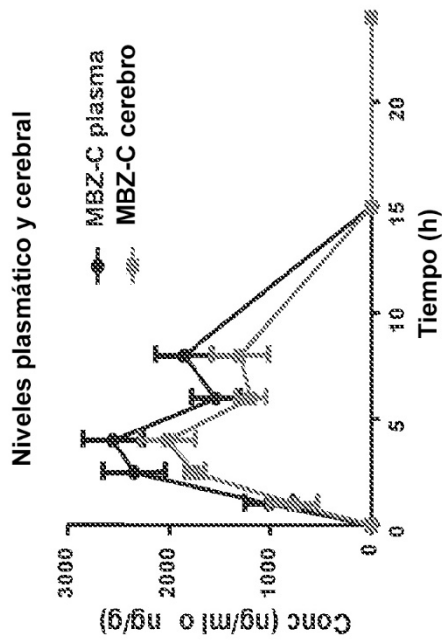


Fig. 2C

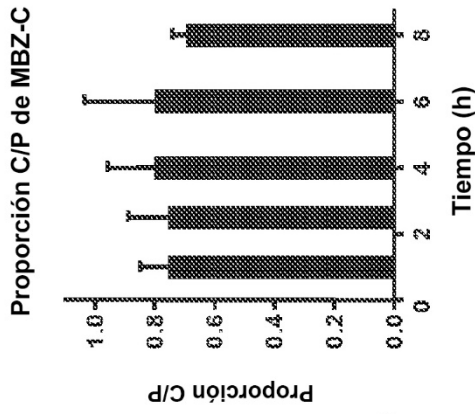


Fig. 2D

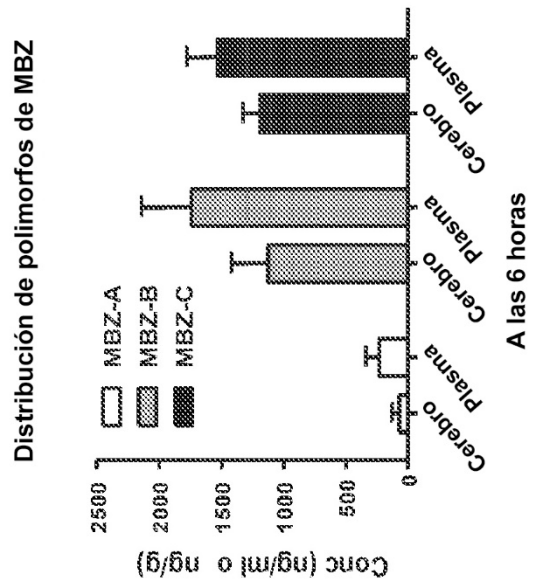


Fig. 2E

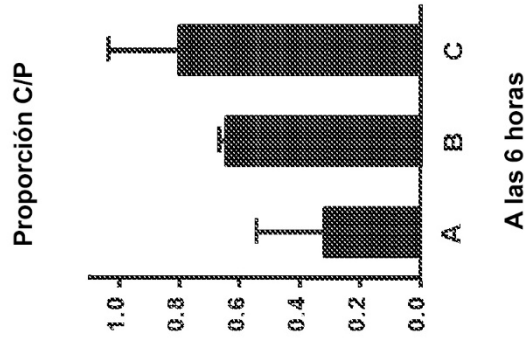


Fig. 2F

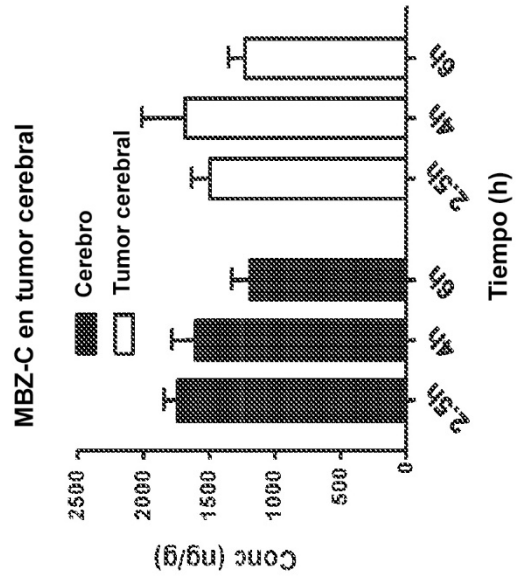


Fig. 3A Metabolitos de MBZ-C en plasma

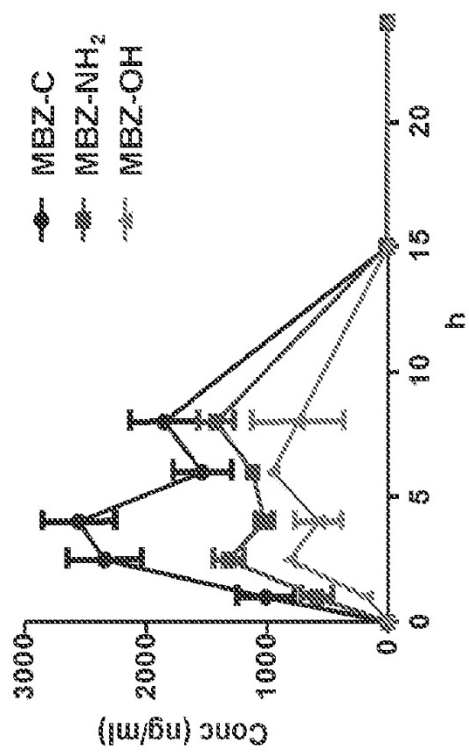


Fig. 3B Metabolitos de MBZ-C en el cerebro

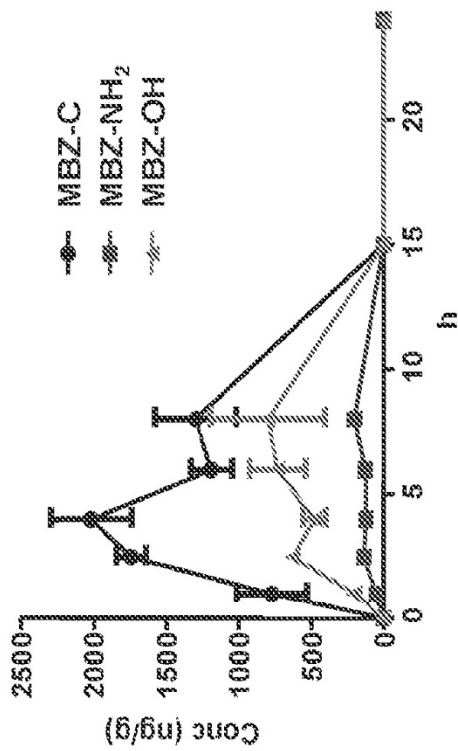


Fig. 3C Metabolitos de MBZ en el cerebro y el tumor

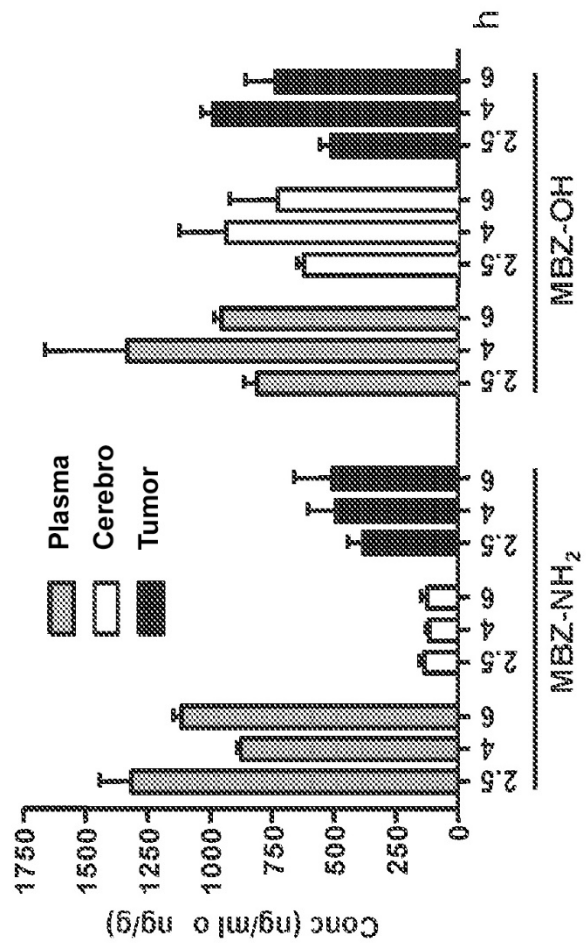


Fig. 3D

Inhibición de GL281 por metabolitos de MBZ

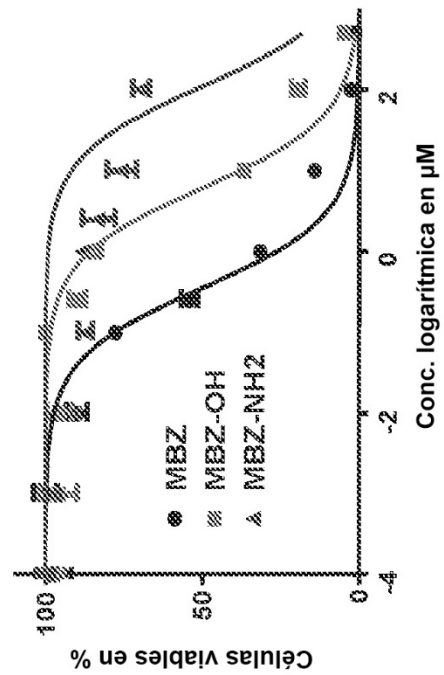


Fig. 4A

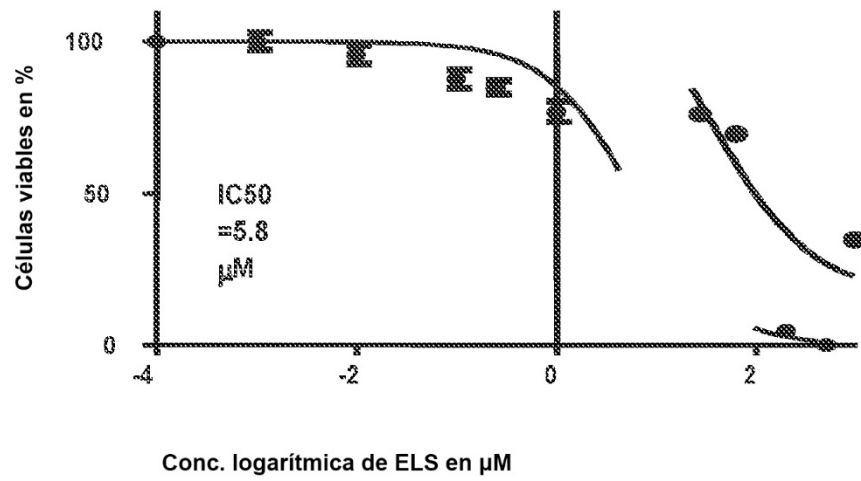


Fig. 4B

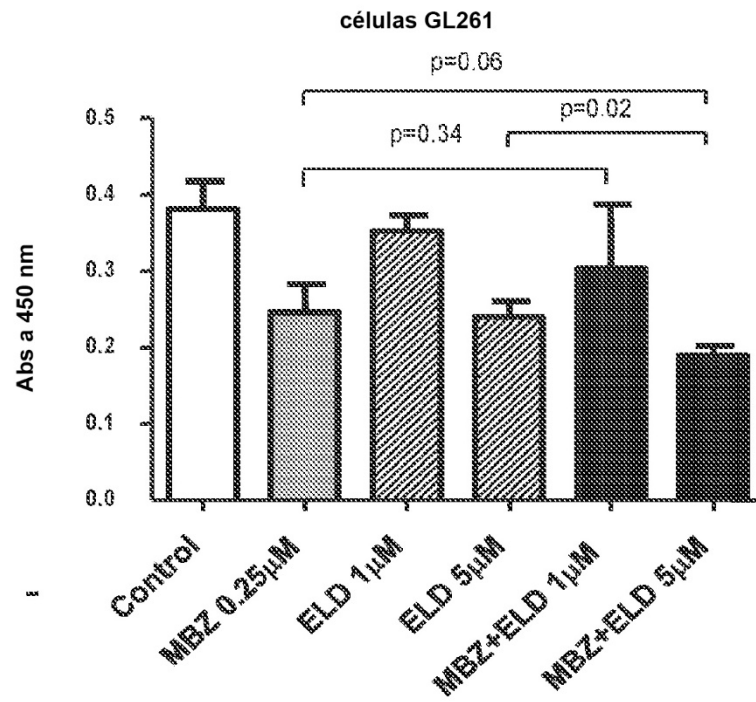


Fig. 4C

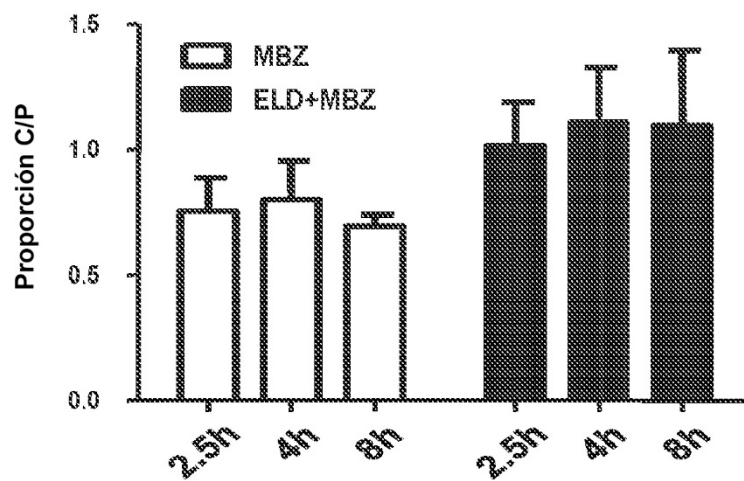


Fig. 5A

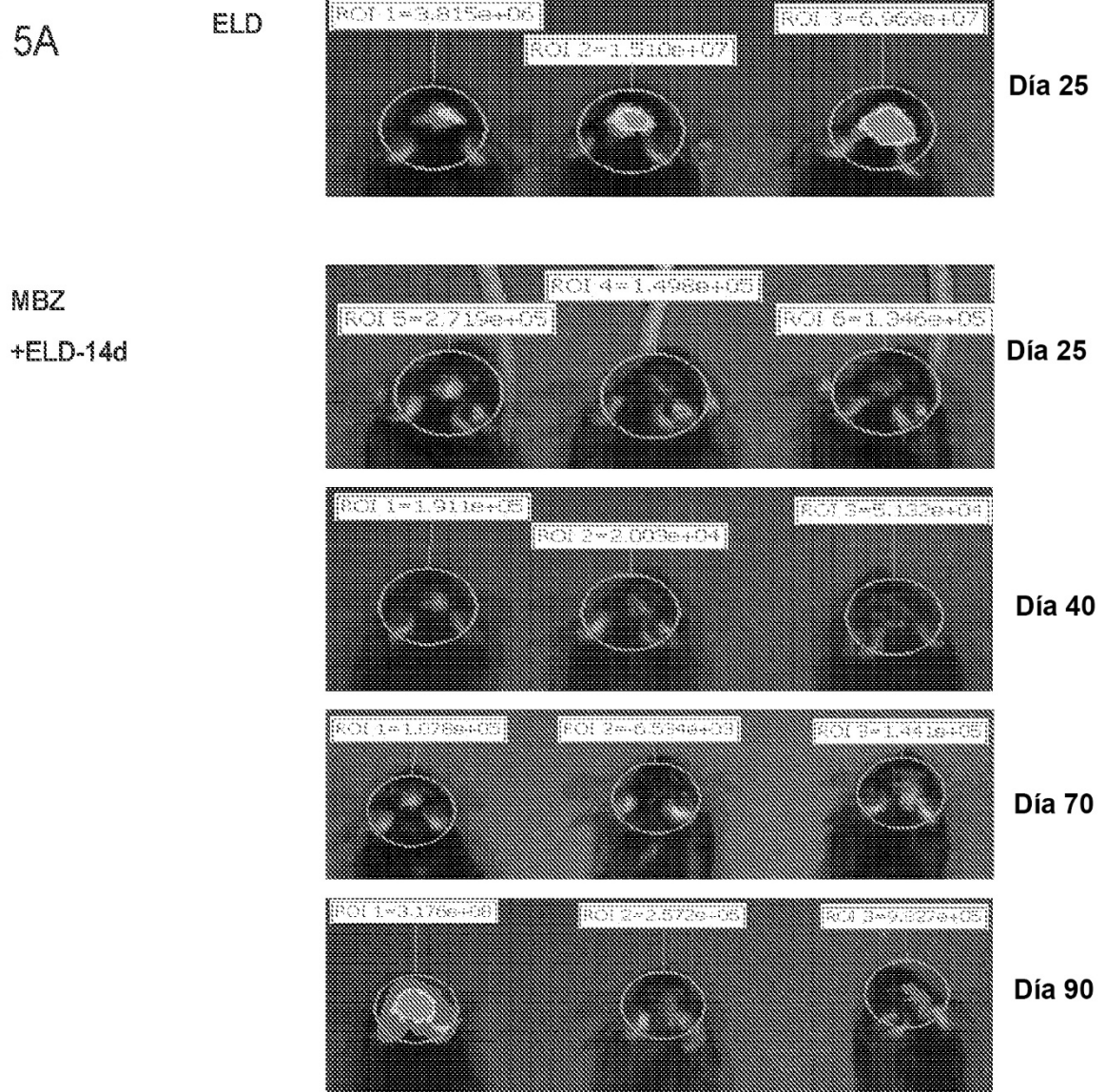


Fig. 5B Supervivencia del modelo de glioma GL281

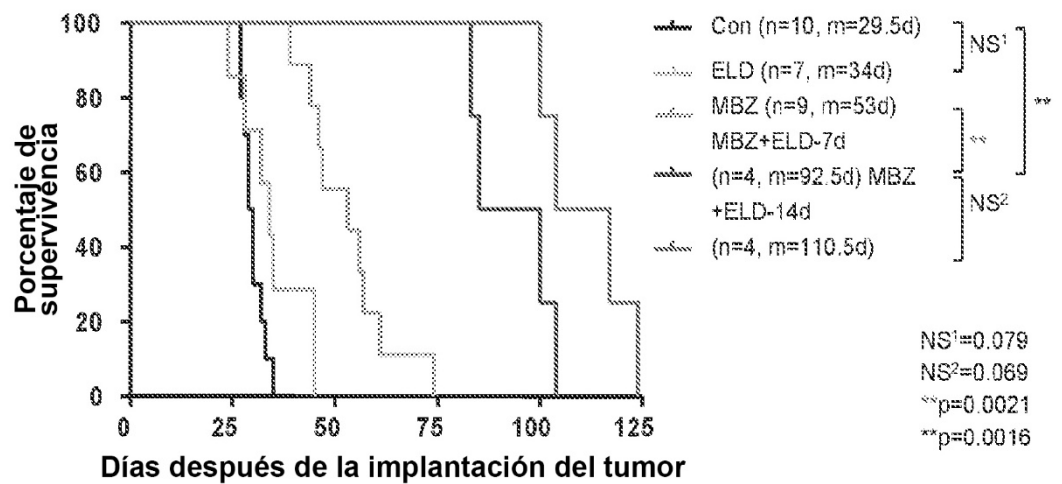
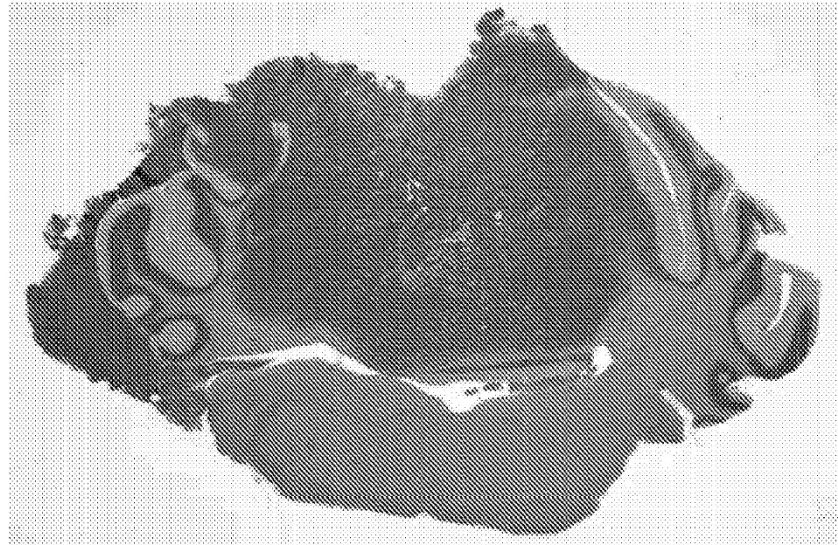


Fig. 5C



Xenoinjerto de meduloblastoma D425

Fig. 5D Supervivencia del xenoinjerto de meduloblastoma D425

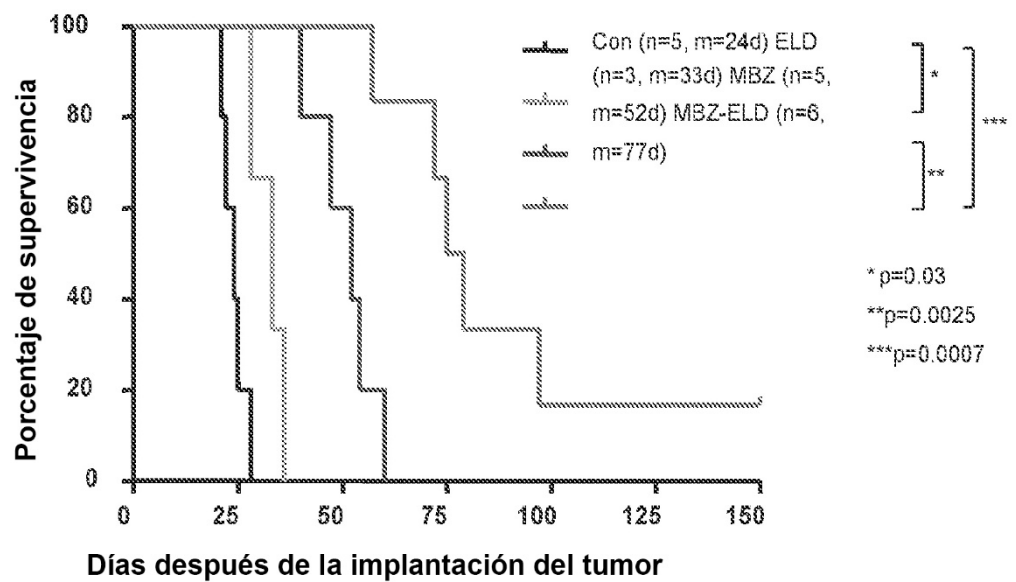


Fig. 6A

Polimorfo	Detección	Plasma			Cerebro				C/P
		T _{1/2} (h)	T _{max} (h)	C _{max} (ng/ml)	AUC _{0-24h} (h*ng/ml)	T _{1/2} (h)	T _{max} (h)	C _{max} (ng/g)	
A	MBZ	3,23	1	379,3	3052				
B	MBZ	3,18	6	2778,3	26474				
C	MBZ	0,90	4	2553,3	16039	1,64	4	2016	0,82
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	201,6	0,13
A	MBZ-OH		1	32,1	247				
B	MBZ-OH		8	744,7	4970				
C	MBZ-OH		6	951,7	5781		8	794,3	0,94

Fig. 6B

Fármaco	Detección	Plasma			Cerebro				¿Significativo?
		T _{max} (h)	C _{max} (ng/ml)	AUC (h*ng/ml)	T _{max} (h)	C _{max} (ng/g)	AUC (h*ng/g)	C/P AUC	
MBZ	MBZ	4	2553,3	15340	4	2016,0	11510	0,75	
ELD+MBZ	MBZ	2,5	1433,3	8636	2,5	1459,7	8904	1,03	No
MBZ	MBZ-NH ₂	8	1416,7	8264	8	201,6	1010	0,12	
ELD+MBZ	MBZ-NH ₂	2,5	1191,7	7828	8	387,8	2386	0,30	Sí
MBZ	MBZ-OH	2,5	810,0	4679	8	794,3	4135	0,88	
ELD+MBZ	MBZ-OH	2,5	491,0	2680	2,5	712,6	3475	1,30	No

Supervivencia del modelo en ratón de glioma GL261

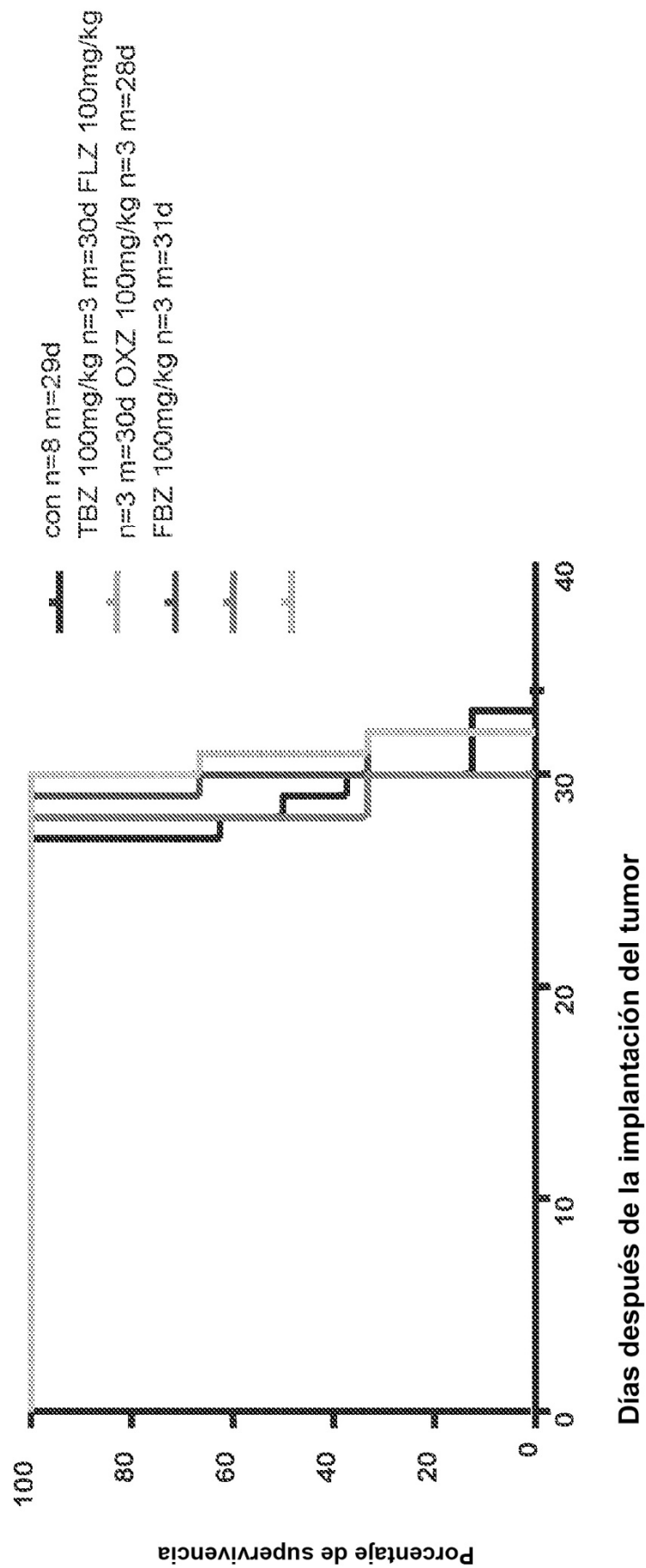


Fig. 7

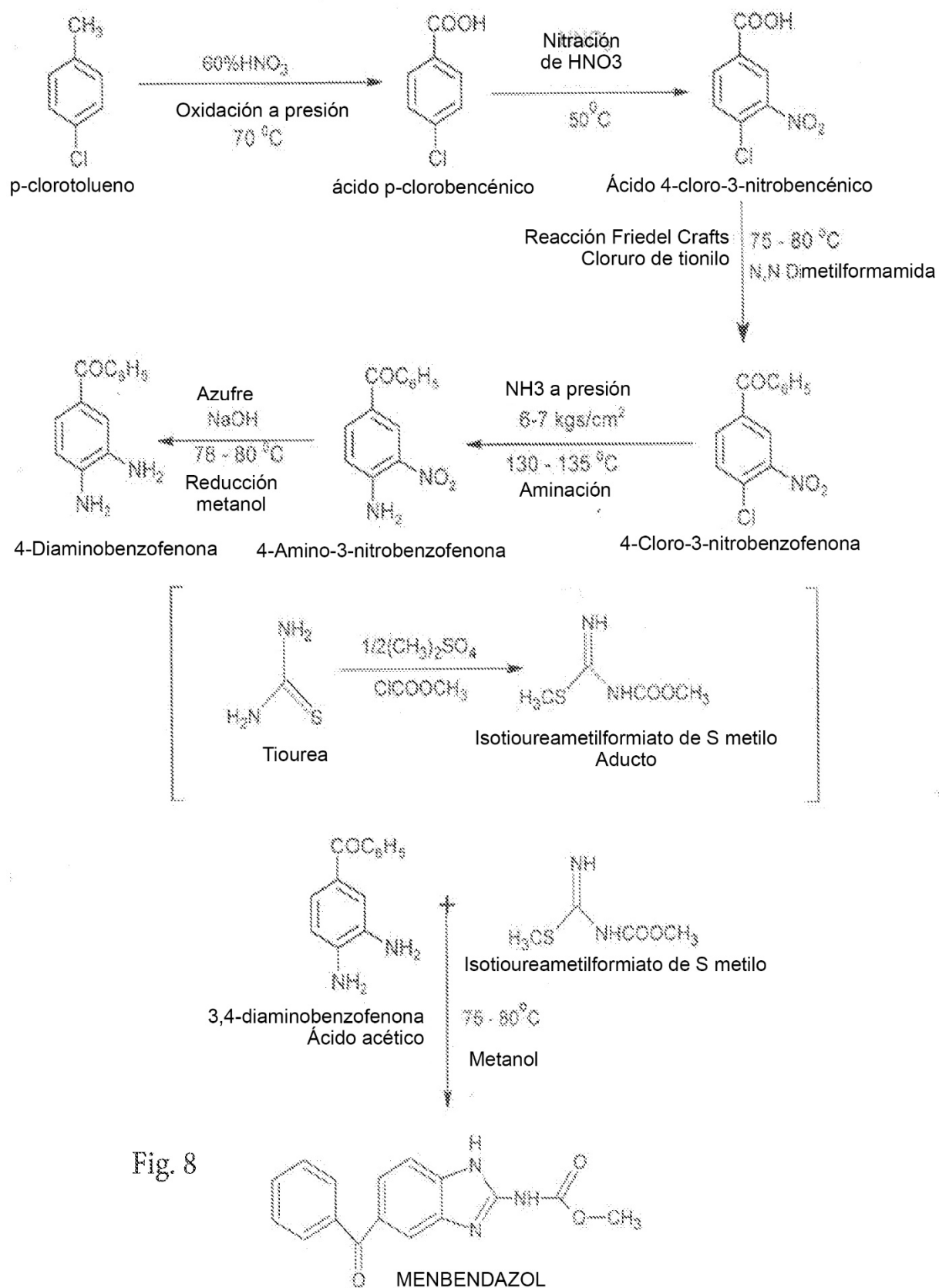
RUTA DE SÍNTESIS DE MENBENDAZOL

Fig. 8

Fig. 9A

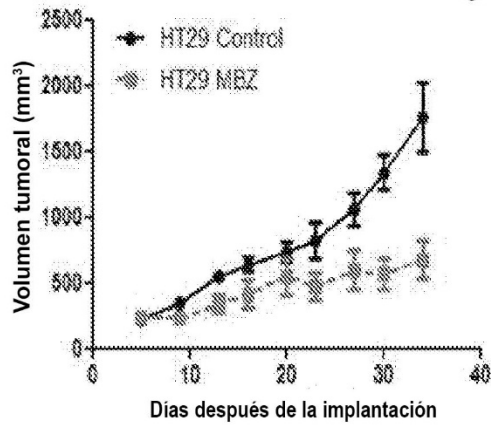


Fig. 9B

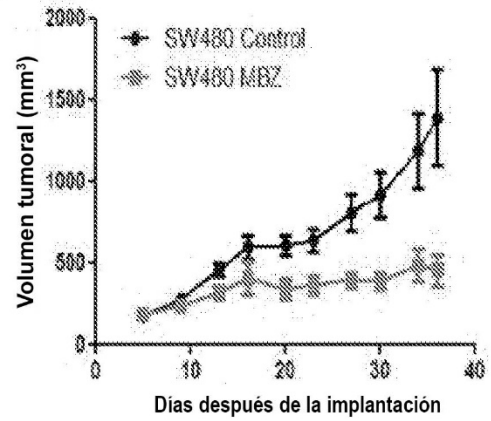


Fig. 9C

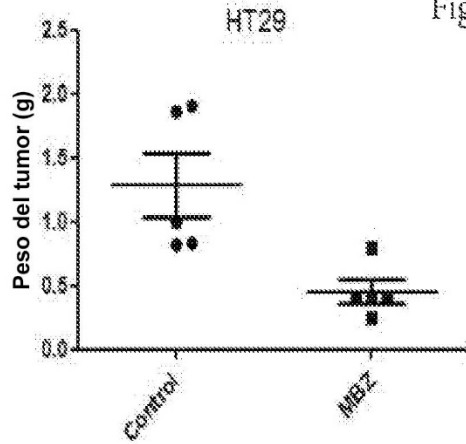


Fig. 9D

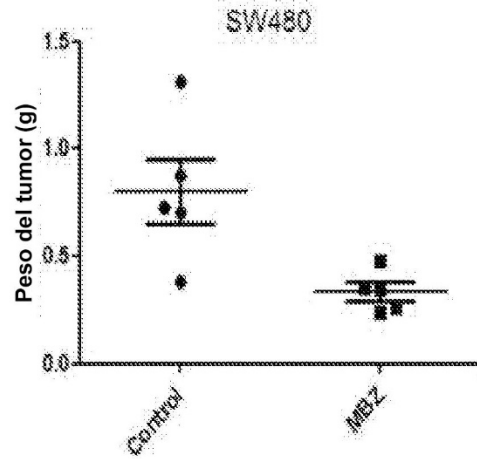


Fig. 9E

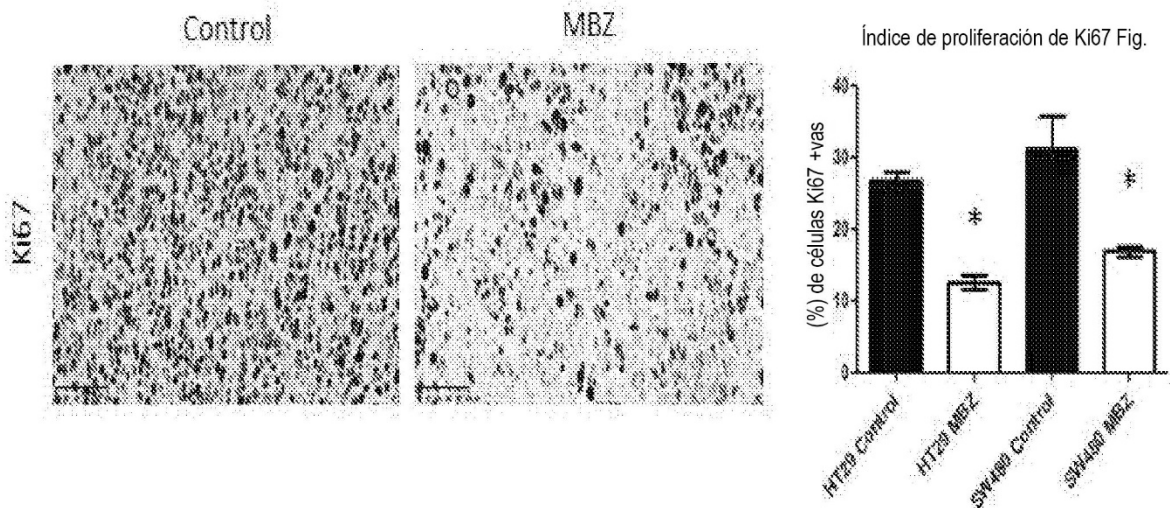


Fig. 10A

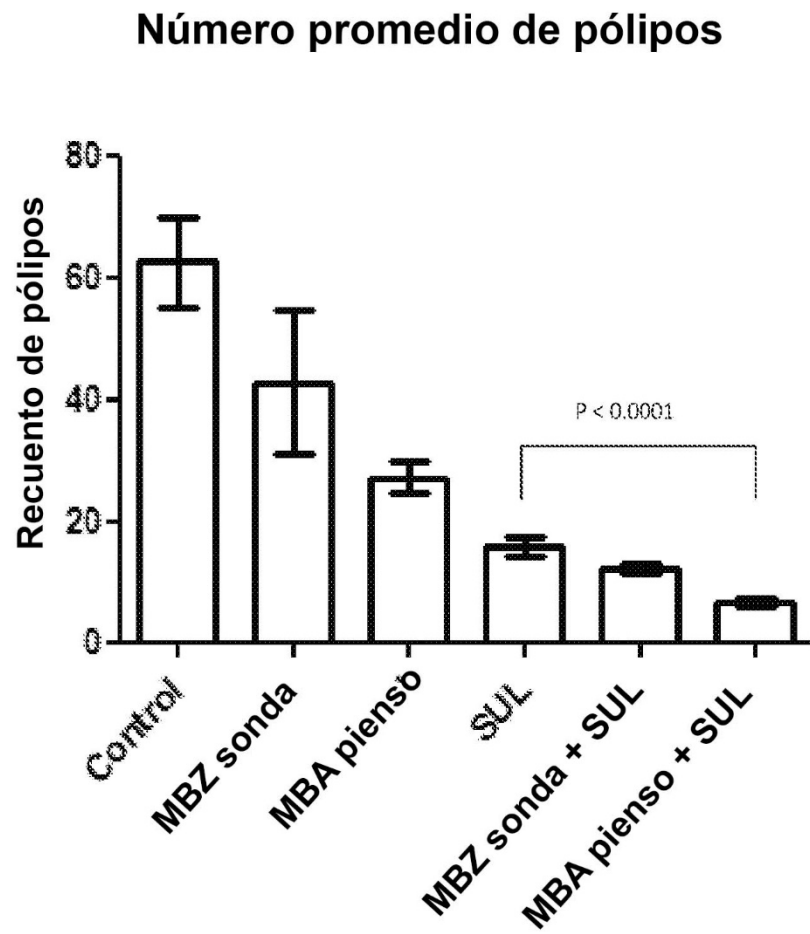


Fig. 10B

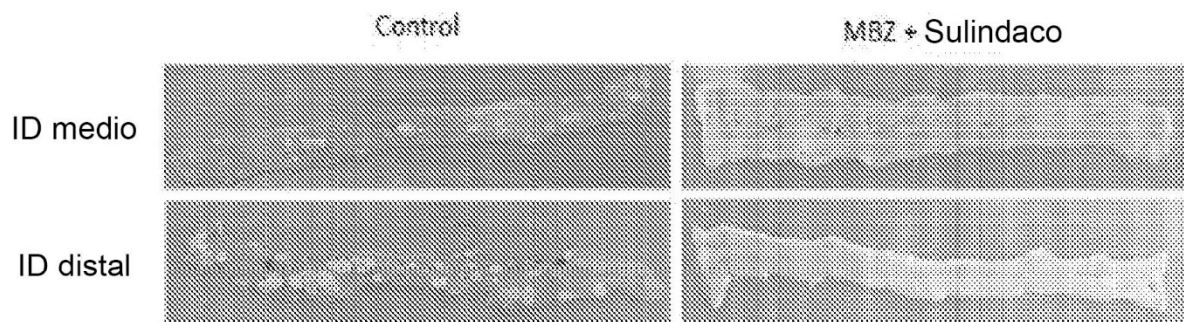


Fig. 10C

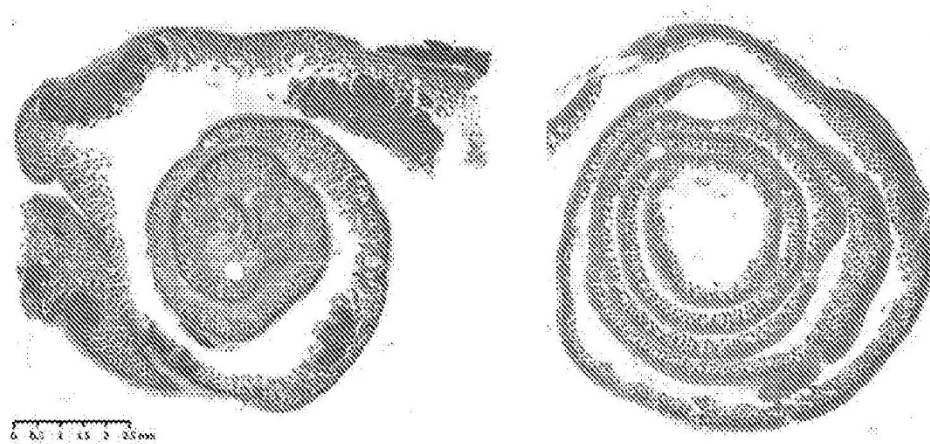


Fig.10D

Tabla 1

Grupo	Región	Medio	Distal	Colon	Total (% de inhibición)	Tamaño del pólipo (mm)			
						<1,0	1,0-2,0		
Control sin tratar	15,5±2,28	28,83 ± 3,74	16,92±2,37	1,25 ±0,33	62,5	32,76	19,83	2,1-3,0	>3,0
	4,58±0,65	12,42 ± 1,22	9,83 ± 1,4	0,42 ±0,19	27,25 (56%)	10,63	12	4,46	0,45
Sulindaco 160 p.p.m agua potable	4,77 ± 0,68	6,08 ± 0,94	3,62 ± 0,53	1,54 ±0,35	16 (74%)	8,46	6,08	1,23	0,15
MBZ 35 mg/kg ±Sulindaco 160 p.p.m.	2,42±0,41	2,42 ± 0,37	1,37 ±0,29	0,37 ±0,14	6,58 (90%)	3,73	2,58	0,22	0,05

Fig. 11A

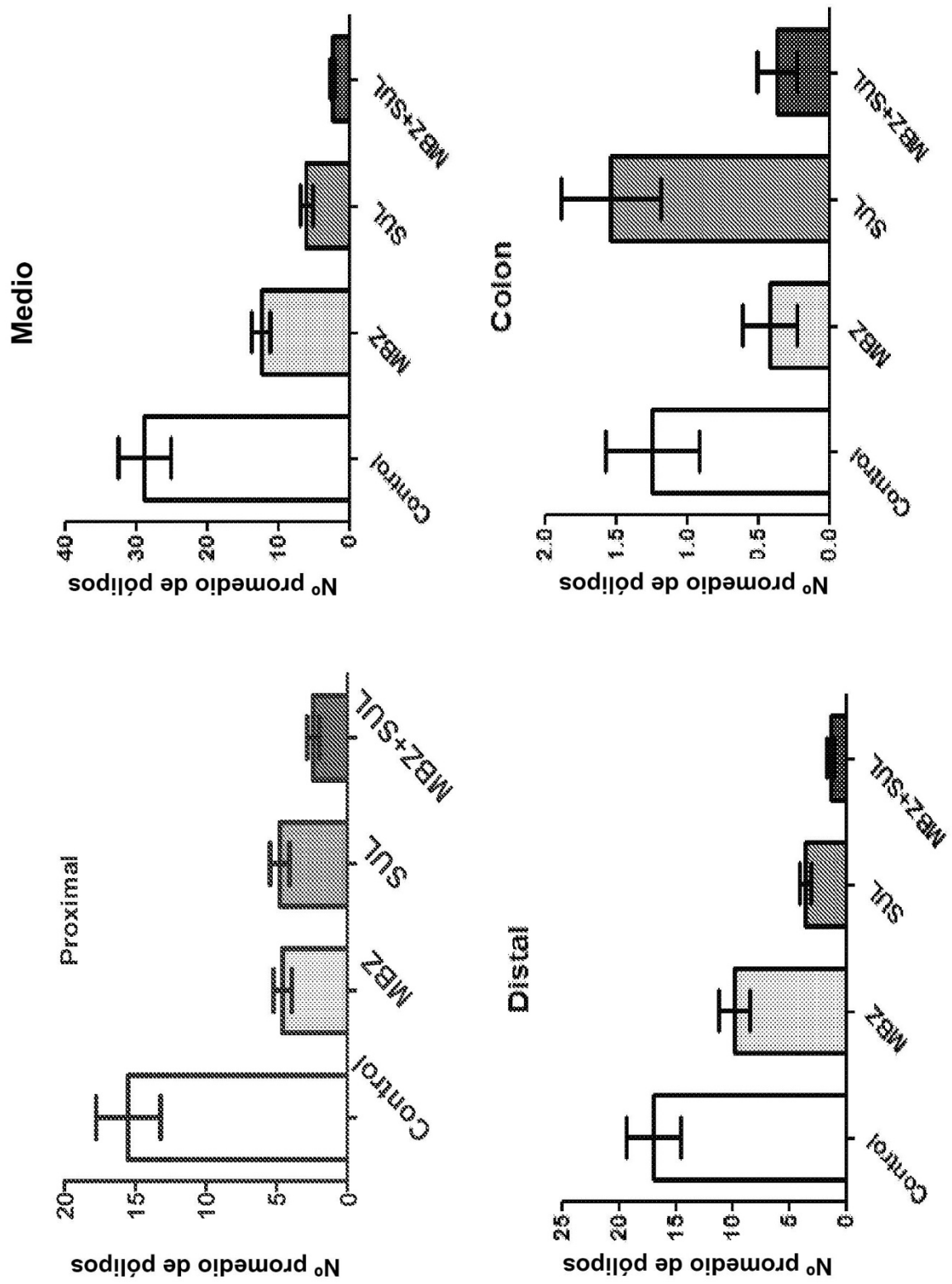


Fig. 11B

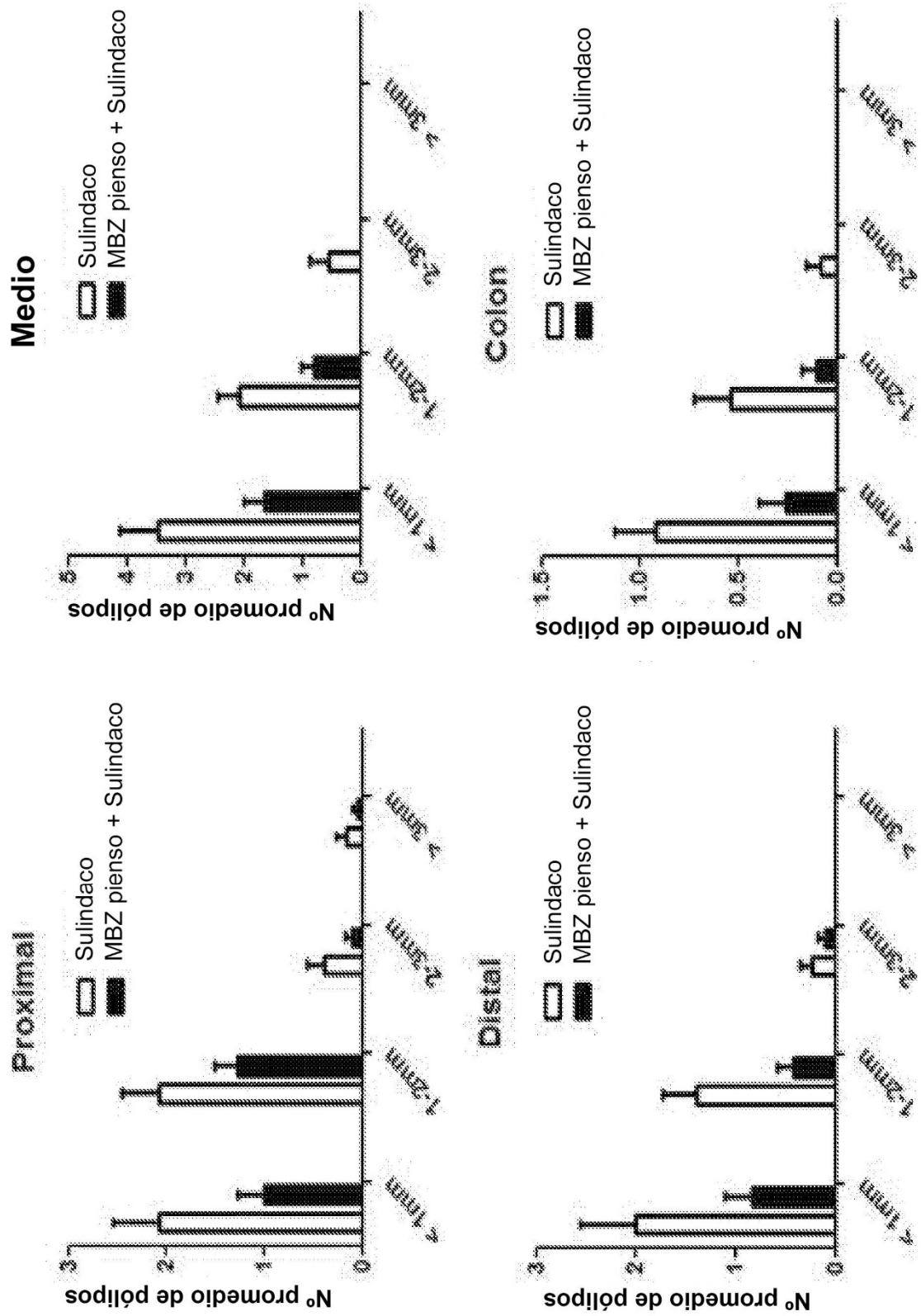


Fig. 11C

Análisis estadístico adicional

	Proximal	Valor de p	Medio	Valor de p	distal	Valor de p	Colon	Valor de p
Control sin tratar	15,5 ($\pm$ 2,28)		28,83 ($\pm$ 3,74)		16,92 ($\pm$ 2,37)		1,25 ($\pm$ 0,33)	
35 mg/kg MBZ pienso	4,58 ($\pm$ 0,65)	0,0001	12,42 ($\pm$ 1,22)	0,0004	9,83 ($\pm$ 1,40)	0,0174	0,42 ($\pm$ 0,19)	0,0397
160 ppm Sundilaco	4,77 ($\pm$ 0,68)	0,0001	6,08 ($\pm$ 0,94)	<0,0001	3,62 ($\pm$ 0,53)	<0,0001	1,54 ($\pm$ 0,35)	0,5562
35 mg/kg MBZ + 160 ppm Suiindaco	2,42 ($\pm$ 0,41)	<0,0001	2,42 ($\pm$ 0,37)	<0,0001	1,37 ($\pm$ 0,29)	<0,0001	0,37 ($\pm$ 0,14)	0,0083
	Sul frente a MBZ/Sul	0,0037	Sul frente a MBZ/Sul	0,0003	Sul frente a MBZ/Sul	0,0003	Sul frente a MBZ/Sul	0,0014

Fig. 12A

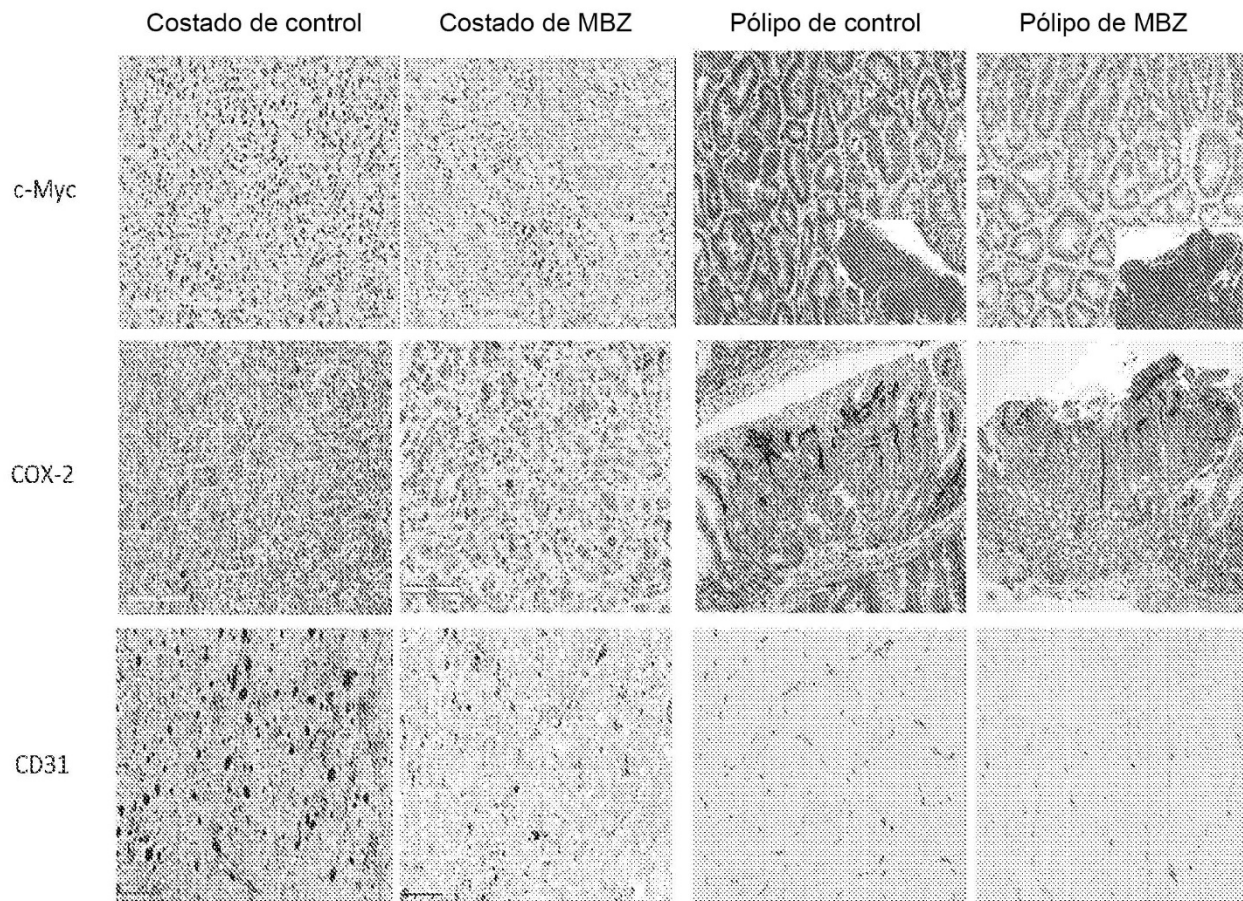


Fig. 12B

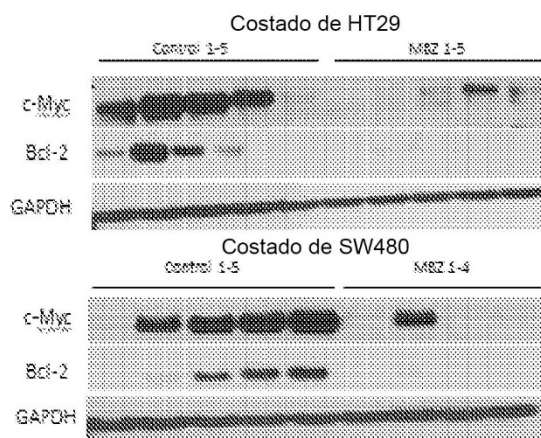


Fig. 12C

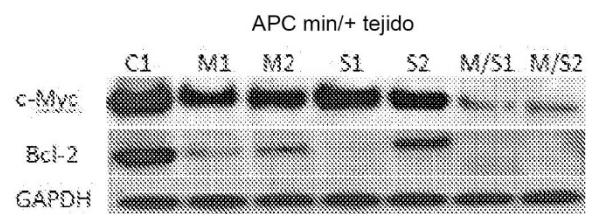


Fig. 13

