



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) PI 0717554-0 A2



(22) Data de Depósito: 24/09/2007
(43) Data da Publicação: 29/10/2013
(RPI 2234)

(51) Int.Cl.:
A61K 31/16

(54) Título: COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, MÉTODO PARA TRATAR CÂNCER E ALIVIAR OS EFEITOS COLATERAIS DO INIBIDOR DA HDAC, E, MÉTODO DE SE OBTER UM COMPLEXO DE QUELATO INIBIDOR DA HDAC DE METAL

(57) Resumo:

(30) Prioridade Unionista: 28/09/2006 US 60/848,300

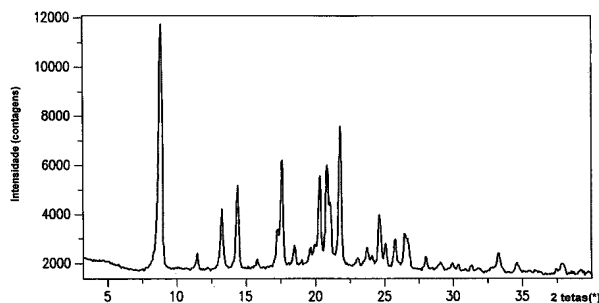
(73) Titular(es): Merck & Co., Inc

(72) Inventor(es): Arlene E. Mckeown, Thomas A. Miller

(74) Procurador(es): Momsen, Leonardos & CIA.

(86) Pedido Internacional: PCT US2007020609 de 24/09/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2008/039421 de 03/04/2008



“COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, MÉTODO PARA TRATAR CÂNCER E ALIVIAR OS EFEITOS COLATERAIS DO INIBIDOR DA HDAC, E, MÉTODO DE SE OBTER UM COMPLEXO DE QUELATO INIBIDOR DA HDAC DE METAL”

5 CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção provê composições farmacêuticas de um inibidor de HDAC e um composto de metal quelatável. Em uma forma de realização, a invenção provê um método para tratar câncer e aliviar os efeitos colaterais do inibidor de HDAC mediante administração da composição farmacêutica. Em outra forma de realização, a presente invenção também provê composições farmacêuticas de complexos de quelato inibidores de HDAC de metal. Em outra forma de realização, a invenção provê métodos de tratar do câncer mediante administração das composições farmacêuticas. A invenção provê composições cristalinas de complexos de quelato inibidores de HDAC de metal e métodos de produzi-los.

15 FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

Na totalidade deste pedido, são feitas referência a várias publicações por números arábicos dentro de parênteses. As referências completas para estas publicações podem ser encontradas no final deste relatório descritivo imediatamente antes das reivindicações.

O câncer é um distúrbio no qual uma população de células tem se tornado, em graus variáveis, insensíveis aos mecanismos de controle que normalmente reprimem a proliferação e a diferenciação. Por muitos anos, tem havido duas estratégias principais para o tratamento quimioterápico do câncer: a) bloquear a proliferação das células tumorais dependentes de hormônio pela interferência com a produção ou ação periférica dos hormônios sexuais; e b) matar as células do câncer diretamente pela sua exposição a substâncias citotóxicas, as quais danificam tanto as populações de células neoplásticas quanto as normais.

A terapia do câncer está também sendo tentada pela indução da diferenciação terminal das células neoplásticas (1). Nos modelos de cultura celular, a diferenciação tem sido relatada pela exposição das células a uma variedade de estímulos, incluindo: AMP cíclico e ácido retinóico (2, 3),
5 aclarrubicina e outras antraciclinas (4).

Não obstante os muitos avanços no campo da oncologia, a maioria dos tumores sólidos permanecem incuráveis nos estágios avançados. A terapia citotóxica é usada na maioria dos casos, entretanto ela causa frequentemente morbidez significativa ao paciente sem benefícios clínicos
10 significativos. Agentes menos tóxicos e mais específicos para tratar e controlar malignidades avançadas estão sendo explorados.

Existe evidência abundante de que a transformação neoplástica não destrói necessariamente o potencial das células do câncer para diferenciar (1, 5, 6). Existem muitos exemplos de células tumorais que não respondem
15 aos reguladores normais da proliferação e parecem ser bloqueados na expressão de seu programa de diferenciação, e ainda podem ser induzidas para diferenciar e cessar a replicação. Uma variedade de agentes, incluindo alguns compostos polares relativamente simples (5, 7 a 9), derivados da vitamina D e ácido retinóico (10 a 12), hormônios esteróides (13), fatores do
20 crescimento (6 a 14), proteases (15, 16), promotores tumorais (17, 18) e inibidores do DNA ou da síntese do RNA (4, 19 a 24), pode induzir várias linhagens celulares transformadas e explantes tumorais humanos primários para expressar características mais diferenciadas.

Os inibidores da histona desacetilase, tais como o ácido suberoilânilida hidroxiamida (SAHA), pertencentes a esta classe de agentes
25 que têm a capacidade de induzir a parada, diferenciação e/ou apoptose do crescimento das células tumorais (25). Estes compostos são dirigidos aos mecanismos inerentes à capacidade de uma célula neoplástica tornar-se maligna, já que elas não parecem ter toxicidade em doses eficazes para

inibição do crescimento tumoral nos animais (26). Existem várias linhas de evidência de que a acetilação e a desacetilação da histona são mecanismos pelos quais a regulação transcricional em uma célula é obtida (27). Pensa-se que estes efeitos ocorram através de mudanças na estrutura da cromatina pela

5 alteração da afinidade das proteínas da histona para com o DNA espiralado no nucleossoma. Existem cinco tipos de histonas que foram identificados nos nucleossomas (designados H1, H2A, H2B, H3 e H4). Cada nucleossoma contém dois de cada tipo de histona dentro do seu núcleo, exceto quanto ao H1, que se acha presente unicamente na porção externa da estrutura do

10 nucleossoma. Acredita-se que, quando as proteínas de histona sejam hipoacetiladas, exista uma afinidade mais elevada da histona à estrutura de fosfato do DNA. Esta afinidade faz com que o DNA seja rigorosamente ligado à histona e torne o DNA inacessível aos elementos e mecanismos reguladores transcricionais. A regulação dos estados acetilados ocorre através

15 do equilíbrio da atividade entre dois complexos enzimáticos, a histona acetil transferase (HAT) e a histona desacetilase (HDAC). Pensa-se que o estado hipoacetilado iniba a transcrição do DNA associado. Este estado hipoacetilado é catalisado por grandes complexos de multiproteínas que incluem as enzimas da HDAC. Em particular, tem sido verificado que as

20 HDACs catalisam a remoção dos grupos acetila das histonas do núcleo da cromatina.

SAHA [ZOLINZA[®] (vorinostat)] tem sido apresentado como sendo útil para tratar do câncer, seletivamente induzindo a diferenciação terminal das células neoplásticas, induzindo a parada do crescimento celular

25 e/ou induzindo a apoptose. Julga-se que a inibição da HDAC pelo SAHA ocorra através da interação direta com o sítio catalítico da enzima, como demonstrado pelos estudos de cristalografia de raios-X (28). Não se acredita que o resultado da inibição da HDAC tenha um efeito generalizado sobre o genoma, mas, ao invés disso, apenas afeta um pequeno subconjunto do

genoma (29). A evidência fornecida pelas microdisposições do DNA usando-se linhagens de células malignas cultivadas com inibidor de HDAC mostra que existe um número finito (1 a 2 %) de genes cujos produtos são alterados. Por exemplo, as células tratadas em cultura com inibidores da HDAC
5 apresentam uma indução consistente do inibidor p21 da cinase dependente de ciclina (30). Esta proteína desempenha um papel importante na parada do ciclo celular. Pensa-se que os inibidores da HDAC aumentem o índice de transcrição de p21 mediante a propagação do estado hiperacetilado das histonas na região do gene p21, dessa forma tornando o gene acessível ao
10 maquinismo transcricional. Os genes cuja expressão não seja afetada pelos inibidores da HDAC não apresentam mudanças na acetilação das histonas regionais associadas (31).

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção fornece composições farmacêuticas de
15 um inibidor da HDAC e um composto de metal suscetível de quelação. Em uma forma de realização, a invenção fornece um método de tratamento do câncer e alívio dos efeitos colaterais do inibidor da HDAC pela administração da composição farmacêutica. Em outra forma de realização, a presente invenção também fornece composições farmacêuticas dos complexos de
20 quelato inibidor da HDAC de metal. Em outra forma de realização, a invenção fornece métodos de tratar do câncer mediante a administração das composições farmacêuticas. A invenção fornece composições cristalinas de complexos de quelato inibidor da HDAC de metal e métodos para produzi-las.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

25 A Figura 1 mostra o perfil de dissolução do SAHA da parte das cápsulas de referência. As cápsulas contêm cerca de 100 mg de ingrediente ativo SAHA e excipientes.

A Figura 2 mostra o difratograma de raio-x para o complexo cristalino do quelato de SAHA de ferro.

A Figura 3 mostra o difratograma de raio-x para SAHA com o Difratômetro de Pó Automático Siemens D500. Figuras 3A a 3E: Forma I a V de SAHA.

A Figura 4 apresenta difratogramas de raio-x para a Forma I de SAHA medida com o difratômetro de raio-X X'PERT Pro Phillips.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A expressão “carreador farmacêuticamente aceitável” inclui qualquer um e todos os solventes, meios de dispersão, revestimentos, agentes antibacterianos e antifúngicos, agentes isotônicos e retardadores da absorção, e outros, compatíveis com a administração farmacêutica. Carreadores adequados são descritos na edição mais recente de Remington's Pharmaceutical Sciences, um texto de referência padrão na área, o qual fica aqui incorporado como referência. Lipossomas e veículos aquosos não lipossomas, tais como os óleos fixos, também podem ser usados. O uso de tais meios e agentes para substâncias farmacêuticamente ativas, é bem conhecido na técnica. Exceto na medida em que qualquer meio ou agente convencionais sejam incompatíveis com as Composições desta invenção, seu uso nas composições é considerado. Os compostos suplementares ativos também podem ser incorporados nas composições.

As siglas “f2” ou “F2” referem-se a um fator de similaridade determinado através de uma comparação ponto por ponto de um novo perfil de dissolução in vitro com um perfil de dissolução de referência in vitro, como mostrado na equação 1.

$$f_2 = 50 \log \left\{ \left[1 + 1/n \sum_{t=1}^n (R_t - T_t)^2 \right]^{-0.5} \times 100 \right\}$$

(Equação 1)

R_t refere-se ao percentual de composto dissolvido em cada ponto do tempo (t) para a referência. T_t refere-se ao percentual de composto

dissolvido em cada ponto do tempo (t) para a amostra de teste. n refere-se ao número de pontos do tempo usados para o cálculo. Os valores de f_2 de 50 ou mais são considerados como refletindo índices de dissolução in vitro semelhantes.

5 Para os fins desta invenção, os índices ou perfis de dissolução in vitro do SAHA inteiro da composição farmacêutica são medidos da composição farmacêutica inteira de acordo com as etapas e condições do Exemplo 4. Em uma forma de realização, os índices ou perfis de dissolução in vitro são medidos pelo uso de um USP Dissolution Apparatus II com
10 depressor helicoidal (Quality Lab Accessories L.L.C., Manville, NJ) em 900 ml de Tween a 2,0 % (TCI America, Portland, Oregon) em uma temperatura de $37 \pm 0,5$ °C, e pás giradas em 100 rpm. A composição farmacêutica total inclui o SAHA total e o composto de metal quelatável e, se a composição farmacêutica contiver uma casca de cápsula, carreador, excipiente, diluente,
15 agente desintegrador, lubrificante, aglutinante ou qualquer agente adicional descrito na Seção de Composições Farmacêuticas abaixo, a medição é realizada com aqueles componentes.

 A expressão “cerca de”, quando usada no contexto de uma quantidade, refere-se a ± 10 % da quantidade especificada.

20 Para os fins desta invenção, quanto aos padrões de difração de raio-X, dependendo da calibração, da amostra ou da instrumentação, os picos em 2θ podem deslocar-se até $\pm 0,3$ graus (erro) em uma direção. Por exemplo, todos os picos no padrão de difração de raio-X deslocam-se até +0,3 graus, ou até -0,3 graus. Um padrão de difração de raio-X ou picos dentro desse erro é
25 considerado o mesmo ou substancialmente semelhante.

Composição Farmacêutica compreendendo o Inibidor da HDAC e o composto de metal Quelatável

 Em uma forma de realização, a invenção provê uma composição farmacêutica compreendendo uma quantidade terapêuticamente

eficaz de inibidor da Histona Desacetilase (HDAC) e um composto de metal quelatável, e um carreador farmacologicamente aceitável. A composição farmacêutica pode formar o complexo de quelato inibidor da HDAC de metal in vivo quando administrada ao paciente.

5 Em uma forma de realização, o inibidor da HDAC é um derivado do ácido hidroxâmico. Em outra forma de realização, o inibidor da HDAC tem um ligando de ligação a metal (isto é, de ferro ou zinco), por exemplo o grupo carbonila, grupo hidroxila, grupo amino, grupo tiol, grupo amida, e outros grupos encontrados nos inibidores de HDAC conhecidos (por
10 exemplo, a Benzamida). Em uma forma de realização, o inibidor de HDAC é o ácido suberoiolanilida hidroxâmico (SAHA) ou seu sal, ou hidrato ou solvato farmacologicamente aceitáveis. Em uma forma de realização, o SAHA total na composição farmacêutica tem um perfil de dissolução in vitro com um fator de similaridade (f_2) de pelo menos 50 a 100, em comparação com o perfil de
15 dissolução de referência mostrado na Figura 1. Em uma forma de realização, o f_2 é 56 a 100. Em uma forma de realização, o f_2 é 60 a 100. Em uma forma de realização, o f_2 é 65 a 100. Em outra forma de realização, o f_2 é 80 a 100. Em uma outra forma de realização, a composição farmacêutica é uma cápsula única, em que a quantidade do SAHA é de cerca de 100 mg.

20 Em uma forma de realização, o SAHA total na composição farmacêutica é de 43 a 63 % dissolvidos em 10 minutos, 66 a 86 % dissolvidos em 30 minutos, e de 77 a 97 % dissolvidos em 60 minutos, in vitro. Em uma forma de realização, o SAHA total da composição farmacêutica é de 52 a 72 % dissolvidos em 15 minutos, de 66 a 86 %
25 dissolvidos em 30 minutos, e de 73 a 93 % dissolvidos em 45 minutos, in vitro. Em outra forma de realização, o SAHA total da composição farmacêutica é de 43 a 63 %, dissolvidos em 10 minutos, de 52 a 72 % dissolvidos em 15 minutos, de 58 a 78 % dissolvidos em 20 minutos, 66 a 86 % dissolvidos em 30 minutos, 73 a 93 % dissolvidos em 45 minutos e 77 a 97

% dissolvidos em 60 minutos, in vitro. Em uma forma de realização, o SAHA total da composição farmacêutica é de 46 a 60 % em peso dissolvidos em 10 minutos, 55 a 69 % em peso dissolvidos em 15 minutos, 61 a 75 % dissolvidos em 20 minutos, 69 a 83 % dissolvidos em 20 minutos, 76 a 90 % dissolvidos em 45 minutos, e 80 a 94 % dissolvidos em 60 minutos, in vitro. Em uma forma de realização, pelo menos 45 %, porém menos ou igual a 75 % do SAHA total, são dissolvidos em 15 minutos, pelo menos 75 % do SAHA total são dissolvidos em 60 minutos.

O inibidor da HDAC ou composto de metal quelatável pode estar na forma amorfa. O inibidor da HDAC ou composto de metal quelatável pode ser micronizado, ou pode ser aglomerado, de grânulos particulados, pós, óleos, suspensões oleosas ou de qualquer outra forma de sólido.

Em uma forma de realização particular, o inibidor da HDAC é o ácido suberoilanilida hidroxâmico cristalino. Em uma forma de realização, o SAHA cristalino é a Forma I da SAHA e caracterizado por um padrão de difração de raio-X substancialmente semelhante àquele apresentado na Figura 3A. Em outra forma de realização, a SAHA cristalina é a Forma I da SAHA e caracterizada por um padrão de difração de raio-X substancialmente semelhante àquele apresentado na Figura 4. Em uma forma de realização, a Forma I da SAHA é caracterizada por um padrão de difração de pó de raio-X com radiação $K\alpha$ de cobre, incluindo os picos característicos em 9,0, 9,4, 17,5, 19,4, 20,0, 24,0, 24,4, 24,8, 25,0, 28,0 graus 2θ . Em outra forma de realização, a Forma I da SAHA é caracterizada por um padrão de difração de pó de raio-X com radiação $K\alpha$ de cobre, incluindo os picos característicos em cerca de 9,0, 9,4, 17,5, 19,4, 20,0, 24,0, 24,4, 24,8, 25,0, 28,0 e 43,3 graus 2θ . Em uma forma de realização, a Forma I da SAHA é caracterizada por um padrão de pó de difração de raio-X com radiação $K\alpha$ de cobre, incluindo os picos característicos em 9,4, 17,5, 19,4, 20,0, 24,0 e 28,0 graus 2θ . Em outra forma de realização, a forma I do ácido suberoilanilida hidroxâmico (SAHA)

é caracterizada por um padrão de difração de pó de raio-X que inclui os picos característicos em cerca de 9,4, 17,5, 19,4, 20,0, 24,0 e 28,0 graus 2θ , em que a difração de pó de raio-X é medida com uma fonte de raio-X de Cobre; e ainda caracterizada por um termograma de Calorimetria de Varredura Diferencial (DSC) tendo um único valor máximo em cerca de $164,4 \pm 2,0$, medido por um Instrumento DSC 6 Elmer Perkins. Em outra forma de realização, a Forma I do ácido suberoilânilda hidroxâmico (SAHA) é caracterizada por um padrão de difração de pó de raio-X incluindo os picos característicos em cerca de 9,4, 17,5, 19,4, 20,0, 24,0 e 28,0 graus 2θ , e picos faltos em cerca de 13,4 a 14,0 e 22,7 a 23,0 graus 2θ , em que a difração de pó de raio-X é medida com uma fonte de raio-X de Cobre. Em uma outra forma de realização, a Forma I do ácido suberoilânilda hidroxâmico é caracterizada por um padrão de difração de pó de raio-X incluindo os picos característicos em 9,1, 10,8, 12,3, 17,2, 19,2, 19,8, 23,7, 24,1, 25,7, 26,8 e 27,7 graus 2θ e faltos dos picos em 13,4 a 14,0 e 22,7 a 23,0 graus 2θ com o uso de uma fonte de raio-X de Cobre.

Em uma forma de realização, a Forma um da SAHA é caracterizada por um padrão de difração de pó de raio-X com radiação $K\alpha$ de cobre, incluindo os picos característicos em 9,0, 9,4, 17,5, 19,4, 20,0, 24,0, 24,4, 24,8, 25,0, 28,0 graus 2θ , e faltando os picos em 13,4 a 14,0 e 22,7 a 23,0 graus 2θ . Em outra forma de realização, a Forma I da SAHA é caracterizada por um padrão de difração de pó de raio-X com radiação $K\alpha$ de cobre, incluindo os picos característicos em 9,0, 9,4, 17,5, 19,4, 20,0, 24,0, 24,4, 24,8, 25,0, 28,0, 43,3 graus 2θ e carentes dos picos 13,4 a 14,0 e 22,7 a 23,0 graus 2θ . Em uma outra forma de realização, a Forma I da SAHA é adicionalmente caracterizada pela falta de pelo menos um pico em cerca de <8,7, 10,0 a 10,2, 13,4 a 14,0, 15,0 a 15,2, 17,5 a 19,0, 20,1 a 20,3, 21,1 a 21,3, 22,0, a 22,22, 22,7 a 23,0, 25,0 a 25,5, 26,0 a 26,2 e 27,4 a 27,6 graus 2θ .

Em outra forma de realização a Forma I da SAHA é caracterizada ainda por um termograma de Calorimetria de Varredura Diferencial (DSC) tendo um valor máximo único de cerca de $164,4 \pm 2,0$, medido por um Instrumento de DSC 6 Perkin Elmer. Em uma forma de
5 realização, a Forma I da SAHA tem parâmetros celulares unitários de $a = 10,9$ Å, $b = 7,9$ Å, $c = 16,4$ Å, $\alpha = 90^\circ$, $\beta = 97,8^\circ$, $\gamma = 90^\circ$, grupo especial $P2_1/n$.

Em uma forma de realização particular, o ácido suberoilanilida hidroxâmico cristalino é a Forma IV de SAHA e é caracterizado por um padrão de difração de pó de raio-X com radiação $K\alpha$ de cobre, incluindo
10 picos característicos em cerca de 8,8, 9,3, 11,0, 12,4, 17,4, 19,4, 19,9, 22,4, 22,9, 23,83, 24,2, 24,8, 25,8, 27,0, 27,8, 28,4 graus 2θ .

Em uma forma de realização, a invenção provê uma cápsula única compreendendo cerca de 100 mg de ácido suberoilanilida hidroxâmico e o composto de metal quelatável, em que a SAHA total tem um perfil de
15 dissolução in vitro caracterizado por: pelo menos 45 %, porém igual ou menos do que 75 % da SAHA total são dissolvidos em 15 minutos, pelo menos 75 % da SAHA total são dissolvidos em 60 minutos, em que a SAHA seja cristalina e caracterizada por um padrão de difração de pó de raio-X com radiação $K\alpha$ de cobre, incluindo os picos característicos em 9,0, 9,4, 17,5,
20 19,4, 20,0, 24,0, 24,4, 24,8, 25,0, 28,0 graus 2θ e faltando picos em 13,4 a 14,0 e 22,7 a 23,0 graus 2θ .

Em uma forma de realização, a invenção provê uma cápsula única compreendendo cerca de 100 mg do ácido suberoilanilida hidroxâmico, e o composto de metal quelatável, em que a SAHA total tem um perfil de
25 dissolução in vitro caracterizado por: pelo menos 45 %, porém menos ou igual a 75 % da SAHA total, são dissolvidos em 15 minutos, pelo menos 75 % da SAHA total são dissolvidos em 60 minutos, em que a SAHA é cristalina e caracterizada por um padrão de difração de pó de raio-X com radiação $K\alpha$ de cobre, incluindo os picos característicos em 9,4, 17,5, 19,4, 20,0, 24,0 e

28,0 graus 2θ , em que a difração de raio-X é medida com uma fonte de raio-X de Cobre; e ainda caracterizada por um termograma de Calorimetria de Varredura Diferencial (DSC) tendo um valor máximo único em cerca de $164,4 \pm 2,0$, medido por um Instrumento de DSC 6 Perkin Elmer.

5 Em uma forma de realização, a invenção provê uma cápsula única contendo cerca de 100 mg de ácido suberoilânilda hidroxâmico, e o composto de metal quelatável, em que a SAHA total tem um perfil de dissolução in vitro caracterizado por: pelo menos, porém menos ou igual a 75 % da SAHA total são dissolvidos em 15 minutos, pelo menos 75 % da SAHA total são dissolvidos em 60 minutos, em que a SAHA é cristalina e
10 caracterizada por um padrão de difração de pó de raio-X com radiação $K\alpha$ de cobre, incluindo picos característicos em 9,1, 10,8, 12,3, 17,2, 19,2, 19,8, 23,7, 24,1, 25,7, 26,8 e 27,7 graus 2θ e faltando picos em 13,4 a 14,0 e 22,7 a 23,0 graus 2θ usando uma fonte de raio-X de cobre.

15 Em outra forma de realização, a invenção provê uma cápsula única compreendendo cerca de 100 mg de ácido suberoilânilda hidroxâmico, e o composto de metal quelatável, em que a SAHA total tem um perfil de dissolução in vitro com um fator de similaridade (f_2) de pelo menos 50 a 100 em comparação com o perfil de dissolução de referência mostrado na Figura
20 1, em que a SAHA é cristalina e caracterizada por um padrão de difração de pó de raio-X com radiação $K\alpha$ de cobre, incluindo picos característicos em 9,0, 9,4, 17,5, 19,4, 20,0, 24,0, 24,4, 24,8, 25,0, 28,0 graus 2θ , e faltando um pico em 13,4 a 14,0 e 22,7 a 23,0 graus 2θ .

25 Em outra forma de realização, a invenção provê uma cápsula única compreendendo cerca de 100 mg de ácido suberoilânilda hidroxâmico, e o composto de metal quelatável, em que a SAHA total tem um perfil de dissolução in vitro com um fator de similaridade (f_2) de pelo menos 50 a 100 em comparação com o perfil de dissolução de referência mostrado na Figura
1, em que a SAHA é cristalina e caracterizada por um padrão de difração de

pó de raio-X com radiação $K\alpha$ de cobre, incluindo picos característicos em 9,4, 17,5, 19,4, 20,0, 24,0 e 28,0 graus 2θ , em que a difração de raio-X é medida com uma fonte de raio-X de Cobre; e ainda caracterizada por um termograma de Calorimetria de Varredura Diferencial (DSC) tendo um valor máximo único em cerca de $164,4 \pm 2,0$, medido por um Instrumento de DSC 6 Perkin Elmer.

Em outra forma de realização, a invenção provê uma cápsula única compreendendo cerca de 100 mg de ácido suberoilânida hidroxâmico, e o composto de metal quelatável, em que a SAHA inteira tem um perfil de dissolução in vitro com um fator de similaridade (f_2) de pelo menos 50 a 100 em comparação com o perfil de dissolução de referência mostrado na Figura 1, em que a SAHA é cristalina e caracterizada por um padrão de difração de pó de raio-X com radiação $K\alpha$ de cobre, incluindo picos característicos em 9,1, 10,8, 12,3, 17,2, 19,2, 19,8, 23,7, 24,1, 25,7, 26,8 e 27,7 graus 2θ e faltando picos em 13,4 a 14,0 e 22,7 a 23,0 graus 2θ com o uso de uma fonte de raio-X de Cobre.

Em uma outra forma de realização, a invenção provê uma cápsula única compreendendo cerca de 100 mg de ácido suberoilânida hidroxâmico, e o composto de metal quelatável, em que a SAHA inteira tem um perfil de dissolução in vitro caracterizado por 43 a 63 % dissolvidos em 10 minutos, 66 a 86 % dissolvidos em 30 minutos, e 77 a 97 % dissolvidos em 60 minutos, em que a SAHA é cristalina e caracterizada por um padrão de difração de pó de raio-X com radiação $K\alpha$ de cobre, incluindo picos característicos em 9,0, 9,4, 17,5, 19,4, 20,0, 24,0, 24,4, 24,8, 25,0, 28,0 graus 2θ , e faltando picos em 13,4 a 14,0 e 22,7 a 23,0 graus 2θ .

Em uma outra forma de realização, a invenção provê uma cápsula única compreendendo cerca de 100 mg de ácido suberoilânida hidroxâmico, e o composto de metal quelatável, em que a SAHA inteira tem um perfil de dissolução in vitro caracterizado por 43 a 63 % dissolvidos em

10 minutos, 66 a 86 % dissolvidos em 30 minutos, e 77 a 97 % dissolvidos em 60 minutos, em que a SAHA é cristalina e caracterizada por um padrão de difração de pó de raio-X com radiação $K\alpha$ de cobre, incluindo picos característicos em 9,4, 17,5, 19,4, 20,0, 24,0 e 28,0 graus 2θ , em que a difração de raio-X é medida com uma fonte de raio-X de cobre; e ainda caracterizada por um termograma de Calorimetria de Varredura Diferencial (DSC) tendo um valor máximo único em cerca de $164 \pm 2,0$, medido por um Instrumento DSC 6 Perkin Elmer tendo um valor máximo único em cerca de $164,4 \pm 2,0$, medido por um Instrumento de DSC 6 Perkin Elmer.

10 Em uma outra forma de realização, a invenção provê uma cápsula única compreendendo cerca de 100 mg de ácido suberoilanilida hidroxâmico, e o composto de metal quelatável, em que a SAHA inteira tem um perfil de dissolução in vitro caracterizado por 43 a 63 % dissolvidos em 10 minutos, 66 a 86 % dissolvidos em 30 minutos, e 77 a 97 % dissolvidos em 60 minutos, em que a SAHA é cristalina e caracterizada por um padrão de difração de pó de raio-X com radiação $K\alpha$ de cobre, incluindo picos característicos em 9,1, 10,8, 12,3, 17,2, 19,2, 19,8, 23,7, 24,1, 25,7, 26,8 e 27,7 graus 2θ e faltando picos em 13,4 a 14,0 e 22,7 a 23,0 graus 2θ com o uso de uma fonte de raio-X de Cobre.

20 Em uma outra forma de realização, a invenção provê uma cápsula única compreendendo cerca de 100 mg de ácido suberoilanilida hidroxâmico, e o composto de metal quelatável, em que a SAHA inteira tem um perfil de dissolução in vitro caracterizado por 43 a 63 % dissolvidos em 10 minutos, 66 a 86 % dissolvidos em 30 minutos, e 77 a 97 % dissolvidos em 60 minutos, em que a SAHA é cristalina e caracterizada por um padrão de difração de pó de raio-X com radiação $K\alpha$ de cobre, incluindo os picos característicos em 9,0, 9,4, 17,5, 19,4, 20,0, 24,0, 24,4, 24,8, 25,0, 28,0 graus 2θ , e faltando picos em 13,4 a 14,0 e 22,7 a 23,0 graus 2θ .

Em uma forma de realização, o composto de metal quelatável

compreende ferro. O composto de ferro pode estar em qualquer forma biodisponível ao paciente, que forma o complexo de quelato inibidor do HDAC de ferro in situ, por exemplo uma forma de composição farmacêutica tal como a forma de tablete ou de cápsula. Em uma forma de realização, o

5 composto de ferro é um suplemento de ferro na forma de gliconato ferroso, gliconato férrico, sulfato ferroso, sulfato férrico, fumarato ferroso, fumarato férrico, quelato de aminoácido de ferro ou bis-glicinato ferroso. O suplemento de ferro pode também conter outras vitaminas e minerais. Em outra forma de realização, o inibidor da HDAC e o ferro na composição farmacêutica acha-se

10 em uma relação estequiométrica de 5:1, 4:1, 3:1, 2:1, 1:1 ou 2:1. Em uma forma de realização, a composição farmacêutica compreende cerca de 100 mg de SAHA e cerca de 1 a 10 equivalentes molares de suplemento de ferro. Em outra forma de realização, a composição farmacêutica compreende cerca de

15 150 mg de SAHA e cerca de 1 a 10 equivalentes molares de suplemento de ferro. Em uma outra forma de realização, a composição farmacêutica compreende cerca de 200 mg de SAHA e cerca de 1 a 10 equivalentes molares de suplemento de ferro. Em uma forma de realização alternativa, a composição farmacêutica compreende cerca de 50 mg de SAHA e cerca de 1

20 a 10 equivalentes molares de suplemento de ferro. Em uma forma de realização, o composto de metal quelatável compreende zinco. O composto de zinco pode estar em qualquer forma biodisponível ao paciente e que forme o complexo de quelato inibidor da HDAC de zinco in situ, por exemplo, na forma de composição farmacêutica, tal como na forma de tablete ou cápsula. Em uma forma de realização, o composto de zinco é um suplemento de zinco

25 na forma de gliconato de zinco, picolinato de zinco, citrato de zinco, quelato de aminoácido de zinco ou óxido de zinco. O suplemento de zinco pode também conter outras vitaminas e minerais. Em outra forma de realização, a SAHA e o zinco na composição farmacêutica acham-se em uma relação estequiométrica de 5:1, 4:1, 3:1, 2:1, 1:1 ou 2:1 de SAHA para zinco. Em uma

forma de realização, a composição farmacêutica compreende cerca de 100 mg de SAHA e cerca de 1 a 10 equivalentes molares de suplemento de zinco. Em outra forma de realização, a composição farmacêutica compreende cerca de 200 mg de SAHA e cerca de 1 a 10 equivalentes molares de suplemento de zinco.

Composição Farmacêutica compreendendo o Complexo de Quelato de inibidor da HDAC de Metal

Em uma forma de realização, a invenção provê uma composição farmacêutica compreendendo uma quantidade terapeuticamente eficaz do complexo de quelato inibidor da HDAC de metal ou seu hidrato ou solvato, e um carreador farmacêuticamente aceitável.

O complexo de quelato inibidor da HDAC de metal pode estar na forma amorfa. O complexo inibidor da HDAC de metal pode ser cristalino, micronizado, ou pode ser aglomerado, grânulos particulados, pós, óleos, suspensões oleosas ou qualquer outra forma de sólido. O complexo de quelato inibidor da HDAC de metal, ou seu hidrato ou solvato, pode estar em qualquer forma cristalina. Em uma forma de realização, o inibidor de HDAC é um derivado do ácido hidroxâmico. Em uma forma de realização, o inibidor da HDAC é SAHA.

Em uma forma de realização, a invenção provê uma composição farmacêutica compreendendo uma quantidade terapeuticamente eficaz do complexo de quelato de SAHA de ferro, ou seu hidrato ou solvato, e um carreador farmacêuticamente aceitável. Em uma forma de realização, a relação de ferro para SAHA é de 1:3, 1:2 ou 1:1.

Em uma forma de realização, o complexo de quelato de SAHA de ferro é cristalino, e é caracterizado por um padrão de difração de raio-X substancialmente semelhante àquele apresentado na Figura 1. Em outra forma de realização, o complexo de quelato de SAHA de ferro é caracterizado por um padrão de difração de pó de raio-X com radiação $K\alpha$ de cobre, incluindo

os picos característicos em 8,8, 14,5 e 21,8 graus 2θ . Em uma outra forma de realização, o complexo de quelato de SAHA de ferro é caracterizado por um padrão de difração de pó de raio-X com radiação $K\alpha$ de cobre, incluindo os picos característicos em 8,8, 13,3, 14,5, 20,3, 21,8 e 24,6 graus 2θ . Em uma
5 outra forma de realização, o complexo de quelato de SAHA de ferro é caracterizado por um padrão de difração de pó de raio-X com radiação $K\alpha$ de cobre, incluindo os picos característicos em 8,8, 13,3, 14,5, 18,5, 20,3, 21,8, 24,6, 25,8 e 33,3 graus 2θ .

Em outra forma de realização, a invenção também provê uma
10 composição farmacêutica compreendendo uma quantidade terapeuticamente eficaz do complexo de quelato de SAHA de zinco, ou seu hidrato ou solvato, e um carreador farmacêuticamente aceitável. Em uma forma de realização, a relação de zinco para SAHA é de 1:3, 1:2 ou 1:1.

A invenção também inclui composições farmacêuticas
15 compreendendo hidratos ou solvatos do complexo de quelato inibidor da HDAC de metal, ou SAHA. O termo “hidrato” inclui, porém sem limitar, hemi-hidrato, monohidrato, diidrato, triidrato e outros.

Composições Farmacêuticas

O carreador farmacêuticamente aceitável nas composições
20 farmacêuticas pode estar na forma de partículas sólidas. Qualquer excipiente inerte que seja comumente usado como o carreador ou diluente pode ser usado nas formulações da presente invenção, tais como, por exemplo, uma goma, um amido, um açúcar, um material celulósico, um acrilato, ou misturas destes. Em uma forma de realização, o diluente é celulose microcristalina. As
25 composições da presente invenção (por exemplo, inibidor de HDAC; composto de metal quelatável; inibidor da HDAC e composto de metal quelatável; ou complexo de quelato inibidor da HDAC de metal) podem ainda compreender um agente de desintegração (por exemplo, croscarmelose sódica) e um lubrificante (por exemplo, o estearato de magnésio), e, além

disso, pode compreender um ou mais aditivos selecionados de um aglutinante, um tampão, um inibidor da protease, um tensoativo, um agente solubilizante, um plastificante, um emulsificante, um agente estabilizador, um agente de aumento da viscosidade, um edulcorante, um agente formador de película, ou
5 qualquer combinação destes. Além disso, as Composições da presente invenção podem estar na forma de formulações de liberação controlada ou de liberação imediata.

Em uma forma de realização, a composição farmacêutica aqui descrita pode ainda consistir em celulose microcristalina, croscarmelose
10 sódica e estearato de magnésio. O percentual das Composições desta invenção e dos vários excipientes nas formulações, pode variar. Por exemplo, a composição farmacêutica pode compreender entre cerca de 20 e 90 %, entre cerca de 50 e 80 %, ou entre cerca de 60 e 70 %, em peso das Composições desta invenção. Além disso, a composição farmacêutica pode compreender
15 entre cerca de 1 e 30 %, entre cerca de 1 e 10 %, entre cerca de 2 e 5 %, em peso, de croscarmelose sódica, como um desintegrante. Além disso, a composição farmacêutica pode compreender entre cerca de 0,1 e 5 % ou cerca de 0,5 e 1,5 % em peso de estearato de magnésio, como um lubrificante.

Em uma forma de realização, a composição farmacêutica da
20 invenção é de cerca de 50 a 80 % em peso das Composições desta invenção; cerca de 20 a 40 % em peso de celulose microcristalina; cerca de 1 a 10 % em peso de croscarmelose sódica; e cerca de 0,1 a 5 % em peso de estearato de magnésio. Em outra forma de realização, a composição farmacêutica da invenção é de cerca de 60 a 70 % em peso das Composições desta invenção;
25 de cerca de 25 a 35 % em peso de celulose microcristalina; cerca de 2 a 5 % em peso de croscarmelose sódica; e cerca de 0,5 a 1,5 % em peso de estearato de magnésio. Em uma forma de realização, a composição farmacêutica descrita compreende cerca de 50 a 200 mg ou 50 a 600 mg da Forma I da SAHA.

Uma forma de realização particular da invenção é uma formulação sólida das Composições desta invenção com celulose microcristalina, NF (Avicel Ph 101), croscarmelose sódica, NF (AC-Di-Sol) e estearato de magnésio, NF, contidos em uma cápsula de gelatina. Uma outra
5 forma de realização é uma composição farmacêutica compreendendo cerca de 100 mg das Composições desta invenção, cerca de 44,3 mg de celulose microcristalina, cerca de 4,5 mg de croscarmelose sódica, cerca de 1,2 mg de estearato de magnésio.

Em uma forma de realização, as composições farmacêuticas
10 são administradas oralmente, e são assim formuladas em uma forma adequada para administração oral, isto é, como uma forma sólida ou líquida. Formulações orais sólidas adequadas incluem, por exemplo, tabletes, cápsulas, pílulas, grânulos, pelotas e outras. Formulações orais líquidas adequadas incluem, por exemplo, emulsões, óleos etc. Em uma forma de
15 realização da presente invenção, a Composição é formulada em cápsulas. De acordo com esta forma de realização, as composições farmacêuticas da presente invenção compreendem uma cápsula de gelatina dura além das Composições desta invenção, mais o carreador ou diluente inertes.

Carreadores/diluentes sólidos incluem, porém sem limitar,
20 uma goma, um amido (por exemplo o amido de milho, o amido pré-gelatinizado), um açúcar (por exemplo lactose, manitol, sacarose, dextrose), um material celulósico (por exemplo a celulose microcristalina), um acrilato (por exemplo o polimetilacrilato), o carbonato de cálcio, o óxido de magnésio, talco, ou as misturas destes.

Para as formulações líquidas, os carreadores
25 farmacêuticamente aceitáveis podem ser soluções não aquosas, suspensões, emulsões ou óleos. Exemplos de solventes não aquosos são o propileno glicol, o polietileno glicol, e ésteres orgânicos injetáveis tais como o oleato de etila. Exemplos de óleos são aqueles de petróleo, animal, vegetal, ou de origem

sintética, por exemplo o óleo de amendoim, o óleo de soja, óleo mineral, azeite, óleo de girassol e óleo de fígado de peixe. As suspensões também podem incluir os seguintes componentes: óleos fixos, polietileno glicóis, glicerina, propileno glicol ou outros solventes sintéticos; agentes antibacterianos tais como o álcool benzílico ou os metil parabenos; antioxidantes tais como o ácido ascórbico ou o bissulfito de sódio; agentes de quelação tais como o ácido etilenodiaminatetraacético (EDTA).

Além disso, as composições farmacêuticas podem ainda compreender aglutinantes (por exemplo, acácia, amido de milho, gelatina, carbômero, etil celulose, goma guar, hidroxipropil celulose, hidroxipropil metil celulose, povidona), agentes desintegrantes (por exemplo o amido de milho, a fécula de batata, o ácido algínico, dióxido de silício, croscarmelose sódica, crospovidona, goma guar, amido glicolato de sódio, Primogel), detergentes (por exemplo, Tween 20, Tween 80, Pluronic F68, sais de ácido biliar), inibidores da protease, tensoativos (por exemplo o lauril sulfato de sódio), intensificadores da permeação, agentes solubilizantes (por exemplo, glicerol, polietileno glicerol), um deslizante (por exemplo, o dióxido de silício coloidal), antioxidantes (por exemplo, ácido ascórbico, metabissulfito de sódio, hidroxianisol butilado), estabilizadores (por exemplo, hidroxipropil celulose, hidroxipropilmetil celulose), agentes de aumento da viscosidade (por exemplo, carbômero, dióxido de silício coloidal, etil celulose, goma guar), edulcorantes (por exemplo, sacarose, aspartame, ácido cítrico), agentes de sabor (por exemplo, hortelã-pimenta, salicilato de metila ou sabor de laranja), preservativos (por exemplo, Thimerosal, álcool benzílico, parabenos), lubrificantes (por exemplo, ácido esteárico, estearato de magnésio, polietileno glicol, lauril sulfato de sódio), auxiliares de circulação (por exemplo, dióxido de silício coloidal), plastificantes (por exemplo, o ftalato de dietila, o citrato de trietila), emulsificantes (por exemplo, carbômero, hidroxipropil celulose, lauril sulfato de sódio), revestimentos poliméricos (por exemplo, poloxâmeros

ou poloxaminas), agentes formadores de revestimento e de película (por exemplo, a etil celulose, acrilatos, polimeracrilatos) e/ou adjuvantes.

Em uma forma de realização, as Composições desta invenção são preparadas com carreadores que as protejam contra a rápida eliminação do corpo, tal como uma formulação de liberação controlada, incluindo implantes e sistemas de liberação microencapsulada. Polímeros biodegradáveis, biocompatíveis, podem ser usados, tais como o vinil acetato de etileno, os polianidridos, o ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres e ácido poliláctico. Métodos para a preparação de tais formulações serão evidentes àqueles habilitados na técnica. Os materiais também podem ser obtidos comercialmente da Alza Corporation e da Nova Pharmaceuticals, Inc. As suspensões lipossômicas (incluindo os lipossomas dirigidos às células infectadas com anticorpos monoclonais aos antígenos virais) podem também ser usadas como carreadores farmacêuticamente aceitáveis. Estes podem ser preparados de acordo com métodos conhecidos daqueles habilitados na técnica, por exemplo como descrito na Patente U.S. nº 4.522.811.

A preparação das composições farmacêuticas que contêm um componente ativo é bem entendida na técnica, por exemplo, pelos processos de mistura, granulação ou formação de tabletes. Para administração oral, os agentes ativos são misturados com aditivos costumeiros para esta finalidade, tais como veículos, estabilizadores ou diluentes inertes, e transformados por métodos costumeiros nas formas adequadas para administração, tais como tabletes, tabletes revestidos, cápsulas de gelatina dura ou macia, soluções aquosas, alcoólicas ou oleosas, e outros, como detalhado acima.

Em uma forma de realização, as composições orais são formuladas na forma unitária de dosagem para facilidade de administração e uniformidade da dosagem. A forma unitária de dosagem, como aqui usada, refere-se a unidades fisicamente discretas adequadas como dosagens unitárias para o paciente a ser tratado, cada unidade contendo uma quantidade

predeterminada das Composições desta invenção, calculada para produzir o efeito terapêutico desejado em associação com o carreador farmacêutico requerido. A especificação para as formas unitárias de dosagem da invenção são prescritas e diretamente dependentes das características únicas das Composições desta invenção, e do efeito terapêutico específico a ser alcançado, e das limitações inerentes na técnica de composição de um tal composto ativo para o tratamento dos pacientes. Em certas formas de realização, a unidade de dosagem contém cerca de 600 mg, 550 mg, 500 mg, 450 mg, 400 mg, 350 mg, 300 mg, 250 mg, 200 mg, 150 mg, 110 mg, 105 mg, 100 mg, 95 mg, 90 mg, 85 mg, 80 mg, 75 mg, 70 mg, 65 mg, 60 mg, 55 mg, 50 mg, 45 mg ou 40 mg das Composições desta invenção. Em uma forma de realização, a quantidade das Composições desta invenção é de cerca de 100 mg.

As composições farmacêuticas podem ser incluídas em um recipiente, pacote ou dispensador, junto com instruções para administração. Em uma forma de realização, a composição farmacêutica é uma cápsula única, em que a quantidade das Composições desta invenção é de cerca de 100 mg. Em uma forma de realização, a composição farmacêutica é em duas cápsulas, em que cada cápsula contém Composições desta invenção de cerca de 50 mg.

Método de se Obter um Complexo de Quelato Inibidor da HDAC de Metal e Cristalização

A invenção também provê um método de se obter um completo de quelato inibidor da HDAC de metal compreendendo a etapa de adicionar um composto de metal quelatável e base com o inibidor da HDAC em um meio de reação. Em uma forma de realização, o meio de reação é um solvente orgânico ou mistura de solvente orgânico e água. Em uma forma de realização, o solvente orgânico é etanol. Em uma forma de realização, o composto de metal quelatável compreende ferro ou zinco. Em outra forma de

realização, o composto de metal quelatável, base e inibidor de HDAC são solúveis no meio de reação. Em uma forma de realização, a base é N,N-diisopropiletilamina ou etóxido de sódio. Em uma forma de realização, o composto de metal quelatável é cloreto férrico ou cloreto de zinco.

5 A invenção também provê um método de se obter um complexo de quelato inibidor da HDAC de metal cristalino compreendendo a etapa de cristalizar o complexo de quelato em um solvente orgânico ou em uma mistura de solvente orgânico e água. Em uma forma de realização, o metal é zinco ou ferro.

10 Em uma forma de realização particular, o complexo de quelato inibidor da HDAC de metal cristalino é cristalizado de um solvente orgânico. O solvente orgânico pode ser um álcool, tal como metanol, etanol ou isopropanol. Em uma forma de realização, o solvente orgânico é um ou mais dentre metano, etanol, acetonitrila, isopropanol e ácido acético. Em uma
15 forma de realização, o solvente orgânico é etanol. Em uma forma de realização particular, o solvente orgânico usado no meio de reação é o mesmo daquele na cristalização.

 Em outra forma de realização, a mistura de solvente orgânico e água compreende cerca de 1 a 99 % de solvente orgânico e cerca de 99 a 1 %
20 de água. Em outra forma de realização, a mistura compreende 40 a 99 % de etanol e 60 a 1 % de água. Em uma forma de realização a mistura compreende cerca de 15 a 85 % de solvente e cerca de 1 a 15 % de água. Em uma forma de realização particular, a mistura compreende cerca de 85 % de solvente orgânico e cerca de 15 % de água. Em outra forma de realização particular, a
25 mistura compreende etanol e água a 1:1. Em ainda outra forma de realização particular, a mistura compreende etanol e água a 9:1. As relações ou percentuais de solvente orgânico para água aqui descritos são em volume.

 Em uma forma de realização particular, o solvente orgânico é um álcool (por exemplo, metanol, etanol, isopropanol e outros). Entretanto,

deve ser evidente a uma pessoa habilitada na técnica, que as cristalizações ou reações aqui descritas podem ser realizadas em quaisquer solventes ou misturas de solventes adequados, os quais podem ser facilmente selecionados por uma pessoa habilitada na técnica da síntese orgânica. Tais solventes orgânicos adequados, como aqui usados, podem incluir, por meio de exemplo e sem limitação, solventes clorados, solventes de hidrocarboneto, solventes de éteres, solventes próticos polares e solventes apróticos polares. Solventes halogenados adequados incluem, porém sem limitação, tetracloreto de carbono, bromodiclorometano, dibromoclorometano, bromofórmio, clorofórmio, bromoclorometano, dibromometano, cloreto de butila, diclorometano, tetracloroetileno, tricloroetileno, 1,1,1-tricloroetano, 1,1,2-tricloroetano, 1,1-dicloroetano, 1,2-dicloroetano, 2-cloropropano, hexafluorobenzeno, 1,2,4-triclorobenzeno, o-diclorobenzeno, clorobenzeno, fluorobenzeno, fluorotriclorometano, clorotrifluorometano, bromotrifluorometano, tetrafluoreto de carbono, diclorofluorometano, clorodifluorometano, trifluorometano, 1,2-diclorotetrafluoroetano e hexafluoroetano. Solventes de hidrocarboneto adequados incluem, porém sem limitar, benzeno, cicloexano, pentano, hexano, tolueno, cicloeptano, metilcicloexano, heptano, etilbenzeno, m-, o- ou p-xileno, octano, indano, nonano. Solventes de éter adequados incluem, sem limitar, dimetoximetano, tetraidrofurano, 1,3-dioxano, 1,4-dioxano, furano, éter dietílico, éter dimetílico de etileno glicol, éter dietílico de etileno glicol, éter dimetílico de dietileno glicol, éter dietílico de dietileno glicol, éter diisopropílico de trietileno glicol, anisol ou éter t-butil metílico.

Solventes próticos polares adequados incluem, sem limitar, metanol, etanol, 2-nitroetanol, 2-fluoroetanol, 2,2,2-trifluoroetanol, etileno glicol, 1-propanol, 2-propanol, 2-metoxietanol, 1-butanol, 2-butanol, álcool i-butílico, álcool t-butílico, 2-etoxietanol, dietileno glicol, 1-, 2-, ou 3-pentanol, álcool neo-pentílico, álcool t-pentílico, éter monometílico de dietileno glicol,

éter monoetílico de dietileno glicol, cicloexanol, álcool benzílico, fenol e glicerol. Solventes apróticos polares adequados incluem, sem limitar, dimetilformamida (DMF), dimetilacetamida (DMAC), 1,3-dimetil-3,4,5,6-tetraidro-2(1H)-pirimidona (DMPU), 1,3-dimetil-2-imidazolidinona (DMI),
5 N-metilpirrolidinona (NMP), formamida, N-metilacetamida, N-metilformamida, acetonitrila (ACN), dimetilsulfóxido, propionitrila, formiato de etila, acetato de metila, hexacloroacetona, acetona, cetona etil metílica, acetato de etila, acetato de isopropila, acetato de t-butila, sulfolano, N,N-dimetilpropionamida, nitrometano, nitrobenzeno, hexametilfosforamida.

10 Métodos de Tratamento

Os inibidores da HDAC que possuem domínios de ligação de metal, tais como os derivados de ácido hidroxâmico, são capazes de sequestrar certos sais endógenos, tais como o ferro e o zinco. Estes sais são requeridos pelos sistemas biológicos para a saúde e sobrevivência a longo
15 prazo. Adicionalmente, os sais quelatáveis, tais como o ferro, são requeridos pelas enzimas e proteínas tais como as lipoxigenases, a superfamília P450 de enzimas, as monoamina oxidases, heme e numerosos outros, para manter a função normal.

O zinco é essencial para a divisão e crescimento celular e
20 auxilia na formação do DNA. O zinco também é importante para auxiliar no funcionamento apropriado da insulina e se acha envolvido na saúde do sistema imune. A deficiência de zinco pode causar atrofia mucosa intestinal, anemia, diarreia, absorção reduzida de água e de nutrientes (desidratação e anorexia), sabor prejudicado, alopecia, atrofia tímica, atrofia dos testículos;
25 hiperglicemia, glicose sérica aumentada, aumento da creatina, insuficiência, dano ou falha renais.

Experiências clínicas adversas ou efeitos colaterais tais como a diarreia, a fadiga, náusea, trombocitopenia, anorexia, disgeusia, redução do peso, espasmos musculares, alopecia, anemia, aumento da creatinina do

sangue, vômitos, calafrios, têm sido observados quanto à SAHA no tratamento de pacientes com câncer, alguns dos quais podem estar associados com a deficiência de ferro ou de zinco como um resultado do sequestro destes íons pelo domínio de ligação de metal da SAHA. A toxicidade pré-clínica da SAHA inclui a perda de peso ou a inapetência, a supressão imune (leucopenia, linfopenia, atrofia tímica) em todas as espécies de animais; a trombocitopenia nos ratos; a toxicidade gastrointestinal (atrofia mucosa, inflamação aguda, necrose, lesões múltiplas), desidratação, perda de eletrólitos, atrofia testicular nos cães.

Da mesma forma, outros quelantes de zinco compartilham de toxicidades ou efeitos colaterais semelhantes ao dos inibidores da HDAC. Por exemplo, o Lithostat (ácido acetoidroxâmico) causa efeitos colaterais tais como náusea, vômito, anorexia, fadiga, mal-estar, reticulocitose, anemia, trombocitopenia, leucopenia e cefaléia. A desferrioxamina (desferiprona) causa efeitos colaterais como a fadiga, a atrofia da medula óssea, a atrofia tímica e a neutropenia.

Assim, a coadministração/coformulação dos inibidores da HDAC e um composto de metal quelatável, tal como o ferro ou zinco, devem ser benéficos em manter a disponibilidade do ferro, do zinco e de outros suprimentos de sais quelatáveis, e eliminar os efeitos colaterais dos inibidores da HDAC. Além da coadministração e da coformulação, considera-se que a pré-formação do complexo de quelato inibidor da HDAC de metal, deve ter um efeito semelhante.

Assim sendo, em uma forma de realização, a invenção fornece um método para tratar câncer e aliviar os efeitos colaterais do inibidor da HDAC, compreendendo a etapa de coadministrar ao paciente uma quantidade terapêuticamente eficaz do inibidor da HDAC e um composto de metal quelatável. Em outra forma de realização, a invenção também provê um uso de um inibidor da HDAC para a preparação de um medicamento para o

tratamento do câncer e alívio dos efeitos colaterais do inibidor da HDAC, compreendendo a etapa de coadministrar a um paciente uma quantidade terapêuticamente eficaz do inibidor da HDAC e um composto de metal quelatável. Em uma forma de realização, o composto de metal quelatável é administrado diariamente ao paciente. Em outra forma de realização, o composto de metal quelatável é administrado antes ou após a administração do inibidor da HDAC. Em outra forma de realização, o composto de metal quelatável é simultaneamente administrado com o inibidor da HDAC. Em uma outra forma de realização, a invenção provê um kit compreendendo pelo menos uma dosagem unitária farmacologicamente eficaz do inibidor de HDAC, e instruções para o tratamento do câncer e alívio dos efeitos colaterais do inibidor da HDAC pela coadministração de um composto de metal quelatável com o inibidor da HDAC. A dosagem unitária farmacologicamente eficaz do SAHA, seu sal ou hidrato farmacologicamente aceitável, pode ser de 200 mg, 300 mg, 400 mg, 500 mg ou 600 mg. O composto de metal quelatável pode estar na forma de uma composição farmacêutica, por exemplo um suplemento vitamínico ou suplemento mineral, que pode também compreender outras vitaminas e minerais.

Em outra forma de realização, a invenção também provê um método para tratar câncer e aliviar os efeitos colaterais do inibidor da HDAC, compreendendo a etapa de administrar a um paciente uma composição farmacêutica compreendendo um inibidor da HDAC e um composto de metal quelatável. Em outra forma de realização, a invenção provê um uso para a preparação de um medicamento contendo um inibidor da HDAC e um composto de metal quelatável para o tratamento do câncer, e aliviar os efeitos colaterais do inibidor da HDAC. Em uma outra forma de realização, a invenção fornece uma composição farmacêutica compreendendo inibidor de HDAC e um composto de metal quelatável, para uso no tratamento do câncer e aliviar os efeitos colaterais do inibidor da HDAC. Em uma forma de

realização, o composto de metal quelatável compreende ferro e zinco. Em outra forma de realização, o inibidor de HDAC é o ácido suberoilânilda hidroxâmico (SAHA).

5 Em uma forma de realização, o efeito colateral é náusea, vômito, diarreia, anorexia, atrofia mucosa intestinal ou toxicidade gastrointestinal. Em outra forma de realização, o efeito colateral é anemia, fadiga ou trombocitopenia. Em uma outra forma de realização, o efeito colateral é náusea, vômito, diarreia, anorexia, atrofia mucosa intestinal, toxicidade gastrointestinal, fadiga ou trombocitopenia.

10 Em uma outra forma de realização, a invenção ainda fornece um método para tratar câncer, compreendendo a etapa de administrar a um paciente uma quantidade terapêuticamente eficaz de complexo de quelato inibidor da HDAC de metal ou seu hidrato ou solvato. Em outra forma de realização, a invenção fornece um uso para a preparação de um medicamento
15 contendo uma quantidade terapêuticamente eficaz do complexo de quelato inibidor da HDAC de metal ou seu hidrato ou solvato, para o tratamento do câncer. Em uma outra forma de realização, a invenção fornece uma composição farmacêutica compreendendo o complexo de quelato inibidor da HDAC de metal ou seu hidrato ou solvato, para uso no tratamento do câncer.

20 A invenção ainda fornece um método para tratar câncer, compreendendo a etapa de administrar a um paciente uma quantidade terapêuticamente eficaz do complexo de quelato de SAHA de zinco ou ferro, ou seu hidrato ou solvato, mencionado nas formas de realização acima.

25 Em uma forma de realização, o método da presente invenção destina-se ao tratamento de pacientes humanos com câncer. Entretanto, é também provável que o método deva ser eficaz no tratamento do câncer em outros mamíferos. O câncer inclui, sem limitação, qualquer câncer causado pela proliferação das células neoplásticas, tal como o câncer dos pulmões, o mieloma linfóide agudo, o linfoma de Hodgkins, o linfoma não de Hodgkins,

o melanoma da bexiga, o carcinoma renal, o carcinoma de mama, o carcinoma prostático, o carcinoma ovariano ou o carcinoma colorretal. De acordo com a invenção, as composições farmacêuticas podem ser usadas no tratamento de uma ampla variedade de cânceres, incluindo, porém sem

5 limitar, tumores sólidos (por exemplo, tumores da cabeça e do pescoço, dos pulmões, mamas, cólon, próstata, bexiga, reto, cérebro, tecido gástrico, ossos, ovário, tireóide ou endométrio), malignidades hematológicas (por exemplo, leucemias, linfomas, mielomas), carcinomas (por exemplo carcinoma da bexiga, carcinoma renal, carcinoma mamário, carcinoma colorretal),

10 neuroblastoma ou melanoma. Exemplos não limitativos destes cânceres incluem o linfoma de células-B grandes difuso (DLBCL), os linfomas de células-T ou leucemias, por exemplo o linfoma de células-T cutâneas (CTCL), o linfoma de células-T periféricas não cutâneas, o linfoma associado com o vírus linfotrófico de células-T humanas (HTLV), leucemia/linfoma de

15 células-T adultas (ATLL), bem como a leucemia linfocítica aguda, a leucemia não linfocítica aguda, a leucemia mielóide aguda, a leucemia linfocítica crônica, a leucemia mielogenosa crônica, a doença de Hodgkin, o linfoma não de Hodgkin, mieloma, mieloma múltiplo, mesotelioma, tumores sólidos da infância, neuroblastoma cerebral, retinoblastoma, glioma, tumor de Wilms,

20 câncer ósseo e sarcomas do tecido macio, tumores sólidos comuns de adultos, tais como os cânceres da cabeça e do pescoço (por exemplo orais, laríngeo e esofágico), cânceres geniturinários (por exemplo, da próstata, da bexiga, renal, uterino, ovariano, testicular, retal e colônico), câncer pulmonar (por exemplo, o carcinoma de células pequenas e o carcinoma pulmonar de células

25 não pequenas, incluindo o carcinoma de células escamosas e o adenocarcinoma), câncer de mamas, câncer pancreático, melanoma e outros cânceres da pele, carcinoma basocelular, carcinoma metatástico da pele, carcinoma de células escamosas tanto do tipo ulcerativo quando do tipo papilar, câncer do estômago, câncer do cérebro, câncer do fígado, câncer

adrenal, câncer dos rins, câncer da tireóide, carcinoma medular, osteossarcoma, sarcoma do tecido macio, sarcoma de Ewing, sarcoma de células do veticulum, e sarcoma de Kaposi. Acham-se também incluídas as formas pediátricas de qualquer dos cânceres aqui descritos.

5 Métodos de Administração

Em todos os métodos descritos neste relatório descritivo, a composição farmacêutica pode ser administrada oralmente em uma cápsula de gelatina. A composição pode ser administrada em dosagens unitárias de acordo com os métodos aqui descritos, uma vez por dia, duas vezes por dia ou
10 três vezes por dia.

A administração diária é então repetida continuamente por um período de vários dias a vários anos. O tratamento oral pode continuar entre uma semana e a vida do paciente. Em uma forma de realização, a administração tem lugar por cinco dias consecutivos após cujo tempo o
15 paciente pode ser avaliado para se determinar de outra administração é necessária. A administração pode ser contínua ou intermitente, isto é, tratamento por vários dias consecutivos seguidos por um período de repouso.

As composições farmacêuticas da presente invenção podem ser administradas oralmente em uma dose diária total entre 25 a 4000 mg/m²,
20 por exemplo cerca de 25 a 1000 mg., 50 a 1000 mg, 100 mg, 200 mg, 300 mg, 400 mg, 600 mg, 800 mg, 1000 mg etc. Tipicamente o composto é administrado como uma dose única quando da administração de até 400 mg ao paciente. Quanto às dosagens totais mais elevadas (isto é, mais elevadas co
25 vezes por dia, três vezes por dia ou coisa parecida, ou disperso através de períodos de tempo iguais durante o dia. Por exemplo, duas doses, por exemplo, 500 mg cada, podem ser administradas com intervalo de 12 horas para se obter uma dosagem total de 1000 mg em um dia.

Em uma forma de realização, o SAHA é administrado ao

paciente em uma dosagem diária total de 200 mg. Em outra forma de realização, o SAHA é administrado ao paciente em uma dosagem diária total de 400 mg. Em outra forma de realização, o SAHA é administrado ao paciente em uma dosagem diária total de 600 mg.

5 Em uma forma de realização, a quantidade do inibidor da HDAC administrada ao paciente é menor do que uma quantidade que pudesse causar toxicidade incontrolável no paciente. Em certas formas de realização, a quantidade do inibidor da HDAC que é administrado ao paciente é menor do que a quantidade que faz com que uma concentração do composto no plasma do paciente seja igual ou exceda ao nível tóxico do composto. Em uma forma de realização, a concentração do inibidor da HDAC no plasma do paciente é mantida entre cerca de 10 nM e cerca de 5000 nM. A quantidade ótima do inibidor da HDAC que deve ser administrada ao paciente na prática da presente invenção dependerá do composto particular usado e do tipo de
10 câncer que esteja sendo tratado.

Histona Desacetilases e Inibidores das Histona Desacetilases

 As histona desacetilases (HDACs), como essa expressão é aqui usada, são enzimas que catalisam a remoção dos grupos acetila dos resíduos de lisina nas caudas terminais amino das histonas do núcleo nucleossômico.
20 Como tal, as HDACs juntamente com as histonas acetil transferases (HATs) regulam o estado de acetilação das histonas. A acetilação das histonas afeta a expressão de genes e inibidores das HDACs, tal como o ácido suberoilânido hidroxâmico (SAHA) do composto polar híbrido com base no ácido hidroxâmico induz a parada do crescimento, a diferenciação e/ou a apoptose das células transformadas in vitro e inibe o crescimento tumoral in vivo. As
25 HDACs podem ser divididas em três classes com base na homologia estrutural. As HDACs de Classe I (HDACs 1, 2, 3 e 8) levam com elas a similaridade à proteína da levedura RPD3, são localizadas no núcleo e são encontradas nos complexos associados com os co-repressores transcricionais.

As HDACs de Classe II (HDACs 4, 5, 6, 7 e 9) são semelhantes à proteína de levedura HDA1, e têm localização subcelular tanto nuclear quanto citoplasmática. As HDACs tanto de Classe I quanto II são inibidas pelos inibidores das HDACs com base no ácido hidroxâmico, tal como o SAHA. As HDACs de Classe III formam uma classe estruturalmente distante das enzimas dependentes de NAD que são relacionadas às proteínas de levedura SIR2 e não são inibidas pelos inibidores da HDAC à base do ácido hidroxâmico.

Os inibidores da histona desacetilase ou os inibidores da HDAC, como essa expressão é aqui usada, são compostos que são capazes de inibir a desacetilação das histonas in vivo, in vitro ou ambos. Como tais, os inibidores da HDAC inibem a atividade de pelo menos uma histona desacetilase. Como resultado da inibição da desacetilação de pelo menos uma histona, um aumento na histona acetilada ocorre e a acumulação da histona acetilada é um marcador biológico adequado para avaliar a atividade dos inibidores da HDAC. Portanto, os procedimentos que podem analisar quanto à acumulação das histonas acetiladas podem ser usados para determinar a atividade inibidora da HDAC dos compostos de interesse. Entende-se que os compostos que podem inibir a atividade da histona desacetilase podem também ligar-se a outros substratos e, como tal, podem inibir outras moléculas biologicamente ativas, tais como as enzimas. Deve também ficar entendido que os compostos da presente invenção são capazes de inibir qualquer das histona desacetilases apresentadas acima, ou qualquer outras histona desacetilases.

Por exemplo, nos pacientes que recebam os inibidores da HDAC, a acumulação das histonas acetiladas nas células mononucleares periféricas, bem como nos tecidos tratados com os inibidores da HDAC, pode ser determinada em relação a um controle adequado.

A atividade inibidora da HDAC de um composto particular

pode ser determinada in vitro com o uso, por exemplo, de um ensaio enzimático que apresente inibição de pelo menos uma histona desacetilase. Além disso, a determinação da acumulação das histonas acetiladas nas células tratadas com uma composição particular, pode ser determinativa da atividade inibidora da HDAC de um composto.

Os ensaios quanto à acumulação das histonas acetiladas são bem conhecidos da literatura. Ver, por exemplo, Marks, P. A. et al, J. Natl. Cancer Inst., 92: 1210-1215, 2000, Butler, L. M. et al., Cancer Res. 60: 5165-5170 (2000), Richon, V. M. et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 95: 3003-3007, 1998, e Yoshida, M. et al, J. Biol. Chem., 265: 17174-17179, 1990.

Por exemplo, um ensaio enzimático para determinar a atividade de um composto inibidor da histona desacetilase pode ser conduzido como a seguir. Resumidamente, o efeito de um composto inibidor da HDAC sobre a HDAC1 rotulada do epítipo humano purificado por afinidade (Flag) pode ser ensaiado pela incubação da preparação enzimática na ausência de substrato sobre gelo, por cerca de 20 minutos, com a quantidade indicada do composto inibidor. O substrato (histona derivada das células de eritroleucemia murina rotulada de ($[^3\text{H}]$ acetila) pode ser adicionado e a amostra pode ser incubada por 20 minutos em 37 °C em um volume total de 30 μl . A reação pode então ser interrompida e o acetato liberado pode ser extraído e a quantidade de liberação da radioatividade determinada por contagem de cintilação. Um ensaio alternativo útil para determinar a atividade de um composto inibidor da histona desacetilase é o “Ensaio da Atividade Fluorescente da HDAC; Drug Discovery Kit-AK-500” disponível da BIOMOL[®] Research Laboratories, Inc., Plymouth Meeting, PA.

Estudos in vivo podem ser conduzidos como segue. Os animais, por exemplo camundongos, podem receber injeção por via intraperitoneal com um composto inibidor da HDAC. Os tecidos selecionados, por exemplo o cérebro, o baço, o fígado etc. podem ser isolados

em tempos predeterminados, após a administração. As histonas podem ser isoladas dos tecidos essencialmente como por Yoshida et al., *J. Biol. Chem.* 265: 17174-17179, 1990. Iguais quantidades de histonas (cerca de 1 µg) podem ser submetidas à eletroforese sobre 15 % de géis de SDS-poliacrilamida e podem ser transferidas para filtros Hybond-P (disponíveis da Amersham). Os filtros podem ser bloqueados com 3 % de leite e podem ser sondados com um anticorpo de histona H4 acetilada policlonal purificada de coelho (α Ac-H4) e anticorpo de histona H3 acetilada (α Ac-H3) (Upstate Biotechnology, Inc.). Os níveis de histona acetilada podem ser observados com o uso de um anticorpo anticoelho de cabra conjugado à peroxidase de raiz-forte (1:5000) e o substrato quimioluminescente SuperSignal (Pierce). Como um controle de carga para a proteína de histona, géis paralelos podem ser desenvolvidos e manchados com Azul de Coomassie (CB).

Além disso, os inibidores da HDAC com base no ácido hidroxâmico foram observados supra-regularem a expressão do gene p21^{WAF1}. A proteína de p21^{WAF1} é induzida dentro de 2 horas da cultura com inibidores da HDAC em uma variedade de células transformadas com o uso de métodos padrão. A indução do gene p21^{WAF1} é associada com o acúmulo das histonas acetiladas na região da cromatina deste gene. A indução de p21^{WAF1} pode, portanto, ser reconhecida como envolvida na parada do ciclo das células G1 causada pelos inibidores da HDAC nas células transformadas.

Tipicamente, os inibidores da HDAC situam-se em cinco classes gerais: 1) derivados de ácido hidroxâmico; 2) Ácidos Graxos de Cadeia Curta (SCFAs); 3) tetrapeptídeos cíclicos; 4) benzamidas; e 5) cetonas eletrofílicas.

Assim sendo, a presente invenção inclui dentro do suas composições de amplo escopo compreendendo inibidores da HDAC que sejam 1) derivados de ácido hidroxâmico; 2) Ácidos Graxos de Cadeia Curta

(SCFAs); 3) tetrapeptídeos cíclicos; 4) benzamidas; e 5) cetonas eletrofílicas, e/ou qualquer outra classe de compostos capazes de inibir as histonas desacetilases, para uso em inibir a histona desacetilase, induzindo a diferenciação terminal nas células neoplásticas, e/ou induzindo a

5 diferenciação das células tumorais em um tumor.

Exemplos de tais inibidores da HDAC incluem, sem limitar:

A. Derivados de Ácido Hidroxâmico tais como o ácido suberoilânilida hidroxâmico (SAHA) [Richon et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 3003-3007 (1998)]; bis-hidroxamida de ácido m-carboxicinâmico

10 (CBHA) (Richon et al., acima); piroxamida; análogos de tricostatina tais como a tricostatina A (TSA) e a tricostatina C (Koghe et al. 1998. Biochem. Pharmacol. 56: 1359-1364); ácido salicilidroxâmico (SBHA) [Andrews et al., International J. Parasitology 30, 761-768 (2000)]; ácido suberoil bis-

15 hidroxâmico (SBHA) (Patente U.S. nº 5.608.108); ácido aceláico bis-hidroxâmico (ABHA) (Andrews et al., acima); azeláico-l-hidroxamato-9-anilida (AAHA) [Qiu et al., Mol. Biol. Cell 11, 2069-2083 (2000)]; ácido 6-(3-clorofenilureído)carpóico-hidroxâmico (3Cl-UCHA); ácido oxanflatina-[(2E)-5-[3-[(fenilsufonil)amino-fenil]-pent-2-en-4-ino-hidroxâmico] [Kim et al. Oncogene, 18: 2461-2470 (1999)]; A-161906, Scriptaid (Su et al. 2000

20 Cancer Research, 60: 3137-3142); PXD-101 (Prolifix); LAQ-824; CHAP; MW2796 (Andrews et al., supra); MW2996 (Andrews et al., supra); ou qualquer dos ácidos hidroxâmicos apresentados nas Patentes U.S. nºs 5.369.108, 5.932.616, 5.700.811, 6.087.367 e 6.511.990.

B. Tetrapeptídeos Cíclicos tais como o tetrapeptídeo cíclico de

25 trapoxina A (TPX) [ciclo-(L-fenilalanil-L-fenilalanil-D-pipecolinil-L-2-amino-8-oxo-9,10-epóxi-decanoil)] [Kijima et al., J Biol. Chem. 268, 22429-22435 (1993)]; FR901228 (FK 228, depsipeptídeo) [Nakajima et al., Ex. Cell Res. 241, 126-133 (1998)]; tetrapeptídeo cíclico FR225497 [H. Mori et al., Pedido PCT WO 00/08048 (17 de fevereiro de 2000)]; tetrapeptídeo cíclico

de apicidina [ciclo(N-O-metil-L-triptofanil-L-isoleucinil-D-pipecolinil-L-2-amino-8-oxodecanoil)] (Darkin-Rattray et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 13143-13147 (1996)]; apicidina Ia, apicidina Ib, apicidina Ic, apicidina IIa e apicidina IIb (P. Dulski et al., Pedido PCT WO 97/11366); CHAP, tetrapeptídeo cíclico de toxina HC [Bosch et al., Plant Cell 7, 1941-1950 (1995)]; tetrapeptídeo cíclico WF27082 (Pedido PCT WO 98/48825); e clamidocina (Bosch et al., acima).

C. Derivados de ácido graxo de cadeia curta (SCFA) tais como: butirato de sódio [Cousens et al., J. Biol. Chem. 254, 1716-1723 (1979)]; isovalerato [McBain et al., Biochem. Pharm. 53: 1357-1368 (1997)]; valerato (McBain et al., supra); 4-fenilbutirato (4-PBA) [Lea e Tulsyan, Anticancer Research, 15, 879-873 (1995)]; fenilbutirate (PB) [Wang et al., Cancer Research, 59, 2766-2799 (1999)]; propionato (McBain et al., supra); butiramida (Lea e Tulsyan, supra); isobutiramida (Lea e Tulsyan, supra); fenilacetato (Lea e Tulsyan, supra); 3-bromopropionato (Lea e Tulsyan, supra); tributirina [Guan et al., Cancer Research, 60, 749-755 (2000)]; ácido valpróico e valproato.

D. Derivados de benzamida tais como CI-994; MS-27-275 [N-(2-aminofenil)-4-[N(piridin-3-ilmetoxicarbonil)aminometil]benzamida] [Saito et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 4592-4597 (1999)]; e derivado 3'-amino de MS-27-275 (Saito et al., supra).

E. Derivados de cetona eletrofílica tais como as cetonas trifluorometílicas [Frey et al., Bioorganic & Med. Chem. Lett. (2002), 12, 3443-3447; U.S. 6.511.990) e α -cetoamidas tais como a N-metil- α -cetoamidas.

F. Outros inibidores da HDAC tais como a depudecina (Kwon et al. 1998. PNAS 95: 3356-3361).

Em uma forma de realização, os inibidores da HDAC à base do ácido hidroxâmico são o ácido suberoilanylida hidroxâmico (SAHA), o bis-

hidroxamato de ácido m-carboxicinâmico (CBHA) e a piroxamida. O SAHA foi apresentado ligando-se diretamente na bolsa catalítica da enzima histona desacetilase. O SAHA induz a parada do ciclo celular, a diferenciação e/ou a apoptose das células transformadas em cultura, e inibe o crescimento tumoral nos roedores. O SAHA é eficaz em induzir estes efeitos tanto nos tumores sólidos quanto nos cânceres hematológicos. Foi observado que o SAHA é eficaz em inibir o crescimento tumoral em animais sem toxicidade ao animal. A inibição do crescimento tumoral induzida pelo SAHA é associada com um acúmulo de histonas acetiladas no tumor. O SAHA é eficaz em inibir o desenvolvimento e o crescimento contínuo dos tumores mamários induzidos pelo carcinógeno (N-metilnitrosouréia) nos ratos. O SAHA foi administrado aos ratos em sua dieta durante os 130 dias do estudo. Assim, o SAHA é um agente antitumoral oralmente ativo, não tóxico, cujo mecanismo de ação envolve a inibição da atividade da histona desacetilase. Em outras formas de realização, os inibidores da HDAC são aqueles apresentados nas Patentes U.S. nºs 5.369.108, 5.932.616, 5.700.811, 6.087.367 e 6.511.990.

Terapia de Combinação

Os métodos da presente invenção podem também compreender inicialmente a administração ao paciente de um agente antitumoral, de modo a tornar as células neoplásticas no paciente resistentes a um agente antitumoral, e, subsequentemente, administrar-se uma quantidade eficaz de qualquer das composições da presente invenção, eficaz para seletivamente induzir a diferenciação terminal, a parada do crescimento das células e/ou a apoptose de tais células.

O agente antitumoral pode ser um dos numerosos agentes de quimioterapia, tal como um agente de alquilação, um antimetabólito, um agente hormonal, um antibiótico, colquicina, um alcalóide da pervinca, L-asparaginase, procarbazina, hidroxiuréia, mitotano, nitrosuréias ou um imidazol carboxamida. Agentes adequados são aqueles agentes que

promovem a despolarização da tubulina. Em uma forma de realização, o agente antitumoral é a colquicina ou um alcalóide da pervinca; vinblastina ou vincristina. Nas formas de realização em que o agente antitumoral seja a vincristina, as células preferivelmente são tratadas de modo a que eles fiquem resistentes à vincristina em uma concentração de cerca de 5 mg/ml. O tratamento das células para torná-las resistentes a um agente antitumoral pode ser efetuados pelo contato das células com o agente por um período de pelo menos 3 a 5 dias. O contato das células resultantes com qualquer dos compostos acima é realizado como anteriormente descrito. Além dos agentes de quimioterapia acima, os compostos podem também ser administrados juntamente com terapia de radiação.

Agentes de Alquilação

Os agentes de alquilação reagem com resíduos nucleofílicos, tais como as entidades químicas nos precursores de nucleotídeos para a produção do DNA. Eles afetam o processo da divisão celular pela alquilação destes nucleotídeos e prevenindo-se sua montagem no DNA.

Exemplos de agentes de alquilação incluem, porém sem limitar, as biscloroetilaminas (mostardas de nitrogênio, por exemplo clorambucil, ciclofosfamida, ifosfamida, mecloretamina, melfalan, mostarda de uracila), aziridinas (por exemplo, tiotepa), alquilalcona sulfonatos (por exemplo, o busulfan), nitrosouréias (por exemplo, carmustina, lomustina, estreptozocina), agentes alquilantes não clássicos (altretamina, decarbazina e procarbazina), compostos de platina (carboplastina e cisplatina). Estes compostos reagem com grupos fosfato, amino, hidroxila, sulfidril, carboxila e imidazol.

Sob condições fisiológicas, estes medicamentos ionizam e produzem íons positivamente carregados que se ligam a ácidos nucléico suscetível e proteínas, conduzindo à parada do ciclo celular e/ou morte celular. Os agentes de alquilação são agentes não específicos de fase do ciclo

celular, porque eles exercem sua atividade independentemente da fase específica do ciclo celular. As mostardas de nitrogênio e alquil alcona sulfonatos são muito eficazes contra as células nas fases G1 ou M. As nitrosouréias, as mostardas de nitrogênio e as aziridinas prejudicam o desenvolvimento das fases G1 e S para as fases M. Chabner e Collins editores. (1990) “Cancer Chemotherapy: Principles and Practice”, Filadélfia: JB Lippincott.

Os agentes de alquilação são ativos contra uma ampla variedade de doenças neoplásticas, com atividade significativa no tratamento das leucemias e dos linfomas, bem como dos tumores sólidos. Clinicamente, este grupo de medicamentos é rotineiramente usado no tratamento das leucemias agudas e crônicas; da doença de Hodgkin, do linfoma não de Hodgkin; do mieloma múltiplo; dos tumores cerebrais primários; dos carcinomas das mamas, ovários, testículos, pulmões, bexiga, cérvix, cabeça e pescoço, e do melanoma maligno.

A toxicidade principal comum a todos os agentes de alquilação é a mielossupressão. Adicionalmente, efeitos adversos gastrintestinais de gravidade variável ocorrem comumente e várias toxicidades dos órgãos são associadas com compostos específicos. Black e Livingston (1990) *Drugs* 39: 489-501 e 39: 652-673.

Antibióticos

Os antibióticos (por exemplo, antibióticos citotóxicos) atuam pela inibição direta da síntese do DNA ou do RNA e são eficazes na totalidade do ciclo celular. Exemplos de agentes antibióticos incluem as antraciclina (por exemplo, doxorubicina, daunorubicina, epirubicina, idarubicina e antracenediona), a mitomicina C, a bleomicina, a dactinomicina, a plicatomicina. Estes agentes antibióticos interferem com o crescimento celular por atingir diferentes componentes celulares. Por exemplo, acredita-se que as antraciclina interfiram com a ação da DNA

topoisomerase II nas regiões do DNA transcricionalmente ativo, o que leva às cisões dos filamentos de DNA.

5 Acredita-se que a bleomicina geralmente quele o ferro e forme um complexo ativado, o qual então se liga às bases do DNA, causando as cisões dos filamentos e a morte celular.

Os agentes antibióticos têm sido usados como agentes terapêuticos através de uma faixa de doenças neoplásticas, incluindo os carcinomas das mamas, dos pulmões, do estomago e das tireóides, os linfomas, as leucemias mielogenosas, os mielomas e os sarcomas. A toxicidade principal das antraciclinas dentro deste grupo e a mielossupressão, especialmente a granulocitopenia. A mucosite frequentemente acompanha a granulocitopenia, e a gravidade se correlaciona com o grau de mielossupressão. Existe também toxicidade cardíaca significativa associada com a administração em altas dosagens das antraciclinas.

15 Agentes Antimetabólicos

Os agentes antimetabólicos (isto é, antimetabólitos) constituem um grupo de medicamentos que interferem com os processos metabólicos vitais à fisiologia e à proliferação das células de câncer. As células de câncer ativamente proliferativas requerem síntese contínua de grandes quantidades de ácidos nucleicos, proteínas, lipídeos e outros constituintes celulares vitais.

Muitos dos antimetabólitos inibem a síntese da purina ou dos nucleosídeos de pirimidina ou inibem as enzimas da replicação do DNA. Alguns antimetabólitos também interferem com a síntese dos ribonucleotídeos e do metabolismo do RNA e/ou aminoácidos e com a síntese protéica também. Pela interferência com a síntese dos constituintes celulares, os antimetabólitos podem retardar ou interromper o crescimento das células de câncer. Exemplos de agentes antimetabólicos incluem, porém sem limitar, fluorouracil (5-FU), floxuridina (5-FUdR), metotrexato, leucovorin, hidroxiuréia, tioguanina (6-TG), mercaptopurina (6-MP), citarabina,

pentostatina, fosfato de fludarabina, cladribina (2-CDA), asparaginase e gencitabina.

Os agentes antimetabólicos têm sido amplamente usados para tratar de várias formas comuns de câncer, incluindo os carcinomas do cólon, reto, mama, fígado, estômago e pâncreas, melanoma maligno, leucemia aguda e crônica e leucemia de células pilosas. Muitos dos efeitos adversos do tratamento antimetabólito resultam da supressão da proliferação celular nos tecidos mitoticamente ativos, tais como a medula óssea ou a mucosa gastrintestinal. Os pacientes tratados com estes agentes comumente experimentam a supressão da medula óssea, a estomatite, a diarreia e a perda dos cabelos. Chen e Grem (1992) Curr. Opin. Oncol. 4: 1089-1098.

Agentes Hormonais

Os agentes hormonais são um grupo de medicamentos que regulam o crescimento e o desenvolvimento de seus órgãos alvo. A maioria dos agentes hormonais são esteróides sexuais e seus derivados e seus análogos, tais como os estrogênios, os progestogênios, antiestrogênios, androgênios, antiandrogênios e progestinas. Estes agentes hormonais podem servir como antagonistas dos receptores para os esteróides sexuais para infra-regular a expressão do receptor e a transcrição dos genes vitais. Exemplos de tais agentes hormonais são os estrogênios sintéticos (por exemplo o dietilestilbestrol), antiestrogênios (por exemplo, o tamoxifên, toremifeno, fluoximesterol e raloxifeno), antiandrogênios (bicalutamida, nilutamida, flutamida), inibidores da aromatase (por exemplo, aminoglutetimida, anastrozol e tetrazol), análogos do hormônio liberador de hormônio luteinizante (LHRH), cetoconazol, acetato de goserelina, leuprolida, acetato de megestrol e mifepristona.

Os agentes hormonais são usados para tratar do câncer de mamas, do câncer prostático, do melanoma e do meningioma. Tendo em vista que a ação principal dos hormônios é mediada através de receptores

esteróides, 60 % dos cânceres de mamas positivos do receptor responderam à terapia hormonal de primeira linha; e menos do que 10 % dos tumores negativos do receptor responderam. O principal efeito colateral associado com agentes hormonais é a exacerbação súbita. As manifestações frequentes são um aumento abrupto da dor óssea, eritema ao redor das lesões cutâneas, e hipercalcemia induzida.

Especificamente, os progestogênios são usados para tratar câncer endométricos, uma vez que estes cânceres ocorrem nas mulheres que ficam expostas a elevados níveis de estrogênio não hostis pelo progestogênio.

Os antiandrogênios são usados principalmente para o tratamento do câncer de próstata, o qual é dependente de hormônio. Eles são usados para reduzir os níveis de testosterona, e por esse meio inibem o crescimento do tumor.

O tratamento hormonal do câncer de mamas envolve reduzir o nível de ativação dependente do estrogênio dos receptores de estrogênio nas células neoplásticas de mamas. Os antiestrogênios atual mela ligação aos receptores de estrogênios e impedem o recrutamento de coativadores, assim inibindo o sinal do estrogênio.

Os análogos de LHRH são usados no tratamento do câncer de próstata para reduzir os níveis da testosterona e, assim, reduzir o crescimento do tumor.

Os inibidores da aromatase atual pela inibição da enzima necessária para a síntese dos hormônios. Nas mulheres pós-menopáusicas, a fonte principal de estrogênio é através da conversão da androstenodiona pela aromatase.

Agentes Derivados de Plantas

Agentes derivados de plantas são um grupo de medicamentos que são derivados das plantas ou modificados com base na estrutura molecular dos agentes. Eles inibem a replicação celular pelo impedimento da

montagem dos componentes das células que são essenciais à divisão celular.

Exemplos de agentes derivados das plantas incluem os alcalóides da pervinca (por exemplo, vincristina, vinblastina, vindesina, vinzolidina e vinorelbina), podofilotoxinas (por exemplo, etoposide (VP-16) e tenipósido (VM-26), taxanos (por exemplo, paclitaxel e docetaxel). Estes agentes derivados das plantas geralmente atuam como agentes antimitóticos que se ligam à tubulina e inibem a mitose. Acredita-se que as podofilotoxinas tais como o etoposide interfiram com a síntese do DNA mediante interação com a topoisomerase II, levando à cisão dos filamentos do DNA.

Os agentes derivados das plantas são usados para tratar de muitas formas de câncer. Por exemplo, a vincristina é usada no tratamento das leucemias, dos linfomas de Hodgkin e não de Hodgkin, e o neuroblastoma dos tumores da infância, o rhabdomyosarcoma, e o tumor de Wilms. A vinblastina é usada contra os linfomas, o câncer testicular, o carcinoma celular renal, os fungóides das micoses e o sarcoma de Kaposi. O doxetaxel tem apresentado atividade promissora contra o câncer de mamas avançado, o câncer pulmonar de células não pequenas (NSCLC), e o câncer ovariano.

O etoposide é ativo contra uma ampla faixa de neoplasmas, dentre os quais o câncer pulmonar de células pequenas, o câncer testicular e o NSCLC são os mais responsivos.

Os agentes derivados de plantas causam efeitos colaterais significativos nos pacientes em tratamento. Os alcalóides da pervinca apresentam diferente espectro de toxicidade clínica. Os efeitos colaterais dos alcalóides da pervinca incluem a neurotoxicidade, a função alterada das plaquetas, a mielossupressão e a leucopenia. O paclitaxel causa a neutropenia limitativa da dose com relativa escassez das outras linhagem de células hematopoéticas. A principal toxicidade das epipofilotoxinas é a hematológica (neutropenia e trombocitopenia).

Outros efeitos colaterais incluem as anormalidades das

enzimas hepáticas transientes, a alopecia, as reações alérgicas e a neuropatia periférica.

Agentes biológicos

5 Os agentes biológicos são um grupo de biomoléculas que eliciam a regressão do câncer/tumor, quando usados isoladamente ou em combinação com a quimioterapia e/ou a radioterapia. Exemplos de agentes biológicos incluem as proteínas imunomoduladoras, tais como as citocinas, os anticorpos monoclonais contra os antígenos tumorais, os genes supressores de tumores, e as vacinas para o câncer.

10 As citocinas possuem profunda atividade imunomoduladora. Algumas citocinas, tais como a interleucina-2 (IL-2, aldesleucina) e o interferon- α (IFN- α), apresentaram atividade antitumoral e têm sido aprovadas para o tratamento de pacientes com carcinoma metastático das células renais e com melanoma maligno metastático. A IL-2 é um fator de
15 crescimento de células T que é fundamental para as respostas imune mediadas pelas células T.

Acredita-se que os efeitos antitumorais seletivos da IL-2 sobre alguns pacientes sejam o resultado de uma resposta imune de mediação celular que discrimina entre apropriado e não apropriado.

20 O interferon- α inclui mais do que 23 subtipos relacionados com atividades sobrepondo-se. O IFN- α tem apresentado atividade contra muitas malignidades sólidas e hematológicas, estas últimas parecendo ser particularmente sensíveis.

25 Exemplos de interferons incluem o interferon- α , o interferon- β (interferon fibroblasto) e o interferon- γ (interferon de fibroblasto). Exemplos de outras citocinas incluem a eritropoietina (epoietina- α), granulócito-CSF (filgrastin), e granulócito, macrófago-CSF (sargramostim). Outros agentes imunomoduladores que não as citocinas, incluem o bacilo Calmette-Guérin, levamisol e octreotídeo, um octapeptídeo de atuação prolongada que imita os

efeitos da somatostatina hormonal de ocorrência natural.

Além disso o tratamento anticâncer pode compreender tratamento por imunoterapia com anticorpos e reagentes usados nas abordagens de vacinação tumoral. Os medicamentos principais nesta classe de
5 terapia são os anticorpos, isolados ou incluindo, por exemplo, toxinas ou quimioterápicos ou citotoxinas às células cancerígenas. Os anticorpos monoclonais contra os antígenos tumorais são anticorpos eliciados contra os antígenos expressos pelos tumores, preferivelmente antígenos específicos dos tumores. Por exemplo, o anticorpo monoclonal HERCEPTIN[®] (trastuzumab)
10 é originado contra o receptor2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2) que é superexpresso em alguns tumores mamários, incluindo o câncer mamário metastático. A superexpressão da proteína do HER2 é associada com doença mais agressivas prognósticos mais fracos na clínica. O HERCEPTIN[®] é usado como um agente isolado para o tratamento de
15 pacientes com câncer de mama metastático, cujos tumores superexpressam a proteína do HER2.

Outro exemplo de anticorpos monoclonais contra os antígenos tumorais é o RITUXAN[®] (rituximab) que é originado contra as células CD20 ou de linfomas e seletivamente exaurem as células normais e malignas
20 CD20+ pré-B e as células B maduras.

O RITUXAN é usado como um agente único para o tratamento de pacientes com linfoma recidivado ou refratário não de Hodgkin CD20+, de células B. O MYELOTARG[®] (gemtuzumab ozogamicina) e CAMPATH[®] (alemtuzumab) são outros exemplos de anticorpos monoclonais
25 contra os antígenos tumorais que podem ser usados.

Os genes supressores de tumores são genes que funcionam para inibir o crescimento celular e os ciclos de divisão, assim impedindo o desenvolvimento da neoplasia. As mutações nos genes supressores de tumores fazem com que as ignorem um ou mais dos componentes da rede de sinais

inibidores, superando os pontos de controle do ciclo celular e resultando em um mais elevado índice de câncer de crescimento celular controlado. Exemplos de genes supressores de tumores incluem Duc-4, NF-1, NF-2, RB, p53, WT1, BRCA1 e BRCA2.

5 O DPC4 acha-se envolvido no câncer pancreático e participa em uma via citoplasmática que inibe a divisão celular. O NF-1 codifica para uma proteína que inibe Ras, uma proteína inibidora citoplasmática. O NF-1
10 acha-se envolvido no neurofibroma e nos feocromocitomas do sistema nervoso e da leucemia mielóide. O NF-2 codifica uma proteína nuclear que se
15 acha envolvida no meningioma, no schwannoma e noependimoma do sistema nervoso. O RB codifica para a proteína pRB, uma proteína nuclear que é um inibidor principal do ciclo celular. O RB acha-se envolvido no retinoblastoma, bem como nos ossos, na bexiga, no câncer pulmonar e mamário de células pequenas. O p53 codifica para a proteína p53 que regula a divisão celular e
20 pode induzir a apoptose. A mutação e/ou a inação do p53 são observadas em uma ampla faixa de cânceres. O WTI é envolvido no tumor de Wilms dos rins. O BRCA1 é envolvido no câncer mamário e no ovariano, e o BRCA2 é envolvido no câncer mamário. O gene supressor de tumores pode ser transferido para as células tumorais em que ele exerça suas funções de
25 supressão de tumores.

 As vacinas de câncer constituem um grupo de agentes que induzem a resposta imune específica do corpo aos tumores. A maioria das vacinas de câncer sob pesquisa e desenvolvimento e as experiências clínicas são antígenos associados aos tumores (TAAs). Os TAAs são estruturas (isto é,
30 proteínas, enzimas ou carboidratos) que se acham presentes nas células tumorais e relativamente ausentes ou reduzidos nas células normais. Em virtude de serem regularmente singulares para a célula tumoral, os TAAs proporcionam alvos para o sistema imune reconhecer e provocar sua destruição. Exemplos de TAAs incluem gangliosídeos (GM2), antígenos

prostáticos específicos (PSA), α -fetoproteína (AFP), antígeno carcinoembrionário (CEA) (produzidos pelos cânceres colônicos e outros adenocarcinomas, por exemplo os cânceres de mamas, pulmões, gástricos e pancreáticos), antígenos associados aos melanomas (MART-1, gap100, MAGE 1,3 tirosinase), fragmentos de papilomavírus E6 e E7, células completas ou porções/lisados de células tumorais autólogas e células tumorais alogênicas.

Outras Terapias

Desenvolvimentos recentes têm introduzido, além das terapias citotóxicas e hormonais tradicionais usadas para tratar do câncer, terapias adicionais para o tratamento do câncer. Por exemplo, muitas formas de terapia de genes estão experimentando experiências pré-clínicas ou clínicas.

Além disso, as abordagens acham-se correntemente em desenvolvimento que se baseia na inibição da vascularização tumoral (angiogênese). O objetivo deste conceito é interromper a nutrição e o suprimento de oxigênio do tumor provido por um sistema vascular tumoral recém-construído.

Além disso, a terapia do câncer está também sendo tentada pela indução da diferenciação terminal das células neoplásticas. Agentes de diferenciação adequados incluem os compostos apresentados em qualquer uma ou mais do que uma das seguintes referências.

a) Compostos polares [Marks et al. (1987); Friend, C., Scher, W., Holland, J. W. e Sato, T. (1971) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 68: 378-382; Tanaka, M., Levy, J., Terada, M., Breslow, R., Rifkind, R. A. e Marks, P. A. (1975) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 72: 1003-1006; Reuben, R. C, Wife, R. L., Breslow, R., Rifkind, R. A. e Marks, P. A. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 73: 862-866];

b) Derivados de vitamina D e ácido retinóico [Abe, E., Miyaura, C., Sakagami, H., Takeda, M., Konno, K., Yamazaki, T., Yoshika,

S. e Suda, T. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 78: 4990-4994; Schwartz, E. L., Snoddy, J. R., Kreutter, D., Rasmussen, H. e Sartorelli, A. C. (1983) Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 24: 18; Tanenaga, K., Hozumi, M. e Sakagami, Y. (1980) Cancer Res. 40: 914-919];

5 c) Hormônios esteróides [Lotem, J. e Sachs, L. (1975) Int. J. Cancer 15: 731-740];

d) Fatores de crescimento [Sachs, L. (1978) Nature (Lond.) 274: 535, Metcalf, D. (1985) Science, 229: 16-22];

10 e) Proteases [Scher, W., Scher, B. M. e Waxman, S. (1983) Exp. Hematol. 11: 490-498; Scher, W., Scher, B. M. e Waxman, S. (1982) Biochem. & Biophys. Res. Comm. 109: 348-354];

f) Promotores tumorais [Huberman, E. e Callahan, M. F. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 76: 1293-1297; Lottem, J. e Sachs, L. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 76: 5158-5162]; e

15 g) Inibidores da síntese de DNA ou de RNA [Schwartz, E. L. e Sartorelli, A. C. (1982) Cancer Res. 42: 2651-2655, Terada, M., Epner, E., Nudel, U., Salmon, J., Fibach, E., Rifkind, R. A. e Marks, P. A. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 75: 2795-2799; Morin, M. J. e Sartorelli, A. C. (1984) Cancer Res. 44: 2807-2812; Schwartz, E. L., Brown, B. J., Nierenberg, M.,
20 Marsh, J. C. e Sartorelli, A. C. (1983) Cancer Res. 43: 2725-2730; Sugano, H., Furusawa, M., Kawaguchi, T. e Ikawa, Y. (1973) Bibl. Hematol. 39: 943-954; Ebert, P. S., Wars, I. e Buell, D. N. (1976) Cancer Res. 36: 1809-1813; Hayashi, M., Okabe, J. e Hozumi, M. (1979) Gann 70: 235-238].

25 A combinação das composições farmacêuticas desta invenção com qualquer dos agentes anticancerígenos descritos acima, e seu uso, acham-se dentro do escopo da presente invenção.

A invenção é ilustrada nos exemplos na Seção de Detalhes Experimentais que segue. Esta seção é apresentada para auxiliar no entendimento da invenção, mas não é preparada para limitar, sob qualquer

hipótese, a invenção apresentada nas reivindicações que seguem posteriormente.

SEÇÃO DE DETALHES EXPERIMENTAIS

EXEMPLO 1

5 PRODUÇÃO DA FORMA I DO SAHA

Etapa 1: ácido 8-anilino-8-oxo-octanóico; ácido suberanílico (Composto 3)

Ácido subérico (Composto 1, 174,2 g, 1,0 mol), anilina (Composto 2, 85,8 a 94,9 g) e tolueno (0,1 a 0,2 litro) são combinados, aquecidos até refluxo e submetidos ao refluxo por um mínimo de 60 horas. A
10 reação é extinta em refluxo mediante ajuste do pH a ≥ 11 com 10 % de solução de hidróxido de sódio. A fase aquosa é separada. A camada orgânica é combinada com tolueno (0,11 a 0,13 litro) e água (0,3 a 0,4 litro), e a camada aquosa é separada. As camadas aquosas das extrações e tolueno (0,11 a 0,13 litro) são combinados, sedimentadas e, depois, separadas. A camada
15 aquosa é extraída por duas vezes com tolueno (0,2 a 0,3 litros) em 60 a 70 °C. A camada aquosa é ajustada em 20 a 30 °C em um pH de 5,8 a 6,2, com o uso de ácido clorídrico e solução de hidróxido de sódio a 10 %, como necessário. A batelada é filtrada, lavada com água fria (0,2 a 0,3 litro) e depois lavada com isopropanol frio. O bolo úmido é secado em um máximo de 65 °C sob
20 vácuo para produzir o ácido suberanílico.

Etapa 2: 8-anilino-8-oxo-octanoato de metila; suberanilato de metila (Composto 4)

Ácido suberanílico (Composto 3, 249,3 g, 1,0 mol) e metanol (0,4 a 0,5 litro) são combinados e aquecidos em 45 a 55 °C. O pH é ajustado a
25 ≤ 2 com o uso de ácido clorídrico, e a temperatura da batelada é mantida em 45 a 55 °C até que a reação fique completa. A reação é extinta com água deionizada (0,1 a 0,2 litro). A batelada é esfriada até 25 a 30 °C e semeada para induzir a cristalização, e depois esfriada até 0 a 10 °C. A batelada é filtrada e o bolo é lavado com uma solução de metanol/água a 50:50 (v/v)

(0,28 a 0,34 litro) em 0 a 10 °C. O bolo úmido é secado em um máximo de 46 °C sob vácuo para produzir suberanilato de metila.

Etapa 3: N-hidróxi-N'-feniloctanodiamina; vorinostat (Composto 5)

Suberanilato de metila (Composto 4, 263,3 g, 1,0 mol) e
5 solução de base livre de hidroxilamina 2M (0,8 a 1,0 litro) são combinados. Enquanto se mantém a batelada em um máximo de 20 °C, o pH aparente é ajustado a $\geq 10,5$ com metóxido de sódio em metanol, conforme necessário. Ao mesmo tempo em que se mantém a batelada em um máximo de 20 °C e pH aparente $\geq 10,5$ com o uso de metóxido de sódio em metanol, a batelada é
10 curada. Durante a cura, a solução de base livre de hidroxilamina (0,5 a 0,6 litro) é adicionada, e a batelada é mantida no máximo de 20 °C e pH aparente $\geq 10,5$ até que a reação esteja completa. A reação é extinta pela adição da batelada à água (0,9 a 1,1 litro) enquanto se mantém a temperatura da batelada entre 20 a 35 °C, e o conteúdo de água da batelada é ajustado em 35
15 a 45 %. O pH é ajustado em 8,8 a 9,2 com o uso de ácido acético glacial e carbonato de sódio conforme necessário. A batelada é esfriada até 0 a 10 °C durante 5 a 10 horas. A batelada é filtrada e o bolo é lavado com metanol/água a 55:45 (v/v) (0,45 a 0,6 litro) em 0 a 10 °C. O bolo úmido é condicionado em vácuo até que o conteúdo de água se torne ≤ 35 %.

20 O bolo úmido bruto de vorinostat (264,32 g, 1,0 mol) é combinado com etanol desnaturado (1308 a 1599 g) e água (167 a 204 g). Cloridreto de hidroxilamina (> 9 mEquiv) e metóxido de sódio em metanol (> 9 mEquiv.) são adicionados à pasta, e a batelada é aquecida até 70 a 80 °C. A solução é filtrada e depois cristalizada mediante esfriamento lento até 0 a 10
25 °C. A batelada é filtrada e o bolo é lavado com etanol desnaturado/água frios a 4:1 (v/v). O bolo úmido é secado em um máximo de 45 °C sob vácuo.

Etapa 4: N-hidróxi-N'-feniloctanodiamida-vorinostat fino (moído úmido) (Composto 6)

Vorinostat (Composto 5, 264,3 g, 1,0 mol) é empastado em

uma solução de etanol/água 50:50 (v/v) (mínimo 2,8 litros). A pasta de vorinostat é moída úmida até um tamanho médio de 25 a 45 μm enquanto se mantém a temperatura da batelada em 7 a 30 $^{\circ}\text{C}$. A pasta final é filtrada e o bolo úmido é lavado com água em 0 a 40 $^{\circ}\text{C}$ (mínimo de 0,8 litro). O bolo úmido é secado em um máximo de 55 $^{\circ}\text{C}$ sob vácuo até um conteúdo máximo de água de 0,2 % (p/p) para produzir a substância medicamentosa de finos de vorinostat.

Etapa 5: N-hidróxi-N'-feniloctanodiamida-vorinostat grosso (Composto 7)

Vorinostat (Composto 5, 264,3 g, 1,0 mol) é empastado em uma solução de etanol/água a 50:50 (v/v) (4,9 a 5,5 litros). Sob um mínimo de 15 psig (103,5 kPa.m) de pressão, a pasta é aquecida até 65 a 70 $^{\circ}\text{C}$ até dissolver-se e depois é esfriada até 60 a 64 $^{\circ}\text{C}$. Uma pasta de semente é transferida para a batelada enquanto se mantém a temperatura desta. A batelada é curada por um mínimo de 2 horas em 61 a 63 $^{\circ}\text{C}$. A batelada é esfriada em três etapas mediante o controle da temperatura da camisa: (1) a 55 $^{\circ}\text{C}$ em 0,35 a 0,78 $^{\circ}\text{C}/\text{hora}$, (2) a 45 $^{\circ}\text{C}$ em 0,83 a 2,0 $^{\circ}\text{C}/\text{hora}$, e (3) a -5 a 25 $^{\circ}\text{C}$ em 2,0 a 4,44 $^{\circ}\text{C}/\text{hora}$. A pasta final é curada em -5 a 25 $^{\circ}\text{C}$ por cerca de 1 hora e depois filtrada. O bolo úmido é lavado com água (mínimo de 0,8 litro). O bolo úmido é secado em um máximo de 55 $^{\circ}\text{C}$ sob vácuo para produzir a substância medicamentosa de vorinostat grosso.

A pasta de semente é preparada pela combinação do bolo seco de vorinostat fino (97,8 a 116,3 g, 0,37 a 0,44 mol) e solução de etanol/água a 50:50 (v/v) (1,0 a 1,2 litro). Sob um mínimo de 15 psig (103,5 kPa.m) de pressão, a pasta de semente é aquecida até 61 a 66 $^{\circ}\text{C}$, curada por cerca de 0,5 hora e depois esfriada até 60 a 64 $^{\circ}\text{C}$.

EXEMPLO 2

MISTURA EM PÓ DE CRISTAIS DE SAHA

Mistura em pó

30 % dos cristais finos de Vorinostat são misturados com 70 %

dos cristais de Vorinostat grosso. 25,0 kg de cristais de SAHA Polimorfo I misturados foram primeiro peneirados através de uma peneira de malha 30 (600 μm). O SAHA resultante, 11,1 kg de Celulose Microcristalina (Avicel PH-101) e 1,13 kg de Croscarmelose Sódica foram então carregados no

5 misturador V de 141,6 litros, no misturador Tote de 113 litros ou em outro misturador de tamanho e tipo comparáveis. Quanto ao misturador V, o material resultante foi misturado até a homogeneidade por aproximadamente 8 minutos em aproximadamente 25 rpm. Quanto ao misturador Tote, o material resultante foi misturados até a homogeneidade por aproximadamente

10 17 minutos em aproximadamente 12 rpm.

LUBRIFICAÇÃO DA MISTURA EM PÓ

293,0 g de Estearato de Magnésio (gradação vegetal) foram peneirados através de uma peneira de malha 30 (600 μm) e carregados no misturador V com a mistura em combinada. A mistura resultante foi

15 misturada até a homogeneidade por aproximadamente 8 minutos em aproximadamente 25 rpm. 293,0 g de Estearato de Magnésio (gradação vegetal) foram também peneirados através de uma peneira de malha 60 (250 μm) e carregados no em um misturador Tote com a mistura em pó combinada. A mistura resultante foi misturada até a homogeneidade por

20 aproximadamente 17 minutos em aproximadamente 12 rpm.

A Tabela 1 fornece um resumo das propriedades físicas dos materiais brutos na cápsula.

TABELA 1

PROPRIEDADES FÍSICAS E QUÍMICAS DOS MATERIAIS BRUTOS

| Material bruto | Propriedade Física | Valor |
|---|---|---|
| ácido suberoilânida hidroxâmico (SAHA) - cristais finos e grossos | Ponto de Fusão (DSC) Solubilidade: o Em Água o Em Metanol o Em Etanol o Solução aquosa CIP 100 2% o Solução aquosa SD-20 2% | 161 a 163 °C < 0,1 mg/ml 42 mg/ml 0,1 mg/ml 11,3 mg/ml 0,085 mg/ml |
| Celulose Microcristalina (Avicel PH-101) NF, Farm. | Tamanho Médio Nominal de Partícula Conteúdo de Umidade | 50 μm $\leq 5 \%$ |

| | | |
|--|--|---|
| Eur., JP (FMC BioPolymer) | Densidade Aparente | 0,26 a 0,31 g/cm ³ |
| Croscarmelose Sódica NF, Farm. Eur., JP (FMC BioPolymer) | Densidade Aparente Densidade Derivada Distribuição do Tamanho de Partículas | 0,48 g/cm ³ 0,67 g/cm ³ ≤ 2 % em peso, retidos na Malha nº 200 (75 µm) ≤ 10 % em peso, retidos na Malha nº 325 (45 µm) |
| Estearato de Magnésio (gradação vegetal) NF, Farm. Eur., JP (Mallinckrodt Baker Inc.) | Densidade Aparente Distribuição do Tamanho de Partículas Área Superficial Específica | 0,16 g/cm ³ ≤ 2 % em peso retidos na Malha 200 (75 µm) 4,2 ± 0,04 m ² /g |

EXEMPLO 3

ENCAPSULAÇÃO DAS CÁPSULAS DE SAHA

Classificação da Encapsulação/Peso

A mistura em pó lubrificada foi encapsulada com o uso de um encapsulador H&K, pinos de recalque polidos ou pinos de recalque revestidos de nitreto de cromo, e cápsulas de tamanho “3” para o peso de cápsula desejado. As cápsulas enchidas foram polidas com o uso de um polidor de cápsulas e subsequentemente classificadas por peso com o uso de um classificador de pesos até a faixa de limite de peso apropriada. A Tabela 2 resume os ajustes do encapsulador.

TABELA 2

SUMÁRIO DOS AJUSTES OPERACIONAIS DO ENCAPSULADOR

| | |
|----------------------------|--|
| Disco de Dosar | 10,0 a 12,7 mm |
| Pinos de recalque/Estação | 3 ou 12 |
| Tipo do Pino de Recalque | Não Revestido Polido ou revestido de nitreto de cromo |
| Vácuo | ON |
| Velocidade do Encapsulador | 150 a 270 cps/min. ou 750 a 1000 cps/min. |

A Composição da Cápsula do SAHA final é ilustrada na Tabela 3. As cápsulas são classificadas em peso com o uso de um limite de aceitação para uma variação do peso da cápsula de ±10 % do peso da cápsula alvo. A variação do peso da cápsula em uma batelada típica é de ± 4 % do peso da cápsula alvo.

TABELA 3COMPOSIÇÃO DA CÁPSULA DO SAHA

| Ingrediente | Peso Unitário (mg) | Peso (%) |
|--|--------------------|----------|
| ácido suberoilânida hidroxâmico (SAHA) - Fino | X | Y |
| ácido suberoilânida hidroxâmico (SAHA) - Grosso | 100,0-x | 66,67-y |
| Celulose Microcristalina (Avicel (PH-101) NF, Farm. Eur., JP | 44,33 | 29,80 |
| Croscarmelose Sódica NF, Far. Eur., JP | 4,500 | 3,00 |
| Estearato de Magnésio (gradação vegetal) NF, Farm. Eur., JP | 1,170 | 0,78 |
| Cápsula de Gelatina Dura, Tamanho "3" Conisnap, Opaco Branco/Opaco Branco* | 49,00 | N/A |
| Totais** | 150,0 | 100,0 |

* A formulação de tinta da cápsula do mercado é a Colorcon S-1-17762. Cápsulas de gelatina livres de TSE.

5 ** Os pesos totais não incluem as cascas das cápsulas de gelatina dura.

EXEMPLO 4MEDICÃO DO ÍNDICE DE DISSOLUÇÃO DAS CÁPSULAS CONTENDO SAHA

10 O índice de dissolução do SAHA das cápsulas de gelatina dura é avaliado com o uso de um Aparelho de Dissolução II USP (VK 7000, Varian Inc., Cary, NC). Cada cápsula é colocada em um depressor helicoidal (Quality Lab Accessories L.L.C., Manville, NJ) e liberada a vasos contendo 900 ml de Tween 2,0 % (TCI America, Portland, Oregon) em uma temperatura de $37 \pm 0,5$ °C. As pás são giradas em 100 rpm e as amostras
15 foram puxadas em intervalos de tempo especificados através de um amostrador automático (VK 8000, Varian Inc., Cary, NC) equipado com filtros de circulação completa de 35 µm (Varian Inc., Cary, NC).

Subsequentemente, as amostras foram ensaiadas quanto ao SAHA por Cromatografia Líquida de Alto Desempenho (Agilent série 1100,

Agilent Technologies Inc., Wilmington, DE). A análise cromatográfica foi conduzida com o uso de uma coluna de tamanho de partícula de 5 μm Phenomenex Luna C8 (2) (100 x 4,6 mm), uma fase móvel de metanol/0,1 % de ácido trifluoroacético (Reagent Grade, Fisher), e um comprimento de onda de detecção de 242 nm.

EXEMPLO 5

ANÁLISE DE DIFRAÇÃO DE PÓ DE RAIÓ-X DO SAHA

A análise de Difração de Pó de Raio-X foi realizada sobre a Forma I de SAHA obtida de acordo com o Exemplo 1, e sobre as Formas II a V de SAHA preparadas pelos métodos detalhados na Tabela 4 abaixo.

TABELA 4

AMOSTRAS DE SAHA ANALISADAS POR DIFRAÇÃO DE PÓ DE RAIÓ-X

| Amostra de SAHA | Referência | Método |
|-------------------|--|--|
| Forma I de SAHA | - | Exemplo 1 |
| Forma II de SAHA | U.S. 5.369.108 Colunas 25-26 Procedimentos A, C, D | SAHA foi dissolvido em EtOAc/THF (3/1). As soluções foram passadas através de um tampão de gel de sílica usando EtOAc/THF (3/1). As frações foram coletadas e concentradas. O sólido pareceu rosado. |
| Forma III de SAHA | U.S. 5.369.108 Colunas 25-26 Procedimento B | SAHA foi dissolvido em metanol, filtrado através de celite, e concentrado em rotovap até a secura. Os resíduos foram empastados com hexanos e filtrados. Os sólidos pareceram rosados. |
| Forma IV de SAHA | Mai et al. OPPI Briefs (2001) Vol. 33(4), 391-394 | O SAHA foi cristalizado da acetonitrila |
| Forma V de SAHA | Stowell et al. J. Med. Chem. (1995), 38(8), 1411-1413 | A uma mistura de SAHA (4,0 g) em metanol anidro (15 ml) foi adicionado NaOMe (10,7 ml, 4,37 M, 47 mmoles). A solução tornou-se homogênea, mas o sólido foi formado após cerca de 5 minutos. A mistura foi agitada por 15 minutos e depois 100 ml de água foram acrescentados, seguidos pela adição lenta de ácido acético glacial (3,77 ml, 4,0 g. O sólido cristalino foi coletado e lavado com água (2 x 75 ml). O sólido foi secado sob alto vácuo durante a noite, produzindo 3,85 g (recuperação de 96 %) de um sólido amarelado. |

Análise de Difração de Raio-X:

As amostras foram analisadas em um Difratorômetro de Pó Automático Siemens D500 (Instrumento ID nº LD-301-4), que é operado de acordo com o Procedimento de Operação Padrão EQ-27, Rev. 12, de acordo com as instruções do fabricante. O Difratorômetro é equipado com um monocromador de grafita e uma fonte de raio-X de Cu ($\lambda = 1,54\text{Å}$) operada em 50 kV, 40 mA. A calibração dois-teta é realizada com o uso de um padrão de mica NBS (SRM675). As amostras foram analisadas com o uso dos seguintes parâmetros do instrumento:

| | | |
|----|----------------------------|-------------|
| 10 | Faixa de Medição | 4-40 2 teta |
| | Amplitude da Etapa: | 0,05 Å |
| | Tempo de Medição por Etapa | 1,2 segundo |

A preparação da amostra foi realizada de acordo com o Procedimento Padrão de Operação MIC-7, Rev. 2 (Seção 3.1.2), de acordo com as instruções do fabricante, usando uma placa de amostra de fundo zero (#1). As amostras foram processadas seguindo-se moagem leve de almofariz e pilão para garantir a homogeneidade.

As Figuras 3A a E apresenta os difratogramas de raio-X para as Formas I a V do SAHA. Os dados correspondentes para os difratogramas de raio-X são apresentados nas Tabelas 5 a 9, abaixo:

TABELA 5

FORMA I DO SAHA

| Pico | 2Teta (graus), | D (Å) |
|------|----------------|---------|
| 1 | 8,97 | 9,86159 |
| 2 | 9,37 | 9,43 |
| 3 | 17,46 | 5,07 |
| 4 | 19,41 | 4,57 |
| 5 | 20,04 | 4,43 |
| 6 | 23,96 | 3,71 |
| 7 | 24,44 | 3,64 |
| 8 | 24,76 | 3,59 |
| 9 | 24,96 | 3,56 |
| 10 | 27,96 | 3,19 |
| 11 | 43,29 | 2,08 |

TABELA 6

FORMA II DO SAHA

| Pico | 2Teta (graus). | D (Å) | Pico | 2Teta (graus). | D (Å) |
|------|----------------|-------|------|----------------|-------|
| 1 | 5,12 | 17,24 | 18 | 21,72 | 4,09 |
| 2 | 5,46 | 16,15 | 19 | 22,07 | 4,02 |
| 3 | 7,48 | 11,8 | 20 | 22,88 | 3,88 |
| 4 | 7,72 | 11,44 | 21 | 23,36 | 3,80 |
| 5 | 8,15 | 18,84 | 22 | 23,79 | 3,73 |
| 6 | 8,72 | 10,13 | 23 | 24,16 | 3,68 |
| 7 | 9,21 | 9,59 | 24 | 24,66 | 3,61 |
| 8 | 10,91 | 8,09 | 25 | 25,75 | 3,46 |
| 9 | 12,38 | 7,14 | 26 | 26,92 | 3,31 |
| 10 | 13,55 | 6,52 | 27 | 27,56 | 3,23 |
| 11 | 17,31 | 5,12 | 28 | 27,88 | 3,20 |
| 12 | 18,22 | 4,86 | 29 | 28,53 | 3,12 |
| 13 | 18,86 | 4,70 | 30 | 30,68 | 2,91 |
| 14 | 19,32 | 4,59 | 31 | 40,21 | 2,24 |
| 15 | 19,88 | 4,46 | 32 | 42,80 | 2,11 |
| 16 | 20,76 | 4,27 | 33 | 43,16 | 2,09 |
| 17 | 21,20 | 4,19 | | | |

TABELA 7

FORMA III DO SAHA

| Pico | 2Teta (graus). | D (Å) | Pico | 2Teta (graus). | D (Å) |
|------|----------------|-------|------|----------------|-------|
| 1 | 10,10 | 8,75 | 12 | 23,81 | 3,73 |
| 2 | 12,13 | 7,29 | 13 | 24,54 | 3,62 |
| 3 | 13,83 | 6,40 | 14 | 25,04 | 3,55 |
| 4 | 15,11 | 5,86 | 15 | 25,36 | 3,51 |
| 5 | 17,65 | 5,02 | 16 | 26,10 | 3,41 |
| 6 | 18,54 | 4,78 | 17 | 26,80 | 3,32 |
| 7 | 18,80 | 4,71 | 18 | 35,62 | 2,51 |
| 8 | 19,60 | 4,52 | 19 | 37,12 | 2,42 |
| 9 | 20,18 | 4,40 | 20 | 40,92 | 2,20 |
| 10 | 20,90 | 4,25 | 21 | 42,43 | 2,13 |
| 11 | 21,69 | 4,10 | 22 | 44,83 | 2,02 |

5 TABELA 8

FORMA IV DO SAHA

| Pico | 2Teta (graus). | D (Å) |
|------|----------------|-------|
| 1 | 8,84 | 9,99 |
| 2 | 9,25 | 9,55 |
| 3 | 11,00 | 8,04 |
| 4 | 12,44 | 7,11 |
| 5 | 17,38 | 5,10 |
| 6 | 19,37 | 4,58 |
| 7 | 19,93 | 4,45 |
| 8 | 22,36 | 3,97 |
| 9 | 22,89 | 3,88 |
| 10 | 23,83 | 3,73 |
| 11 | 24,24 | 3,67 |
| 12 | 24,80 | 3,59 |
| 13 | 25,80 | 3,45 |
| 14 | 26,96 | 3,30 |
| 15 | 27,84 | 3,20 |
| 16 | 28,39 | 3,14 |

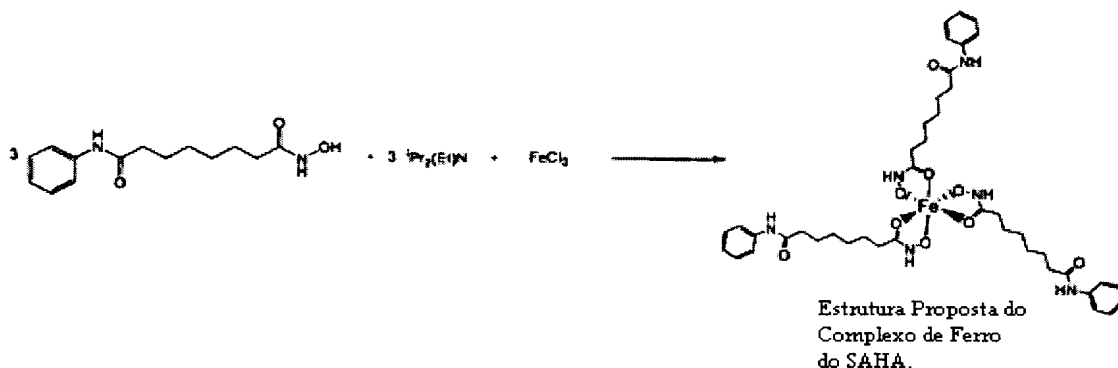
TABELA 9**FORMA V DO SAHA**

| Pico | 2Teta (graus) | D (Å) |
|------|---------------|-------|
| 1 | 5,08 | 17,39 |
| 2 | 9,20 | 9,60 |
| 3 | 10,07 | 8,77 |
| 4 | 12,13 | 7,29 |
| 5 | 15,09 | 5,86 |
| 6 | 17,65 | 5,02 |
| 7 | 19,32 | 4,59 |
| 8 | 19,80 | 4,48 |
| 9 | 20,16 | 4,41 |
| 10 | 20,87 | 4,25 |
| 11 | 21,67 | 4,10 |
| 12 | 24,56 | 3,62 |
| 13 | 25,25 | 3,52 |
| 14 | 26,10 | 3,41 |
| 15 | 35,62 | 2,51 |
| 16 | 37,12 | 2,42 |
| 17 | 40,90 | 2,20 |
| 18 | 41,78 | 2,16 |
| 19 | 42,42 | 2,13 |
| 20 | 44,82 | 2,02 |

O padrão de difração de pó de raio-X da Forma I do SAHA foi também coletado com o uso de um difratômetro de raio-X X'PERT Pro Phillips com uma radiação $K\alpha$ de cobre (comprimento de onda de 1,542 Å). As posições 2θ dignas de nota junto com os espaçamentos d acham-se resumidas na Tabela 5A.

TABELA 5A**FORMA I DO SAHA**

| Posição [$^{\circ} 2\theta$] | Espaçamento d [Å]. |
|--------------------------------|----------------------|
| 9,1 | 9,7 |
| 10,8 | 8,2 |
| 12,3 | 7,2 |
| 17,2 | 5,2 |
| 19,2 | 4,6 |
| 19,8 | 4,5 |
| 23,7 | 3,7 |
| 24,1 | 3,7 |
| 25,7 | 3,5 |
| 26,8 | 3,3 |
| 27,7 | 3,2 |

EXEMPLO 6PREPARAÇÃO DO COMPLEXO DE QUELATO DE METAL DE SAHA DE FERROEsquema da Reação Química5 Experimental

Na temperatura ambiente, o SAHA (1,0 g, 3,78 mmoles) e etanol (10,0 ml) foram adicionados a um frasco de Erlenmeyer, e N,N-diisopropiletilamina foi então adicionada em gotas (0,66 ml, 3,78 mmoles) com agitação. À pasta resultante, uma solução de cloreto férrico em etanol (0,205 g, 1,26 mmol em 10,0 ml de etanol) foi adicionada. A mistura imediatamente tornou-se de uma cor vermelha escura quando a solução de cloreto férrico foi adicionada. Etanol (5,0 ml) foi usado para lavar a solução de cloreto férrico remanescente no frasco de reação. Após 5 minutos de agitação na temperatura ambiente, a mistura de reação tornou-se uma solução vermelha escura claro. A mistura de reação foi deixada em agitação na temperatura ambiente por 16 horas. Após este período, um precipitado de cor laranja escura foi observado. O sólido de cor laranja foi colhido através de filtração e lavado com etanol (3 x 3,0 ml). O filtrado ficou incolor. O sólido de cor laranja foi deixado secar por 24 horas (1,02 g de massa, rendimento 96 %).

Análise

A análise elementar quanto ao conteúdo de C, H, N e Fe é fornecida abaixo na Tabela 10:

TABELA 10ANÁLISE ELEMENTAR

| % do Elemento | Teórico | Real |
|---------------|---------|-------|
| % de C | 59,64 | 58,29 |
| % de H | 6,79 | 6,88 |
| % de N | 9,94 | 9,56 |
| % de Fe | 6,60 | 6,3 |

Os resultados da análise elementar acham-se bem de acordo com a estrutura proposta apresentada acima.

5 EXEMPLO 7ANÁLISE DE DIFRAÇÃO DE PÓ DE RAIO-X DO COMPLEXO DE QUELATO DO SAHA DE FERRO

O padrão de difração de pó de raio-X (Figura 2) do complexo cristalino de quelato do SAHA de ferro foi gerado em um Sistema de Difração de Raio-X X'Pert PRO Analítico Phillips com consolo PW3040/60. Uma radiação K-Alfa de tubo de raio-X LEF Cu cerâmico PW3373/00 foi usada como a fonte. O complexo cristalino de quelato de SAHA de ferro pode ser caracterizado em 8,8, 14,5 e 21,8 graus (2θ). O complexo cristalino de quelato de SAHA de ferro é ainda caracterizado por picos em 13,3, 20,3 e 24,6 graus (2θ). Picos adicionais atribuídos ao complexo são observados em 18,5, 25,8 e 33,3 graus (2θ).

EXEMPLO 8ESTUDOS DO PACIENTE

Administrou-se aos pacientes com câncer a composição farmacêutica contendo um complexo de quelato inibidor da HDAC de metal, ou uma composição farmacêutica de um inibidor de HDAC com o composto de metal quelatável. As experiências adversas dos pacientes são registradas e comparadas com as experiências adversas dos pacientes que recebem o inibidor da HDAC.

25 É administrada aos pacientes que têm ou o Linfoma de Células-T Cutâneas ou o Linfoma de Células-T periféricas, a composição

farmacêutica uma vez por dia, continuamente, em que a quantidade de SAHA administrada é de 400 mg. Os pacientes ou com o Linfoma de Células-T Cutâneas ou o Linfoma de Células-T periféricas recebem a composição farmacêutica duas vezes por dia, três a cinco dias por semana, em que a quantidade de SAHA administrada para cada dose é de 300 mg. Os pacientes com leucemias avançadas e síndrome mielodisplástica (MDS) recebem a administração da composição farmacêutica oralmente (po) três vezes (tid) por dia durante 14 dias, seguidos por uma semana de repouso, no transcorrer de 3 semanas, em que a quantidade de SAHA administrada por cada dose é de 100 mg, 150 mg, 200 mg ou 250 mg.

Os pacientes com câncer recebem a administração simultânea de um inibidor da HDAC e do composto de metal quelatável. As experiências adversas dos pacientes são registradas e comparadas com as experiências adversas dos pacientes que recebem apenas o inibidor da HDAC.

Os pacientes ou com o Linfoma de células-T Cutâneas ou o Linfoma de células-T Periféricas recebem a administração simultânea de SAHA oralmente uma vez por dia, continuamente, a 400 mg ou a 300 mg duas vezes por dia, durante três a cinco dias por semana, e um suplemento de ferro ou zinco diariamente. Os pacientes com leucemias avançadas e síndrome mielodisplástica (MDS) recebem a administração oral da SAHA (po) a 100 mg, 150 mg, 200 mg ou 250 mg três vezes ao dia (tid) durante 14 dias, seguidos por 1 semana de repouso, e um suplemento de ferro ou zinco diariamente, durante um período de 3 semanas. Os pacientes com câncer avançado, incluindo o câncer hematológico e os tumores sólidos, recebem oralmente 400 ou 500 mg de SAHA uma vez por dia, diariamente, 200 ou 300 mg duas vezes por dia, diariamente, 300 mg ou 400 mg duas vezes por dia, intermitentemente 3 vezes por semana, ou 100

mg três vezes por dia (2 semanas), e um suplemento de ferro ou zinco diariamente. Os pacientes com Linfoma de Células-B Grandes Difusas (DLBCL) ou mesotelioma, recebem oralmente a administração de 300 mg de SAHA duas vezes por dia, 3 dias por semana, e um duplemento diário de ferro ou zinco. Espera-se que a quantidade de zinco ou ferro administrada varie de paciente para paciente e seja a quantidade necessária para aliviar as toxicidades induzidas pelo inibidor da HDAC sem produzir toxicidade mediada pela sobrecarga do metal.

EXEMPLO 9

10 EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE ZINCO SOBRE OS EFEITOS COLATERAIS MEDIADOS PELO VORINOSTAT

Para testar se a dose máxima tolerada (MTD) do vorinostat nos camundongos poderia ser aumentada com suplementação de zinco, os Camundongos (CD1 nu/nu fêmeas, 6 a 8 semanas de idade, Charles River Laboratories), recebem a administração de veículo, 150 mg/kg (MTD) ou 300 mg/kg de vorinostat em veículo (Tabela 11). Os camundongos receberam 0,5, 1 ou 5 equivalentes molares (relativos ao vorinostat) de cloreto de zinco. Isto corresponde a doses de $ZnCl_2$ de 38,5, 77 e 385 mg/kg para o grupo de vorinostat de 150 mg/kg.

20 Um estudo inicial de camundongos sem tumores é usado para estabelecer a MTD das combinações de vorinostat/Zn. Se uma modificação na MTD for observada, uma experiência subsequente com os camundongos é feita para estabelecer os xenoenxertos subcutâneos do carcinoma do cólon HCT116 (s.q.) para avaliar o papel da MTD alterada sobre o crescimento tumoral (eficácia).

TABELA 11

MTD DO VORINOSTAT E SUPLEMENTAÇÃO DE ZINCO

Todos os camundongos recebem a dose (i.p.) diária (qd) por 14 dias com as quantidades indicadas dos compostos.

| Grupo | N | Agente | Mg / kg | Agente | Mg / kg |
|-------|---|------------|---------|-------------------|---------|
| 1 | 5 | Veículo. | -- | -- | -- |
| 2 | 5 | Veículo. | -- | ZnCl ₂ | 38.5 |
| 3 | 5 | Veículo. | -- | ZnCl ₂ | 77 |
| 4 | 5 | Veículo. | -- | ZnCl ₂ | 385 |
| 5 | 5 | Vorinostat | 150 | -- | -- |
| 6 | 5 | Vorinostat | 150 | ZnCl ₂ | 38.5 |
| 7 | 5 | Vorinostat | 150 | ZnCl ₂ | 77 |
| 8 | 5 | Vorinostat | 150 | ZnCl ₂ | 385 |
| 9 | 5 | Vorinostat | 300 | -- | -- |
| 10 | 5 | Vorinostat | 300 | ZnCl ₂ | 77 |
| 11 | 5 | Vorinostat | 300 | ZnCl ₂ | 154 |
| 12 | 5 | Vorinostat | 300 | ZnCl ₂ | 770 |

O veículo para o Vorinostat (Dose IP em 10 ul/g) contém 10 % v/v de DMSO (Sigma, cat.: D8418), 45 % v/v de PEG-400 e 45 % de água. O vorinostat no veículo (Dose IP em 10 ul/g) é preparado pesando-se o composto (pré-aquecer cada componente do veículo a 37 °C antes de formular o composto), adicionar 1/10 de volume final de DMSO 100 %, sonicando até se obter uma solução transparente, adicionar 50 % de PEG-400 (em água) até o volume final desejado, sonicando e mantendo-se nos 37 °C todo o tempo. ZnCl₂ é dissolvido em solução salina tamponada de fosfato (PBS) estéril.

O peso do corpo e a sobrevivência são monitorados como indicações da toxicidade. As doses que resultem na perda de peso corporal médio do grupo de mais do que a média de 20 % serão considerados não tolerados. Da mesma forma, as doses que resultem na morte relacionada ao tratamento de mais do que 2 camundongos por grupo serão consideradas não toleradas. Quanto aos animais com tumores, os tamanhos dos tumores na resposta ao tratamento são medidos pela aplicação do paquímetro 2 a 3 vezes por semana.

TABELA 12

TÉRMINO DO PROGRAMA DE COLETA DE SORO DO ESTUDO

| | |
|---------------------------------------|-------------------------------------|
| Primeiros 2 camundongos em cada grupo | Últimos 3 camundongos em cada grupo |
| RO 0,5 h PD, CP 4 h PD | RO 2 h PD, CP 24 h |

Punção cardíaca (terminal)

Sangramento retro-orbitário: 0,2 ml de sangue é coletado por sangramento retro-orbitário sob anestesia de isoflurano. O sangue é processado quanto ao soro (nenhum anticoagulante é adicionado).

- 5 Punção Cardíaca: O volume total de sangue é colhido por punção cardíaca terminal sob anestesia de CO₂. O sangue é processado quanto ao soro (nenhum anticoagulante é adicionado).

Hemograma Completo (CBC)

- 10 O tratamento do Vorinostat tem sido associado com números reduzidos de certas populações sanguíneas, incluindo as plaquetas e os linfócitos. O CBC de camundongos são monitorados antes (linha de referência) e durante (Dia 7), e após (Dia 14) o tratamento. Uma pequena quantidade (< 50 µl) de sangue é obtida pelas subséries de sangramento RO contadas poro um instrumento Advia 120 (Siemens Medical).

15 Autópsia e cultivo tecidual

- Quanto aos animais com tumores, o tumor de xenoenxerto é removido, pesado, e porções em excesso são congeladas ou fixadas em formalina tamponada. O material do tumor fixado é processado como lâminas incrustadas de parafina e submetidas às análises imunoistoquímicas. Estas
20 incluem ensaios para proliferação (Ki-67, BrdU), apoptose (Caspase-3) e acetilação de várias histonas (H2, H3, H4). A proteína histona do material congelado é usada para ensaiar as mudanças de acetilação da histona por ELISA (ensaio imunoabsorvente ligado a enzima). Os camundongos são também submetidos a uma autópsia completa.

- 25 Embora esta invenção tenha sido particularmente apresentada e descrita com referência às suas formas de realização, será entendido por aqueles habilitados na técnica que várias modificações na forma e nos detalhes poderão ser nela feitas, sem que se afaste do significado da invenção descrita. Certamente, o escopo da invenção é definido pelas reivindicações que seguem.

REFERÊNCIAS

1. Sporn, M. B., Roberts, A. B. E Driscoll, J. S. (1985) em Cancer: Principles and Practice of Oncology, eds. Hellman, S., Rosenberg, S. A. e DeVita, V. T., Jr., Ed. 2, (J. B. Lippincott, Filadélfia), p. 49.
- 5 2. Breitman, T. R., Selonick, S. E. e Collins, S. J. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 2936-2940.
3. Olsson, I. L. e Breitman, T. R. (1982) Cancer Res. 42: 3924-3927.
4. Schwartz, E. L. e Sartorelli, A. C. (1982) Cancer Res. 42:
10 2651-2655.
5. Marks, P. A., Sheffery, M. e Rifkind, R. A. (1987) Cancer Res. 47: 659.
6. Sachs, L. (1978) Nature (Lond.) 274: 535.
7. Friend, C., Scher, W., Holland, J. W. e Sato, T. (1971) Proc.
15 Natl. Acad. Sci. (USA) 68: 378-382.
8. Tanaka, M., Levy, J., Terada, M., Breslow, R., Rifkind, R. A. e Marks, P. A. (1975) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 72: 1003-1006.
9. Reuben, R. C, Wife, R. L., Breslow, R., Rifkind, R. A. e Marks, P. A. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 73: 862-866.
- 20 10. Abe, E., Miyaura, C, Sakagami, H., Takeda, M., Konno, K., Yamazaki, T., Yoshika, S. e Suda, T. (1981) Proc. Natl, Acad, Sci. (USA) 78: 4990-4994.
11. Schwartz, E. L., Snoddy, J. R., Kreutter, D., Rasmussen, H. e Sartorelli, A. C. (1983) Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 24: 18.
- 25 12. Tanenaga, K., Hozumi, M. e Sakagami, Y. (1980) Cancer Res. 40: 914-919.
13. Lotem, J. e Sachs, L. (1975) Int. J. Cancer 15: 731-740.
14. Metcalf, D. (1985) Science, 229: 16-22.
15. Scher, W., Scher, B. M. e Waxman, S. (1983) Exp.

Hematol. 11: 490-498.

16. Scher, W., Scher, B. M. e Waxman, S. (1982) *Biochem. & Biophys. Res. Comm.* 109: 348-354.

17. Huberman, E. e Callahan, M. F. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 76: 1293-1297.

18. Lottem, J. e Sachs, L. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 76: 5158-5162.

19. Terada, M., Epner, E., Nudel, U., Salmon, J., Fibach, E., Rifkind, R. A., e Marks, P. A. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 75: 2795-2799.

20. Morin, M. J. e Sartorelli, A. C. (1984) *Cancer Res.* 44: 2807-2812.

21. Schwartz, E. L., Brown, B. J., Nierenberg, M., Marsh, J. C. e Sartorelli, A. C. (1983) *Cancer Res.* 43: 2725-2730.

22. Sugano, H., Furusawa, M., Kawaguchi, T. e Ikawa, Y. (1973) *Bibl. Hematol.* 39: 943-954.

23. Ebert, P. S., Wars, L. e Buell, D. N. (1976) *Cancer Res.* 36: 1809-1813.

24. Hayashi, M., Okabe, J. e Hozumi, M. (1979) *Gann* 70: 235-238.

25. Richon, V. M., Webb, Y., Merger, R. et al. (1996) *PNAS* 93: 5705-5708.

26. Cohen, L. A., Amin, S., Marks, P. A., Rifkind, R. A., Desai, D. e Richon, V. M. (1999) *Anticancer Research* 19: 4999-5006.

27. Grunstein, M. (1997) *Nature* 389: 349-352.

28. Finnin, M. S., Donigian, J. R., Cohen, A. et al. (1999) *Nature* 401: 188-193.

29. Van Lint, C., Emiliani, S., Verdin, E. (1996) *Gene Expression* 5: 245-253.

30. Archer, S., Shufen, M., Shei, A., Hodin, R. (1998) PNAS 95: 6791-6796.

31. Dressel, U., Renkawitz, R., Baniahmad, A. (2000) Anticancer Research 20(2A): 1017-1022.

5 32. Parker, Vigoroux, Reed, AIChE J. (2000) pp. 1290-1299.

33. Nunez, Espiell, Chem. Eng. Sci. (1986) pp. 2075-2083.

34. O. Levenspiel: Chemical Reaction Engineering, 2^o Edição, p. 373.

10 35. M. Vanni: J. of Colloid and Interface Sci. (2000) pp. 143-160.

36. P. J. Hill e K. M. Ng, AIChE J. (1995) pp. 1204-1216.

REIVINDICAÇÕES

1. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende uma quantidade terapêuticamente eficaz do inibidor da Histona Desacetilase (HDAC) e um composto de metal quelatável, e um carreador farmacêuticamente aceitável.

2. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o composto de metal quelatável compreende ferro ou zinco.

3. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 2, caracterizada pelo fato de que o inibidor da HDAC é o ácido suberoilânilda hidroxâmico (SAHA) ou sal ou hidrato ou solvato farmacêuticamente aceitáveis do mesmo

4. Método para tratar câncer e aliviar os efeitos colaterais do inibidor da HDAC, caracterizado pelo fato de que compreende a etapa de administrar a um paciente a composição farmacêutica como definida na reivindicação 1.

5. Método para tratar câncer e aliviar os efeitos colaterais do inibidor da HDAC, caracterizado pelo fato de que compreende a etapa de coadministrar a um paciente uma quantidade terapêuticamente eficaz do inibidor da HDAC e um composto de metal quelatável.

6. Método de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que o composto de metal quelatável compreende ferro ou zinco.

7. Método de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que o inibidor da HDAC é o ácido suberoilânilda hidroxâmico (SAHA) ou um sal ou hidrato ou solvato farmacêuticamente aceitáveis do mesmo.

8. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende uma quantidade terapêuticamente eficaz do complexo de quelato de SAHA de ferro ou seu hidrato ou solvato, e um carreador

farmaceuticamente aceitável.

9. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 8, caracterizada pelo fato de que a relação estequiométrica do ferro para a SAHA é de 1:3.

5 10. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 9, caracterizada pelo fato de que o complexo de quelato de SAHA de ferro é cristalino, e é por um padrão de pó de difração de raio-X com radiação $K\alpha$ de cobre, incluindo os picos característicos em 8,8, 14,5 e 21,8 graus 2θ .

10 11. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 9, caracterizada pelo fato de que o complexo de quelato de ferro é cristalino, e é caracterizado por um padrão de difração pó de raio-X com radiação $K\alpha$ de cobre, incluindo os picos característicos em 8,8, 13,3, 14,5, 20,3, 21,8 e 24,6 graus 2θ .

15 12. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 9, caracterizada pelo fato de que o complexo de quelato de ferro é cristalino, e é caracterizado por um padrão de difração de raio-X com radiação $K\alpha$ de cobre, incluindo os picos característicos em 8,8, 13,3, 14,5, 18,5, 20,3, 21,8, 24,6, 25,8 e 33,3 graus 2θ .

20 13. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende uma quantidade terapêuticamente eficaz do complexo de quelato de SAHA de zinco, ou seu hidrato ou solvato, e um carreador farmaceuticamente aceitável.

25 14. Método para tratar câncer, caracterizado pelo fato de que compreende a etapa de administrar a um paciente uma quantidade terapêuticamente eficaz do complexo de quelato inibidor da HDAC de metal, ou seu hidrato ou solvato.

15. Método de se obter um complexo de quelato inibidor da HDAC de metal cristalino, caracterizado pelo fato de que compreende a etapa de cristalizar o complexo de quelato em um solvente orgânico ou em uma

mistura de solvente orgânico e água.

16. Método de se obter um complexo de quelato inibidor da HDAC de metal, caracterizado pelo fato de que compreende a etapa de adicionar um composto de metal quelatável e base com o inibidor de HDAC em um meio de reação.

5

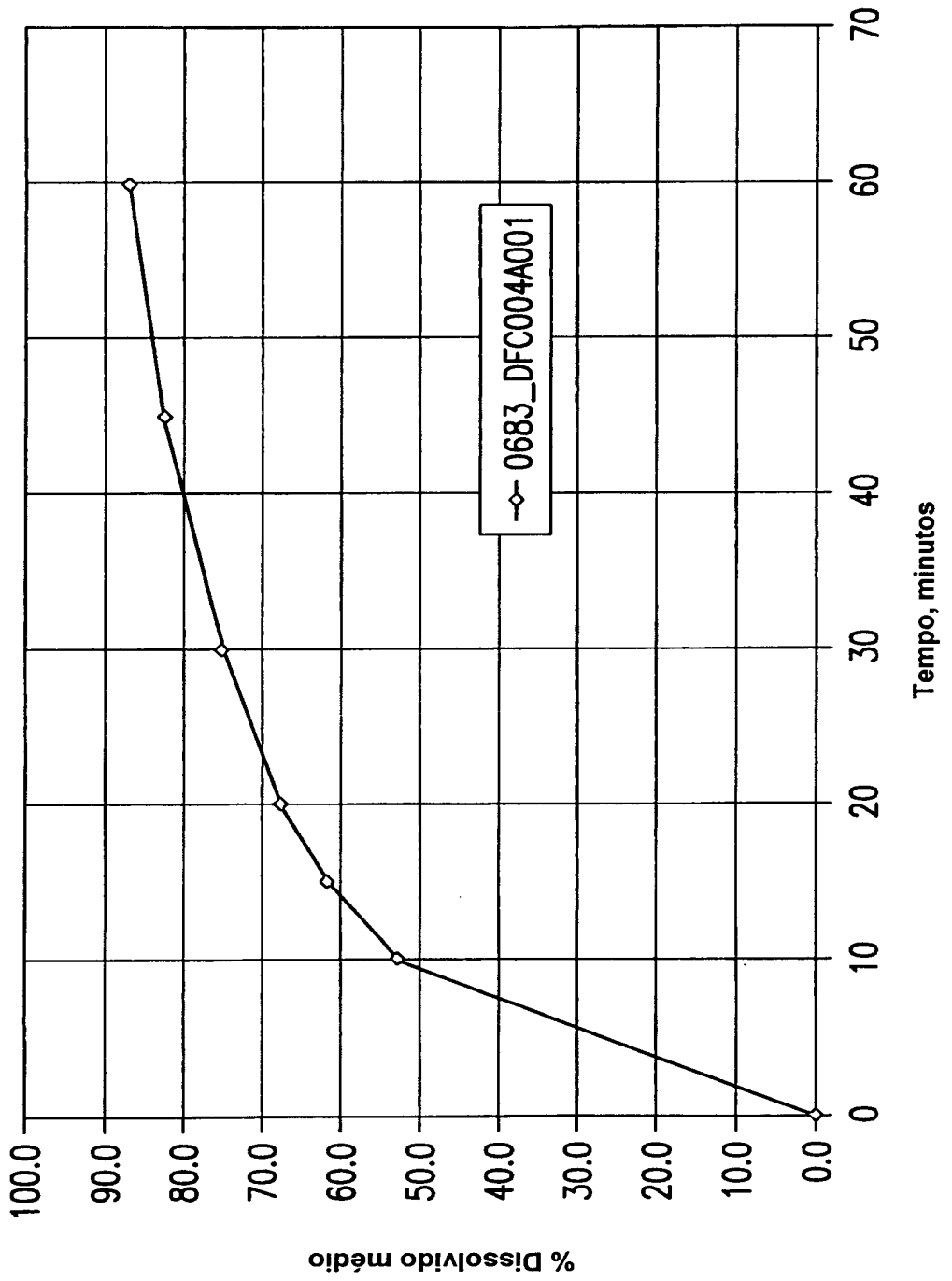


FIG.1

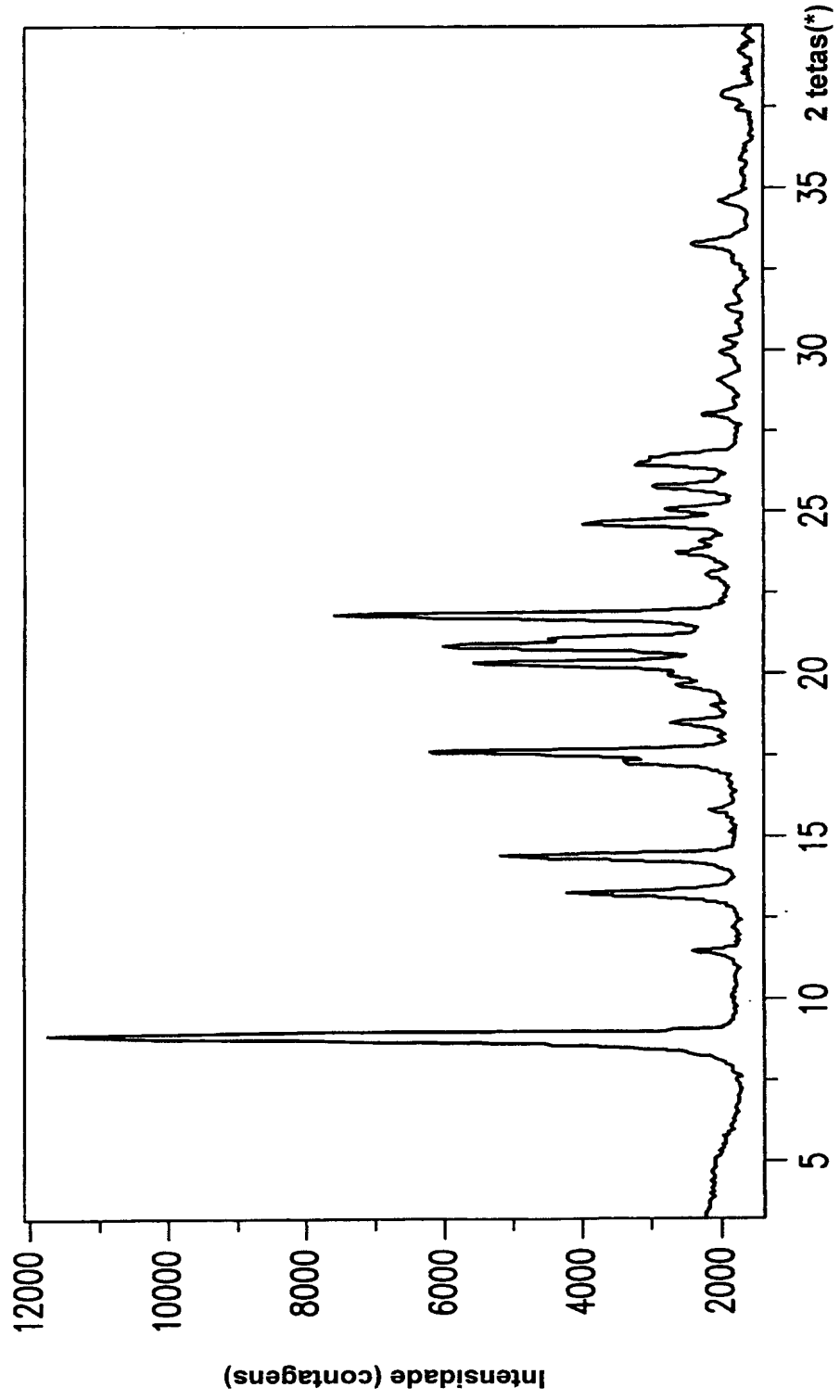


FIG.2

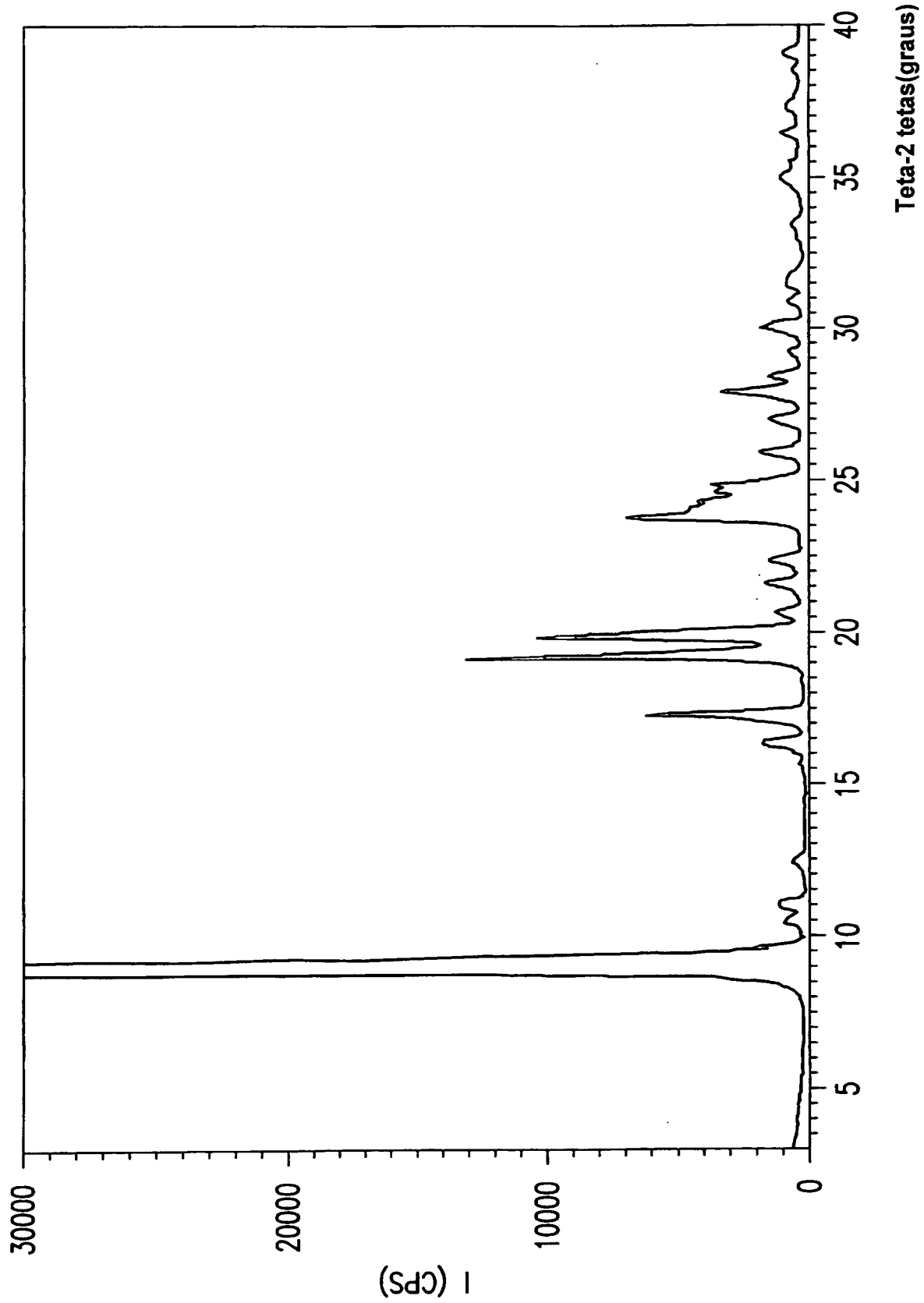


FIG.3A

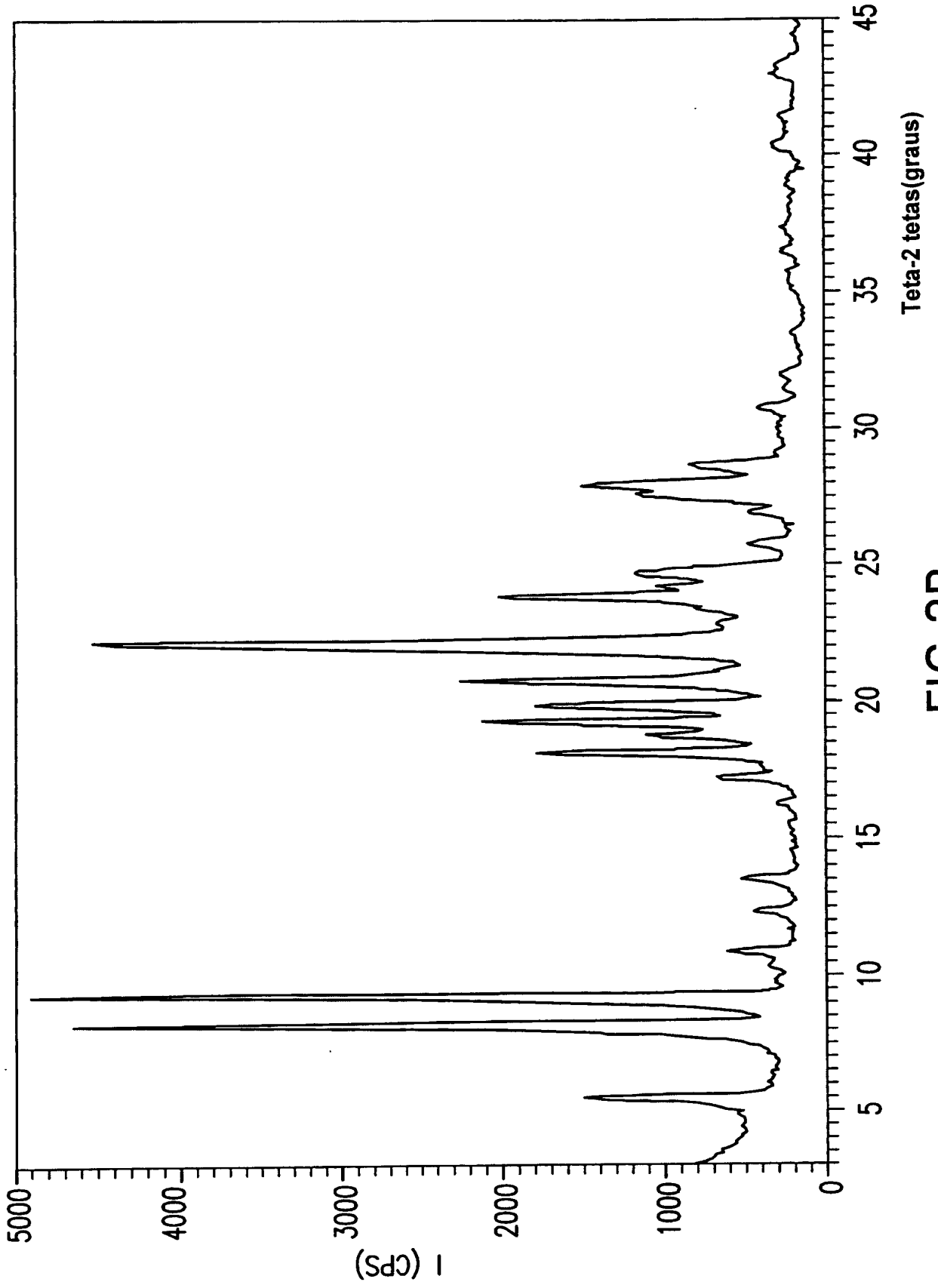


FIG.3B

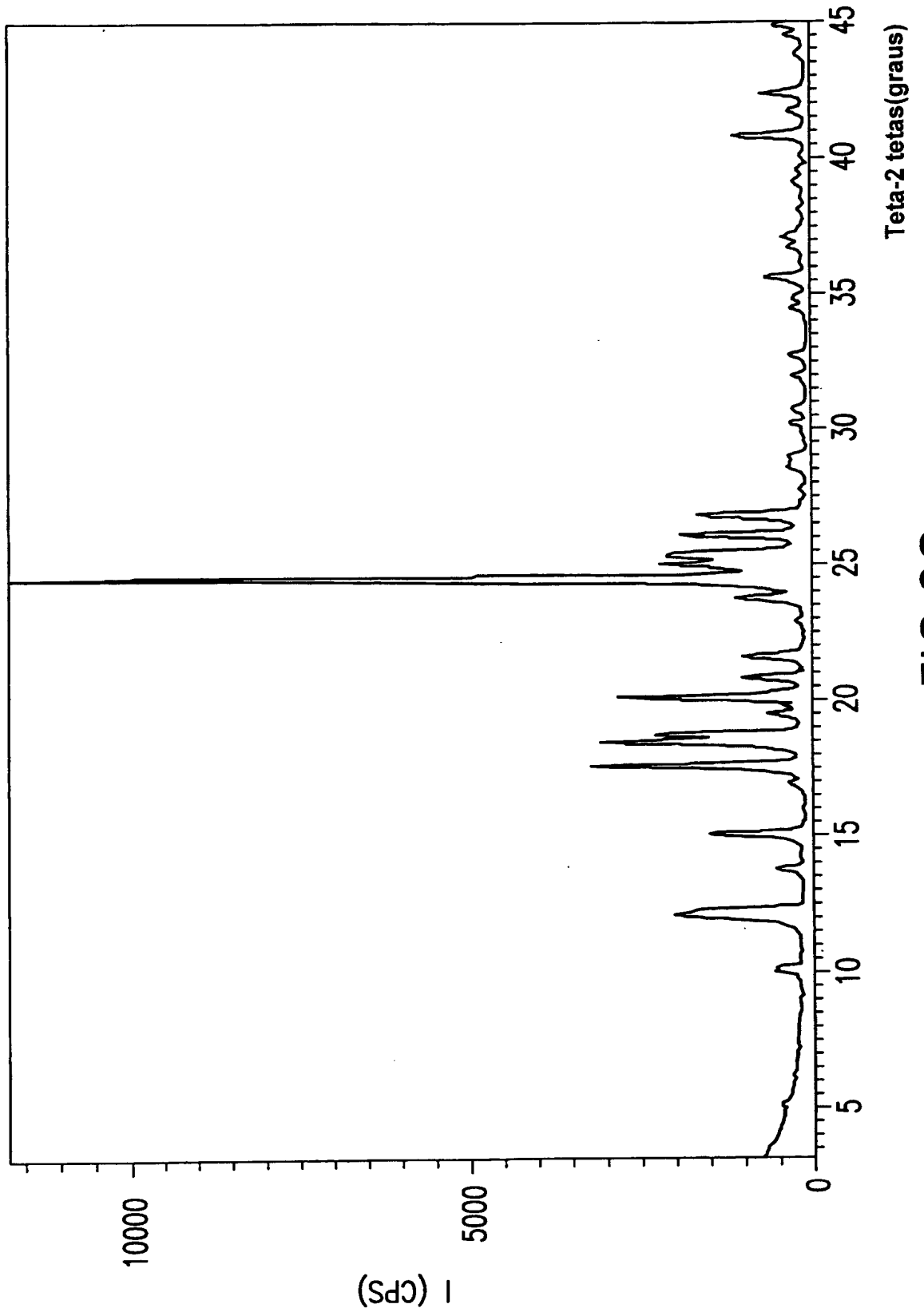


FIG.3C

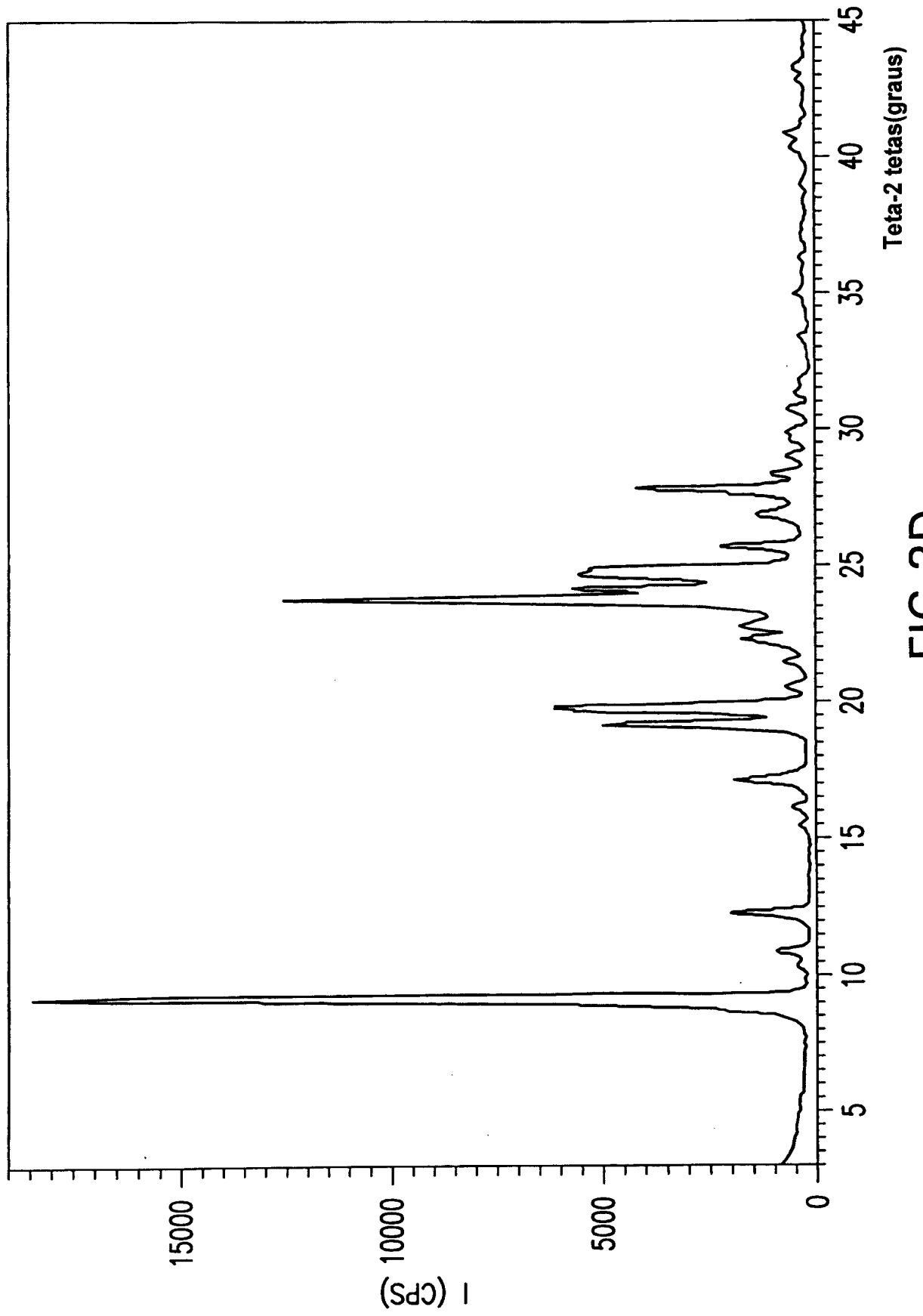


FIG.3D

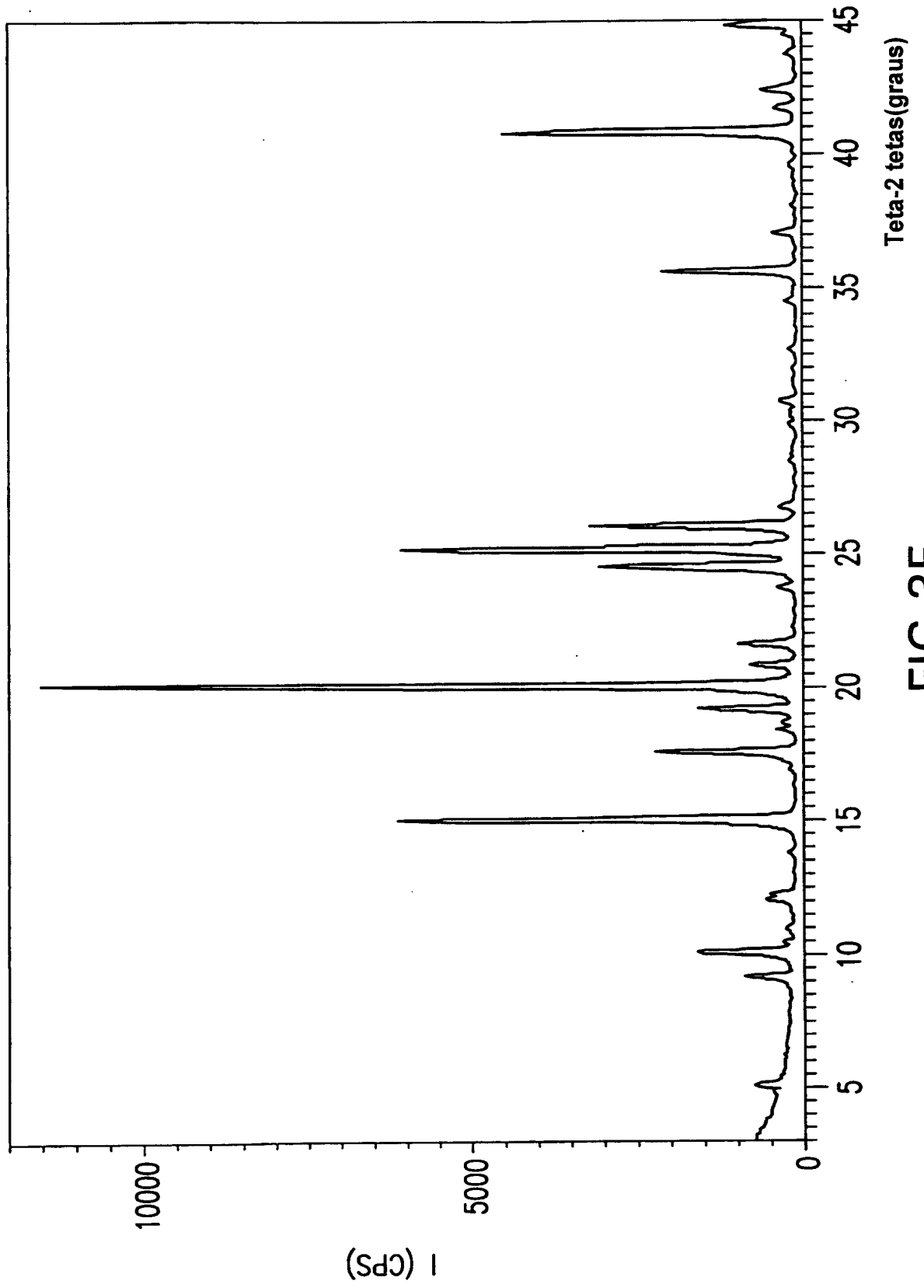


FIG.3E

RESUMO

“COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, MÉTODO PARA TRATAR
CÂNCER E ALIVIAR OS EFEITOS COLATERAIS DO INIBIDOR DA
HDAC, E, MÉTODO DE SE OBTER UM COMPLEXO DE QUELATO
5 INIBIDOR DA HDAC DE METAL”

A presente invenção provê composições farmacêuticas de um
inibidor de HDAC e composto de metal quelatável. Em uma forma de
realização, a invenção provê um método para tratar câncer e aliviar os efeitos
colaterais do inibidor de HDAC pela administração da composição
10 farmacêutica. Em outra forma de realização, a presente invenção também
provê composições farmacêuticas de complexos de quelato inibidor de HDAC
de metal. Em outra forma de realização, a invenção provê métodos de tratar
do câncer mediante a administração das composições farmacêuticas. A
invenção provê composições cristalinas de complexos de quelato inibidor de
15 HDAC de metal e métodos de produzi-los.