

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 532 607**

51 Int. Cl.:

A61K 47/12 (2006.01)
A61K 47/38 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)
A61K 9/16 (2006.01)
A61K 9/48 (2006.01)
A61K 31/13 (2006.01)
A61K 31/164 (2006.01)
A61K 31/165 (2006.01)
A61K 31/19 (2006.01)
A61K 31/44 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.03.2003 E 09005103 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.12.2014 EP 2082737**

54 Título: **Métodos de inducción de la diferenciación terminal**

30 Prioridad:

04.03.2002 US 361759 P

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

30.03.2015

73 Titular/es:

**MERCK HDAC RESEARCH, LLC (100.0%)
33 Avenue Louis Pasteur
Boston, MA 02115, US**

72 Inventor/es:

MILLER, THOMAS A

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 532 607 T3

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

DESCRIPCIÓN

Métodos de inducción de la diferenciación terminal

5 **Campo de la invención**

La presente invención proporciona una forma cristalina de ácido hidroxámico suberoilánilida (SAHA) para inducir selectivamente la diferenciación terminal, la detención del crecimiento celular y/o la apoptosis de las células neoplásicas, y/o inhibir las histona desacetilasas (HDAC), y de composiciones farmacéuticas que comprenden SAHA. Las formulaciones orales de las composiciones farmacéuticas tienen perfiles farmacocinéticos favorables, tales como una alta biodisponibilidad y, sorprendentemente, dan lugar a niveles elevados en sangre de los compuestos activos durante un período prolongado de tiempo.

15 **Antecedentes de la invención**

A lo largo de la presente solicitud, se hace referencia a diversas publicaciones mediante números arábigos entre paréntesis. Las citas completas de estas publicaciones se pueden encontrar al final de la memoria descriptiva, inmediatamente antes de las reivindicaciones.

20 El cáncer es un trastorno en el que una población de células ha dejado de responder, en diversos grados, a los mecanismos de control que normalmente gobiernan la proliferación y la diferenciación. Durante muchos años, ha habido dos estrategias principales para el tratamiento quimioterapéutico del cáncer: a) el bloqueo de la proliferación de las células tumorales dependiente de hormonas interfiriendo en la producción o la acción periférica de las hormonas sexuales; y b) la destrucción de las células cancerosas directamente, exponiéndolas a sustancias citotóxicas que lesionan las poblaciones tanto de células neoplásicas como de células normales

También se está intentando tratar el cáncer mediante la inducción de la diferenciación terminal de las células neoplásicas (1). En modelos de cultivo celular, se ha informado de la diferenciación mediante la exposición de las células a varios estímulos, incluyendo: AMP cíclico y ácido retinoico (2, 3), aclarubicina y otras antraciclina (4).

30 A pesar de los numerosos avances en el campo de la oncología, la mayoría de los tumores sólidos sigue siendo incurable en los estadios avanzados. En la mayoría de los casos, se usa la terapia citotóxica; sin embargo, con frecuencia provoca una importante morbilidad en el paciente sin ningún beneficio clínico significativo. Se están investigando agentes menos tóxicos y más específicos para tratar y controlar los tumores malignos avanzados.

35 Existen abundantes pruebas de que la transformación neoplásica no destruye necesariamente el potencial de las células cancerosas para diferenciarse (1, 5, 6). Hay muchos ejemplos de células tumorales que no responden a los reguladores normales de la proliferación y parecen encontrarse bloqueados en la expresión de su programa de diferenciación, pudiéndose hacer, sin embargo, que se diferencien y cesen su replicación. Varios agentes, incluyendo algunos compuestos polares relativamente simples (5, 7-9), derivados de la vitamina D y el ácido retinoico (10-12), hormonas esteroides (13), factores de crecimiento (6, 14), proteasas (15, 16), promotores tumorales (17, 18) e inhibidores de la síntesis del ADN o del ARN (4, 19-24) pueden hacer que diversas líneas celulares transformadas y explantes tumorales humanos primarios expresen características más diferenciadas.

45 Los primeros estudios identificaron una serie de compuestos polares que resultaron ser inductores eficaces de la diferenciación en una serie de líneas celulares transformadas (8, 9). Entre ellos, el inductor más eficaz resultó ser el compuesto híbrido polar/apolar *N,N'*-hexametilén bisacetamida (HMBA) (9). El uso de este compuesto polar/apolar para hacer que células de eritroleucemia murina (MELC) se sometieran a una diferenciación eritroide con supresión de la oncogenicidad ha demostrado ser un modelo útil para el estudio de la diferenciación mediada por inductores de células transformadas (5, 7-9). La diferenciación eritroide terminal de MELC inducida por HMBA es un proceso de múltiples etapas. Tras la adición de HMBA a MELC (745A-DS19) en cultivo, tiene lugar un período latente de 10 a 12 horas antes de poderse detectar la dedicación hacia la diferenciación terminal. Dedicación se define como la capacidad de las células para expresar la diferenciación terminal a pesar de la retirada del inductor (25). Tras la exposición continua a HMBA, se produce un reclutamiento progresivo de las células hacia la diferenciación. Los presentes inventores han informado de que las líneas celulares MELC convertidas en resistentes a niveles relativamente reducidos de vincristina se sensibilizan notablemente hacia la acción inductora de la HMBA, pudiéndose inducir la diferenciación con un período latente breve o nulo (26).

60 La HMBA es capaz de inducir cambios fenotípicos de acuerdo con la diferenciación en una amplia variedad de líneas celulares (5). Las características del efecto inducido farmacológicamente se han estudiado más ampliamente en el sistema celular de la eritroleucemia murina (MELC) (5, 25, 27, 28). La inducción de MELC a diferenciarse depende tanto del tiempo como de la concentración. La concentración mínima necesaria para demostrarse un efecto *in vitro* en la mayoría de cepas es de 2 a 3 mM; la duración mínima de la exposición continua que se necesita en general para inducir la diferenciación en una parte sustancial (>20 %) de la población sin exposición continua a un fármaco es de aproximadamente 36 horas.

65 Se desconoce la diana de acción principal de la HMBA. Hay pruebas de que la proteína quinasa C participa en la

ruta de la diferenciación mediada por inductor (29). Los estudios *in vitro* proporcionan una base para evaluar el potencial de la HMBA como agente de citodiferenciación en el tratamiento de los cánceres humanos (30). Se han completado varios ensayos clínicos de fase I con HMBA (31-36). Los ensayos clínicos han demostrado que este compuesto puede inducir una respuesta terapéutica en pacientes con cáncer (35, 36). Sin embargo, estos ensayos clínicos de fase I también han demostrado que la posible eficacia de la HMBA es limitada, en parte, por la toxicidad relacionada con la dosis, que impide que se alcancen niveles óptimos en sangre, y por la necesidad de administrar por vía intravenosa grandes cantidades del agente durante períodos prolongados.

Se ha informado de que una serie de compuestos relacionados con la HMBA con grupos polares separados por enlaces apolares, en una base molar, son tan activos (37) o 100 veces más activos que la HMBA (38). Sin embargo, como clase, se ha encontrado que los dímeros simétricos, tales como la HMBA y compuestos relacionados, no son los mejores agentes de citodiferenciación.

Inesperadamente, se ha encontrado que los mejores compuestos comprenden dos grupos de extremo polar separados por una cadena flexible de grupos metileno, en los que uno o ambos grupos de extremo polar son grupos hidrófobos grandes. Preferentemente, los grupos de extremo polar son diferentes, y solo uno es un grupo hidrófobo grande. Inesperadamente, estos compuestos son mil veces más activos que la HMBA y diez veces más activos que los compuestos relacionados con la HMBA.

Los inhibidores de las histona desacetilasas, tales como el ácido hidroxámico suberoilánilida (SAHA), pertenecen a esta clase de agentes que tienen la capacidad de inducir la detención del crecimiento, la diferenciación y/o la apoptosis de las células tumorales (39). Stowell *et al.* describen, en *J. Med. Chem.* (1995) vol. 38(8), páginas 1411-13, un proceso de preparación de ácido hidroxámico suberoilánilida cristalino a partir de ácido subérico. Estos compuestos se dirigen a mecanismos inherentes a la capacidad de una célula neoplásica de convertirse en maligna, dado que parecen no tener toxicidad a dosis eficaces para la inhibición del crecimiento tumoral en animales (40). Hay varias líneas que evidencian que la acetilación y la desacetilación de las histonas son mecanismos mediante los que se consigue la regulación de la transcripción en una célula (41). Se cree que estos efectos se producen a través de cambios en la estructura de la cromatina, mediante la alteración de la afinidad de las proteínas histonas por el ADN enrollado en el nucleosoma. Se han identificado cinco tipos de histonas en los nucleosomas (denominadas H1, H2A, H2B, H3 y H4). Cada nucleosoma contiene dos histonas de cada tipo dentro de su núcleo, a excepción de H1, que está presente individualmente en la parte exterior de la estructura del nucleosoma. Se cree que, cuando las proteínas histonas se encuentran hipoacetiladas, hay una mayor afinidad de la histona hacia la estructura principal de fosfatos del ADN. Esta afinidad hace que el ADN se una firmemente a la histona y vuelva al ADN inaccesible a los elementos reguladores y la maquinaria de la transcripción. La regulación de los estados acetilados se produce mediante el equilibrio entre la actividad de dos complejos enzimáticos, la histona acetiltransferasa (HAT) y la histona desacetilasa (HDAC). Se cree que el estado hipoacetilado inhibe la transcripción del ADN asociado. Este estado hipoacetilado está catalizado por grandes complejos multiproteicos que incluyen enzimas HDAC. En particular, se ha demostrado que las HDAC catalizan la eliminación de los grupos acetilo de las histonas nucleares de la cromatina.

Se cree que la inhibición de HDAC por parte de SAHA se produce mediante la interacción directa con el sitio catalítico de la enzima, como se ha demostrado mediante estudios de cristalografía de rayos X (42). No se cree que el resultado de la inhibición de HDAC tenga un efecto generalizado sobre el genoma, sino que solo afecta a un pequeño subconjunto del genoma (43). Las pruebas proporcionadas por micromatrices de ADN usando líneas celulares malignas cultivadas con un inhibidor de HDAC demuestran que hay un número finito (1-2 %) de genes cuyos productos se han modificado. Por ejemplo, las células tratadas en cultivo con inhibidores de HDAC muestran una inducción constante del inhibidor quinasa p21 dependiente de la ciclina (44). Esta proteína desempeña un papel importante en la detención del ciclo celular. Se cree que los inhibidores de HDAC aumentan la tasa de transcripción de p21 mediante la propagación del estado hiperacetilado de las histonas en la región del gen p21, permitiendo así que el gen sea accesible a la maquinaria de la transcripción. Los genes cuya expresión no se ve afectada por los inhibidores de HDAC no muestran cambios en la acetilación de las histonas asociadas regionales (45).

Se ha demostrado en varios casos que la interrupción de la actividad de HAT o de HDAC está implicada en el desarrollo de un fenotipo maligno. Por ejemplo, en la leucemia promielocítica aguda, la oncoproteína producida por la fusión de PML y RAR α parece inhibir la transcripción génica específica a través del reclutamiento de HDAC (46). De esta manera, la célula neoplásica es incapaz de completar la diferenciación, y conduce a una proliferación excesiva de la línea celular leucémica.

Las patentes de EE.UU. Nº 5.369.108, 5.932.616, 5.700.811, 6.087.367 y 6.511.990, expedidas a algunos de los presentes inventores, desvelan compuestos útiles para inducir selectivamente la diferenciación terminal de las células neoplásicas, compuestos que tienen dos grupos de extremo polar separados por una cadena flexible de grupos metileno o por un grupo fenilo rígido, en los que uno o ambos grupos de extremo polar son un grupo hidrófobo grande. Algunos de los compuestos tienen un grupo hidrófobo grande adicional en el mismo extremo de la molécula como primer grupo hidrófobo, lo que aumenta adicionalmente la actividad de diferenciación aproximadamente 100 veces en un ensayo enzimático y aproximadamente 50 veces en un ensayo de diferenciación celular. Los métodos de síntesis de los compuestos usados en los métodos y las composiciones farmacéuticas de la presente invención se describen por completo en las patentes anteriormente mencionadas.

Sumario de la invención

5 La presente invención proporciona una forma cristalina de ácido hidroxámico suberoilánilida (SAHA) que se puede obtener mediante el método del Ejemplo 1.

10 Como se demuestra en el presente documento, se ha encontrado sorprendente e inesperadamente que las formulaciones orales que comprenden ácido hidroxámico suberoilánilida (SAHA), tienen una biodisponibilidad oral total del compuesto activo muy alta *in vivo*. Además, las formulaciones dan lugar a altos niveles en sangre del compuesto activo, que se mantienen inesperadamente altas durante un período prolongado de tiempo, por ejemplo, de hasta 10-12 horas. Las formulaciones orales de la presente invención tienen muchas ventajas, especialmente en comparación con las formulaciones parenterales, ya que, por un lado, proporcionan niveles en sangre terapéuticamente eficaces altos, estables y prolongados de los inhibidores de HDAC y, por otro lado, son fáciles de administrar a los pacientes por cualquier modo convencional de administración oral.

15 Por consiguiente, la presente invención proporciona una composición farmacéutica para la administración oral que comprende una forma cristalina de ácido hidroxámico suberoilánilida (SAHA) que se puede obtener mediante el método del Ejemplo 1, y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable; en el que la composición proporciona una concentración media en plasma de SAHA eficaz para inhibir una histona desacetilasa (HDAC) *in vivo* durante un período de al menos 2 horas después de la administración. En una realización preferida, la concentración de SAHA es eficaz para inhibir la HDAC durante un período de al menos 10 horas después de la administración.

20 Las formulaciones de la presente invención son útiles para inducir selectivamente la diferenciación terminal, la detención del crecimiento celular y/o la apoptosis de las células neoplásicas y, por lo tanto, ayudar en el tratamiento de tumores en pacientes.

25 Las composiciones de la presente invención se pueden formular en cualquier forma de dosificación unitaria sólida adecuada para la administración oral, por ejemplo, en forma de un microgránulo, un comprimido, un comprimido recubierto, una cápsula, una cápsula de gelatina o una dispersión. En una realización preferida, la composición está en forma de una cápsula de gelatina.

30 En las formulaciones de la presente invención, se puede usar cualquier excipiente inerte que se use comúnmente como vehículo o diluyente, tal como, por ejemplo, una goma, un almidón, un azúcar, un material celulósico, un acrilato o mezclas de los mismos. Un diluyente preferido es celulosa microcristalina. Las composiciones pueden comprender además un agente disgregante (por ejemplo, croscarmelosa de sodio) y un lubricante (por ejemplo, estearato de magnesio) y, además, pueden comprender uno o más aditivos seleccionados entre un aglutinante, un tampón, un inhibidor de la proteasa, un tensioactivo, un agente solubilizante, un plastificante, un emulsionante, un agente estabilizante, un agente que aumenta la viscosidad, un edulcorante, un agente filmógeno o cualquier combinación de los mismos. Además, las composiciones de la presente invención pueden estar en forma de formulaciones de liberación controlada o de liberación inmediata.

35 Además, de acuerdo con realizaciones específicas de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica para la administración oral que comprende una forma cristalina de ácido hidroxámico suberoilánilida (SAHA) que se puede obtener mediante el método del Ejemplo 1; celulosa microcristalina como vehículo o diluyente; croscarmelosa sódica como disgregante; y estearato de magnesio como lubricante; en la que la composición proporciona una concentración media en plasma del inhibidor de HDAC eficaz para inhibir una histona desacetilasa *in vivo* durante un período de al menos 2 horas después de la administración.

40 En otra realización preferida, la composición comprende del 50-70 % en peso de SAHA cristalino; 20-40 % en peso de celulosa microcristalina como vehículo o diluyente; 5-15 % en peso de croscarmelosa sódica como disgregante; y 0,1-5 % en peso de estearato de magnesio como lubricante. En otra realización preferida, la composición comprende aproximadamente 50-200 mg de SAHA. En una realización particularmente preferida, la composición está en forma de una cápsula de gelatina.

45 La presente invención proporciona además una pauta de dosificación diaria, segura, de estas formulaciones, que es fácil de seguir y cumplir. Las formulaciones de la presente invención son útiles para inducir selectivamente la diferenciación celular, la detención del crecimiento celular y/o la apoptosis de las células neoplásicas y, por lo tanto, ayudar en el tratamiento de tumores en pacientes.

60 Breve descripción de las figuras

65 Lo anteriormente expuesto y otros objetos, características y ventajas de la invención serán evidentes a la luz de la siguiente descripción más concreta de las realizaciones preferidas de la invención, como se ilustra en las figuras adjuntas, en las que los caracteres de referencia iguales se refieren a las mismas partes en las diferentes vistas. Las figuras no están necesariamente a escala, haciéndose énfasis, en cambio, en la ilustración de los principios de la invención.

- 5 **La Fig. 1** es una imagen de una transferencia Western (panel superior) que muestra las cantidades de histona-4 acetilada (α -ACh4) en el plasma sanguíneo de pacientes tras una dosis oral o intravenosa (i.v.) de SAHA. El SAHA i.v. se administró a una dosis de 200 mg infundidos durante dos horas. El SAHA oral se administró en una sola cápsula a una dosis de 200 mg. Se muestra la cantidad de α -ACh4 en los puntos temporales indicados. Panel inferior: tinción de azul de Coomassie.
- 10 **La Fig. 2** es una imagen de una transferencia Western (panel superior) que muestra las cantidades de histona-4 acetilada (α -ACh4) en el plasma sanguíneo de pacientes que tienen un tumor sólido tras una dosis oral o intravenosa (i.v.) de SAHA. El SAHA i.v. y oral se administraron como en la Figura 1. Se muestra la cantidad de α -ACh4 en los puntos temporales indicados. Se muestra el experimento por duplicado (Fig. 2A y 2B). Paneles inferiores: tinción de azul de Coomassie.
- 15 **La Fig. 3** es una imagen de una transferencia Western (paneles superiores) que muestra las cantidades de histona-4 acetilada (α -ACh4) (Figura 3A) y de histona-3 acetilada (α -ACh3) (Figuras 3B-E) en el plasma sanguíneo de pacientes tras una dosis oral o intravenosa (i.v.) de SAHA, los días 1 y 21. El SAHA i.v. y oral se administraron como en la Figura 1. Se muestra la cantidad de α -ACh4 o de α -ACh3 en los puntos temporales indicados. Paneles inferiores: tinción de azul de Coomassie.
- 20 **La Fig. 4** es una imagen de una transferencia Western (paneles superiores) que muestra las cantidades de histona-3 acetilada (α -ACh3) en el plasma sanguíneo de pacientes que tienen un tumor sólido, tras una dosis oral o intravenosa (i.v.) de SAHA. El SAHA i.v. y oral se administraron como en la Figura 1. Se muestra la cantidad de α -ACh3 en los puntos temporales indicados. Panel inferior: tinción de azul de Coomassie.
- 25 **La Fig. 5** es una imagen de una transferencia Western (paneles superiores) que muestra las cantidades de histona-3 acetilada (α -ACh3) en el plasma sanguíneo de pacientes tras una dosis oral o intravenosa (i.v.) de SAHA. El SAHA i.v. se administró por infusión de 400 mg durante dos horas. El SAHA oral se administró en una sola cápsula de 400 mg. Se muestra la cantidad de α -ACh4 en los puntos temporales indicados. El experimento se muestra por triplicado (Fig. 5A y B). Paneles inferiores: tinción de azul de Coomassie.
- 30 **La Fig. 6** es una imagen de una transferencia Western (panel superior) que muestra las cantidades de histona-3 acetilada (α -ACh3) en el plasma sanguíneo de pacientes que tienen un tumor sólido, tras una dosis oral o intravenosa (i.v.) de SAHA. El SAHA i.v. y oral se administraron como en la Figura 5. Se muestra la cantidad de α -ACh3 en los puntos temporales indicados. Panel inferior: tinción de azul de Coomassie.
- 35 **La Fig. 7** es una imagen de una transferencia Western (paneles superiores) que muestra las cantidades de histona-3 acetilada (α -ACh3) en el plasma sanguíneo de pacientes que tienen un tumor sólido tras una dosis oral o intravenosa (i.v.) de SAHA, los días 1 y 21. El SAHA i.v. y oral se administraron como en la Figura 4. Se muestra la cantidad de α -ACh4 o de α -ACh3 en los puntos temporales indicados. Se muestra el experimento por triplicado (Fig. 7A-C). Paneles inferiores: tinción de azul de Coomassie.
- 40 **La Fig. 8** es una imagen de una transferencia Western (paneles superiores) que muestra las cantidades de histona-3 acetilada (α -ACh3) en el plasma sanguíneo de pacientes tras una dosis oral o intravenosa (i.v.) de SAHA. El SAHA oral e i.v. se administraron como en la Figura 5. Se muestra la cantidad de α -ACh3 en los puntos temporales indicados. Paneles inferiores: tinción de azul de Coomassie.
- 45 **Las Fig. 9A-C** son gráficos que muestran la concentración media en plasma de SAHA (ng/ml) en los puntos temporales indicados tras la administración. Fig. 9A: dosis oral (200 mg y 400 mg) en ayuno el día 8. Fig. 9B: dosis oral con alimentos el día 9. Fig. 9C: dosis i.v. el día 1.
- 50 **La Fig. 10** muestra la semivida aparente de una dosis oral de 200 mg y de 400 mg de SAHA, los días 8, 9 y 22.
- La Fig. 11** muestra la AUC (ng/ml/h) de una dosis oral de 200 mg y de 400 mg de SAHA, los días 8, 9 y 22.
- La Fig. 12** muestra la biodisponibilidad de SAHA tras una dosis oral de 200 mg y de 400 mg, los días 8, 9 y 22.

55 Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración oral que comprenden una forma cristalina de ácido hidroxámico suberoilánilida (SAHA) que se puede obtener mediante el método del Ejemplo 1, que es útil para inducir selectivamente la diferenciación terminal, la detención del crecimiento celular y/o la apoptosis de las células neoplásicas, y que es un potente inhibidor de la histona desacetilasa (HDAC).

60 Las composiciones farmacéuticas están compuestas además de celulosa microcristalina, croscarmelosa sódica y estearato de magnesio. La presente invención también proporciona composiciones farmacéuticas para la administración oral que comprenden SAHA, celulosa microcristalina, croscarmelosa sódica y estearato de magnesio. La biodisponibilidad oral de los compuestos activos de las formulaciones de la presente invención es sorprendentemente alta. Además las formulaciones dan lugar, inesperadamente, a altos niveles en sangre terapéuticamente eficaces de los compuestos activos durante un período de tiempo prolongado. La presente

65

invención proporciona además una pauta de dosificación diaria, segura, de estas formulaciones, que es fácil de seguir y de cumplir.

5 La biodisponibilidad oral de los compuestos activos de las formulaciones de la presente invención es sorprendentemente alta. Además, las formulaciones, inesperadamente, dan lugar a altos niveles en sangre terapéuticamente eficaces de los compuestos activos durante un período prolongado de tiempo. La presente invención proporciona además una pauta de dosificación diaria, segura, de estas formulaciones, que es fácil de seguir, y que da lugar a una cantidad terapéuticamente eficaz de los compuestos citados *in vivo*. Las formulaciones de la presente invención son útiles para inducir selectivamente la diferenciación terminal, la detención del crecimiento celular y/o la apoptosis de las células neoplásicas y, por lo tanto, ayudar en el tratamiento de tumores en
10 pacientes.

15 Como se demuestra en el presente documento, las composiciones farmacéuticas proporcionadas en la presente invención dan lugar a una concentración media en plasma inicial (es decir, la concentración que se obtiene inmediatamente después de la administración de la formulación), que permanece inesperadamente elevada durante un período prolongado de tiempo. En comparación con las formulaciones parenterales (tales como las formulaciones i.v.) que tienen la misma dosis, en las que los compuestos activos se eliminan casi de inmediato, las composiciones orales conservan una alta concentración media en plasma del compuesto activo durante un período prolongado de tiempo, durante al menos 2 horas, pero más normalmente durante al menos 10 o 12 horas. Por lo general, la
20 concentración media en plasma de las formulaciones de dosificación oral, no cae por debajo del 50 % de la concentración media en plasma inicial durante un período de tiempo de hasta 12 horas o incluso más tiempo.

25 Hasta los hallazgos de la presente invención, la administración intravenosa de los inhibidores de HDAC descritos en el presente documento ha demostrado ser la más eficaz. La administración intravenosa del compuesto se debe realizar de forma continua, es decir, diariamente, durante un período prolongado de tiempo, tal como durante al menos 3 días, y preferentemente durante más de 5 días. Como es evidente, esto proporciona una pesada carga para el paciente que recibe este tratamiento. Los hallazgos inesperados y sorprendentes de la presente invención permiten formular formas de dosificación oral que dan lugar a niveles altos y estables de los compuestos activos *in vivo*, sin la necesidad de administrar de forma continua los fármacos, mediante infusiones i.v., lo que proporciona
30 una enorme ventaja para el paciente que recibe el tratamiento.

35 Por consiguiente, la presente invención proporciona una composición farmacéutica para la administración oral que comprende una forma cristalina de ácido hidroxámico suberoilánilida (SAHA) que se puede obtener mediante el método del Ejemplo 1, y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable; en el que la composición proporciona una concentración media en plasma del inhibidor de HDAC eficaz para inhibir una histona desacetilasa (HDAC) *in vivo* durante un período de al menos 2 horas después de la administración. En una realización preferida, la concentración del inhibidor de HDAC es eficaz para inhibir la HDAC durante un período de al menos 8 horas después de la administración. En otra realización preferida, la concentración del inhibidor de HDAC es eficaz para inhibir la HDAC durante un período de al menos 10 horas después de la administración. En otra realización preferida, la concentración del inhibidor de HDAC es eficaz para inhibir la HDAC durante un período de al menos 12 horas después de la administración.

45 Las formulaciones de la presente invención son útiles para inducir selectivamente la diferenciación terminal, la detención del crecimiento celular y/o la apoptosis de las células neoplásicas y, por lo tanto, ayudar en el tratamiento de tumores en pacientes.

50 En otra realización preferida, la composición proporciona una concentración media en plasma de SAHA capaz de inhibir la histona desacetilasa durante un período de al menos 2 horas después de la administración, que es preferentemente en una concentración de al menos aproximadamente 10 nM. En otra realización, la composición proporciona una concentración media en plasma de SAHA de al menos aproximadamente 10 nM durante un período de al menos 8 horas después de la administración. En otra realización preferida más, la composición proporciona una concentración media en plasma de inhibidor de HDAC de al menos aproximadamente 10 nM durante un período de al menos 10 horas después de la administración. En otra realización preferida más, la composición proporciona una concentración media en plasma del SAHA de al menos aproximadamente 10 nM durante un período de al
55 menos 12 horas después de la administración.

60 Los ejemplos no limitantes de las concentraciones medias en plasma son aproximadamente 10 nM, 25 nM, 40 nM, 45 nM, 50 nM, 100 nM, 1 μ M, 2 μ M, 2,5 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M y similares. Debe ser evidente para el experto en la materia que estas dosis no limitan, en modo alguno, el alcance de la presente invención, y que es adecuada cualquier concentración media en plasma que sea capaz de inhibir una histona desacetilasa.

65 En una realización preferida, la composición proporciona una concentración media en plasma de SAHA capaz de inducir selectivamente la diferenciación terminal, la detención del crecimiento celular y/o la apoptosis de células neoplásicas, o de inducir la diferenciación de las células tumorales en un tumor, en la que la concentración se mantiene durante un período de al menos 2 horas después de la administración, que es preferentemente una concentración de al menos aproximadamente 2,5 μ M. En otra realización, la composición proporciona una

concentración media en plasma de SAHA de al menos aproximadamente 2,5 μM durante un período de al menos 8 horas después de la administración. En otra realización preferida más, la composición proporciona una concentración media en plasma del inhibidor de HDAC de al menos aproximadamente 2,5 μM durante un período de tiempo de al menos 10 horas después de la administración. En otra realización preferida más, la composición

5 proporciona una concentración media en plasma del inhibidor de HDAC de al menos aproximadamente 2,5 μM durante un período de al menos 12 horas después de la administración. Los ejemplos no limitantes de las concentraciones medias en plasma son aproximadamente 10 μM , 25 nM, 40 nM, 45 nM, 50 nM, 100 nM, 1 μM , 2 μM , 2,5 μM , 5 μM , 10 μM , 25 μM , 50 μM , 100 μM y similares. Debe ser evidente para el experto en la materia que estas dosis no limitan, en modo alguno, el alcance de la presente invención, y que es adecuada cualquier

10 concentración media en plasma que sea capaz de la diferenciación terminal, la detención del crecimiento celular y/o la apoptosis de células neoplásicas.

En otra realización preferida, la composición proporciona una concentración media en plasma de SAHA eficaz para inducir la diferenciación de las células tumorales en un sujeto que tiene un tumor, en la que la cantidad se mantiene durante un período de al menos 2 horas después de la administración al sujeto. En otra realización preferida, la composición proporciona una concentración media en plasma de SAHA eficaz para inducir la diferenciación de las células tumorales en un sujeto que tiene un tumor, en la que la cantidad se mantiene durante un período de al menos 8 horas después de la administración al sujeto. En otra realización preferida, la composición proporciona una concentración media en plasma del inhibidor de SAHA eficaz para inducir la diferenciación de las células tumorales

15 en un sujeto que tiene un tumor, en la que la cantidad se mantiene durante un período de al menos aproximadamente 10 horas después de la administración al sujeto. Los ejemplos no limitantes de las concentraciones medias en plasma son aproximadamente 10 nM, 25 nM, 40 nM, 45 nM, 50 nM, 100 nM, 1 μM , 2 μM , 2,5 μM , 5 μM , 10 μM , 25 μM , 50 μM , 100 μM y similares. Debe ser evidente para el experto en la materia que estas dosis no limitan, en modo alguno, el alcance de la presente invención, y que es adecuada cualquier

20 concentración media en plasma que sea capaz de inducir la diferenciación de las células tumorales en un tumor.

La composición para su uso en los métodos de la presente invención es adecuada para la práctica *in vitro* e *in vivo*. Si los métodos se ponen en práctica *in vitro*, el contacto se puede efectuar mediante la incubación de las células con el compuesto. La concentración del compuesto en contacto con las células debe ser de aproximadamente 1 nM a aproximadamente 25 mM, por ejemplo, de aproximadamente 10 nM a aproximadamente 1 mM, de aproximadamente 40 mM a aproximadamente 0,5 mM. Los ejemplos no limitantes de las dosis específicas son 10 nM, 25 nM, 40 nM, 45 nM, 50 nM, 100 nM, 1 μM , 2 μM , 2,5 μM , 5 μM , 10 μM , 25 μM , 50 μM , 100 μM y similares. La concentración depende de cada compuesto y del estado de las células neoplásicas.

Aunque los métodos se pueden practicar *in vitro*, se contempla que en la realización preferida para la composición para su uso en los métodos de inducción selectiva de la diferenciación terminal, de la detención del crecimiento celular y/o de la apoptosis de las células neoplásicas, el método comprenderá poner en contacto las células *in vivo*, es decir, mediante la administración de los compuestos a un sujeto que alberga las células neoplásicas o células tumorales en necesidad de tratamiento.

Los métodos también pueden comprender inicialmente la administración al sujeto de un agente antitumoral con el fin de volver las células neoplásicas en el sujeto resistentes a un agente antitumoral y, posteriormente, la administración de una cantidad eficaz de una composición de la presente invención, eficaz para inducir selectivamente la diferenciación terminal, la detención del crecimiento celular y/o apoptosis de dichas células.

El agente antitumoral puede ser uno de los numerosos agentes quimioterapéuticos tales como un agente alquilante, un antimetabolito, un agente hormonal, un antibiótico, colchicina, un alcaloide vinca, L-asparaginasa, procarbazona, hidroxurea, mitotano, nitrosoureas o una carboxamida de imidazol. Los agentes adecuados son aquellos agentes que potencian la despolarización de la tubulina. Preferentemente, el agente antitumoral es colchicina o un alcaloide vinca. En especial, se prefieren la vinblastina y la vincristina. En realizaciones en las que el agente antitumoral es vincristina, las células se tratan preferentemente de modo que sean resistentes a la vincristina a una concentración de aproximadamente 5 mg/ml. El tratamiento de las células para hacerlas resistentes a un agente antitumoral se puede efectuar poniendo en contacto las células con el agente durante un período de al menos 3 a 5 días. La puesta en contacto de las células resultantes con cualquiera de los compuestos anteriores se realiza como se ha descrito anteriormente. Además de los agentes quimioterapéuticos anteriores, los compuestos también se pueden administrar junto con radioterapia.

También se describen composiciones de la presente invención para su uso en un método de tratamiento de un paciente que tiene un tumor caracterizado por la proliferación de células neoplásicas para inducir selectivamente la diferenciación terminal de dichas células neoplásicas e inhibir así su proliferación.

La composición de la presente invención está destinada al tratamiento de pacientes humanos con tumores. Sin embargo, también es probable que el método sea eficaz en el tratamiento de tumores en otros mamíferos. El término "tumor" pretende incluir cualquier cáncer causado por la proliferación de células neoplásicas, tal como cáncer de pulmón, mieloma linfóide agudo, linfoma de Hodgkin, linfoma no de Hodgkin, melanoma de vejiga, carcinoma renal,

carcinoma de mama, carcinoma de próstata, carcinoma de ovario o carcinoma colorrectal.

La administración de las composiciones farmacéuticas se puede llevar a cabo en dosis unitarias que se pueden administrar oralmente una vez al día, dos veces al día, tres veces al día y similar. Las realizaciones preferidas en la actualidad son la administración una vez al día, la administración dos veces al día y la administración tres veces al día.

Histona desacetilasas e inhibidores de las histona desacetilasas

10 Las histona desacetilasas (HDAC), como se usa la expresión en el presente documento, son enzimas que catalizan la eliminación de los grupos acetilo de residuos lisina en las colas aminoterminales de las histonas nucleares de los nucleosomas. Como tales, las HDAC, junto con las histona acetiltransferasas (HAT), regulan el estado de acetilación de las histonas. La acetilación de las histonas afecta a la expresión génica, y los inhibidores de las HDAC, tales como el compuesto polar híbrido a base de ácido hidroxámico denominado ácido hidroxámico suberoilánilida (SAHA), inducen la detención del crecimiento, la diferenciación y/o la apoptosis de células transformadas *in vitro* e inhiben el crecimiento tumoral *in vivo*. Las HDAC se pueden dividir en tres clases basándose en la homología estructural. Las HDAC de clase I (HDAC 1, 2, 3 y 8) portan similitudes con la proteína RPD3 de levadura, se ubican en el núcleo y se encuentran en complejos asociados a correpresores de la transcripción. Las HDAC de clase II (HDAC 4, 5, 6, 7 y 9) son similares a la proteína HDA1 de levadura, y se ubican a nivel subcelular tanto nuclear como citoplasmático. Las HDAC tanto de clase I como de clase II son inhibidas por inhibidores de HDAC a base de ácido hidroxámico, tales como SAHA. Las HDAC de clase III forman una clase estructuralmente distante de enzimas dependientes de NAD que se relacionan con las proteínas SIR2 de levadura y que no son inhibidas por los inhibidores de HDAC a base de ácido hidroxámico.

25 Los inhibidores de las histona desacetilasas, o inhibidores de HDAC, como se usa la expresión en el presente documento, son compuestos que son capaces de inhibir la desacetilación de las histonas *in vivo*, *in vitro* o ambos. Como tales, los inhibidores de HDAC inhiben la actividad de al menos una histona desacetilasa. Como resultado de la inhibición de la desacetilación de al menos una histona, se produce un aumento de las histonas acetiladas, siendo la acumulación de histona acetilada un marcador biológico adecuado para evaluar la actividad de los inhibidores de HDAC. Por lo tanto, se pueden usar procedimientos que pueden analizar la acumulación de histonas acetiladas para determinar la actividad de inhibición de HDAC de los compuestos de interés. Se entiende que los compuestos que pueden inhibir la actividad de las histona desacetilasas también se pueden unir a otros sustratos y, como tales, pueden inhibir otras moléculas biológicamente activas, tales como enzimas. También se ha de entender que los compuestos de la presente invención son capaces de inhibir cualquiera de las histona desacetilasas indicadas anteriormente, o cualquier otra histona desacetilasa.

Por ejemplo, en los pacientes que reciben inhibidores de HDAC, se puede determinar la acumulación de histonas acetiladas en células mononucleares periféricas, así como en tejido tratado con inhibidores de HDAC frente a un control adecuado.

La actividad inhibidora de HDAC de un determinado compuesto se puede determinar *in vitro* usando, por ejemplo, ensayos enzimáticos que muestren inhibición de al menos una histona desacetilasa. Además, la determinación de la acumulación de histonas acetiladas en células tratadas con una composición en particular puede determinar la actividad inhibidora de HDAC de un compuesto.

Los ensayos de la acumulación de histonas acetiladas son bien conocidos en la literatura. Véase, por ejemplo, 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. EE.UU.* 95:3003-3007, 1998, y Yoshida M. *et al.*, *J. Biol. Chem.* 265:17174-17179, 1990.

Por ejemplo, un ensayo enzimático para determinar la actividad de un compuesto inhibidor de histona desacetilasas se puede realizar de la siguiente manera. En resumen, se puede someter a ensayo el efecto de un compuesto inhibidor de HDAC sobre HDAC1 marcado con epítipo humano (Flag) purificado por afinidad mediante la incubación del preparado enzimático en ausencia de sustrato sobre hielo durante aproximadamente 20 minutos con la cantidad indicada de compuesto inhibidor. Se puede añadir sustrato (histona derivada de células de eritroleucemia murina marcadas con [³H]-acetilo) y se puede incubar la muestra durante 20 minutos a 37 °C en un volumen total de 30 µl. A continuación, se puede detener la reacción y se puede extraer el acetato liberado y determinarse la radioactividad liberada mediante recuento de centelleo. Un ensayo alternativo útil para determinar la actividad de un compuesto inhibidor de histonas acetilasas es el ensayo de actividad fluorescente de HDAC; Drug Discovery Kit-AK-500, disponible en BIOMOL[®] Research Laboratories Inc., Plymouth Meeting, PA.

Se pueden realizar estudios *in vivo* de la siguiente manera. Se puede inyectar intraperitonealmente un compuesto inhibidor de HDAC en animales, por ejemplo, en ratones. Se pueden aislar tejidos seleccionados, por ejemplo, cerebro, bazo, hígado, etc., en tiempos predeterminados, tras la administración. Se pueden aislar histonas de los tejidos esencialmente como describen Yoshida *et al.*, *J. Biol. Chem.* 265:17174-17179, 1990. Se pueden someter a electroforesis cantidades iguales de histonas (aproximadamente 1 µg) en geles de SDS-poliacrilamida al 15 % y se

pueden transferir a filtros Hybond-P (disponibles en Amersham). Se pueden bloquear los filtros con leche al 3 % y se pueden sondar con un anticuerpo policlonal purificado contra histona H4 acetilada de conejo (α Ac-H4) y anticuerpo contra histona H3 acetilada de conejo (α Ac-H3) (Upstate Biotechnology Inc.). Se pueden visualizar los niveles de histona acetilada usando un anticuerpo anticonejo de cabra conjugado con peroxidasa de rábano picante (1:5.000) y el sustrato quimioluminiscente SuperSignal (Pierce). Como control de carga para la proteína histona, se pueden procesar geles paralelos y teñirlos con azul de Coomassie (CB).

Además, se ha demostrado que los inhibidores de HDAC a base de ácido hidroxámico regulan positivamente la expresión del gen p21^{WAF1}. La proteína p21^{WAF1} es inducida en las 2 primeras horas de cultivo con inhibidores de HDAC en varias células transformadas usando métodos convencionales. La inducción del gen p21^{WAF1} se asocia a la acumulación de histonas acetiladas en la región de la cromatina donde de este gen. Por lo tanto, cabe reconocer que la inducción de p21^{WAF1} participa en la detención del ciclo celular G1 causada por inhibidores de HDAC en células transformadas.

Por lo general, los inhibidores de HDAC se clasifican en cinco categorías generales: 1) derivados del ácido hidroxámico; 2) ácidos grasos de cadena corta (SCFA); 3) tetrapéptidos cíclicos; 4) benzamidas; y 5) cetonas electrófilas.

Los ejemplos de dichos inhibidores de HDAC incluyen, pero sin limitación:

A. **Derivados de ácido hidroxámico**, tales como ácido hidroxámico suberoilanolida (SAHA) (Richon *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 95:3003-3007 (1998)), bis-hidroxamida del ácido *m*-carboxicinámico (CBHA) (Richon *et al.*, *supra*); piroxamida; análogos de tricostatina tales como la tricostatina A (TSA) y la tricostatina C (Koghe *et al.*, *Biochem. Pharmacol.* 56:1359-1364); ácido salicilhidroxámico (SBHA) (Andrews *et al.*, *International J. Parasitology* 30:761-768 (2000)); ácido suberoil-bis-hidroxámico (SBHA) (patente de EE.UU. N° 5.608.108); ácido azelaico-bis-hidroxámico (ABHA) (Andrews *et al.*, *supra*); azelaico-1-hidroxamato-9-anilida (AAHA) (Qiu *et al.*, *Mol. Biol. Cell* 11:2069-2083, (2000)); ácido 6-(3-clorofenilureido)carpoico (3Cl-UCHA); oxamflatina [ácido (2E)-5-[3-(fenilsulfonil)aminofenil]-pent-2-en-4-inohidroxámico] (Kim *et al.*, *Oncogene* 18:2461-2470, (1999)); A-161906; Scriptaid (Su *et al.*, 2000 *Cancer Research* 60:3137-3142); PXD-101 (Prolifix); LAQ-824; CHAP; MW2796 (Andrews *et al.*, *supra*); MW2996 (Andrews *et al.*, *supra*); o cualquiera de los ácidos hidroxámicos desvelados en las patentes de EE.UU. N° 5.369.108, 5.932.616, 5.700.811, 6.087.367 y 6.511.990.

B. **Tetrapéptidos cíclicos** tales como tetrapéptido cíclico de trapoxina A (TPX) (ciclo-(L-fenilalanil-L-fenilalanil-D-pipecolinil-L-2-amino-8-oxo-9,10-epoxi-decanoil)) (Kijima *et al.*, *J Biol. Chem.* 268,22429-22435 (1993)); FR901228 (FK 228, depsipéptido) (Nakajima *et al.*, *Ex. Cell Res.* 241,126-133 (1998)); tetrapéptido cíclico FR225497 (H. Mori *et al.*, solicitud PCT WO 00/08048 (17 de febrero de 2000)); tetrapéptido cíclico de apicidina [ciclo(N-O-metil-L-triptofanil-L-isoleucinil-D-pipecolinil-L-2-amino-8-oxodecanoil)] (Darkin-Ratray *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 93,1314313147 (1996)); apicidina Ia, apicidina Ib, apicidina Ic, apicidina IIa y apicidina IIb (P. Dulski *et al.*, solicitud PCT WO 97/11366); CHAP, tetrapéptido cíclico de toxina HC (Bosch *et al.*, *Plant Cell* 7, 1941-1950 (1995)); tetrapéptido cíclico WF27082 (solicitud PCT WO 98/48825); y clamidocina (Bosch *et al.*, *supra*).

C. **Derivados de ácidos grasos de cadena corta (SCFA)** tales como: butirato de sodio (Cousens *et al.*, *J. Biol. Chem.* 40 254,1716-1723 (1979)); isovalerato (McBain *et al.*, *Biochem. Pharm.* 53: 1357-1368 (1997)); valerato (McBain *et al.*, *supra*); 4-fenilbutirato (4-PBA) (Lea y Tulsyan, *Anticancer Research*, 15,879-873 (1995)); fenilbutirato (PB) (Wang *et al.*, *Cancer Research*, 59, 2766-2799 (1999)); propionato (McBain *et al.*, *supra*); butiramida (Lea y Tulsyan, *supra*); isobutiramida (Lea y Tulsyan, *supra*); fenilacetato (Lea y Tulsyan, *supra*); 3-bromo-propionato (Lea y Tulsyan, *supra*); tributirina (Guan *et al.*, *Cancer Research*, 60,749-755 (2000)); ácido valproico y valproato.

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

E. **Derivados de cetonas electrófilas** tales como trifluorometilcetonas (Frey *et al.*, *Biorganic & Med. Chem. Lett.* (2002), 12, 3443-3447; US 6.511.990) y α -ceto-amidas tales como N-metil- α -cetoamidas.

F. **Otros inhibidores de HDAC** tales como la depudecina (Kwon *et al.* 1998. PNAS 95: 3356-3361).

Se ha demostrado que SAHA se une directamente al bolsillo catalítico de la enzima histona desacetilasa. SAHA induce la detención del ciclo celular, la diferenciación y/o la apoptosis de las células transformadas en cultivo e inhibe el crecimiento tumoral en roedores. SAHA es eficaz en la inducción de estos efectos tanto en tumores sólidos como en cánceres hematológicos. Se ha demostrado que SAHA es eficaz en la inhibición del crecimiento tumoral en animales sin producir toxicidad para los mismos. La inhibición inducida por SAHA del crecimiento tumoral se asocia con una acumulación de histonas acetiladas en el tumor. SAHA es eficaz en la inhibición del desarrollo y crecimiento continuo de tumores mamarios inducidos por carcinógenos (N-metilnitrosourea) en ratas. Se administró SAHA a las ratas en su dieta durante los 130 días del estudio. Así pues, SAHA es un agente antitumoral oralmente activo no

tóxico cuyo mecanismo de acción implica la inhibición de la actividad de histona desacetilasa.

Los inhibidores de HDAC son aquellos desvelados en las patentes de EE.UU. Nº 5.369.108, 5.932.616, 5.700.811, 6.087.367 y 6.511.990, expedidas a algunos de los presentes inventores.

5 La presente invención también engloba una composición farmacéutica que comprende formas físicas sólidas de SAHA en una forma cristalina que se puede obtener mediante el método del Ejemplo 1, y que tiene cualquier tamaño de partícula.

10 **Composiciones farmacéuticas**

15 La forma cristalina de SAHA de la invención se puede incorporar en composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración oral, junto con un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. Por lo general, dichas composiciones comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de cualquiera de los compuestos anteriores, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Preferentemente, la cantidad eficaz es una cantidad eficaz para inducir selectivamente la diferenciación terminal de células neoplásicas adecuadas e inferior a una cantidad que causa toxicidad en un paciente.

20 En las formulaciones de la presente invención, se puede usar cualquier excipiente inerte que se use comúnmente como vehículo o diluyente, tal como por ejemplo, una goma, un almidón, un azúcar, un material celulósico, un acrilato, o mezclas de los mismos. Un diluyente preferido es celulosa microcristalina. Las composiciones pueden comprender además un agente disgregante (por ejemplo, croscarmelosa de sodio) y un lubricante (por ejemplo, estearato de magnesio), y además pueden comprender uno o más aditivos seleccionados entre un aglutinante, un tampón, un inhibidor de la proteasa, un tensioactivo, un agente solubilizante, un plastificante, un emulsionante, un agente estabilizante, un agente que aumenta la viscosidad, un edulcorante, un agente filmógeno o cualquier combinación de los mismos. Además, las composiciones de la presente invención pueden estar en forma de formulaciones de liberación controlada o de liberación inmediata.

30 Una realización es una composición farmacéutica para la administración oral que comprende una forma cristalina de ácido hidroxámico suberoilánilida (SAHA) que se puede obtener mediante el método del Ejemplo 1, celulosa microcristalina, croscarmelosa de sodio y estearato de magnesio.

35 Otra realización comprende del 50 al 70 % en peso de SAHA, o una sal farmacéuticamente aceptable o hidrato del mismo, del 20 al 40 % en peso de celulosa microcristalina, del 5 al 15 % en peso de croscarmelosa sódica y del 0,1 al 5 % en peso de estearato de magnesio. Otra realización comprende aproximadamente 50-200 mg de SAHA.

40 En una realización, las composiciones farmacéuticas se administran por vía oral y, por tanto, se formulan en una forma adecuada para la administración oral, en forma de un preparado sólido. Las formulaciones orales sólidas adecuadas incluyen comprimidos, cápsulas, píldoras, gránulos, microgránulos y similares.

45 En una realización de la presente invención, la composición se formula en una cápsula. De acuerdo con dicha realización, las composiciones de la presente invención comprenden además del compuesto activo SAHA y el vehículo o diluyente inerte, una cápsula de gelatina dura.

50 Como se usa en el presente documento, "vehículo farmacéuticamente aceptable" pretende incluir cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción, y similares, compatibles con la administración farmacéutica, tales como agua estéril apirógena. Los vehículos adecuados se describen en la edición más reciente de "Remington Pharmaceutical Sciences", un texto de referencia convencional en el campo, que se incorpora en el presente documento por referencia. Los ejemplos preferidos de dichos vehículos o diluyentes incluyen, pero sin limitación, agua, solución salina, soluciones Ringer, solución de dextrosa y albúmina de suero humano al 5 %. También se pueden usar liposomas y vehículos no acuosos tales como aceites fijos. El uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el compuesto activo, se contempla su uso en las composiciones. También se pueden incorporar a las composiciones compuestos activos suplementarios.

60 Los diluyentes/vehículos sólidos incluyen, pero sin limitación, una goma, un almidón (por ejemplo, almidón de maíz, almidón pregelatinizado), un azúcar (por ejemplo, lactosa, manitol, sacarosa, dextrosa), un material celulósico (por ejemplo, celulosa microcristalina), un acrilato (por ejemplo, polimetilacrilato), carbonato de calcio, óxido de magnesio, talco o mezclas de los mismos.

65 Además, las composiciones pueden comprender además aglutinantes (por ejemplo, acacia, almidón de maíz, gelatina, carbómero, etilcelulosa, goma guar, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, povidona), agentes desintegrantes (por ejemplo, almidón de maíz, almidón de patata, ácido algínico, dióxido de silicio, croscarmelosa sódica, crospovidona, goma de guar, glicolato de almidón sódico, Primogel), tampones (por ejemplo, tris-HCl, acetato, fosfato) de varios pH y fuerza iónica, aditivos tales como albúmina o gelatina para prevenir la absorción a

superficies, detergentes (por ejemplo, Tween 20, Tween 80, Pluronic F68, sales de ácidos biliares), inhibidores de la proteasa, tensioactivos (por ejemplo, laurilsulfato de sodio), potenciadores de la permeación, agentes solubilizantes (por ejemplo, glicerol, glicerol de polietileno), un agente de deslizamiento (por ejemplo, dióxido de silicio coloidal), antioxidantes (por ejemplo, ácido ascórbico, metabisulfito de sodio, hidroxianisol butilado), estabilizantes (por ejemplo, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa), agentes de aumento de la viscosidad (por ejemplo, carbómero, dióxido de silicio coloidal, etilcelulosa, goma guar), edulcorantes (por ejemplo, sacarosa, aspartamo, ácido cítrico), agentes aromatizantes (por ejemplo, menta, metilsalicilato o aroma de naranja), conservantes (por ejemplo, timerosal, alcohol bencílico, parabenos), lubricantes (por ejemplo, ácido esteárico, estearato de magnesio, polietilenglicol, laurilsulfato de sodio), potenciadores de la fluidez (por ejemplo, dióxido de silicio coloidal), plastificantes (por ejemplo, ftalato de dietilo, citrato de trietilo), emulsionantes (por ejemplo, carbómero, hidroxipropilcelulosa, laurilsulfato sódico), recubrimientos poliméricos (por ejemplo, poloxámeros o poloxaminas), agentes de recubrimiento y filmógenos (por ejemplo, etilcelulosa, acrilatos, polimetacrilatos) y/o adyuvantes.

En una realización, los compuestos activos se preparan con vehículos que protegerán el compuesto contra la eliminación rápida del organismo, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes y sistemas de administración microencapsulados. Se pueden usar polímeros biodegradables, biocompatibles, tales como acetato de etilvinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Los métodos para la preparación de dichas formulaciones serán evidentes para los expertos en la materia. Los materiales también se pueden obtener en el mercado, en Alza Corporation y Nova Pharmaceuticals, Inc. También se pueden usar como vehículos farmacéuticamente aceptables las suspensiones liposomales (incluyendo liposomas dirigidos a células infectadas con anticuerpos monoclonales contra antígenos virales). Estas se pueden preparar de acuerdo con métodos conocidos por los expertos en la materia, por ejemplo, como se describe en la patente de EE.UU. N° 4.522.811.

Resulta especialmente ventajoso formular composiciones orales en forma de dosificación unitaria para facilitar la administración y uniformidad de la dosis. La forma de dosificación unitaria, como se usa en el presente documento, se refiere a unidades físicamente diferenciadas adecuadas como dosis unitarias para el sujeto que se vaya a tratar; conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido. Las especificaciones para las formas de dosificación unitarias de la invención están dictadas por y dependen directamente de las características únicas del compuesto activo y del efecto terapéutico particular que se desee conseguir, y las limitaciones inherentes a la técnica de formación de dicho compuesto activo para el tratamiento de cada individuo.

Las composiciones farmacéuticas se pueden incluir en un recipiente, paquete o dispensador junto con instrucciones para su administración.

Entonces se repite la administración diaria de forma continua durante un período de varios días a varios años. El tratamiento oral puede continuar durante entre una semana y toda la vida del paciente. Preferentemente, la administración tiene lugar durante cinco días consecutivos, después de los que el paciente puede ser evaluado para determinar si se requiere una administración adicional. La administración puede ser continua o intermitente, es decir, el tratamiento durante un número de días consecutivos, seguido por un período de descanso.

Los compuestos de la presente invención se pueden administrar por vía intravenosa el primer día del tratamiento, con la administración oral en el segundo día y el resto de días consecutivos a partir de entonces.

Los compuestos de la presente invención se pueden administrar con el fin de prevenir la progresión de una enfermedad o la estabilización del crecimiento tumoral.

La preparación de composiciones farmacéuticas que contienen un componente activo es bien conocida en la técnica, por ejemplo, mediante procesos de mezcla, granulación o formación de comprimidos. El principio terapéutico activo se mezcla a menudo con excipientes que son farmacéuticamente aceptables y compatibles con el principio activo. Para la administración oral, los agentes activos se mezclan con aditivos habituales para este fin, tales como vehículos, estabilizantes o diluyentes inertes, y se convierten mediante métodos habituales en formas adecuadas para la administración, tales como comprimidos, comprimidos recubiertos, cápsulas duras o blandas de gelatina, y similares como se ha detallado anteriormente.

El SAHA de la presente invención se puede administrar por vía oral a una dosis diaria total de entre 25 a 4.000 mg/m², por ejemplo, de aproximadamente 25 a 1.000 mg, 50-1.000 mg, 100 mg, 200 mg, 300 mg, 400 mg, 600 mg, 800 mg, 1.000 mg y similares. Por lo general, el compuesto se administra como una sola dosis cuando se administran hasta 400 mg al paciente. Para dosis totales superiores (es decir, superiores a 400 mg), el total se divide en múltiples dosis, por ejemplo, dos veces al día, tres veces al día o similares, que se distribuyen preferentemente en períodos iguales de tiempo a lo largo del día. Por ejemplo, dos dosis, por ejemplo, de 500 mg cada una, se pueden administrar cada 12 horas para alcanzar una dosis total de 1.000 mg en un día.

65

En una realización preferida en la actualidad, el SAHA se administra al paciente a una dosis diaria total de 200 mg. En otra realización preferida actualmente, el SAHA se administra al paciente a una dosis diaria total de 400 mg. En otra realización preferida en la actualidad, el SAHA o cualquiera de los inhibidores de HDAC se administran al paciente a una dosis diaria total de 600 mg.

5 La cantidad de SAHA administrada al paciente es menor que una cantidad que provocaría toxicidad en el paciente. En ciertas realizaciones, la cantidad de SAHA que se administra al paciente es menor que la cantidad que genera una concentración del compuesto en el plasma del paciente igual o superior al nivel tóxico del compuesto. Preferentemente, la concentración del compuesto en el plasma del paciente se mantiene a aproximadamente 10 nM.
10 En otra realización, la concentración del compuesto en el plasma del paciente se mantiene a aproximadamente 25 nM. En otra realización, la concentración del compuesto en el plasma del paciente se mantiene a aproximadamente 50 nM. En otra realización, la concentración del compuesto en el plasma del paciente se mantiene a aproximadamente 100 nM. En otra realización, la concentración del compuesto en el plasma del paciente se mantiene a aproximadamente 500 nM. En otra realización, la concentración de SAHA en el plasma del paciente se mantiene a aproximadamente 1.000 nM. En otra realización, la concentración de SAHA en el plasma del paciente se mantiene a aproximadamente 2.500 nM. En otra realización, la concentración de SAHA en el plasma del paciente se mantiene a aproximadamente 5.000 nM. La cantidad óptima de SAHA que se debe administrar al paciente en la práctica de la presente invención dependerá del compuesto usado en particular y del tipo de cáncer que se esté tratando.

20 En una realización actualmente preferida de la presente invención, la composición farmacéutica comprende una forma cristalina de ácido hidroxámico suberoilánilida (SAHA) que se puede obtener mediante el método del Ejemplo 1; celulosa microcristalina como vehículo o diluyente; croscarmelosa de sodio como disgregante; y estearato de magnesio como lubricante.

25 El porcentaje de principio activo y diversos excipientes en las formulaciones puede variar. Por ejemplo, la composición puede comprender entre el 20 y 90 %, preferentemente entre 50-70 % en peso del SAHA cristalino. Además, la composición puede comprender entre el 10 y 70 %, preferentemente entre 20-40 % en peso de celulosa microcristalina como vehículo o diluyente. Además, la composición puede comprender entre el 1 y 30 %, preferentemente 5-15 % en peso de croscarmelosa sódica como disgregante. Además, la composición puede comprender entre 0,1-5 % en peso de estearato de magnesio como lubricante. En otra realización preferida, la composición comprende aproximadamente 50-200 mg del inhibidor de HDAC (por ejemplo, 50 mg, 100 mg y 200 mg para el inhibidor de HDAC, por ejemplo, SAHA). En una realización particularmente preferida, la composición está en forma de una cápsula de gelatina.

35 Una realización de la invención actualmente preferida es una formulación sólida de una forma cristalina de ácido hidroxámico suberoilánilida (SAHA) que se puede obtener mediante el método del Ejemplo 1 con celulosa microcristalina, NF (Avicel Ph 101), croscarmelosa sódica, NF (AC-Di-Sol) y estearato de magnesio, NF, contenido en una cápsula de gelatina. Una realización preferida adicional es 200 mg de una forma cristalina de ácido hidroxámico suberoilánilida (SAHA) que se puede obtener mediante el método del Ejemplo 1 con 89,5 mg de celulosa microcristalina, 9 mg de croscarmelosa sódica y 1,5 mg de estearato de magnesio contenido en una cápsula de gelatina.

45 Debe ser evidente para el experto en la materia que las composiciones farmacéuticas de la presente invención no solo son útiles para inhibir la proliferación de las células neoplásicas y el tratamiento del cáncer, sino que estas composiciones también son útiles en el tratamiento de una amplia selección de enfermedades para las que los inhibidores de HDAC se han encontrado útiles.

50 Por ejemplo, se ha encontrado que el SAHA es útil en el tratamiento de varias enfermedades inflamatorias agudas y crónicas, enfermedades autoinmunes, enfermedades alérgicas, enfermedades asociadas con el estrés oxidativo y enfermedades caracterizadas por la hiperproliferación celular. Los ejemplos no limitantes son afecciones inflamatorias de una articulación, incluyendo la artritis reumatoide (AR) y la artritis sorriásica; enfermedades inflamatorias del intestino tales como la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa; espondiloartropatías; esclerodermia; soriasis (incluyendo la soriasis mediada por linfocitos T) y dermatosis inflamatorias tales como una dermatitis, eczema, dermatitis atópica, dermatitis de contacto alérgica, urticaria; vasculitis (por ejemplo, vasculitis necrotizante, cutánea y de hipersensibilidad); miositis eosinofílica, fascitis eosinofílica; cánceres con infiltración de leucocitos de la piel u órganos, lesión isquémica, incluyendo isquemia cerebral (por ejemplo, lesión cerebral como resultado de traumatismo, epilepsia, hemorragia o apoplejía, pudiendo cada una de ellas conducir a neurodegeneración); VIH, insuficiencia cardíaca, enfermedad hepática crónica, aguda o maligna, tiroiditis autoinmune; lupus eritematoso sistémico, síndrome de Sjorgren, enfermedades pulmonares (por ejemplo, ARDS); pancreatitis aguda; esclerosis lateral amiotrófica (ALS); enfermedad de Alzheimer; caquexia/anorexia; asma; aterosclerosis; síndrome de fatiga crónica, fiebre; diabetes (por ejemplo, diabetes insulín dependiente o diabetes de inicio juvenil); glomerulonefritis; rechazo de injerto contra huésped (por ejemplo, en trasplantes); choque hemorrágico; hiperalgesia: enfermedad inflamatoria del intestino; esclerosis múltiple; miopatías (por ejemplo, metabolismo de proteína muscular, especialmente en sepsis); osteoporosis; enfermedad de Parkinson; dolor; parto prematuro; soriasis; lesión por reperfusión; toxicidad inducida por citoquinas (por ejemplo, choque séptico, choque

endotóxico); efectos secundarios de la radioterapia, enfermedad de articulación temporomandibular, metástasis tumoral; o una afección inflamatoria como consecuencia de torceduras, esguinces, daño del cartílago, traumatismos tales como quemaduras, cirugía ortopédica, infección u otros procesos patológicos. Las enfermedades y afecciones alérgicas incluyen, pero sin limitación, enfermedades alérgicas respiratorias tales como asma, rinitis alérgica, enfermedades de hipersensibilidad pulmonar, neumonitis por hipersensibilidad, neumonías eosinofílicas (por ejemplo, síndrome de Loeffler, neumonía eosinofílica crónica), hipersensibilidad de tipo retardado, enfermedades pulmonares intersticiales (ILD) (por ejemplo, fibrosis pulmonar idiopática o ILD asociada con artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, espondilitis anquilosante, esclerosis sistémica, síndrome de Sjogren, polimiositis o dermatomiositis); anafilaxis sistémica o respuestas de hipersensibilidad, alergia a fármacos (por ejemplo, a la penicilina, cefalosporinas), alergias a picaduras de insectos y similares.

Por ejemplo, se ha encontrado que el SAHA es útil en el tratamiento de varias enfermedades neurodegenerativas, siendo una lista no exhaustiva de las mismas:

- I. Trastornos caracterizados por demencia progresiva en ausencia de otros signos neurológicos importantes, tales como la enfermedad de Alzheimer; demencia senil de tipo Alzheimer; y enfermedad de Pick (atrofia lobar).
- II. Síndromes que combinan la demencia progresiva con otras alteraciones neurológicas importantes tales como
 - A) síndromes que aparecen principalmente en los adultos (por ejemplo, enfermedad de Huntington, atrofia multisistémica que combina la demencia con la ataxia y/o manifestaciones de la enfermedad de Parkinson, parálisis supranuclear progresiva (Steel-Richardson-Olszewski), enfermedad de cuerpos de Lewy difusos y degeneración corticodentatonigral); y B) síndromes que aparecen principalmente en niños o adultos jóvenes (por ejemplo, enfermedad de Hallervorden-Spatz y epilepsia mioclónica familiar progresiva).
- III. Síndromes de anomalías de la postura y el movimiento de desarrollo gradual, tales como parálisis agitante (enfermedad de Parkinson), degeneración estriatonigral, parálisis supranuclear progresiva, distonía de torsión (espasmo de torsión; distonía muscular deformante), tortícolis espasmódica y otras discinesias, temblor familiar, y síndrome de Gilles de la Tourette.
- IV. Síndromes de ataxia progresiva tales como degeneraciones del cerebelo (por ejemplo, degeneración cortical cerebelosa y atrofia olivopontocerebelosa (OPCA)); y degeneración espinocerebelosa (ataxia de Friedreich y trastornos relacionados).
- V. Síndrome del fallo del sistema nervioso autónomo central (síndrome de Shy-Drager).
- VI. Síndromes de debilidad y desgaste muscular sin cambios sensoriales (enfermedad de las motoneuronas tal como la esclerosis lateral amiotrófica, la atrofia muscular espinal (por ejemplo, atrofia muscular espinal infantil (Werdnig-Hoffman), atrofia muscular espinal juvenil (Wohlfart-Kugelberg-Welander) y otras formas de atrofia muscular espinal familiar), esclerosis lateral primaria y paraplejía espástica hereditaria).
- VII. Síndromes que combinan debilidad y desgaste muscular con cambios sensoriales (atrofia muscular neuronal progresiva; polineuropatías crónicas familiares) tales como atrofia muscular del peroneo (Charcot-Marie-Tooth), B. polineuropatía intersticial hipertrófica (Dejerine-Sottas) y C. diversas formas de neuropatía progresiva crónica.
- VIII. Síndromes de pérdida visual progresiva tales como degeneración pigmentaria de la retina (retinitis pigmentosa) y atrofia óptica hereditaria (enfermedad de Leber).

La invención se ilustra en los ejemplos del apartado de datos experimentales que figura a continuación. Dicho apartado se expone para ayudar a comprender la invención, pero no pretende ser ni debe interpretarse como limitante, en modo alguno, de la invención expuesta en las reivindicaciones que figuran posteriormente.

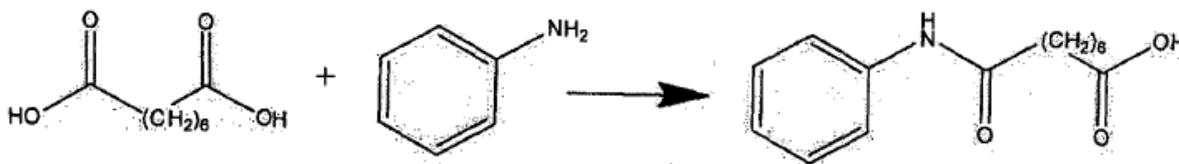
APARTADO DE DATOS EXPERIMENTALES

EJEMPLO 1:

Síntesis de SAHA

Síntesis de SAHA

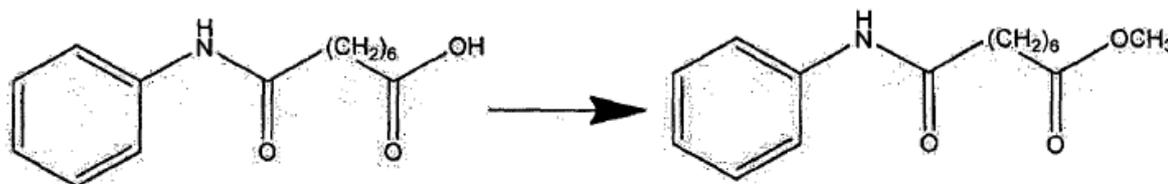
Etapa 1 - Síntesis de ácido suberanílico



En un matraz de 22 l, se colocaron 3,5 kg (20,09 mol) de ácido subérico, y se fundió el ácido con calor. Se elevó la temperatura hasta 175 °C, y luego se añadieron 2,04 kg (21,92 mol) de anilina. Se elevó la temperatura hasta 190 °C y se mantuvo a esa temperatura durante 20 minutos. Se vertió la masa fundida en un tanque de Nalgene que contenía 4,017 kg de hidróxido de potasio disueltos en 50 l de agua. Se agitó la mezcla durante 20 minutos tras la adición de la masa fundida. Se repitió la reacción a la misma escala, y se vertió la segunda masa fundida en la misma solución de hidróxido de potasio. Tras agitar la mezcla a fondo, se apagó el agitador, y se dejó sedimentar la mezcla. A continuación, se filtró la mezcla a través de un lecho corto de Celite (4,2 kg) (el producto se filtró para retirar el subproducto neutro [del ataque por la anilina en ambos extremos del ácido subérico]). El filtrado contenía la sal del producto y también la sal de ácido subérico sin reaccionar. Se dejó sedimentar la mezcla, porque la filtración fue muy lenta, llevando varios días). Se acidificó el filtrado usando 5 l de ácido clorhídrico concentrado; se agitó la mezcla durante una hora, y luego se dejó sedimentar durante la noche. Se recogió el producto por filtración, y se lavó en el embudo con agua desionizada (4 x 5 l). Se colocó la torta de filtro húmeda en un matraz de 72 l con 44 l de agua desionizada, se calentó la mezcla hasta 50 °C, y se aisló el sólido por filtración en caliente (el producto deseado estaba contaminado con ácido subérico que tiene una solubilidad mucho mayor en agua caliente. Se realizaron varias trituraciones en caliente para eliminar el ácido subérico. Se verificó el producto por RMN [D₆DMSO] para monitorizar la eliminación del ácido subérico). Se repitió la trituración en caliente con 44 litros de agua a 50 °C. Se aisló el producto de nuevo por filtración, y se enjuagó con 4 l de agua caliente. Se secó durante un fin de semana en un horno de vacío a 65 °C, usando una bomba Nash como fuente de vacío (la bomba Nash es una bomba de anillo líquido [agua], y extrae un vacío de aproximadamente 98,205 kPa [982,05 mbar]. Se usó una purga de argón intermitente para ayudar a llevar el agua). Se obtuvieron 4,1828 kg de ácido suberanílico.

El producto seguía conteniendo una pequeña cantidad de ácido subérico. Por lo tanto, se realizó la trituración en caliente en porciones a 65 °C, usando aproximadamente 300 g de producto a la vez. Se filtró cada porción, y se enjuagó a fondo con más agua caliente (un total de aproximadamente 6 l). Se repitió esto para purificar todo el lote. Se retiró este ácido subérico por completo del producto. Se combinó el producto sólido en un matraz y se agitó con 6 l de metanol/agua (1:2) y, a continuación, se aisló por filtración y se secó al aire sobre el filtro durante el fin de semana. Se colocó en bandejas y se secó en un horno de vacío a 65 °C durante 45 horas usando la bomba Nash y una purga de argón. El producto final resultó tener un peso de 3,2784 kg (rendimiento del 32,7 %).

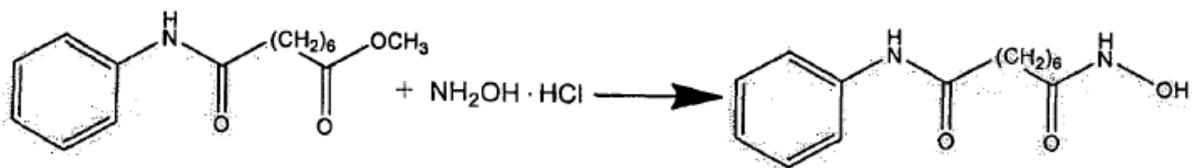
Etapa 2 - Síntesis de suberanilato de metilo



En un matraz de 50 l dotado de un agitador mecánico y condensador, se introdujeron 3,229 kg de ácido suberanílico de la etapa anterior, 20 l de metanol y 398,7 g de resina Dowex 50WX2-400. Se calentó la mezcla a reflujo y se mantuvo a reflujo durante 18 horas. Se filtró la mezcla para retirar las perlas de resina, y se extrajo el filtrado hasta un residuo en un evaporador rotatorio.

Se transfirió el residuo del evaporador rotatorio a un matraz de 50 l dotado de un condensador y un agitador mecánico. Se añadieron 6 l de metanol al matraz, y se calentó la mezcla, dando una solución. A continuación, se añadieron 2 l de agua desionizada, y se apagó el calor. Se dejó enfriar la mezcla agitada, y luego se colocó el matraz en un baño de hielo, y se enfrió la mezcla. Se aisló el producto sólido por filtración, y se enjuagó la torta del filtro con 4 l de metanol/agua fría (1:1). Se secó el producto a 45 °C en un horno de vacío usando una bomba Nash durante un total de 64 horas, dando 2,8502 kg (rendimiento del 84 %) de suberanilato de metilo, CSL N° de lote 98-794-92-3 1.

Etapa 3 - Síntesis de SAHA en bruto



5 A un matraz de 50 l con un agitador mecánico, termopar y entrada para atmósfera inerte, se añadieron 1,4519 kg de clorhidrato de hidroxilamina, 19 l de metanol anhidro y 3,93 l de una solución de metóxido de sodio al 30 % en metanol. A continuación, se cargó el matraz con 2,748 kg de suberilato de metilo, seguidos de 1,9 l de una solución de metóxido de sodio al 30 % en metanol. Se dejó la mezcla en agitación durante 16 horas y 10 minutos. Se transfirió aproximadamente la mitad de la mezcla de reacción desde el matraz de reacción (matraz 1) a un matraz de 50 l (matraz 2) dotado de un agitador mecánico. A continuación, se añadieron 27 l de agua desionizada al matraz 1, y se agitó la mezcla durante 10 minutos. Se tomó el pH usando un medidor de pH; el pH resultó ser de 11,56. Se ajustó el pH de la mezcla a 12,02 mediante la adición de 100 ml de solución de metóxido de sodio al 30 % en metanol. Esto dio una solución transparente (la mezcla de reacción en este momento contenía una pequeña cantidad de sólido. Se ajustó el pH, dando una solución transparente en la que precipitaría el producto). Se diluyó la mezcla de reacción del matraz 2 de la misma manera. Se añadieron 27 l de agua desionizada, y se ajustó el pH mediante la adición de 100 ml de una solución de metóxido de sodio al 30 % a la mezcla, dando un pH de 12,01 (solución transparente).

20 Se acidificó la mezcla de reacción de cada matraz mediante la adición de ácido acético glacial para hacer precipitar el producto. El matraz 1 resultó tener un pH final de 8,98, y el matraz 2, un pH final de 8,70. Se aisló el producto de ambos matraces por filtración usando un embudo Buchner y un filtro de tela. Se lavó la torta del filtro con 15 l de agua desionizada, y se cubrió el embudo y se secó el producto parcialmente en el embudo al vacío durante 15,5 h. Se retiró el producto y se colocó en cinco bandejas de vidrio. Se colocaron las bandejas en un horno de vacío y se secó el producto hasta un peso constante. El primer período de secado fue de 22 horas a 60 °C usando una bomba Nash como fuente de vacío con una purga de argón. Se sacaron las bandejas del horno de vacío y se pesaron. Se devolvieron las bandejas al horno, y se secó el producto durante 4 h y 10 minutos más usando una bomba de aceite como fuente de vacío y sin purga de argón. Se envasó el material en bolsas de polietileno dobles de 4 mm, y se colocaron en un recipiente exterior de plástico. El peso final tras el muestreo fue de 2,6334 kg (95,6 %).

Etapa 4 - Recristalización del SAHA en bruto

30 El SAHA en bruto se recristalizó en metanol/agua. En un matraz de 50 l con un agitador mecánico, termopar, condensador y entrada para atmósfera inerte, se cargaron el SAHA en bruto por cristalizar (2,5257 kg), seguido de 2,625 l de agua desionizada y 15,755 l de metanol. Se calentó el material a reflujo, dando una solución. A continuación, se añadieron 5,250 l de agua desionizada a la mezcla de reacción. Se apagó el calor, y se dejó enfriar la mezcla. Cuando la mezcla se hubo enfriado lo suficiente para que el matraz se pudiera manipular de una manera segura (28 °C), se retiró el matraz de la manta calefactora, y se colocó en una bañera para su uso como baño de enfriamiento. Se añadió agua con hielo a la bañera para enfriar la mezcla hasta -5 °C. Se mantuvo la mezcla por debajo de esa temperatura durante 2 horas. Se aisló el producto por filtración, y se lavó la torta del filtro con 1,5 l de metanol/agua fría (2:1). Se cubrió el embudo, y se secó el producto parcialmente al vacío durante 1,75 h. Se retiró el producto del embudo y se colocó en 6 bandejas de vidrio. Se colocaron las bandejas en un horno de vacío, y se secó el producto durante 64,75 horas a 60 °C usando una bomba Nash como fuente de vacío, y usando una purga de argón. Se retiraron las bandejas para pesarlas, y luego se devolvieron al horno y se secaron durante 4 horas más a 60 °C, dando un peso constante. La fuente de vacío para el segundo período de secado fue una bomba de aceite, y no se usó purga de argón. Se envasó el material en bolsas de polietileno dobles de 4 mm, y se colocaron en un recipiente exterior de plástico. El peso final tras el muestreo fue de 2,5409 kg (92,5 %).

Ejemplo 2:Dosificación oral de ácido hidroxámico suberoilánilida (SAHA)

50 **Antecedentes:** el tratamiento con agentes de diferenciación celular polares híbridos ha producido la inhibición del crecimiento de tumores sólidos humanos derivados de líneas celulares y xenoinjertos. El efecto es mediado en parte por la inhibición de la histona desacetilasa. El SAHA es un potente inhibidor de la histona desacetilasa del que se ha demostrado que tiene la capacidad de inducir la detención del crecimiento, la diferenciación y la apoptosis de células tumorales en el laboratorio y en estudios preclínicos.

60 **Objetivos:** definir una pauta oral diaria segura de SAHA que se pueda usar en estudios de fase II. Además, se puede evaluar el perfil farmacocinético de la formulación oral de SAHA. También se controlaron la biodisponibilidad oral del SAHA en seres humanos en ayuno frente al no ayuno, y los efectos antitumorales del tratamiento. Además, se evaluaron los efectos biológicos del SAHA sobre tejidos normales y células tumorales, y se documentaron las

respuestas con respecto a los niveles de acetilación de las histonas.

Pacientes: pacientes con tumores sólidos de adulto primarios o metastásicos, en etapa avanzada documentada histológicamente, que son refractarios al tratamiento convencional o para quienes no existe una terapia convencional curativa. Los pacientes deben tener un estado de desempeño de Karnofsky ≥ 70 % y función hematológica, hepática y renal adecuadas. Los pacientes deben llevar al menos cuatro semanas sin haber recibido quimioterapia, radioterapia u otros fármacos contra el cáncer en investigación.

Programa de dosificación: el primer día, los pacientes se trataron primero con 200 mg de SAHA administrados por vía intravenosa. A partir del segundo día, los pacientes se trataron con dosis diarias de SAHA oral de acuerdo con la Tabla 1. Cada cohorte recibió una dosis diferente de SAHA. "Qd" indica la dosificación una vez al día; "Bid" indica la dosificación dos veces al día. Por ejemplo, los pacientes de la cohorte IV recibieron dos dosis de 800 mg de SAHA al día. Las dosis se administraron a los pacientes diariamente y de manera continua. Se tomaron muestras de sangre el día uno y el día 21 del tratamiento oral. Se interrumpió el tratamiento oral con SAHA en los pacientes con una progresión de la enfermedad, regresión del tumor, efectos secundarios inaceptables o tratamiento con otras terapias.

Tabla 1: Programa de dosificación de SAHA oral

Cohorte	Dosis oral (mg)	Número de días	Programa de dosificación diario
I	200	Continua	Qd
II	400	Continua	Qd
III	400	Continua	Bid
IV	800	Continua	Bid
V	1.200	Continua	Bid
VI	1.600	Continua	Bid
VII	2.000	Continua	Bid

Resultados: la comparación de los niveles en plasma de suero muestra una alta biodisponibilidad de SAHA administrado por vía oral, tanto en el paciente en ayunas como en el paciente que no se encuentra en ayunas, en comparación con el SAHA administrado por vía intravenosa (SAHA i.v.). La "AUC" es una estimación de la biodisponibilidad de SAHA en (ng/ml)min, donde 660 ng/ml equivalen a SAHA 2,5 μ M. La AUC tomada junto con la semivida ($t^{1/2}$) muestra que la biodisponibilidad global del SAHA oral es mejor que la del SAHA i.v. La $C_{m\acute{a}x}$ es la concentración máxima de SAHA observada tras la administración. El SAHA i.v. se administró a 200 mg infundidos durante dos horas. El SAHA oral se administró en una sola cápsula a 200 mg. Las Tablas 2 y 3 resumen los resultados de un ensayo de HPLC (LCMS usando un patrón deuterado) que cuantifica la cantidad de SAHA en el plasma sanguíneo de los pacientes frente al tiempo, usando la histona-4 acetilada (α -ACH4) como marcador.

Tabla 2: Niveles en plasma de suero de SAHA oral- Paciente N° 1

	i.v.	Oral (en ayunas)	Oral (no en ayunas)
$C_{m\acute{a}x}$ (ng/ml)	1.329	225	328
$t^{1/2}$ (min)	20	80	64
AUC (ng/ml)min	153.000	25.000	59.000

Tabla 3: Niveles en plasma de suero de SAHA oral- Paciente N° 2

	i.v.	Oral (en ayunas)	Oral (no en ayunas)
$C_{m\acute{a}x}$ (ng/ml)	1.003	362	302
$t^{1/2}$ (min)	21	82	93
AUC (ng/ml)min	108.130	63.114	59.874

Las Fig. 1 a 8 son portaobjetos de HPLC que muestran la cantidad de α -ACH4 en pacientes de las cohortes I y II, medida hasta 10 horas después de haber recibido la dosis oral, en comparación con los niveles de α -ACH4 al administrar el SAHA por vía intravenosa. La Fig. 9 muestra la concentración media en plasma de SAHA (ng/ml) en los puntos temporales indicados tras la administración. La Fig. 9A: dosis oral (200 mg y 400 mg) en ayunas el Día 8. Fig. 9B: dosis oral con comida el Día 9. Fig. 9C: dosis i.v. el Día 1. La Fig. 10 muestra la semivida aparente de una dosis oral de 200 mg y 400 mg de SAHA, los Días 8, 9 y 22. La Fig. 11 muestra la AUC (ng/ml/h) de una dosis oral de 200 mg y 400 mg de SAHA, los Días 8, 9 y 22. La Fig. 12 muestra la biodisponibilidad de SAHA tras una dosis oral de 200 mg y 400 mg, los Días 8, 9 y 22.

EJEMPLO 3:Dosificación oral de ácido hidroxámico suberoilánilida (SAHA) - aumento de la dosis.

- 5 En otro experimento, veinticinco pacientes con tumores sólidos se han inscrito en la rama A, trece pacientes con linfomas de Hodgkin o linfomas de no Hodgkin se han inscrito en la rama B; y un paciente con leucemia aguda y un paciente con síndrome mielodisplásico se han inscrito en la rama C, como se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4: Esquema de aumento de la dosis y número de pacientes de cada nivel de dosis

Cohorte	Dosis (mg/día)	Programa de dosificación	Nº de días de la dosificación	Período de descanso	Nº de pacientes inscritos (rama A/rama B/rama C)*
I	200	Una vez al día	Continua	Ninguno	6/0/0
II	400	Una vez al día	Continua	Ninguno	5/4/2
III	400	Dos veces al día	Continua	Ninguno	6/3/0
IV	600	Una vez al día	Continua	Ninguno	4/3/0
V	200	Dos veces al día	Continua	Ninguno	4/3/0
VI	300	Dos veces al día	Continua	Ninguno	-/-/-
					Subtotales: 25/13/2
					Total = 40

*Rama A = tumor sólido, rama B = linfoma, rama C = leucemia.

10

Resultados:

Entre los once pacientes tratados en la Cohorte II, un paciente experimentó DLT de diarrea de grado 3 y deshidratación de grado 3 durante el primer ciclo de tratamiento. Se incluyeron nueve pacientes en la Cohorte III. Dos pacientes no se pudieron valorar durante la evaluación de la toxicidad de 28 días por la finalización temprana del estudio debido a la rápida progresión de la enfermedad. De los siete pacientes restantes, cinco experimentaron DLT durante el primer ciclo de tratamiento: diarrea/deshidratación (n = 1), fatiga/deshidratación (n = 1), anorexia (n = 1), deshidratación (n = 1) y anorexia/deshidratación (n = 1). Estos cinco pacientes se recuperaron en aproximadamente una semana tras el mantenimiento del fármaco del estudio. Después, se les redujo la dosis hasta 400 mg Qd, que parecieron ser bien tolerados. El promedio de días con 400 mg Bid para todos los pacientes de la Cohorte III fue de 21 días. Basándose en estos hallazgos, se estimó que el programa de dosificación de 400 mg dos veces al día había superado la dosis máxima tolerada. Tras modificar el protocolo, se prosiguió el aumento en la Cohorte IV a una dosis de 600 mg una vez al día. De los siete pacientes inscritos en la Cohorte IV, dos no se pudieron valorar durante la evaluación de la toxicidad de 28 días por la finalización temprana del estudio debido a la rápida progresión de la enfermedad. Tres pacientes experimentaron DLT durante el primer ciclo de tratamiento: anorexia/deshidratación/fatiga (n = 1) y diarrea/deshidratación (n = 2). Por tanto, se estimó que la dosis de 600 mg había superado la dosis máxima tolerada, y se definió la dosis de 400 mg una vez al día como la dosis máxima tolerada para la administración oral una vez al día. Se modificó el protocolo para evaluar niveles de dosis adicionales del programa de dosificación de dos veces al día a 200 mg Bid y 300 mg Bid administrados de forma continua.

30

El análisis farmacocinético provisional se basó en 18 pacientes tratados a los niveles de dosis de 200 mg Qd, 400 mg Qd y 400 mg Bid. En general, las estimaciones medias de $C_{m\acute{a}x}$ y AUC_{inf} del SAHA administrado por vía oral en condiciones de ayuno o de no ayuno aumentaron de manera proporcional a la dosis en el intervalo de dosis de 200 mg a 400 mg. En general, la fracción de AUC_{inf} debida a la extrapolación fue del 1 % o inferior. Las estimaciones medias para la semivida aparente fueron variables entre los grupos de dosis en condiciones de ayuno o de no ayuno, variando de 61 a 114 minutos. Las estimaciones medias de $C_{m\acute{a}x}$ varían de 233 ng/ml (0,88 μ M) a 570 ng/ml (2,3 μ M). La fracción biodisponible de SAHA, calculada a partir de los valores de AUC_{inf} después de la infusión i.v. y la administración oral, resultó ser de aproximadamente 0,48.

35

Se recogieron células mononucleares de sangre periférica antes del tratamiento, inmediatamente después de la infusión y entre 2 y 10 horas después de la ingestión oral de las cápsulas de SAHA para evaluar el efecto de SAHA sobre el grado de acetilación de las histonas en una célula huésped normal. Las histonas se aislaron y se sondaron con anticuerpo contra histona acetilada (H3) seguido de anticuerpo secundario de HRP. El análisis preliminar demostró un aumento de la acumulación de las histonas acetiladas en las células mononucleares periféricas que se pudo detectar hasta 10 horas después de la ingestión de las cápsulas de SAHA al nivel de dosis de 400 mg al día.

45

Trece pacientes continuaron el tratamiento durante 3-12 meses con alteraciones o estabilidad de la enfermedad: tiroides (n = 3), glándulas sudoríparas (n = 1), renal (n = 2), laringe (n = 1), próstata (n = 1), linfoma de Hodgkin (n = 2), linfoma de no Hodgkin (n = 2) y leucemia (n = 1).

50

Seis pacientes presentaron una reducción del tumor en las TC. Tres de estos seis pacientes cumplen con los criterios de respuesta parcial (un paciente con cáncer de laringe metastásico y dos pacientes con linfomas de no Hodgkin). Estas respuestas parciales se observaron a los niveles de dosis de 400 mg Bid (n = 2) y 600 mg Qd (n = 1).

EJEMPLO 4:Dosificación intravenosa de SAHA

- 5 La Tabla 5 muestra un programa de dosificación para pacientes que recibieron SAHA por vía intravenosa. Los pacientes comenzaron en la Cohorte I, recibiendo 300 mg/m² de SAHA durante cinco días consecutivos de una semana, con una dosis total de 1.500 mg/m². A continuación, se observaron los pacientes durante un período de dos semanas y pasaron a la Cohorte II, y luego fueron progresando por las cohortes a menos que el tratamiento se diera por terminado debido a la progresión de la enfermedad, la regresión del tumor, efectos secundarios inaceptables o que el paciente recibiera otro tratamiento.

Tabla 5: Aumento de la dosis convencional para el SAHA administrado por vía intravenosa

Cohorte	Dosis (mg/m ²)	Número de días/semana	Número de semanas consecutivas	Período de observación (semanas)	Dosis total (mg/m ²)
I	300	5	1	2	1.500
n	300	5	2	2	3.000
III	300	5	3	1*	4.500
IV	600	5	3	1*	9.000
V	800	5	3	1*	13.500
VI	1200	5	3	1*	18.000
VII	1500	5	3	1*	22.500

*Los pacientes hematológicos comenzaron al nivel de dosis III.

- 15 Si bien la presente invención se ha mostrado y descrito particularmente con referencias a las realizaciones preferidas de la misma, los expertos en la materia entenderán que se pueden realizar diversos cambios en la forma y el contenido de la misma sin apartarse del significado de la invención descrita. En cambio, el alcance de la invención está definido por las reivindicaciones que figuran más adelante.

Referencias

- 20 1. Sporn, M. B., Roberts, A. B. y Driscoll, J. S. (1985) en "Cancer: Principles and Practice of Oncology", eds. Hellman, S., Rosenberg, S. A. y DeVita, V. T., Jr., Ed. 2, (J. B. Lippincott, Filadelfia), P. 49.
- 25 2. Breitman, T. R., Selonick, S. E. y Collins, S. J. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 77: 2936-2940.
- 3 3. Olsson, I. L. y Breitman, T. R. (1982) *Cancer Res.* 42: 3924-3927.
4. Schwartz, E. L. y Sartorelli, A. C. (1982) *Cancer Res.* 42: 2651-2655.
- 30 5. Marks, P. A., Sheffery, M. y Rifkind, R. A. (1987) *Cancer Res.* 47: 659.
6. Sachs, L. (1978) *Nature* (Londres) 274: 535.
- 35 7. Friend, C., Scher, W., Holland, J. W. y Sato, T. (1971) *Proc. Natl. Acad. Sci. (EE.UU.)* 68: 378-382.
8. Tanaka, M., Levy, J., Terada, M., Breslow, R., Rifkind, R. A. y Marks, P. A. (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci. (EE.UU.)* 72: 1003-1006.
- 40 9. Reuben, R. C., Wife, R. L., Breslow, R., Rifkind, R. A. y Marks, P. A. (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. (EE.UU.)* 73: 862-866.
10. Abe, E., Miyaura, C., Sakagami, H., Takeda, M., Konno, K., Yamazaki, T., Yoshika, S. y Suda, T. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. (EE.UU.)* 78: 4990-4994.
- 45 11. Schwartz, E. L., Snoddy, J. R., Kreutter, D., Rasmussen, H. y Sartorelli, A. C. (1983) *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* 24: 18.
12. Tanenaga, K., Hozumi, M. y Sakagami, Y. (1980) *Cancer Res.* 40: 914-919.
- 50 13. Lotem, J. y Sachs, L. (1975) *Int. J. Cancer* 15: 731-740.
14. Metcalf, D. (1985) *Science*, 229: 16-22.
- 55 15. Scher, W., Scher, B. M. y Waxman, S. (1983) *Exp. Hematol.* 11: 490-498.

16. Scher, W., Scher, B. M. y Waxman, S. (1982) *Biochem. & Biophys. Res. Comm.* 109: 348-354.
17. Huberman, E. y Callahan, M. F. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci.* (EE.UU.) 76: 1293-1297.
- 5 18. Lottem, J. y Sachs, L. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci.* (EE.UU.) 76: 5158-5162.
19. Terada, M., Epner, E., Nudel, U., Salmon, J., Fibach, E., Rifkind, R. A. y Marks, P. A. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci.* (EE.UU.) 75: 2795-2799.
- 10 20. Morin, M. J. y Sartorelli, A. C. (1984) *Cancer Res.* 44: 2807-2812.
21. Schwartz, E. L., Brown, B. J., Nierenberg, M., Marsh, J. C. y Sartorelli, A. C. (1983) *Cancer Res.* 43: 2725-2730.
- 15 22. Sugano, H., Furusawa, M., Kawaguchi, T. y Ikawa, Y. (1973) *Bibl. Hematol.* 39: 943-954.
23. Ebert, P. S., Wars, I y Buell, D. N. (1976) *Cancer Res.* 36: 1809-1813.
24. Hayashi, M., Okabe, J. y Hozumi, M. (1979) *Gann* 70: 235-238.
- 20 25. Fibach, E., Reuben, R. C., Rifkind, R. A. y Marks, P. A. (1977) *Cancer Res.* 37: 440-444.
26. Melloni, E., Pontremoli, S., Damiani, G., Viotti, P., Weich, N., Rifkind, R. A. y Marks, P. A. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci.* (EE.UU.) 85: 3835-3839.
- 25 27. Reuben, R., Khanna, P. L., Gazitt, Y., Breslow, R., Rifkind, R. A. y Marks, P. A. (1978) *J. Biol. Chem.* 253: 4214-4218.
28. Marks, P. A. y Rifkind, R. A. (1988) *International Journal of Cell Cloning* 6: 230-240.
- 30 29. Melloni, E., Pontremoli, S., Michetti, M., Sacco, O., Cakiroglu, A. G., Jackson, J. F., Rifkind, R. A. y Marks, P. A. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sciences* (EE.UU.) 84: 5282-5286.
30. Marks, P. A. y Rifkind, R. A. (1984) *Cancer* 54: 2766-2769.
- 35 31. Egorin, M. J., Sigman, L. M. VanECHO, D. A., Forrest, A., Whitacre, M. Y. y Aisner, J. (1987) *Cancer Res.* 47: 617-623.
32. Rowinsky, E. W., Ettinger, D. S., Grochow, L. B., Brundrett, R. B., Cates, A. E. y Donehower, R. C. (1986) *J. Clin. Oncol.* 4: 1835-1844.
- 40 33. Rowinsky, E. L. Ettinger, D. S., McGuire, W. P., Noe, D. A., Grochow, L. B. y Donehower, R. C. (1987) *Cancer Res.* 47: 5788-5795.
34. Callery, P. S., Egorin, M. J., Geelhaar, L. A. y Nayer, M. S. B. (1986) *Cancer Res.* 46: 4900-4903.
35. Young, C. W. Fanucchi, M. P., Walsh, T. B., Blatzer, L., Yaldaie, S., Stevens, Y. W., Gordon, C., Tong, W., Rifkind, R. A. y Marks, P. A. (1988) *Cancer Res.* 48: 7304-7309.
- 50 36. Andreeff, M., Young, C., Clarkson, B., Fettes, J., Rifkind, R. A. y Marks, P. A. (1988) *Blood* 72: 186a.
37. Marks, P. A., Breslow, R., Rifkind, R. A., Ngo, L. y Singh, R. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci.* (EE.UU.) 86: 6358-6362.
38. Breslow, R., Jursic, B., Yan, Z. F., Friedman, E., Leng, L., Ngo, L., Rifkind, R. A. y Marks, P. A. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci.* (EE.UU.) 88: 5542-5546.
- 55 39. Richon, V. M., Webb, Y., Merger, R., *et al.* (1996) *PNAS* 93:5705-8.
40. Cohen, L. A., Amin, S., Marks, P. A., Rifkind, R. A., Desai, D. y Richon, V. M. (1999) *Anticancer Research* 19:4999-5006.
- 60 41. Grunstein, M. (1997) *Nature* 389:349-52.
42. Finnin, M. S., Donigian, J. R., Cohen, A., *et al.* (1999) *Nature* 401:188-193.
- 65 43. Van Lint, C., Emiliani, S., Verdin, E. (1996) *Gene Expression* 5:245-53.

44. Archer, S. Shufen, M. Shei, A., Hodin, R. (1998) *PNAS* 95:6791-96.
45. Dressel, U., Renkawitz, R., Baniahmad, A. (2000) *Anticancer Research* 20(2A):1017-22.
- 5 46. Lin, R. J., Nagy, L., Inoue, S., *et al.* (1998) *Nature* 391:811-14.

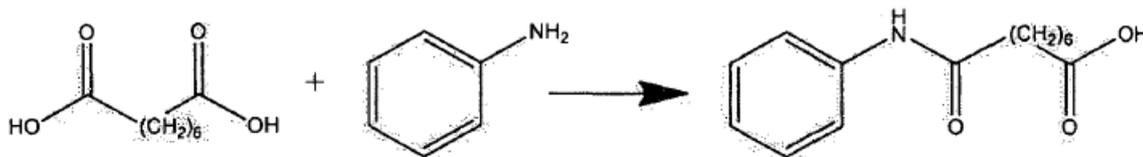
REIVINDICACIONES

1. Una forma cristalina de ácido hidroxámico suberoilánilida (SAHA) que se puede obtener mediante un método de recristalización que comprende las etapas de:

5

A. preparar un preparado en bruto de SAHA, comprendiendo dicha preparación las etapas de:

(i) sintetizar ácido suberanílico usando la reacción:



10

reacción que consiste en las etapas de:

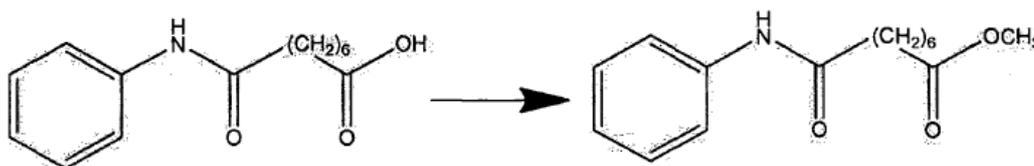
- a) colocar, en un matraz de 22 l, 3,5 kg (20,09 mol) de ácido subérico y fundir el ácido con calor;
- b) elevar la temperatura hasta 175 °C, y luego añadir 2,04 kg (21,92 mol) de anilina;
- c) elevar la temperatura hasta 190 °C y mantener esa temperatura durante 20 minutos;
- d) verter la masa fundida en un tanque de Nalgene que contiene 4,017 kg de hidróxido de potasio disueltos en 50 l de agua;
- e) agitar la mezcla durante 20 minutos tras la adición de la masa fundida;
- f) repetir las etapas de reacción a)-c) a la misma escala, y verter la segunda masa fundida resultante en la solución de hidróxido de potasio de la etapa d);
- g) agitar bien la mezcla de reacción, tras lo que se apaga el agitador y se deja sedimentar la mezcla;
- h) filtrar la mezcla a través de un lecho corto de Celite de 4,2 kg para retirar el subproducto neutro del ataque por la anilina en ambos extremos del ácido subérico, dejando la mezcla sedimentar durante el proceso de filtración, proceso que dura varios días;
- i) acidificar el filtrado usando 5 l de ácido clorhídrico concentrado;
- j) agitar la mezcla durante una hora y luego dejar que la mezcla se sedimente durante la noche;
- k) recoger el producto por filtración;
- l) lavar el producto en un embudo con cuatro porciones de 5 l de agua desionizada;
- m) colocar la torta del filtro húmeda en un matraz de 72 l con 44 l de agua desionizada;
- n) calentar la mezcla hasta 50 °C;
- o) aislar el sólido mediante una filtración en caliente;
- p) retirar el ácido subérico usando varias trituraciones en caliente, en las que el producto se verifica por RMN [D₆DMSO] para controlar la eliminación del ácido subérico;
- q) repetir las etapas o) y p) con 44 l de agua a 50 °C al menos una vez;
- r) aislar el producto por filtración;
- s) enjuagar el producto aislado con 4 l de agua caliente;
- t) secar el producto durante dos días en un horno de vacío a 65 °C usando una bomba Nash como fuente de vacío, siendo la bomba Nash una bomba de anillo de agua que extrae un vacío de 98,2 kPa (982 mbar) y en la que se usa una purga de argón intermitente para ayudar a arrastrar el agua;
- u) purificar el producto mediante trituración en caliente en porciones a 65 °C usando aproximadamente 300 g de producto cada vez;
- v) filtrar cada porción y enjuagar bien con un total de 6 l de agua caliente;
- w) repetir las etapas u) y v) hasta que el ácido subérico se haya eliminado por completo del producto;
- x) combinar el producto sólido en un matraz y agitar con 6 l de una mezcla 1:2 de metanol/agua;
- y) aislar el producto por filtración y secar al aire el producto sobre el filtro durante dos días;
- z) colocar el producto en bandejas y secar el producto al vacío a 65 °C durante 45 horas usando una bomba Nash y un flujo de argón;

35

40

45

(ii) sintetizar suberanilato de metilo usando la reacción:

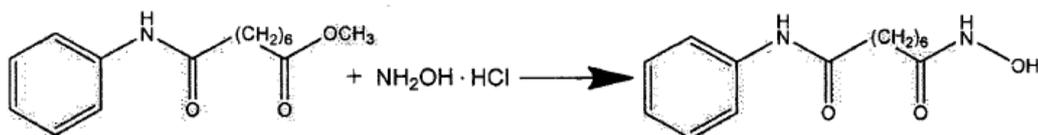


50

reacción que consiste en las etapas de:

- a) colocar en un matraz de 50 l dotado de un agitador mecánico y condensador 3,229 kg de ácido suberanílico producido mediante síntesis (i), 20 l de metanol y 398,7 g de resina Dowex 50WX2-400;
- b) calentar la mezcla a reflujo y mantenerla a reflujo durante 18 horas;
- c) filtrar la mezcla para retirar las perlas de resina;
- d) extraer el filtrado hasta el residuo en un evaporador rotatorio;
- e) transferir el residuo del evaporador rotatorio a un matraz de 50 l dotado de un condensador y un agitador mecánico, y añadir 6 l de metanol al matraz;
- f) calentar la mezcla, dando una solución;
- g) añadir 2 l de agua desionizada al matraz y apagar el calor;
- h) dejar que se enfríe la mezcla agitada, y luego colocar el matraz en un baño de hielo;
- i) enfriar la mezcla;
- j) aislar el producto sólido por filtración y enjuagar la torta del filtro con 4 l de una mezcla fría de metanol/agua 1:1;
- k) secar el producto a 45 °C en un horno de vacío usando una bomba Nash durante un total de 64 horas;

(iii) sintetizar SAHA en bruto usando la reacción:



reacción que consiste en las etapas de:

- a) añadir a un primer matraz de 50 l con un agitador mecánico, termopar y entrada para atmósfera inerte 1,4519 kg de clorhidrato de hidroxilamina, 19 l de metanol anhidro y 3,93 l de solución de metóxido de sodio al 30 % en metanol;
- b) cargar el matraz con 2,748 kg de suberanilato de metilo, seguidos de 1,9 l de solución de metóxido de sodio al 30 % en metanol;
- c) dejar agitando la mezcla durante 16 h y 10 minutos;
- d) transferir aproximadamente la mitad de la mezcla de reacción desde el primer matraz a un segundo matraz de 50 l dotado de un agitador mecánico;
- e) añadir 27 l de agua desionizada al primer matraz y agitar la mezcla durante 10 minutos, siendo el pH 11,56 medido usando un medidor de pH;
- f) ajustar el pH de la mezcla hasta 12,02 mediante la adición de 100 ml de solución de metóxido de sodio al 30 % en metanol, dando una solución transparente;
- g) diluir la mezcla de reacción en el matraz 2 de la misma manera que en la etapa e);
- h) ajustar el pH de la mezcla hasta 12,01 mediante la adición de 100 ml de solución de metóxido de sodio al 30 % en metanol, dando una solución transparente;
- i) acidificar la mezcla de reacción de cada matraz mediante la adición de ácido acético glacial para hacer precipitar el producto, teniendo el primer matraz un pH final de 8,98 y el segundo matraz, un pH final de 8,70;
- j) aislar el producto de ambos matraces por filtración usando un embudo Buchner y un filtro de tela;
- k) lavar la torta del filtro con 15 l de agua desionizada, tapando el embudo y secando parcialmente el producto sobre el embudo al vacío durante 15,5 horas;
- l) retirar el producto y colocarlo en cinco bandejas de vidrio;
- m) colocar las bandejas en un horno de vacío y secar el producto hasta un peso constante, siendo el primer período de secado de 22 horas a 60 °C usando una bomba Nash como fuente de vacío con un flujo de argón, tras lo cual las bandejas se retiran del horno de vacío y se pesan, para devolverlas luego al horno y secar el producto durante 4 horas y 10 minutos más usando una bomba de aceite como fuente de vacío sin flujo de argón;
- n) envasar el material en bolsas dobles de polietileno de 4 mm y colocarlas en un recipiente exterior de plástico;

B. preparar SAHA cristalino a partir del preparado en bruto de SAHA mediante:

- a) la carga de un matraz de 50 l dotado de un agitador mecánico, termopar, condensador y entrada para atmósfera inerte con 2,5257 kg de SAHA en bruto preparado en el apartado A, seguidos de 2,625 l de agua desionizada y 15,755 l de metanol;
- b) calentamiento del material a reflujo, dando una solución;

- c) adición de 5,250 l de agua desionizada a la mezcla de reacción;
d) apagado del calor y dejar que la mezcla se enfríe hasta 28 °C;
e) retirada del matraz de la manta calefactora y colocación del mismo en una bañera para usarla como baño de enfriamiento;
5 f) adición de agua con hielo a la bañera hasta enfriar la mezcla hasta -5 °C;
g) mantenimiento de la mezcla por debajo de -5 °C durante dos horas;
h) aislamiento del producto por filtración y lavado de la torta del filtro con 1,5 l de una mezcla fría de metanol/agua 2:1;
10 i) tapado del embudo y secado parcial del producto al vacío durante 1,75 horas;
j) retirada del producto del embudo y colocación del mismo en 6 bandejas de vidrio;
k) colocación de las bandejas en un horno de vacío y secado del producto durante 64,75 horas a 60 °C usando una bomba Nash como fuente de vacío y usando un flujo de argón;
l) retirada de las bandejas para pesarlas y posterior devolución de las bandejas al horno y secado durante 4 horas más a 60 °C usando una bomba de aceite sin flujo de argón, dando un peso constante;
15 m) envasado del material en bolsas dobles de polietileno de 4 mm y colocación de las mismas en un recipiente exterior de plástico.
2. Un principio activo que consiste en la forma cristalina de ácido hidroxámico suberoilánilida (SAHA) de acuerdo con la reivindicación 1.
20
3. Una composición farmacéutica para la administración oral que comprende el principio activo de la reivindicación 2 y un vehículo farmacéuticamente aceptable, formulado en forma sólida.
4. Una composición farmacéutica para la administración oral que comprende la forma cristalina de ácido hidroxámico suberoilánilida (SAHA) de acuerdo con la reivindicación 1 y un vehículo farmacéuticamente aceptable, formulado en forma sólida.
25

Paciente de SAHA: i.v. frente a oral (200 mg/dosis)

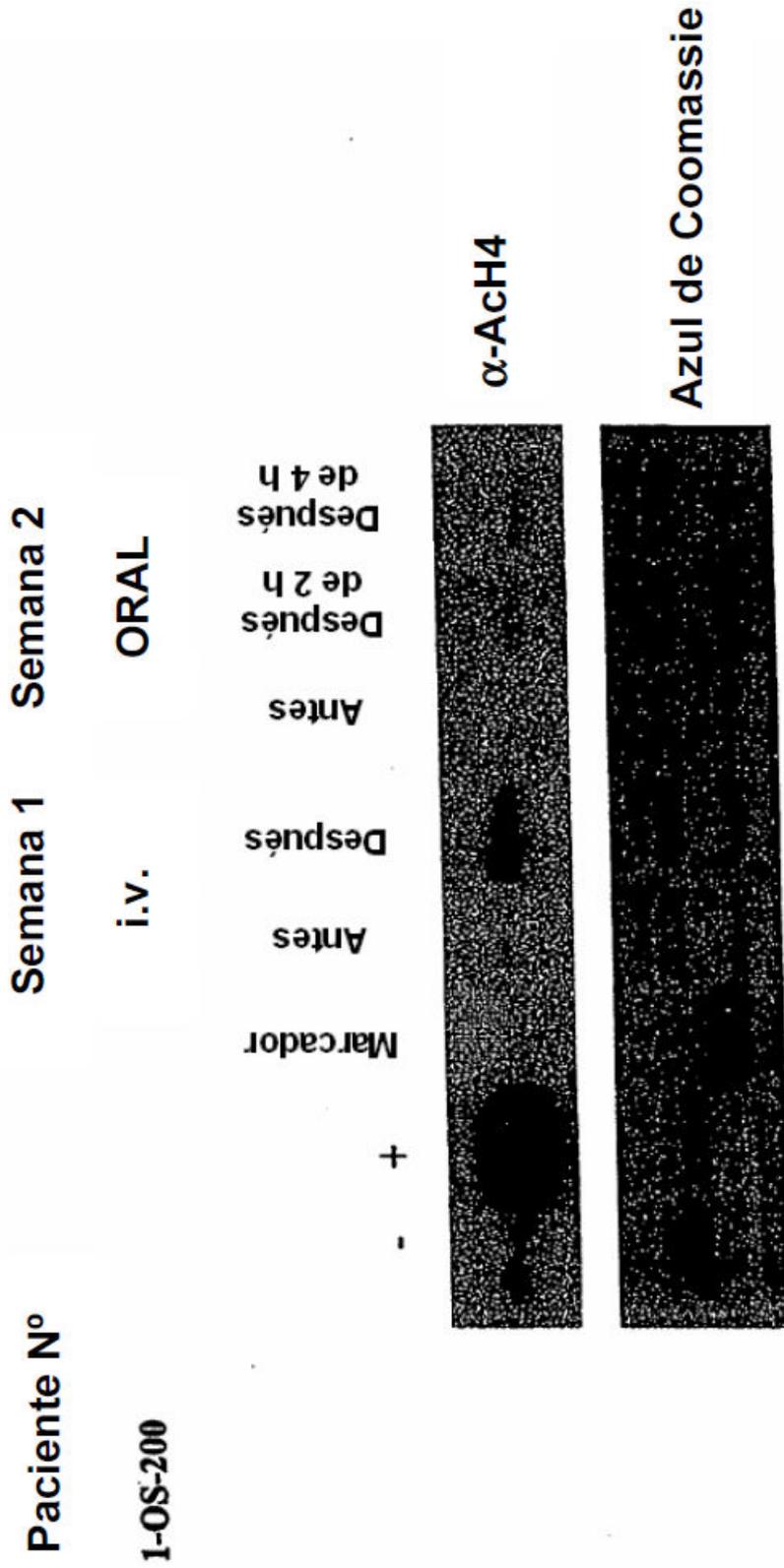


FIG. 1

**Protocolo 01-021 (SAHA ORAL) RAMA A: PACIENTES
CON TUMOR SÓLIDO, Cohorte I (200 mg/dosis)**

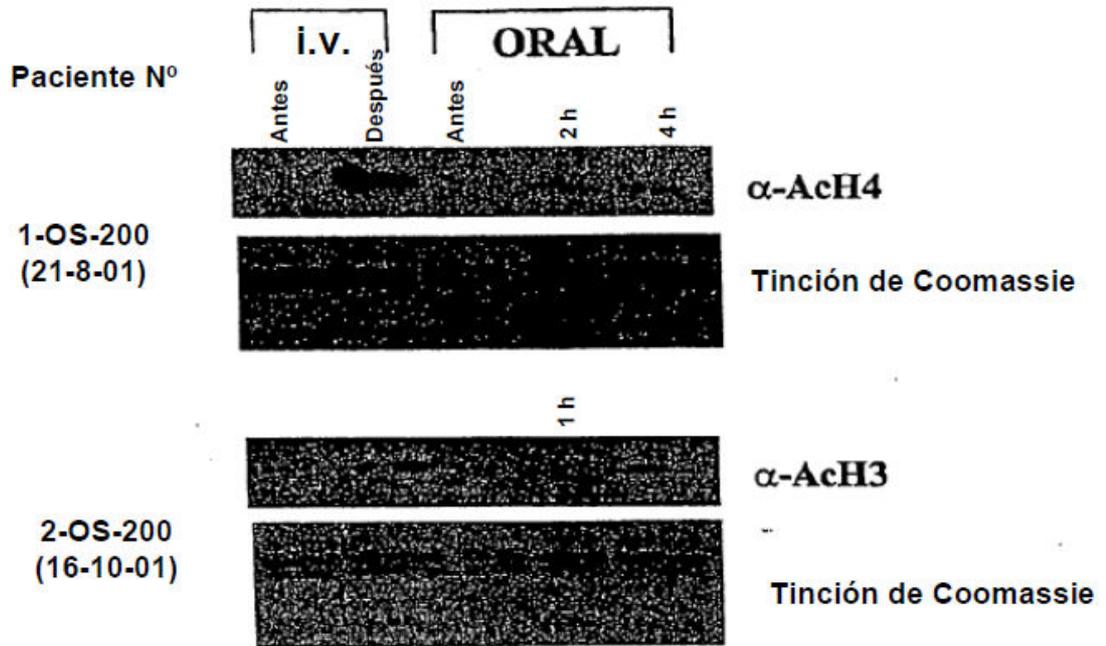


FIG. 2

Pacientes de SAHA: ORAL/Cohorte I (200 mg/dosis)

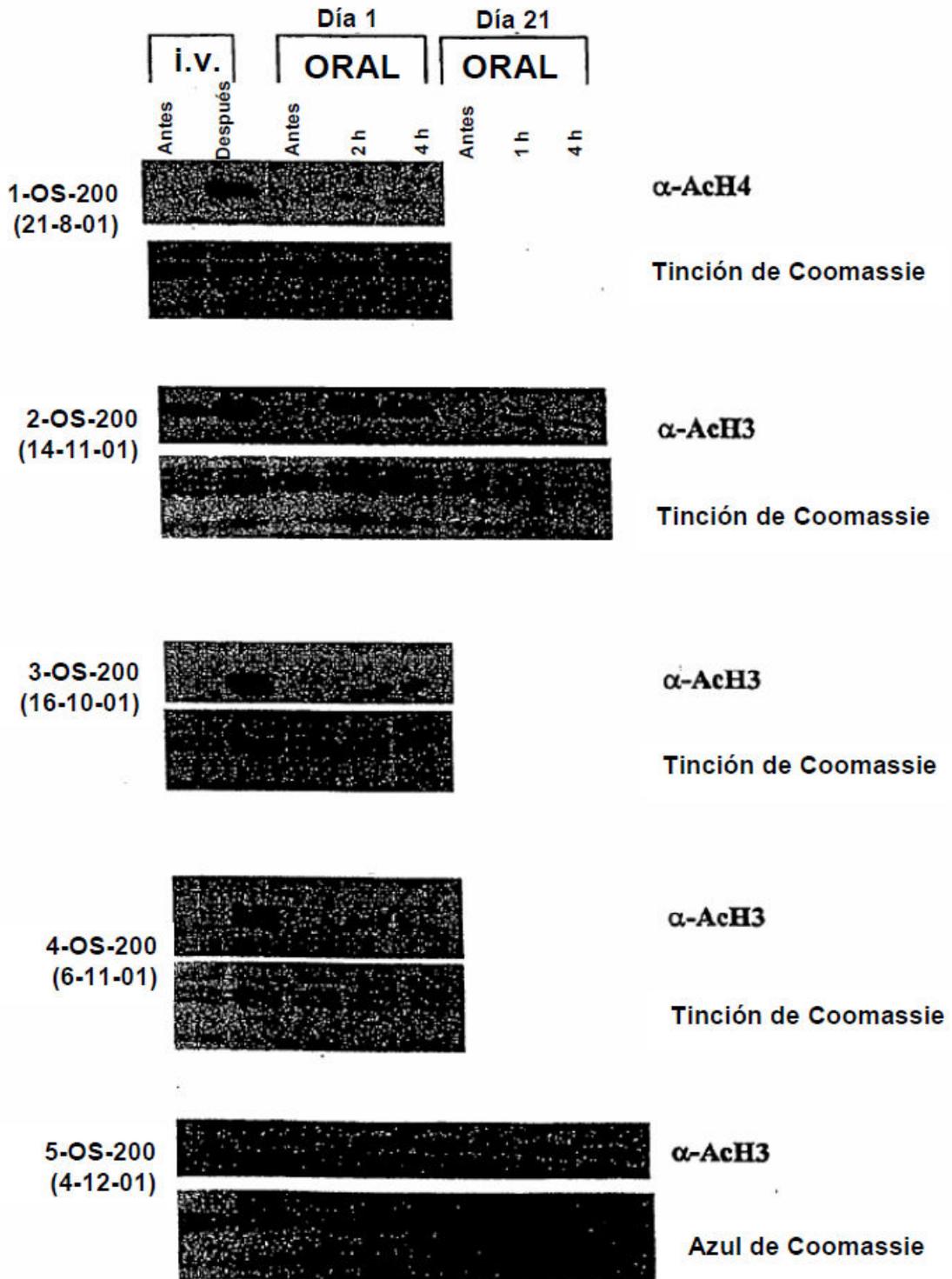


FIG. 3

Protocolo 01-021 (SAHA ORAL)
RAMA A: PACIENTES CON TUMOR SÓLIDO
Cohorte I (200 mg/dosis)

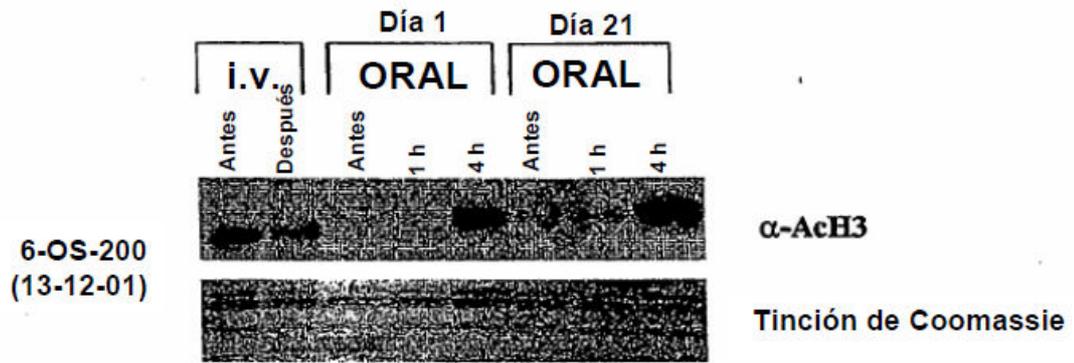
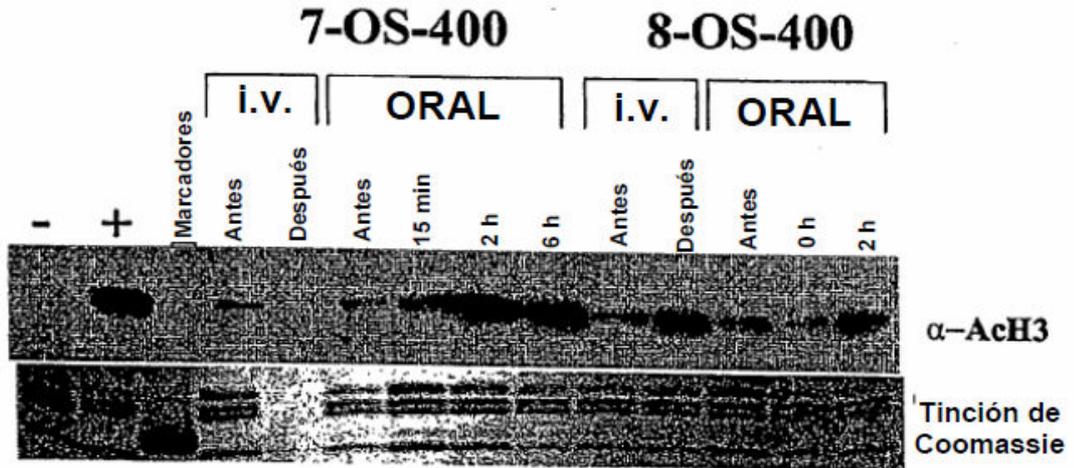
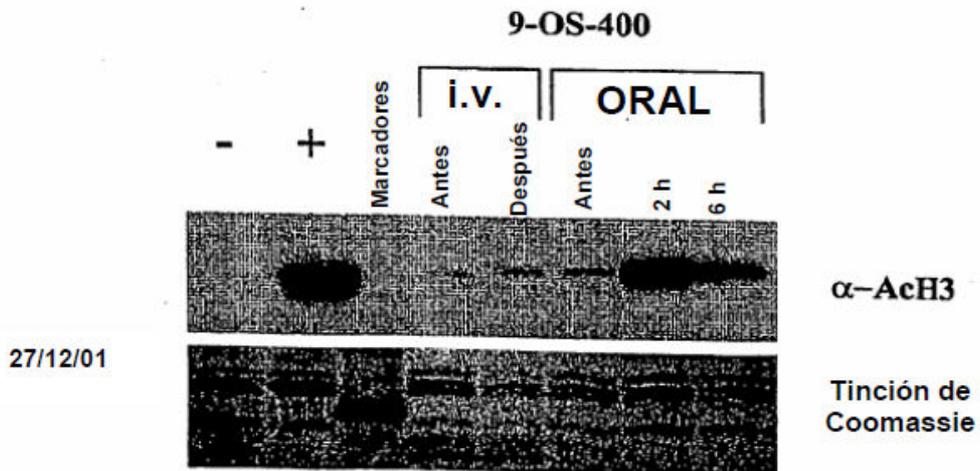


FIG. 4

**Protocolo 01-021 (SAHA ORAL)
RAMA A: PACIENTES CON TUMOR SÓLIDO
Cohorte IIa (400 mg/dosis)**



19/12/01



27/12/01

FIG. 5

Pacientes de SAHA: ORAL/Cohorte II (400 mg/dosis)

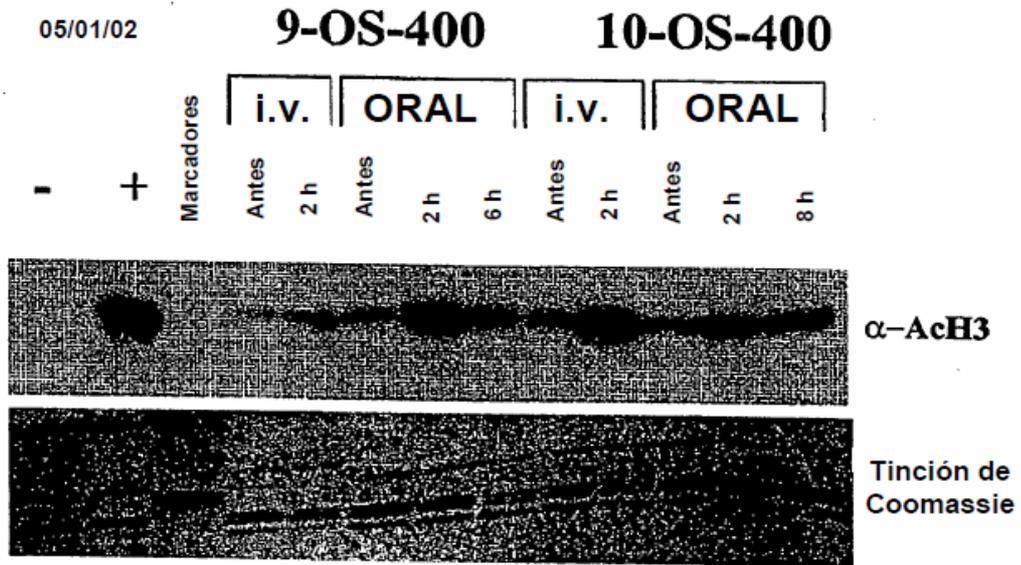


FIG. 6

**Protocolo 01-021 (SAHA ORAL)
RAMA A: PACIENTES CON TUMOR SÓLIDO
Cohorte IIa (400 mg/dosis)**

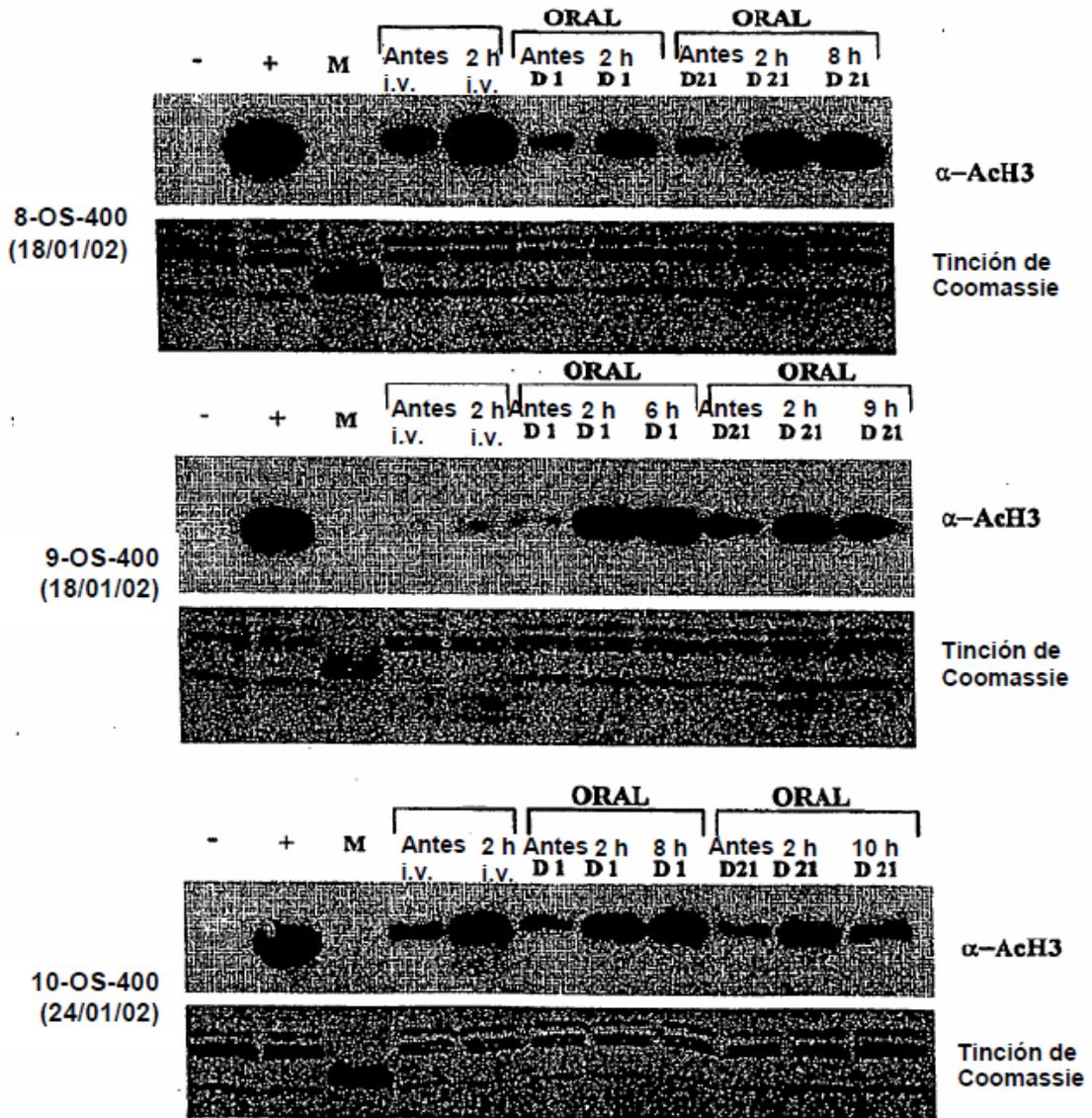


FIG. 7

Pacientes de SAHA: ORAL/Cohorte II (400 mg/dosis)

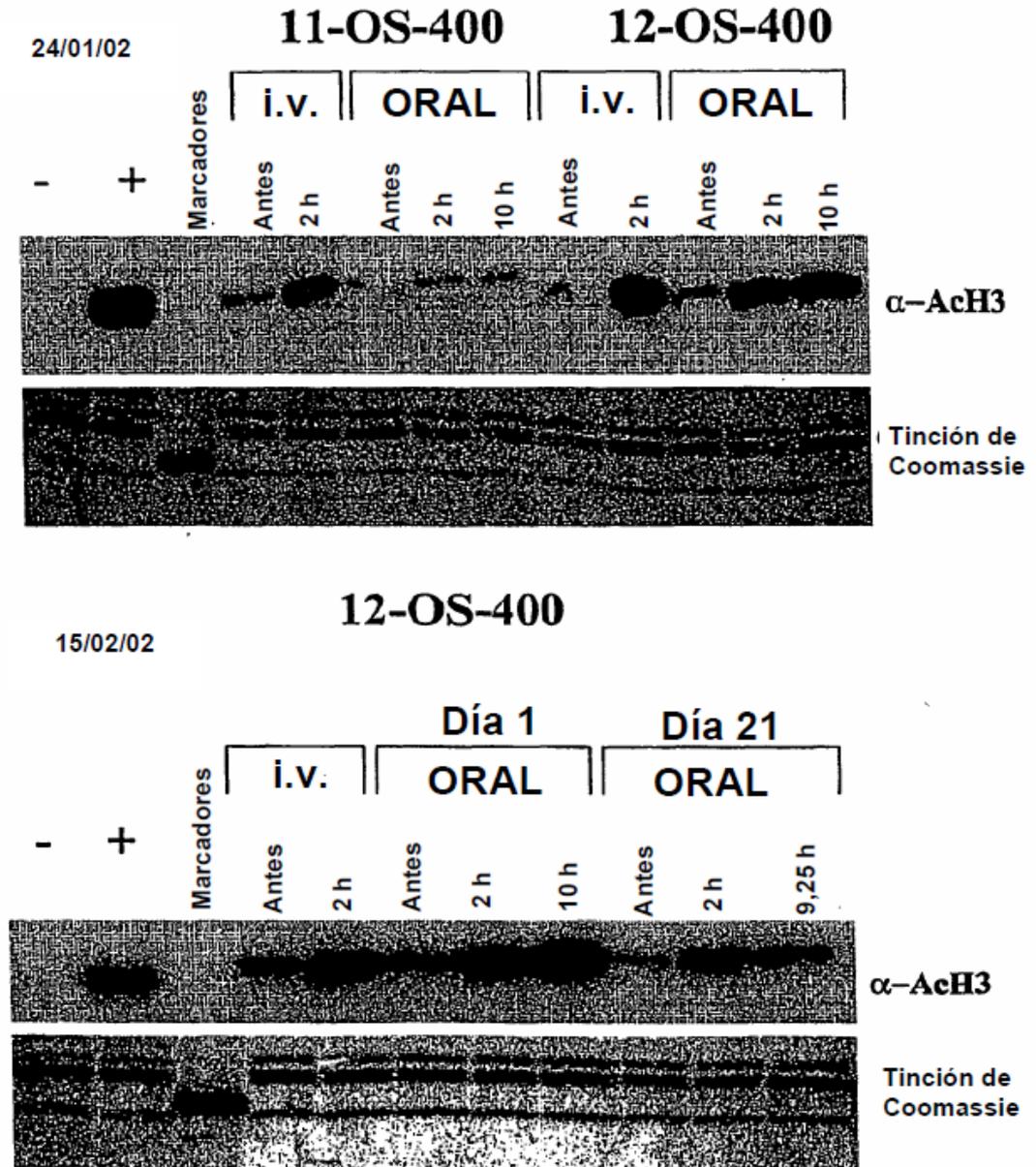


FIG. 8

200 mg frente a 400 mg por vía oral (en ayunas)

Dosis oral del Día 8 del Ciclo 1

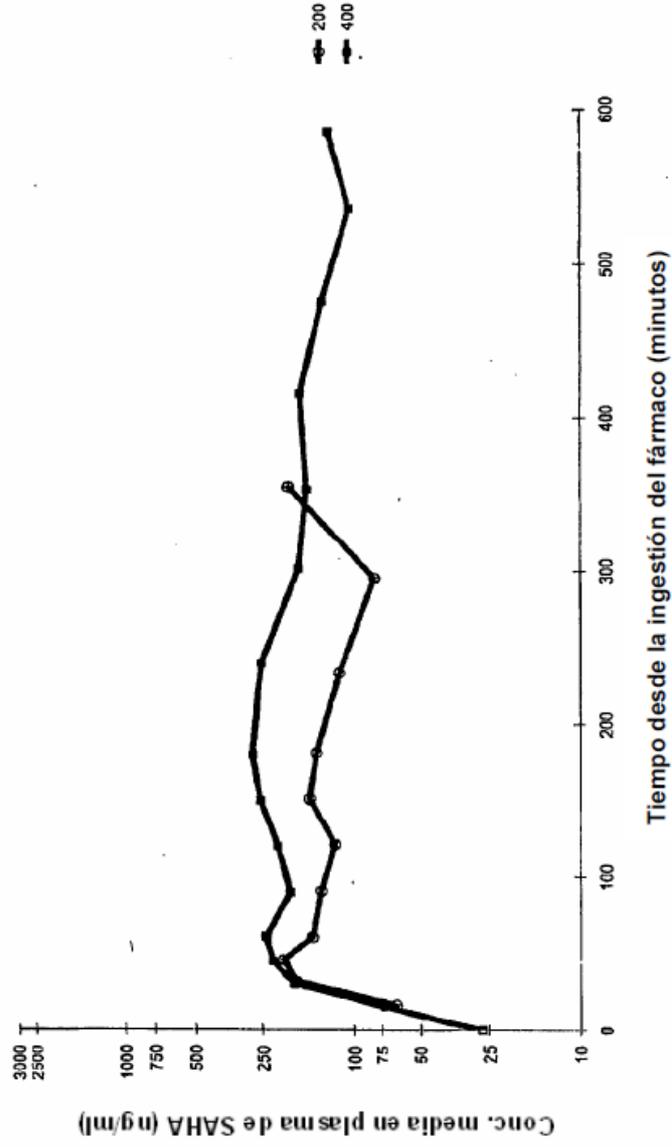


Figura 9A

200 mg frente a 400 mg por vía oral (no ayunas)

Dosis oral del Día 9 del Ciclo 1

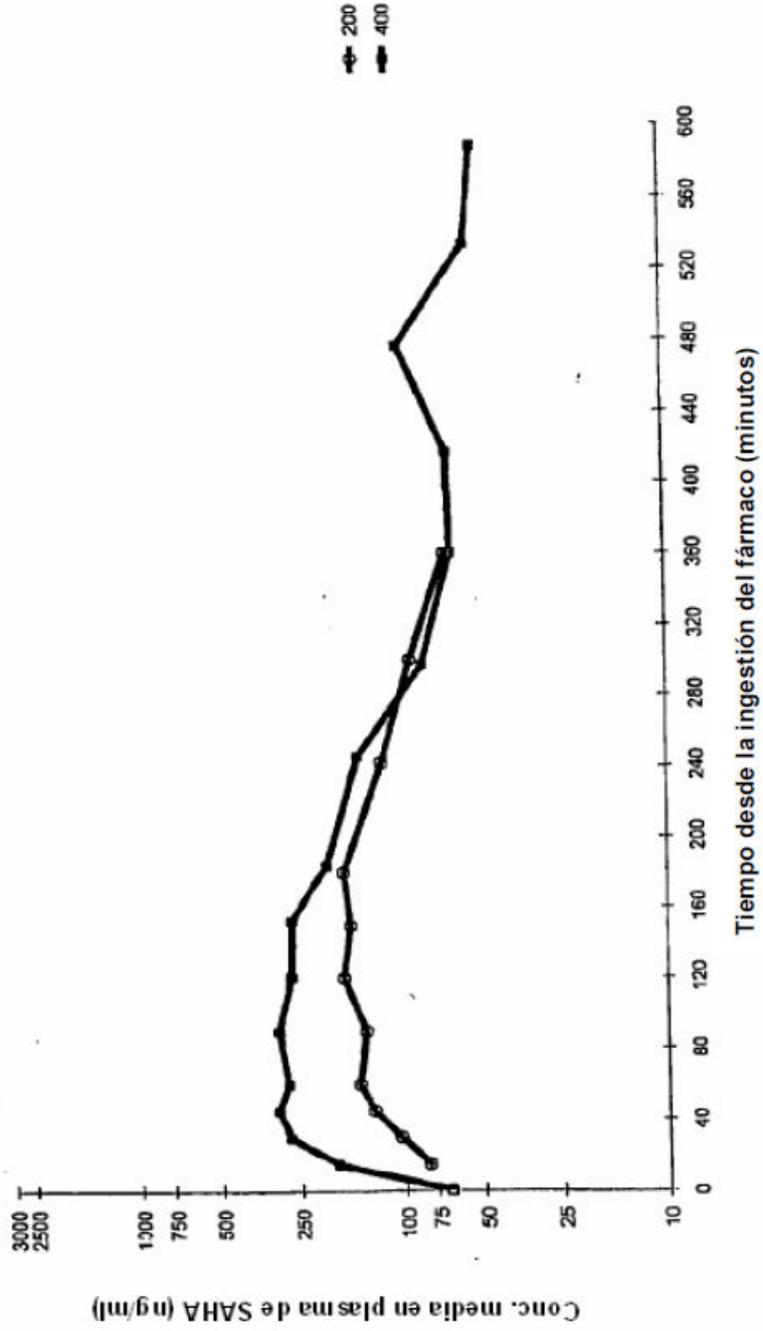


Figura 9B

200 mg frente a 400 mg i.v.

Dosis i.v. del Día 1 del Ciclo 1

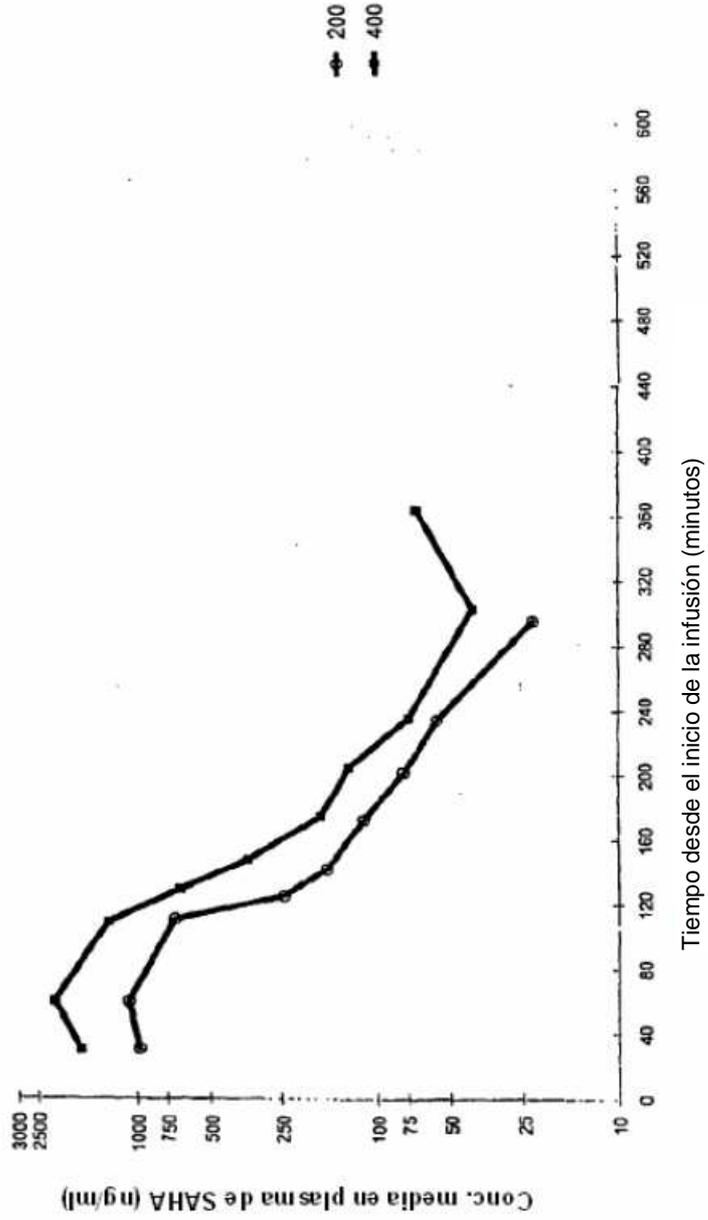
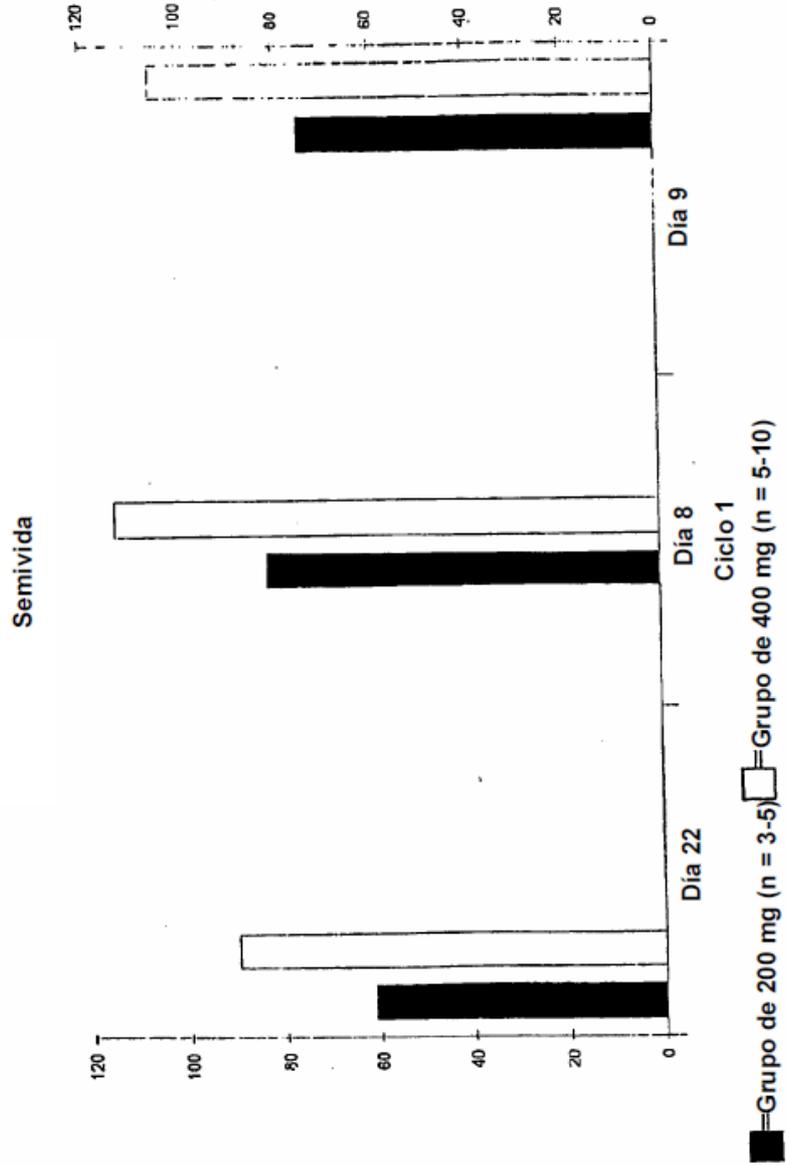


Figura 9C

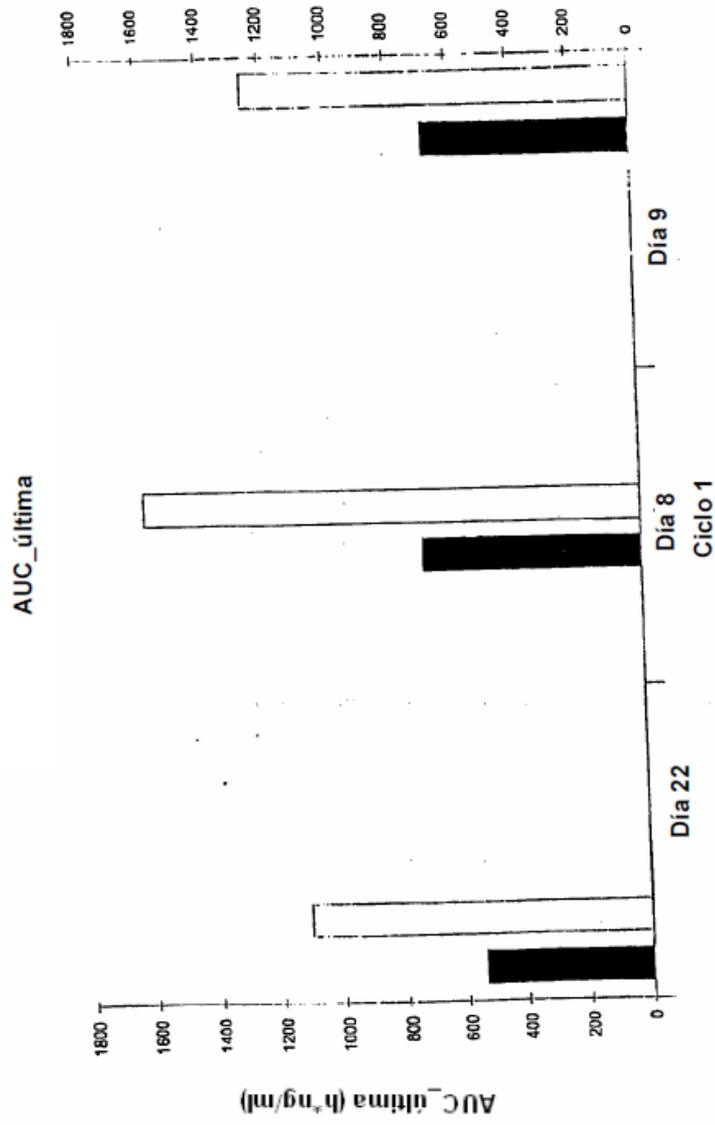
Semivida aparente de la dosis oral



4/3/2003

Figura 10

AUC de la dosis oral



■ = Grupo de 200 mg (n = 3-5) □ = Grupo de 400 mg (n = 5-10)

Figura 11

4/3/2003

Biodisponibilidad

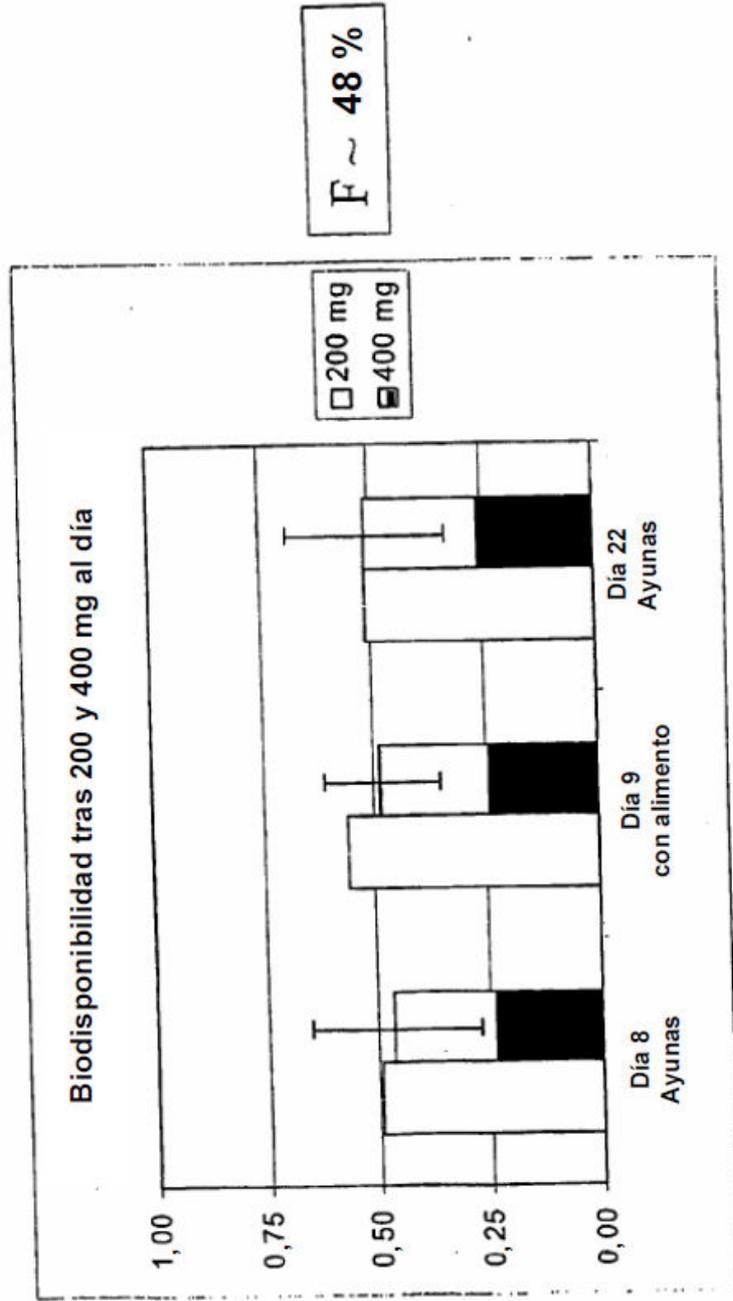


Figura 12