

**OLARTEMOURE**

OLARTE MOURE & ASOCIADOS LTDA.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-041802- -00009-0000

Fecha: 2011-04-19 16:54:51 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR  
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI  
Act. 329 CTOINFORMACION Folios: 70

Señores

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIRECCION DE NUEVAS CREACIONES

E. \_\_\_\_\_ S. \_\_\_\_\_ D. \_\_\_\_\_

Ref: Expediente No. 09-041.802

**Solicitud de patente titulada: "COMPOSICIONES FARMACEUTICAS DE INHIBIDORES DE LA HDAC Y COMPUESTOS METALICOS QUELABLES, Y COMPLEJOS QUELADOS METALICOS INHIBIDORES DE LA HDAC"**

**Solicitante: MERCK SHARP & DOHME CORP**

**Nuestra Ref: P2009/000038A**

CARLOS R. OLARTE, mayor de edad y vecino de Bogotá, identificado tal como aparece al pie de mi firma, en mi carácter de apoderado de la sociedad solicitante, me permito manifestar lo siguiente:

1. Me permito presentar una **SOLICITUD DIVISIONAL A**, para la solicitud de patente en referencia.

Atentamente,

CARLOS R. OLARTE  
C.C. 79.782.747 de Bogotá  
T.P. 74.295

Anexo: Solicitud Divisional



Espacio reservado para el adhesivo de radicación.

## PETITORIO - FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD

### PATENTE PCT

### ENTRADA EN FASE NACIONAL

P2009/000038A

### SOLICITUD DE:

1

☒

Patente de Invención.

☐

Patente de Modelo de Utilidad.

☒

Capítulo I.

☐

Capítulo II.

2

### SOLICITANTE (71)

Nombre: MERCK SHARP & DOHME CORP

Dirección: 126 East Lincoln Avenue, Rahway,  
NJ 07065-0907

Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos

Lugar de Constitución: Estado Unidos

Teléfono: \_\_\_\_\_

Fax: \_\_\_\_\_

E-mail: \_\_\_\_\_

### IDENTIFICACIÓN

C.C.

☐

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual

Número

### REPRESENTANTE O APODERADO

Nombre: CARLOS R. OLARTE

Dirección: World Trade Center Torre A,  
Calle 100 No. 8A-37 Piso 10

Teléfono: 601-7700 Fax: 601-7799

E-mail: office@olarteraisbeck.com

### IDENTIFICACIÓN

C.C.

☒

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual

Número 79.782.747Bta  
TP 74.295

### INVENTOR (ES) (72)

Nombre: Arlene E. MCKEOWN, Thomas A. MILLER,

Dirección: 126 East Lincoln Avenue, Rahway, NJ 07065-0907 EU.A.

Nacionalidad o Domicilio: Británica, Estadounidense

5

### PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/US2007/020609

Fecha

Septiembre 24, 2007

Publicación Internacional No. WO 2008/039421

Fecha

Abril 3, 2008

6

Título (54) COMPOSICIONES FARMACEUTICAS DE INHIBIDORES DE LA HDAC  
Y COMPUESTOS METALICOS QUELABLES, Y COMPLEJOS QUELADOS METALICOS  
INHIBIDORES DE LA HDAC

7

Clasificación Internacional (51) A61K 31/295

8

### Prioridad

SI

☒

NO

☐

(33) País de Origen

US

(32) Fecha

Septiembre 28, 2006

(31) Número de Solicitud

60/848.300

9

Comprobante de pago No. \_\_\_\_\_

Fecha

10

**ANEXOS**

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Poderes, si fuere el caso. Adjunto copia simple ver expediente No. 09-041.802
- ☒ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante. Ver expediente No. 09-041.802
- ☐ Declaraciones.
- ☒ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
- ☐ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
- ☐ Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- ☐ Arte final 12 x 12.
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☒ Otros. Búsqueda Internacional

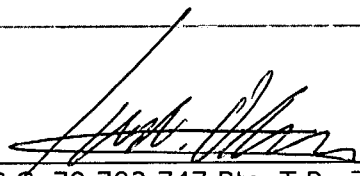
11

**FIGURA CARACTERÍSTICA:**

☐

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: CARLOS R. OLARTE

  
C.C. 79.782.747 Bta T.P. 74.295

**SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO**

**NIT : 800.176.089-2**

- / -



**RECIBO DE CAJA**

**No. 11 - 0037223**

Bogotá D.C., Abril 19 de 2011 - 16:12:00

RECIBIDO DE : OLARTERAISBECK

NI 830.122.870

\*\*\* Soporte del Pago \*\*\*

| TIPO PAGO    | BANCO           | CUENTA    | No. PAGO  | FECHA PAGO | VR. PAGO     |
|--------------|-----------------|-----------|-----------|------------|--------------|
| CONSIGNACION | BANCO DE BOGOTA | 062754387 | 444403175 | 19/04/2011 | 6.649.000.00 |

\*\*\* Conceptos Pagados \*\*\*

| CANT. | RENTISTICO              | CONCEPTO                                   | VR. UNDITARIO | VR. CONCEPTO        |
|-------|-------------------------|--------------------------------------------|---------------|---------------------|
| 1     | 50005-01-01 SOLICITUDES | 1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN | 571.000.00    | 571.000.00          |
|       |                         |                                            |               | <b>\$571.000.00</b> |

**SON: \*\*QUINIENTOS SETENTA Y UN MIL PESOS MONEDA CORRIENTE\*\*\***

Responsable: \_\_\_\_\_

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. \_\_\_\_\_

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



**No. 09-041802- -00009-0000**

Fecha: 2011-04-19 16:54:51 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR  
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI  
Act. 329 CTOINFORMACION Follos: 70

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mai: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Abril 19 de 2011 - 16:12:01

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau



(43) International Publication Date  
3 April 2008 (03.04.2008)

PCT

(10) International Publication Number  
**WO 2008/039421 A2**

(51) International Patent Classification:  
**A61K 31/295** (2006.01)

(74) Common Representative: **MERCK & CO., INC.**; 126  
East Lincoln Avenue, Rahway, NJ 07065-0907 (US).

(21) International Application Number:  
PCT/US2007/020609

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every  
kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,  
AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,  
CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG,  
ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL,  
IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK,  
LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW,  
MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL,  
PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY,  
TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA,  
ZM, ZW.

(22) International Filing Date:  
24 September 2007 (24.09.2007)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:  
60/848,300 28 September 2006 (28.09.2006) US

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every  
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,  
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,  
ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),  
European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,  
FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL,  
PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM,  
GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Applicant (for all designated States except US): **MERCK  
& CO., INC.** [US/US]; 126 East Lincoln Avenue, Rahway,  
NJ 07065-0907 (US).

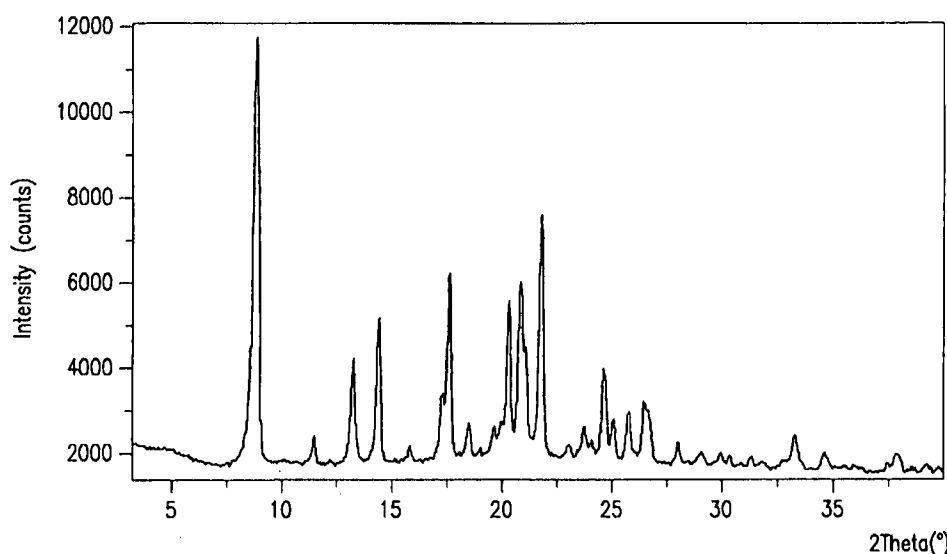
(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **MCKEOWN, Ar-  
lene, E.** [GB/US]; 126 East Lincoln Avenue, Rahway, NJ  
07065-0907 (US). **MILLER, Thomas, A.** [US/US]; 126  
East Lincoln Avenue, Rahway, NJ 07065-0907 (US).

Published:

— without international search report and to be republished  
upon receipt of that report

(54) Title: PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS OF HDAC INHIBITORS AND CHELATABLE METAL COMPOUNDS,  
AND METAL-HDAC INHIBITOR CHELATE COMPLEXES



(57) Abstract: The present invention provides pharmaceutical compositions of an HDAC inhibitor and a chelatable metal compound. In one embodiment, the invention provides a method of treating cancer and alleviating the side effects of the HDAC inhibitor by administering the pharmaceutical composition. In another embodiment, the present invention also provides pharmaceutical compositions of metal HDAC inhibitor chelate complexes. In another embodiment, the invention provides methods of treating cancer by administering the pharmaceutical compositions. The invention provides crystalline compositions of metal HDAC inhibitor chelate complexes and methods of producing same.

WO 2008/039421 A2

## TITLE OF THE INVENTION

PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS OF HDAC INHIBITORS AND CHELATABLE METAL COMPOUNDS, AND METAL-HDAC INHIBITOR CHELATE COMPLEXES

## 5 FIELD OF THE INVENTION

The present invention provides pharmaceutical compositions of an HDAC inhibitor and a chelatable metal compound. In one embodiment, the invention provides a method of treating cancer and alleviating the side effects of the HDAC inhibitor by administering the pharmaceutical composition. In another embodiment, the present invention  
10 also provides pharmaceutical compositions of metal HDAC inhibitor chelate complexes. In another embodiment, the invention provides methods of treating cancer by administering the pharmaceutical compositions. The invention provides crystalline compositions of metal HDAC inhibitor chelate complexes and methods of producing same.

## 15 BACKGROUND OF THE INVENTION

Throughout this application various publications are referenced by arabic numerals within parentheses. Full citations for these publications may be found at the end of the specification immediately preceding the claims.

Cancer is a disorder in which a population of cells has become, in varying  
20 degrees, unresponsive to the control mechanisms that normally govern proliferation and differentiation. For many years there have been two principal strategies for chemotherapeutic treatment of cancer: a) blocking hormone-dependent tumor cell proliferation by interference with the production or peripheral action of sex hormones; and b) killing cancer cells directly by exposing them to cytotoxic substances, which injure both neoplastic and normal cell populations.

25 Cancer therapy is also being attempted by the induction of terminal differentiation of the neoplastic cells (1). In cell culture models differentiation has been reported by exposure of cells to a variety of stimuli, including: cyclic AMP and retinoic acid (2,3), aclarubicin and other anthracyclines (4).

Despite many advances in the field of oncology, the majority of solid tumors  
30 remain incurable in the advanced stages. Cytotoxic therapy is used in most cases, however, it often causes significant morbidity to the patient without significant clinical benefit. Less toxic and more specific agents to treat and control advanced malignancies are being explored.

6

There is abundant evidence that neoplastic transformation does not necessarily destroy the potential of cancer cells to differentiate (1,5,6). There are many examples of tumor cells which do not respond to the normal regulators of proliferation and appear to be blocked in the expression of their differentiation program, and yet can be induced to differentiate and cease replicating. A variety of agents, including some relatively simple polar compounds (5,7-9), derivatives of vitamin D and retinoic acid (10-12), steroid hormones (13), growth factors (6,14), proteases (15,16), tumor promoters (17,18), and inhibitors of DNA or RNA synthesis (4,19-24), can induce various transformed cell lines and primary human tumor explants to express more differentiated characteristics.

Histone deacetylase inhibitors such as suberoylanilide hydroxamide acid (SAHA), belong to this class of agents that have the ability to induce tumor cell growth arrest, differentiation and/or apoptosis (25). These compounds are targeted towards mechanisms inherent to the ability of a neoplastic cell to become malignant, as they do not appear to have toxicity in doses effective for inhibition of tumor growth in animals (26). There are several lines of evidence that histone acetylation and deacetylation are mechanisms by which transcriptional regulation in a cell is achieved (27). These effects are thought to occur through changes in the structure of chromatin by altering the affinity of histone proteins for coiled DNA in the nucleosome. There are five types of histones that have been identified in nucleosomes (designated H1, H2A, H2B, H3 and H4). Each nucleosome contains two of each histone type within its core, except for H1, which is present singly in the outer portion of the nucleosome structure. It is believed that when the histone proteins are hypoacetylated, there is a greater affinity of the histone to the DNA phosphate backbone. This affinity causes DNA to be tightly bound to the histone and renders the DNA inaccessible to transcriptional regulatory elements and machinery. The regulation of acetylated states occurs through the balance of activity between two enzyme complexes, histone acetyl transferase (HAT) and histone deacetylase (HDAC). The hypoacetylated state is thought to inhibit transcription of associated DNA. This hypoacetylated state is catalyzed by large multiprotein complexes that include HDAC enzymes. In particular, HDACs have been shown to catalyze the removal of acetyl groups from the chromatin core histones.

SAHA (ZOLINZA<sup>TM</sup> (vorinostat)) has been shown to be useful for treating cancer, selectively inducing terminal differentiation of neoplastic cells, inducing cell growth arrest and/or inducing apoptosis. The inhibition of HDAC by SAHA is thought occur through direct interaction with the catalytic site of the enzyme as demonstrated by X-ray crystallography

studies (28). The result of HDAC inhibition is not believed to have a generalized effect on the genome, but rather, only affects a small subset of the genome (29). Evidence provided by DNA microarrays using malignant cell lines cultured with a HDAC inhibitor shows that there are a finite (1-2%) number of genes whose products are altered. For example, cells treated in culture with HDAC inhibitors show a consistent induction of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 (30). This protein plays an important role in cell cycle arrest. HDAC inhibitors are thought to increase the rate of transcription of p21 by propagating the hyperacetylated state of histones in the region of the p21 gene, thereby making the gene accessible to transcriptional machinery. Genes whose expression is not affected by HDAC inhibitors do not display changes in the acetylation of regional associated histones (31).

#### SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention provides pharmaceutical compositions of an HDAC inhibitor and a chelatable metal compound. In one embodiment, the invention provides a method of treating cancer and alleviating the side effects of the HDAC inhibitor by administering the pharmaceutical composition. In another embodiment, the present invention also provides pharmaceutical compositions of metal HDAC inhibitor chelate complexes. In another embodiment, the invention provides methods of treating cancer by administering the pharmaceutical compositions. The invention provides crystalline compositions of metal HDAC inhibitor chelate complexes and methods of producing same.

#### BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

**FIG. 1** Figure 1 shows the dissolution profile of SAHA from the reference capsule lot. The capsules contain about 100 mg of active ingredient SAHA and excipients.

**FIG. 2** Figure 2 shows the x-ray diffractogram for the crystalline iron SAHA chelate complex.

**FIG. 3** Figure 3 shows x-ray diffractograms for SAHA measured with Siemens D500 Automated Powder Diffractometer. Fig 3A-E: SAHA Form I-V.

**FIG. 4** Figure 4 shows x-ray diffractograms for SAHA Form I measured with X'PERT Pro Phillips X-ray diffractometer.

## DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

The term “pharmaceutically acceptable carrier” is intended to include any and all solvents, dispersion media, coatings, antibacterial and antifungal agents, isotonic and absorption delaying agents, and the like, compatible with pharmaceutical administration. Suitable carriers are described in the most recent edition of Remington’s Pharmaceutical Sciences, a standard reference text in the field, which is incorporated herein by reference. Liposomes and non-aqueous vehicles such as fixed oils may also be used. The use of such media and agents for pharmaceutically active substances is well known in the art. Except insofar as any conventional media or agent is incompatible with the Compositions of this invention, use thereof in the compositions is contemplated. Supplementary active compounds can also be incorporated into the compositions.

The term “f<sub>2</sub>” or “F<sub>2</sub>” refers to a similarity factor determined through a point by point comparison of a new *in vitro* dissolution profile to a reference *in vitro* dissolution profile, as shown in equation 1.

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

$R_t$  refers to the percent of compound dissolved at each time point (t) for the reference.  $T_t$  refers to the percent of compound dissolved at each time point (t) for the test sample.  $n$  refers to the number of time points used for the calculation.  $f_2$  values of 50 or greater are considered to reflect similar *in vitro* dissolution rates.

For the purpose of this invention, dissolution rates or profiles *in vitro* of the entire SAHA of the pharmaceutical composition is measured from the entire pharmaceutical composition according to the steps and conditions in Example 4. In one embodiment, dissolution rates or profiles *in vitro* is measured by using a USP Dissolution Apparatus II with a helical sinker (Quality Lab Accessories L.L.C., Manville, NJ) in 900 mL of 2.0% Tween (TCI America, Portland, Oregon) at a temperature of  $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ , and paddles rotated at 100 rpm. The entire pharmaceutical composition includes the entire SAHA and the chelatable metal compound and if the pharmaceutical composition contains a capsule shell, carrier, excipient, diluent, disintegrating agent, lubricant, binder or any additional agent described in the Pharmaceutical Composition Section below, the measurement is performed with those components.

The term “about” when used in the context of an amount refers to  $\pm 10\%$  of the specified amount.

For the purpose of this invention, for X-ray diffraction patterns, depending on the calibration, sample or instrumentation, peaks at  $2\theta$  can shift up to  $\pm 0.3$  degrees (error) in one direction. For example, all peaks in X-ray diffraction pattern shift up to  $+0.3$  degrees, or up to  $-0.3$  degrees. An X-ray diffraction pattern or peaks within that error is considered the same or substantially similar.

Pharmaceutical Composition comprising HDAC Inhibitor and Chelatable metal compound

In one embodiment, the invention provides a pharmaceutical composition comprising a therapeutically effective amount of Histone Deacetylase (HDAC) inhibitor and a chelatable metal compound, and a pharmaceutically acceptable carrier. The pharmaceutical composition can form the metal HDAC inhibitor chelate complex in vivo when administered to the subject.

In one embodiment, the HDAC inhibitor is a hydroxamic acid derivative. In another embodiment, the HDAC inhibitor has a metal-binding (i.e. iron or zinc) ligand, for example carbonyl group, hydroxyl group, amino group, thiol group, amide group, and other groups found in known HDAC inhibitors (eg. Benzamide). In one embodiment, the HDAC inhibitor is suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) or pharmaceutically acceptable salt or hydrate or solvate thereof. In another embodiment, the entire SAHA in the pharmaceutical composition has an in vitro dissolution profile with a similarity factor ( $f_2$ ) of at least 50 to 100 compared to the reference dissolution profile shown in Figure 1. In one embodiment,  $f_2$  is 56 to 100. In one embodiment,  $f_2$  is 60 to 100. In one embodiment,  $f_2$  is 65 to 100. In another embodiment,  $f_2$  is 80 to 100. In a further embodiment, the pharmaceutical composition is a single capsule, wherein the amount of the SAHA is about 100 mg.

In one embodiment, the entire SAHA in the pharmaceutical composition is 43-63% dissolved at 10 minutes, 66-86% dissolved at 30 minutes, and 77-97% dissolved at 60 minutes *in vitro*. In one embodiment, the entire SAHA of the pharmaceutical composition is 52-72% dissolved at 15 minutes, 66-86% dissolved at 30 minutes, and 73-93% dissolved at 45 minutes *in vitro*. In another embodiment, the entire SAHA of the pharmaceutical composition is 43-63% dissolved at 10 minutes, 52-72% dissolved at 15 minutes, 58-78% dissolved at 20 minutes, 66-86% dissolved at 30 minutes, 73-93% dissolved at 45 minutes and 77-97% dissolved at 60 minutes *in vitro*. In one embodiment, the entire SAHA of the pharmaceutical composition is 46-60% dissolved at 10 minutes, 55-69% dissolved at 15 minutes, 61-75% dissolved at 20 minutes, 69-83% dissolved at 30 minutes, 76-90% dissolved at 45 minutes, and 80-94%

8

dissolved at 60 minutes *in vitro*. In one embodiment, at least 45% but less than or equal to 75% of the entire SAHA is dissolved at 15 minutes, at least 75% of the entire SAHA is dissolved in 60 minutes.

The HDAC inhibitor or chelatable metal compound can be in amorphous form.

- 5 The HDAC inhibitor or chelatable metal compound may be micronized, or may be agglomerated, particulate granules, powders, oils, oily suspensions or any other form of solid.

- In a particular embodiment, the HDAC inhibitor is crystalline suberoylanilide hydroxamic acid. In one embodiment, crystalline SAHA is SAHA Form I and characterized by an X-ray diffraction pattern substantially similar to that set forth in Figure 3A. In another
- 10 embodiment, crystalline SAHA is SAHA Form I and characterized by an X-ray diffraction pattern substantially similar to that set forth in Figure 4. In one embodiment, SAHA Form I is characterized by an X-ray powder diffraction pattern with copper K $\alpha$  radiation, including characteristic peaks at 9.0, 9.4, 17.5, 19.4, 20.0, 24.0, 24.4, 24.8, 25.0, 28.0 degrees 2 $\theta$ . In another embodiment, SAHA Form I is characterized by an X-ray powder diffraction pattern with
- 15 copper K $\alpha$  radiation, including characteristic peaks at about 9.0, 9.4, 17.5, 19.4, 20.0, 24.0, 24.4, 24.8, 25.0, 28.0, and 43.3 degrees 2 $\theta$ . In one embodiment, the SAHA Form I is characterized by an X-ray diffraction powder pattern with copper K $\alpha$  radiation, including characteristic peaks at 9.4, 17.5, 19.4, 20.0, 24.0, and 28.0 degrees 2 $\theta$ . In another embodiment, suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) Form I is characterized by an X-ray powder diffraction pattern
- 20 including characteristic peaks at about 9.4, 17.5, 19.4, 20.0, 24.0, and 28.0 degrees 2 $\theta$ , wherein the X-ray powder diffraction is measured with a Copper X-ray source; and further characterized by a Differential Scanning Calorimetry (DSC) thermogram having a single maximum value at about 164.4 $\pm$ 2.0, as measured by a Perkins Elmer DSC 6 Instrument. In another embodiment, suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) Form I is characterized by an X-ray powder diffraction
- 25 pattern including characteristic peaks at about 9.4, 17.5, 19.4, 20.0, 24.0, and 28.0 degrees 2 $\theta$ , and lacking peaks at about 13.4-14.0 and 22.7-23.0 degrees 2 $\theta$ , wherein the X-ray powder diffraction is measured with a Copper X-ray source. In a further embodiment, suberoylanilide hydroxamic acid Form I is characterized by an X-ray powder diffraction pattern including characteristic peaks at 9.1, 10.8, 12.3, 17.2, 19.2, 19.8, 23.7, 24.1, 25.7, 26.8 and 27.7 degrees
- 30 2 $\theta$  and lacking peaks at 13.4-14.0 and 22.7-23.0 degrees 2 $\theta$  using a Copper X-ray source.

In one embodiment, the SAHA Form I is characterized by an X-ray powder diffraction pattern with copper K $\alpha$  radiation, including characteristic peaks at 9.0, 9.4, 17.5, 19.4, 20.0, 24.0, 24.4, 24.8, 25.0, 28.0 degrees 2 $\theta$ , and lacking peaks at 13.4-14.0 and 22.7-23.0

degrees  $2\theta$ . In another embodiment, SAHA Form I is characterized by an X-ray powder diffraction pattern with copper  $K\alpha$  radiation, including characteristic peaks at 9.0, 9.4, 17.5, 19.4, 20.0, 24.0, 24.4, 24.8, 25.0, 28.0, 43.3 degrees  $2\theta$  and lacking peaks at 13.4-14.0 and 22.7-23.0 degrees  $2\theta$ . In a further embodiment, SAHA Form I is additionally characterized by the lack of  
5 at least one peak at about <8.7, 10.0-10.2, 13.4-14.0, 15.0-15.2, 17.5-19.0, 20.1-20.3, 21.1-21.3, 22.0-22.22, 22.7-23.0, 25.0-25.5, 26.0-26.2, and 27.4-27.6 degrees  $2\theta$ .

In another embodiment, SAHA Form I is further characterized by a Differential Scanning Calorimetry (DSC) thermogram having a single maximum value at about  $164.4 \pm 2.0$ , as measured by a Perkins Elmer DSC 6 Instrument. In one embodiment, SAHA Form I has unit  
10 cell parameters of  $a = 10.9 \text{ \AA}$ ,  $b = 7.9 \text{ \AA}$ ,  $c = 16.4 \text{ \AA}$ ,  $\alpha = 90^\circ$ ,  $\beta = 97.8^\circ$ ,  $\gamma = 90^\circ$ , space group  $P2_1/n$ .

In a particular embodiment, the crystalline suberoylanilide hydroxamic acid is SAHA Form IV and is characterized by an X-ray powder diffraction pattern with copper  $K\alpha$  radiation, including characteristic peaks at about 8.8, 9.3, 11.0, 12.4, 17.4, 19.4, 19.9, 22.4, 22.9, 23.83, 24.2, 24.8, 25.8, 27.0, 27.8, 28.4 degrees  $2\theta$ .

In one embodiment, the invention provides a single capsule comprising about 100 mg suberoylanilide hydroxamic acid, and the chelatable metal compound, wherein the entire SAHA has an in vitro dissolution profile characterized by: at least 45% but less than or equal to 75% of the entire SAHA is dissolved at 15 minutes, at least 75% of the entire SAHA is dissolved in 60 minutes, wherein the SAHA is crystalline and characterized by an X-ray powder diffraction  
20 pattern with copper  $K\alpha$  radiation, including characteristic peaks at 9.0, 9.4, 17.5, 19.4, 20.0, 24.0, 24.4, 24.8, 25.0, 28.0 degrees  $2\theta$ , and lacking peaks at 13.4-14.0 and 22.7-23.0 degrees  $2\theta$ .

In one embodiment, the invention provides a single capsule comprising about 100 mg suberoylanilide hydroxamic acid, and the chelatable metal compound, wherein the entire SAHA has an in vitro dissolution profile characterized by: at least 45% but less than or equal to  
25 75% of the entire SAHA is dissolved at 15 minutes, at least 75% of the entire SAHA is dissolved in 60 minutes, wherein the SAHA is crystalline and characterized by an X-ray powder diffraction pattern with copper  $K\alpha$  radiation, including characteristic peaks at 9.4, 17.5, 19.4, 20.0, 24.0, and 28.0 degrees  $2\theta$ , wherein the X-ray diffraction is measured with a Copper X-ray source; and further characterized by a Differential Scanning Calorimetry (DSC) thermogram having a single  
30 maximum value at about  $164.4 \pm 2.0$ , as measured by a Perkins Elmer DSC 6 Instrument.

In one embodiment, the invention provides a single capsule comprising about 100 mg suberoylanilide hydroxamic acid, and the chelatable metal compound, wherein the entire SAHA has an in vitro dissolution profile characterized by: at least 45% but less than or equal to

75% of the entire SAHA is dissolved at 15 minutes, at least 75% of the entire SAHA is dissolved in 60 minutes, wherein the SAHA is crystalline and characterized by an X-ray powder diffraction pattern with copper K $\alpha$  radiation, including characteristic peaks at 9.1, 10.8, 12.3, 17.2, 19.2, 19.8, 23.7, 24.1, 25.7, 26.8 and 27.7 degrees 2 $\theta$  and lacking peaks at 13.4-14.0 and 22.7-23.0 degrees 2 $\theta$  using a Copper X-ray source.

In another embodiment, the invention provides a single capsule comprising about 100 mg suberoylanilide hydroxamic acid, and the chelatable metal compound, wherein the entire SAHA has an in vitro dissolution profile with a similarity factor (f<sub>2</sub>) of at least 50 to 100 compared to the reference dissolution profile shown in Figure 1, wherein the SAHA is crystalline and characterized by an X-ray powder diffraction pattern with copper K $\alpha$  radiation, including characteristic peaks at 9.0, 9.4, 17.5, 19.4, 20.0, 24.0, 24.4, 24.8, 25.0, 28.0 degrees 2 $\theta$ , and lacking a peak at 13.4-14.0 and 22.7-23.0 degrees 2 $\theta$ .

In another embodiment, the invention provides a single capsule comprising about 100 mg suberoylanilide hydroxamic acid, and the chelatable metal compound, wherein the entire SAHA has an in vitro dissolution profile with a similarity factor (f<sub>2</sub>) of at least 50 to 100 compared to the reference dissolution profile shown in Figure 1, wherein the SAHA is crystalline and characterized by an X-ray powder diffraction pattern with copper K $\alpha$  radiation, including characteristic peaks at 9.4, 17.5, 19.4, 20.0, 24.0, and 28.0 degrees 2 $\theta$ , wherein the X-ray diffraction is measured with a Copper X-ray source; and further characterized by a Differential Scanning Calorimetry (DSC) thermogram having a single maximum value at about 164.4 $\pm$ 2.0, as measured by a Perkins Elmer DSC 6 Instrument.

In another embodiment, the invention provides a single capsule comprising about 100 mg suberoylanilide hydroxamic acid, and the chelatable metal compound, wherein the entire SAHA has an in vitro dissolution profile with a similarity factor (f<sub>2</sub>) of at least 50 to 100 compared to the reference dissolution profile shown in Figure 1, wherein the SAHA is crystalline and characterized by an X-ray powder diffraction pattern with copper K $\alpha$  radiation, including characteristic peaks at 9.1, 10.8, 12.3, 17.2, 19.2, 19.8, 23.7, 24.1, 25.7, 26.8 and 27.7 degrees 2 $\theta$  and lacking peaks at 13.4-14.0 and 22.7-23.0 degrees 2 $\theta$  using a Copper X-ray source.

In a further embodiment, the invention provides a single capsule comprising about 100 mg suberoylanilide hydroxamic acid, and the chelatable metal compound, wherein the entire SAHA has an in vitro dissolution profile characterized by 43-63% dissolved at 10 minutes, 66-86% dissolved at 30 minutes, and 77-97% dissolved at 60 minutes, wherein the SAHA is crystalline and characterized by an X-ray powder diffraction pattern with copper K $\alpha$  radiation,

including characteristic peaks at 9.0, 9.4, 17.5, 19.4, 20.0, 24.0, 24.4, 24.8, 25.0, 28.0 degrees  $2\theta$ , and lacking a peak at 13.4-14.0 and 22.7-23.0 degrees  $2\theta$ .

In a further embodiment, the invention provides a single capsule comprising about 100 mg suberoylanilide hydroxamic acid, and the chelatable metal compound, wherein the  
5 entire SAHA has an in vitro dissolution profile characterized by 43-63% dissolved at 10 minutes, 66-86% dissolved at 30 minutes, and 77-97% dissolved at 60 minutes, wherein the SAHA is crystalline and characterized by an X-ray powder diffraction pattern with copper  $K\alpha$  radiation, including characteristic peaks at 9.4, 17.5, 19.4, 20.0, 24.0, and 28.0 degrees  $2\theta$ , wherein the X-ray diffraction is measured with a Copper X-ray source; and further characterized by a  
10 Differential Scanning Calorimetry (DSC) thermogram having a single maximum value at about  $164.4 \pm 2.0$ , as measured by a Perkins Elmer DSC 6 Instrument.

In a further embodiment, the invention provides a single capsule comprising about 100 mg suberoylanilide hydroxamic acid, and the chelatable metal compound, wherein the entire SAHA has an in vitro dissolution profile characterized by 43-63% dissolved at 10 minutes,  
15 66-86% dissolved at 30 minutes, and 77-97% dissolved at 60 minutes, wherein the SAHA is crystalline and characterized by an X-ray powder diffraction pattern with copper  $K\alpha$  radiation, including characteristic peaks at 9.1, 10.8, 12.3, 17.2, 19.2, 19.8, 23.7, 24.1, 25.7, 26.8 and 27.7 degrees  $2\theta$  and lacking peaks at 13.4-14.0 and 22.7-23.0 degrees  $2\theta$  using a Copper X-ray source.

In a further embodiment, the invention provides a single capsule comprising about 100 mg suberoylanilide hydroxamic acid, and the chelatable metal compound, wherein the entire SAHA has an in vitro dissolution profile characterized by 43-63% dissolved at 10 minutes,  
20 66-86% dissolved at 30 minutes, and 77-97% dissolved at 60 minutes, wherein the SAHA is crystalline and characterized by an X-ray powder diffraction pattern with copper  $K\alpha$  radiation, including characteristic peaks at 9.0, 9.4, 17.5, 19.4, 20.0, 24.0, 24.4, 24.8, 25.0, 28.0 degrees  $2\theta$ , and lacking peaks at 13.4-14.0 and 22.7-23.0 degrees  $2\theta$ .

In one embodiment, the chelatable metal compound comprises iron. The iron compound can be in any form bioavailable to the patient that forms the iron HDAC inhibitor chelate complex in situ, for example, a pharmaceutical composition form such as tablet or  
30 capsule form. In one embodiment, the iron compound is an iron supplement in the form of ferrous gluconate, ferric gluconate, ferrous sulfate, ferric sulfate, ferrous fumarate, ferric fumarate, iron amino acid chelate or ferrous bis-glycinate. The iron supplement may also contain other vitamins and minerals. In another embodiment, the HDAC inhibitor and iron in the

pharmaceutical composition is at a 5:1, 4:1, 3:1, 2:1, 1:1, or 2:1 stoichiometric ratio. In one embodiment, the pharmaceutical composition comprises about 100 mg of SAHA and about 1 to 10 molar equivalents of iron supplement. In another embodiment, the pharmaceutical composition comprises about 150 mg of SAHA and about 1 to 10 molar equivalents of iron supplement. In a further embodiment, the pharmaceutical composition comprises about 200 mg of SAHA and about 1 to 10 molar equivalents of iron supplement. In an alternative embodiment, the pharmaceutical composition comprises about 50 mg of SAHA and about 1 to 10 molar equivalents of iron supplement. In one embodiment, the chelatable metal compound comprises zinc. The zinc compound can be in any form bioavailable to the patient and that forms the zinc HDAC inhibitor chelate complex in situ, for example, in pharmaceutical composition form such as tablet or capsule form. In one embodiment, the zinc compound is a zinc supplement in the form of zinc gluconate, zinc picolinate, zinc citrate, zinc amino acid chelate or zinc oxide. The zinc supplement may also contain other vitamins and minerals. In another embodiment, the SAHA and zinc in the pharmaceutical composition is at a 5:1, 4:1, 3:1, 2:1, 1:1, or 2:1 stoichiometric ratio of SAHA to zinc. In one embodiment, the pharmaceutical composition comprises about 100 mg of SAHA and about 1 to 10 molar equivalents of zinc supplement. In another embodiment, the pharmaceutical composition comprises about 150 mg of SAHA and about 1 to 10 molar equivalents of zinc supplement. In a further embodiment, the pharmaceutical composition comprises about 200 mg of SAHA and about 1 to 10 molar equivalents of zinc supplement.

#### Pharmaceutical Compositions comprising Metal HDAC inhibitor Chelate Complex

In one embodiment, the invention provides a pharmaceutical composition comprising a therapeutically effective amount of metal HDAC inhibitor chelate complex or hydrate or solvate thereof and a pharmaceutically acceptable carrier.

The metal HDAC inhibitor chelate complex can be in amorphous form. The metal HDAC inhibitor complex may be crystalline, micronized, or may be agglomerated, particulate granules, powders, oils, oily suspensions or any other form of solid. The metal HDAC inhibitor chelate complex or hydrate or solvate thereof can be in any crystalline form. In one embodiment, the HDAC inhibitor is a hydroxamic acid derivative. In one embodiment, the HDAC inhibitor is SAHA.

In one embodiment, the invention provides a pharmaceutical composition comprising a therapeutically effective amount of iron SAHA chelate complex or hydrate or

solvate thereof and a pharmaceutically acceptable carrier. In one embodiment, the iron to SAHA ratio is 1:3, 1:2 or 1:1.

In one embodiment, the iron SAHA chelate complex is crystalline, and is characterized by an X-ray diffraction pattern substantially similar to that set forth in Figure 1. In another embodiment, the iron SAHA chelate complex is characterized by an X-ray powder diffraction pattern with copper K $\alpha$  radiation, including characteristic peaks at 8.8, 14.5 and 21.8 degrees  $2\theta$ . In a further embodiment, the iron SAHA chelate complex is characterized by an X-ray powder diffraction pattern with copper K $\alpha$  radiation, including characteristic peaks at 8.8, 13.3, 14.5, 20.3, 21.8 and 24.6 degrees  $2\theta$ . In a further embodiment, the iron SAHA chelate complex is characterized by an X-ray powder diffraction pattern with copper K $\alpha$  radiation, including characteristic peaks at 8.8, 13.3, 14.5, 18.5, 20.3, 21.8, 24.6, 25.8 and 33.3 degrees  $2\theta$ .

In another embodiment, the invention also provides a pharmaceutical composition comprising a therapeutically effective amount of zinc SAHA chelate complex or hydrate or solvate thereof and a pharmaceutically acceptable carrier. In one embodiment, the zinc to SAHA ratio is 1:3, 1:2 or 1:1.

The invention also encompasses pharmaceutical compositions comprising hydrates or solvates of the metal HDAC inhibitor chelate complex or SAHA. The term "hydrate" includes but is not limited to hemihydrate, monohydrate, dihydrate, trihydrate and the like.

#### Pharmaceutical Compositions

The pharmaceutically acceptable carrier in the pharmaceutical compositions can be in solid particle form. Any inert excipient that is commonly used as a carrier or diluent may be used in the formulations of the present invention, such as for example, a gum, a starch, a sugar, a cellulosic material, an acrylate, or mixtures thereof. In one embodiment, the diluent is microcrystalline cellulose. The Compositions of the present invention (for example, HDAC inhibitor; chelatable metal compound; HDAC inhibitor and chelatable metal compound; or metal HDAC inhibitor chelate complex) may further comprise a disintegrating agent (e.g., croscarmellose sodium) and a lubricant (e.g., magnesium stearate), and in addition may comprise one or more additives selected from a binder, a buffer, a protease inhibitor, a surfactant, a solubilizing agent, a plasticizer, an emulsifier, a stabilizing agent, a viscosity increasing agent, a sweetener, a film forming agent, or any combination thereof. Furthermore, the Compositions of the present invention may be in the form of controlled release or immediate release formulations.

In one embodiment, the pharmaceutical composition described herein may further be comprised of microcrystalline cellulose, croscarmellose sodium and magnesium stearate. The percentage of the Compositions of this invention and various excipients in the formulations may vary. For example, the pharmaceutical composition may comprise between  
5 about 20 and 90%, between about 50-80% or between about 60-70% by weight of the Compositions of this invention. Furthermore, the pharmaceutical composition may comprise between about about 10 and 70%, between about 20-40%, between about 25-35% by weight microcrystalline cellulose as a carrier or diluent. Furthermore, the pharmaceutical composition may comprise between about 1 and 30%, between about 1-10%, between about 2-5% by weight  
10 croscarmellose sodium as a disintegrant. Furthermore, the pharmaceutical composition may comprise between about 0.1-5% or about 0.5-1.5% by weight magnesium stearate as a lubricant.

In one embodiment, the pharmaceutical composition of the invention is about 50-80% by weight of Compositions of this invention; about 20-40% by weight microcrystalline cellulose; about 1-10% by weight croscarmellose sodium; and about 0.1-5% by weight  
15 magnesium stearate. In another embodiment, the pharmaceutical composition of the invention is about 60-70% by weight of Compositions of this invention; about 25-35% by weight microcrystalline cellulose; about 2-5% by weight croscarmellose sodium; and about 0.5-1.5% by weight magnesium stearate. In one embodiment, the pharmaceutical composition described comprises about 50-200 mg or 50-600 mg of SAHA Form I.

A particular embodiment of the invention is a solid formulation of the Compositions of this invention with microcrystalline cellulose, NF (Avicel Ph 101), sodium croscarmellose, NF (AC-Di-Sol) and magnesium stearate, NF, contained in a gelatin capsule. A further embodiment is a pharmaceutical composition comprising about 100 mg Compositions of  
20 this invention, about 44.3 mg of microcrystalline cellulose, about 4.5 mg of croscarmellose sodium, about 1.2 mg of magnesium stearate.

In one embodiment, the pharmaceutical compositions are administered orally, and are thus formulated in a form suitable for oral administration, i.e., as a solid or liquid form. Suitable solid oral formulations include for example, tablets, capsules, pills, granules, pellets and the like. Suitable liquid oral formulations include for example, emulsions, oils and the like. In  
30 one embodiment of the present invention, the Composition is formulated in a capsule. In accordance with this embodiment, the pharmaceutical compositions of the present invention comprise a hard gelatin capsule in addition to the Compositions of this invention and the inert carrier or diluent.

Solid carriers/diluents include, but are not limited to, a gum, a starch (e.g., corn starch, pregelatinized starch), a sugar (e.g., lactose, mannitol, sucrose, dextrose), a cellulosic material (e.g., microcrystalline cellulose), an acrylate (e.g., polymethylacrylate), calcium carbonate, magnesium oxide, talc, or mixtures thereof.

5 For liquid formulations, pharmaceutically acceptable carriers may be non-aqueous solutions, suspensions, emulsions or oils. Examples of non-aqueous solvents are propylene glycol, polyethylene glycol, and injectable organic esters such as ethyl oleate. Examples of oils are those of petroleum, animal, vegetable, or synthetic origin, for example, peanut oil, soybean oil, mineral oil, olive oil, sunflower oil, and fish-liver oil. Suspensions can also include the  
10 following components: fixed oils, polyethylene glycols, glycerine, propylene glycol or other synthetic solvents; antibacterial agents such as benzyl alcohol or methyl parabens; antioxidants such as ascorbic acid or sodium bisulfite; chelating agents such as ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA).

In addition, the pharmaceutical compositions may further comprise binders (e.g.,  
15 acacia, cornstarch, gelatin, carbomer, ethyl cellulose, guar gum, hydroxypropyl cellulose, hydroxypropyl methyl cellulose, povidone), disintegrating agents (e.g., cornstarch, potato starch, alginic acid, silicon dioxide, croscarmellose sodium, crospovidone, guar gum, sodium starch glycolate, Primogel), detergents (e.g., Tween 20, Tween 80, Pluronic F68, bile acid salts), protease inhibitors, surfactants (e.g., sodium lauryl sulfate), permeation enhancers, solubilizing  
20 agents (e.g., glycerol, polyethylene glycerol), a glidant (e.g., colloidal silicon dioxide), anti-oxidants (e.g., ascorbic acid, sodium metabisulfite, butylated hydroxyanisole), stabilizers (e.g., hydroxypropyl cellulose, hydroxypropylmethyl cellulose), viscosity increasing agents (e.g., carbomer, colloidal silicon dioxide, ethyl cellulose, guar gum), sweeteners (e.g., sucrose, aspartame, citric acid), flavoring agents (e.g., peppermint, methyl salicylate, or orange  
25 flavoring), preservatives (e.g., Thimerosal, benzyl alcohol, parabens), lubricants (e.g., stearic acid, magnesium stearate, polyethylene glycol, sodium lauryl sulfate), flow-aids (e.g., colloidal silicon dioxide), plasticizers (e.g., diethyl phthalate, triethyl citrate), emulsifiers (e.g., carbomer, hydroxypropyl cellulose, sodium lauryl sulfate), polymer coatings (e.g., poloxamers or poloxamines), coating and film forming agents (e.g., ethyl cellulose, acrylates,  
30 polymethacrylates) and/or adjuvants.

In one embodiment, the Compositions of this invention is prepared with carriers that will protect the Compositions against rapid elimination from the body, such as a controlled release formulation, including implants and microencapsulated delivery systems. Biodegradable,

12

biocompatible polymers can be used, such as ethylene vinyl acetate, polyanhydrides, polyglycolic acid, collagen, polyorthoesters, and polylactic acid. Methods for preparation of such formulations will be apparent to those skilled in the art. The materials can also be obtained commercially from Alza Corporation and Nova Pharmaceuticals, Inc. Liposomal suspensions (including liposomes targeted to infected cells with monoclonal antibodies to viral antigens) can also be used as pharmaceutically acceptable carriers. These can be prepared according to methods known to those skilled in the art, for example, as described in U.S. Patent No. 4,522,811.

The preparation of pharmaceutical compositions that contain an active component is well understood in the art, for example, by mixing, granulating, or tablet-forming processes. For oral administration, the active agents are mixed with additives customary for this purpose, such as vehicles, stabilizers, or inert diluents, and converted by customary methods into suitable forms for administration, such as tablets, coated tablets, hard or soft gelatin capsules, aqueous, alcoholic or oily solutions and the like as detailed above.

In one embodiment, the oral compositions are formulated in dosage unit form for ease of administration and uniformity of dosage. Dosage unit form as used herein refers to physically discrete units suited as unitary dosages for the subject to be treated; each unit containing a predetermined quantity of Compositions of this invention calculated to produce the desired therapeutic effect in association with the required pharmaceutical carrier. The specification for the dosage unit forms of the invention are dictated by and directly dependent on the unique characteristics of the Compositions of this invention and the particular therapeutic effect to be achieved, and the limitations inherent in the art of compounding such an active compound for the treatment of individuals. In certain embodiments, the dosage unit contains about 600 mg, 550 mg, 500 mg, 450 mg, 400 mg, 350 mg, 300 mg, 250 mg, 200 mg, 150 mg, 110 mg, 105 mg, 100 mg, 95 mg, 90 mg, 85 mg, 80 mg, 75 mg, 70 mg, 65 mg, 60 mg, 55 mg, 50 mg, 45 mg, or 40 mg of Compositions of this invention. In one embodiment, the amount of the Compositions of this invention is about 100 mg.

The pharmaceutical compositions can be included in a container, pack, or dispenser together with instructions for administration. In one embodiment, the pharmaceutical composition is a single capsule, wherein the amount of the Compositions of this invention is about 100 mg. In one embodiment, the pharmaceutical composition is two capsules, wherein each capsule contains Compositions of this invention of about 50 mg.

Method of Obtaining a Metal HDAC Inhibitor Chelate Complex and Crystallization

The invention also provides a method of obtaining a metal HDAC inhibitor chelate complex comprising the step of adding a chelatable metal compound and base with the HDAC inhibitor in a reaction medium. In one embodiment, the reaction medium is an organic solvent or mixture of organic solvent and water. In one embodiment, the organic solvent is ethanol. In one embodiment, the chelatable metal compound comprises iron or zinc. In another embodiment, the chelatable metal compound, base and HDAC inhibitor are soluble in the reaction medium. In one embodiment, the base is N,N-diisopropylethylamine or sodium ethoxide. In one embodiment, the chelatable metal compound is ferric chloride or zinc chloride.

The invention also provides a method of obtaining a crystalline metal HDAC inhibitor chelate complex comprising the step of crystallizing the chelate complex in an organic solvent or in a mixture of organic solvent and water. In one embodiment, the metal is zinc or iron.

In one particular embodiment, the crystalline metal HDAC inhibitor chelate complex is crystallized from an organic solvent. The organic solvent may be an alcohol such as methanol, ethanol or isopropanol. In one embodiment, the organic solvent is one or more of methanol, ethanol, acetonitrile, isopropanol and acetic acid. In one embodiment, the organic solvent is ethanol. In a particular embodiment, the organic solvent used in the reaction medium is the same as that in the crystallization.

In another embodiment, the mixture of organic solvent and water comprises about 1-99% organic solvent and about 99-1% of water. In another embodiment, the mixture comprises 40-99% ethanol and 60%-1% of water. In one embodiment, the mixture comprises about 15-85% organic solvent and about 1-15% water. In a particular embodiment, the mixture comprises about 85% organic solvent and about 15% water. In another particular embodiment, the mixture comprises 1:1 ethanol and water. In yet another particular embodiment, the mixture comprises 9:1 ethanol and water. The ratios or percentages of organic solvent to water described here are by volume.

In one particular embodiment, the organic solvent is an alcohol (e.g. methanol, ethanol, isopropanol and the like). However, it should be apparent to a person skilled in the art that the crystallizations or reactions described herein can be carried out in any suitable solvents or solvent mixtures which may be readily selected by one of skill in the art of organic synthesis. Such suitable organic solvents, as used herein may include, by way of example and without limitation, chlorinated solvents, hydrocarbon solvents, ether solvents, polar protic solvents and

polar aprotic solvents. Suitable halogenated solvents include, but are not limited to carbon tetrachloride, bromodichloromethane, dibromochloromethane, bromoform, chloroform, bromochloromethane, dibromomethane, butyl chloride, dichloromethane, tetrachloroethylene, trichloroethylene, 1,1,1-trichloroethane, 1,1,2-trichloroethane, 1,1-dichloroethane, 1,2-dichloroethane, 2-chloropropane, hexafluorobenzene, 1,2,4-trichlorobenzene, o-dichlorobenzene, chlorobenzene, fluorobenzene, fluorotrichloromethane, chlorotrifluoromethane, bromotrifluoromethane, carbon tetrafluoride, dichlorofluoromethane, chlorodifluoromethane, trifluoromethane, 1,2-dichlorotetrafluoroethane and hexafluoroethane. Suitable hydrocarbon solvents include, but are not limited to benzene, cyclohexane, pentane, hexane, toluene, cycloheptane, methylcyclohexane, heptane, ethylbenzene, m-, o-, or p-xylene, octane, indane, nonane. Suitable ether solvents include, but are not limited to dimethoxymethane, tetrahydrofuran, 1,3-dioxane, 1,4-dioxane, furan, diethyl ether, ethylene glycol dimethyl ether, ethylene glycol diethyl ether, diethylene glycol dimethyl ether, diethylene glycol diethyl ether, triethylene glycol diisopropyl ether, anisole, or t-butyl methyl ether.

Suitable polar protic solvents include, but are not limited to methanol, ethanol, 2-nitroethanol, 2-fluoroethanol, 2,2,2-trifluoroethanol, ethylene glycol, 1-propanol, 2-propanol, 2-methoxyethanol, 1-butanol, 2-butanol, i-butyl alcohol, t-butyl alcohol, 2-ethoxyethanol, diethylene glycol, 1-, 2-, or 3- pentanol, neo-pentyl alcohol, t-pentyl alcohol, diethylene glycol monomethyl ether, diethylene glycol monoethyl ether, cyclohexanol, benzyl alcohol, phenol, and glycerol. Suitable polar aprotic solvents include, but are not limited to dimethylformamide (DMF), dimethylacetamide (DMAC), 1,3-dimethyl-3,4,5,6-tetrahydro-2(1H)-pyrimidinone (DMPU), 1,3-dimethyl-2-imidazolidinone (DMI), N-methylpyrrolidinone (NMP), formamide, N-methylacetamide, N-methylformamide, acetonitrile (ACN), dimethylsulfoxide, propionitrile, ethyl formate, methyl acetate, hexachloroacetone, acetone, ethyl methyl ketone, ethyl acetate, isopropyl acetate, t-butyl acetate, sulfolane, N,N-dimethylpropionamide, nitromethane, nitrobenzene, hexamethylphosphoramide.

#### Methods of Treatment

HDAC inhibitors that possess metal binding domains, such as the hydroxamic acid derivatives, are capable of sequestering certain endogenous salts, such as iron and zinc. These salts are required by biological systems for long-term health and survival. Additionally, chelatable salts such as iron are required by enzymes and proteins such as: lipoxigenases, the P-

450 superfamily of enzymes, monoamine oxidases, heme and numerous others, to maintain normal function.

Zinc is essential for cell division and growth and assists in the formation of DNA. Zinc is also important for assisting in the proper functioning of insulin and is involved in  
5 immune system health. Zinc deficiency can cause intestinal mucosal atrophy, anemia, diarrhea, decreased water and nutrient absorption (dehydration and anorexia), impaired taste, alopecia, thymic atrophy, testes atrophy; hyperglycemia, increased serum glucose, creatine increase, renal insufficiency, impairment or failure.

Clinical adverse experiences or side effects such as diarrhea, fatigue, nausea,  
10 thrombocytopenia, anorexia, dysgeusia, weight decrease, muscle spasms, alopecia, anemia, blood creatinine increase, vomiting, chills have been observed for SAHA in the treatment of patients with cancer, some of which may be associated with the deficiency of iron or zinc as a result of the sequestering of these ions by the metal binding domain of SAHA. Preclinical toxicity of SAHA include weight loss or inappetence, immune suppression (leucopenia,  
15 lymphopenia, thymic atrophy) in all animal species; thrombocytopenia in rats; gastrointestinal toxicity (mucosal atrophy, acute inflammation, necrosis, multiple lesions), dehydration, electrolyte loss, testicular atrophy in dogs.

Likewise, other zinc chelators share similar toxicities or side effects as HDAC inhibitors. For example, Lithostat (acetoxyhydroxamic acid) causes side effects such as nausea,  
20 vomiting, anorexia, fatigue, malaise, reticulocytosis, anemia, thrombocytopenia, leukopenia and headache. Desferrioxamine (desferiprone) causes side effects such as fatigue, bone marrow atrophy, thymic atrophy and neutropenia.

Thus, the co-administration/co-formulation of HDAC inhibitors and a chelatable metal compound, such as iron or zinc, would be beneficial in maintaining the availability of iron,  
25 zinc and other chelatable salt stores, and eliminate the side effects of HDAC inhibitors. In addition to co-administration and co-formulation, it is envisioned that the pre-formation of the metal HDAC inhibitor chelate complex would have a similar effect.

Thus, in one embodiment, the invention provides a method of treating cancer and alleviating the side effects of the HDAC inhibitor comprising the step of co-administering to a  
30 patient a therapeutically effective amount of HDAC inhibitor and a chelatable metal compound. In another embodiment, the invention also provides a use of an HDAC inhibitor for the preparation of a medicament for the treatment of cancer and alleviating the side effects of the HDAC inhibitor comprising the step of co-administering to a patient a therapeutically effective

14

amount of HDAC inhibitor and a chelatable metal compound. In one embodiment, the chelatable metal compound is administered daily to the patient. In another embodiment, the chelatable metal compound is administered before or after administration of the HDAC inhibitor. In another embodiment, the chelatable metal compound is simultaneously administered with the HDAC inhibitor. In a further embodiment, the invention provides a kit comprising at least one pharmaceutically effective unit dosage of HDAC inhibitor, and instructions for the treatment of cancer and alleviating the side effects of the HDAC inhibitor by co-administering a chelatable metal compound with the HDAC inhibitor. The pharmaceutically effective unit dosage of SAHA, pharmaceutically acceptable salt or hydrate thereof can be 200 mg, 300 mg, 400 mg, 500 mg or 600 mg. The chelatable metal compound can be in the form of a pharmaceutical composition, for example a vitamin supplement or mineral supplement, which can also comprise other vitamins and minerals.

In another embodiment, the invention also provides a method of treating cancer and alleviating the side effects of the HDAC inhibitor comprising the step of administering to a patient a pharmaceutical composition comprising an HDAC inhibitor and a chelatable metal compound. In another embodiment, the invention provides a use for the preparation of a medicament comprising an HDAC inhibitor and a chelatable metal compound for the treatment of cancer and alleviating the side effects of the HDAC inhibitor. In a further embodiment, the invention provides a pharmaceutical composition comprising HDAC inhibitor and a chelatable metal compound, for use in treatment of cancer and to alleviate the side effects of the HDAC inhibitor. In one embodiment, the chelatable metal compound comprises iron or zinc. In another embodiment, the HDAC inhibitor is suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA).

In one embodiment, the side effect is nausea, vomiting, diarrhea, anorexia, intestinal mucosal atrophy or gastrointestinal toxicity. In another embodiment, the side effect is anemia, fatigue or thrombocytopenia. In a further embodiment, the side effect is nausea, vomiting, diarrhea, anorexia, intestinal mucosal atrophy, gastrointestinal, fatigue or thrombocytopenia.

In a further embodiment, the invention further provides a method of treating cancer comprising the step of administering to a patient a therapeutically effective amount of metal HDAC inhibitor chelate complex or hydrate or solvate thereof. In another embodiment, the invention provides a use for the preparation of a medicament comprising a therapeutically effective amount of metal HDAC inhibitor chelate complex or hydrate or solvate thereof for the treatment of cancer. In a further embodiment, the invention provides a pharmaceutical

composition comprising the metal HDAC inhibitor chelate complex or hydrate or solvate thereof, for use in treatment of cancer.

The invention further provides a method of treating cancer comprising the step of administering to a patient a therapeutically effective amount of the zinc or iron SAHA chelate  
5 complex or hydrate or solvate thereof mentioned in the foregoing embodiments.

In an embodiment, the method of the present invention is for the treatment of human patients with cancer. However, it is also likely that the method would be effective in the treatment of cancer in other mammals. Cancer includes but is not limited to any cancer caused by the proliferation of neoplastic cells, such as lung cancer, acute lymphoid myeloma, Hodgkins  
10 lymphoma, non-Hodgkins lymphoma, bladder melanoma, renal carcinoma, breast carcinoma, prostate carcinoma, ovarian carcinoma or colorectal carcinoma. In accordance with the invention, the pharmaceutical compositions can be used in the treatment of a wide variety of cancers, including but not limited to solid tumors (e.g., tumors of the head and neck, lung, breast, colon, prostate, bladder, rectum, brain, gastric tissue, bone, ovary, thyroid, or endometrium),  
15 hematological malignancies (e.g., leukemias, lymphomas, myelomas), carcinomas (e.g. bladder carcinoma, renal carcinoma, breast carcinoma, colorectal carcinoma), neuroblastoma, or melanoma. Non-limiting examples of these cancers include diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL), T-cell lymphomas or leukemias, e.g., cutaneous T-cell lymphoma (CTCL), noncutaneous peripheral T-cell lymphoma, lymphoma associated with human T-cell  
20 lymphotropic virus (HTLV), adult T-cell leukemia/lymphoma (ATLL), as well as acute lymphocytic leukemia, acute nonlymphocytic leukemia, acute myeloid leukemia, chronic lymphocytic leukemia, chronic myelogenous leukemia, Hodgkin's disease, non-Hodgkin's lymphoma, myeloma, multiple myeloma, mesothelioma, childhood solid tumors, brain neuroblastoma, retinoblastoma, glioma, Wilms' tumor, bone cancer and soft-tissue sarcomas,  
25 common solid tumors of adults such as head and neck cancers (e.g., oral, laryngeal and esophageal), genitourinary cancers (e.g., prostate, bladder, renal, uterine, ovarian, testicular, rectal, and colon), lung cancer (e.g., small cell carcinoma and non-small cell lung carcinoma, including squamous cell carcinoma and adenocarcinoma), breast cancer, pancreatic cancer, melanoma and other skin cancers, basal cell carcinoma, metastatic skin carcinoma, squamous  
30 cell carcinoma of both ulcerating and papillary type, stomach cancer, brain cancer, liver cancer, adrenal cancer, kidney cancer, thyroid cancer, medullary carcinoma, osteosarcoma, soft-tissue sarcoma, Ewing's sarcoma, veticulum cell sarcoma, and Kaposi's sarcoma. Also included are pediatric forms of any of the cancers described herein.

### Methods of Administration

In all of the methods described herein, the pharmaceutical composition may be administered orally in a gelatin capsule. The composition may be administered in unit dosages according to the methods described herein once-daily, twice-daily or three times-daily.

The daily administration is then repeated continuously for a period of several days to several years. Oral treatment may continue for between one week and the life of the patient. In one embodiment, the administration takes place for five consecutive days after which time the patient can be evaluated to determine if further administration is required. The administration can be continuous or intermittent, i.e., treatment for a number of consecutive days followed by a rest period.

The pharmaceutical compositions of the present invention may be administered at orally at a total daily dose of between 25 to 4000 mg/m<sup>2</sup>, for example, about 25 to 1000 mg, 50-1000 mg, 100 mg, 200 mg, 300 mg, 400 mg, 600 mg, 800 mg, 1000 mg and the like. Typically the compound is administered as a single dose when administering up to 400 mg to the patient. For higher total dosages (i.e., greater than 400 mg), the total is split into multiple dosages, for example, twice daily, three times daily or the like, or spread out over equal periods of time during the day. For example, two doses, e.g., 500 mg each, can be administered 12 hours apart to achieve a total dosage of 1000 mg in a day.

In one embodiment, SAHA is administered to the patient at a total daily dosage of 200 mg. In another embodiment, SAHA is administered to the patient at a total daily dosage of 400 mg. In another embodiment, SAHA is administered to the patient at a total daily dosage of 600 mg.

In one embodiment, the amount of the HDAC inhibitor administered to the patient is less than an amount that would cause unmanageable toxicity in the patient. In certain embodiments, the amount of the HDAC inhibitor that is administered to the patient is less than the amount that causes a concentration of the compound in the patient's plasma to equal or exceed the toxic level of the compound. In one embodiment, the concentration of the HDAC inhibitor in the patient's plasma is maintained at between about 10 nM to about 5000 nM. The optimal amount of the HDAC inhibitor that should be administered to the patient in the practice of the present invention will depend on the particular compound used and the type of cancer being treated.

### Histone Deacetylases and Histone Deacetylase Inhibitors

Histone deacetylases (HDACs), as that term is used herein, are enzymes that  
5 catalyze the removal of acetyl groups from lysine residues in the amino terminal tails of the  
nucleosomal core histones. As such, HDACs together with histone acetyl transferases (HATs)  
regulate the acetylation status of histones. Histone acetylation affects gene expression and  
inhibitors of HDACs, such as the hydroxamic acid-based hybrid polar compound suberoylanilide  
hydroxamic acid (SAHA) induce growth arrest, differentiation and/or apoptosis of transformed  
10 cells *in vitro* and inhibit tumor growth *in vivo*. HDACs can be divided into three classes based on  
structural homology. Class I HDACs (HDACs 1, 2, 3 and 8) bear similarity to the yeast RPD3  
protein, are located in the nucleus and are found in complexes associated with transcriptional co-  
repressors. Class II HDACs (HDACs 4, 5, 6, 7 and 9) are similar to the yeast HDA1 protein, and  
have both nuclear and cytoplasmic subcellular localization. Both Class I and II HDACs are  
15 inhibited by hydroxamic acid-based HDAC inhibitors, such as SAHA. Class III HDACs form a  
structurally distant class of NAD dependent enzymes that are related to the yeast SIR2 proteins  
and are not inhibited by hydroxamic acid-based HDAC inhibitors.

Histone deacetylase inhibitors or HDAC inhibitors, as that term is used herein are  
compounds that are capable of inhibiting the deacetylation of histones *in vivo*, *in vitro* or both.  
20 As such, HDAC inhibitors inhibit the activity of at least one histone deacetylase. As a result of  
inhibiting the deacetylation of at least one histone, an increase in acetylated histone occurs and  
accumulation of acetylated histone is a suitable biological marker for assessing the activity of  
HDAC inhibitors. Therefore, procedures that can assay for the accumulation of acetylated  
histones can be used to determine the HDAC inhibitory activity of compounds of interest. It is  
25 understood that compounds that can inhibit histone deacetylase activity can also bind to other  
substrates and as such can inhibit other biologically active molecules such as enzymes. It is also  
to be understood that the compounds of the present invention are capable of inhibiting any of the  
histone deacetylases set forth above, or any other histone deacetylases.

For example, in patients receiving HDAC inhibitors, the accumulation of  
30 acetylated histones in peripheral mononuclear cells as well as in tissue treated with HDAC  
inhibitors can be determined against a suitable control.

HDAC inhibitory activity of a particular compound can be determined *in vitro*  
using, for example, an enzymatic assay which shows inhibition of at least one histone

deacetylase. Further, determination of the accumulation of acetylated histones in cells treated with a particular composition can be determinative of the HDAC inhibitory activity of a compound.

Assays for the accumulation of acetylated histones are well known in the literature. See, for example, Marks, P.A. *et al.*, J. Natl. Cancer Inst., 92:1210-1215, 2000, Butler, L.M. *et al.*, Cancer Res. 60:5165-5170 (2000), Richon, V. M. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 95:3003-3007, 1998, and Yoshida, M. *et al.*, J. Biol. Chem., 265:17174-17179, 1990.

For example, an enzymatic assay to determine the activity of a histone deacetylase inhibitor compound can be conducted as follows. Briefly, the effect of an HDAC inhibitor compound on affinity purified human epitope-tagged (Flag) HDAC1 can be assayed by incubating the enzyme preparation in the absence of substrate on ice for about 20 minutes with the indicated amount of inhibitor compound. Substrate ([<sup>3</sup>H]acetyl-labelled murine erythroleukemia cell-derived histone) can be added and the sample can be incubated for 20 minutes at 37°C in a total volume of 30 µL. The reaction can then be stopped and released acetate can be extracted and the amount of radioactivity release determined by scintillation counting. An alternative assay useful for determining the activity of a histone deacetylase inhibitor compound is the "HDAC Fluorescent Activity Assay; Drug Discovery Kit-AK-500" available from BIOMOL® Research Laboratories, Inc., Plymouth Meeting, PA.

In vivo studies can be conducted as follows. Animals, for example, mice, can be injected intraperitoneally with an HDAC inhibitor compound. Selected tissues, for example, brain, spleen, liver etc, can be isolated at predetermined times, post administration. Histones can be isolated from tissues essentially as described by Yoshida *et al.*, J. Biol. Chem. 265:17174-17179, 1990. Equal amounts of histones (about 1 µg) can be electrophoresed on 15% SDS-polyacrylamide gels and can be transferred to Hybond-P filters (available from Amersham). Filters can be blocked with 3% milk and can be probed with a rabbit purified polyclonal anti-acetylated histone H4 antibody (αAc-H4) and anti-acetylated histone H3 antibody (αAc-H3) (Upstate Biotechnology, Inc.). Levels of acetylated histone can be visualized using a horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit antibody (1:5000) and the SuperSignal chemiluminescent substrate (Pierce). As a loading control for the histone protein, parallel gels can be run and stained with Coomassie Blue (CB).

In addition, hydroxamic acid-based HDAC inhibitors have been shown to up regulate the expression of the p21<sup>WAF1</sup> gene. The p21<sup>WAF1</sup> protein is induced within 2 hours of culture with HDAC inhibitors in a variety of transformed cells using standard methods. The

induction of the p21<sup>WAF1</sup> gene is associated with accumulation of acetylated histones in the chromatin region of this gene. Induction of p21<sup>WAF1</sup> can therefore be recognized as involved in the G1 cell cycle arrest caused by HDAC inhibitors in transformed cells.

Typically, HDAC inhibitors fall into five general classes: 1) hydroxamic acid derivatives; 2) Short-Chain Fatty Acids (SCFAs); 3) cyclic tetrapeptides; 4) benzamides; and 5) electrophilic ketones.

Thus, the present invention includes within its broad scope compositions comprising HDAC inhibitors which are 1) hydroxamic acid derivatives; 2) Short-Chain Fatty Acids (SCFAs); 3) cyclic tetrapeptides; 4) benzamides; 5) electrophilic ketones; and/or any other class of compounds capable of inhibiting histone deacetylases, for use in inhibiting histone deacetylase, inducing terminal differentiation in neoplastic cells, and /or inducing differentiation of tumor cells in a tumor.

Examples of such HDAC inhibitors include, but are not limited to:

A. Hydroxamic Acid Derivatives such as suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) (Richon *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95,3003-3007 (1998)); m-carboxycinnamic acid bishydroxamide (CBHA) (Richon *et al.*, supra); pyroxamide; trichostatin analogues such as trichostatin A (TSA) and trichostatin C (Koghe *et al.* 1998. Biochem. Pharmacol. 56: 1359-1364); salicylihydroxamic acid (SBHA) (Andrews *et al.*, International J. Parasitology 30,761-768 (2000)); suberoyl bishydroxamic acid (SBHA) (U.S. Patent No. 5,608,108); azelaic bishydroxamic acid (ABHA) (Andrews *et al.*, supra); azelaic-1-hydroxamate-9-anilide (AAHA) (Qiu *et al.*, Mol. Biol. Cell 11, 2069-2083 (2000)); 6-(3-chlorophenylureido) carpoic hydroxamic acid (3Cl-UCHA); oxamflatin [(2E)-5-[3-[(phenylsulfonyl) aminol phenyl]-pent-2-en-4-ynohydroxamic acid] (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); or any of the hydroxamic acids disclosed in U.S. Patent Numbers 5,369,108, 5,932,616, 5,700,811, 6,087,367 and 6,511, 990.

B. Cyclic Tetrapeptides such as trapoxin A (TPX)-cyclic tetrapeptide (cyclo-(L- phenylalanyl-L-phenylalanyl-D-pipecolinyl-L-2-amino-8-oxo-9,10-epoxy decanoyl)) (Kijima *et al.*, J Biol. Chem. 268,22429-22435 (1993)); FR901228 (FK 228, depsipeptide) (Nakajima *et al.*, Ex. Cell Res. 241,126-133 (1998)); FR225497 cyclic tetrapeptide (H. Mori *et al.*, PCT Application WO 00/08048 (17 February 2000)); apicidin cyclic tetrapeptide [cyclo(N-O-methyl-L-tryptophanyl-L -isoleucinyl-D-pipecolinyl-L-2-amino-8-oxodecanoyl)] (Darkin-Rattray *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93,1314313147 (1996)); apicidin Ia, apicidin Ib,

apicidin Ic, apicidin IIa, and apicidin IIb (P. Dulski *et al.*, PCT Application WO 97/11366); CHAP, HC-toxin cyclic tetrapeptide (Bosch *et al.*, Plant Cell 7, 1941-1950 (1995)); WF27082 cyclic tetrapeptide (PCT Application WO 98/48825); and chlamydocin (Bosch *et al.*, supra).

C. Short chain fatty acid (SCFA) derivatives such as: sodium butyrate

5 (Cousens *et al.*, J. Biol. Chem. 254, 1716-1723 (1979)); isovalerate (McBain *et al.*, Biochem. Pharm. 53: 1357-1368 (1997)); valerate (McBain *et al.*, supra); 4-phenylbutyrate (4-PBA) (Lea and Tulsyan, Anticancer Research, 15,879-873 (1995)); phenylbutyrate (PB) (Wang *et al.*, Cancer Research, 59, 2766-2799 (1999)); propionate (McBain *et al.*, supra); butyramide (Lea and Tulsyan, supra); isobutyramide (Lea and Tulsyan, supra); phenylacetate (Lea and Tulsyan, supra); 3-bromopropionate (Lea and Tulsyan, supra); tributyrin (Guan *et al.*, Cancer Research, 10 60,749-755 (2000)); valproic acid and valproate.

D. Benzamide derivatives such as CI-994; MS-27-275 [N- (2-aminophenyl)-4- [N- (pyridin-3-yl methoxycarbonyl) aminomethyl] benzamide] (Saito *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 4592-4597 (1999)); and 3'-amino derivative of MS-27-275 (Saito *et al.*, supra).

15 E. Electrophilic ketone derivatives such as trifluoromethyl ketones (Frey *et al.*, Bioorganic & Med. Chem. Lett. (2002), 12, 3443-3447; U.S. 6,511,990) and  $\alpha$ -keto amides such as N-methyl-  $\alpha$ -ketoamides

F. Other HDAC Inhibitors such as depudecin (Kwon *et al.* 1998. PNAS 95: 3356-3361.

20 In one embodiment, hydroxamic acid based HDAC inhibitors are suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA), m-carboxycinnamic acid bishydroxamate (CBHA) and pyroxamide. SAHA has been shown to bind directly in the catalytic pocket of the histone deacetylase enzyme. SAHA induces cell cycle arrest, differentiation and/or apoptosis of transformed cells in culture and inhibits tumor growth in rodents. SAHA is effective at inducing these effects in both solid  
25 tumors and hematological cancers. It has been shown that SAHA is effective at inhibiting tumor growth in animals with no toxicity to the animal. The SAHA-induced inhibition of tumor growth is associated with an accumulation of acetylated histones in the tumor. SAHA is effective at inhibiting the development and continued growth of carcinogen-induced (N-methylnitrosourea) mammary tumors in rats. SAHA was administered to the rats in their diet  
30 over the 130 days of the study. Thus, SAHA is a nontoxic, orally active antitumor agent whose mechanism of action involves the inhibition of histone deacetylase activity. In other embodiments, HDAC inhibitors are those disclosed in U.S. Patent Numbers 5,369,108, 5,932,616, 5,700,811, 6,087,367 and 6,511, 990.

### Combination Therapy

The methods of the present invention may also comprise initially administering to  
5 the subject an antitumor agent so as to render the neoplastic cells in the subject resistant to an  
antitumor agent and subsequently administering an effective amount of any of the compositions  
of the present invention, effective to selectively induce terminal differentiation, cell growth arrest  
and/or apoptosis of such cells.

The antitumor agent may be one of numerous chemotherapy agents such as an  
10 alkylating agent, an antimetabolite, a hormonal agent, an antibiotic, colchicine, a vinca alkaloid,  
L-asparaginase, procarbazine, hydroxyurea, mitotane, nitrosoureas or an imidazole carboxamide.  
Suitable agents are those agents that promote depolarization of tubulin. In one embodiment, the  
antitumor agent is colchicine or a vinca alkaloid; vinblastine or vincristine. In embodiments  
where the antitumor agent is vincristine, the cells preferably are treated so that they are resistant  
15 to vincristine at a concentration of about 5 mg/ml. The treating of the cells to render them  
resistant to an antitumor agent may be effected by contacting the cells with the agent for a period  
of at least 3 to 5 days. The contacting of the resulting cells with any of the compounds above is  
performed as described previously. In addition to the above chemotherapy agents, the  
compounds may also be administered together with radiation therapy.

### *Alkylating Agents*

Alkylating agents react with nucleophilic residues, such as the chemical entities  
on the nucleotide precursors for DNA production. They affect the process of cell division by  
alkylating these nucleotides and preventing their assembly into DNA.

25 Examples of alkylating agents include, but are not limited to,  
bischloroethylamines (nitrogen mustards, e.g., chlorambucil, cyclophosphamide, ifosfamide,  
mechlorethamine, melphalan, uracil mustard), aziridines (e.g., thiotepa), alkyl alkane sulfonates  
(e.g., busulfan), nitrosoureas (e.g., carmustine, lomustine, streptozocin), nonclassic alkylating  
agents (altretamine, dacarbazine, and procarbazine), platinum compounds (carboplatin and  
30 cisplatin). These compounds react with phosphate, amino, hydroxyl, sulfhydryl, carboxyl, and  
imidazole groups.

Under physiological conditions, these drugs ionize and produce positively charged  
ion that attach to susceptible nucleic acids and proteins, leading to cell cycle arrest and/or cell

death. The alkylating agents are cell cycle phase nonspecific agents because they exert their activity independently of the specific phase of the cell cycle. The nitrogen mustards and alkyl alkone sulfonates are most effective against cells in the G1 or M phase. Nitrosoureas, nitrogen mustards, and aziridines impair progression from the G1 and S phases to the M phases. Chabner and Collins eds. (1990) "Cancer Chemotherapy: Principles and Practice", Philadelphia: JB Lippincott.

The alkylating agents are active against wide variety of neoplastic diseases, with significant activity in the treatment of leukemias and lymphomas as well as solid tumors. Clinically this group of drugs is routinely used in the treatment of acute and chronic leukemias; Hodgkin's disease; non-Hodgkin's lymphoma; multiple myeloma; primary brain tumors; carcinomas of the breast, ovaries, testes, lungs, bladder, cervix, head and neck, and malignant melanoma.

The major toxicity common to all of the alkylating agents is myelosuppression. Additionally, Gastrointestinal adverse effects of variable severity occur commonly and various organ toxicities are associated with specific compounds. Black and Livingston (1990) Drugs 39: 489-501 and 39: 652-673.

#### *Antibiotics*

Antibiotics (e.g., cytotoxic antibiotics) act by directly inhibiting DNA or RNA synthesis and are effective throughout the cell cycle. Examples of antibiotic agents include anthracyclines (e.g., doxorubicin, daunorubicin, epirubicin, idarubicin and anthracenedione), mitomycin C, bleomycin, dactinomycin, plicatamycin. These antibiotic agents interfere with cell growth by targeting different cellular components. For example, anthracyclines are generally believed to interfere with the action of DNA topoisomerase II in the regions of transcriptionally active DNA, which leads to DNA strand scissions.

Bleomycin is generally believed to chelate iron and forms an activated complex, which then binds to bases of DNA, causing strand scissions and cell death.

The antibiotic agents have been used as therapeutics across a range of neoplastic diseases, including carcinomas of the breast, lung, stomach and thyroids, lymphomas, myelogenous leukemias, myelomas, and sarcomas. The primary toxicity of the anthracyclines within this group is myelosuppression, especially granulocytopenia. Mucositis often accompanies the granulocytopenia and the severity correlates with the degree of

myelosuppression. There is also significant cardiac toxicity associated with high dosage administration of the anthracyclines.

### *Antimetabolic Agents*

5           Antimetabolic agents (i.e., antimetabolites) are a group of drugs that interfere with metabolic processes vital to the physiology and proliferation of cancer cells. Actively proliferating cancer cells require continuous synthesis of large quantities of nucleic acids, proteins, lipids, and other vital cellular constituents.

Many of the antimetabolites inhibit the synthesis of purine or pyrimidine  
10   nucleosides or inhibit the enzymes of DNA replication. Some antimetabolites also interfere with the synthesis of ribonucleosides and RNA and/or amino acid metabolism and protein synthesis as well. By interfering with the synthesis of vital cellular constituents, antimetabolites can delay or arrest the growth of cancer cells. Examples of antimetabolic agents include, but are not limited to, fluorouracil (5-FU), floxuridine (5-FUdR), methotrexate, leucovorin, hydroxyurea,  
15   thioguanine (6-TG), mercaptopurine (6-MP), cytarabine, pentostatin, fludarabine phosphate, cladribine (2-CDA), asparaginase, and gemcitabine.

Antimetabolic agents have been widely used to treat several common forms of cancer including carcinomas of colon, rectum, breast, liver, stomach and pancreas, malignant melanoma, acute and chronic leukemia and hair cell leukemia. Many of the adverse effects of  
20   antimetabolite treatment result from suppression of cellular proliferation in mitotically active tissues, such as the bone marrow or gastrointestinal mucosa. Patients treated with these agents commonly experience bone marrow suppression, stomatitis, diarrhea, and hair loss. Chen and Grem (1992) Curr. Opin. Oncol. 4: 1089-1098.

### *Hormonal Agents*

25           The hormonal agents are a group of drug that regulate the growth and development of their target organs. Most of the hormonal agents are sex steroids and their derivatives and analogs thereof, such as estrogens, progestogens, anti-estrogens, androgens, anti-androgens and progestins. These hormonal agents may serve as antagonists of receptors for the  
30   sex steroids to down regulate receptor expression and transcription of vital genes. Examples of such hormonal agents are synthetic estrogens (e.g., diethylstilbestrol), antiestrogens (e.g., tamoxifen, toremifene, fluoxymesterol and raloxifene), antiandrogens (bicalutamide, nilutamide, flutamide), aromatase inhibitors (e.g., aminoglutethimide, anastrozole and tetrazole), luteinizing

hormone release hormone (LHRH) analogues, ketoconazole, goserelin acetate, leuprolide, megestrol acetate and mifepristone.

Hormonal agents are used to treat breast cancer, prostate cancer, melanoma and meningioma. Because the major action of hormones is mediated through steroid receptors, 60% receptor-positive breast cancer responded to first-line hormonal therapy; and less than 10% of receptor-negative tumors responded. The main side effect associated with hormonal agents is flare. The frequent manifestations are an abrupt increase of bony pain, erythema around skin lesions, and induced hypercalcemia.

Specifically, progestogens are used to treat endometrial cancers, since these cancers occur in women that are exposed to high levels of oestrogen unopposed by progestogen.

Antiandrogens are used primarily for the treatment of prostate cancer, which is hormone dependent. They are used to decrease levels of testosterone, and thereby inhibit growth of the tumor.

Hormonal treatment of breast cancer involves reducing the level of oestrogen-dependent activation of oestrogen receptors in neoplastic breast cells. Anti-oestrogens act by binding to oestrogen receptors and prevent the recruitment of coactivators, thus inhibiting the oestrogen signal.

LHRH analogues are used in the treatment of prostate cancer to decrease levels of testosterone and so decrease the growth of the tumor.

Aromatase inhibitors act by inhibiting the enzyme required for hormone synthesis. In post-menopausal women, the main source of oestrogen is through the conversion of androstenedione by aromatase.

#### *Plant-derived Agents*

Plant-derived agents are a group of drugs that are derived from plants or modified based on the molecular structure of the agents. They inhibit cell replication by preventing the assembly of the cell's components that are essential to cell division.

Examples of plant derived agents include vinca alkaloids (e.g., vincristine, vinblastine, vindesine, vinzolidine and vinorelbine), podophyllotoxins (e.g., etoposide (VP-16) and teniposide (VM-26)), taxanes (e.g., paclitaxel and docetaxel). These plant-derived agents generally act as antimitotic agents that bind to tubulin and inhibit mitosis. Podophyllotoxins such as etoposide are believed to interfere with DNA synthesis by interacting with topoisomerase II, leading to DNA strand scission.

Plant-derived agents are used to treat many forms of cancer. For example, vincristine is used in the treatment of the leukemias, Hodgkin's and non-Hodgkin's lymphoma, and the childhood tumors neuroblastoma, rhabdomyosarcoma, and Wilms' tumor. Vinblastine is used against the lymphomas, testicular cancer, renal cell carcinoma, mycosis fungoides, and Kaposi's sarcoma. Doxorubicin has shown promising activity against advanced breast cancer, non-small cell lung cancer (NSCLC), and ovarian cancer.

Etoposide is active against a wide range of neoplasms, of which small cell lung cancer, testicular cancer, and NSCLC are most responsive.

The plant-derived agents cause significant side effects on patients being treated. The vinca alkaloids display different spectrum of clinical toxicity. Side effects of vinca alkaloids include neurotoxicity, altered platelet function, myelosuppression, and leukopenia. Paclitaxel causes dose-limiting neutropenia with relative sparing of the other hematopoietic cell lines. The major toxicity of the epipophyllotoxins is hematologic (neutropenia and thrombocytopenia).

Other side effects include transient hepatic enzyme abnormalities, alopecia, allergic reactions, and peripheral neuropathy.

### *Biologic Agents*

Biologic agents are a group of biomolecules that elicit cancer/tumor regression when used alone or in combination with chemotherapy and/or radiotherapy. Examples of biologic agents include immuno-modulating proteins such as cytokines, monoclonal antibodies against tumor antigens, tumor suppressor genes, and cancer vaccines.

Cytokines possess profound immunomodulatory activity. Some cytokines such as interleukin-2 (IL-2, aldesleukin) and interferon- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) demonstrated antitumor activity and have been approved for the treatment of patients with metastatic renal cell carcinoma and metastatic malignant melanoma. IL-2 is a T-cell growth factor that is central to T-cell-mediated immune responses. The selective antitumor effects of IL-2 on some patients are believed to be the result of a cell-mediated immune response that discriminate between self and nonself.

Interferon- $\alpha$  includes more than 23 related subtypes with overlapping activities. IFN- $\alpha$  has demonstrated activity against many solid and hematologic malignancies, the latter appearing to be particularly sensitive.

Examples of interferons include, interferon- $\alpha$ , interferon- $\beta$  (fibroblast interferon) and interferon- $\gamma$  (fibroblast interferon). Examples of other cytokines include erythropoietin (epoietin- $\alpha$ ), granulocyte-CSF (filgrastin), and granulocyte, macrophage-CSF (sargramostim).

Other immuno-modulating agents other than cytokines include bacillus Calmette-Guerin, levamisole, and octreotide, a long-acting octapeptide that mimics the effects of the naturally occurring hormone somatostatin.

Furthermore, the anti-cancer treatment can comprise treatment by immunotherapy with antibodies and reagents used in tumor vaccination approaches. The primary drugs in this therapy class are antibodies, alone or carrying e.g. toxins or chemotherapeutics/cytotoxics to cancer cells. Monoclonal antibodies against tumor antigens are antibodies elicited against antigens expressed by tumors, preferably tumor-specific antigens. For example, monoclonal antibody HERCEPTIN® (trastuzumab) is raised against human epidermal growth factor receptor2 (HER2) that is overexpressed in some breast tumors including metastatic breast cancer. Overexpression of HER2 protein is associated with more aggressive disease and poorer prognosis in the clinic. HERCEPTIN® is used as a single agent for the treatment of patients with metastatic breast cancer whose tumors overexpress the HER2 protein.

Another example of monoclonal antibodies against tumor antigens is RITUXAN® (rituximab) that is raised against CD20 on lymphoma cells and selectively deplete normal and malignant CD20+ pre-B and mature B cells.

RITUXAN is used as single agent for the treatment of patients with relapsed or refractory low-grade or follicular, CD20+, B cell non-Hodgkin's lymphoma. MYELOTARG® (gemtuzumab ozogamicin) and CAMPATH® (alemtuzumab) are further examples of monoclonal antibodies against tumor antigens that may be used.

Tumor suppressor genes are genes that function to inhibit the cell growth and division cycles, thus preventing the development of neoplasia. Mutations in tumor suppressor genes cause the cell to ignore one or more of the components of the network of inhibitory signals, overcoming the cell cycle checkpoints and resulting in a higher rate of controlled cell growth-cancer. Examples of the tumor suppressor genes include Duc-4, NF-1, NF-2, RB, p53, WT1, BRCA1 and BRCA2.

DPC4 is involved in pancreatic cancer and participates in a cytoplasmic pathway that inhibits cell division. NF-1 codes for a protein that inhibits Ras, a cytoplasmic inhibitory protein. NF-1 is involved in neurofibroma and pheochromocytomas of the nervous system and myeloid leukemia. NF-2 encodes a nuclear protein that is involved in meningioma, schwannoma, and ependymoma of the nervous system. RB codes for the pRB protein, a nuclear protein that is a major inhibitor of cell cycle. RB is involved in retinoblastoma as well as bone, bladder, small cell lung and breast cancer. P53 codes for p53 protein that regulates cell division and can induce

apoptosis. Mutation and/or inaction of p53 is found in a wide ranges of cancers. WTI is involved in Wilms' tumor of the kidneys. BRCA1 is involved in breast and ovarian cancer, and BRCA2 is involved in breast cancer. The tumor suppressor gene can be transferred into the tumor cells where it exerts its tumor suppressing functions.

5 Cancer vaccines are a group of agents that induce the body's specific immune response to tumors. Most of cancer vaccines under research and development and clinical trials are tumor-associated antigens (TAAs). TAAs are structures (i.e., proteins, enzymes or carbohydrates) that are present on tumor cells and relatively absent or diminished on normal cells. By virtue of being fairly unique to the tumor cell, TAAs provide targets for the immune  
10 system to recognize and cause their destruction. Examples of TAAs include gangliosides (GM2), prostate specific antigen (PSA),  $\alpha$ -fetoprotein (AFP), carcinoembryonic antigen (CEA) (produced by colon cancers and other adenocarcinomas, e.g., breast, lung, gastric, and pancreatic cancers), melanoma-associated antigens (MART-1, gap100, MAGE 1,3 tyrosinase), papillomavirus E6 and E7 fragments, whole cells or portions/lysates of autologous tumor cells  
15 and allogeneic tumor cells.

#### *Other Therapies*

Recent developments have introduced, in addition to the traditional cytotoxic and hormonal therapies used to treat cancer, additional therapies for the treatment of cancer. For  
20 example, many forms of gene therapy are undergoing preclinical or clinical trials.

In addition, approaches are currently under development that is based on the inhibition of tumor vascularization (angiogenesis). The aim of this concept is to cut off the tumor from nutrition and oxygen supply provided by a newly built tumor vascular system.

In addition, cancer therapy is also being attempted by the induction of terminal  
25 differentiation of the neoplastic cells. Suitable differentiation agents include the compounds disclosed in any one or more of the following references.

a) Polar compounds (Marks et al (1987); , Friend, C., Scher, W., Holland, J. W., and Sato, T. (1971) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 68: 378-382; Tanaka, M., Levy, J., Terada, M., Breslow, R., Rifkind, R. A., and Marks, P. A. (1975) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 72: 1003-  
30 1006; Reuben, R. C., Wife, R. L., Breslow, R., Rifkind, R. A., and Marks, P. A. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 73: 862-866);

b) Derivatives of vitamin D and retinoic acid (Abe, E., Miyaura, C., Sakagami, H., Takeda, M., Konno, K., Yamazaki, T., Yoshika, S., and Suda, T. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci.

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

c) Steroid hormones (Lotem, J. and Sachs, L. (1975) Int. J. Cancer 15: 731-740);

d) Growth factors (Sachs, L. (1978) Nature (Lond.) 274: 535, Metcalf, D. (1985) Science, 229: 16-22);

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

f) Tumor promoters (Huberman, E. and Callahan, M. F. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 76: 1293-1297; Lottem, J. and Sachs, L. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 76: 5158-5162); and

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

The combination of the pharmaceutical compositions of this invention and any of the anti-cancer agents described above and their use thereof are within the scope of the present invention.

The invention is illustrated in the examples in the Experimental Details Section which follows. This section is set forth to aid in an understanding of the invention but is not intended to, and should not be construed to limit in any way the invention as set forth in the claims which follow thereafter.

## EXPERIMENTAL DETAILS SECTION

### EXAMPLE 1

#### Production of SAHA Form I

Step 1 8-anilino-8-oxooctanoic acid; suberanilic acid (Compound 3)

Suberic acid (Compound 1, 174.2 g, 1.0 mole), aniline (Compound 2, 85.8-94.9 g), and toluene (0.1-0.2 L) are combined, heated to reflux and refluxed for a minimum of 60 hours. The reaction is quenched at reflux by adjusting the pH to  $\geq 11$  with 10% sodium hydroxide solution. The aqueous phase is separated. The organic layer is combined with toluene (0.11-0.13 L) and water (0.3-0.4 L), and the aqueous layer is separated. The aqueous layers from the extractions and toluene (0.11-0.13 L) are combined, settled, and then separated. The aqueous layer is extracted twice with toluene (0.2-0.3 L) at 60-70°C. The aqueous layer is adjusted at 20-30°C to a pH of 5.8-6.2, using hydrochloric acid and 10% sodium hydroxide solution as needed. The batch is filtered, washed with chilled water (0.2-0.3 L) and then washed with chilled isopropanol. The wet cake is dried at a maximum of 65°C under vacuum to yield suberanilic acid.

Step 2 methyl 8-anilino-8-oxooctanoate; methyl suberanilate (Compound 4)

Suberanilic acid (Compound 3, 249.3 g, 1.0 mole) and methanol (0.4-0.5 L) are combined and heated to 45-55°C. The pH is adjusted to  $\leq 2$  using hydrochloric acid, and the batch temperature is maintained at 45-55°C until the reaction is complete. The reaction is quenched with deionized water (0.1-0.2 L). The batch is cooled to 25-30°C and seeded to induce crystallization, and then cooled to 0-10°C. The batch is filtered, and the cake washed with a 50:50 (v/v) methanol/water solution (0.28-0.34 L) at 0-10°C. The wet cake is dried at a maximum of 46°C under vacuum to yield methyl suberanilate.

Step 3 N-hydroxy-N'-phenyloctanediamide; vorinostat (Compound 5)

Methyl suberanilate (Compound 4, 263.3 g, 1.0 mole) and 2M hydroxylamine freebase solution (0.8-1.0 L) are combined. While maintaining the batch at a maximum of 20°C, the apparent pH is adjusted to  $\geq 10.5$  with sodium methoxide in methanol as needed. While maintaining the batch at maximum 20°C and apparent pH  $\geq 10.5$  using sodium methoxide in methanol, the batch is aged. During the age, hydroxylamine freebase solution (0.5-0.6 L) is added, and the batch is maintained at maximum 20°C and apparent pH  $\geq 10.5$  until the reaction is complete. The reaction is quenched by adding the batch to water (0.9-1.1 L) while maintaining the batch temperature between 20-35°C, and the water content of the batch is adjusted to 35-45%. The pH is adjusted to 8.8-9.2 using glacial acetic acid and sodium carbonate as needed. The batch is cooled to 0-10°C over 5-10 hours. The batch is filtered and the cake washed with 55:45 (v/v) methanol/water (0.45-0.6 L) at 0-10°C. The wet cake is vacuum conditioned until the water content is  $\leq 35\%$ .

The vorinostat crude (264.32 g, 1.0 mole) wet cake is combined with denatured ethanol (1308-1599 g) and water (167-204 g). Hydroxylamine hydrochloride ( $> 9$  mEquiv) and sodium methoxide in methanol ( $> 9$  mEquiv) are added to the slurry, and the batch is heated to 70-80°C. The solution is filtered and then crystallized by slowly cooling to 0-10°C. The batch is

filtered and the cake washed with cold 4:1 (v/v) denatured ethanol/water. The wet cake is dried at a maximum of 45°C under vacuum.

Step 4 *N*-hydroxy-*N'*-phenyloctanediamide – vorinostat-fine (wet-milled) (Compound 6)

Vorinostat (Compound 5, 264.3 g, 1.0 mole) is slurried in a 50:50 (v/v) ethanol/water solution (minimum 2.8 L). The vorinostat slurry is wet-milled to a mean size of 25-45 µm while maintaining the batch temperature at 7-30°C. The final slurry is filtered and the wet cake is washed with 0-40°C water (minimum 0.8 L). The wet cake is dried at a maximum of 55°C under vacuum to a maximum water content of 0.2% (w/w) to yield vorinostat-fine drug substance.

Step 5 *N*-hydroxy-*N'*-phenyloctanediamide – vorinostat-coarse (Compound 7)

Vorinostat (Compound 5, 264.3 g, 1.0 mole) is slurried in a 50:50 (v/v) ethanol/water solution (4.9-5.5 L). Under a minimum of 15 psig pressure, the slurry is heated to 65-70°C to dissolve and then cooled to 60-64°C. A seed slurry is transferred into the batch while maintaining the batch temperature. The batch is aged for a minimum of 2 hours at 61-63°C. The batch is cooled in three steps by controlling the jacket temperature: (1) to 55°C at 0.35-0.78°C/hour, (2) to 45°C at 0.83-2.00°C/hour, and (3) to -5 to 25°C at 2.00-4.44°C/hour. The final slurry is aged at -5 to 25°C for about 1 hour and then filtered. The wet cake is washed with water (minimum 0.8 L). The wet cake is dried at a maximum of 55°C under vacuum to yield vorinostat-coarse drug substance.

The seed slurry is prepared by combining vorinostat-fine dry cake (97.8-116.3 g, 0.37-0.44 mol) and 50:50 (v/v) ethanol/water solution (1.0-1.2 L). Under a minimum of 15 psig pressure, the seed slurry is heated to 62-66°C, aged for about 0.5 hours and then cooled to 60-64°C.

EXAMPLE 2

Powder Blending of SAHA Crystals

Powder Blending

30% of the Vorinostat-fine crystals are blended with 70% of the Vorinostat-coarse crystals. 25.0 Kg of blended SAHA Polymorph I crystals were first sieved through a 30 mesh screen (600 µm). The resulting SAHA, 11.1 Kg of Microcrystalline Cellulose (Avicel PH-101), and 1.13 Kg of Croscarmellose Sodium were then loaded into the 141.6 L V-blender, 113 L Tote blender or another comparable sized and type blender. For the V-blender, the resulting material was mixed to homogeneity for approximately 8 minutes at approximately 25 rpm. For the Tote

blender, the resulting material was mixed to homogeneity for approximately 17 minutes at approximately 12 rpm.

Powder Blend Lubrication

5                    293.0 g of Magnesium Stearate (vegetable grade) was sieved through a 30 mesh screen (600 μm) and loaded into the V-blender with the blended powder mixture. The resulting mixture was blended to homogeneity for approximately 8 minutes at approximately 25 rpm. 293.0 g of Magnesium Stearate (vegetable grade) was also sieved through a 60 mesh screen (250 μm) and loaded into a tote blender with the blended powder mixture. The resulting mixture was  
10                    blended to homogeneity for approximately 17 minutes at approximately 12 rpm.

Table 1 summarizes the physical properties of the raw materials in the capsule.

Table 1: Physical and Chemical Properties of Raw Materials.

| Raw Material                                                                    | Physical Property          | Value                                                                                   |
|---------------------------------------------------------------------------------|----------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|
| Suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) – fine and coarse crystals               | Melting Point (DSC)        | 161 - 163°C                                                                             |
|                                                                                 | Solubility:                |                                                                                         |
|                                                                                 | ○ In Water                 | < 0.1 mg/ml                                                                             |
|                                                                                 | ○ In Methanol              | 42 mg/ml                                                                                |
|                                                                                 | ○ In Ethanol               | 0.1 mg/ml                                                                               |
|                                                                                 | ○ 2% CIP100 aqueous soln.  | 11.3 mg/ml                                                                              |
|                                                                                 | ○ 2% SD-20 aqueous soln.   | 0.085 mg/ml                                                                             |
| Microcrystalline Cellulose (Avicel PH-101) NF, Ph. Eur., JP (FMC BioPolymer)    | Nominal Mean Particle Size | 50 μm                                                                                   |
|                                                                                 | Moisture Content           | ≤ 5 %                                                                                   |
|                                                                                 | Bulk Density               | 0.26 – 0.31 g/cc                                                                        |
| Croscarmellose Sodium NF, Ph. Eur., JP (FMC BioPolymer)                         | Bulk Density               | 0.48 g/cc                                                                               |
|                                                                                 | Tapped Density             | 0.67 g/cc                                                                               |
|                                                                                 | Particle Size Distribution | ≤ 2% wt. retained on Mesh No. 200 (75 μm)<br>≤ 10% wt. retained on Mesh No. 325 (45 μm) |
| Magnesium Stearate (vegetable grade) NF, Ph. Eur., JP (Mallinckrodt Baker Inc.) | Bulk Density               | 0.16 g/cc                                                                               |
|                                                                                 | Particle Size Distribution | ≤ 2% wt. retained on Mesh No. 200 (75 μm)                                               |
|                                                                                 | Specific Surface Area      | 4.2±0.04 m <sup>2</sup> /g                                                              |

EXAMPLE 3

Encapsulation of SAHA Capsules

Encapsulation/Weight Sorting

The lubed powder mixture was encapsulated using an H&K encapsulator, polished tamping pins or chromium nitride coated tamping pins and size “3” capsules to the desired capsule weight. The filled capsules were polished using a capsule polisher and subsequently weight sorted using a weight sorter to the appropriate weight limit range. Table 2 summarizes the encapsulator settings.

Table 2. Summary of Encapsulator Operational Settings

|                      |                                              |
|----------------------|----------------------------------------------|
| Dosing Disc          | 10.0-12.7 mm                                 |
| Tamping Pins/Station | 3 or 12                                      |
| Tamping Pin Type     | Polished Uncoated or chromium nitride coated |
| Vacuum               | ON                                           |
| Encapsulator Speed   | 150-270 caps/min or 750-1000 caps/min        |

The final SAHA Capsule Composition is illustrated in Table 3. The capsules are weight-sorted using an acceptance limit for capsule weight variation of  $\pm 10\%$  the target capsule weight. The capsule weight variation in a typical batch is  $\pm 4\%$  of the target capsule weight.

Table 3: SAHA Capsule Composition

| Ingredient                                                  | Unit Weight (mg) | Weight (%) |
|-------------------------------------------------------------|------------------|------------|
| Suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) – Fine               | X                | Y          |
| Suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) – Coarse             | 100.0 - x        | 66.67 - y  |
| Microcrystalline Cellulose (Avicel PH-101) NF, Ph. Eur., JP | 44.33            | 29.80      |
| Croscarmellose                                              | 4.500            | 3.00       |

|                                                                     |       |        |
|---------------------------------------------------------------------|-------|--------|
| Sodium NF, Ph. Eur., JP                                             |       |        |
| Magnesium Stearate (vegetable grade) NF, Ph. Eur., JP               | 1.170 | 0.78   |
| Hard Gelatin Capsule, Size "3" Conisnap, White Opaque/White Opaque* | 49.00 | N/A    |
| Total**                                                             | 150.0 | 100.00 |

\*The market capsule ink formulation is Colorcon S-1-17762. TSE-free gelatin capsules.

\*\* Total weights do not include the hard gelatin capsule shells.

5

EXAMPLE 4

Measurement of Dissolution Rate of Capsules containg SAHA

The dissolution rate of SAHA from hard gelatin capsules is evaluated using a USP Dissolution Apparatus II (VK 7000, Varian Inc., Cary, NC). Each capsule is placed into a helical sinker (Quality Lab Accessories L.L.C., Manville, NJ) and delivered to vessels containing 10 900 mL of 2.0% Tween (TCI America, Portland, Oregon) at a temperature of 37±0.5°C. The paddles are rotated at 100 rpm and samples were pulled at specified time intervals via an autosampler (VK 8000, Varian Inc., Cary, NC) equipped with 35 µm full flow filters (Varian Inc., Cary, NC).

Subsequently, samples were assayed for SAHA by High Performance Liquid 15 Chromatography (Agilent 1100 series, Agilent Technologies Inc., Wilmington, DE). The chromatographic analysis was conducted using a Phenomenex Luna C8 (2) (100 x 4.6 mm) 5 µm particle size column, a mobile phase of 1:1 methanol/0.1% trifluoroacetic acid (Reagent Grade, Fisher), and a detection wavelength of 242 nm.

20

EXAMPLE 5

X-Ray Powder Diffraction Analysis of SAHA

X-ray Powder Diffraction analysis was performed on SAHA Form I obtained in accordance with Example 1, and on SAHA Form II-V prepared by methods detailed in Table 4 below.

Table 4: SAHA Samples analyzed by X-ray Powder Diffraction

| SAHA Sample   | Reference                                                      | Method                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|---------------|----------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| SAHA Form I   | -                                                              | Example 1                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| SAHA Form II  | U.S. 5,369,108<br>Columns 25-26<br>Procedures A, C, D          | SAHA was dissolved in EtOAc/THF (3/1). The solutions were passed through a plug of silica gel using EtOAc/THF (3/1). Fractions were collected and concentrated. The solid appeared pink.                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| SAHA Form III | U.S. 5,369,108<br>Columns 25-26<br>Procedure B                 | SAHA was dissolved in methanol, filtered via celite, and concentrated on the rotovap to dryness. The residues were slurried with hexanes and filtered. The solids appeared pink.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| SAHA Form IV  | Mai et al <i>OPPI Briefs</i><br>(2001)Vol 33(4),<br>391-394    | SAHA was recrystallized from acetonitrile.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| SAHA Form V   | Stowell et al <i>J. Med. Chem.</i> (1995), 38(8),<br>1411-1413 | To a mixture of SAHA (4.0g) in anhydrous methanol (15 mL) was added NaOMe (10.7 mL, 4.37 M, 47 mmol). The solution became homogeneous, but solid formed after about 5 minutes. The mixture was stirred for 15 min, and then 100 ml of water was added followed by slow addition of glacial acetic acid (3.77 mL, 4.0 g). The crystalline solid was collected and washed with water (2x75 mL). The solid was dried under high vacuum overnight yielding 3.85 g (96% recovery) of an off-white solid. |

X-Ray Diffraction Analysis:

The samples were analyzed on a Siemens D500 Automated Powder

5     Diffractometer (Instrument ID No. LD-301-4), which is operated according to Standard Operating Procedure EQ-27, Rev. 12, in accordance with the manufacturer’s instructions. The Diffractometer is equipped with a graphite monochromator and a Cu ( $\lambda=1.54\text{\AA}$ ) X-ray source operated at 50kV, 40 mA. Two-theta calibration is performed using an NBS mica standard (SRM675). The samples were analyzed using the following instrument parameters:

- 10
- Measuring Range:

4-40 2 theta

Step Width:

0.05 Å

Measuring Time per Step:

1.2 seconds

Sample preparation was performed according to Standard Operating Procedure MIC-7, Rev. 2 (Section 3.1.2), in accordance with the manufacturer’s instructions, using a zero background sample plate (#1). The samples were processed following a light mortar and pestle grind to ensure homogeneity.

5                      Figure 3A-E depicts the X-ray diffractograms for SAHA Forms I-V. The corresponding data for the X-ray diffractograms is presented in Tables 5-9 below:

Table 5: SAHA Form I

| Peak | 2Theta<br>(deg) | D (Å)   |
|------|-----------------|---------|
| 1    | 8.97            | 9.86159 |
| 2    | 9.37            | 9.43    |
| 3    | 17.46           | 5.07    |
| 4    | 19.41           | 4.57    |
| 5    | 20.04           | 4.43    |
| 6    | 23.96           | 3.71    |
| 7    | 24.44           | 3.64    |
| 8    | 24.76           | 3.59    |
| 9    | 24.96           | 3.56    |
| 10   | 27.96           | 3.19    |
| 11   | 43.29           | 2.08    |

10

Table 6: SAHA Form II

| Peak | 2Theta<br>(deg) | D (Å) | Peak | 2Theta<br>(deg) | D (Å) |
|------|-----------------|-------|------|-----------------|-------|
| 1    | 5.12            | 17.24 | 18   | 21.72           | 4.09  |
| 2    | 5.46            | 16.15 | 19   | 22.07           | 4.02  |
| 3    | 7.48            | 11.8  | 20   | 22.88           | 3.88  |
| 4    | 7.72            | 11.44 | 21   | 23.36           | 3.80  |
| 5    | 8.15            | 18.84 | 22   | 23.79           | 3.73  |
| 6    | 8.72            | 10.13 | 23   | 24.16           | 3.68  |
| 7    | 9.21            | 9.59  | 24   | 24.66           | 3.61  |
| 8    | 10.91           | 8.09  | 25   | 25.75           | 3.46  |

|    |       |      |    |       |      |
|----|-------|------|----|-------|------|
| 9  | 12.38 | 7.14 | 26 | 26.92 | 3.31 |
| 10 | 13.55 | 6.52 | 27 | 27.56 | 3.23 |
| 11 | 17.31 | 5.12 | 28 | 27.88 | 3.20 |
| 12 | 18.22 | 4.86 | 29 | 28.53 | 3.12 |
| 13 | 18.86 | 4.70 | 30 | 30.68 | 2.91 |
| 14 | 19.32 | 4.59 | 31 | 40.21 | 2.24 |
| 15 | 19.88 | 4.46 | 32 | 42.80 | 2.11 |
| 16 | 20.76 | 4.27 | 33 | 43.16 | 2.09 |
| 17 | 21.20 | 4.19 |    |       |      |

Table 7: SAHA Form III

| Peak | 2Theta<br>(deg) | D (Å) | Peak | 2Theta<br>(deg) | D (Å) |
|------|-----------------|-------|------|-----------------|-------|
| 1    | 10.10           | 8.75  | 12   | 23.81           | 3.73  |
| 2    | 12.13           | 7.29  | 13   | 24.54           | 3.62  |
| 3    | 13.83           | 6.40  | 14   | 25.04           | 3.55  |
| 4    | 15.11           | 5.86  | 15   | 25.36           | 3.51  |
| 5    | 17.65           | 5.02  | 16   | 26.10           | 3.41  |
| 6    | 18.54           | 4.78  | 17   | 26.80           | 3.32  |
| 7    | 18.80           | 4.71  | 18   | 35.62           | 2.51  |
| 8    | 19.60           | 4.52  | 19   | 37.12           | 2.42  |
| 9    | 20.18           | 4.40  | 20   | 40.92           | 2.20  |
| 10   | 20.90           | 4.25  | 21   | 42.43           | 2.13  |
| 11   | 21.69           | 4.10  | 22   | 44.83           | 2.02  |

Table 8: SAHA Form IV

| Peak | 2Theta<br>(deg) | D (Å) |
|------|-----------------|-------|
| 1    | 8.84            | 9.99  |
| 2    | 9.25            | 9.55  |
| 3    | 11.00           | 8.04  |
| 4    | 12.44           | 7.11  |
| 5    | 17.38           | 5.10  |

|    |       |      |
|----|-------|------|
| 6  | 19.37 | 4.58 |
| 7  | 19.93 | 4.45 |
| 8  | 22.36 | 3.97 |
| 9  | 22.89 | 3.88 |
| 10 | 23.83 | 3.73 |
| 11 | 24.24 | 3.67 |
| 12 | 24.80 | 3.59 |
| 13 | 25.80 | 3.45 |
| 14 | 26.96 | 3.30 |
| 15 | 27.84 | 3.20 |
| 16 | 28.39 | 3.14 |

Table 9: SAHA Form V

| Peak | 2Theta<br>(deg) | D (Å) |
|------|-----------------|-------|
| 1    | 5.08            | 17.39 |
| 2    | 9.20            | 9.60  |
| 3    | 10.07           | 8.77  |
| 4    | 12.13           | 7.29  |
| 5    | 15.09           | 5.86  |
| 6    | 17.65           | 5.02  |
| 7    | 19.32           | 4.59  |
| 8    | 19.80           | 4.48  |
| 9    | 20.16           | 4.41  |
| 10   | 20.87           | 4.25  |
| 11   | 21.67           | 4.10  |
| 12   | 24.56           | 3.62  |
| 13   | 25.25           | 3.52  |
| 14   | 26.10           | 3.41  |
| 15   | 35.62           | 2.51  |
| 16   | 37.12           | 2.42  |
| 17   | 40.90           | 2.20  |
| 18   | 41.78           | 2.16  |

|    |       |      |
|----|-------|------|
| 19 | 42.42 | 2.13 |
| 20 | 44.82 | 2.02 |

The X-ray powder diffraction pattern of SAHA Form I was also collected using a X'PERT Pro Phillips X-ray diffractometer with a copper K $\alpha$  radiation (wavelength 1.542 Å). The prominent 2 $\theta$  positions along with the *d*-spacings are summarized in Table 5A.

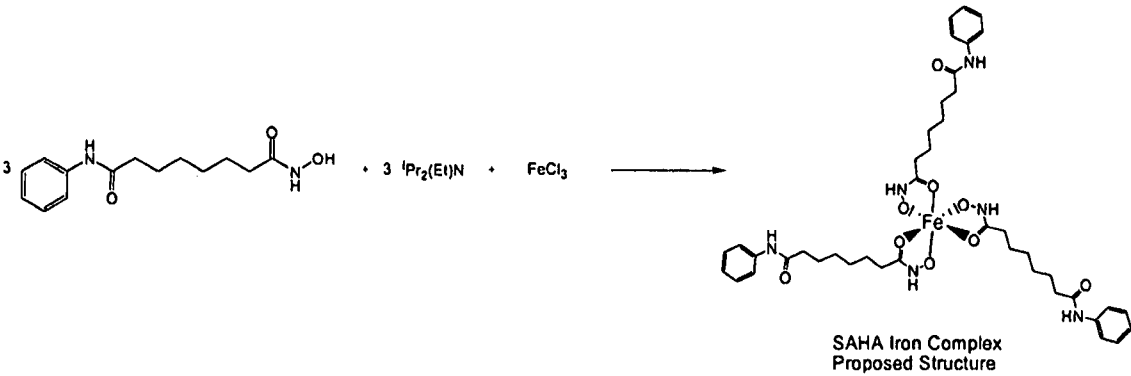
5

| Table 5A SAHA Form I     |                       |
|--------------------------|-----------------------|
| Position [° 2 $\theta$ ] | <i>d</i> -spacing [Å] |
| 9.1                      | 9.7                   |
| 10.8                     | 8.2                   |
| 12.3                     | 7.2                   |
| 17.2                     | 5.2                   |
| 19.2                     | 4.6                   |
| 19.8                     | 4.5                   |
| 23.7                     | 3.7                   |
| 24.1                     | 3.7                   |
| 25.7                     | 3.5                   |
| 26.8                     | 3.3                   |
| 27.7                     | 3.2                   |

EXAMPLE 6

Preparation of Iron SAHA Metal Chelate Complex

10 Chemical Reaction Scheme



Experimental

15 At ambient temperature, SAHA (1.0 g, 3.78 mmol) and ethanol (10.0 mL) were added to an erlenmyer flask, and N,N-diisopropylethylamine was then added dropwise (0.66 mL,

3.78 mmol) with stirring. To the resultant slurry, a solution of ferric chloride in ethanol (0.205 g, 1.26 mmol in 10.0 mL of ethanol) was added. The mixture immediately took on a deep red color as the ferric chloride solution was added. Ethanol (5.0 mL) was used to wash the remaining ferric chloride solution into the reaction flask. After 5 min of stirring at ambient temperature, the reaction mixture became a clear, dark red solution. The reaction mixture was allowed to stir at ambient temperature for 16 h. After this time, a dark orange precipitate was observed. The orange solid was collected via filtration and washed with ethanol (3 x 3.0 mL). The filtrate was colorless. The orange solid was allowed to dry for 24 h (mass 1.02 g, 96 % yield).

10    Analysis

Elemental analysis for C, H, N and Fe content is provided below in Table 10:

Table 10: Elemental Analysis

| % Element | Theoretical | Actual |
|-----------|-------------|--------|
| % C       | 59.64       | 58.29  |
| % H       | 6.79        | 6.88   |
| % N       | 9.94        | 9.56   |
| % Fe      | 6.60        | 6.3    |

15                    The results of the elemental analysis are in good agreement with the proposed structure shown above.

EXAMPLE 7

20                    X-Ray Powder Diffraction Analysis of iron SAHA chelate complex

The X-ray powder diffraction pattern (Figure 2) of the crystalline iron SAHA chelate complex was generated on a Philips Analytical X'Pert PRO X-ray Diffraction System with PW3040/60 console. A PW3373/00 ceramic Cu LEF X-ray tube K-Alpha radiation was used as the source. The crystalline iron SAHA chelate complex can be characterized at 8.8, 14.5 and 21.8 degrees (2θ). The crystalline iron SAHA chelate complex is further characterized by peaks at 13.3, 20.3 and 24.6 degrees (2θ). Additional peaks attributed to the complex are observed at 18.5, 25.8 and 33.3 degrees (2θ).

EXAMPLE 8

30                    Patient Studies

Patients with cancer are administered the pharmaceutical composition comprising a metal HDAC inhibitor chelate complex, or a pharmaceutical composition of an HDAC

inhibitor and chelatable metal compound. Adverse experiences of the patients are recorded and compared with adverse experiences of patients administered with the HDAC inhibitor.

Patients with either Cutaneous T-cell Lymphoma or Peripheral T-cell Lymphoma are administered the pharmaceutical composition once daily continuously, wherein the amount of SAHA administered is 400 mg. Patients with either Cutaneous T-cell Lymphoma or Peripheral T-cell Lymphoma are administered the pharmaceutical composition twice daily three to five days per week, wherein the amount of SAHA administered for each dose is 300 mg. Patients with advanced leukemias and myelodysplastic syndrome (MDS) are administered the pharmaceutical composition orally (po) three times (tid) a day for 14 days followed by 1 week of rest, for a 3-week course, wherein the amount of SAHA administered for each dose is at 100 mg, 150 mg, 200 mg or 250 mg.

Patients with cancer are co-administered an HDAC inhibitor and chelatable metal compound. Adverse experiences of the patients are recorded and compared with adverse experiences of patients administered with only the HDAC inhibitor.

Patients with either Cutaneous T-cell Lymphoma or Peripheral T-cell Lymphoma are co-administered orally SAHA once daily continuously at 400 mg or at 300 mg twice daily three to five days per week and an iron or zinc supplement daily. Patients with advanced leukemias and myelodysplastic syndrome (MDS) are administered orally SAHA (po) at 100 mg, 150 mg, 200 mg or 250 mg three times (tid) a day for 14 days followed by 1 week of rest and an iron or zinc supplement daily, for a 3-week course. Patients with advanced cancer including hematologic cancer and solid tumors are administered orally SAHA 400 or 500 mg once a day daily, 200 or 300 mg twice a day daily, 300 mg or 400 mg twice a day intermittently 3 days a week, or 100 mg three times a day (2 wks) and an iron or zinc supplement daily. Patients with Diffuse Large B Cell Lymphoma (DLBCL) or mesothelioma are administered orally SAHA 300 mg twice a day 3 days a week and an iron or zinc supplement daily. The amount of zinc or iron administered will be expected to vary from patient to patient and will be the amount needed to alleviate the HDAC inhibitor induced toxicities without causing metal overload mediated toxicity.

#### EXAMPLE 9

##### Effects of Zinc Supplementation on Vorinostat-Mediated Side Effects

To test whether the maximum tolerated dose (MTD) of vorinostat in mice can be increased with zinc supplementation, Mice (CD1 nu/nu female, 6-8 weeks old, Charles River Laboratories) are administered vehicle, 150 mg/kg (MTD) or 300 mg/kg vorinostat in vehicle

(Table 11). Mice are given 0.5, 1, or 5 molar equivalents (relative to vorinostat) of zinc chloride. This corresponds to ZnCl<sub>2</sub> doses of 38.5, 77, and 385 mg/kg for the 150 mg/kg vorinostat group.

An initial study of non-tumored mice is used to establish MTD of vorinostat/Zn combinations. If a shift in MTD is noted, a subsequent experiment with mice is used to establish HCT116 colon carcinoma subcutaneous (s.q.) xenografts to evaluate the role of altered MTD on tumor growth (efficacy).

Table 11. Vorinostat MTD and Zinc Supplementation.  
All mice are dosed (i.p.) daily (qd) for 14 days with the indicated amounts of compounds.

| Group | N | Agent      | Mg / kg | Agent             | Mg / kg |
|-------|---|------------|---------|-------------------|---------|
| 1     | 5 | Vehicle    | --      | --                | --      |
| 2     | 5 | Vehicle    | --      | ZnCl <sub>2</sub> | 38.5    |
| 3     | 5 | Vehicle    | --      | ZnCl <sub>2</sub> | 77      |
| 4     | 5 | Vehicle    | --      | ZnCl <sub>2</sub> | 385     |
| 5     | 5 | Vorinostat | 150     | --                | --      |
| 6     | 5 | Vorinostat | 150     | ZnCl <sub>2</sub> | 38.5    |
| 7     | 5 | Vorinostat | 150     | ZnCl <sub>2</sub> | 77      |
| 8     | 5 | Vorinostat | 150     | ZnCl <sub>2</sub> | 385     |
| 9     | 5 | Vorinostat | 300     | --                | --      |
| 10    | 5 | Vorinostat | 300     | ZnCl <sub>2</sub> | 77      |
| 11    | 5 | Vorinostat | 300     | ZnCl <sub>2</sub> | 154     |
| 12    | 5 | Vorinostat | 300     | ZnCl <sub>2</sub> | 770     |

The vehicle for Vorinostat (Dose IP at 10 ul/g) contain 10% v/v DMSO (Sigma, cat # : D8418), 45% v/v PEG-400 and 45% water. Vorinostat in vehicle (Dose IP at 10 ul/g) is prepared by weighing the compound (pre-warm each vehicle component to 37°C prior to formulating the compound), adding 1/10<sup>th</sup> final volume of 100% DMSO, sonicating until clear solution, adding 50% PEG-400 (in water) to final desired volume, sonicating and maintaining at 37°C at all times. ZnCl<sub>2</sub> is dissolved in sterile phosphate buffered saline (PBS).

Body weight and survival are monitored as indications of toxicity. Doses resulting in a group average body weight loss of more than 20% average will be considered non-tolerated. Likewise, doses resulting in the treatment-related death of more than 2 mice per group will be considered non-tolerated. For tumored animals, tumor sizes in response to treatment are measured by callipering 2-3 times per week.

Table 12. End of Study Serum Harvest Schedule

|                            |                           |
|----------------------------|---------------------------|
| First 2 mice in each group | Last 3 mice in each group |
| RO 0.5 hr PD, CP 4 hr PD   | RO 2 hr PD, CP 24 hr      |

PD = post-dose; RO= retro-orbital bleed; CP= cardiac puncture (terminal)

5

Retro-orbital bleed: 0.2 mL blood is collected by retro-orbital bleed under isoflurane anesthesia. Blood is processed for serum (no anti-coagulant added).

Cardiac Puncture: Full volume of blood is collected by terminal cardiac puncture under CO<sub>2</sub> anesthesia. Blood is processed for serum (no anti-coagulant added).

10

Complete Blood Count (CBC)

Vorinostat treatment has been associated with reduced numbers of certain blood populations, including platelets and lymphocytes. CBC from mice are monitored before (baseline) and during (Day7), and after (Day14) treatment. A small quantity (<50 µl) of blood is obtained by RO bleed subsets counted by an Advia 120 instrument (Seimens Medical).

15

Autopsy and tissue harvest

For tumored animals, the xenograft tumor is removed, weighed, and portions flash frozen or fixed in buffered formalin. Fixed tumor material is processed as paraffin embedded slides and subjected to immunohistochemical analyses. These include assays for proliferation (Ki-67, BrdU), apoptosis (Caspase-3), and acetylation of various histones (H2, H3, H4). Histone protein from frozen material are used to assay histone acetylation changes by ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). Mice are also subjected to a full autopsy.

20

While this invention has been particularly shown and described with references to embodiments thereof, it will be understood by those skilled in the art that various changes in form and details may be made therein without departing from the meaning of the invention described. Rather, the scope of the invention is defined by the claims that follow.

25

## References

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

29

15. Scher, W., Scher, B. M., and Waxman, S. (1983) *Exp. Hematol.* 11: 490-498.
16. Scher, W., Scher, B. M., and Waxman, S. (1982) *Biochem. & Biophys. Res. Comm.* 109: 348-354.
- 5 17. Huberman, E. and Callahan, M. F. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 76: 1293-1297.
18. Lottem, J. and Sachs, L. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 76: 5158-5162.
- 10 19. Terada, M., Epner, E., Nudel, U., Salmon, J., Fibach, E., Rifkind, R. A., and Marks, P. A. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 75: 2795-2799.
20. Morin, M. J. and Sartorelli, A. C. (1984) *Cancer Res.* 44: 2807-2812.
- 15 21. Schwartz, E. L., Brown, B. J., Nierenberg, M., Marsh, J. C., and Sartorelli, A. C. (1983) *Cancer Res.* 43: 2725-2730.
22. Sugano, H., Furusawa, M., Kawaguchi, T., and Ikawa, Y. (1973) *Bibl. Hematol.* 39: 943-954.
- 20 23. Ebert, P. S., Wars, I., and Buell, D. N. (1976) *Cancer Res.* 36: 1809-1813.
24. Hayashi, M., Okabe, J., and Hozumi, M. (1979) *Gann* 70: 235-238.
- 25 25. Richon, V.M., Webb, Y., Merger, R., et al. (1996) *PNAS* 93:5705-8.
26. Cohen, L.A., Amin, S., Marks, P.A., Rifkind, R.A., Desai, D., and Richon, V.M. (1999) *Anticancer Research* 19:4999-5006.
- 30 27. Grunstein, M. (1997) *Nature* 389:349-52.
28. Finnin, M.S., Donigian, J.R., Cohen, A., et al. (1999) *Nature* 401:188-193.
29. Van Lint, C., Emiliani, S., Verdin, E. (1996) *Gene Expression* 5:245-53.
- 35 30. Archer, S. Shufen, M. Shei, A., Hodin, R. (1998) *PNAS* 95:6791-96.
31. Dressel, U., Renkawitz, R., Baniahmad, A. (2000) *Anticancer Research* 20(2A):1017-22.

## WHAT IS CLAIMED IS:

1. A pharmaceutical composition comprising a therapeutically effective amount of Histone Deacetylase (HDAC) inhibitor and a chelatable metal compound, and a pharmaceutically acceptable carrier.
2. The pharmaceutical composition of claim 1, wherein the chelatable metal compound comprises iron or zinc.
3. The pharmaceutical composition of claim 2, wherein the HDAC inhibitor is suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) or pharmaceutically acceptable salt or hydrate or solvate thereof.
4. A method of treating cancer and alleviating the side effects of the HDAC inhibitor comprising the step of administering to a patient the pharmaceutical composition of claim 1.
5. A method of treating cancer and alleviating the side effects of the HDAC inhibitor comprising the step of co-administering to a patient a therapeutically effective amount of HDAC inhibitor and a chelatable metal compound.
6. The method of claim 5, wherein the chelatable metal compound comprises iron or zinc.
7. The method of claim 6, wherein the HDAC inhibitor is suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) or a pharmaceutically acceptable salt or hydrate or solvate thereof.
8. A pharmaceutical composition comprising a therapeutically effective amount of iron SAHA chelate complex or hydrate or solvate thereof and a pharmaceutically acceptable carrier.
9. The pharmaceutical composition of claim 8, wherein the iron to SAHA stoichiometric ratio is 1:3.

10. The pharmaceutical composition of claim 9, wherein the iron SAHA chelate complex is crystalline, and is characterized by an X-ray diffraction powder pattern with copper K $\alpha$  radiation, including characteristic peaks at 8.8, 14.5 and 21.8 degrees  $2\theta$ .

5

11. The pharmaceutical composition of claim 9, wherein the iron chelate complex is crystalline, and is characterized by an X-ray powder diffraction pattern with copper K $\alpha$  radiation, including characteristic peaks at 8.8, 13.3, 14.5, 20.3, 21.8 and 24.6 degrees  $2\theta$ .

10

12. The pharmaceutical composition of claim 9, wherein the iron chelate complex is crystalline, and is characterized by an X-ray diffraction pattern with copper K $\alpha$  radiation, including characteristic peaks at 8.8, 13.3, 14.5, 18.5, 20.3, 21.8, 24.6, 25.8 and 33.3 degrees  $2\theta$ .

15

13. A pharmaceutical composition comprising a therapeutically effective amount of zinc SAHA chelate complex or hydrate or solvate thereof and a pharmaceutically acceptable carrier.

20

14. A method of treating cancer comprising the step of administering to a patient a therapeutically effective amount of metal HDAC inhibitor chelate complex or hydrate or solvate thereof.

25

15. A method of obtaining a crystalline metal HDAC inhibitor chelate complex comprising the step of crystallizing the chelate complex in an organic solvent or a mixture of organic solvent and water.

16. A method of obtaining a metal HDAC inhibitor chelate complex comprising the step of adding a chelatable metal compound and base with the HDAC inhibitor in a reaction medium.

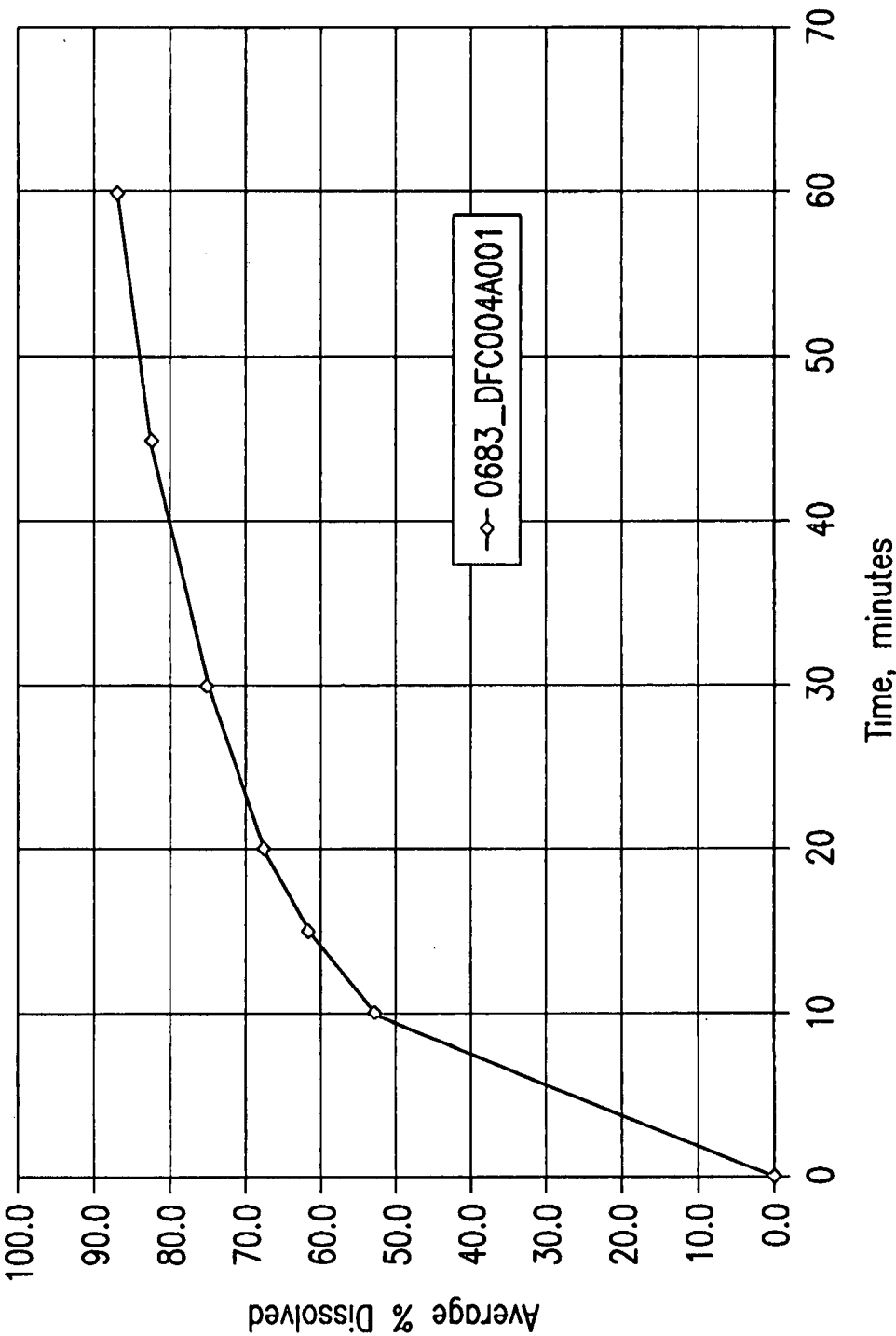


FIG.1

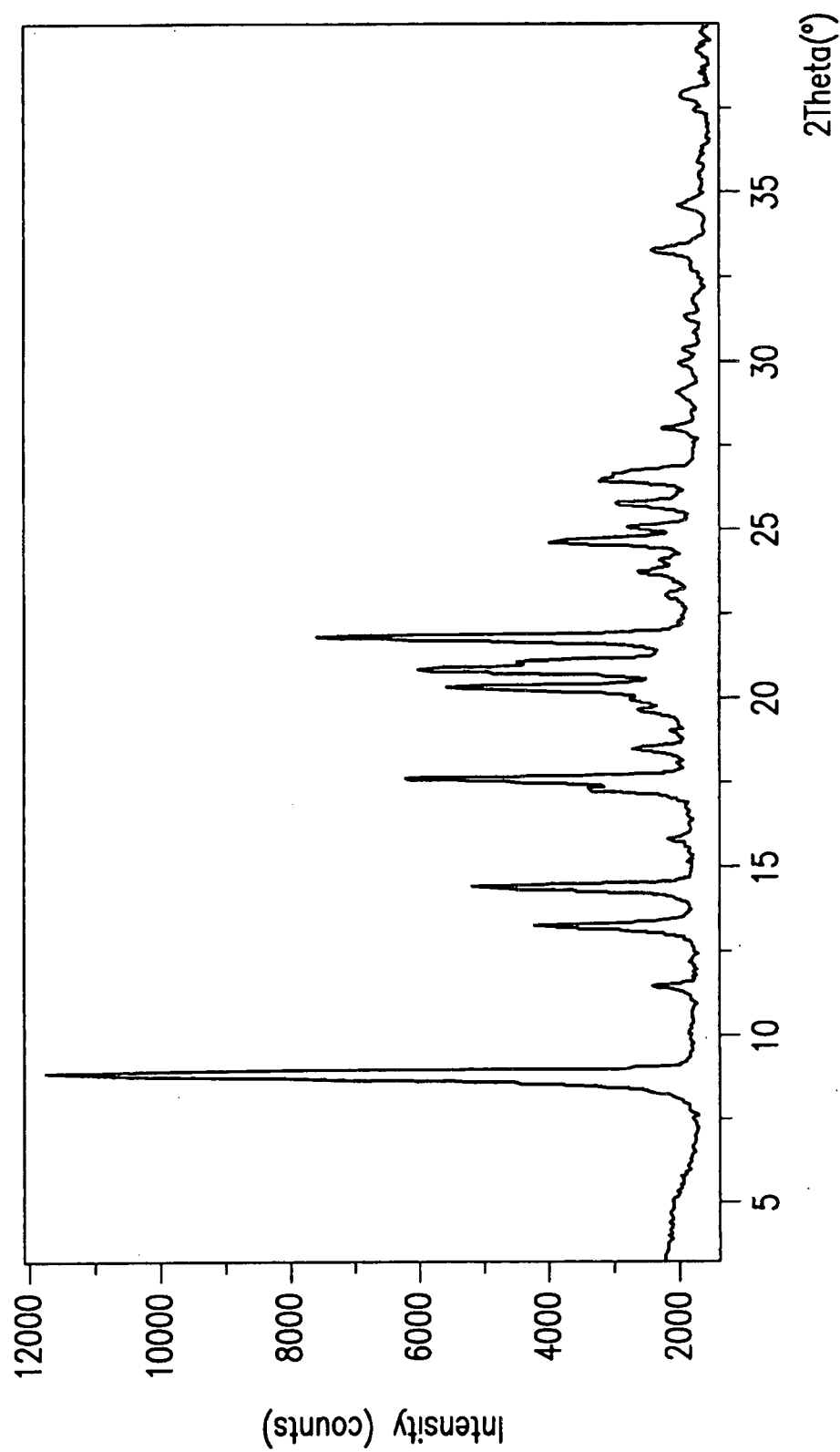


FIG.2

32

3/7

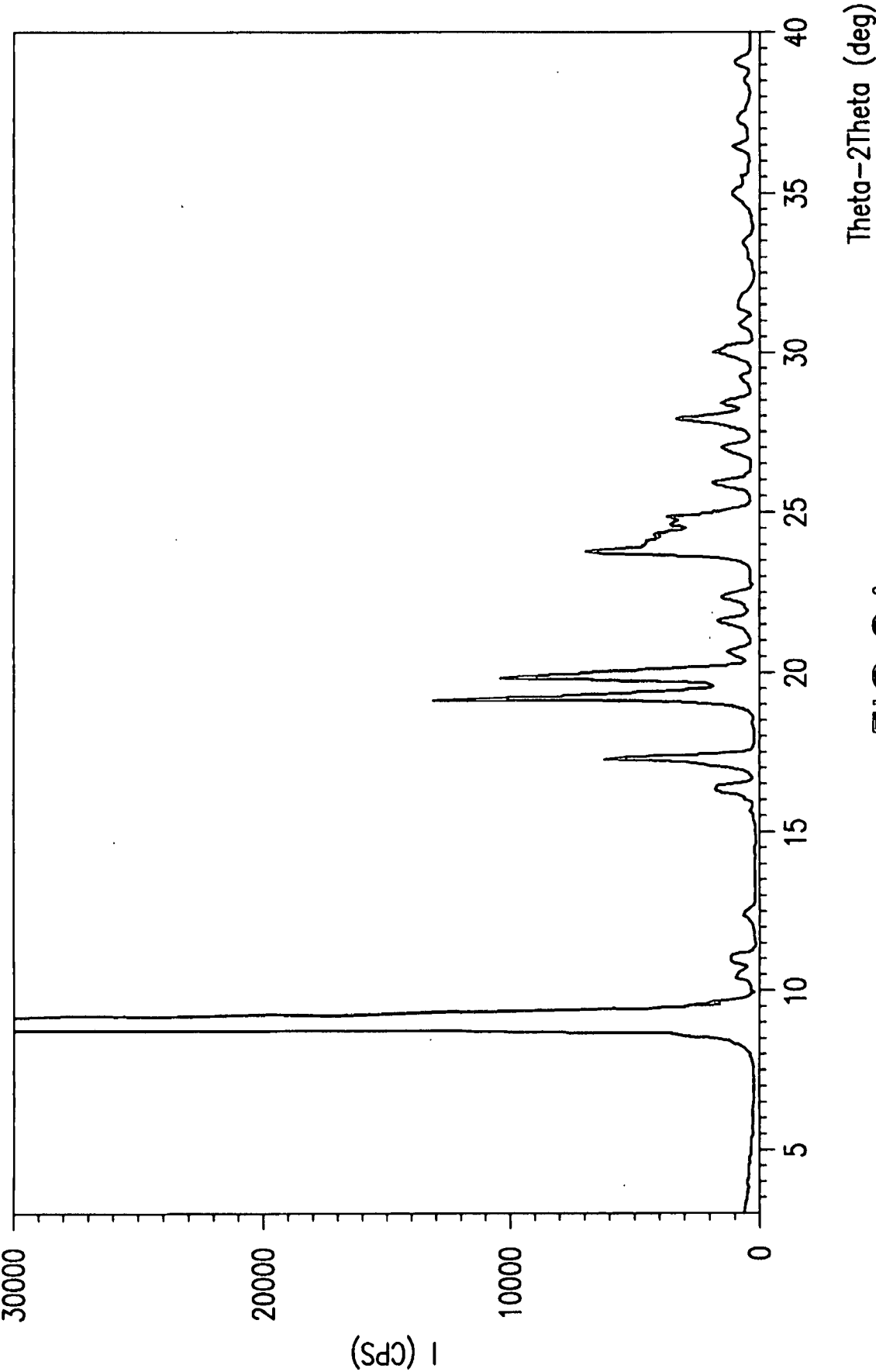


FIG. 3A

4/7

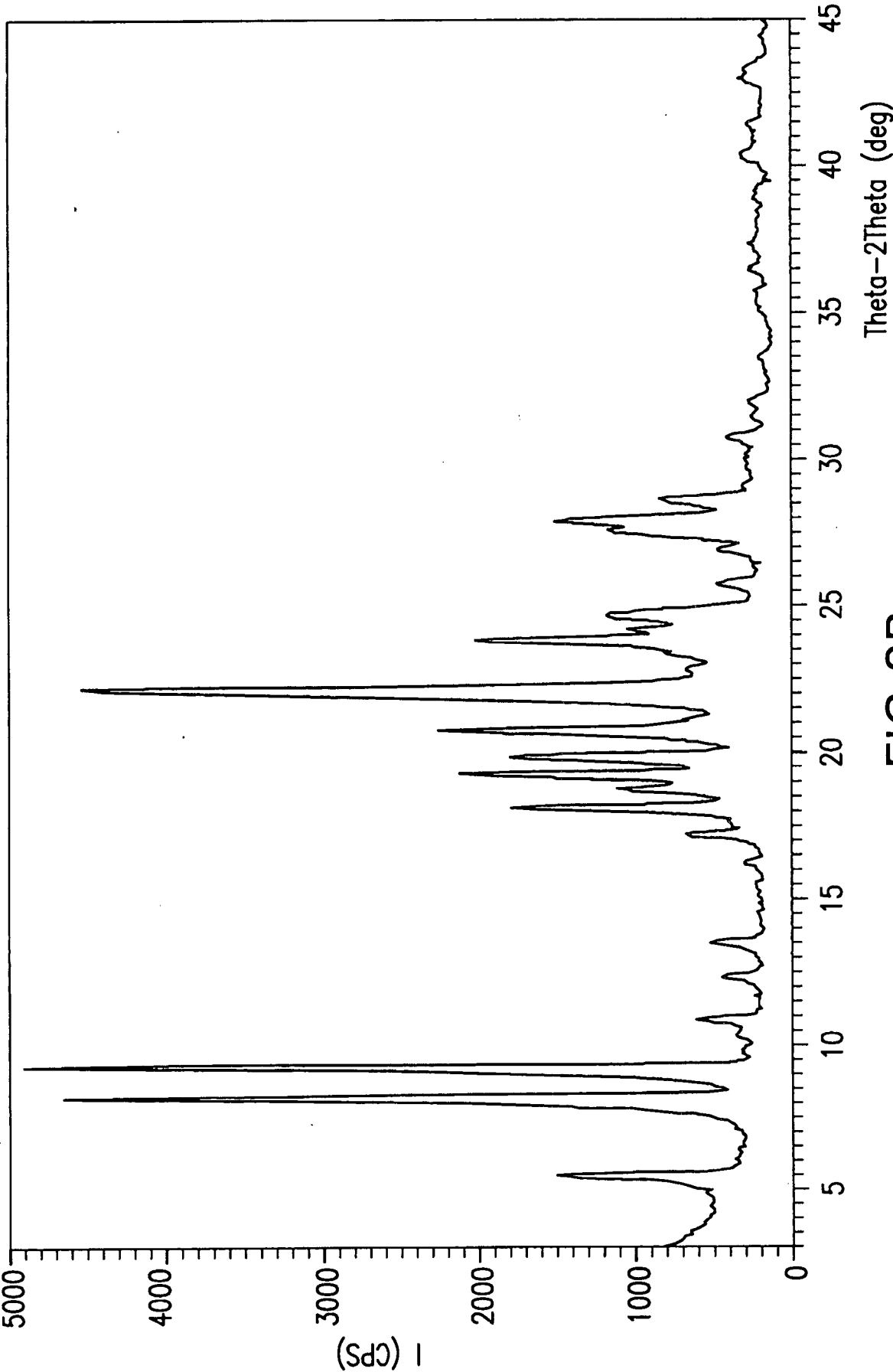


FIG.3B

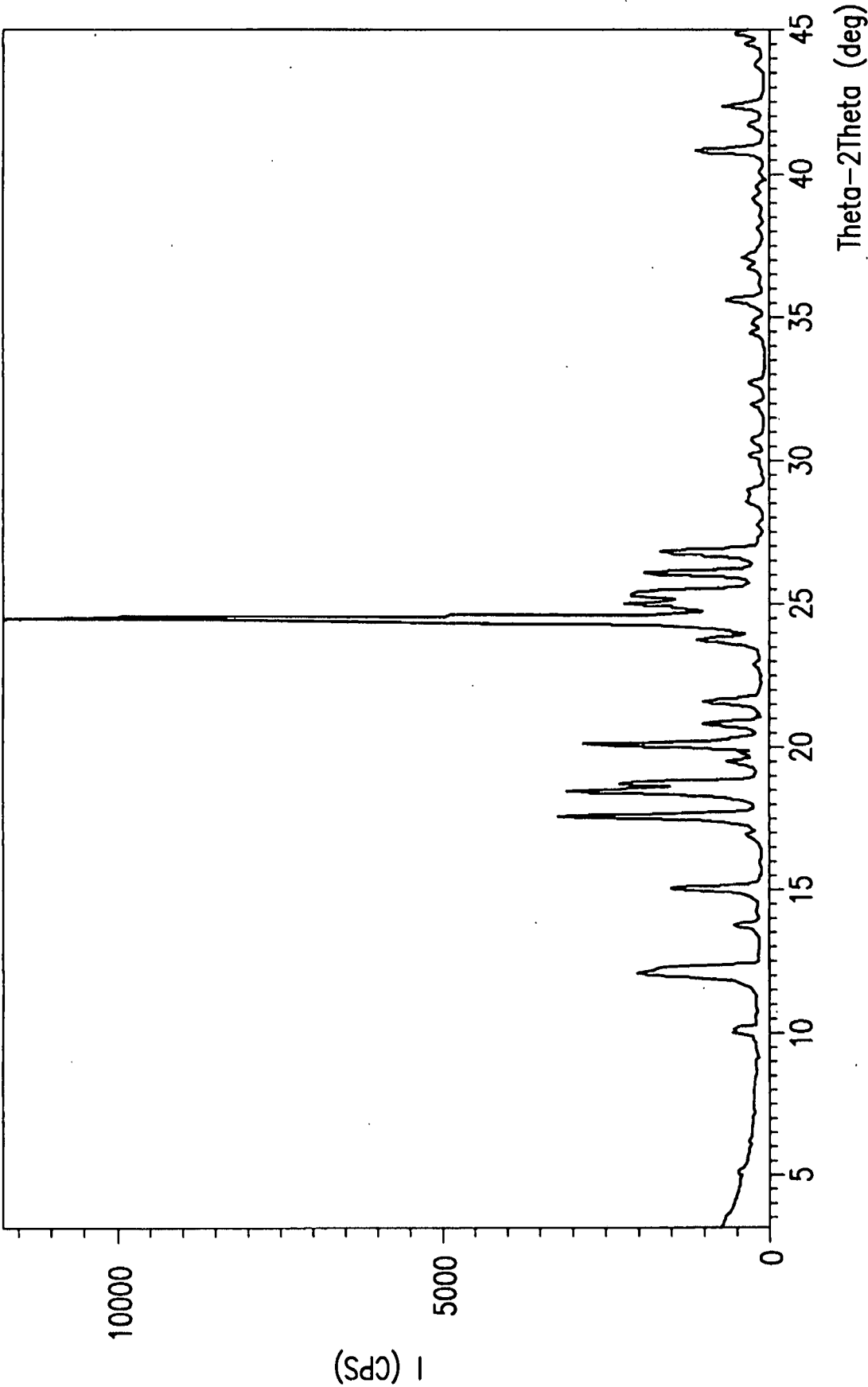


FIG.3C

33

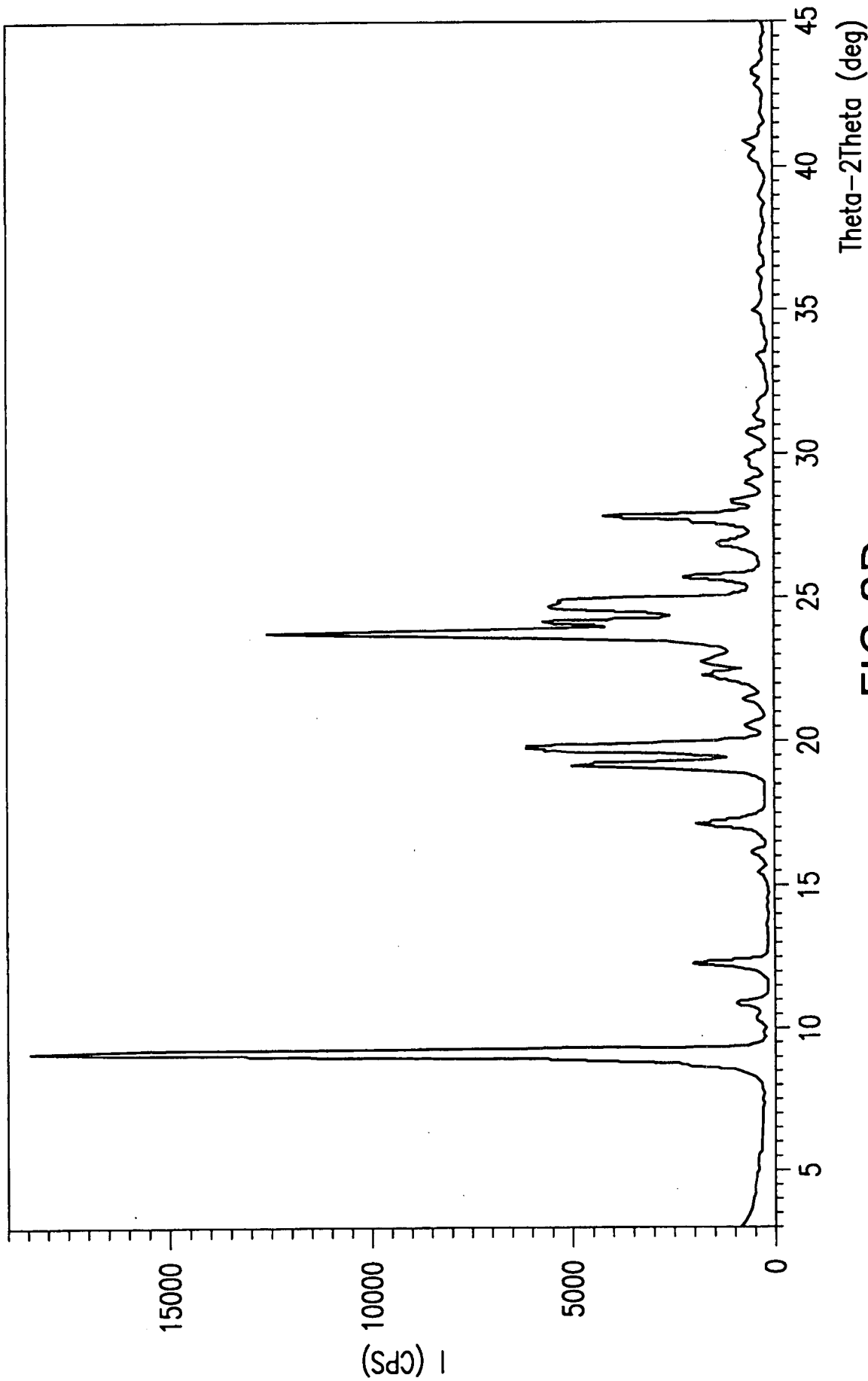


FIG.3D

34

7/7

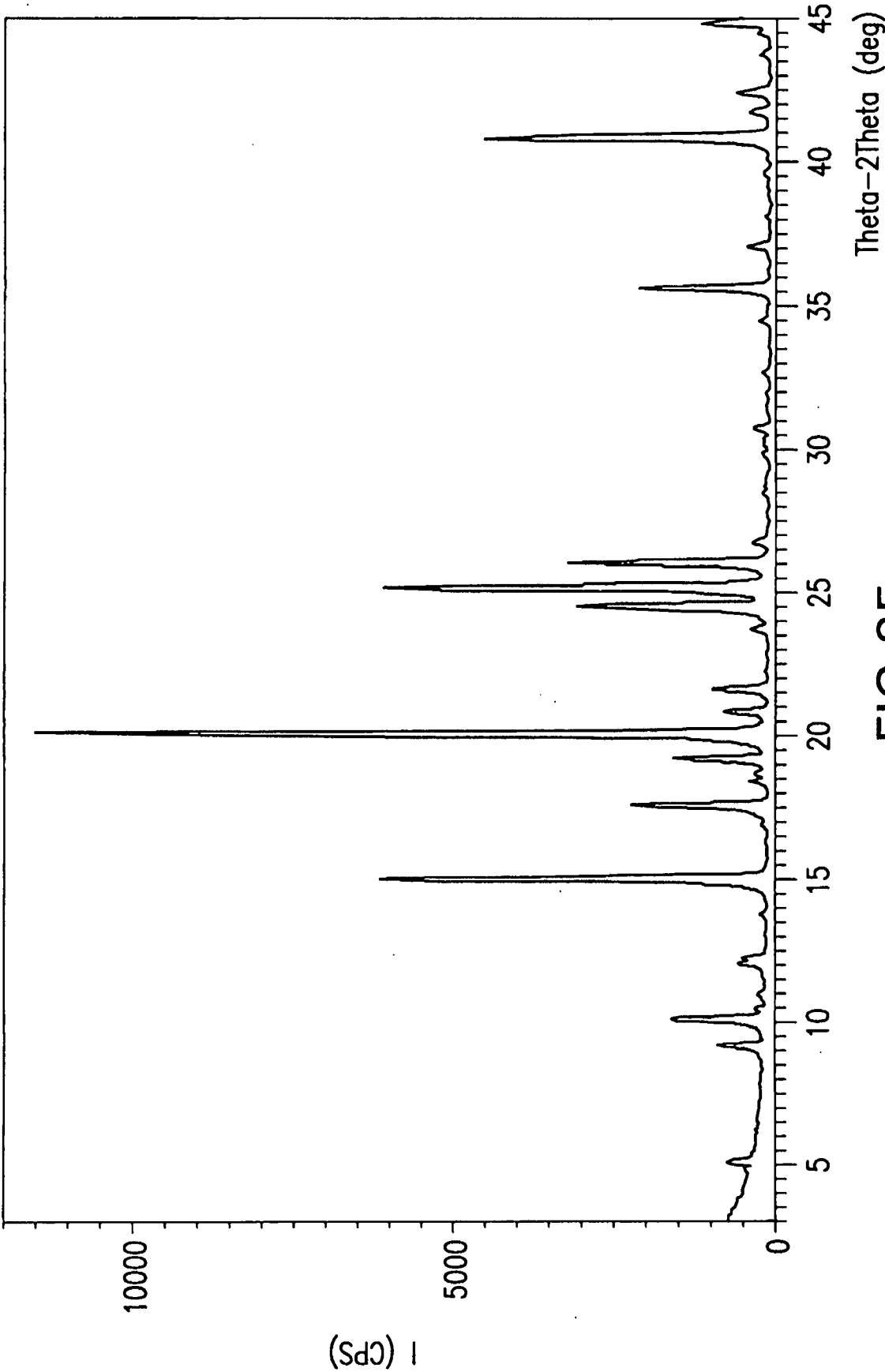


FIG.3E

TITULO DEL INVENTO

COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS DE INHIBIDORES DE LA HDAC Y  
COMPUESTOS METÁLICOS QUELABLES, Y COMPLEJOS QUELADOS

5 METÁLICOS INHIBIDORES DE LA HDAC

CAMPO DEL INVENTO

El presente invento proporciona composiciones farmacéuticas de un inhibidor de la HDAC y un compuesto metálico quelable. En una realización, el invento proporciona un método  
10 de tratar el cáncer y aliviar los efectos secundarios del inhibidor de la HDAC mediante la administración de la composición farmacéutica. En otra realización, el presente invento también proporciona composiciones farmacéuticas de complejos quelados metálicos inhibidores de la HDAC. En otra realización, el invento proporciona métodos de tratar el cáncer mediante la administración de las composiciones farmacéuticas. El invento proporciona composiciones  
15 cristalinas de complejos quelados metálicos inhibidores de la HDAC y métodos para producir las mismas.

FUNDAMENTO DEL INVENTO

A lo largo de esta solicitud varias publicaciones son citadas mediante números arábigos  
20 dentro de paréntesis. Las citas completas para estas publicaciones se pueden encontrar al final de la especificación inmediatamente antes de las reivindicaciones.

El cáncer es un trastorno en el cual una población de células, en grados variables, no responde a los mecanismos de control que normalmente gobiernan proliferación y diferenciación. Durante muchos años han habido dos estrategias principales para tratamiento quimioterapéutico de  
25 cáncer: a) bloquear la proliferación celular tumoral dependiente de hormonas mediante interferencia con la producción o acción periférica de hormonas sexuales; y b) eliminar células de cáncer directamente exponiéndolas a sustancias citotóxicas, lo cual lesiona ambas poblaciones celulares, neoplásicas y normales.

La terapia contra el cáncer también se ha intentado mediante la inducción de  
30 diferenciación terminal de las células neoplásicas (1) . En modelos de cultivos celulares la diferenciación se ha reportado mediante exposición de células a una variedad de estímulos, incluyendo: AMP cíclico y ácido retinóico (2,3) , aclarubicina y otras antraciclinas (4) .

A pesar de los avances en el campo de la oncología, la mayoría de tumores sólidos permanecen incurable en las fases avanzadas. En la mayoría de los casos se utiliza terapia citotóxica, sin embargo, a menudo produce morbilidad significativa al paciente sin beneficio clínico significativo. Se están explorando agentes menos tóxicos y más específicos para tratar y  
5 controlar malignidades avanzadas.

Existe evidencia abundante que la transformación neoplásica no necesariamente destruye el potencial de las células de cáncer para diferenciarse (1,5,6) . Existen muchos ejemplos de células tumorales las cuales no responden a reguladores normales de proliferación y parecen estar bloqueadas en la expresión de su programa de diferenciación, y pueden aún ser inducidas a  
10 diferenciarse y cesar la replicación. Una variedad de agentes, incluyendo algunos compuestos polares relativamente simples (5,7- 9) , derivados de vitamina D y ácido retinóico (10- 12) , hormonas esteroideas (13) , factores de crecimiento (6,14) , proteasas (15,16) , promotores tumorales (17,18) , e inhibidores de ADN o Síntesis de ARN (4,19- 24) , pueden inducir varias líneas celulares transformadas y explantes tumorales humanos primarios para expresar  
15 características más diferenciadas.

Los inhibidores de la histona desacetilasa tales como ácido hidroxámico suberoilánilida (SAHA) , pertenecen a esta clase de agentes que tienen la capacidad para inducir inhibición de crecimiento celular tumoral, diferenciación y/o apoptosis (25) . Estos compuestos son dianizados hacia mecanismos inherentes a la capacidad de una célula neoplásica para volverse maligna,  
20 puesto que no parece que tengan toxicidad en dosis efectivas para inhibición de crecimiento tumoral en animales (26) . Existen varias líneas de evidencia que la acetilación y desacetilación de la histona son mecanismos mediante los cuales se logra la regulación de la transcripción en una célula (27) . Se cree que estos efectos ocurren a través de cambios en la estructura de la cromatina al alterar la afinidad de proteínas de la histona para ADN enrollado en el nucleosoma. Existen  
25 cinco tipos de histonas que se han identificado en los nucleosomas (designados H1, H2A, H2B, H3 y H4) . Cada nucleosoma contiene dos de cada tipo de histona dentro de su núcleo, excepto para H1, el cual está presente de manera única en la porción externa de la estructura de nucleosoma. Se cree que cuando las proteínas de la histona son hipoacetiladas, existe una mayor afinidad de la histona al esqueleto azúcar- fosfato del ADN. Esta afinidad hace que el ADN se  
30 una de manera más fuerte a la histona y hace el ADN inaccesible a elementos y maquinaria reguladora de la transcripción. La regulación de estados acetilados ocurre mediante el balance de

actividad entre dos complejos enzimáticos, histona acetiltransferasa (HAT) e histona desacetilasa (HDAC) . Se cree que el estado hipoacetilado inhibe la transcripción de ADN asociado. Este estado hipoacetilado es catalizado mediante grandes complejos multiprotéicos que incluyen enzimas de la HDAC. En particular, se ha mostrado que las HDACs catalizan el retiro de grupos acetilo a partir de las histonas de núcleo de cromatina.

Se ha mostrado que SAHA (ZOLINZA <sup>TM</sup> (vorinostat) ) es útil para tratar cáncer, selectivamente induciendo diferenciación terminal de células neoplásicas, induciendo inhibición de crecimiento celular y/o induciendo apoptosis. Se cree que la inhibición de la HDAC mediante SAHA ocurre mediante interacción directa con el sitio catalítico de la enzima como se demostró mediante estudios de cristalografía de rayos- X (28) . No se cree que el resultado de la inhibición de la HDAC tenga un efecto generalizado sobre el genoma, pero preferiblemente, solamente afecta un pequeño subgrupo del genoma (29) . Evidencia proporcionada mediante microconjuntos de ADN utilizando líneas celulares malignas cultivadas con un inhibidor de la HDAC muestra que existe un número finito de genes (1- 2%) cuyos productos son alterados. Por ejemplo, las células tratadas en cultivo con inhibidores de la HDAC muestran una inducción consistente del inhibidor de quinasa p21 dependiente de ciclina (30) . Esta proteína juega un papel importante en inhibición de ciclo celular. Se cree que los inhibidores de la HDAC aumentan la tasa de transcripción de p21 al propagar el estado hiperacetilado de las histonas en la región del gen p21, haciendo así el gen accesible a maquinaria transcripcional. Los genes cuya expresión no es afectada por inhibidores de la HDAC no presentan cambios en la acetilación de las histonas asociadas regionales (31) .

## RESUMEN DEL INVENTO

El presente invento proporciona composiciones farmacéuticas de un inhibidor de la HDAC y un compuesto metálico quelable. En una realización, el invento proporciona un método de tratar cáncer y aliviar los efectos secundarios del inhibidor de la HDAC mediante la administración de la composición farmacéutica. En otra realización, el presente invento también proporciona composiciones farmacéuticas de complejos quelados metálicos inhibidores de la HDAC. En otra realización, el invento proporciona métodos de tratar cáncer mediante la administración de las composiciones farmacéuticas. El invento proporciona composiciones cristalinas de complejos quelados metálicos inhibidores de la HDAC y métodos para producir las

mismas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS ILUSTRACIONES

**FIG. 1** La Figura 1 muestra el perfil de disolución de SAHA a partir del lote de cápsulas de referencia. Las cápsulas contienen 100 mg aproximadamente del ingrediente activo SAHA y excipientes.

**FIG. 2** La Figura 2 muestra el difractograma de rayos- X para el complejo quelado SAHA férrico cristalino.

**FIG. 3** La Figura 3 muestra difractogramas de rayos- x para SAHA medidos con un Difractómetro de Polvo Automatizado Siemens D500. Fig 3A- E: Forma SAHA I- V.

**FIG. 4** La Figura 4 muestra difractogramas de rayos- x para Forma SAHA I medidos con un Difractómetro de rayos- X X'PERT Pro Phillips.

DESCRIPCION DETALLADA DEL INVENTO

El término "portador farmacéuticamente aceptable" tiene la intención de incluir cualquiera y todos los solventes, medios de dispersión, revestimientos, agentes antibacterianos y antimicóticos, agentes retardantes isotónicos y de absorción, y similares, compatibles con administración farmacéutica. Los portadores apropiados son descritos en la edición más reciente de Remington's Pharmaceutical Sciences, un texto de referencia estándar en el campo, el cual el cual se incorpora en la presente como referencia. También se pueden utilizar liposomas y vehículos no acuosos tales como aceites fijos. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido en el estado de la técnica. Excepto que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con las composiciones de este invento, se contempla el uso de los mismos en las composiciones. También se pueden incorporar compuestos activos suplementarios en las composiciones.

El término "f2" o "F2" se refiere a un factor de similitud determinado mediante una comparación de punto por punto de un nuevo perfil de disolución in vitro con un perfil de disolución in vitro de referencia, como se muestra en la ecuación 1.

$$f_2 = 50 \log \left\{ \left[ 1 + 1/n \sum_{i=1}^n (R_i - T_i)^2 \right]^{-0.5} \times 100 \right\} \quad (\text{Ecuación 1})$$

$R_t$  se refiere al porcentaje de compuesto disuelto en cada punto de tiempo (t) para la referencia.  $T_t$  se refiere al porcentaje de compuesto disuelto en cada punto de tiempo (t) para la muestra de prueba,  $n$  se refiere al número de puntos de tiempo utilizados para el cálculo, se considera que valores de 50 o mayores reflejan tasas de disolución *in vitro* similares. Para el propósito de este

invento, las tasas de disolución o perfiles *in vitro* del SAHA entera de la composición farmacéutica se miden a partir de la composición farmacéutica entera según los pasos y condiciones en el Ejemplo 4. En una realización, tasas de disolución o perfiles *in vitro* se miden mediante el uso de un Aparato de Disolución USP II con un *sinker* helicoidal (Quality Lab Accessories L.L.C., Manville, NJ) en 900 mL de 2.0% Tween (TCI America, Portland, Oregon) a una temperatura de  $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ , y paletas giradas a 100 rpm. La composición farmacéutica entera incluye el SAHA entero y el compuesto metálico quelable y si la composición farmacéutica contiene una envoltura de cápsula, portador, excipiente, diluyente, agente desintegrante, lubricante, aglomerante o cualquier agente adicional descrito en la Sección de Composiciones Farmacéuticas a continuación, la medición es realizada con estos componentes.

El término "aproximadamente" cuando se utiliza en el contexto de una cantidad se refiere a  $\pm 10\%$  de la cantidad especificada.

Para el propósito de este invento, para Patrones de difracción de rayos- x, dependiendo de la calibración, muestra o instrumentación, picos a  $2\theta$  pueden cambiar hasta  $\pm 0.3$  grados (error) en una dirección. Por ejemplo, todos los picos en el patrón de difracción de rayos- x cambian hasta  $+0.3$  grados, o hasta  $-0.3$  grados. Un patrón de difracción de rayos X o picos dentro de ese error se considera igual o sustancialmente similar.

#### Composición farmacéutica que comprende Inhibidor de la HDAC y Compuesto metálico quelable

En una realización, el invento proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de inhibidor de la histona desacetilasa (HDAC) y un compuesto metálico quelable, y un portador farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica puede formar el complejo quelado metálico inhibidor de la HDAC *in vivo* cuando se administra al sujeto.

En una realización, el inhibidor de la HDAC es un derivado de ácido hidroxámico. En otra realización, el inhibidor de la HDAC tiene un ligando de fijación metálica (es decir hierro o

zinc) , por ejemplo grupo carbonilo, grupo hidroxilo, grupo amino, grupo tiol, grupo amida, y otros grupos encontrados en inhibidores de la HDAC conocidos (ej., Benzamida) . En una realización, el inhibidor de la HDAC es ácido hidroxámico suberoilánilida (SAHA) o sal o hidrato o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo. En otra realización, el SAHA entero en la composición farmacéutica tiene un perfil de disolución *in vitro* con un factor de similitud (f2) de al menos 50 a 100 en comparación con el perfil de disolución de referencia mostrado en la Figura 1. En una realización, f2 es 56 a 100. En una realización, f2 es 60 a 100. En una realización, f2 es 65 a 100. En otra realización, f2 es 80 a 100. En una realización adicional, la composición farmacéutica es una única capsula, en donde la cantidad del SAHA es aproximadamente 100 mg.

En una realización, el SAHA entero en la composición farmacéutica es 43- 63% disuelto en 10 minutos, 66- 86% disuelto en 30 minutos, y 77- 97% disuelto en 60 minutos *in vitro*. En una realización, el SAHA entero de la composición farmacéutica es 52- 72% disuelto en 15 minutos, 66- 86% disuelto en 30 minutos, y 73- 93% disuelto en 45 minutos *in vitro*. En otra realización, el SAHA entero de la composición farmacéutica es 43- 63% disuelto en 10 minutos, 52- 72% disuelto en 15 minutos, 58- 78% disuelto en 20 minutos, 66- 86% disuelto en 30 minutos, 73- 93% disuelto en 45 minutos y 77- 97% disuelto en 60 minutos *in vitro*. En una realización, el SAHA entero de la composición farmacéutica es 46- 60% disuelto en 10 minutos, 55- 69% disuelto en 15 minutos, 61- 75% disuelto en 20 minutos, 69- 83% disuelto en 30 minutos, 76- 90% disuelto en 45 minutos, y 80- 94% disuelto en 60 minutos *in vitro*. En una realización, al menos 45% pero menos o igual a 75% del SAHA entero es disuelto en 15 minutos, al menos 75% del SAHA entero es disuelto en 60 minutos.

El inhibidor de la HDAC o compuesto metálico quelable puede estar en forma amorfa. El inhibidor de la HDAC o compuesto metálico quelable puede ser micronizado, o puede ser aglomerado, gránulos particulados, polvos, aceites, suspensiones aceitosas o cualquier otra forma de sólido.

En un particular realización, el inhibidor de la HDAC es ácido hidroxámico suberoilánilida cristalino. En una realización, el SAHA cristalino es SAHA Forma I y se caracteriza mediante un Patrón de difracción de rayos X sustancialmente similar a aquel divulgado en la Figura 3A. En otra realización, el SAHA cristalino es SAHA Forma I y se caracteriza mediante un patrón de difracción de rayos- x sustancialmente similar a aquel

divulgado en Figura 4. En una realización, el SAHA Forma I se caracteriza mediante un patrón de difracción de polvo de rayos x con radiación  $K\alpha$  del cobre incluyendo picos característicos en 9.0, 9.4, 17.5, 19.4, 20.0, 24.0, 24.4, 24.8, 25.0, 28.0 grados  $2\theta$ . En otra realización, SAHA Forma I se caracteriza mediante un patrón de difracción de polvo de rayos x con radiación  $K\alpha$  del cobre, incluyendo picos característicos a aproximadamente 9.0, 9.4, 17.5, 19.4, 20.0, 24.0, 24.4, 24.8, 25.0, 28.0, y 43.3 grados  $2\theta$ . En una realización, el SAHA Forma I se caracteriza mediante un patrón de polvo de difracción de rayos x con radiación  $K\alpha$  del cobre, incluyendo picos característicos en 9.4, 17.5, 19.4, 20.0, 24.0, y 28.0 grados  $2\theta$ . En otra realización, el ácido hidroxámico suberoilánilida (SAHA) Forma I se caracteriza mediante un Patrón de difracción de polvo de rayos x incluyendo picos característicos a aproximadamente 9.4, 17.5, 19.4, 20.0, 24.0, y 28.0 grados  $2\theta$ , en donde la difracción de polvo de rayos- X se mide con una fuente de rayos X del cobre; y se caracteriza además por un termograma de Calorimetría de Barrido Diferencial (DSC) con un valor máximo único en aproximadamente  $164.4 \pm 2.0$ , como se midió mediante un Instrumento Perkins Elmer DSC 6. En otra realización, el ácido hidroxámico suberoilánilida (SAHA) Forma I se caracteriza por un Patrón de difracción de polvo de rayos x incluyendo picos característicos a aproximadamente 9.4, 17.5, 19.4, 20.0, 24.0, y 28.0 grados  $2\theta$ , y careciendo de picos a aproximadamente 13.4- 14.0 y 22.7- 23.0 grados  $2\theta$ , en donde la difracción de polvo de rayos- X se mide con una fuente de rayos X del cobre. En una realización adicional, el ácido hidroxámico suberoilánilida Forma I se caracteriza por un patrón de difracción de polvo de rayos x incluyendo picos característicos a 9.1, 10.8, 12.3, 17.2, 19.2, 19.8, 23.7, 24.1, 25.7, 26.8 y 27.7 grados  $2\theta$  y careciendo de picos a 13.4- 14.0 y 22.7- 23.0 grados  $2\theta$  utilizando una fuente de rayos X del cobre.

En una realización, el SAHA Forma I se caracteriza por un patrón de difracción de polvo de rayos X con radiación  $K\alpha$  del cobre, incluyendo picos característicos a 9.0, 9.4, 17.5, 19.4, 20.0, 24.0, 24.4, 24.8, 25.0, 28.0 grados  $2\theta$ , y careciendo de picos a 13.4- 14.0 y 22.7- 23.0 grados  $2\theta$ . En otra realización, SAHA Forma I se caracteriza por un patrón de difracción de polvo de rayos X con radiación  $K\alpha$  del cobre, incluyendo picos característicos a 9.0, 9.4, 17.5, 19.4, 20.0, 24.0, 24.4, 24.8, 25.0, 28.0, 43.3 grados  $2\theta$  y careciendo de picos a 13.4- 14.0 y 22.7- 23.0 grados  $2\theta$ . En una realización adicional, SAHA Forma I adicionalmente se caracteriza por la falta de al menos un pico en aproximadamente <8.7, 10.0- 10.2, 13.4- 14.0, 15.0- 15.2, 17.5- 19.0, 20.1-

20.3, 21.1- 21.3, 22.0.- 22.22, 22.7- 23.0, 25.0- 25.5, 26.0- 26.2, y 27.4- 27.6 grados  $2\theta$ .

En otra realización, SAHA Forma I se caracteriza además por un termograma de Calorimetría de Barrido Diferencial (DSC) con un valor máximo único en aproximadamente  $164.4 \pm 2.0$ , como se midió mediante un Instrumento Perkins Elmer DSC 6. En una realización, SAHA Forma I tiene parámetros celulares unitarios de  $a = 10.9 \text{ \AA}$ ,  $b = 7.9 \text{ \AA}$ ,  $c = 16.4 \text{ \AA}$ ,  $\alpha = 90^\circ$ ,  $\beta = 97.8^\circ$ ,  $\gamma = 90^\circ$ , grupo espaciador  $P2_1/n$ .

En una realización particular, el ácido hidroxámico suberoilánilida cristalino es SAHA Forma IV y se caracteriza por un patrón de difracción de polvo de rayos x con radiación  $K\alpha$  del cobre, incluyendo picos característicos a aproximadamente 8.8, 9.3, 11.0, 12.4, 17.4, 19.4, 19.9, 22.4, 22.9, 23.83, 24.2, 24.8, 25.8, 27.0, 27.8, 28.4 grados  $2\theta$ .

En una realización, el invento proporciona una única capsula que comprende aproximadamente 100 mg de ácido hidroxámico suberoilánilida, y el compuesto metálico quelable, en donde el SAHA entero tiene un perfil de disolución in vitro caracterizado por: al menos 45% pero menos o igual a 75% del SAHA entero es disuelto en 15 minutos, al menos 75% del SAHA entero es disuelto en 60 minutos, en donde el SAHA es cristalino y caracterizado por un patrón de difracción de polvo de rayos x con radiación  $K\alpha$  del cobre, incluyendo picos característicos en 9.0, 9.4, 17.5, 19.4, 20.0, 24.0, 24.4, 24.8, 25.0, 28.0 grados  $2\theta$ , y careciendo de picos en 13.4- 14.0 y 22.7- 23.0 grados  $2\theta$ .

En una realización, el invento proporciona una única capsula que comprende aproximadamente 100 mg de ácido hidroxámico suberoilánilida, y el compuesto metálico quelable, en donde el SAHA entero tiene un perfil de disolución in vitro caracterizado por: al menos 45% pero menos o igual a 75% del SAHA entero es disuelto en 15 minutos, al menos 75% del SAHA entero es disuelto en 60 minutos, en donde el SAHA es cristalino y caracterizado por un patrón de difracción de polvo de rayos x con radiación  $K\alpha$  del cobre, incluyendo picos característicos en 9.4, 17.5, 19.4, 20.0, 24.0, y 28.0 grados  $2\theta$ , en donde la Difracción de rayos X se mide con una fuente de rayos X del cobre; y se caracteriza además por un termograma de Calorimetría de Barrido Diferencial (DSC) con un valor máximo único en aproximadamente  $164.4 \pm 2.0$ , como se midió mediante un Instrumento Perkins Elmer DSC 6.

En una realización, el invento proporciona una única capsula que comprende aproximadamente 100 mg de ácido hidroxámico suberoilánilida, y el compuesto metálico quelable, en donde el SAHA entero tiene un perfil de disolución in vitro caracterizado por: al

menos 45% pero menos o igual a 75% del SAHA entero es disuelto en 15 minutos, al menos 75% del SAHA entero es disuelto en 60 minutos, en donde el SAHA es cristalino y caracterizado por un Patrón de difracción de polvo de rayos X con radiación  $K\alpha$  del cobre, incluyendo picos característicos a 9.1, 10.8, 12.3, 17.2, 19.2, 19.8, 23.7, 24.1, 25.7, 26.8 y 27.7 grados  $2\theta$  y careciendo de picos a 13.4- 14.0 y 22.7- 23.0 grados  $2\theta$  utilizando una fuente de rayos X del cobre.

En otra realización, el invento proporciona una única capsula que comprende aproximadamente 100 mg de ácido hidroxámico suberoilánilida, y el compuesto metálico quelable, en donde el SAHA entero tiene un perfil de disolución in vitro con un factor de similitud ( $f_2$ ) de al menos 50 a 100 en comparación con el perfil de disolución de referencia mostrado en Figura 1, en donde el SAHA es cristalino y caracterizado por un Patrón de difracción de polvo de rayos x con radiación  $K\alpha$  del cobre, incluyendo picos característicos a 9.0, 9.4, 17.5, 19.4, 20.0, 24.0, 24.4, 24.8, 25.0, 28.0 grados  $2\theta$ , y careciendo de un pico a 13.4- 14.0 y 22.7- 23.0 grados  $2\theta$ .

En otra realización, el invento proporciona una única capsula que comprende aproximadamente 100 mg de ácido hidroxámico suberoilánilida, y el compuesto metálico quelable, en donde el SAHA entero tiene un perfil de disolución in vitro con un factor de similitud ( $f_2$ ) de al menos 50 a 100 en comparación con el perfil de disolución de referencia mostrado en Figura 1, en donde el SAHA es cristalino y caracterizado por un Patrón de difracción de polvo de rayos x con radiación  $K\alpha$  del cobre, incluyendo picos característicos a 9.4, 17.5, 19.4, 20.0, 24.0, y 28.0 grados  $2\theta$ , en donde la Difracción de rayos X se mide con una fuente de rayos X del cobre; y se caracteriza además por un termograma de Calorimetría de Barrido Diferencial (DSC) con un valor máximo único en aproximadamente  $164.4 \pm 2.0$ , como se midió mediante un Instrumento Perkins Elmer DSC 6.

En otra realización, el invento proporciona una única capsula que comprende aproximadamente 100 mg de ácido hidroxámico suberoilánilida, y el compuesto metálico quelable, en donde el SAHA entero tiene un perfil de disolución in vitro con un factor de similitud ( $f_2$ ) de al menos 50 a 100 en comparación con el perfil de disolución de referencia mostrado en Figura 1, en donde el SAHA es cristalino y caracterizado por un Patrón de difracción de polvo de rayos X con radiación  $K\alpha$  del cobre, incluyendo picos característicos a 9.1, 10.8, 12.3, 17.2, 19.2, 19.8, 23.7, 24.1, 25.7, 26.8 y 27.7 grados  $2\theta$  y careciendo de picos a 13.4- 14.0 y 22.7- 23.0 grados  $2\theta$  utilizando una fuente de rayos X del cobre.

En una realización adicional, el invento proporciona una única capsula que comprende aproximadamente 100 mg de ácido hidroxámico suberoilánilida, y el compuesto metálico quelable, en donde el SAHA entero tiene un perfil de disolución in vitro caracterizado por 43-63% disuelto en 10 minutos, 66- 86% disuelto en 30 minutos, y 77- 97% disuelto en 60 minutos, en donde el SAHA es cristalino y caracterizado por un patrón de difracción de polvo de rayos x con radiación  $K\alpha$  del cobre, incluyendo picos característicos a 9.0, 9.4, 17.5, 19.4, 20.0, 24.0, 24.4, 24.8, 25.0, 28.0 grados  $2\theta$ , y careciendo de un pico a 13.4- 14.0 y 22.7- 23.0 grados  $2\theta$ .

En una realización adicional, el invento proporciona una única capsula que comprende aproximadamente 100 mg de ácido hidroxámico suberoilánilida, y el compuesto metálico quelable, en donde el SAHA entero tiene un perfil de disolución in vitro caracterizado por 43-63% disuelto en 10 minutos, 66- 86% disuelto en 30 minutos, y 77- 97% disuelto en 60 minutos, en donde el SAHA es cristalino y caracterizado por un Patrón de difracción de polvo de rayos x con radiación  $K\alpha$  del cobre, incluyendo picos característicos a 9.4, 17.5, 19.4, 20.0, 24.0, y 28.0 grados  $2\theta$ , en donde la Difracción de rayos X se mide con una fuente de rayos X del cobre; y se caracteriza además por un Termograma de Calorimetría de Barrido Diferencial (DSC) con un valor máximo único en aproximadamente  $164.4 \pm 2.0$ , como se midió mediante un Instrumento Perkins Elmer DSC 6.

En una realización adicional, el invento proporciona una única capsula que comprende aproximadamente 100 mg de ácido hidroxámico suberoilánilida, y el compuesto metálico quelable, en donde el SAHA entero tiene un perfil de disolución in vitro caracterizado por 43-63% disuelto en 10 minutos, 66- 86% disuelto en 30 minutos, y 77- 97% disuelto en 60 minutos, en donde el SAHA es cristalino y caracterizado por un patrón de difracción de polvo de rayos x con radiación  $K\alpha$  del cobre, incluyendo picos característicos a 9.1, 10.8, 12.3, 17.2, 19.2, 19.8, 23.7, 24.1, 25.7, 26.8 y 27.7 grados  $2\theta$  y careciendo de picos a 13.4- 14.0 y 22.7- 23.0 grados  $2\theta$  utilizando una fuente de rayos X del cobre.

En una realización adicional, el invento proporciona una única capsula que comprende aproximadamente 100 mg de ácido hidroxámico suberoilánilida, y el compuesto metálico quelable, en donde el SAHA entero tiene un perfil de disolución in vitro caracterizado por 43-63% disuelto en 10 minutos, 66- 86% disuelto en 30 minutos, y 77- 97% disuelto en 60 minutos, en donde el SAHA es cristalino y caracterizado por un patrón de difracción de polvo de rayos x con radiación  $K\alpha$  del cobre, incluyendo picos característicos a 9.0, 9.4, 17.5, 19.4, 20.0, 24.0,

24.4, 24.8, 25.0, 28.0 grados 2θ, y careciendo de picos a 13.4- 14.0 y 22.7- 23.0 grados 2θ.

En una realización, el compuesto metálico quelable comprende hierro. El compuesto férrico puede estar en cualquier forma biodisponible al paciente que forma el complejo quelado férrico inhibidor de la HDAC in situ, por ejemplo, una forma de composición farmacéutica tal como tableta o capsula. En una realización, el compuesto férrico es un suplemento férrico en la forma de gluconato ferroso, gluconato férrico, sulfato ferroso, sulfato férrico, fumarato ferroso, fumarato férrico, hierro quelado con aminoácidos o bis- glicinato férrico. El suplemento férrico también puede contener otras vitaminas y minerales. En otra realización, el inhibidor de la HDAC y hierro en la composición farmacéutica está a una tasa estequiométrica 5:1, 4:1, 3:1, 2:1, 1:1, o 2:1. En una realización, la composición farmacéutica comprende aproximadamente 100 mg de SAHA y aproximadamente 1 a 10 equivalentes molares de suplemento férrico. En otra realización, la composición farmacéutica comprende aproximadamente 150 mg de SAHA y aproximadamente 1 a 10 equivalentes molares de suplemento férrico. En una realización adicional, la composición farmacéutica comprende aproximadamente 200 mg de SAHA y aproximadamente 1 a 10 equivalentes molares de suplemento férrico. En una realización alternativa, la composición farmacéutica comprende aproximadamente 50 mg de SAHA y aproximadamente 1 a 10 equivalentes molares de suplemento férrico. En una realización, el compuesto metálico quelable comprende zinc. El compuesto de zinc puede estar en cualquier forma biodisponible al paciente y forma el complejo quelado de zinc inhibidor de la HDAC in situ, por ejemplo, en forma de composición farmacéutica tal como tableta o cápsula. En una realización, el compuesto de zinc es un suplemento de zinc en la forma de gluconato de zinc, picolinato de zinc, citrato de zinc, quelado de aminoácido de zinc u óxido de zinc. El suplemento de zinc también puede contener otras vitaminas y minerales. En otra realización, el SAHA y zinc en la composición farmacéutica está a una proporción estequiométrica de 5:1, 4:1, 3:1, 2:1, 1:1, o 2:1 de SAHA a zinc. En una realización, la composición farmacéutica comprende aproximadamente 100 mg de SAHA y aproximadamente 1 a 10 equivalentes molares de suplemento de zinc. En otra realización, la composición farmacéutica comprende aproximadamente 150 mg de SAHA y aproximadamente 1 a 10 equivalentes molares de suplemento de zinc. En una realización adicional, la composición farmacéutica comprende aproximadamente 200 mg de SAHA y aproximadamente 1 a 10 equivalentes molares de suplemento de zinc.

### Composiciones Farmacéuticas que comprenden Complejo Quelado Metálico Inhibidor de la HDAC

En una realización, el invento proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de complejo quelado metálico inhibidor de la HDAC o hidrato o solvato del mismo y un portador farmacéuticamente aceptable.

El complejo quelado metálico inhibidor de la HDAC puede estar en forma amorfa. El complejo metálico de inhibidor de la HDAC puede ser cristalino, micronizado, o puede ser gránulos aglomerados, particulados, polvos, aceites, suspensiones aceitosas o cualquier otra forma de sólido. El complejo quelado metálico inhibidor de la HDAC o hidrato o solvato del mismo puede estar en cualquier forma cristalina. En una realización, el inhibidor de la HDAC es un derivado de ácido hidroxámico. En una realización, el inhibidor de la HDAC es SAHA.

En una realización, el invento proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de complejo quelado férrico SAHA o hidrato o solvato del mismo y un portador farmacéuticamente aceptable. En una realización, la proporción de hierro a SAHA es 1:3, 1:2 o 1:1.

En una realización, el complejo quelado de SAHA férrico es cristalino, y se caracteriza mediante un Patrón de difracción de rayos- x sustancialmente similar a aquel divulgado en Figura 1. En otra realización, el complejo quelado de SAHA férrico se caracteriza mediante un Patrón de difracción de polvo de rayos x con radiación  $K\alpha$  del cobre, incluyendo picos característicos a 8.8, 14.5 y 21.8 grados  $2\theta$ . En una realización adicional, el complejo quelado de SAHA férrico se caracteriza por un patrón de difracción de polvo de rayos X con radiación  $K\alpha$  del cobre, incluyendo picos característicos a 8.8, 13.3, 14.5, 20.3, 21.8 y 24.6 grados  $2\theta$ . En una realización adicional, el complejo quelado de SAHA férrico se caracteriza por un Patrón de difracción de polvo de rayos x con radiación  $K\alpha$  del cobre, incluyendo picos característicos a 8.8, 13.3, 14.5, 18.5, 20.3, 21.8, 24.6, 25.8 y 33.3 grados  $2\theta$ .

En otra realización, el invento también proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de complejo quelado de SAHA de zinc o hidrato o solvato del mismo y un portador farmacéuticamente aceptable. En una realización, la proporción de zinc a SAHA es 1:3, 1:2 o 1:1.

El invento también contempla composiciones farmacéuticas que comprenden hidratos o

21

solvatos del complejo quelado metálico inhibidor de la HDAC o SAHA. El término "hidrato" incluye pero no está limitado a hemihidrato, monohidrato, dihidrato, trihidrato y similares.

Composiciones farmacéuticas

5 El portador farmacéuticamente aceptable en las composiciones farmacéuticas puede estar en forma de partículas sólidas. Cualquier excipiente inerte que comúnmente se utiliza como un portador o diluyente se puede utilizar en las formulaciones del presente invento, tales como por ejemplo, una goma, un almidón, un azúcar, un material celulósico, un acrilato, o mezclas de los mismos. En una realización, el diluyente es celulosa microcristalina. Las composiciones del  
10 presente invento (por ejemplo, inhibidor de la HDAC; compuesto metálico quelable; inhibidor de la HDAC y compuesto metálico quelable; o complejo quelado metálico inhibidor de la HDAC) pueden además comprender un agente desintegrante (e.j., sodio de croscarmelosa) y un lubricante (ej., estearato de magnesio) , y además pueden comprender uno o más aditivos seleccionados a partir de un aglomerante, un amortiguador, un inhibidor de proteasa, un  
15 surfactante, un agente solubilizante, un plastificante, un emulsificador, un agente solubilizante, un agente mejorador de viscosidad, un endulzante, un agente formador de película, o cualquier combinación de los mismos. Además, las composiciones del presente invento puede estar en la forma de formulaciones de liberación controlada o liberación inmediata.

En una realización, la composición farmacéutica descrita en la presente además puede  
20 estar compuesta de celulosa microcristalina, sodio de croscarmelosa y estearato de magnesio. El porcentaje de las composiciones de este invento y varios excipientes en las formulaciones puede variar. Por ejemplo, la composición farmacéutica puede comprender entre 20 y 90% aproximadamente, entre 50- 80% aproximadamente o entre 60- 70% aproximadamente por peso de las composiciones de este invento. Además, la composición farmacéutica puede comprender  
entre 10 y 70% aproximadamente, entre 20- 40% aproximadamente, entre 25- 35% aproximadamente por peso de celulosa microcristalina como un portador o diluyente. Además, la  
composición farmacéutica puede comprender entre 1 y 30% aproximadamente, entre 1- 10% aproximadamente, entre 2- 5% aproximadamente por peso de sodio de croscarmelosa como un  
desintegrante. Además, la composición farmacéutica puede comprender entre 0.1- 5%  
30 aproximadamente o 0.5- 1.5% aproximadamente por peso de estearato de magnesio como un lubricante.

En una realización, la composición farmacéutica del invento es aproximadamente 50-80% por peso de las Composiciones de este invento; aproximadamente 20- 40% por peso de celulosa microcristalina; aproximadamente 1- 10% por peso de sodio de croscarmelosa; y aproximadamente 0.1- 5% por peso de estearato de magnesio. En otra realización, la composición farmacéutica del invento es aproximadamente 60- 70% por peso de las Composiciones de este invento; aproximadamente 25- 35% por peso de celulosa microcristalina; aproximadamente 2- 5% por peso de sodio de croscarmelosa; y aproximadamente 0.5- 1.5% por peso de estearato de magnesio. En una realización, la composición farmacéutica descrita comprende aproximadamente 50- 200 mg o 50- 600 mg de SAHA Forma I.

Una realización particular del invento es una formulación sólida de las composiciones de este invento con celulosa microcristalina, NF (Avicel Ph 101) , croscarmelosa de sodio, NF (AC-Di- Sol) y estearato de magnesio, NF, contenida en una cápsula de gelatina. Una realización adicional es una composición farmacéutica que comprende aproximadamente 100 mg de Composiciones de este invento, aproximadamente 44.3 mg de celulosa microcristalina, aproximadamente 4.5 mg de sodio de croscarmelosa, aproximadamente 1.2 mg de estearato de magnesio.

En una realización, las composiciones farmacéuticas se administran de manera oral, y por lo tanto son formuladas en una forma apropiada para administración oral, es decir, como una forma sólida o líquida. Las formulaciones orales sólidas apropiadas incluyen por ejemplo, tabletas, cápsulas, píldoras, gránulos, pellets y similares. Las formulaciones orales líquidas apropiadas incluyen por ejemplo, emulsiones, aceites y similares. En una realización del presente invento, la composición es formulada en un cápsula. Según esta realización, las composiciones farmacéuticas del presente invento comprenden una cápsula de gelatina dura además de las composiciones de este invento y el portador o diluyente inerte. Los portadores/diluyentes sólidos incluyen, pero no se limitan a, una goma, un almidón (ej., almidón de maíz, almidón pregelatinizado) , un azúcar (ej., lactosa, manitol, sacarosa, dextrosa) , una material celulósico (ej., celulosa microcristalina) , un acrilato (ej., polimetilacrilato) , carbonato de calcio, óxido de magnesio, talco, o mezclas de los mismos.

Para formulaciones líquidas, los portadores farmacéuticamente aceptables pueden ser soluciones no acuosas, suspensiones, emulsiones o aceites. Ejemplos de solventes no acuosos son glicol de propileno, glicol de polietileno, y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo.

Ejemplos de aceites son aquellos de origen de petróleo, animal, vegetal, o sintético, por ejemplo, aceite de cacahuete, aceite de semilla de soya, aceite mineral, aceite de oliva, aceite de girasol, y aceite de hígado de bacalao. Las suspensiones también pueden incluir los siguientes componentes: aceites fijos, glicoles de polietileno, glicerina, glicol de propileno u otros solventes sintéticos; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o parabenos de metilo; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; agentes quelantes tales como ácido etilendiaminotetracético (EDTA) .

Además, las composiciones farmacéuticas pueden además comprender aglomerantes (ej., acacia, almidón de maíz, gelatina, carbómero, celulosa de etilo, goma guar, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, povidona) , agentes desintegrantes (ej., almidón de maíz, almidón de papa, ácido algínico, dióxido de silicio, sodio de croscarmelosa, crospovidona, goma guar, glicolato de almidón de sodio, Primogel) , detergentes (ej., Tween 20, Tween 80, Pluronic F68, sales de ácido biliar) , inhibidores de proteasa, surfactantes (ej., laurilsulfato sódico) , mejoradores de permeación, agentes solubilizantes (ej., glicerol, glicerol de polietileno) , un glidante (ej., dióxido de silicio coloidal) , antioxidantes (ej., ácido ascórbico, metabisulfito de sodio, hidroxianisol butilado) , estabilizantes (ej., hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa) , agentes mejoradores de viscosidad (ej., carbómero, dióxido de silicio coloidal, celulosa de etilo, goma guar) , endulzantes (ej., sacarosa, aspartame, ácido cítrico) , agentes saborizantes (ej., menta, salicilato de metilo, o aderezo de naranja) , preservativos (ej., Timerosal, alcohol bencílico, parabenos) , lubricantes (ej., ácido esteárico, estearato de magnesio, glicol de polietileno, laurilsulfato sódico) , promotores del flujo (ej., dióxido de silicio coloidal) , plastificantes (ej., ftalato de dietilo, citrato de trietilo) , emulsificantes (ej., carbómero, hidroxipropilcelulosa, laurilsulfato sódico) , recubrimientos poliméricos (ej., poloxámeros o poloxaminas) , agentes formadores de revestimientos y películas (ej., celulosa de etilo, acrilatos, polimetacrilatos) y/o adyuvantes.

En una realización, las composiciones de este invento se preparan con portadores que protegerán las composiciones contra rápida eliminación desde el cuerpo, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes y sistemas de liberación microencapsulados. Se pueden utilizar polímeros biodegradables, biocompatibles, tales como acetato de vinilo de etileno, polianhidruros, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, y ácido poliláctico. Métodos para la preparación de tales formulaciones serán manifiestos a aquellos con experiencia

en el estado de la técnica. Los materiales también se pueden obtener comercialmente en Alza Corporation y Nova Pharmaceuticals, Inc. También se pueden utilizar suspensiones liposomales (incluyendo liposomas dianizados a células infectadas con anticuerpos monoclonales a agentes virales) como portadores farmacéuticamente aceptables. Estas se pueden preparar según métodos conocidos por aquellos con experiencia en el estado de la técnica, por ejemplo, como describió en Patente Americana No. 4,522,811.

La preparación de las composiciones farmacéuticas que contienen un componente activo se entiende bien en el estado de la técnica, por ejemplo, mediante procesos de mezclado, granulación, o formación de tabletas. Para administración oral, los agentes activos se mezclan con aditivos usuales para este propósito, tales como vehículos, estabilizantes, o diluyentes inertes, y se convierten mediante métodos usuales en formas apropiadas para administración, tales como tabletas, tabletas recubiertas, cápsulas de gelatina dura o suave, soluciones acuosas alcohólicas o aceitosas y similares como se describió en detalle anteriormente.

En una realización, las composiciones orales se formulan en forma unitaria de dosificación para facilidad de administración y uniformidad de dosificación. Forma unitaria de dosificación como se utiliza en la presente se refiere a unidades físicamente discretas apropiadas como dosificaciones unitarias para el sujeto a ser tratado; cada unidad conteniendo una cantidad predeterminada de Composiciones de este invento calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el portador farmacéutico requerido. La especificación para las formas unitarias de dosificación del invento son dictadas por y directamente dependen de las características únicas de las composiciones de este invento y el efecto terapéutico particular a ser logrado, y las limitaciones inherentes al arte de formular tal compuesto activo para el tratamiento de individuos. En ciertas realizaciones, la unidad de dosificación contiene aproximadamente 600 mg, 550 mg, 500 mg, 450 mg, 400 mg, 350 mg, 300 mg, 250 mg, 200 mg, 150 mg, 110 mg, 105 mg, 100 mg, 95 mg, 90 mg, 85 mg, 80 mg, 75 mg, 70 mg, 65 mg, 60 mg, 55 mg, 50 mg, 45 mg, o 40 mg de Composiciones de este invento. En una realización, la cantidad de las composiciones de este invento es aproximadamente 100 mg.

Las composiciones farmacéuticas pueden estar incluidas en un recipiente, paquete, o dispensador junto con instrucciones para administración. En una realización, la composición farmacéutica es una única capsula, en donde la cantidad de las composiciones de este invento es aproximadamente 100 mg. En una realización, la composición farmacéutica es dos cápsulas, en

donde cada cápsula contiene Composiciones de este invento de aproximadamente 50 mg.

Método para Obtener un Complejo quelado metálico inhibidor de la HDAC y Cristalización

El invento también proporciona un método de obtener un complejo quelado metálico inhibidor de la HDAC que comprende el paso de agregar un compuesto metálico quelable y base con el inhibidor de la HDAC en un medio de reacción. En una realización, el medio de reacción es un solvente orgánico o mixture de solvente orgánico y agua. En una realización, el solvente orgánico es etanol. En una realización, el compuesto metálico quelable comprende hierro o zinc. En otra realización, el compuesto metálico quelable, base e inhibidor de la HDAC son solubles en el medio de reacción. En una realización, la base es N,N- diisopropiletilamina o etóxido de sodio. En una realización, el compuesto metálico quelable es cloruro férrico o cloruro de zinc.

El invento también proporciona un método para obtener un complejo quelado metálico inhibidor de la HDAC cristalino que comprende el paso de cristalizar el complejo quelado en un solvente orgánico o en una mezcla de solvente orgánico y agua. En una realización, el metal es zinc o hierro.

En una particular realización, el complejo quelado metálico inhibidor de la HDAC cristalino es cristalizado a partir de un solvente orgánico. El solvente orgánico puede ser un alcohol tal como metanol, etanol o isopropanol. En una realización, el solvente orgánico es uno o más entre metanol, etanol, acetonitrilo, isopropanol y ácido acético. En una realización, el solvente orgánico es etanol. En una realización particular, el solvente orgánico utilizado en el medio de reacción es el mismo que en la cristalización.

En otra realización, la mezcla de solvente orgánico y agua comprende aproximadamente 1- 99% de solvente orgánico y aproximadamente 99- 1% de agua. En otra realización, la mezcla comprende 40- 99% de etanol y 60%- 1% de agua. En una realización, la mezcla comprende aproximadamente 15- 85% de solvente orgánico y aproximadamente 1- 15% de agua. En una realización particular, la mezcla comprende aproximadamente 85% de solvente orgánico y aproximadamente 15% de agua. En otra realización particular, la mezcla comprende 1:1 etanol y agua. En aún otra realización particular, la mezcla comprende 9:1 etanol y agua. Las proporciones o porcentajes de solvente orgánico a agua descritos en la presente son por volumen.

En una particular realización, el solvente orgánico es un alcohol (ej. metanol, etanol, isopropanol y similares) . Sin embargo, debe ser manifiesto a una persona con experiencia en el

estado de la técnica que las cristalizaciones o reacciones descritas en la presente se pueden realizar en solvente o mezclas de solventes apropiados las cuales puedan ser fácilmente seleccionadas por alguien con experiencia en el estado de la técnica de síntesis orgánica. Tales solventes orgánicos apropiados, como se utiliza en la presente pueden incluir, a manera de ejemplo y sin limitación, solventes clorados, solventes de hidrocarburos, solventes de éteres, solventes próticos polares y solventes apróticos polares. Solventes halogenados apropiados incluyen, pero no se limitan a tetracloruro de carbono, bromodiclorometano, dibromoclorometano, bromoformo, cloroformo, bromoclorometano, dibromometano, cloruro de butilo, diclorometano, tetracloroetileno, tricloroetileno, 1,1,1- tricloroetano, 1,1,2- tricloroetano, 1,1- dicloroetano, 1,2- dicloroetano, 2- cloropropano, hexafluorobenceno, 1,2,4- triclorobenceno, o- diclorobenceno, clorobenceno, fluorobenceno, fluorotriclorometano, clorotri fluorometano, bromotri fluorometano, tetrafluoruro de carbono, diclorofluorometano, clorodifluorometano, trifluorometano, 1,2- diclorotetrafluoreetano y hexafluoroetano. Solventes apropiados de hidrocarburo incluyen, pero no se limitan a benceno, ciclohexano, pentano, hexano, tolueno, cicloheptano, metilciclohexano, heptano, etilbenceno, m- , o- , o p- xileno, octano, indano, nonano. Solventes apropiados de éter incluyen, pero no se limitan a dimetoximetano, tetrahidrofurano, 1,3- dioxano, 1,4- dioxano, furano, éter dietílico, éter dimetílico de glicol de etileno, éter dietílico de glicol de etileno, éter dimetílico de glicol de dietileno, éter dietílico de glicol de dietileno, éter diisopropílico de glicol de trietileno, anisol, o éter metílico de t- butilo.

Solventes próticos polares apropiados incluyen, pero no se limitan a metanol, etanol, 2- nitroetanol, 2- fluoroetanol, 2,2,2- trifluoroetanol, glicol de etileno, 1- propanol, 2- propanol, 2- metoxietanol, 1- butanol, 2- butanol, alcohol i- butílico, alcohol t- butílico, 2- etoxietanol, glicol de dietileno, 1- , 2- , o 3- pentanol, alcohol neo- pentílico, alcohol t- pentílico, éter monometílico de glicol de dietileno, éter monoetílico de glicol de dietileno, ciclohexanol, alcohol bencílico, fenol, y glicerol. Solventes apropiados apróticos polares incluyen, pero no se limitan a dimetilformamida (DMF) , dimetilacetamida (DMAC) , 1,3- dimetil- 3,4,5,6- tetrahidro- 2(IH) - pirimidinona (DMPU) , 1,3- dimetil- 2- imidazolidinona (DMI) , N- metilpirrolidinona (NMP) , formamida, N- metilacetamida, N- metilformamida, acetonitrilo (ACN) , dimetilsulfóxido, propionitrilo, formato de etilo, acetato de metilo, hexacloroacetona, acetona, etil metil cetona, acetato de etilo, acetato de isopropilo, acetato de t- butilo, sulfolano, N,N- dimetilpropionamida, nitrometano, nitrobenzoceno, hexametilfosforamida.

48

## Métodos de Tratamiento

Los inhibidores de la HDAC que poseen dominios metálicos de fijación, tales como los derivados de ácido hidroxámico, son capaces de separar ciertas sales endógenas, tales como hierro y zinc. Estas sales son requeridas por los sistemas biológicos para salud y supervivencia a largo plazo. Adicionalmente, las sales quelables tales como hierro son requeridas por enzimas y proteínas tales como: lipoxigenasas, la superfamilia de enzimas P450, oxidasas de monoamina, heme y muchas otras, para mantener la función normal.

Zinc es esencial para división y crecimiento celular y ayuda en la formación de ADN. Zinc también es importante para ayudar en el funcionamiento apropiado de insulina y está involucrado en la salud del sistema inmune. La deficiencia del zinc puede producir atrofia de la mucosa intestinal, anemia, diarrea, absorción disminuida de agua y nutrientes (deshidratación y anorexia), gusto deteriorado, alopecia, atrofia tímica, atrofia de testículos; hiperglicemia, glucosa sérica aumentada, aumento de creatina, insuficiencia, deterioro o falla renal.

Experiencias clínicas adversas o efectos secundarios tales como diarrea, fatiga, náuseas, trombocitopenia, anorexia, disgeusia, disminución de peso, espasmos musculares, alopecia, anemia, aumento de la creatinina en sangre, vómito, escalofríos se han observado para SAHA en el tratamiento de pacientes con cáncer, algunos de los cuales pueden estar asociados con la deficiencia de hierro o zinc como resultado de la separación de estos iones por el dominio de fijación metálica de SAHA. La toxicidad preclínica de SAHA incluye pérdida de peso o inapetencia, supresión inmune (leucopenia, linfopenia, atrofia tímica) en todas las especies animales; trombocitopenia en ratas; toxicidad gastrointestinal (atrofia de la mucosa, inflamación aguda, necrosis, lesiones múltiples), deshidratación, pérdida de electrolitos, atrofia testicular en perros.

Igualmente, otros quelantes de zinc comparten toxicidades o efectos secundarios similares como inhibidores de la HDAC. Por ejemplo, Lithostat (ácido acetohidroxámico) produce efectos secundarios tales como náuseas, vómito, anorexia, fatiga, malestar, reticulocitosis, anemia, trombocitopenia, leucopenia y cefalea. La desferrioxamina (desferiprona) produce efectos secundarios tales como fatiga, atrofia de médula ósea, atrofia tímica y neutropenia.

Por lo tanto, la co- administración/co- formulación de inhibidores de la HDAC y un compuesto metálico quelable, tal como hierro o zinc, sería benéfica para mantener la

disponibilidad de hierro, zinc y otra sal quelable almacena, y elimina los efectos secundarios de los inhibidores de la HDAC. Además de la co- administración y co- formulación, se prevé que la pre- formación del complejo quelado metálico inhibidor de la HDAC tendría un efecto similar.

Por lo tanto, en una realización, el invento proporciona un método de tratar cáncer y  
5 aliviar los efectos secundarios del Inhibidor de la HDAC que comprende el paso de co-  
administrar a un paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de inhibidor de la HDAC y un  
compuesto metálico quelable. En otra realización, el invento también proporciona un uso de un  
inhibidor de la HDAC para la preparación de un medicamento para el tratamiento de cáncer y  
aliviar los efectos secundarios del inhibidor de la HDAC que comprende el paso de co-  
10 administrar a un paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de inhibidor de la HDAC y un  
compuesto metálico quelable. En una realización, el compuesto metálico quelable se administra  
diariamente al paciente. En otra realización, el compuesto metálico quelable se administra antes o  
después de la administración del inhibidor de la HDAC. En otra realización, el compuesto  
metálico quelable se administra de manera simultánea con el inhibidor de la HDAC. En una  
15 realización adicional, el invento proporciona un kit que comprende al menos dosificación unitaria  
farmacéuticamente efectiva del inhibidor de la HDAC, e instrucciones para el tratamiento de  
cáncer y aliviar los efectos secundarios del inhibidor de la HDAC mediante la co- administración  
de un compuesto metálico quelable con el inhibidor de la HDAC. La dosificación unitaria  
farmacéuticamente efectiva de SAHA, sal farmacéuticamente aceptable o hidrato del mismo  
20 puede ser 200 mg, 300 mg, 400 mg, 500 mg o 600 mg. El compuesto metálico quelable puede  
estar en la forma de una composición farmacéutica, por ejemplo un suplemento vitamínico o  
suplemento mineral, el cual también puede comprender otras vitaminas y minerales.

En otra realización, el invento también proporciona un método de tratar cáncer y aliviar  
los efectos secundarios del inhibidor de la HDAC que comprende el paso de administrar a un  
25 paciente una composición farmacéutica que comprende un inhibidor de la HDAC y un compuesto  
metálico quelable. En otra realización, el invento proporciona un uso para la preparación de un  
medicamento que comprende un inhibidor de la HDAC y un compuesto metálico quelable para el  
tratamiento de cáncer y aliviar los efectos secundarios del inhibidor de la HDAC. En una  
realización adicional, el invento proporciona una composición farmacéutica que comprende el  
30 inhibidor de la HDAC y un compuesto metálico quelable, para uso en tratamiento de cáncer y  
para aliviar los efectos secundarios del inhibidor de la HDAC. En una realización, el compuesto

metálico quelable comprende hierro o zinc. En otra realización, el inhibidor de la HDAC es ácido hidroxámico suberoilánilida (SAHA) .

En una realización, el efecto secundario es nauseas, vomito, diarrea, anorexia, atrofia de la mucosa intestinal o toxicidad gastrointestinal. En otra realización, el efecto secundario es anemia, fatiga o trombocitopenia. En una realización adicional, el efecto secundario es nauseas, vomito, diarrea, anorexia, atrofia de la mucosa intestinal, gastrointestinal, fatiga o trombocitopenia.

En una realización adicional, el invento además proporciona un método de tratar cáncer que comprende el paso de administrar a un paciente una cantidad terapéuticamente efectiva del complejo quelado metálico inhibidor de la HDAC o hidrato o solvato del mismo. En otra realización, el invento proporciona un uso para la preparación de un medicamento que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva del complejo quelado metálico inhibidor de la HDAC o hidrato o solvato del mismo para el tratamiento de cáncer. En una realización adicional, el invento proporciona una composición farmacéutica que comprende el complejo quelado metálico inhibidor de la HDAC o hidrato o solvato del mismo, para uso en tratamiento de cáncer.

El invento además proporciona un método de tratar cáncer que comprende el paso de administrar a un paciente una cantidad terapéuticamente efectiva del zinc o complejo quelado de SAHA férrico o hidrato o solvato del mismo mencionado en las realizaciones anteriores.

En un realización, el método del presente invento es para el tratamiento de pacientes humanos con cáncer. Sin embargo, también es probable que el método sea efectivo en el tratamiento de cáncer en otros mamíferos. Cáncer incluye pero no está limitado a cualquier cáncer producido por la proliferación de células neoplásicas, tal como cáncer de pulmón, mieloma linfoide agudo, linfoma de Hodgkins, linfoma no Hodgkins , melanoma de vejiga, carcinoma renal, carcinoma de seno, carcinoma de próstata, carcinoma ovárico o carcinoma colorectal. Según el invento, las composiciones farmacéuticas se pueden utilizar en el tratamiento de una amplia variedad de cánceres, incluyendo pero sin limitar a tumores sólidos (ej., tumores de cabeza y cuello, pulmón, seno, colon, próstata, vejiga, recto, cerebro, tejido gástrico, hueso, ovario, tiroides, o endometrio) , malignidades hematológicas (ej., leucemias, linfomas, mielomas) , carcinomas (ej. carcinoma de vejiga, carcinoma renal, carcinoma de seno, carcinoma colorectal) , neuroblastoma, o melanoma. Ejemplos no limitantes de estos cánceres incluyen linfoma difuso de células B grandes (DLBCL) , linfomas o leucemias de células T, ej., linfoma cutáneo de

células T (CTCL) , linfoma periférico no cutáneo de células T, linfoma asociado con virus linfotrófico humano de células T (HTLV) , leucemia/linfoma de células T del adulto (ATLL) , así como también leucemia linfocítica aguda, leucemia no linfocítica aguda, leucemia mieloide aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena crónica, Enfermedad de Hodgkin, 5 linfoma no Hodgkin, mieloma, mieloma múltiple, mesotelioma, tumores sólidos de la infancia, neuroblastoma cerebral, retinoblastoma, glioma, Tumor de Wilms, cáncer óseo y sarcomas de tejido suave, tumores sólidos comunes de adultos tales como cánceres de cabeza y cuello (ej., oral, laríngeo y esofágico) , cánceres genitourinarios (ej., próstata, vejiga, renal, uterino, ovárico, testicular, rectal, y de colon) , cáncer de pulmón (ej., carcinoma de células pequeñas y carcinoma 10 de pulmón de células no pequeñas, incluyendo carcinoma de células escamosas y adenocarcinoma) , cáncer de seno, cáncer pancreático, melanoma y otros cánceres de piel, carcinoma de células basales, carcinoma metastático de piel, carcinoma de células escamosas tanto de tipo ulcerativo como papilar, cáncer de estómago, cáncer cerebral, cáncer hepático, cáncer adrenal, cáncer renal, cáncer tiroideo, carcinoma medular, osteosarcoma, sarcoma de 15 tejidos suaves, Sarcoma de Ewing, sarcoma de células reticulares, y Sarcoma de Kaposi. También incluidas están las formas pediátricas de cualquiera de los cánceres descritos en la presente.

#### Métodos de Administración

En todos los métodos descritos en la presente, la composición farmacéutica se puede 20 administrar de manera oral en una cápsula de gelatina. La composición se puede administrar en dosis unitarias según los métodos descritos en la presente una vez al día, dos veces al día o tres veces al día.

Luego la administración diaria se repite continuamente durante un periodo de varios días a varios años. El tratamiento oral puede continuar durante un periodo de entre una semana y la 25 vida del paciente. En una realización, la administración tiene lugar durante cinco días consecutivos tiempo después del cual el paciente puede ser evaluado para determinar si se requiere administración adicional. La administración puede ser continua o intermitente, es decir, tratamiento durante un número de días consecutivos seguido por un periodo de descanso.

Las composiciones farmacéuticas del presente invento se pueden administrar oralmente a 30 una dosis diaria total entre 25 y 4000 mg/m<sup>2</sup>, por ejemplo, aproximadamente 25 a 1000 mg, 50-1000 mg, 100 mg, 200 mg, 300 mg, 400 mg, 600 mg, 800 mg, 1000 mg y similares. Típicamente

el compuesto se administra como una dosis única cuando se administra hasta 400 mg al paciente. Para dosificaciones totales superiores (es decir, mayores de 400 mg), el total se divide en múltiples dosificaciones, por ejemplo, dos veces al día, tres veces al día o similares, o se separan en periodos iguales de tiempo durante el día. Por ejemplo, dos dosis, ej., 500 mg cada una, se pueden administrar 12 horas aparte para lograr una dosificación total de 1000 mg en un día.

En una realización, SAHA se administra al paciente a una dosificación total diaria de 200 mg. En otra realización, SAHA se administra al paciente a una dosificación total diaria de 400 mg. En otra realización, SAHA se administra al paciente a una dosificación total diaria de 600 mg.

En una realización, la cantidad del inhibidor de la HDAC administrada al paciente es menor que una cantidad que produzca toxicidad inmanejable en el paciente. En ciertas realizaciones, la cantidad del inhibidor de la HDAC que se administra al paciente es menor que la cantidad que produce una concentración del compuesto en el plasma del paciente para igualar o exceder el nivel tóxico del compuesto. En una realización, la concentración del inhibidor de la HDAC en el plasma del paciente se mantiene entre aproximadamente 10 nM y 5000 nM. La cantidad óptima del inhibidor de la HDAC que se debe administrar al paciente en la práctica del presente invento dependerá del compuesto particular utilizado y el tipo de cáncer tratado.

#### Histona desacetilasas e inhibidores de la histona desacetilasa

Histona desacetilasas (HDACs), como se utilizan en la presente, son enzimas que catalizan el retiro de grupos acetilo desde residuos de lisina en las colas amino terminales de las histonas centrales nucleosomales. Como tal, las HDACs junto con las histona acetiltransferasas (HATs) regulan el estado de acetilación de las histonas. La acetilación de las histonas afecta la expresión genética e inhibidores de las HDACs, tales como el ácido hidroxámico suberoilánilida (SAHA) de compuesto polar híbrido basado en ácido hidroxámico induce inhibición de crecimiento, diferenciación y/o apoptosis de células transformadas *in vitro* e inhiben el crecimiento tumoral *in vivo*. HDACs se pueden dividir en tres clases con base en la homología estructural. HDACs Clase I (HDACs 1, 2, 3 y 8) tienen similitud con la proteína RPD3 de levadura, se localizan en el núcleo y se encuentran en complejos asociados con co-represores de transcripción. HDACs Clase II (HDACs 4, 5, 6, 7 y 9) son similares a la proteína HDA1 de levadura, y tienen localización subcelular nuclear y citoplásmica. Ambas la clase I y II de

HDACs son inhibidas por inhibidores de la HDAC basados en ácido hidroxámico, tales como SAHA. HDACs Clase III forman una clase estructuralmente distante de enzimas dependientes de NAD que están relacionadas con las proteínas SER2 de levadura y no son inhibidas por inhibidores de la HDAC basados en ácido hidroxámico.

5           Inhibidores de la histona desacetilasa o inhibidores de la HDAC, como se utiliza en la presente son compuestos capaces de inhibir la desacetilación de las histonas *in vivo*, *in vitro* o ambas. Como tal, los inhibidores de la HDAC inhiben la actividad de al menos una histona desacetilasa. Como resultado de inhibir la desacetilación de al menos una histona, ocurre un aumento en histona acetilada y la acumulación de la histona acetilada es un marcador biológico  
10           apropiado para evaluar la actividad de inhibidores de la HDAC. Por lo tanto, los procedimientos que pueden probar la acumulación de las histonas acetiladas se pueden utilizar para determinar la actividad inhibitoria de HDAC de compuestos de interés. Se entiende que compuestos que pueden inhibir actividad de la histona desacetilasa también se pueden fijar a otros sustratos y como tal pueden inhibir otras moléculas biológicamente activas tales como enzimas. También se  
15           debe entender que los compuestos del presente invento son capaces de inhibir cualquiera de las histona desacetilasas divulgadas anteriormente, o cualquier otra histona desacetilasa.

          Por ejemplo, en pacientes que reciben inhibidores de la HDAC, la acumulación de las histonas acetiladas en células mononucleares periféricas así como también en tejido tratado con inhibidores de la HDAC puede ser determinada contra un control apropiado. Inhibidor de la  
20           HDAC y actividad de un compuesto particular se pueden determinar *in vitro* utilizando, por ejemplo, un ensayo enzimático el cual muestra inhibición de al menos una histona desacetilasa. Además, la determinación de la acumulación de las histonas acetiladas en células tratadas con una composición particular puede ser determinativa de la actividad inhibitoria de HDAC de un compuesto.

25           Los ensayos para la acumulación de las histonas acetiladas son bien conocidos en la literatura. Ver, por ejemplo, Marks, P.UN. , J. Natl. Cáncer Inst., 92:1210- 1215, 2000, Butler, L.M. , Cáncer Res. 60:5165- 5170 (2000) , Richon, V. M. , Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 95:3003- 3007, 1998, y Yoshida, M. , J. Biol. Chem., 265:17174- 17179, 1990.

          Por ejemplo, un ensayo enzimático para determinar la actividad de un compuesto  
30           inhibidor de la histona desacetilasa, se puede realizar como sigue. Brevemente, el efecto de un compuesto inhibidor de la HDAC sobre un HDAC1 humano etiquetado con epítoto (*flag*)

purificado por su afinidad puede ser evaluado al incubar la preparación de enzimas en ausencia de sustrato sobre hielo durante aproximadamente 20 minutos con la cantidad indicada de compuesto inhibidor. Se puede agregar sustrato (histona derivada de células murinas de eritroleucemia marcadas con  $[^3\text{H}]$ acetilo) y la muestra se puede incubar durante 20 minutos a 37°C en un volumen total de 30  $\mu\text{L}$ . Luego la reacción se puede detener y el acetato liberado puede ser extraído y la cantidad de radioactividad liberada se puede determinar mediante conteo de centelleo. Un ensayo alternativo útil para determinar la actividad de un compuesto inhibidor de la histona desacetilasa 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 como sigue. Animales, por ejemplo, ratones, se pueden inyectar intraperitonealmente con un compuesto inhibidor de la HDAC. Se pueden aislar tejidos seleccionados, por ejemplo, cerebro, bazo, hígado etc., en momentos predeterminados, después de la administración. Las histonas se pueden aislar a partir de tejidos esencialmente como lo describe Yoshida, J. Biol. Chem. 265:17174- 17179,1990. Cantidades iguales de histonas (aproximadamente 1  $\mu\text{g}$ ) se pueden someter a electroforesis sobre 15% de geles de poliacrilamida SDS y se pueden transferir a filtros Hybond- P (disponibles en Amersham) . Los filtros se pueden bloquear con leche al 3% y pueden ser sondeados con anticuerpos H4 histona anti- acetilada ( $\alpha\text{Ac}$ - H4) y H3 histona anti- acetilada ( $\alpha\text{Ac}$ - H3) policlonales purificados con conejo (Upstate Biotechnology, Inc.) . Los niveles de la histona acetilada se pueden visualizar utilizando un anticuerpo anti- conejo de cabra conjugado con peroxidasa de rábano (1:5000) y el sustrato quimioluminiscente SuperSignal (Pierce) . Como un control de carga para la proteína de la histona, geles paralelos pueden ser corridos y teñidos con Azul de Coomassie (CB) .

Además, se ha mostrado que los inhibidores de la HDAC basados en ácido hidroxámico regulan positivamente la expresión del gen  $p21^{\text{WAF1}}$ . La proteína  $p21^{\text{WAF1}}$  es inducida dentro de 2 horas de cultivo con inhibidores de la HDAC en una variedad de células transformadas utilizando métodos estándares. La inducción del gen  $p21^{\text{WAF1}}$  está asociada con la acumulación de las histonas acetiladas en la región de cromatina de este gen. Por lo tanto, la inducción de  $p21^{\text{WAF1}}$  se puede reconocer por estar involucrada en la inhibición de ciclo celular G1 causada por inhibidores de la HDAC en células transformadas.

Típicamente, los inhibidores de la HDAC caen en cinco clases generales: 1) derivados de ácido hidroxámico; 2) Ácidos Grasos de Cadena Corta (SCFAs) ; 3) tetrapéptidos cíclicos; 4)

benzamidas; y 5) cetonas electrofilicas.

Por lo tanto, el presente invento incluye dentro de su amplio alcance composiciones que comprenden inhibidores de la HDAC los cuales son 1) derivados de ácido hidroxámico; 2) Ácidos Grados de Cadenas Cortas (SCFAs) ; 3) tetrapéptidos cíclicos; 4) benzamidas; 5) cetonas electrofilicas; y/o cualquier otra clase de compuestos capaces de inhibir histona desacetilasas, para uso en inhibir histona desacetilasa, induciendo diferenciación terminal en células neoplásicas, y /o induciendo diferenciación de células tumorales en un tumor.

Ejemplos de tales inhibidores de la HDAC incluyen, pero no se limitan a:

A. Derivados de Acido Hidroxámico tales como ácido hidroxámico suberoilánilida

(SAHA) (Richon , Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95,3003- 3007 (1998) ) ; bishidroxamida del ácido m- carboxicinámico (CBHA) (Richon , supra) ; piroxamida; análogos de tricostatina tales como tricostatina A (TSA) y tricostatina C (Koghe *et al.* 1998. Biochem. Pharmacol. 56: 1359-1364) ; ácido salicilihidroxámico (SBHA) (Andrews *et al.*, International J. Parasitology 30,761-768 (2000) ) ; ácido suberoil bishidroxámico (SBHA) (Patente Americana No. 5,608,108) ; ácido bishidroxámico azeláico (ABHA) (Andrews *et al.*, supra) ; l- hidroxamato- 9- anilida azeláica (AAHA) (Qiu , Mol. Biol. Cell 11, 2069- 2083 (2000) ) ; ácido 6- (3- clorofenilureido) carpóico hidroxámico (3C1- UCHA) ; oxamflatina [ácido (2E) - 5- [3- [(fenilsufonil) aminol fenil]- pent- 2- en- 4- inohidroxámico] (Kim *et al.* Oncogene, 18: 2461 2470 (1999) ) ; A- 161906, Scriptaid (Su . 2000 Cáncer Research, 60: 3137- 3142) ; PXD- 101 (Prolifix) ; LAQ- 824; CHAP; MW2796 (Andrews ., supra) ; MW2996 (Andrews ., supra) ; o cualquiera de los ácidos hidroxámicos divulgados en las Patentes Americanas No 5.369.108, 5.932.616, 5.700.811, 6.087.367 y 6.511.990.

B. Tetrapéptidos cíclicos tales como trapoxin A (TPX) - tetrapéptido cíclico (ciclo- (L- fenilalanil- L- fenilalanil- D- pipicolinil- L- 2- amino- 8- oxo- 9,10- epoxi- decanoilo) )

(Kijima , J Biol. Chem. 268,22429- 22435 (1993) ) ; FR901228 (FK 228, depsipeptido) (Nakajima , Ex. Cell Res. 241,126- 133 (1998) ) ; FR225497 tetrapéptido cíclico (H. Mori , PCT Solicitud WO 00/08048 (17 Febrero 2000) ) ; tetrapéptido cíclico de apicidina [ciclo(N- O- metil- L- triptofanil- L- isoleucinil- D- pipicolinil- L- 2- amino- 8- oxodecanoilo) ] (Darkin- Rattray , Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93,1314313147 (1996) ) ; apicidina Ia, apicidina Ib, apicidina Ic, apicidina IIa, y apicidina IIb (P. Dulski , PCT Solicitud WO 97/11366) ; CHAP, tetrapéptido cíclico de toxina HC(Bosch, Plant Cell 7,1941- 1950 (1995) ) ; WF27082 tetrapéptido cíclico

88

(PCT Solicitud WO 98/48825) ; y clamidocina (Bosch , supra) .

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

10 D. Derivados de Benzamida tales como CI- 994; MS- 27- 275 [N- (2- aminofenil) - 4- [N- (piridin- 3- il- metoxycarbonil) aminometil] benzamida] (Saito , Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 4592- 4597 (1999) ) ; y derivado 3'- amino de MS- 27- 275 (Saito , supra) .

E. Derivados de cetona electrofílica tales como las trifluorometil cetonas (Frey , Bioorganic & Med. Chem. Lett. (2002) , 12, 3443- 3447; U.S. 6,511,990) y  $\alpha$ - ceto amidas tales  
15 como N- metil-  $\alpha$ - ketoamidas

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

En una realización, los inhibidores de la HDAC basados en ácido hidroxámico son ácido hidroxámico suberoilanolida (SAHA) , bishidroxamato del ácido m- carboxicinámico (CBHA) y  
20 piroxamida. Se ha mostrado que SAHA se fija directamente en el bolsillo catalítico de la enzima de la histona desacetilasa. SAHA induce inhibición del ciclo celular, diferenciación y/o apoptosis de células transformadas en cultivo e inhibe el crecimiento tumoral en roedores. SAHA es efectivo para inducir estos efectos tanto en tumores sólidos como cánceres hematológicos. Se ha mostrado que SAHA es efectivo para inhibir crecimiento tumoral en animales sin toxicidad para  
25 el animal. La inhibición de crecimiento tumoral inducida por SAHA está asociada con una acumulación de las histonas acetiladas en el tumor. SAHA es efectivo para inhibir el desarrollo y crecimiento continuo de tumores mamarios inducidos por carcinógenos (N- metilnitrosourea) en ratas. SAHA se administró a las ratas en su dieta durante los 130 días del estudio. Por lo tanto, SAHA es un agente anti tumoral, no toxico, oralmente activo cuyo mecanismo de acción  
30 involucra la inhibición de la actividad de la histona desacetilasa. En otras realizaciones, los inhibidores de la HDAC son aquellos divulgados en las Patentes Americanas No 5.369.108,

5.932.616, 5.700.811, 6.087.367 y 6.511. 990.

### Terapia de Combinación

Los métodos del presente invento también pueden comprender inicialmente administrar al  
5 sujeto un agente antitumoral para hacer las células neoplásicas en el sujeto resistentes a un agente  
antitumoral y subsecuentemente administrar una cantidad efectiva de cualquiera de las  
composiciones del presente invento, efectivas para inducir selectivamente diferenciación  
terminal, inhibición de crecimiento celular y/o apoptosis de tales células.

El agente antitumoral puede ser uno de numerosos agentes de quimioterapia tal como un  
10 agente alquilante, un antimetabolito, un agente hormonal, un antibiótico, colchicina, un alcaloide  
vinca, L- asparaginasa, procarbazona, hidroxiaurea, mitotano, nitrosoureas o una carboxamida de  
imidazol. Agentes apropiados son aquellos agentes que promueven la despolarización de  
tubulina. En una realización, el agente antitumoral es colchicina o un alcaloide vinca; vinblastina  
o vincristina. En realizaciones donde el agente antitumoral es vincristina, las células  
15 preferiblemente son tratadas de manera que sean resistentes a vincristina a una concentración de  
aproximadamente 5 mg/ml. Tratar las células para hacerlas resistentes a un agente antitumoral se  
puede realizar al colocar en contacto las células con el agente durante un periodo de al menos 3 a  
5 días. El contacto de las células resultantes con cualquiera de los compuestos anteriores se  
realiza como se describió anteriormente. Además de los anteriores agentes quimioterapéuticos,  
20 los compuestos también se pueden administrar junto con terapia de radiación.

### *Agentes Alquilantes*

Los agentes alquilantes reaccionan con residuos nucleofílicos, tales como las entidades  
químicas sobre los precursores nucleótidos para producción de ADN. Estos afectan el proceso de  
25 división celular al alquilar estos nucleótidos y evitar su ensamble a ADN.

Ejemplos de agentes alquilantes incluyen, pero no se limitan a, biscloroetilaminas  
(mostazas de nitrógeno, ej., clorambucilo, ciclofosfamida, ifosfamida, mecloretamina, melphalan,  
mostaza de uracilo) , aziridinas (ej., tiotepa) , alquil alcona sulfonatos (ej., busulfan) ,  
nitrosoureas (ej., carmustina, lomustina, estreptozocina) , agentes alquilantes no clásicos  
30 (altretamina, dacarbazina, y procarbazona) , compuestos de platino (carboplatina y cisplatina) .  
Estos compuestos reaccionan con fosfato, amino, hidroxilo, sulfhidrilo, carboxilo, y grupos de

imidazol.

Bajo condiciones fisiológicas, estos fármacos ionizan y producen iones de carga positiva que se fijan a ácidos nucleicos susceptibles y proteínas, llevando a inhibición de ciclo celular y/o muerte celular. Los agentes alquilantes son agentes no específicos de fase de ciclo celular puesto que ejercen su actividad independientemente de la fase específica del ciclo celular. Las mostazas de nitrógeno y sulfonatos de alcona de alquilo son más efectivos contra células en la fase G1 o M. Las nitrosoureas, mostazas de nitrógeno, y aziridinas deterioran la progresión desde las fases G1 y S a las fases M. Chabner y Collins eds. (1990) "Quimioterapia contra el Cáncer: Principios y Práctica", Philadelphia: JB Lippincott.

Los agentes alquilantes son activos contra una amplia variedad de enfermedades neoplásicas, con actividad significativa en el tratamiento de leucemias y linfomas así como también de tumores sólidos. Clínicamente este grupo de fármacos es utilizado de manera común en el tratamiento de leucemias agudas y crónicas; Enfermedad de Hodgkin; linfoma no Hodgkin; mieloma múltiple; tumores cerebrales primarios; carcinomas del seno, ovarios, testículos, pulmones, vejiga, cervix, cabeza y cuello, y melanoma maligno.

La toxicidad principal común a todos los agentes alquilantes es mielosupresión. Adicionalmente, efectos adversos gastrointestinales de severidad variable ocurren comúnmente y varias toxicidades de órganos están asociadas con compuestos específicos. Black y Livingston (1990) *Fármacos* 39: 489- 501 y 39: 652- 673.

### *Antibióticos*

Los antibióticos (ej., antibióticos citotóxicos) actúan al inhibir directamente síntesis de ADN o ARN y son efectivos a través de todo el ciclo celular. Ejemplos de agentes antibióticos incluyen antraciclinas (ej., doxorubicina, daunorubicina, epirubicina, idarubicina y antracenediona), mitomicina C, bleomicina, dactinomicina, plicatomicina. Estos agentes antibióticos interfieren con el crecimiento celular al dañar diferentes componentes celulares. Por ejemplo, se cree que las antraciclinas generalmente interfieren con la acción de topoisomerasa II ADN en las regiones de ADN transcripcionalmente activo, lo cual conlleva a escisiones de hebras de ADN.

Generalmente se cree que la bleomicina quelata el hierro y forma un complejo activado, el cual luego se fija a bases de ADN, produciendo escisiones de hebras y muerte celular.

Se han utilizado agentes antibióticos como terapéuticos a través de un rango de enfermedades neoplásicas, incluyendo carcinomas del seno, pulmón, estomago y tiroides, linfomas, leucemias mielogenas, mielomas, y sarcomas. La toxicidad principal de las antraciclinas dentro de este grupo es mielosupresión, especialmente granulocitopenia. La Mucositis a menudo acompaña la granulocitopenia y la severidad se relaciona con el grado de mielosupresión. También existe toxicidad cardiaca significativa asociada con administración de altas dosis de las antraciclinas.

#### *Agentes Antimetabólicos*

Los agentes antimetabólicos (es decir, antimetabolitos) son un grupo de fármacos que interfieren con los procesos metabólicos vitales para la fisiología y proliferación de células de cáncer. Las células de cáncer con proliferación activa requieren síntesis continua de grandes cantidades de ácidos nucleicos, proteínas, lípidos, y otros constituyentes celulares vitales.

Muchos de los antimetabolitos inhiben la síntesis de nucleósidos de purina o pirimidina o inhiben las enzimas de replicación de ADN. Algunos antimetabolitos también interfieren con la síntesis de ribonucleósidos y ARN y/o metabolismo de aminoácidos y síntesis de proteínas también. Al interferir con la síntesis de constituyentes celulares vitales, los antimetabolitos pueden retardar o detener el crecimiento de células de cáncer. Ejemplos de agentes antimetabólicos incluyen, pero no se limitan a, fluorouracilo (5- FU) , floxuridina (5- FUdR) , metotrexato, leucovorina, hidroxiurea, tioguanina (6- TG) , mercaptopurina (6- MP) , citarabina, pentostatina, fosfato de fludarabina, cladribina (2- CDA) , asparaginasa, y gemcitabina.

Los agentes antimetabólicos se han utilizado ampliamente para tratar diferentes formas comunes de cáncer incluyendo carcinomas de colon, recto, seno, hígado, estomago y páncreas, melanoma maligno, leucemia crónica y aguda y leucemia de células capilares. Muchos de los efectos adversos de tratamiento antimetabolito resultan a partir de la supresión de proliferación celular en tejidos mitóticamente activos, tales como la médula ósea o mucosa gastrointestinal. Los pacientes tratados con estos agentes comúnmente experimentan supresión de médula ósea, estomatitis, diarrea, y pérdida de cabello. Chen y Grem (1992) Curr. Opin. Oncol. 4: 1089- 1098.

#### *Agentes Hormonales*

Los agentes hormonales son un grupo de fármacos que regulan el crecimiento y desarrollo

50

de sus órganos objetivo. La mayoría de los agentes hormonales son esteroides sexuales y sus derivados y análogos de los mismos, tales como estrógenos, progestógenos, anti- estrógenos, andrógenos, anti- andrógenos y progestinas. Estos agentes hormonales pueden servir como antagonistas de receptores para que los esteroides sexuales regulen negativamente la expresión de receptores y la transcripción de genes vitales. Ejemplos de tales agentes hormonales son estrógenos sintéticos (ej., dietilestilbestrol) , antiestrógenos (ej., tamoxifen, toremifeno, fluoximesterol y raloxifeno) , antiandrógenos (bicalutamida, nilutamida, flutamida) , inhibidores de aromatasa (ej., aminoglutetimida, anastrozol y tetrazol) , análogos de hormona liberadora de hormona lutenizante (LHRH) , cetoconazol, acetato de goserelina, leuprolida, acetato de megestrol y mifepristone.

Los agentes hormonales son utilizados para tratar cáncer de seno, cáncer de próstata, melanoma y meningioma. Puesto que la principal acción de las hormonas es mediada por receptores esteroides, cáncer de seno de un 60% positivo a receptores respondió a la terapia hormonal de primera línea; y menos de 10% de tumores negativos a receptores respondieron. El principal efecto secundario asociado con agentes hormonales un brote. Las manifestaciones frecuentes son un aumento abrupto de dolor óseo, eritema alrededor de lesiones cutáneas, e hipercalcemia inducida.

Específicamente, los progestógenos se utilizan para tratar cánceres endometriales, puesto que estos cánceres ocurren en mujeres que son expuestas a altos niveles de estrógeno sin oposición de progesterona.

Los antiandrógenos se utilizan principalmente para el tratamiento de cáncer de próstata, el cual es dependiente de hormonas. Estos se utilizan para disminuir los niveles de testosterona, y así inhibir el crecimiento del tumor.

El Tratamiento hormonal de cáncer de seno involucra reducir el nivel de activación dependiente de estrógeno de receptores de estrógeno en células neoplásicas de seno. Los anti-estrógenos actúan al fijarse a receptores de estrógeno y evitar el reclutamiento de coactivadores, inhibiendo así la señal de estrógeno.

Los análogos de LHRH se utilizan en el tratamiento de cáncer de próstata para disminuir niveles de testosterona y disminuir así el crecimiento del tumor.

Los inhibidores de aromatasa actúan al inhibir la enzima requerida para síntesis de hormonas. En mujeres post- menopáusicas, la fuente principal de estrógeno es a través de la

conversión de androstenodiona por aromatasa.

### *Agentes de origen vegetal*

5 Los agentes de origen vegetal son un grupo de fármacos que se derivan a partir de plantas o se modifican con base en la estructura molecular de los agentes. Estos inhiben la replicación celular al evitar el ensamble de los componentes celulares que son esenciales para la división celular.

Ejemplos de agentes de origen vegetal incluyen alcaloides vinca (ej., vincristina, 10 vinblastina, vindesina, vinzolidina y vinorelbina) , podofilotoxinas (ej., etoposido (VP- 16) y teniposido (VM- 26) ) , taxanos (ej., paclitaxel y docetaxel) . Estos agentes de origen vegetal generalmente actúan como agentes antimitóticos que se fijan a tubulina e inhiben mitosis. Se cree que las podofilotoxinas tales como etoposido interfieren con la síntesis de ADN al interactuar con topoisomerasa II, produciendo escisión de hebras de ADN.

15 Los agentes de origen vegetal se utilizan para tratar muchas formas de cáncer. Por ejemplo, la vincristina se utiliza en el tratamiento del leucemias, linfoma de Hodgkin y no Hodgkin, y tumores en niños como el neuroblastoma, rabdomiosarcoma, y Tumor de Wims. La vinblastina se utiliza contra los linfomas, cáncer testicular, carcinoma de células renales, micosis fungoides, y Sarcoma de Kaposi. El doxetaxel ha mostrado actividad prometedora contra cáncer 20 de seno avanzado, cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) , y cáncer ovárico.

El etoposido es activo contra un amplio rango de neoplasmas, de los cuales el cáncer pulmonar de células pequeñas, cáncer testicular, y NSCLC son los que más responden.

Los agentes de origen vegetal producen efectos secundarios significativos en los pacientes tratados. Los alcaloides vinca presentan espectro diferente de toxicidad clínica. Los efectos 25 secundarios de alcaloides vinca incluyen neurotoxicidad, función de plaquetas alterada, mielosupresión, y leucopenia. El paclitaxel produce neutropenia dosis- limitante sin afectar relativamente las otras líneas celulares hematopoyéticas. La toxicidad principal de las epipofilotóxicas es hematológica (neutropenia y trombocitopenia) .

Otros efectos secundarios incluyen anormalidades enzimáticas hepáticas temporales, 30 alopecia, reacciones alérgicas, y neuropatía periférica.

### *Agentes Biológicos*

Los agentes biológicos son un grupo de biomoléculas que producen regresión de cáncer/tumores cuando se utilizan solas o en combinación con quimioterapia y/o radioterapia.

Ejemplos de agentes biológicos incluyen proteínas inmuno- moduladoras tales como las citoquinas, anticuerpos monoclonales contra antígenos tumorales, genes supresores de tumores, y vacunas contra el cáncer.

Las citoquinas poseen actividad inmunomoduladora profunda. Algunas citoquinas tales como interleucina- 2 (IL- 2, aldesleucina) e interferón-  $\alpha$  (IFN-  $\alpha$ ) demuestran actividad antitumoral y se han aprobado para el tratamiento de pacientes con carcinoma metastático de células renales y melanoma maligno metastático. La IL- 2 es un factor de crecimiento de células T que es central a respuestas inmunes mediadas por células T. Se cree que los efectos antitumorales selectivos de IL- 2 sobre algunos pacientes son el resultado de una respuesta inmune mediada por células que discrimina entre lo propio y lo no propio.

La interferón-  $\alpha$  incluye más de 23 subtipos relacionados con actividades coincidentes. IFN-  $\alpha$  ha demostrado actividad contra muchas malignidades sólidas y hematológicas, la última parece ser particularmente sensitiva.

Ejemplos de interferonas incluyen, interferón-  $\alpha$ , interferón-  $\beta$  (interferón de fibroblastos) e interferón-  $\gamma$  (interferón de fibroblastos) . Ejemplos de otras citoquinas incluyen eritropoyetina (epoyetina- ) , granulocito- CSF (filgrastina) , y granulocito, macrófago- CSF (sargramostim) .

Otros agentes inmunomoduladores diferentes de las citoquinas incluyen el bacilo Calmette- Guerin, levamisol, y octreotida, un octapéptido de acción prolongada que imita los efectos de la hormona natural somatostatina.

Además, el tratamiento anti- cáncer puede comprender tratamiento mediante inmunoterapia con anticuerpos y reactivos utilizados en enfoques de vacunación contra tumores.

Los principales fármacos en esta clase de terapia clase son los anticuerpos, solos o portando ej., toxinas o quimioterapéuticos/ citotoxinas a células de cáncer. Los anticuerpos monoclonales contra antígenos tumorales son anticuerpos producidos contra antígenos expresados mediante tumores, preferiblemente antígenos específicos a tumores. Por ejemplo, el anticuerpo monoclonal HERCEPTIN® (trastuzumab) contra el receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2) está sobre- expresado en algunos tumores de seno incluyendo cáncer de seno metastático. La sobre- expresión de la proteína HER2 está asociada con enfermedad más agresiva

y pronóstico más pobre en la clínica. HERCEPTIN® se utiliza como un único agente para el tratamiento de pacientes con cáncer de seno metastático cuyos tumores sobreexpresan la proteína HER2.

Otro ejemplo de anticuerpos monoclonales contra antígenos tumorales es RITUXAN® (rituximab) contra CD20 sobre células de linfoma y selectivamente disminuye células CD20+ pre-B y B maduras normales y malignas.

RITUXAN se utiliza como único agente para el tratamiento de pacientes con linfoma no Hodgkin de linfocitos B, CD20+, folicular o refractario de bajo grado o recidivante. MYELODARG® (gemtuzumab ozogamicina) y CAMPATH® (alemtuzumab) son ejemplos adicionales de anticuerpos monoclonales que se pueden utilizar contra antígenos tumorales.

Los genes supresores de tumores son genes que funcionan para inhibir el crecimiento y ciclos de división celular, evitando así el desarrollo de neoplasia. Las mutaciones en genes supresores de tumores hacen que la célula ignore uno o más de los componentes de la red de señales inhibitorias, superando los puntos de chequeo de ciclo celular y produciendo una tasa mayor de crecimiento celular controlado- cáncer. Ejemplos de genes supresores de tumores incluyen p53, RB, NF-1, NF-2, WT1, BRCA1 y BRCA2.

p53 está involucrado en cáncer pancreático y participa en una ruta citoplásmica que inhibe la división celular. NF-1 codifica una proteína que inhibe Ras, una proteína inhibitoria citoplásmica. NF-1 está involucrado en neurofibroma y feocromocitomas del sistema nervioso y leucemia mieloide. NF-2 codifica una proteína nuclear que está involucrada en meningioma, schwannoma, y ependimoma del sistema nervioso. RB codifica la proteína pRB, una proteína nuclear que es un inhibidor principal del ciclo celular. RB está involucrado en retinoblastoma así como también en cáncer óseo, de vejiga, cáncer pulmonar de células pequeñas, y cáncer de seno. p53 codifica la proteína p53 que regula división celular y pueden inducir apoptosis. La mutación y/o inactividad de p53 es encontrada en un amplio rango de cánceres. WT1 está involucrado en Tumor de Wilms de los riñones. BRCA1 está involucrado en cáncer de seno y ovárico, y BRCA2 está involucrado en cáncer de seno. El gen supresor de tumores se puede transferir hacia las células tumorales donde ejerce sus funciones supresoras tumorales.

Las vacunas contra el cáncer son un grupo de agentes que inducen la respuesta inmune específica del cuerpo a tumores. La mayoría de vacunas contra el cáncer en investigación y desarrollo y ensayos clínicos son antígenos asociados a tumores (TAAs). Los TAAs son

estructuras (es decir, proteínas, enzimas o carbohidratos) que están presentes en las células tumorales y relativamente ausentes o disminuidos en las células normales. En virtud de ser claramente únicos a la célula tumoral, los TAAs proporcionan objetivos para que el sistema inmune reconozca y produzca su destrucción. Ejemplos de TAAs incluyen gangliosidos (GM2),  
 5 antígeno específico a próstata (PSA),  $\alpha$ -fetoproteína (AFP), antígeno carcinoembrionario (CEA) (producido mediante cánceres de colon y otros adenocarcinomas, ej., cánceres de seno, pulmón, gástrico, y pancreático), antígenos asociados a melanoma (MART-1, gp100, MAGE 1,3 tirosinasa), fragmentos de papilomavirus E6 y E7, células enteras o porciones/lisados de células tumorales autólogas y células tumorales alogénicas.

### Otras Terapias

Los desarrollos recientes han introducido, además de las terapias citotóxicas y hormonales tradicionales utilizadas para tratar cáncer, terapias adicionales para el tratamiento de cáncer. Por ejemplo, muchas formas de terapia genética están experimentando ensayos preclínicos o clínicos.

15 Además, los enfoques están actualmente en desarrollo con base en la inhibición de vascularización tumoral (angiogénesis). El propósito de este concepto es cortar al tumor la nutrición y suministro de oxígeno proporcionados mediante un sistema vascular tumoral recién construido.

20 Además, la terapia contra el cáncer también se ha intentado mediante la inducción de diferenciación terminal de las células neoplásicas. Agentes de diferenciación apropiados incluyen los compuestos divulgados en cualquiera de las siguientes referencias.

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

b) Derivados de vitamina D y ácido retinólico (Abe, E., Miyaura, C, Sakagami, H., Takeda, M., Konno, K., Yamazaki, T., Yoshika, S., y Suda, T. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 78: 4990- 4994; Schwartz, E. L., Snoddy, J. R., Kreutter, D., Rasmussen, H., y Sartorelli, UN. C. (1983) Proc. Am. Assoc. Cáncer Res. 24: 18; Tanenaga, K., Hozumi, M., y Sakagami,

Y. (1980) *Cáncer Res.* 40: 914- 919) ;

c) Hormonas esteroides (Lotem, J. y Sachs, L. (1975) *Int. J. Cancer* 15: 731- 740) ;

d) Factores de crecimiento (Sachs, L. (1978) *Nature (Lond.)* 274: 535, Metcalf, D. (1985) *Science*, 229: 16- 22) ;

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

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

g) Inhibidores de ADN o Síntesis de ARN (Schwartz, E. L. y Sartorelli, UN. C. (1982) *Cancer Res.* 42: 2651- 2655, Terada, M., Epner, E., Nudel, U., Salmon, J., Fibach, E., Rifkind, R. UN., y Marks, P. UN. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 75: 2795- 2799; Morin, M. J. y Sartorelli, UN. C. (1984) *Cancer Res.* 44: 2807- 2812; Schwartz, E. L., Brown, B. J., Nierenberg, M., Marsh, J. C, y Sartorelli, UN. C. (1983) *Cáncer Res.* 43: 2725- 2730; Sugano, H., Furusawa, M., Kawaguchi, T., y Dcawa, Y. (1973) *Bibl. Hematol.* 39: 943- 954; Ebert, P. S., Wars, I., y Buell, D. N. (1976) *Cáncer Res.* 36: 1809- 1813; Hayashi, M., Okabe, J., y Hozumi, M. (1979) *Gann* 70: 235- 238) ,

La combinación de las composiciones farmacéuticas de este invento y cualquiera de los agentes anti- cáncer descritos anteriormente y el uso de los mismos están dentro del alcance del presente invento.

El invento se ilustra en los ejemplos en la Sección Detalles Experimentales la cual sigue a continuación. Esta sección es divulgada para ayudar a entender el invento pero no pretende limitar en forma alguna el invento como se divulga en las reivindicaciones más adelante.

## SECCIÓN DETALLES EXPERIMENTALES

### EJEMPLO 1

#### Producción de SAHA Forma I

##### Paso 1 ácido 8- anilino- 8- oxooctanóico: ácido suberanílico (Compuesto 3)

Se combina ácido subérico (Compuesto 1, 174.2 g, 1.0 molar) , anilina (Compuesto 2, 85.8- 94.9 g) , y tolueno (0.1- 0.2 L) , se calientan a reflujo y se someten a reflujo durante un

mínimo de 60 horas. La reacción es apagada a reflujo ajustando el pH a  $> 11$  con 10% solución de hidróxido de sodio. La fase acuosa es separada. La capa orgánica es combinada con tolueno (0.11- 0.13 L) y agua (0.3- 0.4 L), y la capa acuosa es separada. Las capas acuosas a partir de las extracciones y tolueno (0.11- 0.13 L) son combinadas, asentadas, y luego separadas. La capa acuosa es extraída dos veces con tolueno (0.2- 0.3 L) a 60- 70°C. La capa acuosa es ajustada a 20- 30°C a un pH de 5.8- 6.2, utilizando ácido clorhídrico y 10% de solución de hidróxido de sodio según lo necesario. El lote es filtrado, lavado con agua fría (0.2- 0.3 L) y luego lavado con isopropanol frío. La torta húmeda es secada a un máximo de 65°C al vacío para proporcionar ácido suberanílico.

#### Paso 2 8- anilino- 8- oxooctanoato de metilo ; suberanilato de metilo (Compuesto 4)

Se combinaron ácido suberanílico (Compuesto 3, 249.3 g, 1.0 molar) y metanol (0.4- 0.5 L) y se calentaron a 45- 55°C. El pH es ajustado  $< 2$  utilizando ácido clorhídrico, y la temperatura de lote se mantiene a 45- 55°C hasta terminar la reacción. La reacción es apagada con agua desionizada (0.1- 0.2 L). El lote es enfriado a 25- 30°C y sembrado para inducir cristalización, y luego enfriado a 0- 10°C. El lote es filtrado, y la torta es lavada con una solución 50:50 (v/v) metanol/agua (0.28- 0.34 L) a 0- 10°C. La torta húmeda es secada a un máximo de 46°C al vacío para proporcionar suberanilato de metilo.

#### Paso 3 N- hidroxil- N'- feniloctanodiamida; vorinostat (Compuesto 5)

Se combinaron suberanilato de metilo (Compuesto 4, 263.3 g, 1.0 molar) y solución base libre de hidroxilamina 2M (0.8- 1.0 L. Mientras se mantuvo el lote a un máximo de 20°C, el pH aparente es ajustado a  $> 10.5$  con hidróxido de sodio en metanol según lo necesario. Mientras se mantiene el lote a máximo 20°C y pH aparente  $> 10.5$  utilizando hidróxido de sodio en metanol, el lote es añejado. Durante el añejamiento, se agrega solución alcalina libre de hidroxilamina (0.5- 0.6 L), y el lote se mantiene a máximo 20°C y pH aparente  $> 10.5$  hasta terminar la reacción. La reacción es apagada al agregar el lote a agua (0.9- 1.1 L) mientras se mantiene la temperatura del lote entre 20- 35°C, y el contenido de agua del lote es ajustado a 35- 45%. El pH es ajustado a 8.8- 9.2 utilizando ácido acético glacial y carbonato de sodio según sea necesario. El lote es enfriado a 0- 10°C durante 5- 10 horas. El lote es filtrado y la torta es lavada con 55:45 (v/v) metanol/agua (0.45- 0.6 L) a 0- 10°C. La torta húmeda es acondicionada al vacío hasta que

el contenido de agua es < 35%.

La torta húmeda de crudo de vorinostat (264.32 g, 1.0 molar) es combinada con etanol desnaturalizado (1308- 1599 g) y agua (167- 204 g) . Hidrocloruro de hidroxilamina (> 9 mEquiv) e hidróxido de sodio en metanol (> 9 mEquiv) se agregan a la pasta aguada, y el lote es calentado a 70- 80°C. La solución es filtrada y luego cristalizada enfriando lentamente hasta 0- 10°C. El lote es filtrado y la torta es lavada con 4:1 (v/v) etanol desnaturalizado/agua fría. La torta húmeda es secada a un máximo de 45 °C al vacío.

10 Paso 4 *N*- hidroxí- *N'*- feniloctanodiamida - vorinostat- fino (triturado en húmedo) (Compuesto 6)

Vorinostat (Compuesto 5, 264.3 g, 1.0 molar) es vuelto una pasta aguada en una solución 50:50 (v/v) etanol/agua (mínimo 2.8 L) . La pasta aguada de vorinostat es triturada en húmedo a un tamaño medio de 25- 45 µm mientras se mantuvo la temperatura de lote a 7- 30°C. La pasta aguada final es filtrada y la torta húmeda es lavada con 0- 40°C agua (mínimo 0.8 L) . La torta húmeda es secada a un máximo de 55°C al vacío a un contenido de agua máximo de 0.2% (w/w) para proporcionar la sustancia farmacológica fina de vorinostat.

Paso 5 *N*- hidroxí- *N'*- feniloctanodiamida - vorinostat- grueso (Compuesto 7)

20 Vorinostat (Compuesto 5, 264.3 g, 1.0 molar) es vuelto una pasta aguada en una solución 50:50 (v/v) etanol/agua (4.9- 5.5 L) . Bajo un mínimo de 15 psig de presión, la pasta aguada es calentada a 65- 70°C para disolver y luego es enfriada a 60- 64°C. Una pasta aguada sembrada es transferida al lote mientras se mantiene la temperatura del lote. El lote es añejado durante un mínimo de 2 horas a 61- 63°C. El lote es enfriado en tres pasos controlando la temperatura de envoltura: (1) hasta 55°C a 0.35- 0.78°C/hora, (2) hasta 45°C a 0.83- 2.00°C/hora, y (3) entre - 5 y 25°C a 2.00- 4.44°C/hora. La pasta aguada final es añejada entre - 5 y 25°C durante aproximadamente 1 hora y luego filtrada. La torta húmeda es lavada con agua (mínimo 0.8 L) . La torta húmeda es secada a un máximo de 55°C al vacío para proporcionar una sustancia farmacológica gruesa de vorinostat.

30 La pasta aguada semillera se prepara combinando vorinostat- torta seca fina (97.8- 116.3 g, 0.37- 0.44 mol) y solución 50:50 (v/v) etanol/agua (1.0- 1.2 L) . Bajo un mínimo de 15 psig

SA

de presión, la pasta aguada semillera es calentada 62- 66°C, añejada durante aproximadamente 0.5 horas y luego enfriada a 60- 64°C.

EJEMPLO 2

Mezcla de polvo de Cristales de SAHA

Mezcla de polvo

30% de los cristales finos de vorinostat son mezclados con 70% de los cristales gruesos de Vorinostat. 25.0 Kg de cristales SAHA mezclados Polimorfos I fueron primero tamizados mediante un tamiz malla 30 (600 µm) . El SAHA resultante, 11.1 Kg de Celulosa microcristalina (Avicel PH- 101) , y 1.13 Kg de Sodio de croscarmelosa luego fueron cargados en el V- mezclador de 141.6 L, Tote mezclador de 113 L u otro mezclador de tamaño y tipo comparables. Para el V- mezclador, el material resultante se mezcló a homogeneidad durante aproximadamente 8 minutos a aproximadamente 25 rpm. Para mezclador Tote, el material resultante se mezcló a homogeneidad durante aproximadamente 17 minutos a aproximadamente 12 rpm.

Lubricación de Mezcla de polvo

293.0 g de Estearato de magnesio (calidad vegetal) fue tamizada mediante un tamiz malla 30 (600 µm) y cargados en el V- mezclador con la mezcla de polvo licuada. La mezcla resultante fue mezclada a homogeneidad durante aproximadamente 8 minutos a aproximadamente 25 rpm. 293.0 g de Estearato de magnesio (calidad vegetal) también se tamizaron mediante un tamiz malla 60 (250 µm) y se cargaron en una licuadora Tote con la mezcla de polvo licuada. La mezcla resultante fue mezclada a homogeneidad durante aproximadamente 17 minutos a aproximadamente 12 rpm.

La Tabla 1 resume las propiedades físicas de los materiales crudos en la cápsula.

Tabla 1: Propiedades físicas y químicas de Materiales crudos.

| Material crudo                                                      | Propiedad Física      | Valor       |
|---------------------------------------------------------------------|-----------------------|-------------|
| Ácido hidroxámico suberoilánilida (SAHA) - fine y cristales gruesos | Punto de fusión (DSC) | 161 - 163°C |
|                                                                     | Solubilidad:          | <0.1 mg/ml  |
|                                                                     | o En Agua             | 42 mg/ml    |
|                                                                     | o En Metanol          | 0.1 mg/ml   |

|                                                                                             |                                                                                                 |                                                                                                                                                         |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                                                                             | o En Etanol<br>o 2% solución acuosa de CIP100.<br>o 2% solución acuosa de SD- 20 .              | 11.3 mg/ml<br>0.085 mg/ml                                                                                                                               |
| Celulosa microcristalina<br>(Avicel PH- 101) NF, Ph.<br>Eur., JP (FMC BioPolymer)           | Tamaño de partícula medio<br>nominal<br>Contenido de humedad<br>Densidad por volumen            | 50/ $\mu$ m<br><5%<br>0.26- 0.31 g/cc                                                                                                                   |
| Sodio de croscarmelosa NF,<br>Ph. Eur., JP<br>(FMC BioPolymer)                              | Densidad por volumen<br>Densidad ahusada<br>Distribución de tamaño de<br>partícula              | 0.48 g/cc<br>0.67 g/cc<br>< 2% peso. retenida<br>sobre Malla No. 200 (75<br>/ $\mu$ m)<br>< 10% peso. retenida<br>sobre Malla No. 325 (45<br>/ $\mu$ m) |
| Estearato de magnesio<br>(calidad vegetal) NF, Ph.<br>Eur., JP (Mallinckrodt Baker<br>Inc.) | Densidad por volumen<br>Distribución de tamaño de<br>partícula<br>Área de superficie específica | 0.16 g/cc<br>< 2% por peso. retenida<br>sobre<br>Malla No. 200 (75/ $\mu$ m)<br>4.2 $\pm$ 0.04 m <sup>2</sup> /g                                        |

EJEMPLO 3

Encapsulación de Capsulas SAHA

Encapsulación/Clasificación por Peso

La mezcla de polvo lubricada fue encapsulada utilizando un encapsulador H&K, espigas compactadoras pulidas o espigas compactadoras recubiertas de nitruro de cromo y cápsulas tamaño “3” para el peso de cápsula deseado. Las cápsulas llenas fueron pulidas utilizando un pulidor de cápsulas y subsecuentemente clasificadas por peso utilizando un clasificador de pesos al rango de limite de peso apropiado. La Tabla 2 resume las configuraciones del encapsulador.

Tabla 2. Resumen de Configuraciones Operacionales del Encapsulador

|                                |                                                                |
|--------------------------------|----------------------------------------------------------------|
| Disco Dosificador              | 10.0- 12.7 mm                                                  |
| Espigas compactadoras/estación | 3 o 12                                                         |
| Tipo espiga compactadora       | Sin recubrimiento y pulidas o recubiertas con nitruro de cromo |
| Vacío                          | ON                                                             |
| Velocidad del encapsulador     | 150- 270 tapas/min o 750- 1000 tapas/min                       |

La composición de la cápsula de SAHA final es ilustrada en la Tabla 3. Las cápsulas son Clasificadas por peso utilizando un límite aceptable para variación de peso de cápsula de ± 10% el peso de cápsula objetivo. La variación de peso de cápsula en un lote típico es ± 4% el peso de cápsula objetivo.

Tabla 3: Composición de cápsulas de SAHA

| Ingrediente                                                | Peso unitario(mg) | Peso (%)  |
|------------------------------------------------------------|-------------------|-----------|
| Acido hidroxámico suberoilánilida (SAHA) – Fino            | X                 | Y         |
| Acido hidroxámico suberoilánilida (SAHA) – Grueso          | 100.0- x          | 66.67 - y |
| Celulosa Microcristalina (Avicel PH- 101) NF, Ph. Eur., JP | 44.33             | 29.80     |
| Sodio de Croscarmelosa NF, Ph. Eur., JP                    | 4.500             | 3.00      |
| Estearato de magnesio (calidad vegetal) NF, Ph. Eur., JP   | 1.170             | 0.78      |
| Cápsula de Gelatina                                        | 49.00             | N/UN      |

|                                                                |       |        |
|----------------------------------------------------------------|-------|--------|
| Dura, Tamaño “3”<br>Conisnap, Blanco<br>Opaco/Blanco<br>Opaco* |       |        |
| Total**                                                        | 150.0 | 100.00 |

\*La formulación de la tinta de capsular del mercado es Colorcon S- l- 17762. Las capsulas de gelatina libres de TSE

\*\* Pesos totales no incluyen las envolturas de las cápsulas de gelatina dura.

5

EJEMPLO 4

Medición de tasa de disolución de Cápsulas que contienen SAHA

La tasa de disolución de SAHA a partir de cápsulas de gelatina dura es evaluada utilizando un Aparato de Disolución USP II (VK 7000, Varian Inc., Cary, NC) . Cada cápsula es colocada en un *sinker* helicoidal (Quality Lab Accessories L.L.C., Manville, NJ) y liberada a recipientes que contienen 900 mL de 2.0% Tween (TCI America, Portland, Oregon) a una temperatura de 37±0.5°C. Las paletas son rotadas a 100 rpm y muestras fueron retiradas a intervalos de tiempo específicos a través de un automuestreador (VK 8000, Varian Inc., Cary, NC) equipados con filtros de flujo total (Varian Inc., Cary, NC) .

10

Subsecuentemente, las muestras fueron probadas para SAHA mediante Cromatografía Liquida de Alto Desempeño (Agilent 1100 series, Agilent Technologies Inc., Wilmington, DE) . El análisis cromatográfico fue realizado utilizando una columna con tamaño de partícula 5µm Phenomenex Luna C8 (2) (100 x 4.6 mm) , una fase móvil de 1:1 metanol/0.1 % ácido trifluoroacético (Calidad Reactiva, Fisher) , y una longitud de onda de detección de 242 nm.

15

20

EJEMPLO 5

Análisis de difracción de polvo de rayos- X de SAHA

El análisis de difracción de polvo de rayos- X se realizó sobre SAHA Forma I obtenido según el Ejemplo 1, y sobre SAHA Forma II- V preparado por los métodos detallados en la Tabla 4 a continuación.

25

Tabla 4: Muestras de SAHA analizadas mediante Difracción de polvo de rayos- X

|  |  |  |
|--|--|--|
|  |  |  |
|--|--|--|

| SAHA Muestra   | Referencia                                                     | Método                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
|----------------|----------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| SAHA Forma I   | -                                                              | Ejemplo 1                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| SAHA Forma II  | U.S. 5.369.108                                                 | SAHA se disolvió en EtOAc/THF (3/1) .                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|                | Columnas 25- 26<br>Procedimientos A, C, D                      | Las soluciones fueron pasadas a través un tapón de gel de sílice utilizando EtOAc/THF (3/1) . Las Fracciones fueron recolectadas y concentradas. El sólido apareció rosado.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| SAHA Forma III | U.S. 5.369.108<br>Columnas 25- 26<br>Procedimiento B           | SAHA se disolvió en metanol, se filtró a través de Celite, y se concentró sobre el rotovap hasta sequedad. Los residuos fueron vueltos una pasta aguada con hexanos y filtrados. Los sólidos aparecieron rosados.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| SAHA Forma IV  | <i>Mai et un OPPI Briefs</i><br>(2001) Vol 33(4) ,<br>391- 394 | SAHA fue recrystalizado a partir de acetonitrilo.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| SAHA Forma V   | Stowell <i>J. Med. Chem.</i> (1995) , 38(8) ,<br>1411- 1413    | A una mezcla de SAHA (4.0g) en metanol anhidro 4.37 metanol (15 mL) se agregó NaOMe (10.7 mL, M, 47 mmol) . La solución se volvió homogénea, pero el sólido se formó después de aproximadamente 5 minutos. La mezcla se agitó durante 15 min, y luego se agregó 100 ml de agua seguido por adición lenta de ácido acético glacial (3.77 mL, 4.0 g) . El sólido cristalino fue recolectado y lavado con agua (2x75 mL) . El sólido fue secado al vacío durante la noche proporcionando 3.85 g (96% de recuperación) de un sólido blancuzco. |

#### Análisis de difracción de rayos X :

Las muestras se analizaron sobre un Difractómetro de Polvo Automático Siemens D500 (ID de Instrumento No. LD- 301- 4) , el cual es operado según Procedimiento de Operación

Estándar EQ- 27, Rev. 12, según las instrucciones del fabricante. El Difractómetro está equipado con un monocromador de grafito y una fuente de rayos X Cu ( $\lambda=1.54\text{\AA}$ ) operada a 50kV, 40 mA. Se realiza una calibración dos- teta utilizando un estándar mica NBS (SRM675) . Las muestras se analizaron utilizando los siguientes parámetros de instrumentos:

- 5
- Rango de Medición:

4- 40 2 teta
- Ancho de Paso:

0.05 Å
- Tiempo de Medición por Paso:

1.2 segundos

10

La preparación de muestras se realizó según el Procedimiento de Operación Estándar MIC- 7, Rev. 2 (Sección 3.1.2) , según las instrucciones del fabricante, utilizando una placa de muestra de fondo cero (#1) . Las muestras se procesaron luego de una molida leve con mazo y mortero para asegurar homogeneidad.

La Figura 3A- E ilustra los difractogramas de rayos- X para SAHA Formas I- V. Los datos correspondientes para los difractogramas de rayos- X se presentan en las Tablas 5- 9 a continuación:

Tabla 5: SAHA Forma I

| Pico | 2Teta (deg) | D(Å)    |
|------|-------------|---------|
| 1    | 8.97        | 9.86159 |
| 2    | 9.37        | 9.43    |
| 3    | 17.46       | 5.07    |
| 4    | 19.41       | 4.57    |
| 5    | 20.04       | 4.43    |
| 6    | 23.96       | 3.71    |
| 7    | 24.44       | 3.64    |
| 8    | 24.76       | 3.59    |
| 9    | 24.96       | 3.56    |
| 10   | 27.96       | 3.19    |
| 11   | 43.29       | 2.08    |

15

Tabla 6: SAHA Forma II

57

| Pico | 2Teta (deg) | D(Å)  | Pico | 2Teta (deg) | D(Å) |
|------|-------------|-------|------|-------------|------|
| 1    | 5.12        | 17.24 | 18   | 21.72       | 4.09 |
| 2    | 5.46        | 16.15 | 19   | 22.07       | 4.02 |
| 3    | 7.48        | 11.8  | 20   | 22.88       | 3.88 |
| 4    | 7.72        | 11.44 | 21   | 23.36       | 3.80 |
| 5    | 8.15        | 18.84 | 22   | 23.79       | 3.73 |
| 6    | 8.72        | 10.13 | 23   | 24.16       | 3.68 |
| 7    | 9.21        | 9.59  | 24   | 24.66       | 3.61 |
| 8    | 10.91       | 8.09  | 25   | 25.75       | 3.46 |
| 9    | 12.38       | 7.14  | 26   | 26.92       | 3.31 |
| 10   | 13.55       | 6.52  | 27   | 27.56       | 3.23 |
| 11   | 17.31       | 5.12  | 28   | 27.88       | 3.20 |
| 12   | 18.22       | 4.86  | 29   | 28.53       | 3.12 |
| 13   | 18.86       | 4.70  | 30   | 30.68       | 2.91 |
| 14   | 19.32       | 4.59  | 31   | 40.21       | 2.24 |
| 15   | 19.88       | 4.46  | 32   | 42.80       | 2.11 |
| 16   | 20.76       | 4.27  | 33   | 43.16       | 2.09 |
| 17   | 21.20       | 4.19  |      |             |      |

Tabla 7: SAHA Forma III

| Pico | 2Teta (deg) | D(Å) | Pico | 2Teta (deg) | D(Å) |
|------|-------------|------|------|-------------|------|
| 1    | 10.10       | 8.75 | 12   | 23.81       | 3.73 |
| 2    | 12.13       | 7.29 | 13   | 24.54       | 3.62 |
| 3    | 13.83       | 6.40 | 14   | 25.04       | 3.55 |
| 4    | 15.11       | 5.86 | 15   | 25.36       | 3.51 |
| 5    | 17.65       | 5.02 | 16   | 26.10       | 3.41 |
| 6    | 18.54       | 4.78 | 17   | 26.80       | 3.32 |

|    |       |      |    |       |      |
|----|-------|------|----|-------|------|
| 7  | 18.80 | 4.71 | 18 | 35.62 | 2.51 |
| 8  | 19.60 | 4.52 | 19 | 37.12 | 2.42 |
| 9  | 20.18 | 4.40 | 20 | 40.92 | 2.20 |
| 10 | 20.90 | 4.25 | 21 | 42.43 | 2.13 |
| 11 | 21.69 | 4.10 | 22 | 44.83 | 2.02 |

Tabla 8: SAHA Forma IV

| Pico | 2Teta (deg) | D(Å)   |
|------|-------------|--------|
| 1    | 8.84        | 9.99   |
| 2    | 9.25        | 9.55   |
| 3    | 11.00       | 8.04   |
| 4    | 12.44       | 7.11   |
| 5    | 17.38       | 5.10   |
| 6    | 19.37       | 4.58   |
| 7    | 19.93       | 4.45   |
| 8    | 22.36       | 3.97   |
| 9    | 22.89       | 3.88   |
| 10   | 23.83       | 3.73   |
| 11   | 24.24       | 3.67   |
| 12   | 24.80       | 3.59   |
| 13   | 25.80       | 3.45   |
| 14   | 26.96       | 3.30   |
| 15   | 27.84       | 3.20   |
| 16   | 28.39       | 3.14 , |

Tabla 9: SAHAFormaV

| Pico | 2Teta (deg) | D(Å)  |
|------|-------------|-------|
| 1    | 5.08        | 17.39 |

|    |       |      |
|----|-------|------|
| 2  | 9.20  | 9.60 |
| 3  | 10.07 | 8.77 |
| 4  | 12.13 | 7.29 |
| 5  | 15.09 | 5.86 |
| 6  | 17.65 | 5.02 |
| 7  | 19.32 | 4.59 |
| 8  | 19.80 | 4.48 |
| 9  | 20.16 | 4.41 |
| 10 | 20.87 | 4.25 |
| 11 | 21.67 | 4.10 |
| 12 | 24.56 | 3.62 |
| 13 | 25.25 | 3.52 |
| 14 | 26.10 | 3.41 |
| 15 | 35.62 | 2.51 |
| 16 | 37.12 | 2.42 |
| 17 | 40.90 | 2.20 |
| 18 | 41.78 | 2.16 |
| 19 | 42.42 | 2.13 |
| 20 | 44.82 | 2.02 |

El patrón de difracción de polvo de rayos X de SAHA Forma I también se recolectó utilizando un Difractómetro de rayos X X'PERT Pro Phillips con una radiación  $K\alpha$  del cobre (longitud de onda 1.542 Å) . Las posiciones  $2\theta$  prominentes junto con los espacios -  $d$  se resumen en Tabla 5A.

Tabla 5A Forma I

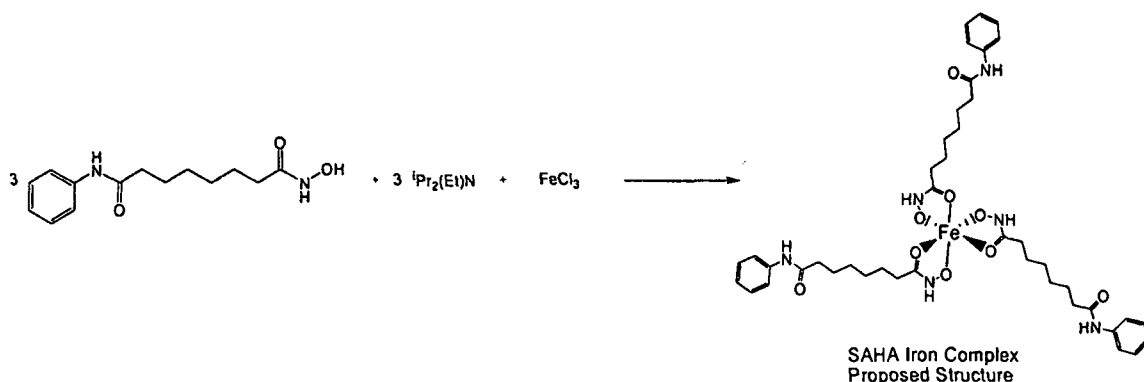
| Posición [ $^{\circ} 2\theta$ ] | espaciado- $d$ [Å] |
|---------------------------------|--------------------|
| 9.1                             | 9.7                |
| 10.8                            | 8.2                |
| 12.3                            | 7.2                |

|      |     |
|------|-----|
| 17.2 | 5.2 |
| 19.2 | 4.6 |
| 19.8 | 4.5 |
| 23.7 | 3.7 |
| 24.1 | 3.7 |
| 25.7 | 3.5 |
| 26.8 | 3.3 |
| 27.7 | 3.2 |

## EJEMPLO 6

### Preparación de Complejo quelado ferro Metálico SAHA

#### Esquema de Reacción Química



#### Experimental

A temperatura ambiente, SAHA (1.0 g, 3.78 mmol) y etanol (10.0 mL) se agregaron a una matraz Erlenmeyer, y luego se agrego por goteo N,N- diisopropiletilamina (0.66 mL, 3.78 mmol) con agitación. A la pasta aguada resultante, se agregó una solución de cloruro férrico en etanol (0.205 g, 1.26 mmol en 10.0 mL de etanol) . La mezcla inmediatamente se tornó de color rojo intenso cuando se agregó la solución de cloruro férrico. Se utilizó etanol (5.0 mL) para lavar la solución de cloruro férrico restante en la matraz de reacción. Después de 5 min de agitación a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se volvió una solución roja oscura brillante. La mezcla de reacción se dejo agitar a temperatura ambiente durante 16 h. Después de este tiempo, se observó un precipitado de color naranja oscuro. El sólido naranja fue recolectado a través de filtración y lavado con etanol (3 x 3.0 mL) . El filtrado fue incoloro. El sólido naranja

se dejo secar durante 24 h (masa 1.02 g, 96 % rendimiento) .

Análisis

El análisis elemental para contenido de C, H, N y Fe es proporcionado a continuación en Tabla

10:

Tabla 10: Análisis elemental

| % Elemento | Teórico | Actual |
|------------|---------|--------|
| %C         | 59.64   | 58.29  |
| %H         | 6.79    | 6.88   |
| %N         | 9.94    | 9.56   |
| %Fe        | 6.60    | 6.3    |

Los resultados del análisis elemental están de acuerdo con la estructura propuesta mostrada anteriormente.

EJEMPLO 7

Análisis de Difracción de polvo de rayos- X de complejo quelado de SAHA férrico

El patrón de difracción de polvo de rayos X (Figura 2) del complejo quelado SAHA férrico cristalino se generó sobre un Sistema de Difracción de rayos X Philips Analytical X'Pert PRO con consola PW3040/60 . Se utilizo una radiación PW3373/00 cerámica Cu LEF tubo de rayos X K- Alpha como la fuente. El complejo quelado SAHA férrico cristalino se puede caracterizar a 8.8, 14.5 y 21.8 grados (2θ) . El complejo quelado SAHA férrico cristalino se caracteriza además por picos a 13.3, 20.3 y 24.6 grados (2θ) . Picos adicionales atribuidos al complejo se observan a 18.5, 25.8 y 33.3 grados (2θ) .

EJEMPLO 8

Estudios de Pacientes

A pacientes con cáncer se administró la composición farmacéutica que comprende un complejo quelado metálico inhibidor de la HDAC, o una composición farmacéutica de un inhibidor de la HDAC y compuesto metálico quelable. Las experiencias adversas de los pacientes son registradas y comparadas con las experiencias adversas de pacientes administrados con el inhibidor de la HDAC.

A pacientes con cualquiera linfoma cutáneo de células T o linfoma periférico de células T se administró la composición farmacéutica una vez al día de manera continua, en donde la cantidad de SAHA administrado es 400 mg. A pacientes con cualquiera linfoma cutáneo de células T o linfoma periférico de células T se administró la composición farmacéutica dos veces al día tres a cinco días por semana, en donde la cantidad de SAHA administrado para cada dosis es 300 mg. A pacientes con leucemias avanzadas y síndrome mielodisplásico (MDS) se administró la composición farmacéutica de manera oral tres veces al día durante 14 días seguido por 1 semana de descanso, durante un curso de 3 semanas, en donde la cantidad de SAHA administrado para cada una dosis es 100 mg, 150 mg, 200 mg o 250 mg.

A pacientes con cáncer se co- administra un inhibidor de la HDAC y compuesto metálico quelable. Las experiencias adversas de los pacientes son registradas y comparadas con las experiencias adversas de pacientes administrados con solamente el inhibidor de la HDAC.

Los pacientes con cualquiera linfoma cutáneo de células T o linfoma periférico de células T son co- administrados de manera oral con SAHA una vez al día de manera continua a 400 mg o a 300 mg dos veces al día de tres a cinco días por semana y un suplemento férrico o zinc diariamente. A pacientes con leucemias avanzadas y síndrome mielodisplásico (MDS) se administra de manera oral SAHA a 100 mg, 150 mg, 200 mg o 250 mg tres veces al día durante 14 días seguido por 1 semana de descanso y un suplemento férrico o zinc diariamente, durante un periodo de 3 semanas. A pacientes con cáncer avanzado incluyendo cáncer hematológico y tumores sólidos se administra de manera oral SAHA 400 o 500 mg una vez al día diariamente, 200 o 300 mg dos veces al día diariamente, 300 mg o 400 mg dos veces al día de manera intermitente 3 días a la semana, o 100 mg tres veces un día (2 semanas) y suplemento férrico o zinc diariamente. A pacientes con linfoma difuso de células B grandes (DLBCL) o mesotelioma se administra de manera oral SAHA 300 mg dos veces al día 3 días durante una semana y un hierro o suplemento de zinc diariamente. La cantidad de zinc o hierro administrada se espera varié de paciente a paciente y será la cantidad necesaria para aliviar las toxicidades inducidas por el inhibidor de la HDAC sin producir toxicidad mediada por sobrecarga metálica.

#### EJEMPLO 9

##### Efectos de Suplementación de zinc sobre Efectos secundarios mediados por Vorinostat

Para probar si la dosis tolerada máxima (MTD) de vorinostat en ratones puede ser

aumentada con suplementación de zinc, A ratones (CD1 nu/nu hembra, de 6- 8 semanas de edad, Charles River Laboratories) se administró vehículo, 150 mg/kg (MTD) o 300 mg/kg vorinostat en vehículo (Tabla 11) . A los ratones se administró 0.5, 1, o 5 equivalentes molares (relativos a vorinostat) de cloruro de zinc. Esto corresponde a dosis de ZnCl<sub>2</sub> dosis de 38.5, 77, y 385 mg/kg para el grupo de vorinostat de 150 mg/kg.

Un estudio inicial de ratones sin tumores se utilizó para establecer MTD de combinaciones de vorinostat/Zn. Si se observa un cambio en MTD, se utiliza un experimento subsiguiente con ratones para establecer xenoinjertos subcutáneos de carcinoma de colon HCT116 para evaluar el papel de MTD alterada sobre crecimiento tumoral (eficacia) .

10

Tabla 11. MTD de Vorinostat y Suplementación de zinc. Todos los ratones son dosificados (i.p.) diariamente (qd) durante 14 días con la cantidades indicadas de compuestos.

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

El vehículo para Vorinostat (Dosis IP a 10 ul/g) contienen 10% v/v DMSO (Sigma, cat # : D8418) , 45% v/v PEG- 400 y 45% agua. Vorinostat en vehículo (Dosis IP a 10 ul/g) se prepara mediante pesando el compuesto (pre- calentar cada componente de vehículo a 37°C antes de formular el compuesto) , agregando volumen final 1/10<sup>th</sup> de 100% DMSO, sonicando hasta solución clara, agregando 50% PEG- 400 (en agua) hasta volumen final deseado, sonicando y

manteniendo a 37°C en todo momento. ZnCl<sub>2</sub> es disuelto en solución salina amortiguada con fosfato estéril (PBS) .

El peso corporal y supervivencia son monitoreados como indicaciones de toxicidad. Las dosis que resultan en una pérdida de peso corporal promedio de grupo mayor de 20% en promedio serán consideradas no toleradas. Igualmente, las dosis que resultan en muerte relacionada con el tratamiento de más de 2 ratones por grupo serán consideradas no toleradas. Para los animales con tumores, los tamaños de tumores en respuesta al tratamiento se miden 2- 3 veces por semana.

10    Tabla 12. Fin de Plan de Cosecha de Suero de estudio

|                                      |                                     |
|--------------------------------------|-------------------------------------|
| Primeros 2 ratones en cada una grupo | últimos 3 ratones en cada una grupo |
| RO 0.5hr PD,CP 4 hr PD               | RO 2hr PD,CP 24 hr                  |

PD = después de dosis; RO= sangrado retro- orbital; CP= punción cardiaca (terminal)

15    Sangrado Retro- orbital: 0.2 mL de sangre se recolecta mediante sangrado retro- orbital bajo anestesia de isoflurano. Sangre es procesada para suero (no se agrega anti- coagulante) .

Punción cardiaca: El volumen total de sangre se recolecta mediante punción cardiaca terminal bajo anestesia con CO<sub>2</sub>. La sangre es procesada para suero (no se agrega anti- coagulante) .

20    Conteo en sangre total (CBC)

El tratamiento de Vorinostat se ha asociado con números reducidos de ciertas poblaciones en sangre, incluyendo plaquetas y linfocitos. CBC de ratones se monitorea antes (línea base) y durante (Día7) , y después (Día 14) de tratamiento. Una pequeña cantidad de sangre (<50 µl) se obtiene mediante subconjuntos de sangrados retro- orbitales contados mediante un Instrumento Ada 120 (Seimens Medical) .

Autopsia y Cosecha de tejidos

Para animales con tumores, el tumor de xenoinjerto es retirado, pesado, y algunas porciones son congeladas al instante y fijadas en formalina amortiguada. El material tumoral fijado es procesado como laminas empotradas en parafina y sometido a análisis inmunohistoquímicos. Estos incluyen ensayos para proliferación (Ki- 67, BrdU) , apoptosis (Caspasa- 3) , y acetilación de varias histonas (H2, H3, H4) . Proteína de la histona a partir de material congelado se utiliza para probar cambios de acetilación de las histonas mediante ELISA (ensayo inmunsorbente ligado a enzima) . Los ratones también se someten a una autopsia total.

Mientras este invento ha sido particularmente mostrado y descrito con referencias a realizaciones del mismo, se entenderá por aquellos con experiencia en el estado de la técnica que varios cambios en forma y detalles se pueden realizar al mismo sin apartarse del significado del invento descrito. Preferiblemente, el alcance del invento se define mediante las reivindicaciones que siguen.

## Referencias

1. Sporn, M. B., Roberts, A. B., y Driscoll, J. S. (1985) en *Cáncer: Principios y Práctica de Oncología*, eds. Hellman, S., Rosenberg, S.A., y DeVita, V. T., Jr., Ed. 2, (J. B. Lippincott, Philadelphia) , P. 49.
2. Breitman, T. R., Selonick, S. E., y Collins, S. J. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 2936- 2940.
3. Olsson, I. L. y Breitman, T. R. (1982) *Cáncer Res.* 42: 3924- 3927.
4. Schwartz, E. L. y Sartorelli, A. C. (1982) *Cancer Res.* 42: 2651- 2655.
5. Marks, P. A., Sheffery, M., y Rifkind, R. A. (1987) *Cancer Res.* 47: 659.
6. Sachs, L. (1978) *Nature (Lond.)* 274: 535.
7. Friend, C, Scher, W., Holland, J. W., y Sato, T. (1971) *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 68: 378- 382.
8. Tanaka, M., Levy, J., Terada, M., Breslow, R., Rifkind, R. A., y Marks, P. A. (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 72: 1003- 1006.
9. Reuben, R. C, Wife, R. L., Breslow, R., Rifkind, R. A., y Marks, P. A. (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 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. (USA)* 78: 4990- 4994.
- 11 Schwartz, E. L., Snoddy, J. R., Kreutter, D., Rasmussen, H., y Sartorelli, A. C. (1983) *Proc. Am. Assoc. Cáncer Res.* 24: 18.
- 12 Tanenaga, K., Hozumi, M., y Sakagami, Y. (1980) *Cáncer Res.* 40: 914- 919.

- 13 Lotem, J. y Sachs, L. (1975) Int. J. Cáncer 15: 731- 740.
- 14 Metcalf, D. (1985) Science, 229: 16- 22.
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 Callaham, M. F. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 76: 1293- 1297.
- 5 18. Lottem, J. y Sachs, L. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 76: 5158- 5162.
19. Terada, M., Epner, E., Nudel, U., Salmon, J., Fibach, E., Rifkind, R. A., y Marks, P. A. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 75: 2795- 2799.
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)
- 10 Cancer Res. 43: 2725- 2730.
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) Cáncer Res. 36: 1809- 1813.
24. Hayashi, M., Okabe, J., y Hozumi, M. (1979) Gann 70: 235- 238.
25. Richon, V.M., Webb, Y., Merger, R., . (1996) PNAS 93:5705- 8.
- 15 26. Cohen, L.A., Amin, S., Marks, P.A., Rifkind, R.A., Desai, D., y Richon, V.M. (1999) Anticancer Research 19:4999- 5006.
27. Grunstein,M. (1997) Nature 389:349- 52.
28. Finnin, M.S., Donigian, J.R., Cohen, A., . (1999) Nature 401:188- 193.
29. Van Lint, C, Emiliani, S., Verdin, E. (1996) Expresión genética 5:245- 53.
- 20 30. Archer, S. Shufen, M. Shei, A., Hodin, R. (1998) PNAS 95:6791- 96.
31. Dressel, U., Renkawitz, R., Baniahmad, A. (2000) Anticancer Research 20(2A) : 1017- 22.
32. Parker, Vigoroux, Reed, AIChE J. (2000) pp. 1290- 99.
33. Nunez, Espiell, Chem.Eng.Sci. (1986) pp.2075- 83.
34. O. Levenspiel: Chemical Reacción Engineering, 2nd Ed., p. 373.
- 25 35. M. Vanni: J. de Colloid y Interface Sci. (2000) pp. 143- 160.
36. P. J. Hill y K. M. Ng, AIChE J. (1995) pp. 1204 - 1216.

## REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de la histona desacetilasa (HDAC) y un suplemento de zinc, y un portador farmacéuticamente aceptable.
2. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en donde el inhibidor de la HDAC es el ácido hidroxámico suberoilánilida (SAHA) o sal o hidrato o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.
3. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un ingrediente activo el cual es un complejo quelado de zinc SAHA o un hidrato o solvato del mismo y un portador farmacéuticamente aceptable.
4. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en donde la proporción estequiométrica de zinc a SAHA es de 1:2 en el complejo quelado de zinc SAHA.

69

1/7

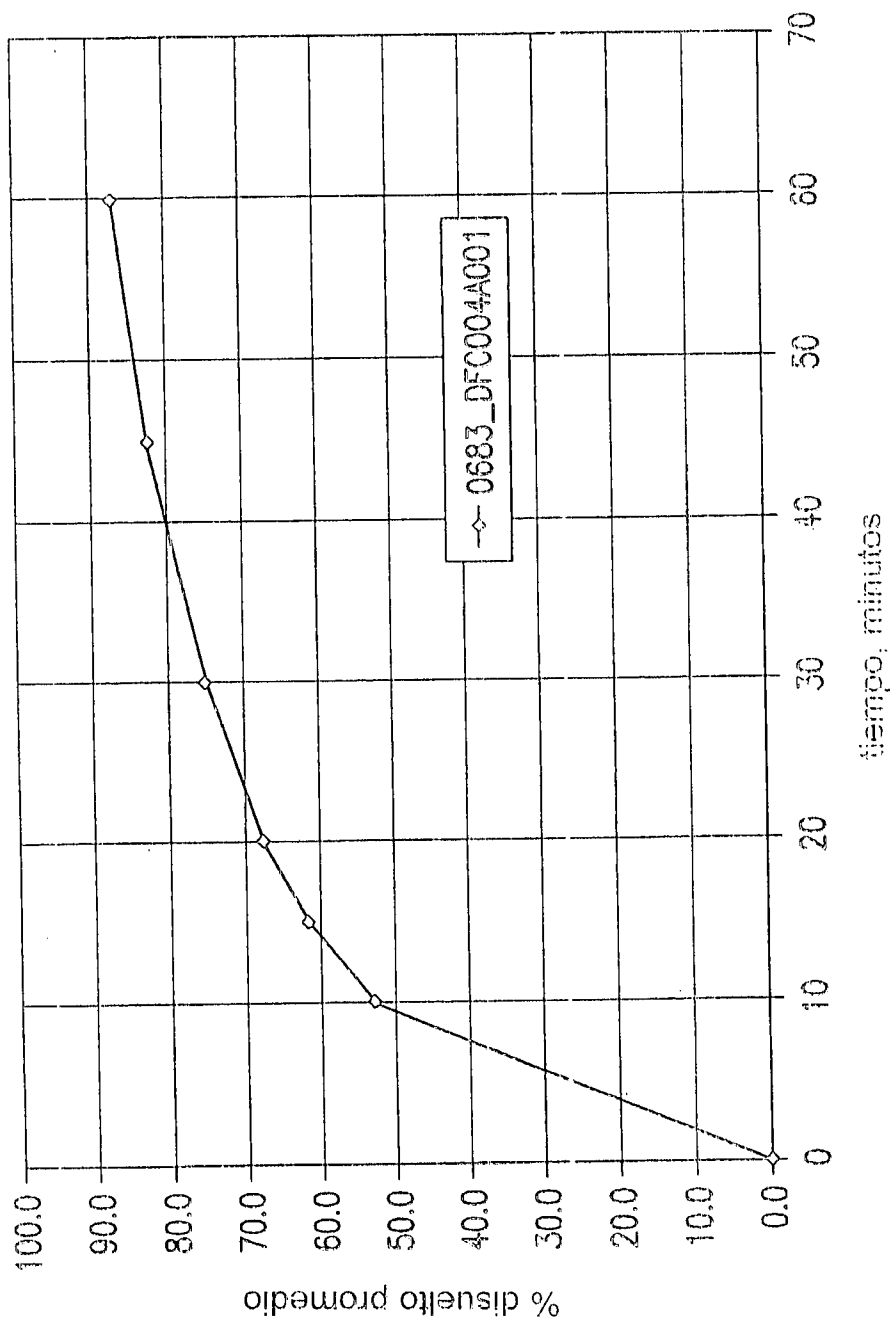


FIG.1

68

2/7

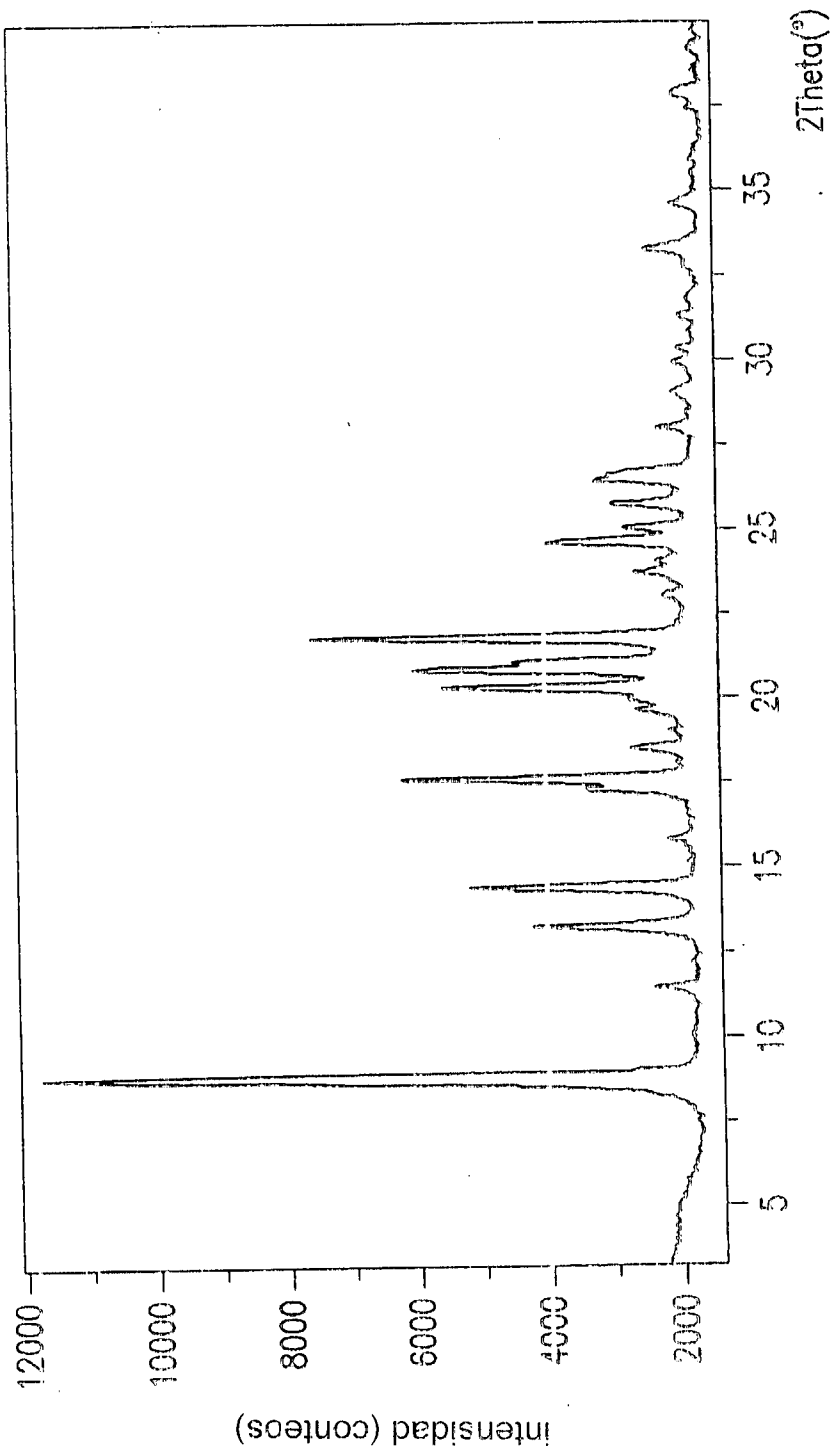


FIG.2

3/7

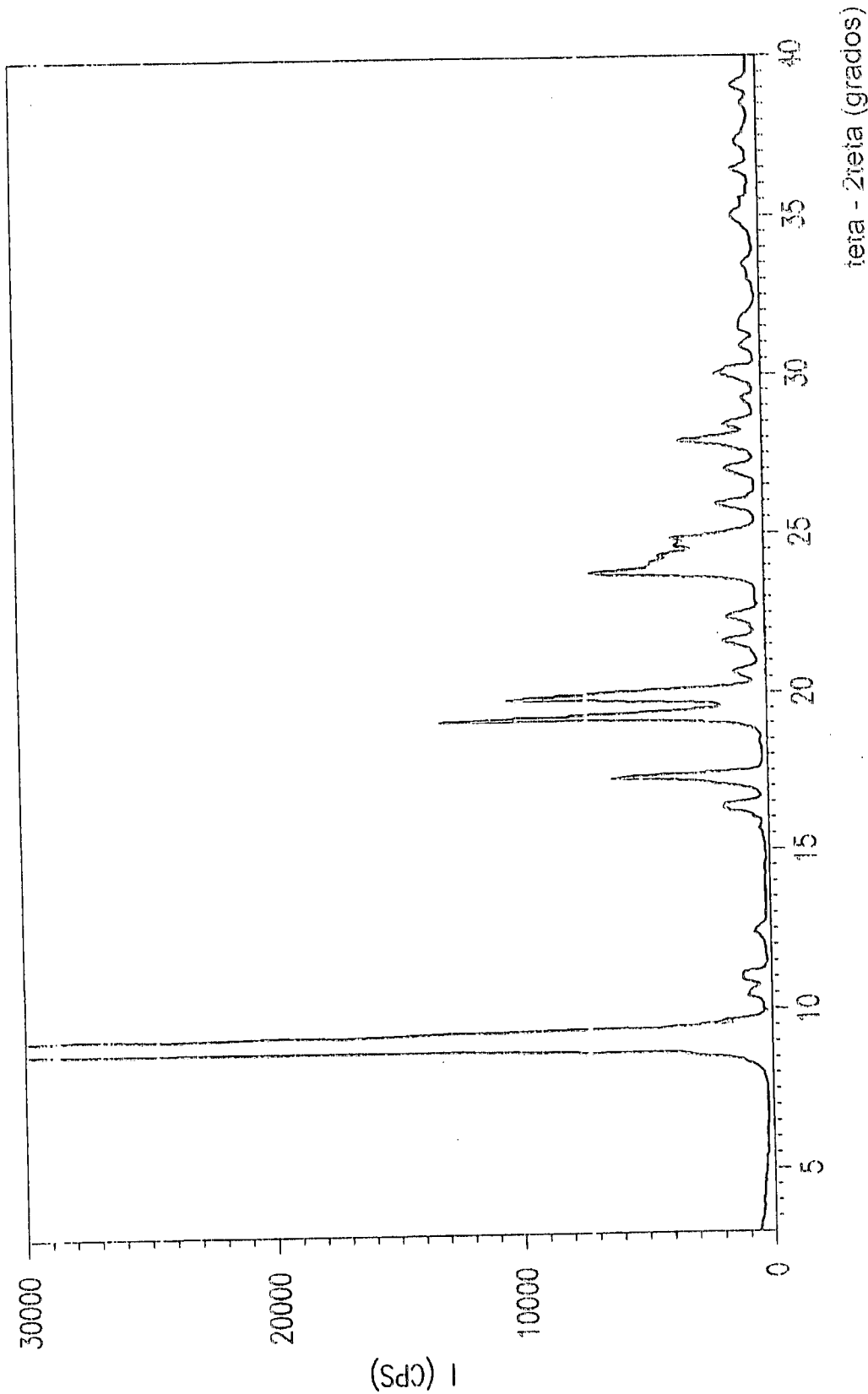
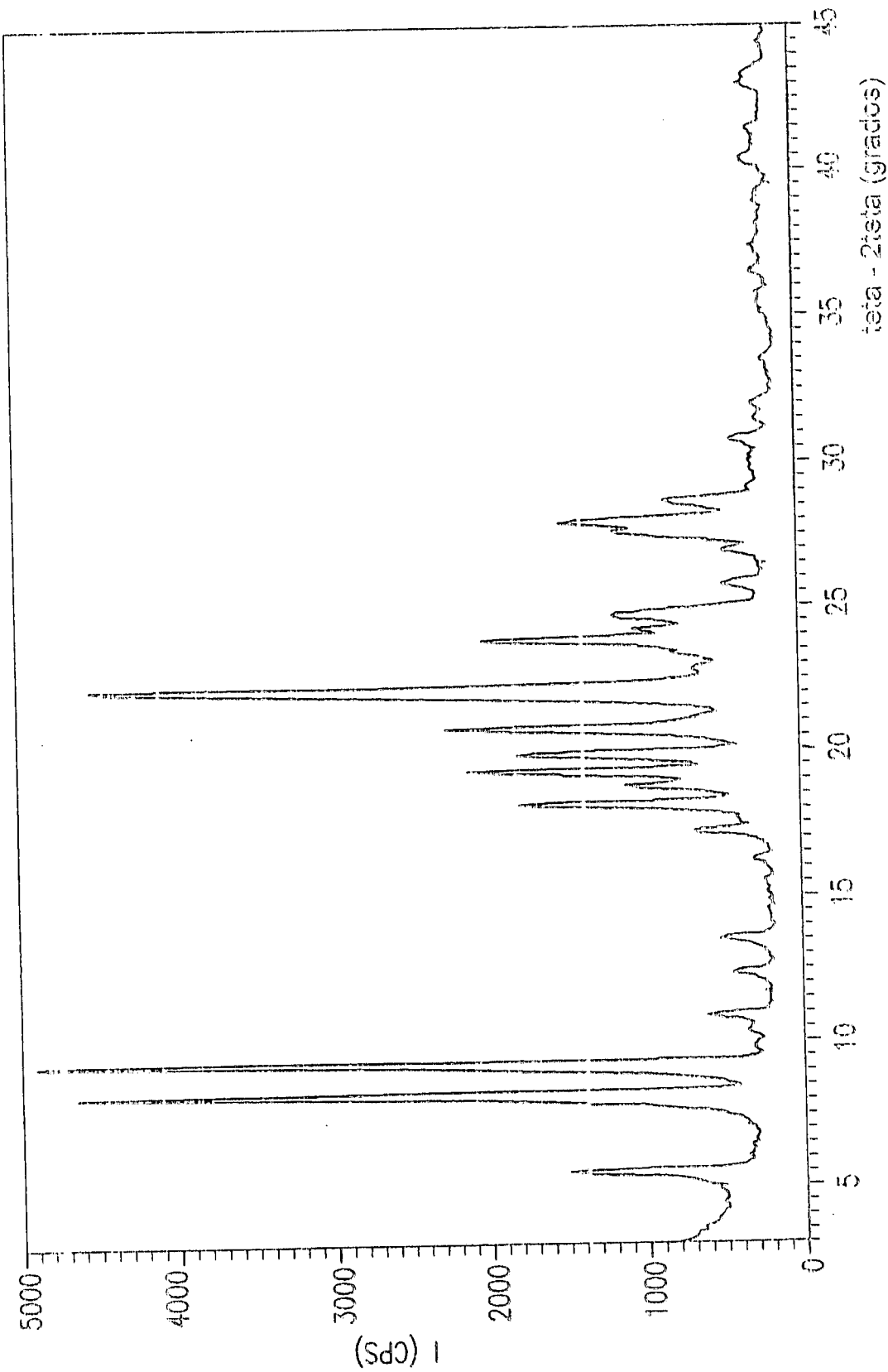


FIG. 3A



68

5/7

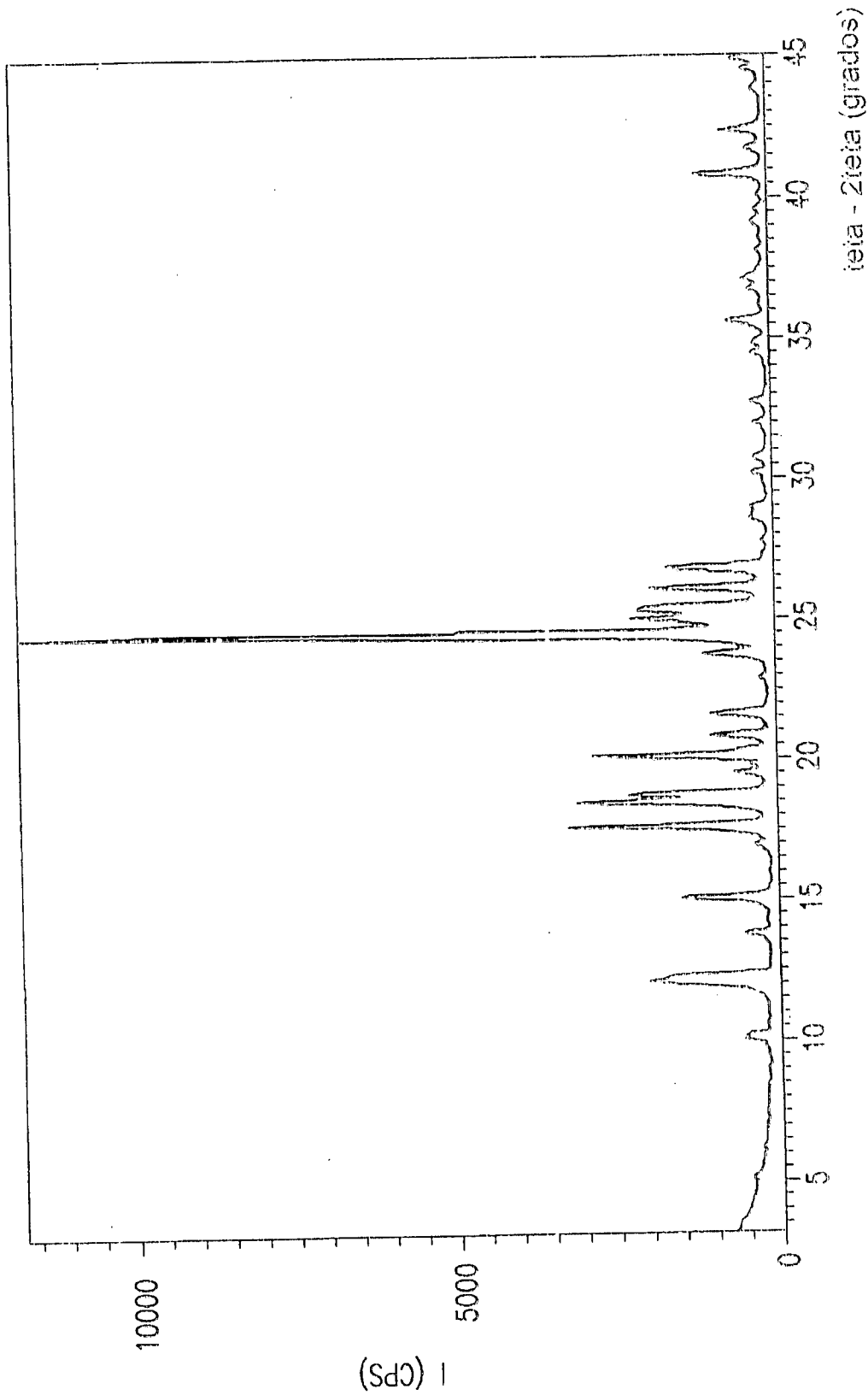


FIG.3C

6/7

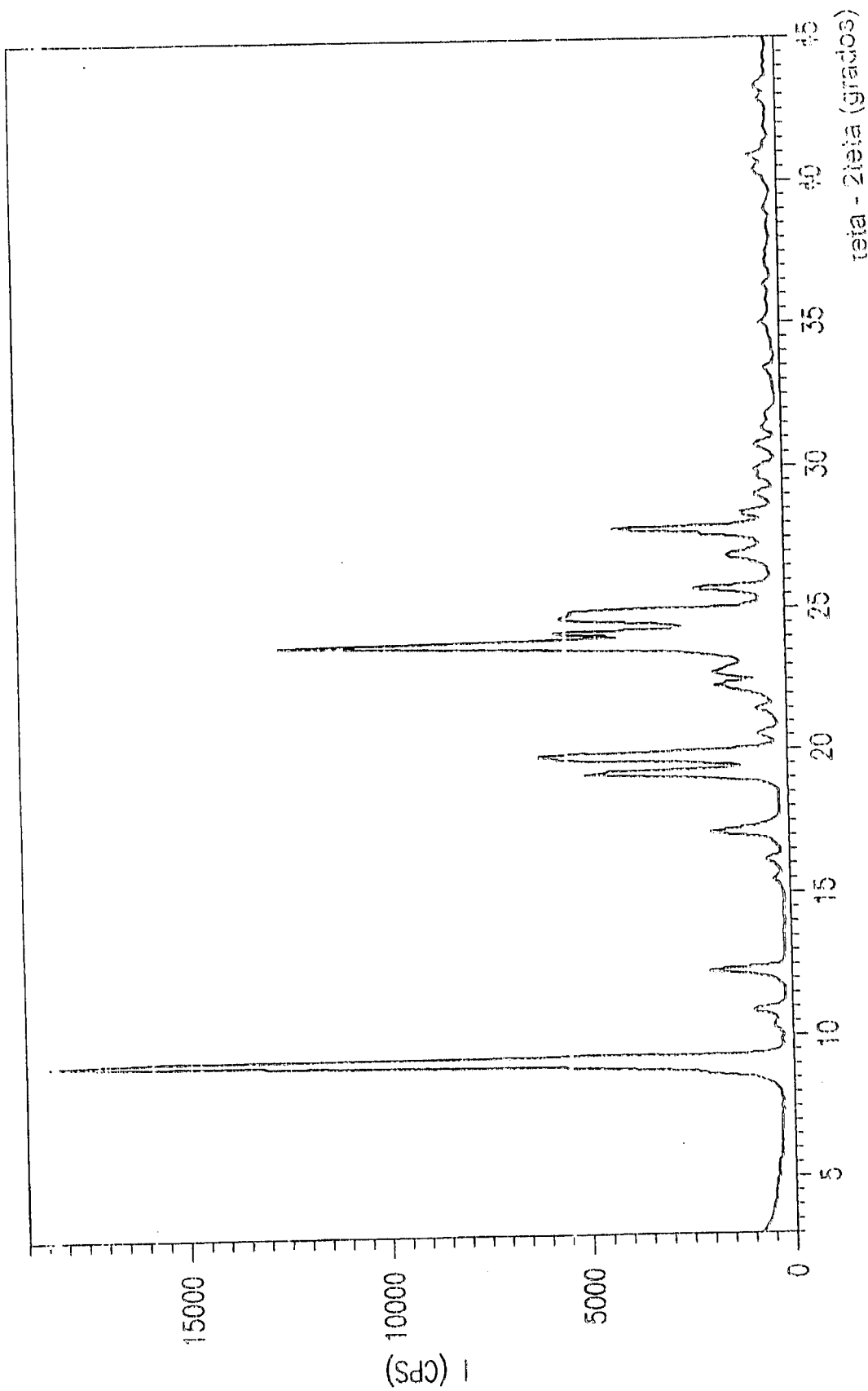


FIG. 3D

70

7/7

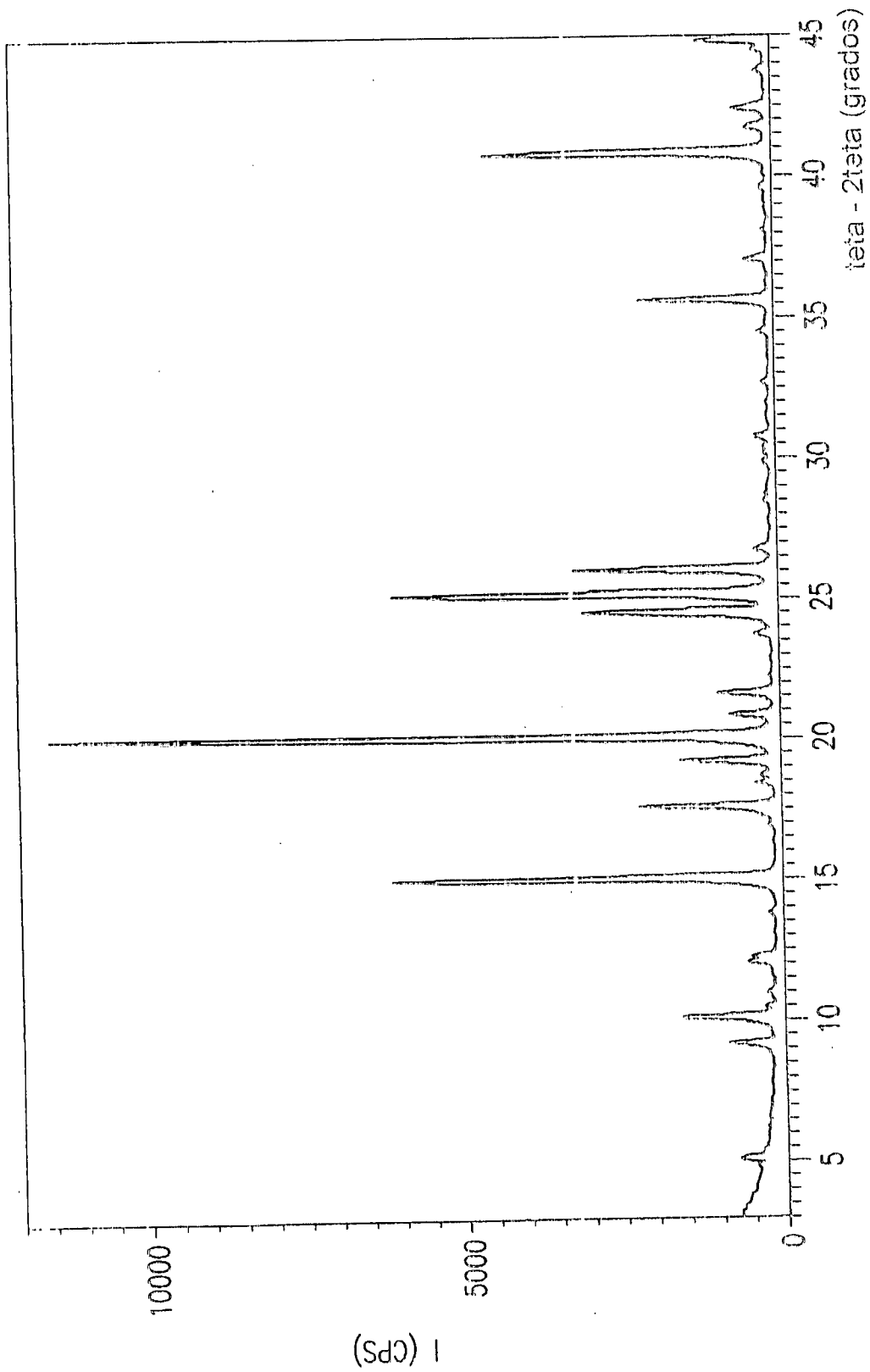


FIG. 3E