



QF

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Delegatura de Propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

PCI

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
INVENTARIO

08-125426

1 EXPEDIENTE No.

4 TITULO COMPUESTOS DE AZIDOPINIL-EPOTILONA

1 CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL COTD 491/64

1 SOLICITANTE BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY

DOMICILIO ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

4 APODERADO ALVARO CORREA ORDONEZ
C.C. 19143366 USUQUEN

2 BOGOTÁ, D. C.,

PETIT

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-125426-00000-0000

Fecha: 2008-11-25 16:23:26 Dep. 2020 NUECREACION
Tra. 11 PATENTEIYI Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 235

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL

SOLICITUD DE :

- 1
- ☒ Patente de Invención ☐ Patente de Modelo de Utilidad
- ☒ Capítulo I. ☐ Capítulo II.

2
SOLICITANTE
(71)

Nombre: BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY

Dirección: P.O. Box 4000, Princeton, Nueva Jersey 08543-4000
Estados Unidos de América

Nacionalidad o Domicilio: Domicilada en Estados de América

Lugar de Constitución: Delaware, Estados Unidos de América

Teléfono: Fax:

E-Mail:

IDENTIFICACION

C.C. ☐ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número _____

3
REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: ALVARO CORREA ORDOÑEZ

Dirección: Avenida 82 No. 10-62 Piso 6

Teléfono: 6341500 Fax: 3762211

E-Mail: office.bogota@bakernet.com

IDENTIFICACION

C.C. ☒ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número 79.143.366 Usaquén TP 28281

4
INVENTOR (ES)
(72)

Nombre: VITE, Gregory D.; LEAMON, Christopher P.; VLAHOV, Iontcho R.
SOONG-HOON, Kim

Dirección: 28 Continental Lane, Titusville, Nueva Jersey 08560 Estados Unidos de América; 5830 Farm Ridge
Road, West Lafayette, Indiana 47906 Estados Unidos de América.; 1041 Shootingstar Court, West
Lafayette, Indiana 47906 Estados Unidos de América.

Nacionalidad o Domicilio: Domiciliados en Estados Unidos de América

5 PCT (85)

Solicitud Internacional No. PCT/US2007/069736 Fecha 25.05.2007

Publicación Internacional No. WO/2007/140297 Fecha 06.12.2007

6 Título (54) COMPUESTOS DE AZIRIDINIL-EPOTILONA

7 Clasificación Internacional (51) C07D 491/04 , A61K 31/396 , A61K 31/427 ,A61P 35/00

8 Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

US

(32) Fecha

25/05/2006

(31) Número de Solicitud

60/808,366

9 Comprobante de pago No. 08,82-845

Fecha 07/20/08

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página

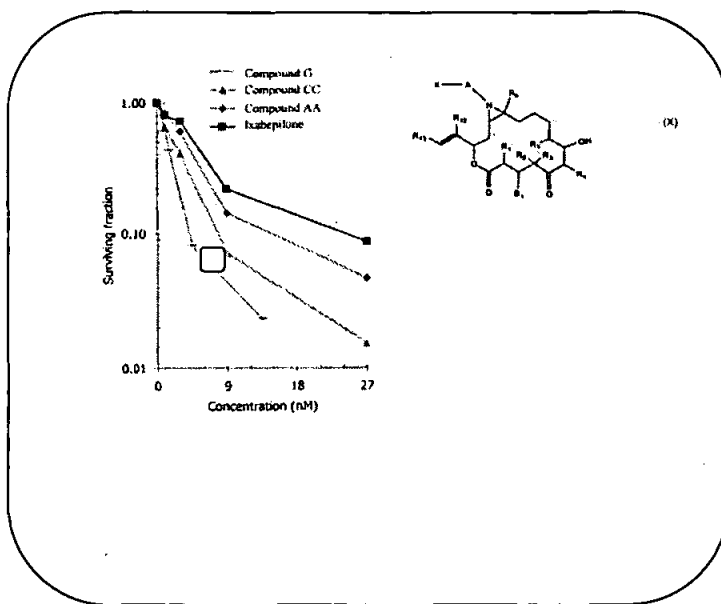
10

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☒ Documento que acredite la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica
- ☐ Poderes, si fuere el caso
- ☒ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- ☐ 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: Notificación Presentación de Prioridad, Opinión Escrita, Reporte de Búsqueda, Forma 306 adición de inventor.

11

FIGURA CARATERISTICA



12

Solicito la concesión de la patente.

NOMBRE: ALVARO CORREA ORDONEZ

FIRMA:

C.C. 79.143.366 de Usaquén

T.P. 20.281

Instrucciones para la presentación de los anexos, ver reverso de esta página

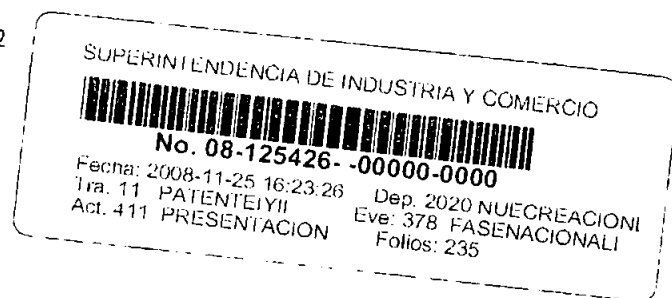
000003

2008/10/19

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 08 - 82,845
FECHA : OCTUBRE 20 DE 2008



***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
BAKER & MCKENZIE	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	102249184	20/10/2008	55,994,500.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	501,000.00
		TOTAL :	\$ 501,000.00

SON: QUINIENTOS UN MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

TRADUCCIÓN OFICIAL No. 631/08 de un documento escrito en inglés, el cual para su identificación se sella con el sello del Traductor. Esta es una Traducción Oficial efectuada el día 20 de noviembre de 2008 por la Sra. María Teresa Lara R., c.c. 41.568.055 de Bogotá, Traductora Oficial según Resolución No. 01016 del 2 de octubre de 1998, expedida por el Ministerio de Justicia.

=====

Traspaso del invento "Compuestos de aziridinil-epotilona" a BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY. Certificación notarial suscrita por Evelyn Vazquez, Notario Público del estado de Nueva Jersey, y legalizaciones subsiguientes.

10706-PCT

CERTIFICACIÓN NOTARIAL

ESTADO DE NUEVA JERSEY	)	
	)	ss.
CONDADO DE MERCER	)	

La suscrita, Evelyn Vazquez, Notario Público en y para el antedicho estado, certifico, a los 6 días del mes de noviembre de 2008, que adjuntas se encuentran copias completas, fieles y exactas de los traspasos originales firmados por los inventores allí nombrados ante un Notario Público.

(Fdo.) Evelyn Vazquez
 Notario Público
 Evelyn Vazquez
 Notario Público de Nueva Jersey
 No. 2106805
 Mi comisión expira el 9 de diciembre de 2012
 Registrada en el Condado de Middlesex

(Adherida, oblea
 dorada con el
 sello-notarial)


 MARIA TERESA LARA R.
 TRADUCTORA OFICIAL
 RESOLUCION No. 01016
 DE MINISTROS DE JUSTICIA

Mundial
Caso 10706 PSP

TRASPASO

Los suscritos,

Gregory D. Vite y Soong-Hoon Kim

en virtud de obligaciones contractuales previamente adquiridas por nosotros y/o por contraprestación válida, el recibo y suficiencia de la cual se reconocen por el presente, por medio de este documento vendemos y traspasamos a **Bristol-Myers Squibb Company**, sociedad constituida en el estado de Delaware, con sede en Lawrenceville-Princeton Road, Princeton, NJ 08543-4000, sus sucesores, cesionarios y representantes legales, todo nuestro derecho, título e interés, lo cual incluye el derecho y el pleno beneficio de las prioridades que nos puedan ser otorgadas en la actualidad o en un futuro por las leyes locales o mediante tratado, incluyendo cualquier convenio internacional para la protección de la propiedad industrial, en y para todos los países del mundo, incluidos los Estados Unidos y sus territorios y posesiones, en y sobre el invento titulado:

COMPUESTOS DE AZIRIDINIL-EPOTILONA

inventado por nosotros y descrito en la solicitud de patente provisional de los Estados Unidos

Solicitud No. 60/808,366, presentada el 25 de mayo de 2006

incluida dicha solicitud de patente provisional de los Estados Unidos y cualquier solicitud que reclame prioridad respecto de dicha solicitud provisional, presentada en cualquier país, y cualesquiera patentes que puedan ser expedidas y/u otorgadas en virtud de la misma, y todas las divisiones, continuaciones, reexpediciones, certificados de reexamen y prórrogas de éstos en todos los países, siendo dicho interés la propiedad total de dicho invento y de todas las antedichas solicitudes,

MARIA TERESA LARA R.
TRADUCTORA OFICIAL
RESOLUCION No. 01818
DE MINISTERIO

patentes (incluyendo patentes reexpedidas), prórrogas y certificados de reexamen para ser mantenidos y disfrutados por la antedicha Bristol-Myers Squibb Company y sus sucesoras y cesionarias hasta el final de los términos para los cuales tales patentes (incluidas las patentes reexpedidas), prórrogas y certificados de reexamen puedan ser otorgados y/o expedidos, tan plena y totalmente como los mismos habrían sido mantenidos y disfrutados por nosotros de no haberse efectuado esta venta, cesión y traspaso;

Y por la presente nos comprometemos a comunicarle a dicha cesionaria o a sus representantes cualquier hecho conocido por nosotros con respecto a dicho invento, a atestiguar en cualquier proceso judicial, a firmar y/u otorgar cualquier documento y/o instrumento adicional que pueda ser necesario, legal y apropiado en y/o para la presentación y/o el trámite de todas las solicitudes, incluidas las solicitudes divisionales, de continuación y reexpedidas, prórrogas y certificados de reexamen y/o el otorgamiento y/o expedición de los mismos y/u obtener de otro modo el título sobre dicho invento y todas las antedichas solicitudes, patentes (incluidas las patentes reexpedidas), prórrogas y certificados de reexamen en dicha cesionaria y en general para hacer todo lo posible por asistir a dicha cesionaria, sus sucesores y cesionarios para obtener y hacer valer la debida protección para dicho invento en todos los países.

MARIA TERESA LARA R.
TRADUCTORA OFICIAL
RESOLUCION No. 07816
DE MINISTERIO

Suscrito a los 25 días del mes de abril de 2007 por (Fdo.) Gregory D. Vite
Gregory D. Vite

ESTADO DE NUEVA JERSEY)
)
CONDADO DE SOMERSET)

A los 25 días del mes de abril de 2007, ante mí compareció Gregory D. Vite, a quien conozco como la persona de ese nombre mencionada y quien suscribió el Traspaso anterior, y reconoció haberlo suscrito.

(Fdo.) Dawnett Bragg
Notario Público

[SELLO]

DAWNETT BRAGG
Notario Público
Mi comisión expira el 22 de septiembre de 2009

Suscrito a los 24 días del mes de abril de 2007 por (Fdo.) Soong-Hoon Kim
Soong-Hoon Kim

ESTADO DE NUEVA JERSEY)
CONDADO DE SOMERSET)

A los 24 días del mes de abril de 2007, ante mí compareció Soong-Hoon Kim, a quien conozco como la persona de ese nombre mencionada y quien suscribió el Traspaso anterior, y reconoció haberlo suscrito.

(Fdo.) Dawnett Bragg
Notario Público

[SELLO]

DAWNETT BRAGG
Notario Público
Mi comisión expira el 22 de septiembre de 2009

TRASPASO

Los suscritos,

Christopher P. Leamon, Iontcho Vlahov

en virtud de obligaciones contractuales previamente adquiridas por nosotros y/o por contraprestación válida, el recibo y suficiencia de la cual se reconocen por el presente, por medio de este documento vendemos y traspasamos a **Endocyte,**

Mundial
10706

MARIA TERESA LARA R.
TRADUCTORA OFICIAL
RESOLUCION No. 0746
DE MINJISTERIO

Inc., sociedad constituida en el estado de Delaware, con sede en 3000 Kent Avenue, Suite A1-100, West Lafayette, Indiana 47906, sus sucesores, cesionarios y representantes legales, todo nuestro derecho, título e interés, lo cual incluye el derecho y el pleno beneficio de las prioridades que nos puedan ser otorgadas en la actualidad o en un futuro por las leyes locales o mediante tratado, incluyendo cualquier convenio internacional para la protección de la propiedad industrial, en y para todos los países del mundo, incluidos los Estados Unidos y sus territorios y posesiones, en y sobre el invento titulado:

COMPUESTOS DE AZIRIDINIL-EPOTILONA

inventado por nosotros y descrito en la solicitud de patente provisional de los Estados Unidos

Solicitud No. 60/808,366, presentada el 25 de mayo de 2006

incluida la solicitud de patente no provisional de los Estados Unidos identificada con el Número de Serie 11/753,785, presentada el 25 de mayo de 2007, y cualquier otra solicitud que reclame prioridad respecto de dicha solicitud no provisional, presentada en cualquier país, y cualesquiera patentes que puedan ser expedidas y/u otorgadas en virtud de la misma, y todas las divisiones, continuaciones, reexpediciones, certificados de reexamen y prórrogas de éstos en todos los países, siendo dicho interés la propiedad total de dicho invento y de todas las antedichas solicitudes, patentes (incluyendo patentes reexpedidas), prórrogas y certificados de reexamen para ser mantenidos y disfrutados por la antedicha Endocyte, Inc. y sus sucesoras y cesionarias hasta el final de los términos para los cuales tales patentes (incluidas las patentes reexpedidas), prórrogas y certificados de reexamen puedan ser otorgados y/o expedidos, tan plena y totalmente como los mismos habrían sido mantenidos y disfrutados por nosotros de no haberse efectuado esta venta, cesión y traspaso;

Y por la presente nos comprometemos a comunicarle a dicha cesionaria (o a sus representantes, sucesores o cesionarios) cualquier hecho conocido por nosotros con respecto a dicho invento, a atestiguar en cualquier proceso judicial, a firmar y/u otorgar cualquier documento y/o instrumento adicional que pueda ser necesario, legal y apropiado en y/o para la presentación y/o el trámite de todas las solicitudes, incluidas las solicitudes divisionales, de continuación y reexpedidas, prórrogas y certificados de reexamen y/o el otorgamiento y/o expedición de los mismos y/u obtener de otro modo el título sobre dicho invento y todas las antedichas solicitudes, patentes (incluidas las patentes reexpedidas, prórrogas y certificados de reexamen), y en general hacer todo lo posible por asistir a dicha cesionaria, sus sucesores y cesionarios para obtener y hacer valer la debida protección para dicho invento en todos los países.

Suscrito a los 26 días del mes de julio de 2007 por (Fdo.) Christopher P. Leamon
Christopher P. Leamon

ESTADO DE)
) ss.
CONDADO DE)

A los 26 días del mes de julio de 2007, ante mí compareció Christopher P. Leamon, a quien conozco como la persona de ese nombre mencionada y quien suscribió el Traspaso anterior, y reconoció haberlo suscrito.

(Fdo.) Beth Ann Biber
Notario Público

[SELLO]

NOTARIO PÚBLICO
SELLO NOTARIAL
ESTADO DE INDIANA

BETH ANN BIBER
Condado de Tippecanoe
Mi comisión expira el
8 de noviembre de 2009

Suscrito a los 26 días de julio de 2007 por (Fdo.) Iontcho Vlahov
Iontcho Vlahov

TERESA LARA R.
TRADUCTORA OFICIAL
RESOLUCION No. 01815
DE MINISTERIO

ESTADO DE)
) ss.
CONDADO DE)

A los 26 días del mes de julio de 2007, ante mí compareció Iontcho Vlahov, a quien conozco como la persona de ese nombre mencionada y quien suscribió el Traspaso anterior, y reconoció haberlo suscrito.

(Fdo.) Beth Ann Biber
Notario Público

[SELLO]

NOTARIO PÚBLICO
SELLO NOTARIAL
ESTADO DE INDIANA

BETH ANN BIBER
Condado de Tippecanoe
Mi comisión expira el
8 de noviembre de 2009

TERESA LARA R.
TRADUCTORA OFICIAL
RESOLUCION No. 01416
DE MINISTRIA

TRASPASO

Por contraprestación valiosa pagada por BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY (en adelante denominada la "CESIONARIA"), sociedad constituida en el estado de Delaware con sede en Route 206 and Provinceline Road, Princeton, Nueva Jersey 08543-4000, el recibo de la cual se reconoce por el presente, ENDOCYTE, INC. (en adelante denominada la "CEDENTE"), sociedad constituida en el estado de Delaware con sede en 3000 Kent Avenue, Suite A1-100, West Lafayette, IN 47906, por la presente cede a la CESIONARIA todo su derecho, título e interés en todos los países del mundo en y sobre todos y cada uno de sus inventos y descubrimientos en COMPUESTOS DE AZIRIDINIL-EPOTILONA, según se describen y/o reivindican en la solicitud provisional de Patente presentada el 25 de mayo de 2006 ante la Oficina de Patentes y Marcas de los Estados Unidos (USPTO), con No. de Serie 60/808,366 y según se describen y/o reivindican en la solicitud no provisional de Patente presentada el 25 de mayo de 2007 ante la USPTO, con No.

de Serie 11/753,785, incluyendo cualesquiera acciones, reclamaciones y demandas, conocidas o desconocidas, que la CEDENTE pueda haber tenido en virtud de las mismas antes de la fecha de este Traspaso, e incluyendo también todas y cada una de las solicitudes que reclamen prioridad frente a tales solicitudes provisionales y/o no provisionales, presentadas en cualquier país, y cualesquiera patentes que puedan expedirse y/u otorgarse sobre las mismas, incluidas todas las divisiones, continuaciones, reexpediciones, certificados de reexamen y prórrogas de éstos en todos los países, siendo dicho interés la propiedad total de dicho invento y todas las antedichas solicitudes; todos los cuales deberán ser mantenidos y disfrutados por la CESIONARIA para su propio uso y beneficio y para sus sucesores, cesionarios y representantes legales, hasta el final del término para el cual cada una de tales patentes sea o pueda en un futuro ser otorgada tan plena y totalmente como la misma habría sido mantenida por la CEDENTE en caso de no haberse efectuado este Traspaso.

TERESA LARA R.
TRADUCTORA OFICIAL
RESOLUCION 2007-01-01
DE MINISTERIO

Este traspaso incluye el otorgamiento por la CEDENTE a la CESIONARIA del derecho a reclamar prioridad para la solicitud provisional de los E.U. antes descrita según el Convenio Internacional para la Protección de la Propiedad Industrial y según cualquier otro acuerdo internacional del cual los Estados Unidos de América sean actualmente o puedan en un futuro ser signatarios.

EN CONSTANCIA DE LO CUAL, la CEDENTE ha hecho suscribir este traspaso a los 26 días del mes de julio de 2007 en W. Lafayette, Indiana.

ENDOCYTE INC.

Por (Fdo.) P. Ron Ellis

Nombre P. Ron Ellis

Cargo CEO

ESTADO DE INDIANA)
SS:
CONDADO DE TIPPECANOE)

Compareció ante mi la persona antes nombrada y reconoció haber suscrito el documento anterior por su propia voluntad y para el propósito allí señalado, a los 26 días del mes de julio de 2007.

(Fdo.) Marietta K. Taylor
Notario Público
Expira el 30 de junio de 2013

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

MARIA TERESA LARA R.
TRADUCTORA OFICIAL
RESOLUCION No. 07416
DE MINISTROS

1. País: ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA
2. Este documento público ha sido firmado por: EVELYN VAZQUEZ
3. actuando en calidad de: NOTARIO PÚBLICO DE NUEVA JERSEY
4. lleva el sello/timbre de: EVELYN VAZQUEZ, NOTARIO

CERTIFICADO

5. en TRENTON, NUEVA JERSEY
6. el día 10 DE NOVIEMBRE DE 2008
7. por R. David Rousseau, TESORERO DE NUEVA JERSEY
8. No. A345582
9. Sello/Timbre:
10. Firma

(El Gran Sello del
Estado de
Nueva Jersey)

(Fdo.) R. David Rousseau

Certificado Número: 112996320
Verificar este certificado en línea en
https://www.nj.us/TYTR_StandingCert/JSP/Verify_Cert.jsp

= = = = =

La anterior es traducción fiel y completa del documento en referencia, de la cual se
deja copia en este archivo para su confrontación.



María Teresa Lara R.
c.c. 41.568.055 de Bogotá
Traductora Oficial según
Resolución No. 01016 del
2 de octubre de 1998, del
Ministerio de Justicia



MARIA TERESA LARA R.
TRADUCTORA OFICIAL
RESOLUCION No. 01016
DE MINISTERIO DE JUSTICIA

000014

APOSTILLE

(CONVENTION DE LA HAYE DU 5 OCTOBRE 1961)

1. COUNTRY: UNITED STATES OF AMERICA
2. THIS PUBLIC DOCUMENT HAS BEEN SIGNED BY:
EVELYN VAZQUEZ
3. ACTING IN THE CAPACITY OF:
NOTARY PUBLIC OF NEW JERSEY
4. BEARS THE SEAL/STAMP OF:
EVELYN VAZQUEZ, NOTARY

CERTIFIED

5. AT TRENTON, NEW JERSEY
6. THE 10TH DAY OF NOVEMBER 2008
7. BY: R. David Rousseau, NEW JERSEY TREASURER
8. NO. A345582
9. SEAL/STAMP:



10. SIGNATURE

A handwritten signature, likely of R. David Rousseau, is written over a horizontal line.

Certificate Number: 112996320

Verify this certificate online at

https://www1.state.nj.us/TYTR_StandingCert/JSP/Verify_Cert.jsp

Maria Teresa Lara R.

MARIA TERESA LARA R.
TRADUCTORA OFICIAL
RESOLUCION No. 01514
DE MINISTERIA

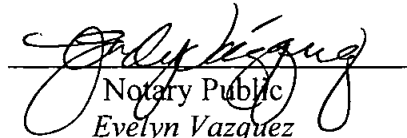
631/08

10706-PCT

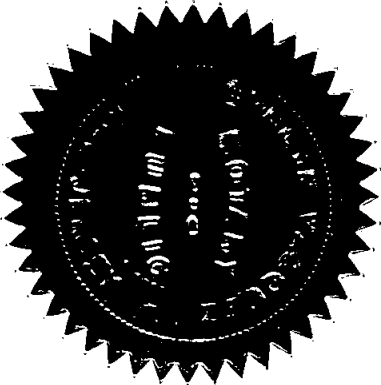
NOTARY CERTIFICATION

STATE OF NEW JERSEY)
)
COUNTY OF MERCER) ss.

I, Evelyn Vazquez, a Notary Public, in and for said state, do certify on this
6th day of November 2008, that the attached are the complete, full, true, and exact
copies of the original assignments signed by the named inventors before a Notary Public.


Notary Public
Evelyn Vazquez
Notary Public of New Jersey
No. 2106805

*My Commission Expires December 9, 2012
Registered in Middlesex County*



ASSIGNMENT

We,

Gregory D. Vite and Soong-Hoon Kim

pursuant to contractual obligations heretofore assumed by us and/or for good and valuable consideration, the receipt and adequacy of which is hereby acknowledged, do hereby sell and assign to **Bristol-Myers Squibb Company**, a Delaware corporation, having a place of business at Lawrenceville-Princeton Road, Princeton, NJ 08543-4000, its successors, assigns and legal representatives, all our right, title and interest, which includes the right to and full benefit of such priorities as may now or hereafter be granted to us by local laws or by treaty, including any international convention for the protection of industrial property, in and for all countries of the world, including the United States and its territories and possessions, in and to the invention entitled:

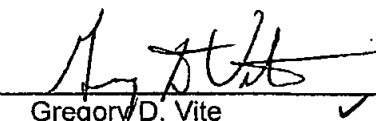
AZIRIDINYL-EPOTHILONE COMPOUNDS

invented by us and described in the provisional United States patent application

Application Number 60/808,366, filed May 25, 2006

Including said provisional United States patent application and any application claiming priority from said provisional application, filed in any country, and any patents which may be issued and/or granted thereon, and all divisions, continuations, reissues, reexamination certificates and extensions thereof in all countries, the said interest being the entire ownership of said invention and all of said applications, patents (including reissue patents), extensions and reexamination certificates to be held and enjoyed by the said Bristol-Myers Squibb Company and its successors and assigns to the full end of the terms to which said patents (including reissue patents), extensions and reexamination certificates may be granted and/or issued, as fully and entirely as the same would have been held and enjoyed by us if this sale, assignment and transfer had not been made;

And we hereby agree to communicate to said assignee or its representatives any facts known to us respecting said invention, to testify in any legal proceedings, to sign and/or execute any further documents and/or instruments which may be necessary, lawful and proper in and/or for the filing and/or prosecution of all applications, including divisional, continuation and reissue applications, extensions and reexamination certificates and/or the granting and/or issuance thereof and/or to otherwise secure title to said invention and all of said applications, patents (including reissue patents, extensions and reexamination certificates in said assignee, and in general to do everything possible to aid said assignee, its successors and assigns to obtain and enforce proper protection for said invention in all countries.

Signed this 25th day of April, 2007 by 
Gregory D. Vite

STATE OF New Jersey
COUNTY OF Somerset

On the 25th day of April, 2007, before me came Gregory D. Vite to me known to be the person of that name mentioned in, and who executed the foregoing Assignment and acknowledged that he/she executed it.

[SEAL]


Notary Public

DAWNET BRAGG
Notary Public of New Jersey
My Commission Expires Sept. 22, 2009

Signed this 24th day of April, 2007 bySoong-Hoon Kim ✓
Soong-Hoon KimSTATE OF New Jersey)COUNTY OF Somerset)

On the 24th day of April, 2007, before me came Soong-Hoon Kim to me known to be the person of that name mentioned in, and who executed the foregoing Assignment and acknowledged that he/she executed it.

[SEAL]

Dawnet Bragg
Notary Public

DAWNET BRAGG
Notary Public of New Jersey
My Commission Expires Sept. 22, 2009

ASSIGNMENT

We,

Christopher P. Leamon, Iontcho Vlahov

pursuant to contractual obligations heretofore assumed by us and/or for good and valuable consideration, the receipt and adequacy of which is hereby acknowledged, do hereby sell and assign to **Endocyte, Inc.**, a Delaware corporation, having a place of business 3000 Kent Avenue, Suite A1-100, West Lafayette, Indiana 47906, its successors, assigns and legal representatives, all our right, title and interest, which includes the right to and full benefit of such priorities as may now or hereafter be granted to us by local laws or by treaty, including any international convention for the protection of industrial property, in and for all countries of the world, including the United States and its territories and possessions, in and to the invention entitled:

AZIRIDINYL-EPOTHILONE COMPOUNDS

invented by us and described in the provisional United States patent application

Application No. 60/808,366, filed May 25, 2006

including said non-provisional United States patent application bearing Serial No. 11/753,785, filed May 25, 2007, and any other application claiming priority from said non-provisional application, filed in any country, and any patents which may be issued and/or granted thereon, and all divisions, continuations, reissues, reexamination certificates and extensions thereof in all countries, the said interest being the entire ownership of said invention and all of said applications, patents (including reissue patents), extensions and reexamination certificates to be held and enjoyed by the said Endocyte, Inc. and its successors and assigns to the full end of the terms to which said patents (including reissue patents), extensions and reexamination certificates may be granted and/or issued, as fully and entirely as the same would have been held and enjoyed by us if this sale, assignment and transfer had not been made;

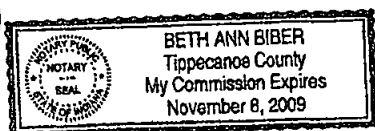
And we hereby agree to communicate to said assignee (or its representatives, successors or assigns), any facts known to us respecting said invention, to testify in any legal proceedings, to sign and/or execute any further documents and/or instruments which may be necessary, lawful and proper in and/or for the filing and/or prosecution of all applications, including divisional, continuation and reissue applications, extensions and reexamination certificates and/or the granting and/or issuance thereof and/or to otherwise secure title to said invention and all of said applications, patents (including reissue patents, extensions and reexamination certificates), and in general to do everything possible to aid said assignee, its successors and assigns to obtain and enforce proper protection for said invention in all countries.

Signed this 26 day of July, 2007 by Christopher P. Leamon ✓
Christopher P. Leamon

STATE OF)
) ss.
COUNTY OF)

On this day 26 of July, 2007, before me came Christopher P. Leamon, to me known to be the person of that name mentioned in, and who executed the foregoing Assignment and acknowledged that he/she executed it.

[SEAL]



Beth Ann Biber
Notary Public

Signed this 26 day of July, 2007 by Iontcho Vlahov ✓
Iontcho Vlahov

STATE OF)
) ss.
COUNTY OF)

On this day 26 of July, 2007, before me came, Iontcho Vlahov, to me known to be the person of that name mentioned in, and who executed the foregoing Assignment and acknowledged that he/she executed it.

[SEAL]



Beth Ann Biber
Notary Public

ASSIGNMENT

For good and valuable consideration paid by BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY (hereinafter referred to as "ASSIGNEE"), a Delaware corporation having an office at Route 206 and Provinceline Road, Princeton, New Jersey 08543-4000, the receipt whereof is hereby acknowledged, ENDOCYTE, INC. (hereinafter referred to as "ASSIGNOR"), A Delaware corporation having an office at 3000 Kent Avenue, Suite A1-100, West Lafayette, IN 47906, does hereby assign to ASSIGNEE all of its right, title and interest in all countries of the world in and to any and all of its inventions and discoveries in AZIRIDINYL-EPOTHILONE COMPOUNDS, as described and/or claimed in the provisional application for Letters Patent filed May 25, 2006 in the United States Patent and Trademark Office (USPTO), having Serial No. 60/808,366, and as described and/or claimed in the non-provisional application for Letters Patent filed May 25, 2007, in the USPTO, having Serial No. 11/753,785, including any actions, claims and demands whatsoever, known or unknown, that ASSIGNOR may have had thereunder prior to the date of this Assignment, and also including any and all applications claiming priority from said provisional and/or non-provisional applications, filed in any country, and any patents which may be issued and/or granted thereon, including all divisions, continuations, reissues, reexamination certificates and extensions thereof in all countries, the said interest being the entire ownership of said invention and all of said applications; all of the same to be held and enjoyed by ASSIGNEE for its own use and benefit and for its successors, assigns, and legal representatives, to the full end of the term for which each of said patents are or may hereafter be granted as fully and entirely as the same would have been held by ASSIGNOR had this Assignment not been made.

This assignment includes the grant by the ASSIGNOR to the ASSIGNEE of the right to claim priority for the above-described U.S. provisional application under the International Convention for the Protection of Industrial Property and under any other international arrangement to which the United States of America is or hereafter becomes a signatory.

IN WITNESS WHEREOF, assignor has caused this assignment to be executed this 26 day of July 2007, at W. Lafayette, Indiana.

ENDOCYTE INC.

By [Signature]
Name P. R. Ellis
Title CEO

STATE OF Indiana)
SS:
COUNTY OF Tipton

There appeared before me the person above-named and acknowledged that he executed the same of his own free will for the purpose set forth, on this 26th day of July 2007.

[Signature]
Notary Public
Expires June 30, 2013

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
6 December 2007 (06.12.2007)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2007/140297 A3

(51) International Patent Classification:

C07D 491/04 (2006.01) A61K 31/396 (2006.01)
A61K 31/427 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/US2007/069736

(22) International Filing Date: 25 May 2007 (25.05.2007)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:

60/808,366 25 May 2006 (25.05.2006) US

(71) Applicant (for all designated States except US): BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY [—/US]; P.O. Box 4000, Princeton, NJ 08543-4000 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): VITE, Gregory D. [US/US]; 28 Continental Lane, Titusville, NJ 08560 (US). LEE, Francis Y. [—/US]; 363 Lang Court, Yardley, PA 19067 (US). LEAMON, Christopher P. [US/US]; 5830 Farm Ridge Road, West Lafayette, IN 47906 (US). VLAHOV, Iontcho R. [US/US]; 1041 Shootingstar Court, West Lafayette, IN 47906 (US).

(74) Agents: PERRY, Lawrence S. et al.; Fitzpatrick, Cella, Harper & Scinto, 30 Rockefeller Plaza, New York, NY 10112 (US).

(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, 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, 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.

(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).

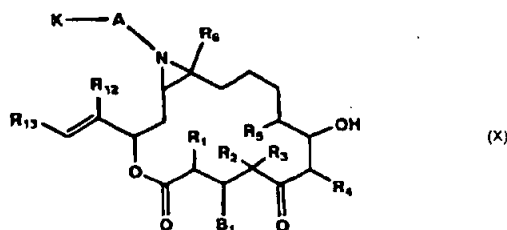
Published:

— with international search report

(88) Date of publication of the international search report:
31 January 2008

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: AZIRIDINYL-EPOTHILONE COMPOUNDS



(57) Abstract: The present invention is directed to aziridinyl epothilone compounds as further described herein, and/or pharmaceutically-acceptable salts and/or solvates thereof having Formula (X). The compounds can be used in cancer treatment of for the preparation of conjugates for targeted drug delivery, especially folates.

- 1 -

TITLE

AZIRIDINYL-EPOTHILONE COMPOUNDS

[0001] This application claims priority to U.S. Provisional Patent Application No. 60/808,366, filed May 25, 2006, which is hereby incorporated by reference herein in its entirety.

BACKGROUND OF THE INVENTION

Field of the Invention

[0002] The present invention relates to aziridinyl-epothilone analogs pharmaceutical compositions comprising aziridinyl-epothilone analogs, and methods of using the same.

Related Background Art

[0003] Epothilones A and B are naturally-occurring compounds that were discovered by Höfle *et al.* as isolated from fermentation products of the microorganism, *Sorangium cellulosum* (see, e.g., WO 93/10121). Höfle *et al.* also discovered 37 natural epothilone variants and related compounds produced by *Sorangium cellulosum*, including epothilones C, D, E, F and other isomers and variants. See, e.g., US Pat. No. 6,624,310. While in 1993 Höfle *et al.* reported on cytotoxic effects of Epothilones A and B, in 1995 researchers with Merck reported that epothilone B exerts microtubule-stabilizing effects similar to

- 2 -

paclitaxel (TAXOL[®]) (*See* D.M. Bollag, "Epothilones, a New Class of Microtubule-Stabilizing Agents with a Taxol-like Mechanism of Action," *Cancer Research*, Vol. 55 (June 1995), at pp. 2325-2333).

[0004] Various derivatives and analogs of the naturally-occurring epothilones have been discovered at Bristol-Myers Squibb Co. Examples of epothilone analogs include the aza-epothilone B analog known as ixabepilone, 21-substituted analogs of epothilone B including a 21-amino analog, 2,3-olefinic analogs, C-3 cyano analogs, cyclopropyl analogs, and heterocyclic analogs including aziridinyl-epothilone analogs. *See, e.g.* US Pat. Nos. 6,605,599; 6,262,094; 6,399,638; 6,498,257; 6,380,395; and 6,800,653, each of which is incorporated herein by reference. Others have also reported on the discovery of other epothilone derivatives and analogs. *See, e.g.*, PCT Pub. Nos. WO 99/65913, WO 98/25929; WO 00/99/07692; WO 99/67252; WO 00/00485; WO 00/37473; WO 01/83800; WO 99/67253, WO 99/07692, WO 00/00485, WO 00/49021, WO 00/66589, WO 03/045324, WO 04/014919, WO 04/056832, WO 03/022844; US Pat. Nos. 6,441,186; 6,284,781; 6,660,758; 6,380,394; 6,242,469; 6,531,497; 6,441,186; 6,489,314; 6,589,968; 6,930,102; US Pat. Appl. Pub. Nos. US 2004/0072870 A1; US 2003/0023082 A1; US 2004/0053910 A1; US 2004/0152708 A1, all of which are incorporated by reference in their entirety.

[0005] The naturally-occurring epothilones and their analogs, like other microtubule-stabilizing agents, may be useful for treating proliferative diseases such as cancer, which typically work by killing (or arresting the growth of) tumor cells, other pathogenic cells, and foreign pathogens. Often, however, anticancer drugs attack not only tumor cells but also normal tissue, leading to undesired side effects. Additionally, anticancer drugs typically present solubility issues such that formulation and delivery of the agents can present challenges, leading to use of solubilizing agents such as CREMOPHOR[®]. The cytotoxicity of some anticancer drugs and/or formulation ingredients has been known to cause neuropathy or other side effects such as hypersensitivity reactions. These adverse side effects highlight the need for anticancer therapies that are selective for pathogenic cell populations and therefore result in reduced host toxicity.

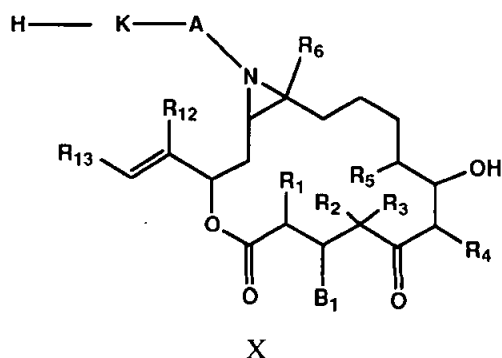
- 3 -

[0006] However, as discussed in WO 2004/054622 A1 scientists have for many years attempted to use monoclonal antibodies (mAbs) in targeted drug therapies for delivery of chemotherapeutic agents to patients, but drawbacks have been encountered in terms of, *inter alia*, the cleavable moiety, the linkers, and the form of drug released in the cell. It has been reported that successful therapy of tumors with mAbs is limited by inadequate penetration of the antibody in the tumor and by the heterogeneous distribution of corresponding tumor-associated antigen in the tumor tissue. See, Klar et al., WO 05/074901 (assigned to Schering AG).

[0007] US Pat. App. Pub. No. 2005/0002942 discloses vitamin receptor binding drug delivery conjugates that are useful for targeted drug delivery. There is a need in the art for identifying anticancer agents that could be used to make conjugates such as those described in US 2005/0002942, in the interest of providing targeted drug delivery for cancer treatment.

SUMMARY OF THE INVENTION

[0008] The present invention is directed to compounds having the following Formula X:



or pharmaceutically-acceptable salts and/or solvates thereof, wherein:

K is -O-, -S-, or -NR₇-;

A is -(CR₈R₉)-(CH₂)_m-Z- wherein Z is -(CHR₁₀)-, -C(=O)-, -C(=O)-C(=O)-, -OC(=O)-, -N(R₁₁)C(=O)-, -SO₂-, or -N(R₁₁)SO₂-;

B₁ is hydroxyl or cyano and R₁ is hydrogen or B₁ and R₁ are taken together to form a double bond;

- 4 -

R₂, R₃, and R₅ are, independently, hydrogen, alkyl, substituted alkyl, aryl or substituted aryl; or R₂ and R₃ may be taken together with the carbon to which they are attached to form an optionally substituted cycloalkyl;

R₄ is hydrogen, alkyl, alkenyl, substituted alkyl, substituted alkenyl, aryl, or substituted aryl;

R₆ is hydrogen, alkyl or substituted alkyl;

R₇, R₈, R₉, R₁₀, and R₁₁ are independently hydrogen, alkyl, substituted alkyl, cycloalkyl, substituted cycloalkyl, aryl, substituted aryl, heterocycloalkyl, substituted heterocycloalkyl, heteroaryl, or substituted heteroaryl;

R₁₂ is H, alkyl, substituted alkyl, or halogen;

R₁₃ is aryl, substituted aryl, heteroaryl or substituted heteroaryl; and

m is 0 to 6.

[0009] The present invention is further directed to methods for treating cancer with use of compounds having the Formula X, as well as use of the compounds of Formula X in preparing pharmaceutical compositions with pharmaceutically acceptable carriers for treating cancer. Compounds of Formula X are especially useful in preparing compositions for targeted drug therapies.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

[0010] **FIG. 1** is the chemical structures, relative affinities, and EC₅₀ (nM) values against KB tumor cells of six folate conjugates of epothilone analog Compound AA (conjugate number AA.I to AA-VI).

[0011] **FIG. 2** is the chemical structures, relative affinities, and EC₅₀ (nM) values against KB tumor cells of three folate conjugates of epothilone analog Compound BB (conjugate number BB.I to BB.III).

[0012] **FIG. 3** demonstrates the fraction of surviving KB clones (Surviving fraction; y-axis) after treatment with increasing concentrations (Concentration (nM); x-axis) of Compound G (bars), Compound CC (triangles), Compound AA (diamonds), or ixabepilone (squares).

[0013] **FIG. 4** demonstrates the in vivo antitumor efficacy of treating KB nasopharyngeal epidermoid carcinoma xenografts in nude mice with Compound J (grey squares, white squares, grey diamonds) at various doses or ixabepilone

- 5 -

(black bars), compared to no treatment (control; black circles), as a measure of (A) median tumor weight (mg; y-axis) several days post tumor implant (x-axis) or (B) weight loss (% body weight change; y-axis) several days post-tumor implant (x-axis).

[0014] FIG. 5 demonstrates the in vivo antitumor effects of Compound J (grey squares) or ixabepilone (white squares), compared to no treatment (control; black circles), against FR (-) M109 murine lung carcinoma as a measure of median tumor weight (mg; y-axis) several days post tumor implant (x-axis).

[0015] FIG. 6 demonstrates the in vivo antitumor effects, as a measure of median tumor weight (mg; y-axis) several days post tumor implant (x-axis), of no treatment (control, black circles), treatment with Compound J alone (grey squares), Compound J in the presence of a folate analog, black bars), or treatment with Compound G (grey diamonds).

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

DEFINITIONS OF TERMS

[0016] The following are definitions of terms used in the present specification. The initial definition provided for a group or term herein applies to that group or term throughout the present specification individually or as part of another group, unless otherwise indicated.

[0017] The term “folate-binding moiety or analog or derivative thereof” as used herein means a moiety that will bind to a folate-receptor protein (not a monoclonal antibody) that is overexpressed or preferentially expressed on cancer cells. For example, it is known that the folate receptor (FR) is over-expressed in ovarian cancer cells and other cancer cells. Illustrative analogs and derivatives of folate are disclosed in US Pat. App. Pub. No. 2005/0002942 to Vlahov et al., (hereinafter “Vlahov”), incorporated herein by reference.

[0018] The term “releasable linker” as used herein means a bivalent linker that includes at least one cleavable bond that can be broken under physiological conditions (e.g. a pH-labile, reductively-labile, acid-labile, oxidatively-labile, or enzyme-labile bond.) It should be appreciated that such physiological conditions resulting in bond breaking include standard chemical hydrolysis reactions that

- 6 -

occur, for example, at physiological pH, or as a result of compartmentalization into a cellular organelle, such as an endosome having a lower pH than cytosolic pH, or as a result of reaction with a cellular reducing agent such as glutathione.

[0019] It is understood that a cleavable bond can connect two adjacent atoms within the releasable linker and/or connect other groups to the releasable linker such as Q and K, as described herein, at either or both ends of the linker.

[0020] The terms "alkyl" and "alk" whether alone or in combination with some other group, refer to a straight or branched chain alkane (hydrocarbon) radical attached at any available carbon atom, containing from 1 to 10 carbon atoms, preferably 1 to 6 carbon atoms, more preferably from 1 to 4 carbon atoms. Exemplary such groups include, but are not limited to methyl, ethyl, propyl, isopropyl, n-butyl, t-butyl, isobutyl, pentyl, hexyl, heptyl, 4,4-dimethylpentyl, octyl, 2,2,4-trimethylpentyl, and the like. "Lower alkyl" or "lower alkylene" means a straight or branched chain alkyl having one to four carbon atoms. When a subscript is used with reference to an alkyl or other group, the subscript refers to the number of carbon atoms that the group may contain. For example, the term "C₀₋₄alkyl" includes a bond and alkyl groups of 1 to 4 carbon atoms, and the term "C₁₋₄alkyl" means alkyl groups of 1 to 4 carbon atoms.

[0021] The term "alkylene" refers to a bivalent hydrocarbon radical, as described above for "alkyl" but with two points of attachment. For example, a methylene group is a -CH₂- group and an ethylene group is a -CH₂-CH₂- group.

[0022] When the term alkyl is used in connection with another group, as in heterocycloalkyl or cycloalkylalkyl, this means the other identified (first named) group is bonded directly through an alkyl group as defined above (*e.g.*, which may be branched or straight chain). Thus, the term "alkyl" is used in this instance to refer to an alkylene, *e.g.*, a divalent alkyl group, having two available points of attachment. For example, cyclopropylC₁₋₄alkyl means a cyclopropyl group bonded through a straight or branched chain alkylene having one to four carbon atoms, and hydroxyalkyl means the group OH bonded through a straight or branched chain alkylene having one to ten carbon atoms, preferably 1 to 6 carbon atoms, more preferably 1 to 4 carbon atoms. In the case of substituents, as in "substituted cycloalkylalkyl," the alkylene portion of the group, besides

- 7 -

being branched or straight chain, may be substituted as recited below for substituted alkyl groups and/or the first named group (*e.g.*, cycloalkyl) may be substituted as recited herein for that named group (*e.g.*, cycloalkyl).

[0023] "Substituted alkyl" refers to an alkyl group substituted with one or more substituents, preferably 1 to 4 substituents, at any available point of attachment. However, when an alkyl group is substituted with multiple halo substituents, the alkyl may contain as valence allows up to 10 substituents, more preferably up to seven substituents. Alkyl substituents may include one or more of the following groups: halo (*e.g.*, a single halo substituent or multiple halo substituents forming, in the latter case, groups such as a perfluoroalkyl group or an alkyl group bearing Cl_3 or CF_3), cyano, $-\text{OR}_a$, $-\text{SR}_a$, $-\text{C}(=\text{O})\text{R}_a$, $-\text{C}(=\text{O})\text{OR}_a$, $-\text{OC}(=\text{O})\text{R}_a$, $-\text{OC}(=\text{O})\text{OR}_a$, $-\text{NR}_a\text{R}_b$, $-\text{C}(=\text{O})\text{NR}_a\text{R}_b$, $-\text{OC}(=\text{O})\text{NR}_a\text{R}_b$, $-\text{S}(=\text{O})\text{R}_a$, $-\text{S}(\text{O})_2\text{R}_a$, $-\text{NHS}(\text{O})_2\text{R}_a$, $-\text{NHS}(\text{O})_2\text{NHR}_a$, $-\text{NHC}(=\text{O})\text{NHR}_a$, $-\text{NHC}(=\text{O})\text{R}_a$, $-\text{NHC}(\text{O})_2\text{R}_a$, $-\text{NHC}(=\text{N}-\text{CN})\text{R}_a$, aryl, heterocycle, cycloalkyl, and/or heteroaryl, wherein the groups R_a and R_b are independently selected from hydrogen, alkyl, alkenyl, cycloalkyl, heterocyclo, aryl, and heteroaryl, and wherein each R_a and/or R_b in turn is optionally substituted with one to four groups selected from alkyl, alkenyl, halogen, haloalkyl, haloalkoxy, cyano, nitro, amino, alkylamino, aminoalkyl, hydroxy, hydroxyalkyl, alkoxy, thiol, alkylthio, phenyl, benzyl, phenyloxy, benzyloxy, C_{3-7} cycloalkyl, five or six membered heterocyclo or heteroaryl, and/or a lower alkyl or lower alkenyl substituted with one to four groups selected from hydroxy, cyano, halogen, halo C_{1-4} alkyl, halo C_{1-4} alkoxy, cyano, nitro, amino, C_{1-4} alkylamino, amino C_{1-4} alkyl, hydroxy C_{1-4} alkyl, C_{1-4} alkoxy, thiol, and/or C_{1-4} alkylthio. For the avoidance of doubt, a "substituted lower alkyl" means an alkyl group having one to four carbon atoms and one to four substituents selected from those recited immediately above for substituted alkyl groups. In the case of a substituted lower alkyl, preferably the groups R_a and R_b are selected from hydrogen, lower alkyl, lower alkenyl, C_{3-7} cycloalkyl, phenyl, and five to six membered monocyclic heterocyclo and/or heteroaryl, in turn optionally substituted as above.

[0024] The term "alkenyl" refers to a straight or branched chain hydrocarbon radical containing from 2 to 12 carbon atoms and at least one carbon-carbon

- 8 -

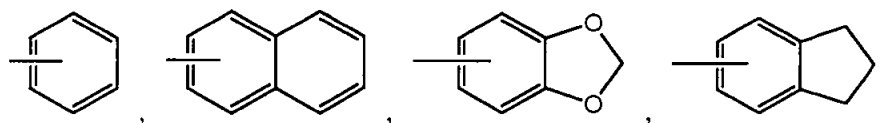
double bond. Exemplary such groups include ethenyl or allyl. "Substituted alkenyl" refers to an alkenyl group substituted with one or more substituents, preferably 1 to 4 substituents, at any available point of attachment. Exemplary substituents include alkyl, substituted alkyl, and those groups recited above as alkyl substituents.

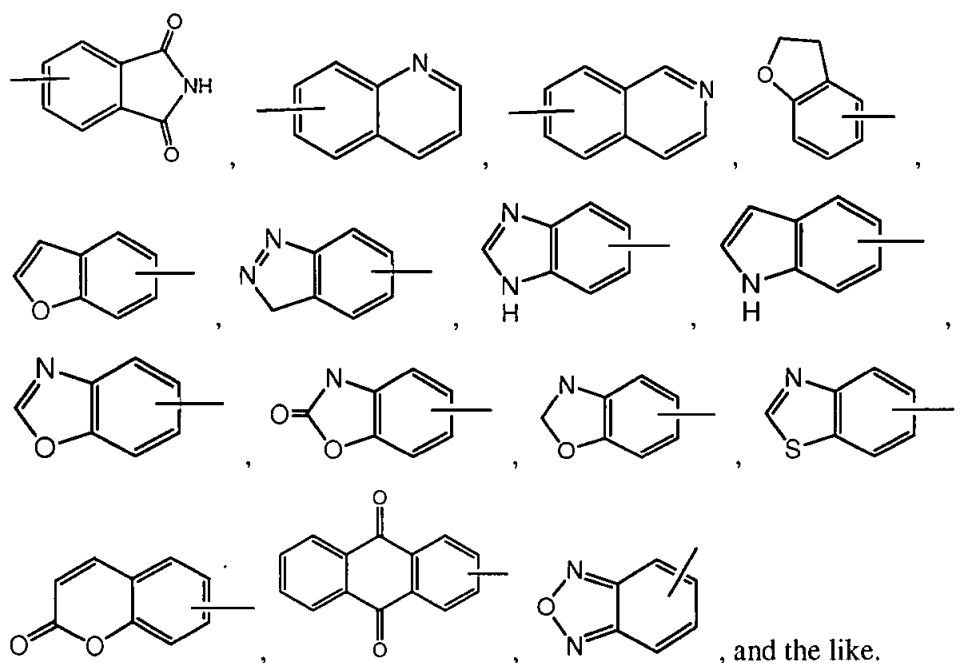
[0025] The terms "alkoxy" and "alkylthio" refer to an alkyl group as described above bonded through an oxygen linkage (-O-) or a sulfur linkage (-S-), respectively. The terms "substituted alkoxy" and "substituted alkylthio" refer to a substituted alkyl group as described above bonded through an oxygen or sulfur linkage, respectively. A "lower alkoxy" or a C₁₋₄alkoxy is a group OR, wherein R is lower alkyl (alkyl of 1 to 4 carbon atoms).

[0026] "Amino" is NH₂. An alkylamino is -NR_cR_d wherein at least one of R_c and R_d is an alkyl or substituted alkyl, and the other of R_c and R_d is selected from hydrogen, alkyl, and substituted alkyl. An "aminoalkyl" means an amino group bonded through an alkylene group (-alkylene-NH₂), and an alkylaminoalkyl means an alkylamino as defined above bonded through an alkylene group (-alkylene-NR_cR_d).

[0027] The term "aryl" refers to cyclic, aromatic hydrocarbon groups which have 1 to 3 aromatic rings, especially monocyclic or bicyclic groups such as phenyl or naphthyl. Aryl groups which are bicyclic or tricyclic must include at least one fully aromatic carbocyclic ring but the other fused ring or rings may be aromatic or non-aromatic and may optionally contain heteroatoms, provided that in such cases the point of attachment will be to the aromatic carbocyclic ring.

Additionally, when an aryl group has fused thereto a heterocyclic or cycloalkyl ring, the heterocyclic and/or cycloalkyl ring may have one or more carbonyl carbon atoms, i.e., attached via a double bond to an oxygen atom to define a carbonyl group. Thus, examples of "aryl" may include without limitation:





[0028] The term “arylene” refers to a bivalent aryl radical, i.e., an aryl group as defined above having two points of attachment to two other groups, at any available points of attachment of the aryl ring. Arylene rings may also be substituted with any of the groups suitable for substitution on the aryl groups defined herein.

[0029] “Substituted aryl” refers to an aryl or arylene group as defined above substituted by one or more substituents, preferably 1 to 4 substituents, at any point of attachment. Substituents include alkyl, substituted alkyl, alkenyl, substituted alkenyl, as well as those groups recited above as alkyl substituents.

[0030] The term “carbocyclic” means a saturated or unsaturated monocyclic, bicyclic, or tricyclic ring (preferably mono- or bicyclic) in which all atoms of all rings are carbon. Thus, the term includes cycloalkyl and aryl rings. The carbocyclic ring may be substituted in which case the substituents are selected from those recited above for cycloalkyl and aryl groups.

[0031] The term “cycloalkyl” refers to a fully saturated or partially saturated cyclic hydrocarbon group containing from 1 to 3 rings and 3 to 7 carbon atoms per ring. Exemplary fully saturated cycloalkyl groups include cyclopropyl, cyclobutyl, cyclopentyl, and cyclohexyl. Exemplary partially saturated cycloalkyl groups include cyclobutenyl, cyclopentenyl, and cyclohexenyl. The

- 11 -

[0035] The term "halogen" or "halo" refers to fluorine, chlorine, bromine and iodine.

[0036] The term "heteroatoms" includes oxygen, sulfur and nitrogen.

[0037] The term "haloalkyl" means an alkyl having one or more halo substituents, including without limitation groups such as $-\text{CH}_2\text{F}$, $-\text{CHF}_2$ and $-\text{CF}_3$.

[0038] The term "haloalkoxy" means an alkoxy group having one or more halo substituents. For example, "haloalkoxy" includes $-\text{OCF}_3$.

[0039] When the term "unsaturated" is used herein to refer to a ring or group, the ring or group may be fully unsaturated or partially unsaturated.

[0040] The term "heteroaryl" refers to an aromatic group which is a 4 to 7 membered monocyclic, 7 to 11 membered bicyclic, or 10 to 15 membered tricyclic ring system, which has at least one ring containing at least one heteroatom. Each ring of the heteroaryl group containing a heteroatom can contain one or two oxygen or sulfur atoms and/or from one to four nitrogen atoms, provided that the total number of heteroatoms in each ring is four or less and each ring has at least one carbon atom. The fused rings completing the bicyclic and tricyclic groups may contain only carbon atoms and may be saturated, partially saturated, or unsaturated. The nitrogen and sulfur atoms may optionally be oxidized and the nitrogen atoms may optionally be quaternized. Heteroaryl groups which are bicyclic or tricyclic must include at least one fully aromatic ring but the other fused ring or rings may be aromatic or non-aromatic and may be carbocyclic, provided that in such cases the point of attachment will be at any available nitrogen or carbon atom of an aromatic heteroatom-containing ring. Additionally, the definition of heteroaryl groups itself includes rings wherein one or more of the carbon atoms is attached via a double bond to an oxygen atom to define a carbonyl group (provided the heteroaryl group is aromatic) and also when a heteroaryl group has fused thereto a heterocyclic or cycloalkyl ring, the heterocyclic and/or cycloalkyl ring may have one or more carbonyl groups.

[0041] Exemplary monocyclic heteroaryl groups include pyrrolyl, pyrazolyl, pyrazolinyl, imidazolyl, oxazolyl, isoxazolyl, thiazolyl (*i.e.*, , thiadiazolyl, isothiazolyl, furanyl, thienyl, oxadiazolyl, pyridyl, pyrazinyl, pyrimidinyl,

- 12 -

pyridazinyl, triazinyl and the like. Additionally, since the definition of heteroaryl groups itself includes rings wherein one or more of the carbon atoms defines a carbonyl group, rings such as 2,4-dihydro-[1,2,4]triazol-3-one (*i.e.*, ) and the like are included.

[0042] Exemplary bicyclic heteroaryl groups include indolyl, benzothiazolyl, benzodioxolyl, benzoxazolyl, benzothienyl, quinolinyl, tetrahydroisoquinolinyl, isoquinolinyl, benzimidazolyl, benzopyranyl, indoliziny, benzofuranyl, chromonyl, coumarinyl, benzopyranyl, cinnolinyl, quinoxaliny, indazolyl, pyrrolopyridyl, furopyridinyl, dihydroisoindolyl, tetrahydroquinolinyl and the like.

[0043] Exemplary tricyclic heteroaryl groups include carbazolyl, benzidolyl, phenanthrollinyl, acridinyl, phenanthridinyl, xanthenyl and the like.

[0044] The term "heteroalkylene" refers to a bivalent heteroaryl radical, *i.e.*, a heteroaryl group as defined above having two points of attachment to two other groups, at any available two points of attachment of the heteroaryl ring.

[0045] "Substituted heteroaryl" groups are heteroaryl groups as defined above substituted with one or more substituents, preferably 1 to 4 substituents, at any available point of attachment. Exemplary substituents include, but are not limited to alkyl, substituted alkyl, alkenyl, substituted alkenyl, as well as those groups recited above as alkyl substituents.

[0046] The terms "heterocycle", heterocyclic" and "heterocyclo" are used interchangeably and each refer to a fully saturated or partially unsaturated nonaromatic cyclic group, which may be substituted or unsubstituted, for example, which is a 4 to 7 membered monocyclic, 7 to 11 membered bicyclic, or 10 to 15 membered tricyclic ring system, which has at least one heteroatom in at least one carbon atom-containing ring. Each ring of the heterocyclic group containing a heteroatom may have 1, 2 or 3 heteroatoms selected from nitrogen, oxygen, and sulfur atoms, where the nitrogen and sulfur heteroatoms also optionally may be oxidized and the nitrogen heteroatoms also optionally may be quaternized. Preferably two adjacent heteroatoms are not simultaneously selected from oxygen and nitrogen. Heterocyclic groups which are bicyclic or tricyclic must include at least one non- aromatic non-carbocyclic ring, but the other fused

- 13 -

ring or rings may be aromatic or non-aromatic and may be carbocyclic, provided that in such cases the point of attachment will be at any available nitrogen or carbon atom of a non-aromatic heteroatom-containing ring. Additionally, the definition of heterocyclic groups itself includes rings wherein one or more of the carbon atoms is attached via a double bond to an oxygen atom to define a carbonyl group (provided the heterocyclic group is non-aromatic) and also when a heterocyclic group has fused thereto a further ring, such further ring may have one or more carbonyl groups.

[0047] Exemplary monocyclic heterocyclic groups include pyrrolidinyl, imidazolidinyl, tetrahydrofuryl, piperidinyl, piperazinyl, pyrazolidinyl, imidazoliny, pyrrolinyl, tetrahydropyran, morpholinyl, thiamorpholinyl, and the like.

[0048] "Substituted heterocycle," "substituted heterocyclic," and "substituted heterocyclo" refer to heterocycle, heterocyclic, or heterocyclo groups as defined above substituted with one or more substituents, preferably 1 to 4 substituents, at any available point of attachment. Exemplary substituents include alkyl, substituted alkyl, alkenyl, substituted alkenyl, as well as those groups recited above as exemplary alkyl substituents.

[0049] "Hydroxy" refers to -OH.

[0050] "Thiol" means the group -SH.

[0051] The term "quaternary nitrogen" refers to a tetravalent positively charged nitrogen atom including, for example, the positively charged nitrogen in a tetraalkylammonium group (*e.g.*, tetramethylammonium or N-methylpyridinium), the positively charged nitrogen in protonated ammonium species (*e.g.*, trimethylhydroammonium or N-hydropyridinium), the positively charged nitrogen in amine N-oxides (*e.g.*, N-methyl-morpholine-N-oxide or pyridine-N-oxide), and the positively charged nitrogen in an N-amino-ammonium group (*e.g.*, N-aminopyridinium).

[0052] When a functional group is termed "protected", this means that the group is in modified form to mitigate, especially preclude, undesired side reactions at the protected site. Suitable protecting groups for the methods and compounds described herein include, without limitation, those described in standard

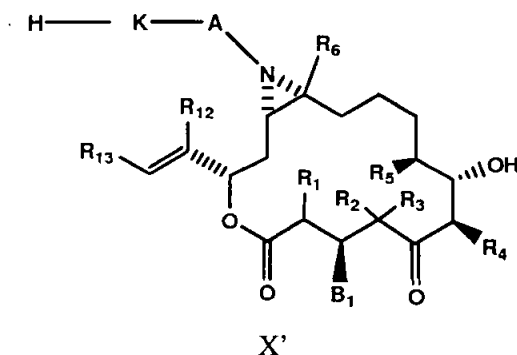
- 14 -

textbooks, including Greene, T.W. et al., *Protective Groups in Organic Synthesis*, Wiley, N.Y. (1991), incorporated herein by reference.

ALTERNATE EMBODIMENTS OF THE INVENTION

[0053] The present invention comprises compounds having the following Formula X, as set forth in the Summary of Invention.

[0054] The present invention comprises compounds having the stereospecific form according to Formula X'



including pharmaceutically-acceptable salts and/or solvates thereof, wherein,

K is -O-, -S-, or -NR₇-;

A is -(CR₈R₉)-(CH₂)_m-Z- wherein Z is -(CHR₁₀)-, -C(=O)-, -C(=O)-C(=O)-, -OC(=O)-, -N(R₁₁)C(=O)-, -SO₂-, or -N(R₁₁)SO₂-;

B₁ is hydroxyl or cyano and R₁ is hydrogen or B₁ and R₁ are taken together to form a double bond;

R₂, R₃, and R₅ are, independently, hydrogen, alkyl, substituted alkyl, aryl or substituted aryl; or R₂ and R₃ may be taken together with the carbon to which they are attached to form an optionally substituted cycloalkyl;

R₄ is hydrogen, alkyl, alkenyl, substituted alkyl, substituted alkenyl, aryl, or substituted aryl;

R₆ is hydrogen, alkyl or substituted alkyl;

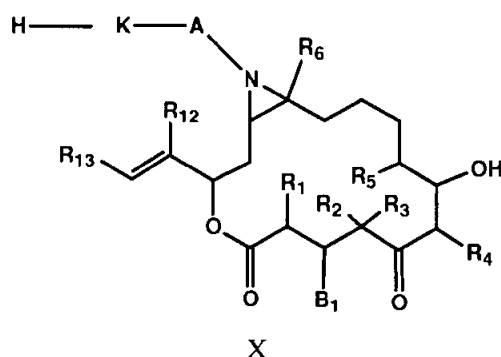
R₇, R₈, R₉, R₁₀, and R₁₁ are independently hydrogen, alkyl, substituted alkyl, cycloalkyl, substituted cycloalkyl, aryl, substituted aryl, heterocycloalkyl, substituted heterocycloalkyl, heteroaryl, or substituted heteroaryl;

R₁₂ is H, alkyl, substituted alkyl, or halogen;

- 15 -

R_{13} is aryl, substituted aryl, heteroaryl or substituted heteroaryl; and
 m is 0 to 6.

[0055] In another embodiment, compounds of the invention have the Formula X



or the stereospecific Formula X', above, including pharmaceutically acceptable salts and/or solvates thereof, wherein

K is $-O-$;

A is C_{2-4} alkylene;

B_1 is $-OH$;

R_2, R_3, R_4 and R_5 are, independently, hydrogen or lower alkyl;

R_6 is hydrogen or methyl;

R_{12} is H, alkyl, substituted alkyl, or halogen; and

R_{13} is an optionally substituted 5 or 6 membered heteroaryl.

[0056] In another embodiment, compounds of the invention have the Formula X or X', as defined above, including pharmaceutically acceptable salts and/or solvates thereof, wherein

K is $-O-$;

A is C_{2-4} alkylene;

B_1 is $-OH$;

R_2, R_3, R_4 and R_5 are, independently, hydrogen or lower alkyl;

R_6 is hydrogen;

R_{12} is H, alkyl, substituted alkyl, or halogen; and

R_{13} is an optionally substituted 5 or 6 membered heteroaryl.

[0057] In another embodiment, compounds of the invention have the Formula X or X', as defined above, including pharmaceutically acceptable salts and/or solvates thereof, wherein

- 16 -

K is -O-;

A is C₂₋₄ alkylene;

B_1 is $-\text{OH}$;

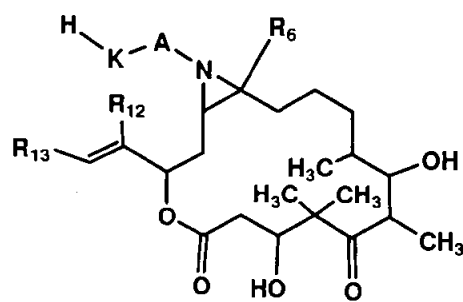
R₂, R₃, R₄ and R₅ are, independently, hydrogen or lower alkyl;

R_6 is hydrogen or methyl;

R₁₂ is H, alkyl, substituted alkyl, or halogen; and

R₁₃ is an optionally substituted thiazolyl, pyridyl, or oxazolyl.

[0058] In another embodiment, compounds are provided having the formula Xa,



Xa

including pharmaceutically-acceptable salts and/or solvates thereof,
wherein.

K is -O-, -S-, or -NR₇-;

A is $-(\text{CR}_8\text{R}_9)-(\text{CH}_2)_m-\text{Z}-$ wherein Z is $-(\text{CHR}_{10})-$, $-\text{C}(=\text{O})-$, $-\text{C}(=\text{O})-\text{C}(=\text{O})-$, $-\text{OC}(=\text{O})-$, $-\text{N}(\text{R}_{11})\text{C}(=\text{O})-$, $-\text{SO}_2-$, or $-\text{N}(\text{R}_{11})\text{SO}_2-$;

R₆ is hydrogen or methyl;

R₈, R₉, R₁₀, and R₁₁ are independently hydrogen, alkyl, or substituted alkyl,

R₁₂ is H, alkyl, substituted alkyl, or halogen; and

R₁₃ is aryl, substituted aryl, heteroaryl or substituted heteroaryl; and

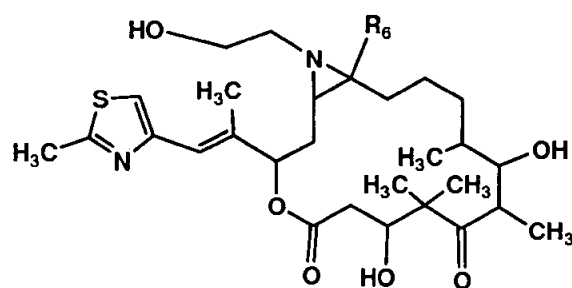
m is 0 to 6.

[0059] In another embodiment of the invention, compounds of formula Xa, including compounds of formula Xa' having the stereospecific form Xa', corresponding to the stereochemistry shown for X', are provided.

[0060] In another embodiment, compounds are provided having the formula Xa, or Xa', immediately above, wherein K is -O- and R₁₃ is optionally substituted thiazolyl, pyridyl, or oxazolyl, and the remaining groups are as defined above.

[0061] In another embodiment, compounds are provided having the formula Xa, or Xa', above, wherein K is -O-; A is C₂₋₄alkylene; R₆ is hydrogen or methyl; R₁₂ is H, lower alkyl, or halogen; and R₁₃ is optionally-substituted thiazolyl, pyridyl, or oxazolyl.

[0062] A compound of the invention may also have the formula Xb

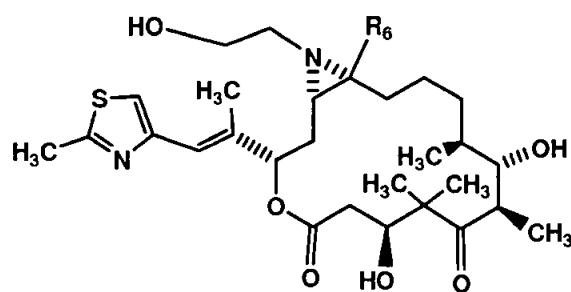


Xb,

including pharmaceutically-acceptable salts and/or solvates thereof, wherein R₆ is hydrogen or methyl.

[0063] In another embodiment, a compound of the invention has the formula Xb, wherein R₆ is hydrogen.

[0064] In another embodiment, a compound of the invention may have the stereospecific formula Xb'



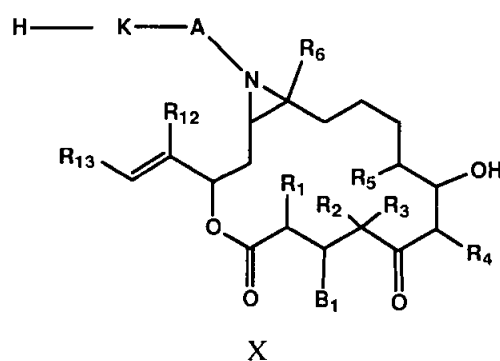
Xb'

including pharmaceutically-acceptable salts and/or solvates thereof, wherein R₆ is hydrogen or methyl.

- 18 -

[0065] In another embodiment, a compound of the invention has the formula Xb', wherein R₆ is hydrogen.

[0066] According to one embodiment of the present invention, methods are provided for treating cancer, *e.g.*, a folate-receptor associated condition, comprising treating a patient with a therapeutically effective amount of a compound having the following Formula X:



or a pharmaceutically-acceptable salt and/or solvate thereof, wherein:

K is -O-, -S-, or -NR₇-;

A is -(CR₈R₉)-(CH₂)_m-Z- wherein Z is -(CHR₁₀)-, -C(=O)-, -C(=O)-C(=O)-, -OC(=O)-, -N(R₁₁)C(=O)-, -SO₂-, or -N(R₁₁)SO₂-;

B₁ is hydroxyl or cyano and R₁ is hydrogen or B₁ and R₁ are taken together to form a double bond;

R₂, R₃, and R₅ are, independently, hydrogen, alkyl, substituted alkyl, aryl or substituted aryl; or R₂ and R₃ may be taken together with the carbon to which they are attached to form an optionally substituted cycloalkyl;

R₄ is hydrogen, alkyl, alkenyl, substituted alkyl, substituted alkenyl, aryl, or substituted aryl;

R₆ is hydrogen, alkyl or substituted alkyl;

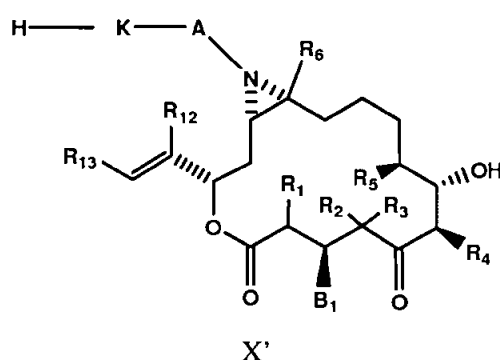
R₇, R₈, R₉, R₁₀, and R₁₁ are independently hydrogen, alkyl, substituted alkyl, cycloalkyl, substituted cycloalkyl, aryl, substituted aryl, heterocycloalkyl, substituted heterocycloalkyl, heteroaryl, or substituted heteroaryl;

R₁₂ is H, alkyl, substituted alkyl, or halogen;

R₁₃ is aryl, substituted aryl, heteroaryl or substituted heteroaryl; and

m is 0 to 6.

[0067] In one embodiment, the method comprises treating a patient with a therapeutically effective amount of a compound having the stereospecific Formula X',



including pharmaceutically-acceptable salts and/or solvates thereof, wherein, wherein K, A, B₁, R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, R₈, R₉, R₁₀, R₁₁, R₁₂, R₁₃, and m are as defined above for compounds of Formula X.

[0068] In another embodiment, the method comprises treating a patient with a therapeutically effective amount of a compound having the formula X, including formula X', as described above, including pharmaceutically acceptable salts and/or solvates thereof, wherein

K is —O—;

A is C₂₋₄ alkylene;

B₁ is —OH;

R₂, R₃, R₄ and R₅ are, independently, hydrogen or lower alkyl;

R₆ is hydrogen or methyl;

R₇, R₈, R₉, R₁₀, and R₁₁ are independently hydrogen, alkyl, substituted alkyl, cycloalkyl, substituted cycloalkyl, aryl, substituted aryl, heterocycloalkyl, substituted heterocycloalkyl, heteroaryl, or substituted heteroaryl;

R₁₂ is H, alkyl, substituted alkyl, or halogen; and

R₁₃ is an optionally substituted 5 or 6 membered heteroaryl.

[0069] In another embodiment, the method comprises treating a patient with a therapeutically effective amount of a compound having the formula X, or X', as described above, including pharmaceutically acceptable salts and/or solvates thereof, wherein

- 20 -

K is -O-;

A is C₂₋₄ alkylene;

B₁ is -OH;

R₂, R₃, R₄ and R₅ are, independently, hydrogen or lower alkyl;

R₆ is hydrogen;

R₇, R₈, R₉, R₁₀, and R₁₁ are independently hydrogen, alkyl, substituted alkyl, cycloalkyl, substituted cycloalkyl, aryl, substituted aryl, heterocycloalkyl, substituted heterocycloalkyl, heteroaryl, or substituted heteroaryl;

R₁₂ is H, alkyl, substituted alkyl, or halogen; and

R₁₃ is an optionally substituted 5 or 6 membered heteroaryl.

[0070] In another embodiment, the method comprises treating a patient with a therapeutically effective amount of a compound having the formula X, or X', as described above, including pharmaceutically acceptable salts and/or solvates thereof, wherein

K is -O-;

A is C₂₋₄ alkylene;

B₁ is -OH;

R₂, R₃, R₄ and R₅ are, independently, hydrogen or lower alkyl;

R₆ is hydrogen or methyl;

R₇, R₈, R₉, R₁₀, and R₁₁ are independently hydrogen, alkyl, substituted alkyl, cycloalkyl, substituted cycloalkyl, aryl, substituted aryl, heterocycloalkyl, substituted heterocycloalkyl, heteroaryl, or substituted heteroaryl;

R₁₂ is H, alkyl, substituted alkyl, or halogen; and

R₁₃ is an optionally substituted thiazolyl, pyridyl, or oxazolyl.

[0071] A method of the invention may also comprise treating a patient in need of such treatment with a therapeutically effective amount of a compound having the formula Xa, above, or the stereospecific form Xa', including pharmaceutically-acceptable salts and/or solvates thereof, wherein, K is -O-, -S-, or -NR₇-; A is - (CR₈R₉)-(CH₂)_m-Z- wherein Z is -(CHR₁₀)-, -C(=O)-, -C(=O)-C(=O)-, -OC(=O)-, -N(R₁₁)C(=O)-, -SO₂-, or -N(R₁₁)SO₂-; R₆ is hydrogen or methyl; R₈ and R₉ are independently hydrogen, alkyl, or substituted alkyl, R₁₂ is H, alkyl, substituted

- 21 -

alkyl, or halogen; R_{13} is aryl, substituted aryl, heteroaryl or substituted heteroaryl; and m is 0 to 6.

[0072] A method of the invention may also comprise treating a patient in need of such treatment a therapeutically effective amount of a compound having the formula Xb or Xb', above, wherein R_6 is hydrogen or methyl. In yet another embodiment, the method comprises treating the patient with a compound of formula Xb or Xb', wherein R_6 is hydrogen.

[0073] Another embodiment of the invention comprises use of any of the compounds described above (including compounds of formula X, Xa, Xa', Xb, and/or Xb', wherein the groups K, A, B₁, R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 , R_6 , R_7 , R_8 , R_9 , R_{10} , R_{11} , R_{12} , and R_{13} may be selected as recited above), in making pharmaceutical compositions for treating cancer in patients, particularly, for use in making pharmaceutical compositions containing conjugated compounds for targeted drug delivery to tumors that over-express or preferentially express the folate receptor.

[0074] Another embodiment of the invention comprises treating a patient in need of such treatment with a therapeutically effective amount of a compound having the formulas X, Xa, Xa', Xb, and/or Xb' (wherein the groups K, A, B₁, R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 , R_6 , R_7 , R_8 , R_9 , R_{10} , R_{11} , R_{12} , and R_{13} may be selected as recited above), wherein the treatment occurs at the tumor site, having been released at the tumor site. In this embodiment, a conjugated compound is delivered to the tumor site, and then the compound of formulae X, Xa, Xa', Xb, or Xb', as defined above, is released at the tumor site and treats the patient at the tumor site. It is therefore understood herein, whenever the term "treatment" is used with reference to treating a patient, that this encompasses treatment at the tumor site, however delivered, e.g., via a conjugated compound.

[0075] The use of an agent to upregulate the level of folate receptor (FR) may be effective to increase the FR expression in certain cancer cells or tumor types to enhance the advantages obtained upon administering the compounds of the invention to patients, and/or to enhance the various diseases or tumor types that may be treated with the folate receptor binding compounds according to the invention. The expression of folate receptor in certain cancers may be upregulated by the administration of a folate receptor inducer, which selectively

- 22 -

increases the level of folate receptor in the cancer cells, thus enhancing the effectiveness a folate receptor targeted therapy. For example, estrogen receptor positive (ER+) breast cancers express low levels of folate receptors. Treatment with a folate receptor inducer, such tamoxifen, an estrogen antagonist, is known to upregulate the expression of folate receptors in ER+ breast cancers, increasing the ER+ breast cancer cells susceptibility to treatment with a folate receptor targeted therapy.

[0076] One aspect of the invention provides a method of treating cancer or a proliferative disease in a patient, comprising optionally administering to a patient an effective amount of at least one folate receptor inducer, and treating the patient with an effective amount of at least one compound according to formula X. The folate receptor inducer may be administered before, during, or after the patient is treated with the compound according to formula X. In one embodiment, the folate receptor inducer is administered prior to treatment with the compound of formula X. An effective amount of the folate receptor inducer refers to an amount that upregulates the folate receptor in the desired cells such that the treatment with the compound is therapeutically effective.

[0077] Examples of folate receptor inducers for the upregulation of folate receptor α (FR α) include: estrogen receptor antagonists such as tamoxifen; progesterone receptor agonists such as progestin; androgen receptor agonists such as testosterone and dihydroxytestosterone, and glucocorticoid receptor agonists such as dexamethasone.

[0078] Examples of folate receptor inducers for the upregulation of folate receptor β (FR β) include: retinoic acid receptor agonists such as all-trans retinoic acid (ATRA), tetramethyl naphthalenyl propenyl benzoic acid (TTNPB), 9-cis retinoic acid (9-cis RA), CD33336, LG101093, and CD2781.

[0079] In one embodiment, a method of treating cancer or a proliferative disease in a patient in need thereof is provided, comprising administering an effective amount of at least one folate receptor inducer and also treating the patient with at least one compound according to formula X; wherein said folate receptor inducer upregulates folate receptor α . Preferably, said cancer or proliferative disease is selected from breast cancer, such as ER+ breast cancer, and ovarian cancer.

- 23 -

[0080] In one embodiment of the present invention, a method of treating cancer or a proliferative disease in a patient in need thereof is provided, comprising administering an effective amount of at least one folate receptor inducer and administering an effective amount of at least one compound according to formula X; wherein said folate receptor inducer upregulates folate receptor β . Preferably, said cancer or proliferative disease is selected from leukemia, and more preferably from acute myelogenous leukemia (AML) and chronic myelogenous leukemia (CML).

[0081] In a further embodiment, a method of treating cancer or a proliferative disease in a patient in need thereof is provided, comprising administering an effective amount of at least one folate receptor inducer, administering at least one histone deacetylase inhibitor, and treating the patient with an effective amount of at least one compound according to formula X. An example of a histone deacetylase inhibitor is trichostatin A (TSA). U.S. Patent Application Publication No. 2003/0170299 A1, WO 2004/082463, Kelly, K. M., B.G. Rowan, and M. Ratnam, *Cancer Research* 63, 2820-2828 (2003), Wang, Zheng, Behm, and Ratnam, *Blood*, 96:3529-3536 (2000).

[0082] The compounds of the present invention may form salts or solvates which are also within the scope of this invention. Reference to a compound of the formula (X) herein is understood to include reference to salts and solvates thereof, racemates, diastereomers, and enantiomers thereof, unless otherwise indicated. The term "salt(s)", as employed herein, denotes acidic and/or basic salts formed with inorganic and/or organic acids and bases. In addition, when a compound of formula (X) contains both a basic moiety, such as but not limited to a pyridinyl imidazolyl, amine or guanidinyl and an acidic moiety such as but not limited to a carboxylic acid, zwitterions may be formed and are included within the term "salt(s)" as used herein. Pharmaceutically acceptable (*i.e.*, non-toxic, physiologically acceptable) salts are preferred, although other salts are also useful, *e.g.*, in isolation or purification steps which may be employed during preparation. Salts of the compounds of the formula (X) may be formed, for example, by reacting a compound of formula (X) with an amount of acid or base,

such as an equivalent amount, in a medium such as one in which the salt precipitates or in an aqueous medium followed by lyophilization.

[0083] The compounds of formula (X) that contain a basic moiety, such as but not limited to an amine, a guanidinyll group, or a pyridyl or imidazolyl ring, may form salts with a variety of organic and inorganic acids. Exemplary acid addition salts include acetates (such as those formed with acetic acid or trihaloacetic acid, for example, trifluoroacetic acid), adipates, alginates, ascorbates, aspartates, benzoates, benzenesulfonates, bisulfates, borates, butyrates, citrates, camphorates, camphorsulfonates, cyclopentanepropionates, digluconates, dodecylsulfates, ethanesulfonates, fumarates, glucoheptanoates, glycerophosphates, hemisulfates, heptanoates, hexanoates, hydrochlorides, hydrobromides, hydroiodides, hydroxyethanesulfonates (*e.g.*, 2-hydroxyethanesulfonates), lactates, maleates, methanesulfonates, naphthalenesulfonates (*e.g.*, 2-naphthalenesulfonates), nicotines, nitrates, oxalates, pectinates, persulfates, phenylpropionates (*e.g.*, 3-phenylpropionates), phosphates, picrates, pivalates, propionates, salicylates, succinates, sulfates (such as those formed with sulfuric acid), sulfonates (such as those mentioned herein), tartrates, thiocyanates, toluenesulfonates such as tosylates, undecanoates, and the like.

[0084] The compounds of formula (X) that contain an acidic moiety, such as but not limited to a carboxylic acid, may form salts with a variety of organic and inorganic bases. Exemplary basic salts include ammonium salts; alkali metal salts such as sodium, lithium, and potassium salts; alkaline earth metal salts such as calcium and magnesium salts; salts with organic bases (for example, organic amines) such as benzathines, dicyclohexylamines, hydrabamines (formed with N,N-bis(dehydroabietyl)ethylenediamine), N-methyl-D-glucamines, N-methyl-D-glycamides, t-butyl amines; and salts with amino acids such as arginine, lysine, and the like. Basic nitrogen-containing groups may be quaternized with agents such as lower alkyl halides (*e.g.* methyl, ethyl, propyl, and butyl chlorides, bromides, and iodides), dialkyl sulfates (*e.g.* dimethyl, diethyl, dibutyl, and diamyl sulfates), long chain halides (*e.g.* decyl, lauryl, myristyl, and stearyl

- 25 -

chlorides, bromides, and iodides), aralkyl halides (*e.g.* benzyl and phenethyl bromides), and others.

[0085] Solvates of the compounds of the invention are also contemplated herein. Solvates of the compounds of formula (X) include, for example, hydrates.

[0086] All stereoisomers of the present compounds (for example, those which may exist due to asymmetric carbons on various substituents), including enantiomeric forms and diastereomeric forms, are contemplated within the scope of this invention. Thus, for example, each reference to compounds of Formula X, is intended to encompass compounds of Formula X'. Individual stereoisomers of the compounds of the invention may, for example, be substantially free of other isomers (*e.g.*, as a pure or substantially pure optical isomer having a specified activity), or may be admixed, for example, as racemates or with all other, or other selected, stereoisomers. The chiral centers of the present invention may have the S or R configuration as defined by the IUPAC 1974 Recommendations. Racemic forms can be resolved by physical methods, such as, for example, fractional crystallization, separation or crystallization of diastereomeric derivatives, or separation by chiral column chromatography. Individual optical isomers can be obtained from stereospecific processes, wherein starting materials and/or intermediates are selected having a stereochemistry corresponding with that desired for the end products, and the stereochemistry is maintained throughout the reactions, and/or the isomers can be obtained from racemates by any suitable method, including without limitation, conventional methods, such as, for example, salt formation with an optically active acid followed by crystallization.

[0087] All configurational isomers of the compounds of the present invention are contemplated, either in admixture, or in pure or substantially pure form. As can be appreciated, the preferred configuration can be a function of the particular compound and the activity desired. Configurational isomers may be prepared by the processes described herein, which may be stereoselective. In other words, a desired stereochemistry for the final compounds can be achieved by using starting materials having the corresponding desired stereochemistry, and then maintaining the stereoselectivity throughout the process of preparation. Alternatively, the compounds may be prepared as racemates or diastereomers,

- 26 -

and then the desired stereochemistry may be achieved via separation of configurational isomers which can be achieved by any suitable method known in the field, e.g., such as column chromatography.

[0088] Throughout the specification, groups and substituents thereof may be chosen to provide stable moieties and compounds useful as pharmaceutically-acceptable compounds and/or intermediate compounds useful in making pharmaceutically-acceptable compounds. One skilled in the field will appreciate suitable selections for variables to achieve stable compounds.

[0089] Embodiments indicated herein as exemplary or preferred are intended to be illustrative and not limiting.

[0090] Other embodiments of the invention will be apparent to one skilled in the field such as, for example, considering combinations of the embodiments referenced above, and are contemplated as covered within the scope of the invention herein.

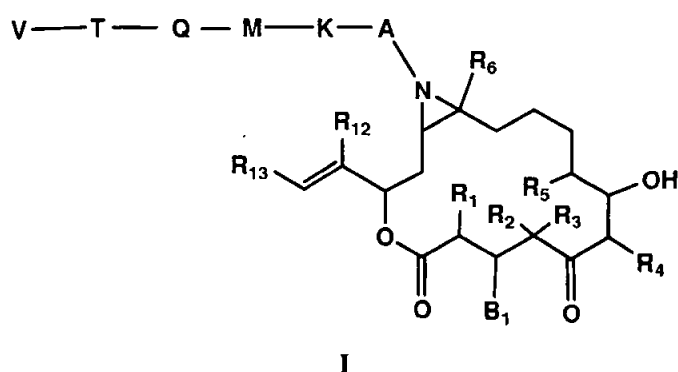
UTILITY

[0091] One of the proteins that is over-expressed or preferentially expressed in certain cancer cells is the folate receptor. Folic acid is required for DNA synthesis, and certain human tumor cells are known to over-express folate-binding proteins. For example, both Campbell et al., "Folate Binding Protein is a Marker for Ovarian Cancer," Cancer Research, Vol. 51 (Oct. 1, 1991), at pp. 5329-38, and Coney et al., "Cloning of a Tumor-Associated Antigen: MOv18 and MOv19 Antibodies Recognize Folate-binding Protein," Cancer Research, Vol. 51 (Nov. 15, 1991), at pp. 6125-31, report that folate-binding proteins are markers for ovarian cancer. Folate-receptor over-expression is also known for other cancers such as, for example, skin, renal, breast, lung, colon, nose, throat, mammary gland, and brain cancers, as well as other cancers referenced herein.

[0092] The compounds of the present invention are useful and can be delivered as epothilone-derived microtubule-stabilizing agents to tumors that express a folate receptor. They are useful in the treatment of a variety of cancers and other proliferative diseases, particularly those cancers characterized by cancer cells or tumors that express the folate receptor. The term "folate-receptor associated

- 27 -

condition" as used herein comprises diseases or disorders characterized by expression of the folate receptor, or in other words, those diseases or disorders that can be diagnosed or treated based on the level of expression of the folate receptor in diseased tissue as compared with normal tissue. Compounds of the present invention are useful for forming conjugates. For example, compounds of the invention may be used to form the following conjugated compound of the formula I:



wherein:

V is folate, or an analog or derivative thereof;

Q is O, S, or NR₇;

M is a releasable linker;

K is O, S, or NR_{7a};

A is $-(CR_8R_9)-(CH_2)_m-Z-$ wherein Z is $-(CHR_{10})-$, $-C(=O)-$, $-C(=O)-C(=O)-$, $-OC(=O)-$, $-N(R_{11})C(=O)-$, $-SO_2-$, or $-N(R_{11})SO_2-$;

B₁ is hydroxyl or cyano and R₁ is hydrogen or B₁ and R₁ are taken together to form a double bond;

R₂, R₃, and R₅ are, independently, hydrogen, alkyl, substituted alkyl, aryl or substituted aryl; or R₂ and R₃ may be taken together with the carbon to which they are attached to form an optionally substituted cycloalkyl;

R₄ is hydrogen, alkyl, alkenyl, substituted alkyl, substituted alkenyl, aryl, or substituted aryl;

R₆ is hydrogen, alkyl or substituted alkyl;

R_{7a}, R₇, R₈, R₉, R₁₀, and R₁₁ are independently hydrogen, alkyl, substituted alkyl, cycloalkyl, substituted cycloalkyl, aryl, substituted aryl, heterocycloalkyl, substituted heterocycloalkyl, heteroaryl, or substituted heteroaryl;

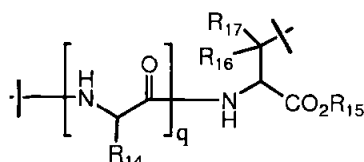
- 28 -

R_{12} is H, alkyl, substituted alkyl, or halogen;

R_{13} is aryl, substituted aryl, heteroaryl or substituted heteroaryl;

m is 0 to 6;

T has the formula:



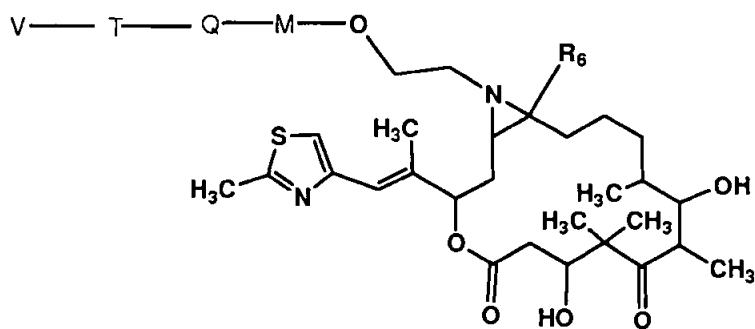
wherein

R_{14} at each occurrence is, independently, hydrogen, alkyl, substituted alkyl, aryl, substituted aryl, arylalkyl, substituted arylalkyl, cycloalkyl, substituted cycloalkyl, cycloalkylalkyl, substituted cycloalkylalkyl, heteroaryl, heteroarylalkyl, substituted heteroarylalkyl, substituted heteroaryl, heterocycloalkyl, or substituted heterocycloalkyl;

q is 1 to 10; and

R_{15} , R_{16} and R_{17} are independently hydrogen, alkyl, substituted alkyl, or cycloalkyl.

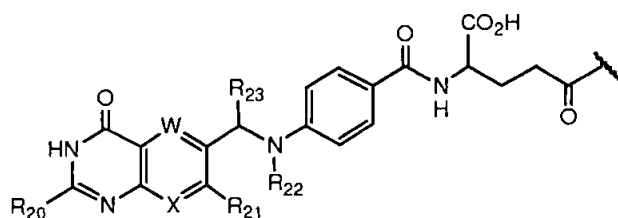
[0093] As another nonlimiting example, compounds of the invention may be used to form the following conjugated compound of the formula Ia:



Ia

wherein V is a folate-receptor binding moiety. For example, V may have the following formula:

- 29 -



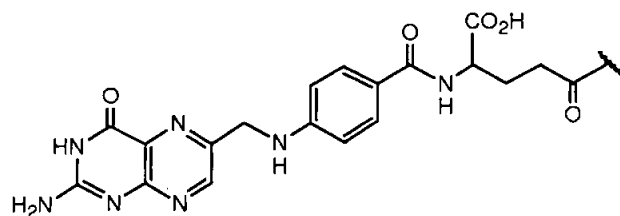
wherein W and X are independently CH or nitrogen;

R₂₀ is hydrogen, amino or lower alkyl;

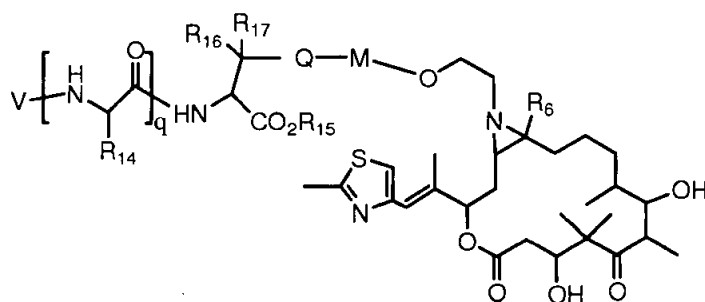
R₂₁ is hydrogen, lower alkyl, or forms a cycloalkyl group with R₂₃;

R₂₂ is hydrogen, lower alkyl, lower alkenyl, or lower alkynyl; and

R₂₃ is hydrogen or forms a cycloalkyl with R₂₁. Preferably, V is



[0094] Compounds of the present invention can be conjugated to form compounds having the following Formula Ib:



Ib

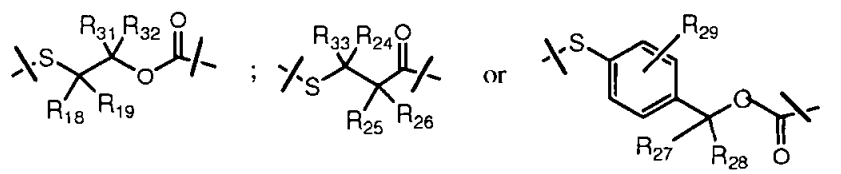
wherein

V is a folate-receptor binding moiety;

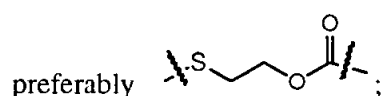
R is H or lower alkyl;

Q is O, S, or NR₇;

M is a releasable linker having the following formula:



- 30 -



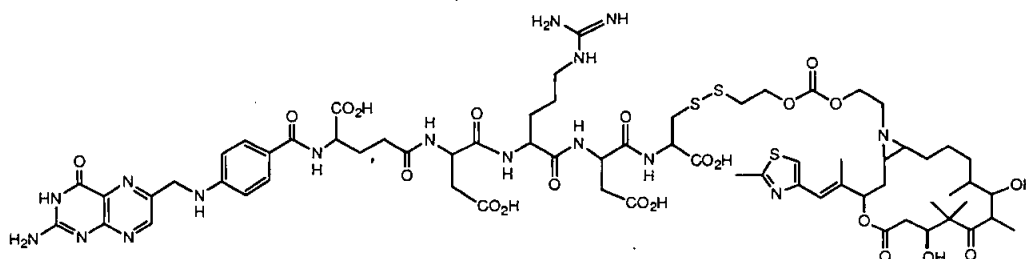
R_{14} at each occurrence is, independently, hydrogen, alkyl, substituted alkyl, aryl, substituted aryl, arylalkyl, substituted arylalkyl, cycloalkyl, substituted cycloalkyl, cycloalkylalkyl, substituted cycloalkylalkyl, heteroaryl, heteroarylalkyl, substituted heteroarylalkyl, substituted heteroaryl, heterocycloalkyl, or substituted heterocycloalkyl; and is preferably a group selected from H, methyl, guanidinypropyl, $-(CH_2)_{1-2}-CO_2H$, $-CH_2-SH$, $-CH_2-OH$, imidazolyl(methyl), aminobutyl, and $-CH(OH)-CH_3$; and is more preferably a C_1 to C_3 alkyl substituted with one of $-C(=O)-OH$ or $-NH-C(=NH)-NH_2$;

q is 1 to 10; preferably 1 to 5;

R_{15} , R_{16} and R_{17} are independently hydrogen, lower alkyl or substituted lower alkyl; and

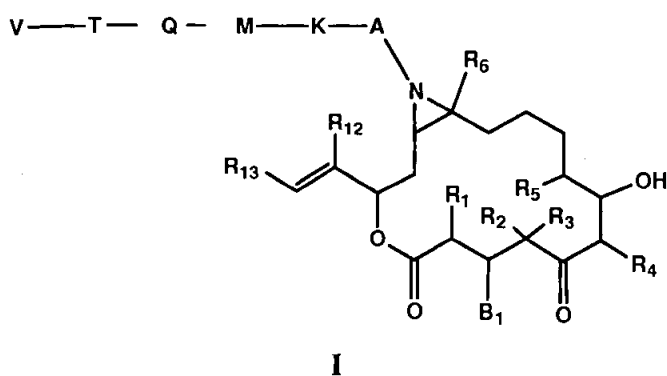
R_{18} , R_{19} , R_{31} , R_{32} , R_{33} , R_{24} , R_{25} , R_{26} , R_{27} , R_{28} and R_{29} are each, independently, H, lower alkyl, substituted lower alkyl, cycloalkyl, or substituted cycloalkyl, or any of R_{18} and R_{19} ; R_{31} and R_{32} ; R_{19} and R_{31} ; R_{33} and R_{24} ; R_{25} and R_{26} ; R_{24} and R_{25} ; or R_{27} and R_{28} may be taken together to form a cycloalkyl.

[0095] Compounds of the present invention are especially useful for forming conjugated compounds, including pharmaceutically acceptable salts and solvates thereof, having the following formula:

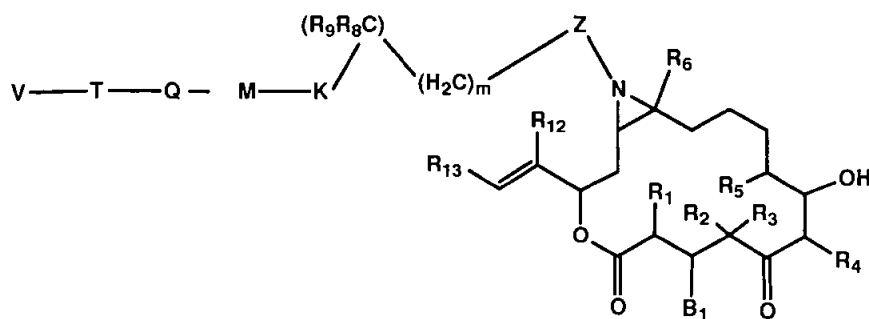


[0096] For any bivalent group listed herein, such as $-(CR_8R_9)-(CH_2)_m-Z-$, that is capable of insertion into compounds of Formula I,

- 31 -



the insertion should be made from left to right. For example, in the following situation where A is defined as $-(CR_8R_9)-(CH_2)_m-Z-$, the methylene group is attached to K, and the Z group is attached to the nitrogen of the aziridinyl ring, as follows:



[0097] As a non-limiting example, such folate-receptor associated cancers include ovarian cancer and cancers of the skin, breast, lung, colon, nose, throat, mammary gland, liver, kidney, spleen, and/or brain; mesotheliomas, pituitary adenoma, cervical cancer, renal cell carcinoma or other renal cancer, choroid plexus carcinoma, and epithelial tumors (See, Asok, Antony, "Folate Receptors: Reflections on a Personal Odyssey and a Perspective on Unfolding Truth," Advanced Drug Delivery Reviews 56 (2004) at 1059-66).

[0098] Additionally, use of an antiestrogen (such as tamoxifen, ICI 182, 780), may be effective to increase the FR expression in certain cancer cells or tumor types to enhance the advantages obtained upon administering the compounds of the invention to patients, and/or to enhance the various diseases or tumor types that may be treated with the compounds according to the invention.

[0099] For example, the diseases that may be treated with the compounds of this invention, and/or upon a combination therapy comprising the compounds of this

- 32 -

invention in combination with an antiestrogen, may further include, without limitation, the following

- carcinomas including those listed above and/or that of the bladder, pancreas, stomach, thyroid, and prostate;
- hematopoietic tumors of lymphoid lineage, including leukemias such as acute lymphocytic leukemia and acute lymphoblastic leukemia, and lymphomas, such as B-cell lymphoma, T-cell lymphoma, Hodgkins lymphoma, non-Hodgkins lymphoma, hairy cell lymphoma, and Burkitts lymphoma;
- hematopoietic tumors of myeloid lineage, including acute and chronic myelogenous leukemias and promyelocytic leukemia;
- tumors of the central and peripheral nervous system, including astrocytoma, neuroblastoma, glioma, and schwannomas;
- tumors of mesenchymal origin, including fibrosarcoma, rhabdomyosarcoma, and osteosarcoma; and
- other tumors, including melanoma, xeroderma pigmentosum, seminoma, keratoacanthoma, thyroid follicular cancer, and teratocarcinoma.

[0100] The compounds of the present invention are useful for treating patients who have been previously treated for cancer, as well as those who have not previously been treated for cancer. The methods and compositions of this invention can be used in first-line and second-line cancer treatments. Furthermore, the compounds of formula (X) may be useful for treating refractory or resistant cancers.

[0101] The compounds of the present invention may also be useful in treatment of other conditions responsive to microtubule-stabilizing agents delivered via the folate receptor, including but not limited to, arthritis, especially inflammatory arthritis and other inflammatory conditions mediated by activated macrophages, and central nervous system disorders such as Alzheimer's disease.

[0102] Furthermore, patients being treatment with the compounds of the present invention may receive a combination of treatments, for example, with other anti-cancer and cytotoxic agents or other treatments useful in the treatment of cancer or other proliferative diseases. In treating cancer, a combination of compounds of the instant invention and one or more additional agents and/or other treatments

- 33 -

may be advantageous. The second agent may have the same or different mechanism of action than the compounds of formula (X). Especially useful are anti-cancer and cytotoxic drug combinations wherein the second drug chosen acts in a different manner or different phase of the cell cycle than the active drug moiety of the present compounds of the present invention.

[0103] Examples of classes of anti-cancer and cytotoxic agents include, but are not limited to, alkylating agents, such as nitrogen mustards, alkyl sulfonates, nitrosoureas, ethylenimines, and triazenes; antimetabolites, such as folate antagonists, purine analogues, and pyrimidine analogues; antibiotics or antibodies, such as monoclonal antibodies; enzymes; farnesyl-protein transferase inhibitors; hormonal agents, such as glucocorticoids, estrogens/antiestrogens, androgens/antiandrogens, progestins, and luteinizing hormone-releasing antagonists; microtubule-disruptor agents, such as ecteinascidins or their analogs and derivatives; microtubule-stabilizing agents; plant-derived products, such as vinca alkaloids, epipodophyllotoxins, and taxanes; topoisomerase inhibitors; prenyl-protein transferase inhibitors; platinum coordination complexes; kinase inhibitors including multi-kinase inhibitors and/or inhibitors of Src kinase or Src/abl; signal transduction inhibitors; and other agents used as anti-cancer and cytotoxic agents such as biological response modifiers, growth factors, and immune modulators. The compounds of formula X may also be used in conjunction with radiation therapy.

[0104] Further examples of anticancer agents that may be used in combination with the compounds of the invention include Src kinase inhibitors, 'N-(2-Chloro-6-methylphenyl)-2-[[6-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-2-methyl-4-pyrimidinyl]amino]-5-thiazolecarboxamide, and other compounds described in US Pat. No. 6,596,746 and US Pat. App. No. 11/051,208, filed February 4, 2005, incorporated herein by reference; ixabepilone, an aza-epothilone B analog, and/or other epothilone analogs described in US Pat. Nos. 6,605,599; 6,262,094; 6,288,237; 6,291,684; 6,359,140; 6,365,749; 6,380,395; 6,399,638; 6,498,257; 6,518,421; 6,576,651; 6,593,115; 6,613,912; 6,624,310, US Appl. Pub. No. 2003/0060623, published March 2003; German Patent No. 4138042.8; WO 97/19086, WO 98/22461, WO 98/25929, WO 98/38192, WO 99/01124, WO

- 34 -

99/02224, WO 99/02514, WO 99/03848, WO 99/07692, WO 99/27890, WO 99/28324, WO 99/43653, WO 99/54330, WO 99/54318, WO 99/54319, WO 99/65913, WO 99/67252, WO 99/67253, WO 00/00485, US Pat. Appl. Pub. Nos. 2004/0053910 and 2004/0152708; cyclin dependent kinase inhibitors found in WO 99/24416 (see also U.S. Pat. No. 6,040,321); prenyl-protein transferase inhibitors found in WO 97/30992 and WO 98/54966; farnesyl protein transferase agents described in U.S. Patent No. 6,011,029; CTLA-4 antibodies described in PCT publication no. WO01/14424, and/or a CTLA-4 antibody described in PCT publication no. WO 00/37504 such as, for example, the antibody known as CP-675206 (ticilimumab), or ORENCIA[®]; MDX-010; vinflunine (Javlor[™]), and Erbitux (cetuximab).

[0105] Other agents potentially useful in combination with compounds of the present invention may include paclitaxel (TAXOL[®]), docetaxel (TAXOTERE[®]) miscellaneous agents such as, hydroxyurea, procarbazine, mitotane, hexamethylmelamine, cisplatin and carboplatin; Avastin; and Herceptin.

[0106] The pharmaceutical compositions prepared according to the present invention can also be formulated or co-administered with other therapeutic agents that are selected for their particular usefulness in administering therapies associated with the aforementioned conditions. For example, the pharmaceutical compositions may be formulated with agents to prevent nausea, hypersensitivity and gastric irritation, such as antiemetics, and H₁ and H₂ antihistaminics.

[0107] The above other therapeutic agents, when employed in combination with the compounds of the present invention, can be used, for example, in those amounts indicated in the Physicians' Desk Reference (PDR) or as otherwise determined by one of ordinary skill in the art.

[0108] One embodiment of the invention comprises use of the present invention compounds in preparing pharmaceutical compositions for treatment of cancer, particularly for use in preparing pharmaceutical compositions for use in targeted drug delivery to tumors that overexpress or preferentially express the folate receptor. The pharmaceutical compositions of the present invention can be administered for any of the uses described herein by any suitable means, for example, parenterally, such as by subcutaneous, intravenous, intramuscular, or

- 35 -

intrasternal injection or infusion techniques (*e.g.*, as sterile injectable aqueous or non-aqueous solutions or suspensions), and/or in dosage unit formulations containing non-toxic, pharmaceutically acceptable vehicles or diluents. The pharmaceutical compositions can, for example, be administered in a form suitable for immediate release or extended release. Immediate release or extended release can be achieved by the use of suitable pharmaceutical compositions comprising the present compounds, or, particularly in the case of extended release, by the use of devices such as subcutaneous implants or osmotic pumps.

[0109] Exemplary compositions for parenteral administration include injectable solutions or suspensions which can contain, for example, suitable non-toxic, parenterally acceptable diluents or solvents, such as mannitol, 1,3-butanediol, water, Ringer's solution, an isotonic sodium chloride solution (0.9% Sodium Chloride Injection [Normal Saline] or 5% Dextrose Injection), or other suitable dispersing or wetting and suspending agents, including synthetic mono- or diglycerides, and fatty acids. Pharmaceutically acceptable compositions and/or methods of administering compounds of the invention may include use of cosolvents including, but not limited to ethanol, N,N dimethylacetamide, propylene glycol, glycerol and polyethylene glycols, *e.g.*, polyethylene glycol 300 and/or polyethylene glycol 400, may comprise use of surfactants (pharmaceutically-acceptable surface active agent that may be used to increase a compound's spreading or wetting properties by reducing its surface tension), including without limitation, CREMOPHOR[®], Solutol HS 15[®], polysorbate 80, polysorbate 20, poloxamer, pyrrolidones such as N-alkylpyrrolidone (*e.g.*, N-methylpyrrolidone) and/or polyvinylpyrrolidone; may also comprise use of one or more "buffers" (*e.g.*, an ingredient which imparts an ability to resist change in the effective acidity or alkalinity of a medium upon the addition of increments of an acid or base), including, without limitation, sodium phosphate, sodium citrate, diethanolamine, triethanolamine, L-arginine, L-lysine, L-histidine, L-alanine, glycine, sodium carbonate, tromethamine (a/k/a tris[hydroxymethyl]aminomethane or Tris), and/or mixtures thereof.

[0110] The effective amount of the compound of the present invention can be determined by one of ordinary skill in the art, and includes exemplary dosage

- 36 -

amounts for an adult human of from about 0.01-10 mg/kg of body weight of active compound per day, which can be administered in a single dose or in the form of individual divided doses, such as from 1 to 4 times per day. A preferred range includes a dosage of about 0.02 to 5 mg/kg of body weight, with a range of about 0.05 – 0.3, being most preferred. It will be understood that the specific dose level and frequency of dosage for any particular subject can be varied and will depend upon a variety of factors including the activity of the specific compound employed, the metabolic stability and length of action of that compound, the species, age, body weight, general health, sex and diet of the subject, the mode and time of administration, rate of excretion, drug combination, and severity of the particular condition. Preferred subjects for treatment include animals, most preferably mammalian species such as humans, and domestic animals such as dogs, cats and the like, subject to microtubule-stabilization associated conditions.

[0111] Compounds of the present invention, such as compounds disclosed in one or more of the following examples, have been tested in one or more of the assays described below and/or assays known in the field, and demonstrate a measurable level of activity as microtubule stabilizing agents.

ASSAYS

Clonogenic Cell Survival Assay

[0112] Cancer cells were seeded at 3.0×10^5 cells in a T75 flask with 10 ml of RPMI1640 media, free of folic acid, and containing 10% fetal bovine serum and 25 mM HEPES. Cells were grown in a 37°C incubator containing 5% CO₂ for 2 days. On day 2, supernatants were removed from the flasks, and the flasks were divided into 2 groups. One group of cells were incubated with 5 ml of media containing 100 M of folic acid (Sigma) for 30 minutes and the others were grown in 5 ml of media without added folic acid. Cells were then treated with 20 nM of epothilone, epothilone analog, conjugated epothilone, or conjugated epothilone analog for one hour. At the end of the incubation, the drugs were removed from the flasks and the cells were washed with PBS buffer 3x. After washing, 5 ml of complete media were added into each flask, and the cell was grown in the CO₂

- 37 -

incubator for 23 hours. The next morning, the cells were removed from the flasks by trypsinization, cell numbers were determined, and then cells were plated in a 6 well plates. Ten days after plating, colonies were stained with crystal violet and counted. The surviving fractions were determined.

In vitro MTS Proliferation/Cytotoxicity Assay

[0113] In vitro cytotoxicity was assessed in tumor cells using a tetrazolium-based colorimetric assay which takes advantage of the metabolic conversion of MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulphenyl)-2H-tetrazolium, inner salt) to a reduced form that absorbs light at 492 nm. Cells were seeded 24 hr prior to addition of the epothilone, epothilone analog, conjugated epothilone, or conjugated epothilone analog. Following a 72 hour incubation at 37°C with serially diluted compound, MTS, in combination with the electron coupling agent phenazine methosulfate, was added to the cells. The incubation was continued for 3 hours, then the absorbancy of the medium at 492 nm was measured with a spectrophotometer to obtain the number of surviving cells relative to control populations. The results are expressed as median cytotoxic concentrations (IC₅₀ values).

Folate Receptor Assay

[0114] All sample preparation procedures used for the FR assay were performed at 4°C. Tissue samples were homogenized in homogenization buffer (10 mM Tris, pH 8.0, 0.02 mg/ml each of leupeptin and aprotinin; 1 ml buffer/50mg tissue) using a PowerGen 125 homogenizer. Large debris was removed by mild centrifugation (3000 X g for 15 min). Membrane pellets were then collected by centrifugation at 40,000 X g for 60 min and resuspended in solubilization buffer (50 mM Tris, pH 7.4, 150 mM NaCl, 25 mM n-octyl-β-D-glucopyranoside, 5 mM EDTA, and 0.02% sodium azide). Insoluble material was removed by a second 40,000 X g 60 min centrifugation, and the total protein concentration of the supernatants was determined by the bicinchoninic acid (BCA) method (Pierce Chemical). Each sample was then diluted to 0.25 mg/ml in solubilization buffer, and 100 μl was placed inside each of two Microcon-30 microconcentrators (30,000-MW cutoff, Millipore). Samples were then centrifuged at 14,000 X g for

- 38 -

10 min at room temperature to pass all of the liquid through the membrane, as well as to retain the solubilized FRs on the surface of the microconcentrator's membrane. All subsequent centrifugation steps were performed using these same parameters. Then 55 μ l of 30 mM acetate buffer (pH 3.0) was added to each microconcentrator, followed by a centrifugation step. Next, 55 μ l of phosphate buffered saline (PBS) was dispensed into each microconcentrator, followed by another centrifugation. Then 50 μ l of [^{3} H]folic acid binding reagent (120 nM [^{3} H]folic acid (Amersham) in 10 mM Na_2PO_4 , 1.8mM KH_2PO_4 , pH 7.4, containing 500 mM NaCl, 2.7 mM KCl, and 25 mM n-octyl- β -D-glucopyranoside) or 50 μ l of a competing reagent (binding reagent plus 120 μ M unlabeled folic acid) was added to the appropriate concentrators. Following a 20-min incubation at room temperature, the concentrators were washed/centrifuged three times with 75 μ l 50 mM n-octyl- β -D-glucopyranoside, 0.7 M NaCl in PBS, pH 7.4. After the final wash, the retentates containing the solubilized FRs were recovered from the membrane surface of the microconcentrators by two rinses with 100 μ l of PBS containing 4% Triton X-100. The samples were then counted in a liquid scintillation counter (Packard Bioscience). Counts per minute (cpm) values were converted to picomoles of FR based on the cpm of a known standard, and the final results were normalized with respect to the sample protein content.

Animals and Tumors

[0115] Female CD2F1 mice (Harlan Sprague-Dawley Inc., 20-22 g) maintained in a controlled environment and provided with water and food ad libitum were used in these studies. The murine FR α (-) Madison 109 (M109) lung carcinoma (Marks et al., 1977) and the FR-expressing (FR α (+)) 98M109 variant were used to evaluate the efficacy of the epothilone, epothilone analog (e.g., epothilone derivative), folate-epothilone conjugate, or folate-epothilone analog conjugate. In addition, the human head and neck epidermoid carcinoma KB grown in nude mice was also used for this purpose.

Drug Treatment and Antitumor Efficacy Evaluation

[0116] For administration of epothilone or epothilone analogs to mice, an excipient consisting of the following was used: CREMOPHOR[®]/ethanol/water

- 39 -

(1:1:8, v/v). The compounds were first dissolved in a mixture of CREMOPHOR®/ethanol (50:50). Final dilution to the required dosage strength was made less than 1 hr before drug administration. Mice were administered the agents by bolus IV injection through the tail vein. Folate-epothilone conjugates or folate-epothilone analog conjugates were prepared in sterile phosphate buffered saline and administered to mice by IV bolus injection through the tail vein at a volume of 0.01 mL/g of mice. Treatment of each animal was based on individual body weight.

[0117] The required number of animals needed to detect a meaningful response were pooled at the start of the experiment and each was given a subcutaneous inoculation of a tumor brei (2% w/v). Tumors were allowed to grow for 4 days. On the fourth day, animals were evenly distributed to various treatment and control groups. Treated animals were checked daily for treatment related toxicity/mortality. Each group of animals was weighed before the initiation of treatment (Wt1) and then again following the last treatment dose (Wt2). The difference in body weight (Wt2-Wt1) provides a measure of treatment-related toxicity.

[0118] Tumor response was determined by measurement of tumors with a caliper twice a week, until the tumors reached a predetermined "target" size of 1 gm. Tumor weights (mg) were estimated from the formula:

$$\text{Tumor weight} = (\text{length} \times \text{width}^2) \div 2$$

[0119] Antitumor activity was evaluated at the maximum tolerated dose (MTD) which is defined as the dose level immediately below which excessive toxicity (i.e. more than one death) occurred. When death occurred, the day of death was recorded. Treated mice dying prior to having their tumors reach target size were considered to have died from drug toxicity. No control mice died bearing tumors less than target size. Treatment groups with more than one death caused by drug toxicity were considered to have had excessively toxic treatments and their data were not included in the evaluation of a compound's antitumor efficacy.

- 40 -

[0120] Tumor response end-point was expressed in terms of tumor growth delay (T-C value), defined as the difference in time (days) required for the treated tumors (T) to reach a predetermined target size compared to those of the control group (C).

[0121] To estimate tumor cell kill, the tumor volume doubling time (TVDT) was first calculated with the formula:

TVDT = Median time (days) for control tumors to reach target size – Median time (days) for control tumors to reach half the target size

And,

$$\text{Log cell kill} = T - C \div (3.32 \times \text{TVDT})$$

Statistical evaluations of data were performed using Gehan's generalized Wilcoxon test.

ABBREVIATIONS

[0122] The following abbreviations are used in the schemes and Examples herein for ease of reference:

CBZ-OSu = N-(Benzyloxycarbonyloxy)succinimide

DCM = dichloromethane

DEA = diethylamine

DIAD = diisopropyl azodicarboxylate

DIPEA = diisopropylethylamine

DMA = dimethylamine

DMF = dimethyl formamide

DMSO = dimethylsulfoxide

EDC = 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride

EtOH = ethanol

EtOAc = ethyl acetate

FR = folate receptor

- 41 -

HOBt = n-hydroxy benzotriazole

HPCL = high performance liquid chromatography

iPr-OH or IPA = isopropyl alcohol

LC/MS = liquid chromatography/mass spec

LDA = lithium diisopropylamide

MeOH = methanol

OTES = o-triethylsilyl;

OMs = mesylate;

Ph = phenyl

Pd/C = palladium on carbon

PyBOP = benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate

Py = pyridyl

RT = room temperature

Sat'd = saturated

THF = tetrahydrofuran

TFA = trifluoroacetic acid

TLC = thin layer chromatography

TESCL = chlorotriethylsilane

UV = ultraviolet.

METHODS OF PREPARATION

[0123] Compounds of the present invention may generally be prepared according to the following schemes and the knowledge of one skilled in the art, and/or using methods set forth in US Pat. Nos. 6,605,599; 6,831,090; 6,800,653; 6,291,684; 6,719,540; 7,172,884, US Pat. Appl. Pub. No. 2005/0002942 and *Organic Letters*, 2001, 3, 2693-2696, the disclosures of which are herein incorporated by reference and/or in the Examples that follow.

[0124] As shown in Scheme 1, a compound of formula X can be prepared from a compound of formula II. Compounds of formula II can be obtained by fermentation (see, e.g. Gerth et al., "Studies on the Biosynthesis of Epothilones: The Biosynthetic Origin of the Carbon Skeleton," *Journal of Antibiotics*, Vol. 53, No. 12 (Dec. 2000), and Hofle et al., "Epothilone A and B- Novel 16-Membered

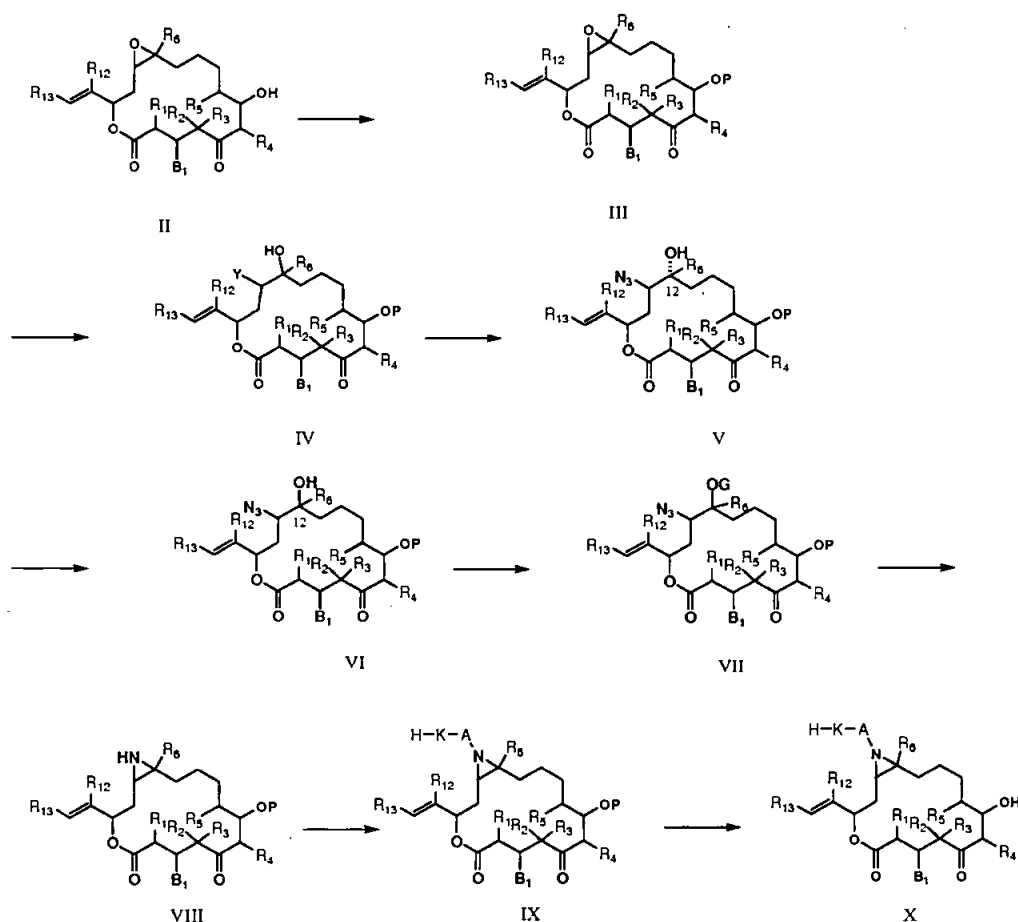
- 42 -

Macrolides: Isolation, Crystal Structure, and Conformation in Solution”, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, Vol. 35, No. 13/14, 1567-1569 (1996), the disclosures of which are herein incorporated by reference) or by synthesis (see, e.g. Vite et al. US Pat. Nos. 6,605,599; 6,242,469; 6,867,333 and US Pat. Appl. Pub. 2006/004065, and Johnson et al. *Organic Letters*, 2000, 2:1537-1540) the disclosures of which are herein incorporated by reference in their entirety). For example a compound of formula II where R₂, R₃, R₄, R₅, and R₁₂ are methyl, B₁ is hydroxyl, R₁ and R₆ are hydrogen, and R₂ is 2-methylthiazol-4-yl is referred to as epothilone A and can be obtained from fermentation of *Sorangium cellulosum* as referenced above. A compound of formula II can be converted to a compound of formula III where P is a silyl protecting group such as triethylsilyl, t-butyltrimethylsilyl, t-butylphenylsilyl, triisopropylsilyl, and the like (see, e.g., Greene et al., “Protective groups in Organic Synthesis”, John Wiley and Sons, Inc.). For example, a compound of formula III where P is triethylsilyl can be prepared by treatment of a compound of formula II with chlorotriethylsilane in the presence of Hunig’s base. In the case where B₁ is hydroxyl in the compound of formula II, then B₁ would also be converted to the corresponding silyl ether. A halohydrin of formula IV (Y is Cl, Br, or I) can be prepared from a compound of formula III by treatment with a metal halide salt by methods known in the art. For example, epoxide opening using magnesium bromide etherate at low temperature (-20 to -5°C) can provide diastereomeric halohydrins, where Y is bromine. A compound of formula V can be prepared from a compound of formula IV by displacement of the halogen using, for example, sodium azide in a polar solvent such as dimethylformamide. An ordinarily skilled artisan will recognize that the stereochemistry at C₁₂ as depicted in Scheme I should not be construed as limiting, but rather exemplary. If desired, inversion of the stereochemistry at the C₁₂ position can be achieved following the Mitsunobu protocol which is well established in the art. For example, treatment of a compound of formula V with *p*-nitrobenzoic acid, diethylazodicarboxylate, and triphenylphosphine provides the corresponding nitrobenzoate ester, which can then be cleaved by mild ester hydrolysis using, for example, methanolic solutions of ammonia to provide a compound of formula VI. Again, the stereochemistry

- 43 -

for C₁₂ as depicted for compound VI is not limiting, and is depicted as such to show that treatment of compound V as described will invert the stereochemistry at that position. Alternatively, other organic acids, azodicarboxylates, and organophosphines can be used to effect the Mitsunobu inversion. A compound of formula VII where OG is a leaving group such as mesylate, tosylate, nosylate, triflate and the like can be prepared from a compound of formula VI by methods known in the art. For example, treatment of VI with methanesulfonyl chloride and triethylamine in a suitable organic solvent such as dichloromethane provides a compound of formula VII where OG is mesylate. A compound of formula VIII can be prepared from a compound of formula VII by reduction of the azido group with a reducing agent such as an organophosphine (e.g., trimethylphosphine). Alternatively, a compound of formula VIII can be prepared directly from a compound of formula VI using an organophosphine reducing agent such as triphenylphosphine. A compound of formula IX can be prepared from a compound of formula VIII by methods known in the art (see, e.g., US Pat. No. 6,800,653; and Regueiro-Ren et al., *Organic Letters*, 2001, 3, 2693-2696). For instance, a compound of formula IX where H-K-A- is 2-hydroxyethyl can be prepared from a compound of formula VIII by alkylation of the aziridine ring using, for example, excess 2-bromoethanol and a base such as potassium carbonate. A compound of formula X can be prepared from a compound of formula IX by removal of the silyl ether protecting groups using methods known in the art (see, e.g., Greene et al., "Protective groups in Organic Synthesis", John Wiley and Sons, Inc.). For instance, when P is triethylsilyl, treatment of a compound of formula IX with trifluoroacetic acid in dichloromethane effects deprotection to provide a compound of formula X.

SCHEME 1



[0125] Scheme 2 shows a process for making a folate analog or derivative V and bivalent linker T-Q having the formula XI, below, that may be used with compounds of the invention to make conjugated molecules for targeted drug delivery, e.g., as per formula I, previously described. As shown in Scheme 2, a folate analog and bivalent linker can be assembled using methods known in the art, especially in the case where V is folic acid or a folic acid analog, as described, for example, by Jackson, et al., *Advanced Drug Delivery Rev.* 56(2004) 1111-1125, the disclosure of which is herein incorporated by reference, and T-Q is a peptide. For example, peptidyl folate XI can be prepared as shown in Scheme 2. Sequential peptide coupling of a cysteine-loaded polystyrene resin with Fmoc-protected aspartate, arginine, aspartate, and then glutamate can be effected using PyBOP as coupling agent and piperidine as Fmoc-deprotection

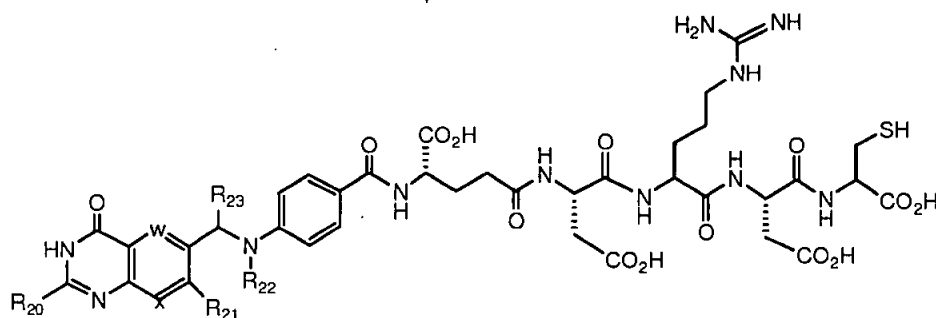
- 45 -

agent. N¹⁰-Trifluoroacetamide-protected pterioic acid can be prepared in two steps by enzymatic (carboxypeptidase G) conversion of folic acid to pterioic acid, followed by N¹⁰-protection using trifluoroacetic anhydride. Next, coupling of the N¹⁰-protected pterioic acid to the resin-bound peptide followed by cleavage from the resin with trifluoroacetic acid and removal of the N¹⁰-trifluoroacetyl group using ammonium hydroxide provides a V-T-Q fragment of a compound of formula I where V is folic acid and T-Q is -Asp-Arg-Asp-Cys-OH. Alternatively, pterioic acid analogs could be used in place of pterioic acid and other amino acids, could be used in place of those illustrated in Scheme 2.

Scheme 2

H-Cys(4-methoxytrityl)-2-chlorotrityl-Resin (loading 0.57mmol/g)

- 1) Fmoc-Asp(OtBu)-OH, PyBOP, DIPEA, DMF, then piperidine
- 2) Fmoc-Arg(Pbf)-OH, PyBOP, DIPEA, DMF, then piperidine
- 3) Fmoc-Asp(OtBu)-OH, PyBOP, DIPEA, DMF, then piperidine
- 4) Fmoc-Glu-OtBu, PyBOP, DIPEA, DMF, then piperidine
- 5) N¹⁰TFA Pterioic Acid, PyBOP, DIPEA, DMSO
- 6) 92.5% TFA, 2.5% H₂O, 2.5% i-Pr₃SiH, and 2.5% ethanedithiol
- 7) NH₄OH aq., then HCl aq.



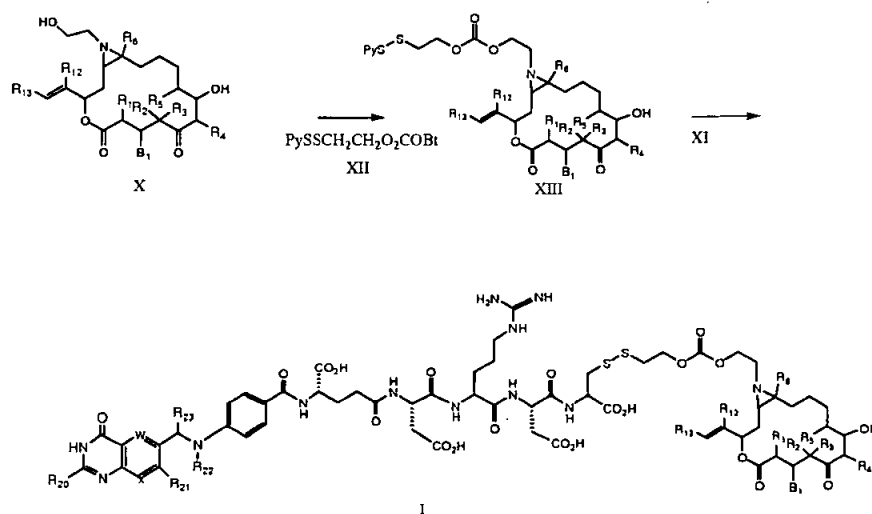
XI

[0126] Scheme 3, below, shows a method for using the epothilone derivatives of the present invention to prepare a conjugated molecule of formula I, for use in targeted drug delivery. As shown in Scheme 3, assembly of compounds of

- 46 -

formula I can be achieved by coupling compounds of formula X to a fragment V-T-Q by stepwise incorporation of a releasable linker M. By way of illustration, a compound of formula X where -A-K-H is -CH₂CH₂OH can be converted to a disulfanylethyl carbonate XIII using an activated benzotriazole compound of formula XII. A compound of formula XII can be prepared from mercaptoethanol, methoxycarbonyl sulfonyl chloride, and an optionally substituted 2-mercaptopyridine to provide an intermediate 2-(2-pyridin-2-yl)disulfanylethanol, which can then be converted to a compound of formula XII by treatment with diphosgene and an optionally substituted 1-hydroxybenzotriazole. Subsequent disulfide exchange with a peptidyl folate such as XI provides a compound of formula I where V is folic acid, T-Q is a -Asp-Arg-Asp-Cys-OH, M is -SCH₂CH₂O(C=O)-, A is -CH₂CH₂- and K is O.

SCHEME 3



[0127] Scheme 4 illustrates an alternative method for making a compound of formula X from a compound of formula XIV (see, U.S. Patent Application No. 60/940,088, filed May 25, 2006, incorporated herein in its entirety by reference). Compounds of formula XIV can be obtained by methods well known in the field, for example, by fermentation (see, e.g. Gerth et al., "Studies on the Biosynthesis of Epothilones: The Biosynthetic Origin of the Carbon Skeleton," Journal of

- 47 -

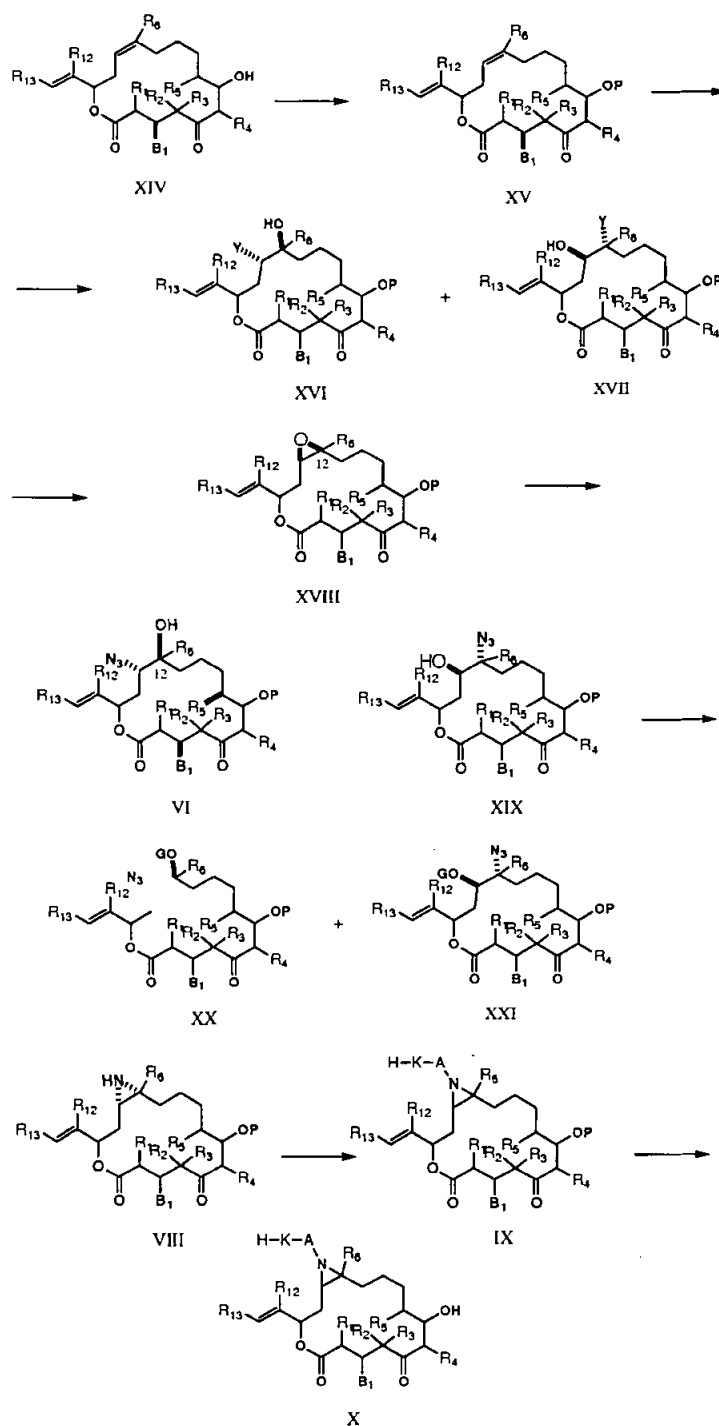
Antibiotics, Vol. 53, No. 12 (Dec. 2000), and Hofle et al., "Epothilone A and B- Novel 16-Membered Macrolides: Isolation, Crystal Structure, and Conformation in Solution", Angew. Chem. Int. Ed. Engl., Vol. 35, No. 13/14, 1567-1569 (1996), the disclosures of which are herein incorporated by reference) or by total synthesis (see, e.g. Vite et al. US Pat. Nos. 6,605,599; 6,242,469; 6,867,333 and US Pat. Appl. Pub. 2006/004065, the disclosures of which are herein incorporated by reference in their entirety). For example a compound of formula XIV where R₂, R₃, R₄, R₅, and R₁₂ are methyl, B₁ is hydroxyl, R₁ and R₆ are hydrogen, and R₂ is 2-methylthiazol-4-yl is referred to as epothilone C and can be obtained from fermentation of *Sorangium cellulosum* as referenced above. A compound of formula XIV can be converted to a compound of formula XV where P is a silyl protecting group such as triethylsilyl, t-butyldimethylsilyl, t-butyldiphenylsilyl, triisopropylsilyl, and the like (see, e.g., Greene et al., "Protective groups in Organic Synthesis", John Wiley and Sons, Inc.). For example, a compound of formula XV where P is triethylsilyl can be prepared by treatment of a compound of formula XIV with chlorotriethylsilane in the presence of base such as Hunig's base. In the case where B₁ is hydroxyl in the compound of formula XIV, then B₁ would also be converted to the corresponding silyl ether. A halohydrin of formula XVI or XVII (Y is Cl, Br, or I) can be prepared from a compound of formula XV by treatment with a halogenating agent such as Y₂. For example, electrophilic addition in polar solvents such as acetonitrile using iodine can stereoselectively provide regioisomeric halohydrins of formulas XVI and XVII, where Y is iodine. Alternatively N-halo succinimides can also be used for the same transformation. A compound of formula XVIII can be prepared from compounds of formulas XVI and/or XVII by epoxide ring closure in the presence of bases such as triethylamine or Hunig's base in a polar/aqueous solvent system such as acetonitrile/water. If desired, compound XIV can be directly transformed into a compounds of formula XVI and/or XVII (where P is H), which could then be converted into the epoxide XVIII (where P is H). A compound of formula XVIII can be transformed into the azido-alcohols of formulas VI and XIX by azide displacement in the presence of inorganic azide salts or tetra-alkyl ammonium azides in alcoholic solvents. In

- 48 -

the case where P is a silyl protecting group, compounds of formulas XX and/or XXI where OG is a leaving group such as mesylate, tosylate, nosylate, triflate and the like can be prepared from compounds of formulas VI and/or XIX by methods known in the art. For example, treatment of VI and/or XIX with methanesulfonyl chloride and triethylamine in a suitable organic solvent such as dichloromethane provides compounds of formulas XX and XXI where OG is mesylate. A compound of formula VIII can be prepared from compounds of formulas XX and/or XXI by reduction of the azido group through methods known in the art. For example, compound VIII can be prepared from compounds of formulas XX and/or XXI through reaction with a reducing agent such as an organophosphine (e.g., trimethylphosphine) in polar solvents such as acetonitrile. Alternatively, when P is H, compound of formula VIII can be directly prepared from compounds of formulas VI and/or XIX by reduction of the azido group with a reducing agent such as an organophosphine (e.g., triphenylphosphine) in polar solvents such as acetonitrile. A compound of formula IX can be prepared from a compound of formula VIII by methods known in the art (see, e.g., US Pat. No. 6,800,653; and Regueiro-Ren et al., *Organic Letters*, 2001, 3, 2693-2696). For instance, a compound of formula IX where H-K-A- is 2-hydroxyethyl can be prepared from a compound of formula VIII by alkylation of the aziridine ring using, for example, excess 2-bromoethanol and a base such as potassium carbonate. In case P is a trialkylsilyl, a compound of formula X can be prepared from a compound of formula IX by removal of the silyl ether protecting groups using methods known in the art (see, e.g., Greene et al., "Protective groups in Organic Synthesis", John Wiley and Sons, Inc.). For instance, when P is triethylsilyl, treatment of a compound of formula IX with trifluoroacetic acid in dichloromethane effects deprotection to provide a compound of formula X.

- 49 -

SCHEME 4

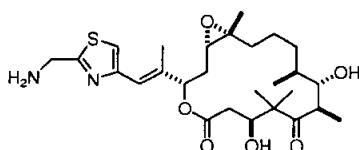


[0128] The invention will now be further described with reference to the following illustrative examples.

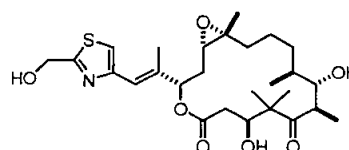
EXAMPLES

EXAMPLE 1: Folate conjugated epothilone analogs

[0129] As described in the detailed description above, analogs and derivatives of folate are described in Vlahov. In research and development directed toward folate receptor targeting to tumor cells of conjugated epothilone and epothilone analog compounds, several compounds were conjugated to folate. For example, Compound AA and Compound BB were considered as candidates for conjugation to folic acid:



Compound AA



Compound BB

[0130] Compound AA has activity in Phase II clinical trials, and six folate conjugates of Compound AA (Compounds AA.I to AA.VI; see **FIG. 1**) were prepared and optionally tested for chemical stability, FR binding, and FR-mediated activity in cell culture.

[0131] The binding of these folate conjugates of Compound AA to FR was determined in an assay that measures displacement of radiolabeled folic acid from FR expressed on KB tumor cells grown to confluence. Finding of the folate conjugates of Compounds AA.I and AA.II to FR was deemed acceptable [relative affinity (RA) >0.25; RA of folic acid = 1.0]. However, surprisingly, none of the six conjugates of Compound AA shown in Fig. 1 displayed appreciable cytotoxicity against KB tumor cells in antiproliferation assays that measure ³H-thymidine incorporation (data not shown).

[0132] Since conjugates of Compound AA demonstrated disappointing cytotoxicity against tumor cells, studies were conducted using three conjugates of Compound BB (Compounds BB.I to BB.III). Compound BB is also known as epothilone F, and is an analog of Compound AA, where the 21-amino group is replaced by a 21-hydroxyl group. While Compound BB.II (**Fig. 2**) displayed

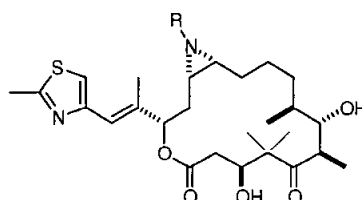
- 51 -

cytotoxicity at high concentrations, the activity was not attenuated in competition studies using excess of folic acid. Therefore, the observed cytotoxicity was attributed to non-specific release of Compound BB.II.

[0133] Other epothilone analogs, e.g., aziridinyl epothilones, are known in the art (see, e.g., U.S. Patent No. 6,399, 638; Regueiro-Ren, A, et al. (2001) *Org. Letters*. 3:2693-96) and show potent antitumor cytotoxicity. For example, an MTS assay that compared the relative cytotoxic potency of a number of epothilone analogs against a pair of taxane-resistant cancer cell lines (HCTVM46 and A2790Tax) was conducted (see Table 1). HCTVM46 is a human colon carcinoma cell line derived from the sensitive HCT116 parent line, and is resistant to taxanes due to overexpression of the 170kD p-glycoprotein drug efflux transporter. A2780Tax is a human ovarian carcinoma cell line derived from the parent A2780 line, and is resistant to paclitaxel as a result of a mutation in the tubulin amino acid sequence that impairs the ability of paclitaxel to bind.

[0134] As is shown in Table 1, various aziridinyl epothilone analogs (Compounds CC-EE) show potent antitumor activity against both the HCT116 colon and A2780 ovarian carcinoma cell lines, compared to other known antitumor agents, e.g., paclitaxel, compound AA, and epothilone B.

Table 1. In vitro activity of 12,13-aziridinyl epothilones



Compound	R	HCT116 IC ₅₀ (nM) ¹	R/S Ratio ²	A2780 IC ₅₀ (nM) ¹	R/S Ratio ³
CC	-H	4.2 ± 2.8	3.1	3.4 ± 1.5	4.7
DD	-CH ₃	0.37 ± 0.13	0.6	0.25 ± 0.06	4.1
EE	-CH ₂ CH ₂ OCH ₃	0.40 ± 0.25	0.8	0.22 ± 0.12	4.7
paclitaxel	--	3.3 ± 1.0	150	3.1 ± 1.0	22.1
AA	--	1.2 ± 0.3	14.8	1.1 ± 0.4	3
Epothilone B	--	0.40 ± 0.13	0.5	0.23 ± 0.09	2.5

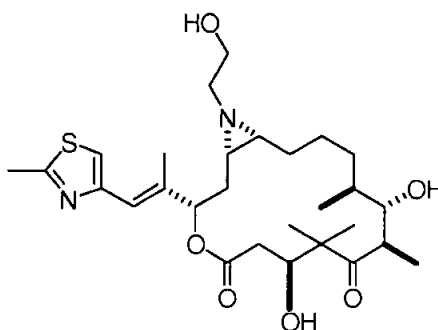
¹ Mean IC₅₀ ± SD calculated from four separate experiments.

² R/S ratio = HCT116 IC₅₀/HCT116VM46IC₅₀

³ R/S ratio = A2780 IC₅₀/A2780Tax IC₅₀

[0135] Despite the antitumor activities of aziridinyl epothilone compounds CC-EE, the only hydroxyl groups on these molecules available for conjugation to folate are those found at the C₃ and C₇ carbon atoms. Consequently, having researched a number of epothilone compounds and analogs, there remained a challenge to discover a compound that would be readily available for conjugation to folate, and which would demonstrate activity via specific release of the active epothilone moiety in the tumor cells.

[0136] The aziridinyl epothilone compound G was discovered, having the formula,



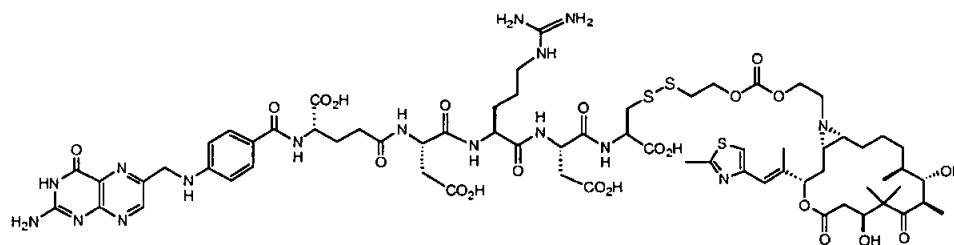
Compound G

- 53 -

[0137] Compound G (see Examples 2 and 3) proved surprisingly easy to conjugate to folic acid to form Compound J (see Example 2) with relative affinity of 0.77 for folate receptor, when compared to folic acid.

[0138] Unexpectedly, the polar hydroxyl group on the aziridine side chain did not adversely affect the antitumor activity of the aziridine epothilone analogs. This is important because it is the aziridine epothilone analog, e.g., Compound G, that mediates the antitumor effects upon release from folic acid. The potency of Compound G, and three other highly potent epothilone analogs (ixabepilone, Compound AA, and Compound BB) were evaluated by the colony formation assay that is described above. The concentration needed to kill 90% of clonogenic KB cancer cells (IC_{90}) was determined after a drug exposure duration of 17 hours. As shown in **FIG. 3**, compound G exhibited an IC_{90} of 4.3 nM and was ~2, 4, and 6-fold more potent than compound CC, compound AA, and ixabepilone, respectively.

[0139] Conjugation of compound G to form Compound J did not affect the antitumor activity of compound G. Compound J demonstrated substantial cytotoxic activity against tumor cells *in vivo*. In the KB *in vivo* FR α (+) tumor model, compound J demonstrated activity both at its maximum tolerated dose (MTD) and at two lower dose levels that produced minimal toxicity (see **FIG. 4**). In contrast, ixabepilone was active only at its MTD (5 μ mol/kg). When compared at the MTDs, compound J produced superior antitumor effects than ixabepilone (**FIG. 4**).



Compound J

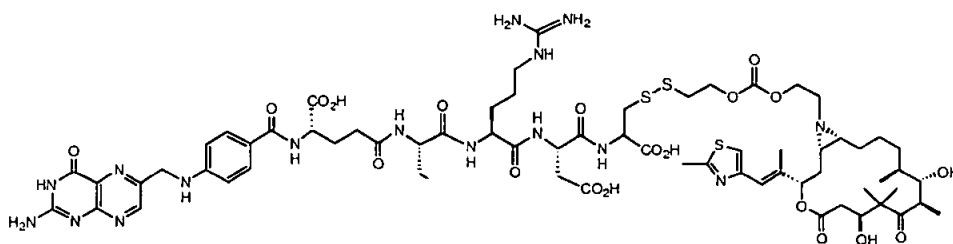
[0140] In contrast, with the FR α (-) M109 parent tumor model, Compound J had poor activity at all dose levels tested, including at its MTD (2.4 μ mol/kg), whereas ixabepilone was active at its MTD of 5 μ mol/kg. (**FIG. 5**). These results indicate that the FR α (-) M109 is sensitive to ixabepilone and the

- 54 -

inactivity of compound J is likely largely a consequence of the absence of FR α expression by this tumor. These results also provide evidence that the antitumor activity of compound J may be mediated through the FR α receptors.

[0141] Further evidence of the FR α mediated drug delivery mechanism of compound J is provided by the observation that co-administration of a folate analog at 20-fold excess of the dose of compound J could substantially compete with compound J for receptor binding and protect FR α (+) 98M109 tumors from the antitumor effects of compound J. (FIG. 6). Since Compound G and the conjugate (Compound J) have surprising anti-tumor effects both in vitro and in vivo, and since the antitumor activities of Compound J may be attributed to FR α (+)-mediated effects, also described herein is the conjugation of aziridinyl epothilone analog Compound G (see Examples 2 and 3) to form Compound J. (See Example 2).

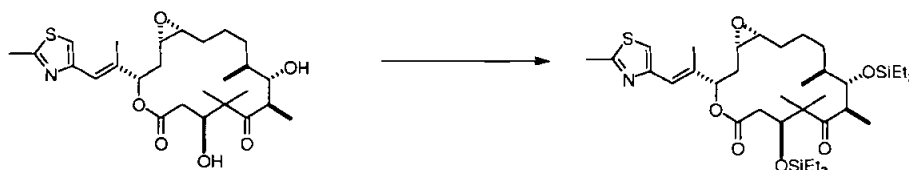
EXAMPLE 2: PREPARATION OF COMPOUND J



(S)-2-(4-((2-amino-4-oxo-3,4-dihydropteridin-6-yl)methylamino)benzamido)-5-((S)-3-carboxy-1-((S)-1-((S)-3-carboxy-1-((R)-1-carboxy-2-(2-(2-((1S,3S,7S,10R,11S,12S,16R)-7,11-dihydroxy-8,8,10,12-tetramethyl-3-((E)-1-(2-methylthiazol-4-yl)prop-1-en-2-yl)-5,9-dioxo-4-oxa-17-aza-bicyclo[14.1.0]heptadecan-17-yl)ethoxy)carbonyloxy)ethyl)disulfany)ethylamino)-1-oxopropan-2-ylamino)-5-guanidino-1-oxopentan-2-ylamino)-1-oxopropan-2-ylamino)-5-oxopentanoic acid

- 55 -

A. [1S-[1R*,3R*(E),7R*,10S*,11R*,12R*,16S*]]-8,8,10,12-Tetramethyl-3-[1-methyl-2-(2-methyl-4-thiazolyl)ethenyl]-7,11-bis[(triethylsilyloxy)-4,17-dioxabicyclo[14.1.0]heptadecane-5,9-dione

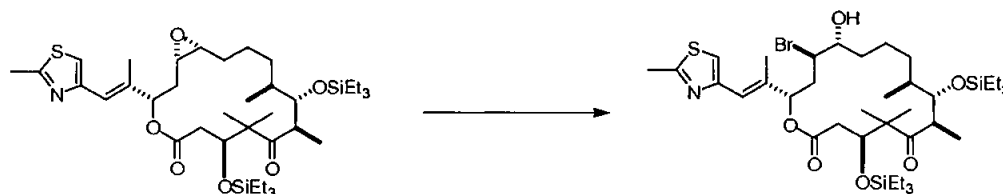


[0142] To a stirred solution of Epothilone A (5.0 g, 10.1 mmol), imidazole (3.40 g, 49.9 mmol) and DIPEA (28.5 mL, 163.6 mmol) in anhydrous DMF (100 mL) under N₂ atmosphere was added triethylsilyl chloride (15.0 mL, 89.4 mmol). After the addition was complete, the reaction solution was warmed at 55 °C (oil bath temperature) for 12 hr to give a single spot (tlc) of the desired product.

[0143] The above reaction was repeated two more times. The DMF of the combined solution was distilled under high vacuum. The foamy residue was purified by column chromatography (silica gel, E. Merck, 230-400 mesh, 600 g; 5:95, 10:90 and 15:85 EtOAc/hexanes) to give 19.4 g (88.6%) of Compound A as a white solid.

[0144] HPLC: ES Industries FluoroSep RP Phenyl, 4.6 x 250mm, isocratic, 30 min, 100%B, (B = 90% MeOH/H₂O + 0.2% H₃PO₄), flow rate at 1.0ml/min, UV 254, t = 23.15 min. LC/MS (ES+) 722 (M+H).

B. Preparation of [4S-[4R*,7S*,8R*,9R*,13S*,14S*,16R*(E)]]-14-Bromo-13-hydroxy-5,5,7,9-tetramethyl-16-[1-methyl-2-(2-methyl-4-thiazolyl)ethenyl]-4,8-bis[(triethylsilyloxy)-1-oxacyclohexadecane-2,6-dione



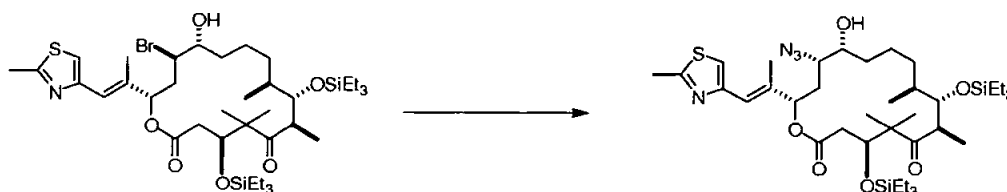
[0145] To a stirred solution of [1S-[1R*,3R*(E),7R*,10S*,11R*,12R*,16S*]]-8,8,10,12-Tetramethyl-3-[1-methyl-2-(2-methyl-4-thiazolyl)ethenyl]-7,11-bis[(triethylsilyloxy)-4,17-dioxabicyclo[14.1.0]heptadecane-5,9-dione (5.0 g, 6.92 mmol) in anhydrous dichloromethane (140 mL) at -20 °C under N₂ atmosphere was added MgBr₂·Et₂O (3 x 2.13 g, 24.78 mmol) in three portions

- 56 -

every two hours while maintaining an internal temperature below -5°C. After about 7 hr, the reaction mixture was diluted with dichloromethane and washed with sat. NaHCO₃ (2 x), dried over anhydrous Na₂SO₄ and evaporated in vacuum to give a foam. The residue was purified by column chromatography (silica gel, E. Merck, 230-400 mesh, 180 g; 5:95, 7.5:92.5 and 12.5:87.5 EtOAc/hexanes) to give Compound B (2.5 g, 45% yield) as a white foam along with recovered starting material (0.9 g, 18%).

[0146] HPLC: ES Industries FluoroSep RP Phenyl, 4.6 x 250 mm, isocratic, 30 min, 100%B, (B = 90% MeOH/H₂O + 0.2% H₃PO₄), flow rate at 1.0ml/min, UV 254, t = 14.37 min. (100% pure) LC/MS (ES+): 802 (M+H).

C. Preparation of [4S-[4R*,7S*,8R*,9R*,13S*,14R*,16R*(E)]]-14-Azido-13-hydroxy-5,5,7,9-tetramethyl-16-[1-methyl-2-(2-methyl-4-thiazolyl)ethenyl]-4,8-bis[(triethylsilyl)oxy]-1-oxacyclohexadecane-2,6-dione

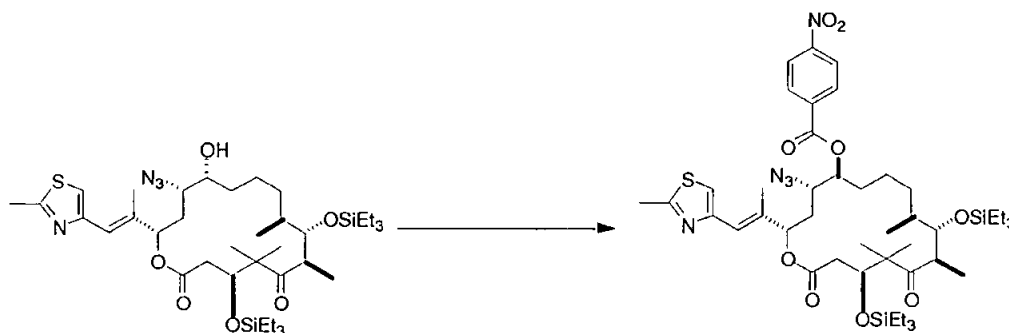


[0147] To a solution of [4S-[4R*,7S*,8R*,9R*,13S*,14S*,16R*(E)]]-14-Bromo-13-hydroxy-5,5,7,9-tetramethyl-16-[1-methyl-2-(2-methyl-4-thiazolyl)ethenyl]-4,8-bis[(triethylsilyl)oxy]-1-oxacyclohexadecane-2,6-dione (9.9 g, 12.3 mmol) in 1.2 L of DMF were added sodium azide (8.01 g, 123.3 mmol) and 18-crown-6 (3.26 g, 12.3 mmol) at RT under N₂ atmosphere. The clear solution was stirred mechanically at rt for 7 days. The solution was diluted with EtOAc (4 L), and washed with H₂O (6 x 3 L). The organic layer was dried (Na₂SO₄), and then evaporated to give 9.2 g of the crude product. Column chromatography (silica gel 450 g, 5 - 15% EtOAc/hexane) furnished 6.7 g (71% yield) Compound C as a white foam.

[0148] HPLC: YMC ODS-A S5, 4.6 x 50mm, isocratic, 30 min, 100%B. (B = 90% MeOH/H₂O + 0.2% H₃PO₄), flow rate at 4.0mL/min, UV 254 nm, t = 2.00 min. LC/MS (ES+) 765 (M+H).

- 57 -

D. Preparation of [4S-[4R*,7S*,8R*,9R*,13R*,14R*,16R*(E)]]-14-Azido-5,5,7,9-tetramethyl-16-[1-methyl-2-(2-methyl-4-thiazolyl)ethenyl]-13-[(4-nitrobenzoyl)oxy]-4,8-bis[(triethylsilyl)oxy]-1-oxacyclohexadecane-2,6-dione

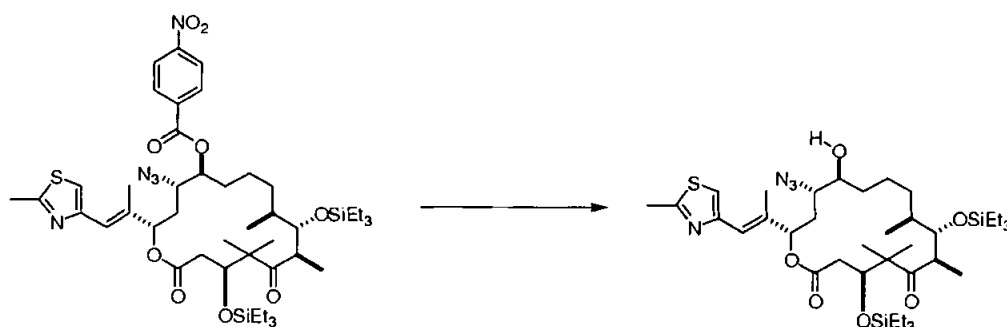


[0149] [4S-[4R*,7S*,8R*,9R*,13S*,14R*,16R*(E)]]-14-Azido-13-hydroxy-5,5,7,9-tetramethyl-16-[1-methyl-2-(2-methyl-4-thiazolyl)ethenyl]-4,8-bis[(triethylsilyl)oxy]-1-oxacyclohexadecane-2,6-dione (7.0 g, 9.15 mmol), 4-nitrobenzoic acid (3.82 g, 22.9 mmol), and triphenylphosphine (6.0 g, 22.9 mmol) were dissolved in THF (100 mL). Diethylazodicarboxylate (9.0 mL of 40% solution in toluene, 22.9 mmol) were added over a period of 5 minutes. The reaction mixture was maintained at RT for 4 hr, concentrated and purified by silica gel chromatography (stepwise gradient from 5% ethylacetate/hexanes to 15% ethylacetate/hexanes) to isolate the nitrobenzoate ester as a white foam (7.3g, 87%).

[0150] LC-MS: Phenomenex C18, 4.6 x 50 mm, isocratic, 15 min, 100%B. (B = 90% MeOH/H₂O + 0.1% TFA), flow rate at 4.0 mL/min, UV 220 nm. Retention time = 8.9 min. MS (ESI) M+H = 886.7

E. Preparation of [4S-[4R*,7S*,8R*,9R*,13R*,14R*,16R*(E)]]-14-Azido-13-hydroxy-5,5,7,9-tetramethyl-16-[1-methyl-2-(2-methyl-4-thiazolyl)ethenyl]-4,8-bis[(triethylsilyl)oxy]-1-oxacyclohexadecane-2,6-dione

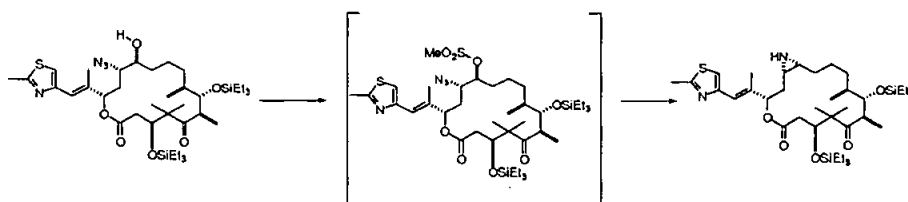
- 58 -



[0151] The nitrobenzoate ester Compound D (7.3g, 7.98 mmol) was dissolved in ethyl acetate (35 mL) and cooled to 0°C. Ammonia in methanol (350 mL of 2M solution in methanol) was added, and the reaction mixture stirred at RT for 4 hr, concentrated and purified by silica gel chromatography (stepwise gradient from 10 % ethylacetate/hexanes to 30% ethylacetate/hexanes) to isolate [4S-[4R*,7S*,8R*,9R*,13R*,14R*,16R*(E)]]-14-Azido-13-hydroxy-5,5,7,9-tetramethyl-16-[1-methyl-2-(2-methyl-4-thiazolyl)ethenyl]-4,8-bis[(triethylsilyl)oxy]-1-oxacyclohexadecane-2,6-dione as a glassy white solid (5.97g, 98%).

[0152] LC-MS: Phenomenex C18, 4.6 x 50mm, isocratic, 5 min, 100%B. (B = 90% MeOH/H₂O + 0.1% TFA), flow rate at 4.0 mL/min, UV 220 nm. Retention time = 2.25 min. MS (ESI) M+H = 765.66

F. Preparation of [1S-[1R*,3R*(E),7R*,10S*,11R*,12R*,16S*]]-8,8,10,12-Tetramethyl-3-[1-methyl-2-(2-methyl-4-thiazolyl)ethenyl]-7,11-bis[(triethylsilyl)oxy]-4-oxa-17-azabicyclo[14.1.0]heptadecane-5,9-dione



[0153] [4S-[4R*,7S*,8R*,9R*,13R*,14R*,16R*(E)]]-14-Azido-13-hydroxy-5,5,7,9-tetramethyl-16-[1-methyl-2-(2-methyl-4-thiazolyl)ethenyl]-4,8-bis[(triethylsilyl)oxy]-1-oxacyclohexadecane-2,6-dione (5.97 g, 7.8 mmol) and triethylamine (4.34 mL, 31.2 mmol) were dissolved in dichloromethane (85 mL) and cooled to 0 °C. Methanesulfonylchloride (1.8 mL, 23.4 mmol) was added dropwise over a period of 5 min. After 10 min, the reaction mixture was

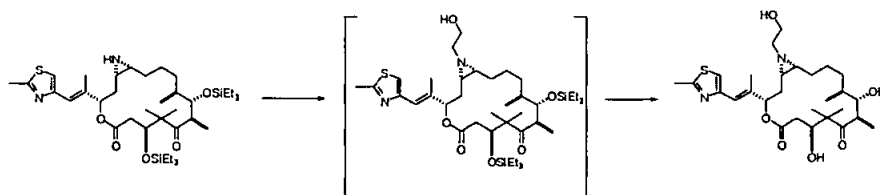
- 59 -

removed from the ice bath, and stirred at RT. After 3 hr, the reaction mixture was taken-up in saturated NaHCO_3 (300 mL), extracted with dichloromethane (3 X 100 mL), dried over Na_2SO_4 , concentrated and taken to next step without further purification.

[0154] The crude methanesulfonate ester was dissolved in THF/ H_2O (12:1, 130 mL). Triethylamine (2.2 mL, 16 mmol) and trimethylphosphine (16 mmol, 16 mL of 1.0 M solution in THF) were added, and the reaction mixture was stirred at RT. After 3 hr, the reaction was heated at 45°C for 7 hr, concentrated and purified by silica gel chromatography (stepwise gradient from 2% methanol/chloroform to 5% methanol/chloroform) to isolate Compound F as a white solid (5.08 g, 88% for two steps).

[0155] LC-MS: Phenomenex C18, 4.6 x 50 mm, isocratic, 5 min, 100%B. (B = 90% MeOH/ H_2O + 0.1% TFA), flow rate at 4.0 mL/min, UV 220 nm. Retention time = 0.298 min. MS (ESI) $\text{M}+\text{H} = 721.58$

G. Preparation of [1S-[1R*,3R*(E),7R*,10S*,11R*,12R*,16S*]]-7,11-Dihydroxy-17-[2-hydroxyethyl]-8,8,10,12-tetramethyl-3-[1-methyl-2-(2-methyl-4-thiazolyl)ethenyl]-4-oxa-17-azabicyclo[14.1.0]heptadecane-5,9-dione



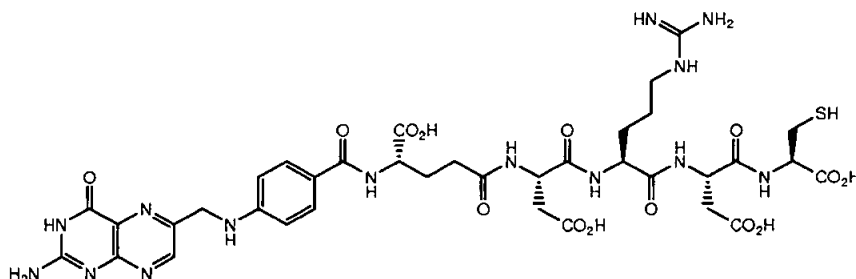
[0156] K_2CO_3 (1.4g, 10.2 mmol) and 2-bromoethanol (0.52 mL, 7.3 mmol) were added to [1S-[1R*,3R*(E),7R*,10S*,11R*,12R*,16S*]]-8,8,10,12-Tetramethyl-3-[1-methyl-2-(2-methyl-4-thiazolyl)ethenyl]-7,11-bis[(triethylsilyl)oxy]-4-oxa-17-azabicyclo[14.1.0]heptadecane-5,9-dione (1.05 g, 1.46 mmol) in acetonitrile (20 mL) and heated to 82°C . After 4 hr, additional 2-bromoethanol (0.52 mL, 7.3 mmol) and K_2CO_3 (1.4 g, 10.2 mmol) were added. After 5 hr, additional 2-bromoethanol (0.21 mL, 2.92 mmol) was added. After 3 hr, the reaction mixture was cooled to room temperature, filtered through Celite, washed with acetonitrile (5 X 5 mL), dichloromethane (2 X 5 mL), concentrated and taken to next step without further purification.

- 60 -

[0157] The crude reaction product was dissolved in dichloromethane (40 mL), cooled to 0°C, and trifluoroacetic acid (8.0 mL) was added. After 1 hr, the reaction mixture was concentrated, taken-up in saturated NaHCO₃ (200 mL), extracted with dichloromethane (3 X 100 mL), dried over Na₂SO₄, concentrated, and purified by silica gel chromatography (10% methanol/dichloromethane) to isolate [1S-[1R*,3R*(E),7R*,10S*,11R*,12R*,16S*]]-7,11-Dihydroxy-17-[2-hydroxyethyl]-8,8,10,12-tetramethyl-3-[1-methyl-2-(2-methyl-4-thiazolyl)ethenyl]-4-oxa-17-azabicyclo[14.1.0]heptadecane-5,9-dione (Compound G), as a clear film (0.62g, 79% for two steps).

[0158] LC-MS: Waters Sunfire C18, 4.6 x 50mm, gradient, 0 to 100%B over 4 min. (A= 10% MeOH/H₂O + 0.1% TFA; B = 90% MeOH/H₂O + 0.1% TFA), flow rate at 4.0 mL/min, UV 220 nm. Retention time = 2.12 min. MS (ESI) M+H = 537.52.

H. Preparation of (S)-2-(4-((2-amino-4-oxo-3,4-dihydropteridin-6-yl)methylamino)benzamido)-5-((S)-3-carboxy-1-((S)-1-((S)-3-carboxy-1-((S)-1-carboxy-2-mercaptoethylamino)-1-oxopropan-2-ylamino)-5-guanidino-1-oxopentan-2-ylamino)-1-oxopropan-2-ylamino)-5-oxopentanoic acid



[0159] (S)-2-(4-((2-amino-4-oxo-3,4-dihydropteridin-6-yl)methylamino)benzamido)-5-((S)-3-carboxy-1-((S)-1-((S)-3-carboxy-1-((S)-1-carboxy-2-mercaptoethylamino)-1-oxopropan-2-ylamino)-5-guanidino-1-oxopentan-2-ylamino)-1-oxopropan-2-ylamino)-5-oxopentanoic acid was synthesized by solid phase peptide synthesis in five steps starting from H-Cys(4-methoxytrityl)-2-chlorotrityl-resin. The Table 2 shows the amount of reagents used in the synthesis.

TABLE 2

	Mmol	Equiv.	MW	amount
--	------	--------	----	--------

	Mmol	Equiv.	MW	amount
H-Cys(4-methoxytrityl)-2-chlorotrityl-Resin (loading 0.57mmol/g)	1.14			2.0 g
Fmoc-Asp(OtBu)-OH (dissolve in 15mL DMF)	1.14	2	411.5	0.938 g
Fmoc-Arg(Pbf)-OH (15mL DMF)	1.14	2	648	1.477 g
Fmoc-Asp(OtBu)-OH (dissolve in 15mL DMF)	1.14	2	411.5	0.938 g
Fmoc-Glu-OtBu (15mL DMF)	1.14	2	425.5	0.970 g
N ¹⁰ -TFA Pteric Acid (dissolve in 15mL DMSO)	1.14	1.25	408	0.581 g
DIPEA	1.14	4	174	0.793
PyBOP	1.14	2	520	1.185 g

[0160] The following procedures were used:

Coupling steps:

[0161] To the resin in a peptide synthesis vessel were added the amino acid solution, DIPEA, and PyBOP. The mixture was bubbled for 1hr and washed 3X with DMF and isopropyl alcohol. Fmoc deprotection was effected by treatment with 20% piperidine in DMF, 2X (10min), before each amino acid coupling. This sequence was repeated for each amino acid coupling step.

Synthesis of N¹⁰-TFA-protected pteric acid:

[0162] To 10 L of 0.1 M tris base solution (121.1 g tris base in 10 L water) in a 22 L mechanically-stirred round bottomed flask, equipped with a heating mantle, was added 200 g (0.453 mole) of folic acid. The mixture was stirred to dissolve the folic acid, and then 500 mg (3.67 mmole) zinc chloride was added.

Carboxypeptidase G (13 x 20 unit vials available from Sigma) was added and the pH was adjusted to 7.3 with 1N HCl and maintained throughout the reaction.

The mixture was protected from light and heated at 30°C for 8-10 days (use of an auto-titrator to hold the pH constant reduced the conversion time by 4-5 days).

The reaction was monitored by analytical HPLC until 80% conversion was achieved (further conversion is desirable but has not been optimized). The product was precipitated from the reaction mixture by adjusting the solution to

- 62 -

pH=3.0 using 6N HCl. The slurry was transferred to a centrifuge vial and centrifuged at 4000 rpm for 10 min. The supernatant was decanted. The wet solid was then directly purified as follows (the wet solid could be frozen for storage or first freeze-dried; however, storage of wet solids in the freezer until dissolution was more efficient). To 40 g of crude pterioic acid in 700 mL of water was added 1.0 M NaOH until pH=11.5. The mixture was filtered (Whatman type 1) and then chromatographed (column: 10 x 120 cm; stationary phase: 8 kg DEAE cellulose; mobile phase: 1.0 M NaCl/0.01 M NaOH, pH=11.5; flow rate: 17 ml/min). One liter yellow-colored fractions were collected and analyzed by HPLC. Fractions containing pure pterioic acid were adjusted to pH=3 with 6 M HCl to precipitate pterioic acid. The mixture was centrifuged at 3000 rpm for 20 min. The supernatant was decanted and washed with water (3x). The solid was freeze-dried for at least 72 hr. The impact of residual water on the next reaction is not known.

[0163] The pterioic acid was further dried over P_2O_5 under high vacuum for over 24 hr (note that similar results in the protection step were obtained without this additional drying step). Next, 100g (0.32 mol) of pterioic acid was added to a 5 L round bottom flask, equipped with a mechanical stirrer and an argon inlet, and stored under high vacuum overnight. Argon gas was added followed by 3500 g (2316 mL) of trifluoroacetic anhydride. The flask was sealed with a rubber stopper or argon inlet adaptor, and then stirred vigorously. The flask was protected from light and stirred at room temperature under argon atmosphere for 7 days (the reaction was monitored by HPLC of aliquots diluted 20x each with water and DMSO). The mixture was rotary evaporated to dryness and treated with 2.5 L of 3% trifluoroacetic acid in water. The mixture was stirred overnight at room temperature to hydrolyze anhydride by-products. Rotary evaporation gave a dry solid. The solid was suspended in 2 L of water and then centrifuged in 250-mL centrifuge bottles at 3000 rpm for 20 min. The supernatant was removed and the solid was washed with water and centrifuged (4 times). The solid was freeze-dried for 3 days, transferred to amber bottles, and dried under high vacuum in the presence of P_2O_5 for 2 days (Purity $\geq 95\%$; residual TFA assessed by Elemental Analysis).

- 63 -

Cleavage step:

[0164] The protected intermediate was released from the resin using the cleavage reagent prepared from 92.5% (50mL) TFA, 2.5% (1.34mL) H₂O, 2.5% (1.34mL) Triisopropylsilane, and 2.5% (1.34mL) ethanedithiol. The cleavage reagent was added to the reaction vessel (25mL). Argon was bubbled through the mixture for 1.5 hr. The liquid was drained from the vessel, and resin was washed with remaining reagent (3 X 8mL). The volatiles were concentrated by rotary evaporation to a volume of 10 mL. Diethyl ether (35.0 mL) was added to effect precipitation. The solid was collected by centrifugation and dried to give 1.25 g of cleavage product.

Deprotection step:

[0165] The N¹⁰-trifluoroacetyl protecting group in the pteric acid portion was removed under basic conditions. Starting with 250 mg of protected intermediate in 10 mL water, the pH was adjusted to 9.3 and maintained for 1 hr using 4:1 H₂O:ammonium hydroxide (1 – 2 mL). After 1hr, the pH was adjusted to 5 with 1N HCl (~1 mL) and the product was purified on preparative HPLC to yield 125 mg of Compound H.

HPLC Purification conditions:

[0166] Column: Waters NovaPak C₁₈ 300x19mm

[0167] Solvent A: Buffer 10mM Ammonium Acetate, pH=5

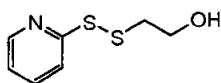
[0168] Solvent B: Acetonitrile

[0169] Elution: 1%B to 20%B in 40min at 15mL/min

[0170] Total yield from combined reactions: 625 mg

I. Preparation of 2-((1S,3S,7S,10R,11S,12S,16R)-7,11-dihydroxy-8,8,10,12-tetramethyl-3-((E)-1-(2-methylthiazol-4-yl)prop-1-en-2-yl)-5,9-dioxo-4-oxa-17-aza-bicyclo[14.1.0]heptadecan-17-yl)ethyl 2-(2-(pyridin-2-yl)disulfanyl)ethyl carbonate

1. Preparation of 2-(2-(Pyridin-2-yl)disulfanyl)ethanol



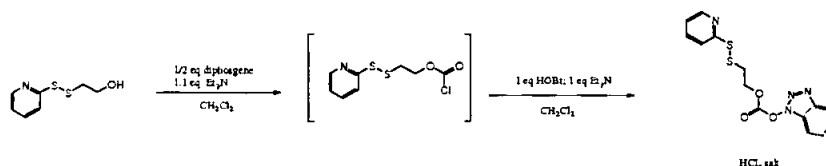
- 64 -

[0171] To a solution of methoxycarbonyl sulfenyl chloride (10 mL, 110 mmol), in dichloromethane (100 mL), cooled to 0 °C, was added mercaptoethanol (7.6 mL, 110 mmol), dropwise. The reaction mixture was allowed to stir at 0 °C for 30 min. At this point, a solution of 2-mercaptopyridine (12.2 g, 110 mmol) in dichloromethane (160 mL) was added. The solution was allowed to react at 0 °C for 1 hr and then was allowed to warm to RT for another 1 hr. Solid product was observed to have fallen out of solution. TLC (1:1 Pet Ether/EtOAc) showed that significant product had been formed. The reaction mixture was concentrated to a volume of 125 mL. The mixture was filtered through a Buchner funnel. The filter cake was washed with dichloromethane and then dried under vacuum overnight to afford 2-(2-(Pyridin-2-yl)disulfanyl)ethanol (23.6 g), as the HCl salt.

[0172] TLC: $R_f = 0.45$

[0173] Plates – EMD Silica Gel 60 F₂₅₄, 5 X 10 cm, 250 M

2. Preparation of Benzo[d][1,2,3]triazol-1-yl 2-(2-(pyridin-2-yl)disulfanyl)ethyl carbonate



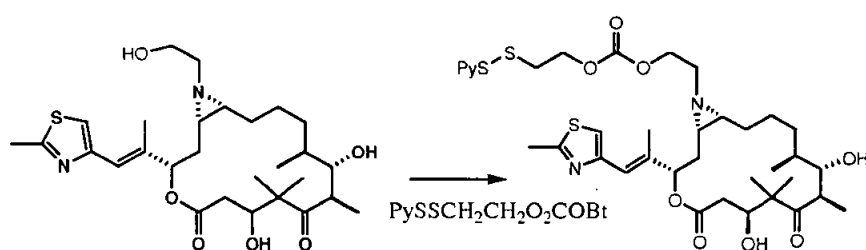
[0174] A solution of diphosgene (2.28 g, 11.5 mmol) in 15 mL anhydrous dichloromethane was stirred under argon in a roundbottom flask and cooled by a ice/salt bath. An addition funnel with a mixture of 2-(pyridin-2-yl)disulfanyl)ethanol (5.01 g, 22.4 mmol) and triethylamine (2.25 g, 22.2 mmol) in 65 mL anhydrous dichloromethane was placed onto the roundbottom flask. The mixture was added dropwise over a period of 20 min. The reaction mixture was allowed to warm to RT and stirred for an additional 1 hr. TLC analysis of the reaction mixture showed that the starting material was consumed and there was formation of a “streaking” less polar chloroformate product, TLC (6:4 EtOAc:Hexanes): R_f of starting material 0.4; R_f of chloroformate product: 0.8.

[0175] The reaction mixture was stirred in a roundbottom flask under argon and cooled by an ice/salt bath. A mixture of 3.02 g, 22.4 mmol HOBt and 2.23 g, 22.0 mmol triethylamine in 10 mL anhydrous dichloromethane was added to a dropping funnel affixed to the roundbottom flask. The mixture was slowly added

- 65 -

to the roundbottom flask maintaining the reaction temperature at 2°C. The reaction mixture was allowed to warm to RT and stirred overnight. Approximately 27 mL of dichloromethane was then distilled from the reaction mixture at atmospheric pressure. The mixture was then allowed to cool to RT and stir for 2 hr. The solids were collected by filtration, and the filter cake was washed with 20 mL of dichloromethane. The solids were then dried under vacuum at 40°C on a rotary evaporator to afford 7.81 g of off-white solids. This product was analyzed by ¹H- NMR and determined to be the desired product.

3. Preparation of 2-((1S,3S,7S,10R,11S,12S,16R)-7,11-dihydroxy-8,8,10,12-tetramethyl-3-((E)-1-(2-methylthiazol-4-yl)prop-1-en-2-yl)-5,9-dioxo-4-oxa-17-aza-bicyclo[14.1.0]heptadecan-17-yl)ethyl 2-(2-(pyridin-2-yl)disulfanyl)ethyl carbonate



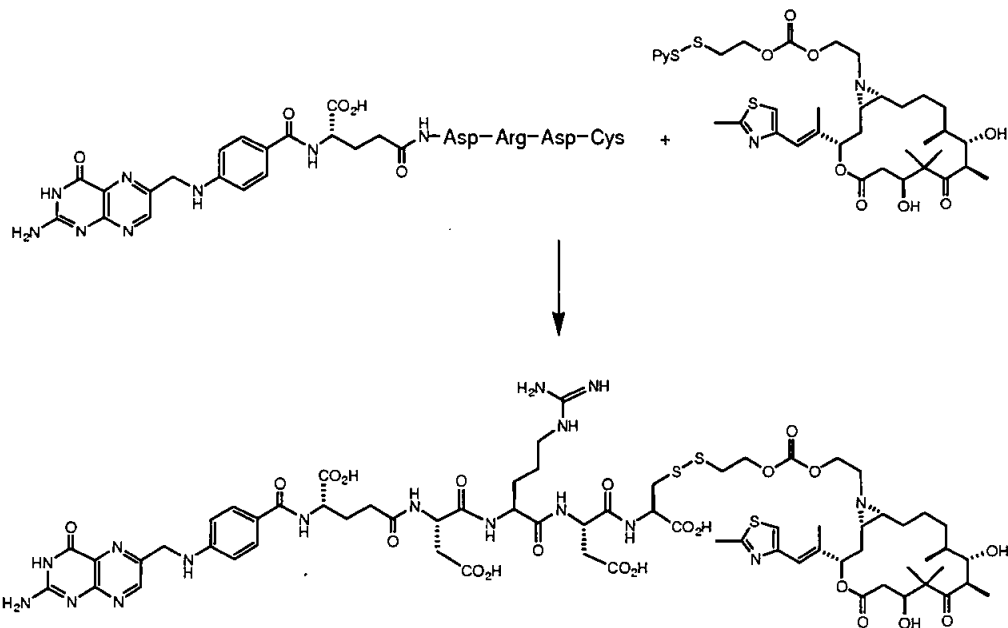
[0176] To a solution of [1S-[1R*,3R*(E),7R*,10S*,11R*,12R*,16S*]]-7,11-Dihydroxy-17-[2-hydroxyethyl]-8,8,10,12-tetramethyl-3-[1-methyl-2-(2-methyl-4-thiazolyl)ethenyl]-4-oxa-17-azabicyclo[14.1.0]heptadecane-5,9-dione in anhydrous dichloromethane at 0°C was added DMAP (1.2 eq.) and benzo[d][1,2,3]triazol-1-yl 2-(2-(pyridin-2-yl)disulfanyl)ethyl carbonate (1.0 eq.) in tandem. The reaction mixture was stirred at 0°C under argon and monitored by TLC every 10 min. Additional DMAP (1.2 eq.) and Compound I (2)(1.0 eq.) were added as necessary until all of Compound G was consumed. The reaction was quenched with MeOH (1 mL) at 0°C, the solvent was removed under vacuum, and the residue was purified by chromatography (silica gel, 2.5-5% MeOH in DCM) to afford the title compound as a beige solid. Compound amounts and recoveries are listed below in Table 3. Total yield from 2.95 g of Compound G was 2.80 g (67.9%) of Compound I.

TABLE 3

	Compound G (mg)	Compound I (2) (mg)	DMAP (mg)	DCM (mL)	Compound I (mg)*
Batch #1	303	197 × 3	82.8 × 3	8.0	204
Batch #2	952	683 × 3	260 × 3	22.0	984
Batch #3	921	661 × 3	251 × 3	22.0	761
Batch #4	775	556 × 3	211 × 3	18.0	851

* Each chromatographic purification typically gave pure product along with some impure (80-90% purity) product. The impure product was combined with the crude product from the next batch for chromatographic purification. For batches #2 and 4, two chromatographic purifications were carried out.

J. Preparation of (S)-2-(4-((2-amino-4-oxo-3,4-dihydropteridin-6-yl)methylamino)benzamido)-5-((S)-3-carboxy-1-((S)-1-((S)-3-carboxy-1-((R)-1-carboxy-2-(2-(2-((2-((1S,3S,7S,10R,11S,12S,16R)-7,11-dihydroxy-8,8,10,12-tetramethyl-3-((E)-1-(2-methylthiazol-4-yl)prop-1-en-2-yl)-5,9-dioxo-4-oxa-17-aza-bicyclo[14.1.0]heptadecan-17-yl)ethoxy)carbonyloxy)ethyl)disulfanyl)ethylamino)-1-oxopropan-2-ylamino)-5-guanidino-1-oxopentan-2-ylamino)-1-oxopropan-2-ylamino)-5-oxopentanoic acid



- 67 -

[0177] To 15 mL of H₂O (bubbled with argon for 10 min before use) was added to (S)-2-(4-((2-amino-4-oxo-3,4-dihydropteridin-6-yl)methylamino)benzamido)-5-((S)-3-carboxy-1-((S)-1-((S)-3-carboxy-1-((S)-1-carboxy-2-mercaptoethylamino)-1-oxopropan-2-ylamino)-5-guanidino-1-oxopentan-2-ylamino)-1-oxopropan-2-ylamino)-5-oxopentanoic acid (498 mg, 0.534 mmol) in a 50 mL size centrifuge tube. To this suspension, while bubbling with argon, was added dropwise saturated NaHCO₃ solution (bubbled with argon for 10 min before use) until the pH of the resulting solution reached 6.9. 2-((1S,3S,7S,10R,11S,12S,16R)-7,11-dihydroxy-8,8,10,12-tetramethyl-3-((E)-1-(2-methylthiazol-4-yl)prop-1-en-2-yl)-5,9-dioxo-4-oxa-17-aza-bicyclo[14.1.0]heptadecan-17-yl)ethyl 2-(2-(pyridin-2-yl)disulfanyl)ethyl carbonate (400 mg, 0.534 mmol) in THF was added quickly and the resulting homogenous solution was stirred under argon for 30 min. The reaction progress was checked by analytical HPLC at 15 min. The product peak came out at ~ 6.4 min under analytical HPLC conditions. The mixture was diluted with ~15 mL of phosphate buffer and the THF was removed under vacuum. The cloudy solution was centrifuged and filtered. The yellow filtrate was divided into two portions and purified by preparative HPLC. Pure fractions (>98% pure) were pooled and freeze-dried. Tail fractions (<98% pure) were collected and re-purified for every 3-6 chromatography runs to provide 700 mg of the title compound as a white powder (contains 11.8% by weight of water and 8.7% by weight sodium and sodium phosphate salts, as determined by Karl Fischer and elemental analyses).

Preparative HPLC parameters:

[0178] Column: Waters Nova-Pak HR C18 6 μ m 30x300 mm

[0179] Mobile phase A: 7.0 mM sodium phosphate buffer, pH=7.2

[0180] Mobile phase B: acetonitrile

[0181] Method: 10%B-50%B in 30 min, flow rate: 40 mL/min

Analytical HPLC parameters:

[0182] Column: Waters Symmetry C18 3.5 μ m 4.6x75 mm

[0183] Mobile phase A: 10 mM Triethylammonium acetate (TEAOAc) buffer, pH=7.5

WO 2007/140297

PCT/US2007/069736

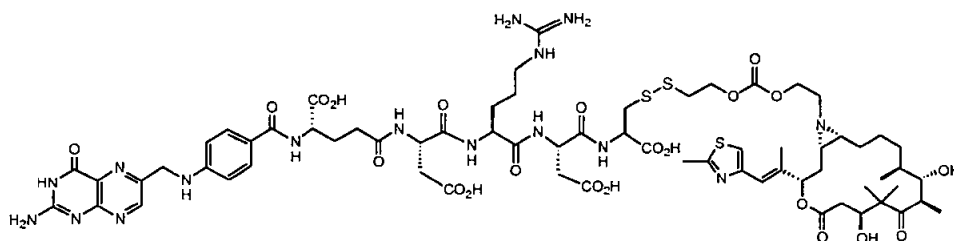
- 68 -

[0184] Mobile phase B: Acetonitrile

[0185] Method: 20%B-40%B in 10 min, flow rate: 1.0 mL/min

Accurate mass m/z ($C_{67}H_{92}N_{16}O_{22}S_3$):[0186] Calculated: 1570.58907 ($M+2H$), 785.29454 ($M+2H$)²⁺, 523.86563($M+3H$)³⁺, 393.15118 ($M+4H$)⁴⁺[0187] Found: ($M+2H$)²⁺ at 785.29100 (4.5 ppm), ($M+3H$)³⁺ at 523.86431 (2.5 ppm), ($M+4H$)⁴⁺ at 393.14996 (3.1 ppm)

EXAMPLE 3: ALTERNATIVE PREPARATION OF COMPOUND J



(S)-2-(4-((2-amino-4-oxo-3,4-dihydropteridin-6-yl)methylamino)benzamido)-5-((S)-3-carboxy-1-((S)-1-((S)-3-carboxy-1-((R)-1-carboxy-2-(2-(2-((1S,3S,7S,10R,11S,12S,16R)-7,11-dihydroxy-8,8,10,12-tetramethyl-3-((E)-1-(2-methylthiazol-4-yl)prop-1-en-2-yl)-5,9-dioxo-4-oxa-17-aza-bicyclo[14.1.0]heptadecan-17-yl)ethoxy)carbonyloxy)ethyl)disulfanyl)ethylamino)-1-oxopropan-2-ylamino)-5-guanidino-1-oxopentan-2-ylamino)-1-oxopropan-2-ylamino)-5-oxopentanoic acid

3A. Preparation of [4S,7R,8S,10R,9S,13R,16S]-4,8,13-trihydroxy-14-iodo-5,5,7,9-tetramethyl-16-[(E)-1-[2-methylthiazol-4-yl]prop-1-en-2-yl]oxacyclohexadecane-2,6-dione.

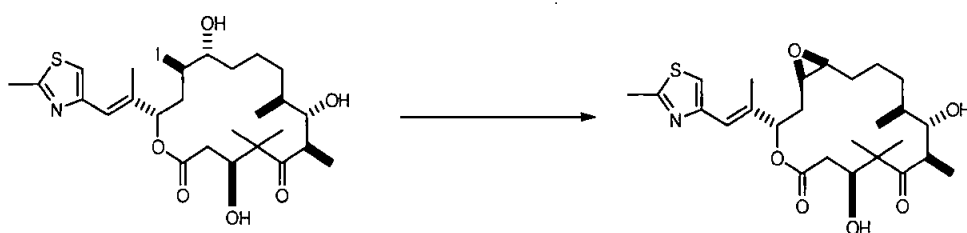


[0188] Epothilone C (54.3 g, 113.7 mmol) was dissolved in acetonitrile (480 mL) and water (50 mL). The solution was cooled to -5 °C to -10 °C. Iodine (144.3 g, 568.4 mmol) was added to the reaction and the reaction was held at least for 15 hr.

[0189] The reaction was quenched with 15% sodium metabisulfite solution (900 mL). The mixture was extracted with ethyl acetate (2 x 1.1 L). Organic phases were collected and washed successively with saturated sodium bicarbonate solution (675 mL) and saturated sodium chloride solution (675 mL). The solvents were evaporated under reduced pressure to give crude Compound A as yellow oil (85.6 g). The Compound A was used in next reaction without further purification.

[0190] HPLC: Phenomex Luna C8 (2) 3um, 4.6 x 150mm, isocratic, 18 min, 36%B, 17 min, 56%B, (Mobile phase A = 0.01M NH₄OAc in ACN:Water (5:95), Mobile phase B = 0.01M NH₄OAc in ACN:Water (95:5)), flow rate at 1.0ml/min, UV 245, Rt = 22.4 min.

3B. Preparation of [1R,3S,7S,10R,11S,12S,16S]-7,11-dihydroxy-8,8,10,12-tetramethyl-3-[(E)-1-[2-methylthiazol-4-yl]prop-1-en-2-yl]-4,17-dioxabicyclo[14.1.0]heptadecane-5,9-dione.



[4S,7R,8S,10R,9S,13R,16S]-4,8,13-trihydroxy-14-iodo-5,5,7,9-tetramethyl-16-[(E)-1-[2-methylthiazol-4-yl]prop-1-en-2-yl] oxacyclohexadecane-2,6-dione (85.6 g) was dissolved in acetonitrile (670 mL) and water (130 mL).

Triethylamine (135 mL, 968.5 mmol) was added to the solution. The reaction was heated to 50 °C to 60 °C for at least 8 hr.

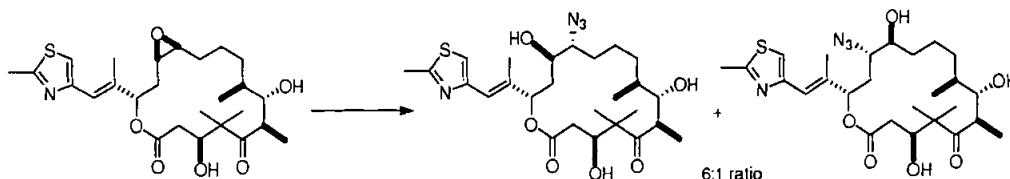
[0191] After it was cooled to RT, the solution was concentrated under reduced pressure. The residue was diluted with EtOAc (1.2 L) and washed with saturated sodium chloride solution (3 x 500 mL). The solvents were evaporated under

- 70 -

reduced pressure to give the crude product as yellow oil. Purification by silica gel pad filtration (silica gel 700 g, 66% EtOAc in heptane, 2 x 4 L, and 1 x 3 L) afforded Compound B as foam (50.3 g, 90% yield) with HPLC AP 80.

HPLC: Phenomex Luna C8 (2) 3um, 4.6 x 150mm, isocratic, 18 min, 36%B, 17 min, 56%B, (Mobile phase A = 0.01M NH₄OAc in ACN:Water (5:95), Mobile phase B = 0.01M NH₄OAc in ACN:Water (95:5)), flow rate at 1.0ml/min, UV 245, Rt = 15.0 min.

3C/3D. Preparation of (4S,7R,8S,9S,13R,14R,16S)-13-Azido-4,8,14-trihydroxy-5,5,7,9-tetramethyl-16-((E)-1-(2-methylthiazol-4-yl)prop-1-en-2-yl)oxacyclohexadecane-2,6-dione and (4S,7R,8S,9S,13S,14S,16S)-14-Azido-4,8,13-trihydroxy-5,5,7,9-tetramethyl-16-((E)-1-(2-methylthiazol-4-yl)prop-1-en-2-yl)oxacyclohexadecane-2,6-dione.



[0192] To a stirred solution of epi-Epothilone-A (14.35 g, 29.07 mmol) in ethanol (240 mL) and water (48 mL) was added sodium azide (11.45 g, 174.41 mmol) and ammonium chloride (3.14g, 58.14 mmol). The mixture was stirred at 60 °C for 17-20h. Volatiles were evaporated on the rotary evaporator under reduced pressure below 50 °C. The residue was dissolved in ethyl acetate (287 mL) and water (50 mL) mixture. Phases were separated and the bottom aqueous phase was extracted with ethyl acetate (115 mL). The combined organic phases were washed with 25% aqueous sodium chloride (brine) solution. Solvent was evaporated under reduced pressure and the residue was passed through a pad of silica gel eluting with ethyl acetate/n-heptane (2:1) mixture. Evaporation of the solvent under reduced pressure provided regio-isomeric mixture of azido-alcohols, (4S,7R,8S,9S,13R,14R,16S)-13-Azido-4,8,14-trihydroxy-5,5,7,9-tetramethyl-16-((E)-1-(2-methylthiazol-4-yl)prop-1-en-2-yl)oxacyclohexadecane-2,6-dione and (4S,7R,8S,9S,13S,14S,16S)-14-Azido-4,8,13-trihydroxy-5,5,7,9-tetramethyl-16-((E)-1-(2-methylthiazol-4-yl)prop-1-en-2-yl)oxacyclohexadecane-2,6-dione in ~6:1 ratio (12.8 g, 82%) as a white foam.

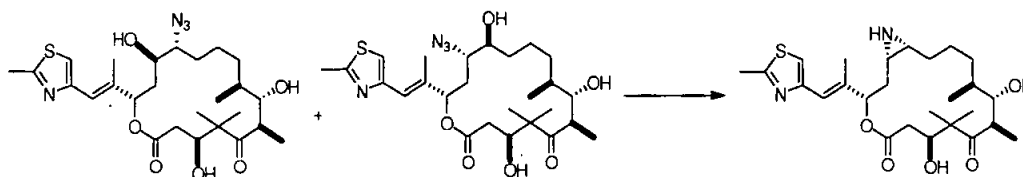
- 71 -

LC-MS: Phenomenex Luna C8(2) column: 3 μ m, 4.6 x 50 mm. Gradient: 15 min, 0%B to 100% B in 10 min, then 100% B for 5 min. Mobile phases: A = 0.01 M NH_4OAc in $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ 5:95; B = 0.01 M NH_4OAc in $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ 95:5. Flow rate: 3.0 mL/min. Wavelength: UV 250 nm. Retention time = 5.52 min. MS (ESI) $(\text{M}+\text{H})^+ = 537.69$

[0193] This reaction also works in other solvents like, acetone, acetonitrile, tetrahydrofuran, 2-propanol, dimethylformamide, methylsulfoxide and N-methylpyrrolidinone.

[0194] Tetrabutylammonium azide reagent also can be used instead of sodium azide/ammonium chloride

3E. Preparation of (1S,3S,7S,10R,11S,12S,16R)-7,11-dihydroxy-8,8,10,12-tetramethyl-3-((E)-1-(2-methylthiazol-4-yl)prop-1-en-2-yl)-4-oxa-17-azabicyclo(14.1.0)heptadecane-5,9-dione.



[0195] To a stirred solution of (4S,7R,8S,9S,13R,14R,16S)-13-Azido-4,8,14-trihydroxy-5,5,7,9-tetramethyl-16-((E)-1-(2-methylthiazol-4-yl)prop-1-en-2-yl)oxacyclohexadecane-2,6-dione and (4S,7R,8S,9S,13S,14S,16S)-14-Azido-4,8,13-trihydroxy-5,5,7,9-tetramethyl-16-((E)-1-(2-methylthiazol-4-yl)prop-1-en-2-yl)oxacyclohexadecane-2,6-dione mixture (12.8 g, 23.85 mmol) in anhydrous acetonitrile (90 mL) was added triphenylphosphine (9.48 g, 35.77 mmol) under nitrogen atmosphere. The clear solution was stirred at 20-40 °C for 19-40h. The reaction mixture was cooled to 0-5 °C for 3-4h and filtered the product. The cake was washed with heptane (64 mL) and dried at 40 °C under reduced pressure for 15-18h to give (1S,3S,7S,10R,11S,12S,16R)-7,11-dihydroxy-8,8,10,12-tetramethyl-3-((E)-1-(2-methylthiazol-4-yl)prop-1-en-2-yl)-4-oxa-17-azabicyclo(14.1.0)heptadecane-5,9-dione as a white solid (5.41 g, 46%).

LC-MS: Phenomenex Luna C8(2) column: 3 μ m, 4.6 x 50 mm. Gradient: 15 min, 0%B to 100% B in 10 min, then 100% B for 5 min. Mobile phases: A = 0.01 M

WO 2007/140297

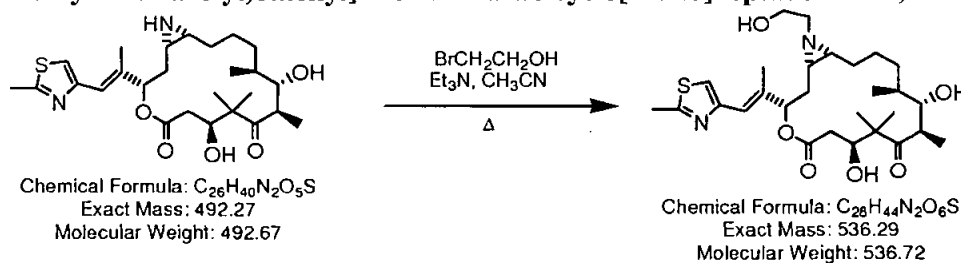
PCT/US2007/069736

- 72 -

NH₄OAc in CH₃CN/H₂O 5:95; B = 0.01 M NH₄OAc in CH₃CN/H₂O 95:5. Flow rate: 3.0 mL/min. Wavelength: UV 250 nm. Retention time = 4.43 min. MS (ESI) (M+H)⁺ = 493.68

[0196] This reaction also works with other phosphines like, tricyclohexylphosphine, trimethylphosphine, tributylphosphine and tris(4-methoxyphenyl)-phosphine and another solvent tetrahydrofuran.

3G. Preparation of [1S-[1R*,3R*(E),7R*,10S*,11R*,12R*,16S*]]-7,11-Dihydroxy-17-[2-hydroxyethyl]-8,8,10,12-tetramethyl-3-[1-methyl-2-(2-methyl-4-thiazolyl)ethenyl]-4-oxa-17-azabicyclo[14.1.0]heptadecane-5,9-dione



[0197] Et₃N (4.95 mL, 35.52 mmol) and 2-bromoethanol (3.02 mL, 42.62 mmol) were added to (1S,3S,7S,10R,11S,12S,16R)-7,11-dihydroxy-8,8,10,12-tetramethyl-3-((E)-1-(2-methylthiazol-4-yl)prop-1-en-2-yl)-4-oxa-17-azabicyclo[14.1.0]heptadecane-5,9-dione (3.50 g, 7.10 mmol) in acetonitrile (35 mL) and heated to 72.5 °C. After 20 hr, the reaction mixture was cooled to room temperature, concentrated to dryness through rotary vacuum distillation. The crude was dissolved in ethyl acetate (50 mL) and mixed with deionized water (35 mL). The mixture was extracted with ethyl acetate (3 x 35 mL), dried over Na₂SO₄, filtered, concentrated, crystallized in acetonitrile (35 mL), washed with acetonitrile (2 x 5 mL), and dried in vacuum oven at 45.5 °C overnight to isolate (1S,3S,7S,10R,11S,12S,16R)-7,11-dihydroxy-17-(2-hydroxyethyl)-8,8,10,12-tetramethyl-3-((E)-1-(2-methylthiazol-4-yl)prop-1-en-2-yl)-4-oxa-17-azabicyclo[14.1.0]heptadecane-5,9-dione as a white crystalline powder (2.60g, HPLC AP 97.1, 68.2% yield).

[0198] LC-MS: Phenomenex C8, 3 μm, 4.6 x 150mm, gradient, 10 to 50%B over 10 min, and stop at 20 min. (A = 5% MeCN/H₂O + 0.01 M NH₄OAc; B = 95% MeOH/H₂O + 0.01 M NH₄OAc), flow rate at 1.0 mL/min, UV 254 nm. Retention time = 9.43 min. MS (ESI) M+H = 537.21.

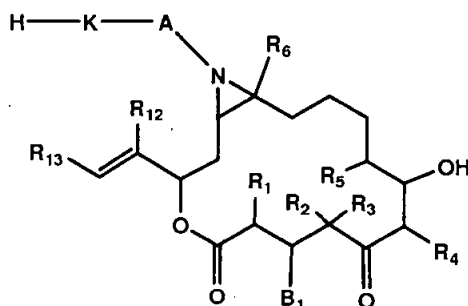
- 73 -

[0199] An ordinarily skilled artisan will recognize that Compound 3G as prepared by this Example 3 is identical to Compound G as prepared by Example 2, and thus, Compound 3G may be used to prepare Compounds H, I, and J, the methods of preparation and compounds of which are described in Example 2.

- 74 -

WE CLAIM:

1. A compound having the formula X:



X

or a pharmaceutically-acceptable salt thereof, wherein:

K is -O-, -S-, or -NR₇-;

A is -(CR₈R₉)-(CH₂)_m-Z- wherein Z is -(CHR₁₀)-, -C(=O)-, -C(=O)-C(=O)-, -OC(=O)-, -N(R₁₁)C(=O)-, -SO₂-, or -N(R₁₁)SO₂-;

B₁ is hydroxyl or cyano and R₁ is hydrogen or B₁ and R₁ are taken together to form a double bond;

R₂, R₃, and R₅ are, independently, hydrogen, alkyl, substituted alkyl, aryl or substituted aryl; or R₂ and R₃ may be taken together with the carbon to which they are attached to form an optionally substituted cycloalkyl;

R₄ is hydrogen, alkyl, alkenyl, substituted alkyl, substituted alkenyl, aryl, or substituted aryl;

R₆ is hydrogen, alkyl or substituted alkyl;

R₇, R₈, R₉, R₁₀, and R₁₁ R₁₂ are independently hydrogen, alkyl, substituted alkyl, cycloalkyl, substituted cycloalkyl, aryl, substituted aryl, heterocycloalkyl, substituted heterocycloalkyl, heteroaryl, or substituted heteroaryl;

R₁₂ is H, alkyl, substituted alkyl, or halogen;

R₁₃ is aryl, substituted aryl, heteroaryl or substituted heteroaryl; and

m is 0 to 6.

2. A compound according to claim 1, wherein:

K is -O-;

- 75 -

A is C₂₋₄ alkylene;

B₁ is -OH;

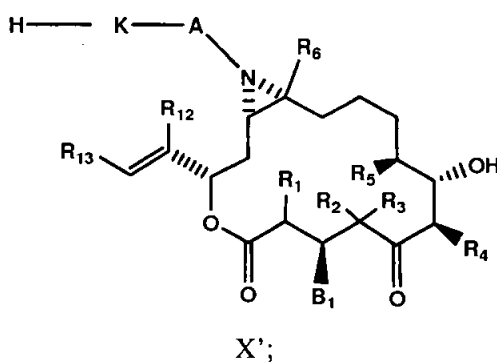
R₂, R₃, R₄ and R₅ are, independently, hydrogen or lower alkyl;

R₆ is hydrogen or methyl; and

R₁₃ is an optionally substituted 5 or 6 membered heteroaryl, or a pharmaceutically-acceptable salt thereof.

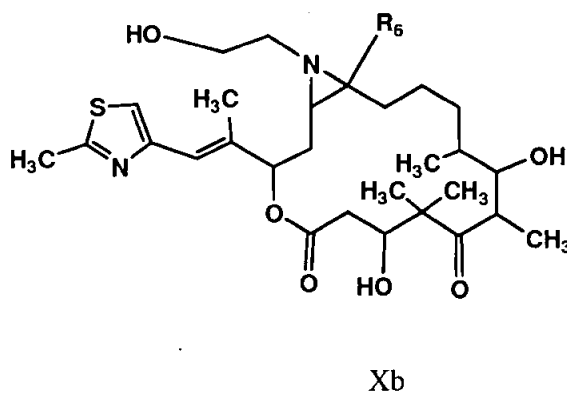
3. A compound according to claim 1 or 2, wherein R₁₃ is an optionally substituted thiazolyl, pyridyl, or oxazolyl.

4. A compound according to claim 1, 2, or 3, having the formula X':



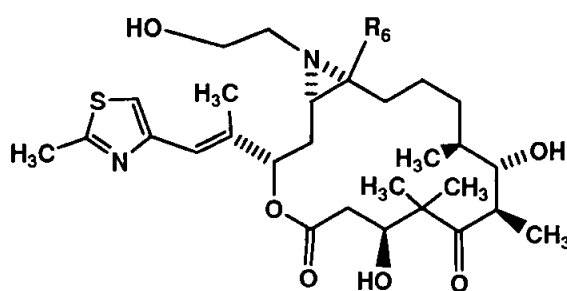
or a pharmaceutically-acceptable salt thereof,

5. A compound according to claim 2, having the formula Xb,



6. A compound according to claim 5, having the formula Xb':

- 76 -



Xb'.

7. A compound according to any one of claims 1, 2, 5 or 6, wherein R₆ is hydrogen.
8. A compound according to any one of claims 1, 2, 5 or 6, wherein R₆ is methyl.
9. Use of a compound according to any one of claims 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, or 8, in preparation of a medicament for treating cancer in a patient.
10. A process for making a pharmaceutical composition for targeted drug delivery comprising conjugating a compound as in any one of claims 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, or 8, to a releasable linker to form a conjugated compound.
11. The process of claim 10, wherein the conjugated compound comprises a folate binding moiety.

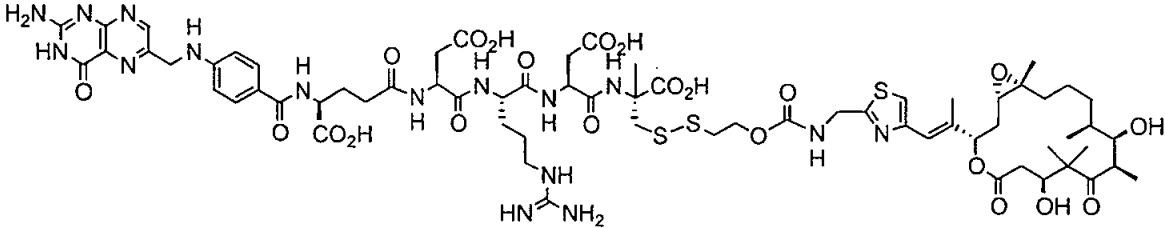
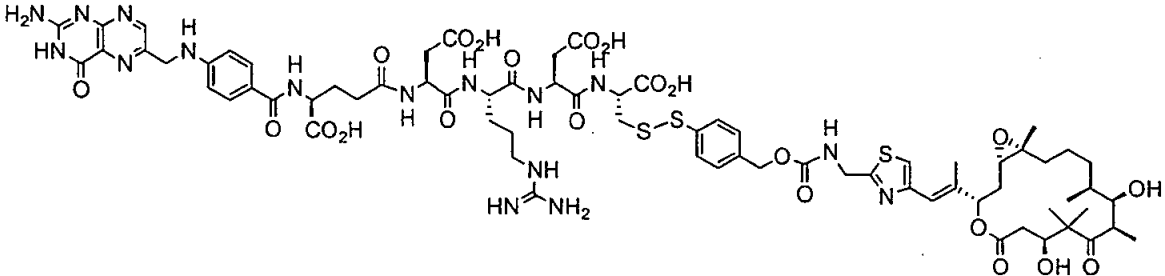
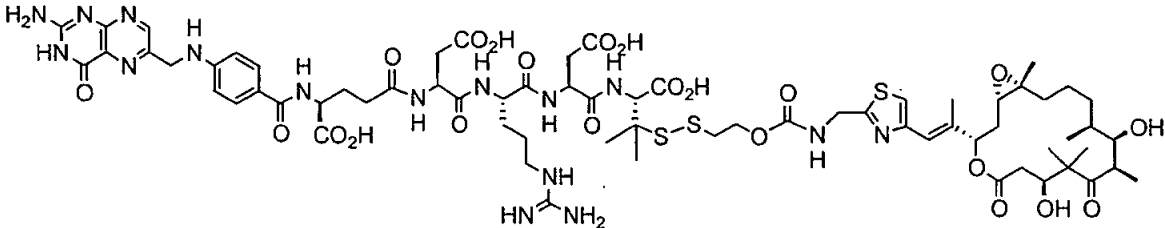
Conjugate Number	Relative Affinity	EC50(nM) KB cells	Structure
AA.I	0.27	>100	
AA.II	0.29	>100	
AA.III	n.t.	>100	

FIG. 1 (1 of 2)

Conjugate Number	Relative Affinity	EC50(nM) KB cells	Structure
AA.IV	n.t.	50	
AA.V	n.t.	>100	
AA.VI	n.t.	>100	

FIG. 1 (2 of 2)

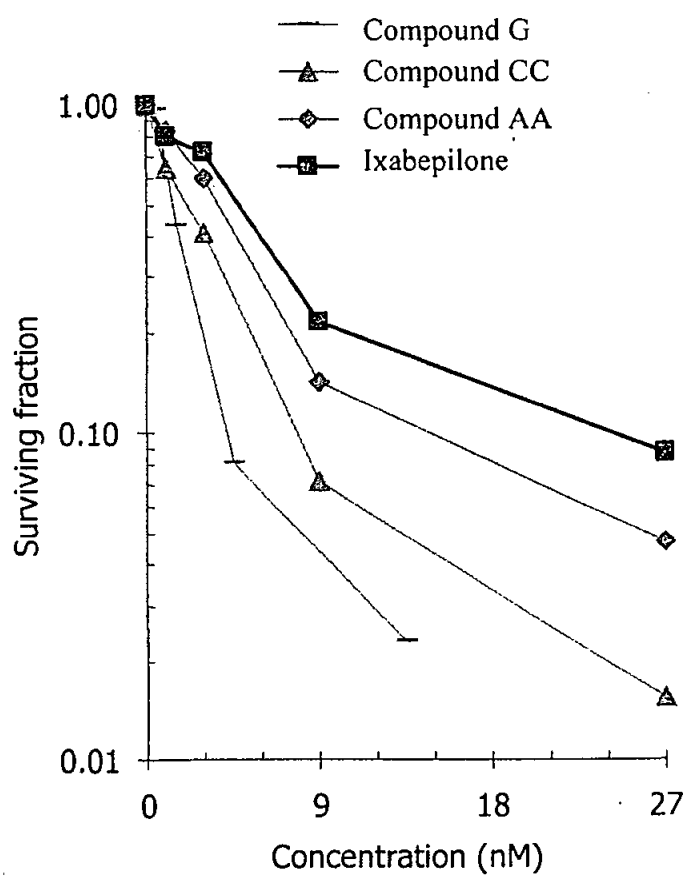


FIG. 3

FIG. 4A Efficacy*

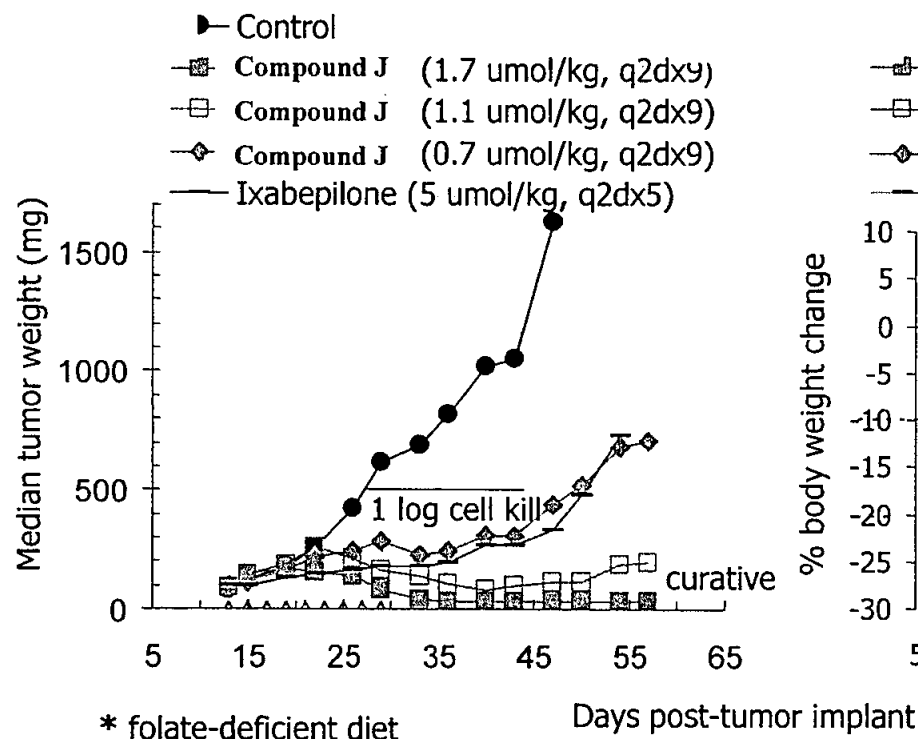
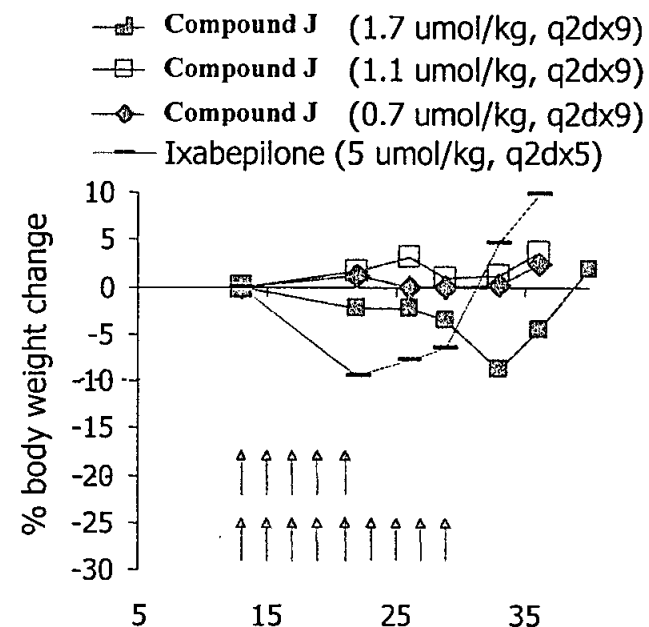


FIG. 4B Weight Loss*



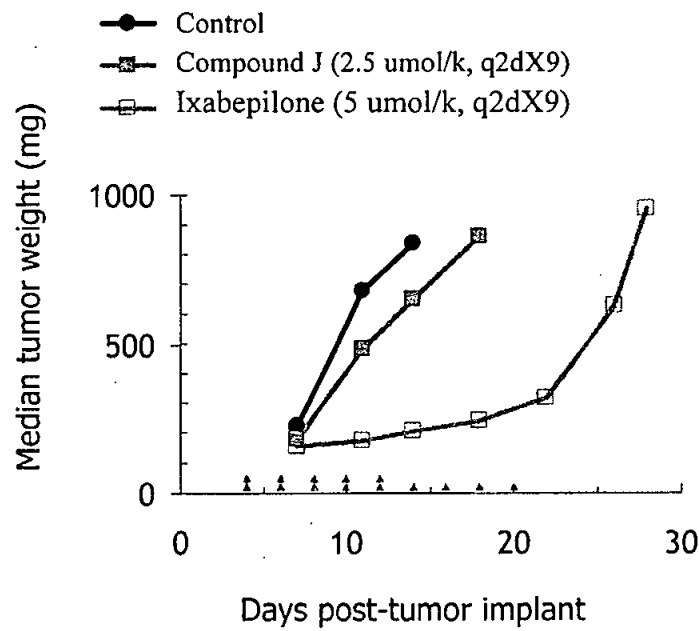


FIG. 5

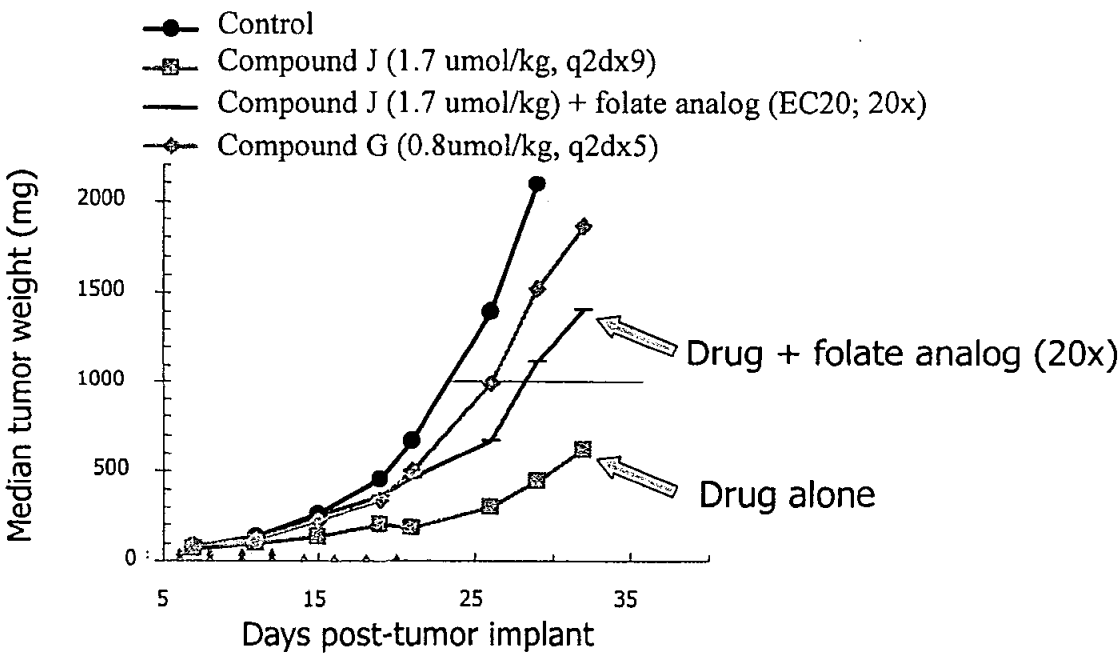


FIG. 6

PATENT COOPERATION TREATY

PCT/US2007/069736

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCTNOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:

PERRY, Lawrence S.
Fitzpatrick, Cella, Harper & Scinto
30 Rockefeller Plaza
New York, NY 10112
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing (day/month/year) 10 November 2008 (10.11.2008)	IMPORTANT NOTIFICATION International filing date (day/month/year) 25 May 2007 (25.05.2007)
Applicant's or agent's file reference 00040.030251.PC	
International application No. PCT/US2007/069736	

1. The following indications appeared on record concerning:		
☒ the applicant	☒ the inventor	☐ the agent
☐ the common representative		
Name and Address	State of Nationality	State of Residence
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address	
2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:		
☒ the person	☐ the name	☐ the address
☐ the nationality	☐ the residence	
Name and Address SOONG-HOON, Kim c/o Bristol-Myers Squibb Company Route 206 and Province Line Road Princeton, NJ 08543-4000 United States of America	State of Nationality US	State of Residence US
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address ☐ Notifications by e-mail authorized	
3. Further observations, if necessary: The person identified in Box 2 should be added to the record as applicant for the United States of America only and inventor for all designated States.		
4. A copy of this notification has been sent to:		
☒ the receiving Office	☒ the designated Offices concerned	
☐ the International Searching Authority	☐ the elected Offices concerned	
☐ the International Preliminary Examining Authority	☐ other:	

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. +41 22 338 89 95	Authorized officer Dezempte Anne e-mail pt04.pct@wipo.int Telephone No. +41 22 338 74 04
---	--

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCTNOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:

PERRY, Lawrence S.
Fitzpatrick, Cella, Harper & Scinto
30 Rockefeller Plaza
New York, NY 10112
ETATS-UNIS D'AMERIQUEDate of mailing (day/month/year)
10 November 2008 (10.11.2008)Applicant's or agent's file reference
00040.030251.PCInternational application No.
PCT/US2007/069736

IMPORTANT NOTIFICATION

International filing date (day/month/year)
25 May 2007 (25.05.2007)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☒ the inventor ☐ the agent ☐ the common representativeName and Address
LEE, Francis, Y.
363 Lang Court
Yardley, PA 19067
United States of AmericaState of Nationality
State of Residence
US

Telephone No.

Facsimile No.

E-mail address

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person ☐ the name ☐ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address

State of Nationality
State of Residence

Telephone No.

Facsimile No.

E-mail address

☐ Notifications by e-mail authorized

3. Further observations, if necessary:

The person identified in Box 1 should be deleted from the records.

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office ☒ the designated Offices concerned
☐ the International Searching Authority ☐ the elected Offices concerned
☐ the International Preliminary Examining Authority ☐ other:The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

Dezempte Anne

e-mail pt04.pct@wipo.int

Telephone No. +41 22 338 74 04

Facsimile No. +41 22 338 89 95

Form PCT/IB/306 (July 2008)

1/DUQ0XZPW0

COMPUESTOS DE AZIRIDINIL-EPOTILONA

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas de análogos de aziridinil-epotilona que comprenden los análogos de aziridinil-epotilona, y métodos de uso de los mismos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Las epotilonas A y B son compuestos que se presentan naturalmente que se descubrieron por Höfle y colaboradores, como aislados de productos de fermentación del microorganismo, *Sorangium cellulosum* (ver, por ejemplo, documento WO 93/10121). Höfle y colaboradores también descubrieron 37 variantes de epotilona naturales y compuestos relacionados producidos por *Sorangium cellulosum*, incluyendo epotilonas C, D, E, F y otros isómeros y variantes. Ver, por ejemplo, Patente Norteamericana 6,624,310. Mientras que en 1993 Höfle y colaboradores reportaron un efecto citotóxico de las Epotilonas A y B, en 1995 investigó con Merck reportando que la epotilona B ejerce efectos de estabilización de microtúbulos similar a paclitaxel (TAXOL®) (Ver D.M. Bollag, "Epothilones, a New Class of Microtubule-Stabilizing Agents with a Taxol-like Mechanism of Action," Cancer Research, Vol. 55 (Junio 1995), en páginas 2325-2333).

Diversos derivados y análogos de las epotilonas que

se presentan naturalmente se han descubierto por Bristol-Myers Squibb Co. Los ejemplos de análogos de epotilona incluyen el análogo de aza-epotilona B conocido como ixabepilona, análogos 21 sustituidos de epotilona B incluyendo un análogo amino 21, 5 análogos 2,3-olefínicos, análogos ciano C-3, análogos de ciclopropilo, y análogos heterocíclicos incluyendo análogos de aziridinil-epotilona. Ver, por ejemplo Patente Norteamericana 6,605,599, Patente Norteamericana 6,262,094, Patente Norteamericana 6,399,638, Patente Norteamericana 6,498, 257, 10 Patente Norteamericana 6,380,395, y Patente Norteamericana 6,800,653, cada una de las cuales se incorpora en la presente para referencia. Otros también se han reportado en el descubrimiento de otros derivados y análogos de epotilona. Ver, por ejemplo, comentarios WO 99/65913, US 6,441,186, US 15 6,284,781, Patente Norteamericana 6,660,758; WO 98/25929, WO 00/99/07692, WO 99/67252, WO 00/00485, WO 00/37473, Patente Norteamericana 6,380,394, Patente Norteamericana 6,242,469, US 6,531,497, US 2004/0072870A1, US 2003/0023082 A1, WO 01/83800, Patente Norteamericana 6,441,186, Patente Norteamericana 20 6,489,314, Patente Estadounidense 6,589,968, US 2004/0053910 A1, US 2004/0152708 A1, WO 99/67253, WO 99/07692, WO 00/00485, WO 00/49021, WO 00/66589, WO 03/045324, WO 04/014919, WO 04/056832, WO 03/022844, y Patente Norteamericana 6,930,102 B2, todas las cuales se incorporan para referencia en su 25 totalidad.

Las epotilonas que se presentan naturalmente y sus análogos, como otros agentes que estabilizan los microtúbulos, pueden ser útiles para tratamiento de enfermedades proliferativas tales como cáncer, el cual generalmente trabaja al exterminar (o detener el crecimiento de) células neoplásicas, otras células patógenas, y patógenos externos. A menudo, sin embargo, los fármacos anticancerígenos atacan no solamente células neoplásicas sino también tejidos normales, llevando a efectos colaterales no deseados. Adicionalmente, los fármacos anticancerígenos generalmente presentan la salida de solubilidad de tal manera que la formulación y administración de los agentes puede presentar cambios, llevando al uso de agentes solubilizantes tales como Cremophor®. La citotoxicidad de algunos fármacos anticancerígenos y/o ingredientes de formulación se han conocido para provocar neuropatía y otros efectos colaterales tales como reacciones de hipersensibilidad. Estos efectos colaterales adversos resaltan la necesidad de terapias anticancerígenas que sean selectivas para poblaciones celulares patógenas y por lo tanto resulten en la toxicidad hospedera reducida.

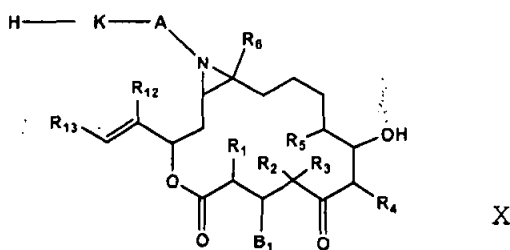
Sin embargo, como se discute en el documento WO 2004/054622 A1 los científicos han intentado durante muchos años el uso de anticuerpos monoclonales (mAbs por sus siglas en inglés) en terapias de fármaco objetivo para la

administración de agentes quimioterapéuticos a pacientes, pero se han encontrado inconvenientes en términos de, *inter alia*, la porción que se divide, las ligaduras, y la forma de liberación de fármaco en las células. Se ha reportado que la terapia exitosa de tumores con mAbs se limita por la penetración inadecuada del anticuerpo en el tumor y por la distribución heterogénea de antígeno asociado al tumor correspondiente en el tejido del tumor. Ver, Klar y colaboradores, documento WO 05/074901 (cedida a Schering AG).

La Publicación de Solicitud de Patente Norteamericana No. 2005/0002942 describe los conjugados de la administración de fármaco que enlaza al receptor de vitamina que son útiles para la administración de fármaco objetivo. Existe una necesidad en la técnica para identificar agentes anticancerígenos que pueden usarse para hacer conjugados tales como aquellos descritos en el documento US 2005/0002942, en el interés de proporcionar la administración de fármaco objetivo para el tratamiento cáncer.

BREVE DESCRIPCION DE LA INVENCION

La presente invención se dirige a compuestos que tienen la siguiente fórmula X:



o sales y/o solvatos farmacéuticamente aceptables de los mismos, en donde:

25

K es -O-, -S-, o -NR₇-;

A es -(CR₈R₉)-(CH₂)_m-Z- en donde Z es -(CHR₁₀)-, -C(=O)-, -C(=O)-C(=O)-, -OC(=O)-, -N(R₁₁)C(=O)-, -SO₂-, o -N(R₁₁)SO₂-;

5 B₁ es hidroxilo o ciano y R₁ es hidrógeno o B₁ y R₁ son tomados juntos para formar un enlace doble;

R₂, R₃, y R₅ son, independientemente, hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, arilo o arilo sustituido; o R₂ y R₃ pueden ser tomados juntos con el carbono al cual se enlazan
10 para formar un cicloalquilo opcionalmente sustituido;

R₄ es hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquilo sustituido, alquenilo sustituido, arilo, o arilo sustituido;

R₆ es hidrógeno, alquilo o alquilo sustituido;

R₇, R₈, R₉, R₁₀, y R₁₁ son independientemente
15 hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heterocicloalquilo, heterocicloalquilo sustituido, heteroarilo, o heteroarilo sustituido;

R₁₂ es H, alquilo, alquilo sustituido, o halógeno;

20 R₁₃ es arilo, arilo sustituido, heteroarilo o heteroarilo sustituido; y

m es 0 hasta 6.

La presente invención se dirige además a métodos para tratar cáncer usando los compuestos que tienen la Fórmula
25 X así como composiciones farmacéuticas que comprenden los

compuestos que tienen la Fórmula X, así como el uso de los compuestos de Fórmula X en la preparación de composiciones farmacéuticas con portadores farmacéuticamente aceptables para tratar el cáncer. Los compuestos de Fórmula X son
5 especialmente útiles para preparar composiciones para terapias de fármaco objetivo.

BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

La FIG. 1 es las estructuras químicas, afinidades relativas, y valores de CE_{50} (nM) contra células neoplásicas
10 de KB de seis conjugaciones de folato del Compuesto análogo de de epotilona AA (número conjugado AA.I a AA-VI).

La FIG. 2 es las estructuras químicas, afinidades relativas, y valores de CE_{50} (nM) contra células neoplásicas KB de tres conjugados de folato (de Compuesto análogo de
15 epotilona BB (número conjugado BB.I a BB.III)).

La FIG. 3 demuestra la fracción de sobrevivencia de clones KB (fracción de supervivencia; eje y) después del tratamiento con incremento de concentraciones (Concentración (nM); eje x) del Compuesto G (barras), Compuesto CC
20 (triángulos), Compuesto AA (diamantes), o ixabepilona (cuadros).

Las FIGS. 4A-4B demuestran la eficacia antitumoral in vivo para tratar xenoinjertos de carcinoma epidermoide nasofaríngeo KB en ratones lampiños con el Compuesto J
25 (cuadros grises, cuadros blancos, diamantes grises) a varias

dosis o ixabepilona (barras negras), comparado con la ausencia de tratamiento (control; círculos negros), como una medida de (A) peso promedio del tumor (mg; eje y) implantación del tumor después de varios días (eje x) o (B) pérdida de peso (% del cambio de peso corporal; eje y) implantación del tumor después de varios días (eje x).

La FIG. 5 demuestra los efectos antitumorales in vivo del Compuesto J (cuadros grises) o ixabepilona (cuadros blancos), comparado con la ausencia de tratamiento (control; círculos negros), contra carcinoma pulmonar de murino FR (-) M109 como una medida del peso promedio del tumor (mg; eje y) implantación del tumor después de varios días (x eje).

La FIG. 6 demuestra los efectos antitumorales in vivo, como una medida del peso promedio del tumor (mg; eje y) implantación del tumor después de varios días (x eje), ausencia de tratamiento (control, círculos negros), tratamiento con tan solo el Compuesto J (cuadros grises), Compuesto J en presencia del análogo de folato, barras negras), o tratamiento con Compuesto G (diamantes grises).

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

DEFINICIONES DE TERMINOS

Los siguientes son definiciones de los términos usados en la presente especificación. La definición inicial proporcionada para un grupo o término en la presente se aplica a tal grupo o término a través de la presente especificación

individualmente o como parte de otro grupo, a menos que se indique lo contrario.

El término "fracción o análogo o derivado de unión de folato del mismo" como se utiliza en la presente significa
5 una fracción que unirá a una proteína del receptor de folato (no un anticuerpo monoclonal) que es sobreexpresado o expresado preferencialmente en células cancerígenas. Por ejemplo, se conoce que el receptor de folato (FR) está sobreexpresado en células cancerígenas ováricas y otras
10 células cancerígenas. Los análogos ilustrativos y derivados de folato se describen en la Publicación de Solicitud de Patente Norteamericana No. 2005/0002942 para Vlahov y colaboradores, (más adelante "Vlahov"), incorporada en la presente por referencia.

15 El término "enlazador liberable" como se utiliza en la presente significa un enlazador bivalente que incluye por lo menos un enlace divisible que puede romperse bajo condiciones fisiológicas (por ejemplo un enlace pH-lábil, reductiblemente-lábil, ácido-lábil, oxidativo-lábil, o enzima-
20 lábil.) Debe apreciarse que tales condiciones fisiológicas dan por resultado la fractura de enlace incluyen reacciones de hidrólisis químicas estándares que ocurren, por ejemplo, a pH fisiológico, o como resultado de la compartimentalización en un organelo celular, tal como un endosoma que tiene un pH más
25 inferior que el pH citosólico, o como resultado de la reacción

con un agente reductor celular tal como glutatona.

Se entiende que un enlace divisible puede conectar dos átomos adyacentes dentro del enlazador liberable y/o conectar otros grupos con el enlazador liberable tal como Q y K, como se describe en la presente, en cualquier o ambos extremos del enlazador.

Los términos "alquilo" y "alq" si solos o en combinación con cierto otro grupo, se refiere a un radical alcano (hidrocarburo) de cadena lineal o ramificada unido en cualquier átomo de carbono disponible, que contiene de 1 a 10 átomos de carbono, preferiblemente 1 a 6 átomos de carbono, más preferiblemente de 1 a 4 átomos de carbono. Ejemplarmente tales grupos incluyen, pero no se limitan a metilo, etilo, propilo, isopropilo, n-butilo, t-butilo, isobutilo, pentilo, hexilo, heptilo, 4,4-dimetilpentilo, octilo, 2,2,4-trimetolpentilo, y similares. "Alquilo inferior" o "alquilen inferior" significa un alquilo de cadena lineal o ramificada que tiene un a cuatro átomos de carbono. Cuando un subscrito se utiliza con referencia a un alquilo u otro grupo, el subscrito se refiere al número de átomos de carbono que el grupo puede contener. Por ejemplo, el término "C₀₋₄alquilo" incluye un enlace y grupos alquilo de 1 a 4 átomos de carbono, y el término "C₁₋₄alquilo" significa grupos alquilo de 1 a 4 átomos de carbono.

El término "alquilen" se refiere a un radical de

hidrocarburo bivalente, como se describe anteriormente para "alquilo" pero con dos puntos de unión. Por ejemplo, un grupo metileno es un grupo $\text{-CH}_2\text{-}$ y un grupo etileno es un grupo $\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$.

5 Cuando el término alquilo se utiliza con respecto a otro grupo, como en heterocicloalquilo o cicloalquilalquilo, esto significa que el otro grupo identificado (primero nombrado) está enlazado directamente a través de un grupo alquilo como se define antes (por ejemplo, que puede de cadena
10 ramificada o lineal). Así, el término "alquilo" se utiliza en este caso para referirse a un alquileno, por ejemplo, un grupo alquilo bivalente, que tiene dos puntos disponibles de unión. Por ejemplo, ciclopropil-alquilo de 1 a 4 átomos de carbono significa un grupo ciclopropilo enlazado a través de un
15 alquileno de cadena lineal o ramificada que tiene uno a cuatro átomos de carbono, e hidroxialquilo significa el grupo OH enlazado a través de un alquileno de cadena lineal o ramificada que tiene una a diez átomos de carbono, preferiblemente 1 a 6 átomos de carbono, más preferiblemente 1
20 a 4 átomos de carbono. En el caso de sustituyentes, como en "cicloalquilalquilo sustituido", la porción alquileno del grupo, además de ser la cadena ramificada o lineal, puede sustituirse como se vuelve a citar más adelante para los grupos alquilo sustituidos y/o el primer grupo nombrado (por
25 ejemplo, cicloalquilo) puede sustituirse como recita en la

presente para el grupo nombrado (por ejemplo, cicloalquilo).

"Alquilo sustituido" se refiere a un grupo alquilo sustituido con uno o más sustituyentes, preferiblemente 1 a 4 sustituyentes, en cualquier punto disponible de unión. Sin embargo, cuando un grupo alquilo es sustituido con sustituyentes halo múltiples, el alquilo puede contener como valencia permite hasta 10 sustituyentes, más preferiblemente hasta siete sustituyentes. Los sustituyentes alquilo pueden incluir uno o más de los siguientes grupos: halo (por ejemplo, un solo sustituyente halo o sustituyentes halo múltiples que forman, en último caso, grupos tal como un grupo perfluoroalquilo o un grupo alquilo que lleva Cl_3 o CF_3), ciano, $-\text{OR}_a$, $-\text{SR}_a$, $-\text{C}(=\text{O})\text{R}_a$, $-\text{C}(=\text{O})\text{OR}_a$, $-\text{OC}(=\text{O})\text{R}_a$, $-\text{OC}(=\text{O})\text{OR}_a$, $-\text{NR}_a\text{R}_b$, $-\text{C}(=\text{O})\text{NR}_a\text{R}_b$, $-\text{OC}(=\text{O})\text{NR}_a\text{R}_b$, $-\text{S}(=\text{O})\text{R}_a$, $-\text{S}(\text{O})_2\text{R}_3$, $-\text{NHS}(\text{O})_2\text{R}_a$, $-\text{NHS}(\text{O})_2\text{NHR}_3$, $-\text{NHC}(=\text{O})\text{NHR}_a$, $-\text{NHC}(=\text{O})\text{R}_a$, $-\text{NHC}(\text{O})_2\text{R}_a$, $-\text{NHC}(=\text{N}-\text{CN})\text{R}_a$, arilo, heterociclo, cicloalquilo, y/o heteroarilo, en donde los grupos R_3 y R_b se seleccionan independiente de hidrógeno, alquilo, alquenilo, cicloalquilo, heterociclo, arilo, y heteroarilo, y en donde cada R_3 y/o R_b alternadamente se sustituye opcionalmente con un a cuatro grupos seleccionados de alquilo, alquenilo, halógeno, haloalquilo, haloalcoxi, ciano, nitro, amino, alquilamino, aminoalquilo, hidroxilo, hidroxialquilo, alcoxi, tiol, alquiltio, fenilo, bencilo, feniloxi, benciloxi, cicloalquilo de 3 a 6 átomos de carbono, heterociclo o heteroarilo de cinco

o seises miembros, y/o un alquilo, inferior o un alqueno inferior sustituido con uno a cuatro grupos seleccionados de hidroxilo, ciano, halógeno, halo-alquilo de 1 a 4 átomos de carbono, halo-alcoxi de 1 a 4 átomos de carbono, ciano, nitro, amino, alquilamino de 1 a 4 átomos de carbono, amino-alquilo de 1 a 4 átomos de carbono, hidroxilo-alquilo de 1 a 4 átomos de carbono, alcoxi de 1 a 4 átomos de carbono, tiol, y/o alquiltio de 1 a 4 átomos de carbono. Para la evasión de duda, un "alquilo inferior sustituido" significa a grupo alquilo que tiene uno a cuatro átomos de carbono y uno a cuatro sustituyentes seleccionados de los recitados inmediatamente antes para grupos alquilo sustituidos. En el caso de un alquilo inferior sustituido, preferiblemente los grupos R_3 y R_6 se seleccionan de hidrógeno, alquilo inferior, alqueno inferior, cicloalquilo de 3 a 7 átomos de carbono, fenilo, y heterociclo y/o heteroarilo monocíclico de cinco a seises miembros, alternadamente opcionalmente sustituidos como antes.

El término "alqueno" se refiere a un radical hidrocarburo de cadena lineal o ramificada que contiene de 2 a 12 átomos de carbono y por lo menos un doble enlace carbono-carbono. Ejemplarmente tales grupos incluyen etenilo o alilo. "Alqueno sustituido" se refiere a un grupo alqueno sustituido con uno o más sustituyentes, preferiblemente 1 a 4 sustituyentes, en cualquier punto disponible de unión. Los

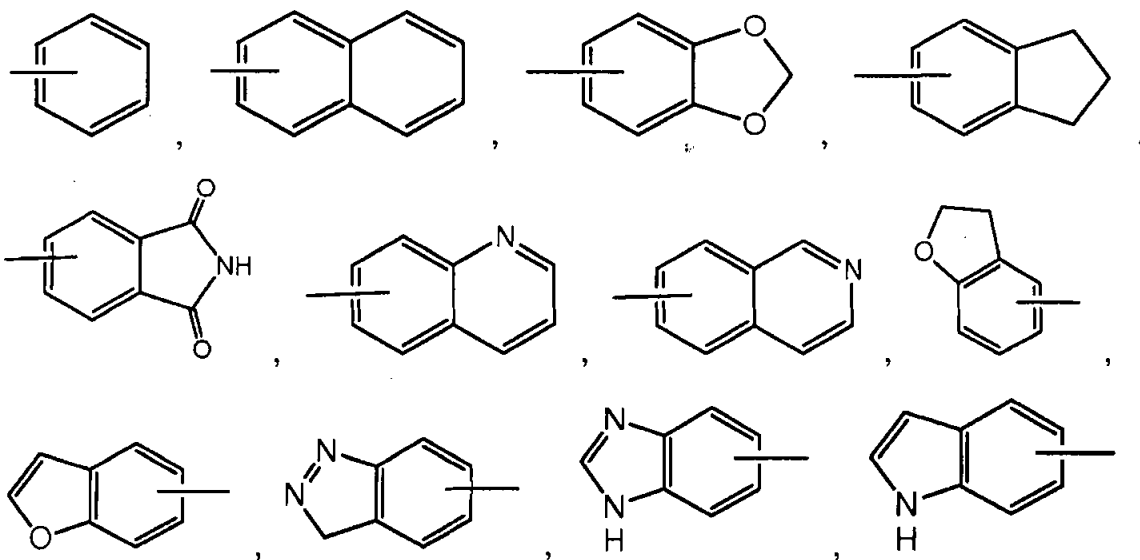
sustituyentes ejemplares incluyen alquilo, alquilo sustituido, y los grupos recitados antes como sustituyentes alquilo.

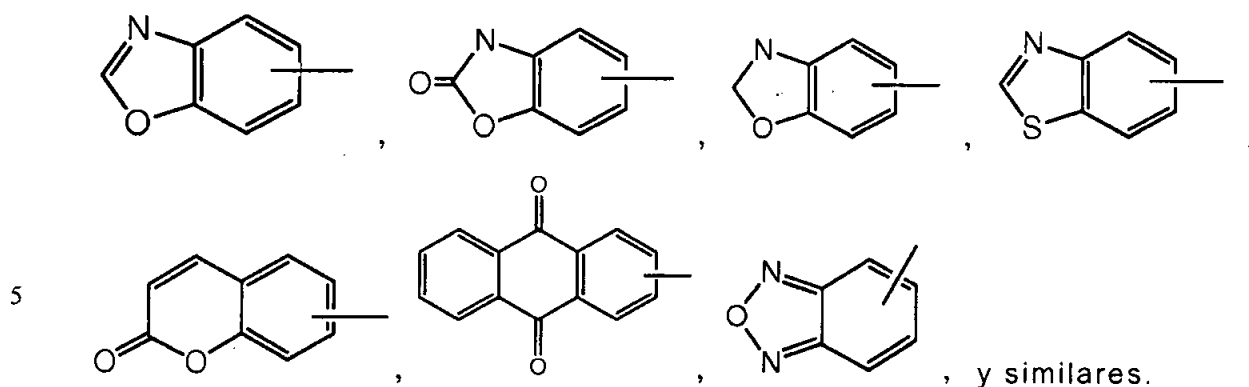
Los términos "alcoxi" y "alquiltio" se refieren a un grupo alquilo como se describe
5 anteriormente enlazado a través de un enlace de oxígeno (-O-) o un enlace de sulfuro (-S-), respectivamente. Los términos "alcoxi sustituido" y "alquiltio sustituido" se refieren a un grupo alquilo sustituido como se describe anteriormente enlazados a
10 través de un enlace de oxígeno o sulfuro, respectivamente. Un "alcoxi inferior" o un alcoxi de 1 a 4 átomos de carbono es un grupo OR, en donde R es alquilo inferior (alquilo de 1 a 4 átomos de carbono).

"Amino" es NH_2 . Un alquilamino es $\text{-NR}_c\text{R}_d$ en
15 donde por lo menos uno de R_c y R_d es un alquilo o alquilo sustituido, y el otro de R_c y R_d se selecciona de hidrógeno, alquilo, y alquilo sustituido. Un "aminoalquilo" significa un grupo amino enlazado a través de un grupo alquileno (-alquileno-NH_2), y un
20 alquilaminoalquilo significa un alquilamino como se define antes enlazado a través de un grupo alquileno ($\text{-alquileno-NR}_c\text{R}_d$).

El término "arilo" se refiere a grupos hidrocarburo cíclico, aromático que tienen 1 a 3
25 anillos aromáticos, grupos especialmente monocíclicos

o bicíclicos tal como fenilo o naftilo. Los grupos arilo que son bicíclicos o tricíclicos tienen que incluir por lo menos un anillo carbocíclico completamente aromático pero el otro anillo o anillos fusionados pueden ser aromáticos o no aromáticos y pueden opcionalmente contener heteroátomos, a condición de que en tales casos el punto de unión sea al anillo carbocíclico aromático. Adicionalmente, cuando un grupo arilo se ha fusionado al mismo un anillo heterocíclico o cicloalquilo, el anillo heterocíclico y/o cicloalquilo puede tener uno o más átomos de carbono de carbonilo, es decir, unido vía un doble enlace a un átomo de oxígeno para definir un grupo carbonilo. Así, los ejemplos de "arilo" pueden incluir sin limitación:





El término "arileno" se refiere a un radical arilo bivalente, es decir, un grupo arilo como se define antes que tiene dos puntos de unión a dos otros grupos, en cualquiera de los puntos de unión disponible del anillo arilo. Los anillos de arileno pueden también sustituirse con cualquiera de los grupos adecuados para sustitución en los grupos arilo definidos en la presente.

15 "Arilo sustituido" se refiere a un grupo arilo o arileno como se define antes sustituido por uno o más sustituyentes, preferiblemente 1 a 4 sustituyentes, en cualquier punto de unión. Los sustituyentes incluyen alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, así como los grupos recitados antes como sustituyentes alquilo.

25 El término "carbocíclico" significa un anillo monocíclico, bicíclico, o tricíclico saturado o insaturado (preferiblemente mono o bicíclico) en el cual todos los átomos de todos los anillos son carbono. Así, el término incluye anillos de cicloalquilo y arilo. El anillo

carbocíclico puede sustituirse en cuyo caso los sustituyentes se seleccionan de los recitados antes para los grupos cicloalquilo y arilo.

El término "cicloalquilo" se refiere a un
5 grupo hidrocarburo cíclico completamente saturado o parcialmente saturado que contiene de 1 a 3 anillos y 3 a 7 átomos de carbono por anillo. Los grupos cicloalquilo completamente saturados ejemplares incluyen ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, y
10 ciclohexilo. Los grupos cicloalquilo parcialmente saturados ejemplares incluyen ciclobutenilo, ciclopentenilo, y ciclohexenilo. El término "cicloalquilo" incluye tales grupos que tienen un puente de tres a cuatro átomos de carbono. Además,
15 los grupos cicloalquilo que son bicíclicos o tricíclicos deben incluir por lo menos un anillo hidrocarburo completamente saturado o parcialmente saturado pero el otro anillo o anillos fusionados pueden ser aromáticos o no aromáticos y pueden
20 contener heteroátomos, a condición de que en tales casos el punto de unión deba ser el grupo hidrocarburo cíclico, no aromático. Adicionalmente, uno o más átomos de carbono del grupo cicloalquilo pueden formar un doble enlace carbono-a-oxígeno para definir un
25 grupo carbonilo. Así, los ejemplos de grupos



El término "halógeno" o "halo" se refiere a flúor, cloro, bromo e yodo.

5 El término "heteroátomos" incluye oxígeno, azufre y nitrógeno.

El término "haloalquilo" significa un alquilo que tiene uno o más sustituyentes halo, incluyendo sin limitación grupos tal como $-\text{CH}_2\text{F}$, $-\text{CHF}_2$ y $-\text{CF}_3$.

10 El término "haloalcoxi" significa un grupo alcoxi que tiene uno o más sustituyentes halo. Por ejemplo, "haloalcoxi" incluye $-\text{OCF}_3$.

Cuando el término "insaturado" se utiliza en la presente para referirse a un anillo o grupo, el anillo o grupo
15 puede ser completamente insaturado o parcialmente insaturado.

El término "heteroarilo" se refiere a un grupo aromático que es un monocíclico de 4 a 7 miembros, bicíclicos de 7 a 11 miembros, o sistema del anillo tricíclico de 10 a 15 miembros, que tiene por lo menos un anillo que contiene por lo
20 menos un heteroátomo. Cada anillo del grupo heteroarilo que contiene un heteroátomo puede contener uno o dos átomos de oxígeno o azufre y/o de un a cuatro átomos de nitrógeno, a condición de que el número total de heteroátomos en cada anillo sea cuatro o menos y cada anillo tiene por lo menos un
25 átomo de carbono. Los anillos fusionados que terminan los

grupos bicíclicos y tricíclicos pueden contener solamente átomos de carbono y pueden ser saturados, parcialmente saturados, o insaturados. Los átomos de nitrógeno y azufre pueden opcionalmente oxidarse y los átomos de nitrógeno pueden
5 opcionalmente cuaternizarse. Los grupos heteroarilo que son bicíclicos o tricíclicos deben incluir por lo menos un anillo completamente aromático pero el otro anillo o anillos fusionados puede ser aromáticos o no aromáticos y pueden ser carbocíclicos, a condición de que en tales casos el punto de
10 unión pueda estar en cualquier átomo de nitrógeno o carbono disponible de un anillo que contiene el heteroátomo aromático. Adicionalmente, la definición de grupos heteroarilo por sí mismos incluye anillos en donde uno o más de los átomos de carbono se unen vía un doble enlace
15 a un átomo de oxígeno para definir un grupo carbonilo (proporcionado el grupo heteroarilo es aromático) y también cuando un grupo del heteroarilo tiene fusionado el mismo un anillo heterocíclico o cicloalquilo, el anillo heterocíclico y/o cicloalquilo puede tener uno o más grupos
20 carbonilo.

Los grupos heteroarilo monocíclicos ejemplares incluyen pirrolilo, pirazolilo, pirazolinilo, imidazolilo, oxazolilo, isoxazolilo, tiazolilo (es decir, ) illo, isotiazolilo, furanilo, tienilo, oxadiazolilo, piridilo,
25 pirazinilo, pirimidinilo, piridazinilo, triazinilo y

similares. Adicionalmente, puesto que la definición de los grupos heteroarilo por sí mismo incluyen anillos en donde uno o más de los átomos de carbono definen un grupo carbonilo, anillos tal como 2,4-dihidro-[1,2,4]triazol-3-ona (es decir,

5 ) y similares se incluyen.

Los grupos heteroarilo bicíclicos ejemplares incluyen indolilo, benzotiazolilo, benzodioxolilo, benzoxaxolilo, benzotienilo, quinolinilo, tetrahidroisoquinolinilo, isoquinolinilo, bencimidazolilo, benzopirani-
10 lo, indolizini-
lo, benzofurani-
lo, cromonilo,
coumarinilo, benzopirani-
lo, cinnolinilo, quinoxalinilo,
indazolilo, pirrolopiridilo, furopiridinilo,
dihidroisoindolilo, tetrahidroquinolinilo y similares.

Los grupos heteroarilo tricíclicos ejemplares
15 incluyen carbazolilo, benzidolilo, fenantrolinilo, acridinilo,
fenantridinilo, xantenilo y similares.

El término "heteroalquileno" se refiere a un radical heteroarilo bivalente, es decir, un grupo heteroarilo como se define antes que tiene dos puntos de unión a dos otros grupos,
20 en cualquiera de los dos puntos de unión disponible del anillo heteroarilo.

Los grupos "heteroarilo sustituido" son grupos heteroarilo como se define antes sustituidos con uno o más sustituyentes, preferiblemente 1 a 4 sustituyentes, en
25 cualquier punto de unión disponible. Los sustituyentes

ejemplares incluyen, pero no se limitan a alquilo, alquilo sustituido, alqueno, alqueno sustituido, así como los grupos recitados antes como sustituyentes alquilo.

Los términos "heterociclo" y "heterocíclico" se
5 utilizan intercambiablemente y cada uno se refiere a un grupo
cíclico no aromático completamente saturado o parcialmente
insaturado, que puede ser sustituido o insustituido, por
ejemplo, que es el sistema del anillo monocíclicos de 4 a 7
miembros, bicíclico de 7 a 11 miembros, o tricíclico de 10 a
10 15 miembros, que tiene por lo menos un heteroátomo en por lo
menos un anillo que contiene el átomo de carbono. Cada anillo
del grupo heterocíclico que contiene un heteroátomo puede
tener 1, 2 ó 3 heteroátomos seleccionados de nitrógeno,
oxígeno, y átomos de azufre, donde los heteroátomos de
15 nitrógeno y azufre también pueden opcionalmente oxidarse y los
heteroátomos de nitrógeno también pueden opcionalmente
cuaternizarse. Preferiblemente dos heteroátomos
adyacentes no se seleccionan simultáneamente de
oxígeno y nitrógeno. Los grupos heterocíclicos que
20 son bicíclicos o tricíclicos deben incluir por lo
menos un anillo no-carbocíclico no aromático, pero el
otro anillo o anillos fusionados pueden ser aromáticos
o no aromáticos y pueden ser carbocíclicos, a
condición de que en tales casos el punto de unión está
25 en cualquier átomo de nitrógeno o carbono disponible

de un anillo que contiene el heteroátomo no aromático. Adicionalmente, la definición de grupos heterocíclicos por sí mismos incluyen anillos en donde uno o más de los átomos de carbono se unen vía un doble enlace a un átomo de oxígeno para definir un grupo de carbonilo (proporcionado el grupo heterocíclico es no aromático) y también cuando un grupo heterocíclico tiene fusionado en el mismo otro anillo, tal anillo adicional puede tener uno o más grupos carbonilo.

10 Los grupos heterocíclicos monocíclicos ejemplares incluyen pirrolidinilo, imidazolidinilo, tetrahidrofurilo, piperidinilo, piperazinilo, pirazolidinilo, imidazolinilo, pirrolinilo, tetrahidropiraniilo, morfolinilo, tiamorfolinilo, y
15 similares.

"Heterociclo sustituido," "heterocíclico sustituido," y "heterociclo sustituido" se refieren a grupos heterociclo o heterocíclico o como se define antes sustituidos con uno o más sustituyentes, preferiblemente 1 a 4 sustituyentes, en cualquier
20 punto de unión disponible. Los sustituyentes ejemplares incluyen alquilo, alquilo sustituido, alqueniilo, alqueniilo sustituido, así como los grupos recitados antes como sustituyentes alquilo ejemplares.

25 "Hidroxi" se refiere a -OH.

"Tiol" significa un grupo -SH.

El término "nitrógeno cuaternario" se refiere a un átomo de nitrógeno cargado positivamente tetravalente que incluye, por ejemplo, nitrógeno cargado positivamente en un grupo tetraalquilamonio (por ejemplo, tetrametilamonio o N-metilpiridinio), el nitrógeno cargado positivamente en la especie amonio protonado (por ejemplo, trimetilhidramonio o N-hidropiridino), nitrógeno cargado positivamente en N-óxidos de amina (por ejemplo, N-metil-morfolina-N-óxido o piridina-N-óxido), y nitrógeno cargado positivamente en un grupo N-amino-amonio (por ejemplo, N-aminopiridinio).

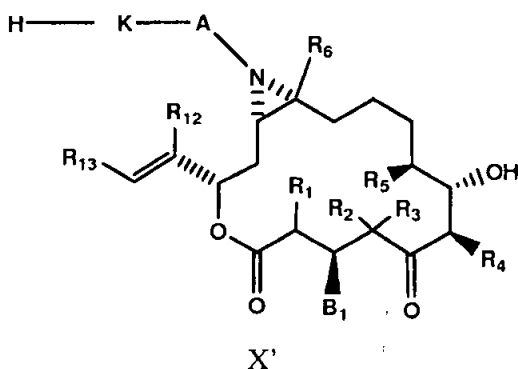
Cuando un grupo funcional es llamado "protegido", éste significa que el grupo está en la forma modificada a atenuar, imposibilita especialmente, las reacciones secundarias indeseadas en el sitio protegido. Los grupos de protección adecuados para los métodos y compuestos descritos en la presente incluyen, sin limitación, los descritos en libros de textos estándares, incluyendo Greene, T.W. y colaboradores, *Protective Groups in Organic Synthesis*, Wiley, N.Y. (1991), incorporados en la presente por referencia.

La presente invención comprende compuestos

que tienen la siguiente fórmula, como se indica en la Breve Descripción de la Invención.

La presente invención comprende compuestos que tienen la forma estereoespecífica de acuerdo a la Fórmula

5 X'



10

incluyendo sales y/o solvatos farmacéuticamente aceptables de los mismos, en donde,

K es -O-, -S-, o -NR₇-;

15

A es -(CR₈R₉)-(CH₂)_m-Z- en donde Z es -(CHR₁₀)-, -C(=O)-, -C(=O)-C(=O)-, -OC(=O)-, -N(R₁₁)C(=O)-, -SO₂-, o -N(R₁₁)SO₂-;

B₁ es hidroxilo o ciano y R₁ es hidrógeno o B₁ y R₁ se toman juntos para formar un doble enlace;

20

R₂, R₃, y R₅ son, independientemente, hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, arilo o arilo sustituido; o R₂ y R₃ pueden tomarse juntos con el carbono al cual se unen para formar un cicloalquilo opcionalmente sustituido;

R₄ es hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquilo sustituido, alquenilo sustituido, arilo, o arilo sustituido;

25

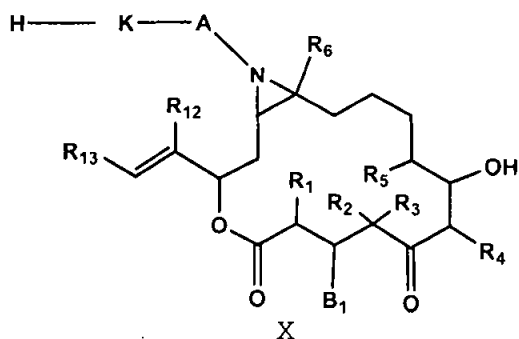
R_6 es hidrógeno, alquilo o alquilo sustituido;

R_7 , R_8 , R_9 , R_{10} , y R_{11} son independientemente hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heterocicloalquilo, heterocicloalquilo sustituido, heteroarilo, o heteroarilo sustituido;

R_{12} es H, alquilo, alquilo sustituido, o halógeno;

R_{13} es arilo, arilo sustituido, heteroarilo o heteroarilo sustituido; y m es 0 a 6.

En otra modalidad, los compuestos de la invención tienen la Fórmula X



o la Fórmula X' esteroespecífica, anterior, que incluye sales y/o solvatos farmacéuticamente aceptables de los mismos, en donde

K es -O;

A es alquileno de 1 a 6 átomos de carbono;

B_1 es -OH;

R_2 , R_3 , R_4 y R_5 son, independientemente, hidrógeno o alquilo inferior;

R_6 es hidrógeno o metilo;

R_{12} es H, alquilo, alquilo sustituido, o halógeno; y

R_{13} es un heteroarilo de 5 ó 6 miembros
opcionalmente sustituido.

5 En otra modalidad, los compuestos de la invención
tienen la Fórmula X o X', como se define antes, incluyendo
sales y/o solvatos farmacéuticamente aceptables de los mismos,
en donde

K es -O;

10 A es alquilenos de 2 a 4 átomos de carbono;

B_1 es -OH;

R_2 , R_3 , R_4 y R_5 son, independientemente, hidrógeno o
alquilo inferior;

R_6 es hidrógeno;

15 R_{12} es H, alquilo, alquilo sustituido, o halógeno; y

R_{13} es un heteroarilo de 5 ó 6 miembros
opcionalmente sustituido.

En otra modalidad, los compuestos de la invención
tienen la Fórmula X o X', como se define antes, incluyendo
20 sales y/o solvatos farmacéuticamente aceptables de los mismos,
en donde

K es -O-;

A es alquilenos de 2 a 4 átomos de carbono;

B_1 es -OH;

25 R_2 , R_3 , R_4 y R_5 son, independientemente, hidrógeno o

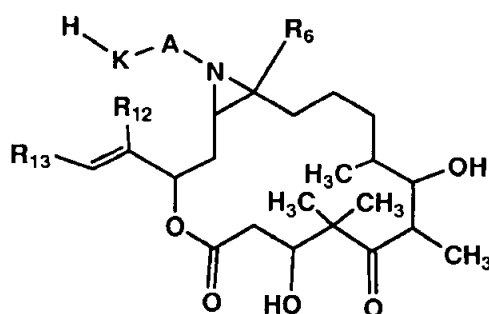
alquilo inferior;

R_6 es hidrógeno o metilo;

R_{12} es H, alquilo, alquilo sustituido, o halógeno; y

R_{13} es un tiazolilo, piridilo, u oxazolilo
5 opcionalmente sustituido.

En otra modalidad, los compuestos que son
proporcionados tienen la Fórmula Xa,



Xa

15 incluyendo sales y/o solvatos farmacéuticamente
aceptables de los mismos, en donde,

K es -O-, -S-, o -NR₇-;

A es -(CR₈R₉)-(CH₂)_m-Z- en donde Z es -(CHR₁₀)-,
-C(=O)-, -C(=O)-C(=O)-, -OC(=O)-, -N(R₁₁)C(=O)-, -SO₂-, o
20 -N(R₁₁)SO₂-;

R_6 es hidrógeno o metilo;

R_8 , R_9 , R_{10} , y R_{11} son independientemente hidrógeno,
alquilo, o alquilo sustituido,

R_{12} es H, alquilo, alquilo sustituido, o halógeno; y

25 R_{13} es arilo, sustituido arilo, heteroarilo o

sustituido heteroarilo; y

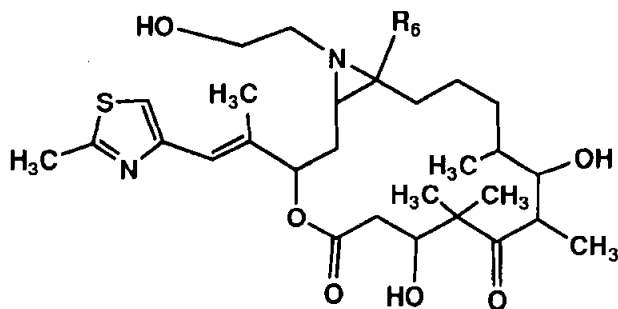
m es 0 a 6.

En otra modalidad de la invención, los compuestos de
Fórmula Xa, incluyendo los compuestos de Fórmula Xa' que tiene
5 la forma estereoespecífica Xa', que corresponden a la
estereoquímica mostrada por X', se proporcionan.

En otra modalidad, los compuestos que son
proporcionados tienen la Fórmula Xa, o Xa', inmediatamente
antes, en donde K es -O- y R₁₃ es tiazolilo, piridilo, u
10 oxazolilo opcionalmente sustituido, y los grupos restantes son
como se define antes.

En otra modalidad, los compuestos que son
proporcionados tienen la Fórmula Xa, o Xa', antes, en donde K
es -O- ; A es alquileo de 2 a 4 átomos de carbono; R₆ es
15 hidrógeno o metilo; R₁₂ es H, alquilo inferior, o halógeno; y
R₁₃ es tiazolilo, piridilo, u oxazolilo opcionalmente
sustituido.

Un compuesto de la invención también puede tener la
Fórmula Xb



Xb,

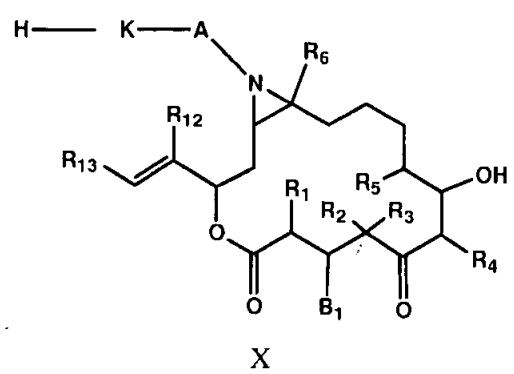
10

15

De acuerdo a una modalidad de la presente invención, los métodos se proporcionan para tratar cáncer, por ejemplo, una condición asociada al receptor de folato, que comprende tratar a un paciente

con una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto que tiene la siguiente Fórmula X:

5



o una sal y/o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde:

K es -O-, -S-, o -NR₇-;

A es -(CR₈R₉)-(CH₂)_m-Z- en donde Z es -(CHR₁₀)-, -C(=O)-, -C(=O)-C(=O)-, -OC(=O)-, -N(R₁₁)C(=O)-, -SO₂-, o -N(R₁₁)SO₂-;

15 B₁ es hidroxilo o ciano y R₁ es hidrógeno o B₁ y R₁ se toman juntos para formar un doble enlace;

R₂, R₃, y R₅ son, independientemente, hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, arilo o arilo sustituido; o R₂ y R₃ pueden tomarse juntos con el carbono al cual se unen para
20 formar un cicloalquilo opcionalmente sustituido;

R₄ es hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquilo sustituido, alquenilo sustituido, arilo, o arilo sustituido;

R₆ es hidrógeno, alquilo o alquilo sustituido;

R₇, R₈, R₉, R₁₀, y R₁₁ son independientemente
25 hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo,

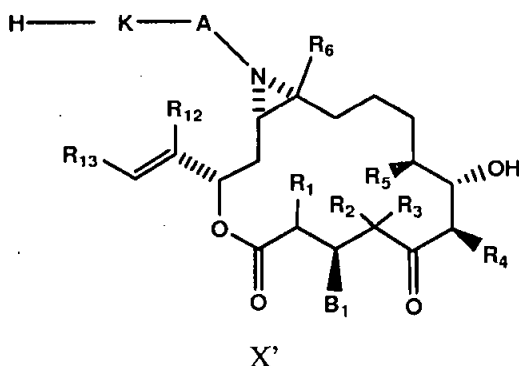
cicloalquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heterocicloalquilo, heterocicloalquilo sustituido, heteroarilo, o heteroarilo sustituido;

R_{12} es H, alquilo, alquilo sustituido, o halógeno;

R_{13} es arilo, arilo sustituido, heteroarilo o heteroarilo sustituido; y

m es 0 a 6.

En una modalidad, el método comprende tratar un paciente con una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto que tiene la Fórmula X' estereoespecífica,



incluyendo sales y/o solvatos farmacéuticamente aceptables de los mismos, en donde, en donde K, A, B_1 , R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 , R_6 , R_7 , R_8 , R_9 , R_{10} , R_{11} , R_{12} , R_{13} , y m are como se define antes para los compuestos de Fórmula X.

En otra modalidad, el método comprende tratar un paciente con una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto que tiene la Fórmula X, incluyendo la Fórmula X', como se describe antes, incluyendo sales y/o solvatos farmacéuticamente aceptables del mismo, en donde

K es -O-;

A es alquileo de 2 a 4 átomos de carbono;

B₁ es -OH;

R₂, R₃, R₄ y R₅ son, independientemente, hidrógeno o
5 alquilo inferior;

R₆ es hidrógeno o metilo;

R₇, R₈, R₉, R₁₀, y R₁₁ son independientemente
hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo,
cicloalquilo sustituido, arilo, arilo sustituido,
10 heterocicloalquilo, heterocicloalquilo sustituido,
heteroarilo, o heteroarilo sustituido;

R₁₂ es H, alquilo, alquilo sustituido, o halógeno; y

R₁₃ es un heteroarilo de 5 ó 6 miembros opcionalmente
sustituido.

15 En otra modalidad, el método comprende tratar un
paciente con una cantidad terapéuticamente efectiva de un
compuesto que tiene la Fórmula X, o X', como se describe
antes, incluyendo sales y/o solvatos farmacéuticamente
aceptables del mismo, en donde

20 K es -O-;

A es alquileo de 2 a 4 átomos de carbono;

B₁ es -OH;

R₂, R₃, R₄ y R₅ son, independientemente, hidrógeno o
alquilo inferior;

25 R₆ es hidrógeno;

R₇, R₈, R₉, R₁₀, y R₁₁ son independientemente hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heterocicloalquilo, heterocicloalquilo sustituido, 5 heteroarilo, o heteroarilo sustituido;

R₁₂ es H, alquilo, alquilo sustituido, o halógeno; y

R₁₃ es un heteroarilo de 5 ó 6 miembros opcionalmente sustituido.

En otra modalidad, el método comprende tratar un 10 paciente con una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto que tiene la Fórmula X, o X', como se describe antes, incluyendo sales y/o solvatos farmacéuticamente aceptables del mismo, en donde

K es -O-;

15 A es alquilenos de 2 a 4 átomos de carbono;

B₁ es -OH;

R₂, R₃, R₄ y R₅ son, independientemente, hidrógeno o alquilo inferior;

R₆ es hidrógeno o metilo;

20 R₇, R₈, R₉, R₁₀, y R₁₁ son independientemente hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heterocicloalquilo, heterocicloalquilo sustituido, heteroarilo, o heteroarilo sustituido;

25 R₁₂ es H, alquilo, alquilo sustituido, o halógeno; y

R_{13} es un tiazolilo, piridilo, u oxazolilo opcionalmente sustituido.

Un método de la invención también puede comprender tratar a un paciente en necesidad de tal tratamiento con una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto que tiene la Fórmula Xa, anterior, o la forma estereoespecífica Xa', incluyendo sales y solvatos farmacéuticamente aceptables del mismo, en donde, K es -O-, -S-, o -NR₇-; A es - (CR₈R₉)-(CH₂)_m-Z- en donde Z es -(CHR₁₀)-, -C(=O)-, -C(=O)-C(=O)-, -OC(=O)-, -N(R₁₁)CC(=O)-, -SO₂-, o -N(R_n)SO₂-; R₆ es hidrógeno o metilo; R₈ y R₉ son independientemente hidrógeno, alquilo, o alquilo sustituido, R₁₂ es H, alquilo, alquilo sustituido, o halógeno; R₁₃ es arilo, arilo sustituido, heteroarilo o heteroarilo sustituido; y m es 0 a 6.

Un método de la invención también puede comprender tratar a un paciente en necesidad de tal tratamiento con una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto que tiene la Fórmula Xb o Xb', anterior, en donde R₆ es hidrógeno o metilo. En aún otra modalidad, el método comprende tratar al paciente con un compuesto de Fórmula Xb o Xb', en donde R₆ es hidrógeno.

Otra modalidad de la invención comprende el uso de cualquiera de los compuestos descritos antes (incluyendo los compuestos de Fórmula X, Xa, Xa', Xb, y/o Xb', en donde los grupos K, A, B₁, R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, R₈, R₉, R₁₀, R₁₁, R₁₂

y R_{13} pueden seleccionarse como se recita antes), en la fabricación de composiciones farmacéuticas para tratar el cáncer en pacientes, particularmente, para uso en fabricar composiciones farmacéuticas que contienen compuestos conjugados para suministrar un fármaco dirigido a tumores que sobreexpresan o preferiblemente expresan el receptor de folato.

Otra modalidad de la invención comprende tratar un paciente en necesidad de tal tratamiento con una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto que tiene las fórmulas X, Xa, Xa', Xb, y/o Xb' (en donde los grupos K, A, B₁, R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, R₈, R₉, R₁₀, R₁₁, R₁₂, y R₁₃ pueden seleccionarse como se recitó antes), en donde el tratamiento ocurre en el sitio del tumor, teniendo que liberarse en el sitio del tumor. En esta modalidad, un compuesto conjugado es suministrado en el sitio del tumor, y después el compuesto de fórmulas X, Xa, Xa', Xb, o Xb', como se define antes, es libera en el sito del tumor y tatar al paciente en el sito del tumor. Por lo tanto se entiende en la presente, en cualquier momento que el término "tratamiento" se usa con referencia para tratar a un paciente, donde este comprende tratar el sito del tumor, sin embargo suministrado, por ejemplo, vía un compuesto conjugado.

El uso de un agente para sobrerregular el nivel del receptor de folato (FR) puede ser efectivo para incrementar la

expresión de FR en ciertas células cancerígenas o tipos de tumor para mejorar las ventajas obtenidas administrando los compuestos de la invención a pacientes, y/o para mejorar las diversas enfermedades o tipos de tumor que pueden tratarse con los compuestos de unión del receptor de folato de acuerdo con la invención. La expresión del receptor de folato en ciertos cánceres puede sobrerregularse mediante la administración de un inductor del receptor de folato, que selectivamente incrementa el nivel del receptor de folato en células cancerígenas, así para mejorar la eficacia de una terapia marcada del receptor de folato. Por ejemplo, los cánceres de mama positivos del receptor de estrógeno (ER+) expresan niveles bajos de receptores de folato. El tratamiento con un inductor del receptor de folato, como tamoxifeno, un antagonista de estrógeno, se conoce para sobrerregular la expresión del receptores de folato en cánceres de mama de ER+, incrementando la susceptibilidad de células cancerígenas de mama de ER+ para tratamiento con una terapia dirigida del receptor de folato.

Un aspecto de la invención proporciona un método para tratar el cáncer o una enfermedad proliferativa en un paciente, que comprende opcionalmente administrar a un paciente una cantidad efectiva de por lo menos un inductor del receptor de folato, y tratar al paciente con una cantidad efectiva de por lo menos un compuesto de acuerdo a la fórmula

X. El inductor del receptor de folato puede administrarse antes, durante, o después de que el paciente se trata con el compuesto de acuerdo con la fórmula X. En una modalidad, el inductor del receptor de folato se administra antes del tratamiento con el compuesto de fórmula X. Una cantidad efectiva de inductor del receptor de folato se refiere a una cantidad que sobrerregula el receptor de folato en las células deseadas tal que el tratamiento con el compuesto es terapéuticamente efectivo.

Los ejemplos de inductores del receptor de folato para la sobrerregulación del receptor de folato α (FR α) incluyen: antagonistas del receptor de estrógeno tal como tamoxifeno; agonistas del receptor de progesterona tal como progestina; agonistas del receptor de andrógeno tal como testosterona y dihidroxitestosterona, y agonistas del receptor de glucocorticoides tal como dexametasona.

Los ejemplos de inductores del receptor de folato para la sobrerregulación del receptor de folato β (FR β) incluyen: agonistas del receptor de ácido retinóico tal como ácido retinóico trans integral, ácido benzoico de tetrametil naftalen propenilo (TTNPB), ácido retinóico 9-cis (9-cis RA), CD33336, LG101093, y CD2781.

En una modalidad, se proporciona un método para tratar el cáncer o una enfermedad proliferativa en un paciente en necesidad del mismo, que comprende administrar una cantidad

efectiva de por lo menos un inductor del receptor de folato y también tratar al paciente con por lo menos un compuesto de acuerdo con la fórmula X; en donde el inductor del receptor de folato sobrerregula el receptor de folato α . Preferiblemente, el cáncer o enfermedad proliferativa se selecciona de cáncer de mama, tal como cáncer de mama de ER+, y cáncer ovárico.

En una modalidad de la presente invención, se proporciona un método para tratar el cáncer o una enfermedad proliferativa en un paciente en necesidad del mismo, que comprende administrar una cantidad efectiva de por lo menos un inductor del receptor de folato y administrar una cantidad efectiva de por lo menos un compuesto de acuerdo con la fórmula X; en donde el inductor del receptor de folato sobrerregula el receptor de folato β . Preferiblemente, el cáncer o enfermedad proliferativa se selecciona de leucemia, y preferiblemente de leucemia mielógena aguda (AML) y leucemia mielógena crónica (CML).

En una modalidad adicional, se proporciona un método para tratar el cáncer o una enfermedad proliferativa en un paciente en necesidad del mismo, que comprende administrar una cantidad efectiva de por lo menos un inductor del receptor de folato, administrar por lo menos un inhibidor de deacetilasa de histona, y tratar al paciente con una cantidad efectiva de por lo menos un compuesto de acuerdo con la fórmula X. Un ejemplo de un inhibidor de deacetilasa de histona es

tricostatina A (TSA). Publicación de solicitud de patente
Norteamericana No. 2003/0170299, WO 2004/082463, Kelly, K. M.,
B.G. Rowan, and M. Ratnam, Cancer Research 63, 2820-2828
(2003), Wang, Zheng, Behm, and Ratnam, Blood, 96:3529-3536
5 (2000).

Los compuestos de la presente invención pueden
formar sales o solvatos los cuales están también dentro del
alcance de esta invención. La referencia para un compuesto de
la fórmula (X) en la presente se entiende para incluir la
10 referencia para sales solvatos de los mismos, racematos,
diastereómeros, y enantiómeros de los mismos, a menos que se
indique de otra manera. El término "sales", como se emplea en
la presente, denota sales ácidas y/o básicas formadas con
ácidos y bases inorgánicas y/u orgánicas. Además, cuando un
15 compuesto de la fórmula (X) contiene tanto una porción básica,
tal como pero no limitada a un piridinil imidazolilo, amina o
guanidinilo como una porción ácida tal como pero no limitada a
un ácido carboxílico, zwitteriones pueden formarse y se
incluyen dentro del término "sales" como se usa en la
20 presente. Sales farmacéuticamente aceptables (esto es,
fisiológicamente aceptables, no tóxicas) son preferidas,
aunque otras sales también son útiles, por ejemplo, en etapas
de aislamiento o purificación las cuales pueden emplearse
durante la preparación. Las sales de los compuestos de la
25 fórmula (X) pueden formarse, por ejemplo, al hacer reaccionar

un compuesto de la fórmula (X) con una cantidad de ácido o base, tal como una cantidad equivalente, en un medio tal como uno en el cual los precipitados de sal o en un medio acuoso seguido por liofilización.

- 5 Los compuestos de la fórmula (X) que contienen una porción básica, tal como pero no limitado a una amina, un grupo guanidinilo, o un anillo piridilo o imidazolilo, pueden formar sales con una variedad de ácidos orgánicos e inorgánicos. Las sales de adición ácida ejemplares incluyen
- 10 acetatos (tales como aquellos formados con ácido acético o ácido trihaloacético, por ejemplo, ácido trifluoroacético), adipatos, alginatos, ascorbatos, aspartatos, benzoatos, bencensulfonatos, bisulfatos, boratos, butiratos, citratos, canforatos, canforsulfonatos, ciclopentanpropionatos,
- 15 digluconatos, dodecilsulfatos, etansulfonatos, fumaratos, glucoheptanoatos, glicerofosfatos, hemisulfatos, heptanoatos, hexanoatos, clorohidratos, bromohidratos, yodohidratos, hidroxietansulfonatos (por ejemplo, 2-hidroxietansulfonatos), lactatos, maleatos, metansulfonatos, naftalensulfonatos (por
- 20 ejemplo, 2-naftalensulfonatos), nicotinas, nitratos, oxalatos, pectinatos, persulfatos, fenilpropionatos (por ejemplo, 3-fenilpropionatos), fosfatos, picratos, pivalatos, propionatos, salicilatos, succinatos, sulfatos (tales como aquellos formados con ácido sulfúrico), sulfonatos (tales como
- 25 aquellos mencionados en la presente), tartratos, tiocianatos,

toluensulfonatos tales como tosilatos, undecanoatos, y los similares.

Los compuestos de la fórmula (X) que contienen una porción ácida, tal como pero no limitado a un ácido carboxílico, puede formar sales con una variedad de bases orgánicas e inorgánicas. Las sales básicas ejemplares incluyen sales de amonio; sales de metal alcalino tales como sodio, litio, y sales de potasio; sales de metal alcalinotérreo tales como sales de calcio y magnesio; sales con bases orgánicas (por ejemplo, aminas orgánicas) tales como benzatinas, diciclohexilaminas, hidrabaminas (formadas con N,N-bis(deshidroabietil)etilendiamina), N-metil-D-glucaminas, N-metil-D-glicamidas, t-butil aminas; y sales con aminoácidos tales como arginina, lisina, y los similares. Los grupos que contienen nitrógeno básico pueden cuaternizarse con agentes tales como haluros de alquilo inferior (por ejemplo cloruros, bromuros, y yoduros de metilo, etilo, propilo, y butilo), sulfatos de dialquilo (por ejemplo sulfatos de dimetilo, dietilo, dibutilo, y diamilo), haluros de cadena larga (por ejemplo cloruros, bromuros y yoduros de decilo, laurilo, miristilo, y estearilo), haluros de aralquilo (por ejemplo bromuros de bencilo y fenetilo), y otros.

Los solvatos de los compuestos de la invención también se contemplan en la presente. Los solvatos de los compuestos de la fórmula (X) incluyen, por ejemplo, hidratos.

Todos los estereoisómeros de los compuestos presentes (por ejemplo, aquellos los cuales pueden existir debido a carbonos asimétricos en diversos sustituyentes), incluyendo formas enantioméricas y formas diastereoméricas, se contemplan dentro del alcance de esta invención. Los estereoisómeros individuales de los compuestos de la invención pueden, por ejemplo, ser substancialmente libre de otros isómeros (por ejemplo, como un isómero óptico puro o substancialmente puro que tiene una actividad específica), o puede mezclarse, por ejemplo, como racematos o con todos los otros isómeros u otros isómeros seleccionados. Los centros quirales de la presente invención pueden tener la configuración S o R como se define por la IUPAC 1974 Recommendations. Las formas racémicas pueden resolverse por métodos físicos, tales como, por ejemplo, cristalización fraccional, separación o cristalización de derivados diastereoméricos, o separación por cromatografía de columna quiral. Los isómeros ópticos individuales pueden obtenerse de procesos estereoespecíficos, en donde los materiales de partida y/o intermediarios se seleccionan que tiene una estereoquímica correspondiente con aquella para los productos finales, y la estereoquímica se mantiene a lo largo de las reacciones, y/o los isómeros pueden obtenerse de racematos por cualquier método adecuado, incluyendo sin limitación, métodos convencionales, tales como, por ejemplo, formación de sal con

un ácido ópticamente activo seguido por cristalización.

Todos los isómeros configuracionales de los compuestos de la presente invención se contemplan, ya sea en mezcla, o en forma pura o substancialmente pura. Como puede
5 apreciarse, la configuración preferida puede ser una función del compuesto particular y la actividad deseada. Los isómeros configuracionales pueden prepararse por los procesos descritos en la presente, el cual puede ser estereoselectivo. En otras palabras, una estereoquímica deseada para los compuestos
10 finales pueden realizarse al usar materiales de partida que tienen la estereoquímica deseada correspondiente, y luego mantener la estereoselectividad a lo largo del proceso de preparación. Alternativamente, los compuestos pueden prepararse como racematos o diastereómeros, y luego la
15 estereoquímica deseada puede alcanzarse por medio de separación de isómeros configuracionales los cuales pueden alcanzarse por cualquier método adecuado conocido en el campo, por ejemplo, tal como cromatografía de columna.

A lo largo de las especificaciones, los grupos y
20 sustituyentes de los mismos pueden elegirse para proporcionar porciones y compuestos estables útiles como compuestos farmacéuticamente aceptables y/o compuestos intermediarios útiles para hacer compuestos farmacéuticamente aceptables. Una persona experimentada en el campo apreciará selecciones
25 adecuadas para variables para realizar compuestos estables.

Las modalidades indicadas en la presente como ejemplares o preferidas se pretenden para ilustrarse y no se limitan.

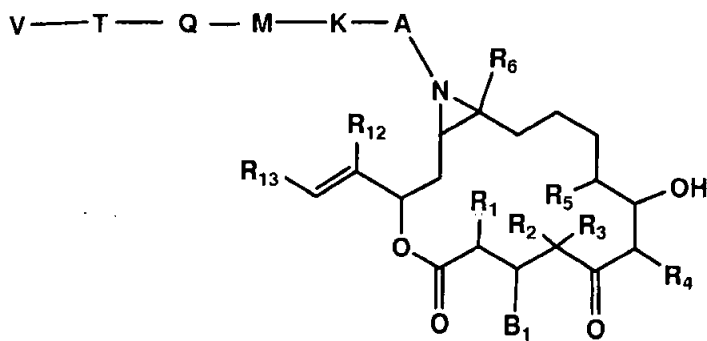
Otras modalidades de la invención aparentarán para una persona experimentada en el campo tales como, por ejemplo, combinaciones consideradas de las modalidades referidas arriba, y se contemplan como cubiertas dentro del alcance de la presente invención.

UTILIDAD

Una de las proteínas que es sobreexpresada o preferencialmente expresada en ciertas células cancerígenas es el receptor de folato. El ácido fólico se requiere para la síntesis del ADN, y se conocen ciertas células neoplásicas humanas para sobreexpresar proteínas de unión a folato. Por ejemplo, Campbell y colaboradores, "Folate Binding Protein is a Marker for Ovarian Cancer", Cancer Research, Vol. 51 (1 de octubre de 1991), en las pp. 5329-38, y Coney y colaboradores, "Cloning of a Tumor-Associated Antigen: MOv18 and MOv19 Antibodies Recognize Folate-binding Protein," Cancer Research, Vol. 51 (15 de noviembre de 1991), en las pp. 6125-31, describen que las proteínas de unión a folato son marcadores para el cáncer ovárico. La sobreexpresión del receptor de folato también se conoce para otros cánceres tal como, por ejemplo, piel, renal, mama, pulmón, colon, nariz, garganta, glándula mamaria, y cánceres de cerebro, así como otros

cánceres referidos en la presente.

Los compuestos de la presente invención son útiles y pueden suministrarse como agentes estabilizantes de microtúbulos derivados de epotilona a tumores que expresan un receptor de folato. Son útiles en el tratamiento de una
 5 variedad de cánceres y otras enfermedades proliferativas, particularmente estos cánceres caracterizados por células cancerígenas o tumores que expresan el receptor de folato. El término "condición asociada al receptor de folato" como se
 10 utiliza en la presente comprende enfermedades o trastornos caracterizados por la expresión del receptor de folato, o en otras palabras, aquellas enfermedades o trastornos que pueden diagnosticarse o tratarse basados en el nivel de expresión del receptor de folato en tejido enfermo con respecto a tejido
 15 normal. Los compuestos de la presente invención son útiles para formar conjugados. Por ejemplo, los compuestos de la invención pueden utilizarse para formar el siguiente compuesto conjugado de Fórmula I:



I

en donde:

V es folato, o un análogo o derivado del mismo;

Q es O, S, o NR_7 ;

M es a enlazador liberable;

5 K es O, S, o NR_{7a} ;

A es $-(\text{CR}_8\text{R}_9)-(\text{CH}_2)_m-\text{Z}-$ en donde Z es $-(\text{CHR}_{10})-$,
-C(=O)-, -C(=O)-C(=O)-, -OC(=O)-, -N(R_n)C(=O)-, -SO₂-, o
-N(R_n)SO₂-;

B₁ es hidroxilo o ciano y R₁ es hidrógeno o B₁ y R₁
10 se toman juntos para formar un doble enlace;

R₂, R₃, y R₅ son, independientemente, hidrógeno,
alquilo, alquilo sustituido, arilo o arilo sustituido; o R₂ y
R₃ pueden tomarse juntos con el carbono al cual se unen para
formar un cicloalquilo opcionalmente sustituido;

15 R₄ es hidrógeno, alquilo, alquenoilo, alquilo
sustituido, alquenoilo sustituido, arilo, o arilo sustituido;

R₆ es hidrógeno, alquilo o alquilo sustituido;

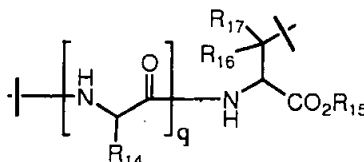
R_{7a}, R₇, R₈, R₉, R₁₀, y R₁₁ son independientemente
hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo,
20 cicloalquilo sustituido, arilo, arilo sustituido,
heterocicloalquilo, heterocicloalquilo sustituido,
heteroarilo, o heteroarilo sustituido;

R₁₂ es H, alquilo, alquilo sustituido, o halógeno;

R₁₃ es arilo, arilo sustituido, heteroarilo o
25 heteroarilo sustituido;

m es 0 a 6;

T tiene la fórmula:



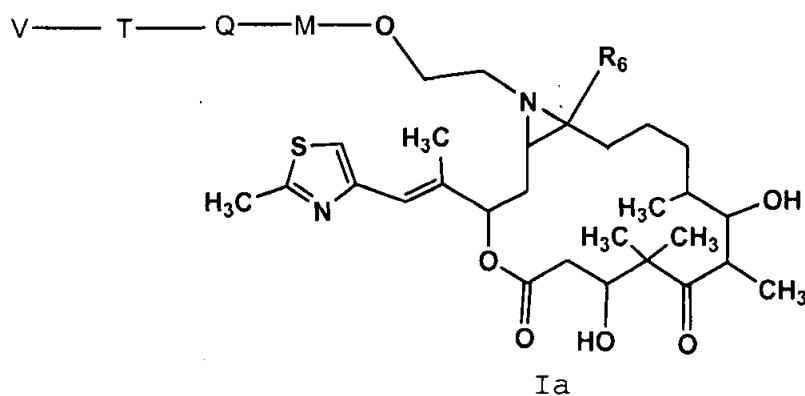
en donde

R_{14} cada que se presenta es, independientemente, hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, arilalquilo, arilalquilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, cicloalquilalquilo, cicloalquilalquilo sustituido, heteroarilo, heteroarilalquilo, heteroarilalquilo sustituido, heteroarilo sustituido, heterocicloalquilo, o heterocicloalquilo sustituido;

q es 1 a 10; y

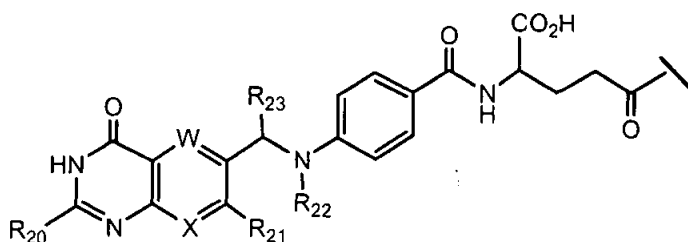
R_{15} , R_{16} y R_{17} son independientemente hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, o cicloalquilo.

Como otro ejemplo no limitante, los compuestos de la invención pueden utilizarse para formar el siguiente compuesto conjugado de fórmula Ia:



en donde V es una porción enlazada al receptor de folato. Por ejemplo, V puede tener la siguiente fórmula:

5



R₂₀ es hidrógeno, amino o alquilo inferior;

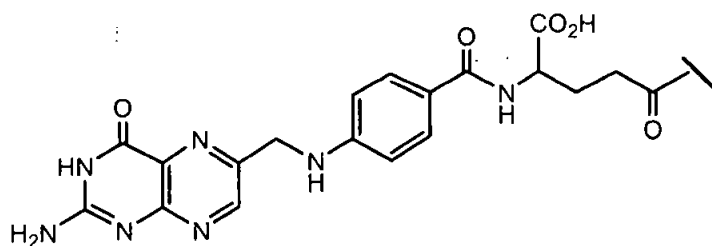
R₂₁ es hidrógeno, alquilo inferior, o forma un grupo cicloalquilo con R₂₃;

10

R₂₂ es hidrógeno, alquilo inferior, alquenilo inferior, o alquinilo inferior; y

R₂₃ es hidrógeno o forma un cicloalquilo con R₂₁. Preferiblemente, V es

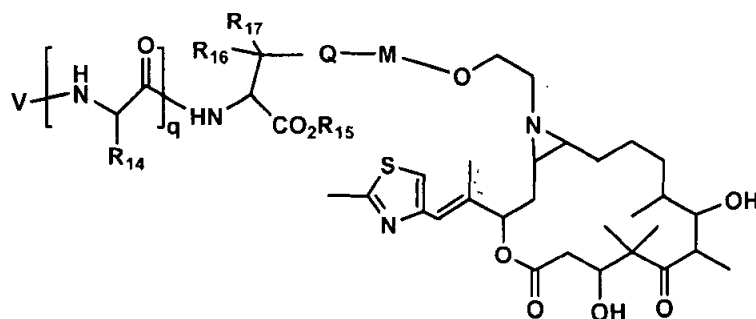
15



Los compuestos de la presente invención pueden ser conjugados para formar compuestos que tienen la siguiente

20

Fórmula Ib:



25

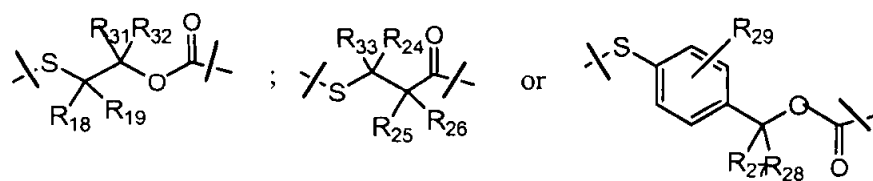
Ib

en donde

V es una porción enlazada al receptor de folato;

Q es O, S, o NR₇;

M es una ligadura que se libera que tiene la
5 siguiente fórmula:



10

preferiblemente

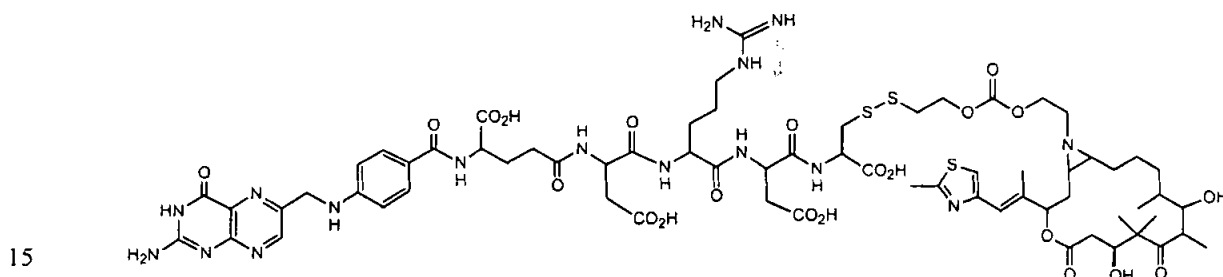
R₁₄ en cada caso es, independientemente, hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, arilalquilo, arilalquilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, cicloalquilalquilo, cicloalquilalquilo sustituido, heteroarilo, heteroarilalquilo, heteroarilalquilo sustituido, heteroarilo sustituido, heterocicloalquilo, o heterocicloalquilo sustituido; y es preferiblemente un grupo seleccionado de H, metilo, guanidinilpropilo, $-(CH_2)_{1-2}-CO_2H$, $-CH_2-SH$, $-CH_2-OH$,
15 imidazolil(metil), aminobutilo, y $-CH(OH)-CH_3$, y es más preferiblemente un alquilo C₁ hasta C₃ sustituido con un $-C(=O)-OH$ o $-NH-C(=NH)-NH_2$;

q es 1 hasta 10; preferiblemente 1 hasta 5;

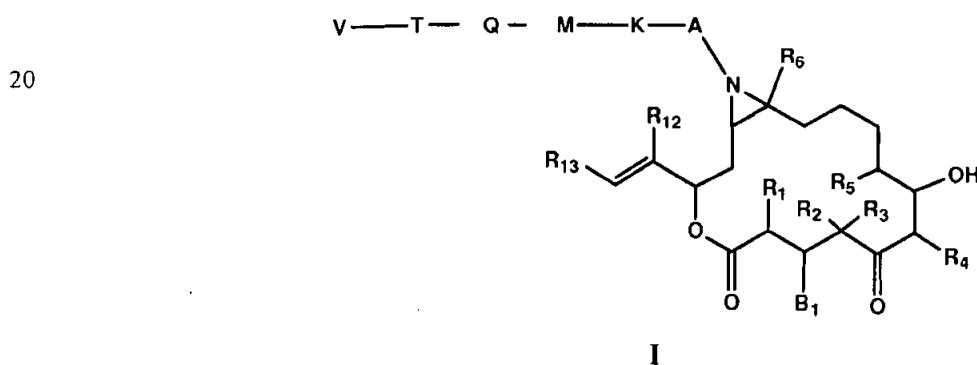
R₁₅, R₁₆ y R₁₇ son independientemente hidrógeno,
25 alquilo inferior o alquilo inferior sustituido; y

R_{18} , R_{19} , R_{31} , R_{32} , R_{33} , R_{24} , R_{25} , R_{26} , R_{27} , R_{28} y R_{29} son cada uno, independientemente, H, alquilo inferior, alquilo inferior sustituido, cicloalquilo, o cicloalquilo sustituido, o cualquiera de R_{18} y R_{19} ; R_{31} y R_{32} ; R_{19} y R_{31} ; R_{33} y R_{24} ; R_{25} y R_{26} ; R_{24} y R_{25} ; o R_{27} y R_{28} pueden ser tomados juntos para formar un cicloalquilo.

Los compuestos de la presente invención son especialmente útiles para formar compuestos conjugados, incluyendo sales y solvatos farmacéuticamente aceptables de los mismos, que tienen la siguiente fórmula:

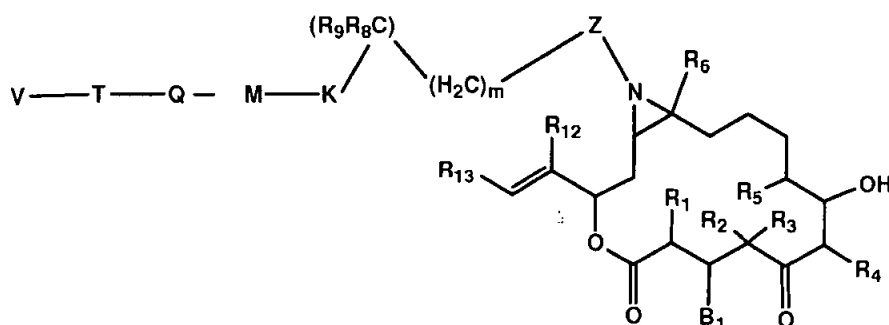


Para cualquier grupo bivalente listado en la presente, tal como $-(CR_8R_9)-(CH_2)_m-Z-$, que es capaz de inserción en el compuesto de Fórmula I,



25 la inserción debe hacerse de izquierda a derecha.

Por ejemplo, en la siguiente situación donde A es definida como $-(CR_8R_9)-(CH_2)_m-Z-$, el grupo metileno se unió a K, y el grupo Z se unió al nitrógeno del anillo de aziridinilo, como sigue:



Como un ejemplo no limitativo, tales cánceres asociados con el receptor de folato incluyen cáncer de ovario y cánceres de la piel, mama, pulmón, colón, nariz, garganta, glándula mamaria, hígado, riñón, bazo, y/o cerebro; mesoteliomas, adenoma pituitaria, cáncer cervical, carcinoma de célula renal u otro cáncer renal, carcinoma de plexo corioide, y tumores epiteliales (ver, Asok, Antony, "Folate Receptors: Reflections on a Personal Odyssey and a Perspective on Unfolding Truth," Advanced Drug Delivery Reviews 56 (2004) en 1059-66).

Adicionalmente, el uso de un antiestrógeno (tales como tamoxifen, ICI 182, 780), puede ser efectivo para incrementar la expresión FR en ciertas células cancerígenas o tipos de tumor para aumentar las ventajas obtenidas para administrar los compuestos conjugados de la invención a

paciente, y/o para aumentar las diversas enfermedades o tipos de tumor que pueden tratarse con los compuestos conjugados de acuerdo a la invención.

Por ejemplo, las enfermedades que pueden tratarse con los compuestos conjugados de esta invención, y/o una terapia de combinación que comprende los compuestos conjugados de esta invención en combinación con un antiestrógeno, puede incluir además, sin limitación, lo siguiente

- carcinomas incluyendo aquellos enlistados arriba y/o tal como vejiga, páncreas, estómago, tiroides, y próstata;

- tumores hematopoyéticos de línea linfoide, incluyendo leucemias tales como leucemia linfocítica aguda y leucemia linfoblástica aguda, y linfomas, tales como linfoma de célula B, linfoma de célula T, linfoma de Hodgkin, linfoma no hodgkiniano, linfoma de célula vellosa, y linfoma de Burkitts;

- tumores hematopoyéticos de línea de mieloide, incluyendo leucemias mielogenas agudas y crónicas y leucemia promielocítica;

- tumores del sistema nervioso central y periférico, incluyendo astrocitoma, neuroblastoma, glioma, y schwannomas;

- tumores de origen mesenquimal, incluyendo fibrosarcoma, rabdomiosarcoma, y osteosarcoma; y

- otros tumores, incluyendo melanoma, xeroderma pigmentoso, seminoma, queratoacantoma, cáncer folicular de la tiroide, y teratocarcinoma.

Los compuestos conjugados de la presente invención
5 son útiles para tratar pacientes como se han tratado
previamente para cáncer, así como aquellos que no se han
tratado previamente para cáncer. Los métodos y composiciones
de esta invención pueden usarse en tratamientos de cáncer de
primera línea y segunda línea. Adicionalmente, los compuestos
10 conjugados de la fórmula I pueden ser útiles para el
tratamiento refractario o resistente de cánceres.

Los compuestos conjugados de la presente invención
también pueden ser útiles en el tratamiento de otras
condiciones con respuesta a agentes que estabilizan los
15 microtúbulos administrados por medio del receptor de folato,
incluyendo pero no se limitan a, artritis, especialmente
artritis inflamatoria y otras condiciones inflamatorias
mediadas por macrófagos activados, y trastornos del sistema
nervioso central tal como enfermedad de Alzheimer.

20 Adicionalmente, los pacientes que están en
tratamiento con compuestos de la presente invención pueden
recibir una combinación de tratamientos, por ejemplo, con
otros agentes anticancerígenos y citotóxicos y otros
tratamientos útiles en el tratamiento de cáncer y otras
25 enfermedades proliferativas. En el tratamiento de cáncer, una

combinación de los compuestos de la invención actual y uno o más agentes adicionales y/u otros tratamientos pueden ser ventajosos. El segundo agente puede tener el mismo o diferente mecanismo de acción que los compuestos de la fórmula (X). Especialmente las combinaciones de fármaco citotóxicas y anticancerígenas son útiles en donde el segundo fármaco elegido actúa en una manera diferente o fase diferente del ciclo celular que la porción de fármaco activa de los compuestos presentes de la presente invención.

Los ejemplos de las clases de agentes citotóxicos y anticancerígenos incluyen, pero no se limitan a, agentes alquilantes, tales como mostazas de nitrógeno, sulfonatos de alquilo, nitrosoureas, etileniminas, y triazenos; antimetabolitos, tales como antagonistas de folato, análogos de purina, y análogos de pirimidina; antibióticos o anticuerpos, tales como anticuerpos monoclonales; enzimas; inhibidores de transferasa de la proteína de farnesilo; agentes hormonales, tales como glucocorticoides, estrógenos/antiestrógenos, andrógenos/antiandrógenos, progestinas, y antagonistas que liberan la hormona luteinizada; agente de disruptor de microtúbulos, tales como ecteinascidinas o sus análogos y derivados; agentes que estabilizan los microtúbulos; productos derivados de plantas, tales como alcaloides vinca, epipodofilotoxinas, y taxanos; inhibidores de topoisomerasa; inhibidores de transferasa de la

proteína de prenilo; complejos de coordinación de platino; inhibidores de cinasa incluyendo inhibidores de cinasa múltiple y/o inhibidores de cinasa Src o Src/abl; inhibidores de transducción de señal; y otros agentes usados como agentes anticancerígenos y citotóxicos tales como modificadores de respuesta biológica, factores de crecimiento, y moduladores inmunes. Los compuestos de la fórmula X también pueden usarse en conjunto con terapia de radiación.

Los ejemplos adicionales de agentes anticancerígenos que pueden usarse en combinación con los compuestos de la invención incluyen el inhibidor de la cinasa Src, 'N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxietil)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida, y otros compuestos descritos en la Patente de EUA No. 6,596,746 y Solicitud de Patente de EUA No. de serie 11/051,208, presentada el 4 de febrero de 2005, incorporado en la presente para referencia; ixabepilona, un análogo de aza-epotilona B, y/u otros análogos de epotilona descritos en la patente de EUA No. 6,605,599, US 6,262,094, US 6,288,237, US 6,291,684, US 6,359,140, US 6,365,749, US 6,380,395, US 6,399,638, US 6,498,257, US 6,518,421, US 6,576,651, US 6,593,115, US 6,613,912, US 6,624,310, Solicitud de EUA 2003/0060623, publicada en marzo de 2003; Patente Alemana No. 4138042.8; WO 97/19086, WO 98/22461, WO 98/25929, WO 98/38192, WO 99/01124, WO 99/02224, WO 99/02514, WO 99/03848, WO 99/07692, WO 99/27890, WO

99/28324, WO 99/43653, WO 99/54330, WO 99/54318, WO 99/54319,
WO 99/65913, WO 99/67252, WO 99/67253, WO 00/00485,
US2004/0053910 y US2004/0152708; inhibidores de cinasa
dependientes de ciclina encontrados en WO 99/24416 (ver
5 también Patente de EUA No. 6,040,321); inhibidores de
transferasa de la proteína de prenilo encontrados en WO
97/30992 y WO 98/54966; agentes de transferasa de la proteína
de farnesilo descritos en la patente de EUA No. 6,011,029;
anticuerpos CTLA-4 descritos en la publicación PCT no.
10 WO01/14424, y/o un anticuerpo CTLA-4 descrito en la
publicación PCT no. WO 00/37504 tales como, por ejemplo, el
anticuerpo conocido como CP-675206 u ORENCIA (necesario para
verificar); MDX-010; vinflunina (Javlor™), Erbitux.

Otros agentes potencialmente útiles en combinación
15 con compuestos de la presente invención pueden incluir
paclitaxel (TAXOL®), docetaxel (TAXOTERE®) agentes misceláneos
tales como, hidroxiurea, procarbazona, mitotano,
hexametilmelamina, cisplatina y carboplatina; Avastina;
Herceptina;

20 Los compuestos de la presente invención también
pueden formularse o co-administrarse con otros agentes
terapéuticos que se seleccionan para su utilidad particular en
administrar terapias asociadas con las condiciones antes
mencionadas. Por ejemplo, los compuestos de la invención
25 pueden formularse con agente para prevenir náusea,

hipersensibilidad e irritación gástrica, tales como antieméticos, y antihistamínicos H_1 y H_2 .

Los otros agentes terapéuticos anteriores, cuando se emplean en combinación con los compuestos de la presente invención, pueden usarse, por ejemplo, en aquellas cantidades indicadas en la Physicians' Desk Reference (PDR) o como se determina de otra manera por alguien de experiencia ordinaria en la técnica.

Una modalidad de la invención comprende el uso de de la compuestos de la presente invención para preparar composiciones farmacéuticas para el tratamiento del cáncer, particularmente para uso en preparar composiciones farmacéuticas para uso en fármaco dirigido administrado en tumores que sobreexpresan o preferencialmente expresan el receptor de folato. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden administrarse por cualesquiera de los usos descritos en la presente por cualquier medio adecuado, por ejemplo, parenteralmente, tales como inyección subcutánea, intravenosa, intramuscular, o intrasternal o técnicas de infusión (por ejemplo, como soluciones o suspensiones acuosas o no acuosas inyectables estériles), y/o en formulaciones de dosis unitaria que contienen vehículos o diluyentes no tóxicos, farmacéuticamente aceptables. Los compuestos actuales pueden, por ejemplo, administrarse en una forma adecuada la liberación extendida o liberación inmediata.

La liberación extendida o liberación inmediata pueden realizarse por el uso de composiciones farmacéuticas adecuadas que comprenden los compuestos presentes, o, particularmente en el caso de liberación extendida, por el uso de dispositivos
5 tales como implantes subcutáneos o bombas osmóticas.

Las composiciones ejemplares para administración parenteral incluyen soluciones o suspensiones inyectables las cuales pueden contener, por ejemplo, diluyentes o solventes parenteralmente aceptables, no tóxicos adecuados, tales como
10 manitol, 1,3-butanodiol, agua, solución de Ringer, una solución de cloruro de sodio isotónico (0.9% de inyección de cloruro de sodio [solución salina normal] o 5% de inyección de dextrosa), u otros agentes de dispersión o humectantes o de suspensión, incluyendo mono- o diglicéridos sintéticos, y
15 ácidos grasos. Las composiciones y/o métodos farmacéuticamente aceptables de compuestos de administración de la invención pueden incluir el uso de co-solventes incluyendo, pero no limitado a etanol, N,N dimetilacetamida, propilenglicol, glicerol polietilenglicoles, por ejemplo, polietilenglicol 300
20 y/o polietilenglicol 400, puede comprender el uso de tensoactivos (agente activo de superficie farmacéuticamente aceptable que puede usarse para incrementar las propiedades de extensión o humectantes del compuesto al reducir su tensión de superficie), incluyendo sin limitación, Cremophor®, Solutol HS

15[®], polisorbato 80, polisorbato 20, poloxámero, pirrolidonas tales como N-alquilpirrolidona (por ejemplo, N-metilpirrolidona) y/o polivinilpirrolidona; también puede comprender el uso de uno o más "amortiguadores" (por ejemplo, un ingrediente el cual imparte una capacidad para resistir un cambio en la acidez o alcalinidad de un medio hasta la adición de incrementos de un ácido o base), incluyendo, sin limitación, fosfato de sodio, citrato de sodio, dietanolamina, trietanolamina, L-arginina, L-lisina, L-histidina, L-alanina, glicina, carbonato de sodio, trometamina (a/k/a tris[hidroximetil]aminometano o Tris), y/o mezclas de los mismos.

La cantidad efectiva del compuesto de la presente invención puede determinarse por una persona ordinaria en la técnica, y incluyen cantidades de dosis ejemplares para un adulto humano desde alrededor de 0.01-10 mg/kg de peso corporal del compuesto activo por día, el cual puede administrarse en una dosis sencilla o en la forma de dosis divididas individuales, tales como desde 1 hasta 4 veces por día. Un intervalo preferido incluyen una dosis de alrededor de 0.02 hasta 5 mg/kg de peso corporal, con un intervalo de alrededor de 0.05-0.3, son más preferidos. Se entenderá que el nivel de dosis específico y frecuencia de dosis para cualquier sujeto particular puede variarse y dependerá de una variedad de factores incluyendo la actividad del compuesto específico.

empleado, la estabilidad metabólica y longitud de acción tal compuesto, la especie, edad, peso corporal, salud general, sexo y dieta del sujeto, el modo y el tiempo de administración, la relación de excreción, la combinación de fármaco, y la severidad de la condición particular. Los sujetos preferidos para el tratamiento incluyen animales, más preferiblemente especies mamíferas tales como humanos, y animales domésticos tales como perros, gatos y los similares, se someten a condiciones asociadas con la estabilización de los microtúbulos.

Los compuestos de la presente invención, tales como compuestos descritos en uno o más de los siguientes ejemplos, se han probado en uno o más de los ensayos descritos a continuación y/o ensayos conocidos en el campo, y demuestran un nivel medible de actividad como agentes que estabilizan los microtúbulos.

ENSAYOS

Ensayo de sobrevivencia de células clonogénicas

Las células cancerígenas se sembraron en $3.0E+05$ células en un matraz T75 con 10 ml de medio RPMI1640, libre de ácido fólico, y que contiene 10% de suero de bovino fetal y 25 mM HEPES. Las células se hicieron crecer en un incubador a 37°C que contiene 5% de CO_2 durante 2 días. En el día 2, los sobrenadantes se removieron de los matraces, y los matraces se dividieron en 2 grupos. Un grupo de células se incubaron con 5

ml de medio que contiene 100 μ M de ácido fólico (Sigma) durante 30 minutos y los otros se hicieron crecer en 5 ml de medio sin agregar ácido fólico. Luego las células se trataron con 20 nM de folato-epotilona durante una hora. Al final de la incubación, los fármacos se removieron de los matraces y las células se lavaron con solución amortiguadora de PBS 3x. Después del lavado, 5 ml de medios completos se agregaron en cada matraz, y la célula se hizo crecer en el incubador CO₂ durante 23 horas. La mañana siguiente, las células se removieron de los matraces por tripsinización, los números de células se determinaron, y luego las células se colocaron en una placa de 6 pozos. Diez días después de colocarse en las placas, las colonias se tiñeron con violeta cristal y se contaron. Las fracciones sobrevivientes se determinaron.

15 Ensayo de Proliferación/citotoxicidad de MT *in vitro*

La citotoxicidad *in vitro* se determinó en células neoplásicas utilizando un ensayo colorimétrico basado en tetrazolio que toma ventaja de la conversión metabólica de MTS (3-(4,5-dimetilotiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfenil)-2H-tetrazolio, sal interna) para una forma reducida que absorba la luz a 492 nm. Las células se sembraron 24 horas antes de la adición de la epotilona, análogo de epotilona, epotilona conjugada, análogo de epotilona conjugado. Seguido de 72 horas de incubación a 37°C con el compuesto diluido en serie, MTS, en combinación con el

metosulfato de fenazina del agente acoplador de electrón, se agregó a las células. La incubación se continuó por 3 horas, después la absorbencia del medio a 492 nm se midió con un espectrofotómetro para obtener el número células
5 sobrevivientes con relación a las poblaciones control. Los resultados se expresan como concentraciones citotóxicas medianas (valores de CI_{50}).

Ensayo del receptor de folato

Todos los procedimientos de preparación de muestra
10 usados para el ensayo FR se llevaron a cabo a 4°C. Las muestras de tejido se homogeneizaron en solución amortiguadora de homogeneización (10mM Tris, pH 8.0, 0.02 mg/ml cada una de leupeptina y aprotinina; 1 ml de solución amortiguadora/50mg de tejido) usando un homogeneizador PowerGen 125. Los desechos
15 grandes se removieron por centrifugación suave (3000g durante 15min). Los granulados de membrana luego se recolectaron por centrifugación a 40,000g durante 60min y se volvieron a suspender en solución amortiguadora de solubilización (50mM de Tris, pH 7.4, 150mM de NaCl, 25mM de n-octil- β -D-
20 glucopiranosido, 5mM de EDTA, y 0.02% de azida de sodio). El material insoluble se removió por una segunda centrifugación 40,000g 60-min, y la concentración de proteína total de los sobrenadantes se determinó por el método de ácido bicinconinico (BCA) (Pierce Chemical). Cada muestra luego se
25 diluyó a 0.25 mg/ml en solución amortiguadora de

solubilización, y 100 μ l se colocó dentro de cada uno de los dos microconcentradores Microcon-30 (30,000-MW corte completo, Millipore). Las muestras luego se centrifugaron a 14,000g durante 10min a temperatura ambiente para pasar todo el líquido a través de la membrana. Así como para retener los FRs solubilizados en la superficie de la membrana de microconcentrador. Se nota que todas las etapas de centrifugación posteriores se llevarán a cabo usando estos mismos parámetros. Luego 55 μ l de 30mM de solución amortiguadora de acetato (pH 3.0) se agregó a cada microconcentrador, seguido por una etapa de centrifugación. Después, 55 μ l de solución amortiguadora salina de fósforo (PBS) se dosificó en cada microconcentrador, seguido por otra centrifugación. Luego 50 μ l de reactivo que enlaza el ácido [3H]fólico (120 nM ácido [3H]fólico (Amersham) en 10 mM de Na₂PO₄, 1.8 mM de KH₂PO₄, pH 7.4, que contiene 500mM de NaCl, 2.7 mM de KCl, y 25 mM de n-octil- β -D-glucopiranosido) o 50 μ l de un reactivo competente (reactivo enlazado plus 120 μ M de ácido fólico no etiquetado) se agregó a los concentradores apropiados. Después de una incubación de 20-min a temperatura ambiente, los concentradores se lavaron/centrifugaron tres veces con 75 μ l 50mM n-octil- β -D-glucopiranosido, 0.7M de NaCl en PBS, pH 7.4. Después del lavado final, los productos de retención que contienen los FRs solubilizados se recuperaron

de la superficie de membrana de los microconcentradores por dos enjuagues con 100 μ l de PBS que contiene 4% de Triton X-100. Las muestras luego se contaron en un contador de escintilación líquida (Packard Bioscience). Los valores
5 contados por minuto (cpm) se convirtieron a picomoles de FR con base en el cpm de un estándar conocido, y los resultados finales se normalizaron con respecto a la muestra de contenido de proteína.

Animales y tumores

10 Ratones hembra CD2F1 (Harlan Sprague-Dawley Inc., 20-22 g) mantenidas en un ambiente controlado y proporcionado con agua y alimento ad libitum se usaron en estos estudios. El carcinoma de pulmón Madison 109 de murino (Marks y colaboradores, 1977) y la variante 98M109 que expresa FR α se
15 usó para evaluar la eficacia de las epotilonas y los conjugados de folato-epotilona. Además, el crecimiento KB de carcinoma epidermoide de cabeza y cuello humano en ratones agénicos sin pelo también se usa para este propósito.

Tratamiento con fármacos y evaluación de la eficacia
20 antitumoral.

Para la administración de epotilonas a ratones un excipiente que consiste de lo siguiente se usó: Cremofor®/etanol/agua (1:1:8, v/v). Los compuestos primero se disolvieron en una mezcla de Cremofor®/etanol (50:50). La

dilución final a la resistencia de dosis requerida se hizo en menos de 1 hr antes de la administración del fármaco. A los ratones se les administraron los agentes por inyección de bolo IV a través de la vena de la cola. Los conjugados de folato-
5 eptilona se prepararon en solución amortiguadora salina de fosfato estéril y se administran a ratones por inyección de bolo IV a través de la vena de la cola a un volumen de 0.01 ml/g de ratón. El tratamiento de cada animal se basó en el peso corporal individual.

10 El número requerido de animales necesarios para detectar una respuesta importante se agrupó al principio del experimento y a cada uno se le da una inoculación subcutánea de un tumor brei (2% p/v). Los tumores se permitieron crecer durante 4 días. En el cuarto día, los animales se
15 distribuyeron igualmente a diversos tratamientos y grupos de control. Los animales tratados se verificaron diariamente para el tratamiento relacionado con la toxicidad/mortalidad. Cada grupo de animales se pesaron antes de iniciar el tratamiento (Wt1) y luego nuevamente después de la última dosis de
20 tratamiento (Wt2). La diferencia en peso corporal (Wt2-Wt1) proporciona una medida de toxicidad relacionada con el tratamiento.

La respuesta del tumor se determinó por la medición de los tumores con un calibrador dos veces a la semana, hasta
25 que los tumores alcanzaron un tamaño "objetivo" predeterminado

de 1 gm. Los pesos del tumor (mg) se estimaron de la fórmula:

$$\text{Peso de tumor} = (\text{longitud} \times \text{ancho}^2) \div 2$$

La actividad antitumor se evaluó en la dosis tolerada máxima (MTD) la cual se define como el nivel de dosis
5 inmediatamente debajo de tal toxicidad excesiva (esto es más de una muerte) ocurrida. Cuando la muerte ocurre, el día de la muerte se registra. Los ratones tratados que mueren previo a hacer que sus tumores alcancen su tamaño objetivo se consideraron por tener muerte de toxicidad por fármaco.
10 Ningunos ratones de control mueren portando tumores de menor tamaño objetivo. Los grupos de tratamiento con más de una muerte provocada por toxicidad de fármaco se consideraron por tener tratamientos excesivamente tóxicos y sus datos no se incluyeron en la evaluación de una eficacia antitumoral en el
15 compuesto.

El punto final de la respuesta de tumor se expresó en términos de retardar el crecimiento del tumor (valor T-C), definido como la diferencia en tiempo (días) requeridos para el tratamiento de tumores (T) para alcanzar un tamaño objetivo
20 predeterminado comparado con aquellos del grupo de control (C).

Para exterminar la célula de tumor estimada, el volumen del tumor en doble tiempo (TVDT) primero se calculó con la fórmula:

$$\text{TVDT} = \text{tiempo promedio (días) para tumores de}$$

control para alcanzar el tamaño objetivo - tiempo promedio (días) para tumores de control para alcanzar la mitad del tamaño objetivo

Y,

5 exterminación de célula $\text{Log} = T - C \div (3.32 \times \text{TVDT})$

Evaluaciones estadísticas de los datos se llevaron a cabo usando la prueba Wilcoxon generalizada de Gehan.

ABREVIATURAS

Las siguientes abreviaturas se usan en los esquemas
10 y ejemplos en la presente para fácil referencia:

CBZ-OSu = N-(Benciloxicarboniloxi)succinimida

DCM = diclorometano

DEA = dietilamina

DIAD = diisopropilazodicarboxilato

15 DIPEA = diisopropiletilamina

DMA = dimetilamina

DMF = dimetilformamida

DMSO = dimetilsufóxido

EDC = clorohidrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-
20 etilcarbodiimida

EtOH = etanol

EtOAc = acetato de etilo

FR = receptor de folato

HOBT = n-hidroxi benzotriazol

25 HPLC = cromatografía líquida de alta resolución

iPr-OH or IPA = alcohol isopropílico

LC/MS = cromatografía líquida/espectro de masas

LDA = diisopropilamida de litio

MeOH = metanol

5 OTES = o-trietilsililo;

OMs = mesilato;

Ph = fenilo

Pd/C = paladio en carbono

PyBOP = hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-
10 oxitripirrolidinofofonio

Py = piridilo

TA = temperatura ambiente

Sat = saturado

THF = tetrahidrofurano

15 TFA = ácido trifluoroacético

CCD = cromatografía de capa delgada

TESCL = clorotrietilsilano

UV = ultravioleta.

METODOS DE PREPARACION

20 Los compuestos de la presente invención pueden prepararse generalmente de acuerdo a los siguientes esquemas y al conocimiento de alguien experto en la técnica, y/o usando métodos establecidos en la Patente de EUA 6,605,599, Patente de EUA 6,831,090, Patente de EUA 6,800,653, Patente de EUA
25 6,291,684 y *Organic Letters*, 2001, 3, 2693-2696, Patente de

EUA 6,719,540, Solicitud de Patente de EUA 2005/0002942, las descripciones de las cuales se incorporan en la presente para referencia y/o en los ejemplos como sigue.

Como se muestra en el Esquema de Reacción 1, un
5 compuesto de la fórmula X puede prepararse de un compuesto de la fórmula II. Los compuestos de fórmula II pueden obtenerse por fermentación (ver, por ejemplo Gerth y colaboradores, "Studies on the Biosynthesis of Epothilones: The Biosynthetic Origin of the Carbon Skeleton," Journal of Antibiotics, Vol.
10 53, No. 12 (Dec. 2000), and Hofle y colaboradores, "Epothilone A and B- Novel 16-Membered Macrolides: Isolation, Crystal Structure, and Conformation in Solution", Angew. Chem. Int. Ed. Engl., Vol. 35, NO. 13/14, 1567-1569 (1996), las descripciones de las cuales se incorporan en la presente para
15 referencia) o por síntesis total (ver, por ejemplo Vite y colaboradores Patente de EUA 6,605,599; Patente de EUA 6,242,469; US 2006/004065; y US 6,867,333, las descripciones de las cuales se incorporan en la presente para referencia en su totalidad). Por ejemplo un compuesto de la fórmula II donde
20 R_2 , R_3 , R_4 , R_5 , y R_{12} son metilo, B_1 es hidroxilo, R_1 y R_6 son hidrógeno, y R_2 es 2-metiltiazol-4-ilo se refiere como epotilona A y puede obtenerse de fermentación de *sorangium cellulosum* como se hace referencia arriba. Un compuesto de la fórmula II puede convertirse a un compuesto de la fórmula III
25 donde P es un grupo protector de sililo tales como

trietilsililo, t-butildimetilsililo, t-butildifenilsililo, triisopropilsililo, y los similares (ver, por ejemplo, Greene y colaboradores, "Protective groups in Organic Synthesis", John Wiley and Sons, Inc.). Por ejemplo, un compuesto de la

5 fórmula III donde P es trietilsililo puede prepararse por el tratamiento de un compuesto de la fórmula II con clorotrietilsilano en presencia de una base Hunig. En el caso donde B₁ es hidroxilo en el compuesto de la fórmula II, luego B₁ deberá también convertirse al éter sililo correspondiente. Una

10 halohidrina de la fórmula IV (Y es Cl, Br, o I) puede prepararse de un compuesto de la fórmula III por el tratamiento con una sal de haluro de metal por métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la abertura de epóxido usando eterato de bromuro de magnesio a temperatura inferior (-20 hasta -5°C) puede proporcionar halohidrinas diastereoméricas, donde Y

15 es bromo. Un compuesto de la fórmula V puede prepararse de un compuesto de la fórmula IV por desplazamiento del halógeno usando, por ejemplo, azida de sodio en un solvente polar tales como dimetilformamida. Si se desea, la inversión de la estereoquímica en la posición C₁₂ puede alcanzarse siguiendo el protocolo Mitsunobu el cual bien se establece en

20 la técnica. Por ejemplo, el tratamiento de un compuesto de la fórmula V con ácido p-nitrobenzoico, dietilazodicarboxilato, y trifenilfosfina proporciona el éster de nitrobenzoato correspondiente, el cual luego puede desdoblarse por hidrólisis de éster suave usando, por ejemplo, soluciones metabólicas de amoníaco para proporcionar un compuesto de la

25 fórmula VI. Alternativamente, otros ácidos orgánicos, azodicarboxilatos,

y organófosfinas pueden usarse para efectuar la inversión Mitsunobu. Un compuesto de la fórmula VII donde OG es un grupo de partida tales como mesilato, tosilato, nosilato, triflato y los similares pueden prepararse de un compuesto de la fórmula VI por métodos conocidos en la técnica.

5 Por ejemplo, el tratamiento de VI con cloruro de metansulfonilo y trietilamina en un solvente orgánico adecuado tal como diclorometano proporciona un compuesto de la fórmula VII donde OG es mesilato. Un compuesto de la fórmula VIII puede prepararse de un compuesto de la fórmula VII por reducción del grupo azido con un reactivo reductor tal

10 como una organofosfina (por ejemplo, trimetilfosfina). Alternativamente, un compuesto de la fórmula VIII puede prepararse directamente de un compuesto de la fórmula VI usando un agente reductor de organofosfina tal como trifenilfosfina. Un compuesto de la fórmula IX puede prepararse de un compuesto de la fórmula VIII por métodos conocidos en la técnica

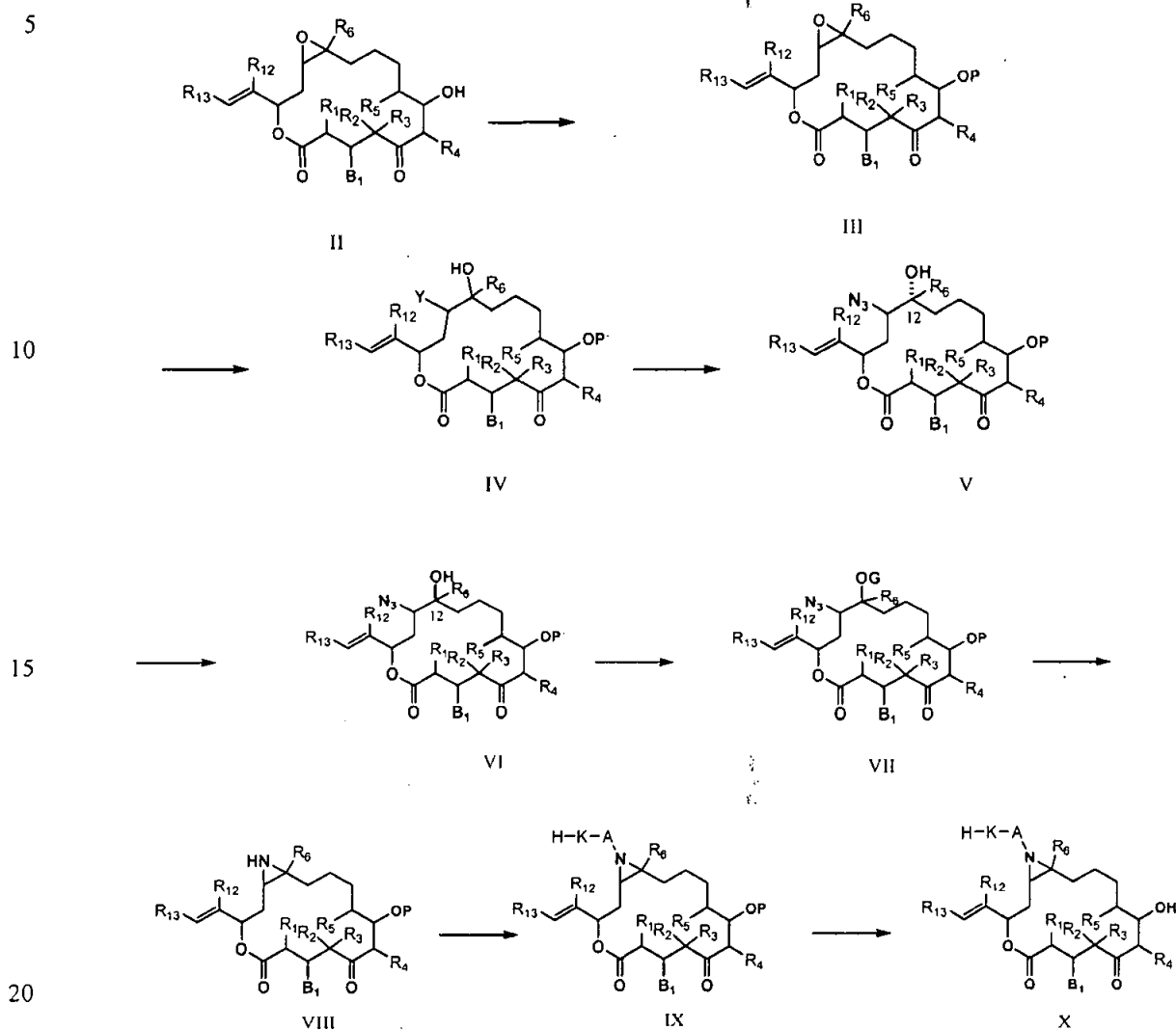
15 (ver, por ejemplo, Regueiro-Ren y colaboradores, Patente de EUA 6,800,653; and Regueiro-Ren y colaboradores, *Organic Letters*, 2001, 3, 2693-2696). Por ejemplo, un compuesto de la fórmula IX donde H-K-A- es 2-hidroxietilo puede prepararse de un compuesto de la fórmula VIII por alquilación del anillo aziridina usando, por ejemplo, exceso de 2-

20 bromoetanol y una base tal como carbonato de potasio. Un compuesto de la fórmula X puede prepararse de un compuesto de la fórmula IX por la eliminación de los grupos protectores de éter de sililo usando métodos conocidos en la técnica (ver, por ejemplo, Greene y colaboradores, "Protective groups in Organic Synthesis", John Wiley and Sons, Inc.).

25 Por ejemplo, cuando P es trietilsililo, el tratamiento de un compuesto

de la fórmula IX con ácido trifluoroacético en diclorometano efectúa la desprotección para proporcionar un compuesto de la fórmula X.

ESQUEMA DE REACCIÓN 1



Como se muestra en el Esquema de Reacción 2 un proceso para elaborar un análogo o derivado de folato V y la ligadura bivalente T-Q que tienen la fórmula XI, que pueden usarse con compuestos de la invención para elaborar moléculas

conjugadas para suministrar el fármaco dirigido, por ejemplo, como por la fórmula I, previamente descrita. Como se muestra en el Esquema de Reacción 2, un análogo de folato y enlazador bivalente pueden ensamblarse utilizando métodos conocidos en la técnica, especialmente en el caso donde V es ácido fólico o un análogo de ácido fólico, como se describe, por ejemplo, por Jackson, y colaboradores, *Advanced Drug Delivery Rev.* 56(2004) 1111-1125, la descripción de la cual se incorpora en la presente para referencia, y T-Q es un péptido. Por ejemplo, peptidil folato XI puede prepararse como se muestra en el Esquema de Reacción 2. El acoplamiento de péptido secuencial de una resina de poliestireno cargada con cisteína con aspartato protegido por Fmoc, arginina, aspartato, y luego glutamato puede efectuarse usando PyBOP como agente de acoplamiento y piperidina como agente de desprotección Fmoc. El ácido pteróico protegido por N¹⁰-trifluoroacetamida puede prepararse en dos etapas por conversión enzimática (carboxipeptidasa G) de ácido fólico hasta ácido pteróico, seguido por protección N¹⁰ usando anhídrido trifluoroacético. Después, el acoplamiento del ácido pteróico protegido por N¹⁰ al péptido enlazado a la resina seguido por desdoblamiento de la resina con ácido trifluoroacético y la eliminación del grupo N¹⁰-trifluoroacetilo usando hidróxido de amonio proporciona un fragmento V-T-Q donde V es ácido fólico y T-Q es -Asp-Arg-Asp-Cys-OH. Alternativamente, los análogos del ácido pteróico puede usarse en lugar del ácido pteróico y otros aminoácidos, puede usarse en lugar de

aquellos ilustrados en el Esquema de Reacción 2.

Esquema de Reacción 2

H-Cys(4-metoxitritil)-2-clorotritil-resina (cargado 0.57 mmol/g)

5

1) Fmoc-Asp(OtBu)-OH, PyBOP, DIPEA, DMF,
luego piperidina

2) Fmoc-Arg(Pbf)-OH, PyBOP, DIPEA, DMF,
luego piperidina

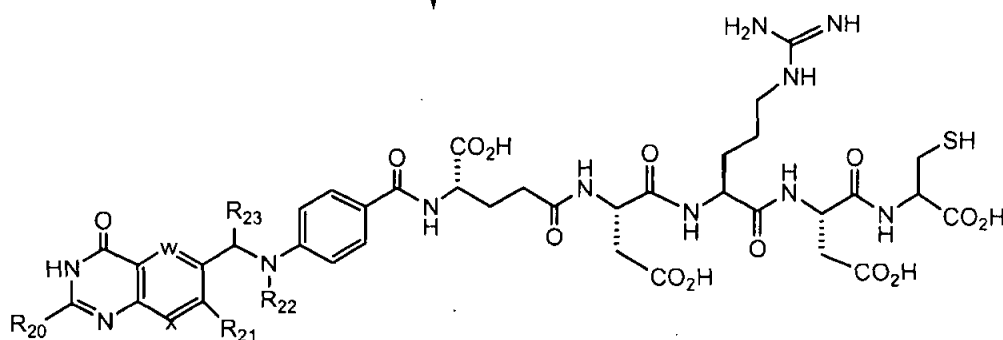
3) Fmoc-Asp(OtBu)-OH, PyBOP, DIPEA, DMF,
luego piperidina

10

4) Fmoc-Glu-OtBu, PyBOP, DIPEA, DMF, DMF,
luego piperidina

5) ácido pteróico N¹⁰TFA, PyBOP, DIPEA,

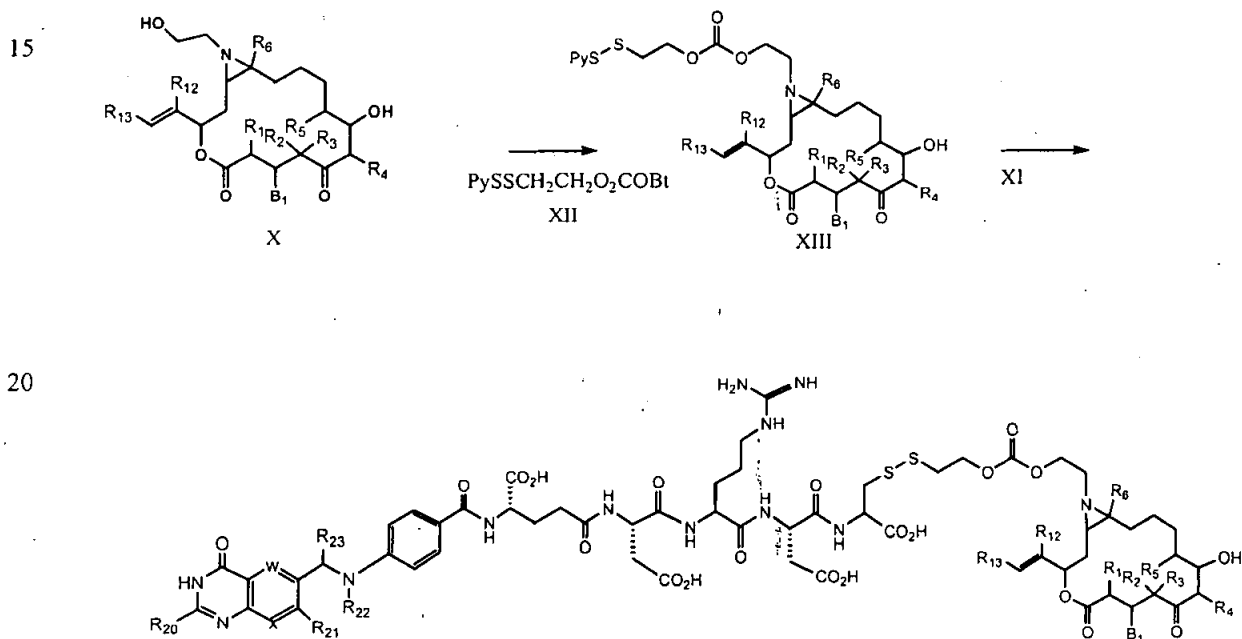
15



El Esquema de Reacción 3, más adelante, muestra un método para utilizar los derivados de epotilona de la presente invención para preparar una molécula conjugada de fórmula I, para uso en el suministro del fármaco dirigido. Como se muestra en el Esquema de Reacción 3, el ensamble de los compuestos de fórmula I pueden realizarse por el acoplamiento del compuesto de fórmula X para un fragmento V-T-Q por la incorporación en etapa de una ligadura libre M. A manera de ilustración, un compuesto de la fórmula X donde -A-K-H es -CH₂CH₂OH

puede convertirse a un carbonato de disulfaniletilo XIII usando un compuesto benzotriazol activado de la fórmula XII. Un compuesto de la fórmula XII puede prepararse de mercaptoetanol, cloruro de metoxycarbonil sulfenilo, y una 2-mercaptopiridina opcionalmente sustituido para proporcionar un intermediario 2-(2-piridin-2-il)disulfanil)etanol, el cual luego puede convertirse a un compuesto de la fórmula XII por el tratamiento con difosgeno y un 1-hidroxibenzotriazol opcionalmente sustituido. El intercambio de disulfuro posterior con un peptidil folato tal como XI proporciona un compuesto de la fórmula I donde V es ácido fólico, T-Q es una -Asp-Arg-Asp-Cys-OH, M es -SCH₂CH₂O(C=O)-, A es -CH₂CH₂- y K es O.

ESQUEMA DE REACCION 3



El esquema 4 ilustra un método alternativo para fabricar un

compuesto de Fórmula X de un compuesto de Fórmula XIV (ver, solicitud de patente Norteamericana No. 60/940,088, presentada el 25 de mayo de 2006, incorporada en la presente en su totalidad por referencia). Los compuestos de Fórmula XIV

5. pueden obtenerse por los métodos bien conocidos en el campo, por ejemplo, por fermentación (ver, Gerth y colaboradores, "Studies on the Biosynthesis of Epothilones: The Biosynthetic Origin of the Carbon Skeleton," Journal of Antibiotics, Vol. 53, No. 12 (diciembre de 2000), y Hofle y colaboradores,

10 "Epothilone A y B- Novel 16-Membered Macrolides: Isolation, Crystal Structure, y Conformation in Solution", Angew. Chem. Int. Ed. Engl., Vol. 35, No. 13/14, 1567-1569 (1996), las descripciones de las cuales se incorporan en la presente por referencia) o por síntesis total (ver, por ejemplo Vite y

15 colaboradores Patentes Norteamericanas Nos. 6,605,599; 6,242,469; 6,867,333 y Pub. de Patente Norteamericana No. 2006/004065, las descripciones de las cuales se incorporan en la presente por referencia en su totalidad). Por ejemplo un

20 compuesto de Fórmula XIV donde R_2 , R_3 , R_4 , R_5 , y R_{12} son metilo, hidroxilo, R_1 es hidroxilo, R_1 y R_6 son hidrógeno, y R_2 es 2-metilotiazol-4-ilo es referido como epotilona C y puede obtenerse de la fermentación de *Sorangium cellulosum* como se referenció antes. Un compuesto de Fórmula XIV puede

25 convertirse a un compuesto de Fórmula XV donde P es un grupo de protección de sililo tal como trietilsililo, t-

butildimetilosililo, t-butildifenilsililo, triisopropilsililo, y similares (ver, por ejemplo, Greene y colaboradores, "Protective groups in Organic Synthesis", John Wiley y Sons, Inc.). Por ejemplo, un compuesto de Fórmula XV donde P es

5 trietilsililo puede prepararse por tratamiento de un compuesto de Fórmula XIV con clorotrietilsilano en presencia de base tal como base de Hunig. En el caso donde B₁ es hidroxilo en el compuesto de Fórmula XIV, después B₁ también se convierte al sililéter correspondiente. Una halohidrina de Fórmula XVI o

10 XVII (Y es Cl, Br, o I) puede prepararse a partir del compuesto de Fórmula XV por tratamiento con un agente de halogenación tal como Y₂. Por ejemplo, la adición electrofílica en solventes polares tal como acetonitrilo que utiliza yodo puede estereoselectivamente proporcionar halohidrin

15 regioisoméricas de Fórmulas XVI y XVII, donde Y es yodo. Alternativamente las succinimidas de N-halo pueden también utilizarse para la misma transformación. Un compuesto de Fórmula XVIII puede prepararse a partir de compuestos de Fórmulas XVI y/o XVII por cierre del anillo de epóxido en presencia de bases tal como trietilamina o base

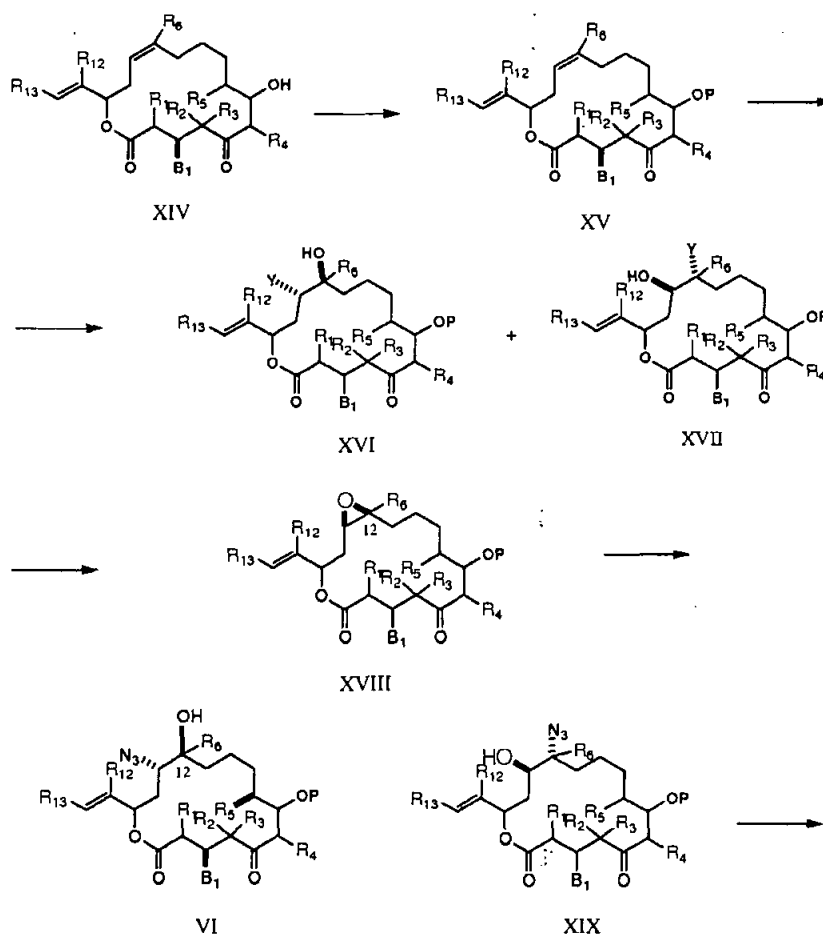
20 de Hunig en un sistema solvente polar/acuoso tal como acetonitrilo/agua. Si se desea, el compuesto XIV puede transformarse directamente en compuestos de Fórmula XVI y/o XVII (donde P es H), que podrá después convertirse en el epóxido XVIII (donde P es H). Un compuesto de Fórmula XVIII puede transformarse en azido-alcoholes de Fórmulas VI y XIX por

25 desplazamiento de azida en presencia de sales de azida inorgánicas o

azidas de amonio de tetra-alquilo en solventes alcohólicos. En el caso donde P es un grupo de protección de lsililo, los compuestos de Fórmulas XX y/o XXI donde OG es un grupo saliente tal como mesilato, tosilato, nosilato, triflato y similares puede prepararse a partir de los compuestos de Fórmulas VI y/o XIX por métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, el tratamiento de VI y/o XIX con cloruro de metansulfonilo y trietilamina en un solvente orgánico adecuado tal como diclorometano proporciona compuestos de Fórmulas XX y XXI donde OG es mesilato. Un compuesto de Fórmula VIII puede prepararse a partir de compuestos de Fórmulas XX y/o XXI por reducción del grupo azido a través de métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, el compuesto VIII puede prepararse a partir de compuestos de Fórmulas XX y/o XXI a través de la reacción con un agente de reducción tal como una organofosfina (por ejemplo, trimetilfosfina) en solventes polares tal como acetonitrilo. Alternativamente, cuando P es H, el compuesto de Fórmula VIII puede prepararse directamente a partir de compuestos de Fórmulas VI y/o XIX por reducción del grupo azido con un agente de reducción tal como una organofosfina (por ejemplo, trifenilfosfina) en solventes polares tal como acetonitrilo. Un compuesto de Fórmula IX puede prepararse a partir del compuesto de Fórmula VIII por métodos conocidos en la técnica (ver, Patente Norteamericana No. 6,800,653; y Regueiro-Ren y colaboradores, *Organic Letters*, 2001, 3, 2693-2696). Por ejemplo, el compuesto de Fórmula IX donde H-K-A- es 2-hidroxietilo puede prepararse a partir del compuesto de Fórmula VIII por alquilación del anillo de aziridina, por ejemplo, exceso de 2-bromoetanol y una base tal como carbonato de

potasio. En caso de que P sea un trialquilsililo, el compuesto de
 Fórmula X puede prepararse a partir del compuesto de Fórmula IX por
 eliminación de los grupos de protección de sililéter usando métodos
 conocidos en la técnica (ver, por ejemplo, Greene y colaboradores,
 5 "Protective groups in Organic Synthesis", John Wiley y Sons, Inc.). Por
 ejemplo, cuando P es trietilsililo, el tratamiento de un compuesto de
 Fórmula IX con ácido trifluoracético en diclorometano efectúa la
 desprotección para proporcionar un compuesto de Fórmula X.

ESQUEMA DE REACCION 4





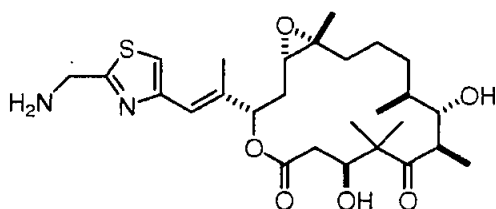
15

EJEMPLOS

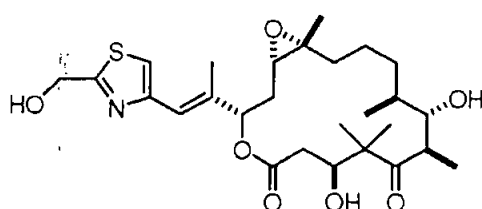
EJEMPLO 1: Análogos del epotilona conjugada de folato

20

25



Compuesto AA



Compuesto BB

El compuesto AA tiene actividad en los ensayos clínicos de Fase II, y seis conjugados de folato del Compuesto AA (Compuestos AA.I a AA.VI; ver **FIG. 1**) se preparó y opcionalmente probó para estabilidad química, unión de FR, y actividad mediada de FR en cultivo celular.

La unión de estos conjugados de folato del Compuesto AA a FR se determinó en un ensayo que mide el desplazamiento del ácido fólico radiomarcado de FR expresado en las células neoplásicas de KB crecidas a confluencia. Encontrando los conjugados de folato de los Compuestos AA.I y AA.II a FR se consideraron aceptables [afinidad relativa (RA) >0.25; RA del ácido fólico = 1.0]. Sin embargo, sorprendentemente, ningunos de los seis conjugados del Compuesto AA mostradas en la Fig. 1 exhibió citotoxicidad apreciable contra células neoplásicas de KB en ensayos de antiproliferación que miden la incorporación de timidina ³H- (datos no mostrados).

Puesto que los conjugados del Compuesto AA demostraron citotoxicidad decepcionante contra células neoplásicas, los estudios se condujeron usando tres conjugados del Compuesto BB (Compuestos BB.I a BB.III). El Compuesto BB

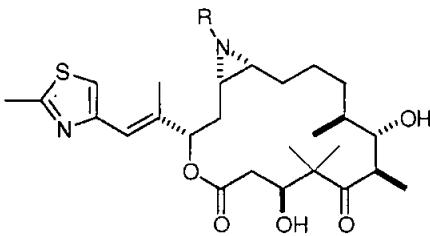
es también conocido como epotilona F, y es un análogo del Compuesto AA, donde el grupo 21-amino es sustituido por un grupo 21-hidroxilo. Mientras que el Compuesto BB.II (**Fig. 2**) exhibió citotoxicidad a concentraciones altas, la actividad no se atenuó en estudios de competición usando exceso de ácido fólico. Por lo tanto, la citotoxicidad observada se atribuyó a liberación no específica del Compuesto BB.II.

Otros análogos de epotilona, por ejemplo, epotilonas de aziridinilo, se conocen en la técnica (ver, por ejemplo, Patente Norteamericana No. 6,399,638; Regueiro-Ren, A, y colaboradores (2001) *Org. Letters.* 3:2693-96) y mostraron citotoxicidad antitumoral potente. Por ejemplo, un ensayo de MTS que comparó la potencia citotóxica relativa de un número de análogos de epotilona contra un par de líneas celulares de cáncer resistentes a taxano (HCTVM46 y A2790Tax) se condujeron (ver Tabla 1). HCTVM46 es una línea celular de carcinoma del clon humano derivada de la línea madre HCT116, y es resistente a taxanos debido a sobreexpresión del transportador de afluencia del fármaco de p-glioproteína 170kD. A2780Tax es una línea celular del carcinoma ovárico humano derivado de la línea A2780 madre, y es resistente a paclitaxel como resultado de una mutación en la secuencia del aminoácido de tubulina que deteriora la capacidad del paclitaxel a unión.

Como es muestra en la Tabla 1, varios análogos de epotilona de aziridinilo (Compuestos CC-EE) muestran actividad

antitumoral potente contra las líneas celulares del carcinoma de colon HCT116 y ovárico A2780 y, comparada con otros agente antitumorales conocidos, por ejemplo, paclitaxel, Compuesto AA, y epotilona B.

Tabla 1. Actividad *in vitro* de epotilonas de 12,13-aziridinilo



Compuesto	R	HCT116	Prop. ²	A2780 CI ₅	Prop. ²
		CI ₅₀ (nM) ¹	R/S	(nM) ¹	R/S
CC	-H	4.2±2.8	3.1	3.4±1.5	4.7
DD	-CH ₃	0.37±0.13	0.6	0.25±0.06	4.1
EE	-	0.40±0.25	0.8	0.22±0.12	4.7
	CH ₂ CH ₂ OCH ₃				
paclitaxel	--	3.3±1.0	1.50	3.1±1.0	22.1
AA	--	1.2±0.3	14.8	1.1±0.4	3
epotilona	--	0.40±0.13	0.5	0.23±0.09	2.5
B					

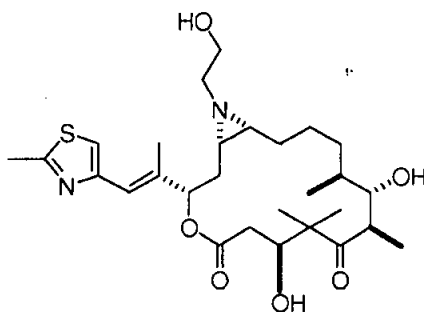
¹ CI₅₀ promedio ± SD calculado de cuatro experimentos separados.

² Proporción de R/S = HCT116 CI₅₀/HCT116VM46CI₅₀

³ Proporción de R/S = A2780CI₅₀/A2780Tax CI₅₀

A pesar de las actividades antitumorales de los compuestos CC-EE de epotilona de aziridinilo, los únicos grupos hidroxilo en estas moléculas disponibles para conjugación a folato son las encontradas en los átomos de carbono C3 y C7. Por lo tanto, investigando un número de compuestos y análogos de epotilona, sigue siendo un desafío a descubrir un compuesto que esté fácilmente disponible para la conjugación a folato, y que demuestre actividad vía la liberación específica de la porción de epotilona activa en las células neoplásicas.

El compuesto G de epotilona de aziridinilo se descubrió, que tiene la Fórmula,



Compuesto G

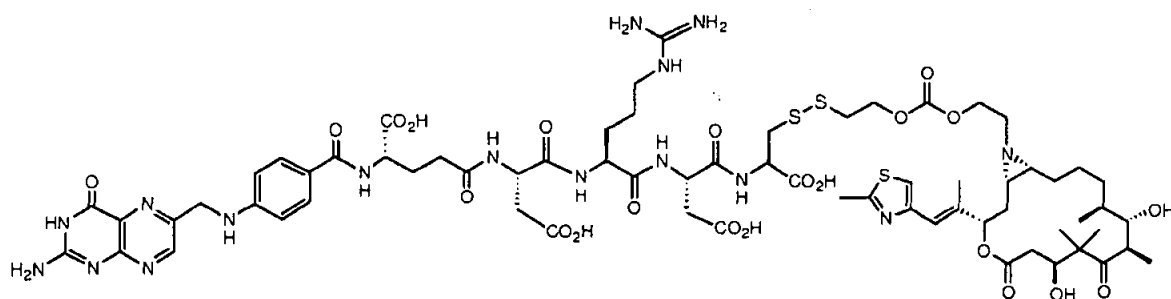
El Compuesto G (ver Ejemplos 2 y 3) probaron sorprendentemente fácil conjugar al ácido fólico para formar el Compuesto J (ver Ejemplo 2) con afinidad relativa de 0.77 para el receptor de folato, cuando se comparó un ácido fólico.

Inesperadamente, el grupo hidroxilo polar en la cadena lateral de aziridina no afectó adversamente la actividad antitumoral de los análogos de epotilona de

aziridina. Este es importante debido a que él es el análogo de epotilona de aziridina, por ejemplo, Compuesto G, que media los efectos antitumorales sobre la liberación del ácido fólico. La potencia del Compuesto G, y otros tres análogos de epotilona altamente potentes (ixabepilona, Compuesto AA, y Compuesto BB) se evaluó por el ensayo de formación de colonia que es describió antes. La concentración necesitó una eliminación del 90% de células cancerígenas clonogénicas KB (CI₉₀) se determinó después de una duración de exposición a fármaco de 17 horas. Como se muestra en la Fig. 3, el Compuesto G exhibió un CI₉₀ de 4.3 nM y fue ~2, 4, y 6-veces más potente que el Compuesto CC, Compuesto AA, e ixabepilona, respectivamente.

La conjugación del compuesto G para formar el Compuesto J no afectó la actividad antitumoral del Compuesto G. El Compuesto J demostrada actividad citotóxica sustancial contra células neoplásicas *in vivo*. En el modelo de tumor KB *in vivo* FR α (+), el Compuesto J demostró actividad de ambos en dosis tolerada máxima (MTD) y a dos niveles de dosis inferiores que produjeron toxicidad mínima (ver **Figs. 4A-4B**). En cambio, la ixabepilona fue activa solamente en su MTD (5 μ mol/kg). Cuando se comparó en los MTDs, el Compuesto J produjo efectos

antitumorales superiores que la ixabepilona (Figs. 4A-4B).



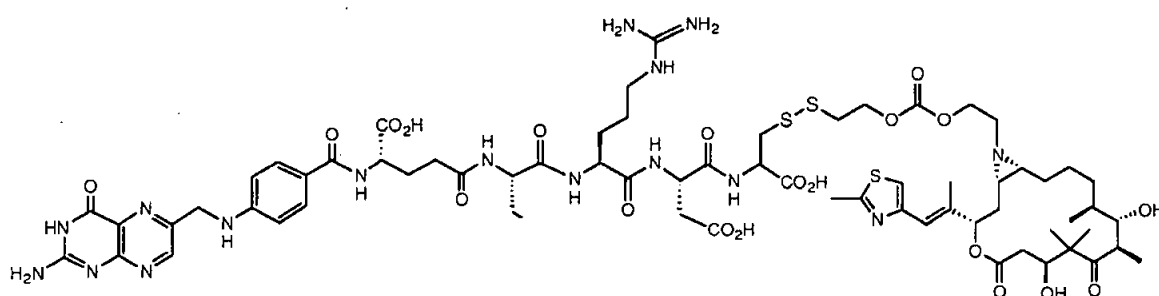
Compuesto J

En cambio, con el modelo de tumor madre FR α (-) M109J, el compuesto tiene actividad pobre en todos los niveles de dosis probados, incluyendo en su MTD (2.4 μ mol/kg), mientras que la ixabepilona fue activa en su MTD de 5 μ mol/kg. (Fig. 5). Estos resultados indican que el FR α (-) M109 es sensible a ixabepilona y la inactividad del Compuesto J es probablemente en gran parte una consecuencia de la ausencia de expresión de FR α por este tumor. Estos resultados también proporcionan evidencia que la actividad antitumoral del Compuesto J puede mediar a través de los receptores de FR α .

La evidencia adicional del mecanismo de liberación de fármaco mediado por FR α del Compuesto J es proporcionada por la observación que la co-administración de un análogo de folato a exceso de 20 veces de la dosis del Compuesto J podrá sustancialmente competir con el Compuesto J para el receptor de unión y protege los tumores FR α (+)98M109 contra los efectos

antitumorales del Compuesto J. (**Fig. 6**). Puesto que el Compuesto G y el conjugado (Compuesto J) tiene sorpresivamente efectos antitumorales ambos *in vitro* e *in vivo*, y puesto que las actividades antitumorales del Compuesto J pueden atribuirse a efectos mediados por $FR\alpha(+)$, también descrito en la presente está la conjugación de la epotilona de aziridinilo análoga al Compuesto G (ver Ejemplos 2 y 3) para formar el Compuesto J. (ver Ejemplo 2).

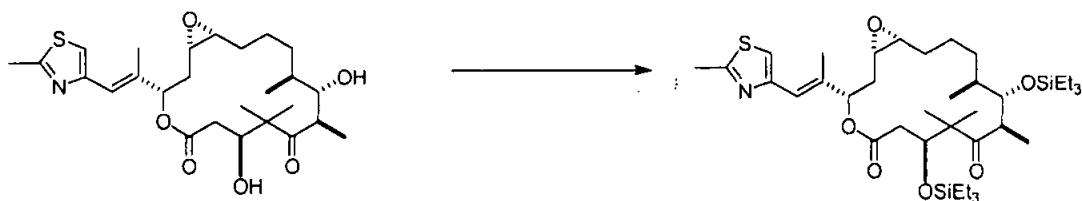
EJEMPLO 2: PREPARACION DEL COMPUESTO J



Ácido (S)-2-(4-((2-amino-4-oxo-3,4-dihidropteridin-6-il)metilamino)benzamido)-5-((S)-3-carboxi-1-((S)-1-((S)-3-carboxi-1-((R)-1-carboxi-2-(2-(2-((2-((1S,3S,7S,10R,11S,12S,16R)-7,11-dihidroxi-8,8,10,12-tetrametil-3-((E)-1-(2-metiltiazol-4-il)prop-1-en-2-il)-5,9-dioxo-4-oxa-17-aza-biciclo[14.1.0]heptadecan-17-il)etoxi)carboniloxi)etil)disulfanil)etilamino)-1-oxopropan-2-ilamino)-5-guanidino-1-oxopentan-2-ilamino)-1-oxopropan-2-ilamino)-5-oxopentanoico

A. [1S-[1R*,3R*(E),7R*,10S*,11R*,12R*,16S*]]-8,8,10,12-Tetrametil-3-[1-metil-2-(2-metil-4-tiazolil)etenil]-7,11-bis[(trietilsili)oxi]-4,17-dioxabicciclo[14.1.0]heptadecan-5,9-diona

5



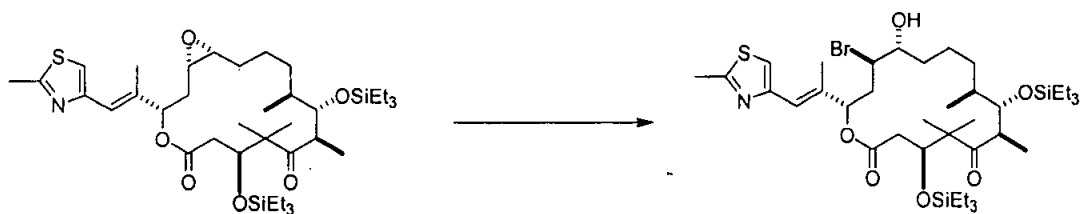
A una solución agitada de epotilona A (5.0 g, 10.1 mmol), imidazol (3.40 g, 49.9 mmol) y DIPEA (28.5 ml, 163.6 mmol) en DMF anhidro (100 ml) bajo atmósfera N₂ se agregó cloruro de trietilsililo (15.0 ml, 89.4 mmol). Después la adición se completó, la solución de reacción se calentó a 55°C (temperatura en baño de aceite) durante 12 hr para dar una
15 mancha sencilla (tlc) del producto deseado.

La reacción anterior se repitió dos veces más. El DMF de la solución combinada se destiló bajo alto vacío. El residuo espumoso se purificó por cromatografía de columna (gel de sílice, E. Merck, malla 230-400, 600 g; 5: 95, 10:90 y
20 15:85 EtOAc/hexanos) para dar 19.4 g (88.6%) del compuesto A como un sólido blanco.

HPLC: ES Industries FluoroSep RP fenilo, 4.6 x 250mm, isocrático, 30 min, 100%B, (B = 90% de MeOH/H₂O + 0.2% de H₃PO₄), relación de flujo a 1.0 ml/min, UV 254, t = 23.15
25 min. LC/MS (ES+) 722 (M+H).

B. Preparación de [4S-[4R*,7S*,8R*,9R*,13S*,14S*,16R*(E)]]-14-bromo-13-hidroxi-5,5,7,9-tetrametil-16-[1-metil-2-(2-metil-4-tiazolil)etenil]-4,8-bis[(trietilsilil)oxi]-1-oxaciclohexadecan-2,6-diona

5



A una solución agitada de [1S-

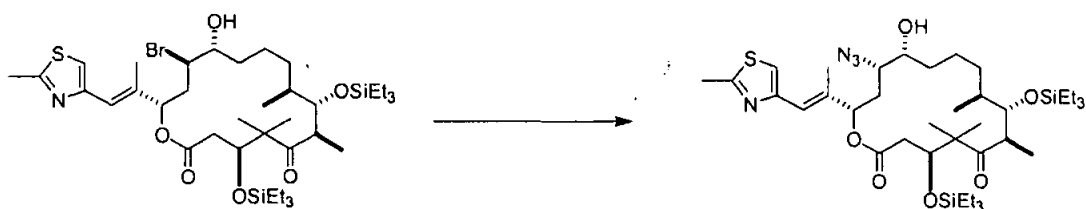
10 [1R*,3R*(E),7R*,10S*,11R*,12R*,16S*]]-8,8,10,12-Tetrametil-3-[1-metil-2-(2-metil-4-tiazolil)etenil]-7,11-bis[(trietilsili)oxi]-4,17-dioxabicciclo[14.1.0]heptadecan-5,9-diona (5.0 g, 6.92 mmol) en diclorometano anhidro (140 ml) a -20°C bajo atmósfera de N₂ se agregó MgBr₂-Et₂O (3 x 2.13 g, 24.78 mmol) en tres porciones cada dos horas mientras mantiene una temperatura interna debajo de -5°C. Después de alrededor de 7 hr, la mezcla de reacción se diluyó con diclorometano y se lava con NaHCO₃ saturado (2 x), se seca sobre Na₂SO₄ anhidro y se evapora en vacío para dar una espuma. El residuo se

20 purificó por cromatografía de columna (gel de sílice, E. Merck, malla 230-400, 180 g; 5: 95, 7.5:92.5 y 12.5:87.5 EtOAc/hexanos) para dar el compuesto B (2.5 g, 45% de rendimiento) como una espuma blanca junto con el material de partida recuperado (0.9 g, 18%).

25 HPLC: ES Industries FluoroSep RP fenilo, 4.6 x 250

mm, isocrático, 30 min, 100%B, (B = 90% de MeOH/H₂O + 0.2% de H₃PO₄), relación de flujo a 1.0 ml/min, UV 254, t_r = 14.37 min. (100% puro) LC/MS (ES⁺): 802 (M+H)

C. Preparación de [4S-[4R*,7S*,8R*,9R*,13S*,14R*,16R*(E)]]-14-Azido-13-hidroxi-5,5,7,9-tetrametil-16-[1-metil-2-(2-metil-4-tiazolil)etenil]-4,8-bis[(triethylsilil)oxi]-1-oxaciclohexadecan-2,6-diona



A una solución de [4S-

[4R*,7S*,8R*,9R*,13S*,14S*,16R*(E)]]-14-bromo-13-hidroxi-

5,5,7,9-tetrametil-16-[1-metil-2-(2-metil-4-tiazolil)etenil]-

4,8-bis[(triethylsilil)oxi]-1-oxaciclohexadecan-2,6-diona (9.9 g, 12.3 mmol) en 1.2 L de DMF se agregaron azida de sodio

(8.01 g, 123.3 mmol) y 18-corona-6 (3.26 g, 12.3 mmol) a

temperatura ambiente bajo atmósfera de N₂. La solución transparente se agitó mecánicamente a temperatura ambiente

durante 7 días. La solución se diluyó con EtOAc (4 l), y se

lava con H₂O (6 x 3 l). La capa orgánica se secó (Na₂SO₄), y

luego se evapora para dar 9.2 g del producto crudo. La

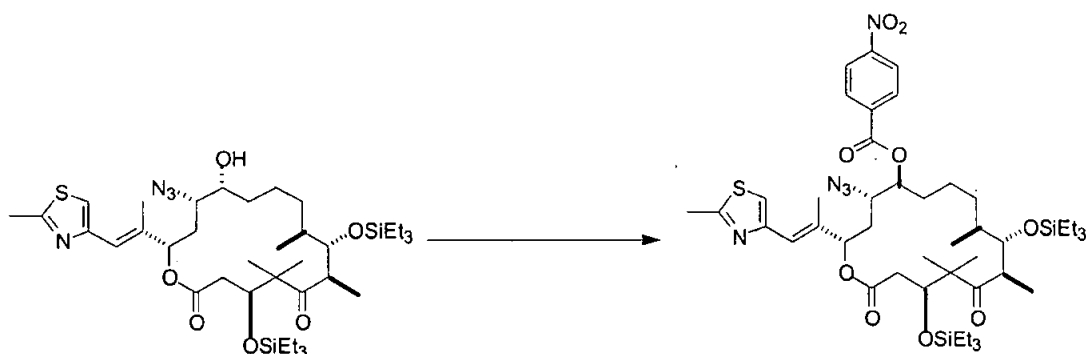
cromatografía de columna (gel de sílice 450 g, 5-15%

EtOAc/hexano) proporciona 6.7 g (71% de rendimiento) del

compuesto C como una espuma blanca.

HPLC: YMC ODS-A S5, 4.6 x 50mm, isocrático, 30 min, 100%B. (B = 90% de MeOH/H₂O + 0.2% de H₃PO₄), relación de flujo a 4.0 ml/min, UV 254 nm, t = 2.00 min. LC/MS (ES+) 765 (M+H).

D. Preparación de [4S-[4R*,7S*,8R*,9R*,13R*,14R*,16R*(E)]]-14-Azido-5,5,7,9-tetrametil-16-[1-metil-2-(2-metil-4-tiazolil)etenil]-13-[(4-nitrobenzoil)oxi]-4,8-bis[(triethylsilyl)oxi]-1-oxaciclohexadecan-2,6-diona



La [4S-[4R*,7S*,8R*,9R*,13S*,14R*,16R*(E)]]-14-

15 Azido-13-hidroxi-5,5,7,9-tetrametil-16-[1-metil-2-(2-metil-4-tiazolil)etenil]-4,8-bis[(triethylsilyl)oxi]-1-oxaciclohexadecan-2,6-diona (7.0g, 9.15 mmol), ácido 4-nitrobenzoico (3.82g, 22.9 mmol), y trifenilfosfina (6.0g, 22.9 mmol) se disolvieron en THF (100 ml). El
20 dietilazodicarboxilato (9.0 ml de 40% de solución en tolueno, 22.9 mmol) se agregaron durante un periodo de 5 minutos. La mezcla de reacción se mantuvo a temperatura ambiente durante 4 hr, se concentra y se purifica por cromatografía en gel de sílice (gradiente en etapas desde 5% de etilacetato/hexanos
25 hasta 15% de etilacetato/hexanos) para aislar el éster

nitrobenzoato como una espuma blanca (7.3g, 87%).

LC-MS: Phenomenex C18, 4.6 x 50mm, isocrático, 15 min, 100%B. (B = 90% de MeOH/H₂O + 0.1% de TFA), relación de flujo a 4.0 ml/min, UV 220 nm. Tiempo de retención = 8.9 min.

5 EM (ESI) M+H = 886.7

E. Preparación de [4S-[4R*,7S*,8R*,9R*,13R*,14R*,16R*(E)]]-14-Azido-13-hidroxi-5,5,7,9-tetrametil-16-[1-metil-2-(2-metil-4-tiazolil)etenil]-4,8-bis[(triethylsilyl)oxi]-1-oxaciclohexadecan-2,6-diona

10



15

El éster de nitrobenzoato, el compuesto D (7.3g, 7.98 mmol), se disolvió en acetato de etilo (35 ml) y se enfría hasta 0°C. El amoníaco en metanol (350 ml de 2M de solución en metanol) se agregó, y la mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 4 hr, se concentra y purifica por cromatografía en gel de sílice (gradiente en etapas desde 10% de etilacetato/hexanos hasta 30% de etilacetato/hexanos) para aislar [4S-[4R*,7S*,8R*,9R*,13R*,14R*,16R*(E)]]-14-Azido-13-hidroxi-5,5,7,9-tetrametil-16-[1-metil-2-(2-metil-4-tiazolil)etenil]-

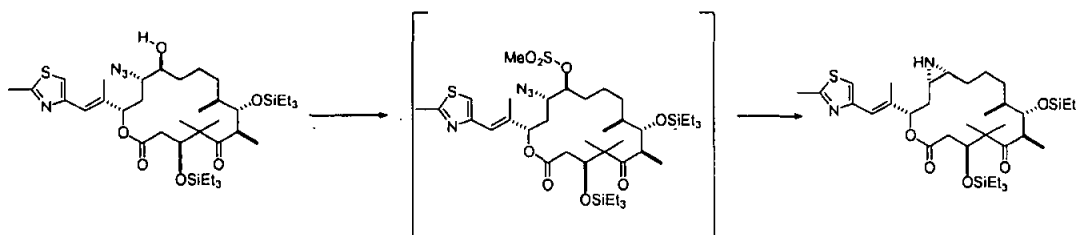
20

25

4,8-bis[(triethylsilyl)oxi]-1-oxaciclohexadecan-2,6-diona como un sólido blanco vidrioso (5.97g, 98%).

LC-MS: Phenomenex C18, 4.6 x 50mm, isocrático, 5 min, 100%B. (B = 90% MeOH/H₂O + 0.1% TFA), relación de flujo a 4.0 ml/min, UV 220 nm. Tiempo de retención = 2.25 min. EM (ESI) M+H = 765.66

F. Preparación de [1S-[1R*,3R*(E),7R*,10S*,11R*,12R*,16S*]]-8,8,10,12-Tetrametil-3-[1-metil-2-(2-metil-4-tiazolil)etenil]-7,11-bis[(triethylsilyl)oxi]-4-oxa-17-azabicyclo[14.1.0]heptadecan-5,9-diona



15

[4S-[4R*,7S*,8R*,9R*,13R*,14R*,16R*(E)]]-14-Azido-13-hidroxi-5,5,7,9-tetrametil-16-[1-metil-2-(2-metil-4-tiazolil)etenil]-4,8-bis[(triethylsilyl)oxi]-1-oxaciclohexadecan-2,6-diona (5.97g, 7.8 mmol) y trietilamina (4.34 ml, 31.2 mmol) se disolvieron en diclorometano (85 ml) y se enfría hasta 0°C. El metansulfonilcloruro (1.8 ml, 23.4 mmol) se agregó gota a gota durante un periodo de 5 min. Después 10 min, la mezcla de reacción se removi6 del ba6o de hielo, y se agita a temperatura ambiente. Después de 3 hr, la mezcla de reacción se tom6 en NaHCO₃ saturado (300 ml), se

25

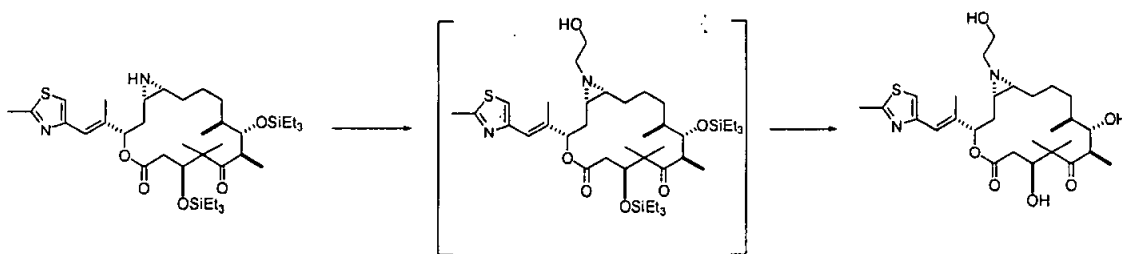
extrae con diclorometano (3 X 100 ml), se seca sobre Na_2SO_4 , se concentra y se toma para la siguiente etapa sin purificación adicional.

El éster de metansulfonato crudo se disolvió en THF/ H_2O (12:1, 130 ml). La trietilamina (2.2 ml, 16 mmol) y trimetilfosfina (16 mmol, 16 ml de 1.0 M de solución en THF) se agregaron, y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente. Después de 3 hr, la reacción se calentó a 45°C durante 7 hr, se concentra y se purifica por cromatografía en gel de sílice (gradiente en etapas desde 2% de metanol/cloroformo hasta 5% de metanol/cloroformo) para aislar el compuesto F como un sólido blanco (5.08g, 88% durante dos etapas).

LC-MS: Phenomenex C18, 4.6 x 50mm, isocrático, 5 min, 100%B. (B = 90% de $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ + 0.1% de TFA), relación de flujo a 4.0 ml/min, UV 220 nm. Tiempo de retención = 0.298 min. EM (ESI) $\text{M}+\text{H} = 721.58$

G. Preparación de [1S-[1R*,3R*(E),7R*,10S*,11R*,12R*,16S*]]-7,11-Dihidroxí-17-[2-hidroxietil]-8,8,10,12-tetrametil-3-[1-metil-2-(2-metil-4-tiazolil)etenil]-4-oxa-17-azabicclo[14.1.0]heptadecan-5,9-diona

20



25 7.3

El K_2CO_3 (1.4g, 10.2 mmol) y 2-bromoetanol (0.52 ml, mmol) se agregaron a [1S-

[1R*,3R*(E),7R*,10S*,11R*,12R*,16S*]]-8,8,10,12-Tetrametil-3-[1-metil-2-(2-metil-4-tiazolil)etenil]-7,11-

bis[(triethylsilyl)oxi]-4-oxa-17-azabicyclo[14.1.0]heptadecan-

5,9-diona (1.05g, 1.46 mmol) en acetonitrilo (20 ml) y se

5 calienta hasta 82°C. Después de 4 hr, 2-bromoetanol adicional (0.52 ml, 7.3 mmol) y K₂CO₃ (1.4g, 10.2 mmol) se agregaron.

Después de 5 hr, 2-bromoetanol adicional (0.21 ml, 2.92 mmol)

se agregó. Después de 3 hr, la mezcla de reacción se enfrió hasta temperatura ambiente, se filtra a través de Celite, se

10 lava con acetonitrilo (5 X 5 ml), diclorometano (2 X 5 ml), se concentra y se toma para la siguiente etapa sin purificación adicional.

El producto de reacción crudo se disolvió en diclorometano (40 ml), se enfrió hasta 0°C, y ácido

15 trifluoroacético (8.0 ml) se agregó. Después de 1 hr, la mezcla de reacción se concentró, se toma en NaHCO₃ saturado

(200 ml), se extrae con diclorometano (3 X 100 ml), se seca sobre Na₂SO₄, se concentra, y purifica por cromatografía en

gel de sílice (10% metanol/diclorometano) para aislar [1S-

20 [1R*,3R*(E),7R*,10S*,11R*,12R*,16S*]]-7,11-Dihidroxi-17-[2-

hidroxietil]-8,8,10,12-tetrametil-3-[1-metil-2-(2-metil-4-

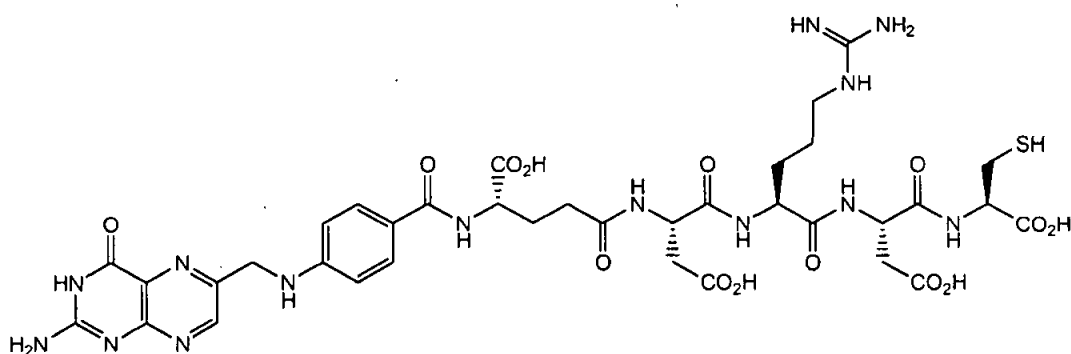
tiazolil)etenil]-4-oxa-17-azabicyclo[14.1.0]heptadecan-5,9-

diona, como una película transparente (0.62g, 79% durante dos etapas).

25 LC-MS: Waters Sunfire C18, 4.6 x 50mm, gradiente, 0

hasta 100%B durante 4 min. (A= 10% de MeOH/H₂O + 0.1% de TFA; B = 90% de MeOH/H₂O + 0.1% de TFA), relación de flujo a 4.0 ml/min, UV 220 nm. Tiempo de retención = 2.12 min. EM (ESI) M+H = 537.52.

- 5 H. Preparación de ácido (S)-2-(4-((2-amino-4-oxo-3,4-dihidropteridin-6-il)metilamino)benzamido)-5-((S)-3-carboxi-1-((S)-1-((S)-3-carboxi-1-((S)-1-carboxi-2-mercaptoetilamino)-1-oxopropan-2-ilamino)-5-guanidino-1-oxopentan-2-ilamino)-1-oxopropan-2-ilamino)-5-oxopentanoico



El ácido (S)-2-(4-((2-amino-4-oxo-3,4-

dihidropteridin-6-il)metilamino)benzamido)-5-((S)-3-carboxi-1-((S)-1-((S)-3-carboxi-1-((S)-1-carboxi-2-mercaptoetilamino)-1-oxopropan-2-ilamino)-5-guanidino-

20 1-oxopentan-2-ilamino)-1-oxopropan-2-ilamino)-5-

oxopentanoico se sintetizó por síntesis de péptido de fase sólida en cinco etapas iniciando a partir de H-Cys(4-metoxitritil)-2-clorotritil-resina. La tabla 2 muestra la cantidad de reactivos usados en la

25 síntesis.

TABLA 2

000202

	mmol	Equiv.	MW	cantidad
H-Cys(4-metoxitritil)-2-clorotritil-Resina (cargado 0.57mmol/g)	1.14			2.0g
Fmoc-Asp(OtBu)-OH (disuelto en 15mL DMF)	1.14	2	411.5	0.938g
Fmoc-Arg(Pbf)-OH (15mL DMF)	1.14	2	648	1.477g
Fmoc-Asp(OtBu)-OH (disuelto en 15mL DMF)	1.14	2	411.5	0.938g
Fmoc-Glu-OtBu (15mL DMF)	1.14	2	425.5	0.970g
Acido pterico N ¹⁰ TFA (disuelto en 15mL DMSO)	1.14	1.25	408	0.581g
DIPEA	1.14	4	174	0.793
PyBOP	1.14	2	520	1.185g

Los siguientes procedimientos se usaron:

Etapas de acoplamiento:

15 A la resina en un recipiente de síntesis de péptido se agregaron a la solución de aminoácido, DIPEA, y PyBOP. La mezcla se burbujeó durante 1hr y se lava 3X con DMF y alcohol isopropílico. La desprotección FMOC se efectuó por el tratamiento con 20% de piperidina en DMF, 2X (10min), antes de
20 cada acoplamiento de aminoácido. Esta secuencia se repitió para cada esta de acoplamiento de aminoácido.

Síntesis de ácido pteróico protegido por N¹⁰-TFA:

A 10 L de 0.1 M de solución base tris (121.1 g base tris en 10 L de agua) en un matraz de fondo redondo agitado
25 mecánicamente de 22 L, equipado con una manta caliente, se

agregó 200 g (0.453 moles) de ácido fólico. La mezcla se agitó para disolver el ácido fólico, y luego 500 mg (3.67 mmol) cloruro de zinc se agregó. La carboxipeptidasa G (13 x 20 viales de unidad disponibles de Sigma) se agregó y el pH se
5 ajustó hasta 7.3 con HCl 1N y se mantiene a lo largo de la reacción. La mezcla se protegió de la luz y se calienta a 30°C durante 8-10 días (el uso de un auto-titulador para mantener el pH constante reducido por el tiempo de conversión por 4-5 días). La reacción se monitoreó por HPLC analítica hasta 80%
10 de la conversión se alcanzó (la conversión adicional es deseable pero no se ha optimizado). El producto se precipitó de la mezcla de reacción al ajustar la solución hasta pH=3.0 usando HCl 6N. La mezcla espesa se transfirió a un vial centrífugo y se centrifuga a 4000 rpm durante 10 min. El
15 sobrenadante se decantó. El sólido húmedo luego se purificó directamente como sigue (el sólido húmedo puede congelarse para almacenaje o primero secado por congelación; sin embargo, el almacenaje de los sólidos húmedos en el congelador hasta que la disolución fue más eficiente). A 40 g del ácido
20 pteróico crudo en 700 ml de agua se agregó 1.0 M NaOH hasta que el pH=11.5. La mezcla se filtró (Whatman tipo 1) y luego se cromatografía (columna: 10 x 120 cm; fase estacionaria: 8 kg celulosa DEAE; fase móvil: 1.0 M NaCl/0.01 M NaOH, pH=11.5; relación de flujo: 17 ml/min). Las fracciones de color
25 amarillas de 1 litro se recolectaron y se analizan por HPLC.

El ácido pteróico puro que contiene fracciones se ajustó hasta pH=3 con 6 M HCl hasta ácido pteróico precipitado. La mezcla se centrifugó a 3000 rpm durante 20 min. El sobrenadante se decantó y se lava con agua (3x). El sólido se secó por congelación durante al menos 72 hr. El impacto de agua residual en la siguiente reacción no se conoce.

El ácido pteróico se secó además sobre P_2O_5 bajo alto vacío durante 24 hr (se nota que los resultados similares en la etapa de protección se obtuvieron sin esta etapa de secado adicional). Después, 100g (0.32 mol) de ácido pteróico se agregó a un matraz de fondo redondo de 5 L, equipado con un agitador mecánico y una entrada de argón, y se almacena bajo alto vacío durante la noche. El gas de argón se agregó seguido por 3500 g (2316 ml) de anhídrido trifluoroacético. El matraz se selló con un tapón de goma o adaptador de entrada de argón, y luego se agita vigorosamente. El matraz se protegió de la luz y se agita a temperatura ambiente bajo atmósfera de argón durante 7 días (la reacción se monitoreó por HPLC de alícuotas diluidas 20x cada una con agua y DMSO). La mezcla se evaporó rotatoriamente hasta secado y se trata con 2.5 L de 3% de ácido trifluoroacético en agua. La mezcla se agitó durante la noche a temperatura ambiente hasta subproductos anhídridos hidrolizados. La evaporación rotatoria da un sólido seco. El sólido se suspendió en 2 L de agua y luego se centrifuga en botellas centrífugas de 250-mL a 3000 rpm durante 20 min. El

sobrenadante se removió y el sólido se lavó con agua y se centrifuga (4 veces). El sólido se secó por congelación durante 3 días, se transfiere a botellas ámbar, y se seca bajo alto vacío en presencia de P_2O_5 durante 2 días (Pureza $\geq 95\%$; 5 evaluación TFA residual por análisis elemental).

Etapas de desdoblamiento:

El intermediario protegido se liberó de la resina usando el reactivo desdoblado preparado de 92.5% (50 ml) TFA, 2.5% (1.34 ml) H_2O , 2.5% (1.34 ml) Triisopropilsilano, y 2.5% 10 (1.34 ml) etanditiol. El reactivo desdoblado se agregó al recipiente de reacción (25 ml). El argón se burbujeó a través de la mezcla durante 1.5 hr. El líquido se drenó del recipiente, y la resina se lavó con el reactivo restante (3 X 8 ml). Los volátiles se concentraron por evaporación rotatoria 15 hasta un volumen de 10 ml. El dietiléter (35.0 ml) se agregó para efectuar la precipitación. El sólido se recolectó por centrifugación y se seca para dar 1.25 g del producto desdoblado.

20 Etapas de desprotección:

El grupo protector N^{10} -trifluoroacetilo en la porción de ácido pteróico se removió bajo condiciones básicas. Iniciando con 250mg del intermediario protegido en 10mL de agua, el pH se ajustó hasta 9.3 y se mantiene durante 1hr 25 usando 4:1 H_2O :hidróxido de amonio (1-2 ml). Después de 1hr,

el pH se ajustó hasta 5 con HCl 1N (~1 ml) y el producto se purificó en HPLC preparativa para proporcionar 125 mg del compuesto H.

5 Condiciones de purificación HPLC:

Columna: Waters NovaPak C₁₈ 300x19mm

Solvente A: solución amortiguadora de acetato de amonio 10 mM, pH=5

Solvente B: Acetonitrilo

10 Elución: 1%B hasta 20%B en 40min a 15 ml/min

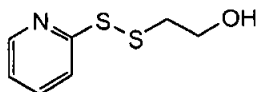
Rendimiento total de las reacciones combinadas:

625 mg

I. Preparación de carbonato de 2-
((1S,3S,7S,10R,11S,12S,16R)-7,11-dihidroxi-8,8,10,12-
15 tetrametil-3-((E)-1-(2-metiltiazol-4-il)prop-1-en-2-il)-5,9-
dioxo-4-oxa-17-aza-biciclo[14.1.0]heptadecan-17-il)etil 2-(2-
(piridin-2-il)disulfanil)etilo

1. Preparación de 2-(2-(Piridin-2-il)disulfanil)etanol

20



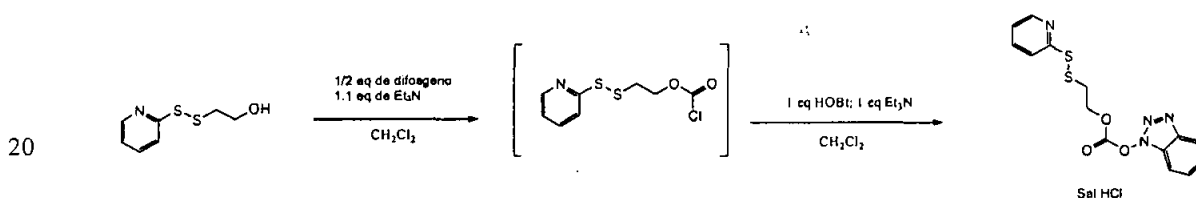
A una solución de cloruro de metoxycarbonil sulfenilo (10 ml, 110 mmol), en diclorometano (100 ml), se enfrió hasta 0°C, se agregó mercaptoetanol (7.6 ml, 110 mmol),
25 gota a gota. La mezcla de reacción se permitió agitar hasta

0°C durante 30 min. En este punto, una solución de 2-mercaptopiridina (12.2 g, 110 mmol) en diclorometano (160 ml) se agregó. La solución se permitió reaccionar a 0°C durante 1 hr y luego se permitió calentar hasta temperatura ambiente durante otra 1 hr. El producto sólido se observó que abandonó la solución. La CCD (1:1 Pet éter/EtOAc) muestra que el producto importante se ha formado. La mezcla de reacción se concentró hasta un volumen de 125 ml. La mezcla se filtró a través de un embudo Buchner. La torta filtro se lavó con diclorometano y luego se seca bajo vacío durante la noche para proporcionar 2-(2-(Piridin-2-il)disulfanil)etanol (23.6 g), como la sal HCl.

TLC: $R_f = 0.45$

Placas - EMD Gel de sílice 60 F₂₅₄, 5 X 10 cm, 250 µm

2. Preparación de carbonato de Benzo[d][1,2,3]triazol-1-il 2-(2-(piridin-2-il)disulfanil)etilo



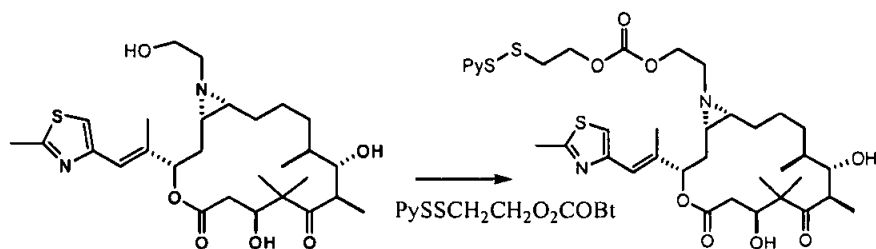
Una solución de difósgeno (2.28 g, 11.5 mmol) en 15 ml de diclorometano anhidro se agitó bajo argón en un matraz de fondo redondo y se enfría por un baño de hielo/sal. Un embudo de adición con una mezcla de 2-(piridin-2-

ildisulfanil)etanol (5.01 g, 22.4 mmol) y trietilamina (2.25 g, 22.2 mmol) en 65 ml de diclorometano anhidro se colocó en el matraz de fondo redondo. La mezcla se agregó gota a gota durante un periodo de 20 min. La mezcla de reacción se
5 permitió calentar hasta temperatura ambiente y se agita durante 1 hr adicional. El análisis CCD de la mezcla de reacción muestra que el material de partida se consumió y se formó de un producto de cloroformiato polar inferior "rayado", CCD (6:4 EtOAc:Hexanos): R_F
10 de material de partida 0.4; R_F del producto de cloroformiato: 0.8.

La mezcla de reacción se agitó en un matraz de fondo redondo bajo argón y se enfría por un baño de hielo/sal. Una mezcla de 3.02 g, 22.4 mmol HOBt y 2.23
15 g, 22.0 mmol de trietilamina en 10 ml de diclorometano anhidro se agregó a un embudo de gotas fijado al matraz de fondo redondo. La mezcla se agregó lentamente al matraz de fondo redondo manteniendo la temperatura de reacción a 2°C. La mezcla de reacción
20 se permitió calentar hasta temperatura ambiente y se agita durante la noche. Aproximadamente 27 ml de diclorometano luego se destiló de la mezcla de reacción a presión atmosférica. La mezcla luego se permitió enfriar hasta temperatura ambiente y se agita
25 durante 2 hr. Los sólidos se recolectaron por

filtración, y la torta filtro se lavó con 20 ml de diclorometano. Los sólidos luego se sacaron bajo vacío a 40°C en un evaporador rotatorio para proporcionar 7.81 g de sólidos blanco opaco. Este producto se analizó
5 por ^1H -RMN y se determina para ser el producto deseado.

3. Preparación de carbonato de 2-
((1S,3S,7S,10R,11S,12S,16R)-7,11-dihidroxi-8,8,10,12-tetrametil-3-((E)-1-(2-metiltiazol-4-il)prop-1-en-2-il)-5,9-dioxo-4-oxa-17-aza-biciclo[14.1.0]heptadecan-17-il)etil 2-(2-
10 (piridin-2-il)disulfanil)etilo



15

A una solución de [1S-[1R*,3R*(E),7R*,10S*,11R*,12R*,16S*]]-7,11-Dihidroxi-17-[2-hidroxietil]-8,8,10,12-tetrametil-3-[1-metil-2-(2-metil-4-tiazolil)etenil]-4-oxa-17-
20 azabicyclo[14.1.0]heptadecan-5,9-diona en diclorometano anhidro a 0°C se agregó DMAP (1.2 eq.) y carbonato de benzo[d][1,2,3]triazol-1-il 2-(2-(piridin-2-il)disulfanil)etilo (1.0 eq.) en tándem. La mezcla de reacción se agitó a 0°C bajo argón y se
25 monitorea por CCD cada 10 min. El DMAP adicional (1.2

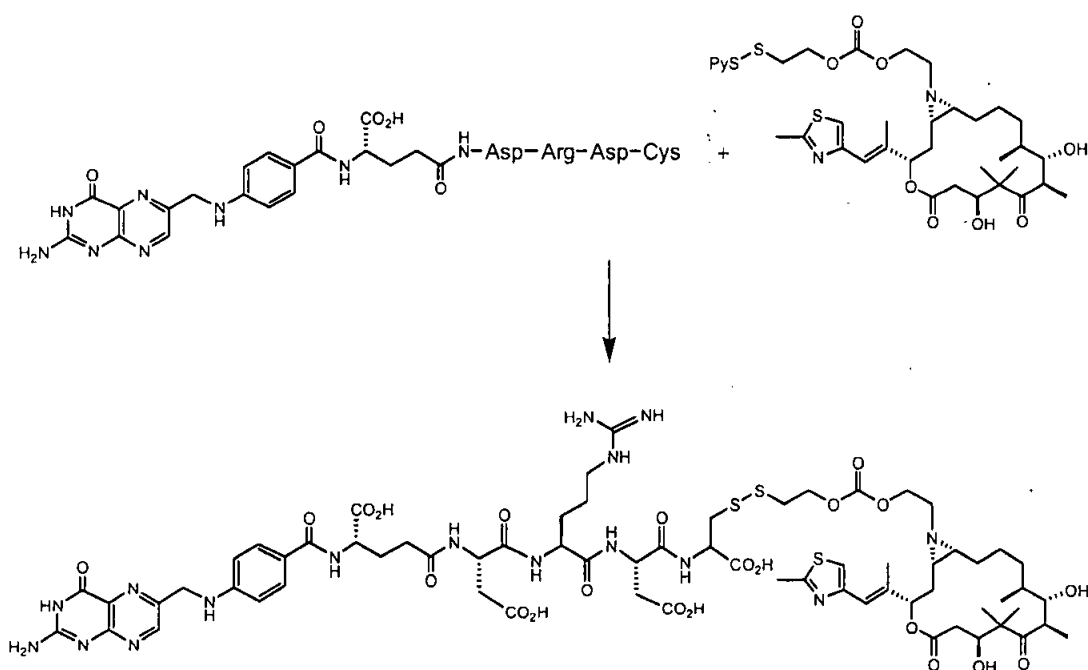
000210

eq.) y el compuesto I (2) (1.0 eq.) se agregaron como es necesario hasta que todo el compuesto G se consumió. La reacción se apagó con MeOH (1 ml) a 0°C, el solvente se removi6 bajo vació, y el residuo se
5 purific6 por cromatografía (gel de sílice, 2.5-5% MeOH en DCM) para proporcionar el compuesto del título como un sólido beige. Las cantidades del compuesto y las recuperaciones se enlistan en la Tabla 3 a continuación. Rendimiento total de 2.95 g del
10 compuesto G fue 2.80 g (67.9%) del compuesto I.

	Compuesto G (mg)	Compuesto I (2) (mg)	DMAP (mg)	DCM (ml)	Compuesto I (mg) *
Lote #1	303	197 x 3	82.8 x 3	8.0	204
Lote #2	952	683 x 3	260 x 3	22.0	984
Lote #3	921	661 x 3	251 x 3	22.0	761
Lote #4	775	556 x 3	211 x 3	18.0	851

* Cada purificación cromatográfica típicamente
20 da un producto puro junto con algún producto impuro (80-90% de pureza). El producto impuro se combinó con el producto crudo del siguiente baño para purificación cromatográfica. Para los baños # 2 y 4, dos purificaciones cromatográficas se llevaron a cabo.

J. Preparación de ácido (S)-2-(4-((2-amino-4-oxo-3,4-dihidropteridin-6-il)metilamino)benzamido)-5-((S)-3-carboxi-1-((S)-1-((S)-3-carboxi-1-((R)-1-carboxi-2-(2-(2-((2-((1S,3S,7S,10R,11S,12S,16R)-7,11-dihidroxi-8,8,10,12-tetrametil-3-((E)-1-(2-metiltiazol-4-il)prop-1-en-2-il)-5,9-dioxo-4-oxa-17-aza-biciclo[14.1.0]heptadecan-17-il)etoxi)carboniloxi)etil)disulfanil)etilamino)-1-oxopropan-2-ilamino)-5-guanidino-1-oxopentan-2-ilamino)-1-oxopropan-2-ilamino)-5-oxopentanoico



A 15 ml de H₂O (burbujeada con argón durante 10 min antes de usarse) se agregó ácido (S)-2-(4-((2-amino-4-oxo-3,4-dihidropteridin-6-il)metilamino)benzamido)-5-((S)-3-carboxi-1-((S)-1-((S)-3-carboxi-1-((S)-1-carboxi-2-mercaptoetilamino)-1-oxopropan-2-ilamino)-5-guanidino-1-oxopentan-2-ilamino)-1-

oxopropan-2-ilamino)-5-oxopentanoico (498 mg, 0.534 mmol) en un tubo centrífugo pequeño de 50 ml. A esta suspensión, mientras se burbujea con argón, se agregó gota a gota solución de NaHCO₃ saturado (burbujeado con argón durante 10 min antes de usarse) hasta que el pH de la solución resultante alcanza 6.9. El carbonato de 2-((1S,3S,7S,10R,11S,12S,16R)-7,11-dihidroxi-8,8,10,12-tetrametil-3-((E)-1-(2-metiltiazol-4-il)prop-1-en-2-il)-5,9-dioxo-4-oxa-17-aza-biciclo[14.1.0]heptadecan-17-il)etil 2-(2-(piridin-2-il)disulfanil)etilo (400 mg, 0.534 mmol) en THF se agregó rápidamente y la solución homogénea resultante se agitó bajo argón durante 30 min. El progreso de la reacción se verificó por HPLC analítica en 15 min. El pico del producto comienza a ~6.4 min bajo condiciones HPLC analíticas. La mezcla se diluyó con ~15 ml de solución amortiguadora de fosfato y el THF se removió bajo vacío. La solución turbia se centrifugó y se filtró. El filtrado amarillo se dividió en dos porciones y se purifica por HPLC preparativa. Las fracciones puras (>98% puro) se agruparon y se secaron por congelación. Las fracciones de cola (<98% puro) se recolectaron y se volvieron a purificar durante cada 3-6 corridas de cromatografía para proporcionar 700 mg del compuesto del título, como un polvo blanco (que contiene 11.8% en peso de agua y 8.7% en peso de sodio y sales de fosfato de sodio, como se determina por Karl Fischer y análisis elemental).

Parámetros de HPLC preparativa:

Columna: Waters Nova-Pak HR C18 6 μ m 30x300 mm

Fase móvil A: 7.0 mM de solución amortiguadora de sodio, pH=7.2

5 Fase móvil B: acetonitrilo

Método: 10%B-50%B en 30 min, relación de flujo: 40 ml/min

Parámetros de HPLC analítica:

Columna: Waters Symmetry C18 3.5 μ m 4.6x75 mm

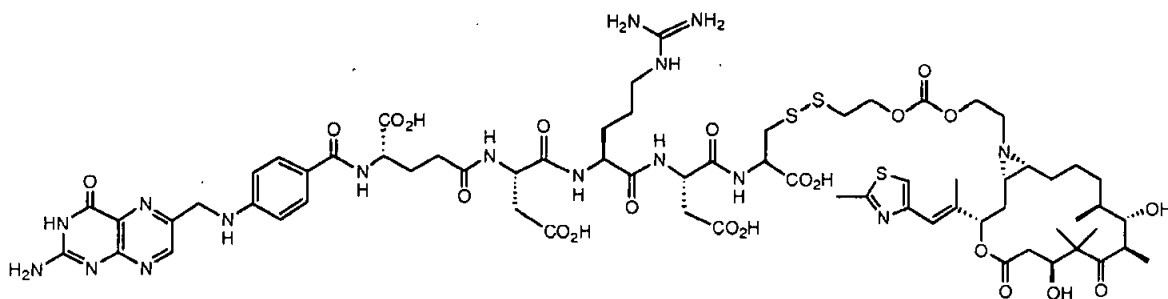
10 Fase móvil A: 10 mM de solución amortiguadora de acetato de trietilamonio (TEAOAc), pH=7.5

Fase móvil B: Acetonitrilo

Método: 20%B-40%B en 10 min, relación de flujo: 1.0 ml/min

15 Masa exacta m/z ($C_{67}H_{92}N_{16}O_{22}S_3$):Calculado: 1570.58907 ($M+2H$), 785.29454 ($M+2H$)²⁺, 523.86563 ($M+3H$)³⁺, 393.15118 ($M+4H$)⁴⁺Encontrado: ($M+2H$)²⁺ at 785.29100 (4.5 ppm), ($M+3H$)³⁺ at 523.86431 (2.5 ppm), ($M+4H$)⁴⁺ at 393.14996 (3.1 ppm).

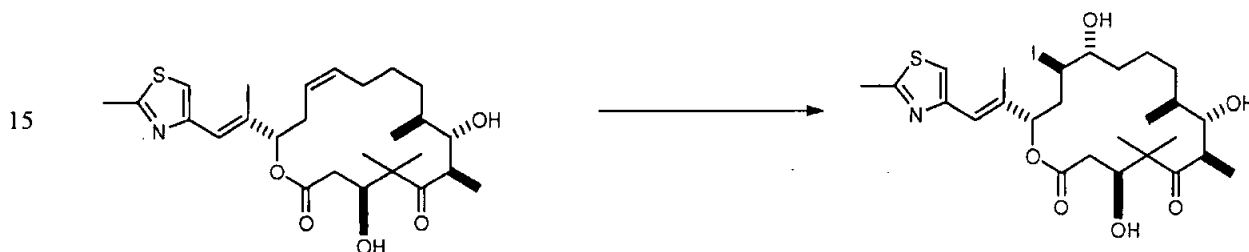
20 EJEMPLO 3: PREPARACIÓN ALTERNATIVA DEL COMPUESTO J



25

Acido (S)-2-(4-((2-amino-4-oxo-3,4-dihidropteridin-6-il)metilamino)benzamido)-5-((S)-3-carboxi-1-((S)-1-((S)-3-carboxi-1-((R)-1-carboxi-2-(2-(2-((2-((1S,3S,7S,10R,11S,12S,16R)-7,11-dihidroxi-8,8,10,12-tetrametil-3-((E)-1-(2-metiltiazol-4-il)prop-1-en-2-il)-5,9-dioxo-4-oxa-17-aza-biciclo[14.1.0]heptadecan-17-il)etoxi)carboniloxi)etil)disulfanil)etilamino)-1-oxopropan-2-ilamino)-5-guanidino-1-oxopentan-2-ilamino)-1-oxopropan-2-ilamino)-5-oxopentanoico

3A. Preparación de [4S,7R,8S,10R,9S,13R,16S]-4,8,13-trihidroxi-14-yodo-5,5,7,9-tetrametil-16-[(E)-1-[2-metiltiazol-4-il]prop-1-en-2-il]oxaciclohexadecano-2,6-diona.



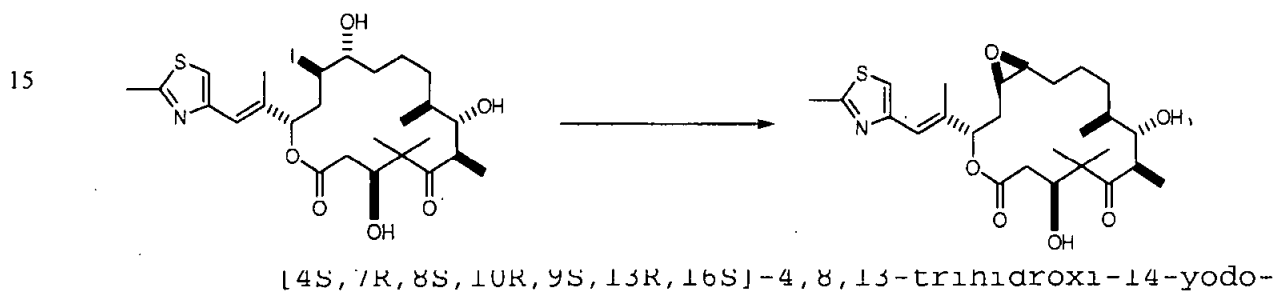
Epotilona C (54.3 g, 113.7 mmol) se disolvió en acetonitrilo (480 ml) y agua (50 ml). La solución se enfrió de -5°C a -10°C. Yodo (144.3 g, 568.4 mmol) se agregó a la reacción y la reacción se mantuvo a por lo menos 15 horas.

La reacción se enfrió rápidamente con 15% de solución de metabisulfito de sodio (900 ml). La mezcla se extrajo con acetato de etilo (2 x 1.1 l). Las fases orgánicas se recolectaron y lavaron sucesivamente con solución saturada

de bicarbonato de sodio (675 ml) y la solución saturada de cloruro sódico (675 ml). Los solventes se evaporaron bajo presión reducida para dar el Compuesto A crudo como un aceite de color amarillo (85.6 g). El Compuesto A se utilizó en la siguiente reacción sin purificación adicional.

HPLC: Phenomex Luna C8 (2) 3 μ m, 4.6 x 150 mm, isocrático, 18 minuto, 36% B, 17 minuto, 56% B, (Fase móvil A = 0.01M NH₄OAc en ACN:Agua (5:95), Fase móvil B = 0.01M NH₄OAc en ACN:Agua (95:5)), velocidad de flujo a 1.0 ml/min, UV 245, R_t = 22.4 min.

3B. Preparación de [1R,3S,7S,10R,HS,12S,16S]-7,11-dihidroxi-8,8,10,12-tetrametil-3-[(E)-1-[2-metiltiazol-4-il]prop-1-en-2-il]-4,17-dioxabicyclo[14.1.0]heptadecano-5,9-diona.

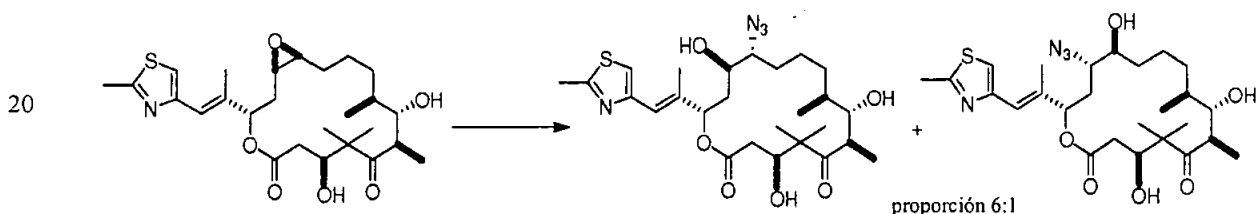


20 il]oxaciclohexadecano-2,6-diona (85.6 g) se disolvió en acetonitrilo (670 ml) y agua (130 ml). La trietilamina (135 ml, 968.5 mmol) se agregó a la solución. La reacción se calentó de 50°C a 60°C por lo menos 8 horas.

Después se enfrió a TA, la solución se concentró bajo presión reducida. El residuo se diluyó con EtOAc (1.2 l)

y lavó con solución de cloruro sódico saturado (3 X 500 ml). Los solventes se evaporaron bajo presión reducida para dar el producto crudo como un aceite de color amarillo. Purificación mediante filtración de almohadilla de gel de sílice (gel de sílice 700 g, 66% de EtOAc en heptano, 2 x 4 l, y 1 x 3 l) produjo el Compuesto B como una espuma (50.3 g, 90% de rendimiento) con HPLC AP 80. HPLC: Phenomex Luna C8 (2) 3 μ m, 4.6 x 150 mm, isocrático, 18 min, 36% B, 17 min, 56% B, (Fase móvil A = 0.01M NH₄OAc en ACN:Agua (5:95), Fase móvil B = 0.01M NH₄OAc en ACN:Agua (95:5)), velocidad de flujo a 10 ml/min, UV 245, R_t = 15.0 min.

3C/3D. Preparación de (4S,7R,8S,9S,13R,14R,16S)-13-azido-4,8,14-trihidrox-5,5,7,9-tetrametil-16-((E)-1-(2-metiltiazol-4-il)prop-1-en-2-il)oxaciclohexadecano-2,6-diona y (4S,7R,8S,9S,13S,14S,16S)-14-azido-4,8,13-trihidrox-5,5,7,9-tetrametil-16-((E)-1-(2-metiltiazol-4-il)prop-1-en-2-il)oxaciclohexadecano-2,6-diona.



A una solución agitada de epi-Epotilona-A (14.35 g, 29.07 mmol) en etanol (240 ml) y agua (48 ml) se agregó azida de sodio (11.45 g, 174.41 mmol) y cloruro de amonio (3.14g,

25

58.14 mmol). La mezcla se agitó a 60°C durante 17-20 h. Los volátiles se evaporaron en el evaporador giratorio bajo presión reducida por debajo de 50°C. El residuo se disolvió en mezcla de acetato de etilo (287 ml) y agua (50 ml). Las fases se separaron y la fase acuosa inferior se extrajo con acetato de etilo (115 ml). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con 25% de solución de cloruro sódico acuoso (salmuera). El solvente se evaporó bajo presión reducida y el residuo se pasó a través de una almohadilla de gel de sílice eluída con mezcla de acetato de etilo/n-heptano (2:1). La evaporación del solvente bajo presión reducida proporcionó la mezcla regioisomérica de azido-alcoholes, (4S,7R,8S,9S,13R,14R,16S)-13-azido-4,8,14-trihidroxí-5,5,7,9-tetrametil-16-((E)-1-(2-metiltiazol-4-il)prop-1-en-2-il)oxaciclohexadecano-2,6-diona y (4S,7R,8S,9S,13S,14S,16S)-14-azido-4,8,13-trihidroxí-5,5,7,9-tetrametil-16-((E)-1-(2-metiltiazol-4-il)prop-1-en-2-il)oxaciclohexadecano-2,6-diona en proporción ~6:1 (12.8 g, 82%) como una espuma de color blanco.

LC-MS: Phenomenex Luna C8 (2) columna: 3 µm, 4.6 x 50 mm. Gradiente: 15 minuto, 0% B a 100% B en 10 min, después 100% B durante 5 min. Fases móviles: A = 0.01 M NH₄OAc en CH₃CN/H₂O 5:95; B = 0.01 M NH₄OAc en CH₃CN/H₂O 95:5.

Velocidad de flujo: 3.0 ml/min. Longitud de onda:

UV 250 nm. Tiempo de retención = 5.52 min. EM (ESI) (M+H)⁺ =

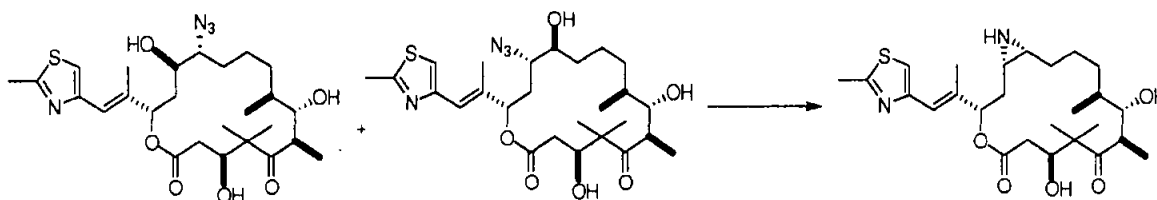
537.69

Esta reacción también se trabaja en otros solventes como, acetona, acetonitrilo, tetrahidrofurano, 2-propanol, dimetilformamida, metilsulfóxido y N-metil-pirrolidinona.

5 El reactivo de azida de tertrabutylamonio también puede utilizarse en vez de azida de sodio/cloruro de amonio.

3E. Preparación de (1S,3S,7S,10R,11S,12S,16R)-7,11-dihidroxi-8,8,10,12-tetrametil-3-((E)-1-(2-metiltiazol-4-il)prop-1-en-2-il)-4-oxa-17-azabicyclo(14.1.0)heptadecano-5,9-diona.

10

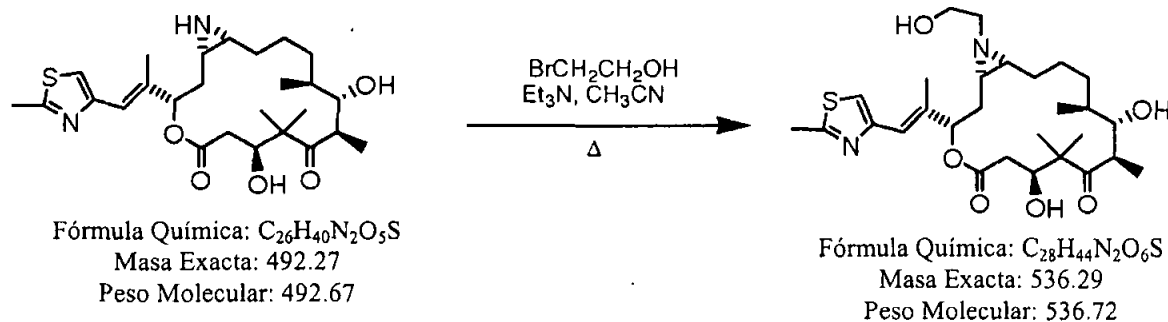


A una solución agitada de la mezcla de
 15 (4S,7R,8S,9S,13R,14R,16S)-13-azido-4,8,14-trihidroxi-5,5,7,9-tetrametil-16-((E)-1-(2-metiltiazol-4-il)prop-1-en-2-il)oxaciclohexadecano-2,6-diona y (4S,7R,8S,9S,13S,14S,16S)-14-azido-4,8,13-trihidroxi-5,5,7,9-tetrametil-16-((E)-1-(2-metiltiazol-4-il)prop-1-en-2-il)oxaciclohexadecano-2,6-diona
 20 (12.8 g, 23.85 mmol) en acetonitrilo anhidro (90 ml) se agregó trifenilfosfina (9.48 g, 35.77 mmol) bajo atmósfera de nitrógeno. La solución clara se agitó a 20-40°C durante 19-40 h. La mezcla de reacción se enfrió a 0-5°C durante 3-4 h y se filtró el producto. La torta se lavó con heptano (64 ml) y
 25 secó a 40 °C bajo presión reducida durante 15-18 h para dar

(1S,3S,7S,10R,11S,12S,16R)-7,11-dihidroxi-8,8,10,12-tetrametil-3-((E)-1-(2-metiltiazol-4-il)prop-1-en-2-il)-4-oxa-17-azabicyclo(14.1.0)heptadecano-5,9-diona como un sólido de color blanco (5.41 g, 46%). LC-MS: Phenomenex Luna C8 (2) columna: 3 μ m, 4.6 x 50 mm. Gradiente: 15 minuto, 0% B a 100% B en 10 min, después 100% B durante 5 min. Fases móviles: A = 0.01 M NH_4OAc en $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ 5:95; B = 0.01 M NH_4OAc en $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ 95:5. Velocidad de flujo: 3.0 ml/min. Longitud de onda: UV 250 nm. Tiempo de retención = 4.43 min. EM (ESI) $(\text{M}+\text{H})^+ =$ 493.68

Esta reacción también trabaja con otras fosfinas como, triciclohexilfosfina, trimetilfosfina, tributilfosfina y tris(4-metoxifenil)-fosfina y otro tetrahidrofurano solvente.

3G. Preparación de [1S-[1R*,3R*(E),7R*,10S*,11R*,12R*,16S*]]-7,11-dihidroxi-17-[2-hidroxietil]-8,8,10,12-tetrametil-3-[1-metil-2-(2-metil-4-tiazolil)etenil]-4-oxa-17-azabicyclo[14.1.0]heptadecano-5,9-diona



Et_3N (4.95 ml, 35.52 mmol) y 2-bromoethanol (3.02 ml, 42.62 mmol) se agregaron a (1S,3S,7S,10R,11S,12S,16R)-7,11-dihidroxi-8,8,10,12-tetrametil-3-((E)-1-(2-metiltiazol-4-

25

il)prop-1-en-2-il)-4-oxa-17-azabicyclo[14.1.0]heptadecano-5,9-diona (3.50 g, 7.10 mmol) en acetonitrilo (35 ml) y se calentaron a 72.5°C. Después de 20 horas, la mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente, se concentró hasta
5 sequedad a través de destilación al vacío giratoria. El crudo se disolvió en acetato de etilo (50 ml) y mezcló con agua desionizada (35 ml). La mezcla se extrajo con acetato de etilo (3 x 35 ml), secó sobre Na₂SO₄, filtró, concentró, cristalizó en acetonitrilo (35 ml), lavó con acetonitrilo (2 x
10 5 ml), y secó en horno al vacío a 45.5°C durante la noche para aislar (1S,3S,7S,10R,HS,12S,16R)-7,11-dihidroxi-17-(2-hidroxietil)-8,8,10,12-tetrametil-3-((E)-1-(2-metiltiazol-4-il)prop-1-en-2-il)-4-oxa-17-azabicyclo[14.1.0]heptadecano-5,9-diona como un polvo cristalino de color blanco (2.60 g, HPLC
15 AP 97.1, 68.2% rendimiento).

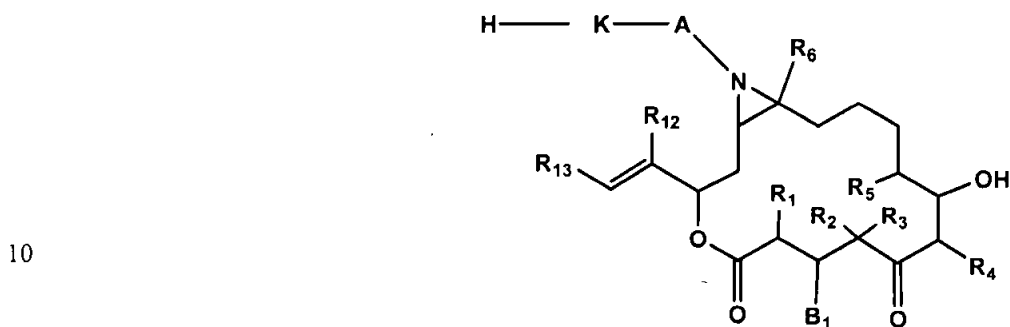
LC-MS: Phenomenex C8, 3 µm, 4.6 x 150 mm, gradiente, 10 a 50% B durante 10 min, y detenido a 20 min. (A = 5% de MeCN/H₂O + 0.01 M NH₄OAc; B = 95% de MeOH/H₂O + 0.01 M NH₄OAc), velocidad de flujo a 1.0 ml/min, UV 254 nm. Tiempo de
20 retención = 9.43 min. (ESI) M+H = 537.21.

Un experto reconocerá que el Compuesto 3G como se preparó por este Ejemplo 3 es idéntico al Compuesto G como se preparó por el Ejemplo 2, y así, el Compuesto 3G puede utilizarse para preparar los Compuestos H, I, y J, los métodos
25 de preparación y compuestos que se describen en el Ejemplo 2.

REIVINDICACIONES

Habiéndose descrito la invención como antecede, se reclama como propiedad lo contenido en las siguientes reivindicaciones:

5 1. Un compuesto que tiene la Fórmula X:



o sales y/o solvatos farmacéuticamente aceptables
del mismo, caracterizado porque:

K es -O-, -S-, o -NR₇-;

15 A es $-(\text{CR}_9\text{R}_9)-(\text{CH}_2)_m-\text{Z}-$ en donde Z es $-(\text{CHR}_{10})-$,
 $-\text{C}(=\text{O})-$, $-\text{C}(=\text{O})-\text{C}(=\text{O})-$, $-\text{OC}(=\text{O})-$, $-\text{N}(\text{R}_{11})\text{C}(=\text{O})-$, $-\text{SO}_2-$, o
 $-\text{N}(\text{R}_{11})\text{SO}_2-$;

B₁ es hidroxilo o ciano y R₁ es hidrógeno o B₁ y R₁ son tomados juntos para formar un enlace doble;

20 R_2 , R_3 , y R_5 son, independientemente, hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, arilo o arilo sustituido; o R_2 y R_3 pueden ser tomados juntos con el carbono al cual se enlazan para formar un cicloalquilo opcionalmente sustituido;

R₄ es hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquilo
25 sustituido, alquenilo sustituido, arilo, o arilo sustituido;

R₆ es hidrógeno, alquilo o alquilo sustituido;

R₇, R₈, R₉, R₁₀, y R₁₁ son independientemente hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, 5 heterocicloalquilo, heterocicloalquilo sustituido, heteroarilo, o heteroarilo sustituido;

R₁₂ es H, alquilo, alquilo sustituido, o halógeno;

R₁₃ es arilo, arilo sustituido, heteroarilo o heteroarilo sustituido; y

10 m es 0 hasta 6.

2. Un compuesto de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque:

K es -O-;

A es alquileno de 2 a 4 átomos de carbono;

15 B₁ es -OH;

R₂, R₃, R₄ y R₅ son, independientemente, hidrógeno o alquilo inferior;

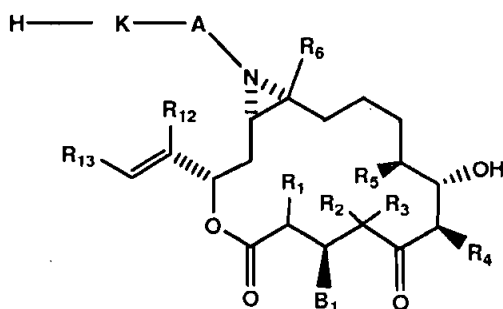
R₆ es hidrógeno o metilo; y

20 R₁₃ es un heteroarilo de 5 ó 6 miembros opcionalmente sustituido.

3. Un compuesto de conformidad con la reivindicación 1 ó 2, caracterizado porque R₁₃ es un tiazolilo, pirídilo u oxazolilo opcionalmente sustituido.

25 4. Un compuesto de conformidad con la reivindicación 1, 2 ó 3, caracterizado porque tiene la fórmula

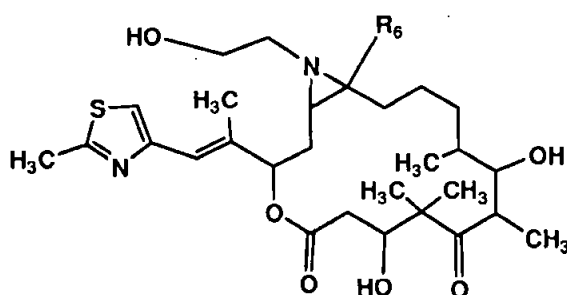
X'.



X';

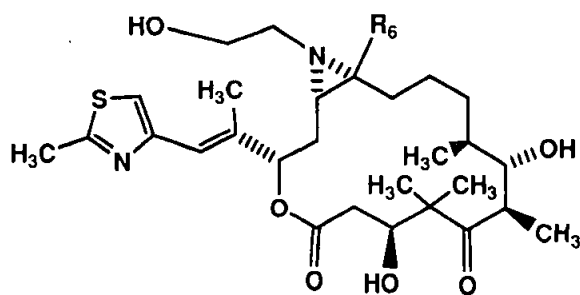
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

5. Un compuesto de conformidad con la
 10 reivindicación 2, caracterizado porque tiene la Fórmula Xb,



Xb

6. Un compuesto de conformidad con la
 reivindicación 5, caracterizado porque tiene la Fórmula Xb':



Xb'.

7. Un compuesto de conformidad con cualquiera de

las reivindicaciones 1, 2, 5 ó 6, caracterizado porque R_6 es hidrógeno.

8. Un compuesto de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 5 ó 6, caracterizado porque R_6 es metilo.

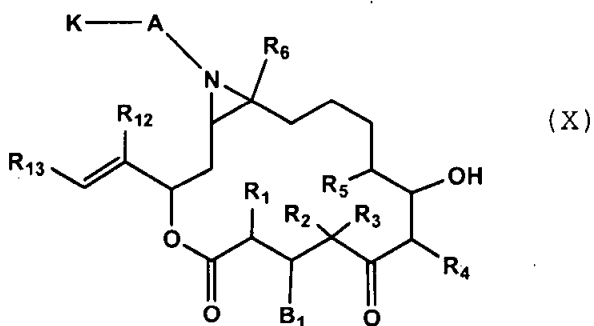
9. Uso de un compuesto de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, u 8, en la preparación de un medicamento para tratar el cáncer en un paciente.

10. Un proceso para fabricar una composición farmacéutica para administrar un fármaco dirigido, caracterizado porque comprende conjugar un compuesto de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, u 8, a un enlazador liberable para formar un compuesto conjugado.

11. El proceso de conformidad con la reivindicación 10, caracterizado porque el compuesto conjugado comprende una porción de enlace de folato.

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención se dirige a compuestos de aziridinil epotilona como se describe adicionalmente en la presente, y/o sales y/o solvatos farmacéuticamente aceptables de los mismos que tienen la Fórmula X:



10

Los compuestos pueden utilizarse en el tratamiento del cáncer para la preparación de conjugados para administrar un fármaco dirigido, especialmente folatos.

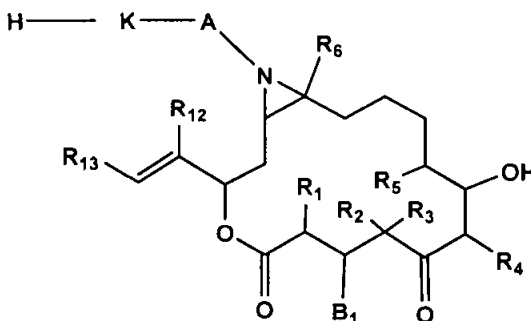
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN
SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT

(21) N° de solicitud:	(51) Int Cl:	C07D 491/04 , A61K 31/396 , A61K 31/427 , A61P 35/00
22) Fecha de solicitud:	(71) Solicitante(s)	BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY
(30) Prioridad (31) No. 32) Fecha (33) País	(72) Inventor(es)	VITE, Gregory, D. LEAMON, Christopher P., Y OTROS
60/808,366 25.05.2006 US	(74) Apoderado:	ALVARO CORREA ORDOÑEZ
(85) Fecha limite inicio fase nacional: 25/11/2008	(87) Publicación internacional	
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT	Fecha:	06.12.2007
Fecha de presentación de la solicitud: 25.05.2007	N° publicación:	WO/2007/140297
No. de solicitud : PCT/US2007/069736		
(54) Título: COMPUESTOS DE AZIRIDINIL-EPOTILONA		

Reivindicación(es):

Habiéndose descrito la invención como antecede, se reclama como propiedad lo contenido en las siguientes reivindicaciones:

1. Un compuesto que tiene la Fórmula X:



o sales y/o solvatos farmacéuticamente aceptables del mismo, caracterizado porque:

K es $-O-$, $-S-$, o $-NR_7-$;

A es $-(\text{CR}_8\text{R}_9)-(\text{CH}_2)_m-\text{Z}-$ en donde Z es $-(\text{CHR}_{10})-$,
 $-\text{C}(=\text{O})-$, $-\text{C}(=\text{O})-\text{C}(=\text{O})-$, $-\text{OC}(=\text{O})-$, $-\text{N}(\text{R}_{11})\text{C}(=\text{O})-$, $-\text{SO}_2-$,
 $-\text{N}(\text{R}_{11})\text{SO}_2-$

B₁ es hidroxilo o ciano y R₁ es hidrógeno o B₁ y R₁ son tomados juntos para formar un enlace doble;

R₂, R₃, y R₅ son, independientemente, hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, arilo o arilo sustituido; o R₂ y R₃ pueden ser tomados juntos con el carbono al cual se enlazan para formar un cicloalquilo opcionalmente sustituido;

R₄ es hidrógeno, alquilo, alqueniilo, alquilo sustituido, alqueniilo sustituido, arilo, o arilo sustituido;

R₆ es hidrógeno, alquilo o alquilo sustituido;

R₇, R₈, R₉, R₁₀, y R₁₁ son independientemente hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heterocicloalquilo, heterocicloalquilo sustituido, heteroarilo, o heteroarilo sustituido;

R₁₂ es H, alquilo, alquilo sustituido, o halógeno;

R₁₃ es arilo, arilo sustituido, heteroarilo o heteroarilo sustituido; y

m es 0 hasta 6.



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

TARJETA ARCHIVO PROPIETARIOS

SUPERINTENDENCIA PATENTE DE INVENCION ____ PCT ☒ MODELO DE UTILIDAD ____ DISEÑO INDUSTRIAL ____

(21) N° de solicitud: (22) Fecha de solicitud:

(51) Clasificación Internacional : A61K 47/48, A61P 35/00

(71) Solicitante(s) BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY y ENDOCYTE, INC

(72) Inventor(es) VITE, Gregory, D.; LEE, Francis, Y. Y OTROS

(74) Apoderado: ALVARO CORREA ORDOÑEZ

(30) Prioridad	(31) No. Prioridad	(32) Fecha	(33) País
	60/808,367	25.05.2006	US

(85) Fecha inicio fase nacional: 25/11/2008

(87) Publicación internacional

(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT

Fecha: 06.12.2007

Fecha de presentación de la solicitud: 25.05.2007

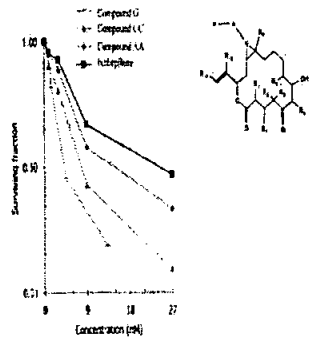
N° publicación: WO/2007/140298

No. de solicitud : PCT/US2007/069740

(54) Título: CONJUGADOS DE ANALOGOS DE AZIRIDINIL-EPOTILONA Y COMPOSICIONES FARMACEUTICAS QUE COMPRENDEN LOS MISMOS.

900 227

Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA PATENTE DE INVENCION PCT <u>X</u> MODELO DE UTILIDAD DISEÑO INDUSTRIAL		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES TARJETA ARCHIVO TEMATICO	
(21) N° de solicitud:		(22) Fecha de solicitud:	
(51) Clasificación Internacional : C07D 491/04 , A61K 31/396 , A61K 31/427 ,A61P 35/00			
(71)Solicitante(s) BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY			
(72) Inventor(es) VITE, Gregory D.; LEAMON, Christopher P. y OTROS			
(74) Apoderado: ALVARO CORREA ORDOÑEZ			
(30) Prioridad		(31) No. Prioridad	(32) Fecha
		60/808,367	25.05.2006
		(33) País	US
(85) Fecha límite inicio fase nacional: 25/11/2008		(87) Publicación internacional:	
(86) Datos relativos a la presentación de la solíc: PCT		Fecha: 06.12.2007	
Fecha de presentación de la solicitud:25.05.2007		No. Publicación : WO/2007/140298	
No. de solicitud : PCT/US2007/069740			
(54) Título: CONJUGADOS DE ANALOGOS DE AZIRIDINIL-EPOTILONA Y COMPOSICIONES FARMACEUTICAS QUE COMPRENDEN LOS MISMOS.			
(57) Resumen: La presente invención se dirige a compuestos de aziridinil epotilona como se describe adicionalmente en la presente, y/o sales y/o solvatos farmacéuticamente aceptables de los mismos que tienen la Fórmula X:			
(X)			
Los compuestos pueden utilizarse en el tratamiento del cáncer para la preparación de conjugados para administrar un fármaco dirigido, especialmente folatos.			



Número de Conjugado	Afinidad Relativa	CE ₅₀ (nM) células KB	Estructura
AA.I	0.27	>100	
AA.II	0.29	>100	
AA.III	n.t.	>100	

FIG. 1

Número de Conjugado	Afinidad Relativa	CE ₅₀ (nM) células KB	Estructura
AA.IV	n.t.	50	
AA.V	n.t.	>100	
AA.VI	n.t.	>100	

FIG. 1 (continuación)

Número de Conjugado	Afinidad Relativa	CE ₅₀ (nM) células KB	Estructura
BB.I	n.t.	68	
BB.II	0.13	10-100 (descomposición de epotilona libre)	
BB.III	n.t.	-75	

FIG. 2

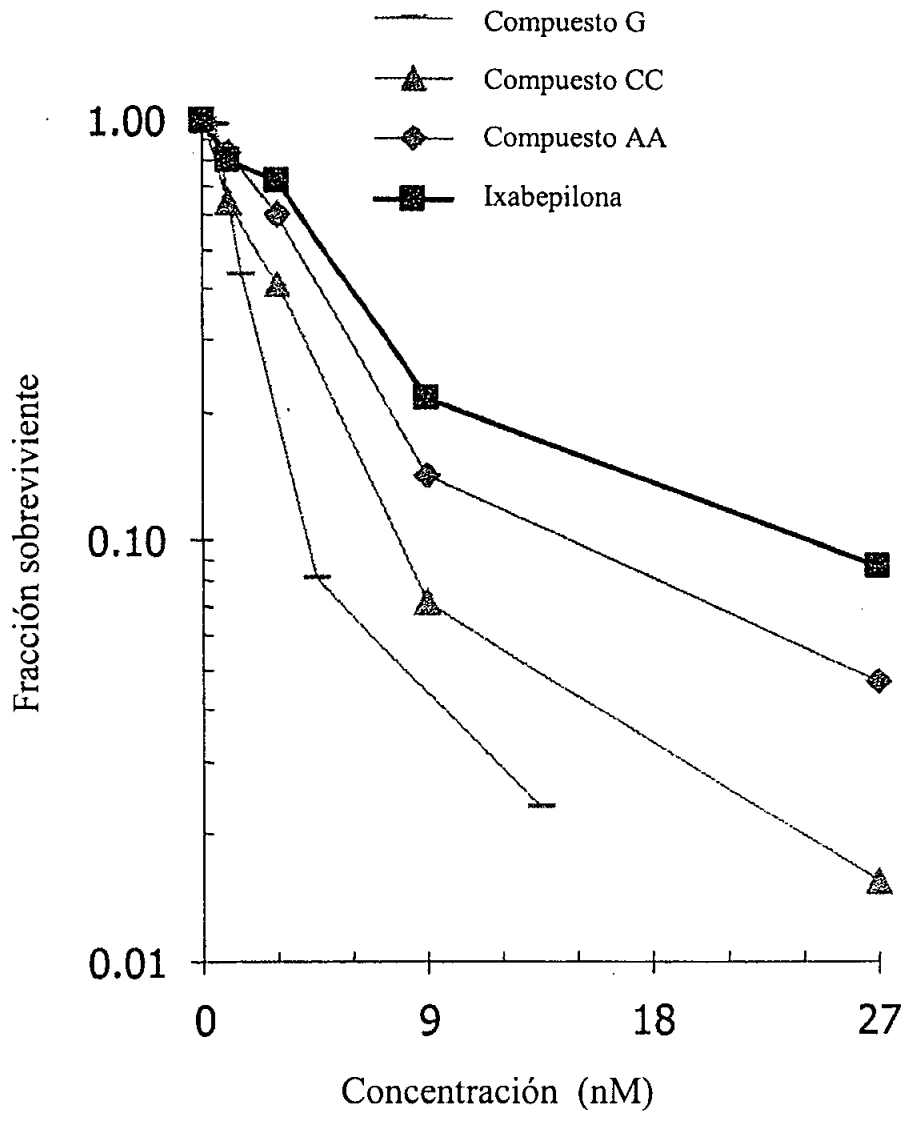


FIG. 3

FIG. 4A Eficacia *

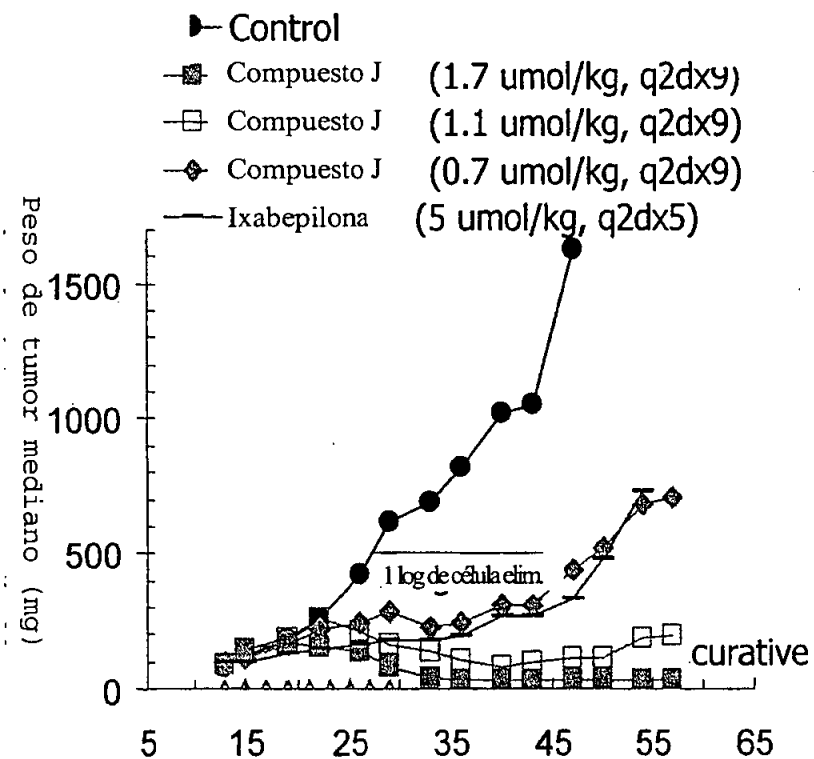
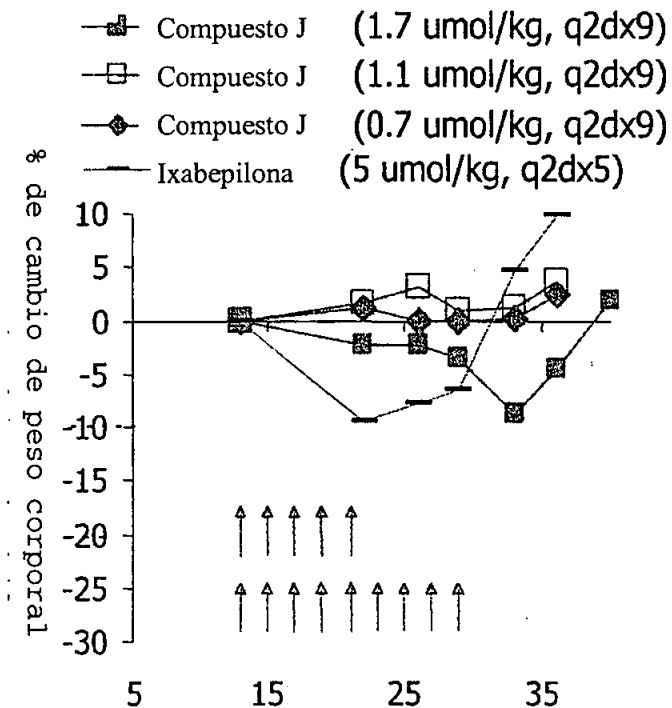


FIG. 4B Pérdida de Peso *



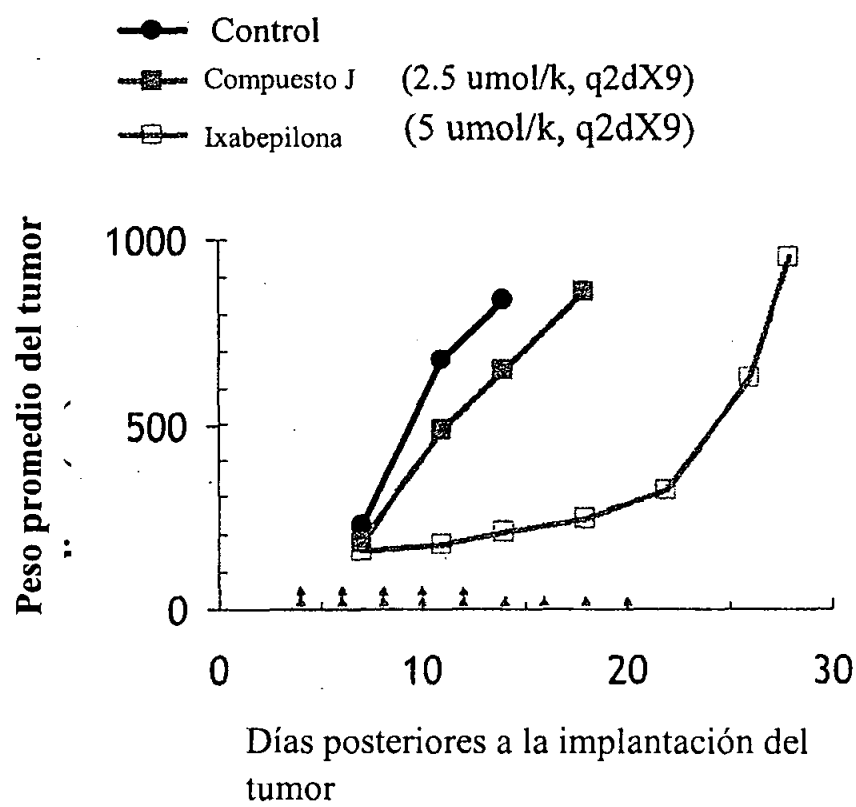


FIG. 5

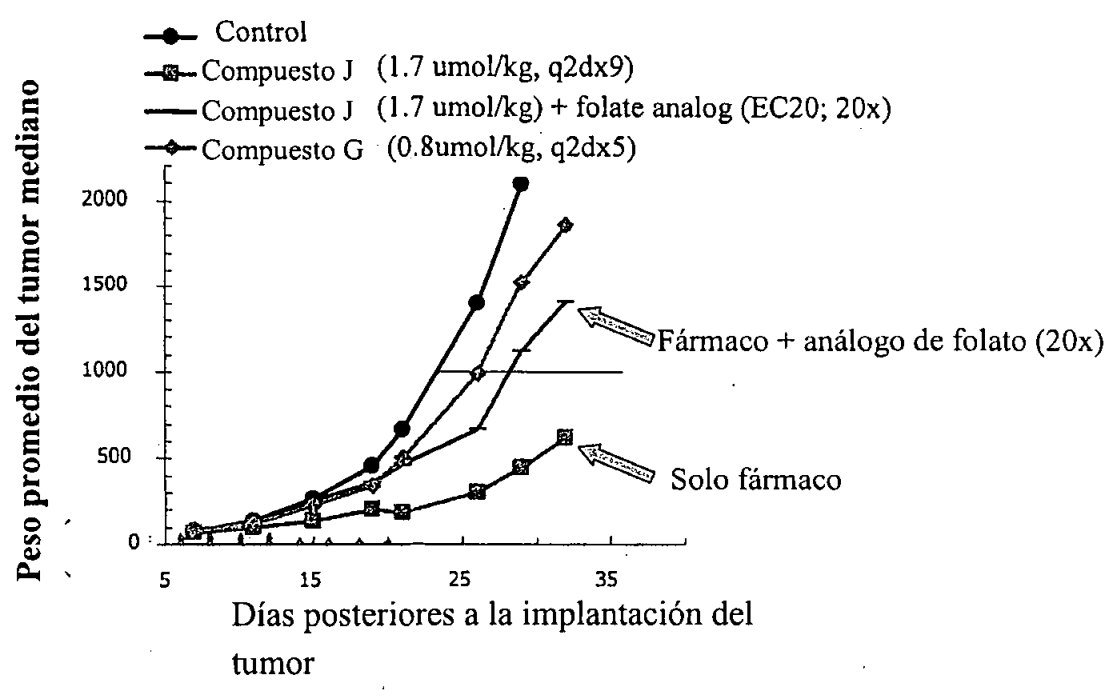


FIG. 6

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-125426-00000-0000

Fecha: 2008-11-25 16:23:26 Dep. 2020 NUECREACION
 Tra. 11 PATENTE Y DISEÑO Ene. 378 FASENACIONAL
 Act. 411 PRESENTACION Folios: 235

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Delegatura de Propiedad Industrial
 División de Nuevas Creaciones

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACIÓN Y AGILIZACIÓN DEL TRAMITE

	USUARIO	RADICADOR
PATENTE DE INVENCION ☒ MODELO DE UTILIDAD ()	()	()
-Indicación de que se solicita la concesión de una patente.	☒	()
-Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud.	☒	()
-Descripción de la invención.	☒	()
-Dibujos de ser estos pertinentes.	☒	()
-Comprobante de Pago de las tasas establecidas.	☒	()
COMPLETA ☒ INCOMPLETA	()	()
DISEÑO INDUSTRIAL ()		
-Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial.	()	()
-Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud.	()	()
-Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del Material que incorpora el diseño.	()	()
-Comprobante de Pago de las tasas establecidas.	()	()
COMPLETA () INCOMPLETA	()	()
ESQUEMA DE TRAZADO ()		
-Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial.	()	()
-Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud.	()	()
-Representación gráfica del Esquema Trazado.	()	()
-Comprobante de Pago de las tasas establecidas.	()	()
COMPLETA () INCOMPLETA	()	()

Firma Responsable:

Claudia M. Noya Cofes

Fecha:

Nov 26/08

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
CORREA ORDOÑEZ ALVARO

REFERENCIA	Radicación No.	8 125426
	Solicitud internacional	PCT/US2007/069736
	Fecha inicio fase nacional	25/12/2008
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado, con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando ésta fuere persona jurídica.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única No.10 de 2001.

ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de
fecha _____
adpall