

Organización y
Digitalización CSA Ltda



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

QF

Delegatura de Propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

PCT

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

08-125431

EXPEDIENTE No.

TÍTULO ANALOGOS DE ANALOGOS DE AZIRIDINIL-EPOTILONA
COMPOSICIONES FARMACEUTICAS QUE COMPRENDEN LOS MISMOS

CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL AGIK 47-48

SOLICITANTE BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY Y ENDOCYTE, INC.

DOMICILIO ESTADOS UNIDOS DE AMERICA.

PODERADO ALVARO CORREA GONZALEZ.
TP 28281 de Bogotá.

BOGOTÁ, D. C.,

PETITORIO

400001



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-125431-00000-0000

Fecha: 2008-11-25 18:25:17 Dep. 2020 NUECREACION
Fra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 225

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 y
ENDOCYTE, INC

Dirección: P.O. Box 4000, Princeton, Nueva Jersey 08543-4000,
Estados Unidos de América y 3000 Kent Avenue,
Suite A1-100 West Lafayette, Indiana 47906, Estados
Unidos de América respectivamente

Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos de América

Lugar de Constitución: 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.; LEE, Francis, Y.; LEAMON, Christopher, P.; VLAHOV, Iontcho, R.

Dirección: 28 Continental Lane, Titusville, Nueva Jersey 08560, Estados Unidos de América; 363 Lang Court,
Yardley, PA 19067, Estados Unidos de América; 5830 Farm Ridge Road, West Lafayette, IN 47906,
Estados Unidos de América; 1041 Shootingstar Court, West Lafayette, IN 47906 Estados Unidos de
América.

Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos de América

5 PCT (85)

Solicitud Internacional No. PCT/US2007/069740

Fecha 25.05.2007

Publicación Internacional No. WO/2007/140298

Fecha 06.12.2007

6 Título (54): CONJUGADOS DE ANALOGOS DE AZIRIDINIL-EPOTILONA Y COMPOSICIONES FARMACEUTICAS QUE
COMPRENDEN LOS MISMOS

7 Clasificación Internacional (51) A61K 47/48, A61P 35/00

8 Prioridad

(33) Pais de Origen

(32) Fecha

(31) Número de Solicitud

SI

☒

NO

☐

US

25.05.2006

60/808,367

9 Comprobante de pago No. 08- 82,841

Fecha Oct 20 /08

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

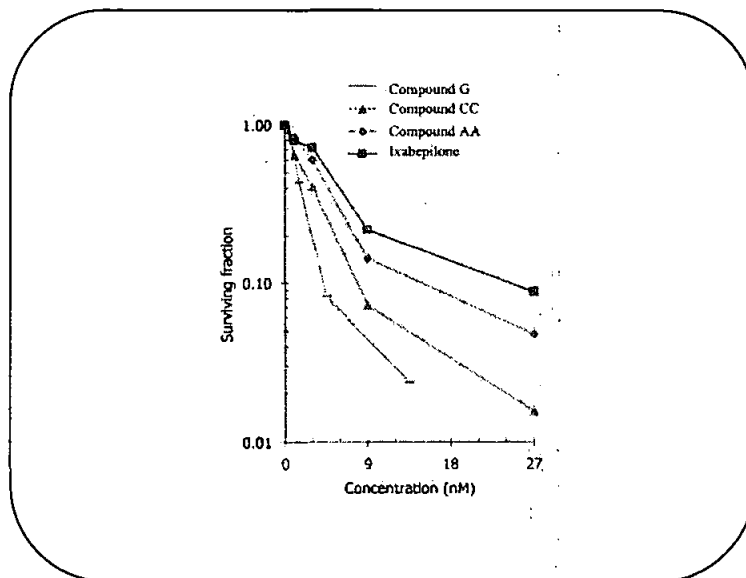
10

ANEXOS

001.002

- ☒ 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: Opinión escrita, Reporte de Búsqueda y Forma 306 adición de un solicitante.

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

2008/019

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 08-125431-00000-0000

Fecha: 2008-11-25 16:25:17 Dep. 2020 NUECREACIONI
Tra 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 225

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 08 - 82,844
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. _____

POD-4002

TRADUCCIÓN OFICIAL N° 0507071 al español de un documento escrito en inglés, efectuada por Jaime Armando Garavito Burgos, c.c. N° 19.130.702 de Bogotá, Traductor e Intérprete Oficial inglés-español-inglés según Resolución N° 034 de enero 11 de 1983 expedida por el Ministerio de Justicia de la República de Colombia

PODER OTORGADO POR BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY

APOSTILLA

1. PAÍS: ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA
2. ESTE DOCUMENTO PÚBLICO HA SIDO FIRMADO POR:
SALLY B. HANSEN
3. QUIEN ACTÚA EN CALIDAD DE NOTARIO PÚBLICO DE NUEVA JERSEY
4. LLEVA EL SELLO DE:
SALLY B. HANSEN, NOTARIO

CERTIFICADO

5. EN TRENTON, NUEVA JERSEY
6. EL 28 DE JUNIO DE 2007
7. POR BRADLEY ABELOW, TESORERO DE NUEVA JERSEY
8. N° A295716
9. SELLO (APARECE ADHERIDO SELLO DORADO)
10. FIRMA (FIRMADO) BRADLEY ABELOW

Texto en inglés y en español mediante el cual **BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY** domiciliada en Nueva York, Nueva York, otorga poder a **ALVARO CORREA ORDOÑEZ y/o OLGA GEORGETTE OTERO y/o RICARDO METKE y/o JUAN PABLO CONCHA**

Dado y suscrito el 30 de mayo de 2007

(Firmado) Anastasia P. Winslow, Senior Patent Counsel (Abogado de Patentes Senior)



TRADUCCIÓN OFICIAL N° 0507071 al español de un documento escrito en inglés, efectuada por Jaime Armando Garavito Burgos, c.c. N° 19.130.702 de Bogotá, Traductor e Intérprete Oficial inglés-español-inglés según Resolución N° 034 de enero 11 de 1983 expedida por el Ministerio de Justicia de la República de Colombia

CERTIFICACIÓN NOTARIAL

Texto en inglés y en español mediante el cual el suscrito Notario certifica el 30 de mayo de 2007 la existencia legal de la sociedad **BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY** así como las funciones y firma de su representante autorizado Anastasia P. Winslow, Senior Patent Counsel (Abogado de Patentes Senior) para lo cual se basó en los documentos relacionados en inglés en el punto 6 de la certificación los cuales se traducen aquí al español, a saber:

Certificación suscrita por el Vicepresidente Senior y el Asesor Legal de Bristol-Myers Squibb Company el 7 de abril de 2007.

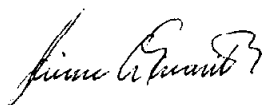
Certificado de Constitución Enmendado y Replanteado de Bristol-Myers Squibb Company fechado mayo 24, 2005.

[Firmado] SALLY B. HANSEN, Notario Público

[Sello en tinta que dice: "SALLY B. HANSEN. Notario Público de Nueva Jersey. Mi comisión vence el 6 de junio de 2010"]

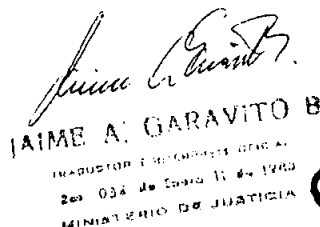
[Aparece sello realzado]

La anterior es traducción fiel y completa de la cual se deja copia en esta oficina para su confrontación.

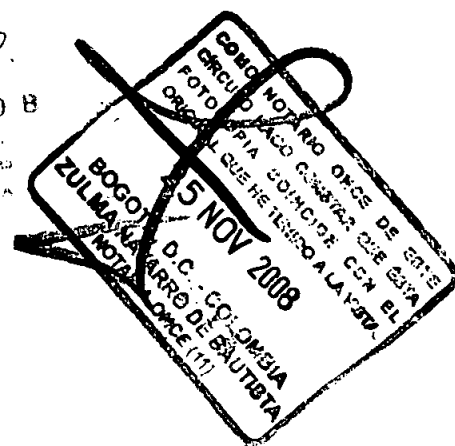


Jaime Armando Garavito Burgos
c.c. N° 19.130.702 de Bogotá
Traductor e Intérprete Oficial según Resolución N° 034 de enero 11 de 1983 expedida por el Ministerio de Justicia

BOGDM5 # 82106



JAIME A. GARAVITO B
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
2da 034 de Enero 11 de 1983
MINISTERIO DE JUSTICIA



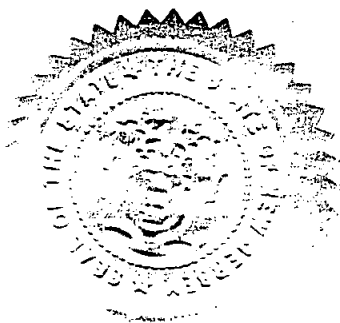
APOSTILLE

(CONVENTION DE LA HAYE DU 5 OCTOBRE 1961)

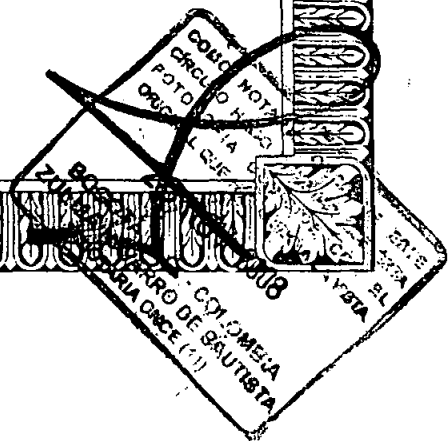
1. COUNTRY: UNITED STATES OF AMERICA
2. THIS PUBLIC DOCUMENT HAS BEEN SIGNED BY:
SALLY B HANSEN
3. ACTING IN THE CAPACITY OF:
NOTARY PUBLIC OF NEW JERSEY
4. BEARS THE SEAL/STAMP OF:
SALLY B HANSEN, NOTARY

CERTIFIED

5. AT TRENTON, NEW JERSEY
6. THE 28TH DAY OF JUNE 2007
7. BY: Bradley Abelow, NEW JERSEY TREASURER
8. NO. A295716
9. SEAL/STAMP:
10. SIGNATURE



Bradley Abelow



BACHEL & MCKENZIE

Ralebeck, Lara, Rodríguez & Rueda
Av. 82 No. 10 - 82 8th Floor
Bogotá, Colombia

NIT: 880.088.840-9
Tel: +57 1 634 1500
Fax: +57 1 378 2211
www.bakemel.com

POWER OF ATTORNEY

The undersigned.

BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY

domiciled in

Route 206 and Province Line Road, Princeton,
New Jersey 08543-4000 United States of America

declares that it hereby grants to

**ALVARO CORREA-ORDOÑEZ and/or
OLGA GEORGETTE OTERO and/or
RICARDO METKE and/or
JUAN PABLO CONCHA**

with domicile at Av. 82 No. 10 - 62, 6Th floor, of Bogotá D. C., Colombia, a full and sufficient power of attorney to obtain the protection of my (our) industrial property and against the unfair competition, for which purpose I (we) authorize the said attorneys to represent me (us) before any authorities or persons, with or without jurisdiction, specially those administrative, administrative contentious and judicial, as well as before Arbitration Court, in all matters concerning the following: a) Obtaining of patents, utility models, industrial designs, integrated circuits, layout-designs and vegetal varieties; the registration of trademarks, denominations of origin, commercial names, trade emblems, slogans and domain names; its renewal, assignments, change of name or domicile, voluntary cancellation; and the registration of licenses of use of the above rights; b) Processes of protection to the consumer, unfair competition, oppositions, cancellations, nullity, precautionary injunctions, infringement, granting of licenses, writ mandamus, the protection of trade secrets, and in general the civil, penal, an administrative processes relating to those rights. And that in all the above matters they may substitute this Power of Attorney, compromise, conciliate, admit the facts of the case, desist, cancel, receive, resign, and ratify acts done by representatives without a power of attorney.

I hereby ratify all actions previously taken on behalf of this company by the aforementioned attorneys with respect to the mentioned matters.

Done and subscribed in

On the 30 day of May of 2007

Signature of the person issuing the Power

Anastasia P. Winslow

Anastasia P. Winslow
Senior Patent Counsel

PODER DE ABOGADO

La abajo firmada,

BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY

domiciliada en

Route 206 and Province Line Road, Princeton,
New Jersey 08543-4000 Estados Unidos de América

declara por el presente que otorga a

**ALVARO CORREA-ORDOÑEZ y/o
OLGA GEORGETTE OTERO y/o
RICARDO METKE y/o
JUAN PABLO CONCHA**

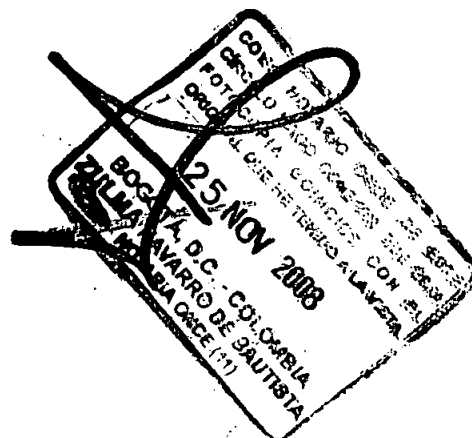
con domicilio en la Av. 82 No. 10 - 62 Piso 6 en Bogotá D. C., Colombia, poder especial amplio y suficiente, para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad industrial y contra la competencia desleal, a cuyo efecto autorizo (amos) a los dichos apoderados para que me (nos) representen ante cualesquiera autoridades o personas, ejerzan o no jurisdicción, especialmente ante las del orden administrativo, contencioso-administrativo y judicial, así como los tribunales de arbitramento, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de patentes de invención, modelos de utilidad, diseños industriales, esquemas de trazado de circuitos integrados y variedades vegetales; el registro de marcas, denominaciones de origen, nombres comerciales, enseñas, lemas comerciales y nombres de dominio; su renovación, traspaso, cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria; y el registro de licencias de uso de esos derechos; b) Los procesos para la protección del consumidor, competencia desleal, oposiciones, cancelaciones, nulidades, medidas cautelares, infracciones, concesión de licencias, la tutela, la protección de secretos industriales, y en general procesos civiles, penales, administrativos relacionados con estos derechos. Y para que en todos los asuntos arriba determinados, puedan sustituir este mandato, transigir, conciliar, admitir los hechos del caso, desistir, cancelar, recibir, renunciar, y ratificar los actos de agentes oficiosos.

Igualmente, ratifico todo lo actuado hasta el momento en los mismos asuntos, por cualquiera de los mencionados apoderados en representación de ésta sociedad.

Dado y firmado en

A los 30 días del mes de mayo de 2007

Firma de la persona que firma el Poder



000008

BAKER & MCKENZIE

NOTARIAL CERTIFICATION

On this 30 day of May
2007, the undersigned Notary

CERTIFIES

1. That Name of the person issuing the power
Anastasia P. Winslow
of legal age and domiciled in
Princeton, NJ USA
Address, city, state, country
set his hand on the foregoing document.
2. That the grantor is to me personally known and that he/she has legal capacity to execute the instrument.
3. That the grantor has executed the foregoing document as
Senior Patent Counsel
Position of the person issuing the Power
of the judicial person **BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY**
4. That the judicial person **BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY**
having its home office in
**Route 206 and Province Line Road, Princeton,
New Jersey 08543-4000 United States of America**
is duly organized, has present legal existence and that the purposes for which the power of attorney is granted are within the scope of its corporate purposes.
5. That the grantor has in fact the referred to authority and that his/her representation is legal.
6. That I have based certifications 3, 4 and 5 above on the following authentic documents for such purpose exhibited to me and which I mention specifically, giving their dates and their origin or source:
(Please indicate here the documents such as the articles of incorporation, by laws or resolution from the Board of Directors and their dates, on which the notary relied to grant the certification)
- Certification executed by Sr. Vice President and General Counsel of Bristol-Myers Squibb Company on April 7, 2007
- Amended and Restated Certificate of Incorporation of Bristol-Myers Squibb Company dated May 24, 2005

Notary Public
Sally B. Hansen
SALLY B. HANSEN
Notary Public of New Jersey
My Commission Expires June 6, 2010

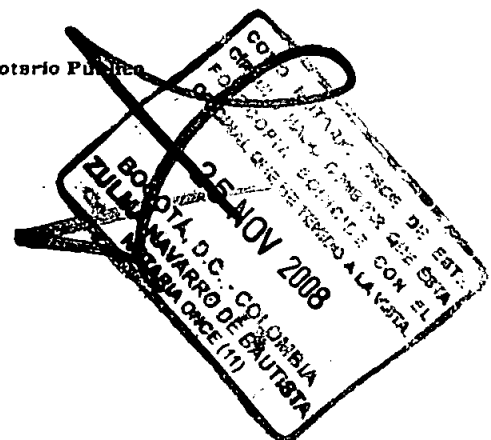
CERTIFICACION NOTARIAL

A los 30 días del mes de mayo
de 2007, el suscrito Notario

DA FE

1. Que Anastasia P. Winslow
mayor y domiciliado en Princeton, NJ
Estados Unidos de América
suscrió de su puño y letra el documento que antecede.
2. Que conozco al otorgante y que éste tiene capacidad legal para el otorgamiento.
3. Que el otorgante ha suscrito el referido documento en su carácter de
Abogados de Patentes Senior
de la persona jurídica **BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY**
4. Que la persona jurídica **BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY**
con sede en
**Route 206 and Province Line Road, Princeton,
New Jersey 08543-4000 Estados Unidos de América**
está legalmente constituida, que tiene existencia legal actual y que el acto para el cual se otorga el poder está comprendido entre los que constituyen su objeto social.
5. Que el otorgante tiene efectivamente la representación que ostenta y que ésta es legítima.
6. Que he basado las certificaciones 3, 4 y 5 anteriores en los siguientes documentos auténticos que al efecto se me exhibieron y que menciono específicamente con expresión de sus fechas y de su origen o procedencia:
- Certificación suscrita por el Vicepresidente Senior y el Asesor Legal de Bristol-Myers Squibb Company el 7 de abril de 2007.
- Certificado de Constitución Enmendado y Replanteado de Bristol-Myers Squibb Company fechado el 4 de mayo de 2005.

El Notario Público



(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
6 December 2007 (06.12.2007)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2007/140298 A1

(51) International Patent Classification:
A61K 47/48 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)

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

(21) International Application Number:
PCT/US2007/069740

(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.

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

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/808,367 25 May 2006 (25.05.2006) US

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

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

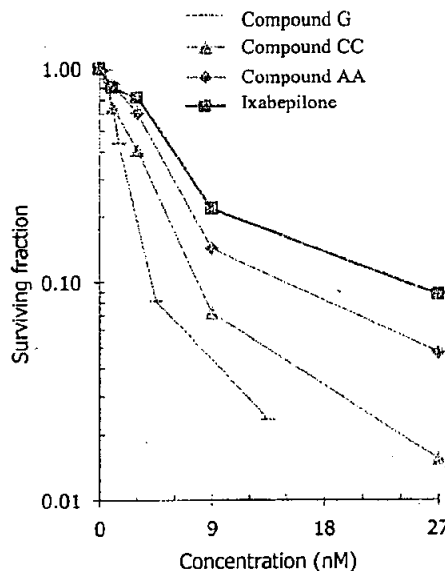
(72) Inventors; and

(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).

Published:
— with international search report

[Continued on next page]

(54) Title: CONJUGATES OF AZIRIDINYL-EPOTHILONE ANALOGS AND PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS COM-
PRISING SAME



(57) Abstract: The present invention is directed to conjugated compounds comprising a folate, or an analog or derivative thereof, and an aziridinyl epothilone analog, as further described herein, and/or pharmaceutically-acceptable salts and/or solvates thereof, useful in the treatment of cancer or other folate-receptor associated conditions.

- 1 -

TITLE

**CONJUGATES OF AZIRIDINYL-EPOTHILONE ANALOGS AND
PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS COMPRISING SAME**

[0001] This application claims priority to U.S. Provisional Patent Application No. 60/808,367, 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 conjugates of aziridinyl-epothilone analogs, more particularly, folate-conjugates of aziridinyl-epothilone analogs, to pharmaceutical compositions comprising the conjugates, and to methods of using 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

- 2 -

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 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., WO 99/65913, US Pat. No. 6,441,186, US Pat. No. 6,284,781; US Pat. No. 6,660,758; WO 98/25929; WO 00/99/07692; WO 99/67252; WO 00/00485; WO 00/37473; US Pat. No. 6,380,394; US Pat. No. 6,242,469; US Pat. No. 6,531,497; US Pat. Appl. No. 2004/0072870A1; US Pat. Appl. No. 2003/0023082 A1; WO 01/83800; US Pat. No. 6,441,186; US Pat. No. 6,489,314; US Pat. 6,589,968, US Pat. Appl. No. 2004/0053910 A1; US Pat. Appl. No. 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; and US Pat. No. 6,930,102 B2, 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

- 3 -

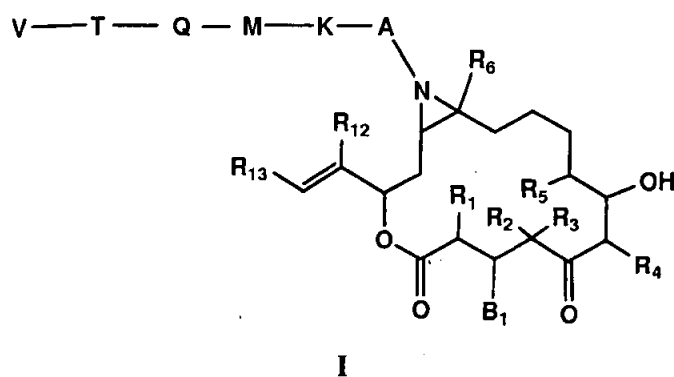
attack not only tumor cells but also normal tissue, leading to undesired side effects. Additionally, anticancer drugs typically present solubility issues such that formulation and delivery of the agents can present challenges, leading to use of solubilizing agents such as Cremophor®. The cytotoxicity 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.

[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). Accordingly, there is a need in the art for targeted drug therapy using, for example, epothilone analogs, for the treatment of cancer.

SUMMARY OF THE INVENTION

[0007] Certain disease states, such as cancer, are characterized by a population of cells that uniquely express, overexpress, or preferentially express a binding site that is accessible to a folate, folate analog, or derivative thereof. Applicants have discovered conjugated compounds having the following Formula I, including pharmaceutically acceptable salts and/or solvates thereof, that may be selectively targeted to cells containing these binding sites, thereby reducing many of the side-effects associated with typical chemotherapy.

- 4 -



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;

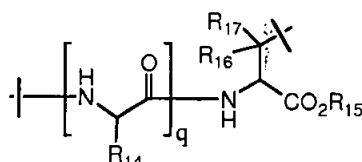
R₁₂ is H, alkyl, substituted alkyl, or halogen;

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

m is 0 to 6;

T has the formula:

- 5 -



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.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

[0008] 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).

[0009] 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).

[0010] 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).

[0011] 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 (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).

[0012] 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).

[0013] 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

[0014] 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.

[0015] As mentioned, according to one embodiment of the present invention, conjugated compounds are provided comprising a folate, or an analog or derivative thereof (V) and an aziridinyl epothilone analog, that may be selectively and/or preferentially delivered to a cell population having an accessible binding site for a vitamin, or analog or derivative thereof, wherein the binding site, such as the folate receptor, is uniquely expressed, overexpressed or preferentially expressed by the cells.

- 7 -

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). For example, it is known, as discussed above, 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 patent application US 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 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

- 8 -

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 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 Cl₃ or CF₃), cyano, -OR_a, -SR_a, -C(=O)R_a, -C(=O)OR_a, -OC(=O)R_a, -OC(=O)OR_a,

- 9 -

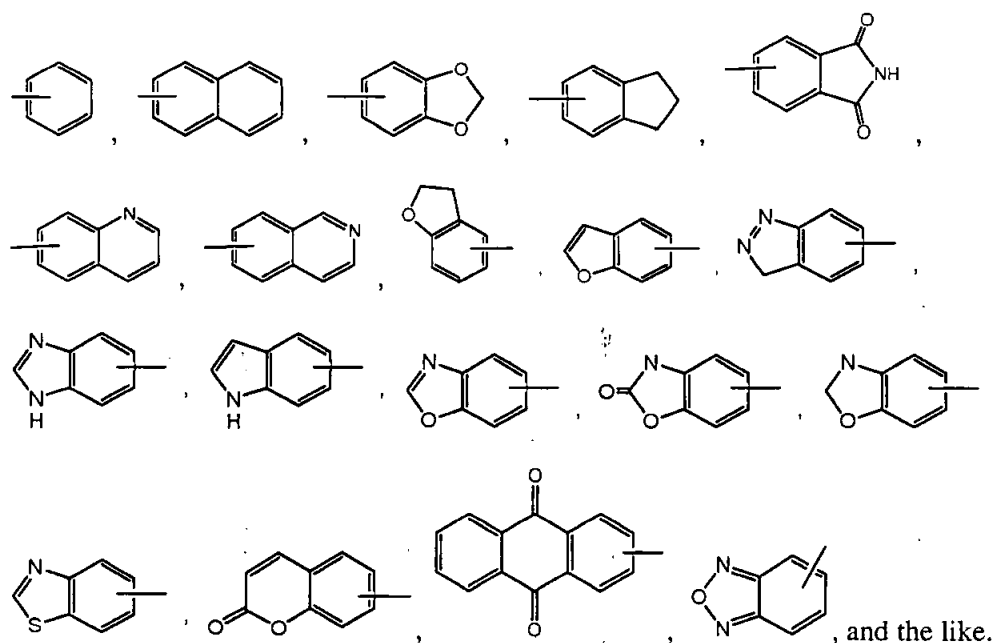
$-NR_aR_b$, $-C(=O)NR_aR_b$, $-OC(=O)NR_aR_b$, $-S(=O)R_a$, $-S(O)_2R_a$, $-NHS(O)_2R_a$,
 $-NHS(O)_2NHR_a$, $-NHC(=O)NHR_a$, $-NHC(=O)R_a$, $-NHC(O)_2R_a$, $-NHC(=N-CN)R_a$,
 aryl, heterocycle, cycloalkyl, and/or heteroaryl, wherein the groups R_a and R_b are
 independently selected from hydrogen, alkyl, 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 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 C_{1-4} alkoxy is a group OR, wherein R is
 lower alkyl (alkyl of 1 to 4 carbon atoms).

[0026] “Amino” is -NH_2 . An alkylamino is $\text{-NR}_c\text{R}_d$ 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-NH_2), and an alkylaminoalkyl means an alkylamino as defined above bonded through an alkylene group ($\text{-alkylene-NR}_c\text{R}_d$).

[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:



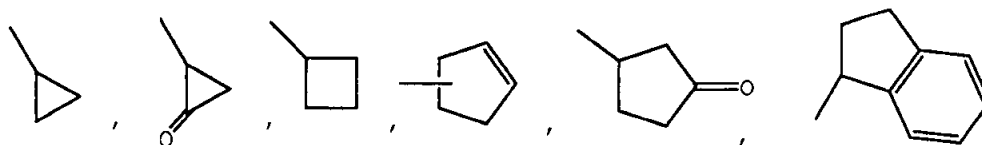
- 11 -

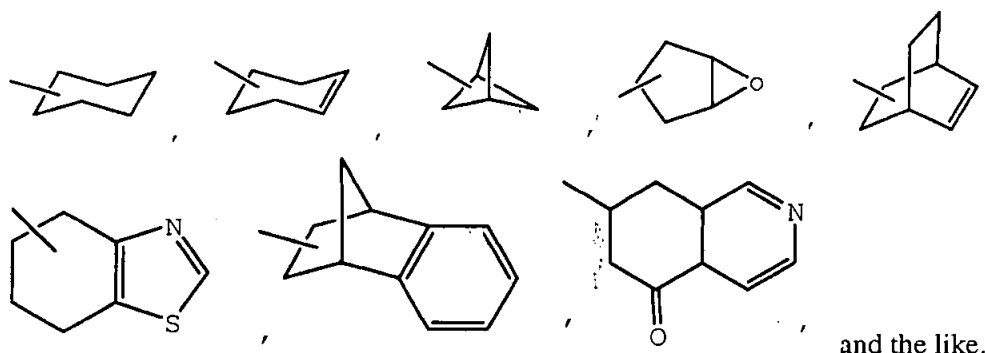
[0028] The term “arylene” refers to a bivalent aryl radical, i.e., an aryl group as defined above having two points of attachment to two other groups, at any available points of attachment of the aryl ring. Arylene rings may also be substituted with any of the groups suitable for substitution on the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

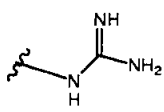
[0031] The term “cycloalkyl” refers to a fully saturated or partially saturated cyclic hydrocarbon group containing from 1 to 3 rings and 3 to 7 carbon atoms per ring. Exemplary fully saturated cycloalkyl groups include cyclopropyl, cyclobutyl, cyclopentyl, and cyclohexyl. Exemplary partially saturated cycloalkyl groups include cyclobutenyl, cyclopentenyl, and cyclohexenyl. The term “cycloalkyl” includes such groups having a bridge of three to four carbon atoms. Additionally, cycloalkyl groups which are bicyclic or tricyclic must include at least one fully saturated or partially saturated hydrocarbon ring but the other fused ring or rings may be aromatic or non-aromatic and may contain heteroatoms, provided that in such cases the point of attachment will be to the cyclic, non-aromatic hydrocarbon group. Additionally, one or more carbon atoms of the cycloalkyl group may form a carbon-to-oxygen double bond to define a carbonyl group. Thus, examples of “cycloalkyl” groups may include, without limitation:

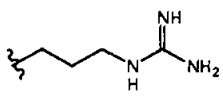




[0032] The term “cycloalkylene” refers to a bivalent cycloalkyl radical, i.e., a cycloalkyl group as defined above having two points of attachment to two other groups, at any available two points of attachment of the cycloalkyl ring.

[0033] “Substituted cycloalkyl” refers to a cycloalkyl group as defined above substituted at any available point of attachment with one or more substituents, preferably 1 to 4 substituents. Cycloalkyl substituents include alkyl, substituted alkyl, alkenyl, substituted alkenyl, and those groups recited above as alkyl substituents.

[0034] The term “guanidinyll” means the group . Thus, a guanidinyllalkyl means an alkyl group bonded to the guanidinyll such as a group

having the formula, 

[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 $-\text{OCF}_3$.

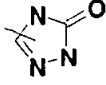
[0039] When the term “unsaturated” is used herein to refer to a ring or group, the ring or group may be fully unsaturated or partially unsaturated.

- 13 -

[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, 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,

- 14 -

isoquinolinyl, benzimidazolyl, benzopyranyl, indoliziny, benzofuranyl, chromonyl, coumarinyl, benzopyranyl, cinnolinyl, quinoxalinyl, 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 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

- 15 -

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, pyrroliny, tetrahydropyranyl, 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.

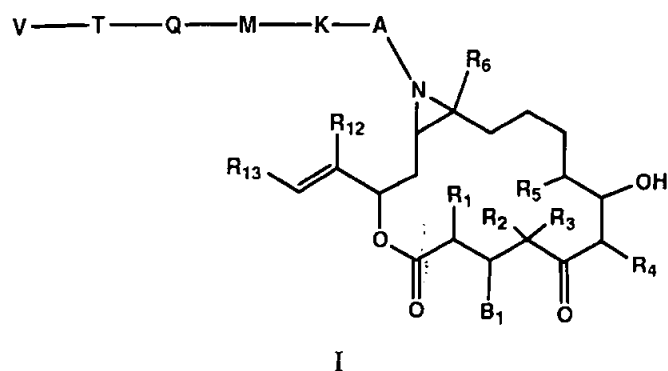
[0050] "Thiol" means the group -SH.

[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).

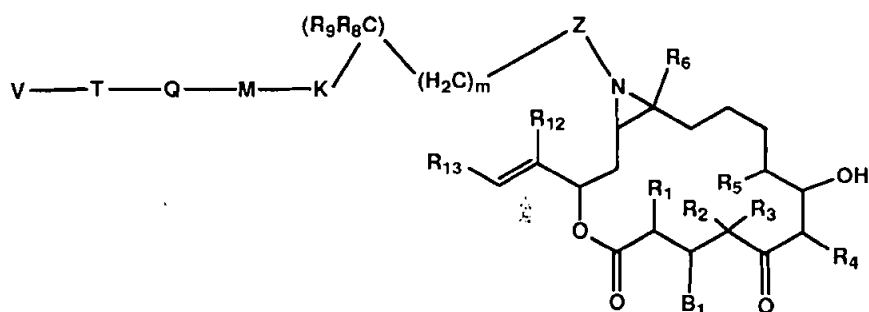
[0052] When a functional group is termed "protected", this means that the group is in modified form to mitigate, especially preclude, undesired side reactions at the protected site. Suitable protecting groups for the methods and compounds described herein include, without limitation, those described in standard textbooks, including Greene, T.W. et al., *Protective Groups in Organic Synthesis*, Wiley, N.Y. (1991), incorporated herein by reference.

[0053] 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,

- 16 -

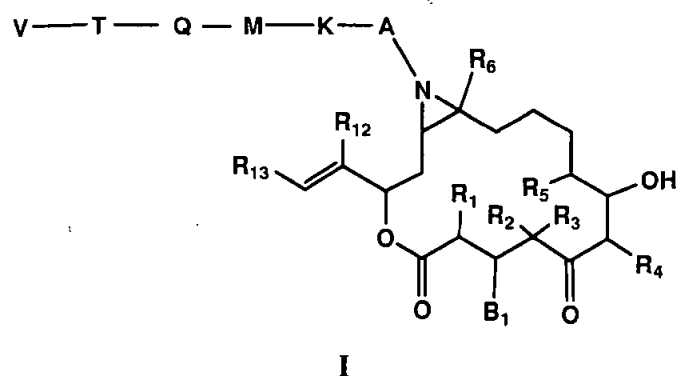


the insertion should be made from left to right. For example, in the following situation where A is defined as $-(CR_8R_9)-(CH_2)_m-Z-$, the methylene group is attached to K, and the Z group is attached to the nitrogen of the aziridiny ring, as follows:



ALTERNATE EMBODIMENTS OF THE INVENTION

[0054] The present invention comprises compounds having the following Formula I, as defined above,



and includes pharmaceutically-acceptable salts and/or solvates thereof.

- 17 -

According to one embodiment of the invention,

K is O;

A is C₂₋₄alkylene;

B₁ is -OH;

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

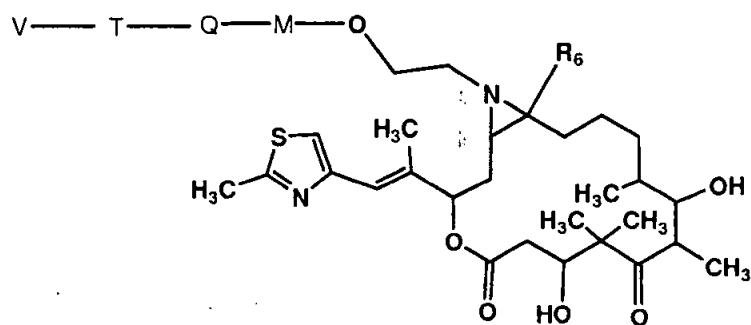
R₆ is hydrogen or methyl;

R₁₃ is an optionally substituted 5 or 6 membered heteroaryl, preferably an optionally substituted thiazolyl, pyridyl, or oxazolyl; and

M is -S-R₃₀-O-C(=O)-, -S-R₃₀-C(=O)-, or -S-R₃₄R₃₀-O-C(=O)-, wherein

R₃₀ is lower alkylene or substituted lower alkylene; and R₃₄ is arylene or substituted arylene; and R₁, R₁₂, T, and Q are as defined elsewhere herein, *e.g.*, as in the Summary of Invention, above, or alternative embodiments, below.

[0055] In one embodiment of the present invention, compounds are provided having the following Formula Ia:

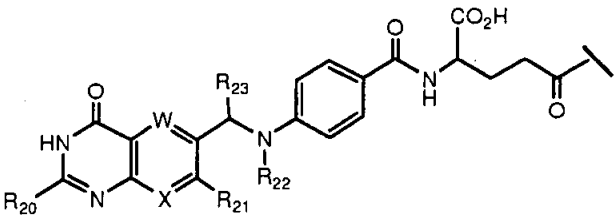


Ia

wherein V is a folate-receptor binding moiety, and T, Q, M and R₆ are as defined elsewhere herein, *e.g.*, as in the Summary of Invention or alternative embodiment, above, or in alternative embodiments below.

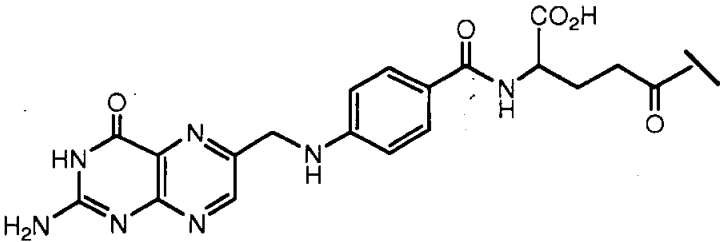
For example, V may have the following formula:

- 18 -

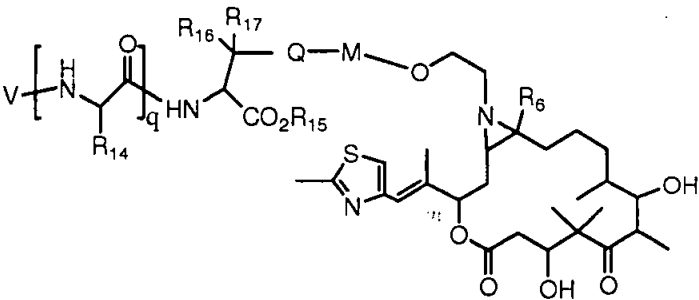


wherein W and X are independently CH or nitrogen;
R₂₀ is hydrogen, amino or lower alkyl;
R₂₁ is hydrogen, lower alkyl, or forms a cycloalkyl group with R₂₃;
R₂₂ is hydrogen, lower alkyl, lower alkenyl, or lower alkynyl; and
R₂₃ is hydrogen or forms a cycloalkyl with R₂₁.

[0056] According to one embodiment of the present invention, V is,



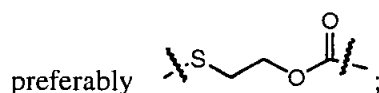
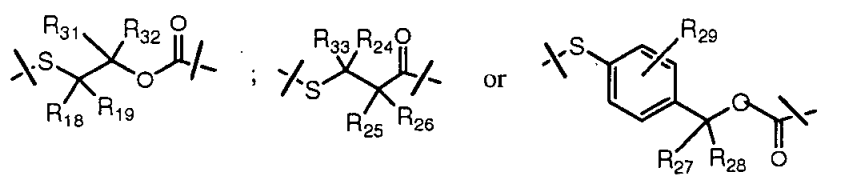
[0057] According to one embodiment of the present invention, compounds are provided having the following Formula Ib:



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:



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 $-NH-C(=NH)-NH_2$;

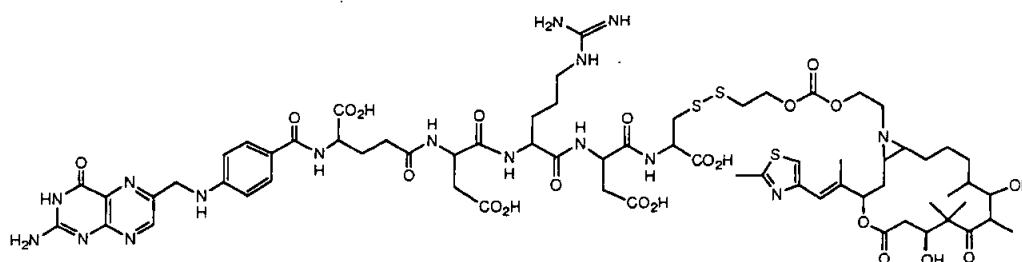
q is 1 to 10 (preferably 1 to 5);

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.

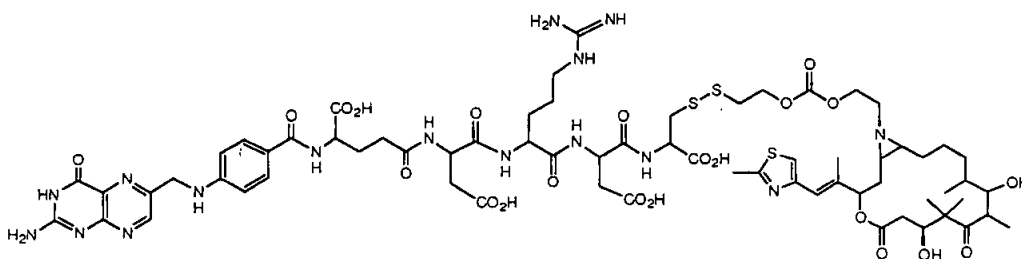
[0058] According to one embodiment of the present invention, compounds are provided having the formula:

- 20 -



and include pharmaceutically acceptable salts and solvates thereof.

[0059] According to one embodiment of the present invention, methods of treating cancer are provided comprising administering to a patient in need of such treatment a therapeutically effective amount of a conjugate of the present invention, as described herein. According to a preferred embodiment, methods for treating a folate-receptor associated cancer are provided comprising administering to a patient in need of such treatment, a conjugate having the following formula:



[0060] 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 conjugated 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 conjugated 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 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

- 21 -

ER+ breast cancer cells susceptibility to treatment with a folate receptor targeted therapy.

[0061] One aspect of the invention provides a method of treating cancer or a proliferative disease in a patient in need thereof, comprising optionally administering an effective amount of at least one folate receptor inducer and administering an effective amount of at least one conjugated compound according to formula I. The folate receptor inducer may be administered prior to or concurrently with the conjugated compound according to formula I. In one embodiment, the folate receptor inducer is administered prior to the conjugated compound of formula I. An effective amount of the folate receptor inducer refers to an amount that upregulates the folate receptor in the desired cells such that administration of the folate receptor conjugated compound is therapeutically effective.

[0062] 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.

[0063] 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.

[0064] 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 administering an effective amount of at least one conjugated compound according to formula I; 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.

[0065] 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 conjugated compound according to formula I; 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).

[0066] 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 administering an effective amount of at least one conjugated compound according to formula I. 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).

[0067] The compounds of formula (I) may form salts or solvates which are also within the scope of this invention. Reference to a compound of the formula (I) herein is understood to include reference to salts and solvates 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 (I) 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 (I) may be formed, for example, by reacting a compound of formula (I) 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.

[0068] The compounds of formula (I) 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.

[0069] The compounds of formula (I) 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 chlorides, bromides, and iodides), aralkyl halides (*e.g.* benzyl and phenethyl bromides), and others.

[0070] Solvates of the compounds of the invention are also contemplated herein.

Solvates of the compounds of formula (I) include, for example, hydrates.

[0071] 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. 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.

[0072] 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, and then the desired stereochemistry may be achieved via separation of configurational isomers which

- 25 -

can be achieved by any suitable method known in the field, e.g., such as column chromatography.

[0073] 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.

[0074] Embodiments indicated herein as exemplary or preferred are intended to be illustrative and not limiting.

[0075] 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

[0076] The conjugated compounds of the present invention are useful for delivering 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 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.

[0077] 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).

[0078] 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 conjugated compounds of the invention to patients, and/or to enhance the various diseases or tumor types that may be treated with the conjugated compounds according to the invention.

[0079] For example, the diseases that may be treated with the conjugated compounds of this invention, and/or upon a combination therapy comprising the conjugated compounds of this 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.

[0080] The conjugated 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 conjugated compounds of formula I may be useful for treating refractory or resistant cancers.

- 27 -

[0081] The conjugated 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.

[0082] Furthermore, the conjugated compounds of the present invention may be administered in combination with other anti-cancer and cytotoxic agents and 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 may be advantageous. The second agent may have the same or different mechanism of action than the compounds of formula (I). 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.

[0083] 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

conjugated compounds of formula I may also be used in conjunction with radiation therapy.

[0084] Further examples of anticancer agents that may be used in combination with the compounds of the invention include the Src Kinase inhibitor, '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. Appl. 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 Pat. Appln. 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 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. 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. Pat. 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) ORENCIA®; MDX-010; vinflunine (Javlor™), and Erbitux (cetixumamb).

[0085] 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.

[0086] The compounds of 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.

- 29 -

For example, compounds of the invention may be formulated with agents to prevent nausea, hypersensitivity and gastric irritation, such as antiemetics, and H₁ and H₂ antihistaminics.

[0087] 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.

[0088] The compounds 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 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 present compounds 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.

[0089] 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 co-solvents 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.

[0090] 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 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.

[0091] 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.

- 31 -

Clonogenic Cell Survival Assay

[0092] 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 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

[0093] 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).

- 32 -

Folate Receptor Assay

[0094] 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 μ l was placed inside each of two Microcon-30 microconcentrators (30,000-MW cutoff, Millipore). Samples were then centrifuged at 14,000 X g for 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 Na₂PO₄, 1.8mM KH₂PO₄, 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

- 33 -

Bioscience). Counts per minute (cpm) values were converted to piconoles 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

[0095] 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

[0096] For administration of epothilones or epothilone analogs to mice, an excipient consisting of the following was used: CREMOPHOR[®]/ethanol/water (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.

[0097] 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

- 34 -

again following the last treatment dose (Wt2). The difference in body weight (Wt2-Wt1) provides a measure of treatment-related toxicity.

[0098] 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:

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

[0099] 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.

[0100] 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).

[0101] To estimate tumor cell kill, the tumor volume doubling time (TVDT) was first calculated with the formula:

$$\text{TVDT} = \text{Median time (days) for control tumors to reach target size} - \text{Median time (days) for control tumors to reach half the target size}$$

And,

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

- 35 -

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

ABBREVIATIONS

[0102] 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

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

- 36 -

THF = tetrahydrofuran

TFA = trifluoroacetic acid

TLC = thin layer chromatography

TESCL = chlorotriethylsilane

UV = ultraviolet.

METHODS OF PREPARATION

[0103] 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, 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.

[0104] 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 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, US Pat. Appl. Pub. No. 2006/004065; and Johnson et al. *Organic Letters* 2000, 2:1537-40; 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-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 III

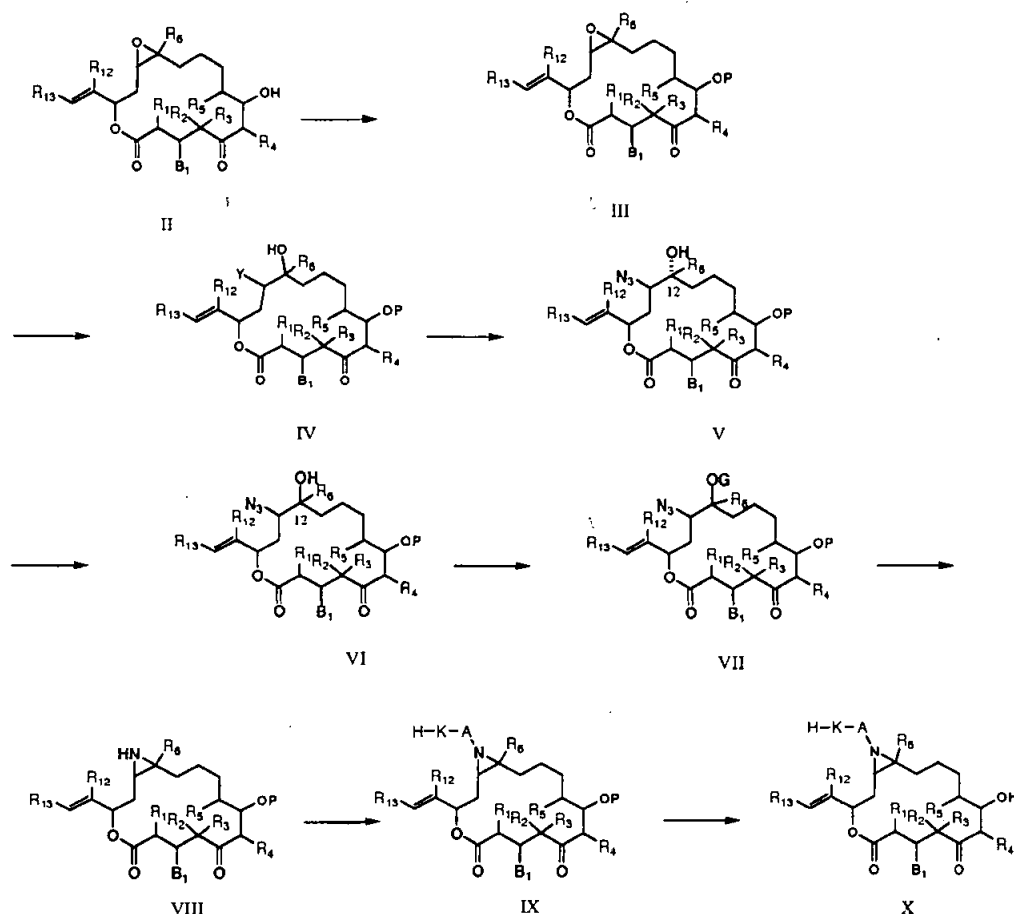
- 37 -

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 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

- 38 -

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



[0105] The folate analog or derivative V and the bivalent linker T-Q of a compound of formula I 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 agent. N^{10} -Trifluoroacetamide-protected pterioic acid can be prepared in two steps by enzymatic (carboxypeptidase G) conversion of folic acid to pterioic acid, followed by N^{10} -protection using trifluoroacetic anhydride. Next,

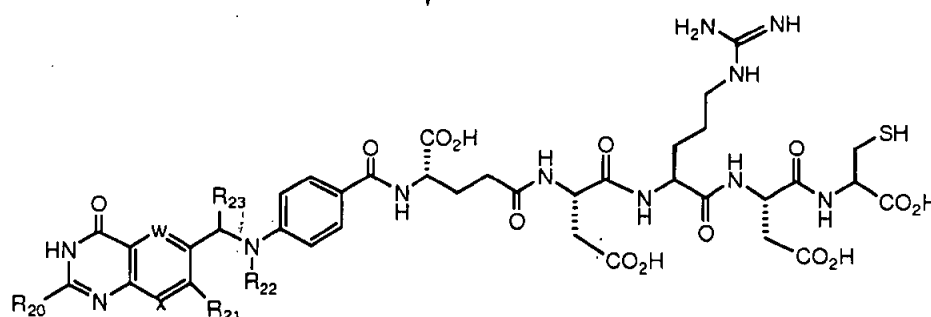
- 40 -

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.



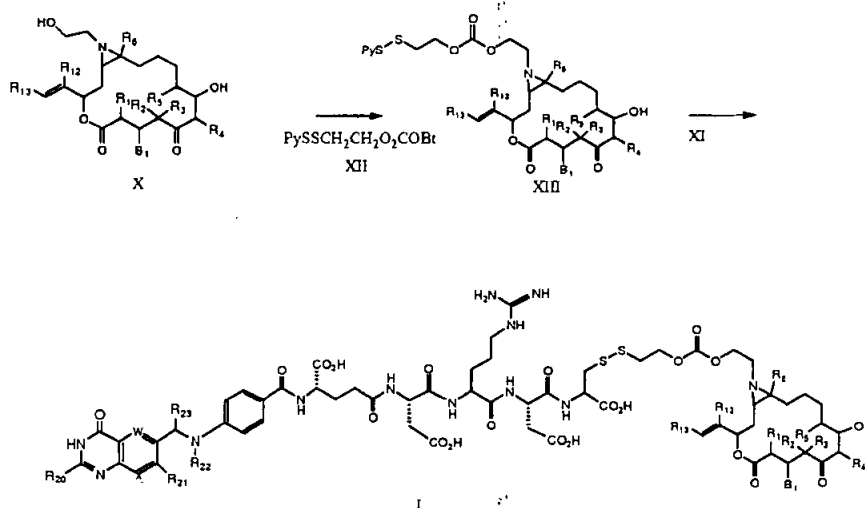
XI

[0106] Final assembly of compounds of formula I can be achieved by coupling of the epothilone analog 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

- 41 -

be prepared from mercaptoethanol, methoxycarbonyl sulfonyl chloride, and an optionally substituted 2-mercaptopyridine to provide an intermediate 2-(2-pyridin-2-yl)disulfanyl)ethanol, 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

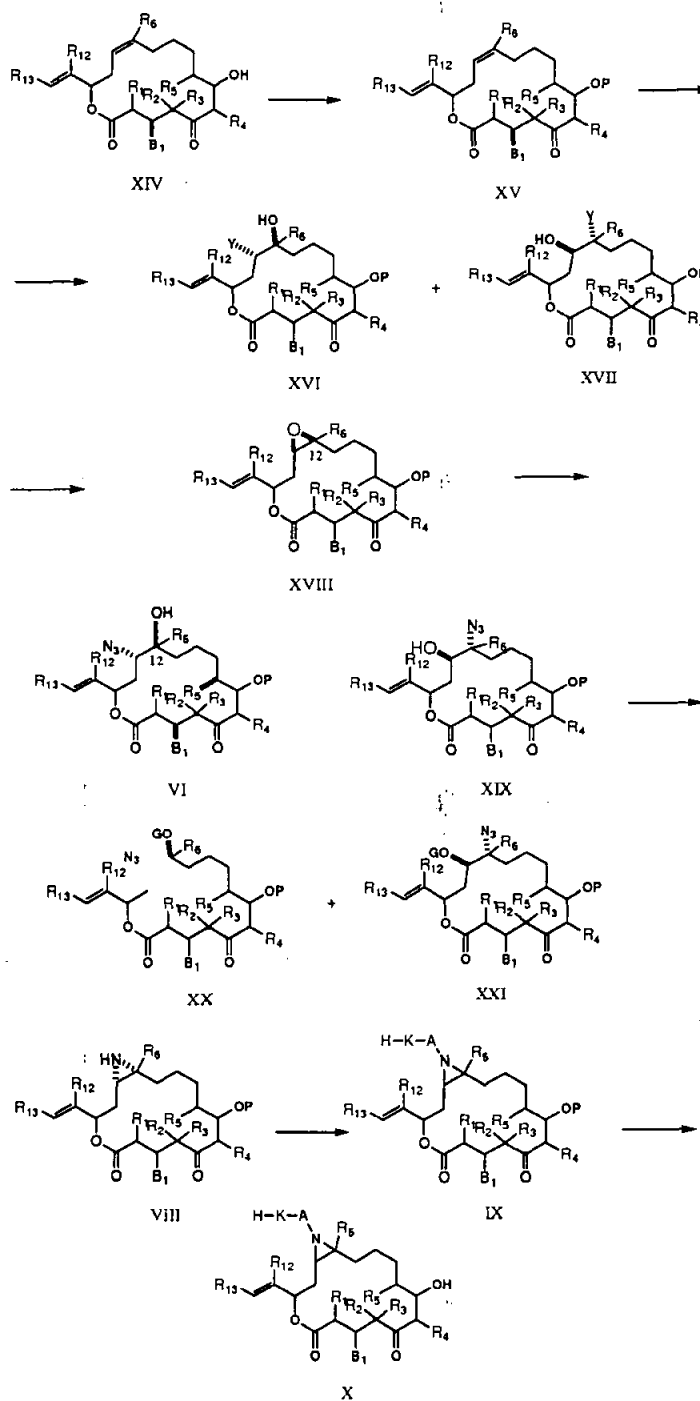


[0107] Scheme 4 illustrates an alternative method for making a compound of formula X from a compound of formula XIV (see, U.S. Patent Application No. 60/940,088, filed May 25, 2006, incorporated herein in its entirety by reference). Compounds of formula XIV can be obtained by methods well known in the 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 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-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 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 by methods known in the art. 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 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.

SCHEME 4

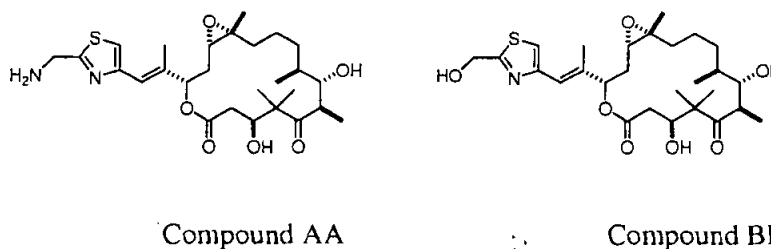


[0108] The invention will now be further described with reference to the following illustrative examples.

EXAMPLES

EXAMPLE 1: FOLATE CONJUGATED EPOTHILONE ANALOGS

[0109] 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:



[0110] 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.

[0111] The binding of 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. Binding of the folate conjugates of Compound AA.I and AA.II 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).

[0112] 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 cytotoxicity at high concentrations, the activity was not attenuated in competition studies using excess of

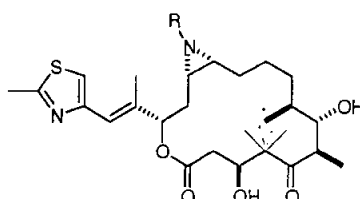
- 46 -

folic acid. Therefore, the observed cytotoxicity was attributed to non-specific release of Compound BB.II.

[0113] 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.

[0114] 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.

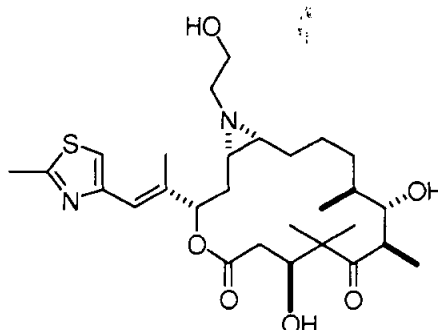
² R/S ratio = HCT116 IC₅₀/HCT116VM46IC₅₀

³ R/S ratio = A2780 IC₅₀/A2780Tax IC₅₀

[0115] 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.

[0116] The aziridinyl epothilone compound G was discovered, having the formula,

- 48 -

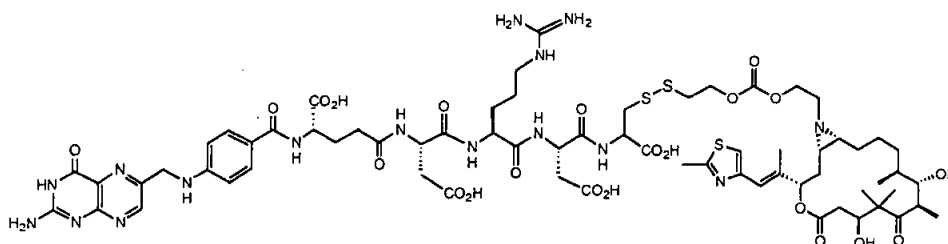


Compound G

[0117] 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.

[0118] 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.

[0119] 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**).



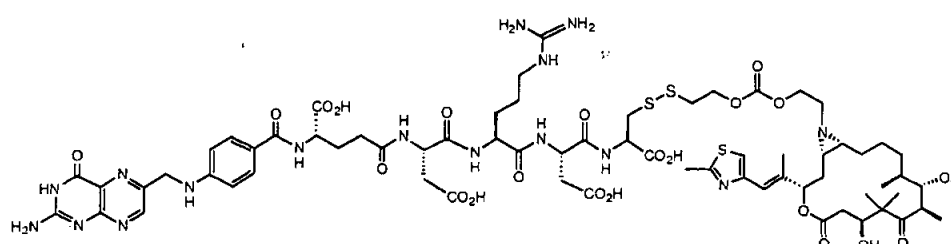
Compound J

[0120] 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 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.

[0121] 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).

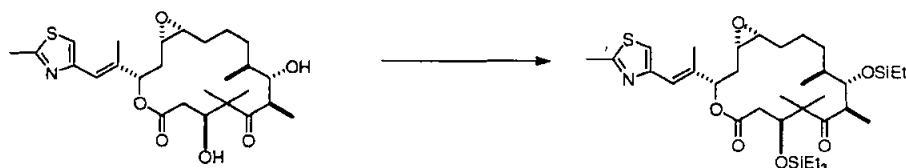
- 50 -

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-azabicyclo[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

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[(triethylsilyl)oxy]-4,17-dioxabicyclo[14.1.0]heptadecane-5,9-dione



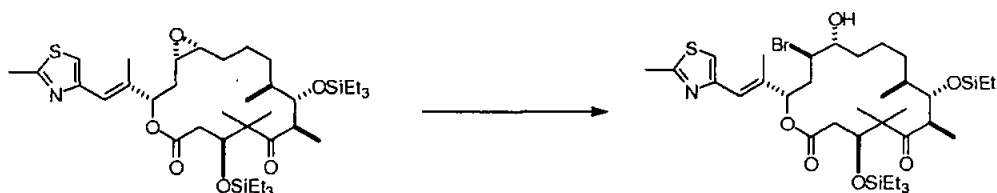
[0122] To a stirred solution of Epothilone A (5.0 g, 10.1 mmol), imidazole (3.40 g, 49.9 mmol) and DIPEA (28.5 mL, 163.6 mmol) in anhydrous DMF (100 mL), under N₂ atmosphere was added triethylsilyl chloride (15.0 mL, 89.4 mmol). After the addition was complete, the reaction solution was warmed at 55 °C (oil bath temperature) for 12 hr to give a single spot (tlc) of the desired product.

[0123] 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.

[0124] 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[(triethylsilyl)oxy]-1-oxacyclohexadecane-2,6-dione

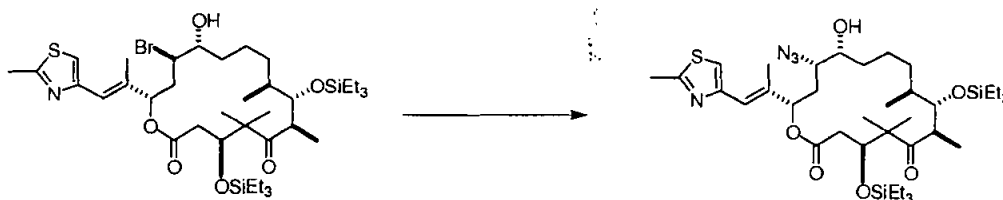


[0125] To a stirred solution of [1S-[1R*,3R*(E),7R*,10S*,11R*,12R*,16S*]]-8,8,10,12-Tetramethyl-3-[1-methyl-2-(2-methyl-4-thiazolyl)ethenyl]-7,11-bis[(triethylsilyl)oxy]-4,17-dioxabicyclo[14.1.0]heptadecane-5,9-dione (5.0 g, 6.92 mmol) in anhydrous dichloromethane (140 mL) at -20 °C under N₂ atmosphere was added MgBr₂·Et₂O (3 x 2.13 g, 24.78 mmol) in three portions 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%).

[0126] 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

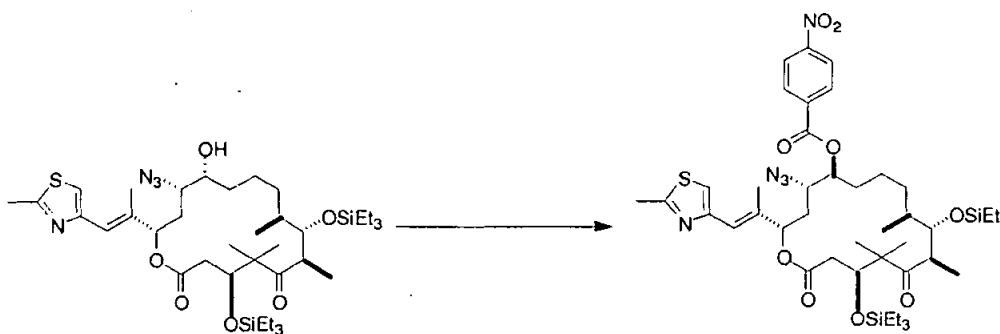
- 52 -



[0127] 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.

[0128] 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).

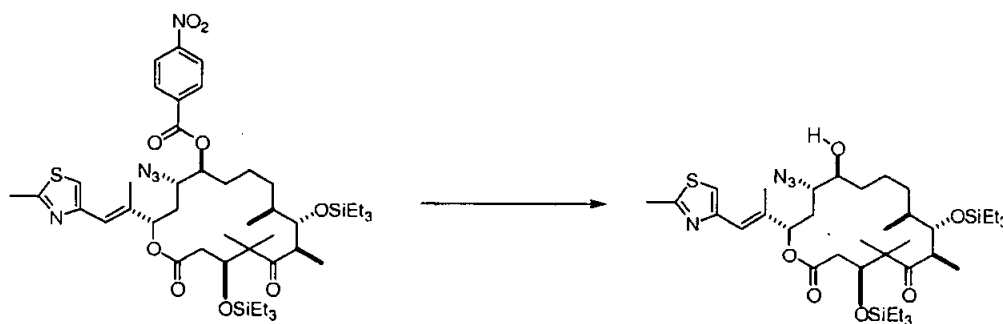
D. Preparation of [4S-[4R*,7S*,8R*,9R*,13R*,14R*,16R*(E)]]-14-Azido-5,5,7,9-tetramethyl-16-[1-methyl-2-(2-methyl-4-thiazolyl)ethenyl]-13-[(4-nitrobenzoyl)oxy]-4,8-bis[(triethylsilyl)oxy]-1-oxacyclohexadecane-2,6-dione



[0129] [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%).

[0130] 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

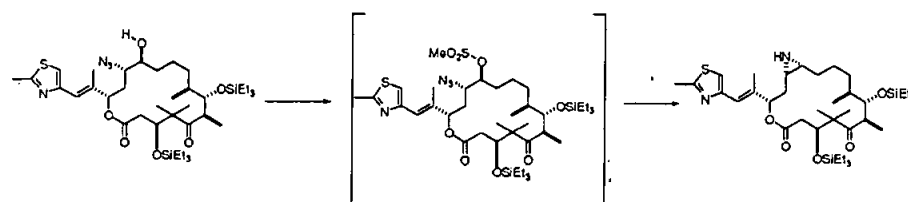
E. Preparation of [4S-[4R*,7S*,8R*,9R*,13R*,14R*,16R*(E)]]-14-Azido-13-hydroxy-5,5,7,9-tetramethyl-16-[1-methyl-2-(2-methyl-4-thiazolyl)ethenyl]-4,8-bis[(triethylsilyl)oxy]-1-oxacyclohexadecane-2,6-dione



[0131] 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%).

[0132] 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

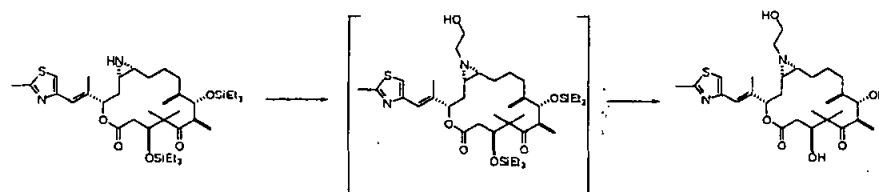


[0133] [4S-[4R*,7S*,8R*,9R*,13R*,14R*,16R*(E)]]-14-Azido-13-hydroxy-5,5,7,9-tetramethyl-16-[1-methyl-2-(2-methyl-4-thiazolyl)ethenyl]-4,8-bis[(triethylsilyl)oxy]-1-oxacyclohexadecane-2,6-dione (5.97 g, 7.8 mmol) and triethylamine (4.34 mL, 31.2 mmol) were dissolved in dichloromethane (85 mL) and cooled 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 removed from the ice bath, and stirred at RT. After 3 hr, the reaction mixture was taken-up in saturated NaHCO₃ (300 mL), extracted with dichloromethane (3 X 100 mL), dried over Na₂SO₄, concentrated and taken to next step without further purification.

[0134] The crude methanesulfonate ester was dissolved in THF/H₂O (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).

[0135] LC-MS: Phenomenex C18, 4.6 x 50 mm, isocratic, 5 min, 100%B. (B = 90% MeOH/H₂O + 0.1% TFA), flow rate at 4.0 mL/min, UV 220 nm. Retention time = 0.298 min. MS (ESI) M+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

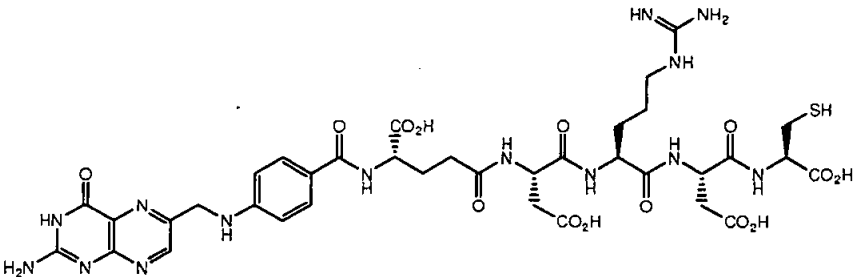


[0136] K_2CO_3 (1.4g, 10.2 mmol) and 2-bromoethanol (0.52 mL, 7.3 mmol) were added to [1S-[1R*,3R*(E),7R*,10S*,11R*,12R*,16S*]]-8,8,10,12-Tetramethyl-3-[1-methyl-2-(2-methyl-4-thiazolyl)ethenyl]-7,11-bis[(triethylsilyl)oxy]-4-oxa-17-azabicyclo[14.1.0]heptadecane-5,9-dione (1.05 g, 1.46 mmol) in acetonitrile (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.

[0137] 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 $NaHCO_3$ (200 mL), extracted with dichloromethane (3 X 100 mL), dried over Na_2SO_4 , 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).

[0138] LC-MS: Waters Sunfire C18, 4.6 x 50mm, gradient, 0 to 100%B over 4 min. (A= 10% MeOH/ H_2O + 0.1% TFA; B = 90% MeOH/ H_2O + 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



[0139] (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
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 Pterioic 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

[0140] The following procedures were used:

Coupling steps:

[0141] 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 pterioic acid:

[0142] 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 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.

- 58 -

[0143] 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).

Cleavage step:

[0144] The protected intermediate was released from the resin using the cleavage reagent prepared from 92.5% (50mL) TFA, 2.5% (1.34mL) H_2O , 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.

- 59 -

Deprotection step:

[0145] The N^{10} -trifluoroacetyl protecting group in the pterioic 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 H_2O :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:

[0146] Column: Waters NovaPak C_{18} 300x19mm

[0147] Solvent A: Buffer 10mM Ammonium Acetate, pH=5

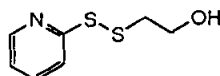
[0148] Solvent B: Acetonitrile

[0149] Elution: 1%B to 20%B in 40min at 15mL/min

[0150] 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



[0151] To a solution of methoxycarbonyl sulfonyl 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

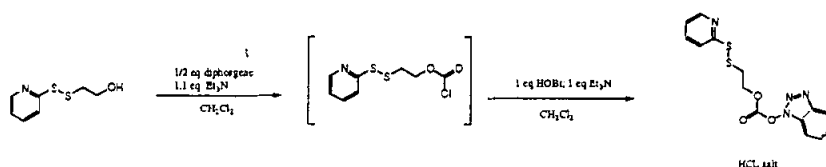
- 60 -

dichloromethane and then dried under vacuum overnight to afford 2-(2-(Pyridin-2-yl)disulfanyl)ethanol (23.6 g), as the HCl salt.

[0152] TLC: $R_f = 0.45$

[0153] 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

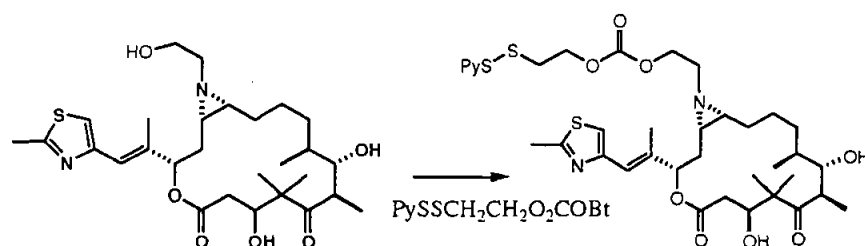


[0154] A solution of diphosgene (2.28 g, 11.5 mmol) in 15 mL anhydrous dichloromethane was stirred under argon in a roundbottom flask and cooled by a ice/salt bath. An addition funnel with a mixture of 2-(pyridin-2-yl)disulfanyl)ethanol (5.01 g, 22.4 mmol) and triethylamine (2.25 g, 22.2 mmol) in 65 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.

[0155] 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 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



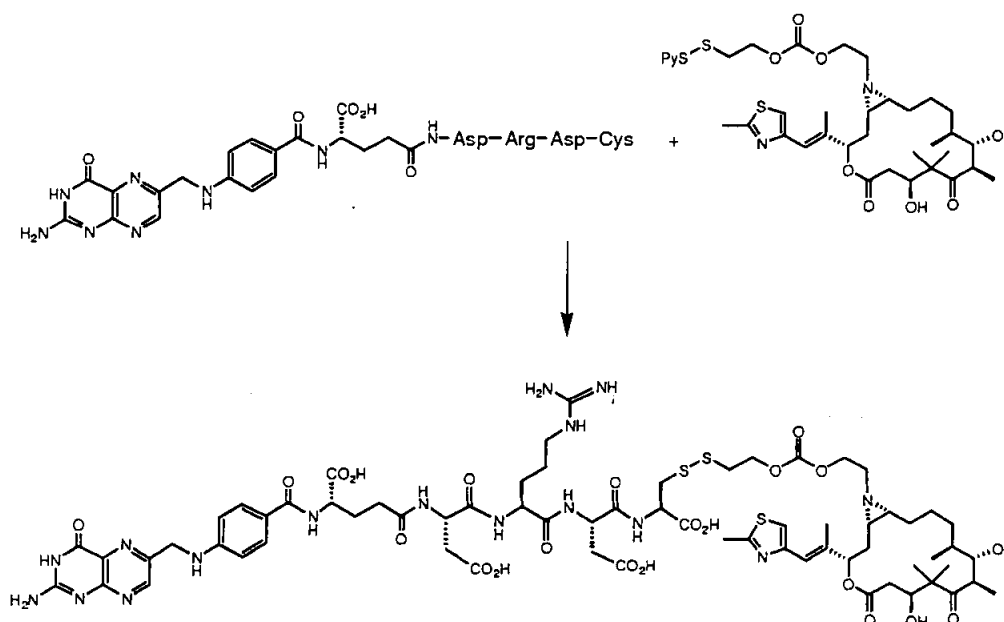
[0156] To a solution of [1S-[1R*,3R*(E),7R*,10S*,11R*,12R*,16S*]]-7,11-Dihydroxy-17-[2-hydroxyethyl]-8,8,10,12-tetramethyl-3-[1-methyl-2-(2-methyl-4-thiazolyl)ethenyl]-4-oxa-17-azabicyclo[14.1.0]heptadecane-5,9-dione in anhydrous dichloromethane at 0°C was added DMAP (1.2 eq.) and benzo[d][1,2,3]triazol-1-yl 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



[0157] 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

- 63 -

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:

[0158] Column: Waters Nova-Pak HR C18 6µm 30x300 mm

[0159] Mobile phase A: 7.0 mM sodium phosphate buffer, pH=7.2

[0160] Mobile phase B: acetonitrile

[0161] Method: 10%B-50%B in 30 min, flow rate: 40 mL/min

Analytical HPLC parameters:

[0162] Column: Waters Symmetry C18 3.5µm 4.6x75 mm

[0163] Mobile phase A: 10 mM Triethylammonium acetate (TEAOAc) buffer, pH=7.5

[0164] Mobile phase B: Acetonitrile

[0165] Method: 20%B-40%B in 10 min, flow rate: 1.0 mL/min

Accurate mass m/z (C₆₇H₉₂N₁₆O₂₂S₃):

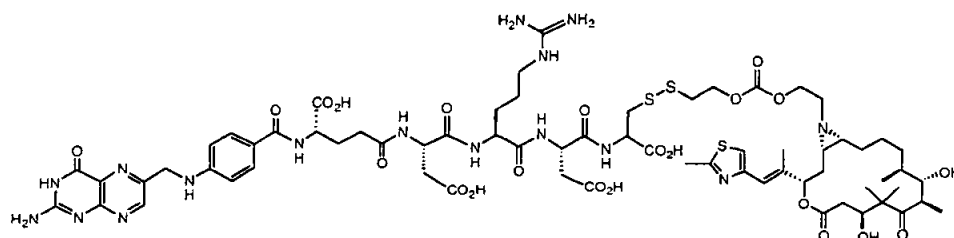
[0166] Calculated: 1570.58907 (M+2H), 785.29454 (M+2H)²⁺, 523.86563 (M+3H)³⁺, 393.15118 (M+4H)⁴⁺

- 64 -

[0167] 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)

[0168]

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.



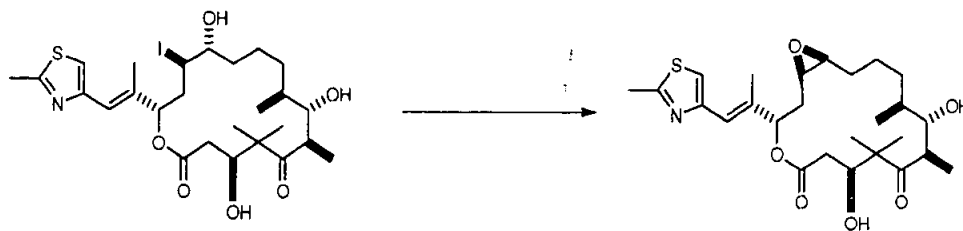
[0169] Epothilone C (54.3 g, 113.7 mmol) was dissolved in acetonitrile (480 mL) and water (50 mL). The solution was cooled to -5 °C to -10 °C. Iodine (144.3 g, 568.4 mmol) was added to the reaction and the reaction was held at least for 15 hr.

- 65 -

[0170] 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.

[0171] HPLC: Phenomex Luna C8 (2) 3 μ m, 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.



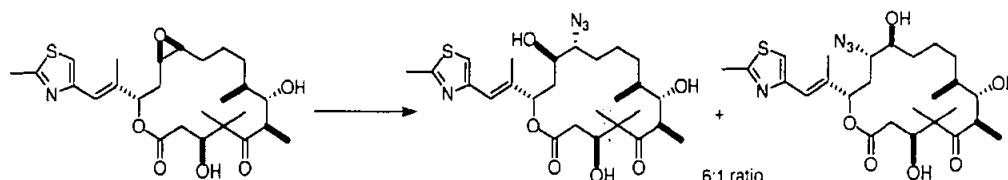
[0172] [4S,7R,8S,10R,9S,13R,16S]-4,8,13-trihydroxy-14-iodo-5,5,7,9-tetramethyl-16-[(E)-1-[2-methylthiazol-4-yl]prop-1-en-2-yl] oxacyclohexadecane-2,6-dione (85.6 g) was dissolved in acetonitrile (670 mL) and water (130 mL). Triethylamine (135 mL, 968.5 mmol) was added to the solution. The reaction was heated to 50 °C to 60 °C for at least 8 hr.

[0173] 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 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.

- 66 -

[0174] HPLC: Phenomex Luna C8 (2) 3 μ m, 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.



[0175] 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.

[0176] 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 NH₄OAc in CH₃CN/H₂O 5:95; B = 0.01 M NH₄OAc in CH₃CN/H₂O 95:5. Flow

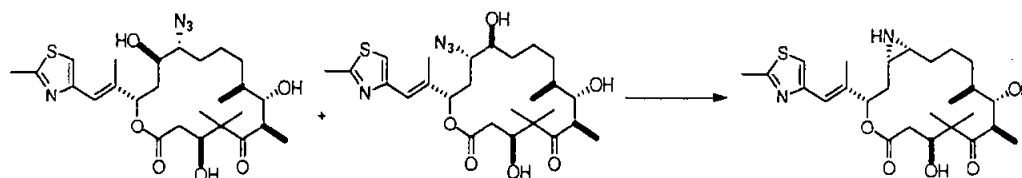
- 67 -

rate: 3.0 mL/min. Wavelength: UV 250 nm. Retention time = 5.52 min. MS (ESI)
 $(M+H)^+ = 537.69$

[0177] This reaction also works in other solvents like, acetone, acetonitrile, tetrahydrofuran, 2-propanol, dimethylformamide, methylsulfoxide and N-methylpyrrolidinone.

[0178] Tertrabutylammonium 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.



[0179] 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 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:

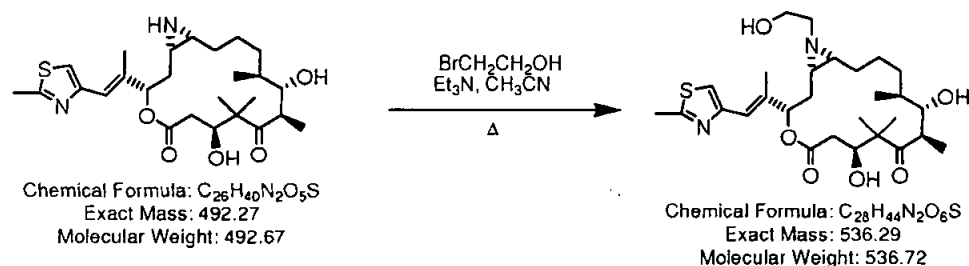
- 68 -

3.0 mL/min. Wavelength: UV 250 nm. Retention time = 4.43 min. MS (ESI) (M+H)⁺ = 493.68

[0180] 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

[00100]



[0181] 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 °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).

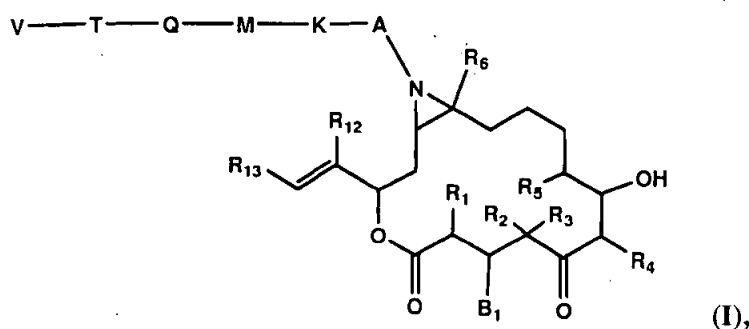
[0182] LC-MS: Phenomenex C8, 3 μm, 4.6 x 150mm, gradient, 10 to 50%B over 10 min, and stop at 20 min. (A= 5% MeCN/H₂O + 0.01 M NH₄OAc; B = 95%

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.

[0183] 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.

WE CLAIM:

1. A conjugated compound having the formula (I),



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

V is a folate-receptor binding moiety;

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;

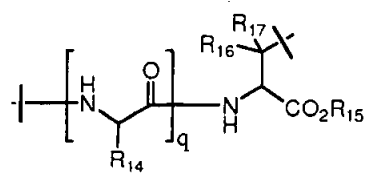
R₁₂ is H, alkyl, substituted alkyl, or halogen;

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

- 71 -

m is 0 to 6;

T has the formula:



wherein R₁₄ 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

R₁₅, R₁₆ and R₁₇ are independently hydrogen, lower alkyl, or substituted lower alkyl or R₁₆ and R₁₇ are taken together to form a cycloalkyl.

2. The conjugated compound according to claim 1, wherein:

K is O;

A is C₂₋₄alkylene;

B_1 is $-\text{OH}$;

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

R₆ is hydrogen or methyl;

R₁₃ is an optionally substituted 5 or 6 membered heteroaryl; and

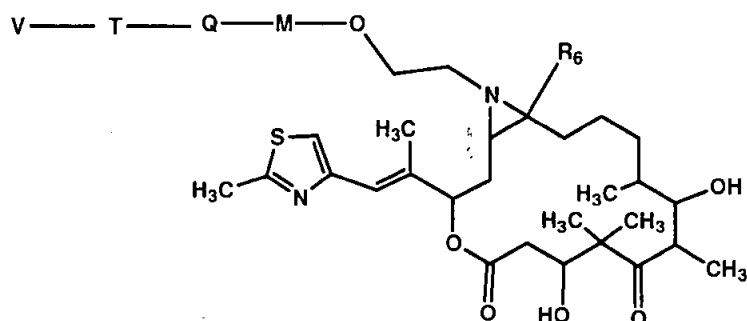
M is $-S-R_{30}-O-C(=O)-$, $-S-R_{30}-C(=O)-$, or $-S-R_{34}R_{10}-O-C(=O)-$ wherein

R₃₀ is lower alkylene or substituted lower alkylene; and R₃₄ is arylene or substituted arylene.

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

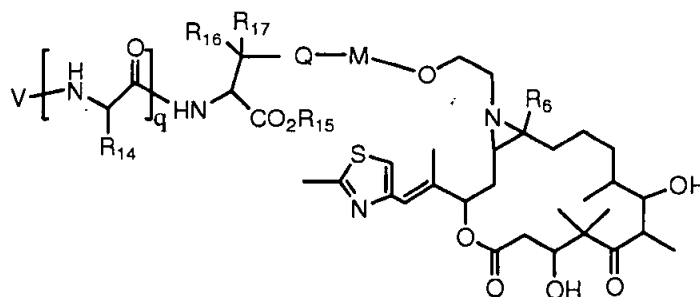
- 72 -

4. The conjugated compound according to claim 2, having the formula Ia



Ia

5. A conjugated compound having the following formula Ib:



Ib

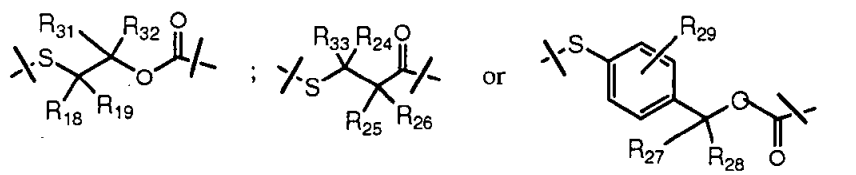
wherein

V is a folate, or an analog or derivative thereof;

R₆ is H or lower alkyl;

Q is O, S, or NR₇;

M is



R₁₄ at each occurrence is, independently, hydrogen, alkyl, substituted alkyl, aryl, substituted aryl, arylalkyl, substituted arylalkyl, cycloalkyl, substituted cycloalkyl, cycloalkylalkyl, substituted cycloalkylalkyl, heteroaryl, heteroarylalkyl,

- 73 -

substituted heteroarylalkyl, substituted heteroaryl, heterocycloalkyl, or substituted heterocycloalkyl;

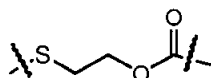
q is 1 to 10;

R₁₅, R₁₆ and R₁₇ are independently hydrogen, lower alkyl or substituted lower alkyl; and

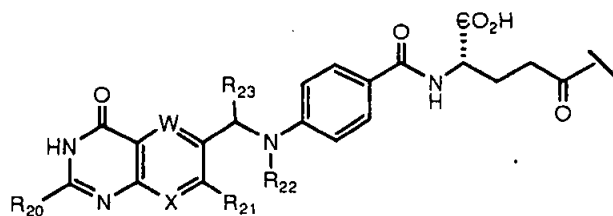
R₁₈, R₁₉, R₃₁, R₃₂, R₃₃, R₂₄, R₂₅, R₂₆, R₂₇, R₂₈ and R₂₉ are each, independently, alkyl, substituted alkyl, cycloalkyl or substituted cycloalkyl; or any of R₁₈ and R₁₉, R₃₁ and R₃₂, R₁₉ and R₃₁, R₃₃ and R₂₄, R₂₅ and R₂₆, R₂₄ and R₂₅; or R₂₇ and R₂₈ may be taken together to form a cycloalkyl.

6. The conjugated compound according to any one of claims 1, 2, 3, 4, or 5, wherein q is 1 to 5, and each R₁₄ is independently H, methyl, guanidinypropyl, -(CH₂)₁₋₂-CO₂H, -CH₂-SH, -CH₂-OH, imidazolyl(methyl), aminobutyl, or -CH(OH)-CH₃.

7. The conjugated compound according to any one of claims 1, 2, 3, 4, 5, or 6, wherein M is:



8. The conjugated compound according to any one of claims 1, 2, 3, 4, 5, 6 or 7, wherein V is



and

W and X are independently CH or nitrogen;

R₂₀ is hydrogen, amino or lower alkyl;

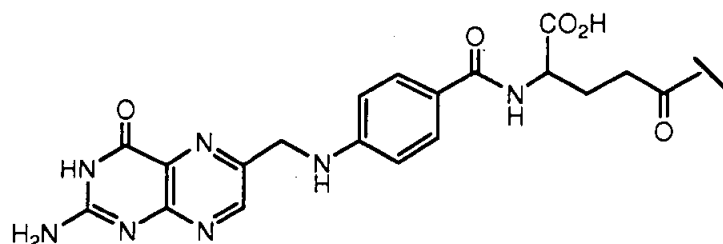
R₂₁ is hydrogen, lower alkyl, or forms a cycloalkyl group with R₂₃;

- 74 -

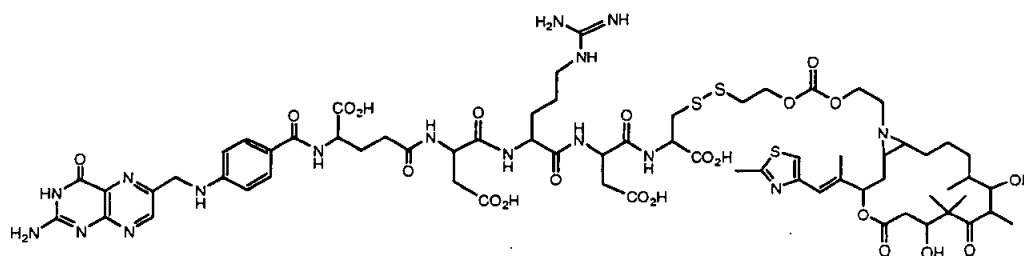
R₂₂ is hydrogen, lower alkyl, lower alkenyl, or lower alkynyl; and

R₂₃ is hydrogen or forms a cycloalkyl with R₂₁.

9. The conjugated compound according to any one of claims 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 or 8, wherein V is

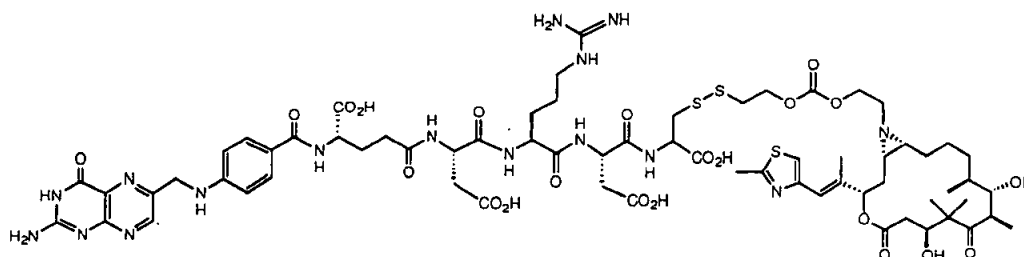


10. The conjugated compound according to claim 1 having the formula



or a pharmaceutically acceptable salt and/or solvate thereof.

11. The conjugated compound according to claim 10 having the formula



or a pharmaceutically acceptable salt and/or solvate thereof.

- 75 -

12. A pharmaceutical composition comprising a conjugated compound according to any one of claims 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 or 11, or a pharmaceutically-acceptable salt thereof and/or solvate thereof, in a pharmaceutically-acceptable carrier.

13. Use of a compound according to any one of claims 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 or 11, for preparing a medicament for the treatment of a folate-receptor associated condition in a patient.

14. The Use according to claim 13 wherein said condition is cancer selected from the group consisting of ovarian cancer, skin cancer, breast cancer, lung cancer, colon cancer, nose cancer, throat cancer, mammary gland cancer, liver cancer, kidney cancer, spleen cancer, brain cancer, mesothelioma, pituitary adenoma, cervical cancer, renal cell carcinoma or other renal cancer, choroid plexus carcinoma, or an epithelial tumor.

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 (1/2)

AA.IV	n.t.	50	
AA.V	n.t.	>100	
AA.VI	n.t.	>100	

FIG. 1

FIG. 1 (2/2)

Conjugate Number	Relative Affinity	EC ₅₀ (nM) KB cells	Structure
BB.I	n.t.	68	
BB.II	0.13	10-100 (decomposition to free epothilone)	
BB.III	n.t.	-75	

FIG. 2

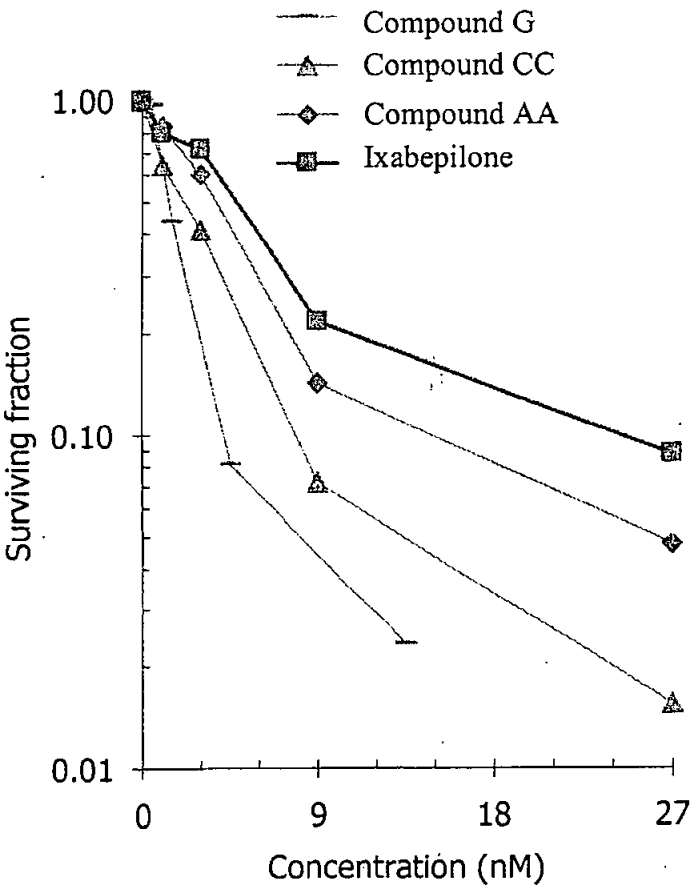
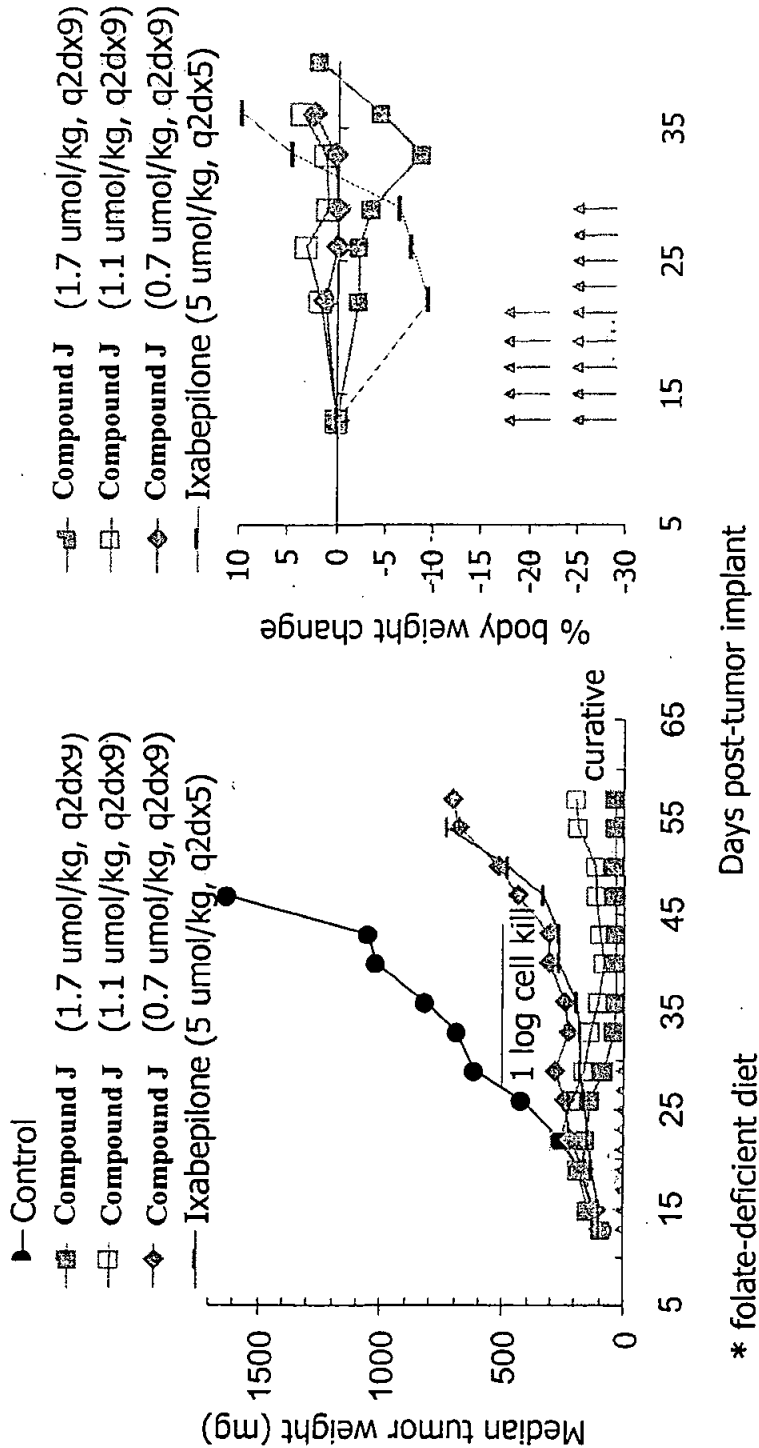


FIG. 3

FIG. 4A Efficacy* FIG. 4B Weight Loss*



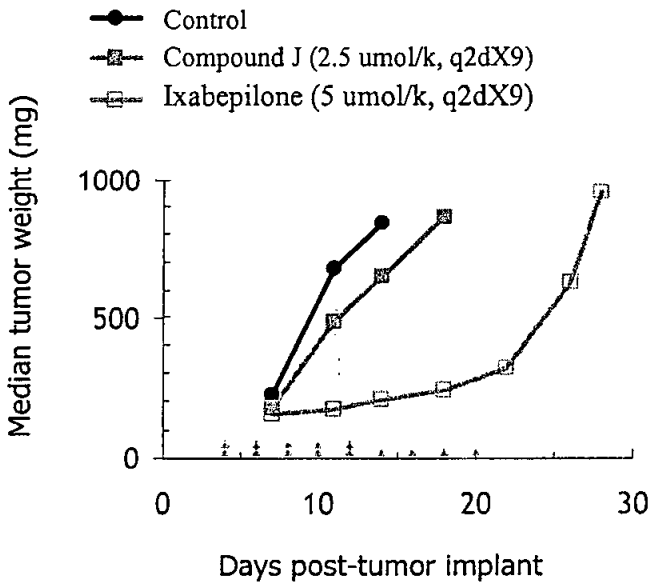


FIG. 5

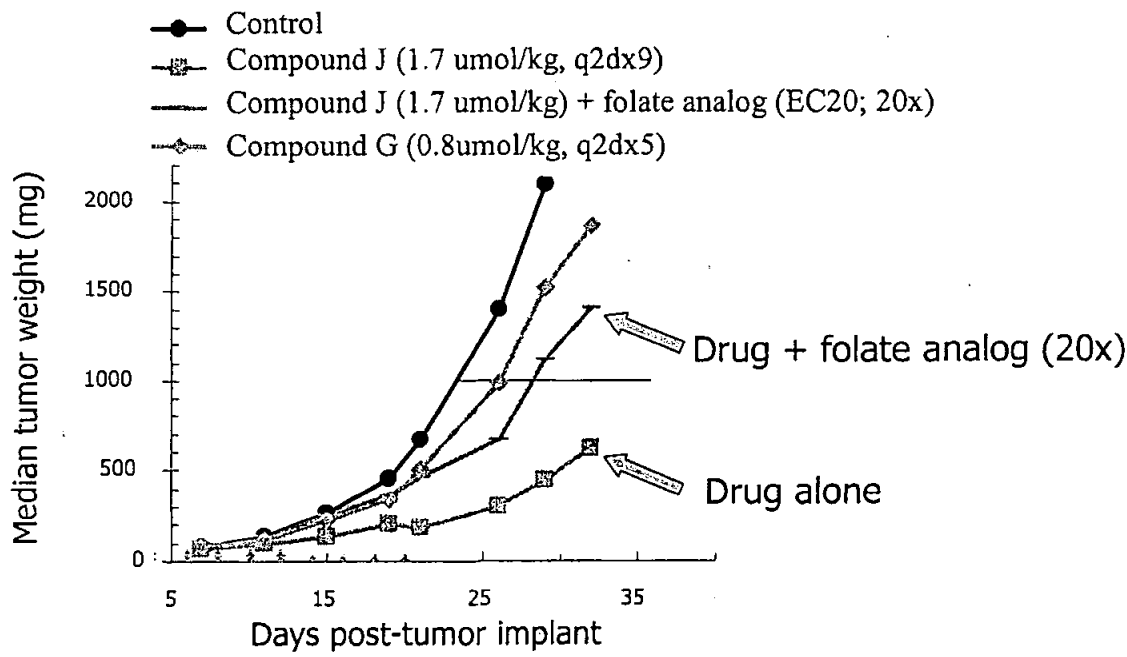


FIG. 6

PATENT COOPERATION TREATY

000092

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCT

To:

see form PCT/ISA/220

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY
(PCT Rule 43bis.1)

Date of mailing
(day/month/year) see form PCT/ISA/210 (second sheet)

Applicant's or agent's file reference
see form PCT/ISA/220

FOR FURTHER ACTION
See paragraph 2 below

International application No.
PCT/US2007/069740

International filing date (day/month/year)
25.05.2007

Priority date (day/month/year)
25.05.2006

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
INV. A61K47/48 A61P35/00

Applicant
BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☐ Box No. II Priority
- ☐ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☐ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☐ Box No. VI Certain documents cited
- ☐ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☐ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. FURTHER ACTION

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will usually be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA") except that this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66.1bis(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

3. For further details, see notes to Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA:



European Patent Office - P.B. 5818 Patentlaan 2
NL-2280 HV Rijswijk - Pays Bas
Tel. +31 70 340 - 2040 Tx: 31 651 epo nl
Fax: +31 70 340 - 3016

Date of completion of
this opinion

see form
PCT/ISA/210

Authorized Officer

James, Sonya

Telephone No. +31 70 340-4528



WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/US2007/069740

Box No. I Basis of the opinion

1. With regard to the **language**, this opinion has been established on the basis of:
 - ☒ the international application in the language in which it was filed
 - ☐ a translation of the international application into , which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1 (b)).
2. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this opinion has been established on the basis of:
 - a. type of material:
 - ☐ a sequence listing
 - ☐ table(s) related to the sequence listing
 - b. format of material:
 - ☐ on paper
 - ☐ in electronic form
 - c. time of filing/furnishing:
 - ☐ contained in the international application as filed.
 - ☐ filed together with the international application in electronic form.
 - ☐ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search.
3. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
4. Additional comments:

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/US2007/069740

Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	<u>1-14</u>
	No: Claims	
Inventive step (IS)	Yes: Claims	
	No: Claims	<u>1-14</u>
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	<u>1-14</u>
	No: Claims	

2. Citations and explanations

see separate sheet

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/US2007/069740

Re Item V

**Reasoned statement with regard to novelty, inventive step or industrial applicability;
citations and explanations supporting such statement**

1. Reference is made to the following documents:

D1: WO 2006/042146 A (UNIV EMORY [US]; NIE SHUMING [US]; LEE YONG KYU [US]; KIM GLORIA [US]) 20 April 2006 (2006-04-20)

D2: ALICIA REGUEIRO-REN ET AL.: "Synthesis and Biological Activity of Novel Epothilone Aziridines" ORGANIC LETTERS, vol. 3, no. 17, 26 July 2001 (2001-07-26), pages 2693-2696, XP002450100

2. Novelty (Art. 33(2) PCT)

2.1. The present application relates to conjugates of epothilone aziridines and derivatives thereof with a folate-receptor binding moiety, useful for targeted delivery of the said epothilone aziridines, and to compositions and uses of the said conjugates.

2.2. The document D1 relates to conjugates comprising a therapeutic agent and a targeting agent and is considered to be the closest prior art to the present application.

2.3. D1 discloses a conjugate comprising an epothilone and a folate moiety, which are linked by a polysaccharide linker.

2.4. The differences between the conjugate of claim 1 of the present application, and the known conjugate of D1, are in the aziridine group, in the position to which the linker is coupled, and in the identity of the linker, which involves a peptide chain in the compounds of claim 1.

2.5. The differences between the conjugate of claim 5 of the present application, and the known conjugate of D1, are the same as discussed above for the conjugates of claim 1.

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/US2007/069740

2.6. Therefore, the subject-matter of claims 1 and 5 of the present application is considered to be novel in the sense of Article 33(2) PCT.

2.7. Claims 2-4 are dependent on claim 1, claims 6-12 are dependent on claims 1 or 5, and claims 13 and 14 relate to uses of the compounds of claims 1-11, therefore the subject-matter of claims 2-4 and 6-14 is also considered to be novel in the sense of Article 33(2) PCT.

3. Inventive Step (Art. 33(3) PCT)

3.1. The present application does not meet the criteria of Article 33(1) PCT, because the subject-matter of claims 1-14 does not involve an inventive step in the sense of Article 33(3) PCT.

3.2. The difference between the subject-matter of claims 1-14, and the subject-matter of D1, has been discussed above.

3.3. No technical effect can be seen to derive from this difference.

3.4. Therefore, the problem to be solved by the present application can be considered to be to provide alternatives to the conjugate of D1.

3.5. The document D2, which is related to epothilone aziridines would be known to the person skilled in the art.

3.6. D2 discloses epothilone aziridines and methods for their synthesis, and also demonstrates the biological activity of epothilone aziridines with a variety of substituents on the nitrogen position (table 1). D2 also discloses that substituents at the N-position can be tolerated, and that changing the substituent at this position could help to fine-tune biological and physicochemical properties of the compound (p2696, column 2, lines 10-20).

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)

International application No.

PCT/US2007/069740

3.7. That is, the compounds of D2 would be an obvious choice for the person skilled in the art seeking to prepare alternatives to the conjugate of D1.

3.8. There does not appear, from currently available data, to be any particular advantage or surprising effect of the linker of the compounds of claim 1, that is the linker appears to have been chosen arbitrarily to link the epothilone aziridines of D2 to a folate moiety so as to provide an alternative to the compounds of D1.

3.9. Therefore, the subject-matter of claim 1 does not appear to involve an inventive step in the sense of Article 33(3) PCT.

3.10. The same arguments apply to the subject-matter of claims 2-12 of the present application, **therefore the subject-matter of claims 2-12 is also not considered to involve an inventive step in the sense of Article 33(3) PCT.**

3.11. The conjugates of D1 are intended for use for treating cancer (see claim 47), **therefore the subject-matter of claims 13 and 14 of the present is also not considered to involve an inventive step in the sense of Article 33(3) PCT.**

4. Industrial Applicability (Art. 33(4) PCT)

The subject-matter of the present claims 1-14 is related to conjugates useful for the treatment of cancer and compositions thereof and uses thereof, and is therefore considered to be industrially applicable (Art. 33(4) PCT).

PATENT COOPERATION TREATY

PCT/US2007/069740

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION CONCERNING
SUBMISSION OR TRANSMITTAL
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

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) 03 August 2007 (03.08.2007)	
Applicant's or agent's file reference 00040.030250.PC	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/US2007/069740	International filing date (day/month/year) 25 May 2007 (25.05.2007)
International publication date (day/month/year) Not yet published	Priority date (day/month/year) 25 May 2006 (25.05.2006)
Applicant BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY et al	

- By means of this Form, which replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents, the applicant is hereby notified of the date of receipt by the International Bureau of the priority document(s) relating to all earlier application(s) whose priority is claimed. Unless otherwise indicated by the letters "NR", in the right-hand column or by an asterisk appearing next to a date of receipt, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
- (If applicable)* The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which, on the date of mailing of this Form, had not yet been received by the International Bureau under Rule 17.1(a) or (b). Where, under Rule 17.1(a), the priority document must be submitted by the applicant to the receiving Office or the International Bureau, but the applicant fails to submit the priority document within the applicable time limit under that Rule, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
- (If applicable)* An asterisk (*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b) (the priority document was received after the time limit prescribed in Rule 17.1(a) or the request to prepare and transmit the priority document was submitted to the receiving Office after the applicable time limit under Rule 17.1(b)). Even though the priority document was not furnished in compliance with Rule 17.1(a) or (b), the International Bureau will nevertheless transmit a copy of the document to the designated Offices, for their consideration. In case such a copy is not accepted by the designated Office as the priority document, Rule 17.1(c) provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

Priority date	Priority application No.	Country or regional Office or PCT receiving Office	Date of receipt of priority document
25 May 2006 (25.05.2006)	60/808,367	US	23 July 2007 (23.07.2007)

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Nora Lindner
Facsimile No. +41 22 338 82 70	Facsimile No. +41 22 338 82 70 Telephone No. +41 22 338 74 02

- 800093

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) 28 February 2008 (28.02.2008)	
Applicant's or agent's file reference 00040.030250.PC	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/US2007/069740	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 representative		
Name and Address	State of Nationality	State of Residence
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	
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 ENDOCYTE, INC. 3000 Kent Avenue Suite A1-100 West Lafayette, IN 47906 United States of America	State of Nationality	State of Residence US
	Telephone No. 765-463-7175	
	Facsimile No. 765-463-9271	
	Teleprinter No.	
3. Further observations, if necessary: The person identified in Box 2 should be added to the record as applicant for all designated States except the United States of America.		
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 Tholle Peter e-mail pt04.pct@wipo.int Telephone No. +41 22 338 74 04
Facsimile No. +41 22 338 89 95 Form PCT/IB/306 (October 2005)	I/DKK2KQ5K0

2007100

Título

CONJUGADOS DE ANÁLOGOS DE AZIRIDINIL-EPOTILONA
Y COMPOSICIONES FARMACEUTICAS QUE COMPRENDEN
LOS MISMOS

Traducción del inglés al español de la
descripción y documentos PCT/US2007/069740

CONJUGADOS DE ANALOGOS DE AZIRIDINIL-EPOTILONA Y COMPOSICIONES
FARMACEUTICAS QUE COMPRENDEN LOS MISMOS

Campo de la Invención

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

10

Antecedentes de la Invención

Las epotilonas A y B son compuestos que se presentan naturalmente que se descubrieron por Höfle et al., como aislados de productos de fermentación del microorganismo, *Sorangium cellulosum* (ver, por ejemplo, WO 93/10121). Höfle et al. también descubrió 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 de EUA 6,624,310. Mientras que en 1993 Höfle et al reportó 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 substituidos de epotilona B incluyendo un análogo amino 21, análogos 2,3-olefínicos, análogos ciano C-3, análogos de ciclopropilo, y análogos heterocíclicos incluyendo análogos de aziridinil-epotilona. Ver, por ejemplo Patente de EUA 6,605,599, Patente de EUA 6,262,094, Patente de EUA 6,399,638, Patente de EUA 6,498,257, Patente de EUA 6,380,395, y Patente de EUA 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, WO 99/65913, Patente de EUA 6,441,186, Patente de EUA 6,284,781, Patente de EUA 6,660,758; WO 98/25929, WO 00/99/07692, WO 99/67252, WO 00/00485, WO 00/37473, Patente de EUA 6,380,394, Patente de EUA 6,242,469, Patente de EUA 6,531,497, Patente de EUA No. de solicitud 2004/0072870A1, Patente de EUA No. de solicitud 2003/0023082 A1, WO 01/83800, Patente de EUA 6,441,186, Patente de EUA No. 6,489,314, Patente de EUA 6,589,968, Patente de EUA No. de solicitud 2004/0053910 A1, Patente de EUA No. de solicitud

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 de EUA No. 6,930,102
B2, todas las cuales se incorporan para referencia en su
5 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 típicamente trabaja
10 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 secundarios no deseados. Adicionalmente,
15 los fármacos anticancerígenos típicamente 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
20 anticancerígenos y/o ingredientes de formulación se han
conocido para provocar neuropatía y otros efectos secundarios
tales como reacciones de hipersensibilidad. Estos efectos
secundarios adversos resaltan la necesidad de terapias
anticancerígenas que sean selectivas para poblaciones
25 celulares patógenicas y por lo tanto resulten en la toxicidad

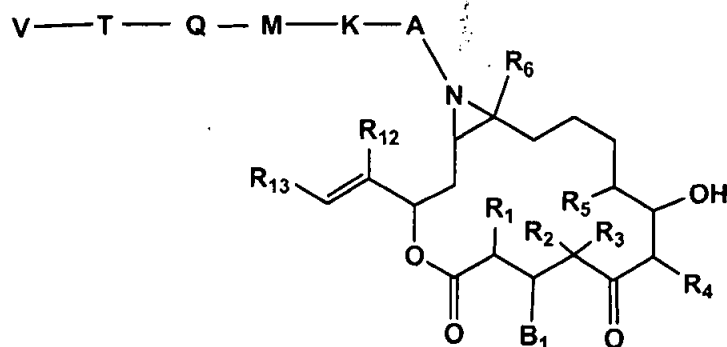
hospedera reducida.

Sin embargo, como se discute en WO 2004/054622 A1 los científicos han intentado durante muchos años el uso de anticuerpo monoclonales (mAbs) 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, los enlazadores, 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 et al., WO 05/074901 (cedida a Schering AG). En consecuencia, hay una necesidad en la técnica para usar la terapia de fármacos objetivo, por ejemplo, análogos de epotilona, para el tratamiento de cáncer.

Breve Descripción de la Invención

Ciertos estados de enfermedad, tales como cáncer, se caracterizan por una población de células que únicamente expresan, sobreexpresan, o preferiblemente expresan un sitio de enlace que es accesible para un folato, análogo de folato, o derivado del mismo. Los solicitantes han descubierto compuestos conjugados que tienen la siguiente Fórmula I, incluyendo sales y/o solvatos farmacéuticamente aceptables de

los mismos, que pueden ser objetivos selectivamente para células que contienen estos sitios de enlace, por ello reducen muchos de los efectos secundarios asociados con la quimioterapia típica.



I

en donde:

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

Q es O, S, o NR_7 ;

15 M es un enlazador liberable;

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 $-(\text{CHR}_{10})-$, $-\text{C}(=\text{O})-$, $-\text{C}(=\text{O})-\text{C}(=\text{O})-$, $-\text{OC}(=\text{O})-$, $-\text{N}(\text{R}_{11})\text{C}(=\text{O})-$, $-\text{SO}_2-$, ó $-\text{N}(\text{R}_{11})\text{SO}_2-$;

20 B₁ es hidroxilo o ciano y R₁ es hidrógeno o B₁ y R₁ se toman 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 tomarse junto con el carbono al cual se enlazan para formar un cicloalquilo opcionalmente sustituido;

25 R₄ es hidrógeno, alquilo, alqueno, alquilo sustituido,

alquenilo sustituido, arilo, o arilo sustituido;

R_6 es hidrógeno, alquilo o alquilo sustituido;

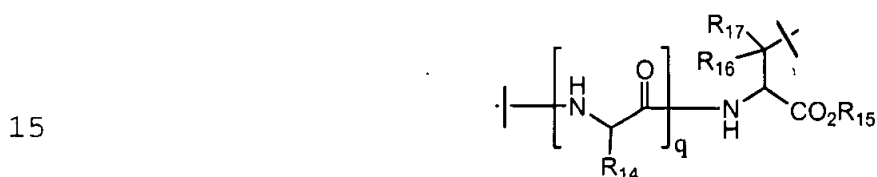
R_{7a} , R_7 , R_8 , R_9 , R_{10} , y R_{11} son independientemente
 hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo,
 5 cicloalquilo sustituido, arilo, arilo sustituido,
 heterocicloalquilo, heterocicloalquilo sustituido,
 heteroarilo, o heteroarilo sustituido;

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

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

m es 0 hasta 6;

T tiene la fórmula:



en donde

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

q es 1 hasta 10; y

R₁₅, R₁₆ y R₁₇ son independientemente hidrógeno, alquilo, alquilo substituido, o cicloalquilo.

5

Breve Descripción de las Figuras

La figura 1 es las estructuras químicas, afinidades relativas y valores EC50 (nM) contra las células neoplásicas KB de seis conjugados de folato del compuesto AA análogo de epotilona (número de conjugado AA.I hasta AA-VI).

10

La figura 2 es las estructuras químicas, afinidades relativas y valores EC50 (nM) contra las células neoplásicas KB de tres conjugados de folato del compuesto BB análogo de epotilona (número de conjugado BB.I hasta BB.III).

15

La figura 3 demuestra la fracción de clones KB sobrevivientes (fracción sobreviviente; eje y) después del tratamiento con concentraciones incrementadas (concentración (nM); eje X) del compuesto G (barras), compuesto CC (triángulos), compuesto AA (rombos), o ixabepilona (cuadros).

20

Las figuras 4A-4B demuestran la eficacia antitumoral *in vivo* del tratamiento de xenoinjertos de carcinoma epidermoide nasofaringeal KB en ratones agénicos lampiños con el compuesto J (cuadros grises, cuadros blancos, rombos grises) en diversas dosis o ixabepilona (barras negras), comparadas con la ausencia tratamiento (control; círculos negros), como un medida (Figura 4A) del peso promedio del tumor medio (mg; eje

25

y) varios días posteriores a la implantación del tumor (eje x) o (figura 4B) pérdida de peso (% cambio de peso corporal; eje y) varios días posteriores a la implantación del tumor (eje x9).

5 La figura 5 demuestra los efectos antitumorales *in vivo* del compuesto J (cuadros grises) o ixabepilona (cuadros blancos), comparados con la ausencia de tratamiento (control; círculos negros), contra carcinoma de pulmón murino FR (-) M109 como una medida del peso promedio del tumor (mg; eje y)
10 varios días posteriores a la implantación del tumor (eje X).

La figura 6 demuestra los efectos antitumorales *in vivo*, como una medida del peso promedio del tumor medio (mg; eje y) varios días posteriores a la implantación del tumor (eje X), ausencia de tratamiento (control, círculos negros),
15 tratamiento solo con el compuesto J (cuadros grises), el compuesto J en la presencia de un análogo de folato), o tratamiento con el compuesto G (rombos grises).

Descripción Detallada de la Invención

20 Una de las proteínas que se sobre-expresa o preferiblemente se expresa en ciertas células cancerígenas es el receptor de folato. El ácido fólico se requiere para la síntesis de ADN, y ciertas células neoplásicas humanas se conocen para sobre expresar las proteínas que enlazan el
25 folato. Por ejemplo, tanto Campbell et al., "Folate Binding

Protein is a Marker for Ovarian Cancer," Cancer Research, Vol. 51 (Oct. 1, 1991), en páginas 5329-38, como Coney et al., "Cloning of a Tumor-Associated Antigen: MOv18 and MOv19 Antibodies Recognize Folate-binding Protein," Cancer Research, Vol. 51 (Nov. 15, 1991), en páginas 6125-31, reportan que las proteínas que enlazan el folato son marcadores para cáncer de ovario. La sobre-expresión del receptor de folato también se conocen para otros cánceres tales como, por ejemplo, cánceres de piel, renal, mama, pulmón, colon, nariz, garganta, glándula mamaria, y de cerebro, así como otros cánceres referidos en la presente.

Como se menciona, de acuerdo a una modalidad de la presente invención, se proporcionan los compuestos conjugados que comprenden un folato, o un análogo o derivado del mismo (V) y un análogo de aziridinil epotilona, que puede ser selectivamente y/o preferiblemente administrado a una población celular que tiene un sitio de enlace accesible para una vitamina, o análogo o derivado del mismo, en donde el sitio de enlace, tal como el receptor de folato, únicamente se expresa, se sobre expresa o preferiblemente se expresa por las células.

Definiciones de Términos

Las siguientes son definiciones de términos usados en la presente especificación. La definición inicial proporcionada

para un grupo o término en la presente aplica para ese grupo o término a lo largo de la presente especificación individualmente o como parte de otro grupo, a menos que se indique de otra manera.

5 El término "porción que enlaza el folato o análogo o derivado del mismo" como se usa en la presente significa una porción que enlazará a una proteína del receptor de folato (un anticuerpo no monoclonal). Por ejemplo, se conoce, como se discute arriba, que el receptor de folato
10 (FR) se sobre expresa en células cancerígenas de ovario y otras células cancerígenas. Los análogos y derivados ilustrativos de folato se describen en la Solicitud de Patente de EUA US 2005/0002942 para Vlahov et al., (de aquí en adelante "Vlahov"), incorporada en la presente para
15 referencia.

El término "enlazador liberable" como se usa en la presente significa un enlazador bivalente que incluye al menos un enlace que se divide que puede romperse bajo condiciones fisiológicas (por ejemplo compatible con pH, compatible con
20 reducción, compatible con el ácido, compatible con oxidación, o enlace compatible con la enzima). Deberá apreciarse que tales condiciones fisiológicas resultan en el rompimiento de enlace incluyendo reacciones de hidrólisis química estándar que se presentan, por ejemplo, a pH fisiológico, o como un
25 resultado de la formación de compartimientos en un organelo

celular, tal como una endosoma que tiene un pH inferior tal como el pH citosólico o como un resultado de la reacción con un agente reductor celular tal como glutatión.

Se entenderá que el enlace que se divide puede conectar
5 dos átomos adyacentes dentro del enlazador liberable y/o conectar otros grupos al enlazador liberable tales como Q y K, como se describe en la presente, a ya sea o ambos extremos del enlazador.

Los términos "alquilo" y "alq" si está solo o en
10 combinación con algún otro grupo, se refiere a un radical alcano de cadena recta o ramificada (hidrocarburo) enlazado a cualquier átomo de carbono disponible, que contiene desde 1 hasta 10 átomos de carbono, preferiblemente 1 hasta 6 átomos de carbono, más preferiblemente desde 1 hasta 4
15 átomos de carbono. Tales grupos ejemplares 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-trimetilpentilo, y los similares. "Alquilo inferior" o "alquilen inferior"
20 significa un alquilo de cadena recta o ramificada que tiene uno hasta cuatro átomos de carbono. Cuando un subíndice se usa con referencia a un alquilo u otro grupo, el subíndice se refiere al número de átomos de carbono que el grupo puede contener. Por ejemplo, el término "alquilo C₀₋₄" incluye un
25 enlace y grupos alquilo de 1 hasta 4 átomos de carbono, y el

término "alquilo C₁₋₄" significa grupos alquilo de 1 hasta 4 átomos de carbono.

El término "alquilenos" se refiere a un radical hidrocarburo divalente, como se describe arriba para "alquilo" pero con dos puntos de enlace. Por ejemplo, un grupo metileno es un grupo -CH₂- y un grupo etileno es un grupo -CH₂-CH₂-.

Cuando el término alquilo se usa en conexión con otro grupo, como en heterocicloalquilo o cicloalquilalquilo, esto significa el otro grupo identificado (nombrado primero) se enlaza directamente a través de un grupo alquilo como se define arriba (por ejemplo, el cual puede ser cadena recta o ramificada). De esta manera, el término "alquilo" se usa en este caso para referir a un alquilenos, por ejemplo, un grupo alquilo divalente, que tiene dos puntos disponibles de enlace. Por ejemplo, ciclopropilalquilo C₁₋₄ significa un grupo ciclopropilo enlazado a través de un alquilenos de cadena recta o ramificada que tiene uno hasta cuatro átomos de carbono, e hidroxialquilo significa el grupo OH enlazado a través de un alquilenos de cadena recta o ramificada que tiene uno hasta diez átomos de carbono, preferiblemente 1 hasta 6 átomos de carbono, más preferiblemente 1 hasta 4 átomos de carbono. En el caso de sustituyentes, como en "cicloalquilalquilo substituido", la porción de alquilenos del grupo, además de ser una cadena recta o ramificada, puede substituirse como se recita a continuación para los

grupos alquilo substituido y/o grupo nombrado primero (por ejemplo, cicloalquilo) puede substituirse como se recita en la presenta para tal grupo nombrado (por ejemplo cicloalquilo).

- 5 "Alquilo substituido" se refiere a un grupo alquilo substituido con uno o más substituyentes, preferiblemente 1 hasta 4 substituyentes, a cualquier punto de enlace disponible. Sin embargo, cuando un grupo alquilo se substituye como substituyentes halo múltiples, el alquilo
- 10 puede contener como la valencia lo permita hasta 10 substituyentes, más preferiblemente hasta siete substituyentes. Los substituyentes alquilo pueden incluir uno o más de los siguientes grupos: halo (por ejemplo, un substituyente halo sencillo o substituyentes halo múltiples
- 15 que forman, en el último caso, grupos tales como grupo perfluoroalquilo o un grupo alquilo que porta Cl_3 o CF_3), ciano, $-\text{OR}_a$, $-\text{SR}_a$, $-\text{C}(=\text{O})\text{R}_a$, $-\text{C}(=\text{O})\text{OR}_a$, $-\text{OC}(=\text{O})\text{R}_a$, $-\text{OC}(=\text{O})\text{OR}_a$, $-\text{NR}_a\text{R}_b$, $-\text{C}(=\text{O})\text{NR}_a\text{R}_b$, $-\text{OC}(=\text{O})\text{NR}_a\text{R}_b$, $-\text{S}(=\text{O})\text{R}_a$, $-\text{S}(\text{O})_2\text{R}_a$, $-\text{NHS}(\text{O})_2\text{R}_a$, $-\text{NHS}(\text{O})_2\text{NHR}_a$, $-\text{NHC}(=\text{O})\text{NHR}_a$, $-\text{NHC}(=\text{O})\text{R}_a$, $-\text{NHC}(\text{O})_2\text{R}_a$, $-\text{NHC}(=\text{N}-\text{CN})\text{R}_a$, arilo, heterociclo, cicloalquilo,
- 20 y/o heteroarilo, en donde los grupos R_a y R_b son independientemente seleccionados de hidrógeno, alquilo, alquenilo, cicloalquilo, heterociclo, arilo, y heteroarilo, y en donde cada R_a y/o R_b en turno es opcionalmente
- 25 substituido con uno hasta cuatro grupos seleccionados de

alquilo, alqueno, halógeno, haloalquilo, haloalcoxi, ciano, nitro, amino, alquilamino, aminoalquilo, hidroxialquilo, alcoxi, tiol, alquiltio, fenilo, bencilo, feniloxi, benciloxi, cicloalquilo C₃₋₇, heterociclo o heteroarilo de cinco o seis miembros, y/o un alquilo inferior o alqueno inferior substituido con uno hasta cuatro grupos seleccionados de hidroxialquilo, ciano, halógeno, haloalquilo C₁₋₄, haloalcoxi C₁₋₄, ciano, nitro, amino, alquilamino C₁₋₄, aminoalquilo C₁₋₄, hidroxialquilo C₁₋₄, alcoxi C₁₋₄, tiol, y/o C₁₋₄alquiltio. Para evitar la duda, un "alquilo inferior substituido" significa un grupo alquilo que tiene uno hasta cuatro átomos de carbono y uno hasta cuatro substituyentes seleccionados de aquellos mencionados inmediatamente arriba para los grupos alquilo substituido.

En el caso de un alquilo inferior substituido, preferiblemente los grupos R_a y R_b son seleccionados de hidrógeno, alquilo inferior, alqueno inferior, cicloalquilo C₃₋₇, fenilo, y heterociclo y/o heteroarilo monocíclico de cinco hasta seis miembros, de nuevo opcionalmente substituido como arriba.

El término "alqueno" se refiere a un radical hidrocarburo de cadena recta o ramificada que contiene desde 2 hasta 12 átomos de carbono y al menos un enlace doble carbono-carbono. Tales grupos ejemplares incluyen etenilo o alilo.

"Alqueno substituido" se refiere a un grupo alqueno

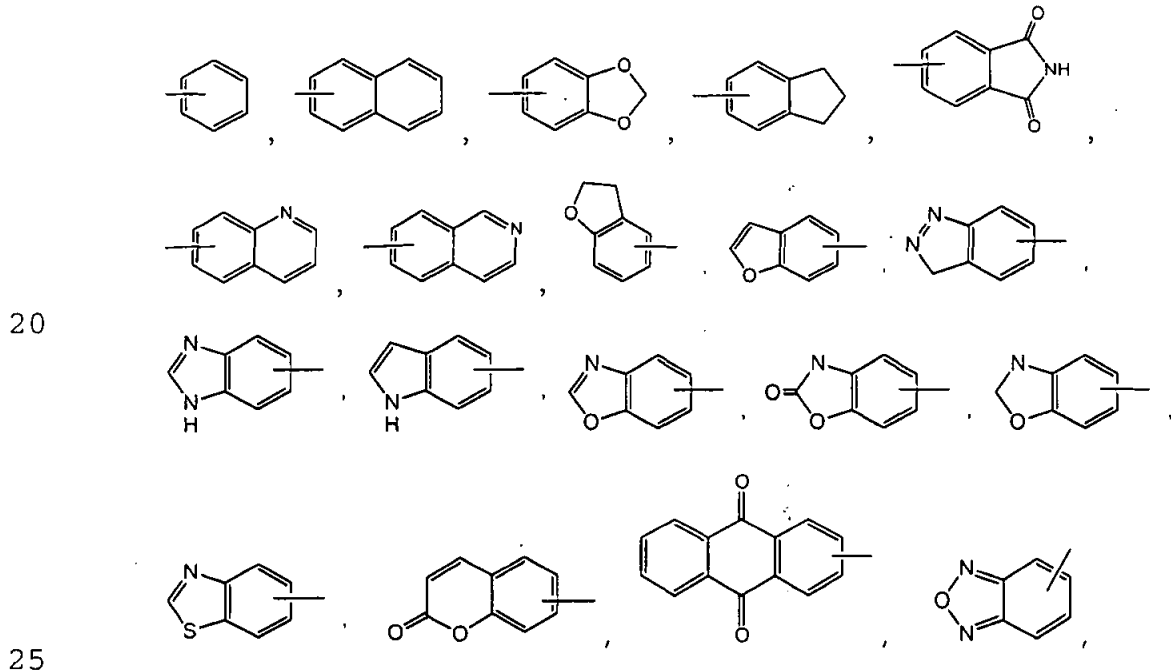
substituido con uno o más substituyentes, preferiblemente 1 hasta 4 substituyentes, en cualquier punto de enlace disponible. Los substituyentes ejemplares incluyen alquilo, alquilo substituido, y aquellos grupos mencionados arriba como substituyentes alquilo.

Los términos "alcoxi" y "alquiltio" se refieren a un grupo alquilo como se describe arriba a través de un enlazador de oxígeno (-O-) o un enlazador de azufre (-S-), respectivamente. Los términos "alcoxi substituido" y "alquiltio substituido" se refiere a un grupo alquilo substituido como se describe arriba enlazado a través de un enlazador de oxígeno o azufre, respectivamente. Un "alcoxi inferior" o un alcoxi C_{1-4} es un grupo OR, en donde R es alquilo inferior (alquilo de 1 hasta 4 átomos de carbono).

"Amino" es $-NH_2$. Un alquilamino es $-NR_cR_d$ en donde al menos uno de R_c y R_d es un alquilo o alquilo substituido, y el otro de R_c y R_d es seleccionados de hidrógeno, alquilo, y alquilo substituido. Un "aminoalquilo" significa un grupo amino enlazado a través de un grupo alquileno ($-alquileno-NH_2$), y un alquilaminoalquilo significa un alquilamino como se define arriba enlazado a través de un grupo alquileno ($-alquileno-NR_cR_d$).

El término "arilo" se refiere a grupos hidrocarburo

aromáticos cíclicos que tienen 1 hasta 3 anillos
aromáticos, especialmente grupos monocíclicos o bicíclicos
tales como fenilo o naftilo. Los grupos arilo los cuales son
bicíclicos o tricíclicos deben incluir al menos un anillo
5 carbocíclico completamente aromático pero el otro anillo
fusionado o anillos pueden ser aromáticos o no aromáticos y
pueden opcionalmente contener heteroátomos, con la condición
de que en tales casos el punto de enlace serán para el anillo
carbocíclico aromático. Adicionalmente, cuando un grupo arilo
10 se ha fusionado a esto un anillo heterocíclico o cicloalquilo,
el anillo heterocíclico y/o cicloalquilo puede tener uno o más
átomos de carbono carbonilo, esto es enlazar por medio de un
enlace doble a un átomo de oxígeno para definir un grupo
carbonilo. De esta manera, los ejemplos de "arilo" pueden
15 incluir sin limitación:



y similares.

El término "arileno" se refiere a un radical arilo bivalente, esto es, un grupo arilo como se define arriba que tiene dos puntos de enlace hasta otros dos grupos, en cualesquiera puntos de enlace del anillo arilo. Los anillos arileno también pueden substituirse con cualesquiera de los grupos adecuados para la substitución en los grupos arilo definidos en la presente.

"Arilo substituido" se refiere a un grupo arilo o arileno como se define arriba substituido por uno o más substituyentes, preferiblemente 1 hasta 4 substituyentes, en cualquier punto de enlace. Los substituyentes incluyen alquilo, alquilo substituido, alquenilo, alquenilo substituido, así como aquellos grupos mencionados arriba como substituyentes alquilo.

El término "carbocíclico" significa un anillo monocíclico, bicíclico, o tricíclico satura o insaturado (preferiblemente mono- o bicíclico) en el cual todos los átomos de los todos los anillos son carbono. De esta manera, el término incluye anillo cicloalquilo y arilo. El anillo carbocíclico puede ser substituido en cuyo caso los substituyentes se seleccionan de aquellos mencionados arriba para grupos cicloalquilo y arilo.

El término "cicloalquilo" se refiere a un grupo hidrocarburo cíclico parcialmente saturado o completamente

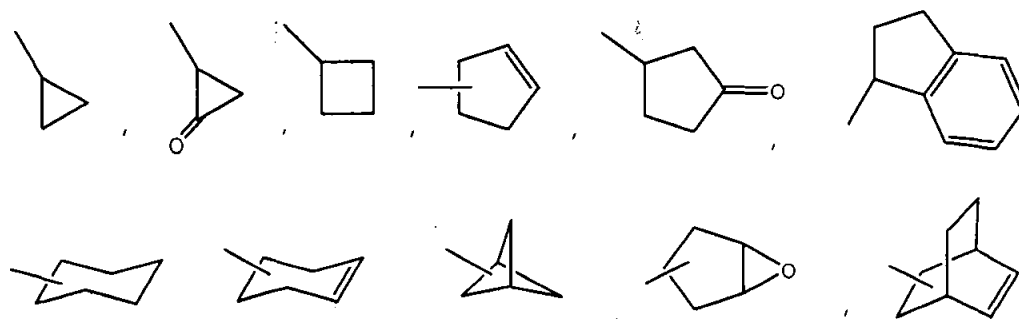
saturado que contiene desde 1 hasta 3 anillos y 3 hasta 7 átomos de carbono por anillo. Los grupos cicloalquilo completamente saturados ejemplares incluyen ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, y ciclohexilo. Los grupos

5 cicloalquilo completamente saturados ejemplares incluyen ciclobutenilo, ciclopentenilo, y ciclohexenilo. El término "cicloalquilo" incluye tales grupos que tienen un puente de tres hasta cuatro átomos de carbono. Adicionalmente, los grupos cicloalquilo los cuales son bicíclicos o tricíclicos

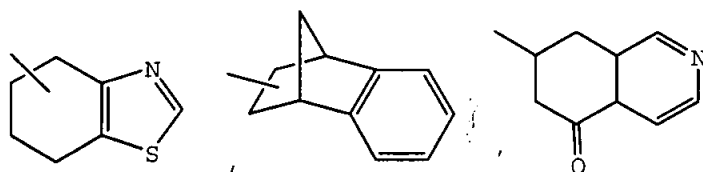
10 deben incluir al menos un anillo hidrocarburo parcialmente saturado o completamente saturado pero el otro anillo o anillos fusionados pueden ser aromáticos o no aromáticos y puede contener heteroátomos, con la condición de que en tales casos el punto de enlace será para el grupo

15 hidrocarburo no aromático, cíclico. Adicionalmente, uno o más átomos de carbono del grupo cicloalquilo puede formar un enlace doble carbono a oxígeno para definir un grupo carbonilo. De esta manera, los ejemplos de grupos "cicloalquilo" pueden incluir, sin limitación:

20



25



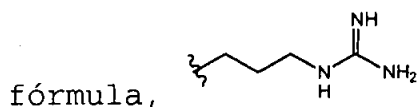
y similares.

5 El término "cicloalquileo" se refiere a un radical cicloalquilo divalente, por ejemplo, un grupo cicloalquilo como se define anteriormente que tienen dos puntos de unión para otros dos grupos, en cualquiera de los dos puntos de unión disponibles del anillo de cicloalquilo.

10 "Cicloalquilo sustituido" se refiere a un grupo de cicloalquilo como se define anteriormente sustituido a cualquier punto disponible de unión con uno o más sustituyentes, preferiblemente 1 hasta 4 sustituyentes. Los sustituyentes cicloalquilo incluye alquilo, alquilo sustituido, alqueno, alqueno sustituido, y estos grupos
15 se relacionan arriba como sustituyentes alquilo.

El término "guanidinilo" significa el grupo

Así, un guanidiniloalquilo significa un grupo alquilo enlazado
20 al guanidinilo tal como un grupo que tiene la



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

25 El término "heteroátomos" incluye oxígeno, azufre y

nitrógeno.

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

5 El término "haloalcoxi" significa un grupo de alcoxi que tiene uno o más substituyentes halo. Por ejemplo, "haloalcoxi" incluyendo $-\text{OCF}_3$.

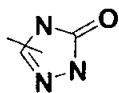
Cuando el término "insaturado" es usado en la presente para referirse a un anillo o grupo, el anillo o grupo puede
10 estar completamente insaturado o parcialmente insaturado.

El término "heteroarilo" se refiere a un grupo aromático el cual es un sistema de anillo monocíclico 4 hasta 7 miembros, bicíclico 7 hasta 11 miembros, o tricíclico 10 hasta 15 miembros, el cual tiene al menos un anillo que contiene al menos un heteroátomo. Cada anillo del grupo heteroarilo que
15 contiene un heteroátomo puede contener uno o dos oxígenos o átomos de azufre y/o desde uno hasta cuatro átomos de nitrógeno, con la condición de que el número total de heteroátomos en cada anillo es cuatro o menos y cada anillo
20 tiene al menos un átomo de carbono. Los anillos de fusión completan los grupos bicíclico y tricíclico pueden contener sólo átomos de carbono y pueden ser saturados, parcialmente saturados, o insaturados. Los átomos de nitrógeno y azufre pueden opcionalmente ser oxidados y los átomos de nitrógeno
25 pueden opcionalmente cuaternizarse. Los grupos heteroarilo los

cuales son bicíclicos ó tricíclicos deben incluir al menos un anillo completamente aromático pero el otro anillo fusionado o anillos pueden ser aromáticos o no aromáticos y puede ser carbocíclico, con la condición de que en tales casos el punto de enlace será en cualquier átomo de nitrógeno o carbono disponible de un anillo que contiene heteroátomo aromático. Adicionalmente, la definición de grupos heteroarilo por sí misma incluye anillos en donde uno o más de los átomos de carbonos se enlazan por medio de un enlace doble a un átomo de oxígeno para definir un grupo carbonilo (con la condición de que el grupo heteroarilo sea aromático) y también cuando un grupo heteroarilo se fusiona hacia un anillo heterocíclico o cicloalquilo, el anillo heterocíclico y/o cicloalquilo puede tener uno o más grupos carbonilo.

Los grupos heteroarilo monocíclicos ejemplares incluyen pirrolilo, pirazolilo, pirazolinilo, imidazolilo, oxazolilo,

isoxazolilo, tiazolilo (por ejemplo, ) , tiadiazolilo, isotiazolilo, furanilo, tienilo, oxadiazolilo, piridilo, pirazinilo, pirimidinilo, piridazinilo, triazinilo y los similares. Adicionalmente, ya que la definición de grupos heteroarilo por si mismos incluyen anillos en donde uno o más de los átomos de carbonos definen un grupo carbonilo, anillos tales como 2,4-dihidro-[1,2,4]triazol-3-ona (por ejemplo,



) y los similares se incluyen.

Los grupos heteroarilo bicíclicos ejemplares incluyen

indolilo, benzotiazolilo, benzodioxolilo, benzoxaxolilo,
benzotienilo, quinolinilo, tetrahidroisoquinolinilo,
isoquinolinilo, benzimidazolilo, benzopiraniilo, indoliziniilo,
benzofuraniilo, cromonilo, cumarinilo, benzopiraniilo,
5 cinolinilo, quinoxaliniilo, indazolilo, pirrolopiridilo,
furopiridiniilo, dihidroisoindolilo, tetrahidroquinolinilo y
los similares.

Los grupos heteroarilo tricíclicos ejemplares incluyen
carbazolilo, benzidolilo, fenantroliniilo, acridiniilo,
10 fenantridiniilo, xantenilo y los similares.

El término "heteroalquilenilo" se refiere a un radical
heteroarilo divalente, esto es, un grupo heteroarilo como se
define anteriormente que tiene dos puntos de enlace para otros
dos grupos, en cualquiera de los dos puntos disponibles de
15 enlace del anillo heteroarilo.

Los grupos "heteroarilo substituido" son grupos
heteroarilo como se definen anteriormente substituidos con uno
o más substituyentes, preferiblemente 1 hasta 4
substituyentes, en cualquier punto disponible de enlace. Los
20 substituyentes ejemplares incluyen, pero no se limitan a
alquilo, alquilo substituido, alqueniilo, alqueniilo
substituido, así como aquellos grupos mencionados
anteriormente como substituyentes alquilo.

Los términos "heterociclo", "heterocíclico" y
25 "heterociclo" son usados intercambiabilmente y cada uno se

refiere a un grupo cíclico no aromático completamente saturado o parcialmente insaturado, el cual puede ser substituido o no substituido, por ejemplo, el cual es un monocíclico de 4 hasta 7 miembros, bicíclico 7 hasta 11 miembros, o sistema del anillo tricíclico 10 hasta 15 miembros, los cuales tienen al menos un heteroátomo en al menos un anillo que contiene 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 nitrógeno y azufre también pueden opcionalmente ser oxidados y los heteroátomos de nitrógeno también opcionalmente pueden cuaternizarse. Preferiblemente dos heteroátomos adyacentes no son simultáneamente seleccionados de oxígeno y nitrógeno.

Los grupos heterocíclicos los cuales son bicíclico o tricíclico deben incluir al menos un anillo no carbocíclico no aromático, pero el otro anillo fusionado o anillos pueden ser aromáticos o no aromáticos y pueden ser carbocíclico, con la condición de que en tales casos el punto de enlace será en cualquier átomo de nitrógeno o carbono disponible de un anillo que contiene heteroátomo no aromático. Adicionalmente, la definición de grupos heterocíclico por si misma incluye anillos en donde uno o más de los átomos de carbonos se enlazan por medio de un enlace doble a un átomo de oxígeno para definir un grupo carbonilo (proporcionando

que el grupo heterocíclico no es aromático) y también cuando un grupo heterocíclico se fusiona puede ser un anillo adicional, tal anillo adicional puede tener uno o más grupos carbonilo.

5 Los grupos heterocíclicos monocíclicos ejemplares incluyen pirrolidinilo, imidazolidinilo, tetrahidrofurilo, piperidinilo, piperazinilo, pirazolidinilo, imidazolinilo, pirrolinilo, tetrahidropiranilo, morfolinilo, tiamorfolinilo, y los similares.

10 "Heterociclo sustituido," "heterocíclico sustituido," y "heterociclo sustituido" se refiere a grupos heterociclo, heterocíclico, o heterociclos como se definen arriba sustituidos con uno o más sustituyentes, preferiblemente 1 hasta 4 sustituyentes, a cualquier punto disponible de
15 enlace. Los sustituyentes ejemplares incluyen alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, así como aquellos grupos recitados arriba como sustituyentes alquilo ejemplares.

"Hidroxi" se refiere a -OH.

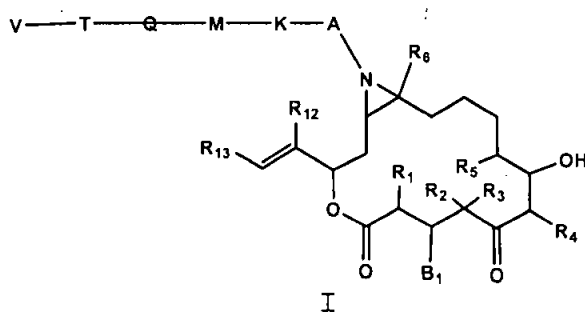
20 "Tiol" significa el grupo -SH.

El término "nitrógeno cuaternario" se refiere a un átomo de nitrógeno tetravalente cargado positivamente que incluyen, por ejemplo, el nitrógeno cargado positivamente en un grupo tetraalquilamonio (por ejemplo, tetrametilamonio o
25 N-metilpiridinio), el nitrógeno cargado positivamente en

especies amonio protonadas (por ejemplo, trimetilhidroamonio o N-hidropiridinio), el nitrógeno cargado positivamente en óxido N amina (por ejemplo, N-metil-morfolino-N-óxido o piridin-N-óxido), y el nitrógeno cargado positivamente en un grupo N-amino-amonio (por ejemplo, N-aminopiridinio).

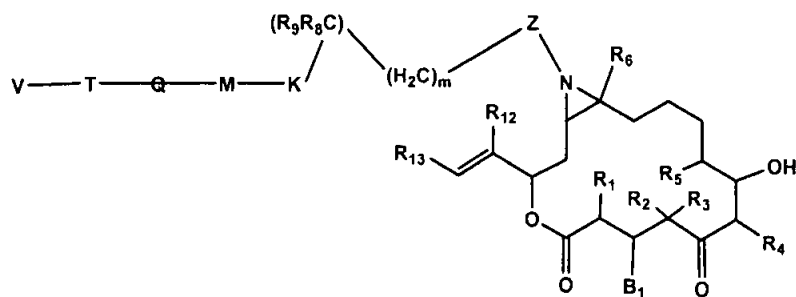
Cuando un grupo funcional se denomina "protegido", esto significa que el grupo está en una forma modificada para mitigar, especialmente evitar, reacciones laterales indeseables al sitio protegido. Los grupos protectores adecuados para los métodos y compuestos descritos en la presente incluyen, sin limitación, aquellos descritos en los libros de textos estándar, incluyendo Greene, T.W. et al., *Protective Groups in Organic Synthesis*, Wiley, N.Y. (1991), incorporados en la presente para referencia.

Para cualquier grupo bivalente enlistado en la presente, tales como $-(CR_8R_9)-(CH_2)_m-Z-$, que es capaz de la inserción dentro de los compuestos de la Fórmula I,

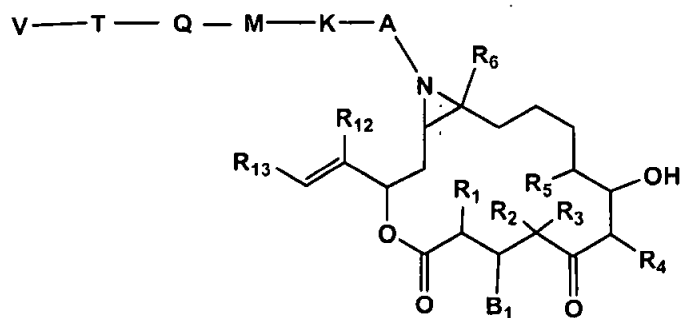


la inserción deberá hacerse de izquierda a derecha. Por ejemplo, en la siguiente situación donde A se define como $-(CR_8R_9)-(CH_2)_m-Z-$, el grupo metileno se enlaza a K, y el

grupo Z se enlaza al nitrógeno del anillo aziridinilo, como sigue:



La presente invención comprende compuestos que tienen la siguiente fórmula I, como se define arriba,



I

e incluye sales y/o solvatos farmacéuticamente aceptables de los mismos.

De acuerdo con una modalidad de la invención,

K es O;

A es alquilenos C_{2-4} ;

B_1 es -OH;

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

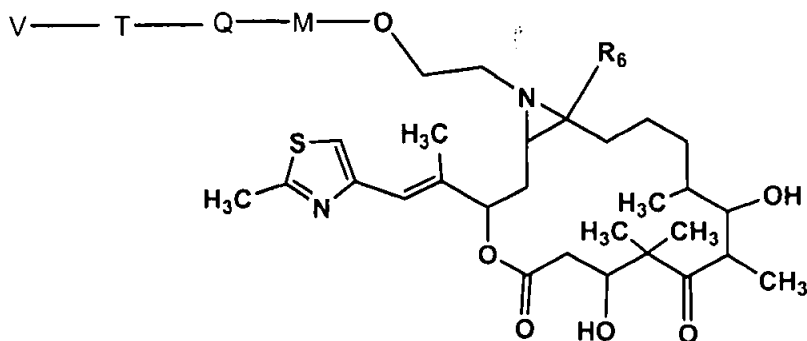
R_6 es hidrógeno o metilo;

R_{13} es un heteroarilo de 5 ó 6 miembros opcionalmente sustituido, preferiblemente un tiazolilo, piridilo, o oxazolilo opcionalmente sustituido; y

M es $-S-R_{30}-O-C(=O)-$, $-S-R_{30}-C(=O)-$, o $-S-R_{34}R_{30}-O-C(=O)-$ en donde

R_{30} es alquileo inferior o alquileo inferior sustituido; y R_{34} es arileno o arileno sustituido; y R_1 , R_{12} , T y Q son como se definen de cualquier manera en la presente, por ejemplo, como en el Sumario de la Invención, arriba, o modalidades alternativas, a continuación.

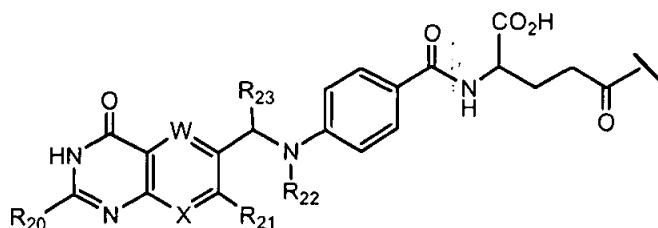
En una modalidad de la presente invención, los compuestos se proporcionan que tienen la siguiente Fórmula Ia:



Ia

en donde V es una porción enlazada al receptor de folato, y T, Q, M y R_6 son como se definen de cualquier manera en la presente, por ejemplo, como en el Sumario de la Invención o modalidad alternativa, de arriba o en modalidades alternativas a continuación.

Por ejemplo, V puede tener la siguiente fórmula:



5

en donde W y X son independientemente CH o nitrógeno;

R₂₀ es hidrógeno, amino o alquilo inferior;

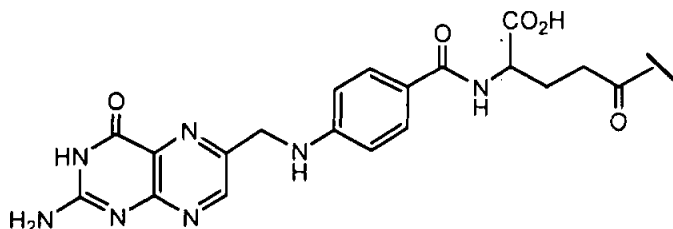
R₂₁ es hidrógeno, alquilo inferior, o forma un grupo cicloalquilo con R₂₃;

10 R₂₂ es hidrógeno, alquilo inferior, alqueno inferior, o alquinilo inferior; y

R₂₃ es hidrógeno o forma un cicloalquilo con R₂₁.

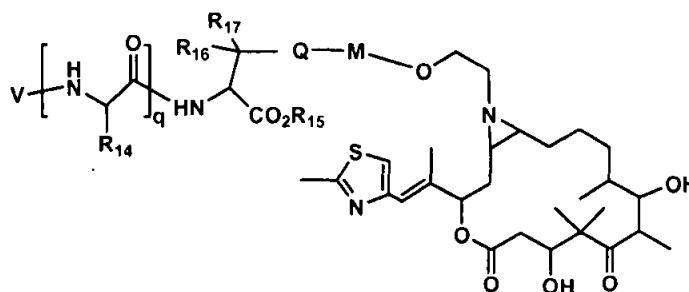
De acuerdo con una modalidad de la presente invención, V es,

15



De acuerdo con una modalidad de la presente invención, los compuestos se proporcionan que tienen la siguiente

20 Fórmula Ib:



25

Ib

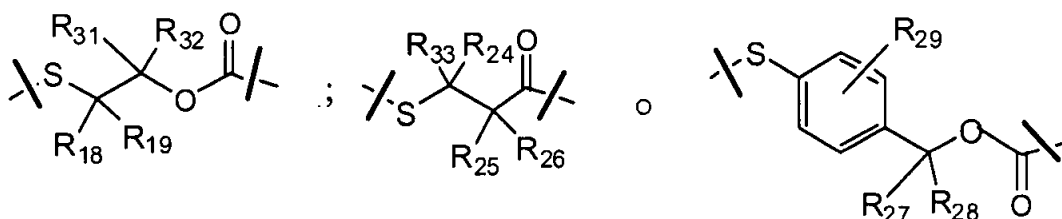
en donde

V es una porción enlazada al receptor de folato;

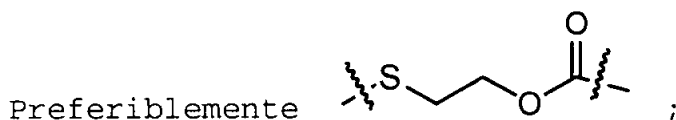
Q es O, S, o NR₇;

M es un enlazador liberable que tiene la siguiente

5 fórmula:



10



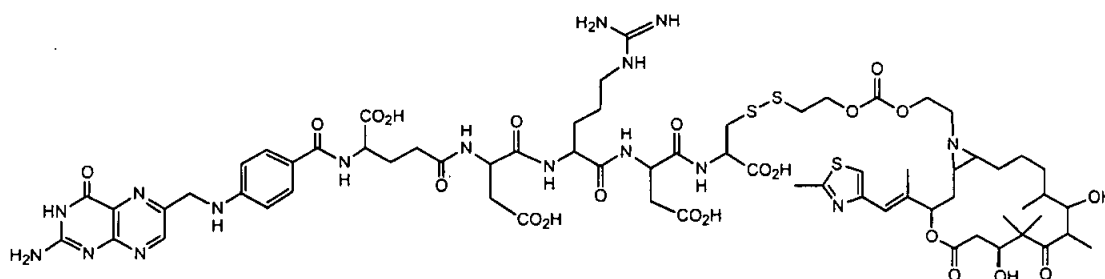
R₁₄ en cada caso es, independientemente, hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, arilalquilo, arilalquilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, cicloalquilalquilo, cicloalquilalquilo sustituido, heteroarilo, heteroarilalquilo, heteroarilalquilo sustituido, heteroarilo sustituido, heterocicloalquilo, o heterocicloalquilo sustituido; y es preferible un grupo seleccionado de H, metilo, guanidinilpropilo, -(CH₂)₁₋₂-CO₂H, -CH₂-SH, -CH₂-OH, imidazolil(metil), aminobutilo, y -CH(OH)-CH₃; y es más preferiblemente un alquilo C₁ hasta C₃ sustituido con un -C(=O)-OH o -NH-C(=NH)-NH₂;

q es 1 hasta 10 (preferiblemente 1 hasta 5, más preferiblemente 1 hasta 3);

R_{15} , R_{16} y R_{17} son independientemente hidrógeno, 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.

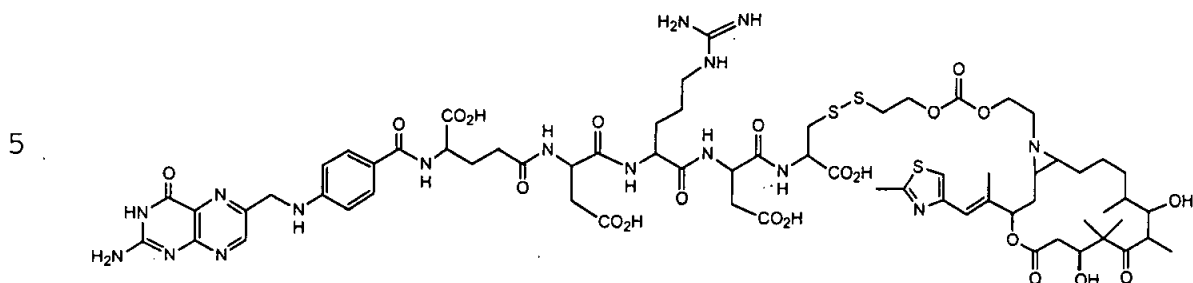
De acuerdo con una modalidad de la presente invención, los compuestos se proporcionan para tener la fórmula:



e incluyen sales y solvatos farmacéuticamente aceptables y de los mismos.

De acuerdo con una modalidad de la presente invención, se proporcionan los métodos para el tratamiento de cáncer que comprenden administrar a un paciente que necesita de tal tratamiento una cantidad terapéuticamente efectiva de un conjugado de la presente invención, como se describe en la presente. De acuerdo a una modalidad preferida, los métodos para el tratamiento de cáncer asociado con un receptor de folato se proporcionan que comprenden

administrar a un paciente que necesita tal tratamiento, un conjugado que tiene la siguiente fórmula:



El uso de un agente para sobrerregular el nivel del receptor de folato (FR) 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 pacientes, y/o para aumentar las diversas enfermedades o tipos de tumor que pueden tratarse con el receptor de folato enlazado a los compuestos conjugados de acuerdo a la invención. La expresión del receptor de folato en ciertos cánceres puede sobrerregularse por la administración de un inductor del receptor de folato, el cual selectivamente incrementa el nivel del receptor de folato en las células cancerígenas, de esta manera se aumenta la efectividad de una terapia objetivo del receptor de folato. Por ejemplo, los cánceres de mama positivos del receptor de estrógeno (ER+) expresan niveles inferiores de los receptores de folato. El tratamiento con un inductor del receptor de folato, tales como tamoxifen, un antagonista de estrógeno, se conoce que sobrerregula la expresión de los receptores de

10

15

20

25

folato en cánceres de mama ER+, incrementando la susceptibilidad de las células cancerígenas de mama ER+ para el tratamiento con una terapia objetivo del receptor de folato.

5 Un aspecto de la invención proporciona un método para el tratamiento de cáncer o una enfermedad proliferativa en un paciente que necesita del mismo, que comprende opcionalmente administrar una cantidad efectiva de al menos un inductor del receptor de folato y administrar una
10 cantidad efectiva de al menos un compuesto conjugado de acuerdo con la fórmula I. El inductor del receptor de folato puede administrarse previo a o concurrentemente con el compuesto conjugado de acuerdo a la fórmula I. En una modalidad, el inductor del receptor de folato se
15 administra previo al compuesto conjugado de la fórmula I. Una cantidad efectiva del inductor del receptor de folato se refiere a una cantidad que sobrerregula el receptor de folato en las células deseadas tales que la administración del compuesto conjugado del receptor de folato es
20 terapéuticamente efectiva.

 Los ejemplos de los inductores del receptor de folato para la sobrerregulación del receptor de folato α (FR α) incluyen: antagonistas del receptor de estrógeno tal como tamoxifen; agonistas del receptor de progesterona tal como
25 progestina; agonistas del receptor de andrógeno tales como

testosterona y dihidroxitestosterona, y agonistas del receptor de glucocorticoide tal como dexametasona.

Los ejemplos de los inductores del receptor de folato para la sobrerregulación del receptor de folato β (FR β) incluyen: agonistas del receptor de ácido retinoico tal como todos los ácidos trans retinoicos (ATRA), ácido tetrametil naftalenil propenil benzoico (TTNPB), ácido 9-cis retinoico (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 que necesita del mismo, que comprende administrar una cantidad efectiva de al menos un inductor del receptor de folato y administrar una cantidad efectiva de al menos un compuesto conjugado de acuerdo a la fórmula I, 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, tales como cáncer de mama ER+, y cáncer de ovario.

En una modalidad de la presente invención, se proporciona un método para el tratamiento de cáncer o una enfermedad proliferativa en un paciente que necesita del mismo, que comprende administrar una cantidad efectiva de al menos un inductor del receptor de folato y administrar una cantidad efectiva de al menos un compuesto conjugado de acuerdo a la fórmula I; 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 más preferiblemente de leucemia mielógena aguda (AML) y leucemia mielógena crónica (CML).

5 En una modalidad adicional, un método para tratar el cáncer o una enfermedad proliferativa en un paciente que necesita del mismo se proporciona, que comprende administrar una cantidad efectiva de al menos un inductor del receptor de folato, administrar al menos un inhibidor de deacetilasa de
10 histona, y administrar una cantidad efectiva de al menos un compuesto conjugado de acuerdo a la fórmula I. Un ejemplo de un inhibidor de deacetilasa de histona es tricoestatina A (TSA). Publicación de Solicitud de Patente de EUA 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
15 Ratnam, *Blood*, 96:3529-3536 (2000).

Los compuestos de la fórmula (I) pueden formar sales o solvatos los cuales están también dentro del alcance de esta invención. La referencia para un compuesto de la fórmula (I)
20 en la presente se entiende para incluir la referencia para sales solvatos 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 inorgánicos y/u orgánicos. Además, cuando un compuesto de la
25 fórmula (I) 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 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 fórmula (I) pueden formarse, por ejemplo, al hacer reaccionar un compuesto de la fórmula (I) 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.

Los compuestos de la fórmula (I) 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 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, digluconatos, dodecilsulfatos, etansulfonatos, fumaratos,

glucoheptanoatos, glicerofosfatos, hemisulfatos, heptanoatos, hexanoatos, clorohidratos, bromohidratos, yodohidratos, hidroxietansulfonatos (por ejemplo, 2-hidroxietansulfonatos), lactatos, maleatos, metansulfonatos, naftalensulfonatos (por ejemplo, 2-naftalensulfonatos), nicotinato, nitrato, oxalato, pectinato, persulfato, fenilpropionato (por ejemplo, 3-fenilpropionato), fosfato, picrato, pivalato, propionato, salicilato, succinato, sulfato (tales como aquellos formados con ácido sulfúrico), sulfonatos (tales como aquellos mencionados en la presente), tartrato, tiocianato, toluensulfonatos tales como tosilatos, undecanoatos, y los similares.

Los compuestos de la fórmula (I) 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, metilo, etilo, propilo y cloruro de butilo, bromuros, y yoduros), 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 (I) incluyen, por ejemplo, hidratos.

Todos los estereoisómeros de los compuestos presentes (por ejemplo, aquellos los cuales pueden existir debido a carbonos asimétricos en diversos substituyentes), 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, u otros seleccionados, estereoisómeros. Los centros quirales de la presente invención pueden tener la configuración S o R como se define por las recomendaciones IUPAC 1974. 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 quirál. Los isómeros ópticos individuales pueden obtenerse de procesos estereoespecíficos, en donde los materiales de partida y/o intermediarios se seleccionan que
5 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
10 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 apreciarse, la configuración preferida puede ser una función del compuesto
15 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 finales pueden realizarse al usar materiales de partida que
20 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 estereoquímica deseada puede alcanzarse por medio de
25 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 la especificación, los grupos y substituyentes de los mismos pueden elegirse para proporcionar
5 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 adecuadas para variables para realizar compuestos estables.

10 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
15 arriba, y se contemplan como cubiertas dentro del alcance de la presente invención.

Utilidad

Los compuestos conjugados de la presente invención son
20 útiles para administrar agentes que estabilizan los microtúbulos derivados de epotilona para tumores que expresan un receptor de folato. Son útiles en el tratamiento de una variedad de cánceres y otras enfermedades proliferativas, particularmente aquellos cánceres caracterizados por células
25 cancerígenas o tumores que expresan el receptor de folato. El

término "condición asociada con el receptor de folato" como se usa en la presente comprende enfermedades o trastornos caracterizados por la expresión del receptor de folato, o en otras palabras, aquellas enfermedades o trastornos pueden
5 diagnosticarse o tratarse con base en el nivel de expresión del receptor de folato en tejido enfermo comparado con el tejido normal.

Como un ejemplo no limitativo, tales cánceres asociados con el receptor de folato incluyen cáncer de ovario y cánceres
10 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 coroide, y tumores epiteliales (ver, Asok, Antony, "Folate Receptors: Reflections
15 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
20 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.

25 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

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

10 - 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;

15 - 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;

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

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

25 Los compuestos conjugados de la presente invención 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
5 línea y segunda línea. Adicionalmente, los compuestos conjugados de la fórmula I pueden ser útiles para el tratamiento refractario o resistente a cánceres.

Los compuestos conjugados de la presente invención también pueden ser útiles en el tratamiento de otras
10 condiciones con respuesta a agentes que estabilizan los 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
15 nervioso central tal como enfermedad de Alzheimer.

Adicionalmente, los compuestos conjugados de la presente invención pueden administrarse en combinación con otros agentes anticancerígenas y citotóxicos y tratamientos útiles en el tratamiento de cáncer y otras enfermedades
20 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 (I). Especialmente las
25 combinaciones de fármaco citotóxicas y anti-cáncer 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.

5 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
10 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,
15 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;
20 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
25 anticancerígenos y citotóxicos tales como modificadores de

respuesta biológica, factores de crecimiento, y moduladores inmunes. Los compuestos conjugados de la fórmula I también pueden usarse en conjunto con terapia de radiación.

Los ejemplos adicionales de agentes anticancerígenos que
5 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
10 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
15 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
20 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 también Patente de EUA No.
25 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. WO01/14424, y/o un anticuerpo CTLA-4
5 descrito en la publicación PCT no. WO 00/37504 tales como, por ejemplo, el anticuerpo conocido como CP-675206 (ticilimunab) ORENCIA®; MDX-010; vinflunina (Javlor™) y Erbitux (cetixumamb).

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

Los compuestos de la presente invención también pueden formularse o co-administrarse con otros agentes terapéuticos
15 que se seleccionan para su utilidad particular en administrar terapias asociadas con las condiciones antes mencionadas. Por ejemplo, los compuestos de la invención pueden formularse con agente para prevenir náusea, hipersensibilidad e irritación gástrica, tales como antieméticos, y antihistamínicos H₁ y H₂.

20 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
25 en la técnica.

Los compuestos 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 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 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

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, propilen glicol, glicerol y polietilen glicoles, por ejemplo, polietilen glicol 300 y/o polietilen glicol 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®, polysorbato 80, polysorbato 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, e 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 rango preferido incluyen una dosis de alrededor de 0.02 hasta 5 mg/kg de peso corporal, con un rango 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.

Ensayo de sobrevivencia de células clonogénicas

5 Las células cancerígenas se sembraron en 3.0×10^5 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 CO₂ durante 2 días. En
10 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 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
15 células se trataron con 20 nM de epotilona, análogo de epotilona, epotilona conjugada, o análogo de epotilona conjugado 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
20 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
25 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.

Ensayo de proliferación/citotoxicidad MTS *in vitro*

5 La citotoxicidad *in vitro* se evaluó en células neoplásicas usando un ensayo colorimétrico con base en tetrazolio el cual toma ventaja de la conversión metabólica de MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfenil)-2H-tetrazolio, sal interna) para una forma reducida
10 que absorbe luz a 492 nm. Las células se sembraron 24 hr antes de la adición de la epotilona, análogo de epotilona, epotilona conjugada, o análogo de epotilona conjugada. Después de 72 horas de incubación a 37°C con el compuesto diluido en serie, MTS, en combinación con el electrón que acopla al agente de
15 metosulfato de fenazina, se agregó a las células. La incubación se continuó durante 3 horas, luego la absorbancia del medio a 492 nm se midió con un espectrofotometro para obtener el número de células sobrevivientes con relación a las poblaciones de control. Los resultados se expresan como
20 concentraciones citotóxicas medias (valores IC₅₀).

Ensayo del Receptor de Folato

Todos los procedimientos de preparación de muestra usados para el ensayo FR se llevaron a cabo a 4°C. Las
25 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 grandes se removieron por
5 centrifugación suave (3000 X g durante 15 min). Los granulados de membrana luego se recolectaron por centrifugación a 40,000 X g durante 60 min 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-
10 glucopiranosido, 5mM de EDTA, y 0.02% de azida de sodio). El material insoluble se removió por una segunda centrifugación 40,000 X g 60 min, y la concentración de proteína total de los sobrenadantes se determinó por el método de ácido bicinconínico (BCA) (Pierce Chemical). Cada muestra luego se
15 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 14,000 X g durante 10 min a temperatura ambiente para pasar
20 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 llevaron a cabo usando estos mismos parámetros. Luego 55 μ l de 30 mM de solución
25 amortiguadora de acetato (pH 3.0) se agregó a cada

microconcentrador, seguido por una etapa de centrifugación. Después, 55 µl de solución amortiguadora salina de fosfato (PBS) se dosificó en cada microconcentrador, seguido por otra centrifugación. Luego 50 µl de reactivo que enlaza el

5 ácido [³H]fólico (120 nM ácido [³H]fólico (Amersham) en 10 mM de Na₂PO₄, 1.8 mM de KH₂PO₄, pH 7.4, que contiene 500 mM de NaCl, 2.7 mM de KCl, y 25 mM de n-octil-β-D-glucopiranosido) o 50 µl de un reactivo competente (reactivo enlazado plus 120 µM de ácido fólico no etiquetado) se

10 agregó a los concentradores apropiados. Después de una incubación de 20-min a temperatura ambiente, los concentradores se lavaron/centrifugaron tres veces con 75 µl 50 mM n-octil-β-D-glucopiranosido, 0.7M de NaCl en PBS, pH 7.4. Después del lavado final, los productos de retención

15 que contienen los FRs solubilizados se recuperaron de la superficie de membrana de los microconcentradores por dos enjuagues con 100 µl de PBS que contiene 4% de Triton X-100. Las muestras luego se contaron en un contador de escintilación líquido (Packard Bioscience). Los valores

20 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

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 FR α (-) Madison 109 (M109) de murino (Marks et al., 1977) y la variante (FR α (+)) 98M109 que expresa FR α se usó para evaluar la eficacia de la epotilona, análogo de epotilona (por ejemplo, derivado de epotilona), conjugados de folato-epotilona, o conjugado de análogo de folato-epotilona. Además, el crecimiento KB de carcinoma epidermoide de cabeza y cuello humano en ratones agénicos sin atímicos pelo también se usa para este propósito.

Evaluación de la Eficacia Antitumoral y Tratamiento con Fármacos

Para la administración de epotilonas o análogos 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-epotilona o conjugados de análogo de folato-epotilona 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.

5 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
10 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
15 tratamiento (Wt2). La diferencia en peso corporal (Wt2-Wt1) proporciona una medida de toxicidad relacionada con el tratamiento.

La respuesta tumoral se determinó por la medición de los tumores con un calibrador dos veces a la semana, hasta que los
20 tumores alcanzaron un tamaño "objetivo" predeterminado de 1 gm. Los pesos del tumor (mg) se estimaron de la fórmula:

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

25 La actividad antitumoral se evaluó en la dosis tolerada

máxima (MTD) la cual se define como el nivel de dosis 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
5 previo a hacer que sus tumores alcancen su tamaño objetivo se consideraron por tener muerte de toxicidad por fármaco. 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
10 para tener tratamientos excesivamente tóxicos y sus datos no se incluyeron en la evaluación de una Eficacia Antitumoral en el compuesto.

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

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

TVDT = tiempo medio (días) para tumores de control para alcanzar el tamaño objetivo - tiempo medio (días) para
25 tumores de control para alcanzar la mitad del tamaño

objetivo

y,

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

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

Abreviaturas

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

CBZ-OSu = N-(Benciloxicarboniloxi)succinimida

DCM = diclorómetano

DEA = dietilamina

DIAD = diisopropil azodicarboxilato

15 DIPEA = diisopropiletilamina

DMA = dimetilamina

DMF = dimetil formamida

DMSO = dimetilsufóxido

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

EtOH = etanol

EtOAc = acetato de etilo

HOBt = n-hidroxi benzotriazol

HPLC = cromatografía líquida de alta resolución

25 iPr-OH or IPA = alcohol isopropílico

LC/MS = cromatografía líquida/espectro de masas

LDA = diisopropilamida de litio

MeOH = metanol

OTES = o-trietilsililo;

5 OMs = mesilato;

Ph = fenilo

Pd/C = paladio en carbono

PyBOP =

Py = piridilo

10 TA = temperatura ambiente

Sat = saturado

THF = tetrahidrofurano

TFA = ácido trifluoroacético

CCD = cromatografía de capa delgada

15 TESCL = clorotrietilsilano

UV = ultravioleta.

Métodos de Preparación

Los compuestos de la presente invención pueden
20 prepararse generalmente de acuerdo a los siguientes
esquemas de reacción y al conocimiento de alguien experto
en la técnica, y/o usando métodos establecidos en las
Patentes de EUA Nos. 6,605,599; 6,831,090; 6,800,653;
6,291,684; 6,719,540, Publicación de Solicitud de Patente
25 EUA No. 2005/0002942 y *Organic Letters*, 2001, 3, 2693-

2696, 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 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 et al., "Studies on the Biosynthesis of Epothilones: The Biosynthetic Origin of the Carbon Skeleton," Journal of Antibiotics, Vol. 53, No. 12 (Dic. 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), las descripciones de las cuales se incorporan en la presente para referencia) o por síntesis total (ver, por ejemplo Vite et al. Patentes de EUA Nos. 6,605,599; 6,242,469; 6,867,333, Publicación de Solicitud de Patente de EUA No. 2006/004065; y Johnson et al. Organic Letters **2000**, 2:1537-40, las descripciones de las cuales se incorporan en la presente para referencia en su totalidad). Por ejemplo un compuesto de la fórmula II donde R₂, R₃, R₄, R₅, y R₁₂ son metilo, B₁ es hidroxilo, R₁ y R₆ son hidrógeno, y R₂ 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 donde P es un grupo protector de sililo tales como trietilsililo, t-butildimetilsililo, t-butildifenilsililo, triisopropilsililo, y los similares (ver, por ejemplo, Greene et al., "Protective groups in Organic Synthesis", John Wiley and Sons, Inc.). Por ejemplo, un compuesto de la 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 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 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 tal como dimetilformamida. Una persona de experiencia ordinaria reconocerá que la estereoquímica a C₁₂ como se detalla en el Esquema de reacción I no deberá construirse como limitante, pero en vez de ejemplar. Sí se desea, la

inversión de la estereoquímica en la posición C₁₂ puede alcanzarse siguiendo el protocolo Mitsunobu el cual bien se establece en 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 desdoblararse por hidrólisis de éster suave usando, por ejemplo, soluciones metabólicas de amoniaco para proporcionar un compuesto de la fórmula VI. Nuevamente, la estereoquímica para C₁₂ como se detalla para el compuesto VI no es limitante, y se detalla como tal para mostrar que el tratamiento del compuesto V como se describe invertirá la estereoquímica en tal posición. Alternativamente, otros ácidos orgánicos, azodicarboxilatos, y organofosfinas 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. 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 azida con un reactivo reductor tal como una organofosfina (por ejemplo, trimetilfosfina). Alternativamente, un compuesto de la

5 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

10 la técnica (ver, por ejemplo, Regueiro-Ren et al., Patente de EUA 6,800,653; and Regueiro-Ren et al., *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

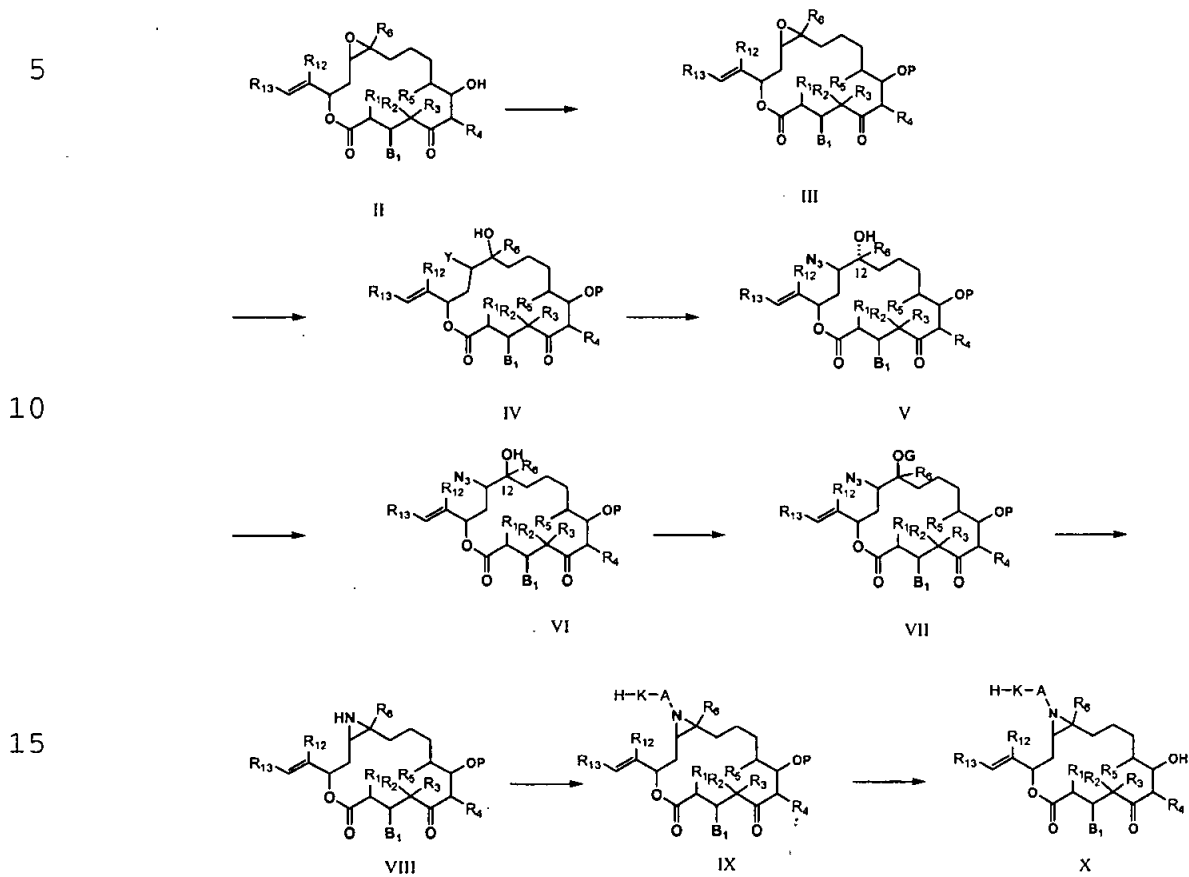
15 fórmula VIII por alquilación del anillo aziridina usando, por ejemplo, exceso de 2-bromoetanol y una base tal como carbonato de potasio. Un compuesto de la fórmula X puede prepararse de un compuesto de la fórmula IX por la eliminación de los grupos

20 protectores de éter de sililo usando métodos conocidos en la técnica (ver, por ejemplo, Greene et al., "Protective groups in Organic Synthesis", John Wiley and Sons, Inc.). Por ejemplo, cuando P es trietilsililo, el tratamiento de un compuesto de la

25 fórmula IX con ácido trifluoroacético en diclorometano

efectúa la desprotección para proporcionar un compuesto de la fórmula X.

ESQUEMA DE REACCIÓN 1



El análogo o derivado de folato V y el enlazador divalente T-Q del compuesto de la fórmula I pueden ensamblarse usando 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, et al., *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, el folato de peptidilo XI puede prepararse como se muestra en el Esquema de reacción

2. El acoplamiento péptido secuencial de una resina de poliestireno cargada con cisteína con aspartato

5 protegido con Fmoc, arginina, aspartato, y luego glutamato puede efectuarse usando PyBOP como agente de

acoplamiento y piperidina como agente de desprotección Fmoc. El ácido pterico protegido con N¹⁰-

trifluoroacetamida puede prepararse en dos etapas por

10 conversión enzimática (carboxipeptidasa G) del ácido fólico al ácido pterico, seguido por protección N¹⁰

usando anhídrido trifluoroacético. A continuación, el

acoplamiento del ácido pterico protegido con N¹⁰ al péptido enlazado a la resina seguido por

15 desdoblamiento de la resina con ácido trifluoroacético y remoción del grupo N¹⁰-trifluoroacetilo usando

hidróxido de amonio proporciona un fragmento V-T-Q del compuesto de la fórmula I donde V es ácido fólico y T-

Q es -Asp-Arg-Asp-Cys-OH. Alternativamente, los

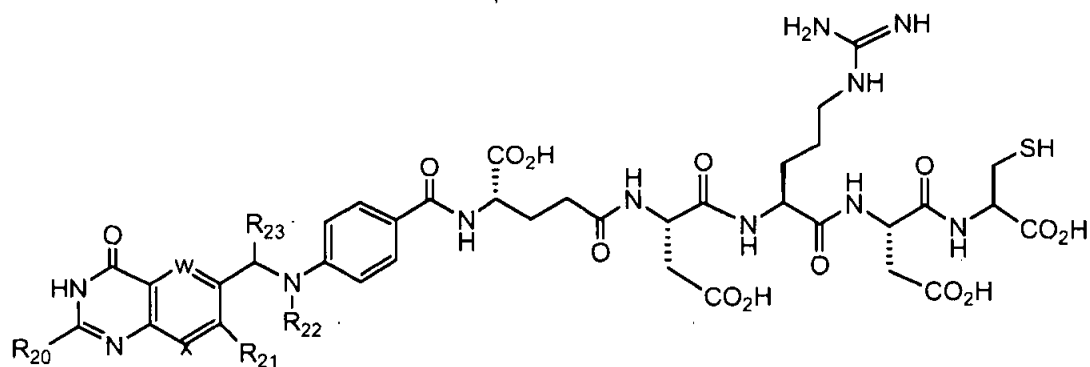
20 análogos de ácido pterico podrán usarse en lugar de ácido pterico, y otros aminoácidos deberán usarse en

lugar de aquellos ilustrados en el Esquema de reacción 2.

ESQUEMA DE REACCIÓN 2

H-Cys(4-metoxitritil)-2-clorotritil-Resina (carga 0.57mmol/g)

- 1) Fmoc-Asp(OtBu)-OH, PyBOP, DIPEA, DMF, luego piridina
- 2) Fmoc-Arg(Pbf)-OH, PyBOP, DIPEA, DMF, luego piridina
- 3) Fmoc-Asp(OtBu)-OH, PyBOP, DIPEA, DMF, luego piridina
- 4) Fmoc-Glu-OtBu, PyBOP, DIPEA, DMF, luego piridina
- 5) N¹⁰TFA ácido pterico, PyBOP, DIPEA, DMSO
- 6) 92.5% TFA, 2.5% H₂O, 2.5% i-Pr₃SiH, y 2.5% etanditiol
- 7) NH₄OH ac., luego HCl ac.

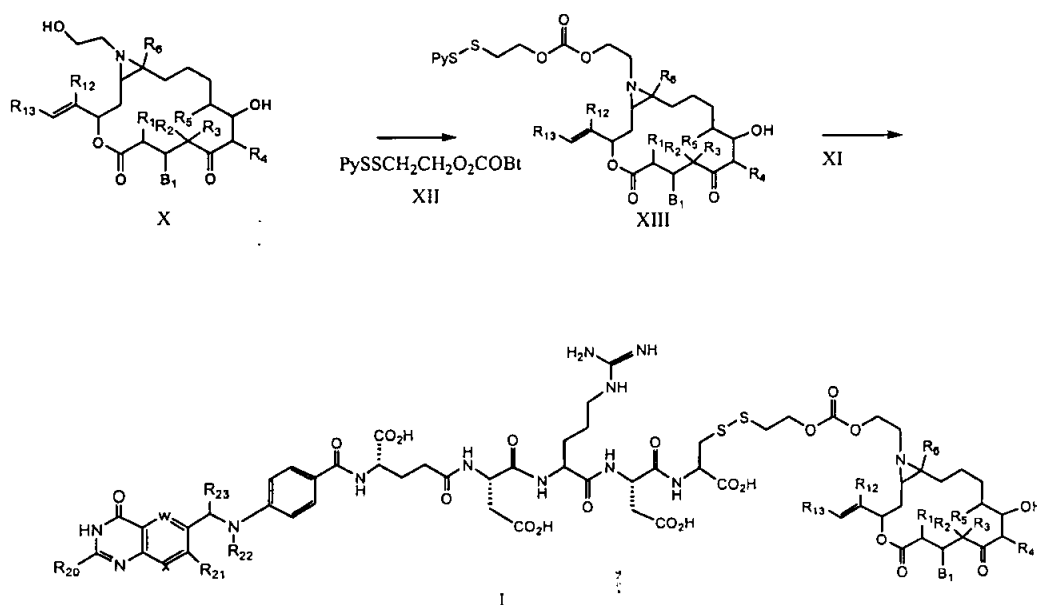


XI

El ensamble final de los compuestos de la fórmula I puede alcanzarse por el acoplamiento del análogo de epotilona de la fórmula X al fragmento V-T-Q por la incorporación en etapas de un enlazador resellable M. A modo de ilustración, el compuesto de la fórmula X donde -A-K-H es -CH₂CH₂OH puede convertirse a un carbonato de disulfaniletilo XIII usando un compuesto de benzotriazol activado de la fórmula XII. El compuesto de la fórmula XII puede prepararse a partir de mercaptoetanol,

cloruro de metoxycarbonil sulfenilo, y una 2-mercaptopiridina
opcionalmente substituida para proporcionar un 2-(2-piridin-2-
il)disulfanil)etanol intermediario; que puede entonces
convertirse al compuesto de la fórmula XII por tratamiento con
5 difosgeno y un 1-hidroxibenzotriazol opcionalmente substituido.
El intercambio de disulfuro posterior con un folato de
peptidilo tal como XI proporciona el compuesto de la fórmula I
donde V es ácido fólico, T-Q es un Asp-Arg-Asp-Cys-OH, M es -
SCH₂CH₂O(C=O)-, A es -CH₂CH₂- y K es O.

ESQUEMA DE REACCIÓN 3



El Esquema de reacción 4 ilustra un método alternativo
para hacer el compuesto de la fórmula X a partir del compuesto
de la fórmula XIV. Los compuestos de la fórmula XIV pueden
25 obtenerse por métodos bien conocidos en el campo, por ejemplo,

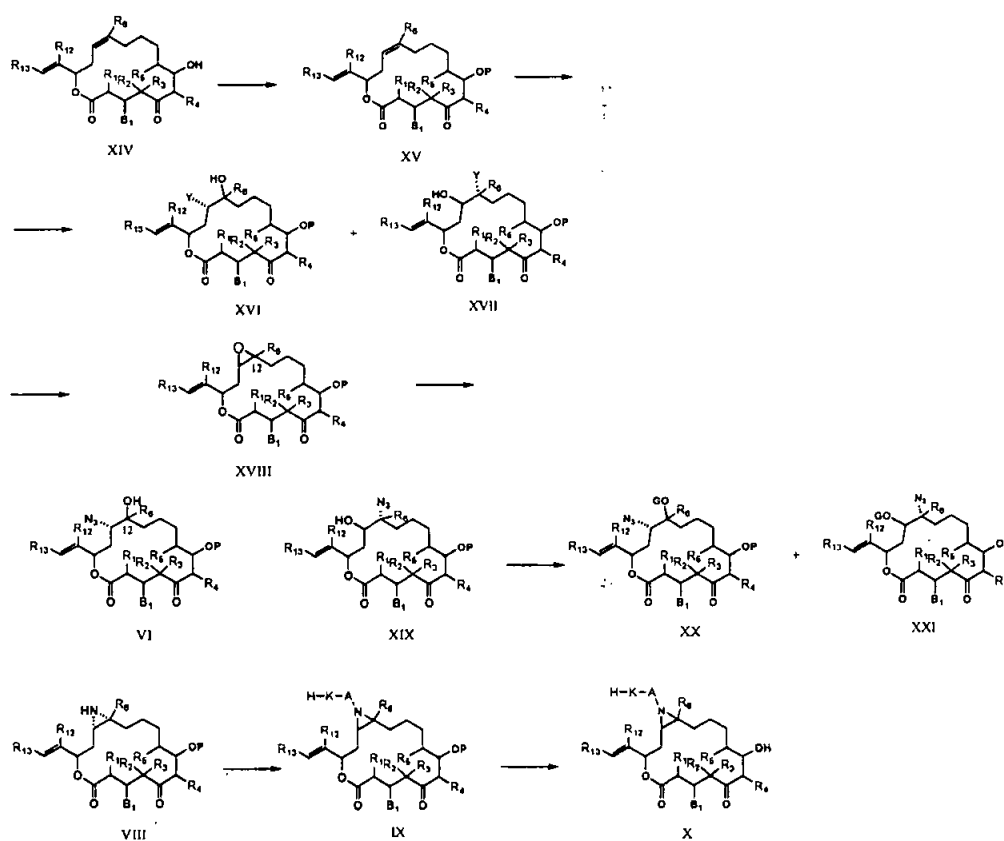
por fermentación (ver, por ejemplo Gerth et al., "Studies on the Biosynthesis of Epothilones: The Biosynthetic Origin of the Carbon Skeleton," Journal of Antibiotics, Vol. 53, No. 12 (Dic. 2000), y Hofle et al., "Epothilone A and B- Novel 16-Membered Macrolides: Isolation, Crystal Structure, and Conformation in Solution", Angew. Chem. Int. Ed. Engl., Vol. 35, No. 13/14, 1567-1569 (1996), la descripción de las cuales se incorporan en la presente para referencia) o por síntesis total (ver, por ejemplo Vite et al. Patentes E.U.A. Nos. 6,605,599; 6,242,469; 6,867,333 y Pub. Sol. Pat. E.U.A. 2006/004065, la descripción de las cuales se incorpora en la presente para referencia en su totalidad). Por ejemplo el compuesto de la fórmula XIV donde 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 C y puede obtenerse a partir de la fermentación de *Sorangium cellulosum* como se hace referencia arriba. El compuesto de la fórmula XIV puede convertirse al compuesto de la fórmula XV donde P es un grupo protector sililo tal como trietilsililo, t-butildimetilsililo, t-butildifenilsililo, triisopropilsililo, y los similares (ver, por ejemplo, Greene et al., "Protective groups in Organic Synthesis", John Wiley and Sons, Inc.). Por ejemplo, el compuesto de la fórmula XV donde P es trietilsililo puede prepararse por el tratamiento del compuesto de la fórmula XIV con clorotrietilsilano en presencia de base tal como base Hunig. En el caso donde B_1 es hidroxilo en el compuesto de la

fórmula XIV, entonces B₁ también se convertiría al correspondiente éter de sililo. Una halohidrina de la fórmula XVI o XVII (Y rs Cl, Br, o I) puede prepararse a partir del compuesto de la fórmula XV por tratamiento con un halógeno Y₂ por métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la adición electrofílica en solventes polares tales como acetonitrilo usando yodo puede proporcionar estereoselectivamente halohidrinas regioisoméricas de las fórmulas XVI y XVII, donde Y es yodo. Alternativamente las N-halo succinimidas también pueden usarse para la misma transformación. El compuesto de la fórmula XVIII puede prepararse a partir de compuestos de las fórmulas XVI y/o XVII por cerrado de anillo epóxido en presencia de bases tales como trietilamina o base Hunig en un sistema solvente polar/acuoso tal como acetonitrilo/agua. Si se desea, el compuesto XIV puede transformarse directamente en compuestos de la fórmula XVI y/o XVII (donde P es H), que entonces se convertirían en el epóxido XVIII (donde P es H). El compuesto de la fórmula XVIII puede transformarse en los alcoholes azido de las fórmulas VI y XIX por desplazamiento azida en presencia de sales de azida inorgánica o azidas de amonio tetra-alquilo en solventes alcohólicos. En el caso donde P es un grupo protector sililo, los compuestos de las fórmulas XX y/o XXI donde OG es un grupo de partida tales como mesilato, tosilato, nosilato, triflato y los similares pueden prepararse de los compuestos de las 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 los compuestos de las fórmulas XX y XXI donde OG es mesilato. El compuesto de la fórmula VIII puede prepararse de compuestos de las 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 de compuestos de las fórmulas XX y/o XXI a través de reacción con un agente reductor tal como organofosfina (por ejemplo, trimetilfosfina) en solventes polares tales como acetonitrilo. Alternativamente, cuando P es H, el compuesto de la fórmula VIII puede prepararse directamente de compuestos de las fórmulas VI y/o XIX por reducción del grupo azido con un agente reductor tal como un organofosfina (por ejemplo, trifenilfosfina) en solventes polares tal como acetonitrilo. El compuesto de la fórmula IX puede prepararse del compuesto de la fórmula VIII por métodos conocidos en la técnica (ver, por ejemplo, Patente de EUA No. 6,800,653; y Regueiro-Ren et al., *Organic Letters*, 2001, 3, 2693-2696). Por ejemplo, el compuesto de la fórmula IX donde H-K-A- es 2-hidroxietilo puede prepararse del compuesto de la fórmula VIII por alquilación del anillo aziridina usando, por ejemplo, exceso de 2-bromoetanol y una base tal como carbonato de potasio. En el caso P es un trialquilsililo, el compuesto de la fórmula X puede prepararse del compuesto de la fórmula IX

por eliminación de los grupos protectores de éter sililo usando métodos conocidos en la técnica (ver, por ejemplo, Greene et al., "Protective groups in Organic Synthesis", John Wiley and Sons, Inc.). Por ejemplo, cuando P es trietilsililo, el tratamiento del compuesto de la fórmula IX con ácido trifluoroacético en diclorometano efectúa desprotección para proporcionar el compuesto de la fórmula X.

ESQUEMA DE REACCIÓN 4

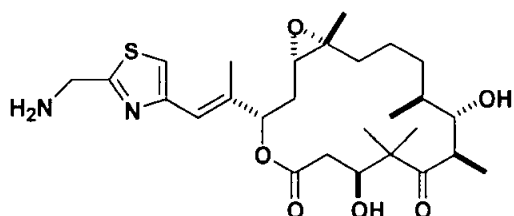


La invención no se describirá además con referencia a los siguientes ejemplos ilustrativos.

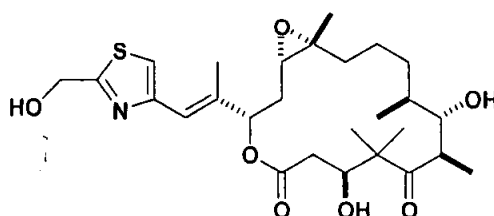
EJEMPLOS

EJEMPLO 1: Análogos de epotilona conjugados de folato

Como se describe en la descripción detallada arriba, los análogos y derivados de folato se describen en Vlahov. En la búsqueda y desarrollo dirigida hacia el receptor objetivo de folato para células neoplásicas de compuestos análogos de epotilona y epotilona conjugado, los diversos compuestos se conjugaron a folato. Por ejemplo, el compuesto AA y compuesto BB se consideraron candidatos para conjugación para ácido fólico:



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 hasta AA.VI; ver **FIG. 1**) se prepararon y opcionalmente se pusieron a prueba para estabilidad química, enlace FR, y actividad mediada por FR en cultivo celular.

El enlace de los conjugados de folato del compuesto AA para FR se determinó en un ensayo que mide el desplazamiento de ácido fólico radioetiquetado de FR expresado en células neoplásicas KB que se hacen crecer

hasta confluencia. El enlace de los conjugados de folato del compuesto AA.I y AA.II se considera aceptable [afinidad relativa (RA) >0.25 ; RA de ácido fólico = 1.0]. Sin embargo, de forma sorpresiva, ninguno de los seis
5 conjugados del compuesto AA se muestra en la Fig. 1 muestra citotoxicidad apreciable contra las células neoplásicas KB en ensayos de antiproliferación que miden la incorporación de ^3H -timidina (los datos no se muestran).

Ya que los conjugados del compuesto AA demuestran
10 citotoxicidad decepcionante contra células neoplásicas, los estudios se condujeron usando tres conjugados del compuesto BB (Compuestos BB.I hasta BB.III). El compuesto BB también se conoce como epotilona F, y es un análogo del compuesto AA, donde el grupo 21-amino se reemplaza por un
15 grupo 21-hidroxilo. Mientras que el compuesto BB.II (**Fig. 2**) muestra citotoxicidad a concentraciones mayores, la actividad no se atenúa en estudios de competencia usando exceso de ácido fólico. Por lo tanto, la citotoxicidad observada se atribuye a liberación no específica del
20 compuesto BB.II.

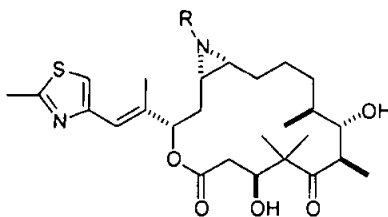
Otros análogos de epotilona, por ejemplo, epotilonas de aziridinilo, se conocen en la técnica (ver, por ejemplo, Patente de EUA No. 6,399,638; Regueiro-Ren, A, et al. (2001) *Org. Letters.* 3:2693-96) y muestra citotoxicidad de
25 antitumor potente. Por ejemplo, un ensayo MTS que compara la

potencia citotóxica relativa de un número de análogos de epotilona contra un par de líneas celulares de cáncer resistentes al taxano (HCTVM46 y A2790Tax) se condujeron (ver Tabla 1). El HCTVM46 es una línea celular de carcinoma de colon humano derivado de la línea precursora HCT116 sensible, y es resistente a taxanos debido a la sobre expresión del transportador de eflujo del fármaco 170kD p-glioproteína. El A2780Tax es una línea celular de carcinoma de ovario humano derivado de la línea A2780 precursora, y es resistente a paclitaxel como un resultado de una mutación en la secuencia de aminoácido de tubulina que imparte la capacidad del paclitaxel al enlace.

Como se muestra en la Tabla 1, varios análogos de epotilona aziridinilo (Compuestos CC-EE) muestra actividad antitumoral potente con tanto las líneas celulares de colon HCT116 como carcinoma de ovario A2780, en comparación con otros agentes antitumor conocidos, por ejemplo, paclitaxel, compuesto AA, y epotilona B.

TABLA 1

Actividad *in vitro* de Epotilonas de 12,13-aziridinilo



Compuesto	R	HCT116 IC ₅₀ (nM) ¹	Relación ² R/S	A2780 IC ₅₀ (nM) ¹	Relación ³ 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	-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
Epotilona B	--	0.40 ± 0.13	0.5	0.23 ± 0.09	2.5

¹ Promedio IC₅₀ ± SD calculado de cuatro experimentos separados.

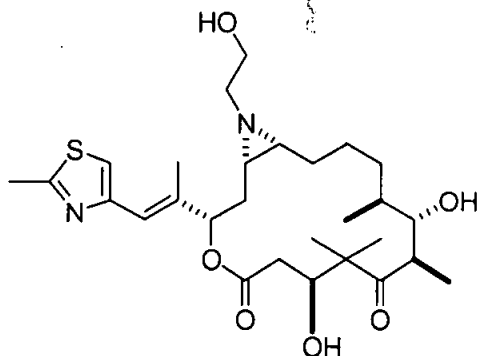
² Relación R/S = HCT116 IC₅₀/HCT116VM46IC₅₀

³ Relación R/S = A2780 IC₅₀/A2780Tax IC₅₀

A pesar de las actividades antitumor de compuestos de epotilona de aziridinilo CC-EE, los grupos solamente hidroxilo en estas moléculas disponibles para conjugación para folato son aquellos encontrados en los átomos de carbono C₃ y C₇. En consecuencia, se ha investigado un número de compuestos y análogos de epotilona, esto mantiene un reto para descubrir un compuesto que estaría fácilmente disponible para conjugación a folato, y el cual deberá mostrar actividad por medio de liberación específica de la porción de epotilona activa en las células neoplásicas.

El compuesto G de aziridinil epotilona se han

descubierto, que tiene la fórmula:



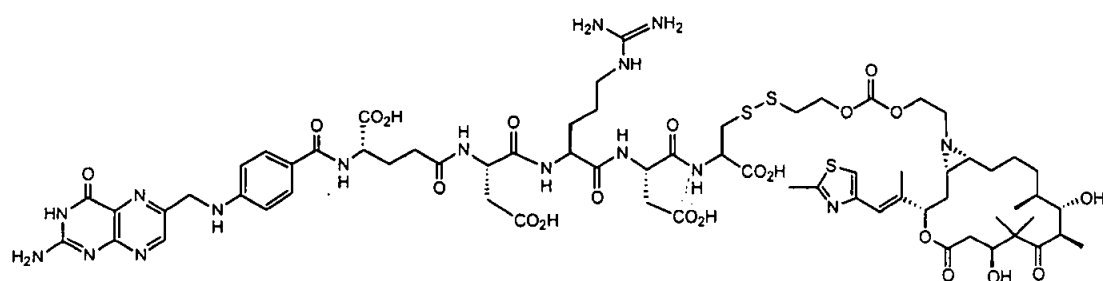
Compuesto G

El compuesto G (ver Ejemplos 2 y 3) prueba sorprendentemente fácil conjugar el ácido fólico para formar el compuesto J (ver Ejemplo 2) con afinidad relativa de 0.77 para el receptor de folato, cuando se compara con el ácido fólico.

De forma inesperada, el grupo hidroxilo polar en la cadena lateral de aziridina no afecta adversamente la actividad antitumoral de los análogos de epotilona de aziridina. Esto es importante debido a que es el análogo de epotilona aziridina, por ejemplo, el compuesto G, que mide los efectos antitumorales de liberación de ácido fólico. La potencia del compuesto G, y otros tres análogos de epotilona altamente potentes (ixabepilona, compuesto AA, y compuesto BB) se evaluaron por el ensayo de formación de colonias que se describe arriba. La concentración necesaria para exterminar el 90% de células cancerígenas KB clonogénicas (IC₉₀) se determinó después de una duración de exposición al fármaco de

17 horas. Como se muestra en la **FIG. 3**, el compuesto G muestra un IC_{90} 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
5 no afecta la actividad antitumoral del compuesto G. El compuesto J demuestra actividad citotóxica substancial contra células neoplásicas *in vivo*. En el modelo de tumor KB *in vivo* $FR\alpha(+)$, el compuesto J demuestra actividad tanto en su dosis tolerada máxima (MTD) como a dos niveles de dosis inferiores
10 que producen toxicidad mínima (ver **FIGS. 4A-4B**). En contraste, la ixabepilona fue solamente activa en su MTD (5 μ mol/kg). Cuando se compara a las MTDs, el compuesto J produce efectos antitumorales superiores a la ixabepilona (**FIGS. 4A-4B**).



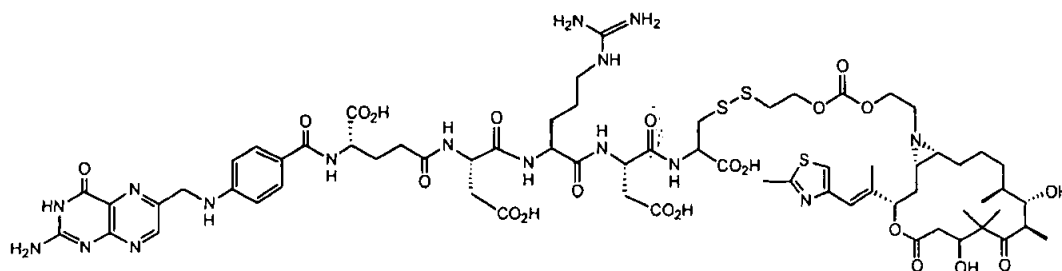
20 **Compuesto J**

En contraste, con el modelo de tumor $FR\alpha(-)$ M109 precursor, el compuesto J tiene una actividad pobre a todos los niveles de dosis probados, incluyendo a su MTD (2.4 μ mol/kg), mientras que la ixabepilona fue activa a su MTD de 5
25 μ mol/kg. (**FIG. 5**). Estos resultados indican que el $FR\alpha(-)$

M109 es sensible a ixabepilona y la inactividad del compuesto J se posiblemente más grande a consecuencia de la ausencia de la expresión $FR\alpha$ por este tumor. Estos resultados también proporcionan evidencia de que la actividad antitumoral del compuesto J puede medirse a través de los receptores $FR\alpha$.

La evidencia adicional del mecanismo de administración de fármaco mediado por $FR\alpha$ del compuesto J se proporciona por la observación que la co-administración de un análogo de folato a 20 veces de exceso de la dosis del compuesto J podría competir substancialmente con el compuesto J para enlazar el receptor y proteger los tumores $FR\alpha(+)$ 98M109 de los efectos antitumorales del compuesto J. (FIG. 6). Ya que el compuesto G y el conjugado (Compuesto J) tiene efectos anti-tumor sorprendentes tanto *in vitro* como *in vivo*, y ya que las actividades antitumor del compuesto J pueden atribuirse a efectos mediados por $FR\alpha(+)$, también lo que se describe en la presente es la conjugación del compuesto G de análogo de epotilona de aziridinilo (ver Ejemplos 2 y 3) para formar el compuesto J. (ver Ejemplo 2).

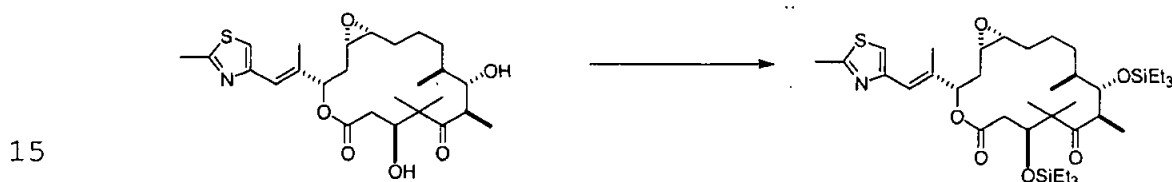
EJEMPLO 2: Preparación del compuesto J



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-
 5 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-
 10 Tetrametil-3-[1-metil-2-(2-metil-4-tiazolil)etenil]-7,11-
 bis[(trietilsili)oxi]-4,17-dioxabicyclo[14.1.0]heptadecan-5,9-
 diona



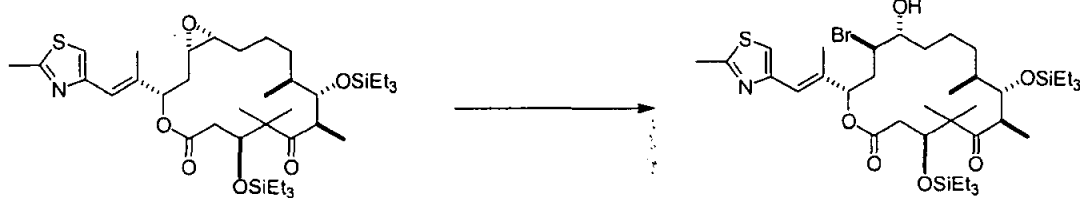
A una solución agitada de Eptilona A (5.0 g, 10.1 mmol),
 imidazol (3.40 g, 49.9 mmol) y DIPEA (28.5 mL, 163.6 mmol) en
 DMF anhidro (100 mL) bajo atmósfera N₂ se agregó cloruro de
 trietilsililo (15.0 mL, 89.4 mmol). Después de que la adición
 20 se completó, la solución de reacción se calentó a 55°C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

La reacción anterior se repitió dos veces más. El DMF de
 la solución combinada se destiló bajo alto vacío. El residuo
 25 espumoso se purificó por cromatografía de columna (gel de

sílice, E. Merck, 230-400 malla, 600 g; 5:95, 10:90 y 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% MeOH/H₂O + 0.2% H₃PO₄), relación de flujo a 1.0ml/min, UV 254, t = 23.15 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[(triethylsilyl)oxi]-1-oxaciclohexadecan-2,6-diona



15 A una solución agitada 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]-4,17-dioxabicyclo[14.1.0]heptadecan-5,9-diona (5.0 g, 6.92 mmol) en diclorometano anhidro (140 mL) a -
20 20°C bajo atmósfera de N₂ se agregó MgBr₂-Et₂O (3 x 2.13 g, 24.78 mmol) en tres porciones cada una dos horas mientras se 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
25 sobre Na₂SO₄ anhidro y se evapora al vacío para dar una

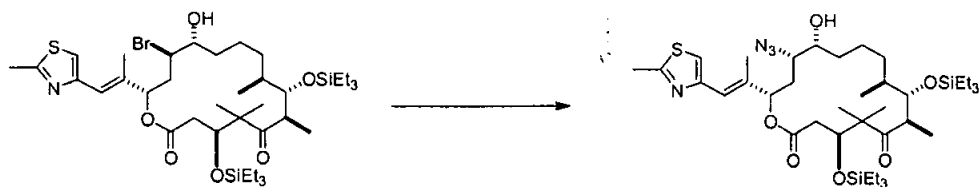
espuma. El residuo se purificó por cromatografía en columna (gel de sílice, E. Merck, 230-400 malla, 180 g; 5:95, 7.5:92.5 y 12.5:87.5 EtOAc/hexanos) para dar el compuesto B (2.5 g, 45% de rendimiento) como una espuma blanca junto con el material
5 de partida recuperado (0.9 g, 18%).

HPLC: ES Industries FluoroSep RP Fenilo, 4.6 x 250 mm, isocrático, 30 min, 100%B, (B = 90% MeOH/H₂O + 0.2% H₃PO₄), relación de flujo a 1.0ml/min, UV 254, t =14.37 min. (100% puro) LC/MS (ES+): 802 (M+H).

10

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[(triethylsilyl)oxi]-1-oxaciclohexadecan-2,6-diona

15



A una solución de [4S-

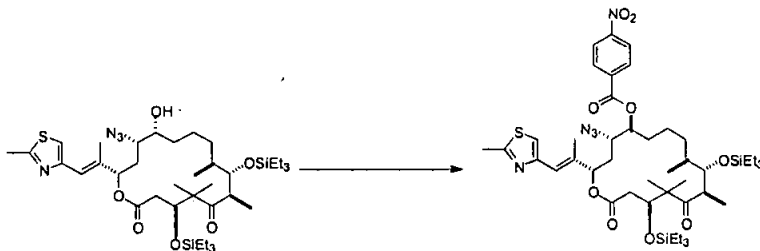
[4R*,7S*,8R*,9R*,13S*,14S*,16R*(E)]]-14-Bromo-13-hidroxi-

20 5,5,7,9-tetrametil-16-[1-metil-2-(2-metil-4-tiazolil)etenil]-4,8-bis[(triethylsilyl)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-crown-6 (3.26 g, 12.3 mmol) a temperatura ambiente bajo atmósfera N₂. La solución
25 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 seco (Na₂SO₄), y luego se evapora para dar 9.2 g del producto crudo. Cromatografía en columna (gel de sílice 450 g, 5 - 15% EtOAc/hexano) encontrado 6.7 g (71% de rendimiento) el compuesto C como una espuma blanca.

HPLC: YMC ODS-A S5, 4.6 x 50mm, isocrático, 30 min, 100%B. (B = 90% MeOH/H₂O + 0.2% H₃PO₄), relación de flujo a 4.0mL/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[(triethylsilil)oxi]-1-oxaciclohexadecan-2,6-diona

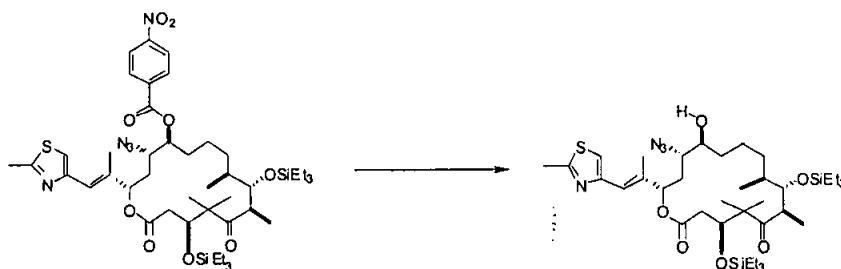


La [4S-[4R*,7S*,8R*,9R*,13S*,14R*,16R*(E)]]-14-Azido-13-hidroxi-5,5,7,9-tetrametil-16-[1-metil-2-(2-metil-4-tiazolil)etenil]-4,8-bis[(triethylsilil)oxi]-1-oxaciclohexadecan-2,6-diona (7.0 g, 9.15 mmol), ácido 4-nitrobenzoico (3.82 g, 22.9 mmol), y trifenilfosfina (6.0 g, 22.9 mmol) se disolvieron en THF (100 mL). El 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 purifica por cromatografía en gel de sílice (gradiente en etapa desde 5% de acetato de etilo/hexanos hasta 15% acetato de etilo/hexanos) para aislar el éster de nitrobenzoato como una espuma blanca (7.3g, 87%).

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



El Compuesto D del éster de nitrobenzoato (7.3 g, 7.98 mmol) se disolvió en acetato de etilo (35 mL) y se enfrió a 0°C. Amonio en metanol (350 mL de solución 2M en metanol) se agregó, y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 4 hr, se concentró y purificó por cromatografía en gel de sílice (gradiente en etapas a partir de etilacetato/hexanos al 10% hasta etilacetato/hexanos al

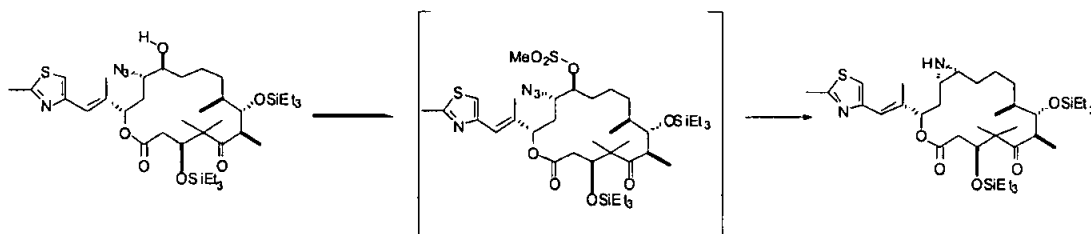
30%) para aislar [4S-[4R*,7S*,8R*,9R*,13R*,14R*,16R*(E)]]-14-Azido-13-hidroxi-5,5,7,9-tetrametil-16-[1-metil-2-(2-metil-4-tiazolil)etenil]-4,8-bis[(triethylsilil)oxi]-1-oxaciclohexadecan-2,6-diona como un sólido blanco vidrioso
5 (5.97g, 98%).

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

10

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[(triethylsilil)oxi]-4-oxa-17-azabicyclo[14.1.0]heptadecan-5,9-diona

15



La [4S-[4R*,7S*,8R*,9R*,13R*,14R*,16R*(E)]]-14-azido-13-
20 hidroxi-5,5,7,9-tetrametil-16-[1-metil-2-(2-metil-4-tiazolil)etenil]-4,8-bis[(triethylsilil)oxi]-1-oxaciclohexadecano-2,6-diona (5.97 g, 7.8 mmol) y trietilamina (4.34 mL, 31.2 mmol) se disolvieron en diclorometano (85 mL) y se enfrió a 0°C. El metansulfonilcloruro (1.8 mL, 23.4 mmol)
25 se agregó gota a gota durante un periodo de 5 min. Después de

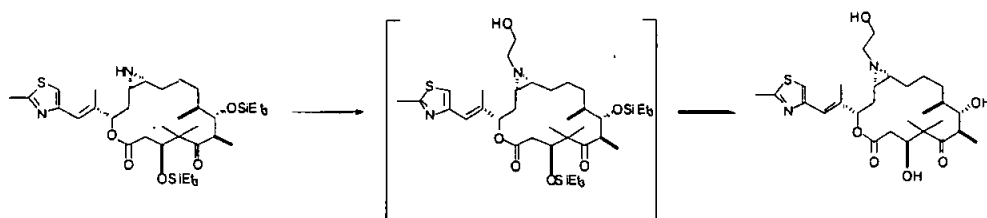
10 min, la mezcla de reacción se removió del baño de hielo, y se agitó a temperatura ambiente. Después de 3 hr, la mezcla de reacción se tomó en NaHCO_3 saturado (300 mL), se extrajo con diclorometano (3 X 100 mL), se secó sobre Na_2SO_4 , se concentró y tomó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

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 solución 1.0 M 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 concentró y purificó por cromatografía en gel de sílice (gradiente en etapas a partir de 2% metanol/cloroformo hasta 5% metanol/cloroformo) para aislar Compuesto F como un sólido blanco (5.08 g, 88% durante dos etapas).

LC-MS: Phenomenex C18, 4.6 x 50 mm, isocrático, 5 min, 100%B. (B = 90% MeOH/ H_2O + 0.1% 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-Dihidroxi-17-[2-hidroxietil]-8,8,10,12-tetrametil-3-[1-metil-2-(2-metil-4-tiazolil)etenil]-4-oxa-17-

20 azabicciclo[14.1.0]heptadecano-5,9-diona



25 K_2CO_3 (1.4g, 10.2 mmol) y 2-bromoetanol (0.52 mL, 7.3

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[(triethylsilil)oxi]-4-oxa-17-azabicyclo[14.1.0]heptadecano-5,9-diona (1.05 g, 1.46 mmol) en
5 acetonitrilo (20 mL) y se calentaron a 82°C. Después de 4 hr, 2-bromoetanol adicional (0.52 mL, 7.3 mmol) y K₂CO₃ (1.4 g, 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 a temperatura ambiente, se
10 filtró a través de Celite, se lavó con acetonitrilo (5 X 5 mL), diclorometano (2 X 5 mL), se concentró y tomó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

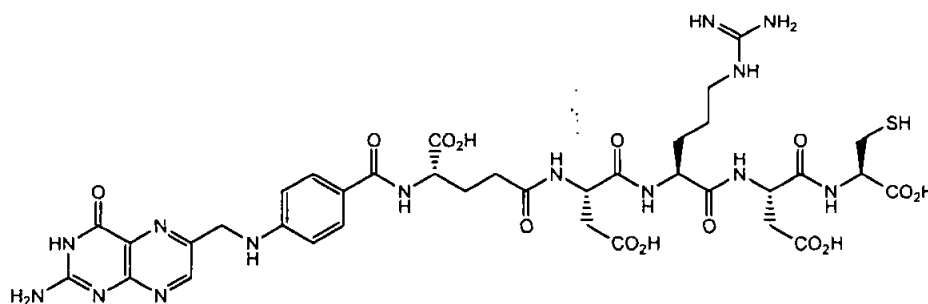
El producto de reacción crudo se disolvió en diclorometano (40 mL), se enfrió a 0°C, y ácido
15 trifluoroacético (8.0 mL) se agregó. Después de 1 hr, la mezcla de reacción se concentró, se tomó en NaHCO₃ saturado (200 mL), se extrajo con diclorometano (3 X 100 mL), se secó sobre Na₂SO₄, se concentró, y purificó por cromatografía en gel de sílice (10%
20 metanol/diclorometano) para aislar [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 (Compuesto G),
25 como una película clara (0.62g, 79% durante dos etapas).

LC-MS: Waters Sunfire C18, 4.6 x 50mm, gradiente, 0 hasta 100% B durante 4 min. (A= 10% MeOH/H₂O + 0.1% TFA; B = 90% MeOH/H₂O + 0.1% 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-oxopentanóico

10



15

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-1-oxopentan-2-ilamino)-1-oxopropan-2-ilamino)-5-

20

oxopentanóico se sintetizó por síntesis de péptido de fase sólida en cinco etapas iniciando de H-Cys(4-metoxitritil)-2-clorotritil-resina. La Tabla 2 muestra la cantidad de reactivos usados en la síntesis.

25

TABLA 2

	Mmol	Equiv.	PM	cantidad
H-Cys(4-metoxitritil)-2-clorotritil-Resina (carga 0.57mmol/g)	1.14			2.0 g
Fmoc-Asp(OtBu)-OH (disuelto en 15 mL DMF)	1.14	2	411.5	0.938 g
Fmoc-Arg(Pbf)-OH (15 mL DMF)	1.14	2	648	1.477 g
Fmoc-Asp(OtBu)-OH (disuelto en 15 mL DMF)	1.14	2	411.5	0.938 g
Fmoc-Glu-OtBu (15 mL DMF)	1.14	2	425.5	0.970 g
N ¹⁰ TFA ácido Ptericoico (disuelto en 15 mL DMSO)	1.14	1.25	408	0.581 g
DIPEA	1.14	4	174	0.793
PyBOP	1.14	2	520	1.185 g

Los siguientes procedimientos se usaron:

Etapas de acoplamiento:

A la resina en un recipiente de síntesis de péptido se agregaron la solución de aminoácido, DIPEA, y PyBOP. La mezcla se burbujeó durante 1hr y se lavó 3X con DMF y alcohol de isopropilo. La desprotección FMOC se efectuó por tratamiento con piperidina al 20% en DMF, 2X (10 min), antes de cada acoplamiento de aminoácido. Esta secuencia se repitió por cada etapa de acoplamiento de aminoácido.

Síntesis de ácido pterico protegido por N¹⁰-TFA:

A 10 L de 0.1 M tris solución base (121.1 g tris base en 10 L de agua) en un matraz de fondo redondo agitado mecánicamente 22 L, equipado con un manto de calentamiento, se
5 agregó 200 g (0.453 mol) de ácido fólico. La mezcla se agitó para disolver el ácido fólico, y luego 500 mg (3.67 mmol) de cloruro de zinc se agregó. La carboxipeptidasa G (13 x 20 viales unitarios disponibles de Sigma) se agregó y el pH se ajustó a 7.3 con HCl 1N y se mantuvo durante toda la reacción.
10 La mezcla se protegió de luz y calor a 30°C durante 8-10 días (el uso de un autotitulador para mantener el pH constante reduciendo el tiempo de conversión por 4-5 días). La reacción se monitoreó por HPLC analítica hasta que 80% de conversión se alcanzó (la conversión adicional es deseable pero no tiene que
15 ser optimizado). El producto se precipitó de la mezcla de reacción al ajustar la solución a un pH = 3.0 usando HCl 6N. La mezcla espesa se transfirió a un vial centrifugo y se centrifugó a 4000 rpm durante 10 min. El sobrenadante se decantó. El sólido húmedo luego se purificó directamente como
20 sigue (el sólido húmedo podría congelarse durante el almacenamiento o primero secarse por congelado; sin embargo, el almacenamiento de sólidos húmedos en el congelador hasta la disolución fue más eficiente). A 40 g de ácido pterico crudo en 700 mL de agua se agregó 1.0 M NaOH hasta un pH = 11.5. La
25 mezcla se filtró (Whatman tipo 1) y luego se procesó por

cromatografía (columna: 10 x 120 cm; fase estacionaria: celulosa DEAE 8 kg; fase móvil: 1.0 M NaCl/NaOH 0.01 M, pH = 11.5; relación de flujo: 17 ml/min). Un litro de fracciones de color amarillo se colectaron y analizaron por HPLC. Las fracciones que contienen ácido ptericoico puro se ajustaron a un pH = 3 con HCl 6 M para precipitar ácido ptericoico. La mezcla se centrifugo a 3000 rpm durante 20 min. El sobrenadante se decantó y se lavó con agua (3x). El sólido se secó por congelado durante al menos 72 hr. El impacto de agua residual en la siguiente reacción no se conoce.

El ácido ptericoico se secó además sobre P_2O_5 bajo alto vacío durante 24 hr (notar que los resultados similares en la etapa de protección se obtuvieron sin esta etapa de secado adicional). Después, 100 g (0.32 mol) de ácido ptericoico se agregó a un matraz de fondo redondo 5 L, equipado con un agitador mecánico y una entrada de argón, y se almacenó 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 hule o adaptador de entrada de argón, y luego se agitó vigorosamente. El matraz se protegió de la luz y se agitó 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 por rotación hasta secarse y se trató con 2.5 L de ácido trifluoroacético 3% en agua. La mezcla se agitó durante la

noche a temperatura ambiente para hidrolizar los subproductos anhídridos. La evaporación rotatoria dio un sólido seco. El sólido se suspendió en 2 L de agua y luego se centrifugó en botellas de centrifugado 250-mL a 3000 rpm durante 20 min. El sobrenadante se removió y el sólido se lavó con agua y se centrifugó (4 veces). El sólido se secó por congelado durante 3 días, se transfirió a botellas ámbar, y se secó bajo alto vacío en la presencia de P_2O_5 durante 2 días (Pureza $\geq 95\%$; TFA residual evaluado por Análisis Elemental).

10

Etapas de desdoblamiento:

El intermediario protegido se liberó de la resina usando el reactivo de desdoblamiento preparado de 92.5% (50 mL) TFA, 2.5% (1.34 mL) H_2O , 2.5% (1.34 mL) Triisopropilsilano, y 2.5% (1.34 mL) etanoditiol. El reactivo de desdoblamiento 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 reactivo restante (3 X 8 mL). Los volátiles se concentraron por la evaporación rotatoria a un volumen de 10 mL. El éter de dietilo (35.0 mL) se agregó para efectuar la precipitación. El sólido se colectó por centrifugación y se secó para dar 1.25 g del producto de desdoblamiento.

20

Etapas de Desprotección:

25 El grupo protector N^{10} -trifluoroacetilo en la porción del

ácido pterico se removi6 bajo condiciones b6sicas. Iniciando con 250 mg de intermediario protegido en 10 mL de agua, el pH se ajust6 a 9.3 y se mantuvo durante 1 hr usando 4:1 H₂O: hidr6xido de amonio (1-2 mL). Despu6s de 1 hr, el pH se ajust6 a 5 con HCl 1N (~1 mL) y el producto se purific6 en HPLC preparativa para producir 125 mg del Compuesto H.

Condiciones de Purificaci6n HPLC:

Columna: Waters NovaPak C₁₈ 300x19mm

10 Solvente A: Soluci6n amortiguadora 10mM Acetato de Amonio, pH=5

Solvente B: Acetonitrilo

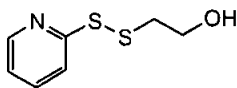
Eluci6n: 1%B hasta 20%B en 40 min a 15 mL/min

Rendimiento total de las reacciones combinadas: 625 mg

15

I. Preparaci6n de 2-(2-(piridin-2-il)disulfanil)etil
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-
20 il)etilo

1. Preparaci6n de 2-(2-(Piridin-2-il)disulfanil)etanol



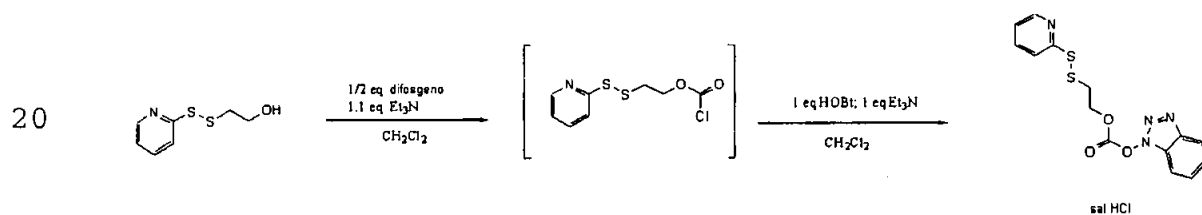
25 A una soluci6n de cloruro de metoxycarbonil sulfenilo (10 mL, 110 mmol), en diclorometano (100 mL), se enfri6 a 0°C, se

le agregó mercaptoetanol (7.6 mL, 110 mmol), gota a gota. La mezcla de reacción se permitió agitar a 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 entibiar a temperatura ambiente durante otra 1 hr. El producto sólido se observó que caen de la solución. El CCD (1:1 Pet éter/EtOAc) mostró que el producto importante se ha formado. La mezcla de reacción se concentró a un volumen de 125 mL. La mezcla se filtró a través de un embudo Buchner. La torta filtró se lavó con diclorometano y luego se secó bajo vacío durante la noche para proporcionar 2-(2-(Piridin-2-il)disulfanil)etanol (23.6 g), como la sal HCl.

CCD: $R_f = 0.45$

Placas - Gel de sílice EMD 60 F₂₅₄, 5 X 10 cm, 250 M

2. Preparación de 2-(2-(piridin-2-il)disulfanil)etil carbonato de Benzo[d][1,2,3]triazol-1-il



Una solución de difosgeno (2.28 g, 11.5 mmol) en diclorometano anhidro 15 mL se agitó bajo argón en un matraz de fondo redondo y se enfrió por un baño de hielo/sal. Un embudo de adición con una mezcla de 2-

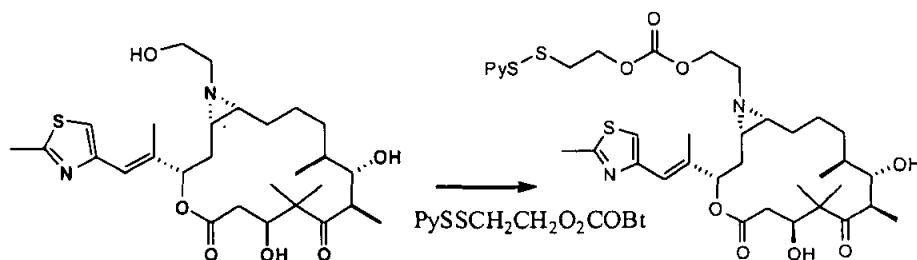
(piridin-2-ildisulfanil)etanol (5.01 g, 22.4 mmol) y trietilamina (2.25 g, 22.2 mmol) en 65 mL diclorometano anhidro se colocó en el matraz de fondo redondo. La mezcla se agregó gota a gota durante un periodo de 20 min. La mezcla de reacción se permitió entibiar a temperatura ambiente y se agitó durante 1 hr adicional. El análisis CCD de la mezcla de reacción mostró que el material de partida se consumió y ahí fue la formación de un "rayado" producto de cloroformiato menos polar, CCD (6:4 EtOAc:Hexanos): R_F de material de partida 0.4; R_F de producto de cloroformiato: 0.8.

La mezcla de reacción se agitó en un matraz de fondo redondo bajo argón y se enfrió por un baño de hielo/sal. Una mezcla de 3.02 g, 22.4 mmol HOBt y 2.23 g, 22.0 mmol trietilamina en 10 mL diclorometano anhidro se agregó a un matraz de goteo puesto en el 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 se permitió entibiar a temperatura ambiente y se agitó durante la noche. Aproximadamente 27 mL de diclorometano se destiló luego de la mezcla de reacción a presión atmosférica. La mezcla se permitió luego enfriar a temperatura ambiente y agitar durante 2 hr. Los sólidos se colectaron por filtración, y la

torta filtró se lavó con 20 mL de diclorometano. Los sólidos se secaron luego bajo vacío a 40°C en un evaporador rotatorio para proporcionar 7.81 g de sólidos blanco apagado. Este producto se analizó por ^1H -RMN y se determinó para ser el producto deseado.

3. Preparación de 2-(2-(piridin-2-il)disulfanil)etil 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)etilo

10



A una solución de [1S-

15 [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 en diclorometano anhidro a 0°C se le agregó DMAP (1.2 eq.) y 2-(2-(piridin-2-il)disulfanil)etil carbonato de benzo[d][1,2,3]triazol-1-il (1.0 eq.) en tándem. La mezcla de reacción se agitó a 0°C bajo argón y se monitoreó por CCD cada 10 min. DMAP adicional (1.2 eq.) y Compuesto I (2) (1.0 eq.) se agregaron como fue
20
25 necesario hasta que todo el Compuesto G se consumió. La

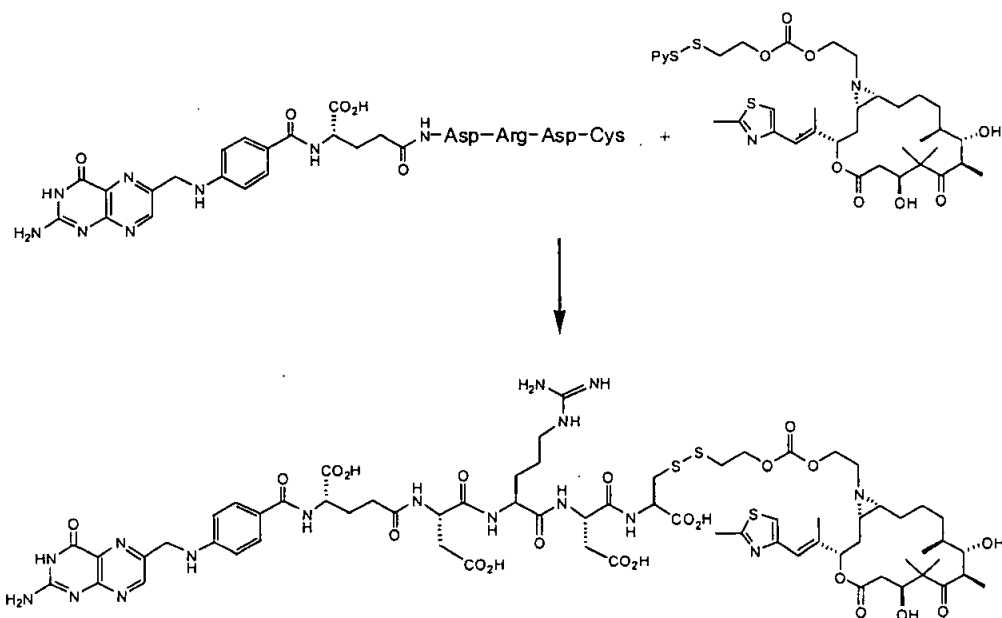
reacción se apagó con MeOH (1 mL) a 0°C, el solvente se removió bajo vacío, y el residuo se purificó por cromatografía (gel de sílice, 2.5-5% MeOH en DCM) para proporcionar el compuesto del título como un sólido beige. Las cantidades y recuperaciones del Compuesto se enlistan abajo en la Tabla 3. Rendimiento Total de 2.95 g de Compuesto G fue 2.80 g (67.9%) del Compuesto I.

TABLA 3

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

* Cada purificación cromatográfica típicamente dio el producto puro junto con algo de producto impuro (80-90% pureza). El producto impuro se combinó con el producto puro del siguiente lote por purificación cromatográfica. Para los lotes #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-oxopentanóico



A 15 mL de H₂O (burbujeado con argón durante 10 min antes del uso) se le 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-

oxopentanóico (498 mg, 0.534 mmol) en un tubo de centrifugado de 50 mL de tamaño. A esta suspensión, mientras burbujea con argón, se le agregó gota a gota solución NaHCO₃ saturada (burbujeada con argón durante 10 min antes de usar) hasta que el pH de la solución resultante alcanzó 6.9. El 2-(2-(piridin-2-il)disulfanil)etil 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)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 revisó por HPLC analítica en 15 min. El pico de producto se volvió 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 centrifugo y filtró. El filtrado amarillo se dividió en dos porciones y purificó por HPLC preparativa. Las fracciones puras (>98% puro) se agruparon y secaron por congelado. Las fracciones de cola (<98% puro) se colectaron y volvieron a purificar por 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 sales de sodio y fosfato de

sodio, como se determina por análisis Karl Fischer y elementales).

Parámetros HPLC Preparativa:

5 Columna: Waters Nova-Pak HR C18 6 μ m 30x300 mm

Fase móvil A: 7.0 mM solución amortiguadora de fosfato de sodio, pH=7.2

Fase móvil B: acetonitrilo

Método: 10%B-50%B en 30 min, relación de flujo: 40 mL/min

10

Parámetros de HPLC Analítica:

Columna: Waters Symmetry C18 3.5 μ m 4.6x75 mm

Fase móvil A: 10 mM Solución amortiguadora de acetato de trietilamonio (TEAOAc), pH = 7.5

15 Fase móvil B: Acetonitrilo

Método: 20%B-40%B en 10 min, relación de flujo: 1.0 mL/min

Masa exacta m/z ($C_{67}H_{92}N_{16}O_{22}S_3$):

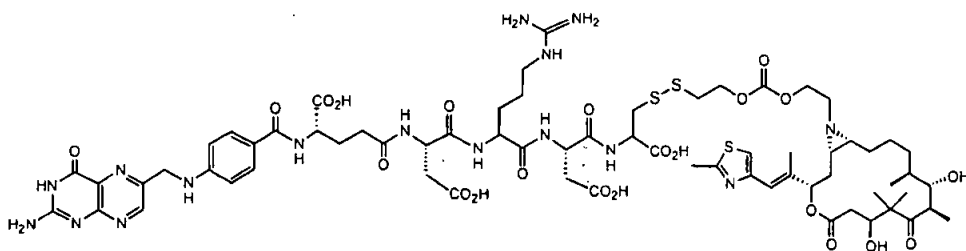
Calculado: 1570.58907 (M+2H), 785.29454 (M+2H)²⁺, 523.86563

20 (M+3H)³⁺, 393.15118 (M+4H)⁴⁺

Encontrado: (M+2H)²⁺ a 785.29100 (4.5 ppm), (M+3H)³⁺ a 523.86431 (2.5 ppm), (M+4H)⁴⁺ a 393.14996 (3.1 ppm)

25

EJEMPLO 3: Preparación alternativa del compuesto J



Ácido (S)-2-(4-(2-amino-4-oxo-3,4-dihydropteridin-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-dihidroxio-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-oxopentanóico

3A. Preparación de [4S,7R,8S,10R,9S,13R,16S]-4,8,13-trihidroxio-14-yodo-5,5,7,9-tetrametil-16-[(E)-1-[2-metiltiazol-4-il]prop-1-en-2-il]oxaciclohexadecano-2,6-diona



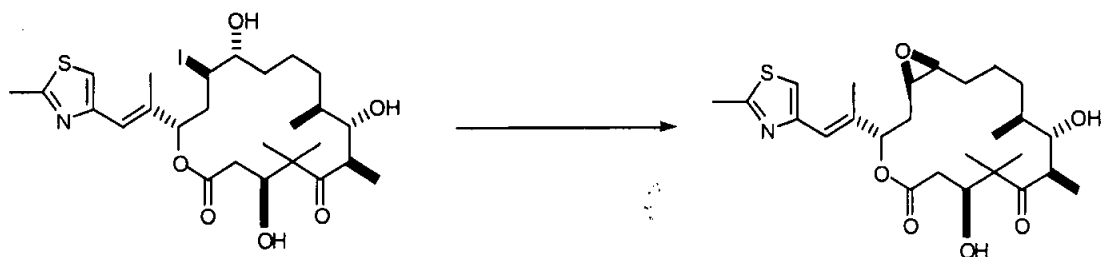
La epotilona C (54.3 g, 113.7 mmol) se disolvió en acetonitrilo (480 mL) y agua (50 mL). La solución se enfrió a -5°C hasta -10°C. El yodo (144.3 g, 568.4 mmol) se agregó a la reacción y la reacción se mantuvo al menos durante 15 hr.

La reacción se apagó 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 colectaron y se lavan sucesivamente con solución de bicarbonato de sodio saturado (675 mL) y solución de cloruro de sodio saturado (675 mL). Los
 5 solventes se evaporaron bajo presión reducida para dar el compuesto A crudo como un aceite amarillo (85.6 g). El compuesto A se usó en la siguiente reacción sin purificación adicional.

HPLC: Phenomex Luna C8 (2) 3um, 4.6 x 150mm, isocrático,
 10 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)), relación de flujo a 1.0ml/min, UV 245, Tr = 22.4 min.

**3B. Preparación de [1R,3S,7S,10R,11S,12S,16S]-7,11-dihidroxi-
 15 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

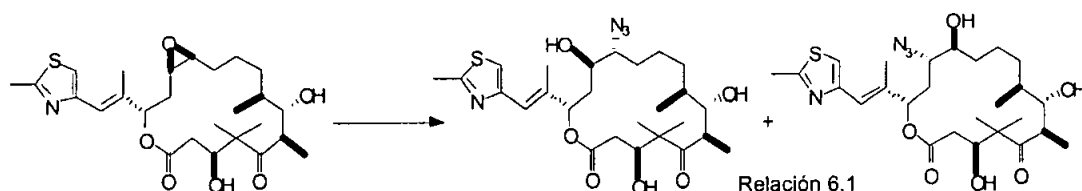
La [4S,7R,8S,10R,9S,13R,16S]-4,8,13-trihidroxi-14-yodo-
 5,5,7,9-tetrametil-16-[(E)-1-[2-metiltiazol-4-il]prop-1-en-2-il]oxaciclohexadecano-2,6-diona (85.6 g) se disolvió en
 acetonitrilo (670 mL) y agua (130 mL). La trietilamina (135
 25 mL, 968.5 mmol) se agregó a la solución. La reacción se

calentó a 50°C hasta 60°C durante al menos 8 hr.

Después de que se enfrió a temperatura ambiente, la solución se concentró bajo presión reducida. El residuo se diluyó con EtOAc (1.2 L) y se lava con solución de cloruro de sodio saturado (3 x 500 mL). Los solventes se evaporaron bajo presión reducida para dar el producto crudo como aceite amarillo. La purificación por filtración de almohadilla de gel de sílice (gel de sílice 700 g, 66% EtOAc en heptano, 2 x 4 L, y 1 x 3 L) proporcionó el Compuesto B como espuma (50.3 g, 90% de rendimiento) con HPLC AP 80.

HPLC: Phenomex Luna C8 (2) 3um, 4.6 x 150mm, 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)), relación de flujo a 1.0ml/min, UV 245, Tr = 15.0 min.

3C/3D. Preparación de (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



A una solución agitada de epi-Epotilona-A (14.35 g, 29.07 mmol) en etanol (240 mL) y agua (48 mL) se le agregó azida de sodio (11.45 g, 174.41 mmol) y cloruro de amonio (3.14g, 58.14 mmol). La mezcla se agitó a 60°C durante 17-20h. Los volátiles se evaporaron en el evaporador rotatorio bajo presión reducida 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 del fondo se extrajo con acetato de etilo (115 mL). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con 25% de solución de cloruro de sodio acuoso (salmuera). El solvente se evaporó bajo presión reducida y el residuo se pasó a través de una almohadilla de gel de sílice eluido con mezcla de acetato de etilo/n-heptano (2:1). La evaporación del solvente bajo presión reducida proporcionó mezcla regio-isomérica 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 relación ~6:1 (12.8 g, 82%) como una espuma blanca.

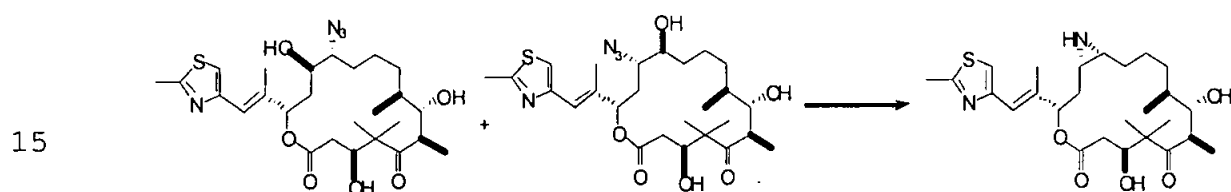
LC-MS: columna Phenomenex Luna C8(2): 3 µm, 4.6 x 50 mm. Gradiente: 15 min, 0%B hasta 100% B en 10 min, luego 100% B durante 5 min. Fases móviles: A = 0.01 M NH₄OAc en CH₃CN/H₂O

5:95; B = 0.01 M NH₄OAc en CH₃CN/H₂O 95:5. Relación 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 trabaja en otros solventes tipo, acetona, acetonitrilo, tetrahidrofurano 2-propanol, dimetilformamida, metilsulfóxido y N-metil-pirrolidinona.

El reactivo de azida de tertrabutilamonio también puede usarse en lugar de azida de sodio/cloruro de amonio.

10 **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**



A una solución agitada de mezcla de (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

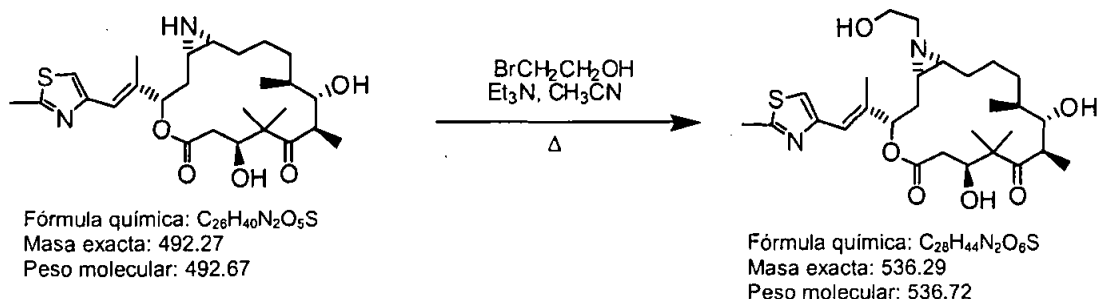
20 (4S,7R,8S,9S,13S,14S,16S)-14-Azido-4,8,13-trihidroxi-5,5,7,9-tetrametil-16-((E)-1-(2-metiltiazol-4-il)prop-1-en-2-il)oxaciclohexadecano-2,6-diona (12.8 g, 23.85 mmol) en acetonitrilo anhidro (90 mL) se le agregó trifenilfosfina (9.48 g, 35.77 mmol) bajo atmósfera de nitrógeno. La solución transparente se agitó a 20-40°C durante 19-40h. La mezcla de

reacción se enfrió hasta 0-5°C durante 3-4h y se filtró el producto. La torta se lavó con heptano (64 mL) y se secó a 40°C bajo presión reducida durante 15-18h para dar (1S,3S,7S,10R,11S,12S,16R)-7,11-dihidroxioctametil-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 blanco (5.41 g, 46%).

LC-MS: columna Phenomenex Luna C8(2): 3 µm, 4.6 x 50 mm. Gradiente: 15 min, 0%B hasta 100% B en 10 min, luego 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. Relación de flujo: 3.0 mL/min. Longitud de onda: UV 250 nm. Tiempo de retención = 4.43 min. EM (ESI) (M+H)⁺ = 493.68

Esta reacción también trabaja con otras fosfinas similares, triciclohexilfosfina, trimetilfosfina, tributilfosfina y tris(4-metoxifenil)-fosfina y otro solvente tetrahidrofurano.

F. Preparación de [1S-[1R*,3R*(E),7R*,10S*,11R*,12R*,16S*]]-7,11-Dihidroxioctametil-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



El Et₃N (4.95 mL, 35.52 mmol) y 2-bromoetanol (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-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 calienta hasta 72.5°C. Después de 20 hr, la mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente, se concentra hasta secarse a través de una destilación al vacío rotatoria. El crudo se disolvió en acetato de etilo (50 mL) y se mezcla con agua desionizada (35 mL). La mezcla se extrae con acetato de etilo (3 x 35 mL), se seca sobre Na₂SO₄, se filtra, se concentra, se cristaliza en acetonitrilo (35 mL), se lava con acetonitrilo (2 x 5 mL), y se seca en un horno al vacío a 45 5°C durante la noche para aislar (1S,3S,7S,10R,11S,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 blanco (2.60g, HPLC AP 97.1, 68.2% de rendimiento).

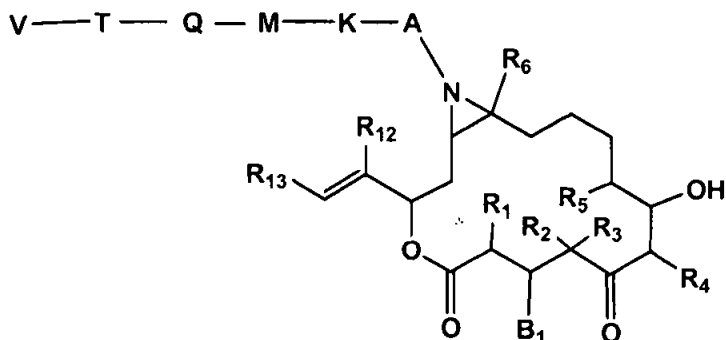
LC-MS: Phenomenex C8, 3 µm, 4.6 x 150mm, gradiente, 10 hasta 50%B durante 10 min, y se detiene a 20 min. (A= 5% MeCN/H₂O + 0.01 M NH₄OAc; B = 95% MeOH/H₂O + 0.01 M NH₄OAc), relación de flujo a 1.0 mL/min, UV 254 nm. Tiempo de retención = 9.43 min. EM (ESI) M+H = 537.21.

Una persona de experiencia ordinaria reconocerá que el Compuesto 3G como se prepara por este Ejemplo 3 es idéntico al

Compuesto G como se prepara por el Ejemplo 2, y de esta manera, el Compuesto 3G puede usarse para preparar los Compuestos H, I, y J, los métodos de preparación y compuestos de los cuales se describen en el Ejemplo 2.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto conjugado, caracterizado porque tiene la fórmula (I),



(I)

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

V es un receptor de folato enlazado a la porción;

15 Q es O, S, o NR_7 ;

M es un enlazador liberable;

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 $-(\text{CHR}_{10})-$, $-\text{C}(=\text{O})-$, $-\text{C}(=\text{O})-\text{C}(=\text{O})-$, $-\text{OC}(=\text{O})-$, $-\text{N}(\text{R}_{11})\text{C}(=\text{O})-$, $-\text{SO}_2-$, ó $-\text{N}(\text{R}_{11})\text{SO}_2-$;

20 B_1 es hidroxilo o ciano y R_1 es hidrógeno o B_1 y R_1 se toman juntos para formar un enlace doble;

R_2 , R_3 , y R_5 son, independientemente, hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, arilo o arilo sustituido; o R_2 y R_3 pueden tomarse junto con el carbono al cual se enlazan para
25 formar un cicloalquilo opcionalmente sustituido;

R_4 es hidrógeno, alquilo, alqueno, alquilo sustituido, alqueno sustituido, arilo, o arilo sustituido;

R_6 es hidrógeno, alquilo o alquilo sustituido;

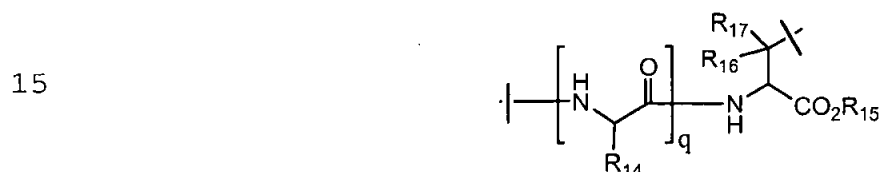
R_{7a} , R_7 , R_8 , R_9 , R_{10} , y R_{11} son independientemente
5 hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heterocicloalquilo, heterocicloalquilo sustituido, heteroarilo, o heteroarilo sustituido;

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

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

m es 0 hasta 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, 20 cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, cicloalquilalquilo, cicloalquilalquilo sustituido, heteroarilo, heteroarilalquilo, heteroarilalquilo sustituido, heteroarilo sustituido, heterocicloalquilo, o heterocicloalquilo sustituido;

25 q es 1 hasta 10; y

R_{15} , R_{16} y R_{17} son independientemente hidrógeno, alquilo inferior o alquilo inferior sustituido o R_{16} y R_{17} se toman juntos para formar un cicloalquilo.

5 2. El compuesto conjugado de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque:

K es O;

A es alquilenos C_{2-4} ;

B_1 es -OH;

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

R_6 es hidrógeno o metilo;

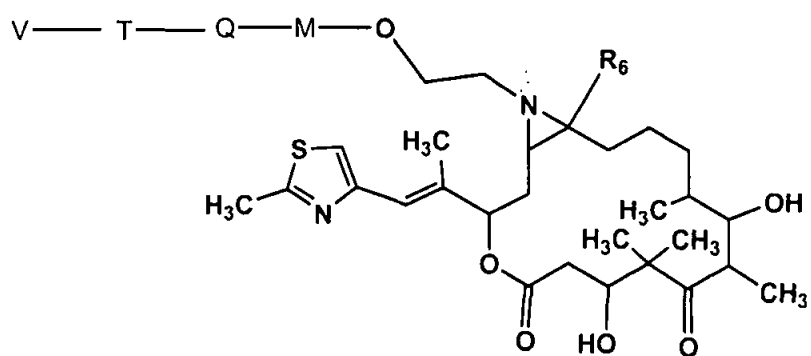
R_{13} es un heteroarilo de 5 ó 6 miembros opcionalmente sustituido, y

15 M es $-S-R_{30}-O-C(=O)-$, $-S-R_{30}-C(=O)-$, o $-S-R_{34}R_{30}-O-C(=O)-$ en donde

R_{30} es alquilenos inferior o alquilenos inferior sustituido; y R_{34} es arileno o arileno sustituido.

20 3. El compuesto conjugado de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado porque R_{13} es un tiazolilo, piridilo u oxazolilo opcionalmente sustituido.

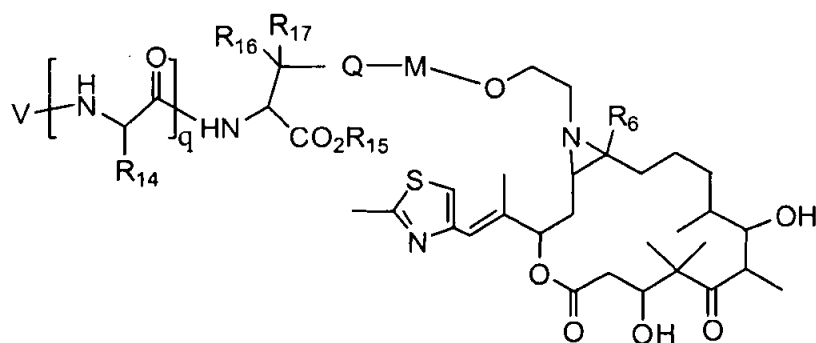
4. El compuesto conjugado de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado porque tiene la fórmula Ia



Ia

5. El compuesto conjugado que tiene la siguiente fórmula

Ib:



Ib

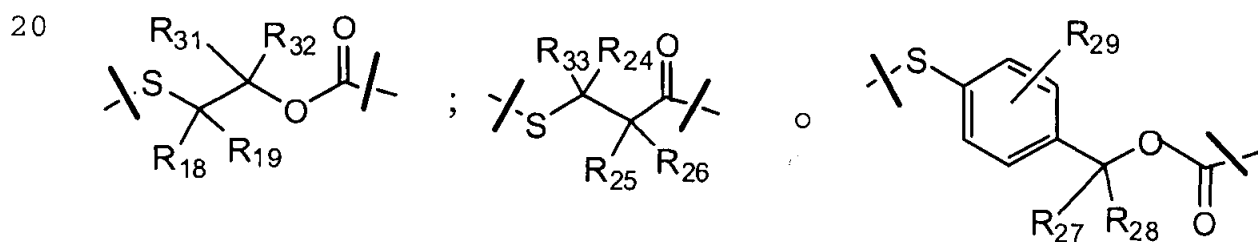
15 caracterizado porque

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

R₆ es H o alquilo inferior;

Q es O, S, o NR₇;

M es



25 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
 5 sustituido, heterocicloalquilo, o heterocicloalquilo
 sustituido;

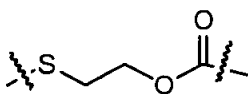
q es 1 hasta 10;

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

10 R₁₈, R₁₉, R₃₁, R₃₂, R₃₃, R₂₄, R₂₅, R₂₆, R₂₇, R₂₈ y R₂₉ son
 cada uno, independientemente, alquilo, alquilo sustituido,
 cicloalquilo, o cicloalquilo sustituido, o cualquiera de R₁₈
 y R₁₉; R₃₁ y R₃₂; R₁₉ y R₃₁; R₃₃ y R₂₄; R₂₅ y R₂₆; R₂₄ y R₂₅; o R₂₇
 y R₂₈ pueden ser tomados juntos para formar un cicloalquilo.

15 6. El compuesto conjugado de conformidad con cualesquiera
 de las reivindicaciones 1, 2, 3, 4 ó 5, caracterizado porque q
 es 1 hasta 5, cada R₁₄ es independientemente H, metilo,
 guanidinilopropilo, $-(CH_2)_{1-2}-CO_2H$, $-CH_2-SH$, $-CH_2-OH$,
 imidazolil(metilo), aminobutilo, o $-CH(OH)-CH_3$.

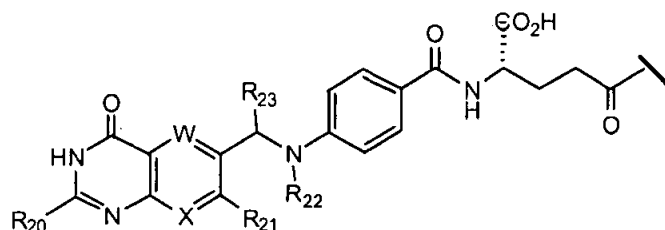
20 7. El compuesto conjugado de conformidad con cualesquiera
 de las reivindicaciones 1, 2, 3, 4, 5 ó 6, caracterizado
 porque M es:



25 8. El compuesto conjugado de conformidad con cualesquiera

de las reivindicaciones 1, 2, 3, 4, 5, 6 ó 7, caracterizado porque V es

5



Y

W y X son independientemente CH' o nitrógeno;

R₂₀ es hidrógeno, amino o alquilo inferior;

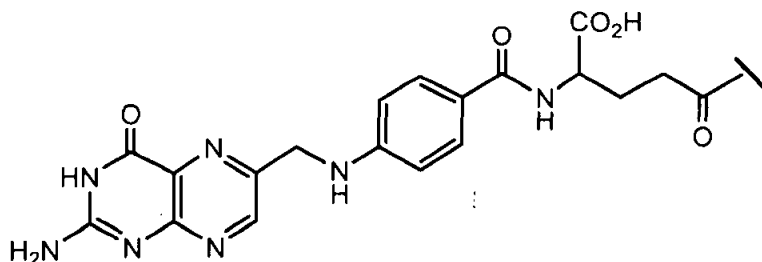
10 R₂₁ es hidrógeno, alquilo inferior, o forma un grupo cicloalquilo con R₂₃;

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

R₂₃ es hidrógeno o forma un cicloalquilo con R₂₁.

15 9. El compuesto conjugado de conformidad con cualesquiera de las reivindicaciones 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ó 8, caracterizado porque V es

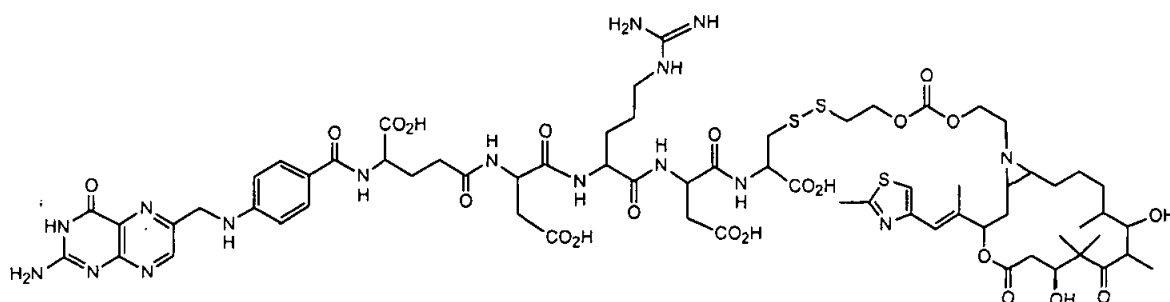
20



10. El compuesto conjugado de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque tiene la fórmula

25

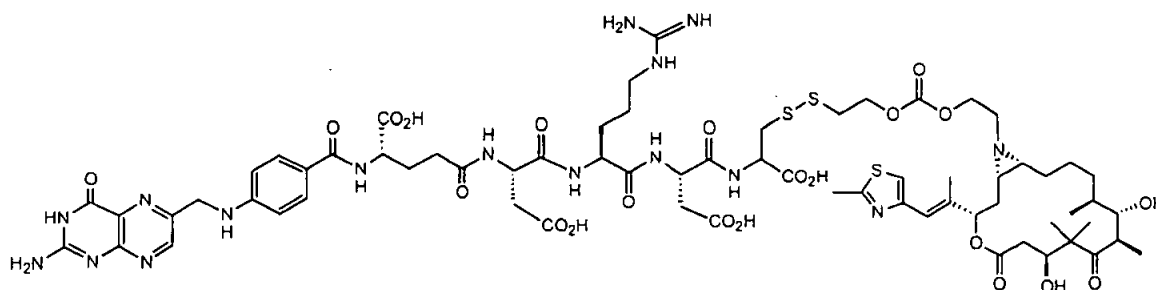
5



o una sal y/o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

11. El compuesto conjugado de conformidad con la reivindicación 10, caracterizado porque tiene la fórmula

10



15

o una sal y/o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

12. Una composición farmacéutica, caracterizada porque comprende un compuesto conjugado de conformidad con cualesquiera de las reivindicaciones 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ó 11, o una sal y/o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, en un portador farmacéuticamente aceptable.

13. El uso de un compuesto de conformidad con cualesquiera de las reivindicaciones 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10 ó 11, para preparar un medicamento para el tratamiento de una condición asociada con el receptor de folato en un

25

paciente.

14. El uso de conformidad con la reivindicación 13, en donde la condición es cáncer seleccionado del grupo que consiste de cáncer de ovario, cáncer de piel, cáncer de mama, 5 cáncer de pulmón, cáncer de colón, cáncer de nariz, cáncer de garganta, cáncer de la glándula mamaria, cáncer de hígado, cáncer de riñón, cáncer de bazo, cáncer de cerebro, mesotelioma, adenoma en la pituitaria, cáncer cervical, carcinoma de célula renal u otro cáncer renal, carcinoma de 10 plexo coroide o un tumor epitelial.

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención se dirige a compuestos conjugados que comprenden un folato, o un análogo o derivado de los mismos, y un análogo de aziridinil epotilona, como se describe
5 además en la presente, y/o sales farmacéuticamente aceptables y/o solvatos de lo mismos, útiles en el tratamiento de cáncer u otras condiciones asociadas con el receptor de folato.

AA.IV	n.t.	50	
AA.V	n.t.	>100	
AA.VI	n.t.	>100	

FIG. 1 (continuación)

Número de Conjugado	Afinidad Relativa	EC50(nM) Células KB	Estructura
BB.I	n.l.	68	
BB.II	0.13	10-100 (descomposición a epiteloma fibro)	
BB.III	n.l.	-75	

FIG. 2

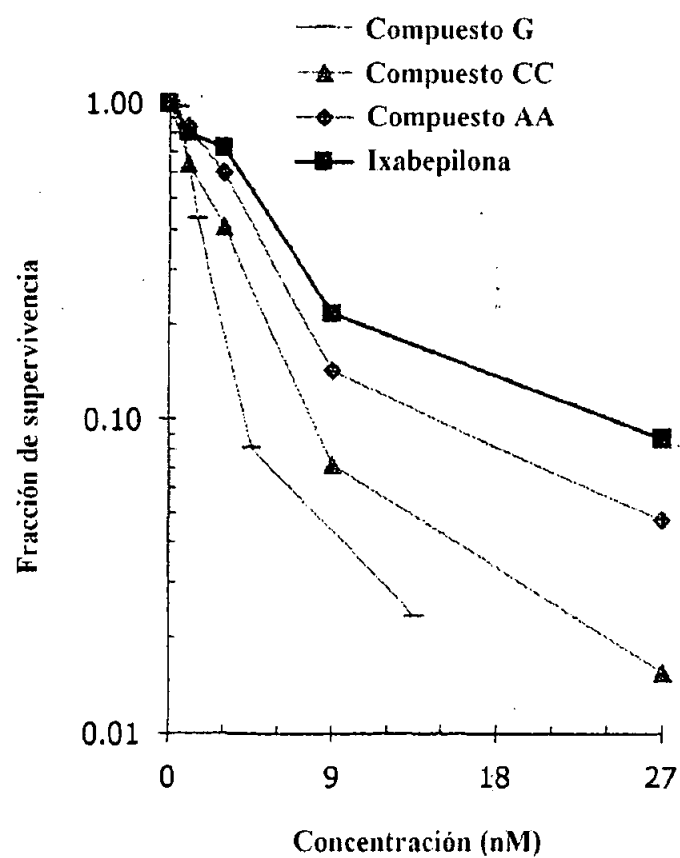
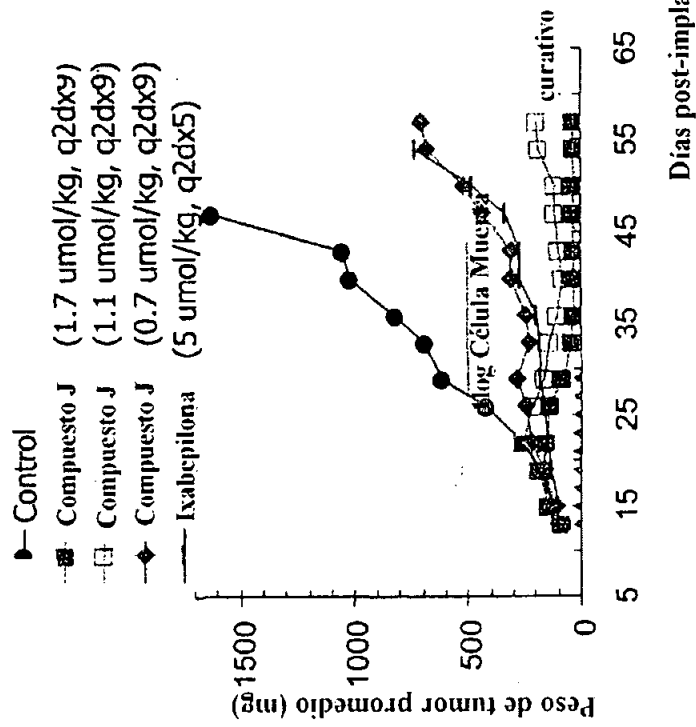


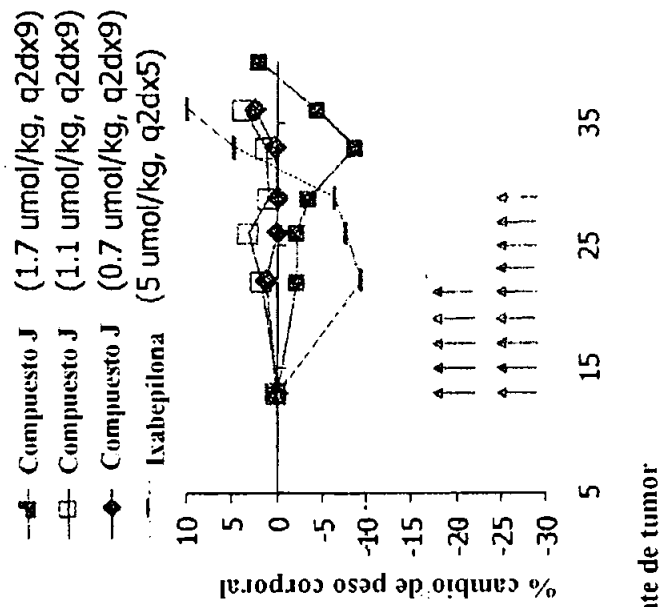
FIG. 3

FIG. 4A Eficacia*



*dieta deficiente de folato

FIG. 4B Pérdida de peso*



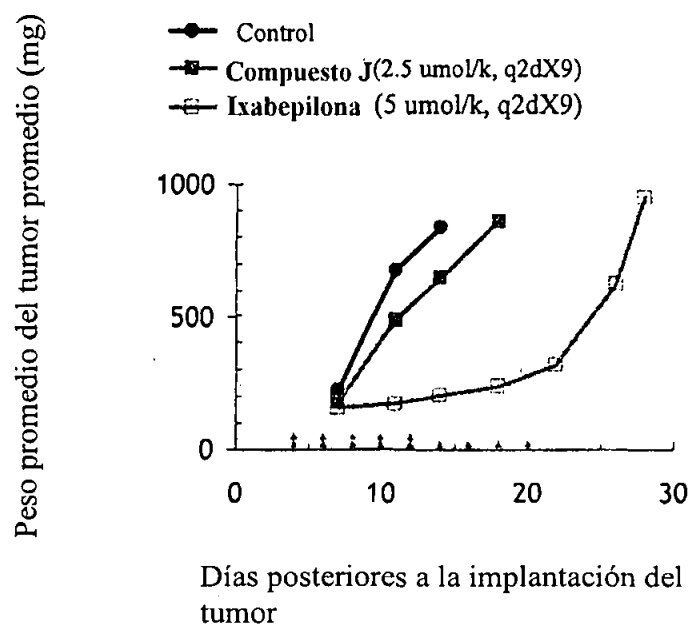


FIG. 5

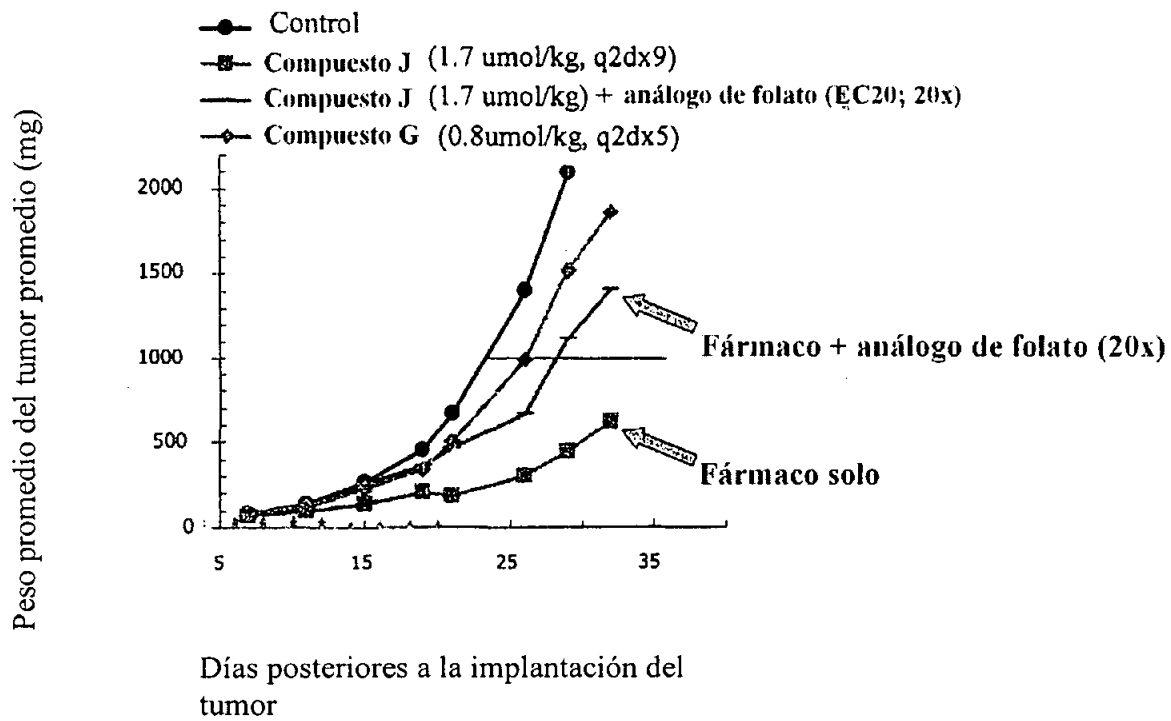


FIG. 6


Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
TARJETA ARCHIVO PROPIETARIOS
SUPERINTENDENCIA PATENTE DE INVENCION **PCT** X **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.


Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
TARJETA ARCHIVO TEMATICO
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

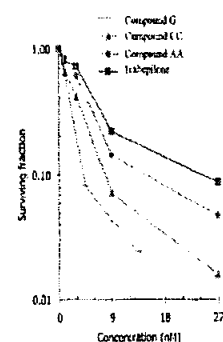
(74) Apoderado: ALVARO CORREA ORDOÑEZ

(30) Prioridad (31) No. Prioridad 32) Fecha (33) País
60/808,367 25.05.2006 US

(85) Fecha limite inicio fase nacional: 25/11/2008

(86) Datos relativos a la presentación de la solíc. PCT
Fecha de presentación de la solicitud: 25.05.2007
No. de solicitud : PCT/US2007/069740

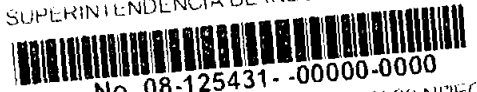
(87) Publicación internacional:

Fecha: 06.12.2007
No. Publicación : WO/2007/140298


() Título: CONJUGADOS DE ANALOGOS DE AZIRIDINIL-EPOTILONA Y COMPOSICIONES FARMACEUTICAS QUE COMPRENDEN LOS MISMOS.

(57) Resumen: La presente invención se dirige a compuestos conjugados que comprenden un folato, o un análogo o derivado de los mismos, y un análogo de aziridinil epotilona, como se describe además en la presente, y/o sales farmacéuticamente aceptables y/o solvatos de lo mismos, útiles en el tratamiento de cáncer u otras condiciones asociadas con el receptor de folato.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-125431 - 00000-0000

Fecha: 2008-11-25 16:25:17
 Tra: 11 PATENTE IYI
 Act: 411 PRESENTACION

Dep: 2020 NUECREACION
 Eva: 378 FASE NACIONAL I
 Folios: 225

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. Novo Cortes

Fecha:

25 NOV - 2008

277

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
CORREA ORDOÑEZ ALVARO
Apoderado(a) y/o Representante de
BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY

REFERENCIA	Radicación No.	8 125431
	Solicitud internacional	PCT/US2007/069740
	Fecha inicio fase nacional	25/12/2008
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	0586

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. Debe aclarar el nombre del solicitante ENDOCYTE INC, por cuanto la publicación internacional difiere del petitorio presentado en fase nacional.

2. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal k) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT., el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título X de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

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.

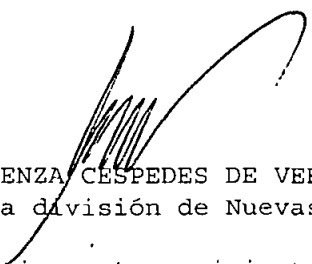
Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Unica No.10 de 2001.

Continúa en la página siguiente...

228

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Radicación No.: 8 125431



ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de
fecha 23 ENE. 2009
adpall