

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 371 111**

51 Int. Cl.:
C07D 491/04 (2006.01)
A61K 31/427 (2006.01)
A61K 31/396 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07762325 .4**
96 Fecha de presentación: **25.05.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **2041140**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **01.04.2009**

54 Título: **COMPUESTOS DE AZIRIDINIL-EPOTILONA.**

30 Prioridad:
25.05.2006 US 808366 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
27.12.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
27.12.2011

73 Titular/es:
Bristol-Myers Squibb Company
P.O. Box 4000
Princeton NJ 08543-4000, US

72 Inventor/es:
VITE, Gregory D.;
LEAMON, Christopher P.;
VLAHOV, Iontcho R. y
SOONG-HOON, Kim

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 371 111 T3

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

DESCRIPCIÓN

Compuestos de aziridinil-epotilona

Esta solicitud reivindica prioridad para la solicitud de patente provisional estadounidense número 60/808.366, presentada el 25 de mayo de 2006, que se incorpora por el presente documento como referencia en el presente documento en su totalidad.

Antecedentes de la invención**Campo de la invención**

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

Técnica anterior relacionada

Las epotilonas A y B son compuestos que se producen de manera natural y que descubrieron Höfle *et al.* como aislados a partir de productos de fermentación del microorganismo *Sorangium cellulosum* (véase, por ejemplo, el documento WO93/10121). Höfle *et al.* también descubrieron 37 variantes naturales de epotilona y compuestos relacionados producidos por *Sorangium cellulosum*, incluyendo las epotilonas C, D, E, F y otros isómeros y variantes. Véase, por ejemplo, la patente estadounidense número 6.624.310. Aunque en 1993 Höfle *et al.* informaron sobre efectos citotóxicos de las epotilonas A y B, en 1995 investigadores de Merck informaron de que la epotilona B ejerce efectos estabilizadores de los microtúbulos similares al paclitaxel (TAXOL®) (véase D.M. Bollag, "Epothilones, a New Class of Microtubule-Stabilizing Agents with a Taxol-like Mechanism of Action", Cancer Research, Vol. 55 (junio de 1995), en las páginas 2325-2333).

En Bristol-Myers Squibb Co. se han descubierto diversos derivados y análogos de las epotilonas que se producen de manera natural. Los ejemplos de análogos de epotilona incluyen el análogo de aza-epotilona B conocido como ixabepilona, análogos 21-sustituídos de epotilona B incluyendo un análogo 21-amino, análogos 2,3-olefínicos, análogos de ciano C-3, análogos de ciclopropilo, y análogos heterocíclicos incluyendo análogos de aziridinil-epotilona. Véanse, por ejemplo las patentes estadounidenses números 6.605.599; 6.262.094; 6.399.638; 6.498.257; 6.380.395; y 6.800.653, cada uno de los cuales se incorpora al presente documento como referencia. Otros han informado también sobre el descubrimiento de otros derivados y análogos de epotilona. Véanse, por ejemplo, las publicaciones PCT números WO 99/65913, WO 98/25929; WO 00/99/07693; WO99/67252; WO00/00485; WO00/37473; WO01/83800; WO99/67253, WO99/07692, WO00/00485, WO00/49021, WO00/66589, WO03/045324, WO04/014919, WO04/056832, WO03/022844; patentes estadounidenses números 6.441.186; 6.284.781; 6.660.758; 6.380.394; 6.242.469; 6.531.497; 6.441.186; 6.489.314; 6.589.968; 6.930.103; publicaciones de solicitud de patente estadounidense número US 2004/0072870 A1; US 2003/0023082 A1; US 2004/0053910 A1; US 2004/0152708 A1, de la cuales todas se incorporan como referencia en su totalidad.

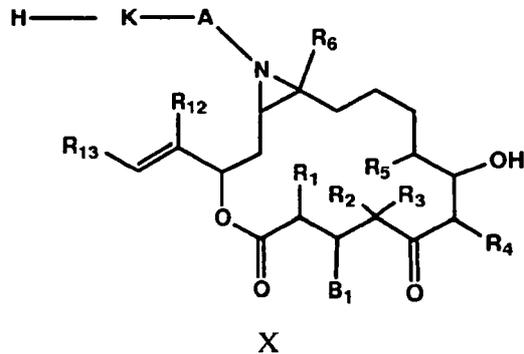
Las epotilonas que se producen de manera natural y sus análogos, al igual que otros agentes de estabilización de microtúbulos, pueden ser útiles para tratar enfermedades proliferativas tales como el cáncer, que habitualmente funcionan destruyendo (o deteniendo el crecimiento de) células tumorales, otras células patogénicas, y patógenos extraños. Con frecuencia, sin embargo, los fármacos contra el cáncer no sólo atacan las células tumorales sino también al tejido normal, llevando a efecto secundarios indeseados. Adicionalmente, los fármacos contra el cáncer presentan normalmente problemas de solubilidad, de manera que la formulación y la administración de los agentes puede representar desafíos, llevando al uso de agentes de solubilización tales como CREMOPHOR®. Se sabe que la citotoxicidad de algunos fármacos contra el cáncer y/o componentes de formulación provoca neuropatía u otros efectos secundarios tales como reacciones de hipersensibilidad. Estos efectos secundarios adversos destacan la necesidad de terapias contra el cáncer que son selectivas para poblaciones de células patogénicas y por tanto dan como resultado una toxicidad al huésped reducida.

Sin embargo, tal como se comenta en el documento WO 2004/054622 A1 los científicos han intentado durante muchos años usar anticuerpos monoclonales (AcM) en terapias farmacológicas dirigidas para administrar agentes quimioterápicos a los pacientes, pero se han encontrado inconvenientes en cuanto a, entre otras cosas, el resto que puede escindirse, los adaptadores, y la forma del fármaco liberado en la célula. Se ha informado de la terapia satisfactoria de tumores con AcM está limitada por la penetración inadecuada del anticuerpo en el tumor y por la distribución heterogénea del antígeno asociado al tumor correspondiente en el tejido tumoral. Véase, Klar *et al.*, documento WO 05/074901 (concedida a Schering AG).

La publicación de solicitud de patente estadounidense número 2005/0002942 da a conocer conjugados para la administración de fármacos de unión a receptores de vitaminas que son útiles para la administración de fármacos dirigida. En la técnica existe la necesidad de identificar agentes contra el cáncer que pudieran usarse para producir conjugados tales como los descritos en el documento US 2005/0002942, con el fin de proporcionar una administración de fármacos dirigida para el tratamiento del cáncer.

Sumario de la invención

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



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

- 5 K es -O-, -S-, o -NR₇-;
- A es -(CR₈R₉)-(CH₂)_m-Z- en el que Z es -(CHR₁₀)-, -C(=O)-, -C(=O)-C(=O)-, -OC(=O)-, -N(R₁₁)C(=O)-, -SO₂-, o -N(R₁₁)SO₂-;
- B₁ es hidroxilo o ciano y R₁ es hidrógeno o B₁ y R₁ se toman juntos para formar un doble enlace;
- 10 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 que están unidos para formar un cicloalquilo opcionalmente sustituido;
- R₄ es hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquilo sustituido, alquenilo sustituido, arilo o arilo sustituido;
- R₆ es hidrógeno, alquilo o alquilo sustituido;
- 15 R₇, R₈, R₉, R₁₀ y R₁₁ son independientemente hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heterocicloalquilo, heterocicloalquilo sustituido, heteroarilo o heteroarilo sustituido;
- R₁₂ es H, alquilo, alquilo sustituido o halógeno;
- R₁₃ es arilo, arilo sustituido, heteroarilo o heteroarilo sustituido; y
- m es de 0 a 6.

20 La presente invención se refiere además a compuestos x para su uso en un procedimiento para tratar el cáncer así como al uso de los compuestos de fórmula X en la preparación de composiciones farmacéuticas con vehículos farmacéuticamente aceptables para tratar el cáncer. Los compuestos de fórmula X son especialmente útiles en la preparación de composiciones para terapias de fármacos dirigidos.

Breve descripción de los dibujos

- 25 **La figura 1** es las estructuras químicas, afinidades relativas, y valores de CE50 (nM) frente a células tumorales KB de seis conjugados de folato del análogo de epotilona compuesto AA (conjugado número AA.I a AA.VI).
- la figura 2** es las estructuras químicas, afinidades relativas, y valores de CE50 (nM) frente a células tumorales KB de tres conjugados de folato del análogo de epotilona compuesto BB (conjugado número BB.I a BB.III).
- 30 **la figura 3** muestra la fracción de clones de KB que sobreviven (Fracción que sobrevive; eje y) tras el tratamiento con concentraciones crecientes (Concentración (nM); eje x) de Compuesto G (barras), Compuesto CC (triángulos), Compuesto AA (diamantes), o ixabepilona (cuadrados).
- la figura 4** muestra la eficacia antitumoral in vivo del tratamiento de xenoinjertos de carcinoma epidermoide nasofaríngeo KB en ratones atímicos con Compuesto J (cuadrados grises, cuadrados blancos, diamantes grises) a diversas dosis o ixabepilona (barras negras), en comparación con ausencia de tratamiento (control; círculos negros), como medida de (A) peso tumoral medio (mg; eje y) varios días tras el implante del tumor (eje x) o (B) pérdida de peso (% de cambio de peso corporal; eje y) varios días tras el implante del tumor (eje x).
- 35 **la figura 5** muestra los efectos antitumorales in vivo del Compuesto J (cuadrados grises) o ixabepilona (cuadrados blancos), en comparación con ausencia de tratamiento (control; círculos negros), frente a carcinoma de pulmón murino FR (-) M109 como medida del peso tumoral medio (mg; eje y) varios días tras el implante del tumor (eje x).
- 40 **la figura 6** muestra los efectos antitumorales in vivo, como medida del peso tumoral medio (mg; eje y) varios días tras el implante del tumor (eje x), de ausencia de tratamiento (control, círculos negros), tratamiento con Compuesto J solo (cuadrados grises), Compuesto J en presencia de un análogo de folato, barras negras), o tratamiento con Compuesto G (diamantes grises).

Descripción detallada de la invención

DEFINICIONES DE LOS TÉRMINOS

Lo siguiente son definiciones de términos usados en la presente memoria descriptiva. La definición inicial proporcionada para un grupo o término en el presente documento se aplica a ese grupo o término a lo largo de toda la presente memoria descriptiva individualmente o como parte de otro grupo, a menos que se indique lo contrario.

La expresión “resto de unión a folato o análogo o derivado del mismo” tal como se usa en el presente documento significa un resto que se unirá a una proteína a una proteína de receptor de folato (no un anticuerpo monoclonal) que se sobreexpresa o se expresa preferentemente en células cancerosas. Por ejemplo, se sabe que el receptor de folato (FR) se sobreexpresa en células de cáncer de ovario y otras células cancerosas. Análogos y derivados de folato ilustrativos se dan a conocer en la publicación de solicitud de patente estadounidense número 2005/0002942 concedida a Vlahov *et al.*, (a continuación en el presente documento “Vlahov”), que se incorpora al presente documento como referencia.

La expresión “adaptador liberable” tal como se usa en el presente documento significa un adaptador bivalente que incluye al menos un enlace que puede escindirse que puede romperse en condiciones fisiológicas (por ejemplo un enlace lábil frente al pH, lábil de manera reductora, lábil frente a ácido, lábil de manera oxidativa, o lábil frente a enzimas). Debe apreciarse que tales condiciones fisiológicas que resultan en la ruptura de enlaces incluyen reacciones de hidrólisis química convencionales que se producen, por ejemplo, a pH fisiológico, o como resultado de la compartimentación en orgánulos celulares, tal como un endosoma que tiene un pH inferior que el pH citosólico, o como resultado de la reacción con un agente reductor celular tal como glutatión.

Se entiende que un enlace que puede escindirse puede conectar dos átomos adyacentes dentro del adaptador liberable y/o conectar otros grupos al adaptador liberable de manera que Q y K, tal como se describe en el presente documento, en cualquiera de los extremos o ambos extremos del adaptador.

Los términos “alquilo” y “alc” ya sea solo o en combinación con algún otro grupo, se refieren a un radical alcano (hidrocarburo) de cadena lineal o ramificada unido en cualquier átomo de carbono disponible, que contienen desde 1 hasta 10 átomos de carbono, preferentemente de 1 a 6 átomos de carbono, más preferentemente desde 1 hasta 4 átomos de carbono. A modo de ejemplo tales grupos incluyen, pero no se limitan a metilo, etilo, propilo, isopropilo, n-butilo, t-butilo, isobutilo, pentilo, hexilo, heptilo, 4,4-dimetilpentilo, octilo, 2,2,4-trimetilpentilo, y similares. “alquilo inferior” o “alquileo inferior” significa un Alquilo de cadena lineal o ramificada que tiene de uno a cuatro átomos de carbono. Cuando se usa un subíndice 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, la expresión “alquilo C₀₋₄” incluye un enlace y grupos Alquilo de 1 a 4 átomos de carbono, y la expresión “alquilo C₁₋₄” significa grupos Alquilo de 1 a 4 átomos de carbono.

El término “alquileo” se refiere a un radical hidrocarburo bivalente, tal como se describió anteriormente para “alquilo” pero son dos puntos de unión. Por ejemplo, un grupo metileno es un grupo -CH₂- y un grupo etileno es un grupo -CH₂-CH₂-.

Cuando el término Alquilo se usa junto con otro grupo, tal como en heterocicloalquilo o cicloalquilalquilo, esto significa que el otro grupo identificado (nombrado en primer lugar) está unido directamente a través de un grupo Alquilo tal como se definió anteriormente (por ejemplo, que puede ser de cadena ramificada o lineal). Por tanto, el término “alquilo” se usa en este caso para referirse a un Alquileo, por ejemplo, un grupo Alquilo divalente, que tiene dos puntos de unión disponibles. Por ejemplo, ciclopropil-Alquilo C₁₋₄ significa un grupo ciclopropilo unido a través de un Alquileo de cadena lineal o ramificada que tiene de uno a cuatro átomos de carbono, e hidroxialquilo significa el grupo OH unido a través de un Alquileo de cadena lineal o ramificada que tiene de uno a diez átomos de carbono, preferentemente de 1 a 6 átomos de carbono, más preferentemente de 1 a 4 átomos de carbono. En el caso de los sustituyentes, tal como en “cicloalquilalquilo sustituido”, la parte de Alquileo del grupo, aparte de ser de cadena ramificada o lineal, puede estar sustituida tal como se menciona a continuación para grupos Alquilo sustituidos y/o el primer grupo nombrado (*por ejemplo*, cicloalquilo) puede estar sustituido tal como se menciona en el presente documento para ese grupo (*por ejemplo*, cicloalquilo).

“Alquilo sustituido” se refiere a un grupo Alquilo sustituido con uno o más sustituyentes, preferentemente de 1 a 4 sustituyentes, en cualquier punto de unión disponible. Sin embargo, cuando un grupo Alquilo está sustituido con múltiples sustituyentes halógeno, el Alquilo puede contener tal como permite la valencia hasta 10 sustituyentes, más preferentemente hasta siete sustituyentes. Los sustituyentes Alquilo pueden incluir uno o más de los siguientes grupos: halógeno (*por ejemplo*, un único sustituyente halógeno o múltiples sustituyentes halógenos formando, en el último caso, grupos tales como un grupo perfluoroalquilo o un grupo Alquilo que porta Cl₃ o CF₃), ciano, -OR_a, -SR_a, -C(=O)R_a, -C(=O)OR_a, -OC(=O)R_a, -OC(=O)OR_a, -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, arilo, heterociclo, cicloalquilo, y/o heteroarilo, en los que los grupos R_a y R_b se seleccionan independientemente de hidrógeno, Alquilo, alqueno, cicloalquilo, heterociclo, arilo y heteroarilo, y en los que cada R_a y/o R_b a su vez está opcionalmente sustituido con uno a cuatro grupos seleccionados de Alquilo, alqueno, halógeno, haloalquilo, haloalcoxilo, ciano, nitro, amino, alquilamino, aminoalquilo, hidroxilo, hidroxialquilo, alcoxilo, tiol, alquiltio, fenilo, bencilo, feniloxilo, benciloxilo,

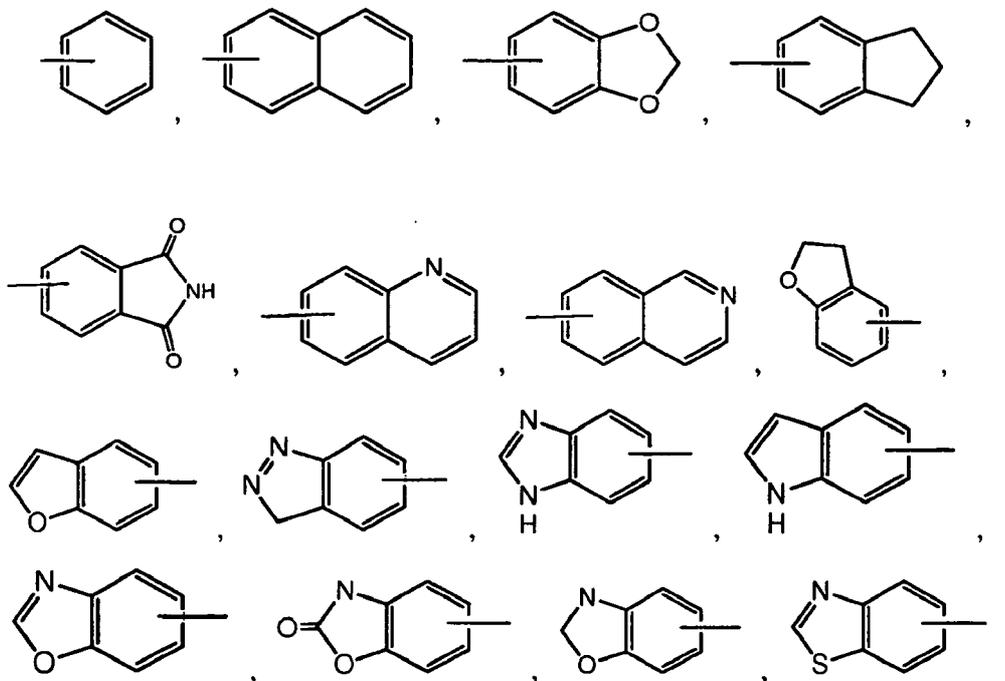
5 cicloalquilo C₃₋₇, heteroarilo o heterociclo de cinco o seis miembros, y/o un alquilo inferior o alqueno inferior sustituido con uno a cuatro grupos seleccionados de hidroxilo, ciano, halógeno, haloalquilo C₁₋₄, haloalcoxilo C₁₋₄, ciano, nitro, amino, alquilamino C₁₋₄, aminoalquilo C₁₋₄, hidroxialquilo C₁₋₄, alcoxilo C₁₋₄, tiol, y/o alquiltio C₁₋₄. Para evitar la duda, un "alquilo inferior sustituido" significa un grupo alquilo que tiene de uno a cuatro átomos de carbono y de uno a cuatro sustituyentes seleccionados de los enumerados anteriormente para grupos alquilo sustituidos. En el caso de un alquilo inferior sustituido, preferentemente los grupos R_a y R_b se seleccionan de hidrógeno, alquilo inferior, alqueno inferior, cicloalquilo C₃₋₇, fenilo, y heteroarilo y/o heterociclo de cinco a seis miembros, a su vez opcionalmente sustituido tal como anteriormente.

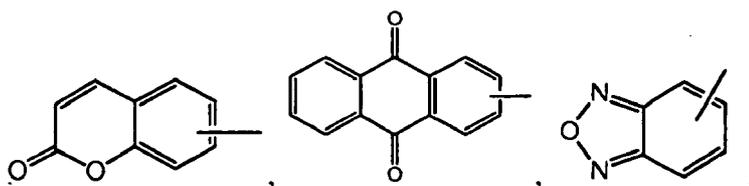
10 El término "alqueno" se refiere a un radical de hidrocarburo de cadena lineal o ramificada que contiene desde 2 hasta 12 átomos de carbono y al menos un doble enlace carbono-carbono. A modo de ejemplo tales grupos incluyen etenilo o alilo. "Alqueno sustituido" se refiere a un grupo alqueno sustituido con uno o más sustituyentes, preferentemente de 1 a 4 sustituyentes, en cualquier punto de unión disponible. A modo de ejemplo los sustituyentes incluyen alquilo, alquilo sustituido, y aquéllos grupos enumerados anteriormente como sustituyentes alquilo.

15 Los términos "alcoxilo" y "alquiltio" se refieren a un grupo alquilo tal como se describió anteriormente unido a través de un enlace oxígeno (-O-) o un enlace azufre (-S-), respectivamente. Las expresiones "alcoxilo sustituido" y "alquiltio sustituido" se refieren a un grupo alquilo sustituido tal como se describió anteriormente unido a través de un enlace oxígeno o azufre, respectivamente. Un "alcoxilo inferior" o un alcoxilo C₁₋₄ es un grupo OR, en el que R es alquilo inferior (alquilo de 1 a 4 átomos de carbono).

20 "Amino" es NH₂. Un alquilamino es -NR_cR_d en el que al menos uno de R_c y R_d es un alquilo o alquilo sustituido, y el otro de R_e y R_d se selecciona de hidrógeno, alquilo y alquilo sustituido. Un "aminoalquilo" significa un grupo amino unido a través de un grupo alqueno (-alqueno-NH₂), y un alquilaminoalquilo significa un alquilamino tal como se definió anteriormente unido a través de un grupo alqueno (-alqueno-NR_cR_d).

25 El término "arilo" se refiere a grupos de hidrocarburo cíclicos, aromáticos que tienen de 1 a 3 anillos aromáticos, especialmente grupos monocíclicos o bicíclicos tales como fenilo o naftilo. Los grupos arilo que son bicíclicos o tricíclicos deben incluir al menos un anillo carbocíclico totalmente aromático pero el otro anillo o los otros anillos condensados pueden ser aromáticos o no aromáticos y pueden contener opcionalmente heteroátomos, siempre que en tales casos el punto de unión sea al anillo carbocíclico aromático. Adicionalmente, cuando se ha condensado un grupo arilo a un anillo heterocíclico o de cicloalquilo, el anillo heterocíclico y/o de cicloalquilo puede tener uno o más átomos de carbono de carbonilo, es decir, unidos a través de un doble enlace a un átomo de oxígeno para definir un grupo carbonilo. Por tanto, los ejemplos de "arilo" pueden incluir sin limitación:





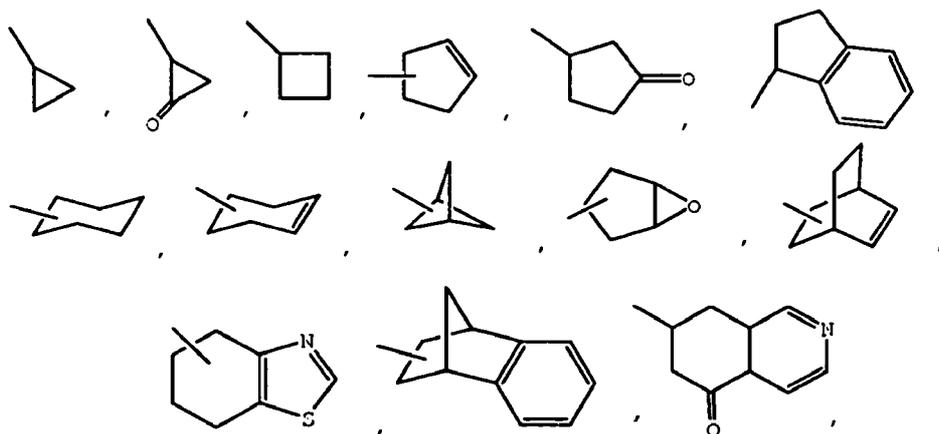
y similares.

5 El término "arileno" se refiere a un radical arilo bivalente, es decir, un grupo arilo tal como se definió anteriormente que tiene dos puntos de unión a dos grupos distintos, en cualquier punto de unión disponible del anillo de arilo. Los anillos arileno pueden estar sustituidos también con cualquiera de los grupos adecuados para la sustitución en los grupos arilo definidos en el presente documento.

10 "Ariilo sustituido" se refiere a un grupo arilo o arileno tal como se definió anteriormente sustituido con uno o más sustituyentes, preferentemente de 1 a 4 sustituyentes, en cualquier punto de unión. Los sustituyentes incluyen alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, así como aquellos grupos enumerados anteriormente como sustituyentes alquilo.

El término "carbocíclico" significa un anillo monocíclico, bicíclico o tricíclico saturado o insaturado (preferentemente mono o bicíclico) en el que todos los átomos de todos los anillos son carbono. Por tanto, el término incluye cicloalquilo y anillos arilo. El anillo carbocíclico puede estar sustituido en cuyo caso los sustituyentes se seleccionan de los enumerados anteriormente para cicloalquilo y grupos arilo.

15 El término "cicloalquilo" se refiere a un grupo hidrocarburo cíclico totalmente saturado o parcialmente saturado que contiene desde 1 hasta 3 anillos y de 3 a 7 átomos de carbono por anillo. Los grupos cicloalquilo totalmente saturados a modo de ejemplo incluyen ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo y ciclohexilo. Los grupos cicloalquilo parcialmente saturados a modo de ejemplo incluyen ciclobutenilo, ciclopentenilo y ciclohexenilo. El término "cicloalquilo" incluye tales grupos que tiene un puente de tres a cuatro átomos de carbono. Adicionalmente, los grupos cicloalquilo que son bicíclicos o tricíclicos deben incluir al menos un anillo de hidrocarburo totalmente saturado o parcialmente saturado pero el otro anillo o los otros anillos condensados deben ser aromáticos o no aromáticos y pueden contener heteroátomos, siempre que en tales casos el punto de unión sea al grupo de hidrocarburo cíclico, no aromático. Adicionalmente, uno o más átomos de carbono del grupo cicloalquilo pueden formar un doble enlace carbono-oxígeno para definir un grupo carbonilo. Por tanto, los ejemplos de grupos "cicloalquilo" pueden incluir, sin limitación:

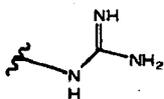


y similares.

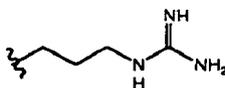
30 El término "cicloalquileno" se refiere a un radical cicloalquilo bivalente, es decir, un grupo cicloalquilo tal como se definió anteriormente que tiene dos puntos de unión a dos grupos distintos, en dos puntos de unión cualesquiera disponibles del anillo de cicloalquilo.

35 "Cicloalquilo sustituido" se refiere a un grupo cicloalquilo tal como se definió anteriormente sustituido en cualquier punto de unión disponible con uno o más sustituyentes, preferentemente de 1 a 4 sustituyentes. Los sustituyentes cicloalquilo incluyen alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, y aquellos grupos enumerados anteriormente como sustituyentes alquilo.

El término "guanidinilo" significa el grupo



Por tanto, un guanidinilalquilo significa un grupo alquilo unido al guanidinilo tal como un grupo que tiene la fórmula,



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

5 El término “heteroátomos” incluye oxígeno, azufre y nitrógeno.

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

El término “haloalcoxilo” significa un grupo alcoxilo que tiene uno o más sustituyentes halógeno. Por ejemplo, “haloalcoxilo” incluye $-\text{OCF}_3$.

10 Cuando el término “insaturado” se usa en el presente documento para referirse a un anillo o grupo, el anillo o grupo puede estar totalmente insaturado o parcialmente insaturado.

El término “heteroarilo” se refiere a un grupo aromático que un sistema de anillo monocíclico de 4 a 7 miembros, bicíclico de 7 a 11 miembros, o tricíclico de 10 a 15 miembros, que tiene al menos un anillo que contiene al menos un heteroátomo. Cada anillo del grupo heteroarilo que contiene un heteroátomo puede contener uno o dos átomos de oxígeno o de azufre y/o desde uno hasta cuatro átomos de nitrógeno, siempre que el número total de heteroátomos en cada anillo sea cuatro o menos y cada anillo tenga al menos un átomo de carbono. Los anillos condensados que completan los grupos bicíclicos y tricíclicos pueden contener sólo átomos de carbono y pueden estar saturados, parcialmente saturados, o insaturados. Los átomos de nitrógeno y de azufre pueden estar opcionalmente oxidados y los átomos de nitrógeno pueden estar opcionalmente cuaternizados. Los grupos heteroarilo que son bicíclicos o tricíclicos deben incluir al menos un anillo totalmente aromático pero el otro anillo o los otros anillos condensados pueden ser aromáticos o no aromáticos y pueden ser carbocíclicos, siempre que en tales casos el punto de unión sea en cualquier átomo de nitrógeno o de carbono disponible de un anillo que contiene heteroátomo aromático. Adicionalmente, la definición de grupos heteroarilo en sí incluye anillos en los que uno o más de los átomos de carbono está unido a través de un doble enlace unido a un átomo de oxígeno para definir un grupo carbonilo (siempre que el grupo heteroarilo sea aromático) y también cuando un grupo heteroarilo se han condensado a un anillo heterocíclico o de cicloalquilo, el anillo heterocíclico y/o de cicloalquilo puede tener uno o más grupos carbonilo.

Los grupos heteroarilo monocíclicos a modo de ejemplo incluyen pirrolilo, pirazolilo, pirazolinilo, imidazolilo, oxazolilo, isoxazolilo, tiazolilo (es decir,



30), tiadiazolilo, isotiazolilo, furanilo, tienilo, oxadiazolilo, piridilo, pirazinilo, pirimidinilo, piridazinilo, triazinilo y similares. Adicionalmente, puesto que la definición de grupos heteroarilo en sí incluye anillos en los que uno o más de los átomos de carbono define un grupo carbonilo, se incluyen anillos tales como 2,4-dihidro-[1,2,4]triazol-3-ona (es decir,



35) y similares.

Los grupos heteroarilo bicíclicos a modo de ejemplo incluyen indolilo, benzotiazolilo, benzodioxolilo, benzoxazolilo, benzotienilo, quinolinilo, tetrahydroisoquinolinilo, isoquinolinilo, bencimidazolilo, benzopiranilo, indolizínilo, benzofuranilo, cromonilo, cumarinilo, benzopiranilo, cinnolinilo, quinoxalinilo, indazolilo, pirrolopiridilo, furopiridinilo, dihidroisoindolilo, tetrahydroquinolinilo y similares.

Los grupos heteroarilo tricíclicos a modo de ejemplo incluyen carbazolilo, bencidolilo, fenantrolinilo, acridinilo, fenantridinilo, xantenilo y similares.

El término "heteroalquileo" se refiere a un radical heteroarilo bivalente, es decir, un grupo heteroarilo tal como se definió anteriormente que tiene dos puntos de unión a dos grupos distintos, en dos puntos de unión cualesquiera disponibles del anillo de heteroarilo.

5 Los grupos "heteroarilo sustituidos" son grupos heteroarilo tal como se definió anteriormente sustituidos con uno o más sustituyentes, preferentemente de 1 a 4 sustituyentes, en cualquier punto de unión disponible. Los sustituyentes a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a alquilo, alquilo sustituido, alqueno, alqueno sustituido, así como aquellos grupos enumerados anteriormente como sustituyentes alquilo.

10 Los términos "heterociclo", "heterocíclico" y "heterociclo" se usan de forma intercambiable y cada uno se refiere a un grupo cíclico no aromático totalmente saturado o parcialmente insaturado, que puede estar sustituido o no sustituido, por ejemplo, que es un sistema de anillo monocíclico de 4 a 7 miembros, bicíclico de 7 a 11 miembros, o tricíclico de 10 a 15 miembros, que tiene al menos un heteroátomo en al menos un anillo que contiene átomos de carbono. Cada anillo del grupo heterocíclico que contiene un heteroátomo puede tener 1, 2 ó 3 heteroátomos seleccionados de átomos de nitrógeno, oxígeno y azufre, en el que los heteroátomos de nitrógeno y azufre también pueden estar opcionalmente oxidados y los heteroátomos de nitrógeno también pueden estar opcionalmente cuaternizados.

15 Preferentemente dos heteroátomos adyacentes no se seleccionan simultáneamente de oxígeno y nitrógeno. Los grupos heterocíclicos que son bicíclicos o tricíclicos deben incluir al menos un anillo no aromático y no carbocíclico, pero el otro anillo o los otros anillos condensados pueden ser aromáticos o no aromáticos y pueden ser carbocíclicos, siempre que en tales casos el punto de unión sea en cualquier átomo de nitrógeno o de carbono disponible de un anillo que contiene heteroátomo no aromático. Adicionalmente, la definición de grupos heterocíclicos en sí incluye anillos en los que uno o más de los átomos de carbono se une a través de un doble enlace a un átomo de oxígeno para definir un grupo carbonilo (siempre que el grupo heterocíclico no sea aromático) y también cuando un grupo heterocíclico se ha condensado a un anillo adicional, pudiendo tener tal anillo adicional uno o más grupos carbonilo.

20

25 Los grupos heterocíclicos monocíclicos a modo de ejemplo incluyen pirrolidinilo, imidazolidinilo, tetrahidrofurilo, piperidinilo, piperazinilo, pirazolidinilo, imidazolinilo, pirrolinilo, tetrahidropiranilo, morfolinilo, tiamorfolinilo, y similares.

"Heterociclo sustituido", "heterocíclico sustituido", y "heterociclo sustituido" se refieren a grupos heterociclo, heterocíclico, o heterociclo tal como se definió anteriormente sustituidos con uno o más sustituyentes, preferentemente de 1 a 4 sustituyentes, en cualquier punto de unión disponible. Los sustituyentes a modo de ejemplo incluyen alquilo, alquilo sustituido, alqueno, alqueno sustituido, así como aquellos grupos enumerados anteriormente como sustituyentes alquilo a modo de ejemplo.

30

"Hidroxilo" se refiere a -OH.

"Tiol" significa el grupo -SH.

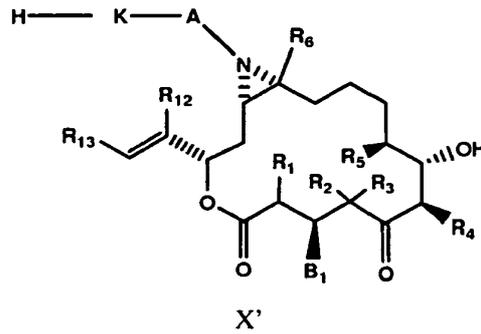
35 El término "nitrógeno cuaternario" se refiere a un átomo de nitrógeno tetravalente con carga positiva incluyendo, por ejemplo, el nitrógeno con carga positiva en un grupo tetraalquilamonio (por ejemplo, tetrametilamonio o N-metilpiridinio), el nitrógeno con carga positiva en especies de amonio protonadas (por ejemplo, trimetilhidroamonio o N-hidropiridinio), el nitrógeno con carga positiva en N-óxidos de amina (por ejemplo, N-metil-morfolina-N-óxido o piridina-N-óxido), y el nitrógeno con carga positiva en un grupo N-amino-amonio (por ejemplo, N-aminopiridinio).

40 Cuando un grupo funcional se denomina "protegido", esto significa que el grupo está en forma modificada para mitigar, especialmente para impedir, reacciones secundarias indeseadas en el sitio protegido. Los grupos protectores adecuados para los procedimientos y compuestos descritos en el presente documento incluyen, sin limitación, los descritos en los libros de texto convencionales, incluyendo Greene, T.W. *et al.*, Protective Groups in Organic Synthesis, Wiley, N.Y. (1991), incorporado al presente documento como referencia.

REALIZACIONES ALTERNATIVAS DE LA INVENCION

45 La presente invención comprende compuestos que tienen la siguiente fórmula X, tal como se expone en el sumario de la invención.

La presente invención comprende compuestos que tienen la forma estereoespecífica según la fórmula X'



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

K es -O-, -S- o -NR₇-;

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

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

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 que están unidos para formar un cicloalquilo opcionalmente sustituido;

10 R₄ es hidrógeno, alquilo, alqueno, alquilo sustituido, alqueno sustituido, arilo o arilo sustituido;

R₆ es hidrógeno, alquilo o alquilo sustituido;

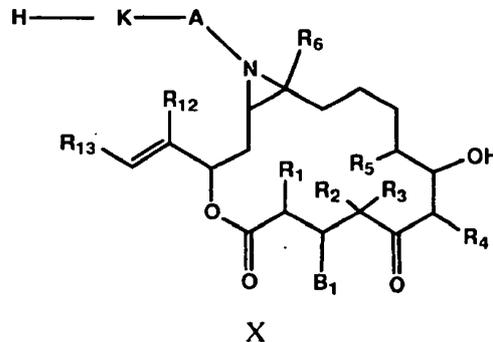
R₇, R₈, R₉, R₁₀ y R₁₁ son independientemente hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heterocicloalquilo, heterocicloalquilo sustituido, heteroarilo o heteroarilo sustituido;

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

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

m es de 0 a 6.

En otra realización, los compuestos de la invención tienen la fórmula X



20 o la fórmula estereoespecífica X', anterior, incluyendo sales y/o solvatos farmacéuticamente aceptables de los mismos, en la que

K es -O-;

A es alquileno C₂₋₄;

B₁ es -OH;

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

R₆ es hidrógeno o metilo;

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

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

30 En otra realización, los compuestos de la invención tienen la fórmula X o X', tal como se definió anteriormente, incluyendo sales y/o solvatos farmacéuticamente aceptables de los mismos, en las que

K es -O-;

A es alquileno C₂₋₄;

B₁ es -OH;

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

R₆ es hidrógeno;

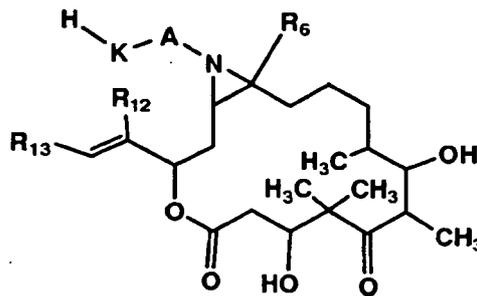
R₁₂ es H, alquilo, alquilo sustituido, o halógeno; y

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

En otra realización, los compuestos de la invención tienen la fórmula X o X', tal como se definió anteriormente, incluyendo sales y/o solvatos farmacéuticamente aceptables de los mismos, en las que

- 5 K es -O-;
 A es alquileo C₂₋₄;
 B₁ es -OH;
 R₂, R₃, R₄ y R₅ son, independientemente, hidrógeno o alquilo inferior;
 R₆ es hidrógeno o metilo;
 R₁₂ es H, alquilo, alquilo sustituido o halógeno; y
 R₁₃ es un tiazolilo, piridilo, u oxazolilo opcionalmente sustituido.

10 En otra realización, se proporcionan compuestos que tienen la fórmula Xa,



Xa

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

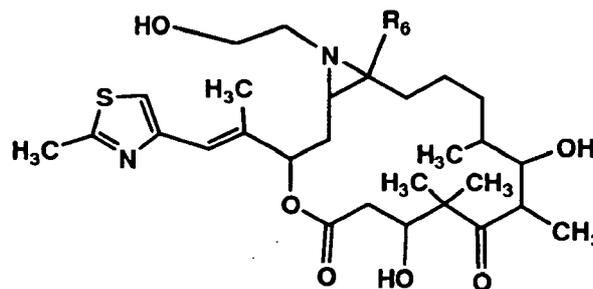
- 15 K es -O-, -S-, o -NR₇-;
 A es -(CR₈R₉)-(CH₂)_m-Z- en el que Z es -(CHR₁₀)-, -C(=O)-, -C(=O)-C(=O)-, -OC(=O)-, -N(R₁₁)C(=O)-, -SO₂-, o -N(R₁₁)SO₂-;
 R₆ es hidrógeno o metilo;
 R₈, R₉, R₁₀ y R₁₁ son independientemente hidrógeno, alquilo, o alquilo sustituido,
 R₁₂ es H, alquilo, alquilo sustituido, o halógeno; y
 R₁₃ es arilo, arilo sustituido, heteroarilo o heteroarilo sustituido; y
 20 m es de 0 a 6.

En otra realización de la invención, se proporcionan compuestos de fórmula Xa, incluyendo compuestos de fórmula Xa' que tienen la forma estereoespecífica Xa', correspondiente a la estereoquímica mostrada para X'.

25 En otra realización, se proporcionan compuestos que tienen la fórmula Xa, o Xa', anteriores, en las que K es -O- y R₁₃ es tiazolilo, piridilo, u oxazolilo opcionalmente sustituido, y los grupos restantes son tal como se definió anteriormente.

En otra realización, se proporcionan compuestos que tienen la fórmula Xa, o Xa', anterior, en las que K es -O-; A es alquileo C₂₋₄; R₆ es hidrógeno o metilo; R₁₂ es H, alquilo inferior o halógeno; y R₁₃ es tiazolilo, piridilo u oxazolilo opcionalmente sustituido.

Un compuesto de la invención también puede tener la fórmula Xb



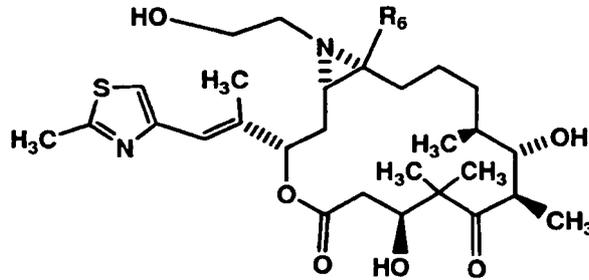
Xb,

30

incluyendo sales y/o silbatos farmacéuticamente aceptables de los mismos, en la que R_6 es hidrógeno o metilo.

En otra realización, un compuesto de la invención tiene la fórmula Xb, en la que R_6 es hidrógeno.

En otra realización, un compuesto de la invención puede tener la fórmula estereoespecífica Xb'

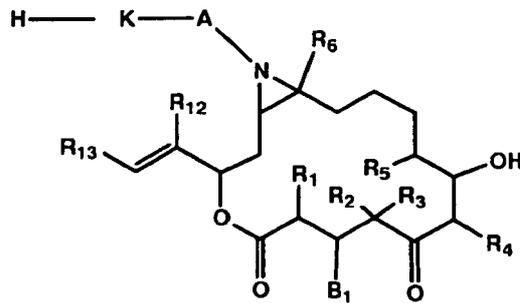


Xb'

5 incluyendo sales y/o solvatos farmacéuticamente aceptables de los mismos, en la que R_6 es hidrógeno o metilo.

En otra realización, un compuesto de la invención tiene la fórmula Xb', en la que R_6 es hidrógeno.

Según una realización de la presente invención, se proporcionan compuestos para tratar el cáncer, por ejemplo, una afección asociada a receptor de folato, en la que los compuestos se proporcionan para el tratamiento de un paciente con una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto que tiene la siguiente fórmula X:



X

10

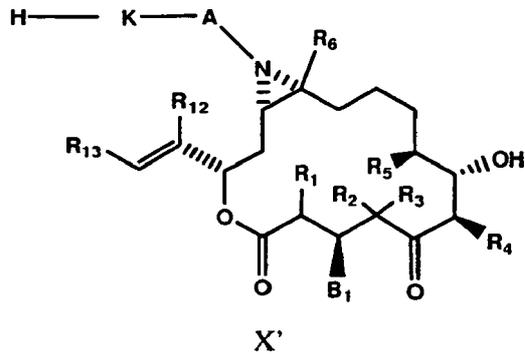
o una sal y/o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que:

K es -O-, -S-, o -NR₇-;

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

- 15 B₁ es hidroxilo o ciano y R₁ es hidrógeno o B₁ y R₁ se toman juntos para formar un doble enlace;
 R₂, R₃ y R₅ son, independientemente, hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, arilo o arilo sustituido; o R₂ y R₃ pueden tomarse junto con el carbono al que están unidos para formar un cicloalquilo opcionalmente sustituido;
 R₄ es hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquilo sustituido, alquenilo sustituido, arilo o arilo sustituido;
 R₆ es hidrógeno, alquilo o alquilo sustituido;
 20 R₇, R₈, R₉, R₁₀ y R₁₁ son independientemente hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heterocicloalquilo, heterocicloalquilo sustituido, heteroarilo o heteroarilo sustituido;
 R₁₂ es H, alquilo, alquilo sustituido o halógeno;
 R₁₃ es arilo, arilo sustituido, heteroarilo o heteroarilo sustituido; y
 m es de 0 a 6.

25 En una realización los compuestos para su uso en tal tratamiento tienen la fórmula estereoespecífica X',



incluyendo sales y/o solvatos farmacéuticamente aceptables de los mismos, en la que K, A, B₁, R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, R₈, R₉, R₁₀, R₁₁, R₁₂, R₁₃, y m son tal como se definió anteriormente para los compuestos de fórmula X.

5 En otra realización, el procedimiento comprende tratar a un paciente con una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto que tiene la fórmula X, incluyendo la fórmula X', tal como se describió anteriormente, incluyendo sales y/o solvatos farmacéuticamente aceptables de los mismos, en la que

K es -O-;

A es alquileo C₂₋₄;

B₁ es -OH;

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

R₆ es hidrógeno o metilo;

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

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

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

En otra realización, los compuestos para su uso en tales tratamientos tienen la fórmula X o X', tal como se describió anteriormente, incluyendo sales y/o solvatos farmacéuticamente aceptables de los mismos, en las que

K es -O-;

A es alquileo C₂₋₄;

20 B₁ es -OH;

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

R₆ es hidrógeno;

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

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

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

En otra realización, los compuestos para su uso en tales tratamientos tienen la fórmula X o X', tal como se describió anteriormente, incluyendo sales y/o solvatos farmacéuticamente aceptables de los mismos, en las que

K es -O-;

30 A es alquileo C₂₋₄;

B₁ es -OH;

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

R₆ es hidrógeno o metilo;

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

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

R₁₃ es un tiazolilo, piridilo u oxazolilo opcionalmente sustituido.

40 Los compuestos para su uso en tales tratamientos pueden tener la fórmula Xa, anterior, o la forma estereoespecífica Xa', incluyendo sales y/o solvatos farmacéuticamente aceptables de los mismos, en las que, K es -O-, -S-, o -NR₇-; A es -(CR₈R₉)-(CH₂)_m-Z en el que Z es -(CHR₁₀)-, -C(=O)-, -C(=O)-C(=O)-, -OC(=O)-, -N(R₁₁)C(=O)-, -SO₂- o -N(R₁₁)SO₂-; R₆ es hidrógeno o metilo; R₈ y R₉ son independientemente hidrógeno, alquilo, o alquilo sustituido, R₁₂ es H, alquilo, alquilo sustituido o halógeno; R₁₃ es arilo, arilo sustituido, heteroarilo o heteroarilo sustituido; y m es de 0 a 6.

45 Los compuestos para su uso en tales tratamientos pueden también tener la fórmula Xb o Xb', anterior, en la que R₆ es hidrógeno o metilo. Aún en otra realización, los compuestos para su uso en tales tratamientos pueden también

tener la fórmula Xb o Xb', en las que R₆ es hidrógeno.

Otra realización de la invención comprende el uso de cualquiera de los compuestos descritos anteriormente (incluyendo compuestos de fórmula X, Xa, Xa', Xb, y/o Xb', en las que los grupos K, A, B₁R₁ R₂, R₃, R₄, R₅ R₆, R₇, R₈ R₉, R₁₀ R₁₁ R₁₂ y R₁₃ pueden seleccionarse tal como se mencionó anteriormente), en la preparación de composiciones farmacéuticas para tratar el cáncer en pacientes, en particular, para su uso en la preparación de composiciones farmacéuticas que contienen compuestos conjugados para la administración de fármacos dirigida a tumores que sobreexpresan o que preferentemente expresan el receptor de folato.

Otra realización de la invención comprende compuestos para su uso para tratar a un paciente que necesita de tal tratamiento con una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto que tiene las fórmulas X, Xa, Xa', Xb y/o Xb' (en las que los grupos K, A, B₁R₁R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, R₈, R₉, R₁₀, R₁₁ R₁₂ y R₁₃ pueden seleccionarse tal como se mencionó anteriormente), produciéndose el tratamiento en el sitio del tumor, habiéndose liberado en el sitio del tumor. En esta realización, se administra un compuesto conjugado al sitio del tumor, y entonces se libera el compuesto de fórmulas X, Xa, Xa', Xb o Xb', tal como se definió anteriormente, en el sitio del tumor y trata al paciente en el del tumor. Por tanto, en el presente documento, siempre que se use el término "tratamiento" con referencia a tratar a un paciente, se entiende que abarca el tratamiento en el sitio del tumor, sin embargo se administra, por ejemplo, a través de un compuesto conjugado.

El uso de un agente para regular por incremento el nivel de receptor de folato (FR) puede ser eficaz para aumentar la expresión de FR en ciertas células cancerosas o tipos de tumor para mejorar las ventajas obtenidas con la administración de los compuestos de la invención a pacientes, y/o para mejorar las diversas enfermedades o tipos de tumor que pueden tratarse con los compuestos de unión al receptor de folato según la invención. La expresión del receptor de folato en ciertos cánceres puede regularse por incremento mediante la administración de un inductor de receptor de folato, que aumenta de forma selectiva el nivel de receptor de folato en las células cancerosas, mejorando así la eficacia de una terapia dirigida al receptor de folato. Por ejemplo, los cánceres de mama positivos para receptores de estrógenos (ER+) expresan bajos niveles de receptores de folato. Se sabe que el tratamiento con un inductor de receptor de folato, tal como tamoxifeno, un antagonista de estrógenos, regula por incremento la expresión de los receptores de folato en cánceres de mama ER+, aumentando la sensibilidad de las células de cáncer de mama ER+ al tratamiento con una terapia dirigida al receptor de folato.

Un aspecto de la invención proporciona compuestos x para su uso en un procedimiento de tratamiento del cáncer o una enfermedad proliferativa en un paciente, que comprende opcionalmente administrar a un paciente una cantidad efectiva de al menos un inductor de receptor de folato, y tratar al paciente con una cantidad efectiva de al menos un compuesto según la fórmula X. El inductor de receptor de folato puede administrarse antes, durante o después de que el paciente se ha tratado con el compuesto según la fórmula X. En una realización, el inductor de receptor de folato se administra antes del tratamiento con el compuesto de fórmula X. Una cantidad efectiva del inductor de receptor de folato se refiere a una cantidad que regula por incremento el receptor de folato en las células deseadas de manera que el tratamiento con el compuesto es terapéuticamente eficaz.

Ejemplos de inductores de receptor de folato para la regulación por incremento del receptor de folato α (FR α) incluyen: antagonistas de receptores de estrógenos tales como tamoxifeno; agonistas de receptores de progesterona tales como progestina; agonistas de receptores de andrógenos tales como testosterona y dihidrotestosterona, y agonistas de receptores de glucocorticoides tales como dexametasona.

Ejemplos de inductores de receptor de folato para la regulación por incremento de receptor de folato β (FR β) incluyen: agonistas de receptor de ácido retinoico tales como ácido retinoico todo trans (ATRA), ácido tetrametil-naftalenil-propenil-benzoico (TTNPB), ácido 9-cis-retinoico (9-cis AR), CD33336, LG 101093 y CD2781.

En una realización, se proporcionan compuestos X para su uso en un procedimiento de tratamiento del cáncer o una enfermedad proliferativa en un paciente que lo necesita, comprendiendo administrar una cantidad efectiva de al menos un inductor de receptor de folato y también tratar al paciente con al menos un compuesto según la fórmula X; en el que dicho inductor de receptor de folato regula por incremento el de folato α . Preferentemente, dicho cáncer o enfermedad proliferativa se selecciona de cáncer de mama, tal como cáncer de mama ER+, y cáncer de ovario.

En una realización de la presente invención, se proporcionan compuestos X para su uso en un procedimiento de tratamiento del cáncer o una enfermedad proliferativa en un paciente que lo necesita, comprendiendo administrar una cantidad efectiva de al menos un inductor de receptor de folato y administrar una cantidad efectiva de al menos un compuesto según la fórmula X; en el que dicho inductor de receptor de folato regula por incremento el receptor de folato β . Preferentemente, dicho cáncer o enfermedad proliferativa se selecciona de leucemia, y más preferentemente de leucemia mielógena aguda (LMA) y leucemia mielógena crónica (LMC).

En una realización adicional, se proporcionan compuestos X para su uso en un procedimiento de tratamiento del cáncer o una enfermedad proliferativa en un paciente que lo necesita, comprendiendo administrar una cantidad efectiva de al menos un inductor de receptor de folato, administrar al menos un inhibidor de la histona desacetilasa, y tratar al paciente con una cantidad efectiva de al menos un compuesto según la fórmula X. Un ejemplo de un inhibidor de la histona desacetilasa es tricostatina A (TSA). Publicación de solicitud de patente estadounidense

número 2003/0170299 A1, WO 2004/082463, Kelly, K. M., B.G. Rowan, y M. Ratnam, Cancer Research 63, 2820-2828 (2003), Wang, Zheng, Behm, y Ratnam, Blood, 96:3529-3536 (2000).

Los compuestos de la presente invención pueden formar sales o solvatos que se encuentran también dentro del alcance de esta invención. En el presente documento, se entiende que la referencia a un compuesto de fórmula (X) incluye la referencia a sales y solvatos del mismo, racematos, diastereómeros y enantiómeros del mismo, a menos que se indique lo contrario. El término "sal(es)", tal como se emplea en el presente documento, indica sales ácidas y/o básicas formadas con ácidos y bases inorgánicos y/u orgánicos. Además, cuando un compuesto de fórmula (X) contiene tanto un resto básico, tal como pero sin limitarse a un resto piridinilo imidazolilo, amina o guanidinilo y un resto ácido tal como pero sin limitarse a un ácido carboxílico, pueden formarse zwitteriones y se incluyen dentro del término "sal(es)" tal como se usa en el presente documento. Se prefieren las sales farmacéuticamente aceptables (es decir, no tóxicas, fisiológicamente aceptable), aunque también son útiles otras sales, por ejemplo, en etapas de aislamiento o de purificación que pueden emplearse durante la preparación. Las sales de los compuestos de fórmula (X) pueden formarse, por ejemplo, haciendo reaccionar un compuesto de fórmula (X) con una cantidad de ácido o de base, tal como una cantidad equivalente, en un medio tal como uno el que la sal precipita o en un medio acuoso seguido de liofilización.

Los compuestos de fórmula (X) que contienen un resto básico, tal como pero sin limitarse a una amina, un grupo guanidinilo, o un anillo de piridilo o imidazolilo, pueden formar sales con diversos ácidos orgánicos e inorgánicos. Las sales de adición de ácido a modo de ejemplo incluyen acetatos (tales como los formados con ácido acético o ácido o ácido trihaloacético, por ejemplo, ácido trifluoroacético), adipatos, alginatos, ascorbatos, aspartatos, benzoatos, bencenosulfonatos, bisulfatos, boratos, butiratos, citratos, alcanforatos, alcanforsulfonatos, ciclopentanopropionatos, digluconatos, dodecilsulfatos, etanosulfonatos, fumaratos, glucoheptanoatos, glicerosulfatos, hemisulfatos, heptanoatos, hexanoatos, clorhidratos, bromhidratos, yodhidratos, hidroxietanosulfonatos (*por ejemplo*, 2-hidroxietanosulfonatos), lactatos, maleatos, metanosulfonatos, naftalenosulfonatos (*por ejemplo*, 2-naftalenosulfonatos), nicotinatatos, nitratos, oxalatos, pectinatatos, persulfatos, fenilpropionatos (*por ejemplo*, 3-fenilpropionatos), fosfatos, picratos, pivalatos, propionatos, salicilatos, succinatos, sulfatos (tales como los formados con ácido sulfúrico), sulfonatos (tales como los mencionados en el presente documento), tartratos, tiocianatos, toluenosulfonatos tales como tosيلاتos, undecanoatos, y similares.

Los compuestos de fórmula (X) que contienen un resto ácido, tal como pero sin limitarse a un ácido carboxílico, pueden formar sales con diversas bases orgánicas e inorgánicas. Las sales básicas a modo de ejemplo incluyen sales de amonio; sales de metal alcalino tales como sales de sodio, de litio y de potasio; sales de metal alcalinotérreo tales como sales de calcio y de magnesio; sales con bases orgánicas (*por ejemplo*, aminas orgánicas) tales como benzatinas, dicitclohexilaminas, hidrabaminas (formadas con N,N-bis(dehidroabietil)etilendiamina), N-metil-D-glucaminas, N-metil-D-glicamidas, t-butilamina; y sales con aminoácidos tales como arginina, lisina, y similares. Los grupos que contienen nitrógeno básico pueden cuaternizarse con agentes tales como haluros de alquilo inferior (*por ejemplo* cloruros, bromuros y yoduros de metilo, etilo, propilo y butilo), sulfatos de dialquilo (*por ejemplo* sulfatos de dimetilo, dietilo, dibutilo y diamilo), haluros de cadena larga (*por ejemplo* cloruros, bromuros y yoduros de decilo, laurilo, miristilo y estearilo), haluros de aralquilo (*por ejemplo* bromuros de bencilo y fenetilo), y otros.

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

Todos los estereoisómeros de los presentes compuestos (*por ejemplo*, aquellos que pueden existir debido a carbonos asimétricos sobre diversos sustituyentes), incluyendo formas enantioméricas y formas diastereoméricas, se contemplan dentro del alcance de esta invención. Por tanto, *por ejemplo*, cada referencia a los compuestos de fórmula X, pretende abarcar los compuestos de fórmula X'. Los estereoisómeros individuales de los compuestos de la invención pueden, *por ejemplo*, estar sustancialmente libres de otros isómeros (*por ejemplo*, como isómero óptico puro o sustancialmente puro que tiene una actividad especificada), o pueden estar mezclados, *por ejemplo*, como racematos o con todos los demás estereoisómeros, u otros estereoisómeros seleccionados. Los centros quirales de la presente invención pueden tener la configuración S o R tal como definen las recomendaciones de 1974 de la IUPAC. Las formas racémicas pueden resolverse mediante procedimientos físicos, tales como, *por ejemplo*, cristalización fraccionada, separación o cristalización de derivados diastereoméricos, o separación mediante cromatografía en columna quirral. Los isómeros ópticos individuales pueden obtenerse a partir de procedimientos estereoespecíficos, en los que los materiales de partida y/o productos intermedios se seleccionan teniendo una estereoquímica correspondiente a la deseada para los productos finales, y la estereoquímica se mantiene a lo largo de toda las reacciones, y/o los isómeros pueden obtenerse a partir de racematos mediante cualquier procedimiento adecuado, incluyendo sin limitación, procedimientos convencionales, tales como, *por ejemplo*, formación de sal con un ácido ópticamente activo seguido de cristalización.

Se contemplan todos los isómeros configuracionales de los compuestos de la presente invención, o bien en mezcla, o bien en forma pura o sustancialmente pura. Tal como puede apreciarse, la configuración preferida puede ser una función del compuesto particular y de la actividad deseada. Los isómeros configuracionales pueden prepararse mediante los procedimientos descritos en el presente documento, que pueden ser estereoselectivos. En otras palabras, puede conseguirse una estereoquímica deseada para los compuestos finales usando materiales de partida

que tienen la estereoquímica deseada correspondiente, y manteniendo entonces la estereoselectividad a lo largo de todo el procedimiento de preparación. Alternativamente, los compuestos pueden prepararse como racematos o diastereómeros, y entonces puede alcanzarse la estereoquímica deseada por medio de la separación de isómeros configuracionales que pueden conseguirse mediante cualquier procedimiento adecuado conocido en el campo, *por ejemplo*, tal como cromatografía en columna.

A lo largo de toda la memoria descriptiva, los grupos y sustituyentes de la misma pueden seleccionarse para proporcionar restos estables y compuestos útiles como compuestos farmacéuticamente aceptables y/o compuestos intermedios útiles en la preparación de compuestos farmacéuticamente aceptables. Un experto en el campo apreciará las selecciones adecuadas para variables para lograr compuestos estables.

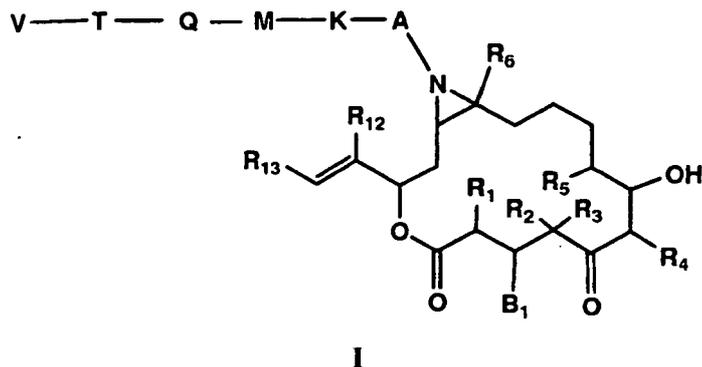
Las realizaciones indicadas en el presente documento como a modo de ejemplo o preferidas pretenden ser ilustrativas y no limitativas.

Otras realizaciones de la invención serán evidentes para un experto en el campo tal como, por ejemplo, considerar combinaciones de las realizaciones a las que se hizo referencia anteriormente, y se contempla que están cubiertas dentro del alcance de la invención en el presente documento.

15 UTILIDAD

Una de las proteínas que se expresa o preferentemente se expresa en ciertas células cancerosas es el receptor de folato. El ácido fólico se requiere para la síntesis de ADN, y se sabe que ciertas células tumorales humanas sobreexpresan proteínas de unión a folato. Por ejemplo, tanto Campbell *et al.*, "Folato Binding Protein is a Marker for Ovarian Cancer", *Cancer Research*, Vol. 51 (1 de octubre de 1991), en las páginas 5329-38, como Coney *et al.*, "Cloning of a Tumor-Associated Antigen: MOv 18 y MOv 19 Antibodies Recognize Folato-binding Protein", *Cancer Research*, Vol. 51 (15 de noviembre de 1991), en las páginas 6125-31, notifican que las proteínas de unión a folato son marcadores para el cáncer de ovario. La sobreexpresión del receptor de folato se conoce también para otros cánceres tales como, por ejemplo, cánceres de piel, renal, de mama, de pulmón, de colon, de nariz, de garganta, de glándula mamaria, y cerebral, así como otros cánceres a los que se hace referencia en el presente documento.

Los compuestos de la presente invención son útiles y pueden administrarse como agentes de estabilización de microtúbulos derivados de epotilona frente a tumores que expresan un receptor de folato. Son útiles en el tratamiento de diversos cánceres y otras enfermedades proliferativas, en particular aquellos cánceres caracterizados por células cancerosas o tumores que expresan el receptor de folato. El término "afección asociada al receptor de folato" tal como se usa en el presente documento comprende enfermedades o trastornos caracterizados por la expresión del receptor de folato, o en otras palabras, aquellas enfermedades o trastornos que pueden diagnosticarse o tratarse basándose en el nivel de expresión del receptor de folato en tejido enfermo en comparación con tejido normal. Los compuestos de la presente invención son útiles para formar conjugados. Por ejemplo, los compuestos de la invención pueden usarse para formar el siguiente compuesto conjugado de fórmula I:



en la que:

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

Q es O, S, o NR₇;

M es un adaptador liberable;

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

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

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

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 que están unidos para formar un cicloalquilo opcionalmente sustituido;

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

R₆ es hidrógeno, alquilo o alquilo sustituido;

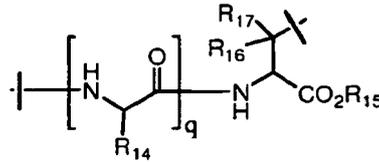
R_{7a}, R₇, R₈, R₉, R₁₀ y R₁₁ son independientemente hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heterocicloalquilo, heterocicloalquilo sustituido, heteroarilo o heteroarilo sustituido;

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

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

m es de 0 a 6;

T tiene la fórmula:



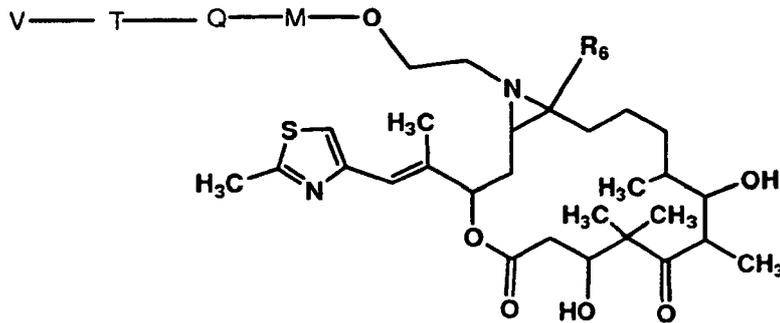
10 en la que

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;

15 q es de 1 a 10; y

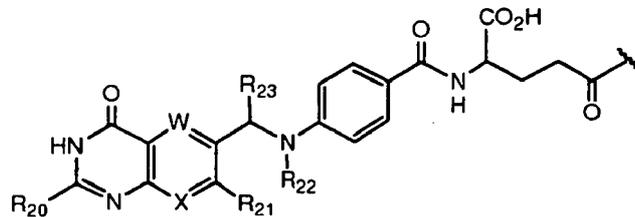
R₁₅, R₁₆ y R₁₇ son independientemente hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido o cicloalquilo.

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



Ia

20 en la que V es un resto de unión a receptor de folato. Por ejemplo, V puede tener la siguiente fórmula:



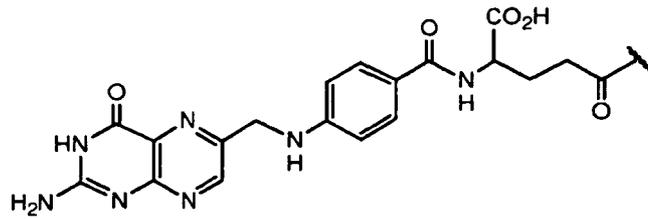
en la que W y X son independientemente CH o nitrógeno;

R₂₀ es hidrógeno, amino o alquilo inferior;

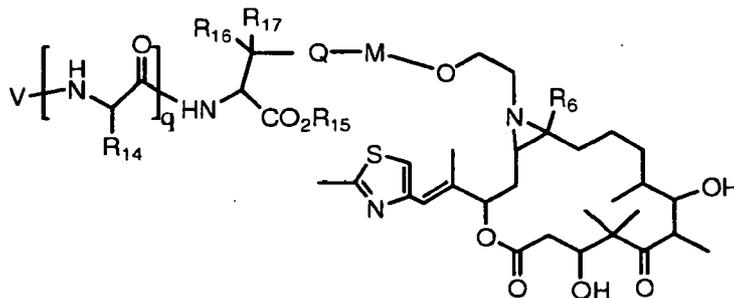
R₂₁ es hidrógeno, alquilo inferior, o forma un grupo cicloalquilo con R₂₃;

25 R₂₂ es hidrógeno, alquilo inferior, alqueno inferior, o alquino inferior; y

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

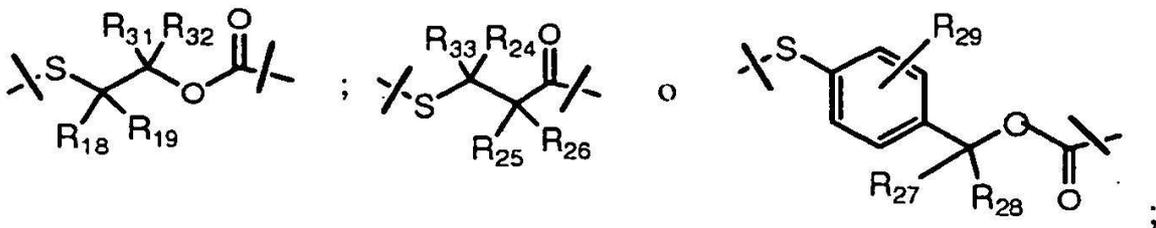


Los compuestos de la presente invención pueden conjugarse para formar compuestos que tienen la siguiente fórmula Ib:

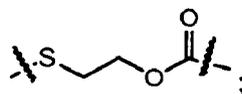


Ib

- 5 en la que
 V es un resto de unión a receptor de folato;
 R es H o alquilo inferior;
 Q es O, S o NR₇;
 M es un adaptador liberable que tiene la siguiente fórmula:



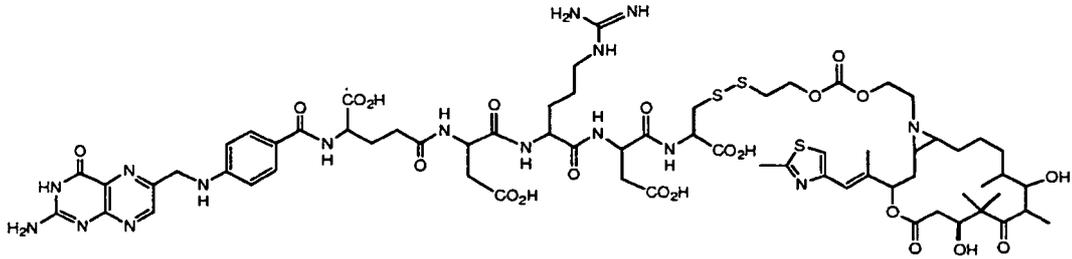
- 10 preferentemente



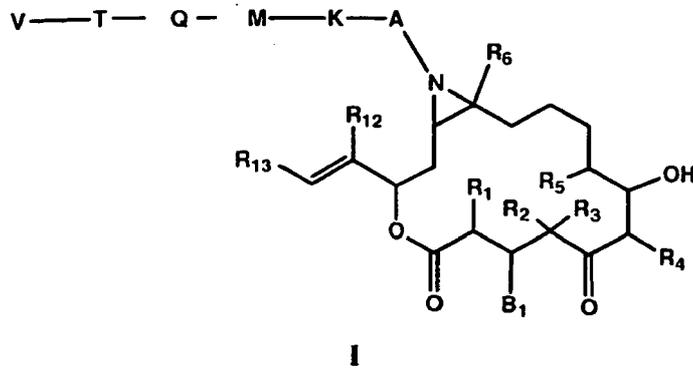
- 15 R₁₄ en cada caso es, independientemente, hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, arilalquilo, arilalquilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, cicloalquilalquilo, cicloalquilalquilo sustituido, heteroarilo, heteroarilalquilo, heteroarilalquilo sustituido, heteroarilo sustituido, heterocicloalquilo, o heterocicloalquilo sustituido;
 y es preferentemente un grupo seleccionado de H, metilo, guanidilpropilo, -(CH₂)₁₋₂-CO₂H, -CH₂-SH, -CH₂-OH, imidazolil(metil), aminobutilo, y -CH(OH)-CH₃; y es más preferentemente un alquilo C₁ a C₃ sustituido con uno de -C(=O)-OH o -NH-C(=NH)-NH₂;
 20 q es de 1 a 10; preferentemente de 1 a 5;
 R₁₅, R₁₆ y R₁₇ son independientemente hidrógeno, alquilo inferior o alquilo sustituido inferior; y
 R₁₈, R₁₉, R₃₁, R₃₂, R₃₃, R₂₄, R₂₅, R₂₆, R₂₇, R₂₈ y R₂₉ son cada uno, independientemente, H, alquilo inferior, alquilo sustituido inferior, 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 tomarse juntos para formar un cicloalquilo.

- 25 Los compuestos de la presente invención son especialmente útiles para formar compuestos conjugados, incluyendo

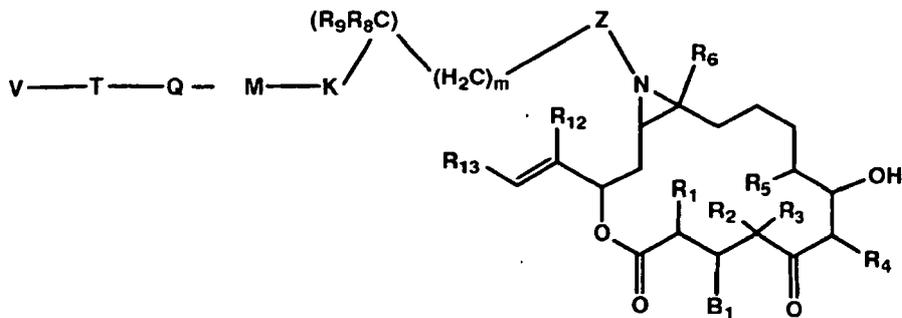
sales y solvatos farmacéuticamente aceptables de los mismos, que tienen la siguiente fórmula:



Para cualquier grupo bivalente enumerado en el presente documento, tal como $-(CR_8R_9)-(CH_2)_m-Z-$, que puede insertarse en compuestos de fórmula I,



5 La inserción debe realizarse de izquierda a derecha. Por ejemplo, en la siguiente situación en la que A se define como $-(CR_8R_9)-(CH_2)_m-Z-$, el grupo metileno está unido a K, y el grupo Z está unido al nitrógeno del anillo de aziridinilo, tal como sigue:



10 Como ejemplo no limitativo, tales cánceres asociados al receptor de folato incluyen cáncer de ovario y cánceres de la piel, de mama, de pulmón, de colon, de nariz, de garganta, de glándula mamaria, de hígado, de riñón, de bazo, y/o cerebral; mesoteliomas, adenoma pituitario, cáncer cervicouterino, carcinoma de células renales u otro cáncer renal, carcinoma del plexo corioideo, y tumores epiteliales (véase, Asok, Antony, "Folate Receptors: Reflections on a Personal Odyssey and a Perspective on Unfolding Truth", Advanced Drug Delivery Reviews 56 (2004) en las páginas

15 1059-66).

Adicionalmente, el uso de un antiestrógeno (tal como tamoxifeno, ICI 182, 780), puede ser eficaz para aumentar la expresión de FR en ciertas células cancerosas o tipos de tumor para mejorar las ventajas obtenidas con la administración de los compuestos de la invención a pacientes, y/o para mejorar las diversas enfermedades o tipos de tumor que pueden tratarse con los compuestos según la invención.

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

- carcinomas incluyendo los enumerados anteriormente y/o el de vejiga, páncreas, estómago, tiroides y próstata;

- tumores hematopoyéticos de linaje linfoide, incluyendo leucemias tales como leucemia linfocítica aguda y leucemia linfoblástica aguda, y linfomas, tales como linfoma de células B, linfoma de células T, linfoma de Hodgkin, linfoma de no Hodgkin, linfoma de células pilosas, y linfoma de Burkitt;
- tumores hematopoyéticos de linaje mieloides, incluyendo leucemias mielógenas aguda y crónica y leucemia promielocítica;
- tumores de sistema nervioso central y periférico, incluyendo astrocitoma, neuroblastoma, glioma, y schwannomas;
- tumores de origen mesenquimatoso, incluyendo fibrosarcoma, rhabdomyosarcoma y osteosarcoma; y
- otros tumores, incluyendo melanoma, xeroderma pigmentoso, seminoma, queratoacantoma, cáncer folicular de tiroides, y teratocarcinoma.

Los compuestos de la presente invención son útiles para el tratamiento de pacientes que se han tratado previamente para el cáncer, así como los que no se han tratado anteriormente para el cáncer. Los procedimientos y composiciones de esta invención pueden usarse en tratamientos contra el cáncer de primera línea y de segunda línea. Además, los compuestos de fórmula (X) pueden ser útiles para tratar cánceres resistentes o que no responden al tratamiento.

Los compuestos de la presente invención pueden ser útiles también en el tratamiento de otras afecciones que responden a agentes de estabilización de microtúbulos administrados a través del receptor de folato, incluyendo pero sin limitarse a, artritis, especialmente artritis inflamatoria y otras afecciones inflamatorias mediadas por macrófagos activados, y trastornos del sistema nervioso central tales como enfermedad de Alzheimer.

Además, los pacientes que se tratan con los compuestos de la presente invención pueden recibir una combinación de tratamientos, por ejemplo, con otros agentes contra el cáncer y agentes citotóxicos u otros tratamientos útiles en el tratamiento del cáncer u otras enfermedades proliferativas. En el tratamiento del cáncer, puede ser ventajosa una combinación de compuestos de la presente invención y uno o más agentes adicionales y/u otros tratamientos. El segundo agente puede tener un mecanismo de acción igual o diferente que los compuestos de fórmula (X). Especialmente útiles son combinaciones de fármacos contra el cáncer y fármacos citotóxicos actuando el segundo fármaco elegido de diferente manera o en diferente fase del ciclo celular que el resto activo del fármaco de los presentes compuestos de la presente invención.

Ejemplos de clases de agentes contra el cáncer y agentes citotóxicos incluyen, pero no se limitan a, agentes alquilantes, tales como mostazas nitrogenadas, sulfonatos de alquilo, nitrosoureas, etileniminas y triazenos; antimetabolitos, tales como antagonistas de folato, análogos de purina, y análogos de pirimidina; antibióticos o anticuerpos, tales como anticuerpos monoclonales; enzimas; inhibidores de la farnesil proteína transferasa; agentes hormonales, tales como glucocorticoides, estrógenos/antiestrógenos, andrógenos/antiandrógenos, progestinas, y antagonistas de la liberación de hormona luteinizante; agentes de alteración de microtúbulos, tales como ecteinascidinas o sus análogos y derivados; agentes de estabilización de microtúbulos; productos derivados de plantas, tales como alcaloides de la vinca, epipodofilotoxinas, y taxanos; inhibidores de topoisomerasa; inhibidores de la prenil proteína transferasa; complejos de coordinación de platino; inhibidores de cinasa incluyendo inhibidores de múltiples cinasas y/o inhibidores de cinasa Src o Src/abl; inhibidores de la transducción de señales; y otros agentes usados como agentes contra el cáncer y agentes citotóxicos tales como modificadores de la respuesta biológica, factores de crecimiento, y moduladores inmunitarios. Los compuestos de fórmula X pueden usarse también junto con radioterapia.

Otros ejemplos de agentes contra el cáncer que pueden usarse en combinación con los compuestos de la invención incluyen inhibidores de cinasa Src, 'N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxiethyl)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida, y otros compuestos descritos en la patente estadounidense número 6.596.746 y la solicitud de patente estadounidense número 11/051.208, presentada el 4 de febrero de 2005, incorporada al presente documento como referencia; ixabepilona, un análogo de aza-epotilona B, y/u otros análogos de epotilona descritos en las patentes estadounidenses números 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, publicación de solicitud de patente estadounidense número 2003/0060623, publicada en marzo de 2003; patente alemana número 4138042.8; documentos WO 97/19086, WO 98/22461, WO 98/25929, WO98/38192, WO99/01124, WO99/02224, WO99/02514, WO99/03848, WO99/07692, WO99/27890, WO99/28324, WO 99/43653, WO 99/54330, WO 99/54318, WO 99/554319, WO 99/65913, WO 99/67252, WO 99/67253, WO 00/00485, publicaciones de solicitud de patente estadounidense número 2004/0053910 y 2004/0152708; inhibidores de cinasa dependientes de ciclina que se encuentran en el documento WO 99/24416 (véase también la patente estadounidense número 6.040.321); inhibidores de la prenil proteína transferasa que se encuentran en los documentos WO 97/30992 y WO 98/54966; agentes de la farnesil proteína transferasa que se describen en la patente estadounidense número 6.011.029; anticuerpos frente a CTLA-4 que se describen en la publicación PCT número WO01/14424, y/o un anticuerpo frente a CTLA-4 que se describe en la publicación PCT número WO 00/37504 tal como, por ejemplo, el anticuerpo conocido como CP-675206 (ticilimunab), o ORENCIA®; MDX-010; vinflunina (Javlor™), y Erbitux (cetuximab).

Otros agentes potencialmente útiles en combinación con los compuestos de la presente invención pueden incluir paclitaxel (TAXOL®), docetaxel (TAXOTERE®) agentes mixtos tales como, hidroxiurea, procarbazona, mitotano,

hexametilmelamina, cisplatino y carboplatino; avastina; y herceptina.

5 Las composiciones farmacéuticas preparadas según la presente invención pueden formularse también o coadministrarse con otros agentes terapéuticos que se seleccionan por su utilidad particular en la administración de terapias asociadas con las afecciones mencionadas anteriormente. Por ejemplo, las composiciones farmacéuticas pueden formularse con agentes para prevenir las náuseas, hipersensibilidad e irritación gástrica, tal como antieméticos, y antihistamínicos H1 y H2.

Los otros agentes terapéuticos anteriores, cuando se emplean en combinación con los compuestos de la presente invención, pueden usarse, por ejemplo, en las cantidades indicadas en el Physicians' Desk Reference (PDR) o como se determina de otro modo por un experto en la técnica.

10 Una realización de la invención comprende el uso de los compuestos de presente invención en la preparación de composiciones farmacéuticas para el tratamiento del cáncer, en particular para su uso en la preparación de composiciones farmacéuticas para su uso la administración de fármacos dirigida a tumores que sobreexpresan o preferentemente expresan el receptor de folato. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden administrarse para cualquiera de los usos descritos en el presente documento mediante cualquier medio adecuado, por ejemplo, por vía parenteral, tal como por inyección subcutánea, intravenosa, intramuscular o intrasternal o técnicas de infusión (*por ejemplo*, como suspensiones o disoluciones no acuosas o acuosas inyectables estériles), y/o en formulaciones unitarias de dosificación que contienen vehículos o diluyentes no tóxicos, farmacéuticamente aceptables. Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse, por ejemplo, en una forma adecuada para la liberación inmediata o liberación prolongada. La liberación inmediata o liberación prolongada puede lograrse mediante el uso de composiciones farmacéuticas adecuadas que comprenden los presentes compuestos, o, en particular en el caso de la liberación prolongada, mediante el uso de dispositivos tales como implantes subcutáneos o bombas osmóticas.

25 Composiciones a modo de ejemplo para administración parenteral incluyen disoluciones o suspensiones inyectables que pueden contener, por ejemplo, diluyentes o disolventes no tóxicos, aceptables por vía parenteral, adecuados, tales como manitol, 1,3-butanodiol, agua, solución de Ringer, una solución isotónica de cloruro de sodio (inyección de cloruro de sodio al 0,9 % [solución salina normal] o inyección de dextrosa al 5 %), u otros agentes de dispersión o de humectación y de suspensión adecuados, incluyendo mono- o diglicéridos sintéticos, y ácidos grasos. Las composiciones farmacéuticamente aceptables y/o los procedimientos de administración de los compuestos de la invención pueden incluir el uso de codisolventes incluyendo, pero sin limitarse a etanol, N,N-dimetilacetamida, propilenglicol, glicerol y polietilenglicoles, *por ejemplo*, polietilenglicol 300 y/o polietilenglicol 400, pueden comprender el uso de tensioactivos (agentes tensioactivos farmacéuticamente aceptables que pueden usarse para aumentar la propiedades de propagación o de humectación de un compuesto reduciendo su tensión superficial), incluyendo sin limitación, CREMOPHOR®, SOLUTOL HS 15®, polisorbato 80, polisorbato 20, poloxámero, pirrolidonas tales como N-alkilpirrolidona (*por ejemplo*, N-metilpirrolidona) y/o polivinilpirrolidona; pueden comprender también el uso de uno o más "tampones" (por ejemplo, un componente que confiere una capacidad para resistir el cambio en la acidez o alcalinidad efectiva de un medio tras la adición de incrementos de un ácido o una 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.

40 La cantidad efectiva del compuesto de la presente invención puede determinarla un experto normal en la técnica, e incluye cantidades de dosificación a modo de ejemplo para un ser humano adulto de desde aproximadamente 0,01-10 mg/kg de peso corporal de compuesto activo al día, que pueden determinarse en una única dosis o en forma de dosis divididas individuales, tales como desde 1 hasta 4 veces al día. Un intervalo preferido incluye una dosificación de aproximadamente 0,02 a 5 mg/kg de peso corporal, siendo el más preferido un intervalo de aproximadamente 45 0,05 – 0,3. Se entenderá que el nivel de dosis específico y la frecuencia de dosificación para cualquier sujeto particular puede variare y dependerá de diversos factores incluyendo la actividad del compuesto específico empleado, la estabilidad metabólica y la duración de la acción de ese compuesto, la especie, la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo y la dieta del sujeto, el modo y el tiempo de administración, la tasa de excreción, la combinación de fármacos, y la gravedad de la afección particular. Los sujetos preferidos para el tratamiento incluyen animales, lo más preferentemente especies de mamífero tales como seres humanos, y animales domésticos tales como perros, gatos y similares, sometidos a afecciones asociadas con la estabilización de microtúbulos.

Compuestos de la presente invención, tales como los compuestos dados a conocer en uno o más de los siguientes ejemplos, se han sometido a prueba en uno o más de los ensayos descritos a continuación y/o los ensayos conocidos en el campo, y demuestran un nivel de actividad medible como agentes de estabilización de microtúbulos.

55 ENSAYOS

Ensayo de supervivencia de células clonogénicas

Se sembraron células cancerosas a 3,0E+05 células en un frasco T75 con 10 ml de medio RPMI 1640, libre de ácido fólico, y que contenía suero bovino fetal al 10 % y HEPES 25 mM. Se hicieron crecer las células en un incubador a

37 °C que contenía 5 % CO₂ durante 2 días. En el día 2, se retiraron los sobrenadantes de los frascos, y se dividieron los frascos en 2 grupos. Se incubó un grupo de células con 5 ml de medio que contenía 100 M de ácido fólico (Sigma) durante 30 minutos y los otros se hicieron crecer en 5 ml de medio sin ácido fólico añadido. Entonces se trataron las células con 20 nM de epotilona, análogo de epotilona, epotilona conjugada, o análogo de epotilona conjugada durante una hora. Al final de la incubación, se retiraron los fármacos de los frascos y se lavaron las células con tampón PBS 3x. Tras lavar, se añadieron 5 ml de medio completo en cada frasco, y se hizo crecer la célula en el incubador de CO₂ durante 23 horas. A la mañana siguiente, se retiraron las células de los frascos mediante tripsinización, se determinaron los números de células, y entonces se sembraron en placa las células en placas de 6 pocillos. Diez días tras sembrar en placa se tiñeron las colonias con violeta cristal y se contaron. Se determinaron las fracciones que sobreviven.

Ensayo de citotoxicidad/proliferación de MTS *in vitro*

Se evaluó la citotoxicidad *in vitro* en células tumorales usando un ensayo colorimétrico a base de tetrazolio que se aprovecha de la conversión metabólica de MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-3-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfenil)-2H-tetrazolio, sal interna) en una forma reducida que absorbe luz a 492 nm. Se sembraron las células 24 h antes de la adición de la epotilona, análogo de epotilona, epotilona conjugada, o análogo de epotilona conjugada. Tras una incubación de 72 horas a 37 °C con el compuesto diluido en serie, MTS, en combinación con el agente de acoplamiento de electrones metosulfato de fenazina, se añadió a las células. La incubación se continuó durante 3 horas, entonces se midió la absorbancia del medio a 492 nm con un espectrofotómetro para obtener el número de células que sobreviven con respecto a las poblaciones control. Los resultados se expresan como concentraciones citotóxicas medias (valores CI₅₀).

Ensayo de receptor de folato

Todos los procedimientos de preparación de muestras usados para el ensayo de FR se realizaron a 4 °C. Se homogeneizaron muestras de tejido en tampón de homogeneización (Tris 10 mM, pH 8,0, 0,02 mg/ml de cada una de leupeptina y aprotinina; 1 ml de tampón/50 mg de tejido) usando un homogeneizador PowerGen 125. Se retiró el residuo grande mediante centrifugación suave (3000 X g durante 15 min.). Entonces se recogieron los sedimentos de membrana mediante centrifugación a 40.000 X g durante 60 min. y se resuspendieron en tampón de solubilización (Tris 50 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, n-octil-(3-D-glucopiranosido 25 mM, EDTA 5 mM, y azida de sodio al 0,02 %). Se retiró el Material insoluble mediante una segunda centrifugación a 40.000 X g 60 min., y se determinó la concentración total de proteína de los sobrenadantes mediante el procedimiento del ácido bicinconínico (BCA) (Pierce Chemical). Entonces se diluyó cada muestra hasta 0,25 mg/ml en tampón de solubilización, y se colocaron 100 µl dentro de cada uno de dos microconcentradores Microcon-30 (30.000 corte de PM, Millipore). Entonces se centrifugaron las muestras a 14.000 X g durante 10 min. a temperatura ambiente para hacer pasar todo el líquido a través de la membrana, así como retener los FR solubilizados sobre la superficie de la membrana del microconcentrador. Todas las etapas de centrifugación posteriores se realizaron usando estos mismos parámetros. Entonces se añadieron 55 µl de tampón acetato 30 mM (pH 3,0) a cada microconcentrador, seguido de una etapa de centrifugación. A continuación, se dispensaron 55 µl de solución salina tamponada con fosfato (PBS) en cada microconcentrador, seguido de otra centrifugación. Entonces se añadieron 50 µl de agente de unión a [³H]ácido fólico ([³H]ácido fólico 120 nM (Amersham) en Na₂PO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1,8 mM, pH 7,4, que contenía NaCl 500 mM, KCl 2,7 mM, y n-octil-β-D-glucopiranosido 25 mM) o 50 µl de un agente de competición (reactivo de unión más ácido fólico no marcado 120 mM) a los concentradores apropiados. Tras una incubación de 20 min. a temperatura ambiente, se lavaron/centrifugaron los concentradores tres veces con 75 µl de n-octil-β-D-glucopiranosido 50 mM, NaCl 0,7 M en PBS, pH 7,4. Tras el lavado final, se recuperaron las fracciones retenidas que contenían los FR solubilizados de la superficie de la membrana de los microconcentradores mediante dos enjuagues con 100 µl de PBS que contenía Triton X-100 al 4 %. Entonces se contaron las muestras en un contador de centelleo líquido (Packard Bioscience). Los valores de cuentas por minuto (cpm) se convirtieron en picomoles de FR basándose en las cpm de un patrón conocido, y los resultados finales se normalizaron con respecto al contenido en proteína de muestra.

Animales y Tumores

En estos estudios se usaron ratones CD2FI hembra (Harlan Sprague-Dawley Inc., 20-22 g) que se mantenían en un ambiente controlado y a los que se proporcionaba agua y alimento a voluntad. Se usaron el carcinoma de pulmón murino Madison 109 (M109) FRα(-) (Marks *et al.*, 1977) y la variante 98M109 que expresa FR (FRα(+)) para evaluar la eficacia de la epotilona, análogo de epotilona (por ejemplo, derivado de epotilona), conjugado folato-epotilona, o conjugado de folato-análogo de epotilona. Además, para este fin se usó también el carcinoma epidermoide de cabeza y cuello humano KB que se hizo crecer en ratones atímicos.

Tratamiento farmacológico y evaluación de la eficacia antitumoral

Para la administración de epotilona o análogos de epotilona a ratones, se usó un excipiente que consistía en lo siguiente: CREMOPHOR®/etanol/agua (1:1:8, v/v). En primer lugar se disolvieron los compuestos en una mezcla de de CREMOPHOR®/etanol (50:50). La dilución final hasta la concentración de dosificación requerida se realizó menos de 1 h antes de la administración del fármaco. Se administraron a los ratones los agentes mediante inyección

IV en bolo a través de la vena de la cola. Se prepararon conjugados de folato-epotilona o conjugados de folato-análogo de epotilona en solución salina tamponada con fosfato estéril y se administraron a los ratones por inyección en bolo IV a través de la vena de la cola a un volumen de 0,01 ml/g de ratones. El tratamiento de cada animal se basó en el peso corporal individual.

- 5 Al inicio del experimento se reunió el número requerido de animales necesario para detectar una respuesta significativa y se administró a cada uno una inoculación subcutánea de una suspensión de tejido tumoral (2 % p/v). Se dejó crecer los tumores durante 4 días. En el cuarto día, se distribuyeron los animales de manera uniforme en diversos grupos de tratamiento y control. Los animales tratados se examinaron diariamente par determinar la toxicidad/mortalidad relacionada con el tratamiento. Se pesó cada grupo de animales antes del inicio del tratamiento (Wt1) y entonces de nuevo tras la última dosis del tratamiento (Wt2). La diferencia en el peso corporal (Wt2-Wt1) proporciona una media de la toxicidad relacionada con el tratamiento.

Se determinó la respuesta tumoral mediante la medición de los tumores con un calibrador dos veces a la semana, hasta que los tumores alcanzaron un nivel "objetivo" predeterminado de 1 g. Los pesos tumorales (mg) se estimaron a partir de la fórmula:

15
$$\text{Peso tumoral} = (\text{longitud} \times \text{anchura}^2) \div 2$$

- Se evaluó la actividad antitumoral a la dosis máxima tolerada (DMT) que se define como el nivel de dosis inmediatamente por debajo del cual se produce toxicidad excesiva (es decir más de una muerte). Cuando se produce una muerte, se registra el día de la muerte. Se consideró que los ratones tratados que murieron antes de que sus tumores hubieran alcanzado el tamaño objetivo habían muerto por la toxicidad del fármaco. Ningún ratón control murió portando tumores menores que el tamaño objetivo. Se consideró que los grupos de tratamiento con más de una muerte provocada por la toxicidad del fármaco se habían sometido a tratamientos excesivamente tóxicos y sus datos no se incluyeron en la evaluación de la eficacia antitumoral de un compuesto.

- El criterio de valoración de respuesta tumoral se expresó en cuanto al retardo de crecimiento tumoral (valor T-C), que se define como la diferencia en el tiempo (días) requerido para que los tumores tratados (T) alcancen un tamaño objetivo predeterminado en comparación con los del grupo control (C).

Para estimar la destrucción de células tumorales, se calculó en primer lugar tiempo para el doble del volumen tumoral (TVDT) con la fórmula:

30
$$\text{TVDT} = \text{Tiempo medio (días) para que los tumores control alcancen el tamaño objetivo} - \text{Tiempo medio (días) para que los tumores control alcancen el tamaño objetivo}$$

y,

$$\text{Log destrucción celular} = T-C \div (3,32 \times \text{TVDT})$$

Las evaluaciones estadísticas de los datos se realizaron usando la prueba de Wilcoxon generalizada de Gehan.

ABREVIATURAS

- 35 En el presente documento se usan las siguientes abreviaturas en los esquemas y ejemplos para facilidad de referencia:

- CBZ-OSu = N-(Benciloxicarbonilo)succinimida
 DCM = diclorometano
 DEA = dietilamina
 40 DIAD = azodicarboxilato de diisopropilo
 DIPEA = diisopropiletilamina
 DMA = dimetilamina
 DMF = dimetilformamida
 DMSO = dimetilsulfóxido
 45 EDC = clorhidrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida
 EtOH = etanol
 EtOAc = acetato de etilo
 FR = receptor de folato
 HOBt = n-hidroxibenzotriazol
 50 HPCL = cromatografía de líquidos de alta resolución
 iPr-OH o IPA = alcohol isopropílico
 CL/EM = cromatografía líquida/espectrometría de masas
 LDA = diisopropilamida de litio
 MeOH = metanol

OTES = o-trietilsililo;
 OMs = mesilato;
 Ph = fenilo
 Pd/C = paladio sobre carbono
 5 PyBOP = hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxitripirrolidinofosfonio
 Py = piridilo
 RT = temperatura ambiente
 Sat. = saturado
 THF = tetrahidrofurano
 10 TFA = ácido trifluoroacético
 CCF = cromatografía de capa fina
 TESCL = clorotrietilsilano
 UV = ultravioleta.

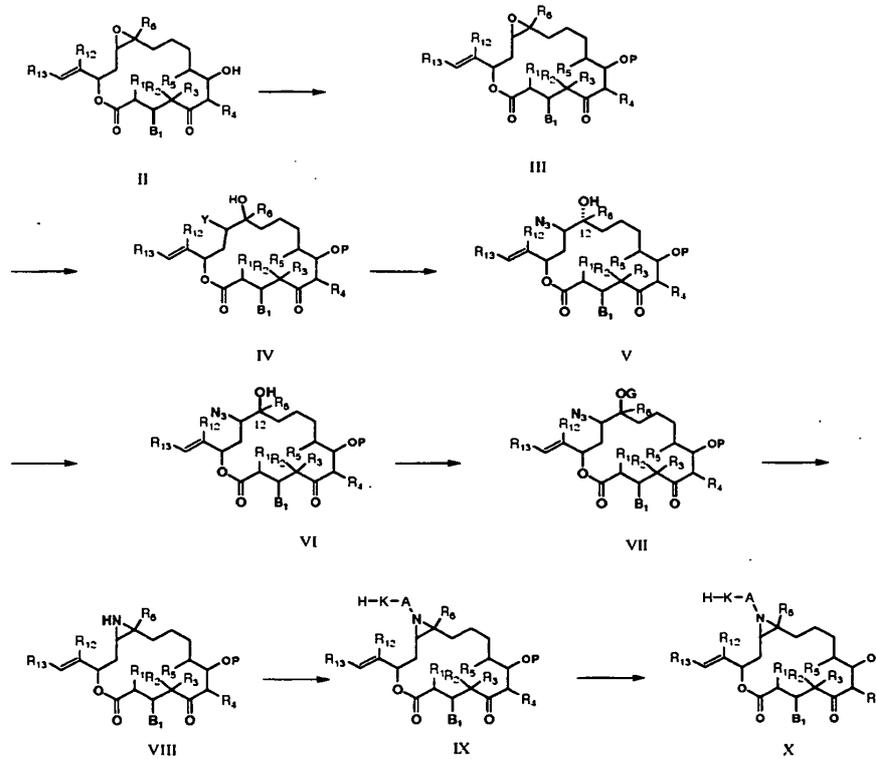
PROCEDIMIENTOS DE PREPARACIÓN

- 15 Los compuestos de la presente invención pueden prepararse en general según los siguientes esquemas y el conocimiento de un experto en la técnica, y/o usando procedimientos expuestos en las patentes estadounidenses números 6.605.599; 6.831.090; 6.800.653; 6.291.684; 6.719.540; 7.173.884, publicación de solicitud de patente estadounidense número 2005/0002942 y *Organic Letters*, 2001, 3, 2693-2696, cuyas descripciones se incorporan al presente documento como referencia y/o en los ejemplos que siguen.
- 20 Tal como se muestra en el esquema 1, un compuesto de fórmula X puede prepararse a partir de un compuesto de fórmula II. Los compuestos de fórmula II pueden obtenerse mediante fermentación (véase, por ejemplo Gerth *et al.*, "Studies on the Biosynthesis of Epothylones: The Biosynthetic Origin of the Carbon Skeleton", *Journal of Antibiotics*, Vol. 53, No. 12 (diciembre de 2000), y Hofle *et al.*, "Epothylone A y B- Novel 16-Membered Macrolides: Isolation, Crystal Structure, and Conformation in Disolution", *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, Vol. 35, No. 13/14, 1567-1,569
- 25 (1996), cuyas descripciones se incorporan al presente documento como referencia) o mediante síntesis (véase, por ejemplo Vite *et al.* patentes estadounidenses números 6.605.599; 6.242.469; 6.867.333 y publicación de solicitud de patente estadounidense 2006/004065, y Johnson *et al.* *Organic Letters*, 2000, 2:1537-1540) cuyas descripciones se incorporan al presente documento como referencia en su totalidad). Por ejemplo un compuesto de fórmula II en la que R₂, R₃, R₄, R₅ y R₁₂ son metilo, B₁ es hidroxilo, R₁ y R₆ son hidrógeno, y R₂ es 2-metilthiazol-4-ilo se denomina as
- 30 epotilona A y puede obtenerse a partir de la fermentación de *Sorangium cellulosum* tal como se mencionó anteriormente. Un compuesto de fórmula II puede convertirse en un compuesto de fórmula III en la que P es un grupo protector de sililo tal como trietilsililo, t-butildimetilsililo, t-butildifenilsililo, triisopropilsililo, y similares (véase, por ejemplo, Greene *et al.*, "Protective Groups in Organic Synthesis", John Wiley and Sons, Inc.). Por ejemplo, un compuesto de fórmula III en la que P es trietilsililo puede prepararse mediante tratamiento de un compuesto de
- 35 fórmula II con clorotrietilsilano en presencia de base de Hunig. En el caso en que B₁ es hidroxilo en el compuesto de fórmula II, entonces B₁ se convertiría también en el correspondiente silil éter. Una halohidrina de fórmula IV (Y es Cl, Br o I) puede prepararse a partir de un compuesto de fórmula III mediante tratamiento con una sal de haluro de metal mediante procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la apertura del epóxido usando eterato de bromuro de magnesio a baja temperatura (de -20 a -5 °C) puede proporcionar halohidrinas diastereoméricas, en las
- 40 que Y es bromo. Un compuesto de fórmula V puede prepararse a partir de un compuesto de fórmula IV mediante desplazamiento del halógeno usando, por ejemplo, azida de sodio en un disolvente polar tal como dimetilformamida. Un experto habitual reconocerá que la estereoquímica en C₁₂ tal como se representa en el esquema I no debe interpretarse como limitante, sino más bien a modo de ejemplo. Si se desea, puede lograrse la inversión de la estereoquímica en la posición C₁₂ siguiendo el protocolo de Mitsunobu que está bien establecido en la técnica. Por
- 45 ejemplo, el tratamiento de un compuesto de fórmula V con ácido p-nitrobenzoico, dietilazodicarboxilato, y trifetilfosfina proporciona el correspondiente éster de nitrobenzoato, que puede entonces escindirse por hidrólisis del éster leve usando, por ejemplo, disoluciones metabólicas de amoniaco para proporcionar un compuesto de fórmula VI. De nuevo, la estereoquímica para C₁₂ tal como se representa para el compuesto VI no es limitante, y se representa como tal para mostrar que el tratamiento del compuesto V tal como se describe invertirá la
- 50 estereoquímica en esa posición. Alternativamente, pueden usarse otros ácidos orgánicos, azodicarboxilatos, y organofosfinas para efectuar la inversión de Mitsunobu. Un compuesto de fórmula VII en la que OG es un grupo saliente tal como mesilato, tosilato, nosilato, triflato y similares puede prepararse a partir de un compuesto de fórmula VI mediante procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, el tratamiento de VI con cloruro de metanosulfonilo y trietilamina en un disolvente orgánico adecuado tal como diclorometano proporciona un
- 55 compuesto de fórmula VII en la que OG es mesilato. Un compuesto de fórmula VIII puede prepararse a partir de un compuesto de fórmula VII mediante la reducción del grupo azido con un agente reductor tal como una organofosfina (por ejemplo, trimetilfosfina). Alternativamente, un compuesto de fórmula VIII puede prepararse directamente a partir de un compuesto de fórmula VI usando un agente reductor de organofosfina tal como trifetilfosfina. Un compuesto de fórmula IX puede prepararse a partir de un compuesto de fórmula VIII mediante procedimientos conocidos en la
- 60 técnica (véase, por ejemplo, patente estadounidense número 6.800.653; y Regueiro-Ren *et al.*, *Organic Letters*, 2001, 3, 2693-2696). Por ejemplo, un compuesto de fórmula IX en la que H-K-A- es 2-hidroxietilo puede prepararse a partir de un compuesto de fórmula VIII mediante alquilación del anillo de aziridina usando, por ejemplo, 3-bromoetanol en exceso y una base tal como carbonato de potasio. Un compuesto de fórmula X puede prepararse a

partir de un compuesto de fórmula IX mediante eliminación de los grupos protectores de silil éter usando procedimientos conocidos en la técnica (véase, 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 fórmula IX con ácido trifluoroacético en diclorometano efectúa la desprotección para proporcionar un compuesto de fórmula X.

5

ESQUEMA 1



El esquema 2 muestra un procedimiento para preparar un análogo de folato o derivado V y adaptador bivalente T-Q que tiene la fórmula XI, a continuación, que puede usarse con compuestos de la invención para preparar moléculas conjugadas para la administración de fármacos dirigida, por ejemplo, tal como para la fórmula I, descrita anteriormente. Tal como se muestra en el esquema 2, pueden ensamblarse un análogo de folato y adaptador bivalente usando procedimientos conocidos en la técnica, especialmente en el caso en que V es ácido fólico o un análogo de ácido fólico, tal como se describe, por ejemplo, por Jackson, *et al.*, *Advanced Drug Delivery Rev.* 56(2004) 1111-1125, cuya descripción se incorpora al presente documento por referencia, y T-Q es un péptido. Por ejemplo, folato de peptidilo XI puede prepararse tal como se muestra en el esquema 2. El acoplamiento de péptidos secuencial de una resina de poliestireno cargada con cisteína con aspartato protegido con Fmoc, arginina, aspartato, y entonces glutamato puede efectuarse usando PyBOP como agente de acoplamiento y piperidina como agente de desprotección de Fmoc. Puede prepararse ácido pterico protegido con N¹⁰-trifluoroacetamida en dos etapas mediante conversión enzimática (carboxipeptidasa G) del ácido fólico en ácido pterico, seguido de protección de N¹⁰ usando anhídrido trifluoroacético. A continuación, el acoplamiento del ácido pterico protegido con N¹⁰ al péptido unido a resina seguido de la escisión de la resina con ácido trifluoroacético y la eliminación del grupo N¹⁰-trifluoroacetilo usando hidróxido de amonio proporciona un fragmento V-T-Q de un compuesto de fórmula I en la que V es ácido fólico y T-Q es -Asp-Arg-Asp-Cys-OH. Alternativamente, podrían usarse análogos de ácido pterico en lugar de ácido pterico y otros aminoácidos, podrían usarse en lugar de los ilustrados en el esquema 2.

10

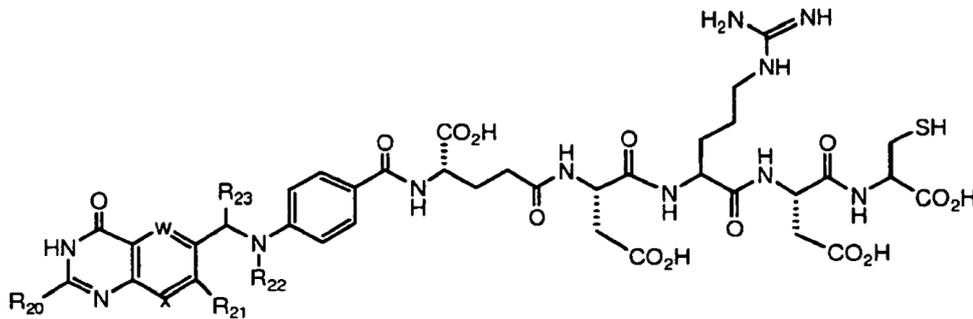
15

20

ESQUEMA 2

Resina de H-Cys-(4-metoxitritil)-2-clorotritil (carga 0,57 mmol/g)

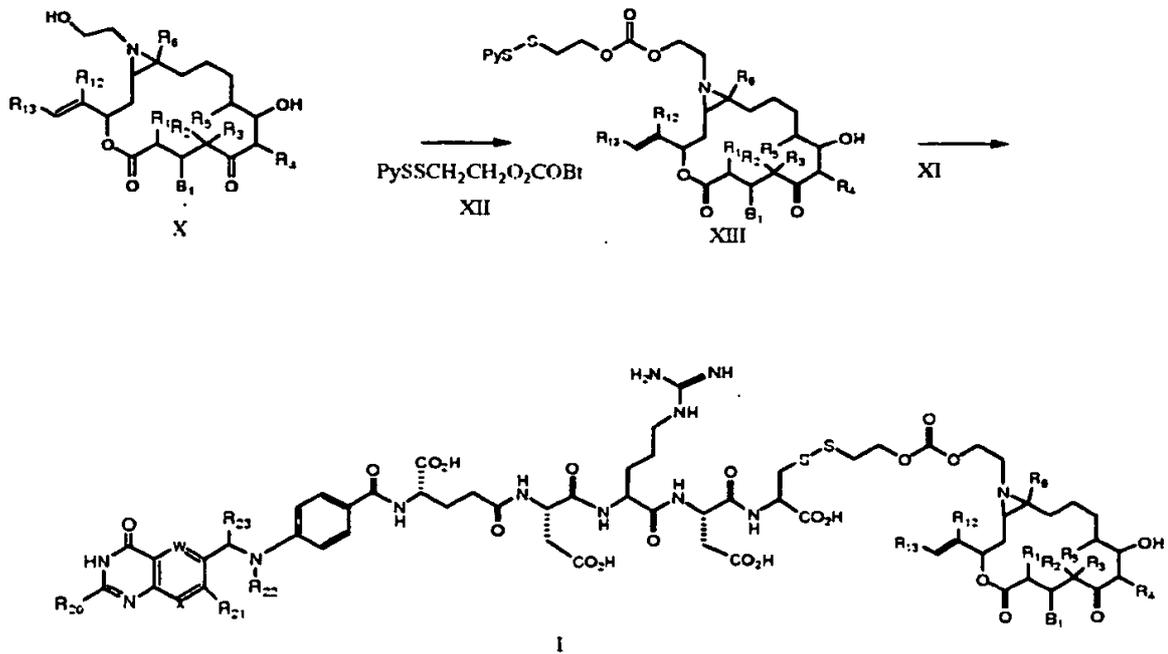
- 1) Fmoc-Asp(OtBu)-OH, PyBOP, DIPEA, DMF, entonces piperidina
- 2) Fmoc-Arg(Pbf)-OH, PyBOP, DIPEA, DMF, entonces piperidina
- 3) Fmoc-Asp(OtBu)-OH, PyBOP, DIPEA, DMF, entonces piperidina
- 4) Fmoc-Glu-OtBu, PyBOP, DIPEA, DMF, entonces piperidina
- 5) N¹⁰TFA ácido pterico, PyBOP, DIPEA, DMSO
- 6) 92,5% de TFA, 2,5% de H₂O, 2,5% de iPr₃SiH, y 2,5% de etanoditiol
- 7) NH₄OH ac. entonces HCl ac.



XI

El esquema 3, a continuación, muestra un procedimiento para usar los derivados de epotilona de la presente invención para preparar una molécula conjugada fórmula I, para su uso en administración de fármacos dirigida. Tal como se muestra en el esquema 3, el ensamblaje de compuestos de fórmula I puede lograrse mediante el acoplamiento de compuestos de fórmula X con un fragmento V-T-Q mediante la incorporación por etapas de un adaptador liberable M. A modo de ilustración, un compuesto de fórmula X en la que -A-K-H es -CH₂CH₂OH puede convertirse en un carbonato de disulfaniletilo XIII usando un compuesto de benzotriazol activado de fórmula XII. Un compuesto de fórmula XII puede prepararse a partir de mercaptoetanol, cloruro de metoxicarbonil-sulfenilo, y una 2-mercaptopiridina opcionalmente sustituida para proporcionar un producto intermedio 2-(2-piridin-2-il)disulfanil)etanol, que puede convertirse entonces en un compuesto de fórmula XII mediante tratamiento con difosgeno y un 1-hidroxibenzotriazol opcionalmente sustituido. El posterior intercambio de disulfuro con un folato de peptidilo tal como XI proporciona un compuesto de fórmula I en la que 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.

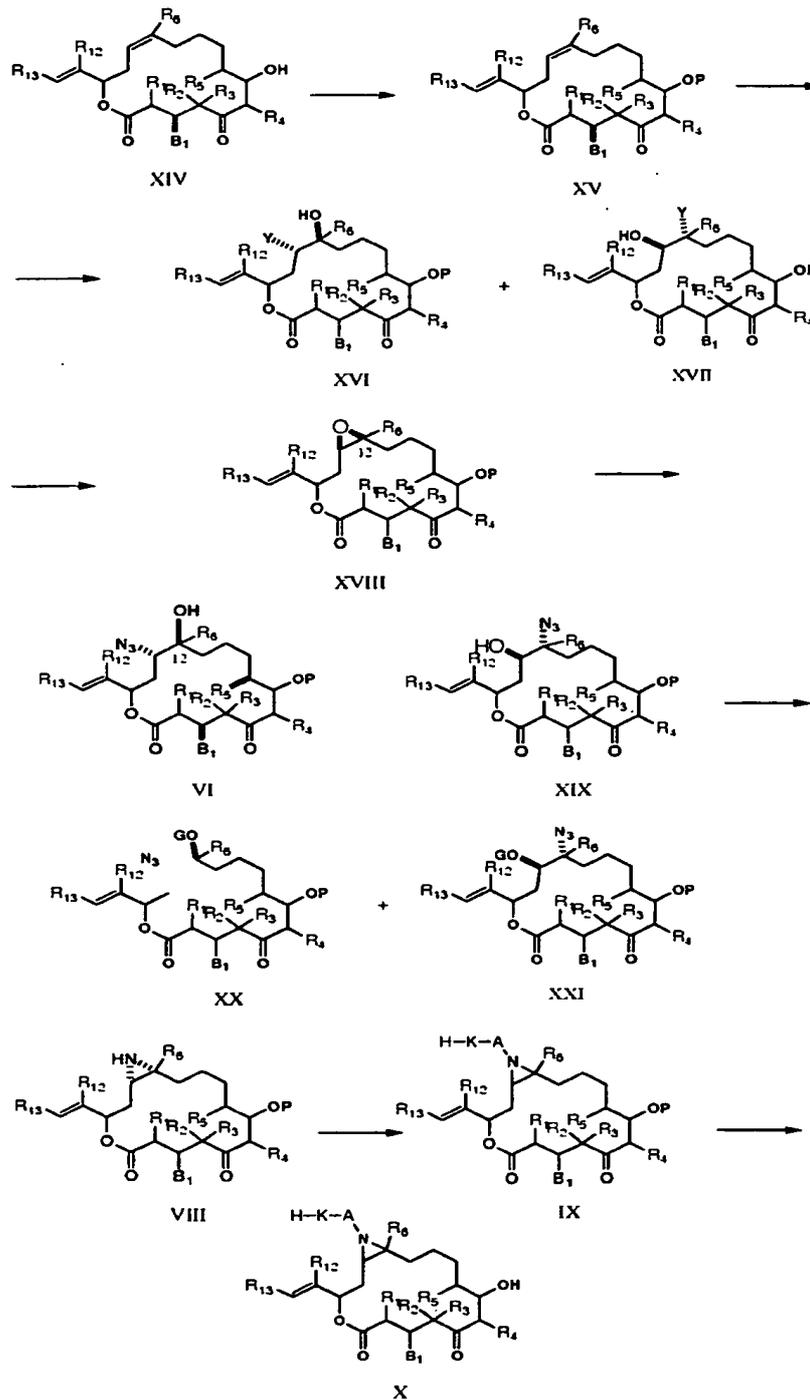
ESQUEMA 3



El esquema 4 ilustra un procedimiento alternativo para preparar un compuesto de fórmula X a partir de un compuesto de fórmula XIV (véase, solicitud de patente estadounidense número 60/940,088, presentada el 25 de mayo de 2006, incorporada al presente documento en su totalidad como referencia). Los compuestos de fórmula XIV pueden obtenerse mediante procedimientos bien conocidos en el campo, por ejemplo, mediante fermentación (véase, por ejemplo Gerth *et al.*, "Studies on the Biosynthesis of Epothylones: The Biosynthetic Origin of the Carbon Skeleton", Journal of Antibiotics, Vol. 53, No. 12 (diciembre de 2000), y Hofle *et al.*, "Epothylone A y B-Novel 16-Membered Macrolides: Isolation, Crystal Structure, and Conformation in Disolution", Angew. Chem. Int. Ed. Engl., Vol. 35, No. 13/14, 1567-1569 (1996), cuyas descripciones se incorporan al presente documento como referencia) o mediante síntesis total (véase, por ejemplo Vite *et al.* patentes estadounidenses números 6.605.599; 6.242.469; 6.867.333 y publicación de solicitud de patente estadounidense 2006/004065, cuyas descripciones se incorporan al presente documento como referencia en su totalidad). Por ejemplo un compuesto de fórmula XIV en el que R₂, R₃, R₄, R₅ y R₁₂ son metilo, B₁ es hidroxilo, R₁ y R₆ son hidrógeno, y R₂ es 2-metiliazol-4-ilo se denomina epotilona C y puede obtenerse a partir de la fermentación de *Sorangium cellulosum* tal como se mencionó anteriormente. Un compuesto de fórmula XIV puede convertirse en un compuesto de fórmula XV en la que P es un grupo protector de sililo tal como trietilsililo, t-butildimetilsililo, t-butildifenilsililo, triisopropilsililo, y similares (véase, por ejemplo, Greene *et al.*, "Protective groups in Organic Synthesis", John Wiley and Sons, Inc.). Por ejemplo, un compuesto de fórmula XV en la que P es trietilsililo puede prepararse mediante el tratamiento de un compuesto de fórmula XIV con clortrietilsilano en presencia de base tal como la base de Hunig. En el caso en que B₁ sea hidroxilo en el compuesto de fórmula XIV, entonces B₁ se convertiría en el correspondiente silil éter. Una halohidrina de fórmula XVI o XVII (Y es Cl, Br o I) puede prepararse a partir de un compuesto de fórmula XV mediante tratamiento con un agente de halogenación tal como Y₂. Por ejemplo, la adición electrofílica en disolventes polares tales como acetonitrilo usando yodo puede proporcionar de manera estereoselectiva halohidrinis regioisoméricas de fórmulas XVI y XVII, en las que Y es yodo. Alternativamente pueden usarse también N-halo-succinimidas para la misma transformación. Un compuesto de fórmula XVIII puede prepararse a partir de compuestos de fórmulas XVI y/o XVII mediante cierre del anillo de epóxido en presencia de bases tales como trietilamina o base de Hunig en un sistema de disolvente polar/acuoso tal como acetonitrilo/agua. Si se desea, el compuesto XIV puede transformarse directamente en compuestos de fórmula XVI y/o XVII (en la que P es H), que podría entonces convertirse en el epóxido XVIII (en el que P es H). Un compuesto de fórmula XVIII puede transformarse en los azido-alcoholes de fórmulas VI y XIX mediante desplazamiento de azida en presencia de sales de azida inorgánicas o azidas de tetra-alquilamonio en disolventes alcohólicos. En el caso en que P es un grupo protector de sililo, los compuestos de fórmulas XX y/o XXI en las que OG es un grupo saliente tal como mesilato, tosilato, nosilato, triflato y similares pueden prepararse a partir de compuestos de fórmulas VI y/o XIX mediante procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, el tratamiento de VI y/o XIX con cloruro de metanosulfonilo y trietilamina en un disolvente orgánico adecuado tal como diclorometano proporciona compuestos de fórmulas XX y XXI en las que OG es mesilato. Un compuesto de fórmula VIII puede prepararse a partir de compuestos de fórmulas XX y/o XXI mediante la reducción del grupo azido a través de procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, el compuesto VIII puede prepararse a partir de compuestos de fórmulas XX y/o XXI a través de la reacción con un agente reductor tal como una organofosfina (por ejemplo, trimetilfosfina) en disolventes polares tales como acetonitrilo. Alternativamente, cuando P es H, el compuesto de

fórmula VIII puede prepararse directamente a partir de compuestos de fórmulas VI y/o XIX mediante la reducción del grupo azido con un agente reductor tal como una organofosfina (por ejemplo, trifenilfosfina) en disolventes polares tales como acetonitrilo. Un compuesto de fórmula IX puede prepararse a partir de un compuesto de fórmula VIII mediante procedimientos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, la patente estadounidense número 6.800.653; y Regueiro-Ren *et al.*, *Organic Letters*, 2001, 3, 2693-2696). Por ejemplo, un compuesto de fórmula IX en la que H-K-A- es 2-hidroxietilo puede prepararse a partir de un compuesto de fórmula VIII mediante alquilación del anillo de aziridina usando, por ejemplo, 2-bromoetanol en exceso y una base tal como carbonato de potasio. En caso de que P sea un trialkilsililo, un compuesto de fórmula X puede prepararse a partir de un compuesto de fórmula IX mediante eliminación de los grupos protectores de silil éter usando procedimientos conocidos en la técnica (véase, 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 fórmula IX con ácido trifluoroacético en diclorometano efectúa la desprotección para proporcionar un compuesto de fórmula X.

ESQUEMA 4

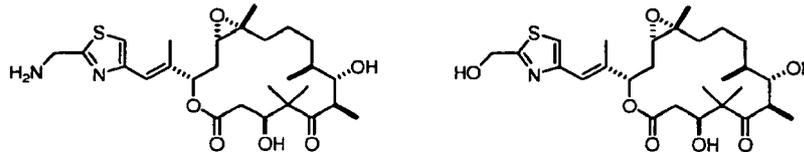


La invención se describirá ahora adicionalmente con referencia a los siguientes ejemplos ilustrativos.

Ejemplos

EJEMPLO 1: Análogos de epotilona conjugados con folato

5 Tal como se describe en la descripción detallada anterior, se describen análogos y derivados de folato en Vlahov. En investigación y desarrollo dirigidos al receptor de folato que selecciona como diana células tumorales de compuestos de epotilona conjugada y análogo de epotilona, se conjugaron varios compuestos con folato. Por ejemplo, el compuesto AA y compuesto BB se consideraron candidatos para la conjugación al ácido fólico:



COMPUESTO AA

COMPUESTO BB

10 El compuesto AA tiene actividad en ensayos clínicos en fase II, y se prepararon seis conjugados de folato del compuesto AA (compuestos AA.I a AA.VI; véase la figura 1) y se sometieron a prueba opcionalmente para determinar la estabilidad química, la unión a FR, y la actividad mediada por FR en cultivo celular.

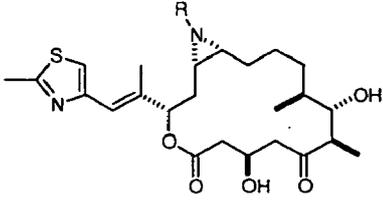
15 La unión de estos conjugados de folato del compuesto AA a FR se determinó en un ensayo que mide el desplazamiento del ácido fólico radiomarcado del FR expresado en células tumorales KB que han crecido hasta confluencia. El hallazgo de los conjugados de folato de los compuestos AA.I y AA.II a FR se consideró aceptable [afinidad relativa (AR) >0,25; AR de ácido fólico = 1,0]. Sin embargo, sorprendentemente, ninguno de los conjugados del compuesto AA mostrado en la figura 1 presentó citotoxicidad apreciable frente a células tumorales KB en ensayos antiproliferación que miden la incorporación de ³H-timidina (datos no mostrados).

20 Puesto que los conjugados del compuesto AA mostraron una citotoxicidad decepcionante contra las células tumorales, se realizaron estudios usando tres conjugados del compuesto BB (compuestos BB.I a BB.III). El compuesto BB se conoce también como epotilona F, y es un análogo del compuesto AA, en el que el grupo 21-amino se sustituye por un grupo 21-hidroxilo. Mientras que el compuesto BB.II (figura 2) presentaba citotoxicidad a concentraciones elevadas, la actividad no se atenúa en estudios de competición usando exceso de ácido fólico. Por lo tanto, la citotoxicidad observada se atribuyó a una liberación no específica del compuesto BB.II.

25 En la técnica se conocen otros análogos de epotilona, por ejemplo, aziridinil-epotilonas (véase, por ejemplo, patente estadounidense número 6.399.638; Regueiro-Ren, A, *et al.* (2001) *Org. Letters.* 3:2693-96) y muestran una potente citotoxicidad antitumoral. Por ejemplo, se realizó un ensayo de MTS que comparaba la potencia citotóxica relativa de varios análogos de epotilonas contra un par de líneas de células cancerosas resistentes a taxanos (HCTVM46 y A2790Tax) (véase la tabla 1). HCTVM46 es una línea celular de carcinoma de colon humana derivada de la línea original HCT116 sensible, y es resistente a taxanos debido a la sobreexpresión del transportador de eflujo de fármaco p-glicoproteína de 170 kD. A2780Tax es una línea celular de carcinoma de ovario humana derivada de la línea A2780 original, y es resistente a paclitaxel como resultado de una mutación en la secuencia del aminoácido tubulina que perjudica la capacidad de paclitaxel para unirse.

35 Tal como se muestra en la tabla 1, diversos análogos de aziridinil-epotilona (compuestos CC-EE) muestran una potente actividad antitumoral contra las líneas celulares de carcinoma tanto de colon HCT116 como de ovario A2780, en comparación con otros agentes antitumorales conocidos, por ejemplo, paclitaxel, compuesto AA, y epotilona B.

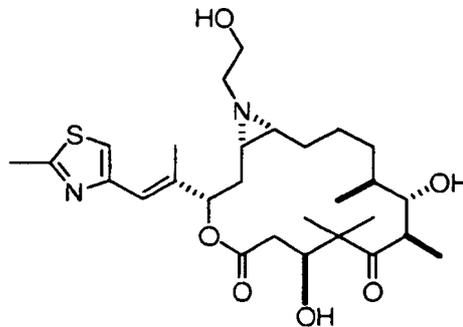
Tabla 1. Actividad *In vitro* de 12,13-aziridinil-epotilonas

					
Compuesto	R	Cl ₅₀ de HCT116 (nM) ¹	Razón R/S ²	Cl ₅₀ de A2780 (nM) ¹	Razón R/S 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
Epotilona B	--	0,40 ± 0,13	0,5	0,23 ± 0,09	2,5

Cl₅₀ media ± DE calculada a partir de cuatro experimentos separados.
²Razón R/S = Cl₅₀ de HCT116/ Cl₅₀ de HCT116VM461
³Razón R/S = Cl₅₀ de A2780/ Cl₅₀ de A2780Tax

5 A pesar de las actividades antitumorales de los compuestos de aziridinil-epotilona, los únicos grupos hidroxilo en estas moléculas disponibles para la conjugación a folato son aquéllos que se encuentran en los átomos de carbono C₃ y C₇. En consecuencia, habiendo investigado varios compuestos y análogos de epotilona, sigue existiendo un reto de descubrir un compuesto que estuviera fácilmente disponible para la conjugación a folato, y que demostrara actividad por medio de la liberación específica del resto de epotilona activo en las células tumorales.

Se descubrió el compuesto G de aziridinil-epotilona, que tiene la fórmula.



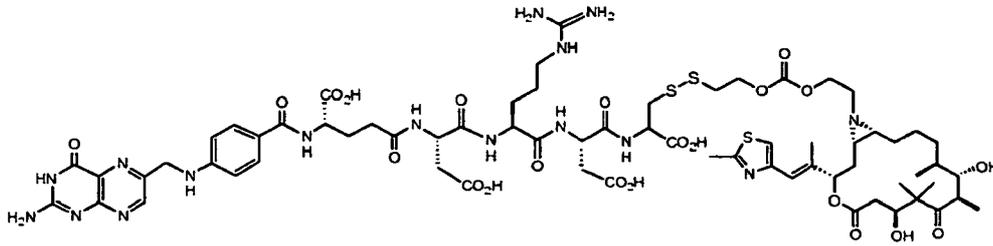
10 COMPUESTO G

El compuesto G (véanse los ejemplos 2 y 3) demostró sorprendentemente facilidad para conjugarse con ácido fólico para formar el compuesto J (véase el ejemplo 2) con afinidad relativa de 0,77 por el receptor de folato, en comparación con ácido fólico.

15 De manera inesperada, el grupo hidroxilo polar en la cadena lateral de aziridina no afectaba de manera adversa la actividad antitumoral de los análogos de aziridina-epotilona. Esto es importante porque es el análogo de aziridina-epotilona, por ejemplo, el compuesto G, que media los efectos antitumorales tras la liberación del ácido fólico. La potencia del compuesto G, y otros tres análogos de epotilona altamente potentes (ixabepilona, compuesto AA, y compuesto BB) se evaluaron mediante el ensayo de formación de colonias que se describió anteriormente. Se determinó la concentración necesaria para destruir el 90 % de las células cancerosas KB clonogénicas (Cl₉₀) tras una duración de exposición a fármaco de 17 horas. Tal como se muestra en **la figura 3**, el compuesto G presentaba una Cl₉₀ de 4,3 nM y era ~2, 4 y 6 veces más potente que el compuesto CC, compuesto AA, e ixabepilona, respectivamente.

25 La conjugación del compuesto G para formar el compuesto J no afectaba a la actividad antitumoral del compuesto G. El compuesto J mostró una actividad citotóxica sustancial contra las células tumorales *in vivo*. En el modelo de tumor FRA(+) de KB *in vivo*, el compuesto J mostró actividad tanto a su dosis máxima tolerada (DMT) como a dos niveles de dosis inferiores que producían toxicidad mínima (véase **la figura 4**). Por el contrario, ixabepilona era activa sólo a su DMT (5 µmol/kg). Cuando se comparó a las DMT, el compuesto J produjo efectos antitumorales

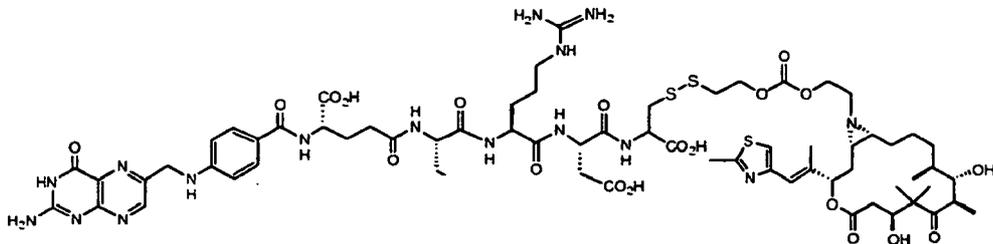
superiores que ixabepilona (figura 4).



COMPUESTO J

- Por el contrario, con el modelo de tumor original M109 FR α (-), el compuesto J tenía escasa actividad a todos los niveles de dosis sometidos a prueba, incluyendo a su DMT (2,4 μ mol/kg), mientras que ixabepilona era activa a su DMT de 5 μ mol/kg. (Figura 5). Estos resultados indican que la M109 FR α (-) es sensible a ixabepilona y la inactividad del compuesto J es probablemente en gran parte una consecuencia de la ausencia de expresión de FR α por este tumor. Estos resultados también proporcionan evidencias de que la actividad antitumoral del compuesto J puede medirse a través de los receptores FR α .
- Otras evidencias del mecanismo de administración de fármaco mediado por FR α del compuesto J se proporcionan por la observación de que la coadministración de un análogo de folato a un exceso de 20 veces de la dosis del compuesto J podría competir sustancialmente con el compuesto J por la unión al receptor y proteger tumores 98M 109 FR α (+) frente a los efectos antitumorales del compuesto J. (Figura 6). Puesto que el compuesto G y el conjugado (compuesto J) tienen efectos antitumorales sorprendentes tanto *in vitro* como *in vivo*, y puesto que las actividades antitumorales del compuesto J pueden atribuirse a los efectos mediados por FR α (+), también se describe en el presente documento la conjugación del análogo de aziridinil-epotilona compuesto G (véanse los ejemplos 2 y 3) para formar el compuesto J. (Véase el ejemplo 2).

EJEMPLO 2: PREPARACIÓN DEL COMPUESTO J



- Ácido (S)-2-(4-((3-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-((3-((1S,3S,7S,10R,11S,12S,16R)-7,11-dihidroxi-8,8,10,12-tetrametil-3-((E)-1-(2-metil-1,2,4-tiazol-4-il)prop-1-en-2-il)-5,9-dioxo-4-oxa-17-azabicyclo[14.1.0]heptadecan-17-il)etoxi)carboniloxi)etil)disulfanil)etilamino)-1-oxopropan-2-ilamino)-5-guanidino-1-oxopentan-3-ilamino)-1-oxopropan-2-ilamino)-5-oxopentanoico
- A. [1S-[1R*,3R*(E),7R*,10S*,11R*,12R*,16S*]]-8,8,10,12-Tetrametil-3-[1-metil-2-(2-metil-4-tiazolil)etenil]-7,11-bis[(triethylsilyl)oxi]-4,17-dioxabicyclo[14.1.0]heptadecano-5,9-diona**



- A una solución con agitación de epotilona A (5,0 g, 10,1 mmol), imidazol (3,40 g, 49,9 mmol) y DIPEA (28,5 ml, 163,6 mmol) en DMF anhidra (100 ml) bajo atmósfera de N₂ se le añadió cloruro de trietilsililo (15,0 ml, 89,4 mmol). Tras haberse completado la adición, se calentó la solución de reacción a 55 °C (temperatura del baño de aceite) durante 12 h dando un único punto (CCF) del producto deseado.

Se repitió la reacción anterior dos veces más. Se destiló la DMF de la solución combinada a alto vacío. Se purificó el residuo espumoso mediante cromatografía en columna (gel de sílice, E. Merck, 230-400 de malla, 600 g;

EtOAc/hexanos 5:95, 10:90 y 15:85) dando 19,4 g (88,6 %) del compuesto A como un sólido blanco.

HPLC: ES Industries FluoroSep RP Phenyl, 4,6 x 250 mm, isocrática, 30 min., 100 % de B, (B = 90 % de MeOH/H₂O + 0,2 % de H₃PO₄), velocidad de flujo a 1,0 ml/min., UV 254, t = 23,15 min. CL/EM (ES+) 722 (M+H).

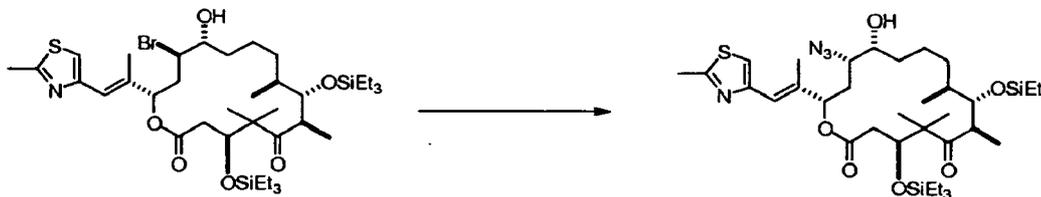
5 **B. Preparación de [4S-[4R*7S*,8R*,9R*,13S*,14S*,16R*(E)]]-14-bromo-13-hidroxi-5,5,7,9-tetrametil-16-[1-metil-2-(2-metil-4-tiazolil)etenil]-4,8-bis[(trietilsilil)oxi]-1-oxaciclohexadecano-2,6-diona**



10 A una solución con agitación 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[(trietilsilil)oxi]-4,17-dioxabicyclo[14.1.0]heptadecano-5,9-diona (5,0 g, 6,92 mmol) en diclorometano anhidro (140 ml) a -20 °C bajo atmósfera de N₂ se le añadió MgBr₂-Et₂O (3 x 2,13 g, 24,78 mmol) en tres porciones cada dos horas mientras se mantiene una temperatura interna por debajo de -5 °C. Tras aproximadamente 7 h, se diluyó la mezcla de reacción con diclorometano y se lavó con NaHCO₃ sat. (2 x), se secó sobre Na₂SO₄ anhidro y se evaporó a vacío dando una espuma. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna (gel de sílice, E. Merck, 230-400 de malla, 180 g; EtOAc/hexanos 5:95, 7,5:92,5 y 12,5:87,5) dando el compuesto B (2,5 g, rendimiento del 45 %) como una espuma blanca junto con el material de partida recuperado (0,9 g, 18 %).

15 HPLC: ES Industries FluoroSep RP Phenyl, 4,6 x 250 mm, isocrática, 30 min., 100 % de B, (B = 90 % de MeOH/H₂O + 0,3 % de H₃PO₄), velocidad de flujo a 1,0 ml/min., UV 254, t=14,37 min. (100 % puro) CL/EM (ES+): 802 (M+H).

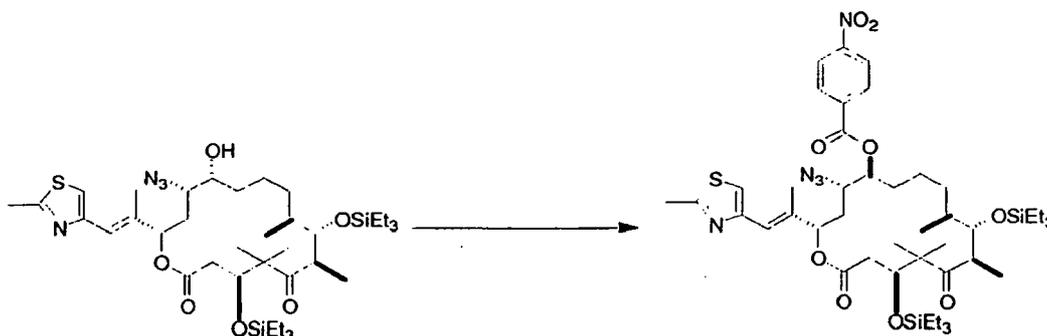
C. Preparación de [4S-[4R*,7S*,8R*,9R*,13S*,14R*,16R*(E)]]-14-Azido-13-hidroxi-5,5,7,9-tetrametil-16-[1-metil-2-(2-metil-4-tiazolil)etenil]-4,8-bis[(trietilsilil)oxi]-1-oxaciclohexadecano-2,6-diona



20 A una solución de [4S-[4R*,7S*,8R*,9R*,13S*,14S*,16R*(E)]]-14-bromo-13-hidroxi-5,5,7,9-tetrametil-16-[1-metil-2-(2-metil-4-tiazolil)etenil]-4,8-bis[(trietilsilil)oxi]-1-oxaciclohexadecano-2,6-diona (9,9 g, 12,3 mmol) en 1,2 l de DMF se le añadieron azida de sodio (8,01 g, 123,3 mmol) y 18-corona-6 (3,26 g, 12,3 mmol) a RT bajo atmósfera de N₂. Se agitó la solución transparente de manera mecánica a TA durante 7 días. Se diluyó la solución con EtOAc (4 l), y se lavó con H₂O (6 x 3 l). Se secó la fase orgánica (Na₂SO₄), y entonces se evaporó dando 9,2 g del producto bruto. La cromatografía en columna (gel de sílice 450 g, EtOAc/hexano 5 - 15 %) proporcionó 6,7 g (rendimiento del 71 %) de compuesto C como una espuma blanca.

25 HPLC: YMC ODS-A S5, 4,6 x 50 mm, isocrática, 30 min., 100 % de B, (B = 90 % de MeOH/H₂O + 0,2 % de H₃PO₄), velocidad de flujo a 4,0 ml/min., UV 254 nm, t = 2,00 min. CL/EM (ES+) 765 (M+H).

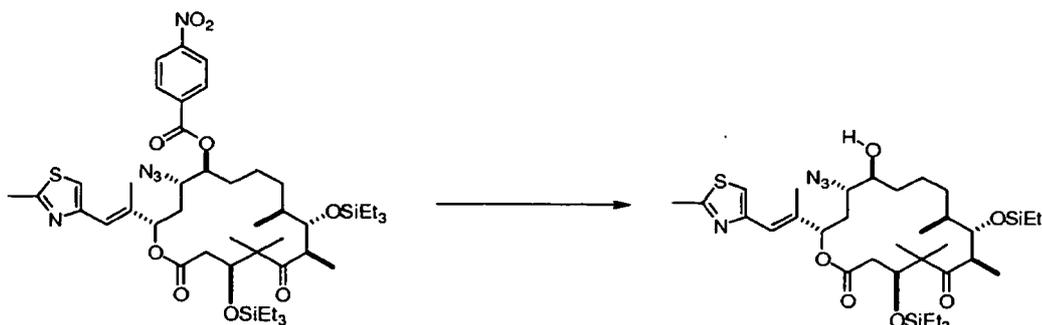
30 **D. Preparación de [4S-[4R*,7S*,8R*,9R*,13R*,14R*,16R*(E)]]-14-Azido-5,5,7,9-tetrametil-16-[1-metil-2-(2-metil-4-tiazolil)etenil]-13-[(4-nitrobenzoi)oxi]-4,8-bis[(trietilsilil)oxi]-1-oxaciclohexadecano-2,6-diona**



5 Se disolvieron [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[(trietilsilil)oxi]-1-oxaciclohexadecano-2,6-diona (7,0 g, 9,15 mmol), ácido 4-nitrobenzoico (3,82 g, 22,9 mmol), y trifetilfosfina (6,0 g, 22,9 mmol) en THF (100 ml). Se añadieron dietilazodicarboxilato (9,0 ml de solución al 40 % en tolueno, 22,9 mmol) a lo largo de un periodo de 5 minutos. Se mantuvo la mezcla de reacción a TA durante 4 h, se concentró y se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (gradiente escalonado desde el 5 % de acetato de etilo/hexanos hasta el 15 % de acetato de etilo/hexanos) para aislar el éster de nitrobenzoato como una espuma blanca (7,3 g, 87 %).

10 CL-EM: Phenomenex C18, 4,6 x 50 mm, isocrática, 15 min., 100 % de B. (B = 90 % de MeOH/H₂O + 0,1 % de TFA), velocidad de flujo a 4,0 ml/min., UV 220 nm. Tiempo de retención = 8,9 min. EM (ESI) M+H = 886,7

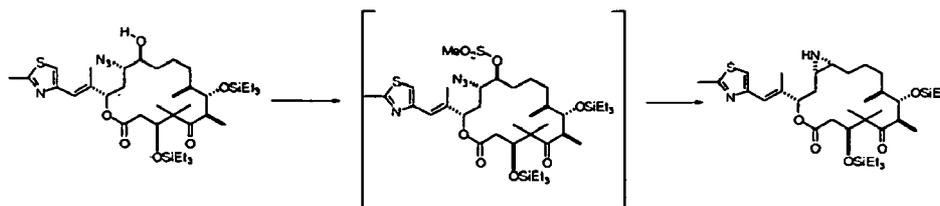
E. Preparación de [4S-[4R*,7S*,8R*,9R*,13R*,14R*,16R*(E)]]-14-Azido-13-hidroxi-5,5,7,9-tetrametil-16-[1-metil-2-(2-metil-4-tiazolil)etenil]-4,8-bis[(trietilsilil)oxi]-1-oxaciclohexadecano-2,6-diona



15 Se disolvió el éster de nitrobenzoato compuesto D (7,3 g, 7,98 mmol) en acetato de etilo (35 ml) y se enfrió hasta 0 °C. Se añadió amoniaco en metanol (350 ml de solución 2 M en metanol), y se agitó la mezcla de reacción a TA durante 4 h, se concentró y se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (gradiente escalonado desde el 10 % de acetato de etilo/hexanos hasta el 30 % de acetato de etilo/hexanos) para aislar [4S-[4R*,7S*,8R*,9R*,13R*,14R*,16R*(E)]]-14-azido-13-hidroxi-5,5,7,9-tetrametil-16-[1-metil-2-(2-metil-4-tiazolil)etenil]-4,8-bis[(trietilsilil)oxi]-1-oxaciclohexadecano-3,6-diona como un sólido blanco vidrioso (5,97 g, 98 %).

20 CL-EM: Phenomenex C18, 4,6 x 50 mm, isocrática, 5 min., 100 % de B. (B = 90 % de MeOH/H₂O + 0,1 % de TFA), velocidad de flujo a 4,0 ml/min., UV 220 nm. Tiempo de retención = 2,25 min. EM (ESI) M+H = 765,66

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



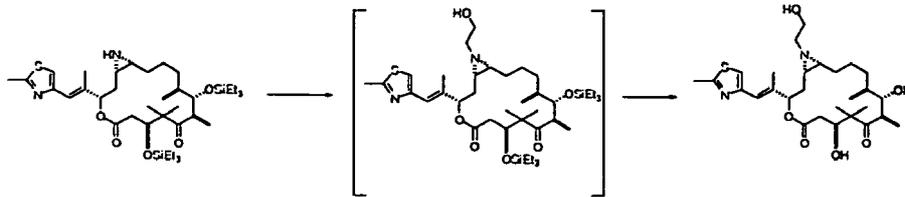
25 Se disolvieron [4S-[4R*,7S*,8R*,9R*,13R*,14R*,16R*(E)]]-14-azido-13-hidroxi-5,5,7,9-tetrametil-16-[1-metil-2-(2-metil-4-tiazolil)etenil]-4,8-bis[(trietilsilil)oxi]-1-oxaciclohexadecano-2,6-diona (5,97 g, 7,8 mmol) y trietilamina (4,34 ml, 31,2 mmol) en diclorometano (85 ml) y se enfrió hasta 0 °C. Se añadió cloruro de metanosulfonio (1,8 ml, 23,4

mmol) gota a gota a lo largo de un periodo de 5 min. Tras 10 min., se retiró la mezcla de reacción del baño de hielo, y se agitó a TA. Tras 3 h, se llevó la mezcla de reacción a NaHCO_3 saturado (300 ml), se extrajo con diclorometano (3 X 100 ml), se secó sobre Na_2SO_4 , se concentró y se llevó a la etapa siguiente sin purificación adicional.

- 5 Se disolvió el éster de metanosulfonato bruto en THF/ H_2O (12:1, 130 ml). Se añadieron trietilamina (2,2 ml, 16 mmol) y trimetilfosfina (16 mmol, 16 ml de solución 1,0 M en THF), y se agitó la mezcla de reacción a TA. Tras 3 h, se calentó la reacción a $45\text{ }^\circ\text{C}$ durante 7 h, se concentró y se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (gradiente escalonado desde el 2 % de metanol/cloroformo hasta el 5 % de metanol/cloroformo) para aislar el compuesto F como un sólido blanco (5,08 g, 88 % para dos etapas).

10 CL-EM: Phenomenex C18, 4,6 x 50 mm, isocrática, 5 min., 100 % de B. (B = 90 % de $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ + 0,1 % TFA), velocidad de flujo a 4,0 ml/min., UV 220 nm. Tiempo de retención = 0,298 min. EM (ESI) M+H = 721,58

G. Preparación de [1S-[1R*,3R*(E),7R*,10S*,11R*,12R*,16S*]]-7,11-dihidroxi-17-[2-hidroxietyl]-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



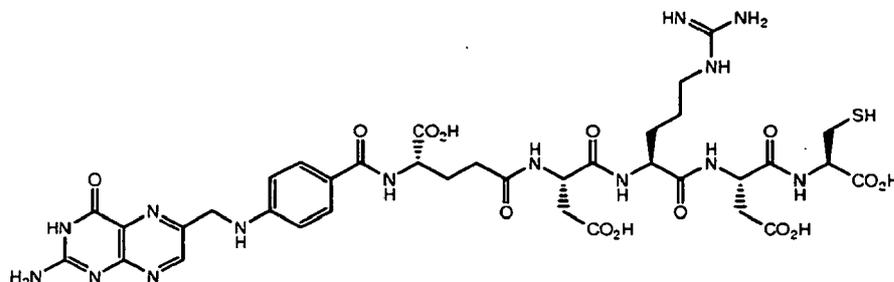
- 15 Se añadieron K_2CO_3 (1,4 g, 10,2 mmol) y 2-bromoetanol (0,52 ml, 7,3 mmol) a [1S-[1R*,3R*(E),7R*,10S*,11R*,12R*,16S*]]-8,8,10,12-tetrametil-3-[1-metil-3-(2-metil-4-tiazolil)etenil]-7,11-bis[(trietilsilil)oxi]-4-oxa-17-azabicyclo[14.1.0]heptadecano-5,9-diona (1,05 g, 1,46 mmol) en acetonitrilo (20 ml) y se calentó hasta $82\text{ }^\circ\text{C}$. Tras 4 h, se añadieron 2-bromoetanol adicional (0,52 ml, 7,3 mmol) y K_2CO_3 (1,4 g, 10,2 mmol). Tras 5 h, se añadió 2-bromoetanol adicional (0,21 ml, 2,92 mmol). Tras 3 h, se enfrió la mezcla de reacción hasta temperatura ambiente, se filtró a través de Celite, se lavó con acetonitrilo (5 X 5 ml), diclorometano (2 X 5 ml), se concentró y se llevó a la siguiente etapa sin purificación adicional.
- 20

Se disolvió el producto de reacción bruto en diclorometano (40 ml), se enfrió hasta $0\text{ }^\circ\text{C}$, y se añadió ácido trifluoroacético (8,0 ml). Tras 1 h, se concentró la mezcla de reacción, se llevó a NaHCO_3 saturado (200 ml), se extrajo con diclorometano (3 X 100 ml), se secó sobre Na_2SO_4 , se concentró y se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (10 % de metanol/diclorometano) para aislar [1S-[1R*,3R*(E),7R*,10S*,11R*,12R*,16S*]]-7,11-dihidroxi-17-[2-hidroxietyl]-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), como una película transparente (0,63 g, 79 % para dos etapas).

25

CL-EM: Waters Sunfire C18, 4,6 x 50 mm, gradiente, del 0 al 100 % de B a lo largo de 4 min. (A = 10 % de $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ + 0,1 % de TFA; B = 90 % de $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ + 0,1 % de TFA), velocidad de flujo a 4,0 ml/min., UV220 nm. Tiempo de retención = 2,12 min. EM(ESI)M+H= 537,52.

- 30 **H. Preparación de ácido (S)-2-(4-((2-amino-4-oxo-3,4-dihidropteridin-6-il)metilamino)benzamido)-5-((S)-3-carboxi-1-((S)-1-((S)-3-carboxi-1-((S)-1-carboxi-2-mercaptoetilamino)-1-oxopropan-2-ilamino)-5-guanidino-1-oxopentan-2-ilamino)-1-oxopropan-2-ilamino)-5-oxopentanoico**



- 35 Se sintetizó 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-oxopentanoico mediante síntesis peptídica en fase sólida en cinco etapas partiendo de resina de HCys(4-metoxitritil)-2-clorotritilo. La tabla 2 muestra la cantidad de reactivos usados en la síntesis.

TABLA 2

	Mmol	Equiv.	PM	cantidad
Resina de H-Cys(4-metoxitritil)-2-clorotritil (carga 0,57 mmol/g)	1,14			2,0 g
Fmoc-Asp(OtBu)-OH (disolver en 15 ml de DMF)	1,14	2	411,5	0,938 g
Fmoc-Arg(Pbf)-OH (15 ml de DMF)	1,14	2	648	1,477 g
Fmoc-Asp(OtBu)-OH (disolver en 15 ml de DMF)	1,14	2	411,5 g	0,938 g
Fmoc-Glu-OtBu (15 ml de DMF)	1,14	2	425,5	0,970 g
N ¹⁰ TFA Ácido pterico (disolver en 15 ml de DMSO)	1,14	1,25	408	0,581 g
DIPEA	1,14	4	174	0,793
PyBOP	1,14	2	520	1,185 g

Se usaron los siguientes procedimientos:

Etapas de acoplamiento:

- 5 A la resina en un recipiente para síntesis de péptidos se le añadieron la solución de aminoácido, DIPEA y PyBOP. Se burbujeó la mezcla durante 1 h y se lavó 3X con DMF y alcohol isopropílico. Se efectuó la desprotección de Fmoc mediante tratamiento con piperidina al 20 % en DMF, 2X (10 min.), antes de cada acoplamiento de aminoácido. Esta secuencia se repitió para cada etapa de acoplamiento de aminoácido.

Síntesis de ácido pterico protegido con N¹⁰-TFA:

- 10 A 10 l de solución de base Tris 0,1 M (121,1 g de base Tris en 10 l de agua) en un matraz de fondo redondo de 22 l agitado de manera mecánica, equipado con una camisa de calefacción, se le añadieron 200 g (0,453 mol) de ácido fólico. Se agitó la mezcla para disolver el ácido fólico, y entonces se añadieron 500 mg (3,67 mmol) de cloruro de zinc. Se añadió carboxipeptidasa G (viales unitarios 13 x 20 disponibles de Sigma) y se ajustó el pH a 7,3 con HCl 1 N y se mantuvo a lo largo de toda la reacción. Se protegió la mezcla de la luz y se calentó a 30 °C durante 8-10 días (el uso de un autovalorador para mantener el pH constante redujo el tiempo de conversión en 4-5 días). Se monitorizó la reacción mediante HPLC analítica hasta que se logró una conversión del 80 % (es deseable una conversión adicional, pero no se ha optimizado). Se precipitó el producto a partir de la mezcla de reacción ajustando la solución a pH=3,0 usando HCl 6 N. Se transfirió la suspensión a un vial para centrifuga y se centrifugó a 4000 rpm durante 10 min. Se decantó el sobrenadante. Entonces se purificó el sólido húmedo directamente tal como sigue (el sólido húmedo podía congelarse para su almacenamiento o liofilizarse en primer lugar; sin embargo, el almacenamiento de los sólidos húmedos en el congelador hasta su solución era más eficaz). A 40 g de ácido pterico bruto en 700 ml de agua se le añadió NaOH 1,0 M hasta pH=11,5. Se filtró la mezcla (Whatman tipo 1) y entonces se sometió a cromatografía (columna: 10 x 120 cm; fase estacionaria: 8 kg de DEAE celulosa; fase móvil: NaCl 1,0 M/NaOH 0,01 M, pH=11,5; velocidad de flujo: 17 ml/min.). Se recogió un litro de fracciones de color amarillo y se analizó mediante HPLC. Se ajustaron las fracciones que contenían ácido pterico puro a pH=3 con HCl 6 M para precipitar ácido pterico. Se centrifugó la mezcla a 3000 rpm durante 20 min. Se decantó el sobrenadante y se lavó con agua (3x). Se liofilizó el sólido durante al menos 72 h. Se desconoce el impacto del agua residual sobre la siguiente reacción.

- 30 Se secó adicionalmente el ácido pterico sobre P₂O₅ a alto vacío durante más de 24 h (obsérvese que se obtuvieron resultados similares en la etapa de protección sin esta etapa de secado adicional). A continuación, se añadieron 100 g (0,32 mol) de ácido pterico a un matraz de fondo redondo de 5 l, equipado con un agitador mecánico y una entrada de argón, y se almacenó a alto vacío durante la noche. Se añadió gas argón seguido de 3500 g (2316 ml) de anhídrido trifluoroacético. Se selló el matraz con un tampón de caucho o adaptador de entrada de argón, y entonces se agitó enérgicamente. Se protegió el matraz de la luz y se agitó a temperatura ambiente bajo atmósfera de argón durante 7 días (se monitorizó la reacción mediante HPLC de alícuotas diluidas 20x cada una con agua y DMSO). Se evaporó de manera giratoria la mezcla hasta sequedad y se trató con 2,5 l de ácido trifluoroacético al 3 % en agua. Se agitó la mezcla durante la noche a temperatura ambiente para hidrolizar los subproductos de anhídrido. La evaporación giratoria dio un sólido seco. Se suspendió el sólido en 2 l de agua y entonces se centrifugó en frascos para centrifuga de 250 ml a 3000 rpm durante 20 min. Se retiró el sobrenadante y se lavó el sólido con agua y se centrifugó (4 veces). Se liofilizó el sólido durante 3 días, se transfirió a frascos de color ámbar, y se secó a alto vacío en presencia de P₂O₅ durante 2 días (pureza ≥95 %; TFA residual evaluado mediante análisis elemental).

Etapas de escisión:

- 45 Se liberó el producto intermedio protegido de la resina usando el reactivo de escisión preparado a partir del 92,5 % (50 ml) de TFA, el 2,5 % (1,34 ml) de H₂O, el 2,5 % (1,34 ml) de triisopropilsilano, y el 2,5 % (1,34 ml) de etanodiol. Se añadió el reactivo de escisión al recipiente de reacción (25 ml). Se burbujeó argón a través de la mezcla durante 1,5 h. Se drenó el líquido del recipiente, y se lavó la resina con el reactivo restante (3 X 8 ml). Se concentraron los componentes volátiles mediante evaporación giratoria hasta un volumen de 10 ml. Se añadió dietil éter (35,0 ml) para efectuar la precipitación. Se recogió el sólido mediante centrifugación y se secó dando 1,25 g del producto de escisión.

Etapa de desprotección:

- 5 Se eliminó el grupo protector de N¹⁰-trifluoroacetilo en la porción de ácido pterico en condiciones básicas. Partiendo con 250 mg de producto intermedio protegido en 10 ml de agua, se ajustó el pH a 9,3 y se mantuvo durante 1 h usando 4: H₂O: hidróxido de amonio (1 - 2 ml). Tras 1 h, se ajustó el pH a 5 con HCl 1 N (~1 ml) y se purificó el producto en HPLC preparativa para proporcionar 125 mg del compuesto H.

Condiciones de purificación por HPLC:

Columna: Waters NovaPak C18 300x19 mm

Disolvente A: Tampón acetato de amonio 10 mM, pH=5

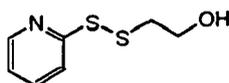
Disolvente B: Acetonitrilo

- 10 Elución: 1 % de B al 20 % de B en 40 min. a 15 ml/min.

Rendimiento total de las reacciones combinadas: 625 mg

I. 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

- 15 1. Preparación de 2-(2-(piridin-3-il)disulfanil)etanol

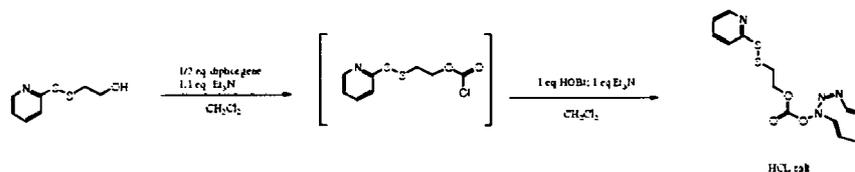


- 20 A una solución de cloruro de metoxicarbonil-sulfenilo (10 ml, 110 mmol), en diclorometano (100 ml), enfriada hasta 0 °C, se le añadió mercaptoetanol (7,6 ml, 110 mmol), gota a gota. Se dejó agitar la mezcla de reacción a 0 °C durante 30 min. En este punto, se añadió una solución de 2-mercaptopiridina (12,2 g, 110 mmol) en diclorometano (160 ml). Se dejó reaccionar la solución a 0 °C durante 1 h y entonces se dejó calentar hasta TA durante 1 h más. Se observó que había precipitado producto sólido de la solución. La CCF (éter de pet./EtOAc 1:1) mostró que se había formado producto significativo. Se concentró la mezcla de reacción hasta un volumen de 125 ml. Se filtró la mezcla a través de un embudo Buchner. Se lavó la torta del filtro con diclorometano y entonces se secó a vacío durante la noche para proporcionar 2-(2-(piridin-2-il)disulfanil)etanol (23,6 g), como la sal de HCl.

- 25 CCF: R_f = 0,45

Placas - EMD Gel de sílice 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-ilo

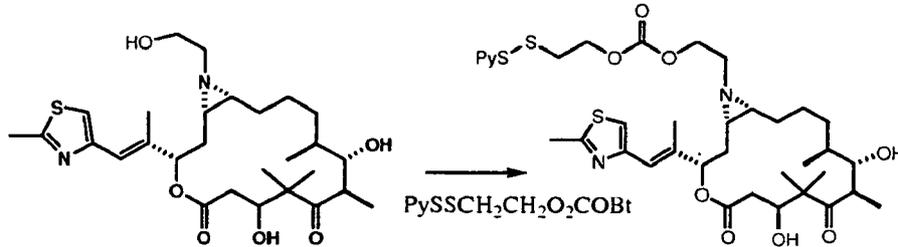


- 30 Se agitó una solución de difosgeno (2,28 g, 11,5 mmol) en 15 ml de diclorometano anhidro bajo argón en un matraz de fondo redondo y se enfrió mediante un baño de hielo/sal. Se colocó un embudo de adición con una mezcla de 2-(piridin-2-ildisulfanil)etanol (5,01 g, 22,4 mmol) y trietilamina (2,25 g, 22,2 mmol) en 65 ml de diclorometano anhidro sobre el matraz de fondo redondo. Se añadió la mezcla gota a gota a lo largo de un periodo de 20 min. Se dejó calentar la mezcla de reacción hasta TA y se agitó durante 1 h más. El análisis por CCF de la mezcla de reacción mostró que el material de partida se consumía y que había formación de un producto de cloroformiato menos polar
- 35 "veteado", CCF (EtOAc:hexanos 6:4): R_F de material de partida 0,4; R_F de producto de cloroformiato: 0,8.

- 40 Se agitó la mezcla de reacción en un matraz de fondo redondo bajo argón y se enfrió mediante un baño de hielo/sal. Se añadió una mezcla de 3,02 g, 22,4 mmol de HOBt y 2,23 g, 22,0 mmol de trietilamina en 10 ml de diclorometano anhidro a un embudo de goteo fijado al matraz de fondo redondo. Se añadió la mezcla lentamente al matraz de fondo redondo manteniendo la temperatura de reacción a 2 °C. Se dejó calentar la mezcla de reacción hasta TA y se agitó durante la noche. Entonces se destilaron aproximadamente 27 ml de diclorometano de la mezcla de reacción a presión atmosférica. Entonces se dejó enfriar la mezcla hasta TA y agitar durante 2 h. Se recogieron los sólidos mediante filtración, y se lavó la torta del filtro con 20 ml de diclorometano. Entonces se secaron los sólidos a vacío a 40 °C en un evaporador giratorio proporcionando 7,81 g de sólidos de color blanquecino. Se analizó este producto

mediante ¹H-NMR y se determinó que era 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



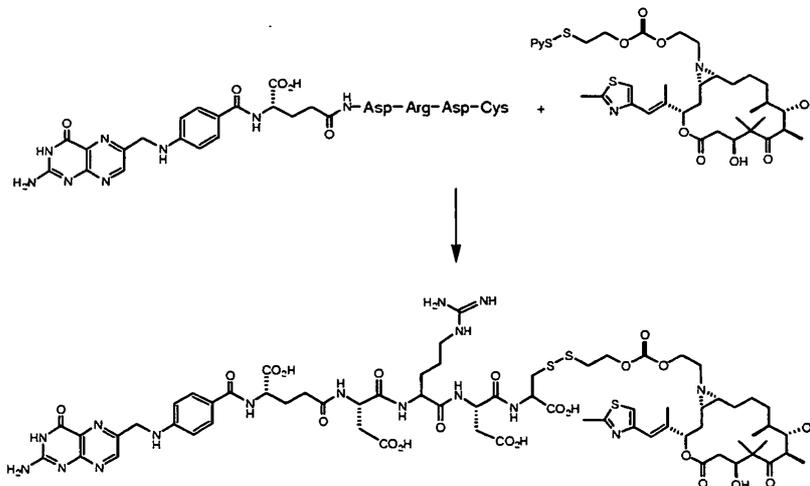
A una solución de [1S-[1R*,3R*(E),7R*,10S*,11R*,12R*,16S*]]-7,11-dihidroxi-17-[2-hidroxietil]-8,8,10,12-tetrametil-3-[1-metil-2-(2-metil-4-tiazolil)etenil]-4-oxa-17-azabicyclo[14.1.0]heptadecano-5,9-diona en diclorometano anhidro a 0 °C se le añadió DMAP (1,2 eq.) y carbonato de benzo[d][1,2,3]triazol-1-ilo 2-(2-(piridin-2-il)disulfanil)etilo (1,0 eq.) en serie. Se agitó la mezcla de reacción a 0 °C bajo argón y se monitorizó mediante CCF cada 10 min. Se añadieron DMAP adicional (1,2 eq.) y compuesto I (2) (1,0 eq.) según era necesario hasta que se consumió todo el compuesto G. Se extinguió la reacción MeOH (1 ml) a 0 °C, se eliminó el disolvente a vacío, y se purificó el residuo mediante cromatografía (gel de sílice, 2,5-5 % de MeOH en DCM) proporcionando el compuesto del título como un sólido beige. Las cantidades de compuesto y las recuperaciones se enumeran a continuación en la tabla 3. El rendimiento total de 2,95 g de compuesto G fue 2,80 g (67,9 %) de compuesto I.

TABLA 3

	Compuesto G (mg)	Compuesto I (2) (mg)	DMAP (mg)	DCM (ml)	Compuesto I (mg)*
Lote n.º 1	303	197 X 3	82,8 X 3	8,0	204
Lote n.º 2	952	683 X 3	260 X 3	22,0	984
Lote n.º 3	921	661 X 3	251 X 3	22,0	761
Lote n.º 4	775	556 X 3	211 X 3	18,0	851

* Cada purificación cromatográfica dio normalmente un producto puro junto con algo de producto impuro (pureza del 80-90 %). Se combinó el producto impuro con el producto bruto del siguiente lote para la purificación cromatográfica. Para los lotes n.º 2 y 4, se llevaron a cabo dos purificaciones cromatográficas.

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



Se añadieron 15 ml de H₂O (burbujeada con argón durante 10 min. antes de su uso) a ácido (S)-2-(4-((2-amino-4-oxo-3,4-dihidropteridin-6-il)metilamino)benzamido)-5-((S)-3-carboxi)-((S)-1-((S)-3-carboxi-1-((S)-1-carboxi-2-

mercaptoetilamino)-1-oxopropan-2-ilamino)-5-guanidino-1-oxopentan-2-ilamino)-1-oxopropan-2-ilamino)-5-oxopentanoico (498 mg, 0,534 mmol) en un tubo para centrifuga de 50 ml de tamaño. A esta suspensión, mientras se burbujeaba con argón, se le añadió gota a gota solución de NaHCO₃ saturado (burbujeada con argón durante 10 min. antes de su uso) hasta que el pH de la solución resultante alcanzó 6,9. Se añadió 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-azabicyclo[14.1.0]heptadecan-17-il)etilo (400 mg, 0,534 mmol) en THF rápidamente y se agitó la solución homogénea resultante bajo argón durante 30 min. Se comprobó el progreso de la reacción mediante HPLC analítica a los 15 min. El pico de producto apareció a ~ 6,4 min. en condiciones de HPLC analítica. Se diluyó la mezcla con ~15 ml de tampón fosfato y se eliminó el THF a vacío. Se centrifugó la solución turbia y se filtró. Se dividió el filtrado amarillo en dos porciones y se purificó mediante HPLC preparativa. Se reunieron fracciones puras (>98 % puras) y se liofilizaron. Se recogieron fracciones parciales (<98 % puras) y se volvieron a purificar cada 3-6 pases de cromatografía proporcionando 700 mg del compuesto del título como un polvo blanco (contiene el 11,8 % en peso de agua y el 8,7 % en peso de sodio y sales de fosfato de sodio, tal como se determina mediante análisis elemental y de Karl Fischer).

15 Parámetros de la HPLC preparativa:

Columna: Waters Nova-Pak H C186µm 30x300 mm

Fase móvil A: tampón fosfato de sodio 7,0 mM, pH=7,2

Fase móvil B: acetonitrilo

Procedimiento: 10 % de B-50 % de B en 30 min., velocidad de flujo: 40 ml/min.

20 Parámetros de la HPLC analítica:

Columna: Waters Symmetry C18 3,5µm 4,6x75 mm

Fase móvil A: tampón acetato de trietilamonio (TEAOAc) 10 mM, pH=7,5

Fase móvil B: acetonitrilo

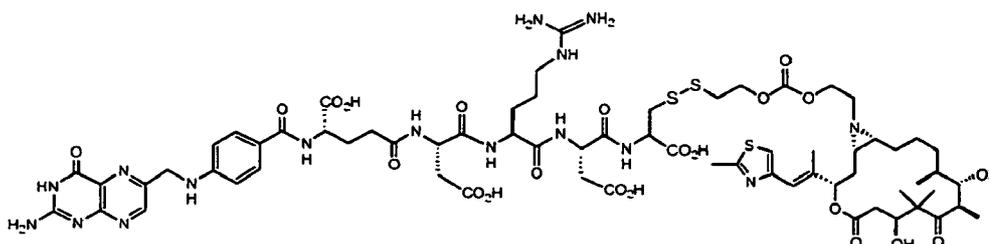
Procedimiento: 20 % de B-40 % de B en 10 min., velocidad de flujo: 1,0 ml/min.

25 Masa exacta m/z (C₆₇H₉₂N₁₆O₂₂S₃):

Calculada: 1570,58907 (M+2H), 785,29454 (M+2H)²⁺, 53,86563 (M+3H)³⁺, 393,15118 (M+4H)⁴⁺

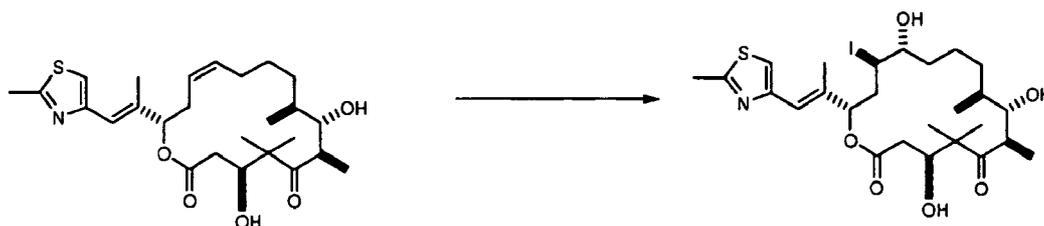
Hallada: (M+2H)²⁺ a 785,29100 (4,5 ppm), (M+3H)³⁺ a 523,86431 (2,5 ppm), (M+4H)⁴⁺ a 393,14996 (3,1 ppm)

EJEMPLO 3: PREPARACIÓN ALTERNATIVA DEL COMPUESTO J



30 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-azabicyclo[14.1.0]heptadecan-17-il)etoxi)carboniloxi)etil)disulfanil)etilamino)-1-oxopropan-3-ilamino)-5-guanidino-1-oxopentan-2-ilamino)-1-oxopropan-2-ilamino)-5-oxopentanoico

35 **3A. Preparación de [4S,7R,8S,10R,9S,13R,16S]-4,8,13-trihidroxi-14-yodo-5,5,7,9-tetrametil-16-[(E)-1-[2-metiltiazol-4-il]prop-1-en-2-il] oxaciclohexadecano-2,6-diona.**

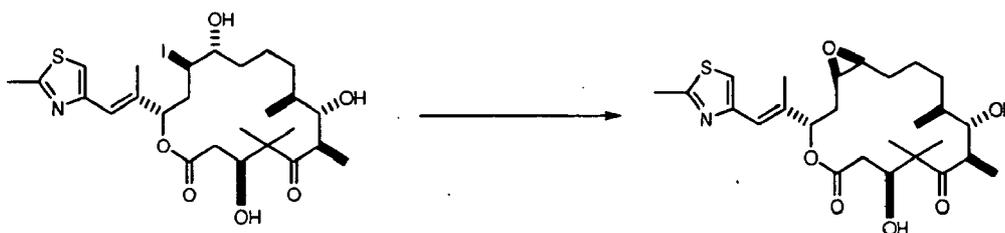


Se disolvió epotilona C (54,3 g, 113,7 mmol) en acetonitrilo (480 ml) y agua (50 ml). Se enfrió la solución hasta -5 °C a -10 °C. Se añadió yodo (144,3 g, 568,4 mmol) a la reacción y se mantuvo la reacción al menos durante 15 h.

- 5 Se extinguió la reacción con solución de metabisulfito de sodio al 15 % (900 ml). Se extrajo la mezcla con acetato de etilo (2 x 1,1 l). Se recogieron las fases orgánicas y se lavaron sucesivamente con solución saturada de bicarbonato de sodio (675 ml) y solución saturada de cloruro de sodio (675 ml). Se evaporaron los disolventes a presión reducida dando el compuesto A bruto como un aceite amarillo (85,6 g). El compuesto A se usó en la siguiente reacción sin purificación adicional.

- 10 HPLC: Phenomex Luna C8 (2) 3µm, 4,6 x 150 mm, isocrática, 18 min., 36 % de B, 17 min., 56 % de B, (Fase móvil A = NH₄OAc 0,01 M en ACN:agua (5:95), Fase móvil B = NH₄OAc 0,01 M en ACN:agua (95:5)), velocidad de flujo a 1,0 ml/min., UV 245, Rt = 22,4 min.

3B. Preparación de [1R,3S,7S,10R,11S,12S,16S]-7,11-dihidroxi-8,8,10,12-tetrametil-3-[(E)-1-[2-metiltiazol-4-il]prop-1-en-2-il]-4,17-dioxabicyclo[14.1.0]heptadecano-5,9-diona.

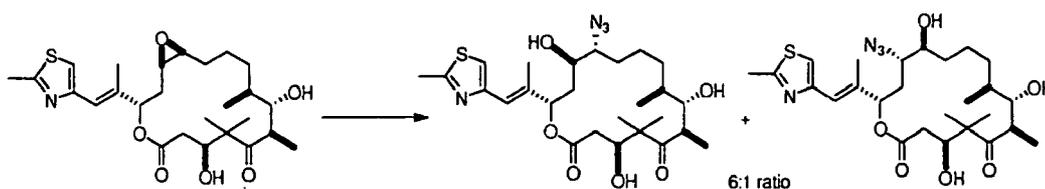


- 15 Se disolvió [4S,7R,8S,10R,9S,13R,16S]-4,8,13-trihidroxi-14-yodo-5,5,7,9-tetrametil-16-[(E)-1-[2-metiltiazol-4-il]prop-1-en-2-il]oxaciclohexadecano-2,6-diona (85,6 g) en acetonitrilo (670 ml) y agua (130 ml). Se añadió trietilamina (135 ml, 968,5 mmol) a la solución. Se calentó la reacción hasta 50 °C a 60 °C durante al menos 8 h.

- 20 Tras enfriarse hasta TA, se concentró la solución a presión reducida. Se diluyó el residuo con EtOAc (1,2 l) y se lavó con solución saturada de cloruro de sodio (3 x 500 ml). Se evaporaron los disolventes a presión reducida dando el producto bruto como aceite amarillo. La purificación mediante filtración con almohadilla de gel de sílice (gel de sílice 700 g, 66 % de EtOAc en heptano, 2 x 4 l, y 1 x 3 l) proporcionó el compuesto B como una espuma (50,3 g, rendimiento del 90 %) con HPLC AP 80.

- 25 HPLC: Phenomex Luna C8 (2) 3µm, 4,6 x 150 mm, isocrática, 18 min., 36 % de B, 17 min., 56 % de B, (Fase móvil A = NH₄OAc 0,01 M en ACN:agua (5:95), Fase móvil B = NH₄OAc 0,01 M en ACN:agua (95:5)), velocidad de flujo a 1,0 ml/min., UV 245, Rt = 15,0 min.

3C/3D. Preparación 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 (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.



- 30 A una solución con agitación de epi-epotilona-A (14,35 g, 29,07 mmol) en etanol (240 ml) y agua (48 ml) se le añadió azida de sodio (11,45 g, 174,41 mmol) y cloruro de amonio (3,14 g, 58,14 mmol). Se agitó la mezcla a 60 °C durante

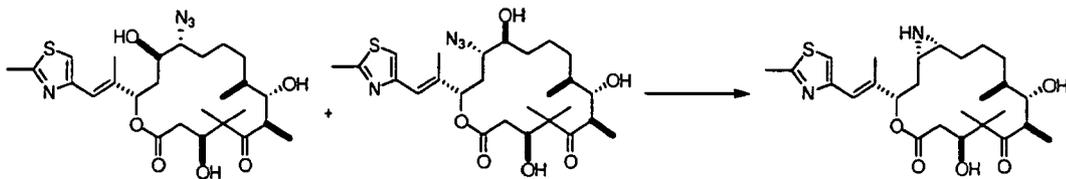
17-20 h. Se evaporaron los componentes volátiles en el evaporador rotatorio a presión reducida por debajo de 50 °C. Se disolvió el residuo se disolvió en mezcla acetato de etilo (287 ml) y agua (50 ml). Se separaron las fases y se extrajo la fase acuosa inferior con acetato de etilo (115 ml). Se lavaron las fases orgánicas combinadas con solución acuosa de cloruro de sodio (salmuera) al 25 %. Se evaporó el disolvente a presión reducida y se pasó el residuo a través de una almohadilla de gel de sílice eluyendo con mezcla de acetato de etilo/n-heptano (2:1). La evaporación del disolvente a presión reducida proporcionó una mezcla regioisomérica de azido-alcoholes, (4S,7R,8S,9S,13R,14R,16S)-13-azido-4,8,14-trihidroxi-5,5,7,9-tetrametil-16-((E)-1-(2-metiltiazol-4-il)prop-1-en-2-il)oxaciclohexadecano-2,6-diona y (4S,7R,8S,9S,13S,14S,16S)-14-azido-4,8,13-trihidroxi-5,5,7,9-tetrametil-16-((E)-1-(2-metiltiazol-4-il)prop-1-en-2-il)oxaciclohexadecano-2,6-diona en una razón ~6:1 (12,8 g, 82 %) como una espuma blanca.

CL-EM: Phenomenex Luna C8(2) columna: 3 µm, 4,6 x 50 mm. Gradiente: 15 min., 0 % de B a 100 % de B en 10 min., entonces 100 % de B durante 5 min. Fases móviles: A = NH₄OAc 0,01 M en CH₃CN/H₂O 5:95; B = NH₄OAc 0,01 M en CH₃CN/H₂O 95:5. Velocidad de flujo: 3,0 ml/min. Longitud de onda: UV 250 nm. Tiempo de retención = 5,52 min. EM (ESI) (M+H)⁺ = 537,69

Esta reacción funciona también en otros disolventes como, acetona, acetonitrilo, tetrahidrofurano, 2-propanol, dimetilformamida, metilsulfóxido y N-metilpirrolidinona.

También puede usarse el reactivo azida de tetrabutilamonio en lugar de azida de sodio/cloruro de amonio

3E. Preparación de (1S,3S,7S,10R,11S,12S,16R)-7,11-dihidroxi-8,8,10,12-tetrametil-3-((E)-1-(2-metiltiazol-4-il)prop-1-en-2-il)-4-oxa-17-azabicyclo(14.1.0)heptadecano-5,9-diona.

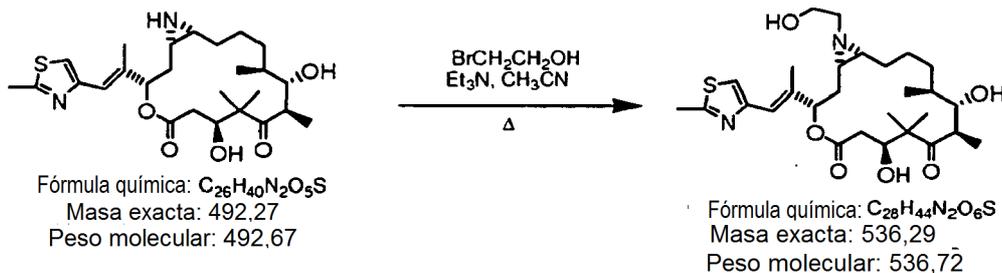


A una solución con agitación de mezcla de (4S,7R,8S,9S, 13R,14R,16S)-13-azido-4,8,14-trihidroxi-5,5,7,9-tetrametil-16-((E)-1-(2-metiltiazol-4-il)prop-1-en-2-il)oxaciclohexadecano-2,6-diona y (4S,7R,8S,9S,13S,14S,16S)-14-azido-4,8,13-trihidroxi-5,5,7,9-tetrametil-16-((E)-1-(2-metilo tiazol-4-il)prop-1-en-2-il)oxaciclohexadecano-2,6-diona (12,8 g, 23,85 mmol) en acetonitrilo anhidro (90 ml) se le añadió trifenilfosfina (9,48 g, 35,77 mmol) bajo atmósfera de nitrógeno. Se agitó la solución transparente a 20-40 °C durante 19-40 h. Se enfrió la mezcla de reacción hasta 0-5 °C durante 3-4 h y se filtró el producto. Se lavó la torta con heptano (64 ml) y se secó a 40 °C a presión reducida durante 15-18 h dando (1S,3S,7S,10R,11S,12S,16R)-7,11-dihidroxi-8,8,10,12-tetrametil-3-((E)-1-(2-metiltiazol-4-il)prop-1-en-2-il)-4-oxa-17-azabicyclo(14.1.0)heptadecano-5,9-diona como un sólido blanco (5,41 g, 46 %).

CL-EM: Phenomenex Luna C8(2) columna: 3 µm, 4,6 x 50 mm. Gradiente: 15 min., 0 % de B al 100 % de B en 10 min., entonces 100 % de B durante 5 min. Fases móviles: A = NH₄OAc 0,01 M en CH₃CN/H₂O 5:95; B = NH₄OAc 0,01 M en CH₃CN/H₂O 95:5. Velocidad 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 funciona también con otras fosfinas como, triciclohexilfosfina, trimetilfosfina, tributilfosfina y tris(4-metoxifenil)-fosfina y otro disolvente tetrahidrofurano.

3G. Preparación de [1S-[1R*,3R*(E),7R*,10S*,11R*,12R*,16S*]]-7,11-dihidroxi-17-[2-hidroxietil]-8,8,10,12-tetrametil-3-[1-metil-2-(2-metil-4-tiazolil)etenil]-4-oxa-17-azabicyclo[14.1.0]heptadecano-5,9-diona



Se añadieron Et₃N (4,95 ml, 35,52 mmol) y 2-bromoetanol (3,02 ml, 42,62 mmol) a (1S,3S,7S,10R,11S,12S,16R)-7,11-dihidroxi-8,8,10,12-tetrametil-3-((E)-1-(3-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 calentó hasta 72,5 °C. Tras 20 h, se enfrió la mezcla de

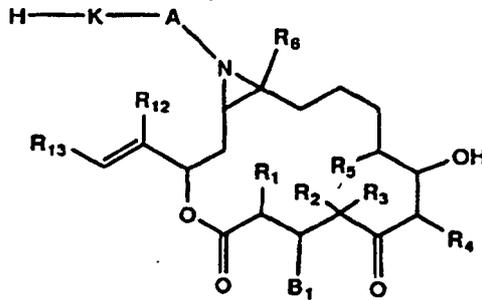
5 reacción hasta temperatura ambiente, se concentró hasta sequedad a través de destilación a vacío giratoria. Se disolvió el producto bruto en acetato de etilo (50 ml) y se mezcló con agua desionizada (35 ml). Se extrajo la mezcla con acetato de etilo (3 x 35 ml), se secó sobre Na₂SO₄, se filtró, se concentró, se cristalizó en acetonitrilo (35 ml), se lavó con acetonitrilo (2 x 5 ml), y se secó en un horno de vacío oven a 45,5 °C durante la noche para aislar (1S,3S,7S,10R,11S,12S,16R)-7,11-dihidroxi-17-(2-hidroxietil)-8,8,10,12-7-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 (2,60 g, HPLC AP 97,1, rendimiento del 68,2 %).

10 CL-EM: Phenomenex C8, 3 µm, 4,6 x 150 mm, gradiente, del 10 al 50 % de B a lo largo de 10 min., y parada a los 20 min. (A= 5 % de MeCN/H₂O + NH₄OAc 0,01 M; B = 95 % de MeOH/H₂O + NH₄OAc 0,01 M), velocidad de flujo a 1,0 ml/min., UV 254 nm. Tiempo de retención = 9,43 min. EM (ESI) M+H = 537,21.

Un experto habitual reconocerá que el compuesto 3G tal como se prepara mediante este ejemplo 3 es idéntico al compuesto G tal como se prepara mediante el ejemplo 2 y, por tanto, el compuesto 3G puede usarse para preparar los compuestos H, I y J, cuyos procedimientos de preparación y compuestos se describen en el ejemplo 2.

REIVINDICACIONES

1. Compuesto que tiene la fórmula X:



X

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que:

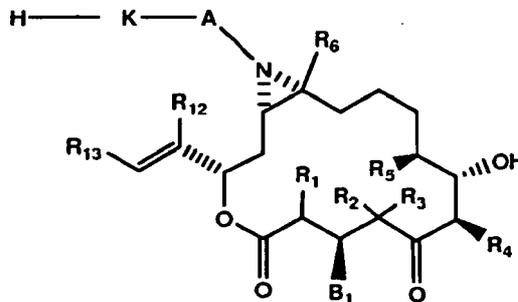
- 5 K es -O-, -S- o -NR₇-;
 A es -(CR₈R₉)-(CH₂)_m-Z- en el que Z es -(CHR₁₀)-, -C(=O)-, -C(=O)-C(=O)-, -OC(=O)-, -N(R₁₁)C(=O)-, -SO₂- o -N(R₁₁)SO₂-;
 B₁ es hidroxilo o ciano y R₁ es hidrógeno o B₁ y R₁ se toman juntos para formar un doble enlace;
 10 R₂, R₃ y R₅ son, independientemente, hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, arilo o arilo sustituido; o R₂ y R₃ pueden tomarse junto con el carbono al que están unidos para formar un cicloalquilo opcionalmente sustituido;
 R₄ es hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, alqueno sustituido, alqueno sustituido, arilo o arilo sustituido;
 R₆ es hidrógeno, alquilo o alquilo sustituido;
 R₇, R₈, R₉, R₁₀ y R₁₁ son independientemente hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heterocicloalquilo, heterocicloalquilo sustituido, heteroarilo o heteroarilo sustituido;
 15 R₁₂ es H, alquilo, alquilo sustituido o halógeno;
 R₁₃ es arilo, arilo sustituido, heteroarilo o heteroarilo sustituido; y
 m es de 0 a 6.

2. Compuesto según la reivindicación 1, en el que:

- 20 K es -O-;
 A es alqueno C₂₋₄;
 B₁ es -OH;
 R₂, R₃, R₄ y R₅ son, independientemente, hidrógeno o alquilo inferior;
 R₆ es hidrógeno o metilo; y
 25 R₁₃ es un heteroarilo de 5 ó 6 miembros opcionalmente sustituido, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

3. Compuesto según la reivindicación 1 ó 2, en el que R₁₃ es un tiazolilo, piridilo u oxazolilo opcionalmente sustituidos.

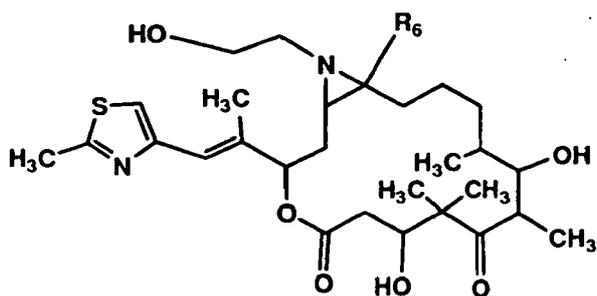
4. Compuesto según la reivindicación 1, 2 ó 3, que tiene la fórmula X':



X';

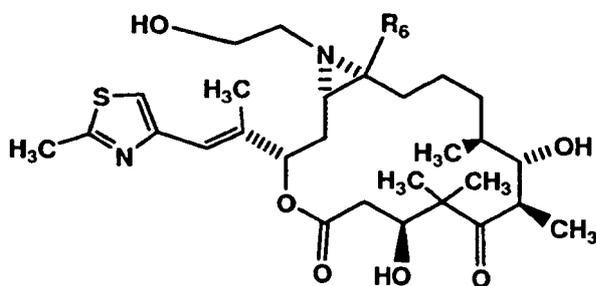
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

5. Compuesto según la reivindicación 2, que tiene la fórmula Xb,



Xb

6. Compuesto según la reivindicación 5, que tiene la fórmula Xb':



Xb'.

7. Compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 5 ó 6, en el que R₆ es hidrógeno.
- 5 8. Compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 5 ó 6, en el que R₆ es metilo.
9. Uso de un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8, en la preparación de un medicamento para tratar el cáncer en un paciente.
10. Procedimiento para preparar una composición farmacéutica para la administración de fármacos dirigida que comprende conjugar un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8, con un adaptador liberable para formar un compuesto conjugado.
- 10 11. El procedimiento según la reivindicación 10, en el que el compuesto conjugado comprende un resto de unión a folato.

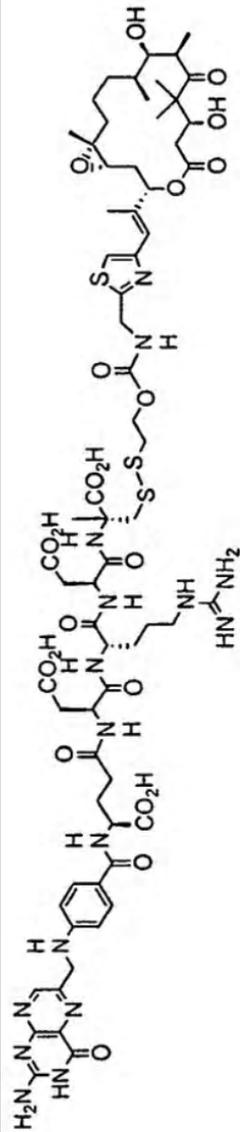
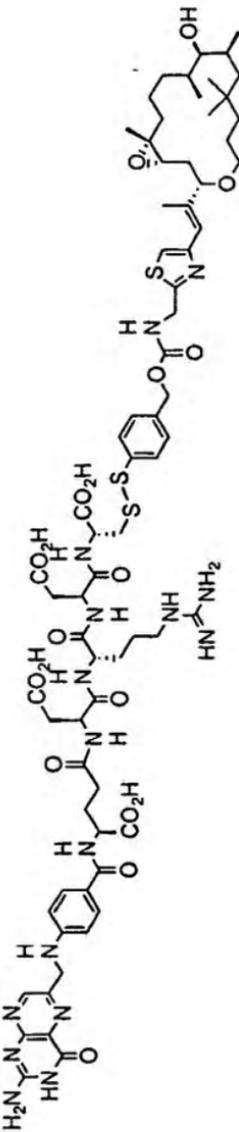
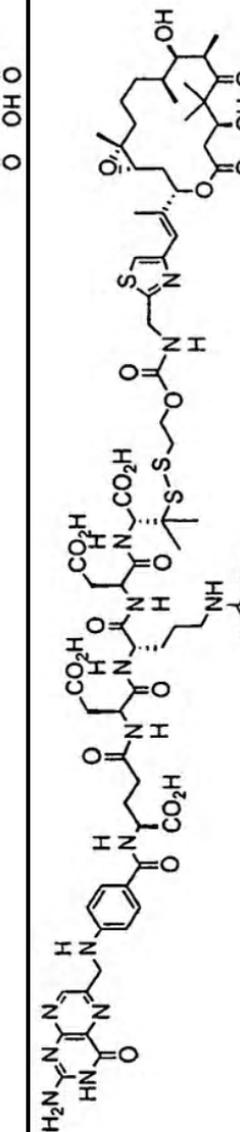
número de conjugado	afinidad relativa	Células Kb CE-50 (nM)	Estructura
AA.I	0,27	>100	
AA.II	0,29	>100	
AA.III	n.t.	>100	

FIG. 1(1 de 2)

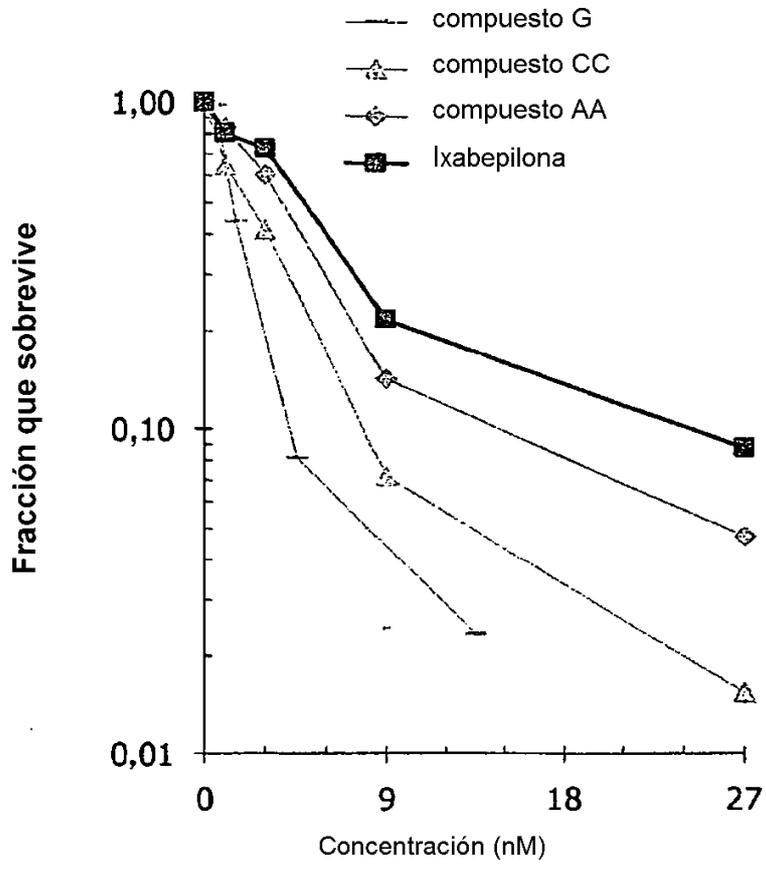


FIG. 3

FIG. 4A Eficacia*

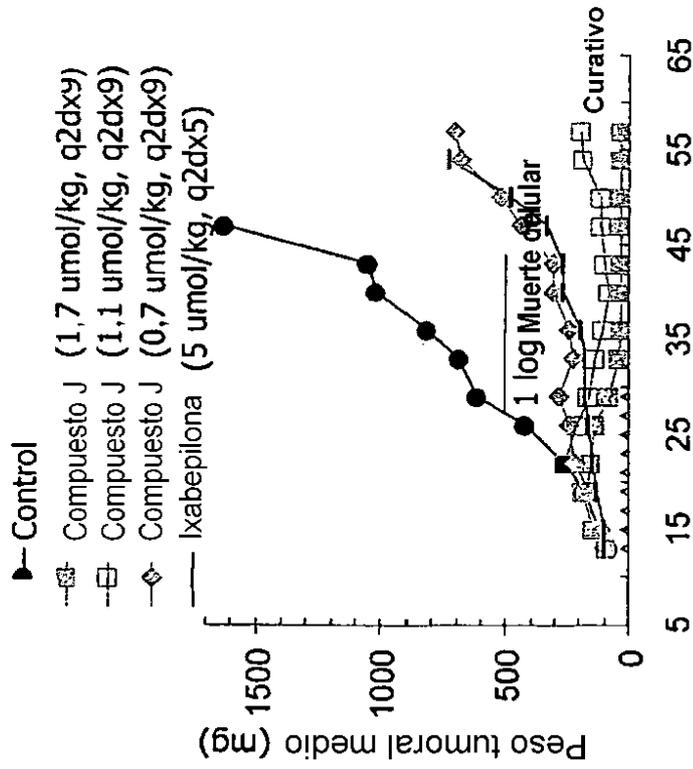
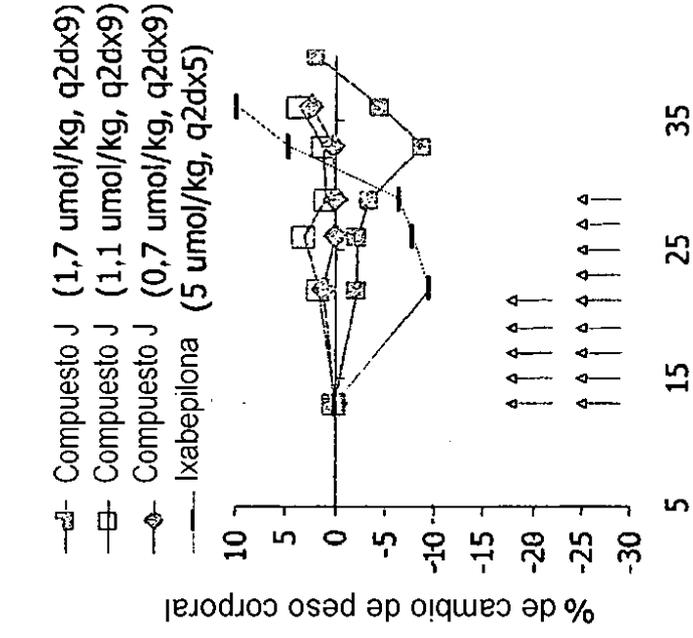


FIG. 4B Pérdida de peso*



* Dieta deficiente en folato Días tras el implante del tumor

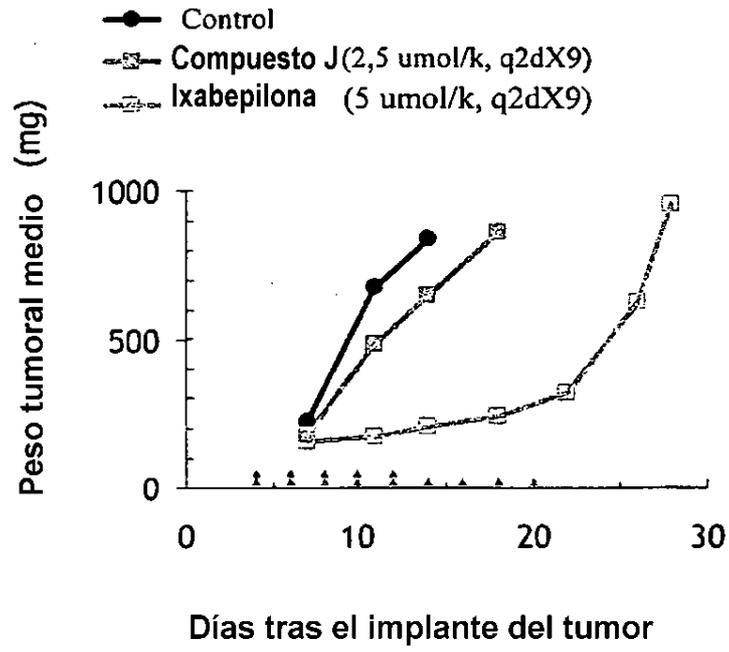


FIG. 5

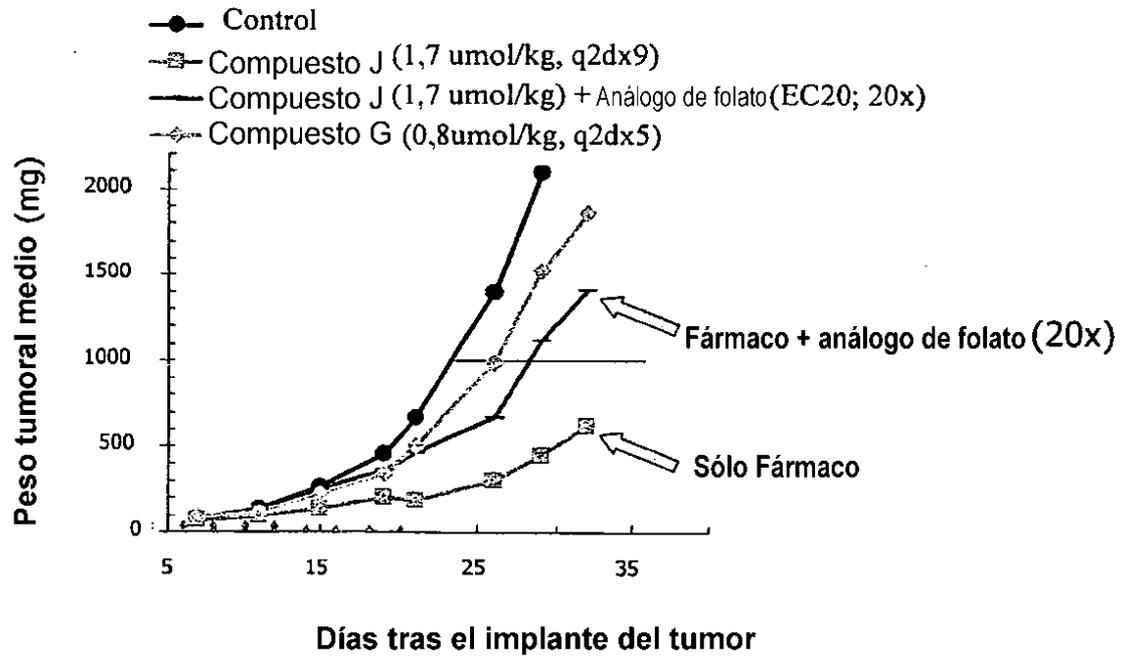


FIG. 6