

- 38 -

1.62-1.82 (m, 3H), 4.12 (m, 1H), 4.30 (bs, 1H), 4.93 (d, J = 5.9 Hz, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 22.45, 22.78, 25.12, 27.96, 36.28, 57.59, 75.39, 83.46, 148.13, 168.00; IR (KBr) 3363, 2960, 2926, 1733, 1763, 1458, 1370, 1350, 1303, 1153 cm^{-1} . Anal. Calcd. for $\text{C}_{12}\text{H}_{21}\text{NO}_4$: C, 59.24; H, 8.70; N, 5.76. Found: C, 59.47; H, 8.91; N, 5.51.

(3R,4S)-1-tert-Butoxycarbonyl-4-cyclohexyl methyl-3-hydroxy-2-azetidinone (6j): 100%; white solid; mp 105-106°C; $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ +61.89° (c 0.74, CHCl_3); ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 0.82-1.84 (m, 13H), 1.50 (s, 9H), 3.82 (bs, 1H), 4.14 (m, 1H), 4.93 (d, J = 5.8 Hz, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 26.12, 26.17, 26.42, 33.20, 33.47, 33.59, 34.71, 28.00, 57.13, 75.49, 83.47, 148.08, 167.57; IR (KBr) 3442, 2921, 2850, 1797, 1682, 1447, 1354, 1342, 1159 cm^{-1} . Anal. Calcd. for $\text{C}_{15}\text{H}_{25}\text{NO}_4$: C, 63.58; H, 8.89; N, 4.94. Found: C, 63.76; H, 8.72; N, 4.68.

(3R,4S)-3-hydroxy-4-phenyl-1-phenylcarbamoyl-2-azetidinone (8a): 88%; white solid; mp 197-200°C; $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ +206.4° (c 1.26, CHCl_3); ^1H NMR (250 MHz, CD_3COCD_3) δ 5.39-5.47 (m, 2H), 7.07-7.60 (m, 10H), 8.80 (bs, 1H); ^{13}C NMR (63 MHz, CD_3COCD_3) δ 61.98, 78.06, 119.85, 124.31, 128.11, 128.31, 128.60, 129.48, 135.31, 138.43, 148.17, 169.76; IR (CHCl_3) 3343, 3018, 2975, 1772, 1712, 1603, 1548, 1447, 1362, 1219, 1045 cm^{-1} ; MS (FAB) m/z(%) 283(2), 263 (33) 207(22), 143(100).

(3R,4S)-1-tert-Butylcarbamoyl-3-hydroxy-4-phenyl-2-azetidinone (8b): 89%; white solid; mp 148-151°C; $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ +160.9° (c 1.28, CHCl_3); ^1H NMR (250 MHz, CDCl_3) δ 1.35 (s, 9H), 3.16 (bs, 1H), 4.97 (d, J = 5.5 Hz, 1H), 5.11 (d, J = 5.5 Hz, 1H), 6.60 (bs, 1H), 7.19-7.38 (m, 5H); ^{13}C NMR (63 MHz, CDCl_3) δ 28.84, 51.53, 60.74, 76.61, 127.00, 128.61, 128.70, 133.13, 148.78, 168.30; IR

- 39 -

(CHCl₃) 3362, 3018, 2975, 1767, 1710, 1533, 1422, 1318, 1216, 1045 cm⁻¹. Anal. Calcd for C₁₄H₁₈N₂O₃: C, 64.11; H, 6.92; N, 10.68. Found: C, 64.10; H, 7.08; N, 10.49.

5 **(3R,4S)-1-Benzylcarbamoyl-3-hydroxy-4-phenyl-**
2-azetidinone (8c): 63%; white solid; mp 165-168°C;
[α]_D²⁰ +139° (c 0.64, CHCl₃); ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ
3.10 (bs, 1H), 4.43 (dd, J = 15.2, 5.8 Hz, 1H), 4.50 (dd,
J = 15.2, 5.8 Hz, 1H), 5.03 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 5.20 (d,
J = 5.6 Hz, 1H), 7.06 (t, J = 5.8 Hz, 1H), 7.23-7.33 (m,
10 10H); ¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃) δ 43.79, 61.01, 76.94,
127.13, 127.73, 128.80, 128.86, 132.94, 137.59, 150.15,
168.34; IR (CHCl₃) 3364, 3028, 2925, 1771, 1704, 1537,
1455, 1361, 1219, 1190, 987 cm⁻¹. Anal. Calcd for
C₇H₁₆N₂O₃: C, 68.91; H, 5.44; N, 9.45. Found: C, 68.89;
15 H, 5.66; N, 9.34.

(3R,4S)-1-Ethylcarbamoyl-3-hydroxy-4-phenyl-
2-azetidinone (8d): 55%; white solid; mp 141- 42°C;
[α]_D²⁰ +211.4° (c 0.44, CHCl₃); ¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ
1.19 (t, J = 7.2 Hz, 3H), 3.34 (qd, J = 7.2, 1.6 Hz, 2H),
20 5.09 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 5.27 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 6.63
(bt, J = 1.6 Hz, 1H), 7.23-7.44 (m, 5H); ¹³C NMR (63 MHz,
CDCl₃) δ 15.04, 34.94, 60.77, 76.98, 127.00, 128.92,
129.06, 132.83, 149.96, 167.98; IR (CHCl₃) 3381, 3018,
2990, 1770, 1732, 1651, 1589, 1422, 1298, 1210, 1045
25 cm⁻¹.

(3R,4S)-3-(1-Hydroxy)-1-phenylthiocarbamoyl-4-
phenyl-2-azetidinone (8e): 78%; yellow solid; mp 85-
88°C; [α]_D²⁰ + 156.7° (c 0.67, CHCl₃); ¹H NMR (300 MHz,
CDCl₃) δ 5.16 (d, J = 5.8 Hz, 1H), 5.53 (d, J = 5.8 Hz,
30 1H), 7.31-7.44 (m, 8H), 7.66 (d, J = 7.8 Hz, 2H), 10.33
(bs, 1H); ¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃) δ 63.97, 75.72, 123.29,
126.49, 127.27, 128.77, 132.49, 137.26, 174.87; IR (CHCl₃)

- 40 -

3553, 3295, 3048, 2949, 1760, 1601, 1384, 1313 cm^{-1} ; MS (FAB) m/z (%) 299(M+1, 46), 179(100).

(3R,4S)-1-(Morpholinecarbonyl)-3-hydroxy-4-phenyl-2-azetidinone (8f): 83%; white solid; mp 55-57°C; ^1H NMR (250 MHz, CDCl_3) δ 3.05 (bs, 1H), 3.56-3.78 (m, 8H), 5.00 (d, $J = 5.9$ Hz, 1H), 5.38 (d, $J = 5.9$ Hz, 1H), 7.24-7.40 (m, 5H).

(3R,4S)-1-(N,N-Dimethylcarbonyl)-3-hydroxy-4-phenyl-2-azetidinone (8g): 88%; white crystal; mp 123-125°C; ^1H NMR (250 MHz, CDCl_3) δ 3.06 (bs, 6H), 4.98 (d, $J=5.9$ Hz, 1H), 5.35 (d, $J=5.9$ Hz, 1H), 7.29-7.39 (m, 5H).

(3R,4S)-1-tert-Butoxycarbonyl-4-phenyl-3-(1,1,1-trichloroethoxycarbonyl)-2-azetidinone (9a): To a solution of 99 mg (0.38 mmol) of 1-tert-butylcarbonyl-3-hydroxy-4-phenyl-2-azetidinone, 5 mg of DMAP and 263 mL (2 mmol) of triethylamine in 5 mL of dichloromethane, was added at 0°C 105 mL (0.8 mmol) of 1,1,1-trichloroethylchloroformate. The reaction mixture was stirred overnight at room temperature. The organic layer was washed several times with brine, dried over MgSO_4 and concentrated. The crude solid was purified by chromatography on silica gel to yield 65 mg (40%) of O-protected β -lactam: White solid; mp 122-124°C; $[\alpha]_D^{20} +28^\circ$ (c 0.5, CHCl_3); ^1H NMR (250 MHz, CDCl_3) δ 1.39 (s, 9H), 4.43 (d, $J = 11.7$ Hz, 1H), 4.55 (d, $J = 11.7$ Hz, 1H), 5.28 (d, $J = 5.5$ Hz, 1H), 5.76 (d, $J = 5.5$ Hz, 1H), 7.30 (m, 5H); ^{13}C NMR (63 MHz, CDCl_3) δ 27.81, 60.80, 77.03, 78.76, 84.40, 127.73, 128.58, 129.09, 131.55, 147.71, 152.17, 160.34; IR (CHCl_3) 3016, 2976, 1819, 1771, 1732, 1683, 1244 cm^{-1} . Anal. Calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{Cl}_3\text{NO}_6$: C, 46.54; H, 4.14; N, 3.19. Found: C, 46.33; H, 4.34; N, 3.33.

- 41 -

(3R,4S)-3-Acetoxy-1-tert-butoxycarbonyl-4-phenyl-2-azetidinone (9b): To a solution of 82 mg (0.3 mmol) of 1-tert-butylcarbonyl-3-hydroxy-4-phenyl-2-azetidinone, 5 mg of DMAP and 210 mL (1.5 mmol) of triethylamine in 5 mL of dichloromethane, was added at 0°C 58 mL (0.7 mmol) of acetic anhydride. The reaction mixture was stirred overnight at room temperature. The organic layer was washed several times with brine, dried over MgSO₄ and concentrated. The crude solid was purified by chromatography on silica gel to yield 71 mg (75%) of O-acetyl β-lactam: White solid; mp 63-64°C; [α]_D²⁰ +32.1° (c 0.81, CHCl₃); ¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ 1.37 (s, 9H), 1.65 (s, 3H), 5.22 (d, J = 5.5 Hz, 1H), 5.83 (d, J = 5.5 Hz, 1H), 7.23-7.33 (m, 5H); ¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃) δ 19.71, 27.81, 60.84, 75.94, 84.07, 127.43, 128.31, 128.67, 132.44, 147.25, 162.39, 168.83; IR (CHCl₃) 3026, 2984, 1815, 1752, 1731, 1497, 1371, 1286, 1224, 1152, 1024 cm⁻¹. Anal. Calcd for C₁₆H₁₉NO₅: C, 62.94; H, 6.27; N, 4.59. Found: C, 63.17; H, 6.14; N, 4.52.

20

Example 54

To a suspension of NaH (35 mg in 1.0 mL of DME), was added at -10°C, a solution of 133 mg (0.15 mmol) of 7,10-ditroc-10-deacetylbaccatin III and 100 mg (0.30 mmol) of 5d in 1.5 mL of DME. The reaction was monitored by TLC and quenched at -8°C by addition of brine. The aqueous layer was extracted with dichloromethane. The combined organic layers were washed with brine, dried over Na₂CO₃ and concentrated. The crude oil was purified by chromatography on silica gel using AcOEt/hexanes (1/2) as the eluant to give 148 mg of the coupling product 2'-EE-7,10-ditroc-Taxotère as a white solid (81% yield; 90% conversion yield) and 12 mg of 7,10-ditroc-10-deacetylbaccatin III (10% recovery).

30

The EE protecting group was removed by stirring

- 42 -

at room temperature 90 mg of 2'-EE-7,10-ditroc-Taxotère in 3 mL of THF and 2 mL of 0.5N HCl for 1 hr. The reaction mixture was diluted with dichloromethane. The organic phase was washed with sat. NaHCO₃ sol., brine dried over MgSO₄ and concentrated. The crude oil was purified by chromatography on silica gel using AcOEt/hexanes (1/2) as the eluant to give 60 mg (71%) of 2'-OH-7,10-ditroc-Taxotère as a white solid: Mp 154-155°C; [α]_D²⁰ -38° (c 0.74, CHCl₃); ¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ 1.19 (s, 3H), 1.26 (s, 3H), 1.35 (s, 9H), 1.85 (s, 3H), 1.95 (s, 3H), 2.04 (m, 1H), 2.34 (m, 2H), 2.39 (s, 3H), 2.62 (m, 1H), 3.90 (d, J = 6.4 Hz, 1H), 4.17 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 4.32 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 4.60 (d, J = 11.9 Hz, 1H), 4.64 (m, 1H), 4.78 (s, 2H), 4.91 (d, J = 11.9 Hz, 1H), 4.95 (m, 1H), 5.26 (bd, J = 8.7 Hz, 1H), 5.46 (bd, J = 9.2 Hz, 1H), 5.54 (dd, J = 10.4, 7.1 Hz, 1H), 5.69 (d, J = 6.8 Hz, 1H), 6.21 (bt, J = 8.7 Hz, 1H), 6.24 (s, 1H), 7.32-7.35 (m, 5H), 7.50 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 7.62 (t, J = 7.3 Hz, 1H), 8.10 (d, J = 7.5 Hz, 2H); ¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃) δ 10.69, 14.63, 20.91, 22.47, 26.25, 28.14, 33.20, 35.21, 43.07, 46.91, 56.14, 72.17, 73.50, 74.10, 76.48, 77.33, 77.51, 78.55, 79.08, 80.23, 80.67, 83.61, 94.11, 126.70, 128.06, 128.70, 128.88, 130.12, 131.91, 133.79, 138.20, 142.48, 153.12, 153.17, 155.36, 166.82, 170.33, 172.78, 200.70; IR (CHCl₃) 3572, 3444, 3034, 2979, 1759, 1737, 1724, 1490, 1450, 1376, 1106 cm⁻¹.

Example 55

To a solution of 90 mg (0.1 mmol) of 7,10-ditroc-10-deacetylbaaccatin III and 47 mg (0.14 mmol) of **5d** in 5 mL of THF, was added at -30°C 110 mL (0.11 mmol, 1M in THF) of sodium hexamethyldisilazide. The reaction was monitored by TLC and quenched by addition of brine. The aqueous layer was extracted with dichloromethane. The combined organic layers were washed with brine, dried over

- 43 -

Na₂CO₃ and concentrated. The crude oil was purified by chromatography on silica gel using AcOEt/hexanes (1/2) as the eluant to give 117 mg of the coupling product 2'-EE-7,10-ditroc-TAXOTÈRE as a white solid (94%). All physical and spectral data are identical with those of 2'-EE-7,10-ditroc-TAXOTÈRE described in Example 54.

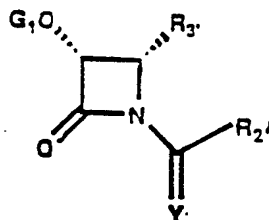
The Troc protecting group was removed by stirring at 60°C 50 mg of 7,10-ditroc-TAXOTÈRE in 1 mL of MeOH and 1 mL of AcOH in presence of 150 mg of zinc for 1 hr. The reaction mixture was filtrated and diluted with dichloromethane. The organic phase was washed with sat. NaHCO₃ sol., brine dried over MgSO₄ and concentrated. The crude oil was purified by chromatography on silica gel using AcOEt/hexanes (1/1) as the eluant to give 28 mg (80%) of TAXOTÈRE as a white solid: $[\alpha]_D^{20} -34^\circ$ (c 0.7, EtOH); NMR (250 MHz, CDCl₃) δ 1.13 (s, 3H), 1.26 (s, 3H), 1.35 (s, 9H), 1.80 (s, 3H), 1.85 (m,), 1.90 (s, 3H), 2.24 (m, 2H), 2.39 (s, 3H), 2.55 (m,), 2.62 (m,), 3.53 (s,), 3.92 (d, J = 7.0 Hz,), 4.18 (d, J = 8.4 Hz,), 4.22 (m,), 4.32 (d, J = 8.4 Hz,), 4.66 (d, J = 6.9 Hz,), 6.19 (bt, J = 8.1 Hz,), 7.32-7.35 (m, 5H), 7.50 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 7.62 (t, J = 7.3 Hz,), 8.10 (d, J = 7.5 Hz, 2H). These data are consistent with those reported for TAXOTÈRE by Mangatal, L. et al. (Ref. Mangatal, L.; Adeline, M.T.; Guénard, D.; Guéritte-Voegelein, F.; Potier, P. *Tetrahedron* 1989, 45, 4177.)

Although the invention has been described in conjunction with specific embodiments, it is evident that many alternatives and variations will be apparent to those skilled in the art in light of the foregoing description. Accordingly, the invention is intended to embrace all of the alternatives and variations that fall within the spirit and scope of the appended claims. The above references are hereby incorporated by reference.

- 44 -

We Claim:

1. A δ -lactam of the formula:



in which

R_2' represents an RO-, RS- or RR'N- in which R
 5 represents an unsubstituted or substituted straight chain
 or branched alkyl, alkenyl or alkynyl, cycloalkyl,
 heterocycloalkyl, cycloalkenyl, heterocycloalkenyl,
 carbocyclic aryl or heteroaryl; is a hydrogen or R as
 defined above; R and R' can be connected to form a cyclic
 10 structure;

R_3' represents an unsubstituted or substituted
 straight or branched alkyl, alkenyl or alkynyl radical, an
 unsubstituted or substituted cycloalkyl, cycloalkenyl
 radical, an unsubstituted or substituted carbocyclic aryl;

15 G_1 represents a hydrogen or a hydroxyl
 protecting group;

Y is oxygen or sulfur.

2. A β -lactam according to claim 1 in which

20 R_2' represents a radical RO-, RS- or RR'N- in
 which R represents a straight chain or branched alkyl
 radical containing 1 to 10 carbon atoms, a straight chain
 or branched alkenyl radical containing 2 to 10 carbon
 atoms, or a straight chain or branched alkynyl radical
 containing 2 to 10 carbon atoms, a cycloalkyl radical
 25 containing 3 to 10 carbon atoms, a heterocycloalkyl
 radical containing 3 to 10 carbon atoms, a cycloalkenyl
 radical containing 3 to 10 carbon atoms, a
 heterocycloalkenyl radical containing 3 to 10 carbon

- 45 -

atoms, a polycycloalkyl radical containing 6 to 20 carbon atoms, an aryl radical containing 6 to 20 carbons, a heteroaryl radical containing 3 to 15 carbon atoms; these radicals being optionally substituted with one or more halogen, hydroxyl, alkoxy, aryloxy, heteroaryloxy, amino, alkylamino, dialkylamino, mercapto, alkylthio, arylthio, heteroarylthio, cyano, carboxyl, alkoxy carbonyl radicals, the alkyl portion of which contain 1 to 15 carbon atoms, aryloxy carbonyl the aryl portion of which containing 6 to 20 carbon atoms, or heteroaryloxy carbonyl the heteroaryl portion of which containing 3 to 15 carbon atoms; R' is a hydrogen or R as defined above; R and R' can be connected to form a cyclic structure which contains 2-10 carbon atoms;

R₃ represents a straight chain or branched alkyl radical containing 1 to 10 carbon atoms, a straight chain or branched alkenyl radical containing 2 to 10 carbon atoms, or a straight chain or branched alkynyl radical containing 2 to 10 carbon atoms, a cycloalkyl radical containing 3 to 10 carbon atoms, a cycloalkenyl radical containing 3 to 10 carbon atoms, a polycycloalkyl radical containing 6 to 20 carbon atoms, or an aryl radical containing 6 to 20 carbons; these radicals being optionally substituted with one or more halogen, hydroxyl, alkoxy, aryloxy, heteroaryloxy, amino, alkylamino, dialkylamino, mercapto, alkylthio, arylthio, heteroarylthio, cyano, carboxyl, alkoxy carbonyl radicals, the alkyl portion of which contain 1 to 15 carbon atoms, aryloxy carbonyl the aryl portion of which contain 6 to 20 carbon atoms, or heteroaryloxy carbonyl the heteroaryl portion of which containing 3 to 15 carbon atoms.

3. A β -lactam according to claim 1 in which R₂ represents an RO-, RS-, or RR'N- in which R is an unsubstituted or substituted alkyl radical selected from methyl, ethyl, propyl, isopropyl, butyl, isobutyl,

- 46 -

tert-butyl, pentyl, isopentyl, neopentyl, hexyl, isohexyl, heptyl, isoheptyl, octyl, isooctyl, cyclopropyl, cyclobutyl, cyclopentyl, cyclohexyl, cycloheptyl, cyclooctyl, 9-fluorenylmethyl, benzyl and adamantyl, or an alkenyl radical selected from vinyl and allyl, or an aryl radical selected from phenyl and naphthyl, or a heteroaryl radical selected from furyl, pyrrolyl, and pyridyl, or a cycloalkenyl radical selected from cyclopentenyl, cyclohexenyl and cycloheptenyl, or a heterocycloalkyl radical selected from an oxiranyl, tetrahydrofuryl, pyrrolidinyl, piperidinyl, tetrahydropyranyl, or a heterocycloalkenyl radical selected from dihydrofuryl, dihydropyrrolyl, dihydropyranyl, dihydropyridyl; R' is a hydrogen or R as defined above; cyclic RR'N- radical includes aziridino, azetidino, pyrrolidino, piperidino or morpholino group;

R₃ is an unsubstituted or substituted alkyl radical selected from methyl, ethyl, propyl, isopropyl, butyl, isobutyl, tert-butyl, pentyl, isopentyl, neopentyl, hexyl, isohexyl, heptyl, isoheptyl, octyl, isooctyl, cyclohexylmethyl, cyclohexylethyl, benzyl, phenylethyl, cyclopropyl, cyclobutyl, cyclopentyl, cyclohexyl, cycloheptyl, cyclooctyl, 9-fluorenylmethyl, benzyl and adamantyl, or an alkenyl radical selected from vinyl, allyl, 2-phenylethenyl, or an alkynyl radical selected from ethynyl and propargyl or an aryl radical selected from phenyl and naphthyl, or a cycloalkenyl radical selected from cyclopentenyl, cyclohexenyl and cycloheptenyl;

G₁ represents a hydrogen or a group protecting the hydroxyl function selected from methoxymethyl (MOM), methoxyethyl (MEM), 1-ethoxyethyl (EE), benzyloxymethyl, (β -trimethylsilylethoxyl), methyl, tetrahydropyranyl, 2,2,2-trichloroethoxycarbonyl (Troc), benzyloxycarbonyl (CBZ), tertbutoxycarbonyl (t-BOC), 9-fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc), 2,2,2-

- 47 -

trichloroethoxymethyl, trimethylsilyl, triethylsilyl, tripropylsilyl, dimethylethylsilyl, dimethyl(t-butyl)silyl, diethylmethylsilyl, dimethylphenylsilyl, diphenylmethylsilyl, acetyl, chloroacetyl, dichloroacetyl, trichloroacetyl and trifluoroacetyl.

4. A β -lactam according to claim 1 in which Y is oxygen and R_2 represents RO- in which R is a methyl, ethyl, propyl, isopropyl, butyl, isobutyl, tert-butyl, neopentyl, cyclohexyl, phenyl, benzyl, or 9-fluorenylmethyl; R_3 is a phenyl, tolyl, 4-methoxyphenyl, 3,4-dimethoxyphenyl, 4-fluorophenyl, 4-trifluoromethylphenyl, 1-naphthyl, 2-phenylethenyl; G_1 is a hydrogen, 1-ethoxyethyl (EE), 2,2,2-trichloroethoxycarbonyl (Troc), trimethylsilyl, triethylsilyl or acetyl.

5. A β -lactam according to claim 1 in which Y is oxygen and R_2 is a methylamino, ethylamino, propylamino, isopropylamino, butylamino, isobutylamino, tert-butylamino, neopentylamino, cyclohexylamino, phenylamino or benzylamino, dimethylamino, diethylamino, dipropylamino, dibutylamino, dipentylamino, dihexylamino, dicyclohexylamino, methyl(tert-butyl)amino, cyclohexyl(methyl)amino, methyl(phenyl)amino, pyrrolidino, piperidino or morpholino group; G_1 is a hydrogen, 1-ethoxyethyl (EE), 2,2,2-trichloroethoxycarbonyl (Troc), trimethylsilyl, triethylsilyl or acetyl.

6. A β -lactam according to claim 1 in which Y is sulfur and R_2 represents RO- in which R is a methyl, ethyl, propyl, isopropyl, butyl, isobutyl, tert-butyl, neopentyl, cyclohexyl, phenyl, benzyl or 9-

- 48 -

fluorenylmethyl; R_3 is a phenyl, tolyl, 4-methoxyphenyl, 3,4-dimethoxyphenyl, 4-fluorophenyl, 4-trifluoromethylphenyl, 1-naphthyl, 2-naphthyl;

G_1 is a hydrogen, 1-ethoxyethyl (EE), 2,2,2-trichloroethoxycarbonyl (Troc), trimethylsilyl, triethylsilyl or acetyl.

7. A β -lactam according to claim 1 in which Y is sulfur and R_2 is a methylamino, ethylamino, propylamino, isopropylamino, butylamino, isobutylamino, tert-butylamino, neopentylamino, cyclohexylamino, phenylamino, or benzylamino, dimethylamino, diethylamino, dipropylamino, dibutylamino, dipentylamino, dihexylamino, dicyclohexylamino, methyl(tert-butyl)amino, cyclohexyl(methyl)amino, methyl(phenyl)amino, pyrrolidino, piperidino, or morpholino group;

G_1 is a hydrogen, 1-ethoxyethyl (EE), 2,2,2-trichloroethoxycarbonyl (Troc), trimethylsilyl, triethylsilyl or acetyl.

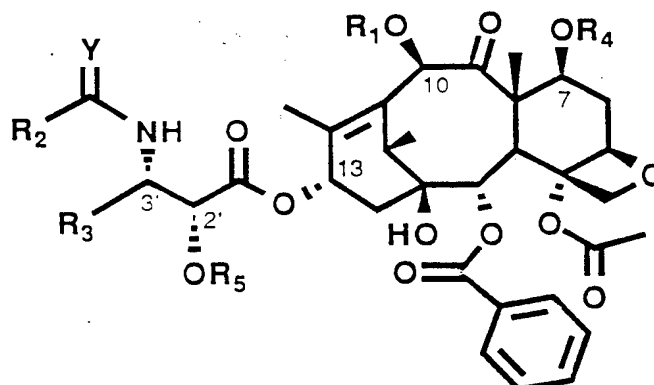
8. A β -lactam according to claim 1 in which Y is oxygen, R_2 represents RO- in which R is a methyl, ethyl, butyl, tert-butyl, phenyl or benzyl and R_3 is a phenyl, 2-phenylethenyl, cyclohexylmethyl or isobutyl;

Y is oxygen, R_2 is an ethylamino, tert-butylamino, phenylamino, benzylamino, dimethylamino or morpholino group, and R_3 is a phenyl;

Y is sulfur, R_2 is a phenylamino, dimethylamino or morpholino group, R_3 is a phenyl;

G_1 is a hydrogen or 1-ethoxyethyl (EE), 2,2,2-trichloroethoxycarbonyl (Troc) or acetyl.

9. A process for the preparation of a taxane derivative of the formula



in which

R_1 represents a hydrogen or an acyl or an alkyl or an alkenyl or an alkynyl or an aryl or a heteroaryl radical or a hydroxyl protecting group;

R_2 represents an RO-, RS- or RR'N- in which R represents an unsubstituted or substituted straight chain or branched alkyl, alkenyl or alkynyl, cycloalkyl, heterocycloalkyl, cycloalkenyl, heterocycloalkenyl, aryl or heteroaryl; R' is a hydrogen or R defined above; R and R' can be connected to form a cyclic structure;

Y is oxygen or sulfur;

R_3 represents an unsubstituted or substituted straight chain or branched alkyl, alkenyl or alkynyl radical, an unsubstituted or substituted cycloalkyl, cycloalkenyl or an unsubstituted or substituted carbocyclic aryl;

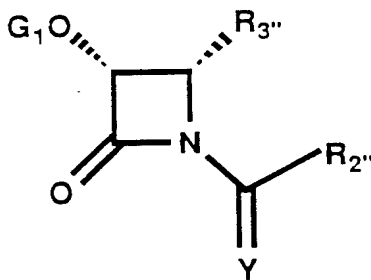
R_4 represents a hydrogen or an acyl radical or an unsubstituted or substituted straight chain or branched alkyl, alkenyl or alkynyl radical, an unsubstituted or substituted cycloalkyl, heterocycloalkyl, cycloalkenyl or heterocycloalkenyl radical, an unsubstituted or substituted aryl or heteroaryl radical, or a hydroxyl group protecting group;

R_5 represents a hydrogen or a acyl radical or an unsubstituted or substituted straight chain or branched alkyl, alkenyl, or alkynyl radical, an unsubstituted or substituted cycloalkyl, heterocycloalkyl, cycloalkenyl or heterocycloalkenyl radical, an unsubstituted or substituted aryl or heteroaryl radical, or a hydroxyl

- 50 -

protecting group;

which comprises reacting a β -lactam of the formula



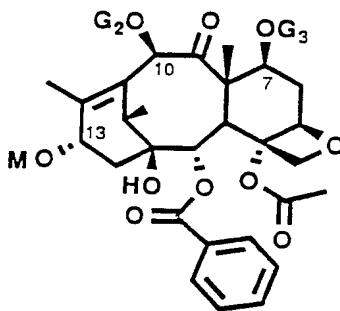
in which

Y is defined above; G_1 represents an hydroxyl
5 protecting group;

R_2'' represents a radical R_2 defined above or a
protected R_2 whenever R_2 includes one or more active
hydrogens,

10 R_3'' represents a radical R_3 defined above or a
protected R_3 whenever R_3 includes one or more active
hydrogens;

with a baccatin III derivative of the formula:



in which M is an alkali metal or alkaline earth metal atom
(ion);

15 G_2 represents a hydroxyl protecting group or an
acyl radical or an unsubstituted or substituted straight
chain or branched alkyl, alkenyl or alkynyl radical, an
unsubstituted or substituted cycloalkyl, heterocycloalkyl,
cycloalkenyl or heterocycloalkenyl radical, an

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

- 51 -

unsubstituted or substituted aryl or heteroaryl radical;
G₃ represents a hydroxyl group protecting group
or an acyl radical or an unsubstituted or substituted
straight chain or branched radical alkyl, alkenyl or
5 alkylnyl radical, an unsubstituted or substituted
cycloalkyl, heterocycloalkyl, cycloalkenyl,
heterocycloalkenyl radical, an unsubstituted or
substituted aryl or heteroaryl.

10 10. The process according to claim 9, in which
R₂ represents a radical RO-, RS-, or RR'N- in
which R represents a straight chain or branched alkyl
radical containing 1 to 10 carbon atoms, a straight chain
or branched alkenyl radical containing 2 to 10 carbon
atoms, or a straight chain or branched alkylnyl radical
15 containing 2 to 10 carbon atoms, a cycloalkyl radical
containing 3 to 10 carbon atoms, a heterocycloalkyl
radical containing 3 to 10 carbon atoms, a cycloalkenyl
radical containing 3 to 10 carbon atoms, a
heterocycloalkenyl radical containing 3 to 10 carbon
20 atoms, a polycycloalkyl radical containing 6 to 20 carbon
atoms, an aryl radical containing 6 to 20 carbons, a
heteroaryl radical containing 3 to 15 carbon atoms; these
radicals being optionally substituted with one or more
halogen, hydroxyl, alkoxy, aryloxy, heteroaryloxy, amino,
25 alkylamino, dialkylamino, mercapto, alkylthio, arylthio,
heteroarylthio, cyano, carboxyl, alkoxy carbonyl the alkyl
portion of which contains 1 to 15 carbon atoms,
aryloxycarbonyl the aryl portion of which containing 6 to
20 carbon atoms, or heteroaryloxycarbonyl the heteroaryl
30 portion of which containing 3 to 15 carbon atoms; R' is a
hydrogen or R defined above; R and R' can form a cyclic
structure which contains 2-10 carbon atoms;

R₃ represents a straight chain or branched alkyl
radical containing 1 to 10 carbon atoms, a straight chain
35 or branched alkenyl radical containing 2 to 10 carbon

- 52 -

atoms, or a straight chain or branched alkynyl radical containing 2 to 10 carbon atoms, a cycloalkyl radical containing 3 to 10 carbon atoms, a cycloalkenyl radical containing 3 to 10 carbon atoms, a polycycloalkyl radical containing 6 to 20 carbon atoms, an aryl radical containing 6 to 20 carbons; these radicals being optionally substituted with one or more halogen, hydroxyl, alkoxy, aryloxy, heteroaryloxy, amino, alkylamino, dialkylamino, mercapto, alkylthio, arylthio, heteroarylthio, cyano, carboxyl, alkoxycarbonyl, the alkyl portion of which containing 1 to 15 carbon atoms, aryloxycarbonyl, the aryl portion of which contains 6 to 20 carbon atoms, or heteroaryloxycarbonyl the heteroaryl portion of which containing 3 to 15 carbon atoms;

R_2 represents a radical R_2 defined above or a protected R_2 whenever R_2 includes one or more active hydrogens;

R_3 represents a radical R_3 defined above or a protected R_3 whenever R_3 includes one or more active hydrogens.

11. The process according to claim 9, wherein R_2 represents an RO-, RS-, or RR'N- in which R is an unsubstituted or substituted alkyl radical selected from methyl, ethyl, propyl, isopropyl, butyl, isobutyl, tert-butyl, pentyl, isopentyl, neopentyl, hexyl, isohexyl, heptyl, isoheptyl, octyl, isooctyl, cyclopropyl, cyclobutyl, cyclopentyl, cyclohexyl, cycloheptyl, cyclooctyl, and adamantyl, or an alkenyl radical selected from vinyl and allyl, or an aryl radical selected from phenyl and naphthyl, or a heteroaryl radical selected from furyl, pyrrolyl, and pyridyl, or a cycloalkenyl radical selected from cyclopentenyl, cyclyhexenyl and cycloheptenyl, or a heterocycloalkyl radical selected from an oxiranyl, tetrahydrofuryl, pyrrolidinyl, piperidinyl,

- 53 -

tetrahydropyranyl, or a heterocycloalkenyl radical selected from dihydrofuryl, dihydropyrrolyl, dihydropyranyl, dihydropyridyl; R' is a hydrogen or R defined above; cyclic RR'N- radical includes aziridino, azetidino, pyrrolidino, piperidino or morpholino group;

R₃ is an unsubstituted or substituted alkyl radical selected from methyl, ethyl, propyl, isopropyl, butyl, isobutyl, tert-butyl, pentyl, isopentyl, neopentyl, hexyl, isohexyl, heptyl, isoheptyl, octyl, isooctyl, cyclohexylmethyl, cyclohexylethyl, benzyl, phenylethyl, cyclopropyl, cyclobutyl, cyclopentyl, cyclohexyl, cycloheptyl, cyclooctyl, and adamantyl, or an alkenyl radical selected from vinyl, allyl or an alkynyl radical selected from ethynyl and propargyl or an aryl radical selected from phenyl and naphthyl, or a cycloalkenyl radical selected from cyclopentenyl, cyclohexenyl and cycloheptenyl.

R₂' represents a radical R₂ defined above or a protected R₂ wherever R₂ includes one or more active hydrogens;

R₃' represents a radical R₃ defined above or a protected R₃ wherever R₃ includes one or more active hydrogens;

G₁ represents a group protecting the hydroxyl function selected from methoxymethyl (MOM), methoxyethyl (MEM), 1-ethoxyethyl (EE), benzyloxymethyl, (β -trimethylsilyl-ethoxyl)-methyl, tetrahydropyranyl, 2,2,2-trichloroethoxycarbonyl (Troc), benzyloxycarbonyl (CBZ), tert-butoxycarbonyl (t-BOC), 9-fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc), 2,2,2-trichloroethoxymethyl, trimethylsilyl, triethylsilyl, tripropylsilyl, dimethylethylsilyl, dimethyl(t-butyl)silyl, diethylmethylsilyl, dimethylphenylsilyl and diphenylmethylsilyl, acetyl, chloroacetyl, dichloroacetyl, trichloroacetyl and trifluoroacetyl;

- 54 -

G₂ represents an acetyl or a 2,2,2-trichloroethoxycarbonyl (Troc) group;

5 G₃ represents a 2,2,2-trichloroethoxycarbonyl (Troc) or silyl group selected from trimethylsilyl, triethylsilyl, tripropylsilyl, dimethylethylsilyl, dimethylphenylsilyl, dimethyl(t-butyl)silyl, diethylmethylsilyl and diphenylmethylsilyl.

12. The process according to claim 9, wherein M is an alkali metal.

10 13. The process according to claim 10, wherein M is an alkali metal selected from lithium, sodium and potassium.

14. The process according to claim 11, wherein M is sodium or potassium.

15 15. The process according to claim 11 wherein R₁ is a hydrogen, an acetyl or an trichloroethoxycarbonyl (Troc); R₄ is a hydrogen, a triethylsilyl or a trichloroethoxycarbonyl (Troc); R₅ is a hydrogen, a triethylsilyl or ethoxyethyl.

20 16. The process according to claim 11 wherein R₂ represents RO- in which R is a methyl, ethyl, propyl, isopropyl, butyl, isobutyl, tert-butyl, neopentyl, cyclohexyl, phenyl, benzyl or 9-fluoroenylmethyl; R₃ is a phenyl, tolyl, 4-methoxyphenyl, 3,4-dimethoxyphenyl, 4-fluorophenyl, 4-trifluoromethylphenyl, 1-naphthyl, 2-naphthyl and 2-phenylethenyl; R₅ is a hydrogen.

25

17. The process according to claim 11 wherein R₂ is a methylamino, ethylamino, propylamino, isopropylamino, butylamino, isobutylamino, tert-

- 55 -

butylamino, neopentylamino, cyclohexylamino, phenylamino or benzylamino, dimethylamino or morpholino group; R_5 is a hydrogen.

5 18. The process according to claim 9 wherein R_1 is a hydrogen or a acetyl; R_2 ($= R_2''$) is tert-butoxy or tert-butylamino; R_3 ($= R_3''$) is a phenyl; Y is oxygen; R_4 is a hydrogen; R_5 is a hydrogen; G_1 is an ethoxyethyl, triethylsilyl or trichloroethoxycarbonyl (Troc); M is sodium or potassium.

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 IPC 5 C07D205/08 C07D305/14

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
 IPC 5 C07D

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	TETRAHEDRON, (INCL. TETRAHEDRON REPORTS) vol. 48, no. 34, 1992, OXFORD GB pages 6985 - 7012 I. OJIMA ET AL. 'New and efficient approaches to the semisynthesis of taxol and its C-13 side chain analogs by means of beta-lactam synthon method' cited in the application see the whole document --- -/--	1-18

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier document but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

14 April 1994

Date of mailing of the international search report

28.04.94

Name and mailing address of the ISA

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

Authorized officer

Chouly, J

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JOURNAL OF ORGANIC CHEMISTRY vol. 56, no. 5, 1991, EASTON US pages 1681 - 1683 I. OJIMA ET AL. 'Efficient and practical asymmetric synthesis of the taxol C-13 side chain, N-benzoyl-(2R,3S)-3-phenylisoserine, and its analogues via chiral 3-hydroxy-4-aryl-beta-lactams through chiral ester enolate-imine cyclocondensation' cited in the application see the whole document ---	1-18
Y	EP,A,0 400 971 (FLORIDA STATE UNIVERSITY) 5 December 1990 cited in the application see claims ---	1-18
P,X	WO,A,93 06093 (FLORIDA STATE UNIVERSITY) 1 April 1993 see pages 15, 28-33 and claims ---	1-18
P,Y	EP,A,0 525 589 (BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY) 3 February 1993 see the whole document -----	1-18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/US 94/00669

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A-0400971	05-12-90	US-A- 5175315	29-12-92
		AU-B- 630696	05-11-92
		AU-A- 5515090	20-12-90
		CA-A- 2016951	30-11-90
		CN-A- 1057049	18-12-91
		JP-A- 3086860	11-04-91
WO-A-9306093	01-04-93	AU-A- 2212292	25-03-93
		AU-A- 2212392	25-03-93
		AU-A- 2212492	25-03-93
		AU-B- 643911	25-11-93
		AU-A- 2688892	27-04-93
		AU-B- 647971	31-03-94
		AU-A- 2689092	27-04-93
		AU-A- 2692692	27-04-93
		AU-A- 3983793	19-08-93
		AU-A- 3983893	19-08-93
		CA-A- 2077394	24-03-93
		CA-A- 2077598	24-03-93
		CA-A- 2077621	24-03-93
		CN-A- 1075315	18-08-93
		CN-A- 1075718	01-09-93
		EP-A- 0534707	31-03-93
		EP-A- 0534708	31-03-93
		EP-A- 0534709	31-03-93
		PT-A- 100884	30-11-93
		WO-A- 9306094	01-04-93
		WO-A- 9306079	01-04-93
		US-A- 5229526	20-07-93
		US-A- 5227400	13-07-93
		US-A- 5243045	07-09-93
		US-A- 5250683	05-10-93
		US-A- 5274124	28-12-93
		US-A- 5284864	08-02-94
US-A- 5283253	01-02-94		
US-A- 5284865	08-02-94		
EP-A-0525589	03-02-93	AU-A- 2064092	04-02-93
		CN-A- 1069028	17-02-93
		JP-A- 5201969	10-08-93

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
**INSTITUT NATIONAL
 DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE**
 PARIS

①1 N° de publication : **2 732 340**
 (à n'utiliser que pour les
 commandes de reproduction)

②1 N° d'enregistrement national : **95 03545**

⑤1 Int Cl⁶ : C 07 D 307/93, A 61 K 31/34

①2 **DEMANDE DE BREVET D'INVENTION**

A1

②2 Date de dépôt : 27.03.95.

③0 Priorité :

④3 Date de la mise à disposition du public de la demande : 04.10.96 Bulletin 96/40.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du présent fascicule.*

⑥0 Références à d'autres documents nationaux apparentés :

⑦1 Demendeur(s) : *RHONE POULENC RORER SA SOCIETE ANONYME — FR.*

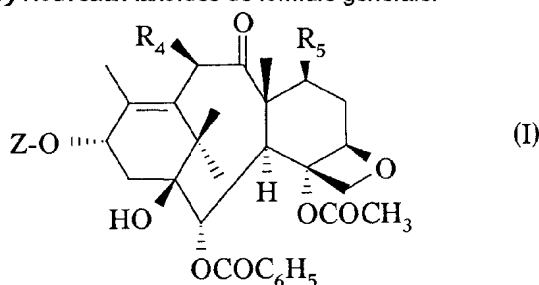
⑦2 Inventeur(s) : *BOUCHARD HERVE, BOURZAT JEAN DOMINIQUE et COMMERCON ALAIN.*

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire :

⑤4 **NOUVEAUX TAXOÏDES, LEUR PREPARATION ET LES COMPOSITIONS PHARMACEUTIQUES QUI LES CONTIENNENT.**

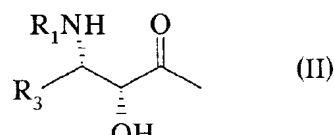
⑤7 Nouveaux taxoïdes de formule générale:



leur préparation et les compositions pharmaceutiques qui les contiennent.

Dans la formule générale (I):

Z représente un atome d'hydrogène ou un radical de formule générale:



dans laquelle dans laquelle R₁ représente un radical benzoyle éventuellement substitué ou un radical R₂-O-CO- dans lequel R₂ représente un radical alcoyle, alcényle, alcynyle, cycloalcoyle, cycloalcényle, bicycloalcoyle, phényle éventuellement substitué ou hétérocyclyle,

R₃ représente un radical alcoyle, alcényle, alcynyle, cycloalcoyle, phényle, naphyle ou hétérocyclique aromatique,

R₄ représente un atome d'hydrogène ou un radical hydroxy ou un radical alcoxy, alcényloxy, alcynyloxy éventuellement substitué, alcanoyloxy, alcényloxy, alcynoyloxy, alcoxyacétyle, alcoyloxycarbonyloxy, ou un radical cycloalcoyloxy ou cycloalcényloxy, et

R₅ représente un radical radical alcoxy éventuellement substitué ou un radical cycloalcoyloxy ou cycloalcényloxy.

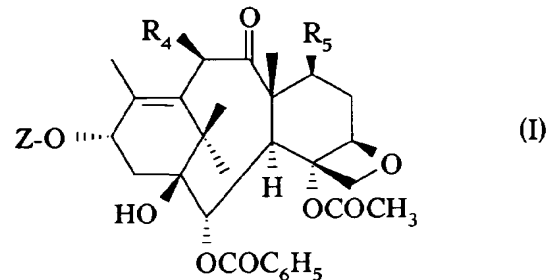
Les nouveaux produits de formule générale (I) dans laquelle Z représente un radical de formule générale (II) présentent des propriétés antitumorales et antileucémiques remarquables.

FR 2 732 340 - A1



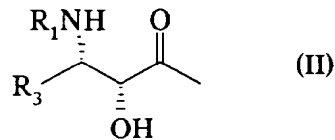
**NOUVEAUX TAXOÏDES. LEUR PRÉPARATION ET LES COMPOSITIONS
PHARMACEUTIQUES QUI LES CONTIENNENT**

La présente invention concerne de nouveaux taxoïdes de formule générale :



5 dans laquelle

Z représente un atome d'hydrogène ou un radical de formule générale :



dans laquelle :

- R₁ représente un radical benzoyle éventuellement substitué par un ou
 10 plusieurs atomes ou radicaux, identiques ou différents, choisis parmi les atomes
 d'halogène et les radicaux alcoyles contenant 1 à 4 atomes de carbone, alcoxy
 contenant 1 à 4 atomes de carbone ou trifluorométhyle, thényle ou furoyle ou un
 radical R₂-O-CO- dans lequel R₂ représente :
- un radical alcoyle contenant 1 à 8 atomes de carbone, alcényle contenant 2 à 8
 - 15 atomes de carbone, alcynyle contenant 3 à 8 atomes de carbone, cycloalcoyle
 contenant 3 à 6 atomes de carbone, cycloalcényle contenant 4 à 6 atomes de carbone,
 bicycloalcoyle contenant 7 à 10 atomes de carbone, ces radicaux étant éventuellement
 substitués par un ou plusieurs substituants choisis parmi les atomes d'halogène et les
 radicaux hydroxy, alcoxy contenant 1 à 4 atomes de carbone, dialcoylamino dont
 - 20 chaque partie alcoyle contient 1 à 4 atomes de carbone, pipéridino, morpholino,
 pipérazinyl-1 (éventuellement substitué en -4 par un radical alcoyle contenant 1 à 4
 atomes de carbone ou par un radical phénylcoyle dont la partie alcoyle contient 1 à 4
 atomes de carbone), cycloalcoyle contenant 3 à 6 atomes de carbone, cycloalcényle
 contenant 4 à 6 atomes de carbone, phényle (éventuellement substitué par un ou
 - 25 plusieurs atomes ou radicaux choisis parmi les atomes d'halogène et les radicaux
 alcoyles contenant 1 à 4 atomes de carbone ou alcoxy contenant 1 à 4 atomes de

carbone), cyano, carboxy ou alcoxycarbonyle dont la partie alcoyle contient 1 à 4 atomes de carbone,

5 - un radical phényle ou α - ou β -naphtyle éventuellement substitué par un ou plusieurs atomes ou radicaux choisis parmi les atomes d'halogène et les radicaux alcoyles contenant 1 à 4 atomes de carbone ou alcoxy contenant 1 à 4 atomes de carbone ou un radical hétérocyclique aromatique à 5 chaînons choisi de préférence parmi les radicaux furyle et thiényle,

- ou un radical hétérocyclyle saturé contenant 4 à 6 atomes de carbone éventuellement substitué par un ou plusieurs radicaux alcoyles contenant 1 à 4 atomes de carbone,

10 R_3 représente un radical alcoyle droit ou ramifié contenant 1 à 8 atomes de carbone, alcényle droit ou ramifié contenant 2 à 8 atomes de carbone, alcynyle droit ou ramifié contenant 2 à 8 atomes de carbone, cycloalcoyle contenant 3 à 6 atomes de carbone, phényle ou α - ou β -naphtyle éventuellement substitué par un ou plusieurs atomes ou radicaux choisis parmi les atomes d'halogène et les radicaux alcoyles, 15 alcényles, alcynyles, aryles, aralcoyles, alcoxy, alcoylthio, aryloxy, arylthio, hydroxy, hydroxyalcoyle, mercapto, formyle, acyle, acylamino, aroylamino, alcoxycarbonylamino, amino, alcoylamino, dialcoylamino, carboxy, alcoxycarbonyle, carbamoyle, alcoylcarbamoyle, dialcoylcarbamoyle, cyano, nitro et trifluorométhyle, ou un hétérocycle aromatique ayant 5 chaînons et contenant un ou plusieurs hétéroatomes, 20 identiques ou différents, choisis parmi les atomes d'azote, d'oxygène ou de soufre et éventuellement substitué par un ou plusieurs substituants, identiques ou différents, choisis parmi les atomes d'halogène et les radicaux alcoyles, aryles, amino, alcoylamino, dialcoylamino, alcoxycarbonylamino, acyle, arylcarbonyle, cyano, carboxy, carbamoyle, alcoylcarbamoyle, dialcoylcarbamoyle ou alcoxycarbonyle, étant 25 entendu que, dans les substituants des radicaux phényle, α - ou β -naphtyle et hétérocyclyles aromatiques, les radicaux alcoyles et les portions alcoyles des autres radicaux contiennent 1 à 4 atomes de carbone et que les radicaux alcényles et alcynyles contiennent 2 à 8 atomes de carbone et que les radicaux aryles sont des radicaux phényles ou α - ou β -naphtyles,

30 R_4 représente un atome d'hydrogène ou un radical hydroxy ou un radical alcoxy contenant 1 à 6 atomes de carbone en chaîne droite ou ramifiée, alcényloxy contenant 3 à 6 atomes de carbone en chaîne droite ou ramifiée, alcynyloxy contenant 3 à 6 atomes de carbone en chaîne droite ou ramifiée, cycloalcoyloxy contenant 3 à 6 atomes de carbone, cycloalcényloxy contenant 3 à 6 atomes de carbone, alcanoyloxy 35 dont la partie alcanoyle contient 1 à 6 atomes de carbone en chaîne droite ou ramifiée,

alcényloxy dont la partie alcénoyle contient 3 à 6 atomes de carbone en chaîne droite ou ramifiée, alcynoyloxy dont la partie alcynoyle contient 3 à 6 atomes de carbone en chaîne droite ou ramifiée, alcoxyacétyle dont la partie alcoyle contient 1 à 6 atomes de carbone en chaîne droite ou ramifiée, alcoylthioacétyle dont la partie alcoyle contient 1 à 6 atomes de carbone en chaîne droite ou ramifiée, alcoyloxy-carbonyloxy dont la partie alcoyle contient 1 à 6 atomes de carbone en chaîne droite ou ramifiée, ces radicaux étant éventuellement substitués par un ou plusieurs atomes d'halogène ou par un radical alcoxy contenant 1 à 4 atomes de carbone, alcoylthio contenant 1 à 4 atomes de carbone, ou un radical carboxy, alcoyloxy-carbonyle dont la partie alcoyle contient 1 à 4 atomes de carbone, cyano, carbamoyle, N-alcoyl-carbamoyle ou N,N-dialcoyl-carbamoyle dont chaque partie alcoyle contient 1 à 4 atomes de carbone ou forme avec l'atome d'azote auquel elle est liée un radical hétérocyclique saturé contenant 5 ou 6 chaînons et éventuellement un second hétéroatome choisi parmi les atomes d'oxygène, de soufre ou d'azote éventuellement substitué par un radical alcoyle contenant 1 à 4 atomes de carbone ou un radical phényle ou un radical phényl-alcoyle dont la partie alcoyle contient 1 à 4 atomes de carbone, ou bien R₄ représente un radical benzyloxy ou hétérocyclyl-carbonyloxy dans lequel la partie hétérocyclique représente un hétérocycle aromatique 5 ou 6 chaînons contenant un ou plusieurs hétéroatomes choisis parmi les atomes d'oxygène, de soufre ou d'azote,

R₅ représente un radical alcoxy contenant 1 à 6 atomes de carbone en chaîne droite ou ramifiée éventuellement substitué par un radical alcoxy contenant 1 à 4 atomes de carbone, alcényloxy contenant 3 à 6 atomes de carbone, alcynoyloxy contenant 3 à 6 atomes de carbone, cycloalcoyloxy contenant 3 à 6 atomes de carbone, cycloalcényloxy contenant 3 à 6 atomes de carbone, ces radicaux étant éventuellement substitués par un ou plusieurs atomes d'halogène ou par un radical alcoxy contenant 1 à 4 atomes de carbone, alcoylthio contenant 1 à 4 atomes de carbone, ou un radical carboxy, alcoyloxy-carbonyle dont la partie alcoyle contient 1 à 4 atomes de carbone, cyano, carbamoyle, N-alcoyl-carbamoyle ou N,N-dialcoyl-carbamoyle dont chaque partie alcoyle contient 1 à 4 atomes de carbone ou forme avec l'atome d'azote auquel elle est liée un radical hétérocyclique saturé contenant 5 ou 6 chaînons et éventuellement un second hétéroatome choisi parmi les atomes d'oxygène, de soufre ou d'azote éventuellement substitué par un radical alcoyle contenant 1 à 4 atomes de carbone ou un radical phényle ou un radical phényl-alcoyle dont la partie alcoyle contient 1 à 4 atomes de carbone.

De préférence les radicaux aryles pouvant être représentés R_3 sont des radicaux phényles ou α - ou β -naphtyles éventuellement substitués par un ou plusieurs atomes ou radicaux choisis parmi les atomes d'halogène (fluor, chlore, brome, iode) et les radicaux alcoyles, alcényles, alcynyles, aryles, arylalcoyles, alcoxy, alcoylthio, aryloxy, arylthio, hydroxy, hydroxyalcoyle, mercapto, formyle, acyle, acylamino, aroylamino, alcoxycarbonylamino, amino, alcoylamino, dialcoylamino, carboxy, alcoxycarbonyle, carbamoyle, dialcoylcarbamoyle, cyano, nitro et trifluoro-méthyle, étant entendu que les radicaux alcoyles et les portions alcoyles des autres radicaux contiennent 1 à 4 atomes de carbone, que les radicaux alcényles et alcynyles contiennent 2 à 8 atomes de carbone et que les radicaux aryles sont des radicaux phényles ou α - ou β -naphtyles.

De préférence les radicaux hétérocycliques pouvant être représentés par R_3 sont des radicaux hétérocycliques aromatiques ayant 5 chaînons et contenant un ou plusieurs atomes, identiques ou différents, choisis parmi les atomes d'azote, d'oxygène ou de soufre, éventuellement substitués par un ou plusieurs substituants, identiques ou différents, choisis parmi les atomes d'halogène (fluor, chlore, brome, iode) et les radicaux alcoyles contenant 1 à 4 atomes de carbone, aryles contenant 6 à 10 atomes de carbone, alcoxy contenant 1 à 4 atomes de carbone, aryloxy contenant 6 à 10 atomes de carbone, amino, alcoylamino contenant 1 à 4 atomes de carbone, dialcoylamino dont chaque partie alcoyle contient 1 à 4 atomes de carbone, acylamino dont la partie acyle contient 1 à 4 atomes de carbone, alcoxycarbonylamino contenant 1 à 4 atomes de carbone, acyle contenant 1 à 4 atomes de carbone, arylcarbonyle dont la partie aryle contient 6 à 10 atomes de carbone, cyano, carboxy, carbamoyle, alcoylcarbamoyle dont la partie alcoyle contient 1 à 4 atomes de carbone, dialcoylcarbamoyle dont chaque partie alcoyle contient 1 à 4 atomes de carbone ou alcoxycarbonyle dont la partie alcoxy contient 1 à 4 atomes de carbone.

De préférence les radicaux R_4 et R_5 , identiques ou différents, représentent des radicaux alcoxy droits ou ramifiés contenant 1 à 6 atomes de carbone éventuellement substitués par un radical méthoxy, éthoxy, méthylthio, éthylthio, carboxy, méthoxycarbonyle, éthoxycarbonyle, cyano, carbamoyle, N-méthylcarbamoyle, N-éthylcarbamoyle, N,N-diméthylcarbamoyle, N,N-diéthylcarbamoyle, N-pyrrolidinocarbonyle ou N-pipéridinocarbonyle.

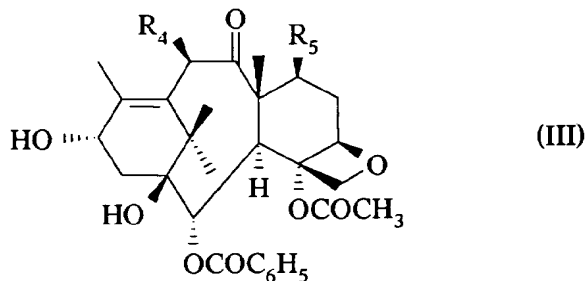
Plus particulièrement, la présente invention concerne les produits de formule générale (I) dans laquelle Z représente un atome d'hydrogène ou un radical de formule générale (II) dans laquelle R_1 représente un radical benzoyle ou un radical R_2 -O-CO-

dans lequel R₂ représente un radical tert-butyle et R₃ représente un radical alcoyle contenant 1 à 6 atomes de carbone, alcényle contenant 2 à 6 atomes de carbone, cycloalcoyle contenant 3 à 6 atomes de carbone, phényle éventuellement substitué par un ou plusieurs atomes ou radicaux, identiques ou différents choisis parmi les atomes
 5 d'halogène (fluor, chlore) et les radicaux alcoyles (méthyle), alcoxy (méthoxy), dialcoylamino (diméthylamino), acylamino (acétylamino), alcoxycarbonylamino (tert-butoxycarbonylamino) ou trifluorométhyle ou un radical furyle-2 ou -3, thiényle-2 ou -3 ou thiazolyle-2, -4 ou -5 et R₄ et R₅, identiques ou différents, représentent un radical alcoyloxy droit ou ramifié contenant 1 à 6 atomes de carbone.

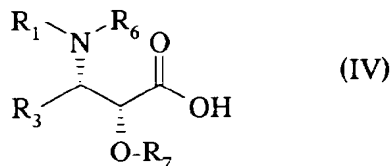
10 Plus particulièrement encore, la présente invention concerne les produits de formule générale (I) dans laquelle Z représente un atome d'hydrogène ou un radical de formule générale (II) dans laquelle R₁ représente un radical benzoyle ou un radical R₂-O-CO- dans lequel R₂ représente un radical tert-butyle et R₃ représente un radical isobutyle, isobutényle, butényle, cyclohexyle, phényle, furyle-2, furyle-3, thiényle-2,
 15 thiényle-3, thiazolyle-2, thiazolyle-4 ou thiazolyle-5, R₄ et R₅ représentent chacun un radical méthoxy.

Les produits de formule générale (I) dans laquelle Z représente un radical de formule générale (II) présentent des propriétés antitumorales et antileucémiques remarquables.

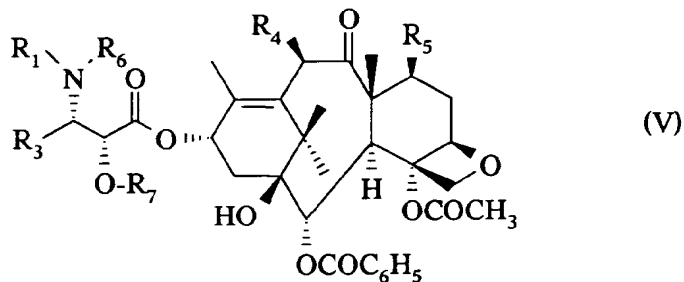
20 Selon la présente invention, les nouveaux produits de formule générale (I) dans laquelle Z représente un radical de formule générale (II) peuvent être obtenus par estérification d'un produit de formule générale :



25 dans laquelle R₄ et R₅ sont définis comme précédemment, au moyen d'un acide de formule générale :



dans laquelle R_1 et R_3 sont définis comme précédemment, ou bien R_6 représente un atome d'hydrogène et R_7 représente un groupement protecteur de la fonction hydroxy, et ou bien R_6 et R_7 forment ensemble un hétérocycle saturé à 5 ou 6 chaînons, ou d'un dérivé de cet acide pour obtenir un ester de formule générale :



5

dans laquelle R_1 , R_3 , R_4 , R_5 , R_6 et R_7 sont définis comme précédemment, suivi du remplacement des groupements protecteurs représentés par R_7 et/ou R_6 et R_7 par des atomes d'hydrogène.

L'estérification au moyen d'un acide de formule générale (IV) peut être effectuée en présence d'un agent de condensation (carbodiimide, carbonate réactif) et d'un agent d'activation (aminopyridines) dans un solvant organique (éther, ester, cétones, nitriles, hydrocarbures aliphatiques, hydrocarbures aliphatiques halogénés, hydrocarbures aromatiques) à une température comprise entre -10 et 90°C.

L'estérification peut aussi être réalisée en utilisant l'acide de formule générale (IV) sous forme d'anhydride symétrique en opérant en présence d'un agent d'activation (aminopyridines) dans un solvant organique (éthers, esters, cétones, nitriles, hydrocarbures aliphatiques, hydrocarbures aliphatiques halogénés, hydrocarbures aromatiques) à une température comprise entre 0 et 90°C.

L'estérification peut aussi être réalisée en utilisant l'acide de formule générale (IV) sous forme d'halogénure ou sous forme d'anhydride mixte avec un acide aliphatique ou aromatique, éventuellement préparé in situ, en présence d'une base (amine aliphatique tertiaire) en opérant dans un solvant organique (éthers, esters, cétones, nitriles, hydrocarbures aliphatiques, hydrocarbures aliphatiques halogénés, hydrocarbures aromatiques) à une température comprise entre 0 et 80°C.

De préférence, R_6 représente un atome d'hydrogène et R_7 représente un groupement protecteur de la fonction hydroxy ou bien R_6 et R_7 forment ensemble un hétérocycle saturé à 5 ou 6 chaînons.

Lorsque R_6 représente un atome d'hydrogène, R_7 représente de préférence un radical méthoxyméthyle, éthoxy-1 éthyle, benzyloxyméthyle, triméthylsilyle,

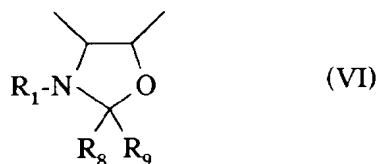
triéthylsilyle, β -triméthylsilyléthoxyméthyle, benzyloxycarbone ou tétrahydropyrannyle.

Lorsque R_6 et R_7 forment ensemble un hétérocycle, celui-ci est de préférence un cycle oxazolidine éventuellement mono-substitué ou gem-disubstitué en position -2.

Le remplacement des groupements protecteurs R_7 et/ou R_6 et R_7 par des atomes d'hydrogène peut être effectué, selon leur nature de la manière suivante :

1) lorsque R_6 représente un atome d'hydrogène et R_7 représente un groupement protecteur de la fonction hydroxy, le remplacement des groupements protecteurs par des atomes d'hydrogène s'effectue au moyen d'un acide minéral (acide chlorhydrique, acide sulfurique, acide fluorhydrique) ou organique (acide acétique, acide méthanesulfonique, acide trifluorométhanesulfonique, acide p.toluènesulfonique) utilisé seul ou en mélange en opérant dans un solvant organique choisi parmi les alcools, les éthers, les esters, les hydrocarbures aliphatiques, les hydrocarbures aliphatiques halogénés, les hydrocarbures aromatiques ou les nitriles à une température comprise entre -10 et 60°C,

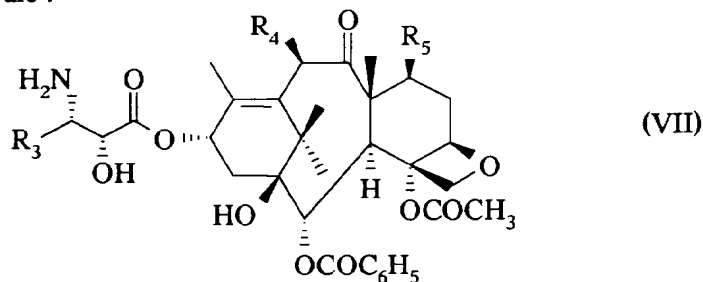
2) lorsque R_6 et R_7 forment ensemble un hétérocycle saturé à 5 ou 6 chaînons et plus particulièrement un cycle oxazolidine de formule générale :



dans laquelle R_1 est défini comme précédemment, R_8 et R_9 , identiques ou différents, représentent un atome d'hydrogène ou un radical alcoyle contenant 1 à 4 atomes de carbone, ou un radical aralcoyle dont la partie alcoyle contient 1 à 4 atomes de carbone et la partie aryle représente, de préférence, un radical phényle éventuellement substitué par un ou plusieurs radicaux alcoxy contenant 1 à 4 atomes de carbone, ou un radical aryle représentant, de préférence un radical phényle éventuellement substitué par un ou plusieurs radicaux alcoxy contenant 1 à 4 atomes de carbone, ou bien R_8 représente un radical alcoyle contenant 1 à 4 atomes de carbone ou un radical trihalométhyle tel que trichlorométhyle ou un radical phényle substitué par un radical trihalométhyle tel que trichlorométhyle et R_9 représente un atome d'hydrogène, ou bien R_8 et R_9 forment ensemble avec l'atome de carbone auquel ils sont liés un cycle ayant 4 à 7 chaînons, le remplacement du groupement

protecteur formé par R_6 et R_7 par des atomes d'hydrogène peut être effectué, selon les significations de R_1 , R_8 et R_9 , de la manière suivante :

- a) lorsque R_1 représente un radical tert-butoxycarboyle, R_8 et R_9 , identiques ou différents, représentent un radical alcoyle ou un radical aralcoyle (benzyle) ou aryle (phényle), ou bien R_8 représente un radical trihalométhyle ou un radical phényle substitué par un radical trihalométhyle, et R_9 représente un atome d'hydrogène, ou bien R_8 et R_9 forment ensemble un cycle ayant de 4 à 7 chaînons, le traitement de l'ester de formule générale (V) par un acide minéral ou organique éventuellement dans un solvant organique tel qu'un alcool conduit au produit de formule générale :



dans laquelle R_3 , R_4 et R_5 sont définis comme précédemment, qui est acylé au moyen de chlorure de benzoyle dans lequel le noyau phényle est éventuellement substitué, de chlorure de thényle, de chlorure de furoyle ou d'un produit de formule générale :



dans laquelle R_2 est défini comme précédemment et X représente un atome d'halogène (fluor, chlore) ou un reste $-O-R_2$ ou $-O-CO-O-R_2$, pour obtenir un produit de formule générale (I) dans laquelle Z représente un radical de formule générale (II).

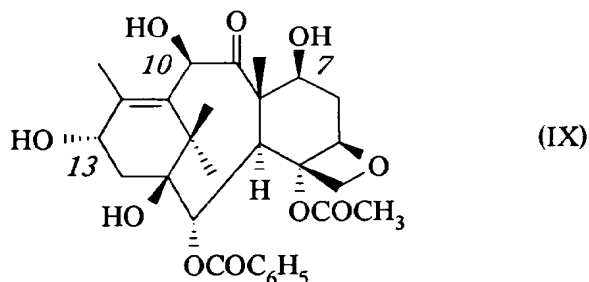
- De préférence, le produit de formule générale (V) est traité par l'acide formique à une température voisine de 20°C pour fournir le produit de formule générale (VII).

- De préférence, l'acylation du produit de formule générale (VII) au moyen d'un chlorure de benzoyle dans lequel le radical phényle est éventuellement substitué, de chlorure de thényle ou de chlorure de furoyle ou d'un produit de formule générale (VIII) est effectuée dans un solvant organique inerte choisi parmi les esters tels que l'acétate d'éthyle, l'acétate d'isopropyle ou l'acétate de n.butyle et les hydrocarbures aliphatiques halogénés tels que le dichlorométhane ou le dichloro-1,2 éthane en présence d'une base minérale telle que le bicarbonate de sodium ou organique telle

que la triéthylamine. La réaction est effectuée à une température comprise entre 0 et 50°C, de préférence voisine de 20°C.

b) lorsque R₁ représente un radical benzoyle éventuellement substitué, thénoyloyle ou furoyle ou un radical R₂O-CO- dans lequel R₂ est défini comme précédemment, R₈ représente un atome d'hydrogène ou un radical alcoxy contenant 1 à 4 atomes de carbone ou un radical phényle substitué par un ou plusieurs radicaux alcoxy contenant 1 à 4 atomes de carbone et R₉ représente un atome d'hydrogène, le remplacement du groupement protecteur formé par R₆ et R₇ par des atomes d'hydrogène s'effectue en présence d'un acide minéral (acide chlorhydrique, acide sulfurique) ou organique (acide acétique, acide méthanesulfonique, acide trifluorométhanesulfonique, acide p.toluènesulfonique) utilisé seul ou en mélange en quantité stoechiométrique ou catalytique, en opérant dans un solvant organique choisi parmi les alcools, les éthers, les esters, les hydrocarbures aliphatiques, les hydrocarbures aliphatiques halogénés et les hydrocarbures aromatiques à une température comprise entre -10 et 60°C, de préférence entre 15 et 30°C.

Selon l'invention, les produits de formule générale (III), c'est-à-dire les produits de formule générale (I) dans laquelle Z représente un atome d'hydrogène, R₄ est défini comme précédemment mais ne peut pas représenter un atome d'hydrogène ou un radical hydroxy et R₅ est défini comme précédemment, peuvent être obtenus à partir de la 10-désacétyl-baccatine III de formule :

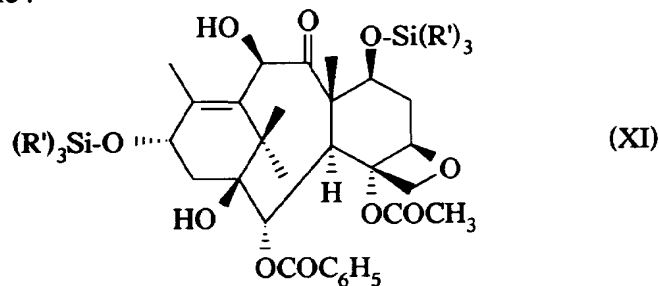


Il peut être particulièrement avantageux de protéger sélectivement les fonctions hydroxy en positions 7 et 13, par exemple sous forme d'un di-éther silylé qui peut être obtenu par action d'un halogénure de silyle de formule générale :



dans laquelle les symboles R', identiques ou différents, représentent un radical alcoyle contenant 1 à 4 atomes de carbone éventuellement substitué par un radical phényle,

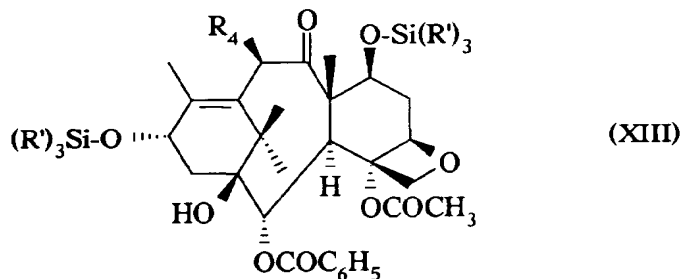
ou un radical phényle, sur la 10-désacétyl-baccatine III pour obtenir un produit de formule générale :



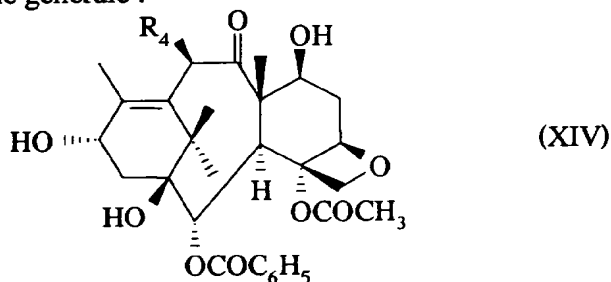
5 dans laquelle R' est défini comme précédemment, puis action d'un produit de formule générale :



10 dans laquelle R'₄ représente un radical alcoyle, alcényle, alcynyle, cycloalcoyle, cycloalcényle, alcanoyle, alcénoyle, alcynoyle, alcoxyacétyle, alcoylthioacétyle ou alcoyloxycarbone éventuellement substitué, ou un radical benzoyle ou hétérocyclalcoyle, ces différents radicaux et substituants ayant une définition identique à celle donnée dans la définition de R₄ et X₁ représente un reste d'ester réactif ou un atome d'halogène pour obtenir un produit de formule générale :



15 dans laquelle R' et R₄ sont définis comme précédemment dont les groupements protecteurs silylés sont remplacés par des atomes d'hydrogène pour obtenir un produit de formule générale :



dans laquelle R₄ est défini comme précédemment, qui est étherifié sélectivement en position 7 par action d'un produit de formule générale :

R'_5-X_2 (XV)

dans laquelle R'_5 représente un radical alcoyle, alcényle, alcynyle, cycloalcoyle, cycloalcényle éventuellement substitué, ces différents radicaux et substituants ayant une définition identique à celle donnée dans la définition de R_5 et X_2 représente
5 atome d'halogène ou un reste d'ester réactif tel qu'un reste d'ester sulfurique ou sulfonique pour donner le produit de formule générale (III).

Généralement, l'action d'un dérivé silylé de formule générale (X) sur la
10 10-désacétyl-baccatine III est effectuée dans la pyridine ou la triéthylamine éventuellement en présence d'un solvant organique tel qu'un hydrocarbure aromatique comme le benzène, le toluène ou les xylènes à une température comprise entre 0°C et la température de reflux du mélange réactionnel.

Généralement, l'action d'un produit de formule générale (XII) sur un produit
de formule générale (XI), est effectuée, après métallation de la fonction hydroxy en position 10 au moyen d'un hydrure de métal alcalin tel que l'hydrure de sodium, un
15 amidure de métal alcalin tel que l'amidure de lithium ou d'un alcoylure de métal alcalin tel que le butyllithium, en opérant dans un solvant organique tel que le diméthylformamide ou le tétrahydrofurane à une température comprise entre 0 et 50°C.

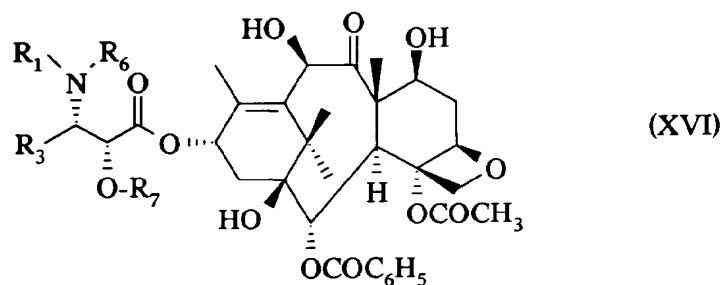
Généralement le remplacement des groupements protecteurs silylés du
20 produit de formule générale (XIII) par des atomes d'hydrogène s'effectue au moyen d'un acide tel que l'acide fluorhydrique ou l'acide trifluoroacétique en présence d'une base telle que la triéthylamine ou la pyridine éventuellement substituée par un ou plusieurs radicaux alcoyles contenant 1 à 4 atomes de carbone, éventuellement associée à un solvant organique inerte tel qu'un nitrile comme l'acétonitrile ou un
25 hydrocarbure aliphatique halogéné comme le dichlorométhane à une température comprise entre 0 et 80°C.

Généralement l'action d'un produit de formule générale (XV) sur un produit
de formule générale (XIV) s'effectue dans les conditions indiquées précédemment pour l'action d'un produit de formule générale (XII) sur un produit de formule
30 générale (XI).

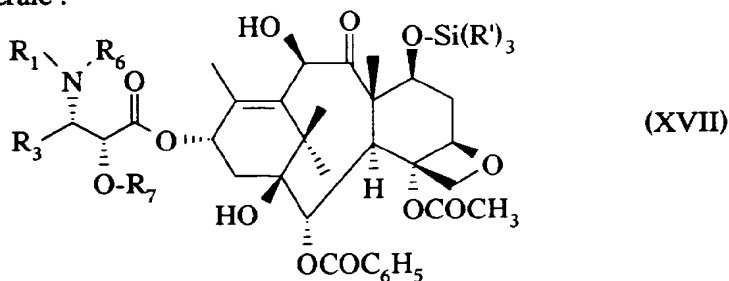
Les produits de formule générale (III) dans laquelle R_4 représente un atome
d'hydrogène ou un radical hydroxy et R_5 est défini comme précédemment, peuvent être obtenus par action d'un produit de formule générale (XV) sur un produit de
formule générale (XIV) dans laquelle R_4 représente un atome d'hydrogène ou un
35 radical hydroxy dans les conditions décrites précédemment pour l'action d'un produit de formule générale (XII) sur un produit de formule générale (XI).

Les produits de formule générale (XIV) dans laquelle R_4 représente un atome d'hydrogène peuvent être obtenus dans les conditions décrites dans des demandes internationales PCT WO 94/11547 et PCT WO 93/06093.

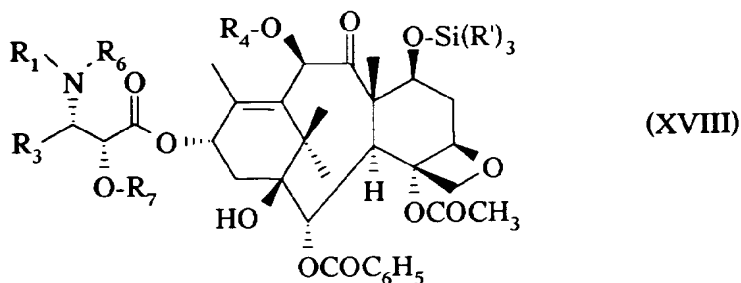
Selon l'invention, les produits de formule générale (I) dans laquelle Z représente un radical de formule générale (II), R_4 est défini comme précédemment mais ne peut pas représenter un atome d'hydrogène ou un radical hydroxy et R_5 est défini comme précédemment, peuvent être obtenus à partir d'un produit de formule générale :



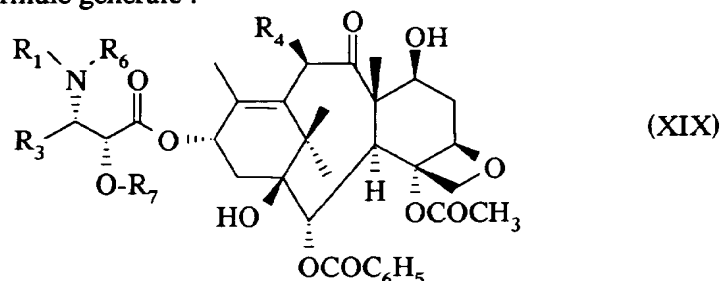
10 dans laquelle R_1 , R_3 , R_6 et R_7 sont définis comme précédemment par silylation en position 7 au moyen d'un produit de formule générale (X) pour obtenir un produit de formule générale :



15 dans laquelle R' , R_1 , R_3 , R_6 et R_7 sont définis comme précédemment, qui est fonctionnalisé en position 10 au moyen d'un produit de formule générale (XII) pour donner un produit de formule générale :



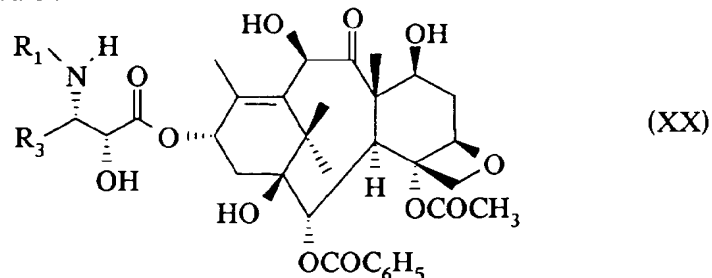
dans laquelle R', R₁, R₃, R₄, R₆ et R₇ sont définis comme précédemment dont le groupement protecteur silylé est remplacé par un atome d'hydrogène pour donner un produit de formule générale :



- 5 qui, par action d'un produit de formule générale (XV) conduit au produit de formule générale (V) dont les groupements protecteurs sont remplacés par des atomes d'hydrogène pour donner un produit de formule générale (I) dans laquelle Z représente un radical de formule générale (II).

10 Les réactions de silylation, de fonctionnalisation et de remplacement des groupements protecteurs par des atomes d'hydrogène sont effectuées dans des conditions analogues à celles décrites ci-dessus.

15 Les produits de formule générale (XVI) peuvent être obtenus dans les conditions décrites dans le brevet européen EP 0336 841 et les demandes internationales PCT WO 92/09589 et WO 94/07878 ou à partir des produits de formule générale :



dans laquelle R₁ et R₃ sont définis comme précédemment selon les méthodes connues de protection de la fonction hydroxy de la chaîne latérale sans toucher au reste de la molécule.

- 20 Selon l'invention, les produits de formule générale (I) dans laquelle Z représente un radical de formule générale (II), R₄ représente un atome d'hydrogène ou un radical hydroxy et R₅ est défini comme précédemment, peuvent être obtenus par action d'un produit de formule générale (XV) sur un produit de formule générale (XIX) dans laquelle R₄ représente un atome d'hydrogène ou un radical hydroxy, R₁,

R₃, R₆ et R₇ sont définis comme précédemment en opérant dans les conditions décrites précédemment pour l'action d'un produit de formule générale (XII) sur un produit de formule générale (XI) pour donner le produit de formule générale (XIII), suivie du remplacement des groupements protecteurs par des atomes d'hydrogène.

5 Les produits de formule générale (XIX) dans laquelle R₄ représente un atome d'hydrogène peuvent être obtenus dans les conditions décrites dans les demandes internationales PCT WO 94/11547 et WO 93/06093.

Les nouveaux produits de formule générale (I) obtenus par la mise en oeuvre des procédés selon l'invention peuvent être purifiés selon les méthodes
10 connues telles que la cristallisation ou la chromatographie.

Les produits de formule générale (I) dans laquelle Z représente un radical de formule générale (II) présentent des propriétés biologiques remarquables.

In vitro, la mesure de l'activité biologique est effectuée sur la tubuline extraite de cerveau de porc par la méthode de M.L. Shelanski et coll., Proc. Natl.
15 Acad. Sci. USA, 70, 765-768 (1973). L'étude de la dépolymérisation des microtubules en tubuline est effectuée selon la méthode de G. Chauvière et coll., C.R. Acad. Sci., 293, série II, 501-503 (1981). Dans cette étude les produits de formule générale (I) dans laquelle Z représente un radical de formule générale (II) se sont montrés au moins aussi actifs que le taxol et le Taxotère.

20 In vivo, les produits de formule générale (I) dans laquelle Z représente un radical de formule générale (II) se sont montrés actifs chez la souris greffée par le mélanome B16 à des doses comprises entre 1 et 10 mg/kg par voie intrapéritonéale, ainsi que sur d'autres tumeurs liquides ou solides.

Les nouveaux produits ont des propriétés anti-tumorales et plus
25 particulièrement une activité sur les tumeurs qui sont résistantes au Taxol[®] ou au Taxotère[®]. De telles tumeurs comprennent les tumeurs du colon qui ont une expression élevée du gène mdr 1 (gène de la multi-drug resistance). La multi-drug resistance est un terme habituel se rapportant à la résistance d'une tumeur à différents produits de structures et de mécanismes d'action différents. Les taxoïdes sont
30 généralement connus pour être fortement reconnus par des tumeurs expérimentales telles que P388/DOX, une lignée cellulaire sélectionnée pour sa résistance à la doxorubicine (DOX) qui exprime mdr 1.

Les exemples suivants illustrent la présente invention.

EXEMPLE 1

A une suspension contenant 217,8 mg d'acétoxy-4 α benzoyloxy-2 α époxy-5 β ,20 dihydroxy-1 β ,13 α diméthoxy-7 β ,10 β oxo-9 taxène-11, 200 mg d'acide tert-butoxycarbonyl-3 (méthoxy-4 phényl)-2 phényl-4 oxazolidine-1,3 carboxylique-5 (2R,4S,5R) et 50 mg de tamis moléculaire 4Å en poudre dans 2 cm³ d'acétate d'éthyle, on ajoute successivement, à une température voisine de 20°C, 126 mg de dicyclohexylcarbodiimide, puis 14 mg de N,N'-diméthylamino-4 pyridine. La suspension obtenue est agitée à une température voisine de 20°C, sous atmosphère d'argon, pendant 16 heures puis concentrée à sec sous pression réduite (0,27 kPa) à une température voisine de 40°C. Le résidu obtenu est purifié par chromatographie à pression atmosphérique sur 50 g de silice (0,063-0,2 mm) contenus dans une colonne de 2 cm de diamètre (gradient d'élution : acétate d'éthyle-dichlorométhane de 10-90 à 40-60 en volumes) en recueillant des fractions de 10 cm³. Les fractions ne contenant que le produit cherché sont réunies et concentrées à sec sous pression réduite (0,27 kPa) à 40°C pendant 2 heures. On obtient ainsi 271,8 mg de tert-butoxycarbonyl-3 (méthoxy-4 phényl)-2 phényl-4 oxazolidine-1,3 carboxylate-5 (2R,4S,5R) d'acétoxy-4 α benzoyloxy-2 α époxy-5 β ,20 hydroxy-1 β diméthoxy-7 β ,10 β oxo-9 taxène-11 yle-13 α sous forme d'un solide blanc dont les caractéristiques sont les suivantes :

- spectre de R.M.N. ¹H (400 MHz ; CDCl₃ avec quelques gouttes de CD₃OD d₄ ; déplacements chimiques δ en ppm ; constantes de couplage J en Hz) : 1,02 (s, 9H : C(CH₃)₃) ; 1,10 (s, 3H : CH₃) ; 1,17 (s, 3H : CH₃) ; 1,63 (s, 3H : CH₃) ; de 1,65 à 1,85 et 2,60 (2 mts, 1H chacun : CH₂ en 6) ; 1,78 (mf, 3H : CH₃) ; 2,02 et 2,15 (2 dd, J = 14 et 9, 1H chacun : CH₂ en 14) ; 2,14 (s, 3H : CH₃) ; 3,22 et 3,35 (2 s, 3H chacun : OCH₃) ; 3,64 (d, J = 7, 1H : H en 3) ; 3,73 (mt, 1H : H en 7) ; 3,76 (s, 3H : ArOCH₃) ; 4,06 et 4,16 (2 d, J = 8,5, 1H chacun : CH₂ en 20) ; 4,53 (d, J = 5, 1H : H en 2') ; 4,67 (s, 1H : H en 10) ; 4,85 (d large, J = 10, 1H : H en 5) ; 5,36 (mt, 1H : H 3') ; 5,52 (d, J = 7, 1H : H en 2) ; 6,07 (mt, 1H : H en 13) ; 6,33 (mf, 1H : H en 5') ; 6,88 (d, J = 8, 2H : H aromatiques en ortho du OCH₃) ; de 7,25 à 7,40 (mt, 7H : H aromatiques en 3' et H aromatiques en méta du OCH₃) ; 7,43 (t, J = 7,5, 2H : OCOC₆H₅ H en méta) ; 7,58 (t, J = 7,5, 1H : OCOC₆H₅ H en para) ; 7,96 (d, J = 7,5, 2H : OCOC₆H₅ H en ortho).

Une solution de 446,3 mg de tert-butoxycarbonyl-3 (méthoxy-4 phényl)-2 phényl-4 oxazolidine-1,3 carboxylate-5(2R,4S,5R) d'acétoxy-4 α benzoyloxy-2 α époxy-5 β ,20 hydroxy-1 β diméthoxy-7 β ,10 β oxo-9 taxène-11 yle-13 α dans 11,6 cm³

d'une solution 0,1N d'éthanol chlorhydrique est maintenue sous agitation à une température voisine de 0°C pendant 16 heures sous atmosphère d'argon. Le mélange réactionnel est alors dilué avec 40 cm³ de dichlorométhane et 5 cm³ d'eau distillée. Après décantation, la phase aqueuse est extraite avec 5cm³ de dichlorométhane. Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur sulfate de magnésium, filtrées sur verre fritté puis concentrées à sec sous pression réduite (0,27 kPa) à une température voisine de 40°C. On obtient ainsi 424,2 mg d'un solide jaune pâle que l'on purifie par chromatographie préparative sur couche mince [12 plaques préparatives Merck, Kieselgel 60F254, épaisseur 1 mm, dépôt en solution dans un mélange méthanol-dichlorométhane (5-95 en volumes), en éluant par un mélange méthanol-dichlorométhane (5-95 en volumes)]. Après élution de la zone correspondant au produit principal par un mélange méthanol-dichlorométhane (15-85 en volumes), filtration sur verre fritté, puis évaporation des solvants sous pression réduite (0,27 kPa) à une température voisine de 40°C, on obtient 126 mg de tert-butoxycarbonylamino-3 hydroxy-2 phényl-3 propionate-(2R,3S) d'acétoxy-4 α benzyloxy-2 α époxy-5 β ,20 hydroxy-1 β diméthoxy-7 β ,10 β oxo-9 taxène-11 yle-13 α sous forme d'une meringue couleur ivoire dont les caractéristiques sont les suivantes :

- pouvoir rotatoire $[\alpha]_{20}^D = -32,9$ (c = 0,5 ; méthanol)
- spectre de R.M.N. ¹H (400 MHz ; CDCl₃ ; déplacements chimiques δ en ppm ; constantes de couplage J en Hz) : 1,23 (s, 3H : CH₃) ; 1,25 (s, 3H : CH₃) ; 1,39 (s, 9H : C(CH₃)₃) ; 1,70 (s, 1H : OH en 1) ; 1,75 (s, 3H : CH₃) ; 1,82 et 2,72 (2 mts, 1H chacun : CH₂ en 6) ; 1,91 (s, 3H : CH₃) ; 2,31 (AB limite, 2H : CH₂ en 14) ; 2,39 (s, 3H : COCH₃) ; 3,33 et 3,48 (2 s, 3H chacun : OCH₃) ; 3,48 (mt, 1H : OH en 2') ; 3,85 (d, J = 7, 1H : H 3) ; 3,88 (dd, J = 11 et 7, 1H : H 7) ; 4,20 et 4,33 (2 d, J = 8,5, 1H chacun : CH₂ en 20) ; 4,65 (mt, 1H : H en 2') ; 4,83 (s, 1H : H en 10) ; 5,00 (d large, J = 10, 1H : H en 5) ; 5,30 (d large, J = 10, 1H : H en 3') ; 5,47 (d, J = 10, 1H : CONH) ; 5,66 (d, J = 7, 1H : H en 2) ; 6,24 (t large, J = 9, 1H : H en 13) ; 6,33 (mt, 1H : H en 5') ; de 7,30 à 7,50 (mt, 5H : H aromatiques en 3') ; 7,52 (t, J = 7,5, 2H : OCOC₆H₅ H en méta) ; 7,63 (t, J = 7,5, 1H : OCOC₆H₅ H en para) ; 8,12 (d, J = 7,5, 2H : OCOC₆H₅ H en ortho).

L'acétoxy-4 α benzyloxy-2 α époxy-5 β ,20 dihydroxy-1 β ,13 α diméthoxy-7 β ,10 β oxo-9 taxène-11 (ou 7 β ,10 β -diméthoxy-7 β ,10 β 10-désacétoxy-baccatine III) peut être préparé de la manière suivante :

A une solution de 500 mg d'acétoxy-4 α benzyloxy-2 α époxy-5 β ,20 trihydroxy-1 β ,7 β ,13 α méthoxy-10 β oxo-9 taxène-11 dans 5 cm³ d'iodométhane et

0,5 cm³ de diméthylformamide, maintenue sous atmosphère d'argon, à une température voisine de 0°C, on ajoute par portions 86 mg d'hydrure de sodium à 50 % en poids dans l'huile de vaseline. Après 45 minutes à une température voisine de 0°C, le mélange réactionnel est dilué par 50 cm³ d'acétate d'éthyle et 8 cm³ d'eau distillée.

5 Après décantation, la phase organique est lavée avec deux fois 8 cm³ d'eau distillée, puis 8 cm³ d'une solution aqueuse saturée en chlorure de sodium, séchée sur sulfate de magnésium, filtrée sur verre fritté, et concentrée à sec sous pression réduite (0,27 kPa) à une température voisine de 40°C. On obtient ainsi 570 mg d'un solide jaune pâle que l'on purifie par chromatographie à pression atmosphérique sur 50 g de

10 silice (0,063-0,2 mm) contenus dans une colonne de 2,5 cm de diamètre en éluant avec un mélange méthanol-dichlorométhane (2-98 en volumes) en recueillant des fractions de 10 cm³. Les fractions ne contenant que le produit cherché sont réunies et concentrées à sec sous pression réduite (0,27 kPa) à 40°C pendant 2 heures. On obtient ainsi 380 mg d'acétoxy-4 α benzoyloxy-2 α époxy-5 β ,20 dihydroxy-1 β ,13 α

15 diméthoxy-7 β ,10 β oxo-9 taxène-11 sous forme d'un solide jaune pâle dont les caractéristiques sont les suivantes :

- spectre de R.M.N. ¹H (400 MHz ; CDCl₃ avec quelques gouttes de CD₃OD d₄ ; déplacements chimiques δ en ppm ; constantes de couplage J en Hz) : 1,03 (s, 3H : CH₃) ; 1,11 (s, 3H : CH₃) ; 1,65 (s, 3H : CH₃) ; 1,72 et 2,67 (2 mts, 1H chacun : CH₂ en 6) ; 2,05 (s, 3H : CH₃) ; 2,21 (AB limite, J = 14 et 9, 2H : CH₂ en 14) ; 2,25 (s, 3H : COCH₃) ; 3,26 et 3,40 (2 s, 3H chacun : OCH₃) ; 3,85 (d, J = 7, 1H : H en 3) ; 3,89 (dd, J = 11 et 6,5, 1H : H en 7) ; 4,12 et 4,25 (2 d, J = 8,5, 1H chacun : CH₂ en 20) ; 4,78 (t large, J = 9, 1H : H en 13) ; 4,83 (s, 1H : H en 10) ; 4,98 (d large, J = 10, 1H : H en 5) ; 5,53 (d, J = 7, 1H : H en 2) ; 7,43 (t, J = 7,5, 2H : OCOC₆H₅ H en méta) ; 7,56 (t, J = 7,5, 1H : OCOC₆H₅ H en para) ; 8,05 (d, J = 7,5, 2H : OCOC₆H₅ H en ortho).

20

25

L'acétoxy-4 α benzoyloxy-2 α époxy-5 β ,20 trihydroxy-1 β ,7 β ,13 α méthoxy-10 β oxo-9 taxène-11 (ou 10 β -méthoxy 10-désacétoxy-baccatine III) peut être préparé de la manière suivante :

30 A une solution de 3,62 g d'acétoxy-4 α benzoyloxy-2 α époxy-5 β ,20 hydroxy-1 β méthoxy-10 β oxo-9 bistréthylsilyloxy-7 β ,13 α taxène-11 dans 30 cm³ de dichlorométhane, maintenue sous atmosphère d'argon, à une température voisine de 0°C, on ajoute lentement 50 cm³ de complexe fluorure d'hydrogène-pyridine (3HF.Et₃N). Après 48 heures à une température voisine de 20°C, le mélange réactionnel est versé

35 sur une suspension de 100 cm³ d'une solution aqueuse sursaturée en

hydrogénocarbonate de sodium maintenue à une température voisine de 0°C. Après
décantation, la phase aqueuse est réextraite avec trois fois 80 cm³ de
dichlorométhane, puis deux fois 80 cm³ d'acétate d'éthyle. Les phases organiques sont
rassemblées, séchées sur sulfate de magnésium, filtrées sur sulfate de magnésium et
5 concentrées à sec sous pression réduite (0,27 kPa) à une température voisine de 40°C.
On obtient ainsi 3,45 g d'une meringue jaune que l'on purifie par chromatographie à
pression atmosphérique sur 150 g de silice (0,063-0,2 mm) contenus dans une colonne
de 3,5 cm de diamètre en éluant avec un mélange méthanol-dichlorométhane (5-95 en
10 volumes) en recueillant des fractions de 35 cm³. Les fractions ne contenant que le
produit cherché sont réunies et concentrées à sec sous pression réduite (0,27 kPa) à
40°C pendant 2 heures. On obtient ainsi 1,97 g d'acétoxy-4 α benzoyloxy-2 α époxy-
5 β ,20 trihydroxy-1 β ,7 β ,13 α méthoxy-10 β oxo-9 taxène-11 sous forme d'un solide
blanc dont les caractéristiques sont les suivantes :

- spectre de R.M.N. ¹H (400 MHz ; CDCl₃ ; déplacements chimiques δ en ppm ;
15 constantes de couplage J en Hz) : 1,10 (s, 3H : CH₃) ; 1,19 (s, 3H : CH₃) ; 1,48 (d,
J = 8,5, 1H : OH en 13) ; 1,70 (s, 3H : CH₃) ; 1,81 et 2,61 (2 mts, 1H chacun : CH₂
en 6) ; 2,09 (d, J = 5, 1H : OH en 7) ; 2,11 (s, 3H : CH₃) ; 2,30 (s, 3H : COCH₃) ;
2,32 (d, J = 9, 2H : CH₂ en 14) ; 3,48 (s, 3H : OCH₃) ; 3,97 (d, J = 7, 1H : H en 3) ;
4,18 et 4,33 (2 d, J = 8,5, 1H chacun : CH₂ en 20) ; 4,31 (mt, 1H : H en 7) ; 4,93
20 (mt, 1H : H en 13) ; 4,99 (s, 1H : H en 10) ; 5,01 (d large, J = 10, 1H : H en 5) ; 5,66
(d, J = 7, 1H : H en 2) ; 7,49 (t, J = 7,5, 2H : OCOC₆H₅ H en méta) ; 7,63 (t, J = 7,5,
1H : OCOC₆H₅ H en para) ; 8,12 (d, J = 7,5, 2H : OCOC₆H₅ H en ortho).

L'acétoxy-4 α benzoyloxy-2 α époxy-5 β ,20 hydroxy-1 β méthoxy-10 β oxo-9
bistriéthylsilyloxy-7 β ,13 α taxène-11 (ou 10 β -méthoxy 10-désacétoxy 7,13-bistriéthyl-
25 silyl-baccatine III) peut être préparé de la manière suivante :

A une solution de 5 g d'acétoxy-4 α benzoyloxy-2 α époxy-5 β ,20 dihydroxy-
1 β ,10 β oxo-9 bistriéthylsilyloxy-7 β ,13 α taxène-11 dans 25 cm³ d'iodométhane,
maintenue sous atmosphère d'argon, à une température voisine de 0°C, on ajoute par
portions 375 mg d'hydrure de sodium à 50 % en poids dans l'huile de vaseline. La
30 solution est maintenue sous agitation pendant 45 minutes à une température voisine
de 0°C, puis pendant 5 heures 30 minutes à une température voisine de 20°C. Le
mélange réactionnel est de nouveau refroidi à une température voisine de 0°C, et
l'on ajoute par portions 125 mg d'hydrure de sodium à 50 % en poids dans l'huile de
vaseline. Après 1 heure à 20°C, puis 18 heures à 5°C, le mélange réactionnel est dilué
35 par addition de 50 cm³ de dichlorométhane, versé sur 50 cm³ d'une solution aqueuse

saturée en chlorure d'ammonium et décanté. La phase aqueuse est extraite par 2 fois 30 cm³ de dichlorométhane, puis les phases organiques sont rassemblées, lavées avec 10 cm³ d'eau distillée, séchées sur sulfate de magnésium, filtrées sur verre fritté, et concentrées à sec sous pression réduite (0,27 kPa) à une température voisine de 40°C.

5 On obtient ainsi 5,15 g d'une meringue jaune que l'on purifie par chromatographie à pression atmosphérique sur 300 g de silice (0,063-0,2 mm) contenus dans une colonne de 5 cm de diamètre (gradient d'élution : acétate d'éthyle-dichlorométhane de 0-100 à 10-90 en volumes) en recueillant des fractions de 30 cm³. Les fractions ne contenant que le produit cherché sont réunies et concentrées à sec sous pression réduite
10 (0,27 kPa) à 40°C pendant 2 heures. On obtient ainsi 3,62 g d'acétoxy-4 α benzoyloxy-2 α époxy-5 β ,20 hydroxy-1 β méthoxy-10 β oxo-9 bistréthylsilyloxy-7 β ,13 α taxène-11 sous forme d'une meringue jaune pâle dont les caractéristiques sont les suivantes :

- spectre de R.M.N. ¹H (600 MHz ; CDCl₃ ; déplacements chimiques δ en ppm ;
15 constantes de couplage J en Hz) : 0,58 et 0,69 (2 mts, 6H chacun : CH₂ éthyle) ; 0,97 et 1,04 (2 t, J = 7,5, 9H chacun : CH₃ éthyle) ; 1,15 (s, 3H : CH₃) ; 1,18 (s, 3H : CH₃) ; 1,58 (s, 1H : OH en 1) ; 1,68 (s, 3H : CH₃) ; 1,89 et 2,48 (2 mts, 1H chacun : CH₂ en 6) ; 2,04 (s, 3H : CH₃) ; 2,15 et 2,23 (2 dd, J = 16 et 9, 1H chacun : CH₂ en 14) ; 2,29 (s, 3H : COCH₃) ; 3,40 (s, 3H : OCH₃) ; 3,83 (d, J = 7, 1H : H en 3) ; 4,15
20 et 4,30 (2 d, J = 8,5, 1H chacun : CH₂ en 20) ; 4,43 (dd, J = 11 et 7, 1H : H en 7) ; 4,91 (s, 1H : H en 10) ; 4,96 (d large, J = 10, 1H : H en 5) ; 5,01 (t large, J = 9, 1H : H en 13) ; 5,62 (d, J = 7, 1H : H en 2) ; 7,46 (t, J = 7,5, 2H : OCOC₆H₅ H en méta) ; 7,60 (t, J = 7,5, 1H : OCOC₆H₅ H en para) ; 8,09 (d, J = 7,5, 2H : OCOC₆H₅ H en ortho).

25 L'acétoxy-4 α benzoyloxy-2 α époxy-5 β ,20 dihydroxy-1 β ,10 β oxo-9 bistréthylsilyloxy-7 β ,13 α taxène-11 (ou 10-désacétyl 7,13-bistréthylsilyl-baccatine III) peut être préparé de la manière suivante :

A une solution de 14 g d'acétoxy-4 α benzoyloxy-2 α époxy-5 β ,20 tétrahydroxy-1 β ,7 β ,10 β ,13 α oxo-9 taxène-11 (10-désacétyl-baccatine III) dans
30 50 cm³ de pyridine anhydre, maintenue sous atmosphère d'argon, à une température voisine de 20°C, on ajoute 10,8 cm³ de chlorure de triéthylsilyle. Après 17 heures à une température voisine de 20°C, le mélange réactionnel est porté à une température voisine de 115°C, puis on ajoute 10,8 cm³ de chlorure de triéthylsilyle. Après 3 heures 15 minutes à une température voisine de 115°C, le mélange réactionnel est
35 ramené jusqu'à une température voisine de 20°C, dilué avec 30 cm³ d'acétate d'éthyle

et 100 cm³ d'eau distillée. Après décantation, la phase aqueuse est extraite avec 2 fois 50 cm³ d'acétate d'éthyle. Les phases organiques sont rassemblées, lavées avec 50 cm³ d'une solution aqueuse saturée en chlorure de sodium, séchées sur sulfate de magnésium, filtrées sur verre fritté puis concentrées à sec sous pression réduite (0,27 kPa) à une température voisine de 40°C. On obtient ainsi 63,1 g d'une huile brune que l'on purifie par chromatographie à pression atmosphérique sur 800 g de silice (0,063-0,2 mm) contenus dans une colonne de 7 cm de diamètre (gradient d'éluion : acétate d'éthyle-dichlorométhane de 0-100 à 5-95 en volumes) en recueillant des fractions de 60 cm³. Les fractions ne contenant que le produit recherché sont réunies et concentrées à sec sous pression réduite (0,27 kPa) à 40°C pendant 2 heures. On obtient ainsi 9,77 g d'acétoxy-4 α benzoyloxy-2 α époxy-5 β ,20 dihydroxy-1 β ,10 β oxo-9 bistréthylsilyloxy-7 β ,13 α taxène-11 sous forme d'une meringue crème dont les caractéristiques sont les suivantes :

- spectre de R.M.N. ¹H (400 MHz ; CDCl₃ ; déplacements chimiques δ en ppm ; constantes de couplage J en Hz) : 0,55 et 0,68 (2 mts, 6H chacun : CH₂ éthyle) ; 0,94 et 1,03 (2 t, J = 7,5, 9H chacun : CH₃ éthyle) ; 1,08 (s, 3H : CH₃) ; 1,17 (s, 3H : CH₃) ; 1,58 (s, 1H : OH en 1) ; 1,73 (s, 3H : CH₃) ; 1,91 et 2,57 (2 mts, 1H chacun : CH₂ en 6) ; 2,04 (s, 3H : CH₃) ; 2,12 et 2,23 (2 dd, J = 16 et 9, 1H chacun : CH₂ en 14) ; 2,30 (s, 3H : COCH₃) ; 3,88 (d, J = 7, 1H : H en 3) ; 4,16 et 4,32 (2 d, J = 8,5, 1H chacun : CH₂ en 20) ; 4,27 (d, J = 1, 1H : OH en 10) ; 4,40 (dd, J = 11 et 7, 1H : H en 7) ; 4,95 (d large, J = 10, 1H : H en 5) ; 4,95 (mt, 1H : H en 13) ; 5,16 (d, J = 1, 1H : H en 10) ; 5,60 (d, J = 7, 1H : H en 2) ; 7,46 (t, J = 7,5, 2H : OCOC₆H₅ H en méta) ; 7,60 (t, J = 7,5, 1H : OCOC₆H₅ H en para) ; 8,09 (d, J = 7,5, 2H : OCOC₆H₅ H en ortho).

Les nouveaux produits de formule générale (I) dans laquelle Z représente un radical de formule générale (II) manifestent une activité inhibitrice significative de la prolifération cellulaire anormale et possèdent des propriétés thérapeutiques permettant le traitement de malades ayant des conditions pathologiques associées à une prolifération cellulaire anormale. Les conditions pathologiques incluent la prolifération cellulaire anormale de cellules malignes ou non malignes de divers tissus et/ou organes, comprenant, de manière non limitative, les tissus musculaires, osseux ou conjonctifs, la peau, le cerveau, les poumons, les organes sexuels, les systèmes lymphatiques ou rénaux, les cellules mammaires ou sanguines, le foie, l'appareil digestif, le pancréas et les glandes thyroïdes ou adrénales. Ces conditions pathologiques peuvent inclure également le psoriasis, les tumeurs solides, les cancers

de l'ovaire, du sein, du cerveau, de la prostate, du colon, de l'estomac, du rein ou des testicules, le sarcome de Kaposi, le cholangiocarcinome, le choriocarcinome, le neuroblastome, la tumeur de Wilms, la maladie de Hodgkin, les mélanomes, les myélomes multiples, les leucémies lymphocytaires chroniques, les lymphomes
5 granulocytaires aigus ou chroniques. Les nouveaux produits selon l'invention sont particulièrement utiles pour le traitement du cancer de l'ovaire. Les produits selon l'invention peuvent être utilisés pour prévenir ou retarder l'apparition ou la réapparition des conditions pathologiques ou pour traiter ces conditions pathologiques.

10 Les produits selon l'invention peuvent être administrés à un malade selon différentes formes adaptées à la voie d'administration choisie qui, de préférence, est la voie parentérale. L'administration par voie parentérale comprend les administrations intraveineuse, intrapéritonéale, intramusculaire ou sous-cutanée. Plus particulièrement préférée est l'administration intrapéritonéale ou intraveineuse.

15 La présente invention comprend également les compositions pharmaceutiques qui contiennent au moins un produit de formule générale (I) en une quantité suffisante adaptée à l'emploi en thérapeutique humaine ou vétérinaire. Les compositions peuvent être préparées selon les méthodes habituelles en utilisant un ou plusieurs adjuvants, supports ou excipients pharmaceutiquement acceptables. Les
20 supports convenables incluent les diluants, les milieux aqueux stériles et divers solvants non toxiques. De préférence les compositions se présentent sous forme de solutions ou de suspensions aqueuses, de solutions injectables qui peuvent contenir des agents émulsifiants, des colorants, des préservatifs ou des stabilisants. Cependant, les compositions peuvent aussi se présenter sous forme de comprimés, de pilules, de
25 poudres ou de granulés administrables par voie orale.

Le choix des adjuvants ou excipients peut être déterminé par la solubilité et les propriétés chimiques du produit, le mode particulier d'administration et les bonnes pratiques pharmaceutiques.

30 Pour l'administration parentérale, on utilise des solutions ou des suspensions stériles aqueuses ou non aqueuses. Pour la préparation de solutions ou de suspensions non aqueuses peuvent être utilisés des huiles végétales naturelles telle que l'huile d'olive, l'huile de sésame ou l'huile de paraffine ou les esters organiques injectables tel que l'oléate d'éthyle. Les solutions stériles aqueuses peuvent être constituées d'une solution d'un sel pharmaceutiquement acceptable en solution dans de l'eau. Les
35 solutions aqueuses conviennent pour l'administration intraveineuse dans la mesure où

le pH est convenablement ajusté et où l'isotonicité est réalisée, par exemple, par une quantité suffisante de chlorure de sodium ou de glucose. La stérilisation peut être réalisée par chauffage ou par tout autre moyen qui n'altère pas la composition.

Il est bien entendu que tous les produits entrant dans les compositions selon l'invention doivent être purs et non toxiques pour les quantités utilisées.

Les compositions peuvent contenir au moins 0,01 % de produit thérapeutiquement actif. La quantité de produit actif dans une composition est telle qu'une posologie convenable puisse être prescrite. De préférence, les compositions sont préparées de telle façon qu'une dose unitaire contienne de 0,01 à 1000 mg environ de produit actif pour l'administration par voie parentérale.

Le traitement thérapeutique peut être effectué concurremment avec d'autres traitements thérapeutiques incluant des médicaments antinéoplastiques, des anticorps monoclonaux, des thérapies immunologiques ou des radiothérapies ou des modificateurs des réponses biologiques. Les modificateurs des réponses incluent, de manière non limitative, les lymphokines et les cytokines telles que les interleukines, les interférons (α , β ou δ) et le TNF. D'autres agents chimiothérapeutiques utiles dans le traitement des désordres dus à la prolifération anormale des cellules incluent, de manière non limitative, les agents alkylants tels que les moutardes à l'azote comme la mechlorethamine, le cyclophosphamide, le melphalan et le chlorambucil, des sulfonates d'alkyle comme le busulfan, les nitrosourées comme la carmustine, la lomustine, la sémustine et la streptozocine, les triazènes comme la dacarbazine, les antimétabolites comme les analogues de l'acide folique tel que le méthotrexate, les analogues de pyrimidine comme le fluorouracil et la cytarabine, des analogues de purines comme la mercaptopurine et la thioguanine, des produits naturels tels que les alcaloïdes de vinca comme la vinblastine, la vincristine et la vendésine, des épipodophyllotoxines comme l'étoposide et le teniposide, des antibiotiques comme la dactinomycine, la daunorubicine, la doxorubicine, la bléomycine, la plicamycine et la mitomycine, des enzymes comme la L-asparaginase, des agents divers comme les complexes de coordination du platine tel que le cisplatine, les urées substituées telles que l'hydroxyurée, les dérivés de méthylhydrazine comme la procarbazine, les suppresseurs adrénocorticoïques comme le mitotane et l'aminoglutéthymide, les hormones et les antagonistes comme les adrénocorticostéroïdes comme la prednisone, les progestines comme le caproate d'hydroxyprogestérone, l'acétate de méthoxyprogestérone et l'acétate de megestrol, les oestrogènes comme le

diéthylstilbestrol et l'éthynylestradiol, les antioestrogènes comme le tamoxifène, les androgènes comme le propionate de testostérone et la fluoxymesterone.

Les doses utilisées pour mettre en oeuvre les méthodes selon l'invention sont celles qui permettent un traitement prophylactique ou un maximum de réponse thérapeutique. Les doses varient selon la forme d'administration, le produit particulier sélectionné et les caractéristiques propres du sujet à traiter. En général, les doses sont celles qui sont thérapeutiquement efficaces pour le traitement des désordres dus à une prolifération cellulaire anormale. Les produits selon l'invention peuvent être administrés aussi souvent que nécessaire pour obtenir l'effet thérapeutique désiré. Certains malades peuvent répondre rapidement à des doses relativement fortes ou faibles puis avoir besoin de doses d'entretien faibles ou nulles. Généralement, de faibles doses seront utilisées au début du traitement et, si nécessaire, des doses de plus en plus fortes seront administrées jusqu'à l'obtention d'un effet optimum. Pour d'autres malades il peut être nécessaire d'administrer des doses d'entretien 1 à 8 fois par jour, de préférence 1 à 4 fois, selon les besoins physiologiques du malade considéré. Il est aussi possible que pour certains malades il soit nécessaire de n'utiliser qu'une à deux administrations journalières.

Chez l'homme, les doses sont généralement comprises entre 0,01 et 200 mg/kg. Par voie intrapéritonéale, les doses seront en général comprises entre 0,1 et 100 mg/kg et, de préférence entre 0,5 et 50 mg/kg et, encore plus spécifiquement entre 1 et 10 mg/kg. Par voie intraveineuse, les doses sont généralement comprises entre 0,1 et 50 mg/kg et, de préférence entre 0,1 et 5 mg/kg et, encore plus spécifiquement entre 1 et 2 mg/kg. Il est entendu que, pour choisir le dosage le plus approprié, devront être pris en compte la voie d'administration, le poids du malade, son état de santé général, son âge et tous les facteurs qui peuvent influencer sur l'efficacité du traitement.

L'exemple suivant illustre une composition selon l'invention.

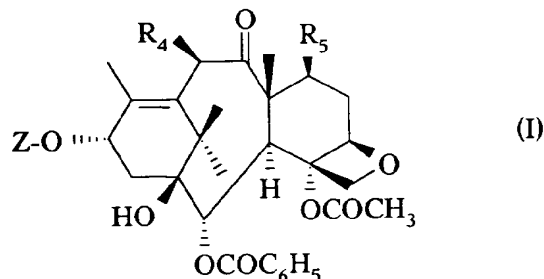
EXEMPLE

On dissout 40 mg du produit obtenu à l'exemple 1 dans 1 cm³ d'Emulphor EL 620 et 1 cm³ d'éthanol puis la solution est diluée par addition de 18 cm³ de sérum physiologique.

La composition est administrée par perfusion pendant 1 heure par introduction dans du soluté physiologique.

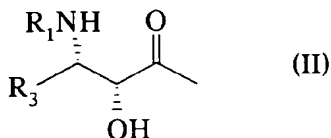
REVENDICATIONS

1 - Nouveaux taxoïdes de formule générale :



dans laquelle

5 Z représente un atome d'hydrogène ou un radical de formule générale :



dans laquelle :

R_1 représente un radical benzoyle éventuellement substitué par un ou plusieurs atomes ou radicaux, identiques ou différents, choisis parmi les atomes d'halogène et les radicaux alcoyles contenant 1 à 4 atomes de carbone, alcoxy contenant 1 à 4 atomes de carbone ou trifluorométhyle, thénoyle ou furoyle ou un radical $R_2-O-CO-$ dans lequel R_2 représente :

10 - un radical alcoyle contenant 1 à 8 atomes de carbone, alcényle contenant 2 à 8 atomes de carbone, alcynyle contenant 3 à 8 atomes de carbone, cycloalcoyle contenant 3 à 6 atomes de carbone, cycloalcényle contenant 4 à 6 atomes de carbone, bicycloalcoyle contenant 7 à 10 atomes de carbone, ces radicaux étant éventuellement substitués par un ou plusieurs substituants choisis parmi les atomes d'halogène et les radicaux hydroxy, alcoxy contenant 1 à 4 atomes de carbone, dialcoylamino dont chaque partie alcoyle contient 1 à 4 atomes de carbone, pipéridino, morpholino,

15 pipérazinyl-1 (éventuellement substitué en -4 par un radical alcoyle contenant 1 à 4 atomes de carbone ou par un radical phénylcoyle dont la partie alcoyle contient 1 à 4 atomes de carbone), cycloalcoyle contenant 3 à 6 atomes de carbone, cycloalcényle contenant 4 à 6 atomes de carbone, phényle (éventuellement substitué par un ou plusieurs atomes ou radicaux choisis parmi les atomes d'halogène et les radicaux

20 alcoyles contenant 1 à 4 atomes de carbone ou alcoxy contenant 1 à 4 atomes de

25

- carbone), cyano, carboxy ou alcoxycarbonyle dont la partie alcoyle contient 1 à 4 atomes de carbone,
- un radical phényle ou α - ou β -naphtyle éventuellement substitué par un ou plusieurs atomes ou radicaux choisis parmi les atomes d'halogène et les radicaux alcoyles
- 5 contenant 1 à 4 atomes de carbone ou alcoxy contenant 1 à 4 atomes de carbone ou un radical hétérocyclique aromatique à 5 chaînons choisi de préférence parmi les radicaux furyle et thiényle,
- ou un radical hétérocyclique saturé contenant 4 à 6 atomes de carbone éventuellement substitué par un ou plusieurs radicaux alcoyles contenant 1 à 4 atomes de carbone,
- 10 R_3 représente un radical alcoyle droit ou ramifié contenant 1 à 8 atomes de carbone, alcényle droit ou ramifié contenant 2 à 8 atomes de carbone, alcynyle droit ou ramifié contenant 2 à 8 atomes de carbone, cycloalcoyle contenant 3 à 6 atomes de carbone, phényle ou α - ou β -naphtyle éventuellement substitué par un ou plusieurs atomes ou radicaux choisis parmi les atomes d'halogène et les radicaux alcoyles,
- 15 alcényles, alcynyles, aryles, aralcoyles, alcoxy, alcoylthio, aryloxy, arylthio, hydroxy, hydroxyalcoyle, mercapto, formyle, acyle, acylamino, aroylamino, alcoxycarbonylamino, amino, alcoylamino, dialcoylamino, carboxy, alcoxycarbonyle, carbamoyle, alcoylcarbamoyle, dialcoylcarbamoyle, cyano, nitro et trifluorométhyle, ou un
- 20 hétérocycle aromatique ayant 5 chaînons et contenant un ou plusieurs hétéroatomes, identiques ou différents, choisis parmi les atomes d'azote, d'oxygène ou de soufre et éventuellement substitué par un ou plusieurs substituants, identiques ou différents, choisis parmi les atomes d'halogène et les radicaux alcoyles, aryles, amino, alcoylamino, dialcoylamino, alcoxycarbonylamino, acyle, arylcarbonyle, cyano, carboxy, carbamoyle, alcoylcarbamoyle, dialcoylcarbamoyle ou alcoxycarbonyle, étant
- 25 entendu que, dans les substituants des radicaux phényle, α - ou β -naphtyle et hétérocycliques aromatiques, les radicaux alcoyles et les portions alcoyles des autres radicaux contiennent 1 à 4 atomes de carbone et que les radicaux alcényles et alcynyles contiennent 2 à 8 atomes de carbone et que les radicaux aryles sont des radicaux phényles ou α - ou β -naphtyles,
- 30 R_4 représente un atome d'hydrogène ou un radical hydroxy ou un radical alcoxy contenant 1 à 6 atomes de carbone en chaîne droite ou ramifiée, alcényloxy contenant 3 à 6 atomes de carbone en chaîne droite ou ramifiée, alcynyloxy contenant 3 à 6 atomes de carbone en chaîne droite ou ramifiée, cycloalcoyloxy contenant 3 à 6 atomes de carbone, cycloalcényloxy contenant 3 à 6 atomes de carbone, alcanoyloxy
- 35 dont la partie alcanoyloxy contient 1 à 6 atomes de carbone en chaîne droite ou ramifiée,

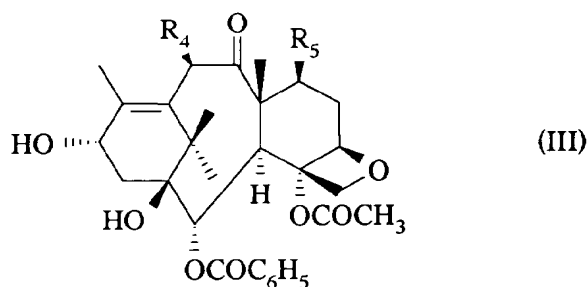
alcényloxy dont la partie alcénoyle contient 3 à 6 atomes de carbone en chaîne droite ou ramifiée, alcynoyloxy dont la partie alcynoyle contient 3 à 6 atomes de carbone en chaîne droite ou ramifiée, alcoxyacétyle dont la partie alcoyle contient 1 à 6 atomes de carbone en chaîne droite ou ramifiée, alcoylthioacétyle dont la partie alcoyle contient 1 à 6 atomes de carbone en chaîne droite ou ramifiée, alcoyloxy-carbonyloxy dont la partie alcoyle contient 1 à 6 atomes de carbone en chaîne droite ou ramifiée, ces radicaux étant éventuellement substitués par un ou plusieurs atomes d'halogène ou par un radical alcoxy contenant 1 à 4 atomes de carbone, alcoylthio contenant 1 à 4 atomes de carbone, ou un radical carboxy, alcoyloxy-carbonyle dont la partie alcoyle contient 1 à 4 atomes de carbone, cyano, carbamoyle, N-alcoyl-carbamoyle ou N,N-dialcoyl-carbamoyle dont chaque partie alcoyle contient 1 à 4 atomes de carbone ou forme avec l'atome d'azote auquel elle est liée un radical hétérocyclique saturé contenant 5 ou 6 chaînons et éventuellement un second hétéroatome choisi parmi les atomes d'oxygène, de soufre ou d'azote éventuellement substitué par un radical alcoyle contenant 1 à 4 atomes de carbone ou un radical phényle ou un radical phényl-alcoyle dont la partie alcoyle contient 1 à 4 atomes de carbone, ou bien R₄ représente un radical benzoyloxy ou hétérocyclique-carbonyloxy dans lequel la partie hétérocyclique représente un hétérocycle aromatique 5 ou 6 chaînons contenant un ou plusieurs hétéroatomes choisis parmi les atomes d'oxygène, de soufre ou d'azote,

R₅ représente un radical alcoxy contenant 1 à 6 atomes ce carbone en chaîne droite ou ramifiée éventuellement substitué par un radical alcoxy contenant 1 à 4 atomes de carbone, alcényloxy contenant 3 à 6 atomes de carbone, alcynoyloxy contenant 3 à 6 atomes de carbone, cycloalcoyloxy contenant 3 à 6 atomes de carbone, cycloalcényloxy contenant 3 à 6 atomes de carbone, ces radicaux étant éventuellement substitués par un ou plusieurs atomes d'halogène ou par un radical alcoxy contenant 1 à 4 atomes de carbone, alcoylthio contenant 1 à 4 atomes de carbone, ou un radical carboxy, alcoyloxy-carbonyle dont la partie alcoyle contient 1 à 4 atomes de carbone, cyano, carbamoyle, N-alcoyl-carbamoyle ou N,N-dialcoyl-carbamoyle dont chaque partie alcoyle contient 1 à 4 atomes de carbone ou forme avec l'atome d'azote auquel elle est liée un radical hétérocyclique saturé contenant 5 ou 6 chaînons et éventuellement un second hétéroatome choisi parmi les atomes d'oxygène, de soufre ou d'azote éventuellement substitué par un radical alcoyle contenant 1 à 4 atomes de carbone ou un radical phényle ou un radical phényl-alcoyle dont la partie alcoyle contient 1 à 4 atomes de carbone.

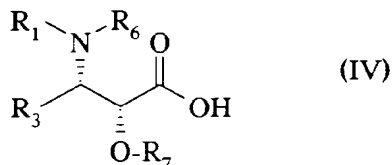
2 - Nouveaux taxoïdes selon la revendication pour lesquels Z représente un atome d'hydrogène ou un radical de formule générale (II) dans laquelle R₁ représente un radical benzoyle ou un radical R₂-O-CO- dans lequel R₂ représente un radical tert-butyle et R₃ représente un radical alcoyle contenant 1 à 6 atomes de carbone, alcényle
 5 contenant 2 à 6 atomes de carbone, cycloalcoyle contenant 3 à 6 atomes de carbone, phényle éventuellement substitué par un ou plusieurs atomes ou radicaux, identiques ou différents choisis parmi les atomes d'halogène et les radicaux alcoyles, alcoxy, dialcoylamino, acylamino, alcoxycarbonylamino ou trifluorométhyle ou un radical
 10 furyle-2 ou -3, thiényle-2 ou -3 ou thiazolyle-2, -4 ou -5 et R₄ et R₅, identiques ou différents, représentent un radical alcoxy droit ou ramifié contenant 1 à 6 atomes de carbone.

3 - Nouveaux taxoïdes selon la revendication 1 pour lesquels Z représente un atome d'hydrogène ou un radical de formule générale (II) dans laquelle R₁ représente un radical benzoyle ou un radical R₂-O-CO- dans lequel R₂ représente un radical tert-
 15 butyle et R₃ représente un radical isobutyle, isobutényle, butényle, cyclohexyle, phényle, furyle-2, furyle-3, thiényle-2, thiényle-3, thiazolyle-2, thiazolyle-4 ou thiazolyle-5, R₄ et R₅ représentent chacun un radical méthoxy.

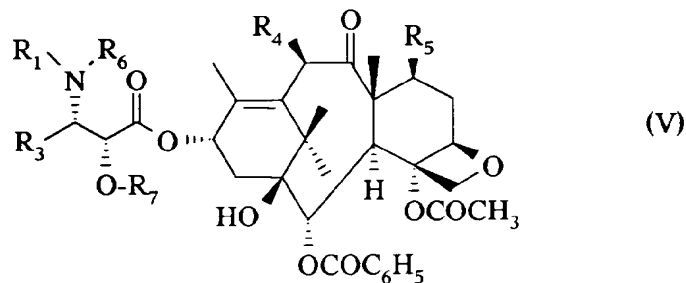
4 - Procédé de préparation des taxoïdes selon l'une des revendications 1, 2 ou
 20 3 pour lequel Z représente un radical de formule générale (II) caractérisé en ce que l'on estérifie un produit de formule générale :



dans laquelle R₄ et R₅ sont définis comme dans l'une des revendications 1, 2 ou 3, au moyen d'un acide de formule générale :



dans laquelle R_1 et R_3 sont définis comme précédemment, ou bien R_6 représente un atome d'hydrogène et R_7 représente un groupement protecteur de la fonction hydroxy, et ou bien R_6 et R_7 forment ensemble un hétérocycle saturé à 5 ou 6 chaînons, ou d'un dérivé de cet acide pour obtenir un ester de formule générale :



5

dans laquelle R_1 , R_3 , R_4 , R_5 , R_6 et R_7 sont définis comme précédemment, dont on remplace les groupements protecteurs représentés par R_7 et/ou R_6 et R_7 par des atomes d'hydrogène.

5 - Procédé selon la revendication 4 caractérisé en ce que l'estérification est effectuée au moyen d'un acide de formule générale (IV) en présence d'un agent de condensation et d'un agent d'activation dans un solvant organique à une température comprise entre -10 et 90°C.

6 - Procédé selon la revendication 4 caractérisé en ce que l'estérification est effectuée au moyen d'un acide de formule générale (IV) sous forme d'anhydride symétrique en opérant en présence d'un agent d'activation dans un solvant organique à une température comprise entre 0 et 90°C.

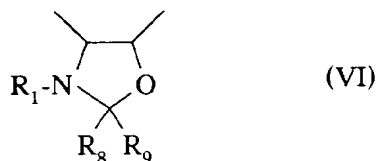
7 - Procédé selon la revendication 4 caractérisé en ce que l'estérification est effectuée en utilisant l'acide de formule générale (IV) sous forme d'halogénure ou sous forme d'anhydride mixte avec un acide aliphatique ou aromatique, éventuellement préparé in situ, en présence d'une base en opérant dans un solvant organique à une température comprise entre 0 et 80°C.

8 - Procédé selon la revendication 4 caractérisé en ce que l'on remplace les groupements protecteurs R_7 et/ou R_6 et R_7 par des atomes d'hydrogène en opérant, selon leur nature de la manière suivante :

1) lorsque R_6 représente un atome d'hydrogène et R_7 représente un groupement protecteur de la fonction hydroxy, on remplace les groupements protecteurs par des

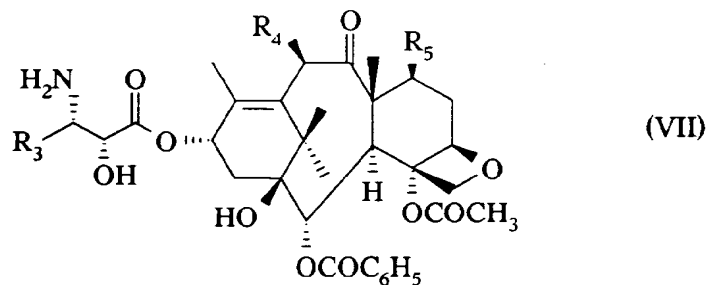
atomes d'hydrogène au moyen d'un acide minéral ou organique utilisé seul ou en mélange en opérant dans un solvant organique choisi parmi les alcools, les éthers, les esters, les hydrocarbures aliphatiques, les hydrocarbures aliphatiques halogénés, les hydrocarbures aromatiques ou les nitriles à une température comprise entre -10 et 5 60°C,

2) lorsque R₆ et R₇ forment ensemble un hétérocycle saturé à 5 ou 6 chaînons de formule générale :



10 dans laquelle R₁ est défini comme précédemment, R₈ et R₉, identiques ou différents, représentent un atome d'hydrogène ou un radical alcoyle contenant 1 à 4 atomes de carbone, ou un radical aralcoyle dont la partie alcoyle contient 1 à 4 atomes de carbone et la partie aryle représente, de préférence, un radical phényle éventuellement substitué par un ou plusieurs radicaux alcoxy contenant 1 à 4 atomes de carbone, ou un radical aryle représentant, de préférence un radical phényle
 15 éventuellement substitué par un ou plusieurs radicaux alcoxy contenant 1 à 4 atomes de carbone, ou bien R₈ représente un radical alcoxy contenant 1 à 4 atomes de carbone ou un radical trihalométhyle tel que trichlorométhyle ou un radical phényle substitué par un radical trihalométhyle tel que trichlorométhyle et R₉ représente un atome d'hydrogène, ou bien R₈ et R₉ forment ensemble avec l'atome de carbone
 20 auquel ils sont liés un cycle ayant 4 à 7 chaînons, on remplace le groupement protecteur formé par R₆ et R₇ par des atomes d'hydrogène en opérant, selon les significations de R₁, R₈ et R₉, de la manière suivante :

a) lorsque R₁ représente un radical tert-butoxycarbonyle, R₈ et R₉, identiques ou différents, représentent un radical alcoyle ou un radical aralcoyle ou aryle, ou bien R₈ représente un radical trihalométhyle ou un radical phényle substitué
 25 par un radical trihalométhyle, et R₉ représente un atome d'hydrogène, ou bien R₈ et R₉ forment ensemble un cycle ayant de 4 à 7 chaînons, on traite l'ester de formule générale (V) par un acide minéral ou organique éventuellement dans un solvant organique tel qu'un alcool pour obtenir le produit de formule générale :



5 dans laquelle R_3 , R_4 et R_5 sont définis comme précédemment, que l'on acyle au moyen de chlorure de benzoyle dans lequel le noyau phényle est éventuellement substitué, de chlorure de thényle, de chlorure de furoyle ou d'un produit de formule générale :



dans laquelle R_2 est défini comme précédemment et X représente un atome d'halogène ou un reste $-O-R_2$ ou $-O-CO-O-R_2$, pour obtenir un produit de formule générale (I) dans laquelle Z représente un radical de formule générale (II),

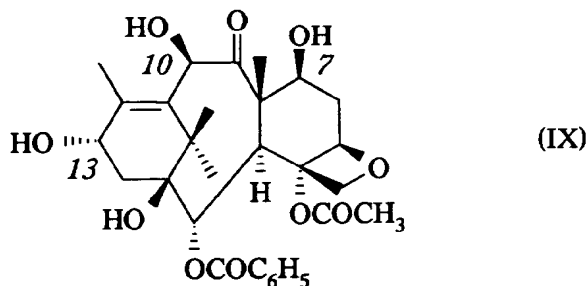
10 b) lorsque R_1 représente un radical benzoyle éventuellement substitué, thényle ou furoyle ou un radical R_2O-CO- dans lequel R_2 est défini comme précédemment, R_8 représente un atome d'hydrogène ou un radical alcoxy contenant 1 à 4 atomes de carbone ou un radical phényle substitué par un ou plusieurs radicaux alcoxy contenant 1 à 4 atomes de carbone et R_9 représente un atome d'hydrogène, on

15 remplace le groupement protecteur formé par R_6 et R_7 par des atomes d'hydrogène s'effectue en présence d'un acide minéral ou organique utilisé seul ou en mélange en quantité stoechiométrique ou catalytique, en opérant dans un solvant organique choisi parmi les alcools, les éthers, les esters, les hydrocarbures aliphatiques, les hydrocarbures aliphatiques halogénés et les hydrocarbures aromatiques à une

20 température comprise entre -10 et 60°C , de préférence entre 15 et 30°C .

9 - Procédé de préparation d'un nouveau taxoïde selon l'une des revendications 1, 2 ou 3 pour lequel Z représente un atome d'hydrogène, R_4 est défini comme dans l'une des revendications 1, 2 ou 3 mais ne peut pas représenter un atome d'hydrogène ou un radical hydroxy et R_5 est défini comme dans l'une des

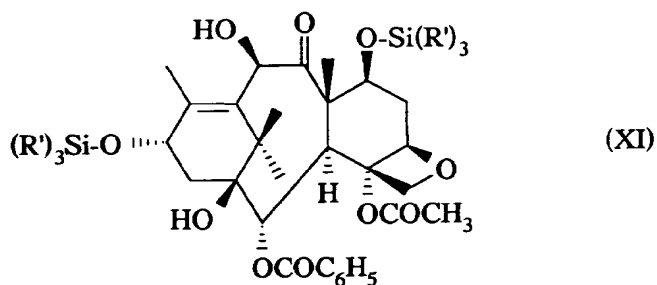
25 revendications 1, 2 ou 3 caractérisé en ce que l'on traite la 10-désacétyl-baccatine III de formule :



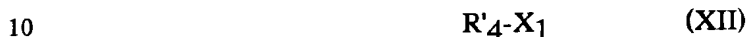
par un halogénure de silyle de formule générale :



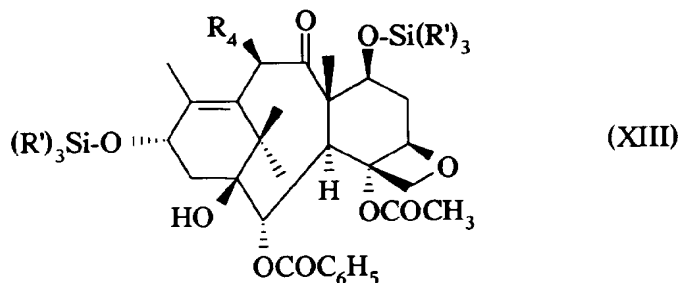
dans laquelle les symboles R', identiques ou différents, représentent un radical alcoyle
 5 contenant 1 à 4 atomes de carbone éventuellement substitué par un radical phényle,
 ou un radical phényle pour obtenir un produit de formule générale :



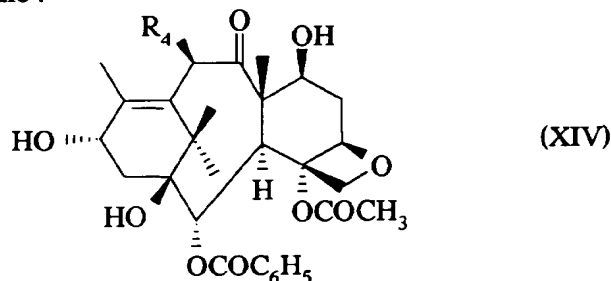
dans laquelle R' est défini comme précédemment, que l'on traite par un produit de
 formule générale :



dans laquelle R'₄ représente un radical alcoyle, alcényle, alcynyle, cycloalcoyle,
 cycloalcényle, alcanoyle, alcénoyle, alcynoyle, alcoxyacétyle, alcoylthioacétyle ou
 alcoyloxy-carbonyle éventuellement substitué, ou un radical benzoyle ou
 15 heterocyclyl-carbonyle, ces radicaux et substituants ayant une définition identique à
 celle donnée dans la définition de R₄ dans les revendications 1, 2 ou 3 et X₁
 représente un atome d'halogène ou un reste d'ester réactif tel qu'un reste d'ester
 sulfurique ou sulfonique pour obtenir un produit de formule générale :



dans laquelle R' et R₄ sont définis comme précédemment, dont on remplace les groupements protecteurs silylés par des atomes d'hydrogène pour obtenir un produit de formule générale :

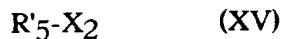


- 5 dans laquelle R₄ est défini comme précédemment, qui est éthérifié sélectivement en position 7 par action d'un produit de formule générale :

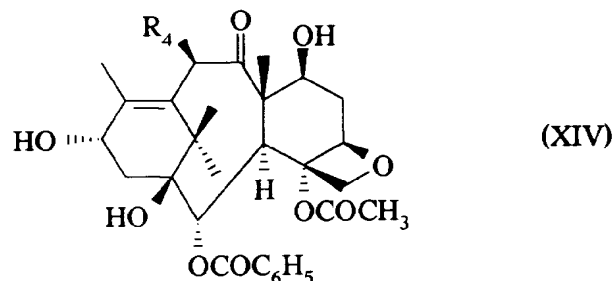


- dans laquelle R'₅ représente un radical alcoyle, alcényle, alcynyle, cycloalcoyle, cycloalcényle éventuellement substitué, ces différents radicaux et substituants ayant
 10 une définition identique à celle donnée dans la définition de R₅ dans l'une des revendications 1, 2 ou 3 et X₂ représente un reste d'ester réactif ou un atome d'halogène pour donner le produit de formule générale (I) dans laquelle Z représente un atome d'hydrogène.

- 10 - Procédé de préparation d'un nouveau taxoïde selon la revendication 1
 15 pour lequel Z représente un atome d'hydrogène, R₄ représente un atome d'hydrogène ou un radical hydroxy et R₅ est défini comme dans l'une des revendications 1, 2 ou 3 caractérisé en ce que l'on fait réagir un produit de formule générale :

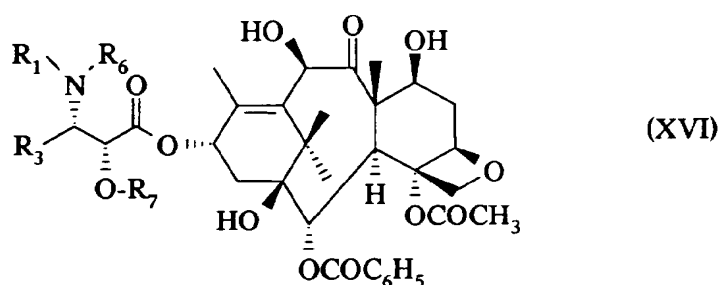


sur un produit de formule générale :



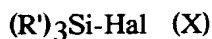
dans laquelle R_4 représente un atome d'hydrogène ou un radical hydroxy, après métallation de la fonction hydroxy en position 7, en opérant dans un solvant organique à une température comprise entre 0 et 50°C.

11 - Procédé de préparation d'un produit selon l'une des revendications 1, 2 ou 3 pour lequel Z représente un radical de formule générale (II), R_4 est défini comme dans l'une des revendications 1, 2 ou 3 mais ne peut pas représenter un atome d'hydrogène ou un radical hydroxy et R_5 est défini comme dans l'une des revendications 1, 2 ou 3 caractérisé en ce que l'on traite un produit de formule générale :

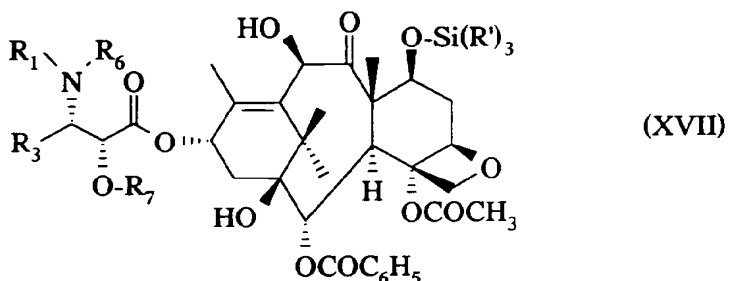


10

dans laquelle R_1 , R_3 , R_6 et R_7 sont définis comme dans l'une des revendications 1, 2, 3 ou 4 au moyen d'un produit de formule générale :



15 dans laquelle les symboles R' , identiques ou différents, représentent un radical alcoyle contenant 1 à 4 atomes de carbone, éventuellement substitué par un radical phényle, ou un radical phényle pour obtenir un produit de formule générale :

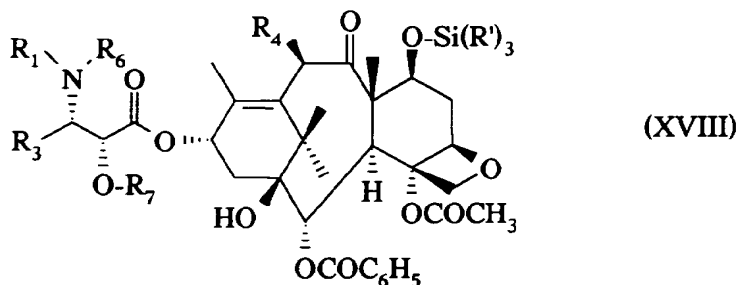


dans laquelle R' , R_1 , R_3 , R_6 et R_7 sont définis comme précédemment, qui est fonctionnalisé en position 10 au moyen d'un produit de formule générale :

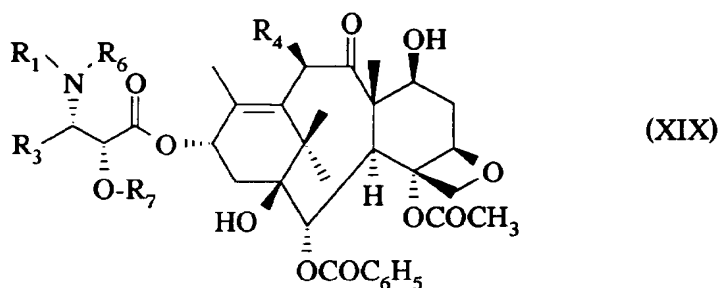
20



dans laquelle R_4 est défini comme dans la revendication 9 et X_1 représente un atome d'halogène ou un reste d'ester réactif pour donner un produit de formule générale :



dans laquelle R' , R_1 , R_3 , R_4 , R_6 et R_7 sont définis comme précédemment dont le groupement protecteur silylé est remplacé par un atome d'hydrogène pour donner un produit de formule générale :



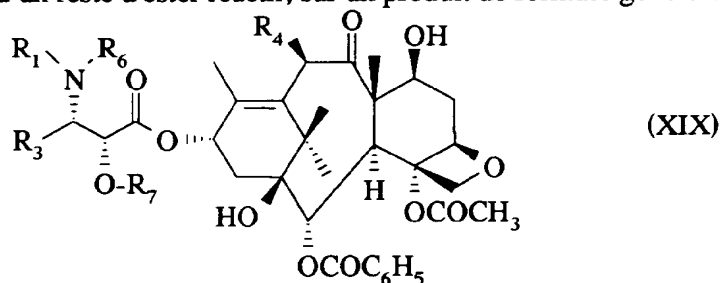
5

qui, par action d'un produit de formule générale (XV) conduit au produit de formule générale (V) dont les groupements protecteurs sont remplacés par des atomes d'hydrogène pour donner un produit de formule générale (I) dans laquelle Z représente un radical de formule générale (II).

10 12 - Procédé de préparation d'un produit selon la revendications 1 pour lequel Z représente un radical de formule générale (I), R_4 représente un atome d'hydrogène ou un radical hydroxy et R_5 est défini comme dans l'une des revendications 1, 2 ou 3 caractérisé en ce que l'on fait réagir un produit de formule générale :



dans laquelle R_5 est défini comme dans la revendication 9 et X_2 représente un atome d'halogène ou un reste d'ester réactif, sur un produit de formule générale :



dans laquelle R_4 représente un atome d'hydrogène ou un radical hydroxy, R_1 , R_3 sont définis comme dans l'une des revendications 1, 2 ou 3, R_6 et R_7 sont définis comme dans la revendication 4 en opérant dans un solvant organique à une température comprise entre 0 et 50°C, suivie du remplacement des groupements protecteurs par des atomes d'hydrogène pour obtenir un produit de formule générale (I) dans laquelle
5 Z représente un radical de formule générale (II) et R_4 représente un atome d'hydrogène ou un radical hydroxy.

13 - Composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle contient au moins un produit selon l'une des revendications 1, 2 ou 3 pour lequel Z représente un
10 radical de formule générale (II) en association avec un ou plusieurs diluants ou adjuvants pharmaceutiquement acceptables et éventuellement un ou plusieurs composés compatibles et pharmacologiquement actifs.

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
X	WO-A-94 18164 (RESEARCH FOUND. UNIV. OF NEW-YORK) * page 1 - page 11; revendications 1,9 * ---	1-4,8-13
X	EP-A-0 639 577 (BRISTOL-MYERS.) * revendications 1,25-28; exemples 1-8,12-17 * -----	1-4,8-13
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.6)
		C07D
		1
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
18 Décembre 1995		Francois, J
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>		

EPO FORM 1503 03.82 (P04C13)

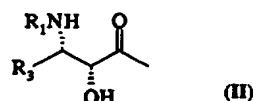
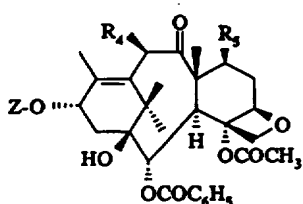


DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

<p>(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C07D 305/14, A61K 31/335</p>	<p>A1</p>	<p>(11) Numéro de publication internationale: WO 96/30356 (43) Date de publication internationale: 3 octobre 1996 (03.10.96)</p>
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR96/00441 (22) Date de dépôt international: 25 mars 1996 (25.03.96) (30) Données relatives à la priorité: 95/03545 27 mars 1995 (27.03.95) FR 95/15381 22 décembre 1995 (22.12.95) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): RHONE-POULENC RORER S.A. [FR/FR]; 20, avenue Raymond-Aron, F-92160 Antony (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): BOUCHARD, Hervé [FR/FR]; 114, avenue Danielle-Casanova, F-94200 Ivry-sur-Seine (FR). BOURZAT, Jean-Dominique [FR/FR]; 36, boulevard de la Libération, F-94300 Vincennes (FR). COMMERÇON, Alain [FR/FR]; 1 bis, rue Charles-Floquet, F-94400 Vitry-sur-Seine (FR). (74) Mandataire: PILARD, Jacques; Rhône-Poulenc Rorer S.A., Direction Brevets, 20, avenue Raymond-Aron, F-92165 Antony Cédex (FR).</p>		<p>(81) Etats désignés: AL, AU, BB, BG, BR, CA, CN, CZ, EE, FI, GE, HU, IS, JP, KP, KR, LK, LR, LT, LV, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, TR, TT, UA, US, UZ, VN, brevet ARIPO (KE, LS, MW, SD, SZ, UG), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i></p>

(54) Title: NOVEL TAXOIDS, PREPARATION THEREOF AND PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS CONTAINING SAME

(54) Titre: NOUVEAUX TAXOÏDES, LEUR PREPARATION ET LES COMPOSITIONS PHARMACEUTIQUES QUI LES CONTIENNENT



(57) Abstract

Novel taxoids of general formula (I), the preparation thereof and pharmaceutical compositions containing them are described, wherein Z is a hydrogen atom or a radical of general formula (II), wherein R₁ is an optionally substituted benzoyl radical or a radical R₂-O-CO- where R₂ is an optionally substituted phenyl, alkyl, alkenyl, alkynyl, cycloalkyl, cycloalkenyl, bicycloalkyl, or heterocyclyl radical, R₃ is an aromatic heterocyclic, alkyl, alkenyl, alkynyl, cycloalkyl, phenyl or naphthyl radical, R₄ is a substituted alkanoyloxy, alkenoyloxy, alkynoyloxy or cycloalkanoyloxy radical and R₅ is an optionally substituted alkoxy radical or a cycloalkyloxy or cycloalkenyloxy radical. The novel products of general formula (I), where Z is a radical of general formula (II), have remarkable anti-tumour and anti-leukemia properties.

(57) Abrégé

Nouveaux taxoïdes de formule générale (I), leur préparation et les compositions pharmaceutiques qui les contiennent. Dans la formule générale (I), Z représente un atome d'hydrogène ou un radical de formule générale (II), dans laquelle R₁ représente un radical benzoyle éventuellement substitué ou un radical R₂-O-CO- dans lequel R₂ représente un radical alcoyle, alcényle, alcynyle, cycloalcoyle, cycloalcényle, bicycloalcoyle, phényle, éventuellement substitué ou hétérocyclyle, R₃ représente un radical alcoyle, alcényle, alcynyle, cycloalcoyle, phényle, naphthyle ou hétérocyclique aromatique, R₄ représente un radical alcanoyloxy substitué, alcénoyloxy, alcynoyloxy ou cycloalcanoyloxy, et R₅ représente un radical alcoxy éventuellement substitué ou un radical cycloalcoyloxy ou cycloalcényloxy. Les nouveaux produits de formule générale (I), dans laquelle Z représente un radical de formule générale (II), présentent des propriétés antitumorales et antileucémiques remarquables.

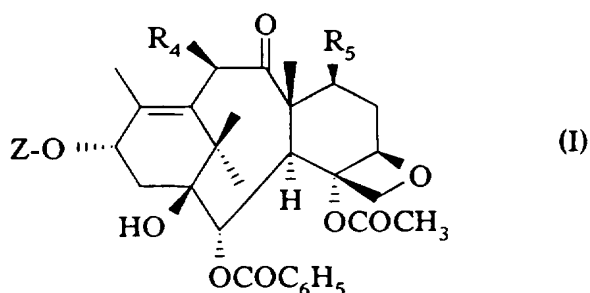
UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Arménie	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
AT	Autriche	GE	Géorgie	MX	Mexique
AU	Australie	GN	Guinée	NE	Niger
BB	Barbade	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BE	Belgique	HU	Hongrie	NO	Norvège
BF	Burkina Faso	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BG	Bulgarie	IT	Italie	PL	Pologne
BJ	Bénin	JP	Japon	PT	Portugal
BR	Bésil	KE	Kenya	RO	Roumanie
BY	Bélarus	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CA	Canada	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CF	République centrafricaine	KR	République de Corée	SE	Suède
CG	Congo	KZ	Kazakhstan	SG	Singapour
CH	Suisse	LI	Liechtenstein	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LR	Libéria	SN	Sénégal
CN	Chine	LT	Lituanie	SZ	Swaziland
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CZ	République tchèque	LV	Lettonie	TG	Togo
DE	Allemagne	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DK	Danemark	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
EE	Estonie	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	UG	Ouganda
FI	Finlande	MN	Mongolie	US	Etats-Unis d'Amérique
FR	France	MR	Mauritanie	UZ	Ouzbékistan
GA	Gabon			VN	Viet Nam

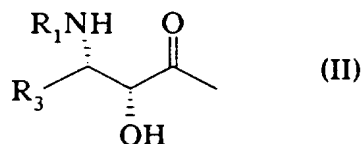
NOUVEAUX TAXOÏDES, LEUR PRÉPARATION ET LES COMPOSITIONS
PHARMACEUTIQUES QUI LES CONTIENNENT

La présente invention concerne de nouveaux taxoïdes de formule générale :



5 dans laquelle

Z représente un atome d'hydrogène ou un radical de formule générale :



dans laquelle :

R₁ représente un radical benzoyle éventuellement substitué par un ou
10 plusieurs atomes ou radicaux, identiques ou différents, choisis parmi les atomes
d'halogène et les radicaux alcoyles contenant 1 à 4 atomes de carbone, alcoxy
contenant 1 à 4 atomes de carbone ou trifluorométhyle, thénoyle ou furoyle ou un
radical R₂-O-CO- dans lequel R₂ représente :

- un radical alcoyle contenant 1 à 8 atomes de carbone, alcényle contenant 2 à 8
15 atomes de carbone, alcynyle contenant 3 à 8 atomes de carbone, cycloalcoyle
contenant 3 à 6 atomes de carbone, cycloalcényle contenant 4 à 6 atomes de carbone,
bicycloalcoyle contenant 7 à 10 atomes de carbone, ces radicaux étant éventuellement
substitués par un ou plusieurs substituants choisis parmi les atomes d'halogène et les
radicaux hydroxy, alcoxy contenant 1 à 4 atomes de carbone, dialcoylamino dont
20 chaque partie alcoyle contient 1 à 4 atomes de carbone, pipéridino, morpholino,
pipérazinyl-1 (éventuellement substitué en -4 par un radical alcoyle contenant 1 à 4
atomes de carbone ou par un radical phénylcoyle dont la partie alcoyle contient 1 à 4
atomes de carbone), cycloalcoyle contenant 3 à 6 atomes de carbone, cycloalcényle

contenant 4 à 6 atomes de carbone, phényle (éventuellement substitué par un ou plusieurs atomes ou radicaux choisis parmi les atomes d'halogène et les radicaux alcoyles contenant 1 à 4 atomes de carbone ou alcoxy contenant 1 à 4 atomes de carbone), cyano, carboxy ou alcoxycarbonyle dont la partie alcoyle contient 1 à 4 atomes de carbone,

5 - un radical phényle ou α - ou β -naphtyle éventuellement substitué par un ou plusieurs atomes ou radicaux choisis parmi les atomes d'halogène et les radicaux alcoyles contenant 1 à 4 atomes de carbone ou alcoxy contenant 1 à 4 atomes de carbone ou un radical hétérocyclique aromatique à 5 chaînons choisi de préférence parmi les radicaux
10 furyle et thiényle,

- ou un radical hétérocyclyle saturé contenant 4 à 6 atomes de carbone éventuellement substitué par un ou plusieurs radicaux alcoyles contenant 1 à 4 atomes de carbone,

R_3 représente un radical alcoyle droit ou ramifié contenant 1 à 8 atomes de carbone, alcényle droit ou ramifié contenant 2 à 8 atomes de carbone, alcynyle droit ou
15 ramifié contenant 2 à 8 atomes de carbone, cycloalcoyle contenant 3 à 6 atomes de carbone, phényle ou α - ou β -naphtyle éventuellement substitué par un ou plusieurs atomes ou radicaux choisis parmi les atomes d'halogène et les radicaux alcoyles, alcényles, alcynyles, aryles, aralcoyles, alcoxy, alcoylthio, aryloxy, arylthio, hydroxy, hydroxyalcoyle, mercapto, formyle, acyle, acylamino, aroylamino, alcoxycarbonyl-
20 amino, amino, alcoylamino, dialcoylamino, carboxy, alcoxycarbonyle, carbamoyle, alcoylcarbamoyle, dialcoylcarbamoyle, cyano, nitro et trifluorométhyle, ou un hétérocycle aromatique ayant 5 chaînons et contenant un ou plusieurs hétéroatomes, identiques ou différents, choisis parmi les atomes d'azote, d'oxygène ou de soufre et éventuellement substitué par un ou plusieurs substituants, identiques ou différents,
25 choisis parmi les atomes d'halogène et les radicaux alcoyles, aryles, amino, alcoylamino, dialcoylamino, alcoxycarbonylamino, acyle, arylcarbonyle, cyano, carboxy, carbamoyle, alcoylcarbamoyle, dialcoylcarbamoyle ou alcoxycarbonyle, étant entendu que, dans les substituants des radicaux phényle, α - ou β -naphtyle et hétérocyclyles aromatiques, les radicaux alcoyles et les portions alcoyles des autres
30 radicaux contiennent 1 à 4 atomes de carbone et que les radicaux alcényles et alcynyles

contiennent 2 à 8 atomes de carbone et que les radicaux aryles sont des radicaux phényles ou α - ou β -naphtyles,

R_4 représente un radical alcanoyloxy dont la partie alcanoyle contient 2 à 6 atomes de carbone en chaîne droite ou ramifiée, à l'exception du radical acétyle, alcényloxy dont la partie alcényole contient 3 à 6 atomes de carbone en chaîne droite ou ramifiée, alcynoyloxy dont la partie alcynoyle contient 3 à 6 atomes de carbone en chaîne droite ou ramifiée, ces radicaux étant éventuellement substitués par un ou plusieurs atomes d'halogène ou par un radical alcoxy contenant 1 à 4 atomes de carbone, alcoylthio contenant 1 à 4 atomes de carbone, ou par un radical carboxy, alcoxycarbonyle dont la partie alcoyle contient 1 à 4 atomes de carbone, cyano, carbamoyle, N-alcoylcarbamoyle ou N,N-dialcoylcarbamoyle dont chaque partie alcoyle contient 1 à 4 atomes de carbone ou forme avec l'atome d'azote auquel elle est liée un radical hétérocyclique saturé contenant 5 ou 6 chaînons et éventuellement un second hétéroatome choisi parmi les atomes d'oxygène, de soufre ou d'azote éventuellement substitué par un radical alcoyle contenant 1 à 4 atomes de carbone ou un radical phényle ou un radical phénylcoyle dont la partie alcoyle contient 1 à 4 atomes de carbone, ou bien R_4 représente un radical cycloalcanoyloxy dont la partie cycloalcanoyle contient 4 à 8 atomes de carbone ou un radical cycloalcényloxy dont la partie cycloalcényole contient 4 à 8 atomes de carbone, ou bien R_4 représente un radical benzoyloxy ou hétérocyclylcarbonyloxy dans lequel la partie hétérocyclique représente un hétérocycle aromatique 5 ou 6 chaînons contenant un ou plusieurs hétéroatomes choisis parmi les atomes d'oxygène, de soufre ou d'azote,

R_5 représente un radical alcoxy contenant 1 à 6 atomes de carbone en chaîne droite ou ramifiée éventuellement substitué par un radical alcoxy contenant 1 à 4 atomes de carbone, alcényloxy contenant 3 à 6 atomes de carbone, alcynoyloxy contenant 3 à 6 atomes de carbone, cycloalcoyloxy contenant 3 à 6 atomes de carbone, cycloalcényloxy contenant 3 à 6 atomes de carbone, ces radicaux étant éventuellement substitués par un ou plusieurs atomes d'halogène ou par un radical alcoxy contenant 1 à 4 atomes de carbone, alcoylthio contenant 1 à 4 atomes de carbone, ou un radical carboxy, alcoxycarbonyle dont la partie alcoyle contient 1 à 4 atomes de carbone, cyano, carbamoyle, N-alcoylcarbamoyle ou N,N-dialcoylcarbamoyle dont chaque

partie alcoyle contient 1 à 4 atomes de carbone ou forme avec l'atome d'azote auquel elle est liée un radical hétérocyclique saturé contenant 5 ou 6 chaînons et éventuellement un second hétéroatome choisi parmi les atomes d'oxygène, de soufre ou d'azote éventuellement substitué par un radical alcoyle contenant 1 à 4 atomes de carbone ou un radical phényle ou un radical phénylcoyle dont la partie alcoyle
5 contient 1 à 4 atomes de carbone.

De préférence les radicaux aryles pouvant être représentés par R_3 sont des radicaux phényles ou α - ou β -naphtyles éventuellement substitués par un ou plusieurs atomes ou radicaux choisis parmi les atomes d'halogène (fluor, chlore, brome, iode) et les radicaux alcoyles, alcényles, alcynyles, aryles, arylalcoyles, alcoxy, alcoylthio,
10 aryloxy, arylthio, hydroxy, hydroxyalcoyle, mercapto, formyle, acyle, acylamino, aroylamino, alcoxycarbonylamino, amino, alcoylamino, dialcoylamino, carboxy, alcoxycarbonyle, carbamoyle, dialcoylcarbamoyle, cyano, nitro et trifluoro-méthyle, étant entendu que les radicaux alcoyles et les portions alcoyles des autres radicaux
15 contiennent 1 à 4 atomes de carbone, que les radicaux alcényles et alcynyles contiennent 2 à 8 atomes de carbone et que les radicaux aryles sont des radicaux phényles ou α - ou β -naphtyles.

De préférence les radicaux hétérocycliques pouvant être représentés par R_3 sont des radicaux hétérocycliques aromatiques ayant 5 chaînons et contenant un ou
20 plusieurs atomes, identiques ou différents, choisis parmi les atomes d'azote, d'oxygène ou de soufre, éventuellement substitués par un ou plusieurs substituants, identiques ou différents, choisis parmi les atomes d'halogène (fluor, chlore, brome, iode) et les radicaux alcoyles contenant 1 à 4 atomes de carbone, aryles contenant 6 à 10 atomes
de carbone, alcoxy contenant 1 à 4 atomes de carbone, aryloxy contenant 6 à 10
25 atomes de carbone, amino, alcoylamino contenant 1 à 4 atomes de carbone, dialcoylamino dont chaque partie alcoyle contient 1 à 4 atomes de carbone, acylamino dont la partie acyle contient 1 à 4 atomes de carbone, alcoxycarbonylamino contenant
1 à 4 atomes de carbone, acyle contenant 1 à 4 atomes de carbone, arylcarbonyle dont la partie aryle contient 6 à 10 atomes de carbone, cyano, carboxy, carbamoyle,
30 alcoylcarbamoyle dont la partie alcoyle contient 1 à 4 atomes de carbone,

dialcoylcarbamoyle dont chaque partie alcoyle contient 1 à 4 atomes de carbone ou alcoxycarbonyle dont la partie alcoxy contient 1 à 4 atomes de carbone.

De préférence les radicaux R_4 représente un radical alcoyloxyacétoxy dont la partie alcoyle contient 1 à 4 atomes de carbone, cycloalcanoyloxy dont la partie cycloalcanoyle contient 4 à 8 atomes de carbone, cycloacénoyloxy dont la partie cycloalcénoyle contient 4 à 8 atomes de carbone, benzoyloxy ou hétérocyclylcarbonyloxy dans lequel la partie hétérocyclique représente un hétérocycle aromatique 5 ou 6 chaînons contenant un ou plusieurs hétéroatomes choisis parmi les atomes d'oxygène, de soufre ou d'azote, et R_5 représente un radical alcoxy droit ou ramifié contenant 1 à 6 atomes de carbone éventuellement substitués par un radical méthoxy, éthoxy, méthylthio, éthylthio, carboxy, méthoxycarbonyle, éthoxycarbonyle, cyano, carbamoyle, N-méthyl-carbamoyle, N-éthylcarbamoyle, N,N-diméthyl-carbamoyle, N,N-diéthylcarbamoyle, N-pyrrolidinocarbonyle ou N-pipéridino-carbonyle.

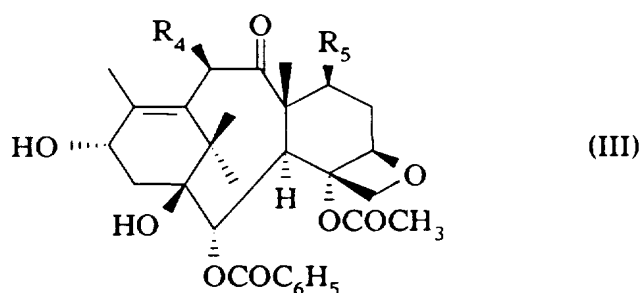
Plus particulièrement, la présente invention concerne les produits de formule générale (I) dans laquelle Z représente un atome d'hydrogène ou un radical de formule générale (II) dans laquelle R_1 représente un radical benzoyle ou un radical R_2 -O-CO- dans lequel R_2 représente un radical tert-butyle et R_3 représente un radical alcoyle contenant 1 à 6 atomes de carbone, alcényle contenant 2 à 6 atomes de carbone, cycloalcoyle contenant 3 à 6 atomes de carbone, phényle éventuellement substitué par un ou plusieurs atomes ou radicaux, identiques ou différents choisis parmi les atomes d'halogène (fluor, chlore) et les radicaux alcoyles (méthyle), alcoxy (méthoxy), dialcoylamino (diméthylamino), acylamino (acétylamino), alcoxycarbonylamino (tert-butoxycarbonylamino) ou trifluorométhyle ou un radical furyle-2 ou -3, thiényle-2 ou -3 ou thiazolyle-2, -4 ou -5 et R_4 représente un radical alcoyloxyacétoxy dont la partie alcoyle contient 1 à 4 atomes de carbone, cycloalcanoyloxy dont la partie cycloalcanoyle contient 4 à 6 atomes de carbone, pyridylcarbonyloxy et R_5 représente un radical alcoyloxy droit ou ramifié contenant 1 à 6 atomes de carbone.

Plus particulièrement encore, la présente invention concerne les produits de formule générale (I) dans laquelle Z représente un atome d'hydrogène ou un radical de formule générale (II) dans laquelle R_1 représente un radical benzoyle ou un radical

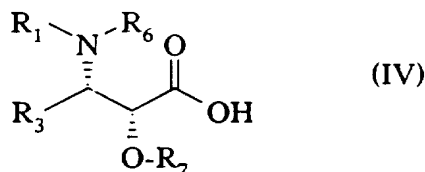
$R_2-O-CO-$ dans lequel R_2 représente un radical tert-butyle et R_3 représente un radical isobutyle, isobutényle, butényle, cyclohexyle, phényle, furyle-2, furyle-3, thiényle-2, thiényle-3, thiazolyle-2, thiazolyle-4 ou thiazolyle-5, R_4 représente un radical méthoxyacétoxy, cyclopropylcarbonyloxy, cyclopentylcarbonyloxy, pyridyl-2
5 carbonyloxy ou pyridyl-3 carbonyloxy et R_5 représente un radical méthoxy.

Les produits de formule générale (I) dans laquelle Z représente un radical de formule générale (II) présentent des propriétés antitumorales et antileucémiques remarquables.

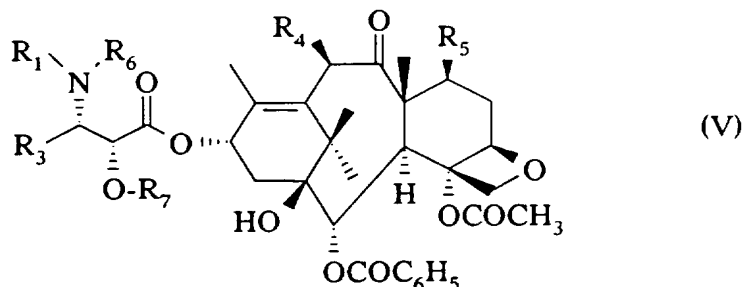
Selon la présente invention, les nouveaux produits de formule générale (I)
10 dans laquelle Z représente un radical de formule générale (II) peuvent être obtenus par estérification d'un produit de formule générale :



dans laquelle R_4 et R_5 sont définis comme précédemment, au moyen d'un acide de formule générale :



15 dans laquelle R_1 et R_3 sont définis comme précédemment, ou bien R_6 représente un atome d'hydrogène et R_7 représente un groupement protecteur de la fonction hydroxy, et ou bien R_6 et R_7 forment ensemble un hétérocycle saturé à 5 ou 6 chaînons, ou d'un dérivé de cet acide pour obtenir un ester de formule générale :



dans laquelle R_1 , R_3 , R_4 , R_5 , R_6 et R_7 sont définis comme précédemment, suivi du remplacement des groupements protecteurs représentés par R_7 et/ou R_6 et R_7 par des atomes d'hydrogène.

- 5 L'estérification au moyen d'un produit de formule générale (XII) dans laquelle X_1 représente un radical hydroxy peut être effectuée en présence d'un agent de condensation (carbodiimide, carbonate réactif) et d'un agent d'activation (aminopyridines) dans un solvant organique (éther, ester, cétones, nitriles, hydrocarbures aliphatiques, hydrocarbures aliphatiques halogénés, hydrocarbures
- 10 aromatiques) à une température comprise entre -10 et $90^\circ C$.

- L'estérification peut aussi être réalisée en utilisant un produit de formule générale (XII) dans laquelle X_1 représente un radical R_4-O- en opérant en présence d'un agent d'activation (aminopyridines) dans un solvant organique (éthers, esters, cétones, nitriles, hydrocarbures aliphatiques, hydrocarbures aliphatiques halogénés,
- 15 hydrocarbures aromatiques) à une température comprise entre 0 et $90^\circ C$.

- L'estérification peut aussi être réalisée en utilisant un produit de formule générale (XII) dans laquelle X_1 représente un atome d'halogène, en présence d'une base (amine aliphatique tertiaire) en opérant dans un solvant organique (éthers, esters, cétones, nitriles, hydrocarbures aliphatiques, hydrocarbures aliphatiques
- 20 halogénés, hydrocarbures aromatiques) à une température comprise entre 0 et $80^\circ C$.

De préférence, R_6 représente un atome d'hydrogène et R_7 représente un groupement protecteur de la fonction hydroxy ou bien R_6 et R_7 forment ensemble un hétérocycle saturé à 5 ou 6 chaînons.

- Lorsque R_6 représente un atome d'hydrogène, R_7 représente de préférence
- 25 un radical méthoxyméthyle, éthoxy-1 éthyle, benzyloxyméthyle, triméthylsilyle,

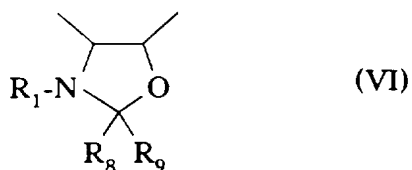
triéthylsilyle, β -triméthylsilyléthoxyméthyle, benzyloxycarbone ou tétrahydropyrannyle.

Lorsque R_6 et R_7 forment ensemble un hétérocycle, celui-ci est de préférence un cycle oxazolidine éventuellement mono-substitué ou gem-disubstitué en position -2.

Le remplacement des groupements protecteurs R_6 et/ou R_7 par des atomes d'hydrogène peut être effectué, selon leur nature de la manière suivante :

1) lorsque R_6 représente un atome d'hydrogène et R_7 représente un groupement protecteur de la fonction hydroxy, le remplacement des groupements protecteurs par des atomes d'hydrogène s'effectue au moyen d'un acide minéral (acide chlorhydrique, acide sulfurique, acide fluorhydrique) ou organique (acide acétique, acide méthanesulfonique, acide trifluorométhanesulfonique, acide p.toluènesulfonique) utilisé seul ou en mélange en opérant dans un solvant organique choisi parmi les alcools, les éthers, les esters, les hydrocarbures aliphatiques, les hydrocarbures aliphatiques halogénés, les hydrocarbures aromatiques ou les nitriles à une température comprise entre -10 et 60°C,

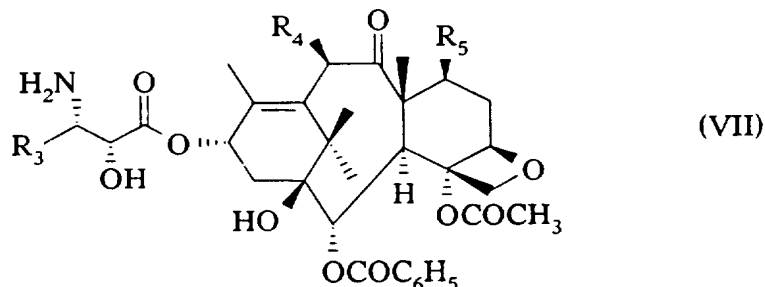
2) lorsque R_6 et R_7 forment ensemble un hétérocycle saturé à 5 ou 6 chaînons et plus particulièrement un cycle oxazolidine de formule générale :



dans laquelle R_1 est défini comme précédemment, R_8 et R_9 , identiques ou différents, représentent un atome d'hydrogène ou un radical alcoyle contenant 1 à 4 atomes de carbone, ou un radical aralcoyle dont la partie alcoyle contient 1 à 4 atomes de carbone et la partie aryle représente, de préférence, un radical phényle éventuellement substitué par un ou plusieurs radicaux alcoxy contenant 1 à 4 atomes de carbone, ou un radical aryle représentant, de préférence un radical phényle éventuellement substitué par un ou plusieurs radicaux alcoxy contenant 1 à 4 atomes de carbone, ou bien R_8 représente un radical alcoyle contenant 1 à 4 atomes de

carbone ou un radical trihalométhyle tel que trichlorométhyle ou un radical phényle substitué par un radical trihalométhyle tel que trichlorométhyle et R₉ représente un atome d'hydrogène, ou bien R₈ et R₉ forment ensemble avec l'atome de carbone auquel ils sont liés un cycle ayant 4 à 7 chaînons, le remplacement du groupement protecteur formé par R₆ et R₇ par des atomes d'hydrogène peut être effectué, selon les significations de R₁, R₈ et R₉, de la manière suivante :

a) lorsque R₁ représente un radical tert-butoxycarbonyl, R₈ et R₉, identiques ou différents, représentent un radical alcoyle ou un radical aralcoyle (benzyle) ou aryle (phényle), ou bien R₈ représente un radical trihalométhyle ou un radical phényle substitué par un radical trihalométhyle, et R₉ représente un atome d'hydrogène, ou bien R₈ et R₉ forment ensemble un cycle ayant de 4 à 7 chaînons, le traitement de l'ester de formule générale (V) par un acide minéral ou organique éventuellement dans un solvant organique tel qu'un alcool conduit au produit de formule générale :



dans laquelle R₃, R₄ et R₅ sont définis comme précédemment, qui est acylé au moyen de chlorure de benzoyle dans lequel le noyau phényle est éventuellement substitué, de chlorure de thénoyl, de chlorure de furoyle ou d'un produit de formule générale :



dans laquelle R₂ est défini comme précédemment et X représente un atome d'halogène (fluor, chlore) ou un reste -O-R₂ ou -O-CO-O-R₂, pour obtenir un produit de formule générale (I) dans laquelle Z représente un radical de formule générale (II).

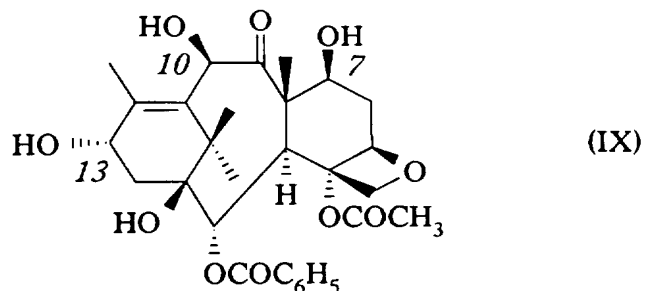
De préférence, le produit de formule générale (V) est traité par l'acide formique à une température voisine de 20°C pour fournir le produit de formule générale (VII).

De préférence, l'acylation du produit de formule générale (VII) au moyen d'un chlorure de benzoyle dans lequel le radical phényle est éventuellement substitué, de chlorure de thényle ou de chlorure de furoyle ou d'un produit de formule générale (VIII) est effectuée dans un solvant organique inerte choisi parmi les esters tels que l'acétate d'éthyle, l'acétate d'isopropyle ou l'acétate de n.butyle et les hydrocarbures aliphatiques halogénés tels que le dichlorométhane ou le dichloro-1,2 éthane en présence d'une base minérale telle que le bicarbonate de sodium ou organique telle que la triéthylamine. La réaction est effectuée à une température comprise entre 0 et 50°C, de préférence voisine de 20°C.

10 b) lorsque R₁ représente un radical benzoyle éventuellement substitué, thényle ou furoyle ou un radical R₂O-CO- dans lequel R₂ est défini comme précédemment, R₈ représente un atome d'hydrogène ou un radical alcoxy contenant 1 à 4 atomes de carbone ou un radical phényle substitué par un ou plusieurs radicaux alcoxy contenant 1 à 4 atomes de carbone et R₉ représente un atome d'hydrogène, le
15 remplacement du groupement protecteur formé par R₆ et R₇ par des atomes d'hydrogène s'effectue en présence d'un acide minéral (acide chlorhydrique, acide sulfurique) ou organique (acide acétique, acide méthanesulfonique, acide trifluorométhanesulfonique, acide p.toluènesulfonique) utilisé seul ou en mélange en quantité stoechiométrique ou catalytique, en opérant dans un solvant organique choisi parmi
20 les alcools, les éthers, les esters, les hydrocarbures aliphatiques, les hydrocarbures aliphatiques halogénés et les hydrocarbures aromatiques à une température comprise entre -10 et 60°C, de préférence entre 15 et 30°C.

Selon l'invention, les produits de formule générale (III), c'est-à-dire les produits de formule générale (I) dans laquelle Z représente un atome d'hydrogène,
25 R₄ et R₅ sont définis comme précédemment, peuvent être obtenus à partir de la 10-désacétyl-baccatine III de formule :

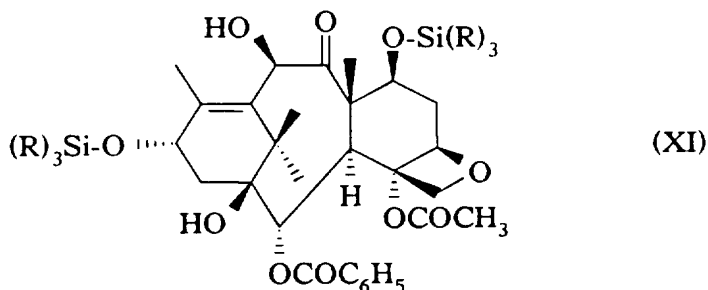
11



Il peut être particulièrement avantageux de protéger sélectivement les fonctions hydroxy en positions 7 et 13, par exemple sous forme d'un di-éther silylé qui peut être obtenu par action d'un halogénure de silyle de formule générale :



dans laquelle les symboles R, identiques ou différents, représentent un radical alcoyle contenant 1 à 4 atomes de carbone éventuellement substitué par un radical phényle, ou un radical phényle, sur la 10-désacétyl-baccatine III pour obtenir un produit de formule générale :

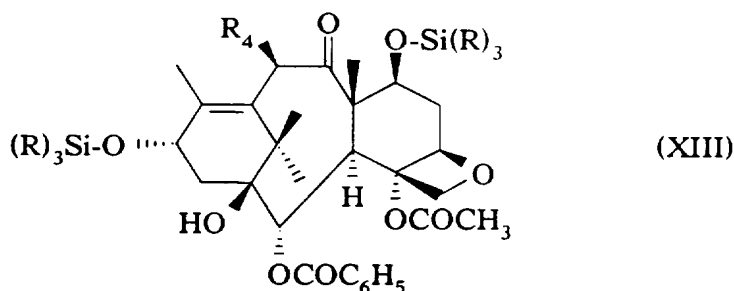


10 dans laquelle R est défini comme précédemment, puis action d'un produit de formule générale :

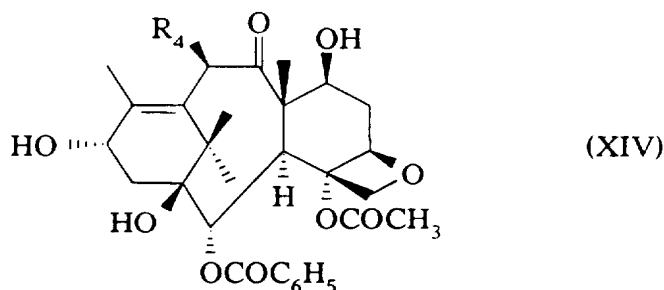


dans laquelle R'₄ est tel que R'₄-O- est identique à R₄ défini comme précédemment mais ne peut pas représenter un atome d'hydrogène ou un radical hydroxy et X₁ représente un atome d'halogène pour obtenir un produit de formule générale :

12



dans laquelle R et R₄ sont définis comme précédemment, dont les groupements protecteurs silylés sont remplacés par des atomes d'hydrogène pour obtenir un produit de formule générale :



5

dans laquelle R₄ est défini comme précédemment, qui est étherifié sélectivement en position 7 par action d'un produit de formule générale :



dans laquelle R'₅ est tel que R'₅-O- est identique à R₅ défini comme précédemment et X₂ représente atome d'halogène ou un reste d'ester sulfurique ou sulfonique pour donner le produit de formule générale (III).

10

15

Généralement, l'action d'un dérivé silylé de formule générale (X) sur la 10-désacétyl-baccatine III est effectuée dans la pyridine ou la triéthylamine éventuellement en présence d'un solvant organique tel qu'un hydrocarbure aromatique comme le benzène, le toluène ou les xylènes à une température comprise entre 0°C et la température de reflux du mélange réactionnel.

20

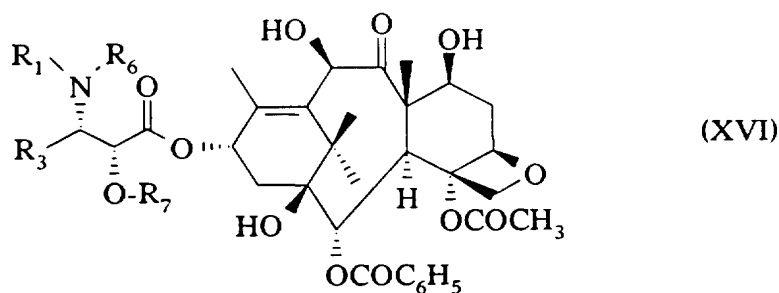
Généralement, l'action d'un produit de formule générale (XII) sur un produit de formule générale (XI), est effectuée, après métallation de la fonction hydroxy en position 10 au moyen d'un hydrure de métal alcalin tel que l'hydrure de sodium, un amidure de métal alcalin tel que l'amidure de lithium ou d'un alcoylure de métal alcalin tel que le butyllithium, en opérant dans un solvant organique tel que le

diméthylformamide ou le tétrahydrofurane à une température comprise entre 0 et 50°C.

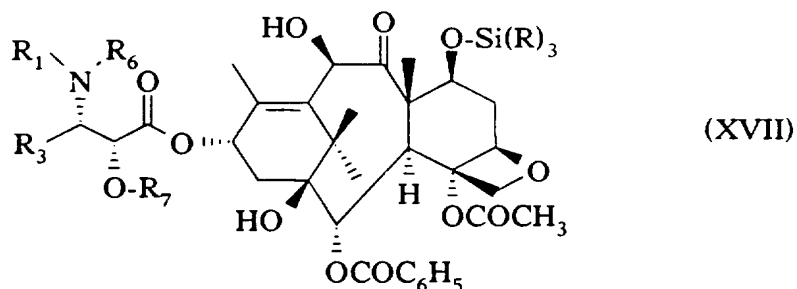
Généralement le remplacement des groupements protecteurs silylés du produit de formule générale (XIII) par des atomes d'hydrogène s'effectue au moyen
 5 d'un acide tel que l'acide fluorhydrique ou l'acide trifluoroacétique en présence d'une base telle que la triéthylamine ou la pyridine éventuellement substituée par un ou plusieurs radicaux alcoyles contenant 1 à 4 atomes de carbone, éventuellement associée à un solvant organique inerte tel qu'un nitrile comme l'acétonitrile ou un hydrocarbure aliphatique halogéné comme le dichlorométhane à une température
 10 comprise entre 0 et 80°C.

Généralement l'action d'un produit de formule générale (XV) sur un produit de formule générale (XIV) s'effectue dans les conditions indiquées précédemment pour l'action d'un produit de formule générale (XII) sur un produit de formule générale (XI).

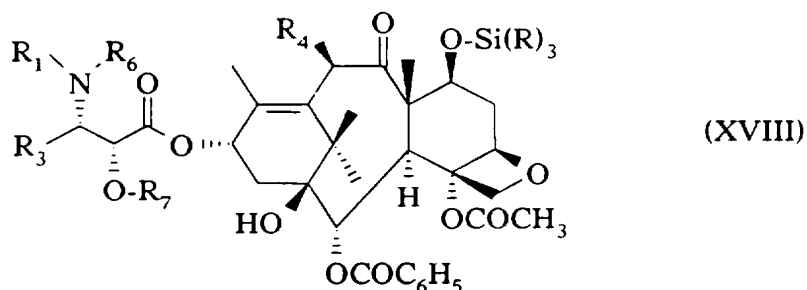
15 Selon l'invention, les produits de formule générale (I) dans laquelle Z représente un radical de formule générale (II), R₄ et R₅ sont définis comme précédemment, peuvent être obtenus à partir d'un produit de formule générale :



dans laquelle R₁, R₃, R₆ et R₇ sont définis comme précédemment par silylation en
 20 position 7 au moyen d'un produit de formule générale (X) pour obtenir un produit de formule générale :

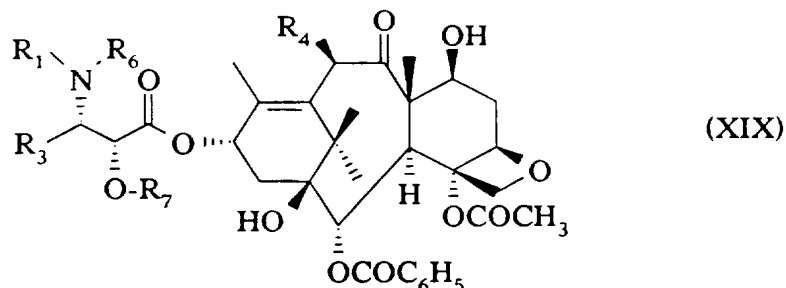


dans laquelle R, R₁, R₃, R₆ et R₇ sont définis comme précédemment, qui est fonctionnalisé en position 10 au moyen d'un produit de formule générale (XII) pour donner un produit de formule générale :



5

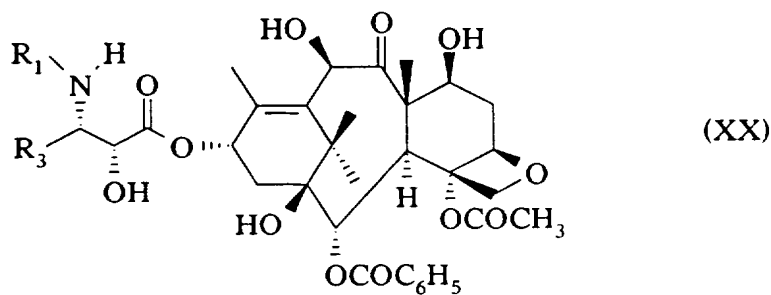
dans laquelle R, R₁, R₃, R₄, R₆ et R₇ sont définis comme précédemment dont le groupement protecteur silylé est remplacé par un atome d'hydrogène pour donner un produit de formule générale :



10 qui, par action d'un produit de formule générale (XV) conduit au produit de formule générale (V) dont les groupements protecteurs sont remplacés par des atomes d'hydrogène pour donner un produit de formule générale (I) dans laquelle Z représente un radical de formule générale (II).

15 Les réactions de silylation, de fonctionnalisation et de remplacement des groupements protecteurs par des atomes d'hydrogène sont effectuée dans des conditions analogues à celles décrites ci-dessus.

Les produits de formule générale (XVI) peuvent être obtenus dans les conditions décrites dans le brevet européen EP 0 336 841 et les demandes internationales PCT WO 92/09589 et WO 94/07878 ou à partir des produits de formule générale :

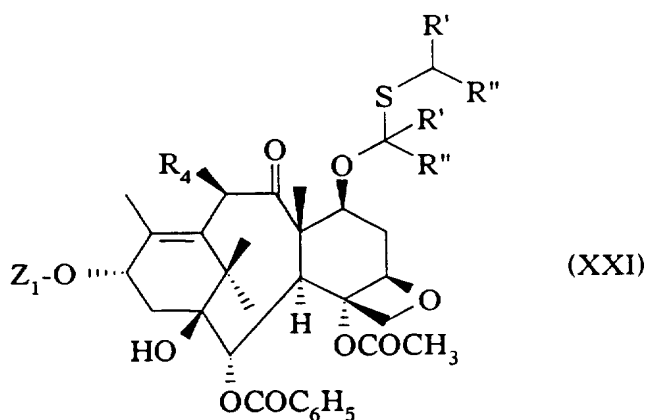


5

dans laquelle R_1 et R_3 sont définis comme précédemment selon les méthodes connues de protection de la fonction hydroxy de la chaîne latérale sans toucher au reste de la molécule.

Selon l'invention, les produits de formule générale (I) dans laquelle Z

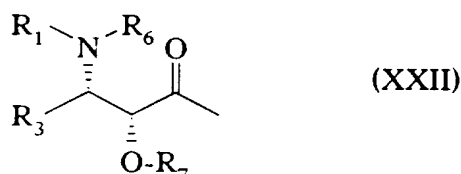
10 représente un atome d'hydrogène ou un radical de formule générale (II) peuvent être obtenus par action de nickel de Raney activé en présence d'un alcool aliphatique contenant 1 à 3 atomes de carbone sur un produit de formule générale :



dans laquelle R_4 est défini comme précédemment et R' et R'' , identiques ou différents

15 représentent un atome d'hydrogène ou un radical alcoyle contenant 1 à 6 atomes de carbone, alcényle contenant 2 à 6 atomes de carbone, alcynyle contenant 2 à 6 atomes de carbone, cycloalcoyle contenant 3 à 6 atomes de carbone ou cycloalcényle

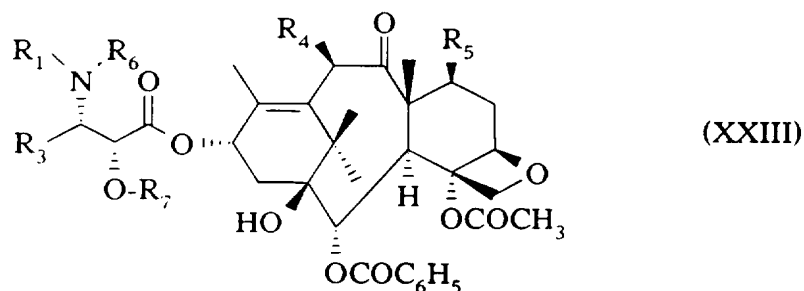
contenant 3 à 6 atomes de carbone, ou bien R' et R'' forment ensemble avec l'atome de carbone auquel ils sont liés un radical cycloacyle contenant 3 à 6 atomes de carbone ou un radical cycloalcényle contenant 4 à 6 atomes de carbone, et Z₁ représente un atome d'hydrogène ou un radical de formule générale :



5

dans laquelle R₁ et R₃ sont définis comme précédemment et, ou bien, R₆ représente un atome d'hydrogène et R₇ représente un groupement protecteur de la fonction hydroxy, et, ou bien, R₆ et R₇ forment ensemble un hétérocycle saturé à 5 ou 6 chaînons, R₄ est défini comme précédemment, pour obtenir un produit de formule générale :

10



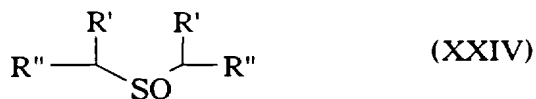
suivi, lorsque Z₁ représente un radical de formule générale (XXII), c'est-à-dire lorsque le produit de formule générale (XXIII) est identique au produit de formule générale (V), du remplacement des groupements protecteurs représentés par R₆ et/ou R₆ et R₇ par des atomes d'hydrogène dans les conditions décrites précédemment.

15

Généralement, l'action du nickel de Raney activé en présence de l'alcool aliphatique est effectuée à une température comprise entre -10 et 60°C.

Selon l'invention, le produit de formule générale (XXI) dans laquelle Z₁ et R₄ sont définis comme précédemment peut être obtenu par action d'un dialcoylsulfoxyde de formule générale:

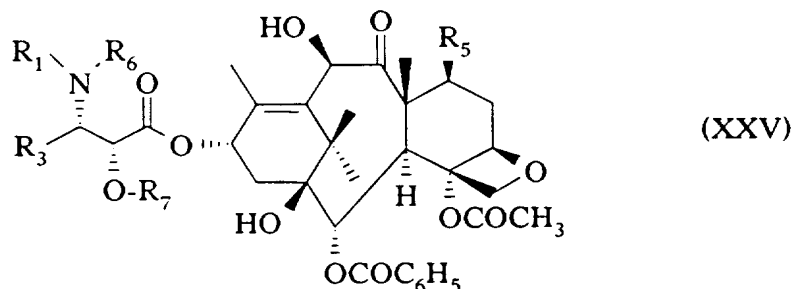
20



dans laquelle R' et R'' sont définis comme précédemment, sur un produit de formule générale (XIX).

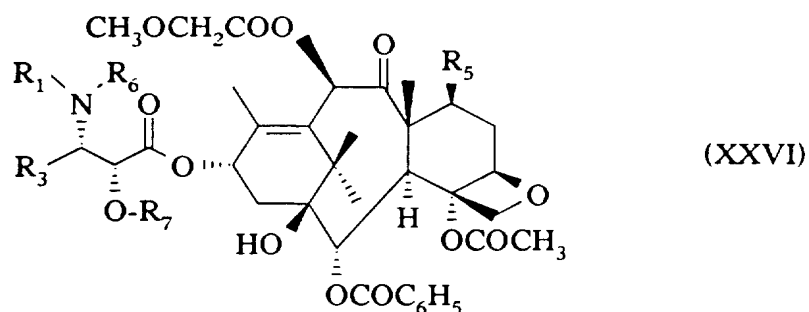
Généralement la réaction du sulfoxyde de formule générale (XXIV), de
5 préférence le diméthylsulfoxyde, sur le produit de formule générale (XIX) s'effectue en présence d'un mélange d'acide acétique et d'anhydride acétique ou d'un dérivé de l'acide acétique tel qu'un acide halogénoacétique à une température comprise entre 0 et 50°C, de préférence voisine de 25°C.

Selon l'invention, les produits de formule générale (I) dans laquelle Z
10 représente un radical de formule générale (II) peuvent être obtenus par action d'un produit de formule générale (XII) sur un produit de formule générale :



dans laquelle R₁, R₃, R₅, R₆ et R₇ sont définis comme précédemment, en opérant
dans les conditions décrites pour l'action d'un produit de formule générale (XII) sur un
15 produit de formule générale (XI), suivie du remplacement des groupements protecteurs représentés par R₇ ou R₆ et R₇ par des atomes d'hydrogène dans les conditions décrites précédemment.

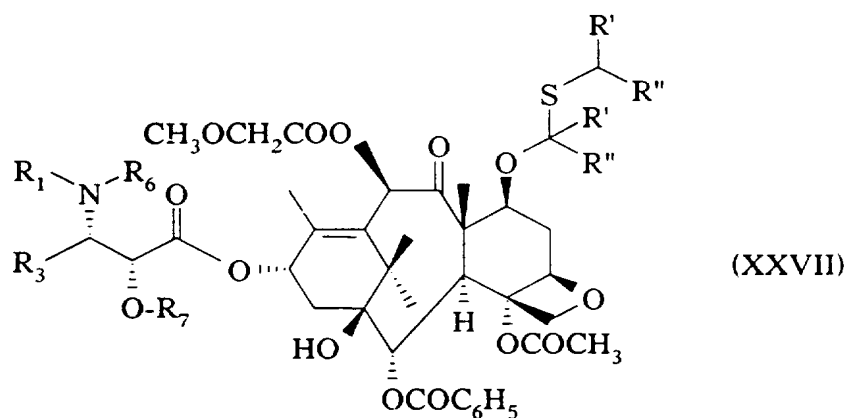
Le produit de formule générale (XXV) peut être obtenu par action d'un
halogénure de zinc tel que l'iodure de zinc ou l'hydrazine sur un produit de formule
20 générale :



dans laquelle R_1 , R_3 , R_5 , R_6 et R_7 sont définis comme précédemment.

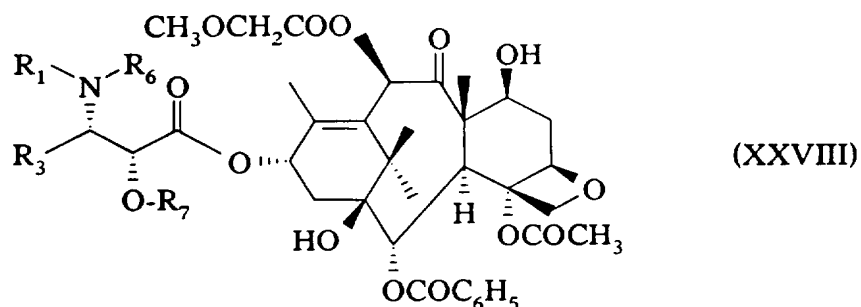
Généralement la réaction est effectuée en opérant dans un alcool aliphatique contenant 1 à 4 atomes de carbone tel que le méthanol ou l'éthanol à une température comprise entre 0 et 50°C.

Le produit de formule générale (XXVI) peut être obtenu par action de nickel de Raney activé en présence d'un alcool aliphatique contenant 1 à 3 atomes de carbone sur un produit de formule générale :



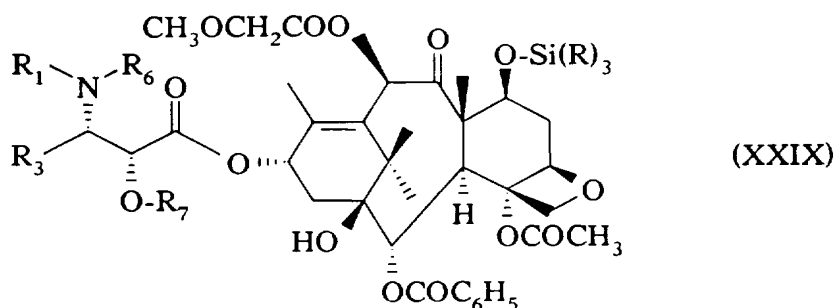
10 dans laquelle R_1 , R_3 , R_6 , R_7 , R' et R'' sont définis comme précédemment, en opérant dans les conditions décrites précédemment pour la préparation d'un produit de formule générale (I) à partir d'un produit de formule générale (XXI).

Le produit de formule générale (XXVII) peut être obtenu par action d'un sulfoxyde de formule générale (XXIV) sur un produit de formule générale :



dans laquelle R_1 , R_3 , R_6 et R_7 sont définis comme précédemment, en opérant dans les conditions décrites précédemment pour l'action d'un sulfoxyde de formule générale (XXIV) sur un produit de formule générale (XIX).

- 5 Le produit de formule générale (XXVIII) peut être obtenu à partir d'un produit de formule générale :



- dans laquelle R_1 , R_3 , R_6 et R_7 sont définis comme précédemment, en opérant dans les conditions décrites précédemment pour remplacer les groupements silylés du produit de formule générale (XIII) par des atomes d'hydrogène.
- 10

Le produit de formule générale (XXIX) peut être préparé dans les conditions décrites dans la demande internationale PCT WO 95/11241.

- Les nouveaux produits de formule générale (I) obtenus par la mise en oeuvre des procédés selon l'invention peuvent être purifiés selon les méthodes connues telles que la cristallisation ou la chromatographie.
- 15

Les produits de formule générale (I) dans laquelle Z représente un radical de formule générale (II) présentent des propriétés biologiques remarquables.

In vitro, la mesure de l'activité biologique est effectuée sur la tubuline extraite de cerveau de porc par la méthode de M.L. Shelanski et coll., Proc. Natl.

Acad. Sci. USA, 70, 765-768 (1973). L'étude de la dépolymérisation des microtubules en tubuline est effectuée selon la méthode de G. Chauvière et coll., C.R. Acad. Sci., 293, série II, 501-503 (1981). Dans cette étude les produits de formule générale (I) dans laquelle Z représente un radical de formule générale (II) se sont montrés au moins aussi actifs que le taxol et le Taxotère.

In vivo, les produits de formule générale (I) dans laquelle Z représente un radical de formule générale (II) se sont montrés actifs chez la souris greffée par le mélanome B16 à des doses comprises entre 1 et 10 mg/kg par voie intrapéritonéale, ainsi que sur d'autres tumeurs liquides ou solides.

Les nouveaux produits ont des propriétés anti-tumorales et plus particulièrement une activité sur les tumeurs qui sont résistantes au Taxol[®] ou au Taxotère[®]. De telles tumeurs comprennent les tumeurs du colon qui ont une expression élevée du gène mdr 1 (gène de la multi-drug resistance). La multi-drug resistance est un terme habituel se rapportant à la résistance d'une tumeur à différents produits de structures et de mécanismes d'action différents. Les taxoïdes sont généralement connus pour être fortement reconnus par des tumeurs expérimentales telles que P388/DOX, une lignée cellulaire sélectionnée pour sa résistance à la doxorubicine (DOX) qui exprime mdr 1.

Les exemples suivants illustrent la présente invention.

20 EXEMPLE 1

On dissout 243 mg de tert-butoxycarbonyl-3 (méthoxy-4 phényl)-2 phényl-4 oxazolidine-1,3 carboxylate-5-(2R,4S,5R) d'acétoxy-4 α benzoyloxy-2 α époxy-5 β ,20 hydroxy-1 β méthoxy-7 β oxo-9 (pyridyl-3 carbonyl)oxy-10 β taxène-11 yle-13 α dans 4,5 cm³ d'une solution éthanolique 0,1N d'acide chlorhydrique à 1% d'eau. La solution ainsi obtenue est agitée pendant 3 heures à une température voisine de 20°C puis additionnée de 25 cm³ de dichlorométhane. La phase organique est séparée par décantation et lavée successivement par 2 fois 10 cm³ d'une solution aqueuse saturée d'hydrogénocarbonate de sodium, séchée sur sulfate de magnésium, filtrée et concentrée à sec sous pression réduite (2,7 kPa) à 40°C. On obtient 290 mg d'une meringue blanche que l'on purifie par chromatographie sur gel de silice déposé sur

plaques [(gel de 1mm d'épaisseur, plaques de 20 x 20 cm, éluant : dichlorométhane-méthanol (95-5 en volumes)] par fractions de 80 mg (4 plaques). Après localisation aux rayons U.V. de la zone correspondant au produit cherché adsorbé, cette zone est grattée et la silice recueillie est lavée sur verre fritté par 10 fois 10 cm³ d'acétate d'éthyle. Les filtrats sont réunis et concentrés à sec sous pression réduite (2,7 kPa) à 20°C. On obtient une meringue blanche que l'on repurifie selon la même technique [(2 plaques : 20 x 20 x 1 mm; éluant : dichlorométhane-méthanol (95-5 en volumes)]. On obtient ainsi 132 mg de tert-butoxycarbonylamino-3 hydroxy-2 phényl-3 propionate-(2R,3S) d'acétoxy-4 α benzoyloxy-2 α époxy-5 β ,20 hydroxy-1 β méthoxy-10 7 β oxo-9 (pyridyl-3 carbonyl)oxy-10 β taxène-11 yle-13 α sous forme d'une meringue blanche dont les caractéristiques sont les suivantes :

- pouvoir rotatoire : $[\alpha]_{D_{20}} = -34$ ($c = 0,5$; méthanol).
 - spectre de R.M.N. ^1H (300 MHz ; CDCl_3 ; déplacements chimiques δ en ppm ; constantes de couplage J en Hz) : 1,30 (s, 3H : $-\text{CH}_3$ en 16 ou en 17) ; 1,35 [(s, 12H : $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$ et $-\text{CH}_3$ en 16 ou en 17)] ; 1,75 (s, 3H : $-\text{CH}_3$) ; 1,82 et 2,77 (2 mts, 1H chacun : $-\text{CH}_2-$ en 6) ; 1,97 (s, 3H : $-\text{CH}_3$) ; 2,35 (d, $J = 9$, 2H : $-\text{CH}_2-$ en 14) ; 2,39 (s, 3H : $-\text{COCH}_3$) ; 3,38 (d, $J = 5$, 1H : $-\text{OH}$ en 2') ; 3,42 (s, 3H : $-\text{OCH}_3$) ; 3,88 (d, $J = 7,5$, 1H : $-\text{H}$ en 3) ; 3,96 (dd, $J = 11$ et $7,5$, 1H : $-\text{H}$ en 7) ; 4,18 et 4,32 (2 d, $J = 8,5$, 1H chacun : $-\text{CH}_2-$ en 20) ; 4,64 (mt, 1H : $-\text{H}$ en 2') ; 4,98 (d large, $J = 10$, 1H : $-\text{H}$ en 5) ; 5,28 (d large, $J = 10$, 1H : $-\text{H}$ en 3') ; 5,39 (d, $J = 10$, 1H : $-\text{CONH}-$) ; 5,70 (d, $J = 7,5$, 1H : $-\text{H}$ en 2) ; 6,22 (t large, $J = 9$, 1H : $-\text{H}$ en 13) ; 6,69 (s, 1H : $-\text{H}$ en 10) ; de 7,25 à 7,45 (mt, 5H : $-\text{C}_6\text{H}_5$ en 3') ; 7,44 [(dd, $J = 8,5$ et 6 , 1H : $-\text{OCOC}_5\text{H}_4\text{N}(-\text{H}$ en 5)] ; 7,50 [(d, $J = 7,5$, 2H : $-\text{OCOC}_6\text{H}_5(-\text{H}$ en 3 et H en 5)] ; 7,62 [(t, $J = 7,5$, 1H : $-\text{OCOC}_6\text{H}_5(-\text{H}$ en 4)] ; 8,12 [(d, $J = 7,5$, 2H : $-\text{OCOC}_6\text{H}_5(-\text{H}$ en 2 et $-\text{H}$ en 6)] ; 8,35 [(dt, $J = 8,5$ et 1 , 1H : $-\text{OCOC}_5\text{H}_4\text{N}(-\text{H}$ en 4)] ; 8,82 (dd, $J = 6$ et 1 , 1H : $-\text{OCOC}_5\text{H}_4\text{N}(-\text{H}$ en 6)] ; 9,32 (d, $J = 1$, 1H : $-\text{OCOC}_5\text{H}_4\text{N}(-\text{H}$ en 2)].

Le tert-butoxycarbonyl-3 (méthoxy-4 phényl)-2 phényl-4 oxazolidine-1,3 carboxylate-5-(2R,4S,5R) d'acétoxy-4 α benzoyloxy-2 α époxy-5 β ,20 hydroxy-1 β méthoxy-7 β oxo-9 (pyridyl-3 carbonyl)oxy-10 β taxène-11 yle-13 α peut être préparé de la manière suivante :

20 A une solution de 46 mg d'acide pyridine-3 carboxylique dans 25 cm³ d'acétate d'éthyle anhydre, maintenue sous atmosphère d'argon et sous agitation, on ajoute, à une température voisine de 20°C, 290 mg de tert-butoxycarbonyl-3 (méthoxy-4 phényl)-2 phényl-4 oxazolidine-1,3 carboxylate-5-(2R,4S,5R) d'acétoxy-4 α benzoyloxy-2 α époxy-5 β ,20 dihydroxy-1 β ,10 β méthoxy-7 β oxo-9 taxène-11 yle-13 α , 18,5 mg de diméthylamino-4 pyridine, 0,5 g de tamis moléculaire 4 Å et 112 mg de N,N'-dicyclohexylcarbodiimide. Le mélange réactionnel est maintenu sous agitation pendant 16 heures à une température voisine de 20°C puis on ajoute 46 mg d'acide pyridine-2 carboxylique, 18,5 mg de diméthylamino-4 pyridine, 0,5 g de tamis moléculaire 4 Å et 112 mg de N,N'-dicyclohexylcarbodiimide et maintient à nouveau sous agitation pendant 24 heures puis répète ce cycle deux autres fois. Le mélange

réactionnel est filtré sur verre fritté garni de célite. Le verre fritté est lavé par 2 fois 50 cm³ d'acétate d'éthyle, les filtrats sont réunis, lavés successivement par 2 fois 10 cm³ d'une solution aqueuse saturée d'hydrogénocarbonate de sodium et par 6 fois 20 cm³ d'eau distillée, séchés sur sulfate de magnésium, filtrés et concentrés à sec sous pression réduite (2,7 kPa) à 40°C. On obtient ainsi 298 mg de tert-butoxycarbonyl-3 (méthoxy-4 phényl)-2 phényl-4 oxazolidine-1,3 carboxylate-5-(2R,4S,5R) d'acétoxy-4 α benzoyloxy-2 α époxy-5 β ,20 hydroxy-1 β méthoxy-7 β oxo-9 (pyridyl-3 carbonyl)oxy-10 β taxène-11 yle-13 α sous forme d'une meringue blanche.

Le tert-butoxycarbonyl-3 (méthoxy-4 phényl)-2 phényl-4 oxazolidine-1,3 carboxylate-5-(2R,4S,5R) d'acétoxy-4 α benzoyloxy-2 α époxy-5 β ,20 dihydroxy-1 β ,10 β méthoxy-7 β oxo-9 taxène-11 yle-13 α peut être préparé de la manière suivante

A une solution de 150 mg de tert-butoxycarbonyl-3 (méthoxy-4 phényl)-2 phényl-4 oxazolidine-1,3 carboxylate-5-(2R,4S,5R) d'acétoxy-4 α benzoyloxy-2 α époxy-5 β ,20 hydroxy-1 β méthoxy-7 β méthoxyacétoxy-10 β oxo-9 taxène-11 yle-13 α dans 4 cm³ d'éthanol anhydre, maintenue sous atmosphère d'argon et sous agitation, on ajoute, goutte à goutte et à une température voisine de 20°C, 0,263 cm³ d'hydrazine monohydratée. Le milieu réactionnel est maintenu sous agitation pendant 1 heure à une température voisine de 20°C puis versé dans un mélange de 100 cm³ d'acétate d'éthyle et de 50 cm³ d'eau distillée. La phase organique est séparée par décantation et on ré extrait la phase aqueuse par 2 fois 50 cm³ d'acétate d'éthyle. Les phases organiques sont réunies lavées par 4 fois 50 cm³ d'eau distillée, séchées sur sulfate de magnésium, filtrées et concentrées à sec sous pression réduite (2,7 kPa) à 40°C. On obtient 180 mg d'une meringue blanche que l'on purifie par chromatographie sur gel de silice déposé sur plaques [(gel de 1 mm d'épaisseur, plaques de 20 x 20 cm, éluant : dichlorométhane-méthanol (90-10 en volumes)] par fractions de 90 mg (2 plaques). Après localisation aux rayons U.V. de la zone correspondant au produit cherché adsorbé, cette zone est grattée et la silice recueillie est lavée sur verre fritté par 10 fois 10 cm³ d'acétate d'éthyle. Les filtrats sont réunis et concentrés à sec sous pression réduite (2,7 kPa) à 40°C. On obtient ainsi 113 mg de tert-butoxycarbonyl-3 (méthoxy-4 phényl)-2 phényl-4 oxazolidine-1,3 carboxylate-

5-(2R,4S,5R) d'acétoxy-4 α benzoyloxy-2 α époxy-5 β ,20 dihydroxy-1 β ,10 β méthoxy-7 β oxo-9 taxène-11 yle-13 α sous forme d'une meringue blanche.

Le tert-butoxycarbonyl-3 (méthoxy-4 phényl)-2 phényl-4 oxazolidine-1,3 carboxylate-5-(2R,4S,5R) d'acétoxy-4 α benzoyloxy-2 α époxy-5 β ,20 hydroxy-1 β méthoxy-7 β méthoxyacétoxy-10 β oxo-9 taxène-11 yle-13 α peut être préparé de la manière suivante :

A une solution de 1,041 g de tert-butoxycarbonyl-3 (méthoxy-4 phényl)-2 phényl-4 oxazolidine-1,3 carboxylate-5-(2R,4S,5R) d'acétoxy-4 α benzoyloxy-2 α époxy-5 β ,20 hydroxy-1 β méthoxyacétoxy-10 β méthylthiométhoxy-7 β oxo-9 taxène-11 yle-13 α dans 100 cm³ d'éthanol anhydre, maintenue sous atmosphère d'argon et sous agitation, on ajoute, à une température voisine de 20°C, 100 cm³ d'une suspension éthanolique de nickel activé selon Raney (obtenue à partir de 80 cm³ de la suspension aqueuse commerciale à environ 50 %, par lavage successifs jusqu'à un pH voisin de 7 par 15 fois 100 cm³ d'eau distillée et par 4 fois 150 cm³ d'éthanol). Le mélange réactionnel est maintenu sous agitation pendant 7 jours à une température voisine de 20°C puis filtré sur verre fritté. Le verre fritté est lavé par 3 fois 100 cm³ d'éthanol, les filtrats sont réunis et concentrés à sec sous pression réduite (2,7 kPa) à 40°C. On obtient 821 mg d'une meringue blanche que l'on purifie par chromatographie sur 75 g de silice (0,063-0,2 mm) contenus dans une colonne de 2,5 cm de diamètre [éluant : dichlorométhane-acétate d'éthyle (90-10 en volumes)] en recueillant des fractions de 5 cm³. Les fractions ne contenant que le produit cherché sont réunies et concentrées à sec sous pression réduite (2,7 kPa) à 40°C. On obtient ainsi 228 mg de tert-butoxycarbonyl-3 (méthoxy-4 phényl)-2 phényl-4 oxazolidine-1,3 carboxylate-5-(2R,4S,5R) d'acétoxy-4 α benzoyloxy-2 α époxy-5 β ,20 hydroxy-1 β méthoxy-7 β méthoxyacétoxy-10 β oxo-9 taxène-11 yle-13 α sous forme d'une meringue blanche.

Le tert-butoxycarbonyl-3 (méthoxy-4 phényl)-2 phényl-4 oxazolidine-1,3 carboxylate-5-(2R,4S,5R) d'acétoxy-4 α benzoyloxy-2 α époxy-5 β ,20 hydroxy-1 β

méthoxyacétoxy-10 β méthylthiométhoxy-7 β oxo-9 taxène-11 yle-13 α peut être préparé de la manière suivante :

A une solution de 5 g de tert-butoxycarbonyl-3 (méthoxy-4 phényl)-2 phényl-4 oxazolidine-1,3 carboxylate-5-(2R,4S,5R) d'acétoxy-4 α benzoyloxy-2 α époxy-5 β ,20
5 dihydroxy-1 β ,7 β méthoxyacétoxy-10 β oxo-9 taxène-11 yle-13 α dans 165 cm³ de diméthylsulfoxyde anhydre, maintenue sous atmosphère d'argon et sous agitation, on ajoute, à une température voisine de 20°C, 3,35 cm³ d'acide acétique et 11,5 cm³ d'anhydride acétique. Le mélange réactionnel est maintenu sous agitation pendant 3 jours à une température voisine de 20°C puis versé dans 500 cm³ de
10 dichlorométhane. On additionne ensuite sous bonne agitation 100 cm³ d'une solution aqueuse saturée de carbonate de potassium jusqu'à un pH voisin de 7. Après 10 minutes d'agitation, la phase organique est séparée par décantation et on réextrait la phase aqueuse par 2 fois 250 cm³ de dichlorométhane. Les phases organiques sont réunies, lavées par 3 fois 100 cm³ d'eau distillée, séchées sur sulfate de magnésium,
15 filtrées et concentrées à sec sous pression réduite (2,7 kPa) à 40°C. On obtient 9,5 g d'une huile jaune pâle que l'on purifie par chromatographie sur 250 g de silice (0,063-0,4 mm) contenus dans une colonne de 3 cm de diamètre [éluant : dichlorométhane-méthanol (99-1 en volumes)] en recueillant des fractions de 50 cm³. Les fractions ne contenant que le produit cherché sont réunies et concentrées à sec sous pression
20 réduite (2,7 kPa) à 40°C. On obtient ainsi 3,01 g de tert-butoxycarbonyl-3 (méthoxy-4 phényl)-2 phényl-4 oxazolidine-1,3 carboxylate-5-(2R,4S,5R) d'acétoxy-4 α benzoyloxy-2 α époxy-5 β ,20 hydroxy-1 β méthoxyacétoxy-10 β méthylthiométhoxy-7 β oxo-9 taxène-11 yle-13 α sous forme d'une meringue blanche.

Le tert-butoxycarbonyl-3 (méthoxy-4 phényl)-2 phényl-4 oxazolidine-1,3
25 carboxylate-5-(2R,4S,5R) d'acétoxy-4 α benzoyloxy-2 α époxy-5 β ,20 dihydroxy-1 β ,7 β méthoxyacétoxy-10 β oxo-9 taxène-11 yle-13 α peut être préparé de la manière suivante :

A une solution de 20 g de tert-butoxycarbonyl-3 (méthoxy-4 phényl)-2 phényl-4 oxazolidine-1,3 carboxylate-5-(2R,4S,5R) d'acétoxy-4 α benzoyloxy-2 α époxy-

5 β ,20 triéthylsilyloxy-7 β hydroxy-1 β méthoxyacétoxy-10 β oxo-9 taxène-11 yle-13 α dans 200 cm³ de dichlorométhane anhydre, maintenue sous atmosphère d'argon et sous agitation, on ajoute, goutte à goutte, à une température voisine de 0°C, 220 cm³ du complexe triéthylamine- acide fluorhydrique (1-3 en moles). Le mélange

5 réactionnel est ensuite réchauffé jusqu'à une température voisine de 20°C, maintenu pendant 3 heures à cette température et versé dans 4 litres d'une solution aqueuse saturée d'hydrogénocarbonate de sodium. Le pH du milieu réactionnel étant ainsi amené aux environs de 7. Après 10 minutes d'agitation, la phase organique est séparée par décantation et on extrait la phase aqueuse par 2 fois 100 cm³ de dichlorométhane.

10 Les phases organiques sont réunies, lavées par 100 cm³ d'eau distillée, séchées sur sulfate de magnésium, filtrées et concentrées à sec sous pression réduite (2,7 kPa) à 40°C. On obtient ainsi 17,4 g de tert-butoxycarbonyl-3 (méthoxy-4 phényl)-2 phényl-4 oxazolidine-1,3 carboxylate-5-(2R,4S,5R) d'acétoxy-4 α benzoyloxy-2 α époxy-5 β ,20 dihydroxy-1 β ,7 β méthoxyacétoxy-10 β oxo-9 taxène-11 yle-13 α sous

15 forme d'une meringue blanche.

Le tert-butoxycarbonyl-3 (méthoxy-4 phényl)-2 phényl-4 oxazolidine-1,3 carboxylate-5-(2R,4S,5R) d'acétoxy-4 α benzoyloxy-2 α époxy-5 β ,20 triéthylsilyloxy-7 β hydroxy-1 β méthoxyacétoxy-10 β oxo-9 taxène-11 yle-13 α peut être préparé dans les conditions décrites dans la demande internationale PCT WO 95/11241.

20 EXEMPLE 2

En opérant comme dans l'exemple 1, mais à partir de 210 mg de tert-butoxycarbonyl-3 (méthoxy-4 phényl)-2 phényl-4 oxazolidine-1,3 carboxylate-5-(2R,4S,5R) d'acétoxy-4 α benzoyloxy-2 α époxy-5 β ,20 hydroxy-1 β méthoxy-7 β oxo-9 (pyridyl-2 carbonyl)oxy-10 β taxène-11 yle-13 α , on obtient 145 mg de tert-

25 butoxycarbonylamino-3 hydroxy-2 phényl-3 propionate-(2R,3S) d'acétoxy-4 α benzoyloxy-2 α époxy-5 β ,20 hydroxy-1 β méthoxy-7 β oxo-9 (pyridyl-2 carbonyl)oxy-10 β taxène-11 yle-13 α sous forme d'une meringue blanche dont les caractéristiques sont les suivantes :

- pouvoir rotatoire : $[\alpha]_{D_{20}} = - 52$ (c = 0,5 ; méthanol).

- spectre de R.M.N. ^1H (400 MHz ; CDCl_3 ; déplacements chimiques δ en ppm ; constantes de couplage J en Hz) : 1,31 (s, 3H : $-\text{CH}_3$ en 16 ou en 17) ; 1,37 [(s, 12H : $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$ et $-\text{CH}_3$ en 16 ou en 17)] ; 1,74 (s, 1H : $-\text{OH}$ en 1) ; 1,78 (s, 3H : $-\text{CH}_3$) ; 1,82 et 2,78 (2 mts, 1H chacun : $-\text{CH}_2-$ en 6) ; 1,97 (s, 3H : $-\text{CH}_3$) ; 2,35 (d, J = 9, 2H : $-\text{CH}_2-$ en 14) ; 2,40 (s, 3H : $-\text{COCH}_3$) ; 3,40 (d, J = 4,5, 1H : $-\text{OH}$ en 2') ; 3,43 (s, 3H : $-\text{OCH}_3$) ; 3,92 (d, J = 7,5, 1H : $-\text{H}$ en 3) ; 3,98 (dd, J = 11 et 7, 1H : $-\text{H}$ en 7) ; 4,20 et 4,32 (2 d, J = 8,5, 1H chacun : $-\text{CH}_2-$ en 20) ; 4,64 (mt, 1H : $-\text{H}$ en 2') ; 5,00 (d large, J = 10, 1H : $-\text{H}$ en 5) ; 5,28 (d large, J = 10, 1H : $-\text{H}$ en 3') ; 5,43 (d, J = 10, 1H : $-\text{CONH}-$) ; 5,73 (d, J = 7,5, 1H : $-\text{H}$ en 2) ; 6,22 (t large, J = 9, 1H : $-\text{H}$ en 13) ; 6,67 (s, 1H : $-\text{H}$ en 10) ; de 7,25 à 7,45 (mt, 5H : $-\text{C}_6\text{H}_5$ en 3') ; 7,51 [(mt, 3H : $-\text{OCOC}_6\text{H}_5$ ($-\text{H}$ en 3 et H en 5) et $-\text{OCOC}_5\text{H}_4\text{N}$ ($-\text{H}$ en 5))] ; 7,61 [(t, J = 7,5, 1H : $-\text{OCOC}_6\text{H}_5$ ($-\text{H}$ en 4))] ; 7,88 [(t dédoublé, J = 8 et 1, 1H : $-\text{OCOC}_5\text{H}_4\text{N}$ ($-\text{H}$ en 4))] ; 8,12 [(d, J = 7,5, 2H : $-\text{OCOC}_6\text{H}_5$ ($-\text{H}$ en 2 et $-\text{H}$ en 6))] ; 8,20 (d large, J = 8, 1H : $-\text{OCOC}_5\text{H}_4\text{N}$ ($-\text{H}$ en 3)) ; 8,82 (dd large J = 5 et 1, 1H : $-\text{OCOC}_5\text{H}_4\text{N}$ ($-\text{H}$ en 6)).

15 En opérant comme dans l'exemple 1, mais à partir de 300 mg de tert-butoxycarbonyl-3 (méthoxy-4 phényl)-2 phényl-4 oxazolidine-1,3 carboxylate-5-(2R,4S,5R) d'acétoxy-4 α benzoyloxy-2 α époxy-5 β ,20 dihydroxy-1 β ,10 β méthoxy-7 β oxo-9 taxène-11 yle-13 α , on obtient 230 mg de tert-butoxycarbonyl-3 (méthoxy-4 phényl)-2 phényl-4 oxazolidine-1,3 carboxylate-5-(2R,4S,5R) d'acétoxy-4 α benzoyloxy-2 α époxy-5 β ,20 hydroxy-1 β méthoxy-7 β oxo-9 (pyridyl-2 carbonyl)oxy-10 β taxène-11 yle-13 α sous forme d'une meringue blanche.

EXEMPLE 3

25 En opérant comme dans l'exemple 1, mais à partir de 300 mg de tert-butoxycarbonyl-3 (méthoxy-4 phényl)-2 phényl-4 oxazolidine-1,3 carboxylate-5-(2R,4S,5R) d'acétoxy-4 α benzoyloxy-2 α cyclopentylcarbonyloxy-10 β époxy-5 β ,20 hydroxy-1 β méthoxy-7 β oxo-9 taxène-11 yle-13 α , on obtient 96 mg de tert-butoxycarbonylamino-3 hydroxy-2 phényl-3 propionate-(2R,3S) d'acétoxy-4 α benzoyloxy-2 α cyclopentylcarbonyloxy-10 β époxy-5 β ,20 hydroxy-1 β méthoxy-7 β

oxo-9 taxène-11 yle-13 α sous forme d'une meringue blanche dont les caractéristiques sont les suivantes :

- pouvoir rotatoire : $[\alpha]_{20}^D = -66$ (c = 0,5 ; méthanol).
- spectre de R.M.N. ^1H (400 MHz ; CDCl_3 ; déplacements chimiques δ en ppm ; constantes de couplage J en Hz) : 1,25 (s, 6H : $-\text{CH}_3$ en 16 et en 17) ; 1,39 [s, 9H : $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$] ; de 1,55 à 1,80 et de 1,90 à 2,10 (2 mts, 4H chacun : $-\text{CH}_2-$ du cyclopentyl) ; 1,71 (s, 1H : $-\text{OH}$ en 1) ; 1,75 (s, 3H : $-\text{CH}_3$) ; 1,82 et 2,75 (2 mts, 1H chacun : $-\text{CH}_2-$ en 6) ; 1,93 (s, 3H : $-\text{CH}_3$) ; 2,33 (d, J = 9 Hz, 2H : $-\text{CH}_2-$ en 14) ; 2,39 (s, 3H : $-\text{COCH}_3$) ; 2,95 (mt, 1H : $=\text{CH}-$ du cyclopentyl) ; 3,38 (s, 3H : $-\text{OCH}_3$) ; 3,40 (d, J = 5, 1H : $-\text{OH}$ en 2') ; 3,88 (d, J = 7,5, 1H : $-\text{H}$ en 3) ; 3,91 (dd, J = 11 et 7,5, 1H : $-\text{H}$ en 7) ; 4,19 et 4,32 (2 d, J = 8,5, 1H chacun : $-\text{CH}_2-$ en 20) ; 4,65 (mt, 1H : $-\text{H}$ en 2') ; 4,98 (d large, J = 10, 1H : $-\text{H}$ en 5) ; 5,28 (d large, J = 10, 1H : $-\text{H}$ en 3') ; 5,41 (d, J = 10, 1H : $-\text{CONH}-$) ; 5,68 (d, J = 7,5, 1H : $-\text{H}$ en 2) ; 6,21 (t large, J = 9, 1H : $-\text{H}$ en 13) ; 6,45 (s, 1H : $-\text{H}$ en 10) ; de 7,25 à 7,45 (mt, 5H : $-\text{C}_6\text{H}_5$ en 3') ; 7,51 [t, J = 7,5, 2H : $-\text{OCOC}_6\text{H}_5$ ($-\text{H}$ en 3 et H en 5)] ; 7,63 [t, J = 7,5, 1H : $-\text{OCOC}_6\text{H}_5$ ($-\text{H}$ en 4)] ; 8,12 [d, J = 7,5, 2H : $-\text{OCOC}_6\text{H}_5$ ($-\text{H}$ en 2 et $-\text{H}$ en 6)].

En opérant comme dans l'exemple 1, mais à partir de 300 mg de tert-butoxycarbonyl-3 (méthoxy-4 phényl)-2 phényl-4 oxazolidine-1,3 carboxylate-5-(2R,4S,5R) d'acétoxy-4 α benzoyloxy-2 α époxy-5 β ,20 dihydroxy-1 β ,10 β méthoxy-7 β oxo-9 taxène-11 yle-13 α , on obtient 410 mg de tert-butoxycarbonyl-3 (méthoxy-4 phényl)-2 phényl-4 oxazolidine-1,3 carboxylate-5-(2R,4S,5R) d'acétoxy-4 α benzoyloxy-2 α cyclopentylcarbonyloxy-10 β époxy-5 β ,20 hydroxy-1 β méthoxy-7 β oxo-9 taxène-11 yle-13 α sous forme d'une meringue blanche.

EXEMPLE 4

En opérant comme dans l'exemple 1, mais à partir de 300 mg de tert-butoxycarbonyl-3 (méthoxy-4 phényl)-2 phényl-4 oxazolidine-1,3 carboxylate-5-(2R,4S,5R) d'acétoxy-4 α benzoyloxy-2 α cyclopropylcarbonyloxy-10 β époxy-5 β ,20 hydroxy-1 β méthoxy-7 β oxo-9 taxène-11 yle-13 α , on obtient 130 mg de tert-butoxycarbonylamino-3 hydroxy-2 phényl-3 propionate-(2R,3S) d'acétoxy-4 α

benzoyloxy-2 α cyclopropylcarbonyloxy-10 β époxy-5 β ,20 hydroxy-1 β méthoxy-7 β oxo-9 taxène-11 yle-13 α sous forme d'une meringue blanche dont les caractéristiques sont les suivantes :

- pouvoir rotatoire : $[\alpha]_{D_{20}} = -71$ (c = 0,5 ; méthanol).

- 5 - spectre de R.M.N. ^1H (400 MHz ; CDCl_3 , déplacements chimiques δ en ppm ; constantes de couplage J en Hz) : 1,00 et 1,19 (2 mts, 2H chacun : $-\text{CH}_2-$ du cyclopropyl) ; 1,25 (s, 3H : $-\text{CH}_3$ en 16 ou en 17) ; 1,27 (s, 3H : $-\text{CH}_3$ en 16 ou en 17) ; 1,39 [s, 9H : $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$] ; 1,71 (s, 1H : $-\text{OH}$ en 1) ; 1,75 (s, 3H : $-\text{CH}_3$) ; de 1,70 à 1,90 (mt, 1H : $=\text{CH}-$ du cyclopropyl) ; 1,82 et 2,75 (2 mts, 1H chacun : $-\text{CH}_2-$ en 6) ; 1,93 (s, 3H : $-\text{CH}_3$) ; 2,33 (d, J = 9, 2H : $-\text{CH}_2-$ en 14) ; 2,40 (s, 3H : $-\text{COCH}_3$) ; 3,35 (s, 3H : $-\text{OCH}_3$) ; 3,40 (d, J = 5, 1H : $-\text{OH}$ en 2') ; 3,88 (d, J = 7,5, 1H : $-\text{H}$ en 3) ; 3,89 (dd, J = 11 et 7,5, 1H : $-\text{H}$ en 7) ; 4,19 et 4,32 (2 d, J = 8,5, 1H chacun : $-\text{CH}_2-$ en 20) ; 4,65 (mt, 1H : $-\text{H}$ en 2') ; 5,00 (d large, J = 10, 1H : $-\text{H}$ en 5) ; 5,28 (d large, J = 10, 1H : $-\text{H}$ en 3') ; 5,42 (d, J = 10, 1H : $-\text{CONH}-$) ; 5,68 (d, J = 7,5, 1H : $-\text{H}$ en 2) ; 6,21 (t large, J = 9, 1H : $-\text{H}$ en 13) ; 6,48 (s, 1H : $-\text{H}$ en 10) ; de 7,25 à 7,45 (mt, 5H : $-\text{C}_6\text{H}_5$ en 3') ; 7,52 [t, J = 7,5, 2H : $-\text{OCOC}_6\text{H}_5$ ($-\text{H}$ en 3 et H en 5)] ; 7,64 [t, J = 7,5, 1H : $-\text{OCOC}_6\text{H}_5$ ($-\text{H}$ en 4)] ; 8,12 [d, J = 7,5, 2H : $-\text{OCOC}_6\text{H}_5$ ($-\text{H}$ en 2 et $-\text{H}$ en 6)].

En opérant comme dans l'exemple 1, mais à partir de 300 mg de tert-butoxycarbonyl-3 (méthoxy-4 phényl)-2 phényl-4 oxazolidine-1,3 carboxylate-5-
20 (2R,4S,5R) d'acétoxy-4 α benzoyloxy-2 α époxy-5 β ,20 dihydroxy-1 β ,10 β méthoxy-7 β oxo-9 taxène-11 yle-13a, on obtient 435 mg de tert-butoxycarbonyl-3 (méthoxy-4 phényl)-2 phényl-4 oxazolidine-1,3 carboxylate-5-(2R,4S,5R) d'acétoxy-4 α benzoyloxy-2 α cyclopropylcarbonyloxy-10 β époxy-5 β ,20 hydroxy-1 β méthoxy-7 β
25 oxo-9 taxène-11 yle-13 α sous forme d'une meringue blanche.

EXEMPLE 5

En opérant comme dans l'exemple 1, mais à partir de 430 mg de tert-butoxycarbonyl-3 (méthoxy-4 phényl)-2 phényl-4 oxazolidine-1,3 carboxylate-5-(2R,4S,5R) d'acétoxy-4 α benzoyloxy-2 α époxy-5 β ,20 hydroxy-1 β méthoxy-7 β

méthoxyacétoxy-10 β oxo-9 taxène-11 yle-13 α , on obtient 164 mg de de tert-butoxycarbonylamino-3 hydroxy-2 phényl-3 propionate-(2R,3S) d'acétoxy-4 α benzoyloxy-2 α époxy-5 β ,20 hydroxy-1 β méthoxy-7 β méthoxyacétoxy-10 β oxo-9 taxène-11 yle-13 α sous forme d'une meringue blanche dont les caractéristiques sont

5 les suivantes :

- pouvoir rotatoire : $[\alpha]_{D_{20}} = -48$ (c = 0,5 ; méthanol)
- spectre de R.M.N. ^1H (300 MHz ; CDCl_3 ; δ en ppm ; constantes de couplage J en Hz) : 1,17 (s, 3H : $-\text{CH}_3$) ; 1,22 (s, 3H : $-\text{CH}_3$) ; 1,35 (s, 9H : $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$) ; 1,75 (s, 3H : $-\text{CH}_3$) ; 1,80 et 2,75 (2 mts, 1H chacun : $-\text{CH}_2-$ 6) ; 1,90 (s, 3H : $-\text{CH}_3$) ; 2,30
- 10 (d, J = 9, 2H : $-\text{CH}_2-$ 14) ; 2,37 (s, 3H : $-\text{COCH}_3$) ; 3,35 et 3,55 (2 s, 3H chacun : $-\text{OCH}_3$) ; 3,40 (d, J = 5, 1H : $-\text{OH}$ 2') ; 3,85 (d, J = 7, 1H : $-\text{H}$ 3) ; 3,88 (dd, J = 11 et 7, 1H : $-\text{H}$ 7) ; 4,17 et 4,32 (2 d, J = 8,5, 1H chacun : $-\text{CH}_2-$ 20) ; 4,19 et 4,27 (2 d, J = 15, 1H chacun : $-\text{OCOCH}_2\text{OCH}_3$) ; 4,65 (mt, 1H : $-\text{H}$ 2') ; 4,97 (d large, J = 10, 1H : $-\text{H}$ 5) ; 5,25 (d large, J = 10, 1H : $-\text{H}$ 3')
- 15 (d, J = 7, 1H : $-\text{H}$ 2) ; 6,18 (t large, J = 9, 1H : $-\text{H}$ 13) ; 6,52 (s, 1H : $-\text{H}$ 10) ; de 7,30 à 7,50 (mt, 5H : $-\text{C}_6\text{H}_5$ 3') ; 7,51 [(t, J = 7,5, 2H : $-\text{OCOC}_6\text{H}_5$ ($-\text{H}$ 3 et H 5))] ; 7,63 [(t, J = 7,5, 1H : $-\text{OCOC}_6\text{H}_5$ ($-\text{H}$ 4))] ; 8,12 (d, J = 7,5, 2H : $-\text{OCOC}_6\text{H}_5$ ($-\text{H}$ 2 et H 6)).

Les nouveaux produits de formule générale (I) dans laquelle Z représente un

20 radical de formule générale (II) manifestent une activité inhibitrice significative de la prolifération cellulaire anormale et possèdent des propriétés thérapeutiques permettant le traitement de malades ayant des conditions pathologiques associées à une prolifération cellulaire anormale. Les conditions pathologiques incluent la prolifération cellulaire anormale de cellules malignes ou non malignes de divers tissus et/ou

25 organes, comprenant, de manière non limitative, les tissus musculaires, osseux ou conjonctifs, la peau, le cerveau, les poumons, les organes sexuels, les systèmes lymphatiques ou rénaux, les cellules mammaires ou sanguines, le foie, l'appareil digestif, le pancréas et les glandes thyroïdes ou adrénales. Ces conditions pathologiques peuvent inclure également le psoriasis, les tumeurs solides, les cancers

30 de l'ovaire, du sein, du cerveau, de la prostate, du colon, de l'estomac, du rein ou des

testicules, le sarcome de Kaposi, le cholangiocarcinome, le choriocarcinome, le neuroblastome, la tumeur de Wilms, la maladie de Hodgkin, les mélanomes, les myélomes multiples, les leucémies lymphocytaires chroniques, les lymphomes granulocytaires aigus ou chroniques. Les nouveaux produits selon l'invention sont particulièrement utiles pour le traitement du cancer de l'ovaire. Les produits selon l'invention peuvent être utilisés pour prévenir ou retarder l'apparition ou la réapparition des conditions pathologiques ou pour traiter ces conditions pathologiques.

Les produits selon l'invention peuvent être administrés à un malade selon différentes formes adaptées à la voie d'administration choisie qui, de préférence, est la voie parentérale. L'administration par voie parentérale comprend les administrations intraveineuse, intrapéritonéale, intramusculaire ou sous-cutanée. Plus particulièrement préférée est l'administration intrapéritonéale ou intraveineuse.

La présente invention comprend également les compositions pharmaceutiques qui contiennent au moins un produit de formule générale (I) en une quantité suffisante adaptée à l'emploi en thérapeutique humaine ou vétérinaire. Les compositions peuvent être préparées selon les méthodes habituelles en utilisant un ou plusieurs adjuvants, supports ou excipients pharmaceutiquement acceptables. Les supports convenables incluent les diluants, les milieux aqueux stériles et divers solvants non toxiques. De préférence les compositions se présentent sous forme de solutions ou de suspensions aqueuses, de solutions injectables qui peuvent contenir des agents émulsifiants, des colorants, des préservatifs ou des stabilisants. Cependant, les compositions peuvent aussi se présenter sous forme de comprimés, de pilules, de poudres ou de granulés administrables par voie orale.

Le choix des adjuvants ou excipients peut être déterminé par la solubilité et les propriétés chimiques du produit, le mode particulier d'administration et les bonnes pratiques pharmaceutiques.

Pour l'administration parentérale, on utilise des solutions ou des suspensions stériles aqueuses ou non aqueuses. Pour la préparation de solutions ou de suspensions non aqueuses peuvent être utilisés des huiles végétales naturelles telle que l'huile d'olive, l'huile de sésame ou l'huile de paraffine ou les esters organiques injectables tel

que l'oléate d'éthyle. Les solutions stériles aqueuses peuvent être constituées d'une solution d'un sel pharmaceutiquement acceptable en solution dans de l'eau. Les solutions aqueuses conviennent pour l'administration intraveineuse dans la mesure où le pH est convenablement ajusté et où l'isotonicité est réalisée, par exemple, par une
5 quantité suffisante de chlorure de sodium ou de glucose. La stérilisation peut être réalisée par chauffage ou par tout autre moyen qui n'altère pas la composition.

Il est bien entendu que tous les produits entrant dans les compositions selon l'invention doivent être purs et non toxiques pour les quantités utilisées.

Les compositions peuvent contenir au moins 0,01 % de produit thérapeuti-
10 quement actif. La quantité de produit actif dans une composition est telle qu'une posologie convenable puisse être prescrite. De préférence, les compositions sont préparées de telle façon qu'une dose unitaire contienne de 0,01 à 1000 mg environ de produit actif pour l'administration par voie parentérale.

Le traitement thérapeutique peut être effectué concurremment avec d'autres
15 traitements thérapeutiques incluant des médicaments antinéoplastiques, des anticorps monoclonaux, des thérapies immunologiques ou des radiothérapies ou des modificateurs des réponses biologiques. Les modificateurs des réponses incluent, de manière non limitative, les lymphokines et les cytokines telles que les interleukines, les interférons (α , β ou δ) et le TNF. D'autres agents chimiothérapeutiques utiles dans le
20 traitement des désordres dus à la prolifération anormale des cellules incluent, de manière non limitative, les agents alkylants tels que les moutardes à l'azote comme la mechlorethamine, le cyclophosphamide, le melphalan et le chlorambucil, des sulfonates d'alkyle comme le busulfan, les nitrosourées comme la carmustine, la lomustine, la sémustine et la streptozocine, les triazènes comme la dacarbazine, les antimétabolites
25 comme les analogues de l'acide folique tel que le méthotrexate, les analogues de pyrimidine comme le fluorouracil et la cytarabine, des analogues de purines comme la mercaptopurine et la thioguanine, des produits naturels tels que les alcaloïdes de vinca comme la vinblastine, la vincristine et la vendésine, des épipodophyllotoxines comme l'étoposide et le teniposide, des antibiotiques comme la dactinomycine, la
30 daunorubicine, la doxorubicine, la bléomycine, la plicamycine et la mitomycine, des enzymes comme la L-asparaginase, des agents divers comme les complexes de

coordination du platine tel que le cisplatine, les urées substituées telles que l'hydroxyurée, les dérivés de méthylhydrazine comme la procarbazine, les supprimeurs adrénocorticoïques comme le mitotane et l'aminoglutéthymide, les hormones et les antagonistes comme les adrénocorticostéroïdes comme la prednisone, les progestines comme le caproate d'hydroxyprogestérone, l'acétate de méthoxyprogestérone et l'acétate de megestrol, les oestrogènes comme le diéthylstilbestrol et l'éthynylestradiol, les antioestrogènes comme le tamoxifène, les androgènes comme le propionate de testostérone et la fluoxymesterone.

Les doses utilisées pour mettre en œuvre les méthodes selon l'invention sont celles qui permettent un traitement prophylactique ou un maximum de réponse thérapeutique. Les doses varient selon la forme d'administration, le produit particulier sélectionné et les caractéristiques propres du sujet à traiter. En général, les doses sont celles qui sont thérapeutiquement efficaces pour le traitement des désordres dus à une prolifération cellulaire anormale. Les produits selon l'invention peuvent être administrés aussi souvent que nécessaire pour obtenir l'effet thérapeutique désiré. Certains malades peuvent répondre rapidement à des doses relativement fortes ou faibles puis avoir besoin de doses d'entretien faibles ou nulles. Généralement, de faibles doses seront utilisées au début du traitement et, si nécessaire, des doses de plus en plus fortes seront administrées jusqu'à l'obtention d'un effet optimum. Pour d'autres malades il peut être nécessaire d'administrer des doses d'entretien 1 à 8 fois par jour, de préférence 1 à 4 fois, selon les besoins physiologiques du malade considéré. Il est aussi possible que pour certains malades il soit nécessaire de n'utiliser qu'une à deux administrations journalières.

Chez l'homme, les doses sont généralement comprises entre 0,01 et 200 mg/kg. Par voie intrapéritonéale, les doses seront en général comprises entre 0,1 et 100 mg/kg et, de préférence entre 0,5 et 50 mg/kg et, encore plus spécifiquement entre 1 et 10 mg/kg. Par voie intraveineuse, les doses sont généralement comprises entre 0,1 et 50 mg/kg et, de préférence entre 0,1 et 5 mg/kg et, encore plus spécifiquement entre 1 et 2 mg/kg. Il est entendu que, pour choisir le dosage le plus approprié, devront être pris en compte la voie d'administration, le poids du malade,

son état de santé général, son âge et tous les facteurs qui peuvent influencer sur l'efficacité du traitement.

L'exemple suivant illustre une composition selon l'invention.

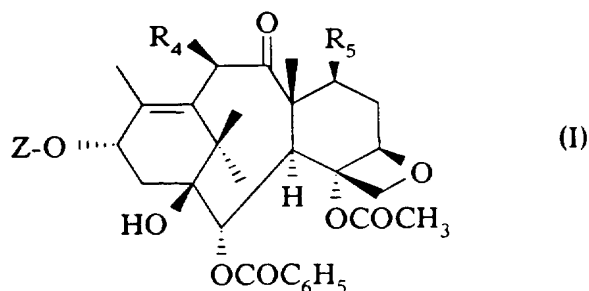
EXEMPLE

- 5 On dissout 40 mg du produit obtenu à l'exemple 1 dans 1 cm³ d'Emulphor EL 620 et 1 cm³ d'éthanol puis la solution est diluée par addition de 18 cm³ de sérum physiologique.

La composition est administrée par perfusion pendant 1 heure par introduction dans du soluté physiologique.

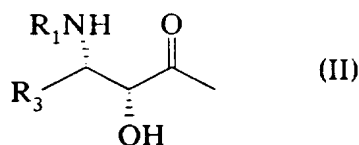
REVENDICATIONS

1 - Nouveaux taxoïdes de formule générale :



dans laquelle

5 Z représente un atome d'hydrogène ou un radical de formule générale :



dans laquelle :

R₁ représente un radical benzoyle éventuellement substitué par un ou plusieurs atomes ou radicaux, identiques ou différents, choisis parmi les atomes d'halogène et les radicaux alcoyles contenant 1 à 4 atomes de carbone, alcoxy contenant 1 à 4 atomes de carbone ou trifluorométhyle, thényle ou furoyle ou un radical R₂-O-CO- dans lequel R₂ représente :

10 - un radical alcoyle contenant 1 à 8 atomes de carbone, alcényle contenant 2 à 8 atomes de carbone, alcynyle contenant 3 à 8 atomes de carbone, cycloalcoyle contenant 3 à 6 atomes de carbone, cycloalcényle contenant 4 à 6 atomes de carbone, bicycloalcoyle contenant 7 à 10 atomes de carbone, ces radicaux étant éventuellement substitués par un ou plusieurs substituants choisis parmi les atomes d'halogène et les radicaux hydroxy, alcoxy contenant 1 à 4 atomes de carbone, dialcoylamino dont chaque partie alcoyle contient 1 à 4 atomes de carbone, pipéridino, morpholino,

15 pipérazinyl-1 (éventuellement substitué en -4 par un radical alcoyle contenant 1 à 4 atomes de carbone ou par un radical phénylalcoyle dont la partie alcoyle contient 1 à 4 atomes de carbone), cycloalcoyle contenant 3 à 6 atomes de carbone, cycloalcényle contenant 4 à 6 atomes de carbone, phényle (éventuellement substitué par un ou

20

plusieurs atomes ou radicaux choisis parmi les atomes d'halogène et les radicaux alcoyles contenant 1 à 4 atomes de carbone ou alcoxy contenant 1 à 4 atomes de carbone), cyano, carboxy ou alcoxycarbonyle dont la partie alcoyle contient 1 à 4 atomes de carbone,

- 5 - un radical phényle ou α - ou β -naphtyle éventuellement substitué par un ou plusieurs atomes ou radicaux choisis parmi les atomes d'halogène et les radicaux alcoyles contenant 1 à 4 atomes de carbone ou alcoxy contenant 1 à 4 atomes de carbone ou un radical hétérocyclique aromatique à 5 chaînons choisi de préférence parmi les radicaux furyle et thiényle,
- 10 - ou un radical hétérocyclyle saturé contenant 4 à 6 atomes de carbone éventuellement substitué par un ou plusieurs radicaux alcoyles contenant 1 à 4 atomes de carbone,

R_3 représente un radical alcoyle droit ou ramifié contenant 1 à 8 atomes de carbone, alcényle droit ou ramifié contenant 2 à 8 atomes de carbone, alcynyle droit ou ramifié contenant 2 à 8 atomes de carbone, cycloalcoyle contenant 3 à 6 atomes de

15 carbone, phényle ou α - ou β -naphtyle éventuellement substitué par un ou plusieurs atomes ou radicaux choisis parmi les atomes d'halogène et les radicaux alcoyles, alcényles, alcynyles, aryles, aralcoyles, alcoxy, alcoylthio, aryloxy, arylthio, hydroxy, hydroxyalcoyle, mercapto, formyle, acyle, acylamino, aroylamino, alcoxycarbonyl-amino, amino, alcoylamino, dialcoylamino, carboxy, alcoxycarbonyle, carbamoyle,

20 alcoylcarbamoyle, dialcoylcarbamoyle, cyano, nitro et trifluorométhyle, ou un hétérocycle aromatique ayant 5 chaînons et contenant un ou plusieurs hétéroatomes, identiques ou différents, choisis parmi les atomes d'azote, d'oxygène ou de soufre et éventuellement substitué par un ou plusieurs substituants, identiques ou différents, choisis parmi les atomes d'halogène et les radicaux alcoyles, aryles, amino,

25 alcoylamino, dialcoylamino, alcoxycarbonylamino, acyle, arylcarbonyle, cyano, carboxy, carbamoyle, alcoylcarbamoyle, dialcoylcarbamoyle ou alcoxycarbonyle, étant entendu que, dans les substituants des radicaux phényle, α - ou β -naphtyle et hétérocyclyles aromatiques, les radicaux alcoyles et les portions alcoyles des autres radicaux contiennent 1 à 4 atomes de carbone et que les radicaux alcényles et alcynyles

contiennent 2 à 8 atomes de carbone et que les radicaux aryles sont des radicaux phényles ou α - ou β -naphtyles,

R_4 représente un radical alcanoyloxy dont la partie alcanoyloxy contient 2 à 6 atomes de carbone en chaîne droite ou ramifiée, à l'exception du radical acétoxy, alcényloxy dont la partie alcényloxy contient 3 à 6 atomes de carbone en chaîne droite ou ramifiée, alcynoyloxy dont la partie alcynoyloxy contient 3 à 6 atomes de carbone en chaîne droite ou ramifiée, ces radicaux étant éventuellement substitués par un ou plusieurs atomes d'halogène ou par un radical alcoxy contenant 1 à 4 atomes de carbone, alcoylthio contenant 1 à 4 atomes de carbone, ou par un radical carboxy, alcoxycarbonyloxy dont la partie alcoyle contient 1 à 4 atomes de carbone, cyano, carbamoyloxy, N-alcoxycarbamoyloxy ou N,N-dialcoxycarbamoyloxy dont chaque partie alcoyle contient 1 à 4 atomes de carbone ou forme avec l'atome d'azote auquel elle est liée un radical hétérocyclique saturé contenant 5 ou 6 chaînons et éventuellement un second hétéroatome choisi parmi les atomes d'oxygène, de soufre ou d'azote éventuellement substitué par un radical alcoyle contenant 1 à 4 atomes de carbone ou un radical phényle ou un radical phénylcoyle dont la partie alcoyle contient 1 à 4 atomes de carbone, ou bien R_4 représente un radical cycloalcanoyloxy dont la partie cycloalcanoyloxy contient 4 à 8 atomes de carbone ou un radical cycloalcényloxy dont la partie cycloalcényloxy contient 4 à 8 atomes de carbone, ou bien R_4 représente un radical benzoyloxy ou hétérocyclalcoxycarbonyloxy dans lequel la partie hétérocyclique représente un hétérocycle aromatique à 5 ou 6 chaînons contenant un ou plusieurs hétéroatomes choisis parmi les atomes d'oxygène, de soufre ou d'azote,

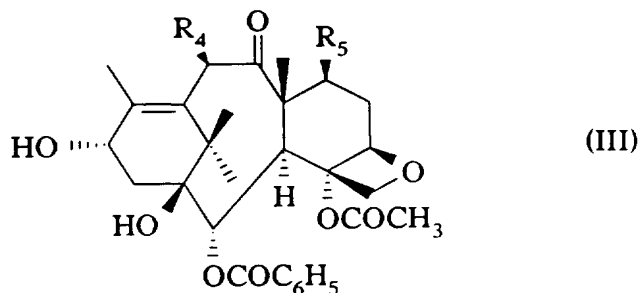
R_5 représente un radical alcoxy contenant 1 à 6 atomes de carbone en chaîne droite ou ramifiée éventuellement substitué par un radical alcoxy contenant 1 à 4 atomes de carbone, alcényloxy contenant 3 à 6 atomes de carbone, alcynoyloxy contenant 3 à 6 atomes de carbone, cycloalcoxycarbonyloxy contenant 3 à 6 atomes de carbone, cycloalcényloxy contenant 3 à 6 atomes de carbone, ces radicaux étant éventuellement substitués par un ou plusieurs atomes d'halogène ou par un radical alcoxy contenant 1 à 4 atomes de carbone, alcoylthio contenant 1 à 4 atomes de carbone, ou un radical carboxy, alcoxycarbonyloxy dont la partie alcoyle contient 1 à 4 atomes de carbone, cyano, carbamoyloxy, N-alcoxycarbamoyloxy ou N,N-dialcoxycarbamoyloxy dont chaque

partie alcoyle contient 1 à 4 atomes de carbone ou forme avec l'atome d'azote auquel elle est liée un radical hétérocyclique saturé contenant 5 ou 6 chaînons et éventuellement un second hétéroatome choisi parmi les atomes d'oxygène, de soufre ou d'azote éventuellement substitué par un radical alcoyle contenant 1 à 4 atomes de carbone ou un radical phényle ou un radical phénylcoyle dont la partie alcoyle
5 contient 1 à 4 atomes de carbone.

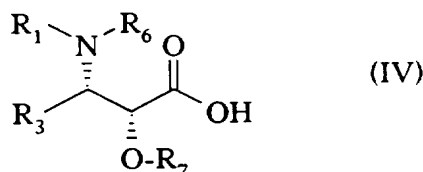
2 - Nouveaux taxoïdes selon la revendication 1 pour lesquels Z représente un atome d'hydrogène ou un radical de formule générale (II) dans laquelle R₁ représente un radical benzoyle ou un radical R₂-O-CO- dans lequel R₂ représente un radical tert-butyle et R₃ représente un radical alcoyle contenant 1 à 6 atomes de carbone, alcényle
10 contenant 2 à 6 atomes de carbone, cycloalcoyle contenant 3 à 6 atomes de carbone, phényle éventuellement substitué par un ou plusieurs atomes ou radicaux, identiques ou différents choisis parmi les atomes d'halogène et les radicaux alcoyles, alcoxy, dialcoylamino, acylamino, alcoxycarbonylamino ou trifluorométhyle ou un radical
15 furyle-2 ou -3, thiényle-2 ou -3 ou thiazolyle-2, -4 ou -5 et R₄ représente un radical alcoyloxyacétoxy dont la partie alcoyle contient 1 à 4 atomes de carbone, cycloalcanoyloxy dont la partie cycloalcanoyle contient 4 à 8 atomes de carbone, pyridylcarbonyloxy et R₅ représente un radical alcoyloxy droit ou ramifié contenant 1 à 6 atomes de carbone.

20 3 - Nouveaux taxoïdes selon la revendication 1 pour lesquels Z représente un atome d'hydrogène ou un radical de formule générale (II) dans laquelle R₁ représente un radical benzoyle ou un radical R₂-O-CO- dans lequel R₂ représente un radical tert-butyle et R₃ représente un radical isobutyle, isobutényle, butényle, cyclohexyle, phényle, furyle-2, furyle-3, thiényle-2, thiényle-3, thiazolyle-2, thiazolyle-4 ou
25 thiazolyle-5, R₄ représente un radical méthoxyacétoxy, cyclopropylcarbonyloxy, cyclopentylcarbonyloxy, pyridyl-2 carbonyloxy ou pyridyl-3 carbonyloxy et R₅ représente un radical méthoxy.

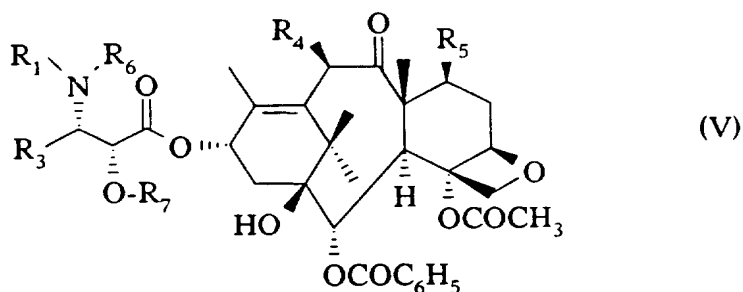
4 - Procédé de préparation des taxoïdes selon l'une des revendications 1, 2 ou 3 pour lequel Z représente un radical de formule générale (II) caractérisé en ce que l'on estérifie un produit de formule générale :



5 dans laquelle R_4 et R_5 sont définis comme dans l'une des revendications 1, 2 ou 3, au moyen d'un acide de formule générale :



dans laquelle R_1 et R_3 sont définis comme précédemment, ou bien R_6 représente un atome d'hydrogène et R_7 représente un groupement protecteur de la fonction hydroxy, et ou bien R_6 et R_7 forment ensemble un hétérocycle saturé à 5 ou 6 chaînons, ou d'un dérivé de cet acide pour obtenir un ester de formule générale :



dans laquelle R_1 , R_3 , R_4 , R_5 , R_6 et R_7 sont définis comme précédemment, dont on remplace les groupements protecteurs représentés par R_7 et/ou R_6 et R_7 par des atomes d'hydrogène.

5 - Procédé selon la revendication 4 caractérisé en ce que l'estérification est effectuée au moyen d'un acide de formule générale (IV) en présence d'un agent de

condensation et d'un agent d'activation dans un solvant organique à une température comprise entre -10 et 90°C.

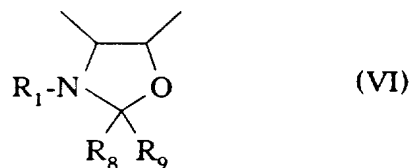
6 - Procédé selon la revendication 4 caractérisé en ce que l'estérification est effectuée au moyen d'un acide de formule générale (IV) sous forme d'anhydride symétrique en opérant en présence d'un agent d'activation dans un solvant organique à une température comprise entre 0 et 90°C.

7 - Procédé selon la revendication 4 caractérisé en ce que l'estérification est effectuée en utilisant l'acide de formule générale (IV) sous forme d'halogénure ou sous forme d'anhydride mixte avec un acide aliphatique ou aromatique, éventuellement préparé in situ, en présence d'une base en opérant dans un solvant organique à une température comprise entre 0 et 80°C.

8 - Procédé selon la revendication 4 caractérisé en ce que l'on remplace les groupements protecteurs R₆ et/ou R₆ et R₇ par des atomes d'hydrogène en opérant, selon leur nature de la manière suivante :

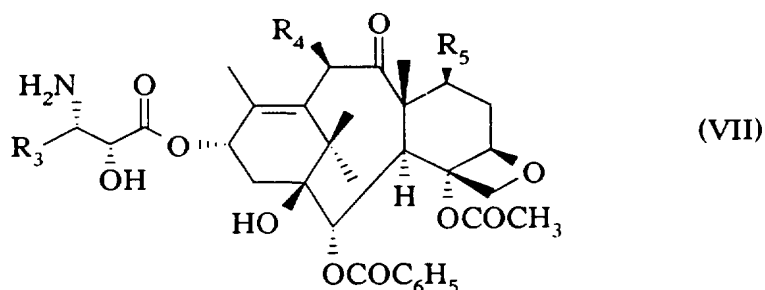
1) lorsque R₆ représente un atome d'hydrogène et R₇ représente un groupement protecteur de la fonction hydroxy, on remplace les groupements protecteurs par des atomes d'hydrogène au moyen d'un acide minéral ou organique utilisé seul ou en mélange en opérant dans un solvant organique choisi parmi les alcools, les éthers, les esters, les hydrocarbures aliphatiques, les hydrocarbures aliphatiques halogénés, les hydrocarbures aromatiques ou les nitriles à une température comprise entre -10 et 60°C,

2) lorsque R₆ et R₇ forment ensemble un hétérocycle saturé à 5 ou 6 chaînons de formule générale :

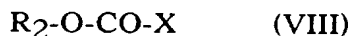


dans laquelle R_1 est défini comme précédemment, R_8 et R_9 , identiques ou différents, représentent un atome d'hydrogène ou un radical alcoyle contenant 1 à 4 atomes de carbone, ou un radical aralcoyle dont la partie alcoyle contient 1 à 4 atomes de carbone et la partie aryle représente, de préférence, un radical phényle éventuellement substitué par un ou plusieurs radicaux alcoxy contenant 1 à 4 atomes de carbone, ou un radical aryle représentant, de préférence un radical phényle éventuellement substitué par un ou plusieurs radicaux alcoxy contenant 1 à 4 atomes de carbone, ou bien R_8 représente un radical alcoxy contenant 1 à 4 atomes de carbone ou un radical trihalométhyle tel que trichlorométhyle ou un radical phényle substitué par un radical trihalométhyle tel que trichlorométhyle et R_9 représente un atome d'hydrogène, ou bien R_8 et R_9 forment ensemble avec l'atome de carbone auquel ils sont liés un cycle ayant 4 à 7 chaînons, on remplace le groupement protecteur formé par R_6 et R_7 par des atomes d'hydrogène en opérant, selon les significations de R_1 , R_8 et R_9 , de la manière suivante :

a) lorsque R_1 représente un radical tert-butoxycarbonyle, R_8 et R_9 , identiques ou différents, représentent un radical alcoyle ou un radical aralcoyle ou aryle, ou bien R_8 représente un radical trihalométhyle ou un radical phényle substitué par un radical trihalométhyle, et R_9 représente un atome d'hydrogène, ou bien R_8 et R_9 forment ensemble un cycle ayant de 4 à 7 chaînons, on traite l'ester de formule générale (V) par un acide minéral ou organique éventuellement dans un solvant organique tel qu'un alcool pour obtenir le produit de formule générale :



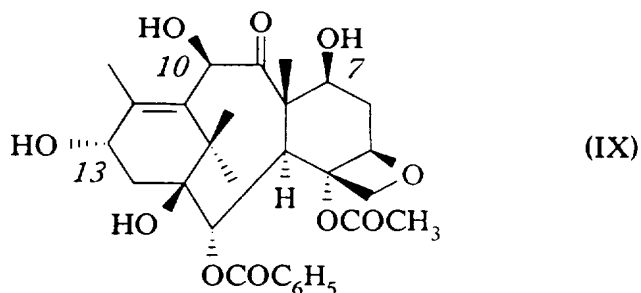
dans laquelle R_3 , R_4 et R_5 sont définis comme précédemment, que l'on acyle au moyen de chlorure de benzoyle dans lequel le noyau phényle est éventuellement substitué, de chlorure de thénoyle, de chlorure de furoyle ou d'un produit de formule générale :



dans laquelle R_2 est défini comme précédemment et X représente un atome d'halogène ou un reste $-O-R_2$ ou $-O-CO-O-R_2$, pour obtenir un produit de formule générale (I) dans laquelle Z représente un radical de formule générale (II),

- 5 b) lorsque R_1 représente un radical benzoyle éventuellement substitué, thénoyle ou furoyle ou un radical R_2O-CO- dans lequel R_2 est défini comme précédemment, R_8 représente un atome d'hydrogène ou un radical alcoxy contenant 1 à 4 atomes de carbone ou un radical phényle substitué par un ou plusieurs radicaux alcoxy contenant 1 à 4 atomes de carbone et R_9 représente un atome d'hydrogène, on
- 10 remplace le groupement protecteur formé par R_6 et R_7 par des atomes d'hydrogène en présence d'un acide minéral ou organique utilisé seul ou en mélange en quantité stoechiométrique ou catalytique, en opérant dans un solvant organique choisi parmi les alcools, les éthers, les esters, les hydrocarbures aliphatiques, les hydrocarbures aliphatiques halogénés et les hydrocarbures aromatiques à une température comprise
- 15 entre -10 et 60°C .

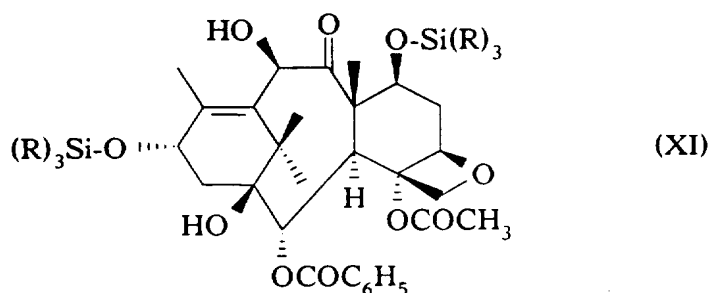
- 9 - Procédé de préparation d'un nouveau taxoïde selon l'une des revendications 1, 2 ou 3 pour lequel Z représente un atome d'hydrogène, R_4 est défini comme dans l'une des revendications 1, 2 ou 3 et R_5 est défini comme dans l'une des revendications 1, 2 ou 3 caractérisé en ce que l'on traite la 10-désacétyl-
- 20 baccatine III de formule :



par un halogénure de silyle de formule générale :



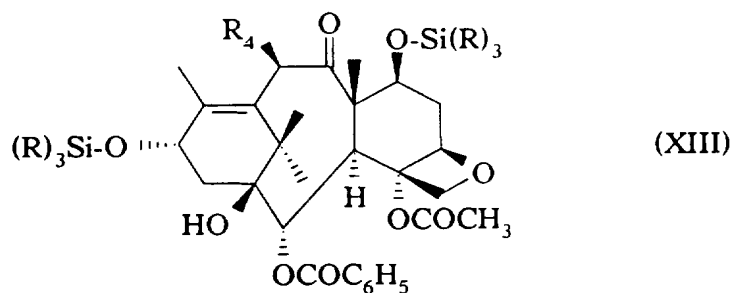
dans laquelle les symboles R, identiques ou différents, représentent un radical alcoyle contenant 1 à 4 atomes de carbone éventuellement substitué par un radical phényle, un radical cycloalcoyle contenant 3 à 6 atomes de carbone ou un radical phényle pour obtenir un produit de formule générale :



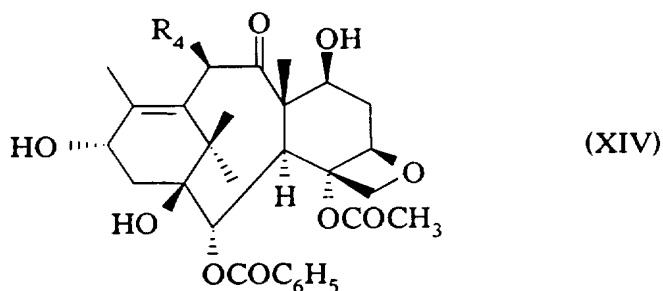
5 dans laquelle R est défini comme précédemment, que l'on traite par un produit de formule générale :



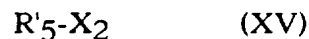
10 dans laquelle R'_4 est tel que R'_4-O- est identique à R_4 défini comme dans l'une des revendications 1, 2 ou 3 et X_1 représente un atome d'halogène pour obtenir un produit de formule générale :



15 dans laquelle R et R_4 sont définis comme précédemment, dont on remplace les groupements protecteurs silylés par des atomes d'hydrogène pour obtenir un produit de formule générale :

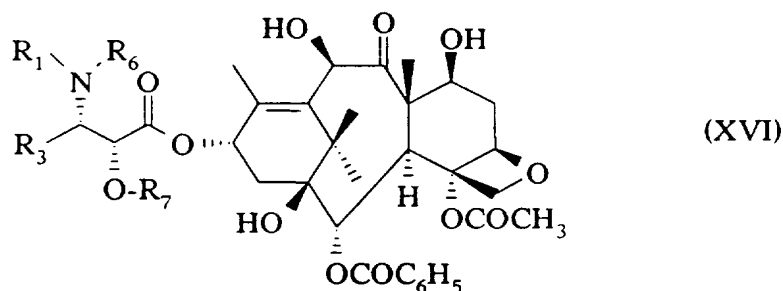


dans laquelle R_4 est défini comme précédemment, qui est étherifié sélectivement en position 7 par action d'un produit de formule générale :

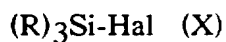


dans laquelle R'_5 est tel que R'_5-O- est identique à R_5 défini comme dans l'une des revendications 1, 2 ou 3 et X_2 représente un reste d'ester réactif ou un atome d'halogène pour donner le produit de formule générale (I) dans laquelle Z représente un atome d'hydrogène.

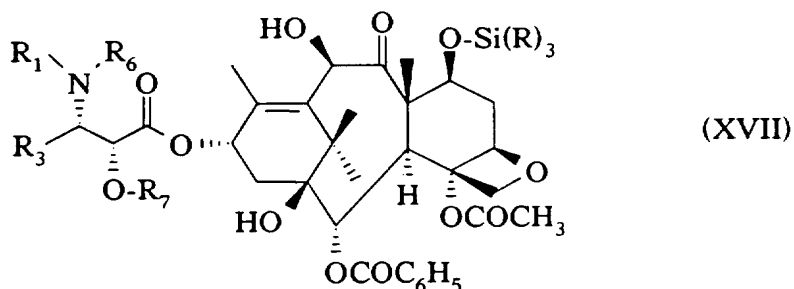
10 - Procédé de préparation d'un produit selon l'une des revendications 1, 2 ou 3 pour lequel Z représente un radical de formule générale (II), R_4 est défini comme dans l'une des revendications 1, 2 ou 3 et R_5 est défini comme dans l'une des revendications 1, 2 ou 3 caractérisé en ce que l'on traite un produit de formule générale :



dans laquelle R_1 , R_3 , R_6 et R_7 sont définis comme dans l'une des revendications 1, 2, 3 ou 4 au moyen d'un produit de formule générale :



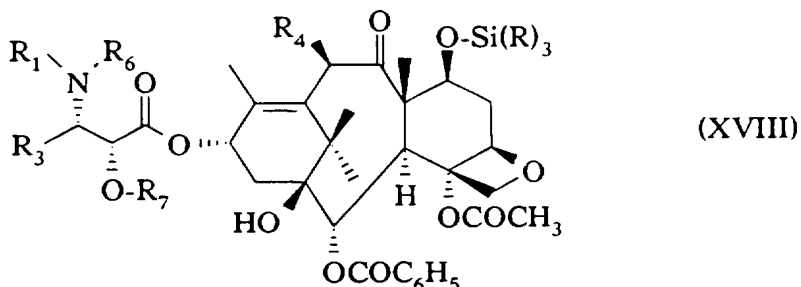
dans laquelle les symboles R , identiques ou différents, représentent un radical alcoyle contenant 1 à 4 atomes de carbone éventuellement substitué par un radical phényle, ou un radical cycloalcoyle contenant 3 à 6 atomes de carbone, ou un radical phényle pour obtenir un produit de formule générale :



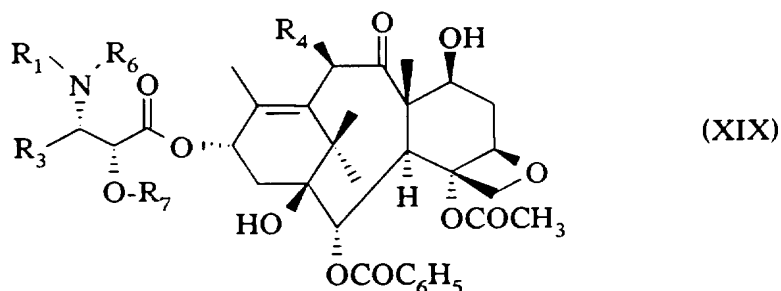
dans laquelle R, R₁, R₃, R₆ et R₇ sont définis comme précédemment, qui est fonctionnalisé en position 10 au moyen d'un produit de formule générale :



5 dans laquelle R₄ est tel que R'₄-O- est identique à R₄ défini comme dans l'une des revendications 1, 2 ou 3 et X₁ représente un atome d'halogène ou un reste d'ester réactif pour donner un produit de formule générale :

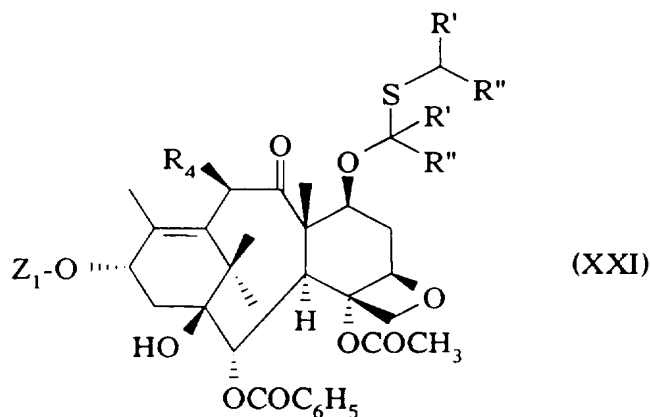


10 dans laquelle R, R₁, R₃, R₄, R₆ et R₇ sont définis comme précédemment dont le groupement protecteur silylé est remplacé par un atome d'hydrogène pour donner un produit de formule générale :



15 qui, par action d'un produit de formule générale (XV) conduit au produit de formule générale (V) dont les groupements protecteurs sont remplacés par des atomes d'hydrogène pour donner un produit de formule générale (I) dans laquelle Z représente un radical de formule générale (II).

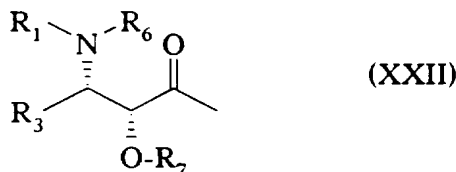
11 - Procédé de préparation d'un produit selon l'une des revendications 1, 2 ou 3, caractérisé en ce que l'on fait réagir du nickel Raney activé en présence d'un alcool aliphatique contenant 1 à 3 atomes de carbone ou d'un éther sur un produit de formule générale :



5

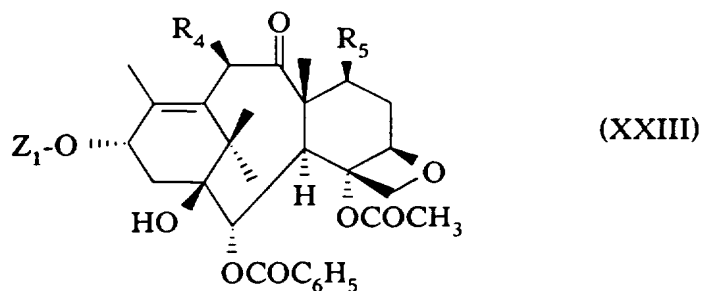
dans laquelle R_4 est défini comme dans l'une des revendications 1, 2 ou 3, R' et R'' , identiques ou différents, représentent un atome d'hydrogène ou un radical alcoyle contenant 1 à 6 atomes de carbone, alcényle contenant 2 à 6 atomes de carbone, alcynyle contenant 3 à 6 atomes de carbone, cycloalcoyle contenant 2 à 6 atomes de carbone ou cycloalcényle contenant 3 à 6 atomes de carbone éventuellement substitué, ou bien R' et R'' forment ensemble avec l'atome de carbone auquel ils sont liés un radical cycloalcoyle contenant 3 à 6 atomes de carbone ou un radical cycloalcényle contenant 4 à 6 atomes de carbone, et Z_1 représente un atome d'hydrogène ou un radical de formule générale :

10



15

dans laquelle R_1 et R_3 sont définis comme dans l'une des revendications 1 à 3 et R_6 et R_7 sont définis comme dans la revendication 4, pour obtenir un produit de formule générale :



suivi, lorsque Z_1 représente un radical de formule générale (XXII), du remplacement des groupements protecteurs représentés par R_6 et/ou R_6 et R_7 par des atomes d'hydrogène dans les conditions de la revendication 8.

5 12 - Procédé de préparation selon la revendication 11 caractérisé en ce que l'on opère à une température comprise entre -10 et 60°C .

13 - Le tert-butoxycarbonylamino-3 hydroxy-2 phényl-3 propionate-(2R,3S) d'acétoxy-4 α benzoyloxy-2 α époxy-5 β ,20 hydroxy-1 β méthoxy-7 β méthoxyacétoxy-10 β oxo-9 taxène-11 yle-13 α .

10 14 - Le tert-butoxycarbonylamino-3 hydroxy-2 phényl-3 propionate-(2R,3S) d'acétoxy-4 α benzoyloxy-2 α hydroxy-1 β époxy-5 β ,20 méthoxy-7 β cyclopropylcarbonyloxy-10 β oxo-9 taxène-11 yle-13 α .

15 15 - Le tert-butoxycarbonylamino-3 hydroxy-2 phényl-3 propionate-(2R,3S) d'acétoxy-4 α benzoyloxy-2 α hydroxy-1 β époxy-5 β ,20 méthoxy-7 β cyclopentylcarbonyloxy-10 β oxo-9 taxène-11 yle-13 α .

16 - Le tert-butoxycarbonylamino-3 hydroxy-2 phényl-3 propionate-(2R,3S) d'acétoxy-4 α benzoyloxy-2 α hydroxy-1 β époxy-5 β ,20 méthoxy-7 β (pyridyl-2)carbonyloxy-10 β oxo-9 taxène-11 yle-13 α .

20 17 - Le tert-butoxycarbonylamino-3 hydroxy-2 phényl-3 propionate-(2R,3S) d'acétoxy-4 α benzoyloxy-2 α hydroxy-1 β époxy-5 β ,20 méthoxy-7 β (pyridyl-3)carbonyloxy-10 β oxo-9 taxène-11 yle-13 α .

18 - Composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle contient au moins un produit selon l'une des revendications 1, 2 ou 3 pour lequel Z représente un radical de formule générale (II) en association avec un ou plusieurs diluants ou adjuvants pharmaceutiquement acceptables et éventuellement un ou plusieurs composés compatibles et pharmacologiquement actifs.

19 - Composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle contient au moins le produit selon la revendication 13 en association avec un ou plusieurs diluants ou adjuvants pharmaceutiquement acceptables et éventuellement un ou plusieurs composés compatibles et pharmacologiquement actifs.

20 - Composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle contient au moins le produit selon la revendication 14 en association avec un ou plusieurs diluants ou adjuvants pharmaceutiquement acceptables et éventuellement un ou plusieurs composés compatibles et pharmacologiquement actifs.

21 - Composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle contient au moins le produit selon la revendication 15 en association avec un ou plusieurs diluants ou adjuvants pharmaceutiquement acceptables et éventuellement un ou plusieurs composés compatibles et pharmacologiquement actifs.

22 - Composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle contient au moins le produit selon la revendication 16 en association avec un ou plusieurs diluants ou adjuvants pharmaceutiquement acceptables et éventuellement un ou plusieurs composés compatibles et pharmacologiquement actifs

23 - Composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle contient au moins le produit selon la revendication 17 en association avec un ou plusieurs diluants ou adjuvants pharmaceutiquement acceptables et éventuellement un ou plusieurs composés compatibles et pharmacologiquement actifs.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat: Application No
PCT/TR 96/00441

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 C07D305/14 A61K31/335		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 C07D		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO,A,94 18164 (RESEARCH FOUND. UNIV. OF NEW-YORK) 18 August 1994 see page 1 - page 11; claims 1,9 ---	1-4, 8-12, 18-23
X	EP,A,0 639 577 (BRISTOL-MYERS.) 22 February 1995 see claims 1,25-28; examples 1-8,12-17 -----	1-4, 8-12, 18-23
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents :		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family	
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
2 July 1996	15. 07. 96	
Name and mailing address of the ISA	Authorized officer	
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+ 31-70) 340-3016	Francois, J	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Internat	Application No
PCT/r-R 96/00441	

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9418164	18-08-94	AU-B- 6031394	29-08-94
		CA-A- 2154071	18-08-94
		CZ-A- 9501921	13-12-95
		EP-A- 0681568	15-11-95
		FI-A- 953645	27-09-95
		NO-A- 953011	21-09-95
		PL-A- 310075	27-11-95
		ZA-A- 9400128	19-08-94

EP-A-0639577	22-02-95	AU-B- 660570	29-06-95
		AU-B- 5260993	07-07-94
		AU-B- 7026794	02-03-95
		CA-A- 2111527	25-06-94
		CA-A- 2129288	18-02-95
		CN-A- 1093369	12-10-94
		CN-A- 1111637	15-11-95
		CZ-A- 9401947	16-08-95
		CZ-A- 9302855	15-12-94
		EP-A- 0604910	06-07-94
		FI-A- 935821	25-06-94
		FI-A- 943749	18-02-95
		HU-A- 65547	28-06-94
		HU-A- 67742	28-04-95
		JP-A- 7149779	13-06-95
		JP-A- 7002885	06-01-95
		NO-A- 934614	27-06-94
		NO-A- 943002	20-02-95
		NZ-A- 250550	24-02-95
		PL-A- 301610	27-06-94
PL-A- 304649	20-02-95		
ZA-A- 9406180	16-02-95		

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No
PCT/FR 96/00441

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 6 C07D305/14 A61K31/335

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C07D

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO,A,94 18164 (RESEARCH FOUND. UNIV. OF NEW-YORK) 18 Août 1994 voir page 1 - page 11; revendications 1,9	1-4, 8-12, 18-23
X	EP,A,0 639 577 (BRISTOL-MYERS.) 22 Février 1995 voir revendications 1,25-28; exemples 1-8,12-17	1-4, 8-12, 18-23

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *&* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

2 Juillet 1996

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

15.07.96

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+ 31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Francois, J

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale No
PCT/TR 96/00441

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO-A-9418164	18-08-94	AU-B- 6031394	29-08-94
		CA-A- 2154071	18-08-94
		CZ-A- 9501921	13-12-95
		EP-A- 0681568	15-11-95
		FI-A- 953645	27-09-95
		NO-A- 953011	21-09-95
		PL-A- 310075	27-11-95
		ZA-A- 9400128	19-08-94

EP-A-0639577	22-02-95	AU-B- 660570	29-06-95
		AU-B- 5260993	07-07-94
		AU-B- 7026794	02-03-95
		CA-A- 2111527	25-06-94
		CA-A- 2129288	18-02-95
		CN-A- 1093369	12-10-94
		CN-A- 1111637	15-11-95
		CZ-A- 9401947	16-08-95
		CZ-A- 9302855	15-12-94
		EP-A- 0604910	06-07-94
		FI-A- 935821	25-06-94
		FI-A- 943749	18-02-95
		HU-A- 65547	28-06-94
		HU-A- 67742	28-04-95
		JP-A- 7149779	13-06-95
		JP-A- 7002885	06-01-95
		NO-A- 934614	27-06-94
		NO-A- 943002	20-02-95
		NZ-A- 250550	24-02-95
		PL-A- 301610	27-06-94
PL-A- 304649	20-02-95		
ZA-A- 9406180	16-02-95		



INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(51) International Patent Classification ⁷ : A61K 31/00	A2	(11) International Publication Number: WO 00/10547 (43) International Publication Date: 2 March 2000 (02.03.00)
(21) International Application Number: PCT/EP99/06292 (22) International Filing Date: 18 August 1999 (18.08.99) (30) Priority Data: 98115650.8 20 August 1998 (20.08.98) EP 60/123,843 11 March 1999 (11.03.99) US (71) Applicant (for all designated States except US): AVEN- TIS PHARMA S.A. [FR/FR]; 20, avenue Raymond Aron, F-92160 Antony (FR). (72) Inventors; and (75) Inventors/Applicants (for US only): BISSERY, Marie-Christine [FR/FR]; 5, rue Henri Poincaré, F-94400 Vitry sur Seine (FR). VRIGNAUD, Patricia [FR/FR]; 27, rue de la Clairière, F-77380 Combs la Ville (FR). ROBERTS, Simon [GB/GB]; 36 Fenton Grange, Harlow, Essex CM17 9PG (GB). BREALEY, Clive [GB/GB]; 99 Hemp Lane, Wigginton, Tring, Herts HP23 6HE (GB). (74) Agent: LE PENNEC, Magali; Aventis Pharma, Direction des Brevets - Tri LE1 144, 20, avenue Raymond Aron, F-92165 Antony Cedex (FR).		(81) Designated States: AE, AL, AU, BA, BB, BG, BR, CA, CN, CR, CU, CZ, DM, EE, GD, GE, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KP, KR, LC, LK, LR, LT, LV, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SG, SI, SK, SL, TR, TT, UA, US, UZ, VN, YU, ZA, ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Published <i>Without international search report and to be republished upon receipt of that report.</i>
(54) Title: NEW USE OF TAXOID DERIVATIVES		
(57) Abstract <p>The present invention relates a new use of taxoid derivatives. It relates more precisely to a method for treating abnormal cell proliferation of different resistant cell lines expressing multidrug resistance P-glycoprotein. This type of cells are representative of colon cancer cells. The products of the present invention are also usable to treat the colon cancer of mammals including men.</p>		

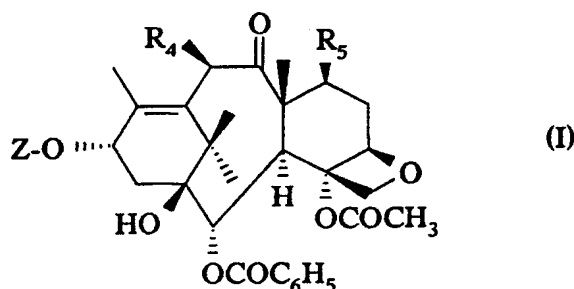
FOR THE PURPOSES OF INFORMATION ONLY

Codes used to identify States party to the PCT on the front pages of pamphlets publishing international applications under the PCT.

AL	Albania	ES	Spain	LS	Lesotho	SI	Slovenia
AM	Armenia	FI	Finland	LT	Lithuania	SK	Slovakia
AT	Austria	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Senegal
AU	Australia	GA	Gabon	LV	Latvia	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaijan	GB	United Kingdom	MC	Monaco	TD	Chad
BA	Bosnia and Herzegovina	GE	Georgia	MD	Republic of Moldova	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tajikistan
BE	Belgium	GN	Guinea	MK	The former Yugoslav Republic of Macedonia	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Greece			TR	Turkey
BG	Bulgaria	HU	Hungary	ML	Mali	TT	Trinidad and Tobago
BJ	Benin	IE	Ireland	MN	Mongolia	UA	Ukraine
BR	Brazil	IL	Israel	MR	Mauritania	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Iceland	MW	Malawi	US	United States of America
CA	Canada	IT	Italy	MX	Mexico	UZ	Uzbekistan
CF	Central African Republic	JP	Japan	NE	Niger	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NL	Netherlands	YU	Yugoslavia
CH	Switzerland	KG	Kyrgyzstan	NO	Norway	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Democratic People's Republic of Korea	NZ	New Zealand		
CM	Cameroon		Republic of Korea	PL	Poland		
CN	China	KR	Republic of Korea	PT	Portugal		
CU	Cuba	KZ	Kazakstan	RO	Romania		
CZ	Czech Republic	LC	Saint Lucia	RU	Russian Federation		
DE	Germany	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Denmark	LK	Sri Lanka	SE	Sweden		
EE	Estonia	LR	Liberia	SG	Singapore		

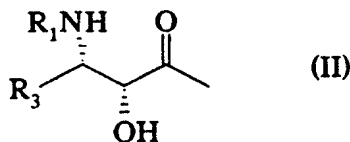
NEW USE OF TAXOID DERIVATIVES

The present invention relates a new use of taxoid derivatives. It relates more precisely to a method for treating abnormal cell proliferation of different resistant cell lines expressing multidrug resistance P-glycoprotein. This type of cells are representative of colon cancer cells. The present invention is related to the treatment of abnormal cell proliferation of different resistant cell lines expressing multidrug resistance P-glycoprotein and is also related to the treatment of abnormal cell proliferation of different resistant cell lines expressing multidrug resistance P-glycoprotein and is also related to the treatment of colon tumors of mammals including men by administrating a compound of general formula (I) or a pharmaceutically acceptable salt or solvante thereof :



in which :

Z represents a hydrogen atom or a radical of general formula :



15

in which :

R₁ represents

a benzoyl radical optionally substituted with one or more identical or different atoms or radicals chosen from halogen atoms and alkyl radicals containing 1 to 4 carbon atoms, alkoxy radicals containing 1 to 4 carbon atoms or trifluoromethyl radicals,

20

a thenoyl or furoyl radical or

a radical R_2 -O-CO- in which R_2 represents :

- an alkyl radical containing 1 to 8 carbon atoms,
- an alkenyl radical containing 2 to 8 carbon atoms,
- 5 - an alkynyl radical containing 3 to 8 carbon atoms,
- a cycloalkyl radical containing 3 to 6 carbon atoms,
- a cycloalkenyl radical containing 4 to 6 carbon atoms or
- a bicycloalkyl radical containing 7 to 10 carbon atoms,

these radicals being optionally substituted with one or more substituents chosen from
10 halogen atoms and hydroxyl radicals, alkoxy radicals containing 1 to 4 carbon atoms,
dialkylamino radicals in which each alkyl portion contains 1 to 4 carbon atoms,
piperidino or morpholino radicals, 1-piperazinyl radicals (optionally substituted at
position 4 with an alkyl radical containing 1 to 4 carbon atoms or with a phenylalkyl
radical in which the alkyl portion contains 1 to 4 carbon atoms), cycloalkyl radicals
15 containing 3 to 6 carbon atoms, cycloalkenyl radicals containing 4 to 6 carbon atoms,
phenyl radicals (optionally substituted with one or more atoms or radicals chosen
from halogen atoms and alkyl radicals containing 1 to 4 carbon atoms or alkoxy
radicals containing 1 to 4 carbon atoms), cyano or carboxyl radicals or
alkoxycarbonyl radicals in which the alkyl portion contains 1 to 4 carbon atoms,

20 - a phenyl or α - or β -naphthyl radical optionally substituted with one or
more atoms or radicals chosen from halogen atoms and alkyl radicals containing 1 to
4 carbon atoms or alkoxy radicals containing 1 to 4 carbon atoms, or

- a 5-membered aromatic heterocyclic radical preferably chosen from furyl
and thienyl radicals,

25 - or a saturated heterocyclic radical containing 4 to 6 carbon atoms,
optionally substituted with one or more alkyl radicals containing 1 to 4 carbon atoms,

R_3 represents

an unbranched or branched alkyl radical containing 1 to 8 carbon atoms,
an unbranched or branched alkenyl radical containing 2 to 8 carbon atoms,
30 an unbranched or branched alkynyl radical containing 2 to 8 carbon atoms,

a cycloalkyl radical containing 3 to 6 carbon atoms,

a phenyl or α - or β -naphthyl radical optionally substituted with one or more atoms or radicals chosen from halogen atoms and alkyl, alkenyl, alkynyl, aryl, aralkyl, alkoxy, alkylthio, aryloxy, arylthio, hydroxyl, hydroxyalkyl, mercapto, 5 formyl, acyl, acylamino, aroylamino, alkoxycarbonylamino, amino, alkylamino, dialkylamino, carboxyl, alkoxycarbonyl, carbamoyl, alkylcarbamoyl, dialkylcarbamoyl, cyano, nitro and trifluoromethyl radicals,

or a 5-membered aromatic heterocycle containing one or more identical or different hetero atoms chosen from nitrogen, oxygen and sulphur atoms and 10 optionally substituted with one or more identical or different substituents chosen from halogen atoms and alkyl, aryl, amino, alkylamino, dialkylamino, alkoxycarbonylamino, acyl, arylcarbonyl, cyano, carboxyl, carbamoyl, alkylcarbamoyl, dialkylcarbamoyl or alkoxycarbonyl radicals,

on the understanding that, in the substituents of the phenyl, α - or β -naphthyl 15 and aromatic heterocyclic radicals, the alkyl radicals and the alkyl portions of the other radicals contain 1 to 4 carbon atoms, and that the alkenyl and alkynyl radicals contain 2 to 8 carbon atoms, and that the aryl radicals are phenyl or α - or β -naphthyl radicals,

R_4 represents

20 an alkoxy radical containing 1 to 6 carbon atoms in an unbranched or branched chain,

an alkenyloxy radical containing 3 to 6 carbon atoms in an unbranched or branched chain,

25 an alkynyloxy radical containing 3 to 6 carbon atoms in an unbranched or branched chain,

a cycloalkyloxy radical containing 3 to 6 carbon atoms or

a cycloalkenyloxy radical containing 4 to 6 carbon atoms,

30 these radicals being optionally substituted with one or more halogen atoms or with an alkoxy radical containing 1 to 4 carbon atoms, an alkylthio radical containing 1 to 4 carbon atoms or a carboxyl radical, an alkyloxycarbonyl radical in

which the alkyl portion contains 1 to 4 carbon atoms, a cyano or carbamoyl radical or an N-alkylcarbamoyl or N,N-dialkylcarbamoyl radical in which each alkyl portion contains 1 to 4 carbon atoms or, with the nitrogen atom to which it is linked, forms a saturated 5- or 6-membered heterocyclic radical optionally containing a second hetero
5 atom chosen from oxygen, sulphur or nitrogen atoms, optionally substituted with an alkyl radical containing 1 to 4 carbon atoms or a phenyl radical or a phenylalkyl radical in which the alkyl portion contains 1 to 4 carbon atoms,

R₃ represents

an alkoxy radical containing 1 to 6 carbon atoms in an unbranched or
10 branched chain,

an alkenyloxy radical containing 3 to 6 carbon atoms,

an alkynyloxy radical containing 3 to 6 carbon atoms,

a cycloalkyloxy radical containing 3 to 6 carbon atoms or

a cycloalkenyloxy radical containing 3 to 6 carbon atoms,

15 these radicals being optionally substituted with one or more halogen atoms or with an alkoxy radical containing 1 to 4 carbon atoms, an alkylthio radical containing 2 to 4 carbon atoms or a carboxyl radical, an alkyloxycarbonyl radical in which the alkyl portion contains 1 to 4 carbon atoms, a cyano or carbamoyl radical or an N-alkylcarbamoyl or N,N-dialkylcarbamoyl radical in which each alkyl portion
20 contains 1 to 4 carbon atoms or, with the nitrogen atom to which it is linked, forms a saturated 5- or 6-membered heterocyclic radical optionally containing a second hetero atom chosen from oxygen, sulphur or nitrogen atoms, optionally substituted with an alkyl radical containing 1 to 4 carbon atoms or a phenyl radical or a phenylalkyl radical in which the alkyl portion contains 1 to 4 carbon atoms.

25 Preferably, the aryl radicals which can be represented by R₃ are phenyl or α - or β -naphthyl radicals optionally substituted with one or more atoms or radicals chosen from halogen atoms (fluorine, chlorine, bromine, iodine) and alkyl, alkenyl, alkynyl, aryl, arylalkyl, alkoxy, alkylthio, aryloxy, arylthio, hydroxyl, hydroxyalkyl, mercapto, formyl, acyl, acylamino, aroylamino, alkoxycarbonylamino, amino,
30 alkylamino, dialkylamino, carboxyl, alkoxycarbonyl, carbamoyl, dialkylcarbamoyl,

cyano, nitro and trifluoromethyl radicals, on the understanding that the alkyl radicals and the alkyl portions of the other radicals contain 1 to 4 carbon atoms, that the alkenyl and alkynyl radicals contain 2 to 8 carbon atoms and that the aryl radicals are phenyl or α - or β -naphthyl radicals.

5 Preferably, the heterocyclic radicals which can be represented by R_3 are 5-membered aromatic heterocyclic radicals containing one or more identical or different atoms chosen from nitrogen, oxygen and sulphur atoms, optionally substituted with one or more identical or different substituents chosen from halogen atoms (fluorine, chlorine, bromine, iodine) and alkyl radicals containing 1 to 4 carbon
10 atoms, aryl radicals containing 6 to 10 carbon atoms, alkoxy radicals containing 1 to 4 carbon atoms, aryloxy radicals containing 6 to 10 carbon atoms, amino radicals, alkylamino radicals containing 1 to 4 carbon atoms, dialkylamino radicals in which each alkyl portion contains 1 to 4 carbon atoms, acylamino radicals in which the acyl
15 portion contains 1 to 4 carbon atoms, alkoxy-carbonylamino radicals containing 1 to 4 carbon atoms, acyl radicals containing 1 to 4 carbon atoms, arylcarbonyl radicals in which the aryl portion contains 6 to 10 carbon atoms, cyano, carboxyl or carbamoyl radicals, alkylcarbamoyl radicals in which the alkyl portion contains 1 to 4 carbon
20 atoms, dialkylcarbamoyl radicals in which each alkyl portion contains 1 to 4 carbon atoms or alkoxy-carbonyl radicals in which the alkoxy portion contains 1 to 4 carbon atoms.

Preferably, the radicals R_4 and R_5 , which may be identical or different, represent unbranched or branched alkoxy radicals containing 1 to 6 carbon atoms, optionally substituted with a methoxy, ethoxy, ethylthio, carboxyl, methoxycarbonyl, ethoxycarbonyl, cyano, carbamoyl, N-methylcarbamoyl, N-ethylcarbamoyl,
25 N,N-dimethylcarbamoyl, N,N-diethylcarbamoyl, N-pyrrolidinocarbonyl or N-piperidinocarbonyl radical.

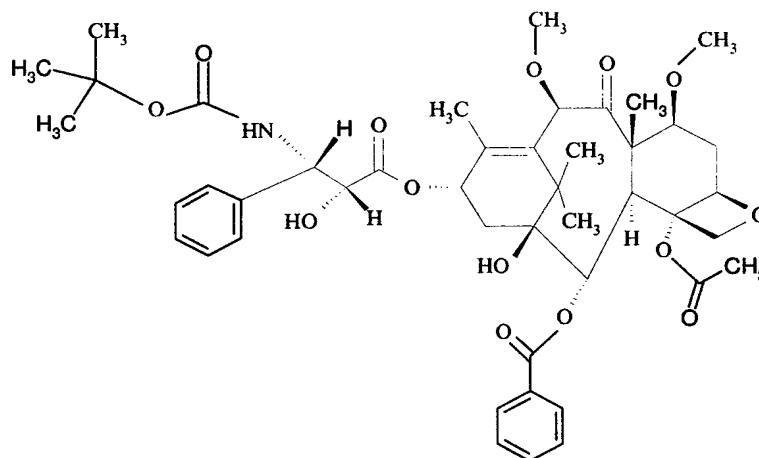
More specially, the present invention relates to the products of general formula (I) in which Z represents a hydrogen atom or a radical of general formula (II) in which R_1 represents a benzoyl radical or a radical R_2 -O-CO- in which R_2 represents

a tert-butyl radical and R_3 represents an alkyl radical containing 1 to 6 carbon atoms, an alkenyl radical containing 2 to 6 carbon atoms, a cycloalkyl radical containing 3 to 6 carbon atoms, a phenyl radical optionally substituted with one or more identical or different atoms or radicals chosen from halogen atoms (fluorine, chlorine) and alkyl (methyl), alkoxy (methoxy), dialkylamino (dimethylamino), acylamino (acetylamino), alkoxy-carbonylamino (tert-butoxycarbonylamino) or trifluoromethyl radicals, or a 2- or 3-furyl, 2- or 3-thienyl or 2-, 4- or 5-thiazolyl radical, and R_4 and R_5 , which may be identical or different, each represent an unbranched or branched alkoxy radical containing 1 to 6 carbon atoms.

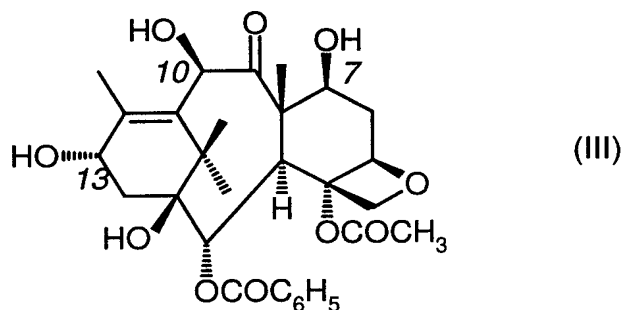
10 Still more specially, the present invention relates to the products of general formula (I) in which Z represents a hydrogen atom or a radical of general formula (II) in which R_1 represents a benzoyl radical or a radical R_2 -O-CO- in which R_2 represents a tert-butyl radical and R_3 represents an isobutyl, isobutenyl, butenyl, cyclohexyl, phenyl, 2-furyl, 3-furyl, 2-thienyl, 3-thienyl, 2-thiazolyl, 4-thiazolyl or 5-thiazolyl radical, and R_4 and R_5 , which may be identical or different, each represent a methoxy, ethoxy or propoxy radical.

Of even more special interest are the products of general formula (I) in which R_3 represents a phenyl radical and R_1 represents a tert-butoxycarbonyl radical, R_4 and R_5 , which may be identical or different, represent a methoxy, ethoxy or propoxy radical.

20 In a still higher interest, the present invention relates to 4 α -acetoxy-2 α -benzoyloxy-5 β ,20-epoxy-1 β -hydroxy-7 β ,10 β -dimethoxy-9-oxo-11-taxen-13 α -yl (2R,3S)-3 tert-butoxycarbonylamino-2-hydroxy-3-phenylpropionate of formula (Ia)



It is known, from patent WO 96/30355, to prepare a derivative according to the present invention by two processes. According to a first, multi-step process, starting with 10-deacetylbaccatin III of formula :



5

it is selectively protected in positions 7 and 13, for example in the form of a silyl diether, followed by the action of a product of general formula:



in which R represents a radical as defined above and X represents a reactive ester residue such as a sulphuric or sulphonic ester residue or a halogen atom, to give a product bearing the unit -OR in position 10 and silyl groups in positions 7 and 13. Next, the silyl protecting groups are replaced with hydrogen atoms to give a compound still bearing the group -OR in position 10 and OH groups in positions 7 and 13. The latter derivative is etherified selectively in position 7 by reaction with the derivative of formula IV to give the derivative of formula (I) in which Z is equal to hydrogen.

15

The final step consists in esterifying in position 13, according to a process which is known per se, the derivatives of formula (Ia), in which Z represents hydrogen, in the presence of a β -lactam according, for example, to the process described in patent EP 617,018, or in the presence of an oxazolidine as described, for example, in patent WO 96/30355 mentioned above. After deprotection of the protecting groups in positions 7 and 10, an ester of formula (Ia) is thus obtained in which Z is other than hydrogen and R represents hydrogen. The next step consists in reacting the positions 7 and 10 simultaneously by the action of a reagent formed in situ from a sulphoxide of formula (V) and acetic anhydride (Pummerer-type reaction),



in which R has the same meaning as above, to form an alkylthioalkoxy-type intermediate on positions 7 and 10.

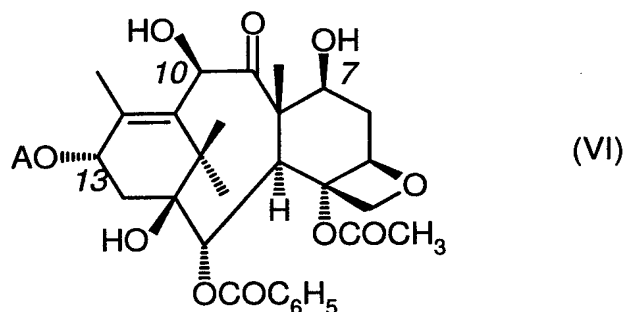
The final step, which allows the desired compound of formula (Ia) to be obtained, is carried out on the intermediate compound obtained above, by the action of activated Raney nickel.

Generally, the action of the reagent formed in situ from sulphoxide of general formula (V), preferably dimethyl sulphoxide and acetic anhydride, is carried out in the presence of acetic acid or an acetic acid derivative such as a haloacetic acid, at a temperature of between 0 and 50°C.

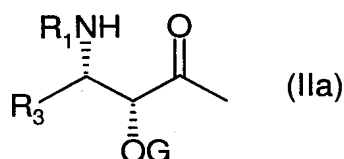
Generally, the action of the activated Raney nickel in the presence of an aliphatic alcohol or an ether is carried out at a temperature of between -10 and 60°C.

In the FR 97-14442 application a further process has been described. This invention allows, in a single step, the direct, selective and simultaneous alkylation of the two hydroxyl functions in positions 7 and 10 of 10-deacetylbaccatin or of derivatives thereof esterified in position 13, of formula (VI)

9

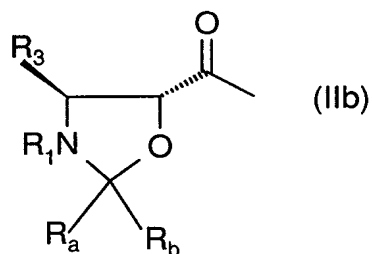


in which A represents hydrogen or a side chain of formula (IIa) below :



5 in which G represents a protecting group for the hydroxyl function, R_1 and R_3 have the same meaning as in formula (II)

or an oxazolidine unit of formula (IIb) :



10 in which R_1 and R_3 have the same meaning as in formula (II), R_a and R_b , which may be identical or different, represent hydrogen or alkyl, aryl, halo, alkoxy, arylalkyl, alkoxyaryl, haloalkyl, haloaryl, it being possible for the substituents optionally to form a 4- to 7-membered ring.

15 It is preferred to use 10-deacetylbaccatin as starting material, i.e. the product of formula (III), which allows appreciable economy as regards the process and moreover avoids the intermediate protection and deprotection steps necessary in the old processes.

Among the groups G for protecting the hydroxyl function of formula (IIa), it is generally preferred to choose all of the protecting groups described in books such

as Greene and Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, 1991, John Wiley & Sons, and MacOmie, Protective Groups in Organic Chemistry, 1975, Plenum Press, and which are deprotected under conditions which degrade the rest of the molecule little or not at all, such as, for example:

- 5
- ethers, and preferably ethers such as methoxymethyl ether, 1-ethoxyethyl ether, benzyloxymethyl ether, p-methoxybenzyloxymethyl ether, benzyl ethers optionally substituted with one or more groups such as methoxy, chloro, nitro, 1-methyl-1-methoxyethyl ether, 2-(trimethylsilyl)ethoxymethyl ether, tetrahydropyranyl ether and silyl ethers such as trialkylsilyl ethers,
- 10
- carbonates such as trichloroethyl carbonates.

More particularly, the radicals R_a and R_b of general formula (IIb) are chosen from those described in patent WO 94/07878 and the derivatives more particularly preferred are those in which R_a is hydrogen and R_b is a p-methoxyphenyl radical.

The alkylating agent is chosen from :

- 15
- alkyl halides, and preferably from alkyl iodides (RI)
 - alkyl sulphates such as methyl sulphate
 - oxoniums such as trialkyloxonium boric salts, in particular trimethyloxonium tetrafluoroborate (Me_3OBF_4).

Methyl iodide is preferably used.

- 20
- The alkylating agent is used in the presence of an anionization agent such as one or more strong bases, in anhydrous medium.

Among the bases which can be used in anhydrous medium, mention may be made of :

- 25
- alkali metal hydrides such as sodium or potassium hydride
 - alkali metal alkoxides such as potassium tert-butoxide
 - silver oxide Ag_2O
 - 1,8-bis(dimethylamino)naphthalene
 - mono- or dimetallic base mixtures such as those described, for example, in publications such as P. Caubère Chem. Rev. 1993, 93, 2317-2334 or M. Schlosser

Mod. Synth. Methods (1992), 6, 227-271; in particular the alkyllithium/alkali metal t-butoxide or alkali metal amide/alkali metal t-butoxide combinations are preferred. One of the two bases can be generated "in situ".

5 Among all of the possible combinations of alkylating agent and anionization agent, it is preferred to use methyl iodide in the presence of potassium hydride.

The reaction is preferably carried out in an organic medium which is inert under the reaction conditions. Among the solvents, it is preferred to use :

- ethers such as tetrahydrofuran or dimethoxyethane
- when silver oxide is used, it is preferred to use polar aprotic solvents such as dimethylformamide, or aromatic solvents such as toluene
- when 1,8-bis(dimethylamino)naphthalene is used, it is preferred to use alkylesters such as ethylacetate.

15 For better implementation of the invention, it is preferred to use a molar ratio between the anionization agent and the substrate of greater than 2 and preferably between 2 and 20.

It is also preferred to use a molar ratio between the alkylating agent and the substrate of greater than 2 and preferably between 2 and 40.

It is preferred to use a reaction temperature of between -30°C and 80°C.

20 The reaction time advantageously ranges between a few hours and 48 hours depending on the reagents chosen.

After the alkylating step, when the latter is carried out on 10-deacetylbaccatin, the process then proceeds, in a known manner, to the esterification step according, for example, to the processes described in patents EP 617,018 or WO 96/30355 mentioned above.

25 Thus, according to a first, 3-step process, the procedure first begins with the dialkylation of 10-deacetylbaccatin, using an alkylating agent in the presence of a strong base, in a second step, the 10-deacetylbaccatin dietherified in positions 7 and 10 is coupled, in position 13, with a suitably protected β -lactam in the presence of an

activating agent chosen from tertiary amines and metal bases which ensure the formation of an alkoxide in position 13. Deprotection of the side chain is then achieved by the action of an inorganic or organic acid.

Thus, according to a second, 3-step process, the procedure first begins with the dialkylation of 10-deacetylbaecatin, using an alkylating agent in the presence of a strong base, in a second step, the 10-deacetylbaecatin dietherified in positions 7 and 10 is coupled, in position 13, with an oxazolidine in the presence of a coupling agent such as diimides in the presence of an activating agent such as dialkylaminopyridines. Opening of the oxazolidine is achieved by the action of an inorganic or organic acid.

According to a third process, the procedure begins with the esterification in position 13 of baecatin suitably protected in positions 7 and 10, with a β -lactam or an oxazolidine in the presence of a coupling agent and/or an activating agent as described in the above two processes. After deprotection in positions 7 and 10, the dietherification in positions 7 and 10 is carried out by an alkylating agent in the presence of a strong base. Deprotection of the side chain is then achieved by the action of an inorganic or organic acid.

The products of general formula (I) have remarkable biological properties.

In vivo, the products of general formula (I) proved active in mice grafted with the colon adenocarcinoma C51 or C38 at doses of between 1 and 30 mg/kg, as well as on other liquid or solid tumours.

The compounds of formula I have anti-tumor properties, more particularly, activity against tumors which are resistant to Taxol® and Taxotere®. Such tumors include, for example, colon tumors which have an elevated expression of multidrug resistance P-glycoprotein. Multi-drug resistance is the usual term relating to the resistance by a tumor against various compounds having differing structures and mechanisms of action. Taxoids are generally known to be highly recognized by experimental tumors such as P388/DOX, a P388 murine leukemia cell line selected for doxorubicin (DOX) resistance, which express P-glycoprotein. The compounds

according to the present invention are less recognized by P388/DOX. More particularly, the compounds are less recognized than Taxotere®.

The compounds of formula (I) are mainly used for preparing a medicine for treating abnormal cell proliferation of cell lines expressing the multidrug resistance P-glycoprotein. The compound of formula I are mainly used for preparing a medicine
5 for treating colon cancer.

The compound and mainly compound of formula (I) where R₄ and R₅ are each methoxy has the property to be active compared to the other known taxoids such as Taxol® or Taxotere® to treat the cancer cells lines expressing the multidrug
10 resistance P-glycoprotein. It is also active against tumor cells resistant to Doxorubicine or resistant to Vincristine

The product of formula (I) can be used concurrently with at least other therapeutic treatment. It is more preferably used with other therapeutic treatment comprising antineoplastic drugs, monoclonal antibodies, immunotherapies,
15 radiotherapies, or biological response modifiers.

The product of formula (I) is preferably administered by parenteral administration such as intravenous, intraperitoneal, intramuscular or subcutaneous administration.

Example

20 1. INTRODUCTION

Product of formula (Ia) is a potent anti-cancer agent in pre-clinical models.

In vitro antiproliferative properties on resistant cell lines

Docetaxel was found to be cross-resistant to cell lines expressing the multidrug resistance P-glycoprotein (RIGEL I. and HORWITZ S.B., Studies with RP 56976
25 (Taxotere®: a semisynththetic analogue of Taxol, J. Natl. Cancer Inst., **83**, 288-291, 1991).

The cytotoxicity of product Ia was examined against different resistant cell lines expressing the multidrug resistance P-glycoprotein, in comparison with docetaxel after 4 days of continuous exposure using standard methods.

The resistance factor was calculated by dividing the IC₅₀ value obtained on resistant cells by the IC₅₀ value obtained on sensitive cells.

Product of formula Ia was found more active than docetaxel on all the resistant tumor cell lines which have been evaluated. Interestingly, product of formula Ia was found minimally cross-resistant (resistance factor: 1.8 to 4.3) in the P388/TXT, P388/VCR, HL60/TAX and Calc18/TXT cell lines that are moderately cross-resistant to docetaxel (resistance factor: 4.8 to 23.5) and which could be more representative of the clinical situation.

In addition, a strong decrease of the cross-resistance for product of formula Ia (resistance factor: 7.6 and 10) was found in the two most resistant to docetaxel cell lines KB V1 and P388/DOX (resistance factor: 59 and 50).

Product of formula Ia was also evaluated on the murine P388/CPT5 cell line with acquired resistance to camptothecin that do not express the P-glycoprotein. A strong decrease in the cross-resistance was found for product of formula Ia and docetaxel (resistance factor: 4.8 and 10.5) as compared to camptothecin (resistance factor: 286). This result suggests a potential application of product of formula Ia in the treatment of tumors with acquired resistance to camptothecin derivatives.

Table 0.1 : Relative resistance of Product of formula Ia and docetaxel against resistant cell lines expressing the P-glycoprotein

20

Resistant cell line	Resistance factor to		<i>mdr1</i> mRNA level*
	Docetaxel	Product of formula Ia	
P388/DOX	50.7	10.0	+++
P388/TXT	4.8	1.8	++
P388/VCR	5.8	1.8	++
HL60/TAX	8.1	2.5	++
Calc18/TXT	23.5	4.3	++
KB V1	59.0	7.6	++++

* Relative expression obtained from Northern blot experiment using the human *mdr1* gene as probe.

CaCo2

The antiproliferative properties of the product of formula Ia and docetaxel were examined on the human colon adenocarcinoma CaCo-2 cell line (ATCC HTB37) that was shown to present a basal level of expression of P-glycoprotein encoded by the *mdr1* gene. The methodology was used, i.e., 96 well plates, time of contact of the drugs (96 hours) and neutral red coloration of viable cell. Results expressed as IC₅₀, were summarized in the next table.

In vitro growth inhibitory effect of Product of formula Ia and docetaxel on CaCo-2 cell line

Cells	Drug	IC ₅₀ (µg/ml)*
CaCo-2	docetaxel	108 ± 17 (3)
	Product of formula Ia	22 ± 3 (3)

*Values into brackets: number of experiments.

Product of formula Ia is cytotoxic on CaCo-2 cells with IC₅₀ included in the range described on the other human cell line tested, i.e., HL60, Calc18 and KB (see previous paragraph). In contrast, docetaxel displays a higher IC₅₀ on CaCo-2 cells, corresponding to 4.9 times the values observed with Product of formula Ia. Therefore, the higher antiproliferative activity of Product of formula Ia, compared to docetaxel, on CaCo-2 cells is in agreement with a lower recognition of Product of formula Ia than docetaxel by the P-glycoprotein intrinsically expressed by this cell line.

***In vivo* antitumor activity**

In vivo schedule of administration and antitumor efficacy studies were carried out using a preclinical standard formulation of Product of formula Ia in ethanol: polysorbate 80 (50:50, v/v). After dilution, the final concentration was 5 % ethanol, 5 % polysorbate, 90 % glucose-5 % in water.

Subsequently, the clinical formulation was developed in which Product of formula Ia was solubilised in polysorbate 80. After dilution, the final polysorbate 80 concentration was 5 %. In the summaries which follow, *in vivo* studies were carried out using the preclinical standard formulation, unless otherwise stated.

Product of formula Ia was administered by the intravenous route (i.v.). The experiments and data analyses were done according to standard protocols .

The activity end points used to assess subcutaneously implanted solid tumors were:

- tumor growth inhibition, T/C, where T and C are the median tumor weights in mg of the treated and the control groups, respectively. According to NCI standards, a T/C > 42 %, -, is inactive, a T/C ≤ 42 %, +, is the minimum level for activity. A T/C < 10 %, ++, is considered as a high antitumor activity level which justifies further development (DN-2 level).

In cases of high antitumor activity, the two following end points were also used:

- tumor growth delay, T-C, where T and C are the median times in days required for the treatment group and the control group tumors to reach a predetermined size (750 to 1500 mg).
- log cell kill, which is the logarithm of the total number of cells killed by treatment. This value can be converted to an arbitrary rating activity according to the Southern Research Institute (SRI) : log cell kill total < 0.7 = - inactive ; 0.7-1.2 = + ; 1.3-1.9 = ++ ; 2.0-2.8 = +++ ; >2.8 = ++++ highly active.

For advanced stage tumors, regressions can be either partial (more than 50 % reduction in tumor mass) or complete. Complete regressions are included in the partial regressions.

- 20 The end point used for assessing activity in intraperitoneally implanted leukemia was percent increase in host life span (% ILS), calculated in relation to median day of death.

The NCI criteria for activity are as follows:

- P388: highly active, ++ ≥ 75 % ILS; active, + 27-74 % ILS; inactive, - < 27 % ILS.
- 25 Toxicity was based on drug deaths (≥ 10 %) or a weight loss nadir > 20 %.

Docetaxel was used for comparison trials when needed.

Colon tumors

Colon 51

Product of formula Ia was administered i.v. on day 4, 6, 8. At the HNTD (9.3 mg/kg/injection), it was found highly active with a 0 % T/C and a 2.6 log cell kill. The dosage below yielded a 2.2 log cell kill. Docetaxel was also found highly active with a 3.1 log cell kill.

- 5 Evaluation of i.v. Product of formula Ia against colon adenocarcinoma C51 on BALB/c female mice

Agent (batch)	Dosage in mg/kg per injection	Schedule in days	T/C in % day 18	T-C in days	log cell kill total	Comments
Product of formula Ia	24.2	4,6,8	-	-	-	Toxic (5/5 DD)
	15.0		-	-	-	Toxic (1/5 DD)
	9.3		0	25.8	2.6	HNTD active
	5.8		0	21.9	2.2	Active
Docetaxel	24.2	4,6,8	-	-	-	Toxic 22.8 % bwl
	15.0		0	31.1	3.1	HNTD highly active
	9.3		0	22.4	2.2	Active
	5.8		4	8.9	0.9	Active

Median time for tumor to reach 750 mg in control = 15.1 days.

Abbreviations used: HNTD = highest nontoxic dose, bwl = body weight loss, DD = drug death,

- 10 bwl = body weight loss.

Advanced stage colon 38

Product of formula Ia was administered i.v. to mice bearing 200 to 400 mg of tumor. At the HNTD (20 mg/kg/injection), it was found highly active and produced 5/5 complete regressions, all mice being tumor free survivors on day 139. The dosage below (12.4 mg/kg/injection) induced the same number of complete regressions and 80 % tumor free survivors. In comparison, docetaxel at the HNTD produced only 40 % partial regressions in the same trial.

- 15 Evaluation of i.v. Product of formula Ia against advanced colon adenocarcinoma C38 on B6D2F₁ female mice

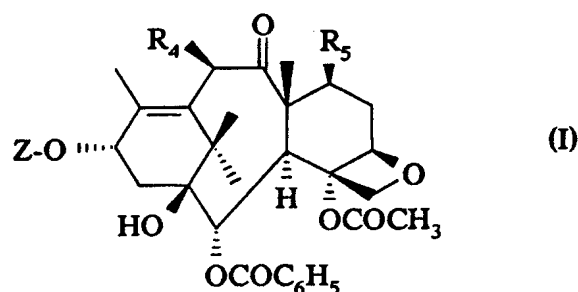
Agent (batch)	Dosage in mg/kg per injection	Schedule in days	T-C in days	log cell kill total	Complete regressions	Comments
Product of formula Ia	32.2	14,17,20	-	-	-	Toxic (1/5 DD)
	20.0		-	-	5/5	HNTD highly active (5/5 TFS)
	12.4		-	-	5/5	Highly active (4/5 TFS)
	7.7		25.0	2.7	2/5	Active
Docetaxel	32.2	14,17,20	-	-	-	Toxic 20.6% bwl
	20.0		29.1	3.1	0/5	HNTD highly active
	12.4		6.1	0.7	0/5	Marginal activity
	7.7		2.5	0.3	0/5	Inactive

Median time for tumor to reach 1000 mg in control = 18.5 days.

Abbreviations used: HNTD = highest nontoxic dose, bwl = body weight loss, DD = drug death, TFS = tumor free survivors observed on day 139.

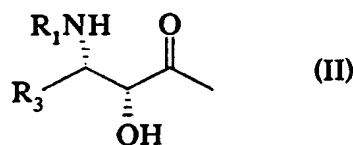
CLAIMS

- 1 - Use of a compound of formula (I) for preparing a medicine for treating abnormal cell proliferation of cell lines expressing the multidrug resistance P-glycoprotein, said use comprising administration to a mammal of an effective amount of a compound of
- 5 formula (I) or a pharmaceutically acceptable salt or solvate.



in which:

Z represents a hydrogen atom or a radical of general formula :



10 in which :

R₁ represents

a benzoyl radical optionally substituted with one or more identical or different atoms or radicals chosen from halogen atoms and alkyl radicals containing 1 to 4 carbon atoms, alkoxy radicals containing 1 to 4 carbon atoms or trifluoromethyl

15 radicals,

a thenoyl or furoyl radical or

a radical R₂-O-CO- in which R₂ represents :

an alkyl radical containing 1 to 8 carbon atoms,

an alkenyl radical containing 2 to 8 carbon atoms,

20

an alkynyl radical containing 3 to 8 carbon atoms,

a cycloalkyl radical containing 3 to 6 carbon atoms,

a cycloalkenyl radical containing 4 to 6 carbon atoms or

a bicycloalkyl radical containing 7 to 10 carbon atoms,

these radicals being optionally substituted with one or more substituents chosen from halogen atoms and hydroxyl radicals, alkoxy radicals containing 1 to 4 carbon atoms, dialkylamino radicals in which each alkyl portion contains 1 to 4
5 carbon atoms, piperidino or morpholino radicals, 1-piperazinyl radicals (optionally substituted at position 4 with an alkyl radical containing 1 to 4 carbon atoms or with a phenylalkyl radical in which the alkyl portion contains 1 to 4 carbon atoms), cycloalkyl radicals containing 3 to 6 carbon atoms, cycloalkenyl radicals containing 4 to 6 carbon atoms, phenyl radicals (optionally substituted with one or more atoms or
10 radicals chosen from halogen atoms and alkyl radicals containing 1 to 4 carbon atoms or alkoxy radicals containing 1 to 4 carbon atoms), cyano or carboxyl radicals or alkoxycarbonyl radicals in which the alkyl portion contains 1 to 4 carbon atoms,

- a phenyl or α - or β -naphthyl radical optionally substituted with one or more atoms or radicals chosen from halogen atoms and alkyl radicals containing 1 to 4
15 carbon atoms or alkoxy radicals containing 1 to 4 carbon atoms, or

- a 5-membered aromatic heterocyclic radical preferably chosen from furyl and thienyl radicals,

- or a saturated heterocyclic radical containing 4 to 6 carbon atoms, optionally substituted with one or more alkyl radicals containing 1 to 4 carbon atoms,

20 R_3 represents

an unbranched or branched alkyl radical containing 1 to 8 carbon atoms,

an unbranched or branched alkenyl radical containing 2 to 8 carbon atoms,

an unbranched or branched alkynyl radical containing 2 to 8 carbon atoms,

a cycloalkyl radical containing 3 to 6 carbon atoms,

25 a phenyl or α - or β -naphthyl radical optionally substituted with one or more atoms or radicals chosen from halogen atoms and alkyl, alkenyl, alkynyl, aryl, aralkyl, alkoxy, alkylthio, aryloxy, arylthio, hydroxyl, hydroxyalkyl, mercapto, formyl, acyl, acylamino, aroylamino, alkoxycarbonylamino, amino, alkylamino, dialkylamino, carboxyl, alkoxycarbonyl, carbamoyl, alkylcarbamoyl,
30 dialkylcarbamoyl, cyano, nitro and trifluoromethyl radicals,

or a 5-membered aromatic heterocycle containing one or more identical or different hetero atoms chosen from nitrogen, oxygen and sulphur atoms and optionally substituted with one or more identical or different substituents chosen from halogen atoms and alkyl, aryl, amino, alkylamino, dialkylamino, alkoxy-carbonylamino, acyl, arylcarbonyl, cyano, carboxyl, carbamoyl, alkylcarbamoyl, dialkylcarbamoyl or alkoxy-carbonyl radicals,

on the understanding that, in the substituents of the phenyl, α - or β -naphthyl and aromatic heterocyclic radicals, the alkyl radicals and the alkyl portions of the other radicals contain 1 to 4 carbon atoms, and that the alkenyl and alkynyl radicals contain 2 to 8 carbon atoms, and that the aryl radicals are phenyl or 1- or 9-naphthyl radicals,

R_4 represents

an alkoxy radical containing 1 to 6 carbon atoms in an unbranched or branched chain,

an alkenyloxy radical containing 3 to 6 carbon atoms in an unbranched or branched chain,

an alkynyloxy radical containing 3 to 6 carbon atoms in an unbranched or branched chain,

a cycloalkyloxy radical containing 3 to 6 carbon atoms or

a cycloalkenyloxy radical containing 4 to 6 carbon atoms,

these radicals being optionally substituted with one or more halogen atoms or with an alkoxy radical containing 1 to 4 carbon atoms, an alkylthio radical containing 1 to 4 carbon atoms or a carboxyl radical, an alkyloxycarbonyl radical in which the alkyl portion contains 1 to 4 carbon atoms, a cyano or carbamoyl radical or an N-alkylcarbamoyl or N,N-dialkylcarbamoyl radical in which each alkyl portion contains 1 to 4 carbon atoms or, with the nitrogen atom to which it is linked, forms a saturated 5- or 6-membered heterocyclic radical optionally containing a second hetero atom chosen from oxygen, sulphur or nitrogen atoms, optionally substituted with an alkyl radical containing 1 to 4 carbon atoms or a phenyl radical or a phenylalkyl radical in which the alkyl portion contains 1 to 4 carbon atoms,

R₅ represents

an alkoxy radical containing 1 to 6 carbon atoms in an unbranched or branched chain,

an alkenyloxy radical containing 3 to 6 carbon atoms,

5 an alkyloxy radical containing 3 to 6 carbon atoms,

a cycloalkyloxy radical containing 3 to 6 carbon atoms or

a cycloalkenyloxy radical containing 3 to 6 carbon atoms,

these radicals being optionally substituted with one or more halogen atoms or with an alkoxy radical containing 1 to 4 carbon atoms, an alkylthio radical containing 10 2 to 4 carbon atoms or a carboxyl radical, an alkyloxycarbonyl radical in which the alkyl portion contains 1 to 4 carbon atoms, a cyano or carbamoyl radical or an N-alkylcarbamoyl or N,N-dialkylcarbamoyl radical in which each alkyl portion contains 1 to 4 carbon atoms or, with the nitrogen atom to which it is linked, forms a saturated 5- or 6-membered heterocyclic radical optionally containing a second hetero 15 atom chosen from oxygen, sulphur or nitrogen atoms, optionally substituted with an alkyl radical containing 1 to 4 carbon atoms or a phenyl radical or a phenylalkyl radical in which the alkyl portion contains 1 to 4 carbon atoms.

2 - Use of compound according to claim 1 wherein Z represents a hydrogen atom or a radical of general formula (II) in which R₁ represents a benzoyl radical or a radical 20 R₂-O-CO- in which R₂ represents a tert-butyl radical and R₃ represents an alkyl radical containing 1 to 6 carbon atoms, an alkenyl radical containing 2 to 6 carbon atoms, a cycloalkyl radical containing 3 to 6 carbon atoms, a phenyl radical optionally substituted with one or more identical or different atoms or radicals chosen from halogen atoms and alkyl, alkoxy, dialkylamino, acylamino, alkoxy-carbonylamino or 25 trifluoromethyl radical, or a 2- or 3-furyl, 2- or 3-thienyl or 2-, 4- or 5-thiazolyl radical, and R₄ and R₅, which may be identical or different, each represent an unbranched or branched alkyloxy radical containing 1 to 6 carbon atoms.

3 - Use of a compound according to claim 2 wherein Z represents a hydrogen atom or a radical of general formula (II) in which R₁ represents a benzoyl radical or a radical

R₂-O-CO- in which R₂ represents a tert-butyl radical and R₃ represents an isobutyl, isobutenyl, butenyl, cyclohexyl, phenyl, 2-furyl, 3-furyl, 2-thienyl, 3-thienyl, 2-thiazolyl, 4-thiazolyl or 5-thiazolyl radical, and R₄ and R₅, which may be identical or different, each represent a methoxy, ethoxy or propoxy radical.

5 4 - Use of 4 α -acetoxy-2 α -benzoyloxy-5 β ,20-epoxy-1 β -hydroxy-7 β ,10 β -dimethoxy-9-oxo-11-taxen-13 α -yl (2R,3S)-3-tert-butoxycarbonylamino-2-hydroxy-3-phenyl-propionate. for preparing a medicine for treating abnormal cell proliferation of cell lines expressing the multidrug resistance P-glycoprotein.

10 5 - Use of compound according to claims 1 to 4 for preparing a medicine usable to treat colon cancer.

6 - Use of compound according to claim 5 wherein this use is performed concurrently with at least other therapeutic treatment.

15 7 - Use of compound according to claim 6 wherein the other therapeutic treatment comprises antineoplastic drugs, monoclonal antibodies, immunotherapies, radiotherapies, or biological response modifiers.

8 - Use of compound according to claim 1 wherein the medicine is administered by parenteral administration.

20 9 - Use of compound of any of the claims 1 to claim 8 wherein the compound of formula (I) is administered by intravenous, intraperitoneal, intramuscular or subcutaneous administration.

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
15 June 2006 (15.06.2006)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2006/062811 A2

(51) International Patent Classification: **Not classified**

Sridaran [IN/US]; 118 Heritage Avenue, Ashland, Massachusetts 01721 (US). **AUGUST, Paul** [US/US]; 13 Hollow Tree Road, Boxford, Massachusetts 01921 (US).

(21) International Application Number:
PCT/US2005/043578

(74) Agents: **KRUPEN, Karen, I.** et al.; Sanofi-Aventis, Route 202-206, P.O. Box 6800, Bridgewater, New Jersey 08807-0800 (US).

(22) International Filing Date:
1 December 2005 (01.12.2005)

(25) Filing Language: English

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

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/634,298 8 December 2004 (08.12.2004) US

(71) Applicant (for all designated States except US): **AVENTIS PHARMACEUTICALS INC.** [US/US]; 300 Somerset Corporate Boulevard, Bridgewater, New Jersey 08807-2854 (US).

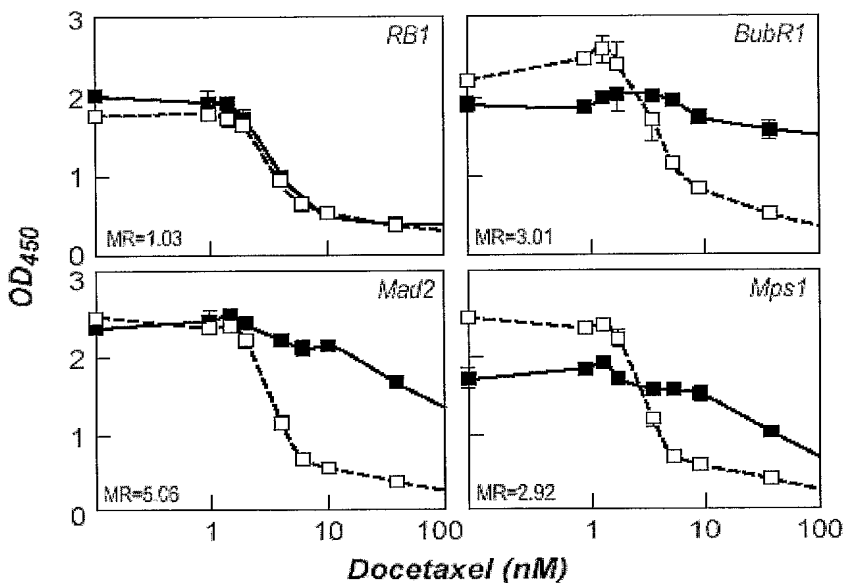
(72) Inventors; and

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT,

(75) Inventors/Applicants (for US only): **GRUENEBERG, Dorre** [US/US]; 58 Oak Cliff Road, Newtonville, Massachusetts 02460 (US). **HUANG, Xi** [CN/US]; 47 Lennon Road, Arlington, Massachusetts 02474 (US). **NATESAN,**

[Continued on next page]

(54) Title: METHOD FOR MEASURING RESISTANCE OR SENSITIVITY TO DOCETAXEL



(57) Abstract: The present invention relates to novel and useful methods that predict or monitor a patient's response to a molecule of the taxoid family by measuring the increase or decrease of specific genetic markers as compared to controls. The present invention also provides kits that predict or monitor patient's response to a molecule of the taxoid family by measuring nucleic acid or protein levels of particular genetic markers and comparing their levels to controls or reference markers.

WO 2006/062811 A2



RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

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

Declarations under Rule 4.17:

- *as to the applicant's entitlement to claim the priority of the earlier application (Rule 4.17(iii))*
- *of inventorship (Rule 4.17(iv))*

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

METHOD FOR MEASURING RESISTANCE OR SENSITIVITY TO DOCETAXEL

FIELD OF THE INVENTION

5

The present invention relates to novel, useful and heretofore unknown methods that may predict or monitor a patient's response to a molecule of the taxoid family by measuring the increase or decrease of specific genetic markers as compared to controls. The present invention also provides kits that predict or monitor patients' response to a molecule of the taxoid family by measuring nucleic acid or protein levels of particular genetic markers and comparing their levels to controls or reference markers.

BACKGROUND OF THE INVENTION

15

Docetaxel is an anti-mitotic drug widely used for the treatment of breast, lung and ovarian cancer, and to a lesser extent used for treating head and neck, gastric and prostate carcinomas (Hong, *Oncology* 16:9, 2002). Docetaxel inhibits microtubule dynamics by binding to beta-tubulin and blocking disassembly of alpha- and beta-tubulin heterodimers thus abrogating tumor growth (Ringel and Horwitz, *J Natl Cancer Inst* 83:288, 1991). The anti-tumor activities of docetaxel and a related taxane, paclitaxel arise from targeting microtubules of the mitotic spindle to impede chromosome alignment and segregation, block cell cycle progression and activate apoptosis pathways (Wang *et al.*, *Cancer* 88:2619, 2000). The proapoptotic activities of paclitaxel have been linked with the phosphorylation and inactivation of Bcl-2 through cell signaling events that involve p53/p21waf1/Cip1, raf/ras and mitogen-activated protein kinases (MAPKs) (Wang *et al.*, *Cancer* 88:2619, 2000). Although docetaxel is a more potent anti-cancer agent than paclitaxel, the pathways involved in its cytotoxicity are less well defined (Katsumata, *Br J Cancer* 89:S9, 2003). Docetaxel-induced apoptosis has been observed in select cell lines through a mechanism involving Bcl-2 phosphorylation and caspase-3 activation (Kolfshoten *et al.*, *Biochem Pharmacol* 63:733, 2002). Other proteins that modulate taxane-induced cell killing in different cultured lines include Aurora-A in HeLa cells (Anand *et al.*, *Cancer Cell* 3:51, 2003), HER-2 in breast cancer cells (Tanabe *et al.*, *Int J Oncol* 22:875, 2003), p21waf1/Cip1 in glioblastoma cells (Li

20
25
30

et al., *J Biol Chem* 277:11352, 2002) and JNK/MKK1 in ovarian cancer cells (Lee *et al.*, *J Biol Chem* 273:28253, 1998).

There remains a need in the field to identify drugable proteins that mediate docetaxel
5 resistance, which could lead to their utilization in drug discovery to identify reagents (small
molecules, siRNA, etc.) that abrogate their in vivo function and potentially sensitize cells to
anti-tumor drug chemotherapy. There also remains a need in the field for an assay which
could confidently predict in advance of chemotherapy treatment which patients would and
would not respond to anti-tumor docetaxel drug based chemotherapy. Applicants describe
10 herein a novel assay that can predict resistance and or sensitivity to docetaxel and provide
screening assays for the development of new therapies to abrogate drug resistance in cancer.

SUMMARY OF THE INVENTION

15 In accordance with the present invention, there is provided novel and useful methods
to monitor and/or predict a patient's response to a molecule of the taxoid family by comparing
the levels of activation and/or expression of specific genetic markers in patients and controls.

20 In one embodiment, the present invention provides a method for predicting or
monitoring a cancer patient's response to a molecule of the taxoid family, comprising the
steps of:

- a) obtaining a test sample from a cancerous area of said patient;
- b) obtaining a control sample;
- 25 c) measuring the level of one or more genetic markers; and
- d) comparing the measured levels of said one or more genetic markers in the test
sample and the control sample;

wherein a decrease in the level of said one or more genetic markers measured in the
test sample as compared to the control sample indicates an increased resistance to a molecule
30 of the taxoid family.

Particular genetic markers provided in this aspect of the present invention include:

BubR1, Homo sapiens similar to protein kinase (BUBR1) mRNA, complete cds (GenBank accession number: AF046079);

Mad2, Homo sapiens mRNA for MAD2 protein (GenBank accession number: AJ000186);

5 Mps1, Homo sapiens TTK protein kinase (TTK), mRNA (GenBank accession number: NM_003318);

GEFT for Rac1/CDC42, Homo sapiens RAC/CDC42 exchange factor (GEFT), transcript variant 2, mRNA (GenBank accession number: NM_133483);

10 Bub1, Homo sapiens BUB1 budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog (yeast) (BUB1), mRNA (GenBank accession number: NM_004336);

hSepharse, Homo sapiens extra spindle poles like 1 (*S. cerevisiae*) (ESPL1), mRNA (GenBank accession number: NM_012291);

CamKIId, Homo sapiens calcium/calmodulin-dependent protein kinase (CaM kinase) II delta (CAMK2D), transcript variant 3, mRNA (GenBank accession number: NM_001221);

15 CDK6, Homo sapiens cyclin-dependent kinase 6 (CDK6), mRNA (GenBank accession number: NM_001259); and

GRB2, Homo sapiens growth factor receptor-bound protein 2 (GRB2), transcript variant 1, mRNA (GenBank accession number: NM_002086).

20 In another embodiment, the present invention relates to a method for predicting or monitoring a cancer patient's response to a molecule of the taxoid family, comprising the steps of:

- a) obtaining a test sample from a cancerous area of said patient;
- b) obtaining a control sample;
- 25 c) measuring the level of one or more genetic markers; and
- d) comparing the measured levels of said one or more genetic markers in the test sample and the control sample;

wherein a decrease in the level of said one or more genetic markers measured in the test sample as compared to the control sample indicates an increased sensitivity to a molecule
30 of the taxoid family.

In this particular aspect of the invention one or more genetic markers may be selected from the group consisting of:

P21(Waf1), Homo sapiens cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1) (CDKN1A), transcript variant 1, mRNA (GenBank accession number: NM_000389);

Pim-1, Homo sapiens pim-1 oncogene (PIM1), mRNA (GenBank accession number: NM_002648);

5 GBP-1, Homo sapiens guanylate binding protein 1, interferon-inducible, 67kDa (GBP1), mRNA (GenBank accession number: NM_002053);

RXRA, Homo sapiens retinoid X receptor, alpha (RXRA), mRNA (GenBank accession number: NM_002957);

10 SPF45, Homo sapiens RNA binding motif protein 17 (RBM17), mRNA (GenBank accession number: NM_032905);

Hec1, Homo sapiens kinetochore associated 2 (KNTC2), mRNA (GenBank accession number: NM_006101);

Raf1, Human mRNA for raf oncogene (GenBank accession number: X03484);

15 Aurora A, Homo sapiens aurora-related kinase 1 (ARK1) mRNA, complete cds (GenBank accession number: AF008551);

TACC3, Homo sapiens transforming, acidic coiled-coil containing protein 3 (TACC3), mRNA (GenBank accession number: NM_006342);

20 RelB, Homo sapiens v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog B, nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 3 (avian) (RELB), mRNA (GenBank accession number: NM_006509);

PRKCD, Homo sapiens protein kinase C, delta (PRKCD), transcript variant 1, mRNA (GenBank accession number: NM_006254);

BRAF35, Homo sapiens high-mobility group 20B (HMG20B), mRNA (GenBank accession number: NM_006339);

25 HSPA1L, Homo sapiens heat shock 70kDa protein 1A (HSPA1A), mRNA (GenBank accession number: NM_005345);

STK11, Homo sapiens serine/threonine kinase 11 (Peutz-Jeghers syndrome) (STK11), mRNA (GenBank accession number: NM_000455); and

30 MKK3, Homo sapiens MAP kinase kinase 3 (MKK3) mRNA, complete cds (GenBank accession number: L36719).

In yet a further embodiment, the present invention relates to a method for predicting or monitoring a cancer patient's response to a molecule of the taxoid family, comprising the steps of:

a) obtaining a test sample from a cancerous area of said patient;

5 b) measuring the level of one or more genetic markers selected from the group consisting of:

BubR1, Homo sapiens similar to protein kinase (BUBR1) mRNA, complete cds (GenBank accession number: AF046079);

10 Mad2, Homo sapiens mRNA for MAD2 protein (GenBank accession number: AJ000186);

Mps1, Homo sapiens TTK protein kinase (TTK), mRNA (GenBank accession number: NM_003318);

GEFT for Rac1/CDC42, Homo sapiens RAC/CDC42 exchange factor (GEFT), transcript variant 2, mRNA (GenBank accession number: NM_133483);

15 Bub1, Homo sapiens BUB1 budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog (yeast) (BUB1), mRNA (GenBank accession number: NM_004336);

hSepharase, Homo sapiens extra spindle poles like 1 (*S. cerevisiae*) (ESPL1), mRNA (GenBank accession number: NM_012291);

20 CamKIID, Homo sapiens calcium/calmodulin-dependent protein kinase (CaM kinase) II delta (CAMK2D), transcript variant 3, mRNA (GenBank accession number: NM_001221);

CDK6, Homo sapiens cyclin-dependent kinase 6 (CDK6), mRNA (GenBank accession number: NM_001259); and

GRB2, Homo sapiens growth factor receptor-bound protein 2 (GRB2), transcript variant 1, mRNA (GenBank accession number: NM_002086)

25 c) measuring the level of one or more reference genetic markers selected from the group consisting of:

GAPDH, Homo sapiens glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPD), mRNA (GenBank accession number: NM_002046); and

30 RPS9, Homo sapiens cDNA clone IMAGE:6647283, partial cds (GenBank accession number: BC071941);

d) comparing the measured levels of said one or more genetic markers and said one or more reference genetic markers in the test sample;

wherein a decrease in the level of said one or more genetic markers as compared to the level of said one or more reference genetic markers indicates an increased resistance to a molecule of the taxoid family.

5 Still yet a further embodiment of the present invention relates to a method for predicting or monitoring a cancer patient's response to a molecule of the taxoid family, comprising the steps of:

a) obtaining a test sample from a cancerous area of said patient;

b) measuring the level of one or more genetic markers selected from the group

10 consisting of:

P21(Waf1), Homo sapiens cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1) (CDKN1A), transcript variant 1, mRNA (GenBank accession number: NM_000389);

Pim-1, Homo sapiens pim-1 oncogene (PIM1), mRNA (GenBank accession number: NM_002648);

15 GBP-1, Homo sapiens guanylate binding protein 1, interferon-inducible, 67kDa (GBP1), mRNA (GenBank accession number: NM_002053);

RXRA, Homo sapiens retinoid X receptor, alpha (RXRA), mRNA (GenBank accession number: NM_002957);

20 SPF45, Homo sapiens RNA binding motif protein 17 (RBM17), mRNA (GenBank accession number: NM_032905);

Hec1, Homo sapiens kinetochore associated 2 (KNTC2), mRNA (GenBank accession number: NM_006101);

Raf1, Human mRNA for raf oncogene (GenBank accession number: X03484);

25 Aurora A, Homo sapiens aurora-related kinase 1 (ARK1) mRNA, complete cds (GenBank accession number: AF008551);

TACC3, Homo sapiens transforming, acidic coiled-coil containing protein 3 (TACC3), mRNA (GenBank accession number: NM_006342);

30 RelB, Homo sapiens v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog B, nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 3 (avian) (RELB), mRNA (GenBank accession number: NM_006509);

PRKCD, Homo sapiens protein kinase C, delta (PRKCD), transcript variant 1, mRNA (GenBank accession number: NM_006254);

BRAF35, Homo sapiens high-mobility group 20B (HMG20B), mRNA (GenBank accession number: NM_006339);

HSPA1L, Homo sapiens heat shock 70kDa protein 1A (HSPA1A), mRNA (GenBank accession number: NM_005345);

5 STK11, Homo sapiens serine/threonine kinase 11 (Peutz-Jeghers syndrome) (STK11), mRNA (GenBank accession number: NM_000455); and

MKK3, Homo sapiens MAP kinase kinase 3 (MKK3) mRNA, complete cds (GenBank accession number: L36719);

10 c) measuring the level of one or more reference genetic markers selected from the group consisting of:

GAPDH, Homo sapiens glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPD), mRNA (GenBank accession number: NM_002046); and

RPS9, Homo sapiens cDNA clone IMAGE:6647283, partial cds (GenBank accession number: BC071941);

15 d) comparing the measured levels of said one or more genetic markers and said one or more reference genetic markers in the test sample;

wherein a decrease in the level of said one or more genetic markers as compared to the level of said one or more reference genetic markers indicates an increased susceptibility to a molecule of the taxoid family.

20

The present invention relates to methods for predicting or monitoring a cancer patient's response to a molecule of the taxoid family. This, a further embodiment of the present inventions includes the taxoid family molecules paclitaxel, docetaxel XRP9881 and XRP6258

25

The genetic markers described in the present inventions may be evaluated by measuring the levels of RNA, DNA or protein using a variety of techniques that are described in further detail below. Other embodiments of the present invention relate to kits for predicting or monitoring a patient's response to a molecule of the taxoid family.

30

The above aspects and other aspects, features, and advantages of the present invention will be better understood from the following detailed description taken in conjunction with the accompanying figures.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

5 Figure 1 shows the characterization of genes whose downregulation confer docetaxel resistance. Docetaxel generated dose response curves shown for HCT116 cells transfected with RB1, BubR1, Mad2 and Mps1 siRNAs (solid squares) compared to control siRNA (open squares). RB1 was an example of a siRNA that did not score in the screen. Cell viability was measured at an absorbance of 450 nM following WST-1 addition. The minimum ratio (MR) is
10 the WST-1 value for a gene over the control at 40 nM docetaxel.

Figure 2 shows dose response curves of BubR1 and Mps1 shRNAs (solid squares) compared to control shRNA (open squares).

15 Figure 3 shows TaqMan real-time PCR analysis of BubR1 and Mps1 mRNA levels in cells containing BubR1 and Mps1 shRNA, respectively.

Figure 4 shows cell viability and morphology shown for HCT116 cells transfected with Mad2, BubR1 and Mps1 siRNAs with or without docetaxel treatment. Twenty-four hours after
20 transfection, cells were left untreated (-Docetaxel) or treated with 200 nM docetaxel (+Docetaxel) and stained with Calcein-AM to visualize live cells 16 and 72 hours after treatment.

Figure 5 shows mitotic indices for HCT116 cells transfected with Mad2, BubR1, Mps1 and
25 control siRNAs following docetaxel treatment. Twenty-four hours after transfection cells were treated with 200 nM docetaxel for 16 and 72 hours and processed. Mitotic cells were detected by a phosphorylated histone H3 antibody, shown here as red punctuate staining over the nucleus of cells (Mitotic Index Kit, Cellomics). Nuclei were stained blue with Hoechst dye.

30 Figure 6 shows TaqMan real-time PCR analysis of Mps1, BubR1 and Mad2 mRNA levels in HCT116 cells transfected with Mps1, BubR1 and Mad2 siRNA, respectively.

Figure 7 shows cell cycle analysis of HCT116 cells transfected with three mitotic checkpoint gene siRNAs. After transfection with Mps1, BubR1 and Mad2 siRNAs, cells were untreated (-Docetaxel) or treated with 200 nM docetaxel (+Docetaxel) for 24 hours. Seventy-two hours after the addition of docetaxel, cells were harvested and analyzed for cell cycle. Numbers
5 above peaks indicate DNA content such as 2N, 4N, 8N, 16N or 32N.

Figure 8 shows clonogenic cell survival assay using stable knockdown cell lines. HCT116 cells containing BubR1 or vector control shRNAs were plated on 10 cm dishes and maintained in 5 nM docetaxel for 10 days. Colonies were washed with PBS and stained with
10 crystal violet.

Figure 9 shows several dose response curves of genes whose down-regulation confer increased sensitivity to docetaxel. Docetaxel generated dose response curves shown for HCT116 cells transfected with RB1, Pim-1, p21, Aurora A and TACC3 siRNAs (solid
15 squares) compared to control siRNA (open squares). The minimum ration (MR) is the ratio of WST-1 readout of a gene over that of the control at 40 nM docetaxel concentration. The IC50 (IR) ratio is the ratio of IC50 of a gene over that of the control.

Figure 10 shows a dose response curves of Aurora A shRNA (solid squares) compared to
20 vector control (open squares).

Figure 11 shows TaqMan real-time PCR analysis of Aurora A mRNA levels in cells containing Aurora A shRNA.

25 Figure 12 shows differences in proliferation of HCT116 cells transfected with Pim-1 and TACC3 siRNAs (solid squares) compared to control siRNA (open squares). Number of cells remaining in 6-well plates at different time points after transfection with Pim-1, TACC3 and control siRNAs.

30 Figure 13 shows TaqMan analysis of Pim-1 and TACC3 mRNA levels after siRNA transfection.

Figure 14 shows active caspase-3 levels in HCT116 cells transfected with Pim-1 and BubR1 siRNAs. Active caspase-3 levels were shown as fluorescent intensity using the active caspase-3 beadmates kit (Upstate). Three docetaxel concentrations, 0, 5 and 40 nM, and three time points, 24, 48 and 72 hours after docetaxel addition were examined.

5

Figure 15 shows AKT phosphorylation levels in HCT116 cells transfected with Pim-1 and BubR1 siRNAs. The ratio of phosphorylated and total AKT levels was determined using a bead-based assay (Biosource). Twenty-four hours after transfection cells were left untreated or treated with 5 and 40 nM docetaxel. Forty-eight hours after docetaxel treatment cells lysates were analyzed. The phosphorylation level was calculated as the ratio of phosphorylated AKT (p-AKT) over total AKT (t-AKT).

10

Figure 16 shows Western blots showing the reduced levels of Pim-1 and BubR1 48 hours after transfection.

15

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

The present invention is broadly based upon applicants' identification of gene markers that can predict whether a test subject is resistant or sensitive to drugs in the taxoid family. Using a cell-based RNA interference (RNAi) screen, applicants observed that drug resistance or sensitivity to docetaxel was associated with particular gene markers.

20

It is noted that numerous terms and phrases are used throughout the instant specification and claims. Definitions of these terms and phrases are provided below:

25

As used herein, the term "prognosis" refers to the prediction or the likelihood of cancer-attributable death or progression, including drug resistance as well as recurrence, metastatic spread, and neoplastic disease.

30

As used herein, the term "prediction" refers to the likelihood that a patient will respond either favorably or unfavorably to a drug or set of drugs, and also the extent of those

responses Such as whether the patient will survive, following surgical removal of the primary tumor and/or chemotherapy for a certain period of time without cancer recurrence. Predictive methods envisioned by the present invention can be used clinically to make treatment decisions by choosing the most appropriate treatment modalities, in particular a
5 chemotherapeutic of the taxoid family, for any particular patient. The predictive methods of the present invention are valuable tools in predicting if a patient is likely to respond favorably to a treatment regimen, such as chemotherapy with a given drug or drug combination, and/or radiation therapy, or whether long-term survival of the patient following termination of chemotherapy or other treatment modalities is likely.

10

As used herein, the term "tumor," refers to all neoplastic cell growth and proliferation, whether malignant or benign, and all pre-cancerous and cancerous cells and tissues.

As used herein, the term "cancer" and "cancerous" refers to a physiological condition
15 in mammals typically characterized by unregulated cell growth. Examples of cancer include but are not limited to the following: breast cancer; colon cancer; lung cancer; prostate cancer; hepatocellular cancer; gastric cancer; pancreatic cancer; cervical and ovarian cancer; liver cancer; bladder cancer; cancer of the urinary tract; carcinoma; melanoma; brain cancer including glioblastomas and medulloblastomas; biliary tract cancer; choriocarcinoma;
20 esophageal cancer; gastric cancer; hematological neoplasms including acute lymphocytic and myelogenous leukemia; multiple myeloma; AIDS-associated leukemia and adult T-cell leukemia lymphoma; intraepithelial neoplasms including Bowen's disease and Paget's disease; lymphomas including Hodgkin's disease and lymphocytic lymphomas; neuroblastomas; oral cancer including squamous cell carcinoma, sarcomas including leiomyosarcoma,
25 rhabdomyosarcoma, liposarcoma, fibrosarcoma, and osteosarcoma; skin cancer including melanoma, Kaposi's sarcoma, basocellular cancer, and squamous cell cancer; testicular cancer including germinal tumors such as seminoma, non-seminoma (teratomas, choriocarcinomas), stromal tumors, and germ cell tumors; thyroid cancer including thyroid adenocarcinoma and modullar carcinoma; and renal cancer including adenocarcinoma and Wilms tumor..

30

As used herein, the term "patient" refers preferably to a human but may also include a non-human primate, cow, horse, pig, sheep, goat, dog, cat or rodent. Preferably the subject is a human either suspected of having cancer, or having been diagnosed with cancer or in a high-

risk category for developing cancer, for example, having a family history of cancer. In a preferred embodiment of the invention the cancer is breast cancer. Methods for identifying subjects suspected of having cancer may include manual examination, biopsy, subject's family medical history, subject's medical history, or a number of imaging technologies such as mammography, magnetic resonance imaging, magnetic resonance spectroscopy, or positron emission tomography. Diagnostic methods for cancer and the clinical characterizations of cancer diagnoses are well-known to those of skill in the medical arts.

As used herein, the term "sample" is tissue obtained using methods well-known to those of ordinary skill in the related medical arts. Methods such as biopsy include gross apportioning of a mass, microdissection, laser-based microdissection, or other art-known cell-separation methods. Because of the variability of the cell types in diseased-tissue biopsy material, and the variability in sensitivity of the diagnostic methods used, the sample size required for analysis may range from 1, 10, 50, 100, 200, 300, 500, 1000, 5000, 10,000, to 50,000 or more cells. The appropriate sample size may be determined based on the cellular composition and condition of the biopsy and the standard preparative steps for this determination and subsequent isolation of the nucleic acid for use in the invention are well known to one of ordinary skill in the art. For example, a sample from a biopsy may be sufficient for assessment of RNA expression without amplification. Conversely, the lack of a suitable number of cells in a small biopsy region may require use of RNA conversion and/or amplification methods or other methods to enhance resolution of the nucleic acid molecules. Such methods, which allow use of limited biopsy materials, are well known to those of ordinary skill in the art. Some examples include but are not limited to direct RNA amplification, reverse transcription of RNA to cDNA, amplification of cDNA, or the generation of radio-labeled nucleic acids.

As used herein, the term "test" with respect to a sample refers to a sample taken from a cancerous area of the body or from an area of the body exhibiting a stage of or characteristics of cancer.

As used herein, the term "control" with respect to a sample refers to samples which are used for comparative purposes. Preferably, these samples are "control" in the sense that the samples do not exhibit any indication of, or are believed to have, any disease or condition that would affect gene expression, particularly in respect of the disease for which they are to be

used as the standard. Alternatively, it may be appreciated that different stages of a disease or condition can be compared and in such cases, the "control" sample corresponds to the earlier stage of the disease or condition. For example, a control sample can be a sample taken from a non-cancerous but comparable area of the body. Additionally, a control sample may be a comparable area of the body from the same subject or a non-cancerous area of the body from a second subject substantially similar to the first subject (same or similar species, age, weight, sex, etc.). Finally, a control sample could also be from a cancerous area of a second subject who respond well to treatment using a molecule of the taxoid family.

A "nucleic acid molecule" refers to the phosphate ester polymeric form of ribonucleosides (adenosine, guanosine, uridine or cytidine; "RNA molecules") or deoxyribonucleosides (deoxyadenosine, deoxyguanosine, deoxythymidine, or deoxycytidine; "DNA molecules"), or any phosphoester analogs thereof, such as phosphorothioates and thioesters, in either single stranded form, or a double-stranded helix. Double stranded DNA-DNA, DNA-RNA and RNA-RNA helices are possible. The term nucleic acid molecule, and in particular DNA or RNA molecule, refers only to the primary and secondary structure of the molecule, and does not limit it to any particular tertiary forms. Thus, this term includes double-stranded DNA found, *inter alia*, in linear or circular DNA molecules (*e.g.*, restriction fragments), plasmids, and chromosomes. In discussing the structure of particular double-stranded DNA molecules, sequences may be described herein according to the normal convention of giving only the sequence in the 5' to 3' direction along the non-transcribed strand of DNA (*i.e.*, the strand having a sequence homologous to the mRNA). A "recombinant DNA molecule" is a DNA molecule that has undergone a molecular biological manipulation.

As used herein, the term "portion" of an isolated nucleic acid molecule that encodes for a particular protein, refers to a part or fragment of the isolated nucleic acid molecule that comprises a sufficient number of contiguous nucleotides that encode for a peptide or polypeptide. Naturally, a "portion" of an isolated nucleic acid molecule is greater than one nucleotide, and the peptide or polypeptide encoded by the portion contains numerous amino acid residues, as described in the definitions of peptide and polypeptide below.

As used herein, the term "peptide" refers to two or more amino acids covalently joined by peptide binds. In a particular embodiment, a peptide comprises at least 10, preferably at least 20, more preferably at least 30, even more preferably at least 40, and most preferably 50 or more amino acids.

As used herein, the term “polypeptide” refers to a linear polymer composed of multiple contiguous amino acids. In particular, a polypeptide may possess a molecular weight greater than 100 kD.

5 As used herein, the term “genetic marker” refers to a physiological composition whose measured RNA, DNA or protein level within a sample serves to predict whether a test subject is resistant or sensitive to drugs in the taxoid family. Moreover, a genetic marker may encode the particular protein or alternatively, may serve as a “surrogate” marker for a protein whose activity is related to the level of the genetic marker in a bodily sample. This relationship may be direct, wherein
10 a decrease in the level of protein activity corresponds to a decrease in the level of the genetic marker, or alternatively, the relationship may be inverse, wherein a decrease in the level of protein activity corresponds to an increase in the level of the genetic marker. Such physiological compositions include, but certainly are not limited to, cells (e.g., progenitor stem cells) proteins, polypeptides, DNA, RNA, carbohydrates, or fatty acids, to name only a few. In a particular embodiment of the present
15 invention, the measured levels of certain gene markers can predict whether a test subject is resistant or sensitive to drugs in the taxoid family. Examples of such genetic markers include, but certainly are not limited to:

BubR1, Homo sapiens similar to protein kinase (BUBR1) mRNA, complete cds
(GenBank accession number: AF046079);

20 Mad2, Homo sapiens mRNA for MAD2 protein (GenBank accession number:
AJ000186);

Mps1, Homo sapiens TTK protein kinase (TTK), mRNA (GenBank accession number:
NM_003318);

25 GEFT for Rac1/CDC42, Homo sapiens RAC/CDC42 exchange factor (GEFT),
transcript variant 2, mRNA (GenBank accession number: NM_133483);

Bub1, Homo sapiens BUB1 budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog (yeast)
(BUB1), mRNA (GenBank accession number: NM_004336);

hSepharase, Homo sapiens extra spindle poles like 1 (*S. cerevisiae*) (ESPL1), mRNA
(GenBank accession number: NM_012291);

30 CamKIID, Homo sapiens calcium/calmodulin-dependent protein kinase (CaM kinase)
II delta (CAMK2D), transcript variant 3, mRNA (GenBank accession number:
NM_001221);

CDK6, Homo sapiens cyclin-dependent kinase 6 (CDK6), mRNA (GenBank
accession number: NM_001259); and

GRB2, Homo sapiens growth factor receptor-bound protein 2 (GRB2), transcript variant 1, mRNA (GenBank accession number: NM_002086)

P21(Waf1), Homo sapiens cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1) (CDKN1A), transcript variant 1, mRNA (GenBank accession number: NM_000389);

5 Pim-1, Homo sapiens pim-1 oncogene (PIM1), mRNA (GenBank accession number: NM_002648);

GBP-1, Homo sapiens guanylate binding protein 1, interferon-inducible, 67kDa (GBP1), mRNA (GenBank accession number: NM_002053);

RXRA, Homo sapiens retinoid X receptor, alpha (RXRA), mRNA (GenBank

10 accession number: NM_002957);

SPF45, Homo sapiens RNA binding motif protein 17 (RBM17), mRNA (GenBank accession number: NM_032905);

Hec1, Homo sapiens kinetochore associated 2 (KNTC2), mRNA (GenBank accession number: NM_006101);

15 Raf1, Human mRNA for raf oncogene (GenBank accession number: X03484);

Aurora A, Homo sapiens aurora-related kinase 1 (ARK1) mRNA, complete cds (GenBank accession number: AF008551);

TACC3, Homo sapiens transforming, acidic coiled-coil containing protein 3 (TACC3), mRNA (GenBank accession number: NM_006342);

20 RelB, Homo sapiens v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog B, nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 3 (avian) (RELB), mRNA (GenBank accession number: NM_006509);

PRKCD, Homo sapiens protein kinase C, delta (PRKCD), transcript variant 1, mRNA (GenBank accession number: NM_006254);

25 BRAF35, Homo sapiens high-mobility group 20B (HMG20B), mRNA (GenBank accession number: NM_006339);

HSPA1L, Homo sapiens heat shock 70kDa protein 1A (HSPA1A), mRNA (GenBank accession number: NM_005345);

STK11, Homo sapiens serine/threonine kinase 11 (Peutz-Jeghers syndrome) (STK11),

30 mRNA (GenBank accession number: NM_000455); and

MKK3, Homo sapiens MAP kinase kinase 3 (MKK3) mRNA, complete cds (GenBank accession number: L36719)

As used herein, the term “reference genetic marker” refers to a physiological composition whose measured RNA, DNA or protein levels remain unchanged before, during or after exposure to drugs in the taxoid family. “Reference genetic markers” are referred to as housekeeping genes. These are genes that are selected based on the relatively invariable levels of expression in the system which is being examined, for example, the in a particular disease such as cancer. Housekeeping genes are used to normalize results of expression. Examples of such genetic markers include, but certainly are not limited to:

GAPDH, Homo sapiens glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPD), mRNA (GenBank accession number: NM_002046); and
RPS9, Homo sapiens cDNA clone IMAGE:6647283, partial cds (GenBank accession number: BC071941).

As used herein, the term “a molecule of the taxoid family” refers to a class of chemotherapeutic compounds to belonging to the taxane family. Specific members of the taxoid family include but are not limited to paclitaxel (taxol) , docetaxel (taxotere) and analogs thereof (*i.e.*, XRP9881 and XRP6258; see Ojima and Geney, *Curr Opin Investig Drugs* 4:737, 2004). Since this class of molecules are beta-tubulin binders and stabilize the polymerized form of the microtubule similar to docetaxel, it is anticipated that the clinical expression of the biomarker herein described will reflect similar response states to these drugs.

As used herein, the terms “molecule”, “compound” or “agent” refer to any composition presently known or subsequently discovered. Examples of compounds or agents having applications herein include organic compounds (e.g., man made, naturally occurring and optically active), peptides (man made, naturally occurring, and optically active, *i.e.*, either D or L amino acids), carbohydrates, nucleic acid molecules, etc.

As used herein, “stringency of hybridization” or “hybridization under stringent conditions” refers to conditions readily determinable by one of ordinary skill in the art, and generally is an empirical calculation dependent upon probe length, washing temperature, and salt concentration. In general, longer probes require higher temperatures for proper annealing, while shorter probes need lower temperatures. Hybridization generally depends on the ability of denatured DNA to reanneal when complementary strands are present in an environment below their melting temperature. The higher the degree of desired homology between the

probe and hybridizable sequence, the higher the relative temperature which can be used. As a result, it follows that higher relative temperatures would tend to make the reaction conditions more stringent, while lower temperatures less so. For additional details and explanation of stringency of hybridization reactions, see Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience Publishers, (1995).

As used herein, "stringent conditions" or "high stringency conditions", refers to those parameters that: (1) employ low ionic strength and high temperature for washing, for example 0.015 M sodium chloride/0.0015 M sodium citrate/0.1% sodium dodecyl sulfate at 50° C.; (2) employ during hybridization a denaturing agent, such as formamide, for example, 50% (v/v) formamide with 0.1% bovine serum albumin/0.1% Ficoll/0.1% polyvinylpyrrolidone/50 mM sodium phosphate buffer at pH 6.5 with 750 mM sodium chloride, 75 mM sodium citrate at 42° C.; or (3) overnight hybridization in a solution that employs 50% formamide, 5x SSC (0.75 M NaCl, 0.075 M sodium citrate), 50 mM sodium phosphate (pH 6.8), 0.1% sodium pyrophosphate, 5x Denhardt's solution, sonicated salmon sperm DNA (50 .mu.g/ml), 0.1% SDS, and 10% dextran sulfate at 42° C, with a 10 minute wash at 42°C in 0.2x SSC (sodium chloride/sodium citrate) followed by a 10 minute high-stringency wash consisting of 0.1x SSC containing EDTA at 55° C. Moderately stringent conditions may be identified as described by Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Press, 1989, and include the use of washing solution and hybridization conditions (e.g., temperature, ionic strength and % SDS) less stringent than those described above. An example of moderately stringent conditions is overnight incubation at 37°C in a solution comprising: 20% formamide, 5x SSC (150 mM NaCl, 15 mM trisodium citrate), 50 mM sodium phosphate (pH 7.6), 5x Denhardt's solution, 10% dextran sulfate, and 20 mg/ml denatured sheared salmon sperm DNA, followed by washing the filters in 1x SSC at about 37-50°C. The skilled artisan will recognize how to adjust the temperature, ionic strength, etc. as necessary to accommodate factors such as probe length and the like. The appropriate stringency for hybridizing nucleic acids depends on the length of the nucleic acids and the degree of complementation, variables well known in the art. The greater the degree of similarity or homology between two nucleotide sequences, the greater the value of T_m for hybrids of nucleic acids having those sequences. The relative stability (corresponding to higher T_m) of nucleic acid hybridizations decreases in the following order: RNA:RNA, DNA:RNA, DNA:DNA. Preferably a minimum length for a hybridizable nucleic acid is at least about 12

nucleotides; preferably at least about 16 nucleotides; and more preferably the length is at least about 24 nucleotides; and most preferably at least 36 nucleotides.

As used herein, "label" or "detectable-label" refers to a detectable label compound or composition which is conjugated directly or indirectly to an antibody, oligopeptide or other organic molecule so as to generate a "labeled" antibody, oligopeptide or other organic molecule. The label may be detectable by itself (e.g. radioisotope labels or fluorescent labels) or, in the case of an enzymatic label, may catalyze chemical alteration of a substrate compound or composition which is detectable.

As used herein, a "direct labels" refers an entity, which in its natural state, is readily visible, either to the naked eye, or with the aid of an optical filter and/or applied stimulation, e.g. ultraviolet light to promote fluorescence. Examples include, but are not limited to, colored labels, metallic sol particles, dye sol particles dyed latex or dyes encapsulated liposomes (described by U.S. Pat. No. 4,313,734, U.S. Pat. No. 4,373,932, WO 88/08534), EP-A 0 280 559, 0 281 327, U.S. Pat. No. 4,703,017). Other direct labels include a radionucleotide, radiopaque substances, a fluorescent moiety or a luminescent moiety.

As used herein, "indirect labels" refers to enzymes can also be used according to the present invention. Various types of enzyme linked immunoassays are well known in the art, for example, alkaline phosphatase and horseradish peroxidase, lysozyme, glucose-6-phosphate dehydrogenase, lactate dehydrogenase, urease, these and others have been discussed in detail by Eva Engvall in Enzyme Immunoassay ELISA and EMIT in Methods in Enzymology, 70:419-439 (1980) and in U.S. Pat. No. 4,857,453.

As used herein, the term "kit" refers to an article of manufacture comprising one or more containers and a label or package insert on or associated with the containers. In a preferred embodiment, the containers may contain a detectable-labeled antibody, detectable-labeled antibody fragments or detectable-labeled oligonucleotides. In another embodiment, the containers provide the means to obtain total RNA from a bodily sample, reverse transcribe the total RNA to obtain cDNA and subject the cDNA to a polymerase chain reaction using a set of primers wherein one or both primers are detectable-labeled. Additional containers of the kit may be included that contain, e.g., diluents and buffers, control antibodies, oligopeptides or

small organic molecules. The label or package insert may provide a description of the composition as well as instructions for storage and for the intended in vitro or diagnostic use.

Furthermore, in accordance with the present invention there may be employed
5 conventional molecular biology, microbiology, and recombinant DNA techniques within the skill of the art. Such techniques are explained fully in the literature. See, e.g., Sambrook, Fritsch & Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (herein "Sambrook *et al.*, 1989"); *DNA Cloning: A Practical Approach*, Volumes I and II (D.N. Glover ed. 1985);
10 *Oligonucleotide Synthesis* (M.J. Gait ed. 1984); *Nucleic Acid Hybridization* [B.D. Hames & S.J. Higgins eds. (1985)]; *Transcription And Translation* [B.D. Hames & S.J. Higgins, eds. (1984)]; *Animal Cell Culture* [R.I. Freshney, ed. (1986)]; *Immobilized Cells And Enzymes* [IRL Press, (1986)]; B. Perbal, *A Practical Guide To Molecular Cloning* (1984); F.M. Ausubel *et al.* (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc.
15 (1994).

In general, RNAi technology uses synthetic or vector-generated double stranded RNA to induce the degradation of mRNA containing homologous sequences (McManus and Sharp,
20 *Nat Rev Genet* 3:737, 2002). RNAi screening has been used to elucidate gene function in many organisms such as *Caenorhabditis elegans* (Simmer *et al.*, *PloS Biol* 1:E12, 2003), *Drosophila* (Lum *et al.*, *Science* 299:2039, 2003) and mammalian cells (Aza-Blanc *et al.*, *Mol Cell* 12:627, 2003).

25 In the present invention, HCT116 colon cancer cells were used to screen siRNAs directed against 101 cancer-related genes, mostly comprising the kinase family members, and the docetaxel killing effects were quantified by high-resolution dose-response curves. Using this approach, applicants have shown that under-expression of 9 genes, including BubR1, Bub1, Mad2, Mps1 and GEFT Rac/CDC, can inhibit killing by docetaxel, whereas under-
30 expressing 15 others, including Pim1, p21, TACC3 and Aurora-A, can potentiate docetaxel-induced cell death.

Thus, broadly the present invention extends to diagnostic methods and kits that may be used to identify whether an individual who is either taking or considering taking docetaxel will be resistant or sensitive to the drug.

5 Applicants have observed drug resistance to docetaxel, whereby drug resistance is associated with the loss of an expanded set of checkpoint control genes including BubR1, Bub1, Mad2, Msp1 and GEFT Rac/CDC.

10 Increased docetaxel sensitivity corresponds with the loss of any one of several genes, including GBP-1, STK11, RXRA, Hec1, SPF45, Raf1, RELB, MKK3, PRKCD, HSPA1A, BRAF35, Aurora-A, Pim-1, TACC3 and p21 waf1/Cip1, and inhibitors against these genes may serve as a valuable adjunct to docetaxel therapy.

15 The mitotic checkpoint genes serve as a failsafe mechanism to delay anaphase by the inhibition of Cdc20-APC (anaphase-promoting complex), until the kinetochores of sister chromatids are properly attached to the mitotic spindle and aligned at the equator (*Zhou et al., J Cell Sci* 115:3547, 2002), thus allowing cells to reliably exit mitosis and enter additional cell cycles with a precise complement of DNA. In the presence of microtubule inhibitors, cells exiting from mitosis can no longer properly segregate their chromosomes and typically
20 undergo apoptosis immediately or after several cell cycles (Taylor and McKeon, *Cell* 89:727, 1997). The combination of microtubule inhibitors with loss of mitotic checkpoint genes such as BubR1 allows cells to escape mitotic arrest without undergoing apoptosis and lead to chromosome instability (CIN) and aneuploidy (Shin *et al., Cancer Cell* 4:483, 2003). Recently, drug resistance data were generated when microtubule inhibitor paclitaxel was used
25 to treat BubR1 and Mad2 down regulated MCF-7 cells (Sudo *et al., Cancer Res* 64:2502, 2004).

30 The Pim-1 gene encodes a serine/threonine kinase that belongs to a small family of related kinases. Pim-1 function has been linked to proliferation, differentiation, apoptosis, tumorigenesis, hypoxia, angiogenesis and mitosis (Wang *et al., Biochim Biophys Acta* 1593:45, 2002). The microscopic imaging data, in conjunction with AKT hypo-phosphorylation data and elevated caspase-3 activity measurements, demonstrate that Pim-1 down regulation enhanced docetaxel-induced apoptosis by inactivating AKT signaling, which

mediates cell survival. Pim-1 and p21 have very similar characteristics in sensitizing HCT116 cells to docetaxel; consistent with reports showing that p21 is a phosphorylation substrate of Pim-1 (Wang *et al.*, *Biochim Biophys Acta* 1593:45, 2002). Pim-1 down regulation induced some apoptosis in the absence of docetaxel but was more effective in the presence of drug, whereas down regulation of transforming acidic coiled-coil protein TACC3 did not induced cell death in the absence of docetaxel, indicating the RNAi alone had no effect on cell proliferation. These results suggest that depletion of different proteins can evoke different mechanisms for sensitizing cells to docetaxel.

Accordingly, in one aspect of the invention, activation of one or more of the genes described in Table I and II and protein levels of these genes may be utilized to select a therapeutic treatment strategy and to monitor effectiveness of the selected treatment strategy.

In a particular embodiment, a method is provided that monitors the activation levels of one or more genes shown in Table I and II during the course of chemotherapy to assess and predict effectiveness of chemotherapy for the patient. Biopsies from tumors (*e.g.*, breast, colon, non-small cell lung, and gastric tumors) or short-term culture of tumor biopsies from undiagnosed cancer patients or patients currently undergoing treatment is processed in order to isolate DNA (Hafner *et al.*, *Arch Pathol Lab Med* 127:1221, 2003; Rodriguez *et al.*, *Clin Cancer Res* 10:5785, 2004), messenger RNA (Chang *et al.*, *Lancet*. 362:340, 2003) and/or proteins (Espina *et al.*, *J Immunol Methods* 290:121, 2004) to assess the levels of gene activation or protein levels of the genes described in Table I and II or a subset thereof. Gene transcription and protein expression profiling has utility in diagnosis, prediction of therapeutic responses to potential treatment strategies and may be a useful tool to monitor a patient's response to therapy.

According to the present invention, RNA may be isolated from tumor samples using any of the available methods commonly used in the art (Ullmann *et al.*, *J Biomol Screen* 9:95, 2004; Badiie *et al.*, *BMC Biotechnol* 3:23, 2003). One or more cells from test subjects are obtained and RNA is isolated from these cells. As examples, peripheral blood leukocytes (PBLs) cells may be obtained from the subject or it is also possible to obtain a cell sample and enrich the sample for a desired cell type. Cells may be isolated from a cell mixture using a variety of techniques, such as cell isolation using antibodies that bind to an particular epitope

on the desired cell type. Where the desired cells are in a solid tissue, particular cells may be dissected, for example, by microdissection or by laser capture microdissection (LCM) (Bonner *et al.*, *Science* 278:1481, 1997; Fend *et al.*, *Am J Path* 154:61, 1999). RNA may be extracted from tissue or cell samples by a variety of methods, for example, guanidium thiocyanate lysis followed by CsCl centrifugation (Chirgwin *et al.*, *Biochemistry* 18:5294, 1979). RNA from single cells may be obtained as described in methods for preparing cDNA libraries from single cells (Dulac, *Curr Top Dev Biol.* 36:245, 1998). The RNA sample can be further enriched for a particular species. In one embodiment, for example, poly(A)+RNA may be isolated from an RNA sample. In particular, poly-T oligonucleotides may be immobilized on a solid support to serve as affinity ligands for mRNA. Kits for this purpose are commercially available, for example, the MessageMaker kit (Life Technologies, Grand Island, N.Y.). Enrichment may be accomplished, for example, by primer-specific cDNA synthesis, or multiple rounds of linear amplification based on cDNA synthesis and template-directed in vitro transcription (Wang *et al.*, *Proc Natl Acad. Sci USA* 86:9717, 1989; Dulac *et al.*, *supra*).

A variety of amplification methods are suitable for use in the methods of the present invention, including, for example, PCR; ligase chain reaction (LCR) (Wu and Wallace, *Genomics* 4:560, 1989); self-sustained sequence replication (SSR) (Guatelli *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 87:1874, 1990); nucleic acid based sequence amplification (NASBA) and transcription amplification (Kwoh *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 86:1173, 1989). Methods for PCR technology are well known in the art (see, e.g., *PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification* (ed. H. A. Erlich, Freeman Press, N.Y., N.Y., 1992); *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (eds. Innis, et al., Academic Press, San Diego, Calif., 1990).

The RNA may be labeled for detection by using any of the methods known to those persons skilled in the art. For example, using microarrays, such as those manufactured by Affymetrix. RNA is labeled and detected by hybridization using any of the methods commonly used, such as, direct RNA labeling with dyes such as Cyanine-3 or Cyanine-5 (Perkin Elmer MPS544001KT). Additional methods include direct cDNA labeling that is done by reverse transcription using nucleotides labeled with Cyanine-3 or Cyanine-5 (Badiee A 2003), fluorescein or Alexa dyes (Molecular Probes), or other fluorophores. Furthermore, indirect cDNA labeling such as FairPlay™/aminoallyl labeling (Stratagene Catalog number:

252002), 3DNA dendrimer labeling (Genisphere Inc) or enzymatic signal amplification (MICROMAX TSA, Perkin Elmer) may be utilized. Alternatively, RNA may be quantified by using RNA probes that are detected by enzymatic, fluorescence, radioactive or light emitting methods.

5

In one aspect of the present invention, RNA is obtained from the tumor sample and Taqman technology is employed in the detection of genetic markers. Primers are generated to detect the specific RNAs designated in Table I and II or subset thereof and amplified using reverse transcriptase. Detection of the specific fragment amplified by reverse transcription is accomplished by gel electrophoresis, polymer electrophoresis, direct DNA sequencing, light
10 detection, loss of a fluorescence signal, enzymatic reaction, or detection by hybridization to a complementary RNA.

In another aspect of the present invention, Real Time PCR is utilized to detect
15 oligonucleotides. The mRNA obtained from a tumor sample is reverse translated into cDNA. Primers are generated to amplify the specific RNAs designated in Table I and II or subset thereof using polymerase chain reaction technology. Detection of mRNA level is achieved by gel electrophoresis and ethidium bromide or CYBR green staining, or by measuring the fluorescence intensity from fluorophore-labeled sequence specific probes released by
20 polymerase.

In a further aspect of the present invention, Northern blotting technology is utilized. RNA is obtained from the tumor sample and then separated by gel electrophoresis and transferred onto a membrane. RNA abundance is determined by hybridization using probes
25 labeled with radioactive isotope such as P³² or by enzymatic based chromogenic or luminescent assays.

In yet another aspect of the present invention, gene dosage may be used as a surrogate indicator of transcript levels. The gene dosage of the transcripts in Table I and II or a subset
30 thereof may be quantitatively determined and assessed for whether a tumor will be responsive or not to docetaxel therapy. (Rodriguez *et al.*, *Clin Cancer Res* 10:5785, 2004). Since this assessment may be drawn prior to neoadjuvant (treatment prior to surgery) therapy, the patient

may be treated with docetaxel if they are classified as a responder or another chemotherapeutic agent may be administered if they are classified as a non-responder.

5 DNA is extracted from patient tumor biopsies and purified to remove contaminants using methods as performed by those skilled in the art. Methods utilized to determine the gene dosage in the tumor DNA include, but are not limited to, quantitative PCR, genomic DNA-chips, in situ hybridization or Southern (Hafner *et al.*, *Arch Pathol Lab Med* 127:1221, 2003; Rodriguez *et al.*, *Clin Cancer Res* 10:5785, 2004). Accordingly, these methods may be utilized to determine copy number of one or more genes in Table I and II and compared to a control sample or reference markers.
10

In yet another aspect of the present invention, protein levels are used as a surrogate measure of transcript levels. Protein levels have been shown to correlate with suppression or elevation of the transcript levels. Thus, the present invention encompasses techniques to measure levels of proteins that correspond to the polypeptide products encoded by the transcripts in Table I and II. Proteins are detected and used as markers of a predictive response to docetaxel. Methods of protein detection are well known in the art. For example, immunoassays are methodologies that employ antibodies to detect the expression of a target protein.
15
20

In a particular embodiment, an immunoassay is used to detect the protein products of one or more genes listed in Table I and II. Additionally, antibodies against any one of the proteins listed in Table I and II may be used in a number of other detection methods. These detection methods include, but are not limited to, the following: Western blots, ELISA assays, sandwich ELISA. Alternatively, other assays not employing antibodies are contemplated and include approaches that utilize DNA oligonucleotides or polypeptides that recognize proteins encoded by transcripts in Table I and II (*e.g.*, aptamers). Mass spectrometric analysis of biological samples may also be used that determine the composition of polypeptides by determining the precise molecular weight of peptide fragments after proteolytic cleavage.
25
30

The present invention further encompasses suitable labels including enzymes, fluorophores (*e.g.*, fluorescein isothiocyanate (FITC), phycoerythrin (PE), Texas red (TR), rhodamine, free or chelated lanthanide series salts, chromophores, radioisotopes, chelating

agents, dyes, colloidal gold, latex particles, ligands (e.g., biotin), and chemiluminescent agents.

In an aspect of the present invention, the radioactive label used may be isotopes such
5 as ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , ^{36}Cl , ^{51}Cr , ^{57}Co , ^{58}Co , ^{59}Fe , ^{90}Y , ^{125}I , ^{131}I , and ^{186}Re .

Quantification of radioactivity levels may be performed through currently known and available counting procedures. Conversely, the use of radiopaque substances may be used. In the embodiment where the label is an enzyme, detection may be accomplished by any of the presently utilized colorimetric, spectrophotometric, fluorospectrophotometric, amperometric
10 or gasometric techniques known in the art.

A further aspect of the invention is the use of peptide binding agents such as antibodies or fragments of antibodies. Antibodies include polyclonal and monoclonal antibodies, prepared according to conventional methodology. Only a small portion of an antibody
15 molecule, the paratope, is involved in the binding of the antibody to its epitope (see, in general, Clark, W. R. (1986) *The Experimental Foundations of Modern Immunology* Wiley & Sons, Inc., New York; Roitt, I. (1991) *Essential Immunology*, 7th Ed., Blackwell Scientific Publications, Oxford). The pFc' and Fc regions, for example, are effectors of the complement cascade but are not involved in antigen binding. An antibody from which the pFc' region has
20 been enzymatically cleaved, or which has been produced without the pFc' region, designated an F(ab')₂ fragment, retains both of the antigen binding sites of an intact antibody. Thus, an embodiment of the present invention utilizes a detectable-labeled antibody fragment such as the F(ab')₂ fragment. Similarly, an antibody from which the Fc region has been enzymatically
25 cleaved, or which has been produced without the Fc region, designated an Fab fragment, retains one of the antigen binding sites of an intact antibody molecule. Fab fragments consist of a covalently bound antibody light chain and a portion of the antibody heavy chain denoted Fd. The Fd fragments are the major determinant of antibody specificity (a single Fd fragment may be associated with up to ten different light chains without altering antibody specificity) and Fd fragments retain epitope-binding ability in isolation.

30 As is well-known in the art, within the antigen-binding portion of an antibody, there are complementarity determining regions (CDRs), which directly interact with the epitope of the antigen, and framework regions (FRs), which maintain the tertiary structure of the

paratope (see, in general, Clark, 1986; Roitt, 1991). In both the heavy chain Fd fragment and the light chain of IgG immunoglobulins, there are four framework regions (FR1 through FR4) separated respectively by three complementarity determining regions (CDR1 through CDR3). The CDRs, and in particular the CDR3 regions, and more particularly the heavy chain CDR3, are largely responsible for antibody specificity. It is now well-established in the art that the non-CDR regions of a mammalian antibody may be replaced with similar regions of conspecific or heterospecific antibodies while retaining the epitopic specificity of the original antibody. This is most clearly manifested in the development and use of "humanized" antibodies in which non-human CDRs are covalently joined to human FR and/or Fc/pFc' regions to produce a functional antibody (refer to U.S. Pat. Nos. 4,816,567, 5,225,539, 5,585,089, 5,693,762 and 5,859,205).

Fully human monoclonal antibodies also can be prepared by immunizing mice transgenic for large portions of human immunoglobulin heavy and light chain loci. Following immunization of these mice (e.g., XenoMouse (Abgenix), HuMAb mice (Medarex/GenPharm)), monoclonal antibodies can be prepared according to standard hybridoma technology. These monoclonal antibodies will have human immunoglobulin amino acid sequences and therefore will not provoke human anti-mouse antibody (HAMA) responses when administered to humans.

Therefore, it is readily apparent to one of ordinary skill in the art, the present invention also encompasses F(ab')₂, Fab, Fv and Fd fragments; chimeric antibodies in which the Fc and/or FR and/or CDR1 and/or CDR2 and/or light chain CDR3 regions have been replaced by homologous human or non-human sequences; chimeric F(ab')₂ fragment antibodies in which the FR and/or CDR1 and/or CDR2 and/or light chain CDR3 regions have been replaced by homologous human or non-human sequences; chimeric Fab fragment antibodies in which the FR and/or CDR1 and/or CDR2 and/or light chain CDR3 regions have been replaced by homologous human or non-human sequences; and chimeric Fd fragment antibodies in which the FR and/or CDR1 and/or CDR2 regions have been replaced by homologous human or non-human sequences. The present invention also includes so-called single chain antibodies.

The present invention may be better understood by reference to the following non-limiting Examples, which are provided as exemplary of the invention. The following

Examples are presented in order to more fully illustrate the preferred embodiments of the invention. They should in no way be construed, however, as limiting the broad scope of the invention.

5

EXAMPLES

EXAMPLE 1: siRNA Screening

10 In order to identify genes that render cells more resistant or sensitive to docetaxel treatment, siRNAs against 101 genes were screened in HCT116 cells using a range of docetaxel concentrations for the generation of dose-response curves. Human colon cancer cell line HCT116 was obtained from ATCC and cultured in McCoy 5A supplemented with 100 units/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 4 mM L-glutamine and 10% fetal bovine serum
15 at 37°C with 95% CO₂ and 5% O₂. The siRNA list was comprised of cancer-related genes, including those that were over expressed in docetaxel-resistant breast tumors as detected by gene expression profiling experiments (Chang *et al.*, *Lancet* 362:362, 2003). Additional criteria were that the targets be amenable to drug development. The overall scheme is summarized as follows. On the first day, HCT116 cells were plated at 5,000 cells per well in a
20 96-well format and on the following day transfected with a pool of 3-4 siRNAs per gene. A representative sample of the siRNAs used is shown in Table I and II. Lipofectamine 2000 (Invitrogen) was used to transfect siRNAs (Dharmacon) into HCT 116 cells in 96 well plates. On the third day siRNA was removed and docetaxel was added at concentrations ranging from 0 to 40nM. On the sixth day cell viability was quantified using WST-1 assay. This is an assay
25 that monitors the activity of mitochondrial dehydrogenases present in viable cells that results in the cleavage of tetrazolium salt WST-1 to form formazan. On the day of assay, media were taken off from 96 well plates. WST-1 reagent (Roche) was diluted 10 times in McCoy 5A medium and 100ul was added to each well. Plates were then incubated for 40 – 80 minutes at 37°C before reading on SpectroMax (Molecular Devices) at 450nm. The WST-1 values were
30 clustered hierarchically by calculating the ratio of the experimental to the control siRNA and a total of 15 genes were characterized as conferring sensitivity, and 9 genes conferring resistance shown in Table III below. The sensitive and resistant populations could be further divided into additional groups: 1) where the siRNA effect was observed at lower

concentrations of docetaxel (1–6 nM) to shift the IC₅₀ or 2) where the major effect was observed at higher concentrations (> 6nM) with a smaller shift in IC₅₀.

As compared to Mad2, BubR1 and Mps1 siRNAs, the siRNAs targeting Grb2, CDK6, 5
sepharase, and calcium/calmodulin-dependent protein kinase II delta (CamKIID) showed
more pronounced effects at lower docetaxel concentrations (1–6 nM), with a characteristic
shift in the IC₅₀. Overall, this subgroup showed weaker resistance than the mitotic checkpoint
genes and the CamKIID siRNA generated the greatest level of protection, which was two-fold
over control cells. These data demonstrate that loss of four mitotic checkpoint genes along
10 with several other genes can increase docetaxel resistance to varying degrees.

The data in Figure 1 show several characteristic dose-response curves for cells transfected
with siRNAs followed by exposure to various concentrations of docetaxel. The siRNAs
against four mitotic checkpoint genes, including BubR1, Bub1, Mad2, and Mps1 (data not
shown for Bub1) as well as guanine nucleotide exchange factor (GEFT) for Rac/Cdc42
15 demonstrated significant docetaxel resistance with the effect being more pronounced at higher
docetaxel concentrations (>6 nM). The greatest level of resistance was shown for Mad2 where
cell viability increased five-fold over the control siRNA transfected cells. The majority of the
siRNAs did not score in the screen and here we show human retinoblastoma 1 (RB1) as a
representative example.

20 Taken together, these results show that siRNA screening can provide insights about
how down-regulating gene expression sensitizes or protects cells from docetaxel treatment
and, depending on the concentrations, evokes different mechanisms of action to modulate
docetaxel-mediated cell death.

25

30

Table I: Sequences of siRNAs Conferring Increased Sensitivity to Docetaxel:				
Gene Name	siRNA sequence	SEQ ID NO	siRNA sequence	SEQ ID NO
P21(Waf1)	GCGAUGGAACUUCGACUUU	1	AGACCAUGUGGACCUGUCA	3
	UGGAACUUCGACUUUGUCA	2		
Pim-1	CCUUCGAAGAAAUCCAGAA*	4	UAUUCUUUCGAGCAUGAC	6
	UGGUGUGUGGAGAUAUUCC	5		
GBP-1	CGAAAGGCAUGUACCAUAA	7	GAACAGGAGCAACUACUAA	9
	GAUACAGGCUGAAGAGAUU	8		
RXRA	GCAAGGACCUGACCUACAC	10	GACCCUGUCACCAACAUUU	12
	GCAAGGACCGGAACGAGAA	11		
SPF45	CAAAUCCGCUGACUGAAAU	13	GACCCUAUGUUUCCUAAUG	15
	GAACAAGACAGACCGAGAU	14		
Hec1	GUGUAUUCGACAACUCUGU	16	GUACUCAGUUGCAGACAUI	18
	GAUUGCAAGAUUGGAACAA	17	GUUUCACAAAUUGGCUAGA	19
Raf1	GCACGGAGAUGUUGCAGUA	20	GACAUGAAAUCCAACAAUA	22
	GCAAAGAACAUCAUCCAUA	21	GGAAUGAGCUUGCAUGACU	23
Aurora A	GAGAACUGCUACUUAUUA	24	GAAGGUCGGAUGCAUGAUG	26
	GAAUAUGCACCACUUGGAA	25	GUAAAGGAAAAGUUUGGUA	27
TACC3	GCACCUCGCUUCCCACAAG	28	GAACGAAGAGUCACUGAAG	30
	GAGCGGACCUGUAAAACUA	29		
RelB	GCAGAAAGAGGACAUUAUCA	31	GCCCGUCUAUGACAAGAAA	33
	GCAGCGAGCCAUUGCCUUU	32		
PRKCD	GGACGUGGAUUGCAAACAA	34	GAAAGAACGCUUCAACAUC	36
	GCAUGAAUGUGCACCAUAA	35		
BRAF35	GGGCGUACCAGCAGUCUGA	37	GUCUGAAGCCUAUAAGAUG	39
	GCUCUGGGCUCAUGAACAC	38		
HSPA1L	GAGAUCGACUCCCUGUUUG	40	GAUCAACGACGGAGACAAG	42
	UGGAGGAGUUCAAGAGAAA	41		
STK11	GAAGAAGGAAAUUCAACUA	43	GAAACAUCCUCCGGCUGAA	45
	GAGAAGCGUUUCCCAGUGU	44		
MKK3	GGUGGAGGCUGAUGACUUG	46	GGAGGGCCAUGUGAAGAUG	48
	GGAGAUUGCUGUGUCUAUC	47	GAUGUGAAGCCCUCCAUG	49

*Individual sequences having demonstrated good knockdown

Table II: Sequences of siRNAs Conferring Decreased Sensitivity to Docetaxel:				
Gene Name	siRNA sequence	SEQ ID NO	siRNA sequence	SEQ ID NO
BubR1	GCAAUGAGCCUUUGGAUUAU*	50	GGAAGAAGAUCUAGAUGUA	52
	GGAACAACCUCAUUCUAAA	51		
Mad2	GAAAUCGUGGCCGAGUUCU	53	GCCGAGUUCUUCUCAUUCG	55
	GUGGCAUAUAUCCAUCUGA	54	GGAACAACUGAAAGAUUGG	56
Mps1	GUCGUUACAGUCAAGCAAU*	57	GAUGAACUAAGCUUGAAUA	59
	GCACGUGACUACUUUCAA	58	GAGCAGUACCACUAGAAAU	60
GEFT	GAACACAGCCUGGAUAUGU	61	GGAUGAAGAUGAGCUGUAA	63
	GCACCGAGACUAUUCUUG	62	GCAUGUGGCUCAGAUCUUG	64
Bub1	GUACAACAGUGACCUGCA	65	GCUUGUGAUAAAGAGUCA	67
	GAUGCUGGAUGUGUGAAUA	66	GAUCCACCAGAUGCUAUUG	68
hSeparase	GCUGUCAGAUAGUUGAUUU	69	GUGGACAGUUGUAAAUCUA	71
	GCCUACAGCUUCUAUAGUC	70	GAAGAUCGUUCCUAUACA	72
CamKIID	GCACGAAAGCAAGAGAUUA	73	GCUAGAAUCUGCCGUCUUU	75
	GAAGAAACCAGAUGGAGUA	74	GAUCAAGGCUGGAGCUUAU	76
CDK6	GAACAUGUCGAUCAAGACU	77	GAGUAGUGCAUCGCGAUCU	79
	GUUUGUAACAGAUUCGAU	78	GUAACAGAUUCGAUGAAC	80
GRB2	GAACGAAGAAUGUGAUCAG	81	GGUACAAGGCAGAGCUUAA	83
	GUGGAUUAUCACAGAUCUA	82	GUGCCACAGCAGCCGACAU	84
Control Sequences:				
	GUCGACCAUUAUGUACCGGAU	85	GGAUUCGUAACGUGAUUAGCG	86
Sequences of siRNAs Not Affecting Docetaxel Response:				
RB1	GAAACAGAAGAACCUGAUU	87	GUACAUCUCAGAAUCUUGA	89
	GAAAGGACAUGUGAACUUA	88		
* Individual sequences having demonstrated good knockdown				

5

10

Table III: Genes Affecting Docetaxel Response**siRNAs Conferring Increased Sensitivity to Docetaxel:**

Gene Name	SEQ ID NO	Accession number	IC50 ratio	p(IC50 ratio)	Min ratio	p(Min ratio)
P21(Waf1)	90	NM_000389	0.70	0.0004	0.25	0.0000
Pim-1	91	NM_002648	0.80	0.0011	0.30	0.0000
GBP-1	92	NM_002053	0.59	0.0000	0.25	0.0000
RXRA	93	NM_002957	0.64	0.0011	0.36	0.3098
SPF45	94	NM_032905	0.72	0.0000	0.47	0.0000
Hec1	95	NM_006101	0.64	0.0000	0.31	0.0121
Raf1	96	X03484	0.90	0.0059	0.30	0.0000
Aurora A	97	AF008551	0.73	0.0000	1.37	0.0018
TACC3	98	NM_006342	0.29	0.0000	0.85	0.0077
RelB	99	NM_006509	0.56	0.0000	0.77	0.0052
PRKCD	100	NM_006254	0.46	0.0683	0.59	1.0000
BRAF35	101	NM_006339	0.44	0.0000	1.29	0.1361
HSPA1L	102	NM_005345	0.60	0.0404	1.08	1.0000
STK11	103	NM_000455	0.94	0.4544	0.27	0.0000
MKK3	104	L36719	0.51	0.0000	0.82	0.0553

siRNAs Conferring Increased Resistance to Docetaxel:

Gene Name	SEQ ID NO	Accession number	IC50 ratio	p(IC50 ratio)	Min ratio	p(Min ratio)
BubR1	105	AF046079	1.88	0.2207	3.01	0.5663 [^]
Mad2	106	AJ000186	3.22	0.0076	5.06	1.0000 [^]
Mps1	107	NM_003318	3.55	0.0008	2.92	1.0000 [^]
GEFT for Rac1/CDC42	108	NM_133483	3.50	1.0000	2.42	1.0000 [^]
Bub1	109	NM_004336	1.38	0.0007	2.45	0.0000
hSeparase	110	NM_012291	1.99	0.0000	0.88	1.0000
CamKIID	111	NM_001221	2.03	0.0016	1.29	1.0000
CDK6	112	NM_001259	1.99	0.0000	1.14	1.0000
GRB2	113	NM_002086	1.97	0.0000	1.16	1.0000

siRNAs Having No Effect on the Response to Docetaxel:

Gene Name	SEQ ID NO	Accession number	IC50 ratio	p(IC50 ratio)	Min ratio	p(Min ratio)
RB1	114	NM_000321	0.87	0.0061	1.03	0.4863
GAPDH	115	NM_002046	nd	nd	nd	nd
RPS9	116	BC071941	nd	nd	nd	nd

Notes:

Min ratio: The ratio of a siRNA over the control at the highest docetaxel dose

The smaller the p value is, the more significant the difference between sample and control

The p values marked with ^ are high because of poor curve fitting on the dose response curves, even though the differences are significant and reproducible

Nd=not determined

EXAMPLE 2: Cross Validation on a Subset of siRNAs that Confer Increased Docetaxel Resistance

A potential drawback to siRNA screening approaches rests on the observation that siRNAs can anneal to transcripts with partial identity or initiate micro-RNA (miRNA) translational blocks, making it difficult to distinguish between target-specific effects and nonspecific (off-site) effects (Jackson *et al.*, *Nat Biotechnol* 21:635, 2003). To confirm resistance using an independent approach with a second sequence, stable knock-down cell lines were generated for BubR1 and Mps1 by infecting HCT116 cells with a retroviral vector carrying DNA oligonucleotides encoding a short hairpin (sh)RNA. The shRNA contained a different sequence than the siRNA, targeting a distinct region of the open reading frame. The retroviral packaging cell line GP2-293 was obtained from Clontech. The cells were maintained in DMEM supplemented with 100 units/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 4 mM L-glutamine and 10% fetal bovine serum. Virus was generated by transiently transfecting GP2-293 cells. A total of 3.6×10^6 cells were seeded in a 10 cm dish 24 hours prior to transfection. The medium was replaced 4 hours prior to transfection with DMEM containing 10% FBS minus antibiotics. The cells were transfected with 6 µg vector DNA, 6 µg of envelope plasmid VSV-G (Clontech) and 72 µl Lipfectamine-2000. The medium was replaced after 14-16 hours; the viral supernatant was harvested 24 hours later, filtered through a 0.45 µm filter and used to infect HCT116 cells at an M.O.I of 5 in the presence of 8 µg/ml polybrene. Forty-eight hours post-infection the cells were selected in 0.5 µg/ml puromycin for 7 days or until the background cells died off. The dose response curves generated with the BubR1 and Mps1 knock-down cell lines again showed enhanced resistance that was more pronounced at higher docetaxel concentrations (Figure 2), similar to the results obtained by siRNA transient transfections. To examine whether the shRNAs reduced mRNA levels we employed real-time PCR to detect endogenous transcripts and confirmed that the RNA levels were diminished in the BubR1 and Mps1 stable knock-down cell lines as compared to the vector control stable line (Figure 3).

Cells were lysed and RNA was extracted using RNAqueous –96 (Ambion). Taqman™ probes and forward and reverse primers were designed with Primer Express™ software (PE Applied Biosystems, UK). BLAST searches of the probe and primer sequences revealed no significant identity to other sequences other than the specific gene under test. For real time

PCR, 20 μ l of master TaqMan™ mix was made for each well: 4.825 μ l Rnase-free water, 12.5 μ l 2x Universal PCR master mix and 0.625 μ l 40x Multiscribe™ and Rnase Inhibitor Mix (Applied BioSystems), 0.9 μ l forward and reverse primers (100 μ M), 0.25ul probe (100 μ M). To each well, 5ul sample RNA (about 1ng/ μ l) was added. Plates were analyzed on a
5 TaqMan™ ABI Prism 7700 Sequence Detector™ (Perkin-Elmer, UK). Cycling parameters were 48°C for 30 minutes, 95°C for 10 minutes, 40 cycles of 95°C for 15 seconds, and 60°C for 1 minute. Test gene mRNA values were extrapolated from the standard curve and presented as percent remaining.

10

EXAMPLE 3: Downregulation of Mad2, BubR1 and Mps1 Protects Cells from Docetaxel-Induced Death by Escaping Mitotic Arrest, Coupled with the Generation of Aneuploidy

As determined by the WST-1 assay, loss of mitotic checkpoint genes in the presence of
15 docetaxel correlated with increased cell viability to signify resistance (Figure 1). To further test the validity of WST-1 measurements, cytological experiments were performed to look at cell morphology and viability (Figure 4). The cells were tracked using confocal microscopy and Calcein-AM, a vital dye converted to green fluorescence by intracellular esterase serving as an indicator of metabolically active cells. Figure 4 demonstrates that 16 hours post
20 docetaxel addition, the Mad2, BubR1 and, to a lesser extent, Mps1 siRNA transfected cells prematurely exited mitosis into an apparent interphase state coincident with a flattened cell morphology, whereas the majority of the control siRNA transfected cells were arrested in mitosis with a rounded up cell morphology. The flat cell phenotype has been previously described for other microtubule inhibitors and refers to the ability of cells to exit from mitotic
25 arrest into an apparent interphase state without actually completing mitosis (Kung *et al.*, *Proc Natl Acad Sci* 87:9553, 1990; Lanni and Jacks, *Mol Cell Biol* 18:1055, 1998). At 72 hours post treatment, the most striking observations for Mad2, BubR1 or Mps1 siRNA down-regulated cells were the presence of many more cells and their very large size, as compared to the siRNA control transfected cells that were virtually eliminated by docetaxel treatment. In
30 the absence of docetaxel, mitotic checkpoint down-regulated cells looked similar to control cells at the two different time points and the increased number of cells at 72 hours suggested the cells were actively growing in the presence of the siRNA.

Mitotic checkpoint-impaired cells can bypass mitotic arrest and prematurely exit mitosis following treatment with microtubule inhibitors such as, colcemid, nocodazole and paclitaxel (Taylor and McKeon, *Cell* 89:727, 1997; Shin *et al.*, *Cancer Cell* 4:483, 2003; Masuda *et al.*, *Am J Pathol* 163:1109, 2003; Sudo *et al.*, *Cancer Res* 64:2502, 2004). To determine if docetaxel treated HCT116 cells prematurely exit from mitosis following suppression of three specific checkpoint genes Mad2, BubR1 or Mps1, we measured mitotic indices of transfected cells. Accordingly, siRNA transfected Mad2, BubR1 or Mps1 cells were harvested without (0) treatment or at 8, 16, 24, 36, 48 and 72 hours after docetaxel treatment, then fixed and incubated with a polyclonal antibody that detects phosphorylation of histone H3 as an indication of mitosis (Mitotic Index Kit, Cellomics). A graphic representation for all time points are shown in Figure 5. The mitotic index peaked between 16 and 24 hours post treatment indicating that in all cases there was mitotic arrest. The mitotic index reached the highest value for cells transfected with the control siRNA, whereas cells transfected with Mad2 and BubR1 siRNA showed a significant decrease in mitotic index. The Mps1 siRNA effects were not as severe as Mad2 and BubR1. These results clearly show that mitotic checkpoint impaired cells can bypass mitotic arrest induced by docetaxel and that BubR1 siRNA was the most effective followed by Mad2 and Mps1.

To rule out the possibility that changes in mitotic index were coincident with large differences in knockdown efficiencies, we employed real-time PCR to measure mitotic checkpoint transcript levels. The experiment shown in Figure 6 demonstrates that mRNA levels were diminished to comparable levels in Mad2, BubR1 and Mps1 siRNA transfected cells, suggesting that the mitotic index differences were more reflective of gene function.

From the microscopy data, it appeared that the very large cells may harbor abnormal DNA content. In order to further investigate whether these mitotic checkpoint impaired cells were capable of overriding docetaxel-induced cell cycle arrest, and re-enter S-phase to generate aneuploid cells, we performed FACS analysis to measure DNA content. The, Mps1, BubR1, Mad2 and control siRNA transfected cells were grown in the absence or presence of docetaxel, fixed and stained with propidium iodide and analyzed by FACS. The data were collected at several different time points post docetaxel addition (data not shown) and histograms for the 72 hour time point are shown in Figure 7. At 72 hours post docetaxel addition, transfections with Mps1, BubR1, Mad2 and siRNAs caused an accumulation of cells

with 8N, 16N and in the case of BubR1 32N DNA content. By just using the control siRNA, an 8N population of cells was detected in the presence of docetaxel, but the 8N numbers was far greater for the mitotic checkpoint down-regulated cells. At an earlier time point following docetaxel addition (data not shown), the majority of control cells were arrested at 4N, whereas
5 cells transfected with Mps1, BubR1 and Mad2 siRNAs were advancing from 4N to 8N. These results indicate that knockdown of mitotic checkpoint genes allow cells to more rapidly accumulate abnormal DNA levels and cross a greater threshold of ploidy as compared to wild-type cells. Our results demonstrate roles for Mad2, BubR1 and Mps1 in regulating mitotic index and cell cycle progression with a previously uncharacterized microtubule inhibitor
10 docetaxel.

EXAMPLE 4: Formation of Docetaxel Resistant Colonies in BubR1 Downregulated Cells

15 The apoptotic function of BubR1 appears to be important for the regulation of chromosome fidelity given that underexpression of BubR1 in combination with anti-microtubule agents was associated with aneuploidy, and restoration of BubR1 associated with an activated checkpoint and apoptosis of aneuploid cells (Shin *et al.*, *Cancer Cell* 4:483, 2003). To determine if permanently downregulating mitotic checkpoint genes enables cells to
20 grow with a greater proliferative capacity, the BubR1 and Mps1 stable knockdown lines (Figure 4) were tested for their ability to proliferate and establish colonies in the continuous presence of docetaxel. The Mad2 stable knockdown cell line could not be generated since impairment of Mad2 was lethal to cells (Michel *et al.*, *Proc Natl Acad Sci* 101:4459, 2004). The BubR1, Mps1 and control shRNA stable knockdown cells lines were subjected to 5 nM
25 docetaxel for 10 days and after that stained with crystal violet. Figure 8 shows that the BubR1 knockdown cell line produced many more large colonies as compared to the control cell line. The Mps1 knockdown cell line was not able to grow out colonies in the presence of 5 nM docetaxel. When the plates were incubated for as long as 17 days, colonies were observed on the control plates but were still fewer in number as compared to the BubR1 knockdown line.
30 These results link low levels of BubR1, but not Mps1, with advanced cell growth in the presence of the chemotherapeutic drug docetaxel.

EXAMPLE 5: Cross Validation of siRNA that Confers Increased Docetaxel Sensitivity

In addition to identifying siRNAs that protect cells from docetaxel-induced killing, the screen identified siRNAs that sensitize cells to killing. In Table III, Pim-1, p21^{waf1/Cip1}, GBP-1, RXRA, Hec1, SPF45, Raf1 represent a group of siRNAs that show pronounced killing at higher docetaxel concentrations (>6 nM) with just a small shift in IC₅₀. The siRNA dose-response curves for oncogenic serine/threonine kinase Pim-1 and cell cycle inhibitor p21^{waf1/Cip1} were very similar (Figure 9), which may reflect overlapping or cooperative roles within a signaling pathway; and previous reports have shown that p21^{waf1/Cip1} is a substrate for Pim-1 (Wang *et al.*, *Biochim Biophys Acta* 1593:45, 2002). Of further interest were data on Pim-1 overexpression in prostate epithelial cells, which lead to mitotic checkpoint interference and genetic instability (Roh *et al.*, *Cancer Res* 63:8079, 2003). These results are in alignment with Mad2, BubR1 and Mps1 underexpression data showing a comparable phenotype with opposing expression levels (see Figure 1). Another siRNA that conferred sensitivity to docetaxel was Hec1.

In Table III, TACC3, RELB, Aurora-A, PRKCD (PKC), HSPA1A, and BRAF35 represent siRNAs that increase sensitivity at lower docetaxel concentrations (1 – 6 nM) with a characteristic shift in IC₅₀. Aurora-A is a serine/threonine kinase that functions at the onset of mitosis and has been implicated in centrosome maturation and spindle assembly (reviewed in Meraldi *et al.*, *Curr Opin Genet Dev* 14:29, 2004). Of great interest were published data showing that Aurora-A over expression in HeLa cells protected cells from paclitaxel, in alignment with our results where under expression of Aurora-A enhanced docetaxel killing (Anand *et al.*, *Cancer Cell* 3:51, 2003). Admittedly this was a small decrease in IC₅₀ for Aurora-A representing a 25% decrease in survival; however, the results were precisely duplicated by using retroviral delivery of shRNA generating a stable knock-down of Aurora-A in HCT116 cells (compare Figures 9 to Figures 10 and 11).

EXAMPLE 6: Pim1 Inhibits Proliferation of HCT116 cells in the Absence of Docetaxel

To further evaluate the positives from the screen, it was important to distinguish between siRNAs that affect cell viability in the absence of docetaxel, and those that act

cooperatively with docetaxel to enhance killing. To distinguish between the possibilities we studied effects of siRNA transfection on proliferation using a trypan blue exclusion assay with cell counting to determine the number of viable cells in 6-well plates at 24, 48, 72 hours post-transfection. Our results show that Pim-1 siRNAs inhibit growth in HCT116 cells whereas
5 TACC3 siRNAs have no effect on growth (Figure 12; knockdown quantitated in Figure 13), although both siRNAs enhance docetaxel-induced cell death (Figure 9).

EXAMPLE 7: Validation of Subsets of Resistant and Sensitive Genes Using Live/Dead
10 Assays

To visually compare siRNAs that confer docetaxel sensitivity and resistance, microscopic imaging is used to determine the ratio of live to dead cells where Calcein-AM is used to stain live cells green, and propidium iodide (PI) to stain the nucleus of dead cells red.
15 Post docetaxel (72 hours) addition, siRNA transfected BubR1 cells had the greatest number of viable cells, whereas siRNA transfected Pim-1 and TACC3 had the greatest number of dead cells and the control cells were in between (data not shown). Although the BubR1 siRNA alone showed increased cell death by 72 hours, the cells ultimately become more resistant to docetaxel. Pim-1 siRNA alone induced cell death by 24 hours whereas the TACC3 siRNA did
20 not cause death. These results demonstrate that BubR1 down regulation was associated with increased cell viability and drug resistance, whereas Pim-1 and TACC3 down regulation was associated with increased cell death and drug sensitivity. Both Pim-1 and TACC3 showed more killing in the presence of docetaxel but this assay could not distinguish between an additive effect and cooperative killing.

EXAMPLE 8: Docetaxel-Induced Caspase-3 Activity was Diminished by BubR1 Down
Regulation and Enhanced by Pim-1 Down Regulation

30 Docetaxel can cause cell death through induction of apoptosis (Kim *et al.*, *Int J Mol Med* 11:799, 2003). To determine whether Pim-1 and BubR1 siRNAs could modulate a canonical apoptotic pathway in the absence and presence docetaxel, we studied activated caspase-3 levels in HCT116 cells (using a bioplex assay) (Figure 14). After 48 hours of 40 nM

docetaxel, caspase-3 activity was induced in control cells and induction was further enhanced by down regulating Pim-1 and diminished by down regulating BubR1 (middle and lower panels). In the absence of docetaxel, down regulation of Pim-1 caused a slight increase in caspase-3 activity at 24 hours, but returned to control level by 48 and 72 hours (upper panel),
5 indicating that other apoptotic machinery were activated to maintain the enhanced killing observed at 72 hours by WST-1 and LIVE/DEAD assays. Down regulation of BubR1 in the absence of docetaxel caused a very slight increase in caspase-3 activity, which is consistent with the observation that BubR1 knockdown initially caused cell death at 72 hours in the LIVE/DEAD assay. These results further implicate Pim-1 and BubR1 as effectors of docetaxel
10 killing through the modulation of caspase-3 activity.

15 EXAMPLE 9: Signaling Pathways Involved in Docetaxel-Induced Pim-1-Associated Sensitivity and BubR1-Associated Resistance

The activities attributed to Pim-1 strongly suggest that it plays a central role in blocking signaling events that lead to cell death while promoting those that foster cell
20 survival. In an attempt to define the molecular basis for enhanced cell death associated with a Pim-1 knockdown, we examined the activation state of a key cellular pathway involved in cell survival, AKT. HCT116 were seeded at 4×10^5 cells/well on 6-well plates and the next day transfected with siRNAs at 16 nM using Lipofectamine 2000 (Invitrogen). After 24 hours, cells were untreated or treated with 5 and 40 nM docetaxel. Cells were lysed 24, 48 and 72
25 hours after docetaxel addition with ice-cold lysis buffer (50 mM HEPES beffer (PH7.4), 1% NP40, 2.5 mM EDTA, 100 mM sodium fluoride, 10 mM sodium PP_i , protease inhibitor cocktail tablet (Roche), 2 mM sodium orthovanadate) and centrifuged at 12,000 g for 10 minutes. Lysates were then quantified for total protein levels using DC protein assay (BioRad). Active caspase-3 levels were determined using an active caspase-3 beadmates kit
30 (Upstate) and the Luminex 100TM system with protocols suggested by the manufacture. Total and phosphorylated AKT levels were determined using a total AKT antibody bead kit and a phosphospecific AKT^{S473} antibody bead kit (Biosource) and the Luminex 100TM system with protocols suggested by manufacture.

The experiment shown in Figure 15 demonstrates that Pim-1 downregulation decreased the baseline phosphorylation of AKT, as compared to the control and the effect was significantly accentuated with increasing concentrations of docetaxel. By comparison, BubR1 downregulation increased the baseline phosphorylation of AKT and the effect was accentuated at the lower but not higher concentration of docetaxel, indicating alternative-signaling pathways may be activated at higher doses.

Applicants performed Western Blot analysis using antibodies against Pim-1 and BubR1 to measure protein levels at the 48 hour time point. Equal amounts of proteins were loaded into NuPAGE Novex Bis-Tris gels (Invitrogen). Antibodies against Pim-1 (Santa Cruz biotechnology), BubR1 (BD bioscience) and α -tubulin (Sigma) were used as suggested by the manufacture. Secondary antibodies were conjugated to HRP (BioRad) and detected by ECL Western Blot Detection System (Amersham Biosciences) followed by exposure to Hyperfilm ECL (Amersham Biosciences). The experiment shown in Figure 16 demonstrated that Pim-1 and BubR1 protein levels were diminished as compared to the control, showing that reduced protein levels corresponded with a functional change (Figure 15). These data suggest that downregulating Pim-1 protein levels can block the phosphorylation and activation of AKT in order to compel the cells towards apoptosis. Pim-1 appears to mediate cell survival by activating pro-survival pathways.

The present invention is not limited in scope by the specific embodiments described herein. Indeed, various modifications of the invention in addition to those described herein will become apparent to those skilled in the art from the foregoing description and the accompanying figures. Such modifications are intended to fall within the scope of the appended claims.

Anand S, Penrhyn-Lowe S, Venkitaraman AR. (2003) AURORA-A amplification overrides the mitotic spindle assembly checkpoint, inducing resistance to Taxol. *Cancer Cell*. 3:51-62.

5 Aza-Blanc P, Cooper CL, Wagner K, Batalov S, Deveraux QL, Cooke MP. (2003) Identification of modulators of TRAIL-induced apoptosis via RNAi-based phenotypic screening. *Mol Cell*. 12:627-37.

10 Chang JC, Wooten EC, Tsimelzon A, Hilsenbeck SG, Gutierrez MC, Elledge R, Mohsin S, Osborne CK, Chamness GC, Allred DC, O'Connell P. (2003) Gene expression profiling for the prediction of therapeutic response to docetaxel in patients with breast cancer. *Lancet*. 362:362-9.

Hong, WK (2002) The current status of docetaxel in solid tumors. *Oncology* 16:9-15.

15

Jackson AL, Bartz SR, Schelter J, Kobayashi SV, Burchard J, Mao M, Li B, Cavet G, Linsley PS. (2003) Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nat Biotechnol*. 21:635-7.

20 Katsumata N. (2003) Docetaxel: an alternative taxane in ovarian cancer. *Br J Cancer*. 89 Suppl 3:S9-S15.

25 Kim R, Tanabe K, Uchida Y, Emi M, Toge T. (2003) Effect of Bcl-2 antisense oligonucleotide on drug-sensitivity in association with apoptosis in undifferentiated thyroid carcinoma. *Int J Mol Med*. 11:799-804.

30 Kolfshoten GM, Hulscher TM, Duyndam MC, Pinedo HM, Boven E. (2002) Variation in the kinetics of caspase-3 activation, Bcl-2 phosphorylation and apoptotic morphology in unselected human ovarian cancer cell lines as a response to docetaxel. *Biochem Pharmacol*. 63:733-43.

Kung AL, Sherwood SW, Schimke RT. (1990) Cell line-specific differences in the control of cell cycle progression in the absence of mitosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87:9553-7.

- 5 Lanni JS, Jacks T. (1998) Characterization of the p53-dependent postmitotic checkpoint following spindle disruption. *Mol Cell Biol.* 18:1055-64.

Lee LF, Li G, Templeton DJ, Ting JP. (1998) Paclitaxel (Taxol)-induced gene expression and cell death are both mediated by the activation of c-Jun NH2-terminal kinase (JNK/SAPK). *J Biol Chem.* 273:28253-60.

Li Y, Dowbenko D, Lasky LA. (2002) AKT/PKB phosphorylation of p21Cip/WAF1 enhances protein stability of p21Cip/WAF1 and promotes cell survival. *J Biol Chem.* 277:11352-61.

- 15 Lum L, Yao S, Mozer B, Rovescalli A, Von Kessler D, Nirenberg M, Beachy PA. (2003) Identification of Hedgehog pathway components by RNAi in *Drosophila* cultured cells. *Science.* 299:2039-45.

20 Masuda A, Maeno K, Nakagawa T, Saito H, Takahashi T. (2003) Association between mitotic spindle checkpoint impairment and susceptibility to the induction of apoptosis by anti-microtubule agents in human lung cancers. *Am J Pathol.* 163:1109-16.

McManus MT, Sharp PA. (2002) Gene silencing in mammals by small interfering RNAs. *Nat Rev Genet.* 3:737-47.

- 25 Meraldi P, Honda R, Nigg EA. (2004) Aurora kinases link chromosome segregation and cell division to cancer susceptibility. *Curr Opin Genet Dev.* 14:29-36.

Michel L, Diaz-Rodriguez E, Narayan G, Hernando E, Murty VV, Benezra R. (2004) Complete loss of the tumor suppressor MAD2 causes premature cyclin B degradation and mitotic failure in human somatic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:4459-64.

5 Ojima, I. and Geney, R. 109881 Aventis (2004) *Curr Opin Investig Drugs* 4:737-40.

Ringel I, Horwitz SB. (1991) Studies with RP 56976 (taxotere): a semisynthetic analogue of taxol. *J Natl Cancer Inst.* 83:288-91.

10 Roh M, Gary B, Song C, Said-Al-Naief N, Tousson A, Kraft A, Eltoum IE, Abdulkadir SA. (2003) Overexpression of the oncogenic kinase Pim-1 leads to genomic instability. *Cancer Res.* 63:8079-84.

15 Shin HJ, Baek KH, Jeon AH, Park MT, Lee SJ, Kang CM, Lee HS, Yoo SH, Chung DH, Sung YC, McKeon F, Lee CW. (2003) Dual roles of human BubR1, a mitotic checkpoint kinase, in the monitoring of chromosomal instability. *Cancer Cell.* 4:483-97.

20 Simmer F, Moorman C, Van Der Linden AM, Kuijk E, Van Den Berghe PV, Kamath R, Fraser AG, Ahringer J, Plasterk RH. (2003) Genome-Wide RNAi of *C. elegans* Using the Hypersensitive *rrf-3* Strain Reveals Novel Gene Functions. *PLoS Biol.* 1:E12.

Sudo T, Nitta M, Saya H, Ueno NT. (2004) Dependence of paclitaxel sensitivity on a functional spindle assembly checkpoint. *Cancer Res.* 64:2502-8.

25 Tanabe K, Kim R, Inoue H, Emi M, Uchida Y, Toge T. (2003) Antisense Bcl-2 and HER-2 oligonucleotide treatment of breast cancer cells enhances their sensitivity to anticancer drugs. *Int J Oncol.* 22:875-81.

Taylor SS, McKeon F. (1997) Kinetochore localization of murine Bub1 is required for normal mitotic timing and checkpoint response to spindle damage. *Cell.* 89:727-35.

Wang TH, Wang HS, Soong YK (2000) Paclitaxel-induced cell death: where the cell cycle and apoptosis come together. *Cancer*. 88:2619-28.

5 Wang Z, Bhattacharya N, Mixer PF, Wei W, Sedivy J, Magnuson NS. (2002)
Phosphorylation of the cell cycle inhibitor p21Cip1/WAF1 by Pim-1 kinase. *Biochim Biophys Acta*. 1593:45-55.

Zhou J, Yao J, Joshi HC. (2002) Attachment and tension in the spindle assembly checkpoint. *J Cell Sci*. 115:3547-55.

CLAIMS

What is claimed is:

- 5
1. A method for predicting or monitoring a cancer patient's response to a molecule of the taxoid family, comprising the steps of:
 - a) obtaining a test sample from a cancerous area of said patient;
 - b) obtaining a control sample;
 - 10 c) measuring the level of one or more genetic markers; and
 - d) comparing the measured levels of said one or more genetic markers in the test sample and the control sample;wherein a decrease in the level of said one or more genetic markers measured in the test sample as compared to the control sample indicates an increased resistance to a molecule
15 of the taxoid family.

 2. The method of Claim 1, wherein said one or more genetic markers is selected from the group consisting of:
 - 20 BubR1, Homo sapiens similar to protein kinase (BUBR1) mRNA, complete cds (GenBank accession number: AF046079);
 - Mad2, Homo sapiens mRNA for MAD2 protein (GenBank accession number: AJ000186);
 - Mps1, Homo sapiens TTK protein kinase (TTK), mRNA (GenBank accession number: 25 NM_003318);
 - GEFT for Rac1/CDC42, Homo sapiens RAC/CDC42 exchange factor (GEFT), transcript variant 2, mRNA (GenBank accession number: NM_133483);
 - Bub1, Homo sapiens BUB1 budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog (yeast) (BUB1), mRNA (GenBank accession number: NM_004336);
 - 30 hSepharse, Homo sapiens extra spindle poles like 1 (*S. cerevisiae*) (ESPL1), mRNA (GenBank accession number: NM_012291);
 - CamKII δ , Homo sapiens calcium/calmodulin-dependent protein kinase (CaM kinase) II delta (CAMK2D), transcript variant 3, mRNA (GenBank accession number: NM_001221);

CDK6, Homo sapiens cyclin-dependent kinase 6 (CDK6), mRNA (GenBank accession number: NM_001259); and
GRB2, Homo sapiens growth factor receptor-bound protein 2 (GRB2), transcript variant 1, mRNA (GenBank accession number: NM_002086).

5

3. The method of Claim 1 wherein said molecule of the taxoid family is selected from the group consisting of paclitaxel, docetaxel XRP9881 and XRP6258.

10

4. The method of Claim 1 wherein said level of one or more genetic markers is measured by mRNA, DNA or protein.

15

5. The method of Claim 4 wherein said mRNA is measured by using a technique selected from the group consisting of in situ hybridization, reverse-transcriptase polymerase chain reaction, nucleic acid hybridization, electrophoresis, Northern blotting and mass spectrometry.

20

6. The method of Claim 4 wherein said DNA is measured by using a technique selected from the group consisting of quantitative polymerase chain reaction, genomic DNA-chips, in situ hybridization, electrophoresis, Southern blotting and mass spectrometry.

25

7. The method of Claim 4 wherein said protein is measured by using a technique selected from the group consisting of immunoassay, Western blots, ELISA, and mass spectrometry.

8. A method for predicting or monitoring a cancer patient's response to a molecule of the taxoid family, comprising the steps of:

30

- a) obtaining a test sample from a cancerous area of said patient;
- b) obtaining a control sample;
- c) measuring the level of one or more genetic markers; and
- d) comparing the measured levels of said one or more genetic markers in the test sample and the control sample;

wherein a decrease in the level of said one or more genetic markers measured in the test sample as compared to the control sample indicates an increased sensitivity to a molecule of the taxoid family.

9. The method of Claim 8, wherein said one or more genetic markers is selected from the group consisting of:

P21(Waf1), Homo sapiens cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1) (CDKN1A), transcript variant 1, mRNA (GenBank accession number: NM_000389);

5 Pim-1, Homo sapiens pim-1 oncogene (PIM1), mRNA (GenBank accession number: NM_002648);

GBP-1, Homo sapiens guanylate binding protein 1, interferon-inducible, 67kDa (GBP1), mRNA (GenBank accession number: NM_002053);

10 RXRA, Homo sapiens retinoid X receptor, alpha (RXRA), mRNA (GenBank accession number: NM_002957);

SPF45, Homo sapiens RNA binding motif protein 17 (RBM17), mRNA (GenBank accession number: NM_032905);

Hec1, Homo sapiens kinetochore associated 2 (KNTC2), mRNA (GenBank accession number: NM_006101);

15 Raf1, Human mRNA for raf oncogene (GenBank accession number: X03484);

Aurora A, Homo sapiens aurora-related kinase 1 (ARK1) mRNA, complete cds (GenBank accession number: AF008551);

TACC3, Homo sapiens transforming, acidic coiled-coil containing protein 3 (TACC3), mRNA (GenBank accession number: NM_006342);

20 RelB, Homo sapiens v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog B, nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 3 (avian) (RELB), mRNA (GenBank accession number: NM_006509);

PRKCD, Homo sapiens protein kinase C, delta (PRKCD), transcript variant 1, mRNA (GenBank accession number: NM_006254);

25 BRAF35, Homo sapiens high-mobility group 20B (HMG20B), mRNA (GenBank accession number: NM_006339);

HSPA1L, Homo sapiens heat shock 70kDa protein 1A (HSPA1A), mRNA (GenBank accession number: NM_005345);

30 STK11, Homo sapiens serine/threonine kinase 11 (Peutz-Jeghers syndrome) (STK11), mRNA (GenBank accession number: NM_000455); and

MKK3, Homo sapiens MAP kinase kinase 3 (MKK3) mRNA, complete cds (GenBank accession number: L36719).

10. The method of Claim 8 wherein said molecule of the taxoid family is selected from the group consisting of paclitaxel, docetaxel XRP9881 and XRP6258.
11. The method of Claim 8 wherein said level of one or more genetic markers is measured by mRNA, DNA or protein.
12. The method of Claim 11 wherein said mRNA is measured by using a technique selected from the group consisting of in situ hybridization, reverse-transcriptase polymerase chain reaction, nucleic acid hybridization, electrophoresis, Northern blotting and mass spectrometry.
13. The method of Claim 11 wherein said DNA is measured by using a technique selected from the group consisting of quantitative polymerase chain reaction, genomic DNA-chips, in situ hybridization, electrophoresis, Southern blotting and mass spectrometry.
14. The method of Claim 11 wherein said protein is measured by using a technique selected from the group consisting of immunoassay, Western blots, ELISA, and mass spectrometry.
15. A kit for predicting or monitoring a cancer patient's response to molecule of the taxoid family according to the method of Claim 1 wherein the kit comprises detectable-labeled antibodies, detectable-labeled antibody fragments or detectable-labeled oligonucleotides comprising nucleic acids capable of hybridizing under stringent conditions to said one or more genetic markers selected from the group consisting of:
- BubR1, Homo sapiens similar to protein kinase (BUBR1) mRNA, complete cds (GenBank accession number: AF046079);
 - Mad2, Homo sapiens mRNA for MAD2 protein (GenBank accession number: AJ000186);
 - Mps1, Homo sapiens TTK protein kinase (TTK), mRNA (GenBank accession number: NM_003318);
 - GEFT for Rac1/CDC42, Homo sapiens RAC/CDC42 exchange factor (GEFT), transcript variant 2, mRNA (GenBank accession number: NM_133483);
 - Bub1, Homo sapiens BUB1 budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog (yeast) (BUB1), mRNA (GenBank accession number: NM_004336);