

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 389 298**

51 Int. Cl.:
A61N 1/00 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **02806788 .2**
96 Fecha de presentación: **10.09.2002**
97 Número de publicación de la solicitud: **1463558**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **06.10.2004**

54 Título: **Agentes citotóxicos que presentan un resto de polietilen glicol reactivo, conjugados citotóxicos que comprenden grupos conectores de polietilen glicol y métodos para preparar y usar los mismos**

30 Prioridad:
21.12.2001 US 24290

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
25.10.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
25.10.2012

73 Titular/es:
IMMUNOGEN, INC. (100.0%)
830 WINTER STREET
WALTHAM, MA 02451, US

72 Inventor/es:
ZHAO, ROBERT YONGXIN;
MILLER, MICHAEL LOUIS;
WIDDISON, WAYNE CHARLES y
CHARI, RAVI V. J.

74 Agente/Representante:
RUO, Alessandro

ES 2 389 298 T3

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

DESCRIPCIÓN

Agentes citotóxicos que presentan un resto de polietilen glicol reactivo, conjugados citotóxicos que comprenden grupos conectores de polietilen glicol y métodos para preparar y usar los mismos.

CAMPO DE LA INVENCION

5 **[0001]** La presente invención se refiere a agentes citotóxicos que presentan conectores de polietilen glicol reactivos y a métodos para preparar dichos agentes. Estos agentes pueden usarse en la producción de conjugados citotóxicos, o para otros propósitos, tales como en una resina de afinidad para uso en el aislamiento de componentes celulares que reconocen y se unen a los agentes citotóxicos.

10 **[0002]** La presente invención también se refiere a nuevos conjugados citotóxicos que comprenden conectores de polietilen glicol, a métodos para preparar los conjugados y a su uso terapéutico. Más específicamente, la invención se refiere a nuevos conjugados citotóxicos que comprenden agentes citotóxicos unidos a agentes de unión a células que usan conectores de polietilen glicol hetero-bifuncionales, a métodos para preparar los conjugados y a su uso terapéutico. Estos nuevos conjugados citotóxicos tienen uso terapéutico porque la parte citotóxica de los conjugados puede administrarse a poblaciones celulares específicas de una manera dirigida, debido a la unión del agente citotóxico con un agente de unión a células.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

20 **[0003]** Se ha mostrado que los conjugados de agentes altamente citotóxicos, tales como maitansinoides y análogos de CC-1065, y agentes de unión a células poseen una actividad anti-tumoral excepcional específica de diana (Pat U.S. Nos: 5.208.020, 5.416.064, 5.475.092, 5.585.499 y 5.846.545). En dichos conjugados citotóxicos, el agente citotóxico se une al agente de unión a células mediante un enlace disulfuro o mediante un conector corto que contiene disulfuro. Se ha mostrado previamente que dichos conectores que contienen disulfuro son estables después de almacenamiento y se escinden eficazmente en el interior de una célula tumoral para liberar el fármaco completamente activo (Liu et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93: 8618-8623 (1996); Chari et al., *Cancer Res.* 55: 4079-4084 (1995); Chari, R. V. J., *Adv. Drug Delivery Rev.* 31: 89-104 (1998). La escisión ocurre probablemente mediante el intercambio de disulfuro entre el agente citotóxico unido a disulfuro y un tiol intracelular, tal como glutatión.

30 **[0004]** Sin embargo, como los agentes citotóxicos más altamente potentes usados en los conjugados citotóxicos son hidrofóbicos, surgen dos dificultades técnicas. La primera es que las reacciones de conjugación entre los agentes citotóxicos y los agentes de unión a células requieren condiciones de reacción que traten la naturaleza hidrofóbica de los agentes citotóxicos. Estas condiciones incluyen disoluciones muy diluidas, el uso de volúmenes grandes, y la presencia de grandes cantidades de co-disolventes no acuosos, que pueden dañar a los agentes de unión a células proteicos. Como resultado, los procesos de preparación y purificación se vuelven bastante engorrosos y el conjugado citotóxico final se obtiene en concentración baja, necesitando la administración de volúmenes grandes a los pacientes.

35 **[0005]** La segunda dificultad técnica es que los conjugados citotóxicos preparados usando enlaces disulfuro o conectores cortos que contienen disulfuro son sólo moderadamente solubles en las disoluciones farmacéuticas usadas típicamente para la administración parenteral a los pacientes. Es por lo tanto difícil producir formulaciones para dichos conjugados.

40 **[0006]** Así, con el fin de desarrollar métodos mejorados para producir conjugados citotóxicos, e incrementar la flexibilidad de la formulación de disoluciones farmacéuticas que contienen los conjugados, existe una necesidad de tratar la hidrofobicidad tanto de los agentes citotóxicos como de los conjugados citotóxicos producidos usando agentes citotóxicos.

[0007] Una manera para conseguir estos dos objetivos sería desarrollar moléculas conectoras nuevas que permitan que los agentes citotóxicos hidrofóbicos se puedan manipular bajo condiciones acuosas y permitan la formación de un conjugado citotóxico que sea soluble tanto bajo condiciones acuosas como no acuosas.

45 **[0008]** Se ha encontrado que el polietilen glicol (PEG) es útil en la conversión de fármacos citotóxicos en profármacos, extendiendo de esta manera la vida media de los fármacos en circulación *in vivo*, y mejorando su solubilidad en agua (para una revisión véase, Greenwald, R. B., *J. Controlled Release* 74: 159-171 (2001)). Por ejemplo, el fármaco anti-canceroso Taxol se ha convertido en el profármaco PEG-Taxol uniendo PEG mediante un enlace éster a la posición C-2' del Taxol (Pat. U.S. No. 5.824.701; Greenwald et al., *J. Med. Chem.* 39: 424-431 (1996); Greenwald et al., *J. Org. Chem.* 60: 331-336 (1995)).

50 **[0009]** Sin embargo, el PEG usado en dichas aplicaciones es habitualmente muy grande (peso molecular medio de 40.000). Dicho tamaño se requiere para alterar significativamente la farmacocinética del fármaco. Las moléculas de fármaco también se hacen reaccionar típicamente con PEG mediante un grupo éster o carbamato del fármaco, lo que puede resultar en una disminución drástica de la potencia del fármaco. Además, el resto de PEG debe

escindirse *in vivo* por algún mecanismo enzimático para restaurar la actividad del fármaco, un proceso que frecuentemente es ineficaz. Finalmente, el PEG usado en dichas aplicaciones es típicamente mono-funcional, es decir, sólo un extremo de la molécula de PEG se modifica de manera que pueda unirse al fármaco.

5 **[00010]** Los presentes inventores han preparado grupos conectores PEG nuevos que proporcionan una solución a las dos dificultades discutidas anteriormente. Estos grupos conectores PEG nuevos son solubles tanto en agua como en disolventes no acuosos, y pueden usarse para unir uno o más agentes citotóxicos a un agente de unión a células. Los grupos conectores PEG son conectores hetero-bifuncionales porque se unen a agentes citotóxicos y a agentes de unión a células en extremos opuestos de los conectores mediante un grupo sulfidrido o disulfuro funcional en un extremo y un éster activo en el otro extremo. Los grupos conectores tienen la doble ventaja sobre otros grupos conectores de que (1) pueden unirse químicamente a un agente citotóxico en un disolvente no acuoso mediante un enlace disulfuro, superando de esta manera la naturaleza hidrofóbica del agente y haciéndolo soluble tanto en disolventes no acuosos como acuosos, y (2) los conjugados citotóxicos producidos usando los grupos conectores tienen una mayor solubilidad en agua, permitiendo de esta manera una flexibilidad mucho mayor en la formulación de disoluciones farmacéuticas para la administración parenteral a los pacientes.

15 **[00011]** Así, en la presente memoria se describen agentes citotóxicos que presentan un grupo conector PEG que tiene un éster activo terminal, y conjugados citotóxicos que comprenden uno o más agentes citotóxicos unidos a un agente de unión a células mediante un grupo conector PEG. Además, se describe una composición terapéutica que comprende un conjugado citotóxico.

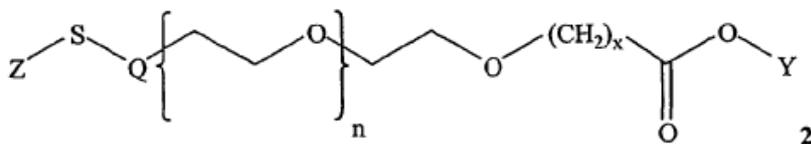
20 **[00012]** También se describen métodos para preparar agentes citotóxicos que presentan un grupo conector PEG que tiene un éster activo terminal, y métodos para preparar conjugados citotóxicos que comprenden uno o más agentes citotóxicos unidos a un agente de unión a células mediante un grupo conector PEG. Finalmente, se describe un método para matar poblaciones celulares seleccionadas usando conjugados citotóxicos.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

25 **[00013]** En una realización de la invención, se describen agentes citotóxicos que presentan un grupo conector de polietilén glicol (PEG) que tiene un éster activo terminal. Los agentes citotóxicos contemplados en ésta, y en cada realización del procedimiento, incluyen un maitansinoide que contiene tiol, taxano que contiene tiol, análogo de CC-1065 que contiene tiol, análogo de daunorrubicina que contiene tiol y análogo de doxorrubicina que contiene tiol y análogos o derivados que contienen tiol de éstos. El núcleo de los ésteres activos terminales del grupo conector PEG contemplados en ésta, y cada realización del procedimiento, son ésteres que reaccionan fácilmente con grupos amino, incluyendo ésteres de *N*-succinimidilo, *N*-sulfosuccinimidilo, *N*-ftalimidilo, *N*-sulfoftalimidilo, 2-nitrofenilo, 4-nitrofenilo, 2,4-dinitrofenilo, 3-sulfonil-4-nitrofenilo ó 3-carboxi-4-nitrofenilo.

[00014] En una realización preferida, el grupo conector PEG tiene de 1 a 20 unidades monoméricas. En una realización igualmente preferida, el grupo conector PEG tiene de 21 a 40 unidades monoméricas. En otra forma de realización igualmente preferida, el grupo conector PEG tiene de 41 a 1.000 unidades monoméricas.

35 **[00015]** Se contempla específicamente un agente citotóxico, que presenta un grupo conector de polietilén glicol (PEG) que tiene un éster activo terminal y de 1 a 20 unidades monoméricas de fórmula 2:



en el que Z es dicho agente citotóxico;

en el que Q es R₂COO-, R₂R₃NCOO-, R₂OCOO-, R₂O-, R₂CONR₃⁻, R₂R₃N-, R₂OCONR₃⁻, o S-,

40 en el que:

R₂ es SCR₄R₅R₆⁻,

R₄, R₅ y R₆ son cada uno H, alquilo lineal, alquilo cíclico o alquilo ramificado y pueden ser el mismo o diferente,

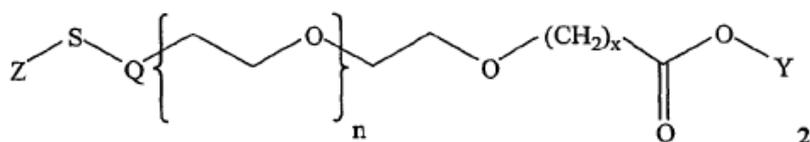
R₃ es H o un alquilo lineal, alquilo cíclico o alquilo ramificado;

en el que n es un número entero de 0 a 20;

45 en el que x es 1 ó 2; y

en el que Y es *N*-succinimidilo, *N*-sulfosuccinimidilo, *N*-ftalimidilo, *N*-sulfoftalimidilo, 2-nitrofenilo, 4-nitrofenilo, 2,4-dinitrofenilo, 3-sulfonil-4-nitrofenilo ó 3-carboxi-4-nitrofenilo.

[00016] También se contempla un agente citotóxico, que presenta un grupo conector PEG que tiene un éster activo terminal y de 21 a 40 unidades monoméricas, de fórmula 2:



5

en el que Z es dicho agente citotóxico;

en el que Q es R_2COO^- , $R_2R_3NCOO^-$, R_2OCOO^- , R_2O^- , $R_2CONR_3^-$, $R_2R_3N^-$, $R_2OCONR_3^-$, o S^- ,

en el que:

R_2 es $SCR_4R_5R_6^-$,

10 R_4 , R_5 y R_6 son cada uno H, alquilo lineal, alquilo cíclico o alquilo ramificado y pueden ser el mismo o diferente,

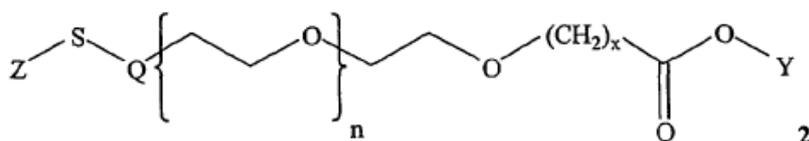
R_3 es H o un alquilo lineal, alquilo cíclico o alquilo ramificado;

en el que n es un número entero de 21 a 40;

en el que x es 1 ó 2; y

15 en el que Y es *N*-succinimidilo, *N*-sulfosuccinimidilo, *N*-ftalimidilo, *N*-sulfoftalimidilo, 2-nitrofenilo, 4-nitrofenilo, 2,4-dinitrofenilo, 3-sulfonil-4-nitrofenilo ó 3-carboxi-4-nitrofenilo.

[00017] También se contempla un agente citotóxico, que presenta un grupo conector PEG que tiene un éster activo terminal y de 41 a 1.000 unidades monoméricas, de fórmula 2:



en el que Z es dicho agente citotóxico;

20 en el que Q es R_2COO^- , $R_2R_3NCOO^-$, R_2OCOO^- , R_2O^- , $R_2CONR_3^-$, $R_2R_3N^-$, $R_2OCONR_3^-$, o S^- ,

en el que:

R_2 es $SCR_4R_5R_6^-$,

R_4 , R_5 y R_6 son cada uno H, alquilo lineal, alquilo cíclico o alquilo ramificado y pueden ser el mismo o diferente,

R_3 es H o un alquilo lineal, alquilo cíclico o alquilo ramificado;

25 en el que n es un número entero de 41 a 999;

en el que x es 1 ó 2; y

en el que Y es *N*-succinimidilo, *N*-sulfosuccinimidilo, *N*-ftalimidilo, *N*-sulfoftalimidilo, 2-nitrofenilo, 4-nitrofenilo, 2,4-dinitrofenilo, 3-sulfonil-4-nitrofenilo ó 3-carboxi-4-nitrofenilo.

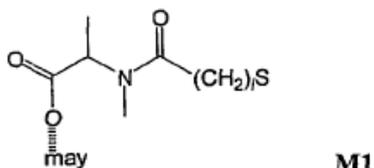
30 **[00018]** También se contempla el agente citotóxico según cualquiera de los ejemplos anteriores, en el que dicho agente citotóxico se selecciona del grupo que consiste en un maitansinoide que contiene tiol, taxano que contiene tiol, análogo de CC-1065 que contiene tiol, análogo de daunorrubicina que contiene tiol y análogo de doxorrubicina que contiene tiol y análogos o derivados de éstos que contienen tiol.

[00019] También se contempla el agente citotóxico según los ejemplos relevantes anteriores, en el que dicho maitansinoide que contiene tiol es un maitansinoide que contiene tiol C-3.

[00020] También se contempla el agente citotóxico según los ejemplos relevantes anteriores, en el que dicho maitansinoide que contiene tior C-3 es un maitansinoide que contiene tior C-3 que contiene N-metil-alanina.

[00021] También se contempla el agente citotóxico según los ejemplos relevantes anteriores, en el que dicho maitansinoide que contiene tior C-3 que contiene N-metil-alanina es un compuesto seleccionado de la fórmula **M1** siguiente:

5

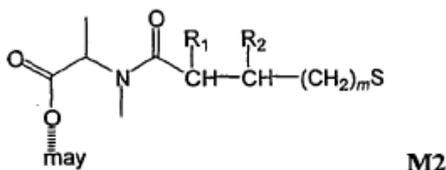


en el que:

m es un número entero de 1 a 10; y

may es un maitansinoide.

10 **[00022]** También se contempla el agente citotóxico según los ejemplos relevantes anteriores, en el que dicho maitansinoide que contiene tior C-3 que contiene N-metil-alanina es un compuesto seleccionado de la fórmula **M2** siguiente:



en el que:

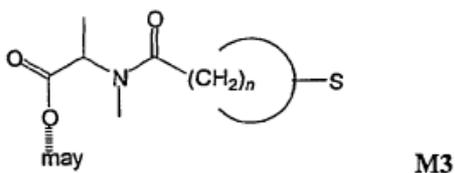
15 R_1 y R_2 son H, CH_3 o CH_2CH_3 , y pueden ser el mismo o diferente;

m es 0, 1, 2 ó 3; y

may es un maitansinoide.

20 **[00023]** También se contempla el agente citotóxico según los ejemplos relevantes anteriores, en el que dicho maitansinoide que contiene tior C-3 que contiene N-metil-alanina es un compuesto seleccionado de la fórmula **M3** siguiente:

20



en el que:

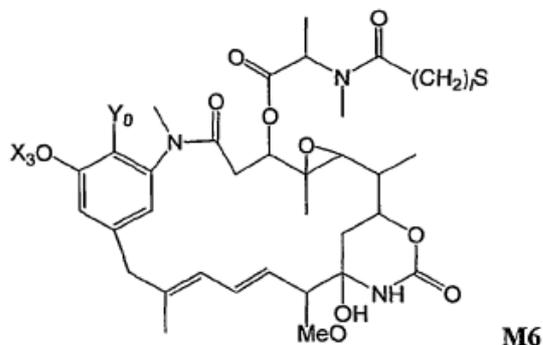
n es un número entero de 3 a 8; y

may es un maitansinoide.

25 **[00024]** También se contempla el agente citotóxico según los ejemplos relevantes anteriores, en el que dicho maitansinoide que contiene tior C-3 que contiene N-metil-alanina es un maitansinol que contiene tior C-3 que contiene N-metil-alanina.

[00025] También se contempla el agente citotóxico según los ejemplos relevantes anteriores, en el que dicho maitansinol que contiene tior C-3 que contiene N-metil-alanina es un decloro maitansinol.

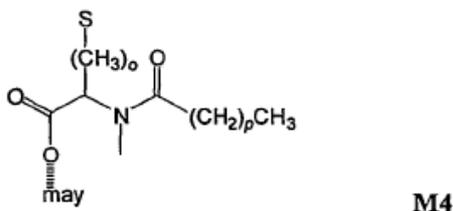
[00026] También se contempla el agente citotóxico según los ejemplos relevantes anteriores, en el que dicho maitansinol que contiene tior C-3 que contiene N-metil-alanina es un compuesto seleccionado de la fórmula **M6** siguiente:



- 5 en el que:
 / es 1, 2 ó 3;
 Y₀ es Cl o H; y
 X₃ es H o CH₃.

10 **[00027]** También se contempla el agente citotóxico según los ejemplos relevantes anteriores, en el que dicho maitansinoide que contiene tior C-3 es un maitansinoide que contiene tior C-3 que contiene N-metil-cisteína.

[00028] También se contempla el agente citotóxico según los ejemplos relevantes anteriores, en el que dicho maitansinoide que contiene tior C-3 que contiene N-metil-cisteína es un compuesto seleccionado de la fórmula **M4** siguiente:

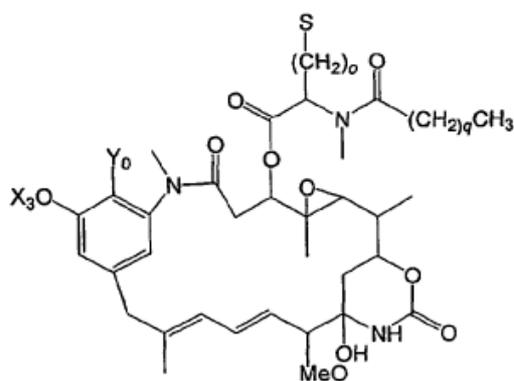


- 15 en el que:
 o es 1, 2 ó 3;
 ρ es un número entero de 0 a 10; y
 may es un maitansinoide.

20 **[00029]** También se contempla el agente citotóxico según los ejemplos relevantes anteriores, en el que dicho maitansinoide que contiene tior C-3 que contiene N-metil-cisteína es un maitansinol que contiene tior C-3 que contiene N-metil-cisteína.

[00030] También se contempla el agente citotóxico según los ejemplos relevantes anteriores, en el que dicho maitansinol que contiene tior C-3 que contiene N-metil-cisteína es un decloro maitansinol.

25 **[00031]** También se contempla el agente citotóxico según los ejemplos relevantes anteriores, en el que dicho maitansinol que contiene tior C-3 que contiene N-metil-cisteína es un compuesto seleccionado de la fórmula **M5** siguiente:



M5

en el que:

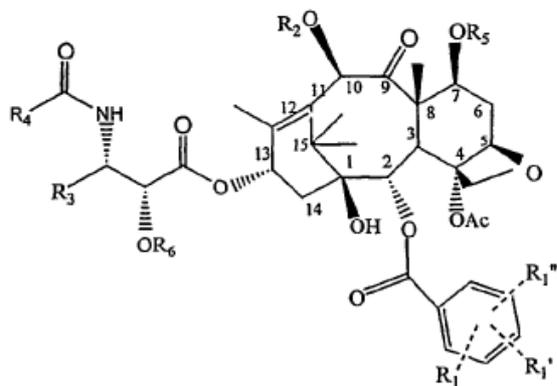
o es 1, 2 ó 3;

q es un número entero de 0 a 10;

5 Y_0 es Cl o H; y

X_3 es H o CH_3 .

[00032] También se contempla el agente citotóxico según los ejemplos relevantes anteriores, en el que dicho taxano que contiene tiol es un compuesto seleccionado de la fórmula T1 siguiente:



T1

10 en el que:

R_1 es H, un grupo aceptor de electrones o un grupo donador de electrones, y R_1' y R_1'' son el mismo o diferente y son H, un grupo aceptor de electrones o un grupo donador de electrones;

15 R_2 es heterocíclico, un éster o éter lineal, ramificado o cíclico que tiene de 1 a 10 átomos de carbono o un carbamato de la fórmula $-CONR_{10}R_{11}$, en el que R_{10} y R_{11} son el mismo o diferente y son H, alquilo lineal, ramificado o cíclico que tiene de 1 a 10 átomos de carbono o arilo;

R_3 es un arilo o un alquilo lineal, ramificado o cíclico que tiene de 1 a 10 átomos de carbono;

R_4 es $-OC(CH_3)_3$ o fenilo;

R_5 es un resto de tiol; y

20 R_6 es heterocíclico, H, un éster o éter lineal, ramificado o cíclico que tiene de 1 a 10 átomos de carbono o un carbamato de la fórmula $-CONR_{10}R_{11}$, en el que R_{10} y R_{11} son el mismo o diferente y son H, alquilo lineal, ramificado o cíclico que tiene de 1 a 10 átomos de carbono o arilo.

[00033] También se contempla el compuesto de los ejemplos relevantes anteriores, en el que R_1 es F, NO_2 , CN, Cl, CHF_2 , CF_3 , $-OCH_3$, $-OCH_2CH_3$ o NR_7R_8 , en el que:

25 R_7 y R_8 son el mismo o diferente y son alquilo lineal, ramificado o cíclico que tiene de 1 a 10 átomos de carbono o arilo simple o sustituido que tiene de 1 a 10 átomos de carbono.

[00034] También se contempla el compuesto de los ejemplos relevantes anteriores, en el que R_7 y R_8 tienen cada uno de 1 a 4 átomos de carbono.

[00035] También se contempla el compuesto de los ejemplos relevantes anteriores, en el que R_7 y R_8 son el mismo.

5 **[00036]** También se contempla el compuesto de los ejemplos relevantes anteriores, en el que R_7 y R_8 son el mismo.

[00037] También se contempla el compuesto de los ejemplos relevantes anteriores, en el que R_2 es $-\text{COC}_2\text{H}_5$, $-\text{CH}_2\text{CH}_3$, $-\text{CONHCH}_2\text{CH}_3$ -CO-morfolino, -CO-piperidino, -CO-piperacino o -CO-N-metilpiperacino.

10 **[00038]** También se contempla el compuesto de los ejemplos relevantes anteriores, en el que R_5 es $-(\text{CH}_2)_n\text{S}$, $-\text{CO}(\text{CH}_2)_n\text{S}$, $-(\text{CH}_2)_n\text{CH}(\text{CH}_3)\text{S}$, $-\text{CO}(\text{CH}_2)_n\text{CH}(\text{CH}_3)\text{S}$, $-(\text{CH}_2)_n\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{S}$, $-\text{CO}(\text{CH}_2)_n\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{S}$, $-\text{CONR}_{12}(\text{CH}_2)_n\text{S}$, $-\text{CONR}_{12}(\text{CH}_2)_n\text{CH}(\text{CH}_3)\text{S}$, $-\text{CONR}_{12}(\text{CH}_2)_n\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{S}$, -CO-morfolino-XS, -CO-piperidino-XS, -CO-piperacino-XS o -CO-N-metilpiperacino-XS;

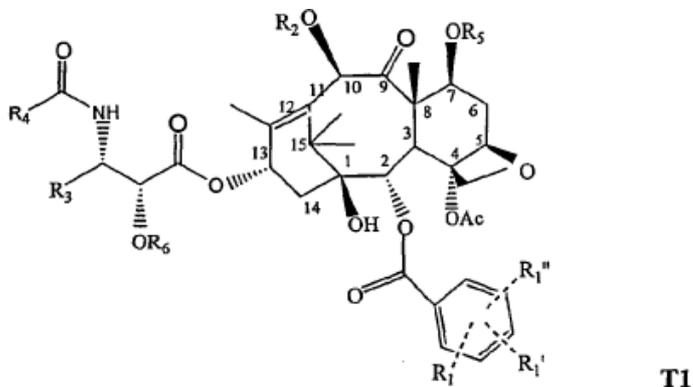
15 en el que n es un número entero de 1 a 10; y

en el que R_{12} es H, un alquilo lineal, alquilo ramificado o alquilo cíclico que tiene 1 a 10 átomos de carbono, o arilo simple o sustituido que tiene de 1 a 10 átomos de carbono o heterocíclico.

[00039] También se contempla el compuesto de los ejemplos relevantes anteriores, en el que R_1 está en la posición meta cuando R_1' y R_1'' son H o OCH_3 .

20 **[00040]** También se contempla el compuesto de los ejemplos relevantes anteriores, en el que R_3 es $-\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)_2$.

[00041] También se contempla el agente citotóxico según los ejemplos relevantes anteriores, en el que dicho taxano que contiene tiol es un compuesto seleccionado de la fórmula **T1** siguiente:



25 en el que:

R_1 es H, un grupo aceptor de electrones o un grupo donador de electrones, y R_1' y R_1'' son el mismo o diferente y son H, un grupo aceptor de electrones o un grupo donador de electrones;

R_2 es un resto de tiol;

R_3 es un arilo o un alquilo lineal, ramificado o cíclico que tiene de 1 a 10 átomos de carbono;

30 R_4 es $-\text{OC}(\text{CH}_3)_3$ o fenilo;

R_5 es heterocíclico, H, un éster o éter lineal, ramificado o cíclico que tiene de 1 a 10 átomos de carbono o un carbamato de la fórmula $-\text{CONR}_{10}\text{R}_{11}$, en el que R_{10} y R_{11} son el mismo o diferente y son H, alquilo lineal, ramificado o cíclico que tiene de 1 a 10 átomos de carbono o arilo; y

35 R_6 es heterocíclico, H, un éster o éter lineal, ramificado o cíclico que tiene de 1 a 10 átomos de carbono o un carbamato de la fórmula $-\text{CONR}_{10}\text{R}_{11}$, en el que R_{10} y R_{11} son el mismo o diferente y son H, alquilo lineal, ramificado o cíclico que tiene 1 a 10 átomos de carbono o arilo.

[00042] También se contempla el compuesto de los ejemplos relevantes anteriores, en el que al menos uno de R_1 es F, NO_2 , CN, Cl, CHF_2 , CF_3 , $-\text{OCH}_3$, $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ o NR_7R_8 en el que:

R_7 y R_8 son el mismo o diferente y son alquilo lineal, ramificado o cíclico que tiene de 1 a 10 átomos de carbono o arilo simple o sustituido que tiene de 1 a 10 átomos de carbono.

5 **[00043]** También se contempla el compuesto de los ejemplos relevantes anteriores, en el que R_7 y R_8 tienen cada uno de 1 a 4 átomos de carbono.

[00044] También se contempla el compuesto de los ejemplos relevantes anteriores, en el que R_7 y R_8 son el mismo.

10 **[00045]** También se contempla el compuesto de los ejemplos relevantes anteriores, en el que R_7 y R_8 son el mismo.

[00046] También se contempla el compuesto de los ejemplos relevantes anteriores, en el que R_5 es $-(\text{CH}_2)_n\text{S}$, $-\text{CO}(\text{CH}_2)_n\text{S}$,

15 $-(\text{CH}_2)_n\text{CH}(\text{CH}_3)\text{S}$, $-\text{CO}(\text{CH}_2)_n\text{CH}(\text{CH}_3)\text{S}$, $-(\text{CH}_2)_n\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{S}$, $-\text{CO}(\text{CH}_2)_n\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{S}$, $-\text{CONR}_{12}(\text{CH}_2)_n\text{S}$, $-\text{CONR}_{12}(\text{CH}_2)_n\text{CH}(\text{CH}_3)\text{S}$, $-\text{CONR}_{12}(\text{CH}_2)_n\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{S}$, $-\text{CO}$ -morfolino-XS, $-\text{CO}$ -piperidino-XS, $-\text{CO}$ -piperacino-XS o $-\text{CO}$ -*N*-metilpiperacino-XS;

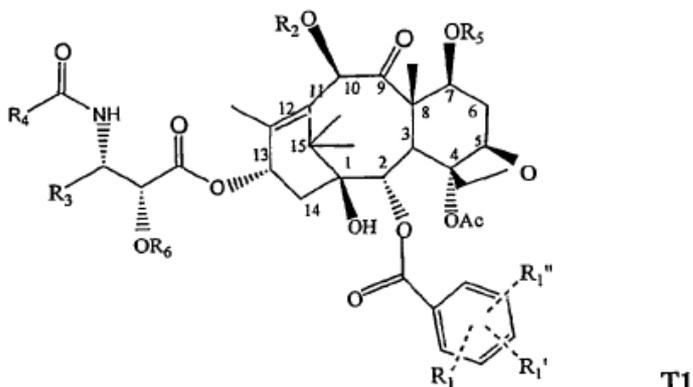
en el que n es un número entero de 1 a 10; y

en el que R_{12} es H, un alquilo lineal, alquilo ramificado o alquilo cíclico que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, o arilo simple o sustituido que tiene de 1 a 10 átomos de carbono o heterocíclico.

20 **[00047]** También se contempla el compuesto de los ejemplos relevantes anteriores, en el que R_5 es $-\text{COC}_2\text{H}_5$, $-\text{CH}_2\text{CH}_3$, $-\text{CONHCH}_2\text{CH}_3$, $-\text{CO}$ -morfolino, $-\text{CO}$ -piperidino, $-\text{CO}$ -piperacino o $-\text{CO}$ -*N*-metilpiperacino.

[00048] También se contempla el compuesto de los ejemplos relevantes anteriores, en el que R_1 está en la posición meta cuando R_1' y R_1'' son H o OCH_3 .

25 **[00049]** También se contempla el agente citotóxico según los ejemplos relevantes anteriores, en el que dicho taxano que contiene tiol es un compuesto seleccionado de la fórmula **T1** siguiente:



en el que:

R_1 es H, un grupo aceptor de electrones o un grupo donador de electrones, y R_1' y R_1'' son el mismo o diferente y son H, un grupo aceptor de electrones o un grupo donador de electrones;

30 R_2 es heterocíclico, un éster o éter lineal, ramificado o cíclico que tiene de 1 a 10 átomos de carbono o un carbamato de la fórmula $-\text{CONR}_{10}\text{R}_{11}$, en el que R_{10} y R_{11} son el mismo o diferente y son H, alquilo lineal, ramificado o cíclico que tiene de 1 a 10 átomos de carbono o arilo;

R_3 es un arilo o es un alquilo lineal, ramificado o cíclico que tiene de 1 a 10 átomos de carbono;

R_4 es $-\text{OC}(\text{CH}_3)_3$ o fenilo;

35 R_5 es heterocíclico, H, un éster o éter lineal, ramificado o cíclico que tiene de 1 a 10 átomos de carbono o un carbamato de la fórmula $-\text{CONR}_{10}\text{R}_{11}$, en el que R_{10} y R_{11} son el mismo o diferente y son H, alquilo lineal, ramificado o cíclico que tiene 1 a 10 átomos de carbono o arilo;

R₆ es un resto de tiol.

[00050] También se contempla el compuesto de los ejemplos relevantes anteriores, en el que R₁ es F, NO₂, CN, Cl, CHF₂, CF₃, -OCH₃, -OCH₂CH₃ o NR₇R₈ en el que:

5 R₇ y R₈ son el mismo o diferente y son alquilo lineal, ramificado o cíclico que tiene de 1 a 10 átomos de carbono o arilo simple o sustituido que tiene de 1 a 10 átomos de carbono.

[00051] También se contempla el compuesto de los ejemplos relevantes anteriores, en el que R₇ y R₈ tiene cada uno 1 a 4 átomos de carbono.

[00052] También se contempla el compuesto de los ejemplos relevantes anteriores, en el que R₇ y R₈ son el mismo.

10 **[00053]** También se contempla el compuesto de los ejemplos relevantes anteriores, en el que R₇ y R₈ son el mismo.

[00054] También se contempla el compuesto de los ejemplos relevantes anteriores, en el que R₂ es -COC₂H₅, -CH₂CH₃, -CONHCH₂CH₃, -CO-morfolino, -CO-piperidino, -CO-piperacino o -CO-N-metilpiperacino.

15 **[00055]** También se contempla el compuesto de los ejemplos relevantes anteriores, en el que R₅ es -(CH₂)_nS, -CO(CH₂)_nS, -(CH₂)_nCH(CH₃)S, -CO(CH₂)_nCH(CH₃)S, -(CH₂)_nC(CH₃)₂S, -CO(CH₂)_nC(CH₃)₂S, -CONR₁₂(CH₂)_nS, -CONR₁₂(CH₂)_nCH(CH₃)S, -CONR₁₂(CH₂)_nC(CH₃)₂S, -CO-morfolino-XS, -CO-piperidino-XS, -CO-piperacino-XS o -CO-N-metilpiperacino-XS;

20 en el que n es un número entero de 1 a 10; y

en el que R₁₂ es H, un alquilo lineal, alquilo ramificado o alquilo cíclico que tiene 1 a 10 átomos de carbono, o arilo simple o sustituido que tiene de 1 a 10 átomos de carbono o heterocíclico.

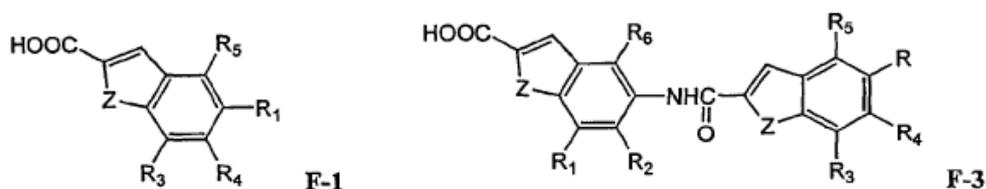
[00056] También se contempla el compuesto de los ejemplos relevantes anteriores, en el que R₁ está en la posición meta cuando R₁' y R₁'' son H o OCH₃.

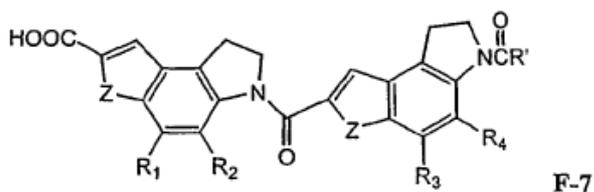
25 **[00057]** También se contempla el agente citotóxico según los ejemplos relevantes anteriores, en el que dicho análogo de CC-1065 que contiene tiol es un compuesto citotóxico que contiene ciclopropilbencindol formado a partir de una subunidad A de las fórmulas **A-3** o **A-4** unida covalentemente a una subunidad B de la fórmula **F-1** o a una subunidad B-C de las fórmulas **F-3** o **F-7** mediante un enlace amida del grupo amino secundario del resto de pirrol de la subunidad A al grupo carboxilo C-2 de la subunidad B,

30 en el que las fórmulas **A-3** y **A-4** son como sigue:



en el que las fórmulas **F-1**, **F-3** y **F-7** son como sigue:





F-7

en el que cada Z puede ser el mismo o diferente y puede ser O o NH; y

5 en el que, en la Fórmula F-1 R₄ es un resto de tiol, en la Fórmula F-3 uno de R o R₄ es un resto tiol, en la Fórmula F-7 uno de R' o R₄ es un resto tiol; cuando R o R' es un resto de tiol, entonces R₁ a R₆, que pueden ser el mismo o diferente, son hidrógeno, alquilo C₁-C₃ lineal, metoxi, hidroxilo, amino primario, amino secundario, amino terciario o amido; y cuando R₄ es un resto de tiol, R, R₁, R₂, R₃, R₄, R₅ y R₆, que pueden ser el mismo o diferente, son hidrógeno, alquilo C₁-C₃ lineal, metoxi, hidroxilo, amino primario, amino secundario, amino terciario o amido y R' es NH₂, alquilo, O-alquilo, amino primario, amino secundario, amino terciario o amido.

10 **[00058]** También se contempla el agente citotóxico de los ejemplos relevantes anteriores, en el que R y R' son restos de tiol y R₁ a R₆ son cada uno hidrógeno.

[00059] También se contempla el agente citotóxico de los ejemplos relevantes anteriores, en el que R o R₄ es NHCO(CH₂)_S, NHCOC₆H₄(CH₂)_S o O(CH₂)_S y R' es (CH₂)_S, NH(CH₂)_S o O(CH₂)_S

en el que:

/ es un número entero de 1 a 10.

15 **[00060]** También se contempla el agente citotóxico de los ejemplos relevantes anteriores, en el que R o R₄ es NHCO(CH₂)_S, NHCOC₆H₄(CH₂)_S o O(CH₂)_S y R' es (CH₂)_S, NH(CH₂)_S o O(CH₂)_S

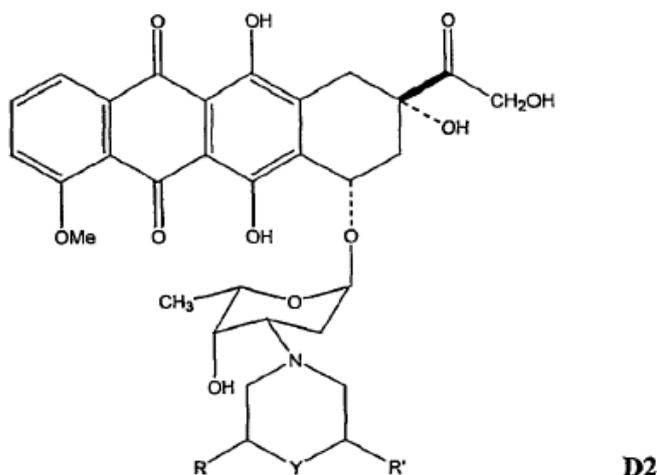
en el que:

/ es un número entero de 1 a 10.

[00061] También se contempla el agente citotóxico de los ejemplos relevantes anteriores, en el que / es 1.

20 **[00062]** También se contempla el agente citotóxico de los ejemplos relevantes anteriores, en el que / es 2.

[00063] También se contempla el agente citotóxico según los ejemplos relevantes anteriores, en el que dicho análogo de doxorubicina que contiene tiol es un compuesto seleccionado de la fórmula D2 siguiente:



D2

en el que,

25 Y es O o NR₂, en el que R₂ es alquilo lineal o ramificado que tiene 1 a 5 átomos de carbono;

R es un resto de tiol, H, o alquilo lineal o ramificado que tiene 1 a 5 átomos de carbono; y

R' es un resto de tiol, H, o -OR₁, en el que R₁ es alquilo lineal o ramificado que tiene 1 a 5 átomos de carbono;

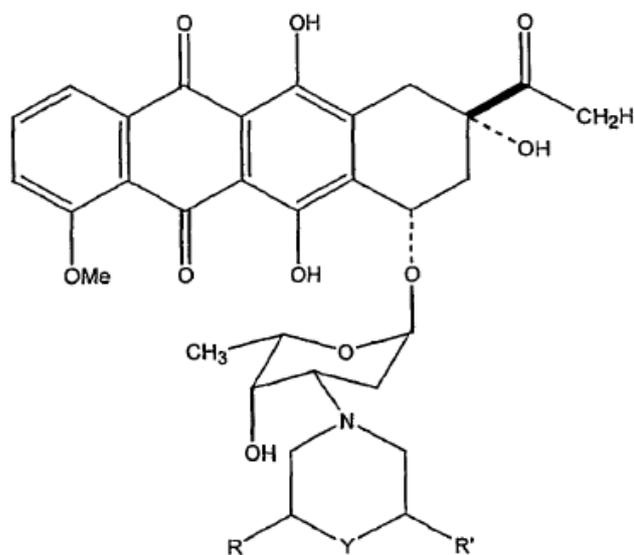
siempre que R y R' no sean restos de tiol al mismo tiempo.

[00064] También se contempla el compuesto de los ejemplos relevantes anteriores, en el que NR₂ es NCH₃.

[00065] También se contempla el compuesto de los ejemplos relevantes anteriores, en el que R' es -O.

5 **[00066]** También se contempla el compuesto de los ejemplos relevantes anteriores, en el que el resto de tiol es - (CH₂)_nS, -O(CH₂)_nS, -(CH₂)_nCH(CH₃)S, -O(CH₂)_nCH(CH₃)S, -(CH₂)_nC(CH₃)₂S, o -O(CH₂)_nC(CH₃)₂S, en el que n es un número entero de 1 a 10.

[00067] También se contempla el agente citotóxico según los ejemplos relevantes anteriores, en el que dicho análogo de daunorrubicina que contiene tiol es un compuesto seleccionado de la fórmula **D3** siguiente:



10

en el que,

Y es O o NR₂, en el que R₂ es alquilo lineal o ramificado que tiene 1 a 5 átomos de carbono;

R es un resto de tiol, H, o alquilo lineal o ramificado que tiene 1 a 5 átomos de carbono; y

R' es un resto de tiol, H, o -OR₁, en el que R₁ es alquilo lineal o ramificado que tiene 1 a 5 átomos de carbono;

15 siempre que R y R' no sean restos de tiol al mismo tiempo.

[00068] También se contempla el compuesto de los ejemplos relevantes anteriores, en el que NR₂ es NCH₃.

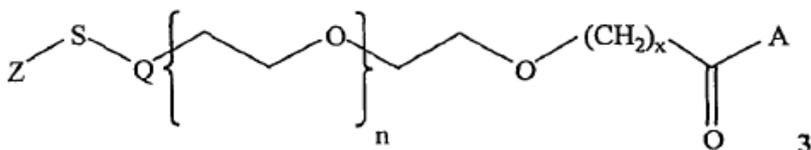
[00069] También se contempla el compuesto de los ejemplos relevantes anteriores, en el que R' es -O.

20 **[00070]** También se contempla el compuesto de los ejemplos relevantes anteriores, en el que el resto de tiol es - (CH₂)_nS, -O(CH₂)_nS, -(CH₂)_nCH(CH₃)S, -O(CH₂)_nCH(CH₃)S, -(CH₂)_nC(CH₃)₂S, o -O(CH₂)_nC(CH₃)₂S, en el que n es un número entero de 1 a 10.

25 **[00071]** En una segunda realización de la invención, se describe un conjugado citotóxico que comprende uno o más agentes citotóxicos unidos a un agente de unión a células mediante un grupo conector PEG. Los agentes de unión a células contemplados en ésta, y en cada realización del procedimiento, incluyen anticuerpos (especialmente anticuerpos monoclonales y fragmentos de anticuerpo), interferones, linfoquinas, hormonas, factores de crecimiento, vitaminas y moléculas transportadoras de nutrientes (tales como transferrina).

[00072] En una realización preferida, el grupo conector PEG tiene de 1 a 20 unidades monoméricas. En una realización igualmente preferida, el grupo conector PEG tiene de 21 a 40 unidades monoméricas. En otra forma de realización igualmente preferida, el grupo conector PEG tiene de 41 a 1.000 unidades monoméricas.

[00073] Se contempla específicamente un conjugado citotóxico, que comprende uno o más agentes citotóxicos unidos covalentemente a un agente de unión a células mediante un grupo conector PEG que tiene 1 a 20 unidades monoméricas, en el que la unión de uno de dichos uno o más agentes citotóxicos se ilustra en la fórmula 3:



5 en el que Z es dicho agente citotóxico;

en el que Q es R_2COO^- , $R_2R_3NCOO^-$, R_2OCOO^- , R_2O^- , $R_2CONR_3^-$, $R_2R_3N^-$, $R_2OCONR_3^-$, o S^- ,

en el que:

R_2 es $SCR_4R_5R_6^-$,

R_4 , R_5 y R_6 son cada uno H, alquilo lineal, alquilo cíclico o alquilo ramificado y pueden ser el mismo o diferente,

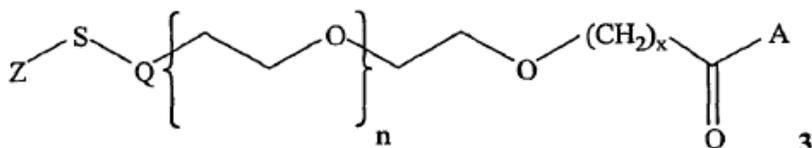
10 R_3 es H o un alquilo lineal, alquilo cíclico o alquilo ramificado,

en el que n es un número entero de 0 a 19;

en el que x es 1 ó 2; y

en el que A es dicho agente de unión a células.

15 **[00074]** También se contempla un conjugado citotóxico, que comprende uno o más agentes citotóxicos unidos covalentemente a un agente de unión a células mediante un grupo conector PEG que tiene 21 a 40 unidades monoméricas, en el que la unión de uno de dichos uno o más agentes citotóxicos se ilustra en la fórmula 3:



en el que Z es dicho agente citotóxico;

en el que Q es R_2COO^- , $R_2R_3NCOO^-$, R_2OCOO^- , R_2O^- , $R_2CONR_3^-$, $R_2R_3N^-$, $R_2OCONR_3^-$, o S^- ,

20 en el que:

R_2 es $SCR_4R_5R_6^-$,

R_4 , R_5 y R_6 son cada uno H, alquilo lineal, alquilo cíclico o alquilo ramificado y pueden ser el mismo o diferente,

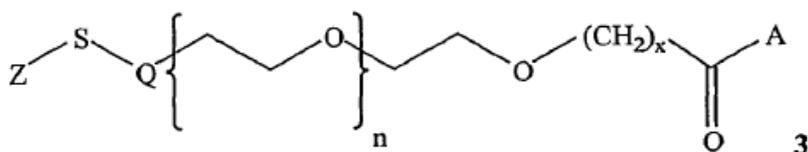
R_3 es H o un alquilo lineal, alquilo cíclico o alquilo ramificado,

en el que n es un número entero de 21 a 39;

25 en el que x es 1 ó 2; y

en el que A es dicho agente de unión a células.

[00075] También se contempla un conjugado citotóxico, que comprende uno o más agentes citotóxicos unidos covalentemente a un agente de unión a células mediante un grupo conector PEG que tiene 41 a 1.000 unidades monoméricas, en el que la unión de uno de dichos uno o más agentes citotóxicos se ilustra en la fórmula 3:



en el que Z es dicho agente citotóxico;

en el que Q es R_2COO^- , $R_2R_3NCOO^-$, R_2OCOO^- , R_2O^- , $R_2CONR_3^-$, $R_2R_3N^-$, $R_2OCONR_3^-$, o S^- ,

en el que:

5 R_2 es $SCR_4R_5R_6^-$,

R_4 , R_5 y R_6 son cada uno H, alquilo lineal, alquilo cíclico o alquilo ramificado y pueden ser el mismo o diferente,

R_3 es H o un alquilo lineal, alquilo cíclico o alquilo ramificado,

en el que n es un número entero de 40 a 999;

en el que x es 1 ó 2; y

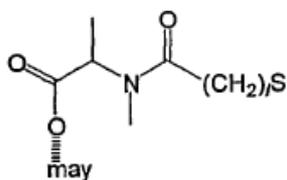
10 en el que A es dicho agente de unión a células.

[00076] También se contempla el conjugado citotóxico según uno cualquiera de los ejemplos relevantes anteriores, en el que dicho agente citotóxico se selecciona del grupo que consiste en un maitansinoide que contiene tiol, taxano que contiene tiol, análogo de CC-1065 que contiene tiol, análogo de daunorrubicina que contiene tiol y análogo de doxorubicina que contiene tiol y análogos o derivados que contienen tiol de éstos y dicho agente de unión a células se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo policlonal, anticuerpo monoclonal, fragmento de anticuerpo, interferón, linfoquina, hormona, factor de crecimiento, vitamina y molécula transportadora de nutrientes.

[00077] También se contempla el conjugado citotóxico según los ejemplos relevantes anteriores, en el que dicho maitansinoide que contiene tiol es un maitansinoide que contiene tiol C-3.

20 **[00078]** También se contempla el conjugado citotóxico según los ejemplos relevantes anteriores, en el que dicho maitansinoide que contiene tiol C-3 es un maitansinoide que contiene tiol C-3 que contiene N-metil-alanina.

[00079] También se contempla el conjugado citotóxico según los ejemplos relevantes anteriores, en el que dicho maitansinoide que contiene tiol C-3 que contiene N-metil-alanina es un compuesto seleccionado de la fórmula **M1** siguiente:



25

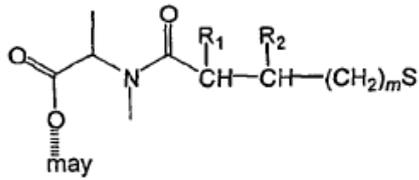
M1

en el que:

l es un número entero de 1 a 10; y

may es un maitansinoide.

30 **[00080]** También se contempla el conjugado citotóxico según los ejemplos relevantes anteriores, en el que dicho maitansinoide que contiene tiol C-3 que contiene N-metil-alanina es un compuesto seleccionado de la fórmula **M2** siguiente:



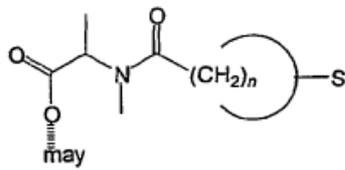
en el que:

R₁ y R₂ son H, CH₃ o CH₂CH₃, y pueden ser el mismo o diferente;

m es 0, 1, 2 ó 3; y

5 may es un maitansinoide.

[00081] También se contempla el conjugado citotóxico según los ejemplos relevantes anteriores, en el que dicho maitansinoide que contiene tiol C-3 que contiene N-metil-alanina es un compuesto seleccionado de la fórmula **M3** siguiente:



10 en el que:

n es un número entero de 3 a 8; y

may es un maitansinoide.

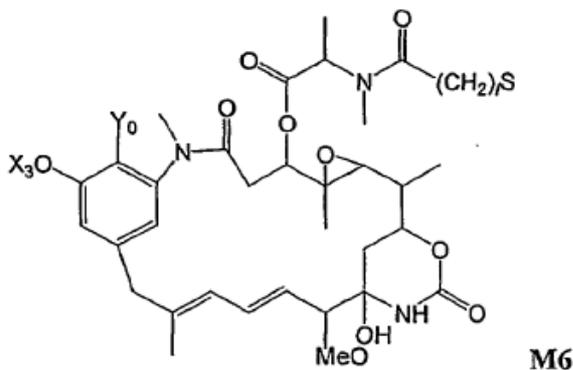
[00082] También se contempla el conjugado citotóxico según los ejemplos relevantes anteriores, en el que dicho maitansinoide que contiene tiol C-3 que contiene N-metil-alanina es un maitansinol que contiene tiol C-3 que

15 contiene N-metil-alanina.

[00083] También se contempla el conjugado citotóxico según los ejemplos relevantes anteriores, en el que dicho maitansinol que contiene tiol C-3 que contiene N-metil-alanina es un decloro maitansinol.

[00084] También se contempla el conjugado citotóxico según los ejemplos relevantes anteriores, en el que dicho maitansinol que contiene tiol C-3 que contiene N-metil-alanina es un compuesto seleccionado de la fórmula **M6** siguiente:

20



en el que:

l es 1, 2 ó 3;

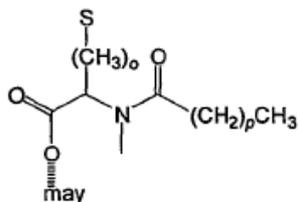
Y₀ es Cl o H; y

25 X₃ es H o CH₃.

[00085] También se contempla el conjugado citotóxico según los ejemplos relevantes anteriores, en el que dicho maitansinoide que contiene tiol C-3 es un maitansinoide que contiene tiol C-3 que contiene N-metil-cisteína.

[00086] También se contempla el conjugado citotóxico según los ejemplos relevantes anteriores, en el que dicho maitansinoide que contiene tiol C-3 que contiene N-metil-cisteína es un compuesto seleccionado de la fórmula **M4** siguiente:

5



M4

en el que:

o es 1, 2 ó 3;

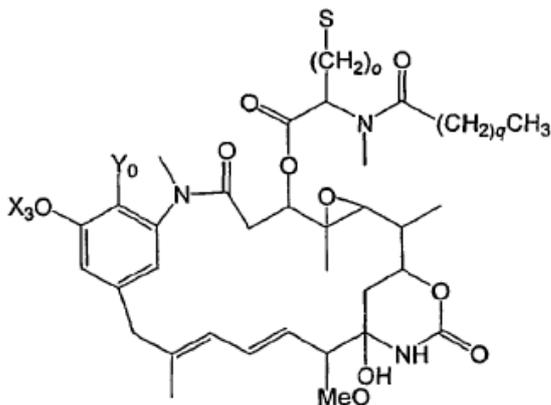
p es un número entero de 0 a 10; y

10 *may* es un maitansinoide.

[00087] También se contempla el conjugado citotóxico según los ejemplos relevantes anteriores, en el que dicho maitansinoide que contiene tiol C-3 que contiene N-metil-cisteína es un maitansinol que contiene tiol C-3 que contiene N-metil-cisteína.

15 **[00088]** También se contempla el conjugado citotóxico según los ejemplos relevantes anteriores, en el que dicho maitansinol que contiene tiol C-3 que contiene N-metil-cisteína es un decloro maitansinol.

[00089] También se contempla el conjugado citotóxico según los ejemplos relevantes anteriores, en el que dicho maitansinol que contiene tiol C-3 que contiene N-metil-cisteína es un compuesto seleccionado de la fórmula **M5** siguiente:



M5

20 en el que:

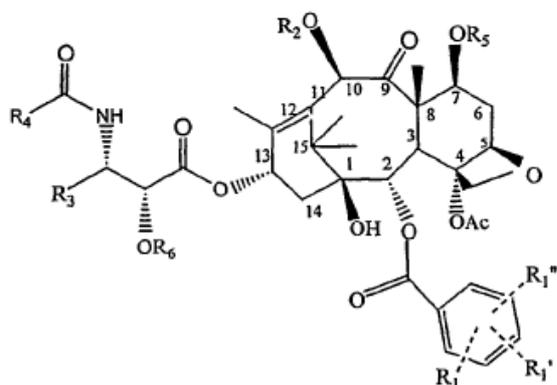
o es 1, 2 ó 3;

q es un número entero de 0 a 10;

*Y*₀ es Cl o H; y

*X*₃ es H o CH₃.

25 **[00090]** También se contempla el conjugado citotóxico según los ejemplos relevantes anteriores, en el que dicho taxano que contiene tiol es un compuesto seleccionado de la fórmula **T1** siguiente:



T1

en el que:

R₁ es H, un grupo aceptor de electrones o un grupo donador de electrones, y R₁' y R₁'' son el mismo o diferente y son H, un grupo aceptor de electrones o un grupo donador de electrones;

- 5 R₂ es heterocíclico, un éster o éter lineal, ramificado o cíclico que tiene de 1 a 10 átomos de carbono o un carbamato de la fórmula -CONR₁₀R₁₁, en el que R₁₀ y R₁₁ son el mismo o diferente y son H, alquilo lineal, ramificado o cíclico que tiene 1 a 10 átomos de carbono o arilo;

R₃ es un arilo o un alquilo lineal, ramificado o cíclico que tiene de 1 a 10 átomos de carbono;

R₄ es -OC(CH₃)₃ o fenilo;

- 10 R₅ es un resto tiol; y

R₆ es heterocíclico, H, un éster o éter lineal, ramificado o cíclico que tiene de 1 a 10 átomos de carbono o un carbamato de la fórmula -CONR₁₀R₁₁, en el que R₁₀ y R₁₁ son el mismo o diferente y son H, alquilo lineal, ramificado o cíclico que tiene 1 a 10 átomos de carbono o arilo.

- 15 **[00091]** También se contempla el compuesto de los ejemplos relevantes anteriores, en el que R₁ es F, NO₂, CN, Cl, CHF₂, CF₃, -OCH₃, -OCH₂CH₃ o NR₇R₈, en el que:

R₇ y R₈ son el mismo o diferente y son alquilo lineal, ramificado o cíclico que tiene 1 a 10 átomos de carbono o arilo simple o sustituido que tiene 1 a 10 átomos de carbono.

[00092] También se contempla el compuesto de los ejemplos relevantes anteriores, en el que R₇ y R₈ tiene cada uno 1 a 4 átomos de carbono.

- 20 **[00093]** También se contempla el compuesto de los ejemplos relevantes anteriores, en el que R₇ y R₈ son el mismo.

[00094] También se contempla el compuesto de los ejemplos relevantes anteriores, en el que R₇ y R₈ son el mismo.

- 25 **[00095]** También se contempla el compuesto de los ejemplos relevantes anteriores, en el que R₂ es -COC₂H₅, -CH₂CH₃, -CONHCH₂CH₃-CO-morfolino, -CO-piperidino, -CO-piperacino o -CO-N-metilpiperacino.

- 30 **[00096]** También se contempla el compuesto de los ejemplos relevantes anteriores, en el que R₅ es -(CH₂)_nS, -CO(CH₂)_nS, -(CH₂)_nCH(CH₃)S, -CO(CH₂)_nCH(CH₃)S, -(CH₂)_nC(CH₃)₂S, -CO(CH₂)_nC(CH₃)₂S, -CONR₁₂(CH₂)_nS, -CONR₁₂(CH₂)_nCH(CH₃)S, -CONR₁₂(CH₂)_nC(CH₃)₂S, -CO-morfolino-XS, -CO-piperidino-XS, -CO-piperacino-XS o -CO-N-metilpiperacino-XS;

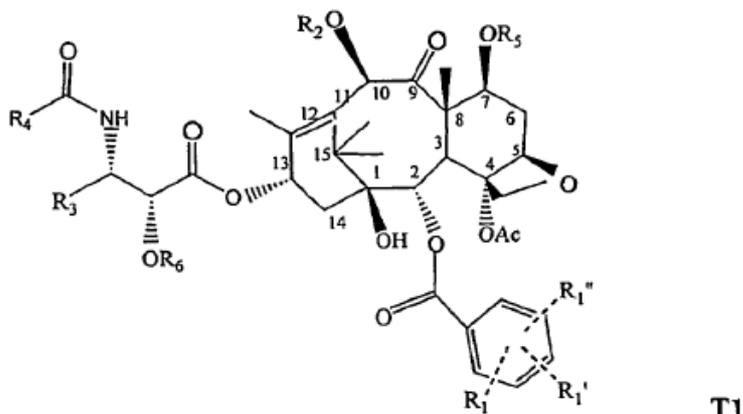
en el que n es un número entero de 1 a 10; y

en el que R₁₂ es H, un alquilo lineal, alquilo ramificado o alquilo cíclico que tiene 1 a 10 átomos de carbono, o arilo simple o sustituido que tiene de 1 a 10 átomos de carbono o heterocíclico.

- 35 **[00097]** También se contempla el compuesto de los ejemplos relevantes anteriores, en el que R₁ está en la posición meta cuando R₁' y R₁'' son H o OCH₃.

[00098] También se contempla el compuesto de los ejemplos relevantes anteriores, en el que R_3 es $-\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)_2$.

[00099] También se contempla el conjugado citotóxico según los ejemplos relevantes anteriores, en el que dicho taxano que contiene tior es un compuesto seleccionado de la fórmula **T1** siguiente:



5

en el que:

R_1 es H, un grupo aceptor de electrones o un grupo donador de electrones, y R_1' y R_1'' son el mismo o diferente y son H, un grupo aceptor de electrones o un grupo donador de electrones;

R_2 es un resto tior;

10 R_3 es arilo o es un alquilo lineal, ramificado o cíclico que tiene de 1 a 10 átomos de carbono;

R_4 es $-\text{OC}(\text{CH}_3)_3$ o fenilo;

R_5 es heterocíclico, H, un éster o éter lineal, ramificado o cíclico que tiene de 1 a 10 átomos de carbono o un carbamato de la fórmula $-\text{CONR}_{10}\text{R}_{11}$, en el que R_{10} y R_{11} son el mismo o diferente y son H, alquilo lineal, ramificado o cíclico que tiene 1 a 10 átomos de carbono o arilo; y

15 R_6 es heterocíclico, H, un éster o éter lineal, ramificado o cíclico que tiene de 1 a 10 átomos de carbono o un carbamato de la fórmula $-\text{CONR}_{10}\text{R}_{11}$, en el que R_{10} y R_{11} son el mismo o diferente y son H, alquilo lineal, ramificado o cíclico que tiene 1 a 10 átomos de carbono o arilo.

[000100] También se contempla el compuesto de los ejemplos relevantes anteriores, en el que al menos uno de R_1 es F, NO_2 , CN, Cl, CHF_2 , CF_3 , $-\text{OCH}_3$, $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ o NR_7R_8 en el que:

20 R_7 y R_8 son el mismo o diferente y son alquilo lineal, ramificado o cíclico que tiene 1 a 10 átomos de carbono o arilo simple o sustituido que tiene 1 a 10 átomos de carbono.

[000101] También se contempla el compuesto de los ejemplos relevantes anteriores, en el que R_7 y R_8 tiene cada uno 1 a 4 átomos de carbono.

25 **[000102]** También se contempla el compuesto de los ejemplos relevantes anteriores, en el que R_7 y R_8 son el mismo.

[000103] También se contempla el compuesto de los ejemplos relevantes anteriores, en el que R_7 y R_8 son el mismo.

30 **[000104]** También se contempla el compuesto de los ejemplos relevantes anteriores, en el que R_5 es $-(\text{CH}_2)_n\text{S}$, $-\text{CO}(\text{CH}_2)_n\text{S}$, $-(\text{CH}_2)_n\text{CH}(\text{CH}_3)\text{S}$, $-\text{CO}(\text{CH}_2)_n\text{CH}(\text{CH}_3)\text{S}$, $-(\text{CH}_2)_n\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{S}$, $-\text{CO}(\text{CH}_2)_n\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{S}$, $-\text{CONR}_{12}(\text{CH}_2)_n\text{S}$, $-\text{CONR}_{12}(\text{CH}_2)_n\text{CH}(\text{CH}_3)\text{S}$, $-\text{CONR}_{12}(\text{CH}_2)_n\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{S}$, $-\text{CO}$ -morfolino-XS, $-\text{CO}$ -piperidino-XS, $-\text{CO}$ -piperacino-XS o $-\text{CO}$ -N-metilpiperacino-XS;

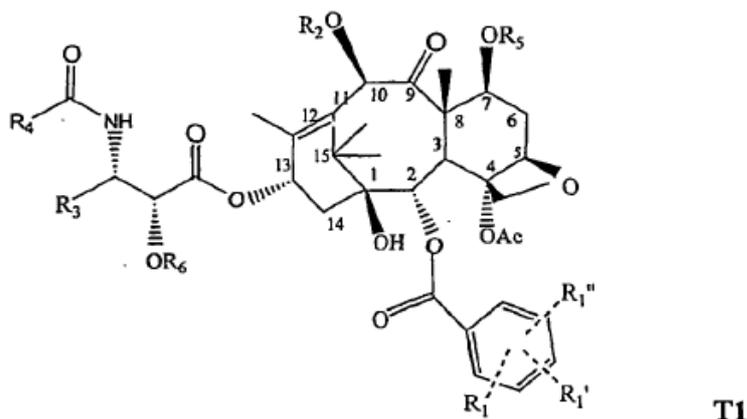
en el que n es un número entero de 1 a 10; y

35 en el que R_{12} es H, un alquilo lineal, alquilo ramificado o alquilo cíclico que tiene 1 a 10 átomos de carbono, o arilo simple o sustituido que tiene de 1 a 10 átomos de carbono o heterocíclico.

[000105] También se contempla el compuesto de los ejemplos relevantes anteriores, en el que R₅ es -COC₂H₅, -CH₂CH₃, -CONHCH₂CH₃, -CO-morfolino, -CO-piperidino, -CO-piperacino o -CO-N-metilpiperacino.

5 **[000106]** También se contempla el compuesto de los ejemplos relevantes anteriores, en el que R₁ está en la posición meta cuando R₁' y R₁'' son H o OCH₃.

[000107] También se contempla el conjugado citotóxico según los ejemplos relevantes anteriores, en el que dicho taxano que contiene tior es un compuesto seleccionado de la fórmula **T1** siguiente:



en el que:

10 R₁ es H, un grupo aceptor de electrones o un grupo donador de electrones, y R₁' y R₁'' son el mismo o diferente y son H, un grupo aceptor de electrones o un grupo donador de electrones;

R₂ es heterocíclico, un éster o éter lineal, ramificado o cíclico que tiene de 1 a 10 átomos de carbono o un carbamato de la fórmula -CONR₁₀R₁₁, en el que R₁₀ y R₁₁ son el mismo o diferente y son H, alquilo lineal, ramificado o cíclico que tiene 1 a 10 átomos de carbono o arilo;

15 R₃ es arilo o es un alquilo lineal, ramificado o cíclico que tiene de 1 a 10 átomos de carbono;

R₄ es -OC(CH₃)₃ o fenilo;

R₅ es heterocíclico, H, un éster o éter lineal, ramificado o cíclico que tiene de 1 a 10 átomos de carbono o un carbamato de la fórmula -CONR₁₀R₁₁, en el que R₁₀ y R₁₁ son el mismo o diferente y son H, alquilo lineal, ramificado o cíclico que tiene 1 a 10 átomos de carbono o arilo;

20 R₆ es un resto tior.

[000108] También se contempla el compuesto de los ejemplos relevantes anteriores, en el que R₁ es F, NO₂, CN, Cl, CHF₂, CF₃, -OCH₃, -OCH₂CH₃ o NR₇R₈ en el que:

R₇ y R₈ son el mismo o diferente y son alquilo lineal, ramificado o cíclico que tiene 1 a 10 átomos de carbono o arilo simple o sustituido que tiene 1 a 10 átomos de carbono.

25 **[000109]** También se contempla el compuesto de los ejemplos relevantes anteriores, en el que R₇ y R₈ tiene cada uno 1 a 4 átomos de carbono.

[000110] También se contempla el compuesto de los ejemplos relevantes anteriores, en el que R₇ y R₈ son el mismo.

30 **[000111]** También se contempla el compuesto de los ejemplos relevantes anteriores, en el que R₇ y R₈ son el mismo.

[000112] También se contempla el compuesto de los ejemplos relevantes anteriores, en el que R₂ es -COC₂H₅, -CH₂CH₃, -CONHCH₂CH₃, -CO-morfolino, -CO-piperidino, -CO-piperacino o -CO-N-metilpiperacino.

35 **[000113]** También se contempla el compuesto de los ejemplos relevantes anteriores, en el que R₅ es -(CH₂)_nS, -CO(CH₂)_nS, -(CH₂)_nCH(CH₃)S, -CO(CH₂)_nCH(CH₃)S, -(CH₂)_nC(CH₃)₂S, -CO(CH₂)_nC(CH₃)₂S, -CONR₁₂(CH₂)_nS,

-CONR₁₂(CH₂)_nCH(CH₃)S, -CONR₁₂(CH₂)_nC(CH₃)₂S, -CO-morfolino-XS, -CO-piperidino-XS, -CO-piperacino-XS o -CO-N-metilpiperacino-XS;

en el que n es un número entero de 1 a 10; y

5 en el que R₁₂ es H, un alquilo lineal, alquilo ramificado o alquilo cíclico que tiene 1 a 10 átomos de carbono, o arilo simple o sustituido que tiene de 1 a 10 átomos de carbono o heterocíclico.

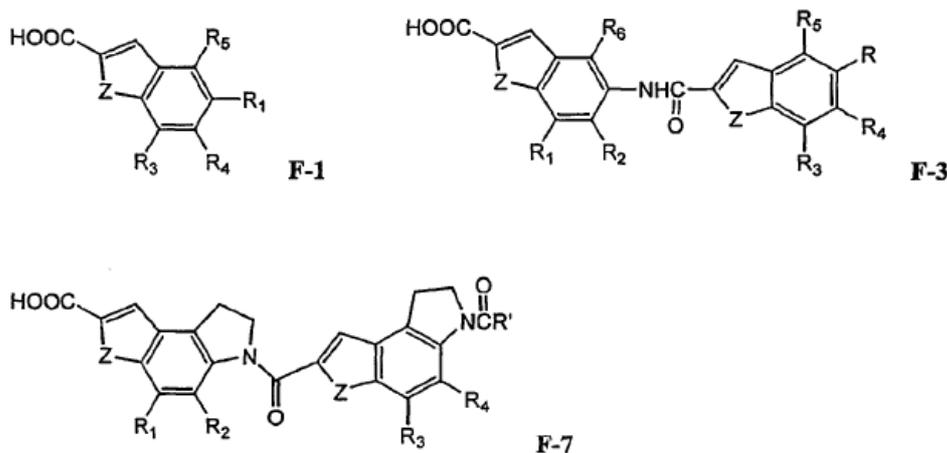
[000114] También se contempla el compuesto de los ejemplos relevantes anteriores, en el que R₁ está en la posición meta cuando R₁' y R₁'' son H o OCH₃.

10 **[000115]** También se contempla el conjugado citotóxico según los ejemplos relevantes anteriores, en el que dicho análogo de CC-1065 que contiene tiol es un compuesto citotóxico que contiene ciclopropilbencindol formado a partir de una subunidad A de las fórmulas **A-3** o **A-4** unida covalentemente a una subunidad B de la fórmula **F-1** o a una subunidad B-C de las fórmulas **F-3** o **F-7** mediante un enlace amida del grupo amino secundario del resto pirrol de la subunidad A al grupo carboxilo C-2 de la subunidad B,

en el que las fórmulas **A-3** y **A-4** son como sigue:



15 en el que las fórmulas **F-1**, **F-3** y **F-7** son como sigue:



en el que cada Z puede ser el mismo o diferente y puede ser O o NCH; y

20 en el que, en la Fórmula **F-1** R₄ es un resto tiol, en la Fórmula **F-3** uno de R o R₄ es un resto tiol, en la Fórmula **F-7** uno de R' o R₄ es un resto tiol; cuando R o R' es un resto tiol, entonces R₁ a R₆, que pueden ser el mismo o diferente, son hidrógeno, alquilo C₁-C₃ lineal, metoxi, hidroxilo, amino primario, amino secundario, amino terciario o amido; y cuando R₄ es un resto tiol, R, R₁, R₂, R₃, R₄, R₅ y R₆, que pueden ser el mismo o diferente, son hidrógeno, alquilo C₁-C₃ lineal, metoxi, hidroxilo, amino primario, amino secundario, amino terciario o amido y R' es NH₂, alquilo, O-alquilo, amino primario, amino secundario, amino terciario o amido.

25 **[000116]** También se contempla el conjugado citotóxico de los ejemplos relevantes anteriores, en el que R y R' son restos tiol y R₁ a R₆ son cada uno hidrógeno.

[000117] También se contempla el conjugado citotóxico de los ejemplos relevantes anteriores, en el que R o R₄ es -NHCO(CH₂)_lS, -NHCOC₆H₄(CH₂)_lS o -O(CH₂)_lS y R' es -(CH₂)_lS, -NH(CH₂)_lS o -O(CH₂)_lS en el que:

l es un número entero de 1 a 10.

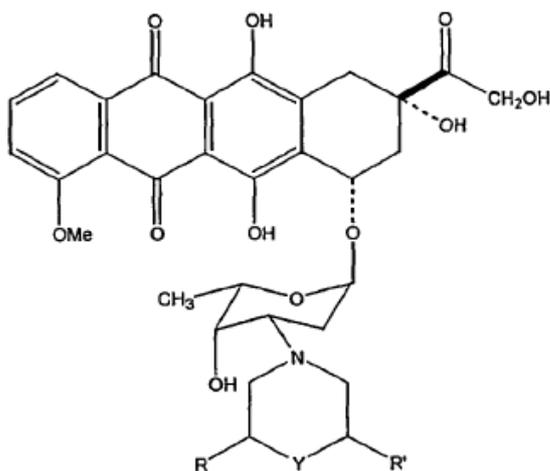
30 **[000118]** También se contempla el conjugado citotóxico de los ejemplos relevantes anteriores, en el que R o R₄ es -NHCO(CH₂)_lS, -NHCOC₆H₄(CH₂)_lS o -O(CH₂)_lS y R' es -(CH₂)_lS, -NH(CH₂)_lS o -O(CH₂)_lS en el que:

/ es un número entero de 1 a 10.

[000119] También se contempla el conjugado citotóxico de los ejemplos relevantes anteriores, en el que / es 1.

[000120] También se contempla el conjugado citotóxico de los ejemplos relevantes anteriores, en el que / es 2.

5 **[000121]** También se contempla el conjugado citotóxico según los ejemplos relevantes anteriores, en el que dicho análogo de doxorubicina que contiene tiol es un compuesto seleccionado de la fórmula **D2** siguiente:



D2

en el que,

Y es O o NR₂, en el que R₂ es alquilo lineal o ramificado que tiene 1 a 5 átomos de carbono;

R es un resto tiol, H, o alquilo lineal o ramificado que tiene 1 a 5 átomos de carbono; y

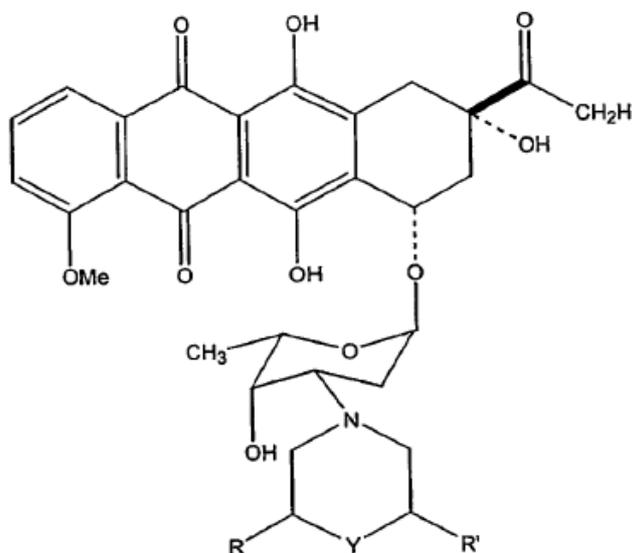
10 R' es un resto tiol, H, o -OR₁, en el que R₁ es alquilo lineal o ramificado que tiene 1 a 5 átomos de carbono; siempre que R y R' no sean restos de tiol al mismo tiempo.

[000122] También se contempla el compuesto de los ejemplos relevantes anteriores, en el que NR₂ es NCH₃.

[000123] También se contempla el compuesto de los ejemplos relevantes anteriores, en el que R' es -O.

15 **[000124]** También se contempla el compuesto de los ejemplos relevantes anteriores, en el que el resto tiol es - (CH₂)_nS, -O(CH₂)_nS, -(CH₂)_nCH(CH₃)S, -O(CH₂)_nCH(CH₃)S, -(CH₂)_nC(CH₃)₂S, o -O(CH₂)_nC(CH₃)₂S, en el que n es un número entero de 1 a 10.

[000125] También se contempla el conjugado citotóxico según los ejemplos relevantes anteriores, en el que dicho análogo de daunorrubicina que contiene tiol es un compuesto seleccionado de la fórmula **D3** siguiente:



D3

en el que,

Y es O o NR₂, en el que R₂ es alquilo lineal o ramificado que tiene 1 a 5 átomos de carbono;

R es un resto tiol, H, o alquilo lineal o ramificado que tiene 1 a 5 átomos de carbono; y

- 5 R' es un resto tiol, H, o -OR₁, en el que R₁ es alquilo lineal o ramificado que tiene 1 a 5 átomos de carbono; siempre que R y R' no sean restos de tiol al mismo tiempo.

[000126] También se contempla el compuesto de los ejemplos relevantes anteriores, en el que NR₂ es NCH₃.

[000127] También se contempla el compuesto de los ejemplos relevantes anteriores, en el que R' es -O.

- 10 **[000128]** También se contempla el compuesto de los ejemplos relevantes anteriores, en el que el resto tiol es -(CH₂)_nS, -O(CH₂)_nS, -(CH₂)_nCH(CH₃)S, -O(CH₂)_nCH(CH₃)S, -(CH₂)_nC(CH₃)₂S, o -O(CH₂)_nC(CH₃)₂S, en el que n es un número entero de 1 a 10.

[000129] También se contempla el conjugado citotóxico según los ejemplos relevantes anteriores, en el que dicho agente de unión a células es un anticuerpo monoclonal.

- 15 **[000130]** También se contempla el conjugado citotóxico según los ejemplos relevantes anteriores, en el que dicho agente de unión a células es un fragmento de anticuerpo.

[000131] También se contempla el conjugado citotóxico según los ejemplos relevantes anteriores, en el que dicho agente citotóxico es un taxano y dicho agente de unión a células es un anticuerpo monoclonal.

- 20 **[000132]** En una tercera realización de la invención, se describe una composición terapéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de uno de los conjugados citotóxicos de la presente invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

[000133] Se contempla específicamente una composición terapéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del conjugado citotóxico de los ejemplos relevantes anteriores y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

- 25 **[000134]** También se contempla la composición terapéutica según los ejemplos relevantes anteriores, en el que la cantidad terapéuticamente eficaz del conjugado citotóxico es de 10 ug a 100 mg.

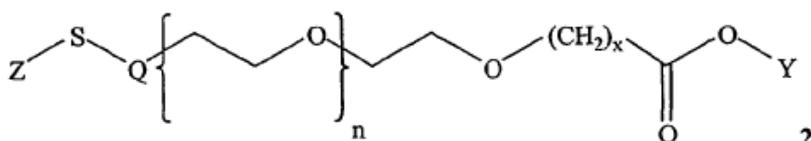
[000135] También se contempla la composición terapéutica según los ejemplos relevantes anteriores, en el que la cantidad terapéuticamente eficaz del conjugado citotóxico es de 50 ug a 30 mg.

- 30 **[000136]** También se contempla la composición terapéutica según los ejemplos relevantes anteriores, en el que la cantidad terapéuticamente eficaz del conjugado citotóxico es de 1 mg a 20 mg.

[000137] En una cuarta realización de la invención, se describe un método para producir un agente citotóxico que presenta un grupo conector PEG que tiene un éster activo terminal. El método comprende a) hacer reaccionar un grupo conector PEG mediante un grupo disulfuro con un agente citotóxico que contiene tiol, y b) convertir el grupo ácido carboxílico terminal o grupo químico protector del producto de la etapa a) en un éster activo, produciendo de esta manera un agente citotóxico que presenta un grupo conector PEG que tiene un éster activo terminal.

[000138] En una realización preferida, el grupo conector PEG tiene de 1 a 20 unidades monoméricas. En una realización igualmente preferida, el grupo conector PEG tiene de 21 a 40 unidades monoméricas. En una realización igualmente preferida más, el grupo conector PEG tiene de 41 a 1.000 unidades monoméricas.

[000139] Se contempla específicamente un método para producir un agente citotóxico, que presenta un grupo conector PEG que tiene un éster activo terminal y 1 a 20 unidades monoméricas de fórmula 2:



en el que Z es dicho agente citotóxico;

en el que Q es R_2COO^- , $R_2R_3NCOO^-$, R_2OCOO^- , R_2O^- , $R_2CONR_3^-$, $R_2R_3N^-$, $R_2OCONR_3^-$, o S^- ,

en el que:

R_2 es $SCR_4R_5R_6^-$,

R_4 , R_5 y R_6 son cada uno H, alquilo lineal, alquilo cíclico o alquilo ramificado y pueden ser el mismo o diferente,

R_3 es H o un alquilo lineal, alquilo cíclico o alquilo ramificado;

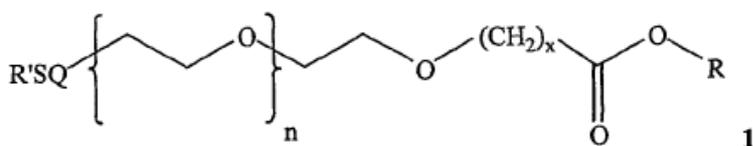
en el que n es un número entero de 0 a 19;

en el que x es 1 ó 2; y

en el que Y es *N*-succinimidilo, *N*-sulfosuccinimidilo, *N*-ftalimidilo, *N*-sulfoftalimidilo, 2-nitrofenilo, 4-nitrofenilo, 2,4-dinitrofenilo, 3-sulfonil-4-nitrofenilo ó 3-carboxi-4-nitrofenilo,

comprendiendo dicho método las etapas de:

a) hacer reaccionar un grupo conector PEG que tiene 1 a 20 unidades monoméricas de fórmula 1:



en el que R' es 2-piridilo, 4-piridilo, 5-nitro-2-piridilo, 5-nitro-4-piridilo, 2-nitrofenilo, 4-nitrofenilo ó 2,4-dinitrofenilo;

en el que Q es R_2COO^- , $R_2R_3NCOO^-$, R_2OCOO^- , R_2O^- , $R_2CONR_3^-$, $R_2R_3N^-$, $R_2OCONR_3^-$, o S^- ,

en el que:

R_2 es $SCR_4R_5R_6^-$,

R_4 , R_5 y R_6 son cada uno H, alquilo lineal, alquilo cíclico o alquilo ramificado y pueden ser el mismo o diferente,

R_3 es H o un alquilo lineal, alquilo cíclico o alquilo ramificado;

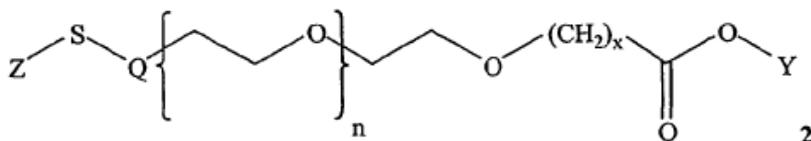
en el que n es un número entero de 0 a 19;

en el que x es 1 ó 2; y

en el que R es H, un catión para formar una sal o un grupo químico para formar un éster, con un agente citotóxico que contiene tiol, y

b) convertir el grupo R del producto de la etapa a) en un éster activo, produciendo de esta manera un agente citotóxico que presenta un grupo conector PEG que tiene un éster activo terminal y 1 a 20 unidades monoméricas.

[000140] También se contempla un método para producir un agente citotóxico, que presenta un grupo conector PEG que tiene un éster activo terminal y 21 a 40 unidades monoméricas de fórmula **2**:



en el que Z es dicho agente citotóxico;

5 en el que Q es R_2COO^- , $R_2R_3NCOO^-$, R_2OCOO^- , R_2O^- , $R_2CONR_3^-$, $R_2R_3N^-$, $R_2OCONR_3^-$, o S-,

en el que:

R_2 es $SCR_4R_5R_6^-$,

R_4 , R_5 y R_6 son cada uno H, alquilo lineal, alquilo cíclico o alquilo ramificado y pueden ser el mismo o diferente,

R_3 es H o un alquilo lineal, alquilo cíclico o alquilo ramificado;

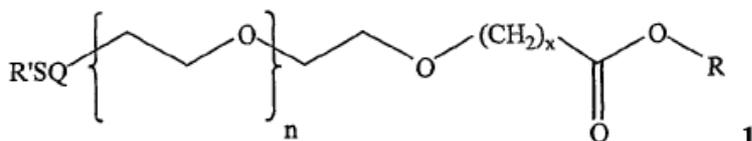
10 en el que n es un número entero de 21 a 39;

en el que x es 1 ó 2; y

en el que Y es *N*-succinimidilo, *N*-sulfosuccinimidilo, *N*-ftalimidilo, *N*-sulfoftalimidilo, 2-nitrofenilo, 4-nitrofenilo, 2,4-dinitrofenilo, 3-sulfonil-4-nitrofenilo ó 3-carboxi-4-nitrofenilo,

comprendiendo dicho método las etapas de:

15 a) hacer reaccionar un grupo conector PEG que tiene 21 a 40 unidades monoméricas de fórmula **1**:



en el que R' es 2-piridilo, 4-piridilo, 5-nitro-2-piridilo, 5-nitro-4-piridilo, 2-nitrofenilo, 4-nitrofenilo ó 2,4-dinitrofenilo;

en el que Q es R_2COO^- , $R_2R_3NCOO^-$, R_2OCOO^- , R_2O^- , $R_2CONR_3^-$, $R_2R_3N^-$, $R_2OCONR_3^-$, o S-,

en el que:

20 R_2 es $SCR_4R_5R_6^-$,

R_4 , R_5 y R_6 son cada uno H, alquilo lineal, alquilo cíclico o alquilo ramificado y pueden ser el mismo o diferente,

R_3 es H o un alquilo lineal, alquilo cíclico o alquilo ramificado;

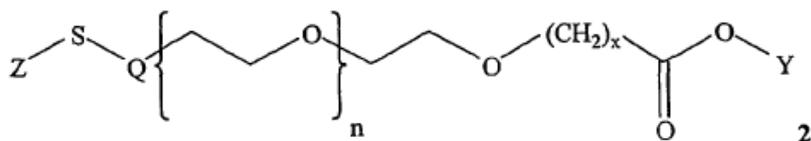
en el que n es un número entero de 21 a 39;

en el que x es 1 ó 2; y

25 en el que R es H, un catión para formar una sal o un grupo químico para formar un éster, con un agente citotóxico que contiene tiol, y

b) convertir el grupo R del producto de la etapa a) en un éster activo, produciendo de esta manera un agente citotóxico que presenta un grupo conector PEG que tiene un éster activo terminal y 21 a 40 unidades monoméricas.

30 **[000141]** También se contempla un método para producir un agente citotóxico, que presenta un grupo conector PEG que tiene un éster activo terminal y 41 a 1.000 unidades monoméricas, de fórmula **2**:



en el que Z es dicho agente citotóxico;

en el que Q es R_2COO^- , $R_2R_3NCOO^-$, R_2OCOO^- , R_2O^- , $R_2CONR_3^-$, $R_2R_3N^-$, $R_2OCONR_3^-$, o S^- ,

en el que:

5 R_2 es $SCR_4R_5R_6^-$,

R_4 , R_5 y R_6 son cada uno H, alquilo lineal, alquilo cíclico o alquilo ramificado y pueden ser el mismo o diferente,

R_3 es H o un alquilo lineal, alquilo cíclico o alquilo ramificado;

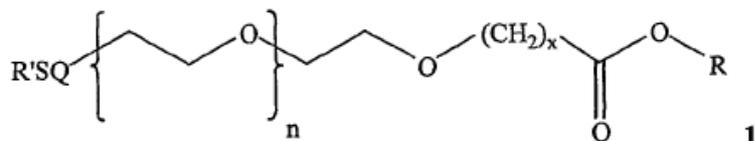
en el que n es un número entero de 40 a 999;

en el que x es 1 ó 2; y

10 en el que Y es *N*-succinimidilo, *N*-sulfosuccinimidilo, *N*-ftalimidilo, *N*-sulfoftalimidilo, 2-nitrofenilo, 4-nitrofenilo, 2,4-dinitrofenilo, 3-sulfonil-4-nitrofenilo ó 3-carboxi-4-nitrofenilo,

comprendiendo dicho método las etapas de:

a) hacer reaccionar un grupo conector PEG que tiene 41 a 1.000 unidades monoméricas de fórmula 1:



15 en el que R' es 2-piridilo, 4-piridilo, 5-nitro-2-piridilo, 5-nitro-4-piridilo, 2-nitrofenilo, 4-nitrofenilo ó 2,4-dinitrofenilo;

en el que Q es R_2COO^- , $R_2R_3NCOO^-$, R_2OCOO^- , R_2O^- , $R_2CONR_3^-$, $R_2R_3N^-$, $R_2OCONR_3^-$, o S^- ,

en el que:

R_2 es $SCR_4R_5R_6^-$,

R_4 , R_5 y R_6 son cada uno H, alquilo lineal, alquilo cíclico o alquilo ramificado y pueden ser el mismo o diferente,

20 R_3 es H o un alquilo lineal, alquilo cíclico o alquilo ramificado;

en el que n es un número entero de 41 a 999;

en el que x es 1 ó 2; y

en el que R es H, un catión para formar una sal o un grupo químico para formar un éster, con un agente citotóxico que contiene tiol, y

25 b) convertir el grupo R del producto de la etapa a) en un éster activo, produciendo de esta manera un agente citotóxico que presenta un grupo conector PEG que tiene un éster activo terminal y 41 a 1.000 unidades monoméricas.

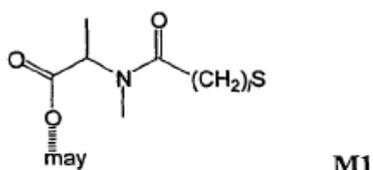
30 **[000142]** También se contempla el método para producir un agente citotóxico, que presenta un grupo conector PEG que tiene un éster activo terminal, según uno cualquiera de los ejemplos relevantes anteriores, en el que el grupo químico es metilo, etilo, fenilo, bencilo o tercbutilo.

35 **[000143]** También se contempla el método para producir un agente citotóxico, que presenta un grupo conector PEG que tiene un éster activo terminal, según uno cualquiera de los ejemplos relevantes anteriores, en el que dicho agente citotóxico se selecciona del grupo que consiste en un maitansinoide que contiene tiol, taxano que contiene tiol, análogo de CC-1065 que contiene tiol, análogo de daunorrubicina que contiene tiol y análogo de doxorubicina que contiene tiol y análogos o derivados que contienen tiol de éstos

[000144] También se contempla el método según los ejemplos relevantes anteriores, en el que dicho maitansinoide que contiene tiol es un maitansinoide que contiene tiol C-3.

[000145] También se contempla el método según los ejemplos relevantes anteriores, en el que dicho maitansinoide que contiene tiol C-3 es un maitansinoide que contiene tiol C-3 que contiene N-metil-alanina.

- 5 **[000146]** También se contempla el método según los ejemplos relevantes anteriores, en el que dicho maitansinoide que contiene tiol C-3 que contiene N-metil-alanina es un compuesto seleccionado de la fórmula **M1** siguiente:

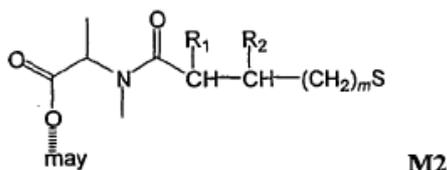


en el que:

- 10 l es un número entero de 1 a 10; y

may es un maitansinoide.

[000147] También se contempla el método según los ejemplos relevantes anteriores, en el que dicho maitansinoide que contiene tiol C-3 que contiene N-metil-alanina es un compuesto seleccionado de la fórmula **M2** siguiente:



- 15

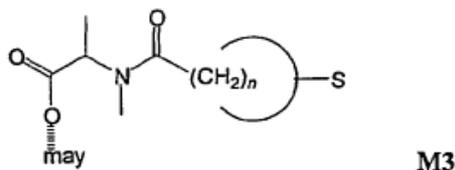
en el que:

R_1 y R_2 son H, CH_3 o CH_2CH_3 , y pueden ser el mismo o diferente;

m es 0, 1, 2 ó 3; y

may es un maitansinoide.

- 20 **[000148]** También se contempla el método según los ejemplos relevantes anteriores, en el que dicho maitansinoide que contiene tiol C-3 que contiene N-metil-alanina es un compuesto seleccionado de la fórmula **M3** siguiente:



en el que:

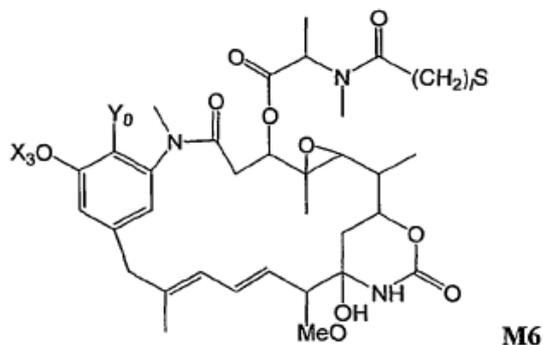
- 25 n es un número entero de 3 a 8; y

may es un maitansinoide.

[000149] También se contempla el método según los ejemplos relevantes anteriores, en el que dicho maitansinoide que contiene tiol C-3 que contiene N-metil-alanina es un maitansinol que contiene tiol C-3 que contiene N-metil-alanina.

- 30 **[000150]** También se contempla el método según los ejemplos relevantes anteriores, en el que dicho maitansinol que contiene tiol C-3 que contiene N-metil-alanina es un decloro maitansinol.

[000151] También se contempla el método según los ejemplos relevantes anteriores, en el que dicho maitansinol que contiene tiol C-3 que contiene N-metil-alanina es un compuesto seleccionado de la fórmula **M6** siguiente:

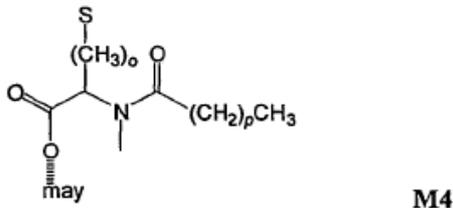


en el que:

- 5 / es 1, 2 ó 3;
 Y_0 es Cl o H; y
 X_3 es H o CH_3 .

[000152] También se contempla el método según los ejemplos relevantes anteriores, en el que dicho maitansinoide que contiene tiol C-3 es un maitansinoide que contiene tiol C-3 que contiene N-metil-cisteína.

- 10 **[000153]** También se contempla el método según los ejemplos relevantes anteriores, en el que dicho maitansinoide que contiene tiol C-3 que contiene N-metil-cisteína es un compuesto seleccionado de la fórmula **M4** siguiente:



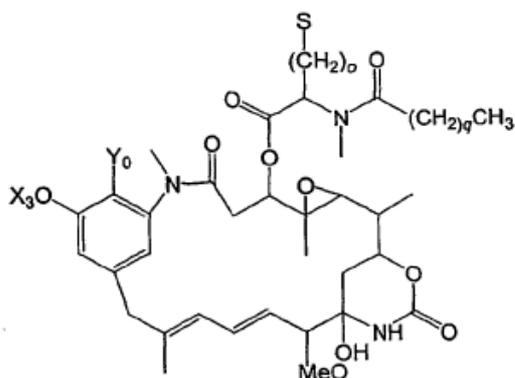
en el que:

- 15 o es 1, 2 ó 3;
 p es un número entero de 0 a 10; y
 may es un maitansinoide.

- 20 **[000154]** También se contempla el método según los ejemplos relevantes anteriores, en el que dicho maitansinoide que contiene tiol C-3 que contiene N-metil-cisteína es un maitansinol que contiene tiol C-3 que contiene N-metil-cisteína.

[000155] También se contempla el método según los ejemplos relevantes anteriores, en el que dicho maitansinol que contiene tiol C-3 que contiene N-metil-cisteína es un decloro maitansinol.

[000156] También se contempla el método según los ejemplos relevantes anteriores, en el que dicho maitansinol que contiene tiol C-3 que contiene N-metil-cisteína es un compuesto seleccionado de la fórmula **M5** siguiente:



M5

en el que:

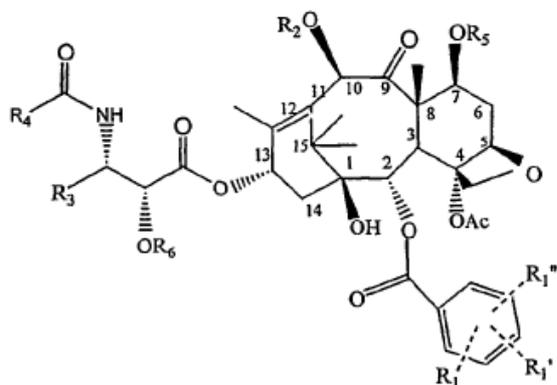
o es 1, 2 ó 3;

q es un número entero de 0 a 10;

5 Y_0 es Cl o H; y

X_3 es H o CH_3 .

[000157] También se contempla el método según los ejemplos relevantes anteriores, en el que dicho taxano que contiene tiol es un compuesto seleccionado de la fórmula **T1** siguiente:



T1

10 en el que:

R_1 es H, un grupo aceptor de electrones o un grupo donador de electrones, y R_1' y R_1'' son el mismo o diferente y son H, un grupo aceptor de electrones o un grupo donador de electrones;

15 R_2 es heterocíclico, un éster o éter lineal, ramificado o cíclico que tiene de 1 a 10 átomos de carbono o un carbamato de la fórmula $-CONR_{10}R_{11}$, en el que R_{10} y R_{11} son el mismo o diferente y son H, alquilo lineal, ramificado o cíclico que tiene 1 a 10 átomos de carbono o arilo;

R_3 es un arilo o un alquilo lineal, ramificado o cíclico que tiene de 1 a 10 átomos de carbono;

R_4 es $-OC(CH_3)_3$ o fenilo;

R_5 es un resto tiol; y

20 R_6 es heterocíclico, H, un éster o éter lineal, ramificado o cíclico que tiene de 1 a 10 átomos de carbono o un carbamato de la fórmula $-CONR_{10}R_{11}$, en el que R_{10} y R_{11} son el mismo o diferente y son H, alquilo lineal, ramificado o cíclico que tiene 1 a 10 átomos de carbono o arilo.

[000158] También se contempla el método según los ejemplos relevantes anteriores, en el que R_1 es F, NO_2 , CN, Cl, CHF_2 , CF_3 , $-OCH_3$, $-OCH_2CH_3$ o NR_7R_8 , en el que:

25 R_7 y R_8 son el mismo o diferente y son alquilo lineal, ramificado o cíclico que tiene 1 a 10 átomos de carbono o arilo simple o sustituido que tiene 1 a 10 átomos de carbono.

[000159] También se contempla el método según los ejemplos relevantes anteriores, en el que R_7 y R_8 tiene cada uno 1 a 4 átomos de carbono.

[000160] También se contempla el método según los ejemplos relevantes anteriores, en el que R_7 y R_8 son el mismo.

5 **[000161]** También se contempla el método según los ejemplos relevantes anteriores, en el que R_7 y R_8 son el mismo.

[000162] También se contempla el método según los ejemplos relevantes anteriores, en el que R_2 es $-\text{COC}_2\text{H}_5$, $-\text{CH}_2\text{CH}_3$, $-\text{CONHCH}_2\text{CH}_3$ -CO-morfolino, -CO-piperidino, -CO-piperacino o -CO-N-metilpiperacino.

10 **[000163]** También se contempla el método según los ejemplos relevantes anteriores, en el que R_5 es $-(\text{CH}_2)_n\text{S}$, $-\text{CO}(\text{CH}_2)_n\text{S}$, $-(\text{CH}_2)_n\text{CH}(\text{CH}_3)\text{S}$, $-\text{CO}(\text{CH}_2)_n\text{CH}(\text{CH}_3)\text{S}$, $-(\text{CH}_2)_n\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{S}$, $-\text{CO}(\text{CH}_2)_n\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{S}$, $-\text{CONR}_{12}(\text{CH}_2)_n\text{S}$, $-\text{CONR}_{12}(\text{CH}_2)_n\text{CH}(\text{CH}_3)\text{S}$, $-\text{CONR}_{12}(\text{CH}_2)_n\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{S}$, -CO-morfolino-XS, -CO-piperidino-XS, -CO-piperacino-XS o -CO-N-metilpiperacino-XS;

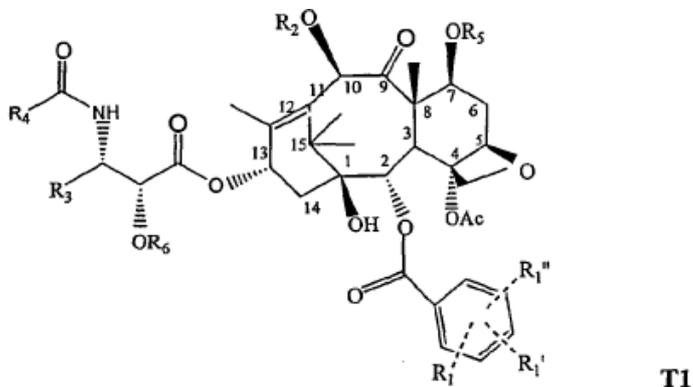
15 en el que n es un número entero de 1 a 10; y

en el que R_{12} es H, un alquilo lineal, alquilo ramificado o alquilo cíclico que tiene 1 a 10 átomos de carbono, o arilo simple o sustituido que tiene de 1 a 10 átomos de carbono o heterocíclico.

[000164] También se contempla el método según los ejemplos relevantes anteriores, en el que R_1 está en la posición meta cuando R_1' y R_1'' son H o OCH_3 .

20 **[000165]** También se contempla el método según los ejemplos relevantes anteriores, en el que R_3 es $-\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)_2$.

[000166] También se contempla el método según los ejemplos relevantes anteriores, en el que dicho taxano es un compuesto seleccionado de la fórmula **T1** siguiente:



25 en el que:

R_1 es H, un grupo aceptor de electrones o un grupo donador de electrones, y R_1' y R_1'' son el mismo o diferente y son H, un grupo aceptor de electrones o un grupo donador de electrones;

R_2 es un resto tiol;

R_3 es un arilo o es un alquilo lineal, ramificado o cíclico que tiene de 1 a 10 átomos de carbono;

30 R_4 es $-\text{OC}(\text{CH}_3)_3$ o fenilo;

R_5 es heterocíclico, H, un éster o éter lineal, ramificado o cíclico que tiene de 1 a 10 átomos de carbono o un carbamato de la fórmula $-\text{CONR}_{10}\text{R}_{11}$, en el que R_{10} y R_{11} son el mismo o diferente y son H, alquilo lineal, ramificado o cíclico que tiene 1 a 10 átomos de carbono o arilo; y

35 R_6 es heterocíclico, H, un éster o éter lineal, ramificado o cíclico que tiene de 1 a 10 átomos de carbono o un carbamato de la fórmula $-\text{CONR}_{10}\text{R}_{11}$, en el que R_{10} y R_{11} son el mismo o diferente y son H, alquilo lineal, ramificado o cíclico que tiene 1 a 10 átomos de carbono o arilo.

[000167] También se contempla el método según los ejemplos relevantes anteriores, en el que al menos uno de R_1 es F, NO_2 , CN, Cl, CHF_2 , CF_3 , $-\text{OCH}_3$, $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ o NR_7R_8 en el que:

R_7 y R_8 son el mismo o diferente y son alquilo lineal, ramificado o cíclico que tiene 1 a 10 átomos de carbono o arilo simple o sustituido que tiene 1 a 10 átomos de carbono.

5 **[000168]** También se contempla el método según los ejemplos relevantes anteriores, en el que R_7 y R_8 tiene cada uno 1 a 4 átomos de carbono.

[000169] También se contempla el método según los ejemplos relevantes anteriores, en el que R_7 y R_8 son el mismo.

10 **[000170]** También se contempla el método según los ejemplos relevantes anteriores, en el que R_7 y R_8 son el mismo.

[000171] También se contempla el método según los ejemplos relevantes anteriores, en el que R_5 es $-(\text{CH}_2)_n\text{S}$, $-\text{CO}(\text{CH}_2)_n\text{S}$,

15 $-(\text{CH}_2)_n\text{CH}(\text{CH}_3)\text{S}$, $-\text{CO}(\text{CH}_2)_n\text{CH}(\text{CH}_3)\text{S}$, $-(\text{CH}_2)_n\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{S}$, $-\text{CO}(\text{CH}_2)_n\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{S}$, $-\text{CONR}_{12}(\text{CH}_2)_n\text{S}$, $-\text{CONR}_{12}(\text{CH}_2)_n\text{CH}(\text{CH}_3)\text{S}$, $-\text{CONR}_{12}(\text{CH}_2)_n\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{S}$, $-\text{CO}$ -morfolino-XS, $-\text{CO}$ -piperidino-XS, $-\text{CO}$ -piperacino-XS o $-\text{CO}$ -N-metilpiperacino-XS;

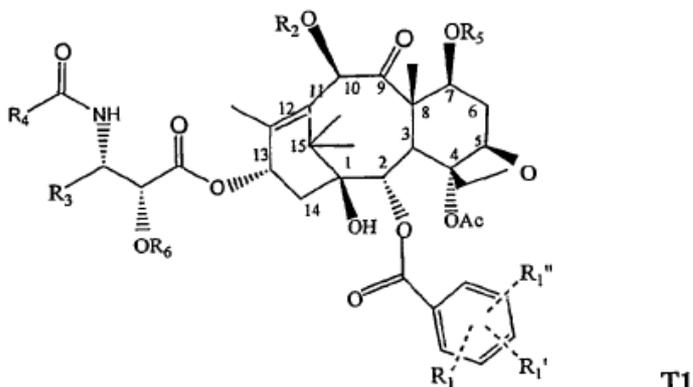
en el que n es un número entero de 1 a 10; y

en el que R_{12} es H, un alquilo lineal, alquilo ramificado o alquilo cíclico que tiene 1 a 10 átomos de carbono, o arilo simple o sustituido que tiene de 1 a 10 átomos de carbono o heterocíclico.

20 **[000172]** También se contempla el método según los ejemplos relevantes anteriores, en el que R_5 es $-\text{COC}_2\text{H}_5$, $-\text{CH}_2\text{CH}_3$, $-\text{CONHCH}_2\text{CH}_3$, $-\text{CO}$ -morfolino, $-\text{CO}$ -piperidino, $-\text{CO}$ -piperacino o $-\text{CO}$ -N-metilpiperacino.

[000173] También se contempla el método según los ejemplos relevantes anteriores, en el que R_1 está en la posición meta cuando R_1' y R_1'' son H o OCH_3 .

25 **[000174]** También se contempla el método según los ejemplos relevantes anteriores, en el que dicho taxano es un compuesto seleccionado de la fórmula T1 siguiente:



en el que:

R_1 es H, un grupo aceptor de electrones o un grupo donador de electrones, y R_1' y R_1'' son el mismo o diferente y son H, un grupo aceptor de electrones o un grupo donador de electrones;

30 R_2 es heterocíclico, un éster o éter lineal, ramificado o cíclico que tiene de 1 a 10 átomos de carbono o un carbamato de la fórmula $-\text{CONR}_{10}\text{R}_{11}$, en el que R_{10} y R_{11} son el mismo o diferente y son H, alquilo lineal, ramificado o cíclico que tiene 1 a 10 átomos de carbono o arilo;

R_3 es un arilo o es un alquilo lineal, ramificado o cíclico que tiene de 1 a 10 átomos de carbono;

R_4 es $-\text{OC}(\text{CH}_3)_3$ o fenilo;

35 R_5 es heterocíclico, H, un éster o éter lineal, ramificado o cíclico que tiene de 1 a 10 átomos de carbono o un carbamato de la fórmula $-\text{CONR}_{10}\text{R}_{11}$, en el que R_{10} y R_{11} son el mismo o diferente y son H, alquilo lineal, ramificado o cíclico que tiene 1 a 10 átomos de carbono o arilo;

R₆ es un resto tiol.

[000175] También se contempla el método según los ejemplos relevantes anteriores, en el que R₁ es F, NO₂, CN, Cl, CHF₂, CF₃, -OCH₃, -OCH₂CH₃ o NR₇R₈ en el que:

5 R₇ y R₈ son el mismo o diferente y son alquilo lineal, ramificado o cíclico que tiene 1 a 10 átomos de carbono o arilo simple o sustituido que tiene 1 a 10 átomos de carbono.

[000176] También se contempla el método según los ejemplos relevantes anteriores, en el que R₇ y R₈ tiene cada uno 1 a 4 átomos de carbono.

[000177] También se contempla el método según los ejemplos relevantes anteriores, en el que R₇ y R₈ son el mismo.

10 **[000178]** También se contempla el método según los ejemplos relevantes anteriores, en el que R₇ y R₈ son el mismo.

[000179] También se contempla el método según los ejemplos relevantes anteriores, en el que R₂ es -COC₂H₅, -CH₂CH₃, -CONHCH₂CH₃, -CO-morfolino, -CO-piperidino, -CO-piperacino o -CO-N-metilpiperacino.

15 **[000180]** También se contempla el método según los ejemplos relevantes anteriores, en el que R₅ es -(CH₂)_nS, -CO(CH₂)_nS, -(CH₂)_nCH(CH₃)S, -CO(CH₂)_nCH(CH₃)S, -(CH₂)_nC(CH₃)₂S, -CO(CH₂)_nC(CH₃)₂S, -CONR₁₂(CH₂)_nS, -CONR₁₂(CH₂)_nCH(CH₃)S, -CONR₁₂(CH₂)_nC(CH₃)₂S, -CO-morfolino-XS, -CO-piperidino-XS, -CO-piperacino-XS o -CO-N-metilpiperacino-XS;

20 en el que n es un número entero de 1 a 10; y

en el que R₁₂ es H, un alquilo lineal, alquilo ramificado o alquilo cíclico que tiene 1 a 10 átomos de carbono, o arilo simple o sustituido que tiene de 1 a 10 átomos de carbono o heterocíclico.

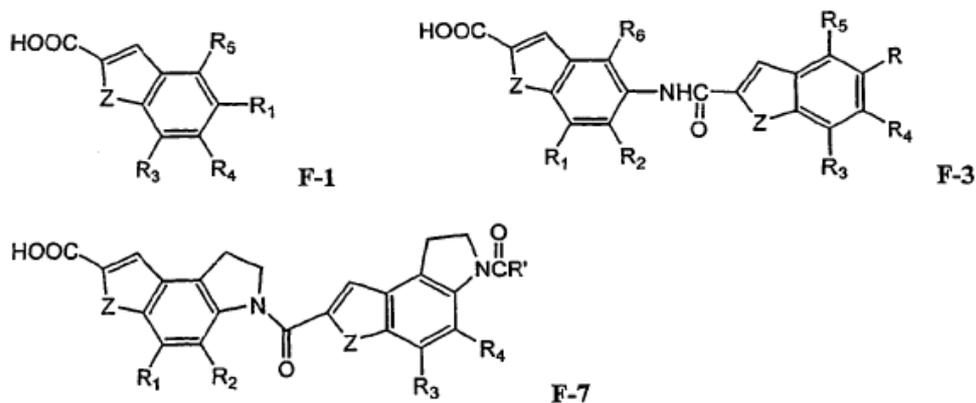
[000181] También se contempla el método según los ejemplos relevantes anteriores, en el que R₁ está en la posición meta cuando R₁' y R₁'' son H o OCH₃.

25 **[000182]** También se contempla el método según los ejemplos relevantes anteriores, en el que dicho análogo de CC-1065 que contiene tiol es un compuesto citotóxico que contiene ciclopropilbencindol formado a partir de una subunidad A de las fórmulas **A-3** o **A-4** unida covalentemente a una subunidad B de la fórmula **F-1** o a una subunidad B-C de las fórmulas **F-3** o **F-7** mediante un enlace amida del grupo amino secundario del resto pirrol de la subunidad A al grupo carboxilo C-2 de la subunidad B,

30 en el que las fórmulas **A-3** y **A-4** son como sigue:



en el que las fórmulas **F-1**, **F-3** y **F-7** son como sigue:



en el que cada Z puede ser el mismo o diferente y puede ser O o NH; y

5 en el que, en la Fórmula **F-1** R₄ es un resto tiol, en la Fórmula **F-3** uno de R o R₄ es un resto tiol, en la Fórmula **F-7** uno de R' o R₄ es un resto tiol; cuando R o R' es un resto tiol, entonces R₁ a R₆, que pueden ser el mismo o diferente, son hidrógeno, alquilo C₁-C₃ lineal, metoxi, hidroxilo, amino primario, amino secundario, amino terciario o amido; y cuando R₄ es un resto tiol, R, R₁, R₂, R₃, R₄, R₅ y R₆, que pueden ser el mismo o diferente, son hidrógeno, alquilo C₁-C₃ lineal, metoxi, hidroxilo, amino primario, amino secundario, amino terciario o amido y R' es NH₂, alquilo, O-alquilo, amino primario, amino secundario, amino terciario o amido.

10 **[000183]** También se contempla el método según los ejemplos relevantes anteriores, en el que R y R' son restos tiol y R₁ a R₆ son cada uno hidrógeno.

[000184] También se contempla el método según los ejemplos relevantes anteriores, en el que R o R₄ es NHCO(CH₂)_S, NHCOC₆H₄(CH₂)_S o O(CH₂)_S y R' es (CH₂)_S, NH(CH₂)_S o O(CH₂)_S en el que:

/ es un número entero de 1 a 10.

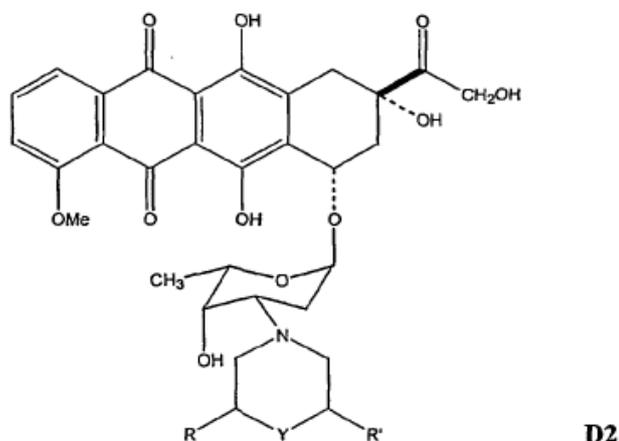
15 **[000185]** También se contempla el método según los ejemplos relevantes anteriores, en el que R o R₄ es NHCO(CH₂)_S, NHCOC₆H₄(CH₂)_S o O(CH₂)_S y R' es (CH₂)_S, NH(CH₂)_S o O(CH₂)_S en el que:

/ es un número entero de 1 a 10.

[000186] También se contempla el método según los ejemplos relevantes anteriores, en el que / es 1.

[000187] También se contempla el método según los ejemplos relevantes anteriores, en el que / es 2.

20 **[000188]** También se contempla el método según los ejemplos relevantes anteriores, en el que dicho análogo de doxorubicina que contiene tiol es un compuesto seleccionado de la fórmula **D2** siguiente:



en el que,

Y es O o NR₂, en el que R₂ es alquilo lineal o ramificado que tiene 1 a 5 átomos de carbono;

R es un resto tiol, H, o alquilo lineal o ramificado que tiene 1 a 5 átomos de carbono; y

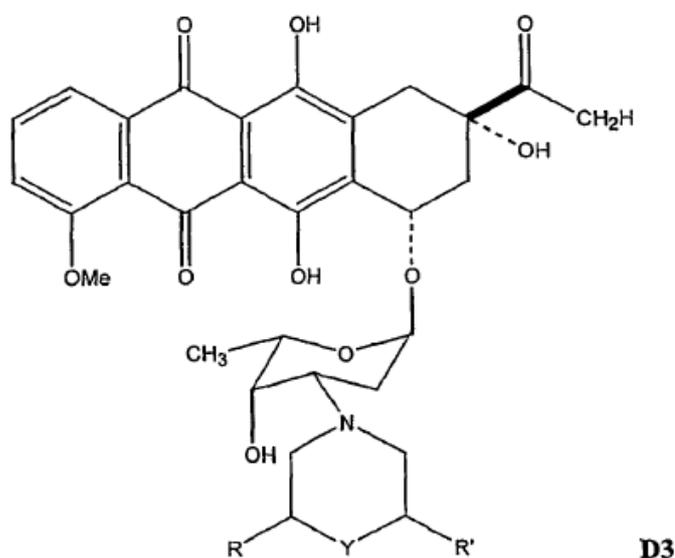
R' es un resto tiol, H, o -OR₁, en el que R₁ es alquilo lineal o ramificado que tiene 1 a 5 átomos de carbono; siempre que R y R' no sean restos de tiol al mismo tiempo.

[000189] También se contempla el método según los ejemplos relevantes anteriores, en el que NR₂ es NCH₃.

5 **[000190]** También se contempla el método según los ejemplos relevantes anteriores, en el que R' es -O.

[000191] También se contempla el método según los ejemplos relevantes anteriores, en el que el resto tiol es - (CH₂)_nS, -O(CH₂)_nS, -(CH₂)_nCH(CH₃)S, -O(CH₂)_nCH(CH₃)S, -(CH₂)_nC(CH₃)₂S, o -O(CH₂)_nC(CH₃)₂S, en el que n es un número entero de 1 a 10.

10 **[000192]** También se contempla el método según los ejemplos relevantes anteriores, en el que dicho análogo de daunorrubicina que contiene tiol es un compuesto seleccionado de la fórmula **D3** siguiente:



en el que,

Y es O o NR₂, en el que R₂ es alquilo lineal o ramificado que tiene 1 a 5 átomos de carbono;

15 R es un resto tiol, H, o alquilo lineal o ramificado que tiene 1 a 5 átomos de carbono; y

R' es un resto tiol, H, o -OR₁, en el que R₁ es alquilo lineal o ramificado que tiene 1 a 5 átomos de carbono; siempre que R y R' no sean restos de tiol al mismo tiempo.

[000193] También se contempla el método según los ejemplos relevantes anteriores, en el que NR₂ es NCH₃.

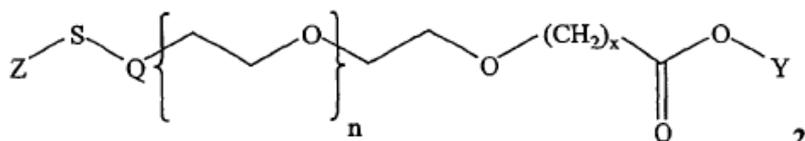
[000194] También se contempla el método según los ejemplos relevantes anteriores, en el que R' es -O.

20 **[000195]** También se contempla el método según los ejemplos relevantes anteriores, en el que el resto tiol es - (CH₂)_nS, -O(CH₂)_nS, -(CH₂)_nCH(CH₃)S, -O(CH₂)_nCH(CH₃)S, -(CH₂)_nC(CH₃)₂S, o -O(CH₂)_nC(CH₃)₂S, en el que n es un número entero de 1 a 10.

25 **[000196]** En una quinta realización de la invención, se describe un método para producir un conjugado citotóxico que comprende uno o más agentes citotóxicos unidos covalentemente a un agente de unión a células mediante un grupo conector PEG. El método comprende hacer reaccionar uno o más agentes citotóxicos con un agente de unión a células, en el que cada agente citotóxico presenta un grupo conector PEG que tiene un éster activo terminal, produciendo de esta manera un conjugado citotóxico.

[000197] En una realización preferida, el grupo conector PEG tiene de 1 a 20 unidades monoméricas. En una realización igualmente preferida, el grupo conector PEG tiene de 21 a 40 unidades monoméricas. En una realización igualmente preferida más, el grupo conector PEG tiene de 41 a 1.000 unidades monoméricas.

5 **[000198]** Se contempla específicamente un método para producir un conjugado citotóxico que comprende uno o más agentes citotóxicos unidos covalentemente a un agente de unión a células mediante un grupo conector PEG que tiene 1 a 20 unidades monoméricas, comprendiendo dicho método hacer reaccionar uno o más agentes citotóxicos con un agente de unión a células, en el que dicho uno o más agentes citotóxicos presenta cada uno un grupo conector PEG que tiene un éster activo terminal y 1 a 20 unidades monoméricas, y en el que dicho agente citotóxico que presenta un grupo conector PEG que tiene un éster activo terminal y 1 a 20 unidades monoméricas es un compuesto de fórmula 2:



en el que Z es dicho agente citotóxico;

en el que Q es R_2COO^- , $R_2R_3NCOO^-$, R_2OCOO^- , R_2O^- , $R_2CONR_3^-$, $R_2R_3N^-$, $R_2OCONR_3^-$, o S^- ,

en el que:

15 R_2 es $SCR_4R_5R_6^-$,

R_4 , R_5 y R_6 son cada uno H, alquilo lineal, alquilo cíclico o alquilo ramificado y pueden ser el mismo o diferente,

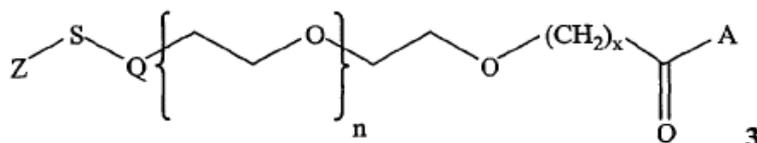
R_3 es H o un alquilo lineal, alquilo cíclico o alquilo ramificado;

en el que n es un número entero de 0 a 19;

en el que x es 1 ó 2; y

20 en el que Y es *N*-succinimidilo, *N*-sulfosuccinimidilo, *N*-ftalimidilo, *N*-sulfoftalimidilo, 2-nitrofenilo, 4-nitrofenilo, 2,4-dinitrofenilo, 3-sulfonil-4-nitrofenilo ó 3-carboxi-4-nitrofenilo,

produciendo de esta manera un conjugado citotóxico, ilustrado en la fórmula 3 con una unión de uno de dichos uno o más agentes citotóxicos



25 en el que Z es dicho agente citotóxico;

en el que Q es R_2COO^- , $R_2R_3NCOO^-$, R_2OCOO^- , R_2O^- , $R_2CONR_3^-$, $R_2R_3N^-$, $R_2OCONR_3^-$, o S^- ,

en el que:

R_2 es $SCR_4R_5R_6^-$,

R_4 , R_5 y R_6 son cada uno H, alquilo lineal, alquilo cíclico o alquilo ramificado y pueden ser el mismo o diferente,

30 R_3 es H o un alquilo lineal, alquilo cíclico o alquilo ramificado;

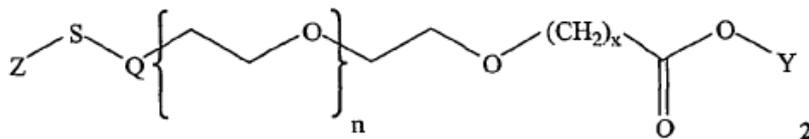
en el que n es un número entero de 0 a 19;

en el que x es 1 ó 2; y

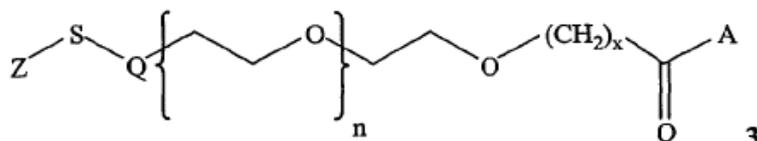
en el que A es dicho agente de unión a células.

35 **[000199]** También se contempla específicamente un método para producir un conjugado citotóxico que comprende uno o más agentes citotóxicos unidos covalentemente a un agente de unión a células mediante un grupo conector PEG que tiene 21 a 40 unidades monoméricas, comprendiendo dicho método hacer reaccionar uno o más agentes

citotóxicos con un agente de unión a células, en el que dicho uno o más agentes citotóxicos presenta cada uno un grupo conector PEG que tiene un éster activo terminal y 21 a 40 unidades monoméricas, y en el que dicho agente citotóxico que presenta un grupo conector PEG que tiene un éster activo terminal y 21 a 40 unidades monoméricas es un compuesto de fórmula 2:

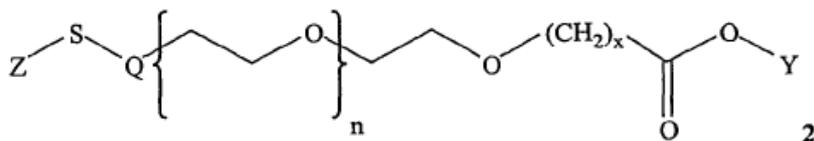


- 5 en el que Z es dicho agente citotóxico;
- en el que Q es R_2COO^- , $R_2R_3NCOO^-$, R_2OCOO^- , R_2O^- , $R_2CONR_3^-$, $R_2R_3N^-$, $R_2OCONR_3^-$, o S^- ,
- en el que:
- R_2 es $SCR_4R_5R_6^-$,
- 10 R_4 , R_5 y R_6 son cada uno H, alquilo lineal, alquilo cíclico o alquilo ramificado y pueden ser el mismo o diferente,
- R_3 es H o un alquilo lineal, alquilo cíclico o alquilo ramificado;
- en el que n es un número entero de 20 a 39;
- en el que x es 1 ó 2; y
- 15 en el que Y es *N*-succinimidilo, *N*-sulfosuccinimidilo, *N*-ftalimidilo, *N*-sulfoftalimidilo, 2-nitrofenilo, 4-nitrofenilo, 2,4-dinitrofenilo, 3-sulfonil-4-nitrofenilo ó 3-carboxi-4-nitrofenilo,
- produciendo de esta manera un conjugado citotóxico, ilustrado en la fórmula 3 con una unión de uno de dichos uno o más agentes citotóxicos



- en el que Z es dicho agente citotóxico;
- 20 en el que Q es R_2COO^- , $R_2R_3NCOO^-$, R_2OCOO^- , R_2O^- , $R_2CONR_3^-$, $R_2R_3N^-$, $R_2OCONR_3^-$, o S^- ,
- en el que:
- R_2 es $SCR_4R_5R_6^-$,
- R_4 , R_5 y R_6 son cada uno H, alquilo lineal, alquilo cíclico o alquilo ramificado y pueden ser el mismo o diferente,
- R_3 es H o un alquilo lineal, alquilo cíclico o alquilo ramificado;
- 25 en el que n es un número entero de 20 a 39;
- en el que x es 1 ó 2; y
- en el que A es dicho agente de unión a células.

- 30 **[000200]** También se contempla específicamente un método para producir un conjugado citotóxico que comprende uno o más agentes citotóxicos unidos covalentemente a un agente de unión a células mediante un grupo conector PEG que tiene 41 a 1.000 unidades monoméricas, comprendiendo dicho método hacer reaccionar uno o más agentes citotóxicos con un agente de unión a células, en el que dicho uno o más agentes citotóxicos presenta cada uno un grupo conector PEG que tiene un éster activo terminal y 41 a 1.000 unidades monoméricas, y en el que dicho agente citotóxico que presenta un grupo conector PEG que tiene un éster activo terminal y 41 a 1.000 unidades monoméricas es un compuesto de fórmula 2:



en el que Z es dicho agente citotóxico;

en el que Q es R_2COO^- , $R_2R_3NCOO^-$, R_2OCOO^- , R_2O^- , $R_2CONR_3^-$, $R_2R_3N^-$, $R_2OCONR_3^-$, o S^- ,

en el que:

5 R_2 es $SCR_4R_5R_6^-$,

R_4 , R_5 y R_6 son cada uno H, alquilo lineal, alquilo cíclico o alquilo ramificado y pueden ser el mismo o diferente,

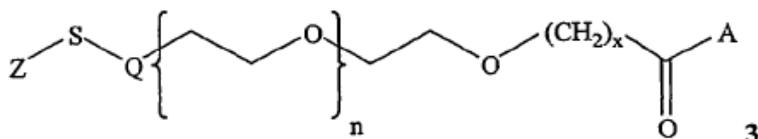
R_3 es H o un alquilo lineal, alquilo cíclico o alquilo ramificado;

en el que n es un número entero de 40 a 999;

en el que x es 1 ó 2; y

10 en el que Y es *N*-succinimidilo, *N*-sulfosuccinimidilo, *N*-ftalimidilo, *N*-sulfoftalimidilo, 2-nitrofenilo, 4-nitrofenilo, 2,4-dinitrofenilo, 3-sulfonil-4-nitrofenilo ó 3-carboxi-4-nitrofenilo,

produciendo de esta manera un conjugado citotóxico, ilustrado en la fórmula 3 con una unión de uno de dichos uno o más agentes citotóxicos



15 en el que Z es dicho agente citotóxico;

en el que Q es R_2COO^- , $R_2R_3NCOO^-$, R_2OCOO^- , R_2O^- , $R_2CONR_3^-$, $R_2R_3N^-$, $R_2OCONR_3^-$, o S^- ,

en el que:

R_2 es $SCR_4R_5R_6^-$,

R_4 , R_5 y R_6 son cada uno H, alquilo lineal, alquilo cíclico o alquilo ramificado y pueden ser el mismo o diferente,

20 R_3 es H o un alquilo lineal, alquilo cíclico o alquilo ramificado;

en el que n es un número entero de 40 a 999;

en el que x es 1 ó 2; y

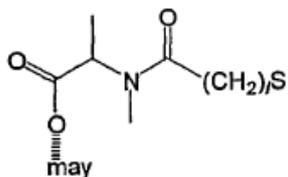
en el que A es dicho agente de unión a células.

25 **[000201]** También se contempla el método para producir un conjugado citotóxico según uno cualquiera de los ejemplos relevantes anteriores, en el que dicho agente citotóxico se selecciona del grupo que consiste en un maitansinoide que contiene tiol, taxano que contiene tiol, análogo de CC-1065 que contiene tiol, análogo de daunorrubicina que contiene tiol y análogo de doxorubicina que contiene tiol y análogos o derivados que contienen tiol de éstos y dicho agente de unión a células se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo policlonal, anticuerpo monoclonal, fragmento de anticuerpo, interferón, linfoquina, hormona, factor de crecimiento, vitamina y molécula transportadora de nutrientes.

[000202] También se contempla el método según los ejemplos relevantes anteriores, en el que dicho maitansinoide que contiene tiol es un maitansinoide que contiene tiol C-3.

[000203] También se contempla el método según los ejemplos relevantes anteriores, en el que dicho maitansinoide que contiene tiol C-3 es un maitansinoide que contiene tiol C-3 que contiene N-metil-alanina.

[000204] También se contempla el método según los ejemplos relevantes anteriores, en el que dicho maitansinoide que contiene tior C-3 que contiene N-metil-alanina es un compuesto seleccionado de la fórmula **M1** siguiente:

**M1**

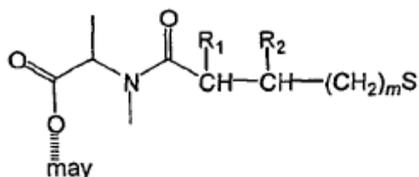
5 en el que:

l es un número entero de 1 a 10; y

may es un maitansinoide.

[000205] También se contempla el método según los ejemplos relevantes anteriores, en el que dicho maitansinoide que contiene tior C-3 que contiene N-metil-alanina es un compuesto seleccionado de la fórmula **M2** siguiente:

10

**M2**

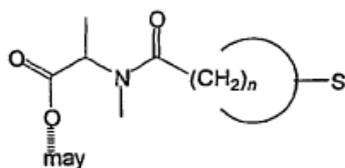
en el que:

R_1 y R_2 son H, CH_3 o CH_2CH_3 , y pueden ser el mismo o diferente;

m es 0, 1, 2 ó 3; y

15 may es un maitansinoide.

[000206] También se contempla el método según los ejemplos relevantes anteriores, en el que dicho maitansinoide que contiene tior C-3 que contiene N-metil-alanina es un compuesto seleccionado de la fórmula **M3** siguiente:

**M3**

20 en el que:

n es un número entero de 3 a 8; y

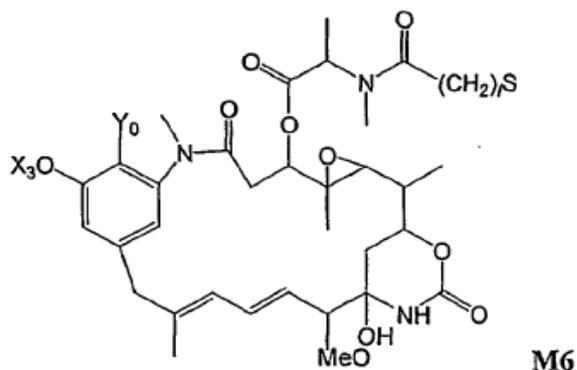
may es un maitansinoide.

[000207] También se contempla el método según los ejemplos relevantes anteriores, en el que dicho maitansinoide que contiene tior C-3 que contiene N-metil-alanina es un maitansinol que contiene tior C-3 que contiene N-metil-alanina.

25

[000208] También se contempla el método según los ejemplos relevantes anteriores, en el que dicho maitansinol que contiene tior C-3 que contiene N-metil-alanina es un decloro maitansinol.

[000209] También se contempla el método según los ejemplos relevantes anteriores, en el que dicho maitansinol que contiene tior C-3 que contiene N-metil-alanina es un compuesto seleccionado de la fórmula **M6** siguiente:



en el que:

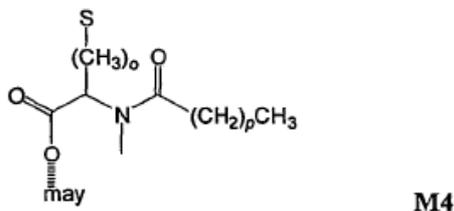
l es 1, 2 ó 3;

Y_0 es Cl o H; y

5 X_3 es H o CH_3 .

[000210] También se contempla el método según los ejemplos relevantes anteriores, en el que dicho maitansinoide que contiene tiol C-3 es un maitansinoide que contiene tiol C-3 que contiene N-metil-cisteína.

10 **[000211]** También se contempla el método según los ejemplos relevantes anteriores, en el que dicho maitansinoide que contiene tiol C-3 que contiene N-metil-cisteína es un compuesto seleccionado de la fórmula **M4** siguiente:



en el que:

o es 1, 2 ó 3;

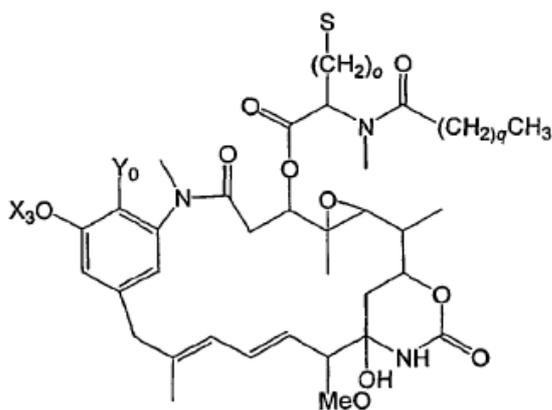
p es un número entero de 0 a 10; y

15 may es un maitansinoide.

[000212] También se contempla el método según los ejemplos relevantes anteriores, en el que dicho maitansinoide que contiene tiol C-3 que contiene N-metil-cisteína es un maitansinol que contiene tiol C-3 que contiene N-metil-cisteína.

20 **[000213]** También se contempla el método según los ejemplos relevantes anteriores, en el que dicho maitansinol que contiene tiol C-3 que contiene N-metil-cisteína es un decloro maitansinol.

[000214] También se contempla el método según los ejemplos relevantes anteriores, en el que dicho maitansinol que contiene tiol C-3 que contiene N-metil-cisteína es un compuesto seleccionado de la fórmula **M5** siguiente:



M5

en el que:

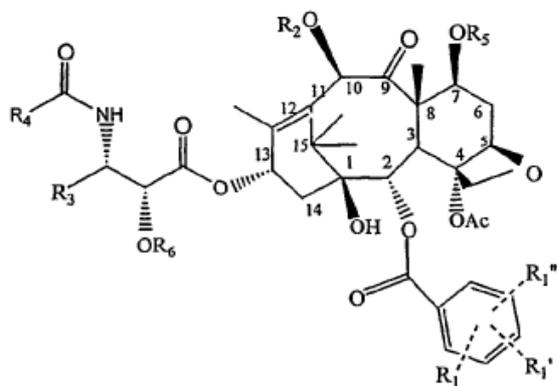
o es 1, 2 ó 3;

q es un número entero de 0 a 10;

5 Y_0 es Cl o H; y

X_3 es H o CH_3 .

[000215] También se contempla el método según los ejemplos relevantes anteriores, en el que dicho taxano que contiene tiol es un compuesto seleccionado de la fórmula **T1** siguiente:



T1

10 en el que:

R_1 es H, un grupo aceptor de electrones o un grupo donador de electrones, y R_1' y R_1'' son el mismo o diferente y son H, un grupo aceptor de electrones o un grupo donador de electrones;

15 R_2 es heterocíclico, un éster o éter lineal, ramificado o cíclico que tiene de 1 a 10 átomos de carbono o un carbamato de la fórmula $-CONR_{10}R_{11}$, en el que R_{10} y R_{11} son el mismo o diferente y son H, alquilo lineal, ramificado o cíclico que tiene 1 a 10 átomos de carbono o arilo;

R_3 es un arilo o un alquilo lineal, ramificado o cíclico que tiene de 1 a 10 átomos de carbono;

R_4 es $-OC(CH_3)_3$ o fenilo;

R_5 es un resto tiol; y

20 R_6 es heterocíclico, H, un éster o éter lineal, ramificado o cíclico que tiene de 1 a 10 átomos de carbono o un carbamato de la fórmula $-CONR_{10}R_{11}$, en el que R_{10} y R_{11} son el mismo o diferente y son H, alquilo lineal, ramificado o cíclico que tiene 1 a 10 átomos de carbono o arilo.

[000216] También se contempla el método según los ejemplos relevantes anteriores, en el que R_1 es F, NO_2 , CN, Cl, CHF_2 , CF_3 , $-OCH_3$, $-OCH_2CH_3$ o NR_7R_8 , en el que:

R₇ y R₈ son el mismo o diferente y son alquilo lineal, ramificado o cíclico que tiene 1 a 10 átomos de carbono o arilo simple o sustituido que tiene 1 a 10 átomos de carbono.

[000217] También se contempla el método según los ejemplos relevantes anteriores, en el que R₇ y R₈ tiene cada uno 1 a 4 átomos de carbono.

5 **[000218]** También se contempla el método según los ejemplos relevantes anteriores, en el que R₇ y R₈ son el mismo.

[000219] También se contempla el método según los ejemplos relevantes anteriores, en el que R₇ y R₈ son el mismo.

10 **[000220]** También se contempla el método según los ejemplos relevantes anteriores, en el que R₂ es -COC₂H₅, -CH₂CH₃, -CONHCH₂CH₃-CO-morfolino, -CO-piperidino, -CO-piperacino o -CO-N-metilpiperacino.

15 **[000221]** También se contempla el método según los ejemplos relevantes anteriores, en el que R₅ es -(CH₂)_nS, -CO(CH₂)_nS, -(CH₂)_nCH(CH₃)S, -CO(CH₂)_nCH(CH₃)S, -(CH₂)_nC(CH₃)₂S, -CO(CH₂)_nC(CH₃)₂S, -CONR₁₂(CH₂)_nS, -CONR₁₂(CH₂)_nCH(CH₃)S, -CONR₁₂(CH₂)_nC(CH₃)₂S, -CO-morfolino-XS, -CO-piperidino-XS, -CO-piperacino-XS o -CO-N-metilpiperacino-XS;

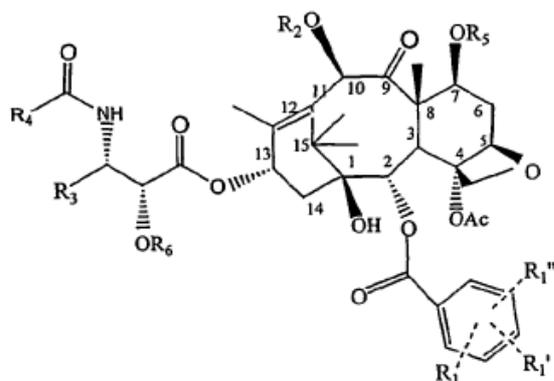
en el que n es un número entero de 1 a 10; y

en el que R₁₂ es H, un alquilo lineal, alquilo ramificado o alquilo cíclico que tiene 1 a 10 átomos de carbono, o arilo simple o sustituido que tiene de 1 a 10 átomos de carbono o heterocíclico.

20 **[000222]** También se contempla el método según los ejemplos relevantes anteriores, en el que R₁ está en la posición meta cuando R₁' y R₁'' son H o OCH₃.

[000223] También se contempla el método según los ejemplos relevantes anteriores, en el que R₃ es -CH=C(CH₃)₂.

[000224] También se contempla el método según los ejemplos relevantes anteriores, en el que dicho taxano es un compuesto seleccionado de la fórmula T1 siguiente:



T1

25 en el que:

R₁ es H, un grupo aceptor de electrones o un grupo donador de electrones, y R₁' y R₁'' son el mismo o diferente y son H, un grupo aceptor de electrones o un grupo donador de electrones;

R₂ es un resto tiol;

30 R₃ es un arilo o es un alquilo lineal, ramificado o cíclico que tiene de 1 a 10 átomos de carbono;

R₄ es -OC(CH₃)₃ o fenilo;

R₅ es heterocíclico, H, un éster o éter lineal, ramificado o cíclico que tiene de 1 a 10 átomos de carbono o un carbamato de la fórmula -CONR₁₀R₁₁, en el que R₁₀ y R₁₁ son el mismo o diferente y son H, alquilo lineal, ramificado o cíclico que tiene 1 a 10 átomos de carbono o arilo; y

R₆ es heterocíclico, H, un éster o éter lineal, ramificado o cíclico que tiene de 1 a 10 átomos de carbono o un carbamato de la fórmula -CONR₁₀R₁₁, en el que R₁₀ y R₁₁ son el mismo o diferente y son H, alquilo lineal, ramificado o cíclico que tiene 1 a 10 átomos de carbono o arilo.

- 5 **[000225]** También se contempla el método según los ejemplos relevantes anteriores, en el que al menos uno de R₁ es F, NO₂, CN, Cl, CHF₂, CF₃, -OCH₃, -OCH₂CH₃ o NR₇R₈ en el que:

R₇ y R₈ son el mismo o diferente y son alquilo lineal, ramificado o cíclico que tiene 1 a 10 átomos de carbono o arilo simple o sustituido que tiene 1 a 10 átomos de carbono.

[000226] También se contempla el método según los ejemplos relevantes anteriores, en el que R₇ y R₈ tiene cada uno 1 a 4 átomos de carbono.

- 10 **[000227]** También se contempla el método según los ejemplos relevantes anteriores, en el que R₇ y R₈ son el mismo.

[000228] También se contempla el método según los ejemplos relevantes anteriores, en el que R₇ y R₈ son el mismo.

- 15 **[000229]** También se contempla el método según los ejemplos relevantes anteriores, en el que R₈ es -(CH₂)_nS, -CO(CH₂)_nS, -(CH₂)_nCH(CH₃)S, -CO(CH₂)_nCH(CH₃)S, -(CH₂)_nC(CH₃)₂S, -CO(CH₂)_nC(CH₃)₂S, -CONR₁₂(CH₂)_nS, -CONR₁₂(CH₂)_nCH(CH₃)S, -CONR₁₂(CH₂)_nC(CH₃)₂S, -CO-morfolino-XS, -CO-piperidino-XS, -CO-piperacino-XS o -CO-N-metilpiperacino-XS;

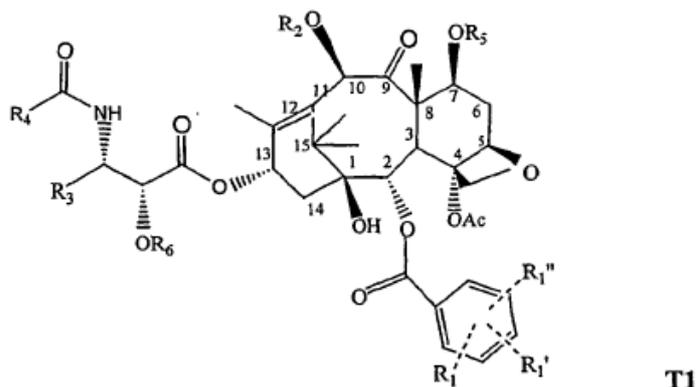
en el que n es un número entero de 1 a 10; y

- 20 en el que R₁₂ es H, un alquilo lineal, alquilo ramificado o alquilo cíclico que tiene 1 a 10 átomos de carbono, o arilo simple o sustituido que tiene de 1 a 10 átomos de carbono o heterocíclico.

[000230] También se contempla el método según los ejemplos relevantes anteriores, en el que R₅ es -COC₂H₅, -CH₂CH₃, -CONHCH₂CH₃, -CO-morfolino, -CO-piperidino, -CO-piperacino o -CO-N-metilpiperacino.

- 25 **[000231]** También se contempla el método según los ejemplos relevantes anteriores, en el que R₁ está en la posición meta cuando R₁' y R₁'' son H o OCH₃.

[000232] También se contempla el método según los ejemplos relevantes anteriores, en el que dicho taxano es un compuesto seleccionado de la fórmula T1 siguiente:



en el que:

- 30 R₁ es H, un grupo aceptor de electrones o un grupo donador de electrones, y R₁' y R₁'' son el mismo o diferente y son H, un grupo aceptor de electrones o un grupo donador de electrones;

R₂ es heterocíclico, un éster o éter lineal, ramificado o cíclico que tiene de 1 a 10 átomos de carbono o un carbamato de la fórmula -CONR₁₀R₁₁, en el que R₁₀ y R₁₁ son el mismo o diferente y son H, alquilo lineal, ramificado o cíclico que tiene 1 a 10 átomos de carbono o arilo;

- 35 R₃ es un arilo o es un alquilo lineal, ramificado o cíclico que tiene de 1 a 10 átomos de carbono;

R₄ es -OC(CH₃)₃ o fenilo;

R₅ es heterocíclico, H, un éster o éter lineal, ramificado o cíclico que tiene de 1 a 10 átomos de carbono o un carbamato de la fórmula -CONR₁₀R₁₁, en el que R₁₀ y R₁₁ son el mismo o diferente y son H, alquilo lineal, ramificado o cíclico que tiene 1 a 10 átomos de carbono o arilo;

R₆ es un resto tiol.

- 5 **[000233]** También se contempla el método según los ejemplos relevantes anteriores, en el que R₁ es F, NO₂, CN, Cl, CHF₂, CF₃, -OCH₃, -OCH₂CH₃ o NR₇R₈ en el que:

R₇ y R₈ son el mismo o diferente y son alquilo lineal, ramificado o cíclico que tiene 1 a 10 átomos de carbono o arilo simple o sustituido que tiene 1 a 10 átomos de carbono.

- 10 **[000234]** También se contempla el método según los ejemplos relevantes anteriores, en el que R₇ y R₈ tiene cada uno 1 a 4 átomos de carbono.

[000235] También se contempla el método según los ejemplos relevantes anteriores, en el que R₇ y R₈ son el mismo.

[000236] También se contempla el método según los ejemplos relevantes anteriores, en el que R₇ y R₈ son el mismo.

- 15 **[000237]** También se contempla el método según los ejemplos relevantes anteriores, en el que R₂ es -COC₂H₅, -CH₂CH₃, -CONHCH₂CH₃, -CO-morfolino, -CO-piperidino, -CO-piperacino o -CO-N-metilpiperacino.

- 20 **[000238]** También se contempla el método según los ejemplos relevantes anteriores, en el que R₅ es -(CH₂)_nS, -CO(CH₂)_nS, -(CH₂)_nCH(CH₃)S, -CO(CH₂)_nCH(CH₃)S, -(CH₂)_nC(CH₃)₂S, -CO(CH₂)_nC(CH₃)₂S, -CONR₁₂(CH₂)_nS, -CONR₁₂(CH₂)_nCH(CH₃)S, -CONR₁₂(CH₂)_nC(CH₃)₂S, -CO-morfolino-XS, -CO-piperidino-XS, -CO-piperacino-XS o -CO-N-metilpiperacino-XS;

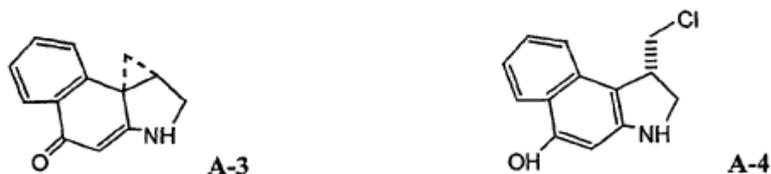
en el que n es un número entero de 1 a 10; y

- 25 en el que R₁₂ es H, un alquilo lineal, alquilo ramificado o alquilo cíclico que tiene 1 a 10 átomos de carbono, o arilo simple o sustituido que tiene de 1 a 10 átomos de carbono o heterocíclico.

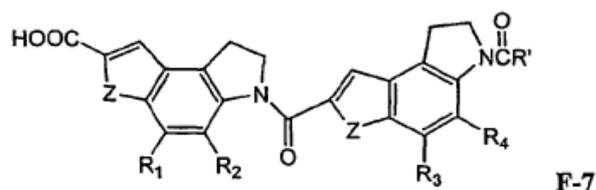
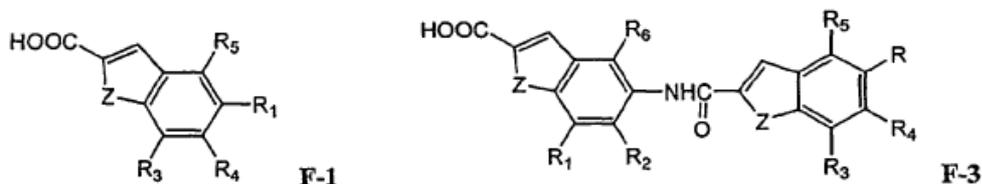
[000239] También se contempla el método según los ejemplos relevantes anteriores, en el que R₁ está en la posición meta cuando R₁' y R₁'' son H o OCH₃.

- 30 **[000240]** También se contempla el método según los ejemplos relevantes anteriores, en el que dicho análogo de CC-1065 que contiene tiol es un compuesto citotóxico que contiene ciclopropilbencindol formado a partir de una subunidad A de las fórmulas **A-3** o **A-4** unida covalentemente a una subunidad B de la fórmula **F-1** o a una subunidad B-C de las fórmulas **F-3** o **F-7** mediante un enlace amida del grupo amino secundario del resto pirrol de la subunidad A al grupo carboxilo C-2 de la subunidad B,

en el que las fórmulas **A-3** y **A-4** son como sigue:



- 35 en el que las fórmulas **F-1**, **F-3** y **F-7** son como sigue:



en el que cada Z puede ser el mismo o diferente y puede ser O o NH; y

en el que, en la Fórmula **F-1** R₄ es un resto tiol, en la Fórmula **F-3** uno de R o R₄ es un resto tiol, en la Fórmula **F-7** uno de R' o R₄ es un resto tiol; cuando R o R' es un resto tiol, entonces R₁ a R₆, que pueden ser el mismo o diferente, son hidrógeno, alquilo C₁-C₃ lineal, metoxi, hidroxilo, amino primario, amino secundario, amino terciario o amido; y cuando R₄ es un resto tiol, R, R₁, R₂, R₃, R₄, R₅ y R₆, que pueden ser el mismo o diferente, son hidrógeno, alquilo C₁-C₃ lineal, metoxi, hidroxilo, amino primario, amino secundario, amino terciario o amido y R' es NH₂, alquilo, O-alquilo, amino primario, amino secundario, amino terciario o amido.

[000241] También se contempla el método según los ejemplos relevantes anteriores, en el que R y R' son restos tiol y R₁ a R₆ son cada uno hidrógeno.

[000242] También se contempla el método según los ejemplos relevantes anteriores, en el que R o R₄ es NHCO(CH₂)_S, NHCOC₆H₄(CH₂)_S o O(CH₂)_S y R' es (CH₂)_S, NH(CH₂)_S o O(CH₂)_S en el que:

/ es un número entero de 1 a 10.

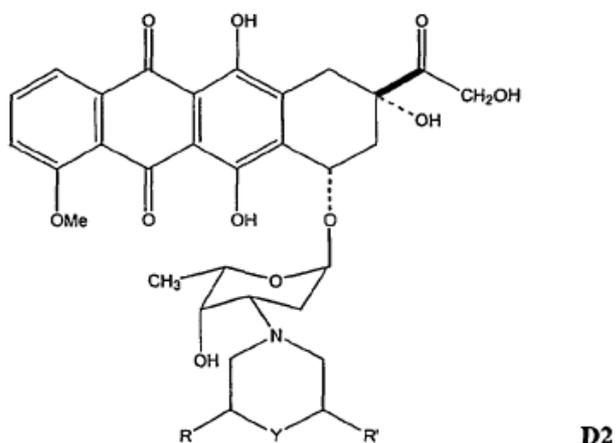
[000243] También se contempla el método según los ejemplos relevantes anteriores, en el que R o R₄ es NHCO(CH₂)_S, NHCOC₆H₄(CH₂)_S o O(CH₂)_S y R' es (CH₂)_S, NH(CH₂)_S o O(CH₂)_S en el que:

/ es un número entero de 1 a 10.

[000244] También se contempla el método según los ejemplos relevantes anteriores, en el que / es 1.

[000245] También se contempla el método según los ejemplos relevantes anteriores, en el que / es 2.

[000246] También se contempla el método según los ejemplos relevantes anteriores, en el que dicho análogo de doxorubicina que contiene tiol es un compuesto seleccionado de la fórmula **D2** siguiente:



en el que,

Y es O o NR₂, en el que R₂ es alquilo lineal o ramificado que tiene 1 a 5 átomos de carbono;

R es un resto tiol, H, alquilo lineal o ramificado que tiene 1 a 5 átomos de carbono; y

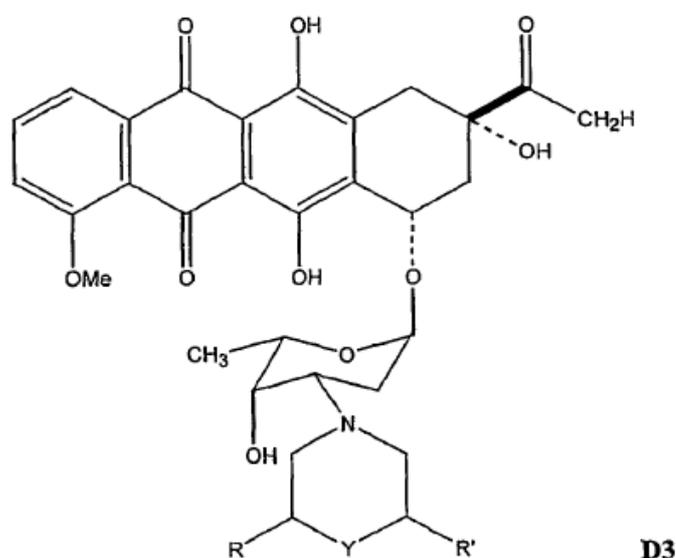
R' es un resto tiol, H, o -OR₁, en el que R₁ es alquilo lineal o ramificado que tiene 1 a 5 átomos de carbono; siempre que R y R' no sean restos de tiol al mismo tiempo.

5 **[000247]** También se contempla el método según los ejemplos relevantes anteriores, en el que NR₂ es NCH₃.

[000248] También se contempla el método según los ejemplos relevantes anteriores, en el que R' es -O.

[000249] También se contempla el método según los ejemplos relevantes anteriores, en el que el resto tiol es -
 10 (CH₂)_nS, -O(CH₂)_nS, -(CH₂)_nCH(CH₃)S, -O(CH₂)_nCH(CH₃)S, -(CH₂)_nC(CH₃)₂S, o -O(CH₂)_nC(CH₃)₂S, en el que n es un número entero de 1 a 10.

[000250] También se contempla el método según los ejemplos relevantes anteriores, en el que dicho análogo de daunorrubicina que contiene tiol es un compuesto seleccionado de la fórmula **D3** siguiente:



en el que,

15 Y es O o NR₂, en el que R₂ es alquilo lineal o ramificado que tiene 1 a 5 átomos de carbono;

R es un resto tiol, H, o alquilo lineal o ramificado que tiene 1 a 5 átomos de carbono; y

R' es un resto tiol, H, o -OR₁, en el que R₁ es alquilo lineal o ramificado que tiene 1 a 5 átomos de carbono; siempre que R y R' no sean restos de tiol al mismo tiempo.

[000251] También se contempla el método según los ejemplos relevantes anteriores, en el que NR₂ es NCH₃.

20 **[000252]** También se contempla el método según los ejemplos relevantes anteriores, en el que R' es -O.

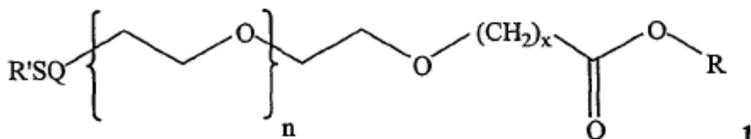
[000253] También se contempla el método según los ejemplos relevantes anteriores, en el que el resto tiol es -
 (CH₂)_nS, -O(CH₂)_nS, -(CH₂)_nCH(CH₃)S, -O(CH₂)_nCH(CH₃)S, -(CH₂)_nC(CH₃)₂S, o -O(CH₂)_nC(CH₃)₂S, en el que n es un número entero de 1 a 10.

25 **[000254]** También se contempla el método según los ejemplos relevantes anteriores, en el que dicho agente de unión a células es un anticuerpo monoclonal.

[000255] También se contempla el método según los ejemplos relevantes anteriores, en el que dicho agente de unión a células es un fragmento de anticuerpo.

[000256] También se contempla el método según los ejemplos relevantes anteriores, en el que dicho agente citotóxico es un taxano y dicho agente de unión a células es un anticuerpo monoclonal.

5 **[000257]** También se contempla el método según uno cualquiera de los ejemplos relevantes anteriores, en el que dicho método comprende además la etapa inicial de preparar un agente citotóxico, que presenta un grupo conector PEG que tiene un éster activo terminal, comprendiendo dicha etapa inicial hacer reaccionar un agente citotóxico que contiene tiol con un grupo conector PEG de fórmula 1:



en el que R' es 2-piridilo, 4-piridilo, 5-nitro-2-piridilo, 5-nitro-4-piridilo, 2-nitrofenilo, 4-nitrofenilo ó 2,4-dinitrofenilo;

en el que Q es R₂COO⁻, R₂R₃NCOO⁻, R₂OCOO⁻, R₂O⁻, R₂CONR₃⁻, R₂R₃N⁻, R₂OCONR₃⁻, o S⁻,

10 en el que:

R₂ es SCR₄R₅R₆⁻,

R₄, R₅ y R₆ son cada uno H, alquilo lineal, alquilo cíclico o alquilo ramificado y pueden ser el mismo o diferente,

R₃ es H o un alquilo lineal, alquilo cíclico o alquilo ramificado;

en el que n es un número entero de 0 a 19, n es un número entero de 20 a 39 o n es un número entero de 41 a 999;

15 en el que x es 1 ó 2; y

en el que R es H, un catión para formar una sal o un grupo químico para formar un éster.

20 **[000258]** En una realización final de la invención, se describe un método para matar poblaciones celulares seleccionadas que comprende poner en contacto células diana, o tejido que contiene células diana, con una cantidad eficaz de uno de los conjugados citotóxicos o composiciones terapéuticas descritas en la presente memoria.

[000259] Se contempla específicamente un método para matar poblaciones celulares seleccionadas que comprende poner en contacto células diana, o tejido que contiene células diana, con una cantidad eficaz del conjugado citotóxico de los ejemplos relevantes anteriores.

DESCRIPCIÓN BREVE DE LOS DIBUJOS

25 **[000260]** La Fig. 1 muestra la preparación de conectores carboxi-PEG. El polietilén glicol **4** se combina con un éster acrilato **5** o un éster bromoacetato **6** para producir un monoéster de PEG **7** u **8**, respectivamente. Los compuestos de PEG **7** y PEG **8** se representan por la fórmula consenso **9**. En la Fig 1, n es cualquier número entero; X es un grupo químico para formar un éster; y x es 1 ó 2.

30 **[000261]** La Fig. 2 muestra la conversión de conectores carboxi-PEG en conectores ω-mercaptocarboxi-PEG, seguido de su conversión adicional en grupos conectores PEG hetero-bifuncionales de la fórmula **13**. El grupo químico protector en el extremo de los compuestos de fórmula **13** puede eliminarse para rendir un compuesto carboxilato de fórmula **14**. A su vez, una sal de un compuesto de fórmula **14** puede prepararse para rendir un compuesto de fórmula **15**. En la Fig. 2, n es cualquier número entero; x es 1 ó 2; X es un grupo químico para formar un éster; R' es 2-piridilo, 4-piridilo, 5-nitro-2-piridilo, 5-nitro-4-piridilo, 2-nitrofenilo, 4-nitrofenilo ó 2,4-dinitrofenilo; y M es un catión para formar una sal.

35 **[000262]** Las Figs. 3A-3D muestran la conversión de conectores carboxi-PEG en conectores ω-aminocarboxi-PEG, seguido de su conversión adicional en grupos conectores PEG hetero-bifuncionales de fórmulas **20**, **23** y **26**. La Fig. 3A muestra la formación de compuestos de fórmula **19** mediante dos esquemas de reacción alternativos. Los compuestos de fórmula **19** se convierten en grupos conectores PEG hetero-bifuncionales de fórmulas **20**, **23** y **26**, como se muestra en las Figs. 3B, 3C y 3D, respectivamente. En cada una de las tres últimas figuras, también se muestra la eliminación del grupo químico protector para rendir los compuestos carboxilato de fórmulas **21**, **24** y **27**. De manera similar, también se muestra la producción de una sal de los compuestos, para rendir los compuestos de fórmulas **22**, **25** y **28**. En la Fig. 3A, n es cualquier número entero; x es 1 ó 2; X es un grupo químico para formar un éster; y R₃ es H o un alquilo lineal, alquilo cíclico o alquilo ramificado. En las Figs. 3B, 3C y 3D, R₃ es H o un alquilo lineal, alquilo cíclico o alquilo ramificado; n es cualquier número entero; x es 1 ó 2; X es un grupo químico para

formar un éster; R_2 es $R'SSCR_4R_5R_6$; R' es 2-piridilo, 4-piridilo, 5-nitro-2-piridilo, 5-nitro-4-piridilo, 2-nitrofenilo, 4-nitrofenilo ó 2,4-dinitrofenilo; R_4 , R_5 y R_6 son cada uno H, alquilo lineal, alquilo cíclico o alquilo ramificado y pueden ser el mismo o diferente; y M es un catión para formar una sal.

5 **[000263]** Las Figs. 4A-4D muestran la conversión de conectores carboxi-PEG en grupos conectores PEG hetero-bifuncionales de fórmulas **29**, **32**, **35** y **38**. La Fig. 4A muestra la producción de compuestos de fórmula **29**, seguido de la eliminación del grupo químico protector para rendir los compuestos carboxilato de fórmula **30**, seguido de la producción de una sal de los compuestos de fórmula **30** para rendir los compuestos de fórmula **31**. De manera similar, las Figs. 4B-4D muestran la producción de los compuestos de fórmulas **32**, **35** y **38**, seguido de la eliminación del grupo químico protector para rendir los compuestos carboxilato de fórmulas **33**, **36** y **39**, seguido de la producción de sales de los compuestos de fórmulas **33**, **36** y **39** para rendir un compuesto de fórmulas **34**, **37** y **40**, respectivamente. En las Figs. 4A, 4C y 4D, n es cualquier número entero; x es 1 ó 2; X es un grupo químico para formar un éster; R_2 es $R'SSCR_4R_5R_6$; R' es 2-piridilo, 4-piridilo, 5-nitro-2-piridilo, 5-nitro-4-piridilo, 2-nitrofenilo, 4-nitrofenilo ó 2,4-dinitrofenilo; R_4 , R_5 y R_6 son cada uno H, alquilo lineal, alquilo cíclico o alquilo ramificado y pueden ser el mismo o diferente; y M es un catión para formar una sal. En la Fig. 4B, R_3 es H o un alquilo lineal, alquilo cíclico o alquilo ramificado; n es cualquier número entero; x es 1 ó 2; X es un grupo químico para formar un éster; R_2 es $R'SSCR_4R_5R_6$; R' es 2-piridilo, 4-piridilo, 5-nitro-2-piridilo, 5-nitro-4-piridilo, 2-nitrofenilo, 4-nitrofenilo ó 2,4-dinitrofenilo; R_4 , R_5 y R_6 son cada uno H, alquilo lineal, alquilo cíclico o alquilo ramificado y pueden ser el mismo o diferente; y M es un catión para formar una sal.

20 **[000264]** La Fig. 5 muestra la preparación de agentes citotóxicos que presentan un resto PEG reactivo. Los grupos conectores PEG hetero-bifuncionales **13-15** y **20-40** se representan por la fórmula consenso **1**. Los grupos conectores PEG hetero-bifuncionales de fórmula **1** se hacen reaccionar con un agente citotóxico que presenta un grupo tiol para producir los compuestos intermedios de fórmula **41**. Los compuestos intermedios de fórmula **41** se convierten en compuestos de fórmula **2**, en los que éstos presentan un éster activo terminal. R' es 2-piridilo, 4-piridilo, 5-nitro-2-piridilo, 5-nitro-4-piridilo, 2-nitrofenilo, 4-nitrofenilo ó 2,4-dinitrofenilo; Q es R_2COO^- , $R_2R_3NCOO^-$, R_2OCOO^- , R_2O^- , $R_2CONR_3^-$, $R_2R_3N^-$, $R_2OCONR_3^-$, o S^- , en el que: R_2 es $SCR_4R_5R_6$, R_4 , R_5 y R_6 son cada uno H, alquilo lineal, alquilo cíclico o alquilo ramificado y pueden ser el mismo o diferente, y R_3 es H o un alquilo lineal, alquilo cíclico o alquilo ramificado; n es cualquier número entero; x es 1 ó 2; R es H, un catión para formar una sal o un grupo químico para formar un éster; Z es un agente citotóxico; e Y es N-succinimidilo, N-sulfosuccinimidilo, N-ftalimidilo, N-sulfoftalimidilo, 2-nitrofenilo, 4-nitrofenilo, 2,4-dinitrofenilo, 3-sulfonyl-4-nitrofenilo ó 3-carboxi-4-nitrofenilo.

35 **[000265]** La Fig. 6 muestra la preparación de conjugados citotóxicos de fórmula **3**. Los agentes citotóxicos que presentan un resto PEG reactivo de fórmula **2** se combinan con un agente de unión a células para rendir conjugados citotóxicos de fórmula **3**. Z es un agente citotóxico; Q es R_2COO^- , $R_2R_3NCOO^-$, R_2OCOO^- , R_2O^- , $R_2CONR_3^-$, $R_2R_3N^-$, $R_2OCONR_3^-$, o S^- , en el que: R_2 es $SCR_4R_5R_6$, R_4 , R_5 y R_6 son cada uno H, alquilo lineal, alquilo cíclico o alquilo ramificado y pueden ser el mismo o diferente, y R_3 es H o un alquilo lineal, alquilo cíclico o alquilo ramificado; n es cualquier número entero; x es 1 ó 2; Y es N-succinimidilo, N-sulfosuccinimidilo, N-ftalimidilo, N-sulfoftalimidilo, 2-nitrofenilo, 4-nitrofenilo, 2,4-dinitrofenilo, 3-sulfonyl-4-nitrofenilo ó 3-carboxi-4-nitrofenilo; y A es un agente de unión a células.

40 **[000266]** La Fig. 7 muestra la preparación del grupo conector PEG hetero-bifuncional éster *terc*-butílico del ácido 15-(2-piridilditio)-4,7,10,13-tetraoxapentadecanoico **13a**, seguido de su conversión a ácido 15-(2-piridilditio)-4,7,10,13-tetraoxapentadecanoico **14a**.

[000267] La Fig. 8 muestra la preparación del grupo conector PEG hetero-bifuncional éster *terc*-butílico del ácido 15-[N-(3-(2-piridilditio)-propionil)]-4,7,10,13-tetraoxapentadecanoico **20a**, seguido de su conversión a ácido 15-[N-(3-(2-piridilditio)-propionil)]-4,7,10,13-tetraoxapentadecanoico **21a**.

45 **[000268]** La Fig. 9 muestra la preparación del grupo conector PEG hetero-bifuncional éster *terc*-butílico del ácido 15-[O-(3-(2-piridilditio)-propionil)]-4,7,10,13-tetraoxapentadecanoico **29a**, seguido de su conversión a ácido 15-[O-(3-(2-piridilditio)-propionato)-hidroxil]-4,7,10,13-tetraoxapentadecanoico **30a**.

[000269] La Fig. 10 muestra la preparación de un agente citotóxico que comprende un grupo conector éster N-hidroxisuccinimida del ácido 15-[N-(3-(L-DM1-ditio)-propionil)]-4,7,10,13-tetraoxapentadecanoico **2a**.

50 **[000270]** La Fig. 11 muestra la preparación de un agente citotóxico que comprende un grupo conector éster N-hidroxisuccinimida del ácido 15-(L-DM1-ditio)-4,7,10,13-tetraoxapentadecanoico **2b**.

[000271] La Fig. 12 muestra la preparación de un conjugado citotóxico **3a** usando un grupo conector N-hidroxisuccinimida del ácido 15-[N-(3-(L-DM1-ditio)-propionil)]-4,7,10,13-tetraoxapentadecanoico. mAb es el anticuerpo monoclonal de ratón anti-Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico KS-77.

55 **[000272]** La Fig. 13 muestra los ejemplos preferidos de las cuatro realizaciones principales de taxanos de fórmula **T1**.

[000273] La Fig. 14 muestra los resultados de los análisis realizados para determinar la citotoxicidad y especificidad *in vitro* de los conjugados citotóxicos KS-77-PEG-DM1, Lotes 1 y 2.

[000274] La Fig. 15 muestra los resultados de los análisis realizados para comparar las afinidades de unión del anticuerpo KS-77 no conjugado y los conjugados citotóxicos KS-77-PEG-DM1.

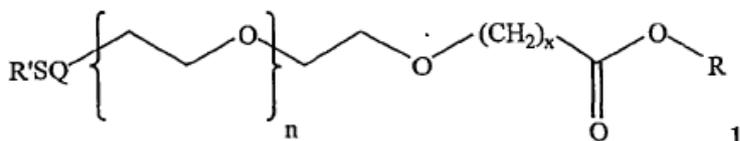
5 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[000275] Cada realización de la presente invención se basa en el uso de un grupo conector polietilen glicol (PEG) hetero-bifuncional. Como se discute en la presente memoria, el uso de PEG como un grupo mono-funcional para la unión a moléculas de fármaco se ha discutido previamente como un medio para convertir fármacos citotóxicos en profármacos, mejorando la vida media y la solubilidad en agua de los fármacos. Los grupos conectores PEG descritos en la presente memoria son hetero-bifuncionales porque se unen a agentes citotóxicos y agentes de unión a células en extremos opuestos de los conectores mediante un grupo sulfidrilo o disulfuro funcional en un extremo y un éster activo en el otro extremo. Así, la nueva estrategia descrita en la presente memoria es utilizar un grupo conector PEG que contiene dos grupos funcionales separados y únicos para unir dos sustituyentes diferentes, específicamente, agentes citotóxicos, incluyendo fármacos citotóxicos, a agentes de unión a células.

15 Grupos conectores PEG

[000276] Los grupos conectores PEG de la presente invención tienen una doble ventaja sobre los otros grupos conectores porque (1) pueden unirse químicamente a un agente citotóxico en un disolvente no acuoso mediante un enlace disulfuro, superando de esta manera la naturaleza hidrofóbica del agente y haciéndolo soluble tanto en disolventes no acuosos como acuosos, y (2) los conjugados citotóxicos producidos usando los grupos conectores tienen una mayor solubilidad en agua, permitiendo de esta manera una flexibilidad mucho mayor en la formulación de disoluciones farmacéuticas para la administración parenteral a los pacientes.

[000277] Los grupos conectores PEG de la presente invención comprenden un intervalo de moléculas con diferentes tamaños basado en la fórmula siguiente 1:



25 en el que R' es 2-piridilo, 4-piridilo, 5-nitro-2-piridilo, 5-nitro-4-piridilo, 2-nitrofenilo, 4-nitrofenilo ó 2,4-dinitrofenilo;

en el que Q es R₂COO-, R₂R₃NCOO-, R₂OCOO-, R₂O-, R₂CONR₃⁻, R₂R₃N-, R₂OCONR₃⁻, o S-,

en el que:

R₂ es SCR₄R₅R₆-,

R₄, R₅ y R₆ son cada uno H, alquilo lineal, alquilo cíclico o alquilo ramificado y pueden ser el mismo o diferente,

30 R₃ es H o un alquilo lineal, alquilo cíclico o alquilo ramificado;

en el que n es cualquier número entero;

en el que x es 1 ó 2; y

en el que R es H, un catión para formar una sal o un grupo químico para formar un éster.

35 **[000278]** En una realización preferida, n es un número entero de 0 a 1.000. En realizaciones más preferidas, n es un número entero de 0 a 20, de 21 a 40 o de 41 a 1.000.

[000279] Los ejemplos preferidos de alquilos lineales incluyen metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo y hexilo.

[000280] Los ejemplos preferidos de alquilos ramificados incluyen isopropilo, isobutilo, *sec*-butilo, *terc*-butilo, isopentilo y 1-etil-propilo.

[000281] Los ejemplos preferidos de alquilos cíclicos incluyen ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo y ciclohexilo.

40 **[000282]** Cada grupo conector PEG presenta un resto disulfuro reactivo terminal en un extremo, separado por la cadena polietilen glicol de un resto ácido carboxílico terminal o de un ácido carboxílico protegido, preferiblemente en la forma de un éster, o una sal carboxilato en el otro extremo. Preferiblemente, el éster protector es éster de metilo,

etilo, fenilo, bencilo o terc-butilo u otros ésteres que pueden convertirse fácilmente en el ácido carboxílico correspondiente.

[000283] Como se ha indicado anteriormente, en una realización preferida n puede ser cualquier número entero de 0 a 1.000 en los grupos conectores PEG de fórmula 1. El experto en la técnica entenderá que la selección de las formas disponibles comercialmente de PEG para uso en cada una de las reacciones de síntesis para producir los grupos conectores PEG pueden seleccionarse tomando como base el lograr la solubilidad óptima en disolventes acuosos, produciendo de esta manera los grupos conectores PEG en los que n es de 0 a 20, n es de 21 a 40 o n es de 41 a 1.000.

[000284] La síntesis de los grupos conectores PEG de fórmula 1 se muestra en las Figs. 1, 2, 3A-3D y 4A-4D. Brevemente, los grupos conectores PEG hetero-bifuncionales pueden prepararse añadiendo en primer lugar metal sodio a THF anhidro y polietilén glicol 4 (que comprende de 1 a 1.000 unidades monoméricas) con agitación. Después de que el sodio se disuelva completamente, se añade un éster de acrilato, tal como acrilato de *terc*-butilo 5. La disolución se agita a temperatura ambiente hasta la finalización, seguido de neutralización con HCl. El disolvente se elimina, preferiblemente en vacío, y el residuo se suspende en disolución salina concentrada, seguido de extracción con acetato de etilo. Las capas orgánicas combinadas se lavan con disolución salina concentrada, agua, se secan sobre sulfato de sodio y el disolvente se elimina. El aceite incoloro resultante se seca en vacío para rendir un compuesto de fórmula 7 (Fig. 1).

[000285] Alternativamente, puede usarse un éster de bromoacetato en lugar de un éster de acrilato. El protocolo es el mismo que anteriormente, excepto que se añade bromoacetato de *terc*-butilo 6 en lugar de acrilato de *terc*-butilo 5. El compuesto resultante es uno de los de fórmula 8 (Fig. 1).

[000286] Conjuntamente, los compuestos de fórmula 7 y fórmula 8 están englobados en la fórmula 9 (Fig.1).

[000287] Un compuesto de fórmula 9 puede convertirse en uno de varios grupos conectores PEG hetero-bifuncionales, tales como los compuestos de fórmulas 13-15 y 20-40, mostrados en las Figs. 2, 3A-3D y 4A-4D.

[000288] Los compuestos del primer grupo son los de fórmulas 13-15 (Fig. 2). Éstos se producen haciendo reaccionar compuestos de fórmula 9 con piridina bajo condiciones frías, seguido de la adición lenta de tribromuro de fósforo. La disolución de reacción se agita hasta la finalización. Se vierte agua en el recipiente de reacción y los orgánicos se extraen en cloruro de metileno. Las capas orgánicas combinadas se lavan con bicarbonato de sodio, seguido de disolución salina concentrada, se secan sobre sulfato de magnesio y el disolvente se elimina en vacío. El residuo se purifica, tal como en gel de sílice usando acetato de etilo puro como el eluyente, para rendir un compuesto de fórmula 10 (Fig. 2).

[000289] Los compuestos de fórmula 10 se convierten en compuestos de fórmula 12 preparando en primer lugar un matraz cargado con resina de intercambio iónico Amberlita IRA-400 (forma Cl) y una disolución de hidrato de hidrosulfuro de sodio ($\text{NaSH}\cdot\text{H}_2\text{O}$) disuelto en metanol (MeOH). Después de dejar que la reacción se vuelva turbia mientras se agita, se añade una disolución de hidrocloreto de trietilamina en MeOH. Se añade gota a gota una disolución de un compuesto de fórmula 10 en MeOH y la disolución resultante se deja con agitación hasta que finaliza la reacción. La resina resultante se elimina por filtración y se añade ácido clorhídrico. La capa orgánica se separa y la capa acuosa se extrae en cloruro de metileno dos veces. Las capas orgánicas combinadas se secan sobre sulfato de sodio anhidro y el disolvente se elimina en vacío. El residuo resultante se purifica, tal como en gel de sílice usando acetato de etilo puro como el eluyente, para rendir un compuesto tiol de fórmula 12 (Fig. 2).

[000290] Alternativamente, puede usarse tiourea seguido de hidróxido de sodio acuoso ($\text{tiourea}/\text{OH}^-$) o tioacetato de potasio seguido de hidróxido de sodio acuoso (KSAc/OH^-) en lugar de hidrato de hidrosulfuro de sodio.

[000291] Los compuestos tiol de fórmula 12 pueden producirse alternativamente haciendo reaccionar un compuesto de fórmula 9 con cloruro de tosilo (TsCl) para rendir un compuesto de fórmula 11. Los compuestos de fórmula 11 pueden convertirse en compuestos tiol de fórmula 12 por reacción con NaSH o $\text{tiourea}/\text{OH}^-$ o KSAc/OH^- , como se ha descrito para la conversión de los compuestos de fórmula 10 a compuestos tiol de fórmula 12.

[000292] A una disolución de un compuesto tiol resultante de fórmula 12, se añade 2,2'-ditiopiridina y ácido acético glacial. La mezcla se agita hasta la finalización bajo una atmósfera de argón y el disolvente se evapora. El residuo se purifica, tal como por cromatografía en gel de sílice, para rendir un compuesto de fórmula 13, un grupo conector PEG hetero-bifuncional (Fig. 2).

[000293] Si se desea, el grupo químico protector puede eliminarse de un compuesto de fórmula 13 añadiendo ácido trifluoroacético (TFA) y trietilsilano (Et_3SiH) a dicho compuesto, en diclorometano. Después de agitar hasta la finalización, la mezcla se diluye con tolueno. La mezcla se evapora, seguido de co-evaporación con tolueno y secado en vacío para rendir un compuesto de fórmula 14 (Fig. 2).

[000294] Finalmente, una sal de un compuesto de fórmula **14** puede producirse por la adición de un equivalente de una base, tal como hidróxido de sodio o potasio para rendir un compuesto de fórmula **15** (Fig. 2).

[000295] El segundo grupo de grupos conectores PEG hetero-bifuncionales en los que pueden convertirse los compuestos de fórmula **9** son los compuestos de fórmulas **20-28**, mostrados en las Figs. 3B-3D. Éstos se producen tratando una disolución de un compuesto de fórmula **9**, en acetonitrilo, con trietilamina. Se añade gota a gota una disolución de cloruro de tosilo en acetonitrilo mediante un embudo de adición durante aproximadamente 30 minutos. Puede usarse análisis con cromatografía en capa fina (TLC) para seguir la finalización de la reacción. El hidrocloreto de trietilamina que se forma se elimina por filtración y el disolvente se elimina. El residuo se purifica, tal como por gel de sílice cargando la columna con 20% acetato de etilo en hexano y eluyendo con acetato de etilo puro, para rendir un compuesto de fórmula **17** (Fig. 3A).

[000296] Alternativamente, un compuesto de fórmula **9** puede hacerse reaccionar con trifenilfosfina y tetrabromuro de carbono en cloruro de metileno para rendir el compuesto **10** (Fig. 3A).

[000297] Los compuestos de fórmulas **10** y **17** se tratan idénticamente para rendir un compuesto de fórmula **18**. A *N,N*-dimetilformamida (DMF) se añade un compuesto de fórmula **10** ó **17** y azida sódica, con agitación. La reacción se calienta y puede monitorizarse para finalización por TLC. La reacción se enfría y se para con agua. La capa acuosa se separa y se extrae en acetato de etilo. Las capas orgánicas combinadas se secan sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtran y el disolvente se elimina en vacío. La azida cruda de fórmula **18** puede usarse sin más purificación (Fig. 3A).

[000298] Un compuesto de fórmula **18** puede convertirse en un compuesto de fórmula **19** disolviendo la azida cruda en etanol y añadiendo catalizador paladio en carbón (Pd/C). El sistema se evacúa en vacío y se pone bajo 1 atm de gas hidrógeno mediante balón con agitación vigorosa, lo que se repite cuatro veces para asegurar una atmósfera de hidrógeno puro. La reacción se agita toda la noche a temperatura ambiente. Puede usarse TLC para confirmar la finalización de la reacción. La reacción cruda se pasa a través de una pequeña almohadilla de celite, lavando con acetato de etilo. El disolvente se elimina y la amina se purifica, tal como en gel de sílice usando una mezcla de 15% metanol y 2,5% trietilamina en cloruro de metileno como el eluyente, para rendir la amina deseada de fórmula **19** (Fig. 3A).

[000299] Las aminas de fórmula **19** pueden convertirse en cualquiera de varios grupos conectores PEG hetero-bifuncionales diferentes, algunos de los cuales se representan por las fórmulas **20-68** (Figs. 3B-3D).

[000300] Para la conversión a grupos conectores de fórmulas **20-22**, se carga un matraz pequeño con una amina de fórmula **19**, ácido 3-(2-piridiltio)-propiónico, hidrocloreto de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (EDC), 4-(dimetilamino)piridina (DMAP) y cloruro de metileno. La reacción se agita a temperatura ambiente toda la noche hasta la finalización. La reacción se para con cloruro de amonio y se extrae en acetato de etilo, se seca sobre sulfato de magnesio anhidro y el disolvente se elimina en vacío. El residuo se purifica, tal como en alúmina usando acetato de etilo puro por monitorización con TLC en 5% metanol en cloruro de metileno, para rendir un grupo conector PEG hetero-bifuncional de fórmula **20** (Fig. 3B).

[000301] Si se desea, el grupo éster protector puede eliminarse de un compuesto de fórmula **20** añadiendo un ácido en un disolvente orgánico tal como ácido trifluoroacético en cloruro de metileno o cloruro de hidrógeno anhidro en acetato de etilo. La mezcla se purifica por cromatografía o cristalización para rendir un compuesto de fórmula **21** (Fig. 3B).

[000302] Finalmente, una sal de un compuesto de fórmula **21** puede producirse por la adición de un equivalente de una base tal como hidróxido de sodio o potasio para rendir un compuesto de fórmula **22** (Fig. 3B).

[000303] Para la conversión de los grupos conectores de fórmulas **23-25**, una amina de fórmula **19** se somete a una reacción de alquilación, por ejemplo tratando con un tosilo de alquilo. La mezcla de reacción se purifica para rendir un grupo conector PEG hetero-bifuncional de fórmula **23** (Fig. 3C).

[000304] Si se desea, el grupo éster protector puede eliminarse de un compuesto de fórmula **23** añadiendo un ácido en un disolvente orgánico tal como ácido trifluoroacético en cloruro de metileno o cloruro de hidrógeno anhidro en acetato de etilo. La mezcla se purifica para rendir un compuesto de fórmula **24** (Fig. 3C).

[000305] Finalmente, una sal de un compuesto de fórmula **24** puede producirse por la adición de un equivalente de una base tal como hidróxido de sodio o potasio para rendir un compuesto de fórmula **25** (Fig. 3C).

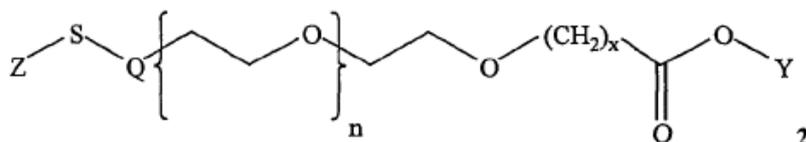
[000306] Para la conversión a grupos conectores de fórmulas **26-28**, una amina de fórmula **19** se trata con un clorofornato de alquilo. La mezcla de reacción se purifica para rendir un grupo conector PEG hetero-bifuncional de fórmula **26** (Fig. 3D).

- [000307]** Si se desea, el grupo éster protector puede eliminarse de un compuesto de fórmula **26** añadiendo un ácido en un disolvente orgánico tal como ácido trifluoroacético en cloruro de metileno o cloruro de hidrógeno anhidro en acetato de etilo. La mezcla se purifica por cristalización o cromatografía para rendir un compuesto de fórmula **27** (Fig. 3D).
- 5 **[000308]** Finalmente, una sal de un compuesto de fórmula **27** puede producirse por la adición de un equivalente de una base tal como hidróxido de sodio o potasio para rendir un compuesto de fórmula **28** (Fig. 3D).
- [000309]** Los grupos conectores PEG hetero-bifuncionales también pueden prepararse a partir de compuestos de fórmula **9** para rendir los compuestos de fórmulas **29-40**, mostrados en las Figs. 4A-4D.
- 10 **[000310]** Los compuestos de fórmulas **29-31** se producen cargando un matraz pequeño con alcohol **9**, ácido 3-(2-piridiltio)-propiónico, hidrocloreuro de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (EDC), 4-(dimetilamino)piridina (DMAP) y cloruro de metileno. La reacción se agita a temperatura ambiente toda la noche hasta la finalización. La reacción se para con cloruro de amonio y se extrae en acetato de etilo, se seca sobre sulfato de magnesio anhidro y el disolvente se elimina en vacío. El residuo se purifica, tal como en gel de sílice usando acetato de etilo puro como el eluyente, para rendir un grupo conector PEG hetero-bifuncional de fórmula **29** (Fig. 4A).
- 15 **[000311]** El grupo éster protector puede eliminarse de un compuesto de fórmula **29** añadiendo dicho compuesto a un matraz pequeño en cloruro de metileno. A esta disolución se añade TFA con agitación hasta que la reacción finaliza. Se añade tolueno a la mezcla de reacción y el disolvente se elimina en vacío. El residuo se purifica, tal como en gel de sílice usando acetato de etilo puro como el eluyente, para rendir un compuesto de fórmula **30** (Fig. 4A).
- 20 **[000312]** Finalmente, una sal de un compuesto de fórmula **30** puede producirse por la adición de un equivalente de una base tal como hidróxido de sodio o potasio para rendir un compuesto de fórmula **31** (Fig. 4A).
- [000313]** Los compuestos de fórmulas **32-34** se producen cargando un matraz pequeño con alcohol **9**, fosgeno y amoniaco, una amina primaria o secundaria en un disolvente orgánico adecuado tal como tolueno o cloruro de metileno. El residuo se purifica, tal como en gel de sílice usando acetato de etilo puro como el eluyente, para rendir un grupo conector PEG hetero-bifuncional de fórmula **32** (Fig. 4B).
- 25 **[000314]** El grupo éster protector puede eliminarse de un compuesto de fórmula **32** por reacción con un ácido en un disolvente orgánico tal como ácido trifluoroacético en cloruro de metileno o cloruro de hidrógeno anhidro en acetato de etilo. El residuo se purifica, tal como en gel de sílice usando acetato de etilo puro como el eluyente, para rendir un compuesto de fórmula **33** (Fig. 4B).
- 30 **[000315]** Una sal de un compuesto de fórmula **33** puede producirse por la adición de un equivalente de una base tal como hidróxido de sodio o potasio para rendir un compuesto de fórmula **34** (Fig. 4B).
- [000316]** Los compuestos de fórmulas **35-37** se producen cargando un matraz pequeño con alcohol **9**, fosgeno y un alcohol. El residuo se purifica, tal como en gel de sílice usando acetato de etilo puro como el eluyente, para rendir un grupo conector PEG hetero-bifuncional de fórmula **35** (Fig. 4C).
- 35 **[000317]** El grupo éster protector puede eliminarse de un compuesto de fórmula **35** por reacción con un ácido en un disolvente orgánico tal como ácido trifluoroacético en cloruro de metileno o cloruro de hidrógeno anhidro en acetato de etilo. El residuo se purifica, tal como en gel de sílice usando acetato de etilo puro como el eluyente, para rendir un compuesto de fórmula **36** (Fig. 4C).
- [000318]** Una sal de un compuesto de fórmula **36** puede producirse por la adición de un equivalente de una base tal como hidróxido de sodio o potasio para rendir un compuesto de fórmula **37** (Fig. 4C).
- 40 **[000319]** Los compuestos de fórmulas **38-40** se producen cargando un matraz pequeño con alcohol **9**, trifetilfosfina y tetrabromuro de carbono en un disolvente tal como cloruro de metileno. El residuo se purifica, tal como en gel de sílice usando acetato de etilo puro como el eluyente, para rendir un grupo conector PEG hetero-bifuncional de fórmula **38** (Fig. 4D).
- 45 **[000320]** El grupo éster protector puede eliminarse de un compuesto de fórmula **38** por reacción con un ácido en un disolvente orgánico tal como ácido trifluoroacético en cloruro de metileno o cloruro de hidrógeno anhidro en acetato de etilo. El residuo se purifica, tal como en gel de sílice usando acetato de etilo puro como el eluyente, para rendir un compuesto de fórmula **39** (Fig. 4D).
- [000321]** Finalmente, una sal de un compuesto de fórmula **39** puede producirse por la adición de un equivalente de una base tal como hidróxido de sodio o potasio para rendir un compuesto de fórmula **40** (Fig. 4D).
- 50 **[000322]** Los grupos conectores PEG hetero-bifuncionales de la presente invención incluyen los compuestos englobados por las fórmulas **13-15** y **20-40**. Conjuntamente, estos compuestos están representados por la fórmula **1**.

Agentes citotóxicos que presentan un resto PEG reactivo

[000323] Los agentes citotóxicos en las realizaciones de la presente invención presentan cada uno un grupo conector PEG que tiene un éster activo terminal.

5 **[000324]** Los agentes citotóxicos que presentan grupos conectores PEG que tienen un éster activo terminal (agente citotóxico-PEG) se ilustran por la fórmula 2.



en el que Z es un agente citotóxico;

en el que Q es R_2COO^- , $R_2R_3NCOO^-$, R_2OCOO^- , R_2O^- , $R_2CONR_3^-$, $R_2R_3N^-$, $R_2OCONR_3^-$, o S^- ,

en el que:

10 R_2 es $SCR_4R_5R_6^-$,

R_4 , R_5 y R_6 son cada uno H, alquilo lineal, alquilo cíclico o alquilo ramificado y pueden ser el mismo o diferente,

R_3 es H o un alquilo lineal, alquilo cíclico o alquilo ramificado;

en el que n es cualquier número entero;

en el que x es 1 ó 2; y

15 en el que Y es *N*-succinimidilo, *N*-sulfosuccinimidilo, *N*-ftalimidilo, *N*-sulfoftalimidilo, 2-nitrofenilo, 4-nitrofenilo, 2,4-dinitrofenilo, 3-sulfonyl-4-nitrofenilo ó 3-carboxi-4-nitrofenilo.

[000325] En una realización preferida, n es un número entero de 0 a 1.000. En realizaciones más preferidas, n es un número entero de 0 a 20, de 21 a 40 o de 41 a 1.000.

[000326] Los ejemplos preferidos de alquilos lineales incluyen metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo y hexilo.

20 **[000327]** Los ejemplos preferidos de alquilos ramificados incluyen isopropilo, isobutilo, *sec*-butilo, *terc*-butilo, isopentilo y 1-etil-propilo.

[000328] Los ejemplos preferidos de alquilos cíclicos incluyen ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo y ciclohexilo.

25 **[000329]** Los agentes citotóxicos pueden ser cualquier compuesto que resulta en la muerte de una célula, o que induce la muerte celular, o que de alguna manera disminuye la viabilidad celular, en los que cada agente citotóxico comprende un resto tiol. Los agentes citotóxicos preferidos con maitansinoides, taxanos, análogos de CC-1065, análogos de daunorrubicina y doxorrubicina, y análogos o derivados de éstos, como se define más adelante.

30 **[000330]** En cada grupo conector, el éster activo es uno que reacciona fácilmente con grupos aminos en disolventes o tampones acuosos. En realizaciones preferidas, el éster activo es un éster de *N*-succinimidilo, *N*-sulfosuccinimidilo, *N*-ftalimidilo, *N*-sulfoftalimidilo, 2-nitrofenilo, 4-nitrofenilo, 2,4-dinitrofenilo, 3-sulfonyl-4-nitrofenilo ó 3-carboxi-4-nitrofenilo.

35 **[000331]** La síntesis de los agentes citotóxicos que presentan un resto PEG reactivo de la presente invención se ilustra en la Fig. 5. Un grupo conector PEG se une a un agente citotóxico mediante reacción de intercambio de disulfuro en el extremo que contiene el resto de disulfuro reactivo. El enlace disulfuro resultante sirve como el sitio de liberación de los agentes citotóxicos completamente activos en o cerca de una célula diana. La síntesis comienza con la reacción de un grupo conector PEG de fórmula 1 con un agente citotóxico que contiene tiol, tal como un maitansinoide, taxano, análogo de CC-1065, análogo de daunorrubicina y análogo de doxorrubicina, o análogos o derivados de éstos, en el que cada agente citotóxico contiene un resto tiol. Brevemente, un agente citotóxico y un grupo conector PEG de fórmula 1 se disuelven en alcohol etílico. Se añade tampón fosfato de potasio y la disolución se agita bajo una atmósfera de argón hasta que la reacción finaliza. La mezcla de reacción puede purificarse por HPLC. El producto deseado se recoge y el disolvente se elimina por evaporación giratoria en vacío para rendir un compuesto de fórmula 41 (Fig. 5).

40 **[000332]** El grupo conector PEG unido al agente citotóxico puede estar al menos en dos formas. Una es el grupo conector PEG de fórmula 1 en el que R es un grupo químico protector. Durante la formación del resto disulfuro

reactivo terminal en un extremo de la cadena de polietileno, el ácido carboxílico en el otro extremo se protege con el grupo químico. El grupo químico protector puede dejarse en el grupo conector PEG durante la reacción del conector y un agente citotóxico. Después de la unión del grupo conector PEG con un agente citotóxico, el grupo químico protector puede reemplazarse con un resto químico para generar un éster activo para usarse en la unión del agente citotóxico-grupo conector PEG a un agente de unión a células.

[000333] Otra forma de grupo conector PEG que puede unirse a un agente citotóxico es el grupo conector PEG de fórmula 1 en el que R es hidrógeno. En esta última versión, el grupo químico protector se elimina del grupo conector PEG después de la formación del resto disulfuro reactivo terminal (véase, por ejemplo, la Fig. 4A, conversión de un compuesto de fórmula 29 en un compuesto de fórmula 30) y antes de la unión del grupo conector PEG con un agente citotóxico. Como anteriormente, después de finalizar la reacción de unión, se forma un éster activo en el extremo libre del grupo conector.

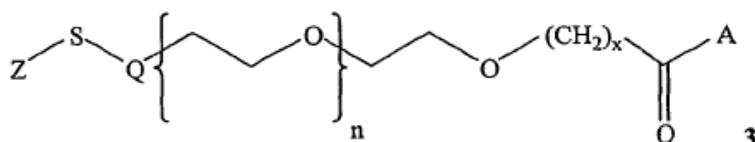
[000334] Después de que se produzca la reacción de intercambio de disulfuro y la formación de un compuesto de fórmula 2, si se usa el grupo conector PEG de fórmula 1 en el que R es un hidrógeno, el ácido carboxílico terminal se convierte en un éster activo. Brevemente, un compuesto de fórmula 41 se disuelve en cloruro de metileno al que se añade *N*-hidroxisuccinimida e hidrocloreuro de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida. La disolución se agita a temperatura ambiente hasta la finalización de la reacción y puede purificarse por cromatografía en sílice. El disolvente se elimina en vacío para rendir un agente citotóxico que contiene un resto PEG reactivo de fórmula 2. El compuesto resultante de fórmula 2 puede purificarse por medios químicos estándar, tales como cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), cromatografía en gel de sílice o cristalización.

[000335] Alternativamente, si se usa el grupo conector PEG de fórmula 1 en el que R es un grupo químico protector, el grupo químico protector terminal se elimina y reemplaza por un hidrógeno, seguido de conversión en un éster activo. Brevemente, el grupo químico protector se elimina por hidrólisis ácida y el ácido carboxílico resultante se convierte en un éster activo de la manera habitual. De nuevo, el resultado es un agente citotóxico que contiene un resto PEG reactivo de fórmula 2.

[000336] Los agentes citotóxicos de la presente invención no están limitados en su uso a la formación de conjugados citotóxicos que comprenden agentes citotóxicos unidos covalentemente a un agente de unión a células mediante un grupo conector PEG, como se ha descrito anteriormente. El experto en la técnica entenderá que existen varios usos para los que pueden usarse los agentes citotóxicos que presentan un resto PEG reactivo de la presente invención. Dichos usos adicionales incluyen, por ejemplo, la preparación de resinas de afinidad, que pueden usarse para aislar el componente celular, por ejemplo, una proteína o enzima que interacciona con el agente citotóxico.

Conjugados citotóxicos

[000337] Los conjugados citotóxicos de la presente invención comprenden cada uno, uno o más agentes citotóxicos unidos covalentemente a un agente de unión a células mediante un grupo conector PEG. La Fórmula 3 ilustra las realizaciones de los conjugados citotóxicos, ilustrando la unión de un agente citotóxico mediante un grupo conector PEG descrito anteriormente:



en el que Z es un agente citotóxico;

en el que Q es R_2COO^- , $R_2R_3NCOO^-$, R_2OCOO^- , R_2O^- , $R_2CONR_3^-$, $R_2R_3N^-$, $R_2OCONR_3^-$, o S^- ,

en el que:

R_2 es $SCR_4R_5R_6^-$,

R_4 , R_5 y R_6 son cada uno H, alquilo lineal, alquilo cíclico o alquilo ramificado y pueden ser el mismo o diferente,

R_3 es H o un alquilo lineal, alquilo cíclico o alquilo ramificado;

en el que n es cualquier número entero;

en el que x es 1 ó 2; y

en el que A es un agente de unión a células.

[000338] En una realización preferida, n es un número entero de 0 a 1.000. En realizaciones más preferidas, n es un número entero de 0 a 20, de 21 a 40 o de 41 a 1.000.

[000339] Los ejemplos preferidos de alquilos lineales incluyen metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo y hexilo.

5 **[000340]** Los ejemplos preferidos de alquilos ramificados incluyen isopropilo, isobutilo, *sec*-butilo, *terc*-butilo, isopentilo y 1-etil-propilo.

[000341] Los ejemplos preferidos de alquilos cíclicos incluyen ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo y ciclohexilo.

[000342] Más de un agente citotóxico, unido mediante un grupo conector PEG, puede unirse a cada molécula de agente de unión a células.

10 **[000343]** El agente citotóxico puede ser cualquier compuesto que resulta en la muerte de una célula, o que induce la muerte celular, o que de alguna manera disminuye la viabilidad celular, en los que cada agente citotóxico comprende un resto tiol. Los agentes citotóxicos preferidos son un maitansinoide, taxano, análogo de CC-1065, análogo de daunorrubicina y análogo de doxorrubicina, y análogos o derivados de éstos, como se define más adelante. El agente de unión a células puede ser cualquier compuesto que pueda unirse a una célula, bien de manera específica o no específica. Preferiblemente, el agente de unión a células es un anticuerpo policlonal, anticuerpo monoclonal, fragmento de anticuerpo, interferón, linfoquina, hormona, factor de crecimiento, vitamina o molécula transportadora de nutrientes, como se discute adicionalmente más adelante.

15

[000344] La síntesis de los conjugados citotóxicos representativos de la presente invención se ilustra en la Fig. 6. La síntesis comienza con la reacción de uno o más de los agentes citotóxicos que presentan un resto PEG reactivo **2** con un agente de unión a células, lo que resulta en el desplazamiento del éster activo terminal de cada resto PEG reactivo por un residuo de aminoácido del agente de unión a células, para rendir un conjugado citotóxico que comprende uno o más agentes citotóxicos unidos covalentemente a un agente de unión a células mediante un grupo conector PEG. Por ejemplo, un compuesto de fórmula **2** se disuelve en etanol anhidro para obtener una concentración madre. Una disolución de un agente de unión a células, tal como un anticuerpo monoclonal, en tampón fosfato de potasio, que contiene NaCl y ácido etilendiaminotetraacético se trata con un exceso molar del compuesto de fórmula **2**. La mezcla de reacción se incubaba a temperatura ambiente durante aproximadamente 2 horas. El conjugado citotóxico puede purificarse por cromatografía de exclusión por tamaño en una columna Sephadex G25 que se había equilibrado previamente con disolución salina tamponada con fosfato para eliminar el compuesto **2** que no ha reaccionado y otros materiales de bajo peso molecular.

20

25

30 **[000345]** De manera importante, el agente de unión a células no necesita ser modificado de ninguna manera antes de su unión con cada agente citotóxico-PEG. El agente de unión a células sólo necesita poseer un grupo amino.

[000346] El conjugado citotóxico puede purificarse por medios bioquímicos estándar, tales como filtración en gel en una columna Sephadex G25 o Sephacryl S 300 o por diálisis como se ha descrito previamente.

Maitansinoides

35 **[000347]** Los maitansinoides que pueden usarse en la presente invención son muy conocidos en la técnica y pueden aislarse de fuentes naturales según métodos conocidos o prepararse sintéticamente según métodos conocidos.

[000348] Los ejemplos de maitansinoides adecuados incluyen maitansinol y análogos de maitansinol. Los ejemplos de análogos de maitansinol adecuados incluyen los que tienen un anillo aromático modificado y los que tienen modificaciones en otras posiciones.

40 **[000349]** Los ejemplos específicos de análogos de maitansinol adecuados que tienen un anillo aromático modificado incluyen:

(1) C-19-decloro (Pat. U.S. No. 4.256.746) (preparado por reducción LAH de ansamitocina P2);

(2) C-20-hidroxi (o C-20 demetil) +/- C-19-decloro (Pat. U.S. Nos. 4.361.650 y 4.307.016) (preparado por desmetilación usando *Streptomyces* o *Actinomyces* o descloración usando LAH); y

45 (3) C-20-demetoxi, C-20-aciloxi (-OCOR), +/- decloro (Pat. U.S. No. 4.294.757) (preparado por acilación usando cloruros de acilo).

[000350] Los ejemplos específicos de análogos adecuados de maitansinol que tienen modificaciones en otras posiciones incluyen:

(1) C-9-SH (Pat. U.S. No. 4.424.219) (preparado por la reacción de maitansinol con H₂S o P₂S₅);

(2) C-14-alcoximetilo (demetoxi/CH₂OR) (Pat. U.S. No. 4.331.598):

(3) C-14-hidroximetil o aciloximetil (CH₂OH o CH₂OAc) (Pat. U.S. No. 4.450.254) (preparado de *Nocardia*);

(4) C-15-hidroxi/aciloxi (Pat. U.S. No. 4.364.866) (preparado por conversión de maitansinol de *Streptomyces*);

(5) C-15-metoxi (Pat. U.S. Nos. 4.313.946 y 4.315.929) (aislado de *Trewia nudiflora*);

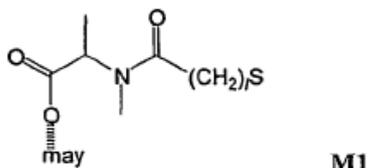
5 (6) C-18-N-demetil (Pat. U.S. Nos. 4.362.663 y 4.322.348) (preparado por la desmetilación de maitansinol por *Streptomyces*); y

(7) 4,5-desoxi (Pat. U.S. No. 4.371.533) (preparado por la reducción tricloruro de titanio/LAH de maitansinol).

10 **[000351]** Los maitansinoides usados en la presente invención contienen un resto tiol. Dichos maitansinoides que contienen tiol se unen covalentemente a un grupo conector PEG mediante intercambio de disulfuro entre el tiol del maitansinoide y el sustituyente disulfuro del grupo conector PEG. La síntesis de los maitansinoides que contienen tiol usados en la presente invención se describe completamente en las Pat. U.S. Nos. 5.208.020 y 5.416.064, incorporadas en la presente memoria en su totalidad.

15 **[000352]** La adición de un grupo conector PEG a un maitansinoide que contiene tiol puede ocurrir en más de una posición. Por ejemplo, se espera que todos los maitansinoides con un resto tiol en la posición C-3, la posición C-14, la posición C-15 o la posición C-20 sean útiles. La posición C-3 se prefiere y la posición C-3 del maitansinol se prefiere especialmente. También se prefiere un maitansinoide con resto tiol C-3 que contiene N-metil-cisteína y un maitansinoide con resto tiol C-3 que contiene N-metil-alanina y análogos de cada uno.

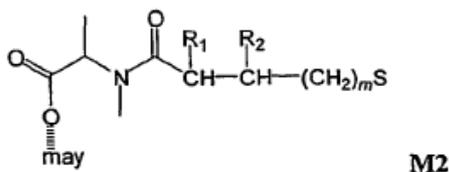
[000353] Los ejemplos específicos de derivados de maitansinoide con resto tiol C-3 que contiene N-metil-alanina útiles en la presente invención están representados por las fórmulas **M1**, **M2**, **M3** y **M6**.



en el que:

l es un número entero de 1 a 10; y

may es un maitansinoide.

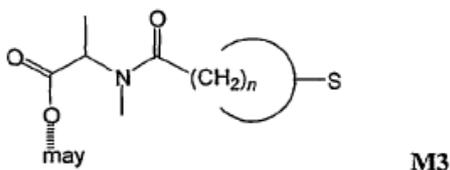


en el que:

R₁ y R₂ son H, CH₃ o CH₂CH₃, y pueden ser el mismo o diferente;

m es 0, 1, 2 ó 3; y

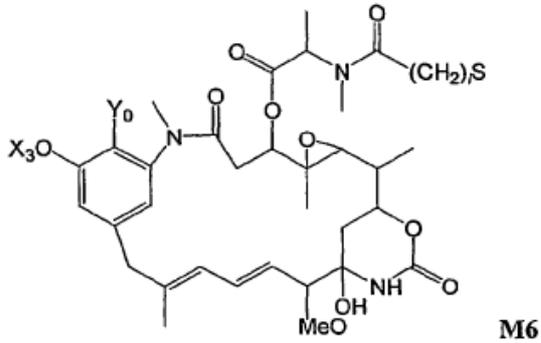
may es un maitansinoide.



en el que:

n es un número entero de 3 a 8; y

may es un maitansinoide.



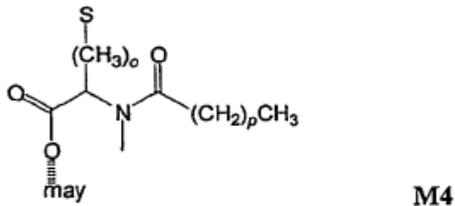
en el que:

l es 1, 2 ó 3;

5 Y_0 es Cl o H; y

X_3 es H o CH_3 .

[000354] Los ejemplos específicos de derivados de maitansinoide con resto tior C-3 que contiene N-metil-cisteína útiles en la presente invención están representados por las fórmulas **M4** y **M5**.

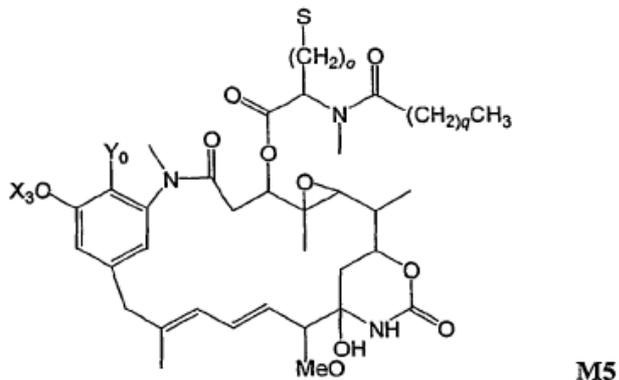


10 en el que:

o es 1, 2 ó 3;

p es un número entero de 0 a 10; y

may es un maitansinoide.



15 en el que:

o es 1, 2 ó 3;

q es un número entero de 0 a 10;

Y_0 es Cl o H; y

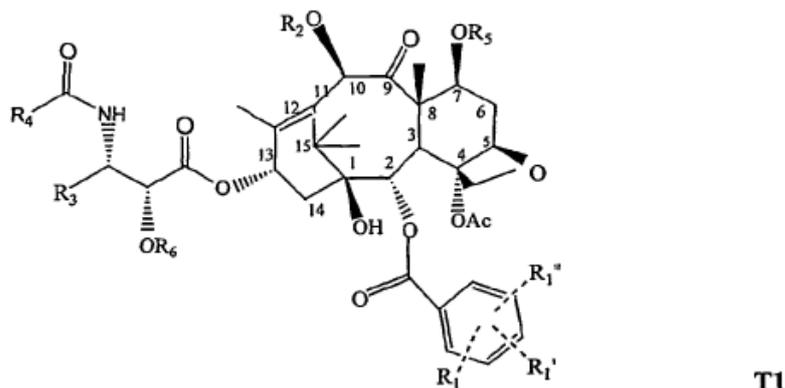
X_3 es H o CH_3 .

Taxanos

[000355] El agente citotóxico, que comprende el agente citotóxico que presenta un resto PEG reactivo y los conjugados citotóxicos según la presente invención, también puede ser un taxano.

5 **[000356]** Los taxanos que pueden usarse en la presente invención pueden modificarse para contener un resto tiol, al que se une covalentemente un grupo conector PEG mediante intercambio de disulfuro entre el tiol y el sustituyente disulfuro del grupo conector PEG.

[000357] Los taxanos útiles en la presente invención tienen la fórmula **T1** mostrada a continuación:



10 **[000358]** Estos nuevos taxanos pueden dividirse en cuatro realizaciones principales, taxanos de los compuestos (1), (2), (3) y (4). Los ejemplos preferidos de las cuatro realizaciones se muestran en la Fig. 13.

15 **[000359]** En las realizaciones (1) a (4), R_1 es un grupo aceptor de electrones, tales como F, NO_2 , CN, Cl, CHF_2 o CF_3 , o un grupo donador de electrones tales como $-\text{OCH}_3$, $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ o NR_7R_8 , $-\text{OR}_9$, en el que R_7 y R_8 son el mismo o diferente y son grupos alquilo lineal, ramificado o cíclico que tiene 1 a 10 átomos de carbono o arilo simple o sustituido que tiene 1 a 10 átomos de carbono. Preferiblemente, el número de átomos de carbono para R_7 y R_8 es 1 a 4. También, preferiblemente, R_7 y R_8 son el mismo. Los ejemplos de grupos $-\text{NR}_7\text{R}_8$ preferidos incluyen dimetil amino, dietil amino, dipropil amino, y dibutil amino, en el que el resto butilo es cualquiera de primario, secundario, terciario o isobutilo. R_9 es alquilo lineal, ramificado o cíclico que tiene 1 a 10 átomos de carbono.

[000360] R_1 también puede ser H.

20 **[000361]** R_1' y R_1'' son el mismo o diferente y son H, un grupo aceptor de electrones o un grupo donador de electrones.

[000362] R_1 es preferiblemente OCH_3 , F, NO_2 o CF_3 .

[000363] Preferiblemente, R_1 está en la posición meta y R_1' y R_1'' son H o OCH_3 .

25 **[000364]** En las realizaciones (1), (2) y (4), R_2 es heterocíclico, un éster lineal, ramificado o cíclico que tiene de 1 a 10 átomos de carbono o heterocíclico, un éter lineal, ramificado o cíclico que tiene de 1 a 10 átomos de carbono o un carbamato de la fórmula $-\text{CONR}_{10}\text{R}_{11}$, en el que R_{10} y R_{11} son el mismo o diferente y son H, alquilo lineal, ramificado o cíclico que tiene 1 a 10 átomos de carbono o arilo simple o sustituido que tiene 1 a 10 átomos de carbono. Para los ésteres, los ejemplos preferidos incluyen $-\text{COCH}_2\text{CH}_3$ y $-\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$. Para los éteres, los ejemplos preferidos incluyen $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ y $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$. Para los carbamatos, los ejemplos preferidos incluyen $-\text{CONHCH}_2\text{CH}_3$, $-\text{CONHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$, $-\text{CO}$ -morfolino, $-\text{CO}$ -piperacino, $-\text{CO}$ -piperidino o $-\text{CO}$ -*N*-metilpiperacino.

30 **[000365]** En la realización (3), R_2 es un resto que contiene tiol.

[000366] En las realizaciones (1), (3) y (4), R_3 es arilo, o es alquilo lineal, ramificado o cíclico que tiene 1 a 10 átomos de carbono, preferiblemente $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$.

[000367] En la realización (2), R_3 es $-\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)_2$.

[000368] En todas las realizaciones, R_4 es $-\text{OC}(\text{CH}_3)_3$ o $-\text{C}_6\text{H}_5$.

35 **[000369]** En las realizaciones (1) y (2), R_5 es un resto que contiene tiol y R_6 es H o tiene la misma definición que anteriormente para R_2 para las realizaciones (1), (2) y (4).

[000370] En la realización (3), R₅ es H o tiene la misma definición que anteriormente para R₂ para las realizaciones (1), (2) y (4).

[000371] En la realización (3), R₆ es H o tiene la misma definición que anteriormente para R₂ para las realizaciones (1), (2) y (4).

5 **[000372]** En la realización (4), R₅ es H o tiene la misma definición que anteriormente para R₂ para las realizaciones (1), (2) y (4) y R₆ es un resto tiol.

[000373] Las posiciones preferidas para la introducción del resto que contiene tiol son R₂ y R₅, siendo R₂ la más preferida.

10 **[000374]** La cadena lateral que porta el resto tiol puede ser lineal o ramificada, aromática o heterocíclica. Un experto en la técnica puede identificar fácilmente cadenas laterales adecuadas. Los ejemplos específicos de restos tiol incluyen -(CH₂)_nS, -CO(CH₂)_nS, -(CH₂)_nCH(CH₃)S, -CO(CH₂)_nCH(CH₃)S, -(CH₂)_nC(CH₃)₂S, -CO(CH₂)_nC(CH₃)₂S, -CONR₁₂(CH₂)_nS, -CONR₁₂(CH₂)_nCH(CH₃)S, o -CONR₁₂(CH₂)_nC(CH₃)₂S, -CO-morfolino-XS, -CO-piperacino-XS, -CO-piperidino-XS -CO-piperidino-XS y -CO-N-metilpiperacino-XS en el que

X es un alquilo lineal o alquilo ramificado que tiene 1-10 átomos de carbono.

15 **[000375]** R₁₂ es un alquilo lineal, alquilo ramificado o alquilo cíclico que tiene 1 a 10 átomos de carbono o arilo simple o sustituido que tiene de 1 a 10 átomos de carbono o heterocíclico, y puede ser H, y

n es un número entero de 0 a 10.

[000376] Los ejemplos de alquilos lineales incluyen metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo y hexilo.

20 **[000377]** Los ejemplos de alquilos ramificados incluyen isopropilo, isobutilo, *sec*-butilo, *terc*-butilo, isopentilo y 1-etil-propilo.

[000378] Los ejemplos de alquilos cíclicos incluyen ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo y ciclohexilo.

[000379] Los ejemplos de arilos simples incluyen fenilo y naftilo.

25 **[000380]** Los ejemplos de arilos sustituidos incluyen arilos tales como los descritos anteriormente sustituidos con grupos alquilo, con halógenos, tales como Cl, Br, F, grupos nitro, grupos amino, grupos ácido sulfónico, grupos ácido carboxílico, grupos hidroxilo o grupos alcoxi.

[000381] Los ejemplos de heterocíclicos son compuestos en los que los heteroátomos se seleccionan de O, N, y S, e incluyen morfolino, piperidino, piperacino, *N*-metilpiperacino, pirrolilo, piridilo, furilo y tiofeno.

30 **[000382]** Los taxanos que tienen un resto tiol pueden sintetizarse según métodos conocidos. El material de partida para la síntesis es el disponible comercialmente 10-deacetilbacatina III. La química para introducir varios sustituyentes se describe en varias publicaciones (Ojima et al, *J. Med. Chem.* 39: 3889-3896 (1996); Ojima et al., *J. Med. Chem.* 40: 267-278 (1997); Ojima et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 96: 4256-4261 (1999); Pat. U.S. No. 5.475.011 y Pat. U.S. No. 5.811.452).

35 **[000383]** El sustituyente R₁ en el anillo fenilo y la posición del sustituyente R₁ puede variarse hasta que se obtiene un compuesto de la toxicidad deseada. Además, el grado de sustitución en el anillo fenilo puede variarse para conseguir una toxicidad deseada. Esto es, el anillo fenilo puede tener uno o más sustituyentes (por ejemplo, mono, di o trisustitución del anillo fenilo) lo que proporciona otros medios para conseguir una toxicidad deseada. Un experto en la técnica puede determinar el resto químico apropiado para R₁ y la posición apropiada para R₁ usando sólo experimentación rutinaria.

40 **[000384]** Por ejemplo, los grupos aceptores de electrones en la posición meta incrementan la potencia citotóxica, mientras que la sustitución en la posición para no se espera que incremente la potencia comparado con el taxano parental. Típicamente, unos pocos taxanos representativos con sustituyentes en las diferentes posiciones (orto, meta y para) se prepararán inicialmente y se evaluarán para citotoxicidad *in vitro*.

45 **[000385]** El resto tiol puede introducirse en una de las posiciones en las que ya existe un grupo hidroxilo. La química para proteger los diferentes grupos hidroxilo, mientras que reacciona el deseado, se ha descrito previamente (véanse, por ejemplo, las referencias citadas *supra*). El sustituyente se introduce simplemente convirtiendo el grupo hidroxilo libre en un éter que contiene disulfuro, un éster que contiene disulfuro o un carbamato que contiene disulfuro. Esta transformación se consigue como sigue. El grupo hidroxilo deseado se desprotona por tratamiento con el reactivo disponible comercialmente hexametildisilazano de litio (1,2 equivalentes) en tetrahidrofurano a -40°C como se describe en Ojima et al. (1999), *supra*. El anión alcóxido resultante se hace

reaccionar con un exceso de un compuesto dihalo, tal como dibromoetano, para proporcionar un halo éter. El desplazamiento del halógeno con un tiol (por reacción con tioacetato de potasio y tratamiento con una base suave o hidroxilamina) proporcionará el taxano que contiene tiol deseado.

- 5 **[000386]** Alternativamente, el grupo hidroxilo deseado puede esterificarse directamente por reacción con un haluro de acilo, tal como cloruro de 3-bromopropionilo, para proporcionar un bromo éter. El desplazamiento del grupo bromo por tratamiento con tioacetato de potasio y procesamiento adicional como se ha descrito anteriormente proporcionará el éster de taxano que contiene tiol.

Análogos de CC-1065

- 10 **[000387]** El agente citotóxico, que comprende el agente citotóxico que presenta un resto PEG reactivo y los conjugados citotóxicos según la presente invención, también puede ser un análogo de CC-1065.

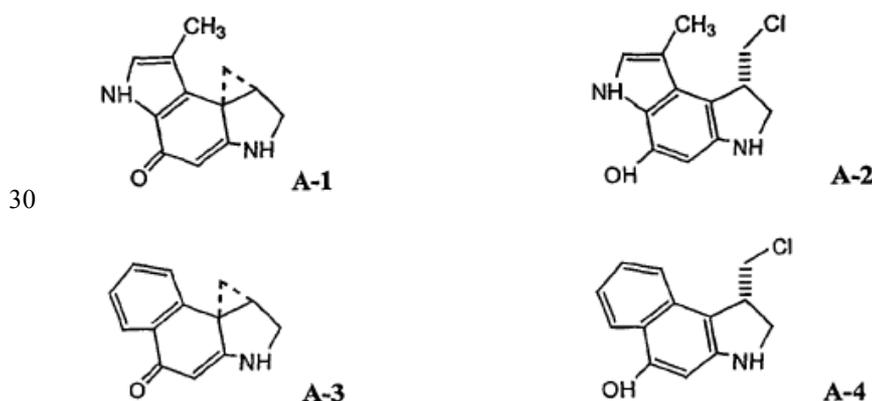
- 15 **[000388]** Según la presente invención, los análogos de CC-1065 deben contener una subunidad A y una subunidad B o B-C. Las subunidades A son CPI (unidad ciclopropapirroloindol) en su forma ciclopropilo cerrada natural o en su forma clorometilo abierta, o la subunidad CBI muy relacionada (unidad ciclopropilbencindol) en la forma ciclopropilo cerrada o la forma clorometilo abierta. Las subunidades B y C de los análogos de CC-1065 son muy similares y son derivados 2-carboxi-indol y 2-carboxi-benzofurano. Para actividad, los análogos de CC-1065 necesitan al menos una tal subunidad 2-carboxi-indol o subunidad 2-carboxi-benzofurano, aunque dos subunidades (es decir, B-C) vuelven al análogo más potente. Como es obvio a partir del CC-1065 natural y de los análogos publicados (por ejemplo, Warpehoski et al, *J. Med. Chem.* 31: 590-603 (1988)), las subunidades B y C también pueden portar diferentes sustituyentes en diferentes posiciones en los anillos indol o benzofurano.

- 20 **[000389]** Con el fin de unir los análogos de CC-1065 a un grupo conector PEG, los análogos se modifican en primer lugar para incluir un resto tiol. Un grupo conector PEG puede unirse covalentemente al análogo de CC-1065 mediante un intercambio de disulfuro entre el tiol y el sustituyente disulfuro del grupo conector PEG.

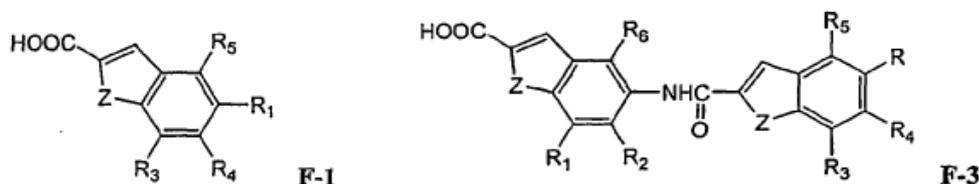
- 25 **[000390]** Los análogos de CC-1065 que contienen un resto tiol pueden ser cualquiera de las subunidades A siguientes de las fórmulas **A-1** {CPI (Forma ciclopropilo)}, **A-2** {CPI (Forma clorometilo)}, **A-3** {CBI (Forma ciclopropilo)}, y **A-4** {CBI (Forma clorometilo)} unidas covalentemente mediante un enlace amida del grupo amino secundario del resto pirrol de la subunidad A al grupo carboxi C-2 bien de la subunidad B de la fórmula **F-1** o una subunidad B-C de las fórmulas **F-3** o **F-7**.

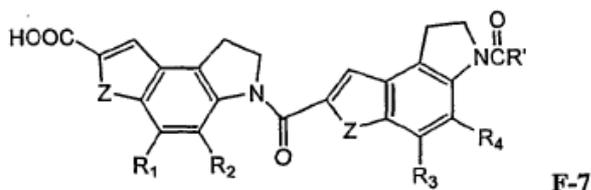
Subunidades A

[000391]



Subunidades B y subunidades B y C unidas covalentemente





en el que cada Z puede ser el mismo o diferente y puede ser O o NH; y

en el que, en la Fórmula **F-1** R₄ es un resto tiol, en la Fórmula **F-3** uno de R o R₄ es un resto tiol, en la Fórmula **F-7** uno de R' o R₄ es un resto que contiene tiol; cuando R o R' es un resto tiol, entonces R₁ a R₆, que pueden ser el mismo o diferente, son hidrógeno, alquilo C₁-C₃ lineal, metoxi, hidroxilo, amino primario, amino secundario, amino terciario o amido; y cuando R₄ es un resto tiol, R, R₁, R₂, R₃, R₄, R₅ y R₆, que pueden ser el mismo o diferente, son hidrógeno, alquilo C₁-C₃ lineal, metoxi, hidroxilo, amino primario, amino secundario, amino terciario o amido y R' es NH₂, alquilo, O-alquilo, amino primario, amino secundario, amino terciario o amido.

5
10 **[000392]** En una realización preferida, R y R' son restos tiol y R₁ y R₂ son cada uno hidrógeno. En otra realización preferida, R y R' son restos tiol y R₁ a R₆ son cada uno hidrógeno.

[000393] En una realización especialmente preferida, R o R₄ es -NHCO(CH₂)_lS, -NHCOC₆H₄(CH₂)S o -O(CH₂)S y R' es -(CH₂)_lS, -NH(CH₂)S o -O(CH₂)S en el que l es un número entero de 1 a 10.

[000394] Los ejemplos de aminas primarias incluyen metil amina, etil amina e isopropil amina.

[000395] Los ejemplos de aminas secundarias incluyen dimetil amina, dietilamina y etilpropil amina.

15 **[000396]** Los ejemplos de aminas terciarias incluyen trimetil amina, trietil amina y etil-isopropil-metil amina.

[000397] Los ejemplos de grupos amido incluyen M-metilacetamido, N-metil-propionamido, N-acetamido y N-propionamido.

[000398] Los ejemplos de alquilo representados por R', cuando R' no es un grupo conector, incluyen alquilo C₁-C₅ lineal o ramificado.

20 **[000399]** Los ejemplos de O-alquilo representados por R' cuando R' no es un grupo conector, incluyen compuestos en los que el resto alquilo es un alquilo C₁-C₅ lineal o ramificado.

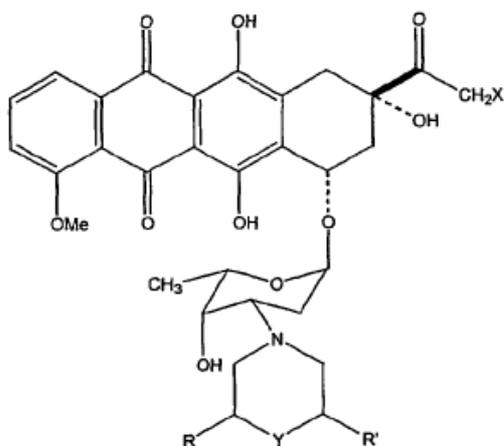
[000400] Los análogos de CC-1065 descritos anteriormente pueden aislarse de fuentes naturales y los métodos para su preparación, que implican modificación posterior, preparación sintética o una combinación de ambas, están bien descritos (véanse, por ejemplo, las Pat. U.S. Nos. 5.475.092, 5.585.499 y 5.846.545).

25 Análogos de Daunorrubicina/Doxorrubicina

[000401] El agente citotóxico, que comprende el agente citotóxico que presenta un resto PEG reactivo y los conjugados citotóxicos según la presente invención, también pueden ser un análogo de daunorrubicina o un análogo de doxorubicina.

30 **[000402]** Los análogos de daunorrubicina y doxorubicina de la presente invención pueden modificarse para comprender un resto tiol. Un grupo conector PEG puede unirse covalentemente a los análogos de daunorrubicina/doxorubicina mediante intercambio de disulfuro entre el tiol y el sustituyente disulfuro del grupo conector PEG.

[000403] Los análogos de doxorubicina/daunorrubicina modificados útiles en la presente invención tienen la fórmula **D1** mostrada a continuación:



D1

en el que,

X es H o OH;

Y es O o NR₂, en el que R₂ es alquilo lineal o ramificado que tiene 1 a 5 átomos de carbono;

5 R es un resto tiol, H, o alquilo lineal o ramificado que tiene 1 a 5 átomos de carbono; y

R' es un resto tiol, H, o -OR₁, en el que R₁ es alquilo lineal o ramificado que tiene 1 a 5 átomos de carbono;

siempre que R y R' no sean restos tiol al mismo tiempo.

[000404] En una realización preferida, NR₂ es NCH₃. En otra realización preferida, R' es -O.

10 **[000405]** En una realización especialmente preferida, el resto tiol es -(CH₂)_nS, -O(CH₂)_nS, -(CH₂)_nCH(CH₃)S, -O(CH₂)_nCH(CH₃)S, -(CH₂)_nC(CH₃)₂S, o -O(CH₂)_nC(CH₃)₂S, en el que n es un número entero de 0 a 10.

[000406] Los ejemplos del alquilo lineal o ramificado que tiene 1 a 5 átomos de carbono, representados por R, R₁ y R₂, incluyen metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, *sec*-butilo, *terc*-butilo y pentilo y cualquiera de sus ocho disposiciones isoméricas.

[000407] R₁ y R₂ son preferiblemente metilo.

15 **[000408]** Los ejemplos de alquilos lineales incluyen metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo y hexilo.

[000409] Los ejemplos de alquilos ramificados incluyen isopropilo, isobutilo, *sec*-butilo, *terc*-butilo, isopentilo y 1-etil-propilo.

20 **[000410]** Cuando R o R' no es un grupo conector, el sustituyente en esa posición puede variarse hasta que se obtiene un compuesto de la toxicidad deseada. Alta toxicidad se define como que tiene una CI₅₀ frente a células cancerosas cultivadas en el intervalo de 1 x 10⁻¹² a 1 x 10⁻⁹ M, después de un tiempo de exposición de 72 horas. Los ejemplos representativos de sustituyentes son H, alquilo y O-alquilo, como se ha descrito anteriormente. Un experto en la técnica puede determinar el resto químico apropiado para R y R' usando sólo experimentación rutinaria.

25 **[000411]** Por ejemplo, los sustituyentes metilo y metoxi se espera que incrementen la potencia citotóxica, mientras que un hidrógeno no se espera que incremente la potencia comparado con los análogos de doxorubicina o daunorrubicina parentales. Típicamente, unos pocos análogos modificados representativos de doxorubicina o daunorrubicina con sustituyentes en diferentes posiciones se prepararán inicialmente y se evaluarán para citotoxicidad *in vitro*.

30 **[000412]** Los análogos de doxorubicina/daunorrubicina modificados de la presente invención, que tienen un resto tiol se describen en WO 01/38318. Los análogos de doxorubicina/daunorrubicina modificados pueden sintetizarse según métodos conocidos (véase, por ejemplo, Pat. U.S. No. 5.146.064).

Análogos y derivados

35 **[000413]** Un experto en la técnica de agentes citotóxicos entenderá fácilmente que cada uno de los agentes citotóxicos descritos en la presente memoria pueden modificarse de manera tal que el compuesto resultante todavía retenga la especificidad y/o actividad del compuesto de partida. El experto en la técnica también entenderá que muchos de estos compuestos pueden usarse en lugar de los agentes citotóxicos descritos en la presente memoria.

Así, los agentes citotóxicos de la presente invención incluyen análogos y derivados de los compuestos descritos en la presente memoria.

Agentes de unión a células

5 **[000414]** El agente de unión a células que comprende cada uno de los conjugados citotóxicos de la presente invención puede ser de cualquier clase conocida actualmente, o que se convierta en conocida, e incluye péptidos y no péptidos. El agente de unión a células puede ser cualquier compuesto que puede unirse a una célula, bien de una manera específica o no específica. Generalmente, éstos pueden ser anticuerpos (especialmente anticuerpos monoclonales y fragmentos de anticuerpos), interferones, linfoquinas, hormonas, factores de crecimiento, vitaminas, moléculas transportadoras de nutrientes (tales como transferrina) o cualquier otra molécula o sustancia de unión a células.

[000415] Los ejemplos más específicos de los agentes de unión a células que pueden usarse incluyen:

- anticuerpos modificados en superficie (Pat. U.S. No. 5.639.641);
- fragmentos de anticuerpos tales como sFv, Fab, Fab' y F(ab')₂ (Parham, *J. Immunol.* 131: 2895-2902 (1983); Spring et al, *J. Immunol.* 113: 470-478 (1974); Nisonoff et al, *Arch. Biochem. Biophys.* 89: 230-244 (1960));
- 15 - interferones (por ejemplo, α, β, γ);
- linfoquinas tales como IL-2, IL-3, IL-4, IL-6;
- hormonas tales como insulina, TRH (hormonas liberadoras de tirotrópina), MSH (hormona estimuladora de melanocitos), hormonas esteroideas, tales como andrógenos y estrógenos;
- vitaminas tales como ácido fólico;
- 20 - factores de crecimiento y factores estimuladores de colonias tales como EGF, TGF-α, G-CSF, M-CSF y GM-CSF (Burgess, *Immunology Today* 5: 155-158 (1984)); y
- transferrina (O'Keefe et al, *J. Biol. Chem.* 260: 932-937 (1985)).

25 **[000416]** Las técnicas de anticuerpos monoclonales permiten la producción de agentes de unión a células extremadamente específicos en la forma de anticuerpos monoclonales específicos. Particularmente muy conocidas en la técnica son las técnicas para crear anticuerpos monoclonales producidos por la inmunización de ratones, ratas, hámsters o cualquier otro mamífero con el antígeno de interés tal como la célula diana intacta, antígenos aislados de la célula diana, virus completos, virus completos atenuados y proteínas virales tales como las proteínas de la cubierta viral. También pueden usarse células humanas sensibilizadas. Otro método para crear anticuerpos monoclonales es el uso de bibliotecas de fagos de sFv (región variable de cadena única), específicamente sFv humana (véanse, por ejemplo, Griffiths et al, Pat. U.S. No. 5.885.793; McCafferty et al, WO 92/01047; Liming et al, WO 99/06587).

[000417] La selección del agente de unión a células apropiado es una elección que depende de la población celular particular que es diana, pero en general se prefieren los anticuerpos monoclonales, si está disponible uno apropiado.

35 **[000418]** Por ejemplo, el anticuerpo monoclonal My9 es un anticuerpo IgG_{2a} murino que es específico para el antígeno CD33 encontrado en células de Leucemia Mielóide Aguda (AML) (Roy et al. *Blood* 77: 2404-2412 (1991)) y puede usarse para tratar pacientes con AML. De manera similar, el anticuerpo monoclonal anti-B4 es una IgG₁ murina, que se une al antígeno CD19 en células B (Nadler et al, *J. Immunol.* 131: 244-250 (1983)) y puede usarse si las células diana son células B o células enfermas que expresan este antígeno tal como en linfoma no Hodgkin o leucemia linfoblástica crónica. De manera similar, el anticuerpo N901 es un anticuerpo monoclonal IgG₁ murino que se une a CD56 encontrado en células de carcinoma de pulmón de células pequeñas y en células de otros tumores de origen neuroendocrino (Roy et al, *J. Nat. Cancer Inst.* 88: 1136-1145 (1996)).

45 **[000419]** Además, GM-CSF, que se une a células mieloides, puede usarse como un agente de unión a células para células enfermas de leucemia mielógena aguda. IL-2, que se une a células T activadas, puede usarse para la prevención de rechazo de injerto de trasplante, para terapia y prevención de enfermedad de injerto frente a huésped, y para el tratamiento de leucemia de células T aguda. MSH, que se une a melanocitos, puede usarse para el tratamiento de melanoma. El ácido fólico, que está dirigido al receptor de folato expresado en cáncer de ovario y otros cánceres también es un agente de unión a células adecuado.

50 **[000420]** Los cánceres de mama y testículos pueden tomarse como diana con éxito con estrógeno (o análogos de estrógeno) o andrógeno (o análogos de andrógeno), respectivamente, como agentes de unión a células.

Ensayos de citotoxicidad

[000421] Los conjugados citotóxicos de la presente invención pueden evaluarse para su capacidad para suprimir la proliferación de varias líneas celulares no deseadas *in vitro*. Por ejemplo, líneas celulares tales como la línea de carcinoma epidermoide humano A-431, la línea celular de cáncer de pulmón de células pequeñas humano SW2, la línea de tumor de mama humano SKBR3 y la línea de linfoma de Burkitt Namalwa pueden usarse fácilmente para la evaluación de la citotoxicidad de estos compuestos. Las células que se van a evaluar pueden exponerse a los compuestos durante 24 horas y las fracciones supervivientes de células medirse en ensayos directos por métodos conocidos. Pueden calcularse los valores de CI_{50} a partir de los resultados de los ensayos.

[000422] La citotoxicidad también puede medirse por la extrapolación retrógrada de las curvas de proliferación celular como se describe en Goldmacher et al, *J. Immunol.* 135: 3648-3651 (1985) o por ensayos clonogénicos como se describe en Goldmacher et al, *J. Cell. Biol.* 102: 1312-1319 (1986).

Composición terapéutica

[000423] La presente invención también proporciona una composición terapéutica que comprende:

(A) una cantidad eficaz de uno o más conjugados citotóxicos, y

(B) un vehículo farmacéuticamente aceptable.

[000424] De manera similar, la presente invención proporciona un método para matar poblaciones celulares seleccionadas que comprende poner en contacto células diana, o tejido que contiene células diana, con una cantidad eficaz de un conjugado citotóxico, o agente terapéutico que comprende un conjugado citotóxico.

[000425] El conjugado citotóxico se prepara como se ha descrito anteriormente.

[000426] Los conjugados citotóxicos pueden evaluarse para potencia y especificidad *in vitro* por métodos descritos previamente (véase, por ejemplo, R.V.J. Chari et al, *Cancer Res.* 55: 4079-4084 (1995)). La actividad anti-tumoral puede evaluarse en modelos de xenoinjerto de tumor humano en ratones por métodos también descritos previamente (véase, por ejemplo, Liu et al. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93: 8618-8623 (1996)).

[000427] Los vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados son muy conocidos y pueden ser determinados por los expertos en la técnica como requiere la situación clínica. Tal y como se usan en la presente memoria, los vehículos incluyen diluyentes y excipientes.

[000428] Los ejemplos de vehículos, diluyentes y/o excipientes adecuados incluyen: (1) disolución salina de Dulbecco tamponada con fosfato, pH ~ 7,4, que contiene o no contiene aproximadamente 1 mg/ml a 25 mg/ml de albúmina de suero humano, (2) disolución salina al 0,9% (0,9% p/v cloruro de sodio (NaCl) y (3) dextrosa al 5% (p/v); y también puede contener un antioxidante tal como triptamina y un agente estabilizador tal como Tween 20.

[000429] El método para matar poblaciones celulares seleccionadas puede practicarse *in vitro*, *in vivo* o *ex vivo*. Tal y como se usa en la presente memoria, matar significa causar la muerte de una célula, lisar una célula, inducir la muerte celular o disminuir la viabilidad celular.

[000430] Los ejemplos de usos *in vitro* incluyen tratamientos de médula ósea autóloga antes de su trasplante al mismo paciente con el fin de matar células enfermas o malignas; tratamientos de médula ósea antes de su trasplante con el fin de matar células T competentes y prevenir la enfermedad de injerto frente a huésped (GVHD); tratamientos de cultivos celulares con el fin de matar todas las células excepto las variantes deseadas que no expresan el antígeno diana; o para matar las variantes que expresan el antígeno no deseado.

[000431] Las condiciones de uso no clínico *in vitro* son determinadas fácilmente por un experto en la técnica.

[000432] Los ejemplos de uso clínico *ex vivo* son para eliminar células tumorales o células linfoides de médula ósea antes de trasplante autólogo en el tratamiento del cáncer o en el tratamiento de enfermedad autoinmune, o para eliminar células T y otras células linfoides de médula ósea o tejido autólogo o alogénico antes de trasplante con el fin de prevenir la enfermedad de injerto frente a huésped (GVHD). El tratamiento puede realizarse como sigue. La médula ósea se recoge del paciente u otro individuo y se incuba en medio que contiene suero al que se añade el agente citotóxico de la invención. Las concentraciones varían de aproximadamente 10 μ M a 1 pM, durante aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 48 horas a aproximadamente 37°C. Las condiciones exactas de concentración y tiempo de incubación, es decir, la dosis, son determinadas fácilmente por un experto en la técnica. Después de la incubación, las células de la médula ósea se lavan con medio que contiene suero y se devuelven al paciente por infusión i.v. según métodos conocidos. En circunstancias en las que el paciente recibe otro tratamiento tal como un curso de quimioterapia ablativa o irradiación de cuerpo total entre el tiempo de la recogida de la médula y la reinfusión de las células tratadas, las células de la médula tratadas se almacenan congeladas en nitrógeno líquido usando equipo médico estándar.

[000433] Para uso clínico *in vivo*, el agente citotóxico de la invención se suministrará como disoluciones que se ensayan para esterilidad y para niveles de endotoxinas. Los ejemplos de protocolos adecuados de administración de conjugado citotóxico son como sigue. Los conjugados se proporcionan semanalmente durante 4 semanas como un bolo i.v. cada semana. Las dosis de los bolos se proporcionan en 50 a 100 ml de disolución salina normal a la que pueden añadirse 5 a 10 ml de albúmina de suero humano. Las dosificaciones serán 10 µg a 100 mg por administración, i.v. (intervalo de 100 ng a 1 mg/kg por día). Más preferiblemente, las dosificaciones variarán de 50 µg a 30 mg. Lo más preferiblemente, las dosificaciones variarán de 1 mg a 20 mg. Después de cuatro semanas de tratamiento, el paciente puede continuar recibiendo tratamiento en una base semanal. Los protocolos clínicos específicos respecto a la ruta de administración, excipientes, diluyentes, dosificaciones, tiempos, etc., pueden ser determinados por un experto en la técnica como requiera la situación clínica.

[000434] Los ejemplos de afecciones médicas que pueden tratarse según los métodos *in vivo* o *ex vivo* de matar poblaciones celulares seleccionadas incluyen malignidad de cualquier tipo incluyendo, por ejemplo, cáncer del pulmón, mama, colon, próstata, riñón, páncreas, ovario y órganos linfáticos; enfermedades autoinmunes, tales como lupus sistémico, artritis reumatoide y esclerosis múltiple; rechazos de injertos, tales como rechazo de trasplante renal, rechazo de trasplante hepático, rechazo de trasplante pulmonar, rechazo de trasplante cardíaco y rechazo de trasplante de médula ósea; enfermedad de injerto frente a huésped; infecciones virales, tales como infección mV, infección por VIH, SIDA, etc.; e infecciones por parásitos, tales como giardiasis, amebiasis, esquistomosis y otras según determina un experto en la técnica.

EJEMPLOS

Ejemplo 1 – Síntesis de Grupos Conectores PEG ejemplares

Éster *terc*-butílico del ácido 15-hidroxi-4,7,10,13-tetraoxapentadecanoico (9a)

[000435] A 300 mL de THF anhidro se añadieron 80 mg (0,0025 moles) de metal sodio y 128 mL de tetraetilen glicol **4a** (0,94 moles) con agitación (Seitz y Kunz, *J. Org. Chem.*, 62: 813-826 (1997)). Después de que el sodio se haya disuelto completamente, se añadió acrilato de *terc*-butilo (24 mL, 0,33 moles). La disolución se agitó durante 20 hr a temperatura ambiente y se neutralizó con 8 mL de 1,0 M HCl. El disolvente se eliminó en vacío y el residuo se suspendió en disolución salina concentrada (250 mL) y se extrajo con acetato de etilo (3 x 125 mL). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con disolución salina concentrada (100 mL), agua (100 mL), se secaron sobre sulfato de sodio y el disolvente se eliminó. El aceite incoloro resultante se secó en vacío para proporcionar 77,13 g (rendimiento 73%) del producto **9a** (Fig. 7). ¹H RMN: 1,40 (s, 9H), 2,49 (t, 2H; J= 6,4 Hz), 3,59-3,73 (m, 18H).

Éster *terc*-butílico del ácido 15-bromo-4,7,10,13-tetraoxapentadecanoico (10a)

[000436] A una disolución agitada de **9a** (1,0 g, 3,11 mmoles) en 1 mL de piridina a 0°C se añadió lentamente tribromuro de fósforo (0,116 mL, 1,22 mmoles) con una jeringa (Bradshaw et al., *J. Het. Chem.*, 27: 347-349 (1990)). La disolución se dejó con agitación toda la noche, momento en el que el análisis de TLC indicó que la reacción había finalizado. Se vertió agua (25 mL) en el recipiente de reacción y los orgánicos se extrajeron en cloruro de metileno (3 x 25 mL). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con bicarbonato de sodio (25 mL), seguido de disolución salina concentrada (25 mL), se secaron sobre sulfato de magnesio y el disolvente se eliminó en vacío. El residuo se purificó en gel de sílice usando acetato de etilo puro como el eluyente para proporcionar 400 mg (rendimiento 35%) del producto puro **10a** (Fig. 7). ¹H RMN: 1,37 (s, 9H), 2,43 (t, 2H; J= 6,4 Hz), 3,40 (t, 2H, J= 6,4 Hz), 3,53-3,61 (m, 12H), 3,64 (t, 2H, J= 6,4 Hz), 3,74 (t, 2H, J= 6,4 Hz). ¹³C RMN: 27,90, 30,13, 36,06, 66,68, 70,17, 70,31, 70,32, 70,39, 70,46, 70,99, 80,22, 170,65.

[000437] Alternativamente, 1,61 g (5,03 mmoles) de **9a** se co-evaporaron sucesivamente con 100% etanol y tolueno, se secaron sobre sulfato de sodio anhidro y tamices moleculares 4A en diclorometano. La mezcla se filtró y se concentró. Al compuesto seco (1,42 g) en 20 ml de diclorometano se añadieron 2,48 g de tetrabromuro de carbono (CBr₄, 7,47 mmoles) y 1,50 g de trifetilfosfina (PPh₃, 5,71 mmoles). Después de agitar bajo una atmósfera de argón toda la noche, la mezcla de reacción se filtró a través de un lecho de gel de sílice, se concentró y se purificó por cromatografía en gel de sílice (Gradiente EtOAc/Hexano empezando en una proporción 1:2 y cambiando a una proporción de 2:3) para rendir 0,92 g de **10a** (62%). R_f = 0,64 (EtOAc); ¹H RMN (CDCl₃) 3,785 (t, 2H, J= 6,3 + 6,3 Hz), 3,68 (t, 2H; J= 6,5 + 6,5 Hz), 3,650 (m, 8H), 3,615 (m, 4H), 3,462 (t, 2H; J= 6,3 + 6,4 Hz), 2,491 (t, 2H; J= 6,5 + 6,5 Hz), 1,434 (s, 9H); ¹³C RMN 171,063, 80,656, 71,368, 70,831, 70,764, 70,706, 70,678, 70,545, 67,061, 36,431, 30,474, 28,263; MS m/z 408,74 (M+Na)⁺, 406,70, 405,70, 404,73.

Éster *terc*-butílico del ácido 15-mercaptop-4,7,10,13-tetraoxapentadecanoico (12a)

[000438] Se cargó un matraz con resina de intercambio iónico Amberlita IRA-400 (forma Cl⁻) (1,3 g, 4,94 mmoles de Cl⁻) y una disolución de NaSH·H₂O (0,218 g, 3,9 mmoles) disuelto en 8 mL de MeOH se añadió con agitación (Choi y Yoon, *Syn.*, 373-375 (1995)). Después de dejar con agitación durante una hora, momento en el que la reacción se volvió turbia, se añadió una disolución de hidrocloreuro de trietilamina (0,180 g, 1,30 mmoles) en 1,5 mL

de MeOH. Se añadió gota a gota una disolución de **10a** (0,500 g, 1,3 mmoles) en 2 mL de MeOH y se dejó con agitación a temperatura ambiente durante 16 hr. La resina se eliminó por filtración y se añadieron 30 mL de 0,5 M HCl. La capa orgánica se separó y la capa acuosa se extrajo en cloruro de metileno (2 x 25 mL). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de sodio anhidro y el disolvente se eliminó en vacío. El residuo se purificó en gel de sílice usando acetato de etilo puro como el eluyente para proporcionar 250 mg (rendimiento 60%) del tiol **12a** (Fig. 7). ¹H RMN: 1,41 (s, 9H), 2,46 (t, 2H, J= 6,4 Hz), 2,85 (t, 2H, J= 6,4 Hz), 3,55-3,62 (m, 12H), 3,64-3,71 (m, 4H). ¹³C RMN: 27,98, 36,14, 38,27, 66,77, 69,51, 70,25, 70,27, 70,39, 70,41, 70,48, 70,52, 80,36, 170,77. MS m/z Calculado: 361,17, Encontrado: 361,94.

[000439] Alternativamente, 800 mg de NaHS·H₂O en etanol puro se agitan hasta que se disuelven completamente. A la disolución de etanol se añadieron 500 mg de **10a** en 3 ml de tetrahidrofurano. Después de agitar bajo argón durante 5 hr, se añadieron 0,5 ml de ácido acético. La mezcla se evaporó a sequedad, se suspendió con THF/EtOAc y se filtró a través de un lecho de gel de sílice. El filtrado se concentró y se purificó por cromatografía en gel de sílice (EtOAc/Hexano 2:1) para rendir 382 mg de **12a** (87%). R_f= 0,47 (EtOAc); ¹H RMN (CDCl₃) 3,810 (t, 2H, J= 6,5 + 6,5 Hz), 3,693 (t, 2H, J= 6,6 + 6,6 Hz), 3,653 (m, 8H), 3,620 (m, 4H), 3,161 (t, 1H, J= 6,4 + 6,4 Hz), 3,072 (t, 1H, J= 6,6 + 6,6 Hz), 2,503 (t, 2H, J= 6,6 + 6,6 Hz), 1,447 (s, 9H); ¹³C RMN 171,098, 80,700, 70,862, 70,815, 70,746, 70,720, 70,698, 70,669, 70,575, 69,629, 69,468, 67,105, 38,191, 36,475, 28,307; MS m/z 361,56 (M+Na)⁺.

Éster *terc*-butílico del ácido 15-(2-piridilditio)-4,7,10,13-tetraoxapentadecanoico (**13a**)

[000440] A una disolución de éster *terc*-butílico del ácido 15-mercapto-4,7,10,13-tetraoxapentadecanoico (**12a**) (125 mg, 0,37 mmoles) en 5 ml de etanol se añadió 2,2'-ditiopiridina (300 mg, 2,1 mmoles) y 20 µl de ácido acético glacial. La mezcla se agitó toda la noche bajo una atmósfera de argón y el disolvente se evaporó. El residuo se purificó por cromatografía en gel de sílice (EtOAc/Hexano 3:2) para rendir 146 mg (rendimiento 88%) del compuesto del título **13a** (Fig. 7). R_f= 0,44 (EtOAc/Hexano 2:1); ¹H RMN (CDCl₃) 8,380 (ddd, 1H, J= 0,7, 1,4, 4,8 Hz), 7,710 (dd, 1H, J= 0,8, 7,2 Hz), 7,600 (dt, 1H, J= 1,8, 7,5, 7,5 Hz), 7,015 (m, 1H), 3,663-3,492 (m, 16H), 2,92 (t, 2H, J= 6,4 + 6,4 Hz), 2,425 (t, 2H, J= 6,6 + 6,5 Hz), 1,372 (s, 9H); ¹³C RMN 170,844, 160,421, 149,467, 137,136, 120,604, 119,578, 80,431, 70,647, 70,589, 70,486, 70,400, 70,353, 68,895, 66,872, 38,475, 36,257, 28,091; MS 470,77 (M+Na)⁺.

Ácido 15-(2-piridilditio)-4,7,10,13-tetraoxapentadecanoico (**14a**)

[000441] A una disolución de 140 mg de éster *terc*-butílico del ácido 15-(2-piridilditio)-4,7,10,13-tetraoxapentadecanoico (**13a**) en 5 ml de diclorometano se añadieron 1,0 ml de TFA y 250 µl de Et₃SiH. Después de agitar durante 2 hr, la mezcla se diluyó con 5 ml de tolueno. La mezcla se evaporó y se co-evaporó tres veces con 5 ml de tolueno y se secó en vacío para rendir 122 mg (rendimiento 99%) del compuesto del título **14a** (Fig. 7). ¹H RMN (CDCl₃) 13,331 (s, OH), 8,770 (d, 1H, J= 5,4 Hz), 8,299 (t, 1H, J= 7,7 + 7,7 Hz), 8,130 (d, 1H, J= 8,2 Hz), 7,677 (t, 1H, J= 6,3 + 6,4 Hz), 3,703-3,556 (m, 16H), 3,109 (t, 2H, J= 6,4 + 6,4 Hz), 2,538 (t, 2H, J= 6,1 + 6,1 Hz); ¹³C RMN 175,900, 157,402, 144,807, 129,114, 124,746, 123,635, 70,452, 70,327, 70,206, 70,184, 69,881, 69,862, 67,229, 66,407, 39,320, 34,866; MS 392,73 (M+H)⁺, 390,76 (M-H)⁻.

Éster *terc*-butílico del ácido 15-O-tosil-4,7,10,13-tetraoxapentadecanoico (**17a**).

[000442] Una disolución de **9a** (10 g, 31 mmoles) en acetonitrilo (100 mL) se trató con trietilamina (5,18 mL). Se añadió gota a gota una disolución de cloruro de tosilo (7,12 g, 37,3 mmoles) en 50 mL de acetonitrilo mediante un embudo de adición durante 30 minutos. Después de 5 hr, el análisis por TLC reveló que la reacción había finalizado. El hidrocloreto de trietilamina que se había formado se eliminó por filtración y el disolvente se eliminó. El residuo se purificó en gel de sílice cargando la columna con acetato de etilo al 20% en hexano y eluyendo con acetato de etilo puro para proporcionar 11,2 g (rendimiento 76%) de **17a** (Fig. 8). ¹H RMN: 1,40 (s, 9H), 2,40 (s, 3H), 2,45 (t, 2H, J= 6,4 Hz), 3,52-3,60 (m, 12H), 3,62-3,68 (m, 4H), 4,11 (t, 2H, J= 4,8 Hz), 7,30 (d, 2H, J= 8,0 Hz), 7,75 (d, 2H, J= 8,0 Hz). ¹³C RMN: 21,48, 27,94, 36,12, 66,73, 68,50, 69,12, 70,20, 70,34, 70,36, 70,41, 70,45, 70,57, 80,31, 127,82, 129,68, 132,86, 144,64, 170,72.

Éster *terc*-butílico del ácido 15-azido-4,7,10,13-tetraoxapentadecanoico (**18a**)

[000443] A 10 mL de DMF se añadió **17a** (4,0 g, 8,4 mmoles) y azida de sodio (0,737 g, 11,3 mmoles) con agitación. La reacción se calentó a 80°C y se monitorizó por TLC. Después de 5 hr, el análisis por TLC reveló que la reacción había finalizado. La reacción se enfrió hasta temperatura ambiente y se paró con agua (25 mL). La capa acuosa se separó y se extrajo en acetato de etilo (3 x 25 mL). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtraron y el disolvente se eliminó en vacío. La azida cruda **18a** se usó sin purificación adicional (Fig. 8). ¹H RMN: 1,39 (s, 9H), 2,44 (t, 2H, J= 6,4 Hz), 3,32 (t, 2H, J= 5,2 Hz), 3,52-3,65 (m, 16H).

Éster *terc*-butílico del ácido 15-amino-4,7,10,13-tetraoxapentadecanoico (**19a**)

[000444] El material crudo **18a** (3,0 g, 8,0 mmoles) se disolvió en etanol (20 mL) y se añadieron 300 mg de 10% Pd/C. El sistema se evacuó en vacío y se puso bajo 1 atm de hidrógeno gas mediante un balón con agitación

vigorosa y se repitió 4 veces para asegurar una atmósfera de hidrógeno puro. La reacción se agitó toda la noche a temperatura ambiente. La TLC mostró que la reacción había finalizado después de 16 hr. La reacción cruda se pasó a través de una pequeña almohadilla de celite lavando con acetato de etilo. El disolvente se eliminó y la amina se purificó en gel de sílice usando una mezcla de 15% metanol y 2,5% trietilamina en cloruro de metileno como el eluyente para proporcionar 2,3 g (rendimiento 85%) de la amina deseada **19a** (Fig. 8). ¹H RMN: 1,36 (s, 9H), 2,27 (br s., 2H), 2,42 (t, 2H, J= 6,4 Hz), 2,80 (t, 2H, J= 5,2 Hz), 3,45 (d, 2H, J= 5,2 Hz), 3,51-3,59 (m, 12H), 3,63 (d, 2H, J= 6,4 Hz). MS: m/z Calculado: 322,21, Encontrado: 321,97.

Éster *terc*-butílico del ácido 15-[N-(3-(2-piridilditio)-propionil)]-4,7,10,13-tetraoxapentadecanoico (**20a**)

[000445] Se cargó un matraz pequeño con la amina **19a** (0,550 g, 1,7 mmoles), ácido 3-(2-piridilditio)-propiónico (0,550 g, 2,6 mmoles), EDC (0,694 g, 3,4 mmoles), DMAP (0,103 g, 0,88 mmoles) y cloruro de metileno (12 mL). La reacción se agitó a temperatura ambiente toda la noche. La TLC reveló que todo el material de partida se había consumido después de 16 horas. La reacción se paró con cloruro de amonio (50 mL) y se extrajo con acetato de etilo (3 x 50 mL), se secó sobre sulfato de magnesio anhidro y el disolvente se eliminó en vacío. El residuo se purificó en alúmina usando acetato de etilo puro monitorizando por TLC en 5% metanol en cloruro de metileno para obtener 562 mg (rendimiento 65%) del producto acoplado deseado **20a** (Fig. 8). ¹H RMN: 1,40 (s, 9H), 2,46 (t, 2H, J= 6,4 Hz), 2,58 (t, 2H, J= 6,8 Hz), 3,05 (t, 2H, J= 6,8 Hz), 3,43 (m, 2H), 3,50-3,62 (m, 14H), 3,66 (t, 2H, J= 6,4 Hz), 7,07 (m, 1H), 7,61-7,63 (m, 2H), 8,45 (m, 1H). MS para C₂₃H₃₈N₂O₇S₂-Na⁺: m/z calculado: 541,20; encontrado: 541,11.

Ácido 15-[N-(3-(2-piridilditio)-propionil)]-4,7,10,13-tetraoxapentadecanoico (**21a**)

[000446] A un matraz pequeño se añadió **20a** (35 mg, 0,0674 mmoles) en 3 mL de cloruro de metileno. A esta disolución se añadieron 0,5 mL de TFA con agitación. Después de 1 hr, la reacción había finalizado por TLC. Se añadió tolueno (3 mL) a la mezcla de reacción y el disolvente se eliminó en vacío. El residuo se purificó en gel de sílice usando una mezcla de 10% metanol y 2% ácido acético en cloruro de metileno como el eluyente para proporcionar 14 mg (rendimiento 45%) del producto deseado **21a** (Fig. 8). ¹H RMN: 2,61 (t, 2H, J= 6,4 Hz), 2,64 (t, 2H, J= 6,8 Hz), 3,06 (t, 2H, J= 6,8 Hz), 3,45 (m, 2H), 3,57-3,68 (m, 16H), 3,78 (t, 2H, J= 6,4 Hz), 7,13 (m, 1H), 7,66-7,74 (m, 2H), 8,48 (d, 1H, J= 5,2 Hz). m/z LC/MS para C₁₉H₃₀N₂O₇S₂-Na⁺: calcd: 485,14; encontrado: 485,00.

Éster *terc*-butílico del ácido 15-[O-(3-(2-piridilditio)-propionil)]-4,7,10,13-tetraoxapentadecanoico (**29a**)

[000447] Se cargó un matraz pequeño con el alcohol **9a** (0,500 g, 1,55 mmoles), ácido 3-(2-piridilditio)-propiónico (0,666 g, 3,1 mmoles), EDC (0,593 g, 3,1 mmoles), DMAP (0,095 g, 0,76 mmoles) y cloruro de metileno (10 mL). La reacción se agitó a temperatura ambiente toda la noche. El análisis por TLC indicó que todo el material de partida se había consumido después de 16 horas. La reacción se paró con cloruro de amonio (50 mL) y se extrajo con acetato de etilo (3 x 50 mL), se secó sobre sulfato de magnesio anhidro y el disolvente se eliminó en vacío. El residuo se purificó en gel de sílice usando acetato de etilo puro como el eluyente para proporcionar 500 mg (rendimiento 62%) del producto acoplado deseado **29a** (Fig. 9). ¹H RMN: 1,42 (s, 9H), 2,48 (t, 2H, J= 6,4 Hz), 2,77 (t, 2H, J= 6,8 Hz), 3,03 (t, 2H, J= 6,8 Hz), 3,54-3,64 (m, 12H), 3,65-3,72 (m, 4H), 4,23 (m, 2H), 7,07 (m, 1H), 7,60-7,66 (m, 2H), 8,46 (m, 1H). MS: m/z Calculado: 542,19. Encontrado: 542,06.

Ácido 15-[O-(3-(2-piridilditio)-propionato)-hidroxi]-4,7,10,13-tetraoxapentadecanoico (**30a**)

[000448] A un matraz pequeño se añadió **29a** (45 mg, 0,0867 mmoles) en 3 mL de cloruro de metileno. A esta disolución se añadieron 0,7 mL de TFA con agitación. Después de 1 hr, la reacción había finalizado por TLC. Se añadió tolueno (2 mL) a la mezcla de reacción y el disolvente se eliminó en vacío. El residuo se purificó en gel de sílice usando acetato de etilo puro como el eluyente para proporcionar 32 mg (rendimiento 80%) del producto deseado **30a** (Fig. 9). ¹H RMN: 2,62 (t, 2H, J= 6,0 Hz), 2,78 (t, 2H, J= 7,0 Hz), 3,03 (t, 2H, J= 7,0 Hz), 3,62-3,68 (m, 12H), 3,69 (t, 2H, J= 4,6 Hz), 3,76 (t, 2H, J= 6,0 Hz), 4,25 (t, 2H, J= 4,6 Hz), 7,12 (m, 1H), 7,65-7,74 (m, 2H), 8,48 (d, 1H, J= 4,8 Hz). MS: m/z para C₁₉H₂₉NOS₂-Na⁺: calcd: 486,13; encontrado: 486,00.

Ejemplo 2 – Síntesis de un Agente Citotóxico que Presenta un Resto PEG Reactivo

Ácido 15-[N-(3-(L-DM1-ditio)-propionil)]-4,7,10,13-tetraoxapentadecanoico (**41a**)

[000449] Se disolvieron L-DM1 (8,1 mg, 0,011 mmoles) y ácido 15-[N-(3-(2-piridilditio)-propionil)]-4,7,10,13-tetraoxapentadecanoico **21a** (6,9 mg, 0,015 mmoles) en 0,40 mL de alcohol etílico destilado en vidrio, en un matraz de 1 mL. Se añadió tampón fosfato de potasio (0,20 mL, 100 mM, 2 mM EDTA, pH 7,5) y la disolución se agitó durante 2 horas bajo una atmósfera de argón. La mezcla de reacción se purificó por HPLC a temperatura ambiente usando una columna 250 x 10 cm Vydac ODS II, velocidad de flujo de 4,5 mL/min con un gradiente lineal de agua di, 0,05% ácido trifluoroacético, acetonitrilo (20% acetonitrilo a 70% acetonitrilo durante 30 min). El producto deseado (tiempo de retención 17,2 min) se recogió y el disolvente se eliminó por evaporación giratoria en vacío para proporcionar 7 mg (rendimiento 58%) del producto deseado **41a** (Fig. 10). MS m/z: 1.110,3 (M⁺+Na). ¹H RMN (CDCl₃) 7,17 (m, 1H), 6,83 (d, 1H, J= 1,8 Hz), 6,62 (d, 1H, J= 1,8 Hz), 6,31-6,46 (m, 2H), 5,57-5,69 (m, 1H), 5,36-5,41 (m, 1H), 4,77 (dd, 1H, J= 12, 1,8 Hz), 4,27 (dd, 1H, J= 12, 1,8 Hz), 3,98 (s, 3H), 3,33-3,7 (m, 14H), 3,72-3,82 (m,

2H), 3,41-3,51 (m, 4H), 3,35 (s, 3H), 3,23 (s, 3H), 3,12 (d, 1H, J= 12,5 Hz), 2,5-3,05 (m, 13H), 2,12 (dd, 1H, 7,2, 0,8 Hz), 1,96 (s, 3H), 1,63 (s, 3H), 1,41-1,49 (m, 1H), 1,19-1,35 (m, 9H), 0,80 (s, 3H).

Éster N-hidroxisuccinimida del ácido 15-[N-(3-(L-DM1-ditio)-propionil]-4,7,10,13-tetraoxapentadecanoico (2a)

[000450] Se disolvió el ácido 15-[N-(3-(L-DM1-ditio)-propionil]-4,7,10,13-tetraoxapentadecanoico **41a** (7 mg, 0,0064 mmoles) en 1,0 mL de cloruro de metileno al que se añadió N-hidroxisuccinimida (10 mg, 0,087 mmoles) e hidrocloreto de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (10 mg, 0,052 mmoles). La disolución se agitó a temperatura ambiente durante 2,5 horas y se purificó por cromatografía en sílice usando una fase móvil de cloruro de metileno:alcohol metílico:ácido acético 90:9,9:0,1, el disolvente se eliminó en vacío proporcionando 5 mg (rendimiento 65%) del producto deseado **2a** (Fig. 10). MS m/z: 1.208,3 (M⁺+Na), 1.220,3 (M⁺+K). ¹H RMN (CDCl₃) 6,83 (d, 1H, J= 1,8 Hz), 6,70 (d, 1H, J= 11 Hz), 6,62 (d, 1H, J= 1,8 Hz), 6,38-6,45 (m, 2H), 6,25 (s, 1H), 6,06-6,21 (m, 1H), 5,82-5,89 (m, 1H), 5,65 (dd, 1H, J= 15, 9 Hz), 5,38 (dd, 1H, J= 13, 6 Hz), 4,78 (dd, 1H, J= 12, 3 Hz), 4,28 (dt, 1H, J= 0,5, 10 Hz), 3,98 (s, 3H), 3,84 (t, 1H, J= 6,7 Hz), 3,61-3,73 (m, 14H), 3,41-3,57 (m, 4H), 3,35 (s, 3H), 3,23 (s, 3H), 3,08 (s, 3H), 2,78-2,91 (m, 4H), 2,47-2,70 (m, 12H), 2,35 (s, 4H), 1,96 (s, 1H), 1,53-1,66 (m, 3H), 1,21-1,31 (m, 7H), 0,80 (s, 3H).

Ácido 15-(L-DM1-ditio)-4,7,10,13-tetraoxapentadecanoico (41b)

[000451] Se disolvieron L-DM1 (13 mg, 0,017 mmoles) y ácido 15-(2-piridilditio)-4,7,10,13-tetraoxapentadecanoico **14a** (9 mg, 0,023 mmoles) en 0,40 mL de alcohol etílico destilado en vidrio, en un matraz de 1 mL. Se añadió tampón fosfato de potasio (0,20 mL, 100 mM, 2 mM EDTA, pH 7,5) y la disolución se agitó durante 2 horas bajo una atmósfera de argón. La mezcla de reacción se purificó por HPLC a temperatura ambiente usando una columna 250 x 10 cm Vydac ODS II, velocidad de flujo de 4,5 mL/min con un gradiente lineal de agua di 0,05% ácido trifluoroacético, acetonitrilo (20% acetonitrilo a 70% acetonitrilo durante 30 min). El producto deseado (tiempo de retención 18,5 min) se recogió y el disolvente se eliminó por evaporación giratoria en vacío para proporcionar 11 mg (rendimiento 61%) del producto deseado **41b** (Fig. 11). MS m/z= 1.040 (M⁺+Na). ¹H RMN (CDCl₃) 7,17 (m, 1H), 6,83 (d, 1H, J= 1,8 Hz), 6,62 (d, 1H, J= 1,8 Hz), 6,31-6,46 (m, 2H), 5,57-5,69 (m, 1H), 5,36-5,41 (m, 1H), 4,77 (dd, 1H, J= 12, 1,8 Hz), 4,27 (dd, 1H, 12, 1,8 Hz), 3,98 (s, 3H), 3,33-3,7 (m, 14H), 3,72-3,82 (m, 2H), 3,41-3,51 (m, 4H), 3,35 (s, 3H), 3,23 (s, 3H), 3,12 (d, 1H, J= 12,5 Hz), 2,5-3,05 (m, 13H), 2,12 (dd, 1H, 7,2, 0,8 Hz), 1,96 (s, 3H), 1,63 (s, 3H), 1,41-1,49 (m, 1H), 1,19-1,35 (m, 9H), 0,80 (s, 3H).

Éster N-hidroxisuccinimida del ácido 15-(L-DM1-ditio)-4,7,10,13-tetraoxapentadecanoico (2b)

[000452] Se disolvieron ácido 15-(L-DM1-ditio)-4,7,10,13-tetraoxapentadecanoico **41b** (10 mg, 0,0098 mmoles) en 1,0 mL de cloruro de metileno al que se añadió N-hidroxisuccinimida (8,0 mg, 0,070 mmoles) e hidrocloreto de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (9,1 mg, 0,047 mmoles). La disolución se agitó a temperatura ambiente durante 2,5 horas y se purificó por cromatografía en sílice usando una fase móvil de cloruro de metileno:alcohol metílico:ácido acético 90:9,9:0,1, el disolvente se eliminó en vacío proporcionando 10 mg (rendimiento 91%) del producto deseado **2b** (Fig. 11). MS m/z= 1.208 (M⁺+Na⁺), 1.224 (M⁺+K⁺). ¹H RMN (CDCl₃) 6,82 (d, 1H, J= 1,8 Hz), 6,71 (d, 1H, J= 11 Hz), 6,63 (d, 1H, J= 1,8 Hz), 6,38-6,45 (m, 1H), 6,27 (s, 1H), 6,06-6,21 (m, 1H), 5,82-5,89 (m, 1H), 5,65 (dd, 1H, J= 15, 9 Hz), 5,38 (dd, 1H, J= 13, 6 Hz), 4,76 (dd, 1H, J= 12, 3 Hz), 4,27 (dt, 1H, J= 0,5, 10 Hz), 3,98 (s, 3H), 3,84 (t, 1H, J= 6,7 Hz), 3,61-3,73 (m, 14H), 3,41-3,57 (m, 4H), 3,35 (s, 3H), 3,23 (s, 3H), 3,08 (s, 3H), 2,78-2,91 (m, 4H), 2,47-2,70 (m, 8H), 2,35 (s, 4H), 1,96 (s, 1H), 1,53-1,66 (m, 3H), 1,21-1,31 (m, 7H), 0,79 (s, 3H).

Ejemplo 3 – Síntesis de un Conjugado Citotóxico que Comprende un Agente Citotóxico unido a un Agente de Unión a Células mediante un Grupo Conector PEG

Conjugado Citotóxico que Comprende un Agente Citotóxico Unido a un Agente de Unión a Células Mediante el Compuesto 2a

[000453] El compuesto **2a** se disolvió en etanol anhidro para obtener una concentración madre de 5 mM (5,9 mg/mL). El agente de unión a células usado en este experimento fue un anticuerpo monoclonal murino dirigido al Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR) que se desarrolló en ImmunoGen. Una disolución del anticuerpo anti-EGFR KS-77 (2 mg/mL, 0,25 mL) en 50 mM de tampón fosfato de potasio, pH 6,5, que contiene 50 mM NaCl y 2 mM ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) se trató con un exceso molar de 12 veces de **2a**. La concentración final de etanol en la mezcla de reacción fue 5% (v/v). La mezcla de reacción se incubó a temperatura ambiente durante 2 horas. El conjugado citotóxico **3a** (Fig. 12) se purificó por cromatografía de exclusión por tamaño en una columna Sephadex G25, que se había equilibrado previamente en disolución salina tamponada con fosfato (PBS) pH 6,5. Esta etapa de purificación eliminó **2a** que no había reaccionado y otro material de bajo peso molecular. El conjugado final tenía, de media, 1,9 moléculas de DM1 unidas por molécula de anticuerpo, según se determina usando los coeficientes de extinción siguientes: para **2a**: $\epsilon_{252nm} = 24.681 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $\epsilon_{280nm} = 5.700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, y para el anticuerpo: $\epsilon_{252nm} = 82.880 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $\epsilon_{280nm} = 224.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Este conjugado **3a** se designa como KS-77-PEG-DM1, Lote 1.

[000454] Otro conjugado (denominado "KS-77-PEG-DM1, Lote 2") se preparó de una manera análoga, excepto que el DM1-conector PEG **2a** se disolvió en dimetilacetamida (DMA) en lugar de etanol. La concentración final de

DMA en la mezcla de conjugación fue 5% v/v. El conjugado se purificó como se ha descrito anteriormente, y contenía, de media, 1,8 moléculas de DM1 unidas por molécula de anticuerpo.

Ejemplo 4 – Ensayo Citotóxico In Vitro

5 **[000455]** La citotoxicidad *in vitro* de KS-77-PEG-DM1, Lotes 1 y 2, se midió en un ensayo clonogénico usando la línea celular tumoral humana positiva para el receptor de EGF A-431 (ATCC CRL-1555). La especificidad diana del efecto citotóxico se midió usando la línea celular de melanoma humana negativa para el antígeno A-375 (ATCC CRL-1619). Las células se plaquearon a diferentes densidades en placas de cultivo tisular de 6 pocillos en medio esencial mínimo modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado con 10% suero fetal de ternera. Se añadieron conjugados citotóxicos a concentraciones variadas (que varían de 3×10^{-11} a 3×10^{-9} M) y las células se mantuvieron en una atmósfera humidificada a 37°C y 6% CO₂ hasta que se formaron colonias de aproximadamente 20 células o más (6 a 10 días). Las placas control no contenían conjugados citotóxicos. Las células se fijaron con formaldehído, se tiñeron con cristal violeta y se contaron bajo un microscopio de poco aumento. Las eficacias de plaqueo se determinaron a partir de los números de colonias y se calcularon las fracciones supervivientes de células como la proporción de la eficacia de plaqueo de la muestra tratada y la eficacia de plaqueo del control.

15 **[000456]** La Fig. 14 muestra los resultados de la determinación de citotoxicidad para los dos lotes de conjugados KS-77-PEG-DM1 en la línea celular positiva para el antígeno A431 diana. Los conjugados de ambos lotes muestran una citotoxicidad alta similar para las células diana; con valores CI₅₀ menores de 3×10^{-11} M (concentración más baja ensayada). La exposición a una concentración de conjugado de 1×10^{-9} M resultó en fracciones supervivientes de menos de 10³ (menos de 0,1% de las células sobreviven). Por el contrario, los conjugados fueron esencialmente no tóxicos frente a las células negativas para el antígeno, con un valor CI₅₀ mayor de 3×10^{-9} M (concentración más alta ensayada). Estos resultados demuestran la muerte selectiva de células positivas para el antígeno y que el efecto citotóxico de los conjugados citotóxicos es dependiente de la unión específica a través del componente anticuerpo.

Ejemplo 5 – Determinación de la Afinidad

25 **[000457]** Las afinidades específicas del anticuerpo KS-77 no conjugado se compararon con la de los dos conjugados citotóxicos, KS-77-PEG-DM1, Lotes 1 y 2 (descritos en el Ejemplo 3) por ensayos de unión en células A-431 que expresan antígeno. Las células A-431 se crecieron en matraces de grado de cultivo tisular que contienen DMEM suplementado con 10% suero fetal de ternera bovino. Las células se tripsinizaron y se incubaron en suspensión, a 37°C, durante 30 minutos en el mismo medio en matraces sin grado de cultivo tisular para prevenir la adherencia de las células al plástico. Las células se transfirieron a pocillos de placas de 96 pocillos y se resuspendieron en medio esencial mínimo que contiene 25% de suero humano combinado. Las suspensiones celulares (0,2 ml de suspensión que contiene 200.000 células/pocillo) se incubaron durante 2 horas a 4°C, con varias concentraciones de cualquiera de los conjugados citotóxicos o anticuerpo KS-77 no conjugado. Las células se lavaron con tampón que contiene 2% suero de cabra y se trataron con IgG anti-ratón de cabra marcada con fluoresceína durante 1 h a 4°C. Las células se lavaron de nuevo con tampón y se fijaron con 1% formaldehído en disolución salina tamponada con fosfato. La fluorescencia celular media se midió en un citómetro de flujo. La fluorescencia media se representó como una función de concentración de anticuerpo o conjugado. Los resultados (Fig. 15) indican que el anticuerpo no conjugado y los dos conjugados citotóxicos DM1 se unen a células A-431 que expresan antígeno con afinidades similares (KD= $1,3 \times 10^9$ M para anticuerpo y sus conjugados). Así, la unión de DM1-PEG al anticuerpo conserva su afinidad de unión al antígeno en las células diana.

40 Ejemplo 6 – Actividad Anti-Tumoral In Vivo

[000458] El efecto anti-tumoral de los conjugados citotóxicos KS-77-PEG-DM1 puede medirse en xenoinjertos de cáncer escamoso humano (A431) en ratones SCID como sigue. En primer lugar, se establece un modelo de xenoinjerto de tumor humano en ratones SCID. Ratones hembra SCID de cinco semanas de edad (20 animales) se inocularon subcutáneamente en el flanco derecho con células de cáncer escamoso humano A431 ($1,5 \times 10^6$ células/ratón) en 0,1 mL de medio sin suero. Los tumores se crecieron durante 11 días hasta un tamaño medio de 100,0 mm³ (intervalo de 50-150 mm³). Los animales se dividieron aleatoriamente en cuatro grupos (5 animales por grupo). Los dos primeros grupos reciben los dos conjugados citotóxicos KS-77-PEG-DM1 (18 mg/kg, cd x 5) administrados por vía intravenosa. El tercer grupo se trata con anticuerpo KS-77 no conjugado (18 mg/kg, cd x 5), también administrado por vía intravenosa. El cuarto grupo de animales es un grupo control que se trata con PBS usando el mismo programa de tratamiento que en los grupos 1-3. Los tamaños de los tumores se miden dos veces a la semana y los volúmenes de los tumores se calculan con la fórmula: $\frac{1}{2}(\text{longitud} \times \text{anchura} \times \text{altura})$. El peso de los animales también se midió dos veces a la semana. El efecto anti-tumoral puede determinarse representando el tamaño del tumor como una función del tiempo.

Ejemplo 7 – Estudios de Aclaramiento y Farmacocinética In Vivo

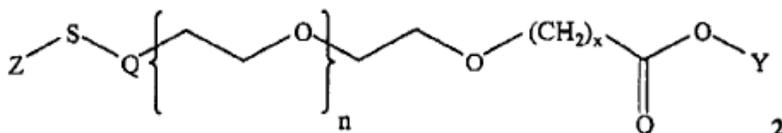
55 **[000459]** Los aclaramientos de sangre de un anticuerpo IgG₁ no conjugado murino o humanizado marcado con ¹²⁵I y su conjugado citotóxico marcado con ¹²⁵I correspondiente se determinan en ratones hembras CD-1. El anticuerpo no conjugado y los conjugados citotóxicos se marcan con yodo radiactivo por el método de Bolton y Hunter (*Biochem. J.* 133: 529-539 (1973)). El anticuerpo y los conjugados se inyectan por vía intravenosa en la vena de la

cola en conjuntos separados de animales. Se recogen muestras de sangre heparinizadas del plexo venoso retroorbital en varios puntos de tiempo (de 2 min hasta 72 horas) y se miden para contenido en radiactividad. La radioactividad residual se representa como una función del tiempo.

5 **[000460]** Aunque la invención se ha descrito con detalle y con referencia a realizaciones específicas de ésta, será evidente para un experto en la técnica que pueden hacerse varios cambios y modificaciones.

REIVINDICACIONES

1. Un agente citotóxico, que presenta un grupo conector de polietilen glicol (PEG) que tiene un éster activo terminal y de 1 a 1.000 unidades monoméricas, de fórmula 2:



en el que Z es un agente citotóxico que contiene tiol;

en el que Q es R_2COO^- , $R_2R_3NCOO^-$, R_2OCOO^- , R_2O^- , $R_2CONR_3^-$, $R_2R_3N^-$, $R_2OCONR_3^-$, o S^- ,

en el que:

R_2 es $SCR_4R_5R_6^-$,

10 R_4 , R_5 y R_6 son cada uno H, alquilo lineal, alquilo cíclico o alquilo ramificado y pueden ser el mismo o diferente,

R_3 es H o un alquilo lineal, alquilo cíclico o alquilo ramificado;

en el que n es un número entero de 0 a 999;

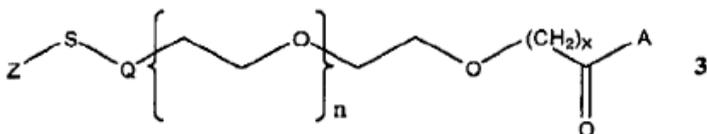
en el que x es 1 ó 2; y

15 en el que Y es *N*-succinimidilo, *N*-sulfosuccinimidilo, *N*-ftalimidilo, *N*-sulfoftalimidilo, 2-nitrofenilo, 4-nitrofenilo, 2,4-dinitrofenilo, 3-sulfonyl-4-nitrofenilo ó 3-carboxi-4-nitrofenilo.

2. El agente citotóxico de la reivindicación 1, en el que n es un número entero de 0 a 19, 20 a 39 ó 40 a 999.

3. El agente citotóxico de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que Z-S es un maitansinoide que contiene tiol, un taxano que contiene tiol, un análogo de CC-1065 que contiene tiol, un análogo de daunorrubicina que contiene tiol o un análogo de doxorrubicina que contiene tiol o derivados de éstos.

20 4. Un conjugado citotóxico, que tiene uno o más agentes citotóxicos unidos covalentemente a un agente de unión a células mediante un grupo conector PEG que tiene de 1 a 1.000 unidades monoméricas, en el que una unión de uno de dichos uno o más agentes citotóxicos se ilustra en la fórmula 3:



en el que Z-S es un agente citotóxico que contiene tiol;

25 en el que Q es R_2COO^- , $R_2R_3NCOO^-$, R_2OCOO^- , R_2O^- , $R_2CONR_3^-$, $R_2R_3N^-$, $R_2OCONR_3^-$, o S^- ,

en el que:

R_2 es $SCR_4R_5R_6^-$,

R_4 , R_5 y R_6 son cada uno H, alquilo lineal, alquilo cíclico o alquilo ramificado y pueden ser el mismo o diferente,

R_3 es H o un alquilo lineal, alquilo cíclico o alquilo ramificado,

30 en el que n es un número entero de 0 a 999;

en el que x es 1 ó 2; y

en el que A es dicho agente de unión a células.

5. El conjugado citotóxico de la reivindicación 4 en el que n es un número entero de 0 a 19, 20 a 39 ó 40 a 999.

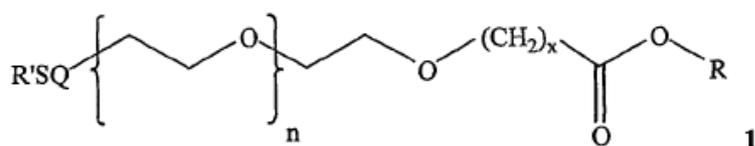
6. El conjugado citotóxico de la reivindicación 4 o la reivindicación 5, en el que Z-S es un maitansinoide que contiene tiol, un taxano que contiene tiol, un análogo de CC-1065 que contiene tiol, un análogo de daunorrubicina que contiene tiol o un análogo de doxorrubicina que contiene tiol o derivados de éstos.

5 7. El conjugado citotóxico de una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, en el que el agente de unión a células se selecciona del grupo que consiste en anticuerpos y fragmentos de anticuerpo de éstos, interferones, linfoquinas, hormonas, factores de crecimiento, vitaminas y moléculas transportadoras de nutrientes.

8. El conjugado citotóxico de la reivindicación 7, en el que los anticuerpos son anticuerpos monoclonales y fragmentos de anticuerpo de éstos.

10 9. Un método para producir un agente citotóxico, que presenta un grupo conector PEG que tiene un éster activo terminal y 1 a 1.000 unidades monoméricas, de fórmula 2 como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, comprendiendo dicho método las etapas de:

a) hacer reaccionar un grupo conector PEG que tiene 1 a 1.000 unidades monoméricas de fórmula 1:

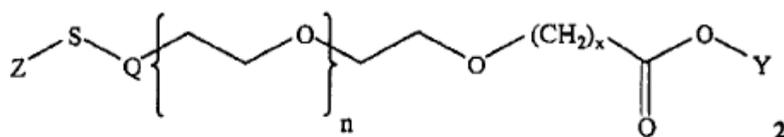


en el que R' es 2-piridilo, 4-piridilo, 5-nitro-2-piridilo, 5-nitro-4-piridilo, 2-nitrofenilo, 4-nitrofenilo ó 2,4-dinitrofenilo; y

15 en el que R es H, un catión para formar una sal o un grupo químico para formar un éster, con un agente citotóxico que contiene tiol, y

b) convertir el grupo R del producto de la etapa a) en un éster activo, produciendo de esta manera un agente citotóxico que presenta un grupo conector PEG que tiene un éster activo terminal y 1 a 1.000 unidades monoméricas.

20 10. Un método para producir un conjugado citotóxico que tiene uno o más agentes citotóxicos unidos covalentemente a un agente de unión a células mediante un grupo conector PEG que tiene 1 a 1.000 unidades monoméricas, comprendiendo dicho método hacer reaccionar uno o más agentes citotóxicos con un agente de unión a células, en el que dicho uno o más agentes citotóxicos presenta cada uno un grupo conector PEG que tiene un éster activo terminal y 1 a 1.000 unidades monoméricas, y en el que dicho agente citotóxico que presenta un grupo conector PEG que tiene un éster activo terminal y 1 a 1.000 unidades monoméricas es un compuesto de fórmula 2:



en el que Z-S es un agente citotóxico que contiene tiol;

en el que Q es R₂COO⁻, R₂R₃NCOO⁻, R₂OCOO⁻, R₂O⁻, R₂CONR₃⁻, R₂R₃N⁻, R₂OCONR₃⁻, o S⁻,

en el que:

30 R₂ es SCR₄R₅R₆⁻,

R₄, R₅ y R₆ son cada uno H, alquilo lineal, alquilo cíclico o alquilo ramificado y pueden ser el mismo o diferente,

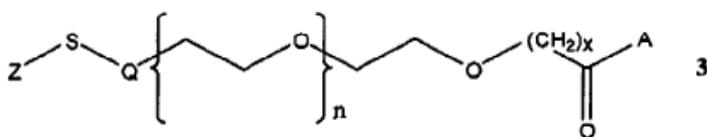
R₃ es H o un alquilo lineal, alquilo cíclico o alquilo ramificado;

en el que n es un número entero de 0 a 999;

en el que x es 1 ó 2; y

35 en el que Y es N-succinimidilo, N-sulfosuccinimidilo, N-ftalimidilo, N-sulfoftalimidilo, 2-nitrofenilo, 4-nitrofenilo, 2,4-dinitrofenilo, 3-sulfonil-4-nitrofenilo ó 3-carboxi-4-nitrofenilo,

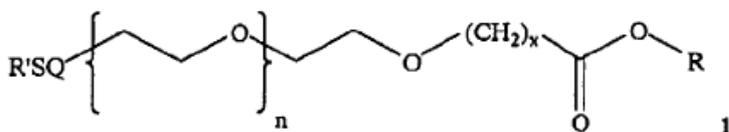
produciendo de esta manera un conjugado citotóxico de fórmula 3 con una unión de uno de dichos uno o más agentes citotóxicos



en el que A es dicho agente de unión a células.

11. El método de la reivindicación 10, en el que n es un número entero de 0 a 19, 20 a 39 ó 40 a 999.

12. El método según la reivindicación 10 o la reivindicación 11, en el que dicho método comprende además la etapa inicial de preparar un agente citotóxico, que presenta un grupo conector PEG que tiene un éster activo terminal, comprendiendo dicha etapa inicial hacer reaccionar un agente citotóxico que contiene tiol con un grupo conector PEG de fórmula 1:



en el que R' es 2-piridilo, 4-piridilo, 5-nitro-2-piridilo, 5-nitro-4-piridilo, 2-nitrofenilo, 4-nitrofenilo ó 2,4-dinitrofenilo; y

en el que R es H, un catión para formar una sal o un grupo químico para formar un éster.

13. El método de cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, en el que Z-S es un maitansinoide que contiene tiol, un taxano que contiene tiol, un análogo de CC-1065 que contiene tiol, un análogo de daunorrubicina que contiene tiol o un análogo de doxorrubicina que contiene tiol o derivados de éstos.

14. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, en el que el agente de unión a células se selecciona del grupo que consiste en anticuerpos y fragmentos de anticuerpo de éstos, interferones, linfoquinas, hormonas, factores de crecimiento, vitaminas y moléculas transportadoras de nutrientes.

15. El método de la reivindicación 14, en el que los anticuerpos son anticuerpos monoclonales y fragmentos de anticuerpo de éstos.

16. Una composición terapéutica que comprende:

(A) una cantidad eficaz de uno o más conjugados citotóxicos de cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8, y

(B) un vehículo farmacéuticamente aceptable.

17. Un método para matar poblaciones celulares seleccionadas *in vitro* o *ex vivo* que comprende poner en contacto células diana, o tejido que contiene células diana, con una cantidad eficaz del conjugado citotóxico de cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8 o agente terapéutico o composición de la reivindicación 16.

18. El método de la reivindicación 17, que es un método para tratar una afección médica que es una malignidad, una enfermedad autoinmune, un rechazo de injerto, enfermedad de injerto frente a huésped, una infección viral o una infección por parásitos.

19. El método de la reivindicación 18, en el que la afección médica es cáncer de pulmón, mama, colon, próstata, riñón, páncreas, ovario u órganos linfáticos.

20. Un conjugado citotóxico como se define en cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8, o composición terapéutica de la reivindicación 16, para uso terapéutico.

21. Un conjugado citotóxico como se define en cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8, o composición terapéutica de la reivindicación 16, para uso en un método *in vivo* para inducir la muerte celular en poblaciones celulares seleccionadas que comprende poner en contacto células diana, o tejido que contiene células diana, con una cantidad eficaz de un agente citotóxico.

22. El conjugado citotóxico como se define en cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8, o composición terapéutica de la reivindicación 16, para uso en un método *in vivo* para tratar una afección médica que es una malignidad, una enfermedad autoinmune, un rechazo de injerto, enfermedad de injerto frente a huésped, una infección viral o una infección por parásitos.

23. El conjugado citotóxico como se define en cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8, o composición terapéutica de la reivindicación 16, para uso en el método *in vivo* de la reivindicación 22, en el que el método es para tratar una afección médica que es cáncer de pulmón, mama, colon, próstata, riñón, páncreas, ovario u órganos linfáticos.

5 24. Uso de un conjugado citotóxico como se define en cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8, o composición terapéutica de la reivindicación 16, en la fabricación de un medicamento para uso en un método *in vivo* para inducir la muerte celular en poblaciones celulares seleccionadas como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 21 a 23.

FIGURA 1

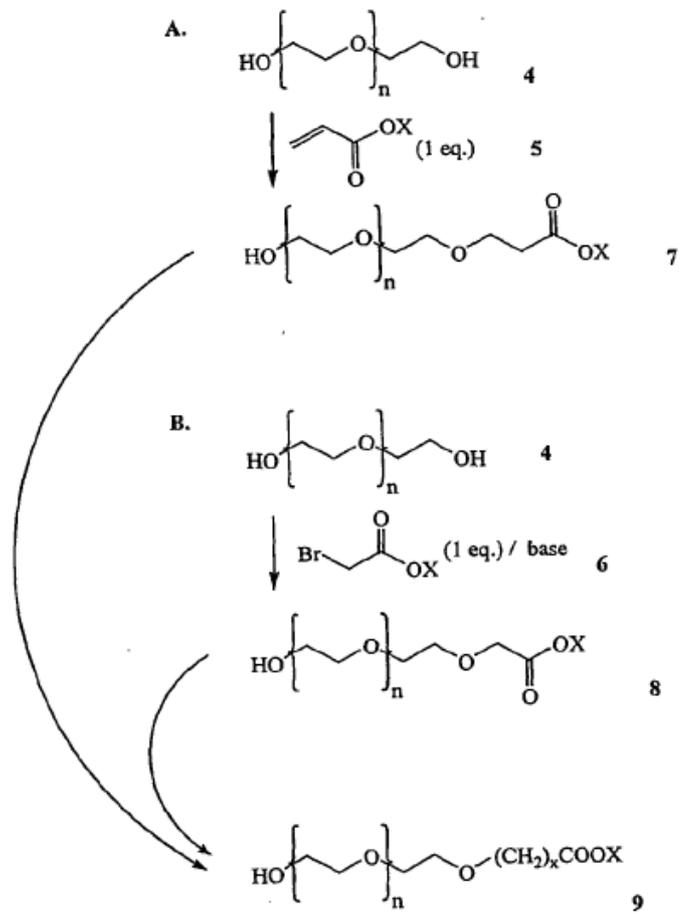


FIGURA 2

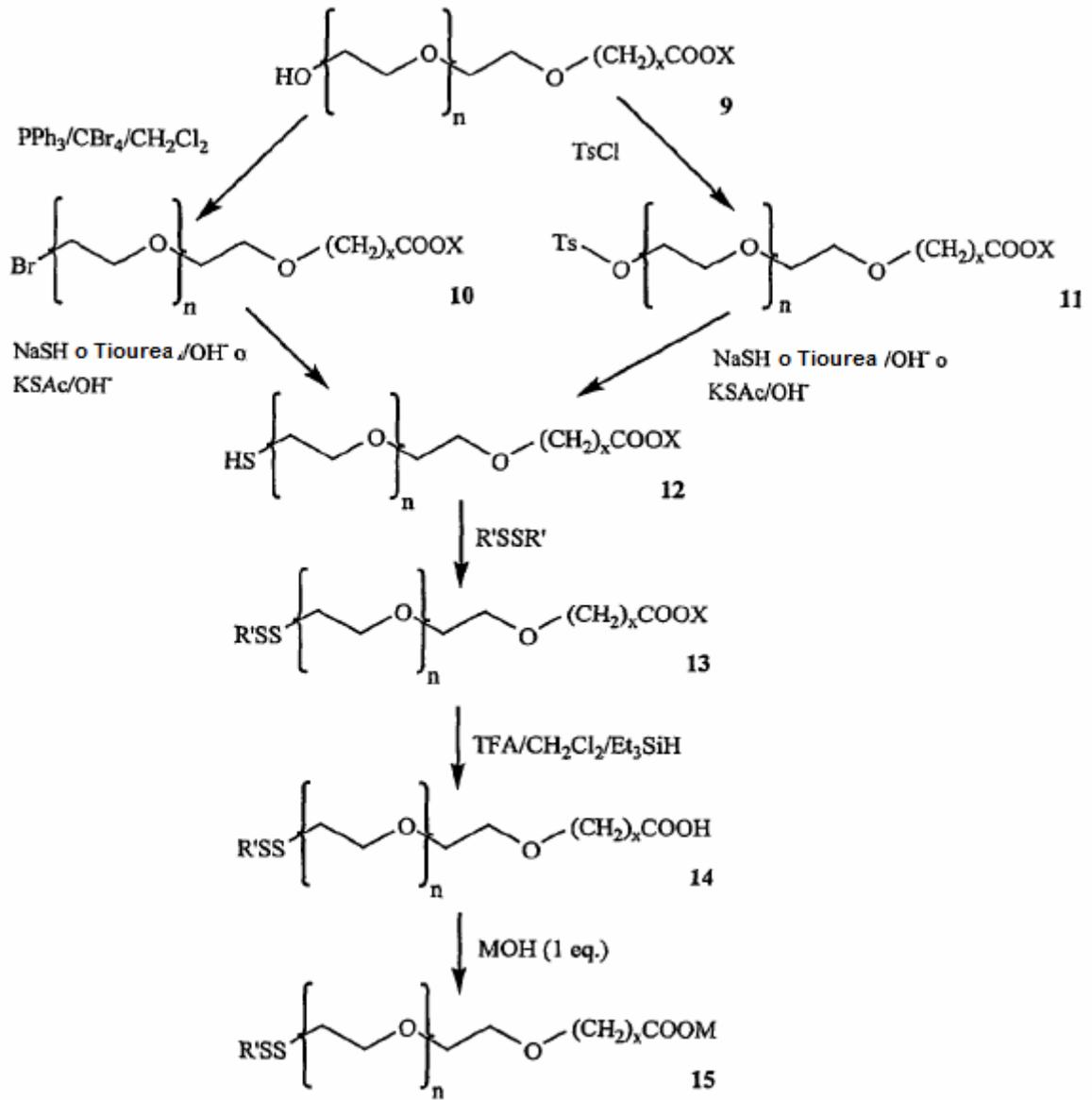


FIGURA 3A

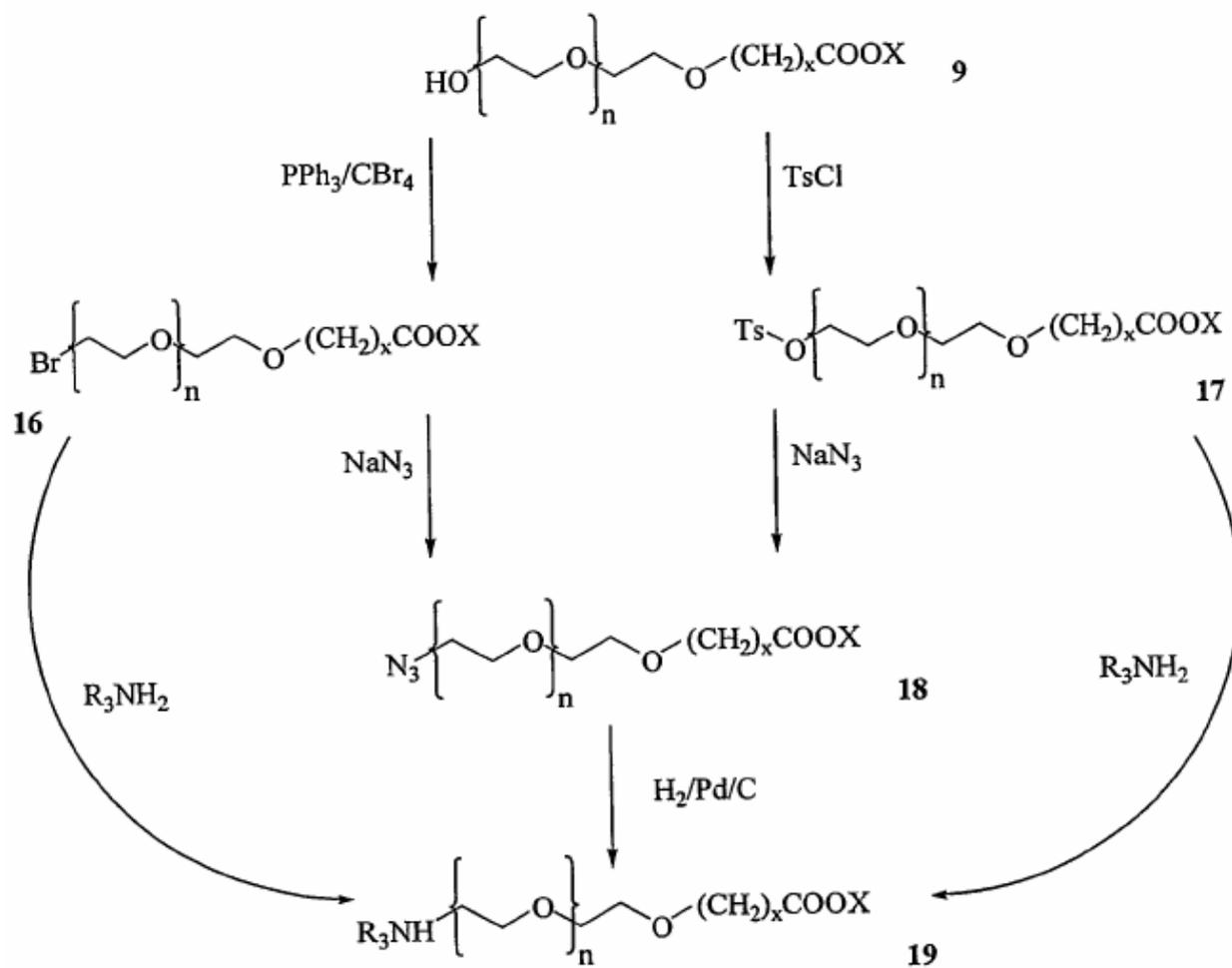


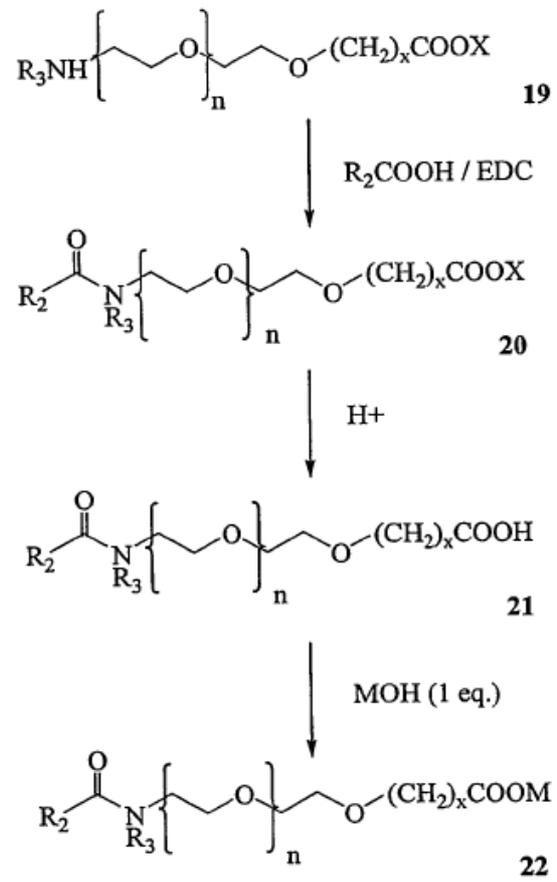
FIGURA 3B

FIGURA 3C

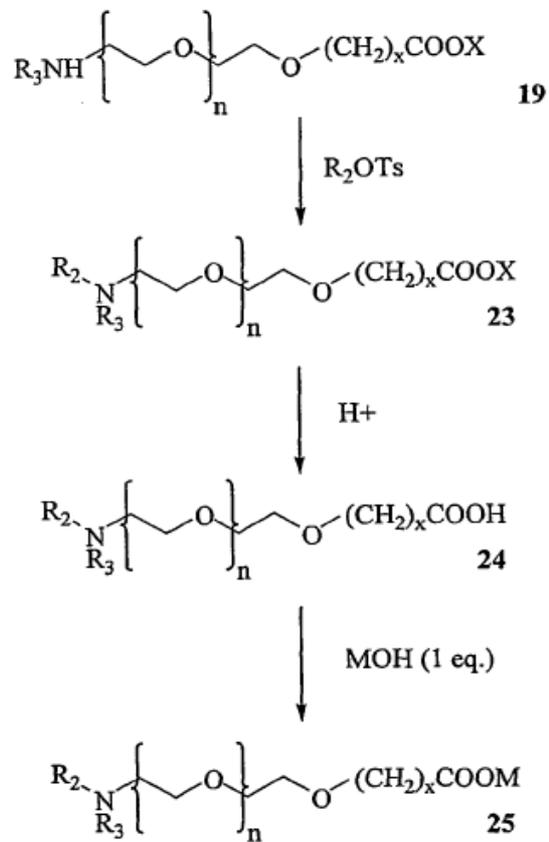


FIGURA 3D

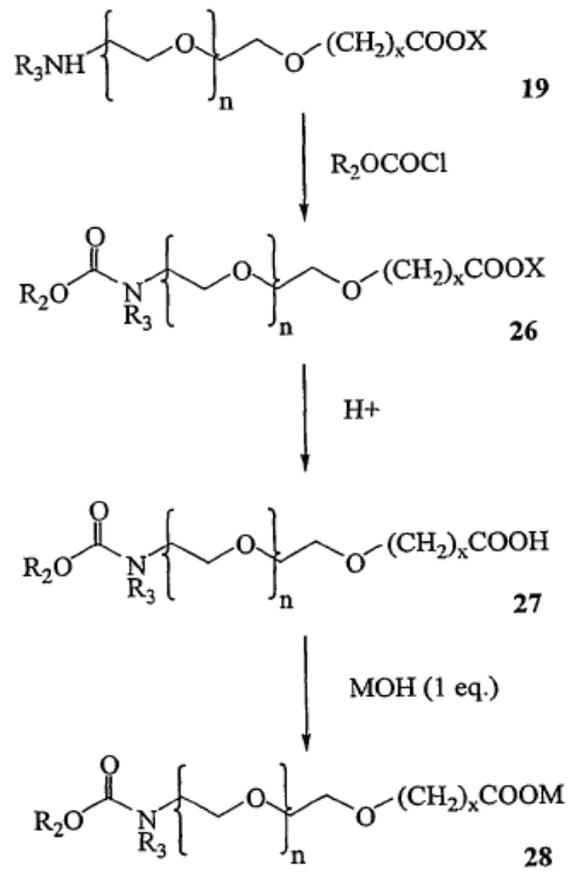


FIGURA 4A

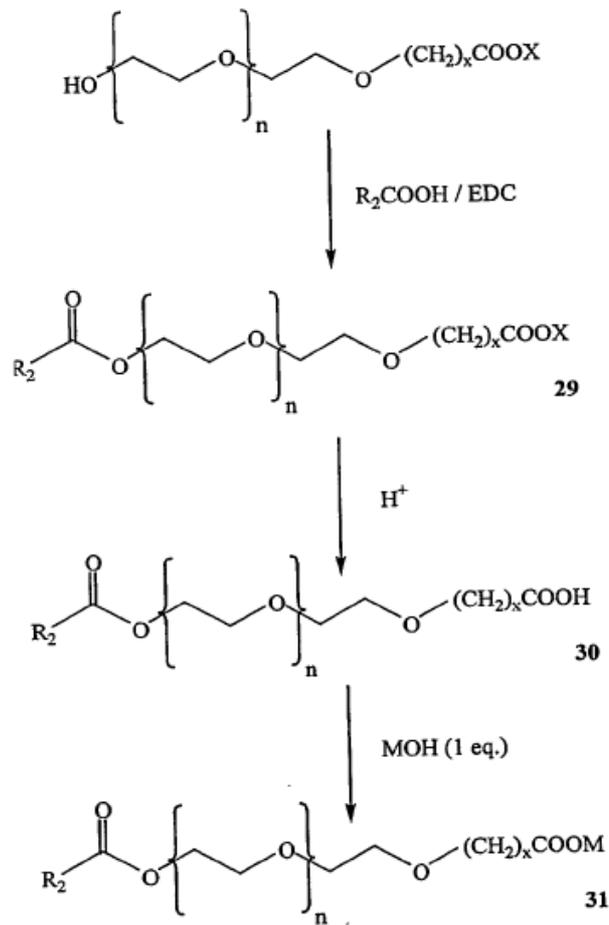


FIGURA 4B

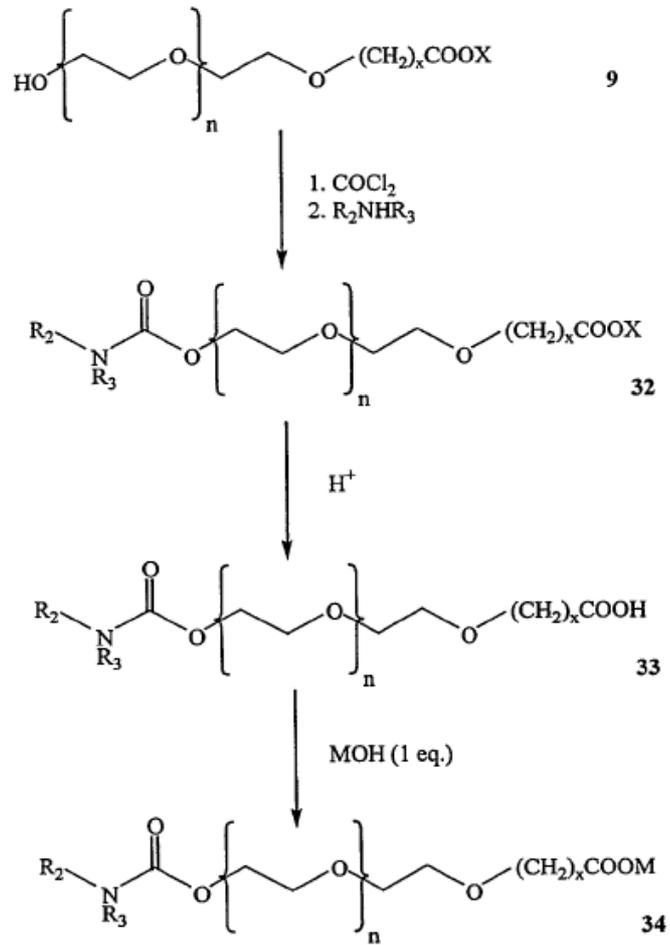


FIGURA 4C

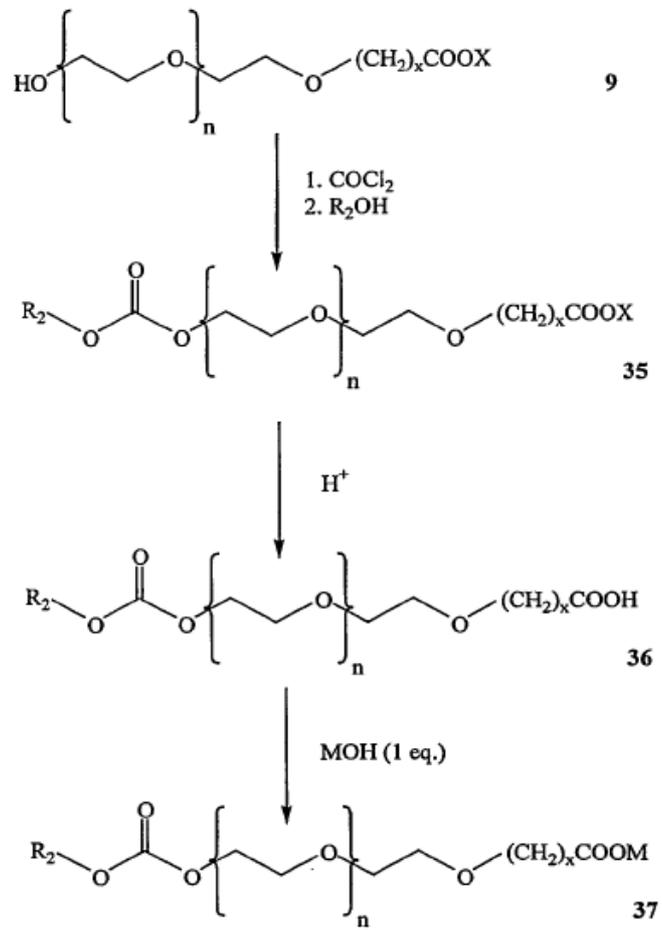


FIGURA 4D

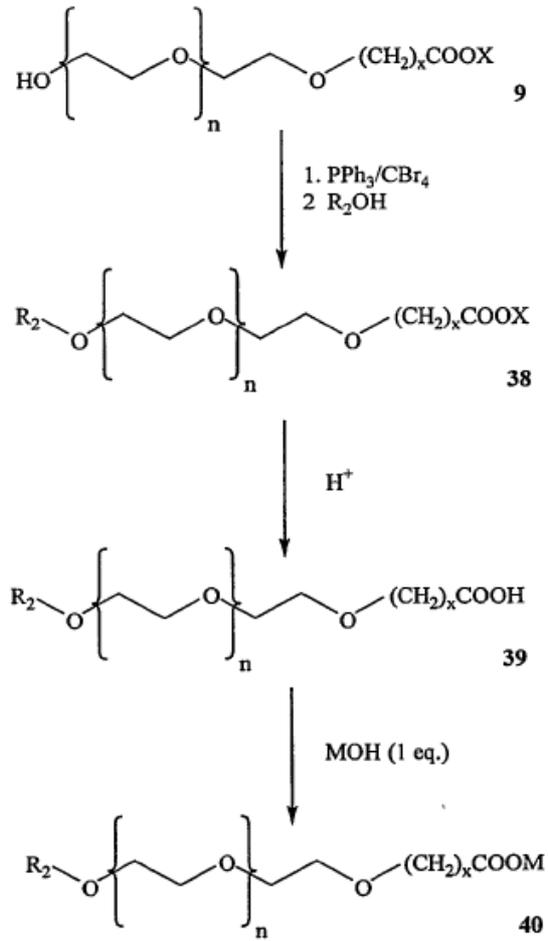


FIGURA 5

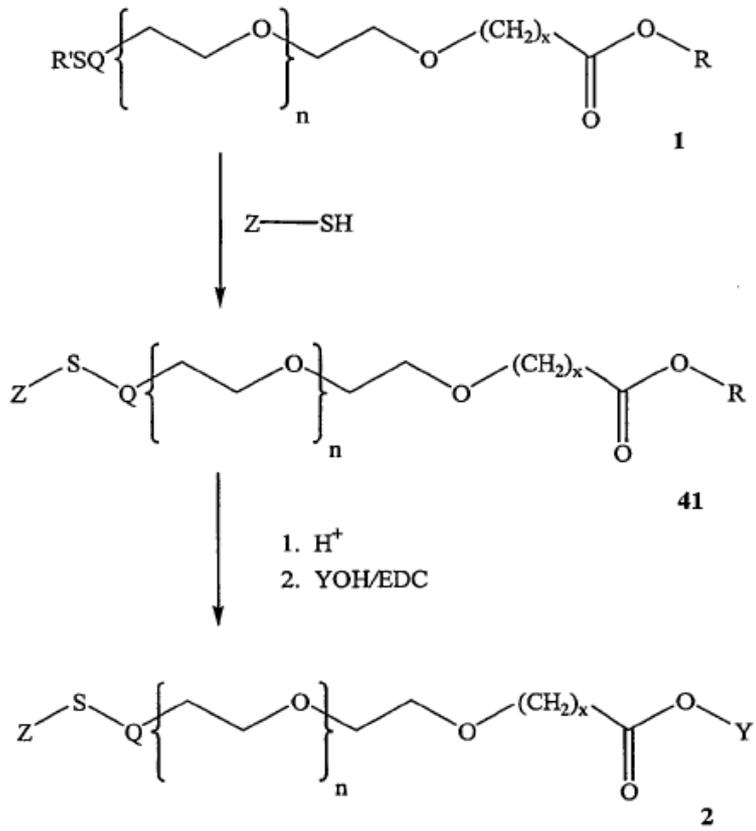


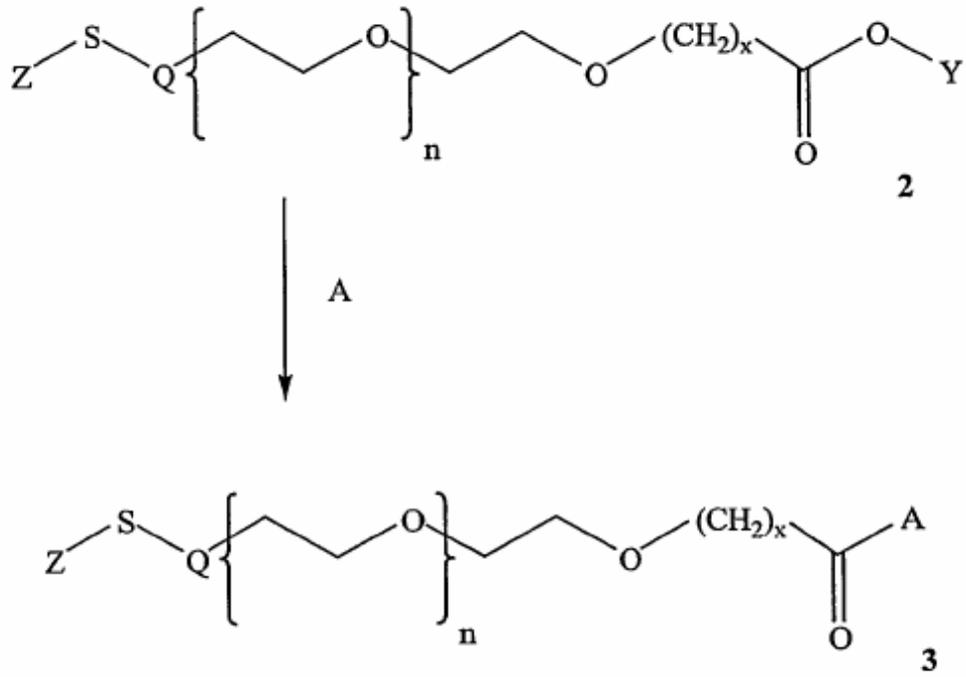
FIGURA 6

FIGURA 7

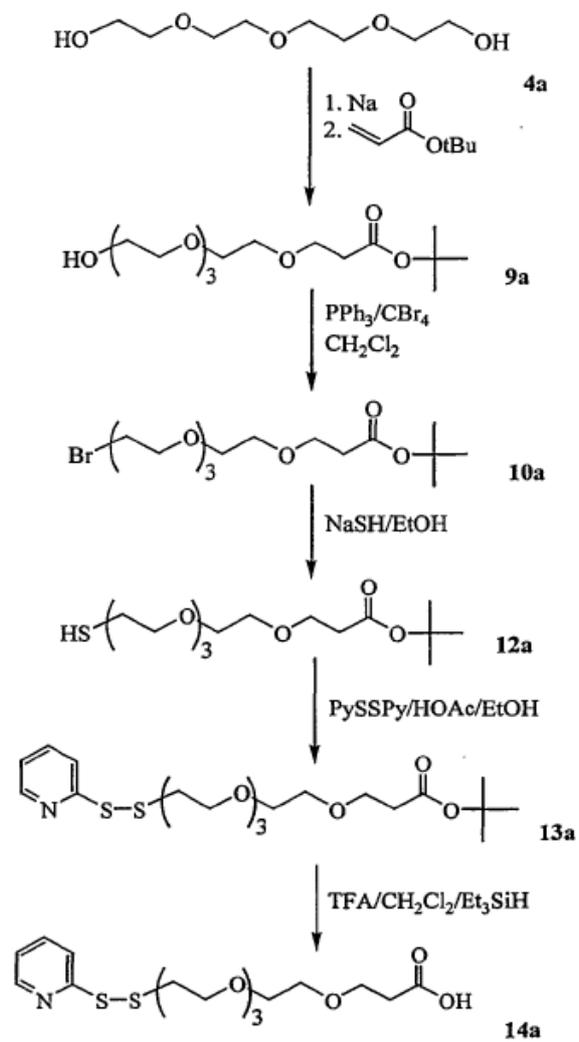


FIGURA 8

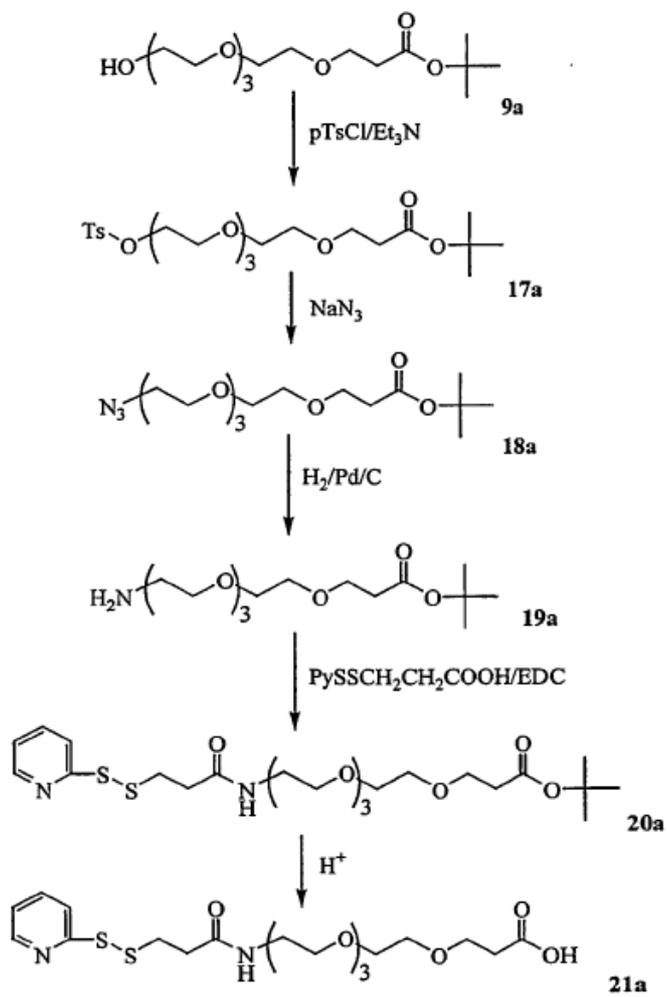


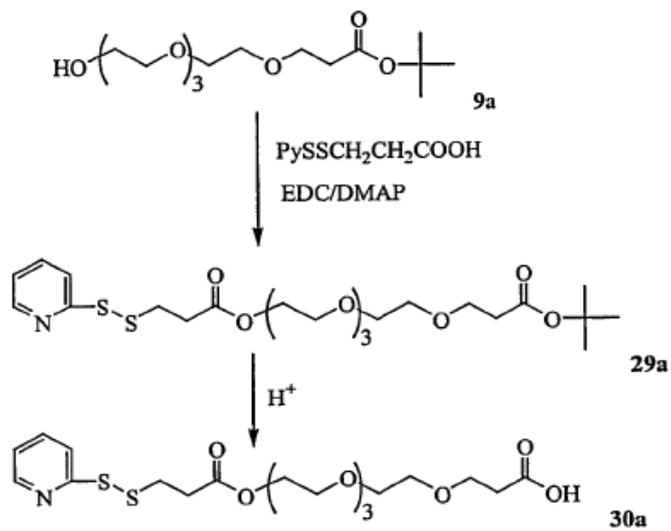
FIGURA 9

FIGURA 10

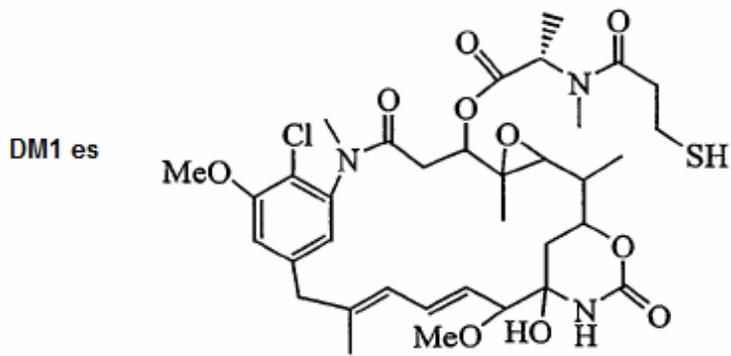
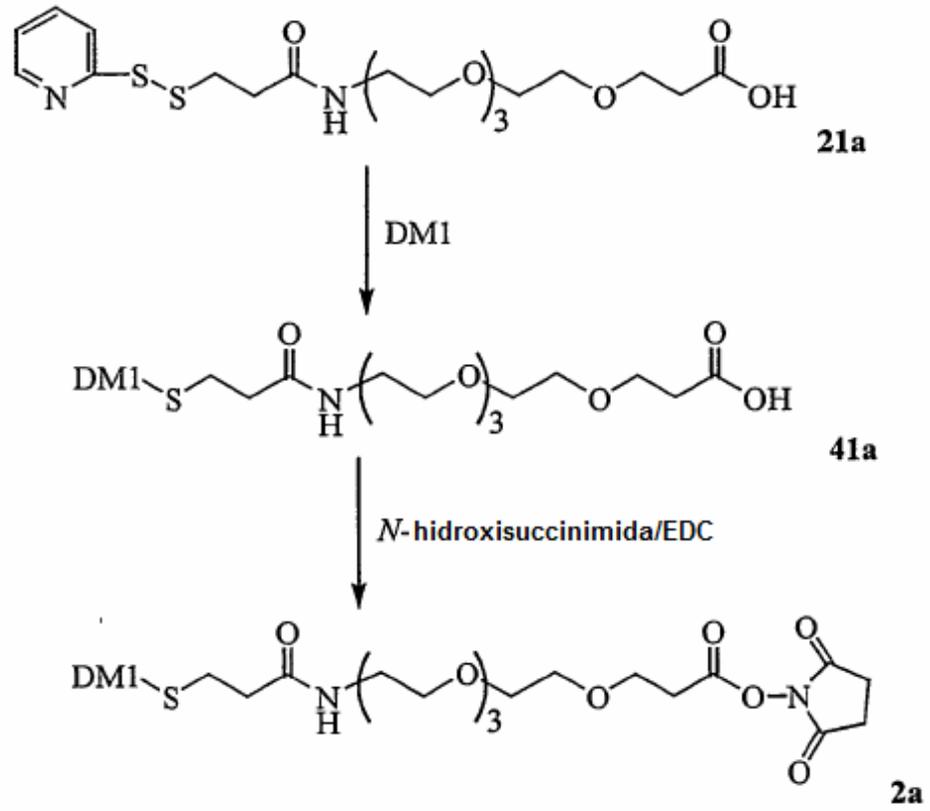


FIGURA 11

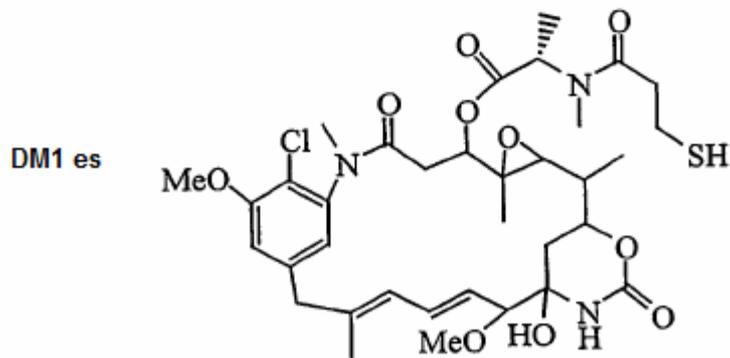
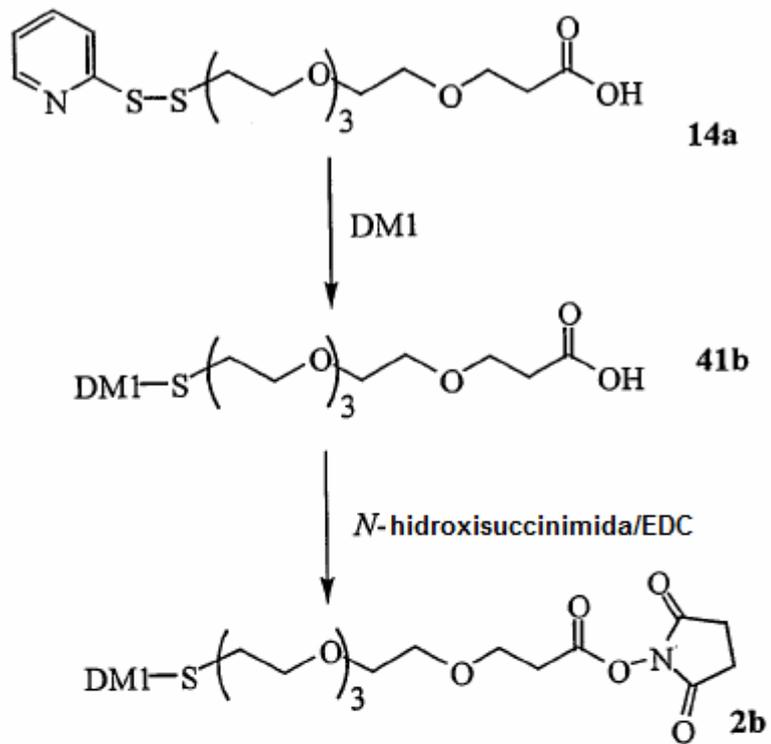


FIGURA 12

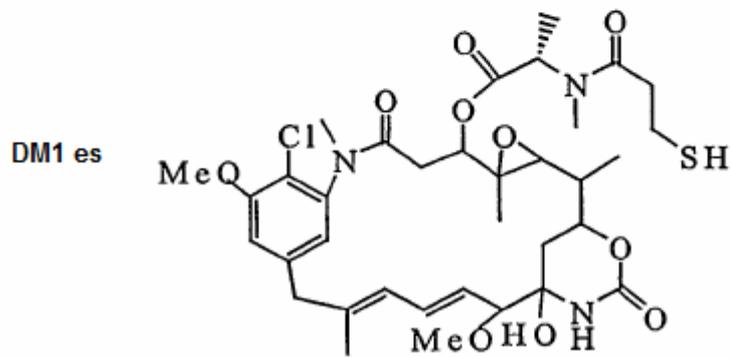
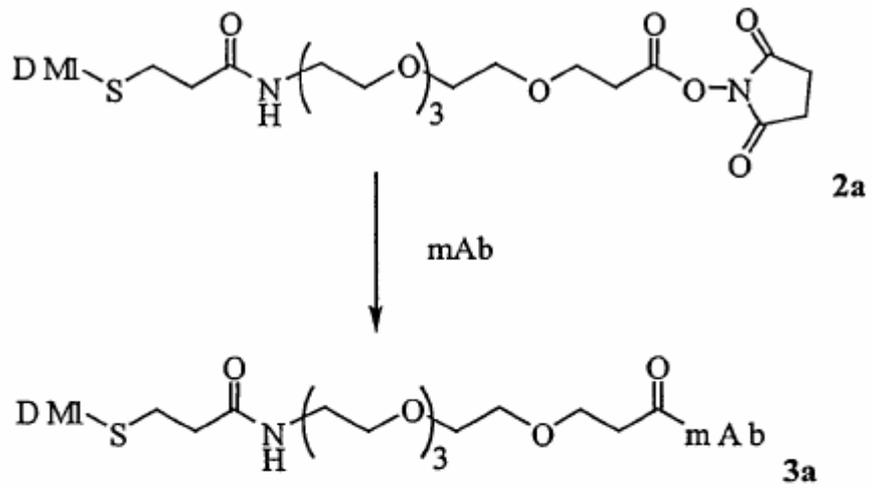
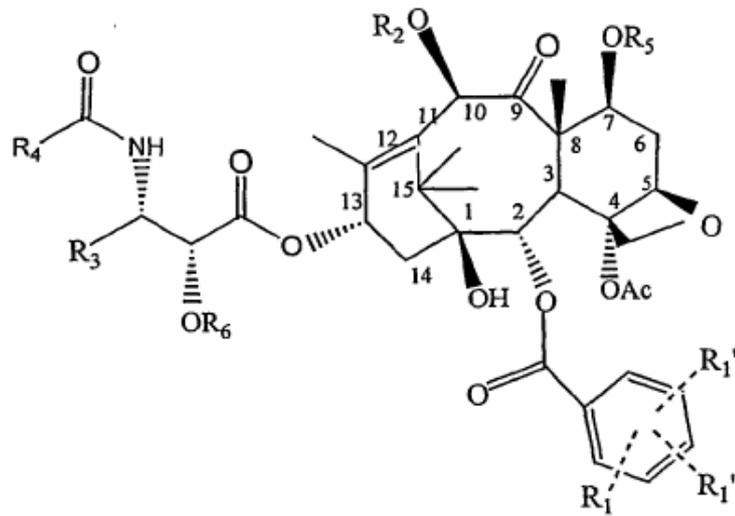


FIGURA 13



T1

	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆
(1)	-F	-COCH ₂ CH ₃ -CH ₂ CH ₃ , o -CONHCH ₂ CH ₃	-CH ₂ CH(CH ₃) ₂ o -C ₆ H ₅	-OC(CH ₃) ₃ o -C ₆ H ₅	-CH ₂ CH ₂ SH o -COCH ₂ CH ₂ SH	-COCH ₂ CH ₃ , -CH ₂ CH ₃ , o CONHCH ₂ CH ₃
(2)	-F	-COCH ₂ CH ₃ , -CH ₂ CH ₃ , o -CONHCH ₂ CH ₃	-CH=C(CH ₃) ₂ o -C ₆ H ₅	-OC(CH ₃) ₃ o -C ₆ H ₅	-CH ₂ CH ₂ SH o -COCH ₂ CH ₂ SH	-COCH ₂ CH ₃ , -CH ₂ CH ₃ , o CONHCH ₂ CH ₃
(3)	-F	-COCH ₂ CH ₂ SH -CH ₂ CH ₂ SH	-CH ₂ CH(CH ₃) ₂ o -C ₆ H ₅	-OC(CH ₃) ₃ o -C ₆ H ₅	-COCH ₂ CH ₃ , -CH ₂ CH ₃ , o -CONHCH ₂ CH ₃	-COCH ₂ CH ₃ , -CH ₂ CH ₃ , o CONHCH ₂ CH ₃
(4)	-F	-COCH ₂ CH ₃ , -CH ₂ CH ₃ , o -CONHCH ₂ CH ₃	-CH ₂ CH(CH ₃) ₂ o -C ₆ H ₅	-OC(CH ₃) ₃ o -C ₆ H ₅	-COCH ₂ CH ₃ , -CH ₂ CH ₃ , o -CONHCH ₂ CH ₃	-CH ₂ CH ₂ SH o COCH ₂ CH ₂ SH

FIGURA 14

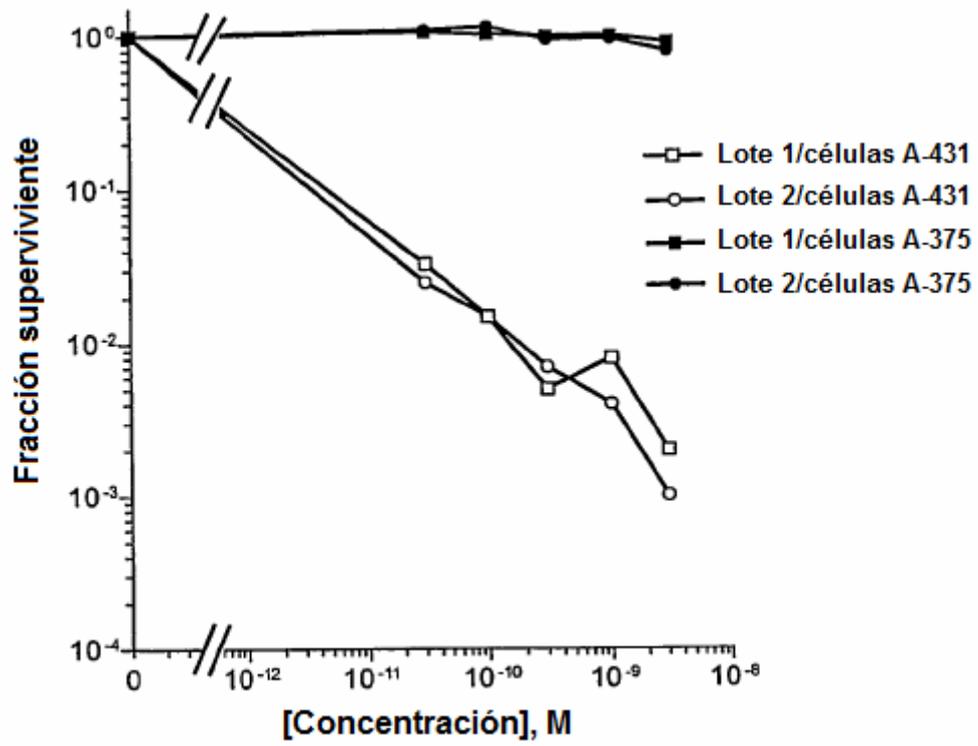


FIGURA 15

