



(12) **Oversettelse av
europeisk patentskrift**

(11) **NO/EP 2265283 B1**

NORGE

(19) NO
(51) Int Cl.

A61K 47/48 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
C07K 17/00 (2006.01)
C07K 17/14 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Oversettelse publisert	2015.01.12
(80)	Dato for Den Europeiske Patentmyndighets publisering av det meddelte patentet	2014.09.03
(86)	Europeisk søknadsnr	09721267.4
(86)	Europeisk innleveringsdag	2009.03.18
(87)	Den europeiske søknadens Publiseringsdato	2010.12.29
(30)	Prioritet	2008.03.18, US, 37705 P 2008.04.11, US, 44431 P
(84)	Utpekte stater	AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MK MT NL NO PL PT RO SE SI SK TR
(73)	Innehaver	Seattle Genetics, Inc., 21823 30th Drive, S.E., Bothell, WA 98021, US-USA
(72)	Oppfinner	SENER, Peter, Seattle Genetics Inc.21823 30th Drive S.E., Bothell, WA 98021, US-USA DORONINA, Svetlana, Seattle Genetics Inc.21823 30th Drive S.E., Bathell, WA 98021, US-USA BOVEE, Timothy, Seattle Genetics Inc.21823 30th Drive S.E., Bothell, WA 98021, US-USA
(74)	Fullmektig	Zacco Norway AS, Postboks 2003 Vika, 0125 OSLO, Norge

(54)	Benevnelse	AURISTATINLEGEMIDDELLINKERKONJUGATER
(56)	Anførte publikasjoner	US-A1- 2005 238 649 US-A1- 2006 229 253 DORONINA ET AL: 'Novel peptide linkers for highly potent antibody-Auristatin conjugate' BIOCONJUGATE CHEM vol. 19, 20 September 2008, pages 1960 - 1963, XP008098503

AURISTATINLEGEMIDDELLINKERKONJUGATER

OPPFINNELSENS OMRÅDE

5 Den foreliggende oppfinnelsen er rettet mot auristatinbaserte konjugater slik som legemiddellinkerligandkonjugater og legemiddellinkerforbindelser, samt sammensetninger som inkluderer disse, som er nyttige for å behandle cancer, en autoimmun sykdom, en infeksøs sykdom og andre patologiske tilstander. Det beskrives også fremgangsmåter for anvendelsen av slike konjugater *in vitro*, *in*
 10 *situ* og *in vivo* for deteksjonen, diagnosen eller behandlingen av pattedyrceller eller assosierte patologiske tilstander.

BAKGRUNN FOR OPPFINNELSEN

15 Det har vært svært stor interesse omkring anvendelsen av monoklonale antistoff (mAb-er) for den selektive leveringen av cytotoksiske stoff til tumorceller. Mens et antall forskjellige legemiddelklasse er forsøkt for levering via antistoff, har kun noen få legemiddelklasser vist seg å være virkningsfulle som antistofflegemiddelkonjugater, samt å ha en egnet toksisitetsprofil. Én slik klasse
 20 er auristatinene, derivater av naturproduktet dolastatin 10. Representative auristatiner inkluderer MMAE (N-metylvalin-valin-dolaisoleuin-dolaproin-norefedrin) og MMAF (N-metylvalin-valin-dolaisoleuin-dolaproin-fenylalanin).

Konjugering av legemiddel til antistoff, enten direkte eller via linkere, involverer
 25 en overveielse av en rekke faktorer, som inkluderer identiteten og plasseringen til den kjemiske gruppen for konjugering av legemiddelet, mekanismen for legemiddelfrisetting, de strukturelle elementene som tilveiebringer legemiddelfrisetting og det frisatte frie legemiddelets strukturelle modifisering. I tillegg, hvis legemiddelet skal frisettes etter antistoffinternalisering, må
 30 mekanismen for legemiddelfrisetting harmonere med konjugatets intracellulære trafikk.

MMAF er relativt ikke-toksisk som et fritt legemiddel, men er likevel svært potent i aktivitet når det konjugeres til et mAb og internaliseres. MMAF er med hell
 35 konjugert til et mAb ved MMAFs N-terminalaminosyre, via en katepsin B-spaltbar

peptidlinker maleimidokaproyl-valin-citrullin (mc-vc-) og en selvimmolativ gruppe p-aminobenzyl-karbamoyl (PABC) for å produsere antistoff-linker-legemiddelkonjugater med følgende struktur mAb-mc-vc-PABC-MMAF. Ved spalting av peptidlinkeren frisetter den selvimmolative PABC-gruppen seg fra MMAF, som frigjør fritt legemiddel.

MMAF er også funnet å være aktivt som et ikke-spaltbart legemiddellinkerkonjugat, maleimidokaproyl MMAF (mcMMAF). For mcMMAF forblir maleimidokaproylet og et cystein fra antistoffet bundet til MMAFs N-terminal.

US2006/0229253 vedrører pentapeptidforbindelser som har biologisk aktivitet, f.eks. cytotoxiskitet, samt prolegemiddel som har søkende grupper og pentapeptiddeler. Det redegjøres også for forløpere som har en reaktiv linker som kan tjene som et reaksjonssted for forening med et søkende middel, f.eks. et antistoff.

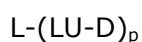
US2005/0238649 vedrører auristatinpeptider, inkludert MeVal-Val-Dil-Dap-norefedrin (MMAE) og MeVal-Val-Dil-Dap-Phe (MMAF), som ble fremstilt og bundet til ligander gjennom ulike linkere.

Det er imidlertid fremdeles et behov for legemiddelleveringsvehikler for den selektive frisettingen av legemiddel til celler.

KORT BESKRIVELSE AV OPPFINNELSEN

Den foreliggende oppfinnelsen er basert på den uventede oppdagelsen at ligandlegemiddelkonjugater omfattende et auristatin som har en fri C-terminal karboksylgruppe konjugerte direkte til en peptidlinker via en peptidbinding, er aktive som legemiddelleveringsmiddel *in vitro* og *in vivo*.

Den foreliggende oppfinnelsen tilveiebringer følgende en forbindelse med formel:



eller et farmasøytisk akseptabelt salt eller solvat derav.

Det tilveiebringes også en forbindelse med formel:

LU-D

5

eller et farmasøytisk akseptabelt salt eller solvat derav.

I forbindelsene ifølge oppfinnelsen er L er ligandenhet, LU er en linkerenheter, og D er en legemiddelenhet;

10 L er et peptid, polypeptid eller protein som binder seg spesifikt til en målcellepopulasjon;

LU har formelen $-A_a-W_w-$,

W_w er en sekvens av w-uavhengig valgte aminosyrediradikaler, hvori W-en proksimalt for legemiddelenheten (W_1) er en naturlig aminosyre som ikke er en

15 D-aminosyre, og er forbundet via en peptidbinding til legemiddelenheten, og

hvor hver resterende W-enhet uavhengig er valgt fra gruppen bestående av glysin og D-isomerene av alanin, arginin, asparaginsyre, asparagin, histidin, glutaminsyre, glutamin, fenylalanin, lysin, leucin, serin, tyrosin, treonin, isoleucin, tryptofan og valin, forutsatt at W_1 ikke kan danne sekundært amid med C-terminal aminosyre av D, og at peptidbindingen kan spaltes av en intracellulær protease,

20

w er et heltall som spenner fra 2 til 12,

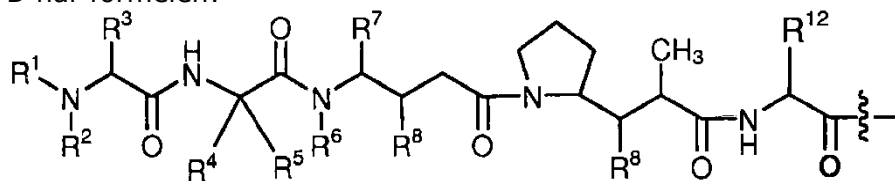
A er stretcherenhet, og

a er 1 eller 2;

25

p er et heltall fra 1 til 20; og

D har formelen:



hvor den bølgede linjen angir peptidbindingen til LU;

30

R^1 og R^2 uavhengig er valgt fra gruppen bestående av -H og $-C_1-C_8$ alkyl, med forbehold om at både R^1 og R^2 ikke er -H;

R^3 er valgt fra gruppen bestående av -H, $-C_1-C_8$ alkyl, $-C_3-C_8$ karbocyklus, -aryl, $-C_1-C_8$ alkyl-aryl, $-X^1-(C_3-C_8$ karbocyklus), $-C_3-C_8$ heterosyklus og $-X^1-$ (C_3-C_8 heterosyklus);

R^4 er valgt fra gruppen bestående av -H, $-C_1-C_8$ alkyl, $-C_3-C_8$ karbocyklus, -aryl, $-X^1$ -aryl, $-C_1-C_8$ alkyl- $(C_3-C_8$ karbocyklus), $-C_3-C_8$ heterosyklus og $-X^1$ -(C_3-C_8 heterosyklus);

R^5 er valgt fra gruppen bestående av -H og metyl;

5 eller R^4 og R^5 i fellesskap danner en karbocyklisk ring og har formelen $-(CR^aR^b)_n$ - hvori R^a og R^b uavhengig er valgt fra gruppen bestående av -H og $-C_1-C_8$ alkyl, og n er valgt fra gruppen bestående av 2, 3, 4, 5 og 6;

R^6 er valgt fra gruppen bestående av -H og $-C_1-C_8$ alkyl;

10 R^7 er valgt fra gruppen bestående av -H, $-C_1-C_8$ alkyl, $-C_3-C_8$ karbocyklus, -aryl, $-X^1$ -aryl, $-X^1$ -(C_3-C_8 karbocyklus), $-C_3-C_8$ heterosyklus og $-X^1$ -(C_3-C_8 heterosyklus); hver R^8 uavhengig er valgt fra gruppen bestående av -H, -OH, $-C_1-C_8$ alkyl, $-C_3-C_8$ karbocyklus og $-O$ -(C_1-C_8 alkyl);

R^{12} er valgt fra sidekjeden av fenylalanin, sidekjeden av metionin og sidekjeden av tryptofan; og hver X_1 uavhengig er $-C_1-C_{10}$ alkylen-.

15

Det beskrives heri legemiddellinkerforbindelser representert av generell formel:



20 eller et farmasøytisk akseptabelt salt eller solvat derav, hvori LU er en linkerenhet og D er et auristatin som har en C-terminal karboksylgruppe som danner en amidbinding med linkerenheten. Linkerenheten omfatter minst én aminosyre.

25 Det beskrives også heri legemiddellinkerligandkonjugater der legemiddellinkerforbindelsene ytterligere omfatter en ligandenhet (L). Konjugatene er representert av generell formel (II):



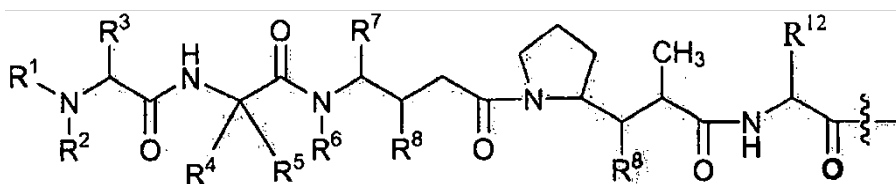
30

eller et farmasøytisk akseptabelt salt eller solvat derav. D er et auristatin som har en C-terminal karboksylgruppe som danner en amidbinding med linkerenheten. Linkerenheten omfatter minst én aminosyre.

35

Auristatinet kan ha følgende formel:

5



hvor den bølgede linjen angir bindingen til en linkerenheter (LU);

R¹ og R² uavhengig er valgt fra gruppen bestående av hydrogen (H) og -C₁-C₈ alkyl; med forbehold om at både R¹ og R² ikke er H;

5 R³ er valgt fra gruppen bestående av H, -C₁-C₈ alkyl, -C₃-C₈ karbocyklus, aryl, -X¹-aryl, -X¹-(C₃-C₈ karbocyklus), -C₃-C₈ heterosyklus og -X¹-(C₃-C₈ heterosyklus);

10 R⁴ er valgt fra gruppen bestående av H, -C₁-C₈ alkyl, -C₃-C₈ karbocyklus, -aryl, -X¹-aryl, -X¹-(C₃-C₈ karbocyklus), -C₃-C₈ heterosyklus og -X¹-(C₃-C₈ heterosyklus);

R⁵ er valgt fra gruppen bestående av H og metyl;

eller R⁴ og R⁵ i fellesskap danner en karbocyklisk ring med formel -(CR³R^b)_n-,
hvor

15 R^a og R^b uavhengig er valgt fra gruppen bestående av H og -C₁-C₈ alkyl, og n er valgt fra gruppen bestående av 2, 3, 4, 5 og 6;

R⁶ er valgt fra gruppen bestående av H og -C₁-C₈ alkyl;

R⁷ er valgt fra gruppen bestående av H, -C₁-C₈ alkyl, -C₃-C₈ karbocyklus, aryl, -X¹-aryl, -X¹-(C₃-C₈ karbocyklus), -C₃-C₈ heterosyklus og -X¹-(C₃-C₈ heterosyklus);

20 hver R⁸ uavhengig er valgt fra gruppen bestående av H, -OH, -C₁-C₈ alkyl, -C₃-C₈ karbocyklus og -O-(C₁-C₈ alkyl);

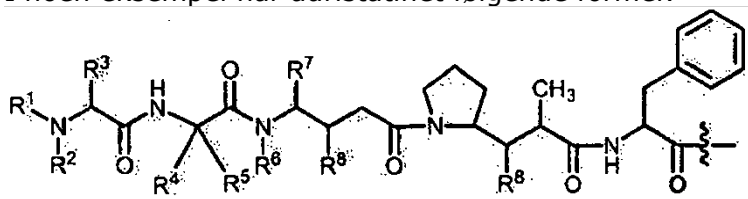
R¹² er valgt fra H, -C₁-C₈ alkyl, aryl, -X¹aryl, -C₃-C₈ karbocyklus, -X¹-(C₃-C₈ karbocyklus), -C₁-C₈ alkyl-NH₂, -C₃-C₈ heterosyklus og -X¹-(C₃-C₈ heterosyklus); og

25 hver X¹ uavhengig er -C₁-C₁₀ alkylen;

eller et farmasøytisk akseptabelt salt eller solvat derav.

30 R⁴ og R¹² kan hver være uavhengig valgt fra en sidekjede av en naturlig aminosyre. R¹² kan for eksempel være sidekjeden av fenylalanin, sidekjeden av metionin eller sidekjeden av tryptofan.

I noen eksempler har auristatinet følgende formel:



hvor R^1 - R^8 er som spesifisert over.

5 I noen eksempler har linkerenheten LU formel $-W_w-A_a$, hvori:

W_w er en sekvens av minst én uavhengig valgt aminosyrediradikaler;

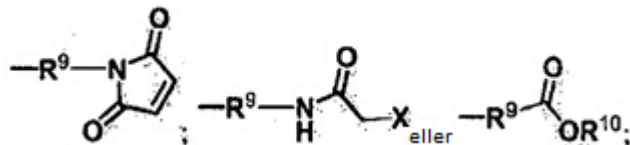
w er et heltall som spenner fra 1 til 12;

A er en stretcherenhet;

a er 1 eller 2;

10 eller et farmasøytisk akseptabelt salt eller solvat derav.

I noen eksempler er stretcherenheten A $-\text{NH}-R^9-R^{11}$ eller $-\text{O}-R^9-R^{11}$, hvori $-R^9-R^{11}$ har formelen:



15 hvori R^9 kan være valgt fra gruppen bestående av $-\text{C}_1$ - C_{10} alkyl-, $-\text{C}_3$ - C_8 karbocyklo-, -arylen-, $-\text{C}_1$ - C_{30} heteroalkyl-, $-\text{C}_3$ - C_8 heterosyklo-, $-\text{C}_1$ - C_{10} alkyl-arylen-, -arylen- $-\text{C}_1$ - C_{10} alkyl-, $-\text{C}_1$ - C_{10} alkyl- $-(\text{C}_3$ - C_8 karbocyklo)-, - $-(\text{C}_3$ - C_8 karbocyklo)- $-\text{C}_1$ - C_{10} alkyl-, $-\text{C}_1$ - C_{10} alkyl- $-(\text{C}_3$ - C_8 heterosyklo)- og - $-(\text{C}_3$ - C_8 heterosyklo)- $-\text{C}_1$ - C_{10} alkyl-; hvori X er en forlatende gruppe; og

20 hver R^{10} danner en aktivert ester, hvori R^{10} uavhengig er valgt fra gruppen bestående av H , $-\text{C}_1$ - C_{10} alkyl, $-\text{C}_3$ - C_8 karbocyklo, aryl, $-\text{C}_1$ - C_{30} heteroalkyl, $-\text{C}_3$ - C_8 heterosyklo, $-\text{C}_1$ - C_{10} alkyl-aryl, -arylen- $-\text{C}_1$ - C_{10} alkyl, $-\text{C}_1$ - C_{10} alkyl- $-(\text{C}_3$ - C_8 karbocyklo), $-(\text{C}_3$ - C_8 karbocyklo)- $-\text{C}_1$ - C_{10} alkyl, $-\text{C}_1$ - C_{10} alkyl- $-(\text{C}_3$ - C_8 heterosyklo),

25 og $-(\text{C}_3$ - C_8 heterosyklo)- $-\text{C}_1$ - C_{10} alkyl.

I noen stretcherenheter A er $-\text{NH}-R^9$ valgt fra $-\text{NH}-\text{C}_1$ - C_{10} alkyl-, $-\text{NH}-\text{C}_1$ - C_{10} alkyl- $-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-\text{C}_1$ - C_{10} alkyl-, $-\text{NH}-\text{C}_1$ - C_{10} alkyl- $-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-\text{C}_1$ - C_{10} alkyl-, $-\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_r$ -, $-\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_r-\text{CH}_2$ -, $-\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH})_r-(\text{CH}_2)_r$ -, $-\text{NH}-$

$(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH})_r-(\text{CH}_2)_r\text{NH}-\text{C}(\text{O})-(\text{CH}_2)_r$, $-\text{NH}-(\text{C}_3-\text{C}_8 \text{ karbosyklo})-$, $-\text{NH}-(\text{arylen})-$ og $-\text{NH}-(\text{C}_3-\text{C}_8 \text{ heterosyklo})-$, hvori hver r uavhengig er 1-10.

I noen stretcherenheter A er $-\text{O}-\text{R}^9-$ valgt fra $-\text{O}-\text{C}_1-\text{C}_{10}$ alkylen-, $-\text{O}-\text{C}_1-\text{C}_{10}$ alkylen- $\text{NH}-\text{C}(\text{O})-\text{C}_1-\text{C}_{10}$ alkylen-, $-\text{O}-\text{C}_1-\text{C}_{10}$ alkylen- $\text{C}(\text{O})-\text{NH}-\text{C}_1-\text{C}_{10}$ alkylen-, $-\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_r-$, $\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_r-\text{CH}_2-$, $-\text{O}-(\text{C}_3-\text{C}_8 \text{ karbosyklo})-$, $-\text{O}-(\text{arylen})-$ og $-\text{O}-(\text{C}_3-\text{C}_8 \text{ heterosyklo})-$, hvori hver r uavhengig er 1-10.

Når stretcherenheten A er $-\text{O}-\text{R}^9-\text{R}^{11}-$, kan esteren være en hindret ester.

Linkerenheten (LU) kan selektivt være stabil slik at det aktive legemiddelet ikke enkelt frisettes i blod, men frisettes ved internalisering inn i en målcelle. De foretrukne linkerne av denne typen inneholder ikke-naturlige D-aminosyrer. Forbedret levering av legemiddelet i legemiddellinkerligandkonjugatene kan oppnås enten på grunn av differensiell prosessering av konjugatene i tumor kontra normale celler/vev, eller på grunn av sakte legemiddelfrisetting inni celler.

Linkerenheten (LU) kan være labil gjennom linkerproteolyse, og tilveiebringer for en lettvinnt frisetting av det aktive legemiddelet nær dets mål.

Det beskrives også heri en legemiddellinkerforbindelse som kan anvendes som et mellomprodukt for syntesen av et legemiddellinkerligandkonjugat. Legemiddellinkerforbindelsene er av spesiell interesse for anvendelsen som mellomprodukter for syntesen av legemiddellinkerligandkonjugater (*f.eks.* et legemiddellinkerantistoffkonjugat eller et antistofflegemiddelkonjugat (ADC)). Legemiddellinkerligandkonjugater, slik som antistofflegemiddelkonjugater, er nyttige med hvilken som helst ligand, spesielt antistoff mot tumorantigener.

Legemiddellinkerligandkonjugatene er nyttige for behandling av lidelser, slik som cancer, autoimmun sykdom eller infeksjøs sykdom, hos en pasient.

Det beskrives også sammensetninger som inkluderer en virkningsfull mengde av et legemiddellinkerligandkonjugat og en farmasøytisk akseptabel bærer eller vehikkel.

Det beskrives også heri fremgangsmåter for dreping eller hemming av mangfoldiggjøring av en tumorcelle eller cancercelle. Det beskrives også fremgangsmåter for behandling av cancer. Fremgangsmåter for dreping eller hemming av replikasjonen av en celle som uttrykker et autoimmunt antistoff, beskrives også. Det beskrives også fremgangsmåter for behandling av en autoimmun sykdom. Fremgangsmåter for behandling av en infeksjons sykdom beskrives også heri.

Det beskrives også et assay for deteksjon av cancerceller, der assayet inkluderer:

(a) eksponering av cellene for et legemiddellinkerligandkonjugat (*f.eks.* et antistofflegemiddelkonjugat); og

(b) bestemmelse av omfanget av legemiddellinkerligandkonjugatenes binding til cellene.

Oppfinnelsen vil forstås best med henvisning til følgende detaljerte beskrivelse av eksemplene på utførelsesformer satt i sammenheng med de medfølgende tegningene, figurene og skjemaene. Omtalen nedenfor er beskrivende, illustrerende og ment som eksempel.

Oppfinnelsen er definert av de medfølgende kravene.

KORT BESKRIVELSE AV TEGNINGENE

Figur 1 viser *in vivo*-effektdata for auristatin F (AF)-dipeptid-h1F6-konjugater hos nakenmus som bærer subkutane 7860-nyrekarsinomtumorer. Musene ble gitt en enkelt dose ip, som angitt i figuren, på dag 14.

Figur 2 viser *in vivo*-effektdata for auristatin-dipeptid-h1F6-konjugater hos nakenmus som bærer subkutane 7860-nyrekarsinomtumorer. Musene ble gitt en enkelt dose ip av konjugatene, som angitt i figuren, på dag 12.

Figur 3 viser *in vivo*-effektdata for AF-dipeptid-h1F6-konjugater hos nakenmus som bærer subkutane DBTRG05-MG-glioblastomtumorer. Musene ble gitt en enkelt dose 3 mg/kg av konjugatene på dag 16. Antall holdbare responser er angitt for hver gruppe.

Figur 4 viser *in vivo*-effektdata for AF-dipeptid-cACIO-konjugater hos en SCID-mus Karpas-modell (subkutan). Musene ble gitt en enkelt dose 0,5 mg/kg ip av konjugatene på dag 12. Antall holdbare helbredelser er angitt for hver gruppe.

5 **Figur 5** viser tolerabilitetsdata for balb/c-mus som er gitt en enkelt dose 50 mg/kg ip av de angitte AF-dipeptid-h1F6-konjugatene. Et h1F6-vc-PABC-MMAF-konjugat anvendes som en kontroll.

Figur 6 viser tolerabilitetsdata for balb/c-mus som er gitt en enkelt dose 75 mg/kg ip av de angitte AF-dipeptid-h1F6-konjugatene. Et h1F6-vc-PABC-MMAF-konjugat anvendes som en kontroll.

10 **Figur 7** viser tolerabilitetsdata for balb/c-mus som er gitt en enkelt dose, i den angitte mengden, av AF-dipeptid-h1F6-konjugatene. Et h1F6-vc-PABC-MMAF-konjugat anvendes som en kontroll.

Figur 8 viser tolerabilitetsdata hos mus som er gitt en enkelt dose 150 mg/kg auristatin-dipeptid-h1F6-konjugater.

15 **Figur 9** viser tolerabilitetsdata for mus som er gitt 150 mg/kg av en enkelt dose ip av de angitte AF-dipeptid- eller AF-tripeptid-h1F6-konjugatene.

20 **Figur 10** viser *in vivo*-effektdata for en musemodell av et subkutan 7860 humant nyrecellekarsinom. Musene ble administrert AF-dipeptid-h1F6-konjugater eller MMAF-dipeptid-h1F6-konjugater. En enkelt dose 2 mg/kg ip av et konjugat ble gitt på dag 12.

Figur 11 viser tolerabilitetsdata for balb/c-mus som er gitt en enkelt dose 100 mg/kg AF-dipeptid-h1F6-konjugater eller MMAF-dipeptid-h1F6-konjugater.

25 **Figur 12** viser *in vivo*-effektdata for en nakenmusxenograftmodell som bærer subkutane 7860 nyrekarsinomtumorer. Musene ble gitt en enkelt dose ip 2 mg/kg av de angitte konjugatene på dag 12.

Figur 13 viser tolerabilitetsdata for balb/c-mus som er gitt en enkelt dose ip 100 mg/kg av AF-Asn-(D)Lys, AF-met-(D)Lys-h1F6-, AF-Asn-(L)Lys- eller AF-met-(L)Lys-h1F6-konjugater.

30 **Figur 14** viser *in vivo*-effektdata for en nakenmusxenograftmodell som bærer subkutane 7860 nyrekarsinomtumorer. Musene ble gitt en enkelt dose ip 2 mg/kg av de angitte konjugatene, som har én eller to aminosyrer i linkerens.

Figur 15 viser tolerabilitetsdata for balb/c-mus som er gitt en enkelt dose ip 50 mg/kg av de angitte h1F6-konjugatene; konjugatet har én eller to aminosyrer i linkerens.

Figur 16 viser *in vivo*-effektdata for SCID-mus som har humane DoHH-2-xenografttumorer av follikulær B-cellelymfon. Musen ble gitt en multiple doser (3 mg/kg doser (4qdx4) ip) av de angitte auristatin-dipeptid-hBU12-konjugatene. Behandling ble initiert på dag 13.

5 **Figur 17** viser *in vivo*-effektdata for SCID-mus som bærer subkutane humane L540cy-xenografttumorer av Hodgkins lymfom. Musen ble gitt multiple doser (1 mg/kg doser (4qdx3) ip) av de angitte konjugatene. Behandling ble initiert på dag 12.

10 DETALJERT BESKRIVELSE

Definisjoner og forkortelser

15 Med mindre noe annet er oppgitt, er følgende begreper og fraser som anvendt heri tiltenkt å ha følgende betydninger. Når handelsnavn anvendes heri, inkluderer handelsnavnet produktformuleringen, det generiske legemiddelet og de(n) aktive farmasøytiske ingrediensen(e) i handelsnavnproduktet, med mindre annet er angitt ved sammenhengen.

20 Betegnelsen "antistoff" anvendes heri i videste forstand og dekker spesifikt intakte monoklonale antistoff, polyklonale antistoff, monospesifikke antistoff, multispesifikke antistoff (*f.eks.* bispesifikke antistoff) og antistofffragmenter som viser ønsket biologisk aktivitet. Et intakt antistoff har primært to regioner: en variabel region og en konstant region. De variable regionene binder til og
25 interagerer med et målantigen. De variable regionene inkluderer en komplementbestemmende region (CDR) som gjenkjenner og binder til et spesifikt bindingssted på et spesielt antigen. Den konstante regionen kan gjenkjennes av og interagere med immunsystemet (*se f.eks.* Janeway et al., 2001, *Immuno. Biology*, 5th Ed., Garland Publishing, New York). Et antistoff kan
30 være av hvilken som helst type eller klasse (*f.eks.* IgG, IgE, IgM, IgD og IgA) eller underklasse (*f.eks.* IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 og IgA2). Antistoffet kan være avledet fra hvilken som helst egnet art. I noen utførelsesformer er antistoffet av human eller murin opprinnelse. Et antistoff kan for eksempel være humant, humanisert eller kimært.

35

Betegnelsene "binder spesifikt" og "spesifikk binding" betyr antistoffbinding til et forutbestemt antigen. Antistoffet binder typisk med en affinitet på minst omkring $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$, og binder til det forutbestemte antigenet med en affinitet som er minst to ganger større enn dets affinitet for binding til et annet ikke-spesifikt antigen (*f.eks.*, BSA, kasein) enn det forutbestemte antigenet eller et nært beslektet antigen.

Betegnelsen "monoklonalt antistoff" betyr som anvendt heri et antistoff oppnådd fra en populasjon av i det vesentlige homogene antistoff, *dvs.* at de individuelle antistoffene omfattende populasjonen er identiske med unntak av mulige naturlig forekommende mutasjoner som kan være til stede i mindre mengder. Monoklonale antistoff er svært spesifikke, idet de rettes mot et enkelt antigensted. Adjektivet "monoklonal" angir antistoffets karakter som å være oppnådd fra en i det vesentlige homogen populasjon av antistoff, og skal ikke tolkes som om det krever produksjon av antistoffet ved noen særlig fremgangsmåte.

Betegnelsen "monoklonale antistoffene" inkluderer spesifikt "kimære" antistoff der en del av den tunge og/eller lette kjeden er identisk med eller homolog med de tilsvarende sekvensene av antistoff avledet fra en spesiell teknikk eller tilhørende en spesiell antistoffklasse eller -underklasse, mens resten av kjeden(e) er identisk eller homolog med de tilsvarende sekvensene av antistoff avledet fra en annen art eller tilhørende en annen antistoffklasse eller -underklasse, samt fragmenter av slike antistoff, så lenge de viser ønsket biologisk aktivitet.

Et "intakt" antistoff er ett som omfatter en antigenbindende variabel region, samt en lett kjedes konstante domene (C_L) og tung kjedes konstante domener, C_{H1} , C_{H2} , C_{H3} og C_{H4} , som egnet for antistoffklassen. De konstante domenene kan være konstante domener med nativ sekvens (*f.eks.* konstante domener med human nativ sekvens) eller aminosyresekvensvarianter derav.

Et intakt antistoff kan ha én eller flere "effektorfunksjoner" som betyr de biologiske aktivitetene som kan tilskrives Fc-regionen (*e.eks.* en Fc-region med nativ sekvens eller en Fc-region med aminosyresekvensvariant) i et antistoff. Eksempel på effektorfunksjoner inkluderer komplementavhengig cytotoksisitet,

antistoffavhengig cellemediert cytotoksitet (ADCC) og antistoffavhengig cellemediert fagocytose.

Et "antistofffragment" omfatter en del av et intakt antistoff, foretrukket omfattende den antigenbindende eller variable region derav. Eksempel på antistofffragmenter inkluderer Fab-, Fab'-, F(ab')₂- og Fv-fragmenter, diastoff, triastoff, tetrastoff, lineære antistoff, enkeltkjedede antistoffmolekyler, scFv, scFv-Fc, multispesifikke antistofffragmenter dannet fra antistofffragment(er), et fragment(er) produsert av et Fab-ekspresjonsbibliotek eller et epitopbindingsfragmenter av et hvilket som helst av ovennevnte som immunspesifikt binder til et målantigen (*f.eks.* et cancercelleantigen, et viralt antigen eller et mikrobielt antigen).

Betegnelsen "variabel" betyr i sammenheng med et antistoff visse deler av de variable domenene av antistoffet som avviker i stor utstrekning i sekvens og anvendes i bindingen, og hvert spesielt antistoffs spesifisitet for dets spesielle antigen. Denne variabiliteten er konsentrert i tre segmenter kalt "hypervariable regioner" i de variable domenene med den lette kjeden og den tunge kjeden. De bedre konserverte delene av variable domener kalles rammeverkregionene (FR-ene). Hver av de variable domenene med native tunge og lette kjeder omfatter fire FR-er koblet sammen av tre hypervariable regioner.

Betegnelsen "hypervariabel region" betyr som anvendt heri aminosyrerestene av et antistoff som er ansvarlige for antigenbinding. Den hypervariable regionen omfatter generelt aminosyrerester fra en "komplementaritetsbestemmende region" eller "CDR" (*f.eks.* rester 24–34 (L1), 50–56 (L2) og 89–97 (L3) i den lette kjedens variable domene 31–35 (H1) 50–65 (H2) og 95–102 (H3) i den tunge kjedens variable domene; Kabat et al. (Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5. utg. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)) og/eller restene fra en "hypervariabel sløyfe" (*f.eks.* rester 26–32 (L1), 50–52 (L2) og 91–96 (L3) i den lette kjedens variable domene og 26–32 (H1), 53–55 (H2) og 96–101 (H3) i den tunge kjedens variable domene; Chothia and Lesk, 1987, J. Mol. Biol. 196:901-917). FR-rester er de variable domenerestene som ikke er de hypervariable regionrestene som er definert heri.

Et "enkeltkjedet Fv"- eller "scFv"-antistofffragment omfatter V_H - og V_L -domenene av et antistoff, hvori disse domenene er til stede i en enkelt polypeptidkjede. Fv-polypeptidet omfatter ytterligere typisk en polypeptidlinker mellom V_H - og V_L -domenene som aktiverer scFv-et for å danne ønsket struktur for antigenbinding.

5 En oversikt over scFv finnes i Pluckthun, i *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, bd. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, s. 269-315 (1994).

Betegnelsen "diastoff" betyr små antistofffragmenter med to antigenbindingssteder, hvilke fragmenter omfatter et variabelt tungt domene (V_H) koblet til et variabelt lett domene (V_L) i samme polypeptidkjede. Ved anvendelse av en linker som er for kort til å tillate paring mellom de to domenene på samme kjede, tvinges domenene til å pares med de komplementære domenene fra en annen kjede og skape to antigenbindingssteder. Diastoff er beskrevet nærmere i for eksempel EP 0 404 097; WO 93/11161; og Hollinger et al., 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448.

10

15

"Humaniserte" former av ikke-humane (*f.eks.* gnager) antistoff er kimære antistoff som inneholder minimal sekvens avledet fra ikke-humant immunglobulin. For det meste er humaniserte antistoff humane immunglobuliner (mottagerantistoff) der rester fra en hypervariabel region hos mottageren erstattes med rester fra en hypervariabel region hos en ikke-human art (donorantistoff), slik som mus, rotte, kanin eller en ikke-human primat som har ønsket spesifisitet, affinitet og kapasitet. I noen tilfeller er rammeverkregionrester (FR) av det humane immunglobulinet erstattet med tilsvarende ikke-humane rester. Humaniserte antistoff kan videre omfatte rester som ikke er funnet i mottagerantistoffet eller i donorantistoffet. Disse modifiseringene foretas for ytterligere å raffinere antistoffytelsen. Det humaniserte antistoffet vil generelt i det vesentlige omfatte alle av minst ett og typisk to, variable domener, der alle eller i det vesentlige alle de hypervariable sløyfene tilsvarer de hypervariable sløyfene for et ikke-humant immunglobulin, og alle eller i det vesentlige alle FR-regionene er FR-regionene fra en human immunglobulinsekvens. Det humaniserte antistoffet vil eventuelt også omfatte minst en del av et immunglobulins konstante region (Fc), som typisk er den for et humant immunglobulin. Mer informasjon finnes i Jones et al., 1986, *Nature*

20

25

30

35

321:522–525; Riechmann et al., 1988, Nature 332:323–329; og Presta, 1992, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596.

5 Som anvendt heri betyr "isolert" separert fra andre bestanddeler av (a) en naturlig kilde slik som en plante- eller dyrecelle eller cellekultur, eller (b) en syntetisk organisk, kjemisk reaksjonsblanding. Som anvendt heri betyr "renset" at når det er isolert, inneholder isolatet minst 95 vekt-%, og i et annet aspekt minst 98 vekt-%, av en forbindelse (*f.eks.* et konjugat) av isolatet.

10 Et "isolert antistoff" er ett som er identifisert og separert og/eller utvunnet fra en bestanddel i sitt naturlige miljø. Kontaminantbestanddeler i sitt naturlige miljø er materialer som ville forstyrre diagnostiske eller terapeutiske anvendelser for antistoffet, og kan inkludere enzymer, hormoner og andre proteinholdige eller ikke-proteinholdige soluter. I foretrukne utførelsesformer vil antistoffet renses 1)
15 til mer enn 95 vekt-% antistoff som bestemt ved Lowry-fremgangsmåten, og mest foretrukket mer enn 99 vekt-%, 2) til en tilstrekkelig grad til å oppnå minst 15 rester av N-terminal eller intern aminosyresekvens ved anvendelse av en sekvenator med roterende kopp eller 3) til homogenitet ved SDS-PAGE under reduserende eller ikke-reduserende betingelser ved hjelp av coomassieblå eller
20 foretrukket sølvfarge. Isolert antistoff inkluderer antistoffet *in situ* innenfor rekombinante celler ettersom minst én bestanddel i antistoffets naturlige miljø ikke vil være til stede. Isolert antistoff vil imidlertid vanligvis bli fremstilt ved hjelp av minst ett rensetrinn.

25 Et antistoff som "induserer apoptose" er ett som induserer programmert celledød som bestemt ved binding av anneksin-V, fragmentering av DNA, cellekrymping, dilatasjon av endoplasmisk retikulum, cellefragmentering og/eller dannelse av membranvesikler (kalt apoptotiske stoff). Cellen er en tumorcelle *f.eks.* en bryst-, eggstokk-, mage-, endometrie-, spyttkjertel-, lunge-, nyre-, tykktarms-,
30 skjoldbrusk-, skjoldbruskkjertel- eller blærecelle. Ulike fremgangsmåter er tilgjengelige for evaluering av cellehendelsene assosiert med apoptose. Translokasjon av fosfatidylserin (PS) kan for eksempel måles ved anneksinbinding, DNA-fragmentering kan evalueres ved DNA-laddering; og nukleær-/kromatinkondensering sammen med DNA-fragmentering kan evalueres
35 ved en hvilken som helst økning i hypodiploidceller.

Uttrykket "terapeutisk virksom mengde" betyr en mengde av et legemiddel virksomt til å behandle en sykdom eller lidelser hos et pattedyr. Ved cancer kan den terapeutisk virkningsfulle mengden av legemiddelet redusere antallet cancerceller; redusere tumorstørrelsen, hemme (*dvs.* til en viss grad bremse og fortrinnsvis stanse) cancercelleinfiltrasjon i perifere organer; hemme (*dvs.* til en viss grad bremse og fortrinnsvis stanse) tumormetastase; til en viss grad hemme tumorvekst; og/eller til en viss grad lindre én eller flere av symptomene assosiert med cancer. I den grad legemiddelet kan hemme vekst og/eller drepe eksisterende cancerceller, kan det være cytostatisk og/eller cytotoxisk. For cancerterapi kan effekten for eksempel måles ved vurdering av tiden før sykdomsprogresjon (TTP) og/eller ved bestemmelse av responsraten (RR).

Betegnelsen "vesentlig mengde" betyr en majoritet, *dvs.* >50 % av en populasjon, av en blanding av en prøve.

Betegnelsen "intracellulær metabolitt" betyr en forbindelse som er resultat av en metabolsk prosess eller reaksjon i en celle på et legemiddellinkerligandkonjugat (*f.eks.* et antistofflegemiddelkonjugat (ADC)). Den metabolske prosessen eller reaksjonen kan være en enzymatisk prosess, slik som proteolytisk spalting av en peptidlinker for ADC-et. Intracellulære metabolitter, men er ikke begrenset til, antistoff og frie legemiddel som har gjennomgått intracellulær spalting etter innføring, diffusjon, opptak eller transport inn i en celle.

Betegnelsene "intracellulært spaltet" og "intracellulær spalting" betyr en metabolsk prosess eller reaksjon i en celle på et antistofflegemiddelkonjugat (ADC) (*f.eks.* et antistofflegemiddelkonjugat (ADC) eller lignende), hvorved den kovalente bindingen, *f.eks.* linkerens, mellom legemiddeldelen (D) og ligandenheten (*f.eks.* et antistoff (Ab)) brytes, som resulterer i det frie legemiddelet eller annen metabolitt av konjugatet dissosiert fra antistoffet i cellen. De spaltede delene av legemiddellinkerligandkonjugatet er således intracellulære metabolitter.

Betegnelsen "biotilgjengelighet" betyr den systemiske tilgjengeligheten (*dvs.* blod-/plasmanivåer) av en gitt mengde av legemiddel administrert til en pasient. Biotilgjengelighet er en absolutt betegnelse som angir måling av både tiden (rate) og total mengde (omfang) av legemiddel som når det generelle omløpet fra en administrert doseform.

Betegnelsen "cytotoksisk aktivitet" betyr en celledrepende, en cytostatisk eller en antiproliferativ effekt av et legemiddellinkerligandkonjugat eller en intracellulær metabolitt av et legemiddellinkerligandkonjugat. Cytotoksisk aktivitet kan uttrykkes som IC_{50} -verdien, som er konsentrasjonen (mol eller masse) per volumenhet der halvparten av cellene overlever.

Betegnelsen "cytotoksisk middel" betyr som anvendt heri et stoff som inhiberer eller hemmer funksjonen av celler og/eller forårsaker destruksjon av celler. Betegnelsen er ment å inkludere radioaktive isotoper (*f.eks.*, ^{211}At , ^{131}I , ^{125}I , ^{90}Y , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{153}Sm , ^{212}Bi , ^{32}P , ^{60}Co og radioaktive isotoper av Lu), kjemoterapeutiske middel og toksiner slik som småmolekyltoksiner eller enzymatisk aktive toksiner av bakterie-, sopp-, plante- eller dyreopprinnelse, inkludert syntetiske analoger og derivater derav. I ett aspekt inkluderer betegnelsen ikke en radioaktiv isotop(er).

En "lidelse" er en tilstand som helst tilstand som vil dra fordel av behandling med et legemiddellinkerligandkonjugat. Dette inkluderer kroniske og akutte lidelser eller sykdommer, inkludert de patologiske tilstandene som predisponerer et pattedyr for den aktuelle lidelsen. Ikke-begrensende eksempel på lidelser som skal behandles heri inkluderer benigne og maligne cancre; leukemi og lymfoide ondartetheter, nevronale-, gliale-, astrocytale-, hypotalamiske og andre kjertel-, makrofagiske, epiteliale, stromale og blastocoeliske lidelser; og inflammatoriske, angiogene og immunologiske lidelser.

Betegnelsene "cancer" og "cancerfremkallende" betyr eller beskriver den fysiologiske tilstanden eller lidelsen hos pattedyr som typisk karakteriseres ved uregulert cellevekst. En "tumor" omfatter én eller flere cancerfremkallende celler.

En "autoimmun sykdom" er heri en sykdom eller lidelse som oppstår fra og er rettet mot et individs egne vev eller et kosegregat eller en manifestasjon derav eller en resulterende tilstand derfra.

Eksempel på en "pasient" inkluderer, men er ikke begrenset til, et menneske, en rotte, et marsvin, en ape, gris, geit, ku, hest, hund, katt, fugl og et fjærfe. I et eksempel på en utførelsesform er pasienten et menneske.

Betegnelsene "behandle" eller "behandling" betyr, med mindre annet er angitt ved sammenhengen, terapeutisk behandling og profylaktiske tiltak for å forhindre tilbakefall, hvori formålet er å hemme eller bremse (minsk) en uønsket fysiologisk endring eller lidelse, slik som utviklingen eller spredning av cancer. For denne oppfinnelsens formål inkluderer gunstige eller ønskede kliniske resultater, men er ikke begrenset til, lindring av symptomer, reduksjon av sykdomsomsfang, stabilisering (dvs. ikke forverring) av sykdomstilstand, forsinkelse eller bremsing av sykdomsprogresjon, forbedring eller lindring av sykdomstilstanden og remisjon (enten partiell eller total), enten detekterbar eller udetekterbar. "Behandling" kan også bety forlengelse av overlevelse sammenlignet med forventet overlevelse hvis behandling ikke mottas. De som trenger behandling inkluderer de som allerede har tilstanden eller lidelsen, samt de som er tilbøyelig til å få tilstanden eller lidelsen.

I sammenheng med cancer inkluderer betegnelsen "behandling" hvilken som helst eller alle av: hemming av vekst av tumorceller, cancerceller eller av en tumor; hemming av replikasjon av tumorceller eller cancerceller, minsking av samlet tumormengde eller reduksjon av antallet cancerfremkallende celler og forbedring av ett eller flere symptomer assosiert med sykdommen.

I sammenheng med en autoimmun sykdom inkluderer betegnelsen "behandling" hvilken som helst eller alle av: hemming av replikasjon av celler assosiert med en autoimmun sykdomstilstand inkludert, men ikke begrenset til, celler som produserer et autoimmunt antistoff, minsking av mengden autoimmunt antistoff og forbedring av ett eller symptomer på en autoimmun sykdom.

I sammenheng med en infeksjøs sykdom inkluderer betegnelsen "behandling" hvilken som helst eller alle av: hemming av veksten, mangfoldiggjøringen eller replikasjonen av patogenet som forårsaker den infeksjøre sykdommen og forbedring av ett eller flere symptomer på en infeksjøs sykdom.

Betegnelsen "pakningsvedlegg" betyr anvisninger som vanligvis inngår i kommersielle pakninger for terapeutiske produkter, som inneholder informasjon om indikasjonen(e), anvendelse, dosering, administrering, kontraindikasjoner og/eller advarsler vedrørende anvendelsen av slike terapeutiske produkter.

Et polypeptid med "nativ sekvens" er ett som har samme aminosyresekvens som et polypeptid, *f.eks.* en tumorassosiert antigenreseptor avledet fra naturen. Slike polypeptider med nativ sekvens kan isoleres fra naturen eller produseres ved hjelp av rekombinante eller syntetiske middel. Et polypeptid med nativ sekvens kan således ha aminosyresekvensen til et naturlig forekommende humant polypeptid, et murint polypeptid eller et polypeptid fra hvilken som helst annen pattedyrart.

Et "isolert" nukleinsyremolekyl er et nukleinsyremolekyl som er identifisert og separert fra minst ett kontaminant nukleinsyremolekyl med hvilket det vanligvis er assosiert i den naturlige kilden til nukleinsyren. Et isolert nukleinsyremolekyl er annerledes enn den formen eller det miljøet det forefinnes i i naturen. Isolerte nukleinsyremolekyler blir derfor skilt fra nukleinsyremolekylet slik det eksisterer i naturlige celler. Et isolert nukleinsyremolekyl inkluderer imidlertid et nukleinsyremolekyl som finnes i celler som vanligvis uttrykker nukleinsyren, hvor for eksempel nukleinsyremolekylet er i en kromosom plassering som er forskjellig fra plasseringen i naturlige celler.

Uttrykket "kontrollsekvenser" betyr nukleinsyresekvenser som er nødvendige for ekspresjonen av en operativt bundet kodingssekvens i en spesiell vertsorganisme. Kontrollsekvensene som er egnet for prokaryoter inkluderer for eksempel en promotor, eventuelt en operatorsekvens og et ribosombindingssted. Eukaryotiske celler er kjent for å benytte promotorer, polyadenylasjonssignaler og enhancere.

En nukleinsyre er "operativt bundet" når den er plassert i et funksjonelt forhold med en annen nukleinsyresekvens. DNA for en presekvens eller sekretorisk leder er for eksempel operativt bundet til DNA-koding for et polypeptid hvis det er uttrykt som et preprotein som deltar i utskillingen av polypeptidet; en promotor eller enhancer er for eksempel operativt bundet til en kodingssekvens hvis den påvirker transkripsjonen av sekvensen; eller et ribosombindingssted er operativt bundet til en kodingssekvens hvis det er plassert for å lette translasjon. "Operativt bundet" betyr generelt at DNA-sekvensene som er bundet er tilgrensende og, når det gjelder en sekretorisk leder, tilgrensende og i lesefase. Enhancere behøver imidlertid ikke å være tilgrensende. Binding kan oppnås ved ligering på praktiske restriksjonssteder. Hvis slike steder ikke eksisterer, kan de

syntetiske oligonukleotidadapterne eller -linkerne anvendes i henhold til konvensjonell praksis.

Som anvendt heri anvendes betegnelsene "celle", "cellelinje" og "cellekultur" om hverandre, og alle slike benevnelser inkluderer avkom. Ordene "transformanter" og "transformerte celler" inkluderer den primære pasientcellen og kulturer eller avkom avledet derfra, uten hensyn til antallet overføringer. Det skal også forstås at alt avkom kanskje ikke er helt identisk i DNA-innhold, på grunn av tilsiktede eller utilsiktede mutasjoner. Mutant avkom som har den samme funksjonen eller biologiske aktiviteten som det er screenet etter i den opprinnelige transformerte cellen, er inkludert. Hvor distinkte benevnelser er ment, vil det være åpenbart ut ifra sammenhengen.

Hvis ikke annet er angitt, betyr betegnelsen "alkyl", alene eller som del av en annen betegnelse, et substituert eller usubstituert rettkjedet eller forgrenet, mettet eller umettet hydrokarbon som har det angitte antallet karbonatomer (*f.eks.* betyr "-C₁-C₈ alkyl" eller "-C₁-C₁₀" alkyl en alkylgruppe som har henholdsvis fra 1 til 8 eller 1 til 10 karbonatomer). Når antallet karbonatomer ikke er angitt, har alkylgruppen fra 1 til 8 karbonatomer. Representative rettkjedede "-C₁-C₈ alkyl"-grupper inkluderer, men er ikke begrenset til, -metyl, -etyl, -n-propyl, -n-butyl, -n-pentyl, -n-heksyl, -n-heptyl og -n-oktyl; mens forgrenede -C₁-C₈ alkyl inkluderer, men er ikke begrenset til, -isopropyl, -sec-butyl, -isobutyl, -*tert*-butyl, -isopentyl og -2-metylbutyl; umettede -C₂-C₈ alkyl inkluderer, men er ikke begrenset til, -vinyl, -allyl, -1-butenyl, -2-butenyl, -isobutylenyl, -1-pentenyl, -2-pentenyl, -3-metyl-1-butenyl, -2-metyl-2-butenyl, -2,3-dimetyl-2-butenyl, -1-heksyl, 2-heksyl, -3-heksyl, -acetylenyl, -propynyl, -1-butynyl, -2-butynyl, -1-pentynyl, -2-pentynyl og -3-metyl-1 butynyl. I noen utførelsesformer er en alkylgruppe usubstituert. I andre utførelsesformer er en alkylgruppe substituert med én eller flere grupper. Foretrukne substituent inkluderer: -O-(C₁-C₈ alkyl), aryl, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH₂, -OH, -C(O)NHR', -C(O)N(R')₂, -NHC(O)R', -SO₃R', -S(O)₂R', -S(O)R', -SR', -halogen, -N₃, -NH₂, -NH(R'), -N(R')₂ og -CN; hvor hver R' uavhengig er valgt fra gruppen bestående av H, usubstituert C₁-C₈ alkyl og aryl. Spesielt foretrukne substituent inkluderer: -OH, -SCH₃, -CONH₂, -COOH, -NHC(=NH)NH₂, -NH₂, NHCOCH₃, -NHCHO og -NHCONH₂.

"Alkenyl" betyr et substituert eller usubstituert C_2-C_{18} hydrokarbon inneholdende normale, sekundære eller tertiære karbonatomer med minst ett umettet sted, dvs. en karbon-karbon, sp^2 -dobbelbinding. Eksempel inkluderer, men er ikke begrenset til: etylen eller vinyl ($-CH=CH_2$), allyl ($-CH_2CH=CH_2$), syklopentenyl ($-C_5H_7$), og 5-heksenyl ($-CH_2CH_2CH_2CH_2CH=CH_2$).

"Alkynyl" betyr et substituert eller usubstituert C_2-C_{18} hydrokarbon inneholdende normale, sekundære eller tertiære karbonatomer med minst ett umettet sted, dvs. en karbon-karbon, sp -trippelbinding. Eksempel inkluderer, men er ikke begrenset til: acetylenisk ($-C\equiv CH$) og propargyl ($-CH_2C\equiv CH$).

Hvis ikke annet er angitt, betyr "alkylen", alene eller som del av en annen betegnelse, en mettet, forgrenet eller rettkjedet eller sykklisk hydrokarbonradikal med det oppgitte antallet karbonatomer, typisk 1–18 karbonatomer, og har to monovalente radikalsentre avledet ved fjerningen av to hydrogenatomer fra den samme eller to forskjellige karbonatomer av et moralken. Typiske alkylenradikaler inkluderer, men er ikke begrenset til: metylen ($-CH_2-$), 1,2-etyl ($-CH_2CH_2-$), 1,3-propyl ($-CH_2CH_2CH_2-$), 1,4-butyl ($-CH_2CH_2CH_2CH_2-$) og lignende. A " C_1-C_{10} alkylen" er en rettkjedet, mettet hydrokarbongruppe med formel $-(CH_2)_{1-10}-$. Eksempel på et C_1-C_{10} alkylen inkluderer metylen, etylen, propylen, butylen, pentylen, heksylen, heptylen, ocytylen, nonylen og dekalen.

"Alkenylen" betyr en umettet, forgrenet eller rettkjedet hydrokarbonradikal på 2–18 karbonatomer og som har monovalente radikalsentre avledet ved fjerningen av to hydrogenatomer fra den samme eller to forskjellige karbonatomer av et moralken. Typiske alkenylenradikaler inkluderer, men er ikke begrenset til: 1,2-etylen ($-CH=CH-$).

"Alkynylen" betyr en umettet, forgrenet eller rettkjedet eller sykklisk hydrokarbonradikal på 2–18 karbonatomer og som har monovalente radikalsentre avledet ved fjerningen av to hydrogenatomer fra den samme eller to forskjellige karbonatomer av et moralkyn. Typiske alkynylenradikaler inkluderer, men er ikke begrenset til: acetylen ($-C\equiv C-$), propargyl ($-CH_2C\equiv C-$), og 4-pentynyl ($-CH_2CH_2CH_2C\equiv CH-$).

Hvis ikke annet er angitt, betyr "aryl", alene eller som del av en annen betegnelse, en substituert eller usubstituert monovalent, karbosyklisk aromatisk

hydrokarbonradikal på 6–20 karbonatomer avledet ved fjerningen av ett hydrogenatom fra et enkelt karbonatom av et aromatisk morringsystem. Noen arylgrupper er representert i eksempelstrukturene som "Ar". Typiske arylgrupper inkluderer, men er ikke begrenset til, radikaler avledet fra benzen, substituert benzen, naftalen, antracen, bifenyl og lignende. En substituert karbosyklisk aromatisk gruppe (f.eks. en arylgruppe) kan være substituert med én eller flere, foretrukket 1 til 5, av følgende grupper: $-C_1-C_8$ alkyl, $-O-(C_1-C_8 \text{ alkyl})$, $-C(O)R'$, $-OC(O)R'$, $-C(O)OR'$, $-C(O)NH_2$, $-C(O)NHR'$, $-C(O)N(R')_2$, $-NHC(O)R'$, $-S(O)_2R'$, $-S(O)R'$, $-OH$, $-halogen$, $-N_3$, $-NH_2$, $-NH(R')$, $-N(R')_2$ og $-CN$; hvori hver R' uavhengig er valgt fra $-H$, $-C_1-C_8$ alkyl og usubstituert aryl. I noen utførelsesformer kan en substituert karbosyklisk aromatisk gruppe ytterligere inkludere én eller flere av: $-NHC(=NH)NH_2$, $-NHCONH_2$, $-S(O)_2R'$ og $-SR'$.

"Substituert alkyl" og "substituert aryl" betyr henholdsvis alkyl og aryl, der ett eller flere hydrogenatomer hver uavhengig er erstattet med en substituent. Typisk substituent inkluderer, men er ikke begrenset til, $-X$, $-R$, $-O-$, $-OR$, $-SR$, $-S^-$, $-NR_2$, $-NR_3$, $=NR$, $-CX_3$, $-CN$, $-OCN$, $-SCN$, $-N=C=O$, $-NCS$, $-NO$, $-NO_2$, $=N_2$, $-N_3$, $-NRC(=O)R$, $-C(=O)R$, $-C(=O)NR_2$, $-SO_3^-$, $-SO_3H$, $-S(=O)_2R$, $-OS(=O)_2OR$, $-S(=O)_2NR$, $-S(=O)R$, $-OP(=O)(OR)_2$, $-P(=O)(OR)_2$, $-PO_3^-$, $-PO_3H_2$, $-AsO_2H_2$, $-C(=O)R$, $-C(=O)X$, $-C(=S)R$, $-CO_2R$, $-CO_2^-$, $-C(=S)OR$, $-C(=O)SR$, $-C(=S)SR$, $-C(=O)NR_2$, $-C(=S)NR_2$ eller $-C(=NR)NR_2$, hvor hver X uavhengig er et halogen: $-F$, $-Cl$, $-Br$, or $-I$; og hver R uavhengig er $-H$, $-C_1-C_{20}$ alkyl, $-C_6-C_{20}$ aryl, $-C_3-C_{14}$ heterosyklus, en beskyttelsesgruppe eller en prolegemiddedel. Alkylen-, alkenylen- og alkynylengrupper som beskrevet over kan også være tilsvarende substituert.

Hvis ikke annet er angitt, betyr en " C_3-C_8 heterosyklus," alene eller som del av en annen betegnelse, et monovalent substituert eller usubstituert aromatisk eller ikke-aromatisk monosyklisk eller bisyklisk ringsystem som har fra 3 til 8 karbonatomer (også betegnet som ringledd) og ett til fire heteroatomringledd uavhengig valgt fra N , O , P eller S , og avledet ved fjerning av ett hydrogenatom fra et ringatom av et morringsystem. Ett eller flere N -, C - eller S -atomer i heterosyklusen kan være oksidert. Ringen som inkluderer heteroatomet kan være aromatisk eller ikke-aromatisk. Hvis ikke annet er bemerket, er heterosyklusen bundet til sin hengende gruppe ved hvilket som helst heteroatom eller karbonatom som resulterer i en stabil struktur.

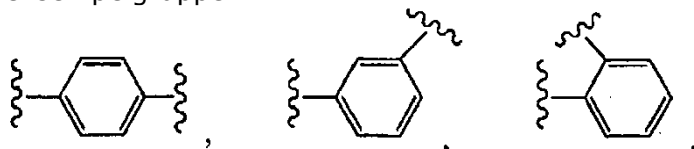
Representative eksempel på en C₃-C₈ heterosyklus inkluderer, men er ikke begrenset til, benzofuranyl, benzotiofen, indolyl, benzopyrazolyl, pyrrolyl, tiofenyl (tiofen), furanyl, tiazolyl, imidazolyl, pyrazolyl, triazolyl, kinolinyl, pyrimidinyl, pyridinyl, pyridonyl, pyrazinyl, pyridazinyl, isotiazolyl, isoxazolyl og tetrazolyl. En C₃-C₈ heterosyklus kan være substituert med opptil sju grupper inkludert, men ikke begrenset til, -C₁-C₈ alkyl, -O-(C₁-C₈ alkyl), aryl, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH₂, -C(O)NHR', -C(O)N(R')₂, -NHC(O)R', -S(O)₂R', -S(O)R', -OH, -halogen, -N₃, -NH₂, -NH(R'), -N(R')₂ og -CN; hvori hver R' uavhengig er valgt fra -H, -C₁-C₈ alkyl og aryl. I noen utførelsesformer kan en substituert heterosyklus også inkludere én eller flere av: -NHC(=NH)NH₂, -NHCONH₂, -S(O)₂R' og -SR'.

Hvis ikke annet er angitt, betyr "C₃-C₈ heterosyklo," alene eller som del av en annen betegnelse, en C₃-C₈ heterosyklusgruppe definert over, hvori ett av heterosyklusgruppens hydrogenatomer er erstattet med en binding. En C₃-C₈ heterosyklo kan være usubstituert eller substituert med opptil seks grupper inkludert, men ikke begrenset til, -C₁-C₈ alkyl, -O-(C₁-C₈ alkyl), aryl, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH₂, -C(O)NHR', -C(O)N(R')₂, -NHC(O)R', -S(O)₂R', -S(O)R', -OH, -halogen, -N₃, -NH₂, -NH(R'), -N(R')₂ og -CN; hvori hver R' uavhengig er valgt fra -H, -C₁-C₈ alkyl og aryl. I noen utførelsesformer kan en substituert heterosyklo også inkludere én eller flere av: -NHC(=NH)NH₂, -NHCONH₂, -S(O)₂R' og -SR'.

Hvis ikke annet er angitt, er "C₃-C₈ karbosyklus", alene eller som del av en annen betegnelse, en 3-, 4-, 5-, 6-, 7- eller 8-leddet monovalent, substituert eller usubstituert, mettet eller umettet ikke-aromatisk monosyklisk eller bisyklisk karbosyklisk ring avledet ved fjerningen av ett hydrogenatom fra et ringatom av et morringsystem. Representative -C₃-C₈ karbosykluser inkluderer, men er ikke begrenset til, -syklopropyl, -syklobutyl; -syklopentyl, -syklopentadienyl, -sykloheksyl, -sykloheksenyl, -1,3-sykloheksadienyl, -1,4-sykloheksadienyl, -sykloheptyl, -1,3-sykloheptadienyl, -1,3,5-sykloheptatrienyl, -syklooktyl og -syklooktadienyl. En "C₃-C₈ karbosyklo"-gruppe kan være usubstituert eller substituert med én eller flere grupper inkludert, men ikke begrenset til, -C₁-C₈ alkyl, -O-(C₁-C₈ alkyl), aryl, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH₂, -C(O)NHR', -C(O)N(R')₂, NHC(O)R', -S(O)₂R', -S(O)R', -OH, -halogen, -N₃, -NH₂, -NH(R'), -N(R')₂ og -CN; hvor hver R' uavhengig er valgt fra -H, -C₁-C₈ alkyl og aryl.

Hvis ikke annet er angitt, betyr en "C₃-C₈ karbosyklo," alene eller som del av en annen betegnelse, en C₃-C₈ karbosyklusgruppe definert over, hvori et annet av heterosyklusgruppens hydrogenatomer er erstattet med en binding.

- 5 Hvis ikke annet er angitt, er et "arylen", alene eller som del av en annen betegnelse, en arylgruppe som har to kovalente bindinger og kan være i orto-, meta- eller parakonfigurasjonene som vist i følgende strukturer med fenyl som eksempelgruppen:



- 10 Arylgruppen kan være usubstituert eller substituert med opptil fire grupper inkludert, men ikke begrenset til, -C₁-C₈ alkyl, -O-(C₁-C₈ alkyl), aryl, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH₂, -C(O)NHR', -C(O)N(R')₂, -NHC(O)R', -S(O)₂R', -S(O)R', -OH, -halogen, -N₃, -NH₂, -NH(R'), -N(R')₂ og -CN; hvori hver R' uavhengig er valgt fra -H, -C₁-C₈ alkyl og aryl.

15

Hvis ikke annet er angitt, betyr betegnelsen "heteroalkyl", alene eller som del av en annen betegnelse, et stabilt rettkjedet eller forgrenet hydrokarbon, eller kombinasjoner derav, fullstendig mettet eller inneholdende fra 1 til 3 grader umettet forbindelse, bestående av det oppgitte antallet karbonatomer og fra ett til tre heteroatomer valgt fra gruppen bestående av O, N, Si og S, og hvori nitrogen- og svovelatomene eventuelt kan være oksidert og nitrogenheteroatomet eventuelt kan være kvarternært.

20

Heteroatomet/heteroatomene O, N og S kan være plassert ved hvilken som helst innvendig posisjon i heteroalkylgruppen. Heteroatomet Si kan være plassert i hvilken som helst posisjon i heteroalkylgruppen, inkludert posisjonen der alkylgruppen er bundet til resten av molekylet. Eksempel inkluderer -CH₂-CH₂-O-CH₃, -CH₂-CH₂-NH-CH₃, -CH₂-CH₂-N(CH₃)-CH₃, -CH₂-S-CH₂-CH₃, -CH₂-CH₂-S(O)-CH₃, -NH-CH₂-CH₂-NH-C(O)-CH₂-CH₃, -CH₂-CH₂-S(O)₂-CH₃, -CH=CH-O-CH₃, -Si(CH₃)₃, -CH₂-CH=N-O-CH₃ og -CH=CH-N(CH₃)-CH₃. Opptil to heteroatomer kan være etter hverandre, slik som for eksempel -CH₂-NH-OCH₃ og -CH₂-O-Si(CH₃)₃.

25

30

Hvis ikke annet er angitt, betyr betegnelsen "heteroalkylen", alene eller som del av en annen substituent, en divalent gruppe avledet fra heteroalkyl (som beskrevet over), som eksemplifisert av -CH₂-CH₂-S-CH₂-CH₂- og -CH₂-S-CH₂-CH₂-NH-CH₂-. For heteroalkylengrupper kan heteroatomer også oppta den ene

eller begge kjedeendene. Enda ytterligere, for alkylen- og heteroalkylenbindingsgrupper, er ingen orientering for bindingsgruppen antydnet.

5 Betegnelsen "kiral" betyr molekyler som er ulike sin speilbildepartner, mens betegnelsen "akiral" betyr molekyler som er like sin speilbildepartner.

Betegnelsen "stereoisomer" betyr forbindelser som har identisk kjemisk konstitusjon, men som avviker med hensyn til romarrangementet av atomer eller grupper.

10

"Diastereomer" betyr en stereoisomer som har to eller flere kirale sentre, og hvor molekyler ikke er speilbilder av hverandre. Diastereomerer har forskjellige fysiske egenskaper, f.eks. smeltepunkt, kokepunkt, spektralegenskaper og reaktiviteter. Blandinger av diastereomerer kan separeres under analytiske

15 høyoppløsningsprosedyrer slik som elektroforese og kromatografi.

15

Heri anvendte stereokjemiske definisjoner og konvensjoner følger generelt S. P. Parker, Ed., McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms, McGraw-Hill Book Company, New York (1984); og Eliel, E. and Wilen, S., Stereochemistry of Organic Compounds, John Wiley & Sons, Inc., New York (1994). Mange organiske forbindelser eksisterer i optisk aktive former, dvs. at de har evnen til å rotere planet av planpolarisert lys. Ved beskrivelse av en optisk aktiv forbindelse anvendes prefiksene D og L, eller R og S for å betegne molekylets absolutte konfigurasjon rundt dets kirale senter/sentre. Prefiksene d og l eller (+) og (-) benyttes til å angi forbindelsens rotasjonstegn for planpolarisert lys, hvor (-) eller l betyr at forbindelsen er levorotatorisk. En forbindelse med prefikset (+) eller d er dekstrorotatorisk. For en gitt kjemisk struktur er disse stereoisomerene identiske, med unntak av at de er speilbilder av hverandre. En spesifikk stereoisomer kan også betegnes som en enantiomer, og en blanding av slike isomerer kalles ofte en enantiomer blanding. En 50:50 blanding av enantiomerer betegnes som en racemisk blanding eller et racemat, som kan oppstå hvor det ikke har vært noen stereoseleksjon eller stereospesifisitet i en kjemisk reaksjon eller prosess. Betegnelsene "racemisk blanding" og "racemat" betyr en ekvimolar blanding av to enantiomere arter frie for optisk aktivitet.

25

30

35

Et "derivat" av en aminosyre inkluderer en aminosyre som har substitusjoner eller modifiseringer ved kovalent binding av en moraminsyre, slik som f.eks.

ved alkylering, glykosylering, acetylering, fosforylering og lignende. Ytterligere inkludert i definisjonen av "derivat" er for eksempel én eller flere analoger av en aminosyre med substituerte bindinger, samt andre modifiseringer kjent i teknikken.

5

En "naturlig aminosyre" betyr arginin, glutamin, fenylalanin, tyrosin, tryptofan, lysin, glysin, alanin, histidin, serin, prolin, glutaminsyre, asparaginsyre, treonin, cystein, metionin, leucin, asparagin, isoleucin og valin, med mindre annet er angitt ved sammenhengen.

10

"Beskyttelsesgruppe" betyr en del som, når den er bundet til en reaktiv gruppe i et molekyl, maskerer, reduserer eller forhindre reaktiviteten. Eksempel på beskyttelsesgrupper finnes i T.W. Greene og P.G.M. Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 3. utgave, John Wiley & Sons, New York, 1999 og Harrison and Harrison et al., *Compendium of Synthetic Organic Methods*, bd. 1–8 (John Wiley and Sons, 1971–1996). Representative hydroksybeskyttelsesgrupper inkluderer acylgrupper, benzyl- og trityletere, tetrahydropyranyleter, trialkylsilyleter og allyleter. Representative aminobeskyttelsesgrupper inkluderer formyl, acetyl, trifluoracetyl, benzyl, benzyloksykarbonyl (CBZ), *tert*-butoksykarbonyl (Boc), trimetylsilyl (TMS), 2-trimetylsilyl-etansulfonyl (SES), trityl og substituerte tritylgrupper, allyloksykarbonyl, 9-fluorenylmetylokykarbonyl (Fmoc), nitro-veratryloksykarbonyl (NVOC) og lignende.

15

20

25

Eksempel på en "hydroksylbeskyttelsesgruppe" inkluderer, men er ikke begrenset til, metoksymetyleter, 2-metoksyetoksymetyleter, tetrahydropyranyleter, benzyleter, *p*-metoksybenzyleter, trimetylsilyleter, trietylsilyleter, triisopropylsilyleter, *t*-butyldimetylsilyleter, trifenylmetylsilyleter, acetater, substituerte acetatere, pivaloat, benzoat, metansulfonat and *p*-toluensulfonat.

30

"Avspaltende gruppe" betyr en funksjonell gruppe som kan være substituert med en annen funksjonell gruppe. Slike avspaltende grupper er velkjent i teknikken, og eksempel omfatter, men er ikke begrenset til, et halid (*f.eks.* klorid, bromid, jodid), metansulfonyl (mesyl), *p*-toluensulfonyl(tosyl), trifluormetylsulfonyl(triflat) og trifluormetylsulfonat.

35

Som anvendt heri betyr frasen "farmasøytisk akseptabelt salt" farmasøytisk akseptable organiske eller uorganiske salter av en forbindelse (*f.eks.* et legemiddel, en legemiddellinkerforbindelse eller et legemiddellinkerligandkonjugat). Forbindelsen inneholder typisk minst én aminogruppe, og følgelig kan syreaddisjonssalter være dannet med denne aminogruppen. Eksempel på salter inkluderer, men er ikke begrenset til, sulfat-, citrat-, acetat-, oksalat-, klorid-, bromid-, jodid-, nitrat-, bisulfat-, fosfat-, syrefosfat-, isonikotinat-, laktat-, salicylat-, syrecitrat-, tartrat-, oleat-, tannat-, pantotenat-, bitartrat-, askorbat-, sukkinat-, maleat-, gentisinat-, fumarat-, glukonat-, glukuronat-, sakkarat-, format-, benzoat-, glutamat-, metansulfonat-, etansulfonat-, benzensulfonat-, p-toluensulfonat- og pamoat- (*dvs.* 1,1'-metylen-bis(2-hydroxy-3-naftoat))-salter. Et farmasøytisk akseptabelt salt kan involvere inkludering av et annet molekyl, slik som et acetation, et sukkination eller et annet motion. Motionet kan være en hvilken som helst organisk eller uorganisk del som stabiliserer ladningen på morforbindelsen. Et farmasøytisk akseptabelt salt kan videre ha mer enn ett ladet atom i sin struktur. Tilfeller hvor flere ladde atomer er del av det farmasøytisk akseptable saltet kan ha motioner. Et farmasøytisk akseptabelt salt kan således ha ett eller flere ladde atomer og/eller ett eller multiple motioner.

"Farmasøytisk akseptabelt solvat" eller "solvat" betyr en assosiasjon av ett eller flere løsemiddelmolekyler og en forbindelse ifølge oppfinnelsen, *f.eks.* et legemiddellinkerligandkonjugat eller en legemiddellinkerforbindelse. Eksempel på løsemiddel som danner farmasøytisk akseptable solvater inkluderer, men er ikke begrenset til, vann, isopropanol, etanol, metanol, DMSO, etylacetat, eddiksyre og etanolamin.

Følgende forkortelser anvendes heri og har de angitte definisjonene: Boc er *N*-(*t*-butoksykarbonyl), cit er citrullin, dap er dolaproin, DCM er diklormetan, DIEA er *N,N*-diisopropyletylamin, dil er dolaisoleuin, DMF er *N,N*-dimetylformamid, DMSO er dimetylsulfoksid, doe er dolafenin, dov er *N,N*-dimetylvalin, DTNB er 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzosyre), DTPA er dietylentriaminpentaeddiksyre, DTT er ditiotreitol, Fmoc er *N*-(9-fluorenylmetylokdykarbonyl), gly er glysin, HATU er *O*-(7-azabenzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetrametyluronium heksafluorfosfat, HBTU er 2-[1H-benzotriazol-1-yl]-1,1,3,3-tetrametylaminium heksafluorfosfat; HOBt er 1-hydroxybenzotriazol, HPLC er høytrykksvæskeskromatografi, ile er isoleucin, lys er lysin, MeOH er metanol, MeVal er *N*-metyl-valin, PAB er *p*-aminobenzyl,

PBS er fosfatbufret saltløsning (pH 7.4), Ph er fenyl, phe er L-fenylalanin, PyBrop er brom *tris*-pyrrolidino fosfonium heksafluorofosfat, TFA er trifluoreddiksyre, UV er ultrafiolett og val er valin.

5 Følgende linkerforkortelser anvendes heri og har de angitte definisjonene: Val Cit eller vc er et valin-citrullin-dipeptidsted i proteasespaltbar linker; PABC er p-aminobenzylkarbamoyl; (Me)vc er N-metyl-valincitrullin, hvor linkerpeptidbindingen er modifisert for å forhindre dens spalting ved katepsin B; og MC(PEG)₆-OH er maleimidokaproyl-polyetylenglykol.

10

Følgende forkortelser for cytotoksiske legemiddel anvendes heri og har de angitte definisjonene: "Auristatin F" eller "AF" er N,N-dimetylvalin-valin-dolaisoleuin(dil)-dolaproin(dap)-fenylalanin. "MMAF" er N-metylvalin-valin-dolaisoleuin(dil)-dolaproin(dap)-fenylalanin (MW 731,5).

15

Forbindelser og konjugater

Som bemerket i Kort beskrivelse av oppfinnelsen angår den foreliggende oppfinnelsen en serie forbindelser og konjugater inneholdende en legemiddeldel (D) bundet til en linkerenhets via sin C-terminal. Linkerenheten kan operere for å

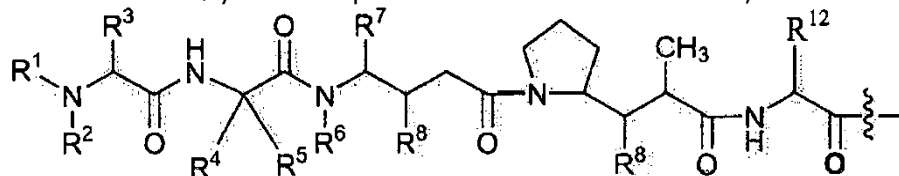
20 tilveiebringe en egnet frisetting av D.

Legemiddellinkerforbindelser med formel I beskrives heri:

LU-D (I)

25

eller et farmasøytisk akseptabelt salt eller solvat derav, hvori D har formelen:



hvori den bølgede linjen angir bindingen til en linkerenhets (LU);

R¹ og R² hver uavhengig er valgt fra gruppen bestående av -H og -C₁-C₈ alkyl, med forbehold om at både R¹ og R² ikke er -H;

30

R³ er valgt fra gruppen bestående av -H, -C₁-C₈ alkyl, -C₃-C₈ karbocyklus, aryl, -X¹-aryl, -X¹-(C₃-C₈ karbocyklus), -C₃-C₈ heterosyklus og -X¹-(C₃-C₈ heterosyklus);

R^4 er valgt fra gruppen bestående av -H, -C₁-C₈ alkyl, -C₃-C₈ karbosyklus, aryl, -X¹-aryl, -C₁-C₈ alkyl-(C₃-C₈ karbosyklus), -C₃-C₈ heterosyklus og -X¹-(C₃-C₈ heterosyklus);

R^5 er valgt fra gruppen bestående av -H og metyl;

5 eller R^4 og R^5 i fellesskap danner en karbosyklisk ring og har formelen $-(CR^aR^b)_n-$, hvori

R^a og R^b uavhengig er valgt fra gruppen bestående av -H og -C₁-C₈ alkyl, og n er valgt fra gruppen bestående av 2, 3, 4, 5 og 6;

R^6 er valgt fra gruppen bestående av -H og -C₁-C₈ alkyl;

10 R^7 er valgt fra gruppen bestående av -H, -C₁-C₈ alkyl, -C₃-C₈ karbosyklus, aryl, -X¹-aryl, -X¹-(C₃-C₈ karbosyklus), -C₃-C₈ heterosyklus og -X¹-(C₃-C₈ heterosyklus);

hver R^8 uavhengig er valgt fra gruppen bestående av -H, -OH, -C₁-C₈ alkyl, -C₃-C₈ karbosyklus og -O-(C₁-C₈ alkyl);

15 hver X^1 uavhengig er -C₁-C₁₀ alkylen-; og

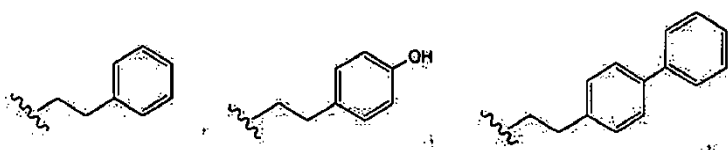
R^{12} er valgt fra gruppen bestående av -H, -C₁-C₈ alkyl, aryl, -X¹-aryl, -C₃-C₈ karbosyklus, -X¹-(C₃-C₈ heterosyklus), -C₁-C₈ alkylen-NH₂, -C₃-C₈ heterosyklus og -X¹-(C₃-C₈ heterosyklus);

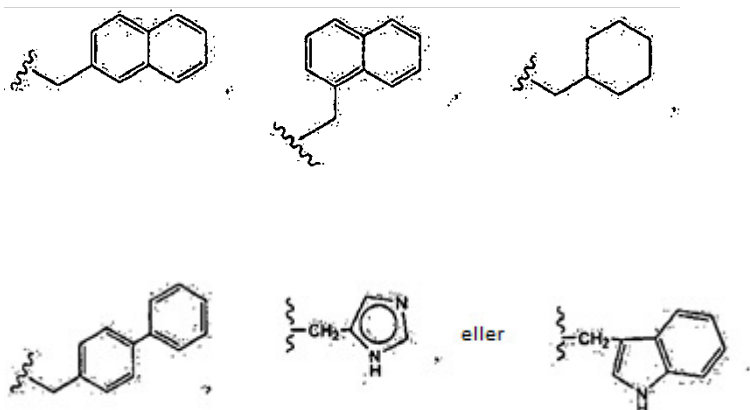
eller et farmasøytisk akseptabelt salt eller solvat derav.

20

I noen konjugater er R^{12} valgt fra gruppen bestående av sidekjeder av naturlige og ikke-naturlige aminosyrer.

I noen konjugater er R^{12} valgt fra gruppen bestående av H, metyl, isopropyl, 25 isobutyl, sec-butyl, benzyl, p-hydroksybenzyl, -CH₂OH, -CH(OH)CH₃, -CH₂CH₂SCH₃, -CH₂CONH₂, -CH₂COOH, -CH₂CH₂CONH₂, -CH₂CH₂COOH, -(CH₂)₃NHC(=NH)NH₂, -(CH₂)₃NH₂, -(CH₂)₃NHCOCH₃, -(CH₂)₃NHCHO, -(CH₂)₄NHC(=NH)NH₂, -(CH₂)₄NH₂, -(CH₂)₄NHCOCH₃, -(CH₂)₄NHCHO, -(CH₂)₃NHCONH₂, -(CH₂)₄NHCONH₂, -CH₂CH₂CH(OH)CH₂NH₂, 2-pyridylmetyl-, 30 pyridylmetyl-, 4-pyridylmetyl-, fenyl, sykloheksyl,





5

I noen konjugater er R^{12} valgt fra gruppen bestående av sidekjeder av naturlige og aminosyrer. R^{12} kan for eksempel være sidekjeden av fenylalanin, sidekjeden av metionin eller sidekjeden av tryptofan.

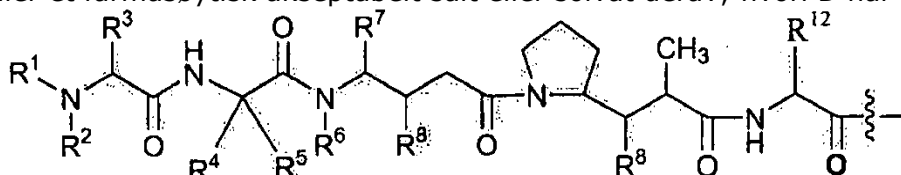
10

Det beskrives også legemiddellinkerforbindelser med formel I:

LU-D (I)

eller et farmasøytisk akseptabelt salt eller solvat derav; hvori D har formelen:

15



hvori den bølgede linjen angir bindingen til en linkerenheter (LU);

R^1 og R^2 hver uavhengig er valgt fra gruppen bestående av -H og $-C_1-C_8$ alkyl, med forbehold om at både R^1 og R^2 ikke er -H;

20

R^3 er valgt fra gruppen bestående av -H, $-C_1-C_8$ alkyl, $-C_3-C_8$ karbosyklus, aryl, $-C_1-C_8$ alkyl-aryl, $-X^1-(C_3-C_8$ karbosyklus), $-C_3-C_8$ heterosyklus og $-X^1-(C_3-C_8$ heterosyklus);

R^4 er valgt fra gruppen bestående av -H, $-C_1-C_8$ alkyl, $-C_3-C_8$ karbosyklus, aryl, $-X^1$ -aryl, $-C_1-C_8$ alkyl-(C_3-C_8 karbosyklus), $-C_3-C_8$ heterosyklus og $X^1-(C_3-C_8$ heterosyklus);

25

R^5 er valgt fra gruppen bestående av -H og metyl;

eller R^4 og R^5 i fellesskap danner en karbocyklisk ring og har formelen $-(CR^aR^b)_n-$, hvori

R^a og R^b uavhengig er valgt fra gruppen bestående av -H og $-C_1-C_8$ alkyl, og n er valgt fra gruppen bestående av 2, 3, 4, 5 og 6;

5 R^6 er valgt fra gruppen bestående av -H og $-C_1-C_8$ alkyl;

R^7 er valgt fra gruppen bestående av H, $-C_1-C_8$ alkyl, $-C_3-C_8$ karbocyklus, aryl, $-X^1$ -aryl, $-X^1-(C_3-C_8$ karbocyklus), $-C_3-C_8$ heterosyklus og $-X^1-(C_3-C_8$ heterosyklus);

10 hver R^8 uavhengig er valgt fra gruppen bestående av -H, -OH, $-C_1-C_8$ alkyl, $-C_3-C_8$ karbocyklus og $-O-(C_1-C_8$ alkyl);

R^{12} er valgt fra gruppen bestående av H, $-C_1-C_8$ alkyl, aryl, $-X^1$ aryl, $-C_3-C_8$ karbocyklus, $-X^1-(C_3-C_8$ karbocyklus), $-C_1-C_8$ alkylen- NH_2 , $-C_3-C_8$ heterosyklus og $-X^1-(C_3-C_8$ heterosyklus); og

hver X^1 uavhengig er $-C_1-C_{10}$ alkylen-;

15 delen LU- er en linkerenheter med formelen $-W_w-A_a$;

W_w er en sekvens av w -uavhengig valgte aminosyrediradikaler;

w er et heltall som spenner fra 1 til 12;

A er en stretcherenhet, og

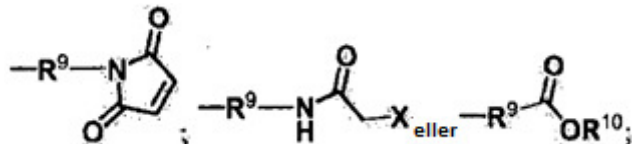
a er 1 eller 2;

20 eller et farmasøytisk akseptabelt salt eller solvat derav.

I noen konjugater er R^{12} en sidekjede av en naturlig aminosyre. I noen konjugater er R^{12} sidekjeden av fenylalanin, sidekjeden av metionin eller sidekjeden av tryptofan.

25

I noen konjugater er stretcherenheten A $-NH-R^9-R^{11}$ eller $-O-R^9-R^{11}$, hvori $-R^9-R^{11}$ har formelen:



30 hvori R^9 kan være valgt fra gruppen bestående av $-C_1-C_{10}$ alkylen-, $-C_3-C_8$ karbocyklo-, -arylen-, $-C_1-C_{30}$ heteroalkylen-, $-C_3-C_8$ heterosyklo-, $-C_1-C_{10}$ alkylen-arylen-, -arylen- $-C_1-C_{10}$ alkylen-, $-C_1-C_{10}$ alkylen- $(C_3-C_8$ karbocyklo)-, -

(C₃-C₈ karbosyklo)-C₁-C₁₀ alkylen-, -C₁-C₁₀ alkylen-(C₃-C₈ heterosyklo)- og - (C₃-C₈ heterosyklo)-C₁-C₁₀ alkylen-;

hvor X er en forlatende gruppe; og

- 5 hver R¹⁰ danner en aktivert ester, hvor R¹⁰ uavhengig er valgt fra gruppen bestående av H, -C₁-C₁₀alkyl, -C₃-C₈ karbosyklus, -aryl, -C₁-C₃₀ heteroalkyl, -C₃-C₈ heterosyklo, -C₁-C₁₀alkylen-aryl, -arylen-C₁-C₁₀alkyl, -C₁-C₁₀ alkylen-(C₃-C₈ karbosyklo), -(C₃-C₈ karbosyklo)-C₁-C₁₀ alkyl, -C₁-C₁₀ alkylen-(C₃-C₈ heterosyklo) og -(C₃-C₈ heterosyklo)-C₁-C₁₀ alkyl.

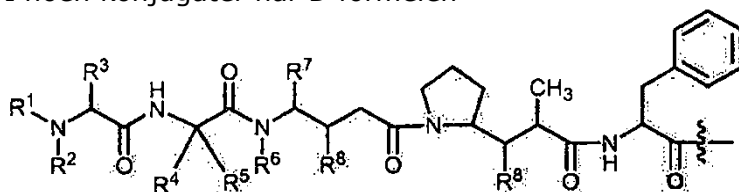
- 10 I noen eksempel på stretcherenheten A er -NH-R⁹- valgt fra -NH-C₁-C₁₀ alkylen-, -NH-C₁-C₁₀ alkylen-NH-C(O)-C₁-C₁₀ alkylen-, -NH-C₁-C₁₀ alkylen-C(O)-NH-C₁-C₁₀ alkylen-, -NH-(CH₂CH₂O)_r-, -NH-(CH₂CH₂O)_r-CH₂-, -NH-(CH₂CH₂NH)_r-(CH₂)_r-, -NH-(CH₂CH₂NH)_r-(CH₂)_r-NH-C(O)-(CH₂)_r-, -NH-(C₃-C₈ karbosyklo)-, -NH-(arylen)- og -NH-(C₃-C₈ heterosyklo)-, hvor hver r uavhengig er 1-10.

- 15 I noen eksempel på stretcherenheten A er -O-R⁹- valgt fra -O-C₁-C₁₀ alkylen-, -O-C₁-C₁₀ alkylen-NH-C(O)-C₁-C₁₀ alkylen-, -O-C₁-C₁₀ alkylen-C(O)-NH-C₁-C₁₀ alkylen-, -O-(CH₂CH₂O)_r-, O-(CH₂CH₂O)_r-CH₂-, -O-(C₃-C₈ karbosyklo)-, -O-(arylen)- og -O-(C₃-C₈ heterosyklo)-, hvor hver r uavhengig er 1-10.

- 20 Når stretcherenheten A er -O-R⁹-R¹¹-, kan esteren være en hindret ester.

I noen konjugater er R⁹ et polyamin.

- 25 I noen konjugater har D formelen

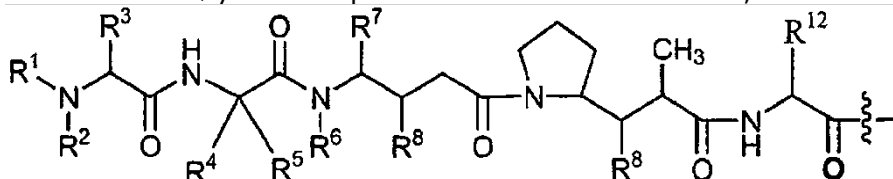


hvor R¹-R⁸ er som fremsatt over.

- 30 Det beskrives i en beslektet redegjørelse heri legemiddellinkerligandkonjugater der legemiddellinkerforbindelsene ytterligere omfatter en ligandenhet (L), der konjugatene har formelen (II).



eller et farmasøytisk akseptabelt salt eller solvat derav; hvori D har formelen:



hvori den bølgede linjen angir bindingen til en linkerenheter (LU);

5 R^1 og R^2 uavhengig er valgt fra gruppen bestående av -H og -C₁-C₈ alkyl, med forbehold om at både R^1 og R^2 ikke er -H;

R^3 er valgt fra gruppen bestående av -H, -C₁-C₈ alkyl, -C₃-C₈ karbocyklus, aryl, -C₁-C₈ alkyl-aryl, -X¹-(C₃-C₈ karbocyklus), -C₃-C₈ heterosyklus og -X¹-(C₃-C₈ heterosyklus);

10 R^4 er valgt fra gruppen bestående av -H, -C₁-C₈ alkyl, -C₃-C₈ karbocyklus, aryl, -X¹-aryl, -C₁-C₈ alkyl-(C₃-C₈ karbocyklus), -C₃-C₈ heterosyklus og X¹-(C₃-C₈ heterosyklus);

R^5 er valgt fra gruppen bestående av -H og metyl;

eller R^4 og R^5 i fellesskap danner en karbocyklisk ring og har formelen -(CR^aR^b)_n, hvori

15 R^a og R^b uavhengig er valgt fra gruppen bestående av -H og -C₁-C₈ alkyl, og n er valgt fra gruppen bestående av 2, 3, 4, 5 og 6;

R^6 er valgt fra gruppen bestående av -H og -C₁-C₈ alkyl;

20 R^7 er valgt fra gruppen bestående av -H, -C₁-C₈ alkyl, -C₃-C₈ karbocyklus, aryl, -X¹-aryl, -X¹-(C₃-C₈ karbocyklus), -C₃-C₈ heterosyklus og -X¹-(C₃-C₈ heterosyklus);

hver R^8 uavhengig er valgt fra gruppen bestående av -H, -OH, -C₁-C₈ alkyl, -C₃-C₈ karbocyklus og -O-(C₁-C₈ alkyl);

hver X¹ uavhengig er -C₁-C₁₀ alkylen-;

25 R^{12} er valgt fra gruppen bestående av -H, -C₁-C₈ alkyl, aryl, -X¹-aryl, -C₃-C₈ karbocyklus, -X¹-(C₃-C₈ heterosyklus), -C₁-C₈ alkylen-NH₂, -C₃-C₈ heterosyklus og -X¹-(C₃-C₈ heterosyklus);

delen LU- er en linkerenheter med formelen -W_w-A_a-;

W_w er en sekvens av w-uavhengig valgte aminosyrediradikaler;

w er et heltall som spanner fra 1 til 12;

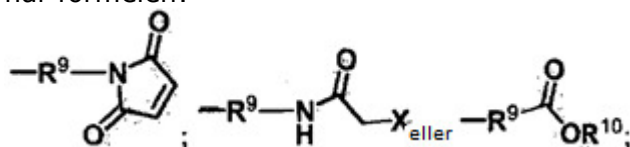
30 A er en stretcherenhet

a er 1 eller 2; og

p er et heltall fra 1 til 20;

eller et farmasøytisk akseptabelt salt eller solvat derav.

- 5 I noen konjugater er stretcherenheten A $\text{-NH-R}^9\text{-R}^{11}$ eller $\text{-O-R}^9\text{-R}^{11}$, hvori $\text{-R}^9\text{-R}^{11}$ har formelen:



- 10 hvori R^9 kan være valgt fra gruppen bestående av $\text{-C}_1\text{-C}_{10}$ alkyl-, $\text{-C}_3\text{-C}_8$ karbosyklo-, -arylen-, $\text{-C}_1\text{-C}_{30}$ heteroalkyl-, $\text{-C}_3\text{-C}_8$ heterosyklo-, $\text{-C}_1\text{-C}_{10}$ alkyl-arylen-, -arylen- $\text{-C}_1\text{-C}_{10}$ alkyl-, $\text{-C}_1\text{-C}_{10}$ alkyl- $\text{-(C}_3\text{-C}_8$ karbosyklo)-, - $\text{-(C}_3\text{-C}_8$ karbosyklo)- $\text{-C}_1\text{-C}_{10}$ alkyl-, $\text{-C}_1\text{-C}_{10}$ alkyl- $\text{-(C}_3\text{-C}_8$ heterosyklo)- og $\text{-(C}_3\text{-C}_8$ heterosyklo)- $\text{-C}_1\text{-C}_{10}$ alkyl-;

hvori X er en forlatende gruppe; og

- 15 hver R^{10} danner en aktivert ester, hvori R^{10} uavhengig er valgt fra gruppen bestående av -H, $\text{-C}_1\text{-C}_{10}$ alkyl, $\text{-C}_3\text{-C}_8$ karbosyklus, aryl, $\text{-C}_1\text{-C}_{30}$ heteroalkyl, $\text{-C}_3\text{-C}_8$ heterosyklo, $\text{-C}_1\text{-C}_{10}$ alkyl-arylen, -arylen- $\text{-C}_1\text{-C}_{10}$ alkyl, $\text{-C}_1\text{-C}_{10}$ alkyl- $\text{-(C}_3\text{-C}_8$ karbosyklo), $\text{-(C}_3\text{-C}_8$ karbosyklo)- $\text{-C}_1\text{-C}_{10}$ alkyl, $\text{-C}_1\text{-C}_{10}$ alkyl- $\text{-(C}_3\text{-C}_8$ heterosyklo) og $\text{-(C}_3\text{-C}_8$ heterosyklo)- $\text{-C}_1\text{-C}_{10}$ alkyl.

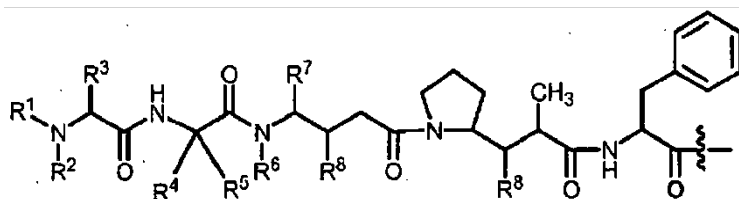
- 20 I noen eksempel på stretcherenheten A er $\text{-NH-R}^9\text{-}$ valgt fra $\text{-NH-C}_1\text{-C}_{10}$ alkyl-, $\text{-NH-C}_1\text{-C}_{10}$ alkyl-NH-C(O)- $\text{-C}_1\text{-C}_{10}$ alkyl-, $\text{-NH-C}_1\text{-C}_{10}$ alkyl-C(O)-NH- $\text{-C}_1\text{-C}_{10}$ alkyl-, $\text{-NH-(CH}_2\text{CH}_2\text{O)}_r\text{-}$, $\text{-NH-(CH}_2\text{CH}_2\text{O)}_r\text{-CH}_2\text{-}$, $\text{-NH-(CH}_2\text{CH}_2\text{NH)}_r\text{-(CH}_2\text{)}_r\text{-}$, $\text{-NH-(CH}_2\text{CH}_2\text{NH)}_r\text{-(CH}_2\text{)}_r\text{-NH-C(O)-(CH}_2\text{)}_r\text{-}$, $\text{-NH-(C}_3\text{-C}_8$ karbosyklo)-, -NH-(arylen)- og $\text{-NH-(C}_3\text{-C}_8$ heterosyklo)-, hvori hver r uavhengig er 1-10.

- 25 I noen eksempel på stretcherenheten A er $\text{-O-R}^9\text{-}$ valgt fra $\text{-O-C}_1\text{-C}_{10}$ alkyl-, $\text{-O-C}_1\text{-C}_{10}$ alkyl-NH-C(O)- $\text{-C}_1\text{-C}_{10}$ alkyl-, $\text{-O-C}_1\text{-C}_{10}$ alkyl-C(O)-NH- $\text{-C}_1\text{-C}_{10}$ alkyl-, $\text{-O-(CH}_2\text{CH}_2\text{O)}_r\text{-}$, $\text{-O-(CH}_2\text{CH}_2\text{O)}_r\text{-CH}_2\text{-}$, $\text{-O-(C}_3\text{-C}_8$ karbosyklo)-, -O-(arylen)- og $\text{-O-(C}_3\text{-C}_8$ heterosyklo)-, hvori hver r uavhengig er 1-10.

30

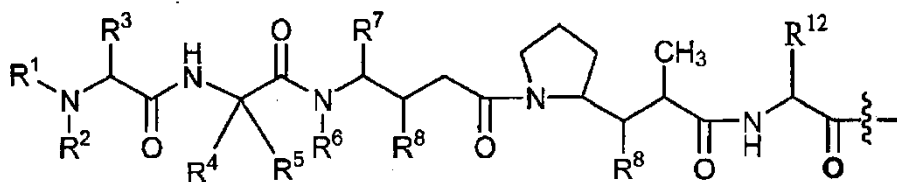
Når stretcherenheten A er $\text{-O-R}^9\text{-R}^{11}$, kan esteren være en hindret ester.

I noen konjugater med formel I eller II, har D formelen

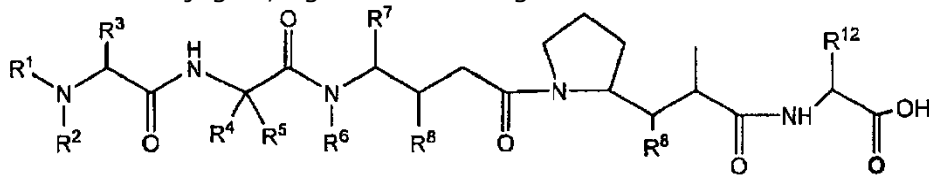


eller et farmasøytisk akseptabelt salt eller solvat derav, hvori R¹- R⁸ er som fremsatt heri.

- 5 Legemiddellinkerligandkonjugater og legemiddellinkerforbindelser inkluderer også legemiddellinkerligandkonjugater og legemiddellinkerforbindelser hvori D har formelen:



når de er konjugert; og som et fritt legemiddel har D formelen:



eller et farmasøytisk akseptabelt salt eller solvat derav, hvori for begge formler:

(a) R¹ og R² uavhengig er valgt fra gruppen bestående av -H og -C₁-C₈ alkyl, med forbehold om at både R¹ og R² ikke er -H;

(b) R¹ og R² uavhengig er valgt fra gruppen bestående av -H og -C₁-C₈ usubstituert alkyl, med forbehold om at både R¹ og R² ikke er -H;

(c) R¹ og R² uavhengig er valgt fra gruppen bestående av -H og metyl, med forbehold om at både R¹ og R² ikke er -H;

(d) R³ er valgt fra gruppen bestående av -H, -C₁-C₈ alkyl, -C₃-C₈ karbocyklus, aryl, -X¹-aryl, -X¹-(C₃-C₈ karbocyklus), -C₃-C₈ heterosyklus og -X¹-(C₃-C₈ heterosyklus);

(e) R³ er valgt fra gruppen bestående av -H eller -C₁-C₈ alkyl;

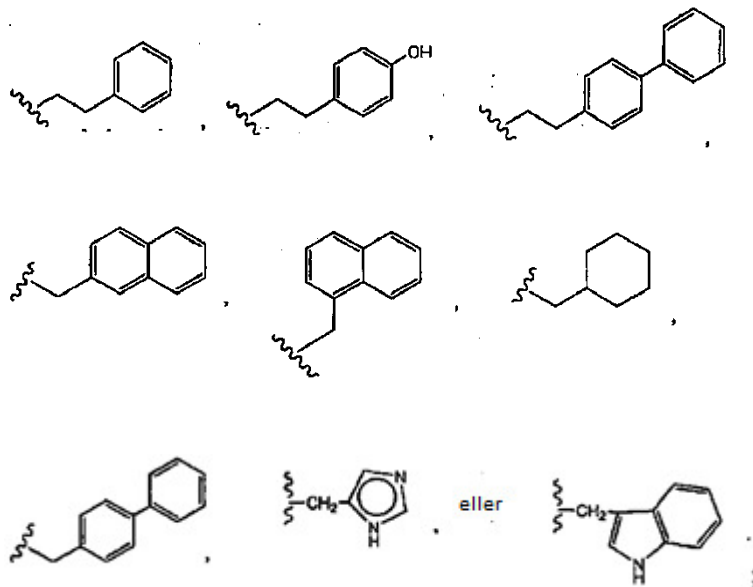
(f) R³ er valgt fra gruppen bestående av -H eller usubstituert -C₁-C₈ alkyl;

(g) R³ er valgt fra gruppen bestående av -H eller isopropyl;

(h) R⁴ er valgt fra gruppen bestående av -H, -C₁-C₈ alkyl, -C₃-C₈ karbocyklus, aryl, -X¹-aryl, -C₁-C₈ alkyl-(C₃-C₈ karbocyklus), -C₃-C₈ heterosyklus og -X¹-(C₃-C₈ heterosyklus);

(i) R^4 er en sidekjede av en naturlig aminosyre;

(j) R^4 er -H, metyl, isopropyl, isobutyl, sec-butyl, benzyl, p-hydroksybenzyl, -CH₂OH, -CH(OH)CH₃, -CH₂CH₂SCH₃, -CH₂CONH₂, -CH₂COOH, -CH₂CH₂CONH₂, -CH₂CH₂COOH, -(CH₂)₃NHC(=NH)NH₂, -(CH₂)₃NH₂, -(CH₂)₃NHCOCH₃, -(CH₂)₃NHCHO, -(CH₂)₄NHC(=NH)NH₂, -(CH₂)₄NH₂, -(CH₂)₄NHCOCH₃, -(CH₂)₄NHCHO, -(CH₂)₃NHCONH₂, -(CH₂)₄NHCONH₂, -CH₂CH₂CH(OH)CH₂NH₂, 2-pyridylmetyl-, 3-pyridylmetyl-, 4-pyridylmetyl-, fenyl, sykloheksyl,



(k) R^4 er isopropyl og R^5 er -H;

(l) eller R^4 og R^5 i fellesskap danner en karbocyklisk ring og har formelen - $(CR^aR^b)_n$ -, hvori R^a og R^b uavhengig er valgt fra gruppen bestående av -H og -C₁-C₈ alkyl, og n er valgt fra gruppen bestående av 2, 3, 4, 5 og 6;

(m) R^6 er valgt fra gruppen bestående av -H og -C₁-C₈ alkyl;

(n) R^6 er valgt fra gruppen bestående av -H og usubstituert -C₁-C₈ alkyl;

(o) R^6 er valgt fra gruppen bestående av -H og metyl;

(p) R^7 er valgt fra gruppen bestående av -H, -C₁-C₈ alkyl, -C₃-C₈ karbocyklus, aryl, -X¹-aryl, -X¹-(C₃-C₈ karbocyklus), -C₃-C₈ heterosyklus og -X¹-(C₃-C₈ heterosyklus);

(q) R^7 er valgt fra gruppen bestående av -H og -C₁-C₈ alkyl;

(r) R^7 er valgt fra gruppen bestående av -H og usubstituert -C₁-C₈ alkyl;

(s) R^7 er valgt fra gruppen bestående av -H og sec-butyl;

(t) hver R^8 uavhengig er valgt fra gruppen bestående av -H, -OH, -C₁-C₈ alkyl, -C₃-C₈ karbocyklus og -O-(C₁-C₈ alkyl);

(u) hver R^8 uavhengig er valgt fra gruppen bestående av -H og -O-(C_1 - C_8 alkyl);

(v) hver R^8 uavhengig er valgt fra gruppen bestående av -H og usubstituert -O-(C_1 - C_8 alkyl);

5

(w) hver R^8 uavhengig er valgt fra gruppen bestående av -H og usubstituert -OCH₃;

(x) hver X^1 uavhengig er - C_1 - C_{10} alkylen-;

(y) hver X^1 uavhengig er usubstituert - C_1 - C_{10} alkylen-;

10

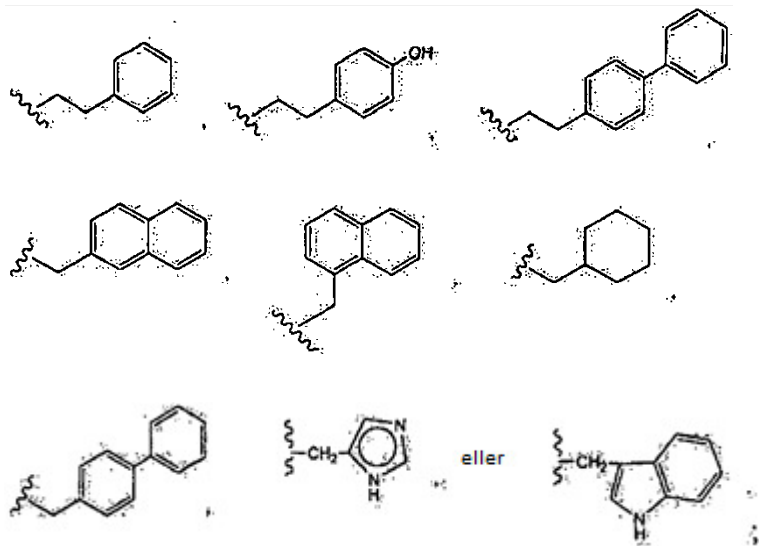
(z) R^{12} er valgt fra gruppen bestående av -H, - C_1 - C_8 alkyl, aryl, - X^1 aryl, - C_3 - C_8 karbosyklus, - X^1 -(C_3 - C_8 heterosyklus), - C_1 - C_8 alkylen-NH₂, - C_3 - C_8 heterosyklus og - X^1 -(C_3 - C_8 heterosyklus);

(aa) R^{12} er en sidekjede av en naturlig aminosyre;

15

(bb) R^{12} er H, metyl, isopropyl, isobutyl, sec-butyl, benzyl, p-hydroksybenzyl, -CH₂OH, -CH(OH)CH₃, -CH₂CH₂SCH₃, -CH₂CONH₂, -CH₂COOH, -CH₂CH₂CONH₂, -CH₂CH₂COOH, -(CH₂)₃NHC(=NH)NH₂, -(CH₂)₃NH₂, -(CH₂)₃NHCOCH₃, -(CH₂)₃NHCHO, -(CH₂)₄NHC(=NH)NH₂, -(CH₂)₄NH₂, -(CH₂)₄NHCOCH₃, -(CH₂)₄NHCHO, -(CH₂)₃NHCONH₂, -(CH₂)₄NHCONH₂, -CH₂CH₂CH(OH)CH₂NH₂, 2-pyridylmetyl-, 3-pyridylmetyl-, 4-pyridylmetyl-, fenyl, sykloheksyl,

20



25

og hvilken som helst kombinasjon av (a) til (bb), så sant det er underforstått at kombinasjoner der forskjellige eksempel på den samme kombinasjonen ville bli kombinert, er utelukket. I et eksempel på et konjugat er alkylgruppene i gruppene (a) til (bb) umettede.

I eksempel på konjugater er R^5 -H, og R^4 og R^{12} er uavhengig en sidekjede av en naturlig aminosyre, og de resterende gruppene er som angitt heri.

5 I eksempel på konjugater er R^3 -H eller $-C_1-C_8$ alkyl, R^4 er en sidekjede av en naturlig aminosyre, R^7 er -H eller $-C_1-C_8$ alkyl, og R^8 er $-O-(C_1-C_8$ alkyl), og de resterende gruppene er som angitt heri.

10 I eksempel på konjugater er R^3 -H eller $-C_1-C_8$ alkyl, R^4 er $-CH_2CH_2SCH_3$, $-CH_2CONH_2$, $-CH_2COOH$, $-CH_2CH_2CONH_2$, $-CH_2CH_2COOH$, $-(CH_2)_3NHC(=NH)NH_2$, $-(CH_2)_3NH_2$, $-(CH_2)_3NHCOCH_3$, $-(CH_2)_3NHCHO$, $-(CH_2)_4NHC(=NH)NH_2$, $-(CH_2)_4NH_2$, $-(CH_2)_4NHCOCH_3$, $-(CH_2)_4NHCHO$, $-(CH_2)_3NHCONH_2$, $-(CH_2)_4NHCONH_2$, $-CH_2CH_2CH(OH)CH_2NH_2$, R^7 er -H eller $-C_1-C_8$ alkyl, og R^8 er $-O-(C_1-C_8$ alkyl), og de resterende gruppene er som angitt heri.

15 I eksempel på konjugater er R^3 -H eller $-C_1-C_8$ alkyl, R^4 er $-CH_2CH_2SCH_3$, $-CH_2CONH_2$, $-CH_2COOH$, $-CH_2CH_2CONH_2$, $-CH_2CH_2COOH$, $-(CH_2)_3NHC(=NH)NH_2$, $-(CH_2)_3NH_2$, $-(CH_2)_3NHCOCH_3$, $-(CH_2)_3NHCHO$, $-(CH_2)_4NHC(=NH)NH_2$, $-(CH_2)_4NH_2$, $-(CH_2)_4NHCOCH_3$, $-(CH_2)_4NHCHO$, $-(CH_2)_3NHCONH_2$, $-(CH_2)_4NHCONH_2$, $-CH_2CH_2CH(OH)CH_2NH_2$, R^7 is -H or $-C_1-C_8$ alkyl, R^8 er $-O-(C_1-C_8$ alkyl), R^{12} er en sidekjede av en naturlig aminosyre, og de resterende gruppene er som angitt heri.

20

25 I eksempel på konjugater er R^3 -H eller $-C_1-C_8$ alkyl, R^4 er $-CH_2CH_2SCH_3$, $-CH_2CONH_2$, $-CH_2COOH$, $-CH_2CH_2CONH_2$, $-CH_2CH_2COOH$, $-(CH_2)_3NHC(=NH)NH_2$, $-(CH_2)_3NH_2$, $-(CH_2)_3NHCOCH_3$, $-(CH_2)_3NHCHO$, $-(CH_2)_4NHC(=NH)NH_2$, $-(CH_2)_4NH_2$, $-(CH_2)_4NHCOCH_3$, $-(CH_2)_4NHCHO$, $-(CH_2)_3NHCONH_2$, $-(CH_2)_4NHCONH_2$, $-CH_2CH_2CH(OH)CH_2NH_2$, R^7 er -H eller $-C_1-C_8$ alkyl, R^8 er $-O-(C_1-C_8$ alkyl), R^{12} er sidekjeden av fenylalanin, metionin eller tryptofan, og de resterende gruppene er som angitt heri.

30 I eksempel på konjugater er R^3 -H eller $-C_1-C_8$ alkyl, R^4 er $-CH_2CH_2SCH_3$ eller $-CH_2CH(CH_3)CH_3$, R^7 er -H eller $-C_1-C_8$ alkyl, og R^8 er $-O-(C_1-C_8$ alkyl), og de resterende gruppene er som angitt heri.

35 I eksempel på konjugater er R^3 -H eller $-C_1-C_8$ alkyl, R^4 er $-CH_2CH_2SCH_3$ eller $-CH_2CH(CH_3)CH_3$, R^7 er -H eller $-C_1-C_8$ alkyl, R^8 er $-O-(C_1-C_8$ alkyl), R^{12} er en

sidekjede av en naturlig aminosyre, og de resterende gruppene er som angitt heri.

5 I eksempel på konjugater er R^3 -H eller $-C_1-C_8$ alkyl, R^4 er $-CH_2CH_2SCH_3$ eller $-CH_2CH(CH_3)CH_3$, R^7 er -H eller $-C_1-C_8$ alkyl, R^8 er $-O-(C_1-C_8$ alkyl), R^{12} er sidekjeden av fenylalanin, metionin eller tryptofan, og de resterende gruppene er som angitt heri.

10 I eksempel på konjugater er R^3 -H eller $-C_1-C_8$ mettet alkyl, R^4 er en sidekjede av en naturlig aminosyre, R^6 er -H eller $-C_1-C_8$ mettet alkyl; R^7 er -H eller C_1-C_8 mettet alkyl, og R^8 er $-O-(C_1-C_8$ mettet alkyl), og de resterende gruppene er som angitt heri.

15 I eksempel på konjugater er R^3 -H eller $-C_1-C_8$ usubstituert mettet alkyl, R^4 er en sidekjede av en naturlig aminosyre, R^6 er -H eller $-C_1-C_8$ usubstituert mettet alkyl; R^7 er -H eller C_1-C_8 usubstituert mettet alkyl, og R^8 er $-O-(C_1-C_8$ usubstituert mettet alkyl), og de resterende gruppene er som angitt heri.

20 I eksempel på konjugater er R^1 og R^2 -H eller $-C_1-C_8$ usubstituert mettet alkyl med forbehold om at ikke begge er hydrogen, R^3 er -H eller $-C_1-C_8$ usubstituert mettet alkyl, R^4 er en sidekjede av en naturlig aminosyre, R^6 er -H eller $-C_1-C_8$ usubstituert mettet alkyl, R^7 er -H eller $-C_1-C_8$ usubstituert mettet alkyl, og R^8 er $-O-(C_1-C_8$ usubstituert mettet alkyl), og de resterende gruppene er som angitt heri.

25 I eksempel på konjugater er R^1 og R^2 -H eller $-C_1-C_8$ usubstituert mettet alkyl med forbehold om at ikke begge er hydrogen, R^3 er -H eller $-C_1-C_8$ usubstituert mettet alkyl, R^4 er en sidekjede av en naturlig aminosyre, R^6 er -H eller $-C_1-C_8$ usubstituert mettet alkyl, R^7 er -H eller $-C_1-C_8$ usubstituert mettet alkyl, R^8 er -
30 $O-(C_1-C_8$ usubstituert mettet alkyl); R^{12} er en sidekjede av en naturlig aminosyre, og de resterende gruppene er som angitt heri.

35 I eksempel på konjugater er R^1 og R^2 -H eller $-C_1-C_8$ usubstituert mettet alkyl med forbehold om at ikke begge er hydrogen, R^3 er -H eller $-C_1-C_8$ usubstituert mettet alkyl, R^4 er $-CH_2CH_2SCH_3$ eller $-CH_2CH(CH_3)CH_3$, R^6 er -H eller $-C_1-C_8$ usubstituert mettet alkyl, R^7 er -H eller $-C_1-C_8$ usubstituert mettet alkyl, R^8 er -

O-(C₁-C₈ usubstituert mettet alkyl); R¹² er sidekjeden av fenylalanin, metionin eller tryptofan, og de resterende gruppene er som angitt heri.

I eksempel på konjugater er R¹ og R² -H eller -C₁-C₃ usubstituert mettet alkyl med forbehold om at ikke begge er hydrogen, R³ er -C₁-C₄ usubstituert mettet alkyl, R⁴ er -CH₂CH₂SCH₃ eller -CH₂CH(CH₃)CH₃, R⁵ er -H, R⁶ er metyl, R⁷ er eller -C₁-C₄ usubstituert mettet alkyl, R⁸ er -O-(C₁-C₃ usubstituert mettet alkyl); R¹² er sidekjeden av fenylalanin, metionin eller tryptofan, og de resterende gruppene er som angitt heri.

10

I noen konjugater er R³, R⁴ og R⁷ uavhengig isopropyl eller sec-butyl, og R⁵ is -H. I et eksempel på et konjugat er R³ og R⁴ hver isopropyl, R⁵ er -H, og R⁷ er sec-butyl.

15

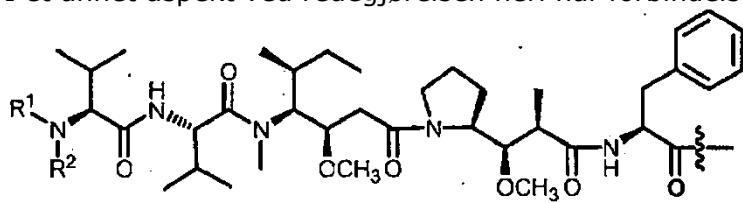
I noen eksempel er R² og R⁶ hver -H eller -C₁-C₈alkyl. I et annet eksempel er R² og R⁶ hver -CH₃, og R⁵ er -H.

I noen konjugater er hver forekomst av R⁸ -OCR₃.

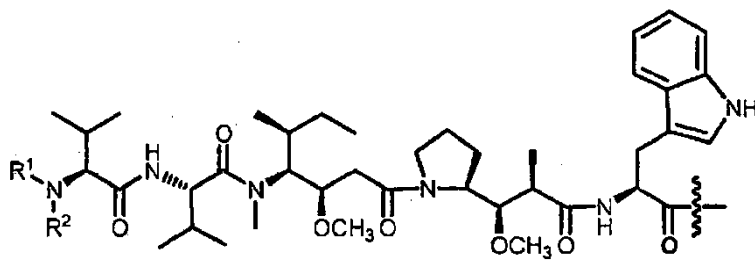
20

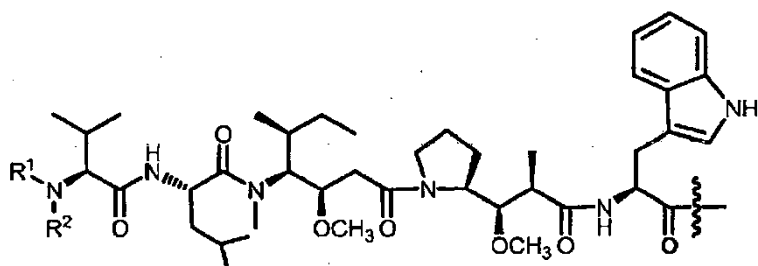
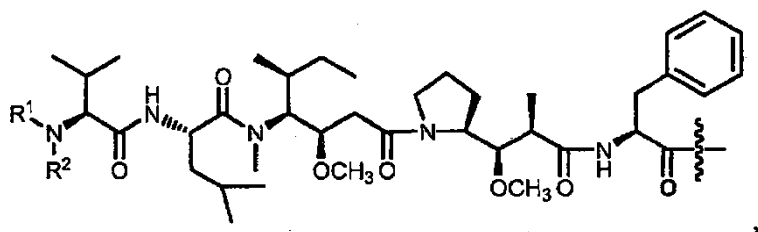
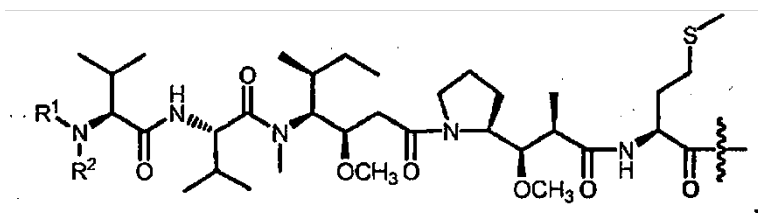
I et eksempelkonjugat er R³ og R⁴ hver isopropyl, R² og R⁶ er hver metyl, R⁵ er -H, R⁷ er sec-butyl, og hver forekomst av R⁸ er -OCH₃.

I et annet aspekt ved redegjørelsen heri har forbindelsen D følgende formel:

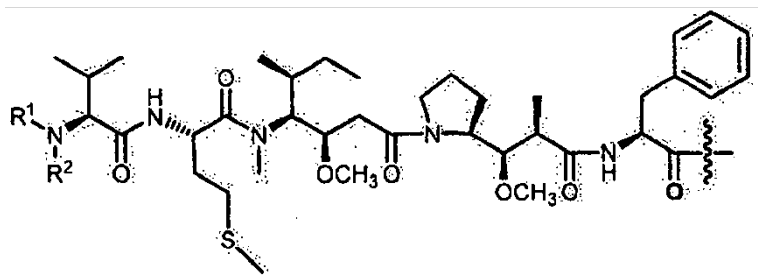
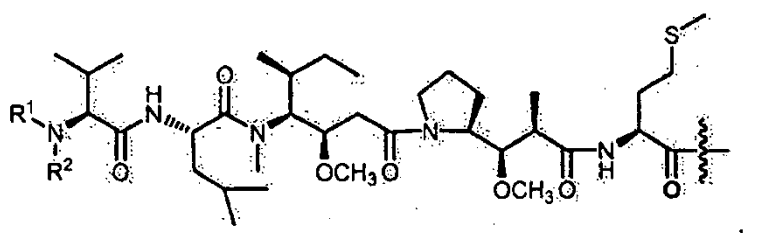


25

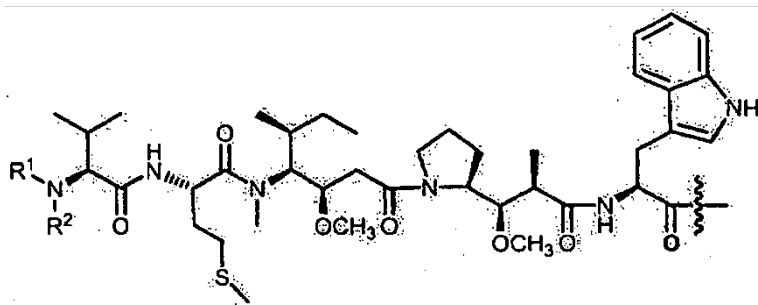




5

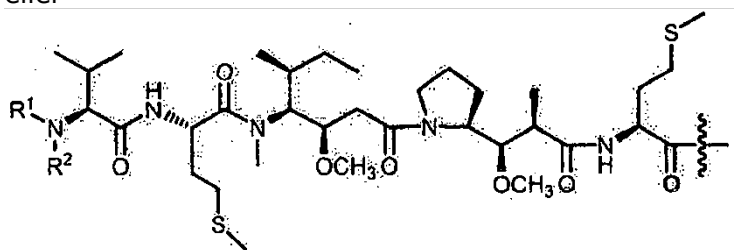


10



41

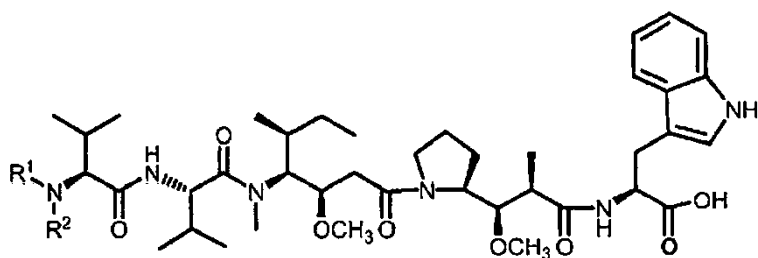
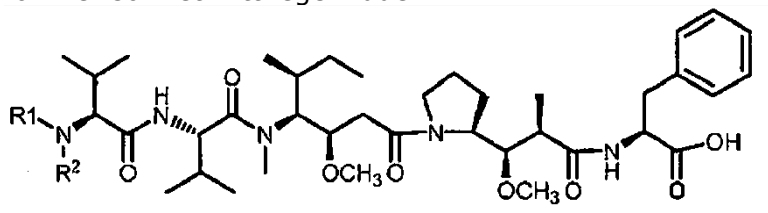
eller



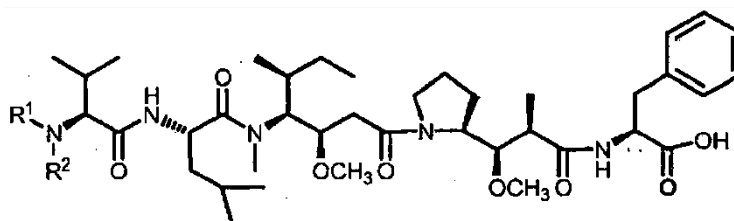
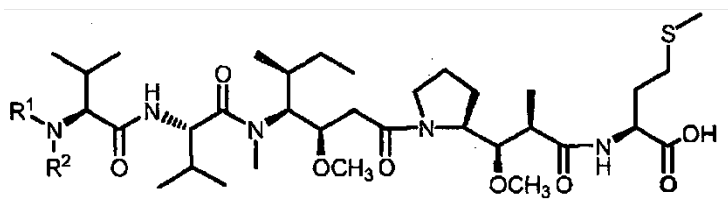
eller et farmasøytisk akseptabelt salt eller solvat derav, hvori den bølgede linjen angir en kovalent binding til linkerenheden (LU).

5

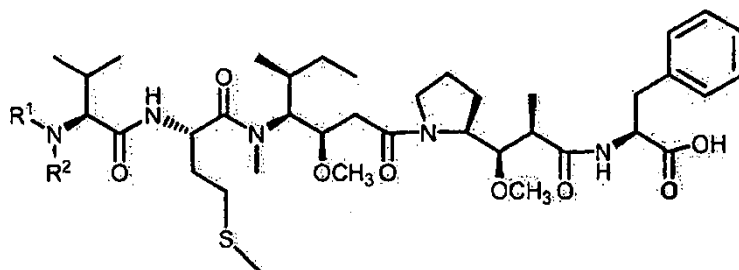
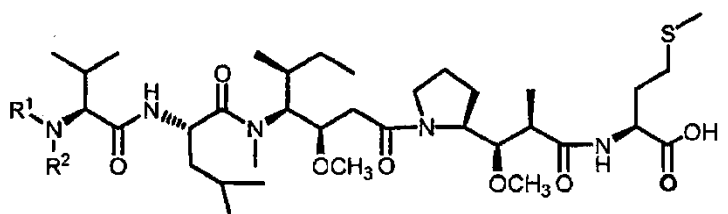
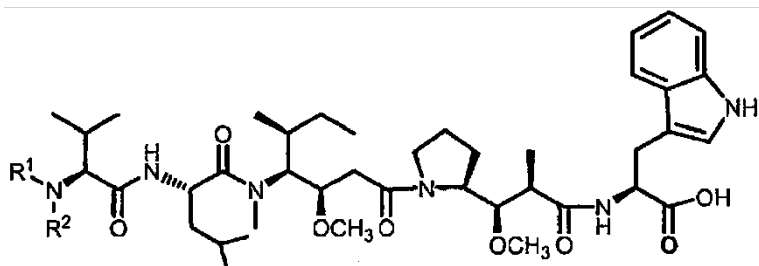
I et annet aspekt ved redegjørelsen heri har forbindelsen D én av følgende formler som et fritt legemiddel:



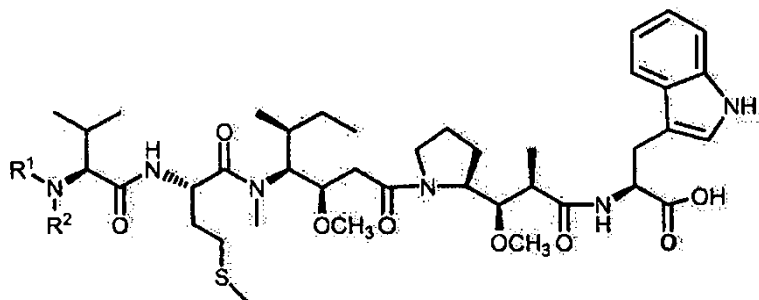
10



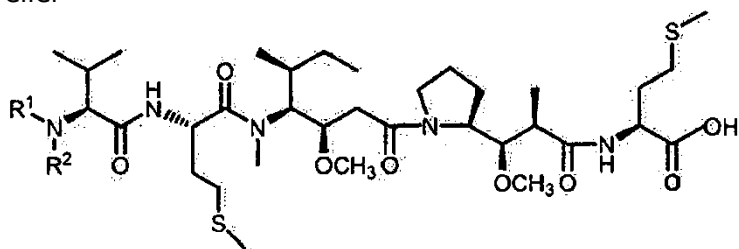
15



5



eller

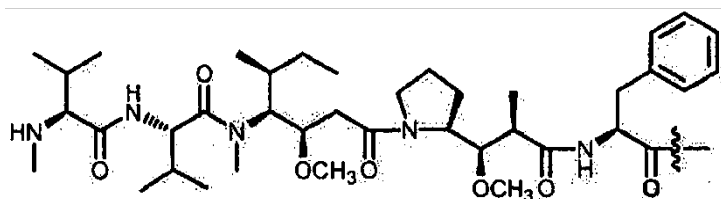


10

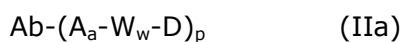
eller et farmasøytisk akseptabelt salt eller solvat derav.

Innenfor eksemplene over er hver R^1 og R^2 -H eller $-C_{1-8}$ alkyl, med forbehold om at ikke både R^1 og R^2 er -H. I en annen gruppe utførelsesformer er R^1 og R^2 - CH_3 .

I nok et annet eksempel har D formelen:



- 5 Det beskrives også legemiddellinkerligandkonjugater der liganden er et antistoff (f.eks. et intakt antistoff eller antistofffragment). I dette aspektet er konjugatene representert av formel **IIa**:

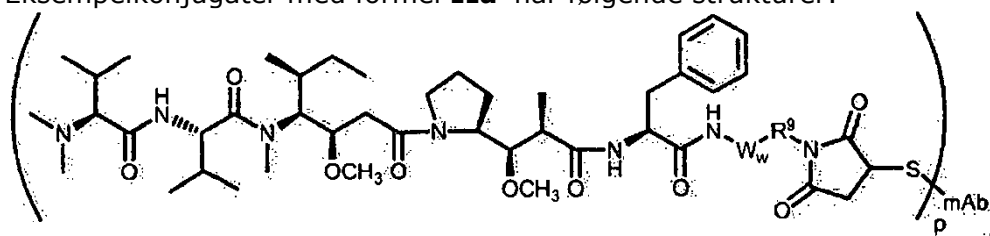


10

eller farmasøytisk akseptable salter eller solvater derav, hvori Ab er et antistoff, A er en stretcherenhet, a er 1 eller 2, hver W uavhengig er en aminosyreenhet, w er et heltall som spenner fra 1 til 12, p er et heltall fra 1 til omkring 20, og D er en legemiddeldel ifølge utførelsesformene over.

15

Eksempelkonjugater med formel **IIa'** har følgende strukturer:



Hvori NH-et tilgrensende W_w er en aminogruppe av en W.

20

Legemiddellasten er representert av p, det gjennomsnittlige antallet legemiddelmolekyler per ligand (f.eks. er antistoff) (f.eks. med formel **II**, **IIa**, **IIa'**). Legemiddellast kan spenne fra 1 til 20 legemiddelenheter (D) per ligandenhet (f.eks. Ab eller mAb). Sammensetninger med formel **IIa** og formel **IIa'** inkluderer blandinger av antistoff konjugert med en rekke legemiddel, fra 1

25

I noen eksempel er p fra omkring 1 til omkring 8 legemiddelenheter per ligandenhet. I noen eksempel er p 1. I noen eksempel er p fra omkring 2 til

omkring 8 legemiddelenheter per ligandenhet. I noen eksempel er p fra omkring 2 til omkring 6, 2 til omkring 5, eller 2 til omkring 4 legemiddelenheter per ligandenhet. I noen eksempel er p omkring 2, omkring 4, omkring 6 eller omkring 8 legemiddelenheter per ligandenhet.

5

Det gjennomsnittlige antallet legemiddelenheter per legemiddelenhet i et preparat fra en konjugeringsreaksjon kan karakteriseres ved konvensjonelle middel slik som massespektroskopi, ELISA-assay og HPLC. Den kvantitative fordelingen av legemiddellinkerligandkonjugater med hensyn til p kan også bestemmes. I noen tilfeller kan separasjon, rensing og karakterisering av

10

homogene legemiddellinkerligandkonjugater, hvor p er en viss verdi fra legemiddellinkerligandkonjugater med legemiddellaster, oppnås med middel slik omvendt fase-HPLC eller elektroforese.

15

Tilbake til formel **IIa'**, der konjugatene omfatter et antistoff kovalent bundet til én eller flere legemiddelenheter (-deler) via en linkerenheter: A, a, W og w er som beskrevet over. Antistofflegemiddelkonjugatet inkluderer farmasøytisk akseptable salter eller solvater derav.

20

Legemiddellasten er representert av p , det gjennomsnittlige antallet legemiddelenheter per ligand i et molekyl med formel II. Legemiddellast kan spenne fra 1 til 20 legemiddel (D) per antistoff (Ab eller mAb). Sammensetninger av ADC-et med formel **IIa'** inkluderer blandinger av antistoff konjugert med en rekke legemiddel, fra 1 til 20. I noen eksempel er p fra omkring 1 til omkring 8 legemiddelenheter per antistoff. I noen eksempel er p 1. I noen eksempel er p fra omkring 8 til omkring 8 legemiddelenheter per antistoff. I noen eksempel er p fra omkring 2 til omkring 6, 2 til omkring 5, eller 2 til omkring 4 legemiddelenheter per antistoff. I noen eksempel er p omkring 2, omkring 4, omkring 6 eller omkring 8 legemiddelenheter per antistoff.

25

30

Det gjennomsnittlige antallet legemiddel per antistoff i preparater av ADC-er fra konjugeringsreaksjoner kan karakteriseres ved konvensjonelle middel slik som UV-/synlig massespektroskopi, massespektrometri, ELISA-assay og HPLC. Den kvantitative fordelingen av ADC-er med hensyn til p kan også bestemmes. I noen tilfeller kan separasjon, rensing og karakterisering av homogene ADC-er, hvor p er en viss verdi fra ADC med andre legemiddellaster, oppnås med middel slik omvendt fase-HPLC eller elektroforese.

35

For noen antistofflegemiddelkonjugater kan p begrenses av antallet bindingssteder på antistoffet. Hvor bindingsstedet for eksempel er et cysteintiol, kan et antistoff kun ha én eller flere cysteintiolgrupper, eller kan ha kun én eller flere tilstrekkelig reaktive tiolgrupper gjennom hvilke en linkerenhets kan bindes. I noen eksempel er cysteintiolet en tiolgruppe av en cysteinrest som danner en interkjededisulfidbinding. I noen eksempel er cysteintiolet en tiolgruppe av en cysteinrest som ikke danner en interkjededisulfidbinding.

Det konjugeres typisk færre enn det teoretisk høyeste antallet legemiddelenheter til et antistoff under en konjugeringsreaksjon. Et antistoff kan for eksempel inneholde mange lysinrester som ikke reagerer med legemiddellinkerforbindelsesmellomproduktet eller linkerenhetsreagens. Bare de mest reaktive lysingruppene kan reagere med en aminreaktiv linkerenhetsreagens. Antistoff inneholder generelt ikke mange, om noen, frie og reaktive cysteintiolgrupper som kan bindes til en legemiddeldel via en linkerenhets. De fleste cysteintiolrestene i antistoffene eksisterer som disulfidbroer og må reduseres med et reduksjonsmiddel slik som ditiotreitol. Antistoffet kan utsettes for denatureringsbetingelser for å avsløre reaktive nukleofilgrupper, slik som lysin eller cystein. Lasten (legemiddel/antistoff-forhold) for et ADC kan kontrolleres på flere forskjellige måter, inkludert: i) begrensnings av moloverskuddet for legemiddellinkerforbindelsesmellomprodukt (D-L) eller linkerenhetsreagens i forhold til antistoff, ii) begrensnings av konjugeringsreaksjonstiden eller -temperaturen og iii) delvis eller begrensende reduktive forhold for cysteintiolmodifisering.

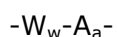
Hvor mer enn én nukleofil gruppe reagerer med et legemiddellinkerforbindelsesmellomprodukt eller en legemiddelenhetsreagens etterfulgt av legermiddeldelreagens, er det resulterende produktet en blanding av legemiddellinkerligandkonjugater (*f.eks.* ADC-er) med en fordeling av én eller flere legemiddeldeler per ligandenhet (*f.eks.* et antistoff). Det gjennomsnittlige antallet legemiddel per ligandenhet (*f.eks.* antistoff) kan for eksempel beregnes fra blandingen ved et dobbelt ELISA-antistoffassay, som er spesifikt for antistoff og spesifikt for legemiddelet. Individuelle legemiddellinkerligandkonjugatmolekyler kan identifiseres i blandingen ved massespektroskopi og separeres ved HPLC, *f.eks.* hydrofob interaksjonskromatografi ("Effect of drug loading on the pharmacology,

pharmacokinetics, and toxicity of an anti-CD30 antibody-drug conjugate", Hamblett, K.J., et al, Abstract No. 624, American Association for Cancer Research; Hamblett et al., 2004, Cancer Research 10:7063; 2004 Annual Meeting, 27.-31. mars 2004, Proceedings of the AACR, bind 45, mars 2004; "Controlling the Location of Drug Attachment in Antibody-Drug Conjugates", Alley, S.C., et al, Abstract No. 627, American Association for Cancer Research; 2004 Annual Meeting, 27.-31. mars 2004, Proceedings of the AACR, Volume 45, mars 2004). Et homogent konjugat med en enkelt lastverdi kan således isoleres fra konjugatblandingen ved elektroforese eller kromatografi.

Linkerenheten (LU)

En "linkerenhet" (LU) er en bifunksjonell forbindelse som kan anvendes for å binde en legemiddelenhet og en ligandenhet for å danne et legemiddellinkerligandkonjugat. Slike konjugater er for eksempel nyttige i dannelsen av immunkonjugater rettet mot tumorassosierte antigener. Noen konjugater tillater den selektive leveringen av cytotoksiske legemiddel til tumorceller.

I ett konjugat har linkerenheten til legemiddellinkerforbindelsen og legemiddellinkerligandkonjugatet formelen:



hvor $-A-$ er en stretcherenhet; a er 1 eller 2; hver $-W-$ uavhengig er en aminosyreenhet; w uavhengig er et heltall som spenner fra 1 til 12.

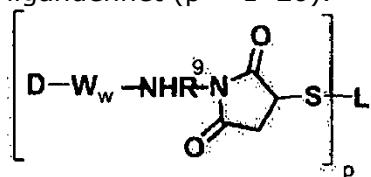
I legemiddellinkerligandkonjugatene tjener linkerenheten til å binde legemiddeldelen og ligandenheten.

Stretcherenheten

Stretcherenheten ($-A-$) er i stand til å binde en ligandenhet til en aminosyreenhet ($-W-$). I dette henseende har en ligand (L) en funksjonell gruppe som kan danne en binding med en funksjonell gruppe av en stretcherenhet. Nyttige funksjonelle grupper som kan være til stede på et

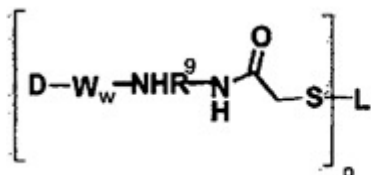
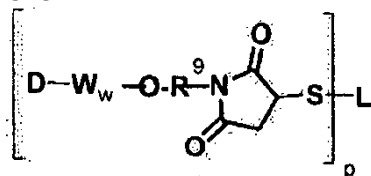
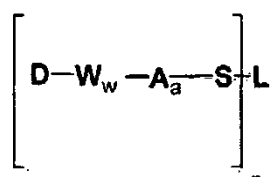
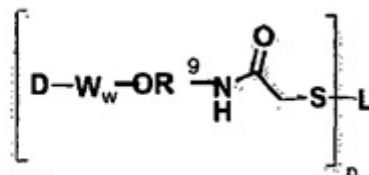
- ligandenhet, enten naturlig eller via kjemisk manipulering, inkluderer, men er ikke begrenset til, sulfhydryl (-SH), amino, hydroksyl, karboksy, den anomere hydroksylgruppen av et karbohydrat og karboksyl. Ligandenhetens funksjonelle grupper kan være sulfhydryl og amino. Sulfhydrylgrupper kan genereres ved reduksjon av en intramolekylær disulfidbinding av en ligandenhet. Sulfhydrylgrupper kan eventuelt genereres ved reaksjon av en aminogruppe av en lysindel av en ligandenhet ved anvendelse av 2-iminotiolan (Trauts reagens) eller en annen sulfhydrylgenererende reagens.
- I én mulighet er $a = 1$, og stretcherenheten danner en binding med aminosyreenheten. I en annen er $a = 2$, og én av stretcherenhetene danner en binding med aminosyreenheten.
- I noen konjugater danner stretcherenheten en binding med et svovelatom av ligandenheten. Svovelatomet kan være avledet fra en sulfhydrylgruppe av en ligandenhet. Representative stretcherenheter ifølge denne utførelsesformen er fremstilt innenfor hakeparentesen i formel **IIIa** og **IIIb**, hvori L-, -W-, -D, w og p er definert som over, og R^9 kan være valgt fra gruppen bestående av -C₁-C₁₀ alkyl-, -C₃-C₈ karbosyklo-, -arylen-, -C₁-C₃₀ heteroalkyl-, -C₃-C₈ heterosyklo-, -C₁-C₁₀ alkyl-arylen-, -arylen-C₁-C₁₀ alkyl-, -C₁-C₁₀ alkyl-, -C₃-C₈ karbosyklo-, -(C₃-C₈karbosyklo)-C₁-C₁₀alkyl-, -C₁-C₁₀ alkyl-(C₃-C₈ heterosyklo)-, og -(C₃-C₈ heterosyklo)-C₁-C₁₀ alkyl-;
- I noen eksempler på stretcherenheten A er -NH- R^9 - valgt fra -NH-C₁-C₁₀ alkyl-, -NH-C₁-C₁₀ alkyl-NH-C(O)-C₁-C₁₀ alkyl-, -NH-C₁-C₁₀ alkyl-C(O)-NH-C₁-C₁₀ alkyl-, -NH-(CH₂CH₂O)_r-, -NH-(CH₂CH₂O)_r-CH₂-, -NH-(CH₂CH₂NH)_r-(CH₂)_r-, -NH-(CH₂CH₂NH)_r-(CH₂)_r-NH-C(O)-(CH₂)_r-, -NH-(C₃-C₈ karbosyklo)-, -NH-(arylen)- og -NH-(C₃-C₈ heterosyklo)-, hvori hver r uavhengig er 1-10.
- I noen eksempler på stretcherenheten A er -O- R^9 - valgt fra -O-C₁-C₁₀ alkyl-, -O-C₁-C₁₀ alkyl-NH-C(O)-C₁-C₁₀ alkyl-, -O-C₁-C₁₀ alkyl-C(O)-NH-C₁-C₁₀ alkyl-, -O-(CH₂CH₂O)_r-, O-(CH₂CH₂O)_r-CH₂-, -O-(C₃-C₈ karbosyklo)-, -O-(arylen)- og -O-(C₃-C₈ heterosyklo)-, hvori hver r uavhengig er 1-10.
- Når stretcherenheten A er -O- R^9 - R^{11} -, kan esteren være en hindret ester.

Det skal forstås fra alle eksemplene med formel **II**, slik som **III-VI**, at selv hvor det ikke er uttrykkelig angitt, er fra 1 til 20 legemiddeldeler bundet til en ligandenhet ($p = 1-20$).

**IIIa;**

5

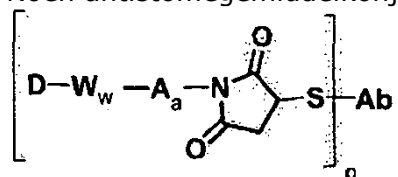
eller

**IIIb; eller****IIIc,**

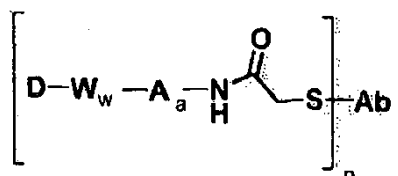
10

hvor S er ligandenhetens tiolgruppe.

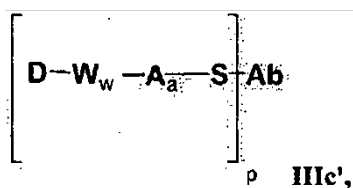
Noen antistofflegemiddelkonjugater inkluderer:

**IIIa';**

15

**IIIb';**

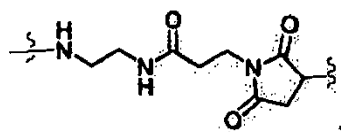
eller



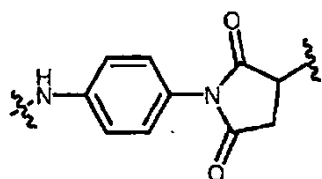
hvor S er ligandenhetens tiolgruppe.

5

En annen illustrerende stretcherenhet er den med formel **IIIa**, hvori R^9 er $\text{C}_1\text{-C}_{30}$ heteroalkylen, slik som følgende:

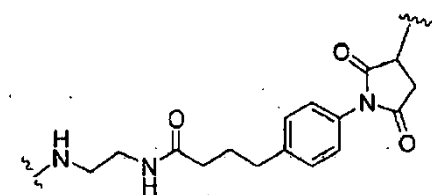


En annen illustrerende stretcherenhet er den med formel **IIIa**, hvori NH-R^9 er -
 $\text{NH- (C}_6\text{H}_4\text{)-}$:



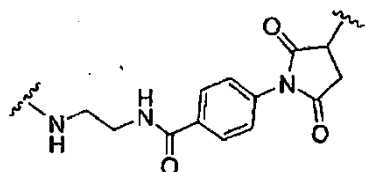
10

En annen illustrerende stretcherenhet har følgende formel:

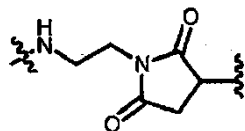


15

En annen illustrerende stretcherenhet er den med formel:

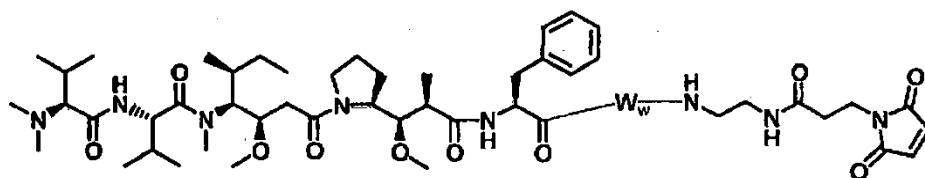


En annen illustrerende stretcherenhet er den med følgende formel, hvori R^9 er C_1 - C_{30} heteroalkylen med følgende formel:



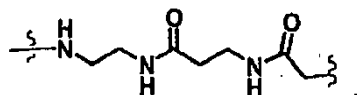
5

En annen illustrerende forbindelse er den som har formelen:



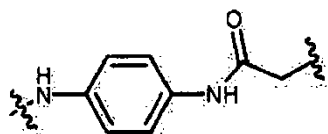
En annen illustrerende stretcherenhet er den med følgende formel **IIIb**, hvori R^9 er $-C_1$ - C_{30} heteroalkylen-:

10

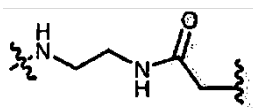


En annen illustrerende stretcherenhet er den med formel **IIIb**, hvori $NH-R^9$ er $-NH-(C_6H_4)-$:

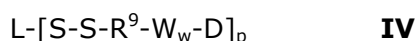
15



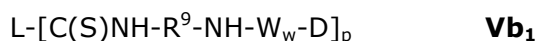
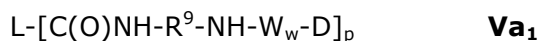
En annen illustrerende stretcherenhet er den med følgende formel **IIIb**, hvori R^9 er $-C_1$ - C_{30} heteroalkylen-:

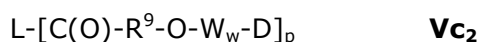
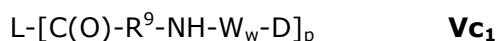


Stretcherenheten kan også være bundet til ligandenheten via en disulfidbinding mellom et svovelatom av ligandenheten og et svovelatom av stretcherenheten. En representativ stretcherenhet er fremstilt innenfor hakeparentesen til legemiddellinkerligandkonjugatet med formel **IV**, hvori R^9 , L-, -W-, -D, w og p er som definert over, og den venstre S-en er del av ligandenheten.

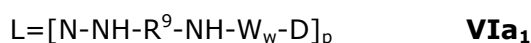


I nok et annet eksempel inneholder stretcherens reaktive gruppen et reaktivt sted som kan danne en binding med en primær eller sekundær aminogruppe av en ligandenhet. Eksempel på disse reaktive stedene inkluderer, men er ikke begrenset til, aktiverte estere slik som sukkinimidestere, 4-nitrofenylestere, pentafluorfenylestere, tetrafluorfenylestere, anhydrider, syreklorider, sulfonylklorider, isocyanater og isotiocyanater. Representative legemiddellinkerligandkonjugater er fremstilt med legemiddellinkerforbindelsene innenfor hakeparentesen i formler **Va - Vc**, hvori $-R^9$ -, L-, -W-, -D, w og p er som definert over og ligandenhetens reaktive sted ikke vises;

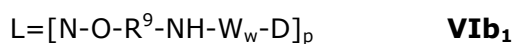
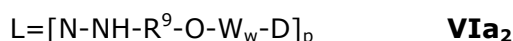




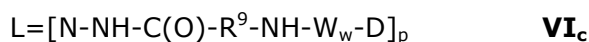
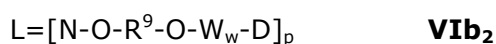
5 I nok et annet aspekt ved den foreliggende redegjørelsen inneholder
 stretcherens reaktive gruppe et reaktivt sted som er reaktivt overfor et
 modifisert karbohydrats (-CHO)-gruppe, som kan være til stede på en ligand. Et
 karbohydrat kan for eksempel oksideres noe ved anvendelse av en reagens slik
 som natriumperiodat, og den resulterende (-CHO)-gruppen av det oksiderte
 10 karbohydratet kan kondenseres med en stretcher som inneholder en
 funksjonalitet slik som et hydrazid, et oksim, et primært eller sekundært amin,
 et hydrazin, et tiosemikarbazon, et hydrazinkarboksylat og et arylhydrazid slik
 som de beskrevet av Kaneko et al. (1991) Bioconjugate Chem 2:133-41.
 Representative legemiddellinkerligandkonjugater er fremstilt med
 15 legemiddellinkerforbindelsene innenfor hakeparentesen i formler **VIa**, **VIb** og
VIc, hvori -R⁹-, L-, -W-, -Y-, -D, w og p er som definert over og ligandenhetens
 reaktive sted ikke vises.

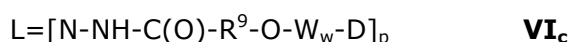


20



25





Aminosyreenheten

5

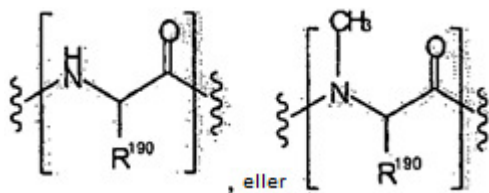
Aminosyreenheten (-W-) binder stretcherenheten til legemiddeldelen.

10

-W_w- er en aminosyre eller en dipeptid-, tripeptid-, tetrapeptid-, pentapeptid-, heksapeptid-, heptapeptid-, oktapeptid-, nonapeptid-, dekaeptid-, undekaeptid- eller dodekaeptidenhet. I noen eksempel er W_w en dipeptidradikal.

15

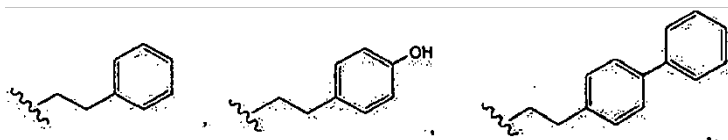
Hver aminosyre W kan være naturlig eller unaturlig. På lignende vis kan hver aminosyre være en D- eller L-isomer. I noen eksempel har hver -W--enhet uavhengig formelen angitt nedenfor i hakeparentesen, og w er et heltall som spenner fra 1 til 12:

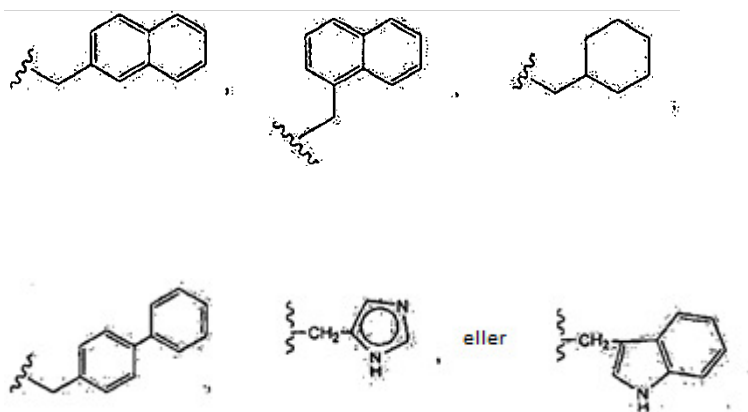


20

hvor R¹⁹⁰ er hydrogen, metyl, isopropyl, isobutyl, sec-butyl, benzyl, p-hydroksybenzyl, -CH₂OH, -CH(OH)CH₃, -CH₂CH₂SCH₃, -CH₂CONH₂, -CH₂COOH, -CH₂CH₂CONH₂, -CH₂CH₂COOH, -(CH₂)₃NHC(=NH)NH₂, -(CH₂)₃NH₂, -(CH₂)₃NHCOCH₃, -(CH₂)₃NHCHO, -(CH₂)₄NHC(=NH)NH₂, -(CH₂)₄NH₂, -(CH₂)₄NHCOCH₃, -(CH₂)₄NHCHO, -(CH₂)₃NHCONH₂, -(CH₂)₄NHCONH₂, -CH₂CH₂CH(OH)CH₂NH₂, 2-pyridylmetyl-, 3-pyridylmetyl-, 4-pyridylmetyl-, fenyl, sykloheksyl,

25





5 I et annet eksempel er hver -W--enhet uavhengig valgt fra gruppen bestående av følgende aminosyrer: alanin, arginin, asparaginsyre, asparagin, histidin, glysin, glutaminsyre, glutamin, fenylalanin, lysin, leucin, serin, tyrosin, treonin, isoleucin, prolin, tryptofan, valin, ornitin, penicillamin, β -alanin, aminoalkansyre, aminoalkynsyre (eng: aminoalkynoic acid), aminoalkanedionsyre (eng.:
10 aminoalkanedioic acid), aminobenzosyre, amino-heterosyklo-alkanoinsyre, heterosyklo-karboksylsyre, citrullin, statin, diaminoalkansyre og derivater derav.

I et annet eksempel er hver -W--enhet uavhengig valgt fra gruppen bestående av følgende L-(naturlige) aminosyrer: alanin, arginin, asparaginsyre, asparagin,
15 histidin, glysin, glutaminsyre, glutamin, fenylalanin, lysin, leucin, serin, tyrosin, treonin, isoleucin, tryptofan og valin.

I noen eksempel er -W- ikke cystein. I noen eksempel er -W- ikke prolin. I noen eksempel er -W- ikke en N-metylaminosyre.

20 I et annet eksempel er hver -W--enhet uavhengig valgt fra gruppen bestående av følgende D-isomerer av disse naturlige aminosyrene: alanin, arginin, asparaginsyre, asparagin, histidin, glysin, glutaminsyre, glutamin, fenylalanin, lysin, leucin, serin, tyrosin, treonin, isoleucin, tryptofan og valin. I noen
25 eksempel er aminosyreenheten (-W₁-) proksimalt for legemiddelenheten (D) ikke en D-aminosyre.

Illustrerende eksempel på alanin og derivater derav inkluderer, men er ikke begrenset til: alanin (Ala), N-alkyl-alanin, dehydro-alanin, 4-thiazolylalanin, 2-
30 pyridylalanin, 3-pyridylalanin, 4-pyridylalanin, β -(1-naftyl)-alanin, β -(2-naftyl)-alanin, α -aminosmørsyre, β -klor-alanin, β -cyano-alanin, β -syklopentyl-alanin, β -

sykloheksyl-alanin, β -jod-alanin, β -syklopentenyl-alanin, β -tBu-alanin, β -syklopropyl-alanin, β -difenyl-alanin, β -fluor-alanin, β -piperaziny-alanin med piperazinringen beskyttet eller ikke, β -(2-kinolyl)-alanin, β -(1,2,4-triazol-1-yl)-alanin, β -ureido-alanin, H- β -(3-benzotienyl)-Ala-OH og H- β -(2-tienyl)-Ala-OH.

5

Illustrerende eksempel på arginin og derivater derav inkluderer, men er ikke begrenset til: arginin (Arg), N-alkyl-arginin, H-Arg(Me)-OH, H-Arg(NH₂)-OH, H-Arg(NO₂)-OH, H-Arg(Ac)₂-OH, H-Arg(Me)₂-OH (asymmetrisk), H-Arg(Me)₂-OH (symmetrisk), 2-amino-4-(2'-hydroksyguanidino)-smørsyre (N- ω -hydroxy-nor-arginin) og homoarginin.

10

Illustrerende eksempel på asparaginsyre og derivater derav inkluderer, men er ikke begrenset til: asparaginsyre (Asp), N-alkyl-asparaginsyre og H-Asp(OtBu)-OH.

15

Illustrerende eksempel på asparagin og derivater derav inkluderer, men er ikke begrenset til: asparagin (Asn), N-alkyl-asparagin og isoasparagin (H-Asp-NH₂).

Illustrerende eksempel på cystein (Cys)-derivater (ikke inneholdende fri SH-gruppe) derav inkluderer, men er ikke begrenset til: H-Cys(Acm)-OH, H-Cys(Trt)-OH, H-Cys(tBu)-OH, H-Cys(Bzl)-OH, H-Cys(Et)-OH, H-Cys(SO₃H)-OH, H-Cys(aminoetyl)-OH, H-Cys(karbamoyl)-OH, H-Cys(fenyl)-OH, H-Cys(Boc)-OH og H-Cys(hydroksyetyl)-OH.

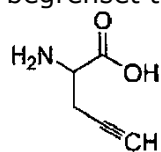
20

Illustrerende eksempel på histidin og derivater derav inkluderer, men er ikke begrenset til: histidin, (His), N-alkyl-histidin, H-His(Boc)-OH, H-His(Bzl)-OH, H-His(1-Me)-OH, H-His(1-Tos)-OH, H-2,5-dijod-His-OH og H-His(3-Me)-OH.

25

Illustrerende eksempel på glysin og derivater derav inkluderer, men er ikke begrenset til: glysin (Gly), N-alkyl-glysin, H-propargylglysin (

30



), α -aminoglysin (beskyttet eller ikke), β -syklopropyl-glysin, syklopentyl-glysin, sykloheksyl-glysin, α -allylglysin, t-Butyl-glysin, neopentylglysin og fenylglysin.

Illustrerende eksempel på glutaminsyre og derivater derav inkluderer, men er ikke begrenset til: glutaminsyre (Glu), N-alkyl-glutaminsyre, H-Glu(OtBu)-OH, H- γ -hydroksy-Glu-OH, H- γ -metylen-Glu-OH, H- γ -karboksy-Glu(OtBu)₂-OH og pyroglutaminsyre.

5

Illustrerende eksempel på glutamin og derivater derav inkluderer, men er ikke begrenset til: glutamin (Gln), N-alkyl-glutamin, isoglutamin (H-Glu-NH₂), H-Gln(Trt)-OH og H-Gln(isopropyl)-OH.

10

Illustrerende eksempel på fenylalanin og derivater derav inkluderer, men er ikke begrenset til: fenylalanin (Phe), N-alkyl-fenylalanin, H-p-amino-Phe-OH, H-p-amino-Phe(Z)-OH, H-p-brom-Phe-OH, H-p-benzyl-Phe-OH, H-p-tBu-Phe-OH, H-p-karboksy-Phe(OtBu)-OH, H-p-karboksy-Phe-OH, H-p-cyano-Phe-OH, H-p-fluor-Phe-OH, H-3,4-diklor-Phe-OH, H-p-jod-Phe-OH, H-p-nitro-Phe-OH, H-p-metyl-Phe-OH, H-pentafluor-Phe-OH, H-m-fluor-Phe-OH, H- α -Me-Phe-OH, H-4-fenyl-Phe-OH, homofenylalanin, klor-fenylalanin og β -homofenylalanin.

15

Illustrerende eksempel på lysin og derivater derav inkluderer, men er ikke begrenset til: lysin (Lys), N-alkyl-lysin, H-Lys(Boc)-OH, H-Lys(Ac)-OH, H-Lys(formyl)-OH, H-Lys(Me)₂-OH, H-Lys(nikotinoyl)-OH, H-Lys(Me)₃-OH, H-trans-4,5-dehydro-Lys-OH, H-Lys(Aloc)-OH, H- H- δ -hydroksy-Lys-OH, H- δ -hydroksy-Lys(Boc)-OH, H-Lys(acetamidoyl)-OH og H-Lys(isopropyl)-OH.

20

Illustrerende eksempel på leucin og derivater derav inkluderer, men er ikke begrenset til: leucin (Leu), N-alkyl-leucin, 4,5-dehydroleucin, H- α -Me-Leu-OH, homoleucin, norleucin og t-leucin.

25

Illustrerende eksempel på metionin og derivater derav inkluderer, men er ikke begrenset til: metionin (Met), H-Met(O)-OH og H-Met(O)₂-OH.

30

Illustrerende eksempel på serin og derivater derav inkluderer, men er ikke begrenset til: serin (Ser), N-alkyl-serin, H-Ser(Ac)-OH, H-Ser(tBu)-OH, H-Ser(Bzl)-OH, H-Ser(p-klor-Bzl)-OH, H- β -(3,4-dihydroksyfenyl)-Ser-OH, H- β -(2-tienyl)-Ser-OH, isoserin N-alkyl-isoserin og 3-fenylisoserin.

35

Illustrerende eksempel på tyrosin og derivater derav inkluderer, men er ikke begrenset til: tyrosin (Tyr), N-alkyl-tyrosin, H-3,5-dinitro-Tyr-OH, H-3-amino-

Tyr-OH, H-3,5-dibrom-Tyr-OH, H-3,5-dijod-Tyr-OH, H-Tyr(Me)-OH, H-Tyr(tBu)-OH, H-Tyr(Boc)-OH, H-Tyr(Bzl)-OH, H-Tyr(Et)-OH, H-3-jod-Tyr-OH og H-3-nitro-Tyr-OH.

5 Illustrerende eksempel på treonin og derivater derav inkluderer, men er ikke begrenset til: treonin (Thr), N-alkyl-treonin, allo-treonin, H-Thr(Ac)-OH, H-Thr(tBu)-OH og H-Thr(Bzl)-OH.

10 Illustrerende eksempel på isoleucin og derivater derav inkluderer, men er ikke begrenset til: isoleucin (Ile), N-alkyl-isoleucin, allo-isoleucin og norleucin.

15 Illustrerende eksempel på tryptofan og derivater derav inkluderer, men er ikke begrenset til: tryptofan (Trp), N-alkyl-tryptofan, H-5-Me-Trp-OH, H-5-hydroksy-Trp-OH, H-4-Me-Trp-OH, H- α -Me-Trp-OH, H-Trp(Boc)-OH, H-Trp(formyl)-OH og H-Trp(mesitylen-2-sulfonyl)-OH.

20 Illustrerende eksempel på prolin og derivater derav inkluderer, men er ikke begrenset til: prolin (Pro), N-alkyl-prolin, homoprolin, tioprolin, hydroksyprolin (H-Hyp-OH), H-Hyp(tBu)-OH, H-Hyp(Bzl)-OH, H-3,4-dehydro-Pro-OH, 4-ketoprolin, α -Me-Pro-OH og H-4-fluor-Pro-OH.

Illustrerende eksempel på valin og derivater derav inkluderer, men er ikke begrenset til: valin (Val), N-alkyl-valin, H- α -Me-Val-OH og norvalin.

25 Illustrerende eksempel på ornitin og derivater derav inkluderer, men er ikke begrenset til: ornitin, N-alkyl-ornitin, H-Om(Boc)-OH, H-Om(Z)-OH, H- α -difluor-Me-Om-OH (eflornitin) og H-Orn(Aloc)-OH.

30 Illustrerende eksempel på penicillamin og derivater derav inkluderer, men er ikke begrenset til: penicillamin, H-penicillamin(Acm)-OH (H- β,β -dimetylcys(Acm)-OH) og N-alkyl- penicillamin.

Illustrerende eksempel på β -alanin og derivater derav inkluderer, men er ikke begrenset til: β -alanin, N-alkyl- β -alanin og dehydro-alanin.

35 Illustrerende eksempel på en aminoalkansyre og derivater derav inkluderer, men er ikke begrenset til: N-alkylaminoalkansyre, aminosmørsyre, 4-

(neopentylloksysulfonyl)-aminosmørsyre, ϵ -aminokapronsyre, α -aminoisosmørsyre, piperidyleddiksyre, 3-aminopropionsyre, 3-amino-3-(3-pyridyl)-propionsyre og 5-aminopentansyre (aminovaleriansyre).

5 Illustrerende eksempel på en aminoalkynsyre og derivater derav inkluderer, men er ikke begrenset til: N-alkylaminoalkynsyre, 6-amino-4-heksynsyre, 6-(Boc-amino)-4-heksynsyre.

10 Illustrerende eksempel på en aminoalkanedisyre og derivater derav inkluderer, men er ikke begrenset til: N-alkylaminoalkanedionsyre (eng.: N-alkylaminoalkanedioic acid), 2-aminoheksanedionsyre (eng.: 2-aminohexanedioic acid), 2-aminoheptanedionsyre (eng.: 2-aminoheptanedioic acid), 2-aminooktanedionsyre (eng.: 2-aminooctanedioic acid) (H-Asu-OH).

15 Illustrerende eksempel på en aminobenzosyre og derivater derav inkluderer, men er ikke begrenset til: N-alkylaminobenzosyre, 2-aminobenzosyre, 3-aminobenzosyre og 4-aminobenzosyre.

20 Illustrerende eksempel på en amino-heterosyklo-alkanoinsyre og derivater derav inkluderer, men er ikke begrenset til: N-alkylamino-heterosyklo-alkanoinsyrer, 4-amino-1-metyl-1H-imidazol-2-karboksyisyre, 4-amino-1-metyl-1H-pyrrol-2-karboksyisyre, 4-amino-piperidin-4-karboksyisyre (H-Pip-OH; 1-beskyttet eller ikke), 3-amino-3-(3-pyridyl)-propionsyre.

25 Illustrerende eksempel på heterosyklo-karboksyisyre og derivater derav inkluderer, men er ikke begrenset til: azetidin-2-karboksyisyre, azetidin-3-karboksyisyre, piperidin-4-karboksyisyre og tiazolidin-4-karboksyisyre.

30 Illustrerende eksempel på citrullin og derivater derav inkluderer, men er ikke begrenset til: citrullin (cit), N-alkyl-citrullin, tiocitrullin, S-metyl-tiocitrullin og homocitrullin.

Illustrerende eksempel på statin og derivater derav inkluderer, men er ikke begrenset til: statin, N-alkyl-statin, sykloheksylstatin og fenylstatin.

35

Illustrerende eksempel på diaminoalkansyre (Dab) og derivater derav inkluderer, men er ikke begrenset til: N-alkyl-diamino-alkanoinsyrer, N,N-dialkylamino-

alkanoinnsyrer, α,γ -diaminosmørsyre (H-Dab-OH), H-Dab(Aloc)-OH, H-Dab(Boc)-OH, H-Dab(Z)-OH, α,β -diaminopropionsyre og dens beskyttede sidekjedeversjoner.

5 I noen konjugater kan bindingen mellom aminosyreenheten og legemiddelenheten spaltes enzymatisk av én eller flere enzymer, inkludert en tumorassosiert protease, for å frigjøre legemiddelenheten (-D), som i én mulighet protoneres *in vivo* ved frisetting for å tilveiebringe et legemiddel (D).

10 Nyttige $-W_w$ -enheter - legemiddelenhet kan utformes og optimaliseres i sin selektivitet for enzymatisk spalting av et spesielt enzym, for eksempel en tumorassosiert protease. I ett eksempel er en binding mellom $-W_w$ --enheten og legemiddelenheten den der spalting katalyseres av katepsin B, C eller D eller en plasminprotease.

15 I én gruppe konjugater, W_1 , kan den første W-enheten bundet til karboksylterminalen til legemiddelenheten med formel D ikke danne et sekundært amin med C-terminalaminosyren av legemiddelenheten med formel D.

20 I ett eksempel er w 1. I visse konjugater er w et heltall som spanner fra 2 til 12. I ett eksempel er $-W_w$ - et dipeptid, tripeptid, tetrapeptid eller pentapeptid. I én gruppe eksempel er w 2.

25 I visse konjugater kan aminosyreenheten omfatte kun naturlige aminosyrer. I andre kan aminosyreenheten omfatte kun ikke-naturlige aminosyrer. I noen konjugater kan aminosyren omfatte en naturlig aminosyre bundet til en ikke-naturlig aminosyre. I noen konjugater kan aminosyren omfatte en naturlig aminosyre bundet til en D-isomer av en naturlig aminosyre.

30 I én gruppe eksempel er minst én W en L-aminosyre. I en annen gruppe er minst én W en D-aminosyre. I noen konjugater har minst én W et kiralt senter i S-konfigurasjonen. I noen konjugater har minst én W et kiralt senter i R-konfigurasjonen.

35 I noen eksempel på aminosyreenheten er aminosyreenheten W_w valgt fra gruppen bestående av -metionin-(L)lysin- og -aparagin-(L)lysin-. I ett aspekt

ved aminosyreenheten er aminosyreenheten W_w valgt fra gruppen bestående av-tyrosin-(D)asparaginsyre-, -norvalin-(D)asparaginsyre-, -fenylglysin-(D)lysin-, -metionin-(D)lysin- og -asparagin-(D)lysin-.

5 **Ligandenheten (L)**

Ligandenheten inkluderer innenfor sitt omfang en hvilken som helst enhet av en ligand (L) som spesifikt binder eller assosierer seg reaktivt eller kompleksere med en reseptor, et antigen eller annen respektiv del assosiert med en gitt målcellepopulasjon. En ligandenhet er et molekyl som binder til, kompleksere med eller reagerer med en reseptor, et antigen eller annen respektiv del av en cellepopulasjon som skal modifiseres terapeutisk eller på annen biologisk måte. I ett aspekt virker ligandenheten for å levere legemiddelenheten til den spesielle målcellepopulasjonen som ligandenheten interagerer med. Slike ligander inkluderer, men er ikke begrenset til, proteiner, polypeptider og peptider. Egnede ligander inkluderer for eksempel antistoff med full lengde, antistofffragmenter, proteiner med mindre molekylvekt, polypeptider eller peptider, lektiner, glykoproteiner, ikke-peptider, vitaminer, næringsmiddeltransportmolekyler (slik som, men ikke begrenset til, transferrin) eller hvilket som helst annet cellebindingmolekyl eller stoff.

En ligandenhet kan danne en binding til en stretcherenhet. En ligandenhet kan danne en binding til linkerens stretcherenhet via et heteroatom av liganden. Heteroatomer som kan være til stede på en ligandenhet inkluderer svovel (i én utførelsesform fra en sulfhydrylgruppe av en ligand), oksygen (i én utførelsesform fra en karbonyl-, karboksyl- eller hydroksylgruppe av en ligand) og nitrogen (i én utførelsesform fra en primær eller sekundær aminogruppe av en ligand). Disse heteroatomene kan være til stede på liganden i ligandens naturlige tilstand, for eksempel et naturlig forekommende antistoff, eller kan introduseres i liganden via kjemisk modifisering.

I ett eksempel har en ligandenhet en sulfhydrylgruppe, og ligandenheten binder til linkerensheten via sulfhydrylgruppens svovelatom.

I et annet eksempel har liganden lysinrester som kan reagere med aktiverte estere (slike estere inkluderer, men er ikke begrenset til, N-hydroksysuksinimid-,

pentafluorfenyl- og p-nitrofenylestere) av linkerenhets stretchenhet og således danne en aminbinding bestående av ligandenhetens nitrogenatom og linkerenhets C=O-gruppe.

5 I nok et annet aspekt beskrevet heri har ligandenheten én eller flere lysinrester som kan modifiseres kjemisk for å introdusere én eller flere sulfhydrylgrupper. Ligandenheten binder til linkerenhetsen via sulfhydrylgruppens svovelatom. Reagensene som kan anvendes for å modifisere lysiner inkluderer, men er ikke begrenset til, N-suksinimidyl S-acetyltioacetat (SATA) og 2-
10 iminotiolanhydroklorid (Trauts reagens).

I et annet aspekt kan ligandenheten ha én eller flere karbohydratgrupper som kan modifiseres kjemisk for å ha én eller flere sulfhydrylgrupper. Ligandenheten binder til linkerenhetsen (stretchenheten) via sulfhydrylgruppens svovelatom.

15

I nok et annet eksempel kan ligandenheten ha én eller flere karbohydratgrupper som kan oksideres for å tilveiebringe en aldehyd (-CHO)-gruppe (*se f.eks.* Laguzza, et al., 1989, J. Med. Chem. 32(3):548-55). Det tilsvarende aldehydet kan danne en binding med et reaktivt sted på en stretchenhet. Reaktive steder
20 på en stretch som kan reagere med en karbonylgruppe på en ligand inkluderer, men er ikke begrenset til, hydrazin og hydroksylamin. Andre protokoller for modifiseringen av proteiner for bindingen eller assosieringen av legemiddelenheter beskrives i Coligan et al., Current Protocols in Protein Science, bd. 2, John Wiley & Sons (2002).

25

Nyttige ikke-immunreaktive protein-, polypeptid- eller peptidligandenheter inkluderer, men er ikke begrenset til, transferrin, epidermale vekstfaktorer ("EGF"), bombesin, gastrin, gastrinfrisettende peptid, blodplateavledet vekstfaktor, IL-2, IL-6, transformerende vekstfaktorer ("TGF") slik som TGF- α og
30 TGF- β , vacciniavekstfaktor ("VGF"), insulin og insulinlignende vekstfaktorer I og II, somatostatin, lektiner og apoprotein fra lavdensitetslipoprotein.

Nyttige polyklonale antistoff er heterogene populasjoner av antistoffmolekyler avledet fra immuniserte dyrs sera. Nyttige monoklonale antistoff er homogene
35 populasjoner av antistoff til en spesiell antigendeterminant (*f.eks.* et cancercelleantigen, et viralt antigen, et mikrobielt antigen, et protein, et peptid, et karbohydrat, en kjemisk nukleinsyre eller fragmenter derav). Et monoklonalt

antistoff (mAb) til et antigen av interesse kan fremstilles ved anvendelse av hvilken som helst teknikk kjent i teknikken som tilveiebringer for produksjonen av antistoffmolekyler ved kontinuerlige cellelinjer i kultur.

5 Nyttige monoklonale antistoff inkluderer, men er ikke begrenset til, humane monoklonale antistoff, humaniserte monoklonale antistoff, antistofffragmenter eller kimære monoklonale antistoff. Humane monoklonale antistoff kan tilberedes med hvilken som helst av tallrike teknikker kjent i teknikken (*f.eks.* Teng et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 80:7308-7312; Kozbor et al., 10 1983, Immunology Today 4:72-79; og Olsson et al., 1982, Meth. Enzymol. 92:3-16).

Antistoffet kan også være et bispesifikt antistoff. Fremgangsmåter for tilberedning av bispesifikke antistoff er kjent i teknikken og beskrives *nedenfor*.

15

Antistoffet kan være en funksjonelt aktivt fragment, derivat eller analog av et antistoff som binder immunspesifikt til målcellene (*f.eks.* cancercelleantigener, virale antigener eller mikrobielle antigener) eller andre antistoff som binder til tumorceller eller -matrise. I dette henseende betyr "funksjonelt aktiv" at fragmentet, derivatet eller analogen er i stand til å frembringe anti-anti-idiotyp antistoff som gjenkjenner antigenet som antistoffet som fragmentet, derivatet eller analogen er fra, gjenkjente. Antigenisiteten til immunglobulinmolekylets idiotyp kan spesifikt forbedres ved delesjon av rammeverk og CDR-sekvenser som er C-terminal for CDR-sekvensen som spesifikt gjenkjenner antigenet. For å 20 bestemme hvilke CDR-sekvenser som binder antigenet, kan syntetiske peptider inneholdende CDR-sekvensene anvendes i bindingsassayer med antigenet ved hvilken som helst fremgangsmåte for bindingsassay kjent i teknikken (*f.eks.* BIA-kjerneassayet) (for plassering av CDR-sekvensene, se, *f.eks.* Kabat et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, femte utgave, National 25 Institute of Health, Bethesda, Md; Kabat E et al., 1980, J. Immunology 125(3):961-969).

30

Andre nyttige antistoff inkluderer fragmenter av antistoff slik som, men ikke begrenset til, F(ab')₂-fragmenter, Fab-fragmenter, Fvs, enkjedede antistoff, 35 diastoff, triastoff, tetrastoff, scFv, scFv-FV eller hvilket som helst annet molekyl med samme spesifisitet som antistoffet.

Dessuten er rekombinante antistoff, slik som kimære og humaniserte monoklonale antistoff, omfattende både humane og ikke-humane deler, som kan tilberedes ved anvendelse av standard rekombinante DNA-teknikker, nyttige antistoff. Et kimært antistoff er et molekyl der forskjellig deler er avledet fra forskjellige dyrearter, slik som for eksempel dyrearter som har en variabel region avledet fra en murin monoklonal og humane immunglobulinkonstante regioner. (Se f.eks. US-patentnr. 4,816,567; og US-patentnr. 4,816,397.) Humaniserte antistoff er antistoffmolekyler fra ikke-humane arter som har én eller flere komplementaritetsbestemmende regioner (CDR-er) fra de ikke-humane artene og en rammeverkregion fra et humant immunglobulinmolekyl. (Se f.eks. US-patentnr. 5,585,089.) Slike kimære og humaniserte monoklonale antistoff kan produseres ved rekombinante DNA-teknikker kjent i teknikken, for eksempel ved anvendelse av fremgangsmåter beskrevet i internasjonal publikasjon nr. WO 87/02671; europeisk patentpublikasjon nr. 0 184 187; europeisk patentpublikasjon nr. 0 171 496; europeisk patentpublikasjon nr. 0 173 494; internasjonal patentpublikasjon nr. WO 86/01533; US-patentnr. 4,816,567; europeisk patentpublikasjon nr.012 023; Berter et al., 1988, Science 240:1041-1043; Liu et al., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:3439-3443; Liu et al., 1987, J. Immunol. 139:3521-3526; Sun et al., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:214-218; Nishimura et al., 1987, Cancer. Res. 47:999-1005; Wood et al., 1985, Nature 314:446-449; og Shaw et al., 1988, J. Natl. Cancer Inst. 80:1553-1559; Morrison, 1985, Science 229:1202-1207; Oi et al., 1986, BioTechniques 4:214; US-patentnr. 5,225,539; Jones et al., 1986, Nature 321:552-525; Verhoeyan et al., 1988, Science 239:1534; og Beidler et al., 1988, J. Immunol. 141:4053-4060.

Helt humane antistoff er spesielt ønskelig og kan produseres ved anvendelse av transgene mus som ikke er i stand til å uttrykke tung- og lettkjedegener av endogen immunglobulin, men som kan uttrykke humane tung- og lettkjedegener. De transgene musene immuniseres på den vanlige måten med et valgt antigen, f.eks. hele eller en del av et polypeptid ifølge oppfinnelsen. Monoklonale antistoff rettet mot antigenet kan oppnås ved anvendelse av konvensjonell hybridomteknologi. De humane immunglobulintransgenene huset i de transgene musene omgrupperes under B-cellectedifferensiering og gjennomgår dernest klassebytte og somatisk mutasjon. Ved anvendelse av en slik teknikk er det således mulig å produsere terapeutisk nyttige IgG-, IgA-, IgM- og IgE-antistoff. For en oversikt over denne teknologien for produksjon av

humane antistoff, se Lonberg and Huszar, 1995, Int. Rev. Immunol. 13:65-93. For en detaljert omtale av denne teknologien for produksjon av humane antistoff og humane monoklonale antistoff og protokoller for produksjon av slike antistoff, se *f.eks.* US-patentnr. 5,625,126; 5,633,425; 5,569,825; 5,661,016; 5,545,806.

5 Andre humane antistoff kan oppnås kommersielt fra for eksempel Abgenix, Inc. (nå Amgen, Freemont, CA) og Medarex (Princeton, NJ).

10 Helt humane antistoff som gjenkjenner en valgt epitop kan genereres ved anvendelse av en teknikk betegnet som "ledet seleksjon". I denne tilnærmingsmåten anvendes et valgt ikke-humant monoklonalt antistoff, *f.eks.* et museantistoff, for å lede valget av et helt humant antistoff som gjenkjenner epitopen. (Se *f.eks.* Jespers et al., 1994, Biotechnology 12:899-903). Humane antistoff kan også produseres ved anvendelse av ulike teknikker kjent i teknikken, inkludert fagvisningsbibliotek (se *f.eks.* Hoogenboom and Winter, 15 1991, J. Mol. Biol. 227:381; Marks et al., 1991, J. Mol. Biol. 222:581; Quan and Carter, 2002, The rise of monoclonal antibodies as therapeutics, In Anti-IgE and Allergic Disease, Jardieu and Fick, eds., Marcel Dekker, New York, NY, kapittel 20, s. 427-469).

20 I andre eksempel er et fusjonsprotein av et antistoff, eller et funksjonelt aktivt fragment derav, for eksempel der antistoffet er fusjonert via en kovalent binding (*f.eks.* en peptidbinding) ved enten N-terminalen eller C-terminalen av en aminosyresekvens av et annet protein (eller del derav, foretrukket minst 10, 20 eller 50 aminosyredel av proteinet) som ikke er fra et antistoff. Antistoffet eller 25 fragmentet derav er foretrukket kovalent bundet til det andre proteinet ved det konstante domenets N-terminal.

Antistoff inkluderer analoger og derivater som enten er modifisert, *dvs.* ved den kovalente bindingen av hvilken som helst type molekyl, så lenge den kovalente 30 bindingen tillater antistoffet å bevare sin antigenbindingsimmunspezifitet. Derivater og analoger av antistoffene inkluderer, men ikke som begrensning, de som er modifisert ytterligere, *f.eks.* ved glykosylering, acetylering, pegylering, fosforylering, amidering, avledning av blokkerings-/beskyttelsesgrupper, proteolytisk spalting, binding til en cellulær antistoffenhet eller et annet protein, 35 osv. Hvilke som helst av tallrike modifiseringer kan utføres ved kjente teknikker inkludert, men ikke begrenset til, spesifikk kjemisk spalting, acetylering,

formylering, metabolsk syntese i nærværet av tunicamycin, osv. I tillegg kan analogen eller derivatet inneholde én eller flere unaturlige aminosyrer.

5 Antistoff kan ha modifiseringer (*f.eks.* substitusjoner, delesjoner eller addisjoner) i aminosyrerester som interagerer med Fc-reseptorer. Særlig kan antistoff ha modifiseringer i aminosyrerester identifisert som involvert i interaksjonen mellom anti-Fc-domenet og FcRn-reseptoren (se *f.eks.* internasjonal publikasjon nr. WO 97/34631).

10 Antistoff som er immunspesifikke for et cancercelleantigen kan oppnås kommersielt eller produseres ved hvilken som helst fremgangsmåte kjent av fagmannen, slik som *f.eks.* kjemisk syntese eller rekombinante ekspresjonsteknikker. Nukleotidsekvensen som koder antistoff som er immunspesifikke for et cancercelleantigen kan oppnås *f.eks.* fra GenBank-
15 databasen eller en lignende database, litteraturpublikasjoner eller ved rutinemessig kloning og sekvensering.

I et spesifikt eksempel kan kjente antistoff for behandlingen av cancer anvendes. Antistoff som er immunspesifikke for et cancercelleantigen kan oppnås
20 kommersielt eller produseres ved hvilken som helst fremgangsmåte kjent av fagmannen, slik som *f.eks.* rekombinante ekspresjonsteknikker. Nukleotidsekvensen som koder antistoff som er immunspesifikke for et cancercelleantigen kan oppnås *f.eks.* fra GenBank-databasen eller en lignende database, litteraturpublikasjonene eller ved rutinemessig kloning og
25 sekvensering. Eksempel på antistoff som er tilgjengelige for behandlingen av cancer inkluderer, men er ikke begrenset til, RFRUXAN® (rituksimab; Genentech) som er et kimært anti-CD20 monoklonalt antistoff for behandlingen av pasienter med non-Hodgkins lymfom; OVAREX som er et murint antistoff for behandlingen av eggstokkancer; PANOREX (Glaxo Wellcome, NC) som er et
30 murint IgG_{2a}-antistoff for behandlingen av kolorektalcancer; Cetuximab ERBITUX (Imclone Systems Inc., NY) som er et anti-EGFR IgG kimært antistoff for behandlingen av cancere positive for epidermal vekstfaktorreseptor, slik som hode- og halscancer; Vitaxin (MedImmune, Inc., MD) som er et humanisert antistoff for behandlingen av sarkom; CAMPATH I/H (Leukosite, MA) som er et humanisert IgG₁-antistoff for behandlingen av kronisk lymfocytisk leukemi
35 (CLL); SMART MI95 (Protein Design Labs, Inc., CA) og SGN-33 (Seattle Genetics, Inc., WA) som er et humanisert anti-CD33 IgG-antistoff for

- behandlingen av akutt myeloidleukemi (AML); LYMPHOCIDE (Immunomedics, Inc., NJ) som er et humanisert anti-CD22 IgG-antistoff for behandlingen av non-Hodgkins lymfom; SMART ID10 (Protein Design Labs, Inc., CA) som er et humanisert anti-HLA-DR-antistoff for behandlingen av non-Hodgkins lymfom;
- 5 ONCOLYM (Techniclone, Inc., CA) som er et radiomerket murint anti-HLA-Dr10-antistoff for behandlingen av non-Hodgkins lymfom; ALLOMUNE (BioTransplant, CA) som er et humanisert anti-CD2 mAb for behandlingen av Hodgkins sykdom eller non-Hodgkins lymfom; AVASTIN (Genentech, Inc., CA) som er et humanisert anti-VEGF-antistoff for behandlingen av lunge- og kolorektalcancer;
- 10 Epratuzamab (Immunomedics, Inc., NJ and Amgen, CA) som er et anti-CD22-antistoff for behandlingen av non-Hodgkins lymfom; og CEACIDE (Immunomedics, NJ) som er et humanisert anti-CEA-antistoff for behandlingen av kolorektalcancer.
- 15 Andre antistoff som er nyttige i behandlingen av cancer inkluderer, men er ikke begrenset til, antistoff mot følgende antigener (hvor eksempel på cancere som kan behandles med antistoffet står i parentes). CA125 (eggstokk), CA15-3 (karsinomer), CA19-9 (karsinomer), L6 (karsinomer), Lewis Y (karsinomer), Lewis X (karsinomer), alfa-fetoprotein (karsinomer), CA 242 (kolorektal),
- 20 alkalisk placentafofosfatase (karsinomer), prostataspesifikt antigen (prostata), prostataspesifikt membranantigen (prostata), prostatasyrefosfatase (prostata), epidermal vekstfaktor (karsinomer), MAGE-1 (karsinomer), MAGE-2 (karsinomer), MAGE-3 (karsinomer), MAGE-4 (karsinomer), anti-transferrinreseptor (karsinomer), p97 (melanom), MUC1 (brystcancer), CEA (kolorektal), gp100 (melanom), MART1 (melanom), IL-2-reseptor (T-celleleukemi og -lymfomer), CD20 (non-Hodgkins lymfom), CD52 (leukemi), CD33 (leukemi), CD22 (lymfom), human choriongonadotrofin (karsinomer), CD38 (multippelt myelom), CD40 (lymfom), mucin (karsinomer), P21 (karsinomer), MPG (melanom) og Neu onkogent produkt (karsinomer). Mange
- 25 andre internaliserende antistoff som binder til tumorassosierte antigener kan anvendes og er gjennomgått (se f.eks. Franke et al., 2000, Cancer Biother. Radiopharm. 15, 459-76; Murray, 2000, Semin Oncol. 27:64-70; Breitling and Dubel, Recombinant Antibodies, John Wiley, and Sons, New York, 1998).
- 30
- 35 I forsøk på å oppdage virkningsfulle cellulære mål for cancerdiagnose og behandling har forskere ønsket å identifisere transmembrane eller på annen måte tumorassosierte polypeptider som er spesifikt uttrykt på overflaten av én

eller flere særlige typer av cancerceller sammenlignet med på én eller flere normale ikke-cancerceller. Slike tumorassosierte polypeptider er ofte mer rikelig uttrykt på overflaten av cancercellene enn på overflaten av ikke-cancercellene. Identifiseringen av slike tumorassosierte antigenpolypeptider på celleoverflaten har gitt mulighet til spesifikt å utpeke cancerceller for destruksjon via antistoffbaserte behandlinger.

I et eksempel på legemiddellinkerligandkonjugatet er ligandenheten et antistoff Ab som binder minst én av CD19, CD20, CD30, CD33, CD70, BCMA, Glypican-3, Liv-1 og Lewis Y-antigen, $w=2$, og D har formel IIb.

I et annet spesifikt eksempel anvendes antistoff for behandlingen av en autoimmun sykdom i henhold til sammensetningene og fremgangsmåtene ifølge oppfinnelsen. Antistoff som er immunspesifikke for et antigen av en celle som er ansvarlig for produksjon av autoimmune antistoff kan oppnås fra hvilken som helst organisasjon (*f.eks.* en universitetsforsker eller et selskap) eller produseres ved hvilken som helst fremgangsmåte kjent for fagmannen, slik som *f.eks.* kjemisk syntese eller rekombinante ekspresjonsteknikker. I et annet eksempel inkluderer antistoff som er immunspesifikke for behandlingen av autoimmun sykdom, men er ikke begrenset til, anti-nukleært antistoff; anti-dsDNA; anti-ssDNA, anti-cardiolipin-antistoff IgM, IgG; anti-fosfolipidantistoff IgM, IgG; anti-SM-antistoff; anti-mitokondrialt antistoff; skjoldbruskkjertelantistoff; mikrosomalt antistoff; tyroglobulinantistoff; anti-SCL-70-antistoff; anti-Jo-antistoff; anti-U₁RNP-antistoff; anti-La/SSB-antistoff; anti-SSA; anti-SSB-antistoff; anti-pertialcelleantistoff; anti-histonantistoff; anti-RNP-antistoff; C-ANCA-antistoff; P-ANCA-antistoff; anti-centromerantistoff; anti-fibrillarinantistoff of anti-GBM-antistoff.

I visse eksempel kan nyttige antistoff binde til en reseptor eller et reseptorkompleks ekspresjonert på en aktivert lymfocytt. Reseptoren eller reseptorkomplekset kan omfatte et immunoglobulinsuperfamiliemedlem, et TNF-reseptorsuperfamiliemedlem, et integrin, en cytokinreseptor, en kjemokinreseptor, et protein med stor histokompatibilitet, et lektin eller et komplementkontrollprotein. Ikke-begrensede eksempel på egnede immunoglobulinsuperfamiliemedlemmer er CD2, CD3, CD4, CD8, CD 19, CD22, CD28, CD79, CD90, CD152/CTLA-4, PD-1 og ICOS. Ikke-begrensede eksempel på egnede TNF-reseptorsuperfamiliemedlemmer er CD27, CD40, CD95/Fas,

CD134/OX40, CD137/4-1BB, TNF-R1, TNFR-2, RANK, TACI, BCMA, osteoprotegerin, Apo2/TRAIL-R1, TRAIL-R2, TRAIL-R3, TRAIL-R4 og APO-3. Ikke-begrensede eksempler på egnede integriner er CD11a, CD11b, CD11c, CD18, CD29, CD41, CD49a, CD49b, CD49c, CD49d, CD49e, CD49f, CD103 og CD104. Ikke-begrensede eksempler på egnede lektiner er C-type-, S-type- og I-typelektin.

I ett eksempel binder ligandenheten til en aktivert lymfocyt som er assosiert med en autoimmun sykdom.

I et annet spesifikt eksempel er nyttige ligander som er immunspekifiske for et viralt eller mikrobielt antigen monoklonale antistoffer. Antistoffene kan være kimære, humaniserte eller humane monoklonale antistoffer. Som anvendt heri inkluderer betegnelsen "viralt antigen", men er ikke begrenset til, hvilket som helst viralt peptid, polypeptidprotein (*f.eks.* HIV gp120, HIV nef, RSV F glykoprotein, neuraminidase fra influensavirus, hemagglutinin fra influensavirus, HTLV tax, herpes simplex-virusglykoprotein (*f.eks.* gB, gC, gD og gE) Som anvendt heri inkluderer betegnelsen "mikrobielt antigen", men er ikke begrenset til, hvilket som helst mikrobielt peptid-, polypeptid-, protein-, sakkarid-, polysakkarid- eller lipidmolekyl (*f.eks.* et bakterielt, sopp-, patogen protozo- eller gjærpolypeptid, inkludert *f.eks.* LPS og kapselpolysakkarid 5/8) som er i stand til å fremkalle en immunrespons.

Antistoff som er immunspekifiske for et viralt eller mikrobielt antigen kan oppnås kommersielt, for eksempel fra BD Biosciences (San Francisco, CA), Chemicon International, Inc. (Temecula, CA) eller Vector Laboratories, Inc. (Burlingame, CA) eller produseres ved hvilken som helst fremgangsmåte kjent for fagmannen, slik som *f.eks.* kjemisk syntese eller rekombinante ekspresjonsteknikker. Nukleotidsekvensen som koder antistoff som er immunspekifiske for et viralt eller mikrobielt antigen kan oppnås *f.eks.* fra GenBank-databasen eller en lignende database, litteraturpublikasjoner eller ved rutinemessig kloning og sekvensering.

I et spesifikt eksempel er nyttige ligander de som er nyttige for behandlingen av viral eller mikrobiell infeksjon i henhold til fremgangsmåtene det er redegjort for heri. Eksempel på antistoff som er nyttige for behandlingen av viral infeksjon eller mikrobiell infeksjon inkluderer, men er ikke begrenset til, SYNAGIS

(MedImmune, Inc., MD) som er et anti-respiratorisk syncytialvirus (RSV) monoklonalt antistoff som er nyttig for behandlingen av pasienter med RSV-infeksjon; PRO542 (Progenies) som er et CD4-fusjonsantistoff som er nyttig for behandlingen av HIV-infeksjon; OSTAVIR (Protein Design Labs, Inc., CA) som er et humant antistoff som er nyttig for behandlingen av hepatitt B-virus; PROTOVIR (Protein Design Labs, Inc., CA) som er et humanisert IgG₁-antistoff som er nyttig for behandlingen av cytomegalovirus (CMV); og anti-LPS-antistoff.

Andre antistoff som er nyttige i behandlingen av infeksjose sykdommer inkluderer, men er ikke begrenset til, antistoff mot antigenene fra patogene bakteriestammer (*Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, *Hemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella ozaenas*, *Klebsiella rhinoscleromatis*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Campylobacter (Vibrio) fetus*, *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus cereus*, *Edwardsiella tarda*, *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pestis*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Salmonella typhimurium*, *Treponema pallidum*, *Treponema pertenue*, *Treponema carateneum*, *Borrelia vincentii*, *Borrelia burgdorferi*, *Leptospira icterohemorrhagiae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Pneumocystis carinii*, *Francisella tularensis*, *Brucella abortus*, *Brucella suis*, *Brucella melitensis*, *Mycoplasma spp.*, *Rickettsia prowazeki*, *Rickettsia tsutsugumushi* og *Chlamydia spp.*); patogene sopper (*Coccidioides immitis*, *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *Blastomyces dermatitidis*, *Cryptococcus neoformans* og *Histoplasma capsulatum*); protozoer (*Entamoeba histolytica*, *Toxoplasma gondii*, *Trichomonas tenax*, *Trichomonas hominis*, *Trichomonas vaginalis*, *Trypanosoma gambiense*, *Trypanosoma rhodesiense*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania donovani*, *Leishmania tropica*, *Leishmania braziliensis*, *Pneumocystis pneumonia*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae*); eller Helminths (*Enterobius vermicularis*, *Trichuris trichiura*, *Ascaris lumbricoides*, *Trichinella spiralis*, *Strongyloides stercoralis*, *Schistosoma japonicum*, *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma haematobium*, og hakeormer).

Andre antistoff som er nyttige for behandlingen av viral sykdom inkluderer, men er ikke begrenset til, antistoff mot antigen av patogene virus, inkludert som eksempel og ikke som begrensing: Poxviridae, Herpesviridae, herpes simplex-

virus 1, herpes simplex-virus 2, Adenoviridae, Papovaviridae, Enteroviridae, Picornaviridae, Parvoviridae, Reoviridae, Retroviridae, influensavirus, parainfluenzavirus, krusma, meslinger, respiratorisk syncytialvirus, rubella, Arboviridae, Rhabdoviridae, Arenaviridae, hepatitt A-virus, hepatitt B-virus, 5 hepatitt C-virus, hepatitt E-virus, ikke-A/ikke-B-hepatittvirus, Rhinoviridae, Coronaviridae, Rotoviridae og humant immunsviktvirus.

Screening for legemiddellinkerligandkonjugater

10 Transgene dyre- og cellelinjer er spesielt nyttige i screening av legemiddellinkerligandkonjugater (f.eks. ADC-er) for forebyggende eller terapeutiske behandlinger av sykdommer eller lidelser som involverer overekspresjon av et målprotein (f.eks. CD 19, CD20, CD30, CD33, CD70, BCMA, Glypican-3, Liv-1 og Lewis Y). Screeningen av 15 legemiddellinkerligandkonjugater som ADC-er er eksemplifisert heri.

Transgene dyre- og cellelinjer er spesielt nyttige i screening av ADC-er. Screening for et nyttig ADC kan involvere administrering av et kandidat-ADC over en rekke doser til det transgene dyret og analysering på ulike tidspunkt for 20 effekten(e) av ADC-et på sykdommen eller lidelsen som evalueres. Alternativt eller i tillegg kan legemiddelet administreres før eller simultant med eksponering for en induser for sykdommen, hvis det er relevant. Kandidat-ADC-er kan screenes serielt og individuelt, eller parallelt under screeningformat med middels eller høy gjennomstrømningshastighet. Raten ved hvilken ADC-et kan screenes 25 for benyttelse for forebyggende eller terapeutiske behandlinger av sykdommer eller lidelser begrenses kun av synteseraten eller screeningmetodologi, inkludert deteksjon/måling/analyse av data.

Det redegjøres heri for en screeningfremgangsmåte omfattende (a) 30 transplantasjon av celler fra en stabil cancercellelinje inn i et ikke-humant dyr, (b) administrering av en ADC-legemiddelkandidat til det ikke-humane dyret (c) og bestemmelse av kandidatens evne til å hemme dannelsen av tumorer fra den transplanterte cellelinjen.

35 Det redegjøres også for en screeningfremgangsmåte omfattende (a) transplantasjon av celler fra en stabil cancercellelinje inn i et ikke-humant dyr og

å tillate tumoren å etablere seg i dyret, (b) administrering av en ADC-legemiddelkandidat til det ikke-humane dyret (c) og bestemmelse av kandidatens evne til å hemme dannelsen av tumorer fra den transplanterte cellelinjen.

5

Det redegjøres også for en screeningfremgangsmåte omfattende (a) opprettelse av kontakt mellom celler fra en stabil cancercellelinje med en ADC-legemiddelkandidat og (b) evaluering av ADC-kandidatens evne til å indusere celledød. I én utførelsesform evalueres ADC-kandidatens evne til å indusere apoptose.

10

Det redegjøres også for en screeningfremgangsmåte omfattende (a) transplantasjon av celler fra en stabil nyrecellecancercellelinje inn i et ikke-humant dyr, (b) administrering av en ADC-legemiddelkandidat til det ikke-humane dyret (c) og bestemmelse av kandidatens evne til å hemme dannelsen av tumorer fra den transplanterte cellelinjen.

15

Det beskrives også heri en screeningfremgangsmåte omfattende (a) transplantasjon av celler fra en stabil nyrecellecancercellelinje inn i et ikke-humant dyr og å tillate tumoren å etablere seg i dyret, (b) administrering av en ADC-legemiddelkandidat til det ikke-humane dyret (c) og bestemmelse av kandidatens evne til å hemme dannelsen av tumorer fra den transplanterte cellelinjen.

20

Det beskrives også en screeningfremgangsmåte omfattende (a) opprettelse av kontakt mellom celler fra en stabil cellelinje av Hodgkins sykdom med en ADC-legemiddelkandidat og (b) evaluering av ADC-kandidatens evne til å indusere celledød. I én utførelsesform evalueres ADC-kandidatens evne til å indusere apoptose.

25

30

I ett eksempel screenes kandidat-ADC-er ved å bli administrert til det transgene dyret over en rekke doser og evaluering av dyrets fysiologiske respons på kandidaten over tid. Administrering kan være ved egnede injeksjoner eller på annen måte, avhengig av kandidaten som skal evalueres sin kjemiske art. I noen tilfeller kan det være passende å administrere kandidaten sammen med et annet terapeutisk stoff som vil forsterke kandidatens effekt. Hvis cellelinjer avledet fra de transgene pasientdyrene anvendes for å screene for kandidater som er

35

nyttige i behandling av ulike lidelser, tilsettes testkandidatene til cellekulturmediet på en egnet tid, og den cellulære responsen på kandidaten evalueres over tid ved anvendelse av de egnede biokjemiske og/eller histologiske assayene. I noen tilfeller kan det være passende å tilføre kandidaten av interesse til kulturmediet sammen med andre terapeutiske stoff som vil forsterke kandidatens effekt.

Det beskrives således heri assayer for identifisering av legemiddellinkerligandkonjugater (slik som ADC-er) som spesifikt retter seg mot og binder et målprotein, der nærværet er korrelert med unormal cellulær funksjon, og i patogenesen av cellulær proliferasjon og/eller differensiering som har en årsakssammenheng med utviklingen av tumorer.

For å identifisere veksthemmende kandidater som retter seg spesifikt mot et antigen av interesse, kan assayet beskrevet i US-patentnr. 5,677,171 utføres. Man kan screene for forbindelser som hemmer veksten av cancerceller som overuttrykker antigen av interesse avledet fra transgene dyr. Ifølge dette assayet dyrkes cancerceller som overuttrykker antigenet av interesse i en 1:1 blanding av F12 og DMEM-medium supplert med 10 % bovint fosterserum, glutamin og penicillinstreptomycin. Cellene plasseres ved 20 000 i en 35 mm cellekulturskål (2 ml/35 mm skål), og testforbindelsen tilsettes ved ulike konsentrasjoner. Etter seks dager telles antallet celler sammenlignet med ubehandlede celler ved anvendelse av en elektronisk COULTER™-celleteller. Forbindelsene som hemmer cellevekst med omkring 20–100 % eller omkring 50–100 % kan velges som veksthemmende forbindelser.

For å velge kandidater som induserer celledød, kan tap av membranintegritet som indikert ved *f.eks.* PI, trypanblå eller 7AAD-opptak vurderes i forhold til en kontroll. PI-opptaksassayet anvender celler isolert fra tumorvevet av interesse av et transgent dyr. Ifølge dette assayet kultiveres celler i Dulbeccos Modified Eagle Medium (D-MEM):Ham's F-12 (50:50) supplert med 10 % varmeinaktivert FBS (Hyclone) og 2 mM L-glutamin. Assayet utføres således under fravær av komplement- og immuneffektorceller. Cellene kimes ved en densitet på 3×10^6 per skål i 100 x 20 mm skåler, og får binde over natten. Deretter fjernes mediet og erstattes med ferskt medium alene eller medium inneholdende ulike konsentrasjoner av kandidaten. Cellene inkuberes i en 3-dagers tidsperiode. Etter hver behandling skylles monosjikt med PBS og løsnes ved trypsinisering.

Cellene sentrifugeres deretter ved 1200 o/min i 5 minutter ved 4 °C, pelleten resuspenderes i 3 ml kald Ca^{2+} -bindingsbuffer (10 mM Hepes, pH 7,4, 140 mM NaCl, 2,5 mM CaCl_2) og aliquoterer i 35 mm silkorkede 12 x 75 mm glass (1 ml per glass, 3 glass per behandlingsgruppe) for fjerning av celleklumper. Glassene mottar deretter PI (10 µg/ml). Prøver kan analyseres ved anvendelse av et FACSCAN™-strømningscytometer og FACSCONVERT™ CellQuest-programvare (Becton Dickinson). Kandidatene som induserer statistisk signifikante nivåer av celledød som bestemt ved PI-opptak, kan velges som celledønduserende kandidater.

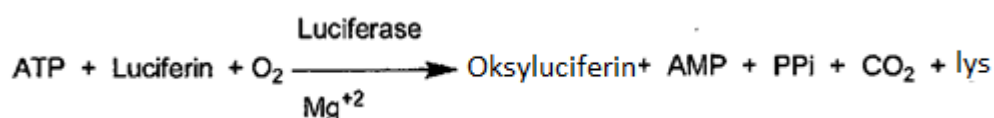
For å velge kandidater som induserer apoptose, utføres et anneksinbindende assay ved anvendelse av celler etablert fra tumorvevet av interesse av det transgene dyret. Cellene dyrkes og kimes i skåler som omtalt i foregående avsnitt. Deretter fjernes og erstattes mediet med ferskt medium alene eller medium inneholdende 10 µg/ml av antistoffkonjugatet (ADC). Etter en tredagers inkuberingsperiode vaskes monosjikt med PBS og løsnes ved trypsinisering. Deretter sentrifugeres cellene, resuspenderes i Ca^{2+} -bindingsbuffer og aliquoterer i glass som omtalt over for celledødashayet. Glassene mottar deretter merket anneksin (f.eks. anneksin V-FITC) (1 µg/ml). Prøver kan analyseres ved anvendelse av et FACSCAN™-strømningscytometer og FACSCONVERT™ CellQuest-programvare (Becton Dickinson). Kandidatene som induserer statistisk signifikante nivåer av anneksinbinding i forhold til kontroll, velges som apoptoseinduserende forbindelser.

***In vitro*-celleproliferasjonsassay**

Den cytotoksiske eller cytostatiske aktiviteten til et legemiddellinkerligandkonjugat, slik som ADC, måles generelt ved: eksponering av pattedyrceller som har reseptorproteiner for konjugatets antistoff i et cellekulturmedium; dyrking av cellene fra omkring 6 timer til omkring 5 dager, foretrukket 96 timer; og måling av cellelevedyktighet. Cellebaserte *in vitro*-assayer anvendes for å måle levedyktighet (proliferasjon), cytotoksisitet og induksjon av apoptose (caspaseaktivering) av et legemiddellinkerkonjugat ifølge oppfinnelsen. Screeningen av legemiddellinkerligandkonjugater som ACD-er er eksemplifisert heri.

Antistofflegemiddelkonjugaters *in vitro*-potens måles ved et celleproliferasjonsassay (se eksempel). CellTiter-Glo[®] Luminescent Cell Viability Assay er en kommersielt tilgjengelig (Promega Corp., Madison, WI), homogen assayfremgangsmåte basert på den rekombinante ekspresjonen av *Coleoptera*-luciferase (US-patentnr. 5,583,024; 5,674,713 og 5,700,670). Dette celleproliferasjonsassayet bestemmer antallet levedyktige celler i kultur basert på kvantitering av tilstedeværende ATP, en indikator på metabolsk aktive celler (Crouch et al., (1993) J. Immunol. Meth. 160:81-88, US-patentnr. 6,602,677). CellTiter-Glo[®]-assayet utføres i 96-brønnersformat, hvilket gjør den mottagelig for automatisk screening med høy gjennomstrømningshastighet (HTS) (Cree et al., (1995) AntiCancer Drugs 6:398-404). Den homogene assayprosedyren involverer tilsetning av den enkelte reagensen (CellTiter-Glo[®]-reagens) direkte til celler kultivert i serumsupplert medium. Cellevasking, fjerning av medium og flere pipetteringsstrinn er ikke påkrevd. Systemet detekterer så få som 15 celler/brønn i et 384-brønnersformat i 10 minutter etter tilsetning av reagens og blanding. Cellene kan behandles kontinuerlig med ADC, eller de kan behandles og separeres fra ADC. Celler behandlet over kort tid, *dvs.* 3 timer, viser generelt de samme potente effektene som kontinuerlig behandlede celler.

Det homogene formatet "tilsett-bland-mål" resulterer i cellelyse og generering av et luminescerende signal som er proporsjonalt med mengden av tilstedeværende ATP. Mengden av ATP er direkte proporsjonal med antallet celler til stede i kultur. CellTiter-Glo[®]-assayet genererer et "glødetype" luminescerende signal, produsert av luciferasereaksjonen, som har en halveringstid på generelt mer enn fem timer, avhengig av anvendt celletype og medium. Levedyktige celler gjenspeiles i relative luminescensenheter (RLU). Substratet, Beetle Luciferin, dekarboksyleres oksidativt ved rekombinant luciferase fra ildflue med samtidig omdannelse av ATP til AMP og generering av fotoner. Den forlengede halveringstiden eliminerer behovet for å anvende reagensinjektorer og tilveiebringer fleksibilitet for kontinuerlig eller batchmodusprosessering av multiple plater. Dette celleproliferasjonsassayet kan anvendes med ulike flerbrønnsformater, *f.eks* 96- eller 384-brønnformat. Data kan registreres med luminometer eller CCD-kameraopptaker. Luminescensutbyttet presenteres som relative lysenheter (RLU) målt over tid.



Antistofflegemiddelkonjugaters antiproliferative effekter kan måles ved celleproliferasjonen, *in vitro*-celledrepande assay mot forskjellige brysttumorlinjer.

5

***In vivo*-plasma-clearance og stabilitet**

Farmakokinetisk plasma-clearance og stabilitet for legemiddellinkerligandkonjugater, slik som ADC-er, kan undersøkes i rotter og cynomolgus-aper over tid. Screening av legemiddellinkerligandkonjugater som ACD-er er eksemplifisert heri.

10

Gnagertoksisitet

15

Antistoffkonjugater og en ADC-minuskontroll, "vehikkel", evalueres i en rottemodell med akutt toksisitet. ADC-ers toksisitet undersøkes ved behandling av Sprague-Dawley-hann- og hunnrotter med ADC-ene og påfølgende inspeksjon og analyse av effektene på ulike organer. Bruttoobservasjon inkluderer endringer i kroppsvekt og tegn til lesjoner og blødning. Kliniske patologiske parametere (serumkjemi og hematologi), histopatologi og nekropsi utføres på doserte dyr. Det anses at vekttap eller vektendring i forhold til dyr dosert kun med vehikkel, hos dyr etter dosering med ADC, er en brutto- og generell indikator på systemisk eller lokalisert toksisitet.

20

25

Hepatotoksisitet måles ved forhøyede leverenzymmer, økte antall mitotiske og apoptotiske figurer og hepatocyttnekrose. Hematolymfoidtoksisitet observeres ved nedbryting av leukocytter, primært granulocytter (nøytrofiler) og/eller blodplater og lymfoidorganinvolvering, *dvs.* atrofi eller apoptotiske aktivitet. Toksisitet kjennetegnes også av mage-tarm-kanallesjoner, slik som økte antall mitotiske og apoptotiske figurer og degenerativ enterokolitt.

30

Enzymer som er indikative på leverskade som studeres inkluderer:

AST (aspartataminotransferase)

- Lokalisering: cytoplasmatisk; lever, hjerte, skjelettmuskulatur, nyre

35

- Lever:plasma-forhold på 7000:1

- T1/2:17 timer
ALT (alaninaminotransferase)
 - Lokalisering: cytoplasmatisk; lever, nyre, hjerte, skjelettmuskulatur
 - Lever:plasma-forhold på 3000:1
- 5
- T1/2:42 timer; døgnvariasjon
 - GGT (g-glutamyltransferase)
 - Lokalisering: plasmamembran av celler med høy sekretorisk eller absorberende kapasitet; lever, nyre, tarm
 - Dårlig prediktor for leverskade; ofte forhøyet i galleganglidelser

10

Toksisitet/sikkerhet for cynomolgus-ape

På lignende vis som studien av rottetoksisitet/-sikkerhet behandles cynomolgus-aper med ADC-er etterfulgt av leverenzymmålinger og inspeksjon og analyse av effektene på ulike organer. Bruttoobservasjon inkluderer endringer i kroppsvekt og tegn til lesjoner og blødning. Kliniske patologiske parametere (serumkjemi og hematologi), histopatologi og nekropsi utføres på doserte dyr.

15

SYNTESE AV FORBINDELSENE

20

Legemiddellinkerligandkonjugatene og legemiddellinkerforbindelsene kan tilberedes ved anvendelse av de syntetiske prosedyrene skissert nedenfor i skjema 1–4. Som beskrevet i nærmere detalj nedenfor kan legemiddellinkerligandkonjugatene og legemiddellinkerforbindelsene fremstilles ved anvendelse av en seksjon av en linkerenheter som har et reaktivt sted for binding til legemiddelenheten. I ett aspekt introduseres en andre seksjon av linkerenheter som har et andre reaktivt sted, *f.eks.* en elektrofil gruppe, som er reaktiv overfor en nukleofil gruppe som er til stede på en ligandenhet (*f.eks.* et antistoff). Nyttige nukleofile grupper på et antistoff inkluderer, men er ikke begrenset til, sulfhydryl-, hydroksyl- og aminogrupper. Heteroatomet av den nukleofile gruppen for et antistoff er reaktivt overfor en elektrofil gruppe på en linkerenheter og danner en kovalent binding til en linkerenheter. Nyttige elektrofile grupper inkluderer, men er ikke begrenset til, maleimid- og

25

30

haloacetamidgrupper. Den elektrofile gruppen tilveiebringer et praktisk sted for antistoffbinding.

5 En linkerenheter kan ha et reaktivt sted som har en nukleofil gruppe som er reaktiv overfor en elektrofil gruppe som er til stede på et antistoff. Nyttige elektrofile grupper på et antistoff inkluderer, men er ikke begrenset til, aldehyd- og ketonkarbonylgrupper. Heteroatomet av en nukleofil gruppe for en linkerenheter kan reagere med en elektrofil gruppe på et antistoff og danne en kovalent binding til antistoffenheten. Nyttige nukleofile grupper på en
10 linkerenheter inkluderer, men er ikke begrenset til, hydrazid, oksim, amino, hydrazin, tiosemikarbazon, hydrazinkarboksylat og arylhydrazid. Den elektrofile gruppen på et antistoff tilveiebringer et praktisk sted for binding til en linkerenheter.

15 Aminofunksjonelle grupper er også nyttige reaktive steder for en linkerenheter, fordi de kan reagere med karboksylsyre eller aktiverte estere av en legemiddelenhet for å danne en amidbinding. Peptidbaserte legemiddelenheter kan typisk fremstilles ved dannelsen av en peptidbinding mellom to eller flere aminosyrer og/eller peptidfragmenter. Slike peptidbindinger kan for eksempel
20 fremstilles ifølge væskefasesyntesefremgangsmåten (se f.eks. E. Schröder and K. Lübke "The Peptides", volum 1, s. 76–136, 1965. Academic Press) som er velkjent innenfor området peptidkjemi.

25 Syntesen av en illustrerende stretcher som har en elektrofil maleimidgruppe er illustrert nedenfor i skjema 1–3. Generelle syntetiske fremgangsmåter som er nyttige for syntese av legemiddellinkerforbindelser beskrives i skjema 1. Skjema 2 og 3 viser konstruksjonen av en linkerenheter som har en elektrofil maleimidgruppe. Skjema 4 skisserer bindingen av et antistoff til en legemiddellinkerforbindelse for å danne et legemiddellinkerligand (antistoff)-
30 konjugat.

Som beskrevet i nærmere detalj nedenfor kan legemiddellinkerligandkonjugatene fremstilles ved anvendelse av en seksjon av linker som har et reaktivt sted for binding til legemiddelenheten og
35 introduksjon av en annen seksjon av linkerenheten som har et reaktivt sted for en ligandenhet. En linkerenheter kan ha et reaktivt sted som har en elektrofil gruppe som er reaktiv med en nukleofil gruppe som er til stede på en

ligandenhet, slik som et antistoff. Den elektrofile gruppen tilveiebringer et praktisk sted for antistoffbinding. Nyttige nukleofile grupper på et antistoff inkluderer, men er ikke begrenset til, sulfhydryl-, hydroksyl- og aminogru-
 5 pper. Heteroatomet av den nukleofil gruppen for et antistoff er reaktivt overfor en elektrofil gruppe på en linker-
 enhet og danner en kovalent binding til en linker-
 enhet. Nyttige elektrofile grupper inkluderer, men er ikke begrenset til, maleimid- og haloacetamidgrupper.

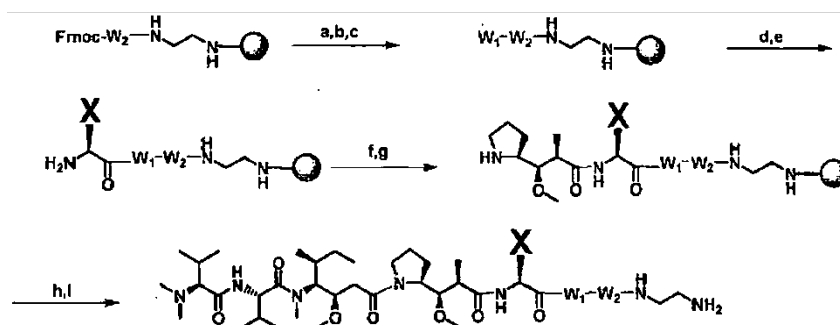
En linker-
 10 enhet kan ha et reaktivt sted som har en nukleofil gruppe som er reaktiv med en elektrofil gruppe som er til stede på en ligandenhet, slik som et antistoff. Den elektrofile gruppen på et antistoff tilveiebringer et praktisk sted for binding til en linker-
 enhet. Nyttige elektrofile grupper på et antistoff inkluderer, men er ikke begrenset til, aldehyd- og ketonkarbonylgrupper. Heteroatomet av en nukleofil gruppe for en linker-
 15 enhet kan reagere med en elektrofil gruppe på et antistoff og danne en kovalent binding til antistoffenheten. Nyttige nukleofile grupper på en linker-
 enhet inkluderer, men er ikke begrenset til, hydrazid, oksim, amino, hydrazin, tiosemikarbazon, hydrazinkarboksylat og arylhydrazid.

Legemiddeldel og linkersyntese

20 Peptidbaserte legemiddel kan typisk fremstilles ved dannelse av en peptidbinding mellom to eller flere aminosyrer og/eller peptidfragmenter. Slike peptidbindinger kan for eksempel fremstilles ifølge væskefasesyntesefremgangsmåten (se E. Schröder and K. Lübke "The Peptides", volum 1, s. 76–136, 1965. Academic Press) som er velkjent innenfor området peptidkjemi.

Auristatin/dolastatin-legemiddeldelene kan fremstilles ifølge de generelle fremgangsmåtene i: US-patentnr. 5,635,483; US-patentnr. 5,780,588; Pettit et al., 1989, J. Am. Chem. Soc. 111:5463-5465; Pettit et al., 1998, Anti-Cancer
 30 Drug Design 13:243-277; og Pettit et al., 1996, J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1 5:859-863.

Skjema 1. Fastfasesyntesevei



Reaksjonsbetingelser (a): 20 % piperidin/DMF, (b) Fmoc-W₁ (2–5 ekviv.), HATU (2–5 ekviv.) og DIEA, (4–10 ekviv.), (c) 20 % piperidin/DMF, (d) Fmoc-NH-CH(X)-COOH (2 ekviv.) HATU (2 ekviv.) og DIEA (4 ekviv.), (e) 20 % piperidin/DMF, (f): Fmoc Dap (2 ekviv.) HATU (2 ekviv.) og DIEA (4 ekviv.), (g) 20 % piperidin/DMF, (h) Dov-Val-Dil-OH (2 ekviv.), HATU (2 ekviv.) og DIEA (4 ekviv.), (i): 95 % TFA/diklormetan.

- 5 Aminosyrer som ikke er kommersielt tilgjengelige forlastet på en egnet syrelabil harpiks, foretrukket 1,2-diaminoetan tritylharpiks, kan lastes på 1,2-diaminoetan tritylharpiks som beskrevet i generell prosedyre SP(a). Last kan bestemmes ved spektrofotometrisk Fmoc-kvantiteringsassay. Lastnivåer (mmol/g) for kommersielt tilgjengelige forlastede aminosyrer på 1,2-diaminoetan tritylharpiks kan bestemmes som beskrevet i generell prosedyre SP(d). Peptider kan deretter sammenstilles på harpiksen lastet med aminosyrer av aminosyreenheten ved kobling av Fmoc-aminosyre ved anvendelse av egnet koblingsreagens, foretrukket HATU/DIEA, etterfulgt av Fmoc-avbeskyttelse og påfølgende kobling med reagenser som danner legemiddelenheten. Legemiddelenhetssyntese kan oppnå ved deretter å koble Fmoc-dolaproin ved anvendelse av egnet koblingsmiddel, foretrukket HATU/DIEA, etterfulgt av Fmoc-avbeskyttelse og påfølgende kobling av Fmoc-MeVal-Val-Dil tripeptid. Koblingsrutine for fast fase er veletablert i teknikken og beskrives i generell prosedyre SP(c). Endelig avbeskyttelse av peptider og avspalting av harpiks kan enkelt utføres ved å følge generell prosedyre SP(d).
- 10
- 15
- 20
- 25

Legemiddellinkerforbindelser inneholdende kun én aminosyre i linkerenheten ble fremstilt ved å følge prosedyren over, men hoppe over trinn (b) og (c).

- 30 Legemiddellinkerforbindelser inneholdende mer enn 2 aminosyrer i linkerenheten ble fremstilt ved å inkorporere ytterligere trinn (b), (c)) med Fmoc-W₃

Monometylversjoner av legemiddellinkere ble fremstilt ved substituering av Dov-Val-Dil-OH i trinn (h) med Fmoc-MeVal-Val-Dil-OH. Fmoc ble fjernet ved 20 % piperidin/DMF-behandling før avspalting av forbindelse fra harpiksen, trinn (i).

- 5 Auristatiner inneholdende ulike aminosyrer ved legemiddelets C-terminal ble generert ved anvendelse av tilsvarende Fmoc-NH-CH(X)-COOH i trinn (d): for eksempel Fmoc-fenylalanin for auristatin F (AF); Fmoc-metionin for auristatin M (AM); Fmoc-tryptofan for auristatin W (AW), osv.

10 **Generell prosedyre SP(a): Harpikslast**

- Fmoc-aminosyre suspenderes i vannfritt løsemiddel slik som CH₂Cl₂ og DIEA. Den resulterende blandingen tilsettes til en sprøyte inneholdende 1,2-diaminoetan tritylharpiks. Blandingene omrøres ved romtemperatur, deretter
15 filtreres harpiksen, vaskes med løsemiddel slik som DCM/MeOH/DIEA, MeOH, DCM, DMF, etyleter, og tørkes *in vacuo*. Harpiksen får deretter stå under vakuum natten over.

- Last bestemmes ved Fmoc-kvantitering. En kjent mengde harpiks veies i en volumetrisk kolbe, og til kolben tilsettes det et løsemiddel slik som 20 % piperidin/DMF. Blandingene tillates å spalte i omkring 1 t med sporadisk omrøring. Til kolben overføres det et løsemiddel slik som DMF for å bringe det totale volumet til et fastsatt nivå (f.eks. 10 ml). En blank løsning fremstilles med et ekvivalent volum av 20 % piperidin/DMF i en volumetrisk kolbe.
25 Spektrofotometeret nullstilles med den blanke løsningen. Absorbansen måles ved 301 nm, og lastnivået gis ved:

$$\text{Last (nmol/g)} = A_{301} \times 10 \text{ ml} / 7800 \text{ vekt\%,}$$

- hvorved A_{301} er absorbansen ved 301 nm, 7800 er piperidin-fluorenonadduktets ekstinksjonskoeffisient, og wt er vekten av anvendt harpiks i milligram. Fmoc-kvantitering utføres generelt i duplikat.
30

Generell prosedyre SP(b): Fmoc-kvantitering av kommersielt tilgjengelige forlastede harpikser

- 35 Fmoc-Cl oppløses i vannfri løsning, slik som CH₂Cl₂, for å ferdigstille en arbeidsløsning. Denne løsningen overføres til en plastsprøyte inneholdende

- aminosyre-1,2-diaminoetan tritylharpiks. Blandingen omrøres i omkring 2 t. Deretter filtreres harpiksen og vaskes med egnede løsemiddel, slik som DMF, CH₂Cl₂ eller etyleter, og tørkes *in-vacuo* i omkring 2 t. Harpiksen utsettes for Kaiser-amintest. Ved negative resultater (fritt amin helt beskyttet), utføres
- 5 Fmoc-kvantiteringen for å oppnå lastnivå som vist i generell prosedyre SP(a).

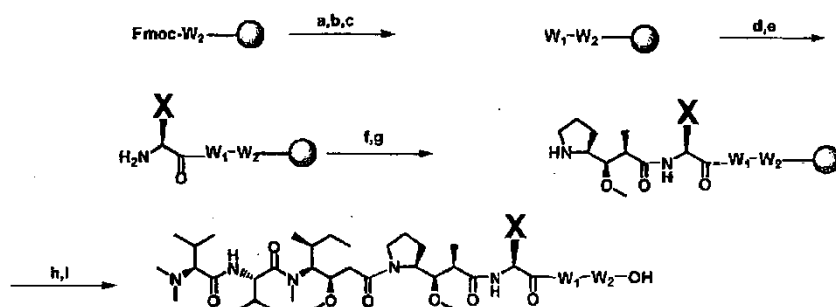
Generell prosedyre SP(c): Peptidkobling for fast fase ved anvendelse av HATU

- 10 En løsning av 20 % piperidin i DMF tilsettes til sprøyten med en PET-fritte inneholdende harpiks, og blandingen omrøres i omkring 2 t. Deretter filtreres harpiksen, vaskes med egnede løsemiddel, slik som DMF, DCM eller etyleter, og tørkes *in-vacuo* i omkring 2 t.
- 15 En løsning av Fmoc-aminosyre, HATU og DIEA i DMF ble deretter tilsatt til harpiksen, som ble ristet i omkring 4 t, vasket og tørket. På denne måten ble Fmoc-Phe, Fmoc-Dap og Dov-Val Dil-OH (eller Fmoc-MeVal-Val-Dil) koblet sekvensielt på harpiksen som beskrevet tidligere.

- 20 **Generell prosedyre SP(d): Endelig avbeskyttelse av avspalting av harpiks.**

- Harpiksen ble deretter behandlet med en løsning av 95 % TFA/diklormetan og vasket med 95 % TFA/diklormetan. Det kombinerte filtratet ble tillatt å stå ved romtemperatur i omkring 30 min, deretter konsentrert til tørrhet. Produktet ble
- 25 rensset ved omvendt fase-preparativ HPLC.

Alternativt kan legemiddellinkere fremstilles på klortritylharpiks som vist i skjema 1a:



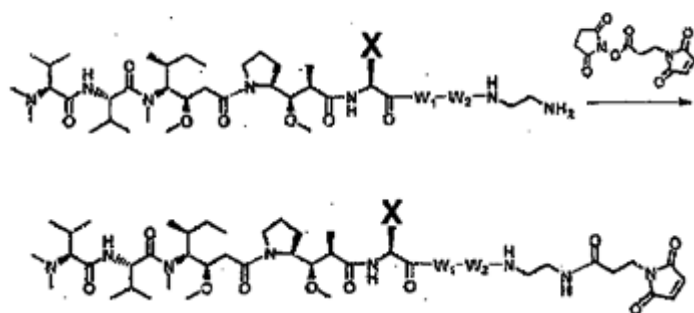
De samme reaksjonsbetingelsene anvendes som i skjema 1. (Bemerk: det frie hydroksylet etter trinn h, i er del av W₂.)

5 Fullførelse av legemiddellinkersyntese

For å fullføre syntesen av legemiddellinkerforbindelsen og for å introdusere et reaktivt sted som vil bli anvendt for konjugering med en ligand, reageres den delvise legemiddellinkerforbindelsen, som avspaltet fra harpiksen, med en annen del av en stretcherenhet for å danne en fullstendig legemiddellinkerforbindelse.

I ett aspekt reagerer den delvise legemiddellinkerforbindelsen med en karboksylsyre eller en aktivert ester av stretcherenhetens andre del. Se for eksempel skjema 2.

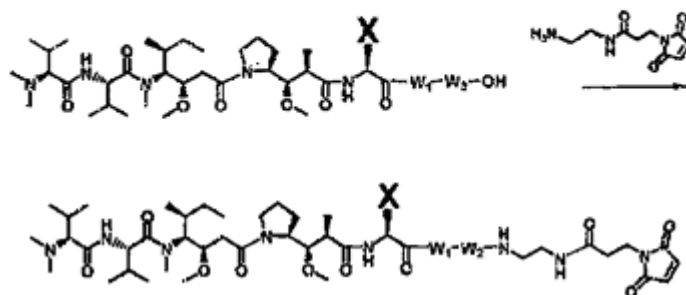
15 Skjema 2



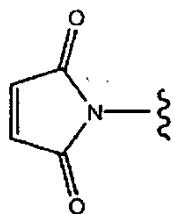
Reaksjonsbetingelser: Maleimidopropionsyre NHS-ester (2 ekviv.), DIEA (2 ekviv.), DMF.

I et annet aspekt reagerer den delvise legemiddellinkerforbindelsen fremstilt ifølge skjema 1a med et amin av stretcherenhetens andre del ved å følge standard koblingsprosedyrer ifølge peptidkjemi. Se for eksempel skjema 2a.

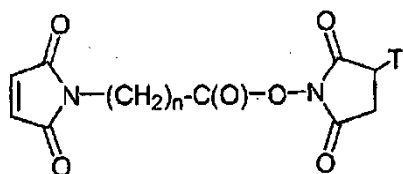
5 Skjema 2a



I ett aspekt inneholder den andre delen av stretcherenheten også en tiolaksepterende gruppe. Egnede tiolaksepterende grupper inkluderer for eksempel: haloacetamidgrupper eller maleimidgrupper som har formelen

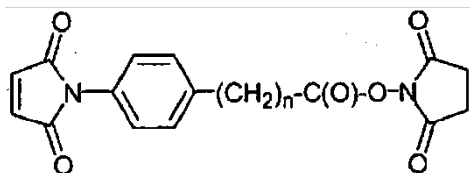


Nyttige stretcherenheter kan oppnås via kommersielle kilder, slik som Molecular Biosciences Inc. (Boulder, CO), eller som vist nedenfor. I tillegg kan stretcherenheter fremstilles som oppsummert i skjema 3 nedenfor. Skjema 3 illustrerer en generell syntese av en illustrerende stretcherenhet inneholdende en maleimidstretcherenhet.

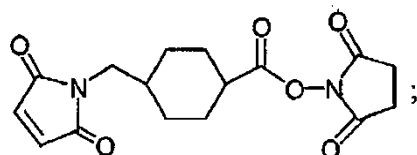


84

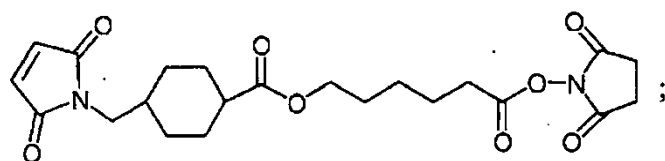
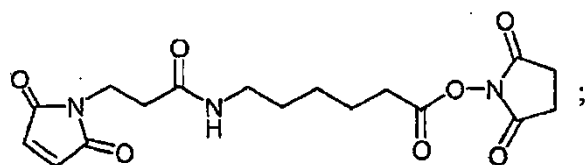
hvor n er et heltall som spanner fra 1-10, og T er -H eller -SO₃Na;



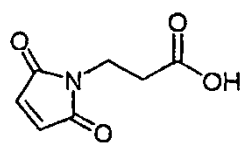
hvor n er et heltall som spanner fra 0-3,



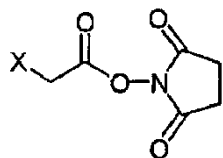
5



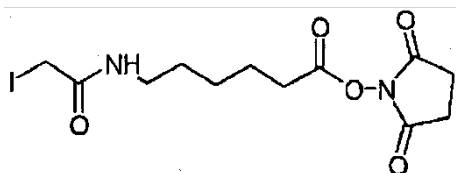
og



10

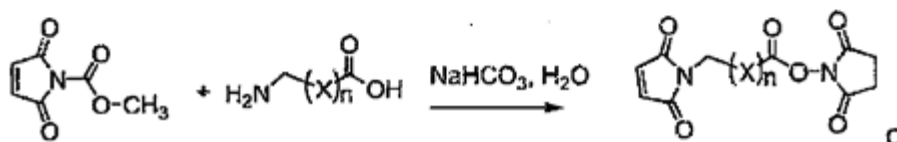
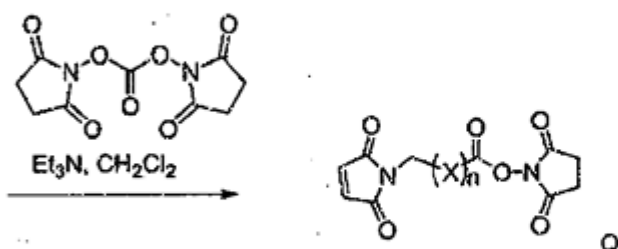
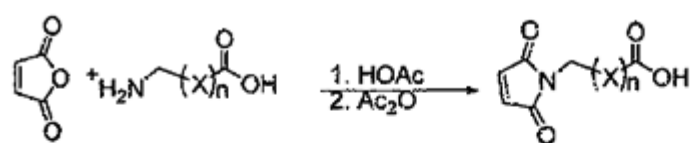


hvor X er Br- eller -I; og



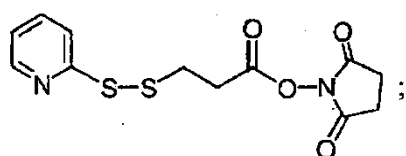
Følgende skjema 3 viser fremgangsmåter for oppnåelse av en stretcherenhet inneholdende en aktivert ester for å reagere med en aminosyreenhet, og som har et maleimid for konjugering med en ligandenhet.

Skjema 3

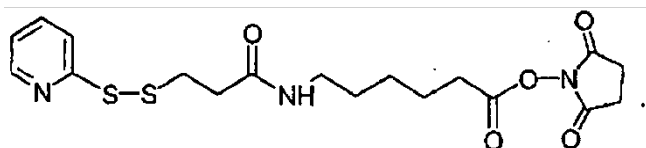


hvor X er -alkylen-, -arylen-, C₃-C₈ karbocyklo-, C₃-C₈-heterosyklo-, -heteroalkylen-; og n er et heltall som spenner enten fra 0-1.

Andre nyttige ligandreaktive stretcherenheter inneholder aktiverte disulfider som vist nedenfor. De kan introduseres i en legemiddellinkerforbindelse ved å reagere følgende mellomprodukter med legemiddellinkerforbindelsens aminfunksjon:

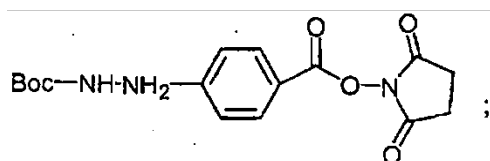


og

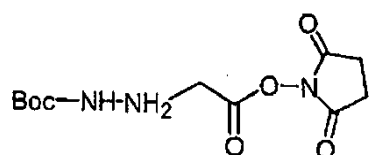


5

Stretcherenheter med formel (Va) kan introduseres til en linker enhet ved å reagere følgende mellomprodukter med N-terminalen av en aminosyreenhet:



og



10

Andre nyttige stretcherenheter kan syntetiseres ifølge kjente prosedyrer. Aminooksystretchere med formelen vist nedenfor kan fremstilles ved behandling av alkylhalider med N-Boc-hydroksylamin ifølge prosedyrer beskrevet i Jones et al., 2000, Tetrahedron Letters 41(10):1531-1533; og Gilon et al., 1967, Tetrahedron 23(11):4441-4447. Aminooksygruppen reagerer med en reaktiv gruppe på ligandenheten.

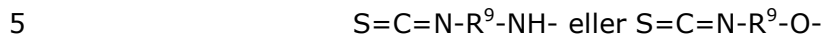
15



20

hvor -R^9 er valgt fra gruppen bestående av $\text{-C}_1\text{-C}_{10}$ alkyl-, $\text{-C}_3\text{-C}_8$ karbocyklo-, -arylen-, $\text{-C}_1\text{-C}_{30}$ heteroalkyl-, $\text{-C}_3\text{-C}_8$ heterosyklo-, $\text{-C}_1\text{-C}_{10}$ alkyl-arylen-, -arylen- $\text{-C}_1\text{-C}_{10}$ alkyl-, $\text{-C}_1\text{-C}_{10}$ alkyl-($\text{-C}_3\text{-C}_8$ karbocyklo)-, $\text{-(C}_3\text{-C}_8 \text{ karbocyklo)-C}_1\text{-C}_{10}$ alkyl-, $\text{-C}_1\text{-C}_{10}$ alkyl-($\text{-C}_3\text{-C}_8$ heterosyklo)- og $\text{-(C}_3\text{-C}_8 \text{ heterosyklo)-C}_1\text{-C}_{10}$ alkyl-.

Isotiocyanatstretchere med formelen vist nedenfor kan fremstilles fra isotiocyanatkarboksylsyreklorider som beskrevet i Angew. Chem., 87(14):517 (1975). Isotiocyanatgruppen reagerer med en reaktiv gruppe på ligandenheten.



hvor $-\text{R}^9-$ er som beskrevet heri.

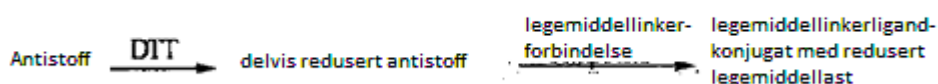
Konjugering av legemiddellinkerforbindelser til ligandenheter

10

Skjema 4 illustrerer metodologi som er nyttig for tilberedning av legemiddellinkerligandkonjugater som har omkring 2 til omkring 4 legemiddel per ligandenhet, som eksemplifisert av et antistoff. Et antistoff behandles med et reduksjonsmiddel, slik som ditiotreitol (DTT), for å redusere noen av eller alle interkjedecysteindisulfidrestene for å danne svært nukleofile cysteintiolgrupper ($-\text{CH}_2\text{SH}$). Det delvis reduserte antistoffet reagerer således med legemiddellinkerforbindelsen eller linkerenhetsreagenser med elektrophile funksjonsgrupper slik som maleimid eller α -halokarbonyl, ifølge konjugeringsfremgangsmåten på side 766 i Klussman et al., 2004, Bioconjugate Chemistry 15(4):765-773.

20

Skjema 4



25

Et antistoff oppløst i for eksempel 500 mM natriumborat og 500 mM natriumklorid ved pH 8,0 behandles med et overskudd av 100 mM ditiotreitol (DTT). Etter inkubering ved 37 °C i ca. 30 minutter utveksles bufferen ved eluering over Sephadex G25-harpiks, og elueres med PBS med 1 mM DTPA. Tiol/Ab-verdien kontrolleres ved bestemmelse av den reduserte antistoffkonsentrasjonen fra absorbansen ved 280 nm av løsningen og tiolkonsentrasjonen ved reaksjon med DTNB (Aldrich, Milwaukee, WI) og bestemmelse av absorbansen ved 412 nm. Det reduserte antistoffet oppløses i PBS og kjøles på is. Legemiddellinkerforbindelsen i DMSO, oppløst i acetonitril og vann ved kjent konsentrasjon, tilsettes til det kjølte reduserte antistoffet i PBS. Etter ca. én time tilsettes et overskudd av maleimid for å stanse reaksjonen og

30

korke eventuelle ureagerte antistofftiolgrupper. Reaksjonsblandingen konsentreres ved sentrifugal ultrafiltrering, og ADC-et renses og avsaltes ved eluering gjennom G25-harpiks i PBS, filtreres gjennom 0,2 µm filtre under sterile betingelser og fryses for lagring.

5

En rekke ADC-er kan fremstilles, med en rekke linkere og en rekke legemiddeldeler, ved å følge eksemplenes protokoller, og karakterisert ved HPLC- og legemiddellastassay.

10

Sammensetninger og fremgangsmåter for administrering

Det beskrives også en farmasøytisk sammensetning som inkluderer en virkningsfull mengde av et legemiddellinkerligandkonjugat og/eller en legemiddellinkerforbindelse og en farmasøytisk akseptabel bærer eller vehikkel.

15

Sammensetningene er egnet for veterinær eller human administrering.

De foreliggende farmasøytiske sammensetningene kan være i hvilken som helst form som tillater sammensetningen å bli administrert til en pasient. Sammensetningen kan for eksempel være i form av et faststoff eller væske. Typiske administreringsveier inkluderer, uten begrensning, parenteral, okulær og intratumor. Parenteral administrering inkluderer subkutane injeksjoner, intravenøse, intramuskulære eller intrasternale injeksjons- eller infusjonsteknikker. Sammensetningene kan administreres parenteralt. Sammensetningene kan alternativt administreres intravenøst.

25

Farmasøytiske sammensetninger kan formuleres for å tillate et legemiddellinkerligandkonjugat og/eller en legemiddellinkerforbindelse å være biotilgjengelig ved administrering av sammensetningen til en pasient. Sammensetninger kan ta form av én eller flere doseringsenheter, hvor for eksempel en tablett kan være en enkelt doseringsenhet, og en beholder for et legemiddellinkerligandkonjugat og/eller en legemiddellinkerforbindelse i væskeform kan romme en flerhet doseringsenheter.

30

Materialer anvendt i fremstillingen av de farmasøytiske sammensetningene kan være ikke-toksiske i de anvendte mengdene. Det vil være åpenbart for fagmannen at den optimale doseringen av de(n) aktive ingrediensen(e) i den

35

farmasøytiske sammensetningen vil avhenge av en rekke faktorer. Relevante faktorer inkluderer, uten begrensning, typen dyr (f.eks. menneske), legemiddellinkerligandkonjugatet og/eller en legemiddellinkerforbindelsens spesielle form, administreringsmåten og sammensetningen som benyttes.

5

Den farmasøytisk akseptable bæreren eller vehikkelen kan være fast eller i partikkelform, slik at sammensetningene for eksempel er i tablett- eller pulverform. Bæreren/bærerne kan være væske. I tillegg kan bæreren/bærerne kan være i partikkelform.

10

Sammensetningen kan være i form av en væske, f.eks. en løsning, emulsjon eller suspensjon. I en sammensetning for administrering ved injeksjon kan også én eller flere av en surfaktant, fuktemiddel, dispergeringsmiddel, suspensjonsmiddel, buffer, stabilisator og isotont middel være inkludert.

15

Væskesammensetningene, enten de er løsninger, suspensjoner eller annen lignende form, kan også inkludere én eller flere av følgende: sterile fortynnere slik som vann for injeksjon, saltløsning, foretrukket fysiologisk saltløsning, Ringers løsning, isoton natriumklorid, faste oljer slik som syntetiske mono- eller diglyserider som kan tjene som løsemiddelet eller suspensjonsmedium, polyetylenglykoler, glyserin, syklodekstrin, propylenglykol eller andre løsemiddel; antibakterielle stoff slik som benzylalkohol eller metylparaben; antioksidanter slik som askorbinsyre eller natriumbisulfitt; chelatdannere slik som etylendiamintetraeddiksyre; buffere slik som acetater, citrater, fosfater eller aminosyrer og middel for justeringen av tonisitet, slik som natriumklorid eller dekstrose. En parenteral sammensetning kan være innelukket i ampull, en engangssprøyte eller en flerdoseflaske ferdigstilt av glass, plass eller annet materiale. Fysiologisk saltløsning er et eksempel på et hjelpestoff. En injiserbar sammensetning er foretrukket steril.

25

30

Mengden av legemiddellinkerligandkonjugatet og/eller en legemiddellinkerforbindelse som er virkningsfull i behandlingen av en spesiell lidelse eller tilstand vil avhenge av lidelsen eller tilstandens art, og kan bestemmes ved standard kliniske teknikker. *In vitro*- eller *in vivo*-assayer kan i tillegg eventuelt benyttes for å bidra til å identifisere optimale doseringsområder. Den nøyaktige dosen som skal benyttes i sammensetningen vil også avhenge av

35

administreringsveien og sykdommen eller lidelsens alvorlighetsgrad, og skal avgjøres ifølge legens skjønn og hver pasients omstendigheter.

5 Sammensetningen omfatter en virkningsfull mengde av et legemiddellinkerligandkonjugat og/eller en legemiddellinkerforbindelse slik at en egnet dosering vil bli oppnådd. Denne mengden er typisk omkring 0,01 vekt-% av sammensetningen av et legemiddellinkerligandkonjugat og/eller en legemiddellinkerforbindelse. Farmasøytiske sammensetninger kan for eksempel fremstilles slik at en parenteral doseringsenhet inneholder fra omkring 0,01 10 vekt-% til omkring 2 vekt-% av legemiddellinkerligandkonjugatet og/eller en legemiddellinkerforbindelse.

For intravenøs administrering kan sammensetningen omfatte fra omkring 0,01 til 100 mg av et legemiddellinkerligandkonjugat og/eller en 15 legemiddellinkerforbindelse per kilo av pasientens kroppsvekt. Sammensetningen inkluderer fra omkring 1 til 100 mg av et legemiddellinkerligandkonjugat og/eller en legemiddellinkerforbindelse per kilo av pasientens kroppsvekt. Den administrerte mengden kan være i området fra omkring 0,1 til 25 mg/kg kroppsvekt av legemiddellinkerligandkonjugatet 20 og/eller en legemiddellinkerforbindelse.

Doseringen av et legemiddellinkerligandkonjugat og/eller en legemiddellinkerforbindelse administrert til en pasient er generelt typisk omkring 0,01 mg/kg til omkring 20 mg/kg av pasientens kroppsvekt. Doseringen 25 administrert til en pasient kan være mellom omkring 0,01 mg/kg til omkring 10 mg/kg av pasientens kroppsvekt. Doseringen administrert til en pasient kan også være mellom omkring 0,1 mg/kg of omkring 10 mg/kg av pasientens kroppsvekt. Doseringen administrert til en pasient kan være mellom omkring 0,1 mg/kg of omkring 5 mg/kg av pasientens kroppsvekt. Alternativt kan den 30 administrerte doseringen være mellom omkring 0,1 mg/kg til omkring 3 mg/kg av pasientens kroppsvekt. Den administrerte doseringen kan være mellom omkring 1 mg/kg til omkring 3 mg/kg av pasientens kroppsvekt.

35 Legemiddellinkerligandkonjugatet og/eller en legemiddellinkerforbindelse kan administreres ved hvilken som helst praktisk vei, for eksempel ved infusjon eller bolusinjeksjon. Administreringen kan være systemisk eller lokal. Ulike administreringssystem er kjent, f.eks. innkapslet i liposomer, mikropartikler,

mikrokapsler, kapsler, osv., og kan anvendes for å administrere et legemiddellinkerligandkonjugat og/eller en legemiddellinkerforbindelse. I visse eksempel administreres mer enn ett legemiddellinkerligandkonjugat og/eller en legemiddellinkerforbindelse til pasienten.

5

I spesifikke eksempel kan det være ønskelig å administrere ett eller flere legemiddellinkerligandkonjugater og/eller en legemiddellinkerforbindelse lokalt til området med behov for behandling. Dette kan for eksempel uten begrensning oppnås ved lokal infusjon under kirurgi; topisk administrering, f.eks. sammen med en sårbandasje etter kirurgi; ved injeksjon, ved hjelp av et kateter; eller ved hjelp av et implantat, der implantatet er av et porøst, ikke-porøst eller gelatinøst materiale, inkludert membraner slik som silastiske membraner eller fibre. I ett eksempel kan administrering være ved direkte injeksjon på stedet (eller tidligere stedet) for en cancer, tumor eller et neoplastisk eller preneoplastisk vev. I et annet kan administrering være ved direkte injeksjon på stedet (eller tidligere stedet) for en manifestasjon av en autoimmun sykdom.

10

15

I nok et annet eksempel kan legemiddellinkerligandkonjugatet og/eller en legemiddellinkerforbindelse leveres i et kontrollert frisettingssystem slik som, men ikke begrenset til, en pumpe, eller ulike polymere materialer kan anvendes. I nok et annet eksempel kan et kontrollert frisettingssystem plasseres i nærheten av legemiddellinkerligandkonjugatet og/eller en legemiddellinkerforbindelses mål, f.eks. leveren, som således krever kun en fraksjon av den systemiske dosen (se f.eks. Goodson, in Medical Applications of Controlled Release, ovenfor, bd. 2, s. 115-138 (1984)). Andre kontrollerte frisettingssystem omtalt i gjennomgåelsen foretatt av Langer, (Science 249:1527-1533 (1990)) kan anvendes.

20

25

Betegnelsen "bærer" betyr en fortynner, et hjelpestoff eller en eksipient som et legemiddellinkerligandkonjugat og/eller en legemiddellinkerforbindelse administreres med. Slike farmasøytiske bærere kan være væsker slik som vann og oljer, inkludert de av petroleum-, dyre-, vegetabilsk eller syntetisk opprinnelse. Bærerne kan være saltløsning og lignende. Hjelpestoff, stabiliseringsmiddel og andre middel kan i tillegg anvendes. I ett eksempel, når de administreres til en pasient, er legemiddellinkerligandkonjugatet og/eller legemiddellinkerforbindelsen og farmasøytisk akseptable bærere sterile. Vann er et eksempel på en bærer når legemiddellinkerligandkonjugatet og/eller en

30

35

legemiddellinkerforbindelse administreres intravenøst. Saltløsninger og vandig dekstrose og glyserolløsninger kan også benyttes som flytende bærere, særlig for injiserbare løsninger. De foreliggende sammensetningene kan om ønskelig også inneholde mindre mengder fuktmiddel eller emulgeringsmiddel eller pH-buffermiddel.

De foreliggende sammensetningen kan ta form av løsninger, pelleter, pulvere, formuleringer for vedvarende frisetting eller hvilken som helst annen form egnet for anvendelse. Andre eksempel på egnede farmasøytiske bærere beskrives i "Remington's Pharmaceutical Sciences" av E.W. Martin.

I et eksempel er legemiddellinkerligandkonjugatene og/eller legemiddellinkerforbindelsene formulert i henhold til rutineprosedyrer som en farmasøytisk sammensetning tilpasset for intravenøs administrering til dyr, spesielt mennesker. Bærerne eller vehiklene for intravenøs administrering er typisk sterile isotoniske, vandige bufferløsninger. Sammensetningene kan om nødvendig også inkludere et solubiliseringsmiddel. Sammensetninger for intravenøs administrering kan eventuelt omfatte et lokalt bedøvelsesmiddel slik som lignokain for å redusere smerte på injeksjonsstedet. Ingrediensene leveres generelt enten separat eller blandet sammen i enhetsdoseringsform, for eksempel som et frysetørket tørrpulver eller vannfritt konsentrat i en hermetisk forseglet beholder slik som en ampull eller dosepose som indikerer mengden av aktivt middel. Hvor et legemiddellinkerligandkonjugat og/eller legemiddellinkerforbindelse skal administreres ved infusjon, kan den for eksempel dispenseres med en infusjonsflaske inneholdende sterilt vann eller saltløsning av farmasøytisk kvalitet. Hvor legemiddellinkerligandkonjugatet og/eller legemiddellinkerforbindelsen administreres ved injeksjon, kan en ampull med sterilt injeksjonsvann eller saltløsning tilveiebringes slik at ingrediensene kan blandes før administrering.

Sammensetningen kan inkludere ulike materialer som modifierer den fysiske formen til en fast eller flytende doseringsenhet. Sammensetningen kan for eksempel inkludere materialer som danner et overtrekksskall omkring de aktive ingrediensene. Materialene som danner overtrekksskallet er typisk inerte og kan velges fra for eksempel sukker, skjellakk og andre enteriske overtrekksmiddel. Alternativt kan de aktive ingrediensene innkapsles i en gelatinkapsel.

Enten de er i fast eller flytende form kan de foreliggende sammensetningene inkludere et farmakologisk middel anvendt i behandlingen av cancer, en autoimmun sykdom eller en infeksjons sykdom.

5 **Terapeutiske anvendelser av legemiddellinkerligandkonjugatene og/eller legemiddellinkerforbindelsene**

10 Legemiddellinkerligandkonjugatene og/eller legemiddellinkerforbindelsene er nyttige for behandling av cancer, en autoimmun sykdom eller en infeksjons sykdom hos en pasient.

Behandling av cancer

15 Legemiddellinkerligandkonjugatene og legemiddellinkerforbindelsene er nyttige for hemming av mangfoldiggjøringen av en tumorcelle eller en cancercelle, å forårsake apoptose i en tumor eller cancercelle eller for behandling av cancer hos en pasient. Legemiddellinkerligandkonjugatene og/eller legemiddellinkerforbindelsene kan anvendes i samsvar med en rekke situasjoner for behandlingen av dyrecancere. Legemiddellinkerligandkonjugatene kan
20 anvendes for å levere et legemiddel eller en legemiddelenhet til en tumorcelle eller cancercelle. Uten å være teoretisk bundet kan et legemiddellinkerligandkonjugats ligandenheter være bundet til eller assosiert med en cancercelle eller et cancercelleassosiert antigen, og legemiddellinkerligandkonjugatet kan tas opp (internaliseres) inni en tumorcelle
25 eller cancercelle gjennom reseptormediert endocytose eller annen internaliseringsmekanisme. Antigenet kan være bundet til en tumorcelle eller cancercelle, eller kan være et ekstracellulært matriseprotein assosiert med tumorcellen eller cancercellen. Når de er inni cellen, spaltes én eller flere spesifikke peptidsekvenser innenfor eller ved legemiddelenhetens proksimale
30 ende av linkerenheten av én eller flere tumorcelle- eller cancercelleassosierte proteaser hydrolytisk, som resulterer i frisetting av legemiddelenheten. Den frisatte legemiddelenheten er deretter fri til å migrere innenfor cellen og indusere cytotoksiske eller cytostatiske aktiviteter. Legemiddellinkerligandkonjugatet kan også spaltes ved en intracellulær protease
35 for å frisetten legemiddeldelen. Alternativt spaltes legemiddelet eller legemiddelenheten fra legemiddellinkerligandkonjugatet utenfor tumorcellen eller

cancercellen, og påfølgende penetrerer legemiddelet eller legemiddelenheten cellen.

5 Legemiddellinkerligandkonjugatet tilveiebringer konjugeringsspesifikk tumor- eller cancercellelegemiddelmålretting, for således å redusere legemiddelets generelle toksisitet. Linkerenhetene stabiliserer legemiddellinkerligandkonjugatene i blod, men er likevel spaltbare av tumorspesifikke proteaser innenfor cellen, som frigjør en legemiddelenhet.

10 I ett eksempel binder ligandenheten til tumorcelle eller cancercellen.

I et annet eksempel binder ligandenheten til et tumorcelle- eller cancercelleantigen som er på tumorcellen eller cancercellens overflate.

15 I et annet eksempel binder ligandenheten til et tumorcelle- eller cancercelleantigen som er et ekstracellulært matriseprotein assosiert med tumorcellen eller cancercellen.

20 Ligandenhetens spesifisitet for en spesiell tumorcelle eller cancercelle kan være viktig for bestemmelsen av tumorene eller cellene som behandles mest effektivt. Et legemiddellinkerligandkonjugat og/eller en legemiddellinkerforbindelse som har en BR96-ligandenhet kan for eksempel være nyttig for behandling av antigenpositive karsinomer inkludert de av lungen, brystet, tykktarmen, eggstokkene og pankreas. Legemiddellinkerligandkonjugater som har en anti-
25 CD30 eller en anti-CD70-bindende ligandenhet kan være nyttig for behandling av hematologiske ondartetheter.

Andre spesielle typer cancere som kan behandles med et legemiddellinkerligandkonjugat og/eller en legemiddellinkerforbindelse
30 inkluderer, men er ikke begrenset til, de redegjort for i tabell 1.

Tabell 1

Faste tumorer inkludert, men ikke begrenset til:
fibrosarkom, myksosarkom, liposarkom, kondrosarkom, osteogent sarkom, kordom, angiosarkom, endoteliosarkom, lymfangiosarkom, lymfangioendoteliosarkom, synoviom, mesoteliom, Ewings tumor, leiomyosarkom, rabdomyosarkom, tykktarmscancer, kolorektalcancer, nyrecancer, bukspyttkjertelcancer, bencancer, brystcancer, eggstokkcancer,

prostatacancer, spiserørcancer,
magecancer, oralcancer, nesecancer, halscancer, skvamøs cellekarsinom, basalcellekarsinom, adenokarsinom, svettekjertelkarsinom, fettkjertelkarsinom, papillært karsinom, papillære adenokarsinomer, cystadenokarsinom, medullært karsinom, bronkogen karsinom, nyrecellekarsinom, hepatom, gallegangskarsinom, koriokarsinom, seminom, embryonalt karsinom, Wilms' tumor, livmorhalscancer, livmorcancer, testikkelcancer, småcellet lungekarsinom, blærekarisnom, lungecancer, epitelkarsinom, gliom, glioblastom multiform, astrocytom, medulloblastom, kraniofaryngiom, ependymom, pinealom, hemangioblastom, akustisk nevrom, oligodendrogliom, meningiom, hudcancer, melanom, neuroblastom, retinoblastom
blodbårne cancere inkludert, men ikke begrenset til: akutt lymfoblastisk leukemi "ALL", akutt lymfoblastisk B-celleleukemi, akutt lymfoblastisk T-celleleukemi, akutt myeloblastisk leukemi "AML", akutt promyeocytisk leukemi "APL", akutt monoblastisk leukemi, akutt erytroleukemisk leukemi, akutt megakaryoblastisk leukemi, akutt myelomonocytisk leukemi, akutt ikke-lymfocytisk leukemi, akutt uddifferensiert leukemi, kronisk myelocytisk leukemi "CML", kronisk lymfocytisk leukemi "CLL", hårcelleleukemi, multippelt myelom
akutte og kroniske leukemier:
lymfoblastiske, myelogene, lymfocytiske, myelocytiske lymfomer:
Hodgkins sykdom, non-Hodgkins lymfom, multippelt myelom, Waldenströms makroglobulinemi, tungkjedesykdom, polycytemi vera

Flermodalitetsterapi for cancer

5 Cancere inkludert, men ikke begrenset til, en tumor, metastase eller annen sykdom eller lidelse karakterisert ved ukontrollert cellevekst, kan behandles ved administrering av et legemiddellinkerligandkonjugat eller en legemiddellinkerforbindelse.

10 Fremgangsmåter for behandling av cancer beskrives også heri, inkludert administrering til en pasient med behov derav en virkningfull mengde av et legemiddellinkerligandkonjugat og et kjemoterapeutisk middel. I ett eksempel er

det kjemoterapeutiske middelet det med hvilket behandling av canceren ikke er funnet å være refraktær. I et annet eksempel er det kjemoterapeutiske middelet det med hvilket behandlingen av canceren er funnet å være refraktær. Legemiddellinkerligandkonjugatene kan administreres til en pasient som også har gjennomgått kirurgi for behandling av canceren.

Pasienten kan også motta en ytterligere behandling, slik som stråleterapi. I et spesifikt eksempel administreres legemiddellinkerligandkonjugatet samtidig med det kjemoterapeutiske middelet eller med stråleterapi. I et annet spesifikt eksempel administreres det kjemoterapeutiske middelet eller stråleterapi før eller etter administrering av et legemiddellinkerligandkonjugat.

Et kjemoterapeutisk middel kan administreres over en serie økter. Et hvilket som helst eller en kombinasjon av de kjemoterapeutiske midlene, slik som et standardpleie kjemoterapeutisk(e) middel, kan administreres.

Dessuten beskrives fremgangsmåter for behandling av en cancer med et legemiddellinkerligandkonjugat og/eller en legemiddellinkerforbindelse som et alternativ til kjemoterapi eller stråleterapi hvor kjemoterapien eller stråleterapien har vist seg eller kan vise seg å være for toksisk, *f.eks.* resulterer i uakseptable eller uutholdelige bivirkninger for pasienten for blir behandlet. Pasienten som blir behandlet kan eventuelt behandles med en annen cancerbehandling slik som kirurgi, stråleterapi eller kjemoterapi, avhengig av hvilken behandling som viser seg å være akseptabel eller utholdelige.

Legemiddellinkerligandkonjugatene og/eller legemiddellinkerforbindelsene på en *in vitro*- eller *ex vivo*-måte, slik som for behandlingen av visse cancere inkludert, men ikke begrenset til leukemier og lymfomer, der slik behandling involverer autologe stamcelletransplantasjoner. Dette kan inkludere en flertrinnsprosess der dyrets autologe hematopoietiske stamceller høstes og renses for alle cancerceller, deretter utryddes dyrets resterende benmargcellepopulasjon via administreringen av en høy dose av et legemiddellinkerligandkonjugat og/eller en legemiddellinkerforbindelse med eller uten ledsagende stråleterapi med høy dose, og stamcelletransplantatet infuseres tilbake inn i dyret. Deretter tilveiebringes støttende pleie mens benmargfunksjon gjenopprettes og pasienten kommer seg.

Behandling av autoimmune sykdommer

Legemiddellinkerligandkonjugatene og legemiddellinkerforbindelsene er nyttige for dreping eller hemming av replikasjonen av en celle som produserer en autoimmun sykdom, eller for behandling av en autoimmun sykdom. Legemiddellinkerligandkonjugatene og/eller legemiddellinkerforbindelsene kan anvendes i samsvar med en rekke situasjoner for behandlingen av en autoimmun sykdom hos en pasient. Legemiddellinkerligandkonjugatene kan anvendes for å levere en legemiddelenhet til en målcelle. Uten å være teoretisk bundet kan legemiddellinkerligandkonjugatet assosiere med et antigen på en målcelles overflate, og legemiddellinkerligandkonjugatet tas deretter opp inni en målcelle gjennom reseptormediert endocytose. Når de er inni cellen, spaltes én eller flere spesifikke peptidsekvenser innenfor og/eller ved legemiddelenhet proksimalt for linkerenheten enzymatisk eller hydrolytisk, som resulterer i frisetting av legemiddelet eller legemiddelenheten. Det frisatte legemiddelet eller den frisatte legemiddelenheten er deretter fri til å migrere i cytosolen og indusere cytotoksiske eller cytostatiske aktiviteter. Legemiddellinkerligandkonjugatet kan også spaltes ved en intracellulær protease for å frisetten legemiddelet eller legemiddelenheten. Alternativt spaltes legemiddelet fra legemiddellinkerligandkonjugatet utenfor målcellen, og påfølgende penetrerer legemiddelet eller legemiddelenheten cellen.

I ett eksempel binder ligandenheten til et autoimmunt antigen. I ett aspekt er antigenet på overflaten av en celle involvert i en autoimmun tilstand.

I et annet eksempel binder ligandenheten til autoimmunt antigen som er på overflaten av en celle.

I ett eksempel binder ligandenheten til aktiverte lymfocytter som er assosiert med den autoimmune sykdomstilstanden.

I et ytterligere eksempel konjugerer legemiddellinkerligandkonjugatet eller dreper eller hemmer legemiddellinkerforbindelse mangfoldiggjøringen av celler som produserer et autoimmunt antistoff assosiert med en spesiell autoimmun sykdom.

Spesielle typer autoimmune sykdommer som kan behandles med legemiddellinkerligandkonjugatene og legemiddellinkerforbindelsene inkluderer, men er ikke begrenset til, Th2-lymfocytrelaterte lidelser (*f.eks.* atopisk dermatitt, atopisk astma, rhinokonjunktivitt, allergisk rhinitt, Omenns syndrom, systemisk sklerose og transplantat-mot-vert-sykdom); Th1-lymfocytrelaterte lidelser (*f.eks.* revmatoid artritt, multipel sklerose, psoriasis, Sjögrens syndrom, Hashimotos tyroiditt, Graves sykdom, primær biliær cirrose, Wegeners granulomatose og tuberkulose); aktivert B-lymfocytrelaterte lidelser (*f.eks.* systemisk lupus erythematosus, Goodpastures syndrom, revmatoid artritt og type I-diabetes); og de redegjort for i tabell 2.

Tabell 2

Aktiv kronisk hepatitt, Addisons sykdom, allergisk alveolitt, allergisk reaksjon, allergisk rhinitt, Alports syndrom, anafylakse, ankyloserende spondylitt, anti-fosfolipidsyndrom, artritt, askariase, aspergillose, atopisk allergi, atopisk dermatitt, atopisk rhinitt, Behcets sykdom, fugleelskerlunge, bronkial astma, Caplans syndrom, kardiomyopati, cøliaki, Chagas' sykdom, kronisk glomerulonefritt, Cogans syndrom, kald agglutinin sykdom, kongenital rubellainfeksjon, CREST-syndrom, Crohns sykdom, kryoglobulinemi, Cushings syndrom, dermatomyositt, lupus discoides, Dresslers syndrom, Eaton-Lambert-syndrom, enterovirusinfeksjon, encefalomyelitt, endokrin optalmopati, Epstein-Barr-virusinfeksjon, hestehoste (eng.: Equine Heaves), erythematosus, Evans syndrom, Feltys syndrom, fibromyalgi, Fuchs cyklitt, gastrisk atrofi, mage-tarm-allergi, kjempecellearrtritt, glomerulonefritt, Goodpastures syndrom, transplantant-mot-vert-sykdom, Graves' sykdom, Guillain-Barre-sykdom, Hashimotos tyroiditt, hemolyttisk anemi, Henoch-Schonlein purpura, idiopatisk adrenalatrofi, idiopatisk lugefibritt, IgA-nefropati, inflammatorisk tarm-sykdommer, insulinavhengig diabetes mellitus, juvenil artritt, juvenil diabetes mellitus (type I), Lambert-Eaton-syndrom, laminitt, lichen planus, lupoid hepatitt, lupus, lymfopeni, Menieres sykdom, blandet bindevevssykdom, multipel sklerose, myasthenia gravis, pernisiøs anemi, polyglandulære syndromer, presenil demens,
primær agammaglobulinemi, primær biliær cirrose, psoriasis, psoriasisartritt, Raynauds fenomenon, rekurrent abort, Reiters syndrom, reumatisk feber, revmatoid artritt, Sampters syndrom, schistosomiasis, Schmidts syndrom, skleroderma, Shulmans syndrom, Sjörgens syndrom, Moersch-Woltmanns syndrom, sympatisk oftalmi, systemisk lupus erythematosus, Takayusus artritt, temporal arteritt, tyroiditt, trombocytopeni, tyrotoksikose, toksisk epidermal

nekrolyse, type B-insulinresistens, type I diabetes mellitus, ulcerøs kolitt, uveitt, vitiligo, Waldenströms makroglobulinemi, Wegeners granulomatose

Flerlegemiddelterapi av autoimmune sykdommer

5 Det redegjøres også for fremgangsmåter for behandling av en autoimmun sykdom som inkluderer administrering til en pasient med behov derav en virkningsfull mengde av et legemiddellinkerligandkonjugat eller en legemiddellinkerforbindelse og et annet terapeutisk middel kjent for behandlingen av en autoimmun sykdom.

10 Behandling av infeksjøs sykdommer

Legemiddellinkerligandkonjugatene og legemiddellinkerforbindelsene er nyttige for dreping eller hemming av mangfoldiggjøringen av en celle som produserer en infeksjøs sykdom, eller for behandling av en infeksjøs sykdom.

15 Legemiddellinkerligandkonjugatene og/eller legemiddellinkerforbindelsene kan anvendes i samsvar med en rekke situasjoner for behandlingen av en infeksjøs sykdom hos en pasient. Legemiddellinkerligandkonjugatene kan anvendes for å levere en legemiddelenhet til en målcelle. I ett eksempel binder ligandenheten til den infeksjøs sykdomscellen.

20 I ett eksempel dreper eller hemmer konjugatene mangfoldiggjøringen av celler som produserer en spesiell infeksjøs sykdom.

25 Spesielle typer infeksjøs sykdommer som kan behandles med legemiddellinkerligandkonjugatenes konjugater inkluderer, men er ikke begrenset til, de redegjort for i tabell 3.

Tabell 3

Bakterielle sykdommer:

Difteri, pertussis, okkult bakteremi, urinveisinfeksjon, gastroenteritt, cellulitt, epiglottitt, trakeitt, adenoid hypertrofi, retrofaryngeal abscess, impetigo, ektyma, lungebetennelse, endokarditt, septisk artritt, pneumokokker,

Bakterielle sykdommer:
peritonitt, baktermi, meningitt, akutt purulent meningitt, urinrørsbetennelse, cervicitt, proktitt, faryngitt, salpingitt, epididymitt, gonore, syfilis, listeriose, antraks, nokardiose, salmonella, tyfoidfeber, dysenteri, bindehinnekattarr, sinusitt, brucellose, tullaremi, kolera, byllepest, tetanus, nekrotiserende enterokolitt, aktinomykose, blandede anaerobe infeksjoner, syfilis, tilbakefallsfeber, leptospirose, Lyme-sykdom, rottebittfeber, tuberkulose, lymfadenitt, spedalskhet, klamydia, klamydialungebetennelse, trakom, inklusjonskonjunktivitt
Systemiske soppsykdommer:
Histoplasmose, coccidioidomykose, blastomycose, sporotrikose, kryptokokk, systemisk candidiasis, aspergillose, mukormykose, mycetom, kromomykose
Rickettsiale sykdommer:
Tyfus, Rocky-Mountain-flekkfeber, ehrlichiose, østlig flåttbåret rickettsiose (eng.: Eastern Tick-Borne Rickettsioses), rickettsiainfeksjoner, Q-feber, bartonellose
Parasittiske sykdommer:
Malaria, babesiose, afrikansk sovesyke, Chagas' sykdom, leishznaniase (eng.: Leishznaniasis), dum-dum-feber, toksoplasmose, meningoencefalitt, keratitt, entamebiase (eng.: Entamebiasis), giardiasis, cryptosporidiasis, isosporiasis, syklosporiasis, mikrosporidiosis, askariase, piskeorminfeksjon, hakeorminfeksjon, trådorminfeksjon, øyelarvemigranter, trikinose, guineaormsykdom, lymfatisk filariasis, loiasis, elveblindhet, hundehjerteorminfeksjon, schistosomiasis, svømmekløe, orientalsk lungeikte, orientalsk leverikte, fascioliasis, fasciolopsiasis,
opisthorchiasis, bendelorminfeksjoner, vannblæresykdom, alveolar vannblæresykdom
Virale sykdommer:
Meslinger, subakutt skleroserende panencefalitt, forkjølelse, kuma, rubella, roseola, femte barnesykdom, vannkopper, respiratorisk syncytialvirusinfeksjon, krupp, bronkiolitt, infeksøs mononukleose, poliomyelitt, herpangina, hånd-fot-munn-sykdom, Bamblesyke, genital herpes, genitale vorter, ikke-infeksøs hjemehinnebetennelse, myokarditt, perikarditt, gastroenteritt, ervervet

Virale sykdommer:

immunsviktsyndrom (AIDS), humant immunsviktvirus (HIV), Reyes syndrom, Kawasaki-syndrom, influensa, bronkitt, viral "gående" lungebetennelse, akutt febril luftveissykdom, akutt faryngokonjunktivalfeber, epidemisk keratokonjunktivitt, herpes simplex-virus 1 (HSV-1), herpes simplex-virus 2 (HSV-2), helvetesild, cytomegalvirussykdom, rabies, progressiv multifokal leukoencefalopati, kuru, dødelig familiær søvnløshet, Creutzfeldt-Jakob-sykdom, Gerstmann-Straussler-Scheinker-sykdom, tropisk spastisk paraparese, vestlig hesteenkefalitt, California-enkefalitt, St. Louis-enkefalitt, gul feber, denguefeber, lymfocytt choriomeningitt, Lassa-feber, hemorragisk feber, Hantvirus-lungesyndrom, Marburg-virusinfeksjoner, ebolavirusinfeksjoner, koppper

Flerlegemiddelterapi av infeksjose sykdommer

5 Det redegjøres for fremgangsmåter for behandling av en infeksjøs sykdom som inkluderer administrering til en pasient med behov derav et legemiddellinkerligandkonjugat eller en legemiddellinkerforbindelse og et annet terapeutisk middel som er et anti-infektiøst sykdomsmiddel.

10 Oppfinnelsen beskrives ytterligere i eksemplene som følger, som ikke er ment å begrense oppfinnelsens omfang.

EKSEMPEL**Eksempel 1-9**

15 **Eksempel 1 - Generell syntese av AF-dipeptidbibliotek ved fastfasesyntese -**

Fremstilling av Fmoc-AA-diaminoetan tritylharpiks (1, AA = valin)

20



Reaksjonsbetingelser (a): Fmoc-aminosyre (2–5 ekviv.), HATU (2–5 ekviv.) eller HBTU/HOBT(5 ekviv.), DIEA (4–10 ekviv.)

5 I en 10 ml fastfasereaksjonsbeholder (plastsprøyte med PET-fritte) ble det tilsatt
1,08 g 1,2-diaminoetan tritylharpiks (1,62 mmol basert på produsentens
etikett), etterfulgt av en løsning av 1,1 g Fmoc-valin (3,24 mmol), 1,24 g HATU
(3,24 mmol) og 1,13 ml DIEA (6,48 mmol) i 3 ml DMF. Beholderen ble ristet i 4
t, deretter ble harpiksen vasket 6 ganger hver i rekkefølge med DMF, DCM og
10 dietyleter og tørket under vakuum. Fullført reaksjon ble bekreftet av en negativ
Kaiser-test. Last = 0,5 mmol/g ved Fmoc-kvantitering.

Eksempel 2 - Fremstilling av Fmoc-(D)valindiaminoetan tritylharpiks
(1a. AA = (D)valin)

15 Fmoc-(D)valindiaminoetan tritylharpiks (**1a**) ble fremstilt på samme måte som **1**. Last = 0,6 mmol/g.

Eksempel 3 - Fremstilling av Fmoc-prolindiaminoetan tritylharpiks (2, AA = prolin)

20 Fmoc-prolindiaminoetan tritylharpiks (**2**) ble fremstilt på samme måte som **1**.
Last = 0,7 mmol/q.

Eksempel 4 - Fremstilling av Fmoc-(D)asparaginsyre(tert-butyl)-diaminoetan tritylharpiks (3, AA = (D)asparaginsyre(tButyl))

25 Fmoc-(D)asparaginsyre(tert-butyl)-diaminoetan tritylharpiks (**3**) ble fremstilt på samme måte som **1**, med følgende unntak: HBTU/HOBT ble anvendt i stedet for HATU. Last = 0,6 mmol/g.

Eksempel 5 - Fremstilling av Fmoc-(D)lysin(boc)-diaminoetan tritylharpiks (4, AA = (D)lysin(boc))

30 Fmoc-(D)lysine(boc)-diaminoetan tritylharpiks (**4**) ble fremstilt på samme måte som **1**. Last = 0,6 mmol/g.

Eksempel 6 - Fremstilling av Fmoc-lysin(boc)-diaminoetan tritylharpiks (4a, AA = lysin(boc))

5 Fmoc-lysin(boc)-diaminoetan tritylharpiks (**4a**) ble fremstilt på samme måte som **1**. Last = 0,6 mmol/g.

Eksempel 7 - Fremstilling av Fmoc-asparagin(trityl)-diaminoetan tritylharpiks (4b, AA = asparagin)

10 Fmoc-asparagin(trityl)-diaminoetan tritylharpiks (**4b**) ble fremstilt på samme måte som **1**. Last = 0,5 mmol/g.

Eksempel 8 - Fremstilling av Fmoc-metionindiaminoetan tritylharpiks (4c, AA = metionin)

15 Fmoc-metionindiaminoetan tritylharpiks (**4c**) ble fremstilt på samme måte som **1**. Last = 0,6 mmol/g.

Eksempel 9 - Fremstilling av Fmoc-(D)metionindiaminoetan tritylharpiks (4d, AA = (D)metionin)

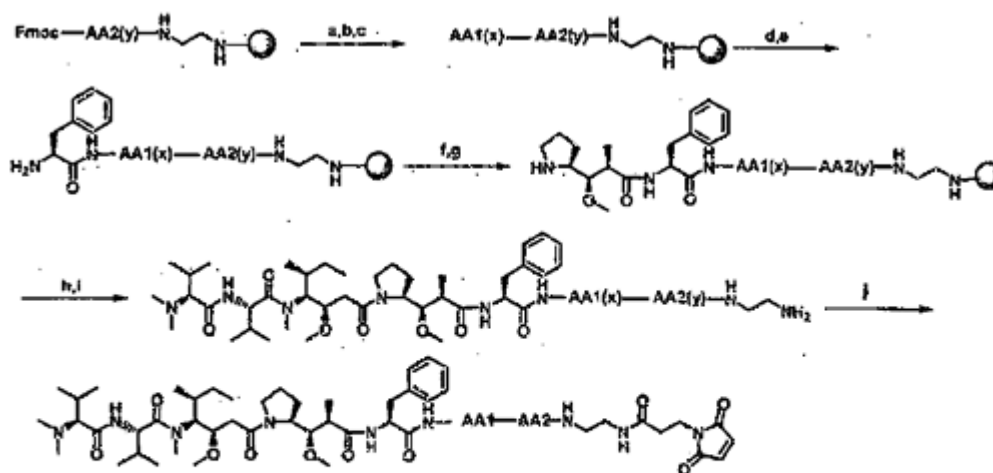
20 Fmoc-(D)metionindiaminoetan tritylharpiks (**4d**) ble fremstilt på samme måte som **1**. Last = 0,5 mmol/g.

Eksempel 10–32

Generell fremstilling av AF-AA1-AA2-diaminoetan-propionyl-1-maleimid (eksempel 10–32) ved en kombinasjon av fast- og løsningsfasesyntese:

25

Eksempel 10: AF-asparaginsyre-valin-diaminoetan-propionyl-maleimid (5a, AA1-AA2 = asparaginsyre-valin).



Reaksjonsbetingelser (a): 20 % piperidin/DMF, (b) Fmoc-aminosyre (2–5 ekviv.), HATU (2–5 ekviv.) og DIEA (4–10 ekviv.), (c) 20 % piperidin/DMF, (d) Fmoc-Phe (2 ekviv.), HATU (2 ekviv.) og DIEA (4 ekviv.), (g) 20 % piperidin/DMF, (h) Dov-Val-Dil-OH (2 ekviv.), HATU (2 ekviv.), og DIEA (4 ekviv.), (i) 95 % TFA/diklometan, (j) BMPS (2 ekviv.), DIEA (2 ekviv.).

200 mg harpiks 1 (0,1 mmol) i en 10 ml sprøyte med en PET-fritte ble behandlet med en løsning av 20 % piperidin i DMF (3 ml) og ristet i 1 t, og deretter vasket 6 ganger i rekkefølge med DMF, DCM og dietyleter og tørket in vacuo i 2 t. En løsning av Fmoc-Asp(OtBu)-OH (82 mg, 0,2 mmol), HATU (76 mg, 0,2 mmol) og DIEA (70 µl, 0,4 mmol) i vannfritt DMF (4 ml) ble deretter tilsatt til harpiksen, som ble ristet i 4 t, vasket 6 ganger hver i rekkefølge med DMF, DCM og dietyleter og vasket in vacuo i 2 t. En løsning av 20 % piperidin i DMF (3 ml) ble tilsatt til sprøyten, og blandingen ble omrørt i 2 t. Harpiksen ble deretter filtrert, vasket 6 ganger hver i rekkefølge med DMF, DCM og dietyleter og tørket under in vacuo i 2 t. I en separat kolbe ble Fmoc-Phe (0,2 mmol) og HATU (0,2 mmol) oppløst i vannfritt DMF (4 ml) etterfulgt av tilsetningen av DIEA (0,4 mmol). Løsningen ble deretter overført til sprøyten inneholdende harpiksen, og blandingen ble omrørt i 4 t. LC-MS-analyse av materiale spaltet fra en liten mengde harpiks ble anvendt for å bestemme reaksjonsfullførelse. Harpiksen ble filtrert, vasket 6 ganger hver i rekkefølge med DMF, DCM og dietyleter og tørket under in vacuo i 2 t. På denne måten, etter Fmoc-avbeskyttelse med 20 % piperidin i DMF, ble Fmoc-Dap koblet, etterfulgt av én Fmoc-avbeskyttelse til og endelig Dov-Val-Dil-OH-kobling. Harpiksen ble deretter behandlet med en

løsning av 95 % TFA/diklormetan (3 ml) og vasket ytterligere 3 ganger med 95 % TFA/diklormetan (3 ml). Det kombinerte filtratet ble tillatt å stå ved romtemperatur i 30 min, deretter konsentrert til tørrhet. Halvparten av dette materialet (0,05 mmol) og 3-maleimidopropionsyre NHS-ester (25 mg, 0,1 mmol) ble oppløst i diklormetan (1 ml) med DIEA (70 µl, 0,1 mmol) og omrørt ved romtemp. i 4 t. Løsemiddel ble fjernet in vacuo og produktet renses ved omvendt fase-preparativ HPLC. Utbytte: 15 mg (26 %), hvitt faststoff. RP-HPLC-analyse: >90 % ved 6,95 min; ESMS $m/z = 1153,50$ (M+H)⁺.

Eksempel 11 - Fremstilling av AF-isoleucin-valin-diaminoetan-propionyl-maleimid (5b, AA1-AA2 = isoleucin-valin)

AF-isoleucin-valin-diaminoetan-propionyl-maleimid (**5b**) ble fremstilt på samme måte som **5a**, ved anvendelse av Fmoc-Ile som AA1. Utbytte: 21 mg (33 %), hvitt faststoff. RP-HPLC-analyse: >95 % ved 9,2 min; ESMS $m/z = 1151,68$ (M+H)⁺.

Eksempel 12 - Fremstilling av AF-asparagin-valin-diaminoetan-propionyl-maleimid (5c, AA1-AA2 = asparagin-valin)

AF-asparagin-valin-diaminoetan-propionyl-maleimid (**5c**) ble fremstilt på samme måte som **5a** ved anvendelse av Fmoc-Asn(trt), men materialet spaltet fra harpiksen ble renses ved preparativ HPLC før kobling med 3-maleimidopropionsyre NHS-ester. Utbytte: 56 mg (63 %), hvitt faststoff. RP-HPLC-analyse: >95 % ved 8,5 min; ESMS $m/z = 1152,96$ (M+H)⁺.

Eksempel 13 - Fremstilling av AF-tyrosin-valin-diaminoetan-propionyl-maleimid (5d, AA1-AA2 = tyrosin-valin)

AF-tyrosin-valin-diaminoetan-propionyl-maleimid (**5d**) ble fremstilt på samme måte som **5c**, ved anvendelse av Fmoc-Tyr for AA1. Utbytte: 36 mg (68 %), hvitt faststoff. RP-HPLC-analyse: >95 % ved 7,8 min; ESMS $m/z = 1201,67$ (M+H)⁺.

Eksempel 14 - Fremstilling av AF-trimetyllysin-prolin-diaminoetan-propionyl-maleimid (6a, AA1-AA2 = trimetyllysin-prolin)

AF-trimetyllysin-prolin-diaminoetan-propionyl-maleimid (**6a**) ble fremstilt ved samme prosedyre som **5a**, ved å begynne med 284 mg Fmoc-prolin-diaminoetan-tritylharpiks (**2**) og anvendelse av Fmoc-trimetyllysin som AA1. Utbytte: 6 mg (21 %). ESMS $m/z = 1207,027 (M+H)^+$.

5 **Eksempel 15 - Fremstilling av AF-isoleucin-prolin-diaminoetan-propionyl-maleimid (6b, AA1-AA2 = isoleucin-prolin)**

10 AF-isoleucin-prolin-diaminoetan-propionylmaleimid (**6b**) ble fremstilt ved anvendelse av samme fremgangsmåte som **5a**, ved å begynne med 378 mg Fmoc-prolin-diaminoetan-tritylharpiks (**2**) og anvendelse av Fmoc-Ile som AA1. Utbytte: 36 mg (19 %), hvitt faststoff. RIP-HPLC-analyse: >95 % ved 9,2 min; ESMS $m/z = 1149,379 (M+H)^+$.

15 **Eksempel 16 - Fremstilling av AF-asparagin-prolin-diaminoetan-propionyl-maleimid (6c, AA1-AA2 = asparagin-prolin)**

20 AF-asparagin-prolin-diaminoetan-propionylmaleimid (**6c**) ble fremstilt ved anvendelse av samme fremgangsmåte som **5a**, ved å begynne med 150 mg Fmoc-prolin-diaminoetan-tritylharpiks (**2**) og anvendelse av Fmoc-Asn som AA1. Utbytte: 21,8 mg (19 %), hvitt faststoff. RP-HPLC-analyse: >95 % ved 10,95 min; ESMS $m/z = 1150,320 (M+H)^+$.

25 **Eksempel 17 - Fremstilling av AF-metionin-prolin-diaminoetan-propionylmaleimid (6d, AA1-AA2 = metionin-prolin)**

30 AF-metionin-prolin-diaminoetan-propionylmaleimid (**6d**) ble fremstilt ved anvendelse av samme fremgangsmåte som **5a**, ved å begynne med 150 mg Fmoc-prolin-diaminoetan-tritylharpiks (**2**) og anvendelse av Fmoc-Met som AA1. Utbytte: 20,6 mg (18,4 %), hvitt faststoff. RP-HPLC-analyse: >95 % ved 11,2 min; ESMS $m/z = 1167,047 (M+H)^+$.

30 **Eksempel 18 - Fremstilling av AF-tyrosin-(D)asparaginsyre-diaminoetan-propionylmaleimid (7a, AA1-AA2 = tyrosin-(D)asparaginsyre)**

AF-tyrosin-(D)asparaginsyre-diaminoetan-propionylmaleimid (**7a**) ble fremstilt ved anvendelse av samme fremgangsmåte som **5c**, ved å begynne med 224 mg

Fmoc-(D)Asp(OtBu)-diaminoetan-tritylharpiks (**3**), og anvendelse av Fmoc-Tyr(OtBu) som AA1. Utbytte: 19 mg (11 %), hvitt faststoff. RP-HPLC-analyse: >90 % ved 6,2 min; ESMS m/z =1217,789 (M+H)⁺.

5 **Eksempel 19 - Fremstilling av AF-norvalin-(D)asparaginsyre-diaminoetan-propionylmaleimid (7b, AA1-AA2 = norvalin-(D)asparaginsyre)**

10 AF-norvalin-(D)asparaginsyre-diaminoetan-propionylmaleimid (**7b**) ble fremstilt ved anvendelse av samme fremgangsmåte som **5c**, ved å begynne med Fmoc-(D)Asp(OtBu)-diaminoetan-tritylharpiks (**3**) og anvendelse av Fmoc-NVal som AA1. Utbytte 10 mg, (6 %). RP-HPLC-analyse: >95 % ved 6,3 min; ESMS m/z =1153,955 (M+H)⁺.

15 **Eksempel 20 - Fremstilling av AF-β-alanin-(D)asparaginsyre-diaminoetan-propionylmaleimid (7c, AA1-AA2 =β-alanin-(D)asparaginsyre)**

20 AF-β-alanin-(D)asparaginsyre-diaminoetan-propionylmaleimid (**7c**) ble fremstilt ved anvendelse av samme fremgangsmåte som **5c**, ved å begynne med 198 mg Fmoc-(D)Asp(OtBu)-diaminoetan-tritylharpiks (**3**) og anvendelse av Fmoc-β-Ala som AA1. Utbytte: 12 mg (8 %), hvitt faststoff. RP-HPLC-analyse: >95 % ved 6,3 min; ESMS m/z =1125,709 (M+H)⁺.

25 **Eksempel 21 - Fremstilling av AF-metionin-(D)asparaginsyre-diaminoetan-propionylmaleimid (7d, AA1-AA2 = metionin-(D)asparaginsyre)**

30 AF-metionin-(D)asparaginsyre-diaminoetan-propionylmaleimid (**7d**) ble fremstilt ved anvendelse av samme fremgangsmåte som **5c**, ved å begynne med 100 mg Fmoc-(D)Asp(OtBu)-diaminoetan-tritylharpiks (**3**) og anvendelse av Fmoc-Met som AA1. Utbytte: 19,4 mg (25 %), hvitt faststoff. RP-HPLC-analyse: >95 % ved 10,97 min; ESMS m/z =1185,195 (M+H)⁺.

Eksempel 22 - Fremstilling av AF-homo-β-fenylalanin-(D)asparaginsyre-diaminoetan-propionylmaleimid (7e, AA1-AA2 = homo-β-fenylalanin-(D)asparaginsyre)

AF-homo- β -fenylalanin-(D)asparaginsyre-diaminoetan-propionylmaleimid (**7e**) ble fremstilt ved anvendelse av samme fremgangsmåte som **5c**, ved å begynne med 100 mg Fmoc-(D)Asp(OtBu)-diaminoetan-tritylharpiks (**3**) og anvendelse av Fmoc-hPhe som AA1. Utbytte: 19,10 mg (24 %), hvitt faststoff. RP-HPLC-analyse: >90 % ved 10,85 min; ESMS m/z =1167,075 (M+H)⁺.

Eksempel 23 - Fremstilling av AF-asparagin-(D)asparaginsyre-diaminoetan-propionylmaleimid (7f, AA1-AA2 = asparagin-(D)asparginsyre)

AF-asparagin-(D)asparaginsyre-diaminoetan-propionylmaleimid (**7f**) ble fremstilt ved anvendelse av samme fremgangsmåte som **5c**, ved å begynne med 100 mg Fmoc-(D)Asp(OtBu)-diaminoetan-tritylharpiks (**3**) og anvendelse av Fmoc-Asn(trt) som AA1. Utbytte: 38 mg (49 %), hvitt faststoff. RP-HPLC-analyse: >90 % ved 10,85 min; ESMS m/z =1167,075 (M+H)⁺.

Eksempel 24 - Fremstilling av AF-prolin-(D)lysin-diaminoetan-propionylmaleimid (8a, AA1-AA2= prolin-(D)lysin)

AF-prolin-(D)lysin-diaminoetan-propionylmaleimid (**8a**) ble fremstilt på samme måte som **5a**, ved å begynne med Fmoc-(D)-lysin(boc)-diaminoetan tritylharpiks (**4**) og Fmoc-prolin for AA1, men kun 30 % HFIP (heksafluorisopropanol) i diklormetan ble anvendt for å spalte det nest siste diaminoetan-peptidet fra harpiksen for å bevare den boc-beskyttende gruppen på lysinet. Etter kobling til maleimidopropionsyre NHS-ester, ble boc-gruppen fjernet ved behandling med 1:1 TFA/diklormetan (1 ml), og produktet ble isolert ved preparativ HPLC. Utbytte: 33 mg (40 %) hvitt faststoff; ESMS m/z =1181,720 (M+H)⁺.

Eksempel 25 - Fremstilling av AF-fenylglysin-(D)lysin-diaminoetan-propionylmaleimid (8b, AA1-AA2 = fenylglysin-(D)lysin)

AF-fenylglysin-(D)lysin-diaminoetan-propionylmaleimid (**8b**) ble fremstilt på samme måte som **8a**, ved å begynne med 232 mg Fmoc-(D)-lysin(boc)-diaminoetan tritylharpiks (**4**) og anvendelse av Fmoc-Phg for AA1. Utbytte: 10 mg (11 %), hvitt faststoff. RP-HPLC-analyse: >90 % ved 10,21 min; ESMS m/z =1200,656 (M+H)⁺.

Eksempel 26 - Fremstilling av AF-metionin-(D)lysin-diaminoetan-propionylmaleimid (8c, AA1-AA2 = metionin-(D)lysin)

5 AF-metionin-(D)lysin-diaminoetan-propionylmaleimid (**8c**) ble fremstilt på samme måte som **8a**, ved å begynne med 236 mg Fmoc-(D)-lysin(boc)-diaminoetan tritylharpiks (**4**) og anvendelse av Fmoc-Met for AA1. Utbytte: 46 mg (49 %), hvitt faststoff. RP-HPLC-analyse: >90 % ved 10,48 min; ESMS m/z =1198,804 (M+H)⁺.

Eksempel 27 - Fremstilling av AF-asparagin-(D)lysin-diaminoetan-propionylmaleimid (8d, AA1-AA2 = asparagin-(D)lysin)

10 AF-asparagin-(D)lysin-diaminoetan-propionylmaleimid (**8d**) ble fremstilt på samme måte som **8a**, ved å begynne med 236 mg Fmoc-(D)-lysin(boc)-diaminoetan tritylharpiks (**4**) og anvendelse av Fmoc-Asn(trt) for AA1. Etter kobling til maleimidopropionsyre NHS-ester, ble sidekjede beskyttelsesgruppene fjernet ved behandling med 95 % TFA/diklormetan (1 ml) i 1 t, og produktet ble
15 deretter isolert ved preparativ HPLC. Utbytte: 64 mg (62 %), hvitt faststoff. RP-HPLC-analyse: >95 % ved 10,34 min; ESMS m/z =1181,699 (M+H)⁺.

Eksempel 28 - Fremstilling av AF-glutamin-(D)lysin-diaminoetan-propionylmaleimid (8e, AA1-AA2 = glutamin-(D)lysin)

20 AF-glutamin-(D)lysin-diaminoetan-propionylmaleimid (**8e**) ble fremstilt på samme måte som **8a**, ved å begynne med 98 mg Fmoc-(D)-lysin(boc)-diaminoetan tritylharpiks (**4**) og anvendelse av Fmoc-Gln for AA1. Utbytte: 15 mg (19,7 %), hvitt faststoff. RP-HPLC-analyse: >90 % ved 10,07 min; ESMS m/z =1195,813 (M+H)⁺.

25 **Eksempel 29 - Fremstilling av AF-arginin-(D)lysin-diaminoetan-propionylmaleimid (8f, AA1-AA2 = arginin-(D)lysin)**

30 AF-arginin-(D)lysin-diaminoetan-propionylmaleimid (**8f**) ble fremstilt på samme måte som **8a**, ved å begynne med 101 mg Fmoc-(D)-lysin(boc)-diaminoetan tritylharpiks (**4**) og anvendelse av Fmoc-Arg(Pbf) for AA1. Utbytte: 13 mg (18 %). RP-HPLC-analyse: >95 % renhet ved toppområde ved 9,80 min; ESMS m/z =1223,908 (M+H)⁺.

Eksempel 30 - Fremstilling av AF-citrullin-(D)lysin-diaminoetan-propionylmaleimid (8g, AA1-AA2 = citrullin-(D)lysin)

5 AF-citrullin-(D)lysin-diaminoetan-propionylmaleimid (**8g**) ble fremstilt på samme måte som **8a**, ved å begynne med 102 mg Fmoc-(D)-lysin(boc)-diaminoetan tritylharpiks (**4**) og anvendelse av Fmoc-Fmoc-Cit for AA1. Utbytte: 26 mg (33 %), hvitt faststoff. RP-HPLC-analyse: >95 % renhet ved 10,45 min; ESMS $m/z = 1223,933$ (M+H)+.

Eksempel 31 - Fremstilling av AF-tyrosin-(D)lysin-diaminoetan-propionylmaleimid (8h, AA1-AA2 = tyrosin-(D)lysin)

10 AF-tyrosin-(D)lysin-diaminoetan-propionylmaleimid (**8n**) ble fremstilt på samme måte som **8a**, ved å begynne med 101 mg Fmoc-(D)-lysin(boc)-diaminoetan tritylharpiks (**4**) og anvendelse av Fmoc-Tyr(OtBu) for AA1. Utbytte: 26 mg (34 %), hvitt faststoff. RP-HPLC-analyse: >95 % ved 10,05 min; ESMS $m/z = 1230,707$ (M+H)+.

15 **Eksempel 32 - Fremstilling av AF-lysin-(D)lysin-diaminoetan-propionylmaleimid (8i, AA1-AA2 = lysin-(D)lysin)**

20 AF-lysin-(D)lysin-diaminoetan-propionylmaleimid (**8i**) ble fremstilt på samme måte som **8a**, ved å begynne med 106 mg Fmoc-(D)-lysin(boc)-diaminoetan tritylharpiks (**4**) og anvendelse av Fmoc-Lys for AA1. Utbytte: 13,6 mg (34 %). RP-HPLC-analyse: >90 % ved 11,32 min; ESMS $m/z = 1281,238$ (M+H)+.

Generelt eksempel 33: Generell fremstilling av AF-AA1-AA2-AA3-diaminoetan-propionyl-1-maleimid (34-35) ved en kombinasjon av fast- og løsningsfasesyntese:

25 Legemiddellinkere inneholdende mer enn 2 aminosyrer i linkerenheten ble fremstilt som beskrevet i eksempel 10 ved å inkorporere ytterligere trinn (b) og (c)) med en ytterligere Fmoc-AA1.

30 **Eksempel 34 - Fremstilling av AF-asparagin -(D)lysin-(D)lysin-diaminoetan-propionylmaleimid (8j, AA1-AA2-AA3 = asparagin-(D)lysin-(D)lysin)**

AF-asparagin-(D)lysin-(D)lysin-diaminoetan-propionylmaleimid (**8j**) ble fremstilt på samme måte som **8a**, som beskrevet i eksempel 33, ved å begynne med 102

mg Fmoc-(D)-lysin(boc)-diaminoetan tritylharpiks (**4**) og anvendelse av Fmoc-(D)Lys for AA2 og Fmoc-Asn(trt) for AA1. Utbytte: 20,5 mg (23 %), hvitt faststoff. RP-HPLC-analyse: >90 % ved 10,41 min; ESMS $m/z = 1309,320$ (M+H)⁺.

5 **Eksempel 35 - Fremstilling av AF-metionin-(D)lysin-(D)lysin-diaminoetan-propionylmaleimid (8k, AA1-AA2-AA3 = metionin-(D)lysin-(D)lysin)**

10 AF-metionin-(D)lysin-(D)lysin-diaminoetan-propionylmaleimid (**8k**) ble fremstilt på samme måte som **8a**, som beskrevet i eksempel 33, ved å begynne med 107 mg Fmoc-(D)-lysin(boc)-diaminoetan tritylharpiks (**4**) og anvendelse av Fmoc-(D)Lys for AA2 og Fmoc-Met for AA1. Utbytte: 22 mg (24 %), hvitt faststoff. RP-HPLC-analyse: >90 % ved 10,33 min; ESMS $m/z = 1326,008$ (M+H)⁺.

15 **Eksempel 36-38**

15 **Eksempel 36 - Fremstilling av MMAF-AA1-AA2-diaminoetan-propionylmaleimid**

20 Monometylversjoner av auristatin F (MMAF)-legemiddellinkere ble fremstilt ved substituerings i trinn (h) av eksempel 10 av Fmoc-MeVal-Val-Dil-OH med Dov-Val-Dil-OH med. Fmoc ble fjernet ved 20 % piperidin/DMF-behandling før avspaltning av forbindelsen fra harpiksen, (trinn i).

25 **Eksempel 37 - Fremstilling av MMAF-metionin-(D)lysin-diaminoetan-propionylmaleimid (8l, AA1-AA2 = metionin-(D)lysin)**

25 MMAF-metionin-(D)lysin-diaminoetan-propionylmaleimid (**8l**) ble fremstilt på samme måte som **8a**, som beskrevet i eksempel 36, ved å begynne med 179 mg Fmoc-(D)-lysin(boc)-diaminoetan tritylharpiks (**4**) og anvendelse av Fmoc-Met for AA1. Fmoc-MeVal-Val-Dil ble anvendt i stedet for Dov-Val-Dil, og Fmoc ble fjernet med 20 % piperidin/DMF før spalting av harpiksen. Utbytte: 30,6 mg (22 %), hvitt faststoff. RP-HPLC-analyse: >90 % ved 10,69 min; ESMS $m/z = 1184,554$ (M+H)⁺.

30 **Eksempel 38 - Fremstilling av MMAF-asparagin-(D)lysin-diaminoetan-propionylmaleimid (8m, AA1-AA2 = asparagin-(D)lysin)**

5 MMAF-asparagin-(D)lysin-diaminoetan-propionylmaleimid (**8m**) ble fremstilt på samme måte som **8l**, som beskrevet i eksempel 36, ved å begynne med 144 mg Fmoc-(D)-lysin(boc)-diaminoetan tritylharpiks (**4**) og anvendelse av Fmoc-Asn(trt) for AA1. Utbytte: 19,2 mg (16 %), hvitt faststoff. RP-HPLC-analyse: >90 % renhet ved 19,2 min; ESMS m/z =1167,169 (M+H)⁺.

Eksempel 39–42

Eksempel 39 - Fremstilling av AF-metionin-(L)lysin-diaminoetan-propionylmaleimid (8n, AA1-AA2 = metionin-(L)lysin)

15 AF-metionin-(L)lysin-diaminoetan-propionylmaleimid (**8n**) ble fremstilt på samme måte som **8a**, ved å begynne med 168 mg Fmoc-(L)-lysin(boc)-diaminoetan tritylharpiks (**4a**) og anvendelse av Fmoc-Met for AA1. Utbytte: 22,1 mg (15,3 %), hvitt faststoff. RP-HPLC-analyse: >90 % ved 10,42 min; ESMS m/z =1181,985 (M+H)⁺.

Eksempel 40 - Fremstilling av AF-asparagin-(L)lysin-diaminoetan-propionylmaleimid (8o, AA1-AA2 = asparagin-(L)lysin)

20 AF-asparagin-(L)lysin-diaminoetan-propionylmaleimid (**8o**) ble fremstilt på samme måte som **8a**, ved å begynne med 146 mg Fmoc-(L)-lysin(boc)-diaminoetan tritylharpiks (**4a**) og anvendelse av Fmoc-Asn(trt) for AA1. Utbytte: 19,9 mg (16 %). RP-HPLC-analyse: >90 % ved 10,32 min; ESMS m/z =1198,985 (M+H)⁺.

Eksempel 41 - Fremstilling av AF-metionin-(D)metionin-diaminoetan-propionylmaleimid (8r, AA1-AA2 = metionin-(D)metionin)

30 AF-metionin-(D)metionin-diaminoetan-propionylmaleimid (**8r**) ble fremstilt på samme måte som **5c**, ved å begynne med 146 mg Fmoc-(D)-metionin-diaminoetan tritylharpiks (**4d**) og anvendelse av Fmoc-Met for AA1. Utbytte: 6 mg (6,3 %). RP-HPLC-analyse: >90 % ved 11,45 min; ESMS m/z =1201,172 (M+H)⁺.

Eksempel 42 - Fremstilling av AF-metionin-(D)valin-diaminoetan-propionylmaleimid (8s, AA1-AA2 = metionin-(D)valin)

- 5 AF-metionin-(D)valin-diaminoetan-propionylmaleimid (**8s**) ble fremstilt på samme måte som **5c**, ved å begynne med 156 mg Fmoc-(D)-valin-diaminoetan tritylharpiks (**1a**) og anvendelse av Fmoc-Met for AA1. Utbytte: 13 mg (13 %). RP-HPLC-analyse: >90 % ved 11,18 min; ESMS $m/z = 1169,52$ (M+H)⁺.

Eksempel 43–45

Eksempel 43 - Fremstilling av AF-AA1-diaminoetan-propionylmaleimid

- 10 AF-AA1-diaminoetan-propionylmaleimid ble fremstilt som beskrevet i eksempel 10 ved utelatelse av trinn (b) og (c).

Eksempel 44 - Fremstilling av AF-asparagin-diaminoetan-propionylmaleimid (8p, AA1-asparagin)

- 15 AF-asparagin-diaminoetan-propionylmaleimid (**8p**) ble fremstilt på samme måte som **5c**, som modifisert i eksempel 43, ved å begynne med 217 mg Fmoc-asparagin(trt)-diaminoetan tritylharpiks (**4b**). Utbytte: 22,9 mg (18 %). RP-HPLC-analyse: >90 % ved 10,85 min; ESMS $m/z = 1053,838$ (M+H)⁺.

- 20 **Eksempel 45 - Fremstilling av AF-metionin-diaminoetan-propionylmaleimid (8q, AA1-asparagin)**

- 25 AF-metionin-diaminoetan-propionylmaleimid (**8q**) ble fremstilt på samme måte som **5c**, som modifisert i eksempel 43, ved å begynne med 177 mg Fmoc-metionin-diaminoetan tritylharpiks (**4c**). Utbytte: 19,6 mg (15,5 %). RP-HPLC-analyse: >90 % ved 10,6 min; ESMS $m/z = 1070,594$ (M+H)⁺.

Eksempel 46–54

Eksempel 46 - Fremstilling av annen auristatin-AA1-AA2-diaminoetan-propionylmaleimid

30

Auristatiner inneholdende andre aminosyrer enn fenylalanin ved C-terminalen ble fremstilt ved anvendelse av tilsvarende Fmoc-aminosyre i trinn (d) av eksempel 10 (eller eksempel 24 hvis harpiks 4 anvendes). Fmoc-fenylalanin for auristatin F

(AF) kan for eksempel erstattes med Fmoc-metionin for auristatin M (AM) eller Fmoc-tryptofan for auristatin W (AW).

Eksempel 47 - Fremstilling av AM-tyrosin-(D)asparaginsyre-diaminoetan-propionylmaleimid (9a, AA1-AA2 = tyrosin-(D)asparaginsyre)

AM-tyrosine-(D)asparaginsyre-diaminoetan-propionylmaleimid (**9a**) ble fremstilt på samme måte som **8a**, ved å begynne med 100 mg Fmoc-(D)Asp(OtBu)-diaminoetan tritylharpiks (**3**) og anvendelse av Fmoc-tyrosin(tBu) for AA1 og Fmoc-metionin som Fmoc-NH-CH(X)-COOH i trinn (d). Utbytte: 16,6 mg. RP-HPLC-analyse: >90 % ved 10,35 min; ESMS $m/z = 1201,430$ (M+H)⁺.

Eksempel 48 - Fremstilling av AM-metionin-(D)lysin-diaminoetan-propionylmaleimid (9b, AA1-AA2 = metionin-(D)lysin)

AM-metionin-(D)lysin-diaminoetan-propionylmaleimid (**9b**) ble fremstilt på samme måte som **9a**, ved å begynne med 100 mg Fmoc-(D)Lys(Boc)-diaminoetan tritylharpiks (**4**) og anvendelse av Fmoc-metionin for AA1 og Fmoc-metionin som Fmoc-NH-CH(X)-COOH. En løsning av 30 % HFIP i diklormetan ble anvendt for å spalte det nest siste diaminoetan-peptidet fra harpiksen for å bevare den boc-beskyttende gruppen på lysinet. Etter kobling til maleimidopropionsyre NHS-ester, ble boc-gruppen fjernet ved behandling med 1:1 TFA/diklormetan (1ml), og produktet ble isolert ved preparativ HPLC. Utbytte: 18,5 mg. RP-HPLC-analyse: >90 % ved 10,05 min; ESMS $m/z = 1182,555$ (M+H)⁺.

Eksempel 49 - Fremstilling av AM-asparagin-(D)lysin-diaminoetan-propionylmaleimid (9c, AA1-AA2 = asparagin-(D)lysin)

AM-asparagin-(D)lysin-diaminoetan-propionylmaleimid (**9c**) ble fremstilt på samme måte som **9a**, ved å begynne med 100 mg Fmoc-(D)Lys(Boc)-diaminoetan tritylharpiks (**4**) og anvendelse av Fmoc-metionin for AA1 og Fmoc-metionin som Fmoc-NH-CH(X)-COOH. Utbytte: 8,9 mg. RP-HPLC-analyse: >95 % ved 9,89 min; ESMS $m/z = 1165,818$ (M+H)⁺.

Eksempel 50 - Fremstilling av AM-asparagin-diaminoetan-propionylmaleimid (9d, AA1 = asparagin)

AM-asparagin-diaminoetan-propionylmaleimid (**9d**) ble oppnådd som et biprodukt under syntese av **9c** på grunn av ineffektiv kobling av Fmoc-(D)lysin til 1,2-diaminoetan tritylharpiks. Utbytte: 5,2 mg. RP-HPLC-analyse: >95 % ved 10,32 min; ESMS m/z = 1037,581 (M+H)⁺.

Eksempel 51 - Fremstilling av AW-tyrosin-(D)asparaginsyre-diaminoetan maleimid (10a, AA1-AA2 = tyrosin-(D)asparaginsyre)

AW-tyrosin-(D)asparaginsyre-diaminoetan-propionylmaleimid (**10 a**) ble fremstilt på samme måte som **9a**, ved å begynne med 100 mg Fmoc-(D)Lys(Boc)-diaminoetan tritylharpiks (3) og anvendelse av Fmoc-tyrosin for AA1 og Fmoc-tryptofan(Boc) som Fmoc-NH-CH(X)-COOH. Utbytte: 19,7 mg. RP-HPLC-analyse: >97 % ved 10,85 min; ESMS m/z = 1256,840 (M+H)⁺.

Eksempel 52 - Fremstilling av AW-metionin-(D)lysin-diaminoetan-propionylmaleimid (10b, AA1-AA2 = metionin-(D)lysin)

AW-metionin-(D)lysin-diaminoetan-propionylmaleimid (**10b**) ble fremstilt på samme måte som **9a**, ved å begynne med 100 mg Fmoc-(D)Lys(Boc)-diaminoetan tritylharpiks (**4**) og anvendelse av Fmoc-metionin for AA1 og Fmoc-tryptofan(Boc) som Fmoc-NH-CH(X)-COOH. En løsning av 30 % HFIP i diklormetan ble anvendt for å spalte det nest siste diaminoetan-peptidet fra harpiksen for å bevare den boc-beskyttende gruppen på lysinet. Etter kobling til maleimidopropionsyre, ble Boc-gruppen fjernet ved behandling med 1:1 TFA/diklormetan (1ml), og produktet ble isolert ved preparativ HPLC. Utbytte: 21 mg. RP-HPLC-analyse: >97 % ved 10,25 min; ESMS m/z = 1238,043 (M+H)⁺.

Eksempel 53 - Fremstilling av AW-asparagin-(D)lysin-diaminoetan-propionylmaleimid (10c, AA1-AA2 = asparagin-(D)lysin)

AW-asparagin-(D)lysin-diaminoetan-propionylmaleimid (**10c**) ble fremstilt på samme måte som **9a**, ved å begynne med 100 mg Fmoc-(D)Lys(Boc)-diaminoetan tritylharpiks (**4**) og anvendelse av Fmoc-asparagin(OtBu) for AA1 og Fmoc-tryptofan(Boc) som Fmoc-NH-CH(X)-COOH. Utbytte: 16 mg. RP-HPLC-analyse: >97 % ved 10,0 min; ESMS m/z = 611,098 (M+H)⁺.

Eksempel 54 - Fremstilling av AW-asparagin-diaminoetan-propionylmaleimid (10d, AA1 = asparagin)

AW-asparagin-diaminoetan-propionylmaleimid (**10d**) ble fremstilt på samme måte som **10c** på grunn av ineffektiv kobling av Fmoc-(D)Lys(Boc) til 1,2-diaminoetan tritylharpiks. Utbytte: 12,4 mg. RP-HPLC-analyse: >95 % ved 10,51 min; ESMS $m/z = 1097,740$ ($M+H$)⁺.

Eksempel 55 - Fremstilling av Dov-Val-Dil-Dap-Phe (AF)

En blanding av Fmoc-Dap (986 mg, 2,4 mmol), HATU (846 mg, 2,4 mmol) og DIEA (842 μ l, 4,8 mmol) i DMF (20 ml) ble tilsatt til en 50 ml beholder inneholdende fenylalanin bundet til 2-klortritylharpiks (3,0 g, 2,4 mmol), og blandingen ble ristet kraftig i 16 t ved romtemperatur. Reaksjonsfullførelse ble bekreftet av negativ Kaiser-test og korrekt produkt bekreftet ved LCMS ($m/z = 410,39$). Harpiks ble skylt 6 ganger hver i rekkefølge med DMF, CH_2Cl_2 og etyleter og tørket under høyt vakuum.

Harpiksen over ble behandlet med 20 ml av en 20 % piperidin/DMF-løsning og ristet kraftig i 2 t. Harpiksen ble skylt 6 ganger hver i rekkefølge med DMF, CH_2Cl_2 og etyleter og tørket under høyt vakuum. En blanding av Dov-Val-Dil-OH (2,4 mmol), HATU (864 mg 2,4 mmol) og DIEA (873 μ l, 5 mmol) i DMF (20 ml) ble tilsatt, og reaksjonsbeholderen ble ristet i 16 t. Harpiksen ble skylt 6 ganger hver i rekkefølge med DMF, CH_2Cl_2 og etyleter og tørket under høyt vakuum. Produktet ble spaltet fra harpiks med en 2 % TFA/ CH_2Cl_2 -løsning og renses ved omvendt fase-preparativ HPLC. Utbytte: 1,6 g (89 %). MS $m/z = 746,59$.

Eksempel 56 - Generell fremstilling av auristatin-peptid-antistoffkonjugater

Et antistoff (*f.eks.* AC10 eller 1F6) oppløst i 500 mM natriumborat og 500 mM natriumklorid ved pH 8,0 behandles med et overskudd av 100 mM ditiotreitol (DTT). Etter inkubering ved 37 °C i ca. 30 minutter utveksles bufferen ved eluering over Sephadex G25-harpiks, og elueres med PBS med 1 mM DTPA. Tiol/Ab-verdien kontrolleres ved bestemmelse av den reduserte antistoffkonsentrasjonen fra absorbansen ved 280 nm av løsningen og tiolkonsentrasjonen ved reaksjon med DTNB (Aldrich, Milwaukee, WI) og

bestemmelse av absorbansen ved 412 nm. Det reduserte antistoffet oppløst i PBS kjøles på is.

Legemiddellinkerforbindelsesreagensen, auristatin-aminosyre(r)-diaminoetan-propionylmaleimid (auristatin-peptid), oppløst i DMSO, fortynnes i acetonitril og vann ved kjent konsentrasjon, og tilsettes til det kjølte reduserte antistoffet i PBS. Etter ca. én time tilsettes et overskudd av maleimid for å stanse reaksjonen og korke eventuelle ureagerte antistofftiolgrupper. Reaksjonsblandingen konsentreres ved sentrifugal ultrafiltrering, og auristatin-peptid-antistoffkonjugatet renses og avsaltes ved eluering gjennom G25-harpiks i PBS, filtrert gjennom 0,2 µm filtre under sterile forhold, og fryses til lagring.

Ved å følge denne prosedyren ble auristatin-peptid-antistoffkonjugater fremstilt ved anvendelse av antistoffhumanisert 1F6 (se f.eks. internasjonal patentpublikasjon WO 06/113909 for en beskrivelse av humanisert 1F6).

Eksempel 57 - Bestemmelse av utvalgte forbindelsers cytotoxisitet

Auristatin-peptid-antistoffkonjugaters cytotoxiske aktivitet evalueres på CD70⁺-positive cellerlinjer, for eksempel 786-O, et nyrecellekarsinom; Caki-1, et nyrecellekarsinom; L428, en cellerlinje av Hodgkins sykdom; UMRC-3, et nyrecellekarsinom; LP-1, en human myelom-cellerlinje; og U251, en glioblastomcellerlinje. I tillegg anvendes en CD70⁻-cellerlinje, slik som HCT-116, som en kontroll. For å evaluere forbindelsers cytotoxisitet, kan celler sås ved omtrent 5–10 000 per brønn i 150 µl kulturmedium, deretter behandles med graderte doser av forbindelser i fire eksemplarer ved initieringen av assayet. Cytotoxisitetsassayer utføres vanligvis i 96 timer etter tilsetting av testforbindelser. Femti µl resazurinfarge kan tilsettes til hver brønn i løpet av de siste 4 til 6 timene av inkuberingen for å vurdere levedyktige celler ved slutten av dyrking. Fargereduksjon kan bestemmes ved fluorescensspektrometri ved anvendelse av eksitasjons- og utslippsbølgelengder på henholdsvis 535 nm og 590 nm. For analyse kan omfanget av resazurinreduksjon for de behandlede cellene sammenlignes med de ubehandlede kontrollcellenes resazurinreduksjon.

In vitro-celleproliferasjonsassay

Et konjugats effekt kan måles ved et celleproliferasjonsassay ved benyttelse av følgende protokoll (Promega Corp. Technical Bulletin TB288; Mendoza et al., 2002, Cancer Res. 62:5485-5488):

1. En alikvot på 100 µl cellekultur inneholdende omkring 10^4 celler (*f.eks.* SKBR-3, BT474, MCF7 eller MDA-MB-468) i medium avsettes i hver brønn på en 96-brønners, gjennomsiktig plate.
2. Det fremstilles kontrollbrønner inneholdende medium og uten celler.
3. Konjugat tilsettes til forsøksbrønnene og inkuberes i 3–5 dager.
4. Platene ekvilibreres til romtemperatur i omtrent 30 minutter.
5. Det tilsettes et volum av CellTiter-Glo-reagens likt volumet av cellekulturmedium til stede i hver brønn.
6. Innholdet blandes i 2 minutter på en orbitalrister for å indusere cellelyse.
7. Platen inkuberes ved romtemperatur i 10 minutter for å stabilisere det luminescerende signalet.
8. Luminescens registreres og rapporteres i grafer som RLU = relative luminescensenheter.

Eksempel 58 - Bestemmelse av utvalgte forbindelsers cytotoksisitet

- Ved å følge prosedyren beskrevet i eksempel 57 ble auristatin-peptid-antistoff (legemiddellinkerligand)-konjugater evaluert på CD70⁺-positive cellelinjer, 786-O-, Caki-1-, L428-, UMRC-3-, LP-1-, U251- og en CD70⁻-cellelinje, HCT-116, som en kontroll. I tillegg ble konjugat h1F6-vc-PABC-MMAF anvendt som en kontroll. Tabell 4 og 5 viser *in vitro*-aktiviteten til utvalgte auristatin-dipeptid-h1F6-konjugater (der peptidet har to aminosyrer) sammenlignet med h1F6-vc-PABC-MMAF-kontrollkonjugat. Konjugatene inneholder omtrent 4 legemiddel per antistoff.

Tabell 4: IC₅₀-er (ng/ml) for auristatin-dipeptid-h1F6 (~4 legemiddel/Ab)-konjugater på CD70⁺-celler

Legemiddellinker i konjugat ⁺	786-O	Caki-1	L428	UMRC-3	LP-1	U251	HCT-116 (CD70-)
AF-Ile-Val	3,4	3,7	2,5	19,5	19	44,6	>1000

Legemiddellinker i konjugat⁺	786-O	Caki-1	L428	UMRC-3	LP-1	U251	HCT-116 (CD70-)
AF-Asp-Val	18	25	18	54	234	407	>1000
AF-Tyr-Val	3,7	7,0	3,0	19,5	34	46,8	>1000
AF-Asn-Val	12,6	22,3	11,7	46,8	174	251	>1000
AF-His-Val	5,6	11,2	5,9	38	77,6	81,2	>1000
AF-Ile-Pro	9,8	9	5	16	219	45	>1000
AF-Me ₃ Lys-Pro	20	11	24	30	298	78	>1000
AF-Tyr-(D)Asp	24	9	27	32	398	72	>1000
AF-NorVal-(D)Asp	28	12	24	25	537	78	>1000
AF-β-Ala-(D)Asp	525	1585	1096	132	>10 000	93	>1000
AF-PhenylGly-(D)Lys	339	44	275	1096	>10 000	98	>1000
AF-Met-(D)Lys	55	25	1698	132	>10 000	98	>1000
AF-Pro-(D)Lys	NT	>10 000	>10 000	NT	NT	5012	>1000
AF-Asn-(D)Lys	19	10	24	28	417	60	>1000
vc-PABC-MMAF	7	3	7	14	22	10	>1000

AF = auristatin F; NT = ikke testet.

⁺ Linkerenhetens stretcherenhet er som angitt i eksemplene ovenfor.

5 Resultatene av disse studiene vises i tabell 4. I dette eksempelet viste auristatin F-dipeptidkonjugatene med antistoff h1F6 generelt sammenlignbar aktivitet med kontrollen, et h1F6-vc-PABC-MMAF-konjugat. Disse resultatene viser at auristatiner kan konjugeres gjennom C-terminalkarboksylgruppe til en linker omfattende aminosyreenheter for å generere aktive ADC-er. Slike konjugaters 10 potens varierer, som kan avhenge av linkernes aminosyresekvens. Konjugater med legemiddellinkere omfattende ikke-naturlige aminosyrer slik som β-alanin og fenylglysin bundet til auristatinets fenylalanin viste redusert aktivitet, potensielt på grunn av ineffektiv enzymatisk spalting av slike substrater. AF-

prolin-(D)lysinlegemiddellinkeren tilveiebrakte en stor inaktivitet i et ADC, mest sannsynlig på grunn av manglende evne til eller ekstrem vanskelighet med proteolytisk spalting av det sekundære amidbåndet mellom fenylalanin og prolin.

5 **Tabell 5: IC50-er (ng/ml), sammendrag for auristatin-dipeptid-h1F6 (~4 legemiddel/Ab)-konjugater på CD70⁺-celler**

Legemiddellinker-i konjugat ⁺	IC50 (ng/ml)				
	786- O	Caki- 1	Caki- 2	L428	HCT-116 (CD70-)
AF-Gln-(D)Lys	12	11	14	209	>1000
AF-Arg-(D)Lys	8	10	8	47	>1000
AF-Cit-(D)Lys	10	11	16	47	>1000
AF-Tyr-(D)Lys	9	11	12	10	>1000
AF-Lys-(D)Lys	9	8	9	37	>1000
AF-Asn-Pro	11	12	32	23	>1000
AF-Met-Pro	8	15	25	8	>1000
AF-Met-(D)Met	4	5	13	4	>1000
AF-Met-(D)Val	5	6	32	8	>1000
AF-Met-(D)Asp	8	10	35	11	>1000
AF-hPhe-(D)Asp	10	>1000	>1000	29	>1000
AF-Asn-(D)Asp	7	7	71	14	>1000
AF-Asn-(D)Lys-(D)Lys	9	10	30	22	>1000
AF-Met-(D)Lys-(D)Lys	8	12	25	>1000	>1000
AM-Tyr-(D)Asp	32	23	71	30	>1000
AM-Met-(D)Lys	56	39	251	1000	>1000
AM-Asn-(D)Lys	20	20	47	26	>1000
AM-Asn	30	31	63	32	>1000
AW-Tyr-(D)Asp	18	16	33	21	>1000
AW-Asn-(D)Lys	16	15	26	19	>1000
AW-Met-(D)Lys	20	22	37	>1000	>1000

Legemiddellinker-i konjugat ⁺	IC50 (ng/ml)				
	786-O	Caki-1	Caki-2	L428	HCT-116 (CD70-)
AW-Asn	18	15	30	22	>1000
vc-PABC-MMAF	5	12	11	4	>1000

AF = auristatin F; AM = auristatin som har metionin ved C-terminalen; AW = auristatin som har tryptofan ved C-terminalen

⁺ Linkerenhetens stretcherenhet er som angitt i eksemplene ovenfor.

5 Tabell 5 viser aktiviteten til et annet sett med auristatin-dipeptid-h1F6-ADC-er på CD70+- og CD70--cellelinjer. De fleste konjugater er svært aktive på CD70+-celler, mens de viser ingen aktivitet på CD70--cellelinjen (HCT-116). Tabellen inkluderer også data for ADC-er produsert med legemiddellinkerforbindelser som kun har én aminosyre i linkerenheten, samt med legemiddellinkerforbindelser

10 inneholdende auristatiner M og W (som har henholdsvis metionin og tryptofan ved legemiddelets C-terminal). Auristatin M- og W-inneholdende konjugater var aktive i disse studiene.

Eksempel 59 - Bestemmelse av utvalgte forbindelsers cytotoxiskitet ved anvendelse

15 Ved å følge prosedyren beskrevet i eksempel 57, ble auristatin-dipeptid-cAC10-antistoffkonjugater evaluert på CD30+-positive cellelinjer, Karpas 299, L428 og L540cy. I tillegg ble et kontrollkonjugat, cAC10-vc-PABC-MMAF, anvendt. Tabell 6 viser *in vitro*-aktiviteten til utvalgte auristatin-dipeptid-cAC10-konjugater sammenlignet med et cAC10-vc-PABC-MMAF-kontrollkonjugat. Konjugatene inneholder omtrent 4 legemiddel per antistoff.

Tabell 6: IC₅₀-er (ng/ml) av auristatin-dipeptid-cAC10 (~4 legemiddel/Ab)-konjugater på CD30⁺-celler

Legemiddellinker ⁺ i konjugat	Karpas 299	L428	L540cy
AF-Ile-Pro	0,6	0,1	0,7
AF-Me ₃ Lys-Pro	0,6	0,09	0,8
AF-Tyr-(D)Asp	0,6	0,06	0,7

Legemiddellinker⁺ i konjugat	Karpas 299	L428	L540cy
AF-NorVal-(D)Asp	0,5	0,09	0,6
AF-β-Ala-(D)Asp	371	0,5	1,6
AF-PhenylGly-(D)Lys	21	2	6
AF-Met-(D)Lys	2	1,5	3
AF-Asn-(D)Lys	44	0,1	4
vc-PABC-MMAF	3	0,5	3

⁺ Linkerenhetens stretcherenhet er som angitt i eksemplene ovenfor.

5 Dataene i tabell 6 viser at auristatin-dipeptidlegemiddellinkere tilveiebringer potente cAC10 ADC-er. Dataene viser at anvendelsen av slike legemiddellinkere ikke er begrenset til h1F6, men kan ha bredere benyttelse for målrettet legemiddellevering.

Eksempel 60 - In vivo-effekt for tumorvolum i transgene eksplantasjonsmus

10 Dyr egnet til transgene forsøk kan oppnås fra standard kommersielle kilder slik som Taconic (Germantown, N.Y.). Mange stammer er egnet, men FVB-hunnmus er foretrukket på grunn av deres høyere mottagelighet for tumordannelse. FVB-hanner kan anvendes til paring, og steriliserte CD.1-hanner kan anvendes for å stimulere pseudograviditet. Steriliserte mus kan oppnås fra en hvilken som helst

15 kommersiell leverandør. Grunnleggerne kan avles med enten FVB-mus eller med heterozygotiske 129/BL6 x FVB p53-mus. Musen med heterozygositet ved p53-allel kan anvendes til potensielt å øke tumordannelse. Noen F1-tumorer er av blandet stamme. Grunnleggertumorer kan kun være FVB.

20 Dyr som har tumorer (allograft propagert fra Fo5 mmtv-transgene mus) kan behandles med en enkelt eller multippel dose av ADV ved IV-injeksjon. Tumorvolum kan vurderes på forskjellige tidspunkt etter injeksjon.

Eksempel 61 - In vivo-effekt av auristatin F-dipeptid-h1F6-konjugater i en nyrecellexenograftmodell

25

AF-dipeptid-h1F6-konjugaters effekt ble evaluert i 786-O (nyrecelle)-xenografter. AF-dipeptid-h1F6-konjugater med et gjennomsnitt på 4 legemiddeldeler per antistoff ble anvendt. 786-O-celler ble implantert subkutan i mus med immunsvikt (5×10^6 celler per mus). Tumorvolumer beregnes ved anvendelse av formelen ($0,5 \times L \times W^2$), hvor L og W er lengre og kortere av to toveismålinger. Resultatene av denne studien vises i figur 1. De fleste ADC-ene av AF-dipeptide-h1F6 viste effekt i *in vivo*-modellen, som resulterte i tumorvolumreduksjon eller total stråling av etablerte tumorer. *In vivo*-effekt av de testede ADC-ene korrelerte med deres *in vitro*-potens. AF-Pro-(D)Lys-konjugatet var inaktivt i musemodellen (data vises ikke). Et antall AF-dipeptid-h1F6-konjugater var mer aktive enn tilsvarende h1F6-vc-PABC-MMAF.

I en andre studie ble ytterligere AF-dipeptid-h1F6-konjugaters effekter evaluert i 786-O (nyrecelle)-xenografter. Auristatin-dipeptid-h1F6-konjugater med et gjennomsnitt på 4 legemiddeldeler per antistoff ble anvendt. 786-O-celler ble implantert subkutan i mus med immunsvikt (5×10^6 celler per mus). Tumorvolumer beregnes ved anvendelse av formelen ($0,5 \times L \times W^2$), hvor L og W er lengre og kortere av to toveismålinger. Resultatene av denne studien vises i figur 2. Auristatin-dipeptidantistoffkonjugatene førte til tumorregresjoner og -helbredelser ved godt tolererte doser.

Eksempel 62 - *In vivo*-effekt av auristatin F-dipeptid-h1F6-konjugater i en glioblastomxenograftmodell

Auristatin F-dipeptid-h1F6-konjugaters effekter ble evaluert i en subkutan DBTRG05-MG-glioblastommodell. Auristatin-F-dipeptid-h1F6-konjugater med et gjennomsnitt på 4 legemiddeldeler per antistoff ble anvendt. DBTRG05-MG-celler ble implantert subkutan i mus med immunsvikt (5×10^6 celler per mus). Tumorvolumer beregnes ved anvendelse av formelen ($0,5 \times L \times W^2$), hvor L og W er lengre og kortere av to toveismålinger. Resultatene av denne studien vises i figur 3. AF-dipeptid-h1F6-konjugatene viste overlegen effekt sammenlignet med tilsvarende N-terminalbundet vc-PABC-MMAF-konjugat, som resulterte i tallrike helbredelser ved en lav dose på 3 mg/kg enkeltbehandling av etablerte tumorer.

Eksempel 63 - *In vivo* -effekt av auristatin F-dipeptid-cAC10-konjugater

Auristatin F-dipeptid-cAC10s effekt ble evaluert i Karpas-299 ALCL-xenografter. Auristatin-dipeptid-cAC10-konjugater med et gjennomsnitt på 4 legemiddeldeler

per antistoff ble anvendt. Karpas-299 humane ALCL-celler ble implantert subkutan i C.B-17 SCID-mus med immunsvikt (5×10^6 celler per mus). Tumorvolumer ble beregnet ved anvendelse av formelen ($0,5 \times L \times W^2$), hvor L og W er lengre og kortere av to toveismålinger. Resultatene vises i figur 4.

5

Behandling av de etablerte tumorene med enkeltdose på kun 0,5 mg/kg AF-dipeptid-cAC10-konjugater resulterte i tumorregresjoner og -helbredelser.

Eksempel 64 - Tolerabilitet for auristatin-dipeptid-h1F6-konjugater hos mus

10

Tolerabiliteten, målt som maksimalt tolerert dose (MTD), ble bestemt hos mus basert på dyrs vekttap etter behandling. Dyr ble vanligvis overvåket i 14 dager. Et konjugat betraktes som å være tolerert ved en bestemt dose hvis en enkelt iv-behandling ved en slik dose resulterer i et forbigående vekttap på ikke mer enn 20 % av innledende kroppsvekt for dyr, og ingen andre tegn til toksisitet er observert. Resultatene vises i figur 5–9. Tolerabilitet for auristatin-dipeptid-h1F6-konjugater med et gjennomsnitt på 4 legemiddelenheter per antistoff ble funnet å avhenge av dipeptidsekvensen til linkeren og auristatinet. AF-Met-(D)Lys- og AF-Asn-(D)Lys-konjugater ble tolerert ved doser så høye som 100 mg/kg (figur 7). Tilsvarende konjugater av auristatiner inneholdende metionin (AM) og tryptofan (AW) ved legemiddels C-terminalposisjon ble tolerert enda bedre, opptil 150 mg/kg (figur 8). Disse dosene er signifikant høyere enn doser funnet å være effektive *in vivo* (50+ ganger høyere). Auristatin-dipeptidlegemiddellinkerne tilveiebringer således ADC-er med signifikant terapeutisk vindu for terapeutisk behandling (*f.eks.* cancer).

15

20

25

Eksempel 65 - Sammenligning av utvalgte auristatin-dipeptid-antistoffkonjugaters effekt og tolerabilitet

Tilsvarende auristatin-dipeptid-antistoffkonjugaters effekter og tolerabiliteter (MTD) ble sammenlignet for to forskjellige legemiddel, auristatin F (AF) eller MMAF, ved anvendelse av den dipeptidinnholdende linkeren Asn-(D)Lys eller Met-(D)Lys. Effekt- og tolerabilitetsstudiene ble generelt utført som beskrevet i henholdsvis eksempel 58 og 64. Resultatene vises i følgende tabell 7 og i figur 10–11.

30

35

Tabell 7: IC50-er (ng/ml), sammendrag for utvalgte auristatin-dipeptid-h1F6-konjugater

Legemiddel	Linker ⁺	IC50s (ng/ml)				
		786-O	Caki-1	L-428	UMRC-3	LP-1
AF	Met-(D)Lys	12	9	158	182	>1000
MMAF		10	8	123	100	>1000
AF	Asn-(D)Lys	10	6	9	32	479
MMAF		9	7	7	19	110

⁺ Linkerenhetens stretcherenhet er som angitt i eksemplene *ovenfor*.

- 5 Dataene viser at MMAF- og AF-ADC-er har lignende *in vitro*- og *in vivo*-potens uavhengig av hvilket legemiddel som ble anvendt med de dipeptidinnholdende linkerne. MMAF-inneholdende konjugater synes å være noe mindre tolerert enn tilsvarende auristatin F-inneholdende ADC-er. Både MMAF-Met-(D)Lys- og MMAF-Asn-(D)Lys-h1F6-konjugater resulterte i tap av dyr ved 100 mg/kg dose, mens tilsvarende AF-konjugater ble tolerert ved denne dosen.

Eksempel 66 - Sammenligning av utvalgte auristatin-dipeptid-antistoffkonjugaters effekt og tolerabilitet

15 Auristatin-dipeptid-antistoffkonjugaters effekt og tolerabilitet (MTD) ble sammenlignet ved anvendelse av forskjellige linkere med D- eller L-aminosyrer i linkerens andre aminosyreposisjon. Effekt- og tolerabilitetsstudiene ble generelt utført som beskrevet i henholdsvis eksempel 58 og 64. Resultatene vises i følgende tabell 8 og i figur 12-13.

Tabell 8. IC50-er (ng/ml), sammendrag for auristatin-dipeptid-h1F6-konjugater

Legemiddel	Linker ⁺	IC50s (ng/ml)				
		786-O	Caki-1	L-428	UMRC-3	LP-1
AF	Met-(D)Lys	12	9	158	182	>1000
	Met-(L)Lys	7	4	3	22	95
AF	Asn-(D)Lys	10	6	9	32	479

Legemiddel	Linker ⁺	IC50s (ng/ml)				
		786-O	Caki-1	L-428	UMRC-3	LP-1
	Asn-(L)Lys	9	8	8	26	501

Linkerenhetens stretcherenhet er som angitt i eksemplene ovenfor.

Legemiddellinkere med en L-aminosyre i andre posisjon tilveiebrakte mindre tolererte ADC-er for begge testede linkere, som vist i figur 13, mens *in vitro*- og *in vivo*-potens for disse konjugatene var sammenlignbare.

Eksempel 67 - Sammenligning av effekten og tolerabiliteten av utvalgte auristatin-dipeptid-antistoffkonjugater med en mono- eller dipeptidlinkere

Auristatin-dipeptid-antistoffkonjugaters effekter og tolerabiliteter (MTD) ble sammenlignet ved anvendelse av mono- eller di-peptidaminosyrelinkere. Effekt- og tolerabilitetsstudiene ble generelt utført som beskrevet i henholdsvis eksempel 58 og 64. Resultatene vises i følgende tabell 9 og i figur 14-15.

Tabell 9. IC50-er (ng/ml), sammendrag for h1F6-legemiddel(4)-konjugater

Legemiddel	Linker ⁺	IC50s (ng/ml)				
		786-O	Caki-1	L-428	UMRC-3	LP-1
AF	Met-(D)Lys	12	9	158	182	>1000
	Met	8	6	3	17	110
AF	Asn-(D)Lys	10	6	9	32	479
	Asn	10	6	9	28	209

⁺ Linkerenhetens stretcherenhet er som angitt i eksemplene ovenfor.

Studienes resultater viser at konjugater med kun én aminosyre i linkeren ble tolerert signifikant mindre sammenlignet med tilsvarende konjugater med dipeptidlinkere (figur 15). AF-Asn-h1F6 og AF-Met-h1F6 var toksiske ved 50 mg/kg dose, mens tilsvarende AF-Asn-(D)Lys- og AF-Met-(D)Lys-konjugater ble tolerert ved 100 mg/kg. Disse dataene støtter anvendelse av minst to

aminosyrer i peptidlinkerne for C-terminalbundne auristatin-dipeptid-antistoffkonjugater.

Generelt eksempel 68 - Fremstilling av auristatin-AA1-AA2-legemiddellinkere med aryl-maleimider

5

Auristatin-peptidlegemiddellinkere med aryl-maleimider i stretcherenheten ble fremstilt ved substituering av 3-maleimidopropionsyre NHS-ester i trinn (j) i eksempel 10, som modifisert i eksempel 24, med p-maleimidobenzoyl NHS-ester.

10

Eksempel 69 - Fremstilling av AM-asparagin-(D)lysin-diaminoetan-propionylmaleimid (10e, AA1-AA2 = asparagin-(D)lysin)

15

AM-asparagin-(D)lysin-diaminoetan-benzoylmaleimid (**10e**) ble fremstilt på samme måte som **9c**, ved å begynne med 100 mg Fmoc-(D)lysin(boc)diaminoetan-tritylharpiks (**4**) og anvendelse av p-maleimidobenzoyl NHS-ester i stedet for 3-maleimidopropionsyre NHS-ester. Utbytte: 24 mg. RP-HPLC-analyse >95 % ved 10,30 min; ESMS $m/z = 1212,84 (M+H)^+$.

Eksempel 70 - Fremstilling av AW-metionin-(D)lysin-diaminoetan-benzoylmaleimid (10f, AA1-AA2 = metionin-(D)lysin)

20

AW-metionin-(D)lysin-diaminoetan-benzoylmaleimid ble fremstilt på samme måte som **10b**, ved å begynne med 100 mg Fmoc-(D)lysin(boc)-diaminoetan-tritylharpiks (**4**) og anvendelse av p-maleimidobenzoyl NHS-ester i stedet for 3-maleimidopropionsyre NHS-ester. Utbytte: 8 mg. RP-HPLC-analyse >95 % ved 10,81 min; ESMS $m/z = 1285,64 (M+H)^+$.

25

Eksempel 71- Sammenligning av potensen til utvalgte aryl- og alkyl-auristatin-peptid-h1F6-konjugater på CD70⁺-celler.

30

Ved å følge prosedyren beskrevet i eksempel 57 og 58, ble auristatin-peptid-h1F6-konjugater evaluert på CD70⁺-celler slik som 786-O, Caki-1, Caki-2 og L428. Konjugater inneholder omtrent 4 legemiddel per antistoff. Med henvisning til følgende tabell 10 resulterte de respektive aryl- og alkyl-maleimid-inneholdende legemiddellinkerne i konjugater med lignende aktiviteter.

Tabell 10. IC₅₀-er (ng/ml), sammendrag for h1F6-legemiddel(4)-konjugater ved anvendelse av aryl- eller alkylmaleimider

Legemiddellinker ⁺	IC ₅₀ (ng/ml)			
	786-O	Caki-1	Caki-2	L428
AW-Met-(D)Lys-aryl-maleimid	12	15	12	>1000
AW-Met-(D)Lys-propionyl-maleimid	17	19	18	>1000
AM-Asn-(D)Lys-aryl maleimid	16	10	17	23
AM-Asn-(D)Lys-propionyl-maleimid	18	16	26	29

AM = auristatin som har metionin ved C-terminalen; AW = auristatin som har tryptofan ved C-terminalen

5 ⁺ Linkerenhetens stretcherenhet er som angitt i eksemplene ovenfor.

Eksempel 72 - AM-Asn-(D)Lys- og AW-Met-(D)Lys-konjugaters aktivitet med cAC10- (anti-CD30), hBU12- (anti-CD19), Anti-LIV-1- og BR96- (anti-Le^y)-antistoff in vitro

10 Ved å følge prosedyren beskrevet i eksempel 57 og 58, ble auristatin-peptid-cAC10-konjugaters aktiviteter evaluert på CD30⁺-celler slik som Karpas 299, L428 og L540cy. Auristatin-peptid-hBU12-konjugaters aktiviteter ble evaluert på CD19⁺-celler slik som Ramos, SUDHL-4 og ARH-77. Auristatin-peptid-anti-LIV-1-konjugaters aktiviteter ble evaluert LIV-1-positive cellelinjer MCF-7 og SKOV-3.

15 Auristatin-peptid-BR96-konjugaters aktiviteter ble evaluert på Le^y-positive celler H3396, RCA og L2987. Alle konjugater inneholder omtrent 4 legemiddel per antistoff.

Resultatene vises med henvisning til tabell 11. AM-Asn-(D)Lys-konjugater hadde lignende in vitro-potens som tilsvarende MC-MMAF-konjugater. AW-Met-(D)Lys-konjugater synes å være mindre aktive.

20

Tabell 11. Sammendrag av IC₅₀-er (ng/ml) for utvalgte auristatin-peptidkonjugater med cAC10-, hBU12-, Anti-LIV-1- og BR96-antistoff.

Legemiddel-linker	cAC10			hBU12			Anti-LIV-1		BR96		
	Karpas 299	L428	L540cy	Ramos	SUDHL - 4	ARH-77	MCF-7	SKOV-3	H3396	RCA	L2987
AM-Asn-	11	0,6	31	1	>10 000	49	24	7600	37	8362	506

Legemiddel-linker	cAC10			hBU12			Anti-LIV-1		BR96		
	Karpas 299	L428	L540cy	Ramos	SUDHL - 4	ARH- 77	MCF- 7	SKOV- 3	H3396	RCA	L2987
(D)Lys											
AW-Met-(D)Lys	11	-10,000	17	>10,00	>10 000	>10 000	>10 000	>10 000	146	5217	422
MC-MMAF	3	1	7	7	~10 000	255	3	2450	42	7400	626

AM = auristatin som har metionin ved C-terminalen; AW = auristatin som har tryptofan ved C-terminalen; MC-MMAF = maleimidokaproyl-monometylauristatin F.

Eksempel 73 - In vivo-effekt av utvalgte auristatin-dipeptid-hBU12-konjugater i en lymfomxenograftmodell.

Auristatin F-dipeptid-hBU12-konjugaters effekter med aryl- og alkylmaleimid-stretcherenheter ble evaluert i en subkutan modell av DoHH-2 follikulær B-cellelymfom. Auristatin-dipeptid-hBU12-konjugater med gjennomsnittlig 4 legemiddeldeler per antistoff ble anvendt. DoHH-2-celler ble implantert subkutan i SCID-mus med immunsvikt (5x10⁶ celler per mus). Tumorvolumer beregnes ved anvendelse av formelen (0,5xLxW²), hvor L og W er lengre og kortere av to toveismålinger. Behandling ble initiert når gjennomsnittlig størrelse på tumorer nådde 100 mm³; behandlingsplanen var q4dx4 ved 3 mg/kg. Resultatene av denne studien vises i figur 16.

Konjugater av aryl- og alkylmaleimidanaloger av tilsvarende auristatin-dipeptider viste lignende effekter. AM-Asn-(D)Lys-ADC-er var mer potente enn tilsvarende AW-Met-(D)Lys-konjugater.

Eksempel 74 - In vivo-effekt av utvalgte auristatin-dipeptid-cAC10-konjugater i en lymfomxenograftmodell.

Effekten av utvalgte auristatin-dipeptid-cAC10-konjugater med stretcherenheter med aryl- eller alkylmaleimider ble evaluert i subkutan modell av L540cy av Hodgkins lymfom. Auristatin-dipeptid-cAC10-konjugater med gjennomsnittlig 4 legemiddeldeler per antistoff ble anvendt. L540cy-celler ble implantert subkutan i SCID-mus med immunsvikt (5x10⁶ celler per mus). Tumorvolumer ble beregnet

ved anvendelse av formelen $(0,5 \times L \times W^2)$, hvor L og W er lengre og kortere av to toveismålinger. Behandling ble initiert når gjennomsnittlig størrelse på tumorer nådde 100 mm³. Behandlingsplanen var q4dx3 ved 1 mg/kg. Resultatene av denne studien vises i figur 17. Konjugatene viste lignende effekt. AM-Asn-(D)Lys-ADC-er var mer potente enn tilsvarende AW-Met-(D)Lys-konjugater i denne studien.

Eksempel 75 - Plasma-clearance hos rotte

Plasma-clearance-farmakokinetikk for antistofflegemiddelkonjugater og antistoff totalt studeres hos Sprague-Dawley-rotter (f.eks. fra Charles River Laboratories, 250–275 gram per stk.). Dyr doseres ved bolushaleåreinjeksjon (rask IV). Omtrent 300 µl fullblod samles inn gjennom halsårekanyler, eller ved halestykke (eng.: tail stick), i litium/heparin-antikoagulasjonsbeholdere på hvert tidspunkt: 0 (forhåndsdose), 10 og 30 minutter; 1, 2, 4, 8, 24 og 36 timer; og 2, 3, 4, 7, 14, 21 og 28 dager etter dose. Antistoff totalt måles ved ELISA, for eksempel ved belegging med målproteinets ekstracellulære domene og deteksjon med et anti-humant Fc - HRP-antistoffkonjugat (ECD/GxhuFc-HRP). Antistofflegemiddelkonjugat måles ved ELISA, for eksempel ved belegging med et anti-legemiddel eller antiFc-antistoff og deteksjon med et ekstracellulært domene-biotinkonjugat og et streptavidin-pepperrot peroksidasekonjugat.

Eksempel 76 - Plasma-clearance hos ape

Plasma-clearance-farmakokinetikk for antistofflegemiddelkonjugater og antistoff totalt kan studeres hos cynomolgus-aper ved anvendelse av en lignende prosedyre som den beskrevet over i eksempel 75.

Patentkrav**1. Forbindelse med formel:**

5 L-(LU-D)_p

eller et farmasøytisk akseptabelt salt eller solvat derav;

hvor L er ligandenhet, LU er en linkerenheter og D er en legemiddelenhet;

10 L er et peptid, polypeptid eller protein som binder seg spesifikt til en målcellepopulasjon;

LU har formelen -A_a-W_w-,

15 W_w er en sekvens av w-uavhengig valgte aminosyrediradikaler, hvor W-en proksimalt for legemiddelenheten (W₁) er en naturlig aminosyre som ikke er en D-aminosyre, og er forbundet via en peptidbinding til legemiddelenheten, og
 20 hvor hver resterende W-enhet uavhengig er valgt fra gruppen bestående av glysin og D-isomerene av alanin, arginin, asparaginsyre, asparagin, histidin, glutaminsyre, glutamin, fenylalanin, lysin, leucin, serin, tyrosin, treonin, isoleucin, tryptofan og valin, forutsatt at W₁ ikke kan danne sekundært amid med C-terminal aminosyre av D, og at peptidbindingen kan spaltes av en intracellulær protease,

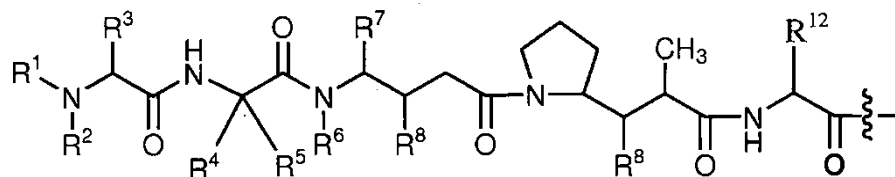
w er et heltall som spenner fra 2 til 12,

A er stretcherenhet, og

a er 1 eller 2;

p er et heltall fra 1 til 20; og

25 D har formelen:



hvor den bølgede linjen angir peptidbindingen til LU;

R¹ og R² uavhengig er valgt fra gruppen bestående av -H og -C₁-C₈ alkyl, med forbehold om at både R¹ og R² ikke er -H;

30 R³ er valgt fra gruppen bestående av -H, -C₁-C₈ alkyl, -C₃-C₈ karbosyklus, -aryl, -C₁-C₈ alkyl-aryl, -X¹-(C₃-C₈ karbosyklus), -C₃-C₈ heterosyklus og -X¹-(C₃-C₈ heterosyklus);

R^4 er valgt fra gruppen bestående av -H, $-C_1-C_8$ alkyl, $-C_3-C_8$ karbosyklus, -aryl, $-X^1$ aryl, $-C_1-C_8$ alkyl- $(C_3-C_8$ karbosyklus), $-C_3-C_8$ heterosyklus og $-X^1-(C_3-C_8$ heterosyklus);

R^5 er valgt fra gruppen bestående av -H og metyl;

5 eller R^4 og R^5 i fellesskap danner en karbosyklisk ring og har formelen $-(CR^aR^b)_n-$ hvori R^a og R^b uavhengig er valgt fra gruppen bestående av -H og $-C_1-C_8$ alkyl, og n er valgt fra gruppen bestående av 2, 3, 4, 5 og 6;

R^6 er valgt fra gruppen bestående av -H og $-C_1-C_8$ alkyl;

10 R^7 er valgt fra gruppen bestående av -H, $-C_1-C_8$ alkyl, $-C_3-C_8$ karbosyklus, -aryl, $-X^1$ -aryl, $-X^1-(C_3-C_8$ karbosyklus), $-C_3-C_8$ heterosyklus og $-X^1-(C_3-C_8$ heterosyklus);

hver R^8 uavhengig er valgt fra gruppen bestående av -H, -OH, $-C_1-C_8$ alkyl, $-C_3-C_8$ karbosyklus og $-O-(C_1-C_8$ alkyl);

15 R^{12} er valgt fra sidekjeden av fenylalanin, sidekjeden av metionin og sidekjeden av tryptofan; og hver X^1 uavhengig er $-C_1-C_{10}$ alkylen-.

2. Forbindelse med formel:

LU-D

20

eller et farmasøytisk akseptabelt salt eller solvat derav;

hvor LU- er en linkerenhed og D er en legemiddelenhet;

LU har formelen A_a-W_w- ,

25

W_w er en sekvens av w -uavhengig valgte aminosyrediradikaler, hvori W -en proksimalt for legemiddelenheten (W_1) er en naturlig aminosyre som ikke er en D-aminosyre, og er forbundet via en peptidbinding til legemiddelenheten, og hvori hver resterende W -enhet uavhengig er valgt fra gruppen bestående av glysin og D-isomerene av alanin, arginin, asparaginsyre, asparagin, histidin, glutaminsyre, glutamin, fenylalanin, lysin, leucin, serin, tyrosin, treonin, isoleucin, tryptofan og valin, forutsatt at W_1 ikke kan danne sekundært amid med C-terminal aminosyre av D, og at peptidbindingen kan spaltes av en intracellulær protease,

30

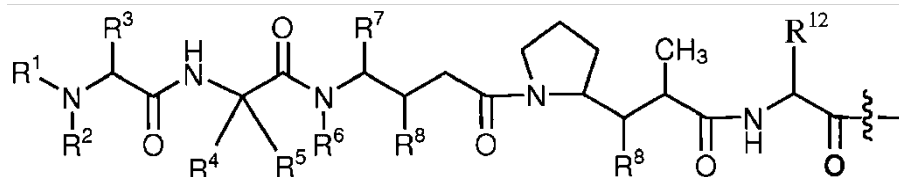
w er et heltall som spenner fra 2 til 12,

A er stretcherenhet, og

35

a er 1 eller 2; og

D har formelen:



hvor den bølgede linjen angir peptidbindingen til LU;

R^1 og R^2 uavhengig er valgt fra gruppen bestående av -H og $-C_1-C_8$ alkyl;

5 R^3 er valgt fra gruppen bestående av -H, $-C_1-C_8$ alkyl, $-C_3-C_8$ karbocyklus, -aryl, $-C_1-C_8$ alkyl-aryl, $-X^1-$ (C_3-C_8 karbocyklus), $-C_3-C_8$ heterosyklus og $-X^1-$ (C_3-C_8 heterosyklus);

10 R^4 er valgt fra gruppen bestående av -H, $-C_1-C_8$ alkyl, $-C_3-C_8$ karbocyklus, -aryl, $-X^1$ -aryl, $-C_1-C_8$ alkyl-(C_3-C_8 karbocyklus), $-C_3-C_8$ heterosyklus og $-X^1$ -(C_3-C_8 heterosyklus);

R^5 er valgt fra gruppen bestående av -H og -metyl;

eller R^4 og R^5 i fellesskap danner en karbocyklisk ring og har formelen $-(CR^aR^b)_n-$ hvor R^a og R^b uavhengig er valgt fra gruppen bestående av -H og $-C_1-C_8$ alkyl, og n er valgt fra gruppen bestående av 2, 3, 4, 5 og 6;

15 R^6 er valgt fra gruppen bestående av -H og $-C_1-C_8$ alkyl;

R^7 er valgt fra gruppen bestående av -H, $-C_1-C_8$ alkyl, $-C_3-C_8$ karbocyklus, -aryl, $-X^1$ -aryl, $-X^1$ -(C_3-C_8 karbocyklus), $-C_3-C_8$ heterosyklus og $-X^1$ -(C_3-C_8 heterosyklus);

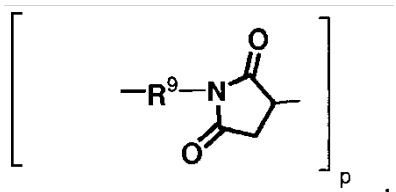
20 hver R^8 uavhengig er valgt fra gruppen bestående av -H, -OH, $-C_1-C_8$ alkyl, $-C_3-C_8$ karbocyklus og $-O-(C_1-C_8$ alkyl);

R^{12} er valgt fra sidekjeden av fenylalanin, sidekjeden av metionin og sidekjeden av tryptofan; og

hver X^1 uavhengig er $-C_1-C_{10}$ alkyl-.

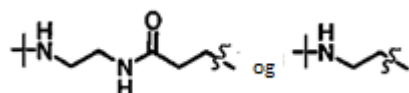
25 **3.** Forbindelsen ifølge krav 1 eller krav 2, hvor a er 1.

4. Forbindelsen ifølge krav 3, hvor A har formelen $-NH-R^9-R^{11}$ og R^9-R^{11} har formelen:

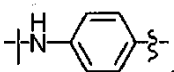


hvor R^9 er valgt fra gruppen bestående av $-C_1-C_{10}$ alkylene-, $-C_3-C_8$ karbosyklo-,
 -arylen-, $-C_1-C_{30}$ heteroalkylen-, $-C_3-C_8$ heterosyklo-, $-C_1-C_{10}$ alkylene-arylen-,
 -arylen- $-C_1-C_{10}$ alkylen-, $-C_1-C_{10}$ alkylen- (C_3-C_8) karbosyklo-,
 5 $-(C_3-C_8)$ karbosyklo- $-C_1-C_{10}$ alkylene-, $-C_1-C_{10}$ alkylene- (C_3-C_8) heterosyklo- og
 $-(C_3-C_8)$ heterosyklo- $-C_1-C_{10}$ alkylene-.

5. Forbindelsen ifølge krav 4, hvor $-NH-R^9$ er valgt fra gruppen bestående av $-$
 $NH-C_1-C_{10}$ alkylene-, $-NH-C_1-C_{10}$ alkylene- $NH-C(O)-C_1-C_{10}$ alkylene-, $-NH-C_1-C_{10}$
 10 $alkylene-C(O)-NH-C_1-C_{10}$ alkylene-, $-NH-(CH_2CH_2O)_r-$, $-NH-(CH_2CH_2O)_r-CH_2-$, $-NH-$
 (C_3-C_8) karbosyklo-, $-NH-(arylen)-$ og $-NH-(C_3-C_8)$ heterosyklo-, hvor r er et
 heltall fra 1–10, for eksempel hvor $-NH-R^9$ er valgt fra gruppen bestående av:



eller for eksempel hvor $-NH-R^9$ er:



15 **6.** Forbindelsen ifølge krav 1,

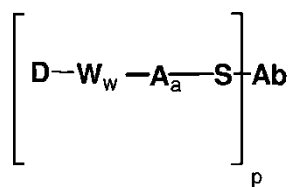
(a) hvor W_1 er en naturlig aminosyre valgt fra gruppen bestående av alanin,
 arginin, asparaginsyre, asparagin, histidin, glysin, glutaminsyre, glutamin,
 fenylalanin, lysin, leucin, serin, tyrosin, treonin, isoleucin, tryptofan og valin, og
 hvor W_1 foretrukket er metionin eller asparagin; eller

20 (b) hvor $-W_w-$ er valgt fra gruppen bestående av (D)asparaginsyre-tyrosin-,
 (D)lysin-metionin- og (D)lysin-asparagin-.

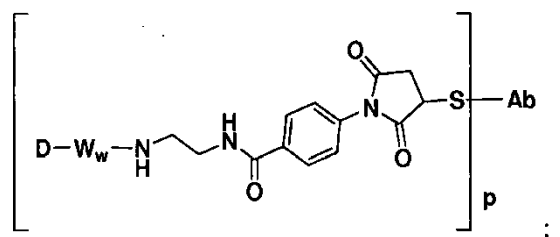
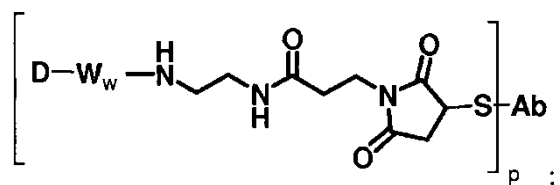
7. Forbindelsen ifølge krav 1 eller krav 2, hvor w er 2.

25 **8.** Forbindelsen ifølge krav 1, hvor L er et antistoff, eventuelt et kimært
 antistoff, et humanisert antistoff eller et antistofffragment.

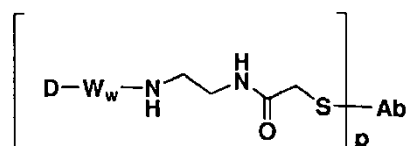
9. Forbindelsen ifølge krav 8, hvori antistoffet (Ab) er bundet til aminosyreenheten (W_w) gjennom en cysteinrest av antistoffet, og forbindelsen har følgende formel:



5 og hvori forbindelsen eventuelt har én av følgende formler:



eller



10

10. Forbindelsen ifølge krav 8, hvori antistoffet binder spesifikt til et B-celleantigen eller binder spesifikt til CD19-, CD20-, CD30-, CD33-, CD70-, BCMA- eller Lewis Y-antigen.

15

11. Forbindelsen ifølge krav 1 eller krav 2, eller et farmasøytisk akseptabelt salt eller solvat derav, som er i isolert og renset form.

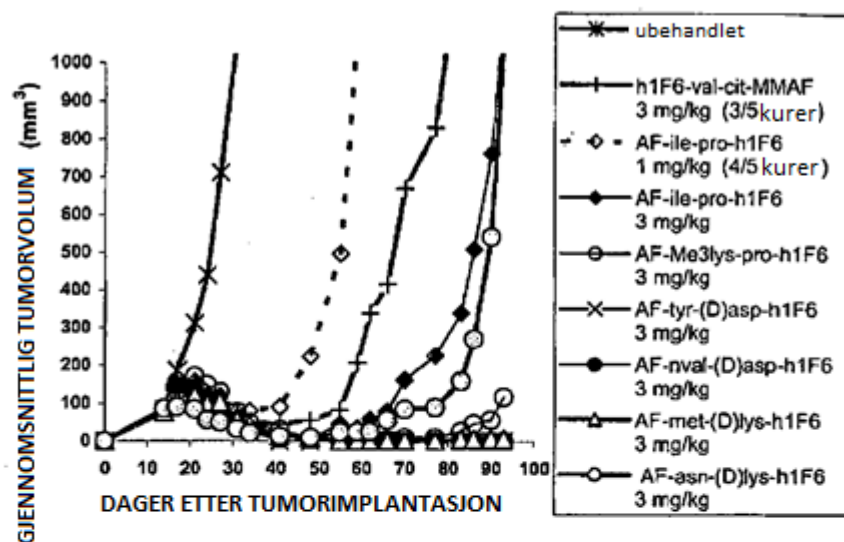
20

12. En farmasøytisk sammensetning omfattende en virkningsfull mengde av forbindelsen ifølge krav 1, eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav, og en farmasøytisk akseptabel fortynner, bærer eller eksipient, der den farmasøytiske

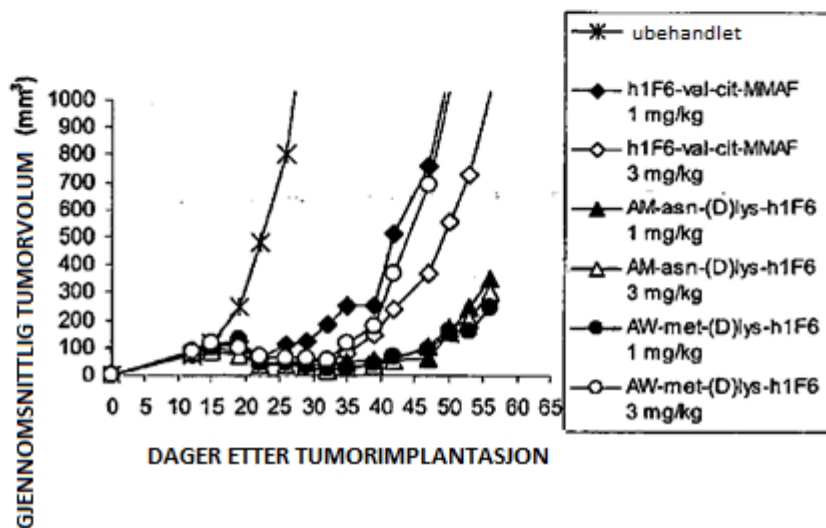
sammensetningen eventuelt ytterligere omfatter en terapeutisk virkningsfull mengde av kjemoterapeutisk middel valgt fra gruppen bestående av en tubulindannende inhibitor, en topoisomeraseinhibitor og en DNA-binder.

- 5 **13.** Forbindelse ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 11 for anvendelse i en fremgangsmåte for behandling.
- 10 **14.** Forbindelse ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 11 for anvendelse i en fremgangsmåte for behandling av cancer, en autoimmun sykdom eller en infeksjons sykdom.
hvor eventuelt
- (a) forbindelsen er i en formulering omfattende en farmasøytisk akseptabel fortynner, bærer eller eksipient;
- (b) forbindelsen er formulert i en injiserbar enhetsdoseform;
- 15 (c) mengden forbindelse administrert til en pasient er i området omkring 0,1 til omkring 10 mg/kg av pasientens vekt; eller
- (d) forbindelsen administreres intravenøst.
- 20 **15.** Forbindelse ifølge krav 8 for anvendelse i en fremgangsmåte for behandling av cancer, hvor forbindelsen hemmer veksten av tumorceller som overuttrykker et tumorassosiert antigen, og hvor antistoffet binder til det tumorassosierte antigenet, der fremgangsmåten eventuelt ytterligere omfatter administrering av et kjemoterapeutisk middel;
- 25 og hvor canceren eventuelt er valgt fra gruppen bestående av bryst-, eggstokk-, mage-, endometrie-, spyttkjertel-, lunge-, nyre-, tykktarms-, kolorektal-, skjoldbrusk-, skjoldbruskkjertel-, prostata- og blærecancer.

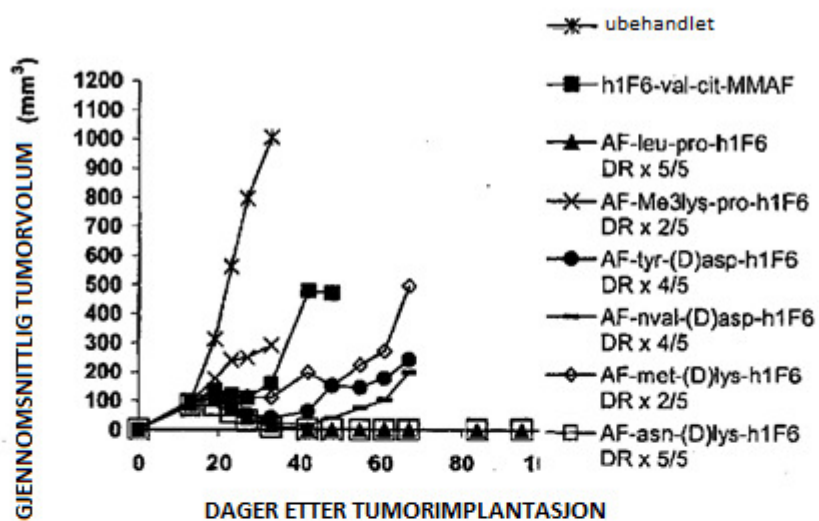
Figur 1



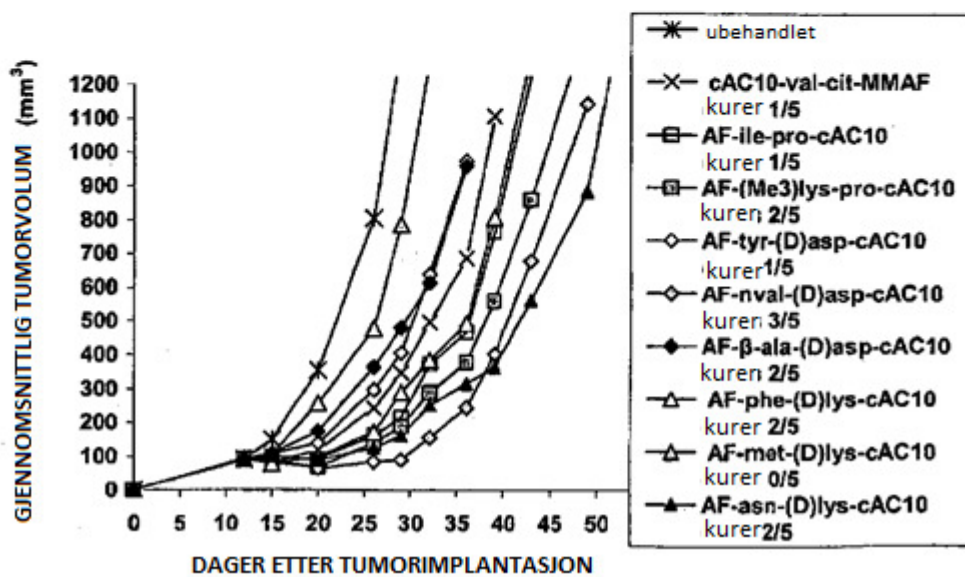
Figur 2



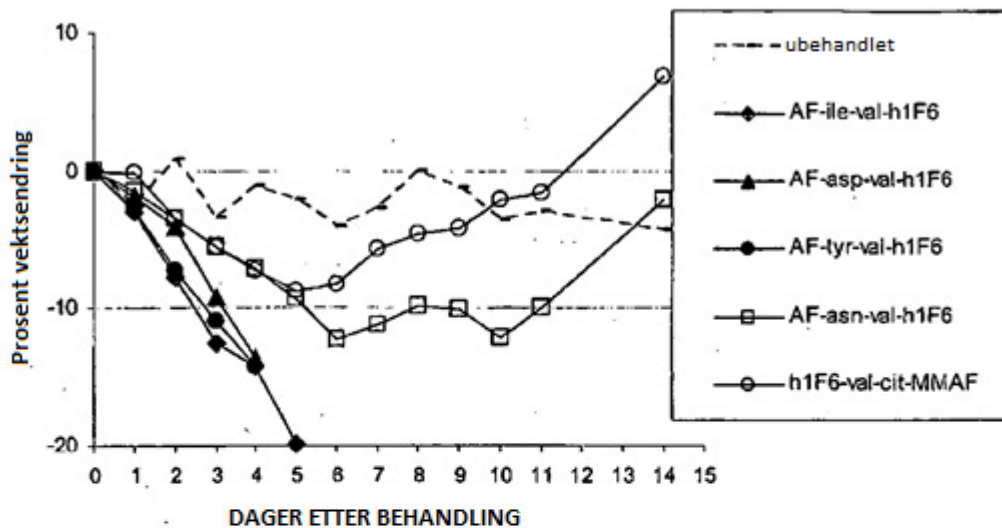
Figur 3



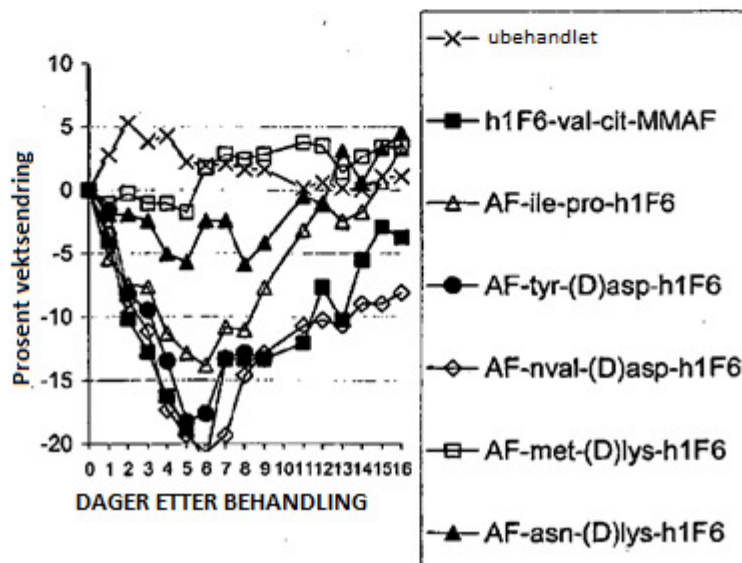
Figur 4



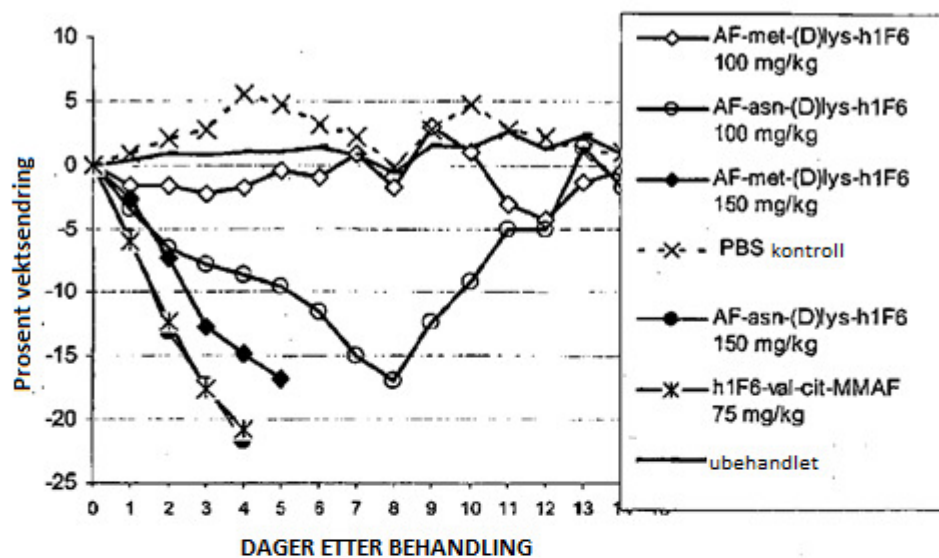
Figur 5



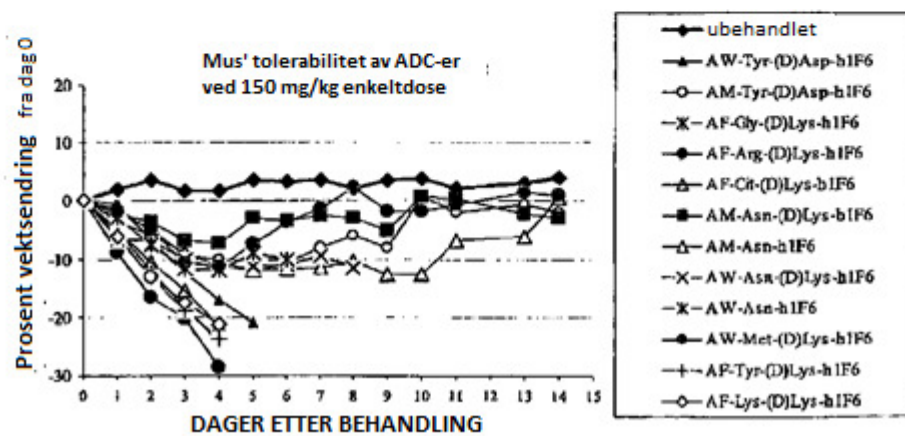
Figur 6



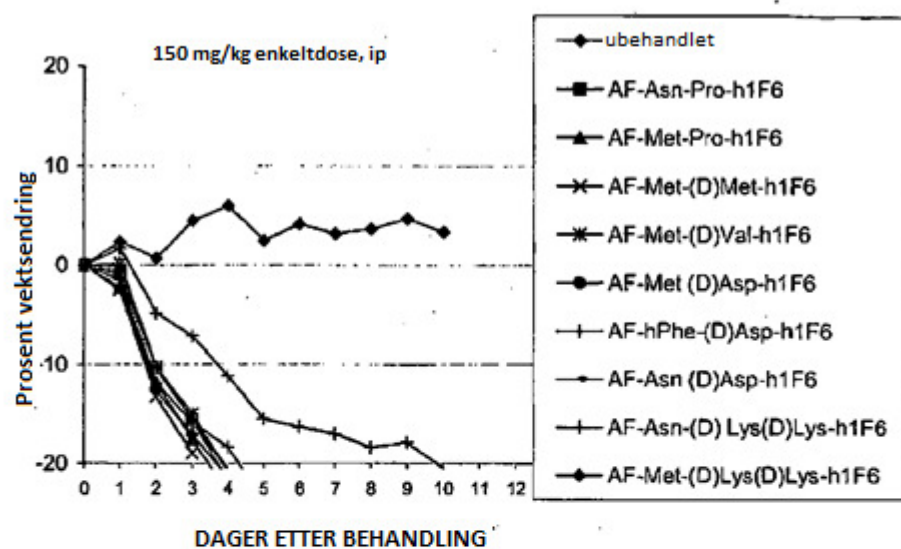
Figur 7



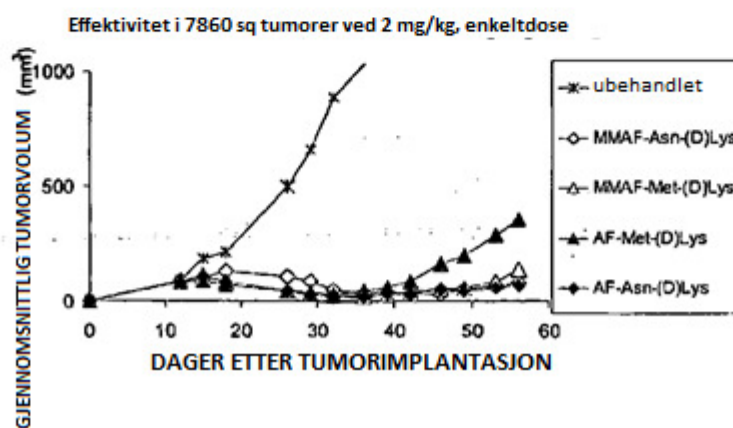
Figur 8



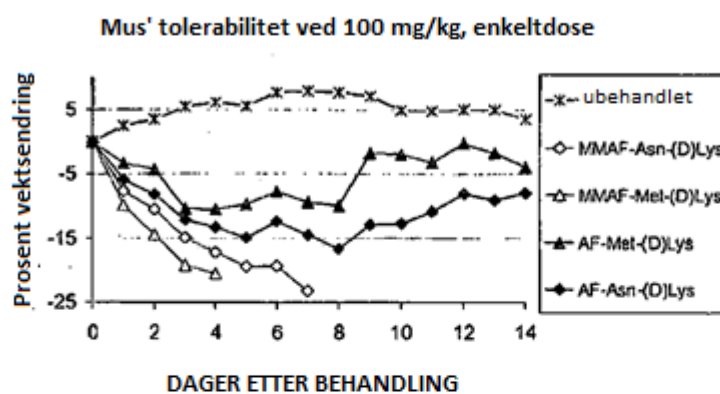
Figur 9



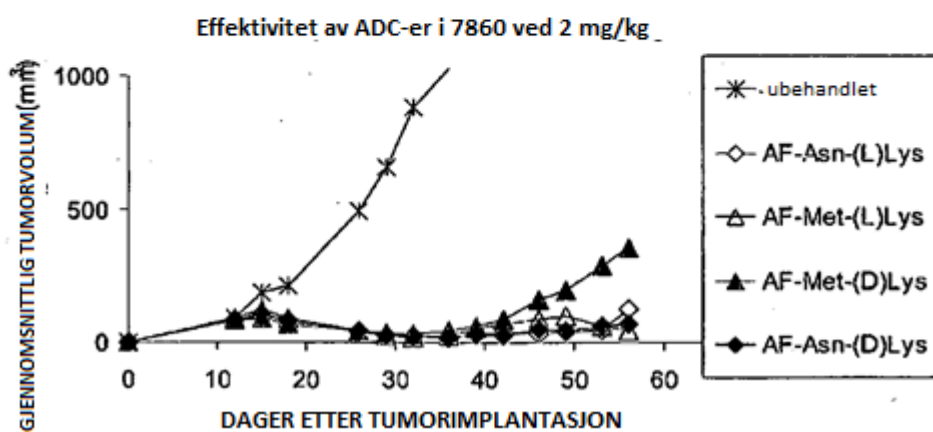
Figur 10



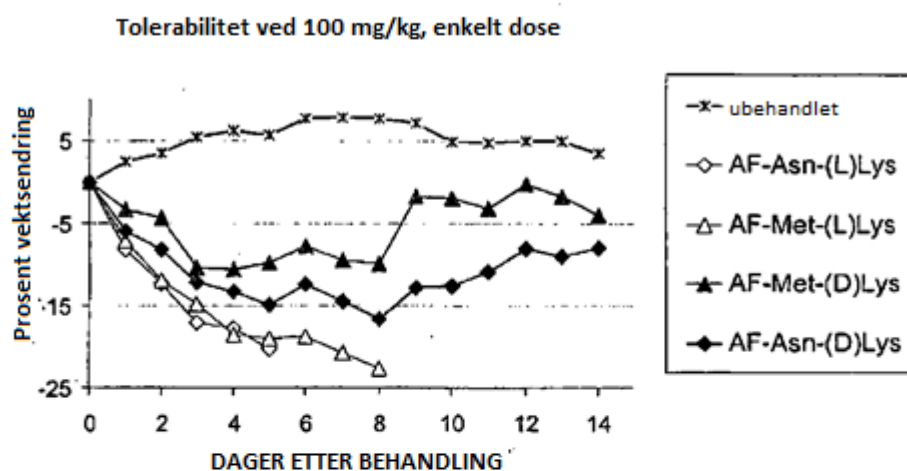
Figur 11



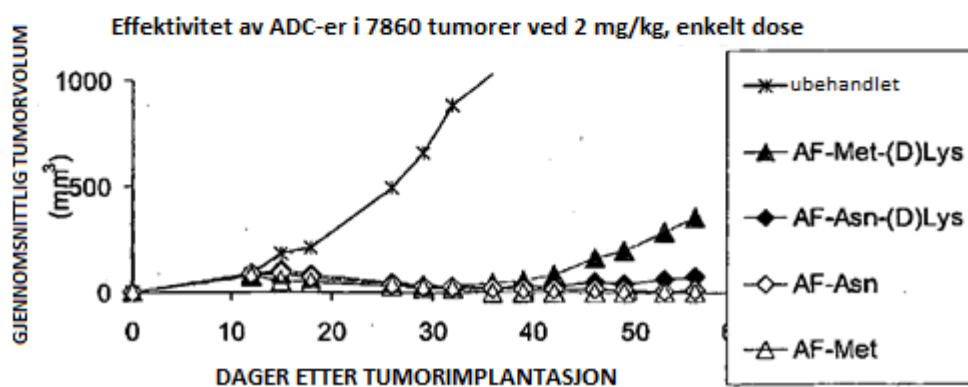
Figur 12



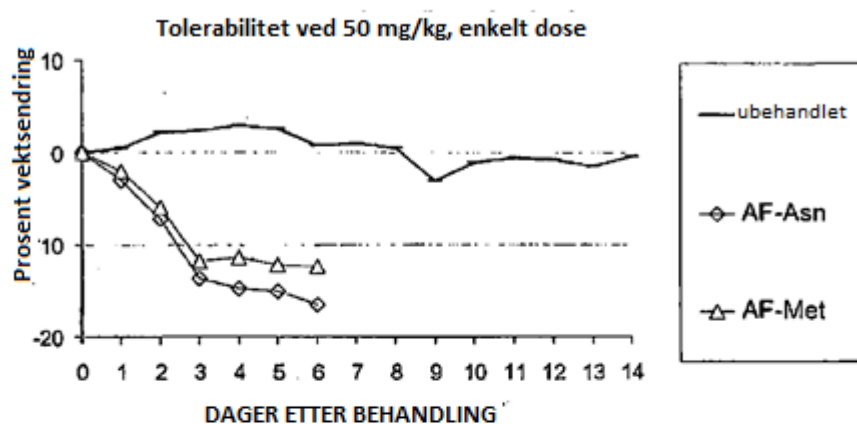
Figur 13



Figur 14

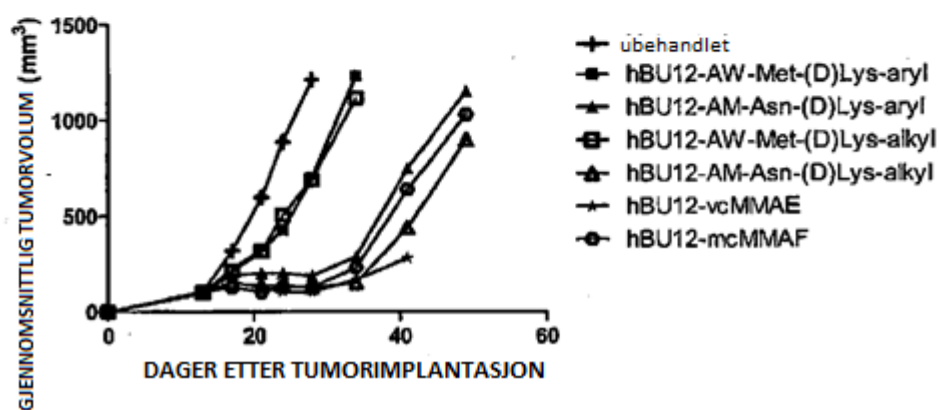


Figur 15



Figur 16

Effektivitet av hBU12 ACD-er i DoHH-2 tumorxenografter
3 mg/kg, q4dx4



Figur 17

Effektivitet av cAC10 ADC-er av maleimidanaloger av AM-Asn-(D)Lys og
AW-Met-(D)Lys i L540cy tumorxenografter
1 mg/kg, q4dx3

