



(12) **Oversettelse av  
europeisk patentskrift**

(11) **NO/EP 2528625 B1**

**NORGE**

(19) NO  
(51) Int Cl.  
**A61K 47/48 (2006.01)**  
**A61P 35/00 (2006.01)**  
**C07D 487/04 (2006.01)**

**Patentstyret**

---

(21)	Oversettelse publisert	2013.12.02
(80)	Dato for Den Europeiske Patentmyndighets publisering av det meddelte patentet	2013.07.10
(86)	Europeisk søknadsnr	11716146.3
(86)	Europeisk innleveringsdag	2011.04.15
(87)	Den europeiske søknadens Publiseringsdato	2012.12.05
(30)	Prioritet	2010.04.15, GB, 201006341 2010.10.06, GB, 201016802
(84)	Utpekte stater	AL 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 RS SE SI SK SM TR
	Utpekte samarbeidende stater	BA ME
(73)	Innehaver	Spirogen Sàrl, Chemin de la Pacottaz 1 c/o Michael Forer, 1806, St-Légier-La Chiésaz, Sveits
(72)	Oppfinner	HOWARD, Philip, Wilson, Spirogen LimitedSchool Of Pharmacy29/39 Brunswick Square, London WC1N 1AX, Storbritannia MASTERSON, Luke, Spirogen LimitedSchool Of Pharmacy29/39 Brunswick Square, London WC1N 1AX, Storbritannia TIBERGHIE, Arnaud, Spirogen LimitedSchool Of Pharmacy29/39 Brunswick Square, London WC1N 1AX, Storbritannia FLYGARE, John, A., Genentech Inc.1 Dna Way, South San Francisco, CA 94080, USA GUNZNER, Janet, L., Genentech Inc.1 Dna Way, South San Francisco, CA 94080, USA POLAKIS, Paul, Genentech Inc.1 Dna Way, South San Francisco, CA 94080, USA POLSON, Andrew, Genentech Inc.1 Dna Way, South San Francisco, CA 94080, USA RAAB, Helga, E., Genentech Inc.1 Dna Way, South San Francisco, CA 94080, USA SPENCER, Susan, D., Genentech Inc.1 Dna Way, South San Francisco, CA 94080, USA
(74)	Fullmektig	Zacco Norway AS, Postboks 2003 Vika, 0125 OSLO, Norge

---

(54)	Benevnelse	<b>Pyrrrolbenzodiazepiner og konjugater derav</b>
(56)	Anførte publikasjoner	EP-A1- 1 813 614, EP-A1- 2 019 104, WO-A1-2005/023814, WO-A2-00/12507 GARY-BOBO MAGALI ET AL: "Cancer therapy improvement with mesoporous silica nanoparticles combining targeting, drug delivery and PDT.", INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICS 28 FEB 2012, vol. 423, no. 2, 28 February 2012 (2012-02-28), pages 509-515, ISSN: 1873-3476 KAMAL AHMED ET AL: "Development of pyrrolo[2,1-c][1,4]-benzodiazepine beta-galactoside prodrugs for selective therapy of cancer by ADEPT and PMT", CHEMMEDCHEM, vol. 3, no. 5, May 2008 (2008-05), pages 794-802, XP002651397, ISSN: 1860-7179

## PYRROLBENZODIAZEPINER OG KONJUGATER DERAU

Den foreliggende oppfinnelsen vedrører pyrrolbenzodiazepiner (PBD-er), særlig pyrrolbenzodiazepiner som har en labil N10-beskyttelsesgruppe, i form av en linker til et cellebindemiddel.

5

### Bakgrunn for oppfinnelsen

#### *Pyrrolbenzodiazepiner*

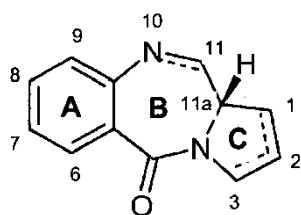
10

Noen pyrrolbenzodiazepiner (PBD-er) har evnen til å gjenkjenne og binde til spesifikke DNA-sekvenser, idet den foretrukne sekvensen er PuGpu. Det første PBD-antitumorantibiotikumet, antramycin, ble oppdaget i 1965 (Leimgruber, et al., J. Am. Chem. Soc., 87, 5793–5795 (1965), Leimgruber, et al., J. Am. Chem. Soc., 87, 5791–5793 (1965)). Siden da er atskillige naturlig forekommende PBD-er rapportert, og over 10 syntetiske veier er utviklet til forskjellige analoger (Thurston, et al., Chem. Rev. 1994, 433–465 (1994)). Familiemedlemmer inkluderer abbeymycin (Hochlowski, et al., J. Antibiotics, 40, 145–148 (1987)), chicamycin (Konishi, et al., J. Antibiotics, 37, 200–206 (1984)), DC-81 (japansk patent 58–180 487, Thurston, et al., Chem. Brit., 26, 767–772 (1990), Bose, et al., Tetrahedron, 48, 751–758 (1992)), mazetramycin (Kuminoto, et al., J. Antibiotics, 33, 665–667 (1980)), neotramyciner A og B (Takeuchi, et al., J. Antibiotics, 29, 93–96 (1976)), porotramycin (Tsunakawa, et al., J. Antibiotics, 41, 1366–1373 (1988)), protrakarsin (Shimizu, et al., J. Antibiotics, 29, 2492–2503 (1982), Langley and Thurston, J. Org. Chem., 52, 91–97 (1987)), sibanomicin (DC-102)(Hara, et al., J. Antibiotics, 41, 702–704 (1988), Itoh, et al., J. Antibiotics, 41, 1281–1284 (1988)), sibiromycin (Leber, et al., J. Am. Chem. Soc., 110, 2992–2993 (1988)) og tomamycin (Arima, et al., J. Antibiotics, 25, 437–444 (1972)). PBD-er har den generelle strukturen:

15

20

25

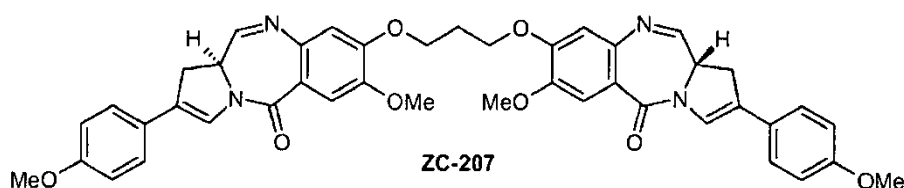


30

De er forskjellige i substituentenes antall, type og posisjon i begge sine aromatiske A-ringer og pyrrol C-ringer, og i C-ringens metningsgrad. I B-ringen er det enten et imin (N=C), et karbinolamin (NH-CH(OH)) eller en karbinolaminmetyleter (NH-CH(OMe)) ved N10-C11-posisjonen som er det elektrofile senteret ansvarlig for alkylering av DNA. Alle de kjente naturlig produktene har en (S)-konfigurasjon ved det kirale C11, en posisjon som gir dem en høyrevri når de ses fra C-ringen mot A-ringen. Dette gir den den egnede tredimensjonale formen for isohelisititet med det mindre sporet av B-form DNA, hvilket fører til en god tilpasning ved bindingsstedet (Kohn, In Antibiotics III. Springer-Verlag, New York, s. 3-11 (1975), Hurley and Needham-VanDevanter, Acc. Chem. Res., 19, 230-237 (1986)). Deres evne til å danne en addukt i det mindre sporet gjør det mulig for dem å forstyrre DNA-prosesseringen, hvilket forklarer deres anvendelse som antitumormidler.

15

De foreliggende oppfinnerne har tidligere beskrevet i WO 2005/085251 dimere PBD-forbindelser som bærer C2-arylsubstituent, slik som:

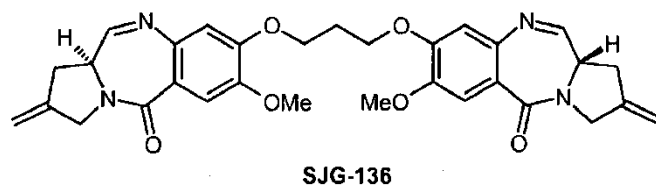


20

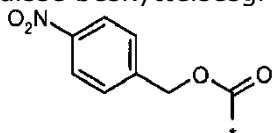
Disse forbindelsene er påvist å være svært nyttige cytotoxiske midler.

En særlig fordelaktig pyrrolbenzodiazepinforbindelse er beskrevet av Gregson et al. (Chem. Commun. 1999, 797-798) som forbindelse 1, og av Gregson et al. (J. Med. Chem. 2001, 44, 1161-1174) som forbindelse 4a. Denne forbindelsen, også kjent som SJG-136, er vist nedenfor:

25



De foreliggende oppfinnerne har tidligere beskrevet at PBD-forbindelser kan benyttes som prolegemidler ved å beskytte dem ved N10-posisjonen med en nitrogenbeskyttelsesgruppe som kan fjernes *in vivo* (WO 00/12507). Mange av disse beskyttelsesgruppene er karbamater og har for eksempel strukturen:



5

hvor stjernen (\*) angir bindingspunktet til PBD-ets N10-atom.

De foreliggende oppfinnerne har også beskrevet fremstillingen av PBD-forbindelser som har en nitrogenkarbamateskyttelsesgruppe ved N10-posisjonen (WO 2005/023814). Beskyttelsesgruppene kan fjernes fra PBD-enhetens N10-posisjon for å gi en N10-C11 iminbinding. Det er beskrevet en rekke beskyttelsesgrupper, inkludert grupper som kan være spaltet under påvirkning av enzymer.

10

WO 2007/085930 beskriver fremstillingen av dimere PBD-forbindelser som har linkergrupper for kobling til et cellebindemiddel, slik som et antistoff. Linkeren er til stede i broen som binder dimerets monomere PBD-enheter.

15

### **Antistoff-legemiddel-konjugater**

20

Antistoffbehandling er etablert for den målrettede behandlingen av pasienter med cancer, immunologiske og angiogeniske lidelser (Carter, P. (2006) Nature Reviews Immunology 6:343–357). Anvendelsen av antistoff-legemiddelkonjugater (ADC), dvs. immunkonjugater, for den lokale tilførselen av cytotoxiske eller cytostatiske midler, dvs. legemidler for å drepe eller inhibere tumorceller i behandlingen av cancer, målretter tilførsel av legemiddelenheten til tumorer, og intracellulær akkumulering deri, mens systemisk administrering av disse ukonjugerte legemidlene kan resultere i uakseptable nivåer av toksisitet for normal celler og de tumorcellene som ønskes eliminert (Xie et al (2006) Expert Opin. Biol. Ther. 6(3):281-291, Kovtun et al (2006) Cancer Res. 66(6):3214-3121, Law et al (2006) Cancer Res. 66(4):2328-2337, Wu et al (2005) Nature Biotech. 23(9):1137-1145, Lambert J. (2005) Current Opin. i Pharmacol. 5:543-549, Hamann P. (2005) Expert Opin. Ther. Patents 15(9):1087–1103, Payne, G. (2003) Cancer Cell 3:207–212, Trail et al (2003) Cancer Immunol. Immunother. 52:328-337, Syrigos and Epenetos (1999) Anticancer Research 19:605–614).

30

35

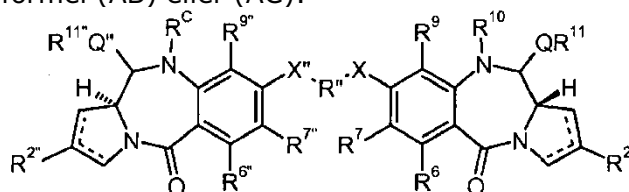
Det ønskes maksimal effekt med minimal toksisitet. Forsøk på å konstruere og raffinere ADC har fokusert på de monoklonale antistoffenes (mAb-enes) selektivitet samt legemiddelets virkemekanisme, legemiddelbinding, 5 legemiddel/antistoff-forhold (mengde) og legemiddelfrisettende egenskaper (Junutula, et al., 2008b Nature Biotech., 26(8):925–932, Dornan et al (2009) Blood 114(13):2721–2729, US 7521541, US 7723485, W02009/052249, McDonagh (2006) Protein Eng. Design & Sel. 19(7) 299-307, Doronina et al (2006) Bioconj. Chem. 17:114-124, Erickson et al (2006) Cancer Res. 66(8):1- 10 8, Sanderson et al (2005) Clin. Cancer Res. 11:843-852, Jeffrey et al (2005) J. Med. Chem. 48:1344-1358, Hamblett et al (2004) Clin. Cancer Res. 10:7063-7070). Legemiddelenheter kan overføre sine cytotoksiske og cytostatiskse effekter ved mekanismer, inkludert tubulinbinding, DNA-binding eller topoisomeraseinhibering. Noen cytotoksiske legemidler har en tendens til å være 15 inaktive eller mindre aktive når de blir konjugert til større antistoffer eller proteinreseptorligander.

De foreliggende oppfinnerne har utviklet en hittil ukjent fremgangsmåte for dannelse av PBD-konjugater med cellebindemidler, og særlig PBD- 20 antistoffkonjugater.

### Kort beskrivelse av oppfinnelsen

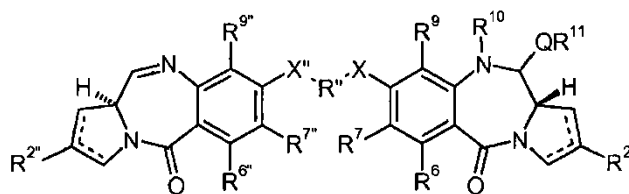
I et generelt aspekt tilveiebringer den foreliggende oppfinnelsen et konjugat 25 omfattende en PBD-forbindelse forbundet gjennom N10-posisjonen via en linker til et cellebindemiddel. Linkeren er en labil linker og kan være en enzymlabil linker. Cellebindemiddelet er foretrukket et antistoff.

I et første aspekt tilveiebringer den foreliggende oppfinnelsen konjugater med 30 formel (AB) eller (AC):



AB

5



AC

og salter og solvater derav, hvori:

de prikkede linjene angir det eventuelle nærværet av en dobbeltbinding mellom C1 og C2 eller C2 og C3,

5  $R^2$  uavhengig er valgt fra H, OH, =O, =CH<sub>2</sub>, CN, R, OR, =CH-R<sup>D</sup>, =C(R<sup>D</sup>)<sub>2</sub>, O-SO<sub>2</sub>-R, CO<sub>2</sub>R og COR og eventuelt ytterligere valgt fra halo eller dihalo,

hvor R<sup>D</sup> uavhengig er valgt fra R, CO<sub>2</sub>R, COR, CHO, CO<sub>2</sub>H og halo,

R<sup>6</sup> og R<sup>9</sup> uavhengig er valgt fra H, R, OH, OR, SH, SR, NH<sub>2</sub>, NHR, NRR', NO<sub>2</sub>, Me<sub>3</sub>Sn og halo,

10  $R^7$  uavhengig er valgt fra H, R, OH, OR, SH, SR, NH<sub>2</sub>, NHR, NRR', NO<sub>2</sub>, Me<sub>3</sub>Sn og halo,

R<sup>10</sup> er en linker koblet til et cellebindemiddel valgt fra et antistoff, et fragment av et antistoff som inneholder minst ett bindingssted og et syklisk polypeptid,

Q er uavhengig valgt fra O, S og NH,

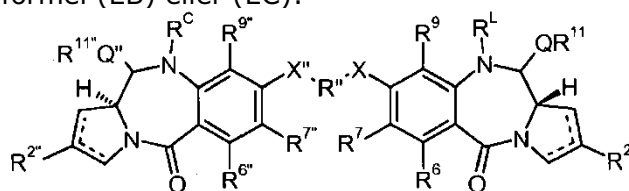
15 R<sup>11</sup> er enten H, eller R eller, hvor Q er O, SO<sub>3</sub>M, hvor M er et metallkation,

R og R' hver for seg er valgt fra eventuelt substituerte C<sub>1-12</sub>-alkyl-, C<sub>3-20</sub>-heterosyklisk- og C<sub>5-20</sub>-aryl-grupper, og eventuelt i forbindelse med gruppen NRR' danner R og R' sammen med nitrogenatomet hvortil de er bundet, en eventuell substituert 4-, 5-, 6- eller 7-leddet heterosyklisk ring, og

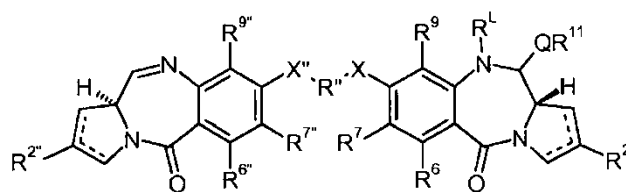
20 hvori R<sup>2''</sup>, R<sup>6''</sup>, R<sup>7''</sup>, R<sup>9''</sup>, X'', Q'' og R<sup>11''</sup> er definert ifølge henholdsvis R<sup>2</sup>, R<sup>6</sup>, R<sup>7</sup>, R<sup>9</sup>, X, Q og R<sup>11</sup>, og R<sup>C</sup> er en kapslende gruppe.

Den foreliggende oppfinnelsen tilveiebringer også forbindelser med

25 formel (EB) eller (EC):



EB



EC

og salter og solvater derav, hvori

de prikkede linjene angir det eventuelle nærværet av en dobbeltbinding mellom  
 5 C1 og C2 eller C2 og C3,

$R^2$  uavhengig er valgt fra H, OH, =O, =CH<sub>2</sub>, CN, R, OR, =CH-R<sup>D</sup>, =C(R<sup>D</sup>)<sub>2</sub>, O-  
 SO<sub>2</sub>-R, CO<sub>2</sub>R og COR og eventuelt ytterligere valgt fra halo eller dihalo,

hvor R<sup>D</sup> uavhengig er valgt fra R, CO<sub>2</sub>R, COR, CHO, CO<sub>2</sub>H og halo,

$R^6$  og  $R^9$  uavhengig er valgt fra H, R, OH, OR, SH, SR, NH<sub>2</sub>, NHR, NRR', NO<sub>2</sub>,  
 10 Me<sub>3</sub>Sn og halo,

$R^7$  uavhengig er valgt fra H, R, OH, OR, SH, SR, NH<sub>2</sub>, NHR, NRR', NO<sub>2</sub>, Me<sub>3</sub>Sn og  
 halo,

$R^L$  er en linker for kobling til et cellebindemiddel valgt fra et antistoff, et  
 fragment av et antistoff som inneholder minst ett bindingssted og et syklisk  
 15 polypeptid,

Q er uavhengig valgt fra O, S og NH,

$R^{11}$  er enten H, eller R eller, hvor Q er O er  $R^{11}$  SO<sub>3</sub>M, hvor M er et metallkation;

R og R' hver for seg er valgt fra eventuelt substituerte C<sub>1-12</sub>-alkyl-, C<sub>3-20</sub>-  
 heterosyklisk- og C<sub>5-20</sub>-arylgrupper, og eventuelt i forbindelse med gruppen NRR'  
 20 danner R og R' sammen med nitrogenatomet hvortil de er bundet, en eventuelt  
 substituert 4-, 5-, 6- eller 7-leddet heterosyklisk ring,

$R''$  er en C<sub>3-12</sub>-alkylengruppe, hvilken kjede kan være avbrutt av ett eller flere  
 heteroatomer, f.eks. O, S, N(H), NMe og/eller aromatiske ringer, f.eks. benzen  
 eller pyridin, hvilke ringer eventuelt er substituert med NH<sub>2</sub>;

hver X er O, S eller N(H); og

hvor  $R^2$ ,  $R^6$ ,  $R^7$ ,  $R^9$ , X'', Q'' og  $R^{11}$ , Q'' and X'' er definert ifølge henholdsvis  $R^2$ ,  
 25  $R^6$ ,  $R^7$ ,  $R^9$ , X, Q og  $R^{11}$ , og R<sup>C</sup> er en kapslende gruppe;

hvor  $R^L$  er forskjellig fra R<sup>C</sup>.

### 30 Kort beskrivelse av tegningene

Figur 1 viser bestemte utførelsesformer ifølge foreliggende oppfinnelse;

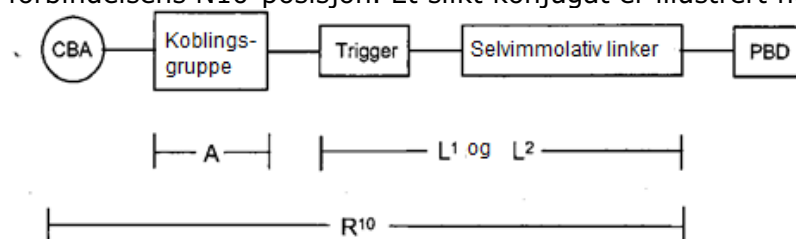
Figurene 2 til 6 viser resultatet av biologiske tester på bestemte utførelsesformer ifølge foreliggende oppfinnelse.

### Detaljert beskrivelse av oppfinnelsen

5

Den foreliggende oppfinnelsen tilveiebringer et konjugat omfattende en PBD-forbindelse koblet gjennom N10-posisjonen via en linker til et cellebindemiddel. I én utførelsesform omfatter konjugatet et cellebindemiddel koblet til en spacerkoblingsgruppe, idet spaceren er koblet til en trigger, triggeren er koblet til en selvimmolativ linker og den selvimmolative linker er koblet til PBD-forbindelsens N10-posisjon. Et slikt konjugat er illustrert nedenfor:

10



15 hvor CBA er et cellebindemiddel og PBD er en pyrrolbenzodiazepinforbindelse, som beskrevet heri. Illustrasjonen viser delene som tilsvarer  $R^{10}$ , A,  $L^1$  og  $L^2$  i visse utførelsesformer av oppfinnelsen.

15

Den foreliggende oppfinnelsen er egnet til anvendelse for tilveiebringelse av en PBD-forbindelse til et foretrukket sted hos et individ. I de foretrukne utførelsesformene muliggjør konjugatet frisetting av en aktiv PBD-forbindelse som ikke bevarer noen del av linkerens. Det er ingen stubb til stede som kan påvirke PBD-forbindelsens reaktivitet.

20

I visse utførelsesformer tilveiebringer oppfinnelsen konjugater omfattende en PBD-dimer gruppe som har en linker forbundet til et cellebindemiddel. De foreliggende oppfinnerne beskriver heri fremgangsmåter for syntese som gjør det mulig for slike dimere konjugater å fremstilles ved anvendelse av hittil ukjente PBD-desymmetriseringsteknikker.

25

### **Preferanser**

30



De følgende preferansene kan gjelde alle aspekter av oppfinnelsen som beskrevet over, eller kan vedrøre et enkelt aspekt. Preferansene kan kombineres i en hvilken som helst kombinasjon.

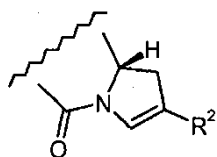
### **Dobbeltbinding**

5

I én utførelsesform er det ingen dobbeltbinding til stede mellom C1 og C2 og C2 og C3.

10

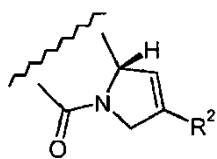
I én utførelsesform indikerer de stiplede linjene det eventuelle nærværet av en dobbeltbinding mellom C2 og C3, som vist under:



15

I én utførelsesform er en dobbeltbinding til stede mellom C2 og C3 når R<sup>2</sup> er C<sub>5</sub>-<sub>20</sub>-aryl eller C<sub>1-12</sub>-alkyl.

I én utførelsesform indikerer de stiplede linjene det eventuelle nærværet av en dobbeltbinding mellom C1 og C2, som vist under:



20

I én utførelsesform er en dobbeltbinding til stede mellom C1 og C2 når R<sup>2</sup> er C<sub>5</sub>-<sub>20</sub>-aryl eller C<sub>1-12</sub>-alkyl.

**R<sup>2</sup>**

25

I én utførelsesform er R<sup>2</sup> uavhengig valgt fra H, OH, =O, =CH<sub>2</sub>, CN, R, OR, =CH-R<sup>D</sup>, =C(R<sup>D</sup>)<sub>2</sub>, O-SO<sub>2</sub>-R, CO<sub>2</sub>R og COR og eventuelt ytterligere valgt fra halo eller

dihalo. I én utførelsesform er  $R^2$  uavhengig valgt fra H, OH, =O, =CH<sub>2</sub>, CN, R, OR, =CH-R<sup>D</sup>, =C(R<sup>D</sup>)<sub>2</sub>, O-SO<sub>2</sub>-R, CO<sub>2</sub>R og COR.

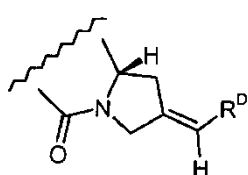
5 I én utførelsesform er  $R^2$  uavhengig valgt fra H, =O, =CH<sub>2</sub>, R, =CH-R<sup>D</sup> og =C(R<sup>D</sup>)<sub>2</sub>.

I én utførelsesform er  $R^2$  uavhengig H.

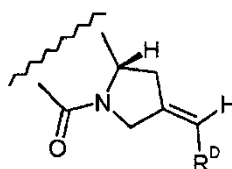
10 I én utførelsesform er  $R^2$  uavhengig =O.

I én utførelsesform er  $R^2$  uavhengig =CH<sub>2</sub>.

I én utførelsesform er  $R^2$  uavhengig =CH-R<sup>D</sup>. Innenfor PBD-forbindelseen kan gruppen =CH-R<sup>D</sup> ha én av to konfigurasjoner vist under:



(I)



(II)

15

I én utførelsesform er konfigurasjonen konfigurasjon (I).

I én utførelsesform er  $R^2$  uavhengig =C(R<sup>D</sup>)<sub>2</sub>.

20

I én utførelsesform er  $R^2$  uavhengig =CF<sub>2</sub>.

I én utførelsesform er  $R^2$  uavhengig R.

25

I én utførelsesform er  $R^2$  uavhengig eventuelt substituert C<sub>5-20</sub>-aryl.

I én utførelsesform er  $R^2$  uavhengig eventuelt substituert C<sub>1-12</sub>-alkyl.

I én utførelsesform er  $R^2$  uavhengig eventuelt substituert C<sub>5-20</sub>-aryl.

30

I én utførelsesform er  $R^2$  uavhengig eventuelt substituert C<sub>5-7</sub>-aryl.

I én utførelsesform er  $R^2$  uavhengig eventuelt substituert  $C_{8-10}$ -aryl.

I én utførelsesform er  $R^2$  uavhengig eventuelt substituert fenyl.

5

I én utførelsesform er  $R^2$  uavhengig eventuelt substituert naptyl.

I én utførelsesform er  $R^2$  uavhengig eventuelt substituert pyridyl.

10

I én utførelsesform er  $R^2$  uavhengig eventuelt substituert kinolinyll eller isokinolinyll.

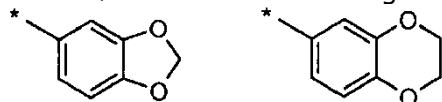
I én utførelsesform bærer  $R^2$  én til tre substituentgrupper, hvorved 1 og 2 er mer foretrukket og enkeltsubstituerte grupper er mest foretrukket. Substituentene kan være en hvilken som helst posisjon.

15

Hvis  $R^2$  er en  $C_{5-7}$ -arylgruppe, er en enkelt substituent fortrinnsvis på et ringatom som ikke grenser til bindingen til resten av forbindelsen, dvs. den er fortrinnsvis  $\beta$  eller  $\gamma$  til bindingen til resten av forbindelsen. Hvor  $C_{5-7}$ -arylgruppen er fenyl, er substituenten derfor fortrinnsvis i meta- eller paraposisjoner og mer foretrukket i paraposisjon.

20

I én utførelsesform er  $R^2$  valgt fra:



25

hvor stjernen indikerer bindingspunktet.

Hvis  $R^2$  er en  $C_{8-10}$ -arylgruppe, for eksempel kinolinyll eller isokinolinyll, kan den bære et hvilket som helst antall substituent i en hvilken som helst posisjon i kinolin- eller isokinolinringene. I noen utførelsesformer bærer den én, to eller tre substituent, og disse kan være på enten de proksimale og distale ringene eller begge deler (hvis det mer enn én substituent).

30

I én utførelsesform hvor  $R^2$  er eventuelt substituert, er substituentene valgt fra substituentene angitt i substituentavsnittet under.

35

Hvis R er eventuelt substituert, er substituentene fortrinnsvis valgt fra:

halo, hydroksyl, eter, formyl, acyl, karboksy, ester, acyloksy, amino, amido, acylamido, aminokarbonyloksy, ureido, nitro, cyano og tioeter.

5 I én utførelsesform hvor R eller R<sup>2</sup> er eventuelt substituert, er substituentene valgt fra gruppen bestående av R, OR, SR, NRR', NO<sub>2</sub>, halo, CO<sub>2</sub>R, COR, CONH<sub>2</sub>, CONHR og CONRR'.

10 Hvis R<sup>2</sup> er C<sub>1-12</sub>-alkyl, kan den eventuelle substituenten i tillegg inkludere C<sub>3-20</sub> heterosyklyl og C<sub>5-20</sub>-arylgrupper.

Hvis R<sup>2</sup> er C<sub>3-20</sub>-heterosyklyl, kan den eventuelle substituenten i tillegg inkludere C<sub>1-12</sub>-alkyl og C<sub>5-20</sub>-arylgrupper.

15 Hvis R<sup>2</sup> er C<sub>5-20</sub>-arylgrupper, kan den eventuelle substituenten i tillegg inkludere C<sub>3-20</sub>-heterosyklyl og C<sub>1-12</sub>-alkylgrupper.

20 Det legges til grunn at betegnelsen "alkyl" omfatter underklassene alkenyl og alkynyl samt sykloalkyl. Hvis R<sup>2</sup> er eventuelt substituert C<sub>1-12</sub>-alkyl, legges det derfor til grunn at alkylgruppen eventuelt inneholder en eller flere karbon-karbon-dobbelt- eller trippeltbindinger, hvilke kan utgjøre en del av et konjugert system. I én utførelsesform inneholder den eventuelt substituerte C<sub>1-12</sub>-alkylgruppen minst én karbon-karbon dobbelt- eller trippelbinding, og denne bindingen er konjugert med en dobbeltbinding som forefinnes mellom C1 og C2, 25 eller C2 og C3. I én utførelsesform er C<sub>1-12</sub>-alkylgruppen en gruppe valgt fra mettet C<sub>1-12</sub>-alkyl, C<sub>2-12</sub>-alkenyl, C<sub>2-12</sub>-alkynyl og C<sub>3-12</sub>-sykloalkyl.

30 Hvis en substituent på R<sup>2</sup> er halo, er den fortrinnsvis F eller Cl, mer foretrukket Cl.

Hvis en substituent på R<sup>2</sup> er eter, kan den i noen utførelsesformer være en alkoksygruppe, for eksempel en C<sub>1-7</sub>-alkoksygruppe (f.eks. metoksy, etoksy) eller kan den i noen utførelsesformer være en C<sub>5-7</sub> aryloksygruppe (f.eks. fenoksy, pyridyloksy, furanyloksy).

35 Hvis en substituent på R<sup>2</sup> er C<sub>1-7</sub>-alkyl, kan den fortrinnsvis være en C<sub>1-4</sub>-alkylgruppe (f.eks. metyl, etyl, propyl, butyl).

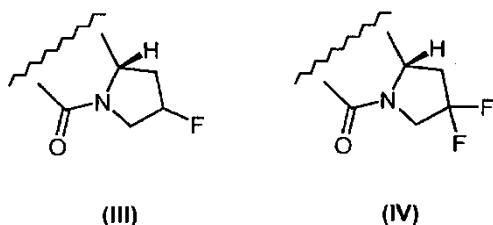
Hvis en substituent på  $R^2$  er  $C_{3-7}$  heterosykl, kan den i noen utførelsesformer være  $C_6$ -nitrogenholdig heterosyklgruppe, f.eks. morfolino, tiomorfolino, piperidiny, piperaziny. Disse gruppene kan være bundet til resten av PBD-enheten via nitrogenatomet. Disse gruppene kan være ytterligere substituert, for eksempel av  $C_{1-4}$ -alkylgrupper.

Hvis en substituent på  $R^2$  er bis-oksy- $C_{1-3}$ -alkylen, er dette fortrinnsvis bis-oksy-metylen eller bis-oksyetylen.

Særlig foretrukne substituent for  $R^2$  inkluderer metoksy, etoksy, fluor, klor, cyano, bis-oksy-metylen, metyl-piperaziny, morfolino og metyl-tienyl.

Særlig foretrukne substituerte  $R^2$ -grupper inkluderer, men er ikke begrenset til, 4-metoksy-fenyl, 3-metoksyfenyl, 4-etoksy-fenyl, 3-etoksy-fenyl, 4-fluor-fenyl, 4-klor-fenyl, 3,4-bisoksymetylen-fenyl, 4-metyltienyl, 4-cyanofenyl, 4-fenoksyfenyl, kinolin-3-yl og kinolin-6-yl, isokinolin-3-yl og isokinolin-6-yl, 2-tienyl, 2-furanyl, metoksynafty og nafty.

I én utførelsesform er  $R^2$  halo eller dihalo. I én utførelsesform er  $R^2$  -F eller -F<sub>2</sub>, hvilke substituent er illustrert under som hhv. (III) og (IV):



$R^D$

I én utførelsesform er  $R^D$  uavhengig valgt fra R, CO<sub>2</sub>R, COR, CHO, CO<sub>2</sub>H og halo.

I én utførelsesform er  $R^D$  uavhengig R.

I én utførelsesform er  $R^D$  uavhengig halo.

$R^6$

$R^6$  uavhengig er valgt fra H, R, OH, OR, SH, SR,  $NH_2$ , NHR,  $NRR'$ ,  $NO_2$ ,  $Me_3Sn$  og halo.

5

I én utførelsesform er  $R^6$  uavhengig valgt fra H, OH, OR, SH,  $NH_2$ ,  $NO_2$  og halo. I én utførelsesform er  $R^6$  uavhengig valgt fra H og halo.

I én utførelsesform er  $R^6$  uavhengig H.

10

I én utførelsesform danner  $R^6$  og  $R^7$  sammen en gruppe  $-O-(CH_2)_p-O-$ , hvor p er 1 eller 2.

 **$R^7$** 

15

$R^7$  uavhengig er valgt fra H, R, OH, OR, SH, SR,  $NH_2$ , NHR,  $NRR'$ ,  $NO_2$ ,  $Me_3Sn$  og halo.

I én utførelsesform er  $R^7$  uavhengig OR.

20

I én utførelsesform er  $R^7$  uavhengig  $OR^{7A}$ , hvor  $R^{7A}$  er uavhengig eventuelt substituert  $C_{1-6}$ -alkyl.

I én utførelsesform er  $R^{7A}$  uavhengig eventuelt substituert mettet  $C_{1-6}$ -alkyl.

25

I én utførelsesform er  $R^{7A}$  uavhengig eventuelt substituert  $C_{2-4}$ -alkenyl.

I én utførelsesform er  $R^{7A}$  uavhengig Me.

30

I én utførelsesform er  $R^{7A}$  uavhengig  $CH_2Ph$ .

I én utførelsesform er  $R^{7A}$  uavhengig allyl.

 **$R^9$** 

35

$R^9$  uavhengig er valgt fra H, R, OH, OR, SH, SR,  $NH_2$ , NHR,  $NRR'$ ,  $NO_2$ ,  $Me_3Sn$  og halo.

I én utførelsesform er  $R^9$  uavhengig H.

5

I én utførelsesform er  $R^9$  uavhengig R eller OR.

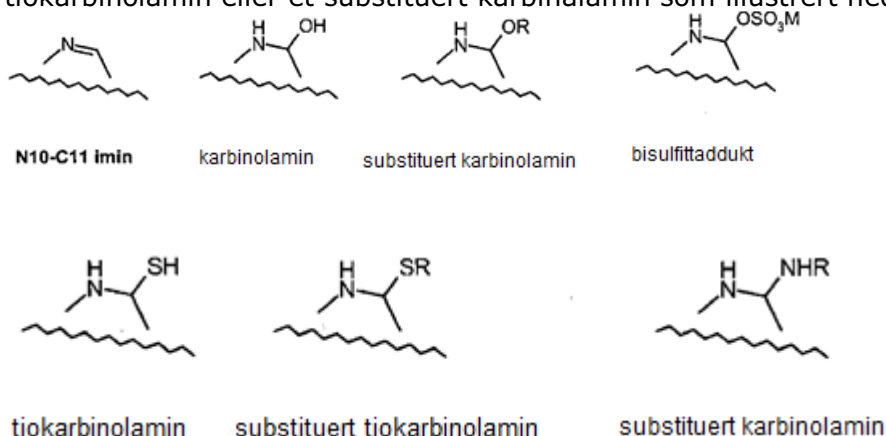
**$R^{10}$**

10 For å unngå enhver tvil, hvor  $R^{10}$  er en linker koblet til et cellebindemiddel, er cellebindemiddelet del av gruppen  $R^{10}$ .

I visse utførelsesformer av oppfinnelsen, hvor konjugatet er en dimer omfattende to monomerer A, har én monomer en gruppe  $R^{10}$  som er en linker koblet til et cellebindemiddel, og den andre monomeren har en gruppe  $R^{10}$  som er en linker forbundet til en kapslende gruppe  $R^C$ .

I én utførelsesform kan gruppen  $R^{10}$  fjernes fra PBD-enhetens N10-posisjon for å gi en N10-C11 iminbinding, et karbinolamin, et substituert karbinolamin, hvor  $QR^{11}$  er  $OSO_3M$ , en bisulfittaddukt, et tiokarbinolamin, et substituert tiokarbinolamin eller et substituert karbinolamin som illustrert nedenfor:

20



25

hvor R og M er som definert for konjugatene ifølge oppfinnelsen.

I én utførelsesform er gruppen  $R^{10}$  fjernbar fra PBD-enhetens N10-posisjon for å gi en N10-C11 iminbinding.

30

I noen utførelsesformer er konjugatet ifølge oppfinnelsen en dimer forbindelse omfattende en monomer med formel (A) og en monomer med formel (B). I

denne utførelsesformen behøver ikke gruppen  $R^{10}$  å være fjernbar fra N10-posisjonen, siden monomeret (B) har egnet funksjonalitet ved N10- og C11-posisjonene for biologisk aktivitet.

5 Det foretrekkes imidlertid at gruppen  $R^{10}$  er fjernbar, hvilket tilveiebringer en dimer som har egnet funksjonalitet ved N10- og C11-posisjonene i begge monomere enheter. Slik funksjonalitet anses for å være nødvendig for å tillate kryssbindingsaktivitet til PBD-dimeren.

10 Denne patentsøknaden vedrører særlig de  $R^{10}$ -gruppene som har en karbamatbinding til N10-posisjonen.

Linkeren forbinder cellebindemiddelet (CBA), f.eks. antistoffet, til PBD-legemiddelenheten D gjennom kovalente bindinger. Linkeren er en bifunksjonell eller multifunksjonell enhet som kan anvendes til å binde én eller flere legemiddelenheter (D) og en antistoffenhet (Ab) for å danne antistoff-legemiddel-konjugater (ADC). Linkeren (L) kan være stabil utenfor en celle, dvs. ekstracellulær, eller den kan være spaltbar ved enzymatisk aktivitet, hydrolyse eller andre metabolske betingelser. Antistoff-legemiddel-konjugater (ADC) kan praktisk fremstilles ved hjelp av en linker som har reaktiv funksjonalitet for binding til legemiddelenheten og til antistoffet. Et cysteintiol, eller et amin, f.eks. N-terminal eller aminosyresidekjede slik som lysin, av et antistoff (Ab) kan danne en binding med en funksjonell gruppe av et linker- eller spacerreagens, en PBD-legemiddelenhet (D) eller en legemiddellinkerreagens (D-L).

25 Mange funksjonelle grupper på linkeren bundet til PBD-enhetens N10-posisjon kan være nyttige for å reagere med cellebindemiddelet. Ester-, tioester-, amid-, tioamid-, karbamat-, tiokarbamat-, urea-, tiourea-, eter-, tioeter- eller disulfidbindinger kan være dannet fra reaksjon mellom linker-PBD-legemiddelmellomprodukter og cellebindemiddelet.

30 Linkerne av ADC-et forebygger foretrukket aggregering av ADC-molekyler og holder ADC-et fritt løselig i vandig medium og i en monomer tilstand.

35 Linkerene av ADC-et er foretrukket ekstracellulært stabile. Før transport eller tilførsel til en celle er antistoff-legemiddel-konjugatet (ADC) foretrukket stabilt og forblir intakt, dvs. antistoffet forblir bundet til legemiddelenheten. Linkerne er

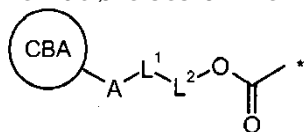


stabile utenfor målcellen og kan spaltes ved en effektiv hastighet inne i cellen. En virkningsfull linker vil: (i) opprettholde de spesifikke bindingsegenskapene ved antistoffet, (ii) gi intracellulær tilførsel av konjugatet eller legemiddelenheten, (iii) forbli stabil og intakt, dvs. ikke spaltet, til konjugatet er blitt tilført eller transportert til sitt målrettede sted og (iv) opprettholde en cytotoxisk, celledrepende effekt eller et cytostatisk effekt av PBD-legemiddelenheten. ADC-stabilitet kan måles ved standard analytiske teknikker slik som massespektroskopi, HPLC og sprednings-/analyseteknikken LC/MS.

Kovalent binding av antistoffet og legemiddelenheten krever at linkerens har to reaktive funksjonelle grupper, dvs. bivalens på en reaktiv måte. Bivalente linkerreagenser som er nyttige for å binde to eller flere funksjonelle eller biologiske aktive enheter, slik som peptider, nukleinsyrer, legemidler, toksiner, antistoffer, haptener og reportergrupper, er kjent, og fremgangsmåter har beskrevet deres resulterende konjugater (Hermanson, G.T. (1996) Bioconjugate Techniques, Academic Press: New York, s. 234–242).

I en annen utførelsesform kan linkerens substitueres med grupper som modulerer aggregering, løselighet eller reaktivitet. En sulfonatsubstituent kan for eksempel øke reagensets vannløselighet og lette koblingsreaksjonen mellom linkerreagenset og antistoffet eller legemiddelenheten, eller lette koblingsreaksjonen mellom Ab-L (antistofflinkermellomprodukt) og D, eller D-L (legemiddellinkermellomprodukt) og Ab avhengig av den syntetiske ruten anvendt til å fremstille ADC.

I én utførelsesform er  $R^{10}$  en gruppe:



hvor stjernen angir bindingspunktet til N10-posisjonen, CBA er et cellebindemiddel,  $L^1$  er en linker, A er en koblingsgruppe som kobler  $L^1$  til cellebindemiddelet,  $L^2$  er en kovalent binding eller sammen med  $-OC(=O)-$  danner en selvimmolativ linker og  $L^1$  eller  $L^2$  er en spaltbar linker.

$L^1$  er foretrukket den spaltbare linkerens og kan omtales som en trigger for aktivering av linkerens for spalting.

35

Arten av  $L^1$  og  $L^2$ , hvis disse er til stede, kan variere mye. Disse gruppene er valgt på grunnlag av deres spaltingsegenskaper, som kan styres av betingelsene på stedet hvortil konjugatet tilføres. De linkerne som spaltes under påvirkning av enzymer, er foretrukket, selv om linkere som er spaltbare ved endringer i pH (f.eks. syre- eller baselabile), temperatur eller ved stråling (f.eks. fotolabile), også kan anvendes. Linkere som er spaltbare under reduksjons- eller oksideringsbetingelser, kan også anvendes i den foreliggende oppfinnelsen.  $L^1$  kan omfatte en tilgrensende sekvens av aminosyrer. Aminosyresekvensen kan være målsubstratet for enzymatisk spalting, hvilket tillater frisetting av  $R^{10}$  fra N10-posisjonen.

I én utførelsesform er  $L^1$  spaltbar under påvirkning av et enzym. I én utførelsesform er enzymet en esterase eller en peptidase.

I én utførelsesform er  $L^2$  til stede og danner sammen med  $-C(=O)O-$  en selvimmolativ linker. I én utførelsesform er  $L^2$  et substrat for enzymatisk aktivitet, hvilket gir mulighet for frisetting av  $R^{10}$  fra N10-posisjonen.

I én utførelsesform, hvor  $L^1$  er spaltbar ved virkningen av et enzym og  $L^2$  er til stede, spalter enzymet bindingen mellom  $L^1$  og  $L^2$ .

$L^1$  og  $L^2$ , hvis disse er til stede, kan være koblet ved en binding valgt fra:

- $C(=O)NH-$ ,
- $C(=O)O-$ ,
- 25 •  $NHC(=O)-$ ,
- $OC(=O)-$ ,
- $OC(=O)O-$ ,
- $NHC(=O)O-$ ,
- $OC(=O)NH-$  og
- 30 •  $NHC(=O)NH-$ .

En aminogruppe av  $L^1$  som binder til til  $L^2$ , kan være N-terminalen av en aminosyre eller kan være avledet fra en aminogruppe av en aminosyresidekjede, f.eks. en lysinaminsyresidekjede.

En karboksylgruppe av  $L^1$  som binder til  $L^2$ , kan være C-terminalen av en aminosyre eller kan være avledet fra en karboksylgruppe av en aminosyresidekjede, f.eks. en glutaminsyreaminosyresidekjede.

5

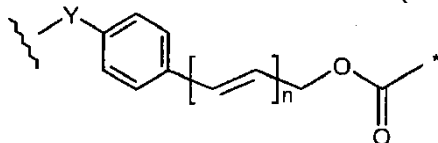
En hydroksylgruppe av  $L^1$  som binder til  $L^2$ , kan være avledet fra en hydroksylgruppe av en aminosyresidekjede, f.eks. en serinaminosyresidekjede.

10

Betegnelsen "aminosyresidekjede" inkluderer gruppene funnet i: (i) naturlig forekommende aminosyrer slik som alanin, arginin, asparagin, asparginsyre, cystein, glutamin, glutaminsyre, glycin, histidin, isoleucin, leucin, lysin, metionin, fenylalanin, prolin, serin, treonin, tryptofan, tyrosin og valin, (ii) mindre aminosyrer slik som ornitin og citrullin, (iii) unaturlige aminosyrer, beta-aminosyrer, syntetiske analoger og derivater av naturlig forekommende aminosyrer, og (iv) alle enantiomerer, diastereomerer, isomerisk anrikede, isotopt merkede (f.eks.  $^2\text{H}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ), beskyttede former og racemiske blandinger derav.

15

I én utførelsesform danner  $-\text{C}(=\text{O})\text{O}-$  og  $L^2$  sammen gruppen:



20

hvor stjernen angir bindingspunktet til N10-posisjonen, den bølgede linjen angir bindingspunktet til linkerens  $L^1$ , Y er  $-\text{N}(\text{H})-$ ,  $-\text{O}-$ ,  $-\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{H})-$  eller  $-\text{C}(=\text{O})\text{O}-$  og n er 0 til 3. Fenylringen er eventuelt substituert med én, to eller tre substituenten som beskrevet heri. I én utførelsesform er eventuelt fenylgruppen substituert med halo,  $\text{NO}_2$ , R eller OR.

25

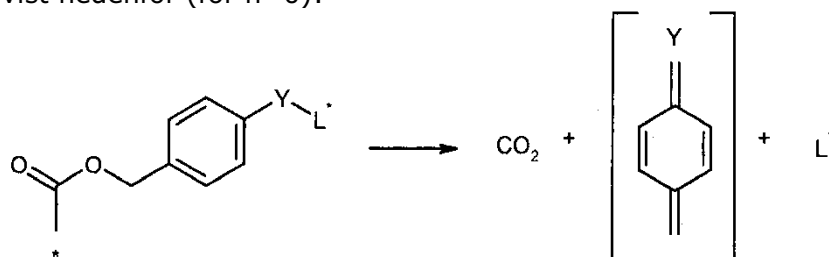
I én utførelsesform er Y NH.

I én utførelsesform er n 0 eller 1. N er foretrukket 0.

30

Hvis Y er NH og n er 0, kan den selvimmolative linkerens omtales som en p-aminobenzylkarbonyllinker (PABC).

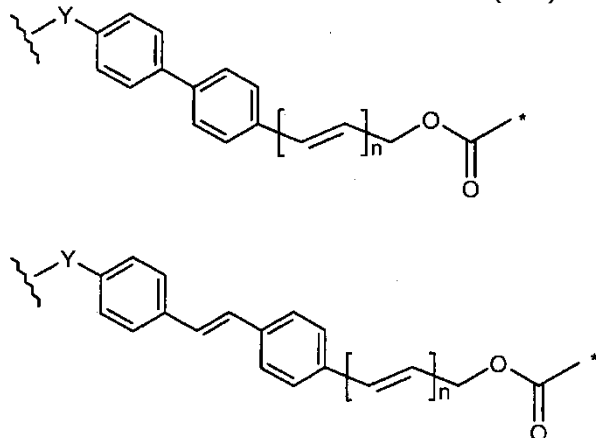
Den selvimmolative linkerens vil gi mulighet for frisetting av den beskyttede forbindelsen når et fjernt sted aktiveres, idet progresjonen foregår langs linjene vist nedenfor (for  $n=0$ ):



5 hvor  $L^*$  er den aktiverte formen av den gjenværende delen av linkerens. Disse gruppene har den fordel å separere aktiveringsstedet fra forbindelsen som beskyttes. Som beskrevet ovenfor kan fenylengruppen eventuelt substitueres.

10 I én utførelsesform beskrevet heri er gruppen  $L^*$  en linker  $L^1$  som beskrevet heri, hvilket kan inkludere en dipeptidgruppe.

I en annen utførelsesform danner  $-C(=O)O-$  og  $L^2$  sammen en gruppe valgt fra:

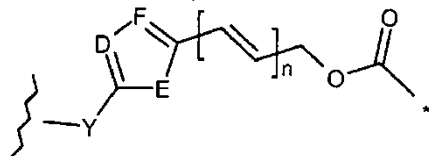


15

hvor stjernen, den bølgede linje, Y og n er som definert ovenfor. Hver fenylring er eventuelt substituert med én, to eller tre substituenten som beskrevet heri. I én utførelsesform er eventuelt fenylringene som har Y-substituenten, substituert, og fenylringene som ikke har Y-substituenten, er usubstituert. I én utførelsesform er fenylringene som har Y-substituenten, usubstituert, og fenylringene som ikke har Y-substituenten, er eventuelt substituert.

20

I en annen utførelsesform danner  $-C(=O)O-$  og  $L^2$  sammen en gruppe valgt fra:



25

hvor stjernen, den bølgede linjen, Y og n er som definert ovenfor, E er O, S eller NR, D er N, CH, eller CR og F er N, CH eller CR.

I én utførelsesform er D N.

5

I én utførelsesform er D CH.

I én utførelsesform er E O eller S.

10

I én utførelsesform er F CH.

I en foretrukket utførelsesform er linkerene en katepsinlabil linker.

15

I én utførelsesform omfatter L<sup>1</sup> et dipeptid. Dipeptidet kan være representert som  $\text{-NH-X}_1\text{-X}_2\text{-CO-}$ , hvor  $\text{-NH-}$  og  $\text{-CO-}$  henholdsvis representerer N- og C-terminalene av aminosyregruppene X<sub>1</sub> og X<sub>2</sub>. Aminosyrene i dipeptidet kan være en hvilken som helst kombinasjon av naturlige aminosyrer. Hvis linkerene er en labil katepsinlinker, kan dipeptidet være virkningsstedet for katepsinmediert spalting.

20

For de aminosyregruppene som har karboksyl- eller aminosidekjedefunksjonalitet, f.eks. henholdsvis Glu og Lys, kan i tillegg CO og NH representere denne sidekjedefunksjonaliteten.

25

I én utførelsesform er gruppen  $\text{-X}_1\text{-X}_2\text{-}$  i dipeptid,  $\text{-NH-X}_1\text{-X}_2\text{-CO-}$  valgt fra:

- Phe-Lys-,
- Val-Ala-,
- Val-Lys-,
- Ala-Lys-,
- Val-Cit-,
- Phe-Cit-,
- Leu-Cit-,
- Ile-Cit-,
- Phe-Arg-,
- Trp-Cit-

35

hvor Cit er citrullin.

Gruppen  $-X_1-X_2-$  i dipeptid,  $-NH-X_1-X_2CO-$  er foretrukket valgt fra:

- Phe-Lys-,
- 5 • Val-Ala-,
- Val-Lys-,
- Ala-Lys-,
- Val-Cit-.

10

Mest foretrukket er gruppen  $-X_1-X_2-$  i dipeptid,  $-NH-X_1-X_2-CO-$ ,  $-Phe-Lys-$  eller  $-Val-Ala-$ .

15

Det kan anvendes andre dipeptidkombinasjoner, inkludert dem beskrevet av Dubowchik et al., *Bioconjugate Chemistry*, 2002, 13 855-869.

20

I én utførelsesform er eventuelt aminosyresidekjeden derivert. En aminogruppe eller karboksygruppe av en aminosyresidekjede kan for eksempel være derivert. I én utførelsesform er en aminogruppe  $NH_2$  av en aminosyresidekjede, slik som lysin, en derivert form valgt fra gruppen bestående av  $NHR$  og  $NRR'$ .

25

I én utførelsesform er en karboksygruppe  $COOH$  av en aminosyresidekjede, slik som asparbinsyre, en derivert form valgt fra gruppen bestående av  $COOR$ ,  $CONH_2$ ,  $CONHR$  og  $CONRR'$ .

30

I én utførelsesform er aminosyresidekjeden eventuelt kjemisk beskyttet. Sidekjedebeskyttelsesgruppen kan være en gruppe som beskrevet nedenfor i forbindelse med gruppen  $R^L$ . De foreliggende oppfinnerne har fastslått at beskyttede aminosyresekvenser er spaltbare ved hjelp av enzymer. Det er for eksempel etablert at en dipeptidsekvens omfattende en Boc-sidekjede beskyttet Lys-rest er spaltbar ved hjelp av katepsin.

35

Beskyttelsesgrupper for aminosyrenes sidekjerder er velkjent i teknikken og er beskrevet i *Novabiochem Catalog*. Ytterligere beskyttelsesgruppestrategier er beskrevet i *Protective Groups in Organic Synthesis*, Greene and Wuts.

Mulige sidekjedebeskyttelsesgrupper er vist nedenfor for de aminosyrene som har reaktiv sidekjedefunksjonalitet:

Arg: Z, Mtr, Tos,

Asn: Trt, Xan,

5 Asp: Bzl, t-Bu,

Cys: Acn, Bzl, Bzl-OMe, Bzl-Me, Trt,

Glu: Bzl, t-Bu,

Gln: Trt, Xan,

His: Boc, Dnp, Tos, Trt,

10 Lys: Boc, Z-Cl, Fmoc, Z, Alloc,

Ser: Bzl, TBDMS, TBDPS,

Thr: Bz,

Trp: Boc,

Tyr: Bzl, Z, Z-Br.

15

I én utførelsesform er sidekjedebeskyttelsen valgt til å være ortogonal til en gruppe tilveiebrakt som, eller som del av, en eventuell kapslende gruppe. Fjerningen av sidekjedebeskyttelsesgruppen fjerner således ikke den kapslende gruppen, eller noen beskyttelsesgruppefunksjonalitet som er del av den kapslende gruppen.

20

I andre utførelsesformer av oppfinnelsen er de valgte aminosyrene de som har ingen reaktiv sidekjedefunksjonalitet. Aminosyrene kan for eksempel være valgt fra: Ala, Gly, Ile, Leu, Met, Phe, Pro og Val.

25

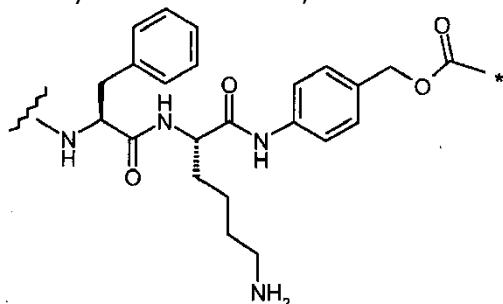
I én utførelsesform anvendes dipeptidet i kombinasjon med en selvimmolativ linker. Den selvimmolative linkeren kan være forbudt med  $-X_2-$ .

30

Hvis en selvimmolativ linker er til stede, er  $-X_2-$  direkte koblet til den selvimmolative linkeren. Gruppen  $-X_2-CO-$  er foretrukket koblet til Y, hvor Y er NH, hvilket danner gruppen  $-X_2-CO-NH-$ .

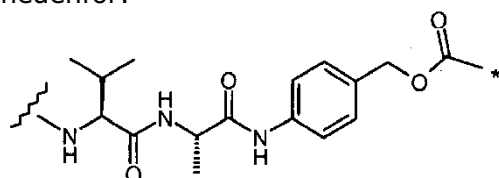
$\text{-NH-X}_1\text{-}$  er direkte forbundet til A. A kan omfatte funksjonaliteten  $\text{-CO-}$ , hvilket danner en amidbinding med  $\text{-X}_1\text{-}$ .

5 I én utførelsesform omfatter  $L^1$  og  $L^2$  sammen med  $\text{-OC(=O)-}$  gruppen  $\text{NH-X}_1\text{-X}_2\text{-CO-PABC-}$ . PABC-gruppen er direkte koblet til N10-posisjonen. Den selvimmolative linker og dipeptidet danner foretrukket sammen gruppen  $\text{-NH-Phe-Lys-CO-NH-PABC-}$ , som er illustrert nedenfor:



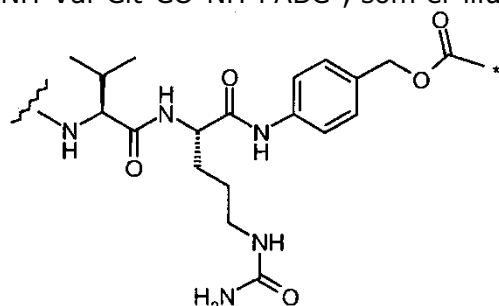
10 hvor stjernen angir bindingspunktet til N10-posisjonen og den bølgede linjen angir bindingspunktet til den gjenværende delen av linkerens  $L^1$  eller bindingspunktet til A. Den bølgede linjen angir foretrukket bindingspunktet til A. Lys-aminosyrens sidekjede kan være beskyttet med for eksempel Boc, Fmoc eller Alloc, som beskrevet ovenfor. Den selvimmolative linker og dipeptidet danner alternativt sammen gruppen  $\text{-NH-Val-Ala-CO-NH-PABC-}$ , som er illustrert

15 nedenfor:



hvor stjernen og den bølgede linjen er som definert ovenfor.

20 Den selvimmolative linker og dipeptidet danner alternativt sammen gruppen  $\text{-NH-Val-Cit-CO-NH-PABC-}$ , som er illustrert nedenfor:



hvor stjernen og den bølgede linjen er som definert ovenfor.



I noen utførelsesformer av den foreliggende oppfinnelsen kan det være foretrukket at hvis PBD/legemiddelenheten inneholder en ubeskyttet iminbinding, f.eks. hvis enhet B er til stede, inneholder deretter linkerene ikke en fri aminogruppe ( $\text{H}_2\text{N}-$ ). Hvis linkerene således har strukturen  $-\text{A}-\text{L}^1-\text{L}^2-$ , vil denne deretter foretrukket ikke inneholde en fri aminogruppe. Denne preferansen er særlig relevant når linkerene inneholder et dipeptid, f.eks. som  $\text{L}^1$ . I denne utførelsesformen vil det være foretrukket at én av de to aminosyrene ikke er valgt fra lysin.

Uten ønske om å være teoretisk bundet har de foreliggende oppfinnerne funnet at kombinasjonen av en ubeskyttet iminbinding i legemiddelenheten og en fri aminogruppe i linkerene kan forårsake dimerisering av legemiddellinkereneheten, hvilket kan forstyrre konjugeringen av en slik legemiddellinkerenehet til et antistoff. Kryssreaksjonen av disse gruppene kan akselereres i tilfelle den frie aminogruppen er til stede som et ammoniumion ( $\text{H}_3\text{N}^+-$ ), slik som når en sterk syre (f.eks. TFA) anvendes til avbeskyttelse av den frie aminogruppen.

I én utførelsesform er A en kovalent binding.  $\text{L}^1$  og cellebindemiddelet er således direkte koblet. Hvis  $\text{L}^1$  for eksempel omfatter en tilgrensende aminosyresekvens, kan sekvensens N-terminal koble direkte til cellebindemiddelet.

Hvis A er en kovalent binding, kan forbindelsen mellom cellebindemiddelet og  $\text{L}^1$  således være valgt fra:

-C(=O)NH-,  
 -C(=O)O-,  
 -NHC(=O)-,  
 -OC(=O)-,  
 -OC(=O)O-,  
 -NHC(=O)O-,  
 -OC(=O)NH-,  
 -NHC(=O)NH-,  
 -C(=O)NHC(=O)-,  
 -S-,  
 -S-S-,

-CH<sub>2</sub>C(=O)- og  
=N-NH-.

5 En aminogruppe av L<sup>1</sup> som binder til til cellebindemiddelet, kan være N-terminalen av en aminosyre eller kan være avledet fra en aminogruppe av en aminosyresidekjede, f.eks. en lysinaminosyresidekjede.

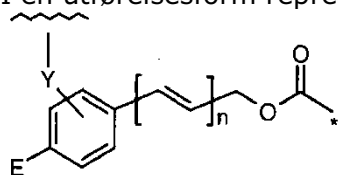
10 En karboksylgruppe av L<sup>1</sup> som binder til cellebindemiddelet, kan være C-terminalen av en aminosyre eller kan være avledet fra en karboksylgruppe av en aminosyresidekjede, f.eks. en glutaminsyreaminosyresidekjede.

15 En hydroksylgruppe av L<sup>1</sup> som binder til cellebindemiddelet, kan være avledet fra en hydroksylgruppe av en aminosyresidekjede, f.eks. en serinaminosyresidekjede.

En tiolgruppe av L<sup>1</sup> som binder til cellebindemiddelet, kan være avledet fra en tiolgruppe av en aminosyresidekjede, f.eks. en serinaminosyresidekjede.

20 Ovennevnte kommentarer i forbindelse med amino-, karboksyl-, hydroksyl- og tiolgruppene av L<sup>1</sup> gjelder også for cellebindemiddelet.

I én utførelsesform representerer L<sup>2</sup> sammen med -OC(=O)-:



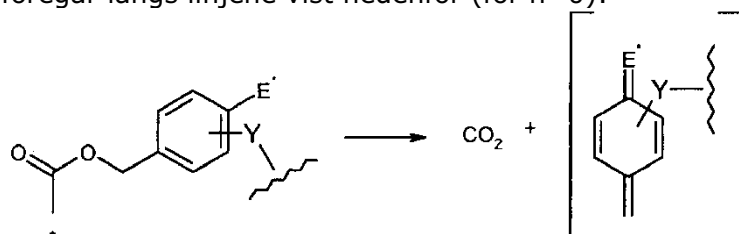
25 hvor stjernen angir bindingspunktet til N10-posisjonen, den bølgede linjen angir bindingspunktet til L<sup>1</sup>, n er 0 til 3, Y er en kovalent binding eller en funksjonell gruppe og E er en aktiverbar gruppe, f.eks. ved enzymatisk virkning eller lys, hvilket genererer en selvimmolativ enhet. Fenylringen er eventuelt ytterligere substituert med én, to eller tre substituenten som beskrevet heri. In one embodiment, the phenylene group is optionally further substituted with halo, NO<sub>2</sub>, R or OR. Preferably n is 0 or 1, most preferably 0.

30

E er valgt slik at gruppen er mottakelig for aktivering, f.eks. ved lys eller under påvirkning av et enzym. E kan være -NO<sub>2</sub> eller glukuronsyre. Førstnevnte kan

være mottagelig for virkningen av en nitroreduktase, sistnevnte for virkningen av en  $\beta$ -glucuronidase.

I denne utførelsesformen vil den selvimmolative linkeren gir mulighet for frisetting av den beskyttede forbindelsen når E aktiveres, idet progresjonen foregår langs linjene vist nedenfor (for  $n=0$ ):



hvor stjernen angir bindingspunktet til N10-posisjonen, E\* er den aktiverte formen for E og Y er som beskrevet ovenfor. Disse gruppene har den fordelen å separere aktiveringsstedet fra forbindelsen som beskyttes. Som beskrevet ovenfor kan fenylengruppen eventuelt substitueres ytterligere.

Gruppen Y kan være en kovalent binding til L<sup>1</sup>.

Gruppe Y kan være en funksjonell gruppe valgt fra:

- C(=O)-
- NH-
- O-
- C(=O)NH-,
- C(=O)O-,
- NHC(=O)-,
- OC(=O)-,
- OC(=O)O-,
- NHC(=O)O-,
- OC(=O)NH-,
- NHC(=O)NH-,
- NHC(=O)NH,
- C(=O)NHC(=O)- og
- S-.

5 Hvis  $L^1$  er et dipeptid, er det foretrukket at Y er  $-NH-$  eller  $-C(=O)-$ , hvilket danner en amidbinding mellom  $L^1$  og Y. I denne utførelsesformen behøver ikke dipeptidsekvensen være et substrat for en enzymatisk aktivitet.

I en annen utførelsesform er A en spacergruppe.  $L^1$  og cellebindemiddelet er således indirekte koblet.

10  $L^1$  og A kan være forbundet ved en binding valgt fra:

- $C(=O)NH-$ ,
- $C(=O)O-$ ,
- $NHC(=O)-$ ,
- $OC(=O)-$ ,
- 15 •  $OC(=O)O-$ ,
- $NHC(=O)O-$ ,
- $OC(=O)NH-$  og
- $NHC(=O)NH-$ .

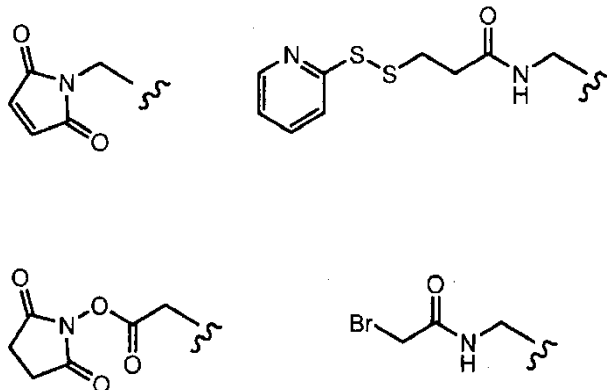
20

Linkeren inneholder foretrukket en elektrofil funksjonell gruppe for reaksjon med en nukleofil funksjonell gruppe på cellebindemiddelet. Nukleofile grupper på antistoffer inkluderer blant annet: (i) N-terminale amingrupper, (ii) sidekjedeamingrupper, f.eks. lysin, (iii) sidekjedetiolergrupper, f.eks. cystein, og (iv) sukkerhydroksyl- eller aminogrupper hvor antistoffet er glykosylert. Amin-, tiol- og hydroksylgrupper er nukleofile og i stand til å reagere for å danne kovalente bindinger med elektrofile grupper på linkereneheter og linkerreagenser, inkludert: (i) maleimidgrupper, (ii) aktiverte disulfider, (iii) aktive estere slik som NHS-estere (N-hydroksysukkinimidestere), HOBt-estere (N-hydroksybenzotriazolestere), haloformater og syrehalider, (iv) alkyl- og benzylhalider slik som haloacetamider og (v) aldehyder, ketoner, karboksyl og hvorav noen er eksemplifisert som følger:

25

30

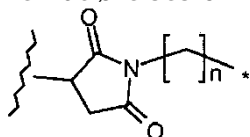
28



- 5 Visse antistoffer har reduserbare interkjededisulfider, dvs. cysteinbroer. Antistoffer kan gjøres reaktive for konjugering med linkerreagenser ved behandling med et reduksjonsstoff slik som DTT (ditiotreitol). Hver cysteinbro vil således teoretisk danne to reaktive tiolnukleofiler. Ytterligere nukleofile grupper
- 10 kan introduseres inn i antistoffer gjennom reaksjonen av lysiner med 2-iminotiolan (Trauts reagens), hvilket resulterer i omdannelse av et amin til et tiol. Reaktive tiolgrupper kan introduseres inn i et antistoff (eller fragment derav) ved å introdusere én, to, tre, fire eller flere cysteinenheter (f.eks. ved fremstilling av antistoffmutanter omfattende én eller flere ikke-native cysteinaminosyreenheter). US 7521541 beskriver konstruksjon av antistoffer ved
- 15 introduksjon av reaktive cysteinaminosyrer.

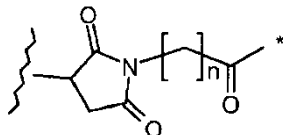
- I noen utførelsesformer har en linker en reaktiv nukleofil gruppe som er reaktiv med en elektrofil gruppe, til stede på et antistoff. Nyttige elektrofile grupper på et antistoff omfatter blant annet aldehyd- og ketonkarbonylgrupper.
- 20 Heteroatomet av en nukleofil gruppe for en linker kan reagere med en elektrofil gruppe på et antistoff og danne en kovalent binding til en antistoffenhet. Nyttige nukleofile grupper på en linker inkluderer, men er ikke begrenset til, hydrazid, oksim, amino, hydrosyl, hydrazin, tiosemikarbazon, hydrazinkarboksylat og arylhydrazid. Den elektrofile gruppen på et antistoff tilveiebringer et egnet sted
- 25 for binding til en linker.

I én utførelsesform er gruppe A:



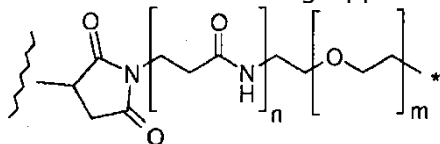
- 30 hvor stjernen angir bindingspunktet til  $L^1$ , den bølgede linjen angir bindingspunktet til cellebindemiddelet og  $n$  er 0 til 6. I én utførelsesform er  $n$  5.

I én utførelsesform er gruppe A:



5 hvor stjernen angir bindingspunktet til L<sup>1</sup>, den bølgede linjen angir bindingspunktet til cellebindemiddelet og n er 0 til 6. I én utførelsesform er n 5.

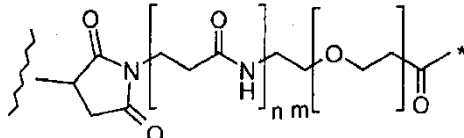
I én utførelsesform er gruppe A:



10 hvor stjernen angir bindingspunktet til L<sup>1</sup>, den bølgede linjen angir bindingspunktet til cellebindemiddelet, n er 0 eller 1 og m er 0 til 30. I en foretrukket utførelsesform er n 1, og m er 0 til 10, 1 til 8, foretrukket 4 til 8 og mest foretrukket 4 eller 8. I en annen utførelsesform er m 10 til 30, og foretrukket 20 til 30. M er alternativt 0 til 50. I denne utførelsesformen er m foretrukket 10–40, og n er 1.

15

I én utførelsesform er gruppe A:

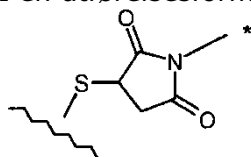


20 hvor stjernen angir bindingspunktet til L<sup>1</sup>, den bølgede linjen angir bindingspunktet til cellebindemiddelet, n er 0 eller 1 og m er 0 til 30. I en foretrukket utførelsesform er n 1, og m er 0 til 10, 1 til 8, foretrukket 4 til 8 og mest foretrukket 4 eller 8. I en annen utførelsesform er m 10 til 30, og foretrukket 20 til 30. M er alternativt 0 til 50. I denne utførelsesformen er m foretrukket 10–40, og n er 1.

25

I én utførelsesform er forbindelsen mellom cellebindemiddelet og A gjennom en tiolrest av et cellebindemiddel og en maleimidgruppe av A.

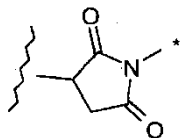
I én utførelsesform er forbindelsen mellom cellebindemiddelet og A:



hvor stjernen angir bindingspunktet til den gjenværende delen av A og den bølgede linjen angir bindingspunktet til den gjenværende delen av cellebindemiddelet. I denne utførelsesformen er S-atomet typisk avledet fra cellebindemiddelet.

5

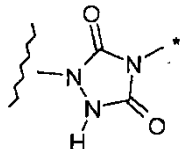
I hver av utførelsesformene nevnt ovenfor kan en alternativ funksjonalitet anvendes i stedet for den maleimidavlede gruppen vist nedenfor:



hvor den bølgede linjen angir bindingspunktet til cellebindemiddelet som før og stjernen angir bindingen til den gjenværende delen av A-gruppen.

10

I én utførelsesform er den maleimidavlede gruppen utbyttet med gruppen:



hvor den bølgede linjen angir bindingspunktet til cellebindemiddelet, og stjernen angir bindingen til den gjenværende delen av A-gruppen.

15

I én utførelsesform er den maleimidavlede gruppen utbyttet med en gruppe, hvilken eventuelt sammen med cellebindemiddelet er valgt fra:

-C(=O)NH-,

20

-C(=O)O-,

-NHC(=O)-,

-OC(=O)-,

-OC(=O)O-,

-NHC(=O)O-,

25

-OC(=O)N H-,

-NHC(=O)NH-,

-NHC(=O)NH,

-C(=O)NHC(=O)-,

-S-,

30

-S-S-,

-CH<sub>2</sub>C(=O)-

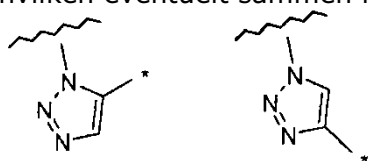
-C(=O)CH<sub>2</sub>-,

=N-NH- og

-NH-N=.

5

I én utførelsesform er den maleimidavlede gruppen utbyttet med en gruppe, hvilken eventuelt sammen med cellebindemiddelet er valgt fra:



10 hvor den bølgede linje angir enten bindingspunktet til cellebindemiddelet eller bindingen til den gjenværende delen av A-gruppen, og stjernen angir det andre bindingspunktet til cellebindemiddelet eller bindingen til den gjenværende delen av A-gruppen.

15 Andre grupper egnet til binding av L<sup>1</sup> til cellebindemiddelet er beskrevet i WO 2005/082023.

20 Gruppen R<sup>10</sup> er avledbar fra gruppen R<sup>L</sup>. Gruppen R<sup>L</sup> kan omdannes til en gruppe R<sup>10</sup> ved kobling av et cellebindemiddel til en funksjonell gruppe av R<sup>L</sup>. Andre trinn kan utføres for å omdanne R<sup>L</sup> til R<sup>10</sup>. Disse trinnene kan inkludere fjerning av eventuelle beskyttelsesgrupper eller installering av en egnet funksjonell gruppe.

**Q**

25 **I én utførelsesform er Q valgt fra O, S eller N(H).**

Fortrinnsvis er Q O.

**R<sup>11</sup>**

30

R<sup>11</sup> er enten H, eller R eller, hvor Q er O, SO<sub>3</sub>M, hvor M er et metallkation.



I én utførelsesform er  $R^{11}$  H.

I én utførelsesform er  $R^{11}$  R.

5

I én utførelsesform hvor Q er O, er  $R^{11}$   $SO_3M$ , hvor M er et metallkation. Kationet kan være  $Na^+$ .

**$R^L$**

10

I én utførelsesform er  $R^L$  en linker for forbindelse med et cellebindemiddel.

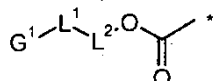
15

I én utførelsesform tilveiebringes linkerens funksjonsgruppe for å danne en forbindelse med et cellebindemiddel. Denne patentsøknaden vedrører særlig de  $R^L$ -gruppene som har en karbamatbinding til N10-posisjonen. Drøftingen av bindingsgruppen i  $R^{10}$  over er også relevant for dens umiddelbare forløpere her.

20

$R^L$  er forskjellig fra  $R^C$ , som ikke er egnet for reaksjon med et cellebindemiddel. I noen utførelsesformer kan  $R^C$  imidlertid omdannes til en gruppe  $R^L$ , for eksempel ved passende manipulering av beskyttelsesgruppene og andre funksjonaliteter som er, eller utgjør del av  $R^C$ .

I én utførelsesform er  $R^L$  en gruppe:



25

hvor stjernen angir bindingspunktet til N10-posisjonen,  $G^1$  er en funksjonsgruppe for å danne en forbindelse med et cellebindemiddel,  $L^1$  er en linker,  $L^2$  er en kovalent binding eller danner sammen med  $-OC(=O)-$  en selvimmolativ linker og  $L^1$  eller  $L^2$  er en spaltbar linker.

30

$L^1$  og  $L^2$  er som definert over i tilknytning til  $R^{10}$ . Henvisninger til forbindelse med A kan her tolkes som henvisning til en forbindelse med  $G^1$ .

35

I én utførelsesform hvor  $L^1$  omfatter en aminosyre, kan sidekjeden av denne aminosyren beskyttes. En hvilken som helst passende beskyttelsesgruppe kan anvendes. I én utførelsesform kan sidekjedebeskyttelsesgruppene fjernes med andre beskyttelsesgrupper i forbindelsen, hvis disse er til stede. I andre

utførelsesformer kan beskyttelsesgruppene være ortogonale til andre beskyttelsesgrupper i molekylet, hvis disse er til stede.

5 Passende beskyttelsesgrupper for aminosyre-sidekjedene inkluderer gruppene som er beskrevet i Novabiochem-katalogen 2006/2007. Beskyttelsesgrupper for anvendelse i en katepsinlabil linker drøftes også i Dubowchik et al.

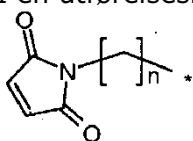
10 I visse utførelsesformer av oppfinnelsen inkluderer gruppen  $L^1$  en Lys/aminosyrerest. Sidekjeden av denne aminosyren kan beskyttes med en Boc- eller Alloc-beskyttet gruppe. En Boc-beskyttelsesgruppe er mest foretrukket.

15 Funksjonsgruppen  $G^1$  danner en koblingsgruppe A ved reaksjon med et cellebindemiddel.

I én utførelsesform er eller omfatter funksjonsgruppen  $G^1$  et amino-, karboksylsyre-, hydroksyl-, tiol- eller maleimidgruppe for reaksjon med en passende gruppe på cellebindemiddelet. I en foretrukket utførelsesform omfatter  $G^1$  en maleimidgruppe.

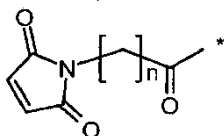
20 I én utførelsesform er gruppen  $G^1$  en alkylmaleimidgruppe. Denne gruppen er passende for reaksjon med tiolgrupper, særlig cysteintiolgrupper som er til stede i cellebindemiddelet, for eksempel til stede i et antistoff.

25 I én utførelsesform er gruppen  $G^1$ :



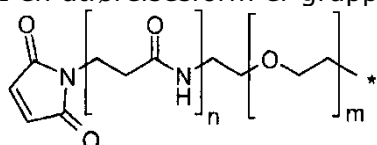
hvor stjernen angir bindingspunktet til  $L^1$ , og n er 0 til 6. I én utførelsesform er n 5.

30 I én utførelsesform er gruppen  $G^1$ :



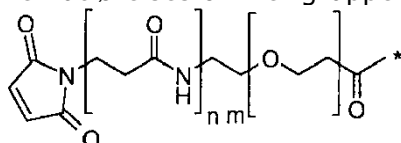
hvor stjernen angir bindingspunktet til  $L^1$ , og n er 0 til 6. I én utførelsesform er n 5.

I én utførelsesform er gruppen  $G^1$ :



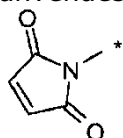
- 5 hvor stjernen angir bindingspunktet til  $L^1$ ,  $n$  er 0 eller 1 og  $m$  er 0 til 30. I en foretrukket utførelsesform er  $n$  1, og  $m$  er 0 til 10, 1 til 2, foretrukket 4 til 8 og mest foretrukket 4 eller 8.  $M$  er alternativt 0 til 50. I denne utførelsesformen er  $m$  foretrukket 10–40, og  $n$  er 1.

I én utførelsesform er gruppen  $G^1$ :



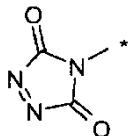
- 10 hvor stjernen angir bindingspunktet til  $L^1$ ,  $n$  er 0 eller 1 og  $m$  er 0 til 30. I en foretrukket utførelsesform er  $n$  1, og  $m$  er 0 til 10, 1 til 8, foretrukket 4 til 8 og mest foretrukket 4 eller 8.  $M$  er alternativt 0 til 50. I denne utførelsesformen er  $m$  foretrukket 10–40, og  $n$  er 1.

- 15 I hver av utførelsesformene nevnt ovenfor kan en alternativ funksjonalitet anvendes i stedet for maleimidgruppen vist nedenfor:



hvor stjernen angir bindingen til den gjenværende delen av G-gruppen.

- 20 I én utførelsesform er den maleimidavlede gruppen utbyttet med gruppen:



hvor stjernen angir bindingen til den gjenværende delen av G-gruppen.

I én utførelsesform erstattes maleimidgruppen med en gruppe valgt fra:

- 25
- $C(=O)OH$ ,
  - $OH$ ,
  - $NH_2$ ,
  - $SH$ ,

- $C(=O)CH_2D$ , hvor D er Cl, Br eller I,
  - CHO,
  - $NHNH_2$
  - $C\equiv CH$ , og
- 5 •  $N_3$  (azid).

I én utførelsesform hvor  $L^1$  er til stede, er  $G^1$   $-NH_2$ ,  $-NHMe$ ,  $-COOH$ ,  $-OH$  eller  $-SH$ .

10

I én utførelsesform hvor  $L^1$  er til stede, er  $G^1$   $-NH_2$  eller  $-NHMe$ . Begge grupper kan være N-terminalen av en  $L^1$  aminosyresekvens.

15

I én utførelsesform hvor  $L^1$  er til stede, er  $G^1$   $-NH_2$  og  $L^1$  er en aminosyresekvens  $-X_1-X_2-$ , som definert over i tilknytning til  $R^{10}$ .

20

I én utførelsesform hvor  $L^1$  er til stede, er  $G^1$   $COOH$ . Denne gruppen kan være C-terminalen av en  $L^1$  aminosyresekvens.

I én utførelsesform hvor  $L^1$  er til stede, er  $G^1$   $OH$ .

I én utførelsesform hvor  $L^1$  er til stede, er  $G^1$   $SH$ .

25

Gruppen  $G^1$  kan være omdannbar fra én funksjonsgruppe til en annen. I én utførelsesform hvor  $L^1$  er til stede, er  $G^1$   $-NH_2$ . Denne gruppen er omdannbar til en annen gruppe  $G^1$  omfattende en maleimidgruppe. For eksempel kan gruppen  $-NH_2$  omsettes med en syre eller en aktivert syre (f.eks. N-suksinimid) av disse  $G^1$ -gruppene omfattende maleimid vist over.

30

Gruppen  $G^1$  kan derfor omdannes til en funksjonsgruppe som er mer passende for reaksjon med et cellebindemiddel.

I andre utførelsesformer,  $R^L$  er en gruppe som er en forløper til linkeren som tilveiebringes med en funksjonsgruppe.

35

Som bemerket over: i én utførelsesform hvor  $L^1$  er til stede, er  $G^1$   $-NH_2$ ,  $-NHMe$ ,  $-COOH$ ,  $-OH$  eller  $-SH$ . I en ytterligere utførelsesform tilveiebringes disse gruppene i en kjemisk beskyttet form. Den kjemisk beskyttede formen er derfor en forløper til linkeren som tilveiebringes med en funksjonsgruppe.

5

I én utførelsesform er  $G^1$   $-NH_2$  i en kjemisk beskyttet form. Gruppen kan beskyttes med en karbamatbeskyttelsesgruppe. Karbamatbeskyttelsesgruppen kan velges fra gruppen bestående av:

Alloc, Fmoc, Boc, Troc, Teoc, Cbz og PNZ.

10

Hvor  $G^1$  er  $-NH_2$ , er den fortrinnsvis beskyttet med en Alloc- eller Fmoc-gruppe.

I én utførelsesform hvor  $G^1$  er  $-NH_2$ , er den beskyttet med en Fmoc-gruppe.

15

I én utførelsesform er beskyttelsesgruppen den samme som karbamatbeskyttelsesgruppen i den kapslende gruppen.

20

I én utførelsesform er beskyttelsesgruppen ikke den samme som karbamatbeskyttelsesgruppen i den kapslende gruppen. I denne utførelsesformen er det foretrukket at beskyttelsesgruppen kan fjernes under betingelser som ikke fjerner karbamatbeskyttelsesgruppen i den kapslende gruppen.

25

Den kjemiske beskyttelsesgruppen kan fjernes for å tilveiebringe en funksjonsgruppe for å danne en forbindelse med et cellebindemiddel. Eventuelt kan denne funksjonsgruppen da omdannes til en annen funksjonsgruppe som beskrevet over.

30

I én utførelsesform er den aktive gruppen et amin. Dette aminet er fortrinnsvis det N-terminale aminet av et peptid og kan være det N-terminale aminet av de foretrukne dipeptidene ifølge oppfinnelsen.

35

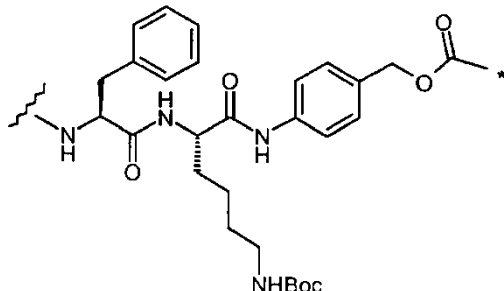
Den aktive gruppen kan omsettes for å gi funksjonsgruppen som er beregnet for å danne en forbindelse med et cellebindemiddel.

I andre utførelsesformer er linkerene en forløper til linkerene som har en aktiv gruppe. I denne utførelsesformen omfatter linkerene den aktive gruppen, som er beskyttet ved hjelp av en beskyttelsesgruppe. Beskyttelsesgruppen kan fjernes for å tilveiebringe linkerene som har en aktiv gruppe. Hvis den aktive gruppen er et amin, kan beskyttelsesgruppen være en aminbeskyttelsesgruppe, slik som beskrevet i Green og Wuts.

Beskyttelsesgruppen er fortrinnsvis ortogonal til andre beskyttelsesgrupper, hvis disse er til stede, i gruppen R<sup>L</sup>.

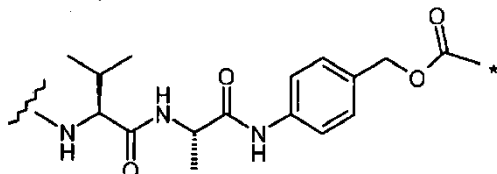
I én utførelsesform er beskyttelsesgruppen ortogonal til den kapslende gruppen. Derfor er den aktive gruppens beskyttelsesgruppe fjernbar samtidig som den beholder den kapslende gruppen. I andre utførelsesformer, beskyttelsesgruppen og den kapslende gruppen er fjernbar under de samme betingelsene som de som anvendes for å fjerne den kapslende gruppen.

I én utførelsesform er R<sup>L</sup>:



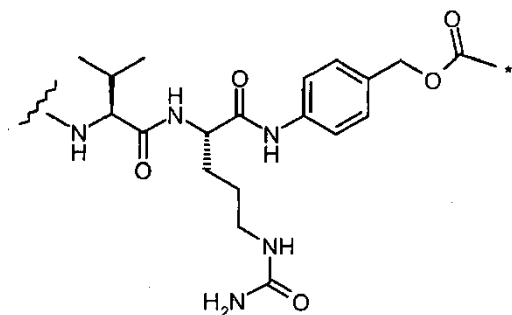
hvor stjernen angir bindingspunktet til N10-posisjonen og den bølgede linjen angir bindingspunktet til den gjenværende delen av linkerene L<sup>1</sup> eller bindingspunktet til G<sup>1</sup>. Fortrinnsvis angir den bølgede linjen bindingspunktet til G<sup>1</sup>.

I én utførelsesform er R<sup>L</sup>:



hvor stjernen og den bølgede linjen er som definert ovenfor.

I én utførelsesform er R<sup>L</sup>:



hvor stjernen og den bølgede linjen er som definert ovenfor.

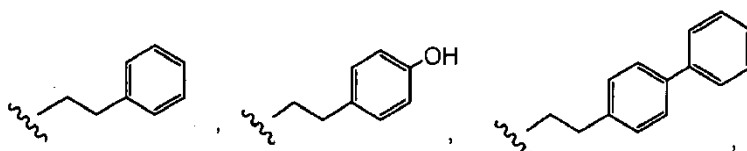
5 Andre funksjonsgrupper som er passende for anvendelse i dannelsen av en forbindelse mellom L<sup>1</sup> og cellebindemiddelet er beskrevet i WO 2005/082023.

10 Linkere kan inkludere proteasespaltbare peptidheter omfattende én eller flere aminosyreenheter. Peptidlinkerreagenser kan fremstilles ved fremgangsmåter for syntese i fast eller flytende fase (E. Schröder and K. Lübke, *The Peptides*, bd. 1, s. 76–136 (1965) Academic Press) som er velkjent innen peptidkjemi, inkludert  
 15 t-BOC-kjemi (Geiser et al "Automation of solid-phase peptide synthesis" i *Macromolecular Sequencing and Synthesis*, Alan R. Liss, Inc., 1988, s. 199-218) and Fmoc/HBTU chemistry (Fields, G. and Noble, R. (1990) "Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids", *Int. J. Peptide Protein Res.* 35:161-214), på en automatisert syntetisator slik som Rainin Symphony-peptidsyntetisator (Protein Technologies, Inc., Tucson, AZ) eller modell 433 (Applied Biosystems, Foster City, CA).

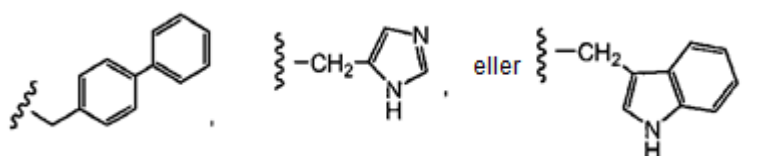
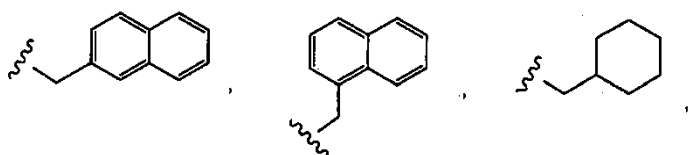
20 Eksempler på aminosyrelinkere inkluderer et dipeptid, et tripeptid, et tetrapeptid eller et pentapeptid. Eksempler på dipeptider inkluderer: valin-citrullin (vc eller val-cit), alanin-fenylalanin (af eller ala-phe). Eksempler på tripeptider omfatter: glycin-valin-citrullin (gly-val-cit) og glycin-glycin-glycin (gly-gly-gly). Aminosyreenheter som omfatter en aminosyrelinkerkomponent, omfatter dem som forekommer naturlig, og mindre aminosyrer og ikke naturlig forekommende  
 25 aminosyreanaloger, slik som citrullin. Aminosyrelinkerkomponenter kan konstrueres og optimeres i deres selektivitet for enzymatisk spaltning av et særlig enzym, f.eks. en tumorassosiert protease, kathepsin B, C og D, eller en plasminprotease.

30 Aminosyresidekjeder inkluderer dem som forekommer naturlig, og mindre aminosyrer og ikke-naturlig forekommende aminosyreanaloger, slik som citrullin.

- Aminosyresidekjeder inkluderer hydrogen, metyl, isopropyl, isobutyl, sec-butyl, benzyl, p-hydroksybenzyl,  $-\text{CH}_2\text{OH}$ ,  $\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$ ,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SCH}_3$ ,  $-\text{CH}_2\text{CONH}_2$ ,  $-\text{CH}_2\text{COOH}$ ,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}_2$ ,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ ,  $-(\text{CH}_2)_3\text{NHC}(=\text{NH})\text{NH}_2$ ,  $-(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$ ,  $-(\text{CH}_2)_3\text{NHCOCH}_3$ ,  $-(\text{CH}_2)_3\text{NHCHO}$ ,  $-(\text{CH}_2)_4\text{NHC}(=\text{NH})\text{NH}_2$ ,  $-(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$ ,  $-(\text{CH}_2)_4\text{NHCOCH}_3$ ,  $-(\text{CH}_2)_4\text{NHCHO}$ ,  $-(\text{CH}_2)_3\text{NHCONH}_2$ ,  $-(\text{CH}_2)_4\text{NHCONH}_2$ ,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{NH}_2$ , 2-pyridylmetyl-, 3-pyridylmetyl-, 4-pyridylmetyl-, fenyl, sykloheksyl, samt følgende strukturer:



10



15

Når aminosyresidekjedene inkluderer annet enn hydrogen (glycin), er karbonatomet hvortil aminosyresidekjeden er bundet, kiral. Hvert karbonatom hvortil aminosyresidekjeden er bundet, er uavhengig i (S)- eller (R)-konfigurasjonen, eller en racemisk blanding. Legemiddellinkerreagenser kan således være enantiomerisk rene, racemiske eller diastereomeriske.

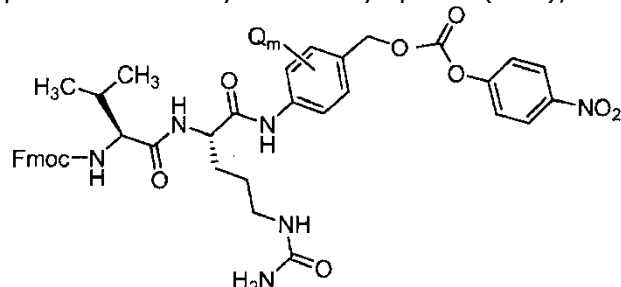
20

I eksempelutførelsesformer er aminosyresidekjeder valgt fra dem av naturlige og ikke-naturlige aminosyrer, inkludert alanin, 2-amino-2-sykloheksylacetinsyre, 2-amino-2-fenylacetinsyre, arginin, asparagin, asparginsyre, cystein, glutamin, glutaminsyre, glycin, histidin, isoleucin, leucin, lysin, metionin, norleucin, fenylalanin, prolin, serin, treonin, tryptofan, tyrosin, valin,  $\gamma$ -aminosmørsyre,  $\alpha,\alpha$ -dimetyl  $\gamma$ -aminosmørsyre,  $\beta,\beta$ -dimetyl  $\gamma$ -aminosmørsyre, ornitin og citrullin (Cit).

25



Et eksempel på valin-citrullin-dipeptidlonkerreagens (val-cit eller vc) som er nyttig for konstruksjon av et linker-PBD-legemiddelenhetmellomprodukt for konjugering til et cellebindemiddel, f.eks. et antistoff, med en selvimmolativ para-aminobenzylkarbamoylspacer (PAB), har strukturen:

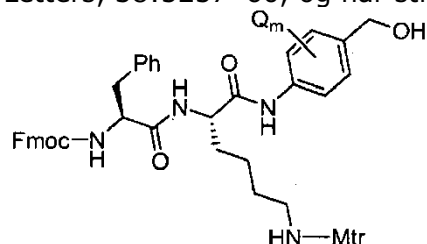


5

hvor Q er C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> alkyl, -O-(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> alkyl), -halogen, -NO<sub>2</sub> eller -CN og m er et heltall fra 0 til 4.

Et eksempel på et phe-lys(Mtr)-dipeptidlinkerreagens som har en p-aminobenzylgruppe, kan fremstilles ifølge Dubowchik, et al. (1997) Tetrahedron Letters, 38:5257-60, og har strukturen:

10



hvor Mtr er mono-4-metoksytrityl, Q er C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-alkyl, -O-(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-alkyl), -halogen, -NO<sub>2</sub> eller -CN og m er et heltall fra 0-4.

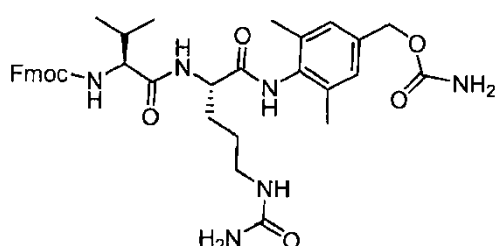
15

Den "selvimmolative linkeren" PAB (para-aminobenzylloksykarbonyl), binder legemiddelenheten til antistoffet i antistofflegemiddelkonjugatet (Carl et al (1981) J. Med. Chem. 24:479-480, Chakravarty et al (1983) J. Med. Chem. 26:638-644, US 6214345, US20030130189, US20030096743, US6759509, US20040052793, US6218519, US6835807, US6268488, US20040018194, WO98/13059, US20040052793, US6677435, US5621002, US20040121940, WO2004/032828). Andre eksempler på selvimmolative spacere foruten PAB inkluderer, men er ikke begrenset til: (i) aromatiske forbindelser som er elektronisk lik PAB-gruppen slik som 2-aminoimidazol-5-metanolderivater (Hay et al. (1999) Bioorg. Med. Chem. Lett. 9:2237), tiazoler (US 7375078), multiple, langstrakte PAB-enheter (de Groot et al (2001) J. Org. Chem. 66:8815-8830) og orto- eller para-aminobenzylacetaler og (ii) homologerte styryl-PAB-analoger (US 7223837). Det kan benyttes spacere som gjennomgår syklisering ved

25

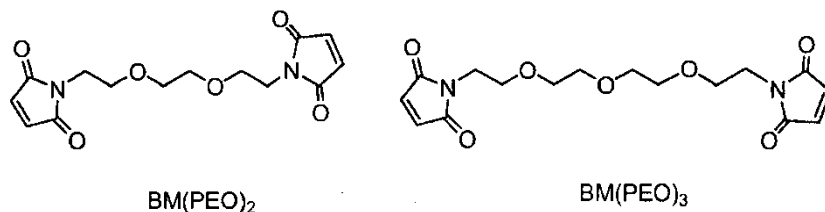
amidbindingshydrolyse, slik som substituerte og usubstituerte 4-aminosmørsyreamider (Rodrigues et al (1995) Chemistry Biology 2:223), passende substituerte bisyklo[2.2.1]- og bisyklo[2.2.2]-ringsystemer (Storm et al (1972) J. Amer. Chem. Soc. 94:5815) og 2-aminofenylpropionsyreamider (Amsberry, et al (1990) J. Org. Chem. 55:5867). Eliminering av aminholdige legemidler som er substituert ved glycin (Kingsbury et al (1984) J. Med. Chem. 27:1447), er også eksempler på selvimmolative spacere som er nyttige i ADC.

I én utførelsesform har et valin-citrullindipeptid-PAB-analogt reagens en 2,6 dimetylfenylgruppe og strukturen:



Linkerreaksenter som er nyttige for antistoff-legemiddel-konjugatene ifølge oppfinnelsen, inkluderer, men er ikke begrenset til: BMPEO, BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC, og sulfo-SMPB og SVSB (sukkinimidyl-(4-vinylsulfon)benzoat) og bis-maleimidreaksenter: DTME, BMB, BMDB, BMH, BMOE, 1,8-bis-maleimidodietylenglycol (BM(PEO)<sub>2</sub>) og 1,11-bis-maleimidotrietylenglycol (BM(PEO)<sub>3</sub>), som er kommersielt tilgjengelig fra Pierce Biotechnology, Inc., ThermoScientific, Rockford, IL, og andre reagensleverandører. Bis-maleimidreaksenter gir mulighet for binding av en fri tiolgruppe av en cysteinrest av et antistoff til en tiolholdig legemiddelenhet, en markør eller et linkermellomprodukt, på en sekvensiell eller samtidig måte. Andre funksjonelle grupper ved siden av maleimid, som er reaktive med en tiolgruppe av et antistoff, PBD-legemiddelenhet eller et linkermellomprodukt, inkluderer jodacetamid, bromacetamid, vinylpyridin, disulfid, pyridyldisulfid, isocyanat og isotiocyanat.

42

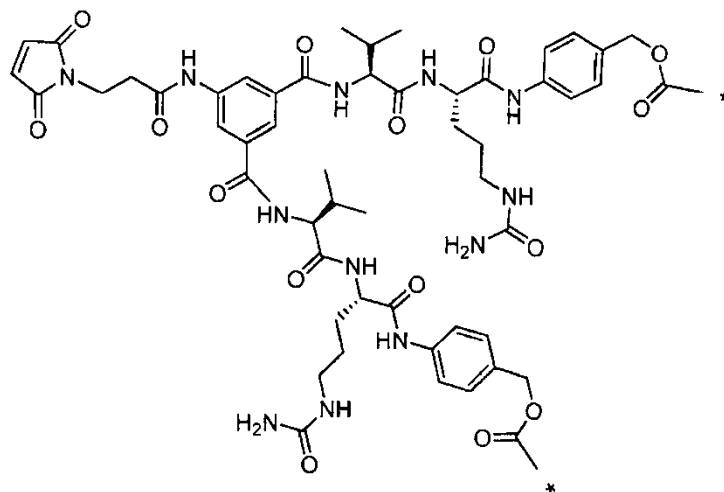


Andre utførelsesformer av linkerreagenser er: N-sukkinimidyl-4-(2-pyridyltio)pentanoat (SPP), N-sukkinimidyl-3-(2-pyridyl-ditio)propionat (SPDP, Carlsson et al (1978) *Biochem. J.* 173:723-737), sukkinimidyl-4-(N-maleimidometyl)sykloheksan-1-karboksylat (SMCC), iminotiolan (IT), bifunksjonelle derivater av imidoestere (slik som dimetyladiipimidat HCl), aktive estere (slik som disukkinimidylsuberat), aldehyder (slik som glutaraldehyd), bis-azido-forbindelser (slik som bis(p-azidobenzoyl)heksandiamin), bis-diazoniumderivater (slik som bis-(p-diazoniumbenzoyl)-etytendiamin), diisocyanater (slik som toluen-2,6-diisocyanat) og bis-aktive fluorforbindelser (slik som 1,5-difluor-2,4-dinitrobenzen). Nyttige linkerreagenser kan også oppnås via andre kommersielle kilder, slik som Molecular Biosciences Inc. (Boulder, CO), eller syntetiseres i samsvar med prosedyrer beskrevet i Toki et al (2002) *J. Org. Chem.* 67:1866-1872, US 6214345, WO 02/088172, US 2003130189, US2003096743, WO 03/026577, WO 03/043583 og WO 04/032828.

Linkeren kan være en linker av dendrittisk type for kovalent binding av mer enn én legemiddelenhet gjennom en forgrenet, multifunksjonell linker-enhet til et antistoff (US 2006/116422, US 2005/271615, de Groot et al (2003) *Angew. Chem. Int. Ed.* 42:4490-4494, Amir et al (2003) *Angew. Chem. Int. Ed.* 42:4494-4499, Shamis et al (2004) *J. Am. Chem. Soc.* 126:1726-1731, Sun et al (2002) *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 12:2213-2215, Sun et al (2003) *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 11:1761-1768, King et al (2002) *Tetrahedron Letters* 43:1987-1990). Dendrittiske linkere kan øke molforholdet mellom legemiddel og antistoff, dvs. mengden, som er relatert til ADC-ets potens. Hvis et antistoff bærer bare én reaktiv cysteintiolgruppe, kan en rekke legemiddelenheter således være bundet gjennom en dendrittisk eller forgrenet linker.

Ett eksempel på en utførelsesform av en linker av dendrittisk type har strukturen:

43



hvor stjernen angir bindingspunktet til PBD-enhetens N10-posisjon.

### **Cellebindemiddel**

5

Atskillige typer av cellebindemidler er mulige, inkludert peptider og ikke-peptider. Disse kan inkludere antistoffer eller et fragment av et antistoff som inneholder minst ett bindingssted, lymfokiner, hormoner, vekstfaktorer, næringsmiddeltransportmolekyler eller et hvilket som helst annet

10 cellebindingmolekyl eller stoff. I den foreliggende oppfinnelsen er  
cellebindemiddelet valgt fra et antistoff, et fragment av et antistoff som  
inneholder minst ett bindingssted og et syklisk polypeptid.

15

Betegnelsen "antistoff" anvendes heri i videste forstand og dekker spesifikt monoklonale antistoffer, polyklonale antistoffer, dimerer, multimerer, multispesifikke antistoffer (*f.eks.* bispesifikke antistoffer) og antistoffragmenter, så lenge de viser ønsket biologisk aktivitet (Miller et al (2003) Jour. of Immunology 170:4854-4861). Antistoffer kan være murine, humane, humaniserte, kimære eller avledet fra andre arter. Et antistoff er et protein generert av immunsystemet som er i stand til å gjenkjenne og binde til et spesifikk antigen. (Janeway, C., Travers, P., Walport, M., Shlomchik (2001) Immuno Biology, 5th Ed., Garland Publishing, New York). Et målantigen har generelt atskillige bindingssteder, også kalt epitoper, gjenkjent ved CDR-er på flere antistoffer. Hvert antistoff som spesifikt binder til et annet epitop, har en

20 annen struktur. Ett antigen kan således ha mer enn ett tilsvarende antistoff. Et antistoff inkluderer et immunglobulinmolekyl med full lengde eller en immunologisk aktiv del av et immunglobulinmolekyl med full lengde, dvs. et

25 molekyl som inneholder et antigenbindingssted som immunspesifikt binder et

antigen av et mål av interesse eller en del derav, idet slike mål inkluderer, men er ikke begrenset til, cancerceller som produserer autoimmune antistoffer assosiert med en autoimmun sykdom. Immunglobulinet kan være av en hvilken som helst type (f.eks. IgG, IgE, IgM, IgD og IgA), klasse (f.eks. IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 og IgA2) eller underklasse av immunglobulinmolekyl. Immunglobulinene kan være avledet fra en hvilken som helst art, inkludert menneske, mus eller kanin.

"Antistoffragmenter" omfatter en del av et antistoff i full lengde, generelt antigenbindingen eller den variable regionen derav. Eksempler på antistoffragmenter inkluderer Fab-, Fab'-, F(ab')<sub>2</sub>- og Fv-fragmenter, antistoffer, lineære antistoffer, fragmenter produsert av et Fab-ekspresjonsbibliotek, anti-idiotypiske (anti-Id) antistoffer, CDR (komplementbestemmende region) og epitopbindingsfragmenter av et hvilket som helst av ovennevnte som immunspesifikt binder til cancercelleantigener, virale antigener eller mikrobielle antigener, enkeltkjededede antistoffmolekyler og multispesifikke antistoffer dannet fra antistoffragmenter.

Betegnelsen "monoklonalt antistoff" betyr som anvendt heri et antistoff oppnådd fra en populasjon av i det vesentlige homogene antistoffer, dvs. at de enkelte antistoffene omfattende populasjonen er identiske med unntak av mulige naturlig forekommende mutasjoner som kan være til stede i mindre mengder. Monoklonale antistoffer er svært spesifikke, idet de rettes mot et enkelt antigensted. I motsetning til polyklonale antistoffremstillinger som inkluderer forskjellige antistoffer rettet mot forskjellige determinanter (epitoper), er hvert monoklonalt antistoff videre rettet mot en enkelt determinant på antigenet. I tillegg til deres spesifisitet er de monoklonale antistoffene fordelaktige fordi de kan syntetiseres ukontaminert av andre antistoffer. Adjektivet "monoklonal" angir antistoffets karakter som å være oppnådd fra en i det vesentlige homogen populasjon av antistoffer, og skal ikke tolkes som om det krever produksjon av antistoffet ved noen særlig fremgangsmåte. For eksempel kan de monoklonale antistoffene som skal anvendes i henhold til foreliggende oppfinnelsen, fremstilles ved hybridomfremgangsmåten først beskrevet av Kohler et al (1975) Nature 256:495, eller fremstilles ved rekombinante DNA fremgangsmåter (se US 4816567). De monoklonale antistoffene kan også isoleres fra fagantistoffbiblioteker ved hjelp av teknikkene beskrevet i Clackson et al (1991) Nature, 352:624-628; Marks et al (1991) J. Mol. Biol., 222:581-597.

De monoklonale antistoffer heri inkluderer spesifikt "kimære" antistoffer hvori en del av den tunge og/eller lette kjeden er identisk med eller homolog med tilsvarende sekvenser i antistoffer avledet fra en særlig teknikk eller tilhørende en særlig antistoffklasse eller -underklasse, mens resten av kjedene er identisk eller homolog med tilsvarende sekvenser i antistoffer avledet fra en annen teknikk eller tilhørende en annen antistoffklasse eller -underklasse, samt fragmenter av slike antistoffer, så lenge de viser ønsket biologisk aktivitet (US 4 816, 567, Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855). Kimære antistoffer inkluderer "primatiserte" antistoffer omfattende antigenbindingssekvenser med variable domener avledet av en ikke-human primat (f.eks. dyreape eller menneskeape), og humane regioner med konstante regioner.

Et "intakt antistoff" heri er ett omfattende VL- og VH-domener, samt en lettkjedes konstante domene (CL) og en tungkjedes konstante domener, CH1, CH2 og CH3. De konstante domenene kan være konstante domener med nativ sekvens (f.eks. konstante domener med human nativ sekvens) eller aminosyresekvensvariant derav. Det intakte antistoffet kan ha én eller flere "effektorfunksjoner" som henviser til de biologiske aktivitetene som kan tilskrives Fc-regionen (en Fc-region med nativ sekvens eller en Fc-region med aminosyresekvensvariant) i et antistoff. Eksempler på antistoffeffektorfunksjoner inkluderer CIq-binding og komplementavhengig cytotoxicitet, Fc-reseptorbinding, antistoffavhengig cellemediert cytotoxicitet (ADCC), fagocytose og nedregulering av celleoverflateresptorer slik som B-celleresptor og BCR.

Avhengig av aminosyresekvensen i det konstante domenet på deres tunge kjeder kan intakte antistoffer tilordnes til forskjellige klasser. Det er fem store klasser av intakte antistoffer: IgA, IgD, IgE, IgG og IgM, og flere av disse kan ytterligere deles i "underklasser" (isotyper), f.eks. IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA og IgA2. Tungkjedens konstante domener som tilsvarer de forskjellige antistoffklassene, kalles henholdsvis  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  og  $\mu$ . Underenhetsstrukturene og de tredimensjonale konfigurasjonene av forskjellige immunoglobulinklasser er velkjent.

Eksempler på cellebindemidler inkluderer midlene beskrevet til anvendelse i WO 2007/085930.

Cellebindemiddelet kan være et syklisk polypeptid. Cellebindemiddelet kan være antistoff. I én utførelsesform tilveiebringer den foreliggende oppfinnelsen således et antistoff-legemiddel-konjugat (ADC).

## 5 **Legemiddelmengde**

Legemiddelmengden er det gjennomsnittlige antallet av PBD-legemidler per antistoff. Legemiddelmengden kan være fra 1 til 8 legemidler (D) per antistoff (Ab), dvs. hvor 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 og 8 legemiddelenheter er kovalent bundet til antistoffet. Sammensetninger av ADC inkluderer samlinger av antistoffer konjugert med en rekke legemidler, fra 1 til 8. Det gjennomsnittlige antallet av legemidler per antistoff i fremstillinger av ADC fra konjugeringsreaksjoner kan karakteriseres ved konvensjonelle midler slik som massespektroskopi, ELISA-assay, elektroforese og HPLC. Den kvantitative fordelingen av ADC med hensyn til p kan også bestemmes. Ved ELISA kan den gjennomsnittlige verdien for p i en særlig fremstilling av ADC bestemmes (Hamblett et al (2004) Clin. Cancer Res. 10:7063-7070, Sanderson et al (2005) Clin. Cancer Res. 11:843-852). Fordelingen av p-verdier (legemiddelverdier) bestemmes imidlertid ikke ved antistoff-antigen-bindingen og detekteringsbegrensningen av ELISA. ELISA-assay for detektering av antistoff-legemiddel-konjugater bestemmer heller ikke hvor legemiddelenhetene er bundet til antistoffet, slik som tungkjede- eller lett kjedefragmentene, eller de særlige aminosyrerestene. I noen tilfeller kan separasjon, rensing og karakterisering av homogent ADC, hvor p er en bestemt verdi fra ADC med andre legemidler, oppnås ved hjelp av HPLC med omvendt fase eller elektroforese.

For noen antistoff-legemiddel-konjugater kan p begrenses av antallet bindingssteder på antistoffet. Et antistoff kan for eksempel bare ha én eller flere cysteintiolgrupper, eller kan bare ha én eller flere tilstrekkelig reaktive tiolgrupper gjennom hvilke en linker kan bindes. Større legemiddelmengder, f.eks.  $p > 5$ , kan forårsake aggregering, uoppløselighet, toksisitet eller tap av cellulær permabilitet for visse antistoff-legemiddel-konjugater.

Det konjugeres typisk færre enn det teoretisk høyeste antallet legemiddelenheter til et antistoff under en konjugeringsreaksjon. Et antistoff kan for eksempel inneholde mange lysinenheter som ikke reagerer med

legemiddellinkermellomproduktet (D-L) eller linkerreagenser. Bare de mest reaktive lysinggruppene kan reagere med et aminreaktivt linkerreagens. Bare de mest reaktive cysteintiolgruppene kan også omsettes med et tiolreaktivt linkerreagens. Antistoffer inneholder generelt ikke mange, om noen, frie og reaktive cysteintiolgrupper som kan bindes til en legemiddelenhet. De fleste cysteintiolrestene i forbindelsenes antistoffer finnes som disulfidbroer og må reduseres med et reduksjonsmiddel slik som ditionitritol (DTT) eller TCEP, under partielle eller totale reduksjonsbetingelser. Mengden (legemiddel/antistoffforhold) av et ADC kan kontrolleres på flere forskjellige måter, inkludert: i) begrensning av moloverskuddet for legemiddellinkermellomproduktet (D-L) eller linkerreagens i forhold til antistoff, ii) begrensning av konjugeringsreaksjonstiden eller -temperaturen og iii) delvis eller begrensende reduktive forhold for cysteintiolmodifikasjon.

Cysteinaminosyrer kan konstrueres ved reaktive steder i et antistoff og som ikke danner intrakjeder eller intermolekulære disulfidbindinger (Junutula, et al., 2008b Nature Biotech., 26(8):925–932, Dornan et al (2009) Blood 114(13):2721–2729, US 7521541, US 7723485, WO2009/052249). De konstruerte cysteintiolene kan omsettes med linkerreagenser eller legemiddellinkerreagenser ifølge den foreliggende oppfinnelsen som har tiolreaktive, elektrofile grupper slik som maleimid- eller alfa-haloamider for å danne ADC med cysteinkonstruerte antistoffer og tPBD-legemiddelenhetene. Legemiddelenhetens posisjon kan således være konstruert, kontrollert og kjent. Legemiddelmengden kan kontrolleres siden de konstruerte cysteintiolgruppene typisk omsettes med tiolreaktive linkerreagenser eller legemiddellinkerreagenser i høyt utbytte. Konstruksjon av et IgG-antistoff for å introdusere en cysteinaminosyre ved substitusjon på et enkelt sted på den tunge eller lette kjeden gir to nye cysteiner på det symmetriske antistoffet. En legemiddelmengde nær 2 kan oppnås, og det samme kan nesten homogeneitet av konjugeringsproduktet ADC.

Hvis mer enn én nukleofil eller elektrofil gruppe av antistoffet reagerer med et legemiddellinkermellomprodukt eller linkerreagens etterfulgt av legemiddelenhetreagens, er det resulterende produktet en blanding av ADC-forbindelser med en fordeling av legemiddelenheter bundet til et antistoff, f.eks. 1, 2, 3 osv. Væskekromatografifremgangsmåter slik som polymer omvendt fase (PLRP) og hydrofob interaksjon (HIC) kan skille forbindelser i blandingen ved



legemiddelmengdeverdi. Fremstillinger av ADC med en enkelt legemiddelmengdeverdi (p) kan isoleres, men disse ADC-ene med enkelt mengdeverdi kan fortsatt være heterogene blandinger siden legemiddelenhetene kan være bundet, via linkeren, på forskjellige steder på antistoffet.

5

Antistoff-legemiddel-konjugatets sammensetninger ifølge oppfinnelsen inkluderer således blandinger av antistoff-legemiddel-konjugatforbindelser hvor antistoffet har én eller flere PBD-legemiddelenheter, og hvor legemiddelenhetene kan være bundet til antistoffet ved forskjellige aminosyrerester.

10

I én utførelsesform er det gjennomsnittlige antallet av monomere eller dimere pyrrolbenzodiazepingrupper per cellebindemiddel i området 1 til 20. I noen utførelsesformer er området valgt fra 1 til 8, 2 til 8, 2 til 6, 2 til 4 og 4 til 8.

15

I noen utførelsesformer er det én dimer pyrrolbenzodiazepingruppe per cellebindemiddel.

### ***Peptider***

20

I én utførelsesform er cellebindemiddelet et syklopeptid omfattende 4–20, foretrukket 6–20, tilgrensende aminosyrerester. I denne utførelsesformen er det foretrukket at ett cellebindemiddel er bundet til én dimer pyrrolbenzodiazepinforbindelse.

25

I én utførelsesform omfatter cellebindemiddelet et peptid som binder integrin  $\alpha_v\beta_6$ . Peptidet kan være selektivt for  $\alpha_v\beta_6$  over XYS.

30

I én utførelsesform omfatter cellebindemiddelet A20FMDV-Cys-polypeptidet. A20FMDV-Cys har sekvensen: NAVPNLRGDLQVLAQKVARTC. Det kan alternativt anvendes en variant av A20FMDV-Cys-sekvensen hvori én, to, tre, fire, fem, seks, sju, åtte, ni eller ti aminosyrerester substitueres med en annen aminosyrerest.

35

I én utførelsesform er antistoffet et monoklonalt antistoff, kimært antistoff, humanisert antistoff, fullstendig humant antistoff eller et enkeltkjedet antistoff. I én utførelsesform er antistoffet et fragment av ett av disse antistoffene som har

biologisk aktivitet. Eksempler på slike fragmenter inkluderer Fab-, Fab'-, F(ab')<sub>2</sub>- og Fv-fragmenter.

5 I disse utførelsesformene kan hvert antistoff være bundet til én eller flere dimere pyrrolbenzodiazepingrupper. Det foretrukne forholdet mellom pyrrolbenzodiazepin og cellebindemiddel er gitt ovenfor.

Antistoffet kan være et domeneantistoff (DAB).

10 I én utførelsesform er antistoffet et monoklonalt antistoff.

Antistoffer til anvendelse i den foreliggende oppfinnelsen inkluderer antistoffene beskrevet i WO 2005/082023. Særlig foretrukket er antistoffene for tumorassosierte antigener. Eksempler på antigenene som er kjent i teknikken, 15 inkluderer, men er ikke begrenset til, de tumorassosierte antigenene beskrevet i WO 2005/082023. Se for eksempel side 41–55.

Konjugatene ifølge oppfinnelsen er konstruert for å målrette tumorceller via deres celleoverflateantigener. Antigenene er vanligvis normale 20 celleoverflateantigener som enten er overuttrykt eller uttrykt på unormale tidspunkt. Ideelt sett uttrykkes bare målantigen på proliferative celler (foretrukket tumorceller), men dette er sjelden observert i praksis. Målantigenene velges følgelig vanligvis på grunnlag av differensialekspresjon mellom proliferativt og friskt vev.

25 Antistoffer dyrkes for å målrette spesifikke tumorrelatert antigener, inkludert:

Cripto, CD30, CD19, CD33, glykoprotein NMB, CanAg, Her2 (ErbB2/Neu), CD56 (NCAM), CD22 (Siglec2), CD33 (Siglec3), CD79, CD138, PSCA, PSMA (prostataspesifikt membranantigen), BCMA, CD20, CD70, E-selektin, EphB2, 30 melanotransferin, Muc16 og TMEFF2.

Tumorassosierte antigener (TAA) er kjent i teknikken og kan fremstilles til anvendelse i generering av antistoffer ved hjelp av fremgangsmåter og 35 informasjon som er velkjent i teknikken. 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.

Eksempler på TAA inkluderer, men er ikke begrenset til, TAA (1)-(36) angitt nedenfor. For enkelhets skyld er informasjon forbundet med disse antigenene, hvor alle er kjent i teknikken, angitt nedenfor og inkluderer navn, alternative navn, Genbank-aksesjonsnummer og primære referanser, i samsvar med nukleinsyre- og proteinsekvensidentifikasjonskonvensjoner fra National Center for Biotechnology Information (NCBI). Nukleinsyre- og proteinsekvenser tilsvarende TAA (1)-(36) er tilgjengelige i offentlige databaser slik som GenBank. Tumorassosierte antigener målrettet av antistoffer inkluderer alle aminosyresekvensvarianter og isoformer som innehar minst ca. 70 %, 80 %, 85 %, 90 % eller 95 % sekvensidentitet i forhold til sekvensene identifisert i de anførte publikasjonene, eller som i det vesentlige viser samme biologiske egenskaper eller karakteristikk som en TAA som har en sekvens funnet i de anførte publikasjonene. En TAA som har en variantsekvens, er for eksempel generelt i stand til å binde spesifikt til et antistoff som binder spesifikt til TAA-er med den tilsvarende angitte sekvensen. Sekvensene og beskrivelsen i henvisningen spesifikt anført heri skal uttrykkelig anses som opptatt heri.

#### 25 TUMORASSOSIERTE ANTIGENER (1)-(36):

(1) BMPR1B (benmorfogenetisk proteinreseptortype IB, genbank-akseksjonsnr. NM\_001203)ten Dijke,P., et al Science 264 (5155):101-104 (1994), Oncogene 14 (11):1377-1382 (1997)); WO2004/063362 (krav 2); WO2003/042661 (krav 12); US2003/134790-A1 (side 38-39); WO2002/102235 (krav 13, side 296); WO2003/055443 (side 91-92); WO2002/99122 (eksempel 2, side 528-530); WO2003/029421 (krav 6); WO2003/024392 (krav 2, fig. 112); WO2002/98358 (krav 1, side 183); WO2002/54940 (side 100-101); WO2002/59377(side 349-350); WO2002/30268 (krav 27, side 376); WO2001/4820 (eksempel, fig. 4); NP\_001194 benmorfogenetisk protein reseptor, type IB /pid=NP\_001194,1. Krysshenvisninger: MIM:603248; NP\_001194,1; AY065994

(2) E16 (LAT1, SLC7A5, genbank-akseksjonsnr. NM\_003486) Biochem. Biophys. Res. Commun. 255 (2), 283-288 (1999), Nature 395 (6699):288-291 (1998),

Gaugitsch, H.W., et al (1992) J. Biol. Chem. 267 (16):11267-11273); WO2004/048938 (eksempel 2); WO2004/032842 (eksempel IV); WO2003/042661 (krav 12); WO2003/016475 (krav 1); WO2002/78524 (eksempel 2); WO2002/99074 (krav 19, side 127-129); WO2002/86443 (krav 27, side 222, 393); WO2003/003906 (krav 10, side bibb1293); WO2002/64798 (krav 33, side 93-95); WO2000/14228 (krav 5, side 133-136); US2003/224454 (fig. 3);

WO2003/025138 (krav 12, side 150); NP\_003477 familie for bærestoffer av oppløst stoff 7 (kationisk aminosyre transporter,  $\gamma$ -system), komponent 5 /pid=NP\_003477,3 - Homo sapiens; krysshenvvisninger: MIM:600182; NP\_003477,3; NM\_015923; NM\_003486\_1

(3) STEAP1 (seks transmembrant epitelantigen av prostata, genbank-akseksjonsnr. NM\_012449); Cancer Res. 61 (15), 5857-5860 (2001), Hubert, R.S., et al (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96 (25):14523-14528); WO2004/065577 (krav 6); WO2004/027049 (fig. 1L); EP1394274 (eksempel 11); WO2004/016225 (krav 2); WO2003/042661 (krav 12); US2003/157089 (eksempel 5); US2003/185830 (eksempel 5); US2003/064397 (fig. 2); WO2002/89747 (eksempel 5, side 618-619); WO2003/022995 (eksempel 9, fig. 13A, Eksempel 53, side 173, Eksempel 2, fig. 2A); NP\_036581 seks transmembrant epitelantigen av prostata; krysshenvvisninger: MIM:604415; NP\_036581,1; NM\_012449\_1

(4) 0772P (CA125, MUC16, genbank-akseksjonsnr. AF361486); J. Biol. Chem. 276 (29):27371-27375 (2001)); WO2004/045553 (krav 14); WO2002/92836 (krav 6, fig. 12); WO2002/83866 (krav 15, side 116-121); US2003/124140 (eksempel 16); krysshenvvisninger: GI:34501467; AAK74120,3; AF361486\_1

(5) MPF (MPF, MSLN, SMR, megakaryocyttopotensieringsfaktor, mesotelin, genbank-akseksjonsnr. NM\_005823) Yamaguchi, N., et al Biol. Chem. 269 (2), 805-808 (1994), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96 (20):11531-11536 (1999), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93 (1):136-140 (1996), J. Biol. Chem. 270 (37):21984-21990 (1995)); WO2003/101283 (krav 14); (WO2002/102235 (krav 13, side 287-288); WO2002/101075 (krav 4, side 308-309); WO2002/71928 (side 320-321); WO94/10312 (side 52-57); krysshenvvisninger: MIM:601051; NP\_005814,2; NM\_005823\_1

(6) Napi3b (NAPI-3B, NPTIIb, SLC34A2, familie for bærestoffer av oppløst stoff 34 (natriumfosfat), komponent 2, type II natriumavhengig fosfattransportør 3b, genbank-akseksjonsnr. NMR\_006424) J. Biol. Chem. 277 (22):19665-19672

- (2002), *Genomics* 62 (2):281-284 (1999), Feild, J.A., et al (1999) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 258 (3):578-582); WO2004/022778 (krav 2); EP1394274 (eksempel 11); WO2002/102235 (krav 13, side 326); EP0875569 (krav 1, side 17-19); WO2001/57188 (krav 20, side 329); WO2004/032842 (eksempel IV); WO2001/75177 (krav 24, side 139-140); krysshenvisninger: MIM:604217; NP\_006415,1; NM\_006424\_1
- (7) Sema 5b (FLJ10372, KIAA1445, Mm,42015, SEMA5B, SEMAG, Semaphorin 5b Hlog, semadomene, sju trombospondinrepetisjoner (type 1 og type 1-like), transmembrant domene (TM) og kort cytoplasmisk domene, (semaforin) 5B, genbank-akseksjonsnr. AB040878); Nagase T., et al (2000) *DNA Res.* 7 (2):143-150); WO2004/000997 (krav 1); WO2003/003984 (krav 1); WO2002/06339 (krav 1, side 50); WO2001/88133 (krav 1, side 41-43, 48-58); WO2003/054152 (krav 20); WO2003/101400 (krav 11), aksesjon: Q9P283; EMBL; AB040878; BAA95969,1. Genew; HGNC:10737
- (8) PSCA hlg (2700050C12Rik, C530008O16Rik, RIKEN cDNA 2700050C12, RIKEN cDNA 2700050C12 gen, genbank-akseksjonsnr. AY358628); Ross et al (2002) *Cancer Res.* 62:2546-2553; US2003/129192 (krav 2); US2004/044180 (krav 12); US2004/044179 (krav 11); US2003/096961 (krav 11); US2003/232056 (eksempel 5); WO2003/105758 (krav 12); US2003/206918 (eksempel 5); EP1347046 (krav 1); WO2003/025148 (krav 20); krysshenvisninger: GI:37182378; AAQ88991,1; AY358628\_1
- (9) ETBR (Endothelin type B reseptor, genbank-akseksjonsnr. AY275463); Nakamuta M., et al *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 177, 34-39, 1991; Ogawa Y., et al *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 178, 248-255, 1991; Arai H., et al *Jpn. Circ. J.* 56, 1303-1307, 1992; Arai H., et al *J. Biol. Chem.* 268, 3463-3470, 1993; Sakamoto A., Yanagisawa M., et al *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 178, 656-663, 1991; Elstimbegy N.A., et al *J. Biol. Chem.* 268, 3873-3879, 1993; Haendler B., et al *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 20, s1-S4, 1992; Tsutsumi M., et al *Gen* 228, 43-49, 1999; Strausberg R.L., et al *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 16899-16903, 2002; Bourgeois C., et al *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82, 3116-3123, 1997; Okamoto Y., et al *Biol. Chem.* 272, 21589-21596, 1997; Verheij J.B., et al *Am. J. Med. Genet.* 108, 223-225, 2002; Hofstra R.M.W., et al *Eur. J. Hum. Genet.* 5, 180-185, 1997; Puffenberger E.G. et al *Cell* 79, 1257-1266, 1994; Attie T., et al, *Hum. Mol. Genet.* 4, 2407-2409, 1995; Auricchio A., et al *Hum. Mol. Genet.* 5:351-354, 1996; Amiel J., et al *Hum. Mol. Genet.* 5, 355-357, 1996; Hofstra R.M.W., et al *Nat. Genet.* 12, 445-447, 1996; Svensson P.J.,

- et al *Hum. Genet.* 103, 145-148, 1998; Fuchs S., et al *Mol. Med.* 7, 115-124, 2001; Pingault V., et al (2002) *Hum. Genet.* 111, 198-206; WO2004/045516 (krav 1); WO2004/048938 (eksempel 2); WO2004/040000 (krav 151); WO2003/087768 (krav 1); WO2003/016475 (krav 1); WO2003/016475 (krav 1);
- 5 WO2002/61087 (fig. 1); WO2003/016494 (fig. 6); WO2003/025138 (krav 12, side 144); WO2001/98351 (krav 1, side 124-125); EP0522868 (krav 8, fig. 2); WO2001/77172 (krav 1, side 297-299); US2003/109676; US6518404 (fig. 3); US5773223 (krav 1a; Col 31-34); WO2004/001004
- (10) MSG783 (RNF124, hypotetisk protein FLJ20315, genbank-akseksjonsnr. NM\_017763); WO2003/104275 (krav 1); WO2004/046342 (eksempel 2);
- 10 WO2003/042661 (krav 12); WO2003/083074 (krav 14, side 61); WO2003/018621 (krav 1); WO2003/024392 (krav 2, fig. 93); WO2001/66689 (eksempel 6); krysshenvisninger: LocusID:54894; NP\_060233,2; NM\_017763\_1
- (11) STEAP2 (HGNC\_8639, IPCA-1, PCANAP1, STAMP1, STEAP2, STMP, prostatakreft-assosiert gen 1, prostatakreft-assosiert protein 1, seks transmembran epitelantigen av prostata 2, seks transmembrant prostataprotein, genbank-akseksjonsnr. AF455138); *Lab. Invest.* 82 (11):1573-1582 (2002);
- 15 WO2003/087306; US2003/064397 (krav 1, fig. 1); WO2002/72596 (krav 13, side 54-55); WO2001/72962 (krav 1, fig. 4B); WO2003/104270 (krav 11);
- 20 WO2003/104270 (krav 16); US2004/005598 (krav 22); WO2003/042661 (krav 12); US2003/060612 (krav 12, fig. 10); WO2002/26822 (krav 23, fig. 2); WO2002/16429 (krav 12, fig. 10); krysshenvisninger: GI:22655488; AAN04080,1; AF455138\_1
- (12) TrpM4 (BR22450, FLJ20041, TRPM4, TRPM4B, transient reseptor potensiell kationekanal, underfamilie M, komponent 4, genbank-akseksjonsnr. NM\_017636); Xu, X.Z., et al *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98 (19):10692-10697 (2001), *celle* 109 (3):397-407 (2002), *J. Biol. Chem.* 278 (33):30813-30820 (2003); US2003/143557 (krav 4); WO2000/40614 (krav 14, side 100-103);
- 25 WO2002/10382 (krav 1, fig. 9A); WO2003/042661 (krav 12); WO2002/30268 (krav 27, side 391); US2003/219806 (krav 4); WO2001/62794 (krav 14, fig. 1A-D); krysshenvisninger: MIM:606936; NP\_060106,2; NM\_017636\_1
- (13) CRIPTO (CR, CR1, CRGF, CRIPTO, TDGF1, teratokarsinom-avledet vekstfaktor, genbank-akseksjonsnr. NP\_003203 eller NMR\_003212); Ciccodicola, A., et al *EMBO J.* 8 (7):1987-1991 (1989), *Am. J. Hum. Genet.* 49 (3):555-565 (1991);
- 35 US2003/224411 (krav 1); WO2003/083041 (eksempel 1); WO2003/034984 (krav 12); WO2002/88170 (krav 2, side 52-53);

WO2003/024392 (krav 2, fig. 58); WO2002/16413 (krav 1, side 94-95, 105);  
 WO2002/22808 (krav 2, fig. 1); US5854399 (eksempel 2; Col 17-18);  
 US5792616 (fig. 2); krysshenvisninger: MIM:187395; NP\_003203,1;  
 NM\_003212\_1

5 (14) CD21 (CR2 (komplementær reseptor 2) eller C3DR (C3d/Epstein Barr-  
 virusreseptor) eller Hs,73792 Genbank-akseksjonsnr. M26004); Fujisaku et al  
 (1989) J. Biol. Chem. 264 (4):2118-2125); Weis J.J., et al J. Exp. Med. 167,  
 1047-1066, 1988; Moore M., et al Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84, 9194-9198,  
 1987; Barel M., et al Mol. Immunol. 35, 1025-1031, 1998; Weis J.J., et al Proc.  
 10 Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83, 5639-5643, 1986; Sinha S.K., et al (1993) J.  
 Immunol. 150, 5311-5320; WO2004/045520 (eksempel 4); US2004/005538  
 (eksempel 1); WO2003/062401 (krav 9); WO2004/045520 (eksempel 4);  
 WO91/02536 (fig. 9,1-9,9); WO2004/020595 (krav 1), aksesjon: P20023;  
 Q13866; Q14212; EMBL; M26004; AAA35786,1.

15 (15) CD79b (CD79B, CD79 $\beta$ , Igb (immunoglobulin-assosiert beta), B29,  
 genbank-akseksjonsnr. NM\_000626 eller 11038674); Proc. Natl. Acad. Sci.  
 U.S.A. (2003) 100 (7):4126-4131, Blood (2002) 100 (9):3068-3076, Muller et al  
 (1992) Eur. J. Immunol. 22 (6):1621-1625); WO2004/016225 (krav 2, Fig 140);  
 WO2003/087768, US2004/101874 (krav 1, side 102); WO2003/062401 (krav  
 20 9); WO2002/78524 (eksempel 2); US2002/150573 (krav 5, side 15);  
 US5644033; WO2003/048202 (krav 1, sider 306 og 309); WO 99/58658,  
 US6534482 (krav 13, Fig 17A/B); WO2000/55351 (krav 11, sider 1145-1146);  
 krysshenvisninger: MIM:147245; NP\_000617,1; NM\_000626\_1

(16) FcRH2 (IFGP4, IRTA4, SPAP1A (SH2 domene inneholdende  
 25 fosfataseankerprotein 1a), SPAP1B, SPAP1C, genbank-akseksjonsnr.  
 NM\_030764, AY358130); Genome Res. 13 (10):2265-2270 (2003),  
 Immunogenetics 54 (2):87-95 (2002), Blood 99 (8):2662-2669 (2002), Proc.  
 Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98 (17):9772-9777 (2001), Xu, M.J., et al (2001)  
 Biochem. Biophys. Res. Commun. 280 (3):768-775; WO2004/016225 (krav 2);  
 30 WO2003/077836; WO2001/38490 (krav 5, fig. 18D-1-18D-2); WO2003/097803  
 (krav 12); WO2003/089624 (krav 25); krysshenvisninger: MIM:606509;  
 NP\_110391,2; NM\_030764\_1

(17) HER2 (ErbB2, genbank-akseksjonsnr. M11730); Coussens L., et al Science  
 (1985) 230(4730):1132-1139); Yamamoto T., et al Nature 319, 230-234, 1986;  
 35 Semba K., et al Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82, 6497-6501, 1985; Swiercz J.M.,  
 et al J. Cell Biol. 165, 869-880, 2004; Kuhns J.J., et al J. Biol. Chem. 274,

- 36422-36427, 1999; Cho H.-S., et al *Nature* 421, 756-760, 2003; Ehsani A., et al (1993) *Genomics* 15, 426-429; WO2004/048938 (eksempel 2); WO2004/027049 (fig. 1I); WO2004/009622; WO2003/081210; WO2003/089904 (krav 9); WO2003/016475 (krav 1); US2003/118592; WO2003/008537 (krav 1); WO2003/055439 (krav 29, fig. 1A-B); WO2003/025228 (krav 37, fig. 5C); WO2002/22636 (eksempel 13, side 95-107); WO2002/12341 (krav 68, fig. 7); WO2002/13847 (side 71-74); WO2002/14503 (side 114-117); WO2001/53463 (krav 2, side 41-46); WO2001/41787 (side 15); WO2000/44899 (krav 52, fig. 7); WO2000/20579 (krav 3, fig. 2); US5869445 (krav 3; kol. 31-38); WO9630514 (krav 2, side 56-61); EP1439393 (krav 7); WO2004/043361 (krav 7); WO2004/022709; WO2001/00244 (eksempel 3, fig. 4); aksesjon: P04626; EMBL; M11767; AAA35808,1. EMBL; M11761; AAA35808,1
- (18) NCA (CEACAM6, genbank-akseksjonsnr. M18728); Barnett T., et al *Genomics* 3, 59-66, 1988; Tawaragi Y., et al *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 150, 89-96, 1988; Strausberg R.L., et al *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99:16899-16903, 2002; WO2004/063709; EP1439393 (krav 7); WO2004/044178 (eksempel 4); WO2004/031238; WO2003/042661 (krav 12); WO2002/78524 (eksempel 2); WO2002/86443 (krav 27, side 427); WO2002/60317 (krav 2), aksesjon: P40199; Q14920; EMBL; M29541; AAA59915,1. EMBL; M18728
- (19) MDP (DPEP1, genbank-akseksjonsnr. BC017023); *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99 (26):16899-16903 (2002)); WO2003/016475 (krav 1); WO2002/64798 (krav 33, side 85-87); JP05003790 (fig. 6-8); WO99/46284 (fig. 9); krysshenvvisninger: MIM:179780; AAH17023,1; BC017023\_1
- (20) IL20R $\alpha$  (IL20Ra, ZCYTOR7, genbank-akseksjonsnr. AF184971); Clark H.F., et al *Genome Res.* 13, 2265-2270, 2003; Mungall A.J., et al *Nature* 425, 805-811, 2003; Blumberg H., et al *Cell* 104, 9-19, 2001; Dumoutier L., et al *J. Immunol.* 167, 3545-3549, 2001; Parrish-Novak J., et al *J. Biol. Chem.* 277, 47517-47523, 2002; Pletnev S., et al (2003) *Biochemistry* 42:12617-12624; Sheikh F., et al (2004) *J. Immunol.* 172, 2006-2010; EP1394274 (eksempel 11); US2004/005320 (eksempel 5); WO2003/029262 (side 74-75); WO2003/002717 (krav 2, side 63); WO2002/22153 (side 45-47); US2002/042366 (side 20-21); WO2001/46261 (side 57-59); WO2001/46232 (side 63-65); WO98/37193 (krav 1, side 55-59), aksesjon: Q9UHF4; Q6UWA9; Q96SH8; EMBL; AF184971; AAF01320,1.
- (21) Brevican (BCAN, BEHAB, genbank-akseksjonsnr. AF229053); Gary S.C., et al *Gen* 256, 139-147, 2000; Clark H.F., et al *Genome Res.* 13, 2265-2270,



- 2003; Strausberg R.L., et al Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99, 16899-16903, 2002; US2003/186372 (krav 11); US2003/186373 (krav 11); US2003/119131 (krav 1, fig. 52); US2003/119122 (krav 1, fig. 52); US2003/119126 (krav 1); US2003/119121 (krav 1, fig. 52); US2003/119129 (krav 1); US2003/119130 (krav 1); US2003/119128 (krav 1, fig. 52); US2003/119125 (krav 1); WO2003/016475 (krav 1); WO2002/02634 (krav 1)
- (22) EphB2R (DRT, ERK, Hek5, EPHT3, Tyro5, genbank-akseksjonsnr. NM\_004442); Chan, J. og Watt, V.M., Oncogene 6 (6), 1057-1061 (1991) Oncogene 10 (5):897-905 (1995), Annu. Rev. Neurosci. 21:309-345 (1998), Int. Rev. Cytol. 196:177-244 (2000)); WO2003042661 (krav 12); WO200053216 (krav 1, side 41); WO2004065576 (krav 1); WO2004020583 (krav 9); WO2003004529 (side 128-132); WO200053216 (krav 1, side 42); krysshenvvisninger: MIM:600997; NP\_004433,2; NM\_004442\_1
- (23) ASLG659 (B7h, genbank-akseksjonsnr. AX092328); US2004/0101899 (krav 2); WO2003104399 (krav 11); WO2004000221 (fig. 3); US2003/165504 (krav 1); US2003/124140 (eksempel 2); US2003/065143 (fig. 60); WO2002/102235 (krav 13, side 299); US2003/091580 (eksempel 2); WO2002/10187 (krav 6, fig. 10); WO2001/94641 (krav 12, fig. 7b); WO2002/02624 (krav 13, fig. 1A-1B); US2002/034749 (krav 54, side 45-46); WO2002/06317 (eksempel 2, side 320-321, Krav 34, side 321-322); WO2002/71928 (side 468-469); WO2002/02587 (eksempel 1, fig. 1); WO2001/40269 (eksempel 3, side 190-192); WO2000/36107 (eksempel 2, side 205-207); WO2004/053079 (krav 12); WO2003/004989 (krav 1); WO2002/71928 (side 233-234, 452-453); WO 01/16318
- (24) PSCA (Prostata stamcelleantigenforløper, genbank-akseksjonsnr. AJ297436); Reiter R.E., et al Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95, 1735-1740, 1998; Gu Z., et al Oncogene 19, 1288-1296, 2000; Biochem. Biophys. Res. Commun. (2000) 275(3):783-788; WO2004/022709; EP1394274 (eksempel 11); US2004/018553 (krav 17); WO2003/008537 (krav 1); WO2002/81646 (krav 1, side 164); WO2003/003906 (krav 10, side 288); WO2001/40309 (eksempel 1, fig. 17); US2001/055751 (eksempel 1, fig. 1b); WO2000/32752 (krav 18, fig. 1); WO98/51805 (krav 17, side 97); WO98/51824 (krav 10, side 94); WO98/40403 (krav 2, fig. 1B), aksesjon: 043653; EMBL; AF043498; AAC39607,1
- (25) GEDA (Genbank-akseksjonsnr. AY260763); AAP14954 lipoma HMGIC fusion-partner-like protein /pid=AAP14954,1 - Homo sapiens (human);

WO2003/054152 (krav 20); WO2003/000842 (krav 1); WO2003/023013 (eksempel 3, Krav 20); US2003/194704 (krav 45); krysshenvisninger: GI:30102449; AAP14954,1; AY260763\_1

5 (26) BAFF-R (B celleaktiveringsfaktorreseptor, BLyS-reseptor 3, BR3, genbank-akseksjonsnr. AF116456); BAFF reseptor /pid=NP\_443177,1 - Homo sapiens: Thompson, J.S., et al Science 293 (5537), 2108-2111 (2001); WO2004/058309; WO2004/011611; WO2003/045422 (eksempel, side 32-33); WO2003/014294 (krav 35, fig. 6B); WO2003/035846 (krav 70, side 615-616); WO2002/94852 (Col 136-137); WO2002/38766 (krav 3, side 133); WO2002/24909 (eksempel 3,  
10 fig. 3); krysshenvisninger: MIM:606269; NP\_443177,1; NMR\_052945\_1; AF132600

(27) CD22 (B-cellereseptor CD22-B isoform, BL-CAM, Lyb-8, Lyb8, SIGLEC-2, FLJ22814, genbank-akseksjonsnr. AK026467); Wilson et al (1991) J. Exp. Med. 173:137-146; WO2003/072036 (krav 1, fig. 1); krysshenvisninger:  
15 MIM:107266; NP\_001762,1; NM\_001771\_1

(28) CD79a (CD79A, CD79a, immunoglobulin-assosiert alfa, et B-cellespesifikt protein som interagerer kovalent med Ig beta (CD79B) og danner et kompleks på overflaten med Ig M-molekyler, transduserer et signal involvert i B-celledifferensiering), pl: 4,84, MW: 25028 TM: 2 [P] Genkromosom: 19q13,2, genbank-akseksjonsnr. NP\_001774,10); WO2003/088808, US2003/0228319; WO2003/062401 (krav 9); US2002/150573 (krav 4, sider 13-14); WO99/58658 (krav 13, Fig 16); WO92/07574 (fig. 1); US5644033; Ha et al (1992) J. Immunol. 148(5):1526-1531; Müller et al (1992) Eur. J. Immunol.. 22:1621-1625; Hashimoto et al (1994) Immunogenetics 40(4):287-295; Preud'homme et al (1992) Clin. Exp. Immunol. 90(1):141-146; Yu et al (1992) J. Immunol. 148(2) 633-637; Sakaguchi et al (1988) EMBO J. 7(11):3457-3464  
20  
25

(29) CXCR5 (Burkitt's lymfomreseptor 1, en G proteinkoblet reseptor som aktiveres ved CXCL13-kjemokin, fungerer i lymfocyttmigrering og humoralt forsvar, spiller en rolle i HIV-2-infeksjon og kanskje utvikling av AIDS, lymfom, myelom og leukemi); 372 aa, pl: 8,54 MW: 41959 TM: 7 [P] Genkromosom: 11q23,3, genbank-akseksjonsnr. NP\_001707,1); WO2004/040000; WO2004/015426; US2003/105292 (eksempel 2); US6555339 (eksempel 2); WO2002/61087 (fig. 1); WO2001/57188 (krav 20, side 269); W02001/72830 (side 12-13); WO2000/22129 (eksempel 1, sider 152-153, Eksempel 2, sider 254-256); WO99/28468 (krav 1, side 38); US5440021 (eksempel 2, col 49-52);  
30  
35

WO94/28931 (side 56-58); WO92/17497 (krav 7, Fig 5); Dobner et al (1992) Eur. J. Immunol. 22:2795-2799; Barella et al (1995) Biochem. J. 309:773-779

(30) HLA-DOB (betaunderenhet av MHC-klasse II-molekyl (Ia-antigen) som binder peptider og presenterer dem for CD4+ T-lymfocytter); 273 aa, pl: 6,56, MW: 30820.TM: 1 [P] Genkromosom: 6p21,3, genbank-akseksjonsnr. NP\_002111,1); Tonnelle et al (1985) EMBO J. 4(11):2839-2847; Jonsson et al (1989) Immunogenetics 29(6):411-413; Beck et al (1992) J. Mol. Biol. 228:433-441; Strausberg et al (2002) Proc. Natl. Acad. Sci USA 99:16899-16903; Serenius et al (1987) J. Biol. Chem. 262:8759-8766; Beck et al (1996) J. Mol. Biol. 255:1-13; Naruse et al (2002) Tissue Antigens 59:512-519; WO99/58658 (krav 13, Fig 15); US6153408 (Col 35-38); US5976551 (col 168-170); US6011146 (col 145-146); Kasahara et al (1989) Immunogenetics 30(1):66-68; Larhammar et al (1985) J. Biol. Chem. 260(26):14111-14119

(31) P2X5 (purinergisk reseptor P2X ligand-gatet ion 5-kanal, en ionekanal gated av ekstracellulær ATP, kan være involvert i synaptisk transmisjon og nevrogenesene, mangel kan bidra til patofysiologien av idiopatisk detrusor-ustabilitet); 422 aa, pl: 7,63, MW: 47206 TM: 1 [P] Genkromosom: 17p13,3, genbank-akseksjonsnr. NP\_002552,2); Le et al (1997) FEBS Lett. 418(1-2):195-199; WO2004/047749; WO2003/072035 (krav 10); Touchman et al (2000) Genome Res. 10:165-173; WO2002/22660 (krav 20); WO2003/093444 (krav 1); WO2003/087768 (krav 1); WO2003/029277 (side 82)

(32) CD72 (B-celledifferensieringsantigen CD72, Lyb-2); 359 aa, pl: 8,66, MW: 40225, TM: 1 [P] Genkromosom: 9p13,3, genbank-akseksjonsnr. NP\_001773,1); WO2004042346 (krav 65); WO2003/026493 (side 51-52, 57-58); WO2000/75655 (side 105-106); Von Hoegen et al (1990) J. Immunol. 144(12):4870-4877; Strausberg et al (2002) Proc. Natl. Acad. Sci USA 99:16899-16903.

(33) LY64 (Lymphocyte antigen 64 (RP105), type I membran protein av leucine rich repeat (LRR)-familien, regulerer B-celleaktivering og apoptose, funksjonstap er assosiert med økt sykdomsaktivitet hos pasienter med systemisk lupus erythematosus); 661 aa, pl: 6,20, MW: 74147 TM: 1 [P] Genkromosom: 5q12, genbank-akseksjonsnr. NP\_005573,1); US2002/193567; WO97/07198 (krav 11, sider 39-42); Miura et al (1996) Genomics 38(3):299-304; Miura et al (1998) Blood 92:2815-2822; WO2003/083047; WO97/44452 (krav 8, sider 57-61); WO2000/12130 (side 24-26)

(34) FcRH1 (Fc-reseptorlignende protein 1, en antatt reseptor for immunoglobulin Fc-domene som inneholder C2 type Ig-lignende og ITAM-domener, kan spille en rolle i B-lymfocyttdifferensiering); 429 aa, pl: 5,28, MW: 46925 TM: 1 [P] Genkromosom: 1q21-1q22, genbank-akseksjonsnr. NP\_443170,1); WO2003/077836; WO2001/38490 (krav 6, Fig 18E-1-18-E-2); Davis et al (2001) Proc. Natl. Acad. Sci USA 98(17):9772-9777; WO2003/089624 (krav 8); EP1347046 (krav 1); WO2003/089624 (krav 7)

5

(35) IRTA2 (immunoglobulinsuperfamilie reseptortranslokasjonsassosiert 2, en antatt immunreseptor med mulige roller i B-celleutvikling og lymfomagenese; deregulering av genet ved translokasjon skjer i noen B-cellemaligniteter); 977 aa, pl: 6,88, MW: 106468, TM: 1 [P] Genkromosom: 1q21, genbank-akseksjonsnr. Human:AF343662, AF343663, AF343664, AF343665, AF369794, AF397453, AK090423, AK090475, AL834187, AY358085; Mouse:AK089756, AY158090, AY506558; NP\_112571,1; WO2003/024392 (krav 2, Fig 97); Nakayama et al (2000) Biochem. Biophys. Res. Commun. 277(1):124-127; WO2003/077836; WO2001/38490 (krav 3, Fig 18B-1-18B-2)

10

15

(36) TENB2 (TMEFF2, tomoregulin, TPEF, HPP1, TR, antatt transmembrant proteoglycan, knyttet til EGF/hereregulin-familien av vekstfaktorer og follistatin); 374 aa, NCBI-aksisjon: AAD55776, AAF91397, AAG49451, NCBI RefSeq: NP\_057276; NCBI Gen: 23671; OMIM: 605734; SwissProt Q9UIK5; Genbank-akseksjonsnr. AF179274; AY358907, CAF85723, CQ782436; WO2004/074320; JP2004113151; WO2003/042661; WO2003/009814; EP1295944 (side 69-70); WO2002/30268 (side 329); WO2001/90304; US2004/249130; US2004/022727; WO2004/063355; US2004/197325; US2003/232350; US2004/005563; US2003/124579; Horie et al (2000) Genomics 67:146-152; Uchida et al (1999) Biochem. Biophys. Res. Commun. 266:593-602; Liang et al (2000) Cancer Res. 60:4907-12; Glynn-Jones et al (2001) Int J Cancer. Oct 15; 94(2):178-84.

20

25

Morantistoffet kan også være et fusjonsprotein omfattende et albumin-bindende peptid (ABP)-sekvens (Dennis et al. (2002) "Albumin Binding As A General Strategy For Improving The Pharmacokinetics Of Proteins" J Biol Chem. 277:35035-35043; WO 01/45746). Antistoffer ifølge oppfinnelsen inkluderer fusjonsproteiner med ABP-sekvenser beskrevet ved: (i) Dennis et al (2002) J Biol Chem. 277:35035-35043 i tabell III og IV, side 35038; (ii) US

30

35

2004/0001827 at [0076]; og (iii) WO 01/45746 på side 12-13, hvor alle er opptatt heri.

5 I én utførelsesform dannes antistoffet for å rettes spesifikt inn mot det tumorrelaterte antigenet  $\alpha_v\beta_6$ .

Cellebindemiddelet er forbundet med linkeren. I én utførelsesform er cellebindemiddelet forbundet med A, hvis det er til stede, i linkeren.

10 I én utførelsesform er forbindelsen mellom cellebindemiddelet og linkeren gjennom en tioeterbinding.

I én utførelsesform er forbindelsen mellom cellebindemiddelet og linkeren gjennom en disulfidbinding.

15

I én utførelsesform er forbindelsen mellom cellebindemiddelet og linkeren gjennom en amidbinding.

20 I én utførelsesform er forbindelsen mellom cellebindemiddelet og linkeren gjennom en esterbinding.

I én utførelsesform dannes forbindelsen mellom cellebindemiddelet og linkeren mellom en tiolgruppe av en cysteinrest av cellebindemiddelet og en maleimidgruppe av linkeren.

25

Cysteinrestene av cellebindemiddelet kan være tilgjengelig for reaksjon med funksjonsgruppen av  $R^L$  for å danne en forbindelse. I andre utførelsesformer, for eksempel hvor cellebindemiddelet er et antistoff, kan tiolgruppene i antistoffet delta i interkjededisulfidbindinger. Disse interkjedebindingene kan omdannes til frie tiolgrupper ved f.eks. behandling av antistoffet med DTT før reaksjon med funksjonsgruppen av  $R^L$ .

30

Cellebindemiddelet kan være merket, for eksempel som hjelp til påvisning eller rensing av middelet enten før inkorporering som et konjugat, eller som del av konjugatet. Merkingen kan være en biotinmarkør. I en annen utførelsesform kan cellebindemiddelet være merket med en radioisotop.

35

*R og R'*

I én utførelsesform er R er uavhengig valgt fra eventuelt substituert C<sub>1-12</sub>-alkyl,

5 C<sub>3-20</sub> heterosyklid og C<sub>5-20</sub>-arylgrupper. Disse gruppene er hver definert i avsnittet med substituenten under.

I én utførelsesform er R uavhengig eventuelt substituert C<sub>1-12</sub>-alkyl.

10 I én utførelsesform er R uavhengig eventuelt substituert C<sub>3-20</sub>-heterosyklid.

I én utførelsesform er R uavhengig eventuelt substituert C<sub>5-20</sub>-aryl.

I én utførelsesform er R uavhengig eventuelt substituert C<sub>1-12</sub>-alkyl.

15

I tilknytning til R<sup>2</sup> er det ovenfor beskrevet ulike utførelsesformer knyttet til foretrukne alkyl- og arylgrupper og identiteten og antallet av eventuelle substituenten. Preferansene angitt for R<sup>2</sup> slik det gjelder for R, gjelder også, hvor det er passende, for alle andre grupper R, for eksempel hvor R<sup>6</sup>, R<sup>7</sup>, R<sup>8</sup> eller R<sup>9</sup> er R.

20

Preferansene for R gjelder også for R'.

I noen utførelsesformer av oppfinnelsen tilveiebringes det en forbindelse som har en substituentgruppe -NRR'. I én utførelsesform danner R og R', sammen med nitrogenatomet til hvilke de er bundet, en eventuelt substituert 4-, 5-, 6- eller 7-leddet heterosyklisk ring. Ringen kan inneholde et ytterligere heteroatom, for eksempel N, O eller S.

25

I én utførelsesform er den heterosykliske ringen selv substituert med en gruppe R. Hvis et ytterligere N-heteroatom er til stede, kan substituenten være på N-heteroatomet.

30

**R''**

35

R" er en C<sub>3-12</sub>-alkylengruppe, hvilken kjede kan være avbrutt av ett eller flere heteroatomer, f.eks. O, S, N(H), NMe og/eller aromatiske ringer, f.eks. benzen eller pyridin, hvilke ringer er eventuelt substituert.

5 I én utførelsesform er R" en C<sub>3-12</sub>-alkylengruppe, hvilken kjede kan være avbrutt av ett eller flere heteroatomer og/eller aromatiske ringer, f.eks. benzen eller pyridin.

10 I én utførelsesform er alkylengruppen eventuelt avbrutt av ett eller flere heteroatomer valgt fra O, S og NMe og/eller aromatiske ringer, hvilke ringer er eventuelt substituert.

15 I én utførelsesform er den aromatiske ringen en C<sub>5-20</sub> arylengruppe, hvor arylen vedrører en divalent enhet oppnådd ved fjerning av to hydrogenatomer fra to aromatiske ringatomer av en aromatisk forbindelse, hvilken enhet har fra 5 til 20 ringatomer.

20 I én utførelsesform er R" en C<sub>3-12</sub>-alkylengruppe, hvilken kjede kan være avbrutt av ett eller flere heteroatomer, f.eks. O, S, N(H), NMe og/eller aromatiske ringer, f.eks. benzen eller pyridin, hvilke ringer er eventuelt substituert med NH<sub>2</sub>.

I én utførelsesform er R" en C<sub>3-12</sub>-alkylengruppe.

25 I én utførelsesform er R" valgt fra en C<sub>3</sub>, C<sub>5</sub>, C<sub>7</sub>, C<sub>9</sub> og en C<sub>11</sub>-alkylengruppe.

I én utførelsesform er R" valgt fra en C<sub>3</sub>, C<sub>5</sub> og en C<sub>7</sub>-alkylengruppe.

30 I én utførelsesform er R" valgt fra en C<sub>3</sub> og en C<sub>5</sub>-alkylengruppe.

I én utførelsesform er R" en C<sub>3</sub>-alkylengruppe.

I én utførelsesform er R" en C<sub>5</sub>-alkylengruppe.

35 Alkylengruppene oppført over kan være eventuelt avbrutt av ett eller flere heteroatomer og/eller aromatiske ringer, f.eks. benzen eller pyridin, hvilke ringer er eventuelt substituert.

Alkylengruppene oppført over kan være eventuelt avbrutt av ett eller flere heteroatomer og/eller aromatiske ringer, f.eks. benzen eller pyridin.

- 5 Alkylengruppene oppført over kan være usubstituerte rettkjedede alifatiske alkylengrupper.

**X**

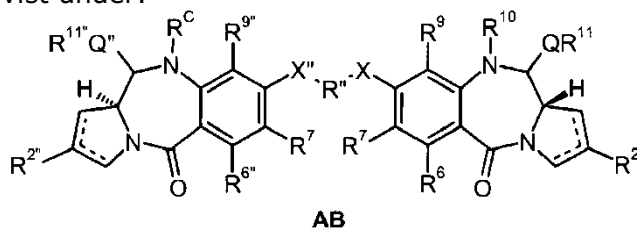
- 10 I én utførelsesform er X valgt fra O, S eller N(H).

Fortrinnsvis er X O.

### **Konjugater**

- 15

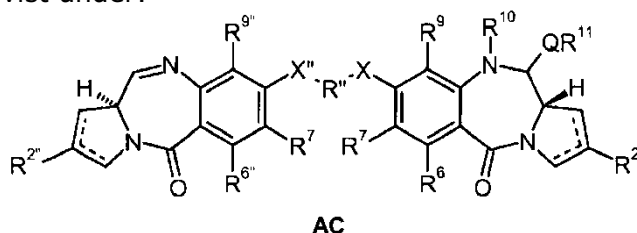
I én utførelsesform er konjugatet en dimer med forbindelsen som har strukturen vist under:



- 20 hvor  $R^{2''}$ ,  $R^{6''}$ ,  $R^{7''}$ ,  $R^{9''}$ ,  $X''$ ,  $Q''$  og  $R^{11''}$  er definert ifølge henholdsvis  $R^2$ ,  $R^6$ ,  $R^7$ ,  $R^9$ ,  $X$  og  $R^{11}$ , og  $R^C$  er en kapslende gruppe. I denne utførelsesformen er hver gruppe  $R^{10}$  en linker forbundet med et cellebindemiddel valgt fra et antistoff, et fragment av et antistoff som inneholder minst et bindingssted og et syklisk polypeptid.

- 25

I én utførelsesform er konjugatet en dimer med forbindelsen som har strukturen vist under:



hvor  $R^{2''}$ ,  $R^{6''}$ ,  $R^{7''}$ ,  $R^{9''}$ ,  $X''$  og  $R^{11''}$  og er som definert ifølge hhv.  $R^2$ ,  $R^6$ ,  $R^7$ ,  $R^9$ ,  $X$  og  $R^{11}$ ,



**Monomerforbindelser** **$R^C$ , kapslingsgruppe**

5

Konjugatet av det første aspektet av oppfinnelsen kan ha en kapslende gruppe  $R^C$  på N10-posisjonen.

10

Gruppen  $R^{10}$  kan fjernes fra PBD-enhetens N10-posisjon for å gi en N10-C11 iminbinding, et karbinolamin, et substituert karbinolamin, hvor  $QR^{11}$  er  $OSO_3M$ , en bisulfittaddukt, et tiokarbinolamin, et substituert tiokarbinolamin eller et substituert karbinalamin.

15

I én utførelsesform kan  $R^C$  være en beskyttelsesgruppe som kan fjernes for å etterlate en N10-C11-iminbinding, et karbinolamin, et substituert karbinolamin, eller, hvor  $QR^{11}$  er  $OSO_3M$ , et bisulfittaddukt. I én utførelsesform er  $R^C$  en beskyttelsesgruppe som kan fjernes for å etterlate en N10-C11-iminbinding.

20

Gruppen  $R^C$  er beregnet å være fjernbar under de samme betingelsenesom disse påkrevd for fjerningen av gruppen  $R^{10}$ , for eksempel for å gi en N10-C11 iminbinding, et karbinolamin og så videre. Kapslingsgruppen fungerer som en beskyttelsesgruppe for den tiltenkte funksjonaliteten på N10-posisjonen. Kapslingsgruppen er beregnet ikke å være reaktiv mot et cellebindemiddel.  $R^C$  er ikke den samme som  $R^L$ .

25

30

Forbindelser som har en kapslende gruppe kan anvendes som mellomprodukter i syntesen av dimerer som har en iminmonomer. Alternativt kan forbindelser som har en kapslende gruppe anvendes som konjugater, hvor den kapslende gruppen fjernes ved målposisjonen for å gi et imin, et karbinolamin, et substituert karbinolamin og så videre. Derfor kan den kapslende gruppen i denne utførelsesformen betegnes som en terapeutisk fjernbar nitrogenbeskyttelsesgruppe, som definert i oppfinnernes tidligere søknad WO 00/12507.

I én utførelsesform er gruppen  $R^C$  fjernbar under betingelsene som spalter linkerens  $R^L$  av gruppen  $R^{10}$ . Derfor er den kapslende gruppen i én utførelsesform spaltbar av virkningen av et enzym.

5 I en alternativ utførelsesform er den kapslende gruppen fjernbar før linkerens  $R^L$ s forbindelse med cellebindemiddelet. I denne utførelsesformen er den kapslende gruppen fjernbar under betingelser som ikke spalter linkerens  $R^L$ .

10 Hvis en forbindelse inkluderer en funksjonsgruppe  $G^1$  for å danne en forbindelse med cellebindemiddelet, er den kapslende gruppen fjernbar før tilsetningen eller avdekkingen av  $G^1$ .

15 Kapslingsgruppen kan anvendes som del av en beskyttelsesgruppestrategi for å sikre at bare én av monomerenhetene i en dimer er forbundet med et cellebindemiddel.

20 Kapslingsgruppen kan anvendes som en maskering for en N10-C11-iminbinding. Kapslingsgruppen kan fjernes på det tidspunktet hvor iminfunksjonaliteten er påkrevd i forbindelsen. Kapslingsgruppen er også en maskering for et karbinolamin, et substituert karbinolamin og et bisulfittaddukt, som beskrevet over.

25  $R^C$  kan være en N10 beskyttelsesgruppe, slik som gruppene beskrevet i oppfinnernes tidligere søknad, WO 00/12507. I én utførelsesform er  $R^C$  en terapeutisk fjernbar nitrogenbeskyttelsesgruppe, som definert i oppfinnernes tidligere søknad, WO 00/12507.

I én utførelsesform er  $R^C$  en karbamatbeskyttelsesgruppe.

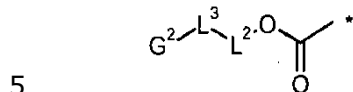
30 I én utførelsesform er karbamatbeskyttelsesgruppen er valgt fra:  
Alloc, Fmoc, Boc, Troc, Teoc, Psec, Cbz og PNZ.

35 Eventuelt, karbamatbeskyttelsesgruppen er ytterligere valgt fra Moc.

I én utførelsesform er  $R^C$  en linkergruppe  $R^L$  som mangler funksjonsgruppen for forbindelse med cellebindemiddelet.

Denne søknaden vedrører i særlig grad disse R<sup>C</sup>-gruppene som er karbamater.

I én utførelsesform er R<sup>C</sup> en gruppe:



hvor stjernen angir bindingspunktet til N10-posisjonen, G<sup>2</sup> er en avslutningsgruppe, L<sup>3</sup> er en kovalent binding eller en spaltbar linker L<sup>1</sup>, L<sup>2</sup> er en kovalent binding eller danner sammen med OC(=O) en selvimmolativ linker.

10 Hvor L<sup>3</sup> og L<sup>2</sup> begge er kovalente bindinger, danner G<sup>2</sup> og OC(=O) sammen en karbamatbeskyttelsesgruppe som definert over.

L<sup>1</sup> er som definert over i tilknytning til R<sup>10</sup>.

15 L<sup>2</sup> er som definert over i tilknytning til R<sup>10</sup>.

Ulike avslutningsgrupper er beskrevet under, inkludert de som er basert på velkjente beskyttelsesgrupper.

20 I én utførelsesform er L<sup>3</sup> en spaltbar linker L<sup>1</sup> og L<sup>2</sup> danner sammen med OC(=O) en selvimmolativ linker. I denne utførelsesformen er G<sup>2</sup> Ac (acetyl) eller Moc, eller en karbamatbeskyttelsesgruppe valgt fra:

Alloc, Fmoc, Boc, Troc, Teoc; Psec, Cbz og PNZ.

25

Eventuelt, karbamatbeskyttelsesgruppen er ytterligere valgt fra Moc.

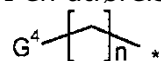
30 I en annen utførelsesform er G<sup>2</sup> en acylgruppe -C(=O)G<sup>3</sup>, hvor G<sup>3</sup> er valgt fra alkyl (inkludert sykloalkyl, alkenyl og alkynyl), heteroalkyl, heterosyklyl og aryl (inkludert heteroaryl og karboaryl). Disse gruppene kan være eventuelt substituert. Acylgruppen sammen med en aminogruppe av L<sup>3</sup> eller L<sup>2</sup>, hvor passende, kan danne en amidbinding. Acylgruppen sammen med en hydroksygruppe av L<sup>3</sup> eller L<sup>2</sup>, hvor passende, kan danne en esterbinding.

35 I én utførelsesform er G<sup>3</sup> heteroalkyl. Heteroalkylgruppen kan omfatte polyetylenglykol. Heteroalkylgruppen kan ha et heteroatom, slik som O eller N,

tilgrensende til acylgruppen, og danner derved karbamat eller karbonatgruppe, hvis det er or passende, med et heteroatom som er til stede i gruppen  $L^3$  eller  $L^2$ , hvor passende.

5 I én utførelsesform er  $G^3$  valgt fra  $NH_2$ ,  $NHR$  og  $NRR'$ . Fortrinnsvis er  $G^3$   $NRR'$ .

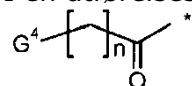
I én utførelsesform er  $G^2$  gruppen:



10 hvor stjernen angir bindingspunktet til  $L^3$ , n er 0 til 6 og  $G^4$  er valgt fra OH, OR, SH, SR, COOR,  $CONH_2$ , CONHR, CONRR',  $NH_2$ , NHR,  $NRR'$ ,  $NO_2$  og halo. Gruppene OH, SH,  $NH_2$  og NHR er beskyttet. I én utførelsesform er n 1 til 6, og fortrinnsvis er n 5. I én utførelsesform er  $G^4$  OR, SR, COOR,  $CONH_2$ , CONHR, CONRR' og  $NRR'$ . I én utførelsesform er  $G^4$  OR, SR og  $NRR'$ . Fortrinnsvis er  $G^4$  valgt fra OR og  $NRR'$ , mest fortrinnsvis  $G^4$  er OR. Mest fortrinnsvis er  $G^4$  OMe.

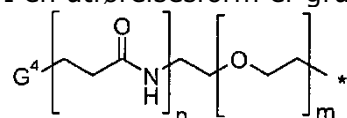
15

I én utførelsesform er gruppen  $G^2$ :



hvor stjernen angir bindingspunktet til  $L^3$ , og n og  $G^4$  er som definert over.

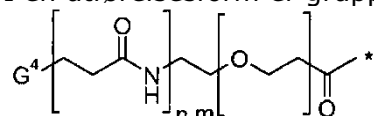
20 I én utførelsesform er gruppen  $G^2$ :



25 hvor stjernen angir bindingspunktet til  $L^3$ , n er 0 eller 1, m er 0 til 50 og  $G^4$  er valgt fra OH, OR, SH, SR, COOR,  $CONH_2$ , CONHR, CONRR',  $NH_2$ , NHR,  $NRR'$ ,  $NO_2$  og halo. I en foretrukket utførelsesform er n 1, og m er 0 til 10, 1 til 2, foretrukket 4 til 8 og mest foretrukket 4 eller 8. I en annen utførelsesform er n 1 og m er 10 til 50, fortrinnsvis 20 til 40. Gruppene OH, SH,  $NH_2$  og NHR er beskyttet. I én utførelsesform er  $G^4$  OR, SR, COOR,  $CONH_2$ , CONHR, CONRR' og  $NRR'$ . I én utførelsesform er  $G^4$  OR, SR og  $NRR'$ . Fortrinnsvis er  $G^4$  valgt fra OR og  $NRR'$ , mest fortrinnsvis  $G^4$  er OR. Fortrinnsvis er  $G^4$  OMe.

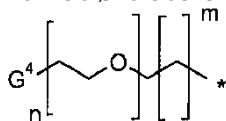
30

I én utførelsesform er gruppen  $G^2$ :



hvor stjernen angir bindingspunktet til  $L^3$  og n, m og  $G^4$  er som definert over.

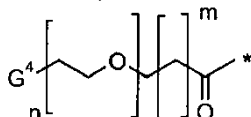
I én utførelsesform er gruppen  $G^2$ :



5 hvor  $n$  er 1-20,  $m$  er 0-6 og  $G^4$  er valgt fra OH, OR, SH, SR, COOR, CONH<sub>2</sub>, CONHR, CONRR', NH<sub>2</sub>, NHR, NRR', NO<sub>2</sub> og halo. I én utførelsesform er  $n$  1-10. I en annen utførelsesform er  $n$  10 til 50, fortrinnsvis 20 til 40. I én utførelsesform er  $n$  1. I én utførelsesform er  $m$  1. Gruppene OH, SH, NH<sub>2</sub> og NHR er beskyttet. I én utførelsesform er  $G^4$  OR, SR, COOR, CONH<sub>2</sub>, CONHR, CONRR' og NRR'. I én utførelsesform er  $G^4$  OR, SR og NRR'. Fortrinnsvis er  $G^4$  valgt fra OR og NRR', mest fortrinnsvis  $G^4$  er OR. Fortrinnsvis er  $G^4$  OMe.

10

I én utførelsesform er gruppen  $G^2$ :



15 hvor stjernen angir bindingspunktet til  $L^3$  og  $n$ ,  $m$  og  $G^4$  er som definert over.

I hver av utførelsesformene over kan  $G^4$  være OH, SH, NH<sub>2</sub> og NHR. Disse gruppene er fortrinnsvis beskyttet.

20 I én utførelsesform er OH beskyttet med Bzl, TBDMS, eller TBDPS.

I én utførelsesform er SH beskyttet med AcM, Bzl, Bzl-OMe, Bzl-Me, eller Trt.

25 I én utførelsesform er NH<sub>2</sub> eller NHR beskyttet med Boc, Moc, Z-Cl, Fmoc, Z, eller Alloc.

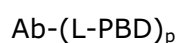
I én utførelsesform er gruppen  $G^2$  til stede i kombinasjon med en gruppe  $L^3$ , hviken gruppe er et dipeptid.

30 Kapslingsgruppen er ikke beregnet for forbindelse med cellebindemiddelet. Derfor, fungerer den andre monomeren som er til stede i dimeren som forbindelsespunktet med cellebindemiddelet via en linker. Følgelig er det foretrukket at funksjonaliteten som finnes i den kapslende gruppen ikke er tilgjengelig for reaksjon med et cellebindemiddel. Derfor unngås fortrinnsvis reaktive funksjonsgrupper slik som OH, SH, NH<sub>2</sub>, COOH. Imidlertid kan slik

funksjonalitet forekomme i kapslingsgruppen hvis den er beskyttet, som beskrevet over.

5 I fremstillingen av forbindelsene ifølge oppfinnelsen kan den kapslende gruppen anvendes til å fremstille en linker  $R^L$ .

10 Et eksempel på en utførelsesform av en antistofflegemiddelkonjugat (ADC)-forbindelse omfatter et antistoff (Ab) og en PBD-legemiddelenhet (PBD) hvori antistoffet er bundet av en linkerenheter (L) til PBD, hvorved sammensetningen har formelen:



15 hvor p er et heltall fra 1 til ca. 8 og representerer legemiddellasten. Hvis Ab er et cysteinkonstruert antistoff, er antallet legemiddelenheter som kan være konjugert gjennom en tiolreaktiv linkerenheter til et antistoffmolekyl begrenset av antallet cysteinrester som innføres ved de her beskrevne fremgangsmåter. ADC-eksempler omfatter derfor antistoffer som har 1, 2, 3, eller 4 konstruerte cysteinaminosyrer.

## 20 **Foretrukne forbindelser**

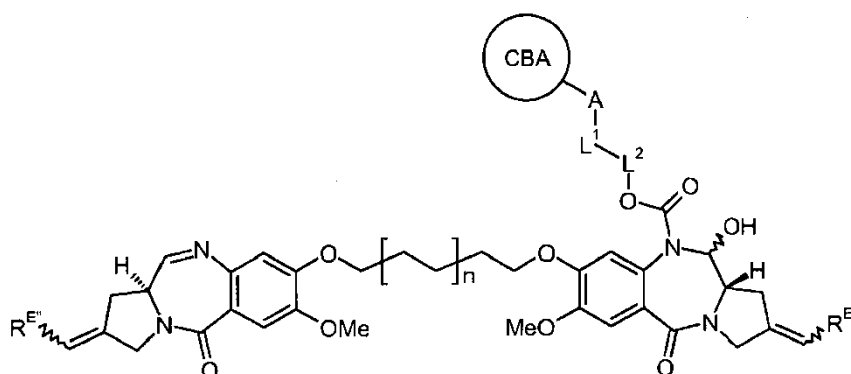
25 I én utførelsesform er konjugatet en dimer hvori hver av monomerene har en C2-metylengruppe dvs. hver  $R^2$  er  $=\text{CH}_2$ . Den er foretrukket at cellebindemiddelet er et antistoff.

I en annen utførelsesform er konjugatet en dimer hvori hver av monomerene har en C2 arylgruppe, dvs. hver  $R^2$  er eventuelt substituert  $\text{C}_{5-20}$ -aryl. Den er foretrukket at cellebindemiddelet er et antistoff.

## 30 **C2 Alkylen**

I én utførelsesform er konjugatet en forbindelse:

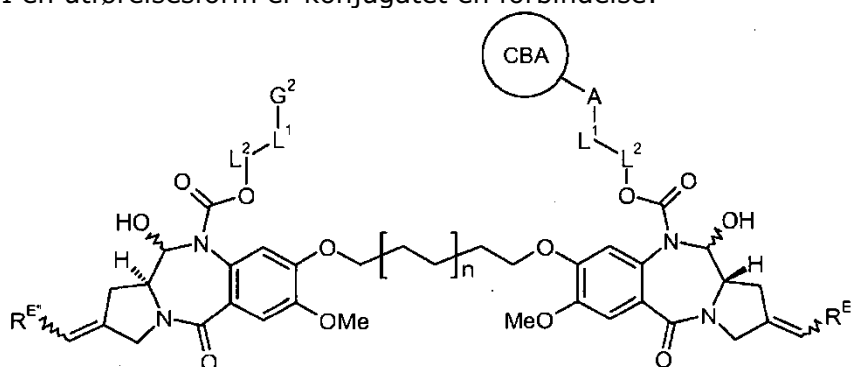
70



hvor CBA er et cellebindemiddel slik som et antistoff eller et syklisk peptid og  $n$  er 0 eller 1.  $L^1$  og  $L^2$  er som tidligere definert, og  $R^E$  og  $R^{E'}$  er hver uavhengig valgt fra H eller  $R^D$ .

5

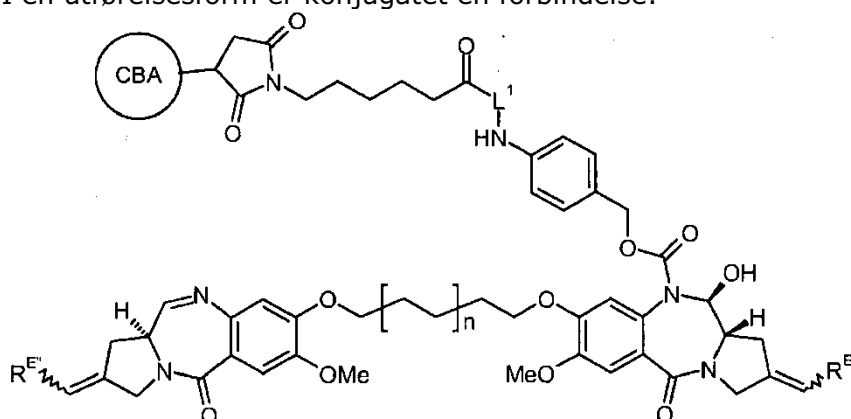
I én utførelsesform er konjugatet en forbindelse:



hvor CBA er et cellebindemiddel slik som et antistoff eller et syklisk peptid og  $n$  er 0 eller 1.  $L^1$ ,  $L^2$  og  $G^2$  er som tidligere definert, og  $R^E$  og  $R^{E'}$  er hver uavhengig valgt fra H eller  $R^D$ .

10

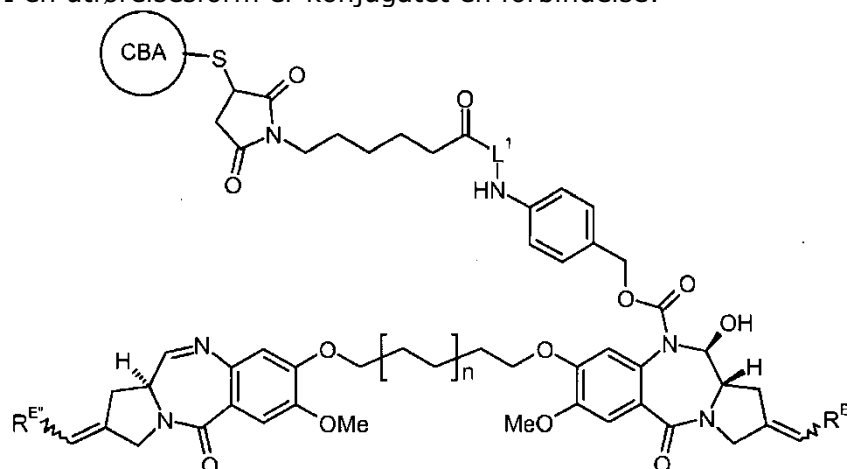
I én utførelsesform er konjugatet en forbindelse:



hvor CBA er et cellebindemiddel slik som et antistoff eller et syklisk peptid og  $n$  er 0 eller 1.  $L^1$  er som tidligere definert, og  $R^E$  og  $R^{E'}$  er hver uavhengig valgt fra H eller  $R^D$ .

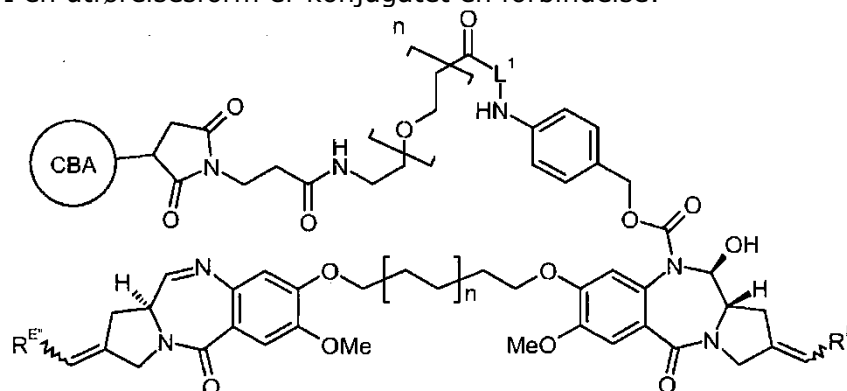
15

I én utførelsesform er konjugatet en forbindelse:



- 5 hvori CBA er et cellebindemiddel slik som et antistoff eller et syklisk peptid og n er 0 eller 1. L<sup>1</sup> er som tidligere definert, og R<sup>E</sup> og R<sup>E'</sup> er hver uavhengig valgt fra H eller R<sup>D</sup>.

I én utførelsesform er konjugatet en forbindelse:

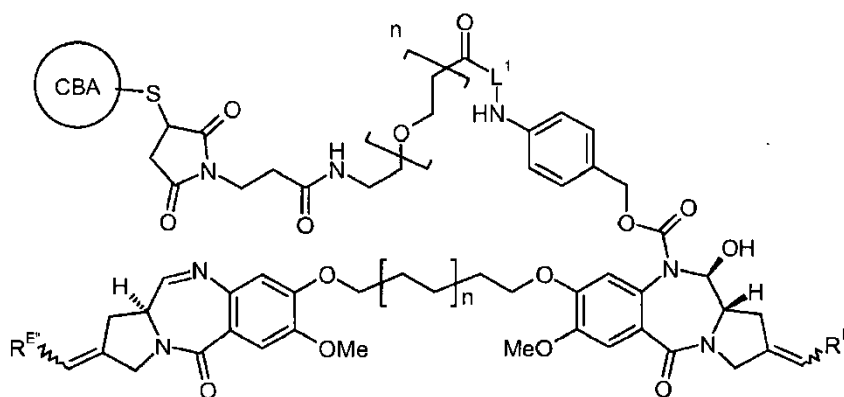


- 10 hvori CBA er et cellebindemiddel slik som et antistoff eller et syklisk peptid og n er 0 eller 1. L<sup>1</sup> er som tidligere definert, og R<sup>E</sup> og R<sup>E'</sup> er hver uavhengig valgt fra H eller R<sup>D</sup>.

I én utførelsesform er konjugatet en forbindelse:



72



hvori CBA er et cellebindemiddel slik som et antistoff eller et syklisk peptid og  $n$  er 0 eller 1.  $L^1$  er som tidligere definert, og  $R^E$  og  $R^{E'}$  er hver uavhengig valgt fra H eller  $R^D$ .

5

For hver av forbindelsene over kan de følgende preferansene gjelde, hvor passende:

$n$  er 0;

$n$  er 1,

10  $R^E$  er H;

$R^E$  er  $R^D$ , hvor  $R^D$  er eventuelt substituert alkyl;

$R^E$  er  $R^D$ , hvor  $R^D$  er metyl;

CBA er et antistoff;

CBA er et syklisk peptid;

15  $L^1$  er eller omfatter et dipeptid;

$L^1$  er  $(H_2N)$ -Val-Ala-(CO) eller  $(H_2N)$ -Fe-Lys-(CO), hvor  $(H_2N)$  og (CO) indikerer de respektive N- og C-terminalene;

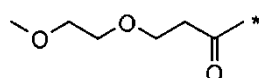
$L^2$  er *p*-aminobenzylen;

$G^2$  er valgt fra Alloc, Fmoc, Boc, Troc, Teoc, Psec, Cbz og PNZ.

20

De følgende preferansene kan også gjelde i tillegg til preferansene over:

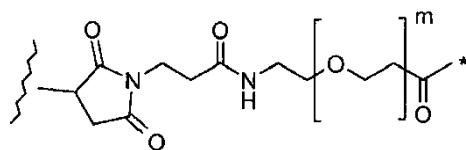
$G^2$  er:



25

hvor stjernen angir bindingspunktet til N-terminalen av  $L^1$ ;

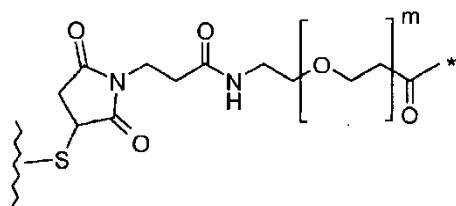
A er:



hvor stjernen angir bindingspunktet til N-terminalen av  $L^1$ , den bølgede linjen angir bindingspunktet til cellebindemiddelet og m er 4 eller 8;

5

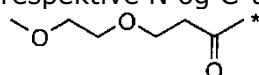
A er



hvor stjernen angir bindingspunktet til N-terminalen av  $L^1$ , den bølgede linjen angir bindingspunktet til cellebindemiddelet og m er 4 eller 8.

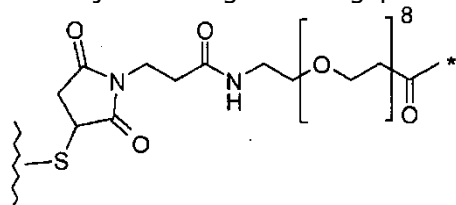
10

I en særlig foretrukket utførelsesform er n 1;  $R^E$  er H; CBA er et antistoff;  $L^1$  er  $(H_2N)\text{-Val-Ala-(CO)}$  eller  $(H_2N)\text{-Fe-Lys-(CO)}$ , hvor  $(H_2N)$  og  $(CO)$  indikerer den respektive N og C-terminalene;  $L^2$  er p-aminobenzylen;  $G^2$  er:



15

hvor stjernen angir bindingspunktet til N-terminalen av  $L^1$ ; og A er



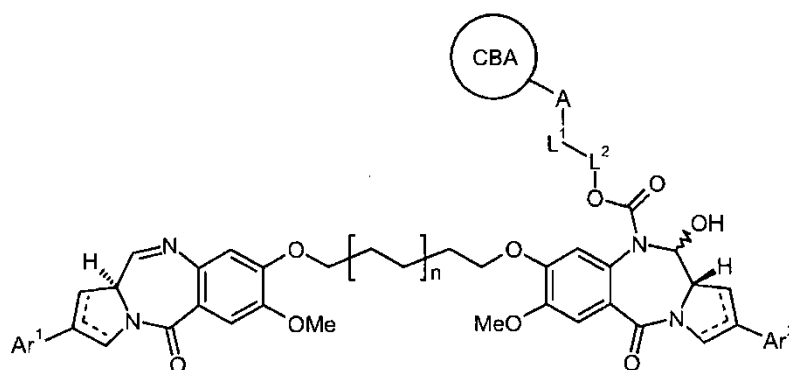
hvor stjernen angir bindingspunktet til N-terminalen av  $L^1$  og den bølgede linjen angir bindingspunktet til cellebindemiddelet.

## C2 Aryl

20

I én utførelsesform er konjugatet en forbindelse:

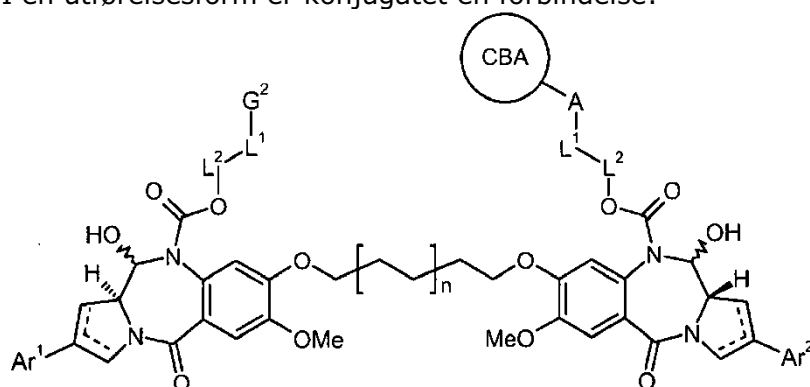
74



hvori CBA er et cellebindemiddel slik som et antistoff eller et syklisk peptid,  $L^1$  og  $L^2$  er som tidligere definert  $Ar^1$  og  $Ar^2$  er hver uavhengig eventuelt substituert  $C_{5-20}$  aryl og  $n$  er 0 eller 1.  $Ar^1$  og  $Ar^2$  kan være like eller forskjellige.

5

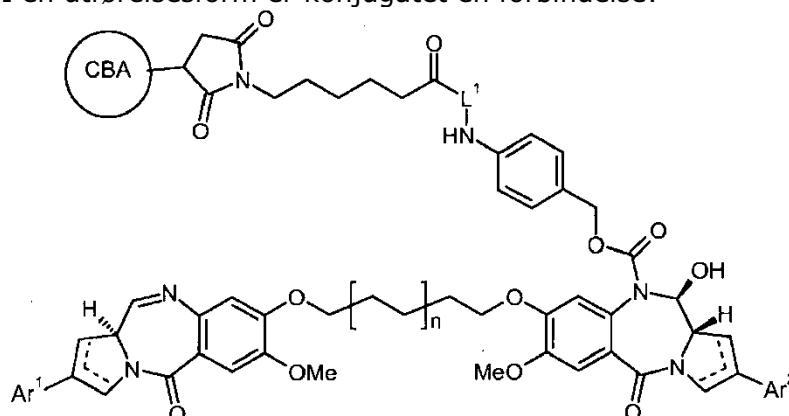
I én utførelsesform er konjugatet en forbindelse:



hvori CBA er et cellebindemiddel slik som et antistoff eller et syklisk peptid,  $L^1$ ,  $L^2$  og  $G^2$  er som tidligere definert,  $Ar^1$  og  $Ar^2$  er hver uavhengig eventuelt substituert  $C_{5-20}$  aryl og  $n$  er 0 eller 1.

10

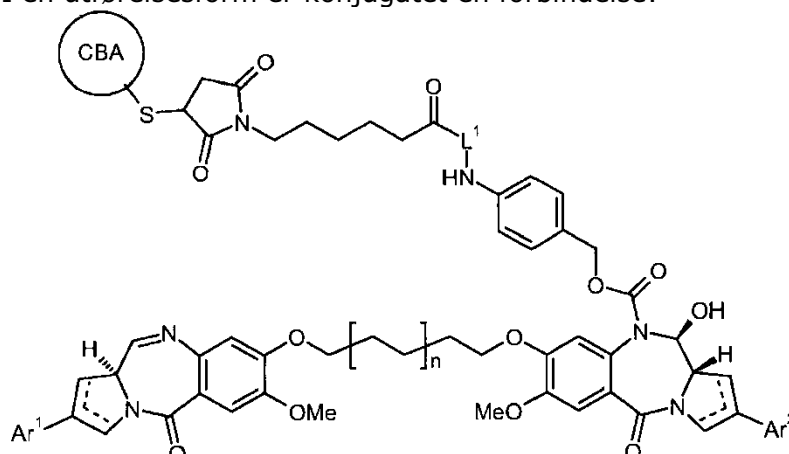
I én utførelsesform er konjugatet en forbindelse:



hvori CBA er et cellebindemiddel slik som et antistoff eller et syklisk peptid,  $L^1$  er som tidligere definert,  $Ar^1$  og  $Ar^2$  er hver uavhengig eventuelt substituert  $C_{5-20}$  aryl og  $n$  er 0 eller 1.

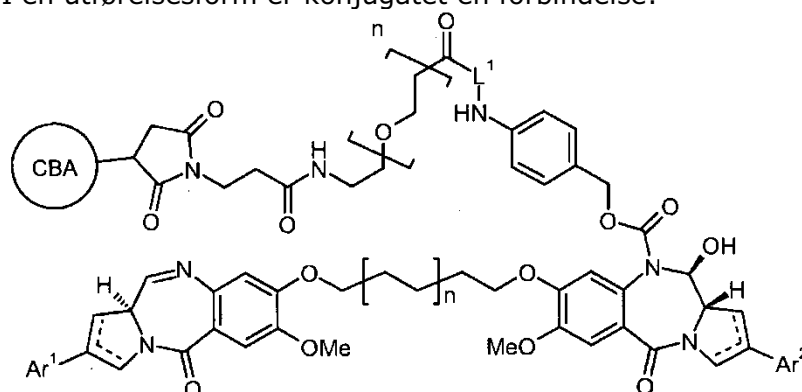
15

I én utførelsesform er konjugatet en forbindelse:



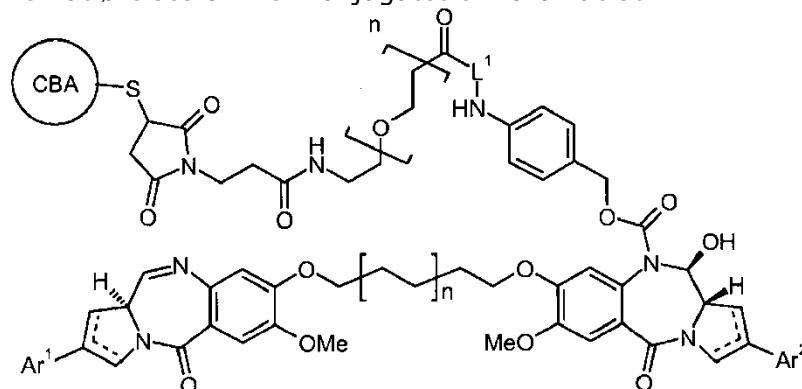
- 5 hvori CBA er et cellebindemiddel slik som et antistoff eller et syklisk peptid,  $L^1$  er som tidligere definert,  $Ar^1$  og  $Ar^2$  er hver uavhengig eventuelt substituert  $C_{5-20}$  aryl og  $n$  er 0 eller 1.

I én utførelsesform er konjugatet en forbindelse:



- 10 hvori CBA er et cellebindemiddel slik som et antistoff eller et syklisk peptid og  $n$  er 0 eller 1.  $L^1$  er som tidligere definert,  $Ar^1$  og  $Ar^2$  er hver uavhengig eventuelt substituert  $C_{5-20}$  aryl og  $n$  er 0 eller 1.

I én utførelsesform er konjugatet en forbindelse:



hvor CBA er et cellebindemiddel slik som et antistoff eller et syklisk peptid og n er 0 eller 1.  $L^1$  er som tidligere definert,  $Ar^1$  og  $Ar^2$  er hver uavhengig eventuelt substituert  $C_{5-20}$  aryl og n er 0 eller 1.

5 I én utførelsesform er  $Ar^1$  og  $Ar^2$  i hver av utførelsesformene over hver uavhengig valgt fra eventuelt substituert fenyl, furanyl, tiofenyl og pyridyl.

I én utførelsesform er  $Ar^1$  og  $Ar^2$  i hver av utførelsesformene over eventuelt substituert fenyl.

10

I én utførelsesform er  $Ar^1$  og  $Ar^2$  i hver av utførelsesformene over eventuelt substituert tiofen-2-yl eller tiofen-3-yl.

15

I én utførelsesform er  $Ar^1$  og  $Ar^2$  i hver av utførelsesformene over eventuelt substituert kinolinyll eller isokinolinyll.

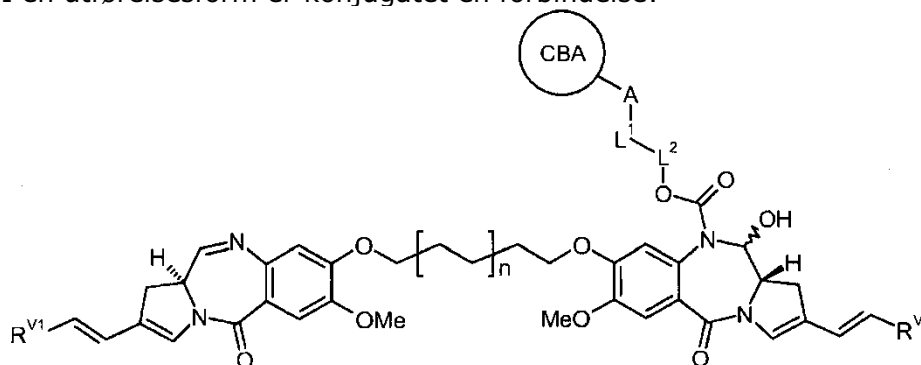
Kinolinyll- eller isokinolinyllgruppen kan være bundet til PBD-kjernen gjennom en hvilken som helst tilgjengelig ringposisjon. For eksempel kan kinolinyll være kinolin-2-yl, kinolin-3-yl, kinolin-4yl, kinolin-5-yl, kinolin-6-yl, kinolin-7-yl og kinolin-8-yl. Av disse kan kinolin-3-yl og kinolin-6-yl være foretrukket. Isokinolinyll kan være isokinolin-1-yl, isokinolin-3-yl, isokinolin-4yl, isokinolin-5-yl, isokinolin-6-yl, isokinolin-7-yl og isokinolin-8-yl. Av disse kan isokinolin-3-yl og isokinolin-6-yl være foretrukket.

20

## C2 Vinyl

25

I én utførelsesform er konjugatet en forbindelse:

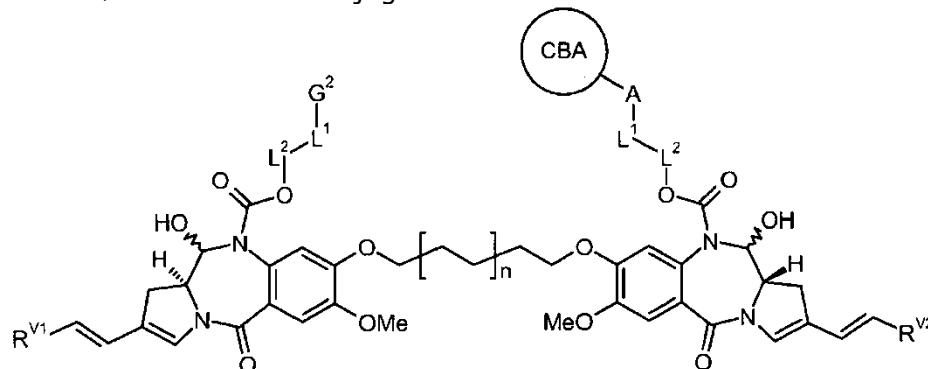


30

hvor CBA er et cellebindemiddel slik som et antistoff eller et syklisk peptid,  $L^1$  og  $L^2$  er som tidligere definert,  $R^{V1}$  og  $R^{V2}$  er uavhengig valgt fra H, metyl, etyl og

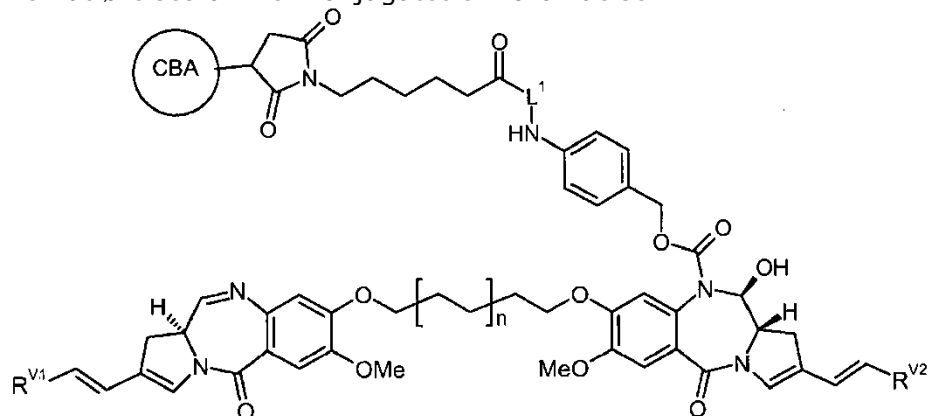
fenyl (hvilket fenyl kan være eventuelt substituert med fluor, særlig i 4-posisjonen) og C<sub>5-6</sub> heterosykl og n er 0 eller 1. R<sup>V1</sup> og R<sup>V2</sup> kan være like eller forskjellige.

5 I én utførelsesform er konjugatet en forbindelse:



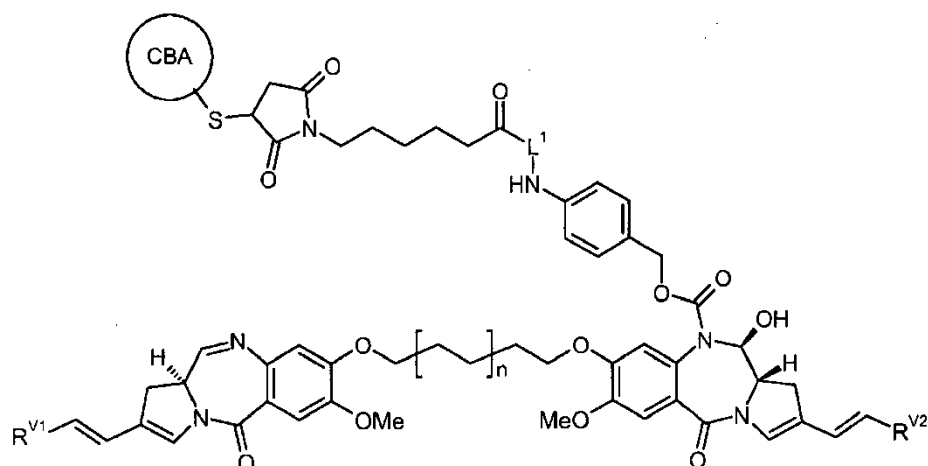
10 hvori CBA er et cellebindemiddel slik som et antistoff eller et syklisk peptid, L<sup>1</sup>, L<sup>2</sup> og G<sup>2</sup> er som tidligere definert, R<sup>V1</sup> og R<sup>V2</sup> er uavhengig valgt fra H, metyl, etyl og fenyl (hvilket fenyl kan være eventuelt substituert med fluor, særlig i 4-posisjonen) og C<sub>5-6</sub> heterosykl og n er 0 eller 1. R<sup>V1</sup> og R<sup>V2</sup> kan være like eller forskjellige.

I én utførelsesform er konjugatet en forbindelse:



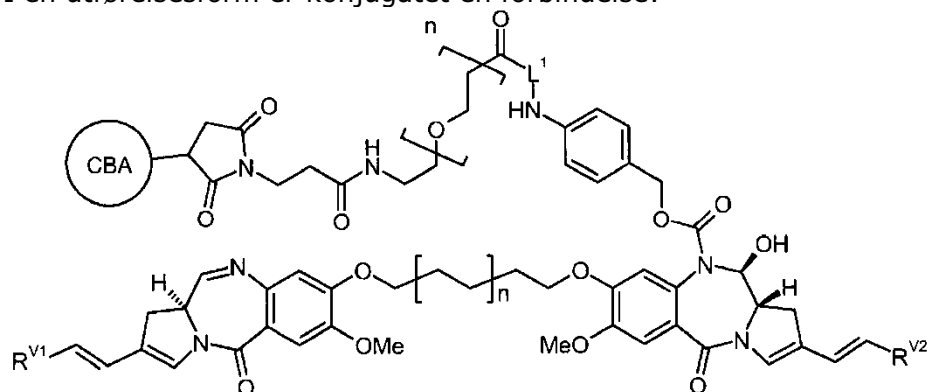
15 hvori CBA er et cellebindemiddel slik som et antistoff eller et syklisk peptid, L<sup>1</sup> er som tidligere definert, R<sup>V1</sup> og R<sup>V2</sup> er uavhengig valgt fra H, metyl, etyl og fenyl (hvilket fenyl kan være eventuelt substituert med fluor, særlig i 4-posisjonen) og C<sub>5-6</sub> heterosykl og n er 0 eller 1. R<sup>V1</sup> og R<sup>V2</sup> kan være like eller forskjellige.

20 I én utførelsesform er konjugatet en forbindelse:



5 hvori CBA er et cellebindemiddel slik som et antistoff eller et syklisk peptid,  $L^1$  er som tidligere definert,  $R^{V1}$  og  $R^{V2}$  er uavhengig valgt fra H, metyl, etyl og fenyl (hvilket fenyl kan være eventuelt substituert med fluor, særlig i 4-posisjonen) og  $C_{5-6}$  heterosyklil og  $n$  er 0 eller 1.  $R^{V1}$  og  $R^{V2}$  kan være like eller forskjellige.

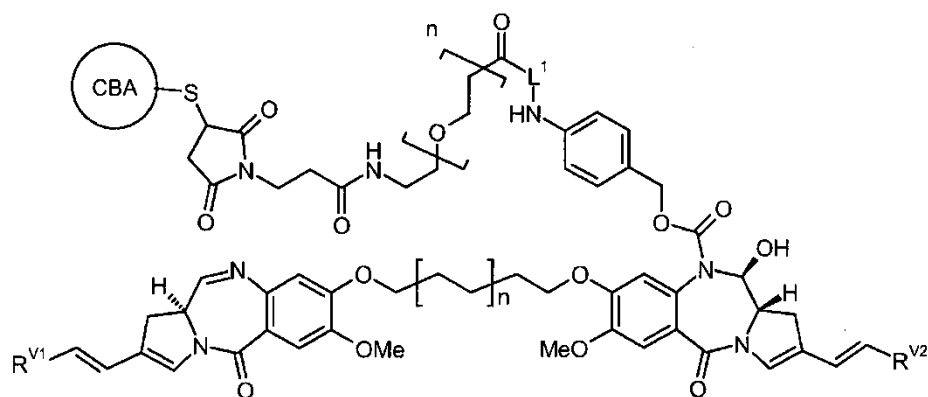
I én utførelsesform er konjugatet en forbindelse:



10 hvori CBA er et cellebindemiddel slik som et antistoff eller et syklisk peptid og  $n$  er 0 eller 1.  $L^1$  er som tidligere definert,  $R^{V1}$  og  $R^{V2}$  er uavhengig valgt fra H, metyl, etyl og fenyl (hvilket fenyl kan være eventuelt substituert med fluor, særlig i 4-posisjonen) og  $C_{5-6}$  heterosyklil og  $n$  er 0 eller 1.  $R^{V1}$  og  $R^{V2}$  kan være like eller forskjellige.

15 I én utførelsesform er konjugatet en forbindelse:

79



hvor CBA er et cellebindemiddel slik som et antistoff eller et syklisk peptid og  $n$  er 0 eller 1.  $L^1$  er som tidligere definert,  $R^{V1}$  og  $R^{V2}$  er uavhengig valgt fra H, metyl, etyl og fenyl (hvilket fenyl kan være eventuelt substituert med fluor, særlig i 4-posisjonen) og  $C_{5-6}$  heterosyklus og  $n$  er 0 eller 1.  $R^{V1}$  og  $R^{V2}$  kan være like eller forskjellige.

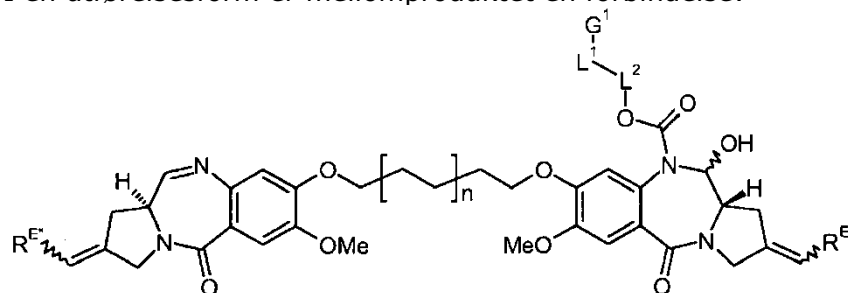
I noen av utførelsesformene over kan  $R^{V1}$  og  $R^{V2}$  være uavhengig valgt fra H, fenyl og 4-fluorfenyl.

### Foretrukne mellomprodukter

Den foreliggende oppfinnelsen tilveiebringer også mellomprodukter for anvendelse i fremstillingen av konjugatforbindelsene beskrevet her.

Foretrukne mellomprodukter er beskrevet under og svarer nøye til de foretrukne konjugatene beskrevet over.

I én utførelsesform er mellomproduktet en forbindelse:

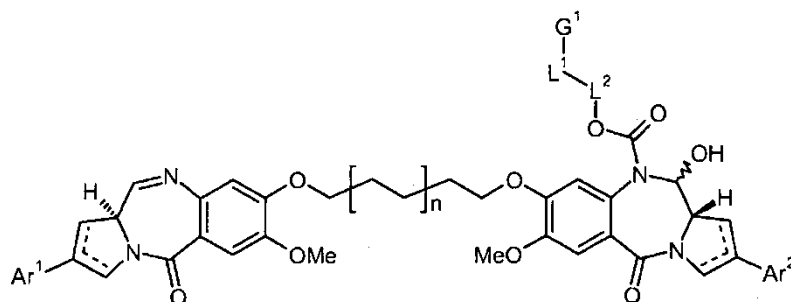


hvor  $n$  er 0 eller 1,  $G^1$ ,  $L^1$  og  $L^2$  er som tidligere definert, og  $R^E$  og  $R^{E'}$  hver er uavhengig valgt fra H eller  $R^D$ .

I én utførelsesform er mellomproduktet en forbindelse:

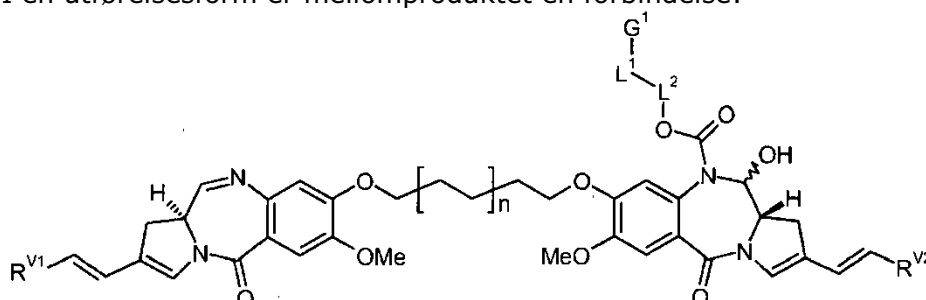


80



hvori  $G^1$ ,  $L^1$  og  $L^2$  er som tidligere definert  $Ar^1$  og  $Ar^2$  hver er uavhengig eventuelt substituert  $C_{5-20}$  aryl og  $n$  er 0 eller 1.  $Ar^1$  og  $Ar^2$  kan være like eller forskjellige.

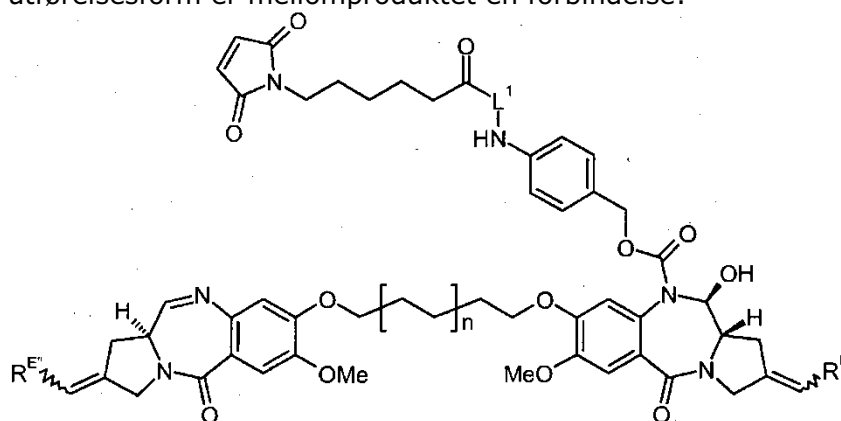
5 I én utførelsesform er mellomproduktet en forbindelse:



hvori  $G^1$ ,  $L^1$  og  $L^2$  er som tidligere definert,  $R^{V1}$  og  $R^{V2}$  er uavhengig valgt fra H, metyl, etyl og fenyl (hvilket fenyl kan være eventuelt substituert med fluor, særlig i 4-posisjonen) og  $C_{5-6}$  heterosyklyl og  $n$  er 0 eller 1.  $R^{V1}$  og  $R^{V2}$  kan være like eller forskjellige.

10

I én utførelsesform er mellomproduktet en forbindelse:

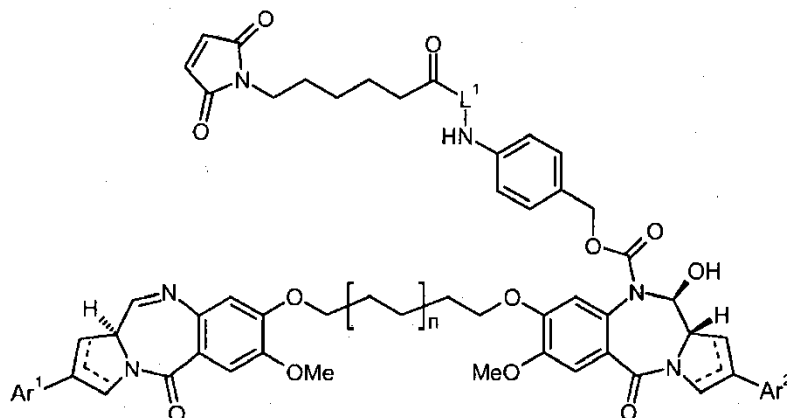


hvori  $n$  er 0 eller 1,  $L^1$  er som tidligere definert, og  $R^E$  og  $R^{E'}$  hver er uavhengig valgt fra H eller  $R^D$ .

15

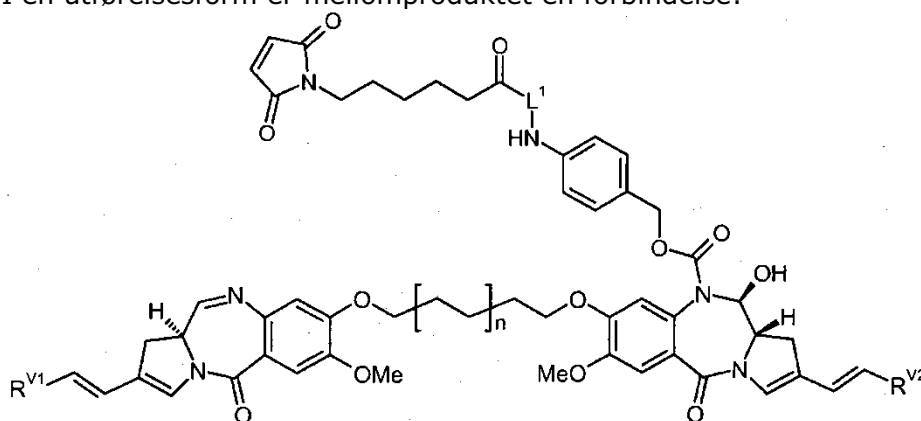
I én utførelsesform er mellomproduktet en forbindelse:

81



hvor  $L^1$  er som tidligere definert,  $Ar^1$  og  $Ar^2$  hver er uavhengig eventuelt substituert  $C_{5-20}$  aryl og  $n$  er 0 eller 1.

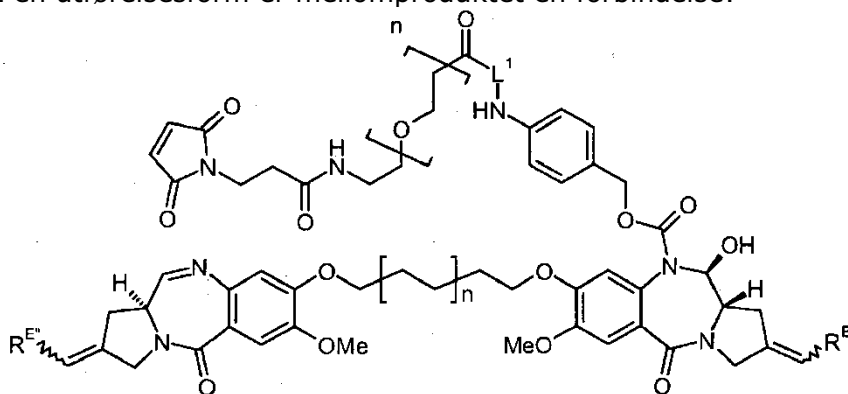
5 I én utførelsesform er mellomproduktet en forbindelse:



hvor  $L^1$  er som tidligere definert, og  $R^{V1}$  og  $R^{V2}$  er uavhengig valgt fra H, metyl, etyl og fenyl (hvilket fenyl kan være eventuelt substituert med fluor, særlig i 4-posisjonen) og  $C_{5-6}$  heterosykl og  $n$  er 0 eller 1.  $R^{V1}$  og  $R^{V2}$  kan være like eller forskjellige.

10

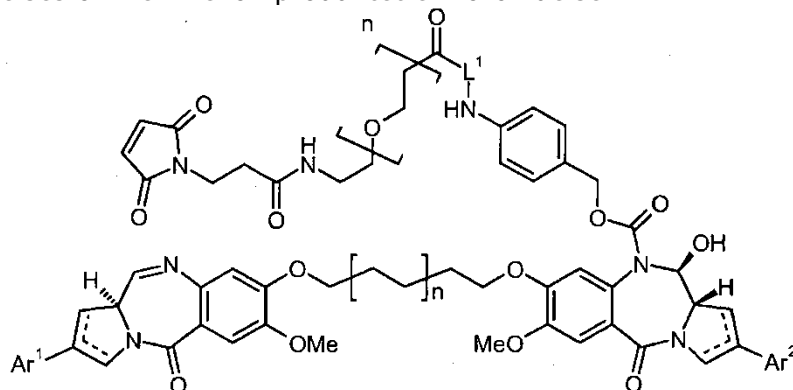
I én utførelsesform er mellomproduktet en forbindelse:



hvor  $n$  er 0 eller 1,  $L^1$  er som tidligere definert, og  $R^E$  og  $R^{E'}$  hver er uavhengig valgt fra H eller  $R^D$ .

15

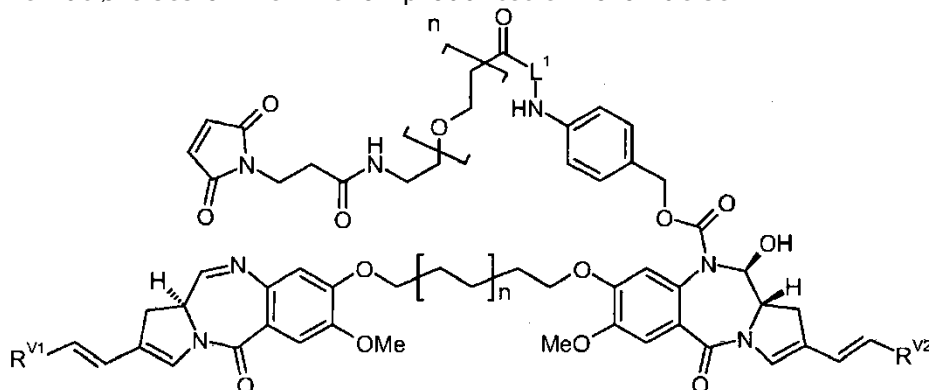
I én utførelsesform er mellomproduktet en forbindelse:



5

hvori  $n$  er 0 eller 1,  $L^1$  er som tidligere definert,  $Ar^1$  og  $Ar^2$  hver er uavhengig eventuelt substituert  $C_{5-20}$  aryl og  $n$  er 0 eller 1.

I én utførelsesform er mellomproduktet en forbindelse:



10

hvori  $L^1$  er som tidligere definert,  $R^{V1}$  og  $R^{V2}$  er uavhengig valgt fra H, metyl, etyl og fenyl (hvilket fenyl kan være eventuelt substituert med fluor, særlig i 4-posisjonen) og  $C_{5-6}$  heterosykl og  $n$  er 0 eller 1.  $R^{V1}$  og  $R^{V2}$  kan være like eller forskjellige.

### **Substituent**

15

Betegnelsen "eventuelt substituert" som anvendt her, vedrører en morgruppe som kan være usubstituert eller som kan være substituert.

20

Med mindre noe annet er angitt, vedrører betegnelsen "substituert" som anvendt her, en morgruppe som bærer en eller flere substituent. Betegnelsen "substituent" er anvendt her i den sedvanlige betydningen og viser til en kjemisk enhet som er kovalent bundet til, eller hvis passende, fusjonert med, en

morgruppe. En lang rekke substituent er velkjent, og fremgangsmåter for deres dannelse og innføring inn i en rekke morgupper er også velkjent.

5 I en foretrukket utførelsesform er substituentene beskrevet her (hvilket inkluderer eventuelle substituent) begrenset til gruppene som er ikke reaktive overfor et cellebindemiddel. Forbindelsen til cellebindemiddelet i det foreliggende tilfellet dannes fra N10-posisjonen av PBD-forbindelsen gjennom en linkergruppe (omfattende, for eksempel L<sup>1</sup>, L<sup>2</sup> og A) til cellebindemiddelet. Reaktive funksjonsgrupper som befinner seg på andre deler av PBD-strukturen kan være i 10 stand til å danne ytterligere bindinger til det cellebindemiddelet (dette kalles også tverrbinding). Disse ytterligere bindingene kan endre konjugatets transport og biologiske aktivitet. Derfor er de ytterligere substituentene i noen utførelsesformer begrenset til de som mangler reaktiv funksjonalitet.

15 I én utførelsesform er substituentene valgt fra gruppen bestående av R, OR, SR, NRR', NO<sub>2</sub>, halo, CO<sub>2</sub>R COR, CONH<sub>2</sub>, CONHR og CONRR'.

I én utførelsesform er substituentene valgt fra gruppen bestående av R, OR, SR, 20 NRR', NO<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>R, COR, CONH<sub>2</sub>, CONHR og CONRR'.

I én utførelsesform er substituentene valgt fra gruppen bestående av R, OR, SR, NRR', NO<sub>2</sub>, og halo.

25 I én utførelsesform er substituentene valgt fra gruppen bestående av R, OR, SR, NRR' og NO<sub>2</sub>.

En hvilken som helst av utførelsesformene nevnt over kan være anvendes på en hvilken som helst av substituentene beskrevet her. Alternativt kan substituentene velges fra en eller flere av gruppene oppført under.

30 Eksempler på substituent er beskrevet i nærmere detalj under.

35 C<sub>1-12</sub>-alkyl: Betegnelsen "C<sub>1-12</sub>-alkyl" som anvendt her, vedrører en monovalent enhet oppnådd ved fjerning av et hydrogenatom fra et karbonatom av en hydrokarbonforbindelse som har fra 1 til 12 karbonatomer, hvilken kan være alifatisk eller alisyklisk og hvilken kan være mettet eller umettet (f.eks. delvis

umettet, helt umettet). Derfor inkluderer betegnelsen "alkyl" underklassene alkenyl, alkynyl, sykloalkyl, osv. som drøftes under.

5 Eksempler på mettede alkylgrupper inkluderer, men er ikke begrenset til metyl ( $C_1$ ), etyl ( $C_2$ ), propyl ( $C_3$ ), butyl ( $C_4$ ), pentyl ( $C_5$ ), heksyl ( $C_6$ ) og heptyl ( $C_7$ ).

Eksempler på mettede, rettkjedede alkylgrupper inkluderer, men er ikke begrenset til metyl ( $C_1$ ), etyl ( $C_2$ ), n-propyl ( $C_3$ ), n-butyl ( $C_4$ ), n-pentyl (amyl) ( $C_5$ ), n-heksyl ( $C_6$ ) og n-heptyl ( $C_7$ ).

10

Eksempler på mettede, forgrenede alkylgrupper inkluderer iso-propyl ( $C_3$ ), iso-butyl ( $C_4$ ), sek-butyl ( $C_4$ ), tert-butyl ( $C_4$ ), iso-pentyl ( $C_5$ ) og neo-pentyl ( $C_5$ ).

15

En alkylgruppe kan eventuelt være avbrutt av ett eller flere heteroatomer valgt fra O, N(H) og S. Slike grupper kan betegnes som "heteroalkyl".

20

$C_{2-20}$  Heteroalkyl: Betegnelsen " $C_{2-12}$  heteroalkyl" som anvendt her, vedrører en monovalent enhet oppnådd ved fjerning av et hydrogenatom fra et karbonatom av en hydrokarbonforbindelse som har fra 2 til 12 karbonatomer og ett eller flere heteroatomer valgt fra O, N(H) og S, fortrinnsvis O og S.

25

Eksempler på heteroalkylgrupper inkluderer, men er ikke begrenset til de som omfatter en eller flere etylenglykolenheter av typen  $-(OCH_2CH_2)-$ . Avslutningene av en heteroalkylgruppe kan være den primære formen av et heteroatom, f.eks.  $-OH$ ,  $-SH$  eller  $-NH_2$ . I en foretrukket utførelsesform er betegnelseninal  $-CH_3$ .

$C_{2-12}$ -alkenyl: Betegnelsen " $C_{2-12}$ -alkenyl" som anvendt her, vedrører en alkylgruppe som har en eller flere karbon-karbon-dobbeltbindinger.

30

Eksempler på umettede alkenylgrupper inkluderer, men er ikke begrenset til ethenyl (vinyl,  $-CH=CH_2$ ), 1-propenyl ( $-CH=CH-CH_3$ ), 2-propenyl (allyl,  $-CH-CH=CH_2$ ), isopropenyl (1-metylvinyl,  $-C(CH_3)=CH_2$ ), butenyl ( $C_4$ ), pentenyl ( $C_5$ ) og heksenyl ( $C_6$ ).

35

$C_{2-12}$ -alkynyl: Betegnelsen " $C_{2-12}$ -alkynyl" som anvendt her, vedrører en alkylgruppe som har en eller flere karbon-karbon-trippelbindinger.

Eksempler på umettede alkynylgrupper inkluderer, men er ikke begrenset til etynyl ( $-C\equiv CH$ ) og 2-propynyl (propargyl,  $-CH_2-C\equiv CH$ ).

5  $C_{3-12}$ -sykloalkyl: Betegnelsen " $C_{3-12}$ -sykloalkyl" som anvendt her, vedrører en alkylgruppe som også er en syklylgruppe; som er en monovalent enhet oppnådd ved fjerning av et hydrogenatom fra et alisyklisk ringatom av en sykklisk hydrokarbon (karbosyklisk)-forbindelse, hvilken enhet har fra 3 til 7 karbonatomer, inkludert fra 3 til 7 ringatomer.

10 Eksempler på sykloalkylgrupper inkluderer, men er ikke begrenset til de som er avledet fra:

mettede, monosykliske hydrokarbonforbindelser: syklopropan ( $C_3$ ), syklobutan ( $C_4$ ), syklopentan ( $C_5$ ), sykloheksan ( $C_6$ ), sykloheptan ( $C_7$ ), metylsyklopropan ( $C_4$ ), dimetylsyklopropan ( $C_5$ ), metylsyklobutan ( $C_5$ ), dimetylsyklobutan ( $C_6$ ),  
15 metylsyklopentan ( $C_6$ ), dimetylsyklopentan ( $C_7$ ) og metylsykloheksan ( $C_7$ );

umettede monosykliske hydrokarbonforbindelser: syklopropen ( $C_3$ ), syklobuten ( $C_4$ ), syklopenten ( $C_5$ ), sykloheksen ( $C_6$ ), metylsyklopropen ( $C_4$ ), dimetylsyklopropen ( $C_5$ ), metylsyklobuten ( $C_5$ ), dimetylsyklobuten ( $C_6$ ), metylsyklopenten ( $C_6$ ), dimetylsyklopenten ( $C_7$ ) og metylsykloheksen ( $C_7$ ); og

20 mettede polysykliske hydrokarbonforbindelser:

norkaran ( $C_7$ ), norpinan ( $C_7$ ), norbornan ( $C_7$ ).

25  $C_{3-20}$  heterosyklyl: Betegnelsen " $C_{3-20}$  heterosyklyl" som anvendt her, vedrører en monovalent enhet oppnådd ved fjerning av et hydrogenatom fra et ringatom i en heterosyklisk forbindelse, hvilken enhet har fra 3 til 20 ringatomer, av hvilke fra 1 til 10 er ringheteroatomer. Fortrinnsvis har hver ring fra 3 til 7 ringatomer, av hvilke fra 1 til 4 er ringheteroatomer.

30 I denne sammenhengen angir prefiksene(f.eks.  $C_{3-20}$ ,  $C_{3-7}$ ,  $C_{5-6}$ , osv.) antallet ringatomer, eller området for antallet ringatomer, enten det er karbonatomer eller heteroatomer. For eksempel vedrører betegnelsen " $C_{5-6}$ heterosyklyl", som anvendt her, en heterosyklylgruppe som har 5 eller 6 ringatomer.

35 Eksempler på monosykliske heterosyklylgrupper inkluderer, men er ikke begrenset til de som er avledet fra:

N<sub>1</sub>: aziridin (C<sub>3</sub>), azetidindin (C<sub>4</sub>), pyrrolidin (tetrahydropyrrol) (C<sub>5</sub>), pyrrolin (f.eks., 3-pyrrolin, 2,5-dihydropyrrol) (C<sub>5</sub>), 2H-pyrrol eller 3H-pyrrol (isopyrrol, isoazol) (C<sub>5</sub>), piperidin (C<sub>6</sub>), dihydropyridin (C<sub>6</sub>), tetrahydropyridin (C<sub>6</sub>), azepin (C<sub>7</sub>);

5 O<sub>1</sub>: oksiran (C<sub>3</sub>), oksetan (C<sub>4</sub>), oksolan (tetrahydrofuran) (C<sub>5</sub>), oksol (dihydrofuran) (C<sub>5</sub>), oksan (tetrahydropyran) (C<sub>6</sub>), dihydropyran (C<sub>6</sub>), pyran (C<sub>6</sub>), oksepin (C<sub>7</sub>);

S<sub>1</sub>: thiiran (C<sub>3</sub>), tietan (C<sub>4</sub>), tiolan (tetrahydrotiofen) (C<sub>5</sub>), tian (tetrahydrotiopyran) (C<sub>6</sub>), tiepan (C<sub>7</sub>);

O<sub>2</sub>: dioksolan (C<sub>5</sub>), dioksan (C<sub>6</sub>) og dioksepan (C<sub>7</sub>);

10 O<sub>3</sub>: trioksan (C<sub>6</sub>);

N<sub>2</sub>: imidazolidin (C<sub>5</sub>), pyrazolidin (diazolidin) (C<sub>5</sub>), imidazolin (C<sub>5</sub>), pyrazolin (dihydropyrazol) (C<sub>5</sub>), piperazin (C<sub>6</sub>);

15 N<sub>1</sub>O<sub>1</sub>: tetrahydrookszazol (C<sub>5</sub>), dihydrookszazol (C<sub>5</sub>), tetrahydroisokszazol (C<sub>5</sub>), dihydroisokszazol (C<sub>5</sub>), morfolin (C<sub>6</sub>), tetrahydrookszazin (C<sub>6</sub>), dihydrookszazin (C<sub>6</sub>), oksazin (C<sub>6</sub>);

N<sub>1</sub>S<sub>1</sub> tiazolin (C<sub>5</sub>), tiazolidin (C<sub>5</sub>), tiomorfolin (C<sub>6</sub>);

N<sub>2</sub>O<sub>1</sub>: oksadiazin (C<sub>6</sub>);

O<sub>1</sub>S<sub>1</sub>: oksatiole (C<sub>5</sub>) og oksatian (tioksan) (C<sub>6</sub>); og,

N<sub>1</sub>O<sub>1</sub>S<sub>1</sub>: oksatiazin (C<sub>6</sub>).

20

Eksempler på substituerte, monosykliske heterosyklilgrupper inkluderer de som er avledet fra sakkarider, i syklisk form, for eksempel furanoser (C<sub>5</sub>), slik som arabinofuranose, lyksofuranose, ribofuranose og xylofuranose og pyranoser (C<sub>6</sub>), slik som allopyranose, altropyranose, glukopyranose, mannopyranose, gulopyranose, idopyranose, galaktopyranose og talopyranose.

25

C<sub>5-20</sub> aryl: Betegnelsen "C<sub>5-20</sub> aryl", som anvendt her, vedrører en monovalent enhet oppnådd ved fjerning av et hydrogenatom fra et aromatisk ringatom av en aromatisk forbindelse, hvilken enhet har fra 3 til 20 ringatomer. Fortrinnsvis har hver ring fra 5 til 7 ringatomer.

30

I denne sammenhengen angir prefiksene(f.eks. C<sub>3-20</sub>, C<sub>5-7</sub>, C<sub>5-6</sub>, osv.) antallet ringatomer, eller området for antallet ringatomer, enten det er karbonatomer

eller heteroatomer. For eksempel vedrører betegnelsen "C<sub>5-6</sub> aryl" som anvendt her en arylgruppe som har 5 eller 6 ringatomer.

Ringatomene kan være utelukkende karbonatomer, som i "karboarylgrupper".

5

Eksempler på karboarylgrupper inkluderer, men er ikke begrenset til de som er avledet fra benzen (dvs. fenyl) (C<sub>6</sub>), naftalen (C<sub>10</sub>), azulen (C<sub>10</sub>), antracen (C<sub>14</sub>), fenantren (C<sub>14</sub>), naftacen (C<sub>18</sub>) og pyren (C<sub>16</sub>).

10

Eksempler på arylgrupper som omfatter fusjonerte ringer, hvor minst én er en aromatisk ring, inkluderer, men er ikke begrenset til grupper avledet fra indan (f.eks. 2,3-dihydro-1H-inden) (C<sub>9</sub>), inden (C<sub>9</sub>), isoinden (C<sub>9</sub>), tetralin (1,2,3,4-tetrahydronaftalene) (C<sub>10</sub>), acenaftene (C<sub>12</sub>), fluoren (C<sub>13</sub>), fenalen (C<sub>13</sub>), acefenantren (C<sub>15</sub>) og aceantren (C<sub>16</sub>).

15

Alternativt kan ringatomene inkludere ett eller flere heteroatomer, som i "heteroarylgrupper". Eksempler på monosykliske heteroarylgrupper inkluderer, men er ikke begrenset til de som er avledet fra:

N<sub>1</sub>: pyrrol (azol) (C<sub>5</sub>), pyridin (azin) (C<sub>6</sub>);

20

O<sub>1</sub>: furan (oksol) (C<sub>5</sub>);

S<sub>1</sub>: tiofen (tiol) (C<sub>5</sub>);

N<sub>1</sub>O<sub>1</sub>: oksazol (C<sub>5</sub>), isoksazol (C<sub>5</sub>), isoksazin (C<sub>6</sub>);

N<sub>2</sub>O<sub>1</sub>: oksadiazol (furazan) (C<sub>5</sub>);

N<sub>3</sub>O<sub>1</sub>: oksatriazol (C<sub>5</sub>);

25

N<sub>1</sub>S<sub>1</sub>: tiazol (C<sub>5</sub>), isotiazol (C<sub>5</sub>);

N<sub>2</sub>: imidazol (1,3-diazol) (C<sub>5</sub>), pyrazol (1,2-diazol) (C<sub>5</sub>), pyridazin (1,2-diazin) (C<sub>6</sub>), pyrimidin (1,3-diazin) (C<sub>6</sub>) (f.eks., cytosin, tymin, uracil), pyrazin (1,4-diazin) (C<sub>6</sub>);

N<sub>3</sub>: triazol (C<sub>5</sub>), triazin (C<sub>6</sub>); og,

30

N<sub>4</sub>: tetrazol (C<sub>5</sub>).

Eksempler på heteroaryl smo omfatter fusjonerte ringer, inkluderer, men er ikke begrenset til:



C<sub>9</sub> (med 2 fusjonerte ringer) avledet fra benzofuran (O<sub>1</sub>), isobenzofuran (O<sub>1</sub>), indol (N<sub>1</sub>), isoindol (N<sub>1</sub>), indolizin (N<sub>1</sub>), indolin (N<sub>1</sub>), isoindolin (N<sub>1</sub>), purine (N<sub>4</sub>) (f.eks., adenin, guanin), benzimidazol (N<sub>2</sub>), indazol (N<sub>2</sub>), benzoksazol (N<sub>1</sub>O<sub>1</sub>), benzisoksazol (N<sub>1</sub>O<sub>1</sub>), benzodioksol (O<sub>2</sub>), benzofurazan (N<sub>2</sub>O<sub>1</sub>) benzotriazol (N<sub>3</sub>),  
5 benzotiofuran (S<sub>1</sub>), benzotiazol (N<sub>1</sub>S<sub>1</sub>), benzotiadiazol (N<sub>2</sub>S);

C<sub>10</sub> (med 2 fusjonerte ringer) avledet fra kromene (O<sub>1</sub>), isokromene (O<sub>1</sub>), kroman (O<sub>1</sub>), isokroman (O<sub>1</sub>), benzodioksan (O<sub>2</sub>), kinolin (N<sub>1</sub>), isokinolin (N<sub>1</sub>), kinolizin (N<sub>1</sub>), benzoksazin (N<sub>1</sub>O<sub>1</sub>), benzodiazin (N<sub>2</sub>), pyridopyridin (N<sub>2</sub>), quinoksalin (N<sub>2</sub>), kinazolin (N<sub>2</sub>), cinnolin (N<sub>2</sub>), ftalazin (N<sub>2</sub>), naftyridin (N<sub>2</sub>),  
10 pteridin (N<sub>4</sub>);

C<sub>11</sub> (med 2 fusjonerte ringer) avledet fra benzodiazepin (N<sub>2</sub>);

C<sub>13</sub> (med 3 fusjonerte ringer) avledet fra karbazol (N<sub>1</sub>), dibenzofuran (O<sub>1</sub>), dibenzotiofen (S<sub>1</sub>), karbolin (N<sub>2</sub>), perimidin (N<sub>2</sub>), pyridoindol (N<sub>2</sub>); og,

C<sub>14</sub> (med 3 fusjonerte ringer) avledet fra acridin (N<sub>1</sub>), xanten (O<sub>1</sub>), tioksenten (S<sub>1</sub>), oksantren (O<sub>2</sub>), fenoksahiin (O<sub>1</sub>S<sub>1</sub>), fenazin (N<sub>2</sub>), fenoksazin (N<sub>1</sub>O<sub>1</sub>), fenotiazin (N<sub>1</sub>S<sub>1</sub>), tiantren (S<sub>2</sub>), fenantridin (N<sub>1</sub>), fenantrolin (N<sub>2</sub>), fenazin (N<sub>2</sub>).  
15

Gruppene over, enten de er alene eller del av en annen substituent, kan selv eventuelt være substituert med en eller flere grupper valgt fra seg selv og de ytterligere substituentene oppført under.  
20

Halo: -F, -Cl, -Br og -I.

25 Hydroksy: -OH.

Eter: -OR, hvori R er en etersubstituent, for eksempel en C<sub>1-7</sub>-alkylgruppe (også betegnet som en C<sub>1-7</sub>-alkoksygruppe, drøftet under), en C<sub>3-20</sub>-heterosyklylgruppe (også betegnet som en C<sub>3-20</sub> heterosyklyloksygruppe), eller en C<sub>5-20</sub>-arylgruppe (også betegnet som en C<sub>5-20</sub> aryloksygruppe), fortrinnsvis en C<sub>1-7</sub>-alkylgruppe.  
30

Alkoksy: -OR, hvori R er en alkylgruppe, for eksempel en C<sub>1-7</sub>-alkylgruppe. Eksempler på C<sub>1-7</sub>-alkoksygrupper inkluderer, men er ikke begrenset til -OMe (metoksy), -OEt (etoksy), -O(nPr) (n-propoksy), -O(iPr) (isopropoksy), -O(nBu) (n-butoksy), -O(sBu) (sek-butoksy), -O(iBu) (isobutoksy) og -O(tBu) (tert-butoksy).  
35

- 5 Acetal:  $-\text{CH}(\text{OR}^1)(\text{OR}^2)$ , hvori  $\text{R}^1$  og  $\text{R}^2$  er uavhengig acetalsubstituent, for eksempel en  $\text{C}_{1-7}$ -alkylgruppe, en  $\text{C}_{3-20}$ -heterosyklgruppe, eller en  $\text{C}_{5-20}$ -arylgruppe, fortrinnsvis en  $\text{C}_{1-7}$ -alkylgruppe, eller, i tilfellet med en "syklisk" acetalgruppe, danner  $\text{R}^1$  og  $\text{R}^2$ , sammen med de to oksygenatomene til hvilke de er bundet og karbonatomene til hvilke de er bundet, en heterosyklisk ring som har fra 4 til 8 ringatomer. Eksempler på acetalgrupper inkluderer, men er ikke begrenset til  $-\text{CH}(\text{OMe})_2$ ,  $-\text{CH}(\text{OEt})_2$  og  $-\text{CH}(\text{OMe})(\text{OEt})$ .
- 10 Hemiacetal:  $-\text{CH}(\text{OH})(\text{OR}^1)$ , hvori  $\text{R}^1$  er en hemiacetalsubstituent, for eksempel en  $\text{C}_{1-7}$ -alkylgruppe, en  $\text{C}_{3-20}$ -heterosyklgruppe eller en  $\text{C}_{5-20}$ -arylgruppe, fortrinnsvis en  $\text{C}_{1-7}$ -alkylgruppe. Eksempler på hemiacetalgrupper inkluderer, men er ikke begrenset til  $-\text{CH}(\text{OH})(\text{OMe})$  og  $-\text{CH}(\text{OH})(\text{OEt})$ .
- 15 Ketal:  $-\text{CR}(\text{OR}^1)(\text{OR}^2)$ , hvor  $\text{R}^1$  og  $\text{R}^2$  er som definert for acetal og  $\text{R}$  er en ketalsubstituent som ikke er enn hydrogen, for eksempel en  $\text{C}_{1-7}$ -alkylgruppe, en  $\text{C}_{3-20}$ -heterosyklgruppe eller en  $\text{C}_{5-20}$ -arylgruppe, fortrinnsvis en  $\text{C}_{1-7}$ -alkylgruppe. Eksempler på ketalgrupper inkluderer, men er ikke begrenset til  $-\text{C}(\text{Me})(\text{OMe})_2$ ,  $-\text{C}(\text{Me})(\text{OEt})_2$ ,  $-\text{C}(\text{Me})(\text{OMe})(\text{OEt})$ ,  $-\text{C}(\text{Et})(\text{OMe})_2$ ,  $-\text{C}(\text{Et})(\text{OEt})_2$  og  $-\text{C}(\text{Et})(\text{OMe})(\text{OEt})$ .
- 20 Hemiketal:  $-\text{CR}(\text{OH})(\text{OR}^1)$ , hvor  $\text{R}^1$  er som definert for hemiacetals og  $\text{R}$  er en hemiketalsubstituent som ikke er hydrogen, for eksempel en  $\text{C}_{1-7}$ -alkylgruppe, en  $\text{C}_{3-20}$ -heterosyklgruppe eller en  $\text{C}_{5-20}$ -arylgruppe, fortrinnsvis en  $\text{C}_{1-7}$ -alkylgruppe. Eksempler på hemiacetalgrupper inkluderer, men er ikke begrenset til  $-\text{C}(\text{Me})(\text{OH})(\text{OMe})$ ,  $-\text{C}(\text{Et})(\text{OH})(\text{OMe})$ ,  $-\text{C}(\text{Me})(\text{OH})(\text{OEt})$  og  $-\text{C}(\text{Et})(\text{OH})(\text{OEt})$ .
- Okso (keto, -on):  $=\text{O}$ .
- 30 Tion (tioketon):  $=\text{S}$ .
- Imino (imin):  $=\text{NR}$ , hvori  $\text{R}$  er en iminosubstituent, for eksempel hydrogen,  $\text{C}_{1-7}$ -alkylgruppe, en  $\text{C}_{3-20}$ -heterosyklgruppe eller en  $\text{C}_{5-20}$ -arylgruppe, fortrinnsvis hydrogen eller en  $\text{C}_{1-7}$ -alkylgruppe. Eksempler på estergrupper inkluderer, men er ikke begrenset til  $=\text{NH}$ ,  $=\text{NMe}$ ,  $=\text{NEt}$  og  $=\text{NPh}$ .
- 35 Formyl (karbaldehyd, karboksaldehyd):  $-\text{C}(=\text{O})\text{H}$ .

- 5 Acyl (keto):  $-C(=O)R$ , hvori R er en acylsubstituent, for eksempel en  $C_{1-7}$ -alkylgruppe (også betegnet som  $C_{1-7}$ -alkylacyl eller  $C_{1-7}$ -alkanoyl), en  $C_{3-20}$ -heterosyklylgruppe (også betegnet som  $C_{3-20}$  heterosyklylacyl), eller en  $C_{5-20}$ -arylgruppen (også betegnet som  $C_{5-20}$  arylacyl), fortrinnsvis en  $C_{1-7}$ -alkylgruppe. Eksempler på acylgrupper inkluderer, men er ikke begrenset til  $-C(=O)CH_3$  (acetyl),  $-C(=O)CH_2CH_3$  (propionyl),  $-C(=O)C(CH_3)_3$  (t-butyryl) og  $-C(=O)Ph$  (benzoyl, fenone).
- 10 Karboksy (karboksylsyre):  $-C(=O)OH$ .
- Tiokarboksy (tiokarboksylsyre):  $-C(=S)SH$ .
- 15 Tiolokarboksy (tiolokarboksylsyre):  $-C(=O)SH$ .
- Tionokarboksy (tionokarboksylsyre):  $-C(=S)OH$ .
- Imidsyre:  $-C(=NH)OH$ .
- 20 Hydroksamidsyre:  $-C(=NOH)OH$ .
- 25 Ester (karboksylat, karboksylsyreester, oksykarbonyl):  $-C(=O)OR$ , hvori R er en estersubstituent, for eksempel en  $C_{1-7}$ -alkylgruppe, en  $C_{3-20}$ -heterosyklylgruppe eller en  $C_{5-20}$ -arylgruppe, fortrinnsvis en  $C_{1-7}$ -alkylgruppe. Eksempler på estergrupper inkluderer, men er ikke begrenset til  $-C(=O)OCH_3$ ,  $-C(=O)OCH_2CH_3$ ,  $-C(=O)OC(CH_3)_3$  og  $-C(=O)OPh$ . Acyl,oksy (omvendt ester):  $-OC(=O)R$ , hvori R er en acyloksysubstituent, for eksempel en  $C_{1-7}$ -alkylgruppe, en  $C_{3-20}$ -heterosyklylgruppe eller en  $C_{5-20}$ -arylgruppe, fortrinnsvis en  $C_{1-7}$ -alkylgruppe. Eksempler på acyloksygrupper inkluderer, men er ikke begrenset til
- 30  $-OC(=O)CH_3$  (acetoksy),  $-OC(=O)CH_2CH_3$ ,  $-OC(=O)C(CH_3)_3$ ,  $-OC(=O)Ph$  og  $-OC(=O)CH_2Ph$ .
- 35 Oksykarboyloksy:  $-OC(=O)OR$ , hvori R er en estersubstituent, for eksempel en  $C_{1-7}$ -alkylgruppe, en  $C_{3-20}$ -heterosyklylgruppe eller en  $C_{5-20}$ -arylgruppe, fortrinnsvis en  $C_{1-7}$ -alkylgruppe. Eksempler på estergrupper inkluderer, men er ikke begrenset til  $-OC(=O)OCH_3$ ,  $-OC(=O)OCH_2CH_3$ ,  $-OC(=O)OC(CH_3)_3$  og  $-OC(=O)OPh$ .

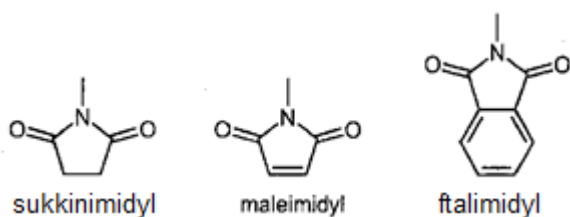
Amino:  $-NR^1R^2$ , hvori  $R^1$  og  $R^2$  er uafhængig aminosubstituent, for eksempel hydrogen, en  $C_{1-7}$ -alkylgruppe (også betegnet som  $C_{1-7}$ -alkylamino eller di- $C_{1-7}$ -alkylamino), en  $C_{3-20}$ -heterosyklylgruppe eller en  $C_{5-20}$ -arylgruppe, fortrinnsvis H eller en  $C_{1-7}$ -alkylgruppe, eller, i tilfellet med en "syklisk" aminogruppe, danner  $R^1$  og  $R^2$ , sammen med nitrogenatomet til hvilke de er bundet, en heterosyklisk ring som har fra 4 til 8 ringatomer. Aminogrupper kan være primære ( $-NH_2$ ), sekundære ( $-NHR^1$ ), eller tertiære ( $-NHR^1R^2$ ) og i kationisk form, kan være kvaternær ( $-^+NR^1R^2R^3$ ). Eksempler på aminogrupper inkluderer, men er ikke begrenset til  $-NH_2$ ,  $-NHCH_3$ ,  $-NHC(CH_3)_2$ ,  $-N(CH_3)_2$ ,  $-N(CH_2CH_3)_2$  og  $-NHPh$ . Eksempler på syklisk aminogrupper inkluderer, men er ikke begrenset til aziridino, azetidino, pyrrolidino, piperidino, piperazino, morfolino og tiomorfolino.

Amido (karbamoyl, karbamyl, aminokarbonyl, karboksamid):  $-C(=O)NR^1R^2$ , hvori  $R^1$  og  $R^2$  er uafhængig aminosubstituent, som definert for aminogrupper. Eksempler på amidogrupper inkluderer, men er ikke begrenset til  $-C(=O)NH_2$ ,  $-C(=O)NHCH_3$ ,  $-C(=O)N(CH_3)_2$ ,  $-C(=O)NHCH_2CH_3$  og  $-C(=O)N(CH_2CH_3)_2$  samt amidogrupper i hvilke  $R^1$  og  $R^2$ , sammen med nitrogenatomet til hvilke de er bundet, danner en heterosyklisk struktur som i for eksempel piperidinokarbonyl, morfolinokarbonyl, tiomorfolinokarbonyl og piperazinokarbonyl.

Tioamido (tiokarbamyl):  $-C(=S)NR^1R^2$ , hvori  $R^1$  og  $R^2$  er uafhængig aminosubstituent, som definert for aminogrupper. Eksempler på amidogrupper inkluderer, men er ikke begrenset til  $-C(=S)NH_2$ ,  $-C(=S)NHCH_3$ ,  $-C(=S)N(CH_3)_2$  og  $-C(=S)NHCH_2CH_3$ .

Acylamido (acylamino):  $-NR^1C(=O)R^2$ , hvori  $R^1$  er en amid substituent, for eksempel hydrogen, en  $C_{1-7}$ -alkylgruppe, en  $C_{3-20}$ -heterosyklylgruppe eller en  $C_{5-20}$ -arylgruppe, fortrinnsvis hydrogen eller en  $C_{1-7}$ -alkylgruppe og  $R^2$  er en acylsubstituent, for eksempel en  $C_{1-7}$ -alkylgruppe, en  $C_{3-20}$ -heterosyklylgruppe eller en  $C_{5-20}$ arylgruppe, fortrinnsvis hydrogen eller en  $C_{1-7}$ -alkylgruppe. Eksempler på acylamidgrupper inkluderer, men er ikke begrenset til  $-NHC(=O)CH_3$ ,

$-NHC(=O)CH_2CH_3$  og  $-NHC(=O)Ph$ .  $R^1$  og  $R^2$  kan danner sammen en syklisk struktur, som i, for eksempel suksinimidyl, maleimidyl og ftalimidyl:



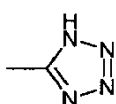
Aminokarbonyloksy:  $-\text{OC}(=\text{O})\text{NR}^1\text{R}^2$ , hvori  $\text{R}^1$  og  $\text{R}^2$  er uavhengig aminosubstituent, som definert for aminogrupper. Eksempler på aminokarbonyloksygrupper inkluderer, men er ikke begrenset til  $-\text{OC}(=\text{O})\text{NH}_2$ ,  $-\text{OC}(=\text{O})\text{NHMe}$ ,  $-\text{OC}(=\text{O})\text{NMe}_2$  og  $-\text{OC}(=\text{O})\text{NEt}_2$ .

Ureido:  $-\text{N}(\text{R}^1)\text{CONR}^2\text{R}^3$  hvori  $\text{R}^2$  og  $\text{R}^3$  er uavhengig aminosubstituent, som definert for aminogrupper og  $\text{R}^1$  er en ureidosubstituent, for eksempel hydrogen, en  $\text{C}_{1-7}$ -alkylgruppe, en  $\text{C}_{3-20}$ -heterosyklgruppe eller en  $\text{C}_{5-20}$ -arylgruppe, fortrinnsvis hydrogen eller en  $\text{C}_{1-7}$ -alkylgruppe. Eksempler på ureidogrupper inkluderer, men er ikke begrenset til  $-\text{NHCONH}_2$ ,  $-\text{NHCONHMe}$ ,  $-\text{NHCONHEt}$ ,  $-\text{NHCONMe}_2$ ,  $-\text{NHCONEt}_2$ ,  $-\text{NMeCONH}_2$ ,  $-\text{NMeCONHMe}$ ,  $-\text{NMeCONHEt}$ ,  $-\text{NMeCONMe}_2$  og  $-\text{NMeCONEt}_2$ .

15

Guanidino:  $-\text{NH}-\text{C}(=\text{NH})\text{NH}_2$ .

Tetrazolyl: en femleddet aromatisk ring som har fire nitrogenatomer og ett karbonatom,



20

Imino:  $=\text{NR}$ , hvori  $\text{R}$  er en iminosubstituent, for eksempel for eksempel hydrogen, en  $\text{C}_{1-7}$ -alkylgruppe, en  $\text{C}_{3-20}$ -heterosyklgruppe eller en  $\text{C}_{5-20}$ -arylgruppe, fortrinnsvis H eller en  $\text{C}_{1-7}$ -alkylgruppe. Eksempler på iminogrupper inkluderer, men er ikke begrenset til  $=\text{NH}$ ,  $=\text{NMe}$  og  $=\text{NEt}$ .

25

Amidin (amidino):  $-\text{C}(=\text{NR})\text{NR}_2$ , hvori hver  $\text{R}$  er en amidinsubstituent, for eksempel hydrogen, en  $\text{C}_{1-7}$ -alkylgruppe, en  $\text{C}_{3-20}$ -heterosyklgruppe eller en  $\text{C}_{5-20}$ -arylgruppe, fortrinnsvis H eller en  $\text{C}_{1-7}$ -alkylgruppe. Eksempler på

amidingrupper inkluderer, men er ikke begrenset til  $-C(=NH)NH_2$ ,  $-C(=NH)NMe_2$  og  $-C(=NMe)NMe_2$ .

Nitro:  $-NO_2$ .

5

Nitroso:  $-NO$ .

Azido:  $-N_3$ .

10

Cyano (nitril, karbonitril):  $-CN$ .

Isocyano:  $-NC$ .

Cyanato:  $-OCN$ .

15

Isocyanato:  $-NCO$ .

Tiocyano (tiocyanato):  $-SCN$ .

20

Isotiocyano (isotiocyanato):  $-NCS$ .

Sulfhydryl (tiol, mercapto):  $-SH$ .

25

Tioeter (sulfid):  $-SR$ , hvori R er en tioetersubstituent, for eksempel en  $C_{1-7}$ -alkylgruppe (også betegnet som en  $C_{1-7}$ -alkyltiogruppe), en  $C_{3-20}$ -heterosyklylgruppe eller en  $C_{5-20}$ -arylgruppe, fortrinnsvis en  $C_{1-7}$ -alkylgruppe. Eksempler på  $C_{1-7}$ -alkyltiogruupper inkluderer, men er ikke begrenset til  $-SCH_3$  og  $-SCH_2CH_3$ .

30

Disulfid:  $-SS-R$ , hvori R er en disulfidsubstituent, for eksempel en  $C_{1-7}$ -alkylgruppe, en  $C_{3-20}$ -heterosyklylgruppe eller en  $C_{5-20}$ -arylgruppe, fortrinnsvis en  $C_{1-7}$ -alkylgruppe (også betegnet her som  $C_{1-7}$ -alkyldisulfid). Eksempler på  $C_{1-7}$ -alkyldisulfidgrupper inkluderer, men er ikke begrenset til  $-SSCH_3$  og  $-SSCH_2CH_3$ .

35

Sulfin (sulfinyl, sulfoksid):  $-S(=O)R$ , hvori R er en sulfinsubstituent, for eksempel en  $C_{1-7}$ -alkylgruppe, en  $C_{3-20}$ -heterosyklylgruppe eller en  $C_{5-20}$ -arylgruppe, fortrinnsvis en  $C_{1-7}$ -alkylgruppe. Eksempler på sulfingruupper inkluderer, men er

ikke begrenset til  $-S(=O)CH_3$  og  $-S(=O)CH_2CH_3$ . Sulfon (sulfonyl):  $-S(=O)_2R$ ,  
 5 hvor R er en sulfonsubstituent, for eksempel en  $C_{1-7}$ -alkylgruppe, en  $C_{3-20}$ -  
 heterosyklylgruppe eller en  $C_{5-20}$ -arylgruppe, fortrinnsvis en  $C_{1-7}$ -alkylgruppe,  
 herunder blant annet en fluorinert eller perfluorinert  $C_{1-7}$ -alkylgruppe. Eksempler  
 på sulfongrupper inkluderer, men er ikke begrenset til  $-S(=O)_2CH_3$   
 (metansulfonyl, mesyl),  $-S(=O)_2CF_3$  (triflyl),  $-S(=O)_2CH_2CH_3$  (esyl),  $-S(=O)_2C_4F_9$   
 (nonaflyl),  $-S(=O)_2CH_2CF_3$  (tresyl),  $-S(=O)_2CH_2CH_2NH_2$  (tauryl),  $-S(=O)_2Ph$   
 (fenylsulfonyl, besyl), 4-metylfenylsulfonyl (tosyl), 4-klorfenylsulfonyl (klosyl),  
 4-bromfenylsulfonyl (brosyl), 4-nitrofenyl (nosyl), 2-naftalenesulfonat (napsyl)  
 10 og 5-dimetylamino-naftalen-1-ylsulfonat (dansyl).

Sulfinsyre (sulfino):  $-S(=O)OH$ ,  $-SO_2H$ .

Sulfonsyre (sulfo):  $-S(=O)_2OH$ ,  $-SO_3H$ .

15

Sulfinat (sulfinsyreester):  $-S(=O)OR$ ; hvor R er en sulfinatsubstituent, for  
 eksempel en  $C_{1-7}$ -alkylgruppe, en  $C_{3-20}$ -heterosyklylgruppe eller en  $C_{5-20}$ -  
 arylgruppe, fortrinnsvis en  $C_{1-7}$ -alkylgruppe. Eksempler på sulfinatgrupper  
 inkluderer, men er ikke begrenset til  $-S(=O)OCH_3$  (metoksysulfinyl;  
 20 metylsulfinat) og  $-S(=O)OCH_2CH_3$  (etoksysulfinyl; etylsulfinat).

20

Sulfonat (sulfonsyreester):  $-S(=O)_2OR$ , hvor R er en sulfonatsubstituent, for  
 eksempel en  $C_{1-7}$ -alkylgruppe, en  $C_{3-20}$ -heterosyklylgruppe eller en  $C_{5-20}$ -  
 arylgruppe, fortrinnsvis en  $C_{1-7}$ -alkylgruppe. Eksempler på sulfonatgrupper  
 25 inkluderer, men er ikke begrenset til  $-S(=O)_2OCH_3$  (metoksysulfonyl;  
 metylsulfonat) og  $-S(=O)_2OCH_2CH_3$  (etoksysulfonyl; etylsulfonat).

25

Sulfinyloksy:  $-OS(=O)R$ , hvor R er en sulfinyloksysubstituent, for eksempel en  
 $C_{1-7}$ -alkylgruppe, en  $C_{3-20}$ -heterosyklylgruppe eller en  $C_{5-20}$ -arylgruppe,  
 30 fortrinnsvis en  $C_{1-7}$ -alkylgruppe. Eksempler på sulfinyloksygrupper inkluderer,  
 men er ikke begrenset til  $-OS(=O)CH_3$  og  $-OS(=O)CH_2CH_3$ .

30

Sulfonyloksy:  $-OS(=O)_2R$ , hvor R er en sulfonyloksysubstituent, for eksempel en  
 $C_{1-7}$ -alkylgruppe, en  $C_{3-20}$ -heterosyklylgruppe eller en  $C_{5-20}$ -arylgruppe,  
 35 fortrinnsvis en  $C_{1-7}$ -alkylgruppe. Eksempler på sulfonyloksygrupper inkluderer,  
 men er ikke begrenset til  $-OS(=O)_2CH_3$  (mesylat) og  $-OS(=O)_2CH_2CH_3$  (esylat).

35

- Sulfat:  $-\text{OS}(=\text{O})_2\text{OR}$ ; hvori R er en sulfatsubstituent, for eksempel en  $\text{C}_{1-7}$ -alkylgruppe, en  $\text{C}_{3-20}$ -heterosyklylgruppe eller en  $\text{C}_{5-20}$ -arylgruppe, fortrinnsvis en  $\text{C}_{1-7}$ -alkylgruppe. Eksempler på sulfatgrupper inkluderer, men er ikke begrenset til  $-\text{OS}(=\text{O})_2\text{OCH}_3$  og  $-\text{SO}(=\text{O})_2\text{OCH}_2\text{CH}_3$ . Sulfamyl (sulfamoyl; sulfinsyreamid; sulfamid):  $-\text{S}(=\text{O})\text{NR}^1\text{R}^2$ , hvori  $\text{R}^1$  og  $\text{R}^2$  er uavhengig aminosubstituent, som definert for aminogru-  
 5 pper. Eksempler på sulfamylgrupper inkluderer, men er ikke begrenset til  $-\text{S}(=\text{O})\text{NH}_2$ ,  $-\text{S}(=\text{O})\text{NH}(\text{CH}_3)$ ,  $-\text{S}(=\text{O})\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ,  $-\text{S}(=\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)$ ,  $-\text{S}(=\text{O})\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$  og  $-\text{S}(=\text{O})\text{NHPH}$ .
- 10 Sulfonamido (sulfinamoyl; sulfonsyreamid; sulfonamid):  $-\text{S}(=\text{O})_2\text{NR}^1\text{R}^2$ , hvori  $\text{R}^1$  og  $\text{R}^2$  er uavhengig aminosubstituent, som definert for aminogru-  
 pper. Eksempler på sulfonamidogru-  
 pper inkluderer, men er ikke begrenset til  $-\text{S}(=\text{O})_2\text{NH}_2$ ,  $-\text{S}(=\text{O})_2\text{NH}(\text{CH}_3)$ ,  $-\text{S}(=\text{O})_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ,  $-\text{S}(=\text{O})_2\text{NH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)$ ,  $-\text{S}(=\text{O})_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$  og  $-\text{S}(=\text{O})_2\text{NHPH}$ .
- 15 Sulfamino:  $-\text{NR}^1\text{S}(=\text{O})_2\text{OH}$ , hvori  $\text{R}^1$  er en aminosubstituent, som definert for aminogru-  
 pper. Eksempler på sulfaminogru-  
 pper inkluderer, men er ikke begrenset til  $-\text{NHS}(=\text{O})_2\text{OH}$  og  $-\text{N}(\text{CH}_3)\text{S}(=\text{O})_2\text{OH}$ .
- 20 Sulfonamino:  $-\text{NR}^1\text{S}(=\text{O})_2\text{R}$ , hvori  $\text{R}^1$  er en aminosubstituent, som definert for aminogru-  
 pper og R er en sulfonaminosubstituent, for eksempel en  $\text{C}_{1-7}$ -alkylgruppe, en  $\text{C}_{3-20}$ -heterosyklylgruppe eller en  $\text{C}_{5-20}$ -arylgruppe, fortrinnsvis en  $\text{C}_{1-7}$ -alkylgruppe. Eksempler på sulfonaminogru-  
 pper inkluderer, men er ikke begrenset til  $-\text{NHS}(=\text{O})_2\text{CH}_3$  og  $-\text{N}(\text{CH}_3)\text{S}(=\text{O})_2\text{C}_6\text{H}_5$ .
- 25 Sulfinamino:  $-\text{NR}^1\text{S}(=\text{O})\text{R}$ , hvori  $\text{R}^1$  er en aminosubstituent, som definert for aminogru-  
 pper og R er en sulfinaminosubstituent, for eksempel en  $\text{C}_{1-7}$ -alkylgruppe, en  $\text{C}_{3-20}$ -heterosyklylgruppe eller en  $\text{C}_{5-20}$ -arylgruppe, fortrinnsvis en  $\text{C}_{1-7}$ -alkylgruppe. Eksempler på sulfinaminogru-  
 30 pper inkluderer, men er ikke begrenset til  $-\text{NHS}(=\text{O})\text{CH}_3$  og  $-\text{N}(\text{CH}_3)\text{S}(=\text{O})\text{C}_6\text{H}_5$ .
- Fosfino (fosfin):  $-\text{PR}_2$ , hvori R er en fosfinosubstituent, for eksempel -H, en  $\text{C}_{1-7}$ -alkylgruppe, en  $\text{C}_{3-20}$ -heterosyklylgruppe eller en  $\text{C}_{5-20}$ -arylgruppe, fortrinnsvis -  
 H, en  $\text{C}_{1-7}$ -alkylgruppe eller en  $\text{C}_{5-20}$ -arylgruppe. Eksempler på fosfinogru-  
 35 pper inkluderer, men er ikke begrenset til  $-\text{PH}_2$ ,  $-\text{P}(\text{CH}_3)_2$ ,  $-\text{P}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$ ,  $-\text{P}(\text{t-Bu})_2$  og  $-\text{P}(\text{Ph})_2$ .



Fosfo:  $-P(=O)_2$ .

5 Fosfinyl (fosfinoksid):  $-P(=O)R_2$ , hvori R er en fosfinylsubstituent, for eksempel en  $C_{1-7}$ -alkylgruppe, en  $C_{3-20}$ -heterosyklylgruppe eller en  $C_{5-20}$ -arylgruppe, fortrinnsvis en  $C_{1-7}$ -alkylgruppe eller en  $C_{5-20}$ -arylgruppe. Eksempler på fosfinylgrupper inkluderer, men er ikke begrenset til  $-P(=O)(CH_3)_2$ ,  $-P(=O)(CH_2CH_3)_2$ ,  $-P(=O)(t-Bu)_2$  og  $-P(=O)(Ph)_2$ .

10 Fosfonsyre (fosfono):  $-P(=O)(OH)_2$ .

15 Fosfonat (fosfonoester):  $-P(=O)(OR)_2$ , hvor R er en fosfonatsubstituent, for eksempel -H, en  $C_{1-7}$ -alkylgruppe, en  $C_{3-20}$ -heterosyklylgruppe eller en  $C_{5-20}$ -arylgruppe, fortrinnsvis -H, en  $C_{1-7}$ -alkylgruppe eller en  $C_{5-20}$ -arylgruppe. Eksempler på fosfonatgrupper inkluderer, men er ikke begrenset til  $-P(=O)(OCH_3)_2$ ,  $-P(=O)(OCH_2CH_3)_2$ ,  $-P(=O)(O-t-Bu)_2$  og  $-P(=O)(OPh)_2$ .

Fosforsyring (fosfonooksy):  $-OP(=O)(OH)_2$ .

20 Fosfat (fosfonooksyester):  $-OP(=O)(OR)_2$ , hvor R er en fosfatsubstituent, for eksempel -H, en  $C_{1-7}$ -alkylgruppe, en  $C_{3-20}$ -heterosyklylgruppe eller en  $C_{5-20}$ -arylgruppe, fortrinnsvis -H, en  $C_{1-7}$ -alkylgruppe eller en  $C_{5-20}$ -arylgruppe. Eksempler på fosfatgrupper inkluderer, men er ikke begrenset til  $-OP(=O)(OCH_3)_2$ ,  $-OP(=O)(OCH_2CH_3)_2$ ,  $-OP(=O)(O-t-Bu)_2$  og  $-OP(=O)(OPh)_2$ .

25 Fosforsyre:  $-OP(OH)_2$ .

30 Fosfitt:  $-OP(OR)_2$ , hvor R er en fosfittsubstituent, for eksempel -H, en  $C_{1-7}$ -alkylgruppe, en  $C_{3-20}$ -heterosyklylgruppe eller en  $C_{5-20}$ -arylgruppe, fortrinnsvis -H, en  $C_{1-7}$ -alkylgruppe, eller en  $C_{5-20}$ -arylgruppe. Eksempler på fosfittgrupper inkluderer, men er ikke begrenset til  $-OP(OCH_3)_2$ ,  $-OP(OCH_2CH_3)_2$ ,  $-OP(O-t-Bu)_2$  og  $-OP(OPh)_2$ .

35 Fosforamiditt:  $-OP(OR^1)-NR^2_2$ , hvor  $R^1$  og  $R^2$  er fosforamidittsubstituent, for eksempel -H, en (eventuelt substituert)  $C_{1-7}$ -alkylgruppe, en  $C_{3-20}$ -heterosyklylgruppe eller en  $C_{5-20}$ -arylgruppe, fortrinnsvis -H, en  $C_{1-7}$ -alkylgruppe, eller en  $C_{5-20}$ -arylgruppe. Eksempler på fosforamidittgrupper inkluderer, men er

ikke begrenset til  $-\text{OP}(\text{OCH}_2\text{CH}_3)\text{-N}(\text{CH}_3)_2$ ,  $-\text{OP}(\text{OCH}_2\text{CH}_3)\text{-N}(\text{i-Pr})_2$  og  $-\text{OP}(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CN})\text{-N}(\text{i-Pr})_2$ .

5 Fosforamidat:  $-\text{OP}(=\text{O})(\text{OR}^1)\text{-NR}^2_2$ , hvor  $\text{R}^1$  og  $\text{R}^2$  er fosforamidatsubstituent, for eksempel  $-\text{H}$ , en (eventuelt substituert)  $\text{C}_{1-7}$ -alkylgruppe, en  $\text{C}_{3-20}$ -heterosyklisk gruppe eller en  $\text{C}_{5-20}$ -arylgruppe, fortrinnsvis  $-\text{H}$ , en  $\text{C}_{1-7}$ -alkylgruppe eller en  $\text{C}_{5-20}$ -arylgruppe. Eksempler på fosforamidatgrupper inkluderer, men er ikke begrenset til  $-\text{OP}(=\text{O})(\text{OCH}_2\text{CH}_3)\text{-N}(\text{CH}_3)_2$ ,  $-\text{OP}(=\text{O})(\text{OCH}_2\text{CH}_3)\text{-N}(\text{i-Pr})_2$  og  $-\text{OP}(=\text{O})(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CN})\text{-N}(\text{i-Pr})_2$ .

## 10 Alkylen

$\text{C}_{3-12}$ -alkylen: Betegnelsen " $\text{C}_{3-12}$ -alkylen", som anvendt her, vedrører bidentatenhet oppnådd ved fjerning av to hydrogenatomer, enten begge fra det samme karbonatomet, eller ett fra hver av to forskjellige karbonatomer, av en hydrokarbonforbindelse som har fra 3 til 12 karbonatomer (med mindre noe annet er angitt), hvilke kan være alifatiske eller alisykliske og hvilke kan være mettet, delvis umettet eller helt umettet. Derfor inkluderer betegnelsen "alkylen" underklassene alkenylen, alkynylen, sykloalkylen, osv. drøftet under.

20 Eksempler på rettkjedede, mettede  $\text{C}_{3-12}$ -alkylengrupper inkluderer, men er ikke begrenset til  $-(\text{CH}_2)_n-$  hvor  $n$  er et heltall fra 3 til 12, for eksempel  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$  (propylen),  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$  (butylen),  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$  (pentylen) og  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$  (heptylen).

25 Eksempler på forgrenede, mettede  $\text{C}_{3-12}$ -alkylengrupper inkluderer, men er ikke begrenset til  $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2-$ ,  $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ,  $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ,  $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2-$ ,  $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ,  $-\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)-$ ,  $-\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)\text{CH}_2-$  og  $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)\text{CH}_2-$ .

30 Eksempler på rettkjedede, delvis umettede  $\text{C}_{3-12}$ -alkylengrupper ( $\text{C}_{3-12}$ -alkenylen og alkynylengrupper) inkluderer, men er ikke begrenset til  $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2-$ ,  $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-$ ,  $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$ ,  $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$ , and  $-\text{CH}_2-\text{C}\equiv\text{C}-\text{CH}_2-$ .

35

Eksempler på forgrenet delvis umettet C<sub>3-12</sub>-alkylengrupper (C<sub>3-12</sub>-alkenylen og alkynylengrupper) inkluderer, men er ikke begrenset til, -C(CH<sub>3</sub>)=CH-, -C(CH<sub>3</sub>)=CH-CH<sub>2</sub>-, -CH=CH-CH(CH<sub>3</sub>)- og -C=C-CH(CH<sub>3</sub>)-

- 5 Eksempler på alisykliske, mettede C<sub>3-12</sub>-alkylengrupper (C<sub>3-12</sub>-sykloalkylener) inkluderer, men er ikke begrenset til, syklopentylen (f.eks. syklopent-1,3-ylen) og sykloheksylen (f.eks. sykloheks-1,4-ylen).

- 10 Eksempler på alisyklisk delvis umettet C<sub>3-12</sub>-alkylengrupper (C<sub>3-12</sub>-sykloalkylener) inkluderer, men er ikke begrenset til, syklopentenylene (f.eks. 4-syklopenten-1,3-ylen), sykloheksenylene (f.eks. 2-sykloheksen-1,4-ylen; 3-sykloheksen-1,2-ylen; 2,5-sykloheksadien-1,4-ylen).

***Inkluderer andre former***

- 15 Med mindre noe annet er angitt, er de velkjente ioniske, salt-, solvat- og beskyttede former inkludert i disse substituentene. For eksempel inkluderer en henvisning til karboksylsyre (-COOH) også den anioniske (karboksylat-)formen (-COO<sup>-</sup>), et salt eller solvat derav samt konvensjonelle beskyttede former. På
- 20 lignende vis inkluderer en henvisning til en aminogruppe den protonerte formen (-N<sup>+</sup>HR<sup>1</sup>R<sup>2</sup>), et salt eller solvat av aminogruppen, for eksempel et hydrokloridsalt samt konvensjonelle beskyttede former av en aminogruppe. På lignende vis inkluderer en henvisning til en hydroksylgruppe også den anioniske formen (-O<sup>-</sup>), et salt eller solvat derav samt konvensjonelle beskyttede former.

- 25 ***Salter***

- 30 Det kan være hensiktsmessig eller ønskelig å fremstille, rense og/eller behandle et solvat tilsvarende den aktive forbindelsen, for eksempel et farmasøytisk akseptabelt salt. Eksempler på farmasøytisk akseptable salter er drøftet i Berge, et al., J. Pharm. Sci., 66, 1-19 (1977).

- 35 Hvis for eksempel forbindelsen er anionisk, eller har en funksjonsgruppe som kan være anionisk (-COOH kan f.eks. være -COO<sup>-</sup>), kan et salt dannes med et passende kation. Eksempler på passende uorganiske kationer inkluderer, men er ikke begrenset til, alkalimetallioner slik som Na<sup>+</sup> og K<sup>+</sup>, kationer av

jordalkalimetaller slik som  $\text{Ca}^{2+}$  og  $\text{Mg}^{2+}$  og andre kationer slik som  $\text{Al}^{3+}$ . Eksempler på passende organiske kationer inkluderer, men er ikke begrenset til, ammoniumion (dvs.  $\text{NH}_4^+$ ) og substituerte ammoniumioner (f.eks.  $\text{NH}_3\text{R}^+$ ,  $\text{NH}_2\text{R}_2^+$ ,  $\text{NHR}_3^+$ ,  $\text{NR}_4^+$ ). Eksempler på noen passende substituerte ammoniumioner er de som er avledet fra: etylamin, dietylamin, disykloheksylamin, trietylamin, butylamin, etylenediamin, etanolamin, dietanolamin, piperazin, benzylamin, fenylbenzylamin, kolin, meglumin og trometamin samt aminosyrer, slik som lysin og arginin. En eksempel på et vanlig kvaternært ammoniumion er  $\text{N}(\text{CH}_3)_4^+$ .

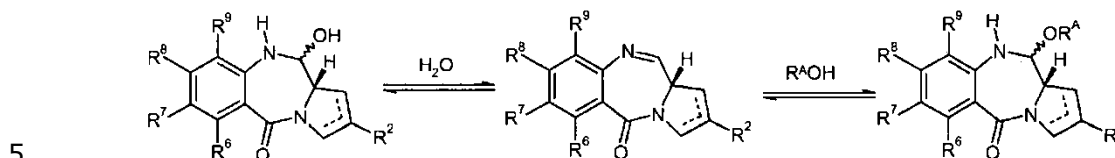
Hvis forbindelsen er kationisk, eller har en funksjonsgruppe som kan være kationisk (f.eks. kan  $-\text{NH}_2$  være  $-\text{NH}_3^+$ ), kan et salt dannes med et passende anion. Eksempler på egnede uorganiske anioner inkluderer, men er ikke begrenset til, de som er avledet fra følgende uorganiske syrer: saltsyre, hydrobromsyre, hydrojodsyre, svovelsyre, svovelsyring, salpetersyre, salpetersyring, fosforsyre og fosforsyring.

Eksempler på egnede organiske anioner inkluderer, men er ikke begrenset til, de som er avledet fra følgende organiske syrer: 2-acetyoxybenzoic, acetic, ascorbic, aspartic, benzoic, camphorsulfonic, cinnamic, citric, edetic, ethanedisulfonic, ethanesulfonic, fumaric, gluheptonic, gluconic, glutamic, glycolic, hydroxymaleic, hydroxynaphthalene carboxylic, isethionic, lactic, lactobionic, lauric, maleic, malic, methanesulfonic, mucic, oleic, oxalic, palmitic, pamoic, pantothenic, phenylacetic, phenylsulfonic, propionic, pyruvic, salicylic, stearic, succinic, sulfanilic, tartaric, toluenesulfonic, trifluoroacetic acid and valeric. Eksempler på egnede polymere organiske anioner inkluderer, men er ikke begrenset til, de som er avledet fra følgende polymere syrer: garvesyre, karboksymetylcellulose.

### **Solvater**

Det kan være hensiktsmessig eller ønskelig å fremstille, rense og/eller behandle et solvat tilsvarende den aktive forbindelsen. Betegnelsen "solvat" er anvendt her i den sedvanlige betydningen for å referere til et kompleks av oppløst stoff (f.eks. aktiv forbindelse, salt av aktiv forbindelse) og løsemiddel. Hvis løsemiddelet er vann, kan solvatet passende betegnes som et hydrat, for eksempel et monohydrat, et dihydrat, et trihydrat osv.

Oppfinnelsen inkluderer forbindelser der et løsemiddel tilsettes på hele iminbindinger av PBD-enheten, som er illustrert nedenfor der løsemiddelet er vann eller en alkohol ( $R^A\text{OH}$ , der  $R^A$  er  $C_{1-4}$ -alkyl):



Disse formene kan kalles karbinolamin og karbinolamineterformer av PBD (som beskrevet i avsnittet om  $R^{10}$  ovenfor). Balansen mellom disse likevektene avhenger av forholdene i hvilke forbindelsene finnes, så vel som selve enhetens natur.

10

Disse bestemte forbindelsene kan isoleres i fast form, for eksempel ved lyofilisering.

### **Isomerer**

15

Visse forbindelser ifølge oppfinnelsen kan foreligge i en eller flere særlige geometriske, optiske, enantiomere, diasteriomere, epimeriske, atropiske, stereoisomere, tautomere, konformasjonale eller anomeriske former, inkludert, men ikke begrenset til, cis- og trans-former; E- og Z-former; c-, t- og r-former; endo- og ekso-former; R-, S- og meso-former; D- og L-former; d- og l-former; (+) og (-)-former; keto-, enol- og enolat-former; syn- og anti-former; synklinal- og antyklinal-former;  $\alpha$ - og  $\beta$ -former; aksiale og ekvatoriale former; båt-, stol-, vri-, konvolutt- og halvstol-former og kombinasjoner derav, heretter samlet omtalt som "isomerer" (eller "isomere former").

20

25

Med "kiral" menes molekyler som er ulike sin speilbildepartner, mens det med "akiral" menes molekyler som er like sin speilbildepartner.

30

Med "stereoisomer" menes forbindelser som har identisk kjemisk konstitusjon, men som er forskjellige med hensyn til romarrangementet av atomer eller grupper.

Med "diastereomer" menes 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 høyoppløsningsprosedyrer slik som elektroforese og kromatografi.

Med "enantiomer" menes stereoisomerer av en forbindelse som er ulike speilbilder av hverandre.

Heri anvendte stereokjemiske definisjoner og konvensjoner følger alminneligvis S. P. Parker, Ed., McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms (1984) McGraw-Hill Book Company, New York og Eliel, E. and Wilen, S., "Stereochemistry of Organic Compounds", John Wiley & Sons, Inc., New York, 1994. Forbindelsene ifølge oppfinnelsen inneholder asymmetriske eller kirale sentre og finnes derfor i forskjellige stereoisomere former. Det er hensikten at alle stereoisomere former av forbindelsene ifølge oppfinnelsen, inkludert, men ikke begrenset til diastereomerer, enantiomerer og atropisomerer, så vel som blandinger derav, som for eksempel racemiske blandinger, utgjør en del av den foreliggende oppfinnelsen. Mange organiske forbindelser foreligger i optisk aktive former, dvs. 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 absolute konfigurasjon rundt dets kirale 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 bestemt kjemisk struktur er disse stereoisomerene identiske, med unntak av at de er speilbilder av hverandre. En spesifikk stereoisomer kan også betegnes en enantiomer, og en blanding av slike isomerer kalles ofte en enantiomerisk blanding. En 50 : 50 blanding av enantiomerer betegnes en racemisk blanding eller et racemat, som kan oppstå hvor det ikke finnes noen stereoseleksjon eller stereospesifisitet i en kjemisk reaksjon eller prosess. Med "racemisk blanding" og "racemat" menes en ekvimolar blanding av to enantiomeriske arter, frie for optisk aktivitet.

Merk at, med unntak av det som er omtalt nedenfor for tautomere former, og som er spesifikt utelukket fra betegnelsen "isomerer", som anvendt heri, er

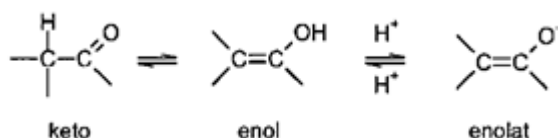
strukturelle (eller konstitusjonelle) isomerer (dvs. isomerer som er forskjellige i forbindelsene mellom atomer i stedet for bare av posisjonen av atomer i rom). En referanse til en metoksygruppe,  $-OCH_3$ , skal for eksempel ikke tolkes som en referanse til dens strukturelle isomer, en hydroksymetylgruppe,  $-CH_2OH$ .

5 Likeledes skal en referanse til orto-klorfenyl ikke tolkes som en referanse til dens strukturelle isomer, meta-klorofenyl. En referanse til en klasse strukturer kan imidlertid godt inkludere strukturelle isomere former som omfattes av den klassen (f.eks.  $C_{1-7}$ -alkyl inkluderer n-propyl og iso-propyl; butyl inkluderer n-, iso-, sek- og tert-butyl; metoksyfenyl inkluderer orto-, meta- og para-

10 metoksyfenyl).

Eksklusjonen over gjelder ikke tautomere former, for eksempel, keto-, enol- og enolat-former, som i for eksempel følgende tautomere par: keto/enol (beskrevet nedenfor), imin/enamin, amid/iminalkohol, amidin/amidin, nitroso/oksim,

15 tioketon/enetiol, N-nitroso/hydroksyazo og nitro/aci-nitro.



Begrepet "tautomer" eller "tautomer form" betyr strukturelle isomerer med forskjellig energi som er interkonvertible via en energisvak barriere.

20 Protontautomerer (også kjent som prototropiske tautomerer) omfatter for eksempel interkonverteringer via migrering av et proton, slik som isomeriseringer av keto-enol og imin-enamin. Valenstautomerer omfatter interkonverteringer ved reorganisering av noen av bindingselektronene.

25 Legg merke til at forbindelser med en eller flere isotopiske substitusjoner er spesifikt inkludert i begrepet "isomer". H kan for eksempel være i en hvilken som helst isotopisk form, inkludert  $^1\text{H}$ ,  $^2\text{H}$  (D) og  $^3\text{H}$  (T); C kan være i en hvilken som helst isotopisk form, inkludert  $^{12}\text{C}$ ,  $^{13}\text{C}$  og  $^{14}\text{C}$ ; O kan være i en hvilken som helst isotopisk form, inkludert  $^{16}\text{O}$  og  $^{18}\text{O}$  og lignende.

30 Eksempler på isotoper som kan bli innlemmet i forbindelsene ifølge oppfinnelsen innbefatter isotoper av hydrogen, karbon, nitrogen, oksygen, fosfor, fluor og klor, deriblant, men ikke begrenset til  $^2\text{H}$  (deuterium, D),  $^3\text{H}$  (tritium),  $^{11}\text{C}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{18}\text{F}$ ,  $^{31}\text{P}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{36}\text{Cl}$ , and  $^{125}\text{I}$ . Forskjellige isotopisk merkede

forbindelser ifølge foreliggende oppfinnelse, for eksempel de i hvilke radioaktive isotoper så som  $^3\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , og  $^{14}\text{C}$  er innlemmet. Slike isotopisk merkede forbindelser kan være nyttige i metabolske studier, reaksjons-kinetiske studier, deteksjons- eller bildediagnostiske teknikker, så som positronemisjonstomografi (PET) eller enfotonstomografi (SPECT), inkludert legemiddel- eller substratvevsfordelingsassayer, eller i radioaktiv behandling av pasienter. Deuterium-merkede eller substituerte terapeutiske forbindelser ifølge oppfinnelsen kan ha forbedrede DMPK-egenskaper (legemiddelmetabolisme og farmakokinetikk) knyttet til fordeling, metabolisme og ekskresjon (ADME). Videre kan substitusjon med tyngre isotoper slik som deuterium tilby visse terapeutiske fordeler på grunn av større metabolsk stabilitet, f.eks. økt halveringstid in vivo eller reduserte doseringskrav. En  $^{18}\text{F}$ -merket forbindelse kan være nyttig for PET- eller SPECT-studier. Isotopisk merkede forbindelser ifølge den foreliggende oppfinnelsen kan som regel fremstilles ved hjelp av fremgangsmåter som er analoge med fremgangsmåtene beskrevet i skjemaene og/eller i eksemplene heri nedenfor, ved substitusjon av et isotopisk merket reagens med et ikke-isotopisk merket reagens. Videre kan substitusjon med tyngre isotoper slik som deuterium (dvs.  $^2\text{H}$  eller D), tilby visse terapeutiske fordeler på grunn av større metabolsk stabilitet, f.eks. økt halveringstid in vivo eller reduserte doseringskrav eller en forbedring i terapeutisk indeks. Det er forutsatt at deuterium i denne sammenhengen regnes som en substituent. Konsentrasjonen av en slik tyngre isotop, spesielt deuterium, kan defineres av en isotopisk anrikningsfaktor. I forbindelsene ifølge denne oppfinnelsen er ethvert atom som ikke er spesielt betegnet som en bestemt isotop ment å representere en hvilken som helst stabil isotop av dette atomet.

Med mindre annet er spesifisert, inkluderer en referanse til en spesiell forbindelse alle slike isomere former, inklusive (helt eller delvis) racemiske og andre blandinger derav. Fremgangsmåter for fremstilling (for eksempel asymmetrisk syntese) og separasjon (for eksempel fraksjonell krystallisasjon og kromatografiske midler) av slike isomere former er enten kjent innen faget eller kan lett oppnås ved å tilpasse fremgangsmåtene beskrevet heri, eller kjente fremgangsmåter, på en kjent måte.

### ***Biologisk aktivitet***

35

### **In vitro-celleproliferasjonsassayer**



Den cytotoxiske eller cytostatiske aktivitet til et antistoff-legemiddel-konjugat (ADC) måles generelt ved: å eksponere pattedyrceller som har reseptorproteiner, f.eks. HER2, for ADC-ets antistoff i et cellekulturmedium, dyrke cellene fra ca. 6 timer til ca. 5 dager og måle cellelevedyktigheten. Cellebaserte *in vitro*-assayer anvendes til å måle levedyktighet (proliferasjon), cytotoxisitet og induksjon av apoptose (caspaseaktivering) av et ADC ifølge oppfinnelsen.

Antistoff-legemiddel-konjugatets *in vitro*-potens kan måles ved et celleproliferasjonsassay. CellTiter-Glo<sup>®</sup> Luminescent Cell Viability Assay er en kommersielt tilgjengelig (Promega Corp., Madison, WI), homogen analysefremgangsmåte basert på den rekombinante ekspresjonen av *Coleoptera*-luciferase (US-patent nr. 5583024, 5674713 og 5700670). Denne celleproliferasjonsanalysen 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 6602677). CellTiter-Glo<sup>®</sup>-assayet utføres i 96-brønners format, hvilket gjør den mottagelig for automatisk screening med høy gjennomstrømningshastighet (HTS) (Cree et al (1995) AntiCancer Drugs 6:398-404). Den homogene analyseprosedyren omfatter tilsetning av det enkelte reagenset (CellTiter-Glo<sup>®</sup>-reagenset) direkte til celler dyrket 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, viste 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 mengdene av tilstedeværende ATP. Mengden av ATP er direkte proporsjonal med antallet av celler til stede i kultur. CellTiter-Glo<sup>®</sup>-assayet genererer et "glødeaktig" 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.

### **In vivo-effekt**

5

*In vivo*-effekten av antistoff-legemiddel-konjugater (ADC) ifølge oppfinnelsen kan måles ved tumorxenograftstudier hos mus. *In vivo*-effekten av et anti-HER2 ADC ifølge oppfinnelsen kan måles ved en modell med transgene mus med høy HER2-ekspresjon ved eksplantasjon. En allograft forplantes fra de Fo5 mmtv-transgene musene som ikke responderer på, eller responderer dårlig på, HERCEPTIN®-behandling. Individuer ble behandlet én gang med ADC ved visse dosenivåer (mg/kg) og PBD-legemiddeleksponering ( $\mu\text{g}/\text{m}^2$ ) og placebobufferkontroll (vehikkel) og overvåket over to uker eller mer for å måle tiden til tumordobling, loggcelledrap og tumorkrymping.

10

15

### **Anvendelse**

Konjugatene ifølge oppfinnelsen kan anvendes til å tilveiebringe en PBD-forbindelse ved en målposisjon.

20

Målposisjonen er foretrukket en proliferativ cellepopulasjon. Antistoffet er et antistoff for et antigen til stede i en proliferativ cellepopulasjon.

25

I én utførelsesform er antigenet fraværende eller til stede ved et redusert nivå i en ikke-proliferativ cellepopulasjon sammenlignet med mengden av antigen som er til stede i den proliferative cellepopulasjonen, f.eks. en tumorcellepopulasjon.

30

Ved målposisjonen kan linkerens spalte for å frisette en forbindelse med formel (D). Konjugatet kan således anvendes til selektivt å tilveiebringe en forbindelse med formel (D) til målposisjonen.

Linkeren kan spaltes ved et enzym som er til stede ved målposisjonen.

Målposisjonen kan være *in vitro*, *in vivo* eller *ex vivo*.

35

Antistoff-legemiddel-konjugatforbindelsene (ADC-forbindelsene) ifølge oppfinnelsen inkluderer dem med nytte for anticanceraktivitet. Forbindelsene inkluderer særlig et konjugert antistoff, dvs. kovalent bundet av en linker, til en PBD-legemiddelenhet, dvs. toksin. Når legemiddelet ikke er konjugert til et antistoff, har PBD-legemiddelet en cytotoxisk effekt. Den biologiske aktiviteten til PBD-legemiddelenheten er således modulert ved konjugering til et antistoff. Antistoff-legemiddel-konjugater (ADC) ifølge oppfinnelsen leverer selektivt en virkningsfull dose av et cytotoxisk middel til tumorvev, hvorved større selektivitet, dvs. en lavere effektiv dose, kan oppnås.

10

I ett aspekt tilveiebringer den foreliggende oppfinnelsen en konjugatforbindelse som beskrevet heri til anvendelse i behandling.

15

I et ytterligere aspekt tilveiebringes det også en konjugatforbindelse som beskrevet heri til anvendelse i behandling av en proliferativ sykdom. Et andre aspekt ved den foreliggende oppfinnelsen tilveiebringer anvendelsen av en konjugatforbindelse i produksjonen av et legemiddel for behandling av en proliferativ sykdom.

20

Fagmannen er uten videre i stand til å bestemme hvorvidt et kandidatkonjugat behandler en proliferativ tilstand for noen særlig celletype. Assayer som praktisk kan anvendes til å vurdere aktiviteten til en særlig forbindelse, er for eksempel beskrevet i eksemplene nedenfor.

25

Betegnelsen "proliferativ sykdom" betyr en uønsket eller ukontrollert cellulær proliferasjon av overdrevne eller unormale celler som er uønsket, slik som neoplastisk eller hyperplastisk vekst, enten *in vitro* eller *in vivo*.

30

Eksempler på proliferative tilstander inkluderer, men er ikke begrenset til, godartet, pre-ondartet og ondartet cellulær proliferasjon, inkludert, men ikke begrenset til, neoplasmer og tumorer (f.eks. histocytom, gliom, astrocytom, osteom), cancere (f.eks. lungecancer, småcellet lungecancer, gastrointestinalcancer, tarmcancer, tykktarmscancer, brystkarsinom, eggstokkarsinom, prostatacancer, testikkelcancer, levercancer, nyrecancer, blærecancer, bukspyttkjertelcancer, hjernecancer, sarkom, osteosarkom, Kaposis sarkom, melanom), leukemier, psoriasis, bensykdommer,

35

fibroproliferative lidelser (f.eks. i bindevev) og aterosklerose. Cancere av særlig interesse inkluderer, men er ikke begrenset til, leukemier og eggstokkencercere.

5 En hvilken som helst celletype kan behandles, inkludert, men ikke begrenset til, lunge, mage-tarm (inkludert f.eks. tarm, tykktarm), bryst, eggstokk, prostata, lever, nyre, blære, bukspyttkjertel, hjerne og hud.

I én utførelsesform er behandlingen av en bukspyttkjertelcancer.

10 I én utførelsesform er behandlingen av en tumor som har  $\alpha_v\beta_6$ -integrin på celleoverflaten.

15 Det er tenkt at antistoff-legemiddel-konjugater (ADC) ifølge den foreliggende oppfinnelsen kan anvendes til å behandle forskjellige sykdommer eller forstyrrelser, f.eks. karakterisert ved overekspresjon av et tumorantigen. Eksempler på tilstander eller hyperproliferative forstyrrelser inkluderer godartede eller ondartede tumorer, leukemi, hematologiske og lymfoidondartetheter. Andre inkluderer neuronale, gliale, astrocytale, hypotalamiske, glandulære, makrofagale, epiteliale, stromale, blastocoeliske, inflammatoriske, angiogene og immunologiske, herunder autoimmune, forstyrrelser. Sykdommen eller forstyrrelsen som skal behandles, er generelt en hyperproliferativ sykdom slik som cancer. Eksempler på cancer som skal behandles heri, inkluderer, men er ikke begrenset til, karsinom, lymfom, blastom, sarkom og leukemi eller lymfoidondartetheter. Mer særlige eksempler på slike cancere inkluderer plateepitelcancer, lungecancer inkludert småcellet lungecancer, ikke-småcellet lungecancer, adenokarsinom i lungen og platekarsinom i lungen, cancer i bukinnen, hepatocellulær cancer, magecancer, inkludert gastrointestinalcancer, bukspyttkjertelcancer, glioblastom, livmorhalscancer, eggstokkancer, levercancer, blærecancer, hepatom, brystcancer, tykktarmscancer, rektalcancer, kolorektalcancer, endometrialt eller uterint karsinom, spyttkjertelkarsinom, nyrecancer, prostatacancer, vulvacancer, skjoldbruskkjertelcancer, hepatisk karsinom, analkarsinom, peniskarsinom samt hode- og halscancer.

35 Autoimmune sykdommer for hvilke ADC-forbindelsene kan anvendes i behandling, inkluderer revmatologiske lidelser (slik som for eksempel revmatoid artritt, Sjögrens syndrom, skleroderma, lupus slik som SLE og lupus nefritt, polymyositt/dermatomyositt, kryoglobulinemi, anti-fosfolipid-antistoffsyndrom

og psoriasisartritt), artrose, autoimmune gastrointestinale forstyrrelser og leverforstyrrelser (slik som for eksempel inflammatoriske tarmsykdommer (f.eks. ulcerøs kolitt og Crohns sykdom), autoimmun gastritt og pernisiøs anemi, autoimmun hepatitt, primær biliær cirrhose, primær skleroserende kolangitt og cøliaki), vaskulitt (slik som for eksempel ANCA-assosiert vaskulitt, herunder Churg-Strauss-vaskulitt, Wegeners granulomatose og polyangitt), autoimmune neurologiske forstyrrelser (slik som for eksempel multippel sklerose, opsoklonus-myoklonussyndrom, myasthenia gravis, neuromyelitis optica, Parkinsons sykdom, Alzheimers sykdom og autoimmune polyneuropatier), nyreforstyrrelser (slik som for eksempel glomerulonefritt, Goodpastures syndrom og Bergers sykdom), autoimmune dermatologiske forstyrrelser (slik som for eksempel psoriasis, elveblest, neslefeber, pemfigus vulgaris, bulløs pemfigus og kutan lupus erythematosus), hematologiske forstyrrelser (slik som for eksempel trombocytopen purpura, trombotisk trombocytopen purpura, posttransfusjonspurpura og autoimmun hemolytisk anemi), aterosklerose, uvetitt, autoimmune hørselssykdommer (slik som for eksempel sykdom i det indre øret og hørselstap) og Behcets sykdom, Raynauds syndrom, organtransplantasjon og autoimmune endokrine forstyrrelser (slik som for eksempel diabetesrelaterte autoimmune sykdommer slik som insulinavhengig diabetes mellitus (IDDM), Addisons sykdom og autoimmun thyroidsykdom (f.eks. Graves sykdom og tyroiditt)). Slike sykdommer inkluderer mer foretrukket for eksempel revmatoid artritt, ulcerøs kolitt, ANCA-assosiert vaskulitt, lupus, multippel sklerose, Sjögrens syndrom, Graves sykdom, IDDM, pernisiøs anemi, tyroiditt og glomerulonefritt.

### 25 ***Fremgangsmåter for behandling***

Konjugatene ifølge den foreliggende oppfinnelsen kan anvendes i en fremgangsmåte for terapi. Selv om den ikke utgjør en del av foreliggende oppfinnelse, er det mulig å gjennomføre en fremgangsmåte for behandling, omfattende administrering til et individ som trenger behandling en terapeutisk effektiv mengde av en konjugert forbindelse ifølge oppfinnelsen. Begrepet "terapeutisk effektiv mengde" er en mengde som er tilstrekkelig til å vise nytte for en pasient. Slik nytte kan i det minste være lindring av minst et symptom. Den faktiske mengden som blir administrert, og hastigheten og tidsforløpet for administrering, vil avhenge av arten og alvorligheten av det som blir behandlet.

Ansvar for forskrivning av behandling, for eksempel vedtak om dosering, tilligger allmennleger og andre leger.

5 En forbindelse ifølge oppfinnelsen kan administreres alene eller i kombinasjon med andre behandlinger, enten samtidig eller sekvensielt, avhengig av tilstanden som skal behandles. Eksempler på behandlinger og terapier inkluderer, men er ikke begrenset til, kjemoterapi (administrering av aktive midler, inkludert blant annet legemidler, slik som kjemoterapeutika), kirurgi og strålebehandling.

10 Et "kjemoterapeutisk stoff" er en kjemisk forbindelse som er nyttig for behandling av kreft, uavhengig av virkemekanisme. Klasser av kjemoterapeutiske stoffer omfatter blant annet: alkylating agents, antimetabolites, spindle poison plant alkaloids, cytotoxic/antitumor antibiotics, topoisomerase inhibitors, antibodies, photosensitizers, and kinase inhibitors.  
15 Kjemoterapeutiske stoffer omfatter forbindelser anvendt i "målrettet behandling" og konvensjonell kjemoterapi.

Eksempler på kjemoterapeutiske stoffer omfatter: erlotinib (TARCEVA®, Genentech/OSI Pharm.), docetaxel (TAXOTERE®, Sanofi-Aventis), 5-FU (fluorouracil, 5-fluorouracil, CAS-nr. 51-21-8), gemcitabin (GEMZAR®, Lilly), PD-0325901 (CAS-nr. 391210-10-9, Pfizer), cisplatin (cis-diamin, diklorplatinum(II), CAS-nr. 15663-27-1), karboplatin (CAS-nr. 41575-94-4), paklitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), trastuzumab (HERCEPTIN®, Genentech), temozolomide (4-methyl-5-oxo-2,3,4,6,8-pentazabicyclo [4.3.0] nona-2,7,9-trien- 9-karboksamid, CAS-nr. 85622-93-1, TEMODAR®, TEMODAL®, Schering Plough), tamoksifen ((Z)-2-[4-(1,2-diphenylbut-1-enyl)phenoxy]-N,N-dimethylethanamine, NOLVADEX®, ISTUBAL®, VALODEX®) og doksorubicin (ADRIAMYCIN®), Akti-1/2, HPPD og rapamycin.

30 Flere eksempler på kjemoterapeutiske stoffer omfatter: oksaliplatin (ELOXATIN®, Sanofi), bortezomib (VELCADE®, Millennium Pharm.), sunitinib (SUNITINIB®, SU11248, Pfizer), letrozol (FEMARA®, Novartis), imatinibmesylat (GLEEVEC®, Novartis), XL-518 (Mek-hemmer, Exelixis, WO 2007/044515), ARRY-886 (Mek-hemmer, AZD6244, Array BioPharma, Astra Zeneca), SF-1126 (PI3K-hemmer, Semafore Pharmaceuticals), BEZ-235 (PI3K-hemmer, Novartis), XL-147 (PI3K-hemmer, Exelixis), PTK787/ZK 222584 (Novartis), fulvestrant

(FASLODEX®, AstraZeneca), leukovorin (folinsyre), rapamycin (sirolimus, RAPAMUNE®, Wyeth), lapatinib (TYKERB®, GSK572016, Glaxo Smith Kline), ionafarnib (SARASAR™, SCH 66336, Schering Plough), sorafenib (NEXAVAR®, BAY43-9006, Bayer Labs), gefitinib (IRESSA®, AstraZeneca), irinotekan (CAMPTOSAR®, CPT-11, Pfizer), tipifarnib (ZARNESTRA™, Johnson & Johnson), ABRAXANE™ (kremoforfri), albuminkonstruert nanopartikkelformuleringer av pallitaksel (American Pharmaceutical Partners, Schaumberg, II), vandetanib (rINN, ZD6474, ZACTIMA®, AstraZeneca), kloranmbucil, AG1478, AG1571 (SU 5271; Sugen), temsirolimus (TORISEL®, Wyeth), pazopanib (GlaxoSmithKline), kanfosfamid (TELCYTA®, Telik), tiotepa og syklofosfamid (CYTOXAN®, NEOSAR®); alkylsulfonater slik som busulfan, improsulfan og piposulfan; aziridiner slik som benzodopa, karboquon, meturedopa og uredopa; etyleniminer og metylamelaminer inkludert altretamin, trietylenmelamin, trietylenfosforamid, trietylentiofosforamid og trimetylomelamin; acetogener (særlig bullatacin og bullatacinon); et kamptotecin (inkludert det syntetiske analoge topotekan); bryostatin; callystatin; CC-1065 (inkludert deres adozelesin-, karzelesin- og syntetiske bizelesinanaloger); kryptofyciner (særlig kryptofycin 1 og kryptofycin 8); dolastatin; duokarmycin (inkludert syntetiske analoger, KW-2189 og CB1-TM1); eleuterobin; pankratistatin; et sarkodistylin; spongistatin; nitrogensennep slik som klorambucil, klornafazin, klorofosfamid, estramustin, ifosfamid, mekloretoamin, mekloretoaminoksidhydroklorid, melfalan, novembikin, fenesterin, prednimustin, trofosfamid, uracilsennep; nitrosourear slik som karmustin, klorzotocin, fotemustin, lomustin, nimustin og ranimnustin; antibiotika slik som enediynantibiotika (f.eks. kalicheamicin, kalicheamicin gamma1I, kalicheamicin omega1I (Angew Chem. Intl. Ed. Engl. (1994) 33:183-186); dynemicin, dynemicin A; bisfosfonater, slik som klodronat; et esperamicin; i tillegg til neokarzinostatinkromofor og relaterte kromproteinenediynantibiotikakromoforer), aklacinomysiner, aktinomyciner, autramycin, azaserin, bleomyciner, kaktinomycin, karabycin, karminomycin, karzinofilin, kromomycin, daktinomycin, daunorubicin, detorubicin, 6-diazo-5-okso-L-norleucin, morfolino-doksorubicin, cyanomorfolino-doksorubicin, 2-pyrrolino-doksorubicin og deoksydoksorubicin), epirubicin, esorubicin, idarubicin, nemorubicin, marcellomycin, mitomyciner slik som mitomycin C, mykofenolsyre, nogalamycin, olivomyciner, peplomycin, porfiromycin, puromycin, quelamycin, rodorubicin, streptonigrin, streptozocin, tubercidin, ubenimeks, zinostatin, zorubicin; anti-metabolitter slik som metotreksat og 5-fluoruracil (5-FU); folsyreanaloger slik som denopterin, metotreksat, pteropterin, trimetreksat;

purinanaloger slik som fludarabin, 6-merkaptopurin, tiamiprin, tioguanin; pyrimidinanaloger slik som ancitabin, azacitidin, 6-azauridin, karmofur, cytarabin, dideoksyuridin, doksifluridin, enocitabin, floksuridin; androgener slik som kalusteron, dromostanolonpropionat, epitiostanol, mepitiostane,

5 testolakton; antiadrenaler slik som aminoglutetimid, mitotan, trilostan; folsyrerefill slik som folinsyre; aceglaton; aldofosfamidglykosid; aminolevulinsyre; eniluracil; amsakrin; bestrabucil; bisantren; edatraksat; defofamin; demekolcin; diaziqon; eflornitin; elliptiniumacetat; et epton; etogluclid; galliumnitrate; hydroksyurea; lentinan; lonidainin; maytansinoider slik

10 som maytansin og ansamitociner; mitoguazon; mitoksantron; mopidanmol; nitraerin; pentostatin; fenamet; pirarubicin; losoksantron; podofyllinsyre; 2-etylhidrazid; prokarbazin; PSK®-polysakkharidkompleks (JHS Natural Products, Eugene, OR); razoksan; rhizoksin; sizofiran; spirogermanium; tenuazonsyre; triaziqon; 2,2',2"-triklorotrietylamin; trikotecener (særlig T-2 toksin, verracurin

15 A, roridin A og anguidin); uretan; vindesin; dakarbazin; mannomustin; mitobronitol; mitolaktol; pipobroman; gacytosin; arabinosid ("Ara-C"); cyklofosfamid; tiotepa; 6-tioguanin; merkaptopurin; metotreksat; platinaanaloger slik som cisplatin og karboplatin; vinblastin; etoposid (VP-16); ifosfamid; mitoksantron; vinkristin; vinorelbin (NAVELBINE®); novantron;

20 teniposid; edatreksat; daunomycin; aminopterin; kapecitabin (XELODA®, Roche); ibandronat; CPT-11; topoisomerasehemmer RFS 2000; difluorometylornitin (DMFO); retinoider slik som retinsyre og farmasøytisk aksepterte salter, syrer og derivativer av hvilke som helst av ovenstående.

25 Også omfattet i definisjonen av "kjemoterapeutisk stoff" er: (i) antihormonstoffer som regulerer eller hemmer hormonvirkning på tumorer slik som antiøstrogen og utvalgte østrogenreseptormodulatorer (SERM-er), herunder for eksempel tamoksifen (omfattende NOLVADEX®, tamoksifensitrat), raloksifen, droloksifen, 4-hydroksytamoksifen, trioksifen, keoksifen, LY117018,

30 onapriston og FARESTON® (toremifinesitrat), (ii) aromatasehemmere som hemmer enzymaromatasen, som regulerer østrogenproduksjon i binyrene, slik som for eksempel 4(5)-imidazoler, aminoglutetimid, MEGASE® (megestrolacetat), AROMASIN® (eksemestan, Pfizer), formestan, fadrozol, RIVISOR® (vorozol), FEMARA® (letrozol, Novartis) og ARIMIDEX® (anastrozol,

35 AstraZeneca), (iii) antiandrogener slik som flutamid, nilutamid, bikalutamid, leuprolid og goserelin samt troksacitabin (en 1,3-dioksolannukleosidcytosinanalogue), (iv) proteinkinasehemmere slik som MEK-



hemmere (WO 2007/044515), (v) lipidkinasehemmere, (vi) antisensoligonukleotider, særlig dem som hemmer ekspresjon av gener i signaliserende ledningsveier implisert i aberrant celleproliferasjon, f.eks. PKC-alfa, Raf og H-Ras, slik som oblimersen (GENASENSE®, Genta Inc.), (vii) 5 ribozymer slik som VEGF-ekspresjonshemmere (f.eks. ANGIOZYME®) og HER2-ekspresjonshemmere (viii) vaksiner slik som genterapivaksiner for eksempel ALLOVECTIN®, LEUVECTIN® og VAXID®, PROLEUKIN® rIL-2, topoisomerase-1-hemmere slik som LURTOTECAN®, ABARELIX® rmRH, (ix) antiangiogene stoffer 10 slik som bevacizumab (AVASTIN®, Genentech) og farmasøytisk akseptable salter, syrer og derivater av hvilke som helst av ovenstående.

Også omfattet i definisjonen av "kjemoterapeutiske stoffer" er terapeutiske antistoffer slik som alemtuzumab (Campath), bevacizumab (AVASTIN®, 15 Genentech), cetuksimab (ERBITUX®, Imclone), panitumumab (VECTIBIX®, Amgen), rituksimab (RITUXAN®, Genentech/Biogen Idec), pertuzumab (OMNITARG™, 2C4, Genentech), trastuzumab (HERGEPITIN®, Genentech), tositumomab (Bexxar, Corixa) og antistoffetlegemiddelkonjugatet, gemtuzumabozogamicin (MYLOTARG®, Wyeth).

20 Humaniserte monoklonale antistoffer med terapeutisk potensial som kjemoterapeutiske midler i kombinasjon med konjugater ifølge oppfinnelsen, inkluderer: alemtuzumab, apolizumab, aselizumab, atlizumab, bapineuzumab, bevacizumab, bivatumab mertansin, kantuzumabmertansin, cedelizumab, certolizumabpegol, cidfusituzumab, cidtuzumab, daklizumab, ekulizumab, 25 efalizumab, epratuzumab, erlizumab, felvizumab, fontolizumab, gemtuzumabozogamicin, inotuzumabozogamicin, ipilimumab, labetuzumab, lintuzumab, matuzumab, mepolizumab, motavizumab, motovizumab, natalizumab, nimotuzumab, nolovizumab, numavizumab, okrelizumab, omalizumab, palivizumab, paskolizumab, pecfusituzumab, pectuzumab, 30 pertuzumab, pekselizumab, ralivizumab, ranibizumab, reslivizumab, reslizumab, resyvizumab, rovelizumab, ruplizumab, sibrotuzumab, siplizumab, sontuzumab, takatuzumabtetraksetan, tadocizumab, talizumab, tefibazumab, tocilizumab, toralizumab, trastuzumab, tukotuzumabcelmoleukin, tukusituzumab, umavizumab, urtoksazumab og visilizumab.

35 Farmasøytiske sammensetninger ifølge den foreliggende oppfinnelsen og for anvendelse ifølge den foreliggende oppfinnelsen kan omfatte, i tillegg til den

aktive bestanddelen, dvs. en konjugatforbindelse, en farmasøytisk akseptabel eksipient, bærestoff, buffer, stabilisator eller andre materialer velkjent for fagmannen. Slik materialer bør være ikke-toksiske og bør ikke interferere med effektiviteten av den aktive bestanddelen. Bærestoffets eller andre materialers nøyaktige natur vil avhenge av administrasjonsveien, hvilken kan være oral, eller ved injeksjon, f.eks. kutant, subkutant, eller intravenøst.

Farmasøytiske sammensetninger for oral administrasjon kan være i tablett-, kapsel-, pulver/ eller væskeform. En tablett kan omfatte et fast bærestoff eller et hjelpestoff. Flytende farmasøytiske sammensetninger omfatter generelt et flytende bærestoff slik som vann, petroleum, animalske eller vegetabiliske oljer, mineralolje eller syntetisk olje. Fysiologisk saltløsning, dekstrose eller andre sakkaridløsninger eller glykoler slik som etylenglykol, propylenglykol eller polyetylenglykol kan være inkludert. En kapsel kan omfatte et fast bærestoff som en gelatin.

For intravenøs, kutan eller subkutan injeksjon, eller injeksjon på det berørte stedet vil den aktive ingrediensen være i form av en parenteralt akseptabel vandig løsning som er pyrogenfri og har passende pH, isotonisitet og stabilitet. Fagmannen er godt i stand til å preparere egnede løsninger ved hjelp av, for eksempel, isotoniske vehikler så som natriumkloridinjeksjon, Ringers injeksjon, laktert Ringers injeksjon. Konserveringsmidler, stabilisatorer, buffere, antioksidanter og/eller andre additiver kan inkluderes etter behov.

### **Formuleringer**

Selv om det er mulig å anvende den konjugerte forbindelsen (f.eks. administrert) alene, er det ofte foretrukket å presentere den som en sammensetning eller formulering.

I én utførelsesform er sammensetningen en farmasøytisk sammensetning (for eksempel formulering, fremstilling, legemidler) omfattende en konjugert forbindelse, som beskrevet heri, og et farmasøytisk akseptabelt bærestoff, fortynningsmiddel eller eksipient.

I én utførelsesform er sammensetningen en farmasøytisk sammensetning omfattende minst én konjugert forbindelse, som beskrevet heri, sammen med én

eller flere andre farmasøytisk akseptable ingredienser som er godt kjent for fagmannen, inkludert, men ikke begrenset til, farmasøytisk akseptable bærestoffer, fortynningsmidler, eksipienter, hjelpestoffer, fyllstoffer, buffere, konserveringsmidler, antioksidanter, smøremidler, stabilisatorer, oppløsningsmidler, overflateaktive midler (for eksempel fuktemidler), maskeringsmidler, fargemidler, smakstilsetningsmidler, og søtningmidler.

I én utførelse omfatter sammensetningen andre ytterligere aktive midler, for eksempel andre terapeutiske eller profylaktiske midler.

10

Passende bærestoffer, fortynningsmidler, eksipienser osv. er å finne i farmasøytiske standardtekster. Se eksempelvis Handbook of Pharmaceutical Additives, 2nd Edition (eds. M. Ash and I. Ash), 2001 (Synapse Information Resources, Inc., Endicott, New York, USA), Remington's Pharmaceutical Sciences, 20th edition, pub. Lippincott, Williams & Wilkins, 2000; og Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2nd edition, 1994.

15

20

Det er mulig å gjennomføre en fremgangsmåte for å tilvirke en farmasøytisk sammensetning som omfatter innblanding av i det minste ett [<sup>11</sup>C]-radiomerket konjugat eller konjugatlignende forbindelse, som definert heri, sammen med én eller flere andre farmasøytisk akseptable ingredienser som er godt kjent for fagmannen, f.eks. bærestoffer, fortynningsmidler, eksipienter, osv. Hvis de er formulert som atskilte enheter (f.eks. tabletter osv.), inneholder hver enhet en forutbestemt mengde (dose) av den aktive forbindelsen.

25

30

Som anvendt heri henviser betegnelsen "farmasøytisk akseptabel" til de forbindelsene, materialene og/eller sammensetningene som er, innenfor omfanget av rimelig medisinsk vurdering, egnet for kontakt med menneske- eller dyrevev uten overdreven toksisitet, irritasjon, allergisk reaksjon eller andre mulige komplikasjoner som tilsvarer et rimelig fordel/risiko-forhold. Hvert bærestoff, fortynningsmiddel, eksipient osv. må også være "akseptabelt" i den forstand at de er forlikelige med de andre bestanddelene i formuleringen.

35

Formuleringene kan fremstilles ved hjelp av hvilke som helst fremgangsmåter som er velkjente i farmasiteknikken. Slike fremgangsmåter inkluderer trinnet for binding av den aktive forbindelsen til et bærestoff som utgjør én eller flere ytterligere ingredienser. Formuleringene fremstilles generelt ved jevnt og

omhyggelig å binde den aktive forbindelsen med bærestoffer (f.eks. væskebærestoffer, findelt fast bærestoffer, osv.) og deretter eventuelt forme produktet.

5           Formuleringen kan fremstilles for å tilrettelegge for hurtig eller langsom frisetting, umiddelbar, forsinket, tidsstyrt eller vedvarende frisetting, eller en kombinasjon derav.

10           Formuleringer egnet til parenteral administrering (f.eks. ved injeksjon), inkluderer vandige eller ikke-vandige, isotoniske, pyrogenfrie, sterile væsker (f.eks. løsninger, suspensjoner), hvori den aktive ingrediensen løses opp, suspenderes eller tilveiebringes på annen måte (f.eks. i et liposom eller andre mikropartikler). Slike væsker kan videre inneholde andre farmasøytisk  
15           akseptable ingredienser, slik som antioksidanter, buffere, konserveringsmidler, stabilisatorer, bakteriestater, suspensjonsmidler, tykningsmidler og soluter som gjør formuleringen isotonisk med blodet (eller andre relevante kroppsvæsker) hos mottageren. Eksempler på eksipienter inkluderer for eksempel vann, alkoholer, polyoler, glyserol, vegetabiliske oljer og lignende. Eksempler på  
20           egne isotoniske bærestoffer til anvendelse i slike formuleringer inkluderer natriumkloridinjeksjon, Ringers løsning eller laktert Ringers injeksjon. Konsentrasjonen av den aktive ingrediensen i væsken er typisk fra ca. 1 ng/ml til ca. 10 µg/ml, f.eks. fra ca. 10 ng/ml til ca. 1 µg/ml. Formuleringene kan presenteres i forseglede beholdere for enhetsdoser eller multidoser, f.eks. ampuller og glass, og kan oppbevares frysetørket (lyofilisert), hvilket bare krever  
25           tilsetning av det sterile flytende bærestoffet, f.eks. injeksjonsvann umiddelbart før anvendelse. Provisoriske injeksjonsløsninger og suspensjoner kan fremstilles fra sterile pulvere, granulater og tabletter.

### **Dose**

30           Det skal forstås av fagmannen at egnede doseringer av konjugatforbindelsen, og sammensetninger omfattende konjugatforbindelsen, kan variere fra pasient til pasient. Bestemmelse av den optimale dosen vil generelt involvere balansering av nivået av terapeutiske fordel mot enhver risiko eller skadelige bivirkninger.  
35           Det valgte dosenivået vil avhenge av forskjellige faktorer, inkludert, men ikke begrenset til, den særlige forbindelsens aktivitet, administreringsveien, administreringstiden, den benyttede forbindelsens ekskresjonshastighet,

behandlingsvarigheten, andre legemidler, forbindelser og/eller materialer  
anvendt i kombinasjon, tilstandens alvorlighetsgrad og pasientens art, kjønn,  
alder, vekt, tilstand, generelle helse og tidligere sykehistorie. Mengden av  
forbindelse og administreringsveien vil til slutt bestemmes etter legens eller  
5 veterinærens skjønn, selv om dosen generelt vil velges for å oppnå lokale  
konsentrasjoner på virkningsstedet som oppnår den ønskede effekten uten å  
forårsake betydelig skadelige bivirkninger.

Administrering kan utføres i én dose, kontinuerlig eller intermitterende (f.eks. i  
10 delte doser ved egnede intervaller) gjennom hele behandlingsforløpet.  
Fremgangsmåter for bestemmelse av det mest virkningsfulle middelet og  
administreringsdose er velkjent for fagmannen og vil variere etter formuleringen  
anvendt til behandling, behandlingens formål, målcellene som behandles og  
individet som behandles. Enkle eller multiple administreringer kan utføres med  
15 dosenivået og mønsteret som velges av lege, veterinær eller kliniker.

En egnet dose av den aktive forbindelsen er generelt fra ca. 100 ng til ca. 25 mg  
(mer typisk ca. 1 µg til ca. 10 mg) per kilogram kroppsvekt for individet per dag.  
Hvis den aktive forbindelsen er et salt, en ester, et amid, et prolegemiddel eller  
20 lignende, beregnes den administrerte mengden på grunnlag av morforbindelsen,  
og den faktiske vekten som skal anvendes økes deretter proporsjonalt.

I én utførelsesform administreres den aktive forbindelsen til en human pasient  
ifølge følgende doseringsregime: ca. 100 mg, 3 ganger daglig.

I én utførelsesform administreres den aktive forbindelsen til en human pasient  
ifølge følgende doseringsregime: ca. 150 mg, 2 ganger daglig.

I én utførelsesform administreres den aktive forbindelsen til en human pasient  
30 ifølge følgende doseringsregime: ca. 200 mg, 2 ganger daglig.

I én utførelsesform administreres imidlertid konjugatforbindelsen til en human  
pasient ifølge følgende doseregime: ca. 50 eller ca. 75 mg, 3 eller 4 ganger  
daglig.

I en utførelsesform administreres konjugatforbindelsen til en human pasient  
ifølge følgende doseregime: ca. 100 eller ca. 125 mg, 2 ganger daglig.

Doseringsmengdene beskrevet ovenfor kan anvendes på konjugatet (inkludert PBD-enheten og linkerene til antistoffet) eller på den virkningsfulle mengden av tilveiebrakt PBD-forbindelse, f.eks. mengden av forbindelse som kan frisettes etter spaltning av linkerene.

5

For forebygging eller behandling av sykdom vil den egnede dosen av et ADC ifølge oppfinnelsen avhenge av typen av sykdom som skal behandles, som definert ovenfor, sykdommens alvorlighetsgrad og progresjon, enten molekylet administreres for forebyggende eller terapeutiske formål, tidligere behandling, pasientens kliniske historie og respons på antistoffet og den behandlende legens skjønn. Molekylet administreres til pasienten passende samtidig eller over en serie av behandlinger. Avhengig av sykdommens type og alvorlighetsgrad er ca. 0,1 µg/kg til 15 mg/kg (f.eks. 0,1 mg/kg-20 mg/kg) av molekyl en første kandidatdose for administrering til pasienten, enten for eksempel ved én eller flere separate administreringer, eller ved kontinuerlig infusjon. Én typisk daglig dose kan være fra ca. 1 µg/kg til 100 mg/kg eller mer, avhengig av faktorene nevnt ovenfor. Et eksempel på en dose av ADC som skal administreres til en pasient, er i området fra ca. 0,1 til ca. 10 mg/kg pasientvekt. For gjentatt administrering over flere dager eller lenger opprettholdes behandlingen, avhengig av tilstanden, til en ønsket suppresjon av sykdomssymptomene forekommer. Et eksempel på et doseringsregime omfatter et forløp med administrering av en initial mengdedose på ca. 4 mg/kg, etterfulgt av ytterligere doser hver uke, annenhver uke eller hver tredje uke med et ADC. Andre doseringsregimer kan være nyttige. Progresjonen i denne behandlingen kan enkelt overvåkes ved konvensjonelle teknikker og assayer.

10

15

20

25

### **Behandling**

Betegnelsen "behandling" betyr som anvendt heri i sammenheng med behandling av en tilstand generelt behandling, enten av et menneske eller et dyr (f.eks. i veterinære anvendelser), hvori noe ønsket terapeutisk effekt oppnås, f.eks. inhibering av tilstandens progresjon, og inkluderer en reduksjon i progresjonshastigheten, en stopp i progresjonshastigheten, regresjon av tilstanden, forbedring av tilstanden og tilheling av tilstanden. Behandling som et forebyggende tiltak (dvs. profylakse, prevensjon) er også inkludert.

30

35

Betegnelsen "terapeutisk virkningsfull mengde" betyr som anvendt heri den mengden av en aktiv forbindelse, eller et materiale, sammensetning eller dose omfattende en aktiv forbindelse, som er virkningsfull for produksjon av noe ønsket terapeutisk effekt, sammenlignet med et fornuftig fordel/risiko-forhold, når den administreres ifølge et ønsket behandlingsregime.

Betegnelsen "profylaktisk virkningsfull mengde" betyr som anvendt heri likeledes den mengden av en aktiv forbindelse, eller et materiale, sammensetning eller dose omfattende en aktiv forbindelse som er virkningsfull for produksjon av noe ønsket forebyggende effekt, sammenlignet med et fornuftig fordel/risiko-forhold, når den administreres ifølge et ønsket behandlingsregime.

### ***Fremstilling av antistoff-legemiddel-konjugater***

Antistofflegemiddelkonjugater kan fremstilles ved flere ruter ved hjelp av reaksjoner, betingelser og reagenser i den organiske kjemien som er kjent for fagmannen, inkludert: (1) omsetning av en nukleofil gruppe eller en elektrofil gruppe av et antistoff med et bivalent linkerreagens, for å danne antistofflinkermellomprodukt Ab-L, via en kovalent binding, etterfulgt av omsetning med et aktivert legemiddelenhetsreagens og (2) omsetning av et legemiddelenhetsreagens med et linkerreagens, for å danne legemiddel-linkerreagens D-L, via en kovalent binding, etterfulgt av omsetning med den nukleofile gruppen eller en elektrofil gruppe av et antistoff. Konjureringsfremgangsmåter (1) og (2) kan benyttes med forskjellige antistoffer og linkere til å fremstille antistoff-legemiddel-konjugatene ifølge oppfinnelsen.

Nukleofile grupper på antistoffer inkluderer, men er ikke begrenset til: (i) N-terminale amingrupper, (ii) sidekjedeamingrupper, f.eks. lysin, (iii) sidekjedetiolergrupper, f.eks. cystein, og (iv) sukkerhydroksyl- eller aminogrupper hvor antistoffet er glykosylert. Amin-, tiol- og hydroksylgrupper er nukleofile og i stand til å reagere for å danne kovalente bindinger med elektrofile grupper på linkerenheter og linkerreagenser, inkludert: i) aktive estere slik som NHS-estere, HOBt-estere, haloformater og syrehalider, ii) alkyl- og benzylhalider slik som haloacetamider, iii) aldehyder, ketoner, karboksyl- og maleimidgrupper. Visse antistoffer har reduserbare interkjededisulfider, dvs. cysteinbroer. Antistoffer kan fremstilles reaktive for konjurering med linkerreagenser ved behandling med et reduksjonsstoff slik som DTT (Clelands reagens, ditiotreitol) eller TCEP

(tris(2-karboksyetyl)fosfinhydroklorid, Getz et al (1999) Anal. Biochem. bd. 273:73–80, Soltec Ventures, Beverly, MA). Hver cysteindisulfidbro vil således teoretisk danne to reaktive tiolnukleofiler. Ytterligere nukleofile grupper kan introduseres inn i antistoffer gjennom reaksjonen av lysiner med 2-iminotiolan (Trauts reagens), hvilket resulterer i omdannelse av et amin til et tiol.

Antistoff-legemiddel-konjugater kan også produseres ved modifikasjon av antistoffet for å tilføre elektrofile enheter, hvilke kan omsettes med nukleofile substituenten på linkerreagenset. Sukkerartene av glykosylerte antistoffer kan oksideres, f.eks. med periodatoksideringsreagenser, for å danne aldehyd- eller ketongrupper som kan reagere med amingruppen av linkerreagenser eller legemiddelenheter. De resulterende imin-Schiff-basegruppene kan danne en stabil binding eller bli redusert, f.eks. ved borohydridreagenser for å danne stabile aminbindinger. I én utførelsesform kan reaksjon mellom karbohyrdratdelen av et glykosylert antistoff og enten galaktoseoksidase eller natriummeta-periodat gi karbonylgrupper (aldehyd og keton) i proteinet som kan reagere med egnede grupper på legemiddelet (Hermanson, G.T. (1996) Bioconjugate Techniques, Academic Press: New York, s. 234–242). I en annen utførelsesform kan proteiner inneholdende N-terminale serin- eller treoninenheter reagere med natriummeta-periodat, hvilket resulterer i produksjon av et aldehyd i stedet for den første aminosyren (Geoghegan & Stroh, (1992) Bioconjugate Chem. 3:138-146, US 5362852). Slikt aldehyd kan omsettes med en legemiddelenhet eller linkernukleofil. Nukleofile grupper på en legemiddelenhet inkluderer likeledes, men er ikke begrenset til: amin-, tiol-, hydroksyl-, hydrazid-, oksim-, hydrazin-, tiosemikarbazon-, hydrazinkarboksylat- og arylhydrazidgrupper i stand til å reagere for å danne kovalente bindinger med elektrofile grupper på linkereneheter og linkerreagenser, herunder: i) aktive estere slik som NHS-estere, HOBt-estere, haloformater og syrehalider, ii) alkyl- og benzyhalider slik som haloacetamider, iii) aldehyder, ketoner, karboksyl- og maleimidgrupper. Reaktive nukleofile grupper kan introduseres på antrasyklinderivatforbindelsene ved standard funksjonelle gruppeinterkonverteringer. Hydroksylgrupper kan for eksempel omdannes til tiolgrupper ved Mitsunobu-typereaksjoner, for å danne tiolmodifiserte legemiddelforbindelser.

35 ***Individet/pasienten***



5 Individet/pasienten kan være et dyr, et pattedyr, et placentalt pattedyr, et pungdyr (f.eks. kenguru, wombat), et kloakkdyr (f.eks. nebbdyr), en gnager (f.eks. marsvin, hamster, rotte, mus), mus, et haredyr (f.eks. kanin), fugl, et hundedyr (f.eks. hund), kattedyr (f.eks. katt), hestedyr (f.eks. hest), svin (f.eks. gris), sauedyr (f.eks. sau), kveg (f.eks. ku), et primat, et høyere apedyr (f.eks. menneskeape eller annen ape), en ape (f.eks. silkeape, bavian), en menneskeape (f.eks. gorilla, sjimpanse, orangutang, gibbon) eller et menneske.

10 Individet/pasienten kan videre være i et hvilket som helst utviklingsstadium, f.eks. et foster. I én foretrukket utførelsesform er individet/pasienten et menneske.

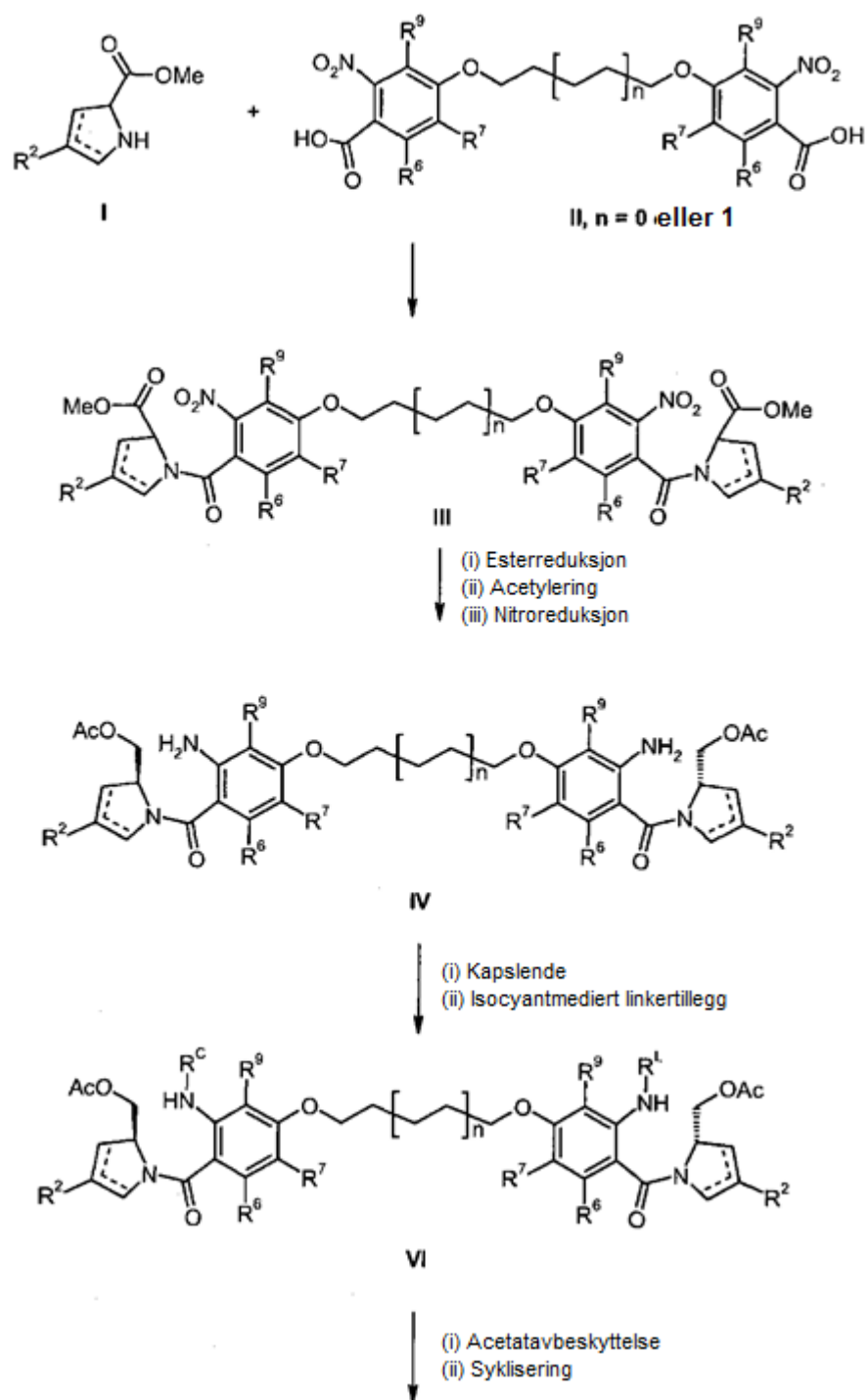
I én utførelsesform er pasienten en populasjon hvor hver pasient har en tumor som har  $\alpha_v\beta_6$ -integrin på celleoverflaten.

15 **Syntese**

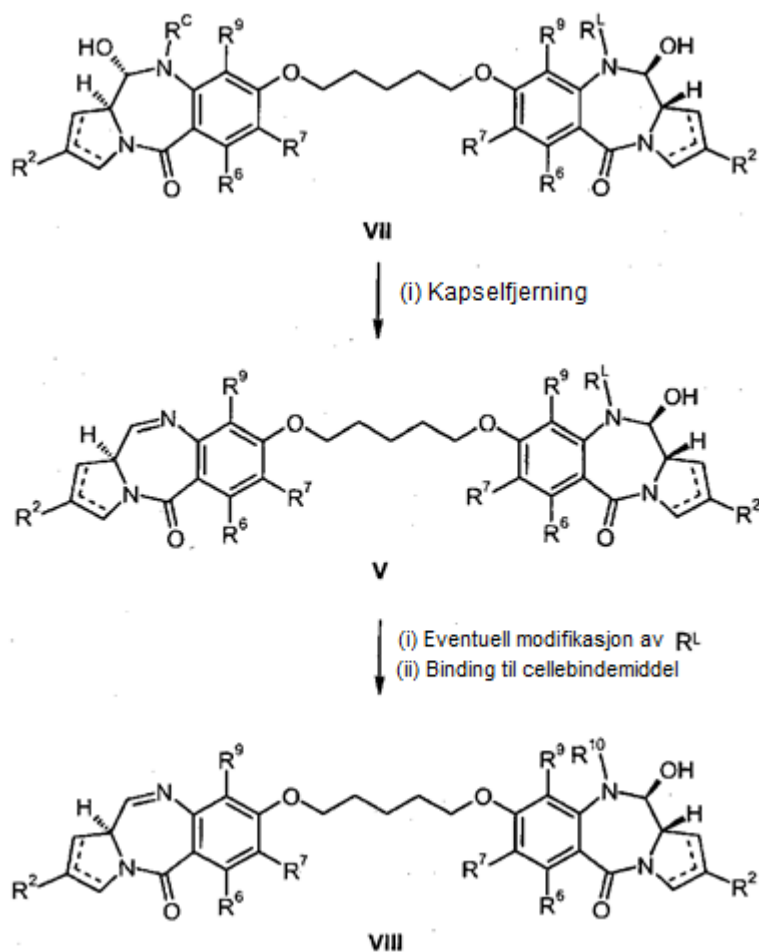
I én utførelsesform kan et dimert konjugat med formel VIII fremstilles fra forbindelse I og II som vist i skjema 1.

121

Skjema 1.



122



Usymmetriske dimere kan generelt fremstilles ved behandling av bis-aminoforbinder med formel IV med én ekvivalent av et kommersielt tilgjengelig (eller enkelt fremstilt) klorformatreagens for å bryte ned molekylens symmetri. Det gjenværende frie aminet kan deretter funksjonaliseres uavhengig for å introdusere den påkrevde terapeutisk labile progruppen (R<sup>L</sup>). Ytterligere manipulering av en funksjonell gruppe for å lukke PBD B-ringene, fjerne beskyttelsesgrupper og kapslende grupper og introdusere en funksjonell antistoffbindingsgruppe, f.eks. G<sup>1</sup>, gir målmolekylet.

10

15

Forbindelser med formel IV fremstilles typisk ved binding av et passende funksjonalisert C-ringfragment (I) til en A-ring inneholdende dimer kjerne med formel II. C-ringfragmenter kan fremstilles fra kjente karbamatbeskyttede metyl-4-oksoprolinatbyggeblokker. Olefinering under Wittig- eller Horner-Emmons betingelser kan benyttes for å sikre endo- eller ekso-umettede alkener. Tandemtriflering og Suzuki-bindingsreaksjoner kan alternativt anvendes til å oppnå 4-arylsubstituerte 3,4 eller 4,5-umettede C-ringfragmenter. C-ring- og A-ringfragmenter kan bindes under standardbetingelser i nærvær av trietylamin, ved hjelp av syrekloridderivater av A-ringfragmentene for å gi molekyler med

formel **III**. Forbindelser av type III kan reduseres, uten å påvirke endo eller ekso C-ringundermetning, med sink i eddiksyre for å gi molekyler med formel **IV**.

5 Usymmetriske karbamater av type VI kan fremstilles ved behandling av bis-aminere av type IV med en enkelt ekvivalent av kommersielt tilgjengelige (eller enkelt fremstilte) klorformater i nærvær av pyridin eller trietylamin. Klorformater kan være valgt for å gi karbamatkapslende enheter ( $R^C$ ) som enten er ortogonale eller identiske med dem anvendt i progruppen ( $R^L$ ). Identiske

10 karbamater gir samtidig fjerning av begge beskyttelsesgruppene, hvilket sparer syntetiske trinn. Fjerning av de kapslende karbamatene ( $R^C$ ) krever imidlertid tilsetning av antistoffbindingsfunksjonalitet som skal foregå i nærvær av en sensitiv N10-C11-imin- eller karbinolaminihet. Denne situasjonen kan eventuelt unngås ved anvendelse av ortogonale karbamatbeskyttelsesgrupper

15 som gir mulighet for tilsetning av antistoffbindingsenheter mens den opprettholder N10-C11-karbinolaminihetsbeskyttelsen. I denne strategien må N10-C11-enheten være umaskert i nærvær av antistoffbindingsenheten, og de anvendte reagensene må være kompatible med denne enheten. Hvis et N10-C11-imin for eksempel skal være umasket i nærvær av en maleimidgruppe, vil Troc og Teoc være egnede  $R^C$ -grupper som avbeskyttelsesmidler, idet Cd/Pb-par og TBAF ikke bør påvirke maleimidgruppen. På den annen side bør alloc-gruppen unngås som p-allylscavengere siden pyrrolidin kan tilsettes på en 1,4-måte til maleimidgruppen.  $L$ -karbamatet kan introduseres ved å omdanne den gjenværende aminogruppen til et isocyanat og quenche det med  $R^L$ -alkoholen.

20  $R^L$ -alkoholen kan alternativt omdannes til et klorformat eller en funksjonell ekvivalent (fluorformat, p-nitrokarbonat, pentafluorkarbonat eller hydroksybenzotriazolkarbonat). Den gjenværende aminogruppen kan til slutt omdannes til et reaktivt p-nitrokarbamate, pentafluorkarbamate eller hydroksybenzotriazolkarbamate som kan fortrennes med  $R^L$ -alkoholen for å gi

25 molekyler med formel **VI**.

30

Molekyler med formel **VII** kan fremstilles fra molekyler med formel **VI** ved fjerning av acetatbeskyttelsesgruppene, med kaliumkarbonat i vandig metanol eller i nærvær av en Fmoc-gruppe i  $R^L$  med litiumtriethylborhydrid. Oksidering med Dess-Martin-periodinan (eller alternativt TPAP/NMO, PDC eller under Swern-betingelser) gir det ringlukkede produktet.

35

Konjugater med formel V kan fremstilles fra molekyler med formel **VII** ved fjerning av den kapslende gruppen  $R^C$  og utførelse av  $R^L$  til å inkludere en antistoffbindingsenhet (f.eks. en maleimidokaproylgruppe) som kan konjugeres til et cellebindemiddel, slik som et antistoff, under standardbetingelser (se

5 Dubowchik et al. *Bioconjugate Chemistry*, 2002, 13,855–869). Utførelsen av  $R^L$  kan inkludere trinnet for utvidelse av gruppen til å inkludere et spacerelement, slik som en  $G^1$ -gruppe, som deretter kan anvendes til å binde til et cellebindemiddel (hvilket danner gruppe A).

10 Monomere forbindelser og symmetriske dimerer kan fremstilles på en lignende måte som usymmetrisk dimer som beskrevet ovenfor.

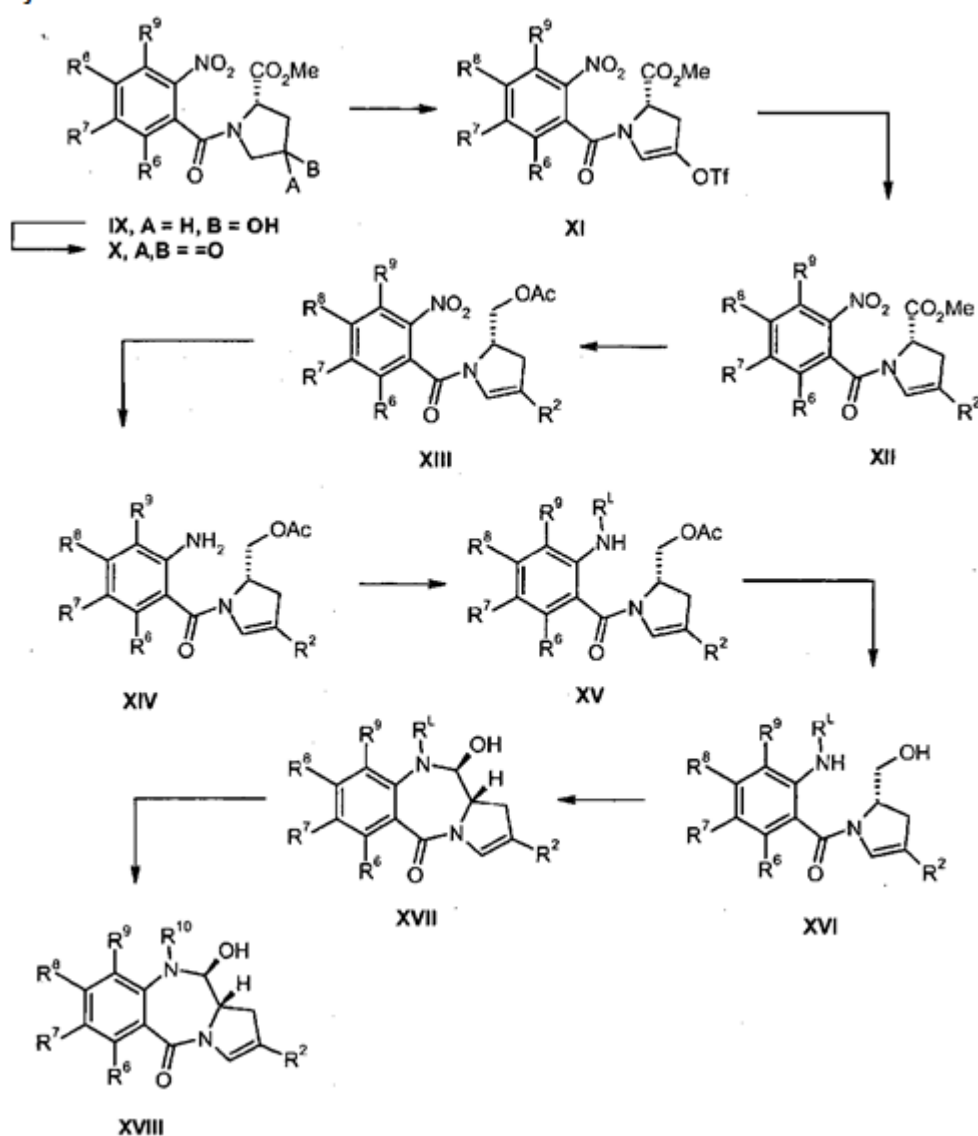
I en annen utførelsesform kan et konjugat med formel **XVIII** fremstilles fra forbindelse **IX** som vist i skjema 2.

15 **Forbindelse II**

Syntesen av forbindelser med formel (II) er beskrevet i patentsøkers tidligere patentsøknad, WO 2006/111759 og er også beskrevet av Gregson et al. (*J. Med. Chem.* 2001, 44, 1161-1174). Forbindelse (IIa) har en tre karboners linker. Forbindelse (IIb) har en fem karboners linker.

20

Skjema 2.



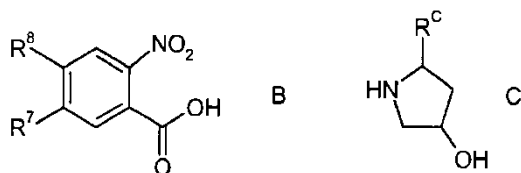
I dette skjemaet er  $R^2$ -gruppen en  $C_{5-20}$ -arylgruppe. Forbindelser med formel **IX** er beskrevet i WO 2004/043963.

5

Forbindelsene med formel **X** kan syntetiseres fra forbindelser med formel **IX** ved oksidering, f.eks. ved hjelp av: TCCA og TEMPO, BAIB og TEMPO, TPAP, Dess-Martin-betingelser eller Swern-betingelser.

10

Forbindelser med formel **IX** kan syntetiseres ved å binde egnede forbindelser med formel B og C eller aktiverte derivater derav:



Forbindelse med formel B og C er generelt kommersielt tilgjengelig eller enkelt syntetiserbar. Hvis forbindelse B er en dimer, kan dette deretter syntetiseres som beskrevet i WO 00/12508.

Forbindelser med formel **XI** kan fremstilles fra en forbindelse med formel **X** i en fremgangsmåte omfattende behandling av **X** med egnet anhydrid og vannfri 2,6-lutidin eller vannfri 2,6-tBu-pyridin ved en temperatur på -35 °C eller lavere i et tørt organisk løsemiddel under en inert atmosfære. **XI** er i det vesentlige fri for forbindelsen som har en C1-C2 dobbeltbinding.

Merk at fremstillingen av forbindelser som har en C1-C2-dobbeltbinding, er beskrevet av Kang et al., Chem. Commun., 2003, 1680-1689

Forbindelser med formel **XI** kan omdannes til forbindelser med formel **XII**. Omdannelsen (en Suzuki-binding) utføres ved palladiumkatalysert kryssbinding av **XI** med egnet arylboderivat. Palladiumkatalysatoren kan være en hvilken som helst egnet katalysator, f.eks. Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>, Pd(OCOCH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, PdCl<sub>2</sub>, Pd(dba)<sub>3</sub>.

Forbindelser med formel **XII** kan omdannes til forbindelser med formel **XIV** via forbindelse **XIII**. Omdannelsen oppnås først ved reduksjon av esteren og deretter gjenbeskyttelse som acetat (eller silyleter i en alternativ metode). Reduksjonen kan oppnås ved standardmidler, f.eks. med LiAlH<sub>4</sub> eller NaBH<sub>4</sub>. Gjenbeskyttelse som acetat kan oppnås for eksempel ved reaksjon med acetylklorid (gjenbeskyttelse som silyleter kan oppnås for eksempel ved reaksjon med det egnede silylklorid). Reduksjon av nitrogruppen utføres deretter ved hjelp av for eksempel sink i eddiksyre.

Forbindelser med formel **XIV** kan omdannes til forbindelser med formel **XV**. Denne omdannelsen oppnås vanligvis ved omsetning av **XIV** med trifosgen for å oppnå isocyanatet etterfulgt av reaksjon med R<sup>L</sup>-OH. Denne fremgangsmåten er beskrevet i WO 2005/023814 Enkle nitrogenbeskyttelsesgrupper kan også alternativt introduseres som et klorformat, fluorformat eller azidofomat. De mer

komplekse nitrogenbeskyttelsesgruppene, samt de enkle nitrogenbeskyttelsesgruppene, kan introduseres som O-sukkinamidkarbonater, O-pentafluorofenylkarbonater og O-nitrofenylkarbonater.

5 Omdannelsen av **XV** til **XVII** kan oppnås ved initial fjerning av acetatbeskyttelsesgruppen, med kaliumkarbonat i vandig metanol eller med litiumtrietylborhydrid. Oksidering med Dess-Martin-periodinan (eller alternativt TPAP/NMO, TFAA/DMSO, SO<sub>3</sub>-pyridinkompleks/DMSO, PDC, PCC, BAIB/TEMPO eller under Swern-betingelser) gir det ringlukkede produktet. Hvis en silyleter

10 anvendes i stedet for et acetat, kan omdannelsen av **XV** til **XVII** oppnås ved initial fjerning av silyleterbeskyttelsesgruppen, f.eks. ved hjelp av TBAF i THF, eddiksyre i vandig THF, CsF i DMF eller HF i pyridin, etterfulgt av oksidering som beskrevet ovenfor.

15 Forbindelsen **XVIII** bindes deretter til et cellebindemiddel. Trinnssekvensen eller trinn fra **XVII** til **XVIII** avhenger av arten av R<sup>L</sup>. Denne gruppen kan modifiseres og deretter bindes til et cellebindemiddel for å danne et konjugat ifølge oppfinnelsen. En beskyttelsesgruppekapsel kan for eksempel fjernes for å

20 tilveiebringe en funksjonalitet egnet til reaksjon med et cellebindemiddel. I andre trinn kan denne samme funksjonaliteten anvendes til å binde til et ytterligere spacerement, slik som en G<sup>1</sup>-gruppe, og dette spacerementet kan deretter i sin tur bindes til cellebindemiddelet (hvilket danner gruppen A).

I noen utførelsesformer av oppfinnelsen er det tilveiebrakt forbindelser med

25 formel A-A og A-B. Forbindelser av denne typen kan fremstilles ved hjelp av fremgangsmåter lignende dem beskrevet i WO 2010/091150. Mellomforbindelsene beskrevet i WO 2010/091150 kan også benyttes i fremgangsmåtene beskrevet ovenfor.

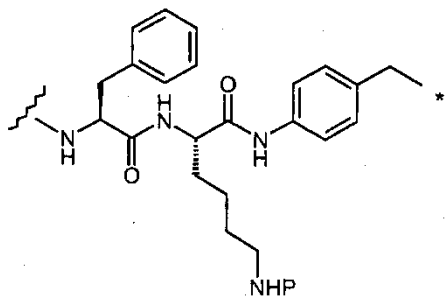
30 Den dimere forbindelsen (15) vist i avsnitt [164] kan for eksempel anvendes som forbindelse (III) i skjema I ovenfor. Monomere forbindelser av typen vist som forbindelse (3), (6) og (9). Denne, og ytterligere tilpasninger, vil være åpenbare for fagmannen.

### **Foretrukne synteser**

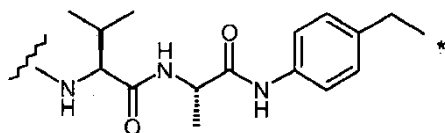
35



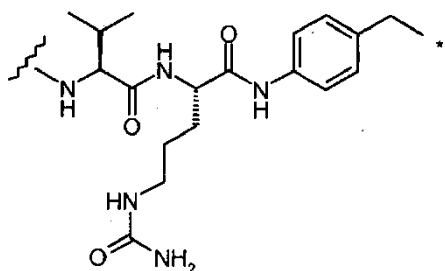
I én utførelsesform er konjugatet forbindelse 14 og fremstilles som vist i skjema 3. Dipeptidene 7a,b og 8 fremstilles som beskrevet i forsøksdelen nedenfor. I det skjemaet har linkerdelene L<sup>1</sup> og L<sup>2</sup> strukturene:



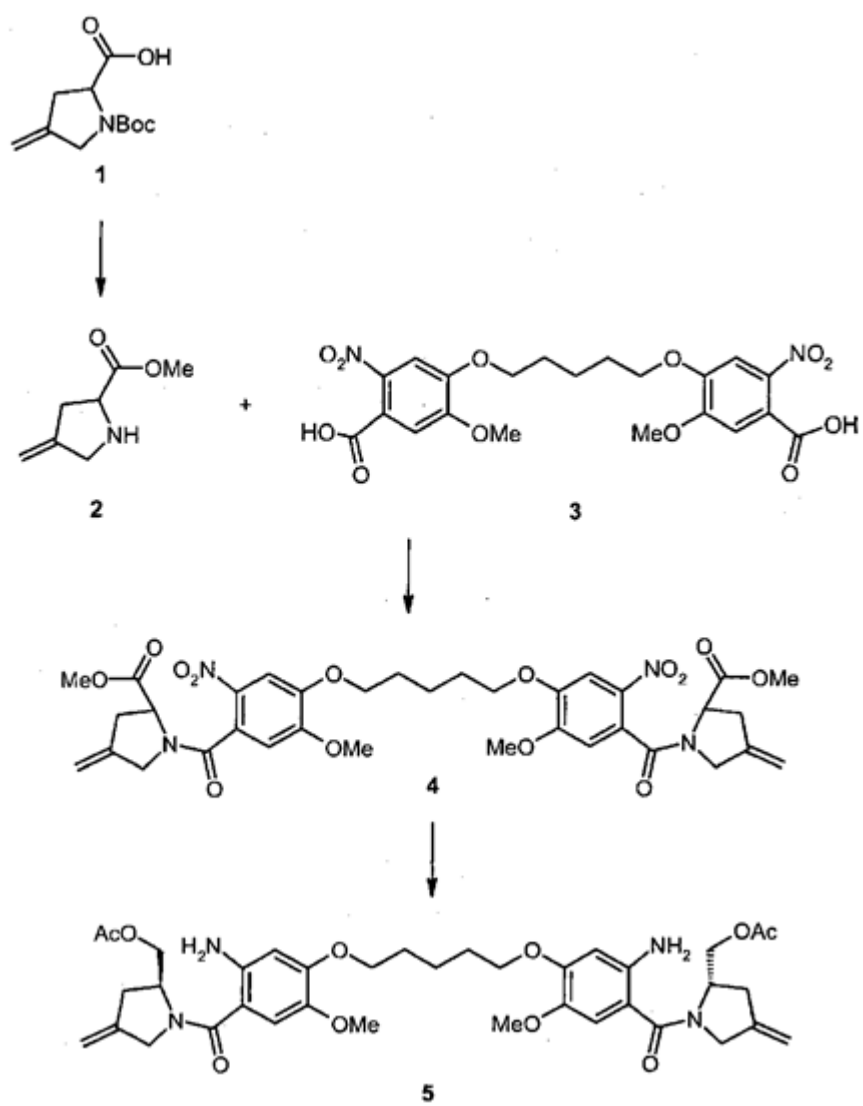
5 L<sup>B</sup> =



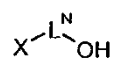
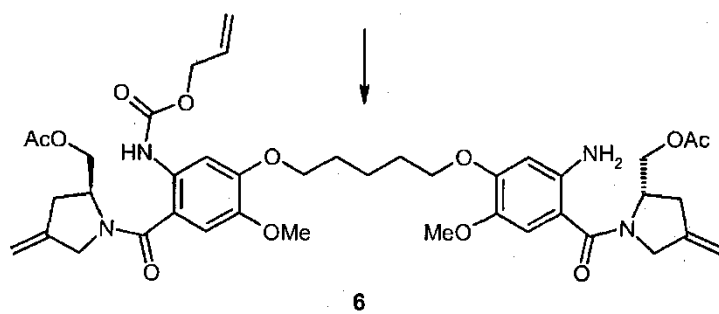
L<sup>C</sup> =



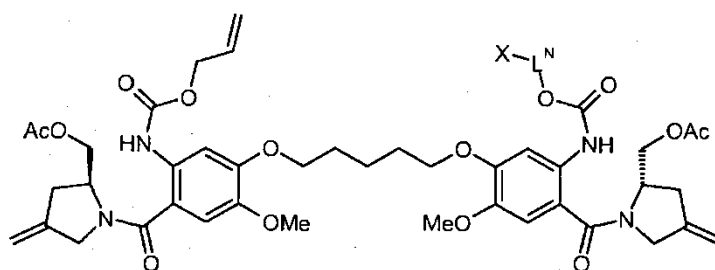
Skjema 3.



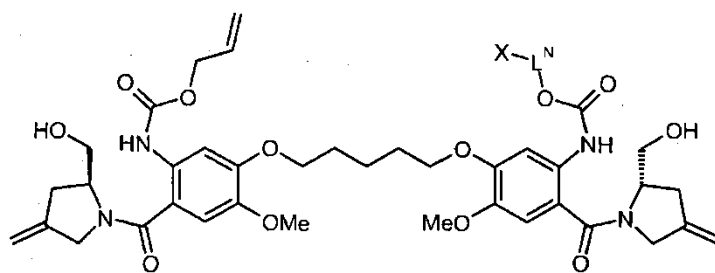
130



**7a, X = Fmoc, L<sup>N</sup> = L<sup>A</sup>, P = Boc**  
**7b, X = Alloc, L<sup>N</sup> = L<sup>A</sup>, P = Boc**  
**8, X = Alloc, L<sup>N</sup> = L<sup>B</sup>**  
**82, X = Boc, L<sup>N</sup> = L<sup>C</sup>**

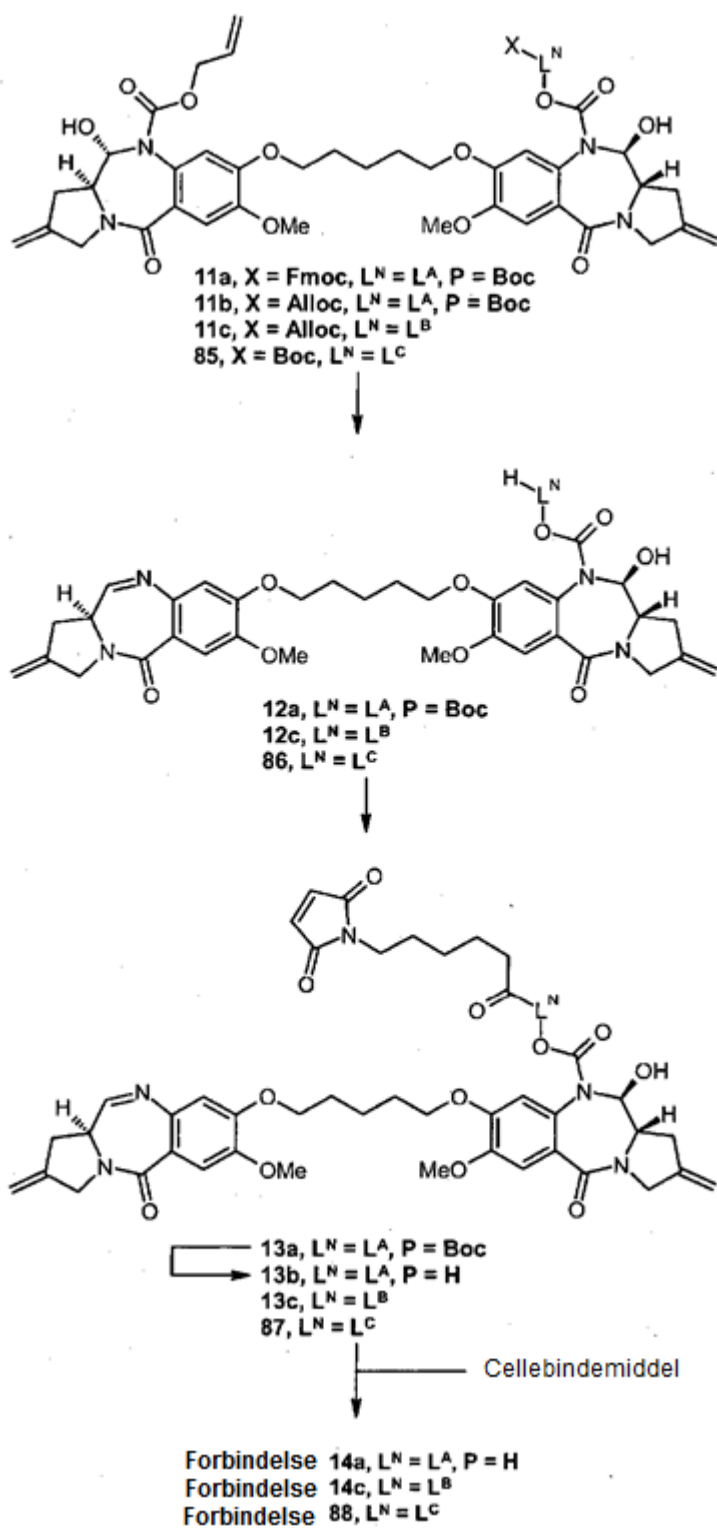


**9a, X = Fmoc, L<sup>N</sup> = L<sup>A</sup>, P = Boc**  
**9b, X = Alloc, L<sup>N</sup> = L<sup>A</sup>, P = Boc**  
**9c, X = Alloc, L<sup>N</sup> = L<sup>B</sup>**  
**83, X = Boc, L<sup>N</sup> = L<sup>C</sup>**



**10a, X = Fmoc, L<sup>N</sup> = L<sup>A</sup>, P = Boc**  
**10b, X = Alloc, L<sup>N</sup> = L<sup>A</sup>, P = Boc**  
**10c, X = Alloc, L<sup>N</sup> = L<sup>B</sup>**  
**84, X = Boc, L<sup>N</sup> = L<sup>C</sup>**

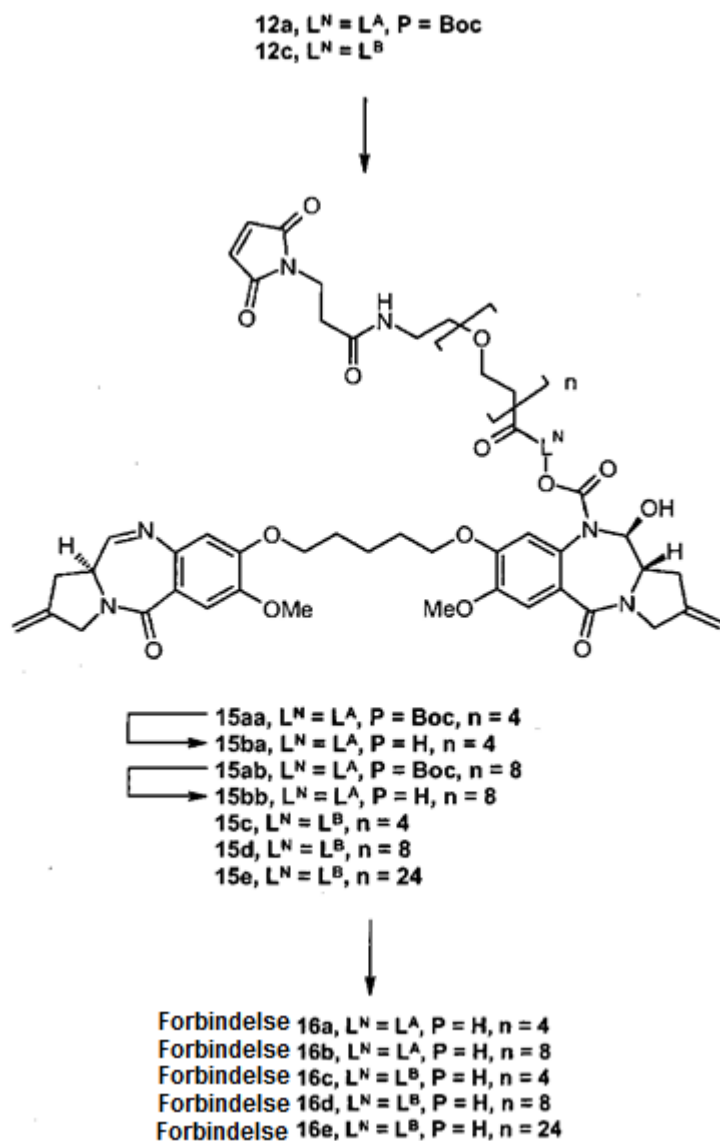
131



Forbindelsen 13c, hvor dipeptidet tilsvare L<sup>2</sup>, kan fremstilles fra 12c ved en analog fremgangsmåte.

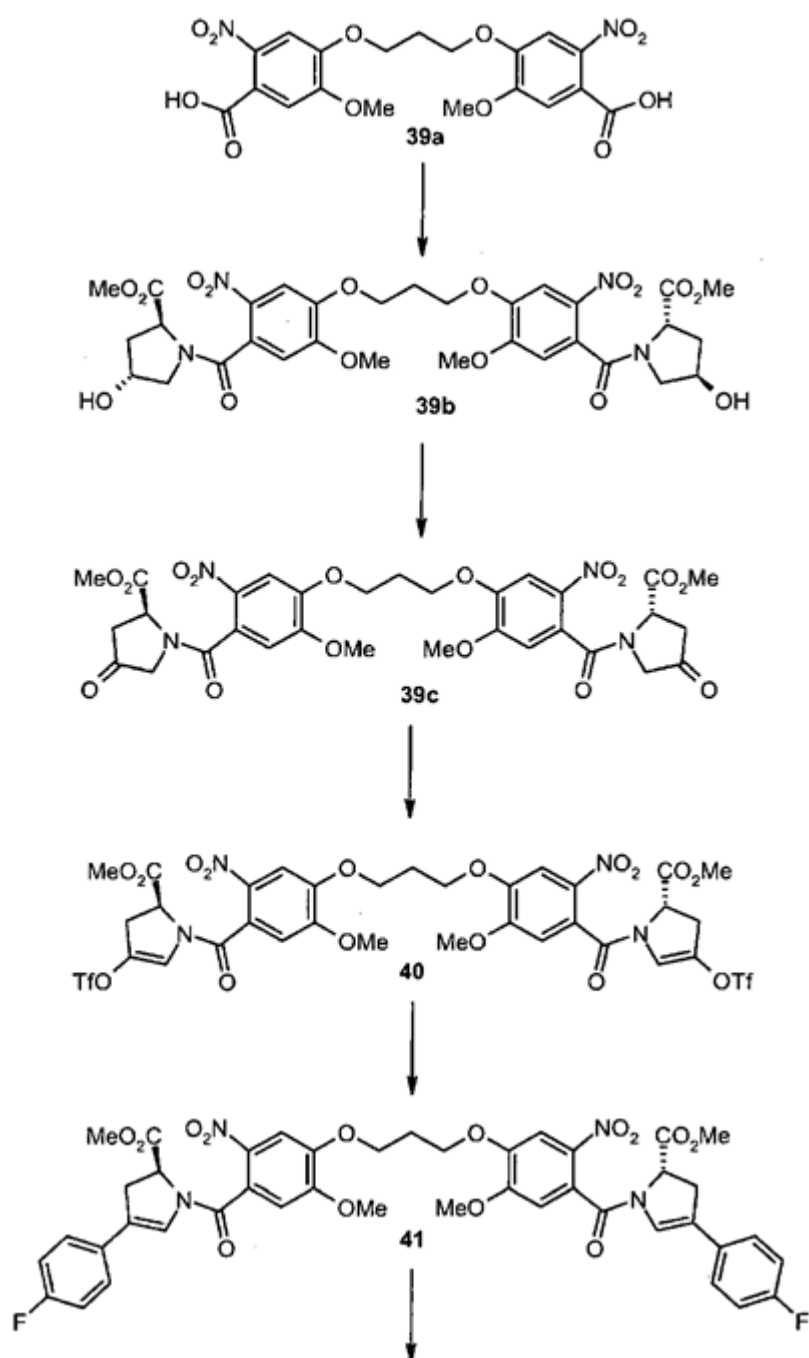
I én utførelsesform er konjugatet forbindelse **16a eller 16b**, og forbindelsen fremstilles som vist i skjema 4 nedenfor, hvor forbindelse **12a** kan fremstilles som beskrevet ovenfor:

Skjema 4.

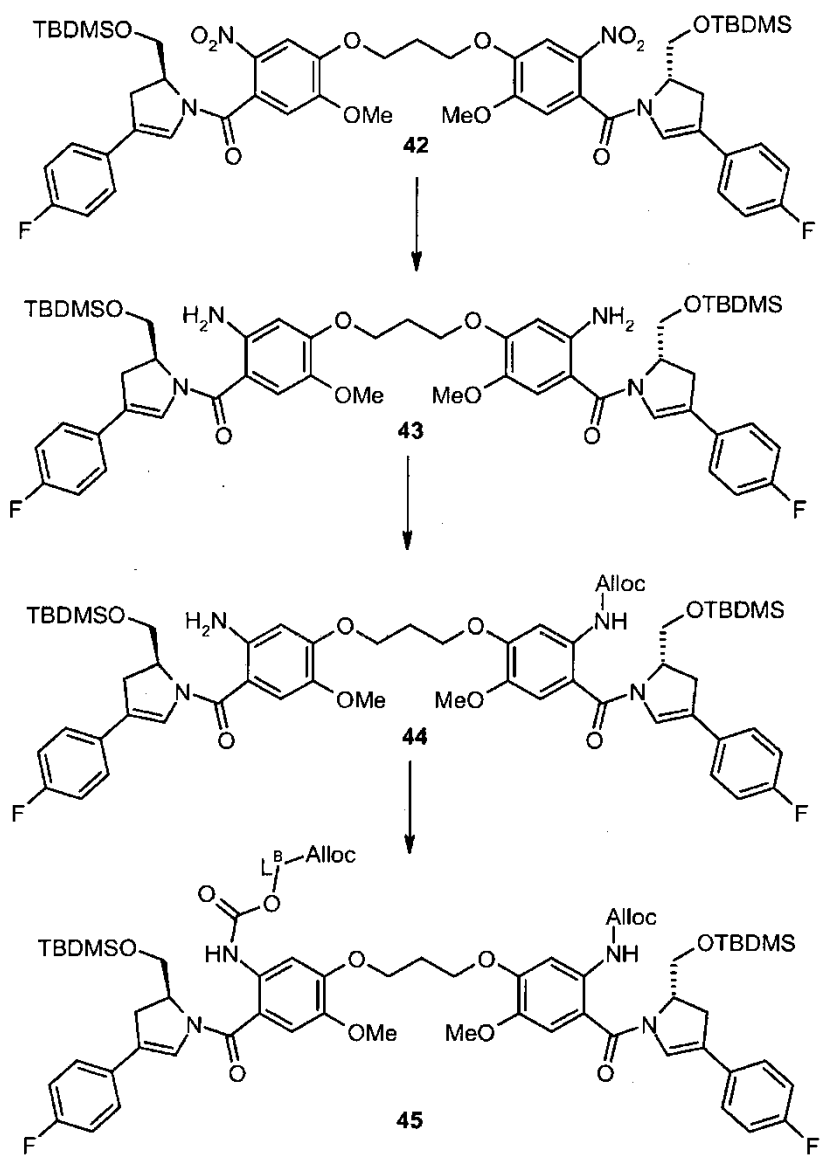


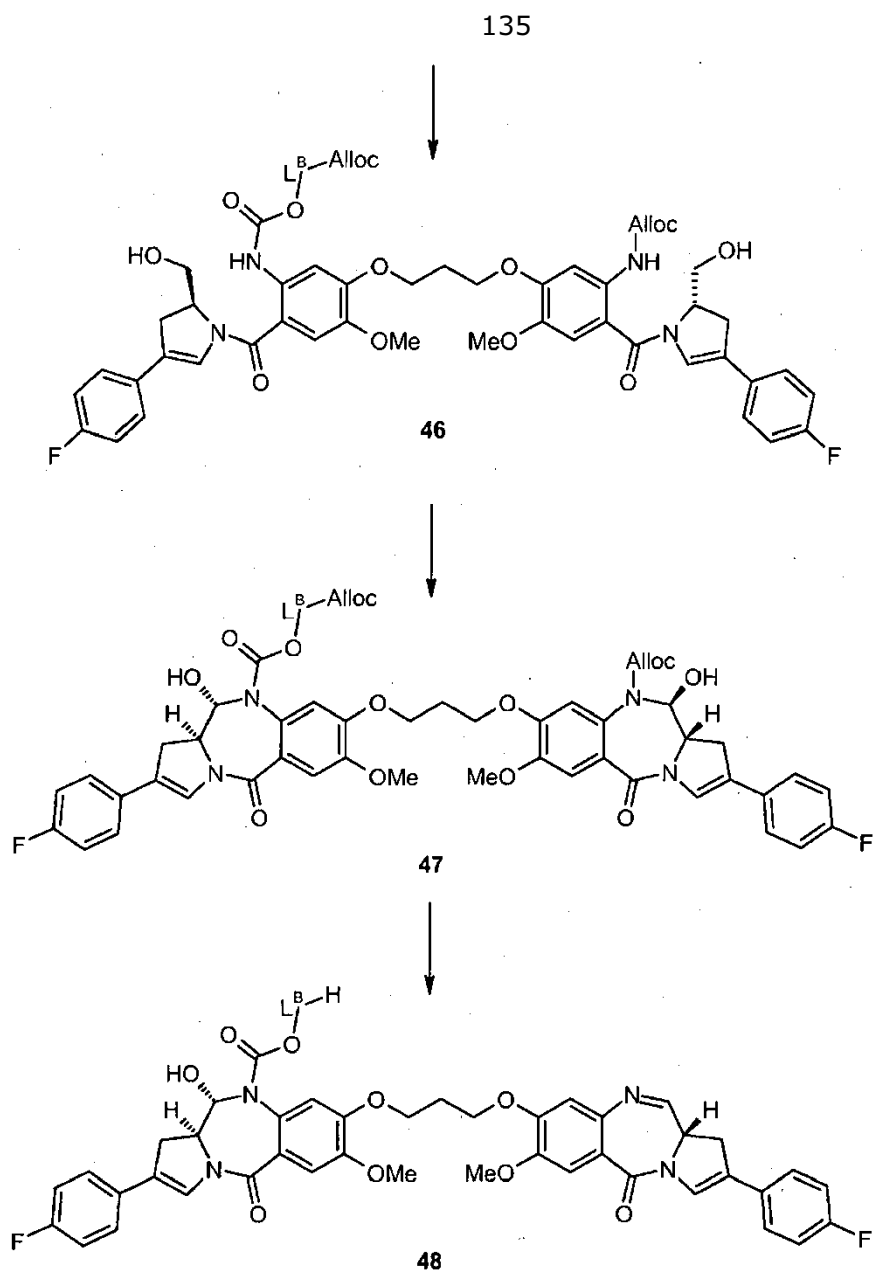
133

Skjema 9.

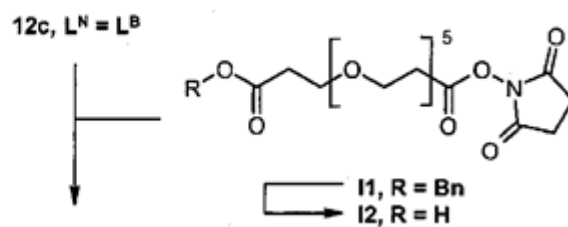


134



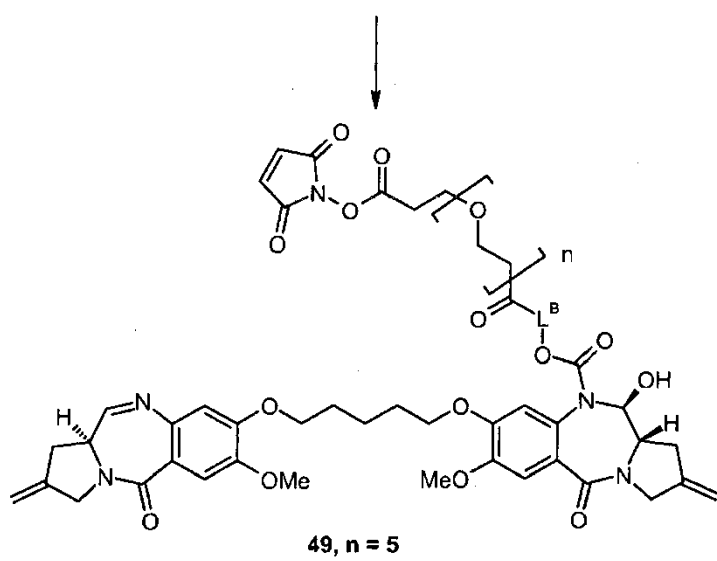
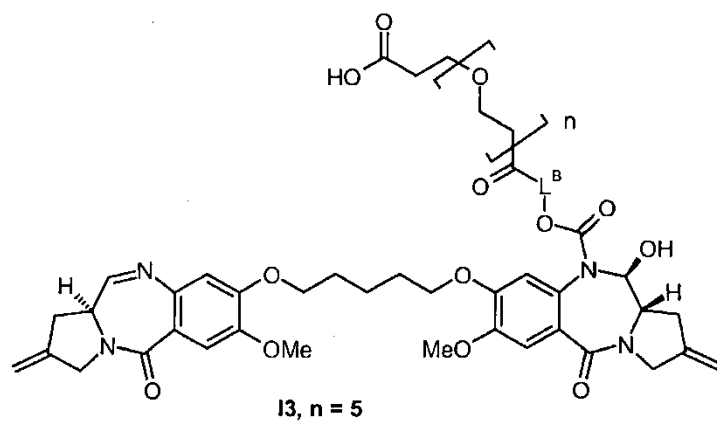


Skjema 10.



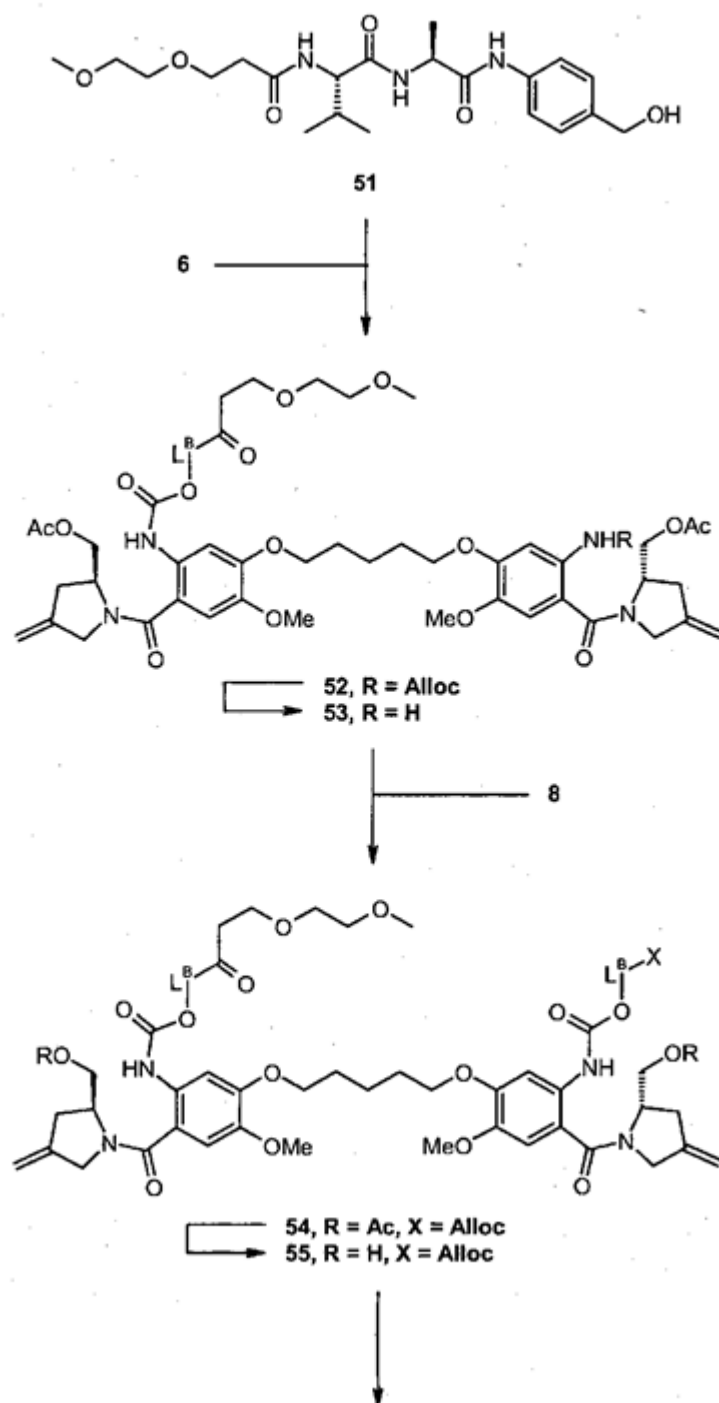


136

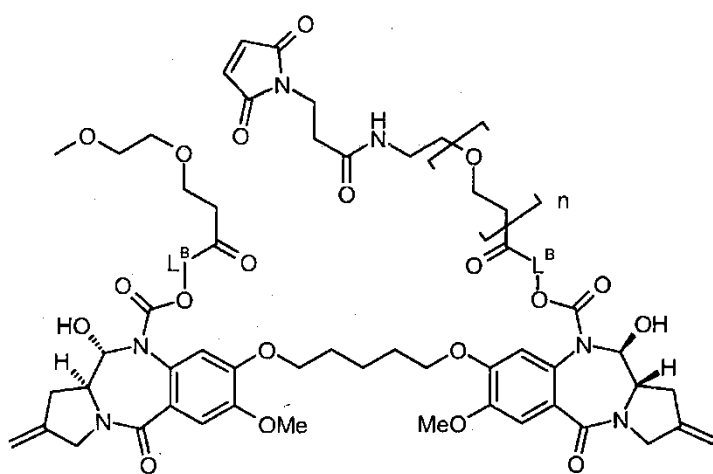
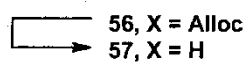
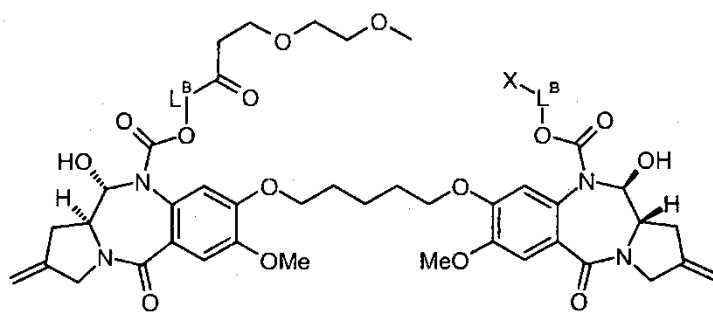


137

Skjema 11.

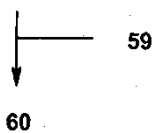


138

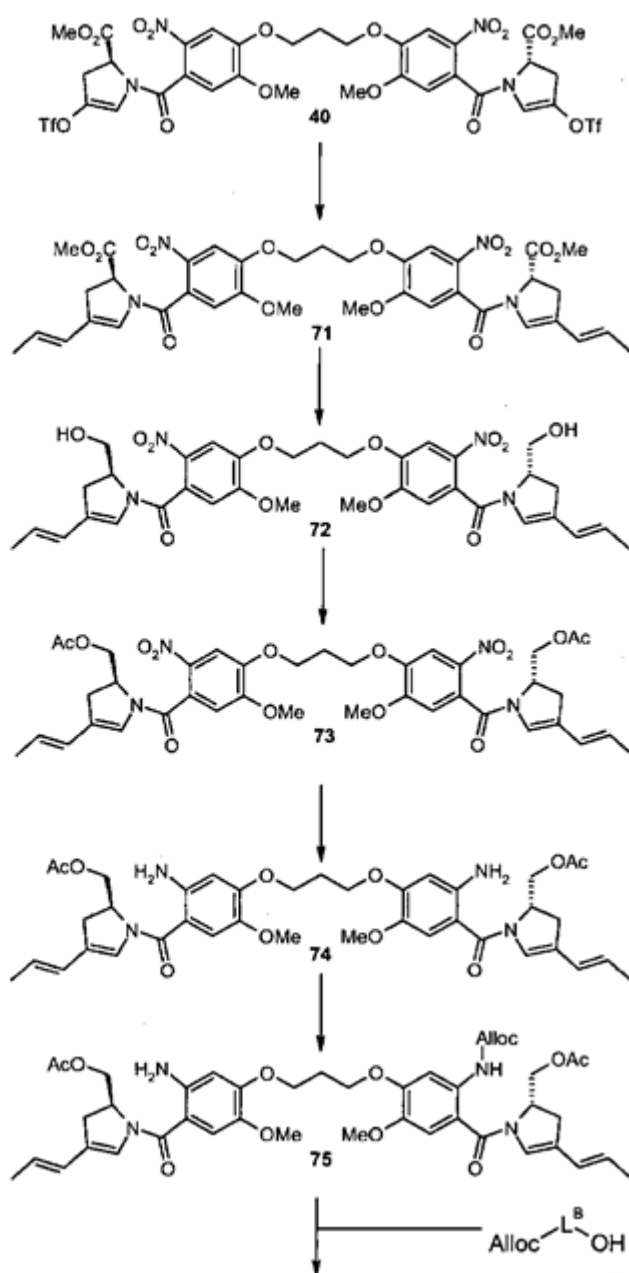


58, n = 8

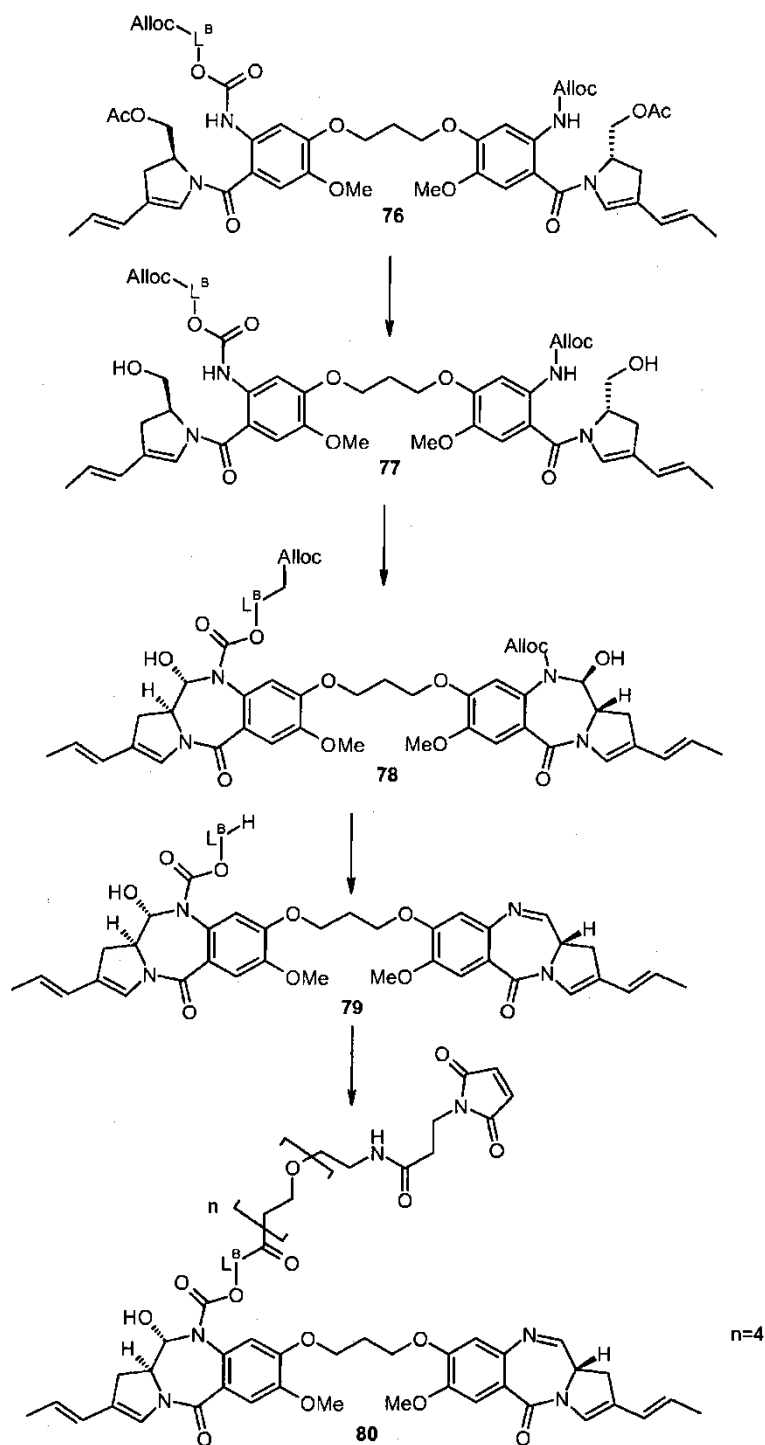
61, n = 24



Skjema 15



140



Oppfinnelsen vil nå bli ytterligere beskrevet under henvisning til følgende ikke-begrensede eksempler. Andre utførelsesformer av oppfinnelsen vil være åpenbare for en fagperson i lys av disse.

5

### Eksperimentelt

**Generell informasjon**

5 Reaksjonsprogresjonen ble overvåket ved tynnsjikt-kromatografi (TLC) ved hjelp av Merck Kieselgel 60 F254 silikagel, med fluorescerende indikator på aluminiumsplater. Visualisering av TLC ble oppnådd med UV-lys eller joddamp med mindre annet er angitt. Flashkromatografi ble utført ved hjelp av Merck Kieselgel 60 F254 silikagel. Ekstraksjons- og kromatografiløsemidler ble kjøpt og anvendt uten ytterligere rensing fra Fisher Scientific, Storbritannia. Alle kjemikalier ble kjøpt fra Aldrich, Lancaster eller BDH.

15 LC/MS-betingelsene var som følger: HPLC (Waters Alliance 2695) ble kjørt ved hjelp av en mobil fase av vann (A) (maursyre 0,1 %) og acetonitril (B) (maursyre 0,1 %). Gradient: Initial sammensetning 5 % B i 1,0 min, deretter 5 % B til 95 % B innen 3 min. Sammensetningen ble holdt i 0,5 min ved 95 % B, og deretter returnert til 5 % B i 0,3 minutter. Samlet gradientkjøringstid er lik 5 min. Strømningsrate 3,0 ml/min, 400 µl ble delt *via* et T-stykke med null dødvolum som passerer inn i massespektrometeret. Bølgelengdedetekteringsområde: 220 til 400 nm. Funksjonstype: diodeserie (535 skanninger). Kolonne: Phenomenex<sup>®</sup> Onyx Monolithic C18 50 x 4,60 mm.

25 Følgende semipreparative HPLC-fremgangsmåte ble anvendt: HPLC ble utført på Zorbax Eclipse XDB C-18-kolonner med følgende dimensjoner: 150 x 4,6 mm for analyse, og 250 x 9,4 mm for forberedende arbeid. Alle HPLC-forsøk ble utført med gradientbetingelser: innledende fast sammensetning 5 % B til 50 % B i løpet av 20 min, holdt i 5 min ved 50 % B, deretter 50 % B til 100% B innen 2 min, holdt i 3 min ved 100 % B, returnerte til 5 % B i 2 min og holdt i 3 min. Gradientprosessens totale varighet var 35 min. Anvendte eluenter løsemiddel A (H<sub>2</sub>O med 0,02 % TFA) og løsemiddel B (CH<sub>3</sub>CN med 0,02 % TFA). Anvendte strømningshastigheter var 1,20 ml/min for analytisk og 5,00 ml/min for preparativ HPLC.

**Forbindelse 2 - (S)-2-(metoksykarbonyl)-4-metylenpyrrolidiniumklorid**

35 Forbindelse 2 er også beskrevet for anvendelse i WO 2007/085930 i fremstillingen av PBD forbindelser.

Forbindelse 2 kan fremstilles fra *trans*-4-hydroksoy-prolin som beskrevet i

5 WO 2007/085930, som herved opptas heri. I særdeleshet er eksempel 13, som beskriver fremstillingen av TFA-saltet av forbindelse **2** særlig relevant.

Alternativt kan forbindelse 2 fremstilles fra forbindelse **1** som beskrevet under.

**(S)-1-tert-Butyl-2-metyl 4-metylenpyrrolidin-1,2-dikarboksyilat**

10

Kaliumkarbonat (19,92 g, 14 mmol, 3 ekv.) ble satt til en omrørt løsning av forbindelse 1 (10,92 g, 48 mmol, 1 ekv.) i DMF (270 ml). Den resulterende hvite suspensjonen ble omrørt ved romtemperatur i 30 min, på hvilket punkt jodmetan (21,48 g/ 9,5 ml, 151 mmol, 3,15 ekv.) ble satt til. 15 Reaksjonsblandingen ble omrørt ved romtemperatur i 3 dager. DMF ble fjernet ved rotasjonsfordamping under redusert trykk for å gi en gul rest som ble fordelt mellom etylacetat og vann. Den organiske sjiktet ble separert og den vandige fasen ble ekstrahert med etylacetat. De kombinerte organiske sjiktene ble vasket med vann, saltløsning og tørket over magnesiumsulfat. Etylacetatet ble fjernet 20 ved rotasjonsfordamping under redusert trykk for å gi det ubearbeidede produktet som en gul olje. Det ubearbeidede produktet ble rensset ved flashkromatografi [85 % n-heksan/15 % etylacetat] for å gi produktet som en fargeløs olje (se også F Manfré et al., J. Org. Chem. 1992, 57, 2060-2065).

**(S)-2-(Metoksykarbonyl)-4-metylenpyrrolidiniumklorid**

25

En løsning av saltsyre i dioksan (4M, 63 ml, 254,4 mmol, 4,5 ekv.) ble satt til (S)-1-tert-butyl 2-metyl 4-metylenpyrrolidin-1,2-dikarboksyilat (13,67 g, 56,6 mmol, 1 ekv.) ved romtemperatur. Effervesens ble observert, noe som indikerte 30 frigivelse av CO<sub>2</sub> og fjerning av Boc-gruppen. Produktet ble utfelt som et hvitt, fast stoff, og ytterligere dioksan ble satt til for å lette omrøring, og reaksjonsblandingen ble tillatt å omrøres i en time og deretter fortynnet med eter. Det utfelte produktet ble samlet ved vakuumfiltrering og vasket med ytterligere eter. Lufttørking ga det ønskede produktet **2** som et hvitt pulver 35 (9,42 g, 94 %) (se også P Herdwijn et al., Canadian Journal of Chemistry. 1982, 60, 2903-7).

**Forbindelse 3**

5 Forbindelse 3 kan fremstilles som beskrevet i WO 2006/111759 og Gregson et al.

**Forbindelse 4**

10 Forbindelse 4 kan fremstilles fra forbindelse 3 og forbindelse 2.

10

En katalytisk mengde vannfritt DMF (0,5 ml) ble satt til en omrørt suspensjon av oksalyklorid (9,1 g, 6,25 ml, 71,7 mmol, 3 ekv.) og forbindelse 3 (11,82 g, 23,9 mmol, 1 ekv.) i vannfritt DCM (180 ml) ved romtemperatur. Kraftig effervesens ble observert etter tilsetningen av DMF, og reaksjonsblandingen ble tillatt å omrøres i 18 h i en rundbunnet kolbe utstyrt med en kalsiumklorid-tørkerør. Den resulterende klare løsningen ble inndampet under redusert trykk og det faste stoffet triturerert med eter. Det faste produktet ble samlet ved vakuumfiltrering, vasket med ytterligere eter og tørket *in vacuo* ved 40 °C i 1,5 timer. Dette faste stoffet ble deretter delvis tilsatt i en suspensjon av forbindelsen 2 (9,35 g, 52,6 mmol, 2,2 ekv.) i TEA (12,08 g, 119,6 mmol, 5 ekv.) og tørt DCM (110 ml), mens temperaturen ble holdt mellom -40 og -50 °C med ved hjelp av et tørris-/acetonitrilbad. Reaksjonsblandingen ble tillatt å omrøres ved -40 °C i 1 time og deretter tillatt å oppvarmes til romtemperatur, på hvilket punkt LCMS indikerte det komplette forbruket av utgangsmaterialet. Reaksjonsblandingen ble fortynnet med ytterligere DCM og vasket i rekkefølge med vandig saltsyre (1M, 2 x 200 ml), mett vandig natriumbikarbonat (2 x 250 ml), vann (250 ml), saltløsning (250 ml), tørket over magnesiumsulfat. DCM ble fjernet ved rotasjonsfordamping under redusert trykk for å gi produktet som et gult skum (13,94 g, 79 %). Analytiske data: RT 3,95 min; MS (ES<sup>+</sup>) m/z (relativ intensitet) 741 ([M + 1]<sup>+</sup>, 100).

15

20

25

30

**Forbindelse 5**

35

Forbindelse 5 kan fremstilles fra forbindelse 4 i tre trinn via bis-alkoholen og bis-acetatet.

**bis-alkohol**



5 Litiumborhydrid i fast form (0,093 g, 4,3 mmol, 3 ekv.) ble satt til samlet til en  
løsning av ester **4** (1,05 g, 142 mmol, 1 ekv.) i tørt THF (10 ml) under en  
nitrogenatmosfære ved 0 °C (isbad). Reaksjonsblandingen ble tillatt å omrøres  
ved 0 °C i 30 min og deretter tillatt å oppvarmes til romtemperatur, på hvilket  
punkt utfelling av en oransje gummi ble observert. Reaksjonsblandingen ble  
10 tillatt å omrøres ved romtemperatur i ytterligere 2 timer og deretter avkjølt i et  
isbad og behandlet med vann (20 ml) for å gi en gul suspensjon. Saltsyre (1M)  
ble forsiktig satt til (kraftig effervesens!) inntil effervesens avtok.  
Reaksjonsblandingen ble ekstrahert med etylacetat (4 x 50 ml) og de  
kombinerte organiske sjiktene ble vasket med vann (100 ml), saltløsning (100  
ml) og tørket over magnesiumsulfat. Etylacetat ble fjernet ved  
rotasjonsfordamping under redusert trykk for å gi *bis*-alkoholproduktet som et  
15 gult skum (0,96 g, 99 %). Reaksjonen ble gjentatt på en 12,4 g-vekt for å gi  
11,06 g av produktet (96 %). Analytiske data: RT 3,37 min; MS (ES<sup>+</sup>) m/z  
(relativ intensitet) 685 ([M + 1]<sup>+</sup>, 100).

#### **bis-acetat**

20 En løsning av acetylklorid (3,4 g/3,1 ml, 43,5 mmol, 2,6 ekv.) i tørt DCM (100  
ml) ble satt til dråpevis i en omrørt løsning av bis-alkoholen (11,46 g, 16,73  
mmol, 1 ekv.) og trietylamin (5,07 g, 6,98 ml, 50,2 mmol, 3 ekv.) i tørt DCM  
(200 ml) ved 0 °C under en nitrogenatmosfære. Reaksjonsblandingen ble tillatt å  
25 oppvarmes til romtemperatur og omrøring ble fortsatt i en time. TLC og LCMS  
viste at reaksjonen var fullført. Reaksjonsblandingen ble vasket med saltløsning  
(200 ml) og tørket over magnesiumsulfat. Fjerning av DCM ved  
rotasjonsfordamping under redusert trykk ga det ubearbeidede produktet.  
Flashkromatografi [gradienteluering 20 % n-heksan/80 % etylacetat til 10 % n-  
30 heksan/90 % etylacetat] ga rent bis-acetat som et gult skum (10,8 g, 84 %).  
Analytiske data: RT 3,35 min; MS (ES<sup>+</sup>) m/z (relativ intensitet) 769 ([M + 1]<sup>+</sup>,  
100).

#### **Forbindelse 5 5**

35

Sinkpulver (14,2 g, 2,17 mmol, 30 ekv.) ble satt til en løsning av bis-acetatet (5,56 g, 7,24 mmol, 1 ekv.) i etanol (250 ml) og eddiksyre (65 ml). Den omrørte reaksjonsblandingen ble oppvarmet ved reflux, hvorved den gule løsningen ble fargeløs (sinkaggregering ble også observert, noe som gjorde det vanskelig å røre om i reaksjonen). Reaksjonen ble tillatt å fortsette i en time, på hvilket punkt LCMS indikerte at reaksjonen var fullført. Reaksjonsblandingen ble tillatt å avkjøles, filtrert gjennom celite og filterputen vasket med DCM. Filtratet ble vasket med vann (3 x 500 ml), mettet vandig natriumbikarbonat (2 x 250 ml), saltløsning (500 ml) og tørket over magnesiumsulfat. Rotasjonsfordamping under redusert trykk ga produktet **5** som et off-white skum (**4,71 g, 92 %**). Analytiske data: RT 3,33 min; MS (ES<sup>+</sup>) m/z (relativ intensitet) 709 ([M + 1]<sup>+</sup>, 100).

### **Forbindelse 6**

15

Forbindelse 6 kan fremstilles fra forbindelse 5 i tre trinn.

### **Mono-Alloc-produkt**

20

En løsning av allylchlorformat (0,634 g/0,56 ml, 5,6 mmol, 0,9 ekv.) i tørt DCM (150 ml) ble satt til dråpevis i en løsning av forbindelse 5 (4,145 g, 5,8 mmol, 1 ekv.) og pyridin (0,106 g/0,11 ml, 11,1 mmol, 1,9 ekv.) i tørt DCM (500 ml) at -78 °C (tørris-/acetonbad). Reaksjonsblandingen ble omrørt ved -78 °C i 1 time og deretter tillatt å nå romtemperatur. Reaksjonsblandingen ble vasket med mettet vandig kopparsulfatløsning (2 x 300 ml), vann (400 ml), saltløsning (400 ml) og tørket over magnesiumsulfat. Rotasjonsfordamping under redusert trykk ga det ubearbeidede produktet som et mørkt skum. Rensing ved flashkromatografi [40 % n-heksan/60 % etylacetat til 5 % metanol/95 % etylacetat] ga bis-alloc-produktet (0,84 g), det ønskede mono-alloc-produktet (1,94 g, 44 %) og gjenvunnet bis-anilin (0,81 g).

30

Analytiske data: RT 3,32 min; MS (ES<sup>+</sup>) m/z (relativ intensitet) 793 ([M + 1]<sup>+</sup>, 100); MS (ES<sup>-</sup>) m/z (relativ intensitet) 791 ([M - 1]<sup>-</sup>, 100).

### **Isocyanat**

35

Trietylamin (0,018 g/25  $\mu$ L, 0,18 mmol, 1,35 ekv.) ble satt til en omrørt løsning av mono-alloc-produktet (0,106 g, 0,134 mmol, 1 ekv.) og trifosgen (0,015 g,  $4,8 \times 10^{-2}$  mmol, 0,36 ekv.) i tørt toluen (5 ml) under en nitrogenatmosfære ved -10 °C. Etter 1 time IR-spektroskopi fremkom en isocyanatstretch ved 2268  $\text{cm}^{-1}$ , og reaksjonsblandingen ble tillatt å nå romtemperatur.

### **Forbindelse 6**

En løsning av alkohol 6a (0,106 g, 0,15 mmol, 1,1 ekv.) og trietylamin (0,018 g, 25  $\mu$ L, 0,18 mmol, 1,35 ekv.) i tørt THF (5 ml) ble satt til dråpevis i det nylig fremstilte isocyanatt. Reaksjonsblandingen ble oppvarmet ved reflux i 4 timer, på hvilket tidspunkt TLC viste dannelsen av et nytt produkt. Reaksjonsblandingen ble avdampet til tørrhet og fordelt mellom DCM og vann. Det vandige sjiktet ble separert og den organiske fasen ble vasket med saltløsning (100 ml) og tørket over magnesiumsulfat. Rotasjonsfordamping under redusert trykk ga det ubearbeidede produktet som en gul olje, hvilken ble rensert ved flashkromatografi [gradienteluering 40 % n-heksan/60 % etylacetat til 20 % n-heksan/80 % etylacetat, med 5 % økninger i etylacetat] for å gi det ønskede produktet som et hvitt skum (0,092 g, 45 % utbytte).

Analytiske data: RT 4,05 min; MS ( $\text{ES}^+$ ) m/z (relativ intensitet) 1540 ( $[\text{M} + 2]^+$ , 30); 1557 ( $[\text{M} + 18]^+$ , 50); MS ( $\text{ES}^-$ ) m/z (relativ intensitet) 1585 ( $[\text{M} - 2\text{Na}]^-$ , 50).

### **Forbindelse 7**

Forbindelse **7** kan fremstilles fra forbindelse **6** i to trinn.

#### **bis-deacetyleret produkt**

En løsning av superhydride™ i THF (1 M, 0,35 ml, 0,35 mmol, 4 ekv.) ble satt til dråpevis via sprøyte til en omrørt løsning av acetat **6** (0,135 g,  $8,8 \times 10^{-2}$  mmol, 1 ekv.) i tørt THF (7 ml) at -78 °C (tørris/acetone). Reaksjonsblandingen ble tillatt å omrøres ved -78 °C i en time, på hvilket tidspunkt LCMS viste fraværet av utgangsmateriale og dannelsen av to nye forbindelser svarende til det mono- og bis-deacetylerede produktet. En ytterligere alikvot av superhydride™ (1M, 0,35

ml, 0,35 mmol, 4 ekv.) ble satt til reaksjonsblandingen , og omrøring fortsatte i en ytterligere en time. LCMS viste på dette punktet fullstendig omdannelse til det bis-deacetylerede produktet. Sitronsyre (1M, 1 ml) ble satt til reaksjonsblandingen (kraftig effervesens!) hvilken deretter ble tillatt å nå romtemperatur, på hvilket punkt en ytterligere alikvot av sitronsyre (1M, 1 ml) ble satt til. Løsemiddel ble fjernet ved rotasjonsfordamping under redusert trykk, og den resulterende resten ble fordelt mellom etylacetat (25 ml) og vann (25 ml). Den vandige fasen ble separert og etylacetatsjiktet vasket med vann (25 ml), saltløsning (25 ml) og tørket over magnesiumsulfat. Fjerning av løsemiddelet ved rotasjonsfordamping under redusert trykk ga det ubearbeidede produktet som en gul olje, hvilken gjennomgikk flashkromatografi [gradienteluering etylacetat→1 % metanol/99 % etylacetat til 2 % metanol 98 % etylacetat] for å gi det rene produktet som et fargeløst glass (0,056 g, 44 %). Analytiske data: RT 3,78 min; MS (ES<sup>+</sup>) m/z (relativ intensitet) 1456 ([M + 1]<sup>+</sup>, 75).

### **Forbindelse 7**

Dess-Martin/periodinan (0,026g,  $6,1 \times 10^{-5}$  mol, 2,1 ekv.) ble satt til samlet til en løsning av det bis-deacetylerede produktet (0,042 g,  $2,9 \times 10^{-5}$  mol, 1 ekv.) i tørt DCM (5 ml) under en nitrogenatmosfære. Løsningen ble omrørt ved romtemperatur i 4 h, på hvilket tidspunkt LCMS indikerte at reaksjonen var fullført. Den uklare suspensjonen ble filtrert under vasking med DCM (20 ml). Filtratet ble vasket med mettet vandig natriumbikarbonatløsning (25 ml), vann (25 ml), saltløsning (25 ml) og tørket over magnesiumsulfat. Løsemiddelet ble fjernet ved rotasjonsfordamping under redusert trykk for å gi produkt 7 som et offwhite skum (0,035 g, 84 %). Analytiske data: RT 3,70 min; MS (ES<sup>+</sup>) m/z (relativ intensitet) 1451 ([M + 1]<sup>+</sup>, 30).

### **Forbindelse 14**

30

Forbindelse **14a eller 14b** kan fremstilles fra forbindelse 7 via forbindelse **8**. Alloc-beskyttelsesgruppen i forbindelse 7 kan fjernes under passende betingelser, for eksempel tetrakis(trifenylfosfin)palladium(0) i nærværet av pyrrolidin. Under disse betingelser fjernes også Fmoc-beskyttelsesgruppen. Alternativt Fmoc-gruppen kan fjernes i et eget trinn, enten før eller etter

35

fjerningen av Alloc-gruppen, ved anvendelse av piperidin i DMF. Produktet av avbeskyttelsestrinnet er et imin-karbinolaminprodukt som har imin/funksjonaliteten på N10-C11-posisjonen av én PBD-monomer og en karbinolaminfunksjonalitet på N10-C11-posisjon av den andre monomeren, hvori

5 karbinolaminet har en linker  $-C(=O)-L^1-NH_2$  på N10-posisjonen.

Imin-karbinolaminet kan omsettes med MC-OSu i nærværet av base for å generere forbindelse 8. Se for eksempel Dubowchik et al., Biokonjugat Chem. 2002, 13, 855-869.

10 Aminosyresidekjede-beskyttelsesgruppen kan deretter fjernes fra forbindelse **8**, for eksempel under sure betingelser. Det resulterende produktet kan deretter være konjugert til en passende antistoffbærende tiolfunksjonalitet for å gi forbindelse **9**.

15 I ett eksempel kan et antistoff kan være behandlet med DTT for å redusere interkjededisulfidbindinger. Det resulterende antistoffet, som bærer frie tiolgrupper, kan deretter omsettes med maleimid-inneholdende forbindelse avledet fra forbindelse **8** for å generere forbindelse **9**. Forbindelse **9** kan renses,

20 for eksempel ved diafiltrering. Se for eksempel Dubowchik et al., Biokonjugat Chem. 2002, 13, 855-869.

### **Forbindelse 18**

25 Disykloheksylkarbodiimid (2,46 g, 11,92 mmol, 1,05 ekv.) ble satt til en suspensjon av N-hydroksysuksinimid (1,44 g, 12,5 mmol, 1,1 ekv.) og N-alloc-fenylalanin (17) (2,83 g, 11,35 mmol, 1 ekv.) i tørt DCM (120 ml) ved 0 °C. Blandingen ble omrørt ved 0 °C i 30 min, deretter ved romtemperatur i 16 h. Reaksjonsblandingen ble filtrert og filtratet inndampet under redusert trykk.

30 Resten ble løst på nytt i DCM (50 ml), tillatt å stå i 1h og filtrert for å fjerne utfelt disykloheksylurea. Inndamping under redusert trykk ga produktet som et hvitt, fast stoff (3,91 g, 99 %). Analytiske data: RT 2,93 min; MS (ES<sup>+</sup>) m/z (relativ intensitet) 369 ([M + Na]<sup>+</sup>, 50).

### **Forbindelse 20**

35

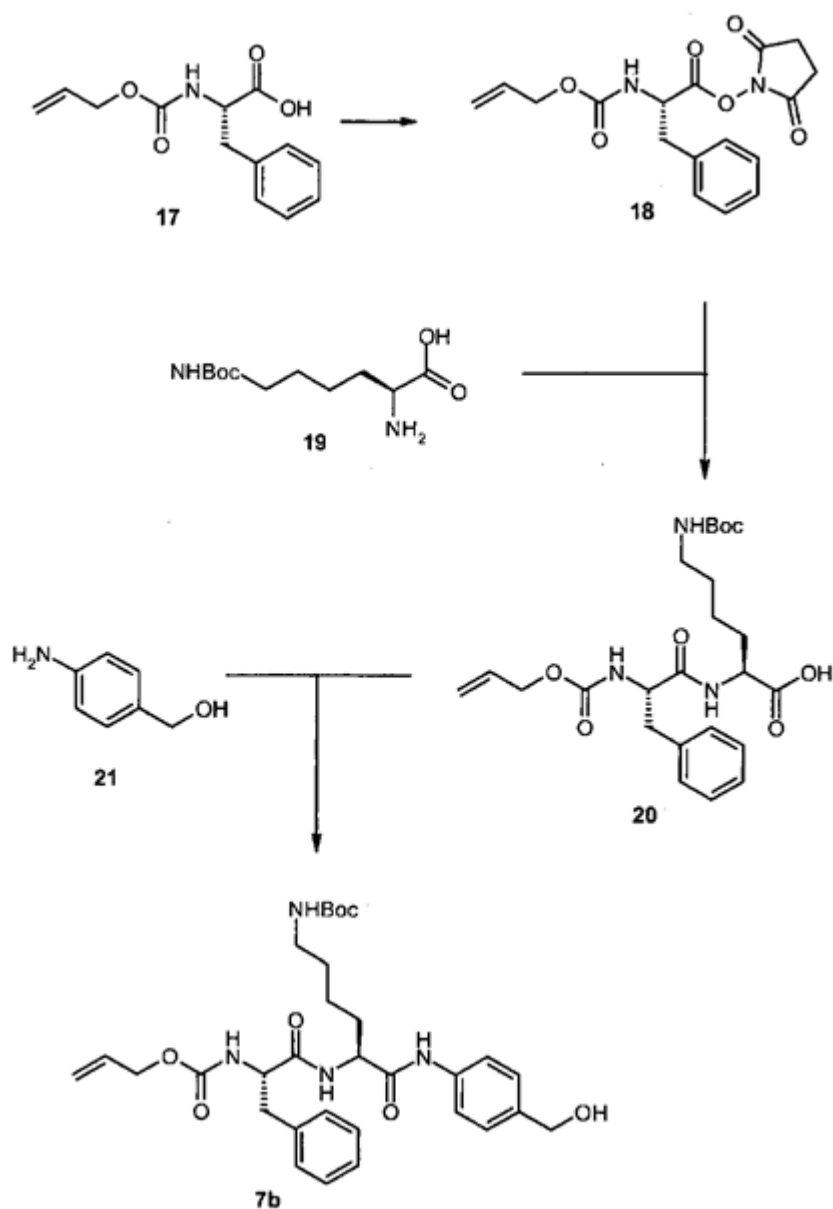
En løsning av suksinimid (**18**) (3,91 g, 11,29 mmol, 1 ekv.) i THF (50 ml) ble satt til en løsning av H-Lys(Boc)-OH (**19**) (2,92 g, 11,85 mmol, 1,05 ekv.) og NaHCO<sub>3</sub> (1,04 g, 12,42 mmol, 1,1 ekv.) i THF (50 ml) og H<sub>2</sub>O (100 ml). Blandingen ble omrørt ved romtemperatur i 72 h og THF avdampet under redusert trykk. PH ble justert til pH 3-4 med sitronsyre for å utfelle en hvit gummi. Denne ble ekstrahert med etylacetat (2 x 250 ml) og de kombinerte ekstraktene ble vasket med H<sub>2</sub>O (200 ml), saltløsning (200 ml), tørket (MgSO<sub>4</sub>) og inndampet under redusert trykk for å gi produktet som et hvitt skum (4,89 g, 91 %). Analytiske data: RT 3,03 min; MS (ES<sup>+</sup>) *m/z* (relativ intensitet) 478 ([*M* + 1]<sup>+</sup>, 80).

### **Forbindelse 7b**

EEDQ (2,66 g, 10,75 mmol, 1,05 ekv.) ble satt til en løsning av *p*-aminobenzyl alkohol (**21**) (1,32 g, 10,75 mmol, 1,05 ekv.) og Alloc-Fe-Lys(Boc)-OH (4,89 g, 10,24 mmol, 1,0 ekv.) i tørt THF (75 ml). Blandingen ble omrørt ved romtemperatur i 18 h. Løsemiddelet ble avdampet under redusert trykk for å gi et brunblekt, fast stoff. Det faste stoffet ble trituret med dietyler og filtrert under vasking med en overskuddsmengde dietyler. Dette ga produktet som et hvitt, fast stoff (4,54 g, 76 %). Analytiske data: RT 3,08 min; MS (ES<sup>+</sup>) *m/z* (relativ intensitet) 583,8 ([*M* + 1]<sup>+</sup>, 100).

Syntesen av 7b er beskrevet under i skjema 12.

Skjema 12.

**Forbindelse 9b**

- 5 Trietylamin (0,18 g, 0,25 ml, 1,79 mmol, 2,3 ekv.) ble satt til en omrørt løsning av det mono-alloc-beskyttede bis-anilinet (**6**) (0,608 g, 0,77 mmol, 1,06 ekv.) og trifosgen (0,088 g, 0,3 mmol, 0,39 ekv.) i tørt THF (5 ml) under en nitrogenatmosfære ved -10 °C. Reaksjonsblandingen ble tillatt å nå
- 10 romtemperatur, en prøve ble behandlet med metanol og analysert ved LCMS som metylkarbametat.

En løsning av benzyl-alkoholen (7b) (0,422 g, 0,72 mmol, 1,0 ekv.) og trietylamin (0,18 g, 0,25 ml, 1,79 mmol, 2,3 ekv.) i tørt THF (20 ml) ble satt til dråpevis i det nylig fremstilte isocyanat. Reaksjonsblandingen ble oppvarmet ved 60-65 °C i 4 timer deretter tillatt å omrøres i 18 timer ved romtemperatur, på 5 hvilket tidspunkt LCMS viste dannelsen av et nytt produkt. Reaksjonsblandingen ble avdampet til tørrhet for å gi det ubearbeidede produktet som en gul olje, hvilken ble rensed ved flashkromatografi [gradienteluering 50 % *n*-heksan/50 % etylacetat til 10 % *n*-heksan/90 % etylacetat i 10 % økninger] for å gi det 10 ønskede produktet som et hvitt skum (0,385 g, 38 %). Analytiske data: RT 3,78 min; MS (ES<sup>+</sup>) *m/z* (relativ intensitet) 1402,8 ([*M* + H]<sup>+</sup>, 15).

### **Forbindelse 10b**

En løsning av K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0,158 g, 1,15 mmol, 5 ekv.) i H<sub>2</sub>O (1 ml) ble satt til en 15 løsning av acetatet (9b) (0,32 g, 0,23 mmol, 1 ekv.) i metanol (6 ml). Reaksjonsblandingen ble omrørt ved romtemperatur i 30 min. Metanolet ble avdampet under redusert trykk, resten ble fortynnet med H<sub>2</sub>O (50 ml) og ekstrahert med etylacetat (3 x 75 ml). De kombinerte etylacetatekstraktene ble vasket med H<sub>2</sub>O (100 ml), saltløsning (100 ml), tørket (MgSO<sub>4</sub>) og inndampet 20 under redusert trykk for å gi produktet som et hvitt skum (0,292 g, 97%). Analytiske data: RT 3,52 min; MS (ES<sup>+</sup>) *m/z* (relativ intensitet) 1318,6 ([*M* + 1]<sup>+</sup>, 15).

### **Forbindelse 11b**

25 Dess-Martin-periodinan (0,197 g, 0,465 mmol, 2,1 ekv.) ble satt til samlet til en løsning av det bis-deacetylerede produktet (10b) (0,292 g, 0,22 mmol, 1 ekv.) i tørt DCM (15 ml) under en nitrogenatmosfære. Løsningen ble omrørt ved romtemperatur i 3,5 h, på hvilket tidspunkt LCMS indikerte at reaksjonen var 30 fullført. Reaksjonsblandingen ble fortynnet med DCM (50 ml) og vasket med mettet vandig natriumbikarbonatløsning (3 x 100 ml), vann (100 ml), saltløsning (100 ml) og tørket over magnesiumsulfat. Løsemiddelet ble fjernet ved rotasjonsfordamping under redusert trykk for å gi det ubearbeidede produktet. Rensing ved flashkolonnekromatografi [gradienteluering 80 % etylacetat/20 % 35 *n*-heksan til 100 % etylacetat i 5 % økninger] ga produktet 11b som et gult



skum (0,235 g, 81 %). Analytiske data: RT 3,42 min; MS (ES<sup>+</sup>) *m/z* (relativ intensitet) 1314,8 ([M + 1]<sup>+</sup>, 8).

### **Forbindelse 12a**

5

Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (4 mg, 3,5 x 10<sup>-6</sup> mol 0,02 ekv.) ble satt til en løsning av bis-alloc-forbindelsen (**11b**) (0,230 g, 0,175 mmol, 1 ekv.) og pyrrolidin (31 mg, 36 µL, 0,44 mmol, 2,5 ekv.) i tørt DCM (10 ml) under en nitrogenatmosfære. Løsningen ble omrørt ved romtemperatur i 3 timer, på hvilket tidspunkt LCMS indikerte at ureagert (**11 b**) gjenble. Ytterligere ekvivalenter av pyrrolidin (31 mg, 36 µL, 0,44 mmol, 2,5 ekv.) og Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (4 mg, 3,5 x 10<sup>-6</sup> mol, 0,02 ekv.) ble satt til og reaksjonen ble omrørt ved romtemperatur i ytterligere 18h. LCMS indikerte at reaksjonen var fullført. Reaksjonsblandingen ble fortyndet med DCM (40 ml) og vasket med mettet vandig ammoniumklorid løsning (100 ml), vann (100 ml), saltløsning (100 ml), tørket (MgSO<sub>4</sub>) og inndampet under redusert trykk for å gi et gult skum. Dette ble triturert med dietyler for å gi produktet (0,187 g, 95 %) som ble anvendt uten ytterligere rensing. Analytiske data: RT 2,80 min; MS (ES<sup>+</sup>) *m/z* (relativ intensitet) 1128,5 ([M + 1]<sup>+</sup>, 20).

10

15

### **Forbindelse 23**

20

En løsning av Alloc-Val-OSu (22) (RT 2,67 min; MS (ES<sup>+</sup>) *m/z* (relativ intensitet) 321,4 ([M + Na]<sup>+</sup>, 57), fremstilt ifølge fremgangsmåten for fremstillingen av forbindelse (**16**) (11,67 g, 39,0 mmol, 1 ekv.) i THF (50 ml) ble satt til en løsning av H-Ala-OH (3,66 g, 41,08 mmol, 1,05 ekv.) og NaHCO<sub>3</sub> (3,61 g, 43,03 mmol, 1,1 ekv.) i THF (100 ml) og H<sub>2</sub>O (100 ml). Blandingen ble omrørt ved romtemperatur i 72 timer, og THF avdampet under redusert trykk. PH ble justert til pH 3-4 med sitronsyre for å utfelle en hvit gummi. Denne ble ekstrahert med etylacetat (6 x 150 ml) og de kombinerte ekstraktene ble vasket med H<sub>2</sub>O (200 ml), saltløsning (200 ml), tørket (MgSO<sub>4</sub>) og inndampet under redusert trykk for å gi et hvitt, fast stoff. Trituration med dietyler (overskytende ) ga det rene produktet 23 som et hvitt pulver (7,93 g, 74 %).

25

30

Analytiske data: RT 2,17 min; MS (ES<sup>+</sup>) *m/z* (relativ intensitet) 295 ([M + Na]<sup>+</sup>, 63), 273 ([M + 1]<sup>+</sup>, 60).

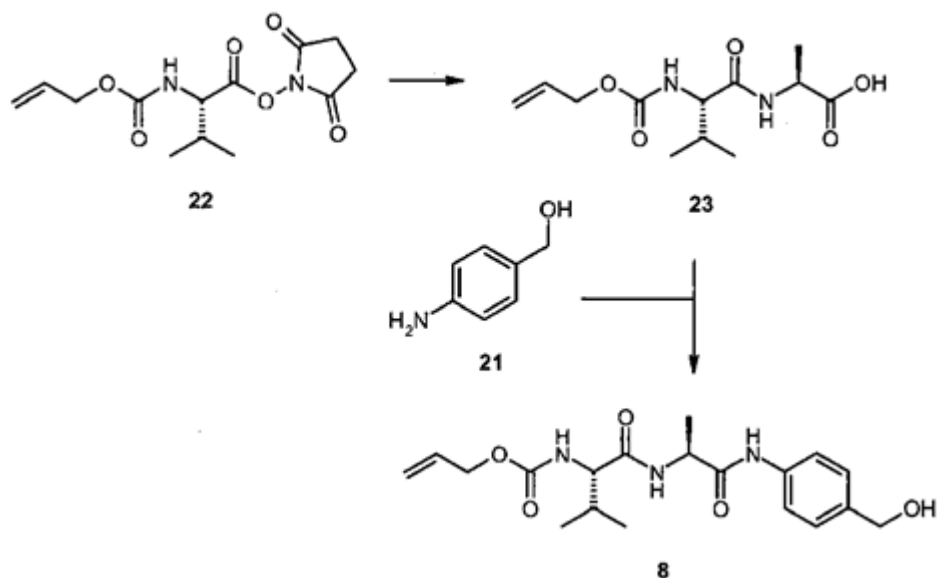
35

### **Forbindelse 8**

5 EEDQ (4,79 g, 19,3 mmol, 1,05 ekv.) ble satt til en løsning av p-aminobenzyl  
 alkohol (21) (2,38 g, 19,3 mmol, 1,05 ekv.) og Alloc-Val-Ala-OH (5,02 g, 18,4  
 10 mmol, 1,0eq) i tørt THF (100 ml). Blandingen ble omrørt ved romtemperatur i 72  
 timer. Løsemiddelet ble avdampet under redusert trykk for å gi et brunblekt, fast  
 stoff. Det faste stoffet ble triturerert med dietyleter og filtrert under vasking med  
 en overskuddsmengde dietyleter. Dette ga produktet som et hvitt, fast stoff (6,2  
 g, 89%). Analytiske data: RT 2,50 min; MS (ES<sup>+</sup>) m/z (relativ intensitet) 400,6  
 ([M + Na]<sup>+</sup>, 50), 378,6 ([M + 1]<sup>+</sup>, 60).

Syntesen av **8** er vist under i skjema 13.

Skjema 13.



### Forbindelse 9c

15

20

Trietylammin (0,16 g, 0,22 ml 1,59 mmol, 2,2 ekv.) ble satt til en omrørt løsning  
 av det mono-alloc-beskyttede bis-anilinet (6) (0,572 g, 0,72 mmol, 1 ekv.) og  
 trifosgen (0,077 g, 0,26 mmol, 0,36 ekv.) i tørt THF (20 ml) under en  
 nitrogenatmosfære ved romtemperatur. Reaksjonsblandingen ble oppvarmet til  
 40 °C, en prøve ble behandlet med metanol og analysert ved LCMS som  
 metylkarbametat.

En løsning av benzyl-alkoholen (8) (0,4 g, 1,06 mmol, 1,5 ekv.) og trietylamin (0,109 g, 0,15 ml, 1,08 mmol, 1,5 ekv.) i tørt THF (20 ml) ble satt til dråpevis i det nylig fremstilte isocyanat. Reaksjonsblandingen ble overvåket ved LCMS i 30 min intervaller. Etter 3 h viste LCMS omdannelse til produkt, nærværet av metylkarbamat og mono-alloc/beskyttet bis-anilin (**6**). En ytterligere del trifosgen (0,038 g, 0,128 mmol, 0,18 ekv.) ble satt til og reaksjonen fortsatte ved 40 °C i en ytterligere 18 h. Reaksjonsblandingen ble avdampet til tørrhet for å gi det ubearbeidede produktet som en gul olje, hvilken ble rensset ved flashkromatografi [gradienteluering 100 % kloroform til 97 % kloroform/metanol 3 % i 0,5 % økninger] for å gi det ønskede produktet som et hvitt skum (0,59 g, 69 %). Analytiske data: RT 3,58 min; MS (ES<sup>+</sup>) m/z (relativ intensitet) 1197 ([M + 1]<sup>+</sup>, 60).

### **Forbindelse 10c**

En løsning av K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0,195 g, 1,41 mmol, 5 ekv.) i H<sub>2</sub>O (1,4 ml) ble satt til en løsning av acetatet (9c) (0,338 g, 0,282 mmol, 1 ekv.) i metanol (8,5 ml). Reaksjonsblandingen ble omrørt ved romtemperatur i 30 min. Metanolet ble avdampet under redusert trykk, resten ble fortynnet med H<sub>2</sub>O (50 ml) og ekstrahert med etylacetat (3 x 75 ml). De kombinerte etylacetatekstraktene ble vasket med H<sub>2</sub>O (100 ml), saltløsning (100 ml), tørket (MgSO<sub>4</sub>) og inndampet under redusert trykk for å gi produktet som et hvitt skum (0,298 g, 95 %). Analytiske data: RT 3,28 min; MS (ES<sup>+</sup>) m/z (relativ intensitet) 1113 ([M + 1]<sup>+</sup>, 40).

### **Forbindelse 11c**

Dess-Martin-periodinan (0,312 g, 0,74 mmol, 2,1 ekv.) ble satt til samlet til en løsning av det bis-deacetylerede produktet (10c) (0,39 g, 0,35 mmol 1 ekv.) i tørt DCM (20 ml) under en nitrogenatmosfære. Løsningen ble omrørt ved romtemperatur i 3,5 h, på hvilket tidspunkt LCMS indikerte at reaksjonen var fullført. Reaksjonsblandingen ble fortynnet med DCM (50 ml) og vasket med mettet vandig natriumbikarbonatløsning (3 x 100 ml), vann (100 ml), saltløsning (100 ml) og tørket (MgSO<sub>4</sub>). Løsemiddelet ble fjernet ved rotasjonsfordamping under redusert trykk for å gi det ubearbeidede produktet. Rensing ved flashkolonnekromatografi [gradienteluering 100 % kloroform til 97 %

kloroform/3 % metanol i 1 % økninger] ga produktet som et hvitt, fast stoff (0,201 g, 52 %). Analytiske data: RT 3,15 min; MS (ES<sup>+</sup>) m/z (relativ intensitet) 1109 ([M + 1]<sup>+</sup>, 30), MS (ES<sup>-</sup>) m/z (relativ intensitet) 1107 ([M - 1]<sup>-</sup>, 100).

### **Forbindelse 12c**

5

Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (8 mg, 7 x 10<sup>-6</sup> mol 0,04 ekv.) ble satt til en løsning av bis-alloc-forbindelsen (**11c**) (0,190 g, 0,17 mmol, 1,0 ekv.) og pyrrolidin (61 mg, 71 µL, 0,86 mmol, 5,0 ekv.) i tørt DCM (5 ml) under en nitrogenatmosfære. Løsningen ble omrørt ved romtemperatur i 3h for å gi en uklar suspensjon. Løsemiddelet ble avdampet under redusert trykk og resten ble trituret med etylacetat for å gi et offwhite fast stoff, hvilket ble samlet ved filtrering for å gi produktet (0,13 g, 82 %), som ble anvendt uten ytterligere rensing. Analytiske data: RT 2,55 min; MS (ES<sup>+</sup>) m/z (relativ intensitet) 922 ([M + 1]<sup>+</sup>, 52).

10

15

### **Forbindelse 13a**

EEDQ (18,4 mg, 7,45 x 10<sup>-5</sup> mol, 2,2 ekv.) ble satt til en løsning av amindipeptid (**12a**) (40 mg 3,5 x 10<sup>-5</sup> mol, 1,0 ekv.) og maleimid kapronsyre (8,2 mg, 3,9 x 10<sup>-5</sup> mol 1,1 ekv.) i DCM (2 ml) og metanol (1 ml). Løsningen ble omrørt ved 40 °C i 72 h. Løsemiddelet ble avdampet under redusert trykk. Resten ble løst i DCM (50 ml) og vasket med mettet vandig NaHCO<sub>3</sub>-løsning (2 x 50 ml), H<sub>2</sub>O (50 ml), saltløsning (50 ml), tørket (MgSO<sub>4</sub>) og inndampet under redusert trykk for å gi et hvitt skum. Dette ble trituret med dietyleter og filtrert under vasking med en overskuddsmengde dietyleter for å gi produktet som et hvitt, fast stoff (36 mg, 78 %). Analytiske data: RT 3,27 min; MS (ES<sup>+</sup>) m/z (relativ intensitet) 1320 ([M + 1]<sup>+</sup>, 75).

20

25

### **Forbindelse 13b**

Kald trifluoreddiksyre (13 ml) ble satt til maleimidderivat (**13a**) (65 mg, 4,9 x 10<sup>-5</sup> mol) ved 0 °C. Løsningen ble omrørt ved denne temperaturen i 30 min og trifluoreddiksyren ble avdampet under redusert trykk. Residuet ble løst i vannfritt DCM (5 ml). Løsemiddelet ble avdampet og resten trituret med dietyleter og det resulterende gule faste stoffet samlet ved filtrering og tørket

30

35

under vakuum (64 mg, 97 %). Analytiske data: RT 2,83 min; MS (ES<sup>+</sup>) m/z (relativ intensitet) 1222 ([M + 2]<sup>+</sup>, 5).

5 Kobling av en maleimid-PEG-suksinimidreagent med **12a** eller **12b** tilveiebringer PBD/legemiddellinkerne 15. Figur 1a viser strukturene av PBD-legemiddellinkere MP-PEG4-Fe-Lys-PAB-PBD 15ba, MP-PEG8-Fe-Lys-PAB-PBD **15bb** og MP-PEG8-Val-Ala-PAB-PBD **15d**, hvor PEG er etylenoksy og PAB er para-aminobenzylloksykarbonyl.

#### **Forbindelse 15aa**

10

Amindipeptidet (**12a**) (83 mg,  $7,4 \times 10^{-5}$  mol, 1 ekv.) ble løst i en blanding av tørt 10 % DMF/DCM (2 ml) og maleimid-4Peg-suksinimid (353 µl av en 250 mmol løsning i tørt DCM) ble satt til fulgt av N,N-diisopropyletylamin (8,2 mg, 11 µl,  $8,1 \times 10^{-5}$  mol, 1,1 ekv.). Løsningen ble omrørt ved romtemperatur i 72 h under en nitrogenatmosfære. Løsemiddelet ble avdampet under redusert trykk. Rensing ved flashkolonnekromatografi [gradienteluering 100 % kloroform til 92 % kloroform/8 % metanol i 1 % økninger] ga produktet som et gult skum (85 mg, 76 %). Analytiske data: RT 3,13 min; MS (ES<sup>+</sup>) m/z (relativ intensitet) 1526 ([M + 1]<sup>+</sup>, 5).

20

#### **Forbindelse 15ab**

25 Amindipeptidet (**12a**) (70 mg,  $76,2 \times 10^{-5}$  mol, 1 ekv.) ble løst i en blanding av tørt 10 % DMF/DCM (2 ml) og maleimid-8Peg-suksinimid (263 µl av en 250 mmol løsning i tørt DCM) ble satt til fulgt av NN-diisopropyletylamin (6,9 mg, 9,5 µl,  $6,6 \times 10^{-5}$  mol, 1,06 ekv.). Løsningen ble omrørt ved romtemperatur i 72 h under en nitrogenatmosfære. Løsemiddelet ble avdampet under redusert trykk. Rensing ved flashkolonnekromatografi [gradienteluering 100 % kloroform til 92 % kloroform/8 % metanol i 1 % økninger] ga produktet som et brunt skum (44 mg, 41,5 %). Analytiske data: RT 3,20 min; MS (ES<sup>+</sup>) m/z (relativ intensitet) 1703 ([M + 2]<sup>+</sup>, 5).

30

35

*Forbindelse 15ba (MP-PEG4-Fe-Lys-PAB-PBD; (11S, 11aS)-4-((2S, 5S)-2-(4-aminobutyl)-5-benzyl-25-(2,5-diokso-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-4,7,23-triokso-10,13,16,19-tetraoksa-3,6,22-triazapentacosanamido)benzyl* 11-

hydroksy-7-metoksy-8-(5-((S)-7-metoksy-2-metylen-5-okso-2,3,5,11a-  
 tetrahydro-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-8-yloksy)pentylloksy)-2-metylen-5-  
 okso-2,3,11,11a-tetrahydro-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-10(5H)-  
 karboksylat) Kald trifluoreddiksyre (17 ml) ble satt til maleimidderivat (**15aa**)  
 5 (85 mg,  $5,6 \times 10^{-5}$  mol) ved 0 °C. Løsningen ble omrørt ved denne temperaturen  
 i 30 min og trifluoreddiksyren ble avdampet under redusert trykk. Residuet ble  
 løst i vannfritt DCM (5 ml). Løsemiddelet ble avdampet og resten triturerert med  
 dietyleter og det resulterende gule faste stoffet samlet ved filtrering og tørket  
 under vakuum (70 mg, 81%). Analytiske data: RT 2,78 min; MS (ES<sup>+</sup>) m/z  
 10 (relativ intensitet) 1444 ([M + 2]<sup>+</sup>, 1).

Forbindelse **15bb** (MP-PEG8-Fe-Lys-PAB-PBD; (11S,11aS)-4-((2S,5S)-2-(5-  
 aminobutyl)-5-benzyl-37-(2,5-diokso-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-4,7,35-  
 triokso-10,13,16,19,22,25,28,31-oktaoksa-3,6,34-  
 15 triazaheptatriakontanamido)benzyl 11-hydroksy-7-metoksy-8-(5-((S)-7-  
 metoksy-2-metylen-5-okso-2,3,5,11a-tetrahydro-pyrrolo[2,1-  
 c][1,4]benzodiazepin-8-yloksy)pentylloksy)-2-metylen-5-okso-2,3,11,11a-  
 tetrahydro-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-10(5H)-karboksylat)  
 20 Kald trifluoreddiksyre (9 ml) ble satt til maleimidderivat (**15ab**) (44 mg,  $2,6 \times$   
 $10^{-5}$  mol) ved 0 °C. Løsningen ble omrørt ved denne temperaturen i 30 min og  
 trifluoreddiksyren ble avdampet under redusert trykk. Residuet ble løst i  
 vannfritt DCM (5 ml). Løsemiddelet ble avdampet og resten triturerert med  
 dietyleter og det resulterende gule faste stoffet samlet ved filtrering og tørket  
 25 under vakuum (40 mg, 91%).

Analytiske data: RT 2,80 min; MS (ES<sup>+</sup>) m/z (relativ intensitet) 1603 ([M + 2]<sup>+</sup>,  
 1).

30 Forbindelse **15d** (MP-PEG8-Val-Ala-PAB-PBD; (11S,11aS)-4-((2S,5S)-37-(2,5-  
 diokso-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-5-isopropyl-2-metyl-4,7,35-triokso-  
 10,13,16,19,22,25,28,31-oktaoksa-3,6,34-triazaheptatriakontanamido)benzyl  
 11-hydroksy-7-metoksy-8-(5-((S)-7-metoksy-2-metylen-5-okso-2,3,5,11a-  
 tetrahydro-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-8-yloksy)pentylloksy)-2-metylen-5-  
 35 okso-2,3,11,11a-tetrahydro-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-10(5H)-  
 karboksylat)

EEDQ (12 mg,  $4,8 \times 10^{-5}$  mol, 1,1 ekv.) ble satt til en suspensjon av amindipeptid (12c) (40,3 mg  $4,4 \times 10^{-5}$  mol, 1,0 ekv.) og maleimid-8 Peg-syre (28 mg,  $4,8 \times 10^{-5}$  mol, 1,1 ekv.) i tørt DCM (5 ml). Tørt dimetylacetamid (0,05 ml) ble satt til for å gi en blekgul løsning som ble omrørt ved romtemperatur i 18h. Løsemiddelet ble avdampet under redusert trykk og resten ble tritureert med dietyleter. Det resulterende faste produktet ble rensset ved flashkolonnekromatografi. Analytiske data: RT 2,90 min; MS (ES<sup>+</sup>) m/z (relativ intensitet) 1496 ([M + H]<sup>+</sup>, 40).

### **Forbindelse 15e**

N,N-Diisopropyldietylamin (10,8 µL, 8 mg,  $7,6 \times 10^{-5}$  mol, 2,2 ekv.) ble satt til en løsning av amindipeptid (12c) (32 mg,  $3,5 \times 10^{-5}$  mol, 1,0 ekv.) og maleimid-dPeg@24-NHS-ester (58 mg,  $4,16 \times 10^{-5}$  mol, 1,2 ekv.) i tørt DCM (5 ml). Løsningen ble rørt om ved romtemperatur i 96 h. Reaksjonsblandingen ble fortynnet med DCM (15 ml) og vasket med mettet NaHCO<sub>3</sub> (25 ml), saltløsning (25 ml), tørket (MgSO<sub>4</sub>) og inndampet under redusert trykk for å gi et blekgult glass. Rensing ved flashkolonnekromatografi [gradienteluering 100 % kloroform til 91 % kloroform/9 % metanol i 1 % økninger] ga produktet som en viskøs, gul gummi (17 mg, 22 %).

### **Forbindelse 16d**

Peptidbiotin-A20FMDV-Cys (**59**) som er svært selektivt for integrinet  $\alpha_v\beta_6$ , som er betydelig oppregulert ved mange krefttyper, ble valgt for konjugering av PBD-linkerderivatene.

En løsning av peptidet (**59**) (11,3 mg, 4,35 µmol, 0,98 ekv.) i 1/1 acetonitril/vann (2 ml) ble satt til en løsning av (15d) (6,91 mg, 4,62 µmol, 1,0 ekv.) i 1/1 acetonitril /vann (3 ml). Løsningen ble rørt om ved romtemperatur i 96 h. Acetonitrilet ble avdampet under redusert trykk og vannet ble fjernet ved lyofilisering for å gi et hvitt skum. Rensing ved semipreparativ HPLC fulgt av lyofilisering ga produktet som et hvitt skum (3,8 mg, 21 %). Analytiske data: MS (MaldiTOF) m/z (relativ intensitet) 3991,1 ([M + H]<sup>+</sup>, 100).

### **Forbindelse 39a**

Forbindelse 39a og dens syntese er beskrevet i WO 00/012508 og WO 2006/111759.

### **Forbindelse 39b**

5

Fremgangsmåte I: En katalytisk mengde DMF (2 dråper) ble satt til (effervesens!) til en omrørt løsning av nitrosyren **39a** (1,0 g, 2,15 mmol) og oksalyklorid (0,95 ml, 1,36 g, 10,7 mmol) i tørt THF (20 ml).  
10 Reaksjonsblandingen ble tillatt å omrøres i 16 timer ved romtemperatur og løsemiddelet ble fjernet ved inndamping *in vacuo*. Den resulterende resten ble løst på nytt i tørt THF (20 ml) og syrekloridløsningen ble satt dråpevis til i en omrørt blanding av (2*S*,4*R*)-metyl-4-hydroksypyrrolidin-2-karboksylatydroklorid (859 mg, 4,73 mmol) og TEA (6,6 ml, 4,79 g, 47,3 mmol) i THF (10 ml) at -30  
15 °C (tørris/etylenglykol) under en nitrogenatmosfære. Reaksjonsblandingen ble tillatt å oppvarmes til romtemperatur og omrørt i ytterligere 3 timer etter hvilket tidspunkt TLC (95:5 v/v CHCl<sub>3</sub>/MeOH) og LC/MS (2,45 min (ES+) *m/z* (relativ intensitet) 721 ( $[M + H]^+$ , 20)) viste dannelse av produkt. Overskytende THF ble fjernet ved rotasjonsfordamping og den resulterende resten ble løst i DCM  
20 (50 ml). Det organiske sjiktet ble vasket med 1 N HCl (2 x 15 ml), mettet NaHCO<sub>3</sub> (2 x 15 ml), H<sub>2</sub>O (20 ml), saltløsning (30 ml) og tørket (MgSO<sub>4</sub>). Filtrering og inndamping av løsemiddelet ga det ubearbeidede produktet som en mørkt farget olje. Rensing ved flashkromatografi (gradienteluering: 100 % CHCl<sub>3</sub> til 96:4 v/v CHCl<sub>3</sub>/MeOH) isolerte det rene amidet **39b** som et oransjefarget  
25 glass (840 mg, 54 %).

Fremgangsmåte II: Oksalyklorid (9,75 ml, 14,2 g, 111 mmol) ble satt til en omrørt suspensjon av nitrosyren **39a** (17,3 g, 37,1 mmol) og DMF (2 ml) i vannfritt DCM (200 ml). Etter innledende effervesens ble reaksjonssuspensjonen  
30 en løsning, og blandingen ble tillatt å omrøres ved romtemperatur i 16 timer. Omdannelse til syrekloridet ble bekreftet ved å behandle en prøve av reaksjonsblandingen med MeOH, og den resulterende bis-metylesteren ble observert ved LC/MS. Mesteparten av løsemiddelet ble fjernet ved inndamping *in vacuo*, den resulterende konsentrerte løsningen ble løst på nytt i en  
35 minimumsmengde av tørt DCM og trituret med dietyleter. Det resulterende gule presipitatet ble samlet ved filtrering, vasket med kald dietyleter og tørket i 1 time i en vakuumovn ved 40 °C. Det faste syrekloridet ble satt til i deler over en



periode på 25 minutter til en omrørt suspensjon av (2*S*,4*R*)-metyl-4-hydroksypyrrolidin-2-karboksylatydoklorid (15,2 g, 84,0 mmol) og TEA (25,7 ml, 18,7 g, 185 mmol) i DCM (150 ml) at -40 °C (tørris/CH<sub>3</sub>CN). Reaksjonen ble umiddelbart fullført, som vurdert ved LC/MS (2,47 min (ES<sup>+</sup>) *m/z* (relativ intensitet) 721 ([*M* + H]<sup>+</sup>, 100)). Blandingen ble fortynnet med DCM (150 ml) og vasket med 1 N HCl (300 ml), mettet NaHCO<sub>3</sub> (300 ml), saltløsning (300 ml), filtrert (gjennom en faseseparator) og løsemiddelet inndampet *in vacuo* for å gi det rene produktet 39b som et oransje fast stoff (21,8 g, 82 %). Analytiske data: [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>22</sup> = -46,1° (*c* = 0,47, CHCl<sub>3</sub>); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) (rotamerer)  $\delta$  7,63 (s, 2H), 6,82 (s, 2H), 4,79-4,72 (m, 2H), 4,49-4,28 (m, 6H), 3,96 (s, 6H), 3,79 (s, 6H), 3,46-3,38 (m, 2H), 3,02 (d, 2H, *J* = 11,1 Hz), 2,48-2,30 (m, 4H), 2,29-2,04 (m, 4H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) (rotamerer)  $\delta$  172,4, 166,7, 154,6, 148,4, 137,2, 127,0, 109,7, 108,2, 69,7, 65,1, 57,4, 57,0, 56,7, 52,4, 37,8, 29,0; IR (ATR, CHCl<sub>3</sub>) 3410 (br), 3010, 2953, 1741, 1622, 1577, 1519, 1455, 1429, 1334, 1274, 1211, 1177, 1072, 1050, 1008, 871 cm<sup>-1</sup>; MS (ES<sup>+</sup>) *m/z* (relativ intensitet) 721 ([*M* + H]<sup>+</sup>?, 47), 388 (80); HRMS [*M* + H]<sup>+</sup> teoretisk C<sub>31</sub>H<sub>36</sub>N<sub>4</sub>O<sub>16</sub> *m/z* 721,2199, funnet (ES<sup>+</sup>) *m/z* 721,2227.

### **Forbindelse 39c**

Fast TCCA (32 g, 137 mmol, 2,2 ekv.) ble satt til i deler til en løsning av TEMPO (1g, 6,4 mmol, 0. 1 ekv.) og bis-alkohol **18** (45 g, 62,5 mmol, 1 ekv.), i normal DCM (500 ml) ved 0 °C. En svak eksoterm ble observert. Reaksjonen ble vurdert som fullført ved TLC (etylacetat) og LC /MS (2,95 min (ES<sup>+</sup>) *m/z* (relativ intensitet) 718,10 ([*M* + H]<sup>+</sup>, 100)) etter 30 minutter. Suspensjonen ble filtrert gjennom celite og vasket med DCM. Filtratet ble vasket med vandig natriumbisulfitt, etterfulgt av mettet NaHCO<sub>3</sub> (forsiktig, kraftig effervesens), saltløsning (200 ml) og tørket (MgSO<sub>4</sub>). Filtrering og inndamping av løsemiddelet *in vacuo* ga det ubearbeidede produktet, hvilket ble rensed ved flashkolonnekromatografi (eluering: 20:80 v/v *n*-heksan/EtOAc) for å gi ketonet **39c** som et hvitt, fast stoff (28,23 g, 63 %). Analytiske data: [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>21</sup> = +18° (*c* = 0,2, CHCl<sub>3</sub>); MS (ES<sup>+</sup>) *m/z* (relativ intensitet) 718,10 ([*M* + H]<sup>+</sup>, 100); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) blanding av rotamerer  $\delta$  7,70 (m, 2H), 6,79 (m, 2H), 5,27 (m, 1 H), 4,44 (m, 1 H), 4,30 (m, 4H), 3,93 (m, 6H), 3,81 (s, 3H), 3,75 (m, 1 H), 3,63 (s, 2H), 3,58 (m, 1 H), 3,09-2,89 (m, 2H), 2,74-2,53 (m, 2H), 2,40 (p, 2H, *J* = 5,73 Hz); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) blanding av rotamerer  $\delta$  206,5, 206,4, 206,0, 205,9, 171,2, 171,1, 170,6, 167,0, 166,7, 155,0, 154,5, 148,8, 137,7,

137,3, 126,4, 125,4, 109,8, 109,1, 108,6, 108,4, 108,4, 65,7, 65,6, 65,5, 60,4, 57,9, 56,7, 56,7, 55,1, 53,6, 52,9, 52,9, 51,6, 41,2, 40,1, 28,7, 28,6, 21,0, 14,1; IR (ATR, CHCl<sub>3</sub>) 1764, 1650, 1578, 1518, 1415, 1333, 1274, 1217, 1060, 870, 824 759 cm<sup>-1</sup>

## 5 **Forbindelse 40**

Vannfritt 2,6-lutidin (4,26 ml, 3,92 g, 36,6 mmol) ble injisert samlet til en kraftig omrørt løsning av bis-keton **39c** (4,23 g, 5,90 mmol) i tørt DCM (100 ml) at -45 °C (tørris/acetoneitril avkjøling bad) under en nitrogenatmosfære. Vannfritt triflisk anhydrid, tatt fra en nyåpnet ampulle (5,96 ml, 10 g, 35,4 mmol), ble injisert hurtig dråpevis, mens temperaturen ble holdt ved -40 °C eller under. Reaksjonsblandingen ble tillatt å omrøres ved -45 °C i 1 time på hvilket punkt TLC (50/50 v/v *n*-heksan/EtOAc) viste det komplette forbruket av utgangsmateriale. Den kalde reaksjonsblandingen ble umiddelbart fortynnet med DCM (200 ml) og, med kraftig risting, vasket med vann (1 x 300 ml), 5 % sitronsyreløsning (1 x 200 ml) mettet NaHCO<sub>3</sub> (200 ml), saltløsning (150 ml) og tørket (MgSO<sub>4</sub>). Filtrering og inndamping av løsemiddelet *in vacuo* ga det ubearbeidede produktet, som ble rensert ved flashkolonnekromatografi (gradienteluering: 70:30 v/v *n*-heksan/EtOAc til 40:60 v/v *n*-heksan/EtOAc) for å gi bis-triflatet **40** som et gult skum (1,32 g, 23 %). Analytiske data: [α]<sup>25</sup><sub>D</sub> = -68° (c = 0,2, CHCl<sub>3</sub>); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,73 (s, 2H), 6,85 (s, 2H), 6,20 (t, 2H, *J* = 1,81 Hz), 5,13 (dd, 2H, *J* = 5,05, 11,93 Hz), 4,33 (t, 4H, *J* = 5,91 Hz), 3,95 (s, 6H), 3,84 (s, 6H), 3,43 (ddd, 2H, *J* = 2,28, 11,92, 16,59 Hz), 2,96 (ddd, 2H, *J* = 1,60, 5,05, 16,58 Hz), 2,44 (p, 2H, *J* = 5,79 Hz); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 169,4, 164,1, 154,7, 149,2, 138,0, 135,2, 124,4, 121,1, 120,0, 116,8, 110,0, 108,4, 65,7, 65,6, 57,0, 56,8, 53,1, 33,3, 28,6; IR (ATR, CHCl<sub>3</sub>) 1749, 1654, 1576, 1522, 1418, 1337, 1277, 1207, 1131, 1061, 1023, 910, 821, 757 cm<sup>-1</sup>; MS (ES<sup>+</sup>) *m/z* (relativ intensitet) 981,86 ([*M* + H]<sup>+</sup>, 100).

## 30 **Forbindelse 41**

Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (660 mg, 571 μmol, 0,08 ekv.) ble satt til en omrørt blanding av bis-enoltriflat **40** (7 g, 7,13 mmol, 1 ekv.), 4-fluorfenylborsyre (2,6 g, 18,5 mmol, 2,6 ekv.), Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (3,93 g, 37,0 mmol, 5,2 ekv.), EtOH (25 ml), toluen (50 ml) og vann (25 ml). Reaksjonsblandingen ble tillatt å omrøres under en

nitrogenatmosfære natten over, etter hvilket tidspunkt det komplette forbruket av utgangsmateriale ble observert ved TLC (60/40 EtOAc/Heksan) og LC/MS (3,68 min (ES+)  $m/z$  (relativ intensitet) 873,90 ( $[M + H]^+$ , 100)). Reaksjonsblandingen ble fortynnet med EtOAc (300 ml) og vasket med H<sub>2</sub>O (2 x 5  
200 ml), saltløsning (100 ml), tørket (MgSO<sub>4</sub>), filtrert og inndampet under redusert trykk for å tilveiebringe det ubearbeidede produktet. Rensing ved flashkromatografi (gradienteluering: 50:50 v/v Heksan/EtOAc til 80:20 v/v heksan/EtOAc) ga bis-C2-aryl-forbindelsen **41** som et oransje fast stoff (5,46 g, 88 %). Analytiske data:  $[\alpha]_D^{22} = -107^\circ$  ( $c = 0,2$ , CHCl<sub>3</sub>); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7,76 (s, 2H), 7,14-7,04 (m, 4H), 6,97-6,87 (m, 6H), 6,31 (s, 2H), 5,18 (dd, 2H,  $J = 11,68, 5,03$  Hz), 4,36 (t, 4H,  $J = 5,87$  Hz), 3,97 (s, 6H), 3,84 (s, 6H), 3,53-3,39 (m, 2H), 3,00 (ddd, 2H,  $J = 1,22, 5,01, 16,28$  Hz), 2,46 (p, 2H,  $J = 5,98$  Hz); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  171,0, 163,3, 148,9, 138,0, 128,1, 126,3, 126,2, 125,8, 123,1, 122,6, 115,7, 115,5, 110,3, 108,5, 65,7, 58,3, 56,8, 34,7, 28,7; IR (ATR, CHCl<sub>3</sub>) 1738, 1650, 1578, 1512, 1416, 1333, 1275, 1212, 1064, 1023, 869, 808, 758, 654, 613 cm<sup>-1</sup>; MS (ES<sup>+</sup>)  $m/z$  (relativ intensitet) 873,90 ( $[M + H]^+$ , 100)).

#### **Forbindelse 42**

20 LiBH<sub>4</sub> (132 mg, 21,3 mmol, 3 ekv.) ble satt til samlet til en omrørt løsning av esteren **41** (5,30 g, 6,07 mmol, 1 ekv.) i vannfritt THF (100 ml) ved 0 °C. Reaksjonsblandingen ble tillatt å oppvarmes til romtemperatur og å omrøres i 1 time etter hvilket tidspunkt den fullstendige omdannelsen av utgangsmateriale ble direkte observert ved LC/MS (3,42 min (ES+)  $m/z$  (relativ intensitet) 818,35 ( $[M + H]^+$ , 100)). Reaksjonsblandingen ble forsiktig fortynnet med etylacetat (500 ml) og overskytende borhydrid destruert med kald, vandig sitronsyre. Det organiske sjiktet ble vasket med 1 N vandig HCL (100ml) fulgt av mettet vandig NaHCO<sub>3</sub> (100 ml), saltløsning (100 ml), tørket over MgSO<sub>4</sub>, filtrert og inndampet under redusert trykk at 35 °C i å tilveiebringe alkoholmellomproduktet, hvilket ble umiddelbart løst på nytt i vannfritt DCM (200 ml). Løsningen ble avkjølt til 0 °C og imidazol (3,97 g, 58,0 mmol, 9,6 ekv.) ble satt til, etterfulgt av TBDMS-Cl (4,390 g, 29,1 mmol, 4,8 ekv.). Reaksjonsblandingen ble tillatt å oppvarmes til RT og reagere i 2 timer.

35 Komplette reaksjon ble observert ved TLC (EtOAc/heksan, 50/50) og LC/MS (4,23 min (ES+)  $m/z$  (relativ intensitet) 1045,99 ( $[M + H]^+$ , 100)). Løsningen ble

vasket med 2N vandig sitronsyre (50 ml), mettet vandig NaHCO<sub>3</sub> (50 ml), saltløsning (50 ml), tørket over MgSO<sub>4</sub>, filtrert og inndampet under redusert trykk. Resten ble rensed ved flashkromatografi (gradient fra 80/20 up til 60/40 heksan/EtOAc) for å gi 2,45 g (38,6 % over to trinn) av rent produkt som et oransje fast stoff. Analytiske data:  $[\alpha]^{22}_D = -123^\circ$  (c = 0,18, CHCl<sub>3</sub>); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,76 (s, 2H), 7,17-7,06 (m, 4H), 6,96-6,87 (m, 4H), 6,81 (s, 2H), 6,17 (s, 2H), 4,84-4,72 (m, 2H), 4,35 (t, 4H, J = 5,87 Hz), 3,93 (s, 6H), 3,25-3,07 (m, 2H), 3,03-2,91 (m, 2H) 2,45 (p, 2H, J = 5,92 Hz), 0,84 (s, 18H), 0,07 (s, 12H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 163,2, 160,7, 154,5, 148,6, 137,9, 130,1, 130,0, 126,7, 126,3, 126,2, 124,3, 123,0, 115,6, 115,4, 110,0, 108,5, 65,7, 60,4, 59,2, 56,7, 33,2, 28,7, 25,8, 25,7, 21,0, 18,2, 14,2, -5,3; IR (ATR, CHCl<sub>3</sub>) 2953, 1742, 1650, 1576, 1512, 1417, 1334, 1274, 1214, 1063, 1023, 869, 808, 759, 654, 612 cm<sup>-1</sup>; MS (ES<sup>+</sup>) m/z (relativ intensitet) 1045,99 ([M + H]<sup>+</sup>, 100).

#### 15 **Forbindelse 43**

En løsning av maursyre i etanol (5 % v/v, 100ml) ble satt til en suspensjon av bis-nitro forbindelse **42** (2,35 g, 2,25 mmol, 1 ekv.) og sinkstøv (8,82 g, 0,135 mmol, 60 ekv.) i etanol (35 ml). Reaksjonsblandingen ble tillatt å omrøres ved romtemperatur i 25 min, på hvilket punkt TLC (metanol/kloroform, 2/98) og LC/MS (4,23 min (ES+) m/z (relativ intensitet) 986,3 ([M + H]<sup>+</sup>, 10), 493,9 ([[(M + 2H)/2]<sup>+</sup>, 100)) viste komplett reaksjon. Suspensjonen ble filtrert og filtratet ble fordelt mellom etylacetat (400 ml) og mettet vandig NaHCO<sub>3</sub> (200 ml). Den organiske fasen ble vasket med saltløsning (100 ml), tørket over MgSO<sub>4</sub>, filtrert og inndampet under redusert trykk for å gi rent bis-amin (2,20g, 98 %) hvilket tatt direkte til det neste trinnet.

#### **Forbindelse 44**

En løsning av allylchlorformat (0,209 ml, 1,97 mmol, 0,9 ekv.) i tørt DCM (50 ml) ble satt til dråpevis i en løsning av bis-anilinoforbindelse **43** (2,15 g, 2,18 mmol, 1 ekv.) og pyridin (0,335 ml, 4,14 mmol, 1,9 ekv.) i tørt DCM (250 ml) at -78 °C. Reaksjonsblandingen ble tillatt å omrøres ved -78 °C i 2 timer og tillatt å oppvarmes til romtemperatur. Løsningen ble vasket med mettet vandig kopparsulfat (2 x 50 ml), vann (250 ml), med saltløsning (100 ml), tørket over

MgSO<sub>4</sub>, filtrert og inndampet under redusert trykk. Resten ble rensset ved flashkromatografi (gradient fra 70/30 up til 30/70 heksan/EtOAc) for å gi 668 mg (26,5 %) av bis-Alloc-beskyttet forbindelse som indikert ved LC/MS (4,45 min (ES+) *m/z* (relativ intensitet) 1154,32 ( $[M + H]^+$ , 100)) og 800 mg av ønsket mono-alloc beskyttet forbindelse slightly contaminated (4,32 min (ES+) *m/z* (relativ intensitet) 1070,58 ( $[M + H]^+$ , 100)). This forbindelse ble rensset ytterligere ved flashkromatografi (gradient fra 40/60 up til 20/80 heksan/dietyleter) for å gi 700 mg (30 %) av ønsket ren mono-alloc-forbindelse. Analytiske data:  $[\alpha]^{22}_D = -41^\circ (c = 0,16, \text{CHCl}_3)$ ; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  8,72 (bs, 1 H), 7,88 (s, 2H), 7,25-7,18 (m, 4H), 7,02-6,93 (m, 4H), 6,93-6,83 (m, 3H), 6,80 (s, 1 H), 6,36 (s, 1 H), 6,00-5,84 (m, 1 H), 5,32 (dd, 1H, *J* = 1,37, *J* = 17,21 Hz), 5,21 (dd, 1H, *J* = 0,90, *J* = 10,40 Hz), 4,85-4,71 (m, 2H), 4,60 (dd, 2H, *J* = 1,02, *J* = 5,62 Hz), 4,46 (s, 2H), 4,31 (t, 2H, *J* = 5,96 Hz), 4,25 (t, 2H, *J* = 6,31 Hz), 3,98 (m, 2H), 3,86 (m, 2H), 3,81 (s, 3H), 3,76 (s, 3H), 3,19-3,05 (m, 2H), 3,05-2,93 (m, 2H), 2,41 (p, 2H, *J* = 6,16 Hz), 0,84 (m, 18H), 0,05 (m, 12H); IR (ATR, CHCl<sub>3</sub>) 2952, 2359, 1732, 1652, 1601, 1507, 1472, 1406, 1225, 1119, 836, 777, 668 cm<sup>-1</sup>; MS (ES+) *m/z* (relativ intensitet) 1070,58 ( $[M + H]^+$ , 100).

#### **Forbindelse 45**

20

En løsning av amin **44** ( 650 mg, 0,607 mmol, 1 ekv.) og TEA (220  $\mu$ L, 1,58 mmol, 2,6 ekv.) i tørt THF ble satt til dråpevis i en nylig fremstilt løsning av trifosgen (81 mg, 0,273 mmol, 0,45 ekv.) i tørt THF (4 ml) ved 0 °C. Den hvite suspensjon ble tillatt å omrøres ved 0 °C i 10 min. En løsning av alkohol (Alloc-Val-Ala-PABOH, 229 mg, 0,607 mmol, 1 ekv.) og TEA (220  $\mu$ l, 1,58 mmol, 2,6 ekv.) i tørt THF (30 ml) ble satt til hurtig. Den hvite suspensjonen ble tillatt å omrøres ved romtemperatur i 15 minutter, deretter oppvarmet ved 65 °C i 2 timer og deretter tillatt å omrøres ved romtemperatur natten over. De hvite TEA-saltene ble fjernet ved filtrering gjennom bomull. Filtratet ble konsentrert og rensset ved flashkromatografi (gradient, 0 % MeOH i kloroform up til 3 % MeOH i kloroform) for å gi 220 mg av ønsket karbamat (25 %). Analytiske data:  $[\alpha]^{24}_D = -46,1^\circ (c = 0,13, \text{CHCl}_3)$ ; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  8,70 (bs, 2H), 8,46 (s, 1H), 7,83 (s, 2H), 7,50 (m, 2H), 7,31 (d, 2H, *J* = 8,50 Hz) 7,25-7,15 (m, 4H), 7,03-6,93 (m, 4H), 6,92-6,77 (m, 4H), 6,51 (d, 1 H, *J* = 7,48Hz), 5,99-5,81 (m, 1 H), 5,38-5,15 (m, 5H), 5,13-5,03 (m, 2H), 4,77 (bs, 2H), 4,66-4,53 (m, 5H), 4,38-4,22 (m, 4H), 4,08-3,94 (m, 3H), 3,93-3,81 (m, 2H), 3,79 (s, 6H), 3,20-

35

3,05 (m, 2H), 3,05-2,94 (m, 2H), 2,41 (p, 2H,  $J = 5,95$  Hz), 2,22-2,08 (m, 1 H), 1,45 (d, 3H,  $J = 7,03$  Hz), 0,94 (dd, 6H,  $J = 6,81, 14,78$  Hz), 0,84 (m, 18H), 0,14-0,02 (m, 12H);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  171,7, 169,8, 165,9, 163,1, 153,6, 151,0, 144,3, 137,8, 132,4, 132,3, 132,0, 130,2, 129,2, 126,2, 126,1, 125,3, 123,3, 123,2, 119,8, 118,2, 118,0, 115,7, 115,5, 112,0, 106,0, 66,5, 66,2, 65,8, 65,4, 62,5, 60,4, 59,5, 56,6, 49,6, 30,8, 28,9, 25,7, 19,2, 18,2, 18,1, 17,7, 17,3, 14,2, -5,4; IR (ATR,  $\text{CHCl}_3$ ) 2950, 2356, 1725, 1691, 1602, 1512, 1408, 1201, 1109, 1023, 832, 774, 668  $\text{cm}^{-1}$ ; MS ( $\text{ES}^+$ )  $m/z$  (relativ intensitet) 1473,43 ( $[\text{M} + \text{H}]^+$ , 100).

10 **Forbindelse I2**

15 1-Benzyl 19-(2,5-dioksopyrrolidin-1-yl) 4,7,10,13,16-pentaoksanonadekan-1,19-dioat (**I1**) (100 mg, 0,19 mmol, 1 ekv.) i tørt etylacetat (15 ml) ble hydrogenert vee 30 psi over 10 % palladium på karbon (10 mg, 10 vekt-%) i 45 minutter. Reaksjonsblandingen ble filtrert gjennom celite under vasking med tørt etylacetat. Inndamping under redusert trykk ga produktet **I2** som en fargeløs olje (74 mg, 89 %). Analytiske data:  $R_T$  (ikke synlig på LC) MS ( $\text{ES}^+$ )  $m/z$  (relativ intensitet) 458 ( $[\text{M} + \text{Na}]^+$ , 55), 436 ( $[\text{M} + \text{H}]^+$ , 12).

20 **Forbindelse I3**

25 N,N-Diisopropyldietylamin (8,4  $\mu\text{l}$ , 6 mg,  $5,97 \times 10^{-5}$  mol, 1,1 ekv.) ble satt til en løsning av amindipeptid (12c) (50 mg,  $5,42 \times 10^{-5}$  mol, 1,0 ekv.) og syre-dPeg@5-NHS-ester (**I2**) (28 mg,  $6,5 \times 10^{-5}$  mol, 1,2 ekv.) i tørt DCM (5 ml). Løsningen ble rørt om ved romtemperatur i 24 timer. Reaksjonsblandingen ble avdampet under redusert trykk for å gi en blekgul olje. Rensing ved flashkolonnekromatografi [gradienteluering 96 % kloroform/4 % metanol til 92 % kloroform/8 % metanol i 0,5 % økninger] ga produktet **I3** som et gult glass 30 (42 mg, 64 %). Analytiske data:  $R_T$  2,78 min; MS ( $\text{ES}^+$ )  $m/z$  (relativ intensitet) 1242 ( $[\text{M} + \text{H}]^+$ , 40).

**Forbindelse 49**

35 1-Etyl-3-(3-dimetylaminopropyl)karbodiimid (9,1 mg,  $4,76 \times 10^{-5}$  mol, 1,6 ekv.) ble satt til en løsning av N-hydroksysuksinimid (5,8 mg,  $5,06 \times 10^{-5}$  mol, 1,7

ekv.) og syre (**13**) i tørt DCM (6 ml) under en nitrogenatmosfære. Reaksjonsblandingen ble omrørt ved romtemperatur i 48 timer. Løsningen ble filtrert under vasking med DCM (10 ml). DCM-løsningen ble vasket med vann (20 ml), saltløsning (20 ml), tørket ( $\text{MgSO}_4$ ) og inndampet under redusert trykk. Produktet **49** (32 mg, 80 %) ble anvendt uten ytterligere rensing. Analytiske data:  $R_T$  2,88 min; MS ( $\text{ES}^+$ )  $m/z$  (relativ intensitet) 1339 ( $[\text{M} + \text{H}]^+$ , 100).

5

### **Forbindelse 50**

$\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$  (61 mg, 0,053 mmol, 0,01 ekv.) ble satt til en løsning av alloc-forbindelsen (**8**) (2,0 g, 5,3 mmol, 1,0 ekv.) og pyrrolidin (0,47 g, 0,55 ml, 6,63 mmol, 1,25 ekv.) i tørt DCM under en nitrogenatmosfære. Løsningen ble rørt om ved romtemperatur i 16 timer. LCMS indikerte nærværet av ureagert alloc-forbindelse. Ytterligere deler av pyrrolidin (0,38 g, 0,44 ml, 5,3 mmol, 1,0 ekv.) og  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$  (61 mg, 0,053 mmol, 0,01 ekv.) ble satt til og reaksjonen ble fortsatt i ytterligere 30 minutter. Løsemiddelet ble avdampet under redusert trykk. Rensing ved flashkolonnekromatografi [gradienteluering 100 % kloroform deretter 98 % kloroform/2 % metanol til 90 % kloroform/10 % metanol i 1 % økninger] ga produktet **50** som et hvitt pulver (1,37 g, 88 %). Analytiske data:  $R_T$  0,33 min; MS ( $\text{ES}^+$ )  $m/z$  (relativ intensitet) 294 ( $[\text{M} + \text{H}]^+$ , 60), MS ( $\text{ES}^-$ )  $m/z$  (relativ intensitet) 292 ( $[\text{M} - \text{H}]^-$ , 100).

10

15

20

### **Forbindelse 51**

EEDQ (1,22 g, 4,93 mmol, 1,05 ekv.) ble satt til en løsning av amindipeptid (**50**) (1,37 g, 4,69 mmol, 1 ekv.) og m-dPeg@2 syre (0,73 g, 4,93 mmol, 1,05 ekv.) i tørt THF (60 ml). Løsningen ble rørt om ved romtemperatur i 5 dager. Løsemiddelet ble avdampet under redusert trykk. Resten ble rensed ved flashkolonnekromatografi [100 % kloroform til 95 % kloroform/5 % metanol i 1 % økninger] for å gi produktet **51** som et hvitt, fast stoff (1,46 g, 74 %). Analytiske data:  $R_T$  2,22 min; MS ( $\text{ES}^+$ )  $m/z$  (relativ intensitet) 446 ( $[\text{M} + \text{Na}]^+$ , 80), 424 ( $[\text{M} + \text{H}]^+$ , 70), MS ( $\text{ES}^-$ )  $m/z$  (relativ intensitet) 422 ( $[\text{M} - \text{H}]^-$ , 100).

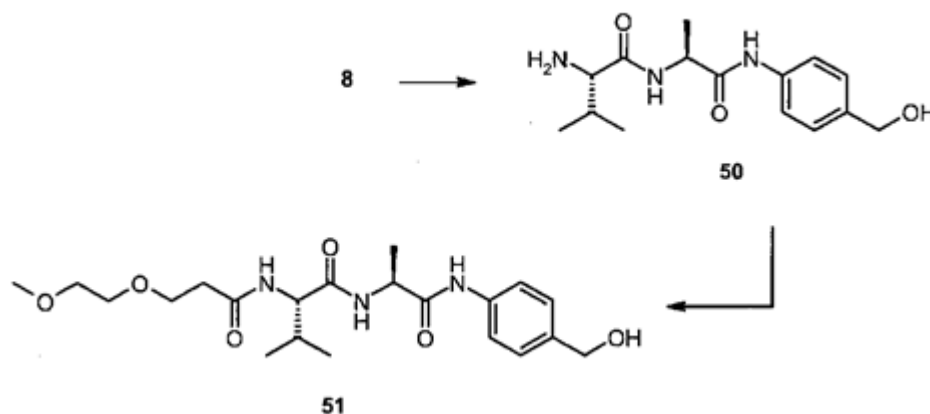
25

30

35

Syntesen av **51** er vist under i skjema 14.

## Skjema 14.

**Forbindelse 52**

5 Trietylamin (0,47 g, 0,65 ml 4,66 mmol, 2,2 ekv.) ble satt til en omrørt løsning av det mono-alloc-beskyttede bis-anilinet (**6**) (1,68 g, 2,12 mmol, 1 ekv.) og trifosgen (0,226 g, 0,76 mmol, 0,36 ekv.) i tørt THF (40 ml) under en nitrogenatmosfære ved romtemperatur. Reaksjonsblandingen ble oppvarmet til 40 °C, en prøve ble behandlet med metanol og analysert ved LCMS som metylkarbametat.

10

En løsning av dPeg®2-benzyl-alkoholen (**51**) (1,35 g, 3,18 mmol, 1,5 ekv.) og trietylamin (0,32 g, 0,44 ml, 3,18 mmol, 1,5 ekv.) i tørt THF (60 ml) ble satt til dråpevis i det nylig fremstilte isocyanat. Reaksjonsblandingen ble overvåket ved LCMS ved 30 minuttersintervaller. Etter 3 timer LC-MS viste omdannelse til produkt, nærværet av metylkarbamat og mono-alloc/beskyttet bis-anilin (**9**). En ytterligere del trifosgen (0,056 g, 0,19 mmol, 0,09 ekv.) ble satt til og reaksjonen fortsatte ved 40 °C i en ytterligere 3 timer. Reaksjonsblandingen ble avdampet til tørrhet for å gi det ubearbeidede produktet som en gul olje, hvilken

15

20 ble rensed ved flashkromatografi [gradienteluering 100 % kloroform til 95 % kloroform/5 % metanol i 1 % økninger] for å gi det ønskede produktet **52** som et gult skum (1,91 g, 73 %). Analytiske data:  $R_T$  min 3,42 min MS (ES<sup>+</sup>)  $m/z$  (relativ intensitet) 1243 ([M + H]<sup>+</sup>, 50), MS (ES<sup>-</sup>)  $m/z$  (relativ intensitet) 1241 ([M - H]<sup>-</sup>, 100).

25 **Forbindelse 53**



Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (35 mg, 3,0 x 10<sup>-5</sup> mol 0,02 ekv.) ble satt til en løsning av alloc-forbindelsen (**52**) (1,87 g, 1,5 mmol, 1,0 ekv.) og pyrrolidin (0,27 mg, 310 µl, 3,8 mmol, 2,5 ekv.) i tørt DCM (30 ml) under en nitrogenatmosfære. Løsningen ble rørt om ved romtemperatur i 4 timer. Løsemiddelet ble avdampet under redusert trykk og produktet ble rensert ved flashkolonnekromatografi [gradienteluering 100 % kloroform til 95 % kloroform/5 % metanol i 1 % økninger] for å gi produktet **53** gult skum (1,57 g, 90 %). Analytiske data: R<sub>T</sub> min 3,17 min MS (ES<sup>+</sup>) *m/z* (relativ intensitet) 1159 ([M + H]<sup>+</sup>, 65).

#### **Forbindelse 54**

Trietylamin (0,26 g, 0,36 ml 2,6 mmol, 2,2 ekv.) ble satt til en omrørt løsning av det mono-beskyttede bis-anilinet (**53**) (1,37 g, 1,18 mmol, 1 ekv.) og trifosgen (0,126 g, 0,43 mmol, 0,36 ekv.) i tørt THF (40 ml) under en nitrogenatmosfære ved romtemperatur. Reaksjonsblandingen ble oppvarmet til 40 °C, en prøve ble behandlet med metanol og analysert ved LC-MS mensmetylkarbamatet indikerte komplett isocyanatdannelse.

En løsning av benzylalkoholen (**8**) (0,67 g, 1,8 mmol, 1,5 ekv.) og trietylamin (0,18 g, 0,25 ml, 1,8 mmol, 1,5 ekv.) i tørt THF (50 ml) ble satt til dråpevis i det nylig fremstilte isocyanat. Reaksjonsblandingen ble overvåket ved LCMS og var fullført etter 18 timer ved 40 °C. Reaksjonsblandingen ble avdampet til tørrhet for å gi en gul olje, hvilken ble rensert ved flashkromatografi [gradienteluering 95 % etylacetat/5 % metanol til 93 % etylacetat/7 % metanol i 1 % økninger] for å gi det ønskede produktet **54** som et hvitt skum (1,21 g, 66 %). Analytiske data: R<sub>T</sub> min 3,42 min MS (ES<sup>+</sup>) *m/z* (relativ intensitet) 1562 ([M + H]<sup>+</sup>, 15).

#### **Forbindelse 55**

En løsning av K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0,522 g, 3,78 mmol, 5 ekv.) i H<sub>2</sub>O (5,0 ml) ble satt til en løsning av acetatet (**54**) (1,18 g, 0,756 mmol, 1 ekv.) i metanol (29 ml). Reaksjonsblandingen ble omrørt ved romtemperatur i 2 timer. Metanolet avdampet under redusert trykk, resten ble fortynnet med H<sub>2</sub>O (50 ml) og ekstrahert med etylacetat (3 x 100 ml). De kombinerte etylacetatekstraktene ble vasket med H<sub>2</sub>O (200 ml), saltløsning (200 ml), tørket (MgSO<sub>4</sub>) og inndampet under redusert trykk for å gi produktet **55** som et hvitt skum (1,052 g, 94 %).

Analytiske data:  $R_T$  min 3,15 min MS ( $ES^+$ )  $m/z$  (relativ intensitet) 1478 ( $[M + H]^+$ , 5), MS ( $ES^-$ )  $m/z$  (relativ intensitet) 1477 ( $[M - H]^-$ , 100).

### **Forbindelse 56**

5

Dess-Martin-periodinan (0,152 g, 0,36 mmol, 2,1 ekv.) ble satt til samlet til en løsning av det bis-deacetylerede produktet (**55**) (0,252 g, 0,17 mmol 1 ekv.) i tørt DCM (5 ml) under en nitrogenatmosfære. Løsningen ble omrørt ved romtemperatur under nitrogen i 2 timer, etter hvilken tid LCMS indikerte fullføring. Reaksjonsblandingen ble fortynnet med DCM (50 ml) og vasket med mettet vandig natriumbikarbonatløsning (3 x 100 ml), vann (100 ml), saltløsning (100 ml) og tørket ( $MgSO_4$ ). Løsemiddelet ble fjernet ved rotasjonsfordampning under redusert trykk for å gi det ubearbeidede produktet. Rensing ved flashkolonnekromatografi [gradienteluering 100 % kloroform til 92 % kloroform/8 % metanol i 1 % økninger] ga produktet **56** som et hvitt skum (0,17 g, 68 %). Analytiske data:  $R_T$  min 6,17 min MS ( $ES^+$ )  $m/z$  (relativ intensitet) 1474 ( $[M + H]^+$ , 5), MS ( $ES^-$ )  $m/z$  (relativ intensitet) 1472 ( $[M - H]^-$ , 100).

10

15

### **Forbindelse 57**

20

$Pd(PPh_3)_4$  (8 mg, 6,9  $\mu$ mol, 6,0 ekv.) ble satt til en løsning av alloc-forbindelsen (**56**) (160 mg, 0,108 mmol, 1,0 ekv.) og 0,5 M pyrrolidin løsning i DCM (0,27 ml, 0,135 mmol, 1,25 ekv.) i tørt DCM (18 ml) under en nitrogenatmosfære. Løsningen ble omrørt ved romtemperatur i 30 min. Løsemiddelet ble avdampet under redusert trykk. Rensing ved flashkolonnekromatografi [gradienteluering 100 % kloroform til 91 % kloroform/9 % metanol i 1 % økninger] ga produktet **57** som et hvitt pulver (0,114 g, 74 %). Analytiske data:  $R_T$  min 2,60 min MS ( $ES^+$ )  $m/z$  (relativ intensitet) 1390 ( $[M + H]^+$ , 5).

25

30

Kobling av en maleimid-PEG-suksinimidreagent med **57** tilveiebringer the PBD legemiddel-linker **58**. Figur 1b viser strukturene av PBD legemiddel-linker MP-PEG8-Val-Ala-PAB-(imp)PBD **58** hvor MP er maleimidopropanamid, PEG er etylenoksy og PAB er para-aminobenzylsykkarbonyl og imp er *N*-1 0 iminbeskyttelsesgruppen: 3-(2-metoksyetoksy)propanoat-Val-Ala-PAB.

35

**Forbindelse 58 (MP-PEG8-Val-Ala-PAB-(imp)PBD; (11S,11aS)-4-((2S,5S)-37-(2,5-diookso-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-5-isopropyl-2-metyl-4,7,35-triookso-10,13,16,19,22,25,28,31-oktaoksa-3,6,34-triazaheptatriakontanamido)benzyl 11-hydroksy-8-(5-((11S,11aS)-11-hydroksy-10-((4-((10S,13S)-10-isopropyl-13-metyl-8,11-diookso-2,5-diooksa-9,12-diazatetradekanamido)benzylloksy)karbonyl)-7-metoksy-2-metylen-5-okso-2,3,5,10,11,11a-heksahydro-pyrrolobenzo[2,1-c][1,4]diazepin-8-yloksy)pentylloksy)-7-metoksy-2-metylen-5-okso-2,3,11,11a-tetrahydro-pyrrolobenzo[2,1-c][1,4]diazepin-10(5H)-karboksylat)**

En 0,5 M løsning av *N,N*-diisopropyldietylamin i tørt DCM (176 µl,  $8,8 \times 10^{-5}$  mol, 2,2 ekv.) ble satt til en løsning av amindipeptid (57) (55 mg,  $3,96 \times 10^{-5}$  mol, 1,0 ekv.) og maleimid-dPeg®8-NHS-ester (33 mg,  $4,75 \times 10^{-5}$  mol, 1,2 ekv.) i tørt DCM (6 ml). Løsningen ble rørt om ved romtemperatur i 24 timer. Reaksjonsblandingen ble avdampet under redusert trykk og residuet ble løst i DCM (50 ml). DCM-løsningen ble ekstrahert med mettet natriumhydrogenkarbonat (2 x 100 ml), vann (100 ml), saltløsning (100 ml), tørket (MgSO<sub>4</sub>) og inndampet under redusert trykk for å gi en gul gummi. Rensing ved flashkolonnekromatografi [gradienteluering kloroform til 91 % kloroform/9 % metanol i 1 % økninger] ga produktet 58 som et hvitt skum (41 mg, 52 %). Analytiske data: RT min 5,8 min. MS (MaldiTOF) m/z (relativ intensitet) 1987,9 ([M + Na]<sup>+</sup>, 100).

### **Konjugat 60**

Peptidbiotin-A20FMDV-Cys (**59**) som er svært selektivt for integrinet α<sub>v</sub>β<sub>6</sub>, som er betydelig oppregulert ved mange krefttyper, ble valgt for konjugering av PBD-linkerderivatene. En løsning av peptidet (**59**) (7,7 mg, 3,08 µmol, 1,2 ekv.) i 1/1 acetonitril/vann (1 ml) ble satt til en løsning av (**58**) (5,05 mg, 2,57 µmol, 1,0 ekv.) i 1/1 acetonitril /vann (2 ml). Løsningen ble rørt om ved romtemperatur i 24 timer. Acetonitrilet ble avdampet under redusert trykk og vannet ble fjernet ved lyofilisering for å gi produktet **60** et hvitt skum. Rensing ved semipreparativ HPLC fulgt av lyofilisering ga produktet som et hvitt skum

(3,4 mg, 29 %). Analytiske data: MS (MaldiTOF)  $m/z$  (relativ intensitet) 4458,3 ( $[M + H]^+$ , 100).

**Forbindelse 61 (MP-PEG24-Val-Ala-PAB-(imp)PBD; (11S,11aS)-4-((2S,5S)-16-(2,5-diokso-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-5-isopropyl-2-metyl-4,7,14-triokso-10-oksa-3,6,13-triazaheksadekanamido)benzyl 11-hydroksy-8-((5-(((11S,11aS)-11-hydroksy-10-(((4-((10S,13S)-10-isopropyl-13-metyl-8,11-diokso-2,5-dioksa-9,12-diazatetradekanamido)benzyl)oksy)karbonyl)-7-metoksy-2-metylen-5-okso-2,3,5,10,11,11a-heksahydro-1H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-8-yl)oksy)pentyl)oksy)-7-metoksy-2-metylen-5-okso-2,3,11,11a-tetrahydro-1H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-10(5H)-karboksylat)**

NN-diisopropyldietylamin (6  $\mu$ l,  $4,3 \times 10^{-5}$  mol, 2,2 ekv.) ble satt til en løsning av amindipeptid (**57**) (27 mg,  $1,94 \times 10^{-5}$  mol, 1 ekv.) og maleimid-dPeg@24-NHS-ester (30 mg,  $2,13 \times 10^{-5}$  mol, 1,1 ekv.) i tørt DCM (5 ml). Løsningen ble rørt om ved romtemperatur i 24 timer. Reaksjonsblandingen ble avdampet under redusert trykk og residuet ble løst i DCM (25 ml). DCM-løsningen ble ekstrahert med mettet natriumhydrogenkarbonat (2 x 50 ml), vann (50 ml), saltløsning (50 ml), tørket ( $MgSO_4$ ) og indampet under redusert trykk for å gi en gul gummi. Rensing ved flashkolonnekromatografi [gradienteluering kloroform til 91 % kloroform/9 % metanol i 1 % økninger] ga produktet som en fargeløs gummi (22 mg, 42 %). Analytiske data: MS (MaldiTOF)  $m/z$  (relativ intensitet) 2691,8 ( $[M + H]^+$ , 100).

**(2S,2'S,E)-dimetyl 1,1'-(4,4'-(propan-1,3-diylbis(oksy))bis(5-metoksy-2-nitrobenzoyl))bis(4-((E)-prop-1-en-1-yl)-2,3-dihydro-1H-pyrrol-2-karboksylat)(71)**

Tetrakis(trifenylfosfin)palladium(0) (21,6mg) ble satt til triflat **40** (230 mg), *trans*-propenylborsyre (52,3 mg) og natriumkarbonat (129 mg) i en blanding av toluen (5 ml), etanol (2,5 ml) og vann (2,5 ml). Reaksjonsblandingen ble tillatt å omrøres i 3 timer under en argonatmosfære ved 32 °C. Reaksjonsblandingen ble fortynnet med etylacetat og vasket med vann, saltløsning og tørket over magnesiumsulfat. Etter filtrering ble overskytende etylacetat fjernet ved rotasjonsfordamping under redusert trykk. Det ubearbeidede koblingsproduktet

ble rensed ved flashkolonnekromatografi (silikagel; gradient 50 %/50 % etylacetat/heksan til 80 %/20 % etylacetat/heksan). Rene fraksjoner ble kombinert og fjerning av overskytende eluent ga det rene produktet **71** som et oransje fast stoff (110 mg, 61,4 % utbytte, LC/MS 3,52 min, m/z ES<sup>+</sup> 764,92).  
 5 Reaksjonen ble gjentatt på i større skala for å gi 7,21 g av Suzuki-koblingsproduktet. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD). δ 7,78 (s, 2H) 6,92 (s, 2H), 5,98 (d, 2H), 5,89 (s, 2H), 5,46-5,55 (m, 2H), 5,10 (dd, 2H), 4,37 (t, 4H), 3,93-4,00 (m, 6H), 3,86 (s, 6H), 3,19-3,26 (m, 2H), 2,80 (dd, 2H), 2,45-2,51 (m, 2H), 1,77 (d, 6H OCH<sub>3</sub>).

10 ***(S,E)-((propan-1,3-diylbis(oksy))bis(5-metoksy-2-nitro-4,1-fenylen))bis(((S)-2-(hydroksymetyl)-4-((E)-prop-1-en-1-yl)-2,3-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)metanon) (72)***

15 *Bis*-esteren **71** (7,21 g) ble satt til samlet som et fast stoff til en løsning av litiumborhydrid (622 mg) i tørt tetrahydrofuran (300 ml), ved 0 °C (isbad). Isbadet ble fjernet, og reaksjonsblandingen tillatt å nå romtemperatur. Etter 1 time viste TLC (etter minimal bearbeiding med etylacetatvann) at reaksjonen ikke var fullført, og dermed ble ytterligere litiumborhydrid (0,75 ekvivalenter)  
 20 satt til. Reaksjonsblandingen ble tillatt å omrøres i ytterligere 2,5 timer, på hvilket tidspunkt TLC (etter minimal bearbeiding) viste at reaksjonen er fullført. Gjenværende litiumborhydrid ble stanset med en stor overskuddsmengde etylacetat (isbad), og reaksjonsblandingen ble tillatt å omrøres i 50 min. Den organiske fasen ble vasket med vann, saltløsning og tørket over  
 25 magnesiumsulfat. Magnesiumsulfat ble fjernet ved vakuumfiltrering og etylacetatet fjernet ved rotasjonsfordamping under redusert trykk for å gi diolet **72** (5,46 g, 82 % utbytte) som ble anvendt i den neste reaksjonen uten ytterligere rensing (LC/MS 3,17 min, m/z ES<sup>+</sup> 708,84). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD). δ 7,78 (s, 2H) 6,85 (s, 2H), 5,97 (d, 2H), 5,77 (s, 2H), 5,61-5,53 (m, 2H), 4,75-4,82 (m, 2H), 4,38 (t, 4H), 3,89-4,00 (m, 12H), 3,01-3,08 (m, 2H)  
 30 2,46-2,51 (m, 4H), 1,77 (d, 6H OCH<sub>3</sub>).

***((2S,2'S,E)-1,1'-(4,4'-(propan-1,3-diylbis(oksy))bis(5-metoksy-2-nitrobenzoyl))bis(4-((E)-prop-1-en-1-yl)-2,3-dihydro-1H-pyrrol-2,1-diyl))bis(metylen) diacetat (73)***

35

En løsning av acetylchlorid (1,64 ml) i tørt diklormetan (40 ml) ble satt til dråpevis i en løsning av bis-alkoholen **72** (6,2 g) i diklormetan (200 ml) i nærværet av trietylamin (3,68 ml) ved 0 °C. Reaksjonsblandingen ble tillatt å oppvarmes til romtemperatur og reaksjonenle overvåket ved TLC og LC/MS. Da reaksjonen var fullført, ble den organiske fasen vasket i rekkefølge med vann, 5 sitronsyre (0,5 N), mettet natriumbikarbonat og saltløsning. Det organiske sjiktet ble tørket over magnesiumsulfat, filtrert og overskytende diklormetan fjernet ved rotasjonsfordamping under redusert trykk. Resten gjennomgikk kolonnekromatografi (silikagel; gradient, 60 % etylacetat/ 40 % heksan til 70 % 10 etylacetat/30 % heksan). Rene fraksjoner ble kombinert og fjerning av overskytende eluent ga *bis*-acetatet **73** (2,50 g, 36 % utbytte, LC/MS 3,60 min, *m/z* ES<sup>+</sup> 792,63). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,77 (d, *J* = 3,4 Hz, 2H), 6,89 (s, 2H), 5,99 (d, *J* = 15,2 Hz, 2H), 5,78 (s, 2H), 5,65 - 5,45 (m, *J* = 15,4, 6,8 Hz, 2H), 5,02 - 4,86 (m, *J* = 9,7, 5,5 Hz, 2H), 4,57 (s, 2H), 4,37 (t, *J* = 5,9 Hz, 4H), 15 4,00 (s, 6H), 3,10 - 2,92 (m, *J* = 10,7 Hz, 2H), 2,60 (dd, *J* = 16,3, 3,1 Hz, 2H), 2,52 - 2,43 (m, 2H), 2,10 (s, 6H), 1,78 (d, *J* = 6,7 Hz, 4H).

***((2S,2'S,E)-1,1'-(4,4'-(propan-1,3-diylbis(oksy))bis(2-amino-5-metoksybenzoyl))bis(4-((E)-prop-1-en-1-yl)-2,3-dihydro-1H-pyrrol-2,1-diyl))bis(metylen) diacetat (74)***

20

Sink pulver (10 g) ble satt til en løsning av *bis*-nitroforbindelse **73** (2,5 g) i etanol (20 ml) og etylacetat (20 ml), etterfulgt av en løsning av maursyre i etanol (5 % v/v; 100 ml). Reaksjonen var eksoterm, hvorved temperaturen steg 25 til 33 °C, temperaturen ble brakt ned til 15 °C med et isbad og reaksjonsblandingen ble tillatt å omrøres mens den ble nøye overvåket ved TLC og LC/MS. Etter 30 min ble reaksjonen vurdert som fullført ettersom det ikke ble påvist spor av utgangsmateriale eller mellomprodukter. Blandingen ble dekantert og filtrert gjennom bomull. Filtratet ble fordelt mellom etylacetat (300 ml) og 30 mettet vandig NaHCO<sub>3</sub> (300 ml). Det organiske sjiktet ble ytterligere vasket med saltløsning (200 ml) og tørket over magnesiumsulfat. Overskytende løsemidler ble fjernet ved rotasjonsfordamping under redusert trykk for å gi produktet **74** (2,09 g; 90 % utbytte, LC/MS 3,35 min, *m/z* ES<sup>+</sup> 732,06). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 6,76 (s, 2H), 6,45 (s, 2H), 6,33 (s, 2H), 6,12 (d, *J* = 15,3 Hz, 2H), 5,54 35 (dq, *J* = 13,2, 6,6 Hz, 2H), 4,90 (td, *J* = 9,6, 4,5 Hz, 2H), 4,48 (s, 4H), 4,42 - 4,33 (m, 4H), 4,23 (t, *J* = 6,1 Hz, 4H), 3,79 (s, 6H), 2,95 (dd, *J* = 16,0, 10,4

Hz, 2H), 2,55 (dd,  $J = 16,2, 3,5$  Hz, 2H), 2,42 - 2,32 (m, 2H), 2,07 (s, 6H), 1,81 (d,  $J = 6,6$  Hz, 6H).

5 ***((S)-1-(4-(3-(4-((S)-2-(acetoksymetyl)-4-((E)-prop-1-en-1-yl)-2,3-dihydro-1H-pyrrol-1-karbonyl)-5-(((allyloksy)karbonyl)amino)-2-metoksyfenoksy)propoksy)-2-amino-5-metoksybenzoyl)-4-((E)-prop-1-en-1-yl)-2,3-dihydro-1H-pyrrol-2-yl)metyl (75)***

10 En løsnings av allylklorformat i tørt diklormetan ble satt til dråpevis i en løsnings av bis-anilinet **74** og pyridin i tørt diklormetan at  $-78$  °C. Reaksjonsblandingen ble tillatt å omrøres ved  $-78$  °C i 2 timer og deretter tillatt å gå tilbake til romtemperatur. Reaksjonsblandingen ble vasket i rekkefølge med vandig kopper(II)sulfat, vann, mettet natriumbikarbonat og saltløsning. Det organiske sjiktet ble tørket over magnesiumsulfat, filtrert under vakuum og overskytende diklormetan ble fjernet ved rotasjonsfordamping under redusert trykk. TLC og LC/MS viste nærværet av både det ønskede mono-alloc-produktet **75** og bis-alloc-produktet. Produktblandingen gjennomgikk kolonnekromatografi (silikagel; gradient 40 % etylacetat/60 % heksan til 70 % etylacetat/40 % heksan). Rene fraksjoner inneholdende det ønskede mono-alloc produktet **75** ble samlet og kombinert, overskytende eluent ble fjernet ved rotasjonsfordamping under redusert trykk for å gi produktet (580 ml, 25 % utbytte). LC/MS 3,58 min, ES<sup>+</sup> 817,02 <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  8,60 (s, 1 H), 7,85 (s, 1 H), 6,80 (s, 1 H), 6,72 (s, 1 H), 6,42 (s, 1 H), 6,37 (s, 1 H), 6,33 (s, 1 H), 6,08 (dd,  $J = 15,4, 6,1$  Hz, 2H), 6,00 - 5,87 (m, 1 H), 5,62 - 5,44 (m, 2H), 5,34 (dd,  $J = 17,2, 1,4$  Hz, 1 H), 5,23 (dd,  $J = 10,4, 1,2$  Hz, 1 H), 4,88 (qd,  $J = 9,5, 4,5$  Hz, 2H), 4,67 - 4,57 (m, 2H), 4,50 - 4,25 (m, 8H), 4,22 (t,  $J = 6,3$  Hz, 2H), 3,82 (s, 3H), 3,76 (s, 3H), 3,00 - 2,85 (m, 2H), 2,58 - 2,47 (m, 2H), 2,37 (p,  $J = 6,1$  Hz, 2H), 2,06 (s, 6H), 1,81 - 1,73 (m, 6H).

30 ***((2S)-1-(4-(3-(4-((S)-2-(acetoksymetyl)-4-((E)-prop-1-en-1-yl)-2,3-dihydro-1H-pyrrol-1-karbonyl)-5-(((4-(2-(2-(((allyloksy)karbonyl)amino)-3-metylbutanamido)propanamido)benzyl)oksy)karbonyl)amino)-2-metoksyfenoksy)propoksy)-2-(((allyloksy)karbonyl)amino)-5-metoksybenzoyl)-4-((E)-prop-1-en-1-yl)-2,3-dihydro-1H-pyrrol-2-yl)metylacetat (76)***

35

Tørt trietylamin (0,206 ml) ble satt til en omrørt løsning av det mono-alloc-beskyttede *bis*-anilinet **75** (560 mg) og trifosgen (72 mg) i tørt tetrahydrofuran (20 ml) under en inert atmosfære. Reaksjonsblandingen ble oppvarmet ved 40 °C og en prøve ble fjernet og behandlet med metanol. LC/MS viste fullstendig omdannelse til metylkarbamatet, noe som indikerte at den frie amingruppen var blitt vellykket omdannet til det reaktive isocyanatmellomproduktet. En løsning av alloc-val-ala-PABOH (381 mg) og trietylamin (0,14 ml) i tørt tetrahydrofuran (20 ml) ble hurtig injisert i reaksjonsbeholderen ved 40 °C. Reaksjonsblandingen ble tillatt å omrøres ved romtemperatur natten over, etter hvilket tidspunkt en prøve ble fjernet og behandlet med metanol. LC/MS viste ikke spor av metylkarbamate, noe som indikerte at alt isocyanat var forbrukt. Reaksjonsblandingen ble avdampet til tørrhet for å gi det ubearbeidede produktet hvilket ble rensert ved kolonnekromatografi (silikagel; gradient kloroform til 2 % metanol/ 98 % kloroform). Rene fraksjoner ble samlet og kombinert, og fjerning av overskytende eluent ved rotasjonsfordamping under redusert trykk ga det rene produktet **76** (691 mg, 84 % utbytte). LC/MS 3,73 min, ES<sup>+</sup> 1220,21.

**Allyl** **4-(2-(2-(((allyloksy)karbonyl)amino)-3-metylbutanamido)propanamido)benzyl ((S,E)-(propan-1,3-diylbis(oksy))bis(2-((S)-2-(hydroksymetyl)-4-((E)-prop-1-en-1-yl)-2,3-dihydro-1H-pyrrol-1-karbonyl)-4-metoksy-5,1-fenylene))dikarbamate (77)**

En vandig løsning av kaliumkarbonat (770 mg i 4,8 ml vann) ble satt til en løsning av bis-acetatet **76** (680 mg) i metanol (29 ml) ved romtemperatur. Deacetyleringen var fullført innenfor 30 min som overvåket ved LC/MS. Reaksjonsblandingen ble fortynnet med diklormetan (200 ml) og den organiske fasen vasket i rekkefølge med sitronsyre (0,5 N, 100 ml), vann (200 ml) og saltløsning (100 ml). Den organiske fasen ble tørket over magnesiumsulfat, suspensjonen ble filtrert (vakuumfiltrering) og overskytende løsemiddel fjernet ved rotasjonsfordamping under redusert trykk. Resten gjennomgikk kolonnekromatografi (silikagel; gradient 1,5 % metanol / 98,5 % kloroform til 3,5 % metanol 96,5 % kloroform). Rene fraksjoner ble kombinert og fjerning av overskytende eluent ved rotasjonsfordamping under redusert trykk ga diolet **77** (530 mg, 84 % utbytte). LC/MS 3,40 min, ES<sup>+</sup> 1136,49.



**(11S,11aS)-allyl 8-(3-(((11S,11aS)-10-(((4-((S)-2-((S)-2-  
 (((allyloksy)karbonyl)amino)-3-  
 metylbutanamido)propanamido)benzyl)oksy)karbonyl)-11-hydroksy-7-  
 metoksy-5-okso-2-((E)-prop-1-en-1-yl)-5,10,11,11a-tetrahydro-  
 5 pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-8-yl)oksy)propoksy)-11-hydroksy-7-  
 metoksy-5-okso-2-((E)-prop-1-en-1-yl)-11,11a-dihydro-pyrrolo[2,1-  
 c][1,4]benzodiazepin-10(5H)-karboksylat (78)**

10 Dess-Martin-periodinan (373 mg, 4 ekv.) ble satt til samlet til en løsning av **77**  
 (250 mg) og pyridin (0,36 ml, 20 ekv.) i tørt diklormetan (10 ml) ved  
 romtemperatur. nøye overvåkning ved TLC (5 % metanol/ kloroform) viste at  
 utgangsmaterialet var forsvunnet etter 30 minutter. Reaksjonen ble bearbeidet  
 med en løsning av natriummetabisulfitt og natriumhydrogenkarbonat, etterfulgt  
 15 av saltløsning. diklormetansjiktet ble tørket over magnesiumsulfat og  
 vakuumfiltrert. Diklormetanløsningen ble deretter behandlet med en katalytisk  
 mengde DMAP (c. 10 mg), noe som som forårsaket at hovedproduktområdet  
 koaleserte til ett, som observert ved TLC/LC/MS. Løsningen ble filtrert og  
 diklormetanet fjernet ved rotasjonsfordamping under redusert trykk. Den  
 20 resulterende resten gjennomgikk kolonnekromatografi (silikagel; gradient 1,5 %  
 metanol/ 98,5 % kloroform til 3 % metanol/ 97 % kloroform). Rene fraksjoner  
 ble samlet og fjerning av eluent ved rotasjonsfordamping under redusert trykk  
 ga det ønskede sykliserte produktet **78** (62 mg, 25 % utbytte). LC/MS 3,35 min,  
 ES<sup>+</sup>1132,19, ES<sup>-</sup>1130,25.

25 **(11S,11aS)-4-((S)-2-((S)-2-amino-3-  
 metylbutanamido)propanamido)benzyl 11-hydroksy-7-metoksy-8-(3-  
 (((S)-7-metoksy-5-okso-2-((E)-prop-1-en-1-yl)-5,11a-dihydro-  
 pyrrolo[2,1-c][1,4]d benzoiazepin-8-yl)oksy)propoksy)-5-okso-2-((E)-  
 prop-1-en-1-yl)-11,11a-dihydro-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-  
 30 10(5H)-karboksylat (79)**

Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (1,9 mg) ble satt til en løsning av alloc-forbindelsen (**78**) (62 mg) og  
 pyrrolidin (22,6 µl) i tørt DCM (3 ml) under en argonatmosfære. Løsningen ble  
 35 rørt om ved romtemperatur i 1,5 timer. Løsemiddelet ble avdampet under  
 redusert trykk. Rensing ved flashkolonnekromatografi [gradienteluering 3 %

metanol /97 % kloroform til /90 % kloroform 10 % metanol] ga produktet som et hvitt pulver (26 mg, 50 %). LC/MS: RT 2,70 min MS (ES<sup>+</sup>) 946,17.

**(11S,11aS)-4-((2S,5S)-25-(2,5-diokso-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-5-isopropyl-2-metyl-4,7,23-triokso-10,13,16,19-tetraoksa-3,6,22-triazapentacosanamido)benzyl 11-hydroksy-7-metoksy-8-(3-(((S)-7-metoksy-5-okso-2-((E)-prop-1-en-1-yl)-5,11a-dihydro-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-8-yl)oksy)propoksy)-5-okso-2-((E)-prop-1-en-1-yl)-11,11a-dihydro-pyrrolobenzo[2,1-c][1,4]diazepin-10(5H)-karboksylat (80)**

10

En løsning av *N,N*-diisopropyldietylamin i(2,6 µl) ble satt til en løsning av amidipeptid **79** (13 mg) og maleimid-dPeg®4-NHS-ester (8,5mg), i tørt DCM (4 ml) Løsningen ble omrørt ved romtemperatur i 24 h. Reaksjonsblandingen ble avdampet under redusert trykk og resten utsatt for semipreparativ TLC (10 % metanol/90 % kloroform) for å gi en ren prøve av det ønskede maleimidet **14**. LC-MS-retensjonstid 2,87 min ES<sup>+</sup> 1344,29.

15

***Boc-Val-Cit-PABOH (82)***

20

En løsning av Boc-Val-OSu (10,0 g, 31,8 mmol, 1 ekv.) i THF (50 ml) ble satt til en løsning av H-Cit-OH (5,85 g, 33,4 mmol, 1,05 ekv.) og NaHCO<sub>3</sub> (2,94 g, 34,9 mmol, 1,1 ekv.) i THF (50 ml) og H<sub>2</sub>O (100 ml). Blandingen ble omrørt ved romtemperatur i 72 timer, og THF avdampet under redusert trykk. PH ble justert til 3 med sitronsyre for å utfelle en hvit gummi. Denne ble ekstrahert med 10 % IPA/etylacetat (8 x 150 ml), de kombinerte ekstraktene ble vasket med saltløsning (300 ml) og tørket (MgSO<sub>4</sub>). Inndamping under redusert trykk ga et hvitt skum hvilket ble tørket under redusert trykk i 18 timer. Skummet ble suspendert i eter med sonikering, fulgt av filtrering for å gi produktet som et fintt, hvitt pulver (10,6 g, 89 %). En porsjon av dette materialet (7,2 g, 19,2 mmol, 1 ekv.), p-aminobenzyl alkohol (2,6 g, 21,15 mmol, 1,1 ekv.) og EEDQ (9,5 g, 38,5 mmol, 2,0 ekv.) i DCM/MeOH (100 ml/50 ml) ble omrørt ved romtemperatur i 24 timer. Løsemiddelet ble avdampet under redusert trykk og den resterende gummi ble triturerert med eter med sonikering, det resulterende produktet ble samlet ved filtrering og tørket under redusert trykk for å gi produktet **82** som et hvitt, fast stoff (6,6 g, 71 %). Analytiske data: RT 2,42

25

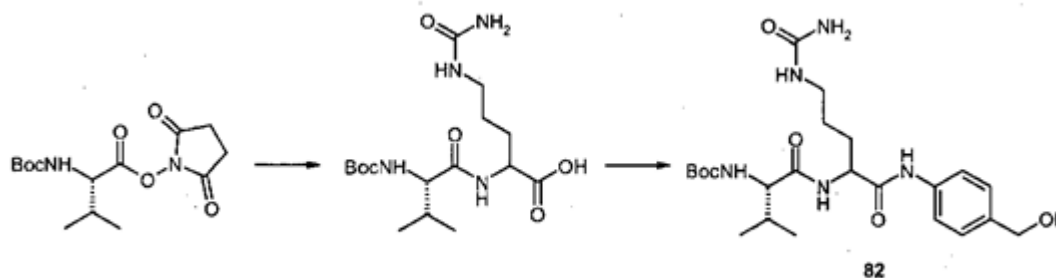
30

35

min; MS (ES<sup>+</sup>) *m/z* (relativ intensitet) 479,8 ([*M* + 1]<sup>+</sup>, 60), MS (ES<sup>-</sup>) *m/z* (relativ intensitet) 477,6 ([*M* - H]<sup>-</sup>, 90).

Syntesen av forbindelse **82** er vist i skjema 16 under.

Skjema 16



5

***((S)-1-(4-((5-(4-((S)-2-(acetoksymetyl)-4-metylenpyrrolidin-1-karbonyl)-5-(((4-((S)-2-((S)-2-((tert-butoksykarbonyl)amino)-3-metylbutanamido)-5-ureidopentanamido)benzyl)oksy)karbonyl)amino)-2-metoksyfenoksy)pentyl)oksy)-2-(((allyloksy)karbonyl)amino)-5-metoksybenzoyl)-4-metylenpyrrolidin-2-yl)metylacetat (83)***

10

Trietylamin (0,14 g, 0,19 ml 1,4 mmol, 2,2 ekv.) ble satt til en omrørt løsning av det mono-alloc-beskyttede bis-anilinet (**6**) (0,505 g, 0,64 mmol, 1 ekv.) og trifosgen (0,068 g, 0,23 mmol, 0,36 ekv.) i tørt THF (10 ml) under en argonatmosfære ved romtemperatur. Reaksjonsblandingen ble oppvarmet til 40 °C, en prøve ble behandlet med metanol og analysert ved LCMS som metylkarbametat.

15

En løsning av benzylalkoholen (**82**) (0,46 g, 0,96 mmol, 1,5 ekv.) og trietylamin (0,096 g, 0,13 ml, 0,96 mmol, 1,5 ekv.) i tørt THF/DMF (20 ml/1 ml) ble satt til dråpevis i det nylig fremstilte isocyanatt. Reaksjonsblandingen ble overvåket ved LC-MS og var fullført etter 2 timer ved 40 °C. Reaksjonsblandingen ble avdampet til tørrhet og resten fordelt mellom 10 % IPA/DCM og vann. Den organiske delen ble separert og vasket med vann (100 ml), saltløsning (100 ml), tørket (MgSO<sub>4</sub>) og inndampet under redusert trykk for å gi et brunt skum. Rensing ved flashkolonnekromatografi [gradienteluering kloroform til 93 % kloroform/7 % metanol i 1 % økninger] ga produktet som et hvitt, fast stoff (0,5

20

25

g, 60 %). Analytiske data: RT 3,42 min; MS (ES<sup>+</sup>) *m/z* (relativ intensitet) 1298 ([*M* + H]<sup>+</sup>, 100).

**Allyl 4-((*S*)-2-((*S*)-2-((*tert*-butoksykarbonyl)amino)-3-metylbutanamido)-5-ureidopentanamido)benzyl ((*S*)-(pentan-1,5-diylobis(oksy))bis(2-((*S*)-2-(hydroksymetyl)-4-metylenpyrrolidin-1-karbonyl)-4-metoksy-5,1-fenylen))dikarbamat (84)**

En løsning av K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0,28 g, 2,0 mmol, 5,4 ekv.) i H<sub>2</sub>O (2 ml) ble satt til en løsning av acetatet (**83**) (0,49 g, 0,4 mmol, 1 ekv.) i metanol (10 ml). Reaksjonsblandingen ble omrørt ved romtemperatur i 2 timer. Metanolet ble avdampet under redusert trykk, resten ble fortynnet med H<sub>2</sub>O (10 ml) og surgjort til pH 3 med 1 M sitronsyre. Blandingen ble ekstrahert med DCM (4 x 50 ml) og de kombinerte ekstraktene ble vasket med saltløsning (100 ml), tørket (MgSO<sub>4</sub>) og inndampet under redusert trykk for å gi produktet som et hvitt skum (0,43 g, 94 %). Analytiske data: RT 3,12 min; MS (ES<sup>+</sup>) *m/z* (relativ intensitet) 1214 ([*M* + H]<sup>+</sup>, 100), MS (ES<sup>-</sup>) *m/z* (relativ intensitet) 1212 ([*M* - H]<sup>-</sup>, 100).

**(11*S*,11*aS*)-allyl 8-((5-(((11*S*,11*aS*)-10-(3-(4-((*S*)-2-((*S*)-2-((*tert*-butoksykarbonyl)amino)-3-metylbutanamido)-5-ureidopentanamido)fenyl)propanoyl)-11-hydroksy-7-metoksy-2-metylen-5-okso-2,3,5,10,11,11*a*-heksahydro-1*H*-pyrrolo[2,1-*c*][1,4]benzodiazepin-8-yl)oksy)pentyl)oksy)-11-hydroksy-7-metoksy-2-metylen-5-okso-2,3,11,11*a*-tetrahydro-1*H*-pyrrolo[2,1-*c*][1,4]benzodiazepin-10(5*H*)-karboksylat (85)**

Stabilisert 45 vekt-% 2-jodoksybenzoylsyre (IBX) (0,18 g, 0,29 mmol, 2,4 ekv.) ble satt til samlet til en løsning av det bis-deacetylerede produktet (**55**) (0,147 g, 0,12 mmol, 1 ekv.) i tørt DMSO (4 ml) under en nitrogenatmosfære. Løsningen ble rørt om ved romtemperatur i 26 timer. En ytterligere del IBX (15 mg, 2,4 x 10<sup>-5</sup>, 0,2 ekv.) ble satt til og reaksjonen ble fortsatt i ytterligere 18 timer. Reaksjonsblandingen ble fortynnet med H<sub>2</sub>O (10 ml), ekstrahert med 10 %MeOH/DCM (4 x 25 ml) og de kombinerte ekstraktene ble vasket med mettet vandig natriumbikarbonatløsning (2 x 100 ml), vann (100 ml), saltløsning (100 ml) og tørket (MgSO<sub>4</sub>). Løsemiddelet ble fjernet ved rotasjonsfordamping under redusert trykk for å gi det ubearbeidede produktet. Rensing ved

flashkolonnekromatografi [gradienteluering 100 % diklormetan til 94 % diklormetan/6 % metanol i 1 % økninger] ga produktet **85** som et hvitt, fast stoff (77 mg, 53 %). Analytiske data: RT 2,98 min; MS (ES<sup>+</sup>) *m/z* (relativ intensitet) 1210 ([*M* + H]<sup>+</sup>, 100), MS (ES<sup>-</sup>) *m/z* (relativ intensitet) 1208 ([*M* - H])<sup>-</sup>, 100).

**(11*S*,11*aS*)-allyl 8-((5-(((11*S*,11*aS*)-10-(((4-((*S*)-2-((*S*)-2-amino-3-metylbutanamido)-5-ureidopentanamido)benzyl)oksy)karbonyl)-11-hydroksy-7-metoksy-2-metylen-5-okso-2,3,5,10,11,11*a*-heksahydro-1*H*-pyrrolo[2,1-*c*][1,4]benzodiazepin-8-yl)oksy)pentyl)oksy)-11-hydroksy-7-metoksy-2-metylen-5-okso-2,3,11,11*a*-tetrahydro-1*H*-pyrrolo[2,1-*c*][1,4]benzodiazepin-10(5*H*)-karboksylat (86)**

Kald trifluoreddiksyre (3 ml) ble satt til den Boc-beskyttede forbindelsen (**85**) (72 mg, 6,0 x 10<sup>-5</sup> mol) ved 0 °C. Løsningen ble omrørt ved denne temperaturen i 15 minutter. Reaksjonsblandingen ble helt over is, og pH ble justert til pH 8 med mettet NaHCO<sub>3</sub>-løsning. Løsningen ble ekstrahert med DCM (4 x 25 ml), og de kombinerte ekstraktene ble vasket med mettet saltløsning (100 ml), tørket (MgSO<sub>4</sub>) og inndampet under redusert trykk for å gi produktet som et hvitt, fast stoff (55 mg, 83 %). Analytiske data: RT 2,53 min; MS (ES<sup>+</sup>) *m/z* (relativ intensitet) 1110 ([*M* + H]<sup>+</sup>, 100), MS (ES<sup>-</sup>) *m/z* (relativ intensitet) 1108 ([*M* - H])<sup>-</sup>, 100).

**(11*S*,11*aS*)-4-((*S*)-2-((*S*)-2-amino-3-metylbutanamido)-5-ureidopentanamido)benzyl 11-hydroksy-7-metoksy-8-((5-(((*S*)-7-metoksy-2-metylen-5-okso-2,3,5,11*a*-tetrahydro-1*H*-pyrrolo[2,1-*c*][1,4]benzodiazepin-8-yl)oksy)pentyl)oksy)-2-metylen-5-okso-2,3,11,11*a*-tetrahydro-1*H*-pyrrolo[2,1-*c*][1,4]benzodiazepin-10(5*H*)-karboksylat (86)**

Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (2,7 mg, 2,3 μmol, 0,03 ekv.) ble satt til en løsning av alloc-forbindelsen (**85**) (80 mg, 72 μmol, 1,0 ekv.) og pyrrolidin (30 μl, 26 mg, 0,36 mmol, 5 ekv.) i tørt DCM (3 ml) under en nitrogenatmosfære. Løsningen ble rørt om ved romtemperatur i 2 timer. Løsemiddelet ble avdampet under redusert trykk. Rensing ved flashkolonnekromatografi [gradienteluering 90 % kloroform/10 % metanol til 76 % kloroform/24 % metanol] ga produktet som et

hvitt pulver (62,5 g, 86 %). Analytiske data: RT 2,45 min MS (ES<sup>+</sup>) *m/z* (relativ intensitet) 1008 ([M + H]<sup>+</sup>, 80).

**(11S,11aS)-4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-diokso-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)heksanamido)-3-metylbutanamido)-5-ureidopentanamido)benzyl 11-hydroksy-7-metoksy-8-((5-((S)-7-metoksy-2-metylen-5-okso-2,3,5,11a-tetrahydro-1H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-8-yl)oksy)pentyl)oksy)-2-metylen-5-okso-2,3,11,11a-tetrahydro-1H-pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-10(5H)-karboksylat (87)**

*N,N*-diisopropyldietylamin (12 µL, 7,1 x 10<sup>-5</sup> mol, 5,0 ekv.) ble satt til en løsning av amindipeptid **(86)** (14,2 mg, 1,4 x 10<sup>-5</sup> mol, 1 ekv.) og 6-maleimidheksansyre-NHS-ester (4,8 mg, 1,55 x 10<sup>-5</sup> mol, 1,1 ekv.) i tørt DCM/DMA (2 ml/0,2 ml) under en argonatmosfære. Løsningen ble omrørt ved romtemperatur i 72 timer. Reaksjonsblandingen ble avdampet under redusert trykk og resten renses ved flashkolonnekromatografi [gradienteluering kloroform til 93 % kloroform/7 % metanol i 1 % økninger] for å gi produktet som et offwhite skum (5 mg, 29 %). Analytiske data: RT 2,83 min MS (ES<sup>+</sup>) *m/z* (relativ intensitet) 1201 ([M + H]<sup>+</sup>, 100).

#### **Reduksjon/oksidasjon av TioMabs for konjugering**

Cysteinkonstruerte monoklonale antistoffer i full lengde (TioMabs) uttrykt i CHO-celler, ble redusert med ca. en 20-40-dobbel overskytende mengde TCEP (tris(2-karboksyetyl)fosfinhydroklorid eller DTT (ditiotreitol) i 50 mM Tris pH 7,5 med 2 mM EDTA i 3 timer ved 37 °C eller natten over ved romtemperatur. (Getz et al (1999) Anal. Biochem. bd. 273:73-80, Soltec Ventures, Beverly, MA). Det reduserte tioMab ble fortynnet og lastet på HiTrap S-kolonne i 10 mM natriumacetat, pH 5, og eluert med PBS inneholdende 0,3 M natriumklorid. Alternativt ble antistoffet surgjort ved å sette til 1/20 volum på 10 % eddiksyre, fortynnet med 10 mM suksinat pH 5, lastet på kolonnen og deretter vasket med 10 kolonnevolum med suksinatbuffer. Kolonnen ble eluert med 50 mM Tris pH7,5, 2 mM

#### **EDTA.**

5 Det eluerte, reduserte TioMab ble behandlet med 200 nM vandig koppersulfat (CuSO<sub>4</sub>) eller 15-dobbel molart overskytende mengde DHAA (dehydroaskorbinsyre). Oksidasjon av interkjededisulfidbindingene ble fullført på ca. tre timer eller mer. Oksidering i omgivelsesluft var også effektivt. Det reoksiderte antistoffet ble dialysert i 20 mM natriumsuksinat pH 5, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA og oppbevart frosset ved -20 °C.

### Konjugering av TioMabs med legemiddel-linkerforbindelser for å fremstille antistoff-legemiddelkonjugater

10

De reoksiderte TioMabs som beskrevet over, ble kombinert med en 2,5 til 10-dobbel overskytende mengde legemiddel-linkermellomprodukt (**15ba**, **15bb**, **15d**, **58**) blandet, og fikk stå i ca. en time ved romtemperatur for å iverksette konjugering og dannet TioMab-antistoff-legemiddelkonjugatene **101-115** i tabell 1. Konjugeringsblandingen ble rensset ved gelfiltrering, kationebyttekromatografi eller dialyse for å fjerne overskytende legemiddel-linkermellomprodukt og andre urenheter.

15

Tabell 1

ADC	ADC (Ab-legemiddel/linker)	Legemiddel-linkerforbindelse	DAR (legemiddel/antistoff-forhold)	Figurer
<b>101</b>	Tr-MP-PEG8-Fe-Lys-PAB-PBD	<b>15bb</b>	1,3	2, 3, 4
<b>102</b>	antiCD22-MP-PEG8-Fe-Lys-PAB-PBD	<b>15bb</b>	1,2	2, 3
<b>103</b>	Tr-MP-PEG4-Fe-Lys-PAB-PBD	<b>15ba</b>	1,37	2, 3, 4
<b>104</b>	antiCD22-MP-PEG4-Fe-Lys-PAB-PBD	<b>15ba</b>	1,2	2, 3
<b>105</b>	trastuzumab-MP-PEG8-Fe-Lys-PAB-PBD	<b>15bb</b>	1	6
<b>106</b>	trastuzumab-MP-PEG4-Fe-Lys-PAB-PBD	<b>15ba</b>	1,1	6

ADC	ADC (Ab- legemiddel/linker)	Legemiddel- linkerforbindelse	DAR (legemiddel/antistoff- forhold)	Figurer
<b>107</b>	antiSteap1-MP-PEG8- Fe-Lys-PAB-PBD	<b>15bb</b>	0,5	4, 6
<b>108</b>	antiSteap1-MP-PEG4- Fe-Lys-PAB-PBD	<b>15ba</b>	1,5	4, 6
<b>109</b>	antiSteap1-MP-PEG8- Val-Ala-PAB-(imp)PBD	<b>58</b>	1,75	5
<b>110</b>	antiCD22-MP-PEG8- Val-Ala-PAB-(imp)PBD	<b>58</b>	1,8	5
<b>111</b>	antiSteap1-MP-PEG8- Val-Ala-PAB-PBD	<b>15d</b>	1,8	
<b>112</b>	gD5B60-MP-PEG8-Val- Ala-PAB-PBD	<b>15d</b>	1,85	
<b>113</b>	gD5B60-MP-PEG8-Val- Ala-PAB-(imp)PBD	<b>58</b>	1,9	
<b>114</b>	trastuzumab-MP- PEG8-Val-Ala-PAB- PBD	<b>15d</b>	1,7	
<b>115</b>	trastuzumab-MP- PEG8-Val-Ala-PAB- (imp)PBD	<b>58</b>	1,8	

Tr = tio trastuzumab, anti HER2, 4D5 HC A118C (sekvensiell nummerering), A114C (Kabat-nummerering)  
imp = N-10 iminbeskyttet: 3-(2-metoksyetoksy)propanoat-Val-Ala-PAB-

5

I særdeleshet ble legemiddel-linkermellomprodukt **15d** (MW 1496,65) solubilisert i DMA (dimetylacetamid) til en konsentrasjon på 20 mM. Reoksidert, cysteinkonstruert H118C trastuzumabantistoff (Tr) ble opptint og en 3-dobbel molar overskuddsmengde **15d** ble satt til. Reaksjonen ble utført ved pH 5 etter at eksperimenter viste økt antistoffeaggregering ved høyere pH. Omfanget av legemiddelkonjugering ble overvåket ved LC-MS-analyse. En ytterligere 1-dobbel



ekvivalent av **15d** ble satt til etter 3 timer og reaksjonen ble tillatt å fortsette natten over ved 4 °C for å gi ubearbeidet ADC **114**.

5 Antistoff-legemiddelkonjugatet trastuzumab-MP-PEG8-Val-Ala-PAB-PBD **114**, ble deretter anvendt på en kationebyttekolonne etter fortykning med suksinat, vasket med minst 10 kolonnevolumer suksinat og eluert med PBS. Antistofflegemiddel-konjugatet **114** ble formulert til 20 mM His/acetat pH 5, 240 mM sukrose ved anvendelse av gelfiltreringskolonner. Antistofflegemiddel-  
10 konjugatet **114** ble karakterisert ved UV-spektroskopi for å bestemme proteinkonsentrasjon, analytisk SEK (størrelseseksklusjonskromatografi) for aggregeringsanalyse og LC-MS før og etter reduksjon for å bestemme legemiddellast.

15 Størrelseseksklusjonskromatografi ble utført ved anvendelse av en Shodex KW802,5-kolonne i 0,2 M kaliumfosfat pH 6,2 med 0,25 mM kaliumklorid og 15 % IPA ved en stømningshastighet på 0,75 ml/min. Konjugatets aggregeringstilstand ble bestemt ved integrering av eluert toppområdeabsorbans ved 280 nm. SEK-analyse viste 4,1 % ved integrert område av aggregert ADC ved 8,08 min og 95,9 % monomer ADC **114** ved 8,99 min.

20 LC-MS-analyse ble utført ved anvendelse av et Agilent QTOF 6520 ESI-instrument. Som et eksempel ble **114** trastuzumab-MP-PEG8-Val-Ala-PAB-(imp)PBD redusert med DTT (ditiotreitol) og lastet på en 1000 Å, 8µm PLRP-S-kolonne (Varian) oppvarmet til 80 °C og eluert med en gradient av 30 % B til 40  
25 % B i 5 minutter. Mobilfase A var H<sub>2</sub>O med 0,05 % TFA, mobilfase B var acetonitril med 0,04 % TFA. Strømningshastigheten var 0,5 ml/min. Proteineluering ble overvåket ved UV-absorbanspåvisning ved A 280nm før elektrosprayionisering og TOF-analyse. Kromatografisk oppløsning ved baseline  
30 av naken lettkjede, resterende naken tungkjede og dosert tungkjede ble oppnådd. De oppnådde m/z-spektrene ble dekonvoluert ved anvendelse av Agilent Mass Hunter(TM)-programvare for å beregne massen av de reduserte antistofffragmentene.

35 Molekylvekt (MW) for MP-PEG8-Val-Ala-PAB-(imp)PBD **58** (figur 1) = 1964 dalton observerte dekonvolerte masser:

23440 dalton tilsvarer MW av naken LC

50627 dalton tilsvarer MW av naken HC

52591 dalton tilsvarer MW av dosert HC

5 Den observerte toppen på 52591 dalton tilsvarer således det forventede tungkjedefragmentet (HC) (50627 dalton) med én legemiddelenhet, legemiddellinkermellomprodukt 58 (1964 dalton).

10 Når antistoffet for konjugering til et PBD-legemiddellinkermellomprodukt ikke er et cystein-konstruert antistoff, reduseres interkjededisulfidbindingene delvis ved tilsetning av ca. et 2,2 moloverskudd TCEP i fosfat pH 7,5 i 2 timer ved 37° C. Hver TCEP-ekvivalent resulterer teoretisk i 2 reaktive cysteiner. Typisk for et mållegemiddel/antistoff-forhold (DAR) på ca. 3,5 tilsettes et 1,8–2 moloverskudd av TCEP. Ingen rensingstrinn er typisk nødvendig etter reduksjonen. Det tilsettes et lett overskudd (1,2–1,5 X) av legemiddellinkermellomprodukt over reaktive  
15 cysteiner, ca. 8 molekvivalenter av legemiddellinkermellomprodukt over antistoff, og reaksjonen utføres i ca. 1 time ved romtemperatur. Rensing kan utføres ved diafiltrering, ionebytte eller gelfiltrering. DAR kan bestemmes ved hydrofobinteraksjonskromatografi (HIC) eller LC-MS av det reduserte konjugatet, ved hjelp av UV A280-områdeintegrasjon.

## 20 **In vitro-celleproliferasjonsassay**

Effekten av ADC ble målt ved et celleproliferasjonsassay som anvender følgende protokoll (CellTiter Glo Luminescent Cell Viability Assay, Promega Corp. Technical  
25 Bulletin TB288, Mendoza et al (2002) Cancer Res. 62:5485-5488):

1. En alikvot på 100 µl cellekultur inneholdende ca.  $10^4$  celler (f.eks. KPL-4, en human brystcancercellelinje, Kurebayashi et al (1999) Brit. Jour. Cancer 79(5-6):707–717), SKBR-3, BT474, MCF7 eller MDA-MB-468) i medium ble avsatt i hver brønn på en 96-brønners, gjennomsiktig plate.
- 30 2. Det ble fremstilt kontrollbrønner inneholdende medium og uten celler.
3. ADC ble tilsatt til forsøksbrønnene og inkubert i 3–5 dager.
4. Platene ble ekvilibrert til romtemperatur i ca. 30 minutter.
5. Det ble tilsatt et volum av CellTiter-Glo-reagens likt volumet av cellekulturmedium til stede i hver brønn.
- 35 6. Innholdet ble blandet i 2 minutter på en orbitalrister for å indusere cellyse.

7. Platen ble inkubert ved romtemperatur i 10 minutter for å stabilisere luminescenssignalet.

8. Luminescens ble registrert og rapportert i grafer som RLU = relative luminescensenheter.

5

Visse celler utsås ved 1000–2000/brønn eller 2000–3000/brønn i en 96-brønners plate, 50 µl/brønn. Etter én eller to dager tilsettes ADC i 50 µl volum til sluttkonsentrasjon på 9000, 3000, 1000, 333, 111, 37, 12,4, 4,1 eller 1,4 ng/ml, med "ingen ADC"-kontrollbrønner som tar imot bare medium. Betingelsene er i duplikat eller triplikat. Etter 3–5 dager tilsettes 100 µl/brønn Cell TiterGlo II (luciferasebasert assay, proliferasjon målt ved ATP-nivåer), og celleantall bestemmes ved hjelp av et luminometer. Data plottes som gjennomsnittet av luminescens for hvert sett av replikasjoner, med standardavviksfeilsøyler. Protokollen er en modifikasjon av CellTiter Glo Luminescent Cell Viability Assay (Promega):

10

15

1. Plasser 1000 celler/brønn i 50 µl/brønn av FBS/glutaminmedium. La cellene binde over natten.

20

2. ADC fortynnes serielt 1:3 i medium som starter ved arbeidskonsentrasjon 18 µg/ml (dette resulterer i en sluttkonsentrasjon på 9 µg/ml). 50 µl fortynnet ADC tilsettes til 50 µl celler og medium som allerede er i brønnen.

3. Inkuber 72–96 h (standard er 72 timer, men følg med 0 µg/ml konsentrasjon for å stoppe assayet når cellene er 85–95 % konfluente).

25

4. Tilsett 100 µl/brønn av Promega Cell Titer Glo-reagens, rist i 3 minutter og les av på luminometer

### **Resultater**

30

Figur 2 viser en graf for SK-BR-3-cellelevedyktighet in vitro etter 5 dager sammenlignet med konsentrasjoner av: Tr-MP-PEG8-Phe-Lys-PAB-PBD **101** (●), antiCD22-MP-PEG8-Phe-Lys-PAB-PBD **102** (▲), Tr-MP-PEG4-Phe-Lys-PAB-PBD **103** (◆) og antiCD22-MP-PEG4-Phe-Lys-PAB-PBD **104** hvor Tr er anti-HER2-tiotrastuzumab-4D5-HC-A118C, idet tungkjedens cysteinkonstruerte antistoffmutanter er nummerert etter det sekvensielle nummereringskjemaet.

35

Proliferasjon av HER2-uttrykkende SK-BR-3-celler inhiberes selektivt av antiHER2-antistoff-legemiddel-konjugatene **101** og **103**, men ikke av antiCD22-antistoff-legemiddel-konjugatene **102** og **104**. Disse resultatene bekrefter den målavhengige, selektive drapeseffekten *in vitro* av PBD-antistoff-legemiddel-konjugater.

Figur 3 viser en graf for KLP-4-cellelevedyktighet *in vitro* etter 5 dager sammenlignet med konsentrasjoner av: Tr-MP-PEG8-Phe-Lys-PAB-PBD **101** (●), antiCD22-MP-PEG8-Phe-Lys-PAB-PBD **102** (▲), Tr-MP-PEG4-Phe-Lys-PAB-PBD **103** (◆) og antiCD22-MP-PEG4-Phe-Lys-PAB-PBD **104** (▼), hvor Tr er anti-HER2-tiotrastuzumab-4D5-HC-A118C, idet tungkjedens cysteinkonstruerte antistoffmutanter er nummerert etter det sekvensielle nummereringskjemaet.

Antistoff-legemiddel-konjugater, trastuzumab-MP-PEG8-Val-Ala-PAB-PBD **114** og trastuzumab-MP-PEG8-Val-Ala-PAB-(imp)PBD **115** ble testet mot SK-BR-3, KPL-4 og MCF-7 (Levenson et al (1997) Cancer Res. 57(15):3071-3078) celler til måling av cellelevedyktighet *in vitro* i femdagersstudier. IC<sub>50</sub>-verdien (µg/ml) for **114** mot SK-BR-3 var 17,2 og mot KPL-4 68,1. IC<sub>50</sub>-verdien for **115** mot SK-BR-3 var 12,3 og mot KPL-4 50,7. Både **114** og **115** var effektivt inaktive mot MCF-7, som er en HER2 ikke-uttrykkende human brystadenokarsinomcellelinje. Konjugatene **114** og **115** viser således målrettet celledrapspotens.

### **In vivo-effekt for tumorvekstinhibering hos transgene mus med høy HER2-ekspressjon ved eksplantasjon**

Dyr egnet til transgene forsøk kan skaffes 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 ble anvendt til parring, og steriliserte CD.1-hanner ble anvendt for å stimulere pseudograviditet. Steriliserte mus kan skaffes fra en hvilken som helst kommersiell leverandør. Grunnleggerne var brede med enten FVB-mus eller med heterozygotiske 129/BL6 x FVB p53-mus. Musen med heterozygositet ved p53-allel ble anvendt til potensielt å øke tumordannelse. Dette har imidlertid vist seg å være unødvendig. Noen F1-tumorer er derfor av blandet stamme. Grunnleggertumorer er bare FVB. Seks grunnleggere ble oppnådd, hvor noen utviklet tumorer uten å få kull.

Dyr som har tumorer (allograft propagert fra Fo5 mmtv-transgene mus), ble behandlet med en enkelt eller multippel dose av ADV ved IV-injeksjon. Tumorvolum ble vurdert på forskjellige tidspunkter etter injeksjon.

5

Tumorer oppstår uten videre hos transgene mus som uttrykker en mutasjonsmessig aktivert form for neu, rottehomologen av HER2, men HER2-et som er overuttrykt ved humane brystcancere, muteres ikke, og tumordannelsen er mye mindre robust hos transgene mus som overuttrykker ikke-mutert HER2 (Webster et al (1994) Semin. Cancer Biol. 5:69-76).

10

For å forbedre tumordannelse med ikke-mutert HER2 ble transgene mus produsert ved hjelp av et HER2 cDNA-plasmid hvori et oppstrøms ATG ble slettet for å forebygge translasjonsstart ved slike oppstrøms ATG-kodoner, som ellers ville redusert frekvensen av translasjonsstart fra det nedstrøms autentiske startkodonet av HER2 (se for eksempel Child et al (1999) J. Biol. Chem. 274: 24335-24341). I tillegg ble et kimært intron tilsatt til 5'-enden, hvilket også bør forbedre ekspresjonsnivået som rapportert tidligere (Neuberger and Williams (1988) Nucleic Acids Res. 16:6713, Buchman and Berg (1988) Mol. Cell. Biol. 8:4395, Brinster et al (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:836). Det kimære intronet ble avledet fra en Promega-vektor, pattedyr-ekspresjonsvektoren Pci-neo (bp 890-1022). cDNA 3'-enden er flankert av de humane veksthormoneksonene 4 og 5, og polyadenyleringssekvenser. Det ble videre anvendt FVB-mus, siden denne stammen er mer mottagelig for tumorutvikling. Promoteren fra MMTV-LTR ble anvendt til å sikre vevsspesifikk HER2-ekspresjon i melkekjertelen. Dyr fikk et AIN 76A-kosthold for å øke mottageligheten for tumordannelse (Rao et al (1997) Breast Cancer Res. and Treatment 45:149-158).

15

20

25

### **Fo5-modell for murin brysttumor**

30

Fo5-modellen er en modell med transgene mus hvori det humane HER2-genet, under transkripsjonal regulering av den murine brysttumorviruspromoteren (MMTV-HER2), er overuttrykt i brystepitel. Overekspresjonen forårsaker spontan utvikling av brysttumorer som overuttrykker den humane HER2-reseptoren. Brysttumoren til ett av grunnleggerdyrene (grunnlegger nr. 5 [Fo5]) er spedt i etterfølgende generasjoner av FVB-mus ved seriell transplantasjon av tumorfragmenter. Før den transgene MMTV-HER2 Fo5-brysttumoren ble anvendt

35

i en in vivo-effektstudie, ble den kirurgisk transplantert inn i nr. 2/3-fettputen i melkekjertelen hos nu/nu-mus (fra Charles River Laboratories) i fragmenter som målt ca. 2 x 2 mm. Når tumorer nådde ønsket volum, ble de tumorbærende musene randomisert og fikk en enkeltdose av ADC-et ved IV-injeksjon.

## 5 **Resultater**

Figur 4 viser en graf for den gjennomsnittlige tumorvolumendringen in vivo over tid i brystcancermodellen for MMTV-HER2 Fo5-brystallografttumorer innpodet i CRL nu/nu-mus etter enkelt IV-dosering på dag 0 med: (1) vehikkel 20 mM histidinacetat, pH 5,5, 240 mM sukrose, (2) antiSteap1-MP-PEG8-Phe-Lys-PAB-PBD **107** på/ved 10 /mg/kg, (3) antiSteap1-MP-PEG4-Phe-Lys-PAB-PBD **108** ved 10 mg/kg, (4) Tr-MP-PEG8-Phe-Lys-PAB-PBD **101** ved 10 mg/kg, og (5) Tr-MP-PEG4-Phe-Lys-PAB-PBD **103** ved 10 mg/kg. Linjene på figuren er angitt med følgende symboler:

—✕—

Vehikkel

—•—

20 **107**

—◐—

**108**

—○—

**101**

25 —◻—

**103**

Anti-HER2-konjugatene **101** og **103** viste målspesifikk tumorvekstinhibering. Av de 10 dyrene behandlet med konjugat **101** viste to partiell respons. Av de 10 dyrene behandlet med konjugat **103** viste tre partiell respons. Ikke-målrettet kontroll-ADC **107** og **108** hadde ingen effekt på tumorvekst.

I en annen eksempelstudie ble gjennomsnittlig tumorvolumendring in vivo over tid i brystcancermodellen for MMTV-HER2 Fo5-brystallograftumorer innpodet i CRL nu/nu-mus målt etter enkelt IV-dosering på dag 0 med: (1) vehikkel 20 mM histidinacetat, pH 5,5, 240 mM sukrose, (2) **112** gD5B60-MP-PEG8-Val-Ala-PAB-PBD ved 5 mg/kg (ADC-dose), 300 µg/m<sup>2</sup> (PBD-legemiddeleksponering), (3) **112** gD5B60-MP-PEG8-Val-Ala-PAB-PBD ved 10 mg/kg, 600 µg/m<sup>2</sup>, (4) **114** trastuzumab-MP-PEG8-Val-Ala-PAB-PBD ved 5 mg/kg, 284 µg/m<sup>2</sup>, (5) **114** trastuzumab-MP-PEG8-Val-Ala-PAB-PBD ved 10 mg/kg, 569 µg/m<sup>2</sup>, (6) **113** gD5B60-MP-PEG8-Val-Ala-PAB-(imp)PBD ved 10 mg/kg, 807 µg/m<sup>2</sup> og (7) **115** trastuzumab-MP-PEG8-Val-Ala-PAB-(imp)PBD ved 10 mg/kg, 790 µg/m<sup>2</sup>. Tumorstørrelse ble målt etter 0, 3, 7 og 10 dager. Etter 10 dager, dyr dosert med: (1) Vehikkel viste økning av tumorstørrelse og ingen tumorinhibering i gruppen med 10 dyr, (2) **112** viste ingen partielle eller komplette responser i gruppen med 10 dyr, (3) **112** viste ingen partielle eller komplette responser i gruppen med 10 dyr, (4) **114** viste ni partielle responser i gruppen med 10 dyr, (5) **114** viste ti partielle responser i gruppen med 10 dyr, (6) **113** viste ingen partielle eller komplette responser i gruppen med 10 dyr og (7) **115** viste ti partielle responser i gruppen med 10 dyr. De antiHER2-målrettede ADC-ene **114** og **115** viste således målrettet tumorinhibering, mens den negative kontrollvehikkelen og de ikke-målrettede ADC-ene **112** og **113** ikke gjorde det.

### **LuCap35V-modell for human prostatatumor**

LuCap35V, skaffet fra University of Washington (Seattle, WA), er en androgenuavhengig variant of den humane LuCap35-prostataeksplantasjonstumormodellen (Corey E, Quinn JE, Buhler KR, et al. LuCap35: en ny modell for prostatacancerprogresjon til androgen avhengighet. The Prostate 2003;55:239–46). Vevet anvendt til å etablere LuCap35 ble isolert fra biopsien av inguinale lymfeknuter inneholdende metastatisk prostatacancer og senere implantert i flanken på musen (Corey et al. 2003). LuCap35V-eksplantasjonsmodellen ble opprettholdt av serielle implantasjoner hos kastrerte C.B-17 Fox Chase SCID-hannmus for 38 passasjer ved University of Washington og senere hos kastrerte C.B-17 SCID-beige-hannmus fra Charles River Laboratories for fortsatte passasjer ved Genentech. Før LuCap35V-tumordelene (ca. 20–30 mm<sup>3</sup>) ble anvendt til en in vivo-effektstudie, ble de implantert subkutant inn i høyre flanke på den kastrerte C.B-17 SCID-beige hannmusen. Dyr ble kastret 2 uker før tumorimplantasjon for å gi resttestosteronnivået tid til

å nå null. Når tumorer nådde ønsket volum, ble de tumorbærende musene randomisert og fikk en enkeltdose av ADC-et ved IV-injeksjon.

### **Resultater**

5

eFigur 5 viser en graf for den gjennomsnittlige tumorvolumendringen in vivo over tid i prostatacancermodellen for LuCap35V-xenografttumorer hos kastrerte SCID beige-hannmus etter enkelt IV-dosering på dag 0 med (1) vehikkel 20 mM histidinacetat, pH 5,5, 240 mM sukrose ( $\blacktriangle$ ), (2) antiCD22-MP-PEG8-Val-Ala-PAB-(imp)PBD **110** ved 5 mg/kg ( $\bullet$ ) og (3) antiSteap1-MP-PEG8-Val-Ala-PAB-(imp)PBD **109** ved 5 mg/kg ( $\blacksquare$ ).

10

Figur 6 viser en graf for den gjennomsnittlige tumorvolumendringen in vivo over tid i prostatacancermodellen for LuCap35V-xenografttumorer hos kastrerte SCID beige-hannmus etter enkelt IV-dosering på dag 0 med (1) vehikkel 20 mM histidinacetat, pH 5,5, 240 mM sukrose (A) (2) **107** antiSteap1-MP-PEG8-Phe-Lys-PAB-PBD, 9,8 mg/kg, 60  $\mu\text{g}/\text{m}^2$  ( $\blacksquare$ ), (3) **107** antiSteap1-MP-PEG8-Phe-Lys-PAB-PBD, 19,5 mg/kg, 120  $\mu\text{g}/\text{m}^2$  ( $\bullet$ ), (4) **108** antiSteap1-MP-PEG4-Phe-Lys-PAB-PBD, 3,3 mg/kg, 60  $\mu\text{g}/\text{m}^2$  ( $\square$ ), (5) **108** antiSteap1-MP-PEG4-Phe-Lys-PAB-PBD, 6,5 mg/kg, 120  $\mu\text{g}/\text{m}^2$  ( $\circ$ ), (6) **105** trastuzumab-MP-PEG8-Phe-Lys-PAB-PBD 9,4 mg/kg, 120  $\mu\text{g}/\text{m}^2$  ( $\blacklozenge$ ) og (7) **106** trastuzumab-MP-PEG4-Phe-Lys-PAB-PBD, 8,6 mg/kg (ADC-dose), 120  $\mu\text{g}/\text{m}^2$  (PBD-legemiddeleksponering) (X).

15

20

25

I en annen eksempelstudie ble gjennomsnittlig tumorvolumendring in vivo over tid i prostatacancermodellen for LuCap35V-xenografttumorer hos kastrerte SCID beige-hannmus målt etter enkelt IV-dosering på dag 0 med (1) vehikkel 20 mM histidinacetat, pH 5,5, 240 mM sukrose (2) **112** gD5B60-MP-PEG8-Val-Ala-PAB-PBD, 3 mg/kg (ADC-dose), 68,3  $\mu\text{g}/\text{m}^2$  (PBD-legemiddeleksponering), (3) **111** antiSteap1-MP-PEG8-Val-Ala-PAB-PBD, 1 mg/kg, 22,15  $\mu\text{g}/\text{m}^2$ , (4) **111** antiSteap1-MP-PEG8-Val-Ala-PAB-PBD, 3 mg/kg, 66,4  $\mu\text{g}/\text{m}^2$ , (5) **113** gD5B60-MP-PEG8-Val-Ala-PAB-(imp)PBD, 3 mg/kg, 70,1  $\mu\text{g}/\text{m}^2$  og (6) **109** antiSteap1-MP-PEG8-Val-Ala-PAB-(imp)PBD 3 mg/kg, 64,6  $\mu\text{g}/\text{m}^2$ . Tumorstørrelse ble målt hver 4. dag. Etter 27 dager, dyr dosert med: (1) Vehikkel viste økning av tumorstørrelse og ingen tumorinhibering i gruppen med 8 dyr, (2) **112** viste én partiell respons i gruppen med 8 dyr, (3) **111** viste fire partielle responser og fire komplette responser i gruppen med 6 dyr, (4) **111** viste fem partielle responser og tre komplette responser i gruppen med 5 dyr, (5) **113** viste ingen

35



partielle eller komplette responser i gruppen med 8 dyr og (6) **109** viste sju partielle responser og én komplett respons i gruppen med 7 dyr. Det antiSteap1-målrrettede ADC **109** og **111** viste målrrettet tumorinhibering, mens den negative kontrollvehikkelen og det ikke-målrrettede ADC **112** og **113** ikke gjorde det.

## 5 Forkortelser

Ac	acetyl
Acm	acetamidometyl
Alloc	allyloksykarbonyl
Boc	di- <i>tert</i> -butyldikarbonat
t-Bu	<i>tert</i> -butyl
Bzl	benzyl, hvor Bzl-OMe er metoksybenzyl og Bzl-Me er metylbenzene
Cbz eller Z	benzyloksy-karbonyl, hvor Z-Cl og Z-Br er hhv. klor- og brombenzyloksykarbonyl
DMF	<i>N,N</i> -dimetylformamid
Dnp	dinitrofenyl
DTT	ditiotreitol
Fmoc	9H-fluoren-9-ylmetoksykarbonyl
imp	<i>N</i> -10 imin beskyttelsesgruppe: 3-(2-metoksyetoksy)propanoat-Val-Ala-PAB
MC-OSu	maleimidokaproyl-O-N-suksinimid
Moc	metoksykarbonyl
MP	maleimidopropanamid
Mtr	4-metoksy-2,3,6-trimet-tylbenzensulfonyl
PAB	para-aminobenzyloksykarbonyl
PEG	etylenoksy
PNZ	p-nitrobenzylkarbamat
Psec	2-(fenylsulfonyl)etoksykarbonyl

TBDMS	tert-butyldimetylsilyl
TBDPS	tert-butyldifenylsilyl
Teoc	2-(trimetylsilyl)etoksykarbonyl
Tos	tosyl
Troc	2,2,2-trikloretoksykarbonylklorid
Trt	trityl
Xan	xantyl

### Referanser

5

EP 0522868

EP 0875569

EP 1295944

EP 1347046

10

EP 1394274

EP 1394274

EP 1439393

JP 05003790

JP 2004113151

15

JP 58180487

US 2001/055751

US 2002/034749

US 2002/042366

US 2002/150573

20

US 2002/193567

US 2003/0228319

US 2003/060612

US 2003/064397  
US 2003/065143  
US 2003/091580  
US 2003/096961  
5 US 2003/105292  
US 2003/109676  
US 2003/118592  
US 2003/119121  
US 2003/119122  
10 US 2003/119125  
US 2003/119126  
US 2003/119128  
US 2003/119129  
US 2003/119130  
15 US 2003/119131  
US 2003/124140  
US 2003/124579  
US 2003/129192  
US 2003/134790-A1  
20 US 2003/143557  
US 2003/157089  
US 2003/165504  
US 2003/185830  
US 2003/186372  
25 US 2003/186373  
US 2003/194704  
US 2003/206918  
US 2003/219806  
US 2003/224411

US 2003/224454  
US 2003/232056  
US 2003/232350  
US 20030096743  
5 US 20030130189  
US 2003096743  
US 2003130189  
US 2004/0001827  
US 2004/005320  
10 US 2004/005538  
US 2004/005563  
US 2004/005598  
US 2004/0101899  
US 2004/018553  
15 US 2004/022727  
US 2004/044179  
US 2004/044180  
US 2004/101874  
US 2004/197325  
20 US 2004/249130  
US 20040018194  
US 20040052793  
US 20040052793  
US 20040121940  
25 US 2005/271615  
US 2006/116422  
US 4816567  
US 5362852  
US 5440021

US 5583024  
US 5621002  
US 5644033  
US 5674713  
5 US 5700670  
US 5773223  
US 5792616  
US 5854399  
US 5869445  
10 US 5976551  
US 6011146  
US 6153408  
US 6214345  
US 6218519  
15 US 6268488  
US 6518404  
US 6534482  
US 6555339  
US 6602677  
20 US 6677435  
US 6759509  
US 6835807  
US 7223837  
US 7375078  
25 US 7521541  
US 7723485  
WO 00/012508  
WO 00/12507  
WO 00/12508

WO 01/16318  
WO 01/45746  
WO 02/088172  
WO 03/026577  
5 WO 03/043583  
WO 04/032828  
WO 2000/12130  
WO 2000/14228  
WO 2000/20579  
10 WO 2000/22129  
WO 2000/32752  
WO 2000/36107  
WO 2000/40614  
WO 2000/44899  
15 WO 2000/55351  
WO 2000/75655  
WO 200053216  
WO 2001/00244  
WO 2001/38490  
20 WO 2001/40269  
WO 2001/40309  
WO 2001/41787  
WO 2001/46232  
WO 2001/46261  
25 WO 2001/48204  
WO 2001/53463  
WO 2001/57188  
WO 2001/62794  
WO 2001/66689

WO 2001/72830  
WO 2001/72962  
WO 2001/75177  
WO 2001/77172  
5 WO 2001/88133  
WO 2001/90304  
WO 2001/94641  
WO 2001/98351  
WO 2002/02587  
10 WO 2002/02624  
WO 2002/06317  
WO 2002/06339  
WO 2002/101075  
WO 2002/10187  
15 WO 2002/102235  
WO 2002/10382  
WO 2002/12341  
WO 2002/13847  
WO 2002/14503  
20 WO 2002/16413  
WO 2002/16429  
WO 2002/22153  
WO 2002/22636  
WO 2002/22660  
25 WO 2002/22808  
WO 2002/24909  
WO 2002/26822  
WO 2002/30268  
WO 2002/38766

WO 2002/54940  
WO 2002/59377  
WO 2002/60317  
WO 2002/61087;  
5 WO 2002/64798  
WO 2002/71928  
WO 2002/72596  
WO 2002/78524  
WO 2002/81646  
10 WO 2002/83866  
WO 2002/86443  
WO 2002/88170  
WO 2002/89747  
WO 2002/92836  
15 WO 2002/94852  
WO 2002/98358  
WO 2002/99074  
WO 2002/99122  
WO 2003/000842  
20 WO 2003/002717  
WO 2003/003906  
WO 2003/003984  
WO 2003/004989  
WO 2003/008537  
25 WO 2003/009814  
WO 2003/014294  
WO 2003/016475  
WO 2003/016494  
WO 2003/018621



WO 2003/022995  
WO 2003/023013  
WO 2003/024392  
WO 2003/025138  
5 WO 2003/025148  
WO 2003/025228  
WO 2003/026493  
WO 2003/029262  
WO 2003/029277  
10 WO 2003/029421  
WO 2003/034984  
WO 2003/035846  
WO 2003/042661  
WO 2003/045422  
15 WO 2003/048202  
WO 2003/054152  
WO 2003/055439  
WO 2003/055443  
WO 2003/062401  
20 WO 2003/062401  
WO 2003/072035  
WO 2003/072036  
WO 2003/077836  
WO 2003/081210  
25 WO 2003/083041  
WO 2003/083047  
WO 2003/083074  
WO 2003/087306  
WO 2003/087768

WO 2003/088808  
WO 2003/089624  
WO 2003/089904  
WO 2003/093444  
5 WO 2003/097803  
WO 2003/101283  
WO 2003/101400  
WO 2003/104270  
WO 2003/104275  
10 WO 2003/105758  
WO 2003004529  
WO 2003042661  
WO 2003104399  
WO 2004/000997  
15 WO 2004/001004  
WO 2004/009622  
WO 2004/011611  
WO 2004/015426  
WO 2004/016225  
20 WO 2004/020595  
WO 2004/022709  
WO 2004/022778  
WO 2004/027049  
WO 2004/031238  
25 WO 2004/032828  
WO 2004/032842  
WO 2004/040000  
WO 2004/043361  
WO 2004/043963

WO 2004/044178  
WO 2004/045516  
WO 2004/045520  
WO 2004/045553  
5 WO 2004/046342  
WO 2004/047749  
WO 2004/048938  
WO 2004/053079  
WO 2004/063355  
10 WO 2004/063362  
WO 2004/063709  
WO 2004/065577  
WO 2004/074320  
WO 2004000221  
15 WO 2004020583  
WO 2004042346  
WO 2004065576  
WO 2005/023814  
WO 2005/082023  
20 WO 2005/085251  
WO 2006/111759  
WO 2007/044515  
WO 2007/085930  
WO 2009/052249  
25 WO 2010/091150  
WO 91/02536  
WO 92/07574  
WO 92/17497  
WO 94/10312

- WO 94/28931
- WO 9630514
- WO 97/07198
- WO 97/44452
- 5 WO 98/13059
- WO 98/37193
- WO 98/40403
- WO 98/51805
- WO 98/51824
- 10 WO 99/28468
- WO 99/46284
- WO 99/58658
- Am. J. Hum. Genet. 49 (3):555-565 (1991)
- Amiel J., et al Hum. Mol. Genet. 5, 355-357, 1996
- 15 Amir et al (2003) Angew. Chem. Int. Ed. 42:4494-4499
- Amsberry, et al (1990) J. Org. Chem. 55:5867
- Angew Chem. Intl. Ed. Engl. (1994) 33:183-186
- Annu. Rev. Neurosci. 21:309-345 (1998)
- Arai H., et al J. Biol. Chem. 268, 3463-3470, 1993
- 20 Arai H., et al Jpn. Circ. J. 56, 1303-1307, 1992
- Arima, et al., J. Antibiotics, 25, 437-444 (1972)
- Attie T., et al, Hum. Mol. Genet. 4, 2407-2409, 1995
- Auricchio A., et al Hum. Mol. Genet. 5:351-354, 1996
- Barel M., et al Mol. Immunol. 35, 1025-1031, 1998
- 25 Barella et al (1995) Biochem. J. 309:773-779
- Barnett T., et al Genomics 3, 59-66, 1988
- Beck et al (1992) J. Mol. Biol. 228:433-441
- Beck et al (1996) J. Mol. Biol. 255:1-13
- Berge, et al., J. Pharm. Sci., 66, 1-19 (1977)

- Biochem. Biophys. Res. Commun. (2000) 275(3):783-788
- Biochem. Biophys. Res. Commun. 255 (2), 283-288 (1999)
- Blood (2002) 100 (9):3068-3076
- Blood 99 (8):2662-2669 (2002)
- 5 Blumberg H., et al Cell 104, 9-19, 2001
- Bose, et al., Tetrahedron, 48, 751-758 (1992)
- Bourgeois C., et al J. Clin. Endocrinol. Metab. 82, 3116-3123, 1997
- Brinster et al (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:836
- Buchman and Berg (1988) Mol. Cell. Biol. 8:4395
- 10 Cancer Res. 61 (15), 5857-5860 (2001)
- Carl et al (1981) J. Med. Chem. 24:479-480
- Carlsson et al (1978) Biochem. J. 173:723-737
- Carter, P. (2006) Nature Reviews Immunology 6:343-357
- Cell 109 (3):397-407 (2002)
- 15 CellTiter Glo Luminescent Cell Viability Assay, Promega Corp. Technical Bulletin TB288
- Chakravarty et al (1983) J. Med. Chem. 26:638-644
- Chan, J. and Watt, V.M., Oncogene 6 (6), 1057-1061 (1991)
- Child et al (1999) J. Biol. Chem. 274: 24335-24341
- 20 Cho H.-S., et al Nature 421, 756-760, 2003
- Ciccodicola, A., et al EMBO J. 8(7):1987-1991 (1989)
- Clackson et al (1991) Nature, 352:624-628
- Clark H.F., et al Genome Res. 13, 2265-2270, 2003
- Corey E, Quinn JE, Buhler KR, et al. LuCap35: a new model of prostate cancer progression to androgen independence. The Prostate 2003;55:239-46
- 25 Coussens L., et al Science (1985) 230(4730):1132-1139
- Cree et al (1995) AntiCancer Drugs 6:398-404
- Crouch et al (1993) J. Immunol. Meth. 160:81-88
- Davis et al (2001) Proc. Natl. Acad. Sci USA 98(17):9772-9777
- 30 de Groot et al (2001) J. Org. Chem. 66:8815-8830

- de Groot et al (2003) *Angew. Chem. Int. Ed.* 42:4490-4494
- Dennis et al. (2002) "Albumin Binding As A General Strategy For Improving The Pharmacokinetics Of Proteins" *J Biol Chem.* 277:35035-35043
- Dobner et al (1992) *Eur. J. Immunol.* 22:2795-2799
- 5 Dornan et al (2009) *Blood* 114(13):2721-2729
- Doronina et al (2006) *Bioconj. Chem.* 17:114-124
- Dubowchik et al. *Bioconjugate Chemistry*, 2002, 13,855-869
- Dubowchik, et al. (1997) *Tetrahedron Letters*, 38:5257-60
- Dumoutier L., et al *J. Immunol.* 167, 3545-3549, 2001
- 10 E. Schröder and K. Lübke, *The Peptides*, volume 1, pp 76-136 (1965) Academic Press
- Ehsani A., et al (1993) *Genomics* 15, 426-429
- Eliel, E. and Wilen, S., "Stereochemistry of Organic Compounds", John Wiley & Sons, Inc., New York, 1994
- Elshourbagy N.A., et al *J. Biol. Chem.* 268, 3873-3879, 1993
- 15 Erickson et al (2006) *Cancer Res.* 66(8):1-8
- Feild, J.A., et al (1999) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 258 (3):578-582
- Fields, G. and Noble, R. (1990) "Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluoroenylmethoxycarbonyl amino acids", *Int. J. Peptide Protein Res.* 35:161-214
- Fuchs S., et al *Mol. Med.* 7, 115-124, 2001
- 20 Fujisaku et al (1989) *J. Biol. Chem.* 264 (4):2118-2125
- Gary S.C., et al *Gene* 256, 139-147, 2000
- Gaugitsch, H.W., et al (1992) *J. Biol. Chem.* 267 (16):11267-11273
- Geiser et al "Automation of solid-phase peptide synthesis" in *Macromolecular Sequencing and Synthesis*, Alan R. Liss, Inc., 1988, pp. 199-218
- 25 *Genome Res.* 13 (10):2265-2270 (2003)
- Genomics* 62 (2):281-284 (1999)
- Geoghegan & Stroh, (1992) *Bioconjugate Chem.* 3:138-146
- Getz et al (1999) *Anal. Biochem.* Vol 273:73-80
- Glynn-Jones et al (2001) *Int J Cancer.* Oct 15; 94(2):178-84
- 30 Gregson et al., *Chem. Commun.* 1999, 797-798

- Gregson et al., *J. Med. Chem.* 2001, 44, 1161-1174
- Gu Z., et al *Oncogene* 19, 1288-1296, 2000
- Ha et al (1992) *J. Immunol.* 148(5):1526-1531
- Haendler B., et al *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 20, s1-S4, 1992
- 5 Hamann P. (2005) *Expert Opin. Ther. Patents* 15(9):1087-1103
- Hamblett et al (2004) *Clin. Cancer Res.* 10:7063-7070
- Handbook of Pharmaceutical Additives, 2nd Edition (eds. M. Ash and I. Ash), 2001 (Synapse Information Resources, Inc., Endicott, New York, USA)
- Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2nd edition, 1994
- 10 Hara, et al., *J. Antibiotics*, 41, 702-704 (1988)
- Hashimoto et al (1994) *Immunogenetics* 40(4):287-295
- Hay et al. (1999) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 9:2237
- Herdwijn, P. et al., *Canadian Journal of Chemistry.* 1982, 60, 2903-7
- Hermanson, G.T. (1996) *Bioconjugate Techniques*; Academic Press: New York, p
- 15 234-242
- Hochlowski, et al., *J. Antibiotics*, 40, 145-148 (1987)
- Hofstra R.M.W., et al *Eur. J. Hum. Genet.* 5, 180-185, 1997
- Hofstra R.M.W., et al *Nat. Genet.* 12, 445-447, 1996
- Horie et al (2000) *Genomics* 67:146-152
- 20 Hubert, R.S., et al (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96 (25):14523-14528
- Hurley and Needham-VanDevanter, *Acc. Chem. Res.*, 19, 230-237 (1986)
- Immunogenetics* 54 (2):87-95 (2002)
- Int. Rev. Cytol.* 196:177-244 (2000)
- Itoh, et al., *J. Antibiotics*, 41, 1281-1284 (1988)
- 25 *J. Biol. Chem.* 270 (37):21984-21990 (1995)
- J. Biol. Chem.* 276 (29):27371-27375 (2001)
- J. Biol. Chem.* 277 (22):19665-19672 (2002)
- J. Biol. Chem.* 278 (33):30813-30820 (2003)
- Janeway, C., Travers, P., Walport, M., Shlomchik (2001) *Immuno Biology*, 5th
- 30 Ed., Garland Publishing, New York

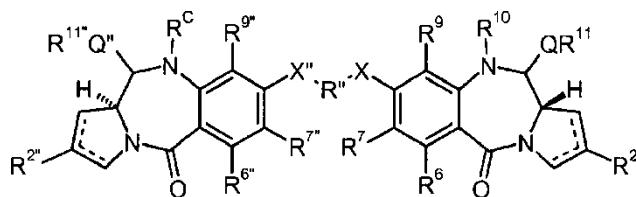
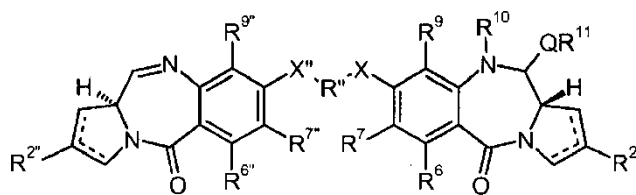
- Jeffrey et al (2005) *J. Med. Chem.* 48:1344-1358
- Jonsson et al (1989) *Immunogenetics* 29(6):411-413
- Junutula, et al., 2008b *Nature Biotech.*, 26(8):925-932
- Kang, G-D., et al., *Chem. Commun.*, 2003, 1680-1689
- 5 Kasahara et al (1989) *Immunogenetics* 30(1):66-68
- King et al (2002) *Tetrahedron Letters* 43:1987-1990
- Kingsbury et al (1984) *J. Med. Chem.* 27:1447
- Kohler et al (1975) *Nature* 256:495
- Kohn, in *Antibiotics III*. Springer-Verlag, New York, pp. 3-11 (1975).
- 10 Konishi, et al., *J. Antibiotics*, 37, 200-206 (1984)
- Kovtun et al (2006) *Cancer Res.* 66(6):3214-3121
- Kuhns J.J., et al *J. Biol. Chem.* 274, 36422-36427, 1999
- Kuminoto, et al., *J. Antibiotics*, 33, 665-667 (1980)
- Kurebayashi et al (1999) *Brit. Jour. Cancer* 79(5-6):707-717
- 15 Lab. Invest. 82 (11):1573-1582 (2002)
- Lambert J. (2005) *Current Opin. in Pharmacol.* 5:543-549
- Langley and Thurston, *J. Org. Chem.*, 52, 91-97 (1987)
- Larhammar et al (1985) *J. Biol. Chem.* 260(26):14111-14119
- Law et al (2006) *Cancer Res.* 66(4):2328-2337
- 20 Le et al (1997) *FEBS Lett.* 418(1-2):195-199
- Leber, et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 110, 2992-2993 (1988)
- Leimgruber, et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 87, 5791-5793 (1965)
- Leimgruber, et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 87, 5793-5795 (1965)
- Levenson et al (1997) *Cancer Res.* 57(15):3071-3078
- 25 Liang et al (2000) *Cancer Res.* 60:4907-12
- Manfré, F. et al., *J. Org. Chem.* 1992, 57, 2060-2065
- Marks et al (1991) *J. Mol. Biol.*, 222:581-597
- McDonagh (2006) *Protein Eng. Design & Sel.*, 19(7): 299-307
- Mendoza et al (2002) *Cancer Res.* 62:5485-5488



- Miller et al (2003) *Jour. of Immunology* 170:4854-4861
- Miura et al (1996) *Genomics* 38(3):299-304
- Miura et al (1998) *Blood* 92:2815-2822
- Moore M., et al *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84, 9194-9198, 1987
- 5 Morrison et al (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855
- Muller et al (1992) *Eur. J. Immunol.* 22 (6):162-1-1625
- Mungall A.J., et al *Nature* 425, 805-811, 2003
- Nagase T., et al (2000) *DNA Res.* 7 (2):143-150)
- Nakamuta M., et al *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 177, 34-39, 1991
- 10 Nakayama et al (2000) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 277(1):124-127
- Naruse et al (2002) *Tissue Antigens* 59:512-519
- Nature* 395 (6699):288-291 (1998)
- Neuberger and Williams (1988) *Nucleic Acids Res.* 16:6713
- Novabiochem Catalog* 2006/2007
- 15 Ogawa Y., et al *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 178, 248-255, 1991
- Okamoto Y., et al *Biol. Chem.* 272, 21589-21596, 1997
- Oncogene* 10 (5):897-905 (1995)
- Oncogene* 14(11):1377-1382 (1997))
- Parrish-Novak J., et al *J. Biol. Chem.* 277, 47517-47523, 2002
- 20 Payne, G. (2003) *Cancer Cell* 3:207-212
- Pingault V., et al (2002) *Hum. Genet.* 111, 198-206
- Pletnev S., et al (2003) *Biochemistry* 42:12617-12624
- Preud'homme et al (1992) *Clin. Exp. Immunol.* 90(1):141-146
- Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (2003) 100 (7):4126-4131
- 25 *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93 (1):136-140 (1996)
- Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98 (17):9772-9777 (2001)
- Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99 (26):16899-16903 (2002)
- Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96 (20):11531-11536 (1999)
- Protective Groups in Organic Synthesis, Greene and Wuts, 3rd Edition, 1999,
- 30 John Wiley & Sons Inc.

- Puffenberger E.G., et al *Cell* 79, 1257-1266, 1994
- Rao et al (1997) *Breast Cancer Res. and Treatment* 45:149-158
- Reiter R.E., et al *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 1735-1740, 1998
- Remington's *Pharmaceutical Sciences*, 20th edition, pub. Lippincott, Williams & Wilkins, 2000
- 5 Rodrigues et al (1995) *Chemistry Biology* 2:223
- Ross et al (2002) *Cancer Res.* 62:2546-2553
- S. P. Parker, Ed., *McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms* (1984) McGraw-Hill Book Company, New York
- 10 Sakaguchi et al (1988) *EMBO J.* 7(11):3457-3464
- Sakamoto A., Yanagisawa M., et al *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 178, 656-663, 1991
- Sanderson et al (2005) *Clin. Cancer Res.* 11:843-852
- Semba K., et al *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82, 6497-6501, 1985
- 15 Serenius et al (1987) *J. Biol. Chem.* 262:8759-8766
- Shamis et al (2004) *J. Am. Chem. Soc.* 126:1726-1731
- Sheikh F., et al (2004) *J. Immunol.* 172, 2006-2010
- Shimizu, et al, *J. Antibiotics*, 29, 2492-2503 (1982)
- Sinha S.K., et al (1993) *J. Immunol.* 150, 5311-5320
- 20 Storm et al (1972) *J. Amer. Chem. Soc.* 94:5815
- Strausberg et al (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 99:16899-16903
- Sun et al (2002) *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 12:2213-2215
- Sun et al (2003) *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 11:1761-1768
- Svensson P.J., et al *Hum. Genet.* 103, 145-148, 1998
- 25 Swiercz J.M., et al *J. Cell Biol.* 165, 869-880, 2004
- Syrigos and Epenetos (1999) *Anticancer Research* 19:605-614
- Takeuchi, et al., *J. Antibiotics*, 29, 93-96 (1976)
- Tawaragi Y., et al *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 150, 89-96, 1988
- ten Dijke, P., et al *Science* 264 (5155):101-104 (1994)
- 30 Thompson, J.S., et al *Science* 293 (5537), 2108-2111 (2001) WO 2004/058309

- Thurston, et al., *Chem. Brit.*, 26, 767-772 (1990)
- Thurston, et al., *Chem. Rev.* 1994, 433-465 (1994)
- Toki et al (2002) *J. Org. Chem.* 67:1866-1872
- Tonnelle et al (1985) *EMBO J.* 4(11):2839-2847
- 5 Touchman et al (2000) *Genome Res.* 10:165-173
- Trail et al (2003) *Cancer Immunol. Immunother.* 52:328-337
- Tsunakawa, et al., *J. Antibiotics*, 41, 1366-1373 (1988)
- Tsutsumi M., et al *Gene* 228, 43-49, 1999
- Uchida et al (1999) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 266:593-602
- 10 Verheij J.B., et al *Am. J. Med. Genet.* 108, 223-225, 2002
- Von Hoegen et al (1990) *J. Immunol.* 144(12):4870-4877
- Webster et al (1994) *Semin. Cancer Biol.* 5:69-76
- Weis J.J., et al *J. Exp. Med.* 167, 1047-1066, 1988
- Weis J.J., et al *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83, 5639-5643, 1986
- 15 Wilson et al (1991) *J. Exp. Med.* 173:137-146
- Wu et al (2005) *Nature Biotech.* 23(9):1137-1145
- Xie et al (2006) *Expert. Opin. Biol. Ther.* 6(3):281-291
- Xu, M.J., et al (2001) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 280 (3):768-775 WO 2004/016225
- 20 Xu, X.Z., et al *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98 (19):10692-10697 (2001)
- Yamaguchi, N., et al *Biol. Chem.* 269 (2), 805-808 (1994)
- Yamamoto T., et al *Nature* 319, 230-234, 1986
- Yu et al (1992) *J. Immunol.* 148(2) 633-637

**Patentkrav****1. Konjugat med formel (AB) eller (AC):****AB****AC**

5

og salter og solvater derav, hvori:

de prikkede linjene angir det eventuelle nærværet av en dobbeltbinding mellom C1 og C2 eller C2 og C3,

10  $R^2$  uavhengig er valgt fra H, OH, =O, =CH<sub>2</sub>, CN, R, OR, =CH-R<sup>D</sup>, =C(R<sup>D</sup>)<sub>2</sub>, O-SO<sub>2</sub>-R, CO<sub>2</sub>R og COR og eventuelt ytterligere valgt fra halo eller dihalo,

hvor R<sup>D</sup> uavhengig er valgt fra R, CO<sub>2</sub>R, COR, CHO, CO<sub>2</sub>H og halo,

R<sup>6</sup> og R<sup>9</sup> uavhengig er valgt fra H, R, OH, OR, SH, SR, NH<sub>2</sub>, NHR, NRR', NO<sub>2</sub>, Me<sub>3</sub>Sn og halo,

15 R<sup>7</sup> uavhengig er valgt fra H, R, OH, OR, SH, SR, NH<sub>2</sub>, NHR, NRR', NO<sub>2</sub>, Me<sub>3</sub>Sn og halo,

R<sup>10</sup> er en linker koblet til et cellebindemiddel valgt fra et antistoff, et fragment av et antistoff som inneholder minst ett bindingssted og et syklisk polypeptid,

Q er uavhengig valgt fra O, S og NH,

R<sup>11</sup> er enten H, eller R eller, hvor Q er O, SO<sub>3</sub>M, hvor M er et metallkation,

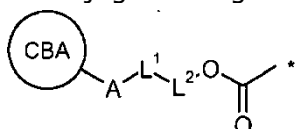
20 R og R' hver for seg er valgt fra eventuelt substituerte C<sub>1-12</sub>-alkyl-, C<sub>3-20</sub>-heterosyklisk- og C<sub>5-20</sub>-arylgrupper, og eventuelt i forbindelse med gruppen NRR' danner R og R' sammen med nitrogenatomet hvortil de er bundet, en eventuelt substituert 4-, 5-, 6- eller 7-leddet heterosyklisk ring,

$R''$  er en  $C_{3-12}$ -alkylengruppe, hvilken kjede kan være avbrutt av ett eller flere heteroatomer, f.eks. O, S, N(H), NMe og/eller aromatiske ringer, f.eks. benzen eller pyridin, hvilke ringer eventuelt er substituert med  $NH_2$ ;

hver X er O, S eller N(H); og

- 5 hvori  $R^{2''}$ ,  $R^{6''}$ ,  $R^{7''}$ ,  $R^{9''}$ ,  $X''$ ,  $Q''$  og  $R^{11''}$  er definert ifølge henholdsvis  $R^2$ ,  $R^6$ ,  $R^7$ ,  $R^9$ , X, Q og  $R^{11}$ , og  $R^C$  er en kapslende gruppe.

2. Konjugatet ifølge krav 1, hvori  $R^{10}$  er en gruppe:



15 hvor stjernen angir bindingspunktet til N10-posisjonen, CBA er cellebindemiddelet,  $L^1$  er en spaltbar linker, A er en koblingsgruppe som forbinder  $L^1$  med cellebindemiddelet,  $L^2$  er en kovalent binding eller sammen med  $-OC(=O)-$  danner en selvimmolativ linker.

3. Konjugatet ifølge krav 2, hvori  $L^1$  er enzymspaltbar.

4. Konjugatet ifølge krav 3, hvori  $L^1$  omfatter et dipeptid og gruppen  $-X_1-X_2-$  i dipeptidet,  $-NH-X_1-X_2-CO-$  er valgt fra:

- 20 - Phe-Lys-,  
 - Val-Ala-,  
 - Val-Lys-,  
 - Ala-Lys-,  
 - Val-Cit-,  
 25 - Phe-Cit-,  
 - Leu-Cit-,  
 - Ile-Cit-,  
 - Phe-Arg-,  
 - Trp-Cit-

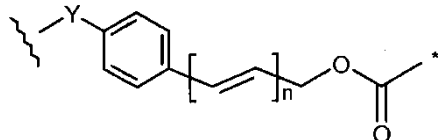
30

5. Konjugatet ifølge krav 4, hvori gruppen  $-X_1-X_2-$  i dipeptidet,  $-NH-X_1-X_2-CO-$ , er -Phe-Lys-, -Val-Ala- eller -Val-Cit-.

**6.** Konjugatet ifølge enten krav 4 eller krav 5, hvori gruppen  $X_2\text{-CO-}$  er forbundet med  $L^2$  og gruppen  $\text{NH-X}_1\text{-}$  er forbundet med A.

5 **7.** Konjugatet ifølge et hvilket som helst av kravene 4 til 6, hvori  $L^2$  sammen med  $\text{OC(=O)}$  danner en selvimmolativ linker.

**8.** Konjugatet ifølge krav 7, hvori  $\text{C(=O)O}$  og  $L^2$  sammen danner gruppen:

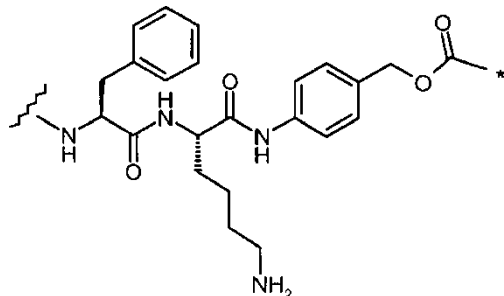


10 hvor stjernen angir bindingspunktet til N10-posisjonen, den bølgede linjen angir bindingspunktet til linkerens  $L^1$ , Y er NH, O,  $\text{C(=O)NH}$  eller  $\text{C(=O)O}$  og n er 0 til 3.

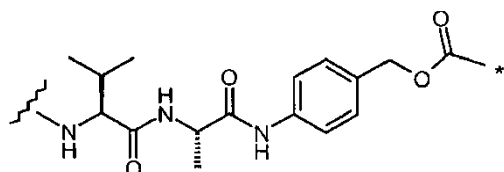
**9.** Konjugatet ifølge krav 8, hvori Y er NH og n er 0.

15

**10.** Konjugatet ifølge krav 2, hvori  $L^1$  og  $L^2$  sammen med  $\text{-OC(=O)-}$  omfatter en gruppe valgt fra:



eller



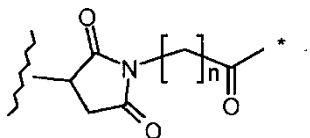
20

hvor stjernen angir bindingspunktet til N10-posisjonen og den bølgede linjen angir bindingspunktet til A.

**11.** Konjugatet ifølge et hvilket som helst av kravene 2 til 10, hvori A er:

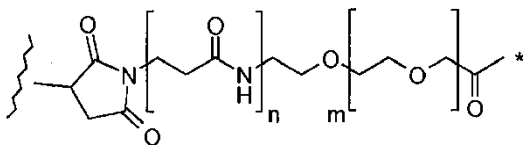
25

(i)



hvor stjernen angir bindingspunktet til  $L^1$ , den bølgede linjen angir bindingspunktet til cellebindemiddelet og n er 0 til 6 eller

(ii)



5

hvor stjernen angir bindingspunktet til  $L^1$ , den bølgede linjen angir bindingspunktet til cellebindemiddelet, n er 0 eller 1 og m er 0 til 30.

10 **12.** Konjugatet ifølge et hvilket som helst av kravene 2 til 11, hvori cellebindemiddelet er forbundet med A gjennom en tioeterbinding dannet fra en cysteintiolrest av cellebindemiddelet og en malemidgruppe av A.

15 **13.** Konjugatet ifølge et hvilket som helst av de foregående kravene, hvori cellebindemiddelet av  $R^{10}$  er et antistoff eller et aktivt fragment derav.

**14.** Konjugatet ifølge krav 13, hvori antistoffet eller antistoffragmentet er et antistoff eller antistoffragmentet for et tumor-assosiert antigen.

20 **15.** Konjugatet ifølge et hvilket som helst av de foregående kravene, hvori  $R^9$  er uavhengig H og  $R^6$  er uavhengig H.

**16.** Konjugatet ifølge et hvilket som helst av de foregående kravene, hvori  $R^7$  er uavhengig OMe.

25 **17.** Konjugatet ifølge et hvilket som helst av de foregående kravene, hvori X er O.

**18.** Konjugatet ifølge et hvilket som helst av de foregående kravene, hvori  $R^{11}$  er H.

30

**19.** Konjugatet ifølge et hvilket som helst av de foregående kravene, hvori de stiplede linjene indikerer det eventuelle nærværet av en dobbeltbinding mellom C2 og C3.

5 **20.** Konjugatet ifølge et hvilket som helst av de foregående kravene, hvori  $R^2$  er uavhengig valgt fra H, =O, =CH<sub>2</sub>, R, =CH-R<sup>D</sup> og =C(R<sup>D</sup>)<sub>2</sub>.

**21.** Konjugatet ifølge krav 20, hvori  $R^2$  er uavhengig =CH<sub>2</sub>.

10 **22.** Konjugatet ifølge krav 20, hvori  $R^2$  er uavhengig eventuelt substituert C<sub>5-20</sub>-aryl.

**23.** Konjugatet ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 22, hvori R<sup>n</sup> er en C<sub>3</sub>-alkylengruppe eller en C<sub>5</sub>-alkylengruppe.

15

**24.** Konjugatet ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 23, hvori R<sup>C</sup> er fjernbar fra N10-posisjonen for å etterlate en N10-C11 iminbinding.

20

**25.** Konjugatet ifølge krav 24, hvori R<sup>C</sup> er en karbamatbeskyttelsesgruppe valgt fra:

Alloc

Fmoc

Boc

Troc

25

Teoc

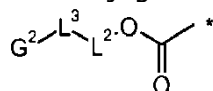
Psec

Cbz

PNZ.

30

**26.** Konjugatet ifølge krav 24, hvori R<sup>C</sup> er en gruppe:



hvor stjernen angir bindingspunktet til N10-posisjonen, G<sup>2</sup> er en avslutningsgruppe, L<sup>3</sup> er en kovalent binding eller en spaltbar linker L<sup>1</sup>, L<sup>2</sup> er en kovalent binding eller sammen med OC(=O) danner en selvimmolativ linker.



**27.** Konjugatet ifølge krav 26, hvori  $L^3$  er en spaltbar linker  $L^1$  og er definert i et hvilket som helst av kravene 3 til 6.

5 **28.** Konjugatet ifølge krav 26 eller krav 27, hvori  $L^2$  sammen med  $OC(=O)$  danner en selvimmolativ linker og den selvimmolative linkeren er som definert i enten krav 8 eller 9.

10 **29.** Konjugatet ifølge et hvilket som helst av kravene 26 til 28, hvori  $G^2$  er Ac eller Moc, eller er en karbamatbeskyttelsesgruppe valgt fra:

Alloc

Fmoc

Boc

Troc

15 Teoc

Psec

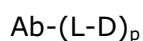
Cbz

PNZ.

20 **30.** Konjugatet ifølge et hvilket som helst av de foregående kravene for anvendelse i terapi.

25 **31.** Konjugatet ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 29, for anvendelse i behandlingen av en proliferativ sykdom hos et individ, hvori sykdommen er kreft.

**32.** Konjugat som har formelen:



30

hvor Ab er et antistoff bundet av en linkerenhet (L) til formelen (AB) eller (AC) PBD-legemiddelenhet (D) og p er et heltall fra 1 til ca. 8, hvori linkerenheten (L) og PBD-legemiddelenheten (D) av formel (AB) eller (AC) som definert i et hvilket som helst av kravene 1 til 29.

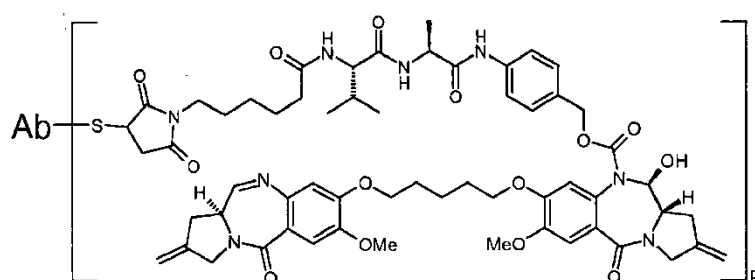
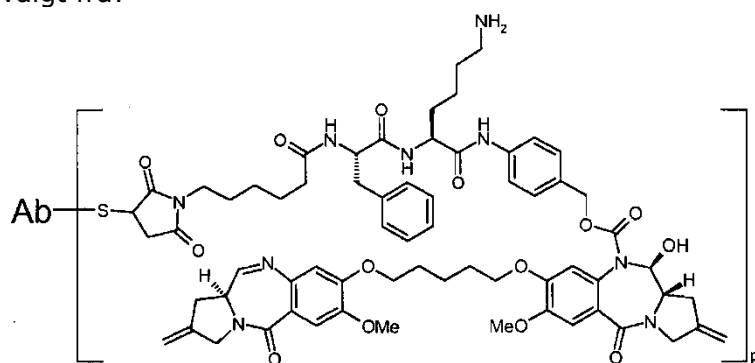
35

**33.** Konjugatet ifølge krav 32, hvori Ab er et antistoff som binder seg til ett eller flere tumorassosierte antigener eller celleoverflateresptorer valgt fra (1)-(36):

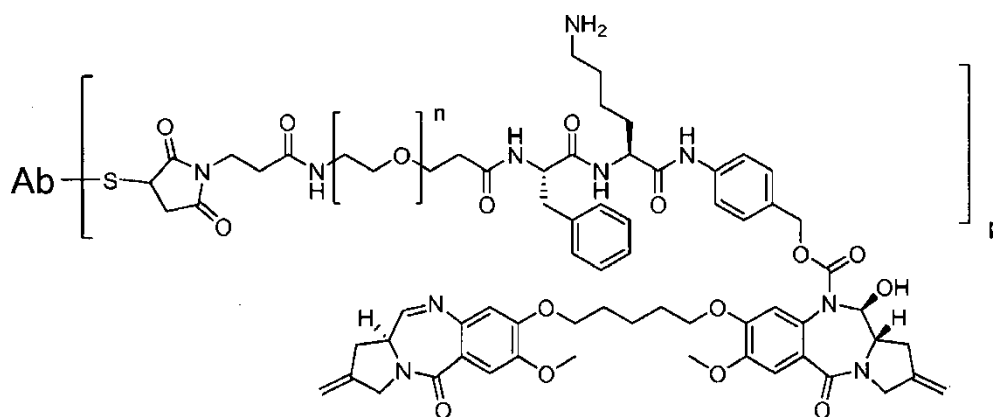
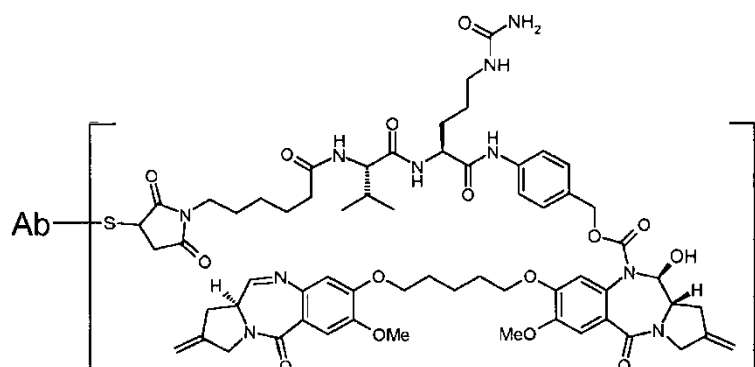
- (1) BMPR1B (benmorfogetisk proteinreseptortype IB);
- (2) E16 (LAT1, SLC7A5);
- 5 (3) STEAP1 (seks transmembrant epitelantigen av prostata);
- (4) 0772P (CA125, MUC16);
- (5) MPF (MPF, MSLN, SMR, megakaryocyttopotensieringsfaktor, mesotelin);
- (6) Napi3b (NAPI-3B, NPTIIb, SLC34A2, familie for bærestoffer av oppløst stoff 34 (natriumfosfat), komponent 2, type II natriumavhengig fosfattransportør 3b);
- 10 (7) Sema 5b (FLJ10372, KIAA1445, Mm,42015, SEMA5B, SEMAG, Semaphorin 5b Hlog, semadomene, sju trombospondinrepetisjoner (type 1 og type 1-like), transmembrant domene (TM) og kort cytoplasmisk domene, (semaforin) 5B);
- (8) PSCA hlg (2700050C12Rik, C530008O16Rik, RIKEN cDNA 2700050C12, RIKEN cDNA 2700050C12 gen);
- 15 (9) ETBR (Endotelin type B-reseptor);
- (10) MSG783 (RNF124, hypotetisk protein FLJ20315);
- (11) STEAP2 (HGNC\_8639, IPCA-1, PCANAP1, STAMP1, STEAP2, STMP, prostatakreft-assosiert gen 1, prostatakreft-assosiert protein 1, seks transmembran epitelantigen av prostata 2, seks transmembrant prostataprotein);
- 20 (12) TrpM4 (BR22450, FLJ20041, TRPM4, TRPM4B, transient reseptor potensiell kationekanal, underfamilie M, komponent 4);
- (13) CRIPTO (CR, CR1, CRGF, CRIPTO, TDGF1, teratokarsinom-avledet vekstfaktor);
- 25 (14) CD21 (CR2 (komplementær reseptor 2) eller C3DR (C3d/Epstein Barr-virusreseptor) eller Hs,73792);
- (15) CD79b (CD79B, CD79 $\beta$ , Igb (immunoglobulin-assosiert beta), B29);
- (16) FcRH2 (IFGP4, IRTA4, SPAP1A (SH2 domene inneholdende fosfataseankerprotein 1a), SPAP1B, SPAP1C);
- 30 (17) HER2;
- (18) NCA;
- (19) MDP;

- (20) IL20R $\alpha$ ;
- (21) Brevican;
- (22) EphB2R;
- (23) ASLG659;
- 5 (24) PSCA;
- (25) GEDA;
- (26) BAFF-R (B celleaktiveringsfaktorreseptor, BLyS-reseptor 3, BR3);
- (27) CD22 (B-cellerreseptor CD22-B isoform);
- (28) CD79a (CD79A, CD79 $\alpha$ , immunoglobulin-assosiert alfa);
- 10 (29) CXCR5 (Burkitt's lymfomreseptor 1);
- (30) HLA-DOB (betaunderenhet av MHC-klasse II-molekyl (Ia-antigen));
- (31) P2X5 (purinergisk reseptor P2X ligand-gatet ion 5-kanal);
- (32) CD72 (B-celledifferensieringsantigen CD72, Lyb-2);
- (33) LY64 (Lymfocyttantigen 64 (RP105), type I membranprotein av leucine rich repeat (LPR)-familien);
- 15 (34) FcRH1 (Fc reseptor-aktig protein 1);
- (35) IRTA2 (immunoglobulinsuperfamilie reseptortranslokasjonsassosiert 2); og
- (36) TENB2 (antatt transmembrant proteoglycan).
- 20 **34.** Konjugatet ifølge krav 32 hvori Ab er et cysteinkonstruert antistoff.
- 35.** Konjugatet ifølge enten krav 32 eller krav 33 hvori Ab er et antistoff som binder seg til en ErbB-reseptor.
- 25 **36.** Konjugatet ifølge krav 35 hvori Ab er trastuzmab.
- 37.** Konjugatet ifølge enten krav 32 eller krav 33 hvori Ab er et anti-HER2-, et antiSteap1- eller et anti-CD22-antistoff.
- 30 **38.** Konjugatet ifølge et hvilket som helst av kravene 32 til 37 hvori p er 1, 2, 3 eller 4.

39. Konjugatet ifølge et hvilket som helst av kravene 32 til 38 med en formel valgt fra:

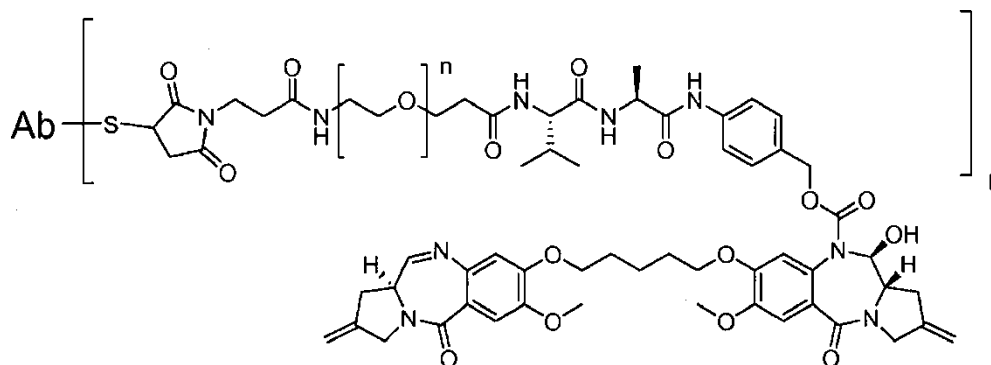


5

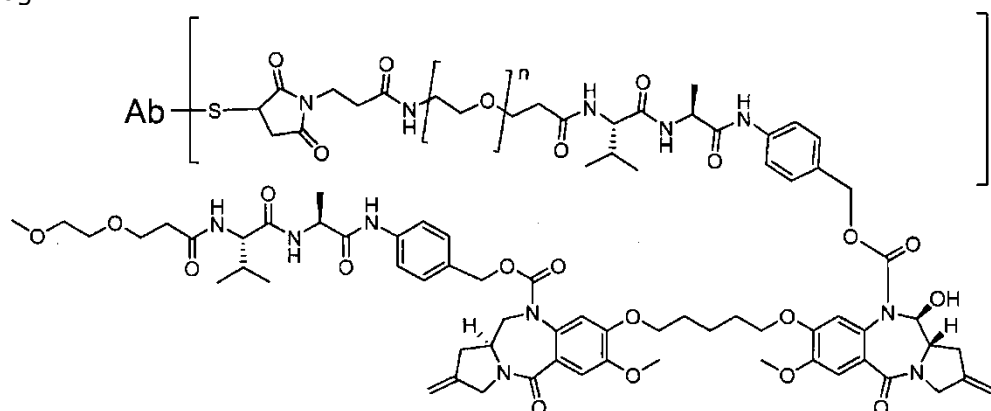


10

220



og



hvor  $n$  er et heltall mellom 1 og 24

5

**40.** Konjugatet ifølge krav 39, hvor  $n$  er et heltall fra 1 til 12.

**41.** Konjugatet eller saltet ifølge krav 40, hvor  $n$  er 4 eller 8.

10

**42.** Farmasøytisk sammensetning omfattende konjugatet ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 29 eller kravene 32 til 41 en farmasøytisk akseptabelt fortynningsmiddel, bærerstoff eller eksipient.

15

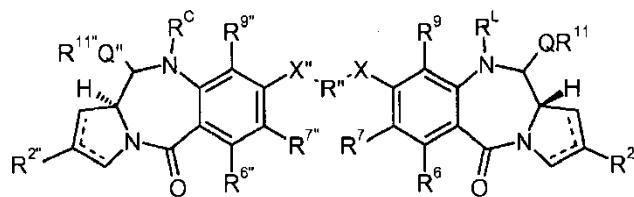
**43.** Den farmasøytiske sammensetningen ifølge krav 42 ytterligere omfattende en terapeutisk virkningsfull mengde av et kjemoterapeutisk stoff.

20

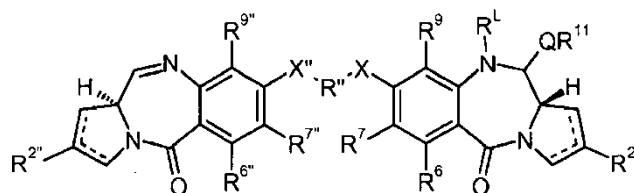
**44.** Anvendelse av et konjugat ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 29 eller kravene 32 til 41 til fremstilling av et legemiddel for anvendelse i behandlingen av en proliferativ sykdom hos en pasient.

**45.** Forbindelse med formel (EB) eller (EC):

221



EB



EC

og salter og solvater deriv, hvori

5 de prikkede linjene angir det eventuelle nærværet av en dobbeltbinding mellom C1 og C2 eller C2 og C3,

R<sup>2</sup> uavhengig er valgt fra H, OH, =O, =CH<sub>2</sub>, CN, R, OR, =CH-R<sup>D</sup>, =C(R<sup>D</sup>)<sub>2</sub>, O-SO<sub>2</sub>-R, CO<sub>2</sub>R og COR og eventuelt ytterligere valgt fra halo eller dihalo,

hvor R<sup>D</sup> uavhengig er valgt fra R, CO<sub>2</sub>R, COR, CHO, CO<sub>2</sub>H og halo, R<sup>6</sup> og R<sup>9</sup>

10 uavhengig er valgt fra H, R, OH, OR, SH, SR, NH<sub>2</sub>, NHR, NRR', NO<sub>2</sub>, Me<sub>3</sub>Sn og halo,

R<sup>7</sup> uavhengig er valgt fra H, R, OH, OR, SH, SR, NH<sub>2</sub>, NHR, NRR', NO<sub>2</sub>, Me<sub>3</sub>Sn og halo,

R<sup>L</sup> er en linker for kobling til et cellebindemiddel valgt fra et antistoff, et  
15 fragment av et antistoff som inneholder minst ett bindingssted og et syklisk polypeptid,

Q er uavhengig valgt fra O, S og NH,

R<sup>11</sup> er enten H eller R eller, hvor Q er O, er R<sup>11</sup> SO<sub>3</sub>M, hvor M er et metallkation;

R og R' i hvert tilfelle uavhengig er valgt fra eventuelt substituerte C<sub>1-12</sub>-alkyl-,  
20 C<sub>3-20</sub>-heterosykl- og C<sub>5-20</sub>-aryl-grupper og eventuelt i forbindelse med gruppen NRR', R og R' sammen med nitrogenatomet som de er bundet til, danner en eventuelt substituert 4-, 5-, 6- eller 7-leddet heterosyklisk ring;

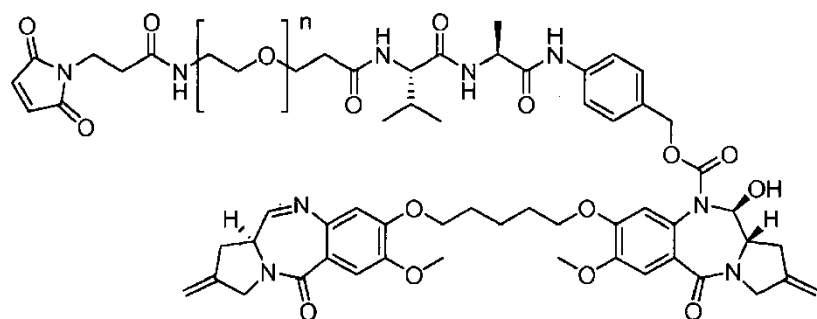
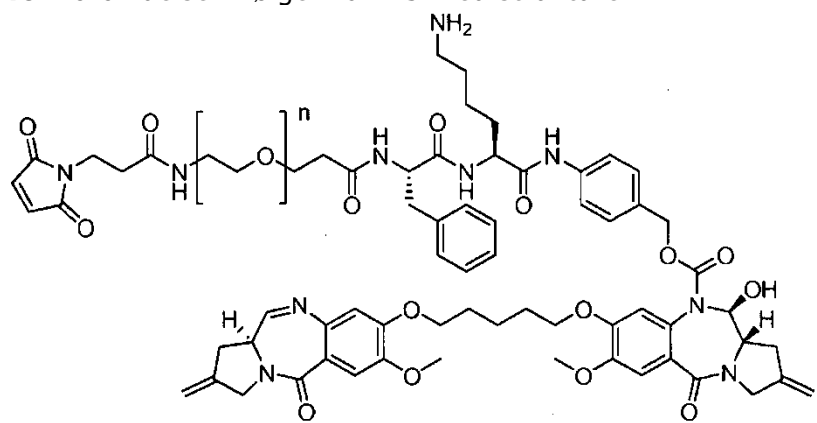
R'' er en C<sub>3-12</sub>-alkylengruppe, hvilken kjede kan være avbrutt av ett eller flere heteroatomer, f.eks. O, S, N(H), NMe og/eller aromatiske ringer, f.eks. benzen  
25 eller pyridin, hvilke ringer eventuelt er substituert med NH<sub>2</sub>;

hver X er O, S eller N(H); og

hvor R<sup>2</sup>, R<sup>6</sup>, R<sup>7</sup>, R<sup>9</sup>, X'', Q'' and R<sup>11</sup>, Q'' and X'' er definert ifølge henholdsvis R<sup>2</sup>, R<sup>6</sup>, R<sup>7</sup>, R<sup>9</sup>, X, Q og R<sup>11</sup>, og R<sup>C</sup> er en kapslende gruppe;

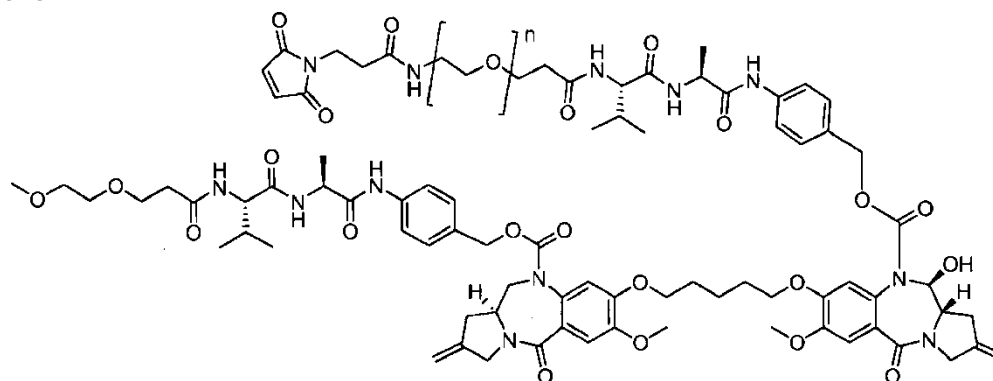
hvor R<sup>L</sup> er forskjellig fra R<sup>C</sup>.

46. Forbindelsen ifølge krav 45 med strukturen:



5

eller



hvor n er et heltall mellom 1 og 24

10

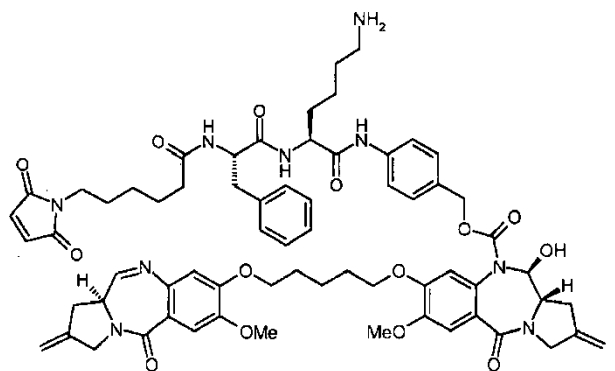
47. Forbindelsen ifølge krav 46, hvor n er et heltall fra 1 til 12.

48. Forbindelsen ifølge krav 47 hvor n er 4 eller 8.

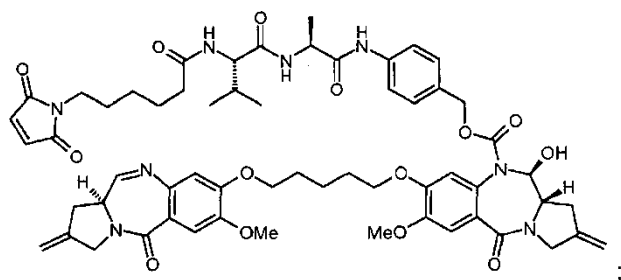
49. Forbindelsen ifølge krav 45, som er valgt fra:

15

(i)



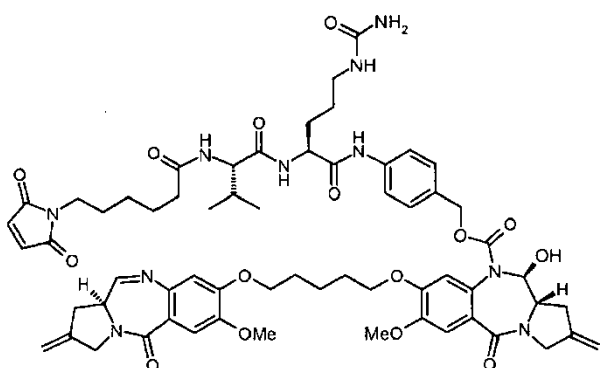
(ii)



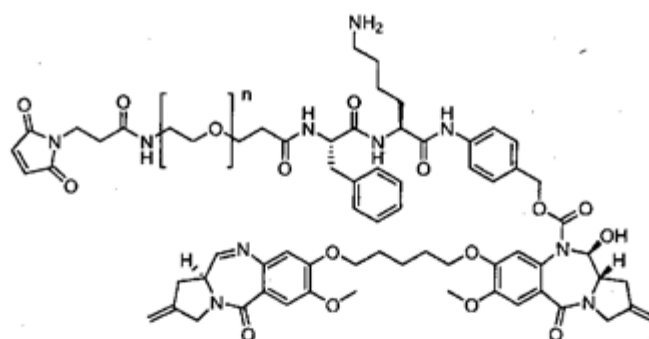
og

5

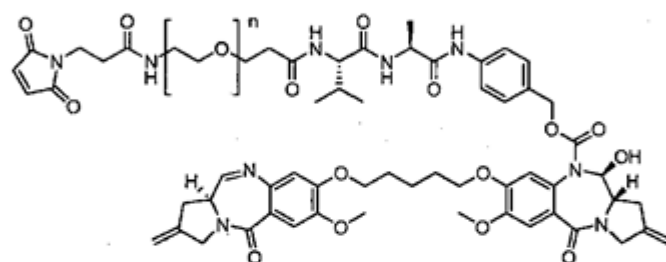
(iii)





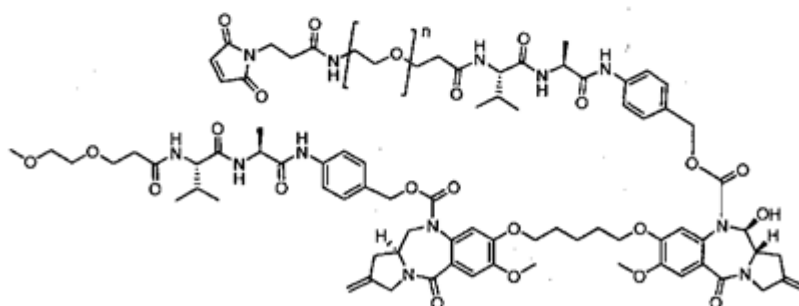


15ba, n = 4  
15bb, n = 8



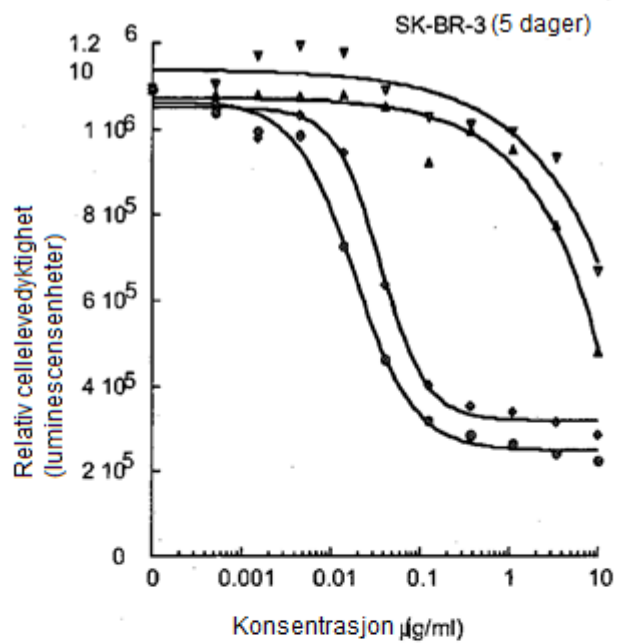
15d, n = 8

**Figur 1a**

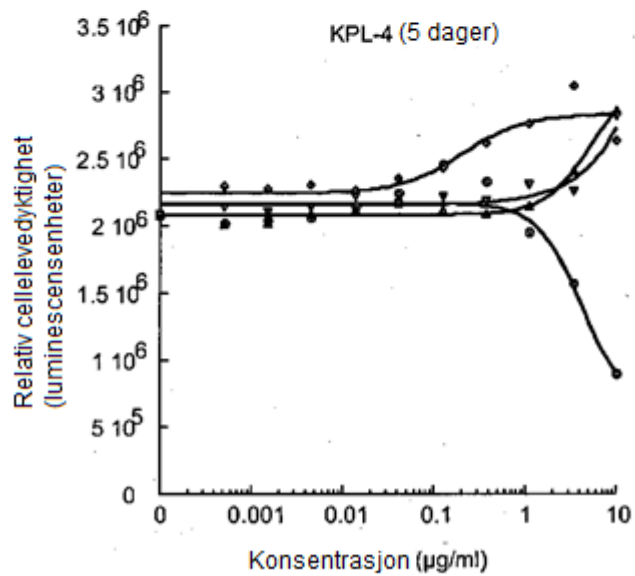


58, n = 8

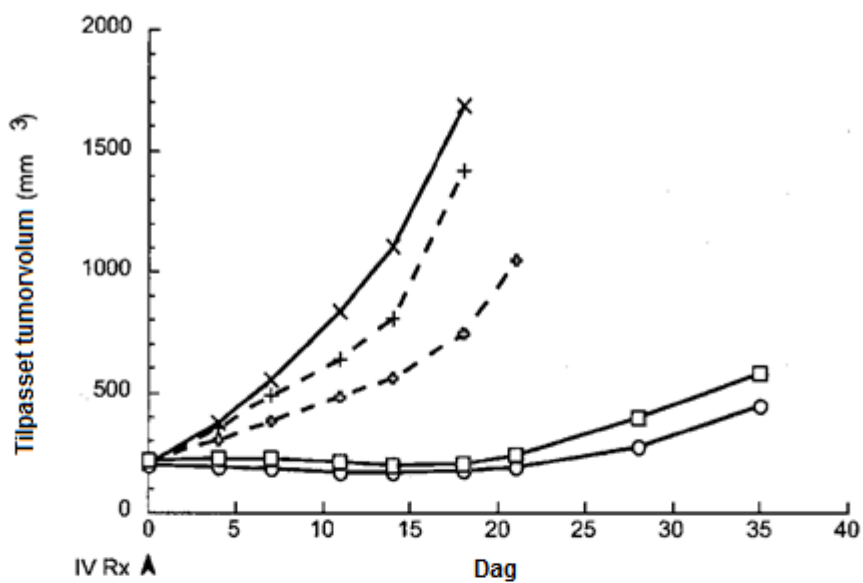
**Figur 1b**



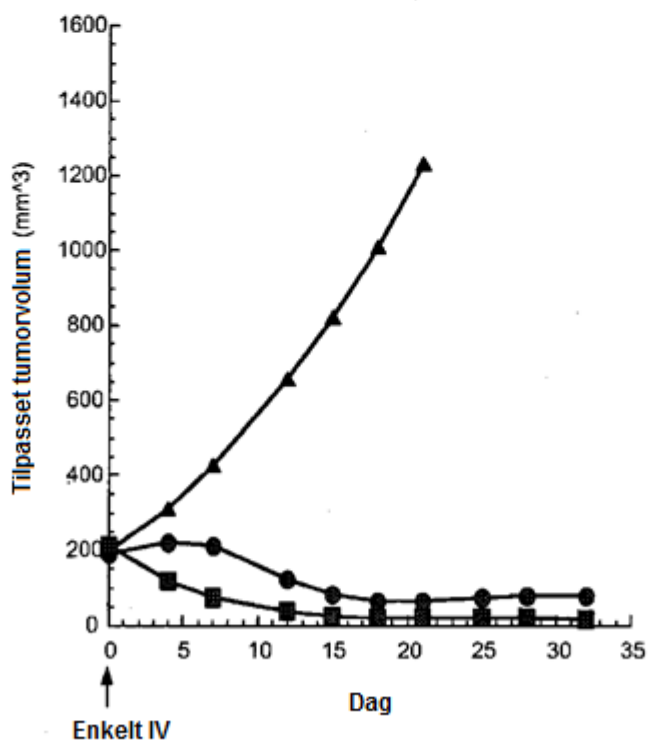
Figur 2



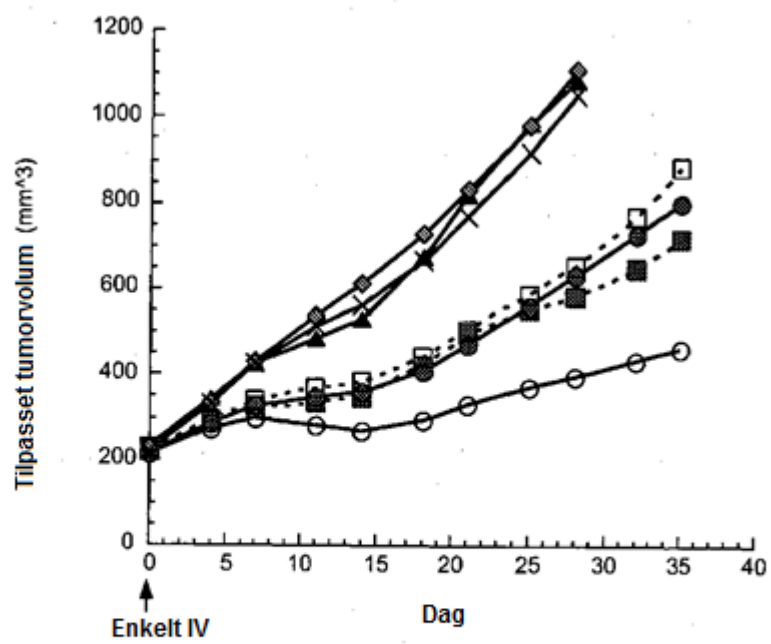
Figur 3



Figur 4



Figur 5



Figur 6