



(12) Translation of
European patent specification

(11) NO/EP 2675480 B1

NORWAY

(19) NO
(51) Int Cl.
A61K 47/68 (2017.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07D 487/04 (2006.01)
C07D 519/00 (2006.01)

Norwegian Industrial Property Office

(21)	Translation Published	2019.06.17
(80)	Date of The European Patent Office Publication of the Granted Patent	2018.12.26
(86)	European Application Nr.	12705761.0
(86)	European Filing Date	2012.02.15
(87)	The European Application's Publication Date	2013.12.25
(30)	Priority	2011.02.15, US, 201161443062 P 2011.02.15, US, 201161443092 P 2011.05.06, US, 201161483499 P
(84)	Designated Contracting States:	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
	Designated Extension States:	BA ; ME
(73)	Proprietor	ImmunoGen, Inc., 830 Winter Street, Waltham, MA 02451, USA
(72)	Inventor	FISHKIN, Nathan, 21 Chisholm Road, Weymouth, MA 02190, USA MILLER, Michael, 4 Maymount Drive, Framingham, MA 01701, USA LI, Wei, 6 Knowlton Drive, Acton, MA 01720, USA SINGH, Rajeeva, 40 Lanewood Avenue, Framingham, MA 01701, USA
(74)	Agent or Attorney	TANDBERG INNOVATION AS, Postboks 1570 Vika, 0118 OSLO, Norge

(54)	Title	METHODS OF PREPARATION OF CONJUGATES
------	-------	---

(56)	References Cited:	WO-A1-2010/091150 EP-A1- 2 019 104 WO-A1-2011/106528
------	----------------------	--

Enclosed is a translation of the patent claims in Norwegian. Please note that as per the Norwegian Patents Acts, section 66i the patent will receive protection in Norway only as far as there is agreement between the translation and the language of the application/patent granted at the EPO. In matters concerning the validity of the patent, language of the application/patent granted at the EPO will be used as the basis for the decision. The patent documents published by the EPO are available through Espacenet (<http://worldwide.espacenet.com>) or via the search engine on our website here: <https://search.patentstyret.no/>

EP 12 705 761.0

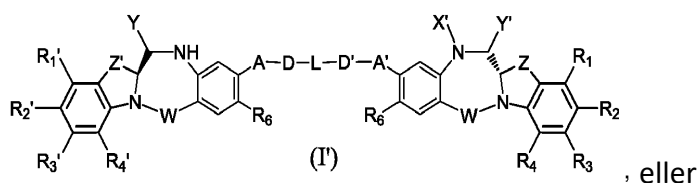
FREMGANGSMÅTER FOR Å FREMSTILLE KONJUGATER

Patentkrav

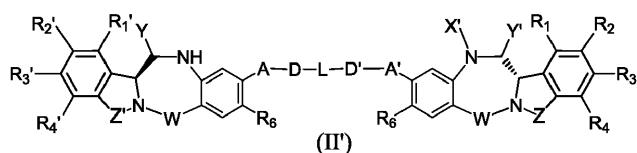
1. Fremgangsmåte for å fremstille et konjugat omfattende et cellebindende middel (CBA)

konjugert til en cytotoksisk forbindelse med en koplingsgruppe, fremgangsmåten omfattende å reagere en cytotoksisk forbindelse med et modifisert CBA med en pH på omtrent 4 til 9, hvori:

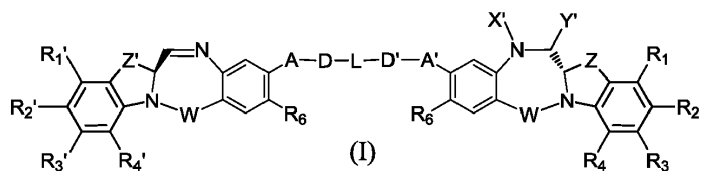
- a) det modifiserte CBA omfatter en rest av et bifunksjonelt tverrkoplingsmiddel bundet til CBA, og resten omfatter koplingsgruppen og en tiolreaktiv gruppe; og
- b) den modifiserte cytotoksiske forbindelsen omfatter en tiolgruppe og representeres av én av følgende formler:



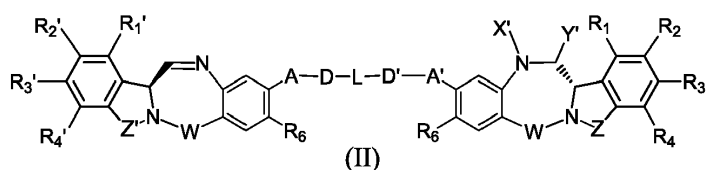
, eller



eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav, hvori den modifiserte cytotoksiske forbindelsen produseres ved å reagere en imininneholdende cytotoksisk forbindelse som bærer tiolgruppen med en iminreaktiv reagens, og hvori den imininneholdende cytotoksiske forbindelsen representeres av én av følgende formler:



,



,

eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav,

EP 12 705 761.0

hvor:

-C(Y)-N(H)- motivet i formel (I') og (II') resulterer fra reaksjonen til den iminreaktive reagensen med den imininnholdende cytotoksiske forbindelsen;

X' velges fra -H, en aminbeskyttende gruppe, et eventuelt substituert lineært, forgrenet eller syklisk alkyl, alkenyl eller alkynyl med fra 1 til 10 karbonatomer, en polyetylenglykolenhet $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$ og eventuell substituert aryl med 6 til 18 karbonatomer, en eventuelt substituert 5- til 18-leddet heteroarylring som inneholder ett eller flere heteroatomer uavhengig valgt fra nitrogen, oksygen og svovel og en eventuelt substituert 3- til 18-leddet heterosyklisk ring som inneholder 1 til 6 heteroatomer uavhengig valgt fra O, S, N og P;

Y' velges fra -H, en oksogruppe, et eventuelt substituert lineært, forgrenet eller syklisk alkyl, alkenyl eller alkynyl med 1 til 10 karbonatomer, et eventuelt substituert 6- til 18-leddet aryl, en eventuell substituert 5- til 18-leddet heteroarylring som inneholder ett eller flere heteroatomer uavhengig valgt fra nitrogen, oksygen og svovel, en eventuelt substituert 3 til 18-leddet heterosyklisk ring med 1 til 6 heteroatomer;

R^c er -H eller et substituert eller usubstituert lineært eller forgrenet alkyl med 1 til 4 karbonatomer;

R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_1' , R_2' , R_3' og R_4' er hver uavhengig valgt fra gruppen bestående av -H, et eventuelt substituert lineært, forgrenet eller syklisk alkyl, alkenyl eller alkynyl med fra 1 til 10 karbonatomer, en polyetylenglykolenhet $-(OCH_2CH_2)_n-R^c$, halogen, guanidinium $[-NH(C=NH)NH_2]$, -OR, -NR'R'', -NO₂, -NCO, -NR'COR'', -SR, et sulfoksid representert med -SOR', et sulfon representert med -SO₂R', et sulfonat -SO₃⁻M⁺, et sulfat -OSO₃⁻M⁺, et sulfonamid representert med -SO₂NR'R'', cyano, et azido, -COR', -OCOR', -OCONR'R'';

R, for hvert tilfelle, velges uavhengig fra gruppen bestående av -H, et eventuelt substituert lineært, forgrenet eller syklisk alkyl, alkenyl eller alkynyl med fra 1 til 10 karbonatomer, en polyetylenglykolenhet $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$, et eventuelt substituert aryl med 6 til 18 karbonatomer, en eventuell substituert 5- til 18-leddet heteroarylring som inneholder ett eller flere heteroatomer uavhengig valgt fra nitrogen, oksygen og svovel,

EP 12 705 761.0

eller en eventuell substituert 3- til 18-leddet heterosyklisk ring som inneholder 1 til 6 heteroatomer uavhengig valgt fra O, S, N og P;

R' og R'' hver uavhengig velges fra -H, -OH, -OR, -NHR, -NR₂, -COR, et eventuelt substituert lineært, forgrenet eller syklisk alkyl, alkenyl eller alkynyl med fra 1 til 10 karbonatomer, en polyetylenglykolenhet -(CH₂CH₂O)_n-R^c og en eventuell substituert 3- til 18-leddet heterosyklisk ring med 1 til 6 heteroatomer uavhengig valgt fra O, S, N og P;

n er et helt tall fra 1 og 24;

W velges fra C=O, C=S, CH₂, BH, SO og SO₂;

R₆ er -H, -R, -OR, -SR, -NR'R'', -NO₂ eller halogen;

Z og Z' velges uavhengig fra -(CH₂)_{n'}-, -(CH₂)_{n'}-CR₇R₈-(CH₂)_{na'}-, -(CH₂)_{n'}-NR₉-(CH₂)_{na'}-, -(CH₂)_n-O-(CH₂)_{na'}- og -(CH₂)_{n'}-S-(CH₂)_{na'};

n' og na' er like eller forskjellige og velges fra 0, 1, 2 og 3;

R₇ og R₈ er like eller forskjellige og hver velges uavhengig fra -H, -OH, -SH, -COOH, -NHR', en polyetylenglykolenhet -(OCH₂CH₂)_n-, en aminosyre, en peptidenhet med 2 til 6 aminosyrer, et eventuelt substituert lineært, forgrenet eller syklisk alkyl med fra 1 til 10 karbonatomer;

R₉ velges uavhengig fra -H, et eventuelt substituert lineært, forgrenet eller syklisk alkyl med 1 til 10 karbonatomer, en polyetylenglykolenhet -(OCH₂CH₂)_n-;

A og A' er like eller forskjellige og velges uavhengig fra -O-, okso (-C(=O)-), -CRR'O-, -CRR'S-, -S-, -CRR'S-, -N(R₅)- og -CRR'N(R₅)-,

R₅ er for hvert tilfelle uavhengig -H eller et eventuelt substituert lineært eller forgrenet alkyl med 1 til 10 karbonatomer;

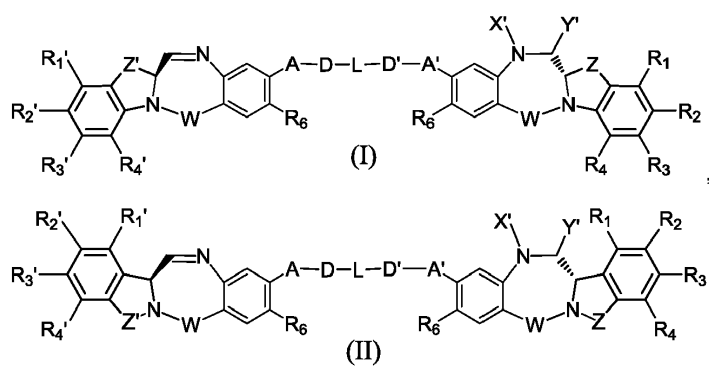
D og D' er like eller forskjellige og uteblir eller velges uavhengig fra gruppen bestående av et eventuelt substituert lineært, forgrenet eller syklisk alkyl, alkenyl eller alkynyl med 1 til 10 karbonatomer, en aminosyre, et peptid med 2 til 6 aminosyrer og en polyetylenglykolenhet (-OCH₂CH₂)_n-; og

L uteblir eller når tilstede, omfatter tiolgruppen eller er en polyetylenglykolenhet unit (-OCH₂CH₂)_n-, et lineært, forgrenet eller syklisk alkyl eller alkenyl med 1 til 10 karbonatomer, en fenylgruppe, en 3- til 18-leddet heterosyklisk ring eller en 5- til 18-

EP 12 705 761.0

leddet heteroarylring med 1 til 6 heteroatomer uavhengig valgt fra O, S, N og P, hvori alkyl, alkenyl, fenyl, eller heterosyklisk eller heteroarylring eventuelt substitueres; og den iminreaktive reagensen velges fra gruppen bestående av sulfitt (H_2SO_3 , H_2SO_2 eller et salt av HSO_3^- , SO_3^{2-} eller HSO_2^- dannet med et kation), et metabisulfitt ($\text{H}_2\text{S}_2\text{O}_5$ eller et salt $\text{S}_2\text{O}_5^{2-}$ dannet med et kation) og et ditionitt ($\text{H}_2\text{S}_2\text{O}_4$ eller et salt $\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$ dannet med et kation).

2. Fremgangsmåte for å fremstille et konjugat omfattende et cellebindende middel (CBA) konjugert til en cytotoxisk forbindelse med en koplingsgruppe, fremgangsmåten omfattende å reagere CBA med en imininneholdende cytotoxisk forbindelse, en iminreaktiv reagens og et bifunksjonelt tverrkoplingsmiddel omfattende koplingsgruppen for å danne konjugatet, hvori den imininneholdende forbindelsen representeres av én av følgende formler, eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav:



hvori:

X' velges fra -H, en aminbeskyttende gruppe, et eventuelt substituert lineært, forgrenet eller syklisk alkyl, alkenyl eller alkynyl med fra 1 til 10 karbonatomer, en polyetylenglykolenhet $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{R}^c$, et eventuell substituert aryl med 6 til 18 karbonatomer, en eventuelt substituert 5- til 18-leddet heteroarylring som inneholder ett eller flere heteroatomer uavhengig valgt fra nitrogen, oksygen og svovel og en eventuelt substituert 3- til 18-leddet heterosyklisk ring som inneholder 1 til 6 heteroatomer uavhengig valgt fra O, S, N og P;

Y' velges fra -H, en oksogruppe, et eventuelt substituert lineært, forgrenet eller syklisk alkyl, alkenyl eller alkynyl med 1 til 10 karbonatomer, et eventuelt substituert 6-

EP 12 705 761.0

til 18-leddet aryl, en eventuell substituert 5- til 18-leddet heteroarylring inneholdende ett eller flere heteroatomer uavhengig valgt fra nitrogen, oksygen og svovel, en eventuelt substituert 3 til 18-leddet heterosyklisk ring med 1 til 6 heteroatomer;

R^c er -H eller et substituert eller usubstituert lineært eller forgrenet alkyl med 1 til 4 karbonatomer;

R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_1' , R_2' , R_3' og R_4' er hver uavhengig valgt fra gruppen bestående av -H, et eventuelt substituert lineært, forgrenet eller syklisk alkyl, alkenyl eller alkynyl med fra 1 til 10 karbonatomer, en polyetylenglykolenhet- $(OCH_2CH_2)_n-R^c$, halogen, guanidinium $[-NH(C=NH)NH_2]$, -OR, -NR'R'', -NO₂, -NCO, -NR'COR'', -SR, et sulfoksid representert med -SOR', et sulfon representert med -SO₂R', et sulfonat -SO₃M⁺, et sulfat -OSO₃M⁺, et sulfonamid representert med -SO₂NR'R'', cyano, et azido, -COR', -OCOR', -OCONR'R'';

R, for hvert tilfelle, velges uavhengig fra gruppen bestående av -H, et eventuelt substituert lineært, forgrenet eller syklisk alkyl, alkenyl eller alkynyl med fra 1 til 10 karbonatomer, en polyetylenglykolenhet $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$, et eventuelt substituert aryl med 6 til 18 karbonatomer, en eventuell substituert 5- til 18-leddet heteroarylring som inneholder ett eller flere heteroatomer uavhengig valgt fra nitrogen, oksygen og svovel, eller en eventuell substituert 3- til 18-leddet heterosyklisk ring som inneholder 1 til 6 heteroatomer uavhengig valgt fra O, S, N og P;

R' og R'' hver uavhengig velges fra -H, -OH, -OR, -NHR, -NR₂, -COR, et eventuelt substituert lineært, forgrenet eller syklisk alkyl, alkenyl eller alkynyl med fra 1 til 10 karbonatomer, en polyetylenglykolenhet $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$ og en eventuell substituert 3- til 18-leddet heterosyklisk ring med 1 til 6 heteroatomer uavhengig valgt fra O, S, N og P;

n er et helt tall fra 1 og 24;

W velges fra C=O, C=S, CH₂, BH, SO og SO₂;

R₆ er -H, -R, -OR, -SR, -NR'R'', -NO₂ eller halogen;

Z og Z' velges uavhengig fra $-(CH_2)_{n'}-$, $-(CH_2)_{n'}-CR_7R_8-(CH_2)_{na'}-$, $-(CH_2)_{n'}-NR_9-(CH_2)_{na'}-$, $-(CH_2)_{n'}-O-(CH_2)_{na'}-$ og $-(CH_2)_{n'}-S-(CH_2)_{na'}-$;

n' og na' er like eller forskjellige og velges fra 0, 1, 2 og 3;

EP 12 705 761.0

R_7 og R_8 er like eller forskjellige og hver velges uavhengig fra -H, -OH, -SH, -COOH, -NHR', en polyetylenglykolenhet $-(OCH_2CH_2)_n-$, en aminosyre, en peptidenhet med 2 til 6 aminosyrer, et eventuelt substituert lineært, forgrenet eller syklisk alkyl med fra 1 til 10 karbonatomer;

R_9 velges uavhengig fra -H, et eventuelt substituert lineært, forgrenet eller syklisk alkyl med 1 til 10 karbonatomer, en polyetylenglykolenhet $-(OCH_2CH_2)_n-$;

A og A' er like eller forskjellige og velges uavhengig fra -O-, okso $(-C(=O)-)$, -CRR'O-, -CRR'-, -S-, -CRR'S-, -N(R_5)- og -CRR'N(R_5)-,

R_5 er for hvert tilfelle uavhengig -H eller et eventuelt lineært eller forgrenet alkyl med 1 til 10 karbonatomer;

D og D' er like eller forskjellige og uteblir eller velges uavhengig fra gruppen bestående av et eventuelt substituert lineært, forgrenet eller syklisk alkyl, alkenyl eller alkynyl med 1 til 10 karbonatomer, en aminosyre, et peptid med 2 til 6 aminosyrer og en polyetylenglykolenhet $-(OCH_2CH_2)_n-$; og

L uteblir eller når tilstede, omfatter en tiolgruppe og er en polyetylenglykolenhet unit $-(OCH_2CH_2)_n-$, et lineært, forgrenet eller syklisk alkyl eller alkenyl med 1 til 10 karbonatomer, en fenylgruppe, en 3- til 18-leddet heterosyklisk ring eller en 5- til 18-leddet heteroarylring med 1 til 6 heteroatomer uavhengig valgt fra O, S, N og P, hvori alkyl, alkenyl, fenyl, eller heterosyklisk eller heteroarylring eventuelt substitueres; og

den iminreaktive reagensen velges fra gruppen bestående av en sulfitt (H_2SO_3 , H_2SO_2 eller et salt av HSO_3^- , SO_3^{2-} eller HSO_2^- dannet med et kation), et metabisulfitt ($H_2S_2O_5$ eller et salt $S_2O_5^{2-}$ dannet med et kation) og et ditionitt ($H_2S_2O_4$ eller et salt $S_2O_4^{2-}$ dannet med et kation).

3. Fremgangsmåte for å fremstille et konjugat omfattende et cellebindende middel (CBA)

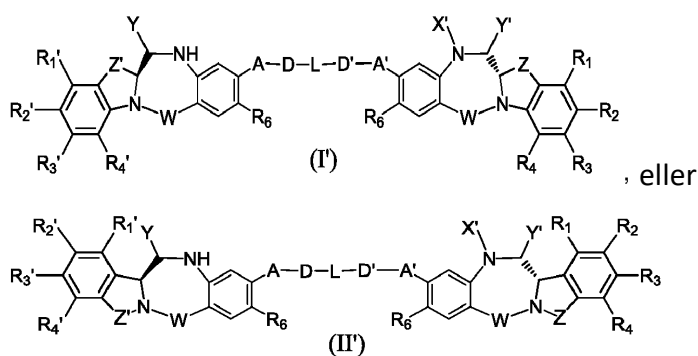
konjugert til et cytotoxisk forbindelse med en koplingsgruppe, fremgangsmåten omfattende:

- a) reagere en modifisert cytotoxisk forbindelse med et bifunksjonell tverrkoplingsmiddel omfattende koplingsgruppe, en gruppe reaktiv med CBA (som f.eks. en tiolgruppe, en maleimidgruppe, en haloacetamidgruppe eller en amingruppe) og en

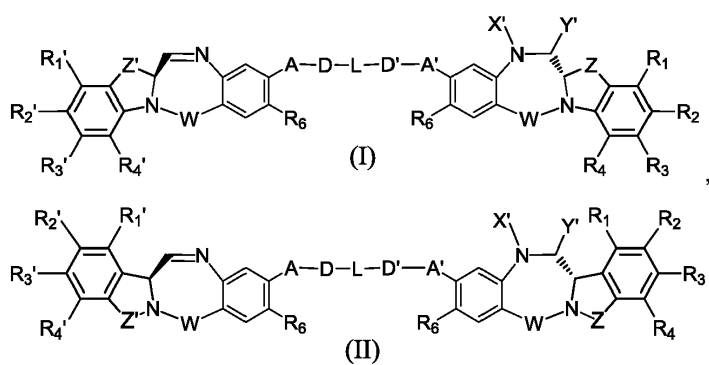
EP 12 705 761.0

gruppe reaktiv med den modifiserte cytotoxiske forbindelse, for å danne en andre modifisert cytotoxiske forbindelse kovalent bundet til en rest av det bifunksjonelle tverrkoplingsmidlet, hvori resten omfatter koplingsgruppen og gruppen reaktiv med CBA;

hvori den modifiserte cytotoxiske forbindelse representeres av én av følgende formel:



eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav, hvori den modifiserte cytotoxiske forbindelse produseres ved å reagere en imininneholdende cytotoxiske forbindelse med en iminreaktiv reagens, hvori den imininneholdende cytotoxiske forbindelse representeres av én av følgende formler, eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav:



hvori:

-C(Y)-N(H)-motivet i formel (I') og (II') resulterer fra reaksjonen til den iminreaktive reagensen med den imininneholdende cytotoxiske forbindelsen;

X' velges fra -H, en aminbeskyttende gruppe, et eventuelt substituert lineært, forgrenet eller syklisk alkyl, alkenyl eller alkynyl med fra 1 til 10 karbonatomer, en polyetylenglykolenhet $-(CH_2CH_2O)_n-R^C$ og eventuell substituert aryl med 6 til 18 karbonatomer, en eventuelt substituert 5- til 18-leddet heteroaryling som inneholder

EP 12 705 761.0

ett eller flere heteroatomer uavhengig valgt fra nitrogen, oksygen og svovel og en eventuelt substituert 3- til 18-leddet heterosyklisk ring som inneholder 1 til 6 heteroatomer uavhengig valgt fra O, S, N og P;

Y' velges fra -H, en oksogruppe, et eventuelt substituert lineært, forgrenet eller syklisk alkyl, alkenyl eller alkynyl med 1 til 10 karbonatomer, et eventuelt substituert 6- til 18-leddet aryl, en eventuell substituert 5- til 18-leddet heteroarylring inneholdende ett eller flere heteroatomer uavhengig valgt fra nitrogen, oksygen og svovel, en eventuelt substituert 3 til 18-leddet heterosyklisk ring med 1 til 6 heteroatomer;

R^c er -H eller et substituert eller usubstituert lineært eller forgrenet alkyl med 1 til 4 karbonatomer;

R₁, R₂, R₃, R₄, R₁', R₂', R₃' og R₄' er hver uavhengig valgt fra gruppen bestående av -H, et eventuelt substituert lineært, forgrenet eller syklisk alkyl, alkenyl eller alkynyl med fra 1 til 10 karbonatomer, en polyetylenglykolenhet-(OCH₂CH₂)_n-R^c, halogen, guanidinium [-NH(C=NH)NH₂], -OR, -NR'R'', -NO₂, -NCO, -NR'COR'', -SR, et sulfoksid representert med -SOR', et sulfon representert med -SO₂R', et sulfonat -SO₃⁻M⁺, et sulfat -OSO₃⁻M⁺, et sulfonamid representert med -SO₂NR'R'', cyano, et azido, -COR', -OCOR', -OCONR'R'';

R, for hvert tilfelle, velges uavhengig fra gruppen bestående av -H, et eventuelt substituert lineært, forgrenet eller syklisk alkyl, alkenyl eller alkynyl med fra 1 til 10 karbonatomer, en polyetylenglykolenhet -(CH₂CH₂O)_n-R^c, et eventuelt substituert aryl med 6 til 18 karbonatomer, en eventuell substituert 5- til 18-leddet heteroarylring som inneholder ett eller heteroatomer uavhengig valgt fra nitrogen, oksygen og svovel, eller en eventuell substituert 3- til 18-leddet heterosyklisk ring som inneholder 1 til 6 heteroatomer uavhengig valgt fra O, S, N og P;

R' og R'' hver uavhengig velges fra -H, -OH, -OR, -NHR, -NR₂, -COR, et eventuelt substituert lineært, forgrenet eller syklisk alkyl, alkenyl eller alkynyl med fra 1 til 10 karbonatomer, en polyetylenglykolenhet -(CH₂CH₂O)_n-R^c og en eventuell substituert 3- til 18-leddet heterosyklisk ring med 1 til 6 heteroatomer uavhengig valgt fra O, S, N og P;

n er et helt tall fra 1 og 24;

EP 12 705 761.0

W velges fra C=O, C=S, CH₂, BH, SO og SO₂;

R₆ er -H, -R, -OR, -SR, -NR'R'', -NO₂ eller halogen;

Z og Z' velges uavhengig fra -(CH₂)_{n'}-, -(CH₂)_{n'}-CR₇R₈-(CH₂)_{na'}-, -(CH₂)_{n'}-NR₉-(CH₂)_{na'}-,
, -(CH₂)_{n'}-O-(CH₂)_{na'}- og -(CH₂)_{n'}-S-(CH₂)_{na'}-;

n' og na' er like eller forskjellige og velges fra 0, 1, 2 og 3;

R₇ og R₈ er like eller forskjellige og hver velges uavhengig fra -H, -OH, -SH, -COOH, -NHR', en polyetylenglykolenhet -(OCH₂CH₂)_n-, en aminosyre, en peptidenhet med 2 til 6 aminosyrer, et eventuelt substituert lineært, forgrenet eller syklisk alkyl med fra 1 til 10 karbonatomer;

R₉ velges uavhengig fra -H, et eventuelt substituert lineært, forgrenet eller syklisk alkyl med 1 til 10 karbonatomer, en polyetylenglykolenhet -(OCH₂CH₂)_n-;

A og A' er like eller forskjellige og velges uavhengig fra -O-, okso (-C(=O)-), -CRR'O-, -CRR'-, -S-, -CRR'S-, -N(R₅)- og -CRR'N(R₅)-,

R₅ er for hvert tilfelle uavhengig -H eller et eventuelt lineært eller forgrenet alkyl med 1 til 10 karbonatomer;

D og D' er like eller forskjellige og uteblir eller velges fra gruppen bestående av et eventuelt substituert lineært, forgrenet eller syklisk alkyl, alkenyl eller alkynyl med 1 til 10 karbonatomer, en aminosyre, et peptid med 2 til 6 aminosyrer og en polyetylenglykolenhet (-OCH₂CH₂)_n-;

L uteblir eller når tilstede, omfatter en tiolgruppe eller er en polyetylenglykolenhet unit (-OCH₂CH₂)_n-, et lineært, forgrenet eller syklisk alkyl eller alkenyl med 1 til 10 karbonatomer, en fenylgruppe, en 3- til 18-leddet heterosyklisk ring eller en 5- til 18-leddet heteroarylring med 1 til 6 heteroatomer uavhengig valgt fra O, S, N og P, hvori alkyl, alkenyl, fenyl, eller heterosyklisk eller heteroarylring eventuelt substitueres; og

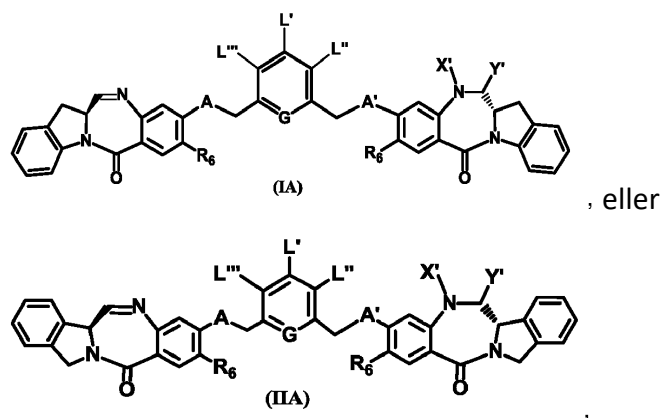
den iminreaktive reagensen velges fra gruppen bestående av en sulfitt (H₂SO₃, H₂SO₂ eller et salt av HSO₃⁻, SO₃²⁻ eller HSO₂⁻ dannet med et kation), et metabisulfitt (H₂S₂O₅ eller et salt S₂O₅²⁻ dannet med et kation) og et ditionitt (H₂S₂O₄ eller et salt S₂O₄²⁻ dannet med et kation); og

EP 12 705 761.0

b) reagere den andre modifiserte cytotoxiske forbindelse med CBA gjennom gruppen reaktiv med CBA, ved en pH på omtrent 4 til omtrent 9, for å danne konjugat.

4. Fremgangsmåten ifølge krav 3, hvori den modifiserte cytotoxiske forbindelse omfatter en tiolgruppe og gruppen reaktiv med den modifiserte cytotoxiske forbindelse i en tiolreaktiv gruppe.

5. Fremgangsmåten ifølge hvilket som helst av krav 1 til 4, hvori den imininneholdende cytotoxiske forbindelsen representeres av hvilken som helst av følgende formler:



hvor:

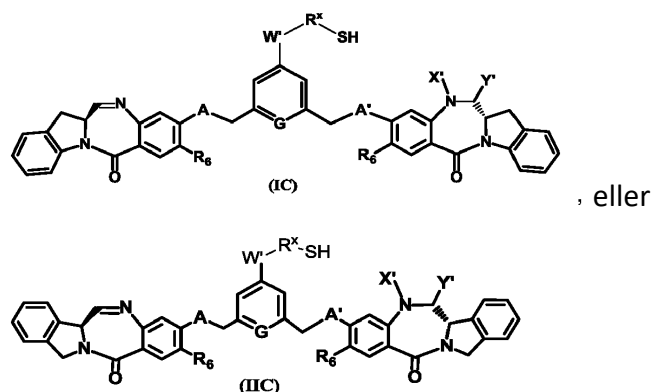
L' , L'' og L''' er like eller forskjellige og velges uavhengig fra -H og eventuelt substituert lineært, forgrenet eller syklisk alkyl, alkenyl eller alkynyl med fra 1 til 10 karbonatomer, en polyetylenglykolenhet $-(OCH_2CH_2)_n-R^c$, halogen, guanidinium [$-NH(C=NH)NH_2$], -OR, -NR'R'', -NO₂, -NR'COR'', -SR, et sulfoksid representert med -SOR', et sulfon representert med -SO₂R', et sulfonat -SO₃M, et sulfat -OSO₃M, et sulfonamid representert med -SO₂NR'R'', cyano, et azido, -COR', -OCOR', -OCONR'R'';

M er -H eller et farmasøytisk akseptabelt kation; og

G velges fra -CH- eller -N-.

6. Fremgangsmåten ifølge krav 5, hvori den imininneholdende cytotoxiske forbindelsen representeres av en hvilken som helst av følgende formler:

EP 12 705 761.0



hvor:

W' utelir, eller når tilstede, velges fra -CR^eR^{e'}-, -O-, -O-C(=O)-, -C(=O)-O-, -S-, -SO-, -SO₂-, -CH₂-S-, -CH₂O-, -CH₂NR^e-, -O-(C=O)O-, -O-(C=O)N(R^e)-, -N(R^e)-, -N(R^e)-C(=O)-, -C(=O)-N(R^e)-, -N(R^e)-C(=O)O-, -N(C(=O)R^e)C(=O)-, -N(C(=O)R^e)-, -(O-CH₂-CH₂)_n-, -SS- eller -C(=O)-, eller en aminosyre eller et peptid med 2 til 8 aminosyrer;

R^x utelir, eller når tilstede, er et eventuelt substituert lineært, forgrenet eller syklisk alkyl, alkenyl eller alkynyl med 1 til 10 karbonatomer, et aryl med 6 til 10 karbonatomer eller en 3- til 8-leddet heterosyklisk med 1 til 3 heteroatomer valgt fra O, N eller S;

R^e og R^{e'} er like eller forskjellige og velges fra -H, et lineært, forgrenet eller syklisk alkyl, alkenyl eller alkynyl med 1 til 10 karbonatomer eller -(CH₂-CH₂-O)_n-R^k, hvori R^k er -H, et lineært, forgrenet syklisk alkyl med 1 til 6 karbonatomer, eventuelt med en sekundær amino- (f.eks. -NHR¹⁰¹) eller tertiær amino (-NR¹⁰¹R¹⁰²)-gruppe eller et 5- eller 6-leddet nitrogen som inneholder heterosyklus, som f.eks. piperidin eller morfolin, hvori R¹⁰¹ and R¹⁰² er hvert uavhengig et lineært, forgrenet syklisk alkyl, alkenyl eller alkynyl med 1 til 10 karbonatomer; R¹⁰¹ og R¹⁰² er fortrinnsvis hver uavhengig et lineært eller forgrenet alkyl med 1 til 6 karbonatomer;

n er et helt tall fra 1 og 24.

7. Fremgangsmåten ifølge krav 6, hvori:

X' velges gruppene bestående av -H, et substituert eller usubstituert lineært, forgrenet eller syklisk alkyl, alkenyl eller alkynyl med fra 1 til 10 karbonatomer, fenyl og

EP 12 705 761.0

en aminbeskyttende gruppe;

Y' velges fra gruppen bestående av -H, en oksogruppe, et substituert eller usubstituert lineært, forgrenet eller syklisk alkyl, alkenyl eller alkynyl med fra 1 til 10 karbonatomer;

A og A' velges fra -O- og -S-;

W' utelir eller velges fra -O-, -N(R^e)-, -N(R^e)-C(=O)-, -N(C(=O)R^e)-, -S- eller -CH₂-S-, -CH₂NR^e-;

R^x utelir eller velges fra et lineært, forgrenet eller syklisk alkyl med 1 til 10 karbonatomer;

R^e er -H, et lineært, forgrenet eller syklisk alkyl, alkenyl eller alkynyl med 1 til 10 karbonatomer eller -(CH₂-CH₂-O)_n-R^k, hvori R^k er -H, et lineært, forgrenet syklisk alkyl med 1 til 6 karbonatomer, eventuelt med en sekundær (f.eks. -NHR¹⁰¹) eller tertiær amino (-NR¹⁰¹R¹⁰²)-gruppe eller et 5- eller 6-leddet nitrogen som inneholder heterosyklus, som f.eks. piperidin eller morfolin, hvori R¹⁰¹ and R¹⁰² er hvert uavhengig et lineært, forgrenet syklisk alkyl, alkenyl eller alkynyl med 1 til 10 karbonatomer;

G velges fra -CH- eller -N-.

8. Fremgangsmåten ifølge hvilket som helst krav 1–7, hvori det bifunksjonelle

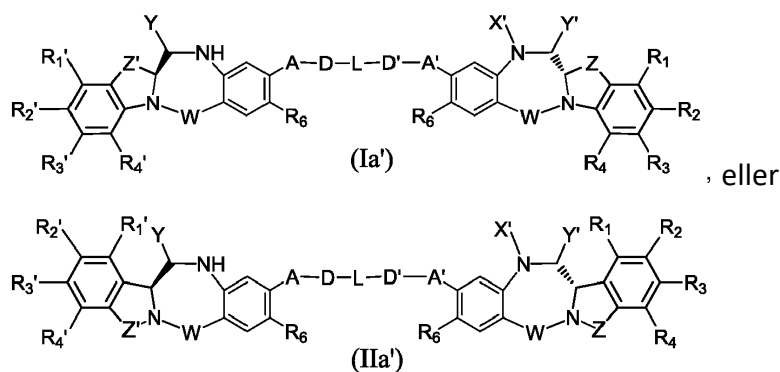
tverrkopplingsmidlet velges fra: N-suksinimidyl 4-(maleimidometyl)sykloheksankarboksylat (SMCC), N-suksinimidyl-4-(N-maleimidometyl)-sykloheksan-1-karboksy-(6-amidocaproat) (LC-SMCC), κ-maleimidoundekansyre N-suksinimidylester (KMUA), γ-maleimidobutansyre N-suksinimidylester (GMBS), ε-maleimidokapransyre N-hydroksysuksinimidsester (EMCS), m-maleimidobenzoyl-N-hydroksysuksinimidsester (MBS), N-(α-maleimidoacetoksy)-suksinimidsester (AMAS), suksinimidyl-6-(β-maleimidopropionamido)heksanoat (SMPH), N-suksinimidyl 4-(p-maleimidofenyl)-butyrat (SMPB), N-(p-maleimidofenyl)isocyanat (PMPI), N-suksinimidyl-4-(4-nitropyridyl-2-ditio)butanoat; N-suksinimidyl-4-(iodoacetyl)-aminobenzoat (SIAB), N-suksinimidyl iodoacetat (SIA), N-suksinimidyl bromoacetat (SBA) og N-suksinimidyl 3-(bromoacetamido)propionat (SBAP), bis-maleimidopolyetyleneglykol (BMPEO), BM(PEO)₂, BM(PEO)₃, N-(β-maleimidopropyloksi)suksinimidsester (BMPS), 5-maleimidovaleriansyre NHS,

EP 12 705 761.0

HBVS, 4-(4-N-maleimidofenyl)-butansyre hydrazid•HCl (MPBH), suksinimidyl-(4-vinylsulfonyl)benzoat (SVSB), ditiobis-maleimidoetan (DTME), 1,4-bis-maleimidobutan (BMB), 1,4-bismaleimidyl-2,3-dihydroksybutan (BMDB), bis-maleimidoheksan (BMH), bis-maleimidoetan (BMOE), sulfosuksinimidyl 4-(N-maleimido-metyl)sykloheksan-1-karboksylat (sulfo-SMCC), sulfosuksinimidyl(4-iodo-acetyl)aminobenzoat (sulfo-SIAB), m-maleimidobenzoyl-N-hydroksysulfosuksinimidsester (sulfo-MBS), N-(γ-maleimidobutryloksy)sulfosuksinimidester (sulfo-GMBS), N-(ε-maleimidokaproylloksy)sulfosuksimidoester (sulfo-EMCS), N-(κ-maleimidoundekanoyloksy)sulfosuksinimidsester (sulfo-KMUS), sulfosuksinimidyl 4-(p-maleimidofenyl)butyrat (sulfo-SMPB), CX1-1, sulfo-Mal, PEG_n-Mal, N-suksinimidyl-4-(4-nitropyridyl-2-ditio)butanoat, N-suksinimidyl-3-(2-pyridylditio)propionat (SPDP), N-suksinimidyl-4-(2-pyridylditio)pentanoat (SPP), N-suksinimidyl-4-(2-pyridylditio)butanoat (SPDB) og N-suksinimidyl-4-(2-pyridylditio)2-sulfo butanoat (sulfo-SPDB).

9. Fremgangsmåte for å fremstille et konjugat omfattende et cellebindende middel (CBA) konjugert til en cytotoxisk forbindelse med en koplingsgruppe, fremgangsmåten omfattende å reagere en andre modifisert forbindelse med CBA ved en pH på omtrent 4 til omtrent 9, hvori den andre modifiserte cytotoxiske forbindelsen omfatter:

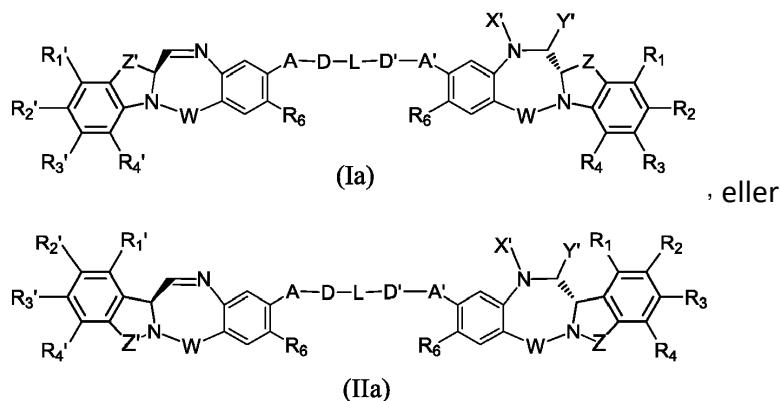
rest av et bifunksjonelt tverrkoplingsmiddel bundet til det cytotoxiske forbindelsen, og resten omfatter koplingsgruppen og en reaktiv gruppe valgt fra en reaktivt ester og en tiolreaktiv gruppe og representeres av én av følgende formler:



eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav, hvori den andre modifiserte cytotoxiske forbindelsen produseres ved å reagere en imininnholdende reagens med en imininnholdende cytotoxisk forbindelse som inneholder koplingsgruppen og den reaktive gruppen

EP 12 705 761.0

og hvori den imininnholdende cytotoxiske forbindelsen representeres av én av følgende formler:



eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav,

hvor:

-C(Y)-N(H)-motivet i formel (Ia') og (IIa') resulterer fra reaksjonen til den iminreaktive reagensen med den imininnholdende cytotoxiske forbindelsen;

X' velges fra -H, en aminbeskyttende gruppe, koplingsgruppen med den reaktive gruppen bundet dertil, et eventuelt substituert lineært, forgrenet eller syklisk alkyl, alkenyl eller alkynyl med fra 1 til 10 karbonatomer, en polyetylenglykolenhet - $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{-R}^c$ og eventuelt substituert aryl med 6 til 18 karbonatomer, en eventuelt substituert 5- til 18-leddet heteroarylring som inneholder ett eller flere heteroatomer uavhengig valgt fra nitrogen, oksygen og svovel, og en eventuelt substituert 3- til 18-leddet heterosyklisk ring som inneholder 1 til 6 heteroatomer uavhengig valgt fra O, S, N og P;

Y' velges fra -H, en oksogruppe, koplingsgruppen med den reaktive gruppen bundet dertil, et eventuelt substituert lineært, forgrenet eller syklisk alkyl, alkenyl eller alkynyl med 1 til 10 karbonatomer, et eventuelt substituert 6- til 18-leddet aryl, en eventuell substituert 5- til 18-leddet heteroarylring inneholdende ett eller flere heteroatomer uavhengig valgt fra nitrogen, oksygen og svovel, en eventuelt substituert 3 til 18-leddet heterosyklisk ring med 1 til 6 heteroatomer;

R^c er -H eller et substituert eller usubstituert lineært eller forgrenet alkyl med 1 til 4 karbonatomer, eller koplingsgruppen med den respektive gruppen bundet dertil;

EP 12 705 761.0

$R_1, R_2, R_3, R_4, R_1', R_2', R_3'$ og R_4' er hver uavhengig valgt fra gruppen bestående av -H, et eventuelt substituert lineært, forgrenet eller syklisk alkyl, alkenyl eller alkynyl med fra 1 til 10 karbonatomer, en polyetylenglykolenhet-(OCH_2CH_2) $_n$ - R^c , halogen, guanidinium [$-\text{NH}(\text{C}=\text{NH})\text{NH}_2$], -OR, -NR'R'', -NO₂, -NCO, -NR'COR'', -SR, et sulfoksid representert med -SOR', et sulfon representert med -SO₂R', et sulfonat -SO₃⁻M⁺, et sulfat -OSO₃⁻M⁺, et sulfonamid representert med -SO₂NR'R'', cyano, et azido, -COR', -OCOR', -OCONR'R''; og koplingsgruppen med den reaktive gruppen bundet dertil;

R, for hvert tilfelle, velges uavhengig fra gruppen bestående av -H, et eventuelt substituert lineært, forgrenet eller syklisk alkyl, alkenyl eller alkynyl med fra 1 til 10 karbonatomer, en polyetylenglykolenhet -($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$) $_n$ - R^c , et eventuelt substituert aryl med 6 til 18 karbonatomer, en eventuell substituert 5- til 18-leddet heteroarylring som inneholder ett eller flere heteroatomer uavhengig valgt fra nitrogen, oksygen og svovel, eller en eventuell substituert 3- til 18-leddet heterosyklisk ring som inneholder 1 til 6 heteroatomer uavhengig valgt fra O, S, N og P;

R' og R'' hver uavhengig velges fra -H, -OH, -OR, -NHR, -NR₂, -COR, et eventuelt substituert lineært, forgrenet eller syklisk alkyl, alkenyl eller alkynyl med fra 1 til 10 karbonatomer, en polyetylenglykolenhet -($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$) $_n$ - R^c og en eventuell substituert 3- til 18-leddet heterosyklisk ring med 1 til 6 heteroatomer uavhengig valgt fra O, S, N og P;

n er et helt tall fra 1 og 24;

W velges fra C=O, C=S, CH₂, BH, SO og SO₂;

R₆ er -H, -R, -OR, -SR, -NR'R'', -NO₂, halogen eller koplingsgruppen med den reaktive gruppen bundet dertil;

Z og Z' velges uavhengig fra -(CH₂) $_{n'}$ -, -(CH₂) $_{n'}$ -CR₇R₈-(CH₂) $_{na'}$ -, -(CH₂) $_{n'}$ -NR₉-(CH₂) $_{na'}$ -, -(CH₂) $_{n'}$ -O-(CH₂) $_{na'}$ - og -(CH₂) $_{n'}$ -S-(CH₂) $_{na'}$ -;

n' og na' er like eller forskjellige og velges fra 0, 1, 2 og 3;

R₇ og R₈ er like eller forskjellige og hver velges uavhengig fra -H, -OH, -SH, -COOH, -NHR', en polyetylenglykolenhet -(OCH_2CH_2) $_n$ -, en aminosyre, en peptidenhet med 2 til 6 aminosyrer, et eventuelt substituert lineært, forgrenet eller syklisk alkyl med fra 1 til 10 karbonatomer;

EP 12 705 761.0

R_9 velges uavhengig fra -H, et eventuelt substituert lineært, forgrenet eller syklisk alkyl med 1 til 10 karbonatomer, en polyetylenglykolenhet $-(OCH_2CH_2)_n-$;

A og A' er like eller forskjellige og velges uavhengig fra -O-; okso $(-C(=O)-)$, -CRR'O-, -CRR'-, -S-, -CRR'S-, -NR₅ og -CRR'N(R₅)-,

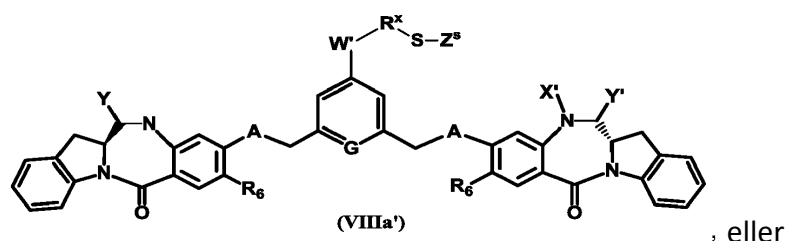
R₅ er for hvert tilfelle uavhengig -H eller et eventuelt lineært eller forgrenet alkyl med 1 til 10 karbonatomer;

D og D' er like eller forskjellige og uteblir eller velges uavhengig fra gruppen bestående av et eventuelt substituert lineært, forgrenet eller syklisk alkyl, alkenyl eller alkynyl med 1 til 10 karbonatomer, en aminosyre, et peptid med 2 til 6 aminosyrer og en polyetylenglykolenhet $(-OCH_2CH_2)_n-$;

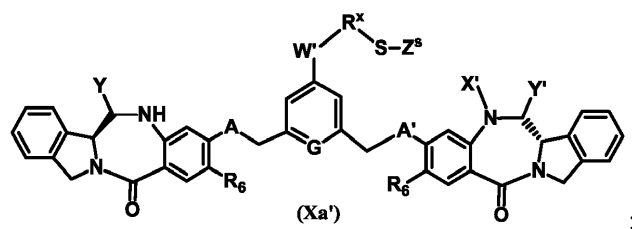
L uteblir, koplingsgruppen med den reaktive gruppen bundet dertil, en polyetylenglykolenhet $(-OCH_2CH_2)_n-$, et lineært, forgrenet eller syklisk alkyl eller alkenyl med 1 til 10 karbonatomer, en fenylgruppe, en 3- til 18-leddet heterosyklisk ring eller en 5- til 18-leddet heteroarylring med 1 til 6 heteroatomer uavhengig valgt fra O, S, N og P, hvori alkylet eller alkenylet eventuelt substitueres med koplingsgruppen med den reaktive gruppen bundet dertil; fenyl eller heterosyklisk eller heteroarylring kan eventuelt substitueres, hvori substituenten kan være koplingsgruppen med den reaktive gruppen bundet dertil; og

den iminreaktive reagensen velges fra gruppen bestående av en sulfitt (H_2SO_3 , H_2SO_2 eller et salt av HSO_3^- , SO_3^{2-} eller HSO_2^- dannet med et kation), en metabisulfitt ($H_2S_2O_5$ eller et salt $S_2O_5^{2-}$ dannet med et kation) og et ditionitt ($H_2S_2O_4$ eller et salt $S_2O_4^{2-}$ dannet med et kation).

10. Fremgangsmåten ifølge krav 3 eller krav 9, hvori den andre cytotoksiske forbindelsen representeres av en hvilken som helst av følgende formler:



EP 12 705 761.0



hvor:

Y velges fra $-\text{SO}_3\text{M}$, $-\text{SO}_2\text{M}$ eller $-\text{OSO}_3\text{M}$;

M er $-\text{H}$ eller et farmasøytisk akseptabelt kation som f.eks. Na^+ eller K^+ ;

X' velges fra gruppen bestående av $-\text{H}$, et substituert eller usubstituert lineært, forgrenet eller syklisk alkyl, alkenyl eller alkynyl med fra 1 til 10 karbonatomer, fenyyl og en aminbeskyttende gruppe;

Y' velges fra gruppen bestående av $-\text{H}$, en oksogruppe, et substituert eller usubstituert lineært, forgrenet eller syklisk alkyl, alkenyl eller alkynyl med fra 1 til 10 karbonatomer;

A og A' velges fra $-\text{O}-$ og $-\text{S}-$;

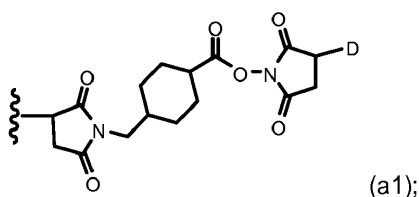
W' uteblir eller velges fra $-\text{O}-$, $-\text{N}(\text{R}^e)-$, $-\text{N}(\text{R}^e)-\text{C}(=\text{O})-$, $-\text{N}(\text{C}(=\text{O})\text{R}^e)-$, $-\text{S}-$ eller $-\text{CH}_2-\text{S}-$, $-\text{CH}_2\text{NR}^e-$;

R^x uteblir eller velges fra et lineært, forgrenet eller syklisk alkyl med 1 til 10 karbonatomer;

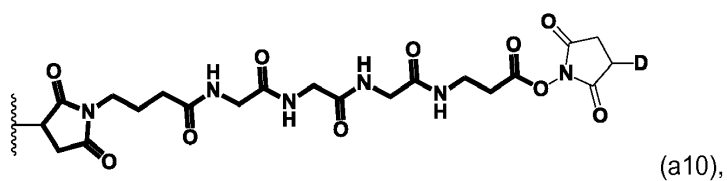
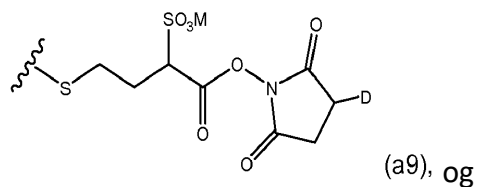
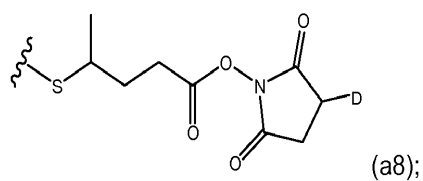
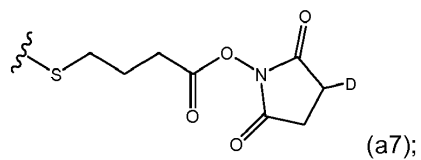
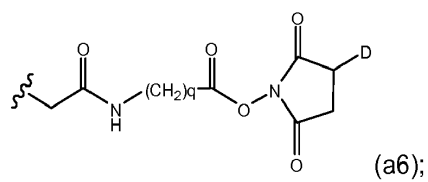
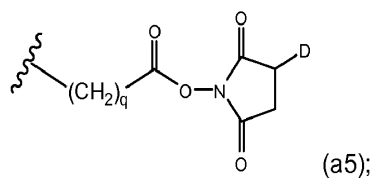
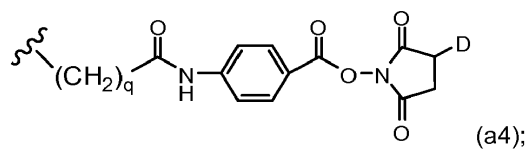
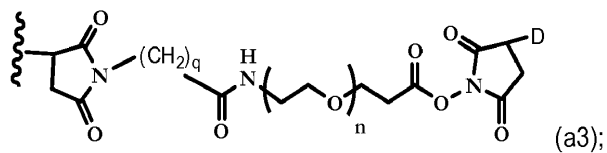
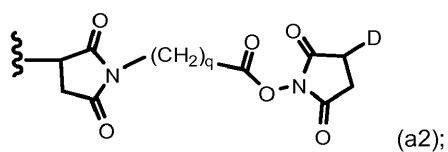
R^e er $-\text{H}$, et lineært, forgrenet eller syklisk alkyl, alkenyl eller alkynyl med 1 til 10 karbonatomer eller $-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_n-\text{R}^k$, hvori R^k er $-\text{H}$, et lineært, forgrenet syklisk alkyl med 1 til 6 karbonatomer, eventuelt med en sekundær amino- (f.eks. $-\text{NHR}^{101}$) eller tertiær amino ($-\text{NR}^{101}\text{R}^{102}$)-gruppe eller et 5- eller 6-leddet nitrogen som inneholder heterosyklus, som f.eks. piperidin eller morfolin, hvori R^{101} og R^{102} er hver uavhengig et lineært, forgrenet eller syklisk alkyl, alkenyl eller alkynyl med 1 til 10 karbonatomer;

G velges fra $-\text{CH}-$ eller $-\text{N}-$;

Z^s velge som hvilken som helst av følgende formler:



EP 12 705 761.0



hvor:

q er et helt tall fra 1 til 5; fortrinnsvis er q lik 2;

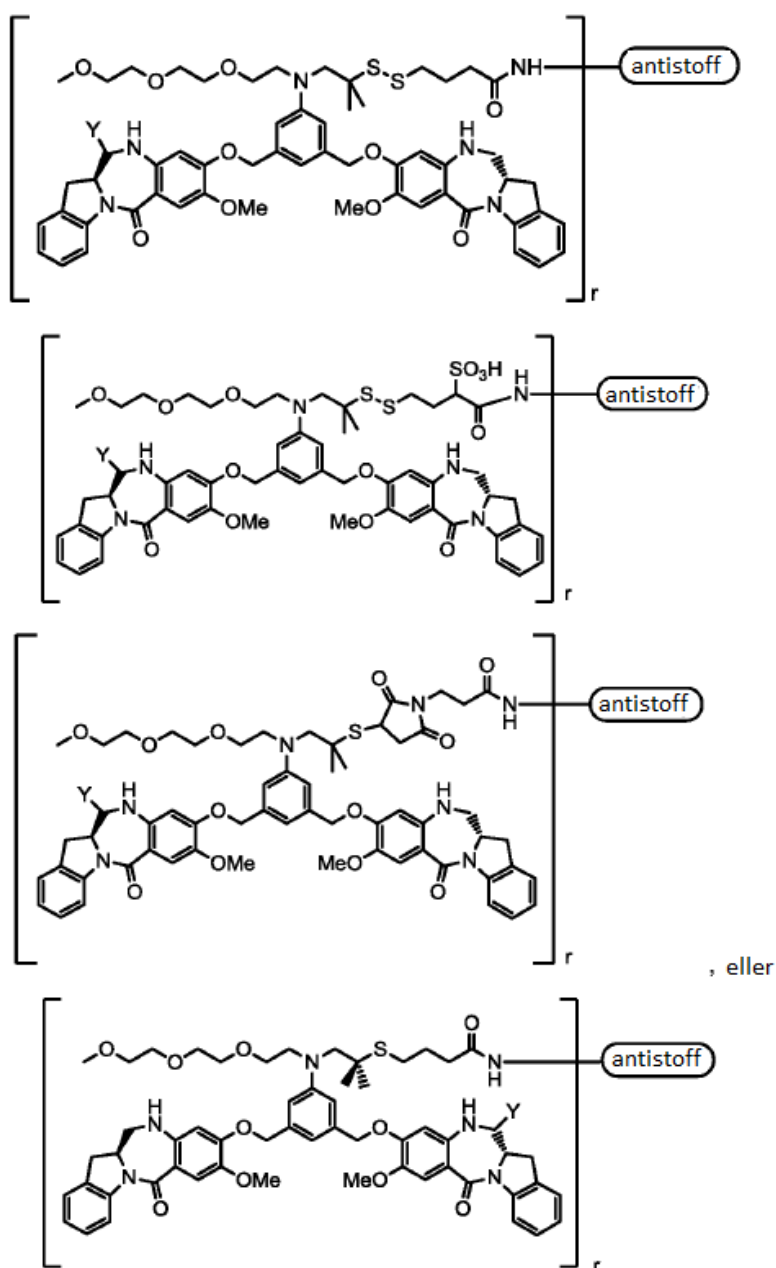
EP 12 705 761.0

n er et helt tall fra 2 og 6; fortrinnsvis er n lik 4;

D er -H eller -SO₃M;

M er -H eller et farmasøytisk akseptabelt kation som f.eks. Na⁺ eller K⁺.

11. Fremgangsmåten ifølge hvilket som helst av krav 1–10, hvori konjugatet er:

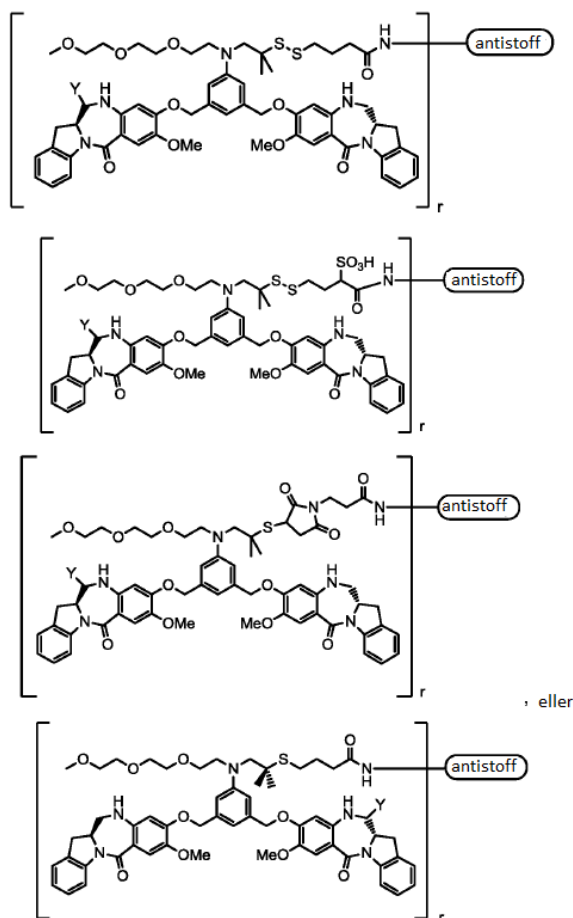


hvor r er et helt tall fra 1 til 10, Y er -SO₃M og M er -H eller et farmasøytisk akseptabelt kation.

EP 12 705 761.0

12. Fremgangsmåten følge hvilket som helst av krav 1–11, hvori det cellebindende midlet er et antistoff, et enkeltkjedet antistoff, et antistoffragment som bindes spesifikt til målcellen, et monoklonalt antistoff, et enkeltkjedet monoklonalt antistoff, eller et monoklonalt antistoffragment som bindes spesifikt til målcellen, et kimerisk antistoff, et kimerisk antistoffragment som bindes spesifikt til målcellen, et domeneantistoff, et domeneantistoffragment som bindes spesifikt til målcellen, et lymfokin, et hormon, et vitamin, en vektfaktor, en kolonistimulerende faktor, et næringtransporterende molekyl.

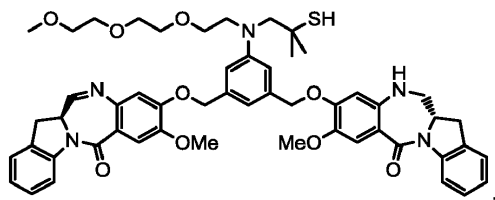
13. Fremgangsmåten ifølge krav 1, hvori fremgangsmåten er for å fremstille et konjugat med følgende formel:



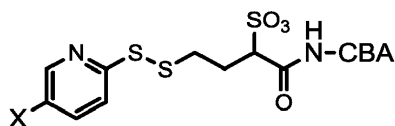
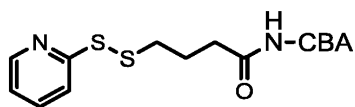
og fremgangsmåten omfatter å reagere en modifisert cytotoxisk forbindelse som produseres ved å reagere en iminreaktiv reagens med en imininneholdende cytotoxisk forbindelse med

EP 12 705 761.0

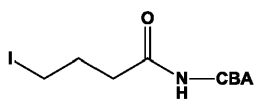
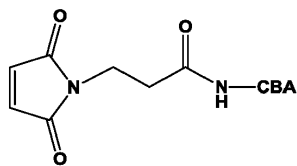
følgende formel:



med henholdsvis modifisert CBA med følgende formel, ved en pH på omtrent 4 til omtrent 9,



X = -H eller -NO₂,

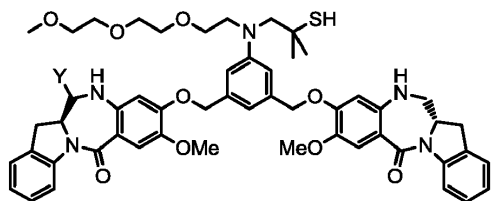


hvor:

r er et helt tall fra 1 og 10; og

hvor -C(Y)-N(H)-motivet i konjugatene resulterer fra reaksjonen til den iminreaktive reagensen med den imininnholdende cytotoksiske forbindelsen.

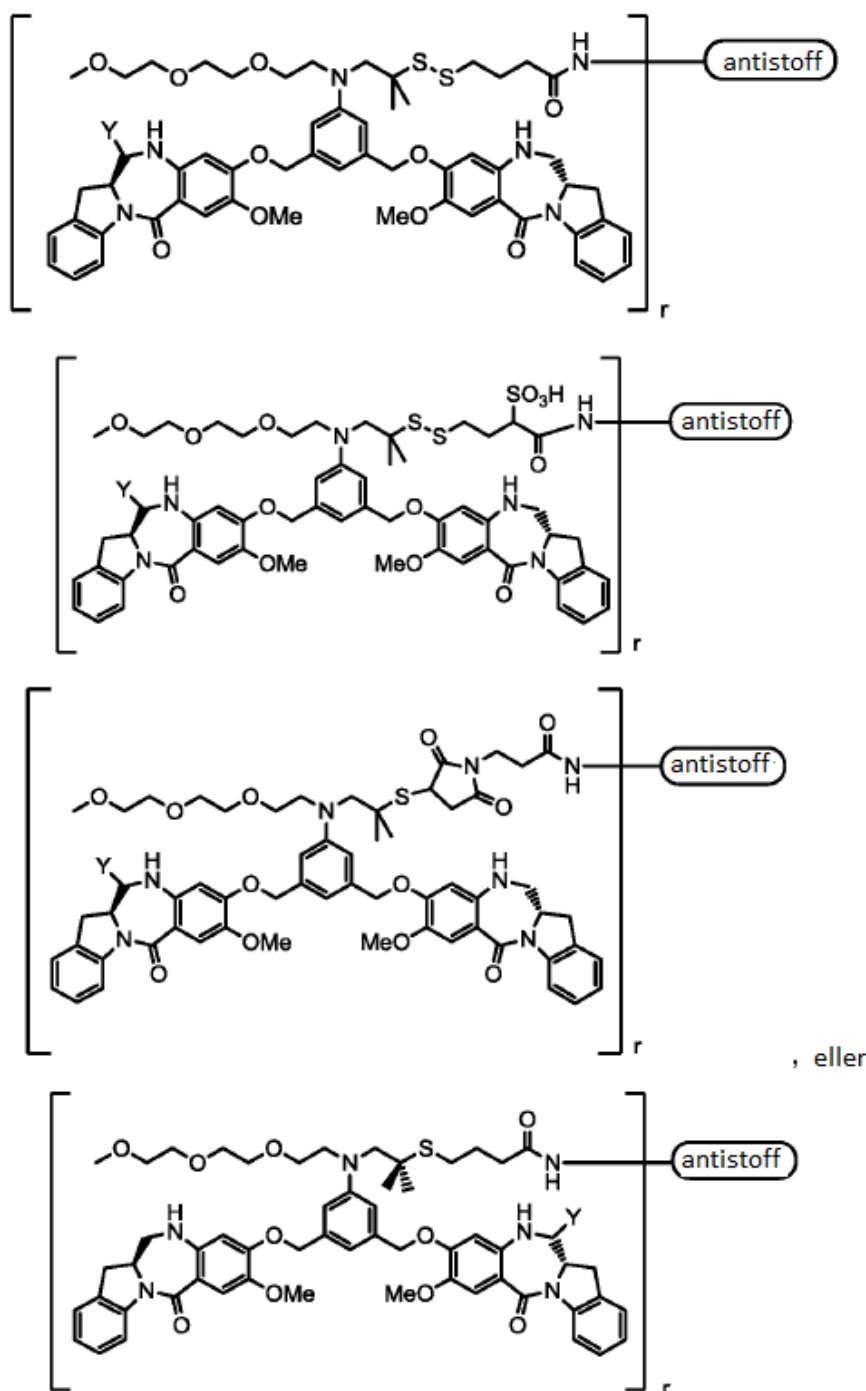
14. Fremgangsmåten ifølge krav 13, hvor den modifiserte cytotoksiske forbindelsen har følgende formel:



hvor Y -SO₃M og M er -H eller et farmasøytisk akseptabelt kation.

EP 12 705 761.0

15. Fremgangsmåten ifølge krav 2, hvori fremgangsmåten er for å fremstille et konjugat med følgende formel:



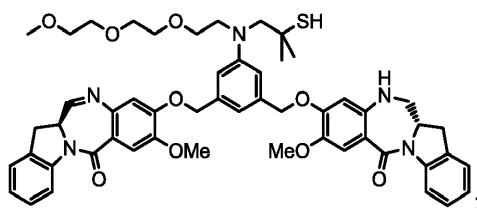
og fremgangsmåten omfatter å reagere CBA med en imininneholdende cytotoksisk forbindelse,

EP 12 705 761.0

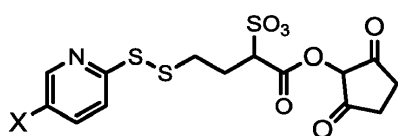
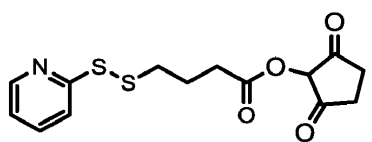
en iminreaktiv reagens og et bifunksjonelt tverrkoplingsmiddel omfattende koplingsgruppen for å danne konjugatet,

hvor:

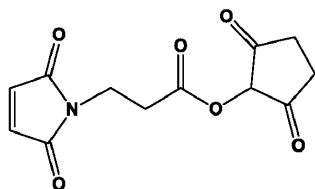
den imininneholdende forbindelsen er:



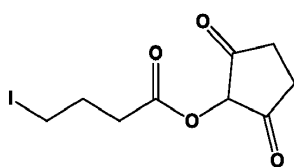
det bifunksjonelle tverrkoplingsmidlet er:



(X = -H eller -NO₂),



, eller



, henholdsvis og

hvor -C(Y)-N(H)-motivet i konjugatene resulterer fra reaksjonen til den iminreaktive reagensen med den imininneholdende cytotoksiske forbindelsen.

16. Fremgangsmåten ifølge hvilke som helst av de forgående kravene, hvor den iminreaktive reagens er NaHSO₃ eller KHSO₃.