Binder-Konjugate (ADCs) mit KSP-Inhibitoren

Einleitung und Stand der Technik

Die Erfindung betrifft Binder-Wirkstoff-Konjugate (ADCs) von Kinesin Spindel Protein-Inhibitoren, wirksamer Metabolite dieser ADCs, Verfahren zur Herstellung dieser ADCs, die Verwendung dieser ADCs zur Behandlung und/oder Prävention von Krankheiten sowie die Verwendung dieser ADCs zur Herstellung von Arzneimitteln zur Behandlung und/oder Prävention von Krankheiten, insbesondere von hyperproliferativen und/oder angiogenen Erkrankungen wie beispielsweise Krebserkrankungen. Solche Behandlungen können als Monotherapie oder auch in Kombination mit anderen Arzneimitteln oder weiteren therapeutischen Maßnahmen erfolgen.

Krebserkrankungen sind die Folge unkontrollierten Zellwachstums verschiedenster Gewebe. In vielen Fällen dringen die neuen Zellen in bestehende Gewebe ein (invasives Wachstum), oder sie metastasieren in entfernte Organe. Krebserkrankungen treten in verschiedensten Organen auf und haben oft gewebespezifische Krankheitsverläufe. Daher beschreibt die Bezeichnung Krebserkrankung als Oberbegriff eine große Gruppe definierter Erkrankungen verschiedener Organe, Gewebe und Zelltypen.

Tumore früher Stadien lassen sich gegebenenfalls durch chirurgische und radiotherapeutische Maßnahmen entfernen. Metastasierte Tumore können im Regelfall durch Chemotherapeutika nur palliativ therapiert werden. Ziel hierbei ist, die optimale Kombination aus einer Verbesserung der Lebensqualität und der Verlängerung der Lebenszeit zu erreichen.

Konjugate von Binderproteinen mit einem oder mehreren Wirkstoffmolekülen sind bekannt, insbesondere in Form sogannter „antibody drug conjugates“ (ADCs), in welchen ein internalisierender, gegen ein Tumor-assoziiertes Antigen gerichteter Antikörper auf kovalente Weise über eine Verknüpfungseinheit ("linker") mit einem cytotoxisch wirkenden Agens verbunden ist. Nach Einschleusung des ADCs in die Tumorzelle und anschließender Spaltung des Konjugats wird dann innerhalb der Tumorzelle entweder das cytotoxische Agens selbst oder ein anderer daraus gebildeter cytotoxisch wirksamer Metabolit freigesetzt, und kann dort seine Wirkung direkt und selektiv entfalten. Auf diesem Wege könnte die Schädigung von normalem Gewebe im Vergleich zu einer konventionellen Chemotherapie der Krebserkrankung in signifikant engeren Grenzen gehalten werden [siehe z.B. J. M. Lambert, *Curr. Opin. Pharmacol.* 5, 543-549 (2005); A. M. Wu und P. D. Senter, *Nat. Biotechnol.* 23, 1137-1146 (2005); P. D. Senter, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 13, 235-244 (2009); L. Ducry und B. Stump, *Bioconjugate Chem.* 21, 5-13 (2010)]. So beschreibt WO2012/171020 ADCs, bei denen mehrere Toxophormoleküle über einen polymeren Linker an einen Antikörper verknüpft sind. Als mögliche

Toxophore werden in WO2012/171020 unter anderem die Substanzen SB 743921, SB 715992 (Ispinesib), MK-0371, AZD8477, AZ3146 und ARRY-520 erwähnt.

Die zuletzt genannten Substanzen sind sogenannte Kinesin Spindel Protein-Inhibitoren. Kinesin Spindel Protein (KSP, auch bekannt als Eg5, HsEg5, KNSL1 oder KIF11) ist ein Kinesin-ähnliches Motorprotein, welches für die Funktion der bipolaren mitotischen Spindel essentiell ist. Die Inhibierung von KSP führt zum mitotischen Stillstand und über einen längeren Zeitraum zur Apoptose (Tao et al., Cancer Cell 2005 Jul 8(1), 39-59). Nach dem Auffinden des ersten zellgängigen KSP-Inhibitors, Monastrol, haben sich KSP-Inhibitoren als eine Klasse neuer Chemotherapeutika etabliert (Mayer et al., Science 286: 971-974, 1999) und sind Gegenstand einer Reihe von Patentanmeldungen (z.B. WO2006/044825; WO2006/002236; WO2005/051922; WO2006/060737; WO03/060064; WO03/040979; und WO03/049527). Da KSP jedoch nur in einem kurzen Zeitraum der Mitosephase seine Wirkung entfaltet, müssen KSP-Inhibitoren in ausreichend hoher Konzentration während dieser ersten Phasen vorliegen.

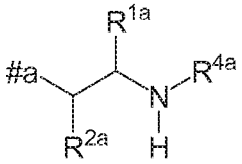
Zusammenfassung der Erfindung

Vor diesem Hintergrund ist es die Aufgabe der vorliegenden Erfindung, Substanzen bereitzustellen, die nach Verabreichung in relativ geringer Konzentration eine apoptotische Wirkung zeigen und damit für die Krebstherapie nützlich sein können.

Zur Lösung dieser Aufgabe stellt die Erfindung Konjugate eines Binders oder Derivats hiervon mit einem oder mehreren Wirkstoffmolekülen bereit, wobei das Wirkstoffmolekül ein Kinesin Spindel Protein-Inhibitor (KSP-Inhibitor) ist, das mit dem Binder über einen Linker L verbunden ist. Der Binder ist vorzugsweise ein Binderprotein oder –peptid, besonders bevorzugt ein humaner, humanisierter oder chimärer monoklonaler Antikörper oder ein Antigen-bindendes Fragment hiervon ist, insbesondere ein anti-TWEAKR-Antikörper oder ein Antigen-bindendes Fragment hiervon oder ein anti-EGFR-Antikörper oder ein Antigen-bindendes Fragment hiervon. Besonders bevorzugt sind ein anti-TWEAKR-Antikörper, der spezifisch an die Aminosäure D in Position 47 (D47) von TWEAKR (SEQ ID NO:169) bindet, insbesondere der anti-TWEAKR-Antikörper TPP-2090, oder die anti-EGFR-Antikörper Cetuximab oder Nimotuzumab.

Die Erfinder haben insbesondere eine Reihe von Möglichkeiten gefunden, wie der Binder an den KSP-Inhibitor gebunden werden kann, um die oben genannte Aufgabe zu lösen.

Erfindungsgemäß können die Kinesin Spindel Protein-Inhibitoren die folgende Substruktur I(sub) aufweisen:



I(sub)

wobei

#a eine Bindung zum Restmolekül darstellt;

R^{1a} H oder $-(CH_2)_{0-3}Z$ darstellt, wobei Z -H, Halogen, $-OY^3$, $-SY^3$, $-NHY^3$, $-CO-NY^1Y^2$, oder $-CO-OY^3$ darstellt,

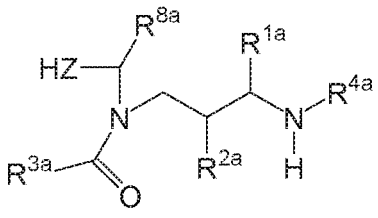
wobei Y^1 und Y^2 unabhängig voneinander H, NH_2, $-(CH_2CH_2O)_{0-3}-(CH_2)_{0-3}Z'$(z.B. $-(CH_2)_{0-3}Z'$), oder $-CH(CH_2W)Z'$ darstellen, und Y^3 H oder $-(CH_2)_{0-3}Z'$ darstellt, wobei Z' H, SO_3H, NH_2, COOH, $-NH-CO-CH_2-CH_2-CH(NH_2)COOH$ oder $-(CO-NH-CHY^4)_{1-3}COOH$ darstellt, wobei W H oder OH darstellt, wobei Y^4 unabhängig voneinander lineares oder verzweigtes, gegebenenfalls mit $-NHCONH_2$ substituiertes, C_{1-6} Alkyl oder gegebenenfalls mit $-NH_2$ substituiertes Aryl oder Benzyl darstellt;

R^{2a} und R^{4a} unabhängig voneinander H, $-CO-CHY^4-NHY^5$ oder $-(CH_2)_{0-3}Z$ darstellen, oder R^{2a} und R^{4a} gemeinsam (unter Bildung eines Pyrrolidinringes) $-CH_2-CHR^{10}-$ oder $-CHR^{10}-CH_2-$ darstellen, wobei R^{10} H, NH_2, COOH, SO_3H, SH, oder OH darstellt, und wobei Z -H, $-OY^3$, $-SY^3$, $-NHY^3$, $-CO-NY^1Y^2$, oder $-CO-OY^3$ darstellt,
wobei Y^1 und Y^2 unabhängig voneinander H, NH_2, oder $-(CH_2)_{0-3}Z'$ darstellen, und Y^3 H oder $-(CH_2)_{0-3}Z'$ darstellt, wobei Z' H, SO_3H, NH_2 oder COOH darstellt;
wobei Y^4 unabhängig voneinander lineares oder verzweigtes, gegebenenfalls mit $-NHCONH_2$ substituiertes, C_{1-6} Alkyl oder gegebenenfalls mit $-NH_2$ substituiertes Aryl oder Benzyl darstellt und Y^5 H oder $-CO-CHY^6-NH_2$ darstellt, wobei Y^6 lineares oder verzweigtes C_{1-6} Alkyl darstellt.

Erfindungsgemäß kann der Kinesin Spindel Protein-Inhibitor durch Substitution eines H-Atoms an R^{1a}, R^{2a}, R^{4a} oder R^{10} über einen Linker mit dem Binder verbunden werden.

Der KSP-Inhibitor, der an diesen Binder gebunden ist, (bzw. die KSP-Inhibitoren, da regelmäßig mehr als ein KSP-Inhibitor an den Binder gebunden wird), ist vorzugsweise eine Verbindung der folgenden Formel (Ia) oder (IIa):

Formel (Ia):



(Ia)

wobei

R^{1a} H, -MOD oder $-(CH_2)_{0-3}Z$ darstellt, wobei Z -H, Halogen, $-OY^3$, $-SY^3$, $-NHY^3$, $-CO-NY^1Y^2$, oder $-CO-OY^3$ darstellt,

mit Y^1 und Y^2 unabhängig voneinander H, NH_2, $-(CH_2CH_2O)_{0-3}-(CH_2)_{0-3}Z$'(z.B. $-(CH_2)_{0-3}Z$'), oder $-CH(CH_2W)Z$' darstellen, und Y^3 H oder $-(CH_2)_{0-3}Z$' darstellt, wobei Z' H, SO_3H, NH_2, COOH, $-NH-CO-CH_2-CH_2-CH(NH_2)COOH$ oder $-(CO-NH-CHY^4)_{1-3}COOH$ darstellt; wobei W H oder OH darstellt,

wobei Y^4 unabhängig voneinander lineares oder verzweigtes, gegebenenfalls mit–$NHCONH_2$ substituiertes, C_{1-6} Alkyl oder gegebenenfalls mit $–NH_2$ substituiertes Aryl oder Benzyl darstellt;

R^{2a} und R^{4a} unabhängig voneinander H, $-CO-CHY^4-NHY^5$ oder $-(CH_2)_{0-3}Z$ darstellen, oder R^{2a} und R^{4a} gemeinsam (unter Bildung eines Pyrrolidinringes) $–CH_2-CHR^{10}-$ oder $-CHR^{10}-CH_2-$ darstellen, wobei R^{10} H, SO_3H, NH_2, COOH, SH, oder OH darstellt;

wobei Z -H, Halogen, $-OY^3$, $-SY^3$, NHY^3, $-CO-NY^1Y^2$, oder $-CO-OY^3$ darstellt,

wobei Y^1 und Y^2 unabhängig voneinander H, NH_2, oder $-(CH_2)_{0-3}Z$' darstellen, und Y^3 H oder $-(CH_2)_{0-3}Z$' darstellt, wobei Z' H, SO_3H, NH_2 oder COOH darstellt;

wobei Y^4 unabhängig voneinander lineares oder verzweigtes, gegebenenfalls mit–$NHCONH_2$ substituiertes, C_{1-6} Alkyl oder gegebenenfalls mit $–NH_2$ substituiertes Aryl oder Benzyl darstellt und Y^5 H oder $–CO-CHY^6-NH_2$ darstellt, wobei Y^6 lineares oder verzweigtes C_{1-6} Alkyl darstellt;

R^{3a} –MOD oder eine gegebenenfalls substituierte Alkyl-, Cycloalkyl-, Aryl-, Heteroaryl-Heteroalkyl- oder Heterocycloalkyl- Gruppe darstellt,

bevorzugt eine C_{1-10}-Alkyl-, C_{6-10}-Aryl- oder C_{6-10}-Aralkyl-, C_{5-10}-Heteroalkyl-, C_{1-10}-Alkyl-O-C_{6-10}-Aryl- oder C_{5-10}-Heterocycloalkyl-Gruppe, die mit 1-3 –OH Gruppen, 1-3 Halogenatomen, 1-3 halogenierten Alkylgruppen (die jeweils 1-3 Halogenatome aufweisen), 1-3 O-Alkyl Gruppen, 1-3 –SH Gruppen, 1-3 -S-Alkyl Gruppen, 1-3 -O-CO-Alkyl Gruppen, 1-3 -O-CO-NH-Alkyl Gruppen, 1-3 -NH-CO-Alkyl Gruppen, 1-3 -NH-CO-NH-Alkyl Gruppen, 1-3 $-S(O)_n$-Alkyl Gruppen, 1-3 $-SO_2$-NH-Alkyl Gruppen, 1-3 -NH-Alkyl Gruppen, 1-3 $-N(Alkyl)_2$ Gruppen, 1-3 $-NH_2$ Gruppen oder 1-3 $-(CH_2)_{0-3}Z$ Gruppen, wobei Z -H, Halogen, $-OY^3$, $-SY^3$, $-NHY^3$, $-CO-NY^1Y^2$, oder $-CO-OY^3$ darstellt, mit Y^1 und Y^2 unabhängig voneinander H, NH_2,

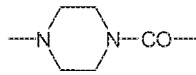
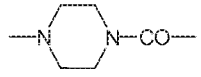
oder -$(CH_2)_{0-3}Z'$ darstellen, und Y^3 H, -$(CH_2)_{0-3}$-CH($NHCOCH_3$)Z',-$(CH_2)_{0-3}$-CH(NH_2)Z', oder -$(CH_2)_{0-3}Z'$ darstellt, wobei Z' H, SO_3H, NH_2 oder COOH darstellt,
substituiert sein kann (wobei „Alkyl" bevorzugt C_{1-10}-Alkyl bedeutet);

R^{8a} C_{1-10}-Alkyl oder –$(CH_2)_{0-2}$-(HZ^2) darstellt, wobei HZ^2 ein 4 bis 7-gliedriger Heterocyclus mit bis zu zwei Heteroatomen ausgewählt aus N, O und S darstellt;

HZ ein mono- oder bicyclischer Heterozyklus ist, der mit einem oder mehreren Substituenten ausgewählt aus Halogen, C_{1-10}-Alkylgruppen, C_{6-10}-Arylgruppen oder C_{6-10}-Aralkylgruppen, die ggf. mit Halogen substituiert sein können, substituiert sein kann;

wobei –MOD –$(NR^{10})_n$-$(G1)_O$-G2-H darstellt, wobei

R^{10} H oder C_1-C_3-Alkyl darstellt;

G1 –NHCO- , -CONH- oder  darstellt (wobei wenn G1 –NHCO- oder  darstellt, R^{10} nicht NH_2 ist);

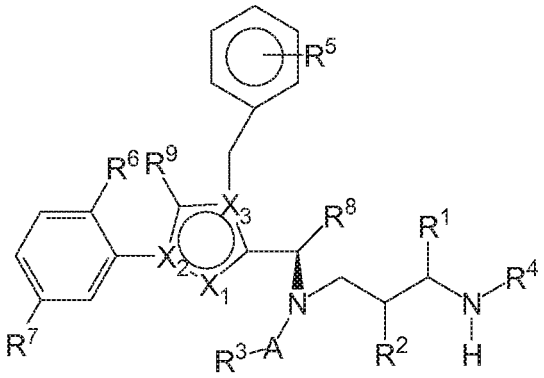
n 0 oder 1 ist;

o 0 oder 1 ist; und

G2 eine geradkettige und/oder verzweigte Kohlenwasserstoffgruppe mit 1 bis 10 Kohlenstoffatomen ist, die einfach oder mehrfach durch eine oder mehrere der Gruppen -O-, -S-, -SO-, SO_2, -NRУ-, -NRУCO-, CONRУ-, -NRУNRУ-, -SO2NRУNRУ-, -CONRУNRУ-, (wobei R^y H, Phenyl, C_1-C_{10}-Alkyl, C_2-C_{10}-Alkenyl, oder C_2-C_{10}-Alkinyl darstellt, die jeweils mit $NHCONH_2$, -COOH, -OH, -NH_2, NH-$CNNH_2$, Sulfonamid, Sulfon, Sulfoxid, oder Sulfonsäure substituiert sein können), -CO-, -CR^x=N-O- (wobei Rx H, C_1-C_3-Alkyl oder Phenyl darstellt) unterbrochen sein kann, wobei die Kohlenwasserstoffkette einschließlich der Seitenketten, sofern vorhanden, mit –$NHCONH_2$, -COOH, -OH, -NH_2, NH-$CNNH_2$, Sulfonamid, Sulfon, Sulfoxid, oder Sulfonsäure substituiert sein kann, wobei die Gruppe –MOD vorzugsweise zumindest eine Gruppe –COOH aufweist;

wobei der Kinesin Spindel Protein-Inhibitor durch Substitution eines H-Atoms an R^{1a}, R^{2a}, R^{3a}, R^{4a}, R^{8a} oder R^{10} oder ggf. über einen der Substituenten von HZ, insbesondere über R^{1a}, R^{2a}, R^{3a}, R^{4a} oder R^{10}, mit dem Linker verbunden ist,
sowie ihre Salze, Solvate und Salze der Solvate.

Formel (IIa):



(IIa)

wobei

X_1 N, X_2 N und X_3 C darstellt; oder

X_1 N, X_2 C und X_3 N darstellt; oder

X_1 CH oder CF, X_2 C und X_3 N darstellt; oder

X_1 NH, X_2 C und X_3 C darstellt; oder

X_1 CH, X_2 N und X_3 C darstellt;

(wobei X_1 CH, X_2 C und X_3 N bevorzugt ist);

R^1 H, –L-#1, –MOD oder $-(CH_2)_{0-3}Z$ darstellt, wobei Z -H, $-NHY^3$, $-OY^3$, $-SY^3$, Halogen, $-CO-NY^1Y^2$, oder $-CO-OY^3$ darstellt,

wobei Y^1 und Y^2 unabhängig voneinander H, NH_2, $-(CH_2CH_2O)_{0-3}-(CH_2)_{0-3}Z$'(z.B. $-(CH_2)_{0-3}Z$'), oder $-CH(CH_2W)Z$' darstellen, und Y^3 H oder $-(CH_2)_{0-3}Z$' darstellt, wobei Z' H, NH_2, SO_3H, COOH, $-NH-CO-CH_2-CH_2-CH(NH_2)COOH$ oder $-(CO-NH-CHY^4)_{1-3}COOH$ darstellt; wobei W H oder OH darstellt,

wobei Y^4 unabhängig voneinander lineares oder verzweigtes, gegebenenfalls mit–$NHCONH_2$ substituiertes, C_{1-6} Alkyl oder gegebenenfalls mit –NH_2 substituiertes Aryl oder Benzyl darstellt;

R^2 –L-#1, H, -MOD, $-CO-CHY^4-NHY^5$ oder $-(CH_2)_{0-3}Z$ darstellt, oder R^2 und R^4 gemeinsam (unter Bildung eines Pyrrolidinringes) $–CH_2-CHR^{10}-$ oder $-CHR^{10}-CH_2-$ darstellen, wobei R^{10} L-#1, H, NH_2, SO_3H, COOH, SH, oder OH darstellt;

wobei Z -H, Halogen, $-OY^3$, $-SY^3$, NHY^3, $-CO-NY^1Y^2$, oder $-CO-OY^3$ darstellt,

wobei Y^1 und Y^2 unabhängig voneinander H, NH_2, oder $-(CH_2)_{0-3}Z$' darstellen, und Y^3 H oder $-(CH_2)_{0-3}Z$' darstellt, wobei Z' H, SO_3H, NH_2 oder COOH darstellt;

wobei Y^4 unabhängig voneinander lineares oder verzweigtes, gegebenenfalls mit–$NHCONH_2$ substituiertes, C_{1-6} Alkyl oder gegebenenfalls mit –NH_2 substituiertes Aryl oder Benzyl darstellt und Y^5 H oder $–CO-CHY^6-NH_2$ darstellt, wobei Y^6 lineares oder verzweigtes C_{1-6} Alkyl darstellt;

R^4 –L-#1, H, -CO-CHY^4-NHY^5 oder -$(CH_2)_{0-3}$Z darstellt,
wobei Z -H, Halogen, -OY^3, -SY^3, NHY^3, -CO-NY^{1}Y^2, oder -CO-OY^3 darstellt,
wobei Y^1 und Y^2 unabhängig voneinander H, NH_2, oder -$(CH_2)_{0-3}$Z‘ darstellen, und Y^3 H oder -$(CH_2)_{0-3}$Z‘ darstellt, wobei Z‘ H, SO_3H, NH_2 oder COOH darstellt;
wobei Y^4 unabhängig voneinander lineares oder verzweigtes, gegebenenfalls mit–$NHCONH_2$ substituiertes, C_{1-6} Alkyl oder gegebenenfalls mit –NH_2 substituiertes Aryl oder Benzyl darstellt und Y^5 H oder –CO-CHY^6-NH_2 darstellt, wobei Y^6 lineares oder verzweigtes C_{1-6} Alkyl darstellt;
oder R^2 und R^4 gemeinsam (unter Bildung eines Pyrrolidinringes) –CH_2-CHR^{10}- oder -CHR^{10}-CH_2- darstellen, wobei R^{10} L-#1, H, NH_2, SO_3H, COOH, SH, oder OH darstellt;

A CO, SO, SO_2, SO_2NH oder CNNH darstellt;

R^3 –L-#1, -MOD, oder eine gegebenenfalls substituierte Alkyl-, Cycloalkyl-, Aryl-, Heteroaryl-Heteroalkyl-, Heterocycloalkyl- Gruppe darstellt, bevorzugt –L-#1 oder eine C_{1-10}-Alkyl-, C_{6-10}-Aryl- oder C_{6-10}-Aralkyl-, C_{5-10}-Heteroalkyl-, C_{1-10}-Alkyl-O-C_{6-10}-Aryl- oder C_{5-10}-Heterocycloalkyl-Gruppe, die mit 1-3 –OH Gruppen, 1-3 Halogenatomen, 1-3 halogenierten Alkylgruppen (die jeweils 1-3 Halogenatome aufweisen), 1-3 O-Alkyl Gruppen, 1-3 –SH Gruppen, 1-3 -S-Alkyl Gruppen, 1-3 -O-CO-Alkyl Gruppen, 1-3 -O-CO-NH-Alkyl Gruppen, 1-3 -NH-CO-Alkyl Gruppen, 1-3 -NH-CO-NH-Alkyl Gruppen, 1-3 -$S(O)_n$-Alkyl Gruppen, 1-3 -SO_2-NH-Alkyl Gruppen, 1-3 -NH-Alkyl Gruppen, 1-3 -$N(Alkyl)_2$ Gruppen, 1-3 -NH_2 Gruppen oder 1-3 -$(CH_2)_{0-3}$Z Gruppen, wobei Z -H, Halogen, -OY^3, -SY^3, -NHY^3, -CO-NY^{1}Y^2, oder -CO-OY^3 darstellt, mit Y^1 und Y^2 unabhängig voneinander H, NH_2, oder -$(CH_2)_{0-3}$Z‘ darstellen, und Y^3 H, -$(CH_2)_{0-3}$-CH($NHCOCH_3$)Z‘,-$(CH_2)_{0-3}$-CH(NH_2)Z‘, oder -$(CH_2)_{0-3}$Z‘ darstellt, wobei Z‘ H, SO_3H, NH_2 oder COOH darstellt,
substituiert sein kann (wobei „Alkyl“ bevorzugt C_{1-10}-Alkyl bedeutet);

R^5 –L-#1, H, NH_2, NO_2, Halogen (insbesondere F, Cl, Br), -CN, CF_3, -OCF_3, -CH_2F, -CH_2F, SH oder -$(CH_2)_{0-3}$Z darstellt, wobei Z -H, -OY^3, -SY^3, Halogen, NHY^3, -CO-NY^{1}Y^2, oder -CO-OY^3 darstellt,
wobei Y^1 und Y^2 unabhängig voneinander H, NH_2, oder -$(CH_2)_{0-3}$Z‘ darstellen, und Y^3 H oder -$(CH_2)_{0-3}$Z‘ darstellt, wobei Z‘ H, SO_3H, NH_2 oder COOH darstellt;
darstellt,

R^6 und R^7 unabhängig voneinander H, Cyano, (ggf. fluoriertes) C_{1-10}-Alkyl, (ggf. fluoriertes) C_{2-10}-Alkenyl, (ggf. fluoriertes) C_{2-10}-Alkinyl, Hydroxy, NO_2, NH_2, COOH oder Halogen (insbesondere F, Cl, Br) darstellen,

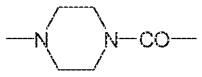
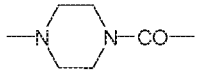
R^8 (ggf. fluoriertes) C_{1-10}-Alkyl, (ggf. fluoriertes) C_{2-10}-Alkenyl, (ggf. fluoriertes) C_{2-10}-Alkinyl, (ggf. fluoriertes) C_{4-10}-Cycloalkyl oder–$(CH_2)_{0-2}$-(HZ^2) darstellt, wobei HZ^2 ein 4 bis 7-gliedriger Heterocyclus mit bis zu zwei Heteroatomen ausgewählt aus N, O und S darstellt, wobei jede dieser Gruppen mit –OH, CO_2H or NH_2 oder –L-#1 substituiert sein kann;

wobei einer oder keiner der Substituenten R^1, R^2, R^3, R^4 R^5, R^8 und R^{10} –L-#1 darstellt bzw. (im Falle von R^8) aufweist,

L für den Linker steht und #1 für die Bindung zum Binder bzw. Derivat hiervon steht,

wobei –MOD $–(NR^{10})_n$-$(G1)_O$-G2-H darstellt, wobei

R^{10} H oder C_1-C_3-Alkyl darstellt;

G1 –NHCO- , -CONH- oder  darstellt (wobei wenn G1 –NHCO- oder  darstellt, R^{10} nicht NH_2 ist);

n 0 oder 1 ist;

o 0 oder 1 ist; und

G2 eine geradkettige und/oder verzweigte Kohlenwasserstoffgruppe mit 1 bis 10 Kohlenstoffatomen ist, die einfach oder mehrfach durch eine oder mehrere der Gruppen -O-, -S-, -SO-, SO_2, -NRУ-, -NRУCO-, CONRУ-, -NRУNRУ-, -SO2NRУNRУ-, -CONRУNRУ-, (wobei R^y H, Phenyl, C_1-C_{10}-Alkyl, C_2-C_{10}-Alkenyl, oder C_2-C_{10}-Alkinyl darstellt, die jeweils mit $NHCONH_2$, -COOH, -OH, $-NH_2$, NH-$CNNH_2$, Sulfonamid, Sulfon, Sulfoxid, oder Sulfonsäure substituiert sein können), -CO-, -CR^x=N-O- (wobei Rx H, C_1-C_3-Alkyl oder Phenyl darstellt) unterbrochen sein kann, wobei die Kohlenwasserstoffkette einschließlich der Seitenketten, sofern vorhanden, mit –$NHCONH_2$, -COOH, -OH, $-NH_2$, NH-$CNNH_2$, Sulfonamid, Sulfon, Sulfoxid, oder Sulfonsäure substituiert sein kann, wobei die Gruppe –MOD vorzugsweise zumindest eine Gruppe –COOH aufweist;

sowie ihre Salze, Solvate und Salze der Solvate.

Die erfindungsgemäßen Konjugate können chemisch labile Linker, enzymatisch labile Linker oder stabile Linker aufweisen. Besonders bevorzugt sind stabile Linker und durch Cathepsin spaltbare Linker.

Die Erfindung stellt ferner bereit Verfahren zur Herstellung der erfindungsgemäßen Konjugate sowie Vorstufen und Intermediate zur Herstellung.

Die Herstellung der erfindungsgemäßen Konjugate umfasst regelmäßig die folgenden Schritte:

(i) Herstellen einer ggf. Schutzgruppen tragenden Linkervorstufe mit einer reaktiven Gruppe, die an den Binder koppeln kann;

(ii) Konjugieren der Linkervorstufe an das ggf. Schutzgruppen tragende Derivat eines niedermolekularen KSP-Inhibitor (vorzugsweise ein KSP-Inhibitor mit der Substruktur I(sub), besonders bevorzugt mit Formel (Ia)und insbesondere mit Formel (IIa), wobei in diesen Formeln eine Bindung an einen Linker noch nicht vorliegt), wobei ein ggf. Schutzgruppen tragendes reaktives KSP-Inhibitor-Linker-Konjugat erhalten wird;

(iii) Abspaltung der ggf. vorhandenen Schutzgruppen im KSP-Inhibitor-Linker-Konjugat und

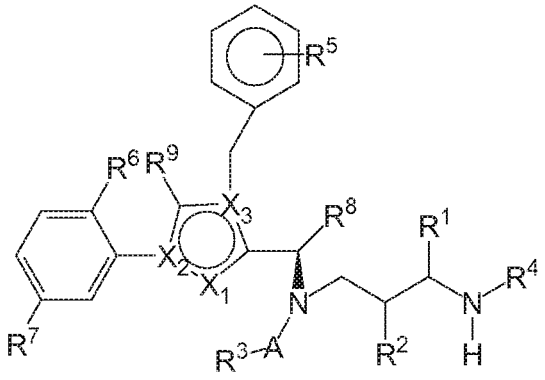
(iv) Konjugieren des Binders an das KSP-Inhibitor-Linker-Konjugat, wobei das erfindungsgemäße Binder-KSP-Inhibitor-Konjugat erhalten wird.

Die Anknüpfung der reaktiven Gruppe kann auch nach Aufbau einer ggf. geschützt vorliegenden KSP-Inhibitor-Linkervorstufe Konjugats erfolgen.

In Abhängigkeit vom Linker können Succinimid-verknüfte ADCs nach der Konjugation nach Schema 26 in die offenkettigenen Bernsteinsäureamide überführt werden, die ein vorteilhaftes Stabilitätsprofil aufweisen.

Wie oben erläutert kann das Konjugieren der Linkervorstufe an einen niedermolekularen KSP-Inhibitor durch Substitution eines Wasserstoffatoms an R^{1a}, R^{2a}, R^{4a} oder R^{10} in Substruktur I(sub), R^{1a}, R^{2a}, R^{3a}, R^{4a}, R^{8a} oder R^{10} in Formel (Ia), oder R^1, R^2, R^3, R^4, R^5, R^8 oder R^{10} in Formel (IIa) durch den Linker erfolgen. In den Syntheseschritten vor der Konjugation können ggf. vorhandene funktionelle Gruppen auch in geschützter Form vorliegen. Vor dem Konjugationsschritt werden diese Schutzgruppen nach bekannten Methoden der Peptidchemie entfernt. Die Konjugation kann chemisch auf verschiedenen Wegen erfolgen, wie in den Schemata 7 bis 31in den Beispielen exemplarisch dargelegt. Es ist insbesondere möglich, den niedermolekularen KSP-Inhibitor für die Konjugation an den Linker ggf. zu modifizieren, z.B. durch Einführen von Schutzgruppen oder Abgangsgruppen zur einfacheren Substituierung.

Insbesondere stellt die Erfindung neue niedermolekulare KSP-Inhibitoren bereit, die ggf. an einen Binder konjugiert werden können. Diese KSP-Inhibitoren bzw. ihre Binder-Konjugate weisen die folgende allgemeine Formel (IIIa) auf:



(IIIa)

wobei

X_1 N, X_2 N und X_3 C darstellt; oder

X_1 N, X_2 C und X_3 N darstellt; oder

X_1 CH oder CF, X_2 C und X_3 N darstellt; oder

X_1 NH, X_2 C und X_3 C darstellt; oder

X_1 CH, X_2 N und X_3 C darstellt;

(wobei X_1 CH, X_2 C und X_3 N bevorzugt ist);

R^1 H, –L-BINDER, –MOD oder $-(CH_2)_{0-3}Z$ darstellt, wobei Z -H, $-NHY^3$, $-OY^3$, $-SY^3$, Halogen, $-CO-NY^1Y^2$, oder $-CO-OY^3$ darstellt,

wobei Y^1 und Y^2 unabhängig voneinander H, NH_2, $-(CH_2CH_2O)_{0-3}-(CH_2)_{0-3}Z'$(z.B. $-(CH_2)_{0-3}Z'$), oder $-CH(CH_2W)Z'$ darstellen, und Y^3 H oder $-(CH_2)_{0-3}Z'$ darstellt, wobei Z' H, NH_2, SO_3H, COOH, $-NH-CO-CH_2-CH_2-CH(NH_2)COOH$ oder $-(CO-NH-CHY^4)_{1-3}COOH$ darstellt; wobei W H oder OH darstellt,

wobei Y^4 unabhängig voneinander lineares oder verzweigtes, gegebenenfalls mit–$NHCONH_2$ substituiertes, C_{1-6} Alkyl oder gegebenenfalls mit $–NH_2$ substituiertes Aryl oder Benzyl darstellt;

R^2 –L-BINDER, H, -MOD, $-CO-CHY^4-NHY^5$ oder $-(CH_2)_{0-3}Z$ darstellt, oder R^2 und R^4 gemeinsam (unter Bildung eines Pyrrolidinringes) $–CH_2-CHR^{10}-$ oder $-CHR^{10}-CH_2-$ darstellen, wobei R^{10} L-#1, H, NH_2, SO_3H, COOH, SH, oder OH darstellt;

wobei Z -H, Halogen, $-OY^3$, $-SY^3$, NHY^3, $-CO-NY^1Y^2$, oder $-CO-OY^3$ darstellt,

wobei Y^1 und Y^2 unabhängig voneinander H, NH_2, oder $-(CH_2)_{0-3}Z'$ darstellen, und Y^3 H oder $-(CH_2)_{0-3}Z'$ darstellt, wobei Z' H, SO_3H, NH_2 oder COOH darstellt;

wobei Y^4 unabhängig voneinander lineares oder verzweigtes, gegebenenfalls mit–$NHCONH_2$ substituiertes, C_{1-6} Alkyl oder gegebenenfalls mit $–NH_2$ substituiertes Aryl oder Benzyl darstellt und Y^5 H oder $–CO-CHY^6-NH_2$ darstellt, wobei Y^6 lineares oder verzweigtes C_{1-6} Alkyl darstellt;

R^4 –L-BINDER, H, $-CO-CHY^4-NHY^5$ oder $-(CH_2)_{0-3}Z$ darstellt,

wobei Z -H, Halogen, -OY^3, -SY^3, NHY^3, -CO-NY^1Y^2, oder -CO-OY^3 darstellt,
wobei Y^1 und Y^2 unabhängig voneinander H, NH_2, oder -$(CH_2)_{0-3}Z$' darstellen, und Y^3 H oder -$(CH_2)_{0-3}Z$' darstellt, wobei Z' H, SO_3H, NH_2 oder COOH darstellt;
wobei Y^4 unabhängig voneinander lineares oder verzweigtes, gegebenenfalls mit–$NHCONH_2$ substituiertes, C_{1-6} Alkyl oder gegebenenfalls mit –NH_2 substituiertes Aryl oder Benzyl darstellt und Y^5 H oder –CO-CHY^6-NH_2 darstellt, wobei Y^6 lineares oder verzweigtes C_{1-6} Alkyl darstellt;
oder R^2 und R^4 gemeinsam (unter Bildung eines Pyrrolidinringes) –CH_2-CHR^{10}- oder -CHR^{10}-CH_2- darstellen, wobei R^{10} –L-BINDER, H, NH_2, SO_3H, COOH, SH, oder OH darstellt;

A CO, SO, SO_2, SO_2NH oder CNNH darstellt;

R^3 –L-BINDER, -MOD, oder eine gegebenenfalls substituierte Alkyl-, Cycloalkyl-, Aryl-, Heteroaryl- Heteroalkyl-, Heterocycloalkyl- Gruppe darstellt, bevorzugt –L-BINDER oder eine C_{1-10}-Alkyl-, C_{6-10}-Aryl- oder C_{6-10}-Aralkyl-, C_{5-10}-Heteroalkyl-, C_{1-10}-Alkyl-O-C_{6-10}-Aryl- oder C_{5-10}-Heterocycloalkyl-Gruppe, die mit 1-3 –OH Gruppen, 1-3 Halogenatomen, 1-3 halogenierten Alkylgruppen (die jeweils 1-3 Halogenatome aufweisen), 1-3 O-Alkyl Gruppen, 1-3 –SH Gruppen, 1-3 -S-Alkyl Gruppen, 1-3 -O-CO-Alkyl Gruppen, 1-3 -O-CO-NH-Alkyl Gruppen, 1-3 -NH-CO-Alkyl Gruppen, 1-3 -NH-CO-NH-Alkyl Gruppen, 1-3 -$S(O)_n$-Alkyl Gruppen, 1-3 -SO_2-NH-Alkyl Gruppen, 1-3 -NH-Alkyl Gruppen, 1-3 -$N(Alkyl)_2$ Gruppen, 1-3 -NH_2 Gruppen oder 1-3 -$(CH_2)_{0-3}Z$ Gruppen, wobei Z -H, Halogen, -OY^3, -SY^3, -NHY^3, -CO-NY^1Y^2, oder -CO-OY^3 darstellt, mit Y^1 und Y^2 unabhängig voneinander H, NH_2, oder -$(CH_2)_{0-3}Z$' darstellen, und Y^3 H, -$(CH_2)_{0-3}$-$CH(NHCOCH_3)Z$',-$(CH_2)_{0-3}$-$CH(NH_2)Z$', oder -$(CH_2)_{0-3}Z$' darstellt, wobei Z' H, SO_3H, NH_2 oder COOH darstellt,
substituiert sein kann (wobei „Alkyl" bevorzugt C_{1-10}-Alkyl bedeutet);

R^5 –L-BINDER, H, NH_2, NO_2, Halogen (insbesondere F, Cl, Br), -CN, CF_3, -OCF_3, -CH_2F, -CH_2F, SH oder -$(CH_2)_{0-3}Z$ darstellt, wobei Z -H, -OY^3, -SY^3, Halogen, NHY^3, -CO-NY^1Y^2, oder -CO-OY^3 darstellt,
wobei Y^1 und Y^2 unabhängig voneinander H, NH_2, oder -$(CH_2)_{0-3}Z$' darstellen, und Y^3 H oder -$(CH_2)_{0-3}Z$' darstellt, wobei Z' H, SO_3H, NH_2 oder COOH darstellt;
darstellt,

R^8 (ggf. fluoriertes) C_{1-10}-Alkyl, (ggf. fluoriertes) C_{2-10}-Alkenyl, (ggf. fluoriertes) C_{2-10}-Alkinyl, (ggf. fluoriertes) C_{4-10}-Cycloalkyl oder –$(CH_2)_{0-2}$-(HZ^2) darstellt, wobei HZ^2 ein 4 bis 7-gliedriger Heterocyclus mit bis zu zwei Heteroatomen ausgewählt aus N, O und S darstellt (vorzugsweise Oxetan), wobei jede dieser Gruppen mit –OH, CO_2H or NH_2 oder –L-BINDER substituiert sein kann;

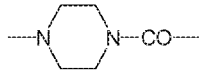
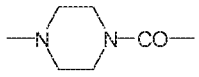
wobei L für einen Linker steht und BINDER für Binder bzw. Derivat hiervon steht, wobei der Binder ggf. an mehrere Wirkstoffmoleküle gebunden sein kann,

wobei maximal ein Vertreter von R^1, R^2, R^3 R^4, R^5, R^8 und R^{10} -L-Binder darstellt;

R^6 und R^7 unabhängig voneinander H, Cyano, (ggf. fluoriertes) C_{1-10}-Alkyl, (ggf. fluoriertes) C_{2-10}-Alkenyl, (ggf. fluoriertes) C_{2-10}-Alkinyl, Hydroxy, NO_2, NH_2, COOH oder Halogen (insbesondere F, Cl, Br) darstellen,

wobei –MOD $-(NR^{10})_n-(G1)_O$-G2-H darstellt, wobei

R^{10} H oder C_1-C_3-Alkyl darstellt;

G1 –NHCO- , -CONH- oder  darstellt (wobei wenn G1 –NHCO- oder  darstellt, R^{10} nicht NH_2 ist);

n 0 oder 1 ist;

o 0 oder 1 ist; und

G2 eine geradkettige und/oder verzweigte Kohlenwasserstoffgruppe mit 1 bis 10 Kohlenstoffatomen ist, die einfach oder mehrfach durch eine oder mehrere der Gruppen -O-, -S-, -SO-, SO_2, $-NR^y$-, $-NR^yCO$-, $CONR^y$-, $-NR^yNR^y$-, $-SO2NR^yNR^y$-, $-CONR^yNR^y$-, (wobei R^y H, Phenyl, C_1-C_{10}-Alkyl, C_2-C_{10}-Alkenyl, oder C_2-C_{10}-Alkinyl darstellt, die jeweils mit $NHCONH_2$, -COOH, -OH, $-NH_2$, NH-$CNNH_2$, Sulfonamid, Sulfon, Sulfoxid, oder Sulfonsäure substituiert sein können), -CO-, $-CR^x$=N-O- (wobei Rx H, C_1-C_3-Alkyl oder Phenyl darstellt) unterbrochen sein kann, wobei die Kohlenwasserstoffkette einschließlich der Seitenketten, sofern vorhanden, mit $–NHCONH_2$, -COOH, -OH, $-NH_2$, NH-$CNNH_2$, Sulfonamid, Sulfon, Sulfoxid, oder Sulfonsäure substituiert sein kann, wobei die Gruppe –MOD vorzugsweise zumindest eine Gruppe –COOH aufweist;

sowie ihre Salze, Solvate und Salze der Solvate.

Beschreibung der Figuren

Figur 1: Alignment der TWEAKR-cysteinreichen Domäne (Aminosäure 34 bis 68) von verschienden Spezies. (Die Zahlen zeigen die Aminosäureposition in Vollängenkonstrukten inklusive der Signalsequenzen; SEQ ID NO: 169).

Figur 2: A – Schematisches Diagram der Struktur von TWEAKR (SEQ ID NO: 169). Das Diagramm zeigt die extrazelluläre Domäne (Aminosäuren 28-80) (SEQ ID NO: 168) einschließlich der cysteinreichen Domäne (36-67), der Transmembrandomäne – TM (81-101) und der intrazellulären Domäne (102-129). TPP-2202 – die vollständige Ektodomäne (28-80), an die Fc-Domäne von hIgG1 fusioniert. TPP-2203 – extrazelluläre Domäne mit N- und C-terminaler Verkürzung (34-68), fusioniert an die Fc-Domäne von hIgG1. Disulfidbrücken Cys36-Cys49, Cys52-Cys67 und Cys55-Cys64 sind durch schwarze Balken angezeigt. N-terminal erhält TPP-2203 zwei Aminosäuren und C-terminal eine Aminosäure mehr verglichen mit der reinen cysteinreichen Domäne, um eine anständige Faltung zu gewährleisten. TPP-1984 – extrazelluläre Domäne mit C-terminaler Verkürzung (28-68), an einen HIS6-Tag fusioniert. Alle drei Konstrukte zeigen eine vergleichbare Bindung an die erfindungsgemäßen Antikörper und PDL-192 (TPP-1104). P4A8 (TPP-1324) bindet nur an die Vollängen-extrazelluläre Domäne (TPP-2202).

B – Aminosäuresequenz der extrazellulären Domäne: Es ist veröffentlicht worden, dass die Aminosäure 64 essenziell für die TWEAK-Ligandenbindung ist; und die Aminosäure 47 ist essentiell für die Bindung der erfindungsgemäßen Antikörper, wie hier bestimmt wurde.

Figur 3: Interaktion der TWEAKR-Ektodomäne mit Antikörpern und Referenzantikörpern. Gezeigt ist das Ergebnis eines ELISA mit TWEAKR-Fc-Fusionsproteinbeschichtung (TPP-2202, 1µg/ml) und mit 0,08 µg/ml (offene Balken) und 0,03 µ/ml (ausgefüllte Balken) biotinyliertem IgG als löslichen Bindungspartner. Der Nachweis wurde mit Streptavidin-HRP und Amplex-Red-Substrat vorgenommen. Y ist die „ELISA-Signalintensität [Rfu]"; X sind die „getesteten Antikörperkonstrukte": a ist "TPP-2090"; b ist "TPP-2084"; c ist "PDL-192(TPP-1104)"; d ist "P4A8(TPP-1324)"; e ist "P3G5(TPP-2195)"; f ist "136.1(TPP-2194)"; h ist "ITEM1"; i ist "ITEM4"; j ist eine Mausisotypkontrolle; k ist eine humane Isotypkontrolle. Alle untersuchten Antikörper zeigen eine gesättigte Bindung mit einer Konzentration von 80ng/ml.

Figur 4: Interaktion der cysteinreichen Domäne von TWEAKR mit erfindungsgemäßen Antikörpern und Referenzantikörpern. Gezeigt ist das Ergebnis eines ELISA mit TWEAKR (34-68)-Fc-Fusionsproteinbeschichtung (TPP-2203, 1µg/ml) und 0.08 µg/ml (offene Balken) bzw. 0,3 µ/ml (ausgefüllte Balken) biotilyniertem IgG als löslichen Bindungspartner. Der Nachweis wurde mit Streptavidin-HRP und Amplex-Red-Substrat vorgenommen. X sind die „getesteten Antikörperkonstrukte": a ist "TPP-2090"; b ist "TPP-2084"; c ist "PDL-192(TPP-1104)"; d ist "P4A8(TPP-1324)"; e ist "P3G5(TPP-2195)"; f ist "136.1(TPP-2194)"; h ist "ITEM1"; i ist "ITEM4"; j ist eine Mausisotypkontrolle; k ist eine human Isotypkontrolle. Alle untersuchten Antikörper zeigen eine gesättigte Bindung mit einer Konzentration von 80ng/ml.

Figur 5: Interaktion von TWEAKR (28-68) mit erfindungsgemäßen Antikörpern und Referenzantikörpern. Gezeigt ist das Ergebnis eines ELISA mit TWEAKR (28-68)-HIS-Beschichtung

(TTP-1984, 1µg/ml) und 0.08 µg/ml (offene Balken) bzw. 0,3 µ/ml (ausgefüllte Balken) biotilyniertem IgG als löslichen Bindungspartner. Der Nachweis wurde mit Streptavidin-HRP und Amplex-Red-Substrat vorgenommen. X sind die „getesteten Antikörperkonstrukte": a ist "TPP-2090"; b ist "TPP-2084"; c ist "PDL-192(TPP-1104)"; d ist "P4A8(TPP-1324)"; e ist "P3G5(TPP-2195)"; f ist "136.1(TPP-2194)"; h ist "ITEM1"; i ist "ITEM4"; j ist eine Mausisotypkontrolle; k ist eine humane Isotypkontrolle. Alle untersuchten Antikörper zeigen eine gesättigte Bindung mit einer Konzentration von 80ng/ml.

Figur 6: A – Alaninscan der cysteinreichen Domäne. Muteine von TWEAKR(34-68)-Fc wurden auf PDL-192(TPP-1104) (X)- und TPP-2090 (Y)-Bindung analysiert. S37A-, R38A-, S40A-, W42A-, S43A-, D45A-, D47A-, K48A-, D51A-, S54A-, R56A-, R58A-, P59A-, H60A-, S61A-, D62A-, F63A- und L65A-Muteine wurden in HEK293-Zellen exprimiert (schwarze Rauten). PFL192(TPP-1104) und TPP-2090 wurden beschichtet (1µg/ml) und ein 8-facher verdünnter Überstand der HEK293-Fermentationsbrühe wurde für die TWEAKR-Proteinbindung hinzugegeben. X ist die „ELISA-Intensität der PDL-192/TTP-1104)-Interaktion [Rfu]", Y ist die „ELISA-Intensität der TPP-2090-Interaktion [Rfu]". TPP-2090 (Y) zeigt verschlechterte Bindung für das D74A-TWEAKR-Mutein (geschlossene Box), und PDL-192(TPP-1104) (X) zeigt eine verschlechterte Bindung an R56A (gepunktete Box).

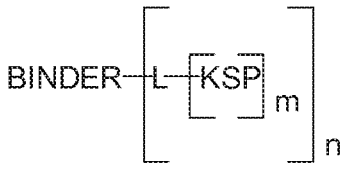
B – Y ist die „%-Bindung normalisiert durch das Wildtypbindungssignal [%]", 1 ist „TPP-2090"; 2, ist „PDL-192(TPP-1104); 3 ist „P4A8(TPP-1324)". (1µg/ml), die TWEAKR-Variante wurde bei 250ng/ml hinzugegeben, der Nachweis fand über Anti-HIS HRP statt. TTP-2090 zeigt weniger als 5%-Bindung im Vergleich zum Wildtypkonstrukt.

Figur 7: NMR-Struktur der TWEAKR-Ektodomäne, wie von Pellegrini et al. publiziert (FEBS 280:1818-1829). Die TWEAK-Bindung hängt von L46 (Pellegrini et al.) ab, die TTP-2090- Binung hängt von D47 ab, und PDL-192 bindet an R56. PDL-192 bindet gegenüber der TWEAK-Ligandenbindungsstelle, TPP-2090 bindet direkt an die TWEAK-Ligandenstelle.

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

Die Erfindung stellt Konjugate eines Binders oder Derivats hiervon mit einem oder mehreren Wirkstoffmolekülen bereit, wobei das Wirkstoffmolekül ein Kinesin Spindel Protein-Inhibitor (KSP-Inhibitor) ist, das mit dem Binder über einen Linker L verbunden ist.

Das erfindungsgemäße Konjugat kann durch die allgemeine Formel



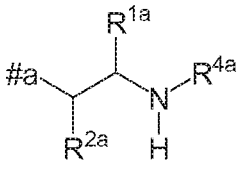
dargestellt werden, wobei BINDER für den Binder, vorzugsweise einen Antikörper, L für den Linker, KSP für den KSP-Inhibitor, m für eine Zahl von 1 bis 2, vorzugsweise 1, und n für eine Zahl von 1 bis 50, vorzugsweise 1,2 bis 20 und besonders bevorzugt 2 bis 8 steht. Hierbei ist m die Zahl der KSP-Inhibitoren pro Linker und n ein Mittelwert der Anzahl an KSP-Inhibitor-Linker-Konjugate pro BINDER. Die Summe aller KSP, die im Konjugat vorliegen, ist also das Produkt von m und n. KSP-L weist vorzugsweise die oben aufgeführte Formel (I) oder (II) auf. Vorzugsweise ist der Binder ein Binderpeptid oder –protein wie z.B. ein Antikörper. Weiterhin ist es bevorzugt, dass der Linker an verschiedene Aminosäuren des Binderpeptids oder –proteins bzw. Derivats hiervon gebunden ist. Besonders bevorzugt ist eine Bindung an unterschiedliche Cysteinreste des Binders.

Im Folgenden werden erfindungsgemäß verwendbare Binder, erfindungsgemäß verwendbare KSP-Inhibitoren sowie erfindungsgemäß verwendbare Linker beschrieben, die ohne Einschränkung in Kombination verwendet werden können. Insbesondere können die jeweils als bevorzugt bzw. besonders bevorzugt dargestellten Binder in Kombination mit den jeweils als bevorzugt bzw. besonders bevorzugt dargestellten KSP-Inhibitoren, ggf. in Kombination mit den jeweils als bevorzugt bzw. besonders bevorzugt dargestellten Linkern verwendet werden.

KSP-Inhibitoren und deren Binderkonjugate

Niedermolekulare KSP-Inhibitoren sind z.B. aus WO2006/044825; WO2006/002236; WO2005/051922; WO2006/060737; WO03/060064; WO03/040979; und WO03/049527 bekannt.

KSP-Inhibitoren weisen regelmäßig die folgende Substruktur I(sub) auf:



I(sub)

wobei

#a eine Bindung zum Restmolekül darstellt;

R^{1a} H oder $-(CH_2)_{0-3}Z$ darstellt, wobei Z -H, Halogen, NHY^3, $-CO-NY^1Y^2$, oder $-CO-OY^3$ darstellt,

mit Y^1 und Y^2 unabhängig voneinander H, NH_2, $-(CH_2CH_2O)_{0-3}-(CH_2)_{0-3}Z'$ (z.B. $-(CH_2)_{0-3}Z'$), oder $-CH(CH_2W)Z'$ darstellen, und Y^3 H oder $-(CH_2)_{0-3}Z'$ darstellt, wobei Z' H, SO_3H, NH_2 COOH, $-NH-CO-CH_2-CH_2-CH(NH_2)COOH$ oder $-(CO-NH-CHY^4)_{1-3}COOH$ darstellt; wobei W H oder OH darstellt,

wobei Y^4 unabhängig voneinander lineares oder verzweigtes, gegebenenfalls mit $-NHCONH_2$ substituiertes, C_{1-6} Alkyl oder gegebenenfalls mit $-NH_2$ substituiertes Aryl oder Benzyl darstellt;

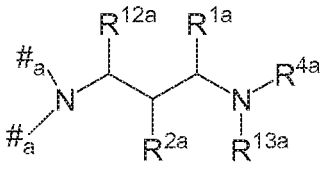
R^{2a} und R^{4a} unabhängig voneinander H, $-CO-CHY^4-NHY^5$ oder $-(CH_2)_{0-3}Z$ darstellen, oder R^{2a} und R^{4a} gemeinsam (unter Bildung eines Pyrrolidinringes) $-CH_2-CHR^{10}-$ oder $-CHR^{10}-CH_2-$ darstellen, wobei R^{10} H, NH_2, COOH, SO_3H, SH, oder OH darstellt;

wobei Z -H, $-OY^3$, $-SY^3$, NHY^3, $-CO-NY^1Y^2$, oder $-CO-OY^3$ darstellt,

wobei Y^1 und Y^2 unabhängig voneinander H, NH^2, oder $-(CH_2)_{0-3}Z'$ darstellen, und Y^3 H oder $-(CH_2)_{0-3}Z'$ darstellt, wobei Z' H, SO_3H, NH_2 oder COOH darstellt,

wobei Y^4 unabhängig voneinander lineares oder verzweigtes, gegebenenfalls mit $-NHCONH_2$ substituiertes, C_{1-6} Alkyl oder gegebenenfalls mit $-NH_2$ substituiertes Aryl oder Benzyl darstellt und Y^5 H oder $-CO-CHY^6-NH_2$ darstellt, wobei Y^6 lineares oder verzweigtes C_{1-6} Alkyl darstellt.

Besonders häufig findet man die folgende Substruktur II(sub)



II(sub)

wobei #a, R^{1a}, R^{2a}, R^{4a} die selbe Bedeutung haben wie in I(sub) und R^{12a} und R^{13a} H oder R^{12a} und R^{13a} gemeinsam (unter Bildung eines Piperidinringes) $-CH_2-CHR^{10}-$ oder $-CHR^{10}-CH_2-$ darstellen, wobei R^{10} H, NH_2, COOH, SO_3H, SH, oder OH darstellt;

wobei Z -H, $-OY^3$, $-SY^3$, NHY^3, $-CO-NY^1Y^2$, oder $-CO-OY^3$ darstellt,

wobei Y^1 und Y^2 unabhängig voneinander H, NH_2, oder $-(CH_2CH_2O)_{0-3}-(CH_2)_{0-3}Z'$ (z.B. $-(CH_2)_{0-3}Z'$) darstellen, und Y^3 H oder $-(CH_2)_{0-3}Z'$ darstellt, wobei Z' H, SO_3H, NH_2, COOH

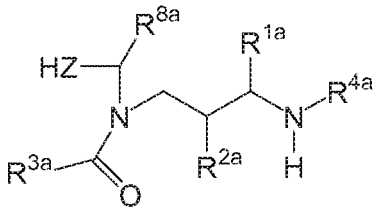
oder -(CO-NH-CHY^4)$_{1-3}$COOH darstellt; wobei Y^4 unabhängig voneinander lineares oder verzweigtes, gegebenenfalls mit–NHCONH$_2$ substituiertes, C$_{1-6}$ Alkyl oder gegebenenfalls mit –NH$_2$ substituiertes Aryl oder Benzyl darstellt.

Insbesondere weisen eine Reihe von KSP-Inhibitoren die Substruktur II(sub) auf, wobei R^{1a}, R^{2a}, R^{4a}, R^{12a} und R^{13a} H darstellen.

Erfindungsgemäß können KSP-Inhibitoren mit der Substruktur I(sub) oder der Substruktur II(sub) verwendet werden. Zu den erfindungsgemäß verwendeten KSP-Inhibitoren gehören auch z.B. Ispinesib (Cytokinetics/GSK), MK-0731 (Merck), AZD4877 (AstraZeneca), ARRY-520 (Array BioPharma) und ARQ 621 (ArQule).

Erfindungsgemäß bevorzugte KSP-Inhibitoren weisen die folgende Grundstruktur auf:

Formel (I):



(I)

wobei

R^{1a} H, -MOD oder -(CH$_2$)$_{0-3}$Z darstellt, wobei Z -H, Halogen, -OY^3, -SY^3, -NHY^3, -CO-NY^{1}Y^2, oder -CO-OY^3 darstellt,

mit Y^1 und Y^2 unabhängig voneinander H, NH$_2$, -(CH$_2$CH$_2$O)$_{0-3}$-(CH$_2$)$_{0-3}$Z‘(z.B. -(CH$_2$)$_{0-3}$Z‘), oder -CH(CH$_2$W)Z‘ darstellen, und Y^3 H oder -(CH$_2$)$_{0-3}$Z‘ darstellt, wobei Z‘ H, SO$_3$H, NH$_2$, COOH, -NH-CO-CH$_2$-CH$_2$-CH(NH$_2$)COOH oder -(CO-NH-CHY^4)$_{1-3}$COOH darstellt; wobei W H oder OH darstellt,

wobei Y^4 unabhängig voneinander lineares oder verzweigtes, gegebenenfalls mit–NHCONH$_2$ substituiertes, C$_{1-6}$ Alkyl oder gegebenenfalls mit –NH$_2$ substituiertes Aryl oder Benzyl darstellt;

R^{2a} und R^{4a} unabhängig voneinander H, -CO-CHY^4-NHY^5 oder -(CH$_2$)$_{0-3}$Z darstellen, oder R^{2a} und R^{4a} gemeinsam (unter Bildung eines Pyrrolidinringes) –CH$_2$-CHR^{10}- oder -CHR^{10}-CH$_2$- darstellen, wobei R^{10} H, SO$_3$H, NH$_2$, COOH, SH, oder OH darstellt;

wobei Z -H, Halogen, -OY^3, -SY^3, NHY^3, -CO-NY^{1}Y^2, oder -CO-OY^3 darstellt,

wobei Y$_1$ und Y$_2$ unabhängig voneinander H, NH$_2$, oder -(CH$_2$)$_{0-3}$Z‘ darstellen, und Y^3 H oder -(CH$_2$)$_{0-3}$Z‘ darstellt, wobei Z‘ H, SO$_3$H, NH$_2$ oder COOH darstellt;

wobei Y^4 unabhängig voneinander lineares oder verzweigtes, gegebenenfalls mit–$NHCONH_2$ substituiertes, C_{1-6} Alkyl oder gegebenenfalls mit $–NH_2$ substituiertes Aryl oder Benzyl darstellt und Y^5 H oder $–CO-CHY^6-NH_2$ darstellt, wobei Y^6 lineares oder verzweigtes C_{1-6} Alkyl darstellt.

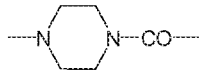
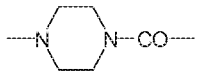
R^{3a} –MOD oder eine gegebenenfalls substituierte Alkyl-, Cycloalkyl-, Aryl-, Heteroaryl-Heteroalkyl- oder Heterocycloalkyl- Gruppe darstellt,
bevorzugt eine C_{1-10}-Alkyl-, C_{6-10}-Aryl- oder C_{6-10}-Aralkyl-, C_{5-10}-Heteroalkyl-, C_{1-10}-Alkyl-O-C_{6-10}-Aryl- oder C_{5-10}-Heterocycloalkyl-Gruppe, die mit 1-3 –OH Gruppen, 1-3 Halogenatomen, 1-3 halogenierten Alkylgruppen (die jeweils 1-3 Halogenatome aufweisen), 1-3 O-Alkyl Gruppen, 1-3 –SH Gruppen, 1-3 -S-Alkyl Gruppen, 1-3 -O-CO-Alkyl Gruppen, 1-3 -O-CO-NH-Alkyl Gruppen, 1-3 -NH-CO-Alkyl Gruppen, 1-3 -NH-CO-NH-Alkyl Gruppen, 1-3 $-S(O)_n$-Alkyl Gruppen, 1-3 $-SO_2$-NH-Alkyl Gruppen, 1-3 -NH-Alkyl Gruppen, 1-3 $-N(Alkyl)_2$ Gruppen, 1-3 $-NH_2$ Gruppen oder 1-3 $-(CH_2)_{0-3}Z$ Gruppen, wobei Z -H, Halogen, $-OY^3$, $-SY^3$, $-NHY^3$, $-CO-NY^1Y^2$, oder $-CO-OY^3$ darstellt, mit Y^1 und Y^2 unabhängig voneinander H, NH_2, oder $-(CH_2)_{0-3}Z'$ darstellen, und Y^3 H, $-(CH_2)_{0-3}-CH(NHCOCH_3)Z'$,$-(CH_2)_{0-3}-CH(NH_2)Z'$, oder $-(CH_2)_{0-3}Z'$ darstellt, wobei Z' H, SO_3H, NH_2 oder COOH darstellt,
substituiert sein kann (wobei „Alkyl" bevorzugt C_{1-10}-Alkyl bedeutet);

R^{8a} C_{1-10}-Alkyl darstellt;

HZ ein mono- oder bicyclischer Heterozyklus ist, der mit einem oder mehreren Substituenten ausgewählt aus Halogen, C_{1-10}-Alkylgruppen, C_{6-10}-Arylgruppen oder C_{6-10}-Aralkylgruppen, die ggf. mit Halogen substituiert sein können, substituiert sein kann;

wobei –MOD $-(NR^{10})_n-(G1)_O$-G2-H darstellt, wobei

R^{10} H oder C_1-C_3-Alkyl darstellt;

G1 –NHCO- , -CONH- oder  darstellt (wobei wenn G1 –NHCO- oder  darstellt, R^{10} nicht NH_2 ist);

n 0 oder 1 ist;

o 0 oder 1 ist; und

G2 eine geradkettige und/oder verzweigte Kohlenwasserstoffgruppe mit 1 bis 10 Kohlenstoffatomen ist, die einfach oder mehrfach durch eine oder mehrere der Gruppen -O-, -S-, -SO-, SO_2, $-NR^y$-, $-NR^yCO$-, $CONR^y$-, $-NR^yNR^y$-, $-SO2NR^yNR^y$-, $-CONR^yNR^y$-, (wobei R^y H, Phenyl, C_1-C_{10}-Alkyl, C_2-C_{10}-Alkenyl, oder C_2-C_{10}-Alkinyl darstellt, die

jeweils mit $NHCONH_2$, -COOH, -OH, $-NH_2$, $NH-CNNH_2$, Sulfonamid, Sulfon, Sulfoxid, oder Sulfonsäure substituiert sein können), -CO-, $-CR^x=N-O-$ (wobei Rx H, C_1-C_3-Alkyl oder Phenyl darstellt) unterbrochen sein kann, wobei die Kohlenwasserstoffkette einschließlich der Seitenketten, sofern vorhanden, mit $-NHCONH_2$, -COOH, -OH, $-NH_2$, $NH-CNNH_2$, Sulfonamid, Sulfon, Sulfoxid, oder Sulfonsäure substituiert sein kann, wobei die Gruppe –MOD vorzugsweise zumindest eine Gruppe –COOH aufweist;

sowie ihre Salze, Solvate und Salze der Solvate

Erfindungsgemäß kann ein solcher Kinesin Spindel Protein-Inhibitor durch Substitution eines H-Atoms an R^{1a}, R^{2a}, R^{3a}, R^{4a}, R^{8a} oder R^{10} oder ggf. über einen der Substituenten von HZ, insbesondere über R^{1a}, R^{2a}, R^{3a}, R^{4a} oder R^{10}, mit dem Linker verbunden sein.

.

Die Substituenten der Formel (I) haben vorzugsweise die folgenden Bedeutungen, wobei diese bevorzugten Bedeutungen vorzugsweise miteinander kombiniert werden:

R^{1a} stellt vorzugsweise H oder $-(CH_2)_{0-3}Z$ dar, wobei Z -H, Halogen, $-OY^3$, $-SY^3$, NHY^3, $-CO-NY^1Y^2$, oder $-CO-OY^3$ darstellt,
mit Y^1 und Y^2 unabhängig voneinander H, NH_2, $-(CH_2CH_2O)_{0-3}-(CH_2)_{0-3}Z'$ (z.B. $-(CH_2)_{0-3}Z'$), oder $-CH(CH_2W)Z'$ darstellen, und Y^3 H oder $-(CH_2)_{0-3}Z'$ darstellt, wobei Z' H, SO_3H, NH_2, COOH, $-NH-CO-CH_2-CH_2-CH(NH_2)COOH$ oder $-(CO-NH-CHY^4)_{1-3}COOH$ darstellt; wobei W H oder OH darstellt,
wobei Y^4 unabhängig voneinander lineares oder verzweigtes, gegebenenfalls mit–$NHCONH_2$ substituiertes, C_{1-6} Alkyl oder gegebenenfalls mit $-NH_2$ substituiertes Aryl oder Benzyl darstellt.

R^{2a} und R^{4a} stellen vorzugsweise unabhängig voneinander H, $-COCHY^4-NHY^5$ oder $-(CH_2)_{0-3}Z$ dar, oder R^{2a} und R^{4a} gemeinsam (unter Bildung eines Pyrrolidinringes) $-CH_2-CHR^{10}-$ oder $-CHR^{10}-CH_2-$ darstellen, wobei R^{10} H, SO_3H, NH_2, COOH, SH, oder OH darstellt;
wobei Z -H, Halogen, $-OY^3$, $-SY^3$, NHY^3, $-CO-NY^1Y^2$, oder $-CO-OY^3$ darstellt,
wobei Y^1 und Y^2 unabhängig voneinander H, NH_2, oder $-(CH_2)_{0-3}Z'$ darstellen, und Y^3 H oder $-(CH_2)_{0-3}Z'$ darstellt, wobei Z' H, SO_3H, NH_2 oder COOH darstellt; wobei Y^4 unabhängig voneinander lineares oder verzweigtes, gegebenenfalls mit–$NHCONH_2$ substituiertes, C_{1-6} Alkyl oder gegebenenfalls mit $-NH_2$ substituiertes Aryl oder Benzyl darstellt und Y^5 H oder $-CO-CHY^6-NH_2$ darstellt, wobei Y^6 lineares oder verzweigtes C_{1-6} Alkyl darstellt.

R^{3a} stellt vorzugsweise eine gegebenenfalls substituierte Alkyl-, Aryl-, Heteroaryl- Heteroalkyl-, Heterocycloalkyl- Gruppe dar, bevorzugt –L-#1 oder eine C_{1-10}-Alkyl-, C_{6-10}-Aryl- oder C_{6-10}-

Aralkyl-, C_{5-10}-Heteroalkyl-, C_{1-10}-Alkyl-O-C_{6-10}-Aryl- oder C_{5-10}-Heterocycloalkyl-Gruppe, die mit 1-3 –OH Gruppen, 1-3 Halogenatomen, 1-3 halogenierten Alkylgruppen (die jeweils 1-3 Halogenatome aufweisen), 1-3 O-Alkyl Gruppen, 1-3 –SH Gruppen, 1-3 -S-Alkyl Gruppen, 1-3 -O-CO-Alkyl Gruppen, 1-3 -O-CO-NH-Alkyl Gruppen, 1-3 -NH-CO-Alkyl Gruppen, 1-3 -NH-CO-NH-Alkyl Gruppen, 1-3 -$S(O)_n$-Alkyl Gruppen, 1-3 -SO_2-NH-Alkyl Gruppen, 1-3 -NH-Alkyl Gruppen, 1-3 -$N(Alkyl)_2$ Gruppen, 1-3 -NH_2 Gruppen oder 1-3 -$(CH_2)_{0-3}Z$ Gruppen, wobei Z -H, Halogen, -OY^3, -SY^3, -NHY^3, -CO-NY^1Y^2, oder -CO-OY^3 darstellt, mit Y^1 und Y^2 unabhängig voneinander H, NH_2, oder -$(CH_2)_{0-3}Z'$ darstellen, und Y^3 H, -$(CH_2)_{0-3}$-$CH(NHCOCH_3)Z'$,-$(CH_2)_{0-3}$-$CH(NH_2)Z'$, oder -$(CH_2)_{0-3}Z'$ darstellt, wobei Z' H, SO_3H, NH_2 oder COOH darstellt,
substituiert sein kann (wobei „Alkyl" bevorzugt C_{1-10}-Alkyl bedeutet).

R^{8a} stellt vorzugsweise C_{1-10}-Alkyl dar.

HZ ist vorzugsweise ein mono- oder bicyclischer Heterozyklus, der mit einem oder mehreren Substituenten ausgewählt aus Halogen, C_{1-10}-Alkylgruppen, C_{6-10}-Arylgruppen oder C_{6-10} Aralkylgruppen, die ggf. mit Halogen substituiert sein können, substituiert sein kann.

C_{1-10}-Alkyl steht im Rahmen der Erfindung (d.h. in der obigen Formel wie auch in den folgenden Formeln) für einen linearen oder verzweigten Alkylrest mit 1 bis 10 Kohlenstoffatomen. Beispielhaft und vorzugsweise seien genannt: Methyl, Ethyl, *n*-Propyl, Isopropyl, *n*-Butyl, Isobutyl, 1-Methylpropyl und *tert.*-Butyl.

C_{6-10}-Aryl- steht im Rahmen der Erfindung für einen mono-oder bicyclischen aromatischen Homocyclus, beispielhaft Phenyl und Naphthyl.

C_{6-10}-Aralkyl-Gruppe steht im Rahmen der Erfindung für einen monocyclischen aromatischen Homocyclus, bespielhaft Phenyl, an den eine C1-C4-Alkylgruppe gebunden ist. Eine beispielhafte C_{6-10}-Aralkyl-Gruppe ist Benzyl.

C_{5-10}-Heteroaryl steht im Rahmen der Erfindung für einen mono-oder bicyclischen, aromatischen Heterocyclus mit insgesamt 6 bis 10 Ring-Kohlenstoffatome, wobei der bzw. die Ringe ein oder zwei Ring-Heteroatome aus der Reihe N, O, S, SO und/oder SO_2 enthält und über ein Ring-Kohlenstoffatom oder gegebenenfalls ein Ring-Stickstoffatom verknüpft ist. Beispielhaft seien genannt Pyridyl, Furanyl, Pyrimidyl, Imidazolyl, Thienyl, Thiophenyl, Isoxazoyl, Isothiazoyl, 1,2,3-Oxadiazoyl, Furazanyl, 1,2,3-Triazoyl, 1,2,4-Triazoyl, Pyridazyl, Pyrrolyl, Triazinyl, Indolyl, Chinolinyl, Chinazolinyl, 1,3-Benzodioxol, Isoindolyl, Indazolyl, 1H-Pyrazolo[3,4-d]pyrimidyl, Benzotriazolyl, Isochinolinyl, Sinolinyl, Phthalazinyl, Pteredinyl, Naphthyridinyl, Benzimidazolinyl, Benzothiazolinyl, Benzoxazolinyl, 3,4-Methylenedioxyphenyl und Benzo[6]furanyl.

Mono- oder bicyclischer Heterozyklus steht im Rahmen der Erfindung für einen mono-oder bicyclischen Heterocyclus mit insgesamt 5 bis 10 Ring-Kohlenstoffatome, wobei der bzw. die Ringe ein bis drei Ring-Heteroatome aus der Reihe N, O, S, SO und/oder SO_2 enthält und über ein Ring-Kohlenstoffatom oder gegebenenfalls ein Ring-Stickstoffatom verknüpft ist. Beispielhaft seien genannt Piperidyl, Pyrrolinyl, Morpholinyl, 3,4-Methylenedioxyphenyl und Tetrahydrofuranyl.

Halogenatom steht im Rahmen der Erfindung für F, Cl, Br, oder I.

Durch Substitution eines H-Atoms an R^{1a}, R^{2a}, R^{4a} oder R^{10} in Substruktur I(sub) oder Substruktur II(sub), oder R^{1a}, R^{2a}, R^{3a}, R^{4a}, R^{8a} oder R^{10} an HZ in Formel (I) kann in einer dem Durchschnittsfachmann bekannten Weise die Verbindung der Formel (I) mit einem Linker verbunden werden. Besonders bevorzugt erfolgt die Substitution des H-Atoms an R^{1a}, R^{2a}, R^{3a}, R^{4a}, oder an dem durch R^{2a} und R^{4a} gebildeten Pyrrolidinring. Diese Konjugation kann chemisch auf verschiedenen Wegen erfolgen, wie in den Schemata 7 bis 31 in den Beispielen exemplarisch dargelegt. Es ist insbesondere möglich, den niedermolekularen KSP-Inhibitor für die Konjugation an den Linker ggf. zu modifizieren, z.B. durch Einführen von Schutzgruppen oder Abgangsgruppen zur einfacheren Substituierung (so dass in der Reaktion diese Abgangsgruppe durch den Linker substituiert wird, und nicht ein H-Atom). Das so erhaltene KSP-Inhibitor – Linker – Molekül (wobei der Linker eine reaktive Gruppe zur Ankopplung an den Binder aufweist) kann dann mit dem Binder umgesetzt werden, um ein erfindungsgemäßes Binderkonjugat zu erhalten. Diese Vorgehensweise ist im experimentellen Teil anhand einer Vielzahl von Beispielen exemplarisch veranschaulicht.

Als R^{1a} ist bevorzugt H, -COOH, $-CONHNH_2$, $-(CH_2)_{1-3}NH_2$, $-CONZ''(CH_2)_{1-3}NH_2$ und $-CONZ''CH_2COOH$, wobei Z'' H oder NH_2 darstellt.

Als R^{2a} und R^{4a} sind bevorzugt H, oder R^{2a} und R^{4a} stellen gemeinsam (unter Bildung eines Pyrrolidinringes) CH_2-CHR^{10}- oder -CHR^{10}-CH_2- dar, wobei R^{10} H darstellt.

Als R^{3a} ist bevorzugt eine C_{1-10}-Alkyl-, die mit –OH, O-Alkyl, SH, S-Alkyl, O-CO-Alkyl, O-CO-NH-Alkyl, NH-CO-Alkyl, NH-CO-NH-Alkyl, $S(O)_n$-Alkyl, SO_2-NH-Alkyl, NH-Alkyl, $N(Alkyl)_2$, oder NH2 substituiert sein kann (wobei Alkyl vorzugsweise C1-3 Alkyl bedeutet).

Als R^{8a} ist bevorzugt eine verzweigte C_{1-5}-Alkyl-Gruppe, vorzugsweise Methyl, Ethyl, *n*-Propyl, Isopropyl, *n*-Butyl, Isobutyl, 1-Methylpropyl und *tert.*-Butyl.

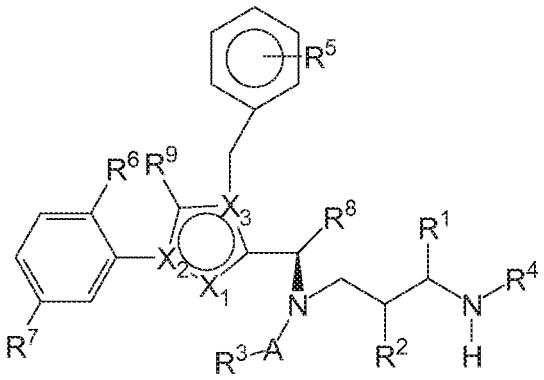
Als HZ ist bevorzugt ein mono- oder bicyclischer Heterozyklus ist, der mit einem oder mehreren Substituenten ausgewählt aus Halogen, C_{1-10}-Alkylgruppen, C_{6-10}-Arylgruppen oder C_{6-10}-Aralkylgruppen, die ggf. mit Halogen substituiert sein können, substituiert sein kann.

Besonders bevorzugt ist HZ ein substituiertes Pyrrol, Pyrazol, Imidazol, Chinazolin oder Dihydrochinazolin, das in ortho-Stellung (in Bezug auf den Substituenten mit R1a etc) mit einer ggf. substituierten Benzylgruppe substituiert ist. Das substituierte Pyrrol, Pyrazol, Imidazol bzw. Chinazolin kann weiterhin vorzugsweise mit Oxo (im Falle von Dihydrochinazolin) oder einer mit 1 bis 2 Halogenatomen substituierten Phenylgruppe substituiert sein. Besonders bevorzugt ist HZ ein substituiertes Pyrrol.

Ein bevorzugt verwendeter KSP-Inhibitor ist Ispinesib. Ein weiterer bevorzugter KSP-Inhibitor ist Arry-520.

Andere besonders bevorzugte Verbindungen weisen die folgende Formel (IIa) oder (II) auf:

Formel (IIa):



(IIa)

wobei

X_1 N, X_2 N und X_3 C darstellt; oder

X_1 N, X_2 C und X_3 N darstellt; oder

X_1 CH oder CF, X_2 C und X_3 N darstellt; oder

X_1 NH, X_2 C und X_3 C darstellt; oder

X_1 CH oder CF, X_2 N und X_3 C darstellt;

(wobei X_1 CH, X_2 C und X_3 N bevorzugt ist);

R^1 H, –L-#1, –MOD oder $-(CH_2)_{0-3}Z$ darstellt, wobei Z -H, $-NHY^3$, $-OY^3$, $-SY^3$, Halogen, $-CO-NY^1Y^2$, oder $-CO-OY^3$ darstellt,

wobei Y^1 und Y^2 unabhängig voneinander H, NH_2, $-(CH_2CH_2O)_{0-3}-(CH_2)_{0-3}Z'$(z.B. $-(CH_2)_{0-3}Z'$), oder $-CH(CH_2W)Z'$ darstellen, und Y^3 H oder $-(CH_2)_{0-3}Z'$ darstellt, wobei Z' H, NH_2, SO_3H, COOH, $-NH-CO-CH_2-CH_2-CH(NH_2)COOH$ oder $-(CO-NH-CHY^4)_{1-3}COOH$ darstellt; wobei W H oder OH darstellt,

wobei Y^4 unabhängig voneinander lineares oder verzweigtes, gegebenenfalls mit--$NHCONH_2$ substituiertes, C_{1-6} Alkyl oder gegebenenfalls mit $-NH_2$ substituiertes Aryl oder Benzyl darstellt;

R^2 –L-#1, H, -MOD, -CO-CHY^4-NHY^5 oder -$(CH_2)_{0-3}Z$ darstellt,
wobei Z -H, Halogen, -OY^3, -SY^3, NHY^3, -CO-NY^1Y^2, oder -CO-OY^3 darstellt,
wobei Y^1 und Y^2 unabhängig voneinander H, NH_2, oder -$(CH_2)_{0-3}Z$‘ darstellen, und Y^3 H oder -$(CH_2)_{0-3}Z$‘ darstellt, wobei Z‘ H, SO_3H, NH_2 oder COOH darstellt;
wobei Y^4 unabhängig voneinander lineares oder verzweigtes, gegebenenfalls mit--$NHCONH_2$ substituiertes, C_{1-6} Alkyl oder gegebenenfalls mit $-NH_2$ substituiertes Aryl oder Benzyl darstellt und Y^5 H oder –CO-CHY^6-NH_2 darstellt, wobei Y^6 lineares oder verzweigtes C_{1-6} Alkyl darstellt;

R^4 –L-#1, H, -CO-CHY^4-NHY^5 oder -$(CH_2)_{0-3}Z$ darstellt,
wobei Z -H, Halogen, -OY^3, -SY^3, NHY^3, -CO-NY^1Y^2, oder -CO-OY^3 darstellt,
wobei Y^1 und Y^2 unabhängig voneinander H, NH_2, oder -$(CH_2)_{0-3}Z$‘ darstellen, und Y^3 H oder -$(CH_2)_{0-3}Z$‘ darstellt, wobei Z‘ H, SO_3H, NH_2 oder COOH darstellt;
wobei Y^4 unabhängig voneinander lineares oder verzweigtes, gegebenenfalls mit--$NHCONH_2$ substituiertes, C_{1-6} Alkyl oder gegebenenfalls mit $-NH_2$ substituiertes Aryl oder Benzyl darstellt und Y^5 H oder –CO-CHY^6-NH_2 darstellt, wobei Y^6 lineares oder verzweigtes C_{1-6} Alkyl darstellt;
oder R^2 und R^4 gemeinsam (unter Bildung eines Pyrrolidinringes) –CH_2-CHR^{10}- oder -CHR^{10}-CH_2- darstellen, wobei R^{10} L-#1, H, NH_2, SO_3H, COOH, SH, oder OH darstellt;

A CO, SO, SO_2, SO_2NH oder CNNH darstellt;

R^3 –L-#1, -MOD oder eine gegebenenfalls substituierte Alkyl-, Cycloalkyl-, Aryl-, Heteroaryl-, Heteroalkyl-, Heterocycloalkyl- Gruppe darstellt, bevorzugt eine C_{1-10}-Alkyl-, C_{6-10}-Aryl- oder C_{6-10}-Aralkyl-, C_{5-10}-Heteroalkyl-, C_{1-10}-Alkyl-O-C_{6-10}-Aryl- oder C_{5-10}-Heterocycloalkyl-Gruppe, die mit 1-3 –OH Gruppen, 1-3 Halogenatomen, 1-3 halogenierten Alkylgruppen (die jeweils 1-3 Halogenatome aufweisen), 1-3 O-Alkyl Gruppen, 1-3 –SH Gruppen, 1-3 -S-Alkyl Gruppen, 1-3 -O-CO-Alkyl Gruppen, 1-3 -O-CO-NH-Alkyl Gruppen, 1-3 -NH-CO-Alkyl Gruppen, 1-3 -NH-CO-NH-Alkyl Gruppen, 1-3 -$S(O)_n$-Alkyl Gruppen, 1-3 -SO_2-NH-Alkyl Gruppen, 1-3 -NH-Alkyl Gruppen, 1-3 -$N(Alkyl)_2$ Gruppen, 1-3 -$NH((CH_2CH_2O)_{1-20}H)$-Gruppen, 1-3 -NH_2 Gruppen oder 1-3 -$(CH_2)_{0-3}Z$ Gruppen, wobei Z -H, Halogen, -OY^3, -SY^3, -NHY^3, -CO-NY^1Y^2, oder -CO-OY^3 darstellt, mit Y^1 und Y^2 unabhängig voneinander H, NH_2, oder -$(CH_2)_{0-3}Z$‘ darstellen, und Y^3 H, -$(CH_2)_{0-3}$-$CH(NHCOCH_3)Z$‘,-$(CH_2)_{0-3}$-$CH(NH_2)Z$‘, oder -$(CH_2)_{0-3}Z$‘ darstellt, wobei Z‘ H, SO_3H, NH_2 oder COOH darstellt, substituiert sein kann (wobei „Alkyl“ bevorzugt C_{1-10}-Alkyl bedeutet);

R^5 –L-#1, H, -MOD, NH_2, NO_2, Halogen (insbesondere F, Cl, Br), -CN, CF_3, $-OCF_3$, $-CH_2F$, $-CH_2F$, SH oder $-(CH_2)_{0-3}Z$ darstellt, wobei Z -H, $-OY^3$, $-SY^3$, Halogen, NHY^3, $-CO-NY^1Y^2$, oder $-CO-OY^3$ darstellt,

wobei Y^1 und Y^2 unabhängig voneinander H, NH_2, oder $-(CH_2)_{0-3}Z'$ darstellen, und Y^3 H oder $-(CH_2)_{0-3}Z'$ darstellt, wobei Z' H, SO_3H, NH_2 oder COOH darstellt;

R^6 und R^7 unabhängig voneinander H, Cyano, (ggf. fluoriertes) C_{1-10}-Alkyl, (ggf. fluoriertes) C_{2-10}-Alkenyl, (ggf. fluoriertes) C_{2-10}-Alkinyl, Hydroxy, NO_2, NH_2, COOH oder Halogen (insbesondere F, Cl, Br) darstellen,

R^8 (ggf. fluoriertes) C_{1-10}-Alkyl, (ggf. fluoriertes) C_{2-10}-Alkenyl, (ggf. fluoriertes) C_{2-10}-Alkinyl, (ggf. fluoriertes) C_{4-10}-Cycloalkyl oder $-(CH_2)_{0-2}-(HZ^2)$ darstellt, wobei HZ^2 ein 4 bis 7-gliedriger Heterocyclus mit bis zu zwei Heteroatomen ausgewählt aus N, O und S darstellt (vorzugsweise Oxetan), wobei jede dieser Gruppen mit –OH, CO_2H or NH_2 oder –L-#1 substituiert sein kann;

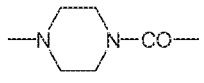
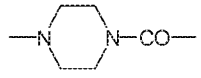
wobei einer oder keiner der Substituenten R^1, R^2, R^3, R^4 R^5, R^8 und R^{10} –L-#1 darstellt (bzw. im Falle von R^8 aufweist),

L für den Linker steht und #1 für die Bindung zum Binder bzw. Derivat hiervon steht,

R^9 H, F, CH_3, CF_3, CH_2F oder CHF_2 darstellt;

wobei –MOD $-(NR^{10})_n-(G1)_o-G2-H$ darstellt, wobei

R^{10} H oder C_1-C_3-Alkyl darstellt;

G1 –NHCO- , -CONH- oder  darstellt (wobei wenn G1 –NHCO- oder  darstellt, R^{10} nicht NH_2 ist);

n 0 oder 1 ist;

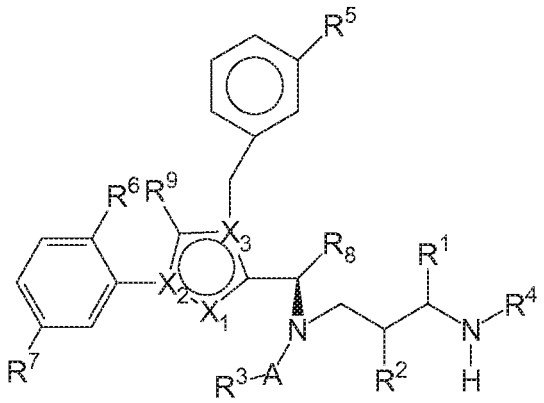
o 0 oder 1 ist; und

G2 eine geradkettige und/oder verzweigte Kohlenwasserstoffgruppe mit 1 bis 10 Kohlenstoffatomen ist, die einfach oder mehrfach durch eine oder mehrere der Gruppen -O-, -S-, -SO-, SO_2, $-NR^y-$, $-NR^yCO-$, $CONR^y-$, $-NR^yNR^y-$, $-SO2NR^yNR^y-$, $-CONR^yNR^y-$, (wobei R^y H, Phenyl, C_1-C_{10}-Alkyl, C_2-C_{10}-Alkenyl, oder C_2-C_{10}-Alkinyl darstellt, die

jeweils mit $NHCONH_2$, -COOH, -OH, $-NH_2$, $NH-CNNH_2$, Sulfonamid, Sulfon, Sulfoxid, oder Sulfonsäure substituiert sein können), -CO-, $-CR^x=N-O-$ (wobei Rx H, C_1-C_3-Alkyl oder Phenyl darstellt) unterbrochen sein kann, wobei die Kohlenwasserstoffkette einschließlich der Seitenketten, sofern vorhanden, mit $–NHCONH_2$, -COOH, -OH, $-NH_2$, $NH-CNNH_2$, Sulfonamid, Sulfon, Sulfoxid, oder Sulfonsäure substituiert sein kann, wobei die Gruppe –MOD vorzugsweise zumindest eine Gruppe –COOH aufweist;

sowie ihre Salze, Solvate und Salze der Solvate.

Formel (II):



(II)

wobei

X_1 N, X_2 N und X_3 C darstellt; oder

X_1 N, X_2 C und X_3 N darstellt; oder

X_1 CH oder CF, X_2 C und X_3 N darstellt; oder

X_1 NH, X_2 C und X_3 C darstellt; oder

X_1 CH, X_2 N und X_3 C darstellt;

R^1 H, –L-#1, oder $-(CH_2)_{0-3}Z$ darstellt, wobei Z -H, $-NHY^3$, $-OY^3$, $-SY^3$, Halogen, $-CO-NY^1Y^2$, oder $-CO-OY^3$ darstellt,

wobei Y^1 und Y^2 unabhängig voneinander H, NH_2, $-(CH_2CH_2O)_{0-3}-(CH_2)_{0-3}Z'$ (z.B. $-(CH_2)_{0-3}Z'$), oder $-CH(CH_2W)Z'$ darstellen, und Y^3 H oder $-(CH_2)_{0-3}Z'$ darstellt, wobei Z' H, NH_2, SO_3H, COOH, $-NH-CO-CH_2-CH_2-CH(NH_2)COOH$ oder $-(CO-NH-CHY^4)_{1-3}COOH$ darstellt; wobei W H oder OH darstellt;

wobei Y^4 unabhängig voneinander lineares oder verzweigtes, gegebenenfalls mit–$NHCONH_2$ substituiertes, C_{1-6} Alkyl oder gegebenenfalls mit $–NH_2$ substituiertes Aryl oder Benzyl darstellt.

R^2 und R^4 unabhängig voneinander H, –L-#1, -CO-CHY^4-NHY^5 oder -$(CH_2)_{0-3}$Z darstellen, oder R^2 und R^4 gemeinsam (unter Bildung eines Pyrrolidinringes) –CH_2-CHR^{10}- oder -CHR^{10}-CH_2- darstellen, wobei R^{10} H, –L-#1, NH_2, SO_3H, COOH, SH, oder OH darstellt;
wobei Z -H, Halogen, -OY^3, -SY^3, NHY^3, -CO-NY^{1}Y^2, oder -CO-OY^3 darstellt,
wobei Y^1 und Y^2 unabhängig voneinander H, NH_2, oder -$(CH_2)_{0-3}$Z‘ darstellen, und Y^3 H oder -$(CH_2)_{0-3}$Z‘ darstellt, wobei Z‘ H, SO_3H, NH2 oder COOH darstellt;
wobei Y^4 unabhängig voneinander lineares oder verzweigtes, gegebenenfalls mit–$NHCONH_2$ substituiertes, C_{1-6} Alkyl oder gegebenenfalls mit –NH_2 substituiertes Aryl oder Benzyl darstellt, wobei Y^4 unabhängig voneinander lineares oder verzweigtes, gegebenenfalls mit–$NHCONH_2$ substituiertes, C_{1-6} Alkyl oder gegebenenfalls mit –NH_2 substituiertes Aryl oder Benzyl darstellt und Y^5 H oder –CO-CHY^6-NH_2 darstellt, wobei Y^6 lineares oder verzweigtes C_{1-6} Alkyl darstellt;

A CO, SO, SO_2, SO_2NH oder CNNH darstellt;

R^3 eine gegebenenfalls substituierte Alkyl-, Aryl-, Heteroaryl- Heteroalkyl-, Heterocycloalkyl-Gruppe darstellt, bevorzugt –L-#1 oder eine C_{1-10}-Alkyl-, C_{6-10}-Aryl- oder C_{6-10}-Aralkyl-, C_{5-10}-Heteroalkyl-, C_{1-10}-Alkyl-O-C_{6-10}-Aryl- oder C_{5-10}-Heterocycloalkyl-Gruppe, die mit 1-3 –OH Gruppen, 1-3 Halogenatomen, 1-3 halogenierten Alkylgruppen (die jeweils 1-3 Halogenatome aufweisen),, 1-3 O-Alkyl Gruppen, 1-3 –SH Gruppen, 1-3 -S-Alkyl Gruppen, 1-3 -O-CO-Alkyl Gruppen, 1-3 -O-CO-NH-Alkyl Gruppen, 1-3 -NH-CO-Alkyl Gruppen, 1-3 -NH-CO-NH-Alkyl Gruppen, 1-3 -$S(O)_n$-Alkyl Gruppen, 1-3 -SO_2-NH-Alkyl Gruppen, 1-3 -NH-Alkyl Gruppen, 1-3 -$N(Alkyl)_2$ Gruppen, 1-3 -NH_2 Gruppen oder 1-3 -$(CH_2)_{0-3}$Z Gruppen, wobei Z -H, Halogen, -OY^3, -SY^3, -NHY^3, -CO-NY^{1}Y^2, oder -CO-OY^3 darstellt, mit Y^1 und Y^2 unabhängig voneinander H, NH_2, oder -$(CH_2)_{0-3}$Z‘ darstellen, und Y^3 H, -$(CH_2)_{0-3}$-CH(NHCOCH$_3$)Z‘,-$(CH_2)_{0-3}$-CH(NH_2)Z‘, oder -$(CH_2)_{0-3}$Z‘ darstellt, wobei Z‘ H, SO_3H, NH_2 oder COOH darstellt,
substituiert sein kann (wobei „Alkyl“ bevorzugt C_{1-10}-Alkyl bedeutet);

R^5 H, F, NH_2, NO_2, Halogen, SH oder -$(CH_2)_{0-3}$Z darstellt, wobei Z -H, Halogen, -OY^3, -SY^3, NHY^3, -CO-NY^{1}Y^2, oder -CO-OY^3 darstellt,
wobei Y^1 und Y^2 unabhängig voneinander H, NH_2, oder -$(CH_2)_{0-3}$Z‘ darstellen, und Y^3 H oder -$(CH_2)_{0-3}$Z‘ darstellt, wobei Z‘ H, SO_3H, NH_2 oder COOH darstellt;

R^6 und R^7 unabhängig voneinander H, Cyano, (ggf. fluoriertes) C_{1-10}-Alkyl, (ggf. fluoriertes) C_{2-10}-Alkenyl, (ggf. fluoriertes) C_{2-10}-Alkinyl, Hydroxy oder Halogen darstellen,

R^8 (ggf. fluoriertes) C_{1-10}-Alkyl, (ggf. fluoriertes) C_{4-10}-Cycloalkyl oder optional substituiertes Oxetan darstellt; und

R^9 H, F, CH_3, CF_3, CH_2F oder CHF_2 darstellt;
sowie ihre Salze, Solvate und Salze der Solvate.

Durch Substitution eines H-Atoms an R^1, R^2, R^3, R^4, R^5 oder R^8 oder an dem durch R^2 und R^4 gebildeten Pyrrolidinring (R^{10}) kann in einer dem Durchschnittsfachmann bekannten Weise die Verbindung der Formel (IIa) oder (II), in der keiner der Substituenten R^1, R^2, R^3, R^4 R^5, R^8 und R^{10} –L-#1 darstellt, mit einem Linker verbunden werden. Hierdurch werden Konjugate der Formel (IIa) oder (II) erhalten, wobei einer der Substituenten R^1, R^2, R^3, R^4, R^5,R^8 oder R^{10} –L-#1 darstellt, L für den Linker steht und #1 für die Bindung zum Binder bzw. Derivat hiervon steht. Wenn der KSP-Inhibitor nach Formel (IIa) oder (II) mit einem Binder konjugiert ist, stellt einer der Substituenten R^1, R^2, R^3, R^4 , R^5 , R^8 oder R^{10} also –L-#1 dar, wobei L für den Linker steht und #1 für die Bindung zum Binder bzw. Derivat hiervon steht. D.h. im Falle der Konjugate stellt einer der Substituenten R^1, R^2, R^3, R^4 , R^5 ,R^8 und R^{10} –L-#1 dar, wobei –L-#1 an den Binder wie z.B. einen Antikörper darstellt. Besonders bevorzugt ist es, wenn einer der Substituenten R^1 und R^3 –L-#1 darstellt. Der Binder ist vorzugsweise ein humaner, humanisierter oder chimärer monoklonaler Antikörper oder ein Antigen-bindendes Fragment hiervon ist, insbesondere ein anti-TWEAKR-Antikörper oder ein Antigen-bindendes Fragment hiervon oder ein anti-EGFR-Antikörper oder ein Antigen-bindendes Fragment hiervon. Besonders bevorzugt sind ein anti-TWEAKR-Antikörper, der spezifisch an die Aminosäure D in Position 47 (D47) von TWEAKR (SEQ ID NO:169) bindet, insbesondere der anti-TWEAKR-Antikörper TPP-2090, oder die anti-EGFR-Antikörper Cetuximab oder Nimotuzumab.

Anstelle von –L-#1 kann auch die Gruppe –L-#3 in der Verbindung vorhanden sein, wobei L für den Linker steht und #3 für die reaktive Gruppe zur Bindung an den Binder bzw. Derivat hiervon steht. Verbindungen mit –L-#3 sind reaktive Verbindungen, die mit dem Binder bzw. Derivat hiervon reagieren. #3 ist vorzugsweise eine Gruppe, die mit einer Amino- oder Thiolgruppe unter Bildung einer kovalenten Bindung reagiert, vorzugsweise mit dem Cysteinrest in einem Protein. Der Cysteinrest in einem Protein kann natürlich im Protein vorliegen, durch biochemische Methoden eingebracht werden oder vorzugsweise durch vorherige Reduktion von Disulfiden des Binders generiert werden kann.

Die Verbindungen der Formel (IIa) oder (II), in der einer der Substituenten R^1, R^2, R^3, R^4, R^5 und R^{10} –L-#1 darstellt, und in denen

X_1 N, X_2 N und X_3 C darstellt;
X_1 CH oder CF, X_2 C und X_3 N darstellt;
X_1 NH, X_2 C und X_3 C darstellt; oder
X_1 CH, X_2 N und X_3 C darstellt;
sind besonders bevorzugt,

insbesondere solche, in denen

X_1 N, X_2 N und X_3 C darstellt; oder X_1 CH, X_2 C und X_3 N darstellt. Insbesondere sind Verbindungen bevorzugt, in denen X_1 CH, X_2 C und X_3 N darstellt.

Als A ist CO (carbonyl) bevorzugt.

Als R^1 ist bevorzugt –L-#1, H, -COOH, $-CONHNH_2$, $-(CH_2)_{1-3}NH_2$, $-CONZ''(CH_2)_{1-3}NH_2$ und $-CONZ''CH_2COOH$, wobei Z'' H oder NH_2.

Als R^2 und R^4 sind bevorzugt H, –L-#1 oder R^2 und R^4 stellen gemeinsam (unter Bildung eines Pyrrolidinringes) -CH2-CHR^{10}- oder $-CHR^{10}-CH_2-$ darstellen, wobei R^{10} H oder –L-#1, darstellt.

Als R^3 ist bevorzugt –L-#1 oder eine C_{1-10}-Alkyl-, die ggf. mit –OH, O-Alkyl, SH, S-Alkyl, O-CO-Alkyl, O-CO-NH-Alkyl, NH-CO-Alkyl, NH-CO-NH-Alkyl, $S(O)_n$-Alkyl, SO_2-NH-Alkyl, NH-Alkyl, $N(Alkyl)_2$, oder NH_2 substituiert sein kann (wobei Alkyl vorzugsweise C_{1-3} Alkyl bedeutet).

Als R^5 ist bevorzugt –L-#1, H oder F.

Als R^6 und R^7 sind unabhängig voneinander bevorzugt H, (ggf. fluoriertes) C_{1-3}-Alkyl, (ggf. fluoriertes) C_{2-4}-Alkenyl, (ggf. fluoriertes) C_{2-4}-Alkinyl, Hydroxy oder Halogen.

Als R^8 ist bevorzugt eine verzweigte C_{1-5}-Alkyl-Gruppe, insbesondere eine Gruppe der Formel $-C(CH_3)_2-(CH_2)_{0-2}-R_y$, wobei R_y –H, –OH, CO_2H, NH_2 oder –L-#1. Besonders bevorzugt ist Gruppe der Formel $-C(CH_3)_2-(CH_2)-R_y$, wobei R_y –H oder –L-#1. ist

Als R^9 ist bevorzugt H oder F.

Insbesondere bevorzugt sind Verbindungen der Formel (IIa) oder (II), in der keiner oder einer der Substituenten R^1, R^2, R^3, R^4, R^5, R^8 und R^{10} –L-#1 darstellt, und

in denen

X_1 N, X_2 N und X_3 C darstellt;

X_1 CH oder CF, X_2 C und X_3 N darstellt;

X_1 NH, X_2 C und X_3 C darstellt; oder

X_1 CH, X_2 N und X_3 C darstellt;

A CO (carbonyl) ist;

R^1 H, -COOH, $-CONHNH_2$, $-(CH_2)_{1-3}NH_2$, $-CONZ''(CH_2)_{1-3}NH_2$ und $-CONZ''CH_2COOH$ ist, wobei Z'' H oder NH_2;

R^2 und R^4 H ist, oder R^2 und R^4 gemeinsam (unter Bildung eines Pyrrolidinringes) $-CH_2-CHR^{10}-$ oder $-CHR^{10}-CH2-$ darstellen, wobei R^{10} H oder –L-#1, darstellt;

R^3 eine Phenylgruppe, die ein oder mehrfach mit Halogen (insbesondere F) oder ggf. fluoriertes C_{1-3} Alkyl substituiert sein kann, oder eine ggf. fluorierte C_{1-10}-Alkylgruppe darstellt, die ggf. mit $-OY^4$, $-SY^4$, $-O-CO-Y^4$, $-O-CO-NH-Y^4$, $NH-CO-Y^4$, $-NH-CO-NH-Y^4$, $S(O)_n-Y^4$(wobei n 0, 1 oder 2 darstellt), $-SO_2-NH-Y^4$, $NH-Y^4$, oder $N(Y^4)_2$, substituiert sein kann, wobei Y4 H, Phenyl (ggf. ein oder mehrfach mit Halogen (insbesondere F) oder ggf. fluoriertes C_{1-3} Alkyl substituiert), oder Alkyl (wobei die Alkylgruppe mit –OH, -COOH, und/oder $-NHCO-C_{1-3}$-Alkyl substituiert sein kann, und wobei Alkyl vorzugsweise C_{1-3} Alkyl bedeutet) darstellt;
wobei iinsbesondere bevorzugt R^3mit –OH, O-Alkyl, SH, S-Alkyl, O-CO-Alkyl, O-CO-NH-Alkyl, NH-CO-Alkyl, NH-CO-NH-Alkyl, $S(O)_n$-Alkyl, SO_2-NH-Alkyl, NH-Alkyl, $N(Alkyl)_2$, oder NH_2 substituiert sein kann (wobei Alkyl vorzugsweise C_{1-3} Alkyl bedeutet)

R^5 H oder F ist;

R^6 und R^7 unabhängig voneinander H, (ggf. fluoriertes) C_{1-3}-Alkyl, (ggf. fluoriertes) C_{2-4}-Alkenyl, (ggf. fluoriertes) C_{2-4}-Alkinyl, Hydroxy oder Halogen darstellen;

R^8 eine verzweigte C_{1-5}-Alkyl-Gruppe ist; und

R^9 H oder F ist.

Weiterhin sind bevorzugt (allein oder in Kombination), wenn

- R^1 –L-#1, COOH oder H darstellt,
- R^2 und R^4 unabhängig voneinander –L-#1 oder H oder R^2 und R^4 gemeinsam (unter Bildung eines Pyrrolidinringes) $-CH_2-CHR^{10}-$ oder $-CHR^{10}-CH_2-$ darstellen, wobei R^{10} H oder –L-#1, darstellt,
- A CO darstellt,
- R^3 $-(CH_2)OH$, $-CH(CH_3)OH$, $-CH_2SCH_2CH(COOH)NHCOCH_3$, $-CH(CH_3)OCH_3$, eine Phenylgruppe, die mit 1-3 Halogenatomen, 1-3 Aminogruppen oder 1-3 Alkylgruppen (die ggf. halogeniert sein können, substituiert sein kann, oder –L-#1 darstellt,
- R^5 –L-#1 oder H darstellt,
- R^6 und R^7 unabhängig voneinander H, C_{1-3}-Alkyl oder Halogen darstellen, insbesondere dass R^6 und R^7 F darstellen;

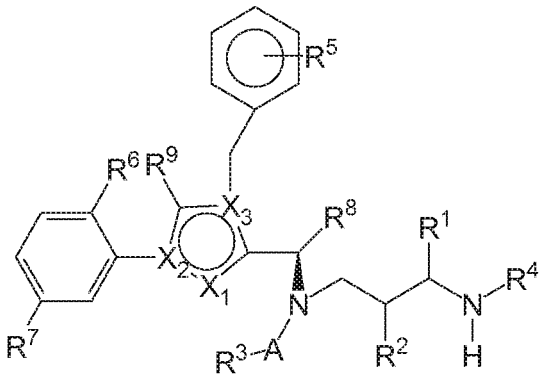
- R^8 C_{1-4}-Alkyl (vorzugsweise tert-butyl) darstellt; und/ oder
- R^9 H darstellt,
- wobei einer der Substituenten R^1, R^2, R^3, R^4, R^5 und R^{10} –L-#1 darstellt.

Zudem ist es erfindungsgemäß bevorzugt, wenn

- R^1 –L-#1, COOH oder H darstellt,
- R^2 und R^4 unabhängig voneinander –L-#1 oder H oder R^2 und R^4 gemeinsam (unter Bildung eines Pyrrolidinringes) $–CH_2-CHR^{10}-$ oder $–CHR^{10}-CH_2-$ darstellen, wobei R^{10} H oder –L-#1, darstellt,
- A CO darstellt,
- R^3 $-(CH_2)OH$, $-CH(CH_3)OH$, $-CH_2SCH_2CH(COOH)NHCOCH_3$, $-CH(CH_3)OCH_3$, eine Phenylgruppe, die mit 1-3 Halogenatomen, 1-3 Aminogruppen oder 1-3 Alkylgruppen (die ggf. halogeniert sein können, substituiert sein kann, oder –L-#1 darstellt,
- R^5 –L-#1 oder H darstellt,
- R^6 und R^7 unabhängig voneinander H, C_{1-3}-Alkyl oder Halogen darstellen, insbesondere dass R^6 und R^7 F darstellen;
- R^8 C_{1-4}-Alkyl (vorzugsweise tert-butyl) darstellt; und
- R^9 H darstellt,
- wobei einer der Substituenten R^1, R^2, R^3, R^4, R^5 und R^{10} –L-#1 darstellt.

Andere besonders bevorzugte Verbindungen weisen die folgende Formel (IIIa) oder (III) auf:

Formel (IIIa):



(IIIa)

wobei

X_1 N, X_2 N und X_3 C darstellt; oder

X_1 N, X_2 C und X_3 N darstellt; oder

X_1 CH oder CF, X_2 C und X_3 N darstellt; oder

X_1 NH, X_2 C und X_3 C darstellt; oder

X_1 CH, X_2 N und X_3 C darstellt;

(wobei X_1 CH, X_2 C und X_3 N bevorzugt ist);

R^1 H, -L-Binder, –MOD oder $-(CH_2)_{0-3}Z$ darstellt, wobei Z -H, $-NHY^3$, $-OY^3$, $-SY^3$, Halogen, $-CO-NY^1Y^2$, oder $-CO-OY^3$ darstellt,
wobei Y^1 und Y^2 unabhängig voneinander H, NH_2, $-(CH_2CH_2O)_{0-3}-(CH_2)_{0-3}Z$'(z.B. $-(CH_2)_{0-3}Z$'), oder $-CH(CH_2W)Z$' darstellen, und Y^3 H oder $-(CH_2)_{0-3}Z$' darstellt, wobei Z' H, NH_2, SO_3H, -COOH, $-NH-CO-CH_2-CH_2-CH(NH_2)COOH$ oder $-(CO-NH-CHY^4)_{1-3}COOH$ darstellt; wobei W H oder OH darstellt,
wobei Y^4 unabhängig voneinander lineares oder verzweigtes, gegebenenfalls mit–$NHCONH_2$ substituiertes, C_{1-6} Alkyl oder gegebenenfalls mit $–NH_2$ substituiertes Aryl oder Benzyl darstellt;

R^2 H, -L-Binder, -MOD, $-CO-CHY^4-NHY^5$ oder $-(CH_2)_{0-3}Z$ darstellt, wobei Y^4 unabhängig voneinander lineares oder verzweigtes, gegebenenfalls mit–$NHCONH_2$ substituiertes, C_{1-6} Alkyl oder gegebenenfalls mit $–NH_2$ substituiertes Aryl oder Benzyl darstellt und Y^5 H oder $–CO-CHY^6-NH_2$ darstellt, wobei Y^6 lineares oder verzweigtes C_{1-6} Alkyl darstellt,
wobei Z -H, Halogen, $-OY^3$, $-SY^3$, NHY^3, $-CO-NY^1Y^2$, oder $-CO-OY^3$ darstellt,
wobei Y^1 und Y^2 unabhängig voneinander H, NH_2, oder $-(CH_2)_{0-3}Z$' darstellen, und Y^3 H oder $-(CH_2)_{0-3}Z$' darstellt, wobei Z' H, SO_3H, NH_2 oder COOH darstellt;
;
R^4 H, -L-Binder, $-CO-CHY^4-NHY^5$ oder $-(CH_2)_{0-3}Z$ darstellt,
wobei Z -H, Halogen, $-OY^3$, $-SY^3$, NHY^3, $-CO-NY^1Y^2$, oder $-CO-OY^3$ darstellt,
wobei Y^1 und Y^2 unabhängig voneinander H, NH_2, oder $-(CH_2)_{0-3}Z$' darstellen, und Y^3 H oder $-(CH_2)_{0-3}Z$' darstellt, wobei Z' H, SO_3H, NH_2 oder COOH darstellt;
wobei Y^4 unabhängig voneinander lineares oder verzweigtes, gegebenenfalls mit–$NHCONH_2$ substituiertes, C_{1-6} Alkyl oder gegebenenfalls mit $–NH_2$ substituiertes Aryl oder Benzyl darstellt und Y^5 H oder $–CO-CHY^6-NH_2$ darstellt, wobei Y^6 lineares oder verzweigtes C_{1-6} Alkyl darstellt;
oder R^2 und R^4 gemeinsam (unter Bildung eines Pyrrolidinringes) $–CH_2-CHR^{10}-$ oder $-CHR^{10}-CH_2-$ darstellen, wobei R^{10} -L-Binder, H, NH_2, SO_3H, COOH, SH, oder OH darstellt;

A CO, SO, SO_2, SO_2NH oder CNNH darstellt;

R^3 -L-Binder, -MOD, oder eine gegebenenfalls substituierte Alkyl-, Cycloalkyl-, Aryl-, Heteroaryl- Heteroalkyl-, Heterocycloalkyl- Gruppe darstellt, bevorzugt –L-#1 oder eine C_{1-10}-Alkyl-, C_{6-10}-Aryl- oder C_{6-10}-Aralkyl-, C_{5-10}-Heteroalkyl-, C_{1-10}-Alkyl-O-C_{6-10}-Aryl- oder C_{5-10}-Heterocycloalkyl-Gruppe, die mit 1-3 –OH Gruppen, 1-3 Halogenatomen, 1-3 halogenierten Alkylgruppen (die jeweils 1-3 Halogenatome aufweisen), 1-3 O-Alkyl Gruppen, 1-3 –SH Gruppen, 1-3 -S-Alkyl Gruppen, 1-3 -O-CO-Alkyl Gruppen, 1-3 -O-CO-NH-Alkyl Gruppen, 1-

3 -NH-CO-Alkyl Gruppen, 1-3 -NH-CO-NH-Alkyl Gruppen, 1-3 -$S(O)_n$-Alkyl Gruppen, 1-3 -SO_2-NH-Alkyl Gruppen, 1-3 -NH-Alkyl Gruppen, 1-3 -$N(Alkyl)_2$ Gruppen, 1-3 -NH_2 Gruppen oder 1-3 -$(CH_2)_{0-3}Z$ Gruppen, wobei Z -H, Halogen, -OY^3, -SY^3, -NHY^3, -CO-NY^1Y^2, oder -CO-OY^3 darstellt, mit Y^1 und Y^2 unabhängig voneinander H, NH_2, oder -$(CH_2)_{0-3}Z'$ darstellen, und Y^3 H, -$(CH_2)_{0-3}$-$CH(NHCOCH_3)Z'$,-$(CH_2)_{0-3}$-$CH(NH_2)Z'$, oder -$(CH_2)_{0-3}Z'$ darstellt, wobei Z' H, SO_3H, NH_2 oder COOH darstellt,
substituiert sein kann (wobei „Alkyl" bevorzugt C_{1-10}-Alkyl bedeutet);

R^5 -L-Binder, H, NH_2, NO_2, Halogen (insbesondere F, Cl, Br), -CN, CF_3, -OCF_3, -CH_2F, -CH_2F, SH oder -$(CH_2)_{0-3}Z$ darstellt, wobei Z -H, -OY^3, -SY^3, Halogen, NHY^3, -CO-NY^1Y^2, oder -CO-OY^3 darstellt,
wobei Y^1 und Y^2 unabhängig voneinander H, NH_2, oder -$(CH_2)_{0-3}Z'$ darstellen, und Y^3 H oder -$(CH_2)_{0-3}Z'$ darstellt, wobei Z' H, SO_3H, NH_2 oder COOH darstellt;
darstellt,

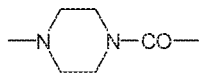
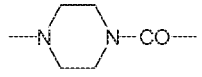
R^6 und R^7 unabhängig voneinander H, Cyano, (ggf. fluoriertes) C_{1-10}-Alkyl, (ggf. fluoriertes) C_{2-10}-Alkenyl, (ggf. fluoriertes) C_{2-10}-Alkinyl, Hydroxy, NO_2, NH_2, COOH oder Halogen (insbesondere F, Cl, Br) darstellen,

R^8 (ggf. fluoriertes) C_{1-10}-Alkyl, (ggf. fluoriertes) C_{2-10}-Alkenyl, (ggf. fluoriertes) C_{2-10}-Alkinyl, (ggf. fluoriertes) C_{4-10}-Cycloalkyl oder--$(CH_2)_{0-2}$-(HZ^2) darstellt, wobei HZ^2 ein 4 bis 7-gliedriger Heterocyclus mit bis zu zwei Heteroatomen ausgewählt aus N, O und S darstellt, wobei jede dieser Gruppen mit --OH, CO_2H or NH_2 oder --L-BINDER substituiert sein kann;

R^9 H, F, CH_3, CF_3, CH_2F oder CHF_2 darstellt;

wobei –MOD –$(NR^{10})_n$-$(G1)_O$-G2-H darstellt, wobei

R^{10} H oder C_1-C_3-Alkyl darstellt;

G1 –NHCO- , -CONH- oder  darstellt (wobei wenn G1 –NHCO- oder  darstellt, R^{10} nicht NH_2 ist);

n 0 oder 1 ist;

o 0 oder 1 ist; und

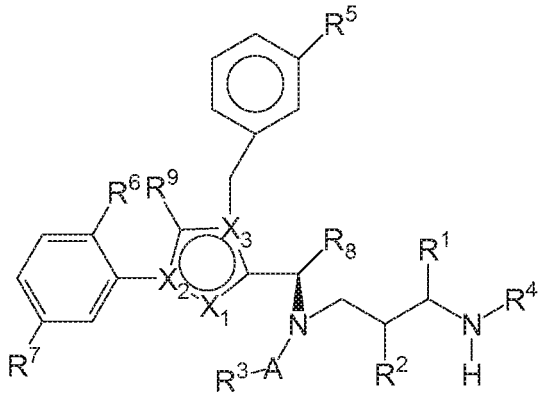
G2 eine geradkettige und/oder verzweigte Kohlenwasserstoffgruppe mit 1 bis 10 Kohlenstoffatomen ist, die einfach oder mehrfach durch eine oder mehrere der Gruppen -O-, -S-, -SO-, SO_2, -NRУ-, -NRУCO-, CONRУ-, -NRУNRУ-, -SO2NRУNRУ-, -CONRУNRУ-,

(wobei R^y H, Phenyl, C_1-C_{10}-Alkyl, C_2-C_{10}-Alkenyl, oder C_2-C_{10}-Alkinyl darstellt, die jeweils mit $NHCONH_2$, -COOH, -OH, $-NH_2$, NH-$CNNH_2$, Sulfonamid, Sulfon, Sulfoxid, oder Sulfonsäure substituiert sein können), -CO-, $-CR^x$=N-O- (wobei Rx H, C_1-C_3-Alkyl oder Phenyl darstellt) unterbrochen sein kann, wobei die Kohlenwasserstoffkette einschließlich der Seitenketten, sofern vorhanden, mit $-NHCONH_2$, -COOH, -OH, $-NH_2$, NH-$CNNH_2$, Sulfonamid, Sulfon, Sulfoxid, oder Sulfonsäure substituiert sein kann, wobei die Gruppe –MOD vorzugsweise zumindest eine Gruppe –COOH aufweist;

sowie ihre Salze, Solvate und Salze der Solvate.

Im Falle von Binderkonjugaten der KSP-Inhibitoren der Formel (IIIa) kann maximal ein Vertreter von R^1, R^2, R^3 R^4, R^5, R^8 und R^{10} (alternativ zu einer der oben angegebenen Bedeutungen) -L-Binder darstellen, wobei L für einen Linker steht und BINDER für Binder bzw. Derivat hiervon steht, wobei der Binder ggf. an mehrere Wirkstoffmoleküle gebunden sein kann.

Formel (III):



(III)

wobei

X_1 N, X_2 N und X_3 C darstellt, oder X_1 CH, X_2 C und X_3 N darstellt oder X_1 NH, X_2 C und X_3 C darstellt, oder X_1 CH, X_2 N und X_3 C darstellt;

R1 –L-BINDER, H, oder $-(CH_2)_{0-3}Z$ darstellt, wobei Z -H, $-NHY^3$, $-OY^3$, $-SY^3$, Halogen, $-CO-NY^1Y^2$, oder $-CO-OY^3$ darstellt,

wobei Y^1 und Y^2 unabhängig voneinander H, NH2, $-(CH_2CH_2O)_{0-3}-(CH_2)_{0-3}Z'$, oder $-CH(CH_2W)Z'$ darstellen, und Y^3 H oder $-(CH_2)_{0-3}Z'$ darstellt, wobei Z' H, NH_2, SO_3H, COOH, -NH-CO-CH_2-CH_2-$CH(NH_2)COOH$ oder $-(CO-NH-CHY^4)_{1-3}COOH$ darstellt; wobei W H oder OH darstellt;

wobei Y^4 unabhängig voneinander lineares oder verzweigtes, gegebenenfalls mit–$NHCONH_2$ substituiertes, C_{1-6} Alkyl oder gegebenenfalls mit $-NH_2$ substituiertes Aryl oder Benzyl darstellt;

R^2 und R^4 unabhängig voneinander –L-BINDER, H, -CO-CHY^4-NHY^5 oder -$(CH_2)_{0-3}$Z darstellen, oder R^2 und R^4 gemeinsam (unter Bildung eines Pyrrolidinringes) –CH_2-CHR^{10}- oder -CHR^{10}-CH_2- darstellen, wobei R^{10} L-#1, H, NH_2, SO_3H, COOH, SH, oder OH darstellt;
wobei Z -H, Halogen, -OY^3, -SY^3, NHY^3, -CO-NY^{1}Y^2, oder -CO-OY^3 darstellt,
wobei Y^1 und Y^2 unabhängig voneinander H, NH_2, oder -$(CH_2)_{0-3}$Z‘ darstellen, und Y^3 H oder -$(CH_2)_{0-3}$Z‘ darstellt, wobei Z‘ H, SO_3H, NH_2 oder COOH darstellt;
wobei Y^4 unabhängig voneinander lineares oder verzweigtes, gegebenenfalls mit–$NHCONH_2$ substituiertes, C_{1-6} Alkyl oder gegebenenfalls mit –NH_2 substituiertes Aryl oder Benzyl darstellt und Y^5 H oder –CO-CHY^6-NH_2 darstellt, wobei Y^6 lineares oder verzweigtes C_{1-6} Alkyl darstellt;

A CO, SO, SO_2, SO_2NH oder CNNH darstellt;

R^3 –L-BINDER oder eine gegebenenfalls substituierte Alkyl-, Aryl-, Heteroaryl- Heteroalkyl-, Heterocycloalkyl- Gruppe darstellt, bevorzugt –L-#1 oder eine C_{1-10}-Alkyl-, C_{6-10}-Aryl- oder C_{6-10}-Aralkyl-, C_{5-10}-Heteroalkyl-, C_{1-10}-Alkyl-O-C_{6-10}-Aryl- oder C_{5-10}-Heterocycloalkyl-Gruppe, die mit 1-3 –OH Gruppen, 1-3 Halogenatomen, 1-3 halogenierten Alkylgruppen (die jeweils 1-3 Halogenatome aufweisen),, 1-3 O-Alkyl Gruppen, 1-3 –SH Gruppen, 1-3 -S-Alkyl Gruppen, 1-3 -O-CO-Alkyl Gruppen, 1-3 -O-CO-NH-Alkyl Gruppen, 1-3 -NH-CO-Alkyl Gruppen, 1-3 -NH-CO-NH-Alkyl Gruppen, 1-3 -$S(O)_n$-Alkyl Gruppen, 1-3 -SO_2-NH-Alkyl Gruppen, 1-3 -NH-Alkyl Gruppen, 1-3 -$N(Alkyl)_2$ Gruppen, 1-3 -NH_2 Gruppen oder 1-3 -$(CH_2)_{0-3}$Z Gruppen, wobei Z -H, Halogen, -OY^3, -SY^3, -NHY^3, -CO-NY^{1}Y^2, oder -CO-OY^3 darstellt, mit Y^1 und Y^2 unabhängig voneinander H, NH_2, oder -$(CH_2)_{0-3}$Z‘ darstellen, und Y^3 H, -$(CH_2)_{0-3}$-$CH(NHCOCH_3)$Z‘,-$(CH_2)_{0-3}$-$CH(NH_2)$Z‘, oder -$(CH_2)_{0-3}$Z‘ darstellt, wobei Z‘ H, SO_3H, NH_2 oder COOH darstellt,
substituiert sein kann (wobei „Alkyl“ bevorzugt C_{1-10}-Alkyl bedeutet);

R^5 –L-BINDER, H, F, NH_2, NO_2, Halogen, SH oder -$(CH_2)_{0-3}$Z darstellt, wobei Z -H, Halogen, -OY^3, -SY^3, -NHY^3, -CO-NY^{1}Y^2, oder -CO-OY^3 darstellt,
wobei Y^1 und Y^2 unabhängig voneinander H, NH_2, oder -$(CH_2)_{0-3}$Z‘ darstellen, und Y^3 H oder -$(CH_2)_{0-3}$Z‘ darstellt, wobei Z‘ H, SO_3H, NH_2 oder COOH darstellt;
wobei L für einen Linker steht und BINDER für Binder bzw. Derivat hiervon steht, wobei der Binder ggf. an mehrere Wirkstoffmoleküle gebunden sein kann,

R^6 und R^7 unabhängig voneinander H, Cyano, (ggf. fluoriertes) C_{1-10}-Alkyl, (ggf. fluoriertes) C_{2-10}-Alkenyl, (ggf. fluoriertes) C_{2-10}-Alkinyl, Hydroxy oder Halogen darstellen,

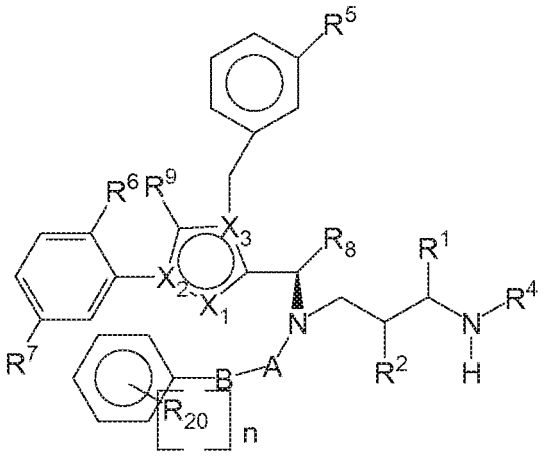
R^8 (ggf. fluoriertes) C_{1-10}-Alkyl, (ggf. fluoriertes) C_{4-10}-Cycloalkyl oder optional substituiertes Oxetan darstellt; und

R^9 H, F, CH_3, CF_3, CH_2F oder CHF_2 darstellt;

sowie ihre Salze, Solvate und Salze der Solvate.

Weiterhin sind erfindungsgemäß bevorzugt folgende KSP-Inhibitoren bzw. deren Binderkonjugate:

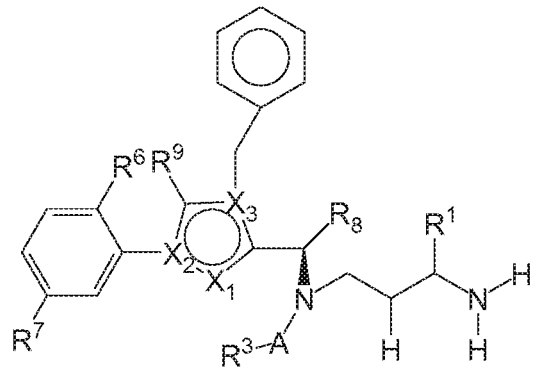
Formel (IIIb):



(IIIb)

wobei X_1, X_2, X_3 die gleiche Bedeutung wie in Formel (IIIa) oder (III) aufweisen (vorzugsweise mit X_1 CH, X_2 C und X_3 N), R^1, R^2, R^4, R^5, R^6, R^7, R^8 und R^9 die gleiche Bedeutung wie in Formel (IIIa) oder (III) aufweisen, A CO darstellt, B eine Einfachbindung, $-O-CH_2-$ oder $-CH_2-O-$ darstellt, und R^{20} NH_2, F, CF3, oder CH_3, und n 0, 1, oder 2 darstellt.

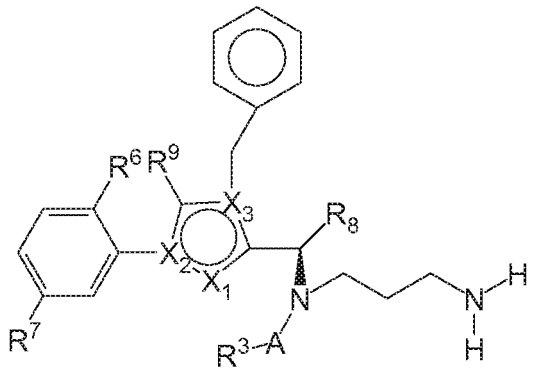
Formel (IIIc):



(IIIc)

wobei X_1, X_2, X_3 die gleiche Bedeutung wie in Formel (IIIa) oder (III) aufweisen (vorzugsweise mit X_1 CH, X_2 C und X_3 N), A, R^1, R^3, R^6, R^7, R^8, und R^9 die gleiche Bedeutung wie in Formel (IIIa) oder (III) aufweisen, wobei A vorzugsweise CO und R^3 $-CH_2OH$, $-CH_2OCH_3$, CH(CH3)OH oder $CH(CH_3)OCH_3$ darstellt.

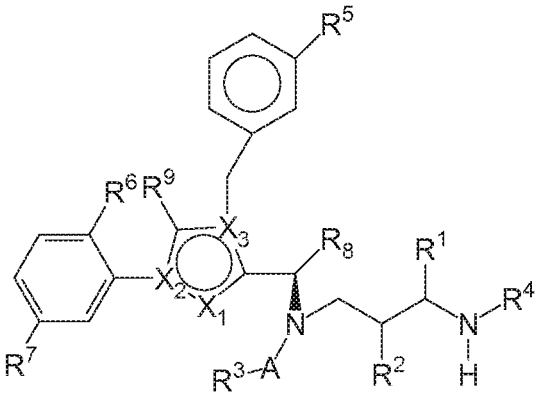
Formel (IIId):



(IIId)

wobei X_1, X_2, X_3 die gleiche Bedeutung wie in Formel (IIIa) oder (III) aufweisen (vorzugsweise mit X_1 CH, X_2 C und X_3 N), A, R^3, R^6, R^7, R^8 und R^9 die gleiche Bedeutung wie in Formel (IIIa) oder (III) aufweisen, wobei A vorzugsweise CO und R^3 $-CH_2-S_x-(CH_2)_{0-4}-CHY^5-COOH$ auf, wobei x 0 oder 1 ist, und Y^5 H oder NHY^6 darstellt, wobei Y^6 H oder $-COCH_3$ darstellt.

Formel (IIIe):



(IIIe)

wobei X_1 CH, X_2 C und X_3 N, A, R^3, R^6, R^7, R^8 und R^9 die gleiche Bedeutung wie in Formel (IIIa) oder (III) aufweisen, und R^1 -L–BINDER darstellt.

Weiterhin sind bevorzugt in den Verbindungen der Formeln (III), (IIIa), (IIIb), (IIIc), (IIId) und (IIIe) (allein oder in Kombination), wenn:

- Z Cl oder Br darstellt;
- R^1 $-(CH_2)_{0-3}Z$ darstellt, wobei Z $-CO-NY^1Y^2$ darstellt, wobei Y^2 $-(CH_2CH_2O)_{0-3}-(CH_2)_{0-3}Z'$ und Y^1 H, NH2, oder $-(CH_2CH_2O)_{0-3}-(CH_2)_{0-3}Z'$darstellt;
- Y^1 H darstellt, Y^2 $-(CH_2CH_2O)_3-CH_2CH_2Z'$ darstellt und Z' –COOH darstellt;
- Y^1 H darstellt, Y^2 $-CH_2CH_2Z'$ darstellt und Z' $-(CONHCHY^4)_2COOH$ stellt;
- Y^1 H darstellt, Y^2 $-CH_2CH_2Z'$ darstellt, Z' $-(CONHCHY^4)_2COOH$ stellt und eine Y^4 *i*-propyl darstellt und der andere ein $-(CH_2)_3-NHCONH_2$ darstellt ;
- Y^1 H darstellt, Y^2 $-CH_2CH_2Z'$ darstellt, Z' $-(CONHCHY^4)_2COOH$ stellt und eine Y^4 $-CH_3$ darstellt und der andere ein $-(CH_2)_3-NHCONH_2$ darstellt ;

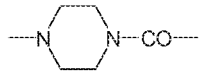
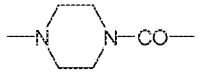
- Y^4 lineares oder verzweigtes, gegebenenfalls mit $-NHCONH_2$ substituiertes, C_{1-6} Alkyl darstellt;
- mindestens ein Vertreter von Y^4 ausgewählt wird aus *i*-propyl oder $-CH_3$.
- Y^1 H darstellt, Y^2 $-CH_2CH_2Z'$ darstellt, Z' $-CONHCHY^4COOH$ darstellt und Y^4 gegebenenfalls mit $-NH_2$ substituiertes Aryl oder Benzyl darstellt;
- Y^4 Aminobenzyl darstellt;
- R^2 $-(CH_2)_{0-3}Z$ darstellt und Z $-SY^3$ darstellt;
- R^4 $-CO-CHY^4-NHY^5$ darstellt und Y^5 H darstellt;
- R^4 $-CO-CHY^4-NHY^5$ darstellt und Y^5 $-CO-CHY^6-NH_2$ darstellt;
- Y^4 lineares oder verzweigtes, gegebenenfalls substituiertes mit $-NHCONH_2$ C_{1-6} Alkyl darstellt.

Weiterhin ist es bevorzugt, wenn R^1, R^2 oder R^3 in Formel (IIa) oder (IIIa) -MOD darstellt, insbesondere wenn R^4 –L-#1 bzw. –L-BINDER darstellt (insbesondere wenn –L ein spaltbarer Linker ist, der direkt an $-N-R^4$ bzw. –N—L-#1 bzw. –L-BINDER spaltet, so dass R^4 bzw. L durch H ersetzt wird).

Besonders bevorzugt stellt R^3 -MOD und R^1 oder R^4 –L-#1 bzw. –L-BINDER dar,

wobei –MOD $-(NR^{10})_n-(G1)_O-G2-H$ darstellt, wobei

R^{10} H oder C_1-C_3-Alkyl darstellt;

G1 –NHCO- , -CONH- oder  darstellt (wobei wenn G1 –NHCO- oder  darstellt, R^{10} nicht NH_2 ist);

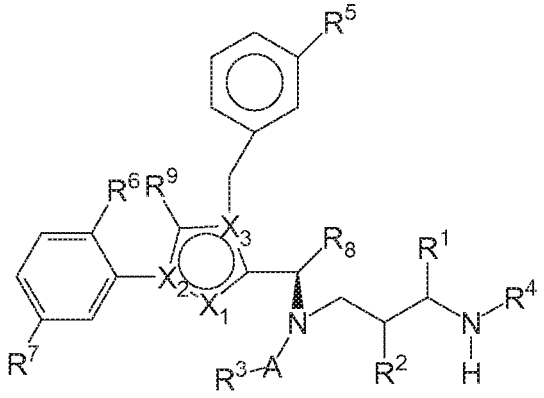
n 0 oder 1 ist;

o 0 oder 1 ist; und

G2 eine geradkettige und/oder verzweigte Kohlenwasserstoffgruppe mit 1 bis 10 Kohlenstoffatomen ist, die einfach oder mehrfach durch eine oder mehrere der Gruppen -O-, -S-, -SO-, SO_2, $-NR^Y-$, $-NR^YCO-$, $CONR^Y-$, $-NR^YNR^Y-$, $-SO2NR^YNR^Y-$, $-CONR^YNR^Y-$, (wobei R^Y H, Phenyl, C_1-C_{10}-Alkyl, C_2-C_{10}-Alkenyl, oder C_2-C_{10}-Alkinyl darstellt, die jeweils mit $NHCONH_2$, -COOH, -OH, $-NH_2$, NH-$CNNH_2$, Sulfonamid, Sulfon, Sulfoxid, oder Sulfonsäure substituiert sein können), -CO-, $-CR^x=N-O-$ (wobei Rx H, C_1-C_3-Alkyl oder Phenyl darstellt) unterbrochen sein kann, wobei die Kohlenwasserstoffkette einschließlich der Seitenketten, sofern vorhanden, mit $-NHCONH_2$, -COOH, -OH, $-NH_2$, NH-$CNNH_2$, Sulfonamid, Sulfon, Sulfoxid, oder Sulfonsäure substituiert sein kann, wobei die Gruppe –MOD vorzugsweise zumindest eine Gruppe –COOH aufweist;

Besonders bevorzugt weist die Gruppe –MOD eine (vorzugsweise terminale) –COOH-Gruppe auf, z.B. in einer Betaingruppe. Vorzugsweise weist die Gruppe –MOD die Formel $–CH_2-S_x-(CH_2)_{0-4}-CHY^5-COOH$ auf, wobei x 0 oder 1 ist, und Y^5 H oder NHY^6 darstellt, wobei Y6 H oder $-COCH_3$ darstellt.

Andere besonders bevorzugte Verbindungen weisen die folgende Formel (IV) auf:



(IV)

wobei

X_1 N, X_2 C und X_3 N darstellt;

R1 –L-BINDER, H, oder $-(CH_2)_{0-3}Z$ darstellt, wobei Z -H, $-NHY^3$, $-OY^3$, $-SY^3$, Halogen, $-CO-NY^1Y^2$, oder $-CO-OY^3$ darstellt,

wobei Y^1 und Y^2 unabhängig voneinander H, NH_2, oder $-(CH_2CH_2O)_{0-3}-(CH_2)_{0-3}Z'$ oder $–CH(CH_2W)Z'$ darstellen, und Y^3 H oder $-(CH_2)_{0-3}Z'$ darstellt, wobei Z' H, NH_2, SO_3H, COOH, $-NH-CO-CH_2-CH_2-CH(NH_2)COOH$ oder $-(CO-NH-CHY^4)_{1-3}COOH$ darstellt;

wobei Y^4 unabhängig voneinander lineares oder verzweigtes, gegebenenfalls mit $-NHCONH_2$ substituiertes, C_{1-6} Alkyl oder gegebenenfalls mit $–NH_2$ substituiertes Aryl oder Benzyl darstellt;

R^2 und R^4 unabhängig voneinander –L-BINDER, H, $-CO-CHY^4-NHY^5$ oder $-(CH_2)_{0-3}Z$ darstellen, oder R^2 und R^4 gemeinsam (unter Bildung eines Pyrrolidinringes) $–CH_2-CHR^{10}-$ oder $-CHR^{10}-CH_2-$ darstellen, wobei R^{10} L-#1, H, NH_2, SO_3H, COOH, SH, oder OH darstellt;

wobei Z -H, Halogen, $-OY^3$, $-SY^3$, NHY^3, $-CO-NY^1Y^2$, oder $-CO-OY^3$ darstellt,

wobei Y^1 und Y^2 unabhängig voneinander H, NH_2, oder $-(CH_2)_{0-3}Z'$ darstellen, und Y^3 H oder $-(CH_2)_{0-3}Z'$ darstellt, wobei Z' H, SO_3H, NH_2 oder COOH darstellt;

wobei Y^4 unabhängig voneinander lineares oder verzweigtes, gegebenenfalls mit–$NHCONH_2$ substituiertes, C_{1-6} Alkyl oder gegebenenfalls mit $–NH_2$ substituiertes Aryl oder Benzyl darstellt und Y^5 H oder $–CO-CHY^6-NH_2$ darstellt, wobei Y^6 lineares oder verzweigtes C_{1-6} Alkyl darstellt;

A CO, SO, SO_2, SO_2NH oder CNNH darstellt;

R^3 –L-BINDER,eine gegebenenfalls substituierte Alkyl-, Aryl-, Heteroaryl- Heteroalkyl-, Heterocycloalkyl- Gruppe, oder–CH_2-S_x-$(CH_2)_{0-4}$-CHY^5-COOH darstellt, wobei x 0 oder 1 ist, und Y^5 H oder NHY^6 darstellt, wobei Y6 H oder -$COCH_3$. darstellt, bevorzugt –L-BINDER oder eine C_{1-10}-Alkyl-, C_{6-10}-Aryl- oder C_{6-10}-Aralkyl-, C_{5-10}-Heteroalkyl-, C_{1-10}-Alkyl-O-C_{6-10}-Aryl- oder C_{5-10}-Heterocycloalkyl-Gruppe, die mit 1-3 –OH Gruppen, 1-3 Halogenatomen, 1-3 halogenierten Alkylgruppen (die jeweils 1-3 Halogenatome aufweisen),, 1-3 O-Alkyl Gruppen, 1-3 –SH Gruppen, 1-3 -S-Alkyl Gruppen, 1-3 -O-CO-Alkyl Gruppen, 1-3 -O-CO-NH-Alkyl Gruppen, 1-3 -NH-CO-Alkyl Gruppen, 1-3 -NH-CO-NH-Alkyl Gruppen, 1-3 -$S(O)_n$-Alkyl Gruppen, 1-3 -SO_2-NH-Alkyl Gruppen, 1-3 -NH-Alkyl Gruppen, 1-3 -$N(Alkyl)_2$ Gruppen, 1-3 -NH_2 Gruppen oder 1-3 -$(CH_2)_{0-3}$Z Gruppen, wobei Z -H, Halogen, -OY^3, -SY^3, -NHY^3, -CO-NY^1Y^2, oder -CO-OY^3 darstellt, mit Y^1 und Y^2 unabhängig voneinander H, NH_2, oder -$(CH_2)_{0-3}$Z‘ darstellen, und Y^3 H, -$(CH_2)_{0-3}$-$CH(NHCOCH_3)$Z‘,-$(CH_2)_{0-3}$-$CH(NH_2)$Z‘, oder -$(CH_2)_{0-3}$Z‘ darstellt, wobei Z‘ H, SO_3H, NH_2 oder COOH darstellt,
substituiert sein kann (wobei „Alkyl“ bevorzugt C_{1-10}-Alkyl bedeutet);

R^5 –L-BINDER, H, F, NH_2, NO_2, Halogen, SH oder -$(CH_2)_{0-3}$Z darstellt, wobei Z -H, Halogen, -OY^3, -SY^3, -NHY^3, -CO-NY^1Y^2, oder -CO-OY^3 darstellt,
wobei Y^1 und Y^2 unabhängig voneinander H, NH_2, oder -$(CH_2)_{0-3}$Z‘ darstellen, und Y^3 H oder -$(CH_2)_{0-3}$Z‘ darstellt, wobei Z‘ H, SO_3H, NH_2 oder COOH darstellt;

wobei L für einen Linker steht und BINDER für Binder bzw. Derivat hiervon steht, wobei der Binder ggf. an mehrere Wirkstoffmoleküle gebunden sein kann,

R^6 und R^7 unabhängig voneinander H, Cyano, (ggf. fluoriertes) C_{1-10}-Alkyl, (ggf. fluoriertes) C_{2-10}-Alkenyl, (ggf. fluoriertes) C_{2-10}-Alkinyl, Hydroxy oder Halogen darstellen,

R^8 (ggf. fluoriertes) C_{1-10}-Alkyl, (ggf. fluoriertes) C_{4-10}-Cycloalkyl oder optional substituiertes Oxetan darstellt; und

R^9 H, F, CH_3, CF_3, CH_2F oder CHF_2 darstellt;

sowie ihre Salze, Solvate und Salze der Solvate;
unter der Maßgabe, dass R^1, R^2 und R^4 nicht gleichzeitig H darstellen.

Weiterhin sind bevorzugt (allein oder in Kombination), wenn in Formel (IIa), (II), (III), (IIIa), (IIIb), (IIIc), (IIId), (IIIe), oder (IV):

- Z Cl oder Br darstellt;
- R^1 -$(CH_2)_{0-3}$Z darstellt, wobei Z -CO-NY^1Y^2 darstellt, wobei Y^2 -$(CH_2CH_2O)_{0-3}$-$(CH_2)_{0-3}$Z‘ und Y^1 H, NH2, oder -$(CH_2CH_2O)_{0-3}$-$(CH_2)_{0-3}$Z’darstellt;

- Y^1 H darstellt, Y^2 -$(CH_2CH_2O)_3$-CH_2CH_2Z' darstellt und Z' –COOH darstellt;
- Y^1 H darstellt, Y^2 -CH_2CH_2Z' darstellt und Z' -$(CONHCHY^4)_2COOH$ stellt;
- Y^1 H darstellt, Y^2 -CH_2CH_2Z' darstellt, Z' -$(CONHCHY^4)_2COOH$ stellt und ein Vertreter von Y^4 *i*-propyl darstellt und der andere –$(CH_2)_3$-$NHCONH_2$ darstellt ;
- Y^1 H darstellt, Y^2 -CH_2CH_2Z' darstellt, Z' -$(CONHCHY^4)_2COOH$ stellt und ein Vertreter vonY^4 –CH_3 darstellt und der andere –$(CH_2)_3$-$NHCONH_2$ darstellt ;
- Y^4 lineares oder verzweigtes, gegebenenfalls mit –$NHCONH_2$ substituiertes, C_{1-6} Alkyl darstellt;
- mindestens ein Vertreter von Y^4 ausgewählt wird aus *i*-propyl or –CH_3.
- Y^1 H darstellt, Y^2 -CH_2CH_2Z' darstellt, Z' -$CONHCHY^4COOH$ darstellt und Y^4 gegebenenfalls mit –NH_2 substituiertes Aryl oder Benzyl darstellt;
- Y^4 eine Aminobenzyl darstellt;
- R^2 –$(CH_2)_{0-3}Z$ darstellt und Z –SY^3 darstellt;
- R^4 -CO-CHY^4-NHY^5 darstellt und Y^5 H darstellt;
- R^4 -CO-CHY^4-NHY^5 darstellt und Y^5–CO-CHY^6-NH_2 darstellt;
- Y^4 lineares oder verzweigtes gegebenenfalls substituiertes mit –$NHCONH_2$ C_{1-6} Alkyl darstellt.

Weiterhin sind bevorzugt Verbindungen der Formel (IIa), (II), (III), (IIIa) oder (IV),

wobei

X_1 N, X_2 N und X_3 C darstellt; oder

X_1 N, X_2 C und X_3 N darstellt; oder

X_1 CH oder CF, X_2 C und X_3 N darstellt; oder

X_1 NH, X_2 C und X_3 C darstellt; oder

X_1 CH oder CF, X_2 N und X_3 C darstellt;

(wobei X_1 CH, X_2 C und X_3 N bevorzugt ist);

R^1 H, –L-#1 bzw. –L-BINDER, –MOD oder -$(CH_2)_{0-3}Z$ darstellt, wobei Z -H, -NHY^3, -OY^3, -SY^3, Halogen, -CO-NY^1Y^2, oder -CO-OY^3 darstellt,

wobei Y^1 und Y^2 unabhängig voneinander H, NH_2, -$(CH_2CH_2O)_{0-3}$-$(CH_2)_{0-3}Z$'(z.B. -$(CH_2)_{0-3}Z$'), oder -$CH(CH_2W)Z$' darstellen, und Y^3 H oder -$(CH_2)_{0-3}Z$' darstellt, wobei Z' H, NH_2, SO_3H, COOH, -NH-CO-CH_2-CH_2-$CH(NH_2)COOH$ oder -$(CO-NH-CHY^4)_{1-3}COOH$ darstellt; wobei W H oder OH darstellt,

wobei Y^4 unabhängig voneinander lineares oder verzweigtes, gegebenenfalls mit–$NHCONH_2$ substituiertes, C_{1-6} Alkyl oder gegebenenfalls mit –NH_2 substituiertes Aryl oder Benzyl darstellt;

R^2 H, -CO-CHY^4-NHY^5 oder -$(CH_2)_{0-3}Z$ darstellt,

wobei Z -H, Halogen, -OY^3, -SY^3, NHY^3, -CO-NY^1Y^2, oder -CO-OY^3 darstellt,

wobei Y^1 und Y^2 unabhängig voneinander H, NH_2, oder -$(CH_2)_{0-3}Z$' darstellen, und Y^3 H oder -$(CH_2)_{0-3}Z$' darstellt, wobei Z' H, SO_3H, NH_2 oder COOH darstellt;

wobei Y^4 unabhängig voneinander lineares oder verzweigtes, gegebenenfalls mit–$NHCONH_2$ substituiertes, C_{1-6} Alkyl oder gegebenenfalls mit $–NH_2$ substituiertes Aryl oder Benzyl darstellt und Y^5 H oder $–CO-CHY^6-NH_2$ darstellt, wobei Y^6 lineares oder verzweigtes C_{1-6} Alkyl darstellt;

R^4 H darstellt;

A CO, SO, SO_2, SO_2NH oder CNNH darstellt;

R^3 –L-#1 bzw. –L-BINDER, -MOD oder eine gegebenenfalls substituierte Alkyl-, Cycloalkyl-, Aryl-, Heteroaryl-, Heteroalkyl-, Heterocycloalkyl- Gruppe darstellt, bevorzugt eine C_{1-10}-Alkyl-, C_{6-10}-Aryl- oder C_{6-10}-Aralkyl-, C_{5-10}-Heteroalkyl-, C_{1-10}-Alkyl-O-C_{6-10}-Aryl- oder C_{5-10}-Heterocycloalkyl-Gruppe, die mit 1-3 –OH Gruppen, 1-3 Halogenatomen, 1-3 halogenierten Alkylgruppen (die jeweils 1-3 Halogenatome aufweisen), 1-3 O-Alkyl Gruppen, 1-3 –SH Gruppen, 1-3 -S-Alkyl Gruppen, 1-3 -O-CO-Alkyl Gruppen, 1-3 -O-CO-NH-Alkyl Gruppen, 1-3 -NH-CO-Alkyl Gruppen, 1-3 -NH-CO-NH-Alkyl Gruppen, 1-3 $-S(O)_m$-Alkyl Gruppen, 1-3 $-SO_2$-NH-Alkyl Gruppen, 1-3 -NH-Alkyl Gruppen, 1-3 $-N(Alkyl)_2$ Gruppen, 1-3 $-NH((CH_2CH_2O)_{1-20}H)$-Gruppen, 1-3 $-NH_2$ Gruppen oder 1-3 $-(CH_2)_{0-3}Z$ Gruppen, wobei Z -H, Halogen, $-OY^3$, $-SY^3$, $-NHY^3$, $-CO-NY^1Y^2$, oder $-CO-OY^3$ darstellt, mit Y^1 und Y^2 unabhängig voneinander H, NH_2, oder $-(CH_2)_{0-3}Z'$ darstellen, und Y^3 H, $-(CH_2)_{0-3}-CH(NHCOCH_3)Z'$,$-(CH_2)_{0-3}-CH(NH_2)Z'$, oder $-(CH_2)_{0-3}Z'$ darstellt, wobei Z' H, SO_3H, NH_2 oder COOH darstellt, substituiert sein kann (wobei „Alkyl" bevorzugt C_{1-10}-Alkyl bedeutet);

R^5 H, -MOD, NH_2, NO_2, Halogen (insbesondere F, Cl, Br), -CN, CF_3, $-OCF_3$, $-CH_2F$, $-CH_2F$, SH oder $-(CH_2)_{0-3}Z$ darstellt, wobei Z -H, $-OY^3$, $-SY^3$, Halogen, NHY^3, $-CO-NY^1Y^2$, oder $-CO-OY^3$ darstellt,
wobei Y^1 und Y^2 unabhängig voneinander H, NH_2, oder $-(CH_2)_{0-3}Z'$ darstellen, und Y^3 H oder $-(CH_2)_{0-3}Z'$ darstellt, wobei Z' H, SO_3H, NH_2 oder COOH darstellt;

R^6 und R^7 unabhängig voneinander H, Cyano, (ggf. fluoriertes) C_{1-10}-Alkyl, (ggf. fluoriertes) C_{2-10}-Alkenyl, (ggf. fluoriertes) C_{2-10}-Alkinyl, Hydroxy, NO_2, NH_2, COOH oder Halogen (insbesondere F, Cl, Br) darstellen,

R^8 (ggf. fluoriertes) C_{1-10}-Alkyl, (ggf. fluoriertes) C_{2-10}-Alkenyl, (ggf. fluoriertes) C_{2-10}-Alkinyl, oder (ggf. fluoriertes) C_{4-10}-Cycloalkyl;

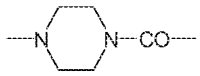
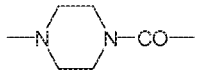
wobei einer oder keiner der Substituenten R^1 und R^3–L-#1 –L-#1 bzw. –L-BINDER darstellt,

L für den Linker steht und #1 für die Bindung zum Binder bzw. Derivat hiervon und BINDER für den Binder steht,

R^9 H, F, CH_3, CF_3, CH_2F oder CHF_2 darstellt;

wobei –MOD $–(NR^{10})_n-(G1)_o-G2-H$ darstellt, wobei

R^{10} H oder C_1-C_3-Alkyl darstellt;

G1 –NHCO- , -CONH- oder  darstellt (wobei wenn G1 –NHCO- oder  darstellt, R^{10} nicht NH_2 ist);

n 0 oder 1 ist;

o 0 oder 1 ist; und

G2 eine geradkettige und/oder verzweigte Kohlenwasserstoffgruppe mit 1 bis 10 Kohlenstoffatomen ist, die einfach oder mehrfach durch eine oder mehrere der Gruppen -O-, -S-, -SO-, SO_2, -$NR^У$-, -$NR^У$CO-, CO$NR^У$-, -$NR^У NR^У$-, -SO2$NR^У NR^У$-, -CO$NR^У NR^У$-, (wobei R^y H, Phenyl, C_1-C_{10}-Alkyl, C_2-C_{10}-Alkenyl, oder C_2-C_{10}-Alkinyl darstellt, die jeweils mit $NHCONH_2$, -COOH, -OH, $-NH_2$, NH-$CNNH_2$, Sulfonamid, Sulfon, Sulfoxid, oder Sulfonsäure substituiert sein können), -CO-, -CR^x=N-O- (wobei Rx H, C_1-C_3-Alkyl oder Phenyl darstellt) unterbrochen sein kann, wobei die Kohlenwasserstoffkette einschließlich der Seitenketten, sofern vorhanden, mit –$NHCONH_2$, -COOH, -OH, $-NH_2$, NH-$CNNH_2$, Sulfonamid, Sulfon, Sulfoxid, oder Sulfonsäure substituiert sein kann, wobei die Gruppe –MOD vorzugsweise zumindest eine Gruppe –COOH aufweist;

sowie ihre Salze, Solvate und Salze der Solvate.

Weiterhin sind bevorzugt Verbindungen der Formel Formel (IIa), (II), (III), (IIIa) oder (IV), in denen

X_1 N, X_2 N und X_3 C darstellt; oder

X_1 N, X_2 C und X_3 N darstellt; oder

X_1 CH oder CF, X_2 C und X_3 N darstellt; oder

X_1 NH, X_2 C und X_3 C darstellt; oder

X_1 CH oder CF, X_2 N und X_3 C darstellt;

(wobei X_1 CH, X_2 C und X_3 N bevorzugt ist);

R^1 H, –L-#1 bzw. –L-BINDER, –MOD oder $-(CH_2)_{0-3}Z$ darstellt, wobei Z -H, $-NHY^3$, $-OY^3$, $-SY^3$, Halogen, $-CO-NY^1Y^2$, oder $-CO-OY^3$ darstellt,
wobei Y^1 und Y^2 unabhängig voneinander H, NH_2, $-(CH_2CH_2O)_{0-3}-(CH_2)_{0-3}Z'$(z.B. $-(CH_2)_{0-3}Z'$), oder $-CH(CH_2W)Z'$ darstellen, und Y^3 H oder $-(CH_2)_{0-3}Z'$ darstellt, wobei Z' H, NH_2, SO_3H, COOH, $-NH-CO-CH_2-CH_2-CH(NH_2)COOH$ oder $-(CO-NH-CHY^4)_{1-3}COOH$ darstellt; wobei W H oder OH darstellt,
wobei Y^4 unabhängig voneinander lineares oder verzweigtes, gegebenenfalls mit–$NHCONH_2$ substituiertes, C_{1-6} Alkyl oder gegebenenfalls mit $–NH_2$ substituiertes Aryl oder Benzyl darstellt;

R^2 H, $-CO-CHY^4-NHY^5$ oder $-(CH_2)_{0-3}Z$ darstellt,
wobei Z -H, Halogen, $-OY^3$, $-SY^3$, NHY^3, $-CO-NY^1Y^2$, oder $-CO-OY^3$ darstellt,
wobei Y^1 und Y^2 unabhängig voneinander H, NH_2, oder $-(CH_2)_{0-3}Z'$ darstellen, und Y^3 H oder $-(CH_2)_{0-3}Z'$ darstellt, wobei Z' H, SO_3H, NH_2 oder COOH darstellt;
wobei Y^4 unabhängig voneinander lineares oder verzweigtes, gegebenenfalls mit–$NHCONH_2$ substituiertes, C_{1-6} Alkyl oder gegebenenfalls mit $–NH_2$ substituiertes Aryl oder Benzyl darstellt und Y^5 H oder $–CO-CHY^6-NH_2$ darstellt, wobei Y^6 lineares oder verzweigtes C_{1-6} Alkyl darstellt;

R^4 H darstellt,

A CO, SO, SO_2, SO_2NH oder CNNH darstellt;

R^3 –L-#1 bzw. –L-BINDER, -MOD oder eine gegebenenfalls substituierte Alkyl-, Cycloalkyl-, Aryl-, Heteroaryl-, Heteroalkyl-, Heterocycloalkyl- Gruppe darstellt, bevorzugt eine C_{1-10}-Alkyl-, C_{6-10}-Aryl- oder C_{6-10}-Aralkyl-, C_{5-10}-Heteroalkyl-, C_{1-10}-Alkyl-O-C_{6-10}-Aryl- oder C_{5-10}-Heterocycloalkyl-Gruppe, die mit 1-3 –OH Gruppen, 1-3 Halogenatomen, 1-3 halogenierten Alkylgruppen (die jeweils 1-3 Halogenatome aufweisen), 1-3 O-Alkyl Gruppen, 1-3 –SH Gruppen, 1-3 -S-Alkyl Gruppen, 1-3 -O-CO-Alkyl Gruppen, 1-3 -O-CO-NH-Alkyl Gruppen, 1-3 -NH-CO-Alkyl Gruppen, 1-3 -NH-CO-NH-Alkyl Gruppen, 1-3 $-S(O)_n$-Alkyl Gruppen, 1-3 $-SO_2$-NH-Alkyl Gruppen, 1-3 -NH-Alkyl Gruppen, 1-3 $-N(Alkyl)_2$ Gruppen, 1-3 $-NH((CH_2CH_2O)_{1-20}H)$-Gruppen, 1-3 $-NH_2$ Gruppen oder 1-3 $-(CH_2)_{0-3}Z$ Gruppen, wobei Z -H, Halogen, $-OY^3$, $-SY^3$, $-NHY^3$, $-CO-NY^1Y^2$, oder $-CO-OY^3$ darstellt, mit Y^1 und Y^2 unabhängig voneinander H, NH_2, oder $-(CH_2)_{0-3}Z'$ darstellen, und Y^3 H, $-(CH_2)_{0-3}-CH(NHCOCH_3)Z'$,$-(CH_2)_{0-3}-CH(NH_2)Z'$, oder $-(CH_2)_{0-3}Z'$ darstellt, wobei Z' H, SO_3H, NH_2 oder COOH darstellt, substituiert sein kann (wobei „Alkyl" bevorzugt C_{1-10}-Alkyl bedeutet);

R^5 H, -MOD, NH_2, NO_2, Halogen (insbesondere F, Cl, Br), -CN, CF_3, $-OCF_3$, $-CH_2F$, $-CH_2F$, SH oder $-(CH_2)_{0-3}Z$ darstellt, wobei Z -H, $-OY^3$, $-SY^3$, Halogen, NHY^3, $-CO-NY^1Y^2$, oder $-CO-OY^3$ darstellt,

wobei Y^1 und Y^2 unabhängig voneinander H, NH_2, oder $-(CH_2)_{0-3}Z'$ darstellen, und Y^3 H oder $-(CH_2)_{0-3}Z'$ darstellt, wobei Z' H, SO_3H, NH_2 oder COOH darstellt;

R^6 und R^7 unabhängig voneinander H oder Halogen (insbesondere F, Cl, Br) darstellen,

R^8 (ggf. fluoriertes) C_{1-10}-Alkyl darstellt;

wobei einer oder keiner der Substituenten R^1 und R^3–L-#1 bzw. –L-BINDER darstellt,

L für den Linker steht und #1 für die Bindung zum Binder bzw. Derivat hiervon und BINDER für den Binder steht,

R^9 H, F, CH_3, CF_3, CH_2F oder CHF_2 darstellt;

wobei –MOD $-CH_2-S_x-(CH_2)_{0-4}-CHY^5-COOH$ auf, wobei x 0 oder 1 ist, und Y^5 H oder NHY^6 darstellt, wobei Y6 H oder $-COCH_3$ darstellt,

sowie ihre Salze, Solvate und Salze der Solvate.

Weiterhin sind die folgende Verbindungen bevorzugt, die ggf. gemeinsam mit einer Säure wie z.B. Trifluoressigsäure vorliegen können. Diese Verbindungen können über die Positionen entsprechend den Positionen R^1, R^2, R^3 R^4, R^5, R^8 und R^{10}:, insbesondere R^1 und R^3, über einen Linker an einen Binder gebunden werden (wobei ein Wasserstoffatom durch den Linker substituiert wird):

N-(3-Aminopropyl)-N-{(1R)-1-[4-benzyl-1-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrazol-3-yl]-2,2-dimethylpropyl}-2-hydroxyacetamid;

N-(3-Aminopropyl)-N-{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-2-hydroxyacetamid;

(2S)-2-amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]-N-methylbutanamid(1:1);

N-(3-Aminopropyl)-N-{(1S)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2yl]-2,2-dimethylpropyl}acetamid.

(15S,19R)-15-Amino-19-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-18-glycoloyl-20,20-dimethyl-14-oxo-4,7,10-trioxa-13,18-diazahenicosan-1-säure;

N-{(2S)-2-Amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}-beta-alanyl-L-valyl-N^5-carbamoyl-L-ornithin;

N-{(2S)-2-Amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}-beta-alanyl-L-alanyl-N^5-carbamoyl-L-ornithin;

N-{(2S)-2-Amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}-beta-alanyl-4-amino-L-phenylalanin;

N-{(1R)-1-[1-(3-aminobenzyl)-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-N-(3-aminopropyl)-2-hydroxyacetamid(1:1);

(2S)-2-Amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butansäure;

N-[(3S)-3-amino-4-hydrazino-4-oxobutyl]-N-{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-2-hydroxyacetamid(1:1);

N-{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-N-[(3S)-3,4-diaminobutyl]-2-hydroxyacetamid(1:1);

N-{(2S)-2-Amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}-beta-alanin;

(2S)-2-amino-N-(2-aminoethyl)-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanamid(2:1);

(1-{(2S)-2-Amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}hydrazino)essigsäure;

N-[3-Amino-2-(sulfanylmethyl)propyl]-N-{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-2-hydroxyacetamidhydrochlorid(1:1);

4-amino-N-(3-aminopropyl)-N-{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}benzamid(2:1);

N-{3-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]propyl}-N5-carbamoyl-L-ornithinamid(1:1);

L-valyl-N-{3-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]propyl}-N5-carbamoyl-L-ornithinamid(1:1);

L-valyl-N-{3-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]propyl}-N5-carbamoyl-L-ornithinamid(1:1);

N-(3-Aminopropyl)-N-{(1S)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-2-hydroxyacetamid;

S-(1-{2-[(N-{(2S)-2-Amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}-beta-alanyl)amino]ethyl}-2,5-dioxopyrrolidin-3-yl)-L-cystein;

S-[1-(2-{[2-({(2S)-2-Amino-4-[{(1R)-1-[4-benzyl-1-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrazol-3-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}amino)ethyl]amino}-2-oxoethyl)-2,5-dioxopyrrolidin-3-yl]-L-cystein:

N-{(2S)-2-Amino-4-[{(1R)-1-[4-benzyl-1-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrazol-3-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}-beta-alanyl-L-alanyl-N-[4-(3-{[(2R)-2-amino-2-carboxyethyl]sulfanyl}-2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)phenyl]-N^5-carbamoyl-L-ornithinamid;

S-(1-{2-[(N-{(2S)-2-Amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}-beta-alanyl)amino]ethyl}-2,5-dioxopyrrolidin-3-yl)-L-cystein;

S-[1-(2-{[2-({(2S)-2-Amino-4-[{(1R)-1-[4-benzyl-1-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrazol-3-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}amino)ethyl]amino}-2-oxoethyl)-2,5-dioxopyrrolidin-3-yl]-L-cystein;N-{(2S)-2-Amino-4-[{(1R)-1-[4-benzyl-1-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrazol-3-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}-beta-alanyl-L-alanyl-N-[4-(3-{[(2R)-2-amino-2-carboxyethyl]sulfanyl}-2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)phenyl]-N^5-carbamoyl-L-ornithinamid;

S-(1-{2-[(N-{(2S)-2-Amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}-beta-alanyl)amino]ethyl}-2,5-dioxopyrrolidin-3-yl)-L-cystein;

N-[6-(3-{[(2R)-2-Amino-2-carboxyethyl]sulfanyl}-2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)hexanoyl]-L-valyl-N^5-carbamoyl-L-ornithyl-N^6-{(2S)-2-amino-4-[{(1R)-1-[4-benzyl-1-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrazol-3-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}-L-lysin;

S-[1-(2-{[2-({(2S)-2-Amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}amino)ethyl]amino}-2-oxoethyl)-2,5-dioxopyrrolidin-3-yl]-L-cystein;

S-(2-{[2-({(2S)-2-Amino-4-[{(1R)-1-[4-benzyl-1-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrazol-3-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}amino)ethyl]amino}-2-oxoethyl)-L-cystein;

S-{1-[6-(2-{(2S)-2-Amino-4-[{(1R)-1-[4-benzyl-1-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrazol-3-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}hydrazino)-6-oxohexyl]-2,5-dioxopyrrolidin-3-yl}-L-cystein;

N-[19-(3(R/S)-{[(2R)-2-Amino-2-carboxyethyl]sulfanyl}-2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)-17-oxo-4,7,10,13-tetraoxa-16-azanonadecan-1-oyl]-R/S-{2-[(3-aminopropyl){(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}amino]-2-oxoethyl}homocystein;

S-{(3R/S)-1-[2-({(2S)-2-Amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}amino)ethyl]-2,5-dioxopyrrolidin-3-yl}-L-cystein;

N-[19-(3(R/S)-{[(2R)-2-Amino-2-carboxyethyl]sulfanyl}-2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)-17-oxo-4,7,10,13-tetraoxa-16-azanonadecan-1-oyl]-R/S-{2-[(3-aminopropyl){(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}amino]-2-oxoethyl}homocystein;

S-[(3R/S)-1-(2-{[6-({2-[(3-Aminopropyl){(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}amino]-2-oxoethyl}sulfanyl)hexanoyl]amino}ethyl)-2,5-dioxopyrrolidin-3-yl]-L-cystein;

S-{1-[2-({[(1R,3S)-3-({(2S)-2-Amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}amino)cyclopentyl]carbonyl}amino)ethyl]-2,5-dioxopyrrolidin-3-yl}-L-cystein;

S-(2-{[2-({(2S)-2-Amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}amino)ethyl]amino}-2-oxoethyl)-L-cystein;

N^6-(N-{(2S)-2-Amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}-D-alanyl)-L-lysin;

N^6-(N-{(2S)-2-Amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}-beta-alanyl)-N^2-{N-[6-(3-{[(2R)-2-amino-2-carboxyethyl]sulfanyl}-2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)hexanoyl]-L-valyl-L-alanyl}-L-lysin;

N-[2-({(2S)-2-Amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}amino)ethyl]-L-glutamin;

N^6-(N-{(2S)-2-Amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}-beta-alanyl)-L-lysin;

N-(3-Aminopropyl)-N-{(1R)-1-[4-benzyl-1-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrazol-3-yl]-2,2-dimethylpropyl}acetamid;

N-(3-Aminopropyl)-N-{(1R)-1-[4-benzyl-1-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrazol-3-yl]-2,2-dimethylpropyl}-2-methoxyacetamid;

N-(3-Aminopropyl)-N-{(1R)-1-[4-benzyl-1-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrazol-3-yl]-2,2-dimethylpropyl}-2,4-difluorobenzamid;

N-(3-Aminopropyl)-N-{(1R)-1-[4-benzyl-1-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrazol-3-yl]-2,2-dimethylpropyl}-4-methylbenzamid;

N-(3-Aminopropyl)-N-{(1R)-1-[4-benzyl-1-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrazol-3-yl]-2,2-dimethylpropyl}-2-ethoxyacetamid;

N-(3-Aminopropyl)-N-{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-3,3,3-trifluorpropanamid;

N-(3-Aminopropyl)-N-{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-4-fluorbenzamid;

N-(3-Aminopropyl)-N-{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}acetamid;

N-(3-Aminopropyl)-N-{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-4-(trifluoromethyl)benzamid;

N-(3-Aminopropyl)-N-{(1R)-1-[4-benzyl-1-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrazol-3-yl]-2,2-dimethylpropyl}-2-ethoxyacetamid;

N-(3-Aminopropyl)-N-{(1R)-1-[4-benzyl-1-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrazol-3-yl]-2,2-dimethylpropyl}-2-ethoxyacetamid

(2S)-2-Amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butansäure;

(2S)-2-amino-N-(2-aminoethyl)-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanamid;

4-[(2-{[2-({(2S)-2-Amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}amino)ethyl]amino}-2-oxoethyl)amino]-3-{[(2R)-2-amino-2-carboxyethyl]sulfanyl}-4-oxobutansäure;

4-[(2-{[2-({(2S)-2-Amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}amino)ethyl]amino}-2-oxoethyl)amino]-2-{[(2R)-2-amino-2-carboxyethyl]sulfanyl}-4-oxobutansäure;

N-{(2S)-2-Amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}-beta-alanin;

N-{(2S)-2-Amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}-L-serin;

N-{(2S)-2-Amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}-L-alanin;

N-{(2S)-2-Amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}glycin;

N-(3-aminopropyl)-N-{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-4-methylbenzamid;

N-(3-aminopropyl)-N-{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-4-(methylsulfanyl)benzamid;

(2S)-N-(3-aminopropyl)-N-{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-2-hydroxypropanamid;

N-(3-aminopropyl)-N-{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-2-(methylsulfanyl)acetamid;

(2S)-N-(3-aminopropyl)-N-{(1R)-1-[4-benzyl-1-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrazol-3-yl]-2,2-dimethylpropyl}-2-hydroxypropanamid;

Methyl-4-[(3-aminopropyl){(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}amino]-4-oxobutanoat;

4-[(3-Aminopropyl){(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}amino]-4-oxobutansäure;

(2R)-22-[(3R/S)-3-{[(2R)-2-Amino-2-carboxyethyl]sulfanyl}-2,5-dioxopyrrolidin-1-yl]-2-[({2-[(3-aminopropyl){(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}amino]-2-oxoethyl}sulfanyl)methyl]-4,20-dioxo-7,10,13,16-tetraoxa-3,19-diazadocosan-1-säure;

4-amino-N-(3-aminopropyl)-N-{(1R)-1-[4-benzyl-1-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrazol-3-yl]-2,2-dimethylpropyl}benzamid;

N-Acetyl-S-{2-[(3-aminopropyl){(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}amino]-2-oxoethyl}-L-cystein;

N-Acetyl-S-[2-([3-(L-alanylamino)propyl]{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}amino)-2-oxoethyl]-L-cystein;

(2S)-N-(3-aminopropyl)-N-{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}tetrahydrofuran-2-carboxamid;

3-({2-[(3-Aminopropyl){(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}amino]-2-oxoethyl}sulfanyl)propansäure;

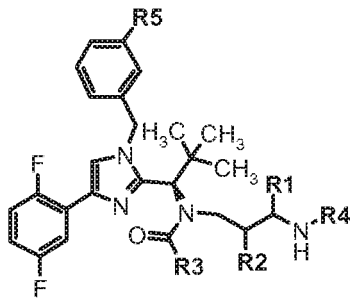
S-{2-[(3-Aminopropyl){(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}amino]-2-oxoethyl}homocystein;

4-amino-N-(3-aminopropyl)-N-{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}benzamid;

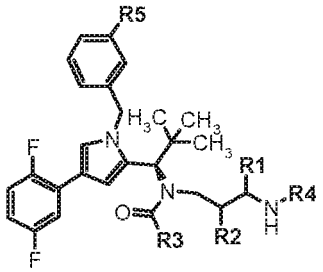
4-[(2-{[(2R)-2-({(2S)-2-Amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}amino)-2-carboxyethyl]amino}-2-oxoethyl)amino]-3-{[(2R)-2-amino-2-carboxyethyl]sulfanyl}-4-oxobutansäure;

4-[(2-{[(2R)-2-({(2S)-2-Amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}amino)-2-carboxyethyl]amino}-2-oxoethyl)amino]-2-{[(2R)-2-amino-2-carboxyethyl]sulfanyl}-4-oxobutansäure;

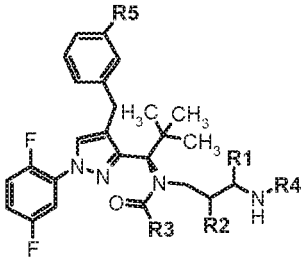
Erfindungsgemäß besonders bevorzugt sind die folgenden Verbindungen der Formeln V, VI oder VII, wobei R^1, R^2, R^3, R^4 und R^5 die oben genannten Bedeutungen (wie z.B. für Formel (IIa) oder (IIIa) angegeben) haben:



Formel V



Formel VI



Formel VII

Besonders bevorzugt sind die Verbindungen der Formeln V, VI, VII, wobei R^1, und R^5 H oder –L-#1 darstellen; R^2 und R^4 unabhängig voneinander –L-#1 oder H oder R^2 und R^4 gemeinsam (unter Bildung eines Pyrrolidinringes) $–CH_2-CHR^{10}-$ oder $–CHR^{10}-CH_2-$ darstellen, wobei R^{10} H oder –L-#1, darstellt; und R^3 CH_2OH, $CH(CH_3)OH$ oder –L-#1 darstellt, wobei einer der Substituenten R^1, R^2, R^3, R^4, R^5 und R^{10} –L-#1 darstellt. Insbesondere bevorzugt sind entsprechende Verbindungen der Formel VI.

Linker

Aus der Literatur sind verschiedene Möglichkeiten der kovalenten Kopplung (Konjugation) von organischen Molekülen an Binder wie z.B. Antikörper bekannt (siehe z.B. K. Lang and J. W. Chin. *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 4764-4806, M. Rashidian et al. *Bioconjugate Chem.* **2013**, *24*, 1277-1294). Erfindungsgemäß bevorzugt ist die Konjugation der KSP-Inhibitoren an einen Antikörper über ein oder mehrere Schwefelatome von Cystein-Resten des Antikörpers, die entweder als freie Thiole bereits vorliegen oder durch Reduktion von Disulfidbrücken generiert werden, und/oder über eine oder mehrere NH-Gruppen von Lysin-Resten des Antikörpers. Es ist jedoch auch möglich, den KSP-Inhibitor an den Antikörper über Tyrosinreste, über Glutaminreste, über Reste unnatürlicher Aminosäuren, über freie Carboxylgruppen oder über Zuckerreste des Antikörpers zu binden. Zur Kopplung werden sogenannte Linker verwendet. Linker lassen sich in die Gruppe der *in vivo* spaltbaren Linker und in die Gruppe der *in vivo* stabilen Linker unterteilen (siehe L. Ducry und B. Stump, *Bioconjugate Chem.* 21, 5-13 (2010)). Die *in vivo* spaltbaren Linker weisen eine *in vivo* spaltbare Gruppe auf, wobei wiederum zwischen chemisch *in vivo* spaltbaren und enzymatisch *in vivo* spaltbaren Gruppen unterschieden werden kann.

„Chemisch *in vivo* spaltbar" bzw. „enzymatisch *in vivo* spaltbar" bedeutet, dass die Linker bzw. Gruppen im Blutkreislauf stabil sind und erst an bzw. in der Zielzelle durch die dort veränderte chemische bzw. enzymatische Umgebung (niedrigerer pH-Wert; erhöhte Glutathion-Konzentration; Vorliegen lysosomaler Enzyme wie Cathepsin oder Plasmin, oder Glyosidasen wie beispielsweise ß-Glucuronidasen) sich spalten, um so den niedermolekularen KSP-Inhibitor oder ein Derivat davon freizusetzen. Die chemisch *in vivo* spaltbaren Gruppen sind insbesondere Disulfid, Hydrazon, Acetal und Aminal; die enzymatisch *in vivo* spaltbaren Gruppen sind insbesondere 2-8-Oligopeptidgruppe, insbesondere eine Dipeptidgruppe oder Glycoside. Peptidspaltstellen sind in *Bioconjugate Chem.* **2002,** *13,* 855-869, sowie *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 8 (**1998**) 3341-3346 *sowie Bioconjugate Chem.* **1998,** *9,* 618-626 offenbart. Hierzu gehören z.B. Valin-Alanin, Valin-Lysin, Valin-Citrullin, Alanin-Lysin und Phenylalanin-Lysin (ggf. mit zusätzlicher Amidgruppe).

Die *in vivo* stabilen Linker zeichnen sich durch eine hohe Stabilität aus (weniger als 5 % Metabolite nach 24 Stunden in Plasma) und weisen die oben genannten chemisch oder enzymatisch *in vivo* spaltbaren Gruppen nicht auf.

Der Linker –L- weist vorzugsweise eine der folgenden Grundstrukturen (i) bis (iv) auf:

(i) $-(CO)_m-SG1-L1-L2-$

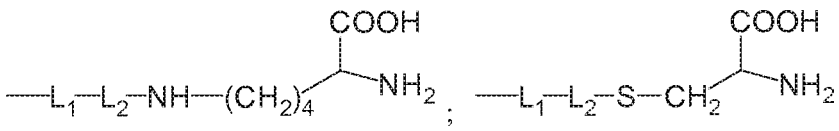
(ii) $-(CO)_m-L1-SG-L1-L2-$

(iii) $-(CO)_m-L1-L2-$

(iv) $-(CO)_m-L1-SG-L2$

wobei m 0 oder 1 ist; SG eine (chemisch oder enzymatisch) *in vivo* spaltbare Gruppe (insbesondere Disulfid, Hydrazon, Acetal und Aminal; oder eine mit Cathepsin oder Plasmin spaltbare 2-8-Oligopeptidgruppe) ist, SG1 eine Oligopeptidgruppe oder vorzugsweise eine Dipeptidgruppe ist, L1 unabhängig voneinander für *in vivo* stabile organische Gruppen stehen, und L2 für eine Kopplungsgruppe an den Binder oder eine Einfachbindung steht. Die Kopplung erfolgt hierbei vorzugsweise an einen Cysteinrest oder einen Lysinrest des Binders. Alternativ kann die Kopplung an einen Tyrosinrest, Glutaminrest oder an eine unnatürliche Aminosäure des Binders erfolgen. Die unnatürlichen Aminosäuren können beispielsweise Aldehyd- oder Ketogruppen (wie z.B. Formylglycin) oder Azid- oder Alkingruppen enthalten (siehe hierzu Lan & Chin, Cellular Incorporation of Unnatural Amino Acids and Bioorthogonal Labeling of Proteins, Chem.Rev. 2014, 114, 4764-4806).

Erfindungsgemäß bevorzugt ist insbesondere die Linker-Grundstruktur (iii), insbesondere wenn der Binder ein anti-TWEAKR-Antikörper oder ein anti-EGFR-Antikörper. Die Verabreichung eines erfindungsgemäßen Konjugats mit einer Linker-Grundstruktur (iii) und Kopplung des Linkers an einen Cystein- oder Lysinrest des Binderproteins oder -peptids führt durch Metabolisierung zu Cystein- bzw. Lysinderivaten der folgenden Formeln:



wobei L1 jeweils an den niedermolekularen KSP-Inhibitor gebunden ist, z.B. einer Verbindung der Formel (I), (IIa), (II), (III), (IIIa), (IIIb), (IIIc), (IIId), (IIIe), oder (IV).

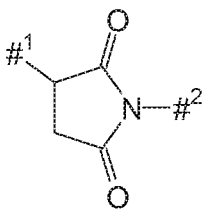
Erfindungsgemäß bevorzugt sind auch die Linker-Grundstrukturen (ii) and (iv), insbesondere bei Anbindung an die Position (iii), insbesondere wenn die Gruppe L1 eine der folgenden Struktur aufweist:

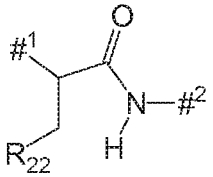
(a) –NH-$(CH_2)_{0-4}$-$(CHCH_3)_{0-4}$-CHY^5-CO-Y^7 , wobei Y^5 H oder NHY^6 darstellt, wobei Y^6 H oder -$COCH_3$ darstellt, und Y^7 eine Einfachbindung oder –NH -$(CH_2)_{0-4}$ –$CHNH_2$-CO- darstellt, so dass nach der Spaltung die entsprechende Struktur –NH-$(CH_2)_{0-4}$-$(CHCH_3)_{0-4}$-CHY^5-COOH bzw. –NH-$(CH_2)_{0-4}$-$(CHCH_3)_{0-4}$-CHY^5-CO-NH -$(CH_2)_{0-4}$ -$CHNH_2$-COOH erhalten wird.

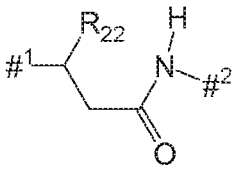
(b) –CH_2-S_x-$(CH_2)_{0-4}$-CHY^5-CO- auf, wobei x 0 oder 1 ist, und Y^5 H oder NHY^6 darstellt, wobei Y6 H oder -$COCH_3$ darstellt, so dass nach der Spaltung die entsprechende Struktur –CH_2-S_x-$(CH_2)_{0-4}$-CHY^5-COOH erhalten wird.

Diese Ausführungsform ist bevorzugt, wenn L1 jeweils an den niedermolekularen KSP-Inhibitor gebunden ist, z.B. einer Verbindung der Formel (I), (IIa), (II), (III), (IIIa), (IIIb), (IIIc), (IIId), (IIIe), oder (IV), insbesondere an der Position R_4, Der Binder ist vorzugsweise ein anti-TWEAKR-Antikörper oder ein anti-EGFR-Antikörper.

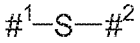
Wenn der Linker an eine Cystein-Seitenkette bzw. einen Cysteinrest gebunden ist, leitet sich L2 vorzugsweise von einer mit der Sulfhydryl-Gruppe des Cysteins reaktiven Gruppe ab. Hierzu zählen Haloacetyle, Maleimide, Aziridines, Acryloyle, Aryliende Verbindungen, Vinylsulfone, Pyridyldisulfide, TNB-thiole and Disulfid-reduzierende Mittel. Diese Gruppen reagieren in der Regel elektrophil mit der Sulfhydryl-Bindung unter Bildung einer Sulfid (z.B. Thioether)- oder Disulfid-Brücke. Bevorzugt sind stabile Sulfidbrücken. L2 ist vorzugsweise

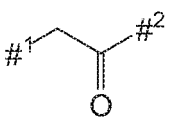


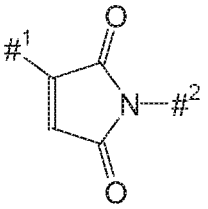


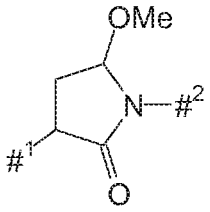


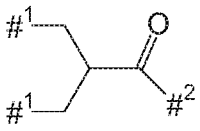
35

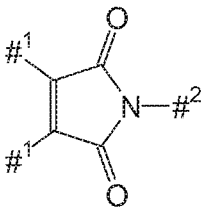












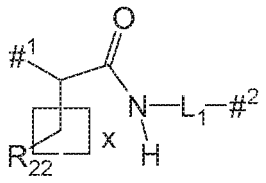
wobei

$\#^1$ die Verknüpfungsstelle mit dem Schwefelatom des Binders kennzeichnet,

$\#^2$ die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe L^1 kennzeichnet, und

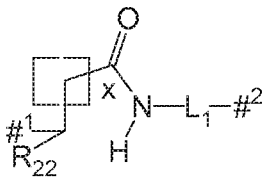
R_{22} COOH, COOR, COR, CONHR, $CONR_2$ (mit R jeweils C1-3-Alkyl), CONH2, vorzugsweise COOH darstellt.

Besonders bevorzugt als L2 ist:



Formel A3

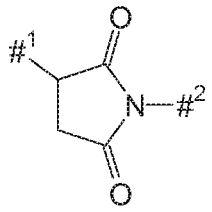
bzw.



Formel A4

wobei $\#^1$ die Verknüpfungsstelle mit dem Schwefelatom des Binders kennzeichnet, $\#^2$ die Verknüpfungsstelle mit der dem Wirkstoff kennzeichnet, x 1 oder 2 darstellt, und R^{22} COOH, COOR, COR, CONHR (mit R jeweils C1-3-Alkyl), CONH2, vorzugsweise COOH darstellt. Bevorzugt ist es, wenn x=1 und R^{22} COOH darstellt.

In einem erfindungsgemäßen Konjugat bzw. in einem Gemisch der erfindungsgemäßen Konjugate liegen die Bindungen an einen Cysteinrest des Binders vorzugsweise zu über 80 %, besonders bevorzugt zu über 90 % (jeweils bezogen auf die Gesamtanzahl von Bindungen des Linkers an den Binder), besonders bevorzugt in einer der beiden Strukturen der Formel A3 oder A4 vor. Hierbei liegen die Strukturen der Formel A3 oder A4 in der Regel gemeinsam vor, vorzugsweise in einem Verhältnis von 60:40 bis 40:60 bezogen auf die Anzahl der Bindungen an den Binder. Die restlichen Bindungen liegen dann in der Struktur



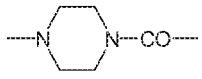
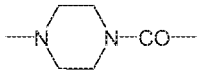
vor.

Erfindungsgemäß wird L1 vorzugsweise durch die Formel

$$\#^1\text{–}(NR^{10})_n\text{-}(G1)_o\text{-}G2\text{-}\#^2$$

dargestellt, wobei

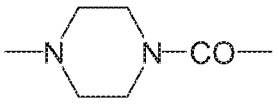
R^{10} H, NH_2 oder C_1-C_3-Alkyl darstellt;

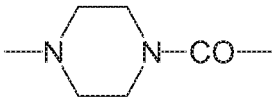
G1 –NHCO- , -CONH- oder  darstellt; (R^{10} ist vorzugsweie nicht NH_2, wenn G1 NHCO oder ).

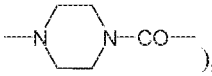
n 0 oder 1 ist;

o 0 oder 1 ist; und

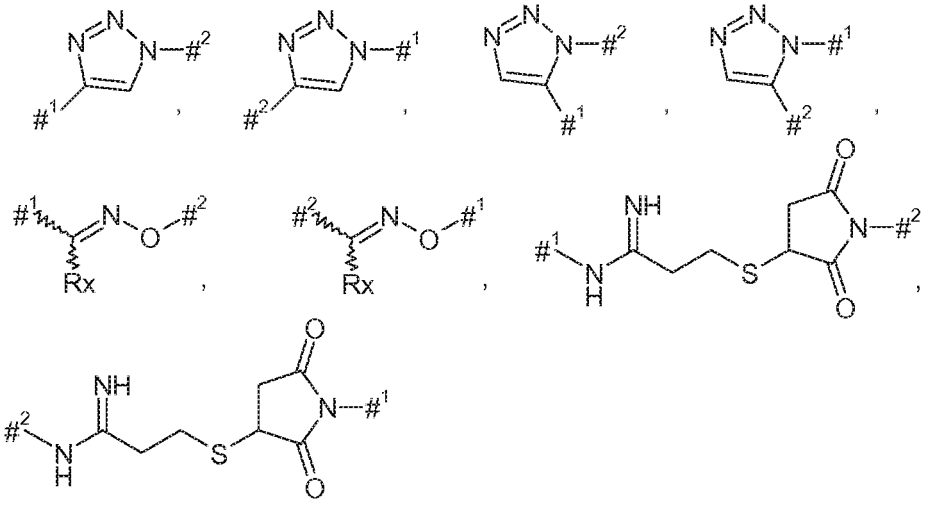
G2 eine geradkettige oder verzweigte Kohlenwasserstoffkette mit 1 bis 100 Kohlenstoffatomen aus Arylengruppen und/oder geradkettigen und/oder verzweigten und/oder cyclischen Alkylengruppen ist, die einfach oder mehrfach durch eine oder mehrere der Gruppen -O-, -S-, -SO-, SO_2, -NR^y-, -NR^yCO-, -$C(NH)NR^y$-, -$CONR^y$-, -NR^yNR^y-, -$SO2NR^yNR^y$-, -$CONR^yNR^y$-, (wobei R^y H, Phenyl, C_1-C_{10}-Alkyl, C_2-C_{10}-Alkenyl, oder C_2-C_{10}-Alkinyl darstellt, die jeweils mit $NHCONH_2$, -COOH, -OH, -NH_2, NH-$CNNH_2$, Sulfonamid, Sulfon, Sulfoxid, oder Sulfonsäure substituiert sein können), -CO-, -CR^x=N-O- (wobei Rx H, C_1-C_3-Alkyl oder Phenyl darstellt) und/oder einen 3 bis 10-gliedriger, aromatischen oder nicht aromatischen Heterozyklus mit bis zu 4 Heteroatomen ausgewählt aus N, O und

S, -SO- oder –SO2- unterbrochen sein kann (vorzugsweise ), wobei die Kohlenwasserstoffkette einschließlich der Seitenketten, sofern vorhanden, mit $–NHCONH_2$, -COOH, -OH, $-NH_2$, $NH-CNNH_2$, Sulfonamid, Sulfon, Sulfoxid, oder Sulfonsäure substituiert sein können.

G2 eine geradkettige oder verzweigte Kohlenwasserstoffkette mit 1 bis 100 Kohlenstoffatomen aus Arylengruppen und/oder geradkettigen und/oder verzweigten und/oder cyclischen Alkylengruppen ist, die einfach oder mehrfach durch eine oder mehrere der Gruppen -O-, -S-, -SO-, SO2, -NH-, -CO-, -NHCO-, -CONH-, -NMe-, -NHNH-, -SO2NHNH-, -CONHNH- und einen 5 bis 10gliedriger, aromatischen oder nicht aromatischen Heterozyklus mit bis zu 4 Heteroatomen ausgewählt aus N, O und S, oder -SO- unterbrochen sein kann (vorzugsweise ), wobei die Seitenketten, sofern vorhanden, mit $–NHCONH_2$, -COOH, -OH, $-NH_2$, $NH-CNNH_2$, Sulfonamid, Sulfon, Sulfoxid, oder Sulfonsäure substituiert sein können.

G2 ist vorzugsweise eine geradkettige oder verzweigte Kohlenwasserstoffkette mit 1 bis 100 Kohlenstoffatomen aus Arylengruppen und/oder geradkettigen und/oder verzweigten und/oder cyclischen Alkylengruppen ist, die einfach oder mehrfach durch eine oder mehrere der Gruppen -O-, -S-, -SO-, SO2, -NH-, -CO-, -NHCO-, -CONH-, -NMe-, -NHNH-, -SO2NHNH-, -CONHNH-, $-CR^x=N-O-$ (wobei Rx H, C_1-C_3-Alkyl oder Phenyl darstellt) und einen 3 bis 10-gliedriger, z.B. 5 bis 10gliedriger aromatischen oder nicht aromatischen Heterozyklus mit bis zu 4 Heteroatomen ausgewählt aus N, O und S, -SO- oder –SO2- unterbrochen sein kann (vorzugsweise ), wobei Kohlenwasserstoffkette einschließlich der Seitenketten, sofern vorhanden, mit $–NHCONH_2$, -COOH, -OH, $-NH_2$, $NH-CNNH_2$, Sulfonamid, Sulfon, Sulfoxid, oder Sulfonsäure substituiert sein können.

Weitere unterbrechende Gruppen in G2 sind vorzugsweise



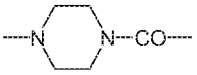
wobei Rx H, C_1-C_3-Alkyl oder Phenyl darstellt.

Hierbei ist $\#^1$ die Bindung zum KSP-Inhibitor und $\#^2$ die Bindung zur Kopplungsgruppe zum Binder (z.B. L2).

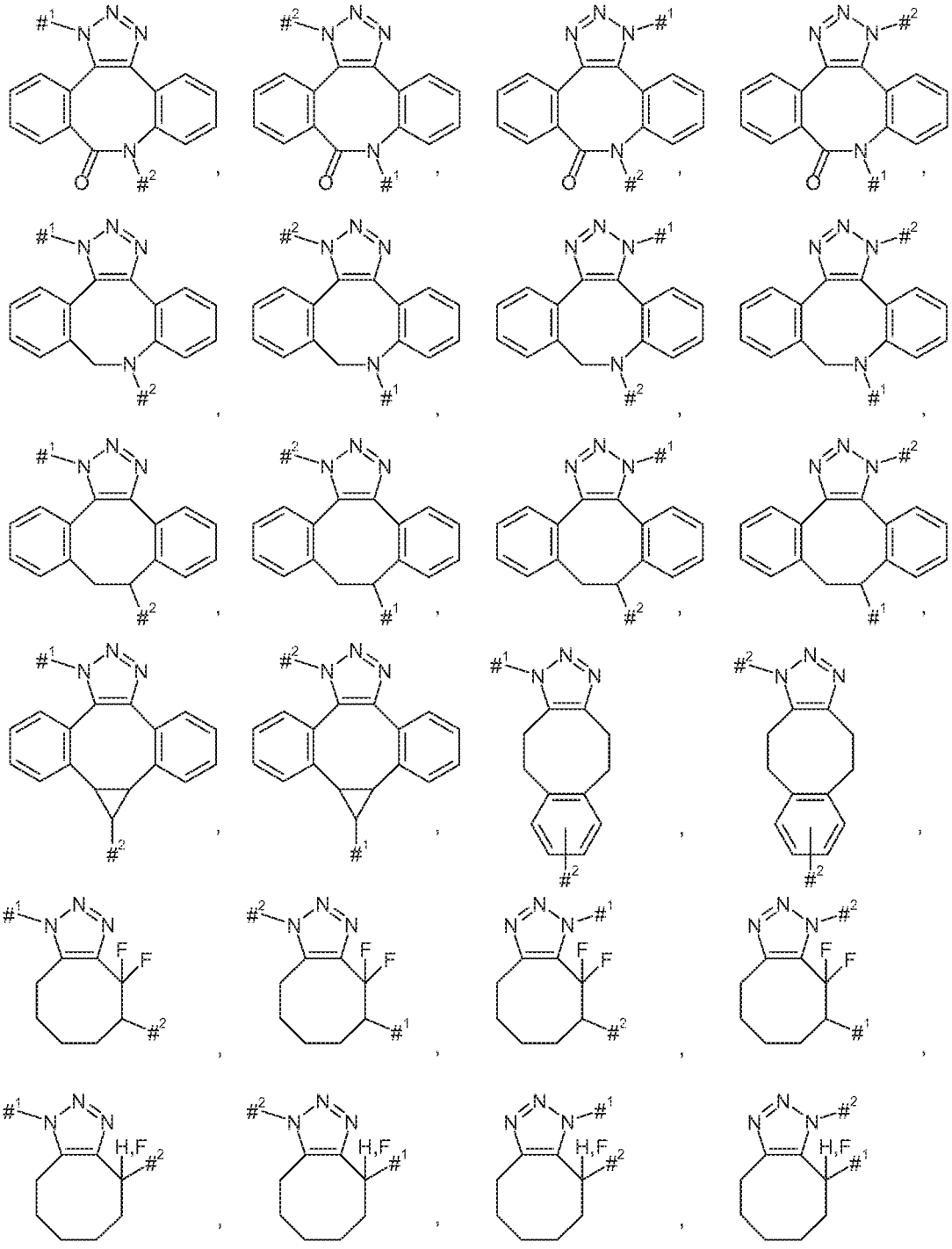
Eine geradkettige oder verzweigte Kohlenwasserstoffkette aus Arylengruppen und/oder geradkettigen und/oder verzweigten und/oder cyclischen Alkylengruppen umfasst in der Regel einen α,ω-divalenten Alkylrest mit der jeweils angegebenen Zahl von Kohlenstoffatomen. Beispielhaft und vorzugsweise seien genannt: Methylen, Ethan-1,2-diyl (1,2-Ethylen), Propan-1,3-diyl (1,3-Propylen), Butan-1,4-diyl (1,4-Butylen), Pentan-1,5-diyl (1,5-Pentylen), Hexan-1,6-diyl (1,6-Hexylen), Heptan-1,7-diyl (1,7-Hexylen), Octan-1,8-diyl (1,8-Octylen), Nonan-1,9-diyl (1,9-Nonylen), Decan-1,10-diyl (1,10-Decylen). Die Alkylengruppen in der Kohlenwasserstoffkette können jedoch auch verzweigt sein, d.h. ein oder mehrere H-Atome der oben genannten linearen Alkylengruppen können ggf. durch C1-10-Alkylgruppen substituiert sein und so Seitenketten bilden. Die Kohlenwasserstoffkette kann weiterhin cyclische Alkylengruppen (Cycloalkandiyl) enthalten, z.B. 1,4-Cyclohexandiyl oder 1,3-Cyclopentandiyl. Diese cyclischen Gruppen können ungesättigt sein. Insbesondere können in der Kohlenwasserstoffgruppe aromatische Gruppen (Arylengruppen) vorliegen, z.B. Phenylen. Auch in den cyclischen Alkylengruppen und den Arylengruppen können wiederum in oder mehrere H-Atome ggf. durch C1-10-Alkylgruppen substituiert sein. Es wird so eine Kohlenwasserstoffkette gebildet, die ggf. verzweigt ist. Diese Kohlenwasserstoffkette weist insgesamt 0 bis 100 Kohlenstoffatomen, vorzugsweise 1 bis 50, besonders bevorzugt 2 bis 25 Kohlenstoffatome auf.

Die Seitenketten können, sofern vorhanden, mit $-NHCONH_2$, -COOH, -OH, $-NH_2$, $NH-CNNH_2$, Sulfonamid, Sulfon, Sulfoxid, oder Sulfonsäure substituiert sein.

Die Kohlenwasserstoffkette kann einfach oder mehrfach durch eine oder mehrere der Gruppen -O-, -S-, -SO-, SO2, -NH-, -CO-, -NHCO-, -CONH-, -NMe-, -NHNH-, -SO2NHNH-, -CONHNH- und einen 5

bis 10gliedriger, aromatischen oder nicht aromatischen Heterozyklus mit bis zu 4 Heteroatomen ausgewählt aus N, O und S, -SO- oder –SO2- unterbrochen sein (vorzugsweise ).

Weitere unterbrechende Gruppen in G2 sind vorzugsweise



Vorzugsweise entspricht der Linker der folgenden Formel:

§-(CO)m-L1-L2-§§

wobei

m 0 oder 1 ist;

§ die Bindung an das Wirkstoffmolekül darstellt und

§§ die Bindung an das Binderpeptid oder –protein darstellt, und

L1 und L2 die oben genannten Bedeutungen aufweisen.

Besonders bevorzugt weist L1 die Formel $–NR^{11}B-$ auf, wobei

R^{11} H oder NH_2 darstellt;

B $–[(CH_2)_x-(X^4)_y]_W-(CH_2)_z-$ darstellt,

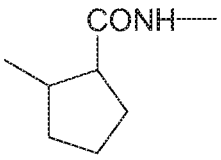
w = 0 bis 20 ist;

x = 0 bis 5 ist;

x = 0 bis 5 ist;

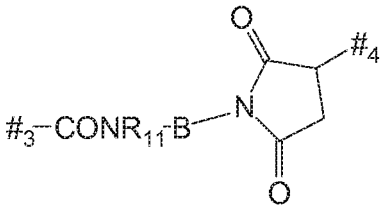
y = 0 oder 1 ist;

z = 0 bis 5 ist; und

X^4 –O-, -CONH-,–NHCO- oder 

darstellt.

Erfindungsgemäß bevorzugte Linker L weisen die folgende Formel auf:



wobei

#3 die Bindung an das Wirkstoffmolekül darstellt,

#4 die Bindung an das Binderpeptid oder –protein darstellt,

R^{11} H oder NH2 darstellt;

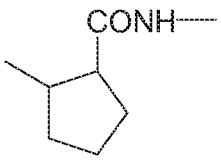
B $–[(CH_2)_x-(X^4)_y]_W-(CH_2)_z-$ darstellt,

w = 0 bis 20 ist;

x = 0 bis 5 ist;

y = 0 oder 1 ist;

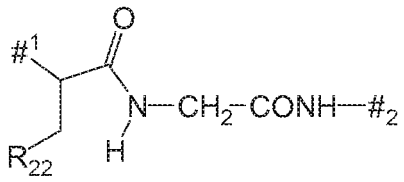
z = 1 bis 5 ist; und

X^4 –O-, -CONH-, –NHCO- oder 

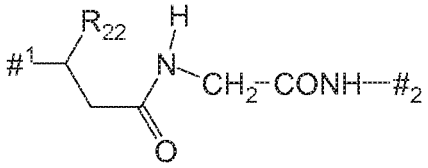
darstellt.

Die oben genannten Linker werden insbesondere bevorzugt in Konjugaten der Formel (I) oder (II), in denen der Linker durch Substitution eines H-Atoms an R1 oder in Verbindung mit einem spaltbaren Linker SG1 an R4 ankoppelt, d.h. R1–L-#1 darstellt oder R4 -SG1-L-#1, wobei #1 die Bindung an den Binder darstellt.

Weiterhin sind die folgenden Linker erfindungsgemäß bevorzugt: In einem erfindungsgemäßen Konjugat bzw. in einem Gemisch der erfindungsgemäßen Konjugate liegen die Bindungen an einen Cysteinrest des Binders vorzugsweise zu über 80 %, besonders bevorzugt zu über 90 % (jeweils bezogen auf die Gesamtanzahl von Bindungen des Linkers an den Binder), besonders bevorzugt in einer der beiden Strukturen der Formel A5 oder A6 vor:



Formel A5



Formel A6

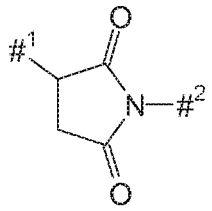
wobei

$#^1$ die Verknüpfungsstelle mit dem Schwefelatom des Binders kennzeichnet,

$#^2$ die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe L^1 kennzeichnet, und

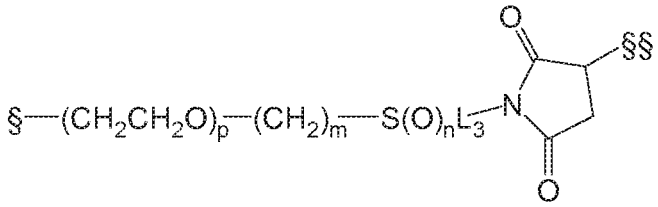
R^{22} COOH, COOR, COR, CONHR (mit R jeweils C1-3-Alkyl), $CONH_2$, vorzugsweise COOH darstellt.

Hierbei liegen die Strukturen der Formel A5 oder A6 in der Regel gemeinsam vor, vorzugsweise in einem Verhältnis von 60:40 bis 40:60 bezogen auf die Anzahl der Bindungen an den Binder. Die restlichen Bindungen liegen dann in der Struktur



vor.

Andere Linker –L-, die an eine Cystein-Seitenkette bzw. Cysteinrest gebunden ist, weisen die folgende Formel auf:



wobei

§ die Bindung an das Wirkstoffmolekül darstellt und

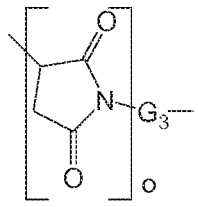
§§ die Bindung an das Binderpeptid oder –protein darstellt,

m 0, 1, 2, oder 3 ist;

n 0, 1 oder 2 ist;

p 0 bis 20 beträgt; und

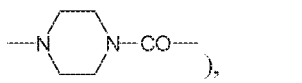
L3

 darstellt;

wobei

o 0 oder 1 ist;

und

G_3 eine geradkettige oder verzweigte Kohlenwasserstoffkette mit 1 bis 100 Kohlenstoffatomen aus Arylengruppen und/oder geradkettigen und/oder cyclischen Alkylengruppen ist, die einfach oder mehrfach durch eine oder mehrere der Gruppen -O-, -S-, -SO-, SO2, -NH-, -CO-, -NHCO-, -CONH-, -NMe-, -NHNH-, -SO2NHNH-, -CONHNH- und einen 3 bis 10gliedriger (vorzugsweise 5 bis10gliedriger), aromatischen oder nicht aromatischen Heterozyklus mit bis zu 4 Heteroatomen ausgewählt aus N, O und S, -SO- oder –SO2- unterbrochen sein kann (vorzugsweise ), wobei die Seitenketten, sofern vorhanden, mit –$NHCONH_2$, -COOH, -OH, -NH_2, NH-$CNNH_2$, Sulfonamid, Sulfon, Sulfoxid oder Sulfonsäure substituiert sein können.

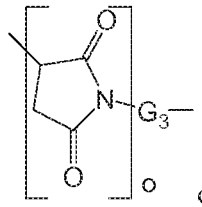
Bevorzugt ist in der obigen Formel

m 1 ist;

p 0 ist;

n 0 ist;

und L3



darstellt;

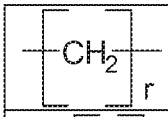
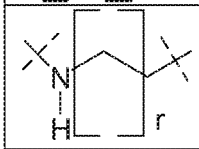
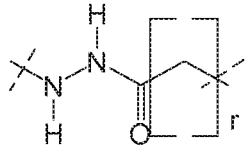
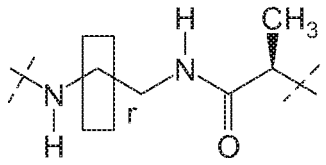
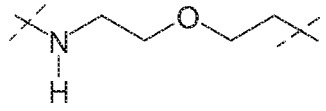
wobei

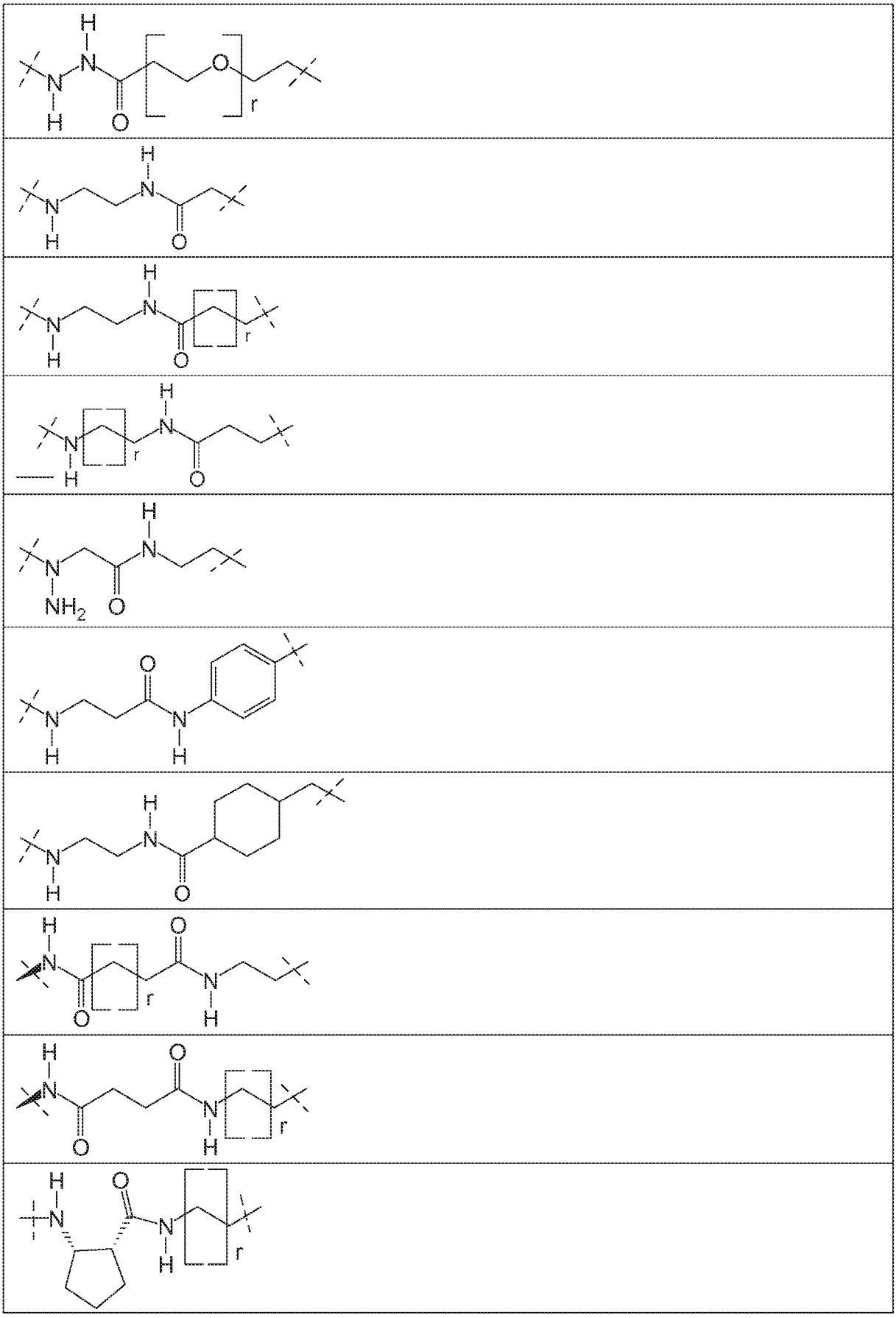
o 0 oder 1 ist; und

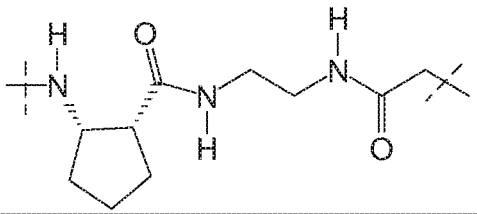
G_3 $-(CH_2CH_2O)_s(CH_2)_t(CONH)_u\ CH_2CH_2O)_v(CH_2)_w-$ darstellt, wobei

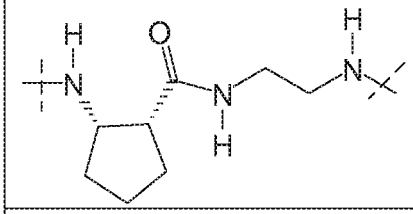
s, t, v und w jeweils unabhängig voneinander 0 bis 20 betragen, und u 0 oder 1 beträgt.

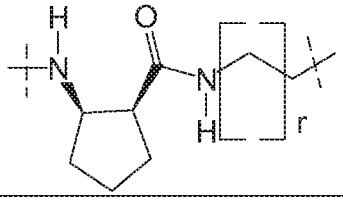
Bevorzugte Gruppen L1 in der obigen Formel §-(CO)m-L1-L2-§§ sind die folgenden, wobei r jeweils unabhängig voneinander eine Zahl von 0 bis 20, vorzugsweise von 0 bis 15, besonders bevorzugt von 1 bis 20, insbesondere bevorzugt von 2 bis 10 aufweist:

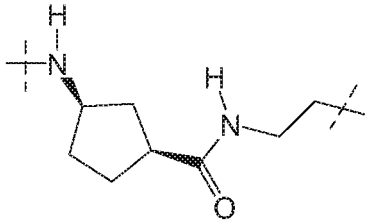






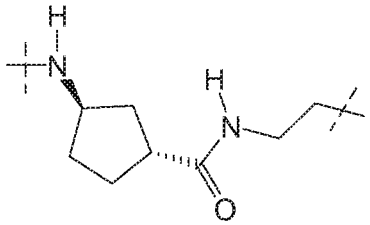


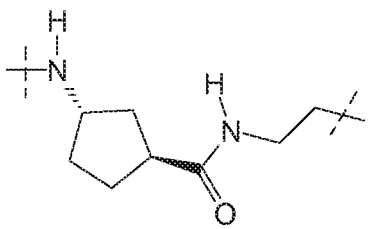


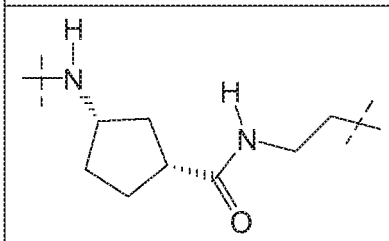


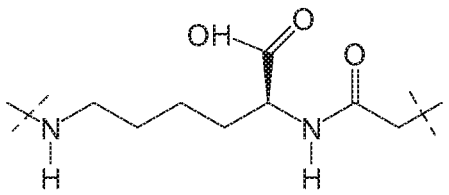

r

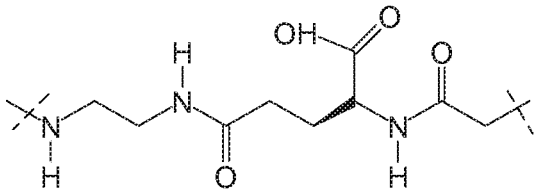


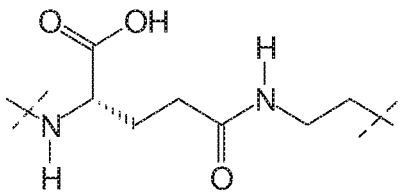


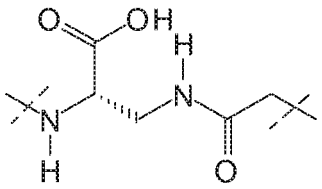


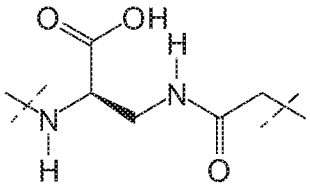


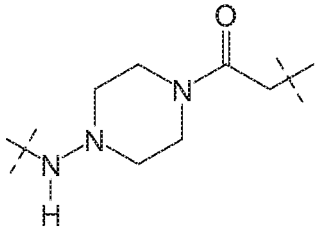


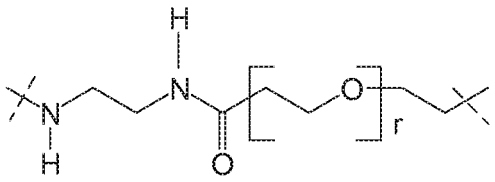


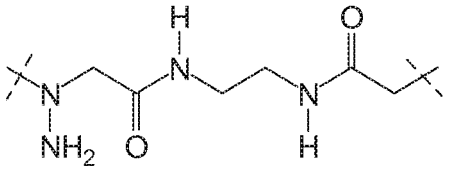


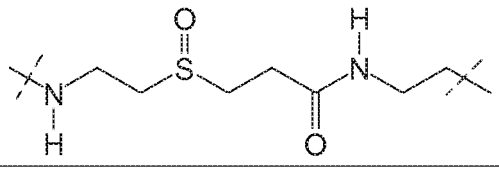


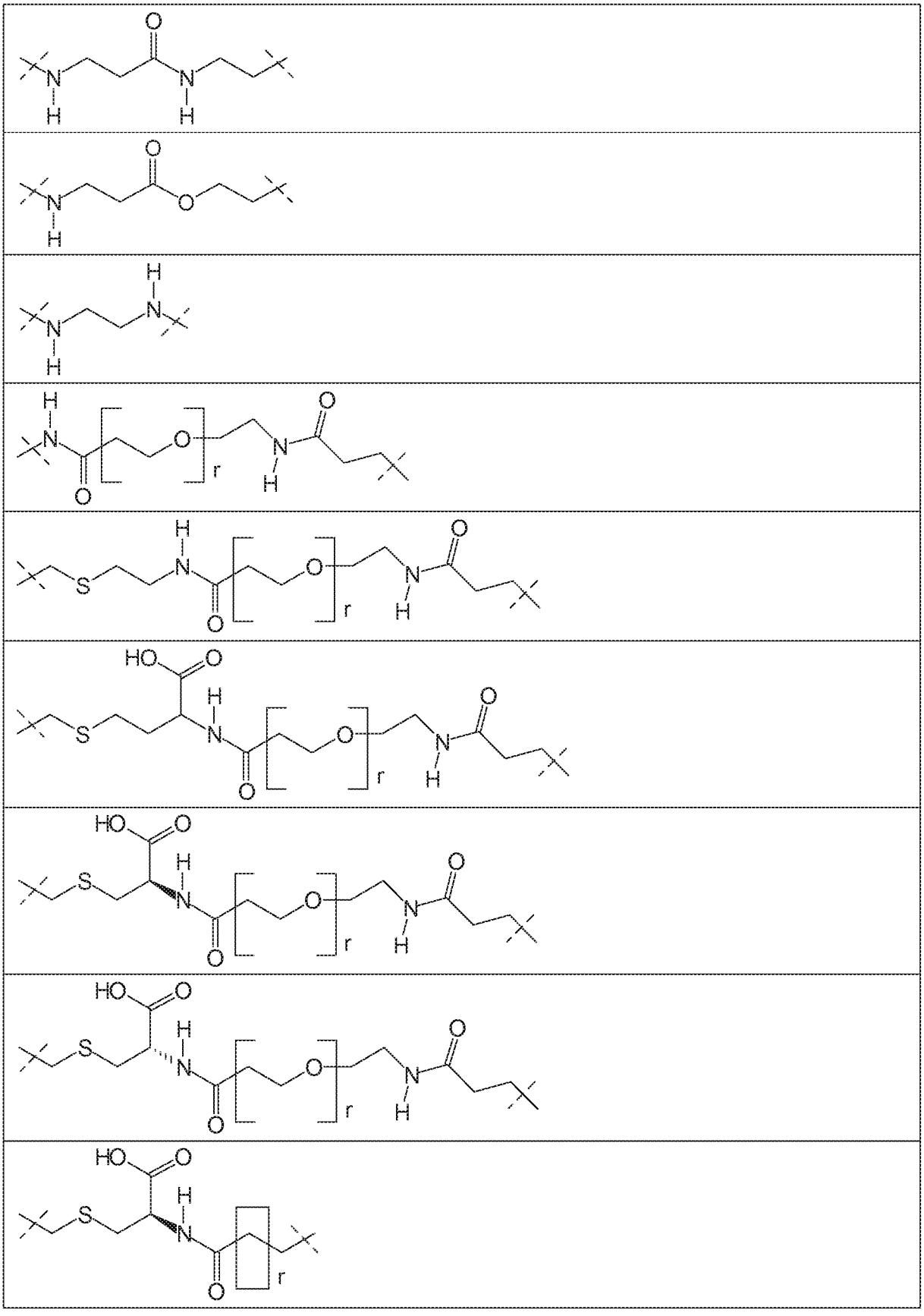


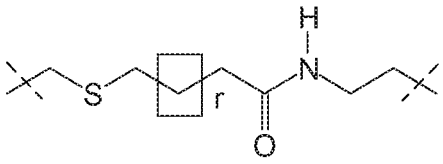


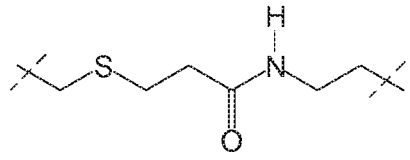


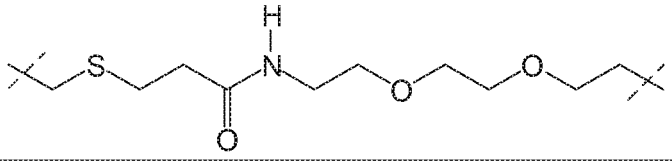


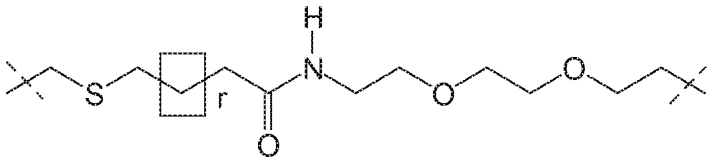


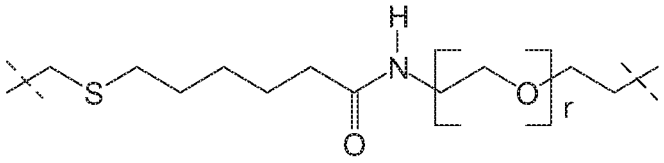


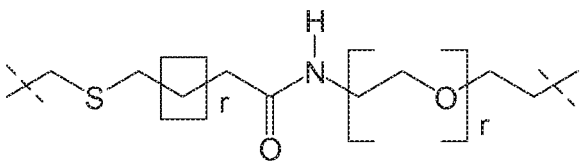


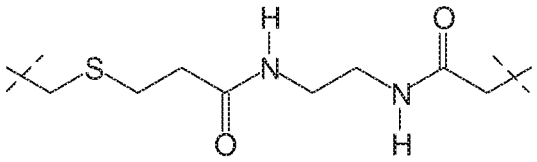


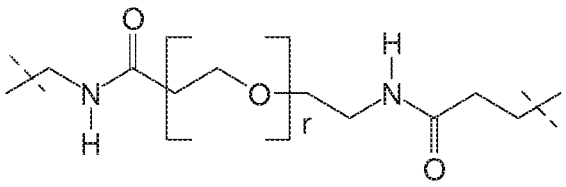


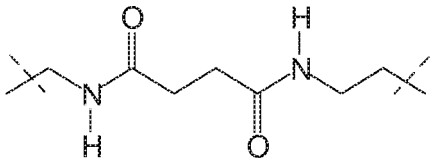


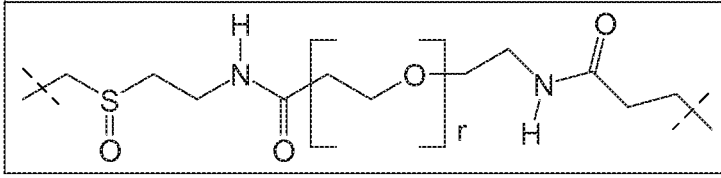


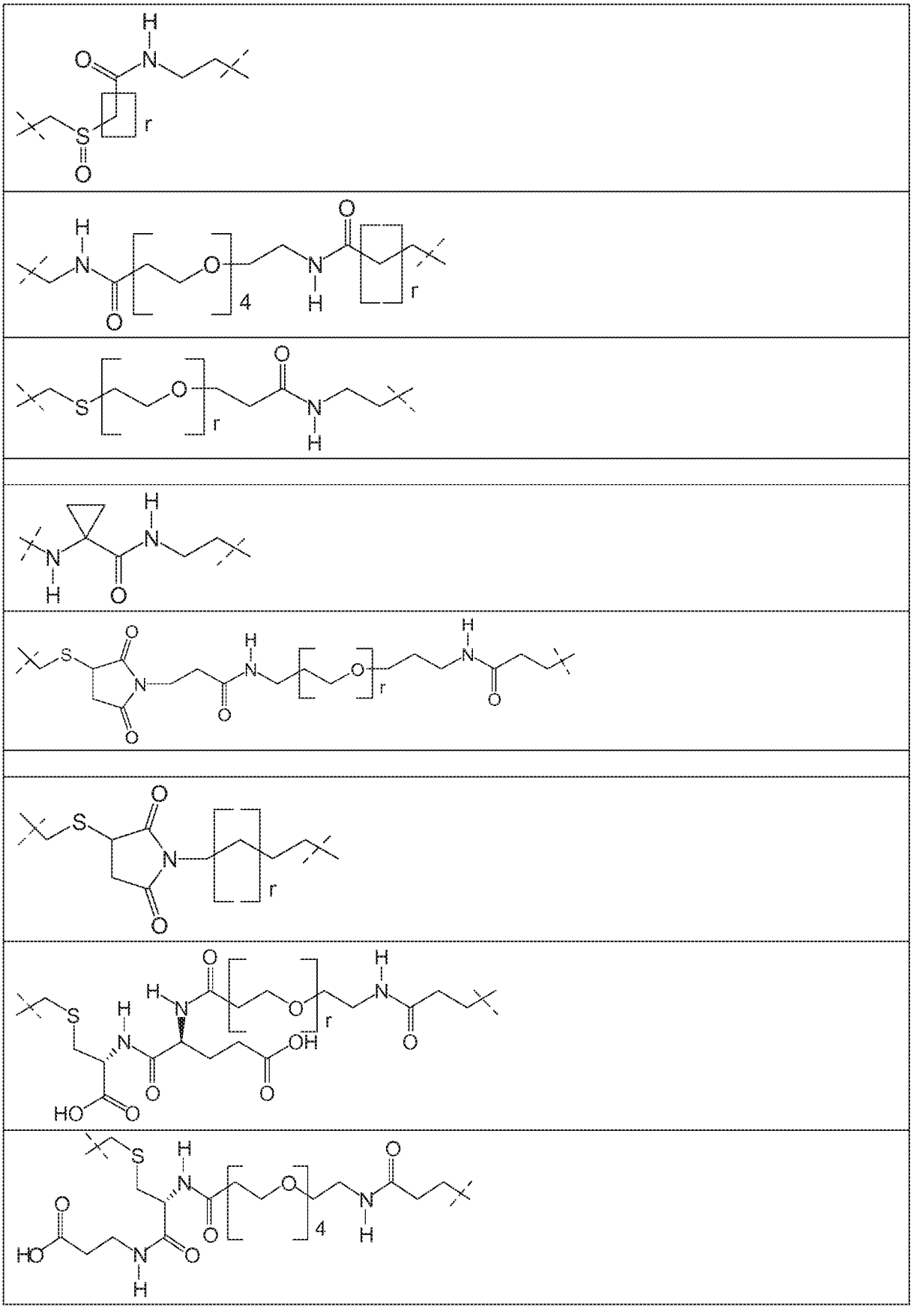


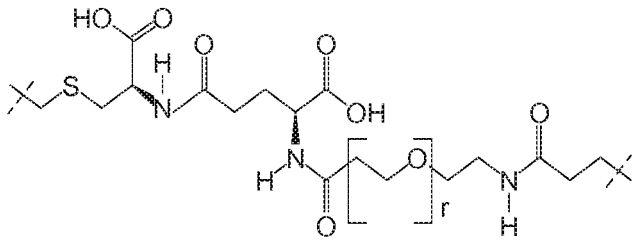


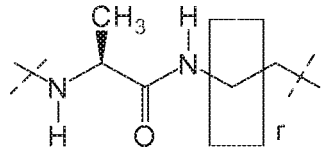


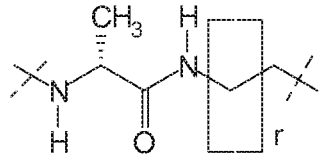








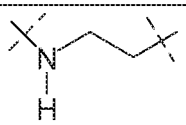
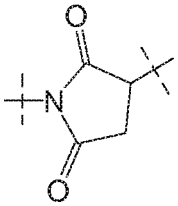


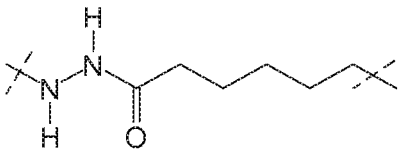
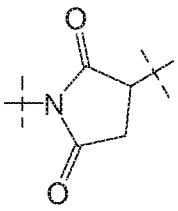
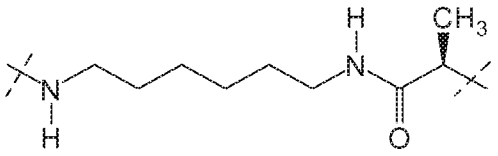
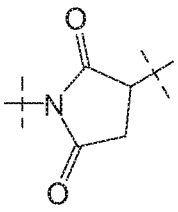
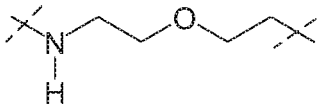
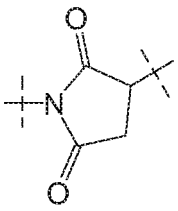
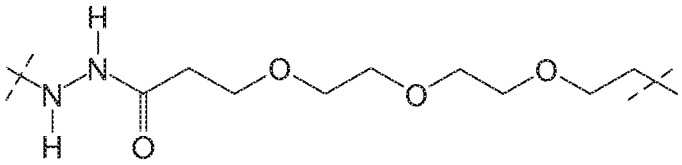
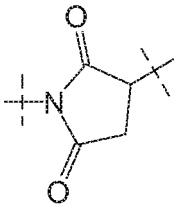
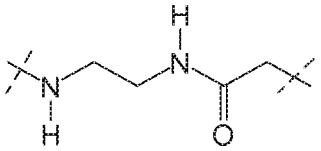
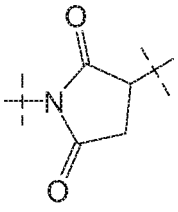
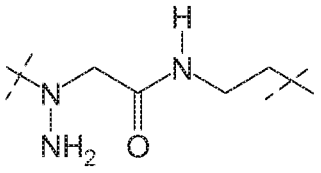
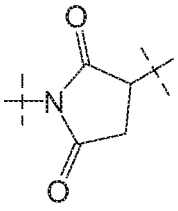
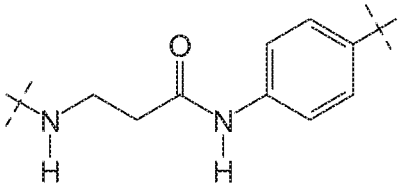
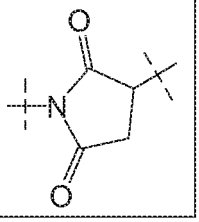


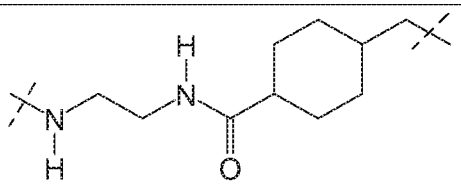
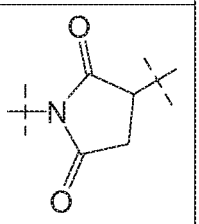
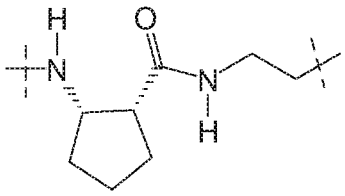
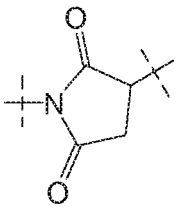
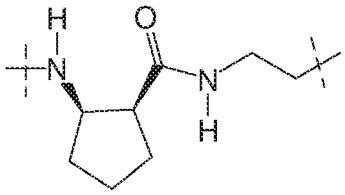
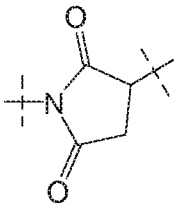
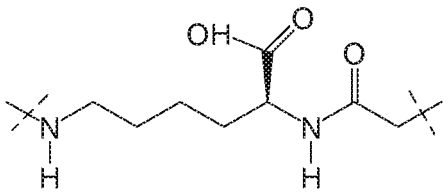
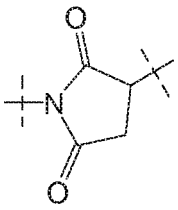
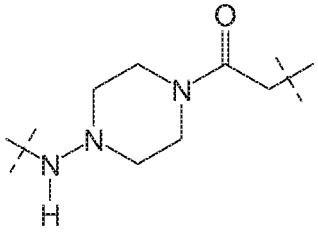
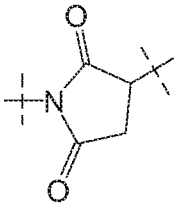
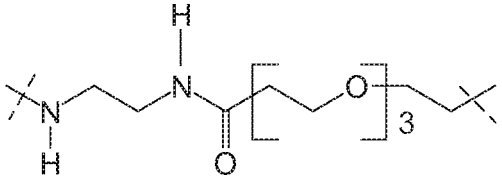
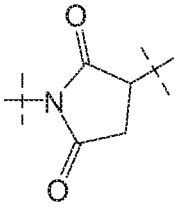
Weitere Beispiele für L1 sind in Tabelle C angegeben, in denen diese Gruppe in einem Kasten hervorgehoben ist.

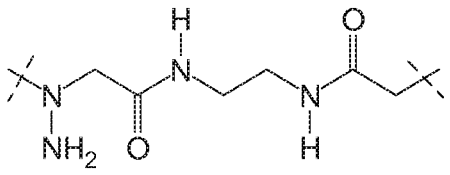
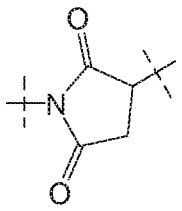
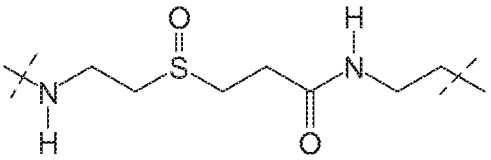
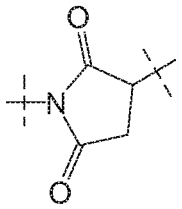
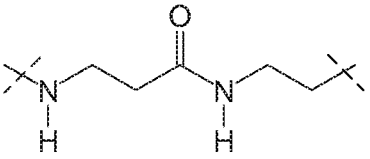
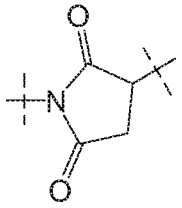
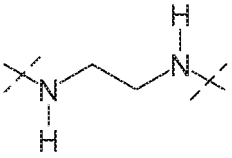
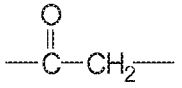
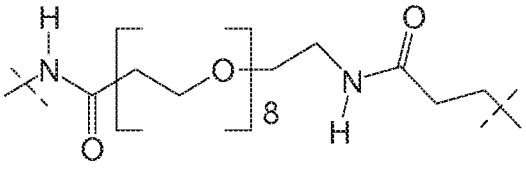
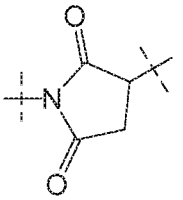
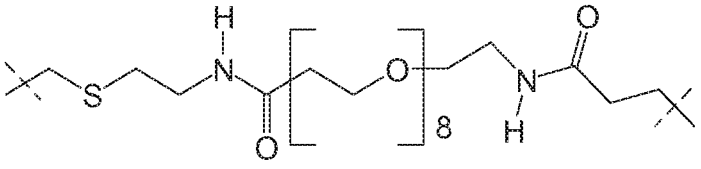
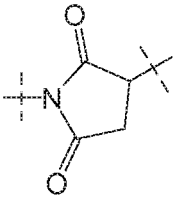
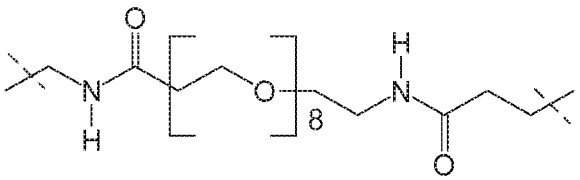
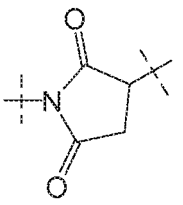
In den folgenden Tabellen A und A' sind Beispiele für einen Linkerteil L1 angegeben. In der Tabelle ist weiterhin angegeben, mit welcher Gruppe L2 diese Beispiele für L1 vorzugsweise kombiniert werden, sowie die bevorzugte Ankopplungsstelle (R^1-R^5) sowie der bevorzugte Wert für m, also ob vor L1 eine Carbonylgruppe vorliegt oder nicht (vgl. §-(CO)m-L1-L2-§§). Diese Linker werden vorzugsweise an einen Cysteinrest gekoppelt. In der ersten Spalte sind weiterhin die Beispielnummern für die Cetuximab ADCs angegeben, in denen entsprechende Linker Anwendung finden, die jedoch gleichermaßen in jeder Zeile für ADCs mit anderen Antikörpern gelten. Wenn L2 ein Bernsteinsäureimid ist bzw. sich hiervon ableitet, kann dieses Imid ganz oder teilweise auch in Form des hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamids vorliegen, wie oben beschrieben. In Abhängigkeit von L1 kann diese Hydrolyse zu offenkettigen Bernsteinsäureamiden mehr oder weniger stark oder gar nicht ausgeprägt sein.

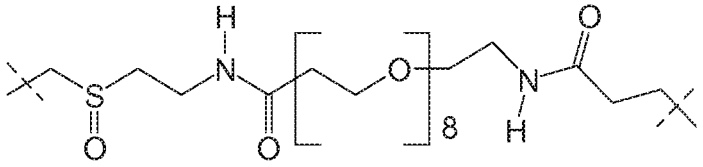
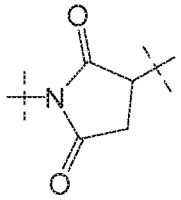
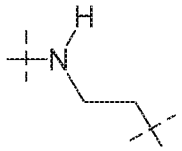
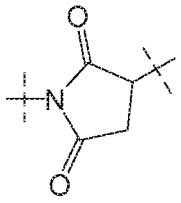
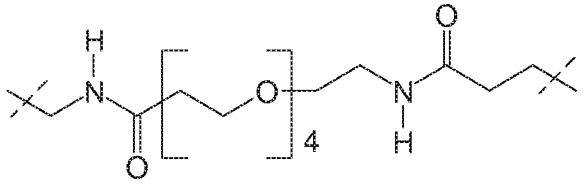
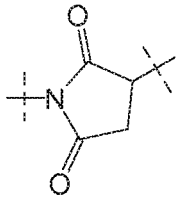
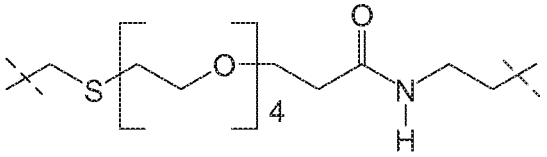
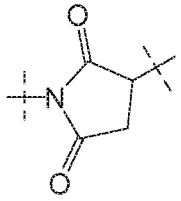
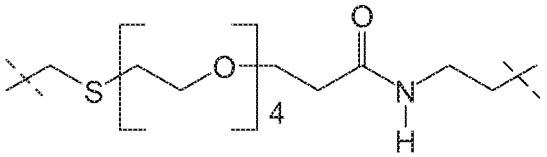
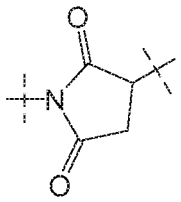
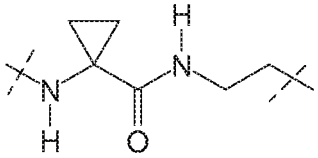
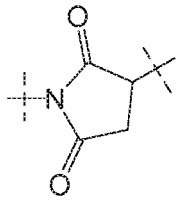
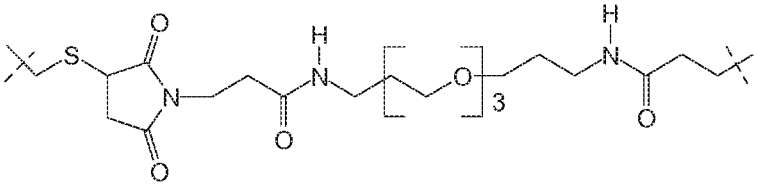
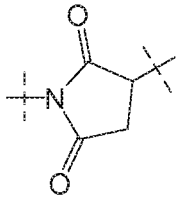
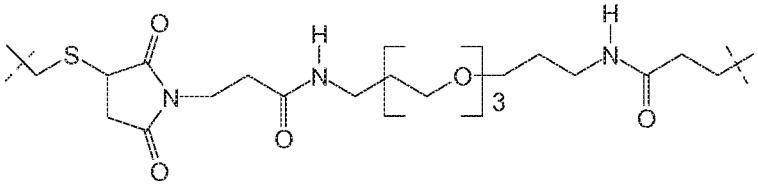
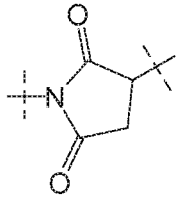
Tabelle A

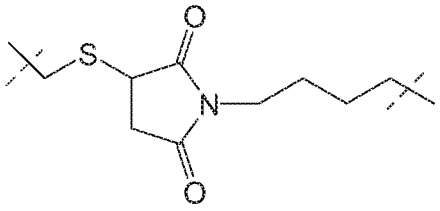
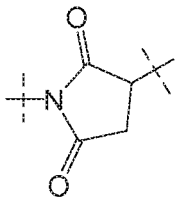
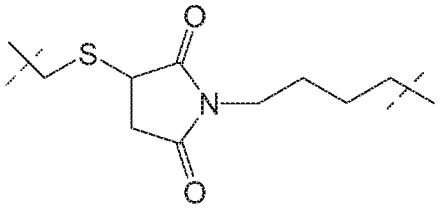
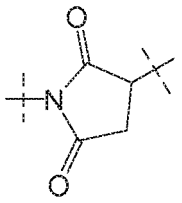
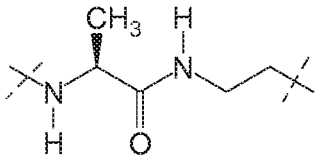
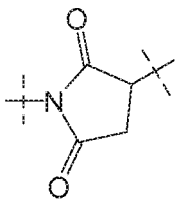
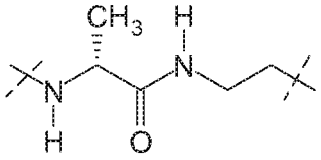
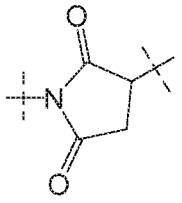
Beisp.	Subst.	m	L1	L2
2	R^1	1		

3	R^1	1		
4	R^1	1		
5	R^1	1		
6	R^1	1		
7	R^1	1		 Siehe Anmerkung **
9	R^1	1		
10	R^1	1		

11	R^1	1		
12	R^1	1		
13	R^1	1		
19	R^1	1		 Siehe Anmerkung **
20	R^1	1		 Siehe Anmerkung **
21/ 176	R^1	1		

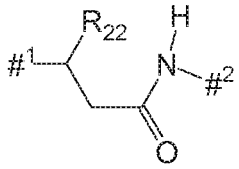
22	R^1	1		 Siehe Anmerkung **
30	R^1	1		
32	R^1	1		
33	R^1	1		
37	R^2-R^4 *	0		
38	R^3	0		
40	R^2-R^4 *	0		

41	R^3	0		
42	R^2-R^4 *	1		
44	R^2-R^4 *	0		
48	R^3	0		
49	R^3	0		
50	R^1	1		
51	R^2	0		
52	R^2	0		

53	R^2	0		
54	R^2	0		
56	R^1	1		
57	R^1	1		

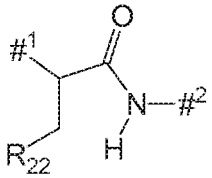
*R^2 und R^4 bilden einen Pyrrolidinring, der mit dem Linker substituiert ist.

**Besonders bevorzugt werden die in diesen Zeilen angegebenen Linker L1 mit einem Linker L2 verknüpft, der ausgewählt ist aus:



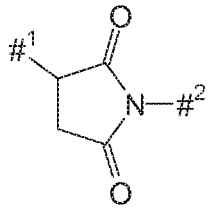
Formel A7

und/oder



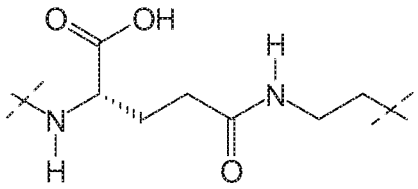
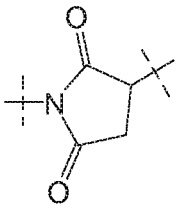
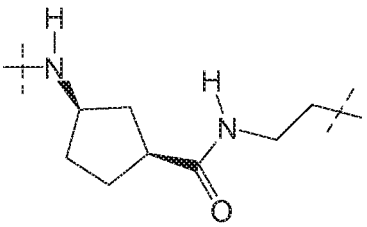
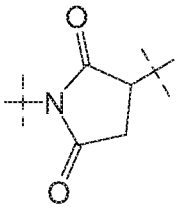
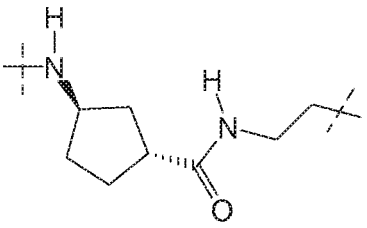
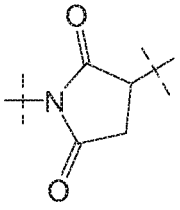
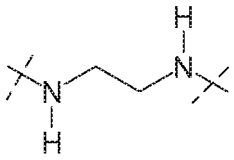
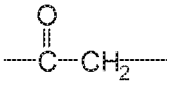
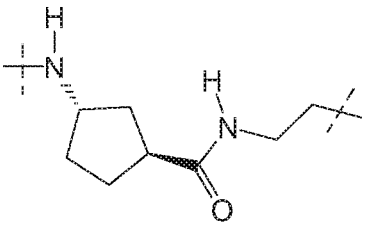
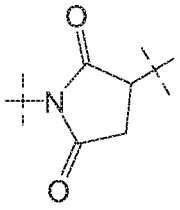
Formel A8

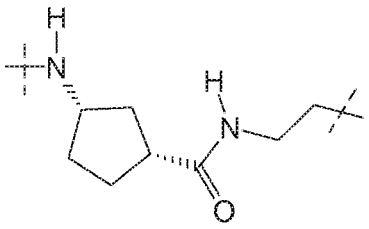
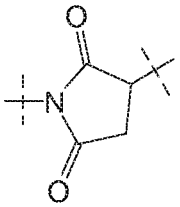
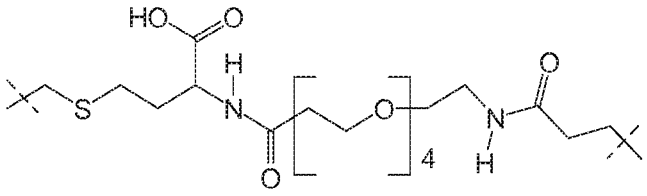
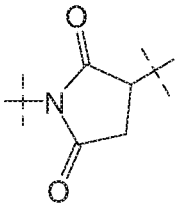
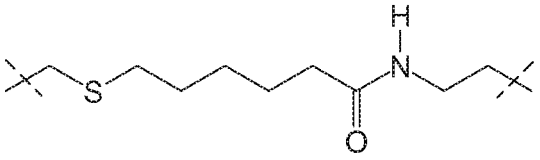
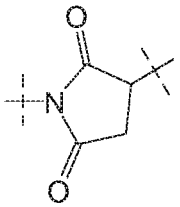
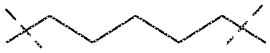
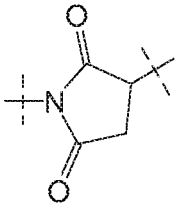
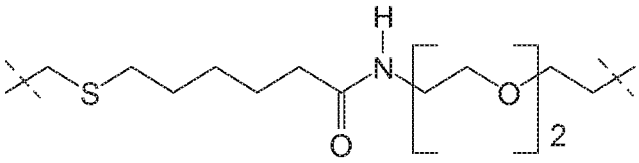
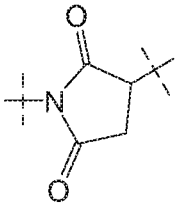
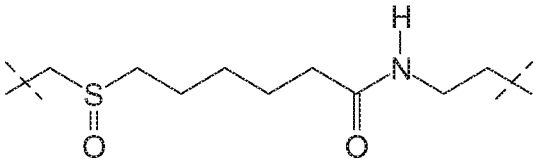
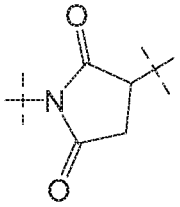
vor, wobei $\#^1$ die Verknüpfungsstelle mit dem Schwefelatom des Binders kennzeichnet, $\#^2$ die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe L^1 kennzeichnet, R^{22} vorzugsweise COOH darstellt. In einem erfindungsgemäßen Konjugat bzw. in einem Gemisch der erfindungsgemäßen Konjugate liegen die Bindungen an einen Cysteinrest des Binders vorzugsweise zu über 80 %, besonders bevorzugt zu über 90 % (jeweils bezogen auf die Gesamtanzahl von Bindungen des Linkers an den Binder), besonders bevorzugt in einer der beiden Strukturen der Formel A7 oder A8 vor. Hierbei liegen die Strukturen der Formel A7 oder A8 in der Regel gemeinsam vor, vorzugsweise in einem Verhältnis von 60:40 bis 40:60 bezogen auf die Anzahl der Bindungen an den Binder. Die restlichen Bindungen liegen dann in der Struktur

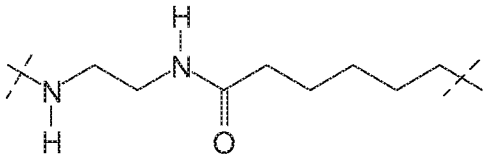
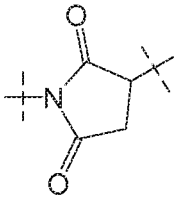
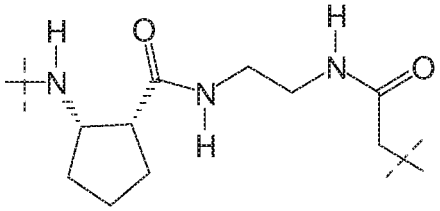
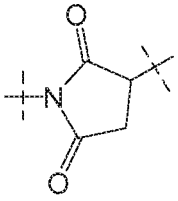
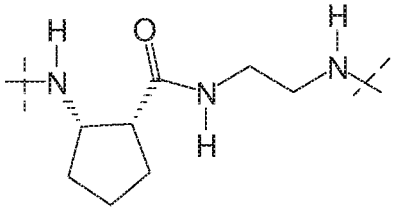
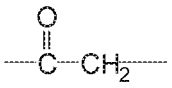
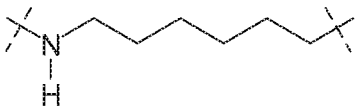
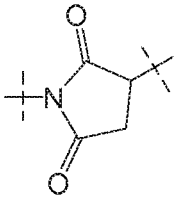
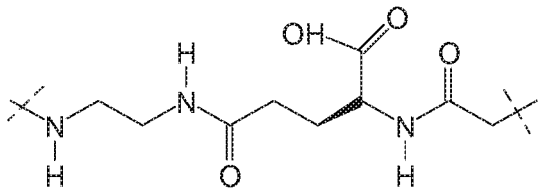
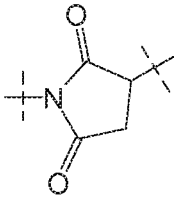


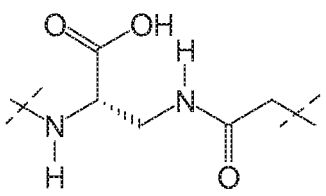
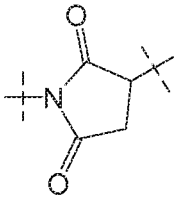
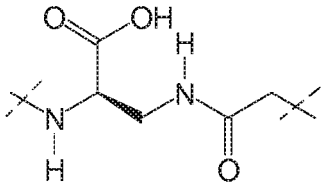
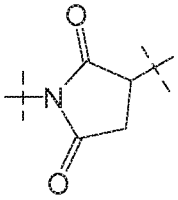
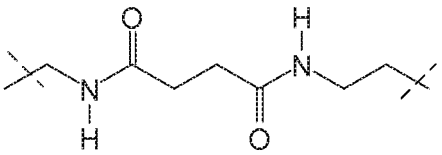
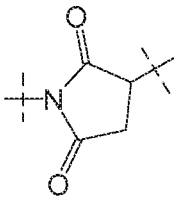
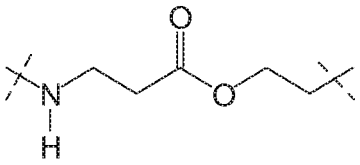
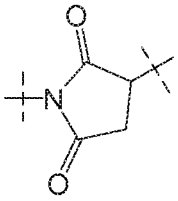
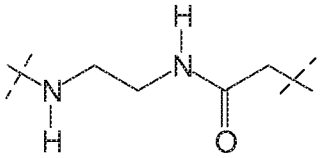
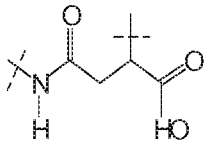
vor.

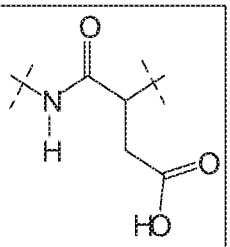
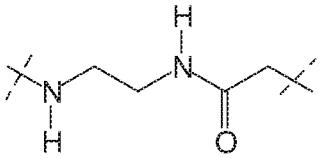
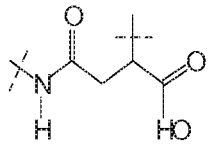
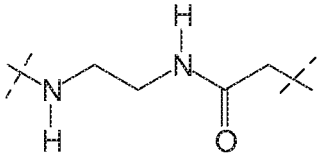
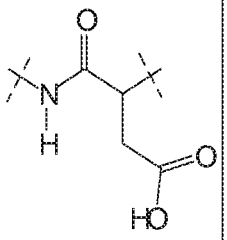
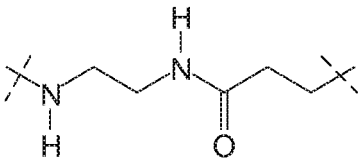
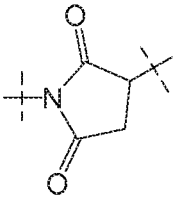
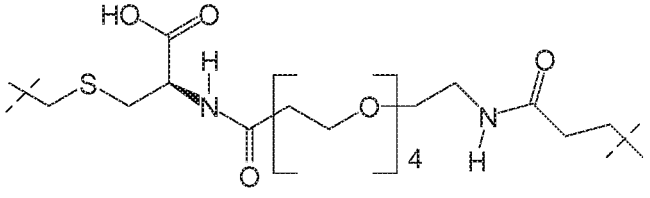
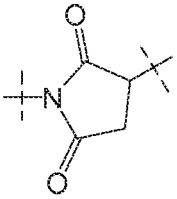
Tabelle A'

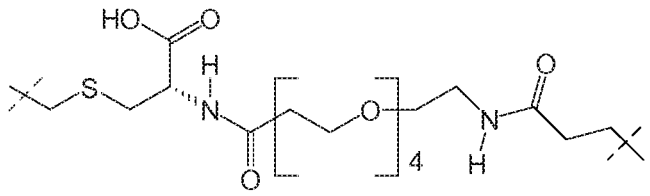
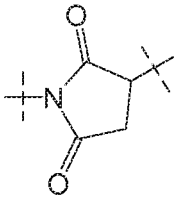
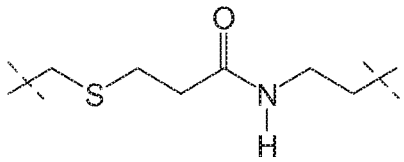
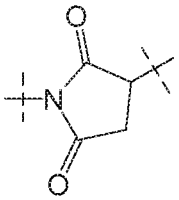
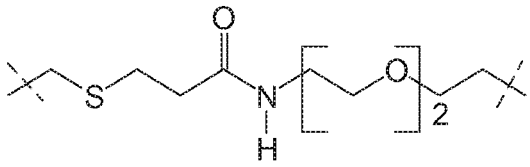
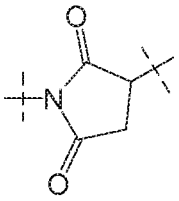
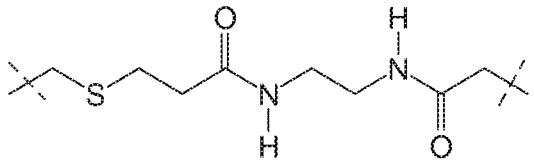
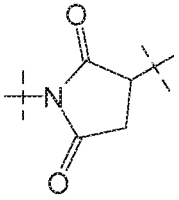
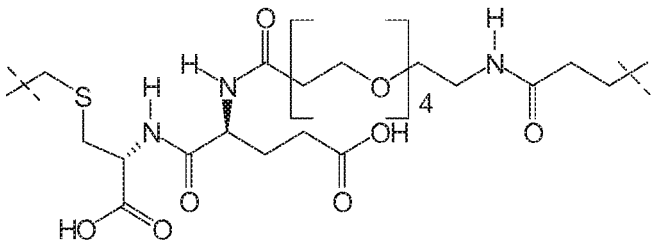
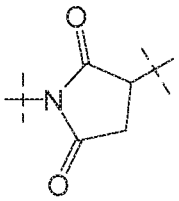
Beisp.	Subst.	m	L1	L2
105	R^1	1		
111	R^1	1		
114	R^1	1		
119/ 158	R^1	1		
120	R^1	1		

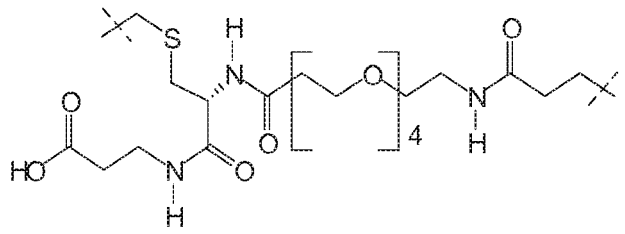
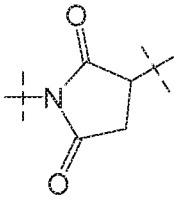
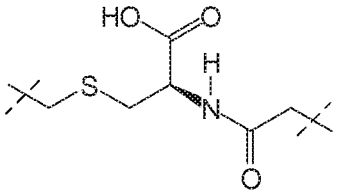
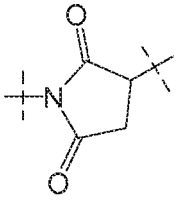
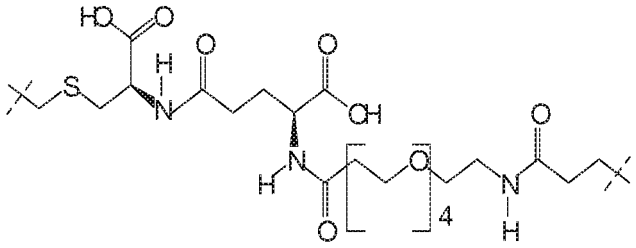
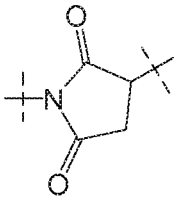
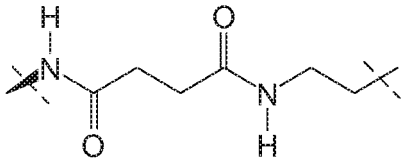
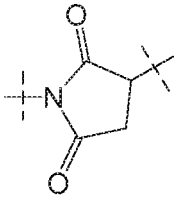
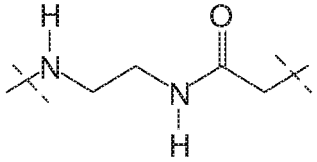
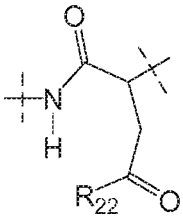
123/ 157 / 125	R^1	1		
138 / 142	R^3	0		
141 / 143	R^3	0		
144	R^3	0		
147	R^3	0		
148	R^3	0		

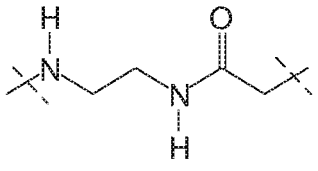
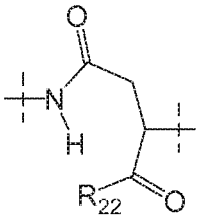
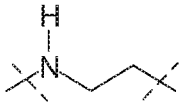
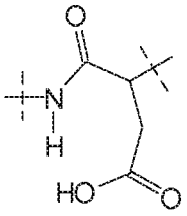
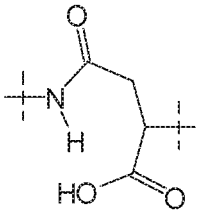
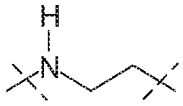
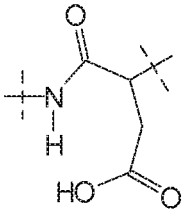
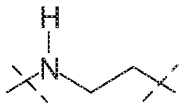
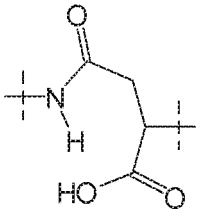
175	R^1	1		
177	R^1	1		 Siehe Anmerkung **
178	R^1	1		
179	R^1	1		
180	R^1	1		 Siehe Anmerkung **

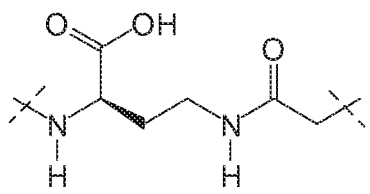
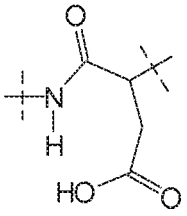
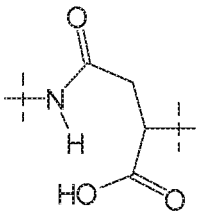
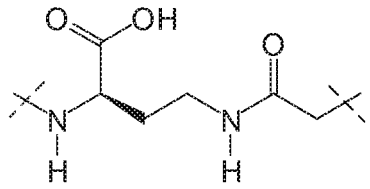
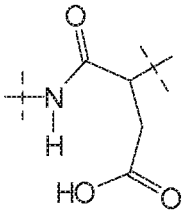
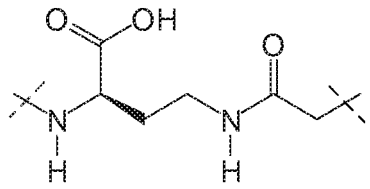
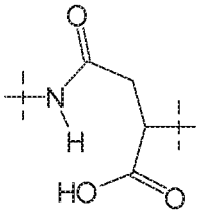
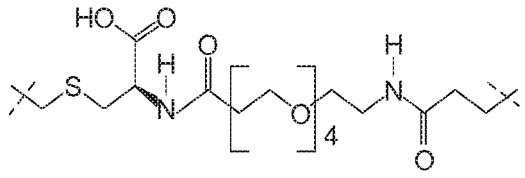
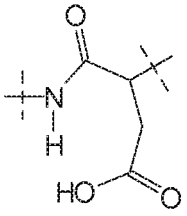
192	R^1	1		 Siehe Anmerkung **
193	R^1	1		 Siehe Anmerkung **
195	R^1	0		
196	R^1	1		
208/ 199	R^1	1		 und

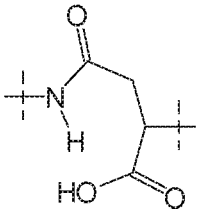
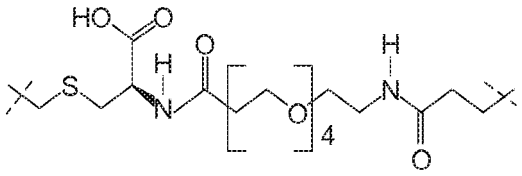
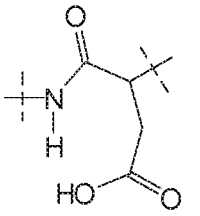
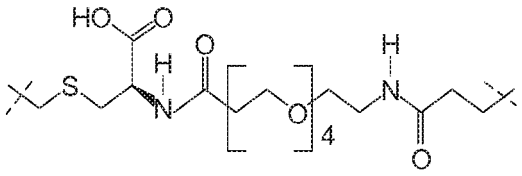
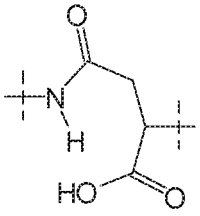
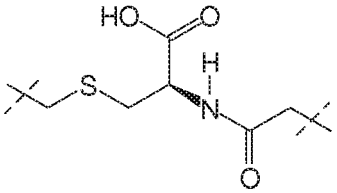
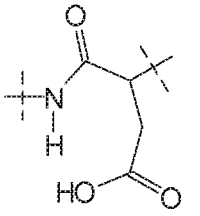
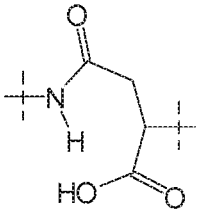
				 Siehe Anmerkung ***
208/ 199	R^1	1		
208/ 199	R^1	1		
204	R^1	1		
209/ 226	R^3	0		

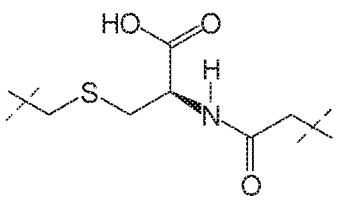
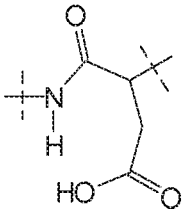
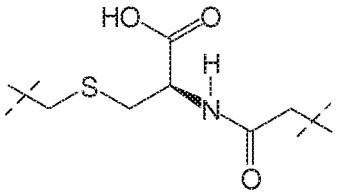
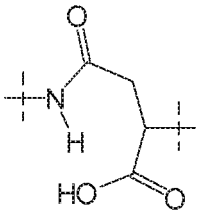
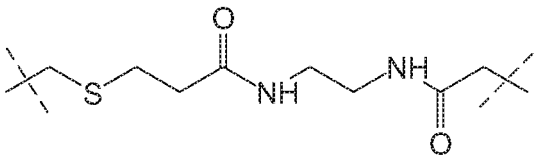
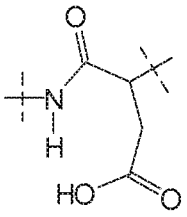
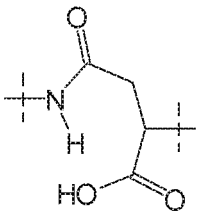
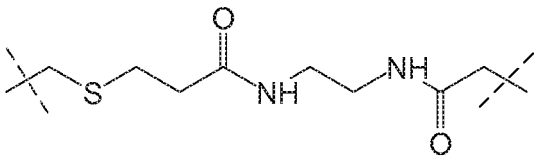
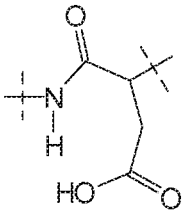
210	R^3	0		
211	R^3	0		
212	R^3	0		
213	R^3	0		 Siehe Anmerkung **
214	R^3	0		

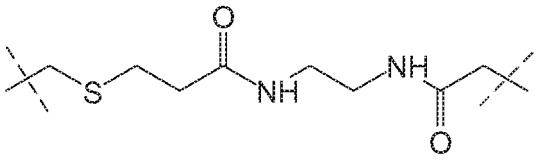
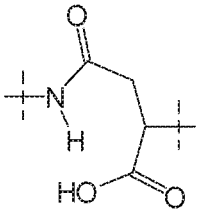
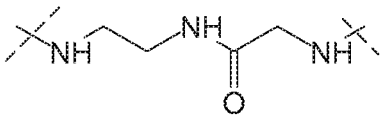
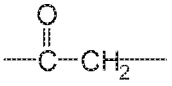
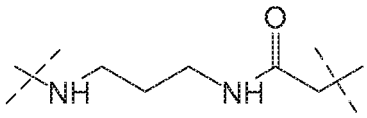
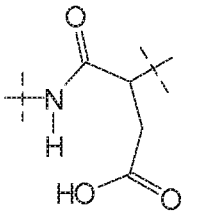
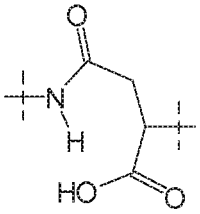
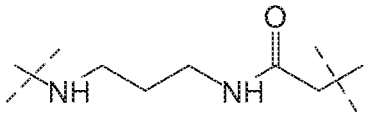
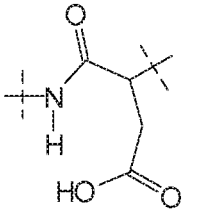
216	R^3	0		
217	R^3	0		 Siehe Anmerkung **
218	R^3	0		
238	R^2	0		
	R^1	1		 Mit R_{22} = -OH oder _NH_2

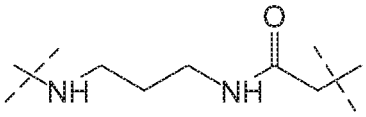
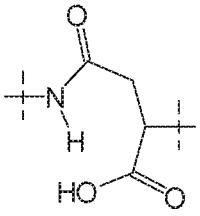
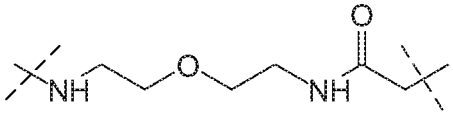
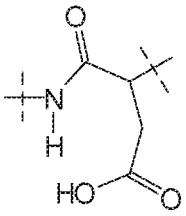
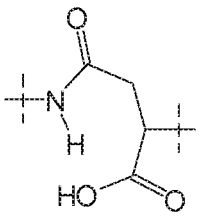
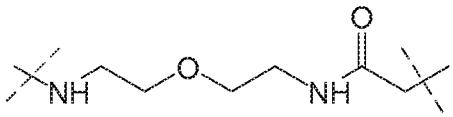
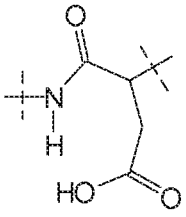
	R^1	1		 Mit R_{22} = -OH oder _NH_2
234	R^1	1		 und  Siehe Anmerkung ***
234	R^1	1		
234	R^1	1		

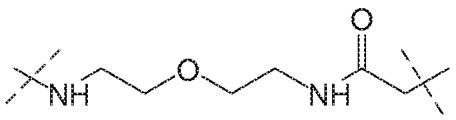
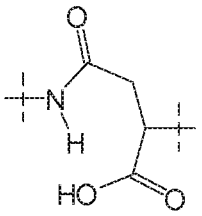
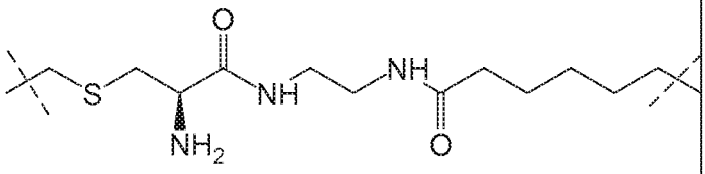
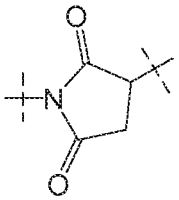
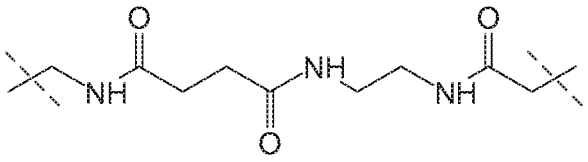
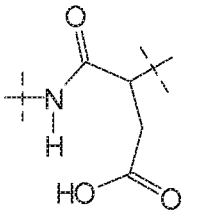
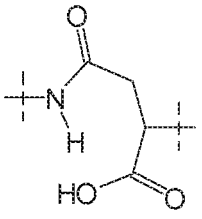
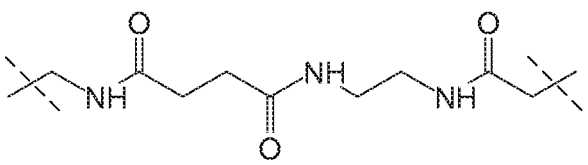
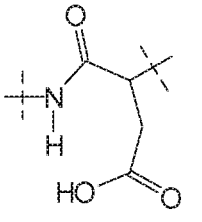
236	R^1	1		 und  Siehe Anmerkung ***
236	R^1	1		
236	R^1	1		
237	R^3	0		 und

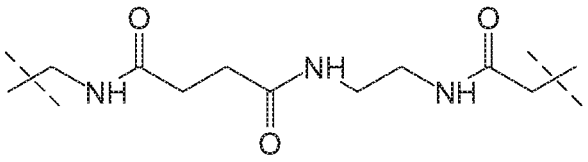
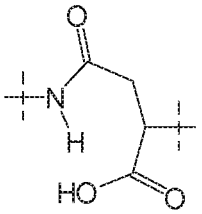
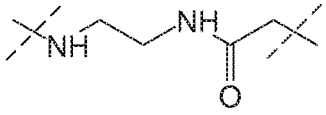
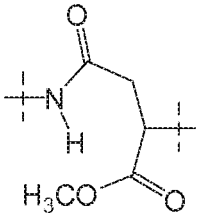
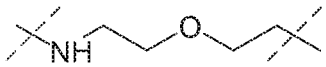
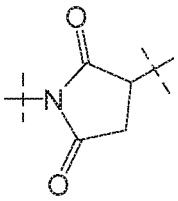
				 Siehe Anmerkung ***
237	R^3	0		
237	R^3	0		
239	R^3	0		 und  Siehe Anmerkung ***

239	R^3	0		
239	R^3	0		
240	R^3	0		 und  Siehe Anmerkung ***
240	R^3	0		

240	R^3	0		
241	R^1	1		
242	R^1	1		 und  Siehe Anmerkung ***
242	R^1	1		

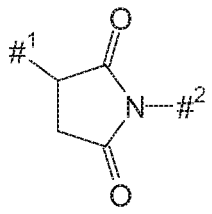
242	R^1	1		
243	R^1	1		 und  Siehe Anmerkung ***
243	R^1	1		

243	R^1	1		
244	R3	0		
245	R1	0		 und  Siehe Anmerkung ***
245	R1	0		

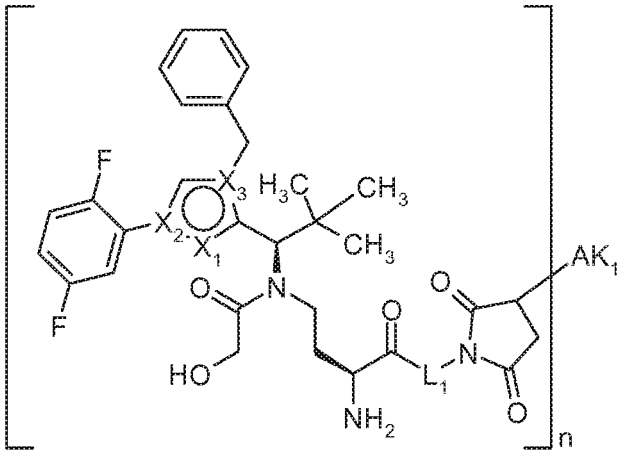
245	R1	0		
247	R1	1		
248	R1	1		

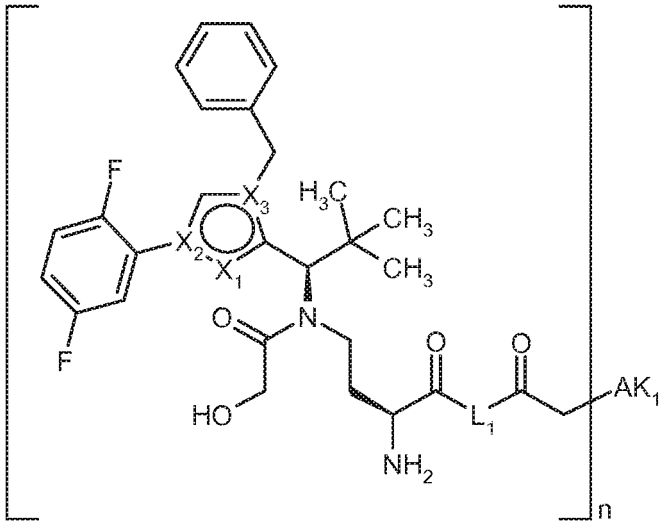
**: Siehe Anmerkung ** zu Tabelle A.

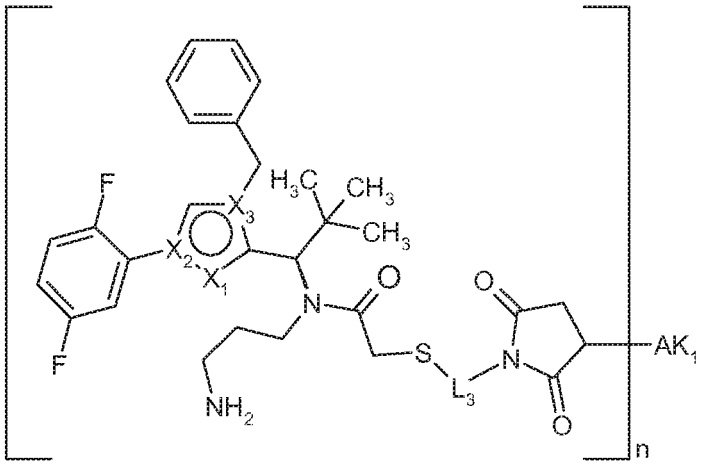
***: Bei Vorhandensein dieser Struktur L2 kann zugleich eine Struktur L2 der folgenden Formel vorliegen:

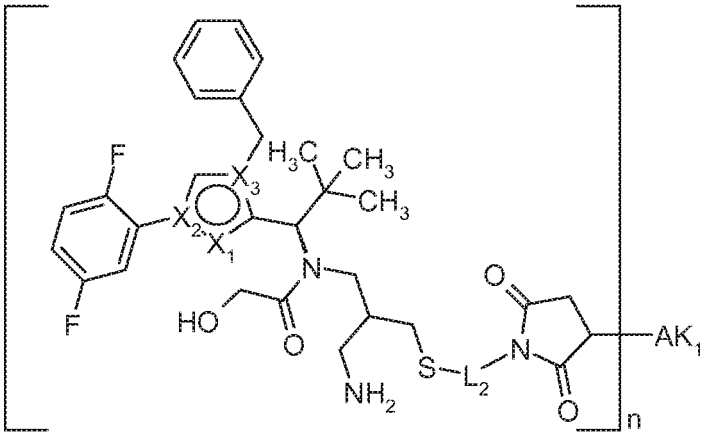


Beispiele für Konjugate mit entsprechenden Linkern weisen folgende Strukturen auf, wobei X1, X2, X3, und L1 die oben angegebenen Bedeutungen aufweisen, L2 und L3 dieselbe Bedeutung wie L1 hat, AK1 für einen Antikörper steht, der über einen Cysteinrest gebunden ist, und n eine Zahl von 1 bis 10 ist. Besonders bevorzugt ist AK1 ein humaner, humanisierter oder chimärer monoklonaler Antikörper oder ein Antigen-bindendes Fragment hiervon ist, insbesondere ein anti-TWEAKR-Antikörper oder ein Antigen-bindendes Fragment hiervon oder ein anti-EGFR-Antikörper oder ein Antigen-bindendes Fragment hiervon. Besonders bevorzugt sind ein anti-TWEAKR-Antikörper, der spezifisch an die Aminosäure D in Position 47 (D47) von TWEAKR (SEQ ID NO:169) bindet, insbesondere der anti-TWEAKR-Antikörper TPP-2090, oder die anti-EGFR-Antikörper Cetuximab oder Nimotuzumab.









Wenn der Linker an eine Lysin-Seitenkette bzw. einen Lysinrest gebunden ist, weist er vorzugsweise die folgende Formel aufweist:

-§-$(SG)_x$-L4-CO-§§,

wobei

§ die Bindung an das Wirkstoffmolekül darstellt und

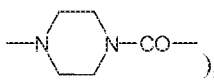
§§ die Bindung an das Binderpeptid oder –protein darstellt,

x 0 oder 1 darstellt,

SG eine spaltbare Gruppe, vorzugsweise ein 2-8 Oligopeptid, besonders, bevorzugt ein Dipeptid darstellt,

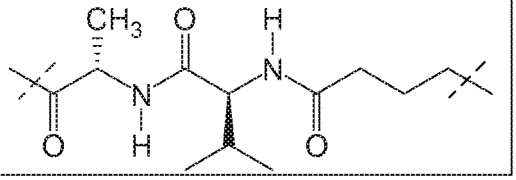
und

L4 eine Einfachbindung oder eine Gruppe $–(CO)_y$-G4- darstellt, wobei y 0 oder 1 darstellt, und

G4 eine geradkettige oder verzweigte Kohlenwasserstoffkette mit 1 bis 100 Kohlenstoffatomen aus Arylengruppen und/oder geradkettigen und/oder verzweigte und/oder cyclischen Alkylengruppen ist, die einfach oder mehrfach durch eine oder mehrere der Gruppen -O-, -S-, -SO-, SO_2, -NH-, -CO-, -NHCO-, -CONH-, -NMe-, -NHNH-, -SO2NHNH-, -CONHNH- und einen 5 bis 10-gliedriger, aromatischen oder nicht aromatischen Heterozyklus mit bis zu 4 Heteroatomen ausgewählt aus N, O und S, -SO- oder –SO2- unterbrochen sein kann (vorzugsweise ), wobei die Seitenketten, sofern vorhanden, mit $–NHCONH_2$, -COOH, -OH, $-NH_2$, $NH-CNNH_2$, Sulfonamid, Sulfon, Sulfoxid oder Sulfonsäure substituiert sein können.

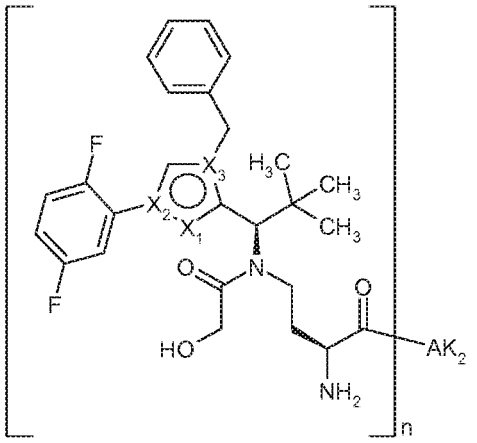
In der folgenden Tabelle B sind Beispiele für Linker an einen Lysinrest angegeben. In der Tabelle ist weiterhin die bevorzugte Ankopplungsstelle (R^1-R^5) angegeben. In der ersten Spalte sind weiterhin die Beispielnummern angegeben, in denen entsprechende Linker Anwendung finden.

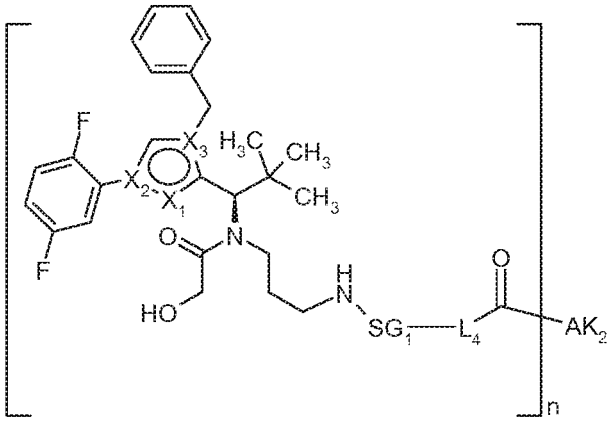
Tabelle B: Lysin-Linker
-§-$(SG)_x$-L4-CO-§§,

Beisp.	Subst.	$(SG)_x$-L4
1A	R^1	Einfachbindung
58/ 194	R^4	

Beispiele für Konjugate mit entsprechenden Linkern weisen folgende Strukturen auf, wobei X1, X2, X3, und L4 die oben angegebenen Bedeutungen aufweisen, AK2 für einen Antikörper steht, der über einen Lysinrest gebunden ist, und n eine Zahl von 1 bis 10 ist. Besonders bevorzugt ist AK2 ein humaner,

humanisierter oder chimärer monoklonaler Antikörper oder ein Antigen-bindendes Fragment hiervon ist, insbesondere ein anti-TWEAKR-Antikörper oder ein Antigen-bindendes Fragment hiervon oder ein anti-EGFR-Antikörper oder ein Antigen-bindendes Fragment hiervon. Besonders bevorzugt sind ein anti-TWEAKR-Antikörper, der spezifisch an die Aminosäure D in Position 47 (D47) von TWEAKR (SEQ ID NO:169) bindet, insbesondere der anti-TWEAKR-Antikörper TPP-2090, oder die anti-EGFR-Antikörper Cetuximab oder Nimotuzumab.

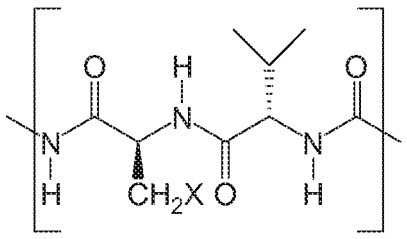




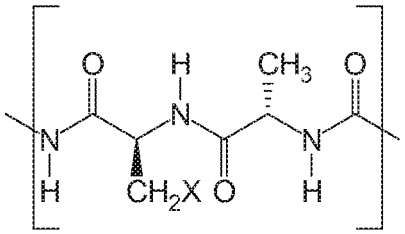
Weiterhin ist erfindungsgemäß bevorzugt die Grundstruktur (i), (ii), oder (iv), wobei SG1 bzw. SG eine durch Cathepsin spaltbare Gruppe darstellt, und L1 und L2 die oben aufgeführten Bedeutungen aufweisen. Besonders bevorzugt sind die folgenden Gruppen:

- -Val-Ala-CONH- (hierdurch Spaltung der Amid-Bindung am C-terminalen Amid von Alanin)
- -NH-Val-Lys-CONH- (Spaltung der Amid-Bindung am C-terminalen Amid von Lysin)
- -NH-Val-Cit-CONH- (Spaltung der Amid-Bindung am C-terminalen Amid von Citrullin)
- -NH-Phe-Lys-CONH (Spaltung der Amid-Bindung am C-terminalen Amid von Lysin)
- -NH-Ala-Lys-CONH- (Spaltung der Amid-Bindung am C-terminalen Amid von Lysin)
- -NH-Ala-Cit-CONH- (Spaltung der Amid-Bindung am C-terminalen Amid von Citrullin)

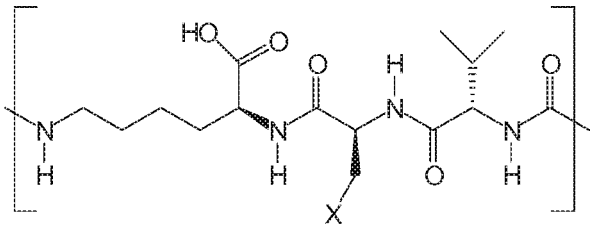
SG1 bzw. SG ist besonders bevorzugt



oder



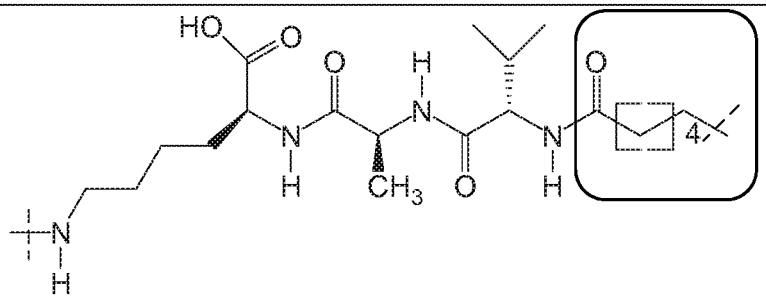
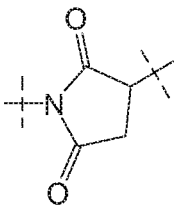
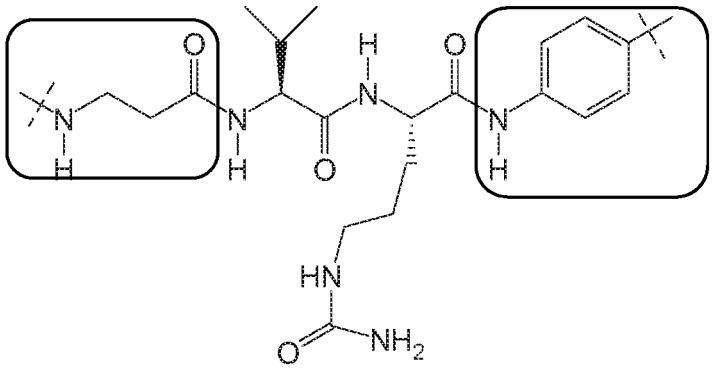
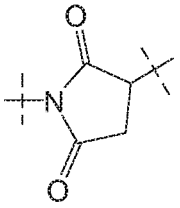
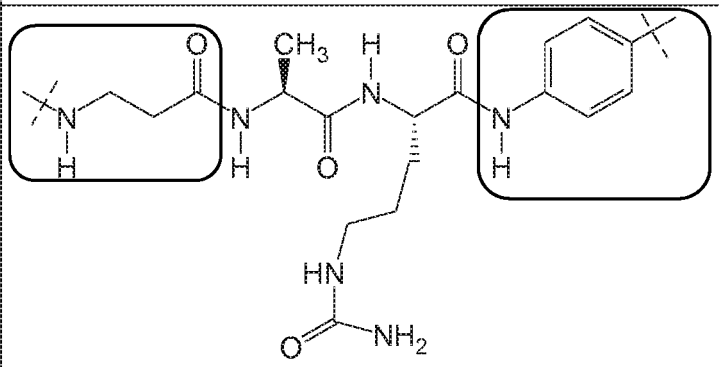
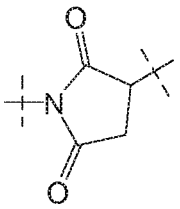
bzw.

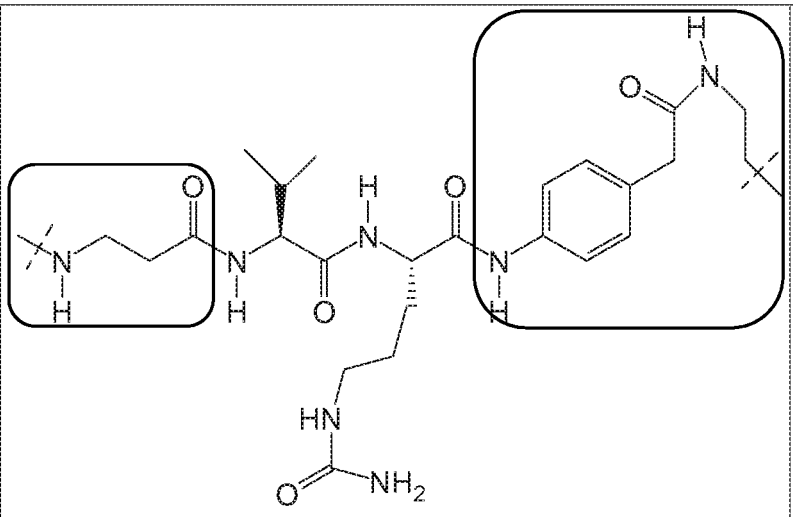
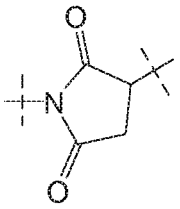
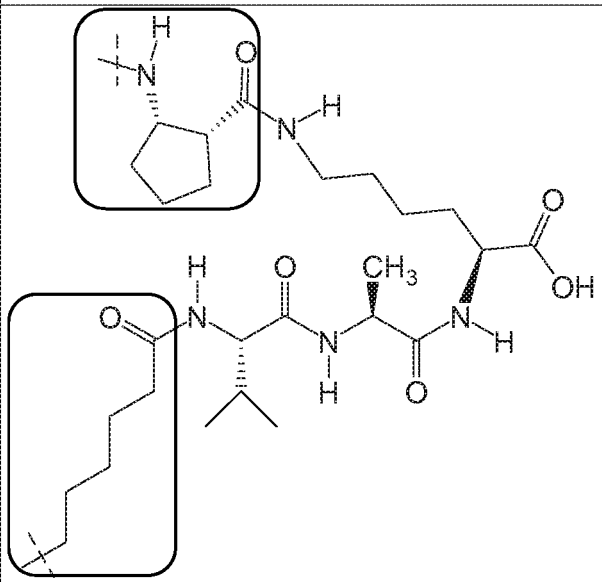
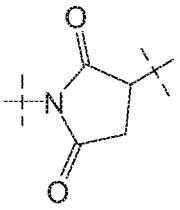
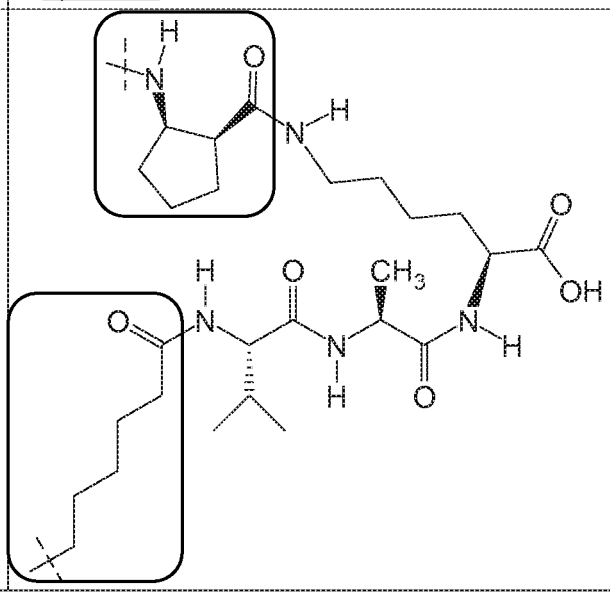
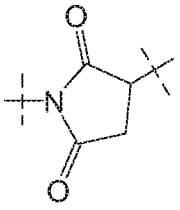


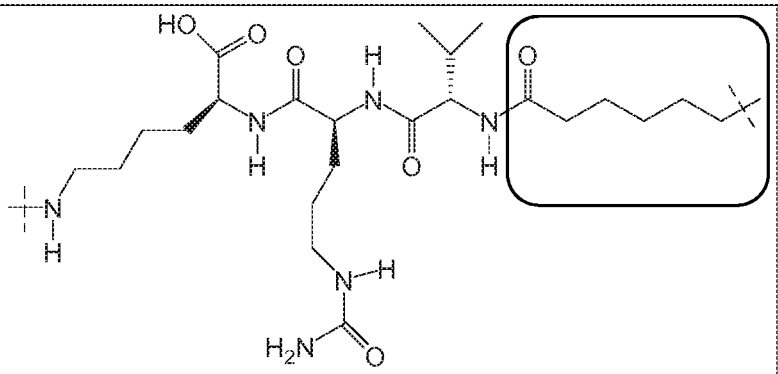
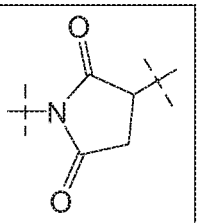
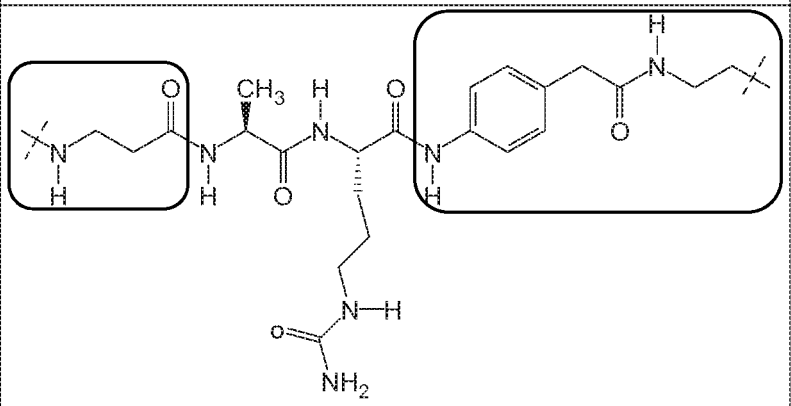
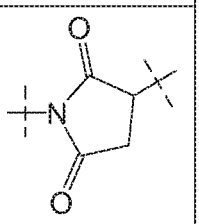
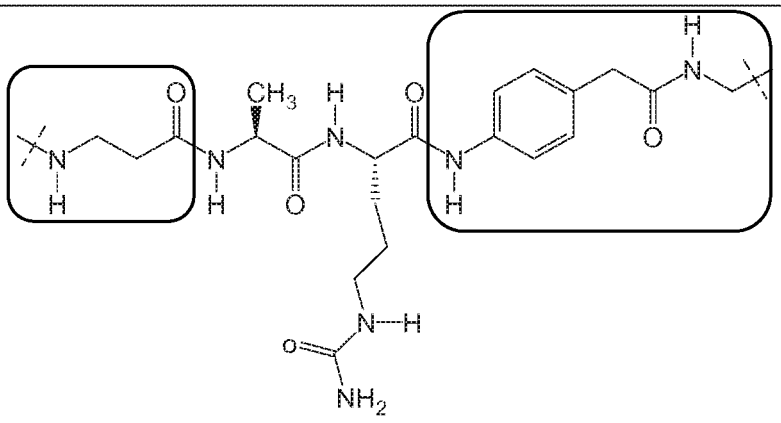
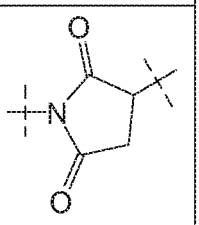
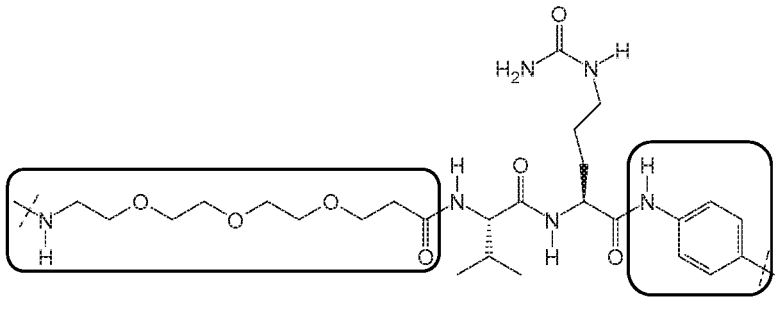
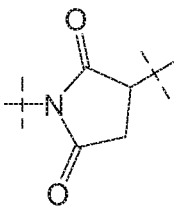
wobei X H, eine C_{1-10}-Alkylgruppe ist, die gegebenenfalls mit $-NHCONH_2$, -COOH, -OH, NH_2, $-NH-CNNH_2$, oder Sulfonsäure substituiert sein kann.

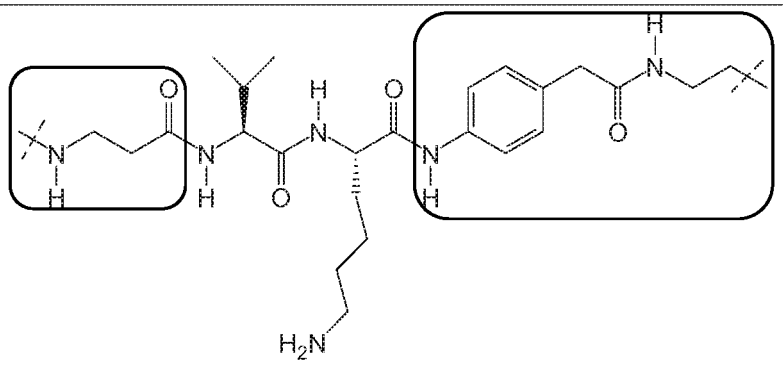
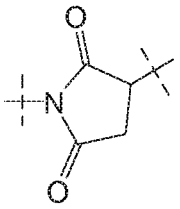
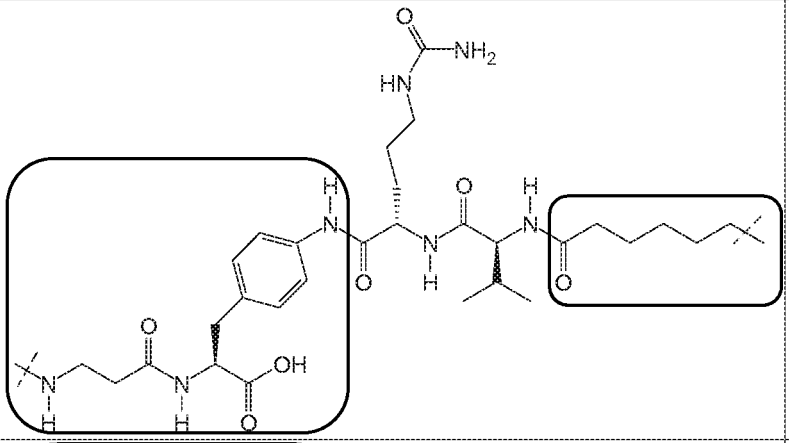
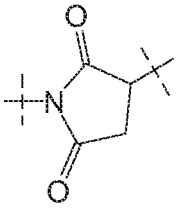
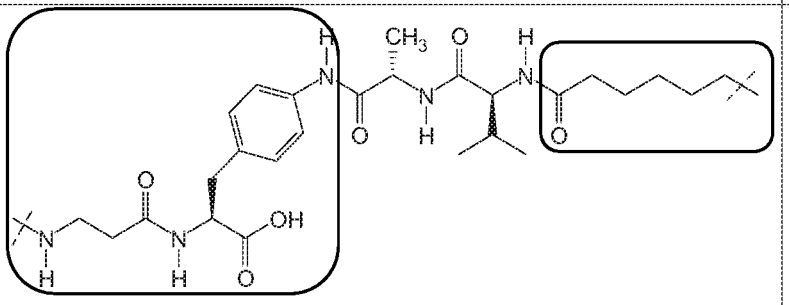
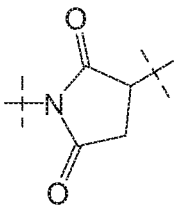
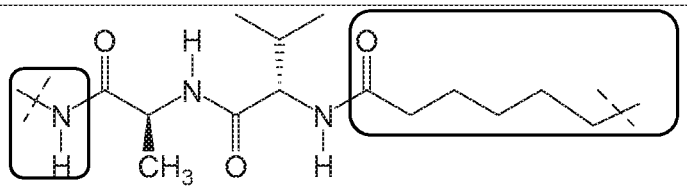
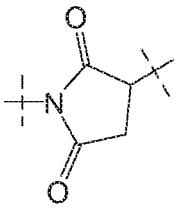
In der folgenden Tabelle C sind Beispiele für einen Linkerteil –SG1-L1- bzw. –L1-SG-L1- angegeben, wobei SG1 bzw. SG eine durch Cathepsin spaltbare Gruppe ist. In der Tabelle C ist weiterhin angegeben, mit welcher Gruppe L2 diese Beispiele für –SG1-L1- bzw. –L1-SG-L1- vorzugsweise kombiniert werden, sowie die bevorzugte Ankopplungsstelle (R^1-R^5) sowie der bevorzugte Wert für m, also ob vor L1 eine Carbonylgruppe vorliegt oder nicht (vgl. §-(CO)m-L1-L2-§§). Diese Linker werden vorzugsweise an einen Cysteinrest gekoppelt. In der ersten Spalte sind weiterhin beispielhaft für die Cetuximab ADCs die Beispielnummern angegeben, in denen entsprechende Linker Anwendung finden. Sie gelten in gleicher Weise für die entsprechenden ADCs mit anderen Antikörpern. Die L1-Gruppe ist in einem Kasten hervorgehoben. Diese Gruppen L1 können jedoch durch eine der Gruppe L1, die für die obige Formel §-(CO)m-L1-L2-§§ angegeben ist, ausgetauscht werden. Wenn L2 ein Bernsteinsäureamid ist bzw. sich hiervon ableitet, kann dieses Amid ganz oder teilweise auch in Form des hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamids vorliegen, wie oben beschrieben.

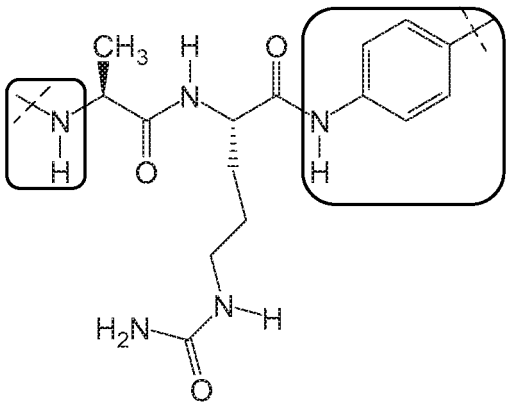
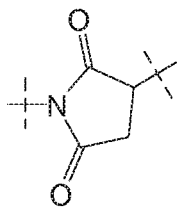
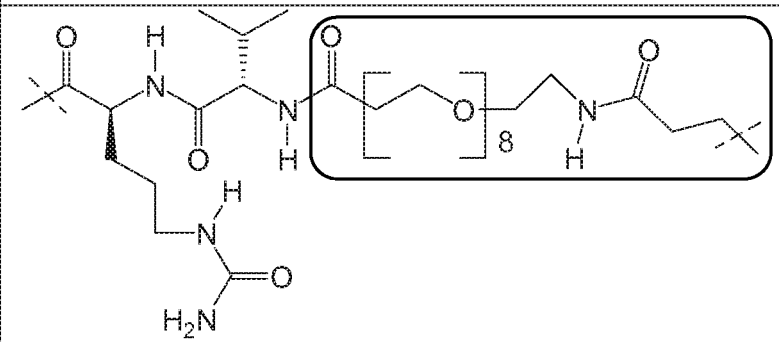
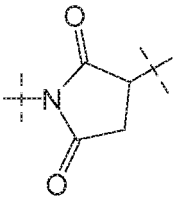
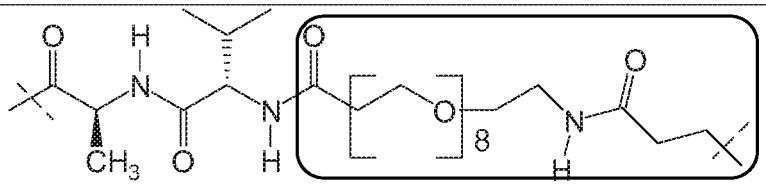
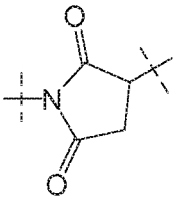
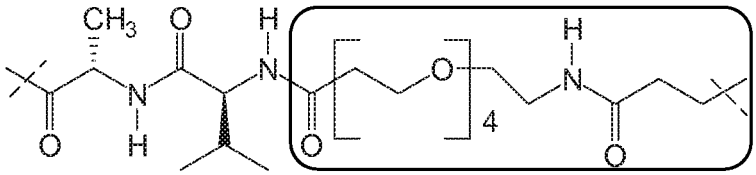
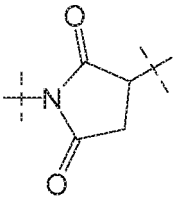
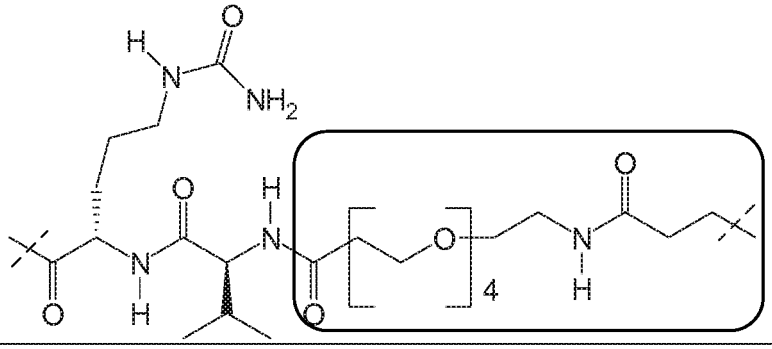
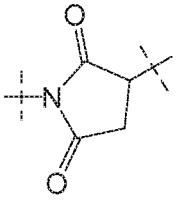
Tabelle C

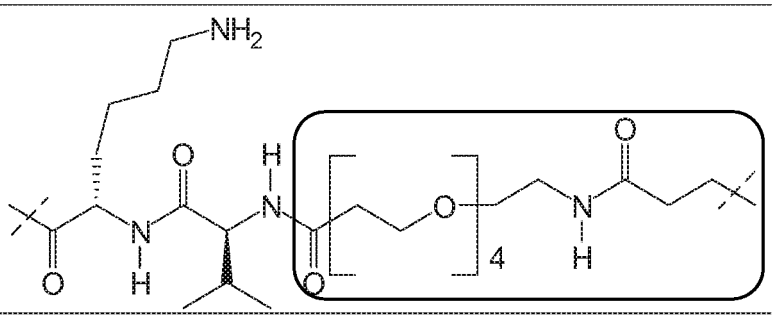
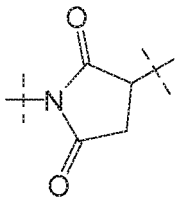
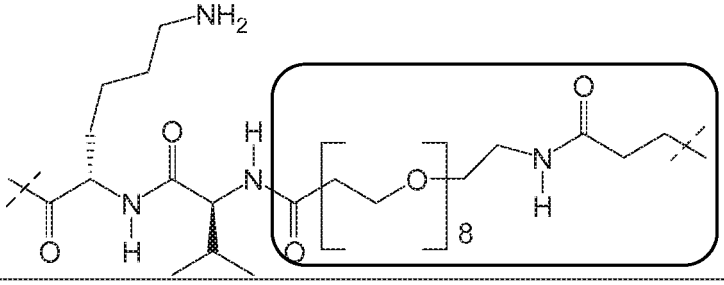
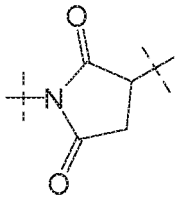
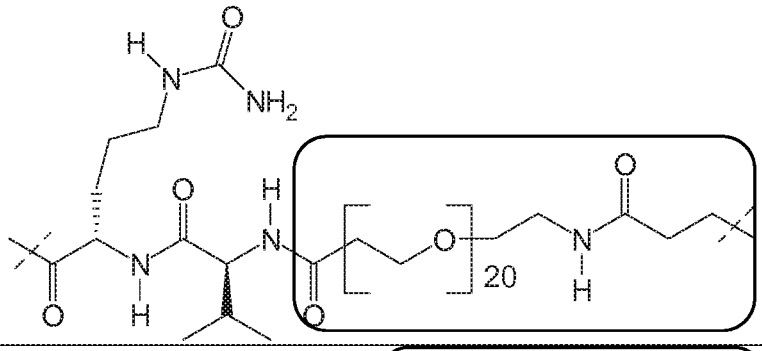
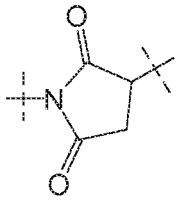
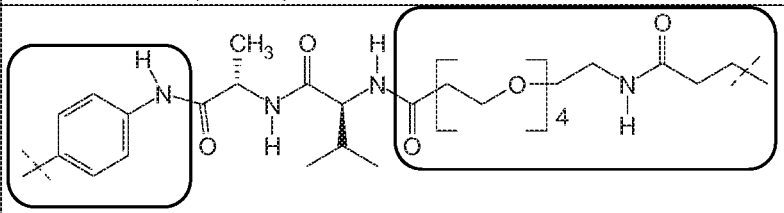
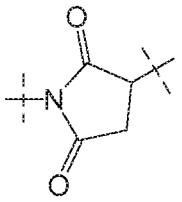
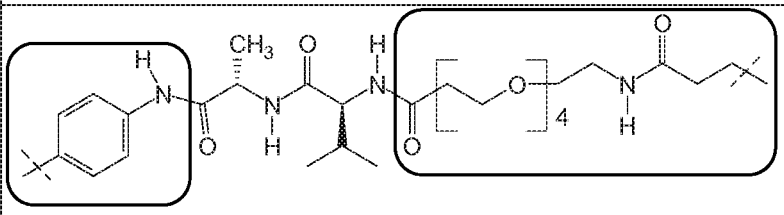
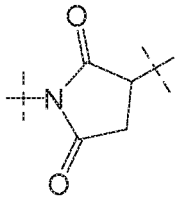
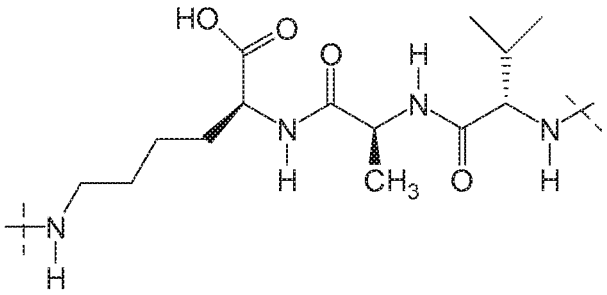
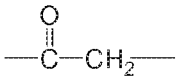
Beisp.	Subst.	m	-SG1-L1- bzw. --L1-SG-L1-	L2
8A /163 A	R^1	1		
14A	R^1	1		
15A	R^1	1		

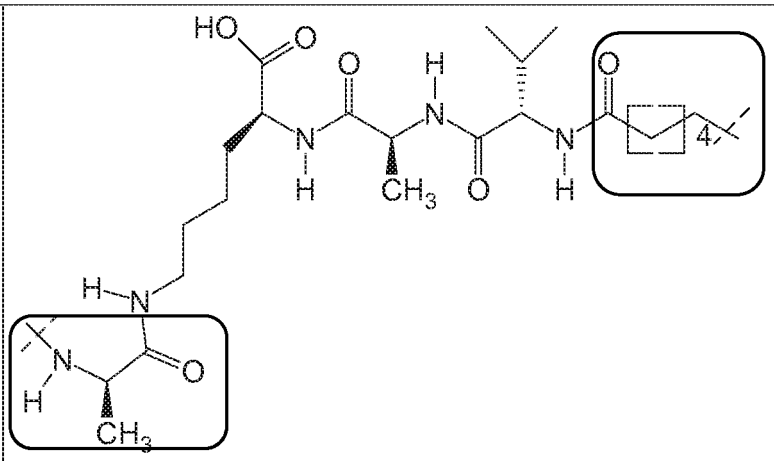
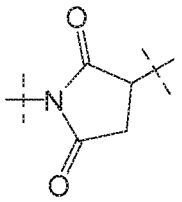
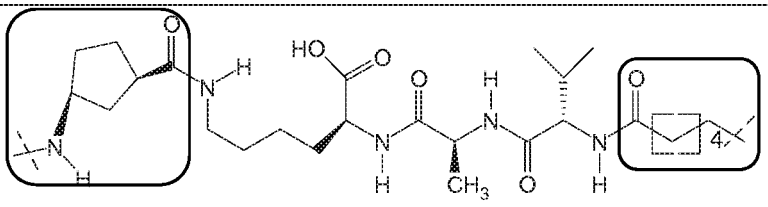
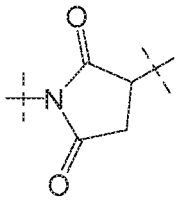
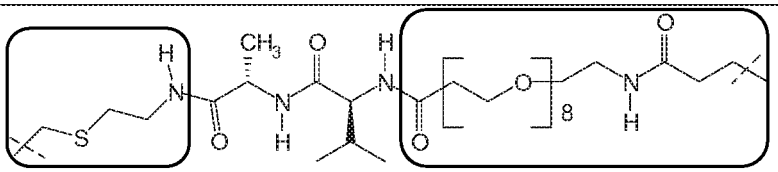
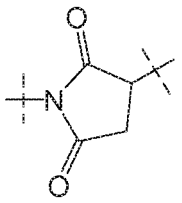
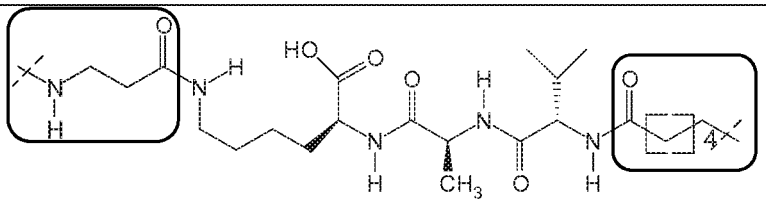
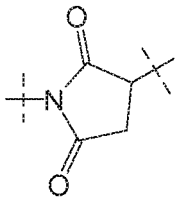
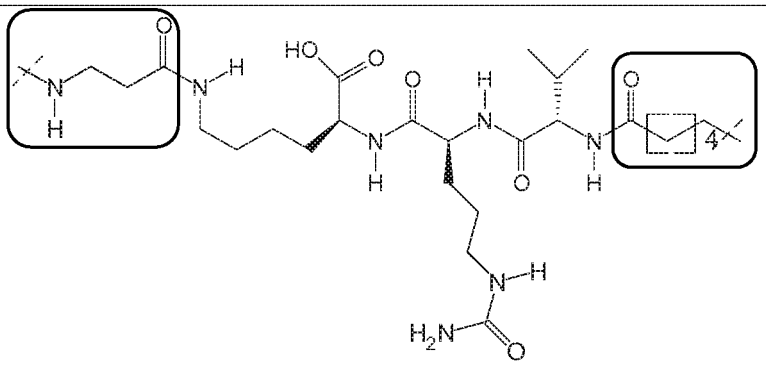
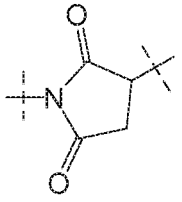
16A	R^1	1		
17A / 168 A	R^1	1		
18A	R^1	1		

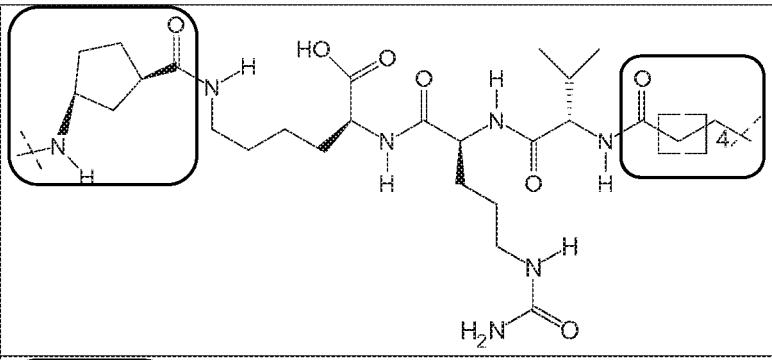
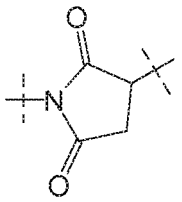
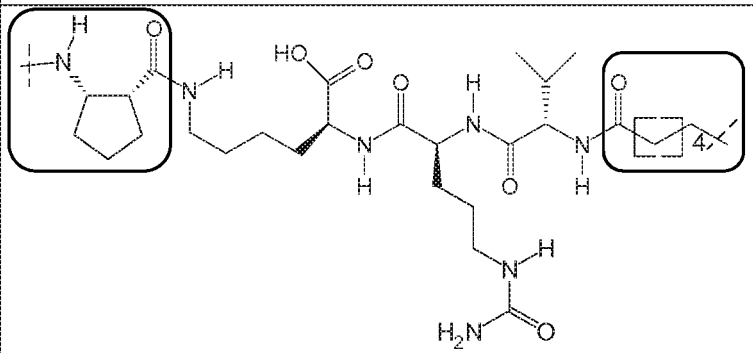
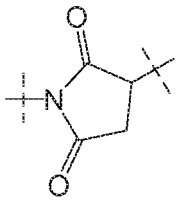
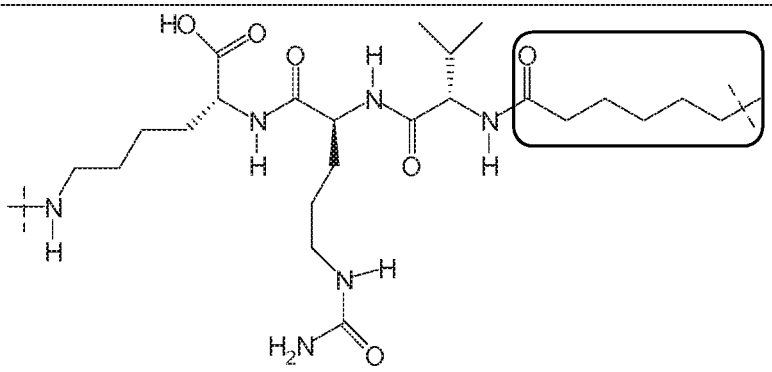
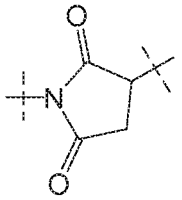
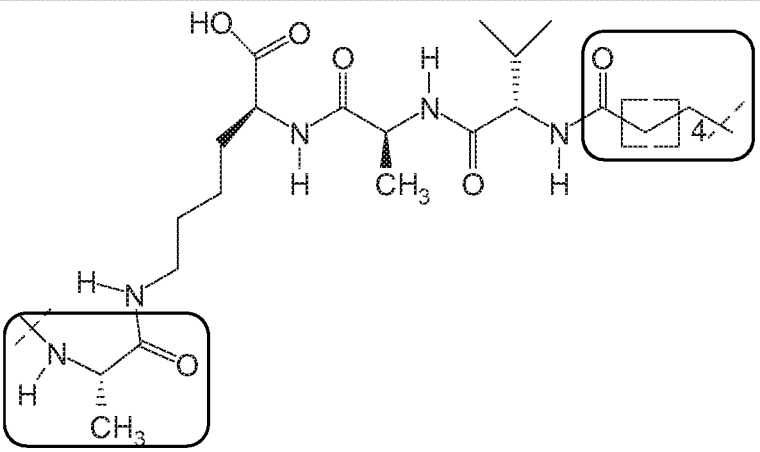
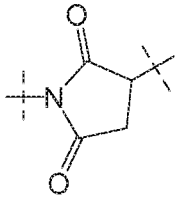
23A/ 164 A	R^1	1		
24A	R^1	1		
25A	R^1	1		
26A	R^1	1		

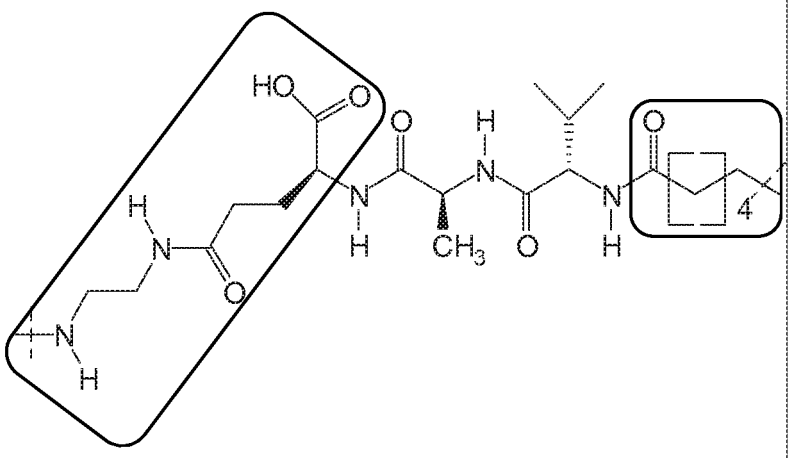
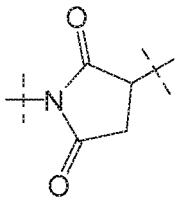
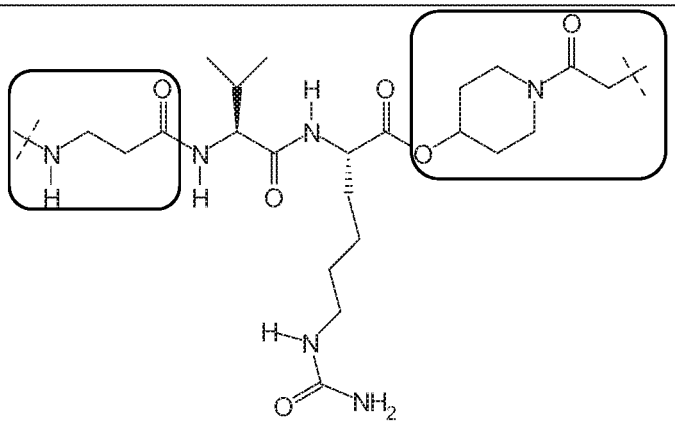
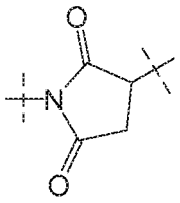
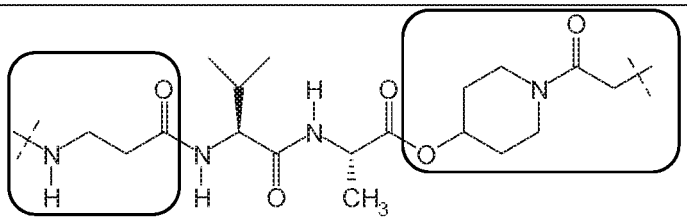
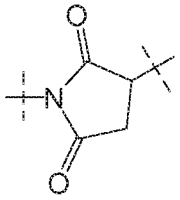
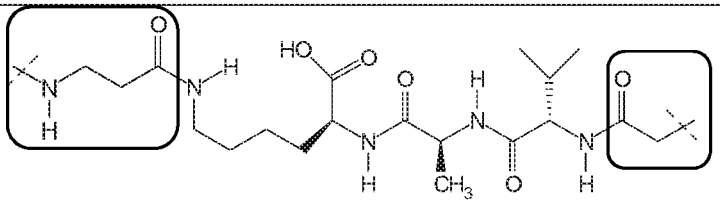
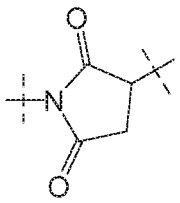
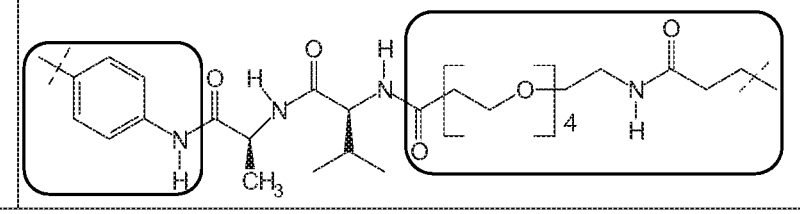
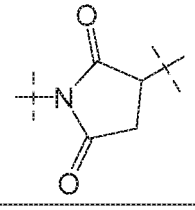
27A	R^1	1		
28A	R^1	1		
29A	R^1	1		
31A	R^5 (m)	0		

34A	R^1	1		
35A	R^4	0		
36A	R^4	0		
39A/ 215 A	R^4	0		
43A	R^4	0		

45A	R^4	0		
46A	R^4	0		
47A	R^4	0		
55A	R^3	0		
55B	R^3	0		
110 A / 156 A	R^1	1		

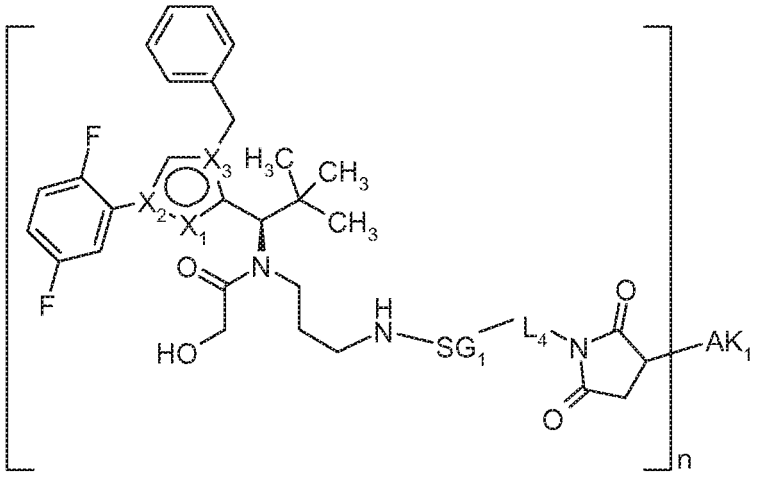
128 A	R^1	1		
129 A /167 A	R^1	1		
150 A	R^3	0		
154 A / 155 A /160	R^1	1		
165 A	R^1	1		

166 A	R^1	1		
169 A	R^1	1		
170 A	R^1	1		
171 A	R^1	1		

172 A/ 173 A/ 174 A	R^1	1		
205 A	R^1	1		
206 A	R^1	1		
207 A	R^1	1		
235 A	R^3	0		

Beispiele für Konjugate mit der Grundstruktur (i) weisen die folgende Struktur auf, wobei X1, X2, und X3 die oben angegebenen Bedeutungen aufweisen, L4 dieselbe Bedeutung wie L1 hat, AK1 für einen

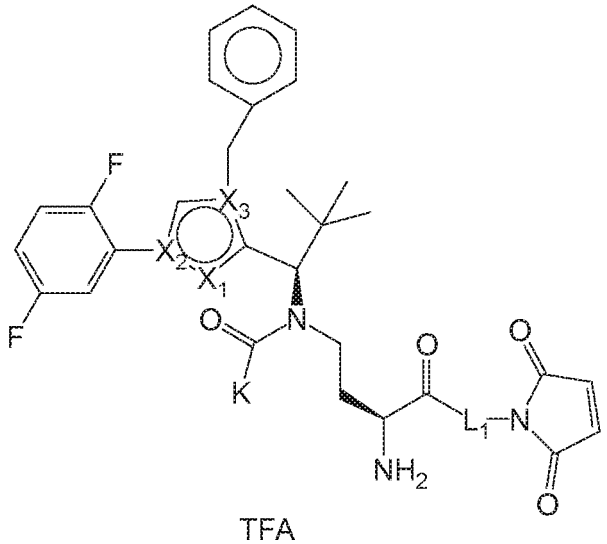
Antikörper steht, der über einen Cysteinrest gebunden ist, und n eine Zahl von 1 bis 10 ist. Besonders bevorzugt ist AK1 ein anti-TWEAKR-Antikörper, insbesondere einer der spezifisch an die Aminosäure D in Position 47 (D47) von TWEAKR (SEQ ID NO:169) bindet, insbesondere der anti-TWEAKR-Antikörper TPP-2090.



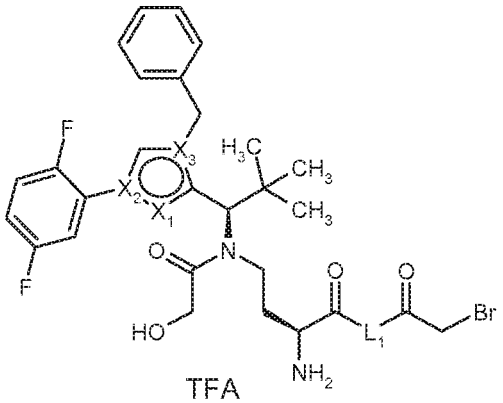
KSP-Inhibitor - Linker-Intermediate und Herstellung der Konjugate

Die erfindungsgemäßen Konjugate werden hergestellt, in dem zunächst der niedermolekulare KSP-Inhibitor mit einem Linker versehen wird. Da so erhaltene Intermediat wird dann mit dem Binder (vorzugsweise Antikörper) umgesetzt.

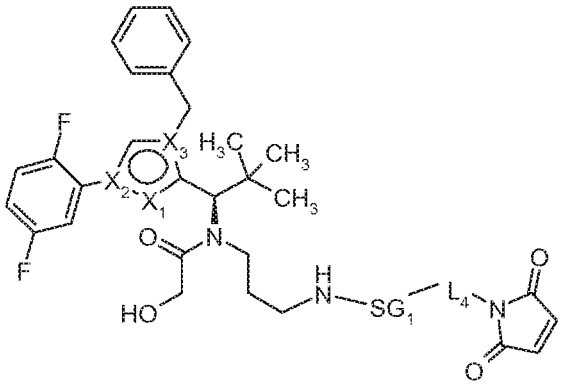
Für die Kopplung an einen Cysteinrest wird vorzugsweise eine der folgenden Verbindungen mit dem Cystein-haltigen Binder wie z.B. einem Antikörper, der dazu ggf. partiell reduziert wurde, umgesetzt:

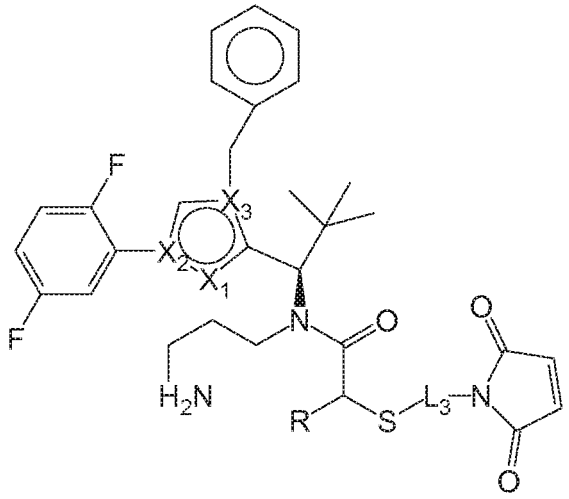


TFA

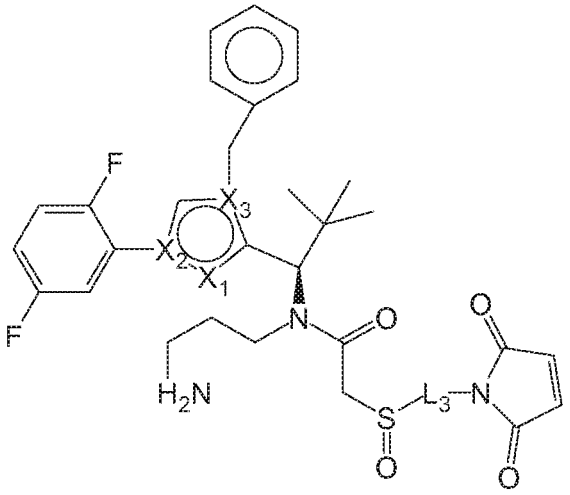


TFA

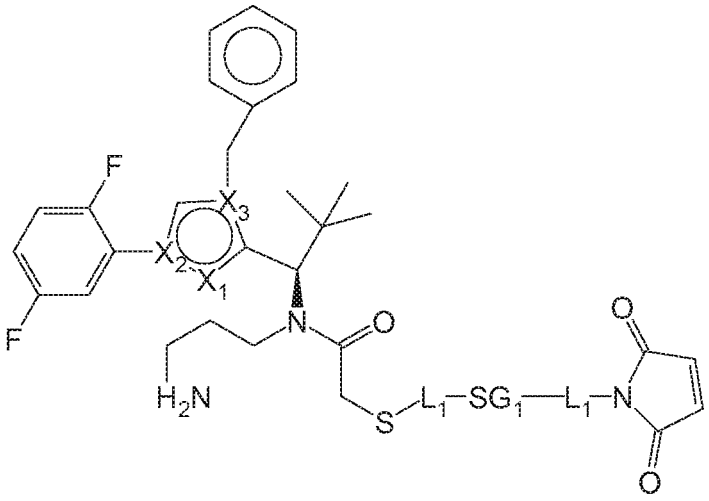




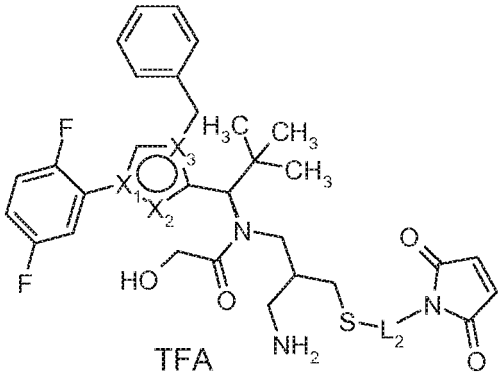
TFA



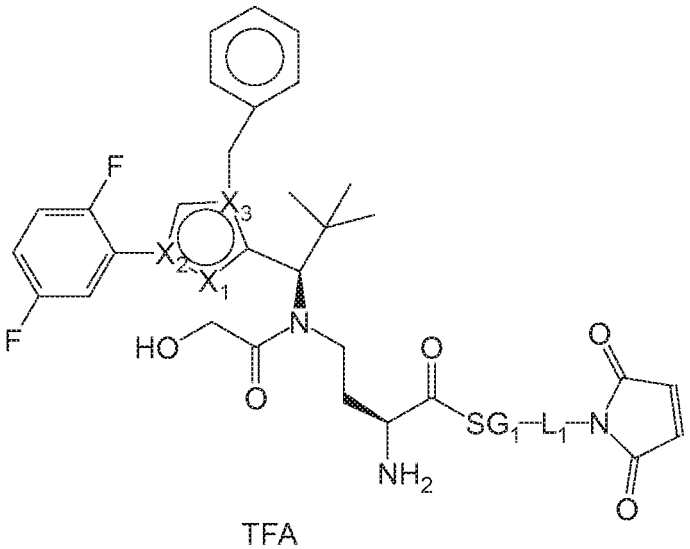
TFA



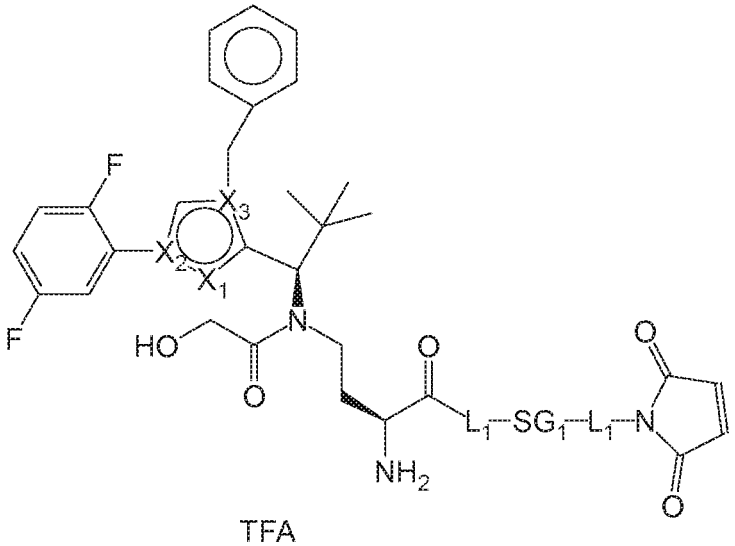
TFA



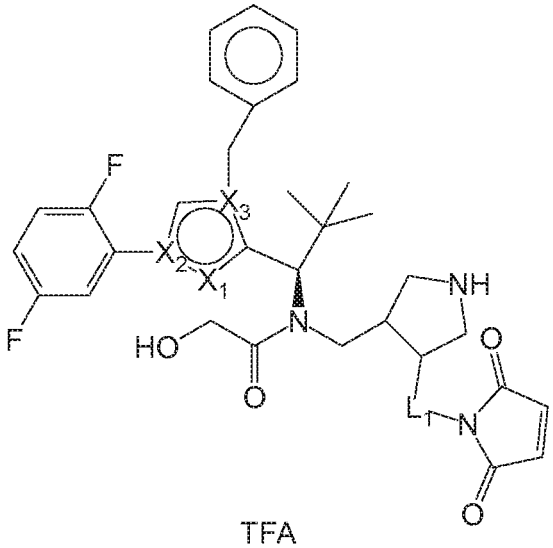
TFA



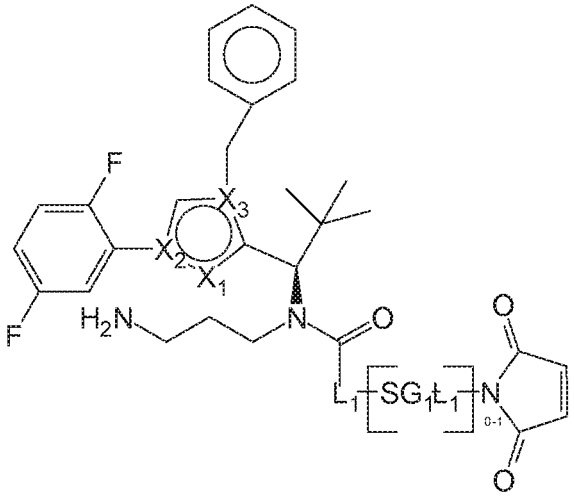
TFA



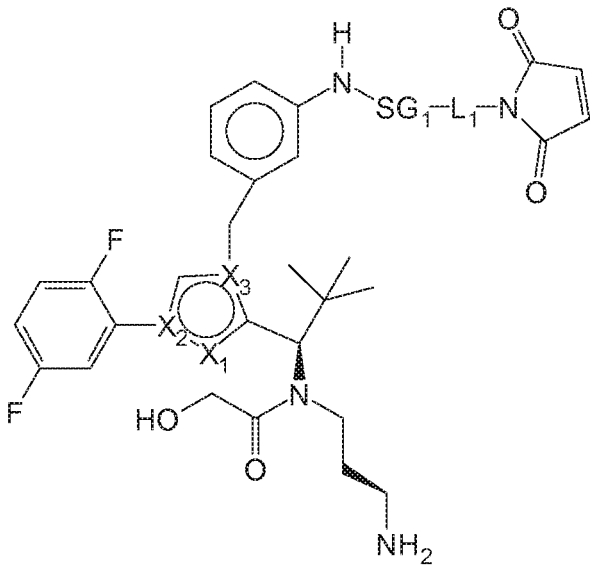
TFA



TFA



TFA



TFA

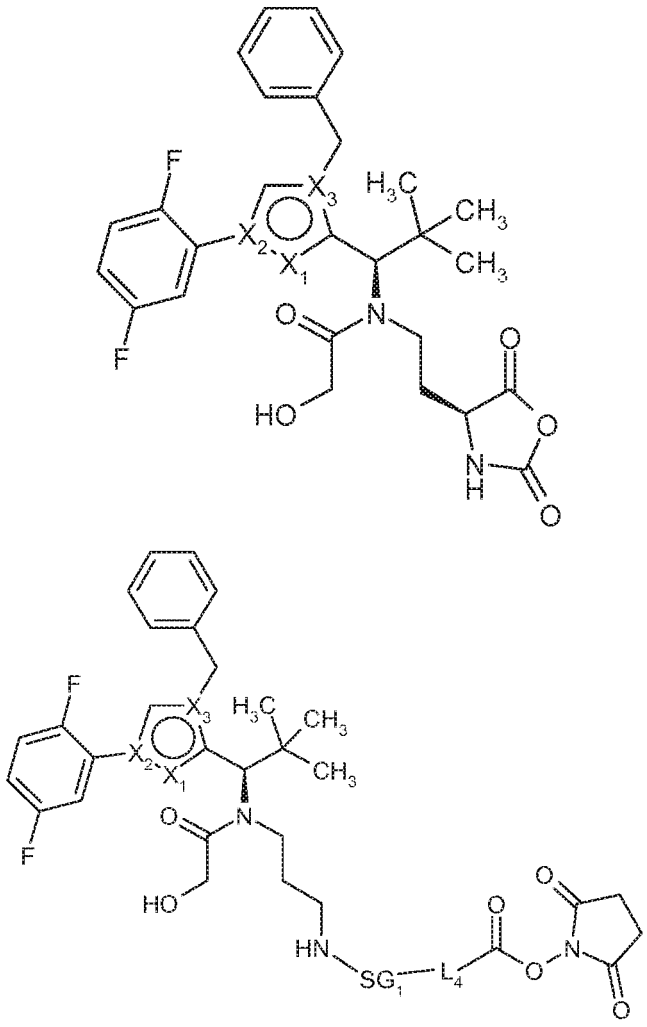
wobei R -H oder –COOH darstellt,

wobei K lineares oder verzweigtes, gegebenenfalls mit C_1-C_6 Alkoxy oder –OH substituiertes C_1-C_6 Alkyl darstellt, und

wobei X_1, X_2, X_3, SG1, L1, L2, L3 und L4 die gleiche Bedeutung haben wie oben beschrieben.

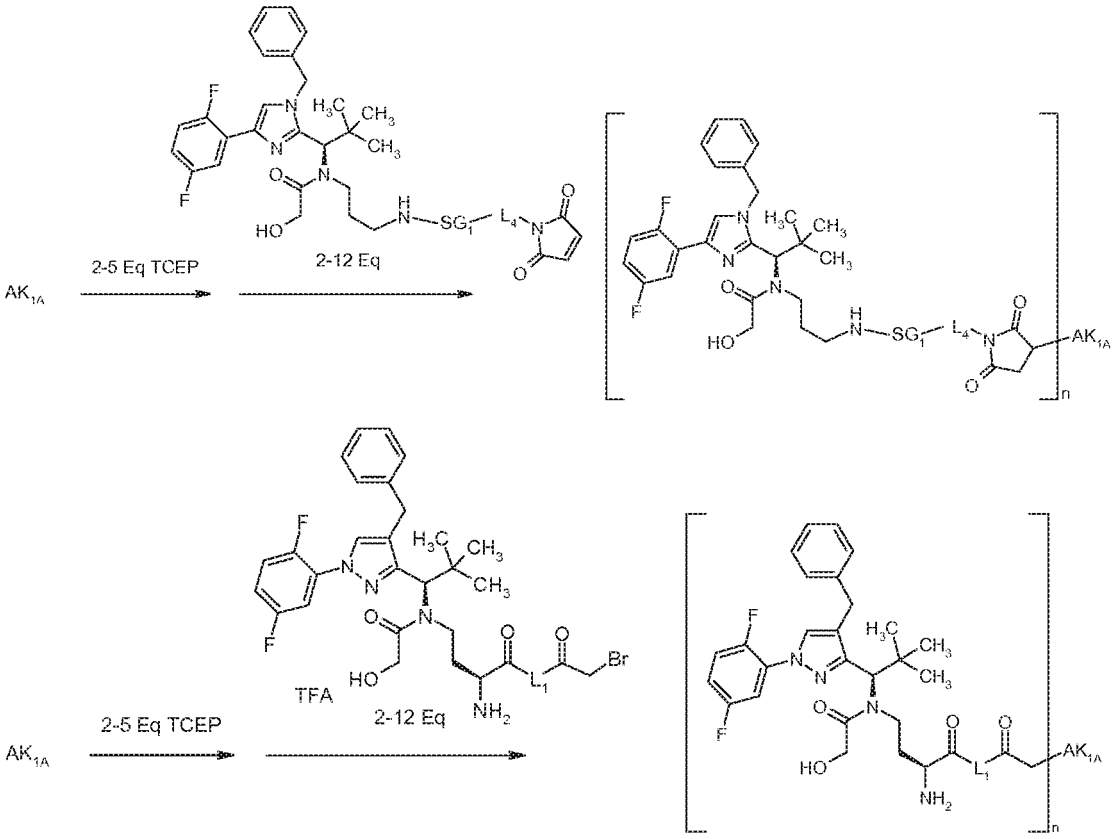
Die Verbindung kann z.B in Form ihres Trifluoressigsäuresalzes verwendet werden. Zur Reaktion mit dem Binder wie z.B. dem Antikörper wird die Verbindung vorzugsweise in 2 bis 12 fachem molaren Überschuss gegenüber dem Binder verwendet.

Für die Kopplung an einen Lysinrest wird vorzugsweise eine der folgenden Verbindungen mit dem Lysin-haltigen Binder wie z.B. einem Antikörper umgesetzt:



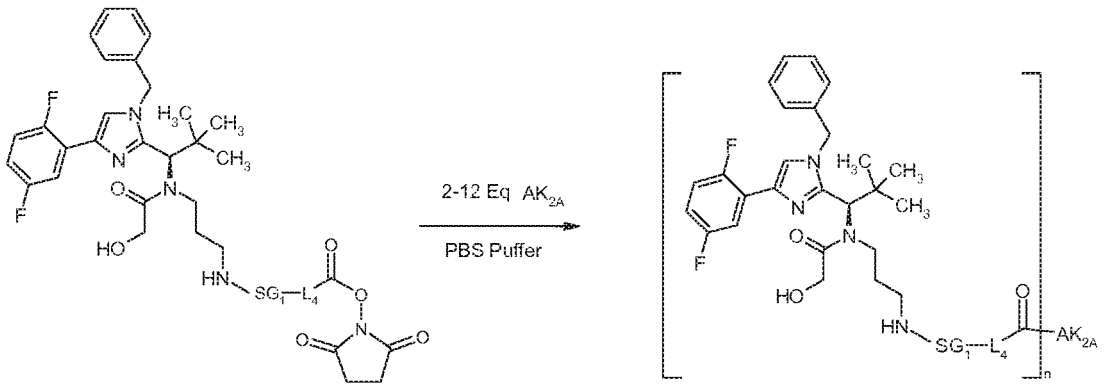
wobei X_1, X_2, X_3 die gleiche Bedeutung haben wie in Formel (II), und L4 die gleiche Bedeutung wie L1 hat, und L1 die gleiche Bedeutung hat wie oben beschrieben,

Für ein an einen Cysteinrest ankoppelndes Intermediat können die Reaktionen wie folgt veranschaulicht werden:

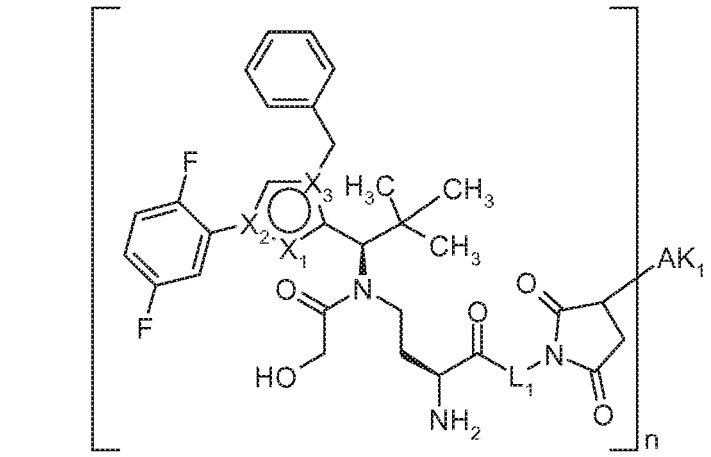


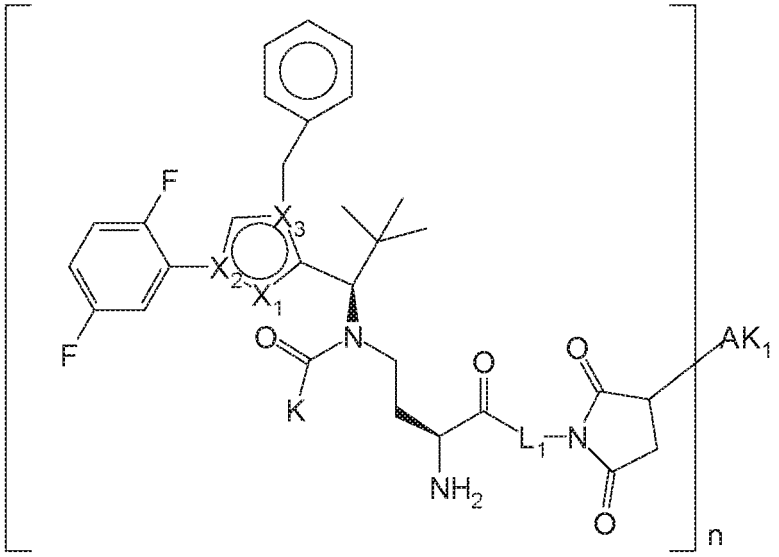
Die anderen Intermediate und andere Antikörper können entsprechend umgesetzt werden.

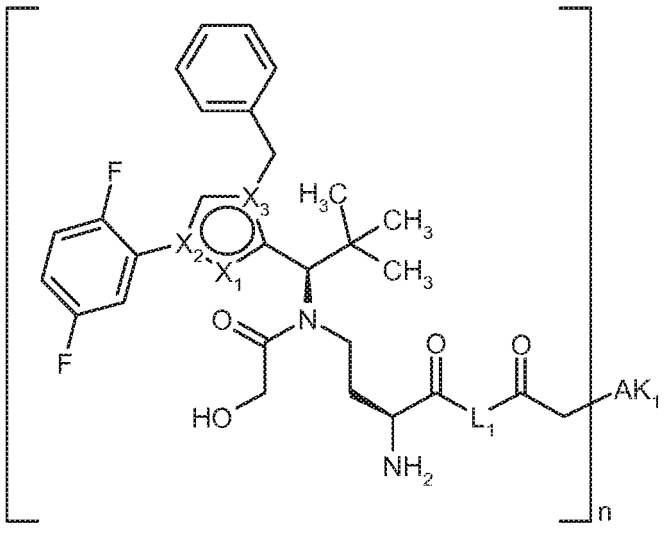
Für ein an einen Lysinrest ankoppelndes Intermediat kann die Reaktion wie folgt veranschaulicht werden:

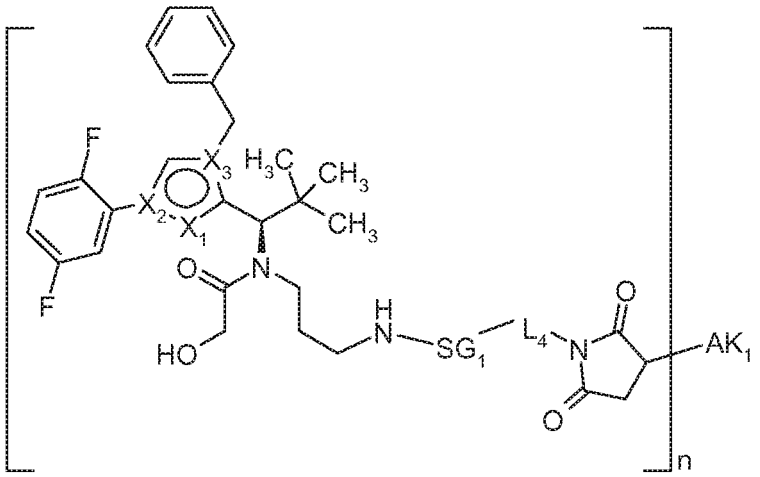


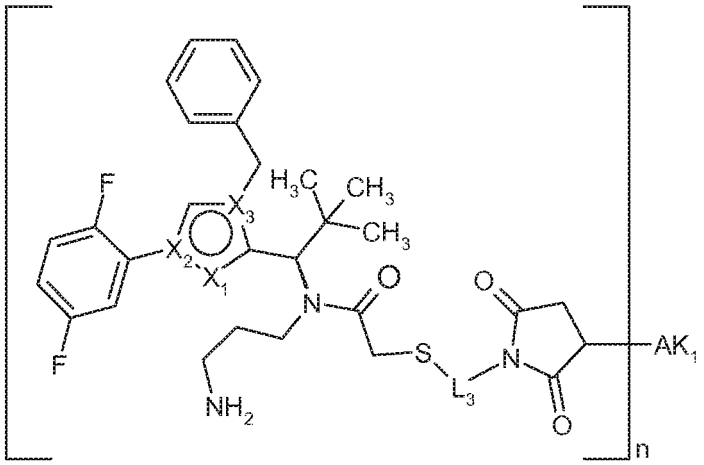
Erfindungsgemäß werden so die folgenden Konjugate erhalten:

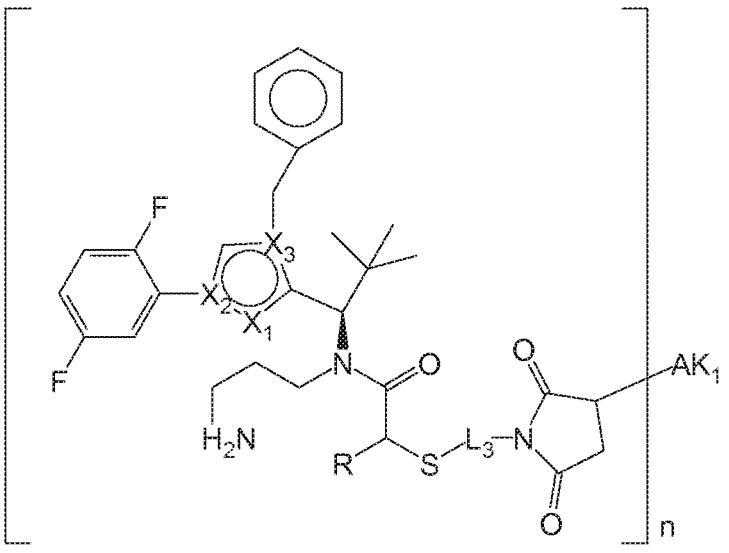


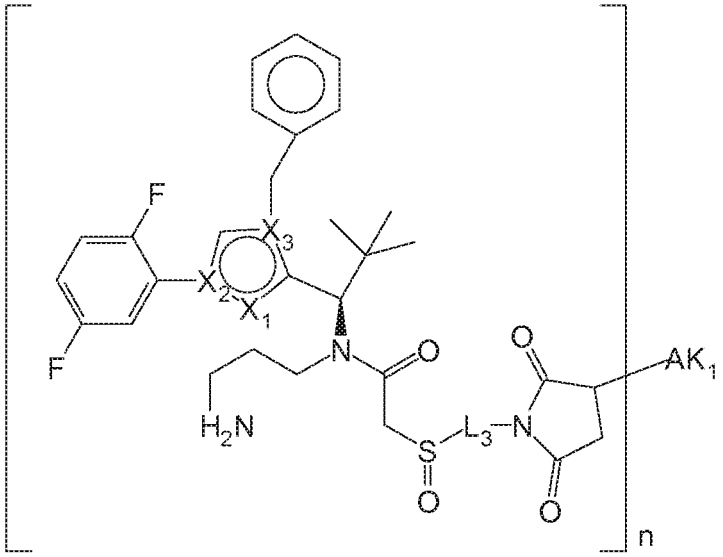


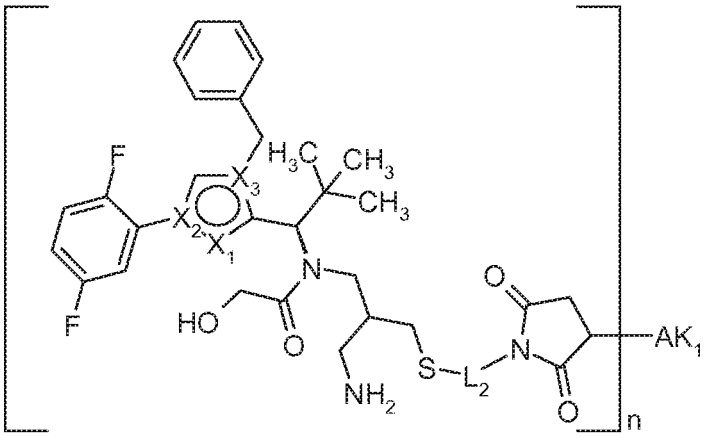


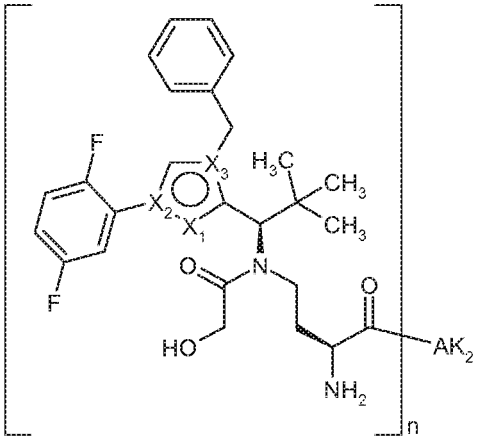


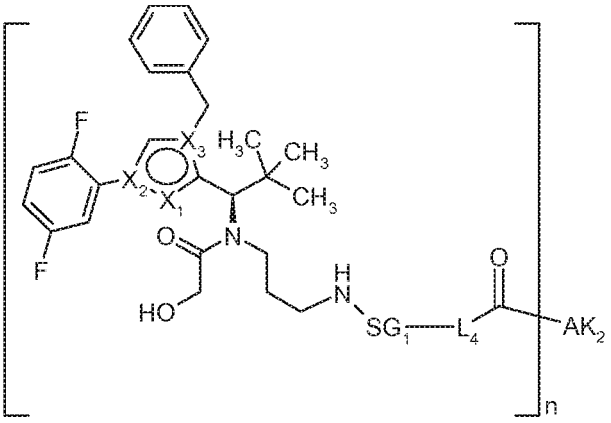


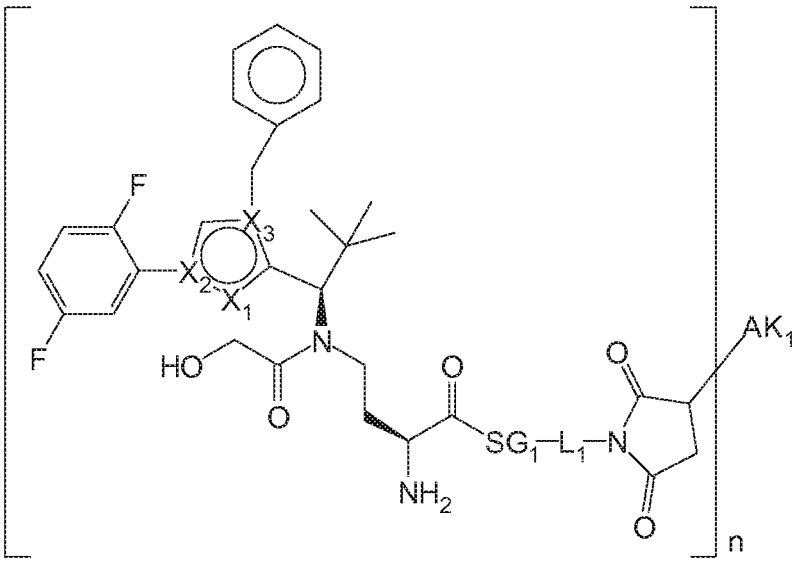


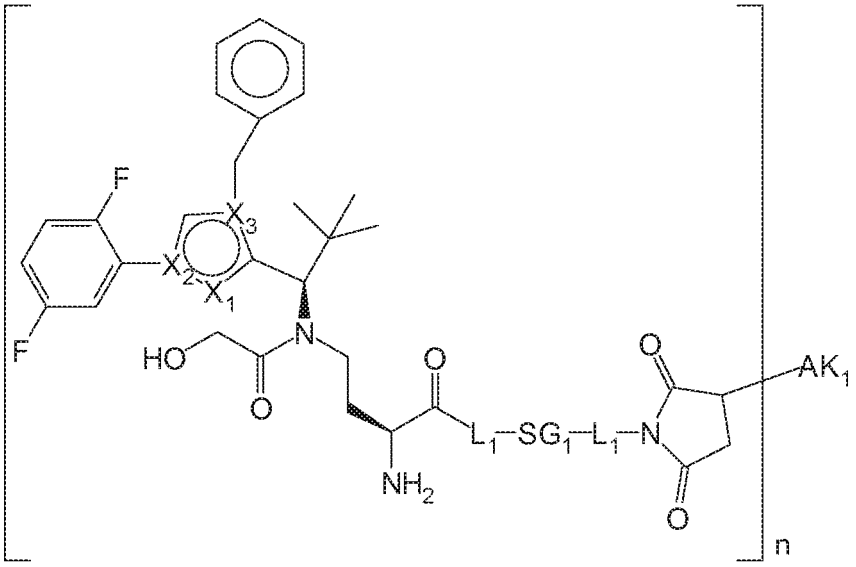


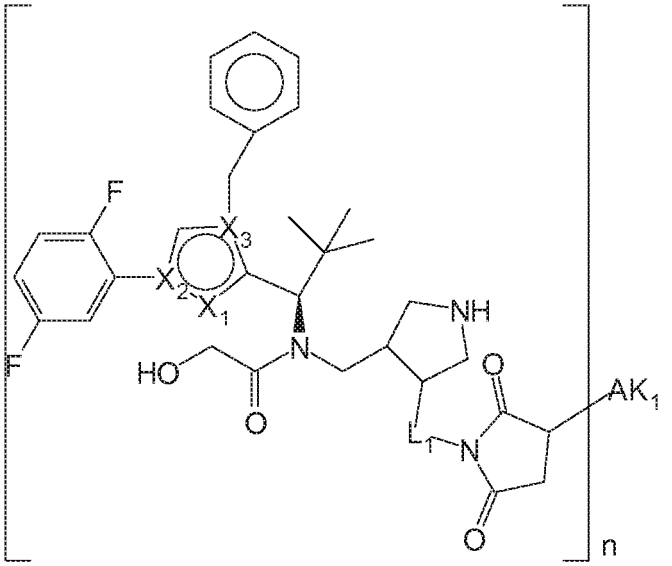


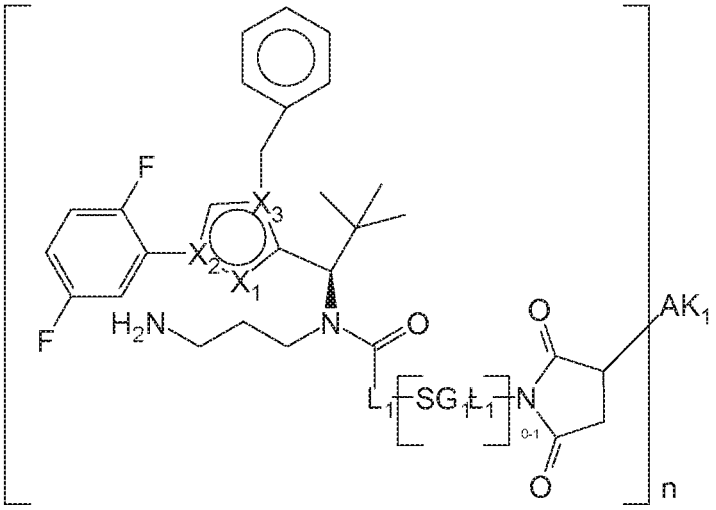


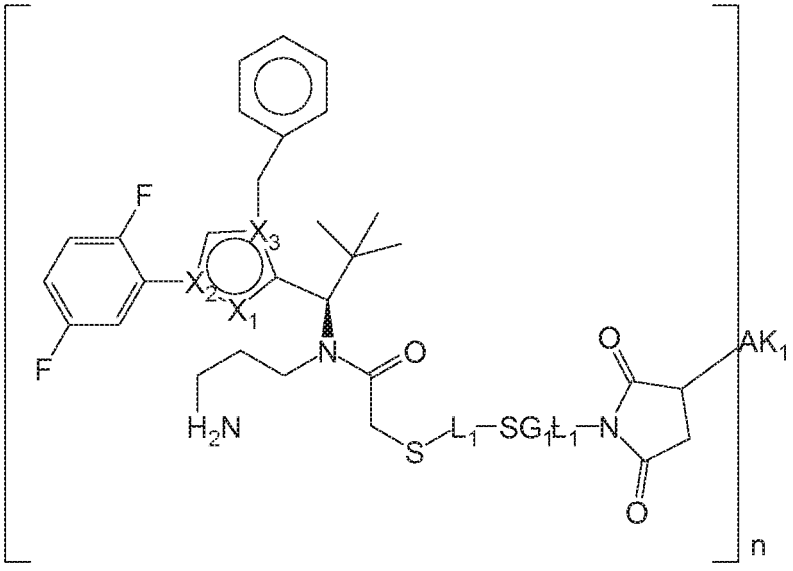


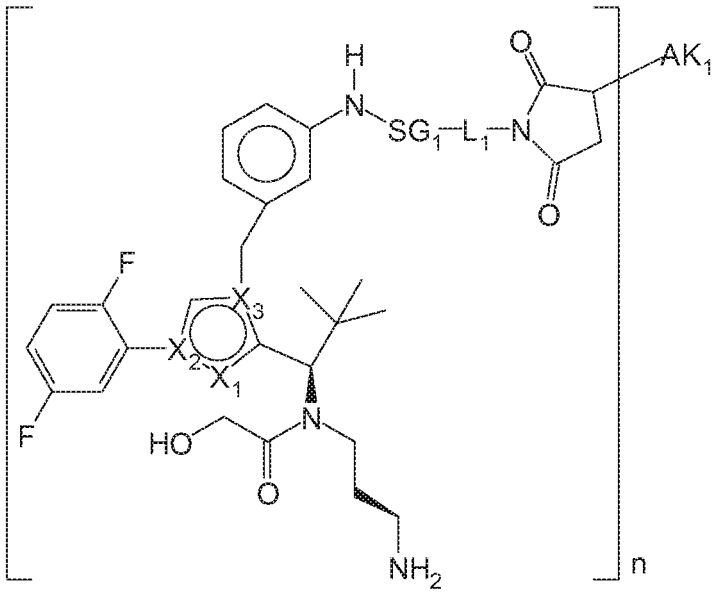




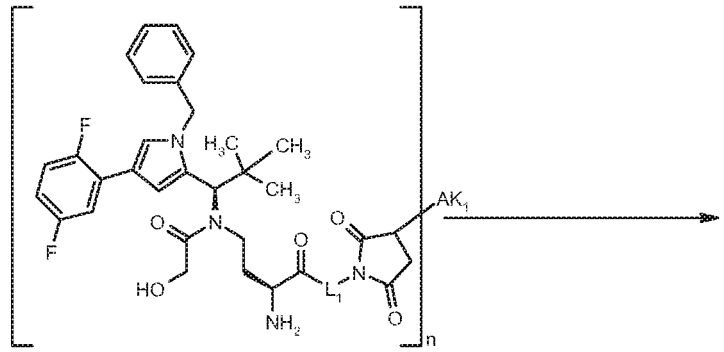


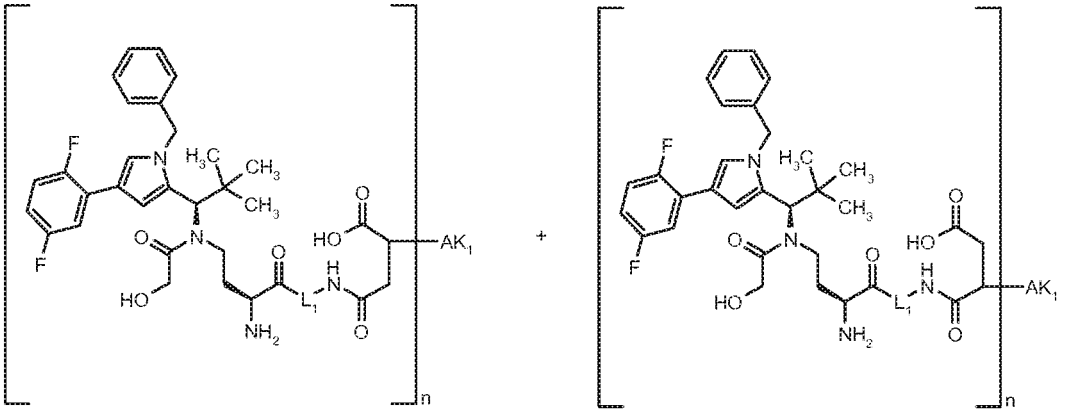






In Abhängigkeit vom Linker können Succinimid-verknüfte ADCs nach der Konjugation in die offenkettigenen Bernsteinsäureamide überführt werden, die ein vorteilhaftes Stabilitätsprofil aufweisen.





Diese Umsetzung (Ringöffnung) kann bei pH 7.5 bis 9, vorzugsweise bei pH 8, bei einer Temperatur von 25 ° C von 37 °C erfolgen, z.B. durch Rühren. Die bevorzugte Rührzeit beträgt 8 bis 30 Stunden.

In den obigen Formeln haben X_1, X_2, X_3 die gleiche Bedeutung wie in Formel (II), SG1 und L1 die gleiche Bedeutung haben wie oben beschrieben, und L2, L3 und L4 die gleiche Bedeutung wie L1; R und K die gleiche Bedeutung haben wie oben beschrieben. AK1 ist ein über einen Cysteinrest gekoppelter Antikörper, und AK2 ist ein über ein Lysinrest gekoppelter Antikörper. Besonders bevorzugt ist AK1 und AK2 ein anti-TWEAKR-Antikörper, insbesondere einer der spezifisch an die Aminosäure D in Position 47 (D47) von TWEAKR (SEQ ID NO:169) bindet, insbesondere der anti-TWEAKR-Antikörper TPP-2090.

Binder

Der Begriff „Binder" wird im breitesten Sinne als ein Molekül verstanden, welches an ein Zielmolekül, das auf einer bestimmten, mit dem Binder-Wirkstoffkonjugat zu adressierenden Zielzellen-Population vorhanden ist, bindet. Der Begriff Binder ist in seiner breitesten Auslegung zu verstehen und umfasst z.B. auch Lektine, Proteine die bestimmte Zuckerketten binden können, oder Phospholipid-bindende Proteine. Solche Binder umfassen beispielsweise hochmolekulare Proteine (Bindeproteine), Polypeptide oder Peptide (Bindepeptide), nicht-peptidische (z.B. Aptamere (US5,270,163) Übersichtsartikel von Keefe AD., et al., Nat. Rev. Drug Discov. 2010; 9:537-550), oder Vitamine) und alle anderen zellbindenden Moleküle oder Substanzen. Bindeproteine sind z.B. Antikörper und Antikörperfragmente oder Antikörpermimetika wie z.B. Affibodies, Adnectins, Anticalins, DARPins, Avimers, Nanobodies (Übersichtsartikel von Gebauer M. et al., Curr. Opinion in Chem. Biol. 2009; 13:245-255; Nuttall S.D. et al., Curr. Opinion in Pharmacology 2008; 8:608-617). Bindepeptide sind z.B. Liganden eines Liganden-Rezeptorspaares, wie z.B. VEGF des Liganden-Rezeptorpaares VEGF/KDR, wie Transferrin des Liganden-Rezeptorpaares Transferrin/Transferrin-Rezeptor oder Cytokine/Cytokin-Rezeptor, wie TNFalpha des Liganden-Rezeptorpaares TNFalpha/TNFalpha Rezeptor.

Aus der Literatur sind verschiedene Möglichkeiten der kovalenten Kopplung (Konjugation) von organischen Molekülen an Antikörper bekannt. Erfindungsgemäß bevorzugt ist die Konjugation der Toxophore an den Antikörper über ein oder mehrere Schwefelatome von Cystein-Resten des Antikörpers und/oder über ein oder mehrere NH-Gruppen von Lysin-Resten des Antikörpers. Es ist jedoch auch möglich, das Toxophor an den Antikörper über freie Carboxylgruppen oder über Zuckerreste des Antikörpers zu binden.

Ein „Zielmolekül" wird im breitesten Sinne als ein Molekül verstanden, welches in der Zielzellenpopulation vorhanden ist, und kann ein Protein (z.B. ein Rezeptor eines Wachstumsfaktors)

oder ein nicht-peptidisches Molekül sein (z.B. ein Zucker oder Phospholipid). Bevorzugt ist es ein Rezeptor oder ein Antigen.

Der Begriff „extrazelluläres" Zielmolekül beschreibt ein an die Zelle gebundenes Zielmolekül, welches sich auf der Außenseite einer Zelle befindet oder den Teil eines Zielmoleküls, welcher sich auf der Außenseite einer Zelle befindet, d.h. ein Binder kann an einer intakten Zelle an sein extrazelluläres Zielmolekül binden. Ein extrazelluläres Zielmolekül kann in der Zellmembran verankert sein oder Bestandteil der Zellmembran sein. Der Fachmann kennt Verfahren, um extrazelluläre Zielmoleküle zu identifizieren. Für Proteine kann dies über eine Bestimmung der Transmembrandomäne(n) und die Orientierung des Proteins in der Membran geschehen. Diese Angaben sind in der Regel in Proteindatenbanken (z.B. SwissProt) hinterlegt.

Der Begriff „Krebs-Zielmolekül" beschreibt ein Zielmolekül, welches auf einer oder mehreren Krebszellarten im Vergleich zu nicht-Krebszellen des gleichen Gewebetypus vermehrt vorhanden ist. Bevorzugt ist das Krebs-Zielmolekül auf einer oder mehreren Krebszellarten im Vergleich zu nicht-Krebszellen des gleichen Gewebetypus selektiv vorhanden, wobei selektiv eine mindestens zweifache Anreicherung auf Krebszellen im Vergleich zu nicht-Krebszellen des gleichen Gewebetypus beschreibt (ein „selektives Krebs-Zielmolekül"). Die Verwendung von Krebs-Zielmolekülen erlaubt die selektive Therapie von Krebszellen mit den erfindungsgemäßen Konjugaten.

Der Binder kann über eine Bindung mit dem Linker verknüpft werden. Die Verknüpfung des Binders kann mittels eines Heteroatoms des Binders erfolgen. Erfindungsgemäße Heteroatome des Binders, die zur Verknüpfung verwendet werden können, sind Schwefel (in einer Ausführungsform via einer Sulfhydrylgruppe des Binders), Sauerstoff (erfindungsgemäß mittels einer Carboxyl oder Hydroxylgruppe des Binders) und Stickstoff (in einer Ausführungsform via einer primären oder sekundären Amingruppe oder Amidgruppe des Binders). Diese Heteroatome können im natürlichen Binder vorhanden sein oder durch chemische oder molekularbiologische Methoden eingeführt werden. Erfindungsgemäß hat die Verknüpfung des Binders mit dem Toxophor nur einen geringen Einfluß auf die Bindeaktivität des Binders zum Zielmolekül. In einer bevorzugten Ausführungsform hat die Verknüpfung keinen Einfluß auf die Bindeaktivität des Binders zum Zielmolekül.

Der Begriff "Antikörper" wird gemäß der vorliegenden Erfindung in seinem breitesten Sinne verstanden und umfasst Immunglobulinmoleküle, beispielsweise intakte oder modifizierte monoklonale Antikörper, polyklonale Antikörper oder multispezifische Antikörper (z.B. bispezifische Antikörper). Ein Immunglobulinmolekül umfasst bevorzugt ein Molekül mit vier Polypeptidketten, zwei schwere Ketten (H Ketten) und zwei leichte Ketten (L Ketten), welche typischerweise durch Disulfidbrücken verknüpft sind. Jede schwere Kette umfasst eine variable Domäne der schweren Kette (abgekürzt VH) und konstante Domäne der schweren Kette. Die konstante Domäne der schweren Kette kann beispielsweise

drei Domänen CH1, CH2 und CH3 umfassen. Jede leichte Kette umfasst eine variable Domäne (abgekürzt VL) und eine konstante Domäne. Die konstante Domäne der leichten Kette umfasst eine Domäne (abgekürzt CL). Die VH und VL Domänen können weiter unterteilt werden in Regionen mit Hypervariabilität, auch Komplementaritäts-bestimmende Regionen genannt („complementarity determining region", abgekürzt CDR) und Regionen mit geringerer Sequenzvariabilität („framework region", abgekürzt FR). Jede VH und VL Region setzt sich typischerweise aus drei CDRs und bis zu vier FRs zusammen. Beispielsweise vom Aminoterminus zum Carboxyterminus in der folgenden Reihenfolge FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Ein Antikörper kann aus jeder dafür geeeigneten Spezies erhalten werden z.B. Kaninchen, Lama, Kamel, Maus, oder Ratte. In einer Ausführungsform ist der Antikörper humanen oder murinen Ursprungs. Ein Antikörper kann z.B. human, humanisiert oder chimär sein.

Der Begriff „monoklonaler" Antikörper bezeichnet Antikörper, die aus einer Population substantiell homogener Antikörper erhalten wurde, d.h. individuelle Antikörper der Population sind bis auf natürlich auftretende Mutationen, welche in geringfügiger Anzahl auftreten können, identisch. Monoklonale Antikörper erkennen mit hoher Spezifität eine einzige antigene Bindestelle. Der Begriff monoklonaler Antikörper bezieht sich nicht auf ein bestimmtes Herstellungsverfahren.

Der Begriff „intakter" Antikörper bezieht sich auf Antikörper, die sowohl eine Antigen-bindende Domäne als auch die konstante Domäne der leichten und schweren Kette umfassen. Die konstante Domäne kann eine natürlich vorkommende Domäne sein, oder eine Variante davon, bei der mehrere Aminosäurepositionen verändert wurden.

Der Begriff „modifizierter intakter" Antikörper bezieht sich auf intakte Antikörper, die mit einem weiteren Polypeptid oder Protein, welche nicht von einem Antikörper stammen, über ihren Aminoterminus oder Carboxyterminus mittels einer kovalenten Bindung (z.B. einer Peptidverknüpfung) fusioniert wurden. Des Weiteren können Antikörper dahingehend modifiziert werden, dass an definierten Stellen reaktive Cysteine eingeführt werden, um die Kopplung an ein Toxophor zu erleichtern (siehe Junutula et al. Nat Biotechnol. 2008 Aug;26(8):925-32).

Der Begriff „humaner" Antikörper bezeichnet Antikörper, die aus einem Menschen erhalten werden können oder synthetische humane Antikörper sind. Ein „synthetischer" humaner Antikörper ist ein Antikörper, der in Teilen oder schweren als ganzes von synthetischen Sequenzen in silico erhältlich ist, die auf der Analyse humaner Antikörpersequenzen basieren. Ein humaner Antikörper kann z.B. durch eine Nukleinsäure kodiert sein, die aus einer Bibliothek von Antikörpersequenzen, die humanen Ursprungs sind, isoliert wurde. Ein Beispiel solcher Antikörper ist in Söderlind et al., Nature Biotech. 2000, 18:853-856 zu finden.

Der Begriff „humanisierter" oder „chimärer" Antikörper beschreibt Antikörper, die aus einem nicht-humanen und einem humanen Sequenzanteil bestehen. Bei diesen Antikörpern wird ein Teil der

Sequenzen des humanen Immunoglobulins (Rezipient) durch Sequenzanteile eines nicht-humanen Immunoglobulins (Donor) ersetzt. Der Donor ist in vielen Fällen ein murines Immunoglobulin. Bei humanisierten Antikörpern werden Aminosäuren der CDR des Rezipienten durch Aminosäuren des Donors ersetzt. Manchmal werden auch noch Aminosäuren des Frameworks durch korrespondierende Aminosäuren des Donors ersetzt. In machen Fällen enthält der humanisierte Antikörper Aminosäuren, die weder im Rezipient noch im Donor enthalten waren und die während der Optimierung des Antikörpers eingefügt wurden. Bei chimären Antikörpern werden die variablen Domänen des Donor-Immunoglobulins mit den konstanten Regionen eines humanen Antikörpers fusioniert.

Der Begriff Komplementaritäts-bestimmende Region (CDR) wie er hier verwendet wird, bezieht sich auf diejenigen Aminosäuren einer variablen Antikörperdomäne, die für die Bindung an das Antigen notwendig sind. Jede variable Region hat typischerweise drei CDR Regionen, welche als CDR1, CDR2 und CDR3 bezeichnet werden. Jede CDR Region kann Aminosäuren nach der Definition von Kabat und/oder Aminosäuren eines Hypervariablen Loops definiert nach Chotia umfassen. Die Definition nach Kabat umfasst zum Beispiel die Region von ungefähr Aminosäureposition 24 – 34 (CDR1), 50 – 56 (CDR2) und 89 – 97 (CDR3) der variablen leichten Kette und 31 – 35 (CDR1), 50 – 65 (CDR2) und 95 – 102 (CDR3) der variablen schweren Kette (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Die Definition nach Chotia umfasst zum Beispiel die Region von ungefähr Aminosäureposition 26 – 32 (CDR1), 50 – 52 (CDR2) und 91 –96 (CDR3) der variablen leichetn Kette und 26 – 32 (CDR1), 53 – 55 (CDR2) und 96 – 101 (CDR3) der variablen schweren Kette Chothia and Lesk; J Mol Biol 196: 901-917 (1987)). In manchen Fällen kann eine CDR Aminosäuren aus einer CDR Region definiert nach Kabat und Chotia umfassen.

Abhängig von der Aminosäure-Sequenz der konstanten Domäne der schweren Kette können Antikörper in verschiedene Klassen eingeteilt werden. Es gibt fünf Hauptklassen von intakten Antikörpern: IgA, IgD, IgE, IgG und IgM, wobei mehrere davon in weitere Unterklassen aufgegliedert werden können. (Isotypen), z.B. IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 und IgA2. Die konstante Domäne der schweren Kette, die zu den unterschiedlichen Klassen korrespondieren, werden als [alpha/α], [delta/δ], [epsilon/ε], [gamma/γ] und [my/μ] bezeichnet. Sowohl die dreidimensionale Struktur als auch die Untereinheitenstruktur von Antikörpern sind bekannt.

Der Begriff „funktionales Fragment“ oder „antigen-bindendes Antikörperfragment“ eines Antikörpers/Immunoglobulins ist definiert als ein Fragment eines Antikörpers/Immunoglobulins (z.B. die variable Domänen eines IgG), welches die Antigen-Bindedomänen des Antikörpers/Immunoglobulins noch umfasst. Die „Antigen-Bindedomäne“ eines Antikörpers umfasst typischerweise eine oder mehrere Hypervariable Regionen eines Antikörpers, z.B. die CDR, CDR2 und/oder CDR3 Region. Allerdings kann auch die „Framework“ oder die „Gerüst“ Region eines Antikörpers zur Bindung des Antikörpers an das Antigen eine Rolle spielen. Die Framework Region

bildet das Gerüst für die CDRs. Vorzugsweise umfasst die Antigen-Bindedomäne mindestens die Aminosäuren 4 bis 103 der variablen leichten Kette und Aminosäure 5 bis 109 der variablen schweren Kette, bevorzugter die Aminosäure 3 bis 107 der variablen leichten Kette und 4 bis 111 der variablen schweren Kette, besonders bevorzugt sind die kompletten variablen leichten und schweren Ketten , also Aminosäure 1 – 109 der VL und 1 bis 113 der VH (Nummerierung nach WO97/08320).

„Funktionale Fragmente" oder „antigen-bindende Antikörperfragmente" der Erfindung umfassen nicht abschliessend Fab, Fab', $F(ab')_2$ und Fv Fragmente, Diabodies, Single Domain Antibodies (DAbs), linerae Antikörper, Einzelketten Antikörper (single-chain Fv, abgekürzt scFv); und multispezifische, wie z.B. bi- und tri-spezifische, Antikörper, gebildet aus Antikörperfragmenten C. A. K Borrebaeck, editor (1995) Antibody Engineering (Breakthroughs in Molecular Biology), Oxford University Press; R. Kontermann & S. Duebel, editors (2001) Antibody Engineering (Springer Laboratory Manual), Springer Verlag). Andere Antikörper als „multi-spezifische" oder „multi-funktionale" sind solche mit identischen Bindestellen. Multispezifische Antikörper können spezifisch für unterschiedliche Epitope eines Antigens sein oder spezifisch für Epitope von mehr als einem Antigen sein (siehe z.B. WO 93/17715; WO 92/08802; WO 91/00360; WO 92/05793; Tutt, et al., 1991, J. Immunol. 147:60 69; U. S. Pat. Nos. 4,474,893; 4,7 14,68 1 ; 4,925,648; 5,573,920; 5,601,8 19; oder Kostelny et al., 1992, J. Immunol. 148: 1547 1553). Ein $F(ab')_2$ oder Fab Molekül kann so konstruiert werden, dass die Zahl der intermolekularen Disulfidinteraktionen, die zwischen den Ch1 und den CL Domänen stattfindet, reduziert oder oder komplett verhindert werden kann.

„Epitope" bezeichnen Proteindeterminanten, die eine spezifische Bindung mit einem Immunglobulin oder T-Zell-Rezeptoren eingehen können. Epitopische Determinanten bestehen normalerweise aus chemisch aktiven Oberflächengruppen von Molekülen wie Aminosäuren oder Zuckerseitenketten, oder Kombinationen hiervon, und weisen normalerweise spezifische 3-dimensionale Struktureigenschaften wie auch spezifische Ladungseigenschaften auf.

„Funktionale Fragmente" oder „antigen-bindende Antikörperfragmente" können mit einem weiteren Polypeptid oder Protein, welche nicht von einem Antikörper stammen, über ihren Aminoterminus oder Carboxyterminus mittels einer kovalenten Bindung (z.B. einer Peptidverknüpfung) fusioniert werden. Des Weiteren können Antikörper und antigen-bindende Fragmente dahingehend modifiziert werden, dass an definierten Stellen reaktive Cysteine eingeführt werden, um die Kopplung an ein Toxophor zu erleichtern (siehe Junutula et al. Nat Biotechnol. 2008 Aug; 26(8):925-32).

Polyklonale Antikörper können durch für den Durchschnittsfachmann bekannte Methoden hergestellt werden. Monoklonale Antiköper können durch für den Durchschnittsfachmann bekannte Methoden hergestellt werden (Köhler und Milstein, Nature, 256, 495-497, 1975). Humane bzw. humanisierte monoklonale Antiköper können durch für den Durchschnittsfachmann bekannte Methoden hergestellt

werden (Olsson et al., Meth Enzymol. 92, 3-16 bzw. Cabilly et al US 4,816,567 oder Boss et al US 4,816,397).

Der Durchschnittsfachmann kennt vielfältige Methoden, um humane Antikörper und deren Fragmente herzustellen, wie beispielsweise mittels transgener Mäuse (N Lonberg und D Huszar, Int Rev Immunol. 1995; 13(1):65-93) oder Phage Display Technologien (Clackson et al., Nature. 1991 Aug 15;352(6336):624-8). Antikörper der Erfindung können aus rekombinanten Antikörperbibliotheken erhalten werden, die z.B. auf den Aminosäuresequenzen einer Vielzahl von Antikörpern besteht, die aus einer großen Anzahl gesunder Freiwilliger erstellt wurden. Antikörper können auch mittels bekannter rekombinanter DNS-Technologien hergestellt werden. Die Nukleinsäuresequenz eines Antikörpers kann durch Routinesequenzierung erhalten werden, oder ist aus öffentlich zugänglichen Datenbanken erhältlich.

Ein „isolierter" Antikörper oder Binder wurde von anderen Bestandteilen der Zelle gereinigt. Kontaminierende Bestandteile einer Zelle, welche mit einer diagnostischen oder therapeutischen Verwendung interferieren können, sind z.B. Enzyme, Hormone, oder andere peptidische- oder nicht-peptidische Bestandteile einer Zelle. Bevorzugt ist ein Antikörper oder Binder, der zu mehr als 95 Gew-% bezogen auf den Antikörper bzw. Binder aufgereinigt wurde (bestimmt durch z.B. Lowry Verfahren, UV-Vis Spektroskopie oder durch SDS-Kapillargelelektrophorese). Ausserdem ein Antikörper, der soweit aufgereinigt wurde, dass mindestens 15 Aminosäuren des Aminoterminus oder einer internen Aminosäuresequenz bestimmt werden können, oder zur Homogenität aufgereinigt wurde, wobei die Homogenität bestimmt wird durch SDS-PAGE unter reduzierenden oder nicht-reduzierenden Bedingungen (die Detektion kann mittels Coomassie Blau Anfärbung oder bevorzugt durch Silberfärbung bestimmt werden). Jedoch wird ein Antikörper normalerweise durch einen oder mehrere Reinigungsschritte hergestellt.

Der Begriff „spezifische Bindung" oder „bindet spezifisch" bezieht sich auf einen Antikörper oder Binder, der an ein vorbestimmtes Antigen/Zielmolekül bindet. Spezifische Bindung eines Antikörpers oder Binders beschreibt typischerweise einen Antikörper bzw. Binder mit einer Affinität von mindestens 10^{-7} M (als Kd-Wert; also vorzugsweise solche mit kleineren Kd-Werten als 10^{-7} M), wobei der Antikörper bzw. Binder eine mindestens zweifach höhere Affinität zum vorbestimmten Antigen/Zielmolekül als zu einem nicht-spezifischen Antigen/Zielmolekül hat (z.B. Rinder Serumalbumin, oder Casein), welches nicht das vorbestimmte Antigen/Zielmolekül oder ein eng verwandtes Antigen/Zielmolekül ist. Die Antikörper weisen vorzugsweise eine Affinität von mindestens 10^{-7} M (als Kd-Wert; also vorzugsweise solche mit kleineren Kd-Werten als 10^{-7} M), vorzugsweise von mindestens 10^{-8} M, besonders bevorzugt in dem Bereich von 10^{-9} M bis 10^{-11} M auf. Die Kd-Werte können durch z.B. Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie bestimmt werden.

Die erfindungsgemäßen Antikörper-Wirkstoff-Konjugate weisen ebenfalls Affinitäten in diesen Bereichen auf. Durch die Konjugation der Wirkstoffe wird die Affinität vorzugsweise nicht wesentlich beeinflusst (in der Regel wird die Affinität weniger als eine Größenordnung verringert, also z.B. maximal von 10^{-8} M auf 10^{-7} M).

Die erfindungsgemäßen verwendeten Antikörper zeichnen sich weiterhin vorzugsweise durch eine hohe Selektivität aus. Eine hohe Selektivität liegt vor, wenn der erfindungsgemäße Antikörper eine mindestens um den Faktor 2, bevorzugt Faktor 5 oder insbesondere bevorzugt Faktor 10 bessere Affinität am Zielprotein aufweisst als an einem unabhängigen anderen Antigen, z.B. humanem Serumalbumin (die Affinität kann z.B. durch Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie bestimmt werden).

Zudem sind die erfindungsgemäßen verwendeten Antikörper vorzugsweise kreuzreaktiv. Um präklinische Studien, z.B. toxikologische oder Wirksamkeitsstudien (z.B. in Xenograft-Mäusen), zu erleichtern und besser interpretieren zu können, ist es von Vorteil, wenn der erfindungsgemäß verwendete Antikörper nicht nur das humane Zielprotein bindet, sondern auch in der für die Studien verwendeten Spezies das Spezies-Zielprotein bindet. In einer Ausführungsform ist der erfindungsgemäß verwendete Antikörper zusätzlich zum humanen Zielprotein kreuzreaktiv zum Zielprotein mindestens einer weiteren Spezies. Für toxikologische und Wirksamkeitsstudien werden bevorzugt Spezien der Familien Nager, Hunde und nicht-humane Primaten, verwendet. Bevorzugte Nager Spezien sind Maus und Ratte. Bevorzugte nicht-humane Primaten sind Rhesusaffen, Schimpansen und Langschwanzmakaken.

In einer Ausführungsform ist der erfindungsgemäß verwendete Antikörper zusätzlich zum humanen Zielprotein kreuzreaktiv zum Zielprotein mindestens einer weiteren Spezies ausgewählt aus der Gruppe von Spezien bestehend aus Maus, Ratte und Langschwanzmakak (Macaca fascicularis). Insbesondere bevorzugt sind erfindungsgemäß verwendete Antikörper, die zusätzlich zum humanen Zielprotein mindestens kreuzreaktiv zum Maus-Zielprotein sind. Bevorzugt sind kreuzreaktive Antikörper, deren Affinität zum Zielprotein der weiteren nicht-humanen Spezies sich nicht um mehr als den Faktor 50, insbesondere nicht mehr als den Faktor zehn von der Affinität zum humanen Zielprotein unterscheidet.

Gegen ein Krebs-Zielmolekül gerichtete Antikörper

Bevorzugt ist das Zielmolekül, gegen das der Binder, z.B. ein Antikörper oder ein Antigen bindendes Fragment davon, gerichtet ist, ein Krebs-Zielmolekül. Der Begriff „Krebs-Zielmolekül" beschreibt ein Zielmolekül, welches auf einer oder mehreren Krebszellarten im Vergleich zu nicht-Krebszellen des gleichen Gewebetypus vermehrt vorhanden ist. Bevorzugt ist das Krebs-Zielmolekül auf einer oder mehreren Krebszellarten im Vergleich zu nicht-Krebszellen des gleichen Gewebetypus selektiv vorhanden, wobei selektiv eine mindestens zweifache Anreicherung auf Krebszellen im Vergleich zu nicht-Krebszellen des gleichen Gewebetypus beschreibt (ein „selektives Krebs-Zielmolekül"). Die

Verwendung von Krebs-Zielmolekülen erlaubt die selektive Therapie von Krebszellen mit den erfindungsgemäßen Konjugaten.

Antikörper, welche spezifisch gegen ein Antigen, wie z.B. ein Krebszell-Antigen, gerichtet sind, können vom Durchschnittsfachmann mittels ihm bekannter Verfahren hergestellt werden (wie z.B. rekombinante Expression) oder kommerziell erworben werden (wie z.B. von Merck KGaA, Deustchland). Beispiele bekannter kommerziell erhältlicher Antikörper in der Krebstherapie sind Erbitux® (Cetuximab, Merck KGaA), Avastin® (Bevacizumab, Roche) und Herceptin® (Trastuzumab, Genentech). Trastuzumab ist ein rekombinanter humanisierter monokloaler Antikörper vom IgG1kappa Typ, welcher mit hoher Affinität in einem Zell-basierten Assay (Kd = 5 nM) die extrazelluläre Domäne des humanen epidermalen Wachstumsrezeptors bindet. Der Antikörper wird rekombinant in CHO-Zellen hergestellt.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist das Zielmolekül ein selektives Krebs-Zielmolekül.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist das Zielmolekül ein Protein.

In einer Ausführungsform ist das Zielmolekül ein extrazelluläres Zielmolekül. In einer bevorzugten Ausführungsform ist das extrazelluläre Zielmolekül ein Protein.

Krebs-Zielmoleküle sind dem Fachmann bekannt. Beispiele hierfür sind im Folgenden aufgeführt.

Beispiele für Krebs-Zielmoleküle sind:

(1) EGF-Rezeptor (NCBI-Referenzsequenz NP_005219.2), SEQ ID NO: 213(1210 Aminosäuren):

>gi|29725609|ref|NP_005219.2| EGFR-Rezeptor-Vorläufer [Homo sapiens]
MRPSGTAGAALLALLAALCPASRALEEKKVCQGTSNKLTQLGTFEDHFLSLQRMFNNCEVVLG
NLEITYVQRNYDLSFLKTIQEVAGYVLIALNTVERIPLENLQIIRGNMYYENSYALAVLSNYDAN
KTGLKELPMRNLQEILHGAVRFSNNPALCNVESIQWRDIVSSDFLSNMSMDFQNHLGSCQKCD
PSCPNGSCWGAGEENCQKLTKIICAQQCSGRCRGKSPSDCCHNQCAAGCTGPRESDCLVCRKF
RDEATCKDTCPPLMLYNPTTYQMDVNPEGKYSFGATCVKKCPRNYVVTDHGSCVRACGADSY
EMEEDGVRKCKKCEGPCRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTSISGDLHILPVAFRGDSFT
HTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTKQHGQFSLAVVSLNITSL
GLRSLKEISDGDVIISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGENSCKATGQVCHALCSPE
GCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLLEGEPREFVENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPD
NCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCPTN
GPKIPSIATGMVGALLLLLVVALGIGLFMRRRHIVRKRTLRRLLQERELVEPLTPSGEAPNQALL
RILKETEFKKIKVLGSGAFGTVYKGLWIPEGEKVKIPVAIKELREATSPKANKEILDEAYVMASV
DNPHVCRLLGICLTSTVQLITQLMPFGCLLDYVREHKDNIGSQYLLNWCVQIAKGMNYLEDRR
LVHRDLAARNVLVKTPQHVKITDFGLAKLLGAEEKEYHAEGGKVPIKWMALESILHRIYTHQS
DVWSYGVTVWELMTFGSKPYDGIPASEISSILEKGERLPQPPICTIDVYMIMVKCWMIDADSRP
KFRELIIEFSKMARDPQRYLVIQGDERMHLPSPTDSNFYRALMDEEDMDDVVDADEYLIPQQGF
FSSPSTSRTPLLSSLSATSNNSTVACIDRNGLQSCPIKEDSFLQRYSSDPTGALTEDSIDDTFLPVPE
YINQSVPKRPAGSVQNPVYHNQPLNPAPSRDPHYQDPHSTAVGNPEYLNTVQPTCVNSTFDSPA
HWAQKGSHQISLDNPDYQQDFFPKEAKPNGIFKGSTAENAEYLRVAPQSSEFIGA

Die extrazelluläre Domäne ist durch Unterstreichung gekennzeichnet.

(2) Mesothelin (SwissProt-Referenz Q13421-3), SEQ ID NO: 214 (622 Aminosäuren):

>sp|Q13421-3|MSLN_HUMAN Isoform 2 of Mesothelin OS=Homo sapiens GN=MSLN
MALPTARPLLGSCGTPALGSLLFLLFSLGWVQPSRTLAGETGQEAAPLDGVLANPPNISS
LSPRQLLGFPCAEVSGLSTERVRELAVALAQKNVKLSTEQLRCLAHRLSEPPEDLDALPL
DLLLFLNPDAFSGPQACTRFFSRITKANVDLLPRGAPERQRLLPAALACWGVRGSLLSEA
DVRALGGLACDLPGRFVAESAEVLLPRLVSCPGPLDQDQQEAARAALQGGGPPYGPPSTW
SVSTMDALRGLLPVLGQPIIRSIPQGIVAAWRQRSSRDPSWRQPERTILRPRFRREVEKT
ACPSGKKAREIDESLIFYKKWELEACVDAALLATQMDRVNAIPFTYEQLDVLKHKLDELY
PQGYPESVIQHLGYLFLKMSPEDIRKWNVTSLETLKALLEVNKGHEMSPQVATLIDRFVK
GRGQLDKDTLDTLTAFYPGYLCSLSPEELSSVPPSSIWAVRPQDLDTCDPRQLDVLYPKA
RLAFQNMNGSEYFVKIQSFLGGAPTEDLKALSQQNVSMDLATFMKLRTDAVLPLTVAEVQ
KLLGPHVEGLKAEERHRPVRDWILRQRQDDLDTLGLGLQGGIPNGYLVLDLSMQEALSGT
PCLLGPGPVLTVLALLLASTLA

Wobei Mesothelin von den Aminosäuren 296-598 kodiert wird. Aminosäuren 37-286 kodieren für "megakaryocyte-potentiating factor". Mesothelin ist durch einen GPI-Anker in der Zellmembran verankert und ist extrazellulär lokalisiert.

(3) Carboanhydrase IX (SwissProt-Referenz Q16790), SEQ ID NO: 215 (459 Aminosäuren):

>sp|Q16790|CAH9_HUMAN Carbonic anhydrase 9 OS=Homo sapiens GN=CA9 PE=1 SV=2
MAPLCPSPWLPLLIPAPAPGLTVQLLLSLLLLVPVHPQRLPRMQEDSPLGGGSSGEDDPL
GEEDLPSEEDSPREEDPPGEEDLPGEEDLPGEEDLPEVKPKSEEEGSLKLEDLPTVEAPG
DPQEPQNNAHRDKEGDDQSHWRYGGDPPWPRVSPACAGRFQSPVDIRPQLAAFCPALRPL
ELLGFQLPPLPELRLRNNGHSVQLTLPPGLEMALGPGREYRALQLHLHWGAAGRPGSEHT
VEGHRFPAEIHVVHLSTAFARVDEALGRPGGLAVLAAFLEEGPEENSAYEQLLSRLEEIA
EEGSETQVPGLDISALLPSDFSRYFQYEGSLTTPPCAQGVIWTVFNQTVMLSAKQLHTLS
DTLWGPGDSRLQLNFRATQPLNGRVIEASFPAGVDSSPRAAEPVQLNSCLAAGDILALVF
GLLFAVTSVAFLVQMRRQHRRGTKGGVSYRPAEVAETGA

Die extrazelluläre Domäne ist durch Unterstreichung gekennzeichnet.

(4) C4.4a (NCBI -Referenzsequenz NP_055215.2; Synonym LYPD3), SEQ ID NO: 216 (346 Aminosäuren):

>gi|93004088|ref|NP_055215.2| ly6/PLAUR domain-containing protein 3-Vorläufer [Homo sapiens]

MDPARKAGAQAMIWTAGWLLLLLLRGGAQALECYSCVQKADDGCSPNKMKTVKCAPGVDV
CTEAVGAVETIHGQFSLAVRGCGSGLPGKNDRGLDLHGLLAFIQLQQCAQDRCNAKLNLTSRA
LDPAGNESAYPPNGVECYSCVGLSREACQGTSPPVVSCYNASDHVYKGCFDGNVTLTAANVT
VSLPVRGCVQDEFCTRDGVTGPGFTLSGSCCQGSRCNSDLRNKTYFSPRIPPLVRLPPPEPTTVA
STTSVTTSTSAPVRPTSTTKPMPAPTSQTPRQGVEHEASRDEEPRLTGGAAGHQDRSNSGQYPA
KGGPQQPHNKGCVAPTAGLAALLLAVAAGVLL

Die maturierte, extrazelluläre Domäne ist durch Unterstreichung gekennzeichnet.

(5) CD52 (NCBI-Referenzsequenz NP_001794.2), SEQ ID NO: 217

>gi|68342030|ref|NP_001794.2| CAMPATH-1 antigen-Vorläufer [Homo sapiens]
MKRFLFLLLTISLLVMVQIQTGLSGQNDTSQTSSPSASSNISGGIFLFFVANAIIHLFCFS

(6) Her2 (NCBI-Referenzsequenz NP_004439.2), SEQ ID NO: 218

>gi|54792096|ref|NP_004439.2| receptor tyrosine-protein kinase erbB-2 isoform a [Homo sapiens]
MELAALCRWGLLLALLPPGAASTQVCTGTDMKLRLPASPETHLDMLRHLYQGCQVVQGNLEL
TYLPTNASLSFLQDIQEVQGYVLIAHNQVRQVPLQRLRIVRGTQLFEDNYALAVLDNGDPLNNT
TPVTGASPGGLRELQLRSLTEILKGGVLIQRNPQLCYQDTILWKDIFHKNNQLALTLIDTNRSRA
CHPCSPMCKGSRCWGESSEDCQSLTRTVCAGGCARCKGPLPTDCCHEQCAAGCTGPKHSDCL
ACLHFNHSGICELHCPALVTYNTDTFESMPNPEGRYTFGASCVTACPYNYLSTDVGSCTLVCPL
HNQEVTAEDGTQRCEKCSKPCARVCYGLGMEHLREVRAVTSANIQEFAGCKKIFGSLAFLPESF
DGDPASNTAPLQPEQLQVFETLEEITGYLYISAWPDSLPDLSVFQNLQVIRGRILHNGAYSLTLQ
GLGISWLGLRSLRELGSGLALIHHNTHLCFVHTVPWDQLFRNPHQALLHTANRPEDECVGEGL
ACHQLCARGHCWGPGPTQCVNCSQFLRGQECVEECRVLQGLPREYVNARHCLPCHPECQPQN
GSVTCFGPEADQCVACAHYKDPPFCVARCPSGVKPDLSYMPIWKFPDEEGACQPCPINCTHSCV
DLDDKGCPAEQRASPLTSIISAVVGILLVVVLGVVFGILIKRRQQKIRKYTMRRLLQETELVEPLT
PSGAMPNQAQMRILKETELRKVKVLGSGAFGTVYKGIWIPDGENVKIPVAIKVLRENTSPKANK
EILDEAYVMAGVGSPYVSRLLGICLTSTVQLVTQLMPYGCLLDHVRENRGRLGSQDLLNWCM
QIAKGMSYLEDVRLVHRDLAARNVLVKSPNHVKITDFGLARLLDIDETEYHADGGKVPIKWM
ALESILRRRFTHQSDVWSYGVTVWELMTFGAKPYDGIPAREIPDLLEKGERLPQPPICTIDVYMI
MVKCWMIDSECRPRFRELVSEFSRMARDPQRFVVIQNEDLGPASPLDSTFYRSLLEDDDMGDL
VDAEEYLVPQQGFFCPDPAPGAGGMVHHRHRSSSTRSGGGDLTLGLEPSEEEAPRSPLAPSEGA
GSDVFDGDLGMGAAKGLQSLPTHDPSPLQRYSEDPTVPLPSETDGYVAPLTCSPQPEYVNQPD
VRPQPPSPREGPLPAARPAGATLERPKTLSPGKNGVVKDVFAFGGAVENPEYLTPQGGAAPQPH
PPPAFSPAFDNLYYWDQDPPERGAPPSTFKGTPTAENPEYLGLDVPV

(7) CD20 (NCBI-Referenzsequenz NP_068769.2), SEQ ID NO: 219

>gi|23110987|ref|NP_068769.2| B-lymphocyte antigen CD20 [Homo sapiens]
MTTPRNSVNGTFPAEPMKGPIAMQSGPKPLFRRMSSLVGPTQSFFMRESKTLGAVQIMNGLFHI
ALGGLLMIPAGIYAPICVTVWYPLWGGIMYIISGSLLAATEKNSRKCLVKGKMIMNSLSLFAAIS
GMILSIMDILNIKISHFLKMESLNFIRAHTPYINIYNCEPANPSEKNSPSTQYCYSIQSLFLGILSVM
LIFAFFQELVIAGIVENEWKRTCSRPKSNIVLLSAEEKKEQTIEIKEEVVGLTETSSQPKNEEDIEII
PIQEEEEEETETNFPEPPQDQESSPIENDSSP

(8) das Lymphozyten aktivierungs Antigen CD30 (SwissProt ID P28908), SEQ ID NO: 220

>gi|68348711|ref|NP_001234.2| tumor necrosis factor receptor superfamily member 8 isoform 1-Vorläufer [Homo sapiens]
MRVLLAALGLLFLGALRAFPQDRPFEDTCHGNPSHYYDKAVRRCCYRCPMGLFPTQQCPQRPT
DCRKQCEPDYYLDEADRCTACVTCSRDDLVEKTPCAWNSSRVCECRPGMFCSTSAVNSCARC
FFHSVCPAGMIVKFPGTAQKNTVCEPASPGVSPACASPENCKEPSSGTIPQAKPTPVSPATSSAST
MPVRGGTRLAQEAASKLTRAPDSPSSVGRPSSDPGLSPTQPCPEGSGDCRKQCEPDYYLDEAGR
CTACVSCSRDDLVEKTPCAWNSSRTCECRPGMICATSATNSRARCVPYPICAAETVTKPQDMA
EKDTTFEAPPLGTQPDCNPTPENGEAPASTSPTQSLLVDSQASKTLPIPTSAPVALSSTGKPVLDA
GPVLFWVILVLVVVVGSSAFLLCHRRACRKRIRQKLHLCYPVQTSQPKLELVDSRPRRSSTQLR
SGASVTEPVAEERGLMSQPLMETCHSVGAAYLESLPLQDASPAGGPSSPRDLPEPRVSTEHTNN
KIEKIYIMKADTVIVGTVKAELPEGRGLAGPAEPELEEELEADHTPHYPEQETEPPLGSCSDVML
SVEEEGKEDPLPTAASGK

(9) das Lymphozyten Adhesionsmolekül CD22 (SwissProt ID **P20273**), SEQ ID NO: 221

>gi|157168355|ref|NP_001762.2| B-cell receptor CD22 isoform 1-Vorläufer [Homo sapiens]
MHLLGPWLLLLVLEYLAFSDSSKWVFEHPETLYAWEGACVWIPCTYRALDGDLESFILFHNPE
YNKNTSKFDGTRLYESTKDGKVPSEQKRVQFLGDKNKNCTLSIHPVHLNDSGQLGLRMESKTE
KWMERIHLNVSERPFPPHIQLPPEIQESQEVTLTCLLNFSCYGYPIQLQWLLEGVPMRQAAVTST
SLTIKSVFTRSELKFSPQWSHHGKIVTCQLQDADGKFLSNDTVQLNVKHTPKLEIKVTPSDAIVR
EGDSVTMTCEVSSSNPEYTTVSWLKDGTSLKKQNTFTLNLREVTKDQSGKYCCQVSNDVGPGR
SEEVFLQVQYAPEPSTVQILHSPAVEGSQVEFLCMSLANPLPTNYTWYHNGKEMQGRTEEKVHI
PKILPWHAGTYSCVAENILGTGQRGPGAELDVQYPPKKVTTVIQNPMPIREGDTVTLSCNYNSS
NPSVTRYEWKPHGAWEEPSLGVLKIQNVGWDNTTIACAACNSWCSWASPVALNVQYAPRDV
RVRKIKPLSEIHSGNSVSLQCDFSSSHPKEVQFFWEKNGRLLGKESQLNFDSISPEDAGSYSCWV
NNSIGQTASKAWTLEVLYAPRRLRVSMSPGDQVMEGKSATLTCESDANPPVSHYTWFDWNNQ
SLPYHSQKLRLEPVKVQHSGAYWCQGTNSVGKGRSPLSTLTVYYSPETIGRRVAVGLGSCLAIL
ILAICGLKLQRRWKRTQSQQGLQENSSGQSFFVRNKKVRRAPLSEGPHSLGCYNPMMEDGISYT
TLRFPEMNIPRTGDAESSEMQRPPPDCDDTVTYSALHKRQVGDYENVIPDFPEDEGIHYSELIQF
GVGERPQAQENVDYVILKH

(10) das Myloidzellen Oberflächenantigen CD33 (SwissProt ID **P20138**), SEQ ID NO: 222

>gi|130979981|ref|NP_001763.3| myeloid cell surface antigen CD33 isoform 1-Vorläufer [Homo sapiens]
MPLLLLLPLLWAGALAMDPNFWLQVQESVTVQEGLCVLVPCTFFHPIPYYDKNSPVHGYWFRE
GAIISRDSPVATNKLDQEVQEETQGRFRLLGDPSRNNCSLSIVDARRRDNGSYFFRMERGSTKY
SYKSPQLSVHVTDLTHRPKILIPGTLEPGHSKNLTCSVSWACEQGTPPIFSWLSAAPTSLGPRTTH
SSVLIITPRPQDHGTNLTCQVKFAGAGVTTERTIQLNVTYVPQNPTTGIFPGDGSGKQETRAGVV
HGAIGGAGVTALLALCLCLIFFIVKTHRRKAARTAVGRNDTHPTTGSASPKHQKKSKLHGPTET
SSCSGAAPTVEMDEELHYASLNFHGMNPSKDTSTEYSEVRTQ

(11) das Transmembran Glykoprotein NMB (SwissProt ID **Q14956**), SEQ ID NO: 223

>gi|52694752|ref|NP_001005340.1| transmembrane glycoprotein NMB isoform a-Vorläufer [Homo sapiens]
MECLYYFLGFLLLAARLPLDAAKRFHDVLGNERPSAYMREHNQLNGWSSDENDWNEKLYPV
WKRGDMRWKNSWKGGRVQAVLTSDSPALVGSNITFAVNLIFPRCQKEDANGNIVYEKNCRNE
AGLSADPYVYNWTAWSEDSDGENGTGQSHHNVFPDGKPFPHHPGWRRWNFIYVFHTLGQYF
QKLGRCSVRVSVNTANVTLGPQLMEVTVYRRHGRAYVPIAQVKDVYVVTDQIPVFVTMFQKN
DRNSSDETFLKDLPIMFDVLIHDPSHFLNYSTINYKWSFGDNTGLFVSTNHTVNHTYVLNGTFSL
NLTVKAAAPGPCPPPPPPPRPSKPTPSLATTLKSYDSNTPGPAGDNPLELSRIPDENCQINRYGHF
QATITIVEGILEVNIIQMTDVLMPVPWPESSLIDFVVTCQGSIPTEVCTIISDPTCEITQNTVCSPVD
VDEMCLLTVRRTFNGSGTYCVNLTLGDDTSLALTSTLISVPDRDPASPLRMANSALISVGCLAIF
VTVISLLVYKKHKEYNPIENSPGNVVRSKGLSVFLNRAKAVFFPGNQEKDPLLKNQEFKGVS

(12) das Adhesionsmolekül CD56 (SwissProt ID P13591), SEQ ID NO: 224

>gi|94420689|ref|NP_000606.3| neural cell adhesion molecule 1 isoform 1 [Homo sapiens]
MLQTKDLIWTLFFLGTAVSLQVDIVPSQGEISVGESKFFLCQVAGDAKDKDISWFSPNGEKLTP
NQQRISVVWNDDSSSTLTIYNANIDDAGIYKCVVTGEDGSESEATVNVKIFQKLMFKNAPTPQE
FREGEDAVIVCDVVSSLPPTIIWKHKGRDVILKKDVRFIVLSNNYLQIRGIKKTDEGTYRCEGRIL
ARGEINFKDIQVIVNVPPTIQARQNIVNATANLGQSVTLVCDAEGFPEPTMSWTKDGEQIEQEED
DEKYIFSDDSSQLTIKKVDKNDEAEYICIAENKAGEQDATIHLKVFAKPKITYVENQTAMELEEQ
VTLTCEASGDPIPSITWRTSTRNISSEEKTLDGHMVVRSHARVSSLTLKSIQYTDAGEYICTASNT
IGQDSQSMYLEVQYAPKLQGPVAVYTWEGN

QVNITCEVFAYPSATISWFRDGQLLPSSNYSNIKIYNTPSASYLEVTPDSENDFGNYNCTAVNRIG
QESLEFILVQADTPSSPSIDQVEPYSSTAQVQFDEPEATGGVPILKYKAEWRAVGEEVWHSKWY
DAKEASMEGIVTIVGLKPETTYAVRLAALNGKGLGEISAASEFKTQPVQGEPSAPKLEGQMGED
GNSIKVNLIKQDDGGSPIRHYLVRYRALSSEWKPEIRLPSGSDHVMLKSLDWNAEYEVYVVAE
NQQGKSKAAHFVFRTSAQPTAIPANGSPTSGLSTGAIVGILIVIFVLLLVVVDITCYFLNKCGLFM
CIAVNLCGKAGPGAKGKDMEEGKAAFSKDESKEPIVEVRTEEERTPNHDGGKHTEPNETTPLTE
PEKGPVEAKPECQETETKPAPAEVKTVPNDATQTKENESKA

(13) das Oberflächenmolekül CD70 (SwissProt ID P32970), SEQ ID NO: 225

>gi|4507605|ref|NP_001243.1| CD70 antigen [Homo sapiens]
MPEEGSGCSVRRRPYGCVLRAALVPLVAGLVICLVVCIQRFAQAQQQLPLESLGWDVAELQLN
HTGPQQDPRLYWQGGPALGRSFLHGPELDKGQLRIHRDGIYMVHIQVTLAICSSTTASRHHPTT
LAVGICSPASRSISLLRLSFHQGCTIASQRLTPLARGDTLCTNLTGTLLPSRNTDETFFGVQWVRP

(14) das Oberflächenmolekül CD74 (SwissProt ID P04233), SEQ ID NO: 226

>gi|10835071|ref|NP_004346.1| HLA class II histocompatibility antigen gamma chain isoform b [Homo sapiens]
MHRRRSRSCREDQKPVMDDQRDLISNNEQLPMLGRRPGAPESKCSRGALYTGFSILVTLLLAG
QATTAYFLYQQQGRLDKLTVTSQNLQLENLRMKLPKPPKPVSKMRMATPLLMQALPMGALPQ
GPMQNATKYGNMTEDHVMHLLQNADPLKVYPPLKGSFPENLRHLKNTMETIDWKVFESWMH
HWLLFEMSRHSLEQKPTDAPPKESLELEDPSSGLGVTKQDLGPVPM

(15) das B-Lymphozyten Antigen CD19 (SwissProt ID P15391), SEQ ID NO: 227

>gi|296010921|ref|NP_001171569.1| B-lymphocyte antigen CD19 isoform 1-Vorläufer [Homo sapiens]
MPPPRLLFFLLFLTPMEVRPEEPLVVKVEEGDNAVLQCLKGTSDGPTQQLTWSRESPLKPFLKLS
LGLPGLGIHMRPLAIWLFIFNVSQQMGGFYLCQPGPPSEKAWQPGWTVNVEGSGELFRWNVSD
LGGLGCGLKNRSSEGPSSPSGKLMSPKLYVWAKDRPEIWEGEPPCLPPRDSLNQSLSQDLTMAP
GSTLWLSCGVPPDSVSRGPLSWTHVHPKGPKSLLSLELKDDRPARDMWVMETGLLLPRATAQ
DAGKYYCHRGNLTMSFHLEITARPVLWHWLLRTGGWKVSAVTLAYLIFCLCSLVGILHLQRAL
VLRRKRKRMTDPTRRFFKVTPPPGSGPQNQYGNVLSLPTPTSGLGRAQRWAAGLGGTAPSYGN
PSSDVQADGALGSRSPPGVGPEEEEGEGYEEPDSEEDSEFYENDSNLGQDQLSQDGSGYENPED
EPLGPEDEDSFSNAESYENEDEELTQPVARTMDFLSPHGSAWDPSREATSLAGSQSYEDMRGIL
YAAPQLRSIRGQPGPNHEEDADSYENMDNPDGPDPAWGGGGRMGTWSTR

(16) das Oberflächenprotein Mucin-1 (SwissProt ID P15941), SEQ ID NO: 228

>gi|65301117|ref|NP_002447.4| mucin-1 isoform 1-Vorläufer [Homo sapiens]
MTPGTQSPFFLLLLLTVLTVVTGSGHASSTPGGEKETSATQRSSVPSSTEKNALSTGVSFFFLSFH
ISNLQFNSSLEDPSTDYYQELQRDISEMFLQIYKQGGFLGLSNIKFRPGSVVVQLTLAFREGTINV
HDVETQFNQYKTEAASRYNLTISDVSVSDVPFPFSAQSGAGVPGWGIALLVLVCVLVALAIVYL
IALAVCQCRRKNYGQLDIFPARDTYHPMSEYPTYHTHGRYVPPSSTDRSPYEKVSAGNGGSSLS
YTNPAVAATSANL

(17) das Oberflächenprotein CD138 (SwissProt ID P18827), SEQ ID NO: 229

>gi|29568086|ref|NP_002988.3| syndecan-1-Vorläufer [Homo sapiens]

MRRAALWLWLCALALSLQPALPQIVATNLPPEDQDGSGDDSDNFSGSGAGALQDITLSQQTPS
TWKDTQLLTAIPTSPEPTGLEATAASTSTLPAGEGPKEGEAVVLPEVEPGLTAREQEATPRPRET
TQLPTTHQASTTTATTAQEPATSHPHRDMQPGHHETSTPAGPSQADLHTPHTEDGGPSATERAA
EDGASSQLPAAEGSGEQDFTFETSGENTAVVAVEPDRRNQSPVDQGATGASQGLLDRKEVLGG
VIAGGLVGLIFAVCLVGFMLYRMKKKDEGSYSLEEPKQANGGAYQKPTKQEEFYA

(18) das Integrin alphaV (Genbank Accession No.: NP_002201.1), SEQ ID NO: 230

>gi|4504763|ref|NP_002201.1| integrin alpha-V isoform 1-Vorläufer [Homo sapiens]
MAFPPRRRLRLGPRGLPLLLSGLLLPLCRAFNLDVDSPAEYSGPEGSYFGFAVDFFVPSASSRMF
LLVGAPKANTTQPGIVEGGQVLKCDWSSTRRCQPIEFDATGNRDYAKDDPLEFKSHQWFGASV
RSKQDKILACAPLYHWRTEMKQEREPVGTCFLQDGTKTVEYAPCRSQDIDADGQGFCQGGFSI
DFTKADRVLLGGPGSFYWQGQLISDQVAEIVSKYDPNVYSIKYNNQLATRTAQAIFDDSYLGYS
VAVGDFNGDGIDDFVSGVPRAARTLGMVYIYDGKNMSSLYNFTGEQMAAYFGFSVAATDING
DDYADVFIGAPLFMDRGSDGKLQEVGQVSVSLQRASGDFQTTKLNGFEVFARFGSAIAPLGDL
DQDGFNDIAIAAPYGGEDKKGIVYIFNGRSTGLNAVPSQILEGQWAARSMPPSFGYSMKGATDI
DKNGYPDLIVGAFGVDRAILYRARPVITVNAGLEVYPSILNQDNKTCSLPGTALKVSCFNVRFC
LKADGKGVLPRKLNFQVELLLDKLKQKGAIRRALFLYSRSPSHSKNMTISRGGLMQCEELIAYL
RDESEFRDKLTPITIFMEYRLDYRTAADTTGLQPILNQFTPANISRQAHILLDCGEDNVCKPKLEV
SVDSDQKKIYIGDDNPLTLIVKAQNQGEGAYEAELIVSIPLQADFIGVVRNNEALARLSCAFKTE
NQTRQVVCDLGNPMKAGTQLLAGLRFSVHQQSEMDTSVKFDLQIQSSNLFDKVSPVVSHKVD
LAVLAAVEIRGVSSPDHIFLPIPNWEHKENPETEEDVGPVVQHIYELRNNGPSSFSKAMLHLQWP
YKYNNNTLLYILHYDIDGPMNCTSDMEINPLRIKISSLQTTEKNDTVAGQGERDHLITKRDLALS
EGDIHTLGCGVAQCLKIVCQVGRLDRGKSAILYVKSLLWTETFMNKENQNHSYSLKSSASFNVI
EFPYKNLPIEDITNSTLVTTNVTWGIQPAPMPVPVWVIILAVLAGLLLLAVLVFVMYRMGFFKR
VRPPQEEQEREQLQPHENGEGNSET

(19) das teratocarcinoma-derived growth factor 1 Protein TDGF1 (Genbank Accession No.: NP_003203.1), SEQ ID NO: 231

>gi|4507425|ref|NP_003203.1| teratocarcinoma-derived growth factor 1 isoform 1-Vorläufer [Homo sapiens]
MDCRKMARFSYSVIWIMAISKVFELGLVAGLGHQEFARPSRGYLAFRDDSIWPQEEPAIRPRSS
QRVPPMGIQHSKELNRTCCLNGGTCMLGSFCACPPSFYGRNCEHDVRKENCGSVPHDTWLPKK
CSLCKCWHGQLRCFPQAFLPGCDGLVMDEHLVASRTPELPPSARTTTFMLVGICLSIQSYY

(20) das Prostata spezifische Membranantigen PSMA (Swiss Prot ID: Q04609), SEQ ID NO: 232

>gi|4758398|ref|NP_004467.1| glutamate carboxypeptidase 2 isoform 1 [Homo sapiens]
MWNLLHETDSAVATARRPRWLCAGALVLAGGFFLLGFLFGWFIKSSNEATNITPKHNMKAFLD
ELKAENIKKFLYNFTQIPHLAGTEQNFQLAKQIQSQWKEFGLDSVELAHYDVLLSYPNKTHPNY
ISIINEDGNEIFNTSLFEPPPPGYENVSDIVPPFSAFSPQGMPEGDLVYVNYARTEDFFKLERDMKI
NCSGKIVIARYGKVFRGNKVKNAQLAGAKGVILYSDPADYFAPGVKSYPDGWNLPGGGVQRG
NILNLNGAGDPLTPGYPANEYAYRRGIAEAVGLPSIPVHPIGYYDAQKLLEKMGGSAPPDSSWR
GSLKVPYNVGPGFTGNFSTQKVKMHIHSTNEVTRIYNVIGTLRGAVEPDRYVILGGHRDSWVF
GGIDPQSGAAVVHEIVRSFGTLKKEGWRPRRTILFASWDAEEFGLLGSTEWAEENSRLLQERGV
AYINADSSIEGNYTLRVDCTPLMYSLVHNLTKELKSPDEGFEGKSLYESWTKKSPSPEFSGMPRI
SKLGSGNDFEVFFQRLGIASGRARYTKNWETNKFSGYPLYHSVYETYELVEKFYDPMFKYHLT
VAQVRGGMVFELANSIVLPFDCRDYAVVLRKYADKIYSISMKHPQEMKTYSVSFDSLFSAVKN
FTEIASKFSERLQDFDKSNPIVLRMMNDQLMFLERAFIDPLGLPDRPFYRHVIYAPSSHNKYAGE
SFPGIYDALFDIESKVDPSKAWGEVKRQIYVAAFTVQAAAETLSEVA

(21) die Tyrosin-Proteinkinase EPHA2 (Swiss Prot ID: P29317), SEQ ID NO: 233

>gi|32967311|ref|NP_004422.2| ephrin type-A receptor 2-Vorläufer [Homo sapiens]
MELQAARACFALLWGCALAAAAAAQGKEVVLLDFAAAGGELGWLTHPYGKGWDLMQNIMN
DMPIYMYSVCNVMSGDQDNWLRTNWVYRGEAERIFIELKFTVRDCNSFPGGASSCKETFNLYY
AESDLDYGTNFQKRLFTKIDTIAPDEITVSSDFEARHVKLNVEERSVGPLTRKGFYLAFQDIGAC
VALLSVRVYYKKCPELLQGLAHFPETIAGSDAPSLATVAGTCVDHAVVPPGGEEPRMHCAVDG
EWLVPIGQCLCQAGYEKVEDACQACSPGFFKFEASESPCLECPEHTLPSPEGATSCECEEGFFRA
PQDPASMPCTRPPSAPHYLTAVGMGAKVELRWTPPQDSGGREDIVYSVTCEQCWPESGECGPC
EASVRYSEPPHGLTRTSVTVSDLEPHMNYTFTVEARNGVSGLVTSRSFRTASVSINQTEPPKVRL
EGRSTTSLSVSWSIPPPQQSRVWKYEVTYRKKGDSNSYNVRRTEGFSVTLDDLAPDTTYLVQV
QALTQEGQGAGSKVHEFQTLSPEGSGNLAVIGGVAVGVVLLLVLAGVGFFIHRRRKNQRARQS
PEDVYFSKSEQLKPLKTYVDPHTYEDPNQAVLKFTTEIHPSCVTRQKVIGAGEFGEVYKGMLKT
SSGKKEVPVAIKTLKAGYTEKQRVDFLGEAGIMGQFSHHNIIRLEGVISKYKPMMIITEYMENG
ALDKFLREKDGEFSVLQLVGMLRGIAAGMKYLANMNYVHRDLAARNILVNSNLVCKVSDFGL
SRVLEDDPEATYTTSGGKIPIRWTAPEAISYRKFTSASDVWSFGIVMWEVMTYGERPYWELSNH
EVMKAINDGFRLPTPMDCPSAIYQLMMQCWQQERARRPKFADIVSILDKLIRAPDSLKTLADFD
PRVSIRLPSTSGSEGVPFRTVSEWLESIKMQQYTEHFMAAGYTAIEKVVQMTNDDIKRIGVRLPG
HQKRIAYSLLGLKDQVNTVGIPI

(22) das Oberflächenprotein SLC44A4 (Genbank Accession No: NP_001171515), SEQ ID NO: 234

>gi|295849282|ref|NP_001171515.1| choline transporter-like protein 4 isoform 2 [Homo sapiens]

MGGKQRDEDDEAYGKPVKYDPSFRGPIKNRSCTDVICCVLFLLFILGYIVVGIVAWLYGDPRQV
LYPRNSTGAYCGMGENKDKPYLLYFNIFSCILSSNIISVAENGLQCPTPQTVITSLQQELCPSFLLP
SAPALGRCFPWTNVTPPALPGITNDTTIQQGISGLIDSLNARDISVKIFEDFAQSWYWILVALGVA
LVLSLLFILLLRLVAGPLVLVLILGVLGVLAYGIYYCWEEYRVLRDKGASISQLGFTTNLSAYQS
VQETWLAALIVLAVLEAILLLMLIFLRQRIRIAIALLKEASKAVGQMMSTMFYPLVTFVLLLICIA
YWAMTALYLATSGQPQYVLWASNISSPGCEKVPINTSCNPTAHLVNSSCPGLMCVFQGYSSKG
LIQRSVFNLQIYGVLGLFWTLNWVLALGQCVLAGAFASFYWAFHKPQDIPTFPLISAFIRTLRYH
TGSLAFGALILTLVQIARVILEYIDHKLRGVQNPVARCIMCCFKCCLWCLEKFIKFLNRNAYIMI
AIYGKNFCVSAKNAFMLLMRNIVRVVVLDKVTDLLLFFGKLLVVGGVGVLSFFFFSGRIPGLGK
DFKSPHLNYYWLPIMTSILGAYVIASGFFSVFGMCVDTLFLCFLEDLERNNGSLDRPYYMSKSL
LKILGKKNEAPPDNKKRKK

(23) das Oberflächenprotein BMPR1B (SwissProt: O00238)

(24) das Transportprotein SLC7A5 (SwissProt: Q01650)

(25) das epitheliale Psostataantigen STEAP1 (SwissProt: Q9UHE8)

(26) das Ovarkarzinomantigen MUC16 (SwissProt: Q8WXI7)

(27) das Transportprotein SLC34A2 (SwissProt: O95436)

(28) das Oberflächenprotein SEMA5b (SwissProt: Q9P283)

(29) das Oberflächenprotein LYPD1 (SwissProt: Q8N2G4)

(30) der Endothelin Rezeptor Typ B EDNRB (SwissProt: P24530)

(31) das Ringfingerprotein RNF43 (SwissProt: Q68DV7)

(32) das Prostatakarzinom-assozierte Protein STEAP2 (SwissProt: Q8NFT2)

(33) der Kationenkanal TRPM4 (SwissProt: Q8TD43)

(34) der Komplementrezeptor CD21 (SwissProt: P20023)

(35) das B-Zell Antigen Rezeptorkomplex-assozierte Protein CD79b (SwissProt: P40259)

(36) das Zelladhäsionsantigen CEACAM6 (SwissProt: P40199)

(37) die Dipeptidase DPEP1 (SwissProt: P16444)

(38) der Interleukinrezeptor IL20Ralpha (SwissProt: Q9UHF4)

(39) das Proteoglykan BCAN (SwissProt: Q96GW7)

(40) der Ephrin Rezeptor EPHB2 (SwissProt: P29323)

(41) das Prostatastammzellen-assozierte Protein PSCA (Genbank Accession No: NP_005663.2)

(42) das Oberflächenprotein LHFPL3 (SwissProt: Q86UP9)

(43) das Rezeptorprotein TNFRSF13C (SwissProt: Q96RJ3)

(44) das B-Zell Antigen Rezeptorkomplex-assozierte Protein CD79a (SwissProt: P11912)

(45) das Rezeptorprotein CXCR5 (SwissProt: P32302)

(46) der Ionenkanal P2X5 (SwissProt: Q93086)

(47) das Lymphozytenantigen CD180 (SwissProt: Q99467)

(48) das Rezeptorprotein FCRL1 (SwissProt: Q96LA6)

(49) das Rezeptorprotein FCRL5 (SwissProt: Q96RD9)

(50) das MHC Klasse II Molekül Ia Antigen HLA-DOB (Genbank Accession No: NP_002111.1)

(51) das T-Zell Protein VTCN1 (SwissProt: Q7Z7D3)

(52) TWEAKR (SEQ ID NO:169 (Protein); SEQ ID NO:170 (DNA).

(53) das Lymphozytenantigen CD37 (Swiss Prot: P11049)

(54) Der FGF Rezeptor 2; FGFR2 (Gene ID: 2263; Official Symbol: FGFR2). Der FGFR2 Rezeptor kommt in verschiedenen Spleißvarianten vor (alpha, beta, IIIb, IIIc). Alle Spleißevarianten können als Zielmolekül fungieren.

(55) das transmembrane Glycoprotein B7H3 (CD276; Gene ID: 80381)

(56) der B Zell Rezeptor BAFFR (CD268; Gene ID: 115650)

(57) das Rezeptorprotein ROR 1 (Gene ID: 4919)

(58) der Oberflächenrezeptor IL3RA (CD123; Gene ID: 3561)

(59) der CXC Chemokinrezeptor CXCR5 (CD185; Gene ID 643)

(60) das Rezeptorprotein Syncytin (Gene ID 30816)

In einem bevorzugten Gegenstand der Erfindung ist das Krebs-Zielmolekül ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus den Krebs-Zielmolekülen (1) – (60), insbesondere (1), (6) und (52).

In einem weiteren besonders bevorzugten Gegenstand der Erfindung bindet der Binder an ein extrazelluläres Krebs-Zielmolekül, welches ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus aus den Krebs-Zielmolekülen (1) – (60), insbesondere (1), (6) und (52).

In einem weiteren besonders bevorzugten Gegenstand der Erfindung bindet der Binder spezifisch an ein extrazelluläres Krebs-Zielmolekül, welches ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus aus den Krebs-Zielmolekülen (1) – (60), insbesondere (1), (6) und (52).In einer bevorzugten Ausführungsform wird der Binder nach Bindung an sein extrazelluläres Zielmolekül auf der Zielzelle durch die Bindung von der Zielzelle internalisiert. Dies bewirkt, dass das Binder-Wirkstoffkonjugat, welches ein Immunokonjugat oder ein ADC sein kann, von der Zielzelle aufgenommen wird. Anschliessend wird der Binder vorzugsweise intrazellulär, bevorzugt lysosomal, prozessiert.

In einer Ausführungsform ist der Binder ein Bindeprotein. In einer bevorzugten Ausführungsform ist der Binder ein Antikörper, ein antigen-bindendes Antikörperfragment, ein multispezifischer Antikörper oder ein Antikörpermimetikum.

Bevorzugte Antikörpermimetika sind Affibodies, Adnectins, Anticalins, DARPins, Avimers, oder Nanobodies. Bevorzugte multispezifischer Antikörper sind bispezifische und trispezifische Antikörper.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist der Binder ein Antikörper oder ein antigen-bindendes Antikörperfragment, weiter bevorzugt ist ein isolierter Antikörper oder ein isoliertes antigen-bindendes Antikörperfragment.

Bevorzugte antigen-bindende Antikörperfragmente sind Fab, Fab', $F(ab')_2$ und Fv Fragmente, Diabodies, DAbs, lineare Antikörper und scFv. Besonders bevorzugt sind Fab, Diabodies und scFv.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist der Binder ein Antikörper. Besonders bevorzugt sind monoklonale Antikörper oder antigen-bindende Antikörperfragmente davon. Weiter besonders bevorzugt sind humane, humanisierte oder chimäre Antikörper oder antigen-bindende Antikörperfragmente davon.

Antikörper oder antigen-bindende Antikörperfragmente, die Krebs-Zielmoleküle binden, können vom Durchschnittsfachmann mit bekannten Verfahren hergestellt werden, wie z.B. chemische Synthese oder rekombinante Expression. Binder für Krebs-Zielmoleküle können kommerziell erworben werden oder können durch den Durchschnittsfachmann mit bekannten Verfahren hergestellt werden, wie z.B. chemische Synthese oder rekombinante Expression. Weitere Verfahren zur Herstellung von Antikörpern oder antigen-bindenden Antikörperfragmenten sind in WO 2007/070538 beschrieben (siehe Seite 22 „Antibodies"). Der Fachmann kennt Verfahren wie sogenannte Phage-Display Bibliotheken (z.B. Morphosys HuCAL Gold) erstellt und zur Auffindung von Antikörpern oder antigen-bindenden Antikörperfragmenten verwendet werden können (siehe WO 2007/070538, Seite 24 ff und AK-Beispiel 1 auf Seite 70, AK-Beispiel 2 auf Seite 72). Weitere Verfahren zur Herstellung von Antikörper, die DNA Bibliotheken aus B-Zellen verwenden, sind zum Beispiel auf Seite 26 (WO 2007/070538) beschrieben. Verfahren zur Humanisierung von Antikörpern sind auf Seite 30-32 von WO2007070538 und im Detail in Queen, et al.,.Pros. Natl. Acad. Sci. USA 86:10029-10033,1989 oder in WO 90/0786 beschrieben. Des Weiteren sind dem Fachmann Verfahren zur rekombinanten Expression von Proteinen im allgemeinen und im speziellen von Antikörpern bekannt (siehe z.B. in Berger and Kimmel (Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology, Vol. 152, Academic Press, Inc.); Sambrook, et al., (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, (Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Cold Spring Harbor, N.Y.; 1989) Vol. 1-3); Current Protocols in Molecular Biology, (F. M. Ausabel et al. [Eds.], Current Protocols, Green Publishing Associates, Inc. / John Wiley & Sons, Inc.); Harlow et al., (Monoclonal Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (19881, Paul [Ed.]); Fundamental Immunology, (Lippincott Williams & Wilkins (1998)); and Harlow, et al., (Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1998)). Der Fachmann kennt die entsprechenden Vektoren, Promotoren und Signalpeptide die zur Expression eines

Proteins/Antikörpers notwendig sind. Gebräuchliche Verfahren sind auch in WO 2007/070538 auf den Seiten 41 – 45 beschrieben. Verfahren zur Herstellung eines IgG1-Antikörpers sind z.B. in WO 2007/070538 in Beispiel 6 auf Seite 74 ff beschrieben. Verfahren, mit denen die Internalisierung eines Antikörpers nach Bindung an sein Antigen bestimmt werden kann, sind dem Fachmann bekannt und sind z.B. in WO 2007/070538 auf Seite 80 beschrieben. Der Fachmann kann die in WO 2007/070538 beschriebenen Verfahren, die zur Herstellung von Carboanhydrase IX (Mn)-Antikörpern verwendet wurden, anlog zur Herstellung für Antikörper mit anderer Zielmolekülspezifität verwenden.

anti-EGFR-Antikörper

Beispiele für Antikörper, die das Krebs-Zielmoleküle EGFR binden, sind Cetuximab (INN Nummer 7906), Panitumumab (INN Nummer 8499) und Nimotuzumab (INN Nummer 8545). Cetuximab (Drug Bank Accession Number DB00002) ist ein chimärer anti-EGFR1-Antikörper, der in SP2/0 Maus-Myelom-Zellen produziert und von ImClone Systems Inc/Merck KgaA/Bristol-Myers Squibb Co vertrieben wird. Cetuximab ist indiziert zur Behandlung des metastasierenden, EGFR exprimierenden Kolorektalkarzinoms mit Wildtyp-K-Ras Gen. Er hat eine Affinität von 10^{-10}M.

Sequenz:

Cetuximab Leichte Kette (kappa), SEQ ID NO: 235:

DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSG
TDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV
CLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACE
VTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Cetuximab Schwere Kette, SEQ ID NO: 236:

QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPF
TSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDTAIYYCARALTYYDYEFAYWGQGTLVTVSAASTKGPS
VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV
PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI
SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL
NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS
LSLSPGK

Panitumumab (INN Nummer 8499) (Drug Bank Accession Number DB01269) ist ein rekombinanter monoklonaler humaner IgG2 Antikörper, der spezifisch an den humanen EGF-Rezeptor 1 bindet und von Abgenix / Amgen vertrieben wird. Panitumumab stammt aus der Immunisierung von transgenen Mäusen (XenoMouse). Diese Mäuse sind in der Lage humane Immunglobuline (leichte und schwere Ketten) zu produzieren. Es wurde ein spezieller B-Zell-Klon ausgewählt, der Antikörper gegen EGFR produziert, und dieser mit CHO-Zellen (Chinese hamster ovary cells) immortalisiert. Diese Zellen

werden jetzt für die Produktion eines zu 100 % humanen Antikörpers verwendet. Panitumumab ist indiziert zur Behandlung des EGFR-exprimierenden, metastasierenden Kolorektalkarzinoms, das refraktär gegenüber einer chemotherapeutischen Behandlung mit Fluropyrimidin, Oxaliplatin und Irinotecan ist. Er hat eine Affinität von 10^{-11} M.

Sequenz:

Panitumumab Leichte Kette (kappa), SEQ ID NO: 237:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGS
GSGTDFTFTISSLQPEDIATYFCQHFDHLPLAFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS
VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYA
CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Panitumumab Schwere Kette, SEQ ID NO: 238:

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSVSSGDYYWTWIRQSPGKGLEWIGHIYYSGNTNYNPS
LKSRLTISIDTSKTQFSLKLSSVTAADTAIYYCVRDRVTGAFDIWGQGTMVTVSSASTKGPSVFP
LAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSN
FGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT
CVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKC
KVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Bei Nimotuzumab (INN Nummer 8545) (EP 00586002, EP 00712863) handelt es sich um einen humanisierten monoklonalen IgG1 Antikörper, der spezifisch an den humanen EGF-Rezeptor 1 bindet und von YM BioScienecs Inc. (Mississauga Canada) vertrieben wird. Er wird in nicht-sekretierenden NSO-Zellen (Säugerzelllinie) produziert. Nimotuzumab ist zugelassen zur Behandlung von Kopf- und Halstumoren, hoch-malignem Astrocytoma und Glioblastoma multiforme (nicht in EU und US) und Pankreaskarzinom (Orphan drug, EMA). Er hat eine Affinität von 10^{-8} M.

Nimotuzumab Leichte Kette, SEQ ID NO: 239:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQNIVHSNGNTYLDWYQQTPGKAPKLLIYKVSNRFSGVPS
RFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCFQYSHVPWTFGQGTKLQITRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS
GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHK
VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Nimotuzumab Schwere Kette, SEQ ID NO: 240:

QVQLQQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTNYYIYWVRQAPGQGLEWIGGINPTSGGSNFNEK
FKTRVTITADESSTTAYMELSSLRSEDTAFYFCTRQGLWFDSDGRGFDFWGQGTTVTVSSASTK
GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT

LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD
IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ
KSLSLSPGK

Weitere Ausführungsformen für EGFR-Antikörper sind:

- Zalutumumab / 2F8 / HuMax-EGFR, Firma Genmab A/S (WO 02/100348, WO 2004/056847, INN-Nummer 8605)
- Necitumumab / 11F8, ImClone / IMC-11F8, Firma ImClone Systems Inc [Eli Lilly & Co] (WO 2005/090407 (EP 01735348-A1, US 2007/0264253-A1, US 7,598,350, WO 2005/090407-A1), INN- Nummer 9083)
- Matuzumab / anti-EGFR MAb, Merck KGaA / anti-EGFR MAb, Takeda / EMD 72000 / EMD-6200 / EMD-72000 und EMD-55900 / MAb 425 / monoclonal antibody 425, Firma Merck KGaA / Takeda (WO 92/15683, INN-Nummer 8103 (Matuzumab))
- RG-7160 / GA-201 / GA201 / R-7160 / R7160 / RG7160 / RO-4858696 / RO-5083945 / RO4858696 / RO5083945, Firma Glycart Biotechnology AG (Roche Holding AG) (WO 2010/112413-A1, WO 2010/115554)
- GT-MAB 5.2-GEX / CetuGEX, Firma Glycotope GmbH (WO 2008/028686-A2 (EP 01900750-A1, EP 01911766-A1, EP 02073842-A2, US 2010/0028947-A1)
- ISU-101, Firma Isu Abxis Inc (ISU Chemical Co Ltd) / Scancell (WO 2008/004834-A1)
- ABT-806 / mAb-806 / ch-806 / anti-EGFR monoclonal antibody 806, Firma Ludwig Institute for Cancer Research / Abbott / Life Science Pharmaceuticals (WO 02/092771, WO 2005/081854 und WO 2009/023265)
- SYM-004 (consists of two chimeric IgG1 antibodies (992 and 1024)), Firma Symphogen A/S (WO 2010/022736-A2)
- MR1-1 /MR1-1KDEL, Firma IVAX Corp (Teva Pharmaceutical Industries Ltd) (Duke University), (Patent: WO2001/062931-A2)
- Antikörper gegen die Deletionsmutante, EGFRvIII, Firma Amgen/Abgenix (WO 2005/010151, US 7,628,986)

- SC-100, Firma Scancell Ltd (WO 01/088138-A1)
- MDX-447 / EMD 82633 / BAB-447 / H 447 / MAb, EGFR, Medarex/Merck KgaA, Firma Bristol-Myers Squibb (US) / Merck KGaA (DE) / Takeda (JP), (WO 91/05871, WO 92/15683)
- anti-EGFR-Mab, Firma Xencor (WO 2005/056606)
- DXL-1218 / anti-EGFR monoclonal antibody (cancer), InNexus, Firma InNexus Biotechnology Inc, Pharmaprojects PH048638

In einer bevorzugten Ausführungsform werden die anti-EGFR Antikörper ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Cetuximab, Panitumumab, Nimotuzumab, Zalutumumab, Necitumumab, Matuzumab, RG-716, GT-MAB 5.2-GEX, ISU-101, ABT-806, SYM-004, MR1-1, SC-100, MDX-447, und DXL-1218.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform werden die anti-EGFR Antikörper ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Cetuximab, Panitumumab, Nimotuzumab, Zalutumumab, Necitumumab und Matuzumab.

Der Fachmann kennt Verfahren, mit denen aus den CDR Regionen der obengenannten Antikörper durch Sequenzvariationen weitere Antikörper hergestellt werden können, die eine ähnliche oder besser Affinität und/oder Spezifität zum Zielmolekül haben.

In einer weiteren Ausführungsform werden die anti-EGFR Antikörper oder antigen-bindenden Antikörperfragmente ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus

Antikörper oder antigenbindende Antikörperfragmente, die drei CDR Regionen der leichten Kette und die drei CDR Regionen der schweren Kette eines der folgenden Antikörper umfasst: Cetuximab, Panitumumab, Nimotuzumab, Zalutumumab, Necitumumab, Matuzumab, RG-716, GT-MAB 5.2-GEX, ISU-101, ABT-806, SYM-004, MR1-1, SC-100, MDX-447, und DXL-1218.

In einer weiteren Ausführungsform werden die anti-EGFR Antikörper oder antigen-bindenden Antikörperfragmente ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus

Antikörper oder antigenbindende Antikörperfragmente, die drei CDR Regionen der leichten Kette und die drei CDR Regionen der schweren Kette eines der folgenden Antikörper umfasst: Cetuximab, Panitumumab, Nimotuzumab, Zalutumumab, Necitumumab, Matuzumab. Diese Antikörper und antigenbindende Fragmente davon sind hierin durch Verweis aufgenommen und können im Rahmen dieser Erfindung verwendet werden.

anti-Carboanhydrase IX Antikörper

Beispiele für Antikörper, die das Krebs-Zielmoleküle Carboanhydrase IX binden, sind in WO 2007/070538-A2 (z.B. Anspüche 1 – 16) beschrieben.

In einer bevorzugten Ausführungsform werden die anti-Carboanhydrase IX Antikörper oder antigen-bindenden Antikörperfragmente ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus anti-Carboanhydrase IX Antikörper oder antigen-bindenden Antikörperfragmente 3ee9 (Anspruch 4 (a) in WO 2007/070538-A2), 3ef2 (Anspruch 4 (b) in WO 2007/070538-A2), 1e4 (Anspruch 4 (c) in WO 2007/070538-A2), 3a4 (Anspruch 4 (d) in WO 2007/070538-A2), 3ab4 (Anspruch 4 (e) in WO 2007/070538-A2), 3ah10 (Anspruch 4 (f) in WO 2007/070538-A2), 3bb2 (Anspruch 4 (g) in WO 2007/070538-A2), 1aa1 (Anspruch 4 (h) in WO 2007/070538-A2), 5a6 (Anspruch 4 (i) in WO 2007/070538-A2) und 5aa3 (Anspruch 4 (j) in WO 2007/070538-A2).

anti-C4.4a Antikörper:

Erfindungsgemäß können C4.4a Antikörper verwendet werden.

Beispiele für C4.4a Antikörper und antigen-bindende Fragmente sind in WO 2012/143499 A2 beschrieben. Alle Antikörper der WO 2012/143499 A2 sind hiermit in die Beschreibung der vorliegenden Erfindung durch Verweis aufgenommen und können in der vorliegenden Erfindung verwendet werden. Die Sequenzen der Antikörper sind in Tabelle 1 der WO 2012/143499 A2 angegeben, wobei jede Zeile die jeweiligen CDR Aminosäuresequenzen der variablen leichten Kette bzw. der variablen Schweren Kette des in Spalte 1 aufgeführten Antikörpers wiedergibt.

In einer Ausführungsform werden die anti-C4.4a Antikörper oder antigen-bindenden Antikörperfragmente davon nach Bindung an eine C4.4a exprimierende Zelle von der Zelle internalisiert.

In einer weiteren Ausführungsform umfassen die anti-C4.4a Antikörper oder antigen-bindenden Antikörperfragmente mindestens eine, zwei oder drei CDR Aminosäuresequenzen eines in Tabelle 1 von WO 2012/143499 A2 oder Tabelle 2 von WO 2012/143499 A2 angeführten Antikörpers. Bevorzugte Ausführungsformen solcher Antikörper sind ebenfalls in WO 2012/143499 A2 aufgeführt und hierin durch Verweis aufgenommen.

anti-HER2-Antikörper:

Ein Beispiel für einen Antikörper, der das Krebs-Zielmoleküle Her2 bindet, ist Trastuzumab (Genentech). Trastuzumab ist ein humanisierter Antikörper, der zur unter anderem Behandlung von Brustkrebs eingesetzt wird.

Weitere Beispiele für Antikörper, die an HER2 binden, sind neben Trastuzumab (INN 7637, CAS NR: RN: 180288-69-1) und Pertuzumab (Cas NR: 380610-27-5), auch Antikörper, wie offenbart in WO 2009/123894-A2, WO 200/8140603-A2, oder in WO 2011/044368-A2. Beispiel für ein anti-HER2 Konjugat ist Trastuzumab-Emtansine (INN-Nr. 9295). Diese Antikörper und antigenbindende Fragmente davon sind hierin durch Verweis aufgenommen und können im Rahmen dieser Erfindung verwendet werden.

anti-CD20-Antikörper:

Ein Beispiel für einen Antikörper, der das Krebs-Zielmoleküle CD20 bindet, ist Rituximab (Genentech). Rituximab (CAS-Nummer: 174722-31-7) ist ein chimärer Antikörper, der zur Behandlung von Non-Hodgkin-Lymphom verwendet wird. Diese Antikörper und antigenbindende Fragmente davon sind hierin durch Verweis aufgenommen und können im Rahmen dieser Erfindung verwendet werden.

anti-CD52-Antikörper:

Ein Beispiel für einen Antikörper, der das Krebs-Zielmoleküle CD52 bindet, ist Alemtuzumab (Genzyme). Alemtuzumab (CAS-Nummer: 216503-57-0) ist ein humanisierter Antikörper, der zur Behandlung von chronischer lymphatischer Leukämie eingesetzt wird. Diese Antikörper und antigenbindende Fragmente davon sind hierin durch Verweis aufgenommen und können im Rahmen dieser Erfindung verwendet werden.

anti-Mesothelin-Antikörper:

Beispiele für anti-Mesothelin -Antikörper sind z.B. WO 2009/068204 beschrieben. Alle in WO 2009/068204 beschriebenen Antikörper sind in diese Beschreibung hiermit durch Verweis aufgenommen, so dass diese Antikörper im Rahmen der hierin offenbarten Erfindung verwendet werden können.

Die erfindungsgemäßen verwendeten anti-Mesothelin-Antikörper zeichnen sich weiterhin vorzugsweise durch eine invariante Bindung an Mesothelin aus. Invariante Bindung zeichnet sich zum Beispiel dadurch aus, dass der erfindungsgemäßen verwendeten Antikörper an ein Epitop von Mesothelin bindet, welches nicht durch ein weiteres extrazelluläres Protein maskiert werden kann. Solch ein weiteres extrazelluläres Protein ist z.B. das Protein Ovarian Cancer Antigen 125 (CA125). Vorzugsweise verwendete Antikörper zeichnen sich dadurch aus, dass deren Bindung an Mesothelin nicht durch CA125 blockiert wird.

anti-CD30-Antikörper

Beispiele für Antikörper, die das Krebs-Zielmolekül CD30 binden und zur Behandlung von Krebs z.B. Hodgkin-Lymphoma verwendet werden können, sind Brentuximab, Iratumumab und Antikörper, wie in

WO 2008/092117, WO 2008/036688 oder WO 2006/089232 offenbart. Beispiele für ein anti- CD30 Konjugat ist Brentuximab Vedotin (INN-Nr. 9144). Diese Antikörper und antigenbindende Fragmente davon sind hierin durch Verweis aufgenommen und können im Rahmen dieser Erfindung verwendet werden.

anti-CD22-Antikörper

Beispiele für Antikörper, die das Krebs-Zielmolekül CD22 binden und zur Behandlung von Krebs z.B. Lymphoma verwendet werden können, sind Inotuzumab oder Epratuzumab. Beispiele für anti- CD22 Konjugate sind Inotuzumab Ozagamycin (INN-Nr. 8574), oder anti-CD22-MMAE und anti-CD22-MC-MMAE (CAS RN: 139504-50-0 bzw. 474645-27-7). Diese Antikörper und antigenbindende Fragmente davon sind hierin durch Verweis aufgenommen und können im Rahmen dieser Erfindung verwendet werden.

anti-CD33-Antikörper

Beispiele für Antikörper, die das Krebs-Zielmolekül CD33 binden und zur Behandlung von Krebs z.B. Leukämie verwendet werden können, sind Gemtuzumab oder Lintuzumab (INN 7580). Ein Beispiel für ein anti-CD33 Konjugat ist Gemtuzumab-Ozagamycin. Diese Antikörper und antigenbindende Fragmente davon sind hierin durch Verweis aufgenommen und können im Rahmen dieser Erfindung verwendet werden.

anti-NMB-Antikörper

Ein Beispiel für einen Antikörper, der das Krebs-Zielmolekül NMB bindet und zur Behandlung von Krebs z.B. Melanom oder Brustkrebs verwendet werden kann, ist Glembatumumab (INN 9199). Ein Beispiel für ein anti-NMB Konjugat ist Glembatumumab Vedotin (CAS RN: 474645-27-7). Diese Antikörper und antigenbindende Fragmente davon sind hierin durch Verweis aufgenommen und können im Rahmen dieser Erfindung verwendet werden.

Anti-CD56-Antikörper

Ein Beispiel für einen Antikörper, der das Krebs-Zielmolekül CD56 bindet und zur Behandlung von Krebs z.B. Multiples Myelom, Kleinzelliges Lungenkarzinom, MCC oder Ovarialkarzinom verwendet werden kann, ist Lorvotuzumab. Ein Beispiel für ein anti-CD56 Konjugat ist Lorvotuzumab Mertansine (CAS RN: 139504-50-0). Diese Antikörper und antigenbindende Fragmente davon sind hierin durch Verweis aufgenommen und können im Rahmen dieser Erfindung verwendet werden.

anti-CD70-Antikörper

Beispiele für Antikörper, die das Krebs-Zielmolekül CD70 binden und zur Behandlung von Krebs z.B. Non-Hodgkin-Lymphom oder Nierenzellkrebs verwendet werden können, sind in WO 2007/038637-A2

oder WO 2008/070593-A2 offenbart. Ein Beispiel für ein anti-CD70 Konjugat ist SGN-75 (CD70 MMAF). Diese Antikörper und antigenbindende Fragmente davon sind hierin durch Verweis aufgenommen und können im Rahmen dieser Erfindung verwendet werden.

anti-CD74-Antikörper

Ein Beispiel für einen Antikörper, der das Krebs-Zielmolekül CD74 bindet und zur Behandlung von Krebs z.B. Multiples Myelom verwendet werden kann, ist Milatuzumab. Ein Beispiel für ein anti-CD74 Konjugat ist Milatuzumab-Doxorubicin (CAS RN: 23214-92-8). Diese Antikörper und antigenbindende Fragmente davon sind hierin durch Verweis aufgenommen und können im Rahmen dieser Erfindung verwendet werden.

anti-CD19-Antikörper

Ein Beispiel für einen Antikörper, der das Krebs-Zielmolekül CD19 bindet und zur Behandlung von Krebs z.B. Non-Hodgkin-Lymphom verwendet werden kann, ist in WO 2008/031056-A2 offenbart. Weitere Antikörper und Beispiele für ein anti-CD19 Konjugat (SAR3419) sind in WO 2008/047242-A2 offenbart. Diese Antikörper und antigenbindende Fragmente davon sind hierin durch Verweis aufgenommen und können im Rahmen dieser Erfindung verwendet werden.

anti-Mucin-Antikörper

Beispiele für Antikörper, die das Krebs-Zielmolekül Mucin-1 binden und zur Behandlung von Krebs z.B. Non-Hodkin-Lymphom verwendet werden können, sind Clivatuzumab oder die in WO 2003/106495-A2, WO 2008/028686-A2 offenbarten Antikörper. Beispiele für anti-Mucin Konjugate sind in WO 2005/009369-A2 offenbart. Diese Antikörper und antigenbindende Fragmente davon sind hierin durch Verweis aufgenommen und können im Rahmen dieser Erfindung verwendet werden.

anti-CD138-Antikörper

Beispiele für Antikörper, die das Krebs-Zielmolekül CD138 binden und Konjugate davon, die zur Behandlung von Krebs z.B. Multiples Myelom verwendet werden können, sind WO 2009/080829-A1, WO 2009/080830-A1 offenbart. Diese Antikörper und antigenbindende Fragmente davon sind hierin durch Verweis aufgenommen und können im Rahmen dieser Erfindung verwendet werden.

anti-Integrin-alphaV-Antikörper

Beispiele für Antikörper, die das Krebs-Zielmolekül Integrin alphaV binden und zur Behandlung von Krebs z.B. Melanoma, Sarcoma oder Carcinoma verwendet werden können, sind Intetumumab (Cas RN: 725735-28-4), Abciximab (Cas-RN: 143653-53-6), Etaracizumab (Cas-RN: 892553-42-3) oder die in US 7,465,449, EP 719859-A1, WO 2002/012501-A1 oder WO2006/062779-A2 offenbarten Antikörper. Beispiele für anti-Integrin AlphaV Konjugate sind Intetumumab-DM4 und weitere in WO 2007/024536-

A2 offenbarte ADCs. Diese Antikörper und antigenbindende Fragmente davon sind hierin durch Verweis aufgenommen und können im Rahmen dieser Erfindung verwendet werden.

anti-TDGF1-Antikörper

Beispiele für Antikörper, die das Krebs-Zielmolekül TDGF1 binden und zur Behandlung von Krebs verwendet werden können, sind die in WO 02/077033-A1, US 7,318,924, WO 2003/083041-A2 und WO 2002/088170-A2 offenbarten Antikörper. Beispiele für anti-TDGF1 Konjugate sind in WO 2002/088170-A2 offenbart. Diese Antikörper und antigenbindende Fragmente davon sind hierin durch Verweis aufgenommen und können im Rahmen dieser Erfindung verwendet werden.

anti-PSMA-Antikörper

Beispiele für Antikörper, die das Krebs-Zielmolekül PSMA binden und zur Behandlung von Krebs z.B. Prostatakarzinom verwendet werden können, sind die in WO 97/35616-A1, WO 99/47554-A1, WO 01/009192-A1 und WO2003/034903 offenbarten Antikörper. Beispiele für anti-PSMA Konjugate sind in WO 2009/026274-A1 und WO 2007/002222 offenbart. Diese Antikörper und antigenbindende Fragmente davon sind hierin durch Verweis aufgenommen und können im Rahmen dieser Erfindung verwendet werden.

anti-EPHA2-Antikörper

Beispiele für Antikörper, die das Krebs-Zielmolekül EPHA2 binden, zur Herstellung eines Konjugats und zur Behandlung von Krebs verwendet werden können, sind in WO 2004/091375-A2 offenbart. Diese Antikörper und antigenbindende Fragmente davon sind hierin durch Verweis aufgenommen und können im Rahmen dieser Erfindung verwendet werden.

anti- SLC44A4-Antikörper

Beispiele für Antikörper, die das Krebs-Zielmolekül SLC44A4 binden, zur Herstellung eines Konjugats und zur Behandlung von Krebs, z.B. Pankreas- oder Prostatakarzinom verwendet werden können, sind in WO2009/033094-A2 und US2009/0175796-A1 offenbart. Diese Antikörper und antigenbindende Fragmente davon sind hierin durch Verweis aufgenommen und können im Rahmen dieser Erfindung verwendet werden.

anti-HLA-DOB-Antikörper

Ein Beispiel für einen Antikörper, der das Krebs-Zielmolekül HLA-DOB bindet, ist der Antikörper Lym-1 (Cas-RN: 301344-99-0), der zur Behandlung von Krebs, z.B. Non-Hodgkin-Lymphom verwendet werden kann. Beispiele für anti-HLA-DOB Konjugate sind z.B. in WO 2005/081711-A2 offenbart. Diese Antikörper und antigenbindende Fragmente davon sind hierin durch Verweis aufgenommen und können im Rahmen dieser Erfindung verwendet werden.

anti-VTCN1-Antikörper

Beispiele für Antikörper, die das Krebs-Zielmolekül VTCN1 binden, zur Herstellung eines Konjugats und zur Behandlung von Krebs, z.B. Ovarialkarzinom, Pankreas-, Lungen-, oder Brustkrebs verwendet werden können, sind in WO 2006/074418-A2 offenbart. Diese Antikörper und antigenbindende Fragmente davon sind hierin durch Verweis aufgenommen und können im Rahmen dieser Erfindung verwendet werden.

anti--FGFR2-Antikörper

Erfindungsgemäß können anti-FGFR2 Antikörper verwendet werden.

Beispiele für anti-FGFR2 Antikörper und antigen-bindende Fragmente sind in WO2013076186 beschrieben. Alle Antikörper der WO2013076186 sind hiermit in die Beschreibung der vorliegenden Erfindung durch Verweis aufgenommen und können in der vorliegenden Erfindung verwendet werden. Die Sequenzen der Antikörper sind in Tabelle 9 und Tabelle 10 der WO2013076186 angegeben. Bevorzugt sind Antikörper, antigen-bindende Fragmente und Varianten der Antikörper, die sich von den als M048-D01 und M047-D08 bezeichneten Antikörpern ableiten. Bevorzugte anti-FGFR2 binden an die verschiedenen von FGFR2 bekannten Spleißvarianten.

In einer Ausführungsform werden die anti- FGFR2 Antikörper oder antigen-bindenden Antikörperfragmente davon nach Bindung an eine FGFR2 exprimierende Zelle von der Zelle internalisiert.

In einer weiteren Ausführungsform umfassen die anti- FGFR2Antikörper oder antigen-bindenden Antikörperfragmente mindestens eine, zwei oder drei CDR Aminosäuresequenzen eines in Tabelle 9 oder Tabelle 10 von WO2013076186 angeführten Antikörpers. Bevorzugte Ausführungsformen solcher Antikörper sind ebenfalls in WO2013076186 aufgeführt und hierin durch Verweis aufgenommen.

Anti-TWEAKR-Antikörper

In einer bevorzugten Ausführungsform wird, wenn in den Verfahren gemäß der vorliegenden Erfindung ein anti-TWEAKR-Antikörper oder ein antigenbindendes Fragment davon verwendet wird, dieser/dieses unter den nachfolgend beschriebenen ausgewählt. Darüber hinaus sind dem Fachmann Antikörper, die an TWEAKR binden bekannt, siehe z.B. WO2009/020933(A2) oder WO2009140177 (A2).

Die Erfindung betrifft insbesondere Konjugate mit Antikörpern oder antigenbindende Antikörperfragmente davon oder Varianten davon, die zu einer starken Aktivierung des TWEAKR (SEQ ID NO:169 (Protein); SEQ ID NO:170 (DNA)) führen, was zu einer starken Induktion von Apoptose in verschiedenen Krebszellen, die eine Überexpression des TWEAKR zeigen, führt.

Die agonistische Aktivität von TWEAKR in Bezug auf die Induktion von Apoptose und Inhibition der Proliferation der früher beschriebenen anti-TWEAKR-Antikörper (z.B. PDL-192) ist beschränkt und

erreicht nicht die Wirksamkeit des endogenen Liganden TWEAK. Dieser Mangel an agonistischer Aktivität beruht nicht auf einer verminderten Affinität, da diese Antikörper an den TWEAKR mit Affinitäten binden, die verglichen mit dem endogenen Liganden TWEAK in einem ähnlichen Bereich liegen (Michaelson JS et al, MAbs. 2011 Jul-Aug;3(4):362-75; Culp PA et al, Clin Cancer Res. 2010 Jan 15;16(2):497-508), und auch Antikörper mit höherer Bindeaffinität nicht notwendigerweise eine wirksamere Signalgebungsaktivität zeigen (Culp PA, et al, Clin Cancer Res. 2010 Jan 15;16(2):497-508). Zusätzlich wurde gezeigt, dass die Anti-Tumoraktivität der früher beschriebenen Antikörper abhängig von der Fc-Effektorfunktion ist, und es wurde gezeigt, dass ADCC eine bedeutsame Rolle für die in-vivo-Wirksamkeit in Mausmodellen spielt.

Erzeugung der anti-TWEAKR-Antikörper

Eine vollständig humane Antikörper-Phagen-Bibliothek (Hoet RM et al, Nat Biotechnol 2005;23(3):344-8) wurde verwendet, um TWEAKR-spezifische, humane, monoklonale Antikörper der vorliegenden Erfindung durch Protein-Panning (Hoogenboom H.R., Nat Biotechnol 2005;23(3):1105-16) mit dimeren, Fc-fusionierten extrazellulären Domänen von humanem und Maus-TWEAKR als immobilisiertes Target zu isolieren. 11 unterschiedliche Fab-Phagen wurden identifiziert, und die entsprechenden Antikörper wurden in einen Säuger-EgG-Expressionsvektor umkloniert, der die im löslichen FAb fehlenden CH2-CH3 Domänen bereitstellt. Nach der Identifizierung bevorzugter Antikörper, wurden diese als Volllängen-IgGs exprimiert. Diese Konstrukte wurden zum Beispiel transient in Säugerzellen exprimiert, wie von Tom et al., Kapitel 12 in Methods Express: Expression Systems herausgegeben von Micheal R. Dyson and Yves Durocher, Scion Publishing Ltd, 2007 (siehe AK-Beispiel 1) beschrieben. Die Antikörper wurden durch Protein-A-Chomatographie gereinigt und weiter über ihre Bindungsaffinität an löslichen monomeren TWEAKR mittels ELISA- und BIAcore-Analyse charakterisiert, wie in AK-Beispiel 2 beschrieben. Um die Zellbindungscharakteristika der anti-TWEAKR Antikörper zu bestimmen, wurde die Bindung mittels Druchflusszytometrie an einer Reihe von Zelllinien (HT29, HS68, HS578) getestet. NFκB -Reporter-Gen-Assays wurden durchgeführt, um die agonistische Aktivität aller 11 identifizierten Antikörper zu untersuchen (humanes IgG1). Der Antikörper mit der stärksten in-vitro-Wirksamkeit (TPP-883) wurde für weitere Wirksamkeits- und Affinitätsreifung ausgewählt (siehe AK-Beispiel 1 für Details). Eine Einzelsubstitutionsvariante mit verbesserter agonistischer Aktivität wurde nachgewiesen: G102T von CDR-H3. Letztlich wurden 7 Varianten basierend auf der erhöhten Affinität, verglichen mit der besten Einzelsubstitutionsvariante G102T, ausgewählt. Die entsprechende DNA davon wurde in einen Säuger-IgG-Expressionsvektor umkloniert und auf funktionale Aktivität im zuvor erwähnten NF-kappaB-Reporter-Gen-Assay untersucht. Letztlich wurden die erhaltenen Sequenzen mit humanen Keimbahnsequenzen verglichen und Abweichungen ohne signifikanten Einfluss auf die Affinität und die Wirksamkeit wurden angepasst. Die folgenden Antikörper wurden durch Antikörper-Bibliotheksscreening und durch Affinitäts- und/oder Wirksamkeitsreifung erhalten: "TPP-2090", "TPP-2149", "TPP-2093", "TPP-2148", "TPP-

2084", "TPP-2077", "TPP-1538", "TPP-883", "TPP-1854", "TPP-1853", "TPP-1857", und "TPP-1858".

Antikörper der Erfindung können weiter durch fachbekannte Verfahren wie Antikörper-Phagen-Display-Screening (z.B. siehe Hoet RM et al, Nat Biotechnol 2005;23(3):344-8), der gut etablierten Hybridomtechnologie (z.B. siehe Köhler and Milstein Nature. 1975 Aug 7;256(5517):495-7), oder Immunisierung von Mäusen, unter anderem Immunisierung von hMAb Mäusen (z.B. VelocImmune mouse®) gewonnen werden.

Besondere Ausführungsformen von anti-TWEAKR-Antikörpern

Eine Ausführungsform der Erfindung ist die Bereitstellung von Antikörpern oder antigenbindenden Antikörperfragmenten davon oder Varianten davon, die eine starke Induktion von Caspase 3/7 in einer oder mehreren TWEAKR-exprimierenden Zelllinien zeigen. In einer bevorzugten Ausführungsform ist die eine oder mehrere TWEAKR-exprimierende Zellline in der Gruppe bestehend aus WiDr, A253, NCI-H322, HT29 und 786-O enthalten. „Induktion von Caspase 3/7" kann durch übliche fachbekannte Verfahren gemessen werden, einschließlich der hierin beschriebenen. In einer Ausführungsform wird die „Induktion von Caspase 3/7" gemäß dieser Erfindung unter Verwendung der Aktivitätsbestimmung mit Caspase 3/7-Lösung (Promega, #G8093) und Auslesen der Lumineszenz auf einem VICTOR V (Perkin Elmer) bestimmt. Am Ende der Inkubationszeit wurde die Caspase 3/7-Aktivität bestimmt und der Faktor der Induktion von Caspase 3/7 wurde im Vergleich zu unbehundelten Zellen bestimmt. Es wird gesagt, dass ein Antikörper „starke Induktion" von Caspase 3/7 aufweist, wenn der Faktor der Induktion größer als 1,2, bevorzugt größer als 1,5, noch bevorzugter größer als 1,8, noch bevorzugter größer als 2,1, noch bevorzugter größer als 2,5 ist. Es werden anti-TWEAKR-Antikörper bereitgestellt, die zu einer stärkeren Induktion von Caspase 3/7 in HT29-Zellen führen, verglichen mit früher beschriebenen agonistischen Antikörpern [z.B. PDL-192(TPP-1104), P4A8(TPP-1324), 136.1(TPP-2194)] und auch verglichen mit 300 ng/ml rekombinantem humanen TWEAK. Diese starke Wirksamkeit, Caspase 3/7 in Krebszellen zu induzieren, wurde auch in WiDr-, A253-, NIC-H322- und 786-O-Zellen beobachtet, wo die untersuchten Antikörper der Erfindung in den meisten Experimenten höhere Faktoren der Veränderung verglichen mit den Referenzantikörpern [PDL-192(TPP-1104), P4A8(TPP-1324)] und mit 300 ng/ml TWEAK induzierten. Einige Antikörper der Erfindung binden an den TWEAKR mit lediglich moderater Affinität (>10nM), die klar niedriger ist, als die Affinität des endogenen Liganden TWEAK, als auch niedriger verglichen mit anderen bekannten agonitischen Antikörpern. Diese Eigenschaft bietet weitere mögliche Vorteile wie z.B. potentiell tieferes Eindringen in den Tumor.

Diesbezüglich ist eine Ausführungsform der Erfindung die Bereitstellung von Antikörpern oder antigenbindenden Antikörperfragmenten davon, die spezifisch an einen TWEAKR an einem neuen

Epitop binden, das durch das selektive Binden an Aspartat (D) an der Position 47 (D47) von TWEAKR (SEQ ID NO:169; siehe auch Figur 1) ausgezeichnet ist. Die identifizierten Abhängigkeiten von bestimmten TWEAKR-Aminosäuren für die Antikörperinteraktion korrelieren mit der agonistischen Aktivität, die für diese Antikörper bestimmt worden ist. Der native Ligand TWEAK zeigt eine wirksame Aktivierung des TWEAKR und bindet abhängig von Leucin 46 in der cysteinreichen Domäne von TWEAKR (Pellegrini et al, FEBS 280:1818-1829). P4A8 zeigt eine sehr niedrige agonistische Aktivität und interagiert mindestens teilweise mit Domänen außerhalb der cysteinreichen Domäne von TWEAKR. PDL-192 zeigt eine moderate agonistische Aktivität und bindet abhängig von R56 an die cysteinreiche Domäne, aber gegenüber der TWEAK-Ligandenstelle. Antikörper dieser Erfindung (z.B. TPP-2090) binden abhängig von D47, und TWEAK bindet abhängig von L46. Somit bindet TWEAK an eine ähnliche aber unterscheidbare Bindestelle (Figur 7). Deshalb binden die Antikörper dieser Erfindung, die eine starke agonistische Aktivität zeigen, an ein neues Epitop (D47-abhängig) für Antikörper, das mit sehr starker agonistischer Aktivität Zusammenhang steht.

Die Aminosäure an der Position 47 (D47) von TWEAKR (SEQ ID NO:169) wird als kritisch für das Binden der erfindungsgemäßen Antikörper angesehen, was bedeutet, dass der Antikörper spezifisch an das D an der Position 47 (D47) von TWEAKR (SEQ ID NO:169) bindet, wenn der Antikörper mehr als 20%, alternativ mehr als 30%, alternativ mehr als 40%, alternativ mehr als 50%, alternativ mehr als 60%, alternativ mehr als 70%, alternativ mehr als 80%, alternativ mehr als 90%, alternativ 100% seines ELISA-Signals durch Änderung dieses Rests in Alanin, wie in AK-Beispiel 2 und Figur 6 beschrieben, verliert. Alternativ bindet ein Antikörper spezifisch an das D an der Position 47 (D47) von TWEAKR (SEQ ID NO:169), wenn der Antikörper mehr als 20%, alternativ mehr als 30%, alternativ mehr als 40%, alternativ mehr als 50%, alternativ mehr als 60%, alternativ mehr als 70%, alternativ mehr als 80%, alternativ mehr als 90%, alternativ 100% seines ELISA-Signals auf TPP-2614 verglichen mit TPP-2203 verliert. Bevorzugt bindet ein Antikörper spezifisch an das D an der Position 47 (D47) von TWEAKR (SEQ ID NO:169), wenn der Antikörper mehr als 80% seines ELISA-Signals auf TPP-2614 verglichen mit TPP-2203 verliert.

In dieser Anmeldung wird auf die folgenden bevorzugten Antikörper der Erfindung Bezug genommen, wie in der nachstehenden Tabelle gezeigt: "TPP-2090", "TPP-2149", "TPP-2093", "TPP-2148", "TPP-2084", "TPP-2077", "TPP-1538", "TPP-883", "TPP-1854", "TPP-1853", "TPP-1857", "TPP-1858".

Tabelle: Proteinsequenzen der Antikörper:

	SEQ ID NO: IgG1 Leichte Kette	SEQ ID NO: IgG1 Schwere Kette	SEQ ID NO: L-CDR1	SEQ ID NO: L-CDR2	SEQ ID NO: L-CDR3	SEQ ID NO: H-CDR1	SEQ ID NO: H-CDR2	SEQ ID NO: H-CDR3	SEQ ID NO: VL Protein	SEQ ID NO: VH Protein
Erfindungsgemäße Anti-TWEAKR-Antikörper:										
TPP-2090	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
TPP-2149	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
TPP-2093	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
TPP-2148	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
TPP-2084	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
TPP-2077	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
TPP-1538	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70
TPP-883	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
TPP-1854	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90
TPP-1853	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
TPP-1857	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110
TPP-1858	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120
Vergleichsantikörper:										
P3G5(TPP-2195)	121	122								
136.1(TPP-2194)	123	124								
P4A8(TPP-1324)	125	126								
PDL-192(TPP-1104)	127	128								
18.3.3(TPP-2193)	129	130								
P2D3(TPP-2196)	131	132								

TPP-2090 ist: ein Antikörper umfassend eine Region der schweren Kette entsprechend SEQ ID NO: 2 sowie eine Region der leichten Kette entsprechend SEQ ID NO: 1.

TPP-2149 ist: ein Antikörper umfassend eine Region der schweren Kette entsprechend SEQ ID NO: 12 sowie eine Region der leichten Kette entsprechend SEQ ID NO: 11.

TPP-2093 ist: ein Antikörper umfassend eine Region der schweren Kette entsprechend SEQ ID NO: 22 sowie eine Region der leichten Kette entsprechend SEQ ID NO: 21.

TPP-2148 ist: ein Antikörper umfassend eine Region der schweren Kette entsprechend SEQ ID NO: 32 sowie eine Region der leichten Kette entsprechend SEQ ID NO: 31.

TPP-2084 ist: ein Antikörper umfassend eine Region der schweren Kette entsprechend SEQ ID NO: 42 sowie eine Region der leichten Kette entsprechend SEQ ID NO: 41.

TPP-2077 ist: ein Antikörper umfassend eine Region der schweren Kette entsprechend SEQ ID NO: 52 sowie eine Region der leichten Kette entsprechend SEQ ID NO: 51.

TPP-1538 ist: ein Antikörper umfassend eine Region der schweren Kette entsprechend SEQ ID NO: 62 sowie eine Region der leichten Kette entsprechend SEQ ID NO: 61.

TPP-883 ist: ein Antikörper umfassend eine Region der schweren Kette entsprechend SEQ ID NO: 72 sowie eine Region der leichten Kette entsprechend SEQ ID NO: 71.

TPP-1854 ist: ein Antikörper umfassend eine Region der schweren Kette entsprechend SEQ ID NO: 82 sowie eine Region der leichten Kette entsprechend SEQ ID NO: 81.

TPP-1853 ist: ein Antikörper umfassend eine Region der schweren Kette entsprechend SEQ ID NO: 92 sowie eine Region der leichten Kette entsprechend SEQ ID NO: 91.

TPP-1857 ist: ein Antikörper umfassend eine Region der schweren Kette entsprechend SEQ ID NO: 102 sowie eine Region der leichten Kette entsprechend SEQ ID NO: 101.

TPP-1858 ist: ein Antikörper umfassend eine Region der schweren Kette entsprechend SEQ ID NO: 112 sowie eine Region der leichten Kette entsprechend SEQ ID NO: 111.

TPP-2090 ist: ein Antikörper umfassend eine variable Region der schweren Kette entsprechend SEQ ID NO: 10 sowie eine variable Region der leichten Kette entsprechend SEQ ID NO: 9.

TPP-2149 ist: ein Antikörper umfassend eine variable Region der schweren Kette entsprechend SEQ ID NO: 20 sowie eine variable Region der leichten Kette entsprechend SEQ ID NO: 19.

TPP-2093 ist: ein Antikörper umfassend eine variable Region der schweren Kette entsprechend SEQ ID NO: 30 sowie eine variable Region der leichten Kette entsprechend SEQ ID NO: 29.

TPP-2148 ist: ein Antikörper umfassend eine variable Region der schweren Kette entsprechend SEQ ID NO: 40 sowie eine variable Region der leichten Kette entsprechend SEQ ID NO: 39.

TPP-2084 ist: ein Antikörper umfassend eine variable Region der schweren Kette entsprechend SEQ ID NO: 50 sowie eine variable Region der leichten Kette entsprechend SEQ ID NO: 49.

TPP-2077 ist: ein Antikörper umfassend eine variable Region der schweren Kette entsprechend SEQ ID NO: 60 sowie eine variable Region der leichten Kette entsprechend SEQ ID NO: 59.

TPP-1538 ist: ein Antikörper umfassend eine variable Region der schweren Kette entsprechend SEQ ID NO: 70 sowie eine variable Region der leichten Kette entsprechend SEQ ID NO: 69.

TPP-883 ist: ein Antikörper umfassend eine variable Region der schweren Kette entsprechend SEQ ID NO: 80 sowie eine variable Region der leichten Kette entsprechend SEQ ID NO: 79.

TPP-1854 ist: ein Antikörper umfassend eine variable Region der schweren Kette entsprechend SEQ ID NO: 90 sowie eine variable Region der leichten Kette entsprechend SEQ ID NO: 89.

TPP-1853 ist: ein Antikörper umfassend a eine variable Region der schweren Kette entsprechend SEQ ID NO: 100 sowie a eine variable Region der leichten Kette entsprechend SEQ ID NO: 99.

TPP-1857 ist: ein Antikörper umfassend eine variable Region der schweren Kette entsprechend SEQ ID NO: 110 sowie eine variable Region der leichten Kette entsprechend SEQ ID NO: 109.

TPP-1858 ist: ein Antikörper umfassend eine variable Region der schweren Kette entsprechend SEQ ID NO: 120 sowie eine variable Region der leichten Kette entsprechend SEQ ID NO: 119.

Tabelle: DNA-Sequenzen erfindungsgemäßer Antikörper

Antikörper	SEQ ID NO: IgG1 leichte Kette	SEQ ID NO: IgG1 schwere Kette
Erfindungsgemäße Antikörper:		
TPP-2090	177	178
TPP-2149	179	180
TPP-2093	181	182
TPP-2148	183	184
TPP-2084	185	186
TPP-2077	187	188
TPP-1538	189	190
TPP-883	191	192
TPP-1854	193	194
TPP-1853	195	196
TPP-1857	197	198
TPP-1858	199	200
Vergleichsantikörper:		
P3G5(TPP-2195)	201	202

Antikörper	SEQ ID NO: IgG1 leichte Kette	SEQ ID NO: IgG1 schwere Kette
Erfindungsgemäße Antikörper:		
136.1(TPP-2194)	203	204
P4A8(TPP-1324)	205	206
PDL-192(TPP-1104)	207	208
18.3.3(TPP-2193)	209	210
P2D3(TPP-2196)	211	212

Bevorzugte Ausführungsformen des anti-TWEAKR-Antikörpers sind die folgenden:

1. Ein Anti-TWEAKR-Antikörper oder ein antigenbindendes Fragment davon, der/das spezifisch an das D an der Position 47 (D47) des TWEAKR (SEQ ID NO:169) bindet.

2. Der Antikörper oder ein antigenbindendes Fragment davon gemäß Ausführungsform 1, wobei der Antikörper ein agonistischer Antikörper ist.

3. Der Antikörper oder ein antigenbindendes Fragment davon gemäß den Ausführungsformen 1 oder 2, der/das umfasst:

eine variable schwere Kette umfassend:

(a) eine CDR1 der schweren Kette, die von einer Aminosäuresequenz umfassend die Formel PYPMX (SEQ ID NO: 171) kodiert wird, wobei X I oder M ist;

(b) eine CDR2 der schweren Kette, die von einer Aminosäuresequenz umfassend die Formel YISPSGGXTHYADSVKG (SEQ ID NO: 172) kodiert wird, wobei X S oder K ist; und

(c) eine CDR3 der schweren Kette, die von einer Aminosäuresequenz umfassend die Formel GGDTYFDYFDY (SEQ ID NO: 173) kodiert wird;

und eine variable leichte Kette umfassend:

(a) eine CDR1 der leichten Kette, die von einer Aminosäuresequenz umfassend die Formel RASQSISXYLN (SEQ ID NO: 174) kodiert wird, wobei X G oder S ist;

(b) eine CDR2 der leichten Kette, die von einer Aminosäuresequenz umfassend die Formel XASSLQS (SEQ ID NO: 175) kodiert wird, wobei X Q , A oder N ist; und

(c) eine CDR3 der leichten Kette, die von einer Aminosäuresequenz umfassend die Formel QQSYXXPXIT (SEQ ID NO: 176) kodiert wird, wobei X an der Position 5 T oder S ist, X an der Position 6 T oder S ist und X an der Position 8 G oder F ist.

4. Der Antikörper oder ein antigenbindendes Fragment davon gemäß einer der vorhergehenden Ausführungsformen umfassend:

a. eine variable schwere Kette umfassend die variable CDR1-Sequenz der schweren Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO: 6, die variable CDR2-Sequenz der schweren Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO: 7 und die variable CDR3-Sequenz der schweren Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO: 8, sowie

eine variable leichte Kette umfassend die variable CDR1-Sequenz der leichten Kette dargestellt durch SEQ ID NO: 3, die variable CDR2-Sequenz der leichten Kette dargestellt durch SEQ ID NO: 4 und die variable CDR3-Sequenz der leichten Kette dargestellt durch SEQ ID NO: 5 oder

b. eine variable schwere Kette umfassend die variable CDR1-Sequenz der schweren Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO: 16, die variable CDR2-Sequenz der schweren Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO: 17, die variable CDR3-Sequenz der schweren Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:18, sowie

eine variable leichte Kette umfassend die variable CDR1-Sequenz der leichten Kette dargestellt durch SEQ ID NO: 13, die variable CDR2-Sequenz der leichten Kette dargestellt durch SEQ ID NO: 14 und die variable CDR3-Sequenz der leichten Kette dargestellt durch SEQ ID NO:15 oder

c. eine variable schwere Kette umfassend die variable CDR1-Sequenz der schweren Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO: 26, die variable CDR2-Sequenz der schweren Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO: 27, die variable CDR3-Sequenz der schweren Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:28, sowie

eine variable leichte Kette umfassend die variable CDR1-Sequenz der leichten Kette dargestellt durch SEQ ID NO: 23, die variable CDR2-Sequenz der leichten Kette dargestellt durch SEQ ID NO: 24 und die variable CDR3-Sequenz der leichten Kette dargestellt durch SEQ ID NO:25 oder

d. eine variable schwere Kette umfassend die variable CDR1-Sequenz der schweren Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO: 36, die variable CDR2-Sequenz der schweren Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO: 37, die variable CDR3-Sequenz der schweren Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:38, sowie

eine variable leichte Kette umfassend die variable CDR1-Sequenz der leichten Kette dargestellt durch SEQ ID NO: 33, die variable CDR2-Sequenz der leichten Kette dargestellt

durch SEQ ID NO: 34 und die variable CDR3-Sequenz der leichten Kette dargestellt durch SEQ ID NO:35 oder

e. eine variable schwere Kette umfassend die variable CDR1-Sequenz der schweren Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO: 46, die variable CDR2-Sequenz der schweren Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO: 47, die variable CDR3-Sequenz der schweren Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:48, sowie

eine variable leichte Kette umfassend die variable CDR1-Sequenz der leichten Kette dargestellt durch SEQ ID NO: 43, die variable CDR2-Sequenz der leichten Kette dargestellt durch SEQ ID NO: 44 und die variable CDR3-Sequenz der leichten Kette dargestellt durch SEQ ID NO:45 oder

f. eine variable schwere Kette umfassend die variable CDR1-Sequenz der schweren Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO: 56, die variable CDR2-Sequenz der schweren Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO: 57, die variable CDR3-Sequenz der schweren Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:58, sowie

eine variable leichte Kette umfassend die variable CDR1-Sequenz der leichten Kette dargestellt durch SEQ ID NO: 53, die variable CDR2-Sequenz der leichten Kette dargestellt durch SEQ ID NO: 54 und die variable CDR3-Sequenz der leichten Kette dargestellt durch SEQ ID NO:55 oder

g. eine variable schwere Kette umfassend die variable CDR1-Sequenz der schweren Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO: 66, die variable CDR2-Sequenz der schweren Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO: 67, die variable CDR3-Sequenz der schweren Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:68, sowie

eine variable leichte Kette umfassend die variable CDR1-Sequenz der leichten Kette dargestellt durch SEQ ID NO: 63, die variable CDR2-Sequenz der leichten Kette dargestellt durch SEQ ID NO: 64 und die variable CDR3-Sequenz der leichten Kette dargestellt durch SEQ ID NO:65oder

h. eine variable schwere Kette umfassend die variable CDR1-Sequenz der schweren Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO: 76, die variable CDR2-Sequenz der schweren Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO: 77, die variable CDR3-Sequenz der schweren Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:78, sowie

eine variable leichte Kette umfassend die variable CDR1-Sequenz der leichten Kette dargestellt durch SEQ ID NO: 73, die variable CDR2-Sequenz der leichten Kette dargestellt durch SEQ ID NO: 74 und die variable CDR3-Sequenz der leichten Kette dargestellt durch SEQ ID NO:75 oder

i. eine variable schwere Kette umfassend die variable CDR1-Sequenz der schweren Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO: 86, die variable CDR2-Sequenz der schweren Kette, wie

dargestellt durch SEQ ID NO: 87, die variable CDR3-Sequenz der schweren Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:88, sowie

eine variable leichte Kette umfassend die variable CDR1-Sequenz der leichten Kette dargestellt durch SEQ ID NO: 83, die variable CDR2-Sequenz der leichten Kette dargestellt durch SEQ ID NO: 84 und die variable CDR3-Sequenz der leichten Kette dargestellt durch SEQ ID NO:85 oder

j. eine variable schwere Kette umfassend die variable CDR1-Sequenz der schweren Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO: 96, die variable CDR2-Sequenz der schweren Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO: 97, die variable CDR3-Sequenz der schweren Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:98, sowie

eine variable leichte Kette umfassend die variable CDR1-Sequenz der leichten Kette dargestellt durch SEQ ID NO: 93, die variable CDR2-Sequenz der leichten Kette dargestellt durch SEQ ID NO: 94 und die variable CDR3-Sequenz der leichten Kette dargestellt durch SEQ ID NO:95 oder

k. eine variable schwere Kette umfassend die variable CDR1-Sequenz der schweren Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO: 106, die variable CDR2-Sequenz der schweren Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO: 107, die variable CDR3-Sequenz der schweren Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:108, sowie

eine variable leichte Kette umfassend die variable CDR1-Sequenz der leichten Kette dargestellt durch SEQ ID NO: 103, die variable CDR2-Sequenz der leichten Kette dargestellt durch SEQ ID NO: 104 und die variable CDR3-Sequenz der leichten Kette dargestellt durch SEQ ID NO:105 oder

l. eine variable schwere Kette umfassend die variable CDR1-Sequenz der schweren Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO: 116, die variable CDR2-Sequenz der schweren Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO: 117, die variable CDR3-Sequenz der schweren Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:118, sowie

eine variable leichte Kette umfassend die variable CDR1-Sequenz der leichten Kette dargestellt durch SEQ ID NO: 113, die variable CDR2-Sequenz der leichten Kette dargestellt durch SEQ ID NO: 114 und die variable CDR3-Sequenz der leichten Kette dargestellt durch SEQ ID NO:115.

5. Der Antikörper oder das antigenbindende Fragment davon gemäß gemäß einer der vorhergehenden Ausführungsformen, umfassend:

a. eine variable Sequenz der schweren Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:10 , sowie eine variable Sequenz der leichten Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:9 oder

b. eine variable Sequenz der schweren Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:20 , sowie eine variable Sequenz der leichten Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:19 oder

c. eine variable Sequenz der schweren Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:30 , sowie eine variable Sequenz der leichten Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:29 oder

d. eine variable Sequenz der schweren Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:40 , sowie eine variable Sequenz der leichten Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:39 oder

e. eine variable Sequenz der schweren Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:50 , sowie eine variable Sequenz der leichten Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:49 oder

f. eine variable Sequenz der schweren Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:60 , sowie eine variable Sequenz der leichten Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:59 oder

g. eine variable Sequenz der schweren Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:70 , sowie eine variable Sequenz der leichten Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:69 oder

h. eine variable Sequenz der schweren Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:80 , sowie eine variable Sequenz der leichten Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:79 oder

i. eine variable Sequenz der schweren Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:90 , sowie eine variable Sequenz der leichten Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:89 oder

j. eine variable Sequenz der schweren Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:100 , sowie eine variable Sequenz der leichten Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:99 oder

k. eine variable Sequenz der schweren Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:110 , sowie eine variable Sequenz der leichten Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:109 oder

l. eine variable Sequenz der schweren Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:120 , sowie eine variable Sequenz der leichten Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:119.

6. Der Antikörper gemäß einer der vorhergehenden Ausführungsformen, der ein IgG Antikörper ist.

7. Der Antikörper gemäß einer der vorhergehenden Ausführungsformen, umfassend:

a. eine Sequenz der schweren Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:2 , sowie eine Sequenz der leichten Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:1 oder

b. eine Sequenz der schweren Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:12, sowie eine Sequenz der leichten Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:11 oder

c. eine Sequenz der schweren Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:22, sowie eine Sequenz der leichten Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:21 oder

d. eine Sequenz der schweren Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:32, sowie eine Sequenz der leichten Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:31 oder

e. eine Sequenz der schweren Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:42, sowie eine Sequenz der leichten Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:41 oder

f. eine Sequenz der schweren Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:52, sowie eine Sequenz der leichten Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:51 oder

g. eine Sequenz der schweren Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:62, sowie eine Sequenz der leichten Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:61 oder

h. eine Sequenz der schweren Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:72, sowie eine Sequenz der leichten Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:71 oder
i. eine Sequenz der schweren Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:82, sowie eine Sequenz der leichten Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:81 oder
j. eine Sequenz der schweren Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:92, sowie eine Sequenz der leichten Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:91 oder
k. eine Sequenz der schweren Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:102, sowie eine Sequenz der leichten Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:101 oder
l. eine Sequenz der schweren Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:112, sowie eine Sequenz der leichten Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:111.

8. Das antigenbindende Fragment gemäß einer der vorhergehenden Ausführungsformen oder ein antigenbindendes Fragment eines Antikörpers gemäß einer der vorhergehenden Ausführungsformen, das ein scFv-, Fab-, Fab'-Fragment oder ein $F(ab')_2$-Fragment ist.

9. Der Antikörper oder das antigenbindende Fragment gemäß gemäß einer der vorhergehenden Ausführungsformen, der ein monoklonaler Antikörper oder ein antigenbindendes Fragment davon ist.

10. Der Antikörper oder das antigenbindende Fragment gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, der ein humaner, humanisierter oder chimärer Antikörper oder ein antigenbindendes Fragment ist.

Besonders bevorzugt ist der anti-TWEAKR-Antikörper TPP-2090.

Isotope, Salze, Solvate, isotopische Varianten

Die vorliegende Erfindung umfasst auch alle geeigneten isotopischen Varianten der erfindungsgemäßen Verbindungen. Unter einer isotopischen Variante einer erfindungsgemäßen Verbindung wird hierbei eine Verbindung verstanden, in welcher mindestens ein Atom innerhalb der erfindungsgemäßen Verbindung gegen ein anderes Atom der gleichen Ordnungszahl, jedoch mit einer anderen Atommasse als der gewöhnlich oder überwiegend in der Natur vorkommenden Atommasse ausgetauscht ist. Beispiele für Isotope, die in eine erfindungsgemäße Verbindung inkorporiert werden können, sind solche von Wasserstoff, Kohlenstoff, Stickstoff, Sauerstoff, Phosphor, Schwefel, Fluor, Chlor, Brom und Iod, wie ^{2}H (Deuterium), ^{3}H (Tritium), ^{13}C, ^{14}C, ^{15}N, ^{17}O, ^{18}O, ^{32}P, ^{33}P, ^{33}S, ^{34}S, ^{35}S, ^{36}S, ^{18}F, ^{36}Cl, ^{82}Br, ^{123}I, ^{124}I, ^{129}I und ^{131}I. Bestimmte isotopische Varianten einer erfindungsgemäßen Verbindung, wie insbesondere solche, bei denen ein oder mehrere radioaktive Isotope inkorporiert sind, können von Nutzen sein beispielsweise für die Untersuchung des Wirkmechanismus oder der Wirkstoff-Verteilung im Körper; aufgrund der vergleichsweise leichten Herstell- und Detektierbarkeit sind hierfür insbesondere mit ^{3}H- oder ^{14}C-Isotopen markierte Verbindungen geeignet. Darüber hinaus kann der Einbau von Isotopen, wie beispielsweise von Deuterium, zu bestimmten therapeutischen Vorteilen als Folge einer größeren metabolischen Stabilität der Verbindung führen, wie beispielsweise eine Verlängerung der Halbwertszeit im Körper oder eine Reduktion der erforderlichen Wirkdosis; solche Modifikationen der erfindungsgemäßen Verbindungen können daher gegebenenfalls auch eine bevorzugte Ausführungs-

form der vorliegenden Erfindung darstellen. Isotopische Varianten der erfindungsgemäßen Verbindungen können nach den dem Fachmann bekannten Verfahren hergestellt werden, so beispielsweise nach den weiter unten beschriebenen Methoden und den bei den Ausführungsbeispielen wiedergegebenen Vorschriften, indem entsprechende isotopische Modifikationen der jeweiligen Reagenzien und/oder Ausgangsverbindungen eingesetzt werden.

Als Salze sind im Rahmen der vorliegenden Erfindung physiologisch unbedenkliche Salze der erfindungsgemäßen Verbindungen bevorzugt. Umfasst sind auch Salze, die für pharmazeutische Anwendungen selbst nicht geeignet sind, jedoch beispielsweise für die Isolierung oder Reinigung der erfindungsgemäßen Verbindungen verwendet werden können.

Physiologisch unbedenkliche Salze der erfindungsgemäßen Verbindungen umfassen Säureadditionssalze von Mineralsäuren, Carbonsäuren und Sulfonsäuren, z.B. Salze der Chlorwasserstoffsäure, Bromwasserstoffsäure, Schwefelsäure, Phosphorsäure, Methansulfonsäure, Ethansulfonsäure, Benzolsulfonsäure, Toluolsulfonsäure, Naphthalindisulfonsäure, Essigsäure, Trifluoressigsäure, Propionsäure, Milchsäure, Weinsäure, Äpfelsäure, Zitronensäure, Fumarsäure, Maleinsäure und Benzoesäure.

Physiologisch unbedenkliche Salze der erfindungsgemäßen Verbindungen umfassen auch Salze üblicher Basen, wie beispielhaft und vorzugsweise Alkalimetallsalze (z.B. Natrium- und Kaliumsalze), Erdalkalisalze (z.B. Calcium- und Magnesiumsalze) und Ammoniumsalze, abgeleitet von Ammoniak oder organischen Aminen mit 1 bis 16 C-Atomen, wie beispielhaft und vorzugsweise Ethylamin, Diethylamin, Triethylamin, Ethyldiisopropylamin, Monoethanolamin, Diethanolamin, Triethanolamin, Dicyclohexylamin, Dimethylaminoethanol, Prokain, Dibenzylamin, *N*-Methylpiperidin, *N*-Methylmorpholin, Arginin, Lysin und 1,2-Ethylendiamin.

Als Solvate werden im Rahmen der Erfindung solche Formen der erfindungsgemäßen Verbindungen bezeichnet, welche in festem oder flüssigem Zustand durch Koordination mit Lösungsmittelmolekülen einen Komplex bilden. Hydrate sind eine spezielle Form der Solvate, bei denen die Koordination mit Wasser erfolgt. Als Solvate sind im Rahmen der vorliegenden Erfindung Hydrate bevorzugt.

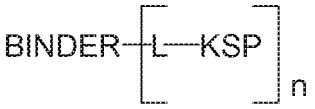
Außerdem umfasst die vorliegende Erfindung auch Prodrugs der erfindungsgemäßen Verbindungen. Der Begriff "Prodrugs" bezeichnet hierbei Verbindungen, welche selbst biologisch aktiv oder inaktiv sein können, jedoch während ihrer Verweilzeit im Körper zu erfindungsgemäßen Verbindungen umgesetzt werden (beispielsweise metabolisch oder hydrolytisch).

Besondere Ausführungsformen

Die folgenden Ausführungsformen sind besonders bevorzugt:

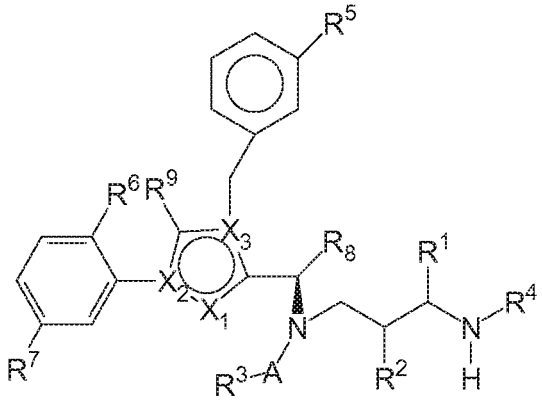
Ausführungsform A:

Ein ADC der Formel



wobei KSP-L- eine Verbindung der folgenden Formel (II), (IIa), (IIb), (IIc), (IId), (IIe) oder der folgenden Formel (IIf)ist, der Binder ein anti-TWEAKR-Antikörper (besonders bevorzugt ein anti-TWEAKR-Antikörper, der spezifisch an die Aminosäure D in Position 47 (D47) von TWEAKR (SEQ ID NO:169) bindet, insbesondere der anti-TWEAK R-Antikörper TPP-2090), und n eine Zahl von 1 bis 10 ist:

Formel (IIf):



(IIf)

wobei

X_1 N, X_2 N und X_3 C darstellt;
X_1 CH, X_2 C und X_3 N darstellt;
X_1 NH, X_2 C und X_3 C darstellt; oder
X_1 CH, X_2 N und X_3 C darstellt;

A CO (carbonyl) ist;

R^1 –L-#1, H, -COOH, $-CONHNH_2$, $-(CH_2)_{1-3}NH_2$, $-CONZ''(CH_2)_{1-3}NH_2$ und $-CONZ''CH_2COOH$ ist, wobei Z'' H oder NH_2;

R^2 und R^4 H oder –L-#1ist, oder R^2 und R^4 gemeinsam (unter Bildung eines Pyrrolidinringes) $-CH_2-CHR^{10}-$ oder $-CHR^{10}-CH_2-$ darstellen, wobei R^{10} H oder –L-#1, darstellt;

R^3 –L-#1 oder eine C1-10-Alkyl-, die ggf. mit –OH, O-Alkyl, SH, S-Alkyl, O-CO-Alkyl, O-CO-NH-Alkyl, NH-CO-Alkyl, NH-CO-NH-Alkyl, $S(O)_n$-Alkyl, SO_2-NH-Alkyl, NH-Alkyl, $N(Alkyl)_2$, oder NH_2 substituiert sein kann (wobei Alkyl vorzugsweise C_{1-3} Alkyl bedeutet) ist;

R^5 –L-#1, H oder F ist;

R^6 und R^7 unabhängig voneinander H, (ggf. fluoriertes) C_{1-3}-Alkyl, (ggf. fluoriertes) C_{2-4}-Alkenyl, (ggf. fluoriertes) C_{2-4}-Alkinyl, Hydroxy oder Halogen darstellen;

R^8 eine verzweigte C_{1-5}-Alkyl-Gruppe ist, die mit –L-#1 substituiert sein kann; und

R^9 H oder F ist,

wobei einer der Substituenten R^1, R^2, R^3, R^4, R^5, R^8 und R^{10} –L-#1 darstellt, und

–L-den Linker und #1 die Bindung zum Antikörper darstellt,

sowie Salze, Solvate und Salze der Solvate des ADCs.

Der Linker ist vorzugsweise ein Linker

§-(CO)m-L1-L2-§§

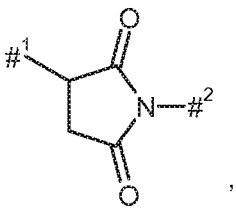
wobei

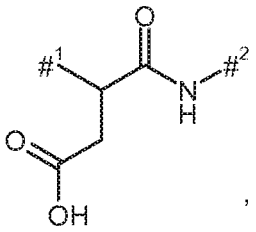
m 0 oder 1 ist;

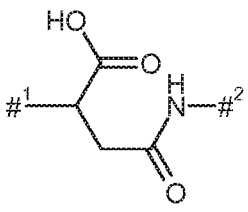
§ die Bindung an KSP darstellt und

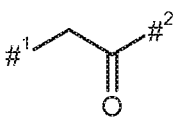
§§ die Bindung an den Antikörper darstellt, und

L2



,


,


oder


darstellt, wobei

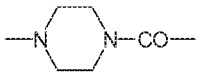
$\#^1$ die Verknüpfungsstelle mit dem Schwefelatom des Antikörpers kennzeichnet,

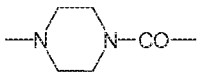
$\#^2$ die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe L^1 kennzeichnet,

und L1 durch die Formel

$$\#^1\text{–}(NR^{10})_n\text{-}(G1)_O\text{-}G2\text{-}\#^2$$

dargestellt wird,
wobei
R^{10} H, NH_2 oder C1-C3-Alkyl darstellt;

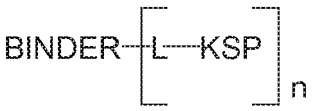
G1 –NHCO- oder  darstellt;
n 0 oder 1 ist;
o 0 oder 1 ist; und

G2 eine geradkettige oder verzweigte Kohlenwasserstoffkette mit 1 bis 100 Kohlenstoffatomen aus Arylengruppen und/oder geradkettigen und/oder verzweigten und/oder cyclischen Alkylengruppen ist, die einfach oder mehrfach durch eine oder mehrere der Gruppen -O-, -S-, -SO-, SO2, -NH-, -CO-, -NHCO-, -CONH-, -NMe-, -NHNH-, -SO2NHNH-, -CONHNH- und einen 3 bis 10gliedriger, aromatischen oder nicht aromatischen Heterozyklus mit bis zu 4 Heteroatomen ausgewählt aus N, O und S, oder -SO- unterbrochen sein kann (vorzugsweise ), wobei die Seitenketten, sofern vorhanden, mit –NHCONH_2, -COOH, -OH, -NH_2, NH-CNNH_2, Sulfonamid, Sulfon, Sulfoxid, oder Sulfonsäure substituiert sein können.

Hierbei ist $\#^1$ die Bindung zum KSP-Inhibitor und $\#^2$ die Bindung zur Kopplungsgruppe zum Binder (z.B. L2).

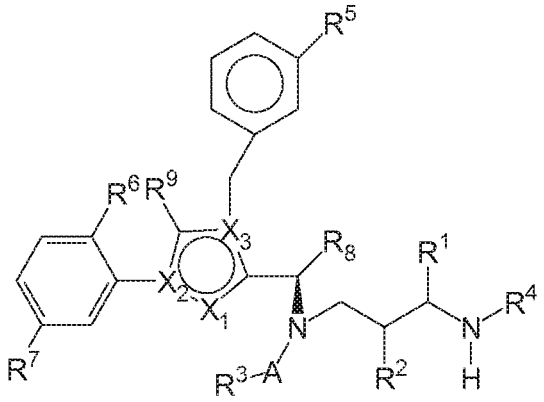
<u>Ausführungsform B:</u>

Ein ADC der Formel



wobei KSP-L- eine Verbindung der folgenden Formel (II), (IIa), (IIb), (IIc), (IId), (IIe), (IIf) oder der folgenden Formel (IIg)ist, der Binder ein Antikörper ist, und n eine Zahl von 1 bis 10 ist:

Formel (IIg):



(IIg)

wobei

X_1 N, X_2 N und X_3 C darstellt;

X_1 CH, X_2 C und X_3 N darstellt;

X_1 NH, X_2 C und X_3 C darstellt; oder

X_1 CH, X_2 N und X_3 C darstellt;

A CO (carbonyl) ist;

R^1 –L-#1, H, -COOH, $-CONHNH_2$, $-(CH_2)_{1-3}NH_2$, $-CONZ''(CH_2)_{1-3}NH_2$ und $-CONZ''CH_2COOH$ ist, wobei Z'' H oder NH_2;

R^2 und R^4 H oder –L-#1 ist, oder R^2 und R^4 gemeinsam (unter Bildung eines Pyrrolidinringes) $-CH_2-CHR^{10}-$ oder $-CHR^{10}-CH_2-$ darstellen, wobei R^{10} H oder –L-#1, darstellt;

R^3 –L-#1 oder eine C_{1-10}-Alkyl-, die ggf. mit –OH, O-Alkyl, SH, S-Alkyl, O-CO-Alkyl, O-CO-NH-Alkyl, NH-CO-Alkyl, NH-CO-NH-Alkyl, $S(O)_n$-Alkyl, SO_2-NH-Alkyl, NH-Alkyl, $N(Alkyl)_2$, oder NH_2 substituiert sein kann (wobei Alkyl vorzugsweise C_{1-3} Alkyl bedeutet) ist;

R^5 –L-#1, H oder F ist;

R^6 und R^7 unabhängig voneinander H, (ggf. fluoriertes) C_{1-3}-Alkyl, (ggf. fluoriertes) C_{2-4}-Alkenyl, (ggf. fluoriertes) C_{2-4}-Alkinyl, Hydroxy oder Halogen darstellen;

R^8 eine verzweigte C_{1-5}-Alkyl-Gruppe ist; und

R^9 H oder F ist,

wobei einer der Substituenten R^1, R^2, R^3, R^4, R^5 und R^{10} –L-#1 darstellt, und

–L-den Linker und #1 die Bindung zum Antikörper darstellt,

wobei –L- dargestellt wird durch

§-(CO)m-L1-L2-§§

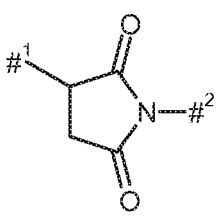
wobei

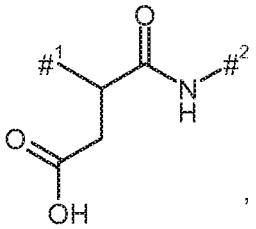
m 0 oder 1 ist;

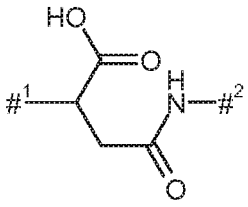
§ die Bindung an KSP darstellt und

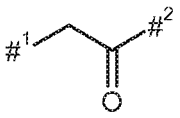
§§ die Bindung an den Antikörper darstellt, und

L2



,


,


oder 

darstellt, wobei

#1 die Verknüpfungsstelle mit dem Schwefelatom des Antikörpers kennzeichnet,

#2 die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe L^1 kennzeichnet,

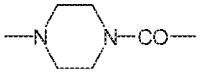
und L1 durch die Formel

$$\#^1\text{–}(NR^{10})_n\text{-}(G1)_o\text{-}G2\text{-}\#^2$$

dargestellt wird,

wobei

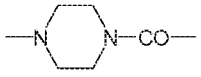
R^{10} H, NH_2 oder C1-C3-Alkyl darstellt;

G1 –NHCO- oder 

darstellt;

n 0 oder 1 ist;

o 0 oder 1 ist; und

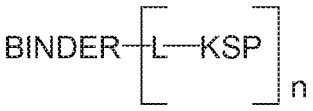
G2 eine geradkettige oder verzweigte Kohlenwasserstoffkette mit 1 bis 100 Kohlenstoffatomen aus Arylengruppen und/oder geradkettigen und/oder verzweigten und/oder cyclischen Alkylengruppen ist, die einfach oder mehrfach durch eine oder mehrere der Gruppen -O-, -S-, -SO-, SO2, -NH-, -CO-, -NHCO-, -CONH-, -NMe-, -NHNH-, -SO2NHNH-, -CONHNH- und einen 3 bis 10gliedriger, aromatischen oder nicht aromatischen Heterozyklus mit bis zu 4 Heteroatomen ausgewählt aus N, O und S, oder -SO- unterbrochen sein kann (vorzugsweise ), wobei die Seitenketten, sofern vorhanden, mit –NHCONH$_2$, -COOH, -OH, -NH$_2$, NH-CNNH$_2$, Sulfonamid, Sulfon, Sulfoxid, oder Sulfonsäure substituiert sein können,

#^{1} die Bindung zum KSP-Inhibitor und #^{2} die Bindung zur Kopplungsgruppe zum Antikörper ist (z.B. L2),

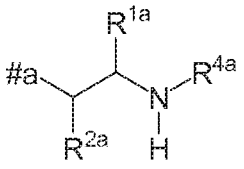
sowie Salze, Solvate und Salze der Solvate des ADCs.

Ausführungsform C:

Ein ADC der Formel



wobei KSP-L- eine Verbindung mit der folgenden Substruktur I(sub) ist, der Binder ein anti-TWEAKR-Antikörper (besonders bevorzugt ein anti-TWEAKR-Antikörper, der spezifisch an die Aminosäure D in Position 47 (D47) von TWEAKR (SEQ ID NO:169) bindet, insbesondere der anti-TWEAK R-Antikörper TPP-2090), anti-HER2-Antikörper oder anti-EGRF-Antikörper (bevorzugt Nimotuzumab) ist, und n eine Zahl von 1 bis 10 ist:



wobei

#a eine Bindung zum Restmolekül darstellt;

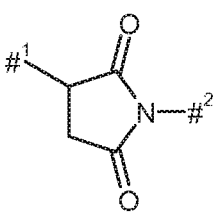
R^{1a} -L-#1, H oder -(CH$_2$)$_{0-3}$Z darstellt, wobei Z -H, Halogen, -NHY^3, -CO-NY^{1}Y^2, oder -CO-OY^3 darstellt,

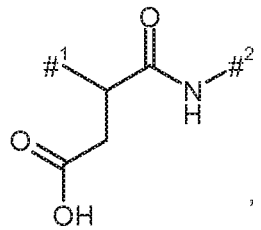
mit Y^1 und Y^2 unabhängig voneinander H, NH2, oder -$(CH_2CH_2O)_{0-3}$-$(CH_2)_{0-3}Z'$ darstellen, und Y^3 H oder -$(CH_2)_{0-3}Z'$ darstellt, wobei Z' H, SO_3H, NH_2, COOH oder -$(CO\text{-}NH\text{-}CHY^4)_{1-3}$COOH darstellt; wobei Y^4 unabhängig voneinander lineares oder verzweigtes, gegebenenfalls mit–$NHCONH_2$ substituiertes, C_{1-6} Alkyl oder gegebenenfalls mit –NH_2 substituiertes Aryl oder Benzyl darstellt;

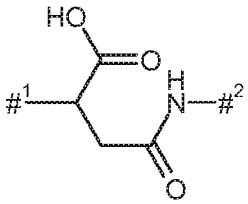
R^{2a} und R^{4a} unabhängig voneinander H, -L-#1, -CO-CHY^4-NHY^5 oder -$(CH_2)_{0-3}Z$ darstellen, oder R^{2a} und R^{4a} gemeinsam (unter Bildung eines Pyrrolidinringes) –CH_2-CHR^{10}- oder -CHR^{10}-CH_2- darstellen, wobei R^{10} -L-#1, H, NH_2, COOH, SO_3H, SH, oder OH darstellt, und wobei Z - H, -CO-NY^1Y^2, oder -CO-OY^3 darstellt,
wobei Y^1 und Y^2 unabhängig voneinander H, NH_2, oder -$(CH_2)_{0-3}Z'$ darstellen, und Y^3 H oder -$(CH_2)_{0-3}Z'$ darstellt, wobei Z' H, SO_3H, NH_2 oder COOH darstellt,
wobei Y^4 unabhängig voneinander lineares oder verzweigtes, gegebenenfalls mit–$NHCONH_2$ substituiertes, C_{1-6} Alkyl oder gegebenenfalls mit –NH_2 substituiertes Aryl oder Benzyl darstellt und Y^5 H oder –CO-CHY^6-NH_2 darstellt, wobei Y^6 lineares oder verzweigtes C_{1-6} Alkyl darstellt;
wobei einer der Substituenten R^{1a}, R^{2a}, R^{4a} oder R^{10} –L-#1 darstellt,
–L-den Linker und #1 die Bindung zum Antikörper darstellt,
wobei –L- dargestellt wird durch

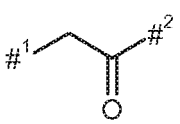
§-(CO)m-L1-L2-§§

wobei
m 0 oder 1 ist;
§ die Bindung an KSP darstellt und
§§ die Bindung an den Antikörper darstellt, und
L2



,


,


oder


darstellt, wobei

#1 die Verknüpfungsstelle mit dem Schwefelatom des Antikörpers kennzeichnet,

#2 die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe L^1 kennzeichnet,

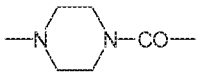
und L1 durch die Formel

$$\#^1\text{–}(NR^{10})_n\text{-}(G1)_O\text{-}G2\text{-}\#^2$$

dargestellt wird,

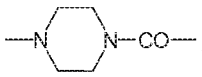
wobei

R^{10} H, NH2 oder C1-C3-Alkyl darstellt;

G1 –NHCO- oder  darstellt;

n 0 oder 1 ist;

o 0 oder 1 ist; und

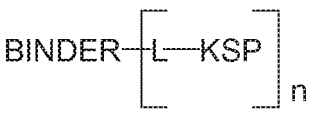
G2 eine geradkettige oder verzweigte Kohlenwasserstoffkette mit 1 bis 100 Kohlenstoffatomen aus Arylengruppen und/oder geradkettigen und/oder verzweigten und/oder cyclischen Alkylengruppen ist, die einfach oder mehrfach durch eine oder mehrere der Gruppen -O-, -S-, -SO-, SO_2, -NH-, -CO-, -NHCO-, -CONH-, -NMe-, -NHNH-, -SO_2NHNH-, -CONHNH- und einen 3 bis 10gliedriger, aromatischen oder nicht aromatischen Heterozyklus mit bis zu 4 Heteroatomen ausgewählt aus N, O und S, oder -SO- unterbrochen sein kann (vorzugsweise ), wobei die Seitenketten, sofern vorhanden, mit –NHCONH$_2$, -COOH, -OH, -NH$_2$, NH-CNNH$_2$, Sulfonamid, Sulfon, Sulfoxid, oder Sulfonsäure substituiert sein können,

#1 die Bindung zum KSP-Inhibitor und #2 die Bindung zur Kopplungsgruppe zum Antikörper ist (z.B. L2),

sowie Salze, Solvate und Salze der Solvate des ADCs.

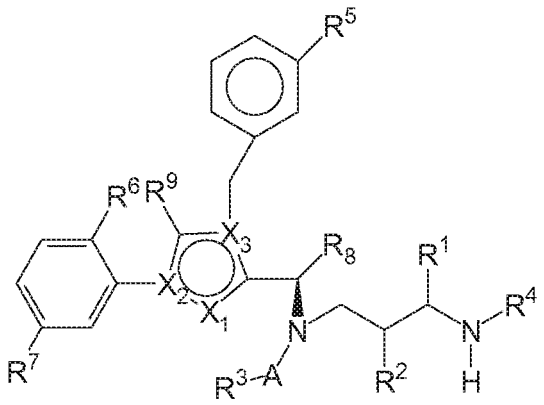
Ausführungsform D:

Ein ADC der Formel



wobei KSP-L- eine Verbindung der folgenden Formel (II), (IIa), (IIb), (IIc), (IId), (IIe), (IIf), (IIg) oder der folgenden Formel (IIh)ist, der Binder ein Antikörper, und n eine Zahl von 1 bis 10 ist:

Formel (IIh):



(II)

wobei

X_1 N, X_2 N und X_3 C darstellt;

X_1 CH, X_2 C und X_3 N darstellt;

X_1 NH, X_2 C und X_3 C darstellt; oder

X_1 CH, X_2 N und X_3 C darstellt;

A CO (carbonyl) ist;

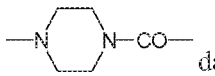
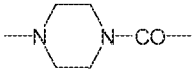
R^1 –L-#1 ist,;

R^2 und R^4 H ist, oder R^2 und R^4 gemeinsam (unter Bildung eines Pyrrolidinringes) $-CH_2-CHR^{10}-$ oder $-CHR^{10}-CH_2-$ darstellen, wobei R^{10} H darstellt;

R^3 eine C_{1-10}-Alkyl-, die ggf. mit –OH, O-Alkyl, SH, S-Alkyl, O-CO-Alkyl, O-CO-NH-Alkyl, NH-CO-Alkyl, NH-CO-NH-Alkyl, $S(O)_n$-Alkyl, SO_2-NH-Alkyl, NH-Alkyl, $N(Alkyl)_2$, oder NH_2 substituiert sein kann (wobei Alkyl vorzugsweise C_{1-3} Alkyl bedeutet), oder –MOD ist;

wobei –MOD $-(NR^{10})_n-(G1)_O-G2-H$ darstellt, wobei

R^{10} H oder C_1-C_3-Alkyl darstellt;

G1 –NHCO- , -CONH- oder  darstellt (wobei wenn G1 –NHCO- oder  darstellt, R^{10} nicht NH_2 ist);

n 0 oder 1 ist;

o 0 oder 1 ist; und

G2 eine geradkettige und/oder verzweigte Kohlenwasserstoffgruppe mit 1 bis 10 Kohlenstoffatomen ist, die einfach oder mehrfach durch eine oder mehrere der

Gruppen -O-, -S-, -SO-, SO_2, -NR^y-, -NR^yCO-, $CONR^y$-, -NR^yNR^y-, -SO2NR^yNR^y-, -$CONR^yNR^y$-, (wobei R^y H, Phenyl, C_1-C_{10}-Alkyl, C_2-C_{10}-Alkenyl, oder C_2-C_{10}-Alkinyl darstellt, die jeweils mit $NHCONH_2$, -COOH, -OH, -NH_2, NH-$CNNH_2$, Sulfonamid, Sulfon, Sulfoxid, oder Sulfonsäure substituiert sein können), -CO-, -CR^x=N-O- (wobei Rx H, C_1-C_3-Alkyl oder Phenyl darstellt) unterbrochen sein kann, wobei die Kohlenwasserstoffkette einschließlich der Seitenketten, sofern vorhanden, mit –$NHCONH_2$, -COOH, -OH, -NH_2, NH-$CNNH_2$, Sulfonamid, Sulfon, Sulfoxid, oder Sulfonsäure substituiert sein kann, wobei die Gruppe –MOD vorzugsweise zumindest eine Gruppe –COOH aufweist;

R^5 H oder F ist;

R^6 und R^7 unabhängig voneinander H, (ggf. fluoriertes) C_{1-3}-Alkyl, (ggf. fluoriertes) C_{2-4}-Alkenyl, (ggf. fluoriertes) C_{2-4}-Alkinyl, Hydroxy oder Halogen darstellen;

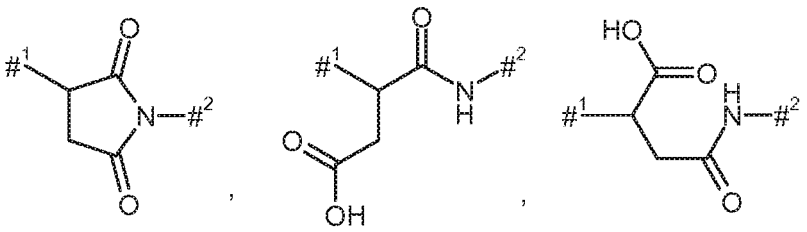
R^8 eine verzweigte C_{1-5}-Alkyl-Gruppe ist; und

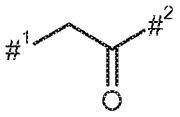
R^9 H oder F ist,

wobei –L-den Linker und #1 die Bindung zum Antikörper darstellt,
wobei –L- dargestellt wird durch

§-(CO)m-L1-L2-§§

wobei
m 0 oder 1 ist;
§ die Bindung an KSP darstellt und
§§ die Bindung an den Antikörper darstellt, und
L2



oder 

darstellt, wobei

$\#^1$ die Verknüpfungsstelle mit dem Schwefelatom des Antikörpers kennzeichnet,

$\#^2$ die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe L^1 kennzeichnet,

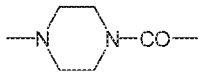
und L1 durch die Formel

$$\#^1\text{–}(NR^{10})_n\text{-}(G1)_O\text{-}G2\text{-}\#^2$$

dargestellt wird,

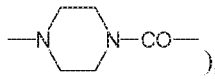
wobei

R^{10} H, NH_2 oder C1-C3-Alkyl darstellt;

G1 –NHCO- oder  darstellt;

n 0 oder 1 ist;

o 0 oder 1 ist; und

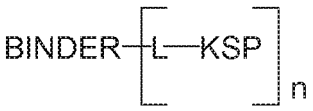
G2 eine geradkettige oder verzweigte Kohlenwasserstoffkette mit 1 bis 100 Kohlenstoffatomen aus Arylengruppen und/oder geradkettigen und/oder verzweigten und/oder cyclischen Alkylengruppen ist, die einfach oder mehrfach durch eine oder mehrere der Gruppen -O-, -S-, -SO-, SO2, -NH-, -CO-, -NHCO-, -CONH-, -NMe-, -NHNH-, -SO2NHNH-, -CONHNH-, $-CR^x$=N-O- (wobei Rx H, C_1-C_3-Alkyl oder Phenyl darstellt) und einen 3 bis 10-gliedriger, aromatischen oder nicht aromatischen Heterozyklus mit bis zu 4 Heteroatomen ausgewählt aus N, O und S, -SO- oder –SO2- unterbrochen sein kann (vorzugsweise ), wobei Kohlenwasserstoffkette einschließlich der Seitenketten, sofern vorhanden, mit $-NHCONH_2$, -COOH, -OH, $-NH_2$, NH-$CNNH_2$, Sulfonamid, Sulfon, Sulfoxid, oder Sulfonsäure substituiert sein können,

#1 die Bindung zum KSP-Inhibitor und #2 die Bindung zur Kopplungsgruppe zum Antikörper ist (z.B. L2),

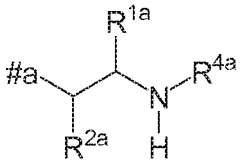
sowie Salze, Solvate und Salze der Solvate des ADCs.

Ausführungsform E:

Ein ADC der Formel



wobei KSP-L- eine Verbindung mit der folgenden Substruktur I(sub) ist, der Binder Nimutuzumab ist, und n eine Zahl von 1 bis 10 ist:



wobei

#a eine Bindung zum Restmolekül darstellt;

R^{1a} -L-#1, H oder $-(CH_2)_{0-3}Z$ darstellt, wobei Z -H, Halogen, $-NHY^3$, $-CO-NY^1Y^2$, oder $-CO-OY^3$ darstellt,
mit Y^1 und Y^2 unabhängig voneinander H, NH2, oder $-(CH_2CH_2O)_{0-3}-(CH_2)_{0-3}Z'$ darstellen, und Y^3 H oder $-(CH_2)_{0-3}Z'$ darstellt, wobei Z' H, SO_3H, NH_2, COOH oder $-(CO-NH-CHY^4)_{1-3}COOH$ darstellt; wobei Y^4 unabhängig voneinander lineares oder verzweigtes, gegebenenfalls mit $-NHCONH_2$ substituiertes, C_{1-6} Alkyl oder gegebenenfalls mit $-NH_2$ substituiertes Aryl oder Benzyl darstellt;

R^{2a} und R^{4a} unabhängig voneinander H, -L-#1, $-CO-CHY^4-NHY^5$ oder $-(CH_2)_{0-3}Z$ darstellen, oder R^{2a} und R^{4a} gemeinsam (unter Bildung eines Pyrrolidinringes) $-CH_2-CHR^{10}-$ oder $-CHR^{10}-CH_2-$ darstellen, wobei R^{10} -L-#1, H, NH_2, COOH, SO_3H, SH, oder OH darstellt, und wobei Z -H, $-CO-NY^1Y^2$, oder $-CO-OY^3$ darstellt,
wobei Y^1 und Y^2 unabhängig voneinander H, NH_2, oder $-(CH_2)_{0-3}Z'$ darstellen, und Y^3 H oder $-(CH_2)_{0-3}Z'$ darstellt, wobei Z' H, SO_3H, NH_2 oder COOH darstellt,
wobei Y^4 unabhängig voneinander lineares oder verzweigtes, gegebenenfalls mit $-NHCONH_2$ substituiertes, C_{1-6} Alkyl oder gegebenenfalls mit $-NH_2$ substituiertes Aryl oder Benzyl darstellt

und Y^5 H oder –CO-CHY^6-NH_2 darstellt, wobei Y^6 lineares oder verzweigtes C_{1-6} Alkyl darstellt;

wobei einer der Substituenten R^{1a}, R^{2a}, R^{4a} oder R^{10} –L-#1 darstellt,

–L-den Linker und #1 die Bindung zum Antikörper darstellt,

wobei –L- dargestellt wird durch

§-(CO)m-L1-L2-§§

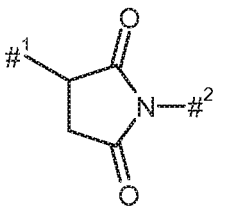
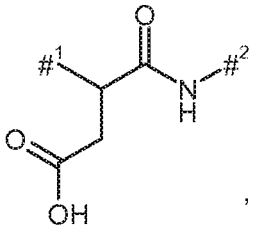
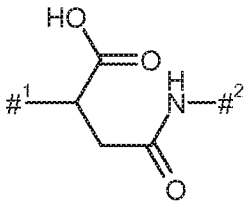
wobei

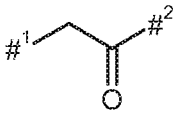
m 0 oder 1 ist;

§ die Bindung an KSP darstellt und

§§ die Bindung an den Antikörper darstellt, und

L2

oder 

darstellt, wobei

$#^1$ die Verknüpfungsstelle mit dem Schwefelatom des Antikörpers kennzeichnet,

$#^2$ die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe L^1 kennzeichnet,

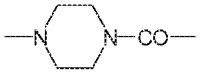
und L1 durch die Formel

$$#^1\text{–}(NR^{10})_n\text{-}(G1)_o\text{-}G2\text{-}#^2$$

dargestellt wird,

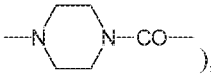
wobei

R^{10} H, NH2 oder C1-C3-Alkyl darstellt;

G1 –NHCO- oder  darstellt;

n 0 oder 1 ist;

o 0 oder 1 ist; und

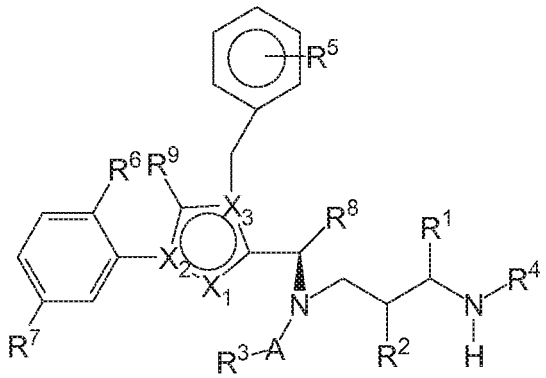
G2 eine geradkettige oder verzweigte Kohlenwasserstoffkette mit 1 bis 100 Kohlenstoffatomen aus Arylengruppen und/oder geradkettigen und/oder verzweigten und/oder cyclischen Alkylengruppen ist, die einfach oder mehrfach durch eine oder mehrere der Gruppen -O-, -S-, -SO-, SO_2, -NH-, -CO-, -NHCO-, -CONH-, -NMe-, -NHNH-, $-SO_2NHNH-$, -CONHNH- und einen 3 bis 10gliedriger, aromatischen oder nicht aromatischen Heterozyklus mit bis zu 4 Heteroatomen ausgewählt aus N, O und S, oder -SO- unterbrochen sein kann (vorzugsweise ), wobei die Seitenketten, sofern vorhanden, mit $-NHCONH_2$, -COOH, -OH, $-NH_2$, $NH-CNNH_2$, Sulfonamid, Sulfon, Sulfoxid, oder Sulfonsäure substituiert sein können,

$\#^1$ die Bindung zum KSP-Inhibitor und $\#^2$ die Bindung zur Kopplungsgruppe zum Antikörper ist (z.B. L2),

sowie Salze, Solvate und Salze der Solvate des ADCs.

Besonders bevorzugt sind in dieser Ausführungsform, wenn KSP-L- die folgende Formel (IIi) aufweist:

Formel (IIi):



(IIi)

wobei

X_1 N, X_2 N und X_3 C darstellt; oder

X_1 N, X_2 C und X_3 N darstellt; oder

X_1 CH oder CF, X_2 C und X_3 N darstellt; oder

X_1 NH, X_2 C und X_3 C darstellt; oder

X_1 CH, X_2 N und X_3 C darstellt;

(wobei X_1 CH, X_2 C und X_3 N bevorzugt ist);

R^1 H,-MOD oder $-(CH_2)_{0-3}Z$ darstellt, wobei Z -H, $-NHY^3$, $-OY^3$, $-SY^3$, Halogen, $-CO-NY^1Y^2$, oder $-CO-OY^3$ darstellt,

wobei Y^1 und Y^2 unabhängig voneinander H, NH_2, $-(CH_2CH_2O)_{0-3}-(CH_2)_{0-3}Z'$(z.B. $-(CH_2)_{0-3}Z'$), oder $-CH(CH_2W)Z'$ darstellen, und Y^3 H oder $-(CH_2)_{0-3}Z'$ darstellt, wobei Z' H, NH_2, SO_3H, COOH, -NH-CO-CH_2-CH_2-$CH(NH_2)$COOH oder $-(CO-NH-CHY^4)_{1-3}$COOH darstellt; wobei W H oder OH darstellt,

wobei Y^4 unabhängig voneinander lineares oder verzweigtes, gegebenenfalls mit–$NHCONH_2$ substituiertes, C_{1-6} Alkyl oder gegebenenfalls mit –NH_2 substituiertes Aryl oder Benzyl darstellt;

R^2 H, -MOD, $-CO-CHY^4-NHY^5$ oder $-(CH_2)_{0-3}Z$ darstellt, oder R^2 und R^4 gemeinsam (unter Bildung eines Pyrrolidinringes) –CH_2-CHR^{10}- oder -CHR^{10}-CH_2- darstellen, wobei R^{10} H, NH_2, SO_3H, COOH, SH, oder OH darstellt;
wobei Z -H, Halogen, $-OY^3$, $-SY^3$, NHY^3, $-CO-NY^1Y^2$, oder $-CO-OY^3$ darstellt,
wobei Y^1 und Y^2 unabhängig voneinander H, NH_2, oder $-(CH_2)_{0-3}Z'$ darstellen, und Y^3 H oder $-(CH_2)_{0-3}Z'$ darstellt, wobei Z' H, SO_3H, NH_2 oder COOH darstellt;
wobei Y^4 unabhängig voneinander lineares oder verzweigtes, gegebenenfalls mit–$NHCONH_2$ substituiertes, C_{1-6} Alkyl oder gegebenenfalls mit –NH_2 substituiertes Aryl oder Benzyl darstellt und Y^5 H oder –$CO-CHY^6-NH_2$ darstellt, wobei Y^6 lineares oder verzweigtes C_{1-6} Alkyl darstellt;

R^4 H, $-CO-CHY^4-NHY^5$ oder $-(CH_2)_{0-3}Z$ darstellt, vorzugsweise H,
wobei Z -H, Halogen, $-OY^3$, $-SY^3$, NHY^3, $-CO-NY^1Y^2$, oder $-CO-OY^3$ darstellt,
wobei Y^1 und Y^2 unabhängig voneinander H, NH_2, oder $-(CH_2)_{0-3}Z'$ darstellen, und Y^3 H oder $-(CH_2)_{0-3}Z'$ darstellt, wobei Z' H, SO_3H, NH_2 oder COOH darstellt;
wobei Y^4 unabhängig voneinander lineares oder verzweigtes, gegebenenfalls mit–$NHCONH_2$ substituiertes, C_{1-6} Alkyl oder gegebenenfalls mit –NH_2 substituiertes Aryl oder Benzyl darstellt und Y^5 H oder –$CO-CHY^6-NH_2$ darstellt, wobei Y^6 lineares oder verzweigtes C_{1-6} Alkyl darstellt;
oder R^2 und R^4 gemeinsam (unter Bildung eines Pyrrolidinringes) –CH_2-CHR^{10}- oder -CHR^{10}-CH_2- darstellen, wobei R^{10} H, NH_2, SO_3H, COOH, SH, oder OH darstellt;

A CO, SO, SO_2, SO_2NH oder CNNH darstellt;

R^3 –L-#1 darstellt,

R^5 H, NH_2, NO_2, Halogen (insbesondere F, Cl, Br), -CN, CF_3, $-OCF_3$, $-CH_2F$, $-CH_2F$, SH oder $-(CH_2)_{0-3}Z$ darstellt, wobei Z -H, $-OY^3$, $-SY^3$, Halogen, NHY^3, $-CO-NY^1Y^2$, oder $-CO-OY^3$ darstellt,

wobei Y^1 und Y^2 unabhängig voneinander H, NH_2, oder -$(CH_2)_{0-3}Z$' darstellen, und Y^3 H oder -$(CH_2)_{0-3}Z$' darstellt, wobei Z' H, SO_3H, NH_2 oder COOH darstellt;
darstellt,

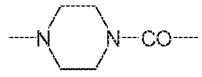
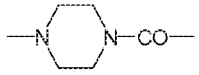
R^6 und R^7 unabhängig voneinander H, Cyano, (ggf. fluoriertes) C_{1-10}-Alkyl, (ggf. fluoriertes) C_{2-10}-Alkenyl, (ggf. fluoriertes) C_{2-10}-Alkinyl, Hydroxy, NO_2, NH_2, COOH oder Halogen (insbesondere F, Cl, Br) darstellen,

R^8 (ggf. fluoriertes) C_{1-10}-Alkyl, (ggf. fluoriertes) C_{2-10}-Alkenyl, (ggf. fluoriertes) C_{2-10}-Alkinyl, (ggf. fluoriertes) C_{4-10}-Cycloalkyl oder–$(CH_2)_{0-2}$-(HZ^2) darstellt, wobei HZ^2 ein 4 bis 7-gliedriger Heterocyclus mit bis zu zwei Heteroatomen ausgewählt aus N, O und S darstellt, wobei jede dieser Gruppen mit –OH, CO_2H oder NH_2 substituiert sein kann;

L für den Linker steht und #1 für die Bindung zum Binder bzw. Derivat hiervon steht,

wobei –MOD –$(NR^{10})_n$-$(G1)_O$-G2-H darstellt, wobei

R^{10} H oder C_1-C_3-Alkyl darstellt;

G1 –NHCO- , -CONH- oder  darstellt (wobei wenn G1 –NHCO- oder  darstellt, R^{10} nicht NH_2 ist);

n 0 oder 1 ist;

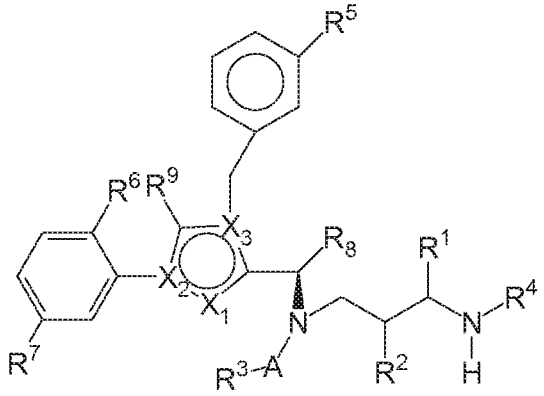
o 0 oder 1 ist; und

G2 eine geradkettige und/oder verzweigte Kohlenwasserstoffgruppe mit 1 bis 10 Kohlenstoffatomen ist, die einfach oder mehrfach durch eine oder mehrere der Gruppen -O-, -S-, -SO-, SO_2, -NRУ-, -NRУCO-, CONRУ-, -NRУNRУ-, -SO2NRУNRУ-, -CONRУNRУ-, (wobei R^y H, Phenyl, C_1-C_{10}-Alkyl, C_2-C_{10}-Alkenyl, oder C_2-C_{10}-Alkinyl darstellt, die jeweils mit $NHCONH_2$, -COOH, -OH, -NH_2, NH-$CNNH_2$, Sulfonamid, Sulfon, Sulfoxid, oder Sulfonsäure substituiert sein können), -CO-, -CR^x=N-O- (wobei Rx H, C_1-C_3-Alkyl oder Phenyl darstellt) unterbrochen sein kann, wobei die Kohlenwasserstoffkette einschließlich der Seitenketten, sofern vorhanden, mit –$NHCONH_2$, -COOH, -OH, -NH_2, NH-$CNNH_2$, Sulfonamid, Sulfon, Sulfoxid, oder Sulfonsäure substituiert sein kann, wobei die Gruppe –MOD vorzugsweise zumindest eine Gruppe –COOH aufweist;

sowie ihre Salze, Solvate und Salze der Solvate.

Ausführungsform F:

Verbindungen der allgemeinen Formel:



(III)

wobei

X_1 N, X_2 N und X_3 C darstellt, oder X_1 CH, X_2 C und X_3 N darstellt;

R^1 H, oder $-(CH_2)_{0-3}Z$ darstellt, wobei Z –H, -NHY^3, -OY^3, -SY^3, Halogen, -CO-NY^1Y^2, oder –CO-OY^3 darstellt,

wobei Y^1 und Y^2 unabhängig voneinander H, NH2, $-(CH_2CH_2O)_{0-3}-(CH_2)_{0-3}Z'$, oder $-CH(CH_2W)Z'$ darstellen, und Y^3 H oder $-(CH_2)_{0-3}Z'$ darstellt, wobei Z' H, NH_2, SO_3H, COOH, -NH-CO-CH_2-CH_2-$CH(NH_2)$COOH oder $-(CO\text{-}NH\text{-}CHY^4)_{1-3}$COOH darstellt, wobei W H oder OH darstellt;

wobei Y^4 unabhängig voneinander lineares oder verzweigtes, gegebenenfalls mit–$NHCONH_2$ substituiertes, C_{1-6} Alkyl oder gegebenenfalls mit $-NH_2$ substituiertes Aryl oder Benzyl darstellt;

R^2 und R^4 unabhängig voneinander H, -CO-CHY^4-NHY^5 oder $-(CH_2)_{0-3}Z$ darstellen, oder R^2 und R^4 gemeinsam (unter Bildung eines Pyrrolidinringes) $-CH_2$-CHR^{10}- oder $-CHR^{10}$-CH_2- darstellen, wobei R^{10} H, NH_2, SO_3H, COOH, SH, oder OH darstellt;

wobei Z –H, Halogen, -OY^3, -SY^3, NHY^3, -CO-NY^1Y^2, oder –CO-OY^3 darstellt,

wobei Y^1 und Y^2 unabhängig voneinander H, NH_2, oder $-(CH_2)_{0-3}Z'$ darstellen, und Y^3 H oder $-(CH_2)_{0-3}Z'$ darstellt, wobei Z' H, SO_3H, NH_2 oder COOH darstellt;

wobei Y^4 unabhängig voneinander lineares oder verzweigtes, gegebenenfalls mit–$NHCONH_2$ substituiertes, C_{1-6} Alkyl oder gegebenenfalls mit $-NH_2$ substituiertes Aryl oder Benzyl darstellt und Y^5 H oder $-CO\text{-}CHY^6\text{-}NH_2$ darstellt, wobei Y^6 lineares oder verzweigtes C_{1-6} Alkyl darstellt;

A CO, SO, SO_2, SO_2NH oder CNNH darstellt;

R^3 oder eine gegebenenfalls substituierte Alkyl-, Aryl-, Heteroaryl- Heteroalkyl-, Heterocycloalkyl- Gruppe darstellt, bevorzugt eine C_{1-10}-Alkyl-, C_{6-10}-Aryl- oder C_{6-10}-Aralkyl-, C_{5-10}-Heteroalkyl-, C_{1-10}-Alkyl-O-C_{6-10}-Aryl- oder C_{5-10}-Heterocycloalkyl-Gruppe, die mit 1-3 –OH Gruppen, 1-3 Halogenatomen, 1-3 halogenierten Alkylgruppen (die jeweils 1-3 Halogenatome aufweisen), 1-3 O-Alkyl Gruppen, 1-3 –SH Gruppen, 1-3 –S-Alkyl Gruppen, 1-3 –O-CO-Alkyl Gruppen, 1-3 –O-CO-NH-Alkyl Gruppen, 1-3 –NH-CO-Alkyl Gruppen, 1-3 –NH-CO-NH-Alkyl Gruppen, 1-3 –$S(O)_n$-Alkyl Gruppen, 1-3 –SO_2-NH-Alkyl Gruppen, 1-3 –NH-Alkyl Gruppen, 1-3 –$N(Alkyl)_2$ Gruppen, 1-3 –NH_2 Gruppen oder 1-3 –$(CH_2)_{0-3}Z$ Gruppen, wobei Z –H, Halogen, -OY^3, -SY^3, -NHY^3, -CO-NY^1Y^2, oder –CO-OY^3 darstellt, mit Y^1 und Y^2 unabhängig voneinander H, NH_2, oder –$(CH_2)_{0-3}Z'$ darstellen, und Y^3 H, -$(CH_2)_{0-3}$-$CH(NHCOCH_3)Z'$,-$(CH_2)_{0-3}$-$CH(NH_2)Z'$, oder –$(CH_2)_{0-3}Z'$ darstellt, wobei Z' H, SO_3H, NH_2 oder COOH darstellt,
substituiert sein kann (wobei „Alkyl" bevorzugt C_{1-10}-Alkyl bedeutet);

R^5 H, F, NH_2, NO_2, Halogen, SH oder –$(CH_2)_{0-3}Z$ darstellt, wobei Z –H, Halogen, -OY^3, -SY^3, -NHY^3, -CO-NY^1Y^2, oder –CO-OY^3 darstellt,
wobei Y^1 und Y^2 unabhängig voneinander H, NH_2, oder –$(CH_2)_{0-3}Z'$ darstellen, und Y^3 H oder –$(CH_2)_{0-3}Z'$ darstellt, wobei Z' H, SO_3H, NH_2 oder COOH darstellt;
darstellt,

R^6 und R^7 unabhängig voneinander H, Cyano, (ggf. fluoriertes) C_{1-10}-Alkyl, (ggf. fluoriertes) C_{2-10}-Alkenyl, (ggf. fluoriertes) C_{2-10}-Alkinyl, Hydroxy oder Halogen darstellen,

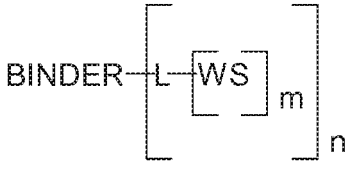
R^8 (ggf. fluoriertes) C_{1-10}-Alkyl, (ggf. fluoriertes) C_{4-10}-Cycloalkyl oder optional substituiertes Oxetan darstellt; und

R^9 H, F, CH_3, CF_3, CH_2F oder CHF_2 darstellt;

sowie ihre Salze, Solvate und Salze der Solvate.

Ausführungsform G:

Die Erfindung stellt auch Binder-Wirkstoff-der folgenden allgemeinen Formel bereit:

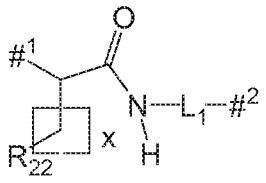


wobei BINDER für den Binder (bevorzugt: Antikörper) bzw. ein Derivat hiervon (bevorzugt: Cysteinrest),, vorzugsweise einen Antikörper, L für den Linker, WS für den Wirkstoff, vorzugsweise einen KSP-Inhibitor, wie z.B. ein erfindungsgemäßer KSP-Inhibitor einer der Formeln (II), (IIa), (IIb), (IIc), (IId), (IIe), (IIf), (IIg) oder (IIh) ist, m für eine Zahl von 1 bis 2, vorzugsweise 1, und n für eine Zahl von 1 bis 50, vorzugsweise 1,2 bis 20 und besonders bevorzugt 2 bis 8 steht, wobei L eine der folgenden Strukturen aufweist. Hierbei ist m die Zahl der Wirkstoffmoleküle pro Linker und n ein Mittelwert der Anzahl an Wirkstoff-Linker-Konjugaten pro BINDER. Die Summe aller WS, die in einem Konjugatmolekül vorliegen, ist also das Produkt von m und n.

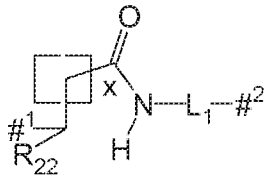
WS ist ein Wirkstoff, der in Tieren, bevorzugt Menschen, eine lokale oder systemische Wirkung therapeutische Wirkung zeigt. Diese Wirkstoffe haben in der Regel ein Molekulargewicht von unter 5 kDa, bevorzugt unter 1.5 kDa. Bevorzugte Wirkstoffe sind antiproliferative Substanzen, z.B. zytotoxische oder zytostatische Substanzen. Bevorzugte Wirkstoffe sind zytotoxische Substanzen, Angiogenese Inhibitoren, Zellzyklusinhibitoren, PI3-Kinase oder m-TOR Inhibitoren, MAPK Signalkaskadeweg Inhibitoren, HDAC Inhibitoren, Proteasom-Inhibitoren, PARP Inhibitoren, Wnt/Hedgehog Signalkaskadeweg-Inhibitoren und RNA Polymeraseinhibitoren. Zytotoxische Substanzen sind unter anderem DNA-bindende oder interkalierende Substanzen, DNA alkylierende Substanzen, Mikrotubulin stabilisierende oder destabilisierende Substanzen, Platin-Verbindungen, und Topoisomerase I-Inhibitoren. Bespielhafte DNA-bindende sind z.B. Anthracycline, wie Doxorubicin oder Daunorubicin). Bespielhafte DNA-alkylierende Substanzen sind z.B. Calichemicine, Temozolomid oder Cyclophosphamid und Derivate. Bespielhafte Mikrotubulin stabilisierende oder destabilisierende Substanzen sind z.B. Taxane, wie z.B. Paclitaxel, Docetaxel, Maytansinoide, und Auristatine, Tubulysine, Vincaalkaloide, Epothilone und Derivate davon. Beispiele für Maytansinoide sind Maytansin, Maytansinol, DM-1 und DM-4 (siehe z.B. US Patent US5208020). Beispiele für Auristatine sind Auristatin E, Monomethylauristatin E (MMAE), Auristatin F, Monomethylauristatin F (MMAF) und Dolastin (siehe unter anderem WO 09/117531, WO 2005/081711, WO 04/010957; WO02/088172 oder WO01/24763). Beispiele für Vincaalkaloide sind Vincristin oder Vinblastin. Beispiele für Epothilone sind Epothilon A, B, C, D, E oder F (siehe unter anderem WO 98/13375; WO2004/005269; WO 2008/138561; WO 2009/002993; WO 2009/055562; WO 2009/012958; WO2009/026177; WO 2009/134279; WO 2010/033733; WO2010/034724; WO 2011/017249; WO2011/057805). Beispiele für Platin Verbindungen sind Cis-Platin, oder Carboplatin. Beispiele für Topoisomerase I-Inhibitoren sind Camptothecin und Derivate. Beispiele für Angiogenese Inhibitoren sind MetAP2 Inhibitoren, wie z.B. Fumagillol. Beispiele für Zellzyklusinhibitoren sind CDK Inhibitoren (z.B. BMS-387032 oder PD0332991), Rho-Kinase Inhibitoren wie z.B. GSK429286, PLK Inhibitoren wie z.B. Volasertib, Aurora-Kinase Inhibitoren wie z.B. AZD1152 oder MLN805Z. Beispiele für MAPK Signalkaskadeweg Inhibitoren sind unter anderem MEK-Inhibitoren (z.B. PD0325901), Ras-Inhibitoren, JNK-Inhibitoren, B-Raf-Inhibitoren (z.B. SB590885) oder p38 MAPK-Inhibitoren(z.B. SB202190). Beispiele für HDAC-

Inhibitoren sind Belinostat oder Givinostat. Beispiele für PARP-Inhibitoren sind Iniparib oder Olaparib. Beispiele für RNA Polymerase-Inhibitoren sind Amatoxine, wie z.B. alpha-Amantin, Amanin oder Amanullin. Besonders bevorzugte Wirkstoffe sind Vinca-Alkaloide, Auristatine, Maytansinoide, Tubulysine, Duocarmycine, Kinase-Inhibitoren, MEK-Inhibitoren und KSP-Inhibitoren.

Hierbei steht L für eine der folgenden Formeln A3 oder A4



Formel A3



Formel A4

wobei $\#^1$ die Verknüpfungsstelle mit dem Schwefelatom des Binders kennzeichnet, $\#^2$ die Verknüpfungsstelle mit der dem Wirkstoff kennzeichnet, x 1 oder 2 darstellt, und R^{22} COOH, COOR, COR (mit R jeweils C1-3-Alkyl), CONH2, Br, vorzugsweise COOH darstellt,.

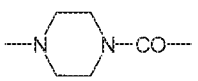
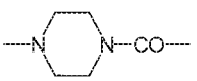
L1 weist dieselbe Bedeutung wie oben auf. Vorzugsweise wird -L1-#2 durch die folgende Formel dargestellt:

$$\#^3\text{–}(NR^{10})_n\text{-}(G1)_O\text{-}G2\text{-}\#^2$$

dargestellt, wobei

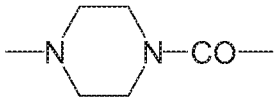
#3 die Verknüpfungsstelle mit dem Stickstoffatom kennzeichnet

R^{10} H, NH_2 oder C_1-C_3-Alkyl darstellt;

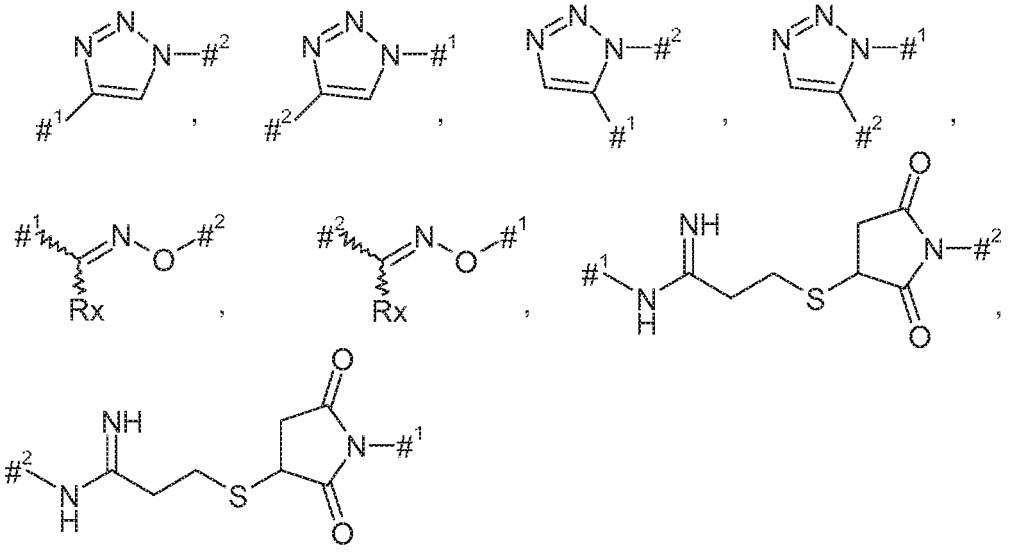
G1 –NHCO- , -CONH- oder  darstellt; (wobei wenn G1 NHCO oder  darstellt, R10 nicht NH2 ist),

n 0 oder 1 ist;

o 0 oder 1 ist; und

G2 eine geradkettige oder verzweigte Kohlenwasserstoffkette mit 1 bis 100 Kohlenstoffatomen aus Arylengruppen und/oder geradkettigen und/oder verzweigten und/oder cyclischen Alkylengruppen ist, die einfach oder mehrfach durch eine oder mehrere der Gruppen -O-, -S-, -SO-, SO_2, -NR^y-, -NR^yCO-, -$C(NH)NR^y$-, -$CONR^y$-, -NR^yNR^y-, -$SO2NR^yNR^y$-, -$CONR^yNR^y$-, (wobei R^y H, Phenyl, C_1-C_{10}-Alkyl, C_2-C_{10}-Alkenyl, oder C_2-C_{10}-Alkinyl darstellt, die jeweils mit $NHCONH_2$, -COOH, -OH, -NH_2, NH-$CNNH_2$, Sulfonamid, Sulfon, Sulfoxid, oder Sulfonsäure substituiert sein können), -CO-, -CR^x=N-O- (wobei Rx H, C_1-C_3-Alkyl oder Phenyl darstellt) und/oder einen 3 bis 10-gliedriger, aromatischen oder nicht aromatischen Heterozyklus mit bis zu 4 Heteroatomen ausgewählt aus N, O und S, -SO- oder –SO2- unterbrochen sein kann (vorzugsweise ), wobei die Kohlenwasserstoffkette einschließlich der Seitenketten, sofern vorhanden, mit –$NHCONH_2$, -COOH, -OH, -NH_2, NH-$CNNH_2$, Sulfonamid, Sulfon, Sulfoxid, oder Sulfonsäure substituiert sein können.

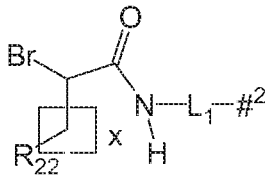
Weitere unterbrechende Gruppen in G2 sind vorzugsweise



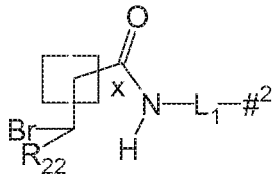
wobei Rx H, C_1-C_3-Alkyl oder Phenyl darstellt.

In dem erfindungsgemäßen Konjugat bzw. in einem Gemisch der erfindungsgemäßen Konjugate liegen die Bindungen an einen Cysteinrest des Binders vorzugsweise zu über 80 %, besonders bevorzugt zu über 90 %, besonders bevorzugt (bezogen auf die Gesamtanzahl von Bindungen des Linkers an den Binder) in einer der beiden Strukturen der Formel A3 oder A4 vor.

Die Konjugate mit den Linkern der Formel A3 bzw. A4 können durch Kupplung der Binder an die entsprechenden Bromderivate der folgenden Formeln A3‘ bzw. A4‘ erhalten werden:



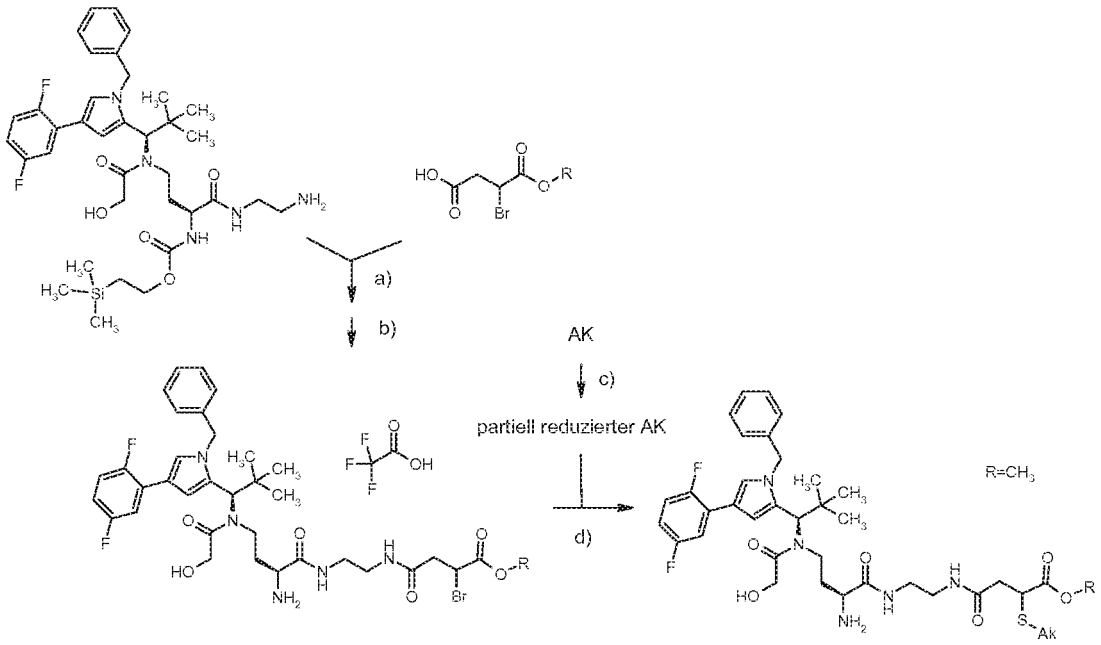
Formel A3‘



Formel A4‘

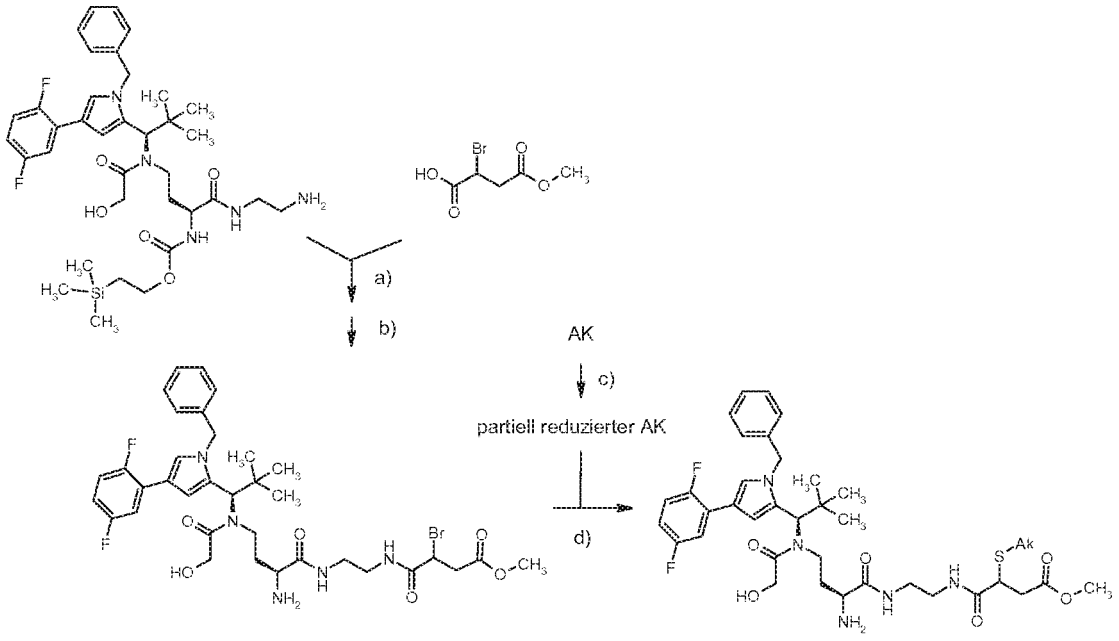
Diese Bromderivate der Formel A3‘ bzw. A4‘ können durch Reaktion von $HOOCCH_2CHBrCOOR_{22}$ bzw. $HOOCCHBrCH_2COOR_{22}$ mit einer Amingruppe des Binders erhalten werden, wie in den folgenden Schemata 30 bis 32 beispielhaft veranschaulicht.

Schema 30:



[a): 2-Brom-1-ethylpyridinium-Tetrafluoroborat (BEP), DCM, Pyridin, RT; b) Zinkchlorid, Trifluorethanol, 50°C, EDTA; c) 3-4 Äquivalente TCEP, PBS Puffer; d) PBS Puffer, 20h RT.]

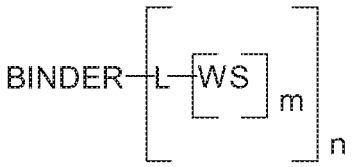
Schema 31:



[a): 2-Brom-1-ethylpyridinium-Tetrafluoroborat (BEP), DCM, Pyridin, RT; b) Zinkchlorid, Trifluorethanol, 50°C, EDTA; c) 3-4 Äquivalente TCEP, PBS Puffer; d) PBS Puffer, 20h RT.]

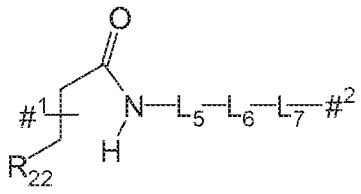
Ausführungsform H:

Die Erfindung stellt auch Binder-Wirkstoff der folgenden allgemeinen Formel bereit:



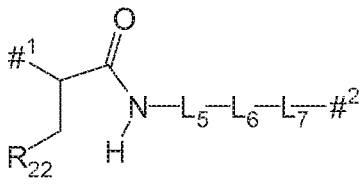
wobei BINDER für den Binder (bevorzugt: Antikörper) bzw. ein Derivat hiervon (bevorzugt: Cysteinrest), vorzugsweise einen Antikörper, L für den Linker, WS für den Wirkstoff, vorzugsweise einen KSP-Inhibitor, wie z.B. ein erfindungsgemäßer KSP-Inhibitor einer der Formeln (II), (IIa), (III) oder (IIIa), m für eine Zahl von 1 bis 2, vorzugsweise 1, und n für eine Zahl von 1 bis 50, vorzugsweise 1,2 bis 20 und besonders bevorzugt 2 bis 8 steht, wobei L eine der folgenden Strukturen aufweist. Hierbei ist m die Zahl der Wirkstoffmoleküle pro Linker und n ein Mittelwert der Anzahl an Wirkstoff-Linker-Konjugaten pro BINDER. Die Summe aller WS, die in einem Konjugatmolekül vorliegen, ist also das Produkt von m und n.

Hierbei steht L für:

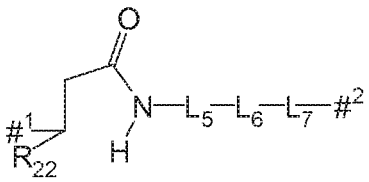


Formel A

wobei $\#^1$ die Verknüpfungsstelle mit dem Schwefelatom des Binders kennzeichnet, $\#^2$ die Verknüpfungsstelle mit der dem Wirkstoff kennzeichnet, und R^{22} COOH, COOR, COR (mit R jeweils C1-3-Alkyl), CONH2, Br, vorzugsweise COOH darstellt. darstellt. Die Verknüpfung mit dem Schwefelatom des Binders kann somit eine der folgenden Strukturen aufweisen:



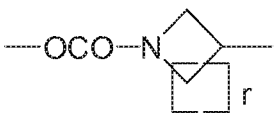
Formel A1

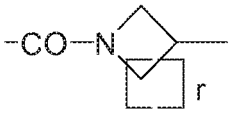


Formel A2

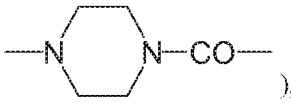
Bei Wirkstoff-Binder-Konjugaten, die mehr als ein Wirkstoffmolekül WS pro Wirkstoff-Binder-Konjugat enthalten, können beide Strukturen gemäß den Formeln A1 und/oder A2 in einem Wirkstoff-Binder-Konjugat vorliegen. Da es sich bei den erfindungsgemäßen Wirkstoff-Binder-Konjugaten um eine Mischung unterschiedlicher Wirkstoff-Binder-Konjugate handeln kann, ist es auch möglich, dass in dieser Mischung Wirkstoff-Binder-Konjugate sowohl mit der Formel A1 oder Formel A2 als auch mit der Formel A1 und A2 enthalten sind.

L_5 ist eine Gruppe ausgewählt aus $-(CH_2)_m-(CHR^S)_n-(OCH_2CH_2)_o-(X)_p-(CH_2)_q-$, wobei m, n, o, p und q unabhängig voneinander die folgenden Werte aufweisen: m=0-10; n=0 oder 1; o=0-10; p=0 oder 1; und q=0-10, wobei m+n+o=1-15, vorzugsweise 1-6 ist. X stellt einen 5- oder 6-gliedrigen, aromatischen oder nicht-aromatischen Hetero- oder Homocyclus dar, vorzugsweise $-C_6H_4-$ oder $-C_6H_{10}-$. R^S stellt eine Säuregruppe, vorzugsweise –COOH oder SO_3H dar.

L_6 ist eine Gruppe ausgewählt aus –CONH-, -OCONH-, -NHCO-, -NHCOO-, 

oder  wobei r 1, 2 oder 3 ist.

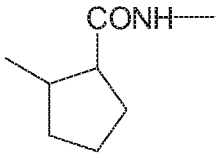
L_7 ist eine Einfachbindung oder eine Gruppe ausgewählt aus einer geradkettige oder verzweigten Kohlenwasserstoffkette mit 1 bis 100 (vorzugsweise 1 bis 10) Kohlenstoffatomen aus Arylengruppen und/oder geradkettigen und/oder verzweigten und/oder cyclischen Alkylengruppen ist, die einfach oder mehrfach durch eine oder mehrere der Gruppen -O-, -S-, -SO-, SO_2, $-NR^Y-$, $-NR^YCO-$, $-C(NH)NR^Y-$, -

$CONR^{y}$-, -$NR^{y}NR^{y}$-, -SO2$NR^{y}NR^{y}$-, -$CONR^{y}NR^{y}$-, (wobei R^{y} H, Phenyl, C_1-C_{10}-Alkyl, C_2-C_{10}-Alkenyl, oder C_2-C_{10}-Alkinyl darstellt, die jeweils mit $NHCONH_2$, -COOH, -OH, $-NH_2$, NH-$CNNH_2$, Sulfonamid, Sulfon, Sulfoxid, oder Sulfonsäure substituiert sein können), -CO-, -CR^{x}=N-O- (wobei Rx H, C_1-C_3-Alkyl oder Phenyl darstellt) und/oder einen 3 bis 10-gliedriger, vorzugsweise 5 bis 10-gliedriger, aromatischen oder nicht aromatischen Heterozyklus mit bis zu 4 Heteroatomen ausgewählt aus N, O und S, -SO- oder –SO2- unterbrochen sein kann (vorzugsweise ), wobei die Kohlenwasserstoffkette einschließlich der Seitenketten, sofern vorhanden, mit –$NHCONH_2$, -COOH, -OH, $-NH_2$, NH-$CNNH_2$, Sulfonamid, Sulfon, Sulfoxid, oder Sulfonsäure substituiert sein können.

L_5 ist bevorzugt eine Gruppe -$(CH_2)_m$-$(CHR^{S})_n$-$(OCH_2CH_2)_o$-$(X)_p$-$(CH_2)_q$-, wobei m=1-3, n=0, o=0-7, p=0, und q=0 oder 1 darstellt. Besonders bevorzugt ist eine Gruppe -$(CH_2)_m$-$(CHR^{S})_n$-$(OCH_2CH_2)_o$-$(X)_p$-$(CH_2)_q$-, wobei m=1 oder 2, n=0, o=0 oder 1, p=0, und q=0 oder 1 darstellt.

L_6 ist bevorzugt eine Gruppe ausgewählt aus –CONH- und -NHCO-.

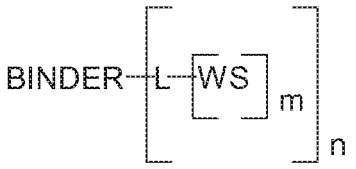
L_7 ist bevorzugt eine Einfachbindung oder –$[(CH_2)_x$-$(X^4)_y]_w$-$(CH_2)_z$-,
wobei
w = 0 bis 20 ist;
x = 0 bis 5 ist;
y = 0 oder 1 ist;
z = 1 bis 5 ist; und

X^4 –O-, -CONH-, –NHCO- oder  darstellt.

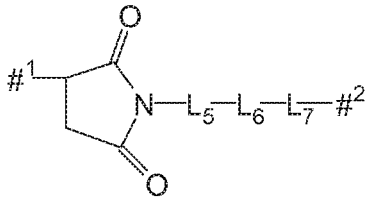
Besonders bevorzugt ist L_7 eine Einfachbindung oder eine Gruppe –$[(CH_2)_x$-NHCO-)], wobei x = 1 bis 5 ist.
Besonders bevorzugt stellt –L_5-L_6-L_7- -$(CH_2)_m$-$(CHR^{S})_n$-$(OCH_2CH_2)_o$-$(X)_p$-$(CH_2)_q$-–NHCO-–$[(CH_2)_x$-NHCO-)] dar, wobei m=1 oder 2, n=0, o=0 oder 1, p=0, und q=0 oder 1, und x=1-5 darstellt.

Es ist jedoch auch möglich, dass diese beiden Strukturen gemeinsam in dem erfindungsgemäßen Konjugat vorliegen.

Diese Binder-Wirkstoff-Konjugate können erfindungsgemäß aus den Verbindungen der Formel



wobei L die folgende Formel A‘ aufweist, hergestellt werden:

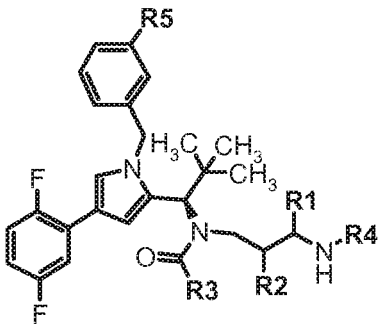


Formel A‘

Vorzugsweise erfolgt die Umsetzung von A‘ zu A durch Rühren in einem pH-Puffer mit einem pH-Wert von 7.5 bis 8.5, vorzugsweise 8, bei einer Temperatur unterhalb 37°C, vorzugsweise 10 bis 25 °C, über einen Zeitraum von bis zu 40 Stunden, vorzugsweise 1 bis 15 Stunden.

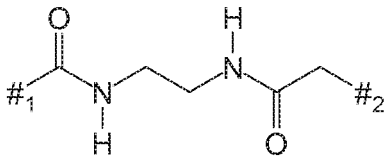
Ausführungsform I:

Ein Antikörper-Konjugat der Formel



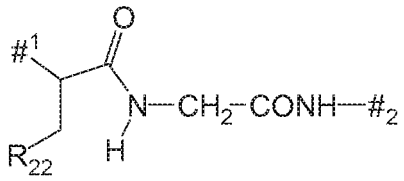
wobei
R2, R4 und R5H darstellen;
R3 –CH2OH darstellt;
R1 –L1-L2-BINDER darstellt, wobei

L1

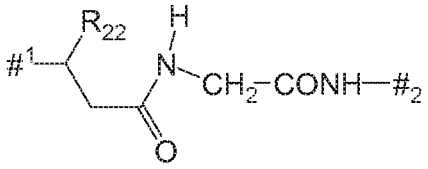


darstellt, wobei #2 die Verknüfung mit der L2 darstellt, und #1 die Verknüfung mit die andere Verknüpfung darstellt;

und L2 eine oder beide der folgenden Strukturen der Formeln A5 und A6 darstellt:



Formel A5



Formel A6

wobei

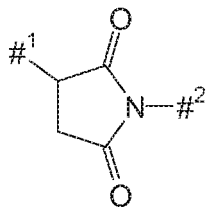
$\#^1$ die Verknüpfungsstelle mit dem Schwefelatom des Binders kennzeichnet,

$\#^2$ die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe L^1 kennzeichnet, und

R^{22} COOH, COOR, COR, CONHR (mit R jeweils C1-3-Alkyl), $CONH_2$, vorzugsweise COOH darstellt.

In einem erfindungsgemäßen Konjugat bzw. in einem Gemisch der erfindungsgemäßen Konjugate liegen die Bindungen an einen Cysteinrest des Binders vorzugsweise zu über 80 %, besonders bevorzugt zu über 90 % (jeweils bezogen auf die Gesamtanzahl von Bindungen des Linkers an den Binder), besonders bevorzugt in einer der beiden Strukturen der Formel A5 oder A6 vor:

Hierbei liegen die Strukturen der Formel A5 oder A6 in der Regel gemeinsam vor, vorzugsweise in einem Verhältnis von 60:40 bis 40:60 bezogen auf die Anzahl der Bindungen an den Binder. Die restlichen Bindungen liegen dann in der Struktur



vor.

Der Binder ist vorzugsweise ein Binderprotein oder –peptid, besonders bevorzugt ein humaner, humanisierter oder chimärer monoklonaler Antikörper oder ein Antigen-bindendes Fragment hiervon ist, insbesondere ein anti-TWEAKR-Antikörper oder ein Antigen-bindendes Fragment hiervon oder ein anti-EGFR-Antikörper oder ein Antigen-bindendes Fragment hiervon. Besonders bevorzugt sind ein anti-TWEAKR-Antikörper, der spezifisch an die Aminosäure D in Position 47 (D47) von TWEAKR (SEQ ID NO:169) bindet, insbesondere der anti-TWEAKR-Antikörper TPP-2090, oder die anti-EGFR-Antikörper Cetuximab oder Nimotuzumab. Alternativ zum Binder kann auch ein Cysteinrest vorliegen.

Therapeutische Verwendung

Zu den hyperproliferativen Erkrankungen, zu deren Behandlung die erfindungsgemäßen Verbindungen eingesetzt werden können, zählt insbesondere die Gruppe der Krebs- und Tumorerkrankungen. Hierunter werden im Rahmen der vorliegenden Erfindung insbesondere die folgenden Erkrankungen verstanden, ohne jedoch auf sie beschränkt zu sein: Brustkarzinome und Brusttumore (Mammakarzinome einschließlich ductaler und lobulärer Formen, auch *in situ*), Atemwegstumore (kleinzelliges und nicht-kleinzelliges Karzinom, Bronchialkarzinome), Hirntumore (z.B. des Hirnstamms und des Hypothalamus, Astrocytoma, Ependymoma, Glioblastoma, Gliome, Medulloblastoma, Meningiome sowie neuro-ektodermale und pineale Tumore), Tumore der Verdauungsorgane (Speiseröhren-, Magen-, Gallenblasen-, Dünndarm-, Dickdarm-, Rektum- und Analkarzinome), Lebertumore (u.a. hepatozelluläres Karzinom, Cholangiokarzinom und gemischt-hepatozelluläres Cholangiokarzinom), Tumore des Kopf- und Halsbereiches (Larynx-, Hypopharynx-, Nasopharynx-, Oropharynx-, Lippen- und Mundhöhlenkarzinome, orale Melanome), Hauttumore (Basaliome, Spinaliome, Plattenepithelkarzinome, Kaposi-Sarkom, maligne Melanome, nicht-melanomartiger Hautkrebs, Merkelzell-Hautkrebs, Mastzelltumore), Tumore des Stütz- und Bindegewebes (u.a. Weichteilsarkome, Osteosarkome, maligne fibröse Histiozytome, Chondrosarkome, Fibrosarkome, Hämangiosarkome, Leiomyosarkome, Liposarkome, Lymphosarkome und Rhabdomyosarkome), Tumore der Augen (u.a. intraokuläres Melanom und Retinoblastom), Tumore der endokrinen und exokrinen Drüsen (z.B. der thyroiden und parathyroiden Drüsen, Bauchspeicheldrüsen- und Speicheldrüsenkarzinome, Adenokarzinome), Tumore des Harntrakts (Blasen-, Penis-, Nieren-, Nierenbecken- und Harnleitertumore) sowie Tumore der reproduktiven Organe (Endometrium-, Zervix-, Ovarial-, Vaginal-, Vulva- und Uteruskarzinome der Frau sowie Prostata- und Hodenkarzinome des Mannes). Dazu gehören auch proliferative Erkrankungen des Blutes, des Lymphsystems und des Rückenmarks, in solider Form und als zirkulierende Zellen, wie Leukämien, Lymphome und myeloproliferative Erkran-

kungen, z.B. akute myeloide, akute lymphoblastische, chronisch-lymphozytische, chronisch-myelogene und Haarzell-Leukämie, sowie AIDS-korrelierte Lymphome, Hodgkin-Lymphome, Non-Hodgkin-Lymphome, kutane T-Zell-Lymphome, Burkitt-Lymphome und Lymphome im zentralen Nervensystem.

Diese gut charakterisierten Krankheiten des Menschen können mit vergleichbarer Ätiologie auch in anderen Säugetieren vorkommen und dort ebenfalls mit den Verbindungen der vorliegenden Erfindung behandelt werden.

Die Behandlung der zuvor genannten Krebserkrankungen mittels der erfindungsgemäßen Verbindungen umfasst sowohl eine Behandlung der soliden Tumore als auch eine Behandlung metastasierter oder zirkulierender Formen hiervon.

Der Begriff "Behandlung" oder "behandeln" wird im Rahmen dieser Erfindung konventionell verwendet und bedeutet die Versorgung, Pflege und Betreuung eines Patienten mit dem Ziel, eine Krankheit oder gesundheitliche Abweichung zu bekämpfen, zu verringern, abzuschwächen oder zu erleichtern und die Lebensbedingungen zu verbessern, die durch diese Krankheit beeinträchtigt werden, wie beispielsweise bei einer Krebserkrankung.

Weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit die Verwendung der erfindungsgemäßen Verbindungen zur Behandlung und/oder Prävention von Erkrankungen, insbesondere der zuvor genannten Erkrankungen.

Weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung der erfindungsgemäßen Verbindungen zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung und/oder Prävention von Erkrankungen, insbesondere der zuvor genannten Erkrankungen.

Weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung der erfindungsgemäßen Verbindungen in einem Verfahren zur Behandlung und/oder Prävention von Erkrankungen, insbesondere der zuvor genannten Erkrankungen.

Weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Behandlung und/oder Prävention von Erkrankungen, insbesondere der zuvor genannten Erkrankungen, unter Verwendung einer wirksamen Menge von mindestens einer der erfindungsgemäßen Verbindungen.

Die erfindungsgemäßen Verbindungen können allein oder bei Bedarf in Kombination mit einer oder mehreren anderen pharmakologisch wirksamen Substanzen eingesetzt werden, solange diese Kombination nicht zu unerwünschten und inakzeptablen Nebenwirkungen führt. Weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind daher Arzneimittel, enthaltend mindestens eine der erfindungsgemäßen

Verbindungen und einen oder mehrere weitere Wirkstoffe, insbesondere zur Behandlung und/oder Prävention der zuvor genannten Erkrankungen.

Beispielsweise können die Verbindungen der vorliegenden Erfindung mit bekannten anti-hyperproliferativen, zytostatischen oder zytotoxischen Substanzen zur Behandlung von Krebserkrankungen kombiniert werden. Als geeignete Kombinationswirkstoffe seien beispielhaft genannt:

131I-chTNT, Abarelix, Abirateron, Aclarubicin, Afatinib, Aflibercept, Aldesleukin, Alemtuzumab, Alisertib, Alitretinoin, Alpharadin (Radium-223-chlorid), Altretamin, Aminoglutethimid, AMP-514, Amrubicin, Amsacrin, Anastrozol, Arglabin, Arsentrioxid, Asparaginase, AT9283, Axitinib, Azacitidin, Basiliximab, Belotecan, Bendamustin, Bevacizumab, Bexaroten, Bicalutamid, Bisantren, Bleomycin, BMS-936559, Bosutinib, Bortezomib, Brentuximab vedotin, Buserelin, Busulfan, Cabazitaxel, Cabozantinib, Calciumfolinat, Calciumlevofolinat, Capecitabin, Carboplatin, Carfilzomib (proteasome inhibitor), Carmofur, Carmustin, Catumaxomab, Celecoxib, Celmoleukin, Cetuximab, Chlorambucil, Chlormadinon, Chlormethin, Cisplatin, Cladribin, Clodronsäure, Clofarabin, Copanlisib , Crisantaspase, Crizotinib, Cyclophosphamid, CYC116, Cyproteron, Cytarabin, Dacarbazin, Dactinomycin, Darbepoetin-alfa, Dabrafenib, Danusertib, Dasatinib, Daunorubicin, Decitabin, Degarelix, Denileukin-Diftitox, Denosumab, Deslorelin, Dibrospidiumchlorid, Docetaxel, Doxifluridin, Doxorubicin, Doxorubicin + Estron, Eculizumab, Edrecolomab, Elliptiniumacetat, Eltrombopag, Endostatin, ENMD-2076, Enocitabin, Epirubicin, Epitiostanol, Epoetin-alfa, Epoetin-beta, Eptaplatin, Eribulin, Erlotinib, Estradiol, Estramustin, Etoposid, Everolimus, Exemestan, Fadrozol, Filgrastim, Fludarabin, Fluoruracil, Flutamid, Formestan, Fotemustin, Fulvestrant, Galliumnitrat, Ganirelix, Gefitinib, Gemcitabin, Gemtuzumab, Glutoxim, Goserelin, Histamindihydrochlorid, Histrelin, Hydroxycarbamid, I-125-Seeds, Ibandronsäure, Ibritumomab-Tiuxetan, Ibrutinib, Idarubicin, Ifosfamid, Imatinib, Imiquimod, INCB24360, Improsulfan, Interferon-alfa, Interferon-beta, Interferon-gamma, Ipilimumab, Irinotecan, Ixabepilon, Lambrolizumab, Lanreotid, Lapatinib, Lenalidomid, Lenograstim, Lentinan, Letrozol, Leuprorelin, Levamisol, Lisurid, Lobaplatin, Lomustin, Lonidamin, Masoprocol, Medroxyprogesteron, Megestrol, Melphalan, Mepitiostan, Mercaptopurin, Methotrexat, Methoxsalen, Methylaminolevulinat, Methyltestosteron, Mifamurtid, Miltefosin, Miriplatin, Mitobronitol, Mitoguazon, Mitolactol, Mitomycin, Mitotan, Mitoxantron, MLN-8054, Mps1-Inhibitoren (offenbart in WO2013/087579, insbesondere Beispiel 01.01, WO2014/131739, insbesondere Beispiel 2), Nedaplatin, Nelarabin, Nemorubicin, Nilotinib, Nilutamid, Nimotuzumab, Nimustin, Nitracrin, Nivolumab, NMS-P715, NMS-P937, Ofatumumab, Omeprazol, Oprelvekin, Oxaliplatin, p53-Gentherapie, Paclitaxel, Palbociclib, Palifermin, Palladium-103-Seed, Pamidronsäure, Panitumumab, Pazopanib, Pegaspargase, PEG-epoetin-beta (Methoxy-PEG-epoetin-beta), Pegfilgrastim, Peg-interferon-alfa-2b, Pemetrexed, Pentazocin, Pentostatin, Peplomycin, Perfosfamid, Picibanil, Pirarubicin, Plerixafor, Plicamycin, Poliglusam, Polyestradiolphosphat, Polysaccharid-K, Ponatinib, Porfimer-Natrium, Pralatrexat, Prednimustin,

Procarbazin, Quinagolid, , R763, Raloxifen, Raltitrexed, Ranimustin, Razoxan, Refametinib (, Regorafenib, Risedronsäure, Rituximab, Romidepsin, Romiplostim, Roninciclib, Ruxolitinib, Sargramostim, Sipuleucel-T, Sizofiran, Sobuzoxan, Natriumglycididazol, SNS-314, Sorafenib, Streptozocin, Sunitinib, Talaporfin, Tamibaroten, Tamoxifen, Tasonermin, Teceleukin, Tegafur, Tegafur + Gimeracil + Oteracil, Temoporfin, Temozolomid, Temsirolimus, Teniposid, Testosteron, Tetrofosmin, Thalidomid, Thiotepa, Thymalfasin, TKM-PLK1, Tioguanin, Tocilizumab, Topotecan, Toremifen, Tositumomab, Tozasertib, Trabectedin, Trametinib, Trastuzumab, Trastuzumab emtansine, Treosulfan, Tretinoin, Trilostan, Triptorelin, Trofosfamid, Tryptophan, Ubenimex, Valrubicin, Vandetanib, Vapreotid, Vemurafenib, Vinblastin, Vincristin, Vindesin, Vinflunin, Vinorelbin, Volasertib, Vorinostat, Vorozol, XL228, Yttrium-90-Glasmikrokugeln, Zinostatin, Zinostatin-Stimalamer, Zoledronsäure, Zorubicin.

Darüber hinaus können die Verbindungen der vorliegenden Erfindung beispielsweise mit Bindern kombiniert werden, die beispielhaft an die folgenden Targets binden können: OX-40, CD137/4-1BB, DR3, IDO1/IDO2, LAG-3, CD40.

Darüber hinaus können die erfindungsgemäßen Verbindungen auch in Kombination mit einer Strahlentherapie und/oder einer chirurgischen Intervention eingesetzt werden.

Generell können mit der Kombination von Verbindungen der vorliegenden Erfindung mit anderen, zytostatisch oder zytotoxisch wirksamen Agenzien folgende Ziele verfolgt werden:

- eine verbesserte Wirksamkeit bei der Verlangsamung des Wachstums eines Tumors, bei der Reduktion seiner Größe oder sogar bei seiner völligen Eliminierung im Vergleich zu einer Behandlung mit einem einzelnen Wirkstoff;
- die Möglichkeit, die verwendeten Chemotherapeutika in geringerer Dosierung als bei der Monotherapie einzusetzen;
- die Möglichkeit einer verträglicheren Therapie mit weniger Nebeneffekten im Vergleich zur Einzelgabe;
- die Möglichkeit zur Behandlung eines breiteren Spektrums von Tumorerkrankungen;
- das Erreichen einer höheren Ansprechrate auf die Therapie;
- eine längere Überlebenszeit der Patienten im Vergleich zur heutigen Standardtherapie.

Darüber hinaus können die erfindungsgemäßen Verbindungen auch in Kombination mit einer Strahlentherapie und/oder einer chirurgischen Intervention eingesetzt werden.

Weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Arzneimittel, die mindestens eine erfindungsgemäße Verbindung, üblicherweise zusammen mit einem oder mehreren inerten, nichttoxischen, pharmazeutisch geeigneten Hilfsstoffen enthalten, sowie deren Verwendung zu den zuvor genannten Zwecken.

Die erfindungsgemäßen Verbindungen können systemisch und/oder lokal wirken. Zu diesem Zweck können sie auf geeignete Weise appliziert werden, wie beispielsweise, parenteral, möglicherweise inhalativ oder als Implantat bzw. Stent.

Für diese Applikationswege können die erfindungsgemäßen Verbindungen in geeigneten Applikationsformen verabreicht werden.

Die parenterale Applikation kann unter Umgehung eines Resorptionsschrittes geschehen (z.B. intravenös, intraarteriell, intrakardial, intraspinal oder intralumbal) oder unter Einschaltung einer Resorption (z.B. . intramuskulär, subkutan, intrakutan, perkutan oder intraperitoneal). Für die parenterale Applikation eignen sich als Applikationsformen u.a. Injektions- und Infusionszubereitungen in Form von Lösungen, Suspensionen, Emulsionen oder Lyophilisaten. Bevorzugt ist die parenterale Applikation, insbesondere die intravenöse Applikation.

Im Allgemeinen hat es sich als vorteilhaft erwiesen, bei parenteraler Applikation Mengen von etwa 0.001 bis 1 mg/kg, vorzugsweise etwa 0.01 bis 0.5 mg/kg Körpergewicht zur Erzielung wirksamer Ergebnisse zu verabreichen.

Trotzdem kann es gegebenenfalls erforderlich sein, von den genannten Mengen abzuweichen, und zwar in Abhängigkeit von Körpergewicht, Applikationsweg, individuellem Verhalten gegenüber dem Wirkstoff, Art der Zubereitung und Zeitpunkt bzw. Intervall, zu welchem die Applikation erfolgt. So kann es in einigen Fällen ausreichend sein, mit weniger als der vorgenannten Mindestmenge auszukommen, während in anderen Fällen die genannte obere Grenze überschritten werden muss. Im Falle der Applikation größerer Mengen kann es empfehlenswert sein, diese in mehreren Einzelgaben über den Tag zu verteilen.

Beispiele

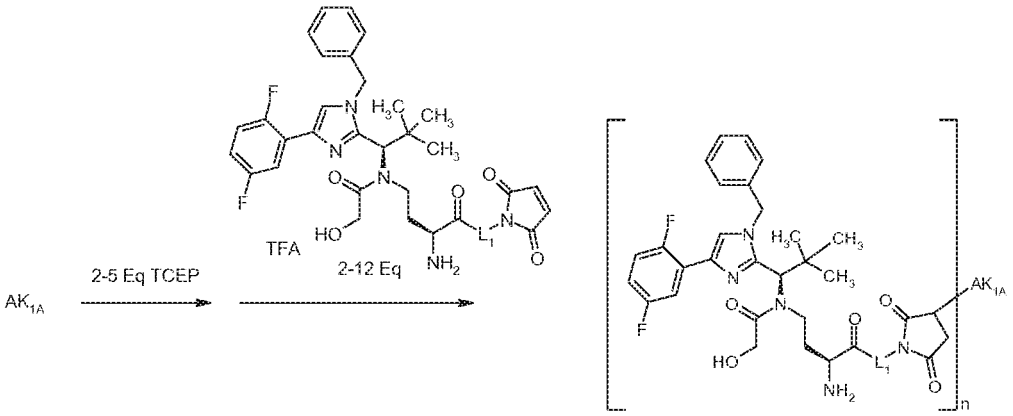
Die nachfolgenden Beispiele erläutern die Erfindung. Die Erfindung ist nicht auf die Beispiele beschränkt.

Die Prozentangaben in den folgenden Tests und Beispielen sind, sofern nicht anders angegeben, Gewichtsprozente; Teile sind Gewichtsteile. Lösungsmittelverhältnisse, Verdünnungsverhältnisse und Konzentrationsangaben von flüssig/flüssig-Lösungen beziehen sich jeweils auf das Volumen.

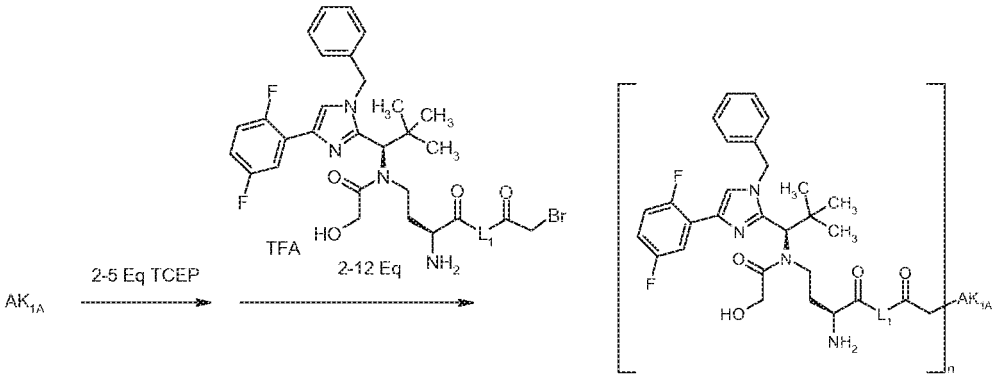
Synthesewege:

Exemplarisch für die Ausführungsbeispiele sind in folgenden Schemata beispielhafte Synthesewege zu den Ausführungsbeispielen dargestellt:

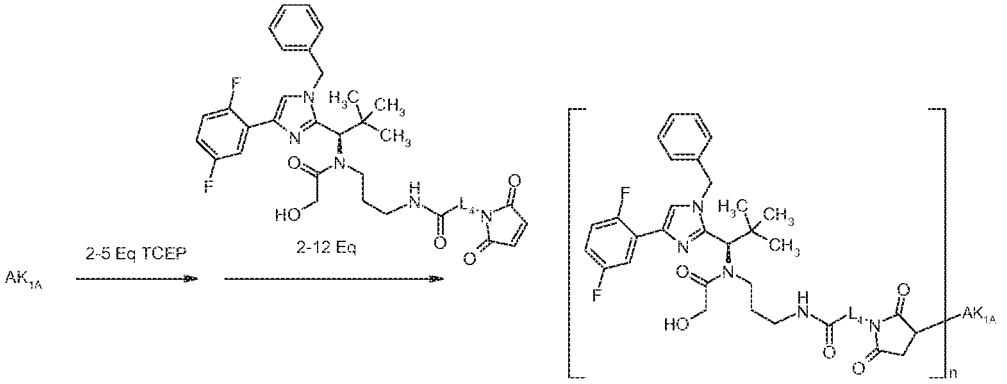
Schema 1: Synthese von Cystein-verknüpften ADCs



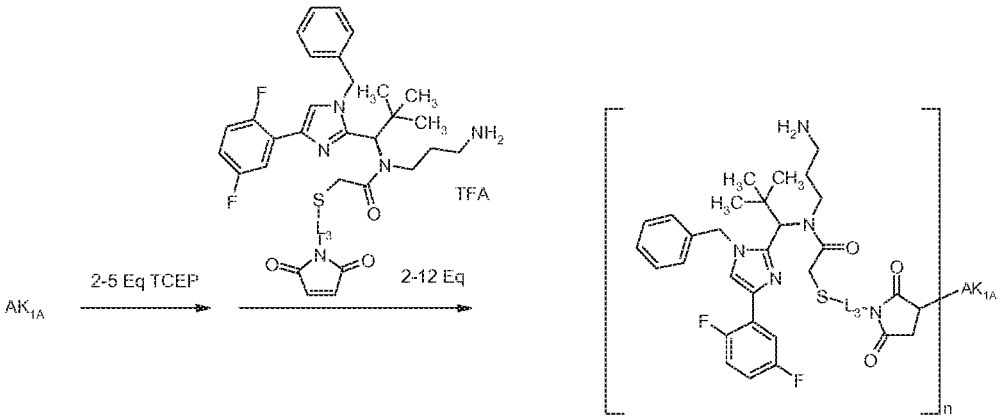
Schema 2: Synthese von Cystein-verknüpften ADCs



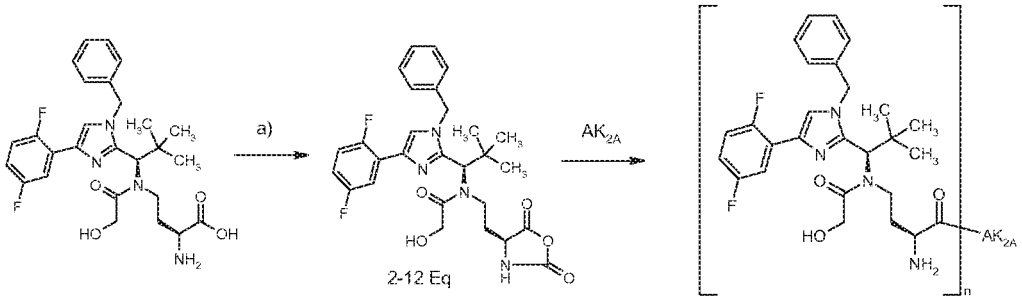
Schema 3: Synthese von Cystein-verknüpften ADCs



Schema 4: Synthese von Cystein-verknüpften ADCs

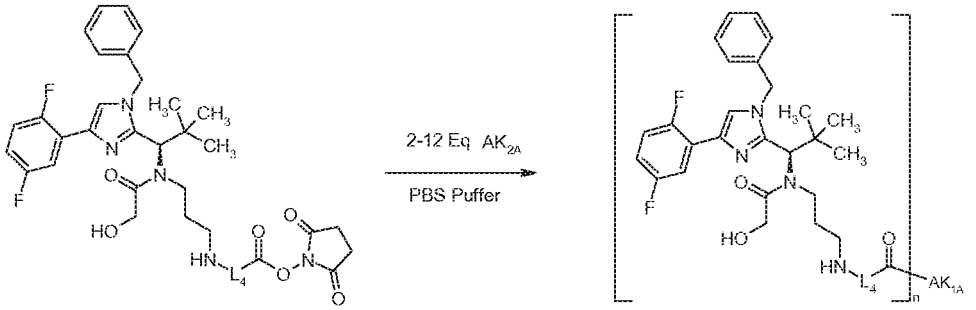


Schema 5: Synthese von Lysin-verknüpften ADCs

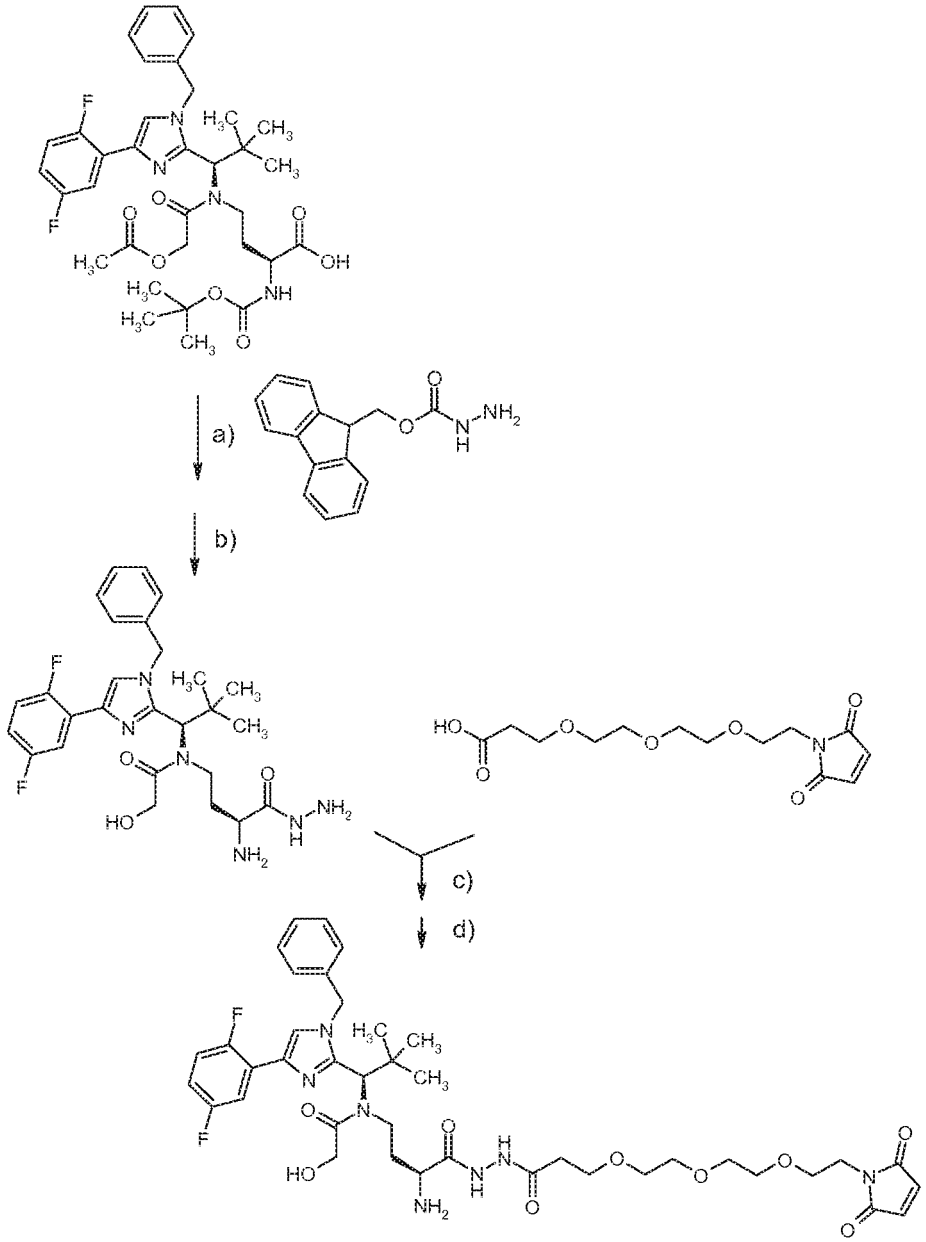


a) Triphosgen, THF, unter Argon

Schema 6: Synthese von Lysin-verknüpften ADCs

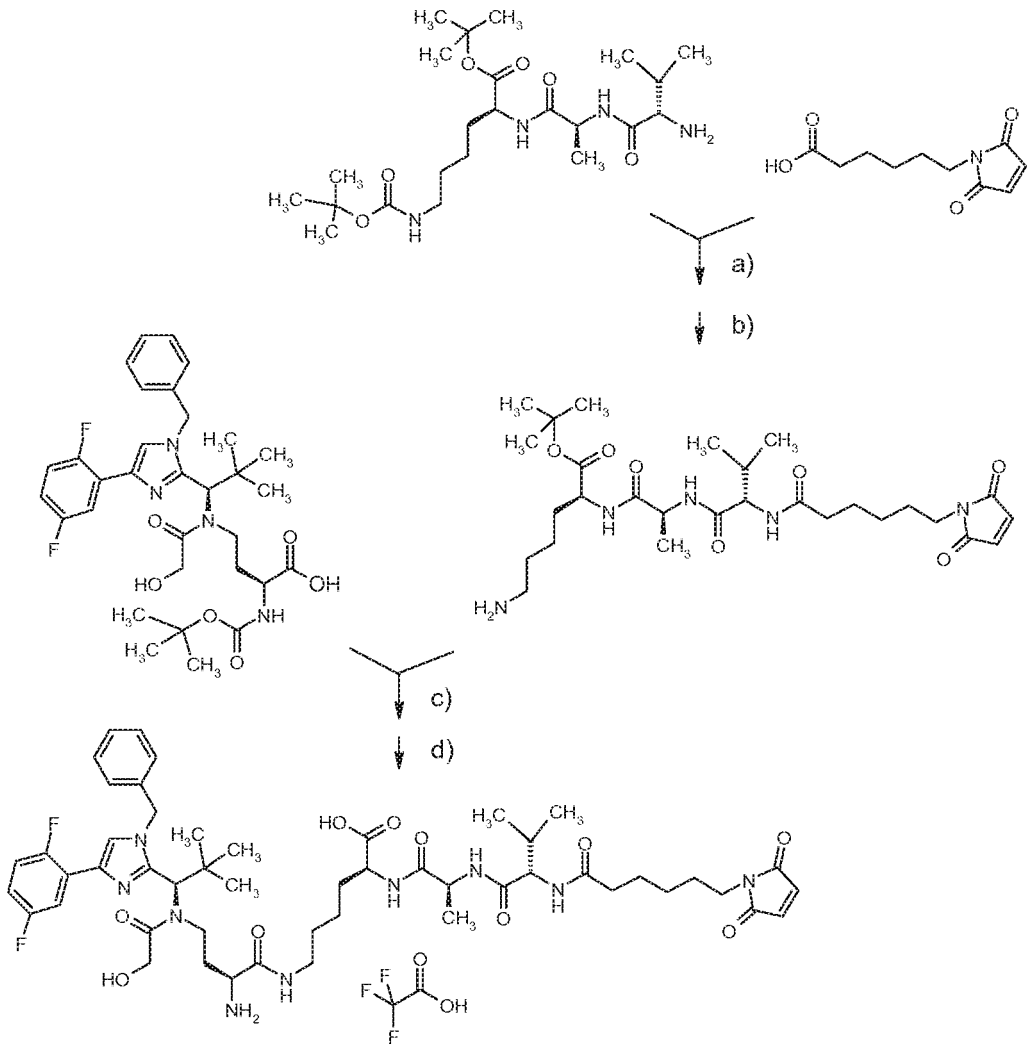


Schema 7



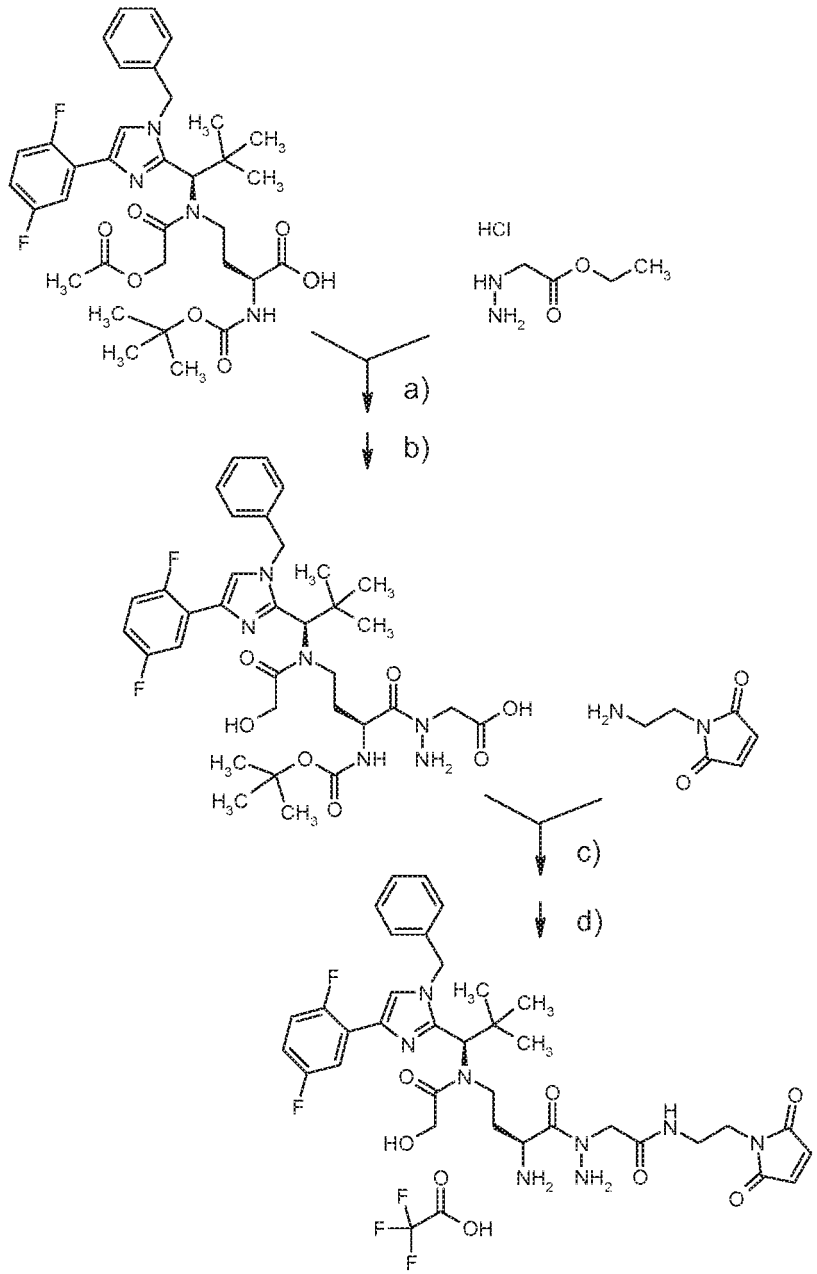
[a): EDCI, HOBT, Diisopropylethylamin, RT; b) Ethanol, Piperidin, Methylamin, Wasser, RT; c) HATU, Diisopropylethylamin, RT; d) TFA, DCM, RT]

Schema 8



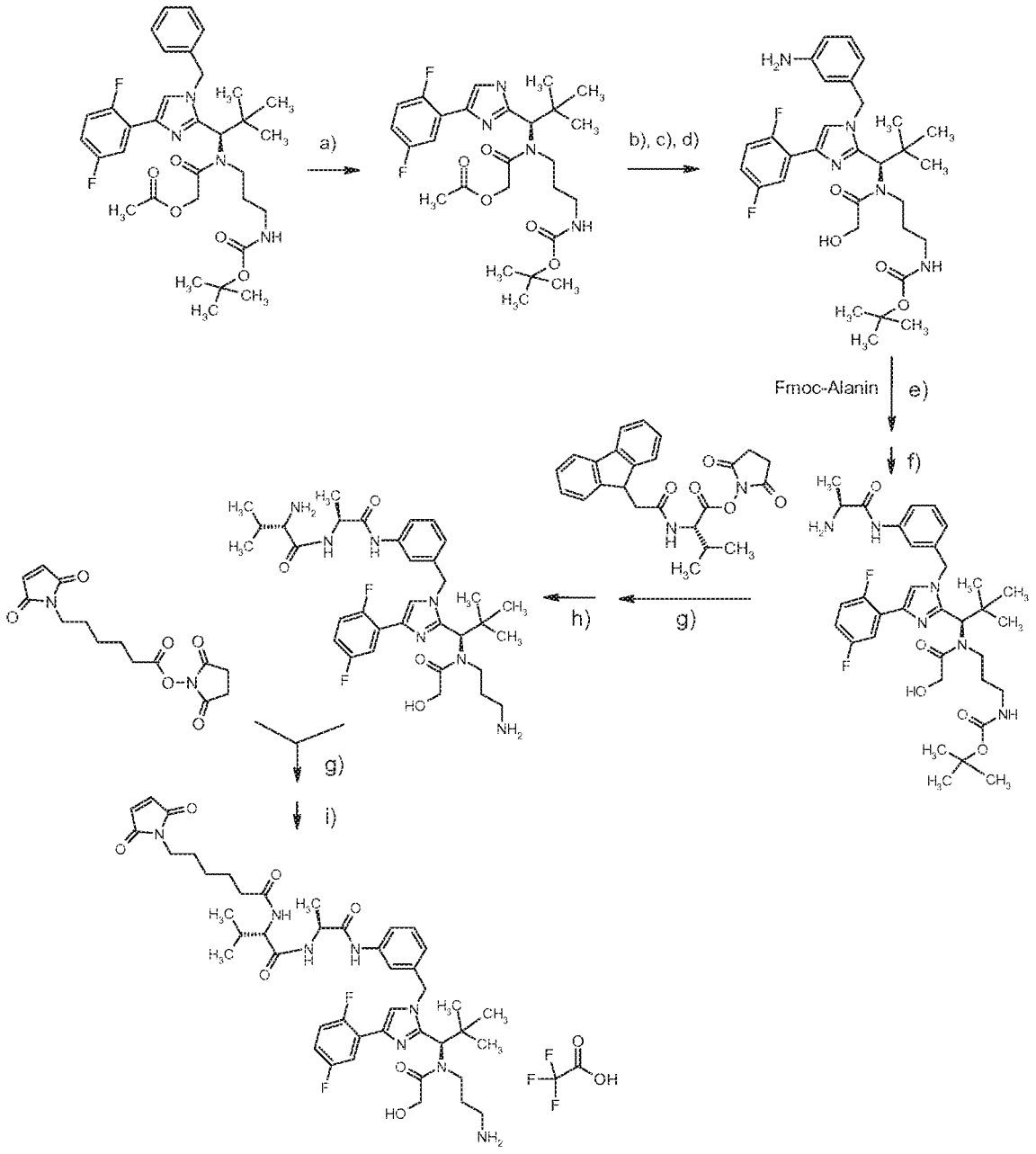
[a): beispielsweise EDCI, HOBT, Diisopropylethylamin, DMF, RT; b) beispielsweise DCM/TFA 20:1, RT; c) beispielsweise HATU, Diisopropylethylamin, DMF, RT; d) beispielsweise TFA, DCM, RT]

Schema 9



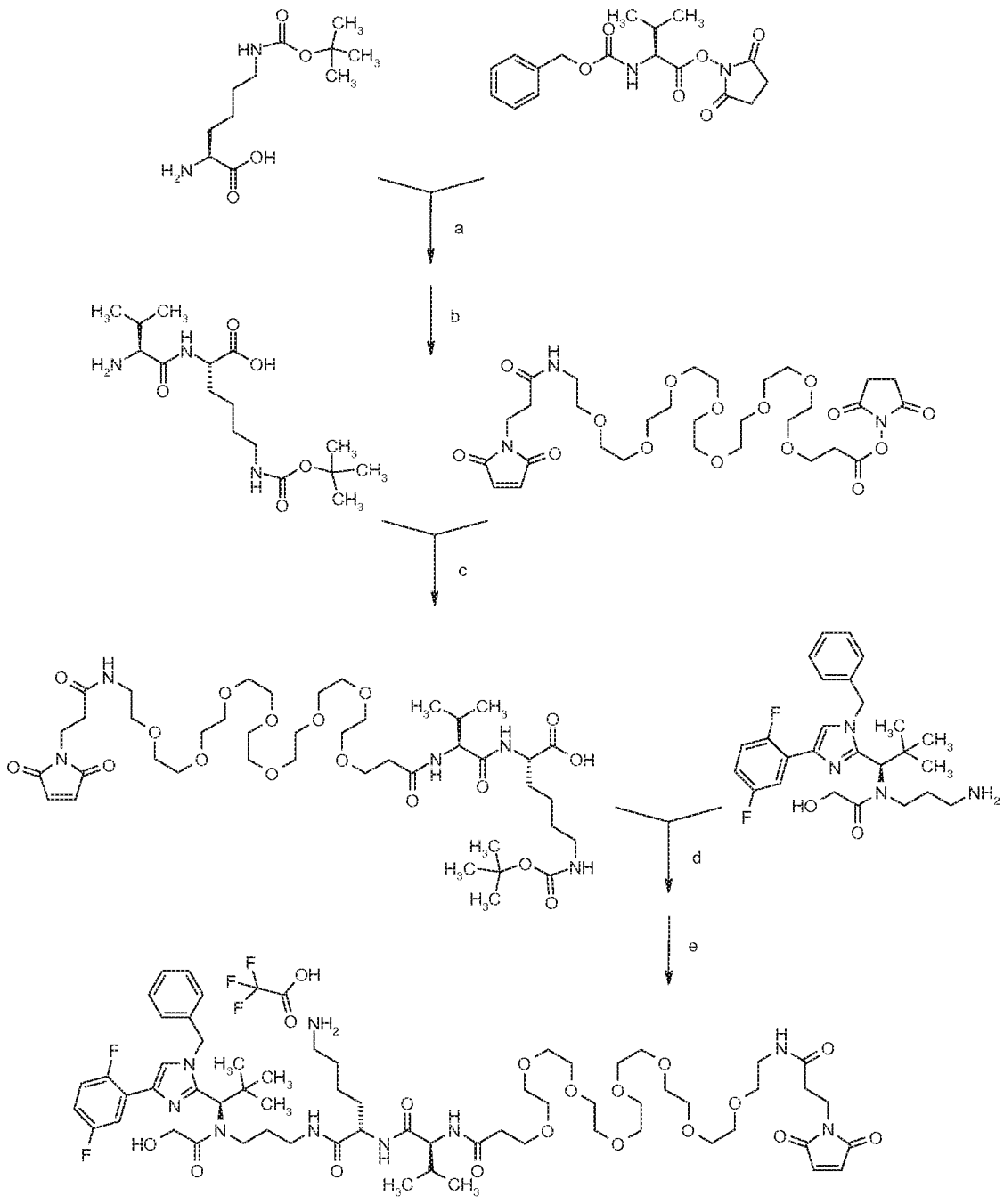
[a): beispielsweise 2-Bromo-1-ethylpyridinium tetrafluoroborate, Diisopropylethylamin, DCM, RT; b) beispielsweise 2M LiOH-Lösung, THF, Wasser, RT, HPLC-Trennung der Regiosisomeren; c) beispielsweise EDCI, HOBT, Diisopropylethylamin, DMF, RT; d) beispielsweise TFA, DCM, RT]

Schema 10



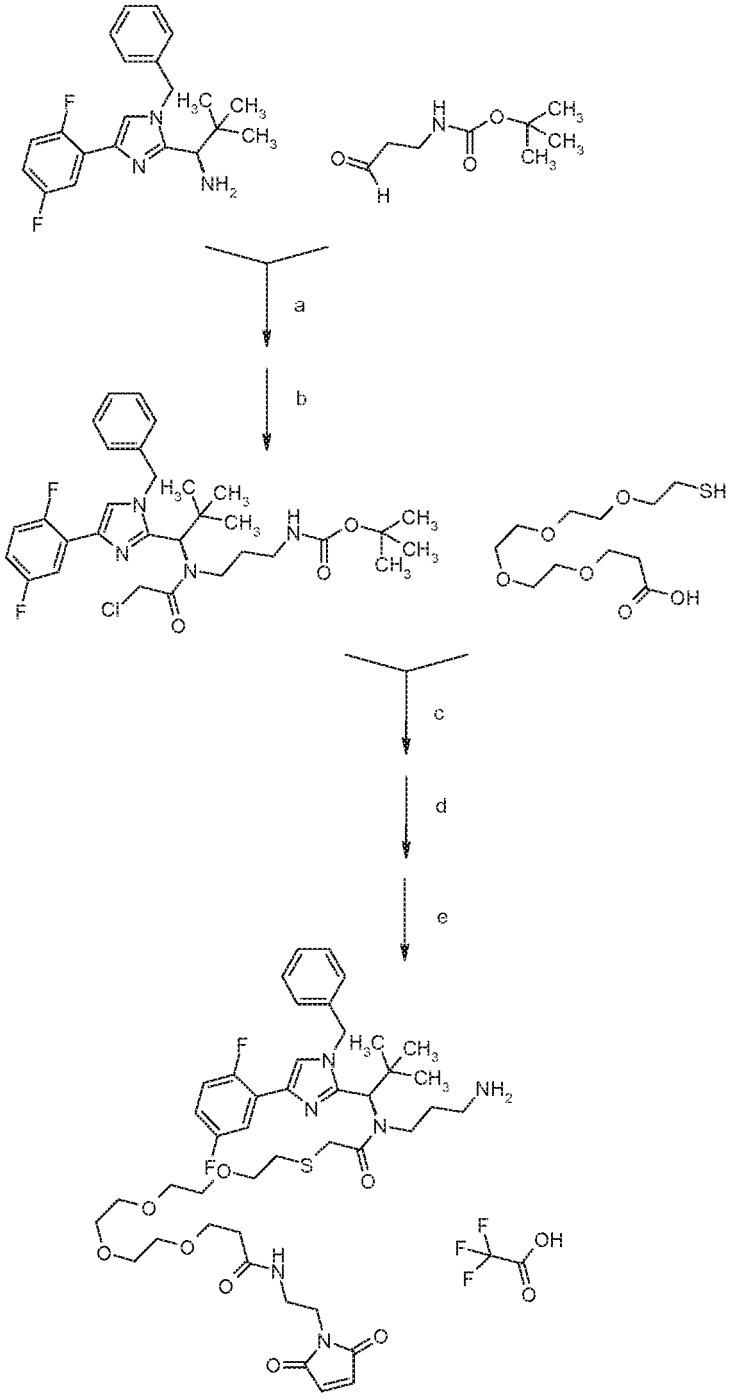
[a): beispielsweise H_2, Pd-C, EtOH, RT; b) beispielsweise p-Nitrobenzylbromid, K_2CO_3, DMF; c) beispielsweise Ethanol, 40%-ige Methylaminlösung in Wasser, 50 °C; d) beispielsweise Dinatriumdithionit, THF, Wasser, 50 °C; e) beispielsweise HATU, Diisopropylethylamin, DMF, RT; f) beispielsweise Piperidin, 40%-ige Methylaminlösung in Wasser, Ethanol, 50 °C; g) beispielsweise Diisopropylethylamin, DMF, RT; h) beispielsweise Piperidin, DMF, RT; i) TFA, DCM, RT]

Schema 11



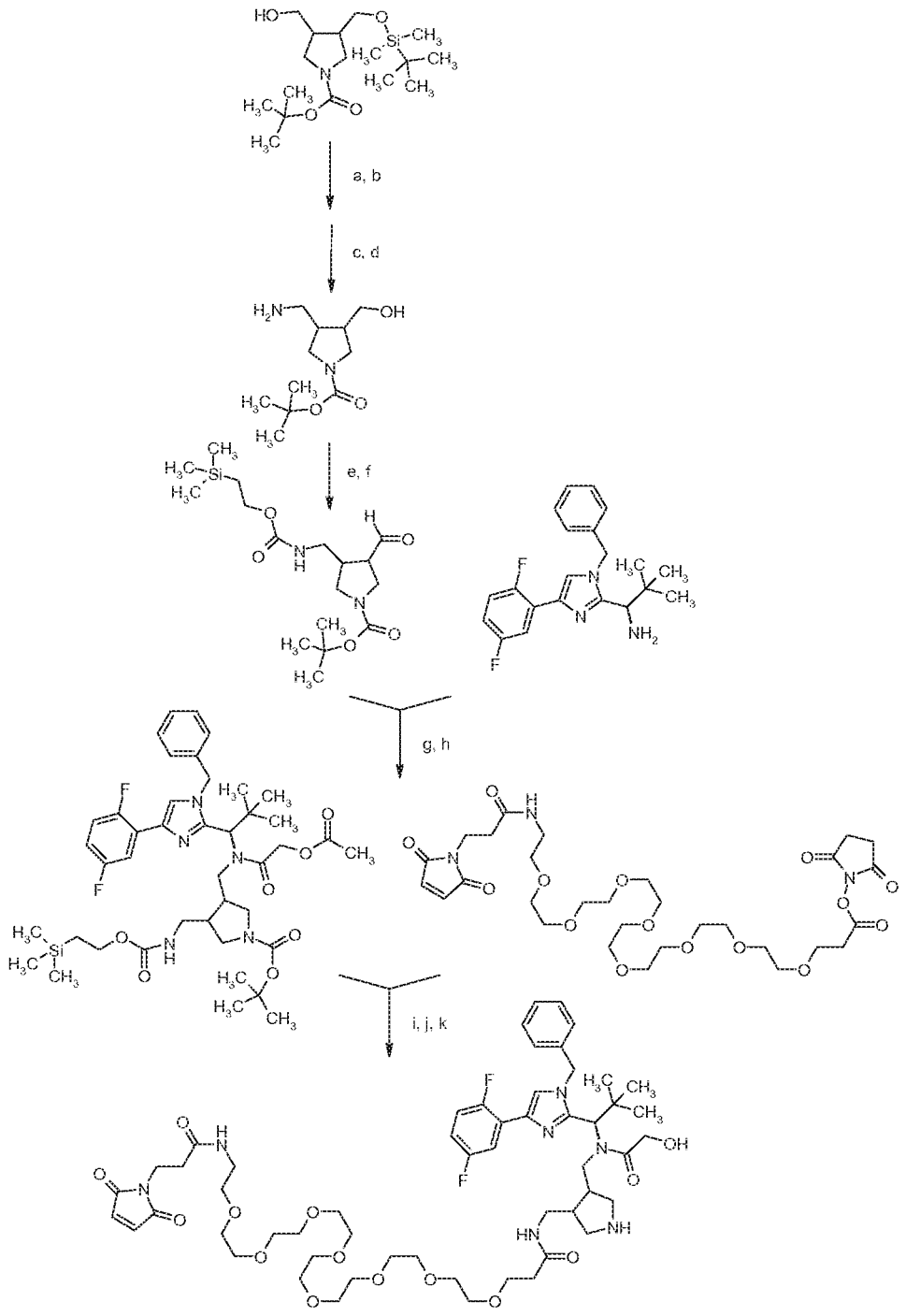
[a): beispielsweise Et_3N, DMF, RT; b) beispielsweise H_2, Pd-C, EtOH/Ethylacetat/THF (1:1:1), RT; c) beispielsweise 4-Methylmorpholin, DMF, RT; d) beispielsweise HATU, HOAt, Diisopropylethylamin, DMF, RT; e) beispielsweise TFA, RT]

Schema 12



[a): beispielsweise $NaBH(OAc)_3$, HOAc, Dichlormethan, RT; b) beispielsweise Chloracetylchlorid, NEt_3, DCM, RT; c) beispielsweise Cs_2CO_3, DMF, 50 °C; d) beispielsweise 1-(2-Aminoethyl)-1H-pyrrol-2,5-dionhydrochlorid(1:1), T3P(R), Diisopropylethylamin, MeCN, RT; e) beispielsweise TFA, RT]

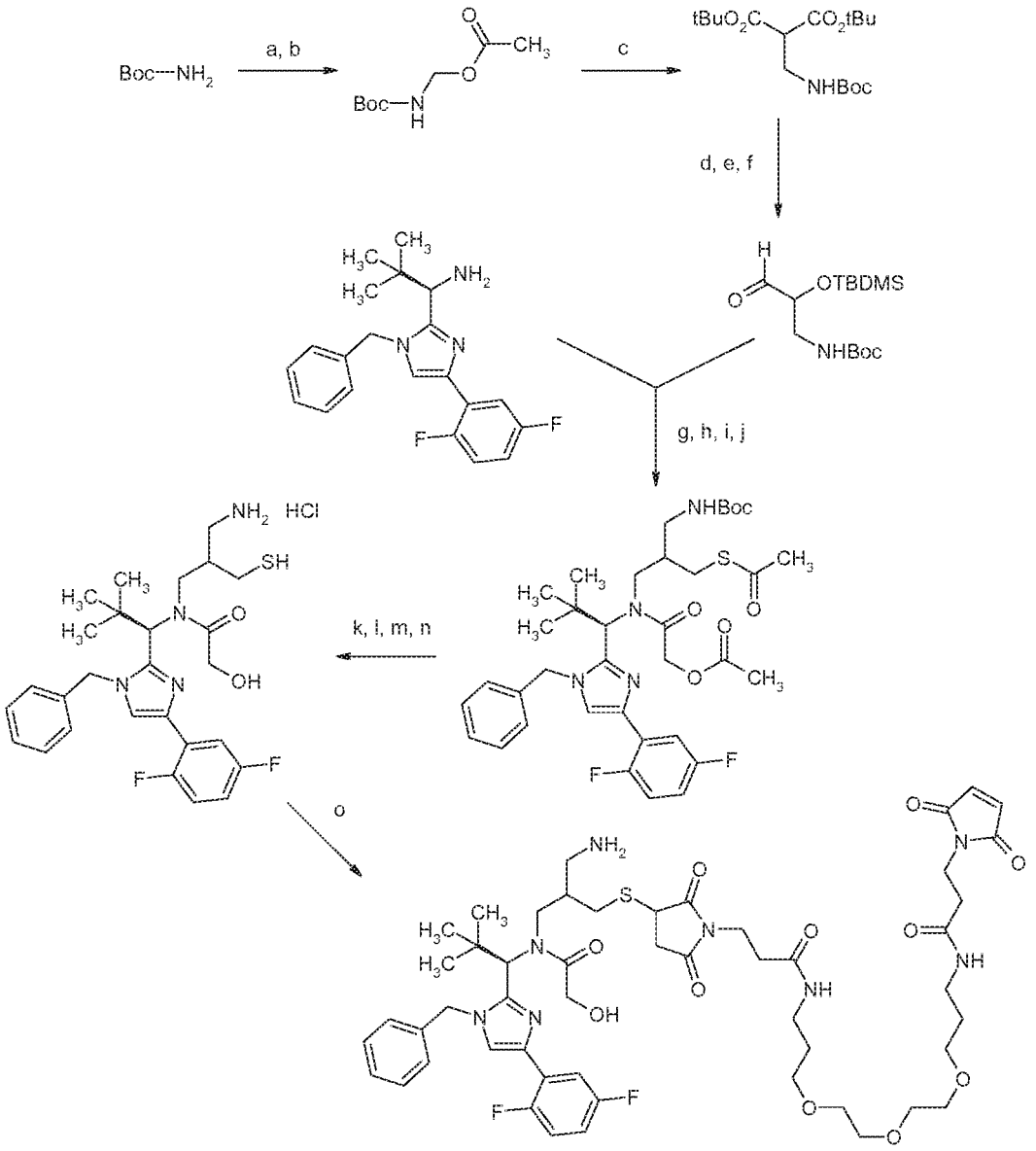
Schema 13



[a]: beispielsweise Methansulfonsäurechlorid, NEt_3, Dichlormethan, 0 °C; b) beispielsweise NaN_3, DMF, 40 °C; c) beispielsweise H_2, Pd-C, EtOH/Ethylacetat (1:1), RT; d) beispielsweise TBAF, THF, RT; e) beispielsweise 1-({[2-(Trimethylsilyl)ethoxy]carbonyl}oxy)pyrrolidin-2,5-dion, NEt_3, $CaCO_3$, 1,4-Dioxan, RT; f) beispielsweise N-Chlorsuccinimid, TEMPO, Tetra-n-butylammoniumchlorid,

Chloroform, 0.05 N Kaliumcarbonat/0.05 N Natriumhydrogencarbonat-Lösung (1:1); g) beispielsweise $NaBH(OAc)_3$, HOAc, Dichlormethan, RT; h) beispielsweise Chloracetylchlorid, NEt_3, DCM, RT; i) beispielsweise TBAF, THF, Wasser, RT; j) beispielsweise 4-Methylmorpholin, DMF, RT; k) beispielsweise TFA, RT]

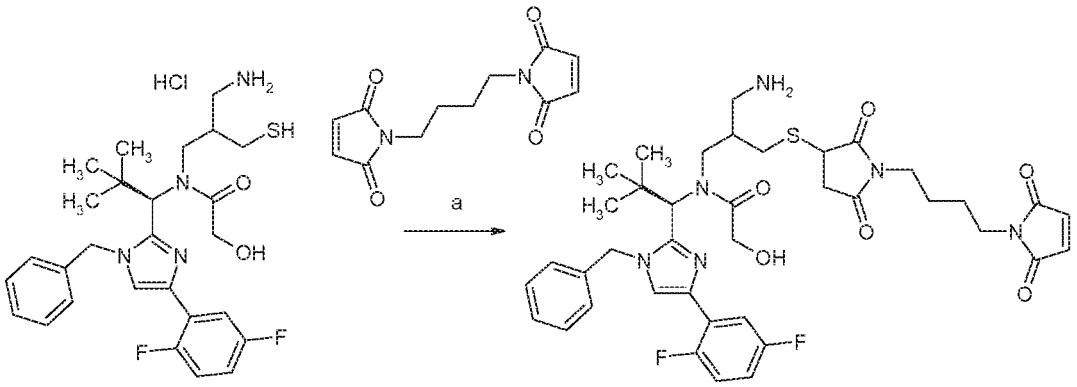
Schema 14



[a): beispielsweise Formaldehyd, Na_2CO_3, Wasser, RT; b) beispielsweise Ac_2O, Pyridin, THF, RT; c) beispielsweise Di-tert-butylmalonat, KOtBu, THF, RT; d) beispielsweise $LiBH_4$, THF, RT; e) beispielsweise TBDMSCl, Imidazol, DCM, RT; f) beispielsweise Dess-Martin-Periodinan, DCM; g)

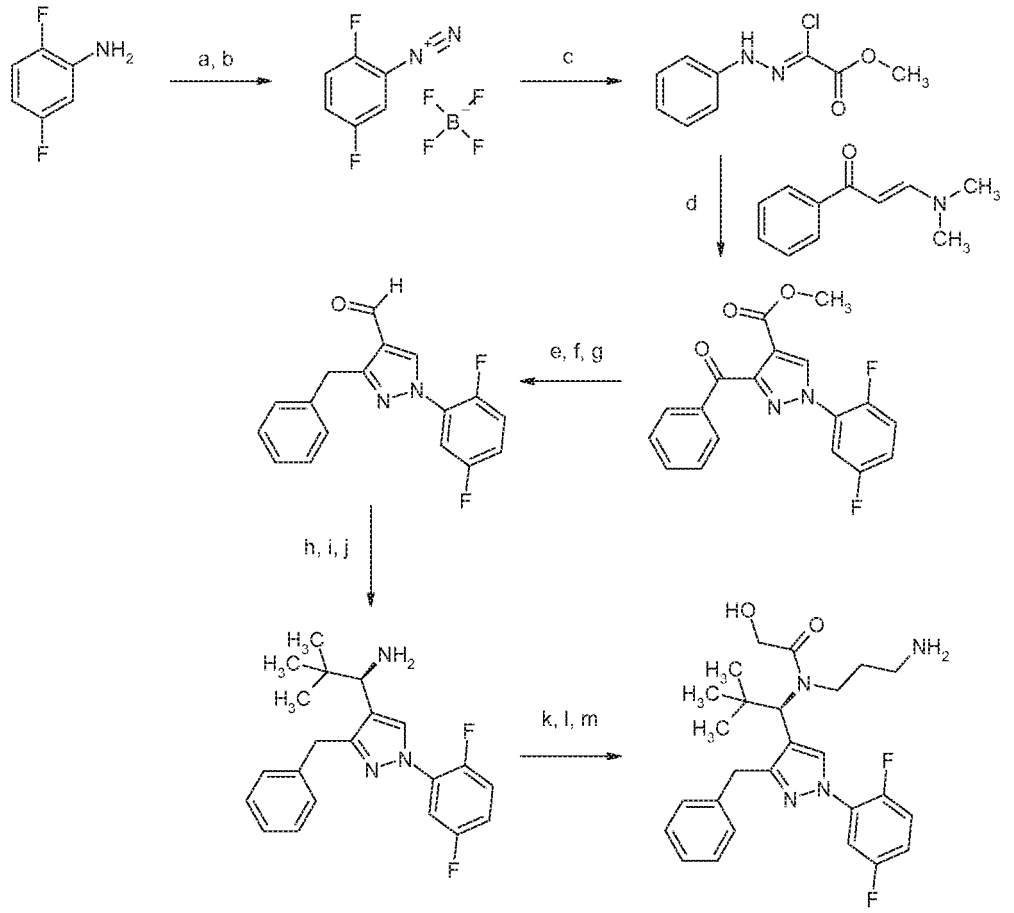
beispielsweise Natriumtriacetoxyborhydrid, AcOH, DCM, RT; h) beispielsweise nBu_4NF, THF, RT; i) beispielsweise $SOCl_2$, THF, RT; j) beispielsweise AcSK, nBu_4NI, DMF, 90°C; k) beispielsweise NaOH, MeOH, THF, RT; l) beispielsweise TCEP, Dioxan, RT; m) beispielsweise Trennung der Epimere; n) beispielsweise 6N Salzsäure, THF, RT o) beispielsweise Mal-dPEG(3)-Mal, PBS-Puffer, ACN, RT]

Schema 15



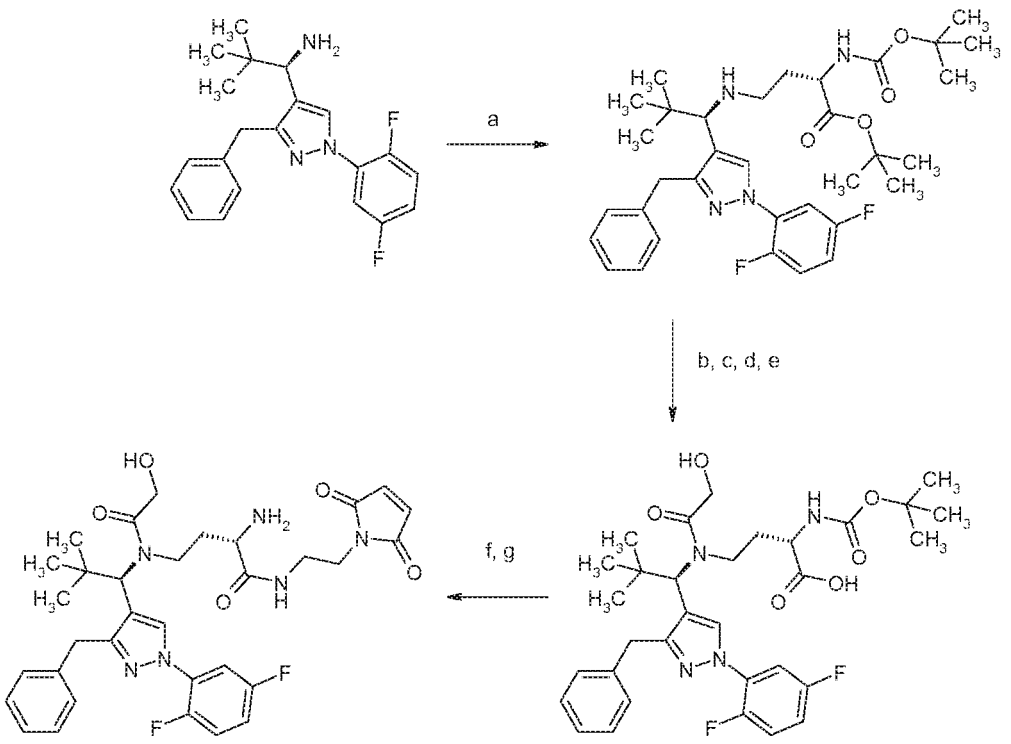
[a): beispielsweise Mal-dPEG(3)-Mal, PBS-Puffer, ACN, RT]

Schema 16



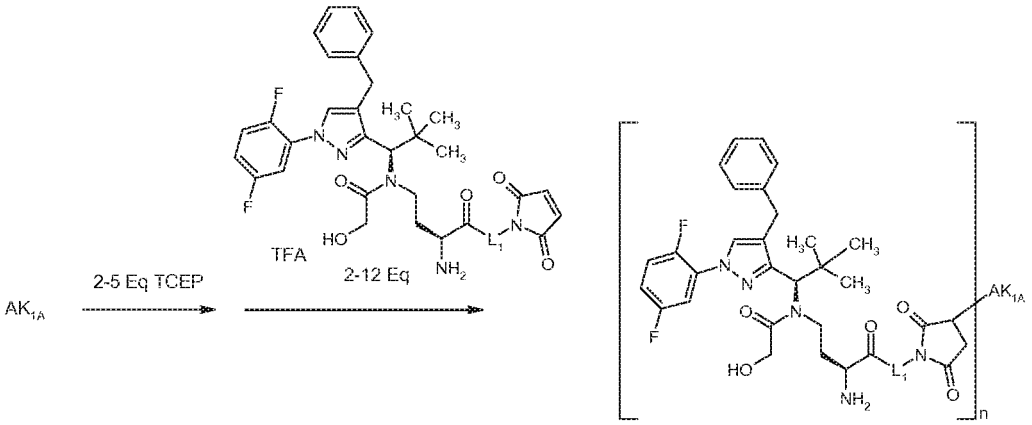
[a): beispielsweise BF_3OEt_2, THF, 0°C; b): beispielsweise Isoamylnitrit, -10°C, 0.5 h; c): beispielsweise Methyl-2-chlor-3-oxobutanoat, Pyridin, Wasser, -5°C; d): beispielsweise NEt_3, Toluol, RT; e): beispielsweise Et_3SiH, TFA, RT; f): beispielsweise $LiBH_4$, THF, 60°C; g): beispielsweise Dess-Martin-Periodinan, DCM, RT; h): beispielsweise (R)-(+)-Methyl-2-propansulfinsäureamid, Titan(IV)isopropylat, THF, RT; i): beispielsweise tert-BuLi, Pentan, THF, -78°C; j): beispielsweise HCl in Dioxan, THF, MeOH, RT; k): beispielsweise 3-(1,3-Dioxo-1,3-dihydro-2H-isoindol-2-yl)propanal, $NaB(OAc)_3H$, AcOH, DCM, RT; l): beispielsweise 2-Chlor-2-oxoethylacetat, NEt_3, DCM, RT; m): beispielsweise Methylamin, Wasser, EtOH, 50°C]

Schema 17

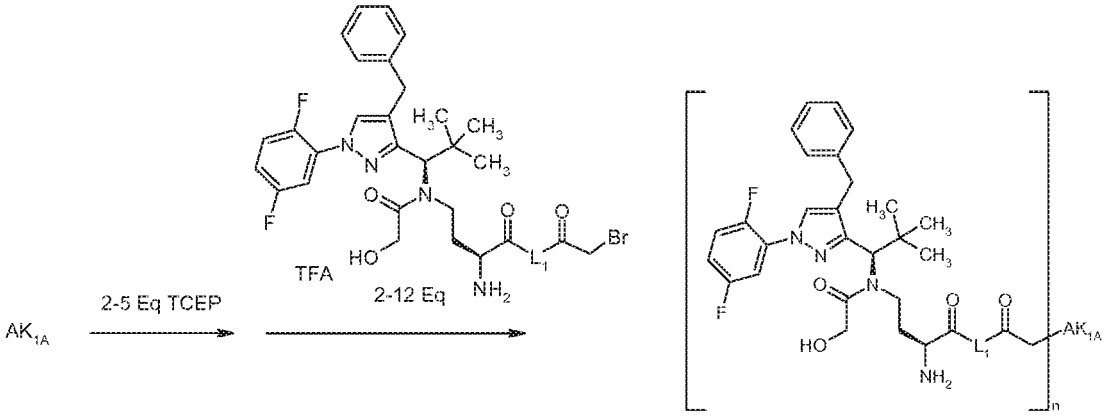


[a): beispielsweise tert-Butyl-N-(tert-butoxycarbonyl)-5-oxo-L-norvalinat, $NaB(OAc)_3H$, AcOH, DCM, RT; b): beispielsweise 2-Chlor-2-oxoethylacetat, NEt_3, DCM, RT; c): beispielsweise Methylamin, Wasser, EtOH, 60°C; d): beispielsweise THF, DCM, 50°C; e): beispielsweise Boc_2O, NEt_3, DCM, RT; f): beispielsweise Trifluoressigsäure-1-(2-aminoethyl)-1H-pyrrol-2,5-dion(1:1), HATU, Diisopropylethylamin, DMF, RT; f): beispielsweise TFA, DCM, RT]

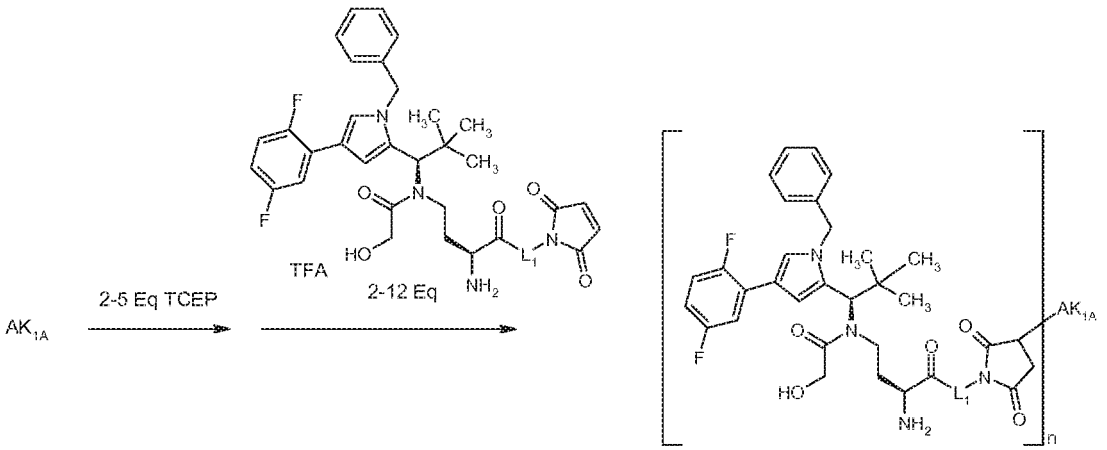
Schema 18: Synthese von Cystein-verknüpften ADCs



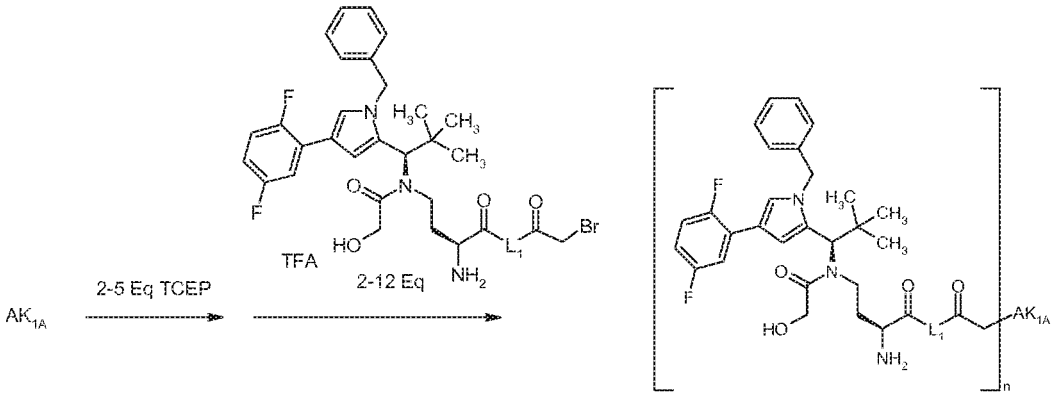
Schema 19: Synthese von Cystein-verknüpften ADCs



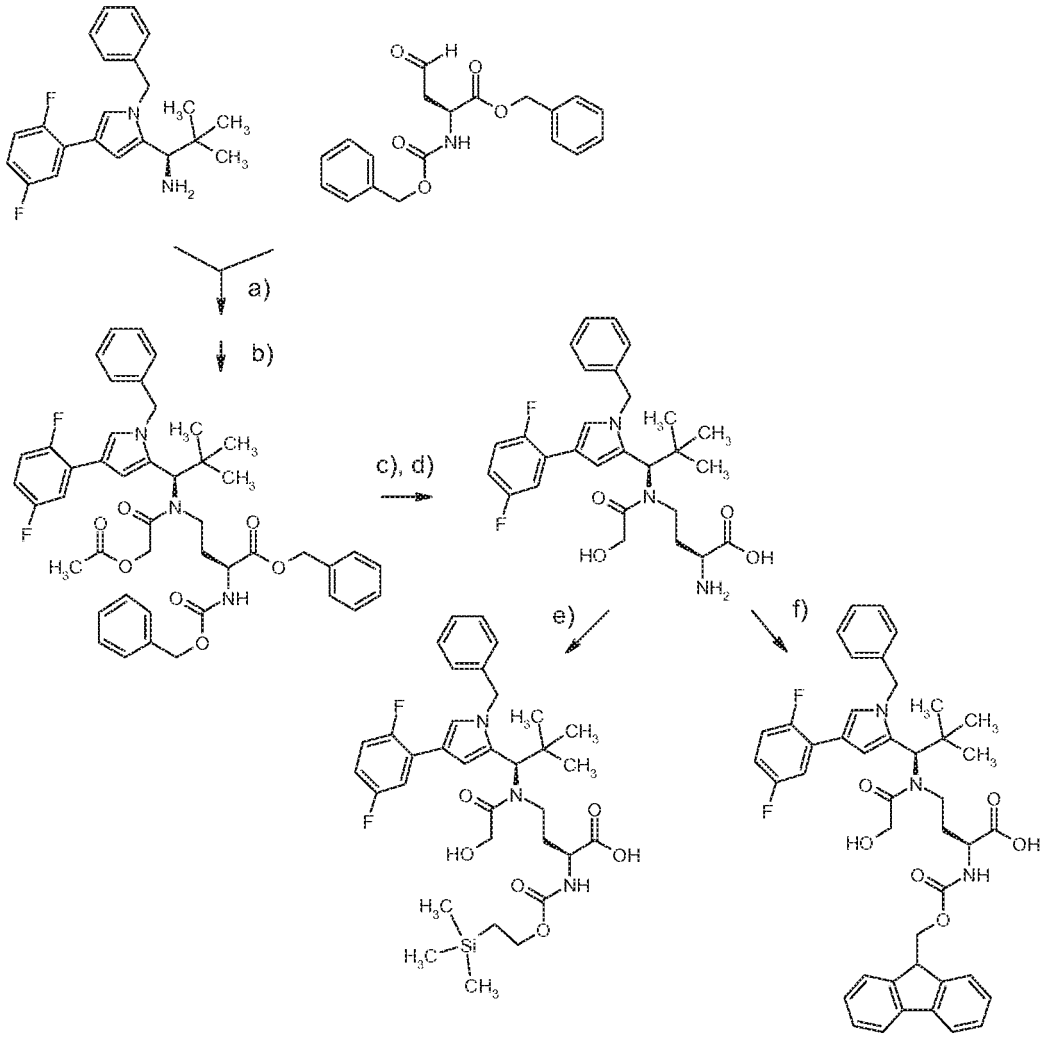
Schema 20: Synthese von Cystein-verknüpften ADCs



Schema 21: Synthese von Cystein-verknüpften ADCs



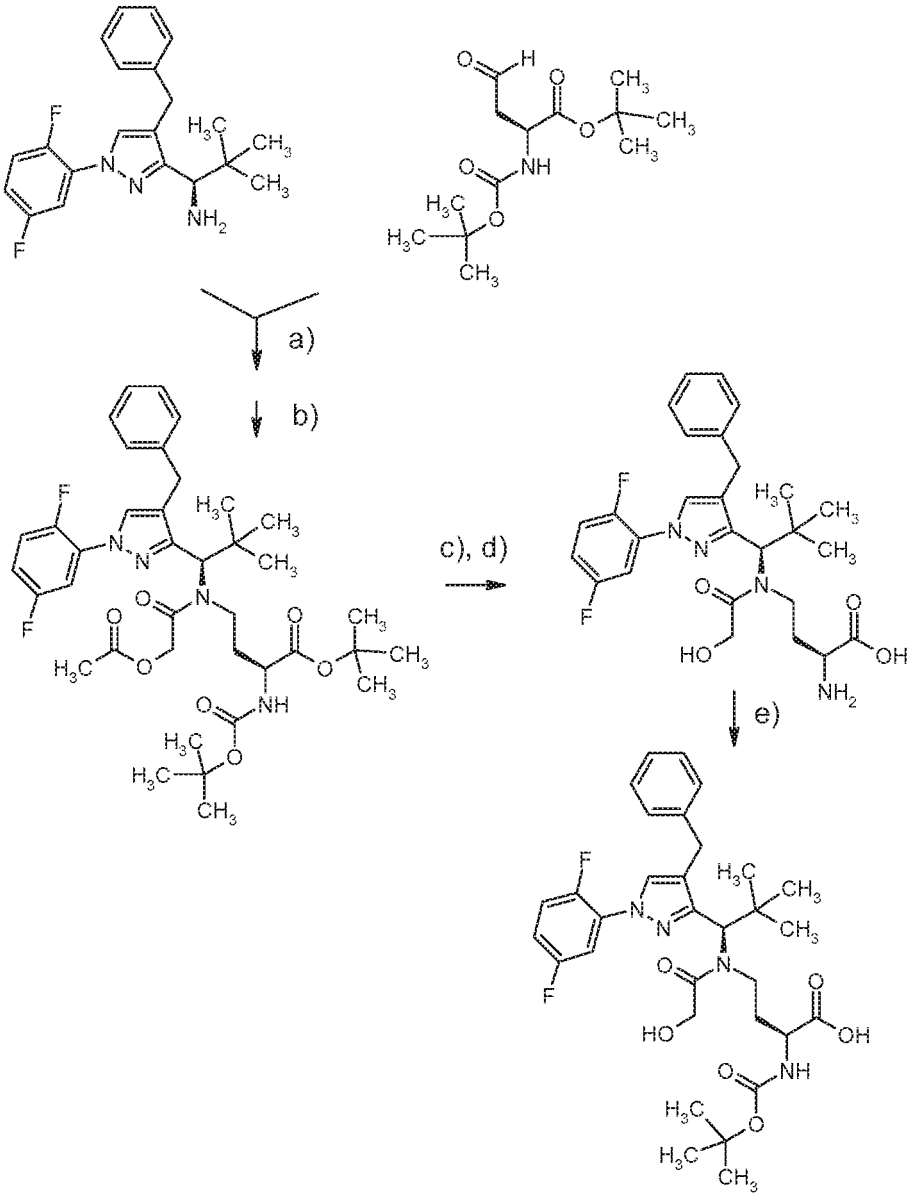
Schema 22



5

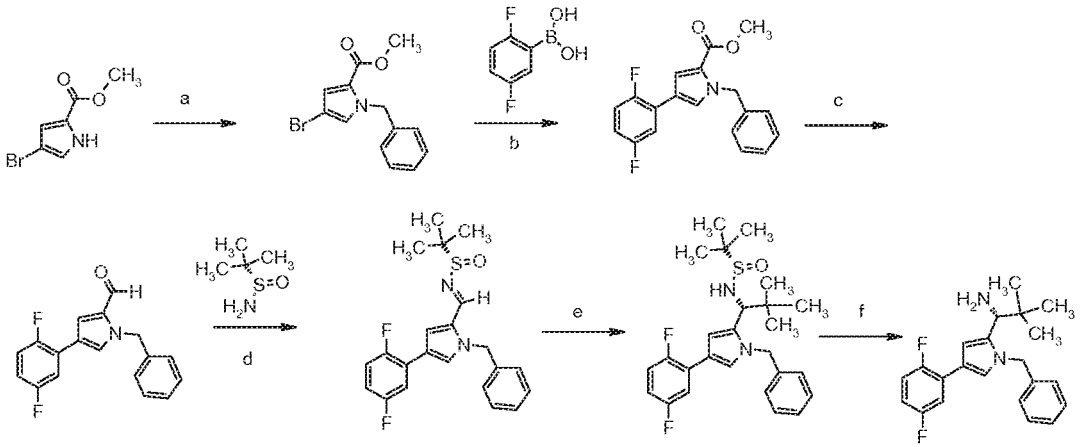
[a): beispielsweise Natriumtriacetoxyborhydrid, Essigsäure, DCM, RT; b) beispielsweise Acetoxyacetylchlorid, NEt3, DCM, RT; c) beispielsweise LiOH, THF/Wasser, RT; d) beispielsweise H_2, Pd-C, EtOH, RT; e) beispielsweise Teoc-OSu, NEt3, Dioxan, RT; f) beispielsweise Fmoc-Cl, Diisopropylethylamin, Dioxan/Wasser 2:1, RT]

Schema 23



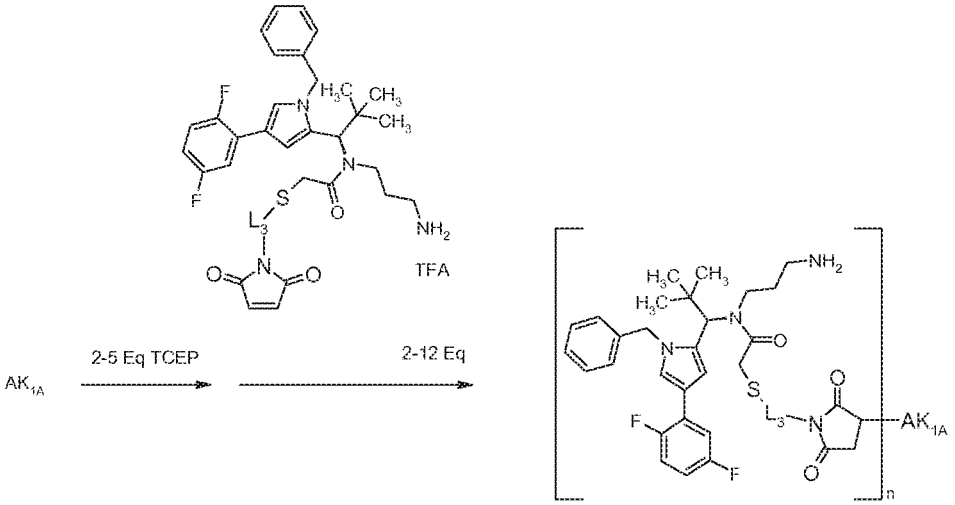
[a): beispielsweise Natriumtriacetoxyborhydrid, Essigsäure, DCM, RT; b) beispielsweise Acetoxyacetylchlorid, NEt3, DCM, RT;c) beispielsweise LiOH, Methanol, RT; d) beispielsweise TFA, DCM, RT; e) beispielsweise Boc_2O, Diisopropylethylamin, DCM, RT]

Schema 24



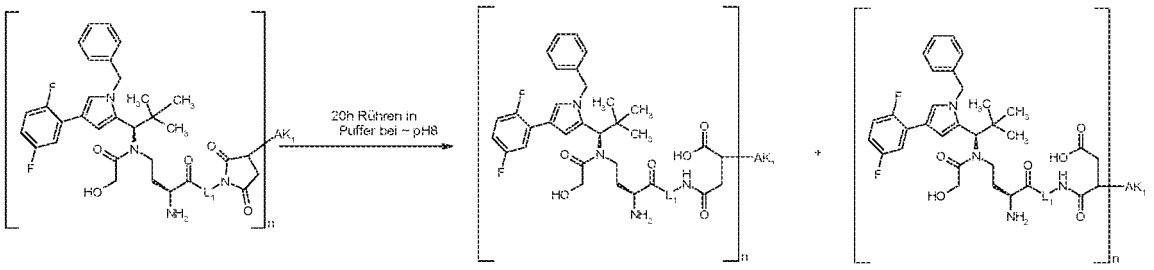
[a): beispielsweise Benzylbromid, Cs_2CO_3, DMF, RT; b) beispielsweise $Pd(dppf)_2Cl_2$, DMF, Na_2CO_3, 85 °C; c) beispielsweise $LiAlH_4$, THF, 0 °C; MnO_2, DCM, RT; d) beispielsweise $Ti(iOPr)_4$, THF, RT; e) beispielsweise tBuLi, THF, -78 °C; MeOH, NH_4Cl; f) beispielsweise HCl/1,4-Dioxan]

Schema 25: Synthese von Cystein-verknüpften ADCs

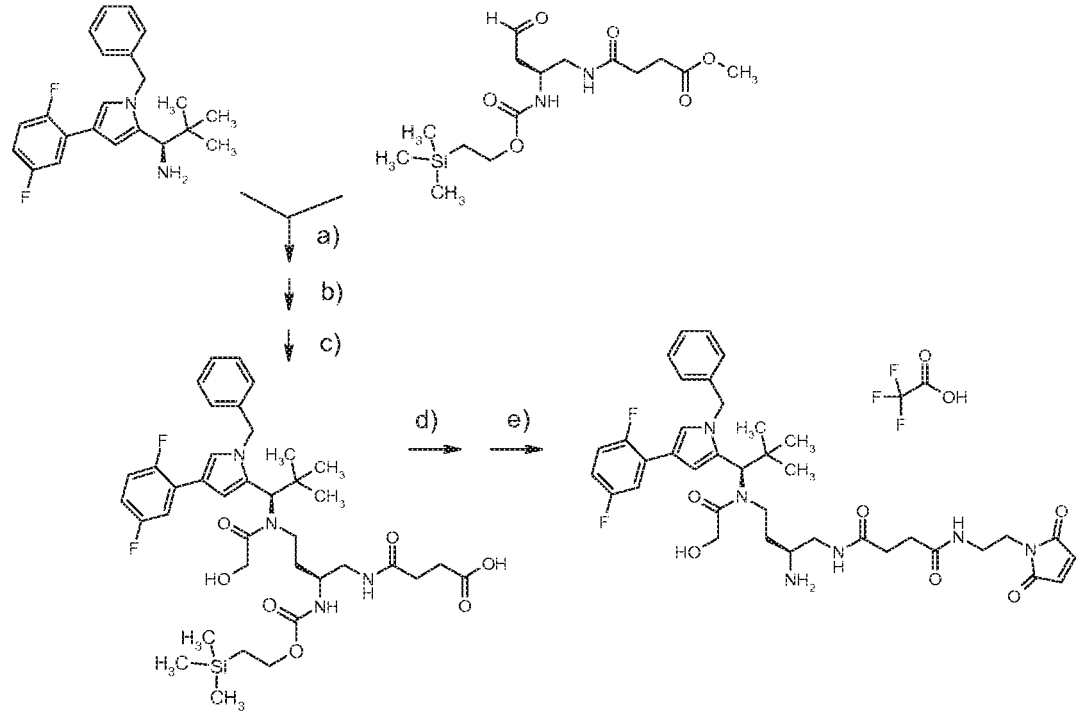


Schema 26: Synthese von Cystein-verknüpften ADCs über hydrolysierte Bernsteinsäureamide

Dieses Verfahren wurde insbesondere bei ADCs mit L1 = CH_2 angewendet, um diese ADCs in die offenkettige Verknüpfungsform zu überführen.

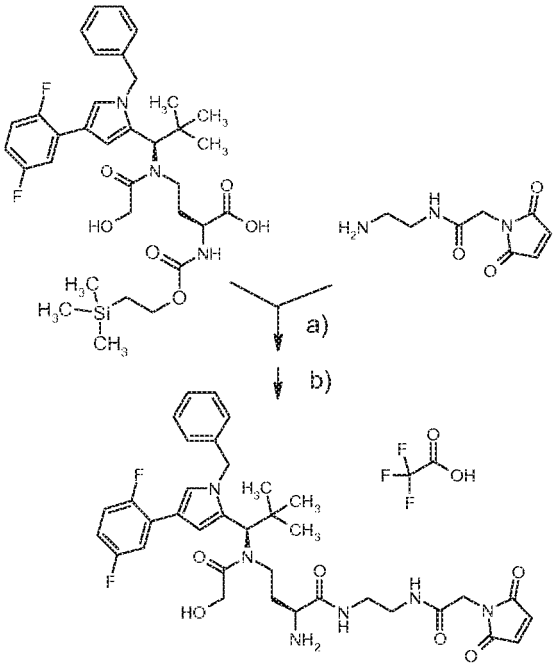


Schema 27:



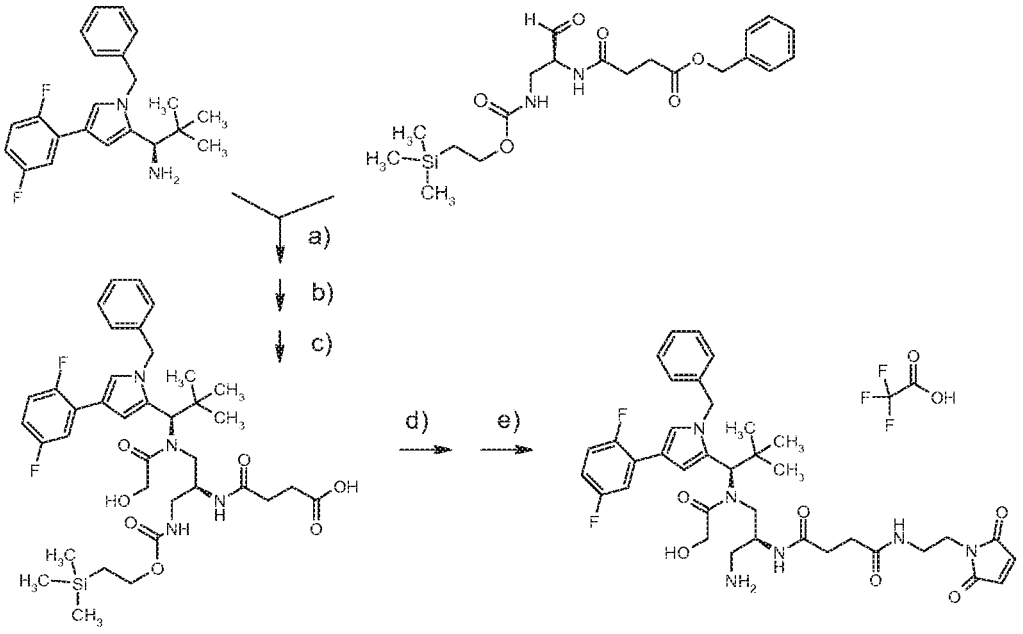
[a): Natriumtriacetoxyborhydrid, Essigsäure, DCM, RT; b) Acetoxyacetylchlorid, Diisopropylethylamin, DCM, RT; c) LiOH, MeOH, RT; d) Trifluoressigsäure--1-(2-aminoethyl)-1H-pyrrol-2,5-dion (1:1) HATU, DMF, Diisopropylethylamin, RT; e) Zinkchlorid, Trifluorethanol, 50°C, EDTA.]

Schema 28:



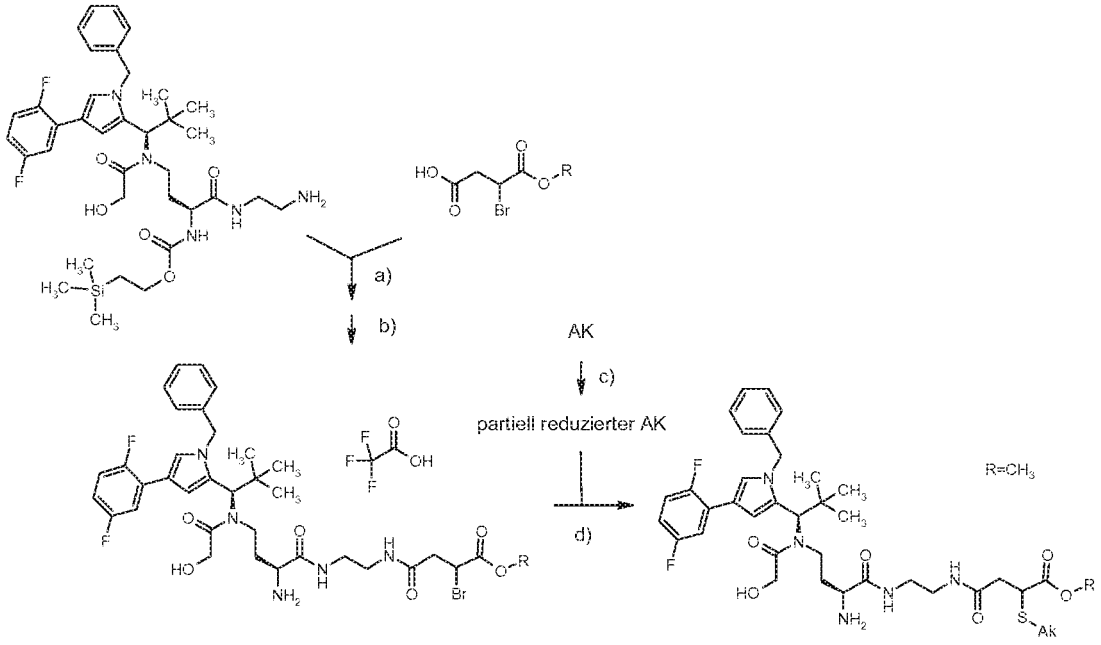
[a): HATU, DMF, Diisopropylethylamin, RT; b) Zinkchlorid, Trifluorethanol, 50°C, EDTA.]

Schema 29:



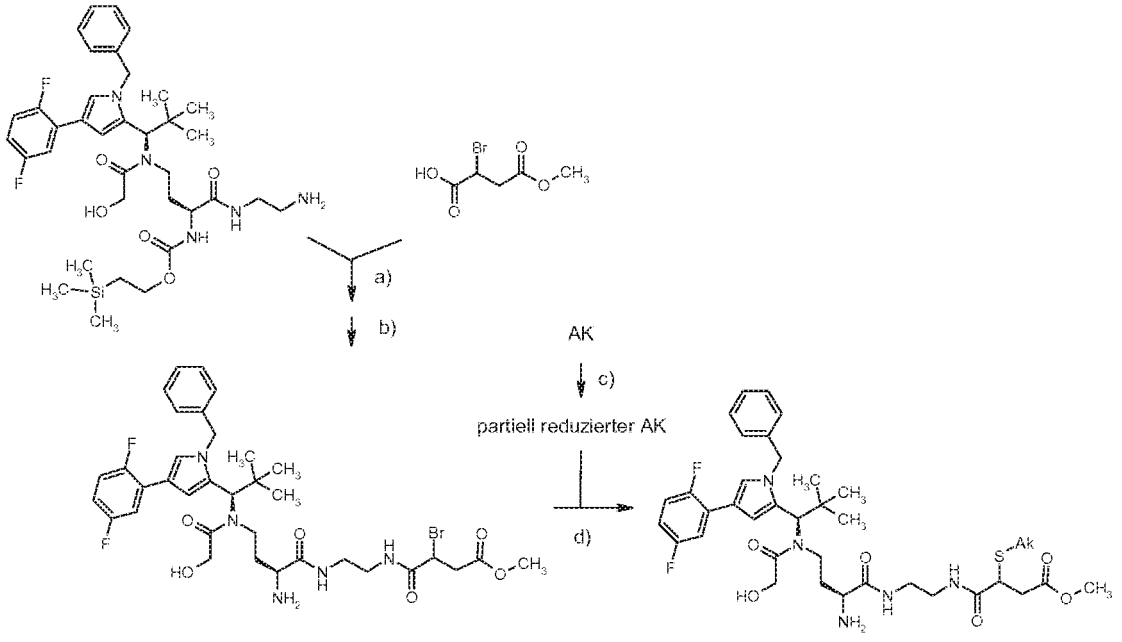
[a): Natriumtriacetoxyborhydrid, Essigsäure, DCM, RT; b) Acetoxyacetylchlorid, Triethylamin, DCM, RT; c) LiOH, MeOH, RT; d) Trifluoressigsäure--1-(2-aminoethyl)-1H-pyrrol-2,5-dion (1:1) HATU, DMF, Diisopropylethylamin, RT; e) Zinkchlorid, Trifluorethanol, 50°C, EDTA.]

Schema 30:



[a): 2-Brom-1-ethylpyridinium-Tetrafluoroborat (BEP), DCM, Pyridin, RT; b) Zinkchlorid, Trifluorethanol, 50°C, EDTA; c) 3-4 Äquivalente TCEP, PBS Puffer; d) PBS Puffer, 20h RT.]

Schema 31:



[a): 2-Brom-1-ethylpyridinium-Tetrafluoroborat (BEP), DCM, Pyridin, RT; b) Zinkchlorid, Trifluorethanol, 50°C, EDTA; c) 3-4 Äquivalente TCEP, PBS Puffer; d) PBS Puffer, 20h RT.]

A. Beispiele

Abkürzungen und Akronyme:

A431NS	humane Tumorzelllinie
A549	humane Tumorzelllinie
ABCB1	ATP-binding cassette sub-family B member 1 (Synonym für P-gp und MDR1)
abs.	Absolut
Ac	Acetyl
ACN	Acetonitril
aq.	wässrig, wässrige Lösung
ATP	Adenosintriphosphat
BCRP	Brustkrebs-Resistenz-Protein, ein Efflux-Transporter
BEP	2-Brom-1-ethylpyridinium-Tetrafluoroborat
Boc	*tert.*-Butoxycarbonyl
br.	breit (bei NMR)
Bsp.	Beispiel
ca.	*circa*, ungefähr
CI	chemische Ionisation (bei MS)
d	Dublett (bei NMR)
d	Tag(e)
DC	Dünnschichtchromatographie
DCI	direkte chemische Ionisation (bei MS)
dd	Dublett von Dublett (bei NMR)
DMAP	4-*N,N*-Dimethylaminopyridin
DME	1,2-Dimethoxyethan
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium (standardisiertes Nährmedium für die Zellkultur)
DMF	*N,N*-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid

DPBS, D-PBS, PBS	Dulbecco's Phosphat-gepufferte Salz-Lösung PBS = DPBS = D-PBS, pH7,4, Fa. Sigma, No D8537 Zusammensetzung: 0,2 g KCl 0,2 g KH_2PO_4 (anhyd) 8,0 g NaCl 1,15 g Na_2HPO_4 (anhyd) ad 1 l mit H_2O auffüllen
dt	Dublett von Triplett (bei NMR)
DTT	DL-Dithiothreitol
d. Th.	der Theorie (bei chemischer Ausbeute)
EDC	*N'*-(3-Dimethylaminopropyl)-*N*-ethylcarbodiimid-Hydrochlorid
EGFR	Epidermal growth factor receptor = Epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor
EI	Elektronenstoß-Ionisation (bei MS)
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
eq.	Äquivalent(e)
ESI	Elektrospray-Ionisation (bei MS)
ESI-MicroTofq	ESI- MicroTofq (Name des Massenspektrometer mit Tof = Time Of Flight und q = Quadrupol)
FCS	fötales Kälberserum
Fmoc	(9*H*-Fluoren-9-ylmethoxy)carbonyl
ges.	gesättigt
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
h	Stunde(n)
HATU	*O*-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium-hexafluorophosphat
HCT-116	HumaneTumorzelllinie
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonsäure
HOAc	Essigsäure
HOAt	1-Hydroxy-7-azabenzotriazol
HOBt	1-Hydroxy-1*H*-benzotriazol-Hydrat
HOSu	*N*-Hydroxysuccinimid
HPLC	Hochdruck-, Hochleistungsflüssigchromatographie
HT29	humane Tumorzelllinie
IC_{50}	halbmaximale Inhibitionskonzentration

i.m.	intramuskulär, Applikation in den Muskel
i.v.	intravenös, Applikation in die Vene
konz.	konzentriert
LC-MS	Flüssigchromatographie-gekoppelte Massenspektrometrie
LLC-PK1-Zellen	Lewis lung carcinoma pork kidney cell line
L-MDR	Human MDR1 transfizierte LLC-PK1 Zellen
m	Multiplett (bei NMR)
MDR1	Multidrug resistence protein 1
MeCN	Acetonitril
min	Minute(n)
MS	Massenspektrometrie
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2*H*-tetrazoliumbromid
NCI-H292	humane Tumorzelllinie
NCI-H520	humane Tumorzelllinie
NMM	*N*-Methylmorpholin
NMP	*N*-Methyl-2-pyrrolidinon
NMR	Kernresonanzspektrometrie
NMRI	Mausstamm, Herkunft aus dem Naval Medical Research Institute (NMRI)
Nude Mäuse	Nacktmäuse (Versuchstiere)
NSCLC	Non small cell lung cancer (Nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom)
PBS	Phosphat-gepufferte Salz-Lösung
Pd/C	Palladium auf Aktivkohle
P-gp	P-Glycoprotein, ein Transporterprotein
PNGaseF	Enzym zur Zuckerabspaltung
quant.	quantitativ (bei Ausbeute)
quart	Quartett (bei NMR)
quint	Quintett (bei NMR)
R_f	Retentionsindex (bei DC)
RT	Raumtemperatur
R_t	Retentionszeit (bei HPLC)
s	Singulett (bei NMR)
s.c.	subcutan, Applikation unter die Haut
SCC-4	Humane Tumorzelllinie
SCC-9	Humane Tumorzelllinie

SCID Mäuse	Versuchsmäuse mit einem schweren kombinierten Immundefekt (severe combined immunodeficiency)
t	Triplett (bei NMR)
TBAF	Tetra-n-butylammoniumfluorid
TEMPO	(2,2,6,6-Tetramethyl-piperidin-1-yl)oxyl
tert.	tertiär
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
T3P®	2,4,6-Tripropyl-1,3,5,2,4,6-trioxatriphosphinan-2,4,6-trioxid
UV	Ultraviolett-Spektrometrie
v/v	Volumen zu Volumen-Verhältnis (einer Lösung)
Z	Benzyloxycarbonyl

Wenn bei einer Reaktionsbeschreibung im Rahmen dieser Offenbarung keine Temperatur angegeben ist, ist immer von Raumtemperatur auszugehen.

HPLC- und LC-MS-Methoden:

Methode 1 (LC-MS):

Instrument: Waters ACQUITY SQD UPLC System; Säule: Waters Acquity UPLC HSS T3 1.8 µ 50 x 1 mm; Eluent A: 1 l Wasser + 0.25 mL 99%ige Ameisensäure , Eluent B: 1 l Acetonitril + 0.25 mL 99%ige Ameisensäure; Gradient: 0.0 min 90% A → 1.2 min 5% A → 2.0 min 5% A Ofen: 50°C; Fluss: 0.40 mL/min; UV-Detektion: 208 – 400 nm.

Methode 2 (LC-MS):

Gerätetyp MS: Waters Synapt G2S; Gerätetyp UPLC: Waters Acquity I-CLASS; Säule: Waters, BEH300, 2.1 x 150 mm, C18 1.7 µm; Eluent A: 1 l Wasser + 0.01% Ameisensäure; Eluent B: 1 l Acetonitril + 0.01% Ameisensäure; Gradient: 0.0 min 2% B → 1.5 min 2% B → 8.5 min 95% B → 10.0 min 95% B; Ofen: 50°C; Fluss: 0.50 mL/min; UV-Detektion: 220 nm

Methode 3 (LC-MS):

Instrument MS: Waters (Micromass) QM; Instrument HPLC: Agilent 1100 Serie; Säule : Agient ZORBAX Extend-C18 3.0x50mm 3.5-Micron; Eluent A: 1 l Wasser + 0.01 mol Ammoniumcarbonat, Eluent B: 1 l Acetonitril; Gradient: 0.0 min 98% A → 0.2min 98% A → 3.0 min 5% A→ 4.5 min 5% A ; Ofen: 40°C; Fluss: 1.75 mL/min; UV-Detektion: 210 nm

Methode 4 (LC-MS):

Gerätetyp MS: Waters Synapt G2S; Gerätetyp UPLC: Waters Acquity I-CLASS; Säule: Waters, HSST3, 2.1 x 50 mm, C18 1.8 µm; Eluent A: 1 l Wasser + 0.01% Ameisensäure; Eluent B: 1 l Acetonitril + 0.01% Ameisensäure; Gradient: 0.0 min 10% B → 0.3 min 10% B → 1.7 min 95% B → 2.5 min 95% B; Ofen: 50°C; Fluss: 1.20 mL/min; UV-Detektion: 210 nm

Methode 5 (LC-MS):

Instrument: Waters ACQUITY SQD UPLC System; Säule: Waters Acquity UPLC HSS T3 1.8 µ 50 x 1 mm; Eluent A: 1 l Wasser + 0.25 mL 99%ige Ameisensäure , Eluent B: 1 l Acetonitril + 0.25 mL 99%ige Ameisensäure; Gradient: 0.0 min 95% A → 6.0 min 5% A → 7.5 min 5% A Ofen: 50°C; Fluss: 0.35 mL/min; UV-Detektion: 210 – 400 nm.

Methode 6 (LC-MS):

Instrument: Micromass Quattro Premier mit Waters UPLC Acquity; Säule: Thermo Hypersil GOLD 1.9 µ 50 x 1 mm; Eluent A: 1 l Wasser + 0.5 mL 50%ige Ameisensäure, Eluent B: 1 l Acetonitril + 0.5 mL 50%ige Ameisensäure; Gradient: 0.0 min 97% A → 0.5 min 97% A → 3.2 min 5% A → 4.0 min 5% A Ofen: 50°C; Fluss: 0.3 mL/min; UV-Detektion: 210 nm.

Methode 7 (LC-MS):

Instrument: Agilent MS Quad 6150;HPLC: Agilent 1290; Säule: Waters Acquity UPLC HSS T3 1.8 µ 50 x 2.1 mm; Eluent A: 1 l Wasser + 0.25 mL 99%ige Ameisensäure , Eluent B: 1 l Acetonitril + 0.25 mL 99%ige Ameisensäure; Gradient: 0.0 min 90% A → 0.3 min 90% A → 1.7 min 5% A → 3.0 min 5% A Ofen: 50°C; Fluss: 1,20 mL/min; UV-Detektion: 205 – 305 nm.

Methode 8 (LC-MS):

Gerätetyp MS: Waters Synapt G2S; Gerätetyp UPLC: Waters Acquity I-CLASS; Säule: Waters, HSST3, 2.1 x 50 mm, C18 1.8 µm; Eluent A: 1 l Wasser + 0.01% Ameisensäure; Eluent B: 1 l Acetonitril + 0.01% Ameisensäure; Gradient: 0.0 min 2% B → 2.0 min 2% B → 13.0 min 90% B → 15.0 min 90% B; Ofen: 50°C; Fluss: 1.20 ml/min; UV-Detektion: 210 nm

Methode 9: LC-MS-Prep Reinigungsmethode für die Beispiele 181-191 (Methode LIND-LC-MS-Prep)

Instrument MS: Waters, Instrument HPLC: Waters (Säule Waters X-Bridge C18, 19 mm x 50 mm, 5 µm, Eluent A: Wasser + 0.05% Ammoniak, Eluent B: Acetonitril (ULC) mit Gradient; Fluss: 40 ml/min; UV-Detektion: DAD; 210 – 400 nm).

bzw.:

Instrument MS: Waters, Instrument HPLC: Waters (Säule Phenomenex Luna 5µ C18(2) 100A, AXIA Tech. 50 x 21.2 mm, Eluent A: Wasser + 0.05% Ameisensäure, Eluent B: Acetonitril (ULC) mit Gradient; Fluss: 40 ml/min; UV-Detektion: DAD; 210 – 400 nm).

Methode 10: LC-MS-Analytik-Methode für die Beispiele 181-191 (LIND_SQD_SB_AQ)

Instrument MS: Waters SQD; Instrument HPLC: Waters UPLC; Säule: Zorbax SB-Aq (Agilent), 50 mm x 2.1 mm, 1.8 µm; Eluent A: Wasser + 0.025% Ameisensäure, Eluent B: Acetonitril (ULC) + 0.025% Ameisensäure; Gradient: 0.0 min 98%A - 0.9 min 25%A – 1.0 min 5%A - 1.4 min 5%A – 1.41 min 98%A – 1.5 min 98%A; Ofen: 40°C; Fluss: 0.600 ml/min; UV-Detektion: DAD; 210 nm.

Methode 11 (HPLC):

Gerät:	HP1100 Serie
Säule:	Merck Chromolith SpeedROD RP-18e, 50-4,6mm, Best.-Nr.1.51450.0001, Vorsäule Chromolith Guard Cartridge Kit, RP-18e, 5-4,6mm, Best.-Nr. 1.51470.0001
Gradient:	Flow 5mL/ Min Injection Volume 5µl Solvent A: HCLO4 (70%ig) in Wasser (4mL/ l) Solvent B: Acetonitril Start 20% B 0.50 Min 20% B 3.00 Min 90% B 3.50 Min 90% B 3.51 Min 20% B 4.00 Min 20% B Säulentemperatur: 40°C
Wellenlänge:	210nm

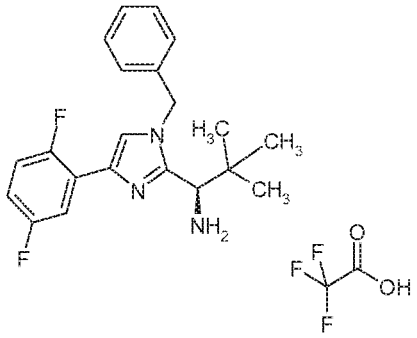
Für alle Reaktanden oder Reagenzien, deren Herstellung im Folgenden nicht explizit beschrieben ist, gilt, dass sie von allgemein zugänglichen Quellen kommerziell bezogen wurden. Für alle übrigen Reaktanden oder Reagenzien, deren Herstellung im Folgenden ebenfalls nicht beschrieben ist und die

nicht kommerziell erhältlich waren oder von Quellen bezogen wurden, die nicht allgemein zugänglich sind, ist ein Verweis auf die veröffentlichte Literatur angegeben, in der ihre Herstellung beschrieben ist.

Ausgangsverbindungen und Intermediate:

Intermediat C1

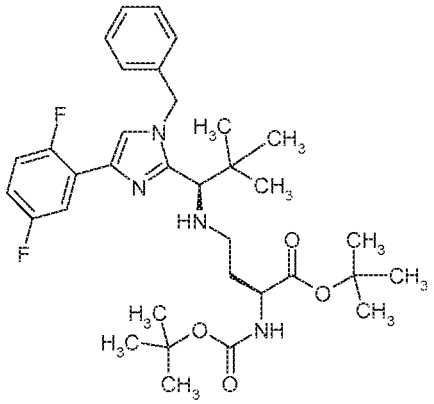
Trifluoressigsäure--(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropan-1-amin(1:1)



Die Titelverbindung wurde wie in WO2006/002326 beschrieben, hergestellt.

Intermediat C2

tert-Butyl-(2S)-4-({(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}amino)-2-[(tert-butoxycarbonyl)amino]butanoat



4.22 g (14.5 mmol) tert-Butyl-N-(tert-butoxycarbonyl)-L-homoserinat wurden in 180 mL Dichlormethan gelöst und dann mit 3.5 mL Pyridin sowie mit 9.2 g (21.7 mmol) 1,1,1-Triacetoxy-1lambda^5,2-benziodoxol-3(1H)-on versetzt. Der Ansatz wurde 1 h bei RT gerührt, anschließend mit 500 mL Dichlormethan verdünnt und zweimal mit 10%-iger Natriumtiosulfatlösung und dann nacheinander zweimal mit 5%-iger Zitronensäure und zweimal mit 10%-iger Natriumhydrogencarbonatlösung ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde abgetrennt, über Magnesiumsulfat getrocknet und anschließend im Vakuum eingeengt. Der Rückstand wurde in DCM aufgenommen und mit einer Mischung aus Diethylether und n-Pentan versetzt. Der Niederschlag wurde abfiltriert und das Filtrat

anschließend eingegengt und aus Acetonitril/Wasser lyophilisiert. Es wurden 3.7 g (93%) tert-Butyl-(2S)-2-[(tert-butoxycarbonyl)amino]-4-oxobutanoat erhalten, die ohne weitere Reinigung in die nächste Stufe eingesetzt wurden. (R_F-Wert: 0.5 (DCM/Methanol 95/5).

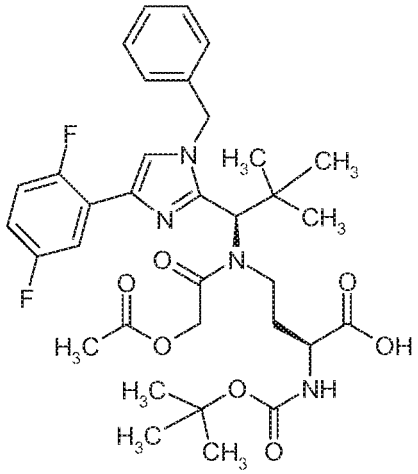
3.5 g (9.85 mmol) von Intermediat C1 wurden in 160 mL DCM gelöst und mit 3.13 g (14.77 mmol) Natriumtriacetoxyborhydrid sowie mit 0.7 mL Essigsäure versetzt. Nach 5 min Rühren bei RT wurden 3.23 g (11.85 mmol) tert-Butyl-(2S)-2-[(tert-butoxycarbonyl)amino]-4-oxobutanoat zugegeben und der Ansatz weitere 30 min bei RT gerührt. Dann wurde das Lösunsgmittel im Vakuum eingedampft und der Rückstand in Acetonitril/Wasser aufgenommen. Der ausgefallene Feststoff wurde abfiltriert und getrocknet und man erhielt 5.46 g (84%) der Titelverbindung.

HPLC (Methode 11): R_t = 2.5 min;

LC-MS (Methode 1): R_t = 1.13 min; MS (ESIpos): m/z = 613 $(M+H)^+$.

Intermediat C3

(2S)-4-[(Acetoxyacetyl){(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}amino]-2-[(tert-butoxycarbonyl)amino]butansäure



5.46 g (8.24 mmol) von Intermediat C2 wurden in 160 mL DCM gelöst und dann mit 4.8 mL Triethylamin sowie mit 2.2 mL (20.6 mmol) Acetoxyacetylchlorid versetzt. Der Ansatz wurde über Nacht bei RT gerührt und dann im Vakuum eingeengt. Der Rückstand wurde in Ethylacetat aufgenommen und dreimal mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und dann mit gesättigter Natriumchloridlösung ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und anschließend eingeengt. Der Rückstand wurde durch Säulenchromatographie über Biotage/Isolera (SNAP 340g) mit Cyclohexan/Ethylacetat 2:1 als Eluent gereinigt. Es wurden 4.57 g (75%) der acylierten Zwischestufe erhalten.

LC-MS (Methode 1): R_t = 1.49 min; MS (ESIpos): m/z = 713 $(M+H)^+$.

1g (1.36 mmol) von dieser Zwischenstufe wurden in 20 mL DCM gelöst und mit 20 mL TFA versetzt. Nach 5 h Rühren bei RT wurde eingeengt und der Rückstand zweimal mit n-Penan verrührt. Das n-Pentan wurde jeweils abdekantiert und der verbliebene Feststoff im Hochvakuum getrocknet. So wurden 1.1 g (2S)-4-[(Acetoxyacetyl){(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}amino]-2-aminobutansäure-trifluoressigsäure(1:1) erhalten. LC-MS (Methode 1): R_t = 0.93 min; MS (ESIpos): m/z = 557 $(M+H)^+$.

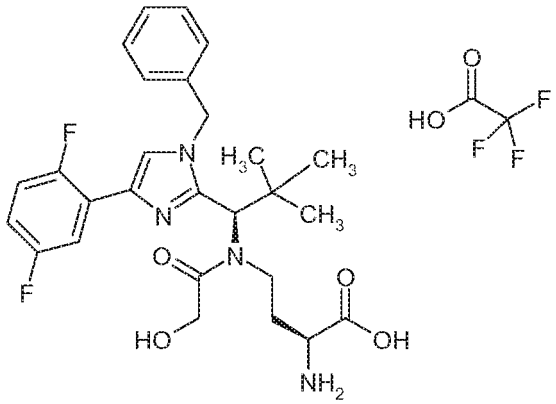
0.91 g (1.57 mmol) von dieser Zwischenstufe wurden in 70 mL DCM gelöst und mit 3.43 g (15.7 mmol) Di-tert-butyldicarbonat und 4.1 mL *N,N*-Diisopropylethylamin versetzt. Nach 30 min Rühren bei RT wurde der Ansatz mit DCM verdünnt und mit 5%-iger Zitronensäure ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und einggengt. Der Rückstand wurde zweimal mit n-Pentan verrührt und jeweils abdekantiert. Der verbliebene Feststoff wurde aus Acetonitril/Wasser 1: 1 lyophilisiert und so wurden 1.11 g der Titelverbindung erhalten.

HPLC (Methode 11): R_t = 2.55 min;

LC-MS (Methode 1): R_t = 1.3 min; MS (ESIpos): m/z = 657 $(M+H)^+$.

Intermediat C4

(2S)-2-Amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butansäure-trifluoressigsäure(1:1)



5.46 g (8.24 mmol) von Intermediat C2 wurden in 160 mL DCM gelöst und dann mit 4.8 mL Triethylamin sowie mit 2.2 mL (20.6 mmol) Acetoxyacetylchlorid versetzt. Der Ansatz wurde über Nacht bei RT gerührt und dann im Vakuum eingeengt. Der Rückstand wurde in Ethylacetat aufgenommen und dreimal mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und dann mit gesättigter Natriumchloridlösung ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und anschließend eingeengt. Der Rückstand wurde durch Säulenchromatographie über Biotage/Isolera

(SNAP 340g) mit Cyclohexan/Ethylacetat 2:1 als Eluent gereinigt. Es wurden 4.57 g (75%) der acylierten Zwischestufe erhalten.

LC-MS (Methode 1): R_t = 1.49 min; MS (ESIpos): m/z = 713 $(M+H)^+$.

1.5 g (2.035 mmol) von dieser Zwischenstufe wurden in 50 mL Ethanol aufgenommen und mit 5.8 mL einer 40%-igen Methanaminlösung in Wasser versetzt. Der Ansatz wurde 4 h bei 50°C gerührt und anschließend eingeengt. Der Rückstand wurde in DCM aufgenommen und zweimal mit Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und anschließend eingeengt. Der Rückstand wurde im Hochvakuum getrocknet. Es wurden 1.235 mg dieser Zwischenstufe erhaltenen die ohne weitere Reinigung weiter umgesetzt wurden.

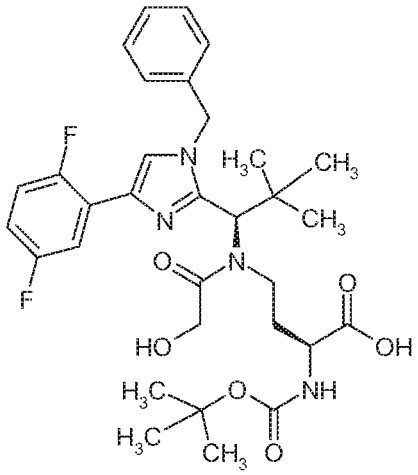
1.235 mg (1.5 mmol) von dieser Zwischenstufe wurden in 15 mL DCM gelöst und mit 15 mL TFA versetzt. Nach 4 h Rühren bei RT wurde eingeengt. Der Rückstand wurde durch präparative HPLC gereinigt. Die entsprechenden Fraktionen wurden eingeengt und der Rückstand aus Acetonitril lyophilisiert. Es wurden 1.04 g (quant) der Titelverbindung erhalten.

HPLC (Methode 11): R_t = 1.9 min;

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.89 min; MS (ESIpos): m/z = 515 $(M+H)^+$.

Intermediat C5

(2S)-4-[{(1R)-1-[1-Benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]-2-[(tert-butoxycarbonyl)amino]butansäure



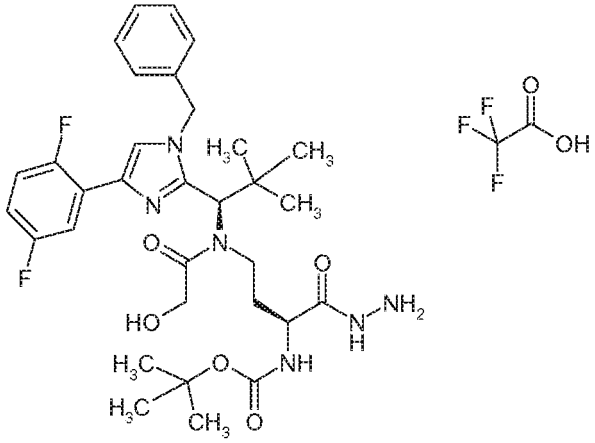
0.9 g (1.24 mmol) von Intermediat C4 wurden in 60 mL DCM gelöst und mit 2.7 g (12.5 mmol) Di-tert-butyldicarbonat sowie mit 3.3 mL *N,N*-Diisopropylethylamin versetzt. Nach 45 min Rühren bei RT wurde der Ansatz eingeengt, der Rückstand in Diethylether aufgenommen und bis zur einsetzenden Trübung mit n-Pentan versetzt. Der Ansatz wurde auf 0°C abgekühlt und anschließend dekantiert. Der Rückstand wurde erneut mit n-Pentan versetzt und abdekantiert. Der verbliebene Feststoff wurde aus Acetonitril/Wasser 1: 1 lyophilisiert und so wurden 0.95 g (quant) der Titelverbindung erhalten.

HPLC (Methode 11): R_t = 2.5 min;

LC-MS (Methode 1): R_t = 1.27 min; MS (ESIpos): m/z = 615 $(M+H)^+$.

Intermediat C6

Trifluoressigsäure--tert-butyl-{(2S)-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]-1-hydrazino-1-oxobutan-2-yl}carbamat(1:1)



150 mg (0.16 mmol) von Intermediat C3 wurden in 21 mL DMF gelöst und dann mit 37.2 mg (0.19 mmol) *N*-(3-Dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimid-Hydrochlorid (EDC), mit 37 mg (0.243 mmol) 1-Hydroxybenzotriazol, mit 85 µl *N,N*-Diisopropylethylamin und schließlich mit 45 mg (0.18mmol) von kommerziell erhältlichem 9H-Fluoren-9-ylmethylhydrazincarboxylat versetzt. Der Ansatz wurde über Nacht bei RT gerührt und dann im Vakuum eingeengt. Der Rückstand wurde durch präparative HPLC gereinigt. Die entsprechenden Fraktionen wurden eingeengt und der Rückstand aus Acetonitril/Wasser lyophilisiert. Es wurden 60 mg (41% d. TH.) der geschützten Zwischenstufe erhalten.

HPLC (Methode 11): R_t = 2.9 min;

LC-MS (Methode 1): R_t = 1.47 min; MS (ESIpos): m/z = 893 $(M+H)^+$.

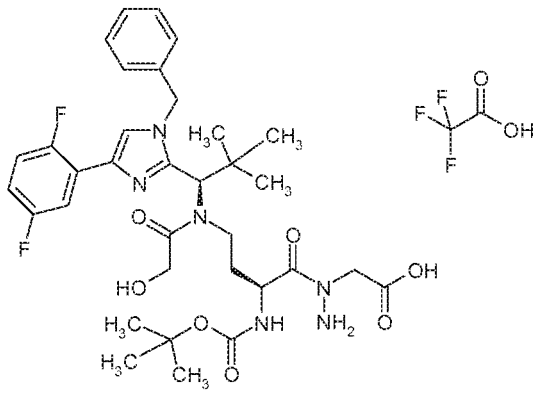
60mg (0.067 mmol) dieser Zwischenstufe wurden in 19 mL Ethanol gelöst und mit 681 µl Piperidin sowie mit 386 µl einer 40%-igen Methanaminlösung in Wasser versetzt. Der Ansatz wurde 18 h bei 50°C gerührt und anschließend eingeengt. Der Rückstand wurde in Acetonitril/Wasser 2:1 aufgenommen und mit TFA auf pH 2 gebracht. Dann wurde erneut eingeengt und der Rückstand durch präparative HPLC gereinigt. Die entsprechenden Fraktionen wurden eingeengt und der Rückstand aus Acetonitril/Wasser lyophilisiert. Es wurden 25 mg (51% d.Th.) der Titelverbindung erhalten.

HPLC (Methode 11): R_t = 2.2 min;

LC-MS (Methode 1): R_t = 1.27 min; MS (ESIpos): m/z = 629 $(M+H)^+$.

Intermediat C7

1-{(2S)-4-[{(1R)-1-[1-Benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]-2-[(tert-butoxycarbonyl)amino]butanoyl}hydrazino)essigsäure - trifluoressigsäure (1:1)



0.2 g (0.305 mmol) von Intermediat C3 wurden in 80 mL DCM gelöst und mit 0.125 g (0.46 mmol) 2-Brom-1-ethylpyridinium-Tetrafluoroborat (BEP), mit 94 mg (0.61 mmol) von kommerziell erhältlichem Hydrazinoessigsaeureethylester Hydrochlorid sowie mit 159 µl *N,N*-Diisopropylethylamin versetzt und die Mischung anschließend 1 h bei RT gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde danach mit Ethylacetat und Wasser versetzt und die Phasen voneinander getrennt. Die organische Phase wurde mit gesättigter Natriumchloridlösung ausgeschüttelt und dann über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und eingeengt. Der Rückstand wurde im Vakuum getrocknet und ohne Reinigung weiter umgesetzt. Dazu wurde er in 20 mL Tetrahydrofuran aufgenommen und mit 10 mL Wasser und 3.2 mL einer 2N-Lithiumhydroxidlösung versetzt. Der Ansatz wurde 1 h bei RT gerührt und anschließend mit TFA auf pH 7 gebracht. Danach wurde der Ansatz eingeengt und der Rückstand durch präparative HPLC gereinigt. So wurde die Titelverbindung von ihrem früher eluierenden Regioisomer abgetrennt. Nach Vereinigung der entsprechenden Fraktionen, Lyophilisation und Trocknung wurden 19.7 mg (8% d.Th. über 2 Stufen) der Titelverbindung als farbloser Schaum erhalten.

HPLC (Methode 11): R_t = 2.4 min;

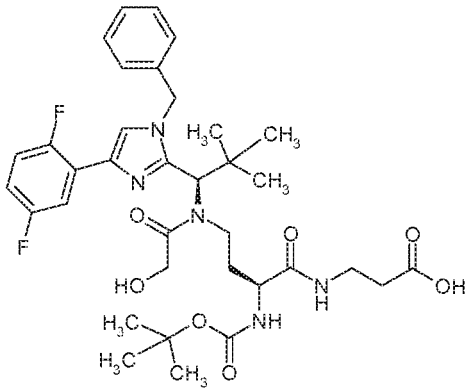
LC-MS (Methode 1): R_t = 1.22 min; MS (ESIpos): m/z = 687 $(M+H)^+$.

Die Strukturzuordnung der Regiosisomere erfolgte in einem separaten Experiment nach Auftrennung der Regioisomeren auf der geschützten Zwischenstufe durch NMR-Spektroskopie. Die geschützte Zwischenstufe Ethyl-(1-{(2S)-4-[(acetoxyacetyl) {(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}amino]-2-[(tert-butoxycarbonyl) amino]butanoyl}hydrazino)acetat der Titelverbindung wies folgendes 1H-NMR-Spektrum auf:

^{1}H-NMR (500 MHz, DMSO-d_6): δ = 7.8 (m, 2H), 7.4-7.2 (m, 6H), 7.08 (m, 1H), 6.73 (d, 1H), 5.6 (s, 1H), 5.25 und 4,89 (2d, 2H), 4.89 und 4.77 (2d, 2H), 4.62 (t, 1H), 4.32 und 3.78 (2d, 2H), 4.1 (t, 2H), 3.62-3.47 (m), 2.13 (s, 3H), 1.41 und 0.72 (2m, 2H), 1.3 (s, 9H), 1.18 (t, 3H), 0.92 (s, 9H).

Intermediat C8

N-{(2S)-4-[{(1R)-1-[1-Benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]-2-[(tert-butoxycarbonyl)amino]butanoyl}-beta-alanin



293 mg (0.41 mmol) von Intermediat C3 wurden in 25 mL DMF gelöst und dann mit 144 mg (0.75 mmol) *N*-(3-Dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimid-Hydrochlorid (EDC), mit 128 mg (0.83 mmol) 1-Hydroxybenzotriazol, mit 218 µl *N,N*-Diisopropylethylamin und schließlich mit 70 mg (0.5mmol) von kommerziell erhältlichem 3-Methoxy-3-oxopropan-1-aminiumchlorid versetzt. Der Ansatz wurde 4 h bei RT gerührt und dann im Vakuum eingeengt. Der Rückstand wurde durch präparative HPLC gereinigt. Die entsprechenden Fraktionen wurden eingeengt und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Es wurden 177 mg (53% d. TH.) der geschützten Zwischenstufe erhalten.

HPLC (Methode 11): R_t = 2.6 min;

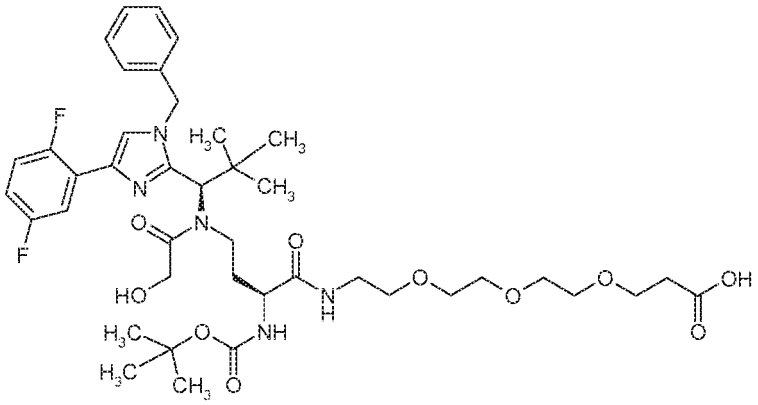
LC-MS (Methode 1): R_t = 1.33 min; MS (ESIpos): m/z = 742 $(M+H)^+$.

177 mg (0.22 mmol) dieser Zwischenstufe wurden in 20 mL Methanol aufgenommen und mit 2.8 mL einer 2N-Lithiumhydroxidlösung versetzt. Der Ansatz wurde 18 h bei RT gerührt. Anschließend wurde eingeengt, der Rückstand in Wasser aufgenommen und die Lösung mit 5%-iger Zitronensäure auf pH 5 gebracht. Danach wurde zweimal mit DCM extrahiert, die organische Phase über Magnesiumsulfat getrocknet und eingeengt. Der Rückstand wurde schließlich aus Acetonitrol/Wasser lyophilisiert und so wurden 133 mg (81% d. Th.) der Titelverbindung erhalten.
HPLC (Methode 11): R_t = 2.3 min;

LC-MS (Methode 3): R_t = 7.4 min; MS (ESIpos): m/z = 686 $(M+H)^+$.

Intermediat C9

(6S)-6-{2-[{(1R)-1-[1-Benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]ethyl}-2,2-dimethyl-4,7-dioxo-3,11,14,17-tetraoxa-5,8-diazaicosan-20-säure



Im ersten Schritt wurden 70 mg (0.114 mmol) von Intermediat C5 mit 32 mg (0.114 mmol) tert-Butyl-3-{2-[2-(2-aminoethoxy)ethoxy]ethoxy}propanoat in 15 mL DMF in Gegenwart von 44 mg (0.228 mmol) 1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimid-Hydrochlorid, 35 mg (0.228 mmol) 1-Hydroxy-1*H*-benzotriazol-Hydrat und 60 µl *N,N*-Diisopropylethylamin gekuppelt.

Der Ansatz wurde über Nacht bei RT gerührt und das Produkt durch präparative HPLC gereinigt. Es wurden 33 mg (33% d.Th.) des geschützten Intermediats isoliert. Dieses wurde 1 h mit 1.1 mL Trifluoressigsäure in 11 mL Dichlormethan gerührt und nach Aufarbeitung wurden 26 mg (98%) der vollständig entschützten Verbindung erhalten.

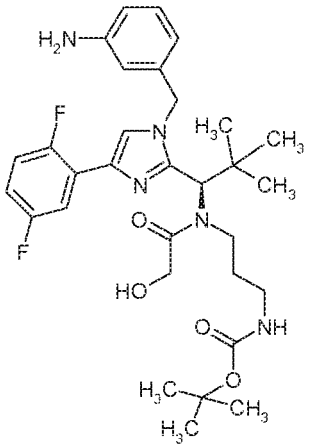
Schließlich wurde das Intermediat in 2 mL DCM aufgenommen und die tert.-Butoxycarbonylschutzgruppe durch zweimalige Zugabe von jeweils 10 mg Di-tert-butyldicarbonat und 79 µl *N,N*-Diisopropylethylamin unter 3-tägigem Rühren bei RT eingeführt. Nach Reinigung des Produktes durch präparative HPLC wurden 16.4 mg (66% d.Th.) der Titelverbindung erhalten.

HPLC (Methode 11): R_t = 2.3 min;

LC-MS (Methode 1): R_t = 1.22 min; MS (ESIpos): m/z = 818 $(M+H)^+$.

Intermediat C10

tert-Butyl-{3-[{(1R)-1-[1-(3-aminobenzyl)-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]propyl}carbamat



Die Titelverbindung wurde ausgehend von Intermediat C1 über 6 Stufen hergestellt: Im ersten Schritt wurden 1 g (2.77 mmol) von Intermediat C1 und 0.864 g (5 mmol) tert-Butyl-(3-oxopropyl)carbamat in 100 mL Methanol zusammengegeben und mit 400 mL Essigsäure sowie 1.288 g (13.9 mmol) Boran-Pyridin-Komplex versetzt. Der Ansatz wurde 3 Tage bei RT gerührt. Anschließend wurde im Vakuum eingeengt und der Rückstand mittels Flash-Chromatographie an Kieselgel (Eluent: Dichlormethan/Ethylacetat 9:1 -> Dichlormethan/Methanol 95:5) gereinigt. Nach Einengen der entsprechenden Fraktionen und Trocknung im Hochvakuum wurden 1255 g (80% d.Th.) des N-alkylierten Zwischenstufe erhalten.

LC-MS (Methode 1): R_t = 1.0 min; MS (ESIpos): m/z = 513 $(M+H)^+$.

1.255 g (2.2 mmol) von dieser Zwischenstufe wurden in 50 mL DCM gelöst und dann mit 1.2 mL Triethylamin sowie mit 0.52 mL (4.85 mmol) Acetoxyacetylchlorid versetzt. Der Ansatz wurde über Nacht bei RT gerührt und dann im Vakuum eingeengt. Der Rückstand wurde in Ethylacetat aufgenommen und dreimal mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und dann mit gesättigter Natriumchloridlösung ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und anschließend eingeengt. Der Rückstand wurde durch präparative HPLC gereinigt.

Es wurden 593 mg (41% d. Th.) der acylierten Zwischestufe erhalten.

LC-MS (Methode 1): R_t = 1.4 min; MS (ESIpos): m/z = 613 $(M+H)^+$.

993 mg (0.91 mmol) dieser Zwischenstufe wurden in 100 mL Ethanol gelöst und nach Zugabe von 60 mg 10%-igem Palladium auf Aktivkohle 3 h lang bei RT unter Wasserstoff-Normaldruck hydriert. Der Katalysator wurde danach abfiltriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Man erhielt 494 mg (91% d.Th.) des de-benzylierten Imidazol-Derivats als nahezu farbloses Öl. LC-MS (Methode 1): R_t = 1.17 min; MS (ESIpos): m/z = 523 $(M+H)^+$.

150 mg (0.25 mmol) von dieser Zwischenstufe wurden in 15 mL DMF vorgelegt und mit 69.2 mg (0.5 mmol) Kaliumcarbonat versetzt. Nach 15min Rühren bei RT wurden 60 mg (0.28 mmol) p-

Nitrobenzylbromid zugegeben und über Nacht gerührt. Das Lösungsmittel wurde anschließend im Vakuum entfernt, der Rückstand in Ethylacetat aufgenommen und mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung extrahiert. Die organische Phase wurde mit gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen, einrotiert und mittels präparativer HPLC gereinigt. Die entsprechenden Fraktionen wurden einrotiert und der Rückstand aus 1,4-Dioxan lyophilisiert. Es wurden 169 mg (quant.) der Zwischenstufe erhalten.

LC-MS (Methode 1): R_t = 1.39 min; MS (ESIpos): m/z = 658 $(M+H)^+$.

165 mg (0.251 mmol) dieser Zwischenstufe wurden in 30 mL Ethanol aufgenommen und mit 0.72 mL einer 40%-igen wässrigen Lösung von Methylamin versetzt. Der Ansatz wurde 5 h bei 50°C gerührt und dann wurde nochmals die gleiche Menge der Methylaminlösung zugegeben. Nach weiteren 10 h Rühren wurde der Ansatz im Vakuum eingeengt. Es wurde zweimal mit Diethylether nachdestilliert und der Rückstand anschließend aus Acetonitril/Wasser lyophilisiert. Es verblieben 148 mg (89%) dieser Zwischenstufe.

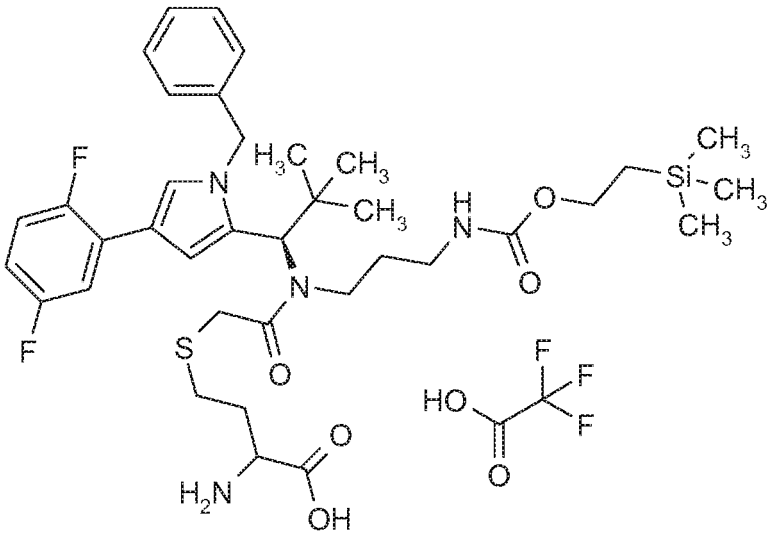
LC-MS (Methode 6): R_t = 2.97 min; MS (ESIpos): m/z = 616 $(M+H)^+$.

98 mg (0.15 mmol) der Vorstufe wurden in 15 mL THF gelöst und dann wurde bei RT eine Lösung aus 569 mg (3.27 mmol) Dinatriumdithionit in 6 mL Wasser zugegeben. Nach 8 h Rühren bei 50°C wurde nochmal die gleiche Menge Dithionit - in 1mL H_2O gelöst – zugeben. Nach weiterem 16 stündigem Rühren bei 50°C wurde der Ansatz auf RT abgekühlt und mit Ethylacetat extrahiert. Die organische Phase wurde eingeengt und der Rückstand durch präparative HPLC gereinigt. Nach Lyophilisation des Rückstandes aus 1,4-Dioxan wurden 44.5 mg (47% d. Th.) der Titelverbindung erhalten.

LC-MS (Methode 1): R_t = 1.24 min; MS (ESIpos): m/z = 586 $(M+H)^+$.

Intermediat C11

R/S-(11-{(1R)-1-[1-Benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-2,2-dimethyl-6,12-dioxo-5-oxa-7,11-diaza-2-silatridecan-13-yl)-homocystein-trifluoressigsäure(1:1)



990.0 mg (2.79 mmol) (1R)-1-[1-Benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropan-1-amin wurden in 15.0 mL Dichlormethan vorgelegt und mit 828.8 mg (3.91 mmol) Natriumtriacetoxyborhydrid und 129.9 mg (3.21 mmol) Essigsäure versetzt und 5 min bei RT grührt. Es wurden 698.1 mg (3.21 mmol) 2-(Trimethylsilyl)ethyl-(3-oxopropyl)carbamat (Intermediat L58) gelöst in 15.0 mL Dichlormethan zugegeben und die Reaktionsmischung über Nacht bei RT gerührt. Die Reaktionsmischung wurde mit Ethylacetat verdünnt und die organische Phase je zweimal mit ges. Natriumcarbonat-Lösung und ges. NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösemittel im Vakuum verdampft. Der Rückstand wurde mittels Kieselgel (Laufmittel: Dichlormethan/Methanol 100:2) gereinigt. Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 1.25 g (73 % d. Th.) der Verbindung 2-(Trimethylsilyl)ethyl-[3-({(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}amino)propyl]carbamat.

LC-MS (Methode 1): R_t = 1.09 min; MS (ESIpos): m/z = 556 $(M+H)^+$.

400.0 mg (0.65 mmol) 2-(Trimethylsilyl)ethyl-[3-({(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}amino)propyl]carbamat wurden mit 151.4 mg (1.5 mmol) Triethylamin und mit 161.6 mg (1.43 mmol) Chloracetylchlorid versetzt. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei RT gerührt. Die Reaktionsmischung wurde mit Ethylacetat versetzt und die organische Phase dreimal mit Wasser und einmal mit ges. NaCl-Lösung gewaschen. Es wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösemittel im Vakuum verdampft. Der Rückstand wurde mittels Kieselgel (Laufmittel: Cyclohexan/Ethylacetat 3:1) gereinigt. Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 254.4 mg (57 % d. Th.) der Verbindung 2-

(Trimethylsilyl)ethyl-{3-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(chloracetyl)amino]propyl}carbamat.

LC-MS (Methode 1): R_t = 1.49 min; MS (ESIneg): m/z = 676 $(M+HCOO)^-$.

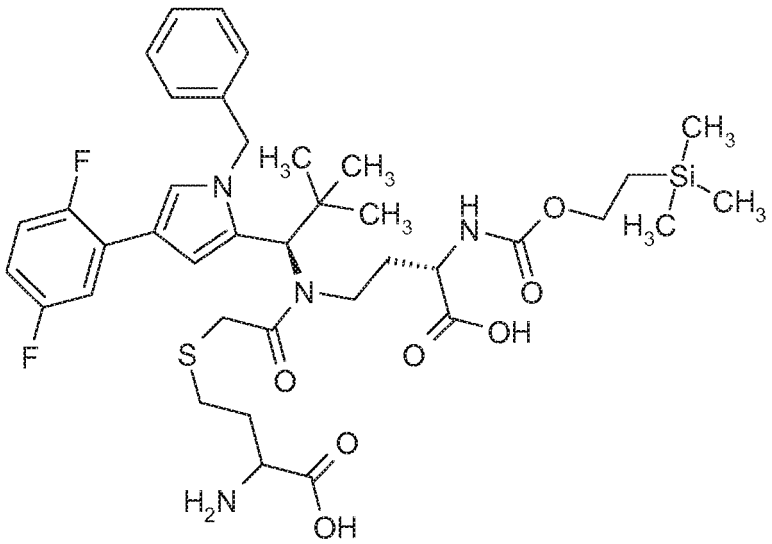
117.4 mg (0.19 mmol) 2-(Trimethylsilyl)ethyl-{3-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(chloracetyl)amino]propyl}carbamat wurde in 10.0 mL Isopropanol gelöst und mit 928.4 µL 1M NaOH und 50.2 mg (0.37 mmol) DL-Homocystein versetzt. Die Reaktionsmischung wurde 4.5 h bei 50 °C gerührt. Die Reaktionsmischung wurde mit Ethylacetat versetzt und die organische Phase mit ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und ges. NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösemittel im Vakuum verdampft. Der Rückstand wurde mittles präp. RP-HPLC gereinigt (Säule: Reprosil 250x40; 10µ, Fluss: 50 mL/min, MeCN/Wasser, 0.1 % TFA). Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 75.3 mg (48 % d. Th.) der Titelverbindung.

LC-MS (Methode 1): R_t = 1.24 min; MS (ESIpos): m/z = 731 $(M+H)^+$.

^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6): δ [ppm] = 0.03 (s, 9H), 0.40 (m, 1H), 0.75-0.91 (m, 11H), 1.30 (m, 1H), 1.99-2.23 (m, 2H), 2.63-2.88 (m, 4H), 3.18-3.61 (m, 5H), 3.79-4.10 (m, 3H), 4.89 (d, 1H), 4.89 (d, 1H), 5.16 (d, 1H), 5.56 (s, 1H), 6.82 (m, 1H), 6.91 (s, 1H), 6.97 (m, 1H), 7.13-7.38 (m, 6H), 7.49 (s, 1H), 7.63 (m, 1H), 8.26 (s, 3H).

Intermediat C12

R/S-[(8S)-11-{(1R)-1-[1-Benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-8-carboxy-2,2-dimethyl-6,12-dioxo-5-oxa-7,11-diaza-2-silatridecan-13-yl]homocystein



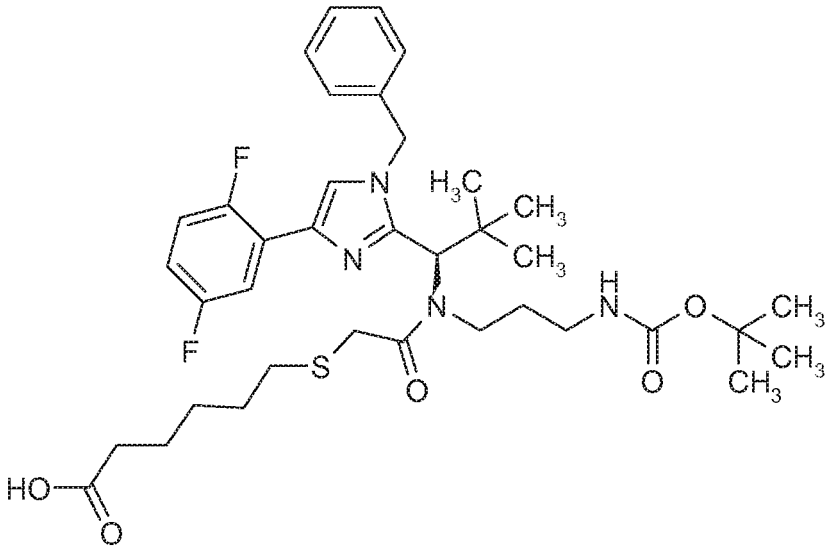
Die Synthese erfolgte in Analogie zur Synthese von Intermediat C11 mit

Methyl-(2S)-4-oxo-2-({[2-(trimethylsilyl)ethoxy]carbonyl}amino)butanoat (Intermediat L57) und Intermediat C52 als Edukten.

LC-MS (Methode 1): R_t = 1.18 min; MS (ESIpos): m/z = 775 $(M+H)^+$.

Intermediat C13

9-{(1R)-1-[1-Benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-2,2-dimethyl-4,10-dioxo-3-oxa-12-thia-5,9-diazaoctadecan-18-säure

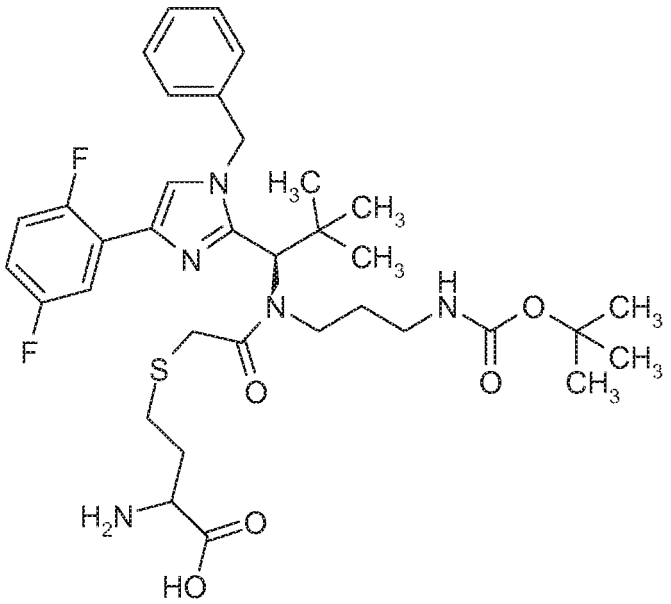


90.0 mg (0.15 mmol) Intermediat C16 und 43.6 mg (0.23 mmol) 6-(Acetylsulfanyl)hexansäure wurden in 9.0 mL Methanol gelöst und mit einem Tropfen Wasser und 73.9 mg (0.54 mmol) Kaliumcarbonat versetzt. Die Reaktionsmischung rührte 4 h bei 50 °C und wurde dann mit Ethylacetat verdünnt. Die organische Phase wurde mit Wasser/ges. NaCl-Lösung und ges. NaCl-Lösung gewaschen und anschließend über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösemittel wurde im Vakuum verdampft und der Rückstand an Kieselgel chromatographiert (Laufmittel: Dichlormethan/Methanol = 100:2). Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt die Titelverbindung in 83 % d. Th.

LC-MS (Methode 1): R_t = 1.44 min; MS (ESIpos): m/z = 701 $(M+H)^+$.

Intermediat C14

R/S-[2-({(1R)-1-[1-Benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}{3-[(tert-butoxycarbonyl)amino]propyl}amino)-2-oxoethyl]homocystein



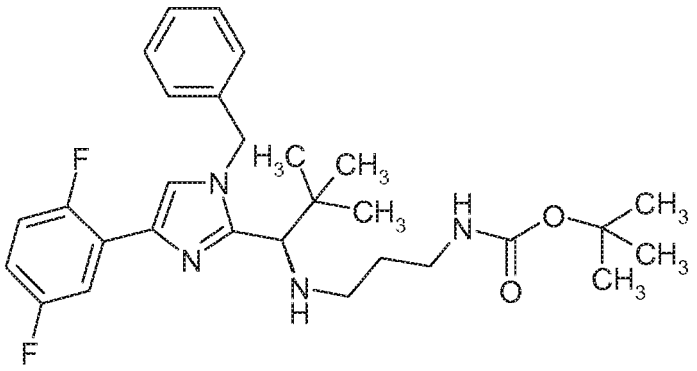
100.0 mg (0.17 mmol) tert-Butyl-{3-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(chloracetyl)amino]propyl}carbamat (Intermediat C16) wurden in 4.0 mL iso-Propanol vorgelegt und mit 276.5 mg (0.85 mmol) 1 M NaOH-Lösung und mit 45.9 mg (0.34 mmol) D/L-Homocystein versetzt. Die Reaktionsmischung wurde 1 h bei 50 °C gerührt. Die Reaktionsmischung wurde mit Ethylacetat verdünnt. Die organische Phase wurde mit ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und ges. NaCl-Lösung gewaschen. Die Trocknung erfolgte über Magnesiumsulfat und das Lösemittel wurde im Vakuum verdampft. Der Rückstand wurde mittles präp. RP-HPLC gereinigt (Säule: Reprosil 250x40; 10µ, Fluss: 50 mL/min, MeCN/Wasser). Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet.

Man erhielt 92.6 mg (66 % d. Th.) der Titelverbindung.

LC-MS (Methode 1): R_t = 1.07 min; MS (ESIpos): m/z = 688 $(M+H)^+$.

Intermediat C15

tert-Butyl-[3-({(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}amino)propyl]carbamat

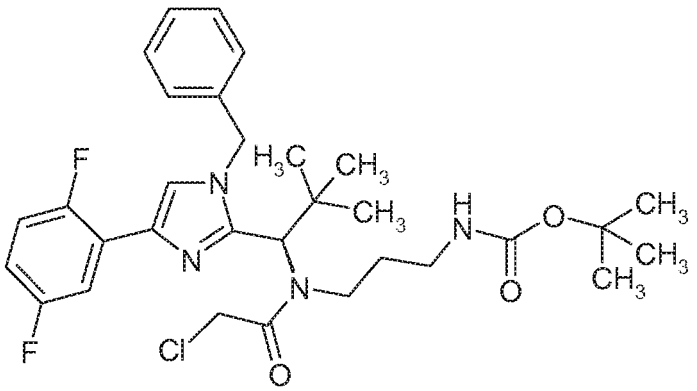


750.0 mg (2.11 mmol) N-(3-Aminopropyl)-N-{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-2-hydroxyacetamid (Intermediat C1) wurden in 15.0 mL Dichlormethan gelöst und mit 626.0 mg (2.95 mmol) Natriumtriacetoxyborhydrid und 139 µL (2.43 mmol) HOAc versetzt und 5 min bei RT gerührt. Dann wurden 420.3 mg (2.43 mmol) tert-Butyl-(3-oxopropyl)carbamat (Die Synthese erfolgte nach Literaturvorschrift J.Med.Chem. 2003, 46, 3536.) zugegeben und bei RT über Nacht gerührt. Die Reaktionsmischung wurde mit Ethylacetat versetzt und zweimal mit ges. Natriumcarbonat-Lösung extrahiert. Die organische Phase wurde mit ges. NaCl-Lösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösemittel wurde im Vakuum verdampft und der Rückstand wurde an Kieselgel chromatographiert. (Laufmittel: Cyclohexan/Ethylacetat = 4:1). Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 881.0 mg (82 % d. Th.) der Titelverbindung.

LC-MS (Methode 1): R_t = 1.07 min; MS (ESIpos): m/z = 513 $[M+H]^+$.

Intermediat C16

tert-Butyl-{3-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(chloracetyl)amino]propyl}carbamat

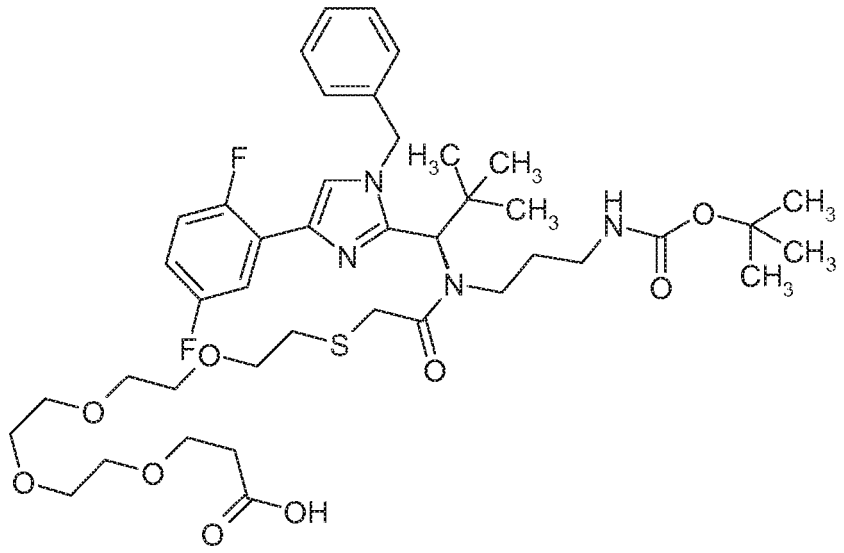


373.4 mg (0.73 mmol) tert-Butyl-[3-({(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}amino)propyl]carbamat (Intermediat C15) wurden in 5.0 mL Dichlormethan vorgelegt und mit 169.5 mg (1.68 mmol) Triethylamin und 181.0 mg (1.60 mmol) Chloracetylchlorid versetzt. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei RT gerührt und dann mit Ethylacetat versetzt und mehrmals mit Wasser extrahiert. Die organische Phase wurde mit ges. NaCl-Lösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösemittel wurde im Vakuum verdampft und der Rückstand wurde an Kieselgel chromatographiert (Laufmittel: Dichlormethan/Methanol = 100:0.5). Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 336.0 mg (75 % d. Th.) der Titelverbindung.

LC-MS (Methode 1): R_t = 1.48 min; MS (ESIpos): m/z = 589 $[M+H]^+$.

Intermediat C17

9-{(1R)-1-[1-Benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-2,2-dimethyl-4,10-dioxo-3,15,18,21,24-pentaoxa-12-thia-5,9-diazaheptacosan-27-säure

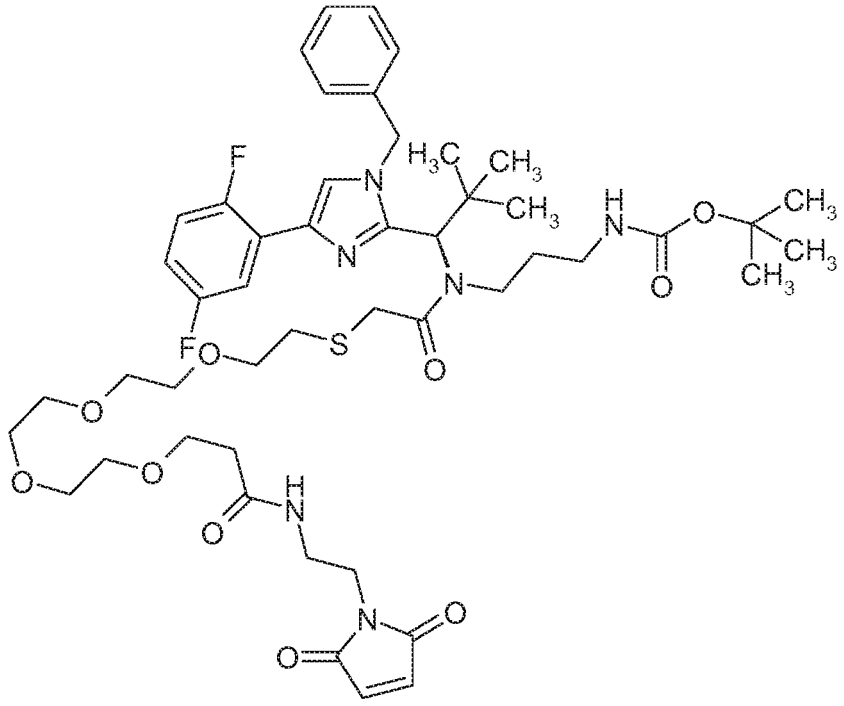


50.0 mg (0.09 mmol) tert-Butyl-{3-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(chloracetyl)amino]propyl}carbamat (Intermediat C16) wurden in 2.0 mL DMF vorgelegt und mit 69.1 mg (0.21 mmol) Cäsiumcarbonat und 28.8 mg (0.10 mmol) 1-Sulfanyl-3,6,9,12-tetraoxapentadecan-15-säure versetzt. Es wurde über Nacht bei 50 °C gerührt. Die Reaktionsmischung wurde mit Wasser versetzt und direkt über die präp. RP-HPLC gereinigt (Säule: Reprosil 250x30; 10µ, Fluss: 50 mL/min, MeCN/Wasser). Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 25.1 mg (35% d. Th.) der Titelverbindung.

LC-MS (Methode 1): R_t = 1.42 min; MS (ESIpos): m/z = 835 $[M+H]^+$.

Intermediat C18

tert-Butyl-[22-{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-1-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-4,21-dioxo-7,10,13,16-tetraoxa-19-thia-3,22-diazapentacosan-25-yl]carbamat

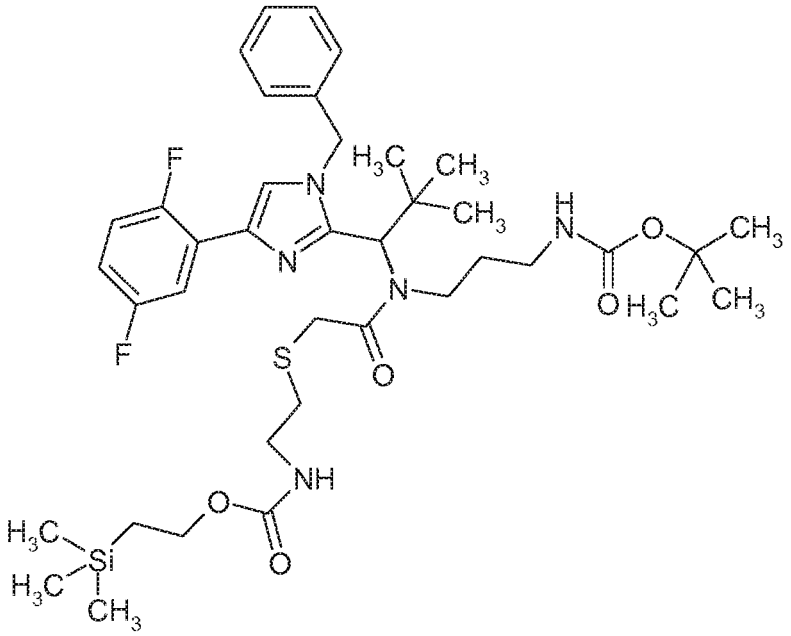


21.0 mg (0.03 mmol) 9-{(1R)-1-[1-Benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-2,2-dimethyl-4,10-dioxo-3,15,18,21,24-pentaoxa-12-thia-5,9-diazaheptacosan-27-säure (Intermediat C17) und 5.8 mg (0.0.3 mmol) 1-(2-Aminoethyl)-1H-pyrrol-2,5-dionhydrochlorid(1:1) wurden in 1.0 mL Acetonitril vorgelegt und mit 26.1 mg (0.20 mmol) N,N-Diisopropylethylamin und 20.9 mg (0.03 mmol) T3P (50 % in Ethylacetat) versetzt. Es wurde über Nacht bei RT gerührt. Die Reaktionsmischung wurde direkt über die präp. RP-HPLC gereinigt (Säule: Reprosil 250x30; 10µ, Fluss: 50 mL/min, MeCN/Wasser). Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 19.7 mg (79 % d. Th.) der Titelverbindung.
LC-MS (Methode 1): R_t = 1.42 min; MS (ESIpos): m/z = 835 $[M+H]^+$.

Intermediat C19

tert-Butyl-(13-{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-

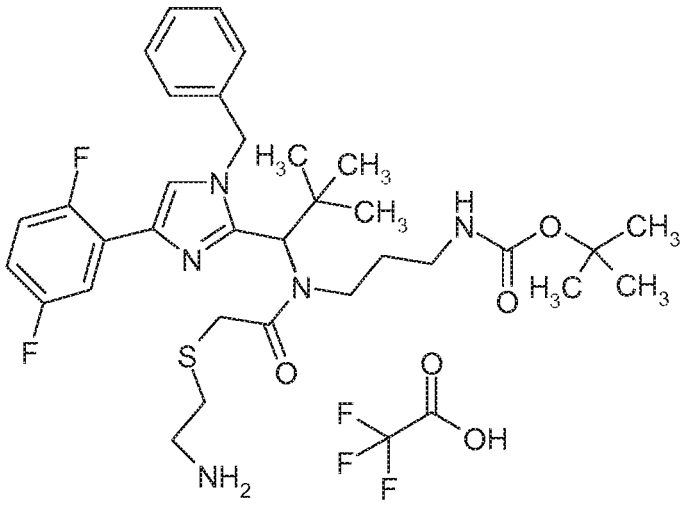
2,2-dimethyl-6,12-dioxo-5-oxa-10-thia-7,13-diaza-2-silahexadecan-16-yl)carbamat



58.5 mg (0.10 mmol) tert-Butyl-{3-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(chloracetyl)amino]propyl}carbamat (Intermediat C16) wurden in 2.0 mL DMF vorgelegt und mit 44.0 mg (0.20 mmol) 2-(Trimethylsilyl)ethyl-(2-sulfanylethyl)carbamat (Intermediat L39) und 64.7 mg (0.20 mmol) Cäsiumcarbonat versetzt. Es wurde über 4 h bei 50 °C gerührt. Der Ansatz wurde wiederholt mit 46.6 mg (0.079 mmol) Intermediat C16. Die beiden Reaktionsmischungen wurden vereinigt und direkt über die präp. RP-HPLC gereinigt (Säule: Reprosil 250x30; 10µ, Fluss: 50 mL/min, MeCN/Wasser). Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 98.0 mg (71 % d. Th.) der Titelverbindung.
LC-MS (Methode 1): R_t = 1.62 min; MS (ESIpos): m/z = 774 $[M+H]^+$.

Intermediat C20

Trifluoressigsäure--tert-Butyl-[3-({[(2-aminoethyl)sulfanyl]acetyl}{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}amino)propyl]carbamat

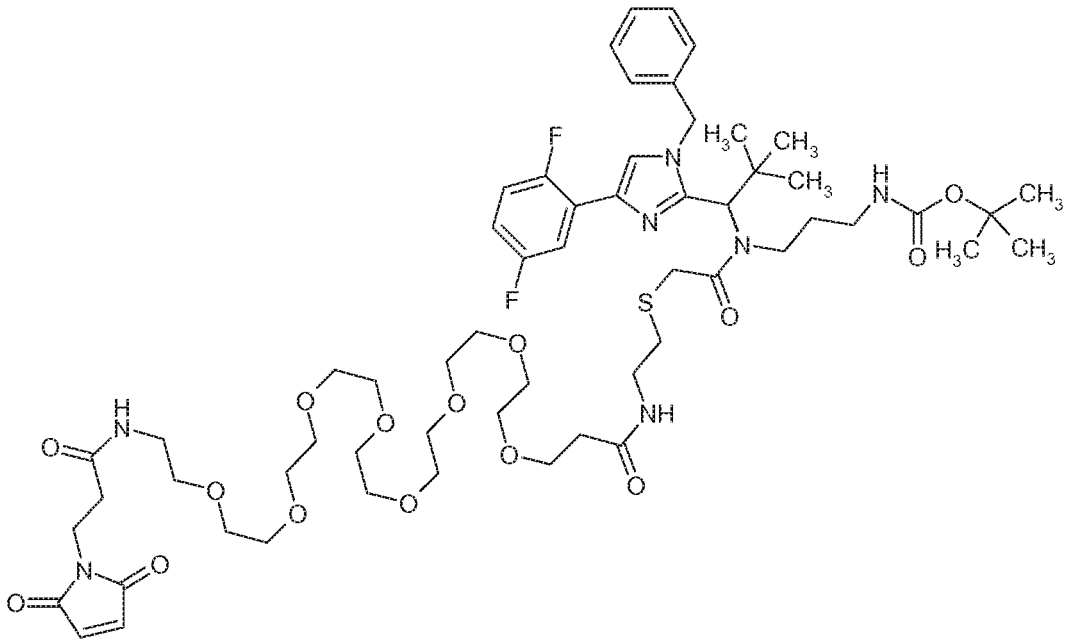


98.0 mg (0.13 mmol) tert-Butyl-(13-{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-2,2-dimethyl-6,12-dioxo-5-oxa-10-thia-7,13-diaza-2-silahexadecan-16-yl)carbamat (Intermediat C19) wurden in 2.0 mL DMF/tert.-Butanol (9:1) vorgelegt und mit 96.2 mg (0.63 mmol) CsF versetzt. Es wurde 16 h bei 90 °C gerührt. Die Reaktionsmischung wurde direkt über die präp. RP-HPLC gereinigt (Säule: Reprosil 250x30; 10µ, Fluss: 50 mL/min, MeCN/Wasser, 0.1 % TFA). Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand lyophilisiert. Man erhielt 57.1 mg (61 % d. Th.) der Titelverbindung. Die Verbindung enthält auch das korrespondierende Sulfoxid.

LC-MS (Methode 1): R_t = 1.08 min; MS (ESIpos): m/z = 630 $[M+H]^+$.

Intermediat C21

tert-Butyl-[38-{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-1-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-3,31,37-trioxo-7,10,13,16,19,22,25,28-octaoxa-35-thia-4,32,38-triazahentetracontan-41-yl]carbamat

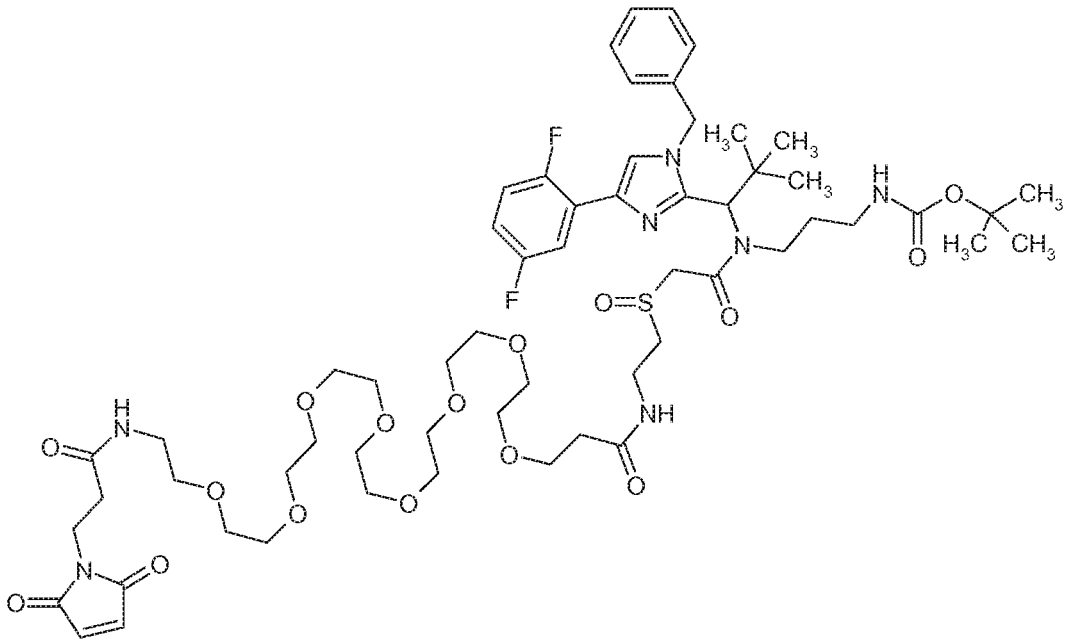


57.1 mg (0.08 mmol) Trifluoressigsäure--tert-Butyl-[3-({[(2-aminoethyl)sulfanyl]acetyl}{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}amino)propyl]carbamat (Intermediat C20) wurden in 3.0 mL DMF vorgelegt und mit 53.0 mg (0.08 mmol) 3-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-N-{27-[(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)oxy]-27-oxo-3,6,9,12,15,18,21,24-octaoxaheptacos-1-yl}propanamid und 15.5 mg (0.15 mmol) Triethylamin versetzt. Es wurde 16 h bei RT gerührt. Die Reaktionsmischung wurde direkt über die präp. RP-HPLC gereinigt (Säule: Reprosil 250x30; 10µ, Fluss: 50 mL/min, MeCN/Wasser). Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand lyophilisiert. Man erhielt 49.7 mg (49 % d. Th.) der Titelverbindung.

LC-MS (Methode 1): R_t = 1.34 min; MS (ESIpos): m/z = 1204 $[M+H]^+$.

Intermediat C22

tert-Butyl-[38-{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-1-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-35-oxido-3,31,37-trioxo-7,10,13,16,19,22,25,28-octaoxa-35lambda4-thia-4,32,38-triazahentetracontan-41-yl]carbamat



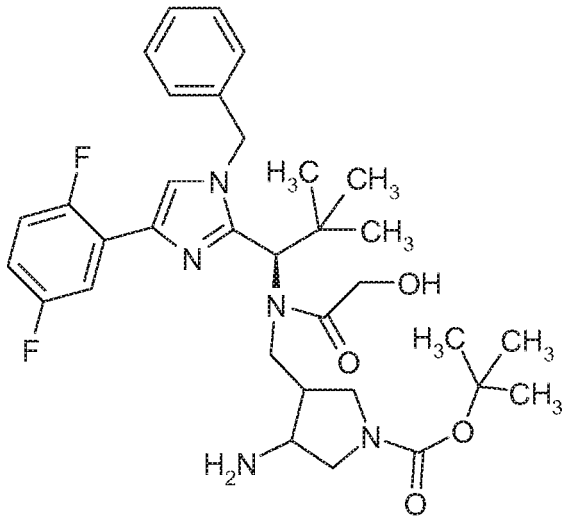
Die Titelverbindung entstand als Nebenprodukt bei der Synthese von Intermediat C21. Man erhielt 15.5 mg (15 % d. Th.) der Titelverbindung.

LC-MS (Methode 1): R_t = 1.25 min; MS (ESIpos): m/z = 1220 $[M+H]^+$.

Intermediat C23

tert-Butyl-3-amino-4-{[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]methyl}pyrrolidin-1-carboxylat

Mischung aus Stereoisomeren.



411.2 mg (1.15 mmol) tert-Butyl-3-formyl-4-({[2-(trimethylsilyl)ethoxy]carbonyl}amino)pyrrolidin-1-carboxylat (Intermediat L28) und 339.7 mg (0.96 mmol) N-(3-Aminopropyl)-N-{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-2-hydroxyacetamid (Intermediat C1) wurden in 6.0 mL Dichlormethan vorgelegt und mit 68.9 mg (1.15 mmol) HOAc versetzt und 1 h bei RT gerührt. Es wurden 405.2 mg (1.91 mmol) Natriumtriacetoxyborhydrid zugegeben und 2 h bei RT gerührt. Das Lösemittel wurde im Vakuum verdampft und der Rückstand mit Ethylacetat und Wasser versetzt. Die wässrige Phase wurde dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden einmal mit ges. NaCl-Lösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösemittel wurde im Vakuum verdampft und der Rückstand mittels Biotage Isolera gereinigt (Kieselgel, Säule 50 g SNAP, Fluss 40 mL/min, Petrolether/Ethylacetat). Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 541.5 mg (81 % d. Th.) der Verbindung tert-Butyl-3-[({(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}amino)methyl]-4-({[2-(trimethylsilyl)ethoxy]carbonyl}amino)pyrrolidin-1-carboxylat.
LC-MS (Methode 1): R_t = 1.24 und 1.29 min; MS (ESIpos): m/z = 698 $[M+H]^+$.

541.5 mg (0.78 mmol) tert-Butyl-3-[({(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}amino)methyl]-4-({[2-(trimethylsilyl)ethoxy]carbonyl}amino)pyrrolidin-1-carboxylat wurden in 13.0 mL Dichlormethan gelöst und mit 180.6 mg (1.78 mmol) Triethylamin versetzt. Die Reaktionslösung wurde auf 0 °C abgekühlt und mit 233.1 mg (1.71 mmol) Acetoxyacetylchlorid versetzt und 16 h bei RT gerührt. Es wurden nochmals 180.6 mg (1.78 mmol) Triethylamin und 233.1 mg (1.71 mmol) Acetoxyacetylchlorid zugesetzt und bei RT nochmals 80 h gerührt. Das Lösemittel wurde im Vakuum verdampft und der Rückstand zwischen Wasser und Ethylacetat verteilt. Die wässrige Phase wurde dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden einmal mit ges. NaCl-Lösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösemittel wurde im Vakuum verdampft und der Rückstand mittels Biotage Isolera gereinigt (Kieselgel, Säule 50 g SNAP, Fluss 40 mL/min, Petrolether/Ethylacetat). Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 529.2 mg (86 % d. Th.) der Verbindung tert-Butyl-3-{[(acetoxyacetyl){(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}amino]methyl}-4-({[2-(trimethylsilyl)ethoxy]carbonyl}amino)pyrrolidin-1-carboxylat.
LC-MS (Methode 1): R_t = 1.53 und 1.56 min; MS (ESIpos): m/z = 798 $[M+H]^+$.

529.2 mg (0.66 mmol) tert-Butyl-3-{[(acetoxyacetyl){(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}amino]methyl}-4-({[2-(trimethylsilyl)ethoxy]carbonyl}amino)pyrrolidin-1-carboxylat wurden in 10.0 mL DMF/tert.-Butanol (9:1) vorgelegt und mit 503.7 mg (3.32 mmol) CsF versetzt. Dir Reaktionsmischung wurde 16 h bei 90 °C gerührt. Die Reaktionsmischung wurde zwischen Wasser und Ethylacetat verteilt. Die wässrige

Phase wurde dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden einmal mit ges. NaCl-Lösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösemittel wurde im Vakuum verdampft und der Rückstand mittels Biotage Isolera gereinigt (Kieselgel, Säule 50 g SNAP, Fluss 25 mL/min, Dichlormethan/Methanol). Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 172.4 mg (40 % d. Th.) der Verbindung tert-Butyl-3-{[(acetoxyacetyl){(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}amino]methyl}-4-aminopyrrolidin-1-carboxylat.

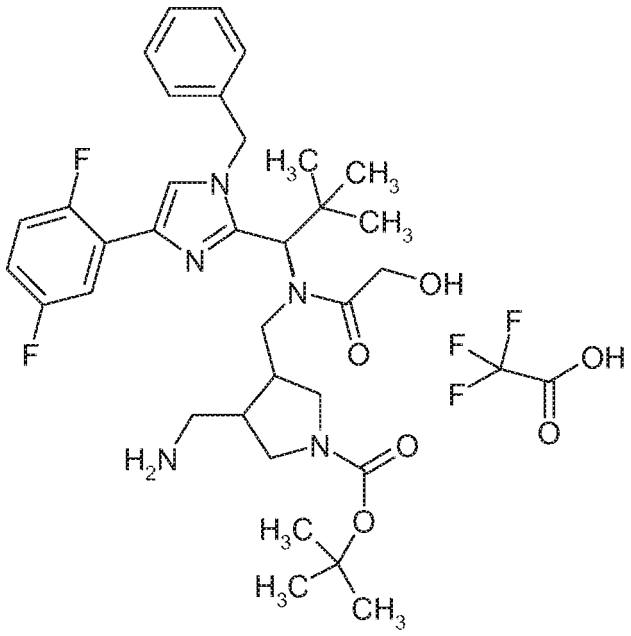
LC-MS (Methode 1): R_t = 1.05 und 1.35 min; MS (ESIpos): m/z = 654 $[M+H]^+$.

172.4 mg (0.26 mmol) tert-Butyl-3-{[(acetoxyacetyl){(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}amino]methyl}-4-aminopyrrolidin-1-carboxylat wurden in 4.5 mL Methanol/Wasser (2:1) vorgelegt und mit 80.2 mg (0.58 mmol) Kaliumcarbonat versetzt und 16 h bei RT gerührt. Die Reaktionsmischung wurde zwischen Wasser und Ethylacetat verteilt. Die wässrige Phase wurde dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden einmal mit ges. NaCl-Lösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösemittel wurde im Vakuum verdampft und der Rückstand wurde mittels präp. RP-HPLC gereinigt (Säule: Reprosil 250x30; 10µ, Fluss: 50 mL/min, MeCN/Wasser). Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 116.0 mg (72 % d. Th.) der Titelverbindung.

LC-MS (Methode 1): R_t = 1.01 min und 1.03 min; MS (ESIpos): m/z = 612 $[M+H]^+$.

Intermediat C24

Trifluoressigsäure--tert-Butyl-3-(aminomethyl)-4-{[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]methyl}pyrrolidin-1-carboxylat(1:1)



26.8 mg (N-(3-Aminopropyl)-N-{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-2-hydroxyacetamid (Intermediat C1) wurden in 3.0 mL Dichlormethan gelöst und mit 5.2 mg (0.09 mmol) HOAc und 22.4 mg (0.11 mmol) Natriumtriacetoxyborhydrid versetzt und 5 min bei RT gerührt. Es wurden 62.4 mg (0.09 mmol) tert-Butyl-3-formyl-4-[({[2-(trimethylsilyl)ethoxy]carbonyl}amino)methyl]pyrrolidin-1-carboxylat (Intermediat L29) zugegeben und über Nacht bei RT gerührt. Das Lösemittel wurde im Vakuum verdampft und der Rückstand wurde mittels präp. RP-HPLC gereinigt (Säule: Reprosil 250x30; 10µ, Fluss: 50 mL/min, MeCN/Wasser, 0.1 % TFA). Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 57.6 mg (91 % d. Th.) der Verbindung Trifluoressigsäure--tert-Butyl-3-[({(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}amino)methyl]-4-[({[2-(trimethylsilyl)ethoxy]carbonyl}amino) methyl]pyrrolidin-1-carboxylat.

LC-MS (Methode 1): R_t = 1.25 und 1.27 min; MS (ESIpos): m/z = 712 $[M+H]^+$.

77.0 mg (0.11 mmol) tert-Butyl-3-[({(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}amino)methyl]-4-[({[2-(trimethylsilyl)ethoxy]carbonyl}amino)methyl] pyrrolidin-1-carboxylat wurden in 1.5 mL Dichlormethan vorgelegt und mit 21.9 mg (0.22 mmol) Triethylamin versetzt. Dann wurden bei 0 °C 29.5 mg (0.22 mmol) Acetoxyessigsäurechlorid zugegeben und die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei RT gerührt. Das Lösemittel wurde im Vakuum verdampft und der Rückstand in Ethylacetat aufgenommen. Die organische Phase wurde je einmal mit Wasser, ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und ges. NaCl-Lösung gewaschen. Nach der Trocknung über Magnesiumsulfat wurde das Lösemittel im Vakuum verdampft. Wiederholung des Ansatzes mit 77.0 mg (0.11 mmol) tert-Butyl-3-[({(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-

dimethylpropyl}amino)methyl]-4-[({[2-(trimethylsilyl)ethoxy]carbonyl}amino)methyl]. ,Die vereinigten Rückstände wurden mittels Kieselgel (Laufmittel: Cyclohexan/Ethylacetat = 2:1) gereinigt. Man erhielt 171.1 mg (85 % d. Th.) der Verbindung tert-Butyl-3-{[(acetoxyacetyl){(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}amino]methyl}-4-[({[2-(trimethylsilyl)ethoxy]carbonyl}amino)methyl]pyrrolidin-1-carboxylat

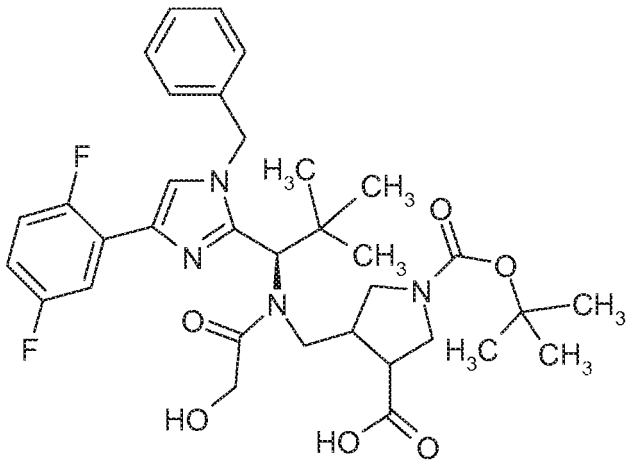
LC-MS (Methode 1): R_t = 1.56 und 1.57 min; MS (ESIpos): m/z = 812 $[M+H]^+$.

30.0 mg (0.04 mmol) tert-Butyl-3-{[(acetoxyacetyl){(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}amino]methyl}-4-[({[2-(trimethylsilyl)ethoxy]carbonyl}amino)methyl]pyrrolidin-1-carboxylat wurden in 0.5 mL TBAF-Lösung (1M in THF) gelöst. Es wurde über Nacht bei RT gerührt. Das Lösemittel wurde im Vakuum verdampft und der Rückstand mittels präp. RP-HPLC gereinigt (Säule: Reprosil 250x30; 10µ, Fluss: 50 mL/min, MeCN/Wasser, 0.1 % TFA). Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 25.0 mg (92 % d. Th.) der Titelverbindung.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.98 min; MS (ESIpos): m/z = 626 $[M+H]^+$.

Intermediat C25

4-{[{(1R)-1-[1-Benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]methyl}-1-(tert-butoxycarbonyl)pyrrolidin-3-carbonsäure



171.4 mg (0.48 mmol) (N-(3-Aminopropyl)-N-{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-2-hydroxyacetamid (Intermediat C1) wurden in 4.0 mL Dichlormethan vorgelegt und mit 248.5 mg (0.72 mmol) tert-Butyl-3-({[tert-butyl(dimethyl)silyl]oxy}methyl)-4-formylpyrrolidin-1-carboxylat (Intermediat L30) und 34.8 mg (0.58 mmol) HOAc versetzt. Die Reaktionsmischung wurde 1 h bei RT gerührt. Es wurde 204.4 mg (0.97 mmol)

Natriumtriacetoxyborhydrid zugesetzt und 60 h bei RT gerührt. Das Lösemittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand mittels Biotage Isolera gereinigt (Kieselgel, Säule 25 g SNAP, Fluss 25 mL/min, Petrolether/Ethylacetat). Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 267.0 mg (77 % d. Th.) der Verbindung tert-Butyl-3-[({(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}amino)methyl]-4-({[tert-butyl(dimethyl)silyl]oxy}methyl)pyrrolidin-1-carboxylat.

LC-MS (Methode 1): R_t = 1.49 min; MS (ESIpos): m/z = 683 $[M+H]^+$.

267.0 mg (0.39 mmol) tert-Butyl-3-[({(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}amino)methyl]-4-({[tert-butyl(dimethyl)silyl]oxy}methyl)pyrrolidin-1-carboxylat wurden in 5.0 mL Dichlormethan gelöst und mit 91.0 mg (0.90 mmol) Triethylamin versetzt und auf 0 °C abgekühlt. Es wurden 117.4 mg (0.86 mmol) Acetoxyacetylchlorid zugegeben und 16 h bei RT gerührt. Es wurden nochmals 593.4 mg (5.87 mmol) Triethylamin und 427.0 mg (3.13 mmol) Acetoxyacetylchlorid zugegeben und weitere 10 h bei RT gerührt. Das Lösemittel wurde im Vakuum verdampft und der Rückstand über die präp. RP-HPLC gereinigt (Säule: Reprosil 250x30; 10µ, Fluss: 50 mL/min, MeCN/Wasser). Die Lösemittel wurden dann im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 216.3 mg (71 % d. Th.) der Verbindung tert-Butyl-3-{[(acetoxyacetyl){(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}amino]methyl}-4-({[tert-butyl(dimethyl)silyl]oxy}methyl)pyrrolidin-1-carboxylat.

LC-MS (Methode 1): R_t = 1.70 und 1.72 min; MS (ESIpos): m/z = 783 $[M+H]^+$.

216. 3 mg (0.28 mmol) tert-Butyl-3-{[(acetoxyacetyl){(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}amino]methyl}-4-({[tert-butyl(dimethyl)silyl]oxy}methyl) pyrrolidin-1-carboxylat wurden in 4.0 mL THF vorgelegt und wurden mit 16.6 mg (0.28 mmol) HOAc und 361.1 mg (1.38 mmol) TBAF-Lösung (1M in THF) versetzt. Die Reaktionslösung wurde 4 h bei RT gerührt. Das Lösemittel wurde im Vakuum verdampft und der Rückstand über die präp. RP-HPLC gereinigt (Säule: Reprosil 250x30; 10µ, Fluss: 50 mL/min, MeCN/Wasser). Die Lösemittel wurden dann im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 94.0 mg (51 % d. Th.) der Verbindung tert-Butyl-3-{[(acetoxyacetyl){(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}amino]methyl}-4-(hydroxymethyl) pyrrolidin-1-carboxylat.

LC-MS (Methode 1): R_t = 1.34 min; MS (ESIpos): m/z = 669 $[M+H]^+$.

52.0 mg (0.08 mmol) tert-Butyl-3-{[(acetoxyacetyl){(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}amino]methyl}-4-(hydroxymethyl) pyrrolidin-1-carboxylat wurden in 4.0 mL PBS-Puffer/Acetonitril (1:1) vorgelegt und mit 1.2 mg (0.01 mmol) TEMPO versetzt. Es wurden dann gleichzeitig 14.1 mg (0.16 mmol) Natriumchlorit in 1.0 mL Wasser und 115.8 µL (0.16

mmol) 10%ige Natriumhypochlorit-Lösung zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde 16 h bei RT gerührt. Die Reaktionsmischung wurde in eine 10%ige Natriumsulfit-Lösung gegossen und mit Ethylacetat versetzt. Die wässrige Phase wurde dreimal mit Ethylacetat extrahiert und die vereinigten organischen Phasen einmal mit ges. NaCl-Lösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösemittel wurde im Vakuum verdampft und der Rückstand ohne weitere Reinigung in der nächsten Synthesestufe eingesetzt.

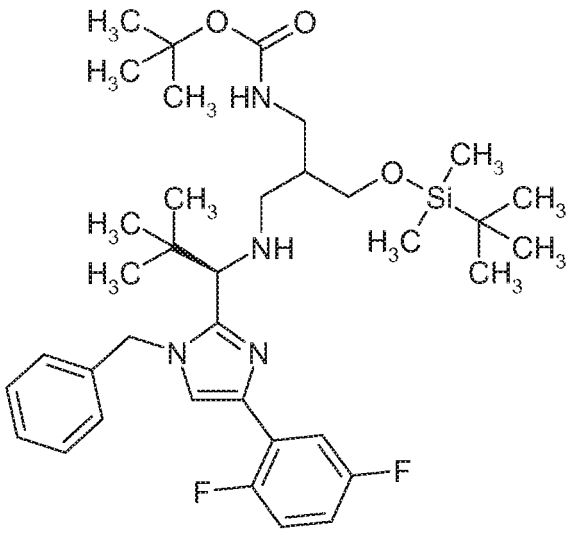
LC-MS (Methode 1): R_t = 1.34 min; MS (ESIpos): m/z = 683 $[M+H]^+$.

103.0 mg (0.15 mmol) 4-{[(Acetoxyacetyl){(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}amino]methyl}-1-(tert-butoxycarbonyl)pyrrolidin-3-carbonsäure wurden in 4.5 mL Methanol/Wasser (2:1) vorgelegt und mit 45.9 mg (0.33 mmol) Kaliumcarbonat versetzt und 3 h bei RT gerührt. Die Reaktionsmischung wurde zwischen Wasser und Ethylacetat verteilt. Die wässrige Phase wurde dreimal mit Ethylacetat extrahiert und die vereinigten organischen Phasen einmal mit ges. NaCl-Lösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösemittel wurde im Vakuum verdampft und die Titelverbindung ohne weitere Reinigung in der nächsten Synthesestufe eingesetzt.

LC-MS (Methode 1): R_t = 1.35 min; MS (ESIpos): m/z = 641 $[M+H]^+$.

Intermediat C26

tert-Butyl-[3-({(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}amino)-2-({[tert-butyl(dimethyl)silyl]oxy}methyl)propyl]carbamat



590 mg (1.69 mmol) Natriumtriacetoxyborhydrid sowie 155 µl (2.70 mmol, 162 mg) Essigsäure wurden in 30 mL Dichlormethan vorgelegt und des Gemisch 30 min. bei RT gerührt. Anschließend wurden 600

mg (1.687 mmol) (1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropan-1-amin (welche aus Trifluoressigsäure--(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropan-1-amin(1:1) durch ausschütteln gegen 1N Natronlauge gewonnen wurde) und 750 mg (2.362 mmol) tert-Butyl-(3-{[tert-butyl(dimethyl)silyl]oxy}-2-formylpropyl)carbamat gelöst in 40 mL Dichlormethan zugetropft. Es wurde 2 h bei RT gerührt. Anschließend wurde Essigsäureethylester addiert, das Gemisch mit gesättigter Natriumcarbonat-Lösung gewaschen und die organische Phase eingeengt. Der Rückstand wurde mittels präparativer HPLC (Eluent: ACN/Wasser, Gradient) getrennt. Es wurden 510 mg (46% d. Th.) der Zielverbindung als Diastereomerengemisch erhalten.

Isomer 1:

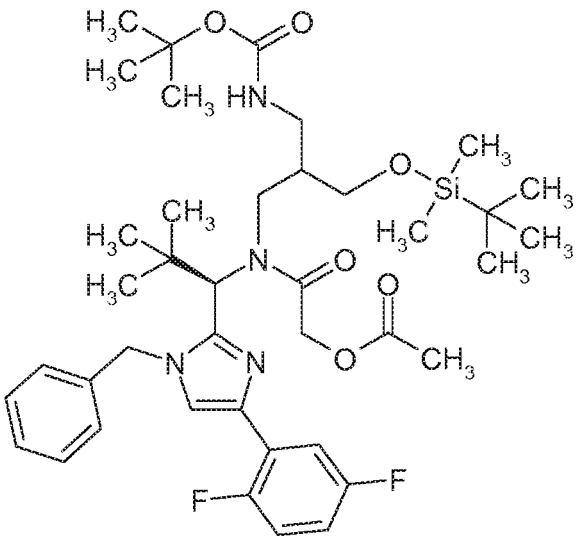
LC-MS (Methode 1): R_t = 1.36 min (51%); MS (EIpos): m/z = 657 $[M+H]^+$.

Isomer 2:

LC-MS (Methode 1): R_t = 1.41 min (49%); MS (EIpos): m/z = 657 $[M+H]^+$.

Intermediat C27

2-({(1R)-1-[1-Benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}{3-[(tert-butoxycarbonyl)amino]-2-({[tert-butyl(dimethyl)silyl]oxy}methyl)propyl}amino)-2-oxoethylacetat



510 mg (0.776 mmol) tert-Butyl-[3-({(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}amino)-2-({[tert-butyl(dimethyl)silyl]oxy}methyl)propyl]carbamat wurden in 30 mL Dichlormethan vorgelegt und bei RT mit 181 mg (249 µl, 1.786 mmol) Triethylamin sowie mit 219 mg (1.553 mmol) 2-Chlor-2-oxoethylacetat versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde bei RT für 2 h gerührt und anschließend mit ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer eingeengt. Der Rückstand wurde mittels

präparativer HPLC (Eluent: ACN/Wasser, Gradient) getrennt. Es wurden 290 mg (49% d. Th.) der Zielverbindung als Epimerengemisch erhalten.

Isomer 1:

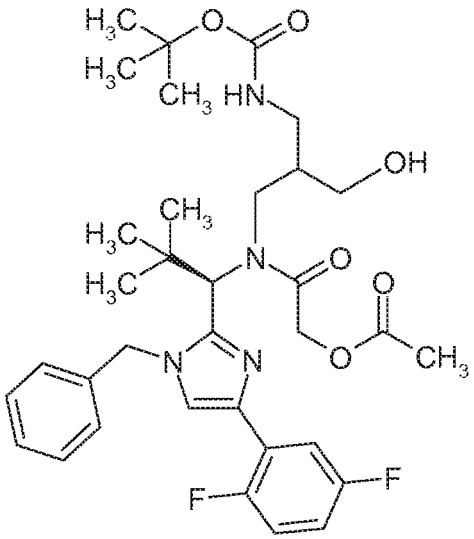
LC-MS (METHODE 1): R_t = 1.70 min; MS (EIpos): m/z = 757 $[M+H]^+$.

Isomer 2:

LC-MS (Methode 1): R_t = 1.72 min; MS (EIpos): m/z = 757 $[M+H]^+$.

Intermediat C28

2-({(1R)-1-[1-Benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}{3-[(tert-butoxycarbonyl)amino]-2-(hydroxymethyl)propyl}amino)-2-oxoethylacetat



285 mg (0.376 mmol) 2-({(1R)-1-[1-Benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}{3-[(tert-butoxycarbonyl)amino]-2-({[tert-butyl(dimethyl)silyl]oxy}methyl)propyl}amino)-2-oxoethylacetat wurden in 5 mL THF gelöst. Es wurden 452 µl (0.452 mmol) einer 1 M Lösung von Tetra-n-butylammoniumfluorid in THF addiert und das Reaktionsgemisch 3 h bei RT gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde mittels präparativer HPLC (Eluent: ACN/Wasser, Gradient) getrennt und lyophilisiert. Es wurden 214 mg (81% d. Th., LC/MS-Reinheit = 92%) der Zielverbindung als Epimerengemisch erhalten.

Isomer 1:

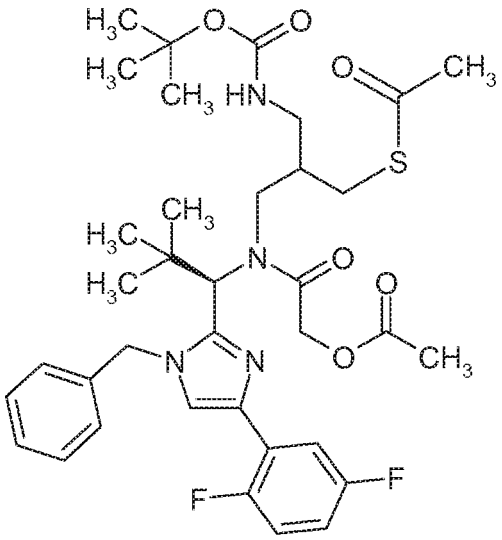
LC-MS (Methode 1): R_t = 1.37 min; MS (EIpos): m/z = 643 $[M+H]^+$.

Isomer 2:

LC-MS (METHODE 1): R_t = 1.40 min; MS (EIpos): m/z = 643 $[M+H]^+$.

Intermediat C29

2-([3-(Acetylsulfanyl)-2-{[(tert-butoxycarbonyl)amino]methyl}propyl]{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}amino)-2-oxoethylacetat



210 mg (0.301 mmol) 2-({(1R)-1-[1-Benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}{3-[(tert-butoxycarbonyl)amino]-2-(hydroxymethyl)propyl}amino)-2-oxoethylacetat wurden in 8 mL absolutem THF vorgelegt, bei RT mit 178 mg (1.503 mmol, 109 µl) Thionylchlorid gelöst in 8 mL absolutem THF tropfenweise versetzt und 40 Min. Bei RT gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde am Rotationsverdampfer eingeengt und im Hochvakuum getrocknet. Der Rückstand wurde in 16 mL absolutem DMF aufgenommen, mit 172 mg (1.503 mmol) Kaliumthioacetat sowei mit 133 mg (0.361 mmol) Tetra-n-butylammoniumiodid versetzt und 2 h bei 90°C gerührt. Nach dem Abkühlen wurde Wasser zugesetzt und das Gemisch mit Essigsäureethylester extrahiert. Die organische Phase wurde am Rotationsverdampfer eingeengt und der Rückstand mittels präparativer HPLC (Eluent: ACN/Wasser, Gradient) getrennt und lyophilisiert. Es wurden 155 mg (69% d. Th., LC/MS-Reinheit = 94%) der Zielverbindung als Epimerengemisch erhalten.

Isomer 1:

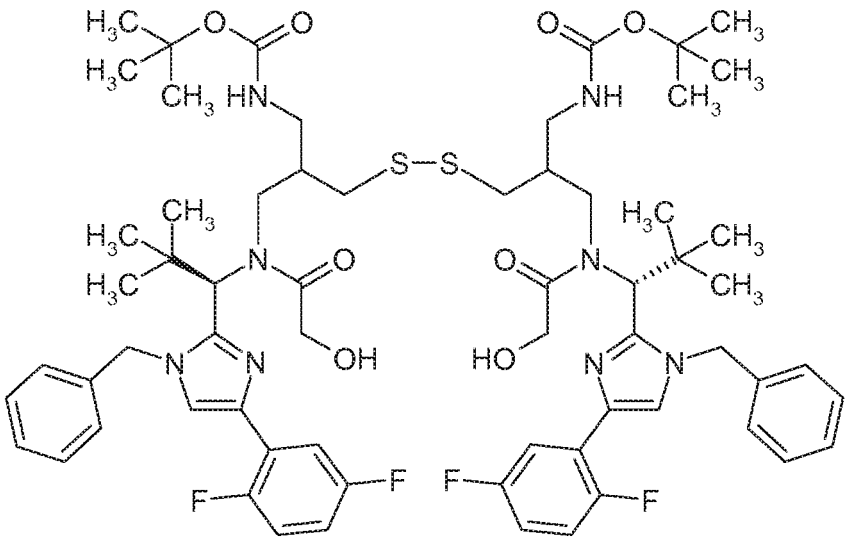
LC-MS (METHODE 1): R_t = 1.50 min; MS (EIpos): m/z = 701 $[M+H]^+$.

Isomer 2:

LC-MS (METHODE 1): R_t = 1.51 min; MS (EIpos): m/z = 701 $[M+H]^+$.

Intermediat C30

Di-tert-butyl-[disulfanediylbis(2-{[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]methyl}propan-3,1-diyl)]biscarbamat



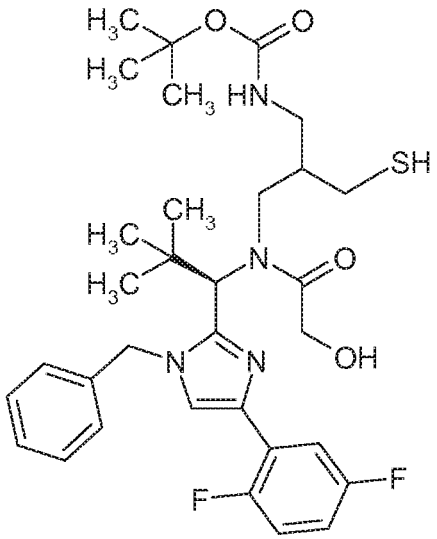
1.220 g (1.010 mmol, LC/MS Reinheit = 58%) 2-([3-(Acetylsulfanyl)-2-{[(tert-butoxycarbonyl)amino]methyl}propyl]{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}amino)-2-oxoethylacetat wurden in 30 mL THF und 30 mL Methanol vorgelegt, mit 10 mL einer 1 N Natronlauge versetzt und 2 h bei RT gerührt. Die Reaktionsmischung wurde mit Wasser versetzt und mit Dichlormethan extrahiert. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer eingeengt. Der Rückstand wurde mittels präparativer HPLC (Eluent: ACN/Wasser, Gradient) gereinigt. Es wurden 390 mg (54% d. Th., LC/MS-Reinheit = 86%) der Zielverbindung als Diastereomerengemisch erhalten.

Isomere:

LC-MS (METHODE 1): R_t = 1.81 min; MS (EIpos): m/z = 1232 $[M+H]^+$.

Intermediat C31

tert-Butyl-{3-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]-2-(sulfanylmethyl)propyl}carbamat



390 mg (0.272 mmol, LC/MS Reiheit = 86%) Di-tert-butyl-[disulfanediylbis(2-{[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]methyl}propan-3,1-diyl)]biscarbamat wurden in 20 mL 1,4-Dioxansowie 10 mL PBS-Puffer aufgenommen und mit 234 mg (0.817 mmol) 3,3',3"-Phosphantriyltripropansäurehydrochlorid(1:1) versetzt. Es wurde 16 h bei RT gerührt. Anschließend wurde die Reaktionsmischung am Rotationsverdampfer eingeengt, mit Dichlormethan ausgerührt, das Filtrat eingeengt und im Hochvakuum getrocknet. Der Rückstand wurde in 8 mL iso-Propanol gelöst und an chiraler Chromatogrphie (Säule: 250x30 mm gefüllt mit Daicel Chiralpak AZ-H, Eluent: iso-Hexan/iso-Propanol = 90:10) gereinigt. Es wurden zwei Fraktionen der Zielverbindung erhalten erhalten. Fraktion 1 enthielt 181.2 mg (50% d.Th.) des Isomers 1 und Fraktion 2 ergab 90.2 mg (25% d. Th.) des Isomers 2.

Isomer 1:

Chirale HPLC (Säule: 250x4.6 mm, gefüllt mit Diacel Chiralpak AZ-H, Eluent: iso-Hexan. Ethanol 90:10): R_t = 6.98 min.

LC-MS (METHODE 1): R_t = 1.47 min; MS (EIpos): m/z = 617 $[M+H]^+$.

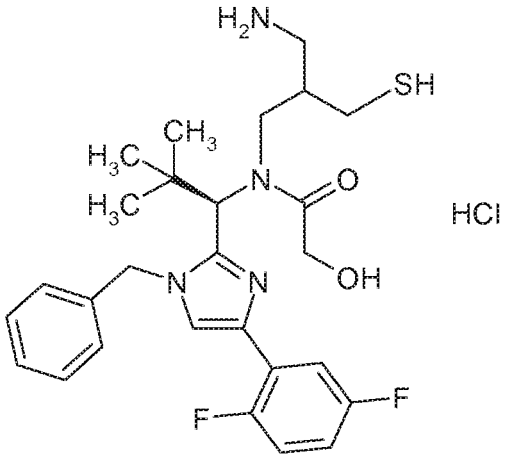
Isomer 2:

Chirale HPLC (Säule: 250x4.6 mm, gefüllt mit Diacel Chiralpak AZ-H, Eluent: iso-Hexan. Ethanol 90:10): R_t = 9.39 min.

LC-MS (METHODE 1): R_t = 1.47 min; MS (EIpos): m/z = 617 $[M+H]^+$.

Intermediat C32

N-[3-Amino-2-(sulfanylmethyl)propyl]-N-{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-2-hydroxyacetamidhydrochlorid(1:1) (Isomer1)



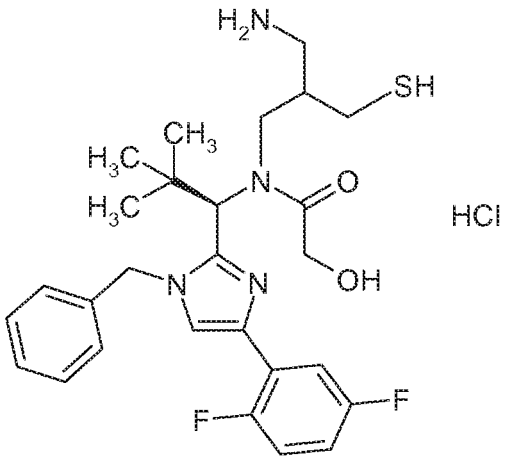
123 mg (199.42 µmol) tert-Butyl-{3-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]-2-(sulfanylmethyl)propyl}carbamat (Isomer 1) wurden in 2 mL THF gelöst und mit 10 mL halbkonzentrierter Salzsäure 1 h lang bei RT gerührt. Die Reaktionslösung wurde unter Argon entgast und anschließend lyophilisiert. Es wurden 108 mg (98% d. Th.) der Zielverbindung enthalten.

Isomer 1

LC-MS (METHODE 1): R_t = 0.95 min; MS (EIpos): m/z = 517 $[M+H]^+$.

Intermediat C33

N-[3-Amino-2-(sulfanylmethyl)propyl]-N-{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-2-hydroxyacetamidhydrochlorid(1:1) (Isomer2)



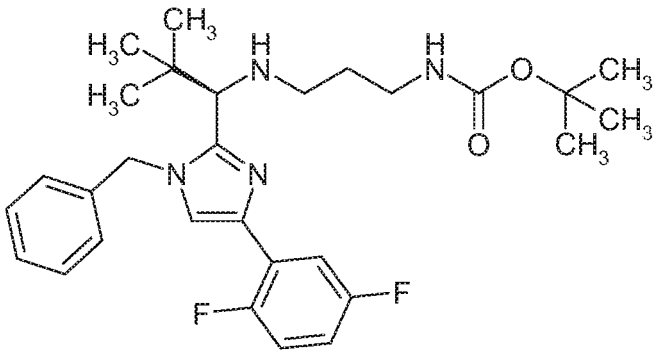
123 mg (199.42 µmol) tert-Butyl-{3-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]-2-(sulfanylmethyl)propyl}carbamat (Isomer 2) wurden in 2 mL THF gelöst und mit 10 mL halbkonzentrierter Salzsäure 1 h lang bei RT gerührt. Die Reaktionslösung wurde unter Argon entgast und anschließend lyophilisiert. Es wurden 58 mg (63% d. Th., LC/MS-Reinheit = 91%) der Zielverbindung enthalten.

Isomer 2

LC-MS (METHODE 1): R_t = 0.97 min; MS (Elpos): m/z = 517 $[M+H]^+$.

Intermediat C34

tert-Butyl-[3-({(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}amino)propyl]carbamat



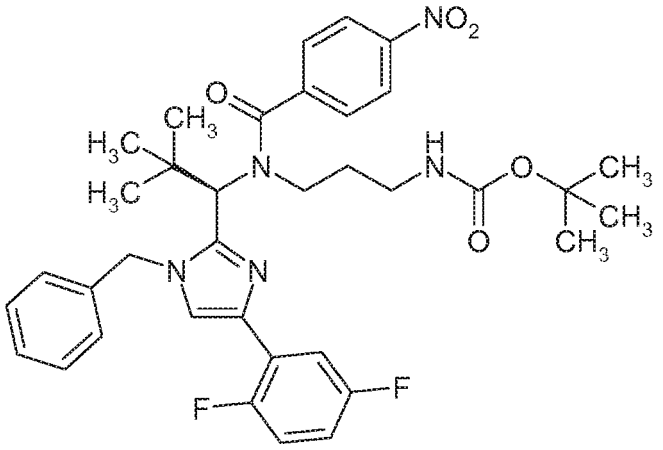
3.790 g (10.02 mmol) (1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropan-1-amin (welche aus Trifluoressigsäure--(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropan-1-amin(1:1) durch ausschütteln gegen 1N Natronlauge gewonnen wurde) und 3.186 g (15.04 mmol) Natriumtriacetoxyborhydrid sowie 690 µl (12.03 mmol, 722 mg) wurden in 100 mL Dichlormethan vorgelegt. Es wurde 5 Min. bei RT gerührt.

Anschließend wurden 4.687 g (27.06 mmol) tert-Butyl-(3-oxopropyl)carbamat zugegeben und für 16 h bei RT gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde mit Dichlormethan verdünnt und mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer eingeengt. Der Rückstand wurde durch Chromatographie an Kieselgel (Eluent: Dichlormethan/Essigsäureethylester, Gradient = 4:1 → 1:1) gereinigt. Es wurden 2.57 g (48% d. Th., LC/MS-Reinheit = 96%) der Zeilverbindung erhalten.

LC-MS (Methode 1): R_t = 1.00 min; MS (EIpos): m/z = 513 $[M+H]^+$.

Intermediat C35

tert-Butyl-{3-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(4-nitrobenzoyl)amino]propyl}carbamat

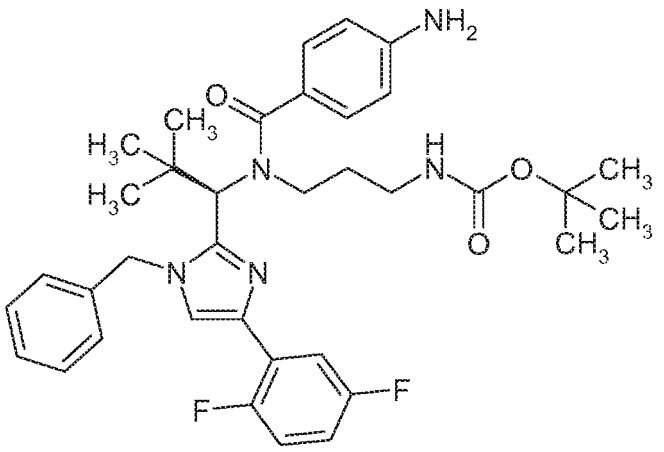


200 mg (0.38 mmol) tert-Butyl-[3-({(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}amino)propyl]carbamat wurden in 9 mL absolutem Dichlormethan vorgelegt und bei RT mit 120 µl (0.86 mmol, 87 mg) Triethylamin versetzt. Bei RT wurden 83 mg (0.45 mmol) 4-Nitrobenzoylchlorid gelöst in 1 mL absolutem Dichlormethan tropfenweise addiert und 1 h bei RT gerührt. Es wurde Wasser addiert und das Gemisch am Rotationsverdampfer eingeengt. Der Rückstand wurde mittels präparativer HPLC (Eluent: ACN/Wasser + 0.1% TFA, Gradient) gereinigt und geterocknet. Es wurden 181 mg (73% d. Th.) der Zielverbindung erhalten.

LC-MS (Methode 1): R_t = 1.47 min; MS (EIpos): m/z = 662 $[M+H]^+$.

Intermediat C36

tert-Butyl-{3-[(4-aminobenzoyl){(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}amino]propyl}carbamat

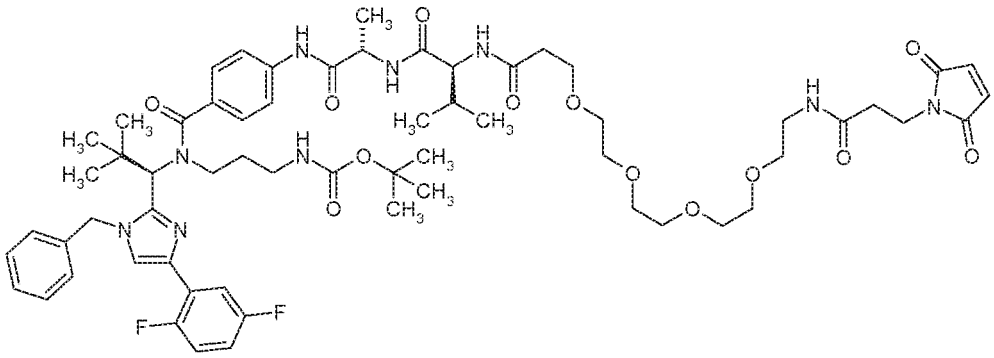


170 mg (0.26 mmol) tert-Butyl-{3-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(4-nitrobenzoyl)amino]propyl}carbamat wurden in 10 mL Essigsäure vorgelegt. Es wurden 143 mg (2.57 mmol) Eisenpulver addiert und 16 h bei 50°C gerührt. Nach dem Abkühlen wurde Wasser addiert und das Gemisch mit Essigsäureethylester extrahiert. Die organische Phse wurde über Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer eingeengt. Der Rückstand wurde im HV getrocknet. Es wurden 154 mg (77% d. Th., LC/MS-Reinheit = 82 %) der Zielverbindung erhalten.

LC-MS (Methode 5): R_t = 4.73 min; MS (EIpos): m/z = 632 $[M+H]^+$.

Intermediat C37

N-[19-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-17-oxo-4,7,10,13-tetraoxa-16-azanonadecan-1-oyl]-L-valyl-N-[4-({(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}{3-[(tert-butoxycarbonyl)amino]propyl}carbamoyl)phenyl]-L-alaninamid



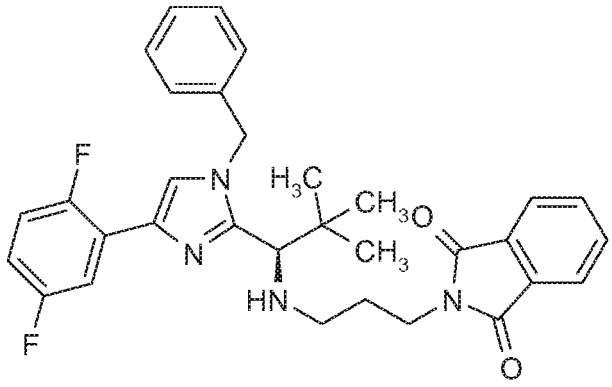
38.6 mg (0.05 mmol, LC/MS Reinheit = 82%) tert-Butyl-{3-[(4-aminobenzoyl){(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}amino]propyl}carbamat wurden in absolutem DMF gelöst und mit 24.8 mg (0.06 mmol) HATU sowie mit 13.0 mg (0.10 mmol) N,N-Diisopropylethylamin versetzt. Das Gemisch wurde 5 Min. bei RT gerührt, anschließend mit 63 mg (0.06 mmol) N-[19-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-17-oxo-4,7,10,13-tetraoxa-16-

azanonadecan-1-oyl]-L-valyl-L-alanin versetzt und 3 h bei RT gerührt. Es wurden 7.5 mg (0.06 mmol) 3H-[1,2,3]triazolo[4,5-b]pyridin-3-ol (HOAt) addiert und 16 h gerührt. Es wurden 19.1 mg (0.05 mmol) HATU addiert und 2 h bei 50°C gerührt. Nach dem Abkühlen wurde das Reaktionsgemisch direkt mittels präparativer HPLC (Eluent: ACN/Wasser + 0.1% TFA, Gradient) gereinigt. Es wurden 6.5 mg (9% d. Th., LC/MS-Reinheit = 83%) der Zielverbindung erhalten.

LC-MS (Methode 2): R_t = 7.89 min; MS (Elpos): m/z = 1200.6 $[M+H]^+$.

Intermediat C38

2-[3-({(1R)-1-[1-Benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}amino)propyl]-1H-isoindol-1,3(2H)-dion

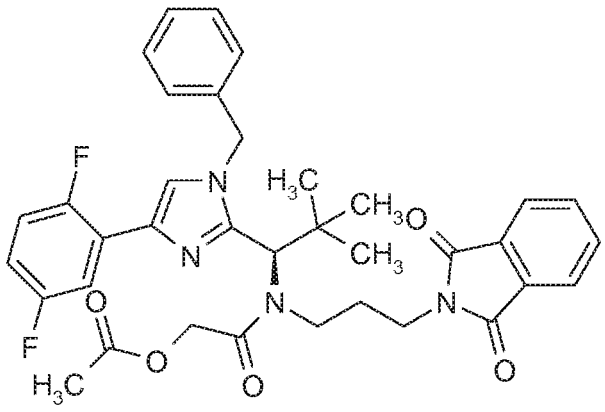


300.0 mg (0.84 mmol) 2-[3-({(1R)-1-[1-Benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}amino)propyl]-1H-isoindol-1,3(2H)-dion (Intermediat C1) wurden in 4.0 mL Dichlormethan vorgelegt und mit 58.3 mg (0.97 mmol) HOAc und 250.4 mg (1.18 mmol) Natriumtriacetoxyborhydrid versetzt und 5 min bei RT gerührt. Es wurden 197.2 mg (0.97 mmol) 3-(1,3-Dioxo-1,3-dihydro-2H-isoindol-2-yl)propanal zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei RT gerührt. Die Reaktionsmischung wurde mit Ethylacetat verdünnt und die organische Phase zweimal mit ges. Natriumcarbonat-Lösung und einmal mit ges. NaCl-Lösung gewaschen. Nach der Trocknung über Magnesiumsulfat wurde das Lösemittel im Vakuum verdampft und der Rückstand mittels Kieselgel (Laufmittel: Ethylacetat/Cyclohexan 1:5) gereinigt. Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 333.3 mg (70 %) der Titelverbindung.

LC-MS (Methode 1): R_t = 1.05 min; MS (ESIpos): m/z = 543 $[M+H]^+$.

Intermediat C39

2-({(1R)-1-[1-Benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}[3-(1,3-dioxo-1,3-dihydro-2H-isoindol-2-yl)propyl]amino)-2-oxoethylacetat

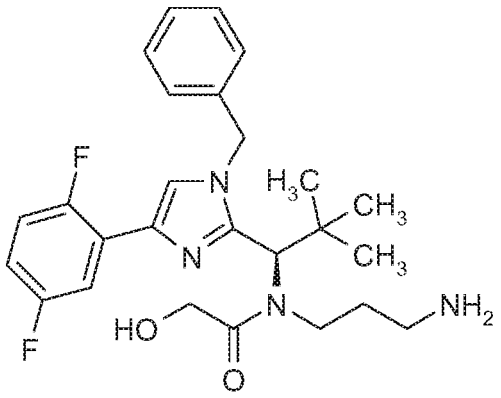


332.3 mg (0.61mmol) 2-[3-({(1R)-1-[1-Benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}amino)propyl]-1H-isoindol-1,3(2H)-dion (Intermediat C38) wurden in 8.0 mL Dichlormethan vorgelegt und mit 142.5 mg (1.35 mmol) Triethylamin versetzt. Bei 0 °C wurden 184.0 mg (1.35 mmol) Acetoxyessigsäurechlorid zugegeben und die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei RT gerührt. Die Reaktionsmischung wurde mit Ethylacetat verdünnt und die organische Phase zweimal mit ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und einmal mit ges. NaCl-Lösung gewaschen. Nach der Trocknung über Magnesiumsulfat wurde das Lösemittel im Vakuum verdampft und der Rückstand wurde mittels Kieselgel (Laufmittel: Ethylacetat/Cyclohexan 1:3) gereinigt. Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 367.1 mg (63 %) der Titelverbindung.

LC-MS (Methode 1): R_t = 1.42 min; MS (ESIpos): m/z = 643 $[M+H]^+$.

Intermediat C40

N-(3-Aminopropyl)-N-{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-2-hydroxyacetamid

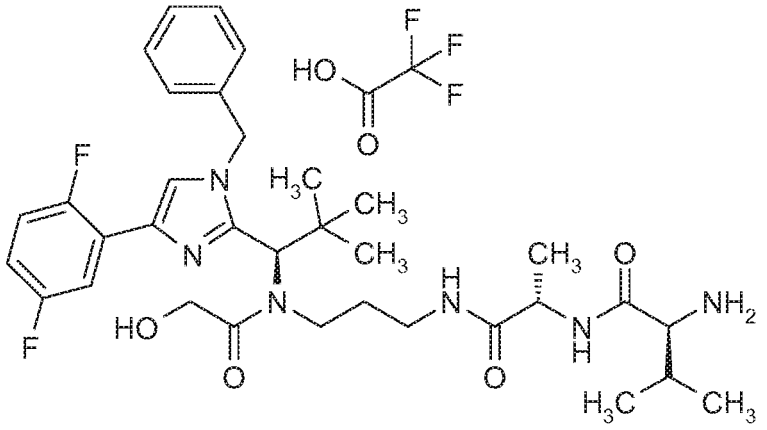


583.1 mg (0.91 mmol) 2-({(1R)-1-[1-Benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}[3-(1,3-dioxo-1,3-dihydro-2H-isoindol-2-yl)propyl]amino)-2-oxoethylacetat (Intermediat C39) wurden in 15.0 mL Ethanol vorgelegt und mit 1.41 g (18.15 mmol) Methanamin (40 % in Wasser) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei 50 °C gerührt. Das Lösemittel wurde im Vakuum verdampft und der Rückstand dreimal mit Toluol kodestilliert. Der Rückstand wurde mittels Kieselgel (Laufmittel: Dichlormethan/Methanol = 100:5) gereinigt. Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 324.9 mg (73 %) der Titelverbindung.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.97 min; MS (ESIpos): m/z = 471 $[M+H]^+$.

Intermediat C41

Trifluoressigsäure--L-valyl-N-{3-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]propyl}-L-alaninamid(1:1)



50.0 mg (0.11 mol) N-(3-Aminopropyl)-N-{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-2-hydroxyacetamid (Intermediat C40) und 30.4 mg (0.11 mmol) 2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl-N-(tert-butoxycarbonyl)-L-alaninat wurden in 2.0 mL DMF vorgelegt und mit

32.2 mg (0.32 mmol) 4-Methylmorpholin versetzt. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei RT gerührt. 19.1 mg (0.32 mmol) HOAc wurden zugegeben und die Reaktionsmischung direkt mittles präp. RP-HPLC gereinigt (Säule: Reprosil 250x30; 10µ, Fluss: 50 mL/min, MeCN/Wasser). Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 38.0 mg (56 %) der Verbindung tert-Butyl-[(2S)-1-({3-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]propyl}amino)-1-oxopropan-2-yl]carbamat.
LC-MS (Methode 1): R_t = 1.26 min; MS (ESIpos): m/z = 642 $[M+H]^+$.

33.6 mg (0.05 mmol) tert-Butyl-[(2S)-1-({3-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]propyl}amino)-1-oxopropan-2-yl]carbamat wurden in 3.0 mL Dichlormethan vorgelegt. Die Reaktionsmischung wurde mit 119.4 mg (1.05 mmol) TFA versetzt und über Nacht bei RT gerührt. Das Lösemittel wurde im Vakuum verdampft und der Rückstand direkt mittles präp. RP-HPLC gereinigt (Säule: Reprosil 250x30; 10µ, Fluss: 50 mL/min, MeCN/Wasser, 0.1 % TFA). Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 32.8 mg (96 %) der Verbindung Trifluoressigsäure--N-{3-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]propyl}-L-alaninamid(1:1).
LC-MS (Methode 1): R_t = 0.93 min; MS (ESIpos): m/z = 542 $[M+H]^+$.

29.5 mg (0.05 mmol) Trifluoressigsäure--N-{3-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]propyl}-L-alaninamid(1:1) und 14.1 mg (0.05 mmol) 2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl-N-(tert-butoxycarbonyl)-L-valinat wurden in 1.0 mL DMF vorgelegt und mit 18.2 mg (0.18 mmol) 4-Methylmorpholin versetzt. Die Reaktionsmischung rührte über Nacht bei RT und wurde direkt mittles präp. RP-HPLC gereinigt (Säule: Reprosil 250x30; 10µ, Fluss: 50 mL/min, MeCN/Wasser). Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 23.1 mg (69 %) der Verbindung N-(tert-Butoxycarbonyl)-L-valyl-N-{3-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]propyl}-L-alaninamid.
LC-MS (Methode 1): R_t = 1.30 min; MS (ESIpos): m/z = 741 $[M+H]^+$.

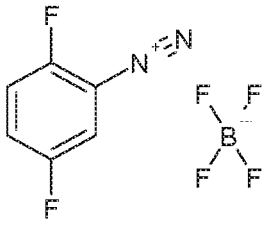
19.4 mg (0.03 mmol) N-(tert-Butoxycarbonyl)-L-valyl-N-{3-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]propyl}-L-alaninamid wurden in 1.5 mL Dichlormethan gelöst und mit 59.7 mg (0.52 mmol) TFA versetzt. Die Reaktionsmischung rührte über Nacht bei RT. Es wurden 119.4 mg (1.04 mmol) TFA zugegeben und nochmals über Nacht bei RT gerührt. Das Lösemittel wurde im Vakuum verdampft und der Rückstand direkt mittles präp. RP-HPLC gereinigt (Säule: Reprosil 250x30; 10µ, Fluss: 50 mL/min, MeCN/Wasser, 0.1 % TFA). Die Lösemittel

wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 19.2 mg (97 %) der Titelverbindung.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.96 min; MS (ESIpos): m/z = 641 $[M+H]^+$.

Intermediat C42

2,5-Difluorbenzoldiazoniumtetrafluoroborat



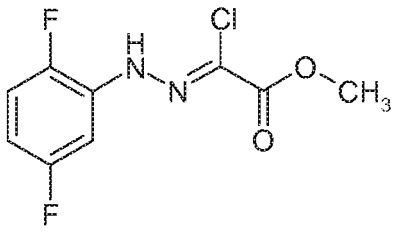
Es wurden 3.00 g (21.16 mmol, 2.68 ml) Bortrifluorid-Diethylether-Komplex vorgelegt und 1.37 g (10.58 mmol) 2,5-Difluoranilin gelöst in 27 ml absolutem THF bei 0°C langsam zu getropft. Bei --10°C wurde eine Lösung von 1.61 g (13.75 mmol, 1.85 ml) Isoamylnitrit gelöst in 3 ml absolutem THF zu getropft und 30 Min. bei gleicher Temperatur weiter gerührt. Es wurden 15 ml Diethylether addiert, das ausgefallene Diazoniumsalz abfiltriert, mit etwas Diethylether gewaschen und im Hochvakuum getrocknet. Es wurden 2.27 g der Zielverbindung (94% d.Th.) erhalten.

LC-MS (Methode 6): R_t = 0.24 min; MS (ESIpos): m/z = 141 $[M]^+$.

^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6): δ [ppm] = 8.11-8.17 (m, 1H), 8.36-8.43 (m, 1H), 8.69-8.73 (m, 1H).

Intermediat C43

Methyl-chlor[2-(2,5-difluorphenyl)hydrazinyliden]acetat



Unter Argonatmospähre wurden 3.63 g (24.13 mmol) Methyl-2-chlor-3-oxobutanoat in 100 ml Wasser vorgelegt und bei -5°C mit 48.90 g (618.19 mmol, 50.00 ml) Pyridin versetzt und 10 Min. bei dieser Temperatur gerührt. Anschließend wurden bei -5°C 5.00 g (21.94 mmol) 2,5-

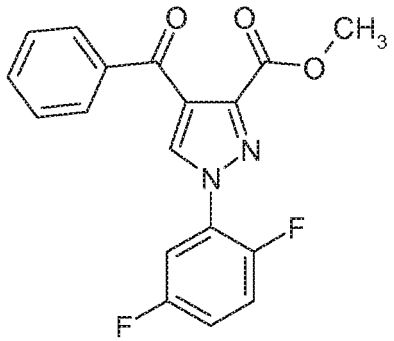
Difluorbenzoldiazoniumtetrafluoroborat zugegeben, wobei sich eine orangefarbene Suspension bildete. Es wurde 30 Min. bei dieser Temperatur gerührt, der Ansatz mit Wasser verdünnt und dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet, am Rotationsverdampfer eingeengt und im Hochvakuum getrocknet. Es wurden 5.52 g der Zielverbindung (97% d. Th., LC/MS-Reinheit = 96%) erhalten.

LC-MS (Methode 1): R_t = 1.03 min; MS (ESIpos): m/z = 249 $[M+H]^+$.

^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6): δ [ppm] = 3.85 (s, 3H), 6.88-6.94 (m, 1H), 7.16-7.21 (m, 1H), 7.31-7.37 (m, 1H), 10.00 (s, 1H).

Intermediat C44

Methyl-4-benzoyl-1-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrazol-3-carboxylat



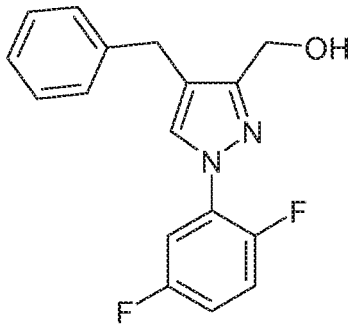
3.50 g (13.52 mmol) Methyl-chlor[2-(2,5-difluorphenyl)hydrazinyliden]acetat (LC/MS-Reinheit 96%) wurden in 9 ml absolutem Toluol gelöst, mit 2.61 g (14.87 mmol) (2E)-3-(Dimethylamino)-1-phenylprop-2-en-1-on sowie 3.01 g (29.73 mmol), 4.14 ml) Triethylamin versetzt und 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde am Rotationsverdampfer eingeengt und der Rückstand mittels präparativer HPLC (Eluent: ACN/Wasser mit 0.1% Ameisensäure, Gradient) getrennt. Es wurden 1.79 g (39% d. Th.) der Zielverbindung erhalten.

LC-MS (Methode 1): R_t = 1.07 min; MS (ESIpos): m/z = 343 $[M+H]^+$.

^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6): δ [ppm] = 3.86 (s, 3H), 7.44-7.50 (m, 1H), 7.55-7.72 (m, 4H), 7.81-7.87 (m, 3H), 8.80 (d, 1H).

Intermediat C45

[4-Benzyl-1-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrazol-3-yl]methanol



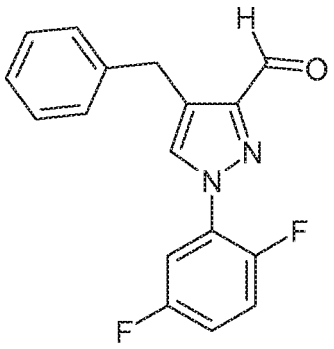
3.18 g (8.92 mmol) Methyl-4-benzoyl-1-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrazol-3-carboxylat (LC/MS-Reinheit = 96%) wurden in 50 ml Trifluoressigsäure vorgelegt, mit 8.74 g (75.13 mmol, 12 ml) Triethylsilan tropfenweise versetzt und 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde am Rotationsverdampfer eingeengt und im Hochvakuum getrocknet. Der erhaltene Rückstand wurde in 120 ml absolutem THF aufgenommen und bei 0°C mit 2.89 g (33.63 mmol, 33.63 ml) Boran-Tetrahydrofuran-Komplex tropfenweise versetzt. Es wurde über Nacht gerührt. Aufgrund des geringen Umsatzes wurden noch 12.33 ml (12.33 mmol) einer 1M Lithiumborhydrid-Lösung in THF zugegeben. Es wurde 1 h bei Raumtemperatur 30 Min. bei 60°C und 2 h bei 80°C gerührt. Bei 0°C wurde vorsichtig mit 60 ml gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung gequencht. Das Gemisch wurde zweimal mit je 100 ml Essigsäureethylester extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über Natriumsulfat getrocknet, am Rotationsverdampfer eingeengt und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Es wurden 2.67 g (76% d. Th., Reinheit = 96%) der Zielverbindung erhalten.

LC-MS (Methode 3): R_t = 2.79 min; MS (ESIpos): m/z = 329 $[M+H]^+$.

^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6): δ [ppm] = 3.91 (s, 2H), 4.45 (d, 2H), 6.51 (s, 1H), 7.18-7.23 (m, 2H), 7.27-7.32 (m, 4H), 7.46-7.53 (m, 1H), 7.60-7.65 (m, 1H), 7.95 (d, 1H).

Intermediat C46

4-Benzyl-1-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrazol-3-carbaldehyd



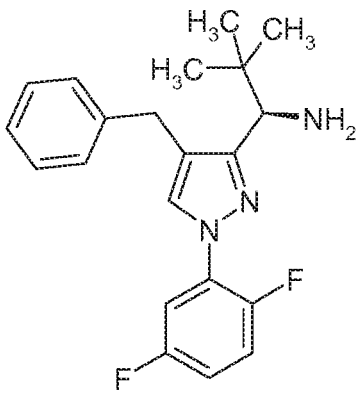
2.66 g (8.50 mmol) [4-Benzyl-1-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrazol-3-yl]methanol (Reinheit 96%) wurden in 150 ml Dichlormethan gelöst und mit 4.33 g (10.20 mmol) Dess-Martin-Periodinan portionsweise versetzt. Das Gemisch wurde 2 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend mit 100 ml einer halbkonzentrierten Natriumhydrogencarbonat-Lösung sowie mit 100 ml einer 10%-igen Natriumthiosulfat-Lösung versetzt, und für 20 Min. gerührt. Die organische Phase wurde abgetrennt, über Natriumsulfat getrocknet und im Hochvakuum eingeengt. Es wurden 2.35 g (88% d. Th., Reinheit = 95%) der Zielverbindung erhalten.

LC-MS (Methode 7): R_t = 1.49 min; MS (ESIpos): m/z = 299 $[M+H]^+$.

^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6): δ [ppm] = 4.12 (s, 2H), 7.17-7.21 (m, 1H), 7.27-7.31 (m, 4H), 7.37-7.42 (m, 1H), 7.57-7.62 (m, 1H), 7.75-7.78 (m, 1H), 8.22 (d, 1H), 10.06 (s, 1H).

Intermediat C47

(1R)-1-[4-benzyl-1-(2,5-difluorophenyl)-1H-pyrazol-3-yl]-2,2-dimethylpropan-1-amine



2.35 g (7.56 mmol) 4-Benzyl-1-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrazol-3-carbaldehyd wurden in 25 ml absolutem THF gelöst und mit 1.10 g (9.08 mmol) (R)-(+)-2-Methyl-2-propansulfinsäureamid sowie mit 4.73 g (16.64 mmol) Titan(IV)isopropylat versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde bei Raumtemperatur für 16h gerührt, anschließend mit 20 ml einer gesättigten Natriumchlorid-Lösung und 30 ml Essigsäureethylester versetzt. Danach gab man ca. 3 g Kieselgur zu und kochte 1 h unter Rückfluss. Es wurde filtriert und vom Filtrat die organische Phase abgetrennt. Die wässrige Phase wurde mit Essigsäureethylester extrahiert, die vereinigten organischen Phasen mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet, am Rotationsverdampfer eingeengt und im Hochvakuum getrocknet. Der Rückstand wurde ohne weitere Reinigung weiter eingesetzt.

Unter Argonatmospähre wurde der Rückstand in 60 ml absolutem THF gelöst und auf -78°C gekühlt und 14.5 ml (23.24 mmol) einer Lösung von *tert.*-Butyllithium in Pentan (c = 1.6 mol/l) zugetropft. Es wurde 3 h bei -78°C gerührt und anschließend mit 5 ml Methanol und 15 ml einer gesättigten Ammoniumchlorid-Lösung gequencht. Unter Rühren ließ man das Reaktionsgemisch auf Raumtemperatur kommen (ca. 30 Min.). Es wurde mit Essigsäureethylester extrahiert, die organische Phase mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung extrahiert, am Rotationsverdampfer eingeengt und im Hochvakuum getrocknet. Der Rückstand wurde ohne weitere Reinigung weiter eingesetzt.

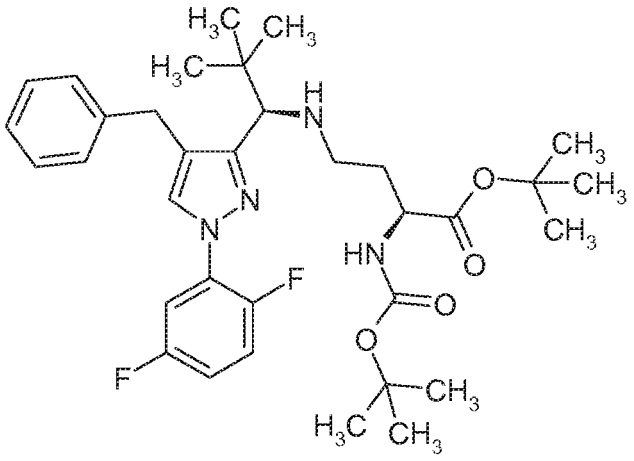
Der Rückstand wurde in 30 ml THF und 6 ml Methanol aufgenommen, mit 6 ml (24.00 mmol) einer 4N Chlorwasserstoff-Lösung in Dioxan versetzt und 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend gab man 15 ml gesättigte Natriumcarbonat-Lösung zu und extrahierte mit Essigsäureethylester. Die organische Phase wurde abgetrennt, am Rotationsverdampfer eingeengt und im Hochvakuum getrocknet. Der Rückstand wurde mittels präparativer HPLC (Eluent: ACN/Wasser, Gradient) getrennt. Es wurden zwei Fraktionen der Zielverbindung erhalten. Die erste Fraktion ergab 1.31 g (72 % d. Th., LC/MS Reinheit = 97%) und die zweite 0.37 g (17% d. Th., LC/MS Reinheit = 83%) Produkt.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.88 min; MS (ESIpos): m/z = 356 $[M+H]^+$.

^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6): δ [ppm] = 0.91 (s, 9H), 1.71 (s, 2H), 3.59 (s, 1H), 3.87 (s, 2H), 7.17-7.32 (m, 6H), 7.45-7.51 (m, 1H), 7.61-7.65 (m, 1H), 7.84(s br, 1H).

Intermediat C48

Tert-butyl-(2S)-4-({(1R)-1-[4-benzyl-1-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrazol-3-yl]-2,2-dimethylpropyl}amino)-2-[(tert-butoxycarbonyl)amino]butanoat



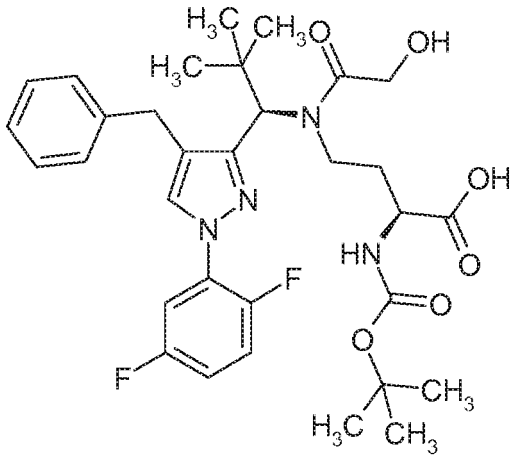
1.28 g (3.35 mmol, LC/MS Reinheit 93%) (1R)-1-[4-benzyl-1-(2,5-difluorophenyl)-1H-pyrazol-3-yl]-2,2-dimethylpropan-1-amine wurden in 100 ml absolutem Dichlormethan gelöst und bei Raumtemperatur mit 261 mg (4.35 mmol, 250 µl) Essigsäure sowie 1.14 g (4.34 mmol) Natriumtriacetoxyborhydrid versetzt und nach 5 Min rühren addierte man 1.19 g (4.35 mmol) tert-Butyl-(2S)-2-[(tert-butoxycarbonyl)amino]-4-oxobutanoat. Es wurde 15 Min. bei Raumtemperatur gerührt, am Rotationsverdampfer eingeengt in Acetonitril und Wasser aufgenommen und mittels präparativer HPLC (Eluent: ACN/Wasser + 0.1% TFA, Gradient) gereinigt. Es wurden 1.64 g (80% d. Th.) der Zielverbindung erhalten.

LC-MS (Methode 1): R_t = 1.10 min; MS (ESIpos): m/z = 613 $[M+H]^+$.

^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6): δ [ppm] = 1.01 (s, 9H), 1.32 (s, 9H), 1.35 (s, 9H), 1.80-1.89 (m, 1H), 2.01-2.11 (m, 1H), 2.54-2.71 (m, 2H), 3.75-3.81 (m, 1H), 3.90 (s, 2H), 4.18 (d, 1H), 7.13 (d, 1H), 7.20-7.24 (m, 1H), 7.28-7.34 (m, 5H), 7.52-7.58 (m, 1H), 7.76-7.80 (m, 1H), 8.10 (s br, 1H), 8.23 (s br, 1H).

Intermediat C49

(2S)-4-[{(1R)-1-[4-Benzyl-1-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrazol-3-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]-2-[(tert-butoxycarbonyl)amino]butansäure



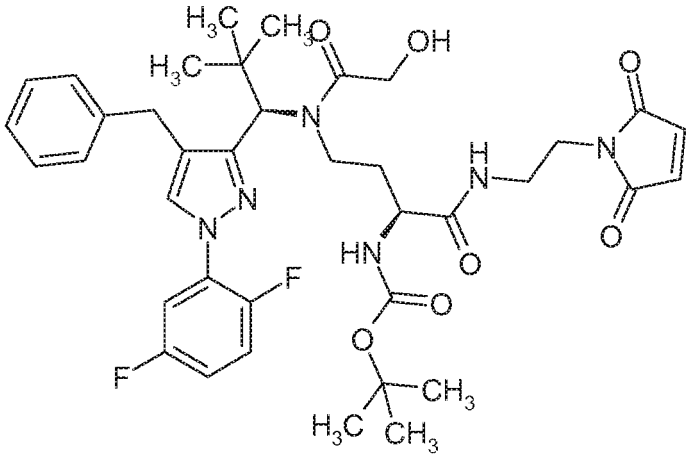
225 mg (0.37 mmol) Tert-butyl-(2S)-4-({(1R)-1-[4-benzyl-1-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrazol-3-yl]-2,2-dimethylpropyl}amino)-2-[(tert-butoxycarbonyl)amino]butanoat wurden in 10 ml absolutem Dichlormethan gelöst, mit 156 mg (1.54 mmol) Triethylamin versetzt. Bei 0°C wurden 125 mg (0.92 mmol) Acetoxyacetylchlorid zugegeben und bei RT für 16 h gerührt. Es wurden erneut 251 mg (1.84 mmol) Acetoxyacetylchlorid und 186 mg (1.84 mmol) Triethylamin addiert und 3 h bei RT gerührt. Es wurde etwas Dichlormethan zugegeben, mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung und gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet, am Rotationsverdampfer eingeengt und im Hochvakuum getrocknet. Der Rückstand wurde in 10 ml Ethanol aufgenommen und mit einer 0.91 ml (12.67 mmol) einer 40%-igen wässrigen Methylamin-Lösung versetzt und bei 50°C 3 h gerührt. Das Gemisch wurde am Rotationsverdampfer eingeengt, der Rückstand in Dichlormethan aufgenommen und die organische Phase zweimal mit Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet, am Rotationsverdampfer eingeengt und im Hochvakuum getrocknet. Der Rückstand wurde in 2 ml Dichlormethan aufgenommen mit 2 ml (25.96 mmol) Trifluoressigsäure versetzt und bei 50°C 4 h gerührt. Das Gemisch wurde am Rotationsverdampfer eingeengt und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Der Rückstand wurde in 10 ml absolutem Dichlormethan aufgenommen, mit 298 mg (2.95 mmol) Triethylamin sowie 429 mg (1.97 mmol) Di-tert-butyldicarbonat versetzt und 1 h bei RT gerührt. Das Gemisch wurde am Rotationsverdampfer eingeengt und der Rückstand mittels präparativer HPLC (Eluent: ACN/Wasser, Gradient) gereinigt. Es wurden 62 mg (27% d. Th.) der Zielverbindung erhalten.

LC-MS (Methode 1): R_t = 1.32 min; MS (ESIpos): m/z = 615 $[M+H]^+$.

^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6): δ [ppm] = 0.91 (s, 9H), 1.32 (s, 9H), 2.64-2.72 (m, 4H), 3.50-3.58 (m, 1H), 3.72 (dd, 2H), 4.07-4.22 (m, 2H), 4.47-4.54 (m, 1H), 5.75 (s, 1H), 6.84-6.89 (m, 1H), 7.15-7.30 (m, 6H), 7.47-7.53 (m, 1H), 7.70-7.75 (m, 1H), 8.09-8.13 (m, 1H), 11.66 (s br, 1H).

Intermediat C50

tert-Butyl-[(2S)-4-[{(1R)-1-[4-benzyl-1-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrazol-3-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]-1-{[2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)ethyl]amino}-1-oxobutan-2-yl]carbamat

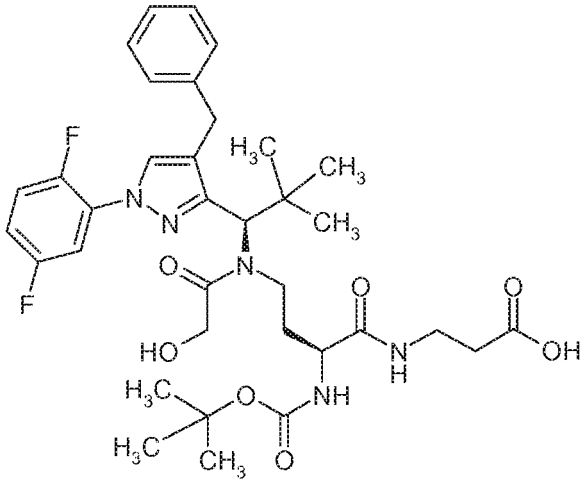


60 mg (0.1 mmol) (2S)-4-[{(1R)-1-[4-Benzyl-1-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrazol-3-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]-2-[(tert-butoxycarbonyl)amino]butansäure wurden in 10 ml absolutem DMF gelöst und mit 74 mg (0.20 mmol) HATU versetzt. 74 mg (0.29 mmol) Trifluoressigsäure-1-(2-aminoethyl)-1H-pyrrol-2,5-dion(1:1) wurden separat in 2 ml absolutem DMF gelöst und mit 38 mg (0.29 mmol) N,N-Diisopropylethylamin versetzt und tropfenweise zum Reaktionsgemisch gegeben. Es wurde 3 d bei RT gerührt. Das Gemisch wurde direkt mittels präparativer HPLC (Eluent: ACN/Wasser + 0.1% TFA, Gradient) gereinigt. Es wurden 9.3 mg (13% d. Th.) der Zielverbindung erhalten.

LC-MS (Methode 1): R_t = 1.34 min; MS (ESIpos): m/z = 737 $[M+H]^+$.

Intermediat C51

N-{(2S)-4-[{(1R)-1-[4-Benzyl-1-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrazol-3-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]-2-[(tert-butoxycarbonyl)amino]butanoyl}-beta-alanin

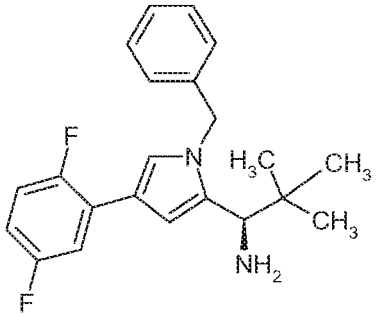


Zunächst wurde Intermediat C47 mit Benzyl-N-{(2S)-2-[(tert-butoxycarbonyl)amino]-4-oxobutanoyl}-beta-alaninat in Analogie zu Intermediat C2 reduktiv alkyliert. Anschließend wurde die sekundäre Aminogruppe mit 2-Chlor-2-oxoethylacetat wie in Intermediat C27 beschrieben acyliert und schließlich mit 2M Lithiumhydroxidlösung in Methanol die Hydrolyse der beiden Estergruppen durchgeführt. Es wurden 23 mg der Titelverbindung erhalten.

LC-MS (Methode 1): R_t = 1.24 min; MS (ESIpos): m/z = 686 $(M+H)^+$.

Intermediat C52

(1R)-1-[1-Benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropan-1-amin



10.00 g (49.01 mmol) Methyl-4-brom-1H-pyrrol-2-carboxylat wurden in 100.0 mL DMF vorgelegt und mit 20.76 g (63.72 mmol) Cäsiumcarbonat und 9.22 g (53.91 mmol) Benzylbromid versetzt. Die Reaktionsmischung rührte über Nacht bei RT. Die Reaktionsmischung wurde zwischen Wasser und Ethylacetat verteilt und die wässrige Phase mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösemittel im Vakuum verdampft. Der Ansatz wurde mit 90.0 g Methyl-4-brom-1H-pyrrol-2-carboxylat wiederholt.
Die Reinigung der vereinigten beiden Ansätze erfolgte mittles präp. RP-HPLC (Säule: Daiso 300x100; 10µ, Fluss: 250 mL/min, MeCN/Wasser). Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der

Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 125.15 g (87 % d. Th.) der Verbindung Methyl-1-benzyl-4-brom-1H-pyrrol-2-carboxylat.

LC-MS (Methode 1): R_t = 1.18 min; MS (ESIpos): m/z = 295 $[M+H]^+$.

Unter Argon wurden 4.80 g (16.32 mmol) Methyl-1-benzyl-4-brom-1H-pyrrol-2-carboxylat in DMF vorgelegt und mit 3.61 g (22.85 mmol) (2,5-Difluorphenyl)boronsäure und 19.20 mL ges. Natriumcarbonat-Lösung und 1.33 g (1.63 mmol) [1,1'-Bis-(diphenylphosphino)-ferrocen]-dichlorpalladium(II):Dichlormethan versetzt. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei 85 °C gerührt. Die Reaktionsmischung wurde über Celite filtriert und der Filterkuchen mit Ethylacetat gewaschen. Die organische Phase wurde mit Wasser extahiert und dann mit ges. NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösemittel im Vakuum verdampft. Der Rückstand wurde mittels Kieselgel (Laufmittel: Cyclohexan/Ethylacetat 100:3) gereinigt. Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 3.60 g (67 % d. Th.) der Verbindung Methyl-1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-carboxylat.

LC-MS (Methode 7): R_t = 1.59 min; MS (ESIpos): m/z = 328 $[M+H]^+$.

3.60 g (11.00 mmol) Methyl-1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-carboxylat wurden in 90.0 mL THF vorgelegt und bei 0 °C mit 1.04 g (27.50 mmol) Lithiumaluminiumhydrid (2.4 M in THF) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde 30 Minuten bei 0 °C gerührt. Es wurde bei 0 °C ges. Kaliumnatriumtartrat-Lösung zugegeben und die Reaktionsmischung mit Ethylacetat versetzt. Die organische Phase wurde dreimal mit ges. Kaliumnatriumtartrat-Lösung extrahiert. Die organische Phase wurde einmal mit ges. NaCl-Lösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösemittel wurde im Vakuum verdampft und der Rückstand in 30.0 mL Dichlormethan gelöst. Es wurden 3.38 g (32.99 mmol) Mangan(IV)oxid zugegeben und 48 h bei RT gerührt. Es wurden nochmals 2.20 g (21.47 mmol) Mangan(IV)oxid zugegeben und über Nacht bei RT gerührt. Die Reaktionsmischung wurde über Celite filtriert und der Filterkuchen mit Dichlormethan gewaschen. Das Lösemittel wurde im Vakuum verdampft und der Rückstand 2.80 g (1-Benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-carbaldehyd) wurde ohne weitere Reinigung in der nächsten Synthesestufe eingesetzt.

LC-MS (Methode 7): R_t = 1.48 min; MS (ESIpos): m/z = 298 $[M+H]^+$.

28.21 g (94.88 mmol) 1-Benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-carbaldehyd wurden zusammen mit 23.00 g (189.77 mmol) (R)-2-Methylpropan-2-sulfinamid in 403.0 mL absol. THF vorgelegt und mit 67.42 g (237.21 mmol) Titan(IV)isopropylat versetzt und über Nacht bei RT gerührt. Es wurden 500.0 mL ges. NaCl-Lösung und 1000.0 mL Ethylacetat zugegeben und 1 h bei RT gerührt. Es wurde über Kieselgur filtriert und das Filtrat zweimal mit ges. NaCl-Lösung gewaschen. Die org. Phase wurde über

Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösemittel wurde im Vakuum verdampft und der Rückstand wurde mittels Biotage Isolera gereinigt (Kieselgel, Säule 1500+340 g SNAP, Fluss 200 mL/min, Ethylacetat/Cyclohexan 1:10).

LC-MS (Methode 7): R_t = 1.63 min; MS (ESIpos): m/z = 401 $[M+H]^+$.

25.00 g (62.42 mmol) (R)-N-{(E/Z)-[1-Benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]methylen}-2-methylpropan-2-sulfinamid wurden in absol. THF unter Argon vorgelegt und auf -78 °C abgekühlt. Dann wurden 12.00 g (187.27 mmol) tert.-Butyllithium (1.7 M Lösung in Pentan) bei -78 °C zugegeben und 3 h bei dieser Temperatur gerührt. Dann wurden bei -78 °C 71.4 mL Methanol und 214.3 mL ges. Ammoniumchlorid-Lösung nacheinander zugegeben und die Reaktionsmischung wurde auf RT kommen lassen und 1 h bei RT gerührt. Es wurde mit Ethylacetat verdünnt und mit Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösemittel wurde im Vakuum verdampft. Der Rückstand (R)-N-{(1R)-1-[1-Benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-2-methylpropan-2-sulfinamid wurde ohne weitere Reinigung in der nächsten Synthesestufe eingesetzt.

LC-MS (Methode 6): R_t = 2.97 min; MS (ESIpos): m/z = 459 $[M+H]^+$.

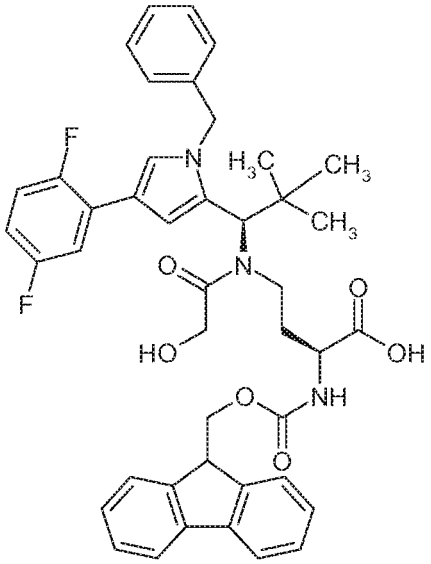
28.00 g (61.05 mmol) (R)-N-{(1R)-1-[1-Benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-2-methylpropan-2-sulfinamid wurden in 186.7 mL 1,4-Dioxan vorgelegt und dann mit 45.8 mL HCl in 1,4-Dioxan-Lösung (4.0 M) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde 2 h bei RT gerührt und das Lösemittel wurde im Vakuum verdampft. Der Rückstand wurde mittles präp. RP-HPLC gereinigt (Säule: Kinetix 100x30; Fluss: 60 mL/min, MeCN/Wasser). Das Acetonitril wurde im Vakuum verdampft und der wässrige Rückstand wurde mit Dichlormethan versetzt. Die organische Phase wurde mit Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösemittel wurde im Vakuum verdampft und der Rückstand wurde im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 16.2 g (75 % d. Th.) der Titelverbindung.

LC-MS (Methode 6): R_t = 2.10 min; MS (ESIpos): m/z = 338 $[M-NH_2]^+$, 709 $[2M+H]^+$.

^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6): δ [ppm] = 0.87 (s, 9H), 1.53 (s, 2H), 3.59 (s, 1H), 5.24 (d, 2H), 6.56 (s, 1H), 6.94 (m, 1H), 7.10 (d, 2H), 7.20 (m, 1H), 7.26 (m, 2H), 7.34 (m, 2H), 7.46 (m, 1H).

Intermediat C53

(2S)-4-[{(1R)-1-[1-Benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]-2-{[(9H-fluoren-9-ylmethoxy)carbonyl]amino}butansäure

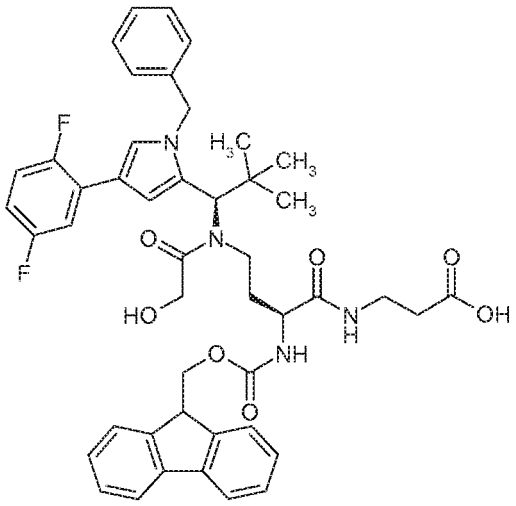


Zunächst wurde Intermediat C52 mit Benzyl-(2S)-2-{[(benzyloxy)carbonyl]amino}-4-oxobutanoat in Analogie zu Intermediat C2 reduktiv alkyliert. Anschließend wurde die sekundäre Aminogruppe mit 2-Chlor-2-oxoethylacetat wie in Intermediat C27 beschrieben acyliert und schließlich mit 2M Lithiumhydroxidlösung in Methanol die Hydrolyse der beiden Estergruppen durchgeführt. Das so erhaltene Intermediat wurde in Ethanol gelöst, mit Palladium auf Kohle (10%ig) versetzt und bei RT mit Wasserstoff unter Normaldruck 1 h hydriert. Die entschützte Verbindung wurde in Dioxan/Wasser 2:1 aufgenommen und mit 9H-Fluoren-9-ylmethylchlorocarbonat in Gegenwart von N,N-Diisopropylethylamin wurde im letzten Schritt die Fmoc-Schutzgruppe eingeführt.

LC-MS (Methode 1): R_t = 1.37 min; MS (ESIpos): m/z = 734 $(M-H)^-$.

Intermediat C54

N-[(2S)-4-[{(1R)-1-[1-Benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]-2-{[(9H-fluoren-9-ylmethoxy)carbonyl]amino}butanoyl]-beta-alanin

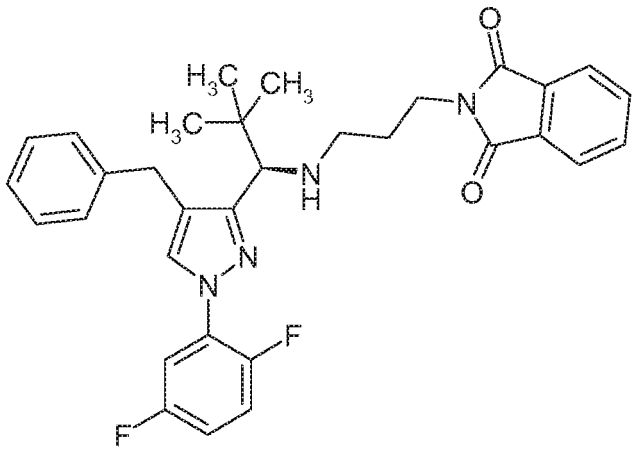


Zunächst wurde Intermediat C52 mit Benzyl-N-[(2S)-2-{[(benzyloxy)carbonyl]amino}-4-oxobutanoyl]-beta-alaninat in Analogie zu Intermediat C2 reduktiv alkyliert. Anschließend wurde die sekundäre Aminogruppe mit 2-Chlor-2-oxoethylacetat wie in Intermediat C27 beschrieben acyliert. Das so erhaltene Intermediat wurde in Methanol gelöst, mit Palladium auf Kohle (10%ig) versetzt und bei RT mit Wasserstoff unter Normaldruck 1 h hydriert. Anschließend wurde mit 2M Lithiumhydroxidlösung in Methanol die Hydrolyse der Estergruppe durchgeführt. Die entschützte Verbindung wurde in Dioxan/Wasser 2:1 aufgenommen und mit 9H-Fluoren-9-ylmethylchlorocarbonat in Gegenwart von N,N-Diisopropylethylamin wurde im letzten Schritt die Fmoc-Schutzgruppe eingeführt. Es wurden 48 mg der Titelverbindung erhalten.

LC-MS (Methode 1): R_t = 1.38 min; MS (ESIpos): m/z = 807 $(M+H)^+$.

Intermediat C55

2-[3-({(1R)-1-[4-Benzyl-1-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrazol-3-yl]-2,2-dimethylpropyl}amino)propyl]-1H-isoindol-1,3(2H)-dion

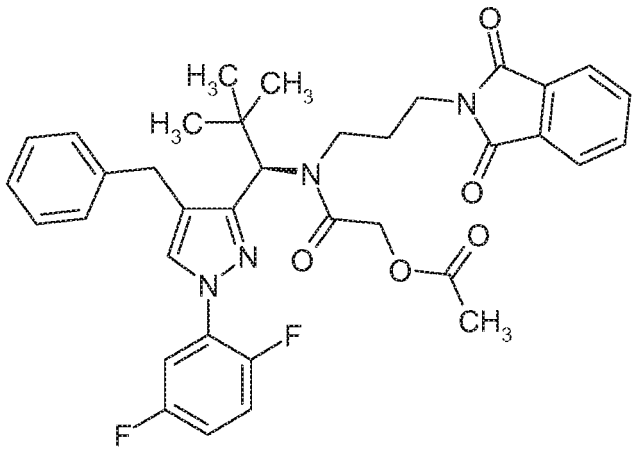


340 mg (0.96 mmol) (1R)-1-[4-benzyl-1-(2,5-difluorophenyl)-1H-pyrazol-3-yl]-2,2-dimethylpropan-1-amine wurden in 7 ml absolutem DCM gelöst und bei RT mit 69 mg (1.15 mmol, 60 µl) Essigsäure sowie 284 mg (1.34 mmol) Natriumtriacetoxyborhydrid versetzt. Es wurde 15 Min. gerührt und anschließend 233 mg (1.15 mmol) 3-(1,3-Dioxo-1,3-dihydro-2H-isoindol-2-yl)propanal addiert. Das Gemisch wurde 4.5 h bei RT gerührt. Es wurden erneut 233 mg (1.15 mmol) 3-(1,3-Dioxo-1,3-dihydro-2H-isoindol-2-yl)propanal, 69 mg (1.15 mmol, 60 µl) Essigsäure sowie 284 mg (1.34 mmol) Natriumtriacetoxyborhydrid zugegeben und 7 h bei RT gerührt. Zur Reaktionsmischung wurde Essigsäureethylester addiert und mit gesättigter Natriumcarbonat-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde eingeengt und der Rückstand zweimal mittels präparativer HPLC [1.) Eluent: ACN/Wasser + 0.1% TFA, Gradient; 2.) Eluent: ACN/Wasser + 1% TFA+1.0% NEt_3)] gereinigt. Es wurden 108 mg (21% d. Th.) der Zielverbindung erhalten.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.96 min; MS (ESIpos): m/z = 543 $[M+H]^+$.

Intermediat C56

2-({(1R)-1-[4-Benzyl-1-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrazol-3-yl]-2,2-dimethylpropyl}[3-(1,3-dioxo-1,3-dihydro-2H-isoindol-2-yl)propyl]amino)-2-oxoethylacetat



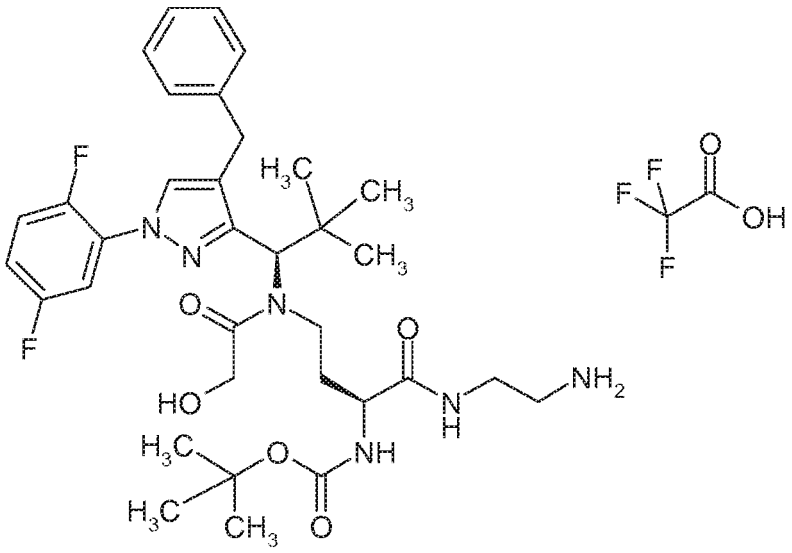
102 mg (0.19 mmol) 2-[3-({(1R)-1-[4-Benzyl-1-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrazol-3-yl]-2,2-dimethylpropyl}amino)propyl]-1H-isoindol-1,3(2H)-dion wurden in 2 ml absolutem DCM vorgelegt und bei RT mit 44 mg (0.43 mmol) Triethylamin versetzt. Bei 0°C wurden 31 mg (0.23 mmol) 2-Chlor-2-oxoethylacetat gelöst in 1 ml absolutem DCM addiert. Das Gemisch wurde 40 Min. bei RT gerührt. Es wurden erneut 26 mg) 2-Chlor-2-oxoethylacetat gelöst in 0.5 ml absolutem DCM sowie 19 mg (0.19 mmol) Triethylamin zugesetzt und 60 Min. bei RT gerührt.

Es wurde Wasser addiert, das Gemisch am Rotationsverdampfer eingeengt und der Rückstand mittels präparativer HPLC (Eluent: ACN/Wasser + 0.1% TFA, Gradient) gereinigt. Es wurden 106 mg (88% d. Th.) der Zielverbindung erhalten.

LC-MS (Methode 1): R_t = 1.37 min; MS (ESIpos): m/z = 643 $[M+H]^+$.

Intermediat C57

Trifluoressigsäure--tert-butyl-{(2S)-1-[(2-aminoethyl)amino]-4-[{(1R)-1-[4-benzyl-1-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrazol-3-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]-1-oxobutan-2-yl}carbamat(1:1)

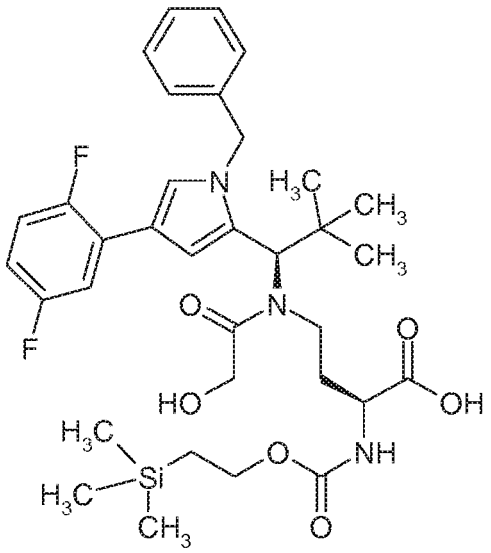


Die Titelverbindung wurde nach Standardmethoden durch Kupplung von Intermediat C49 mit 9H-Fluoren-9-ylmethyl-(2-aminoethyl)carbamat in Gegenwart von HATU und anschließender Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe mit Piperidin hergestellt. Es wurden 14 mg der Titelverbindung (40% d. Th. über 2 Stufen) erhalten.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.98 min; MS (ESIpos): m/z = 657 $(M+H)^+$.

Intermediat C58

(2S)-4-[{(1R)-1-[1-Benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]-2-({[2-(trimethylsilyl)ethoxy]carbonyl}amino)butansäure



Zunächst wurde Intermediat C52 mit Benzyl-(2S)-2-{[(benzyloxy)carbonyl]amino}-4-oxobutanoat in Analogie zu Intermediat C2 reduktiv alkyliert. Anschließend wurde die sekundäre Aminogruppe mit 2-

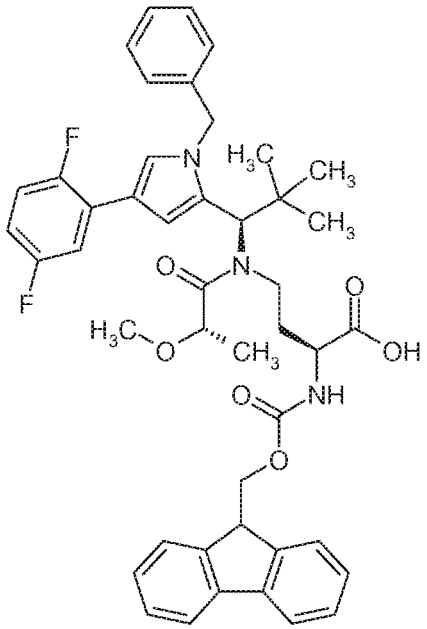
Chlor-2-oxoethylacetat wie in Intermediat C27 beschrieben acyliert und schließlich mit 2M Lithiumhydroxidlösung in Methanol die Hydrolyse der beiden Estergruppen durchgeführt. Das so erhaltene Intermediat wurde in Ethanol gelöst, mit Palladium auf Kohle (10%ig) versetzt und bei RT mit Wasserstoff unter Normaldruck 1 h hydriert.

500 mg (0.886 mmol) von diesem vollständig entschützten Intermediat wurden in 60 ml Dioxan aufgenommen und mit 253 mg (0.975 mmol) 1-({[2-(Trimethylsilyl)ethoxy]carbonyl}oxy) pyrrolidin-2,5-dion sowie 198 µL Triethylamin versetzt. Nach 24 h Rühren bei RT wurde der Ansatz eingeengt und der Rückstand durch präparative HPLC gereinigt. Nach Vereinigung der entsprechenden Fraktionen, Einengen im Vakuum und Trocknen im Hochvakuum wurden 312 mg (50% d.Th.) der Titelverbindung erhalten.

LC-MS (Methode 5): R_t = 4.61 min; MS (ESIpos): m/z = 658 $(M+H)^+$.

Intermediat C59

(2S)-4-({(1R)-1-[1-Benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}[(2S)-2-methoxypropanoyl]amino)-2-{[(9H-fluoren-9-ylmethoxy)carbonyl]amino}butansäure



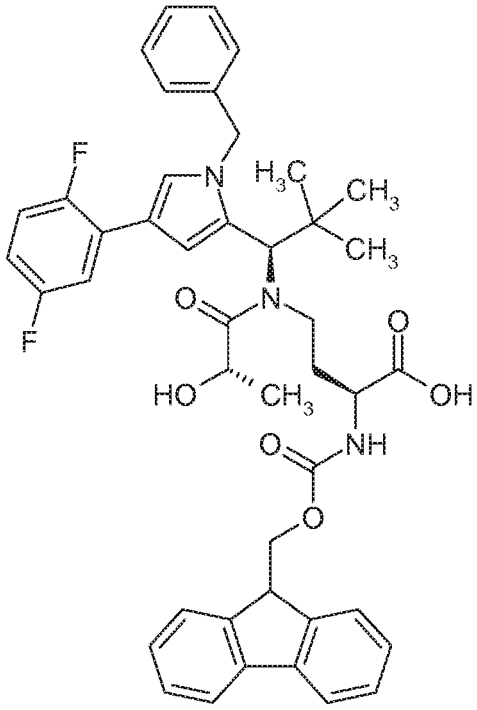
Zunächst wurde die sekundäre Aminogruppe von Benzyl-(2S)-4-({(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}amino)-2-{[(benzyloxy)carbonyl]amino} butanoat mit (2S)-2-Methoxypropanoylchlorid (Zwischenstufe aus Intermediat C53) in Gegenwart von Triethylamin wie in Intermediat C53 beschrieben acyliert. Das erhaltene Intermediat wurde in Ethanol aufgenommen, mit Palladium auf Kohle (10%ig) versetzt und bei RT mit Wasserstoff unter Normaldruck 1 h hydriert. Die entschützte Verbindung wurde in Dioxan/Wasser 2:1 aufgenommen und

mit 9H-Fluoren-9-ylmethylchlorocarbonat in Gegenwart von N,N-Diisopropylethylamin wurde im letzten Schritt die Fmoc-Schutzgruppe eingeführt.

LC-MS (Methode 1): R_t = 1.39 min; MS (ESIpos): m/z = 764 $(M-H)^-$.

Intermediat C60

(2S)-4-({(1R)-1-[1-Benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}[(2S)-2-methoxypropanoyl]amino)-2-{[(9H-fluoren-9-ylmethoxy)carbonyl]amino}butansäure

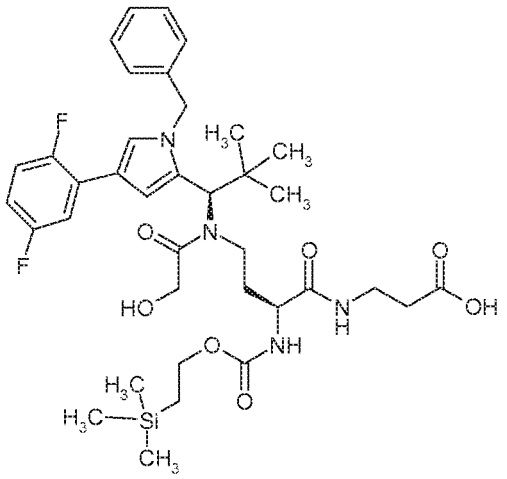


Die Synthese erfolgte in Analogie zu Intermediat C53.

LC-MS (Methode 1): R_t = 1.41 min; MS (ESIpos): m/z = 750 $(M+H)^+$.

Intermediat C61

N-[(2S)-4-[{(1R)-1-[1-Benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]-2-({[2-(trimethylsilyl)ethoxy]carbonyl}amino)butanoyl]-beta-alanin

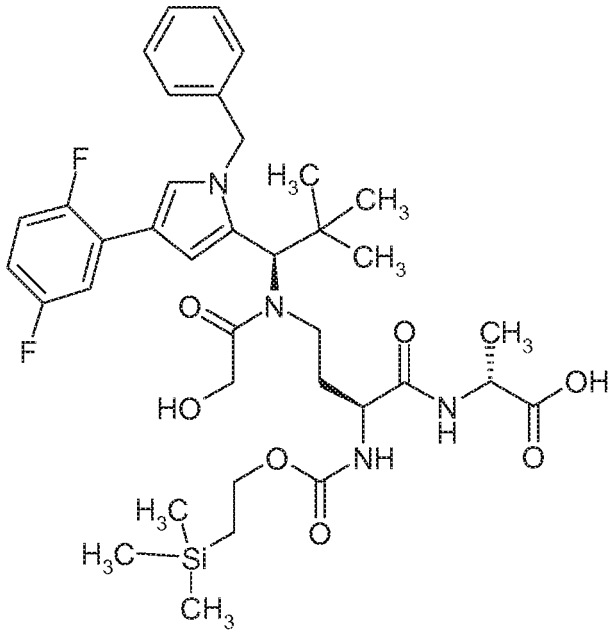


Die Titelverbindung wurde durch Kupplung von 60 mg (0.091 mmol) Intermediat C58 mit ß-Alaninmethylester und anschließender Esterspaltung mit 2m Lithiumhydroxidlösung hergestellt. Es wurden 67mg (61% d.Th.) der Titelverbindung über 2 Stufen erhalten.

LC-MS (Methode 1): R_t = 1.29 min; MS (ESIpos): m/z = 729 $(M+H)^+$.

Intermediat C62

N-[(2S)-4-[{(1R)-1-[1-Benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]-2-({[2-(trimethylsilyl)ethoxy]carbonyl}amino)butanoyl]-D-alanin

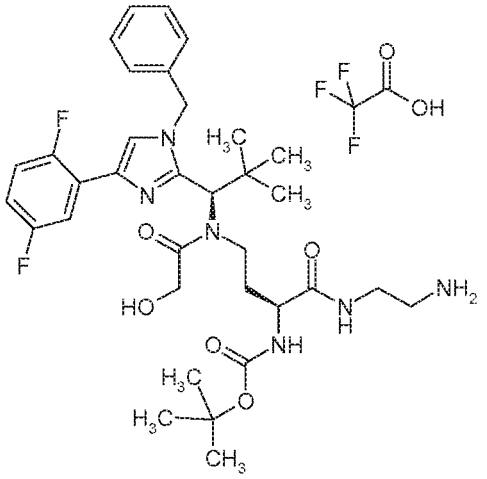


Die Titelverbindung wurde in Analogie zu Intermediat C61 aus Intermediat C58 und Methyl-D-alaninat hergestellt.

LC-MS (Methode 1): R_t = 1.32 min; MS (ESIpos): m/z = 729 $(M+H)^+$.

Intermediat C63

Trifluoressigsäure --tert-butyl-{(2S)-1-[(2-aminoethyl)amino]-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]-1-oxobutan-2-yl}carbamat (1:1)



Die Synthese dieses Intermediats begann im ersten Schritt mit der Kupplung von 50 mg (0.075 mmol) Intermediat C3 mit 26.2 mg (0.082 mmol) 9H-Fluoren-9-ylmethyl-(2-aminoethyl)carbamathydrochlorid(1:1) in Gegenwart von 28.7 mg (0.15 mmol) 1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimid-Hydrochlorid, 22.9 mg (0.15 mmol) 1-Hydroxy-1*H*-benzotriazol-Hydrat und 39 µl *N,N*-Diisopropylethylamin. Nach 18 h Rühren bei RT wurde eingeengt und der Rückstand durch präparative HPLC gereinigt. 45 mg (65% d. Th.) dieser Zwischenstufe wurden erhalten.

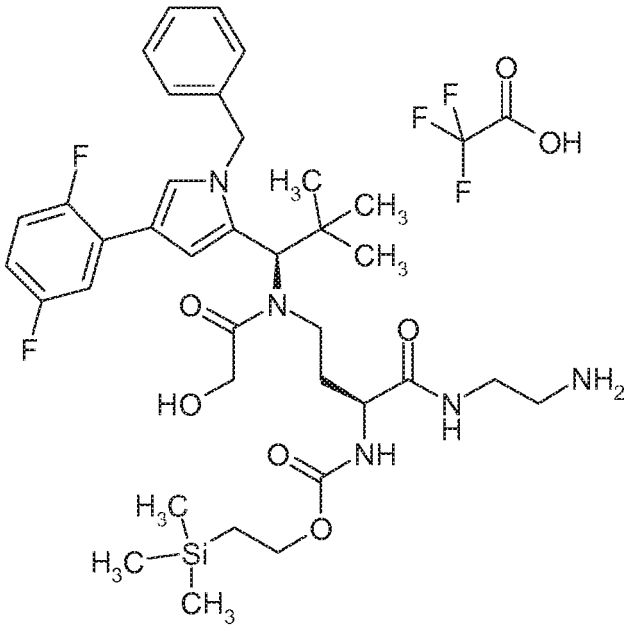
LC-MS (Methode 1): R_t = 1.51 min; MS (ESIpos): m/z = 921 $(M+H)^+$.

45 mg (0.049 mmol) von dieser Zwischenstufe wurden in 10 mL Ethanol aufgenommen und mit 176µ mL einer 40%-igen Methanaminlösung in Wasser versetzt. Der Ansatz wurde bei 50°C gerührt wobei nach 6h und nach 9h jeweils die gleiche Menge an Methanaminlösung zugegeben wurden. Nach weiteren 14 h Rühren bei 50°C wurden nochmals 700 µl der Mathenaminlösung zugegeben und nach weiteren 20h Rühren schließlich eingeengt. Der Rückstand wurde in DCM aufgenommen und mit Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde eingeengt und der Rückstand durch präparative HPLC gereinigt. Nach Einengen der entsprechenden Fraktionen und Trocknung des Rückstandes im Hochvakuum wurden 32 mg (99% d.Th.) von tert-Butyl-{(2S)-1-[(2-aminoethyl)amino]-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]-1-oxobutan-2-yl}carbamat erhaltenen.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.95 min; MS (ESIpos): m/z = 657 $(M+H)^+$.

Intermediat C64

Trifluoressigsäure --2-(trimethylsilyl)ethyl-{(2S)-1-[(2-aminoethyl)amino]-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]-1-oxobutan-2-yl}carbamat (1:1)

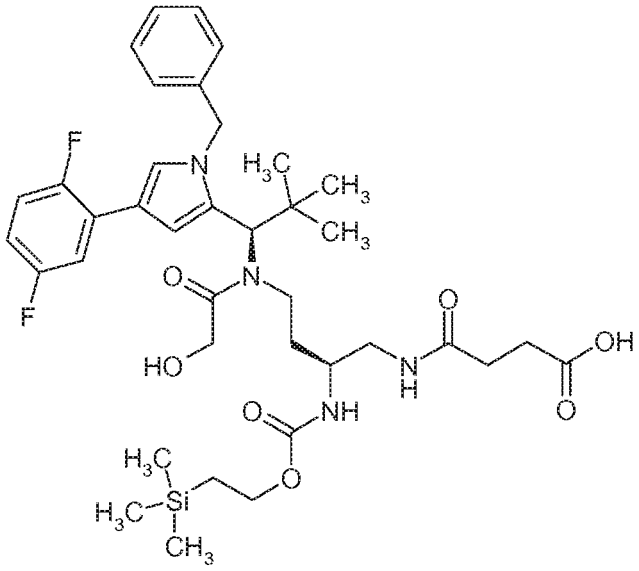


Die Titelverbindung wurde ausgehend von Intermediat C58 in Analogie zu Intermediat C63 hergestellt.
HPLC (Methode 11): R_t = 2.4 min;

LC-MS (Methode 1): R_t = 1.01 min; MS (ESIpos): m/z = 700 $(M+H)^+$.

Intermediat C65

(8S)-8-{2-[{(1R)-1-[1-Benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]ethyl}-2,2-dimethyl-6,11-dioxo-5-oxa-7,10-diaza-2-silatetradecan-14-säure



215 mg (0.59 mmol) von Intermediat L66 wurden in 25 mL Dichlormethan vorgelegt und mit 377 mg (0.89 mmol) Dess-Martin Periodinan und 144 µL (1.78 mmol) Pyridin versetzt. Man rührte 30 min bei RT. Anschließend wurde der Ansatz mit 300 ml Dichlormethan verdünnt und die organische Phase je zweimal mit 10%iger $Na_2S_2O_3$-Lösung, 10%iger Citronensäure-Lösung und ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösemittel im Vakuum abgedampft. Man erhielt 305 mg des Aldehyds, der ohne weitere Reinigung umgesetzt wurde.

175 mg (0.49 mmol) von Intermediat C52 wurden in 50 ml Dichlormethan gelöst und mit 147mg (0.69 mmol) Natriumtriacetoxyborhydrid sowie 32.5 µL Essigsäure versetzt. Nach 5 min Rühren bei RT wurden 214 mg (0.593 mmol) vom oben beschriebenen Aldehyd hinzugegeben und der Ansatz über Nacht bei RT gerührt. Dabei ist anstelle erwarteten Produktes 2-(Trimethylsilyl)ethyl-[(2S)-4-({(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}amino)-1-(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)butan-2-yl]carbamat entstanden. Da auch dieses Imid sich weiter zur Titelverbindung umsetzen lassen sollte, wurde der Ansatz eingeengt und der Rückstand durch präparative HPLC gereinigt. Nach Vereinigung der entsprechenden Imid-enthaltenden Fraktionen wurde das Lösungsmittel im Vakuum abgedampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. So wurden 195 mg (58%) des oben benannten Imids erhalten.

LC-MS (Methode 5): R_t = 3.32 min; MS (ESIpos): m/z = 667 $(M+H)^+$.

65 mg (97.5 µmol) dieses Imids wurden in 15 ml Dichlormethan aufgenommen und mit 367 µL (3.4 mmol) Acetoxyacetylchlorid sowie 595 µL *N,N*-Diisopropylethylamin versetzt. Nach 30 min Rühren bei RT wurde der Ansatz ohne Erwärmung im Vakuum eingeengt und der Rückstand durch präparative HPLC gereinigt. Die entsprechenden Fraktionen wurden vereinigt und nach Abdampfen der Lösungsmittel und Trocknung im Hochvakuum verblieben 28 mg (37% d. Th.) (8S)-11-{(1R)-1-[1-

Benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-8-[(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)methyl]-2,2-dimethyl-6,12-dioxo-5-oxa-7,11-diaza-2-silatridecan-13-yl-acetat.

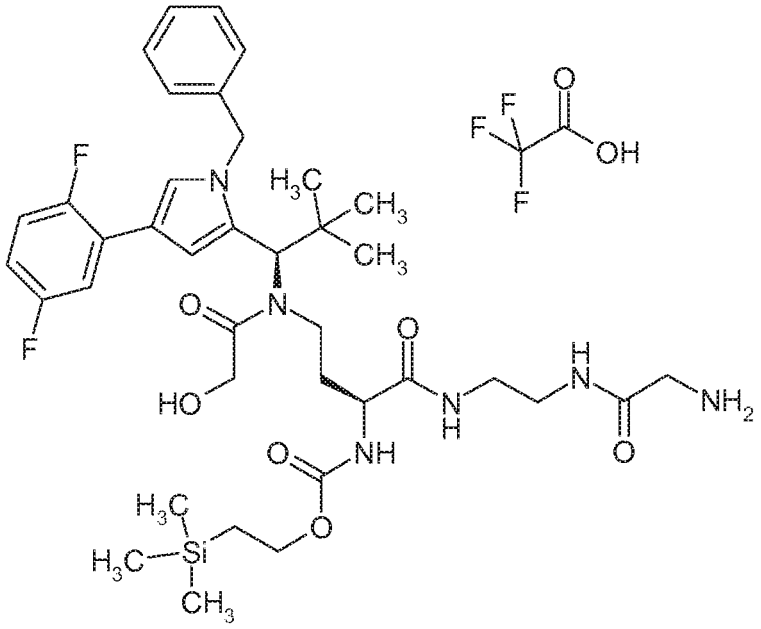
LC-MS (Methode 1): R_t = 1.44 min; MS (ESIpos): m/z = 767 $(M+H)^+$.

28 mg (37 µmol) von diesem Intermediat wurden in 3 mL Methanol gelöst und mit 548 µL einer 2M Lithiumhydroxidlösung versetzt. Nach 10 min Rühren bei RT wurde der Ansatz mit Trifluoressigsäure auf pH 4 gebracht und dann eingeengt. Der Rückstand wurde durch präparative HPLC gereinigt. Nach Vereinigung der entsprechenden Fraktionen, Abdampfen des Lösungsmittels und Trocknung des Rückstandes im Hochvakuum wurden 26 mg (96% d. Th.) der Titelverbindung als weißer Feststoff erhalten.

LC-MS (Methode 1): R_t = 1.33 min; MS (ESIpos): m/z = 743 $(M+H)^+$.

Intermediat C66

2-(Trimethylsilyl)ethyl-[(2S)-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]-1-{[2-(glycylamino)ethyl]amino}-1-oxobutan-2-yl]carbamat



Zuächst wurde aus N-[(benzyloxy)carbonyl]glycin und tert-Butyl (2-aminoethyl)carbamat nach klassischen Methoden der Peptidchemie (HATU-Kupplung und Boc-Spaltung) Trifluoressigsäure - benzyl-{2-[(2-aminoethyl)amino]-2-oxoethyl}carbamat (1:1) hergestellt.

13 mg (0.036 mmol) von diesem Intermediat sowie 25 mg (0.033 mmol) von Intermediat C58 wurden in 3 mL DMF aufgenommen und mit 19 mg (0.05 mmol) HATU und 17 µl N,N-Diisopropylethylamin versetzt. Nach 10 min Rühren bei RT wurde eingeengt und der Rückstand durch präparative HPLC gereinigt. Es wurden 17.8 mg (60% d. Th.) der Zwischenstufe erhalten.

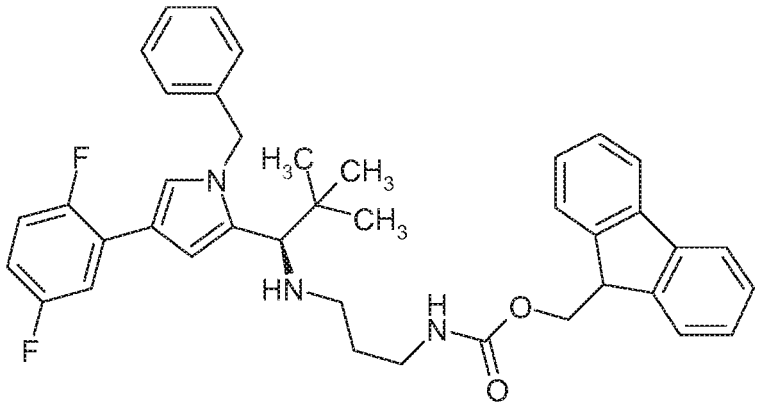
LC-MS (Methode 1): R_t = 1.36 min; MS (ESIpos): m/z = 891 $(M+H)^+$.

17 mg (0.019 mmol) dieser Zwischenstufe wurden in 10 ml Ethanol gelöst, mit Palladium auf Kohle (10%ig) versetzt und bei RT mit Wasserstoff unter Normaldruck 2 h hydriert. Der Katalysator wurde abfiltriert, die Lösemittel im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Es wurden 9 mg (62% d. Th.) der Titelverbindung erhalten.

LC-MS (Methode 1): R_t = 1.03 min; MS (ESIpos): m/z = 757 $(M+H)^+$.

Intermediat C67

9H-Fluoren-9-ylmethyl-[3-({(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}amino)propyl]carbamat



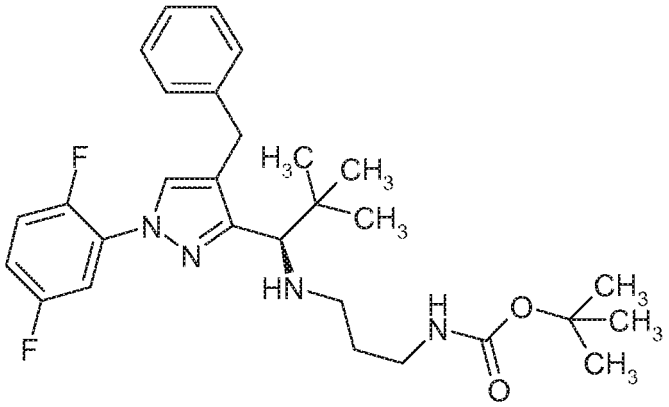
605.3 mg (1.71 mmol) (1R)-1-[1-Benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropan-1-amin (Intermediat C52) wurden in 10.0 mL Dichlormethan vorgelegt und mit 506.7 mg (2.39 mmol) Natriumtriacetoxyborhydrid und 117.9 mg (1.96 mmol) Essigsäure versetzt und 5 min bei RT grührt. Es wurden 580.0 mg (1.96 mmol) 9H-Fluoren-9-ylmethyl-(3-oxopropyl)carbamat (Intermediat L70) gelöst in 10.0 mL Dichlormethan zugegeben und die Reaktionsmischung über Nacht bei RT gerührt. Die Reaktionsmischung wurde mit Ethylacetat verdünnt und die organische Phase je zweimal mit ges. Natriumcarbonat-Lösung und ges. NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösemittel im Vakuum verdampft. Der Rückstand wurde mittels Kieselgel (Laufmittel: Cyclohexan/Ethylacetat 3:1) gereinigt. Die Lösemittel wurden im Vakuum

verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 514.7 mg (46 % d. Th.) der Titelverbindung.

LC-MS (Methode 1): R_t = 1.10 min; MS (ESIpos): m/z = 634 $(M+H)^+$.

Intermediat C68

tert-Butyl-[3-({(1R)-1-[4-benzyl-1-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrazol-3-yl]-2,2-dimethylpropyl}amino)propyl]carbamat



Die Synthese erfolgte in Analogie zur Synthese der Verbidnung Intermediat C67.

1000.0 mg (2.81 mmol) (1R)-1-[4-Benzyl-1-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrazol-3-yl]-2,2-dimethylpropan-1-amin (Intermediat C47)

835.0 mg (3.94 mmol) Natriumtriacetoxyborhydrid

194.0 mg (3.24 mmol) Essigsäure

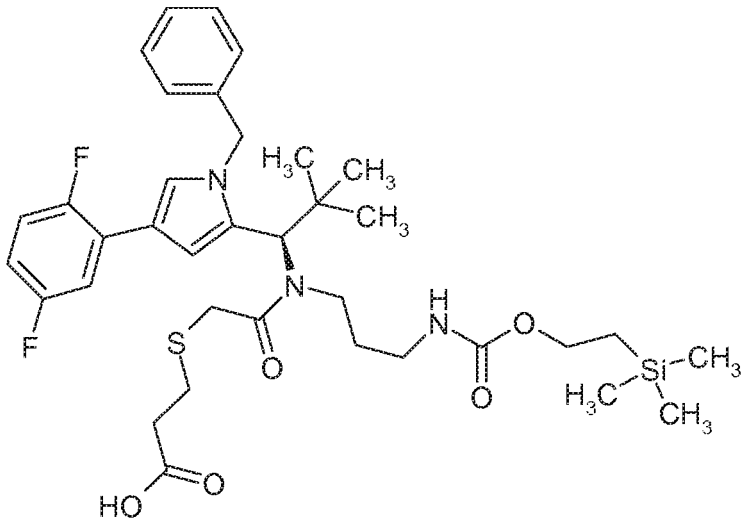
560.0 mg (3.24 mmol) tert-Butyl-(3-oxopropyl)carbamat

Man erhielt 695.8 mg (48 % d. Th.) der Titelverbindung.

LC-MS (Methode 1): R_t = 1.02 min; MS (ESIpos): m/z = 513 $(M+H)^+$.

Intermediat C69

11-{(1R)-1-[1-Benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-2,2-dimethyl-6,12-dioxo-5-oxa-14-thia-7,11-diaza-2-silaheptadecan-17-säure

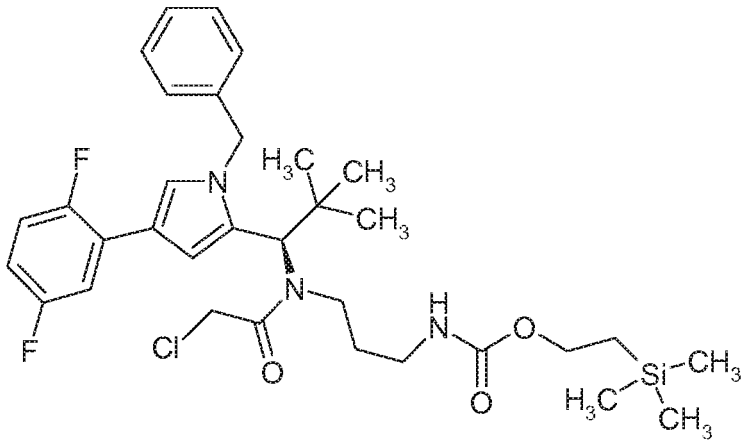


117.0 mg (0.19 mmol) (2-(Trimethylsilyl)ethyl-{3-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(chloracetyl)amino]propyl}carbamat (Intermediat C70) und 21.6 mg (0.20 mmol) 3-Sulfanylpropansäure wurden in 3.0 mL Methanol vorgelegt und mit 89.5 mg (0.65 mmol) Kaliumcarbonat versetzt und 4 h bei 50 °C gerührt. Die Reaktionsmischung wurde mit Ethylacetat verdünnt und die organische Phase wurde mit Wasser und ges. NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösemittel im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Der Rückstand wurde ohne weitere Reinigung in der nächsten Synthesestufe eingesetzt. Man erhielt 106.1 mg (73 % d. Th.) der Titelverbindung.

LC-MS (Methode 1): R_t = 1.42 min; MS (ESIneg): m/z = 700 $(M-H)^-$.

Intermediat C70

(2-(Trimethylsilyl)ethyl-{3-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(chloracetyl)amino]propyl}carbamat

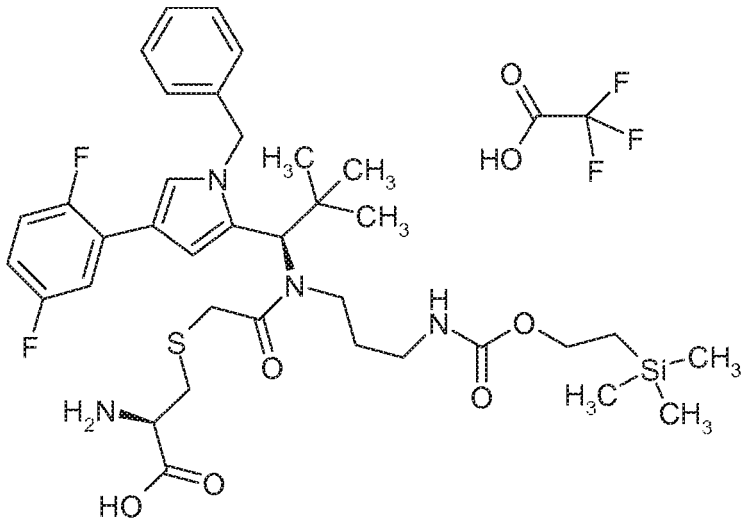


908.1 mg (1.63 mmol) 2-(Trimethylsilyl)ethyl-[3-({(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}amino)propyl]carbamat (siehe Synthese Intermediat C11) und 545.6 mg (5.39 mmol) Triethylamin wurden in 10.0 mL Dichlormethan vorgelegt und auf 0 °C abgekühlt. Bei dieser Temperatur wurden 590.5 mg (5.23 mmol) Chloracetylchlorid zugegeben und über Nacht bei RT gerührt. Die Reaktionsmischung wurde mit Ethylacetat verdünnt und die organische Phase wurde je dreimal mit ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und ges. Ammoniumchlorid-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde mit ges. NaCl-Lösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Der Rückstand wurde mittels präp. RP-HPLC (Säule: Reprosil 250x30; 10µ, Fluss: 50 mL/min, MeCN/Wasser, 0.1% TFA) gereinigt. Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 673.8 mg (65 % d. Th.) der Titelverbindung.

LC-MS (Methode 1): R_t = 1.53 min; MS (ESIneg): m/z = 676 $(M+HCOO^-)^-$.

Intermediat C71

S-(11-{(1R)-1-[1-Benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-2,2-dimethyl-6,12-dioxo-5-oxa-7,11-diaza-2-silatridecan-13-yl)-L-cystein-trifluoressigsäure (1:1)

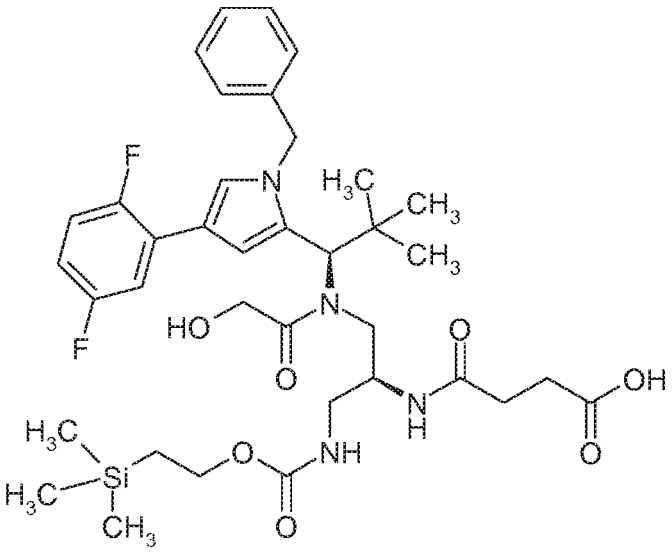


536.6 mg (4.43 mmol) L-Cystein wurden in 2.5 mL Wasser zusammen mit 531.5 mg (6.33 mmol) Natriumhydrogencarbonat suspendiert. Dazu wurden 400.0 mg (0.63 mmol) (2-(Trimethylsilyl)ethyl-{3-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(chloracetyl)amino]propyl}carbamat (Intermediat C70) gelöst in 25.0 mL *iso*-Propanol und 1.16 g (7.59 mmol) 1,8-Diazabicyclo(5.4.0)undec-7-en gegeben. Die Reaktionsmischung wurde 1.5 h bei 50 °C gerührt. Die Reaktionsmischung wurde mit Ethylacetat versetzt und die org. Phase wurde mehrmals mit ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und einmal mit ges. NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösemittel im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Der Rückstand wurde mittels präp. RP-HPLC (Säule: Reprosil 250x30; 10µ, Fluss: 50 mL/min, MeCN/Wasser, 0.1% TFA) gereinigt. Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 449.5 mg (86 % d. Th.) der Titelverbindung.

LC-MS (Methode 1): R_t = 1.20 min; MS (ESIpos): m/z = 717 $(M+H)^+$.

Intermediat C72

(9S)-9-{[{(1R)-1-[1-Benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]methyl}-2,2-dimethyl-6,11-dioxo-5-oxa-7,10-diaza-2-silatetradecan-14-säure



90 mg (0.212 mmol) von Intermediat L72 wurden in 6 mL Dichlormethan vorgelegt und mit 86 µL (1.06 mmol) Pyridin sowie 135 mg (0.318 mmol) Dess-Martin Periodinan versetzt. Man rührte 30 min bei RT. Anschließend wurde der Ansatz mit 30 ml Dichlormethan verdünnt und die organische Phase zweimal mit 10%iger $Na_2S_2O_3$-Lösung und einmal mit 5%iger Citronensäure-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösemittel im Vakuum abgedampft. Der so erhaltene Aldehyd wurde ohne weitere Reinigung umgesetzt.

63 mg (0.177 mmol) von Intermediat C52 wurden in 15 ml Dichlormethan gelöst und mit 52.4 mg (0.247 mmol) Natriumtriacetoxyborhydrid sowie 20.2 µL Essigsäure versetzt. Nach 5 min Rühren bei RT wurden 89.6 mg (0.212 mmol) vom oben beschriebenen Aldehyd hinzugegeben und der Ansatz 20 min bei RT gerührt. Der Ansatz wurde im Vakuum eingeengt und der Rückstand durch präparative HPLC gereinigt. Nach Vereinigung der entsprechenden Fraktionen wurde das Lösungsmittel im Vakuum abgedampft und der Rückstand aus Acetonitril/Wasser lyophilisiert. So wurden 71 mg (53% d. Th. Über 2 Stufen) Benzyl-(9R)-9-[({(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}amino)methyl]-2,2-dimethyl-6,11-dioxo-5-oxa-7,10-diaza-2-silatetradecan-14-oat erhalten.

LC-MS (Methode 1): R_t = 1.21 min; MS (ESIpos): m/z = 761 $(M+H)^+$.

70 mg (92 µmol) dieses Intermediats wurden in 15 ml Dichlormethan aufgenommen, auf 10°C abgekühlt und mit 54 µL Triethylamin sowie mit 25.5 µL (0.23 mmol) Acetoxyacetylchlorid versetzt. Nach 1 h Rühren bei RT wurden nochmals gleiche Mengen an Säurechlorid und Triethylamin zugegeben und nach einer weiteren Stunde Rühren bei RT erneut. Der Ansatz wurde anschließend für weitere 30 min bei RT gerührt und dann im Vakuum eingeengt und der Rückstand durch präparative HPLC gereinigt. Die entsprechenden Fraktionen wurden vereinigt und nach Abdampfen der

Lösungsmittel und Lyophilisation des Rückstandes aus Acetonitril/Wasser verblieben 46.5 mg (59% d. Th.) des acylierten Intermediats.

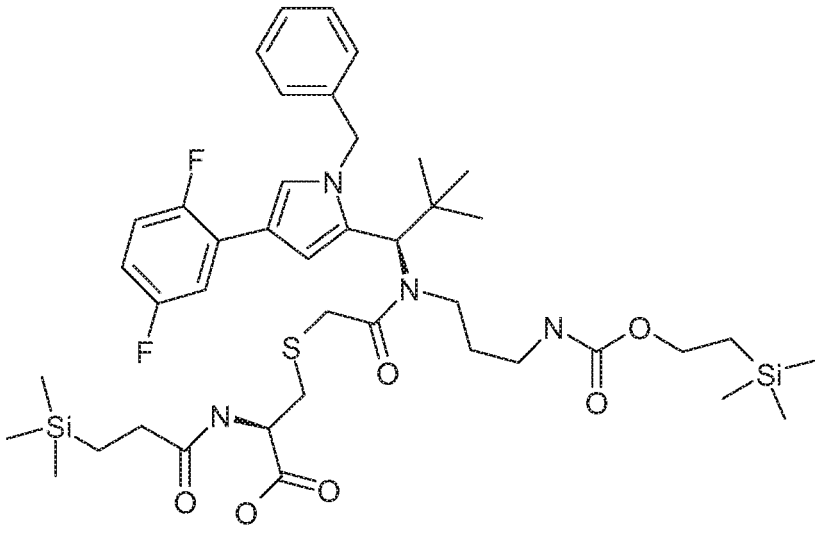
LC-MS (Methode 1): R_t = 1.53 min; MS (ESIpos): m/z = 861 $(M+H)^+$.

46 mg (53 µmol) von diesem Intermediat wurden in 5 mL Methanol gelöst und mit 2.7 mL einer 2M Lithiumhydroxidlösung versetzt. Nach 10 min Rühren bei RT wurde der Ansatz mit Essigsäure auf pH 3-4 gebracht und dann mit 15 ml Wasser verdünnt. Die wäßrige Phase wurde mit Ethylacetat extrahiert und die organische Phase über Magnesiumsulfat getrocknet und eingeengt. Der Rückstand wurde aus Acetronitril/Wasser lyophilisiert und nach Trocknung des Rückstandes im Hochvakuum wurden 37 mg (90% d. Th.) der Titelverbindung als weißer Feststoff erhalten.

LC-MS (Methode 1): R_t = 1.32 min; MS (ESIpos): m/z = 729 $(M+H)^+$.

Intermediat C73

S-(11-{(1R)-1-[1-Benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-2,2-dimethyl-6,12-dioxo-5-oxa-7,11-diaza-2-silatridecan-13-yl)-N-[3-(trimethylsilyl)propanoyl]-L-cystein



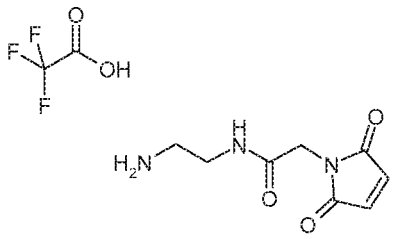
619 mg (0.86 mmol) S-(11-{(1R)-1-[1-Benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-2,2-dimethyl-6,12-dioxo-5-oxa-7,11-diaza-2-silatridecan-13-yl)-L-cystein-trifluoressigsäure (1:1) (Intermediat C71) wurden in 8.8 ml Dichlormethan vorgelegt und mit 87 mg (0.86 mmol) Triethylamin und 224 mg (0.86 mmol) N-[2-(Trimethylsilyl)-ethoxycarbonyloxy]-pyrrolidin-2,5-dion versetzt. Nach 1h wurden 45 mg (0.17 mmol) N-[2-(Trimethylsilyl)-ethoxycarbonyloxy]-pyrrolidin-2,5-dion zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde 1 h bei RT gerührt. Das Gemisch wurde im Vakuum verdampft und der Rückstand in Dichlormethan aufgenommen und

dann wurde die organische Phase zweimal mit Wasser und einer gesättigten Natriumhydrogenkarbonat-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet, am Rotationsverdampfer eingeengt und im Hochvakuum getrocknet. Der Rückstand wurde ohne weitere Reinigung weiter eingesetzt. Man erhielt 602 mg (71%, Reinheit 87%) der Titelverbindung.

LC-MS (Methode 1): R_t = 1.58 min; MS (ESIpos): m/z = 861 $(M+H)^+$.

Intermediat L1

Trifluoressigsäure--N-(2-aminoethyl)-2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)acetamid(1:1)

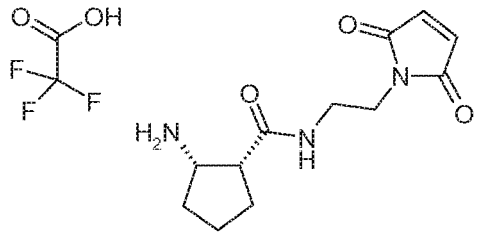


Die Titelverbindung wurde nach klassischen Methoden der Peptidchemie aus kommerziell erhältlicher (2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)essigsäure und tert-Butyl-(2-aminoethyl) carbamat hergestellt.
HPLC (Methode 11): R_t = 0.19 min;

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.17 min; MS (ESIpos): m/z = 198 $(M+H)^+$.

Intermediat L2

Trifluoressigsäure--rel-(1R,2S)-2-amino-N-[2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)ethyl]cyclopentancarboxamid(1:1)

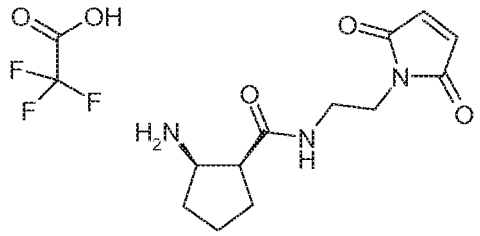


Die Titelverbindung wurde ausgehend von 50 mg (0.214 mmol) von kommerziell erhältlicher cis-2-[(tert-Butoxycarbonyl)amino]-1-cyclopentancarbonsäure mit 60 mg (0.235 mmol) von ebenso kommerziell erhältlichem Trifluoressigsäure--1-(2-aminoethyl)-1H-pyrrol-2,5-dion(1:1) durch Kupplung mit EDC/HOBT und anschließender Entschützung mit TFA hergestellt. Es wurden 36 mg (38% d.Th. über 2 Stufen) der Titelverbindung erhalten.
HPLC (Methode 11): R_t = 0.2 min;

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.17 min; MS (ESIpos): m/z = 252 $(M+H)^+$.

Intermediat L3

Trifluoressigsäure--(1S,2R)-2-amino-N-[2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)ethyl]cyclopentancarboxamid(1:1)



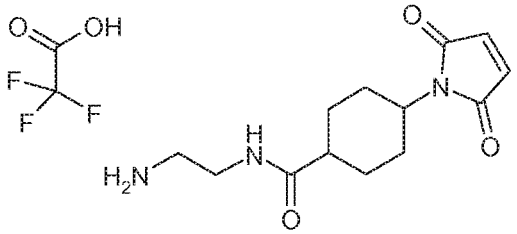
Die Titelverbindung wurde ausgehend von 50 mg (0.214 mmol) von kommerziell erhältlicher (1S,2R)-2-[(tert-Butoxycarbonyl)amino]cyclopentancarbonsäure mit 72 mg (0.283 mmol) von ebenso kommerziell erhältlichem Trifluoressigsäure--1-(2-aminoethyl)-1H-pyrrol-2,5-dion(1:1) durch Kupplung mit EDC/HOBT und anschließender Entschützung mit TFA hergestellt. Es wurden 13 mg (16% d.Th. über 2 Stufen) der Titelverbindung erhalten.

HPLC (Methode 11): R_t = 0.2 min;

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.2 min; MS (ESIpos): m/z = 252 $(M+H)^+$.

Intermediat L4

Trifluoressigsäure--N-(2-aminoethyl)-4-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)cyclohexancarboxamid(1:1)



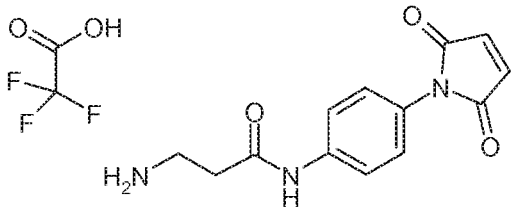
Die Titelverbindung wurde nach klassischen Methoden der Peptidchemie aus kommerziell erhältlichem 1-[(4-{[(2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl)oxy]carbonyl}cyclohexyl)methyl]-1H-pyrrol-2,5-dion und tert-Butyl-(2-aminoethyl) carbamat hergestellt.

HPLC (Methode 11): R_t = 0.26 min;

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.25 min; MS (ESIpos): m/z = 280 $(M+H)^+$.

Intermediat L5

Trifluoressigsäure--N-[4-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)phenyl]-beta-alaninamid(1:1)

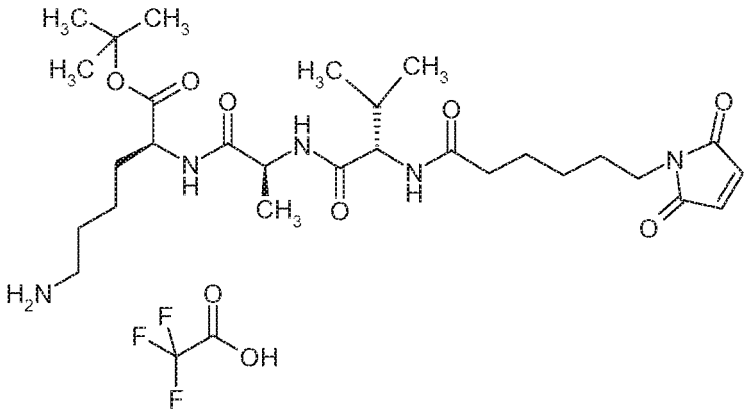


Die Titelverbindung wurde nach klassischen Methoden der Peptidchemie aus kommerziell erhältlichem 1-(4-Aminophenyl)-1H-pyrrol-2,5-dion und N-(tert-Butoxycarbonyl)-beta-alanin hergestellt.
HPLC (Methode 11): R_t = 0.22 min;

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.22 min; MS (ESIpos): m/z = 260 $(M+H)^+$.

Intermediat L6

Trifluoressigsäure--tert-butyl-N-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)hexanoyl]-L-valyl-L-alanyl-L-lysinat(1:1)

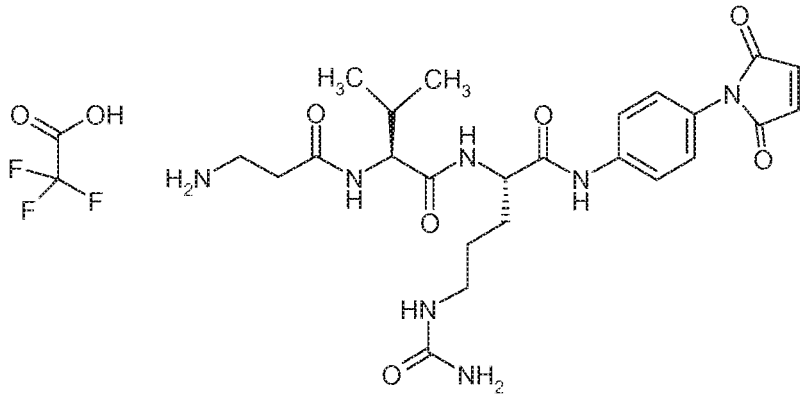


Die Titelverbindung wurde zunächst durch Kupplung von kommerziell erhältlicher 6-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)hexansäure mit dem nach klassischen Methoden der Peptidchemie hergestellten partiell geschützten Peptid tert-Butyl-L-valyl-L-alanyl-N^6-(tert-butoxycarbonyl)-L-lysinat in Gegenwart von EDC/HOBT hergestellt. Anschließend erfolgte die Entschützung an der Aminogruppe unter schonenden Bedingungen durch Rühren in 5%iger Trifluoressigsäure in DCM bei RT, wobei in 37%iger Ausbeute die Titelverbindung erhalten wurde.
HPLC (Methode 11): R_t = 1.29 min;

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.62 min; MS (ESIpos): m/z = 566 $(M+H)^+$.

Intermediat L7

Trifluoressigsäure--beta-alanyl-L-valyl-N^5-carbamoyl-N-[4-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)phenyl]-L-ornithinamid(1:1)



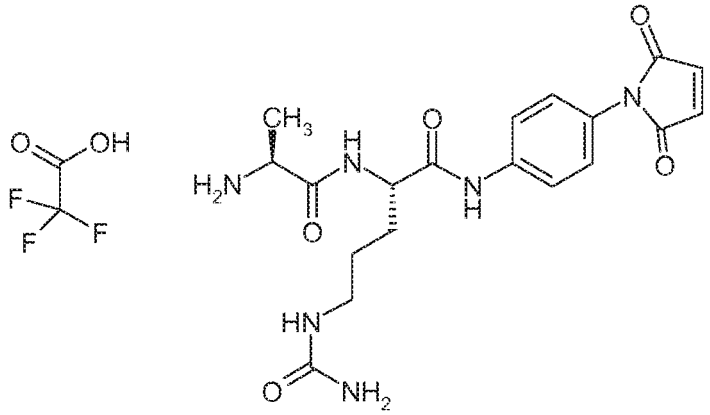
Die Titelverbindung wurde nach klassischen Methoden der Peptidchemie ausgehend von kommerziell erhältlichem 1-(4-Aminophenyl)-1H-pyrrol-2,5-dion durch sequentielle Kupplung mit N^2-(tert-Butoxycarbonyl)-N^5-carbamoyl-L-ornithin in Gegenwart von HATU, Entschützung mit TFA, Kupplung mit 2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl-N-(tert-butoxycarbonyl)-L-valinat, Entschützung mit TFA, Kupplung mit 2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl-N-(tert-butoxycarbonyl)-beta-alaninat und erneute Entschützung mit TFA hergestellt. Es wurden 32 mg der Titelverbindung erhalten.

HPLC (Methode 11): R_t = 0.31 min;

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.47 min; MS (ESIpos): m/z = 516 $(M+H)^+$.

Intermediat L8

Trifluoressigsäure--L-alanyl-N^5-carbamoyl-N-[4-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)phenyl]-L-ornithinamid(1:1)



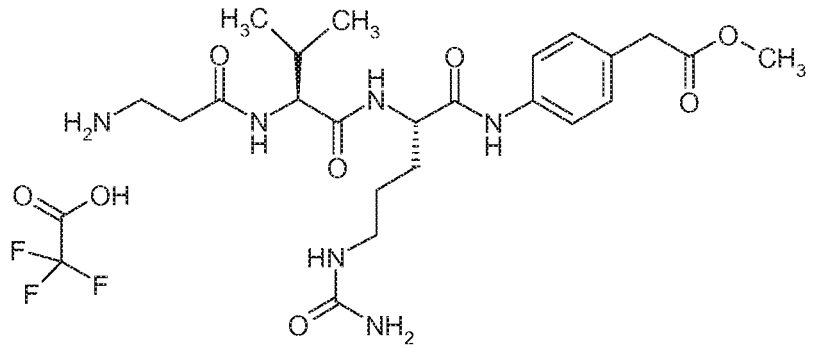
Die Titelverbindung wurde nach klassischen Methoden der Peptidchemie ausgehend von kommerziell erhältlichem 1-(4-Aminophenyl)-1H-pyrrol-2,5-dion durch sequentielle Kupplung mit N^2-(tert-Butoxycarbonyl)-N^5-carbamoyl-L-ornithin in Gegenwart von HATU, Entschützung mit TFA, Kupplung mit 2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl-N-(tert-butoxycarbonyl)-L-alaninat und erneute Entschützung mit TFA hergestellt. Es wurden 171 mg der Titelverbindung erhalten.

HPLC (Methode 11): R_t = 0.23 min;

LC-MS (Methode 7): R_t = 0.3 min; MS (ESIpos): m/z = 417 $(M+H)^+$.

Intermediat L9

Trifluoressigsäure--beta-alanyl-L-valyl-N^5-carbamoyl-N-[4-(2-methoxy-2-oxoethyl)phenyl]-L-ornithinamid(1:1)

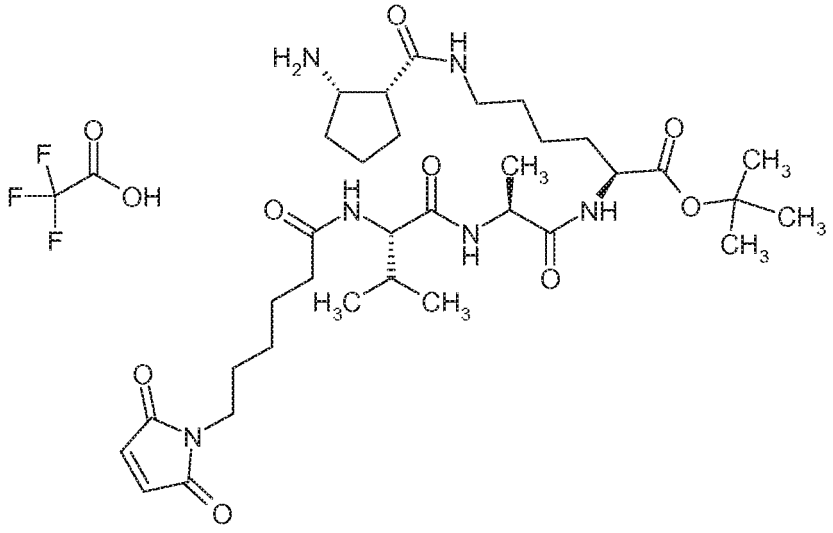


Die Titelverbindung in Analogie zu Intermediat L7 ausgehend von kommerziell erhältlichem Methyl-(4-aminophenyl)acetat hergestellt. Es wurden 320 mg der Titelverbindung erhalten.
HPLC (Methode 11): R_t = 0.45 min;

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.48 min; MS (ESIpos): m/z = 493 $(M+H)^+$.

Intermediat L10

N-[6-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)hexanoyl]-L-valyl-L-alanyl-rel-N^6-{[(1R,2S)-2-aminocyclopentyl]carbonyl}-L-lysin-trifluoressigsäure(1:2)



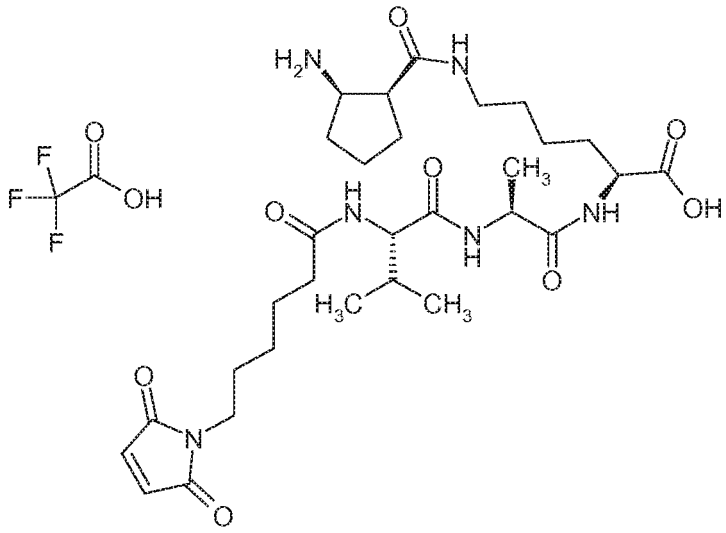
Die Titelverbindung wurde ausgehend von Intermediat L6 durch Kupplung mit cis-2-[(tert-Butoxycarbonyl)amino]-1-cyclopentancarbonsäure mit EDC/HOBT und anschließender Entschützung mit TFA hergestellt. Es wurden 12 mg (52% d.Th. über 2 Stufen) der Titelverbindung erhalten.

HPLC (Methode 11): R_t = 1.45 min;

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.73 min; MS (ESIpos): m/z = 677 $(M+H)^+$.

Intermediat L11

N-[6-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)hexanoyl]-L-valyl-L-alanyl-N^6-{[(1S,2R)-2-aminocyclopentyl]carbonyl}-L-lysin-trifluoressigsäure(1:2)



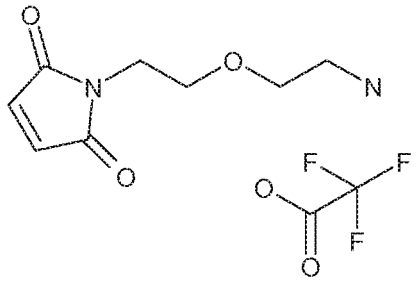
Die Titelverbindung wurde ausgehend von Intermediat L6 durch Kupplung mit (1S,2R)-2-[(tert-Butoxycarbonyl)amino]cyclopentancarbonsäure mit EDC/HOBT und anschließender Entschützung mit TFA hergestellt. Es wurden 11 mg (39% d.Th. über 2 Stufen) der Titelverbindung erhalten.

HPLC (Methode 11): R_t = 1.45 min;

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.74 min; MS (ESIpos): m/z = 677 $(M+H)^+$.

Intermediat L12

Trifluoressigsäure--1-[2-(2-aminoethoxy)ethyl]-1H-pyrrol-2,5-dion(1:1)



Zu 228 mg (1.12 mmol) tert-Butyl-[2-(2-aminoethoxy)ethyl]carbamat gelöst in 7 mL Dioxan/Wasser 1:1 gelöst wurden 381 mg (2.46 mmol) Methyl-2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-carboxylat gegeben. Dann wurden 1.2 mL einer gesättigten Natriumhydrogencarbonat Lösung zugesetzt und der Ansatz bei

RT gerührt. Nach insgesamt 5-tägigem Rühren bei 2 weiteren Zugaben von gleichen Mengen der Natriumhydrogencarbonat Lösung wurde der Ansatz durch Ansäuern mit Trifluoressigsäure, Einrotieren und Reinigung des Rückstandes durch präparative HPLC aufgearbeitet. Die entsprechenden Fraktionen wurden vereinigt, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand aus Acetonitril/Wasser 1:1 lyophilisiert.

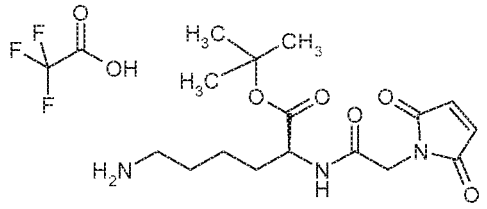
Der Rückstand wurde in 3 mL Dichlormethan aufgenommen und mit 1 mL Trifluoressigsäure versetzt. Nach 15 min Rühren bei RT wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand aus Acetonitril/Wasser 1:1 lyophilisiert. So wurden 70 mg (67% d.Th. über 2 Stufen) der Titelverbindung als harziger Rückstand erhalten.

HPLC (Methode 11): R_t = 0.2 min;

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.18 min; MS (ESIpos): m/z = 185 $(M+H)^+$.

Intermediat L13

Trifluoressigsäure--tert-butyl-N^2-[(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)acetyl]-L-lysinat(1:1)



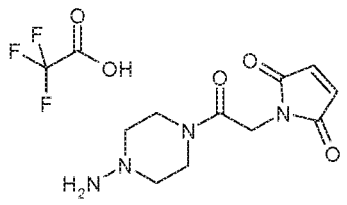
Die Titelverbindung wurde durch Kupplung von (2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)essigsäure mit tert-Butyl-N^6-(tert-butoxycarbonyl)-L-lysinathydrochlorid(1:1) in Gegenwart von EDC/HOBT und anschließender schonender Abspaltung der tert-Butoxycarbonyl Schutzgruppe in Analogie zu Intermediat L6 hergestellt.

HPLC (Methode 11): R_t = 0.42 min;

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.43 min; MS (ESIpos): m/z = 340 $(M+H)^+$.

Intermediat L14

Trifluoressigsäure--1-[2-(4-aminopiperazin-1-yl)-2-oxoethyl]-1H-pyrrol-2,5-dion(1:1)



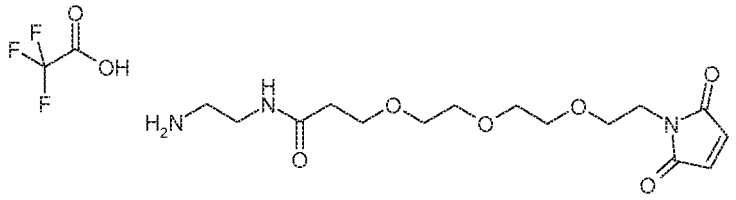
Die Titelverbindung wurde in Analogie zu Intermediat L2 über 2 Stufen aus tert-Butyl-piperazin-1-ylcarbamat und (2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)essigsäure hergestellt.

HPLC (Methode 11): R_t = 0.2 min;

LC-MS (Methode 3): R_t = 0.25 min; MS (ESIpos): m/z = 239 $(M+H)^+$.

Intermediat L15

Trifluoressigsäure--N-(2-aminoethyl)-3-(2-{2-[2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)ethoxy]ethoxy}ethoxy)propanamid(1:1)



2.93 g (10.58 mmol) tert-Butyl-3-{2-[2-(2-aminoethoxy)ethoxy]ethoxy}propanoat wurden in 100 mL Dioxan/Wasser 1:1 gelöst und mit 3.28 g (21.15 mmol) Methyl-2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-carboxylat sowie einer gesättigten Natriumhydrogencarbonatlösung bis zum Erreichen eines pH-Wertes von 6-7 versetzt. Die Lösung wurde 30 min bei RT gerührt und anschließend wurde das 1,4-Dioxan im Vakuum abgedampft. Dann wurden 200 mL Wasser zugegeben und die Mischung dreimal mit jeweils 300 mL Ethylacetat ausgeschüttelt. Die organischen Extrakte wurden vereinigt, über Magnesiumsulfat getrocknet und filtriert. Nach Einengen wurde tert-Butyl-3-(2-{2-[2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)ethoxy]ethoxy}ethoxy)propanoat als braunes Öl erhalten, das anschließend im Hochvakuum getrocknet wurde.

HPLC (Methode 11): R_t = 1.5 min;

LC-MS (Methode 3): R_t = 0.88 min; MS (ESIpos): m/z = 375 $(M+NH_4)^+$.

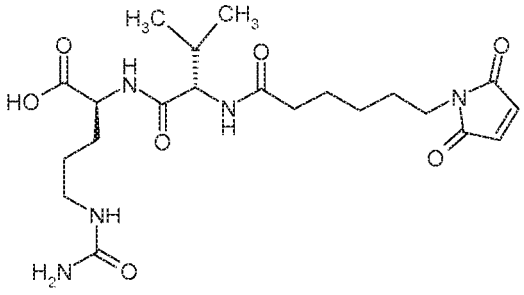
Dieses Intermediat wurde nach Standardverfahren (Entschützung mit TFA, Kupplung mit tert-Butyl-(2-aminoethyl)carbamat und erneute Entschützung mit TFA) in die Titelverbindung überführt.

HPLC (Methode 11): R_t = 0.2 min;

LC-MS (Methode 3): R_t = 0.25 min; MS (ESIpos): m/z = 344 $(M+H)^+$.

Intermediat L16

N-[6-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)hexanoyl]-L-valyl-N^5-carbamoyl-L-ornithin



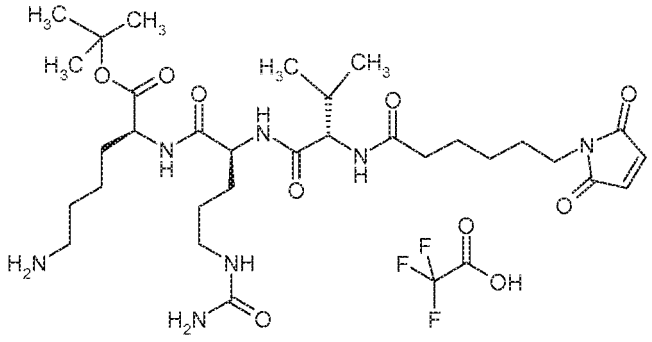
Zu einer Lösung von 266 mg (1.33 mmol) L-Valyl-N5-carbamoyl-L-ornithin in 24 mL DMF wurden 535 mg (1.73 mmol) von kommerziell erhältlichem 1-{6-[(2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl)oxy]-6-oxohexyl}-1H-pyrrol-2,5-dion sowie 930 mL *N,N*-Diisopropylethylamin hinzugegeben. Der Ansatz wurde 24 h im Ultraschallbad behandelt und anschließend im Vakuum bis zur Trockene eingeengt. Der verbliebene Rückstand wurde mittels präparativer HPCL gereinigt und nach Einengen der entsprechenden Fraktionen und Trocknung des Rückstandes im Hochvakuum verblieben 337 mg (50% d.Th.) der Titelverbindung.

HPLC (Methode 11): R_t = 0.4 min;

LC-MS (Methode 3): R_t = 0.58 min; MS (ESIpos): m/z = 468 $(M+H)^+$.

Intermediat L17

Trifluoressigsäure--tert-butyl-N-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)hexanoyl]-L-valyl-N^5-carbamoyl-L-ornithyl-L-lysinat(1:1)



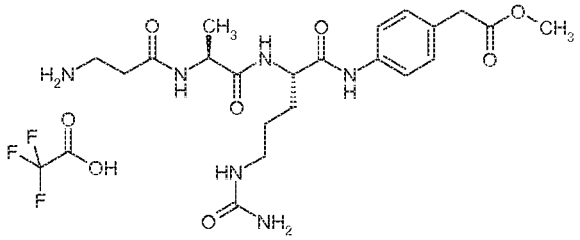
Die Titelverbindung wurde zunächst durch Kupplung von 172 mg (0.37 mmol) Intermediat L16 und 125 mg (0.37 mmol) tert-Butyl-N6-(tert-butoxycarbonyl)-L-lysinat hydrochlorid(1:1) in Gegenwart von EDC/HOBT und *N,N*-Diisopropylethylamin und anschließende Entschützung der Aminogruppe unter schonenden Bedingungen durch 2h Rühren in 10%iger Trifluoressigsäure in DCM bei RT hergestellt. Nach Gefriertrocknung aus Acetonitril/ Wasser wurden 194 mg (49% d.Th.) der Titelverbindung über 2 Stufen erhalten.

HPLC (Methode 11): R_t = 1.1 min;

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.58 min; MS (ESIpos): m/z = 652 $(M+H)^+$.

Intermediat L18

Trifluoressigsäure--beta-alanyl-L-alanyl-N^5-carbamoyl-N-[4-(2-methoxy-2-oxoethyl)phenyl]-L-ornithinamid(1:1)

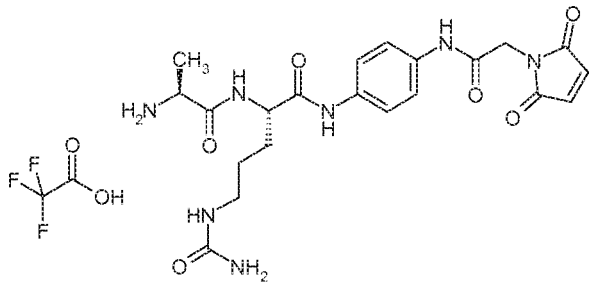


Die Titelverbindung wurde ausgehend von Methyl-(4-aminophenyl)acetat analog Intermediat L7 sequentiell nach klassischen Methoden der Peptidchemie durch Anknüpfung von N^2-(tert-Butoxycarbonyl)-N^5-carbamoyl-L-ornithin in Gegenwart von HATU, Entschützung mit TFA, Kupplung mit 2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl-N-(tert-butoxycarbonyl)-L-alaninat, Entschützung mit TFA, Kupplung mit 2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl-N-(tert-butoxycarbonyl)-beta-alaninat und erneute Entschützung mit TFA hergestellt. Es wurden 330 mg der Titelverbindung erhalten.
HPLC (Methode 11): R_t = 0.29 min;

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.41 min; MS (ESIpos): m/z = 465 $(M+H)^+$.

Intermediat L19

Trifluoressigsäure--L-alanyl-N5-carbamoyl-N-(4-{[(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)acetyl]amino}phenyl)-L-ornithinamid(1:1)



Die Titelverbindung wurde ausgehend von 1,4 Phenylendiamin sequentiell nach klassischen Methoden der Peptidchemie hergestellt. Im ersten Schritt wurden 942 mg (8.72 mmol) 1,4 Phenylendiamin mit 0.8 g (2.9 mmol) N^2-(tert-Butoxycarbonyl)-N^5-carbamoyl-L-ornithin in Gegenwart von HATU und *N,N*-Diisopropylethylamin monoacyliert. Im zweiten Schritt wurde in analoger Weise die zweite anilinische

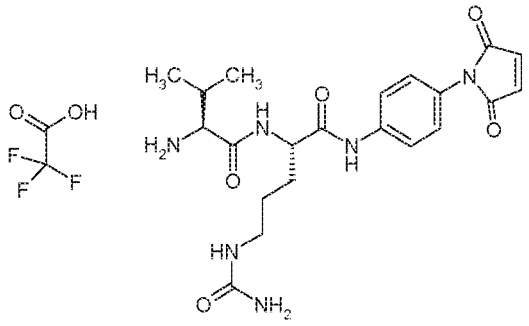
Aminogruppe mit (2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)essigsäure in Gegenwart von HATU und *N,N*-Diisopropylethylamin acyliert. Entschützung mit TFA, Kupplung mit 2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl-N-(tert-butoxycarbonyl)-L-alaninat und erneute Entschützung mit TFA führten dann in 3 weiteren Syntheseschritten zur Titelverbindung, von der auf diesem Weg 148 mg erhalten wurden.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.21 min; MS (ESIpos): m/z = 474 $(M+H)^+$.

LC-MS (Methode 4): R_t = 0.2 min; MS (ESIpos): m/z = 474 $(M+H)^+$.

Intermediat L20

Trifluoressigsäure--L-valyl-N^5-carbamoyl-N-[4-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)phenyl]-L-ornithinamid(1:1)

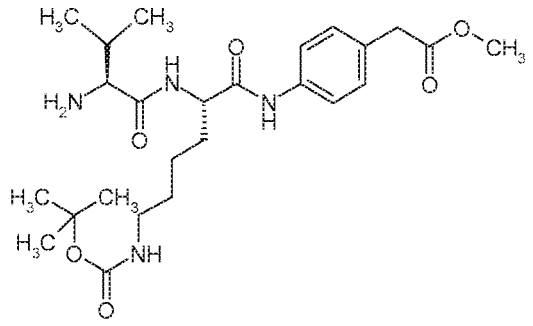


Die Titelverbindung wurde nach klassischen Methoden der Peptidchemie analog zu Intermediat L8 ausgehend von kommerziell erhältlichem 1-(4-Aminophenyl)-1H-pyrrol-2,5-dion durch sequentielle Kupplung mit N^2-(tert-Butoxycarbonyl)-N^5-carbamoyl-L-ornithin in Gegenwart von HATU, Entschützung mit TFA, Kupplung mit 2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl-N-(tert-butoxycarbonyl)-L-valinat und erneute Entschützung mit TFA hergestellt. Es wurden 171 mg der Titelverbindung erhalten.
HPLC (Methode 11): R_t = 0.28 min;

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.39 min; MS (ESIpos): m/z = 445 $(M+H)^+$.

Intermediat L21

L-Valyl-N^6-(tert-butoxycarbonyl)-N-[4-(2-methoxy-2-oxoethyl)phenyl]-L-lysinamid



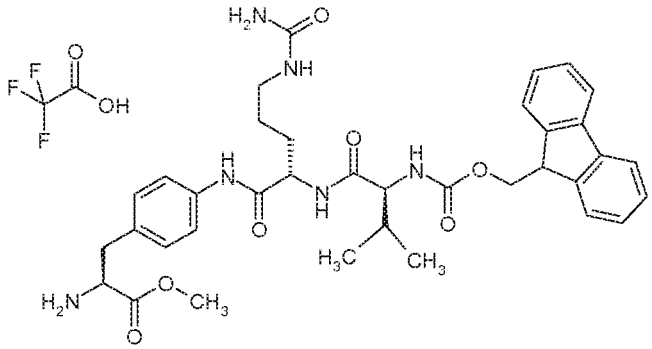
Die Titelverbindung wurde nach klassischen Methoden der Peptidchemie ausgehend von kommerziell erhältlichem 0.42 g (2.56 mmol) Methyl-(4-aminophenyl)acetat durch sequentielle Kupplung mit N6-(tert-Butoxycarbonyl)-N2-[(9H-fluoren-9-ylmethoxy)carbonyl]-L-lysin in Gegenwart von HATU, und *N,N*-Diisopropylethylamin, Entschützung mit Piperidin, Kupplung mit 2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl-N-[(benzyloxy)carbonyl]-L-valinat in Gegenwart von *N,N*-Diisopropylethylamin und anschließende hydrogenolytische Abspaltung der Benzyloxycarbonylschutzgruppe über 10%-Palladium-Aktivkohle. Es wurden 360 mg (32% d.Th. über 4 Stufen) der Titelverbindung erhalten.

HPLC (Methode 11): R_t = 1.5 min;

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.73 min; MS (ESIpos): m/z = 493 $(M+H)^+$.

Intermediat L22

Trifluoressigsäure--N-[(9H-fluoren-9-ylmethoxy)carbonyl]-L-valyl-N-{4-[(2S)-2-amino-3-methoxy-3-oxopropyl]phenyl}-N^5-carbamoyl-L-ornithinamid(1:1)



Die Titelverbindung wurde ausgehend von N-(tert-Butoxycarbonyl)-4-nitro-L-phenylalanin sequentiell nach klassischen Methoden der Peptidchemie hergestellt. 2.5 g (8.06 mmol) von diesem Edukt wurde im ersten Schritt zunächst in das Caesiumsalz und dann mit Iodmethan in DMF in den Methylester überführt.

Hydrogenolytisch wurde dann in Methanol über 10% Palladium-Aktivkohle die Nitrogruppe in eine Aminogruppe überführt.

Die so generierte Aminogruppe wurde dann mit N5-Carbamoyl-N2-[(9H-fluoren-9-ylmethoxy)carbonyl]-L-ornithin in DMF in Gegenwart von HATU und *N,N*-Diisopropylethylamin acyliert. Im nächsten Schritt wurde die Fmoc-Gruppe mit Piperidin in DMF abgespalten.

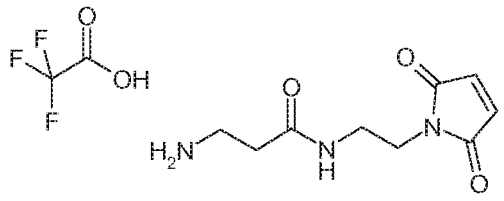
Anschließend erfolgte in DMF die Kupplung mit N-[(9H-Fluoren-9-ylmethoxy)carbonyl]-L-valin in Gegenwart von 1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimid-Hydrochlorid, 1-Hydroxy-1*H*-benzotriazol-Hydrat und *N,N*-Diisopropylethylamin und schließlich die Abspaltung der tert-Butoxycarbonylgruppe mit Trifluoressigsäure.

HPLC (Methode 11): R_t = 1.6 min;

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.77 min; MS (ESIpos): m/z = 673 $(M+H)^+$.

Intermediat L23

Trifluoressigsäure--N-[2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)ethyl]-beta-alaninamid(1:1)

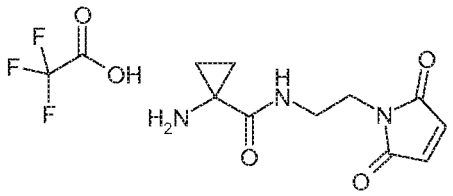


Die Titelverbindung wurde ausgehend von kommerziell erhältlichem Trifluoressigsäure--1-(2-aminoethyl)-1H-pyrrol-2,5-dion(1:1) durch Kupplung mit N-(tert-Butoxycarbonyl)-beta-alanin in Gegenwart von EDCI/HOBT und *N,N*-Diisopropylethylamin und anschließende Entschützung mit Trifluoressigsäure hergestellt.

HPLC (Methode 11): R_t = 0.19 min.

Intermediat L24

Trifluoressigsäure--1-amino-N-[2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)ethyl] cyclopropancarboxamid(1:1)



114 mg (0.67 mmol) von kommerziell erhältlicher 1-[(tert-Butoxycarbonyl)amino]cyclopropan carbonsäure wurden in 25 mL DCM gelöst und mit 110 mg (0.623 mmol) von kommerziell erhältlichem Trifluoressigsäure--1-(2-aminoethyl)-1H-pyrrol-2,5-dion(1:1) sowie mit 395 µl *N,N*-Diisopropylethylamin versetzt und auf -10°C abgekühlt. Dann wurden 217 mg (0.793 mmol) 2-Brom-1-ethylpyridiniumtetrafluoroborat zugegeben und der Ansatz 2 h bei RT gerührt. Anschließend wurde mit Ethylacetat verdünnt und nacheinander mit 10%-iger Zitronensäure, gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung un gesättigter Natriumchloridlösubng ausgeschüttelt, dann über Magnesiumsulfat getrocknet und eingeengt. Nach Trocknung im Hochvakuum wurden 152 mg des geschützten Intermediats erhalten.

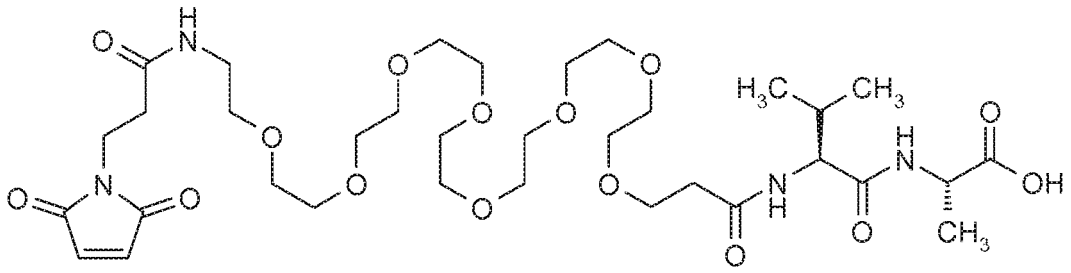
Diese wurden anschließend in 10 mL DCM aufgenommen und mit 1 mL Trifluoressigsäure entschützt. Nach Lyophilisation aus Acetonitril/Wasser wurden 158 mg (71% d.Th. über 2 Stufen) der Titelverbindung erhalten.

HPLC (Methode 11): R_t = 0.19 min.

LC-MS (Methode 3): R_t = 0.98 min; MS (ESIpos): m/z = 224 $(M+H)^+$.

Intermediat L25

N-[31-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-29-oxo-4,7,10,13,16,19,22,25-octaoxa-28-azahentriacontan-1-oyl]-L-valyl-L-alanin

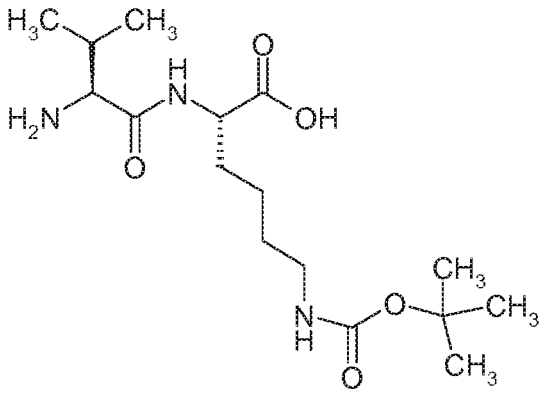


31.4 mg (0.17 mmol) Valyl-L-alanin wurden in 3.0 mL DMF gelöst und mit 115.0 mg (0.17 mmol) 3-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-N-{27-[(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)oxy]-27-oxo-3,6,9,12,15,18,21,24-octaoxaheptacos-1-yl}propanamid und mit 33.7 mg (0.0.33 mmol) Triethylamin versetzt. Es wurde über Nacht bei RT gerührt. Die Reaktionsmischung wurde direkt über die präp. RP-HPLC gereinigt (Säule: Reprosil 250x30; 10µ, Fluss: 50 mL/min, MeCN/Wasser). Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 74.1 mg (58 % d. Th.) der Titelverbindung.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.61 min; MS (ESIpos): m/z = 763 $[M+H]^+$.

Intermediat L26

L-Valyl-N6-(tert-butoxycarbonyl)-L-lysin



600.0 mg (1.58 mmol) N2-[(Benzyloxy)carbonyl]-N6-(tert-butoxycarbonyl)-L-lysin wurden in 25.0 mL Wasser/Ethanol/THF (1:1:0.5) suspendiert und mit Palladium auf Kohle (10%ig) versetzt und bei RT mit Wasserstoff unter Normaldruck 5 h hydriert. Der Katalysator wurde abfiltriert und die Lösemittel im Vakuum verdampft. Die erhaltene Verbindung wurde ohne weitere Reinigung in der nächsten Stufe eingesetzt.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.42 min; MS (ESIpos): m/z = 247 $[M+H]^+$.

180 mg (0.73 mmol) N6-(tert-Butoxycarbonyl)-L-lysin wurden in 5.0 mL DMF gelöst und mit 74.0 mg (0.73 mmol) Triethylamin versetzt. Dann wurden 254.6 mg (0.73 mmol) 2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl-N-[(benzyloxy)carbonyl]-L-valinat und 74.0 mg (0.73 mmol) Triethylamin zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde 3.5 h bei RT gerührt. Die Reaktionslösung wurde direkt über die präp. RP-HPLC gereinigt (Säule: Reprosil 250x30; 10µ, Fluss: 50 mL/min, MeCN/Wasser, 0.1 % TFA). Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 294.1 mg (76 % d. Th.) N-[(Benzyloxy)carbonyl]-L-valyl-N6-(tert-butoxycarbonyl)-L-lysin.

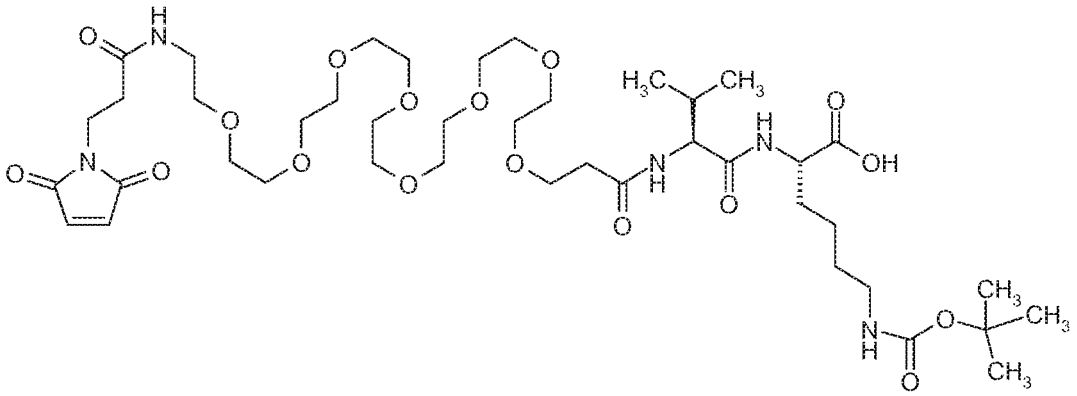
LC-MS (Methode 1): R_t = 0.97 min; MS (ESIpos): m/z = 480 $[M+H]^+$.

272.2 mg (0.57 mmol) N-[(Benzyloxy)carbonyl]-L-valyl-N6-(tert-butoxycarbonyl)-L-lysin wurden in 20.0 mL Ethylacetat/Ethanol/THF (1:1:1) vorgelegt und mit 27.2 mg Palladium auf Aktivkohle versetzt. Man hydrierte mit Wasserstoff bei RT unter Normaldruck 5 h. Es wurde mit Hilfe von Celite(R) abfiltriert und der Filterkuchen mit Ethylacetat/Ethanol/THF (1:1:1) nachgewaschen. Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Die Titelverbindung (182 mg, 72 % d. Th.) wurde in der nächsten Reaktionsstufe ohne weitere Reinigung eingesetzt.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.53 min; MS (ESIpos): m/z = 346 $[M+H]^+$.

Intermediat L27

N-[31-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-29-oxo-4,7,10,13,16,19,22,25-octaoxa-28-azahentriacontan-1-oyl]-L-valyl-N6-(tert-butoxycarbonyl)-L-lysin

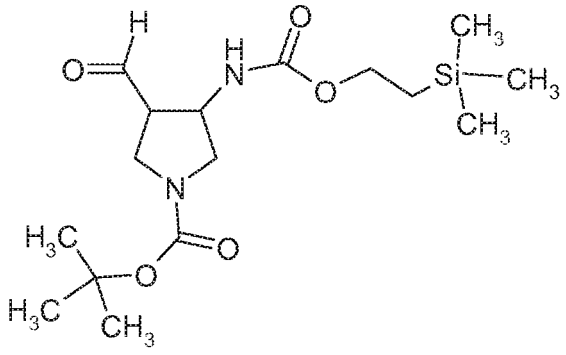


30 mg (0.07 mmol) L-Valyl-N6-(tert-butoxycarbonyl)-L-lysin (Intermediat L26) und 46.1 mg (0.07 mmol) 3-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-N-{27-[(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)oxy]-27-oxo-3,6,9,12,15,18,21,24-octaoxaheptacos-1-yl}propanamid wurden in 1.5 mL DMF vorgelegt und mit 6.8 mg (0.07 mmol) 4-Methylmorpholin versetzt. Die Reaktionslösung rührte bei RT über Nacht. Die Reaktionsmischung wurde direkt über die präp. RP-HPLC gereinigt (Säule: Reprosil 250x30; 10µ, Fluss: 50 mL/min, MeCN/Wasser). Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 55.6 mg (90 % d. Th.) der Titelverbindung.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.77 min; MS (ESIpos): m/z = 920 $[M+H]^+$.

Intermediat L28

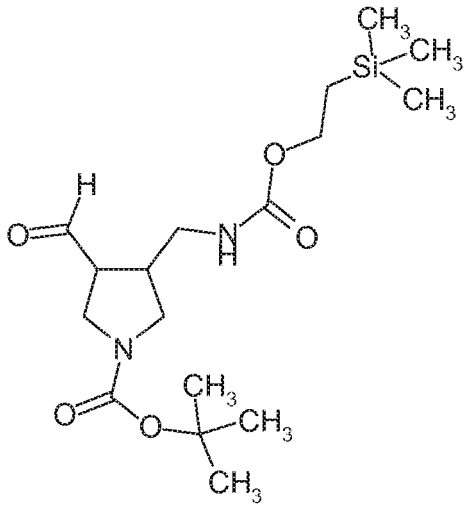
tert-Butyl-3-formyl-4-({[2-(trimethylsilyl)ethoxy]carbonyl}amino)pyrrolidin-1-carboxylat



461.7 mg (1.15 mmol) 1-tert-Butyl-3-ethyl-4-({[2-(trimethylsilyl)ethoxy]carbonyl}amino)pyrrolidin-1,3-dicarboxylat (Diese Verbindung wurde gemäß Literaturvorschrift WO 2006/066896 hergestellt) wurden in 5.0 mL absol. Dichlormethan vorgelegt und auf -78 °C abgekühlt. Dann wurde langsam 326.2 mg (2.29 mmol) Diisobutylaluminiumhydrid-Lösung (1 M in THF) zugetropft und 2 h bei -78 °C gerührt (Dünnschichtchromatographische Kontrolle (Petrolether/Ethylacetat = 3:1). Es wurden 1.3 g (4.59 mmol) Kaliumnatriumtartrat gelöst in 60 mL Wasser zugetropft und die Reaktionsmischung auf RT kommen gelassen. Die Reaktionsmischung wurde mit Ethylacetat versetzt und die wässrige Phase dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden einmal mit ges. NaCl-Lösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösemittel wurde im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 629.0 mg der Titelverbindung als Rohprodukt, welches ohne weitere Reinigung sofort in der nächsten Reaktionsstufe eingesetzt wurde.

Intermediat L29

tert-Butyl-3-formyl-4-[({[2-(trimethylsilyl)ethoxy]carbonyl}amino)methyl]pyrrolidin-1-carboxylat Mischung aus Diastereomeren.



807.1 mg (2.34 mmol) tert-Butyl-3-({[tert-butyl(dimethyl)silyl]oxy}methyl)-4-(hydroxymethyl)pyrrolidin-1-carboxylat (Die Herstellung erfolgte gemäß der Literaturvorschrift WO 2006/100036) wurden in 8.0 mL Dichlormethan vorgelegt und 236.4 mg (2.34 mmol) Triethylamin zugegeben. Bei 0 °C wurden 267.6 mg (2.34 mmol) Methansulfonsäurechlorid zugetropft und die Reaktionsmischung über Nacht bei RT gerührt. Es erfolgte eine weitere Zugabe von 133.8 mg (1.17 mmol) Methansulfonsäurechlorid und 118.2 mg (1.17 mmol) Triethylamin. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei RT gerührt. Es wurde mit Dichlormethan verdünnt und die organische Phase je

einmal mit ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung, 5%iger Kaliumhydrogensulfat-Lösung und ges. NaCl-Lösung gewaschen. Nach der Trocknung über Magnesiumsulfat wurde das Lösemittel im Vakuum verdampft und der Rückstand wurde mittels Biotage Isolera gereinigt (Kieselgel, Säule 50 g SNAP, Fluss 66 mL/min, Cyclohexan/Ethylacetat). Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 402.0 mg (41 % d. Th.) der Verbindung tert-Butyl-3-({[tert-butyl(dimethyl)silyl]oxy}methyl)-4-{[(methylsulfonyl)oxy]methyl}pyrrolidin-1-carboxylat

LC-MS (Methode 1): R_t = 1.38 min; MS (ESIpos): m/z = 424 $[M+H]^+$.

400.0 mg (0.94 mmol) tert-Butyl-3-({[tert-butyl(dimethyl)silyl]oxy}methyl)-4-{[(methylsulfonyl)oxy]methyl}pyrrolidin-1-carboxylat wurden in 5.0 mL DMF vorgelegt und mit 98.2 mg (1.51 mmol) Natriumazid versetzt. Die Reaktionsmischung wurde 10 h bei 40 °C gerührt. Dann wurden nochmals 30.7 mg (0.47 mmol) Natriumazid zugegeben und weitere 10 h bei 40 °C gerührt. Es wurde Ethylacetat zugegeben und die organsiche Phase mehrmals mit Wasser gewaschen. Nach der Trocknung der organischen Phase über Magnesiumsulfat wurde das Lösemittel im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 309.5 mg (89 % d. Th.) der Verbindung tert-Butyl-3-(azidomethyl)-4-({[tert-butyl(dimethyl)silyl]oxy}methyl)pyrrolidin-1-carboxylat. Die Verbindung wurde ohne weitere Reinigung in der nächsten Synthesestufe eingesetzt.

LC-MS (Methode 1): R_t = 1.50 min; MS (ESIpos): m/z = 371 $[M+H]^+$.

250 mg (0.68 mmol) tert-Butyl-3-(azidomethyl)-4-({[tert-butyl(dimethyl)silyl]oxy}methyl)pyrrolidin-1-carboxylat wurden in 10.0 mL Ethylacetat/Ethanol (1:1) gelöst und mit 25.0 mg Palladium auf Aktivkohle (10%) versetzt. Man hydrierte mit Wasserstoff bei RT unter Normaldruck 8 h. Die Reaktion wurde über Celite® filtiert und der Filterkuchen intensiv mit Ethylacetat gewaschen. Das Lösemittel wurde im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 226.2 mg (82 % d. Th.) der Verbindung tert-Butyl-3-(aminomethyl)-4-({[tert-butyl(dimethyl)silyl]oxy}methyl)pyrrolidin-1-carboxylat. Die Verbindung wurde ohne weitere Reinigung in der nächsten Synthesestufe eingesetzt.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.89 min; MS (ESIpos): m/z = 345 $[M+H]^+$.

715.0 mg (2.08 mmol) tert-Butyl-3-(aminomethyl)-4-({[tert-butyl(dimethyl)silyl]oxy}methyl)pyrrolidin-1-carboxylat wurden in 15.0 mL THF gelöst und mit 2.28 mL (2.28 mmol) TBAF-Lösung (1M in THF) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde bei RT über Nacht gerührt. Das Lösemittel wurde im Vakuum verdampft und der Rückstand (1.54 g) ohne weitere Reinigung in der nächsten Synthesestufe eingesetzt.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.41 min; MS (ESIpos): m/z = 231 $[M+H]^+$.

1.54 g (4.88 mmol) tert-Butyl-3-(aminomethyl)-4-(hydroxymethyl)pyrrolidin-1-carboxylat wurden in 1,4-Dioxan vorgelegt mit 541.8 mg (4.88 mmol) Calciumchlorid (wasserfrei) und 488.6 mg (4.88 mmol) Calciumcarbonat versetzt und kräftig gerührt. Dann wurden 592.8 mg (5.86 mmol) Triethylamin und 1.52 g (5.86 mmol) 1-({[2-(Trimethylsilyl)ethoxy]carbonyl}oxy)pyrrolidin-2,5-dion zugegeben und die Reaktionsmischung über Nacht bei RT gerührt. Es wurden 644.9 mg (10.7 mmol) HOAc und Ethylacetat zugegeben. Die organische Phase wurde zweimal mit Wasser und einmal mit ges. NaCl-Lösung gewaschen. Nach der Trocknung über Magnesiumsulfat wurde das Lsöemittel im Vakuum verdampft und der Rückstand mittels Kieselgel (Laufmittel: Dichlormethan/Methanol = 100:1) gereinigt. Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 346.9 mg (19 % d. Th.) der Verbindung tert-Butyl-3-(hydroxymethyl)-4-[({[2-(trimethylsilyl)ethoxy]carbonyl}amino)methyl]pyrrolidin-1-carboxylat.

LC-MS (Methode 1): R_t = 1.08 min; MS (ESIpos): m/z = 375 $[M+H]^+$.

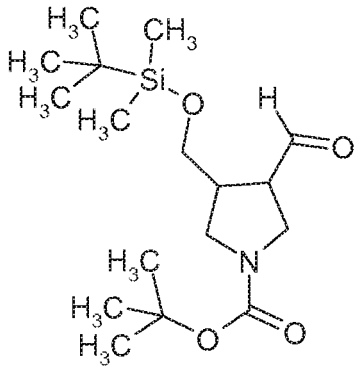
804.0 mg (2.15 mmol) tert-Butyl-3-(hydroxymethyl)-4-[({[2-(trimethylsilyl)ethoxy]carbonyl}amino)methyl]pyrrolidin-1-carboxylat wurden in 20.0 mL Chloroform und 20.0 mL 0.05 N Kaliumcarbonat/0.05 N Natriumhydrogencarbonat-Lösung (1:1) vorgelegt. Dann wurden 59.7 mg (0.22 mmol) Tetra-n-butylammoniumchlorid, 429.9 mg (3.22 mmol) N-Chlorsuccinimid und 33.5 mg (0.22 mmol) TEMPO zugegeben und die Reaktionsmischung kräftig über Nacht bei RT gerührt. Die organische Phase wurde abgetrennt und im Vakuum vom Lösemittel befreit. Der Rückstand wurde mittels Kieselgel (Lausfmittel: Cyclohexan/Ethylacetat = 3:1) gereinigt. Man erhielt 517.0 mg (46 % d. Th.) der Titelverbindung.

LC-MS (Methode 1): R_t = 1.13 min; MS (ESIpos): m/z = 373 $[M+H]^+$.

Intermediat L30

tert-Butyl-3-({[tert-butyl(dimethyl)silyl]oxy}methyl)-4-formylpyrrolidin-1-carboxylat

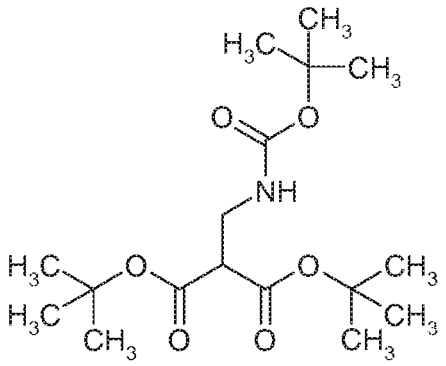
Mischung aus Stereoisomeren



250.0 mg (0.72 mmol) tert-Butyl-3-({[tert-butyl(dimethyl)silyl]oxy}methyl)-4-(hydroxymethyl)pyrrolidin-1-carboxylat (Die Verbindung wurde gemäß der Literaturvorschrift WO2006/100036 hergestellt.) wurde in 12.5 mL Dichlormethan/DMSO (4:1) vorgelegt und mit 219.6 mg (2.17 mmol) Triethylamin versetzt. Bei 2 °C wurde 345.5 mg (2.17 mmol) Schwefeltrioxid-Pyridin-Komplex portionsweise zugegeben und 3 h bei 2 °C gerührt. Es wurden nochmals 345.5 mg (2.17 mmol) Schwefeltrioxid-Pyridin-Komplex portionsweise zugegeben und 17 h bei RT gerührt. Die Reaktionsmischung wurde zwischen Dichlormethan und Wasser verteilt. Die wässrige Phase wurde dreimal mit Dichlormethan extrahiert und die vereinigten organischen Phasen einmal mit Wasser gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösemittel wurde im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Die Rückstand wurde ohne weitere Reinigung in der nächsten Synthesestufe eingesetzt (Dünnschichtchromatographie: Petrolether/Ethylacetat 7:3).

Intermediat L31

Di-tert-butyl-{[(tert-butoxycarbonyl)amino]methyl}malonat



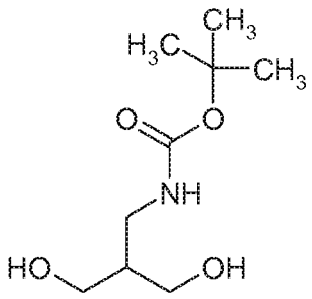
Zu 600 mL Wasser wurden 57.2 g (488.27 mmol) tert-Butylcarbamat, 51.2 mL (683.57 mmol) einer 37%-igen Lösung von Formaldehyd in Wasser und 25.9 g (244.13 mmol) Natriumcarbonat addiert. Das Gemisch wurde erwärmt, bis eine Lösung entstand und dann bei RT für 16 h gerührt. Die entstandene Suspension wurde mit 500 mL Dichlormethan extrahiert, die organische Phase abgetrennt, mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Es wurde am Rotationsverdampfer eingeengt und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet, wobei ein kristalliner Feststoff anfällt. Der Rückstand wurde in 1000 mL absoluten THF aufgenommen und bei RT ein Gemisch aus 322 mL (3.414 mol) Essigsäureanhydrid und 138 mL (1.707 mol) Pyridin zugetropft. Die Reaktionsmischung wurde bei RT für 16 h gerührt und anschließend am Rotationsverdampfer eingenegt, wobei das Wasserbad Raumtemperatur hatte. Der Rückstand wurde in Diethylether aufgenommen und drei mal mit einer gesättigten Natriumhydrogencarbonat-Lösung sowie ein mal mit einer gesättigten Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet, am

Rotationsverdampfer eingeengt und der Rückstand 2 d im Hochvakuum getrocknet. Der Rückstand wurde in 2000 mL absolutem THF aufgenommen und unter Eiskühlung mit 456 mL (456.52 mmol) einer 1 M Lösung von Kalium-tert-butanolat in THF versetzt. Es wurde 20 Min. bei 0°C gerührt und anschließend 100.8 g (456.52 mmol) Di-tert-butylmalonat gelöst in 200 mL absolutem THF zugetropft. Es wurde 48 h bei RT gerührt und anschließend Wasser addiert. Das Reaktionsgemisch wurde am Rotationsverdampfer eingeengt und in 500 mL Essigsäureethylester aufgenommen. Das Gemisch wurde mit 500 mL Wasser und 100 mL einer gesättigten Natriumchlorid-Lösung gewaschen und die organische Phase über Natriumsulfat getrocknet. Die organische Phase wurde am Rotationsverdampfer eingeengt und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Der Rückstand wurde mittels Filtration über Kieselgel (Eluent: Cyclohexan/Essigsäureethylester, Gradient = 30:1 → 5:1) gereinigt. Es wurden 37.07 g (22% d. Th.) der Zielverbindung erhalten.

LC-MS (Methode 6): R_t = 2.87 min; MS (ESIpos): m/z = 346 $[M+H]^+$.

Intermediat L32

tert-Butyl-[3-hydroxy-2-(hydroxymethyl)propyl]carbamat

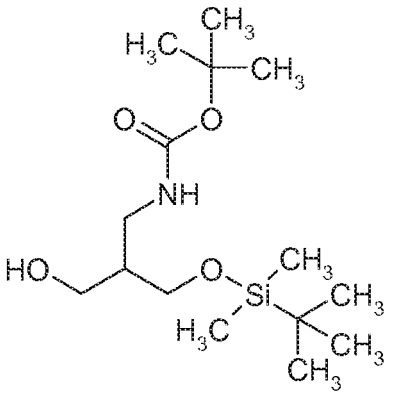


37.0 g (107.11 mmol) Di-tert-butyl-(acetoxymethyl)malonat wurden in 1000 mL absolutem THF gelöst und unter Eiskühlung mit 535.5 mL (1071.10 mmol) einer 2 M Lösung von Lithiumborhydrid in THF tropfenweise versetzt. Es wurden 19.3 mL (1071.10 mmol) Wasser zugetropft und 4.5 h bei RT gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde am Rotationsverdampfer eingeengt und im Hochvakuum getrocknet. Der Rückstand wurde in 1500 mL Essigsäureethylester aufgenommen und mit 100 mL Wasser versetzt und 30 Min. unter Wasserkühlung gerührt (leicht exotherm). Die organische Phase wurde abgetrennt und die wässrige Phase zwei mal mit 500 mL Essigsäureethylester extrahiert. Die organische Phase wurde am Rotationsverdampfer eingeengt und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Es wurden 20.7 g (94% d. Th.) der Zeilverbindung erhalten.

LC-MS (Methode 6): R_t = 1.49 min; MS (EIpos): m/z = 106 $[M-C_5H_8O_2]^+$.

Intermediat L33

tert-Butyl-[3-{[tert-butyl(dimethyl)silyl]oxy}-2-(hydroxymethyl)propyl]carbamat

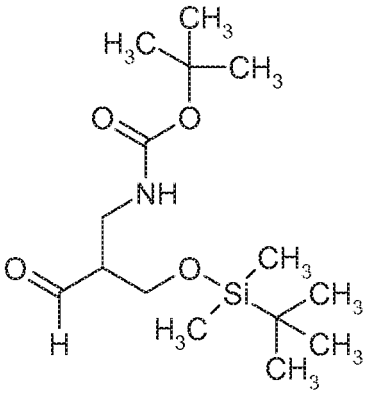


20.00 g (97.44 mmol) tert-Butyl-[3-hydroxy-2-(hydroxymethyl)propyl]carbamat wurden in 1000 mL absolutem Dichlormethan gelöst und bei RT mit 6.63 g (97.44 mmol) Imidazol sowie 16.16 g (107.18 mmol) tert-Butyl(chlor)dimethylsilan versetzt. Es wurde 16 h bei RT gerührt und das Reaktionsgemisch mit halbkonzentrierter Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Die wässrige Phase wurde mit Essigsäureethylester extrahiert und die vereinigten oranischen Phasen über Natriumsulfat getrocknet, am Rotationsverdampfer eingeengt und im Hochvakuum getrocknet. Es wurden 28.50 g (92% d. Th.) der Zielverbindung erhalten.

^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6): δ [ppm] = 0.02 (s, 6H), 0.86 (s, 9H), 1.37 (s, 9H), 1.58-1.73 (m, 1H), 2.91 (q, 2H), 3.33-3.36 [m, (2H, verdeckt)], 3.53-3.58 (m, 2H), 6.65-6.72 (m, 1H).

Intermediat L34

tert-Butyl-(3-{[tert-butyl(dimethyl)silyl]oxy}-2-formylpropyl)carbamat

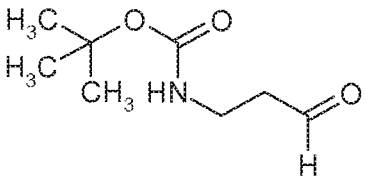


12.65 g (39.591 mmol) tert-Butyl-[3-{[tert-butyl(dimethyl)silyl]oxy}-2-(hydroxymethyl)propyl]carbamat wurden in 200 mL Dichlormethan gelöst und bei RT mit und mit 19.31 g (45.53 mmol) Dess-Martin-Periodinan gelöst in 150 mL Dichlormethan tropfenweise versetzt. Das Gemisch wurde 2 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend mit 250 mL einer halbkonzentrierten Natriumhydrogencarbonat-Lösung sowie mit 250 mL einer 10%-igen Natriumthiosulfat-Lösung versetzt, und für 20 Min. gerührt. Die organische Phase wurde abgetrennt und die wässrige Phase mit Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit 300 mL Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet, am Rotationsverdampfer eingeengt und im Hochvakuum getrocknet. Es wurden 11.35 g (90% d. Th.) der Zielverbindung erhalten.

^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6): δ [ppm] = 0.02 (s, 6H), 0.84(s, 9H), 1.36 (s, 9H), 1.48-1.51 (m, 1H), 3.08-3.32 [m, (1H, verdeckt)], 3.50-3.58 (m, 2H), 3.81-3.91 (m, 1H), 6.71 (t, 1H), 9.60 (d, 1H).

Intermediat L35

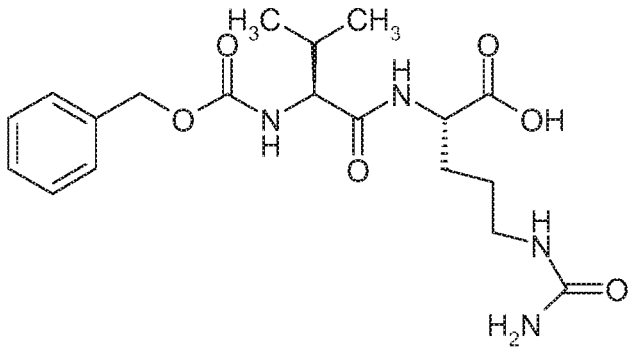
tert-Butyl-(3-oxopropyl)carbamat



Die Titelverbindung wurde nach literaturbekannten Verfahren hergestellt (z.B. Jean Bastide et al. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*(16), 3536-3545).

Intermediat L36

N-[(Benzyloxy)carbonyl]-L-valyl-N5-carbamoyl-L-ornithin

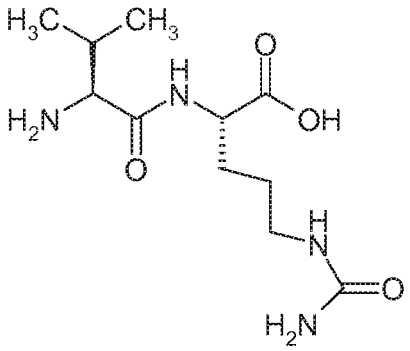


100 mg (0.57 mmol) N5-Carbamoyl-L-ornithin wurden in 4.0 mL DMF aufgenommen und mit 0.08 mL (0.57 mmol) Triethylamin versetzt. Dann wurden 199.0 mg (0.57 mmol) 2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl-N-[(benzyloxy)carbonyl]-L-valin und 0.08 mL (0.57 mmol) Triethylamin zugesetzt. Es wurde 48 h bei RT gerührt. Die Reaktionsmischung wurde direkt über die präp. RP-HPLC gereinigt (Säule: Reprosil 250x30; 10µ, Fluss: 50 mL/min, MeCN/Wasser mit 0.1 % TFA). Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 75.7 mg (33 % d. Th.) der Titelverbindung.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.69 min; MS (ESIpos): m/z = 409 $[M+H]^+$.

Intermediat L37

L-Valyl-N5-carbamoyl-L-ornithin

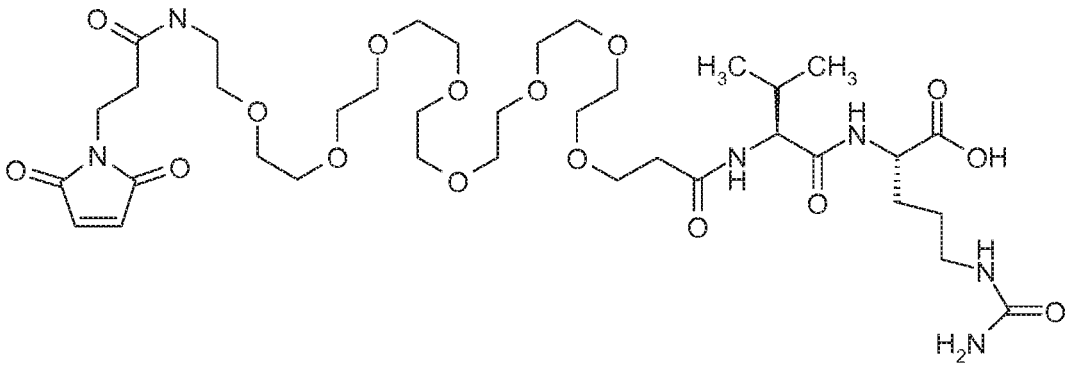


75.7 mg (0.19 mmol) von Intermediat L36 wurden in 25 mL Wasser/Ethanol/THF suspendiert und mit 7.5 mg Palladium auf Aktivkohle (10%ig) versetzt und bei RT 4.5 h lang mit Wasserstoff unter Normaldruck hydriert. Der Katalysator wurde abfiltriert und die Reaktionsmischung im Vakuum vom Lösemittel befreit und im Hochvakuum getrocknet. Der Rückstand wurde ohne weitere Reinigung in der nächsten Stufe eingesetzt. Man erhielt 64.9 mg (93 % d. Th.) der Titelverbindung.

LC-MS (Methode 6): R_t = 0.25 min; MS (ESIpos): m/z = 275 $[M+H]^+$.

Intermediat L38

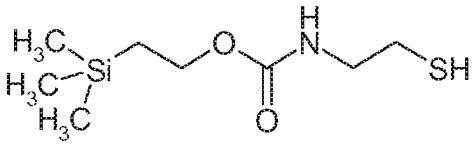
N-[31-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-29-oxo-4,7,10,13,16,19,22,25-octaoxa-28-azahentriacontan-1-oyl]-L-valyl-N5-carbamoyl-L-ornithin



38.3 mg (0.14 mmol) von Intermediat L37 wurden in 3.0 mL DMF vorgelegt und mit 96.4 mg (0.14 mmol) 3-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-N-{27-[(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)oxy]-27-oxo-3,6,9,12,15,18,21,24-octaoxaheptacos-1-yl}propanamid und mit 39.0 µL (0.28 mmol) Triethylamin versetzt. Es wurde über Nacht bei RT gerührt. Die Reaktionsmischung wurde anschließend mit 16.0 µL (0.28 mmol) HOAc versetzt und direkt über die präp. RP-HPLC gereinigt (Säule: Reprosil 250x30; 10µ, Fluss: 50 mL/min, MeCN/Wasser). Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 58.9 mg (45 % d. Th.) der Titelverbindung.
LC-MS (Methode 1): R_t = 0.61 min; MS (ESIpos): m/z = 849 $[M+H]^+$.

Intermediat L39

2-(Trimethylsilyl)ethyl-(2-sulfanylethyl)carbamat

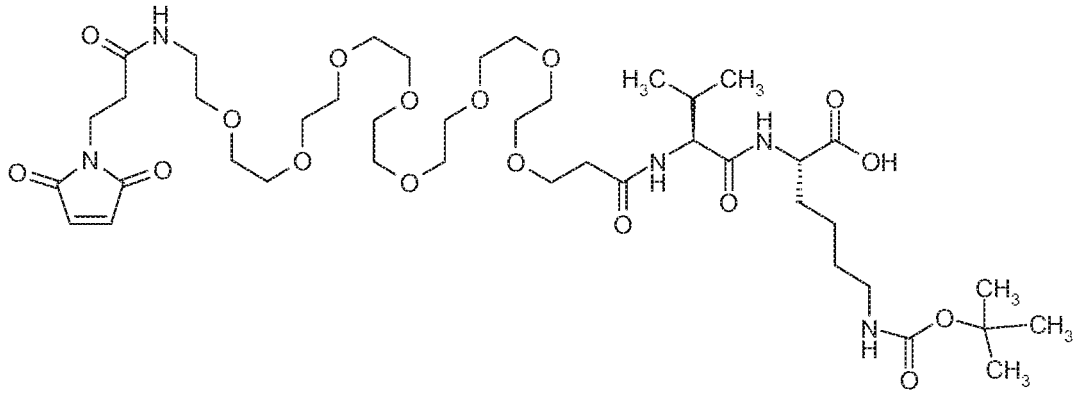


300 mg (2.64 mmol) 2-Aminoethanthiolhydrochlorid (1:1) wurden in 3.0 mL Dichlormethan vorgelegt und mit 668.0 mg (6.60 mmol)Triethylamin mit 719.1 mg (2.77 mmol) 1-({[2-(Trimethylsilyl)ethoxy]carbonyl}oxy)pyrrolidin-2,5-dion versetzt. Es wurde 2 Tage bei RT gerührt. (Dünnschichtchromatographische Kontrolle: Dichlormethan/Methanol = 100:1,5) Die Reaktionsmischung wurde mit Ethylacetat versetzt und dreimal mit Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde zweimal mit ges. NaCl-Lösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das

Lösemittel wurde im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Einsatz der Verbindung ohne weitere Reinigung in der nächsten Synthesestufe.

Intermediat L40

N-[31-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-29-oxo-4,7,10,13,16,19,22,25-octaoxa-28-azahentriacontan-1-oyl]-L-valyl-N6-(tert-butoxycarbonyl)-L-lysin



600 mg (1.58 mmol) N2-[(Benzyloxy)carbonyl]-N6-(tert-butoxycarbonyl)-L-lysin wurden in 25.0 mL Wasser/Ethanol/THF (1:1:0.5) mittels Palladium auf Kohle (10 %) bei RT unter Normaldruck mit Wasserstoff hydriert. Die Verbindung N6-(tert-Butoxycarbonyl)-L-lysin wird ohne weitere Reinigung in der nächsten Synthesestufe eingesetzt.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.99 min; MS (ESIpos): m/z = 247 $[M+H]^+$.

180.0 (0.73 mmol) N6-(tert-Butoxycarbonyl)-L-lysin wurden in 5.0 mL DMF gelöst und mit 74.0 mg (0.73 mmol) Triethylamin versetzt. Es wurden 254.6 mg (0.73 mmol) 2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl-N-[(benzyloxy)carbonyl]-L-valinat und 74.0 mg (0.73 mmol) Triethylamin zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde 3.5 h bei RT gerührt. Die Reaktionsmischung wurde direkt mittles präp. RP-HPLC gereinigt (Säule: Reprosil 250x30; 10µ, Fluss: 50 mL/min, MeCN/Wasser, 0.1 % TFA). Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 294.1 mg (76 % d. Th.) der Verbindung N-[(Benzyloxy)carbonyl]-L-valyl-N6-(tert-butoxycarbonyl)-L-lysin.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.97 min; MS (ESIpos): m/z = 480 $[M+H]^+$.

272.2 mg (0.57 mmol) N-[(Benzyloxy)carbonyl]-L-valyl-N6-(tert-butoxycarbonyl)-L-lysin wurden in 20 mL Ethylacetat/Ethanol/THF (1:1:1) gelöst und mit 27.2 mg Palladium auf Aktivkohle versetzt und unter Normaldruck und bei RT mit Wasserstoff hydriert. Es wurde über Celite(R) filtriert und der Filterkuchen intensiv mit Ethylacetat/Ethanol/THF (1:1:1) gewaschen. Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 182.0 mg (72 % d. Th.) der Verbindung L-Valyl-N6-(tert-butoxycarbonyl)-L-lysin.

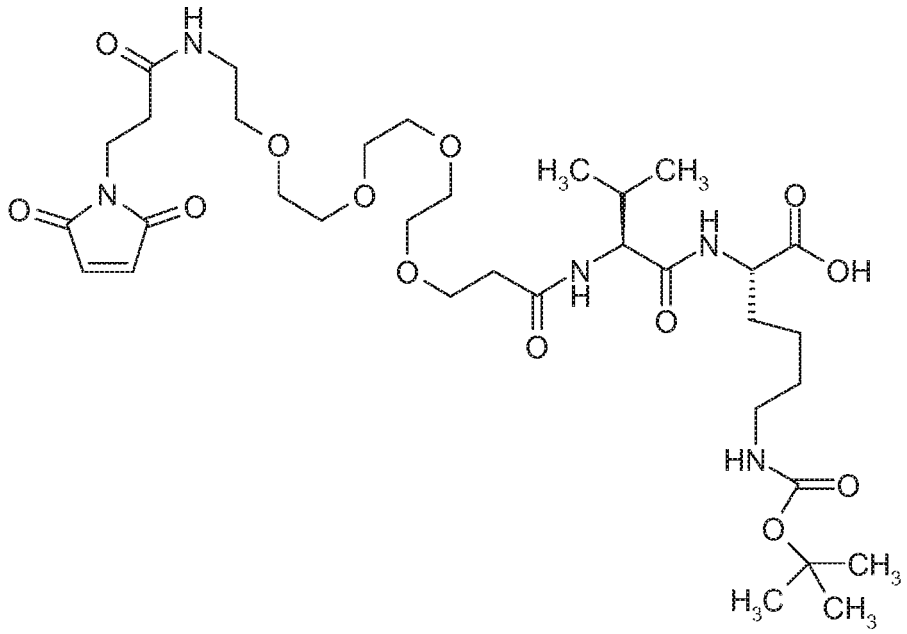
LC-MS (Methode 1): R_t = 0.53 min; MS (ESIpos): m/z = 346 $[M+H]^+$.

30.0 mg (0.07 mmol) L-Valyl-N6-(tert-butoxycarbonyl)-L-lysin und 46.1 mg (0.07 mmol) 3-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-N-{27-[(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)oxy]-27-oxo-3,6,9,12,15,18,21,24-octaoxaheptacos-1-yl}propanamid wurden in 1.5 mL DMF gelöst und mit 6.8 mg (0.07 mmol) 4-Methylmorpholin versetzt. Dir Reaktionsmischung wurde über Nacht bei RT gerührt. Die Reaktionsmischung wurde direkt mittles präp. RP-HPLC gereinigt (Säule: Reprosil 250x30; 10µ, Fluss: 50 mL/min, MeCN/Wasser). Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 55.6 mg (90 % d. Th.) der Titelverbindung.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.77 min; MS (ESIpos): m/z = 920 $[M+H]^+$.

Intermediat L41

N-[19-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-17-oxo-4,7,10,13-tetraoxa-16-azanonadecan-1-oyl]-L-valyl-N6-(tert-butoxycarbonyl)-L-lysin



600 mg (1.58 mmol) N2-[(Benzyloxy)carbonyl]-N6-(tert-butoxycarbonyl)-L-lysin wurden in 25.0 mL Wasser/Ethanol/THF (1:1:0.5) mittels Palladium auf Kohle (10 %) bei RT unter Normaldruck mit Wasserstoff hydriert. Die Verbindung N6-(tert-Butoxycarbonyl)-L-lysin wird ohne weitere Reinigung in der nächsten Synthesestufe eingesetzt.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.99 min; MS (ESIpos): m/z = 247 $[M+H]^+$.

180.0 (0.73 mmol) N6-(tert-Butoxycarbonyl)-L-lysin wurden in 5.0 mL DMF gelöst und mit 74.0 mg (0.73 mmol) Triethylamin versetzt. Es wurden 254.6 mg (0.73 mmol) 2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl-N-[(benzyloxy)carbonyl]-L-valinat und 74.0 mg (0.73 mmol) Triethylamin zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde 3.5 h bei RT gerührt. Die Reaktionsmischung wurde direkt mittles präp. RP-HPLC gereinigt (Säule: Reprosil 250x30; 10µ, Fluss: 50 mL/min, MeCN/Wasser, 0.1 % TFA). Die Lösemittel wurden dann im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 294.1 mg (76 % d. Th.) der Verbindung N-[(Benzyloxy)carbonyl]-L-valyl-N6-(tert-butoxycarbonyl)-L-lysin.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.97 min; MS (ESIpos): m/z = 480 $[M+H]^+$.

272.2 mg (0.57 mmol) N-[(Benzyloxy)carbonyl]-L-valyl-N6-(tert-butoxycarbonyl)-L-lysin wurden in 20.0 mL Ethylacetat/Ethanol/THF (1:1:1) gelöst und mit 27.2 mg Palladium auf Aktivkohle versetzt und unter Normaldruck und bei RT mit Wasserstoff hydriert. Es wurde über Celite(R) filtriert und der Filterkuchen intensiv mit Ethylacetat/Ethanol/THF (1:1:1) gewaschen. Die Lösemittel wurden im

Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 182.0 mg (72 % d. Th.) der Verbindung L-Valyl-N6-(tert-butoxycarbonyl)-L-lysin.

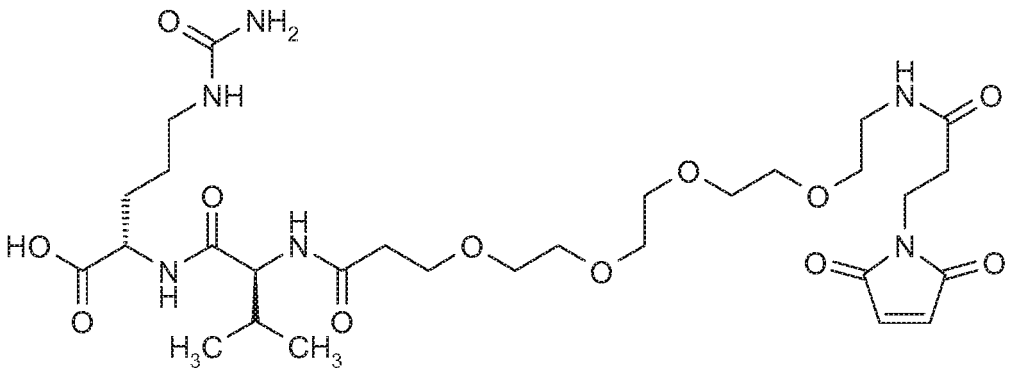
LC-MS (Methode 1): R_t = 0.53 min; MS (ESIpos): m/z = 346 $[M+H]^+$.

30.0 mg (0.07 mmol) L-Valyl-N6-(tert-butoxycarbonyl)-L-lysin und 34.3 mg (0.07 mmol) 3-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-N-{15-[(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)oxy]-15-oxo-3,6,9,12-tetraoxapentadec-1-yl}propanamid wurden in 1.5 mL DMF gelöst und mit 6.8 mg (0.07 mmol) 4-Methylmorpholin versetzt. Dir Reaktionsmischung wurde über Nacht bei RT gerührt. Die Reaktionsmischung wurde direkt mittles präp. RP-HPLC gereinigt (Säule: Reprosil 250x30; 10µ, Fluss: 50 mL/min, MeCN/Wasser). Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 40.6 mg (82 % d. Th.) der Titelverbindung.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.73 min; MS (ESIpos): m/z = 744 $[M+H]^+$.

Intermediat L42

N-[19-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-17-oxo-4,7,10,13-tetraoxa-16-azanonadecan-1-oyl]-L-valyl-N5-carbamoyl-L-ornithin

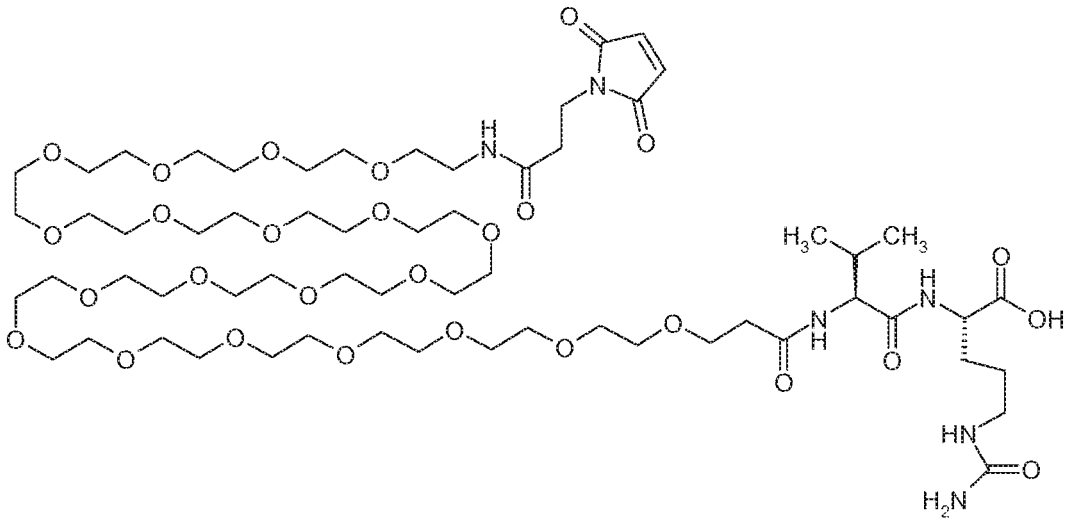


50.0 mg (0.18 mmol) L-Valyl-N5-carbamoyl-L-ornithin (Intermediat L37) wurden in DMF vorgelegt und mit 93.6 mg (0.18 mmol) 3-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-N-{15-[(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)oxy]-15-oxo-3,6,9,12-tetraoxapentadec-1-yl}propanamid und 36.9 mg (0.37 mmol) Triethylamin versetzt. Die Reaktionsmischung rührte bei RT über Nacht. Es wurden 21.9 mg (0.37 mmol) HOAc hinzugefügt und die Reaktionsmischung direkt über die präp. RP-HPLC gereinigt (Säule: Reprosil 250x30; 10µ, Fluss: 50 mL/min, MeCN/Wasser). Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 20.6 mg (14 % d. Th.) der Titelverbindung.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.55 min; MS (ESIpos): m/z = 673 $[M+H]^+$.

Intermediat L43

N-[67-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-65-oxo-4,7,10,13,16,19,22,25,28,31,34,37,40,43,46,49,52,55,58,61-icosaoxa-64-azaheptahexacontan-1-oyl]-L-valyl-N5-carbamoyl-L-ornithin

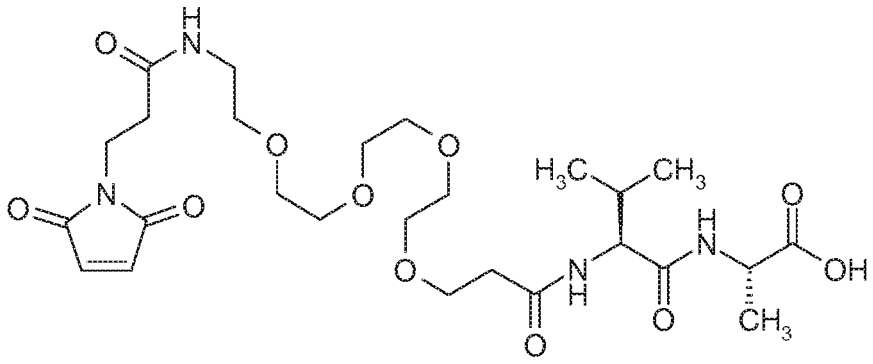


11.3 mg (0.04 mmol) L-Valyl-N5-carbamoyl-L-ornithin (Intermediat L37) wurden in DMF vorgelegt und mit 50.0 mg (0.04 mmol) 3-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-N-{63-[(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)oxy]-63-oxo-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45,48,51,54,57,60-icosaoxatrihexacont-1-yl}propanamid und 8.3 mg (0.08 mmol) Triethylamin versetzt. Die Reaktionsmischung rührte bei RT über Nacht. Es wurden 4.9 mg (0.08 mmol) HOAc hinzugefügt und die Reaktionsmischung direkt über die präp. RP-HPLC gereinigt (Säule: Reprosil 250x30; 10µ, Fluss: 50 mL/min, MeCN/Wasser). Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 15.8 mg (20 % d. Th.) der Titelverbindung.

LC-MS (Methode 4): R_t = 0.94 min; MS (ESIpos): m/z = 1377 $[M+H]^+$.

Intermediat L44

N-[19-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-17-oxo-4,7,10,13-tetraoxa-16-azanonadecan-1-oyl]-L-valyl-L-alanin

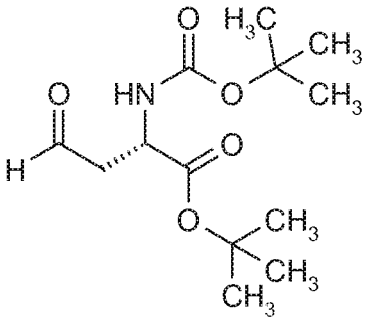


73.3 mg (0.39 mmol) L-Valyl-L-alanin wurden in 7.0 mL DMF gelöst und mit 200.0 mg (0.39 mmol) 3-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-N-{15-[(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)oxy]-15-oxo-3,6,9,12-tetraoxapentadec-1-yl}propanamid und 78.8 mg (0.78 mmol) Triethylamin versetzt. Die Reaktionsmischung wurde bei RT über Nacht gerührt. Die Reaktionsmischung wurde direkt über die präp. RP-HPLC gereinigt (Säule: Reprosil 250x30; 10µ, Fluss: 50 mL/min, MeCN/Wasser). Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 103.3 mg (45 % d. Th.) der Titelverbindung.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.58 min; MS (ESIpos): m/z = 587 $[M+H]^+$.

Intermediat L45

tert-Butyl-(2S)-2-[(tert-butoxycarbonyl)amino]-4-oxobutanoat



2.00 g (7.26 mmol) tert-Butyl-N-(tert-butoxycarbonyl)-L-homoserinat wurden in 90 ml Dichlormethan gelöst und dann mit 1.76 ml Pyridin sowie mit 4.62 g (10.90 mmol) 1,1,1-Triacetoxy-1lambda^5,2-benziodoxol-3(1H)-on (Dess-Martin-Periodinan) versetzt. Der Ansatz wurde 2 h bei RT gerührt, anschließend mit 200 ml Dichlormethan verdünnt und zweimal mit 10%-iger Natriumtiosulfat-Lösung und dann nacheinander zweimal mit 5%-iger Zitronensäure und zweimal mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde abgetrennt, über Natriumsulfat getrocknet und anschließend im Vakuum eingeengt. Der Rückstand wurde mit 100 ml

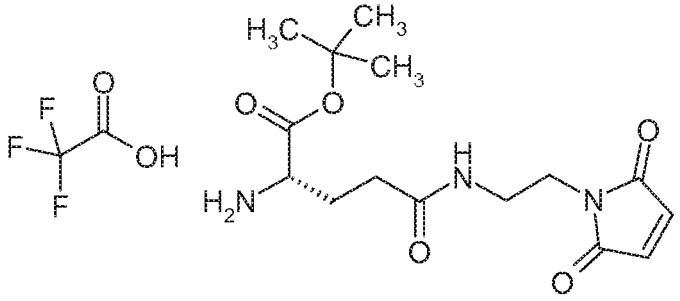
Diethylether und Cyclohecan (v/v=1:1) versetzt, etwas eingeengt, wobei ein weißer Niederschlag ausfiel. Dieser wurde abgesaugt. Das Filtrat wurde am Rotationsverdampfer eingeengt und im Hochvakuum getrocknet, wobei 1.74 g (88% d. Th.) der Zielverbindung als hellgelbes Öl erhalten wurden.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.85 min; MS (ESIpos): m/z = 274 $[M+H]^+$.

^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6): δ [ppm] = 1.38 (s, 18H), 2.64-2.81 (m, 2H), 4.31-4.36 (m, 1H), 7.23 (d, 1H), 9.59 (s, 1H).

Intermediat L46

Trifluoressigsäure--tert-butyl-N-[2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)ethyl]-L-glutaminat(1:1)

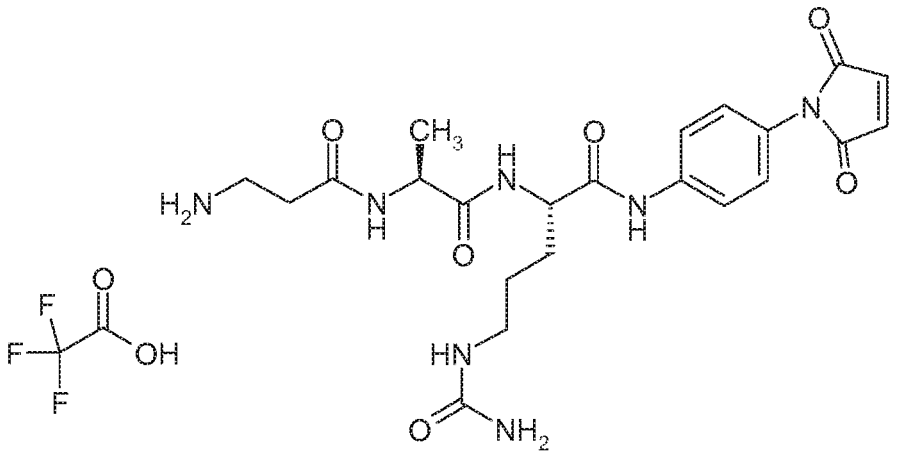


Die Titelverbindung wurde zunächst durch Kupplung von 200 mg (0.79 mmol) Trifluoressigsäure--1-(2-aminoethyl)-1H-pyrrol-2,5-dion(1:1) mit 263 mg (0.87 mmol) (4S)-5-tert-Butoxy-4-[(tert-butoxycarbonyl)amino]-5-oxopentansäure-trifluoressigsäure(1:1) in Gegenwart von EDC/HOBT und *N,N*-Diisopropylethylamin und anschließende Entschützung der Aminogruppe unter schonenden Bedingungen durch 1h Rühren in 10%iger Trifluoressigsäure in DCM bei RT hergestellt. Nach Gefriertrocknung aus Acetonitril/ Wasser wurden 85 mg (20% d.Th.) der Titelverbindung über 2 Stufen erhalten.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.37 min; MS (ESIpos): m/z = 326 $[M+H]^+$.

Intermediat L47

Trifluoressigsäure--beta-alanyl-L-alanyl-N^5-carbamoyl-N-[4-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)phenyl]-L-ornithinamid(1:1)

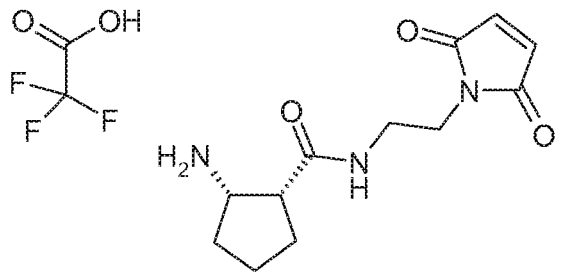


Die Titelverbindung wurde durch Kupplung von Intermediat L8 mit 2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl-N-(tert-butoxycarbonyl)-beta-alaninat und anschließender Entschützung mit TFA hergestellt.

LC-MS (Methode 3): R_t = 1.36 min; MS (ESIpos): m/z = 488 $(M+H)^+$.

Intermediat L48

Trifluoressigsäure--(1R,2S)-2-amino-N-[2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)ethyl]cyclopentancarboxamid(1:1)

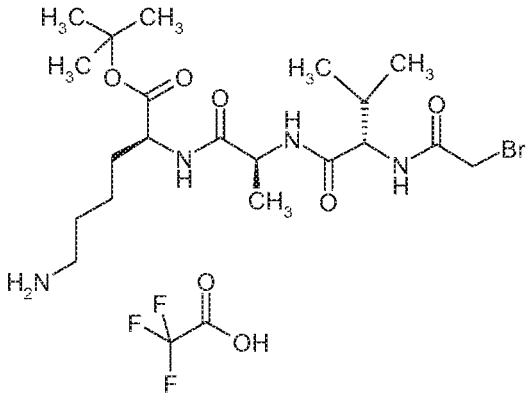


Die Titelverbindung wurde ausgehend von kommerziell erhältlicher (1R, 2S)-2-[(tert-Butoxycarbonyl)amino]cyclopentancarbonsäure in Analogie zu Intermediat L2 hergestellt.

LC-MS (Methode 3): R_t = 1.22 min; MS (ESIpos): m/z = 252 $(M+H)^+$.

Intermediat L49

Trifluoressigsäure--tert-butyl-N-(bromacetyl)-L-valyl-L-alanyl-L-lysinat(1:1)

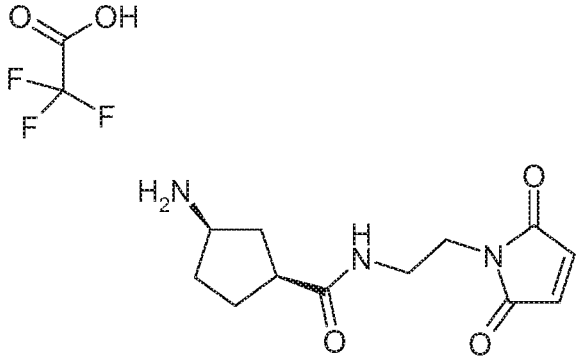


Die Titelverbindung wurde zunächst durch Kupplung von kommerziell erhältlichem Bromessigsäureanhydrid mit dem nach klassischen Methoden der Peptidchemie hergestellten partiell geschützten Peptid tert-Butyl-L-valyl-L-alanyl-N^6-(tert-butoxycarbonyl)-L-lysinat in Gegenwart von *N,N*-Diisopropylethylamin in Dichlormethan hergestellt. Anschließend erfolgte die Entschützung an der Aminogruppe unter schonenden Bedingungen durch Rühren in 10%iger Trifluoressigsäure in DCM bei RT, wobei in 49%-iger Ausbeute über 2 Stufen die Titelverbindung erhalten wurde.

LC-MS (Methode 1): R_t = 1.09 min; MS (ESIpos): m/z = 593 und 595 $(M+H)^+$.

Intermediat L50

Trifluoressigsäure--(1S,3R)-3-amino-N-[2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)ethyl]cyclopentancarboxamid(1:1)



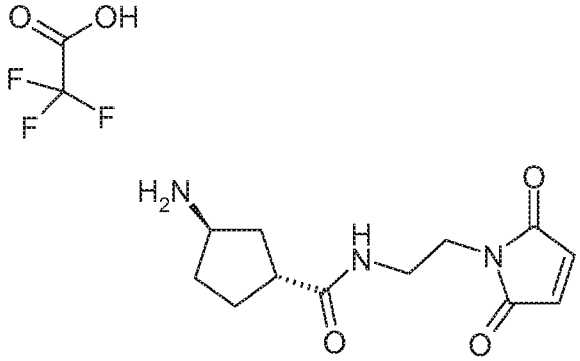
Die Titelverbindung wurde ausgehend von kommerziell erhältlicher (1S,3R)-3-[(tert-Butoxycarbonyl)amino]cyclopentancarbonsäure und ebenso kommerziell erhältlichem Trifluoressigsäure--1-(2-aminoethyl)-1H-pyrrol-2,5-dion(1:1) durch Kupplung mit HATU in Gegenwart von *N,N*-Diisopropylethylamin und anschließender Entschützung mit TFA hergestellt.

HPLC (Methode 11): R_t = 0.2 min;

LC-MS (Methode 3): R_t = 0.88 min; MS (ESIpos): m/z = 252 $(M+H)^+$.

Intermediat L51

Trifluoressigsäure--(1R,3R)-3-amino-N-[2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)ethyl]cyclopentancarboxamid(1:1)

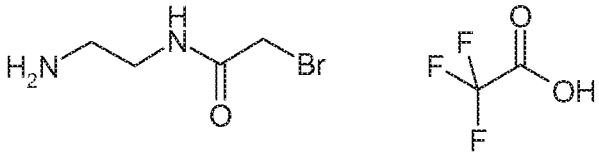


Die Titelverbindung wurde ausgehend von kommerziell erhältlicher (1R,3R)-3-[(tert-Butoxycarbonyl)amino]cyclopentancarbonsäure und ebenso kommerziell erhältlichem Trifluoressigsäure--1-(2-aminoethyl)-1H-pyrrol-2,5-dion(1:1) durch Kupplung mit HATU in Gegenwart von *N,N*-Diisopropylethylamin und anschließender Entschützung mit TFA hergestellt.

LC-MS (Methode 3): R_t = 0.98 min; MS (ESIpos): m/z = 250 $(M-H)^-$.

Intermediat L52

Trifluoressigsäure --N-(2-aminoethyl)-2-bromacetamid (1:1)



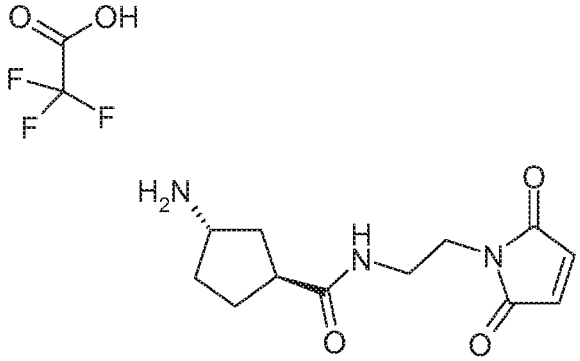
420 mg (2.62 mmol) tert-Butyl-(2-aminoethyl)carbamat wurden in 50 ml Dichlormethan aufgenommen und mit 817 mg (3.15 mmol) Bromessigsäureanhydrid sowie 913 µl (5.24 mmol) *N,N*-Diisopropylethylamin versetzt. Der Ansatz wurde 1 h bei RT gerührt und anschließend im Vakuum eingeengt. Der Rückstand wurde duch präparative HPLC gereinigt.

Es wurden 577 mg der geschützten Zwischenstufe erhalten, die anschließend in 50 ml Dichlormethan aufgenommen und mit 10 ml Trifluoressigsäure versetzt wurde. Nach 1 h Rühren bei RT wurde der Ansatz im Vakuum eingeengt und der Rückstand aus Acentonitril/Wasser lyophilisert. So wurden 705 mg (65% d. Th.) der Titelverbindung erhalten.

LC-MS (Methode 3): R_t = 0.34 min; MS (ESIpos): m/z = 181 und 183 $(M+H)^+$.

Intermediat L53

Trifluoressigsäure--(1S,3S)-3-amino-N-[2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)ethyl]cyclopentancarboxamid(1:1)



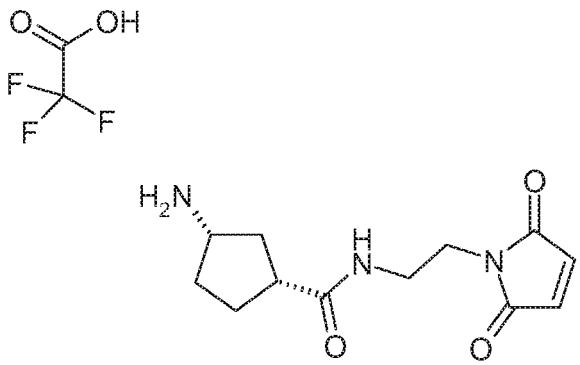
Die Titelverbindung wurde ausgehend von kommerziell erhältlicher (1S,3S)-3-[(tert-Butoxycarbonyl)amino]cyclopentancarbonsäure und ebenso kommerziell erhältlichem Trifluoressigsäure--1-(2-aminoethyl)-1H-pyrrol-2,5-dion(1:1) durch Kupplung mit HATU in Gegenwart von *N,N*-Diisopropylethylamin und anschließender Entschützung mit TFA hergestellt.

HPLC (Methode 11): R_t = 0.19 min;

LC-MS (Methode 3): R_t = 0.88 min; MS (ESIpos): m/z = 250 $(M-H)^-$.

Intermediat L54

Trifluoressigsäure--(1R,3S)-3-amino-N-[2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)ethyl]cyclopentancarboxamid(1:1)

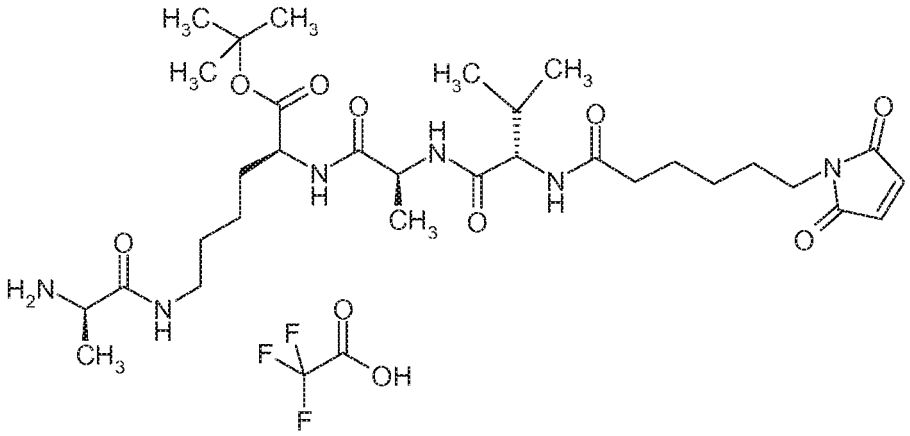


Die Titelverbindung wurde ausgehend von kommerziell erhältlicher (1R,3S)-3-[(tert-Butoxycarbonyl)amino]cyclopentancarbonsäure und ebenso kommerziell erhältlichem Trifluoressigsäure--1-(2-aminoethyl)-1H-pyrrol-2,5-dion(1:1) durch Kupplung mit HATU in Gegenwart von *N,N*-Diisopropylethylamin und anschließender Entschützung mit TFA hergestellt.

LC-MS (Methode 3): R_t = 0.89 min; MS (ESIpos): m/z = 252 $(M+H)^+$.

Intermediat L55

Trifluoressigsäure--tert-butyl-N^6-D-alanyl-N^2-{N-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)hexanoyl]-L-valyl-L-alanyl}-L-lysinat (1:1)



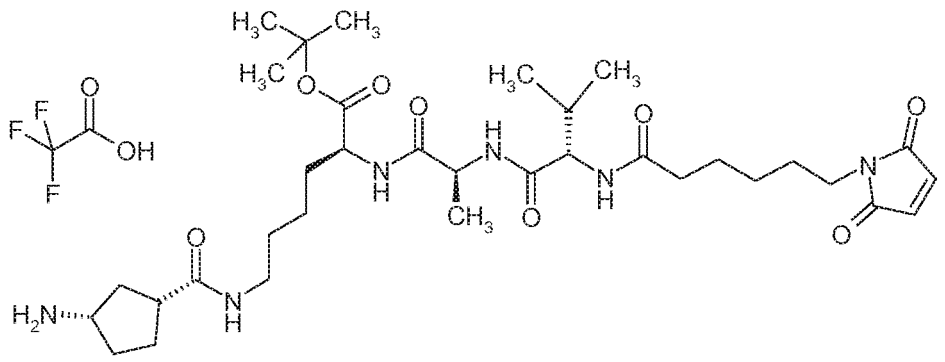
Die Titelverbindung wurde zunächst durch Kupplung von Intermediat L6 mit N-(tert-Butoxycarbonyl)-D-alanin in Gegenwart von HATU und anschließender Entschützung an der Aminogruppe unter schonenden Bedingungen durch 90 minütiges Rühren in 5%iger Trifluoressigsäure in DCM bei RT hergestellt.

HPLC (Methode 11): R_t = 1.35 min;

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.67 min; MS (ESIpos): m/z = 637 $(M+H)^+$.

Intermediat L56

Trifluoressigsäure --tert-butyl-N-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)hexanoyl]-L-valyl-L-alanyl-N^6-{[(1R,3S)-3-aminocyclopentyl]carbonyl}-L-lysinat (1:1)



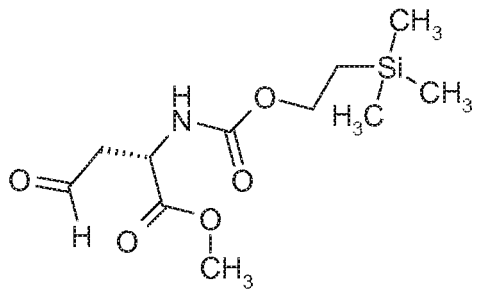
Die Titelverbindung wurde zunächst durch Kupplung von Intermediat L6 mit (1R,3S)-3-[(tert-Butoxycarbonyl)amino]cyclopentancarbonsäure in Gegenwart von HATU und anschließender Entschützung an der Aminogruppe unter schonenden Bedingungen durch 15 minütiges Rühren in 25%-iger Trifluoressigsäure in DCM bei RT hergestellt.

HPLC (Methode 11): R_t = 1.4 min;

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.7 min; MS (ESIpos): m/z = 677 $(M+H)^+$.

Intermediat L57

Methyl-(2S)-4-oxo-2-({[2-(trimethylsilyl)ethoxy]carbonyl}amino)butanoat



500.0 mg (2.72 mmol) L-Asparaginsäuremethylester Hydrochlorid und 706.3 mg (2.72 mmol) 2-(Trimethylsilyl)ethyl-2,5-dioxopyrrolidin-1-carboxylat wurden in 5.0 mL 1,4-Dioxan vorgelegt und mit 826.8 mg (8.17 mmol) Triethylamin versetzt. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei RT gerührt. Die Reaktionsmischung wurde direkt mittles präp. RP-HPLC gereinigt (Säule: Reprosil 250x40; 10µ, Fluss: 50 mL/min, MeCN/Wasser, 0.1 % TFA). Die Lösemittel wurden dann im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 583.9 mg (74 % d. Th.) der Verbindung (3S)-4-Methoxy-4-oxo-3-({[2-(trimethylsilyl)ethoxy]carbonyl}amino) butansäure.
LC-MS (Methode 1): R_t = 0.89 min; MS (ESIneg): m/z = 290 $(M-H)^-$.

592.9 mg (3S)-4-Methoxy-4-oxo-3-({[2-(trimethylsilyl)ethoxy]carbonyl}amino)butansäure wurden in 10.0 mL 1,2-Dimethoxyethan vorgelegt und auf -15 °C abgekühlt und mit 205.8 mg (2.04 mmol) 4-Methylmorpholin und 277.9 mg (2.04 mmol) Isobutylchlorformiat versetzt. Der Niederschlag wird nach 15 min abgesaugt und zweimal mit je 10.0 mL 1,2-Dimethoxyethan gewaschen. Das Filtrat wird auf -10 °C abgekühlt und mit 115.5 mg (3.05 mmol) Natriumborhydrid gelöst in 10 mL Wasser unter starkem Rühren versetzt. Die Phasen werden getrennt und die organische Phase je einmal mit ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und ges. NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösemittel im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 515.9 mg (91 % d. Th.) der Verbindung Methyl-N-{[2-(trimethylsilyl)ethoxy]carbonyl}-L-homoserinat.

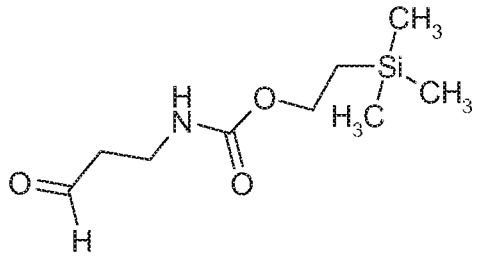
LC-MS (Methode 1): R_t = 0.87 min; MS (ESIpos): m/z = 278 $(M+H)^+$.

554.9 mg (2.00 mmol) Methyl-N-{[2-(trimethylsilyl)ethoxy]carbonyl}-L-homoserinat wurden in 30.0 mL Dichlormethan vorgelegt und mit 1.27 g (3.0 mmol) Dess-Martin periodinan und 474.7 mg (6.00 mmol) Pyridin versetzt. Man rührte über Nacht bei RT. Nach 4 h wurde der Ansatz mit Dichlormethan verdünnt und die organische Phase je dreimal mit 10%iger $Na_2S_2O_3$-Lösung, 10%iger Citronensäure-Lösung und ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösemittel im Vakuum verdampft. Man erhielt 565.7 mg (97 % d. Th.) der Titelverbindung.

^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6): δ [ppm] = 0.03 (s, 9H), 0.91 (m, 2H), 2.70-2.79 (m, 1H), 2.88 (dd, 1H), 3.63 (s, 3H), 4.04 (m, 2H), 4.55 (m, 1H), 7.54 (d, 1H), 9.60 (t, 1H).

Intermediat L58

2-(Trimethylsilyl)ethyl-(3-oxopropyl)carbamat



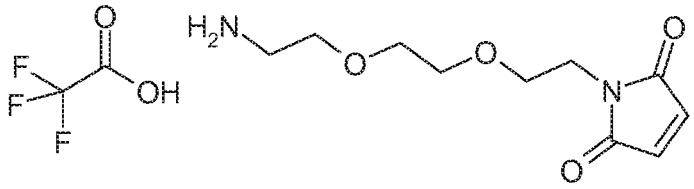
434.4 mg (5.78 mmol) 3-Amino-1-propanol und 1.50 g (5.78 mmol) 2-(Trimethylsilyl)ethyl-2,5-dioxopyrrolidin-1-carboxylat wurden in 10.0 mL Dichlormethan gelöst und mit 585.3 mg (5.78 mmol) Triethylamin versetzt und über Nacht bei RT gerührt. Die Reaktionsmischung wurde mit Dichlormethan verdünnt und die organische Phase mit Wasser und ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen und anschließend über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösemittel wurde im Vakuum verdampft. Der Rückstand 2-(Trimethylsilyl)ethyl-(3-hydroxypropyl)carbamat (996.4 mg, 79 % d. Th.) wurde im Hochvakuum getrocknet und ohne weitere Reinigung in der nächsten Synthesestufe eingesetzt.

807.0 mg (3.68 mmol) 2-(Trimethylsilyl)ethyl-(3-hydroxypropyl)carbamat wurden in 15.0 mL Chloroform und 15.0 mL 0.05 N Kaliumcarbonat/0.05 N Natriumhydrogencarbonat-Lösung (1:1) vorgelegt. Dann wurden 102.2 mg (0.37 mmol) Tetra-n-butylammoniumchlorid, 736.9 mg (5.52 mmol) N-Chlorsuccinimid und 57.5 mg (0.37 mmol) TEMPO zugegeben und die Reaktionsmischung kräftig über Nacht bei RT gerührt. Die Reaktionsmischung wurde mit Dichlormethan verdünnt und die organische Phase wurde mit Wasser und ges. NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösemittel im Vakuum verdampft. Der Rückstand wurde im

Hochvakuum getrocknet und ohne weitere Reinigung in der nächsten Synthesestufe eingesetzt (890.3 mg).

Intermediat L59

Trifluoressigsäure--1-{2-[2-(2-aminoethoxy)ethoxy]ethyl}-1H-pyrrol-2,5-dion(1:1)

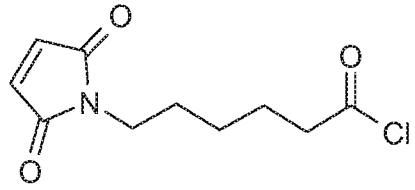


300.0 mg (0.91 mmol) tert-Butyl-(2-{2-[2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)ethoxy]ethoxy}ethyl)carbamat wurden in Dichlormethan vorgelegt und mit 4.2 g (36.54 mmol) TFA versetzt und 1 h bei RT gerührt (DC-Kontrolle: Dichlormethan/Methanol 10:1). Die flüchtigen Bestandteile wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand viermal mit Dichlormethan kodestilliert. Der Rückstand wurde im Hochvakuum getrocknet und ohne weitere Reinigung in der nächsten Synthesestufe eingesetzt.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.19 min; MS (ESIpos): m/z = 229 $(M+H)^+$.

Intermediat L60

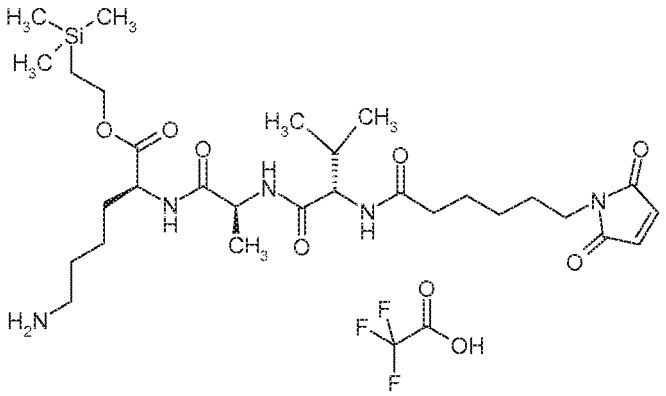
6-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)hexanoylchlorid



200.0 mg (0.95 mmol) 6-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)hexansäure wurden in 4.0 mL Dichlormethan gelöst und mit 338.0 mg (2.84 mmol) Thionylchlorid versetzt. Die Reaktionsmischung wurde 3 h bei RT gerührt und dann mit 1 Tropfen DMF vesetzt. Es wurde nochmal 1 h gerührt. Das Lösemittel wurde im Vakuum verdampft und es wurde dreimal mit Dichlormethan kodestilliert. Das Rohprodukt wurde ohne weitere Reinigung in der nächsten Synthesestufe eingesetzt.

Intermediat L61

Trifluoressigsäure --2-(trimethylsilyl)ethyl-N-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)hexanoyl]-L-valyl-L-alanyl-L-lysinat (1:1)

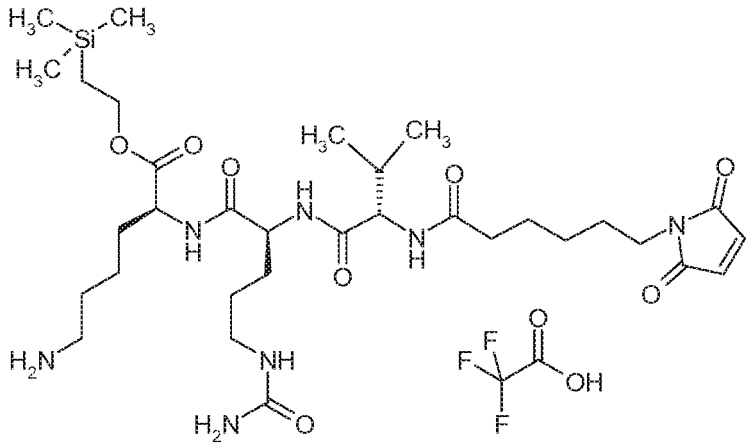


Zunächst wurde ausgehend von N2-[(Benzyloxy)carbonyl]-N6-(tert-butoxycarbonyl)-L-lysin nach klassischen Methoden der Peptidchemie (Veresterung mit 2-(Trimethylsilylethanol mittels EDCI/DMAP, Hydrogenolyse, Kupplung mit N-[(Benzyloxy)carbonyl]-L-valyl-L-alanin in Gegenwart von HATU und erneute Hydrogenolyse) das Tripeptidderivat 2-Trimethylsilyl)ethyl-L-valyl-L-alanyl-N6-(tert-butoxycarbonyl)-L-lysinat hergestellt. Die Titelverbindung wurde durch Kupplung dieses partiell geschützten Peptidderivats mit kommerziell erhältlicher 6-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)hexansäure in Gegenwart von HATU und *N,N*-Diisopropylethylamin hergestellt. Anschließend erfolgte die Entschützung an der Aminogruppe unter schonenden Bedingungen durch 2.5 stündiges Rühren in 5%iger Trifluoressigsäure in DCM bei RT unter Erhalt der Esterschutzgruppe. Nach Aufarbeitung und Reinigung durch präparative HPLC wurden 438 mg der Titelverbindung erhalten.
HPLC (Methode 11): R_t = 1.69 min;

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.78 min; MS (ESIpos): m/z = 610 $(M+H)^+$.

Intermediat L62

Trifluoressigsäure --2-(trimethylsilyl)ethyl-N-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)hexanoyl]-L-valyl-N^5-carbamoyl-L-ornithyl-L-lysinat (1:1)



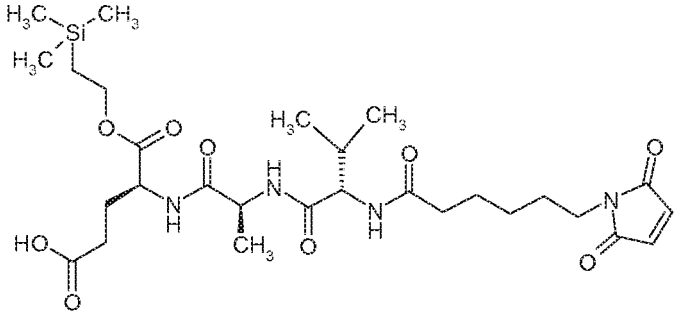
Zunächst wurde ausgehend von N2-[(Benzyloxy)carbonyl]-N6-(tert-butoxycarbonyl)-L-lysin nach klassischen Methoden der Peptidchemie 2-(Trimethylsilyl)ethyl-N6-(tert-butoxycarbonyl)-L-lysinat hergestellt. 148 mg (0.43 mmol) von diesem Intermediat wurden dann in Gegenwart von 195 mg (0.51 mmol) HATU und 149 µL *N,N*-Diisopropylethylamin mit 200 mg (0.43 mmol) von Intermediat L16 gekuppelt. Nach Einengen und Reinigung des Rückstandes mittels präparativer HPLC wurde das geschützte Intermediat in 20 mL DCM aufgenommen und durch Zugabe von 2 mL Trifluoressigsäure und 1 h Rühren bei RT die tert. Butoxycarbonyl-Schutzgruppe abgelöst. Nach Einengen und Lyophilisation des Rückstandes aus Acetonitril/Wasser wurden 254 mg (63% d. Th. über 2 Stufen) erhalten.

HPLC (Methode 11): R_t = 1.51 min;

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.68 min; MS (ESIpos): m/z = 696 $(M+H)^+$.

Intermediat L63

(4S)-4-{[(2S)-2-{[(2S)-2-{[6-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)hexanoyl]amino}-3-methylbutanoyl]amino}propanoyl]amino}-5-oxo-5-[2-(trimethylsilyl)ethoxy]pentansäure

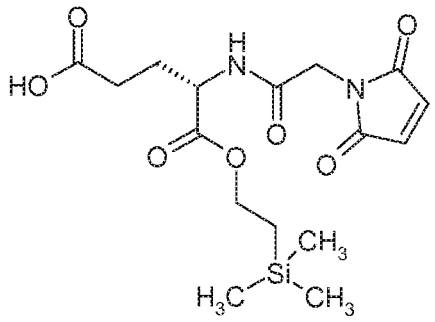


Zunächst wurde ausgehend von (2S)-5-(Benzyloxy)-2-[(tert-butoxycarbonyl)amino]-5-oxopentansäure nach klassischen Methoden der Peptidchemie (Veresterung mit 2-(Trimethylsilylethanol mittels EDCI/DMAP, Abspaltung der Boc-Schutzgruppe mit Trifluoressigsäure, Kupplung mit N-[(Benzyloxy)carbonyl]-L-valyl-L-alanin in Gegenwart von HATU und Hydrogenolyse in Methanol über 10%-igem Palladium auf Aktivkohle) das Tripeptidderivat (4S)-4-{[(2S)-2-{[(2S)-2-Amino-3-methylbutanoyl]amino}propanoyl]amino}-5-oxo-5-[2-(trimethylsilyl)ethoxy]pentansäure hergestellt. Die Titelverbindung wurde durch Kupplung dieses partiell geschützten Peptidderivats mit kommerziell erhältlichem 1-{6-[(2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl)oxy]-6-oxohexyl}-1H-pyrrol-2,5-dion hergestellt. Nach Aufarbeitung und Reinigung durch präparative HPLC wurden 601 mg der Titelverbindung erhalten.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.96 min; MS (ESIpos): m/z = 611 $(M+H)^+$.

Intermediat L64

(4S)-4-{[(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)acetyl]amino}-5-oxo-5-[2-(trimethylsilyl)ethoxy]pentansäure

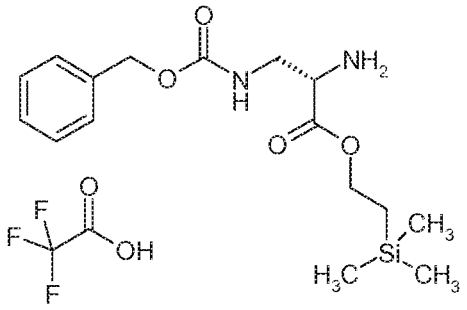


Die Titelverbindung wurde ausgehend von (2S)-5-(Benzyloxy)-2-[(tert-butoxycarbonyl)amino]-5-oxopentansäure nach klassischen Methoden der Peptidchemie (Veresterung mit 2-(Trimethylsilylethanol mittels EDCI/DMAP, Abspaltung der Boc-Schutzgruppe mit Trifluoressigsäure, hydrogenolytische Spaltung des Benzylesters in Methanol über 10%-igem Palladium auf Aktivkohle und Kupplung mit 1-{2-[(2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl)oxy]-2-oxoethyl}-1H-pyrrol-2,5-dion in Gegenwart von *N,N*-Diisopropylethylamin) hergestellt.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.84 min; MS (ESIpos): m/z = 385 $(M+H)^+$.

Intermediat L65

Trifluoressigsäure --2-(trimethylsilyl)ethyl-3-{[(benzyloxy)carbonyl]amino}-L-alaninat (1:1)

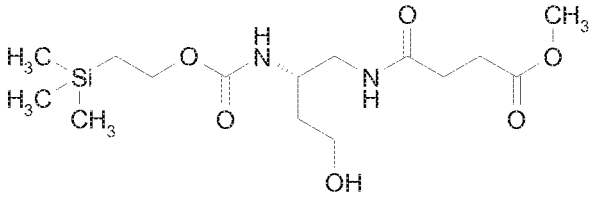


Die Titelverbindung wurde ausgehend von 3-{[(Benzyloxy)carbonyl]amino}-N-(tert-butoxycarbonyl)-L-alanin nach klassischen Methoden der Peptidchemie (Veresterung mit 2-(Trimethylsilylethanol mittels EDCI/DMAP und Abspaltung der Boc-Schutzgruppe mit Trifluoressigsäure hergestellt. Man erhielt 373 mg (79 % d. Th. über 2 Stufen) der Titelverbindung.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.72 min; MS (ESIpos): m/z = 339 $(M+H)^+$.

Intermediat L66

Methyl-(8S)-8-(2-hydroxyethyl)-2,2-dimethyl-6,11-dioxo-5-oxa-7,10-diaza-2-silatetradecan-14-oat



1000 mg (2.84 mmol) (3S)-3-{[(Benzyloxy)carbonyl]amino}-4-[(tert-butoxycarbonyl)amino] butansäure wurden in 10.0 mL 1,2-Dimethoxyethan vorgelegt und mit 344.4 mg (3.4 mmol) 4-Methylmorpholin und 504 mg (3.69 mmol) Isobutylchlorformiat versetzt. Nach 10min Rühren bei RT wurde der Ansatz auf 5°C abgekühlt und portionsweise mit 161 mg (4.26 mmol) Natriumborhydrid gelöst in 3 mL Wasser unter starkem Rühren versetzt. Nach 1 h erfolgte nochmals eine Zugabe der gleichen Menge an Natriumborhydrid und der Ansatz wurde anschließend langsam auf RT erwärmt. Es wurden 170 ml Wasser zugegeben und der Ansatz dann viermal mit jeweils 200 ml Ethylacetat extrahiert. Die Phasen wurden getrennt und die organische Phase einmal mit Citronensäure und anschließend mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösemittel im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 760 mg (78 % d. Th.) der Verbindung Benzyl-tert-butyl-[(2S)-4-hydroxybutan-1,2-diyl]biscarbamat.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.84 min; MS (ESIpos): m/z = 339 $(M+H)^+$.

760 mg (2.16 mmol) von diesem Intermediat wurden in 13 ml Chlorwasserstoff/Dioxan gelöst 20 min bei RT gerührt. Anschließend wurde der Ansatz auf 5 ml aufkonzentriert und mit Diethylether versetzt. Der Niederschlag wurde abfiltriert und aus Acetonitril/Wasser 1:1 lyophilisiert.

Das so erhaltene Produkt wurde in 132 ml DMF gelöst und mit 345.5 mg (2.35 mmol) 4-Methoxy-4-oxobutansäure, 970 mg (2.55 mmol) HATU und 1025 µl *N,N*-Diisopropylethylamin versetzt. Die Mischung wurde 5 min bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der verbliebene Rückstand mittels präparativer HPLC gereinigt. Die entsprechenden Fraktionen wurden vereinigt und das Acetonitril im Vakuum abgedampft. Die verbleibende wässrige Phase wurde zweimal mit Ethylacetat extrahiert und die organische Phase anschließend einggengt und im Hochvakuum getrocknet.

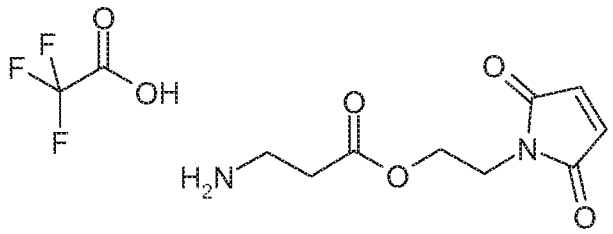
Das so erhaltene Zwischenprodukt wurde in Methanol aufgenommen und über 10%-igem Palladium auf Aktivkohle 1 h lang bei RT unter Wasserstoff-Normaldruck hydriert. Der Katalysator wurde danach abfiltriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

247 mg von dieser entschützten Verbindung wurden in 20 ml DMF aufgenommen und mit 352 mg (1.36 mmol) 1-({[2-(Trimethylsilyl)ethoxy]carbonyl}oxy)pyrrolidin-2,5-dion sowie 592 µL *N,N*-Diisopropylethylamin versetzt. Die Reaktionsmischung wurde 1h bei RT gerührt, anschließend eingeengt und der Rückstand mittles präparativer HPLC gereinigt. Die Lösemittel wurden dann im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt über diese 5 Reaktionsschritte in einer 21%-igen Gesamtausbeute 218 mg der Titelverbindung.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.74 min; MS (ESIpos): m/z = 363 $(M+H)^+$.

Intermediat L67

Trifluoressigsäure --2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)ethyl-beta-alaninat (1:1)



Die Titelverbindung wurde ausgehend von 50 mg (0.354 mmol) von kommerziell erhältlichem 1-(2-Hydroxyethyl)-1H-pyrrol-2,5-dion durch Kupplung mit 134 mg (0.71 mmol) N-(tert-Butoxycarbonyl)-

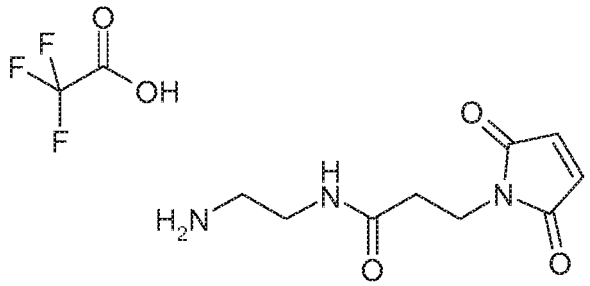
beta-alanin in 10 ml Dichlormethan in Gegenwart von 1.5 Equivalenten EDCI und 0.1 Equivalent 4-*N*, *N*-Dimethylaminopyridin und anschließende Entschützung mit Trifluoressigsäure hergestellt.

Ausbeute: 56 mg (48% d. Th. über 2 Stufen)

LC-MS (Methode 3): R_t = 1.15 min; MS (ESIpos): m/z = 213 $(M+H)^+$.

Intermediat L68

Trifluoressigsäure--N-(2-aminoethyl)-2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)propanamid(1:1)

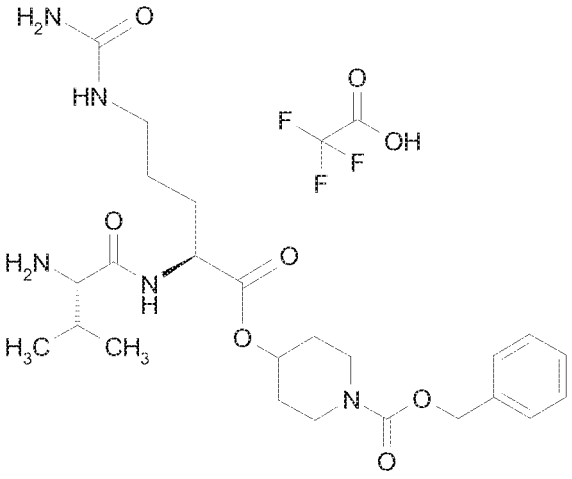


Die Titelverbindung wurde in Analogie zu Intermediat L1 nach klassischen Methoden der Peptidchemie aus kommerziell erhältlicher (2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)propansäure und tert-Butyl-(2-aminoethyl) carbamat hergestellt.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.17 min; MS (ESIpos): m/z = 212 $(M+H)^+$.

Intermediat L69

Trifluoressigsäure--1-[(benzyloxy)carbonyl]piperidin-4-yl-L-valyl-N^5-carbamoyl-L-ornithinat (1:1)



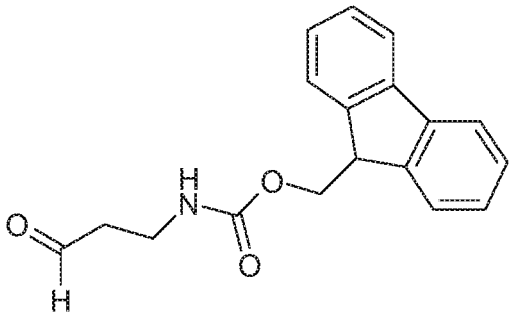
Die Titelverbindung wurde nach klassischen Methoden der Peptidchemie aus kommerziell erhältlichem Benzyl-4-hydroxypiperidin-1-carboxylat durch Veresterung mit N2-(tert-Butoxycarbonyl)-N5-carbamoyl-L-ornithin mittels EDCI/DMAP, anschließende Boc-Spaltung mit TFA, dann folgende

Kupplung mit N-[(tert.-Butoxy)carbonyl]-L-valin in Gegenwart von HATU und *N,N*-Diisopropylethylamin und schließlich erneute Boc-Abspaltung mit TFA hergestellt.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.62 min; MS (ESIpos): m/z = 492 $(M+H)^+$.

Intermediat L70

9H-Fluoren-9-ylmethyl-(3-oxopropyl)carbamat

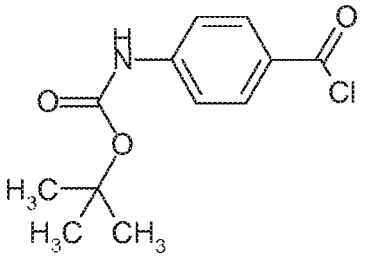


1000.0 mg (3.36 mmol) 9H-Fluoren-9-ylmethyl-(3-hydroxypropyl)carbamat wurden in 15.0 mL Chloroform und 15.0 mL 0.05 N Kaliumcarbonat/0.05 N Natriumhydrogencarbonat-Lösung (1:1) vorgelegt. Dann wurden 93.5 mg (0.34 mmol) Tetra-n-butylammoniumchlorid, 673.6 mg (5.04 mmol) N-Chlorsuccinimid und 52.5 mg (0.34 mmol) TEMPO zugegeben und die Reaktionsmischung kräftig über Nacht bei RT gerührt. Die Reaktionsmischung wurde mit Dichlormethan verdünnt und die organische Phase wurde mit Wasser und ges. NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösemittel im Vakuum verdampft. Der Rückstand wurde im Hochvakuum getrocknet und mittels Kieselgel (Laufmittel: Cyclohexan/Ethylacetat 3:1-1:1) gereinigt. Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 589.4 mg (58 % d. Th.) der Titelverbindung.

LC-MS (Methode 6): R_t = 2.15 min; MS (ESIpos): m/z = 296 $(M-H)^+$.

Intermediat L71

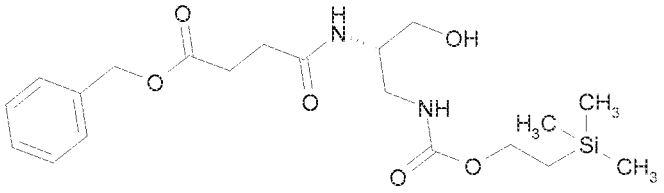
tert-Butyl-[4-(chlorcarbonyl)phenyl]carbamat



100.0 mg (0.42 mmol) 4-[(tert-Butoxycarbonyl)amino]benzoesäure wurden in 2.0 mL Dichlormethan vorgelegt und mit 64.2 mg (0.51 mmol) Oxalsäuredichlorid versetzt. Die Reaktionsmischung rührte bei RT 30 min (DC-Kontrolle: Dichlormethan/Methanol). Dann wurden nochmals 192.6 mg (1.53 mmol) Oxalsäuredichlorid und 1 Tropfen DMF zugegeben und 1 h bei RT gerührt. Das Lösemittel wurde im Vakuum verdampft und der Rückstand mehrmals mit Dichlormethan kodestilliert. Der Rückstand wurde ohne weitere Reinigung in der nächsten Synthesestufe eingesetzt.

Intermediat L72

Benzyl-(9S)-9-(hydroxymethyl)-2,2-dimethyl-6,11-dioxo-5-oxa-7,10-diaza-2-silatetradecan-14-oat

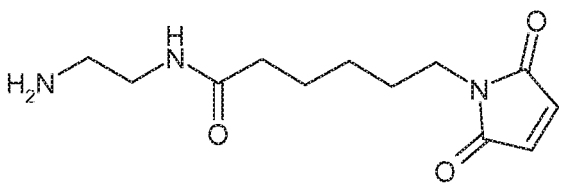


Die Titelverbindung wurde ausgehend von kommerziell erhältlichem Benzyl-tert-butyl-[(2S)-3-hydroxypropan-1,2-diyl]biscarbamat nach klassischen Methoden der Peptidchemie durch hydrogenolytische Abspaltung der Z-Schutzgruppe, anschließende Kupplung mit 4-(Benzyloxy)-4-oxobutansäure in Gegenwart von EDCI/HOBT, dann Abspaltung der Boc-Schutzgruppe mit TFA und schließlich durch Umsetzung mit 1-({[2-(Trimethylsilyl)ethoxy]carbonyl}oxy)pyrrolidin-2,5-dion in Gegenwart von Triethylamin hergestellt.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.94 min; MS (ESIpos): m/z = 425 $[M+H]^+$.

Intermediat L73

N-(2-aminoethyl)-6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)hexanamide



Zu einer Lösung von 300 mg (1.87 mmol) tert-butyl (2-aminoethyl)carbamate in 20 ml Dimethylformamid wurden 395.5 mg (1.87 mmol) 6-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)hexansäure, 1.21 g (9.36 mmol) N,N-Diisopropylethylamin und 854.3 mg (2.25 mmol) HATU zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde 5 Minuten bei Rt gerührt. Nach Einengen der Mischung wurde der Rückstand in DCM aufgenommen und mit Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde mit Brine gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet, abfiltriert und eingeengt. Man erhielt 408 mg (33%, Reinheit 53%) der Titelverbindung, die ohne weitere Reinigung eingesetzt wurden.

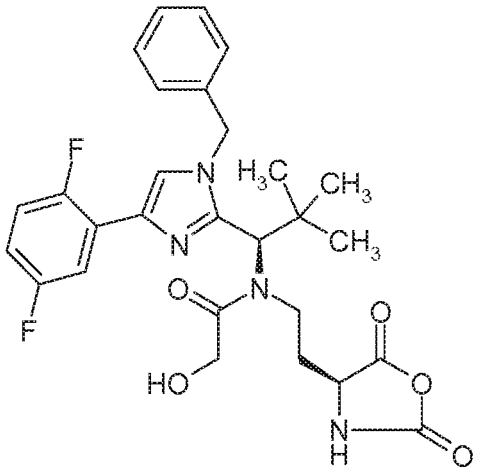
LC-MS (Methode 1): R_t = 0.75 min; MS (ESIpos): m/z = 354 $(M+H)^+$.

Zu einer Lösung von *tert*-butyl (2-{[6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)hexanoyl]amino}ethyl)carbamate (408 mg, 0.365 mmol) in 7 ml dichlormethan wurde 1 ml TFA zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird 0.5 h bei RT gerührt. Die Reaktionsmischung wurde im Vakuum verdampft und der Rückstand wurde zweimal mit Dichlormethan kodestilliert. Der Rückstand wurde ohne weitere Reinigung weiter eingesetzt. Man erhielt 384 mg (94%, Reinheit 57%) der Titelverbindung.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.26 min; MS (ESIpos): m/z = 254 $(M+H)^+$.

Intermediat F1

N-{(1R)-1-[1-Benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-N-{2-[(4S)-2,5-dioxo-1,3-oxazolidin-4-yl]ethyl}-2-hydroxyacetamid



77 mg (0.14 mmol) (2S)-2-Amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butansäurehydrochlorid(1:1) (Intermediat C4) wurden unter Argon in THF gelöst. Zum Ansatz wurden dann 2mg Aktivkohle und 27,5mg (0.14 mmol) Triphosgen gegeben und anschließend 10 min bei 50°C gerührt. Nach zwei weiteren Zugaben von jeweils 27.5 mg Triphosgen und 30 min Rühren bei RT war die Reaktion abgeschlossen.

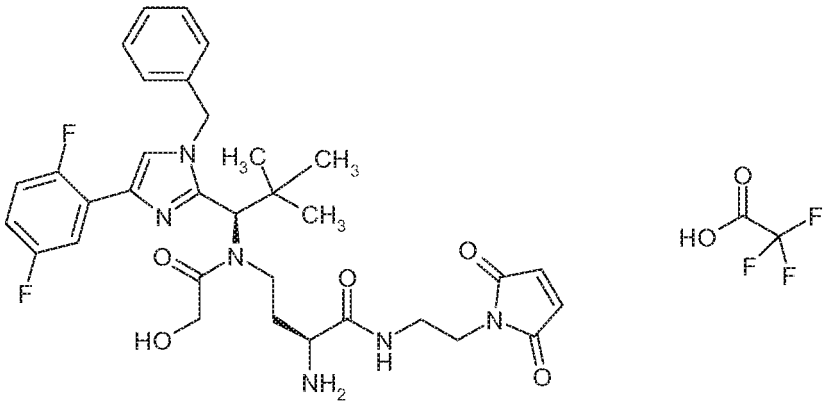
Die Aktivkohle wurde über einen Spritzenfilter abfiltriert und das Lösungsmittel dann im Vakuum entfernt. Der Ansatz wurde mit Acetonitril versetzt und erneut im Vakkuum eingeengt. Man erhielt 72mg (95%) der Titelverbindung, die ohne weitere Reinigung in die ADC-Kupplung eingesetzt wurden.

HPLC (Methode 11): R_t = 2.28 min;

LC-MS (Methode 1): R_t = 1.2 min; MS (ESIpos): m/z = 541 $(M+H)^+$.

Intermediat F2

Trifluoressigsäure--(2S)-2-amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]-N-[2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)ethyl]butanamid(1:1)



55 mg (0.089 mmol) (2S)-4-[{(1R)-1-[1-Benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]-2-[(tert-butoxycarbonyl)amino]butansäure (Intermediat C5) wurden in 12 mL DMF aufgenommen und nacheinander mit 68 mg (0.268 mmol) von kommerziell erhältlichem Trifluoressigsäure--1-(2-aminoethyl)-1H-pyrrol-2,5-dion(1:1), 34.3 mg (0.18 mmol) 1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimid-Hydrochlorid, 27.4 mg (0.18 mmol) 1-Hydroxy-1*H*-benzotriazol-Hydrat sowie 47 µl (0.27 mmol) *N,N*-Diisopropylethylamin versetzt. Die Mischung wurde über Nacht bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der verbliebene Rückstand mittels präparativer HPLC gereinigt. Die entsprechenden Fraktionen wurden eingeengt und nach Lyophilisation aus 1,4-Dioxan wurden 20 mg (30% d.Th.) der Titelverbindung erhalten.

HPLC (Methode 11): R_t = 2.48 min;

LC-MS (Methode 1): R_t = 1.29 min; MS (ESIpos): m/z = 737 $(M+H)^+$.

20 mg (0.027 mmol) dieses Intermediats wurden in 5 mL Dichlormethan aufgenommen, mit 1 mL Trifluoressigsäure versetzt und 1 h bei RT gerührt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch im Vakuum eingeengt und der verbliebene Rückstand aus Acetonitril/Wasser 1:1 lyophilisiert. Es wurden so 19 mg (95% d. Th.) der Titelverbindung erhalten.

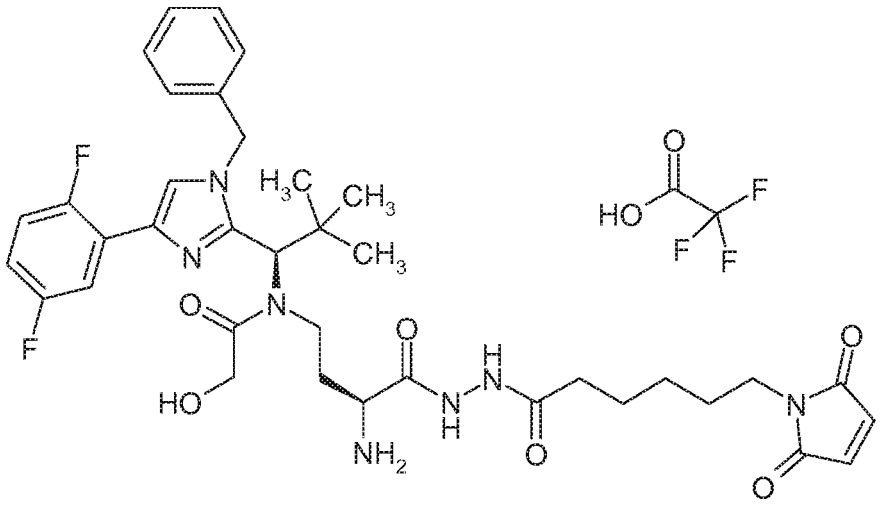
HPLC (Methode 11): R_t = 2.0 min;

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.9 min; MS (ESIpos): m/z = 637 $(M+H)^+$.

^{1}H-NMR (500 MHz, DMSO-d_6): δ = 8.28 (t, 1H), 7.9-8.1 (m, 3H), 7.7-7.8 (m, 2H), 7.2-7.4 (m, 6H) 7.0-7.1 (m, 3H), 5.7 (s, 1H), 5.0 und 5.3 (2d, 2H), 4.08 und 4.25 (2d, 2H), 3.3-3.65 (m, 5H), 3.1-3.25 (m, 2H), 0.75 und 1.45 (2m, 2H), 0.9 (s, 9H).

Intermediat F3

Trifluoressigsäure--N-[(3S)-3-amino-4-{2-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)hexanoyl]hydrazino}-4-oxobutyl]-N-{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-2-hydroxyacetamid(1:1)



13 mg (0.021 mmol) (2S)-4-[{(1R)-1-[1-Benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]-2-[(tert-butoxycarbonyl)amino]butansäure (Intermediat C5) wurden in 5 mL DMF aufgenommen und anschließend mit 33 mg (86 µmol) *O*-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium-hexafluorophosphat, 15 µL *N,N*-Diisopropylethylamin sowie mit 22 mg (64 µmol) von kommerziell erhältlichem 6-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)hexanhydrazid versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 1 h bei RT gerührt. Anschließend wurde im Hochvakuum eingeengt und der verbliebene Rückstand mittels präparativer HPLC aufgereinigt. So wurden 9.5 mg (53 % d.Th.) des geschützten Intermediats als farbloser Schaum erhalten.

HPLC (Methode 11): R_t = 2.1 min;

LC-MS (Methode 1): R_t = 1.33 min; MS (ESIpos): m/z = 822 $(M+H)^+$.

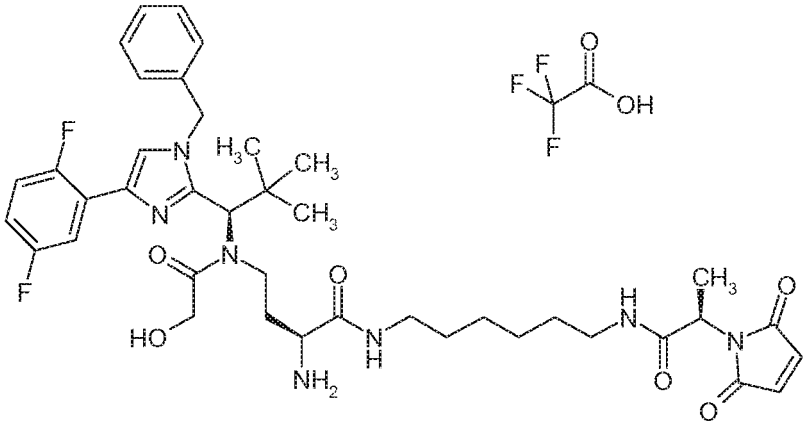
9.5 mg (0.011 mmol) dieses Intermediats wurden in 3 mL Dichlormethan aufgenommen, mit 1 mL Trifluoressigsäure versetzt und 2 h bei RT gerührt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch im Vakuum eingeengt und der verbliebene Rückstand aus Acetonitril/Wasser 1:1 lyophilisiert. Es wurden so 7 mg (70% d. Th.) der Titelverbindung erhalten.

HPLC (Methode 11): R_t = 1.75 min;

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.91 min; MS (ESIpos): m/z = 722 $(M+H)^+$.

Intermediat F4

Trifluoressigsäure--(2S)-2-amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]-N-(6-{[(2R)-2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)propanoyl]amino}hexyl)butanamid(1:1)



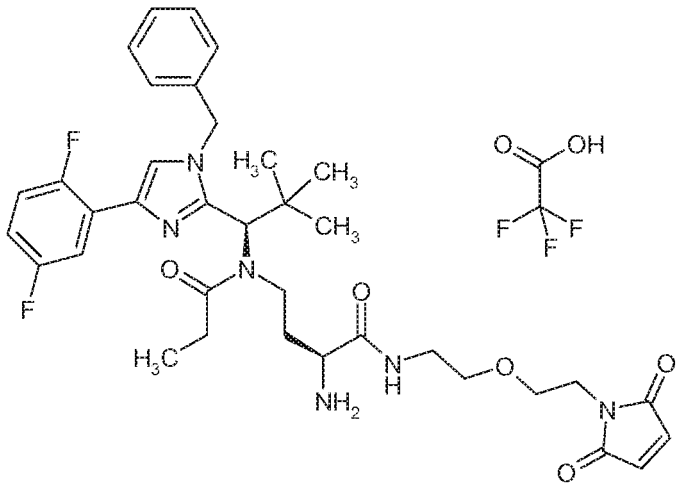
Zunächst wurden 30 mg (0.049 mmol) (2S)-4-[{(1R)-1-[1-Benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]-2-[(tert-butoxycarbonyl)amino]butansäure (Intermediat C5) in Analogie zu Intermediat F3 mit Trifluoressigsäure--9H-fluoren-9-ylmethyl-(6-aminohexyl) carbamat(1:1) in Gegenwart von HATU gekuppelt. Anschließend wurde mit Piperidin nach Standardmethoden die Fmoc-Schutzgruppe entfernt. Diese Aminkomponente wurde dann mit (2R)-2-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)propanoylchlorid, das aus der freien Säure mit Thionylchlorid hergestellt wurde, in Gegenwart von *N,N*-Diisopropylethylamin gekuppelt. Im letzten Schritt wurde die Boc-Schutzgruppe mit Trifluoressigsäure in DCM entfernt. Es wurden 1.1 mg (3% über 4 Stufen) der Titelverbindung erhalten.

HPLC (Methode 11): R_t = 1.83 min;

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.96 min; MS (ESIpos): m/z = 764 $(M+H)^+$.

Intermediat F5

Trifluoressigsäure--(2S)-2-amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(propionyl)amino]-N-{2-[2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)ethoxy]ethyl}butanamid(1:1)



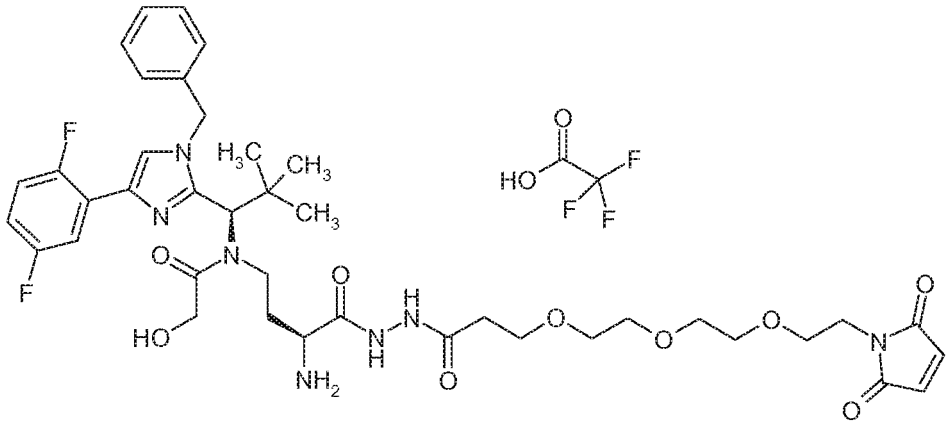
Die Titelverbindung wurde in Analogie zu Intermediat F2 aus 16 mg (0.026 mmol) Intermediat C5 und 8.5 mg (0.03 mmol) Intermediat L12 hergestellt. Es wurden 3 mg (13% d.Th. über 2 Stufen) der Titelverbindung erhalten.

HPLC (Methode 11): R_t = 2.0 min;

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.96 min; MS (ESIpos): m/z = 681 $(M+H)^+$.

Intermediat F6

Trifluoressigsäure--N-[(16S)-16-amino-1-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-12,15-dioxo-3,6,9-trioxa-13,14-diazaoctadecan-18-yl]-N-{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-2-hydroxyacetamid(1:1)



8 mg (12.7 µmol) Trifluoressigsäure--tert-butyl-{(2S)-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]-1-hydrazino-1-oxobutan-2-yl}carbamat(1:1) (Intermediat C6) wurden in 8 mL DMF aufgenommen und mit 6 mg (19 µmol) von kommerziell erhältlicher 3-(2-{2-[2-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)ethoxy]ethoxy}ethoxy)propansäure, 5.8 mg (15 µmol) *O*-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium-hexafluorophosphat (HATU) sowie 7 µl (38 µmol) *N,N*-Diisopropylethylamin versetzt. Die Mischung wurde 15 min bei RT gerührt.

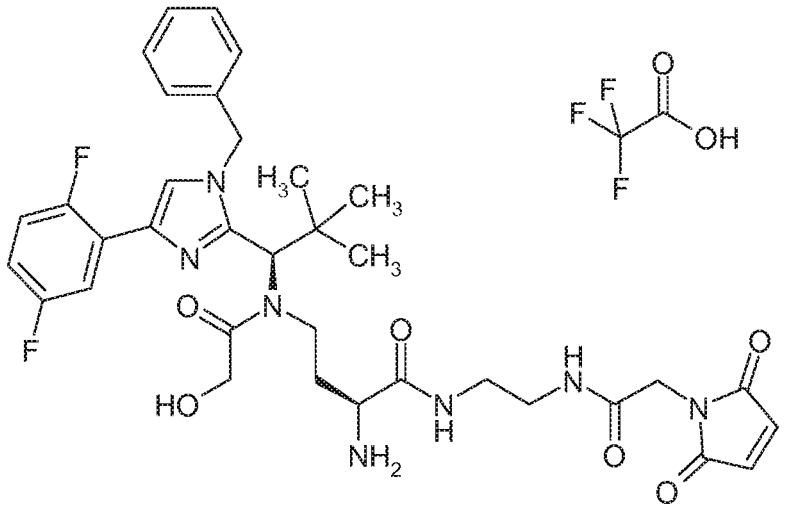
Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand in Acetonitril/Wasser 1:1 aufgenommen und mit Trifluoressigsäure auf pH 2 gebracht. Die Reinigung erfolgte durch präparative HPLC. Nach Vereinigung der entsprechenden Fraktionen, Einengen und Gefriertrocknung aus Acetonitril/Wasser 1:1 wurden 5 mg (41% d.Th.) des Boc-geschützten Intermediats erhalten. Nach Abspaltung der Boc-Gruppe mit Trifluoressigsäure wurden 4 mg (32% d.Th. über 2 Stufen) der Titelverbindung erhalten.

HPLC (Methode 11): R_t = 1.89 min;

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.89 min; MS (ESIpos): m/z = 812 $(M+H)^+$.

Intermediat F7

Trifluoressigsäure--(2S)-2-amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]-N-(2-{[(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)acetyl]amino}ethyl)butanamid(1:1)



Die Titelverbindung wurde in Analogie zu Intermediat F2 aus 25 mg (0.037 mmol) Intermediat C5 und 35 mg (0.112 mmol) Intermediat L1 hergestellt. Es wurden 14.4 mg (29% d.Th. über 2 Stufen) der Titelverbindung erhalten.

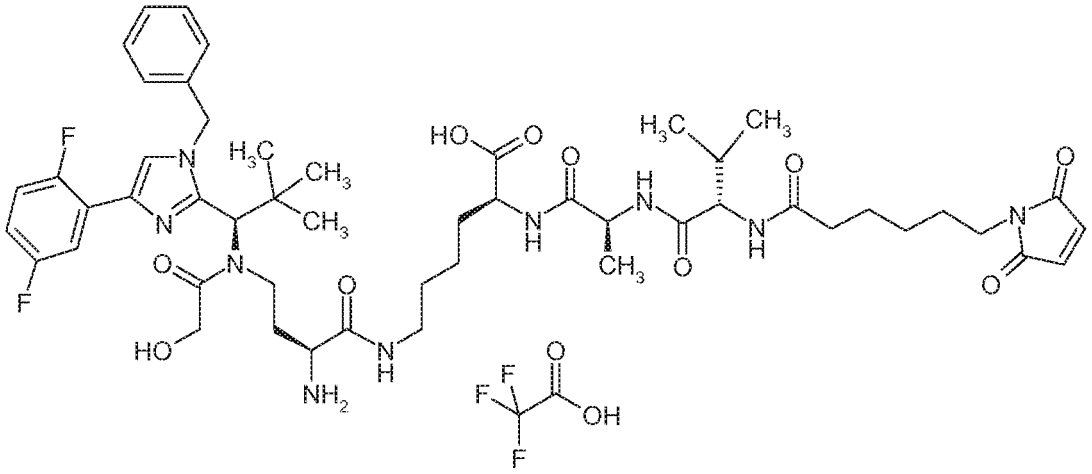
HPLC (Methode 11): R_t = 2.0 min;

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.9 min; MS (ESIpos): m/z = 694 $(M+H)^+$.

^{1}H-NMR (500 MHz, DMSO-d_6): δ = 8.2 (m, 1H), 7.9-8.1 (m, 3H), 7.7-7.8 (m, 2H), 7.2-7.4 (m, 6H), 7.0-7.12 (m, 3H), 5.7 (s, 1H), 4.95 und 5.3 (2d, 2H), 4.1 und 4.25 (2d, 2H), 4.0 (s, 2H), 3.3-3.65 (m, 5H), 3.0-3.15 (m, 2H), 0.7 und 1.45 (2m, 2H), 0.88 (s, 9H).

Intermediat F8

N-[6-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)hexanoyl]-L-valyl-L-alanyl-N^6-{(2S)-2-amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}-L-lysin-trifluoressigsäure(1:1)



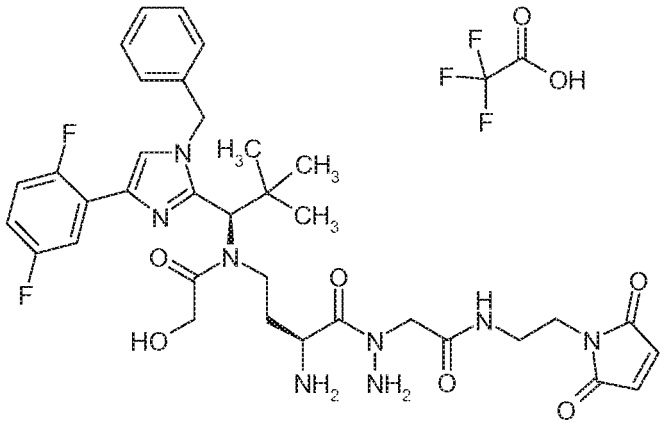
Die Titelverbindung wurde in Analogie zu Intermediat F2 aus 10 mg (0.016 mmol) Intermediat C5 und 13 mg (0.018 mmol) Intermediat L6 hergestellt. Es wurden 10 mg (49% d.Th. über 2 Stufen) der Titelverbindung erhalten.

HPLC (Methode 11): R_t = 1.97 min;

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.93 min; MS (ESIpos): m/z = 1006 $(M+H)^+$.

Intermediat F9

Trifluoressigsäure--N-{(3S)-3-amino-4-[1-(2-{[2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)ethyl]amino}-2-oxoethyl)hydrazino]-4-oxobutyl}-N-{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-2-hydroxyacetamid(1:1)

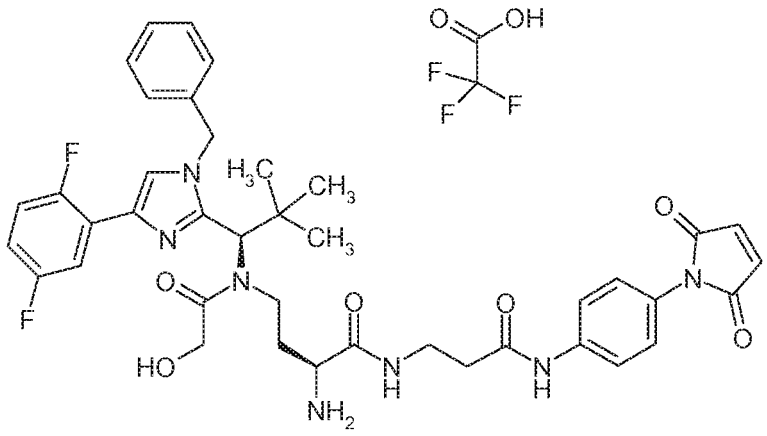


Die Titelverbindung wurde in Analogie zu Intermediat F2 aus 1.5 mg (0.002 mmol) Intermediat C7 und 0.95 mg (0.004 mmol) von kommerziell erhältlichem Trifluoressigsäure--1-(2-aminoethyl)-1H-pyrrol-2,5-dion(1:1) hergestellt. Es wurden 1.1 mg (52% d.Th. über 2 Stufen) der Titelverbindung erhalten.
HPLC (Methode 11): R_t = 1.9 min;

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.89 min; MS (ESIpos): m/z = 709 $(M+H)^+$.

Intermediat F10

Trifluoressigsäure--(2S)-2-amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]-N-(3-{[4-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)phenyl]amino}-3-oxopropyl)butanamid(1:1)

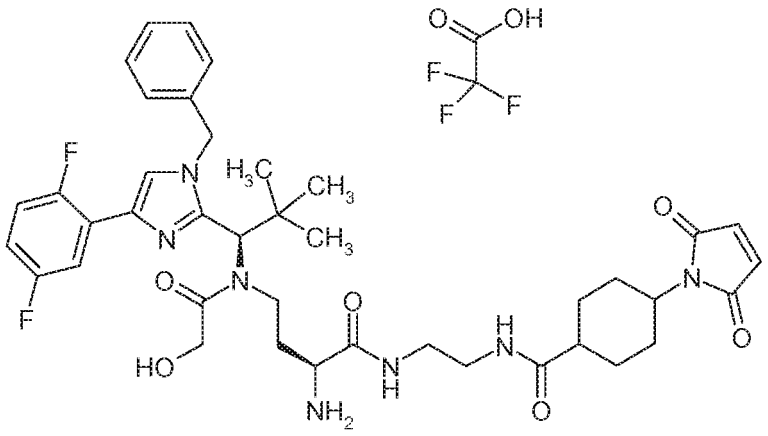


Die Titelverbindung wurde in Analogie zu Intermediat F2 aus 14 mg (0.022 mmol) Intermediat C5 und 10 mg (0.025 mmol) von Intermediat L5 hergestellt. Es wurden 4.5 mg (22% d.Th. über 2 Stufen) der Titelverbindung erhalten.
HPLC (Methode 11): R_t = 2.0 min;

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.93 min; MS (ESIpos): m/z = 756 $(M+H)^+$.

Intermediat F11

Trifluoressigsäure--N-[2-({(2S)-2-amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}amino)ethyl]-4-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)cyclohexancarboxamid(1:1)



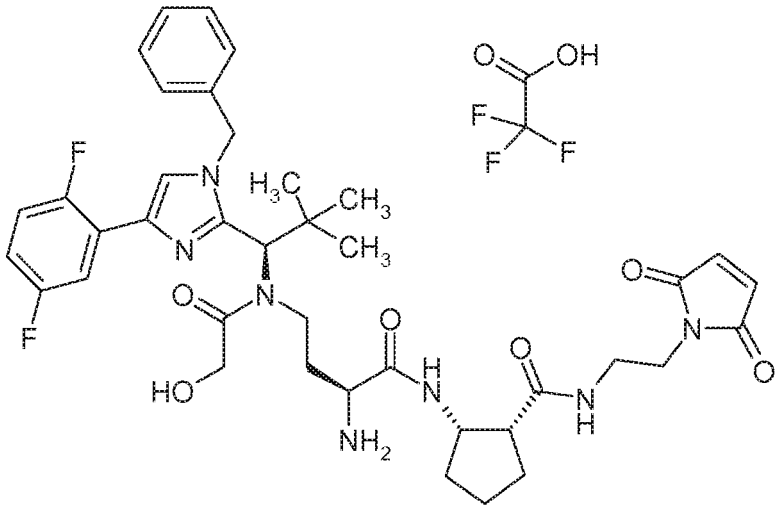
Die Titelverbindung wurde in Analogie zu Intermediat F2 aus 12 mg (0.019 mmol) Intermediat C5 und 10 mg (0.021 mmol) von Intermediat L4 hergestellt. Es wurden 7 mg (38% d.Th. über 2 Stufen) der Titelverbindung erhalten.

HPLC (Methode 11): R_t = 2.04 min;

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.93 min; MS (ESIpos): m/z = 776 $(M+H)^+$.

Intermediat F12

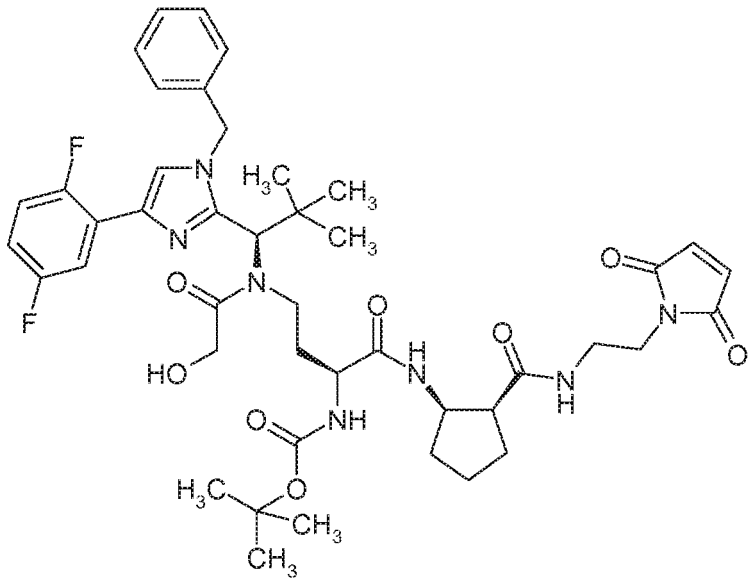
Trifluoressigsäure--(1R,2S)-2-({(2S)-2-amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}amino)-N-[2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)ethyl]cyclopentancarboxamid(1:1)



Die Titelverbindung wurde in Analogie zu Intermediat F2 aus 43 mg (0.071 mmol) Intermediat C5 und 30 mg (0.071 mmol) von Intermediat L2 hergestellt. Auf der Boc-geschützten Zwischenstufe wurden die enstandenen Diastereomere durch präparative HPLC (Chromatorex C18-10 / 125x30 / 12mL/min) voneinander getrennt. Durch Vergleiche mit dem aus kommerziell erhältlicher (1S, 2R)-2-[(tert-

Butoxycarbonyl)amino]cyclopentancarbonsäure in analoger Weise hergestellten Einzeldiastereomer konnte die Stereochemie der aufgetrennten Diastereomere zugeordnet werden:

Fraktion 1: 1S2R Diastereomer

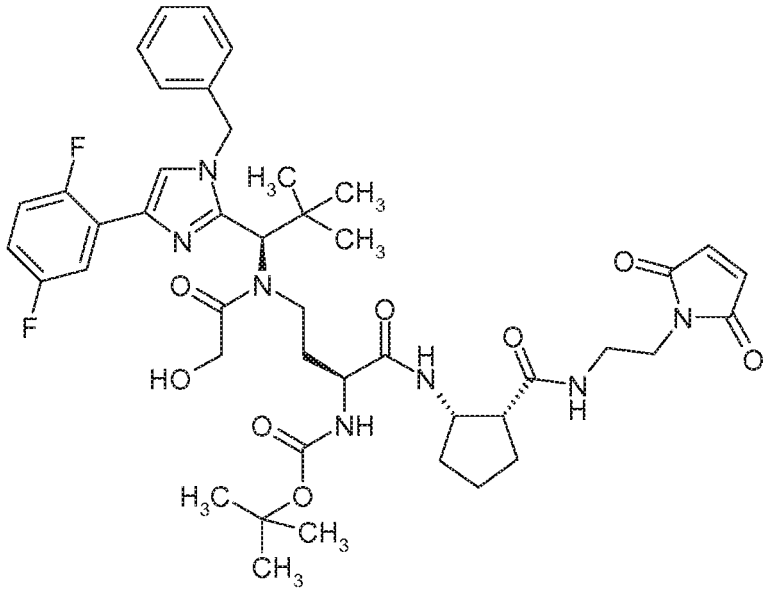


Ausbeute: 13mg (22%)

HPLC (Methode 11): R_t = 2.52 min;

LC-MS (Methode 1): R_t = 1.31 min; MS (ESIpos): m/z = 848 $(M+H)^+$.

Fraktion 2: 1R2S Diastereomer



Ausbeute: 10 mg (17%)

HPLC (Methode 11): R_t = 2.56 min;

LC-MS (Methode 1): R_t = 1.33 min; MS (ESIpos): m/z = 848 $(M+H)^+$.

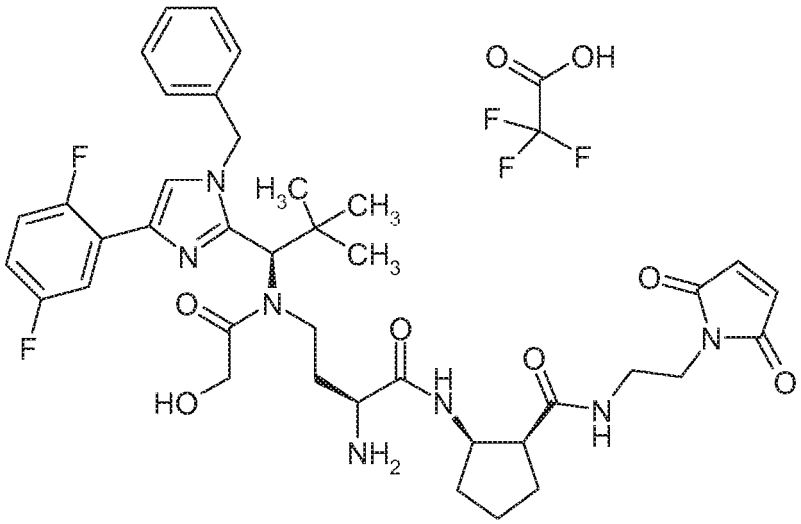
Die Entschützung von 10 mg (0.011 mmol) vom 1R2S Diastereomer mit TFA führte dann zu 8 mg (75% d.Th.) der Titelverbindung.

HPLC (Methode 11): R_t = 2.04 min;

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.92 min; MS (ESIpos): m/z = 748 $(M+H)^+$.

Intermediat F13

Trifluoressigsäure--(1S,2R)-2-({(2S)-2-amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}amino)-N-[2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)ethyl]cyclopentancarboxamid(1:1)



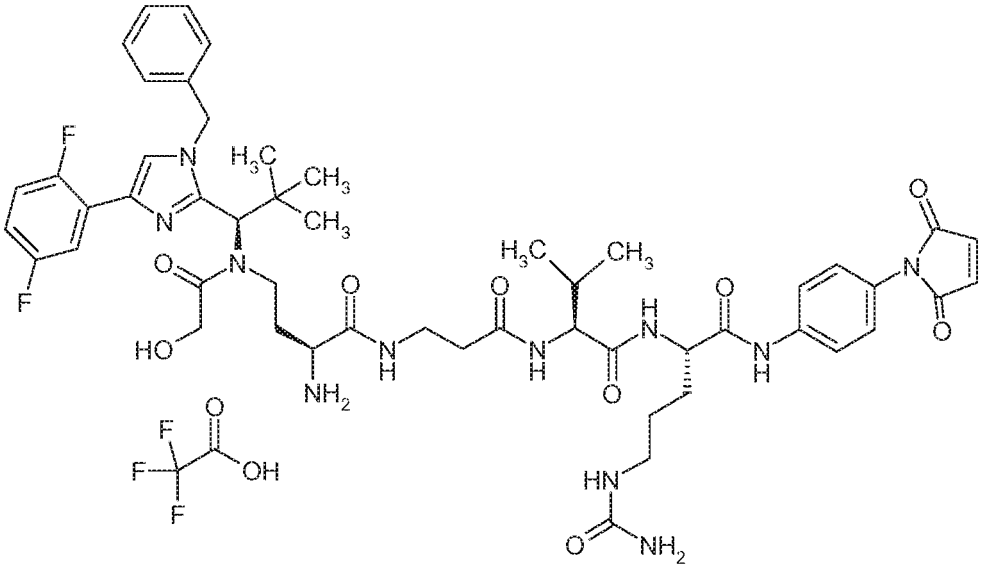
Die Synthese erfolgte analog Intermediat F13 und die Titelverbindung wurde durch Entschützung des 1S2R-Diastereomers erhalten.

HPLC (Methode 11): R_t = 2.1 min;

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.94 min; MS (ESIpos): m/z = 748 $(M+H)^+$.

Intermediat F14

Trifluoressigsäure--N-{(2S)-2-amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}-beta-alanyl-L-valyl-N^5-carbamoyl-N-[4-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)phenyl]-L-ornithinamid(1:1)



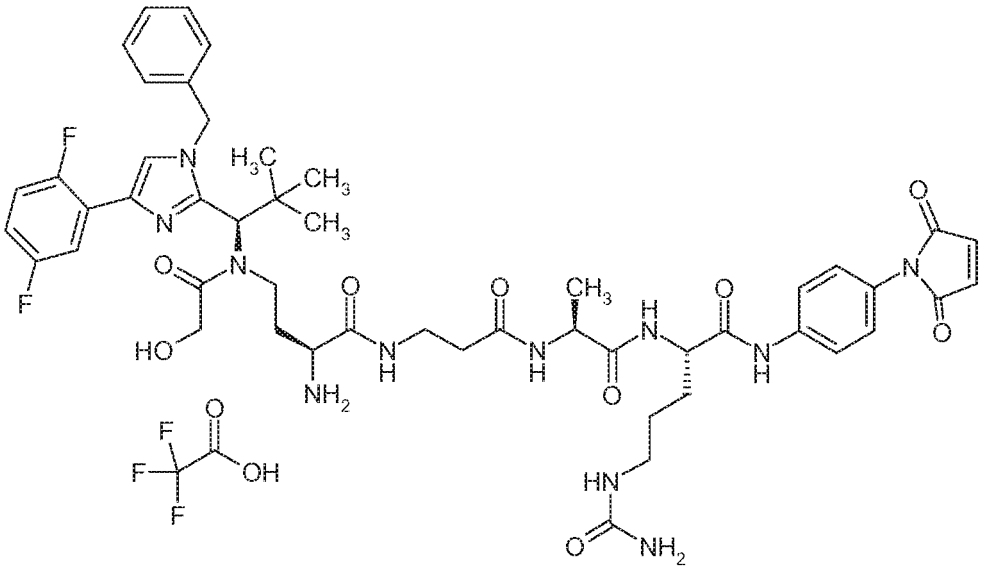
Die Titelverbindung wurde durch Kupplung von 20 mg (0.028 mmol) Intermediat C5 und 18 mg (0.028 mmol) Intermediat L7 in Gegenwart von HATU und anschließender Deblockierung mit TFA hergestellt. Es wurden 15 mg (49% d.Th. über 2 Stufen) der Titelverbindung erhalten.

HPLC (Methode 11): R_t = 1.97 min;

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.91 min; MS (ESIpos): m/z = 1012 $(M+H)^+$.

Intermediat F15

Trifluoressigsäure--N-{(2S)-2-amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}-beta-alanyl-L-alanyl-N^5-carbamoyl-N-[4-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)phenyl]-L-ornithinamid(1:1)

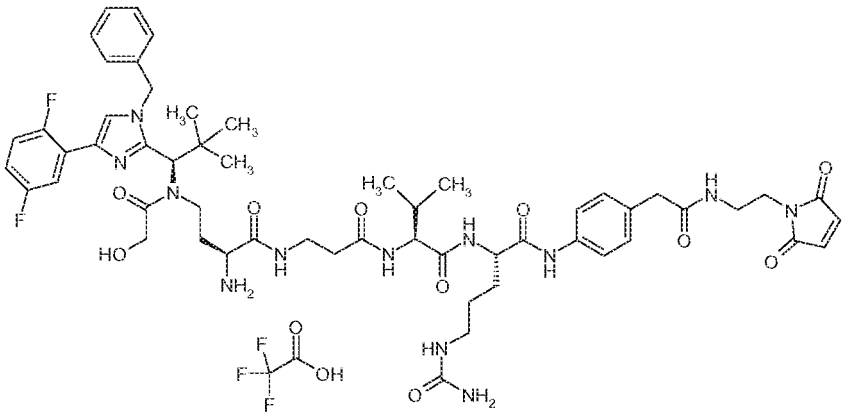


Dieses Intermediat wurde durch Kupplung von 15 mg (0.022 mmol) von Intermediat C8 und 14 mg (0.026 mmol) Intermediat L8 in Gegenwart von HATU und anschließender Deblockierung mit TFA hergestellt. Es wurden 7 mg (27% d.Th. über 2 Stufen) der Titelverbindung erhalten.
HPLC (Methode 11): R_t = 1.85 min;

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.87 min; MS (ESIpos): m/z = 984 $(M+H)^+$.

Intermediat F16

Trifluoressigsäure--N-{(2S)-2-amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}-beta-alanyl-L-valyl-N^5-carbamoyl-N-[4-(2-{[2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)ethyl]amino}-2-oxoethyl)phenyl]-L-ornithinamid(1:1)



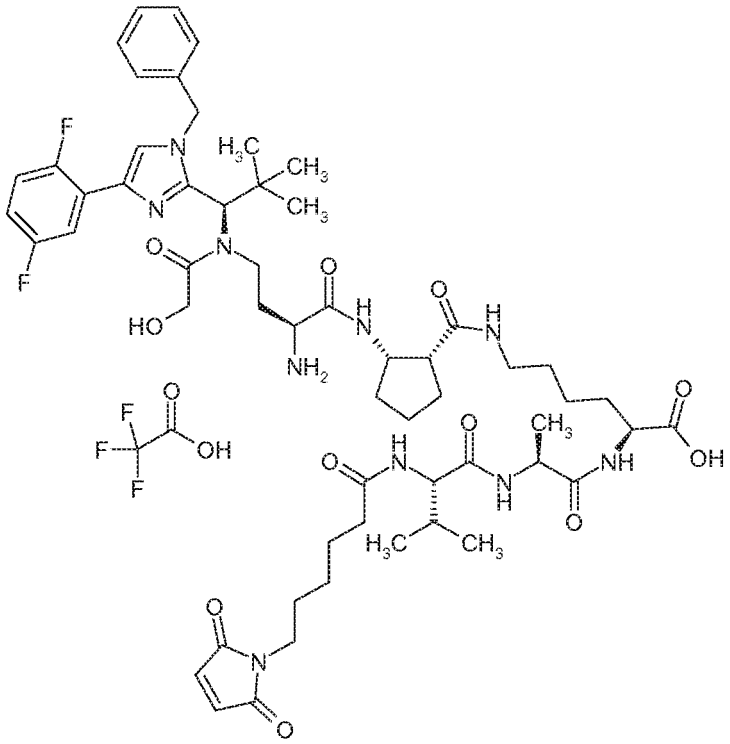
Zunächst wurden 20 mg (0.03 mmol) Intermediat C3 in Analogie zu Intermediat F3 mit Trifluoressigsäure--beta-alanyl-L-valyl-N5-carbamoyl-N-[4-(2-methoxy-2-oxoethyl)phenyl]-L-ornithinamid(1:1) (Intermediat L9) in Gegenwart von HATU gekuppelt (Ausbeute: 15 mg (44% d. Th.). 26 mg (0.023 mmol) von dieser Zwischenstufe N-{(2S)-4-[(Acetoxyacetyl){(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}amino]-2-[(tert-butoxycarbonyl)amino] butanoyl}-beta-alanyl-L-valyl-N5-carbamoyl-N-[4-(2-methoxy-2-oxoethyl)phenyl]-L-ornithinamid wurden in 5 mL Methanol gelöst, mit 1mL einer 2M Lithiumhydroxidlösung versetzt und der Ansatz 90 min bei RT gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der Rückstand in Acetonitril/Wasse aufgenommen und der Ansatz dann mit TFA auf pH 2 gebracht. Dann wurde wiederum eingengt und nach Reinigung des Rückstands durch präparative HPLC wurden 20 mg (81%) der Carboxylverbindung erhalten.
Diese Zwischenstufe wurde dann in 5 mL DMF aufgenommen und mit 6 mg (0.022 mmol) von kommerziell erhältlichem Trifluoressigsäure--1-(2-aminoethyl)-1H-pyrrol-2,5-dion(1:1) in Gegenwart von 8,4 mg (0.022 mmol) HATU und 16µl *N,N*-Diisopropylethylamin gekuppelt. Nach Reinigung durch präparative HPLC wurden 17 mg (76% d.Th.) der geschützten Zwischenstufe erhalten. Diese wurden in 3 mL DCM aufgenommen und mit 1 mL TFA versetzt. Nach 45 min Rühren bei RT wurde

eingeengt und der Rückstand mit Diethylether digeriert. Nach Absaugen und Trocknung des Rückstandes im Hochvakuum verblieben 15 mg (81%) der Titelverbindung
HPLC (Methode 11): R_t = 1.9 min;

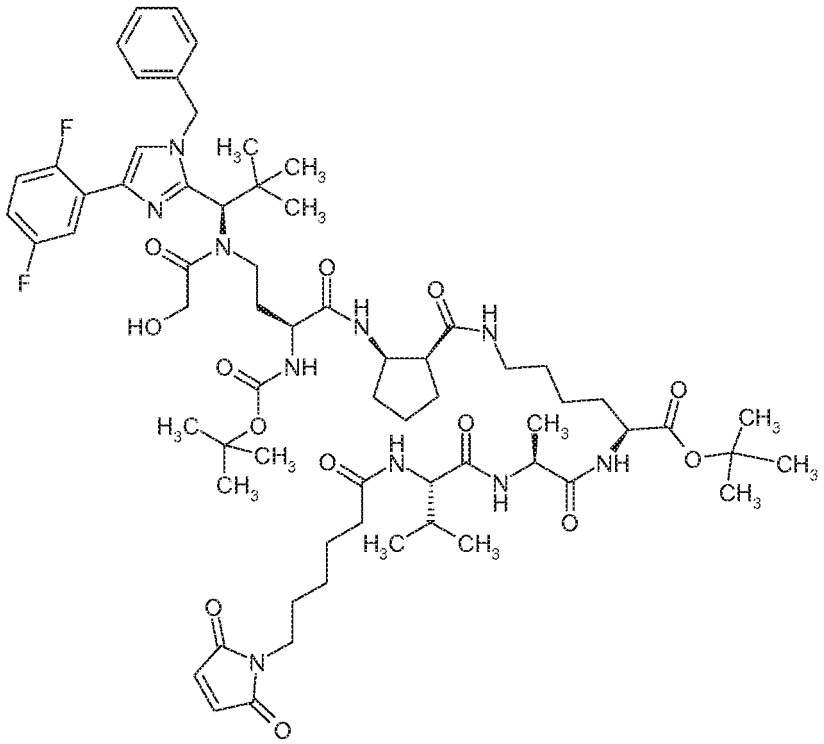
LC-MS (Methode 1): R_t = 0.9 min; MS (ESIpos): m/z = 1097 $(M+H)^+$.

Intermediat F17

N-[6-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)hexanoyl]-L-valyl-L-alanyl-N^6-{[(1R,2S)-2-({(2S)-2-amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}amino)cyclopentyl]carbonyl}-L-lysin-trifluoressigsäure(1:1)



Die Titelverbindung wurde in Analogie zu Intermediat F12 aus 6 mg (0.01 mmol) Intermediat C5 und 8 mg (0.01 mmol) von Intermediat L10 hergestellt. Auf der Boc-geschützten Zwischenstufe wurden die enstandenen Diastereomere durch präparative HPLC (Chromatorex C18-10 / 125x30 / 12mL/min) voneinander getrennt. Durch Vergleiche mit dem aus kommerziell erhältlicher (1S, 2R)-2-[(tert-Butoxycarbonyl)amino]cyclopentancarbonsäure in analoger Weise hergestellten Einzeldiastereomer konnte die Stereochemie der aufgetrennten Diastereomere zugeordnet werden:
Fraktion 1: 1S2R Diastereomer

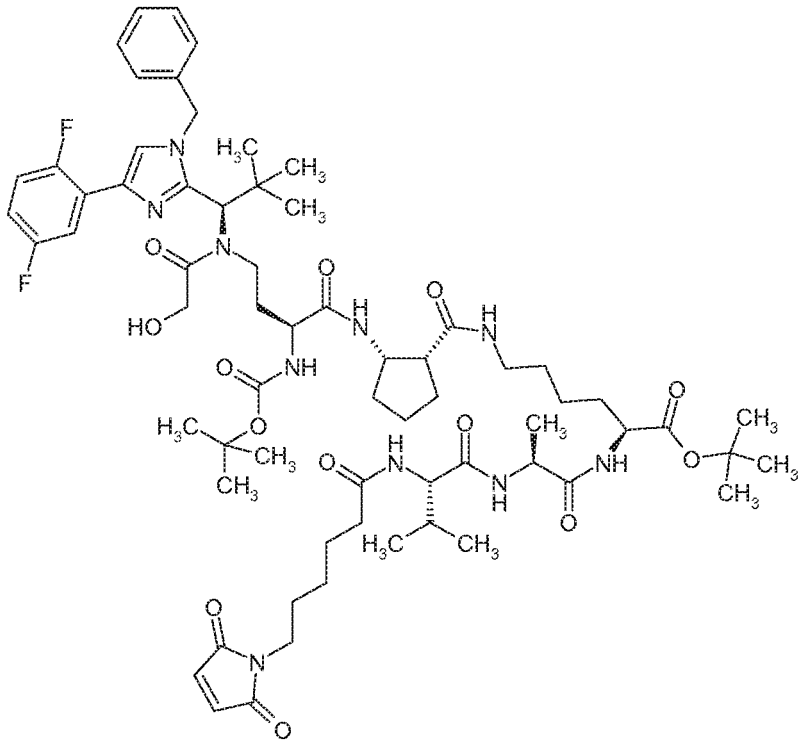


Ausbeute: 1mg

HPLC (Methode 11): R_t = 2.73 min;

LC-MS (Methode 1): R_t = 1.37 min; MS (ESIpos): m/z = 1274 $(M+H)^+$.

Fraktion 2: 1R2S Diastereomer



Ausbeute: 0.7 mg

HPLC (Methode 11): R_t = 2.81 min;

LC-MS (Methode 1): R_t = 1.41 min; MS (ESIpos): m/z = 1274 $(M+H)^+$.

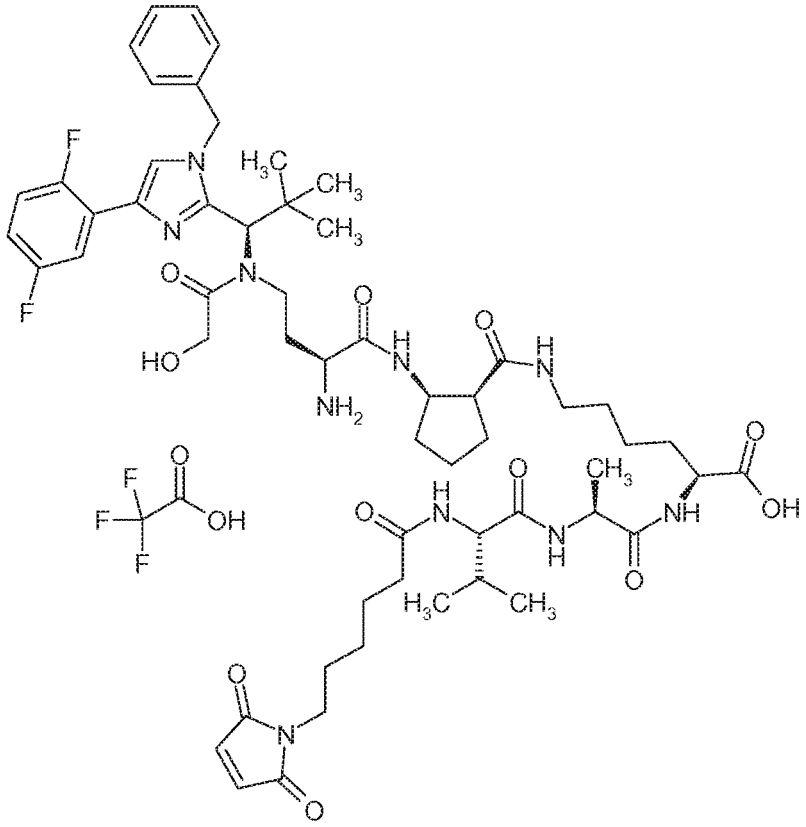
Die vollständige Entschützung von 0.7 mg (0.001 mmol) des 1R2S-Diastereomers wurde durch Lösen in 1 mL DCM, Zugabe von 1 mL TFA und 1h Rühren bei RT erreicht. Nach Einengen im Vakuum und Lyophilisation des Rückstandes aus Acetonitril/Wasser wurden 0.68 mg (94% d. Th.) der Titelverbindung erhalten.

HPLC (Methode 11): R_t = 2.1 min;

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.97 min; MS (ESIpos): m/z = 1117 $(M+H)^+$.

Intermediat F18

N-[6-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)hexanoyl]-L-valyl-L-alanyl-N^6-{[(1S,2R)-2-({(2S)-2-amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}amino)cyclopentyl]carbonyl}-L-lysin-trifluoressigsäure(1:1)



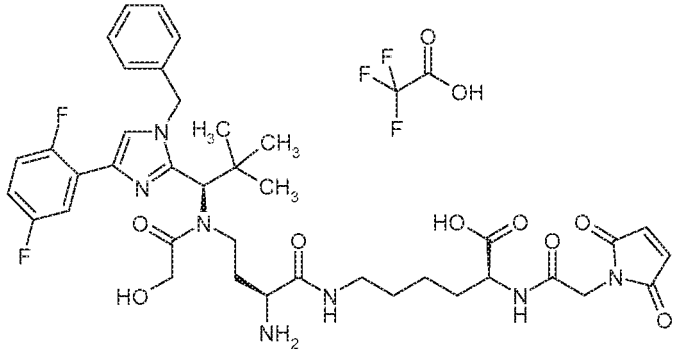
Die Titelverbindung wurde in Analogie zu Intermediat F17 aus 8.9 mg (0.014 mmol) Intermediat C5 und 13 mg (0.014 mmol) von Intermediat L11 hergestellt.

HPLC (Methode 11): R_t = 2.2 min;

LC-MS (Methode 1): R_t = 1.01 min; MS (ESIpos): m/z = 1117 $(M+H)^+$.

Intermediat F19

N^6-{(2S)-2-Amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}-N^2-[(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)acetyl]-L-lysin-trifluoressigsäure(1:1)



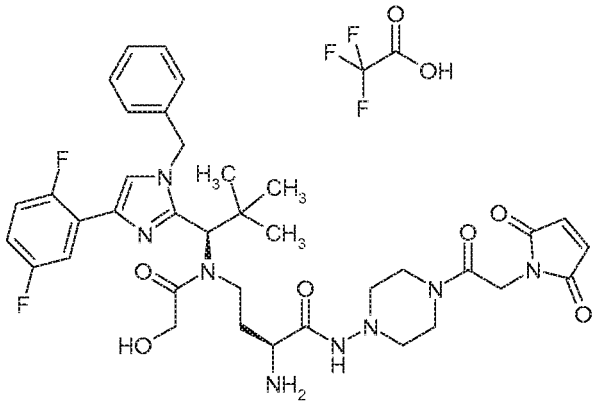
Die Titelverbindung wurde in Analogie zu Intermediat F2 durch Kupplung von 25 mg (0.041 mmol) Intermediat C5 mit 55 mg (0.122 mmol) von Intermediat L13 und anschließender Entschützung hergestellt.

HPLC (Methode 11): R_t = 1.84 min;

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.88 min; MS (ESIpos): m/z = 780 $(M+H)^+$.

Intermediat F20

Trifluoressigsäure--(2S)-2-amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]-N-{4-[(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)acetyl]piperazin-1-yl}butanamid(1:1)



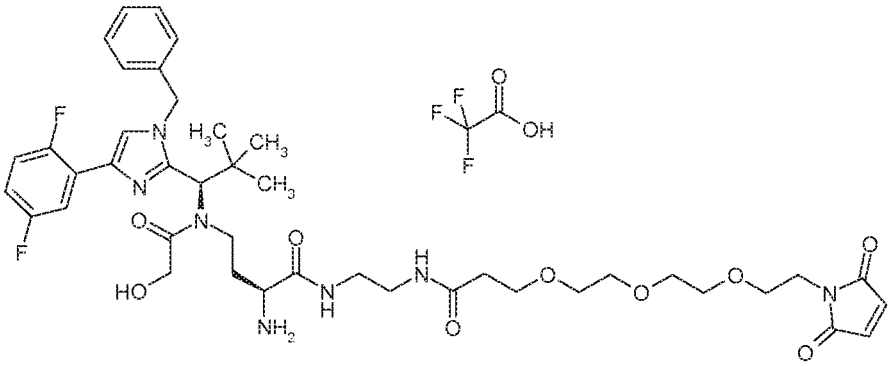
Die Titelverbindung wurde in Analogie zu Intermediat F2 durch Kupplung von 10 mg (0.015 mmol) Intermediat C5 mit 55 mg (0.122 mmol) von Intermediat L14 und anschließender Entschützung hergestellt.

HPLC (Methode 11): R_t = 1.9 min;

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.87 min; MS (ESIpos): m/z = 735 $(M+H)^+$.

Intermediat F21

Trifluoressigsäure--(2S)-2-amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]-N-[1-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-12-oxo-3,6,9-trioxa-13-azapentadecan-15-yl]butanamid(1:1)

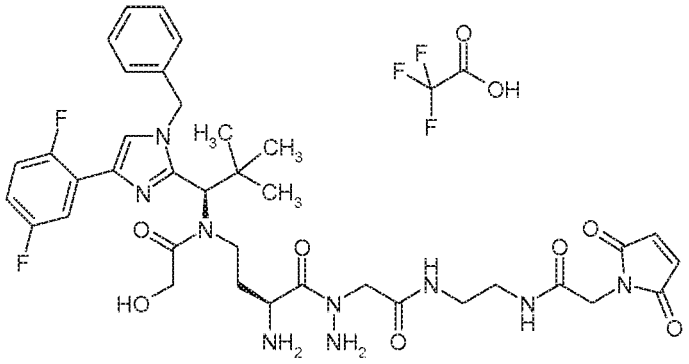


Die Titelverbindung wurde in Analogie zu Intermediat F2 durch Kupplung von 10 mg (0.015 mmol) Intermediat C5 mit 7 mg (0.015 mmol) von Intermediat L15 und anschließender Entschützung hergestellt.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.89 min; MS (ESIpos): m/z = 840 $(M+H)^+$.

Intermediat F22

Trifluoressigsäure--N-[(3S)-3-amino-4-(1-{2-[(2-{[(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)acetyl]amino}ethyl)amino]-2-oxoethyl}hydrazino)-4-oxobutyl]-N-{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-2-hydroxyacetamid(1:1)



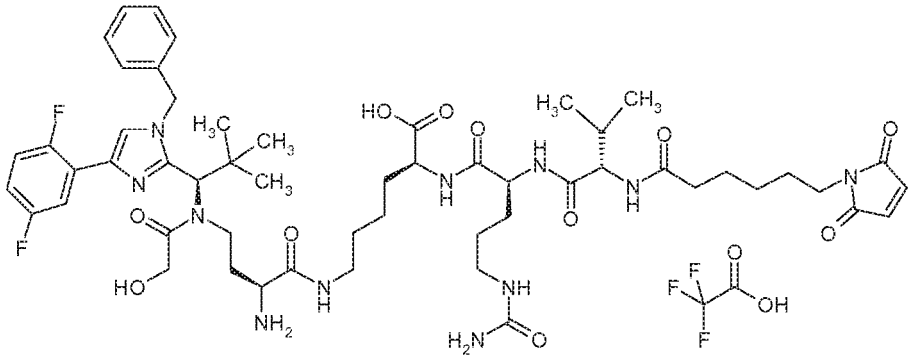
Die Titelverbindung wurde in Analogie zu Intermediat F9 durch Kupplung von 13.7 mg (0.017 mmol) Intermediat C7 mit 5.9 mg (0.017 mmol) von Intermediat L1 und anschließender Entschützung hergestellt.

HPLC (Methode 11): R_t = 2.3 min;

LC-MS (Methode 1): R_t = 1.2 min; MS (ESIpos): m/z = 866 $(M+H)^+$.

Intermediat F23

N-[6-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)hexanoyl]-L-valyl-N^5-carbamoyl-L-ornithyl-N^6-{(2S)-2-amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}-L-lysin-trifluoressigsäure(1:1)



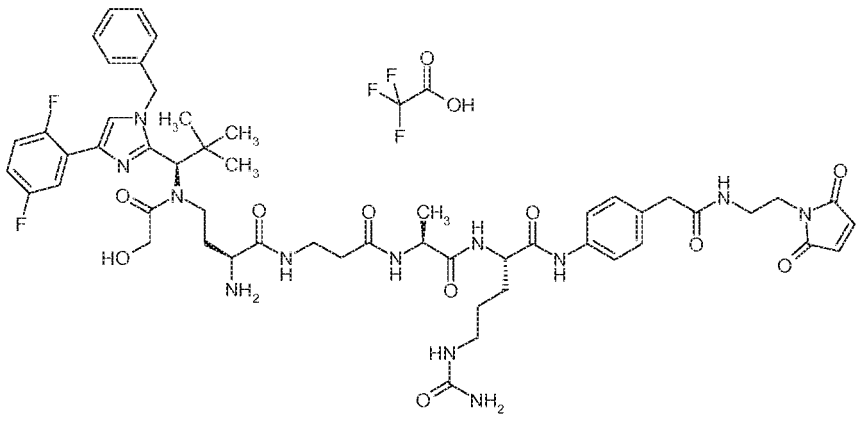
Die Titelverbindung wurde in Analogie zu Intermediat F2 durch Kupplung von 10 mg (0.016 mmol) Intermediat C5 mit 16.8 mg (0.016 mmol) von Intermediat L17 in Gegenwart von EDC/HOBT und *N,N*-Diisopropylethylamin und anschließender Entschützung hergestellt.

HPLC (Methode 11): R_t = 1.9 min;

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.9 min; MS (ESIpos): m/z = 1092 $(M+H)^+$.

Intermediat F24

Trifluoressigsäure--N-{(2S)-2-amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}-beta-alanyl-L-alanyl-N^5-carbamoyl-N-[4-(2-{[2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)ethyl]amino}-2-oxoethyl)phenyl]-L-ornithinamid(1:1)



Die Herstellung der Titelverbindung erfolgte in Analogie zu Intermediat F16:

Zunächst wurden 30 mg (0.046 mmol) Intermediat C3 in Analogie zu Intermediat F3 mit Intermediat L18 in Gegenwart von HATU gekuppelt (Ausbeute: 25 mg (47% d. Th.).

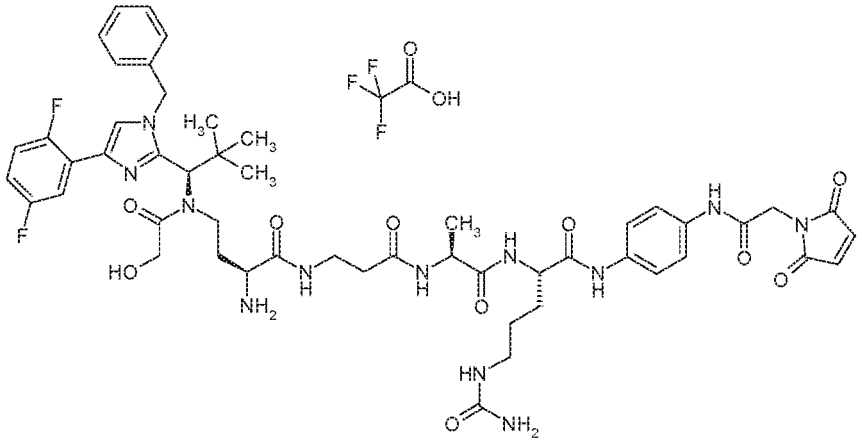
27 mg (0.024 mmol) von dieser Zwischenstufe wurden in 5 mL Methanol gelöst, mit 1mL einer 2M Lithiumhydroxidlösung versetzt und der Ansatz 30 min bei RT gerührt, wobei der Methylester sowie die Acetylgruppe gespalten wurden. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der Rückstand in Acetonitril/Wasse aufgenommen und der Ansatz dann mit TFA auf pH 2 gebracht. Dann wurde wiederum eingengt und nach Reinigung des Rückstands durch präparative HPLC wurden 15 mg (58%) der Carboxylverbindung erhalten.

Diese Zwischenstufe wurde dann in 3 mL DMF aufgenommen und mit 4.4 mg (0.017 mmol) von kommerziell erhältlichem Trifluoressigsäure--1-(2-aminoethyl)-1H-pyrrol-2,5-dion(1:1) in Gegenwart von 6.5 mg (0.017 mmol) HATU und 12µl *N,N*-Diisopropylethylamin gekuppelt. Nach Reinigung durch präparative HPLC wurden 12 mg (72% d.Th.) der geschützten Zwischenstufe erhalten. Diese wurden in 2 mL DCM aufgenommen und mit 1 mL TFA versetzt. Nach 30 min Rühren bei RT wurde eingeengt und aus Acetonitril/Wasser 1:1 lyophilisiert. Nach Trocknung des Rückstandes im Hochvakuum verblieben 11 mg (91%) der Titelverbindung.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.83 min; MS (ESIpos): m/z = 1069 $(M+H)^+$.

Intermediat F25

Trifluoressigsäure--N-{(2S)-2-amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}-beta-alanyl-L-alanyl-N^5-carbamoyl-N-(4-{[(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)acetyl]amino}phenyl)-L-ornithinamid(1:1)



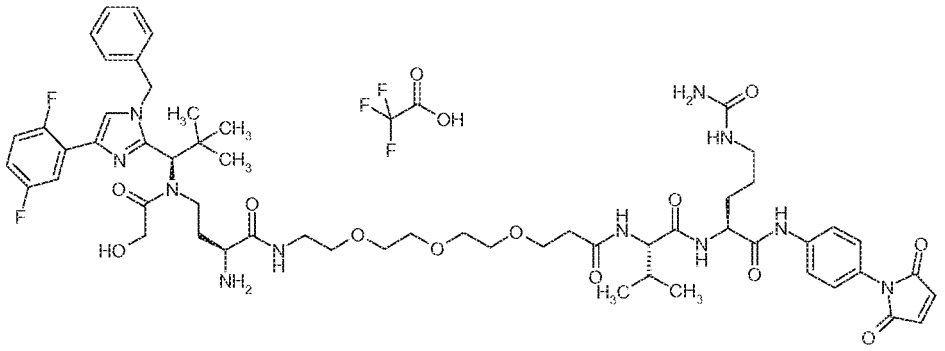
Dieses Intermediat wurde durch Kupplung von 9.6 mg (0.014 mmol) von Intermediat C8 mit10.8 mg (0.015 mmol) Intermediat L19 in Gegenwart von 6.4 mg (0.017 mmol) HATU und 72µl *N,N*-Diisopropylethylamin und anschließender Deblockierung mit TFA hergestellt. Es wurden 5 mg (31% d.Th. über 2 Stufen) der Titelverbindung erhalten.

HPLC (Methode 11): R_t = 1.8 min;

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.85 min; MS (ESIpos): m/z = 1041 $(M+H)^+$.

Intermediat F26

Trifluoressigsäure--N-{(15S,19R)-15-amino-19-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-18-glycoloyl-20,20-dimethyl-14-oxo-4,7,10-trioxa-13,18-diazahenicosan-1-oyl}-L-valyl-N^5-carbamoyl-N-[4-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)phenyl]-L-ornithinamid(1:1)



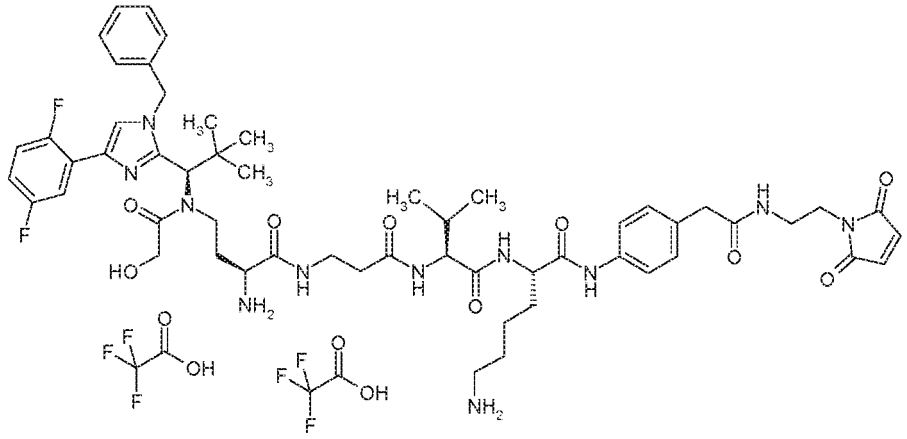
Dieses Intermediat wurde durch Kupplung von 16.4 mg (0.02 mmol) Intermediat C9 mit 11.2 mg (0.02 mmol) Intermediat L20 in Gegenwart von 8 mg (0.04 mmol) 1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethyl-carbodiimid-Hydrochlorid, 6 mg (0.04 mmol) 1-Hydroxy-1*H*-benzotriazol-Hydrat und 11 µl (0.06 mmol) *N,N*-Diisopropylethylamin und anschließender Deblockierung mit TFA hergestellt. Es wurden 10 mg (37% d.Th. über 2 Stufen) der Titelverbindung erhalten.

HPLC (Methode 11): R_t = 2.0 min;

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.91 min; MS (ESIpos): m/z = 1144 $(M+H)^+$.

Intermediat F27

Trifluoressigsäure--N-{(2S)-2-amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}-beta-alanyl-L-valyl-N-[4-(2-{[2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)ethyl]amino}-2-oxoethyl)phenyl]-L-lysinamid(2:1)



Dieses Intermediat wurde über 4 Stufen hergestellt:

Im ersten Schritt wurden 20 mg (0.028 mmol) von Intermediat C8 mit16.7 mg (0.031 mmol) Intermediat L21 in Gegenwart von 11 mg (0.057 mmol) 1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimid-Hydrochlorid, 8.7 mg (0.057 mmol) 1-Hydroxy-1*H*-benzotriazol-Hydrat und 15 µl (0.085 mmol) *N,N*-Diisopropylethylamin in 5 mL DMF gekuppelt. Nach 4 Tagen Rühren bei RT wurde der Ansatz eingengt und das Produkt durch präparative HPLC gereinigt. Ausbeute: 18 mg (54.5% d.Th.).

18 mg (0.016 mmol) von dieser Zwischenstufe wurden in 4 mL Methanol gelöst, mit 194 µl einer 2M Lithiumhydroxidlösung versetzt und der Ansatz über Nacht bei RT gerührt. Dann wurden nochmals 116 µl Lithiumhydroxidlösung nachgesetzt und der Ansatz weitere 4 h bei RT gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der Rückstand in Wasser aufgenommen und der Ansatz dann mit 5%-iger Citronensäure auf pH 5 gebracht. Es wurde zweimal mit Dichlormethan ausgeschüttelt und die organische Phase über Natriumsulfat getrocknet. Sie wurde dann filtriert, eingengt und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Es verblieben 10.5 mg (58%) der Carboxylverbindung erhalten.

10.5 mg (0.009 mmol) von dieser Zwischenstufe wurde dann in 4 mL DMF aufgenommen und mit 3 mg (0.012 mmol) von kommerziell erhältlichem Trifluoressigsäure--1-(2-aminoethyl)-1H-pyrrol-2,5-dion(1:1) in Gegenwart von 3.5 mg (0.018 mmol) 1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimid-Hydrochlorid, 2.8 mg (0.018 mmol) 1-Hydroxy-1*H*-benzotriazol-Hydrat und 6 µl *N,N*-Diisopropylethylamin gekuppelt. Nach Rühren über Nacht wurden nochmals die gleichen Mengen an Kupplungsreagenzien nachgesetzt und der Ansatz weitere 3 Tage bei RT gerührt. Anschließend wurde eingengt und das Produkt durch präparative HPLC gereinigt. Ausbeute: 6 mg (52% d. Th.).

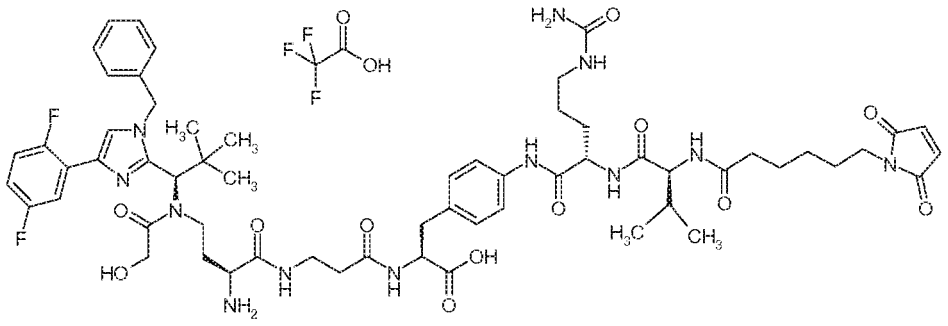
6 mg (0.005 mmol) dieses Intermediats wurden dann in 3 mL DCM mit 1 mL Trifluoressigsäure entschützt. Nach Lyophilisation aus Acetonitril/Wasser wurden 6 mg (83% d.Th.) der Titelverbindung erhalten.

HPLC (Methode 11): R_t = 1.84 min;

LC-MS (Methode 4): R_t = 0.93 min; MS (ESIpos): m/z = 1068 $(M+H)^+$.

Intermediat F28

N-{(2S)-2-Amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}-beta-alanyl-4-({N-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)hexanoyl]-L-valyl-N^5-carbamoyl-L-ornithyl}amino)-L-phenylalanin-trifluoressigsäure(1:1)



Dieses Intermediat wurde über 5 Stufen hergestellt:

Im ersten Schritt wurden 40 mg (0.058 mmol) von Intermediat C8 mit 46 mg (0.058 mmol) Intermediat L22 in Gegenwart von 44.3 mg (0.117 mmol) HATU und 30 µl *N,N*-Diisopropylethylamin gekuppelt. Nach 1 h Rühren bei RT wurde der Ansatz eingengt und das Produkt durch präparative HPLC gereinigt. Ausbeute: 53 mg (62.5% d.Th.).

Im nächsten Schritt wurde die Fmoc-Gruppe mit 0.6 mL Piperidin in 3 mL DMF abgespalten. Nach 1 h Rühren bei RT wurde der Ansatz eingengt und das Produkt durch präparative HPLC gereinigt. Ausbeute: 42 mg (82% d.Th.).

Zur Spaltung des Methylesters wurden 42 mg (0.033 mmol) von dieser Zwischenstufe in 2 mL THF und 1 mL Wasser gelöst, mit 330 µl einer 2M Lithiumhydroxidlösung versetzt und der Ansatz 1 h bei RT gerührt. Der Ansatz wurde dann mit TFA neutral gestellt, eingeengt und der Rückstand durch präparative HPLC gereinigt. Nach Trocknung im Hochvakuum verblieben 32 mg (78%) der Carboxylverbindung.

32 mg (0.026 mmol) dieses Intermediats wurden anschließend in 2.3 mL DMF mit 14.6 mg (0.047 mmol) von kommerziell erhältlichem 1-{6-[(2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl)oxy]-6-oxohexyl}-1H-pyrrol-2,5-dion in Gegenwart von 18 µl *N,N*-Diisopropylethylamin gekuppelt. Nach 4-stündiger Behandlung im Ultraschallbad wurde der Ansatz eingengt und das Produkt durch präparative HPLC gereinigt. Ausbeute: 20.4 mg (60% d.Th.).

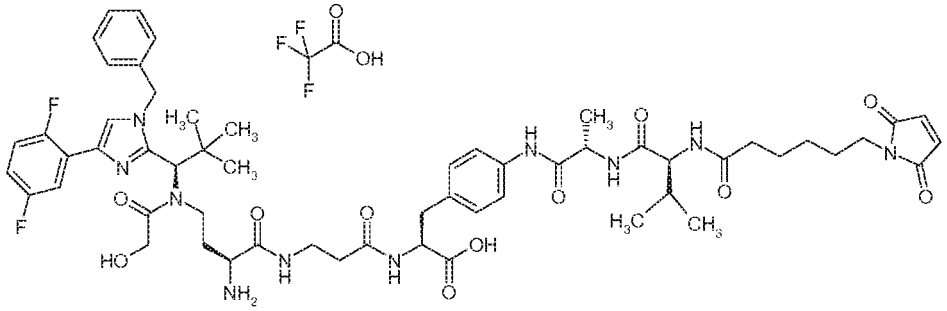
Im letzten Schritt wurden 20.4 mg (0.016 mmol) dieses Intermediats in DCM mit Trifluoressigsäure entschützt. Nach Lyophilisation aus Acetonitril/Wasser wurden 20 mg (85% d.Th.) der Titelverbindung erhalten.

HPLC (Methode 11): R_t = 1.9 min;

LC-MS (Methode 5): R_t = 2.84 min; MS (ESIpos): m/z = 1197 $(M+H)^+$.

Intermediat F29

N-{(2S)-2-Amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}-beta-alanyl-4-({N-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)hexanoyl]-L-valyl-L-alanyl}amino)-L-phenylalanin-trifluoressigsäure(1:1)



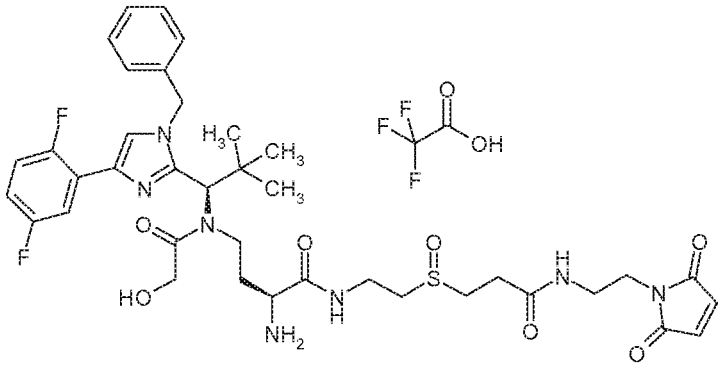
Die Herstellung der Titelverbindung erfolgte in Analogie zu Intermediat F28.

HPLC (Methode 11): R_t = 2.0 min;

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.92 min; MS (ESIpos): m/z = 1111 $(M+H)^+$.

Intermediat F30

Trifluoressigsäure--(2S)-2-amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]-N-{2-[(3-{[2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)ethyl]amino}-3-oxopropyl)sulfinyl]ethyl}butanamid(1:1)



Dieses Intermediat wurde über 4 Stufen hergestellt:

Im ersten Schritt wurden 37.5 mg (0.055 mmol) von Intermediat C3 mit 15 mg (0.066 mmol) von kommerziell erhältlichem Methyl-3-[(2-aminoethyl)sulfanyl]propanoathydrochlorid (1:1) in DMF in Gegenwart von 25 mg (0.066 mmol) HATU und 29 µl *N,N*-Diisopropylethylamin gekuppelt. Nach 15 min Rühren bei RT wurden nochmals die Kupplungsreagenzien nachgesetzt. Der Ansatz wurde

nochmals 15 min bei RT gerührt, anschließend eingengt und das Produkt durch präparative HPLC gereinigt. Ausbeute: 21 mg (48% d.Th.).

LC-MS (Methode 1): R_t = 1.41 min; MS (ESIpos): m/z = 802 $(M+H)^+$.

Zur Spaltung des Methylesters wurden 21 mg (0.026 mmol) von dieser Zwischenstufe in 5 mL Methanol gelöst, mit 655 µl einer 2M Lithiumhydroxidlösung versetzt und der Ansatz über Nacht bei RT gerührt. Dabei ist teilweise Oxidation am Schwefel eingetreten. Der Ansatz wurde eingeengt und der Rückstand in Wasser aufgenommen und dann mit Essigsäure auf pH 3 gebracht. Es wurde zweimal mit 50 mL Ethylacetat extrahiert und anschließend die organische Phase über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und eingeengt. Das nach Trocknung des Rückstandes im Hochvakuum erhaltene Gemisch wurde ohne weitere Reinigung in die nächste Stufe zur Kupplung mit 8.4 mg (0.033 mmol) von kommerziell erhältlichem Trifluoressigsäure--1-(2-aminoethyl)-1H-pyrrol-2,5-dion(1:1) in Gegenwart von 11.6 mg (0.031 mmol) HATU und 22 µl *N,N*-Diisopropylethylamin eingesetzt. Der Ansatz wurde 5 min bei RT gerührt und anschließend eingengt. Der Rückstand wurde in Ethylacetat aufgenommen und die Lösung mit 5%-iger Citronensäure und dann mit Wasser ausgeschüttelt. Anschließend wurde die organische Phase über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und eingeengt. Das nach Trocknung des Rückstandes im Hochvakuum erhaltene Gemisch wurde ohne weitere Reinigung in die nächste Stufe eingesetzt.

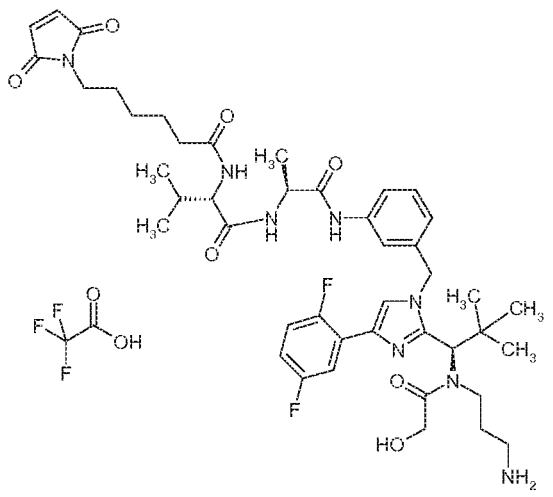
22 mg von diesem Rohmaterial wurden dann in 2 mL DCM gelöst und mit 0.5 mL Trifluoressigsäure entschützt. Nach 10 min Rühren bei RT wurde der Ansatz eingeengt und der Rückstand durch präparative HPLC gereinigt. Nach Trocknung im Hochvakuum wurden 2.1 mg der Titelverbindung erhalten.

HPLC (Methode 11): R_t = 1.8 min;

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.83 min; MS (ESIpos): m/z = 784 $(M+H)^+$.

Intermediat F31

Trifluoressigsäure--N-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)hexanoyl]-L-valyl-N-(3-{[2-{(1R)-1-[(3-aminopropyl)(glycoloyl)amino]-2,2-dimethylpropyl}-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-1-yl]methyl}phenyl)-L-alaninamid(1:1)



Dieses Intermediat wurde ausgehend von Intermediat C10 über 6 Stufen mit klassischen Methoden der Peptidchemie aufgebaut.

Im ersten Schritt wurden 42 mg (0.066 mmol) von Intermediat C10 mit 20.7 mg (0.066 mmol) von N-[(9H-Fluoren-9-ylmethoxy)carbonyl]-L-alanin in 5 mL DMF in Gegenwart von 100 mg (0.266 mmol) HATU und 46 µl *N,N*-Diisopropylethylamin gekuppelt. Der Ansatz wurde über Nacht bei RT gerührt und das Produkt durch präparative HPLC gereinigt. Es wurden 16 mg (27% d.Th.) der N-acylierten Verbindung sowie 9 mg (12% d.Th.) der N-, O- bis-acylierten Verbindung erhalten.

Die Entschützung der N-acylierten Verbindung wurde in DMF mit Piperidin durchgeführt. Die bis-acylierte Verbindung wurde in Ethanol sowohl mit Piperidin als auch mit einer wässrigen Lösung von Methylamin behandelt. In beiden Fällen entstand tert-Butyl-(3-{[(1R)-1-{1-[3-(L-alanylamino)benzyl]-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl}-2,2-dimethylpropyl](glycoloyl) amino}propyl)carbamat und nach Reinigung durch präparative HPLC wurden 13 mg in 95%iger Reinheit isoliert.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.95 min; MS (ESIpos): m/z = 657 $(M+H)^+$.

13 mg (0.019 mmol) dieses Intermediats wurden in 2 mL DMF mit 9.1 mg (0.021 mmol) 2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl-N-[(9H-fluoren-9-ylmethoxy)carbonyl]-L-valinat in Gegenwart von 7 µl *N,N*-Diisopropylethylamin gekuppelt. Nach 20h Rühren bei RT wurde eingeengt und der Rückstand durch präparative HPLC gereinigt. Nach Lyophilisation aus 1,4-1,4-Dioxan/Wasser verbleiben 10 mg (54% d.Th.).

Bei der dann folgenden Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe mit Piperidin in DMF wurden 9 mg (quant.) des partiell entschützten Intermediats erhalten.

9 mg (0.01 mmol) diese Intermediats wurden anschließend in 2 mL DMF mit 3.2 mg (0.01 mmol) von kommerziell erhältlichem 1-{6-[(2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl)oxy]-6-oxohexyl}-1H-pyrrol-2,5-dion in Gegenwart von 5 µl *N,N*-Diisopropylethylamin gekuppelt. Nach Rühren über Nacht bei RT wurde der

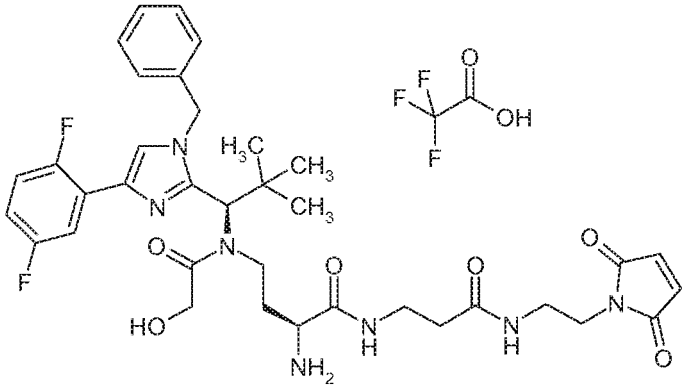
Ansatz eingengt und das Produkt durch präparative HPLC gereinigt. Nach Lyophilisation aus Acetonitril/Wasser und einigen Tropfen 1,4-Dioxanverblieben 3 mg (32% d.Th.), die im letzten Schritt in 2 mL DCM mit 0.5 mL Trifluoressigsäure entschützt wurden. Nach Lyophilisation aus Acetonitril/Wasser wurden 3.8 mg (quant.) der Titelverbindung erhalten.

HPLC (Methode 11): R_t = 1.9 min;

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.89 min; MS (ESIpos): m/z = 849 $(M+H)^+$.

Intermediat F32

Trifluoressigsäure--(2S)-2-amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]-N-(3-{[2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)ethyl]amino}-3-oxopropyl)butanamid(1:1)



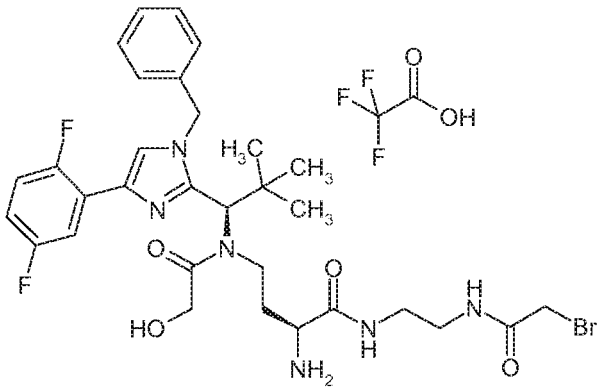
Dieses Intermediat wurde durch Kupplung von 15 mg (0.041 mmol) Intermediat C5 mit 16.8 mg (0.027 mmol) Intermediat L23 in Gegenwart von 10.5 mg (0.055 mmol) 1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethyl-carbodiimid-Hydrochlorid, 8.4 mg (0.055 mmol) 1-Hydroxy-1*H*-benzotriazol-Hydrat und 14 µl (0.08 mmol) *N,N*-Diisopropylethylamin und anschließender Deblockierung mit TFA hergestellt. Es wurden 3.4 mg (15% d.Th. über 2 Stufen) der Titelverbindung erhalten.

HPLC (Methode 11): R_t = 1.9 min;

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.85 min; MS (ESIpos): m/z = 708 $(M+H)^+$.

Intermediat F33

Trifluoressigsäure--(2S)-2-amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]-N-{2-[(bromacetyl)amino]ethyl}butanamid(1:1)



Die Synthese dieses Intermediats begann im ersten Schritt mit der Kupplung von 50 mg (0.075 mmol) Intermediat C3 mit 26.2 mg (0.082 mmol) 9H-Fluoren-9-ylmethyl-(2-aminoethyl)carbamathydrochlorid(1:1) in Gegenwart von 28.7 mg (0.15 mmol) 1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimid-Hydrochlorid, 22.9 mg (0.15 mmol) 1-Hydroxy-1*H*-benzotriazol-Hydrat und 39 µl *N,N*-Diisopropylethylamin. Nach 18 h Rühren bei RT wurde eingeengt und der Rückstand durch präparative HPLC gereinigt. 45 mg (65% d. Th.) dieser Zwischenstufe wurden erhalten.

LC-MS (Methode 1): R_t = 1.51 min; MS (ESIpos): m/z = 921 $(M+H)^+$.

45 mg (0.049 mmol) von dieser Zwischenstufe wurden in 10 mL Ethanol aufgenommen und mit 176µ mL einer 40%-igen Methanaminlösung in Wasser versetzt. Der Ansatz wurde bei 50°C gerührt wobei nach 6h und nach 9h jeweils die gleiche Menge an Methanaminlösung zugegeben wurden. Nach weiteren 14 h Rühren bei 50°C wurden nochmals 700 µl der Mathenaminlösung zugegeben und nach weiteren 20h Rühren schließlich eingeengt. Der Rückstand wurde in DCM aufgenommen und mit Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde eingeengt und der Rückstand durch präparative HPLC gereinigt. Nach Einengen der entsprechenden Fraktionen und Trocknung des Rückstandes im Hochvakuum wurden 32 mg (99% d.Th.) von tert-Butyl-{(2S)-1-[(2-aminoethyl)amino]-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]-1-oxobutan-2-yl}carbamat erhaltenen.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.95 min; MS (ESIpos): m/z = 657 $(M+H)^+$.

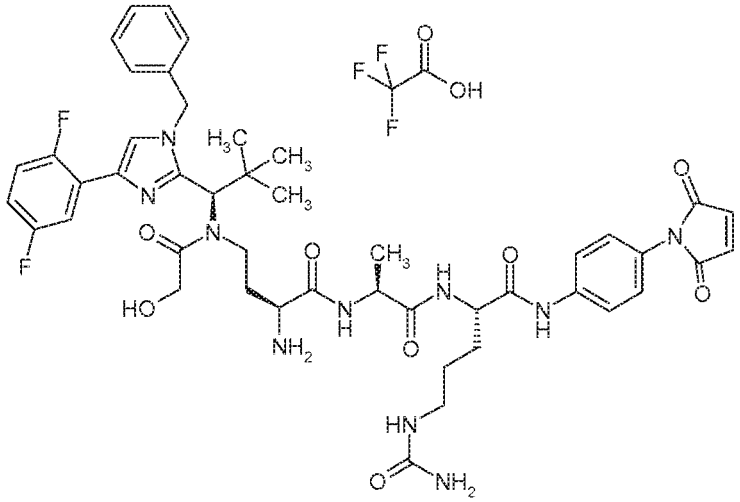
8.3 mg (0.013 mmol) dieser Zwischenstufe wurden in 4 mL Dichlormethan gelöst und mit 3.3 mg (0.013 mmol) Bromessigsäureanhydrid sowie 2 µl *N,N*-Diisopropylethylamin versetzt. Nach 1 h Rühren bei RT wurde eingeengt und der Rückstand durch präparative HPLC gereinigt. Die entsprechenden Fraktionen wurden eingeengt und der Rückstand aus Acetonitril/Wasser lyophilisiert. Er wurde in 1 mL Dichlormethan aufgenommen und mit 0.5 mL Trifluoressigsäure entschützt. Nach Einengen und Lyophilisation aus Acetonitril/Wasser wurden 1.1 mg (9% d.Th. über 2 Stufen) der Titelverbindung erhalten.

HPLC (Methode 11): R_t = 1.9 min;

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.88 min; MS (ESIpos): m/z = 677/679 $(M+H)^+$.

Intermediat F34

Trifluoressigsäure--N-{(2S)-2-amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}-L-alanyl-N^5-carbamoyl-N-[4-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)phenyl]-L-ornithinamid(1:1)



Dieses Intermediat wurde durch Kupplung von 14 mg (0.022 mmol) Intermediat C5 mit 12.7 mg (0.024 mmol) Intermediat L8 in Gegenwart von 9.9 mg (0.026 mmol) HATU und 19 µl *N,N*-Diisopropylethylamin gekuppelt. Der Ansatz wurde 30 min bei RT gerührt und das Produkt durch präparative HPLC gereinigt und anschließend aus Acetonitri/Wasser lyophilisiert.

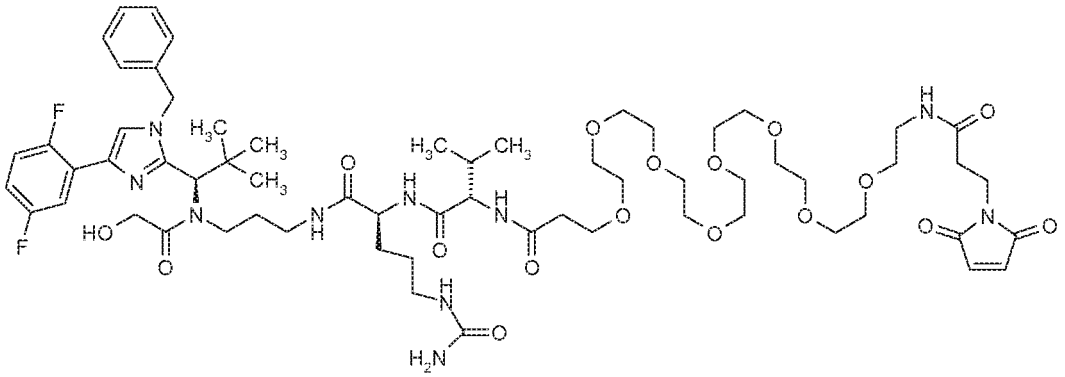
Das erhaltene Intermediat wurde in 3 mL Dichlormethan aufgenommen und mit 1 mL Trifluoressigsäure deblockiert. Nach 30 min Rühren bei RT wurde der Ansatz eingeengt und der Rückstand aus Acetonitril/Wasser lyophilisiert. Es wurden 8.2 mg (36% d.Th. über 2 Stufen) der Titelverbindung erhalten.

HPLC (Methode 11): R_t = 1.8 min;

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.87 min; MS (ESIpos): m/z = 913 $(M+H)^+$.

Intermediat F35

N-[31-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-29-oxo-4,7,10,13,16,19,22,25-octaoxa-28-azahentriacontan-1-oyl]-L-valyl-N-{3-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]propyl}-N5-carbamoyl-L-ornithinamid

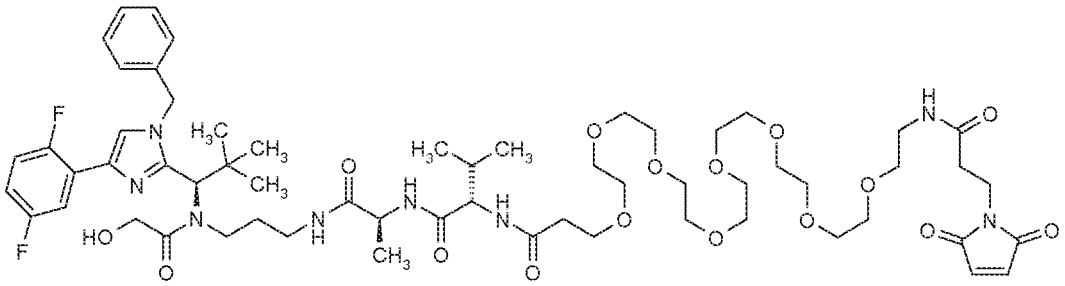


Unter Argon wurden bei 0 °C 31.8 mg (0.07 mmol) N-(3-Aminopropyl)-N-{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-2-hydroxyacetamid (Intermediat C40) in 4.0 mL DMF mit 57.3 mg (0.07 mmol) N-[31-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-29-oxo-4,7,10,13,16,19,22,25-octaoxa-28-azahentriacontan-1-oyl]-L-valyl-N5-carbamoyl-L-ornithin (Intermediat L38), 9.2 mg (0.07 mmol) HOAt und 32 mg (0.08 mmol) HATU versetzt. Dann wurden 23.5 µL (0.14 mmol) N,N-Diisopropylethylamin zugegeben und über Nacht bei RT nachgerührt. Die Reaktionsmischung wurde mit 7.7 µL HOAc versetzt und direkt über die präp. RP-HPLC gereinigt (Säule: Reprosil 250x30; 10µ, Fluss: 50 mL/min, MeCN/Wasser). Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 33.4 mg (38 % d. Th.) der Titelverbindung.

LC-MS (Methode 1): R_t = 1.12 min; MS (ESIpos): m/z = 651 $[M+2H]^{2+}$.

Intermediat F36

N-[31-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-29-oxo-4,7,10,13,16,19,22,25-octaoxa-28-azahentriacontan-1-oyl]-L-valyl-N-{3-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]propyl}-L-alaninamid



Die Synthese der Titelverbindung erfolgte in Analogie zur Herstellung von Intermediat F35.

15.4 mg (0.03 mmol) N-(3-Aminopropyl)-N-{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-2-hydroxyacetamid (Intermediat C40).

25.0 mg (0.03 mmol) N-[31-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-29-oxo-4,7,10,13,16,19,22,25-octaoxa-28-azahentriacontan-1-oyl]-L-valyl-L-alanin (Intermediat L25).

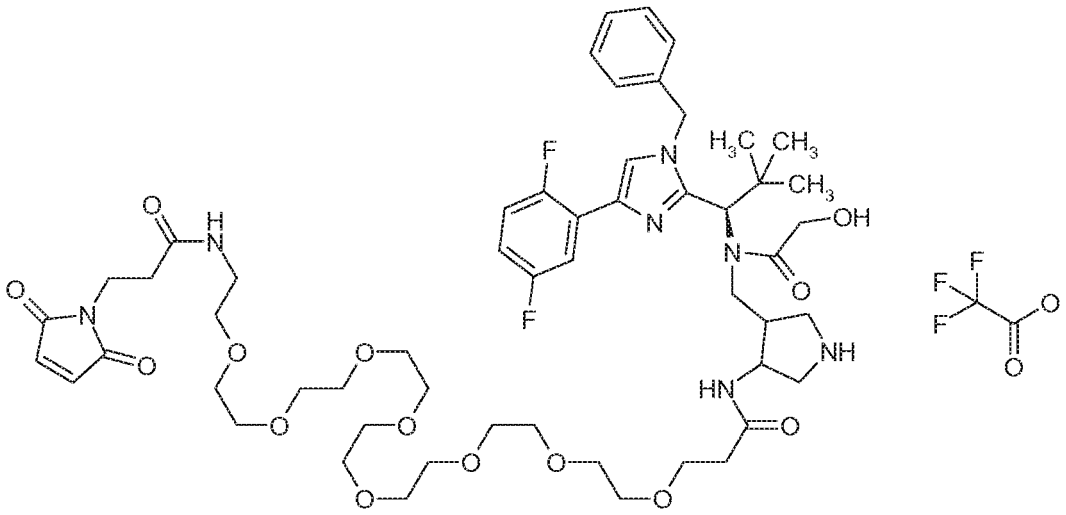
Man erhielt 10.7 mg (27 % d. Th.) der Titelverbindung.

LC-MS (Methode 1): R_t = 1.13 min; MS (ESIpos): m/z = 1215 $[M+H]^+$.

Intermediat F37

Trifluoressigsäure--N-(4-{[{(1R)-1-[1-Benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]methyl}pyrrolidin-3-yl)-31-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-29-oxo-4,7,10,13,16,19,22,25-octaoxa-28-azahentriacontan-1-amid(1:1)

Mischung aus Diastereomeren.



Die Verbindung tert-Butyl-3-{[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]methyl}-4-{[31-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-29-oxo-4,7,10,13,16,19,22,25-octaoxa-28-azahentriacontan-1-oyl]amino}pyrrolidin-1-carboxylat wurde in Analogie zur Synthese von Intermediat C21 hergestellt.

8.0 (0.01 mmol) bzw. 13.0 mg (0.02 mmol) tert-Butyl-3-amino-4-{[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]methyl}pyrrolidin-1-carboxylat (Intermediat C23).

9.0 mg (0.01 mmol) bzw. 14.7 mg (0.02 mmol) 3-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-N-{27-[(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)oxy]-27-oxo-3,6,9,12,15,18,21,24-octaoxaheptacos-1-yl}propanamid.

Ausbeute (beide Ansätze vereinigt):

10.5 mg (42 %) Diastereomer 1

11.6 mg (46 %) Diastereomer 2

Die Titelverbindung wurde in Analogie zur Synthese von Intermediat F38 hergestellt.

10.5 mg (0.01 mmol) tert-Butyl-3-{[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]methyl}-4-{[31-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-29-oxo-4,7,10,13,16,19,22,25-octaoxa-28-azahentriacontan-1-oyl]amino}pyrrolidin-1-carboxylat (Diastereomer 1)

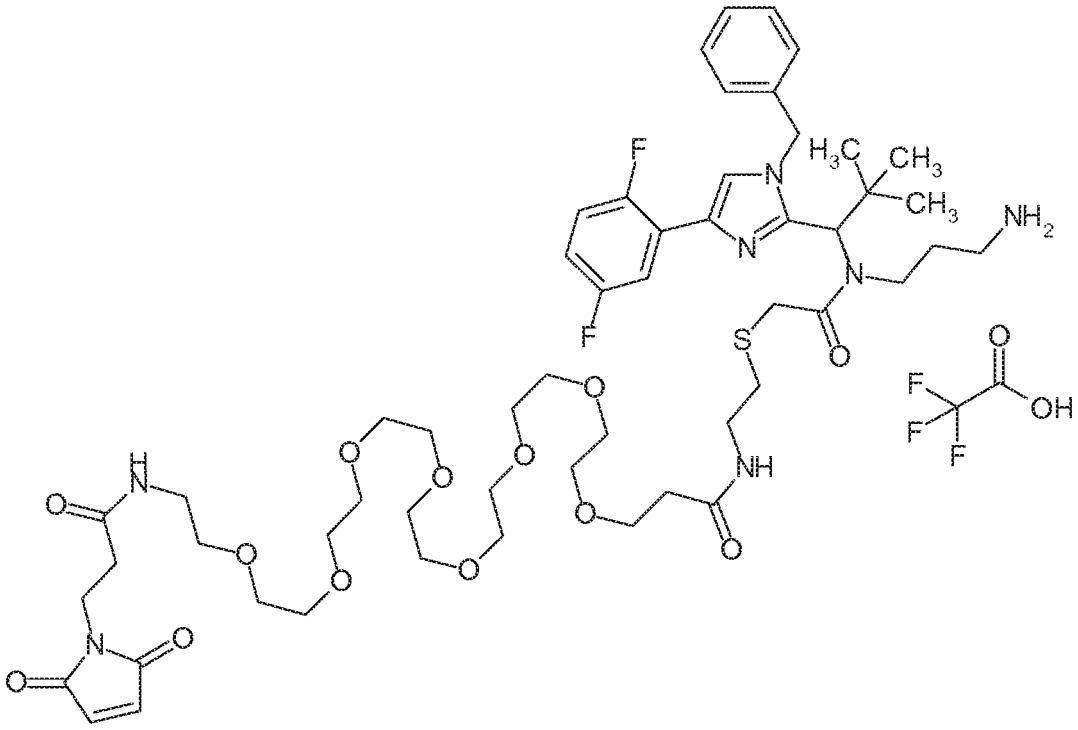
60.6 mg (0.54 mmol) TFA.

Man erhielt 7.4 mg (70 % d. Th.) der Titelverbindung.

LC-MS (Methode 1): R_t = 1.09 min; MS (ESIpos): m/z = 1086 $[M+H]^+$.

Intermediat F38

Trifluoressigsäure--N-(3-Aminopropyl)-N-{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-37-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-7,35-dioxo-10,13,16,19,22,25,28,31-octaoxa-3-thia-6,34-diazaheptatriacontan-1-amid(1:1)



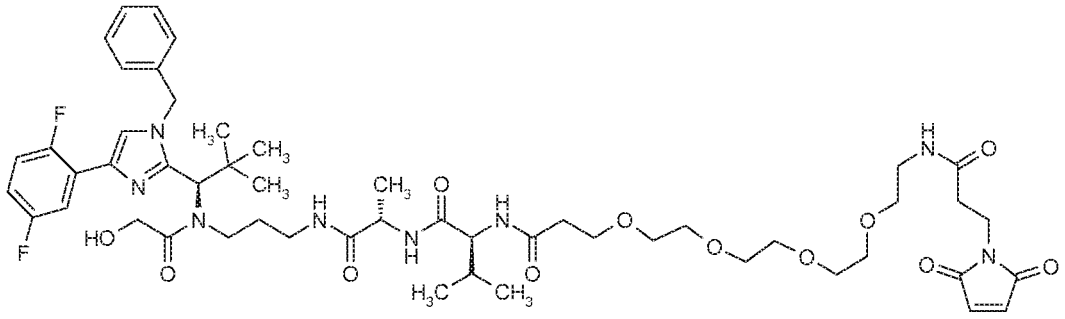
24.8 mg (0.02 mmol) tert-Butyl-[38-{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-1-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-3,31,37-trioxo-7,10,13,16,19,22,25,28-

octaoxa-35-thia-4,32,38-triazahentetracontan-41-yl]carbamat (Intermediat C21) wurden in 1.0 mL Dichlormethan vorgelegt und mit 85.8 mg (0.75 mmol) TFA versetzt. Es wurde 16 h bei RT gerührt. Das Lösemittel wurde im Vakuum verdampft und der Rückstand wurde direkt über die präp. RP-HPLC gereinigt (Säule: Reprosil 250x30; 10µ, Fluss: 50 mL/min, MeCN/Wasser, 0.1 % TFA). Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 23.0 mg (95 % d. Th.) der Titelverbindung.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.96 min; MS (ESIpos): m/z = 1104 $[M+H]^+$.

Intermediat F39

N-[19-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-17-oxo-4,7,10,13-tetraoxa-16-azanonadecan-1-oyl]-L-valyl-N-{3-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]propyl}-L-alaninamid



Die Titelverbindung wurde in Analogie zur Synthese von Intermediat F35 hergestellt.

56.1 mg (0.10 mmol) N-[19-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-17-oxo-4,7,10,13-tetraoxa-16-azanonadecan-1-oyl]-L-valyl-L-alanin (Intermediat L44).

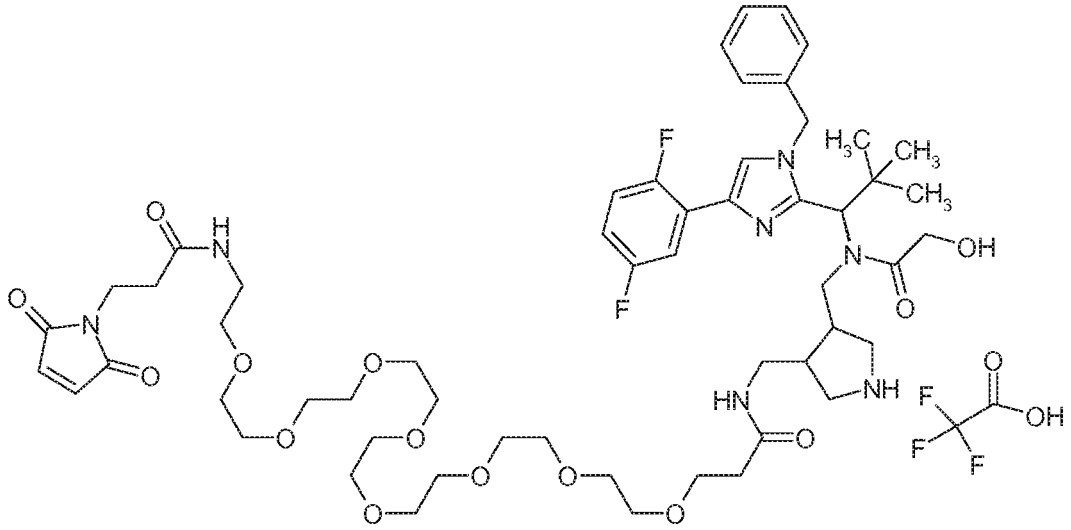
45.0 mg (0.10 mmol) N-(3-Aminopropyl)-N-{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-2-hydroxyacetamid (Intermediat C40).

Man erhielt 20.9 mg (21 % d. Th.) der Titelverbindung.

LC-MS (Methode 1): R_t = 1.16 min; MS (ESIpos): m/z = 1040 $[M+H]^+$.

Intermediat F40

Trifluoressigsäure--N-[(4-{[{(1R)-1-[1-Benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]methyl}pyrrolidin-3-yl)methyl]-31-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-29-oxo-4,7,10,13,16,19,22,25-octaoxa-28-azahentriacontan-1-amid(1:1)



tert-Butyl-3-{[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]methyl}-4-[33-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-3,31-dioxo-6,9,12,15,18,21,24,27-octaoxa-2,30-diazatritriacont-1-yl]pyrrolidin-1-carboxylat wurde in Analogie zur Synthese von Intermediat C21 hergestellt.

25.0 mg (0.04 mmol) Trifluoressigsäure--tert-Butyl-3-(aminomethyl)-4-{[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]methyl}pyrrolidin-1-carboxylat(1:1) (Intermediat C24).

27.6 mg (0.04 mmol) 3-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-N-{27-[(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)oxy]-27-oxo-3,6,9,12,15,18,21,24-octaoxaheptacos-1-yl}propanamid.

Ausbeute: 20.6 mg (39 % d. Th.)

LC-MS (Methode 1): R_t = 1.23 min; MS (ESIpos): m/z = 1200 $[M+H]^+$.

Die Titelverbindung wurde in Analogie zur Synthese von Intermediat F37 hergestellt.

26.1 mg (0.02 mmol) (tert-Butyl-3-{[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]methyl}-4-[33-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-3,31-dioxo-6,9,12,15,18,21,24,27-octaoxa-2,30-diazatritriacont-1-yl]pyrrolidin-1-carboxylat.

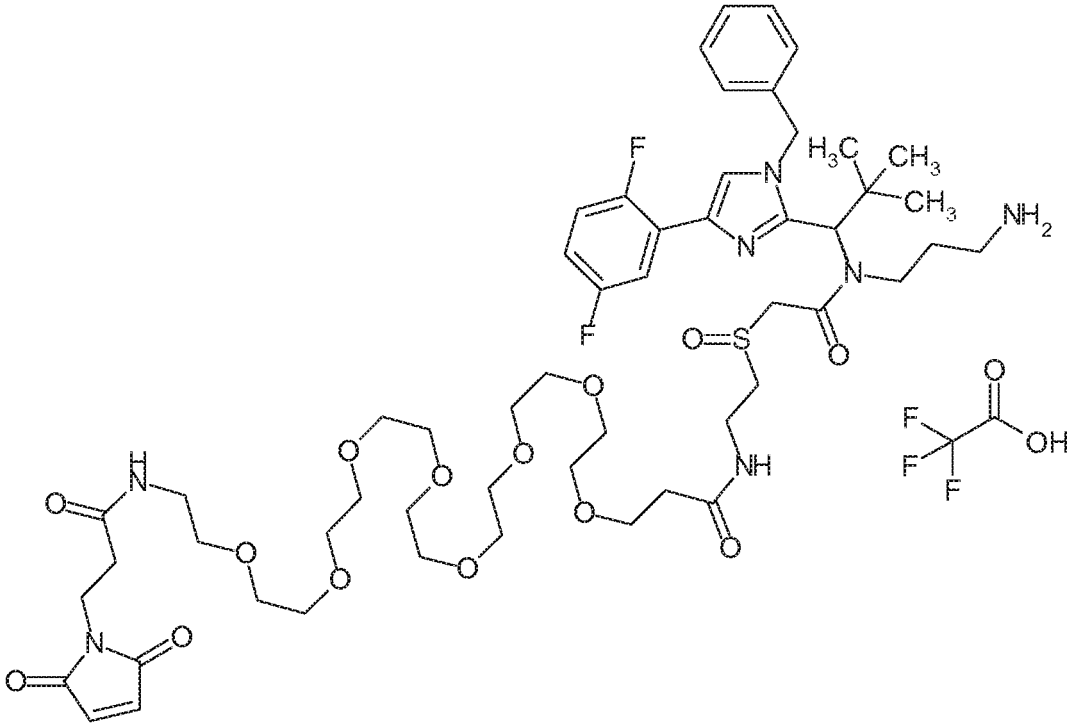
90.6 mg (0.80 mmol) TFA.

Man erhielt von der Titelverbindung 22.9 mg (95 % d. Th.).

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.91 und 0.92 min; MS (ESIpos): m/z = 1100 $[M+H]^+$.

Intermediat F41

Trifluoressigsäure--N-(3-Aminopropyl)-N-{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-37-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-7,35-dioxo-10,13,16,19,22,25,28,31-octaoxa-3-thia-6,34-diazaheptatriacontan-1-amid-3-oxid(1:1)

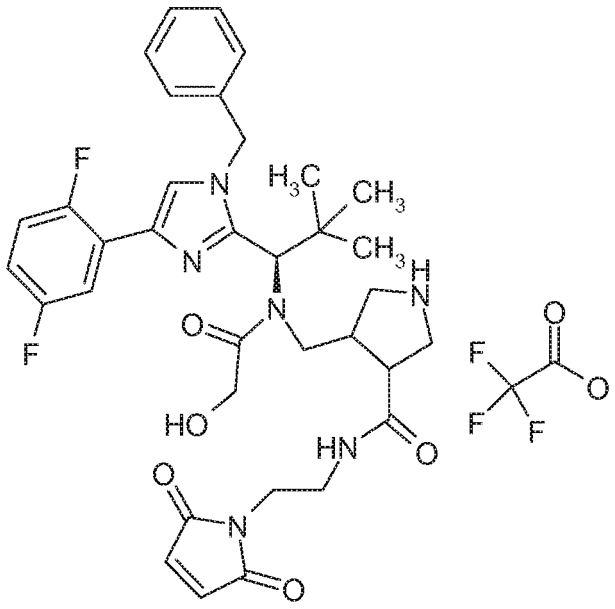


Die Titelverbindung wurde in Analogie zu Intermediat F38 aus 15.5 mg (0.01 mmol) Intermediat C22 hergestellt. Man erhielt 4.0 mg (27 % d. Th.) der Titelverbindung.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.90 min; MS (ESIpos): m/z = 1120 $[M+H]^+$.

Intermediat F42

Trifluoressigsäure--4-{[{(1R)-1-[1-Benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]methyl}-N-[2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)ethyl]pyrrolidin-3-carboxamid(1:1)



40.5 mg (0.06 mmol) 4-{[{(1R)-1-[1-Benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl} (glycoloyl)amino]methyl}-1-(tert-butoxycarbonyl)pyrrolidin-3-carbonsäure (Intermediat C25) und 14.5 mg (0.08 mmol) 1-(2-Aminoethyl)-1H-pyrrol-2,5-dionhydrochlorid(1:1) wurden in 1.0 mL Acetonitril vorgelegt und mit 64.4 mg (0.51 mmol) N,N-Diisopropylethylamin und 50.0 mg (0.08 mmol) T3P versetzt und 16 h bei RT gerührt. Es wurden nochmals die gleichen Mengen an 1-(2-Aminoethyl)-1H-pyrrol-2,5-dionhydrochlorid(1:1), N,N-Diisopropylethylamin und T3P zugegeben und weitere 4 h bei RT gerührt. Die Reaktionsmischung wurde direkt über die präp. RP-HPLC gereinigt (Säule: Reprosil 125x30; 10µ, Fluss: 50 mL/min, MeCN/Wasser). Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 7.2 mg (15 % d. Th.) der Verbindung tert-Butyl-3-{[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]methyl}-4-{[2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)ethyl]carbamoyl}pyrrolidin-1-carboxylat.

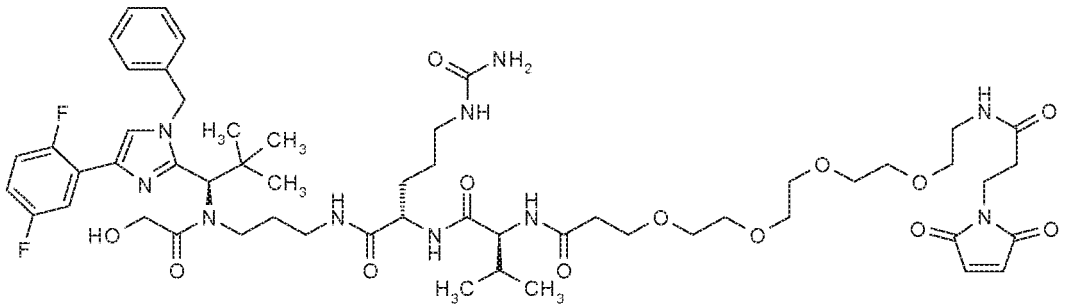
LC-MS (Methode 1): R_t = 1.30 min; MS (ESIpos): m/z = 763 $[M+H]^+$.

7.2 mg (0.01 mmol) tert-Butyl-3-{[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]methyl}-4-{[2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)ethyl]carbamoyl}pyrrolidin-1-carboxylat wurden in 1.0 mL Dichlormethan vorgelegt und mit 43.0 mg (0.38 mmol) TFA versetzt. Die Reaktionsmischung wurde 16 h bei RT gerührt. Das Lösemittel wurde im Vakuum verdampft und der Rückstand über die präp. RP-HPLC gereinigt (Säule: Reprosil 125x30; 10µ, Fluss: 50 mL/min, MeCN/Wasser, 0.1 % TFA). Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 4.5 mg (50 % d. Th.) der Titelverbindung.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.92 min; MS (ESIpos): m/z = 663 $[M+H]^+$.

Intermediat F43

N-[19-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-17-oxo-4,7,10,13-tetraoxa-16-azanonadecan-1-oyl]-L-valyl-N-{3-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphBeiDirenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]propyl}-N5-carbamoyl-L-ornithinamid

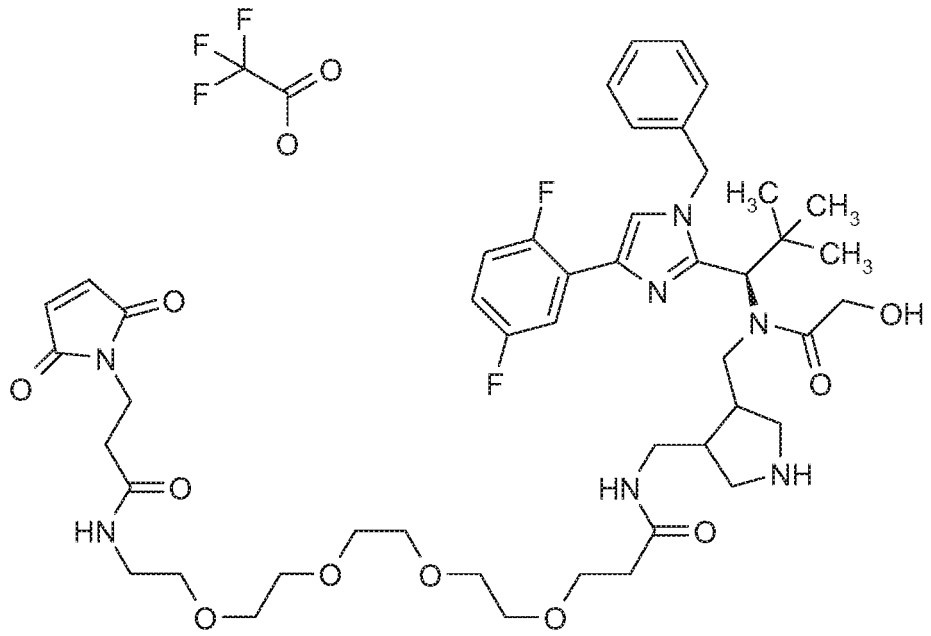


22.4 mg (0.03 mmol) N-[19-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-17-oxo-4,7,10,13-tetraoxa-16-azanonadecan-1-oyl]-L-valyl-N5-carbamoyl-L-ornithin (Intermediat L42) wurden in 2.0 mL DMF gelöst und mit 4.5 mg (0.03 mmol) HOAt, 15.8 mg (0.04 mmol) HATU und 15.7 mg (0.03 mmol) N-(3-Aminopropyl)-N-{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-2-hydroxyacetamid (Intermediat C40) versetzt. 8.6 mg (0.07 mmol) N,N-Diisopropylethylamin wurden hinzugefügt und die Reaktionsmischung rührte über Nacht bei RT. Die Reaktionsmischung wurde direkt über die präp. RP-HPLC gereinigt (Säule: Reprosil 250x30; 10µ, Fluss: 50 mL/min, MeCN/Wasser). Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 16.7 mg (45 % d. Th.) der Titelverbindung.

LC-MS (Methode 4): R_t = 1.34 min; MS (ESIpos): m/z = 1125 $[M+H]^+$.

Intermediat F44

Trifluoressigsäure--N-[(4-{[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]methyl}pyrrolidin-3-yl)methyl]-19-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-17-oxo-4,7,10,13-tetraoxa-16-azanonadecan-1-amid(1:1)



Die Titelverbindung wurde in Analogie zur Synthese von Intermediat F40 hergestellt.

25.0 mg (0.04 mmol) Trifluoressigsäure--tert-Butyl-3-(aminomethyl)-4-{[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]methyl}pyrrolidin-1-carboxylat(1:1) (Intermediat C24).

20.5 mg (0.04 mmol) 3-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-N-{15-[(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)oxy]-15-oxo-3,6,9,12-tetraoxapentadec-1-yl}propanamid.

Man erhielt 21.8 mg (48 % d. Th.) der Verbindung tert-Butyl-3-{[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]methyl}-4-[21-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-3,19-dioxo-6,9,12,15-tetraoxa-2,18-diazahenicos-1-yl]pyrrolidin-1-carboxylat.

LC-MS (Methode 1): R_t = 1.22 min; MS (ESIpos): m/z = 1025 $[M+H]^+$.

21.0 mg (0.02 mmol) tert-Butyl-3-{[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]methyl}-4-[21-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-3,19-dioxo-6,9,12,15-tetraoxa-2,18-diazahenicos-1-yl]pyrrolidin-1-carboxylat.

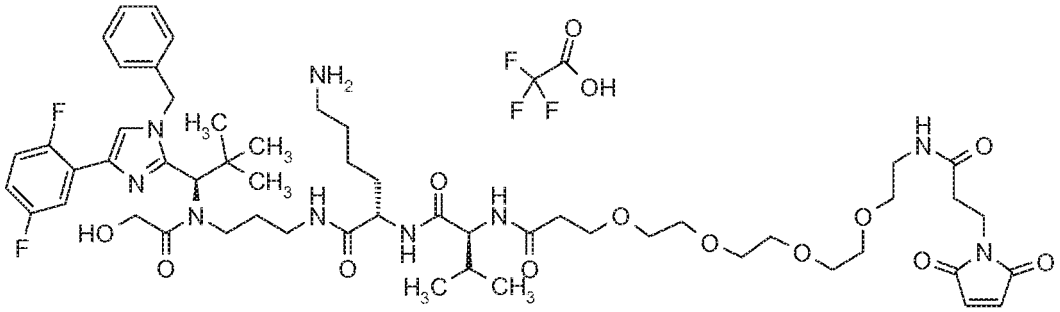
168.3 mg (1.48 mmol) TFA.

Man erhielt 17.3 mg (90 % d. Th.) der Titelverbindung.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.92 und 0.94 min; MS (ESIpos): m/z = 924 $[M+H]^+$.

Intermediat F45

Trifluoressigsäure--N-[19-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-17-oxo-4,7,10,13-tetraoxa-16-azanonadecan-1-oyl]-L-valyl-N-{3-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]propyl}-L-lysinamid (1:1)



Die Synthese erfolgte in Analogie zur Synthese von Intermediat F46.

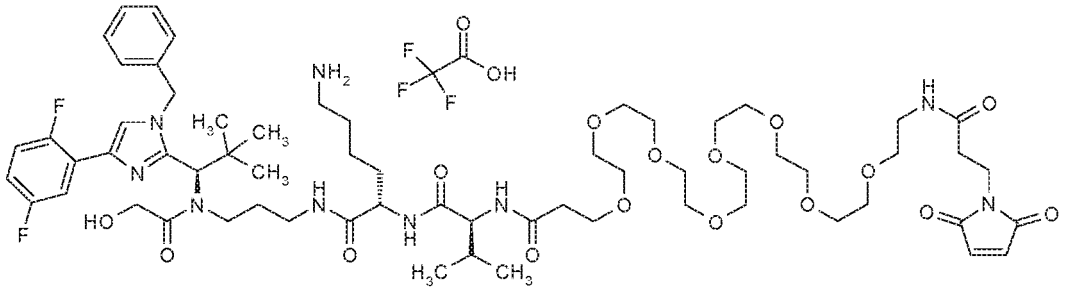
22.9 mg (0.05 mmol) N-(3-Aminopropyl)-N-{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-2-hydroxyacetamid (Intermediat C40).
36.2 mg (0.05 mmol) N-[19-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-17-oxo-4,7,10,13-tetraoxa-16-azanonadecan-1-oyl]-L-valyl-N6-(tert-butoxycarbonyl)-L-lysin (Intermediat L41).
Man erhielt 19.8 mg (34 %) der Verbindung N-[19-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-17-oxo-4,7,10,13-tetraoxa-16-azanonadecan-1-oyl]-L-valyl-N-{3-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]propyl}-N6-(tert-butoxycarbonyl)-L-lysinamid.
LC-MS (Methode 1): R_t = 1.20 min; MS (ESIpos): m/z = 1196 $[M+H]^+$.

17.0 mg (0.01 mmol) N-[19-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-17-oxo-4,7,10,13-tetraoxa-16-azanonadecan-1-oyl]-L-valyl-N-{3-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]propyl}-N6-(tert-butoxycarbonyl)-L-lysinamid.

Man erhielt 13.6 mg (79% d. Th.) der Titelverbindung.
LC-MS (Methode 1): R_t = 0.94 min; MS (ESIpos): m/z = 1096 $[M+H]^+$.

Intermediat F46

Trifluoressigsäure--N-[31-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-29-oxo-4,7,10,13,16,19,22,25-octaoxa-28-azahentriacontan-1-oyl]-L-valyl-N-{3-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]propyl}-L-lysinamid (1:1)



Unter Argon wurden bei 0 °C 25.1 mg (0.05 mmol) N-(3-Aminopropyl)-N-{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-2-hydroxyacetamid (Intermediat C40) in 2.0 mL DMF mit 49.0 mg (0.05 mmol) N-[31-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-29-oxo-4,7,10,13,16,19,22,25-octaoxa-28-azahentriacontan-1-oyl]-L-valyl-N6-(tert-butoxycarbonyl)-L-lysin (Intermediat L40), 7.3 mg (0.05 mmol) HOAt und 25.3 mg (0.07 mmol) HATU versetzt. Dann wurden 18.6 µL (0.11 mmol) N,N-Diisopropylethylamin zugegeben und über Nacht bei RT nachgerührt. Die Reaktionsmischung wurde direkt über die präp. RP-HPLC gereinigt (Säule: Reprosil 250x30; 10µ, Fluss: 50 mL/min, MeCN/Wasser). Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 29.2 mg (37 % d. Th.) der Verbindung N-[31-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-29-oxo-4,7,10,13,16,19,22,25-octaoxa-28-azahentriacontan-1-oyl]-L-valyl-N-{3-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]propyl}-N6-(tert-butoxycarbonyl)-L-lysinamid.

LC-MS (Methode 4): R_t = 1.51 min; MS (ESIpos): m/z = 1372 $[M+H]^+$.

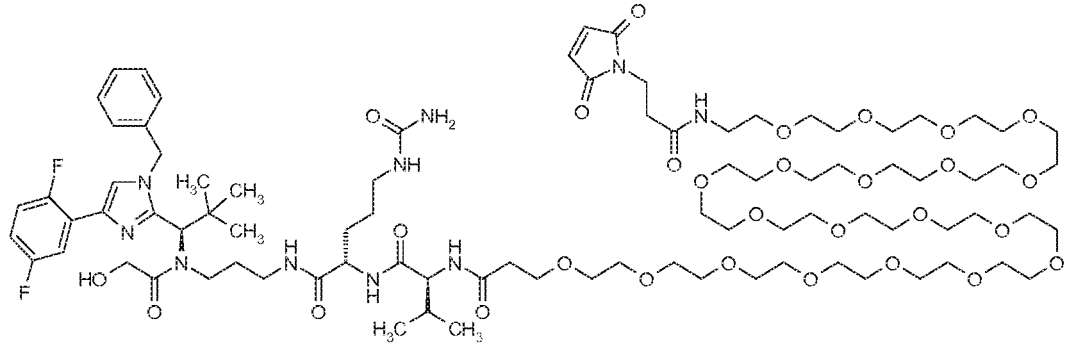
25.2 mg (0.02 mmol) N-[31-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-29-oxo-4,7,10,13,16,19,22,25-octaoxa-28-azahentriacontan-1-oyl]-L-valyl-N-{3-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]propyl}-N6-(tert-butoxycarbonyl)-L-lysinamid wurden in 3.0 mL Dichlormethan vorgelegt und mit 83.7 mg (0.73 mmol) TFA versetzt. Die Reaktionslösung wurde 48 h bei RT gerührt. Das Lösemittel wurde im Vakuum verdampft und über die präp. RP-HPLC gereinigt (Säule: Reprosil 250x30; 10µ, Fluss: 50 mL/min, MeCN/Wasser, 0.1 % TFA). Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 24.5 mg (96 % d. Th.) der Titelverbindung.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.95 min; MS (ESIpos): m/z = 1272 $[M+H]^+$.

Intermediat F47

N-[67-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-65-oxo-4,7,10,13,16,19,22,25,28,31,34,37,40,43,46,49,52,55,58,61-icosaoxa-64-azaheptahexacontan-1-oyl]-L-

valyl-N-{3-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]propyl}-N5-carbamoyl-L-ornithinamid

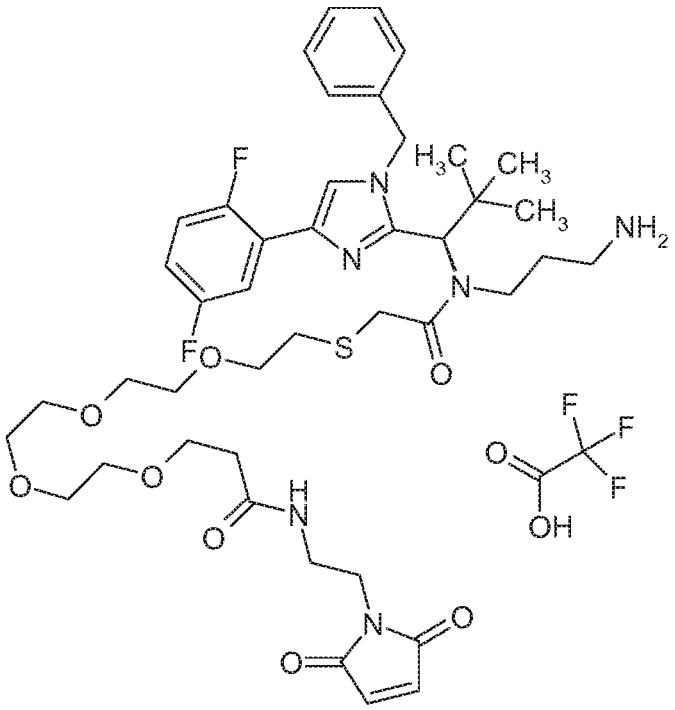


15.2 mg (0.01 mmol) N-[67-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-65-oxo-4,7,10,13,16,19,22,25,28,31,34,37,40,43,46,49,52,55,58,61-icosaoxa-64-azaheptahexacontan-1-oyl]-L-valyl-N5-carbamoyl-L-ornithin (Intermediat L43) wurden in 1.0 mL DMF gelöst und mit 1.5 mg (0.01 mmol) HOAt, 5.2 mg (0.01 mmol) HATU und 5.2 mg (0.01 mmol) N-(3-Aminopropyl)-N-{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-2-hydroxyacetamid (Intermediat C40) versetzt. 2.9 mg (0.02 mmol) N,N-Diisopropylethylamin wurden hinzugefügt und die Reaktionsmischung rührte über Nacht bei RT. Die Reaktionsmischung wurde direkt über die präp. RP-HPLC gereinigt (Säule: Reprosil 250x30; 10µ, Fluss: 50 mL/min, MeCN/Wasser). Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 6.8 mg (33 % d. Th.) der Titelverbindung.

LC-MS (Methode 4): R_t = 1.37 min; MS (ESIpos): m/z = 1831 $[M+H]^+$.

Intermediat F48

Trifluoressigsäure--N1-(3-Aminopropyl)-N1-{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-N18-[2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)ethyl]-6,9,12,15-tetraoxa-3-thiaoctadecan-1,18-diamid(1:1)

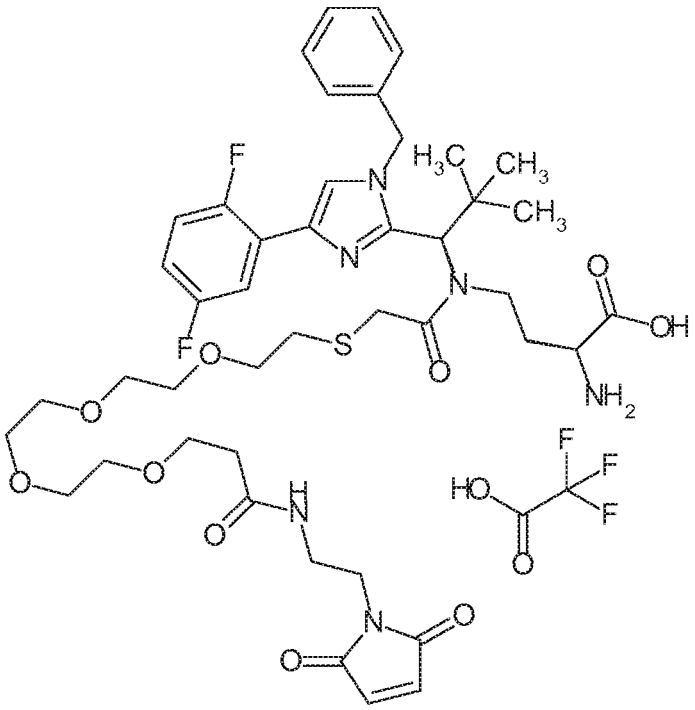


16.1 mg (0.02 mmol) tert-Butyl-[22-{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-1-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-4,21-dioxo-7,10,13,16-tetraoxa-19-thia-3,22-diazapentacosan-25-yl]carbamat (Intermediat C18) wurden in 1.5 mL Dichlormethan vorgelegt und mit 26 µL (0.34 mmol) TFA versetzt. Es wurde über Nacht bei RT gerührt und dann nochmals 26 µL (0.34 mmol) TFA hinzugefügt. Es wurde nochmals über Nacht bei RT gerührt. Das Lösemittel wurde im Vakuum verdampft und der Rückstand mittels präp. RP-HPLC gereinigt (Säule: Reprosil 250x30; 10µ, Fluss: 50 mL/min, MeCN/Wasser, 0.1% TFA). Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand in Wasser aufgenommen und lyophilisiert. Man erhielt 10.8 mg (66 % d. Th.) der Titelverbindung.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.98 min; MS (ESIpos): m/z = 857 $[M+H]^+$.

Intermediat F49

(25S)-25-Amino-22-{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-1-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-4,21-dioxo-7,10,13,16-tetraoxa-19-thia-3,22-diazahexacosan-26-säure-trifluoressigsäure(1:1)



Die Synthese der Verbindung tert-Butyl-(2S)-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(chloracetyl)amino]-2-[(tert-butoxycarbonyl)amino]butanoat erfolgte in Analogie zur Synthese von Intermediat C16.

50.0 mg (0.08 mmol) Intermediat C2

20.3 mg (0.18 mmol) Chloracetylchlorid

19.0 mg (0.19 mmol) Triethylamin

Man erhielt 43.1 mg (77 % d. Th.) der Verbindung tert-Butyl-(2S)-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(chloracetyl)amino]-2-[(tert-butoxycarbonyl)amino]butanoat.

LC-MS (Methode 1): R_t = 1.55 min; MS (ESIpos): m/z = 689 $[M+H]^+$.

Die Synthese der Verbindung (6S)-9-{(1R)-1-[1-Benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-6-(tert-butoxycarbonyl)-2,2-dimethyl-4,10-dioxo-3,15,18,21,24-pentaoxa-12-thia-5,9-diazaheptacosan-27-säure erfolgte in Analogie zur Synthese von Intermediat C17.

38.8 mg (0.06 mmol) tert-Butyl-(2S)-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(chloracetyl)amino]-2-[(tert-butoxycarbonyl)amino]butanoat.

19.1 mg (0.07 mmol) 1-Sulfanyl-3,6,9,12-tetraoxapentadecan-15-säure

45.9 mg (0.14 mmol) Cäsiumcarbonat

Man erhielt 40.7 mg (77 % d. Th.) der Verbindung (6S)-9-{(1R)-1-[1-Benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-6-(tert-butoxycarbonyl)-2,2-dimethyl-4,10-dioxo-3,15,18,21,24-pentaoxa-12-thia-5,9-diazaheptacosan-27-säure.

LC-MS (Methode 1): R_t = 1.45 min; MS (ESIpos): m/z = 935 $[M+H]^+$.

Die Synthese der Verbindung tert-Butyl-(25S)-22-{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-25-[(tert-butoxycarbonyl)amino]-1-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-4,21-dioxo-7,10,13,16-tetraoxa-19-thia-3,22-diazahexacosan-26-oat erfolgte in Analogie zur Synthese von Intermediat C18.

37.4 mg (0.04 mmol) (6S)-9-{(1R)-1-[1-Benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-6-(tert-butoxycarbonyl)-2,2-dimethyl-4,10-dioxo-3,15,18,21,24-pentaoxa-12-thia-5,9-diazaheptacosan-27-säure.

9.2 mg (0.05 mmol) 1-(2-Aminoethyl)-1H-pyrrol-2,5-dionhydrochlorid(1:1).

Man erhielt 23.4 mg (49 % d. Th.) der Verbindung tert-Butyl-(25S)-22-{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-25-[(tert-butoxycarbonyl)amino]-1-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-4,21-dioxo-7,10,13,16-tetraoxa-19-thia-3,22-diazahexacosan-26-oat.

LC-MS (Methode 1): R_t = 1.47 min; MS (ESIpos): m/z = 1057 $[M+H]^+$.

Die Synthese der Titelverbindung erfolgte in Analogie zur Synthese von Intermediat F38.

20.8 mg (0.02 mmol) tert-Butyl-(25S)-22-{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-25-[(tert-butoxycarbonyl)amino]-1-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-4,21-dioxo-7,10,13,16-tetraoxa-19-thia-3,22-diazahexacosan-26-oat.

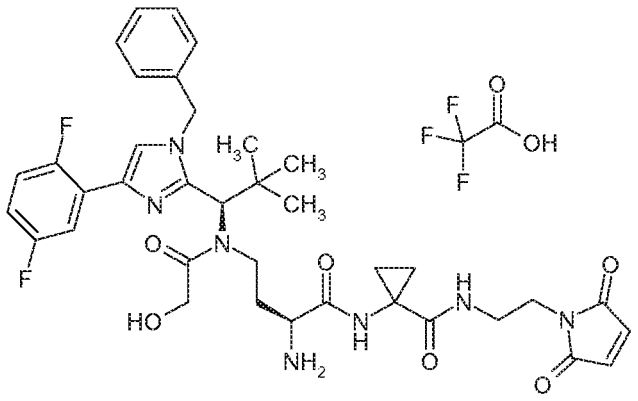
157.0 mg (1.37 mmol) TFA.

Man erhielt 13.0 mg (65 %) der Titelverbindung.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.93 min; MS (ESIpos): m/z = 901 $[M+H]^+$.

Intermediat F50

Trifluoressigsäure--1-({(2S)-2-amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}amino)-N-[2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)ethyl]cyclopropancarboxamid(1:1)



15 mg (0.024 mmol) von Intermediat C5 wurden in 6.5 mL DCM gelöst und mit 19 mg (0.049 mmol) von Intermediat L24 sowie mit 13 µl *N,N*-Diisopropylethylamin und 10 mg (0.037 mmol) 2-Brom-1-ethylpyridiniumtetrafluoroborat versetzt. Der Ansatz wurde 3 h bei RT gerührt und anschließend im Vakuum eingeengt. Der Rückstand wurde durch präparative HPLC gereinigt und es wurden 2.4 mg der geschützten Zwischestufe erhalten.

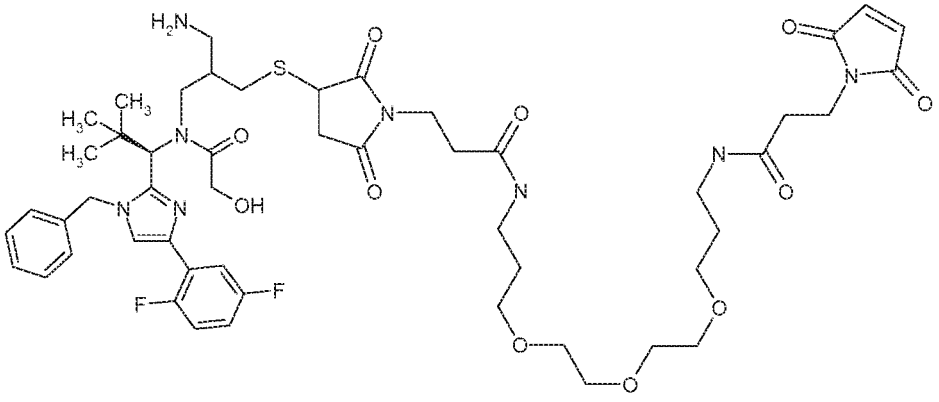
Diese wurden anschließend in 1 mL DCM aufgenommen und mit 0.1 mL Trifluoressigsäure entschützt. Nach Lyophilisation aus Acetonitril/Wasser wurden 2.6 mg (11% d.Th. über 2 Stufen) der Titelverbindung erhalten.

HPLC (Methode 11): R_t = 2.4 min.

LC-MS (Methode 1): R_t = 1.25 min; MS (ESIpos): m/z = 819 $[M+H]^+$.

Intermediat F51

3-{3-[(3-Amino-2-{[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]methyl}propyl)sulfanyl]-2,5-dioxopyrrolidin-1-yl}-N-[17-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-15-oxo-4,7,10-trioxa-14-azaheptadec-1-yl]propanamid (Isomer 1)



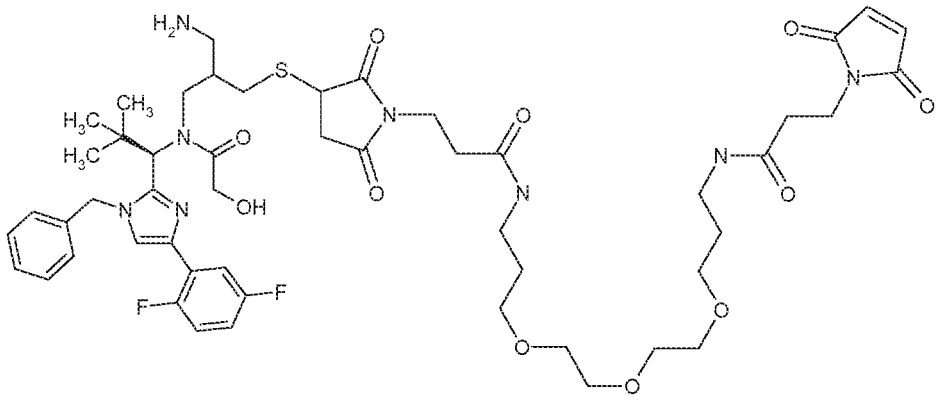
10.0 mg (18.079 µmol) N-[3-Amino-2-(sulfanylmethyl)propyl]-N-{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-2-hydroxyacetamidhydrochlorid(1:1) (Isomer1) wurden in 100 µl PBS-Puffer (Sigma D8537) und 200 µl ACN vorgelegt. Es wurden 17.1 mg (32.543 µmol) 3-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-N-[17-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-15-oxo-4,7,10-trioxa-14-azaheptadec-1-yl]propanamid zugegeben und 16 h bei RT gerührt. Die Reaktionslösung wurde mittels präparativer HPLC (Eluent: ACN/Wasser + 0.1% TFA, Gradient) gereinigt und lyophilisiert. Es wurden 14.0 mg (75 % d. Th.) der Zielverbindung erhalten.

Isomer 1

LC-MS (METHODE 1): R_t = 0.94 min; MS (ESIpos): m/z = 1039 $[M+H]^+$.

Intermediat F52

3-{3-[(3-Amino-2-{[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]methyl}propyl)sulfanyl]-2,5-dioxopyrrolidin-1-yl}-N-[17-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-15-oxo-4,7,10-trioxa-14-azaheptadec-1-yl]propanamid (Isomer 2)



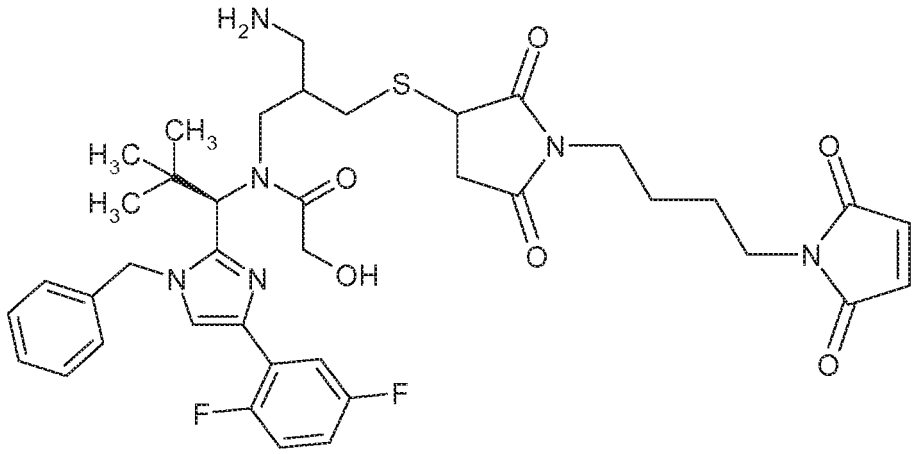
6.5 mg (10.694 µmol, LC/MS Reinheit = 91%) N-[3-Amino-2-(sulfanylmethyl)propyl]-N-{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-2-hydroxyacetamidhydrochlorid(1:1) (Isomer2) wurden in 100 µl PBS-Puffer (Sigma D8537) und 200 µl ACN vorgelegt. Es wurden 10.1 mg (19.249 µmol) 3-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-N-[17-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-15-oxo-4,7,10-trioxa-14-azaheptadec-1-yl]propanamid zugegeben und 16 h bei RT gerührt. Die Reaktionslösung wurde mittels präparativer HPLC (Eluent: ACN/Wasser + 0.1% TFA, Gradient) gereinigt und lyophilisiert. Es wurden 5.0 mg (45% d. Th. Der Zielverbindung erhalten.

Isomer 2

LC-MS (Methode 5): R_t = 2.87 min; MS (ESIpos): m/z = 1039 $[M+H]^+$.

Intermediat F53

N-{3-Amino-2-[({1-[4-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)butyl]-2,5-dioxopyrrolidin-3-yl}sulfanyl)methyl]propyl}-N-{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-2-hydroxyacetamid (Isomer 1)



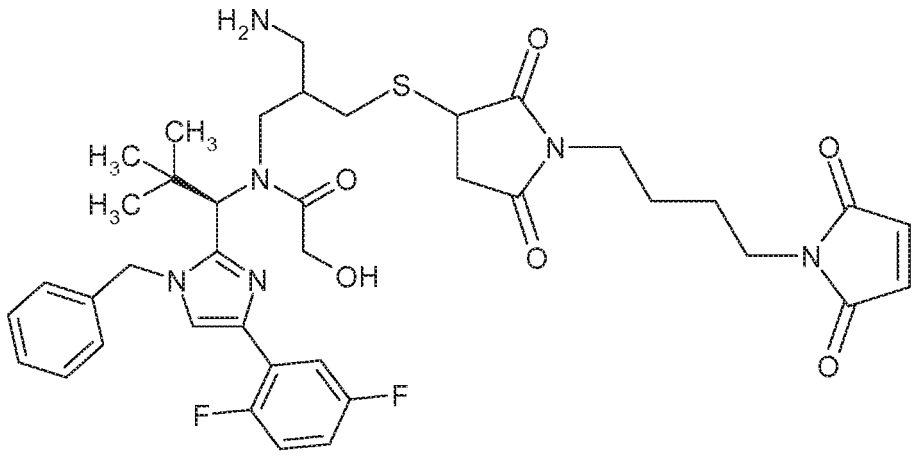
10.0 mg (18.079 µmol) N-[3-Amino-2-(sulfanylmethyl)propyl]-N-{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-2-hydroxyacetamidhydrochlorid(1:1) (Isomer1) wurden in 200 µl PBS-Puffer (Sigma D8537) und 400 µl ACN corgelegt. Es wurden 8.1 mg (32.543 µmol) 1,1'-Butan-1,4-diylbis(1H-pyrrol-2,5-dion) zugegeben und 1 h bei RT gerührt. Anschließend wurden 300µl DMF addiert und weitere 1.5 h gerührt. Die Reaktionslösung wurde mittels präparativer HPLC (Eluent: ACN/Wasser + 0.1% TFA, Gradient) gereinigt und lyophilisiert. Es wurden 4.0 mg (29 % d. Th.) der Zielverbindung erhalten.

Isomer 1

LC-MS (METHODE 1): R_t = 0.97 min; MS (ESIpos): m/z = 765 $[M+H]^+$.

Intermediat F54

N-{3-Amino-2-[({1-[4-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)butyl]-2,5-dioxopyrrolidin-3-yl}sulfanyl)methyl]propyl}-N-{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-2-hydroxyacetamid (Isomer 2)



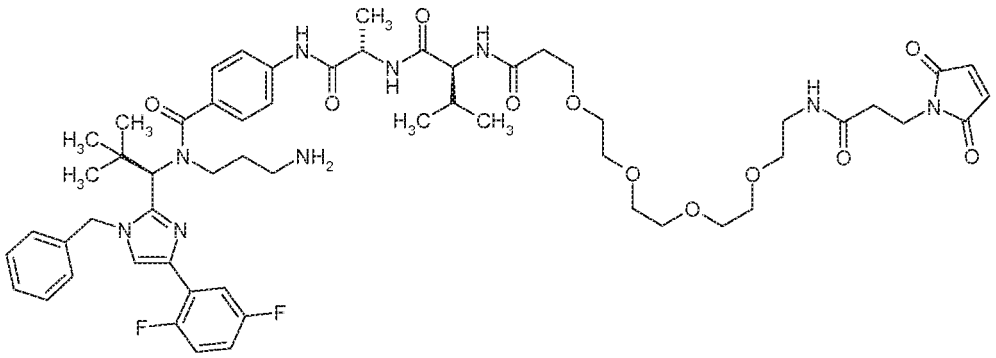
5.0 mg (9.040 µmol) N-[3-Amino-2-(sulfanylmethyl)propyl]-N-{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-2-hydroxyacetamidhydrochlorid(1:1) (Isomer2) wurden in 500 µl DMF eorgelegt. Es wurden 4.0 mg (16.271 µmol) 1,1'-Butan-1,4-diylbis(1H-pyrrol-2,5-dion) zugegeben und 16 h bei RT gerührt. Die Reaktionslösung wurde mittels präparativer HPLC (Eluent: ACN/Wasser + 0.1% TFA, Gradient) gereinigt und lyophilisiert. Es wurden1.1 mg (16 % d. Th.) der Zielverbindung erhalten.

Isomer 2

LC-MS (Methode 6): R_t = 2.41 min; MS (ESIpos): m/z = 765 $[M+H]^+$.

Intermediat F55

N-[19-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-17-oxo-4,7,10,13-tetraoxa-16-azanonadecan-1-oyl]-L-valyl-N-{4-[(3-aminopropyl){(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorophenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}carbamoyl]phenyl}-L-alaninamide



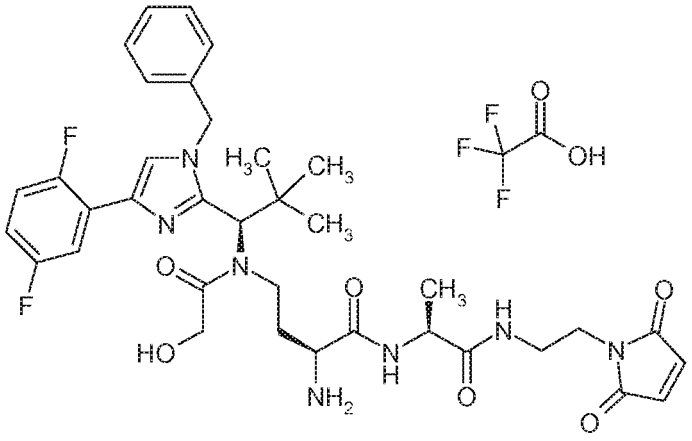
6.5 mg (4.5 µmol) N-[19-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-17-oxo-4,7,10,13-tetraoxa-16-azanonadecan-1-oyl]-L-valyl-N-[4-({(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}{3-[(tert-butoxycarbonyl)amino]propyl}carbamoyl)phenyl]-L-alaninamid wurden in

441 µl Dichlormethan gelöst und mit 44 µl (573.1 µmol) Trifluoressigsäure versetzt. Der Ansatz wurde bei RT am Rotationsverdampfer eingeengt, in Wasser sowie ACN aufgenommen und lyophilisiert. Es wurden 5.6 mg (94% d. Th., LC/MS-Reinheit = 92%) der Zielverbindung erhalten.

LC-MS (Methode 1): R_t = 1.01 min; MS (ESIpos): m/z = 1100.6 $[M+H]^+$.

Intermediat F56

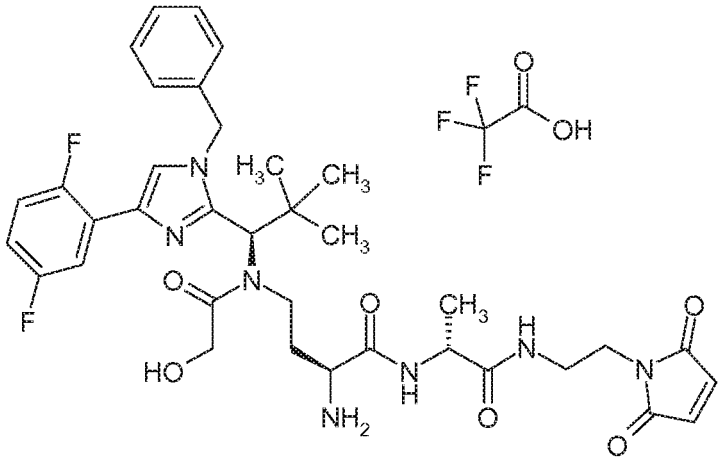
Trifluoressigsäure--(2S)-2-amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]-N-[(2S)-1-{[2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)ethyl]amino}-1-oxopropan-2-yl]butanamid(1:1)



Die Titelverbindung wurde in Analogie zu Intermediat F50 hergestellt.
LC-MS (Methode 1): R_t = 0.9 min; MS (EIpos): m/z = 708 $[M+H]^+$.

Intermediat F57

Trifluoressigsäure--(2S)-2-amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]-N-[(2R)-1-{[2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)ethyl]amino}-1-oxopropan-2-yl]butanamid(1:1)

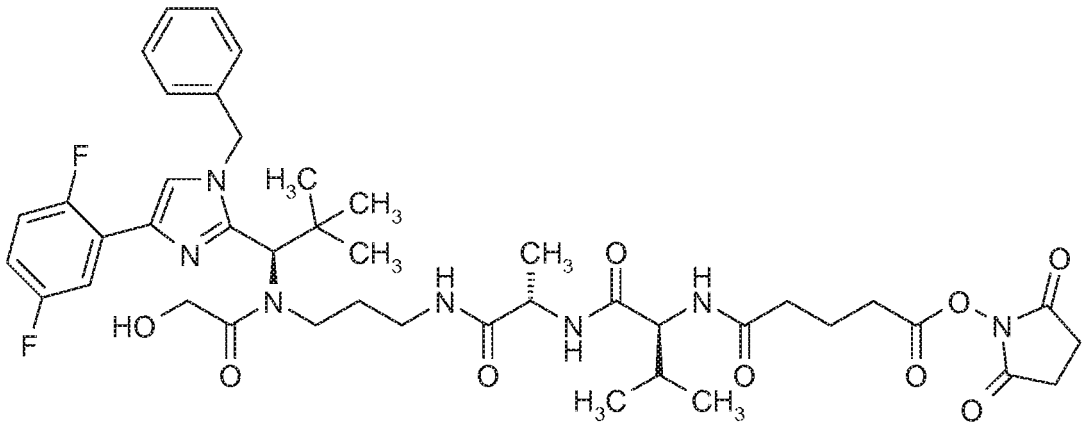


Die Titelverbindung wurde in Analogie zu Intermediat F56 hergestellt.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.91 min; MS (EIpos): m/z = 708 $[M+H]^+$.

Intermediat F58

N-{5-[(2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl)oxy]-5-oxopentanoyl}-L-valyl-N-{3-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]propyl}-L-alaninamid

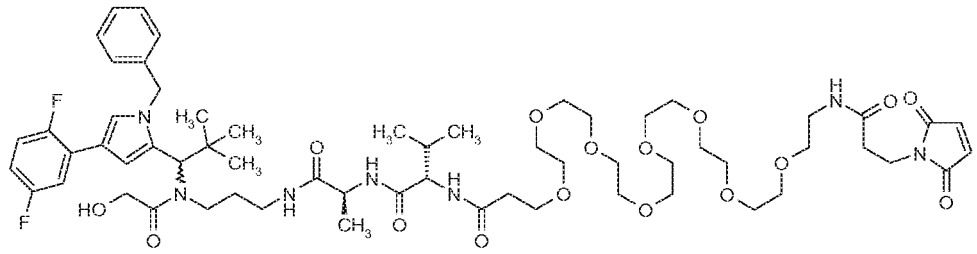


16.2 mg (0.02 mmol) Trifluoressigsäure--L-valyl-N-{3-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]propyl}-L-alaninamid(1:1) (Intermediat C41) wurden in 1.0 mL DMF vorgelegt und mit 8.3 mg (0.06 mmol) N,N-Diisopropylethylamin und 12.6 mg (0.04 mmol) 1,1'-[(1,5-Dioxopentan-1,5-diyl)bis(oxy)]dipyrrolidin-2,5-dion versetzt. Die Reaktionsmischung rührte über Nacht bei RT und wurde direkt mittles präp. RP-HPLC gereinigt (Säule: Reprosil 250x30; 10µ, Fluss: 50 mL/min, MeCN/Wasser). Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 11.0 mg (60 % d. Th.) der Titelverbindung.

LC-MS (Methode 1): R_t = 1.18 min; MS (ESIpos): m/z = 852 $[M+H]^+$.

Intermediat F82

N-[31-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-29-oxo-4,7,10,13,16,19,22,25-octaoxa-28-azahentriacontan-1-oyl]-L-valyl-N-{3-[{1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]propyl}-L-alaninamid

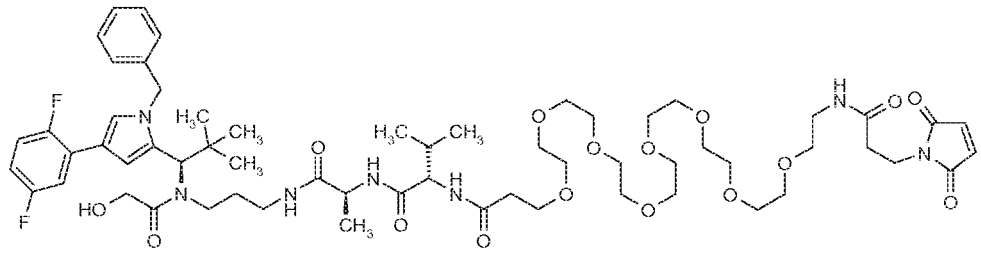


Die Synthese der Titelverbindung erfolgte in Analogie zur Synthese von Intermediat F83. Die dabei verwendeten racemischen Intermediate wurden in Analogie zu den entsprechenden R-Isomer Intermediaten erhalten.

LC-MS (Methode 2): R_t = 7.07 min; MS (Elpos): m/z = 1236 $[M+Na]^+$.

Intermediat F83

N-[31-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-29-oxo-4,7,10,13,16,19,22,25-octaoxa-28-azahentriacontan-1-oyl]-L-valyl-N-{3-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]propyl}-L-alaninamid



30.0 mg (0.06 mmol) N-(3-Aminopropyl)-N-{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-2-hydroxyacetamid (Beispiel 98) und 26.1 mg (0.06 mmol) 2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl-N-[(9H-fluoren-9-ylmethoxy)carbonyl]-L-alaninat wurden in 2.0 mL DMF vorgelegt und mit 19.4 mg (0.19 mmol) 4-Methylmorpholin versetzt. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei RT gerührt und mit 11.5 mg (0.19 mmol) HOAc versetzt. Die Reaktionsmischung wurde direkt mittles präp. RP-HPLC gereinigt (Säule: Reprosil 250x30; 10µ, Fluss: 50 mL/min, MeCN/Wasser). Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 41.9 mg (79

% d. Th.) der Verbindung 9H-Fluoren-9-ylmethyl-[(2S)-1-({3-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]propyl}amino)-1-oxopropan-2-yl]carbamat.
LC-MS (Methode 1): R_t = 1.44 min; MS (ESIpos): m/z = 763 $[M+H]^+$.

37.2 mg (0.05 mmol) 9H-Fluoren-9-ylmethyl-[(2S)-1-({3-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]propyl}amino)-1-oxopropan-2-yl]carbamat wurden in 1.5 mL DMF gelöst und mit 124.6 mg (1.46 mmol) 2-Aminoethanol versetzt. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei RT gerührt. Die Reaktionsmischung wurde zwischen Ethylacetat und Wasser verteilt und die organische Phase zweimal mit Wasser und einmal mit ges. NaCl-Lösung gewaschen. Nach der Trocknung über Magnesiumsulfat wurde das Lösemittel im Vakuum verdampft und der Rückstand mittels Kieselgel (Laufmittel: Dichlormethan/Methanol 10:1) gereinigt. Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 14.2 mg (50 % d. Th.) der Verbindung N-{3-[{(1R)-1-[1-Benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]propyl}-L-alaninamid.
LC-MS (Methode 1): R_t = 0.92 min; MS (ESIpos): m/z = 541 $[M+H]^+$.

14.1 mg (0.03 mmol) N-{3-[{(1R)-1-[1-Benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]propyl}-L-alaninamid und 11.4 (0.03 mmol) 2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl-N-[(9H-fluoren-9-ylmethoxy)carbonyl]-L-valinat wurden in 1.5 mL DMF gelöst und mit 7.9 mg (0.08 mmol) 4-Methylmorpholin versetzt. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei RT gerührt und mit 4.7 mg (0.08 mmol) HOAc versetzt. Die Reaktionsmischung wurde direkt mittles präp. RP-HPLC gereinigt (Säule: Reprosil 250x30; 10µ, Fluss: 50 mL/min, MeCN/Wasser). Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 15.9 mg (71 % d. Th.) der Verbindung N-[(9H-Fluoren-9-ylmethoxy)carbonyl]-L-valyl-N-{3-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]propyl}-L-alaninamid.
LC-MS (Methode 1): R_t = 1.46 min; MS (ESIpos): m/z = 862 $(M+H)^+$.

14.9 mg (0.02 mmol) N-[(9H-Fluoren-9-ylmethoxy)carbonyl]-L-valyl-N-{3-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]propyl}-L-alaninamid wurden in 1.5 mL DMF gelöst und mit 44.2 mg (0.52 mmol) 2-Aminoethanol versetzt. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei RT gerührt. Die Reaktionsmischung wurde zwischen Ethylacetat und Wasser verteilt und die organische Phase zweimal mit Wasser und einmal mit ges. NaCl-Lösung gewaschen. Nach der Trocknung über Magnesiumsulfat wurde das Lösemittel im Vakuum verdampft und der Rückstand mittels Kieselgel (Laufmittel: Dichlormethan/Methanol 10:1) gereinigt. Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 5.7 mg (52

% d. Th.) der Verbindung L-Valyl-N-{3-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]propyl}-L-alaninamid.

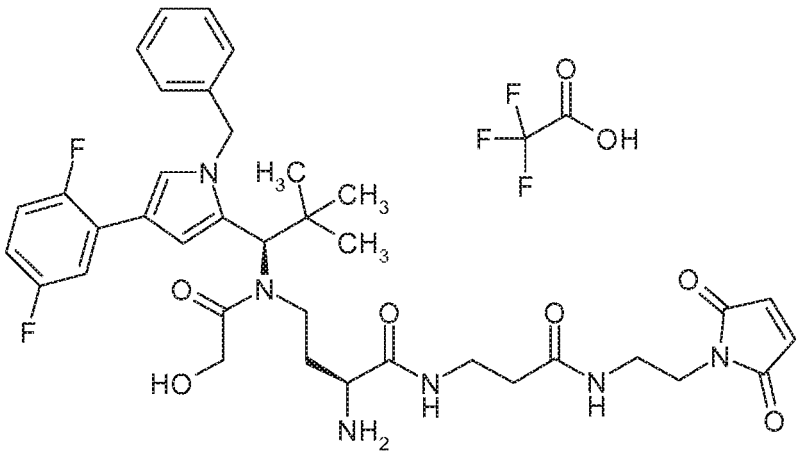
LC-MS (Methode 1): R_t = 0.92 min; MS (ESIpos): m/z = 640 $(M+H)^+$.

5.5 mg (8.6 µmol) L-Valyl-N-{3-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]propyl}-L-alaninamid und 6.5 mg (6.5 µmol) 3-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-N-{27-[(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)oxy]-27-oxo-3,6,9,12,15,18,21,24-octaoxaheptacos-1-yl}propanamid wurden in 1.0 mL DMF gelöst und mit 0.9 mg (8.6 mmol) 4-Methylmorpholin versetzt. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei RT gerührt und mit 0.8 mg (0.01 mmol) HOAc versetzt. Die Reaktionsmischung wurde direkt mittles präp. RP-HPLC gereinigt (Säule: Reprosil 250x30; 10µ, Fluss: 50 mL/min, MeCN/Wasser). Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 7.7 mg (74 % d. Th.) der Titelverbindung.

LC-MS (Methode 1): R_t = 1.10 min; MS (ESIpos): m/z = 1214 $(M+H)^+$.

Intermediat F84

Trifluoressigsäure--(2S)-2-amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]-N-(3-{[2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)ethyl]amino}-3-oxopropyl)butanamid(1:1)



Zunächst wurden 16.5 mg (0.02 mmol) Intermediat C54 in 5 ml DMF aufgenommen und mit 10.4 mg (0.041 mmol) Trifluoressigsäure--1-(2-aminoethyl)-1H-pyrrol-2,5-dion(1:1) in Gegenwart von 11.7 mg (0.03 mmol) HATU sowie 18 µl N,N-Diisopropylethylamin umgesetzt. Nach 5 min Rühren bei RT wurde eingeengt und der Rückstand in Acetonitril/Wasser 1:1 aufgenommen. Mit Trifluoressigsäure wurde ein pH-Wert von 2 eingestellt und der Ansatz erneut eingeengt. Der verbliebene Rückstand durch präparative HPLC gereinigt. Es wurden 8 mg (42% d. Th.) des geschützten Intermediats erhalten.

LC-MS (Methode 1): R_t = 1.38 min; MS (EIpos): m/z = 929 $[M+H]^+$.

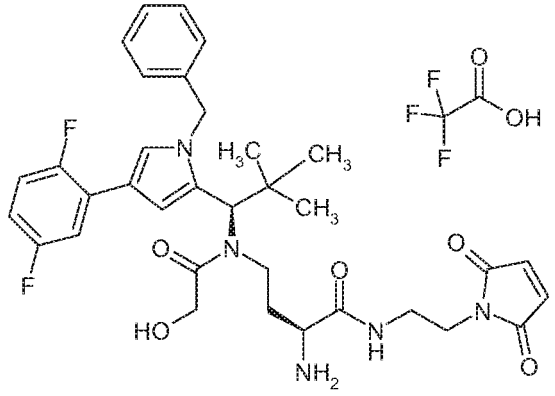
7.6 mg (0.008 mmol) dieses Intermediats wurden in 3 ml DMF aufgenommen und mit 92 mg (0.82 mmol) 1,4-Diazabicyclo(2.2.2)octan versetzt. Der Ansatz wurde 1 h im Ultraschallbad behandelt. Anschließend wurden 31 µl Essigsäure zugegeben und der Ansatz im Hochvakuum eingeengt. Der Rückstand wurde durch präparative HPLC gereinigt. Es wurden 3 mg (45% d. Th.) der Titelverbindung erhalten.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.86 min; MS (EIpos): m/z = 707 $[M+H]^+$.

^{1}H-NMR (500 MHz, DMSO-d_6): δ = 8.15 (t, 1H), 7.9-8.1 (m, 4H), 7.6 (m, 1H), 7.5 (s, 1H), 7.15-7.35 (m, 6H), 6.9-7.0 (m, 3H), 6.85 (s, 1H), 5.6 (s, 1H), 4.9 und 5.2 (2d, 2H), 4.05 und 4.2 (2d, 2H), 3.1-3.2 (m, 4H), 2.15 (m, 2H), 0.7 und 1.45 (2m, 2H), 0.8 (s, 9H).

Intermediat F85

Trifluoressigsäure--(2S)-2-amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]-N-[2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)ethyl]butanamid(1:1)



Zunächst wurden 10 mg (0.014 mmol) Intermediat C53 in 3.4 ml DMF aufgenommen und mit 7 mg (0.027 mmol) Trifluoressigsäure--1-(2-aminoethyl)-1H-pyrrol-2,5-dion(1:1) in Gegenwart von 7.8 mg (0.02 mmol) HATU sowie 12 µl N,N-Diisopropylethylamin umgesetzt. Nach 15 min Rühren bei RT wurde eingeengt und der Rückstand durch präparative HPLC gereinigt. Es wurden 6.6 mg (57% d. Th.) des geschützten Intermediats erhalten.

LC-MS (Methode 1): R_t = 1.4 min; MS (EIpos): m/z = 858 $[M+H]^+$.

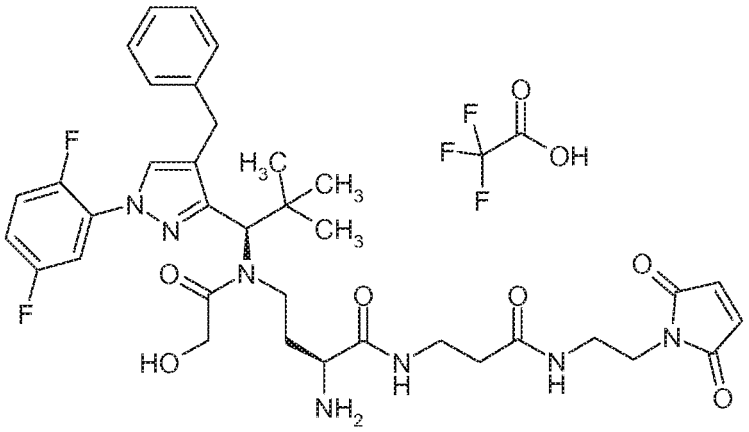
6.6 mg (0.008 mmol) dieses Intermediats wurden in 2 ml DMF aufgenommen und mit 86 mg (0.77 mmol) 1,4-Diazabicyclo(2.2.2)octan versetzt. Der Ansatz wurde 2 h im Ultraschallbad behandelt. Anschließend wurden 44 µl Essigsäure zugegeben und der Ansatz im Hochvakuum eingeengt. Der

Rückstand wurde durch präparative HPLC gereinigt. Es wurden 3.3 mg (53% d. Th.) der Titelverbindung erhalten.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.88 min; MS (EIpos): m/z = 636 $[M+H]^+$.

Intermediat F86

Trifluoressigsäure--(2S)-2-amino-4-[{(1R)-1-[4-benzyl-1-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrazol-3-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]-N-(3-{[2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)ethyl]amino}-3-oxopropyl)butanamid(1:1)

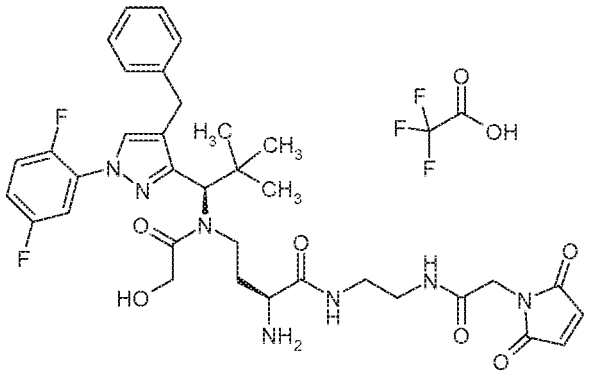


Die Titelverbindung wurde ausgehend von 8 mg (0.012 mmol) Intermediat C51 durch Umsetzung mit 4.5 mg (0.017 mmol) Trifluoressigsäure--1-(2-aminoethyl)-1H-pyrrol-2,5-dion(1:1) in Gegenwart von 5.8 mg (0.015 mmol) HATU sowie 10 µl N,N-Diisopropylethylamin und anschließender Entschützung mit Trifluoressigsäure hergestellt. Es wurden 7 mg (78% d. Th. über 2 Stufen) erhalten.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.83 min; MS (EIpos): m/z = 708 $[M+H]^+$.

Intermediat F87

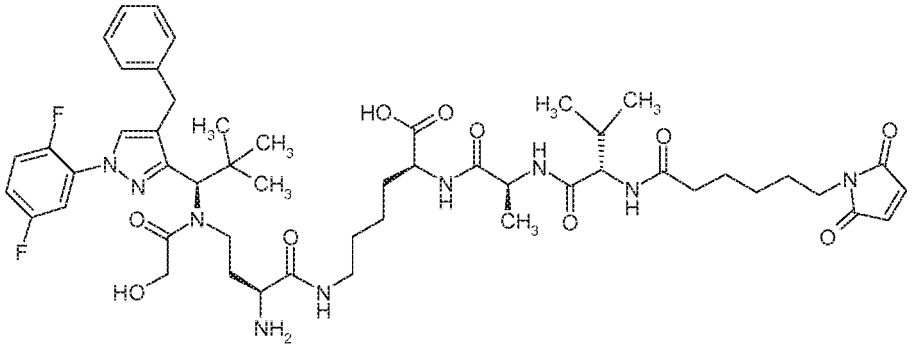
Trifluoressigsäure--(2S)-2-amino-4-[{(1R)-1-[4-benzyl-1-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrazol-3-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]-N-(3-{[2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)ethyl]amino}-3-oxopropyl)butanamid(1:1)



Die Titelverbindung wurde in Analogie zu Intermediat F2 ausgehend von 16 mg (0.025 mmol) Intermediat C49 durch Umsetzung mit 24 mg (0.076 mmol) von Intermediat L1 in Gegenwart von EDCI/HOBT und *N,N*-Diisopropylethylamin und anschließender Entschützung mit Trifluoressigsäure hergestellt. Es wurden 3 mg der Titelverbindung (14% d. Th. über 2 Stufen) erhalten.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.88 min; MS (EIpos): m/z = 694 $[M+H]^+$.

Intermediat F88

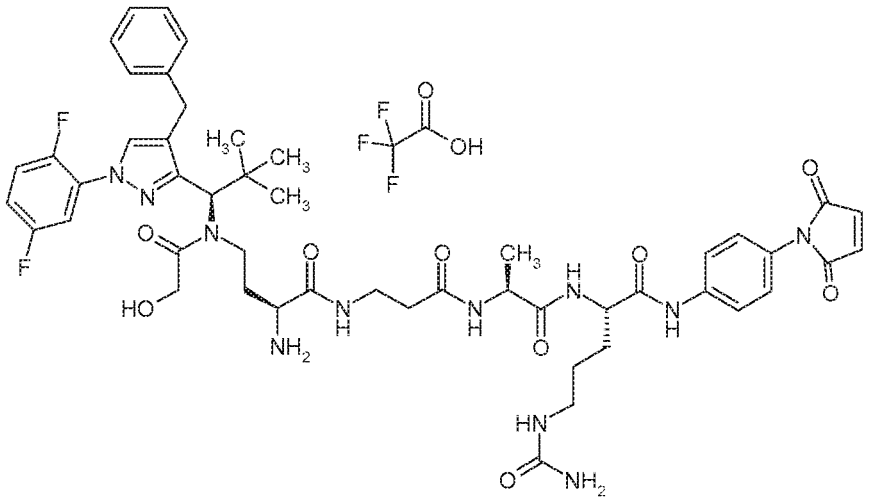


Die Verbindung wurde in Analogie zu Intermediat F8 hergestellt.

LC-MS (Methode 5): R_t = 2.97 min; MS (EIpos): m/z = 1006 $[M+H]^+$.

Intermediat F89

Trifluoressigsäure--N-{(2S)-2-amino-4-[{(1R)-1-[4-benzyl-1-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrazol-3-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}-beta-alanyl-L-alanyl-N^5-carbamoyl-N-[4-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)phenyl]-L-ornithinamid(1:1)

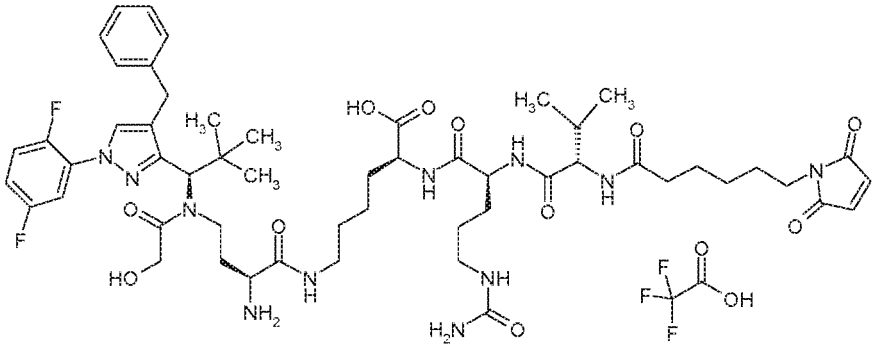


Die Titelverbindung wurde ausgehend von 8 mg (0.012 mmol) Intermediat C51 durch Umsetzung mit 7.4 mg (0.014 mmol) Intermediat L8 in Gegenwart von 5.8 mg (0.015 mmol) HATU sowie 10 µl N,N-Diisopropylethylamin und anschließender Entschützung mit Trifluoressigsäure hergestellt. Es wurden 10 mg (78% d. Th. über 2 Stufen) erhalten.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.87 min; MS (ElPos): m/z = 984 $[M+H]^+$.

Intermediat F90

N-[6-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)hexanoyl]-L-valyl-N^5-carbamoyl-L-ornithyl-N^6-{(2S)-2-amino-4-[{(1R)-1-[4-benzyl-1-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrazol-3-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}-L-lysin-trifluoressigsäure(1:1)

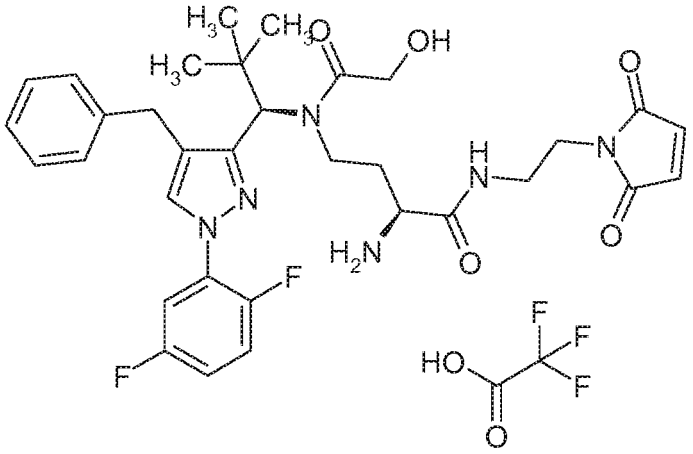


Die Titelverbindung wurde ausgehend von 11 mg (0.018 mmol) Intermediat C49 durch Umsetzung mit 13.7 mg (0.018 mmol) Intermediat L17 in Gegenwart von 34 mg (0.089 mmol) HATU sowie 19 µl N,N-Diisopropylethylamin und anschließender Entschützung mit Trifluoressigsäure hergestellt. Es wurden 7.5 mg (35% d. Th. über 2 Stufen) erhalten.

LC-MS (Methode 8): R_t = 6.78 min; MS (ElPos): m/z = 1092 $[M+H]^+$.

Intermediat F91

Trifluoressigsäure--(2S)-2-amino-4-[{(1R)-1-[4-benzyl-1-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrazol-3-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]-N-[2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)ethyl]butanamid(1:1)

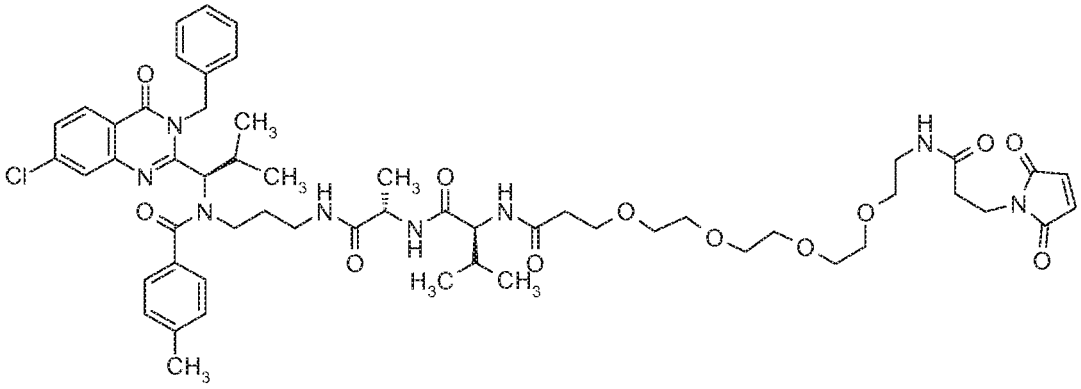


9.3 mg (0.01 mmol) tert-Butyl-[(2S)-4-[{(1R)-1-[4-benzyl-1-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrazol-3-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]-1-{[2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)ethyl]amino}-1-oxobutan-2-yl]carbamat wurden in 2 ml Dichlormethan gelöst und mit 740 mg (6.49 mmol, 0.50 ml) Trifluoressigsäure versetzt und 1.5 h bei RT gerührt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch eingeengt und der Rückstand in Acetonitril und Wasser aufgenommen und lyophilisiert. Es wurden 9.2 mg (96% d. Th.) der Zielverbindung erhalten.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.88 min; MS (Elpos): m/z = 637 $[M+H]^+$.

Intermediat F103

N-[19-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-17-oxo-4,7,10,13-tetraoxa-16-azanonadecan-1-oyl]-L-valyl-N-(3-{[(1R)-1-(3-benzyl-7-chlor-4-oxo-3,4-dihydrochinazolin-2-yl)-2-methylpropyl](4-methylbenzoyl)amino}propyl)-L-alaninamid



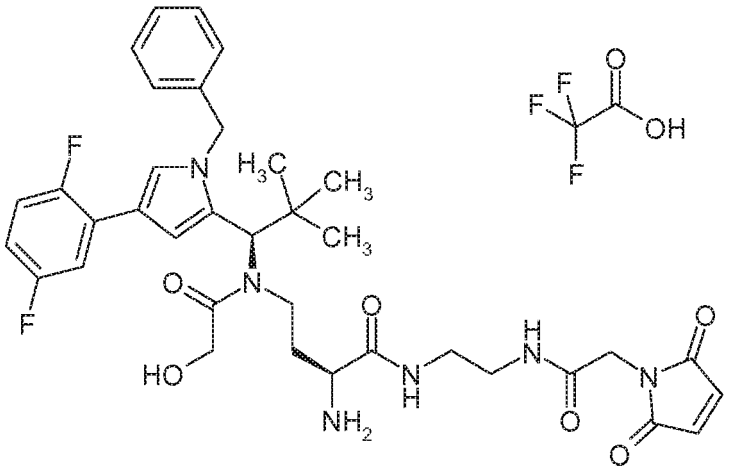
Die Titelverbindung wurde ausgehend von 10 mg (0.019 mmol) N-(3-Aminopropyl)-N-[(1R)-1-(3-benzyl-7-chlor-4-oxo-3,4-dihydrochinazolin-2-yl)-2-methylpropyl]-4-methylbenzamid
durch Umsetzung mit 11.3 mg (0.019 mmol) Intermediat L44 in Gegenwart von 8.8 mg (0.023 mmol) HATU sowie 10 µl N,N-Diisopropylethylamin erhalten. Die Reinigung erfolgte durch präparative HPLC.

Ausbeute: 8.5 mg (35% d. Th.)

LC-MS (Methode 5): R_t = 3.82 min; MS (EIpos): m/z = 1085 $[M+H]^+$.

Intermediat F104

Trifluoressigsäure--(2S)-2-amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]-N-(2-{[(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)acetyl]amino}ethyl)butanamid(1:1)



10 mg (0.014 mmol) von Intermediat C53 wurden in 3.3 mL DMF gelöst und mit 8.5 mg (0.027 mmol) von Intermediat L1 sowie mit 7.8 mg (0.02 mmol) HATU und 12 µl N,N-Diisopropylethylamin versetzt. Der Ansatz wurde 15 min bei RT gerührt und anschließend eingeengt. Der Rückstand wurde

durch präparative HPLC gereinigt und nach Lyophilisation wurden 5.6 mg (38% d. Th.) der geschützten Zwischstufe erhalten.

LC-MS (Methode 1): R_t = 1.32 min; MS (ESIpos): m/z = 915 $(M+H)^+$.

5.6 mg (0.006 mmol) dieses Intermediats wurden in 2 ml DMF aufgenommen und mit 69 mg (0.61 mmol) 1,4-Diazabicyclo(2.2.2)octan versetzt. Der Ansatz wurde 2 h im Ultraschallbad behandelt. Anschließend wurden 35 µl Essigsäure zugegeben und der Ansatz im Hochvakuum eingeengt. Der Rückstand wurde durch präparative HPLC gereinigt. Es wurden 2.4 mg (48% d. Th.) der Titelverbindung erhalten.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.84 min; MS (EIpos): m/z = 693 $[M+H]^+$.

HPLC (Methode 11): R_t = 1.91 min;

Alternativ wurde die Titelverbindung auch ausgehend von Intermediat C58 hergestellt. 15 mg (0.023 mmol) von Intermediat C58 wurden zunächst mit 11 mg (0.036 mmol) Intermediat L1 in Gegenwart von 13 mg (0.034 mmol) HATU sowie 10 µl N,N-Diisopropylethylamin umgesetzt. Nach 60 min Rühren bei RT wurde eingeengt und der Rückstand durch präparative HPLC gereinigt. Es wurden 12.3 mg (63% d. Th.) des geschützten Intermediats erhalten.

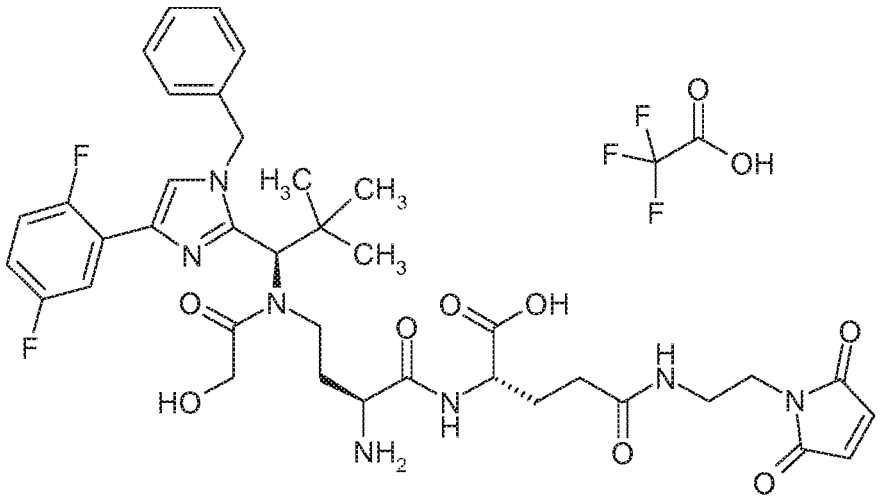
LC-MS (Methode 1): R_t = 1.3 min; MS (EIpos): m/z = 837 $[M+H]^+$.

Im zweiten Schritt wurde dieses Intermediat in 3 mL 2,2,2-Trifluorethanol gelöst. Es wurden 12 mg (0.088 mmol) Zinkchlorid zugegeben und der Ansatz 2 h bei 50°C gerührt. Anschließend wurden 26 mg (0.088 mmol) Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure sowie 2 mL einer 0.1%-igen wässrigen Trifluoressigsäurelösung zugesetzt. Der Ansatz wurde mittels präparativer HPLC gereinigt. Nach Einengen der entsprechenden Fraktionen und Lyophilisation des Rückstands aus Acetonitril/Wasser wurden 8.1 mg (68% d.Th.) der Titelverbindung erhalten.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.89 min; MS (ESIpos): m/z = 693 $(M+H)^+$.

Intermediat F105

N^2-{(2S)-2-Amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}-N-[2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)ethyl]-L-glutamin-trifluoressigsäure(1:1)

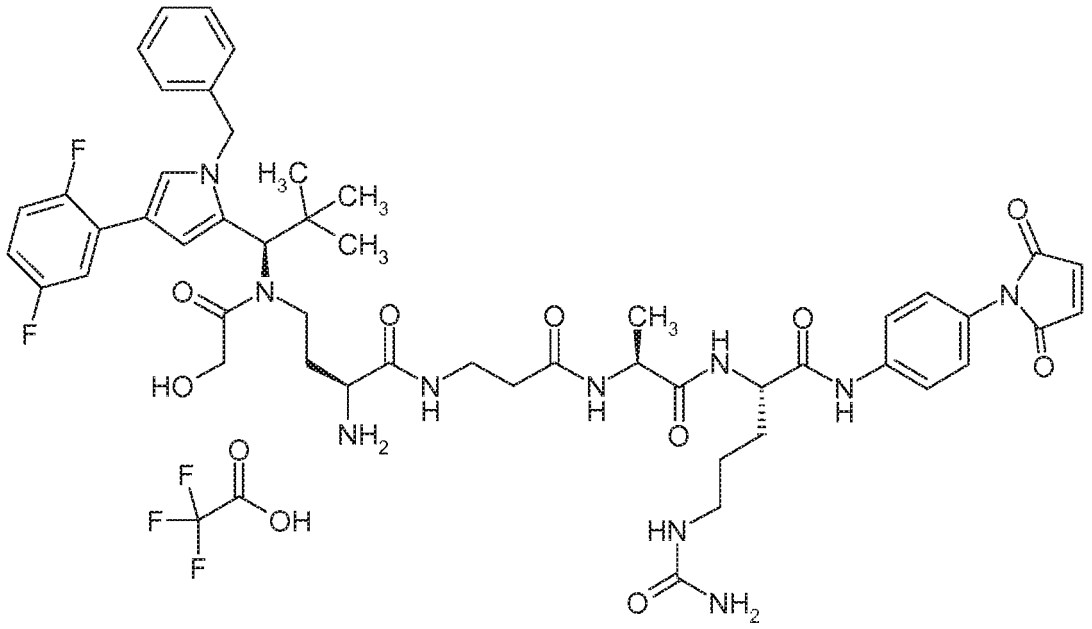


Die Titelverbindung wurde in Analogie zu Intermediat F32 ausgehend von Intermediat C5 und Intermediat L46 hergestellt.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.82 min; MS (EIpos): m/z = 766 $[M+H]^+$.

Intermediat F106

Trifluoressigsäure--N-{(2S)-2-amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}-beta-alanyl-L-alanyl-N^5-carbamoyl-N-[4-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)phenyl]-L-ornithinamid(1:1)



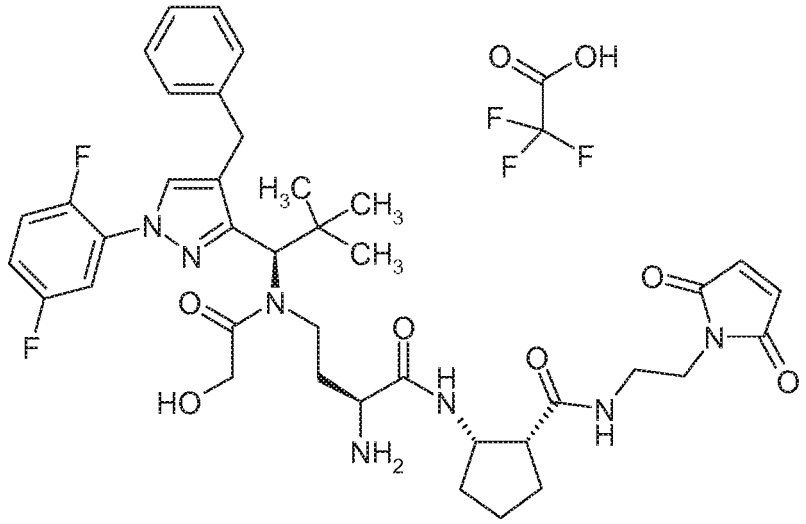
Die Titelverbindung wurde in Analogie zu Intermediat F104 ausgehend von Intermediat C53 und Intermediat L47 hergestellt.

HPLC (Methode 11): R_t = 1.85 min;

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.86 min; MS (ESIpos): m/z = 983 $(M+H)^+$.

Intermediat F107

Trifluoressigsäure--(1R,2S)-2-({(2S)-2-amino-4-[{(1R)-1-[4-benzyl-1-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrazol-3-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}amino)-N-[2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)ethyl]cyclopentancarboxamid(1:1)

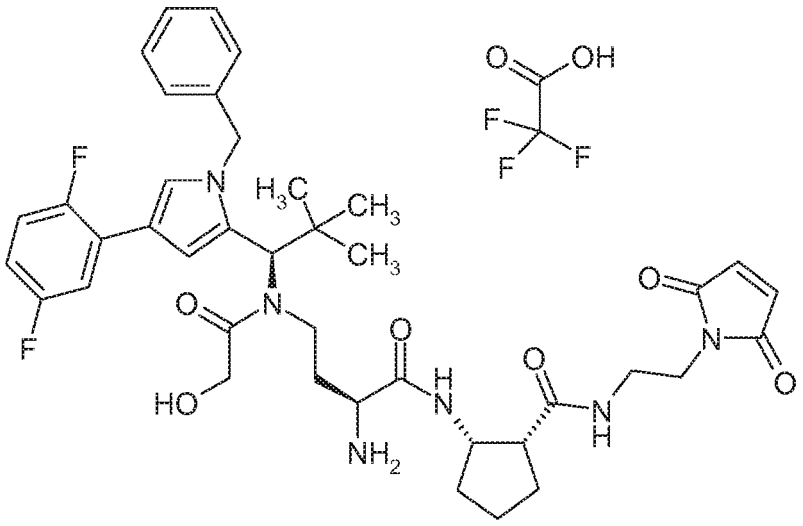


Die Titelverbindung wurde ausgehend von 15 mg (0.024 mmol) Intermediat C49 durch Umsetzung mit 22.3 mg (0.049 mmol) Intermediat L48 in Gegenwart von 14 mg (0.037 mmol) HATU sowie 21 µl N,N-Diisopropylethylamin und anschließender Entschützung mit Trifluoressigsäure hergestellt. Es wurden 13 mg (60% d. Th. über 2 Stufen) erhalten.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.9 min; MS (EIpos): m/z = 748 $[M+H]^+$.

Intermediat F108

Trifluoressigsäure--(1R,2S)-2-({(2S)-2-amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}amino)-N-[2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)ethyl]cyclopentancarboxamid(1:1)

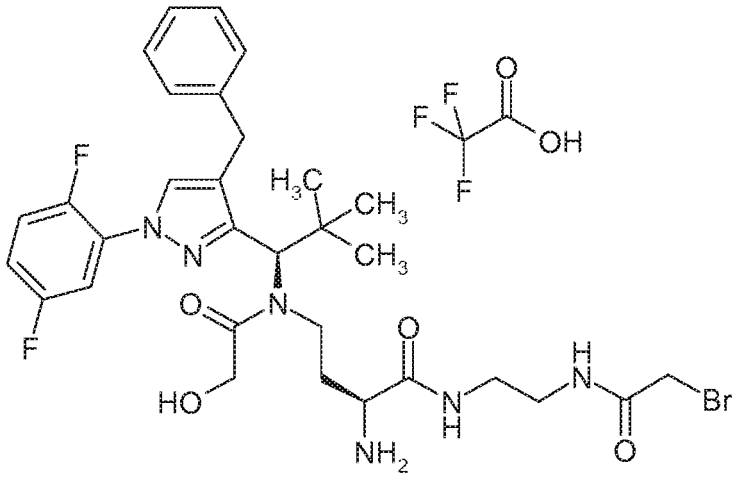


Die Titelverbindung wurde in Analogie zu Intermediat F104 aus 20 mg (0.027 mmol) Intermediat C53 und 24 mg (0.054 mmol) von Intermediat L48 hergestellt. Es wurden 3 mg (14% d. Th. über 2 Stufen) erhalten.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.93 min; MS (Elpos): m/z = 747 $[M+H]^+$.

Intermediat F109

Trifluoressigsäure--(2S)-2-amino-4-[{(1R)-1-[4-benzyl-1-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrazol-3-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]-N-{2-[(bromacetyl)amino]ethyl}butanamid(1:1)



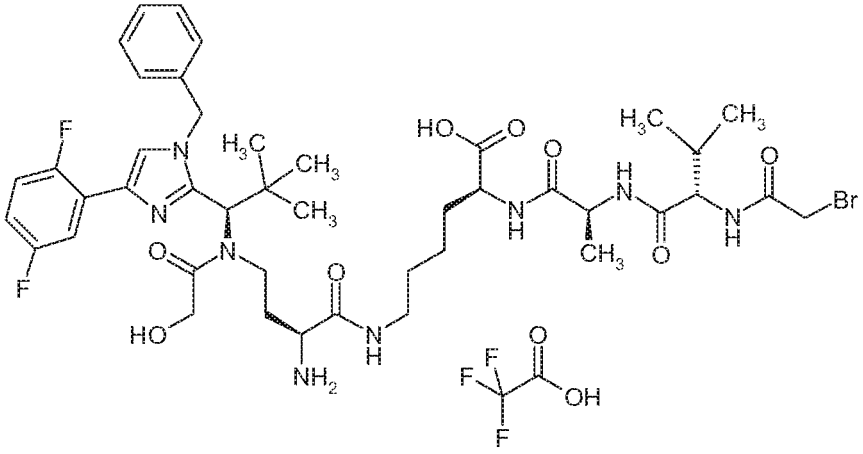
17 mg (0.026 mmol) von Intermediat C57 wurden in 3 mL DMF aufgenommen und mit 7 mg (0.027 mmol) von kommerziell erhältlichem 1-(2-Bromacetoxy)pyrrolidin-2,5-dion in Gegenwart von 14 µl *N,N*-Diisopropylethylamin umgesetzt. Nach 15min Rühren bei RT wurde eingeengt und der Rückstand durch präparative HPLC gereinigt. Es wurden 7 mg (33% d. Th.) dieser Zwischenstufe erhalten.
LC-MS (Methode 1): R_t = 1.29 min; MS (ESIpos): m/z = 777 und 779 $(M+H)^+$.

Dieses Intermediat wurde in 1 mL Dichlormethan aufgenommen und mit 1 mL Trifluoressigsäure entschützt. Nach Einengen und Lyophilisation aus Acetonitril/Wasser wurden 6 mg (88% d.Th.) der Titelverbindung erhalten.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.86 min; MS (ESIpos): m/z = 677/679 $(M+H)^+$.

Intermediat F110

N-(Bromacetyl)-L-valyl-L-alanyl-N^6-{(2S)-2-amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}-L-lysin-trifluoressigsäure(1:1)



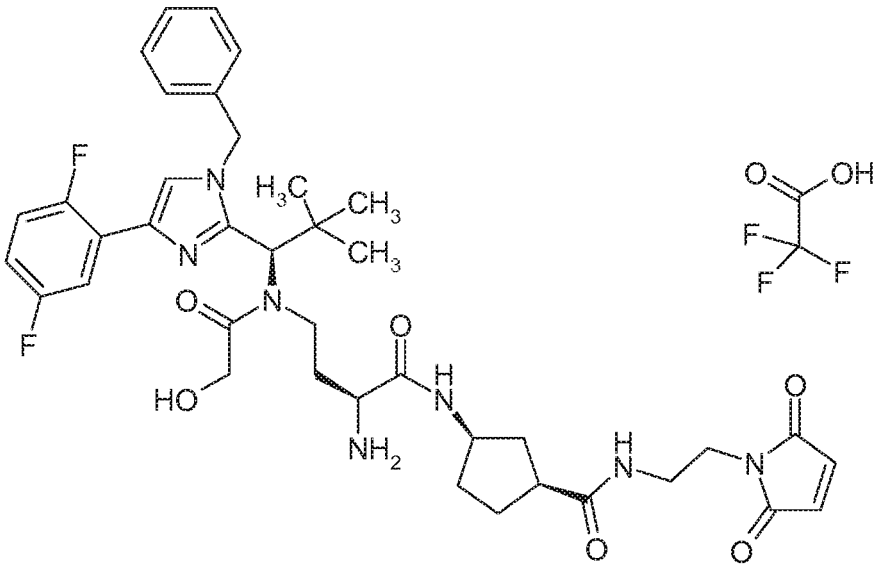
Die Titelverbindung wurde in Analogie zu Intermediat F109 aus 16 mg (0.023 mmol) Intermediat C5 und 17 mg (0.025 mmol) Intermediat L49 hergestellt. Es wurden 6 mg (24% d.Th. über 2 Stufen) der Titelverbindung erhalten.

HPLC (Methode 11): R_t = 1.93 min;

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.88 min; MS (ESIpos): m/z = 933 und 935 $(M+H)^+$.

Intermediat F111

Trifluoressigsäure--(1S,3R)-3-({(2S)-2-amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}amino)-N-[2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)ethyl]cyclopentancarboxamid(1:1)

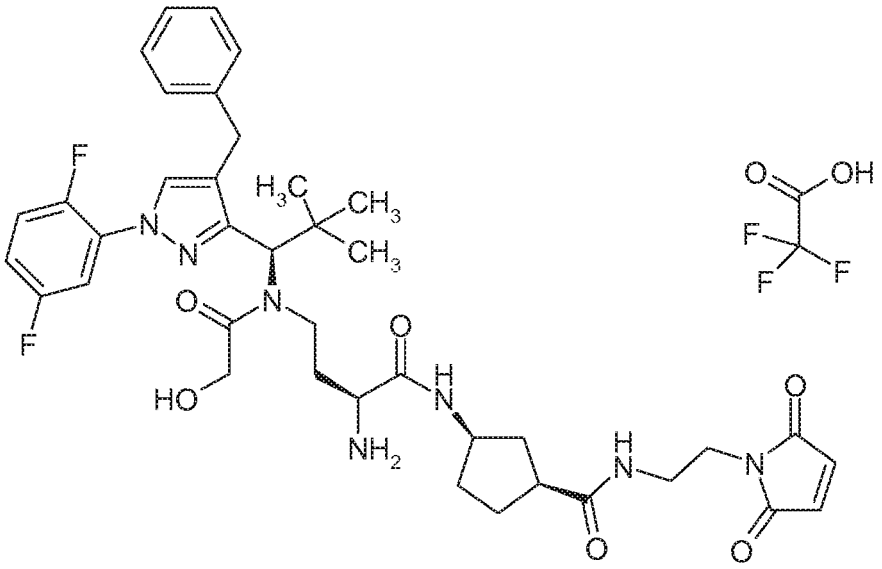


Die Titelverbindung wurde ausgehend von 15 mg (0.022 mmol) Intermediat C5 durch Umsetzung mit 16 mg (0.044 mmol) Intermediat L50 in Gegenwart von 12.5 mg (0.032 mmol) HATU sowie 19 µl N,N-Diisopropylethylamin und anschließender Entschützung mit Trifluoressigsäure hergestellt. Es wurden 13 mg (67% d. Th. über 2 Stufen) erhalten.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.89 min; MS (Elpos): m/z = 748 $[M+H]^+$.

Intermediat F112

Trifluoressigsäure--(1S,3R)-3-({(2S)-2-amino-4-[{(1R)-1-[4-benzyl-1-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrazol-3-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}amino)-N-[2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)ethyl]cyclopentancarboxamid(1:1)



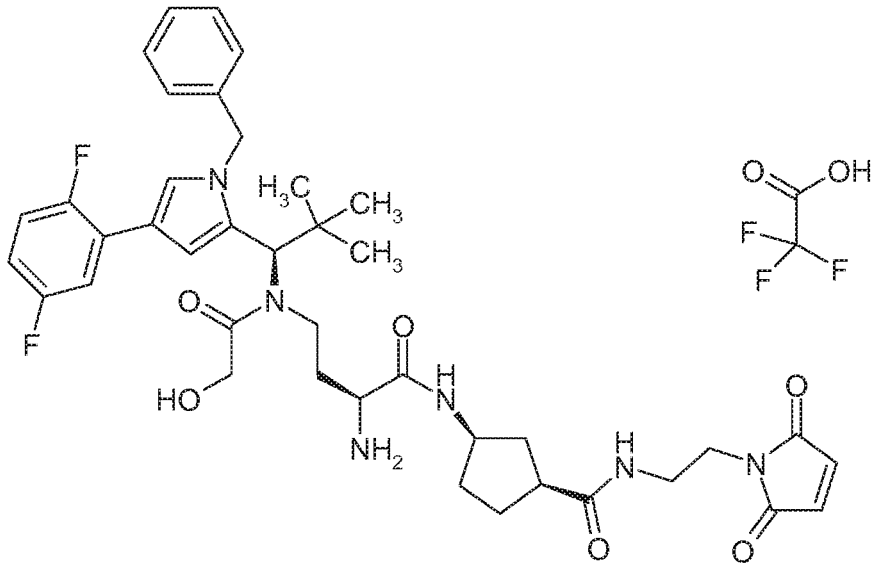
Die Titelverbindung wurde ausgehend von 15 mg (0.024 mmol) Intermediat C49 durch Umsetzung mit 18 mg (0.049 mmol) Intermediat L50 in Gegenwart von 14 mg (0.037 mmol) HATU sowie 21 µl N,N-

Diisopropylethylamin und anschließender Entschützung mit Trifluoressigsäure hergestellt. Es wurden 12 mg (51% d. Th. über 2 Stufen) erhalten.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.89 min; MS (Elpos): m/z = 748 $[M+H]^+$.

Intermediat F113

Trifluoressigsäure--(1S,3R)-3-({(2S)-2-amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}amino)-N-[2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)ethyl]cyclopentancarboxamid(1:1)

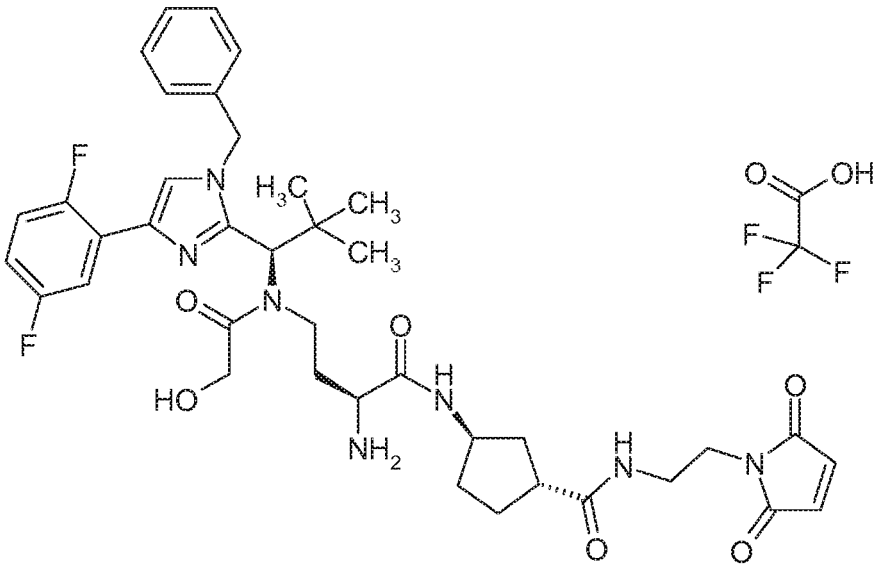


Die Titelverbindung wurde ausgehend von 15 mg (0.019 mmol) Intermediat C53 durch Umsetzung mit 14 mg (0.038 mmol) Intermediat L50 in Gegenwart von 11 mg (0.029 mmol) HATU sowie 17 µl N,N-Diisopropylethylamin und anschließender Entschützung mit 133 mg DABCO in 2 ml DMF hergestellt. Nach HPLC-Reinigung wurden 4 mg (24% d. Th. über 2 Stufen) erhalten.

LC-MS (Methode 5): R_t = 2.77 min; MS (Elpos): m/z = 747 $[M+H]^+$.

Intermediat F114

Trifluoressigsäure--(1R,3R)-3-({(2S)-2-amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}amino)-N-[2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)ethyl]cyclopentancarboxamid(1:1)

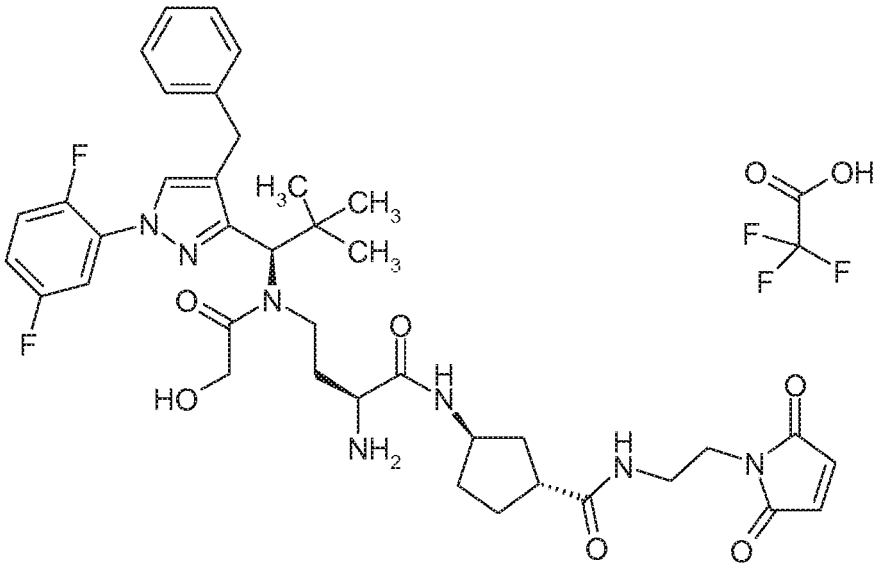


Die Titelverbindung wurde ausgehend von 15 mg (0.022 mmol) Intermediat C5 durch Umsetzung mit 16 mg (0.044 mmol) Intermediat L51 in Gegenwart von 12.6 mg (0.032 mmol) HATU sowie 19 µl N,N-Diisopropylethylamin und anschließender Entschützung mit Trifluoressigsäure hergestellt. Es wurden 11 mg (53% d. Th. über 2 Stufen) erhalten.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.89 min; MS (Elpos): m/z = 748 $[M+H]^+$.

Intermediat F115

Trifluoressigsäure--(1R,3R)-3-({(2S)-2-amino-4-[{(1R)-1-[4-benzyl-1-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrazol-3-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}amino)-N-[2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)ethyl]cyclopentancarboxamid(1:1)



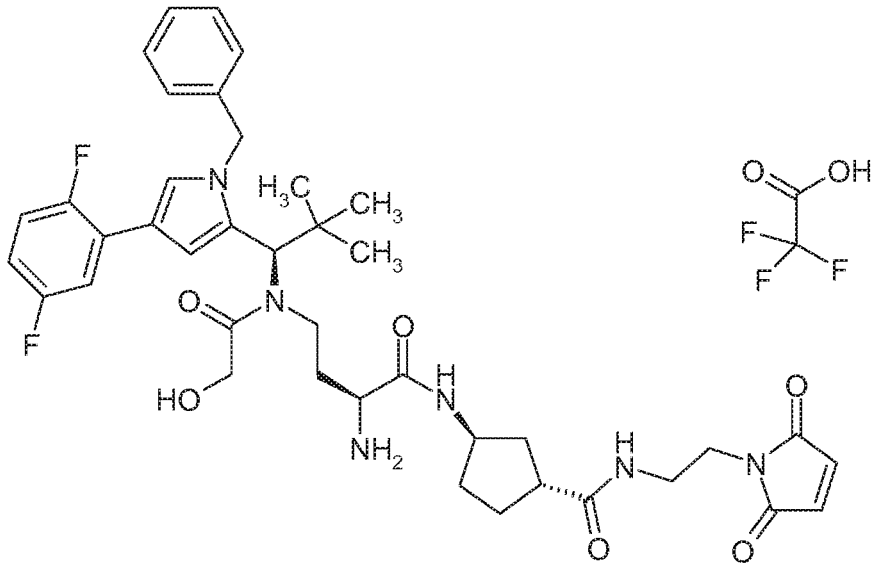
Die Titelverbindung wurde ausgehend von 15 mg (0.024 mmol) Intermediat C49 durch Umsetzung mit 18 mg (0.047 mmol) Intermediat L51 in Gegenwart von 13 mg (0.035 mmol) HATU sowie 21 µl N,N-

Diisopropylethylamin und anschließender Entschützung mit Trifluoressigsäure hergestellt. Es wurden 12 mg (51% d. Th. über 2 Stufen) erhalten.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.87 min; MS (EIpos): m/z = 748 $[M+H]^+$.

Intermediat F116

Trifluoressigsäure--(1R,3R)-3-({(2S)-2-amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}amino)-N-[2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)ethyl]cyclopentancarboxamid(1:1)

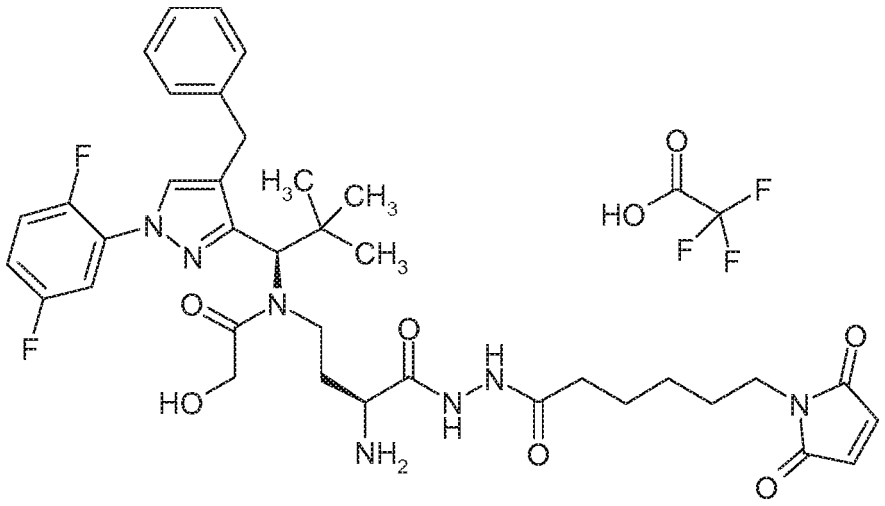


Die Titelverbindung wurde ausgehend von 11 mg (0.014 mmol) Intermediat C53 durch Umsetzung mit 11 mg (0.028 mmol) Intermediat L51 in Gegenwart von 8 mg (0.021 mmol) HATU sowie 12 µl N,N-Diisopropylethylamin und anschließender Entschützung mit 87 mg DABCO in 2 ml DMF hergestellt. Nach HPLC-Reinigung wurden 3.3 mg (28% d. Th. über 2 Stufen) erhalten.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.92 min; MS (EIpos): m/z = 747 $[M+H]^+$.

Intermediat F117

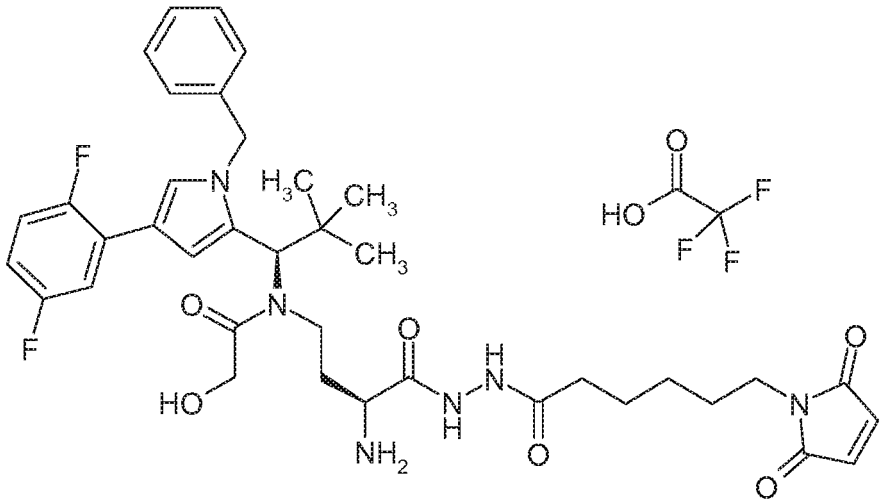
Trifluoressigsäure--N-[(3S)-3-amino-4-{2-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)hexanoyl]hydrazino}-4-oxobutyl]-N-{(1R)-1-[4-benzyl-1-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrazol-3-yl]-2,2-dimethylpropyl}-2-hydroxyacetamid (1:1)



Die Titelverbindung wurde nach klassischen Methoden der Peptidchemie ausgehend von Intermediat C49 hergestellt. C49 wurde zunächst mit 9H-Fluoren-9-ylmethyl-hydrazincarboxylat in Gegenwart von HATU gekuppelt. Anschließend wurde die Fmoc-Schutzgruppe mit Piperidin in DMF entfernt und das erhaltene Hydrazid mit 6-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)hexansäure in Gegenwart von HATU gekuppelt. Im letzten Schritt wurde die Boc-Schutzgruppe mit TFA in Dichlormethan entfernt.
LC-MS (Methode 1): R_t = 0.93 min; MS (EIpos): m/z = 722 $[M+H]^+$.

Intermediat F118

Trifluoressigsäure--N-[(3S)-3-amino-4-{2-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)hexanoyl]hydrazino}-4-oxobutyl]-N-{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-2-hydroxyacetamid (1:1)



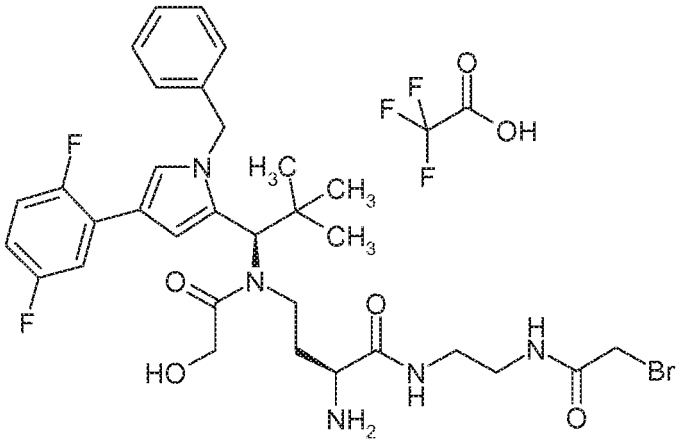
Die Titelverbindung wurde im ersten Schritt analog zu Intermediat F3 ausgehend von 15 mg (0.019 mmol) Intermediat C53 durch Kupplung mit kommerziell erhältlichem 6-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1*H*-

pyrrol-1-yl)hexanhydrazid in Gegenwart von HATU hergestellt. Anschließend erfolgte die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe mit 142 mg DABCO in DMF. Nach HPLC Reinigung wurden 3 mg (19 % d. Th.) der Titelverbindung erhalten.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.90 min; MS (Elpos): m/z = 721 $[M+H]^+$.

Intermediat F119

Trifluoressigsäure--(2S)-2-amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]-N-{2-[(bromacetyl)amino]ethyl}butanamid (1:1)



29 mg (0.044 mmol) von Intermediat C58 wurden in 3.4 mL DMF aufgenommen und mit 36 mg (0.087 mmol) von Intermediat L52 sowie mit 25 mg (0.065 mmol) HATU und 19 µl N,N-Diisopropylethylamin versetzt. Nach 60 min Rühren bei RT wurde eingeengt und der Rückstand durch präparative HPLC gereinigt. Es wurden 26.4 mg (73% d. Th.) der Zwischenstufe erhalten.

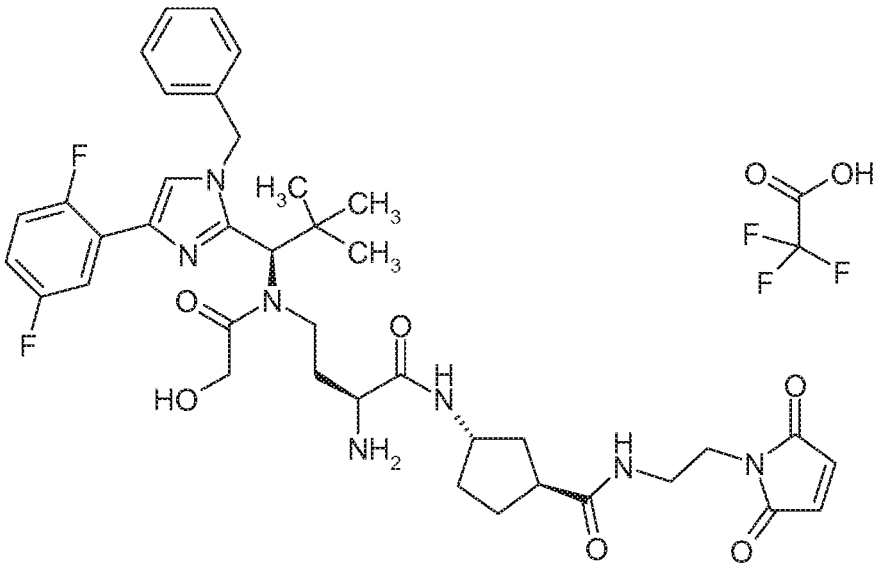
LC-MS (Methode 1): R_t = 1.34 min; MS (ESIpos): m/z = 820 und 822 $(M+H)^+$.

Dieses Intermediat wurde in 3 mL 2,2,2-Trifluorethanol gelöst. Es wurden 6.5 mg (0.048 mmol) Zinkchlorid zugegeben und der Ansatz 4 h bei 50°C gerührt. Dann wurden 13.9 mg (0.048 mmol) Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure sowie 2 mL einer 0.1%-igen wässrigen Trifluoressigsäurelösung zugesetzt. Der Ansatz wurde mittels präparativer HPLC gereinigt. Nach Einengen der entsprechenden Fraktionen und Lyophilisation des Rückstands aus Acetonitril/Wasser wurden 14.4 mg (58% d.Th.) der Titelverbindung erhalten.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.88 min; MS (ESIpos): m/z = 676 und 678 $(M+H)^+$.

Intermediat F120

Trifluoressigsäure--(1S,3S)-3-({(2S)-2-amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}amino)-N-[2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)ethyl]cyclopentancarboxamid(1:1)

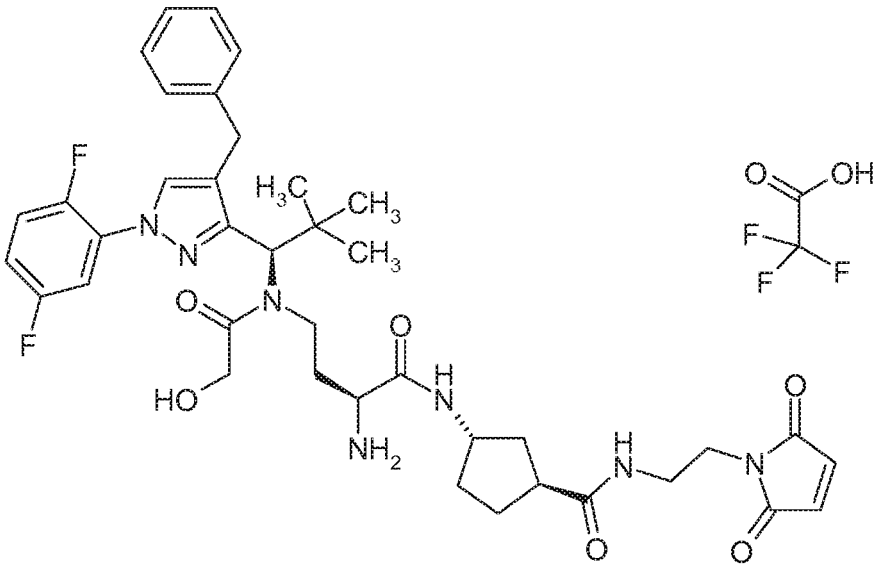


Die Titelverbindung wurde ausgehend von 10 mg (0.015 mmol) Intermediat C5 durch Umsetzung mit 11 mg (0.03 mmol) Intermediat L53 in Gegenwart von 8.4 mg (0.022 mmol) HATU sowie 13 µl N,N-Diisopropylethylamin und anschließender Entschützung mit Trifluoressigsäure hergestellt. Es wurden 7.5 mg (59% d. Th. über 2 Stufen) erhalten.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.85 min; MS (EIpos): m/z = 748 $[M+H]^+$.

Intermediat F121

Trifluoressigsäure--(1S,3S)-3-({(2S)-2-amino-4-[{(1R)-1-[4-benzyl-1-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrazol-3-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}amino)-N-[2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)ethyl]cyclopentancarboxamid(1:1)

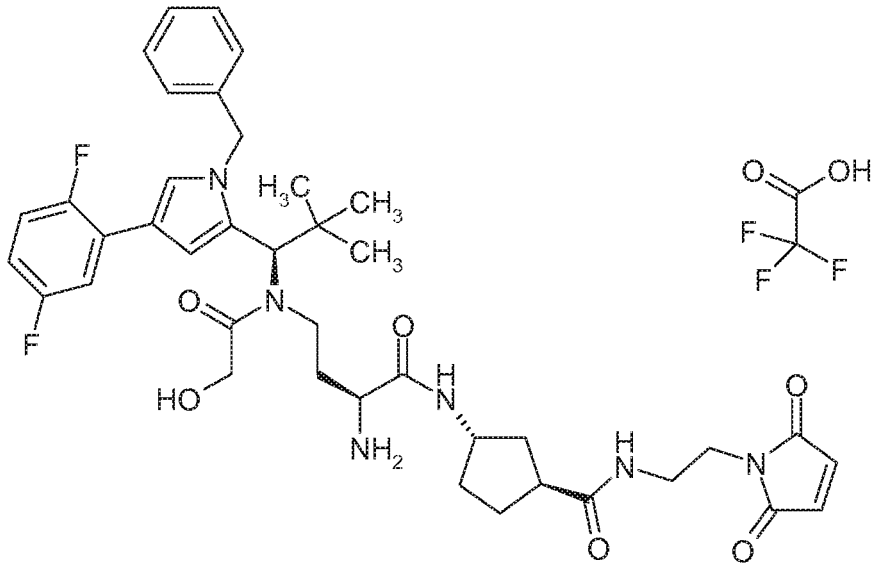


Die Titelverbindung wurde ausgehend von 10 mg (0.016 mmol) Intermediat C49 durch Umsetzung mit 11.5 mg (0.031 mmol) Intermediat L53 in Gegenwart von 9 mg (0.024 mmol) HATU sowie 14 µl N,N-Diisopropylethylamin und anschließender Entschützung mit Trifluoressigsäure hergestellt. Es wurden 9 mg (61% d. Th. über 2 Stufen) erhalten.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.84 min; MS (Elpos): m/z = 748 $[M+H]^+$.

Intermediat F122

Trifluoressigsäure--(1S,3S)-3-({(2S)-2-amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}amino)-N-[2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)ethyl]cyclopentancarboxamid(1:1)



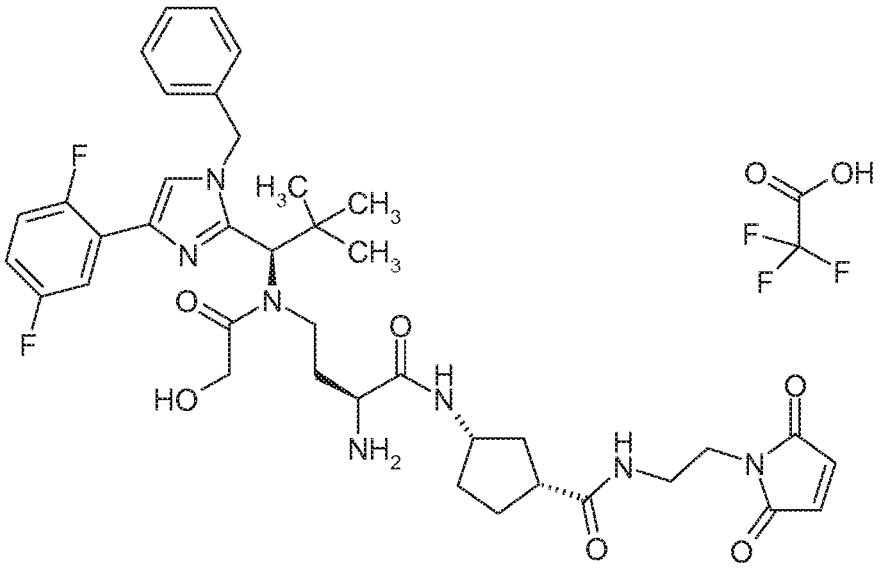
Die Titelverbindung wurde ausgehend von 15 mg (0.019 mmol) Intermediat C53 durch Umsetzung mit 14 mg (0.038 mmol) Intermediat L53 in Gegenwart von 11 mg (0.029 mmol) HATU sowie 17 µl N,N-

Diisopropylethylamin und anschließender Entschützung mit 202 mg DABCO in 3 ml DMF hergestellt. Nach HPLC-Reinigung wurden 4 mg (24% d. Th. über 2 Stufen) erhalten.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.87 min; MS (ElPos): m/z = 747 $[M+H]^+$.

Intermediat F123

Trifluoressigsäure--(1R,3S)-3-({(2S)-2-amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}amino)-N-[2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)ethyl]cyclopentancarboxamid(1:1)

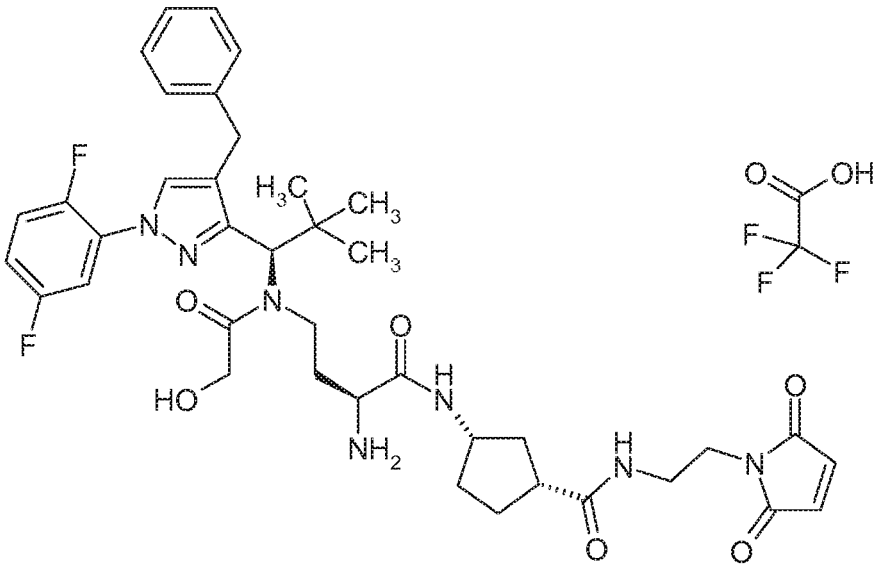


Die Titelverbindung wurde ausgehend von 10 mg (0.015 mmol) Intermediat C5 durch Umsetzung mit 11 mg (0.030 mmol) Intermediat L54 in Gegenwart von 8.4 mg (0.022 mmol) HATU sowie 13 µl N,N-Diisopropylethylamin und anschließender Entschützung mit Trifluoressigsäure hergestellt. Es wurden 4 mg (31% d. Th. über 2 Stufen) erhalten.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.86 min; MS (ElPos): m/z = 748 $[M+H]^+$.

Intermediat F124

Trifluoressigsäure--(1R,3S)-3-({(2S)-2-amino-4-[{(1R)-1-[4-benzyl-1-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrazol-3-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}amino)-N-[2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)ethyl]cyclopentancarboxamid(1:1)

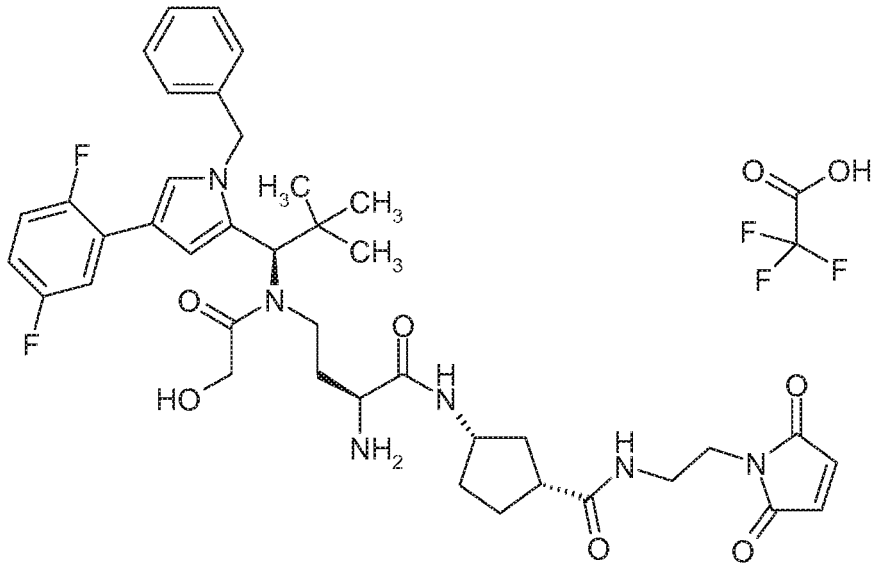


Die Titelverbindung wurde ausgehend von 10 mg (0.016 mmol) Intermediat C49 durch Umsetzung mit 11.5 mg (0.031 mmol) Intermediat L54 in Gegenwart von 9 mg (0.024 mmol) HATU sowie 14 µl N,N-Diisopropylethylamin und anschließender Entschützung mit Trifluoressigsäure hergestellt. Es wurden 9 mg (66% d. Th. über 2 Stufen) erhalten.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.84 min; MS (Elpos): m/z = 748 $[M+H]^+$.

Intermediat F125

Trifluoressigsäure--(1R,3S)-3-({(2S)-2-amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}amino)-N-[2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)ethyl]cyclopentancarboxamid(1:1)



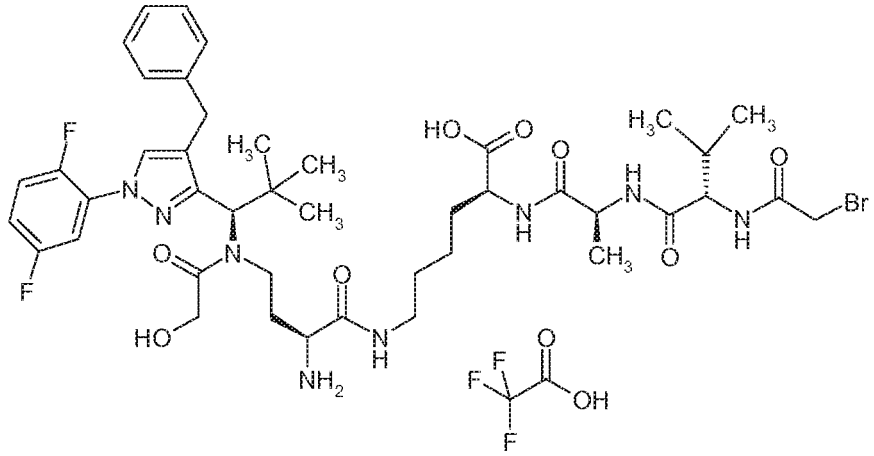
Die Titelverbindung wurde ausgehend von 15 mg (0.019 mmol) Intermediat C53 durch Umsetzung mit 14 mg (0.038 mmol) Intermediat L54 in Gegenwart von 11 mg (0.029 mmol) HATU sowie 17 µl N,N-

Diisopropylethylamin und anschließender Entschützung mit 127 mg DABCO in 3 ml DMF hergestellt. Nach HPLC-Reinigung wurden 3 mg (17% d. Th. über 2 Stufen) erhalten.

LC-MS (Methode 4): R_t = 1.08 min; MS (EIpos): m/z = 769 $[M+Na]^+$.

Intermediat F126

N-(Bromacetyl)-L-valyl-L-alanyl-N^6-{(2S)-2-amino-4-[{(1R)-1-[4-benzyl-1-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrazol-3-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}-L-lysin -trifluoressigsäure (1:1)



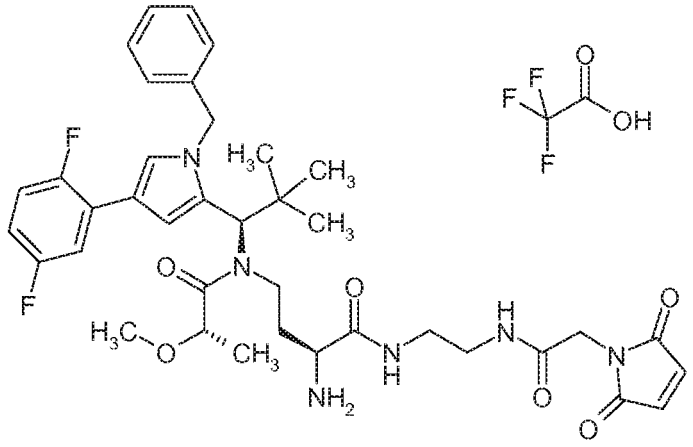
Die Titelverbindung wurde in Analogie zu Intermediat F110 aus 18 mg (0.027 mmol) von Intermediat C49 und 21 mg (0.027 mmol) von Intermediat L49 hergestellt. Es wurden 8.7 mg (30% d. Th. über 2 Stufen) der Titelverbindung erhalten.

HPLC (Methode 11): R_t = 1.94 min;

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.86 min; MS (ESIpos): m/z = 933 und 935 $(M+H)^+$.

Intermediat F127

Trifluoressigsäure --(2S)-2-amino-4-({(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}[(2S)-2-methoxypropanoyl]amino)-N-(2-{[(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)acetyl]amino}ethyl)butanamid (1:1)



12 mg (0.015 mmol) von Intermediat C59 wurden in 2.4 mL DMF gelöst und mit 14.6 mg (0.046 mmol) von Intermediat L1 sowie mit 6 mg (0.031 mmol) 1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimid-Hydrochlorid, 5.9 mg (0.039 mmol) 1-Hydroxy-1*H*-benzotriazol-Hydrat und 8 µl *N,N*-Diisopropylethylamin versetzt. Nach 1 h Rühren bei RT wurde eingeengt und der Rückstand durch präparative HPLC gereinigt. 11 mg (70% d. Th.) dieser Zwischenstufe wurden erhalten.
LC-MS (Methode 1): R_t = 1.34 min; MS (ESIpos): m/z = 942 $(M+H)^+$.

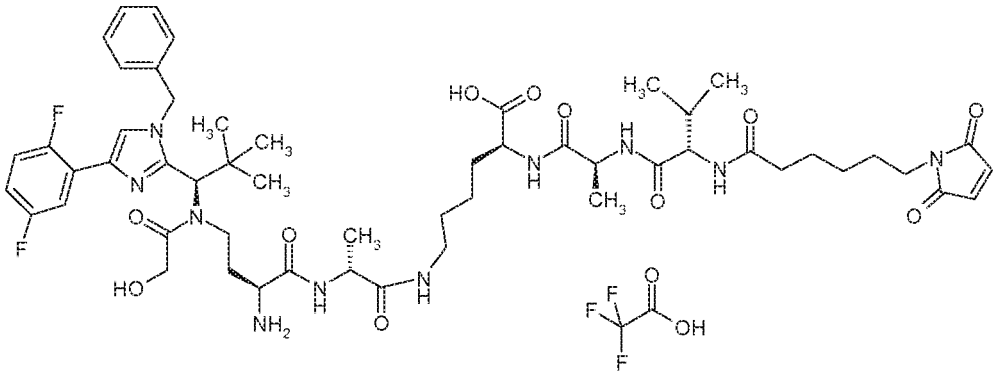
11 mg (0.011 mmol) dieses Intermediats wurden in 2 ml DMF aufgenommen und mit 123 mg (1.1 mmol) 1,4-Diazabicyclo(2.2.2)octan versetzt. Der Ansatz wurde 2 h im Ultraschallbad behandelt. Anschließend wurden 63 µl Essigsäure zugegeben und der Ansatz im Hochvakuum eingeengt. Der Rückstand wurde durch präparative HPLC gereinigt. Es wurden 2 mg (22% d. Th.) der Titelverbindung erhalten.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.89 min; MS (EIpos): m/z = 721 $[M+H]^+$.

HPLC (Methode 11): R_t = 1.95 min;

Intermediat F128

N^6-(N-{(2S)-2-Amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}-D-alanyl)-N^2-{N-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)hexanoyl]-L-valyl-L-alanyl}-L-lysin -trifluoressigsäure (1:1)

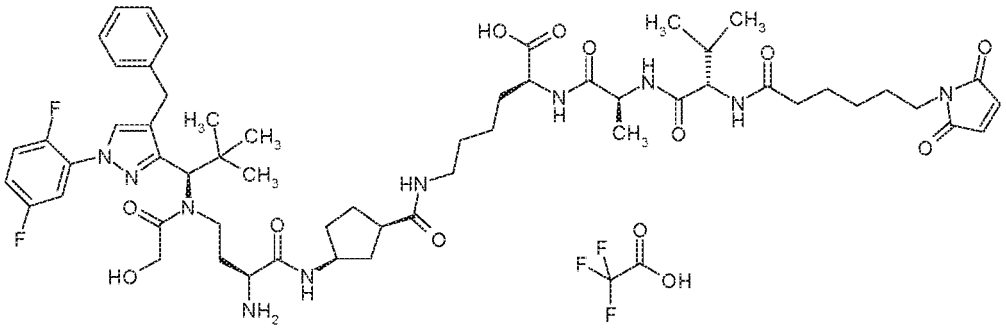


Die Titelverbindung wurde ausgehend von 3 mg (0.005 mmol) Intermediat C5 durch Umsetzung mit 2.5 mg (0.003 mmol) Intermediat L55 in Gegenwart von 2.5 mg (0.007 mmol) HATU sowie 3 µl N,N-Diisopropylethylamin und anschließender Entschützung mit Trifluoressigsäure hergestellt. Es wurden 1.4 mg (32% d. Th. über 2 Stufen) erhalten.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.93 min; MS (Elpos): m/z = 1077 $[M+H]^+$.

Intermediat F129

N-[6-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)hexanoyl]-L-valyl-L-alanyl-N^6-{[(1R,3S)-3-({(2S)-2-amino-4-[{(1R)-1-[4-benzyl-1-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrazol-3-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}amino)cyclopentyl]carbonyl}-L-lysin -trifluoressigsäure (1:1)

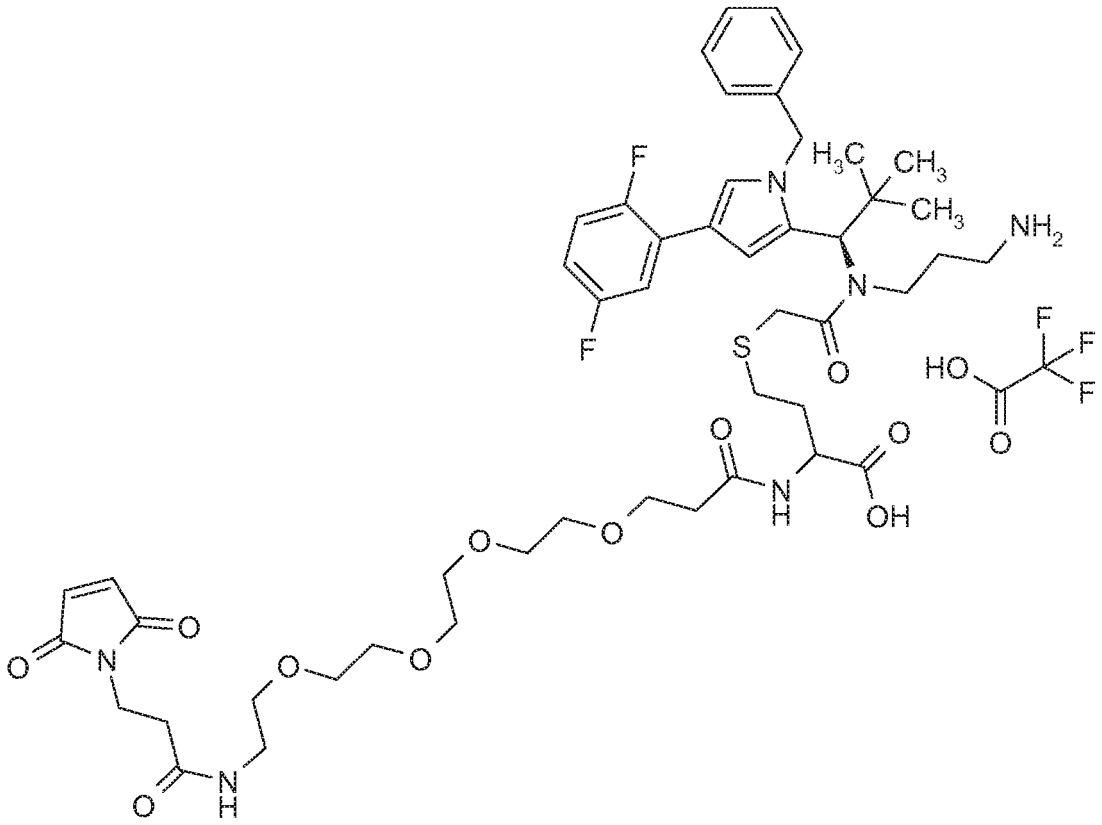


Die Titelverbindung wurde in Analogie zu Intermediat F128 ausgehend von 10 mg (0.016 mmol) Intermediat C49 durch Umsetzung mit 19 mg (0.024 mmol) Intermediat L56 in Gegenwart von 12 mg (0.031 mmol) HATU sowie 14 µl N,N-Diisopropylethylamin und anschließender Entschützung mit Trifluoressigsäure hergestellt. Es wurden 13.5 mg (70% d. Th. über 2 Stufen) erhalten.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.9 min; MS (Elpos): m/z = 1117 $[M+H]^+$.

Intermediat F142

R/S-{2-[(3-Aminopropyl){(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}amino]-2-oxoethyl}-N-[19-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-17-oxo-4,7,10,13-tetraoxa-16-azanonadecan-1-oyl]-homocystein-trifluoressigsäure(1:1)



20.0 mg (23.7 µmol) R/S-(11-{(1R)-1-[1-Benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-2,2-dimethyl-6,12-dioxo-5-oxa-7,11-diaza-2-silatridecan-13-yl)-homocystein-trifluoressigsäure(1:1) und 13.4 mg (26.04 mmol) 3-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-N-{15-[(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)oxy]-15-oxo-3,6,9,12-tetraoxapentadec-1-yl}propanamid wurden in 1.0 mL DMF gelöst und mit 4.8 mg (47.34 µmol) 4-Methylmorpholin versetzt. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei RT gerührt. Es wurden 3.6 mg (0.06 mmol) Essigsäure zugegeben und die Reaktionsmischung wurde direkt mittles präp. RP-HPLC gereinigt (Säule: Reprosil 250x30; 10µ, Fluss: 50 mL/min, MeCN/Wasser). Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 12.4 mg (44 % d. Th.) der Verbindung R/S-(11-{(1R)-1-[1-Benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-2,2-dimethyl-6,12-dioxo-5-oxa-7,11-diaza-2-silatridecan-13-yl)-N-[19-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-17-oxo-4,7,10,13-tetraoxa-16-azanonadecan-1-oyl]- homocystein.

LC-MS (Methode 1): R_t = 1.30 min; MS (ESIpos): m/z = 1129 $(M+H)^+$.

10.0 mg (8.85 µmol) R/S-(11-{(1R)-1-[1-Benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-2,2-dimethyl-6,12-dioxo-5-oxa-7,11-diaza-2-silatridecan-13-yl)-N-[19-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-17-oxo-4,7,10,13-tetraoxa-16-azanonadecan-1-oyl]-L-homocystein wurden in

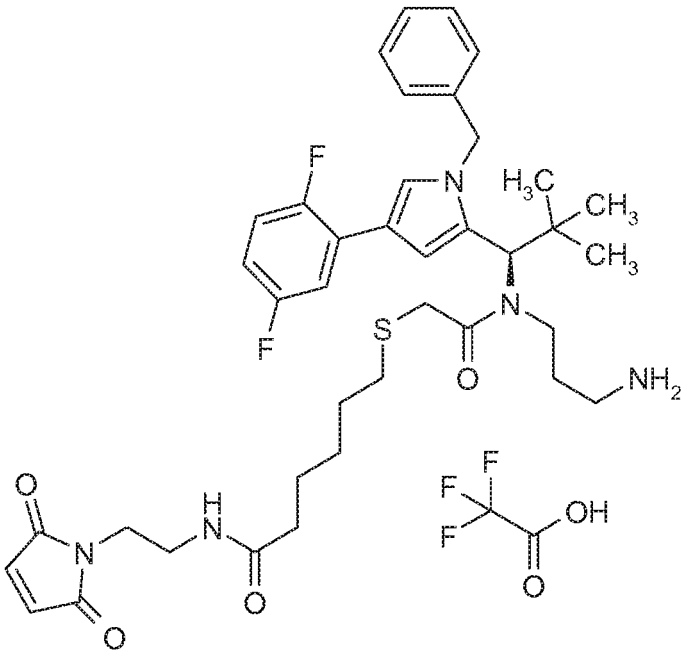
Trifluorethanol gelöst und mit 3.1 mg (22.71 µmol) Zinkdichlorid versetzt. Die Reaktionsmischung rührte über Nacht bei 50 °C. Die Reaktionsmischung wurde mit 3.9 mg (0.01 mmol) Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure versetzt, kurz gerührt und dann mit Wasser (0.1% TFA) versetzt. Die Reinigung erfolgte direkt mittles präp. RP-HPLC (Säule: Reprosil 250x30; 10µ, Fluss: 50 mL/min, MeCN/Wasser, 0.1% TFA). Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand mit etwas Wasser lyophilisiert. Man erhielt 7.6 mg (78 % d. Th.) der Titelverbindung.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.94 min; MS (ESIpos): m/z = 983 $(M+H)^+$.

^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6): δ [ppm] = 0.50 (m, 1H), 0.81 (s, 9H), 1.49 (m, 1H), 1.89 (m, 1H), 2.05 (m, 1H), 2.29-2.43 (m, 4H), 2.45-2.55 (m, 2H), 2.58-2.74 (m, 2H), 3.10-3.20 (m, 2H), 3.21-3.40 (m, 2H), 3.42-3.54 (m, 16H), 3.55-3.65 (m, 4H), 4.28 (m, 1H), 4.91 (dd, 1H), 5.18 (dd, 1H), 5.60 (s, 1H), 6.95 (m, 1H), 7.00 (s, 2H), 7.15-7.38 (m, 7H), 7.53 (s, 1H), 7.68 (m, 1H), 8.00 (m, 2H).

Intermediat F143

Trifluoressigsäure--6-({2-[(3-aminopropyl){(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}amino]-2-oxoethyl}sulfanyl)-N-[2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)ethyl]hexanamid(1:1)



30.0 mg (0.05 mmol) 2-(Trimethylsilyl)ethyl-{3-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(chloracetyl)amino]propyl}carbamat und 13.5 mg (0.07 mmol) 6-(Acetylsulfanyl)hexansäure wurden in 2.0 mL Methanol mit einem Tropfen Wasser vorgelegt. 23.0 mg (0.17 mmol) Kaliumcarbonat wurden hinzugefügt. Die Reaktionsmischung wurde 4 h bei 50 °C gerührt. Die Reaktionsmischung wurde mit Ethylacetat versetzt. Die organische Phase wurde mit ges. NaCl-

Lösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösemittel wurde im Vakuum verdampft. Der Rückstand wurde mittles präp. RP-HPLC gereinigt (Säule: Reprosil 125x30; 10µ, Fluss: 50 mL/min, MeCN/Wasser, 0.1% TFA). Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 54.2 mg (90 % d. Th.) der Verbindung 11-{(1R)-1-[1-Benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-2,2-dimethyl-6,12-dioxo-5-oxa-14-thia-7,11-diaza-2-silaicosan-20-säure.

LC-MS (Methode 1): R_t = 1.49 min; MS (ESIpos): m/z = 1106 $(M+H)^+$.

54.0 mg (0.07 mmol) 11-{(1R)-1-[1-Benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-2,2-dimethyl-6,12-dioxo-5-oxa-14-thia-7,11-diaza-2-silaicosan-20-säure und 16.7 mg (0.09 mmol) 1-(2-Aminoethyl)-1H-pyrrol-2,5-dionhydrochlorid(1:1) wurden in 3.0 mL Acetonitril vorgelegt und mit 75.0 mg (0.58 mmol) N,N-Diisopropylethylamin versetzt. Es wurden 60.0 mg (0.09 mmol) T3P (50% in Acetonitril) zugegeben und über Nacht bei RT gerührt. Es wurde mit Wasser gequencht und die Reaktionsmischung direkt mittles präp. RP-HPLC gereinigt (Säule: Reprosil 125x30; 10µ, Fluss: 50 mL/min, MeCN/Wasser). Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 42.8 mg (68 % d. Th.) der Verbindung 2-(Trimethylsilyl)ethyl-[3-({(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}{[(6-{[2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)ethyl]amino}-6-oxohexyl)sulfanyl]acetyl}amino)propyl]carbamat.

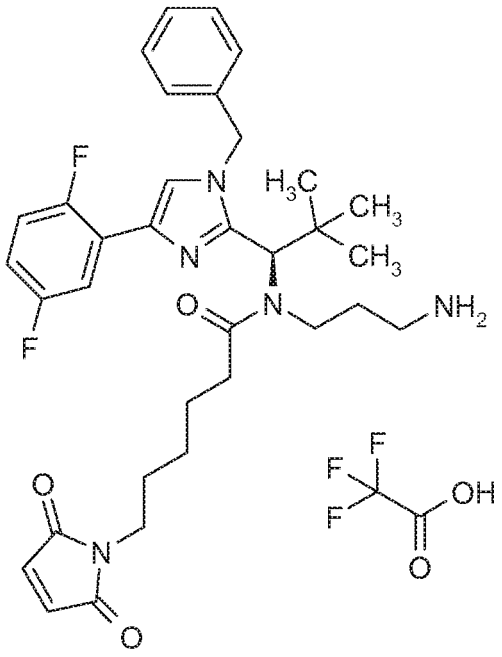
LC-MS (Methode 1): R_t = 1.48 min; MS (ESIpos): m/z = 866 $(M+H)^+$.

20.0 mg (0.02 mmol) 2-(Trimethylsilyl)ethyl-[3-({(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}{[(6-{[2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)ethyl]amino}-6-oxohexyl)sulfanyl]acetyl}amino)propyl]carbamat wurden in 2.0 ml Trifluorethanol gelöst und mit 4.7 mg (0.04 mmol) Zinkdichlorid versetzt. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei 50 °C gerührt und danach mit 10.1 mg (0.04 mmol) Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure versetzt und 10 min gerührt. Wasser (0.1% TFA) wurde zugesetzt und die Reaktionsmischung mittles präp. RP-HPLC gereinigt (Säule: Reprosil 125x30; 10µ, Fluss: 50 mL/min, MeCN/Wasser, 0.1% TFA). Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 9.2 mg (48 % d. Th.) der Titelverbindung.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.98 min; MS (ESIpos): m/z = 722 $(M+H)^+$.

Intermediat F144

Trifluoressigsäure--N-(3-aminopropyl)-N-{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)hexanamid(1:1)



50.0 mg (0.1 mmol) tert-Butyl-[3-({(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}amino)propyl]carbamat (Intermediat C15) wurden in 2.0 mL Dichlormethan vorgelegt und mit 22.7 mg (0.22 mmol) Triethylamin und 49.3 mg (0.22 mmol) 6-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)hexanoylchlorid (Intermediat L60) WISV1648-1-1 versetzt.

Die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei RT gerührt. Es wurde dann alle 2 h dreimal 1 Äquivalent Intermediat L60 und 1.2 Äquivalente Triethylamin zugesetzt und anschließend über Nacht bei RT gerührt. Dieser Vorgang wurde noch zweimal wiederholt. Das Lösemittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand mittles präp. RP-HPLC gereinigt (Säule: Reprosil 125x30; 10µ, Fluss: 50 mL/min, MeCN/Wasser). Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 30.9 mg (43 % d. Th.) der Verbindung tert-Butyl-[3-({(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}[6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)hexanoyl]amino)propyl]carbamat

LC-MS (Methode 1): R_t = 1.51 min; MS (ESIpos): m/z = 706 $(M+H)^+$.

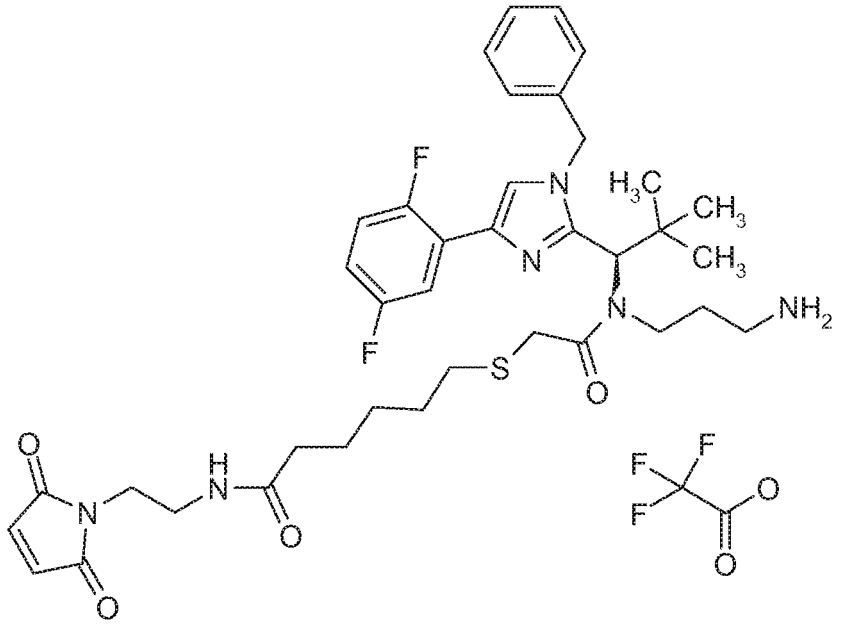
24.6 mg (0.04 mmol) tert-Butyl-[3-({(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}[6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)hexanoyl]amino)propyl]carbamat wurden in 3.0 mL Dichlormethan gelöst und mit 79.5 mg (0.7 mmol) TFA versetzt und 6 h bei RT gerührt. Es wurden nochmals 79.5 mg (0.7 mmol) TFA zugesetzt und über Nacht bei RT gerührt. Das Lösemittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand dreimal mit Dichlormethan kodestilliert. Der Rückstand wurde mittles präp. RP-HPLC gereinigt (Säule: Reprosil 125x30; 10µ, Fluss: 50 mL/min,

MeCN/Wasser, 0.1% TFA). Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 24.2 mg (97 % d. Th.) der Titelverbindung.

LC-MS (Methode 1): R_t = 1.02 min; MS (ESIpos): m/z = 606 $(M+H)^+$.

Intermediat F145

Trifluoressigsäure--6-({2-[(3-Aminopropyl){(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}amino]-2-oxoethyl}sulfanyl)-N-[2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)ethyl]hexanamid



90.0 mg (0.15 mmol) tert-Butyl-{3-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(chloracetyl)amino]propyl}carbamat Intermediat C16 und 43.6 mg (0.23 mmol) 6-(Acetylsulfanyl)hexansäure wurden in 9.0 mL Methanol mit einem Tropfen Wasser vorgelegt und mit 73.9 mg (0.54 mmol) Kaliumcarbonat versetzt. Die Reaktionsmischung wurde 4 h bei RT gerührt und anschließend mit Ethylacetat versetzt. Die organische Phase wurde mit Wasser/ges. NaCl-Lösung und mit ges. NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und die Lösemittel im Vakuum verdampft. Der Rückstand wurde mittels Kieselgel (Laufmittel: Dichlormethan/Methanol 100:2) gereinigt. Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 98.7 mg (83 % d. Th.) der Verbindung 9-{(1R)-1-[1-Benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-2,2-dimethyl-4,10-dioxo-3-oxa-12-thia-5,9-diazaoctadecan-18-säure.

LC-MS (Methode 1): R_t = 1.44 min; MS (ESIpos): m/z = 701 $(M+H)^+$.

20.0 mg (0.03 mmol) 9-{(1R)-1-[1-Benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-2,2-dimethyl-4,10-dioxo-3-oxa-12-thia-5,9-diazaoctadecan-18-säure und 6.5 (0.04 mmol) 1-(2-Aminoethyl)-1H-pyrrol-2,5-dionhydrochlorid(1:1) wurden in 1.5 mL Acetonitril vorgelegt und mit 23.6 mg (0.04 mmol) T3P sowie mit 29.5 mg (0.23 mmol) N,N-Diisopropylethylamin versetzt. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei RT gerührt und anschließend mit Wasser versetzt. Die Reaktionsmischung wurde mittles präp. RP-HPLC gereinigt (Säule: Reprosil 250x30; 10µ, Fluss: 50 mL/min, MeCN/Wasser). Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 16.7 mg (99 % d. Th.) der Verbindung tert-Butyl-[3-({(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}{[(6-{[2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)ethyl]amino}-6-oxohexyl)sulfanyl]acetyl}amino)propyl]carbamat.

LC-MS (Methode 1): R_t = 1.40 min; MS (ESIpos): m/z = 823 $(M+H)^+$.

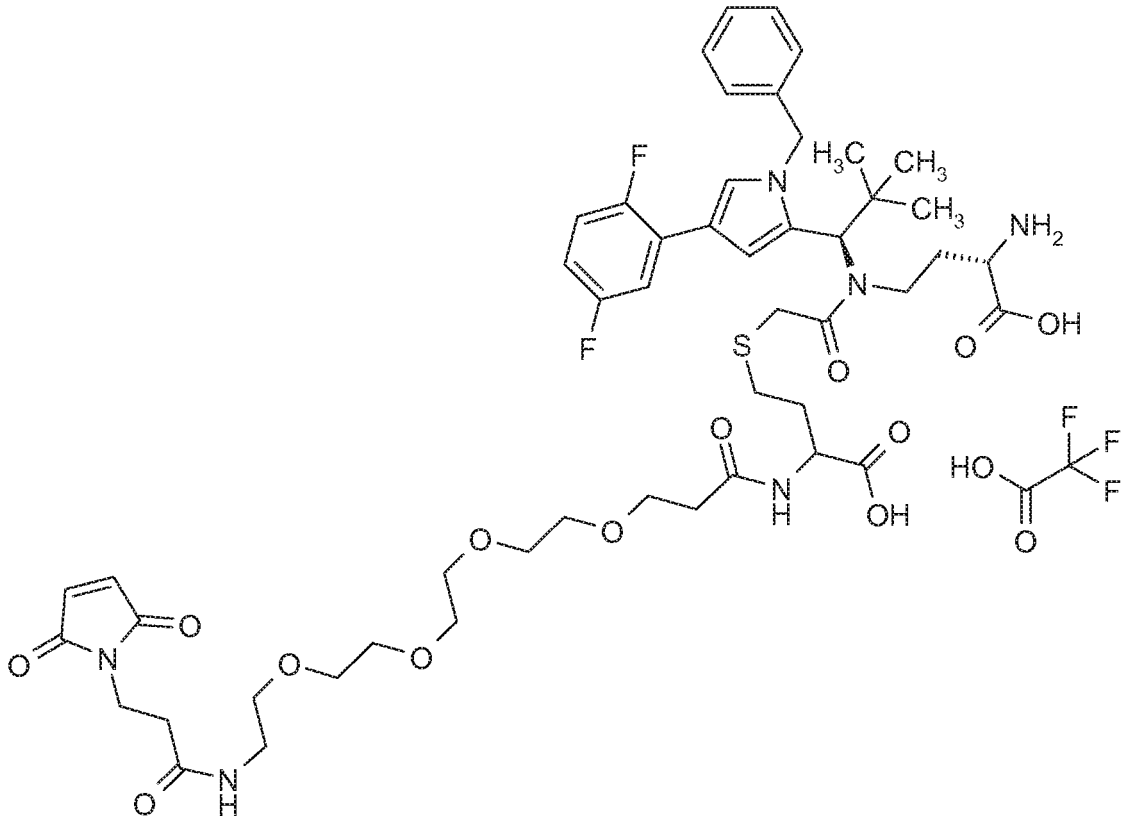
14.8 mg (0.02 mmol) tert-Butyl-[3-({(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}{[(6-{[2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)ethyl]amino}-6-oxohexyl)sulfanyl]acetyl}amino)propyl]carbamat wurden in 1.5 mL Dichlormethan gelöst und mit 41.0 mg (0.36 mmol) TFA versetzt. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei RT gerührt.

Dann wurden noch jeweils zweimal 41.0 mg (0.36 mmol) TFA hinzugefügt und über Nacht bei RT gerührt. Das Lösemittel wurde im Vakuum verdampft und der Rückstand mittles präp. RP-HPLC gereinigt (Säule: Reprosil 250x30; 10µ, Fluss: 50 mL/min, MeCN/Wasser, 0.1% TFA). Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand wurde in 1,4-Dioxan und Wasser aufgenommen und lyophilisiert. Man erhielt 2.9 mg (19 % d. Th.) der Titelverbindung.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.93 min; MS (ESIpos): m/z = 723 $(M+H)^+$.

Intermediat F146

R/S-[2-({(3S)-3-Amino-3-carboxypropyl}{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}amino)-2-oxoethyl]-N-[19-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-17-oxo-4,7,10,13-tetraoxa-16-azanonadecan-1-oyl]homocystein-trifluoressigsäure(1:1)



25.0 mg (28.12 µmol) R/S-[(8S)-11-{(1R)-1-[1-Benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-8-carboxy-2,2-dimethyl-6,12-dioxo-5-oxa-7,11-diaza-2-silatridecan-13-yl]homocystein (Intermediat C12) und 15.9 mg (30.93 µmol) 3-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-N-{15-[(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)oxy]-15-oxo-3,6,9,12-tetraoxapentadec-1-yl}propanamid wurden in 2.0 mL DMF gelöst und mit 11.4 mg (112.48 µmol) 4-Methylmorpholin versetzt. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei RT gerührt. Es wurden 7.6 mg (0.13 mmol) Essigsäure zugegeben und die Reaktionsmischung wurde direkt mittles präp. RP-HPLC gereinigt (Säule: Reprosil 250x30; 10µ, Fluss: 50 mL/min, MeCN/Wasser). Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 23.9 mg (59 % d. Th.) der Verbindung R/S-[(8S)-11-{(1R)-1-[1-Benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-8-carboxy-2,2-dimethyl-6,12-dioxo-5-oxa-7,11-diaza-2-silatridecan-13-yl]-N-[19-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-17-oxo-4,7,10,13-tetraoxa-16-azanonadecan-1-oyl]homocystein.

LC-MS (Methode 1): R_t = 1.26 min; MS (ESIpos): m/z = 1173 $(M+H)^+$.

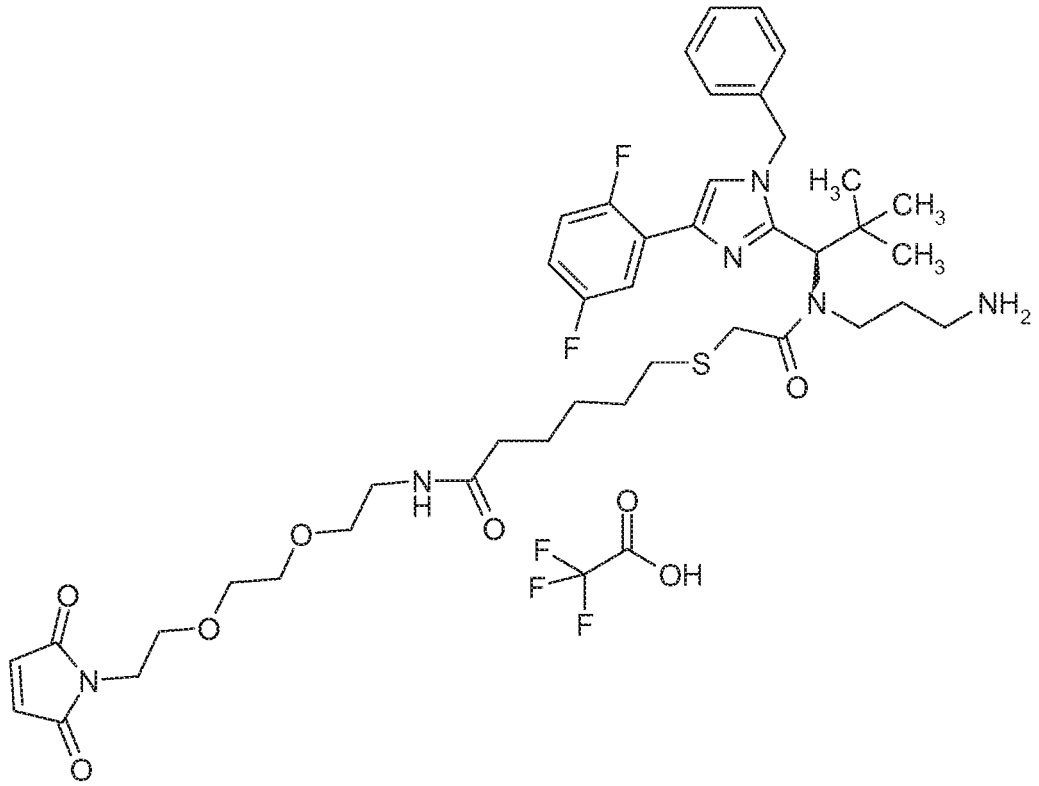
11.8 mg (8.23 µmol) R/S-[(8S)-11-{(1R)-1-[1-Benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-8-carboxy-2,2-dimethyl-6,12-dioxo-5-oxa-7,11-diaza-2-silatridecan-13-yl]-N-[19-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-17-oxo-4,7,10,13-tetraoxa-16-azanonadecan-1-oyl]homocystein

wurden in Trifluorethanol gelöst und mit 1.7 mg (12.35 µmol) Zinkdichlorid versetzt. Die Reaktionsmischung rührte über Nacht bei 50 °C. Die Reaktionsmischung wurde mit 3.6 mg (0.01 mmol) Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure versetzt, kurz gerührt und dann mit Wasser (0.1% TFA) versetzt. Die Reinigung erfolgte direkt mittles präp. RP-HPLC (Säule: Reprosil 250x30; 10µ, Fluss: 50 mL/min, MeCN/Wasser, 0.1% TFA). Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 5.8 mg (62 % d. Th.) der Titelverbindung.

LC-MS (Methode 4): R_t = 1.20 min; MS (ESIpos): m/z = 1029 $(M+H)^+$.

Intermediat F147

Trifluoressigsäure--N-(3-Aminopropyl)-N-{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-1-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-10-oxo-3,6-dioxa-16-thia-9-azaoctadecan-18-amid(1:1)



15.0 mg (0.03 mmol) 9-{(1R)-1-[1-Benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-2,2-dimethyl-4,10-dioxo-3-oxa-12-thia-5,9-diazaoctadecan-18-säure (Intermediat C13) wurden in 1.5 mL Acetonitril vorgelegt und mit 22.1 mg (0.17 mmol) N,N-Diisopropylethylamin und dann mit 17.7 mg (0.03 mmol) T3P versetzt. Es wurde 5 min bei RT gerührt und dann 9.5 mg (0.03 mmol) Trifluoressigsäure--1-{2-[2-(2-aminoethoxy)ethoxy]ethyl}-1H-pyrrol-2,5-dion(1:1) (Intermediat

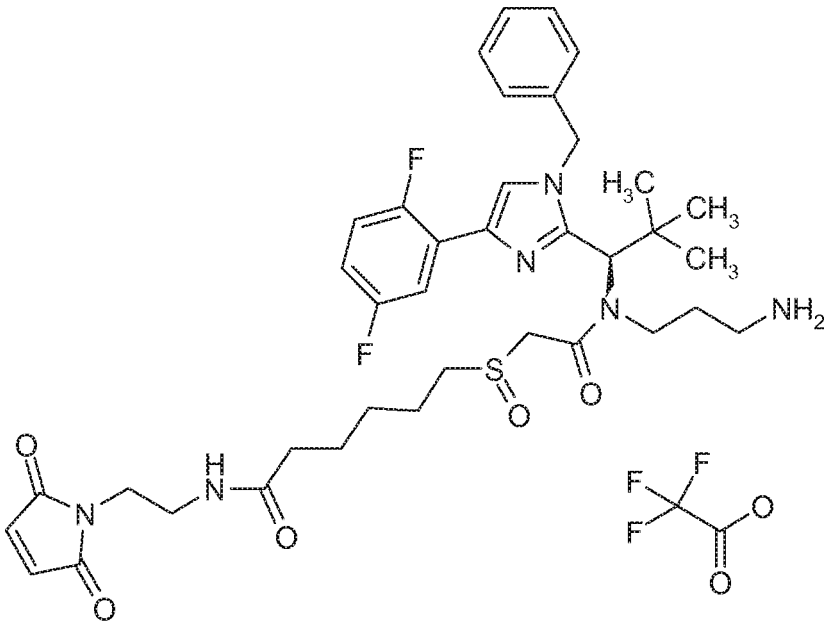
L59) zugegeben. Die Reaktionsmischung rührte über Nacht bei RT und wurde mit Wasser gequenchT. Die Reaktionsmischung wurde direkt mittles präp. RP-HPLC gereinigt (Säule: Reprosil 250x30; 10µ, Fluss: 50 mL/min, MeCN/Wasser). Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 14.8 mg (57 % d. Th.) der Verbindung tert-Butyl-[19-{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-1-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-10,18-dioxo-3,6-dioxa-16-thia-9,19-diazadocosan-22-yl]carbamat.

LC-MS (Methode 1): R_t = 1.40 min; MS (ESIpos): m/z = 911 $(M+H)^+$.

14.2 mg (0.02 mmol) tert-Butyl-[19-{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-1-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-10,18-dioxo-3,6-dioxa-16-thia-9,19-diazadocosan-22-yl]carbamat wurden in 1.5 mL Dichlormethan gelöst und mit 35.5 mg (0.31 mmol) TFA versetzt und bei RT über Nacht gerührt. Es wurden nochmals 71.0 mg (0.62 mmol) TFA zugesetzt und über Nacht bei RT gerührt. Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand mittles präp. RP-HPLC gereinigt (Säule: Reprosil 250x30; 10µ, Fluss: 50 mL/min, MeCN/Wasser, 0.1% TFA). Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand in wenig Wasser aufgenommen und lyophilisiert. Man erhielt 14.0 mg (97 % d. Th.) der Titelverbindung.
LC-MS (Methode 1): R_t = 1.01 min; MS (ESIpos): m/z = 811 $(M+H)^+$.

Intermediat F148

Trifluoressigsäure--6-({2-[(3-aminopropyl){(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}amino]-2-oxoethyl}sulfinyl)-N-[2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)ethyl]hexanamid(1:1)

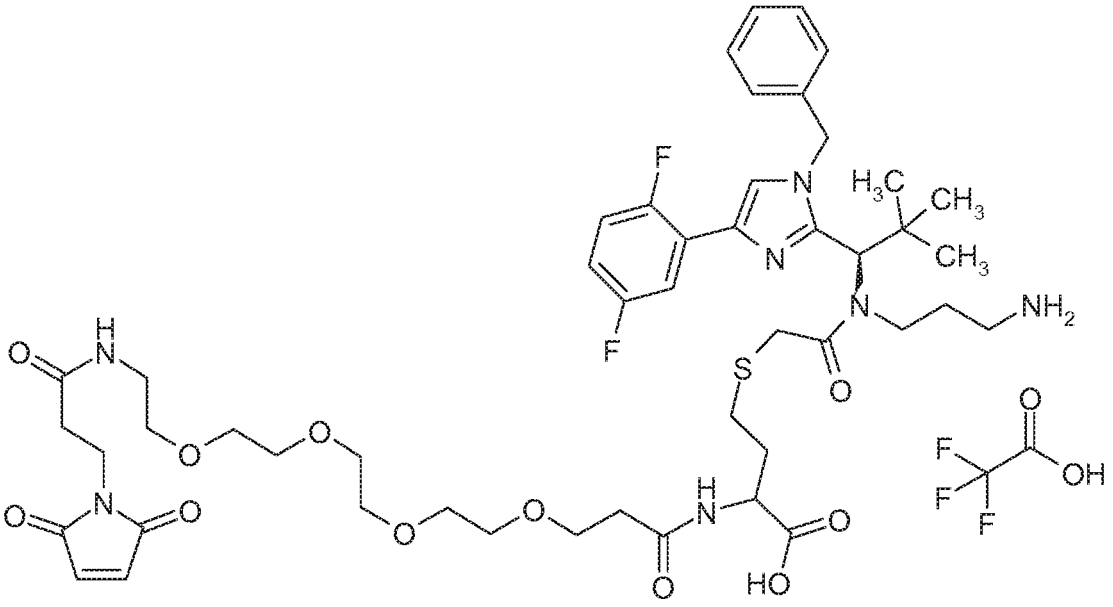


Die Titelverbindung entstand als Nebenprodukt bei der Synthese von Intermediat F145. Man erhielt 8.1 mg (53 % d. Th.) der Titelverbindung.

LC-MS (Methode 1): R_t = 1.25 min; MS (ESIpos): m/z = 739 $[M+H]^+$.

Intermediat F149

Trifluoressigsäure--R/S-{2-[(3-aminopropyl){(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}amino]-2-oxoethyl}-N-[19-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-17-oxo-4,7,10,13-tetraoxa-16-azanonadecan-1-oyl]homocystein(1:1)



20.0 mg (24.94 µmol) R/S-[2-({(1R)-1-[1-Benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}{3-[(tert-butoxycarbonyl)amino]propyl}amino)-2-oxoethyl]homocystein (Intermediat C14) und 14.1 mg (27.44 µmol) 3-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-N-{15-[(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)oxy]-15-oxo-3,6,9,12-tetraoxapentadec-1-yl}propanamid wurden in 1.0 mL DMF vorgelegt und mit 5.1 mg (49.88 µmol) 4-Mehylmorpholin versetzt. Die Reaktionsmischung rührte über Nacht. Es wurden 3.7 mg (0.06 mmol) Essigsäure zugegeben und die Reaktionsmischung wurde direkt mittles präp. RP-HPLC gereinigt (Säule: Reprosil 250x30; 10µ, Fluss: 50 mL/min, MeCN/Wasser). Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 18.2 mg (67 % d. Th.) der Verbindung R/S-[2-({(1R)-1-[1-Benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}{3-[(tert-butoxycarbonyl)amino]propyl}amino)-2-oxoethyl]-N-[19-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-17-oxo-4,7,10,13-tetraoxa-16-azanonadecan-1-oyl]homocystein.

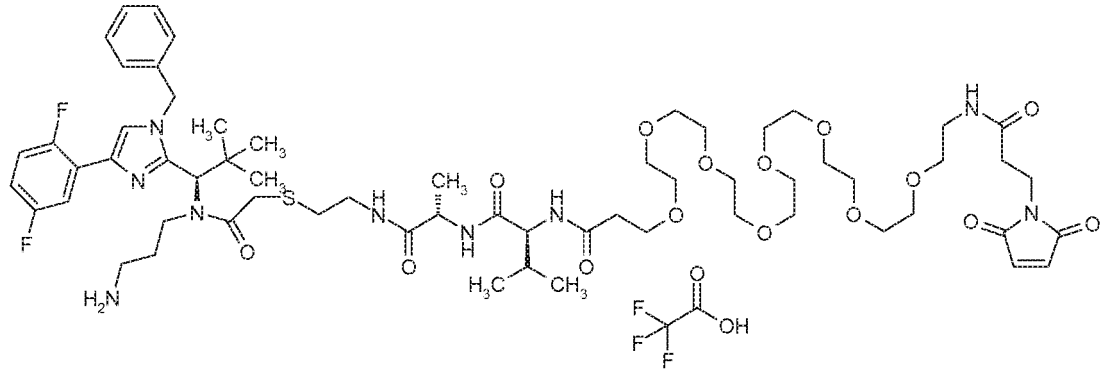
LC-MS (Methode 1): R_t = 1.23 min; MS (ESIpos): m/z = 1086 $(M+H)^+$.

17.6 mg (0.02 mmol) R/S-[2-({(1R)-1-[1-Benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}{3-[(tert-butoxycarbonyl)amino]propyl}amino)-2-oxoethyl]-N-[19-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-17-oxo-4,7,10,13-tetraoxa-16-azanonadecan-1-oyl]homocystein wurden in 1.5 mL Dichlormethan gelöst und mit 37.0 mg (0.32 mmol) TFA versetzt und bei RT über Nacht gerührt. Es wurden nochmals 74.0 mg (0.64 mmol) TFA zugesetzt und über Nacht bei RT gerührt. Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand mittles präp. RP-HPLC gereinigt (Säule: Reprosil 250x30; 10µ, Fluss: 50 mL/min, MeCN/Wasser, 0.1% TFA). Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand in wenig Wasser aufgenommen und lyophilisiert. Man erhielt 16.0 mg (90 % d. Th.) der Titelverbindung.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.92 min; MS (ESIpos): m/z = 986 $(M+H)^+$.

Intermediat F150

Trifluoressigsäure --N-[31-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-29-oxo-4,7,10,13,16,19,22,25-octaoxa-28-azahentriacontan-1-oyl]-L-valyl-N-[2-({2-[(3-aminopropyl){(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}amino]-2-oxoethyl}sulfanyl)ethyl]-L-alaninamid (1:1)



Unter Argon wurden bei 0 °C 10.0 mg (0.02 mmol) Trifluoressigsäure--tert-Butyl-[3-({[(2-aminoethyl)sulfanyl]acetyl}{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}amino)propyl]carbamat (Intermediat C20) in 1.0 mL DMF mit 12.1 mg (0.02 mmol) N-[31-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-29-oxo-4,7,10,13,16,19,22,25-octaoxa-28-azahentriacontan-1-oyl]-L-valyl-L-alanin (Intermediat L25), 2.2 mg (0.02 mmol) HOAt und 7.6 mg (0.02 mmol) HATU versetzt. Dann wurden 5.5 µL (0.03 mmol) N,N-Diisopropylethylamin zugegeben und über Nacht bei RT nachgerührt. Die Reaktionsmischung wurde mit 1.8 µL HOAc versetzt und direkt über die präp. RP-HPLC gereinigt (Säule: Reprosil 250x30; 10µ, Fluss: 50 mL/min, MeCN/Wasser). Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 10.4 mg (48 % d. Th.) der Verbindung N-[31-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-

pyrrol-1-yl)-29-oxo-4,7,10,13,16,19,22,25-octaoxa-28-azahentriacontan-1-oyl]-L-valyl-N-(9-{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-2,2-dimethyl-4,10-dioxo-3-oxa-12-thia-5,9-diazatetradecan-14-yl)-L-alaninamid.

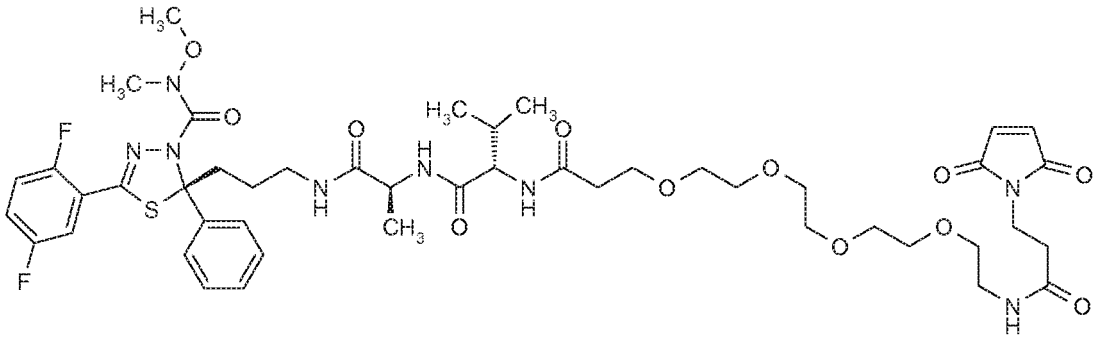
LC-MS (Methode 4): R_t = 1.60 min; MS (ESIpos): m/z = 687.5 $[M+2H]^{2+}$.

9.5 mg (0.01 mmol) N-[31-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-29-oxo-4,7,10,13,16,19,22,25-octaoxa-28-azahentriacontan-1-oyl]-L-valyl-N-(9-{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-2,2-dimethyl-4,10-dioxo-3-oxa-12-thia-5,9-diazatetradecan-14-yl)-L-alaninamid wurden in 1.0 mL Dichlormethan vorgelegt und mit 15.8 mg (0.14 mmol) TFA versetzt und über Nacht gerührt. Es wurden nochmals 31.6 mg (0.28 mmol) TFA zugegeben und über Nacht gerührt. Das Lösemittel wurde im Vakuum verdampft und der Rückstand wurde mittels präp. RP-HPLC gereinigt (Säule: Reprosil 250x30; 10µ, Fluss: 50 mL/min, MeCN/Wasser, 0.1% TFA). Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand in wenig Wasser aufgenommen und lyophilisiert. Man erhielt 10.2 mg (98 % d. Th.) der Titelverbindung.

LC-MS (Methode 4): R_t = 1.13 min; MS (ESIpos): m/z = 637.5 $[M+2H]^{2+}$.

Intermediat F151

N-[19-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-17-oxo-4,7,10,13-tetraoxa-16-azanonadecan-1-oyl]-L-valyl-N-(3-{(2S)-5-(2,5-difluorphenyl)-3-[methoxy(methyl)carbamoyl]-2-phenyl-2,3-dihydro-1,3,4-thiadiazol-2-yl}propyl)-L-alaninamid

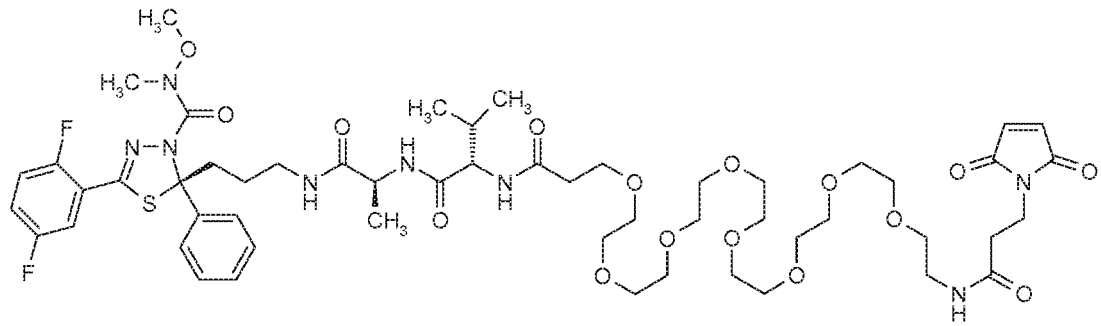


5.0 mg (0.01 mmol) (2S)-2-(3-Aminopropyl)-5-(2,5-difluorphenyl)-N-methoxy-N-methyl-2-phenyl-1,3,4-thiadiazol-3(2H)-carboxamid wurden in 1.0 mL Acetonitril vorgelegt und mit 7.7 mg (0.06 mmol) N,N-Diisopropylethylamin sowie 9.8 (0.02 mmol) T3P versetzt. Es wurde 5 min bei RT gerührt und dann wurden 9.1 mg (0.02 mmol) N-[19-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-17-oxo-4,7,10,13-tetraoxa-16-azanonadecan-1-oyl]-L-valyl-L-alanin (Intermediat L44) zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei RT gerührt. Es wurde Wasser zugegeben und die

Reaktionsmischung direkt mittels präp. RP-HPLC gereinigt (Säule: Reprosil 250x40; 10µ, Fluss: 50 mL/min, MeCN/Wasser, 0.1% TFA). Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 4.3 mg (35 % d. Th.) der Titelverbindung.
LC-MS (Methode 1): R_t = 1.02 min; MS (ESIpos): m/z = 989 $[M+H]^+$.

Intermediat F152

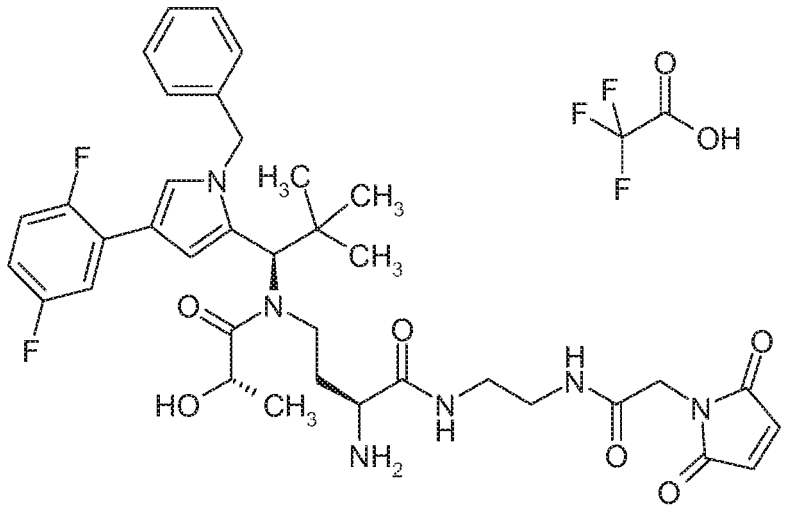
N-[31-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-29-oxo-4,7,10,13,16,19,22,25-octaoxa-28-azahentriacontan-1-oyl]-L-valyl-N-(3-{(2S)-5-(2,5-difluorphenyl)-3-[methoxy(methyl)carbamoyl]-2-phenyl-2,3-dihydro-1,3,4-thiadiazol-2-yl}propyl)-L-alaninamid



5.0 mg (0.01 mmol) (2S)-2-(3-Aminopropyl)-5-(2,5-difluorphenyl)-N-methoxy-N-methyl-2-phenyl-1,3,4-thiadiazol-3(2H)-carboxamid wurden in 1.0 mL Acetonitril vorgelegt und mit 7.7 mg (0.06 mmol) N,N-Diisopropylethylamin sowie 9.8 (0.02 mmol) T3P versetzt. Es wurde 5 min bei RT gerührt und dann wurden 11.8 mg (0.02 mmol) N-[31-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-29-oxo-4,7,10,13,16,19,22,25-octaoxa-28-azahentriacontan-1-oyl]-L-valyl-L-alanin (Intermediat L25) zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei RT gerührt. Es wurde Wasser zugegeben und die Reaktionsmischung direkt mittels präp. RP-HPLC gereinigt (Säule: Reprosil 250x30; 10µ, Fluss: 50 mL/min, MeCN/Wasser, 0.1% TFA). Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 4.7 mg (34 % d. Th.) der Titelverbindung.
LC-MS (Methode 4): R_t = 1.34 min; MS (ESIpos): m/z = 1165 $[M+H]^+$.

Intermediat F153

Trifluoressigsäure --(2S)-2-amino-4-({(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}[(2S)-2-hydroxypropanoyl]amino)-N-(2-{[(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)acetyl]amino}ethyl)butanamid (1:1)

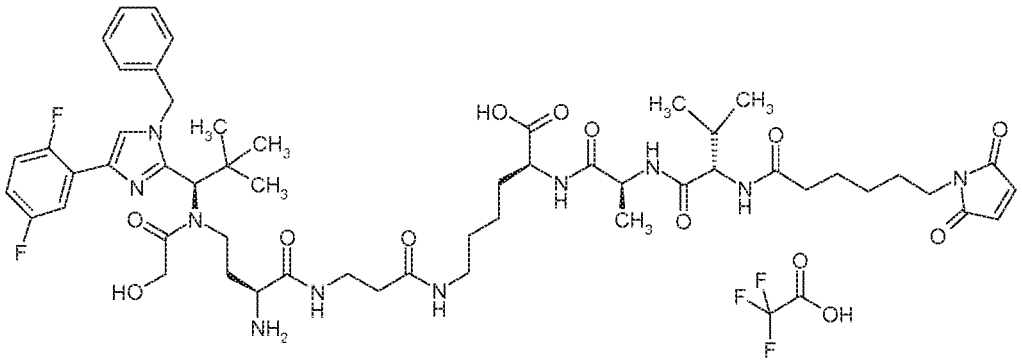


Die Synthese erfolgte in Analogie zu Intermediat F104 ausgehend von Intermediat C60.

LC-MS (Methode 1): R_t = 1.1 min; MS (ESIpos): m/z = 707 $(M+H)^+$.

Intermediat F154

N^6-(N-{(2S)-2-Amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}-beta-alanyl)-N^2-{N-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)hexanoyl]-L-valyl-L-alanyl}-L-lysin -trifluoressigsäure (1:1)



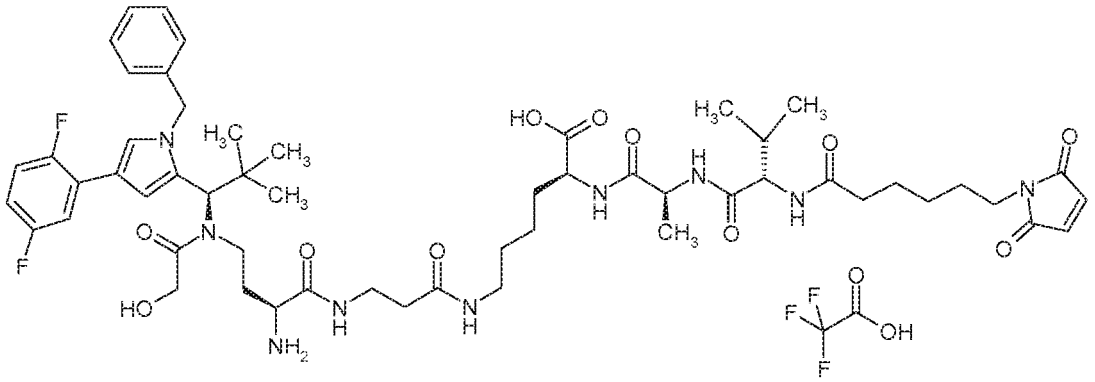
Die Titelverbindung wurde in Analogie zu Intermediat F2 aus 10 mg (0.015 mmol) Intermediat C8 und 15 mg (0.022 mmol) Intermediat L6 hergestellt.

HPLC (Methode 11): R_t = 1.91 min;

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.89 min; MS (ESIpos): m/z = 1077 $(M+H)^+$.

Intermediat F155

N^6-(N-{(2S)-2-Amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}-beta-alanyl)-N^2-{N-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)hexanoyl]-L-valyl-L-alanyl}-L-lysin -trifluoressigsäure (1:1)

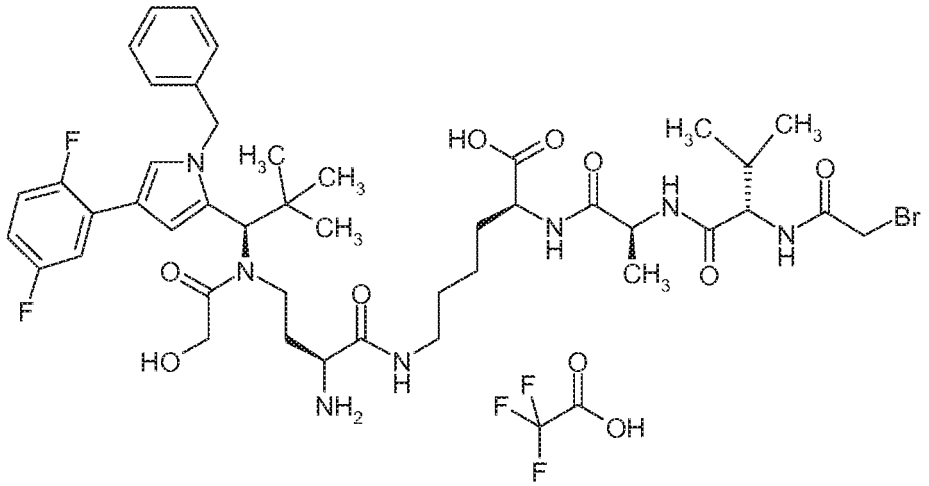


Die Titelverbindung wurde durch Kupplung von 14 mg (0.019 mmol) des Intermediats C61 mit 15 mg (0.021 mmol) von Intermediat L61 in Gegenwart von 8.7 mg (0.023 mmol) HATU sowie 17 µl N,N-Diisopropylethylamin und anschließender Entschützung mit Zinkchlorid in Trifluorethanol wie in Intermediat F119 beschrieben hergestellt. Nach Reinigung durch präparative HPLC wurden 13 mg (59% d. Th. über 2 Stufen) der Titelverbindung erhalten.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.86 min; MS (ESIpos): m/z = 1076 $(M+H)^+$.

Intermediat F156

N-(Bromacetyl)-L-valyl-L-alanyl-N^6-{(2S)-2-amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}-L-lysin -trifluoressigsäure (1:1)



Zunächst wurde ausgehend von N2-[(Benzyloxy)carbonyl]-N6-(tert-butoxycarbonyl)-L-lysin nach klassischen Methoden der Peptidchemie (Veresterung mit 2-(Trimethylsilylethanol mittels EDCI/DMAP, Hydrogenolyse, Kupplung mit N-[(Benzyloxy)carbonyl]-L-valyl-L-alanin in Gegenwart

von HATU und erneute Hydrogenolyse) das Tripeptidderivat 2-Trimethylsilyl)ethyl-L-valyl-L-alanyl-N6-(tert-butoxycarbonyl)-L-lysinat hergestellt.

84mg (0.163 mmol) von diesem Intermediat wurden in 2.5 ml DMF aufgenommen und mit 58 mg (0.244 mmol) 1-(2-Bromacetoxy)pyrrolidin-2,5-dion versetzt. Nach 10min Rühren bei RT wurde eingeengt, der Rückstand in Acetonitril/Wasser 1:1 aufgenommen und mit Trifluoressigsäure auf pH 2 gebracht und durch präparative HPLC gereinigt. Nach Einengen der entsprechenden Fraktionen wurde der Rückstand in 15 ml einer 5%-igen Trifluoressigsäurelösung in DCM aufgenommen und 2 h bei RT gerührt. Anschließend wurde bei leichter Kühlung eingeengt und der Rückstand aus Acetonitril/Wasser 1:1 lyophilisiert. Von diesem Intermediat wurden 53mg (50% d. Th.) über 2 Stufen erhalten.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.72 min; MS (ESIpos): m/z = 537 und 539 $(M+H)^+$.

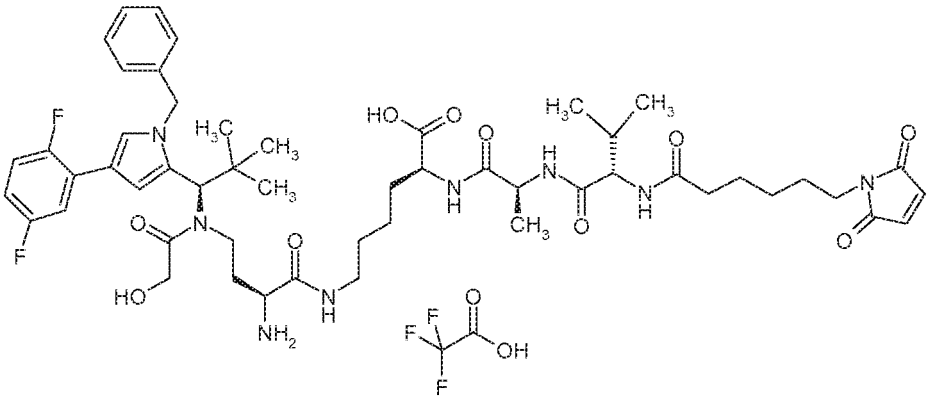
Zur Synthese der Titelverbindung wurden 18 mg (0.027 mmol) von diesem Intermediat in 4 ml DMF aufgenommen, mit 16 mg (0.025 mmol) Intermediat C61 sowie mit 19 mg HATU und 9 µL N,N-Diisopropylethylamin versetzt. Nach 5 min Rühren bei RT wurden einige Tropfen Trifluoressigsäure zugegeben und der Ansatz mittels präparativer HPLCC gereinigt. Nach Einengen der entsprechenden Fraktionen und Lyophilsation aus Acetonitril/Wasser 1:1 wurde das erhaltene Intermediat in 3 mL 2,2,2-Trifluorethanol gelöst. Nach Zugabe von 4.8 mg (0.035 mmol) Zinkchlorid wurde der Ansatz 2.5 h bei 50°C gerührt. Dann wurden 10 mg (0.035 mmol) Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure hinzugegeben und der Ansatz mit Acetonitril/Wasser verdünnt und filtriert. Die Reinigung erfolgte mittels präparativer HPLC. Nach Einengen der entsprechenden Fraktionen und Lyophilisation des Rückstands aus Acetonitril/Wasser wurden 3.2 mg (13% d.Th.) der Titelverbindung über 2 Stufen erhalten.

HPLC (Methode 11): R_t = 1.94 min;

LC-MS (Methode 5): R_t = 2.79 min; MS (ESIpos): m/z = 932 und 934 $(M+H)^+$.

Intermediat F163

N-[6-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)hexanoyl]-L-valyl-L-alanyl-N^6-{(2S)-2-amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino] butanoyl}-L-lysin -trifluoressigsäure (1:1)



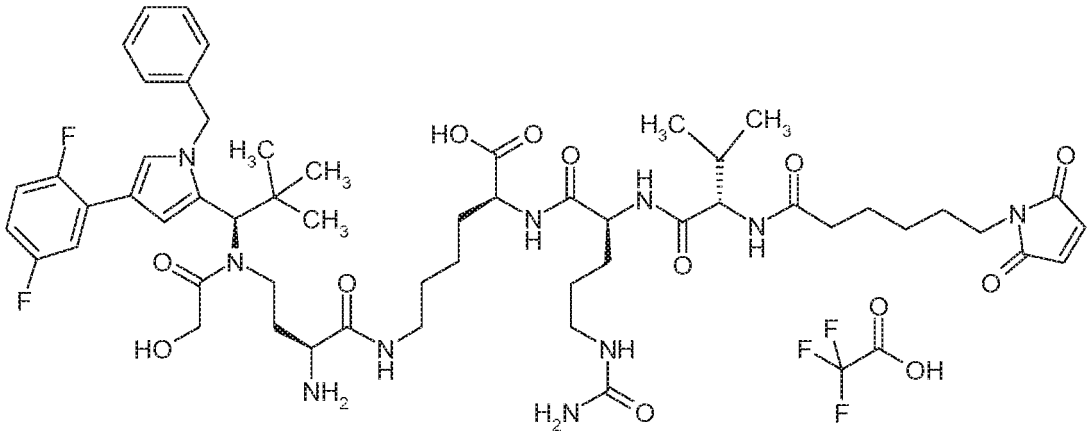
Die Titelverbindung wurde durch Kupplung von 37 mg (0.056 mmol) Intermediat C58 und 41 mg (0.056 mmol) Intermediat L61 in Gegenwart von HATU und anschließende Deblockierung mit Zinkchlorid wie in Intermediat F119 beschrieben, hergestellt. Es wurden 12 mg (19% d.Th. über 2 Stufen) der Titelverbindung erhalten.

HPLC (Methode 11): R_t = 1.49 min;

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.89 min; MS (ESIpos): m/z = 1005 $(M+H)^+$.

Intermediat F164

N-[6-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)hexanoyl]-L-valyl-N^5-carbamoyl-L-ornithyl-N^6-{(2S)-2-amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}-L-lysin -trifluoressigsäure (1:1)



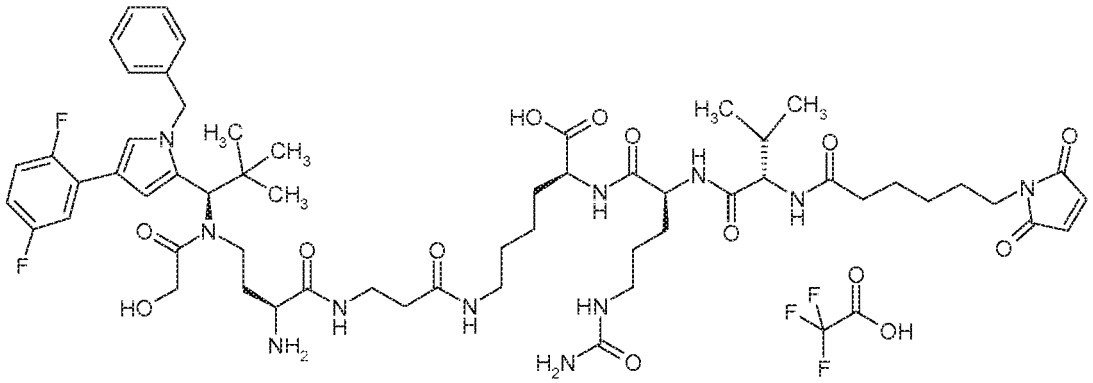
Die Titelverbindung wurde in Analogie zu Intermediat F155 durch Kupplung von 20 mg (0.030 mmol) Intermediat C58 mit 27 mg (0.033 mmol) von Intermediat L62 in Gegenwart von HATU und *N,N*-Diisopropylethylamin und anschließender Entschützung mittels Zinkchlorid in Trifluorethanol hergestellt.

HPLC (Methode 11): R_t = 1.92 min;

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.87 min; MS (ESIpos): m/z = 1091 $(M+H)^+$.

Intermediat F165

N^6-(N-{(2S)-2-Amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}-beta-alanyl)-N^2-{N-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)hexanoyl]-L-valyl-N^5-carbamoyl-L-ornithyl}-L-lysin -trifluoressigsäure (1:1)

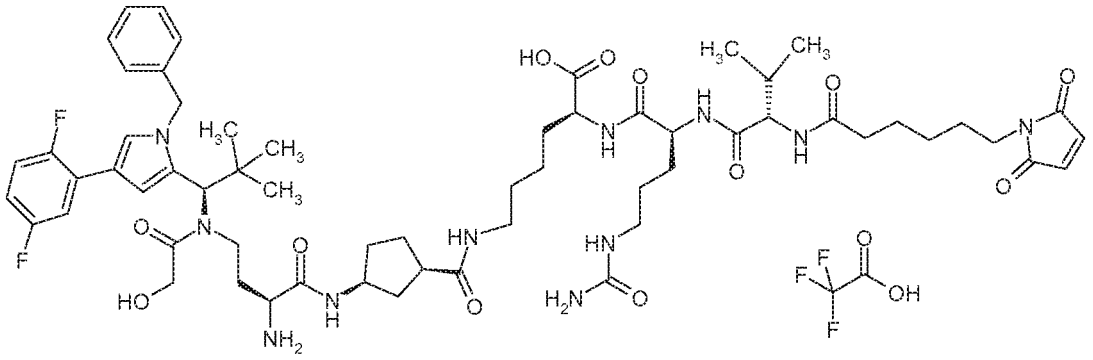


Die Titelverbindung wurde in Analogie zu Intermediat F155 durch Kupplung von 15 mg (0.021 mmol) Intermediat C61 mit 18 mg (0.023 mmol) Intermediat L62 in Gegenwart von HATU und anschließender Entschützung mit Zinkchlorid in Trifluorethanol hergestellt.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.88 min; MS (ESIpos): m/z = 1162 $(M+H)^+$.

Intermediat F166

N-[6-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)hexanoyl]-L-valyl-N^5-carbamoyl-L-ornithyl-N^6-{[(1R,3S)-3-({(2S)-2-amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}amino)cyclopentyl]carbonyl}-L-lysin -trifluoressigsäure (1:1)



Zunächst wurde ausgehend von kommerziell erhältlicher (1R, 3S)-3-[(tert-Butoxycarbonyl)amino]cyclopentancarbonsäure nach klassischen Methoden der Peptidchemie durch Veresterung mit Benzylalkohol mittels EDCI/DMAP und anschließender Abspaltung der tert

Butoxycarbonylschutzgruppe mit TFA in DCM Trifluoressigsäure -benzyl-(1R, 3S)-3-aminocyclopentancarboxylat (1:1) hergestellt.

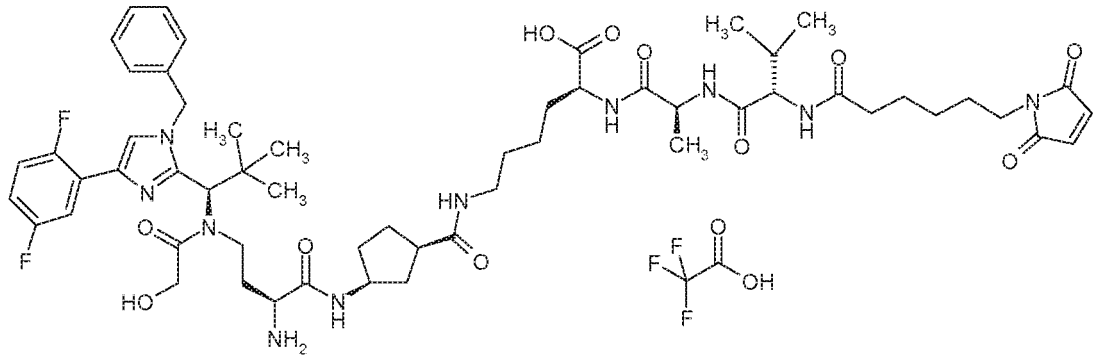
51mg (0.076 mmol) von diesem Intermediat wurden in 6 ml DMF aufgenommen und mit 50 mg (0.076 mmol) von Intermediat C58 in Gegenwart von HATU und *N,N*-Diisopropylethylamin gekuppelt. Nach Reinigung durch präparative HPLC wurde das Intermediat in Methanol aufgenommen und über 10%-igem Palladium auf Aktivkohle 2 h lang bei RT unter Wasserstoff-Normaldruck hydriert. Der Katalysator wurde danach abfiltriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Produkt durch präparative HPLC gereinigt. Nach Lyophilisation aus Dioxan wurden 21 mg (34% d.Th. über 2 Stufen) von (1R,3S)-3-{[(2S)-4-[{(1R)-1-[1-Benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]-2-({[2-(trimethylsilyl)ethoxy]carbonyl}amino)butanoyl]amino}cyclopentancarbonsäure erhalten.

Die Titelverbindung wurde dann in Analogie zu Intermediat F155 durch Kupplung von 10.5 mg (0.013 mmol) dieses Intermediats mit 11.4 mg (0.014 mmol) von Intermediat L62 in Gegenwart von HATU und anschließender Entschützung mit Zinkchlorid in Trifluorethanol hergestellt. Nach Reinigung durch präparative HPLC wurden 8.6 mg (48% d. Th. über 2 Stufen) der Titelverbindung erhalten.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.88 min; MS (ESIpos): m/z = 1203 $(M+H)^+$.

Intermediat F167

N-[6-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)hexanoyl]-L-valyl-L-alanyl-N^6-{[(1R,3S)-3-({(2S)-2-amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}amino)cyclopentyl]carbonyl}-L-lysin -trifluoressigsäure (1:1)

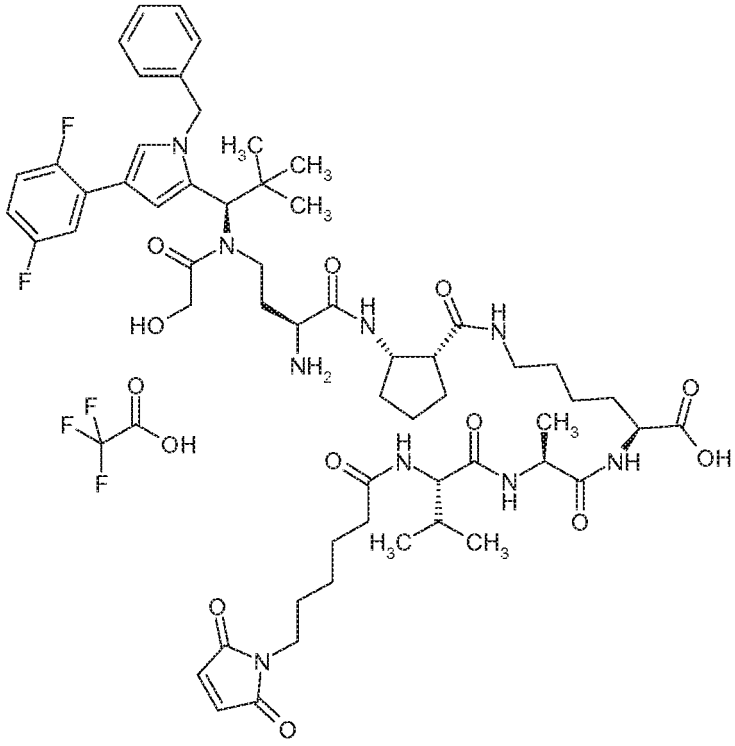


Die Titelverbindung wurde in Analogie zu Intermediat F129 ausgehend von 11 mg (0.016 mmol) Intermediat C5 durch Umsetzung mit 20 mg (0.024 mmol) Intermediat L56 in Gegenwart von 12 mg (0.032 mmol) HATU sowie 14 µl N,N-Diisopropylethylamin und anschließender Entschützung mit Trifluoressigsäure hergestellt. Es wurden 11 mg (46% d. Th. über 2 Stufen) erhalten.

LC-MS (Methode 4): R_t = 1.13 min; MS (EIpos): m/z = 1117 $[M+H]^+$.

Intermediat F168

N-[6-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)hexanoyl]-L-valyl-L-alanyl-N^6-{[(1R,2S)-2-({(2S)-2-amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}amino)cyclopentyl]carbonyl}-L-lysin -trifluoressigsäure (1:1)



Zunächst wurde ausgehend von kommerziell erhältlicher (1R,2S)-2-[(tert-Butoxycarbonyl) amino]cyclopentancarbonsäure nach klassischen Methoden der Peptidchemie durch Veresterung mit Benzylalkohol mittels EDCI/DMAP und anschließender Abspaltung der tert Butoxycarbonylschutzgruppe mit TFA in DCM Trifluoressigsäure -benzyl-(1R,2S)-2-aminocyclopentancarboxylat (1:1) hergestellt.

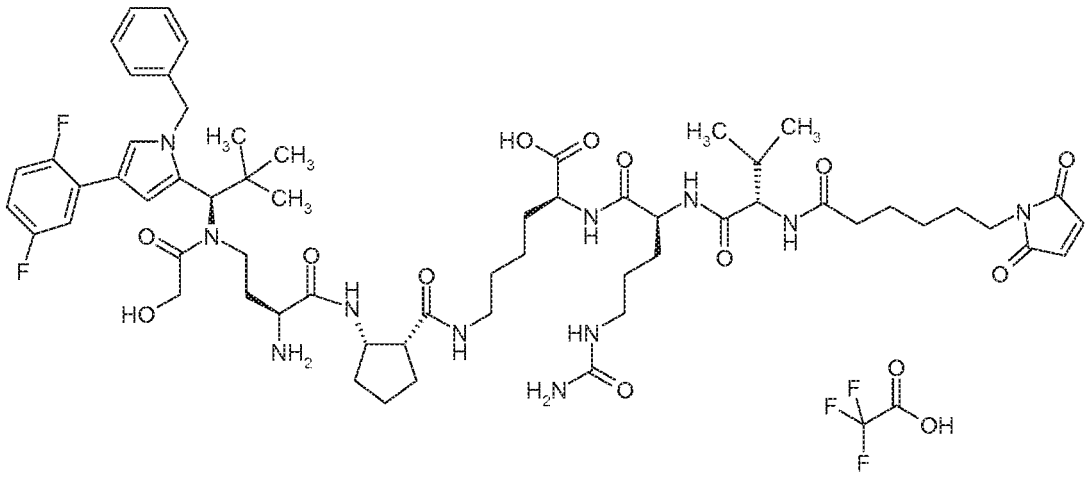
102mg (0.305 mmol) von diesem Intermediat wurden in 12 ml DMF aufgenommen und mit 100 mg (0.152 mmol) von Intermediat C58 in Gegenwart von HATU und *N,N*-Diisopropylethylamin gekuppelt. Nach Reinigung durch präparative HPLC wurde das Intermediat in Methanol aufgenommen und über 10%-igem Palladium auf Aktivkohle 2 h lang bei RT unter Wasserstoff-Normaldruck hydriert. Der Katalysator wurde danach abfiltriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Produkt durch präparative HPLC gereinigt. Nach Lyophilisation aus Acetonitril/Wasser 1:1 wurden 70 mg (59% d.Th. über 2 Stufen) von (1R,2S)-2-{[(2S)-4-[{(1R)-1-[1-Benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]-2-({[2-(trimethylsilyl)ethoxy]carbonyl}amino)butanoyl]amino}cyclopentancarbonsäure erhalten.

Die Titelverbindung wurde dann durch Kupplung von 20 mg (0.013 mmol) dieses Intermediats mit 16.6 mg (0.023 mmol) von Intermediat L61 in Gegenwart von 9.5 mg (0.025 mmol) HATU sowie 18 µl N,N-Diisopropylethylamin und anschließender Entschützung mit Zinkchlorid in Trifluorethanol wie in Intermediat F119 beschrieben hergestellt. Nach Reinigung durch präparative HPLC wurden 9.3 mg (30% d. Th. über 2 Stufen) der Titelverbindung erhalten.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.98 min; MS (ESIpos): m/z = 1116 $(M+H)^+$.

Intermediat F169

N-[6-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)hexanoyl]-L-valyl-N^5-carbamoyl-L-ornithyl-N^6-{[(1R,2S)-2-({(2S)-2-amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}amino)cyclopentyl]carbonyl}-L-lysin -trifluoressigsäure (1:1)

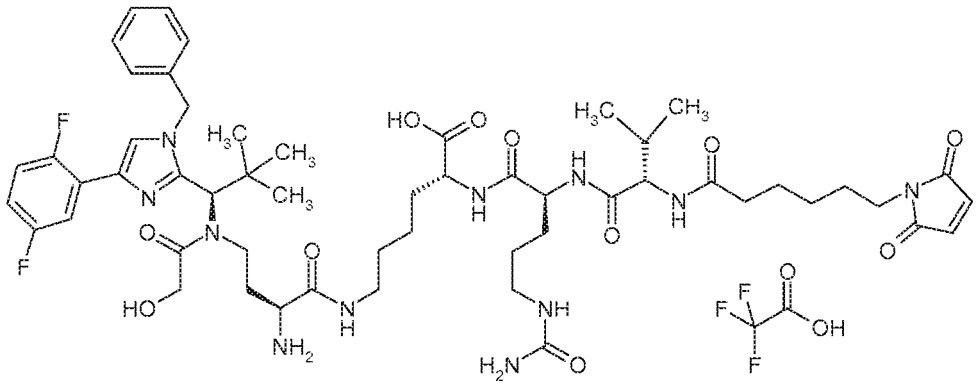


Die Synthese der Titelverbindung erfolgte in Analogie zu Intermediat F168 ausgehend von den Intermediaten C58 und L62.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.91 min; MS (ESIpos): m/z = 1202 $(M+H)^+$.

Intermediat F170

N-[6-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)hexanoyl]-L-valyl-N^5-carbamoyl-L-ornithyl-N^6-{(2S)-2-amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}-D-lysin-trifluoressigsäure(1:1)

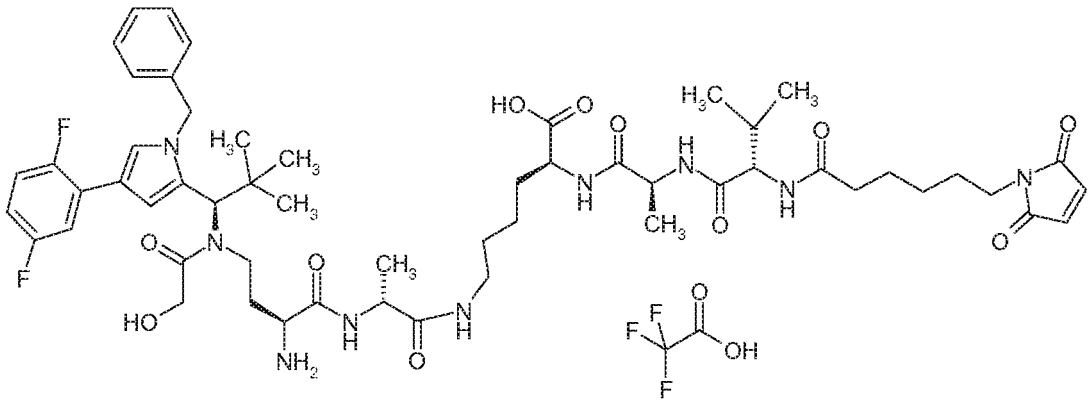


Die Titelverbindung wurde in Analogie zu seinem Diastereomer Intermediat F23 hergestellt.
HPLC (Methode 11): R_t = 1.9 min;

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.83 min; MS (ESIpos): m/z = 1092 $(M+H)^+$.

Intermediat F171

N^6-(N-{(2S)-2-Amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}-D-alanyl)-N^2-{N-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)hexanoyl]-L-valyl-L-alanyl}-L-lysin -trifluoressigsäure (1:1)

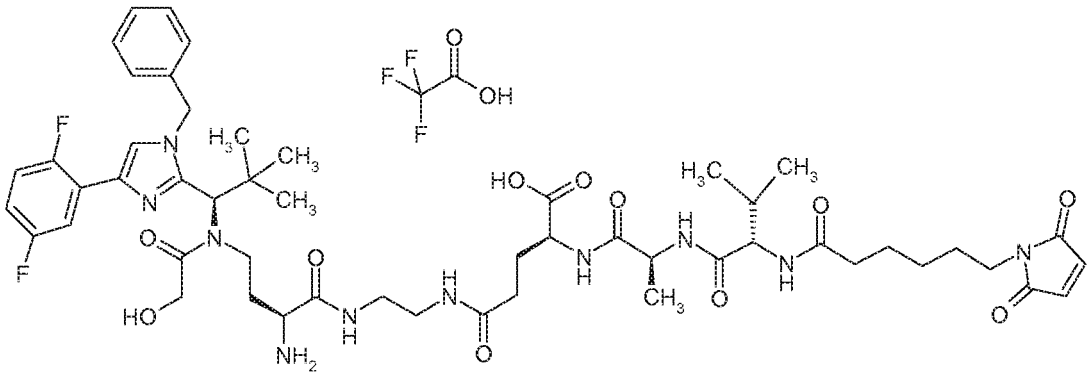


Die Synthese der Titelverbindung erfolgte in Analogie zu Intermediat F155 ausgehend von den Intermediaten C62 und L61.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.93 min; MS (ESIpos): m/z = 1076 $(M+H)^+$.

Intermediat F172

N-[6-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)hexanoyl]-L-valyl-L-alanyl-N-[2-({(2S)-2-amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}amino)ethyl]-L-glutamin -trifluoressigsäure (1:1)

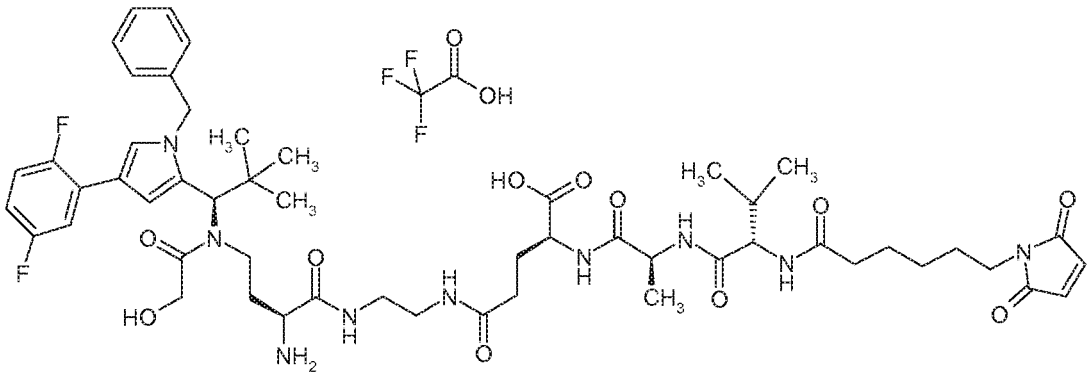


Die Titelverbindung wurde ausgehend von 10 mg (0.013 mmol) Intermediat C63 durch Kupplung mit 9 mg (0.014 mmol) von Intermediat L63 in Gegenwart von 5.5 mg (0.014 mmol) HATU sowie 11 µl N,N-Diisopropylethylamin und anschließender Entschützung durch 2.5 stündiges Rühren in einer Lösung aus Trifluoressigsäure/Dichlormethan 1:1 hergestellt. Es wurden 11 mg (72% d. Th. über 2 Stufen) erhalten.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.9 min; MS (EIpos): m/z = 1049 $[M+H]^+$.

Intermediat F173

N-[6-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)hexanoyl]-L-valyl-L-alanyl-N-[2-({(2S)-2-amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}amino)ethyl]-L-glutamin -trifluoressigsäure (1:1)

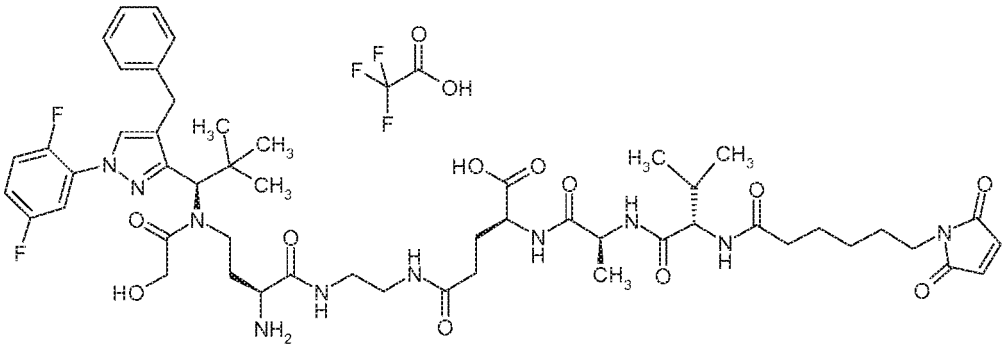


Die Titelverbindung wurde ausgehend von 15 mg (0.018 mmol) Intermediat C64 durch Kupplung mit 12 mg (0.02 mmol) von Intermediat L63 in Gegenwart von 7.7 mg (0.02 mmol) HATU sowie 16 µl N,N-Diisopropylethylamin und anschließender Entschützung mittels Zinkchlorid in Trifluorethanol wie in Intermediat F119 beschrieben hergestellt. Nach Reinigung durch präparative HPLC wurden 12 mg (58% d. Th. über 2 Stufen) der Titelverbindung erhalten.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.91 min; MS (EIpos): m/z = 1048 $[M+H]^+$.

Intermediat F174

N-[6-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)hexanoyl]-L-valyl-L-alanyl-N-[2-({(2S)-2-amino-4-[{(1R)-1-[4-benzyl-1-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrazol-3-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}amino)ethyl]-L-glutamin -trifluoressigsäure (1:1)

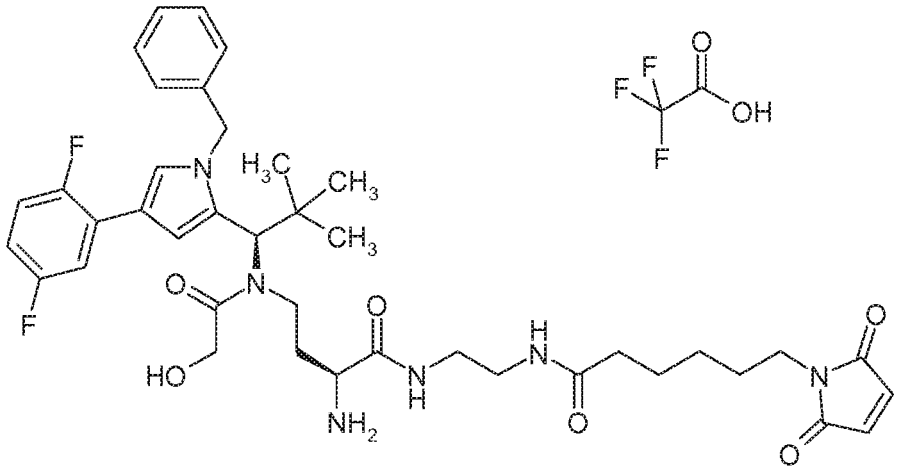


Die Titelverbindung wurde analog zu Intermediat F172 ausgehend Intermediat C57 und L63 hergestellt.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.9 min; MS (Elpos): m/z = 1049 $[M+H]^+$.

Intermediat F175

Trifluoressigsäure --N-[2-({(2S)-2-amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}amino)ethyl]-6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)hexanamid (1:1)



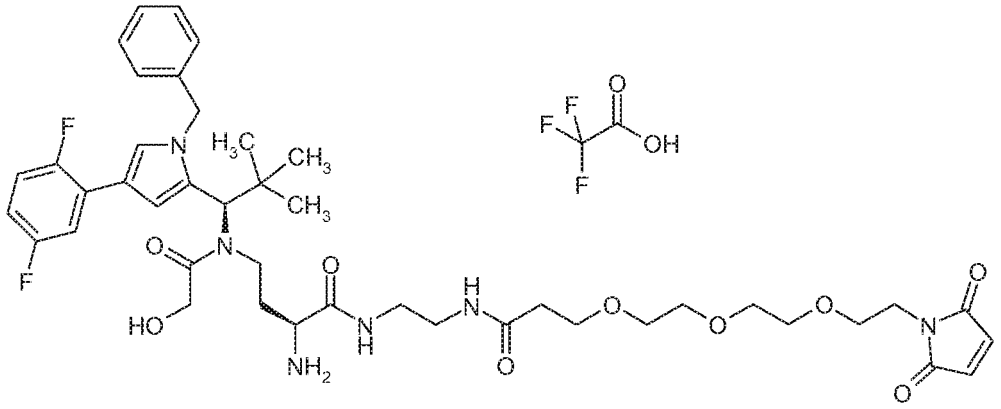
Die Titelverbindung wurde durch Kupplung von 11 mg (0.013 mmol) Intermediat C64 mit 3.4 mg (0.016 mmol) von 6-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)hexansäure in Gegenwart von 6.7 mg (0.018 mmol) HATU sowie 9 µl N,N-Diisopropylethylamin und anschließender Entschützung mittels

Zinkchlorid in Trifluorethanol wie in Intermediat F119 beschrieben hergestellt. Nach Reinigung durch präparative HPLC wurden 8 mg (69% d. Th. über 2 Stufen) der Titelverbindung erhalten.

LC-MS (Methode 1): R_t = 1.35 min; MS (Elpos): m/z = 893 $[M+H]^+$.

Intermediat F176

Trifluoressigsäure--(2S)-2-amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]-N-[1-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-12-oxo-3,6,9-trioxa-13-azapentadecan-15-yl]butanamid (1:1)

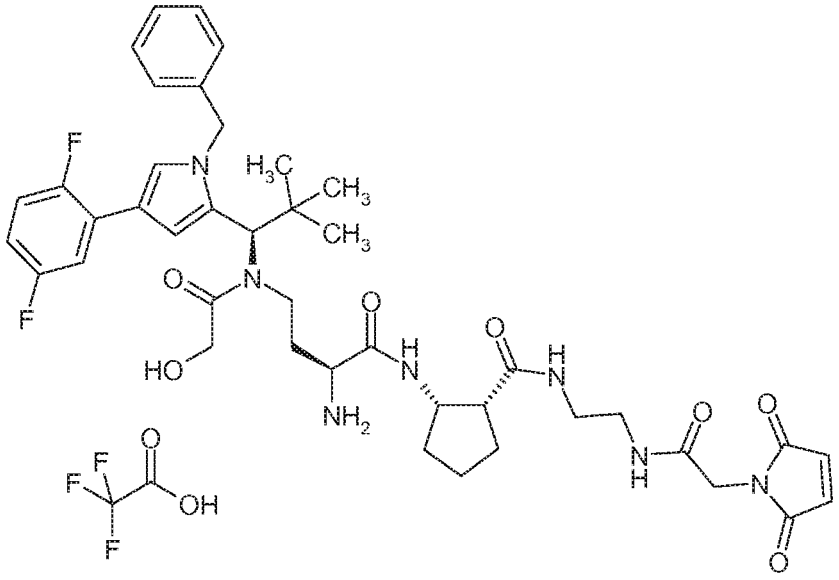


Die Titelverbindung wurde durch Kupplung von 5 mg (0.006 mmol) Intermediat C64 mit 2 mg (0.007 mmol) von 3-(2-{2-[2-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)ethoxy]ethoxy}ethoxy) propansäure, deren Herstellung unter Intermediat L15 beschrieben ist, in Gegenwart von 3.5 mg (0.009 mmol) HATU sowie 4 µl N,N-Diisopropylethylamin und anschließender Entschützung mittels Zinkchlorid in Trifluorethanol wie in Intermediat F119 beschrieben hergestellt. Nach Reinigung durch präparative HPLC wurden 2 mg (35% d. Th. über 2 Stufen) der Titelverbindung erhalten.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.86 min; MS (Elpos): m/z = 839 $[M+H]^+$.

Intermediat F177

Trifluoressigsäure--(1R,2S)-2-({(2S)-2-amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}amino)-N-(2-{[(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)acetyl]amino}ethyl)cyclopentancarboxamid (1:1)

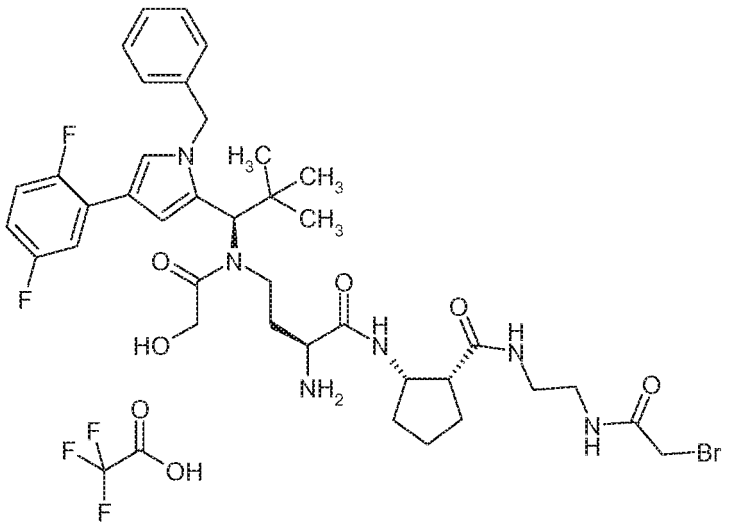


Die Titelverbindung wurde in Anlogie zu Intermediat F168 hergestellt, wobei an Stelle von Intermediat L61 das Intermediat L1 eingesetzt wurde.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.86 min; MS (EIpos): m/z = 804 $[M+H]^+$.

Intermediat F178

Trifluoressigsäure--(1R,2S)-2-({(2S)-2-amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}amino)-N-{2-[(bromacetyl)amino]ethyl}cyclopentancarboxamid (1:1)

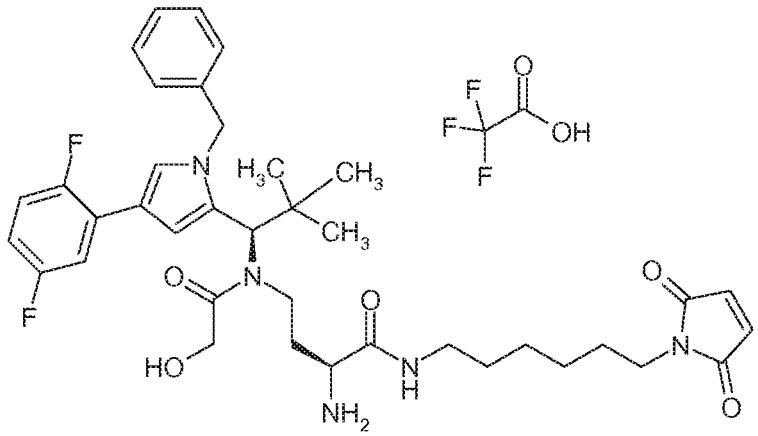


Die Titelverbindung wurde in Anlogie zu Intermediat F177 hergestellt, wobei an Stelle von Intermediat L1 das Intermediat L52 eingesetzt wurde.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.89 min; MS (EIpos): m/z = 787 und 789 $[M+H]^+$.

Intermediat F179

Trifluoressigsäure --(2S)-2-amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]-N-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)hexyl]butanamid (1:1)

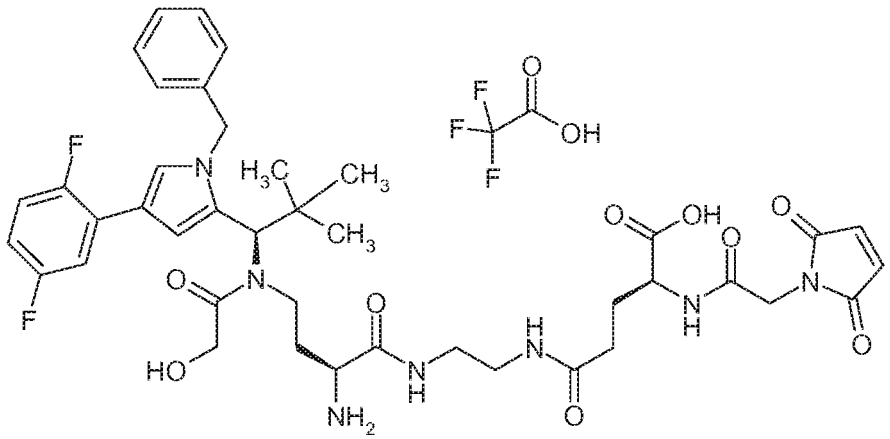


Die Titelverbindung wurde durch Kupplung von 15 mg (0.023 mmol) Intermediat C58 mit 6 mg (0.025 mmol) 1-(6-Aminohexyl)-1H-pyrrol-2,5-dion in Gegenwart von 13 mg (0.034 mmol) HATU sowie 16 µl N,N-Diisopropylethylamin und anschließender Entschützung mittels Zinkchlorid in Trifluorethanol wie in Intermediat F119 beschrieben hergestellt. Nach Reinigung durch präparative HPLC wurden 8.5 mg (46% d. Th. über 2 Stufen) der Titelverbindung erhalten.

LC-MS (Methode 6): R_t = 2.22 min; MS (EIpos): m/z = 692 $[M+H]^+$.

Intermediat F180

N-[2-({(2S)-2-Amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}amino)ethyl]-N^2-[(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)acetyl]-L-glutamin -trifluoressigsäure (1:1)

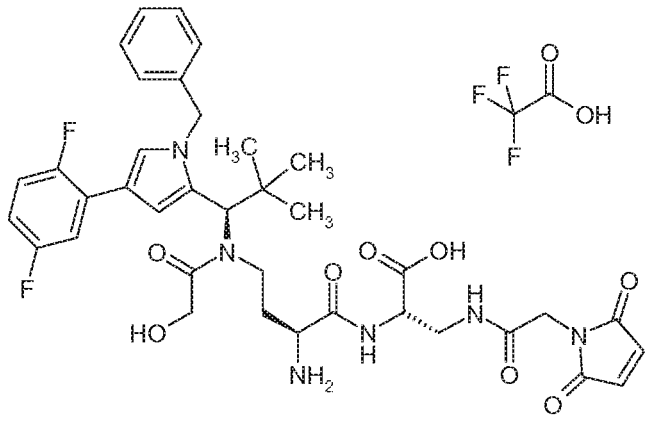


Die Titelverbindung wurde durch Kupplung von 9.6 mg (0.012 mmol) Intermediat C64 mit 5 mg (0.013 mmol) von Intermediat L64 in Gegenwart von 7 mg (0.018 mmol) HATU sowie 6 µl N,N-Diisopropylethylamin und anschließender Entschützung mittels Zinkchlorid in Trifluorethanol wie in Intermediat F119 beschrieben hergestellt. Nach Reinigung durch präparative HPLC wurden 3.1 mg (28% d. Th. über 2 Stufen) der Titelverbindung erhalten.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.85 min; MS (ESIpos): m/z = 822 $[M+H]^+$.

Intermediat F192

N-{(2S)-2-Amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}-3-{[(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)acetyl]amino}-L-alanin -trifluoressigsäure (1:1)



60mg (0.091 mmol) von Intermediat C58 wurden in 8 ml DMF aufgenommen und mit 45 mg (0.100 mmol) von Intermediat L65 in Gegenwart von 42 mg (0.11 mmol) HATU und 64 µL *N,N*-Diisopropyl-ethylamin gekuppelt. Nach Reinigung durch präparative HPLC wurde das Intermediat in 10 ml Ethanol aufgenommen und über 10%-igem Palladium auf Aktivkohle 45 min lang bei RT unter Wasserstoff-Normaldruck hydriert. Der Katalysator wurde danach abfiltriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Produkt durch präparative HPLC gereinigt. Nach Lyophilisation aus Acetonitril/Wasser 1:1 wurden 24.5 mg (31% d.Th. über 2 Stufen) von 2-(Trimethylsilyl)ethyl-3-amino-N-[(2S)-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]-2-({[2-(trimethylsilyl)ethoxy]carbonyl}amino) butanoyl]-L-alaninat erhalten.

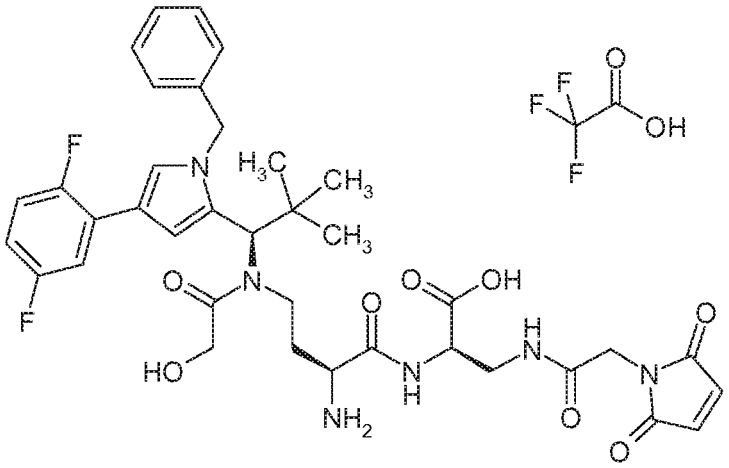
LC-MS (Methode 1): R_t = 1.17 min; MS (ESIpos): m/z = 844 $[M+H]^+$.

Die Titelverbindung wurde dann durch Kupplung von 10 mg (0.012 mmol) dieses Intermediats mit 2 mg (0.013 mmol) von kommerziell erhältlicher (2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)essigsäure Intermediat in Gegenwart von 5.4 mg (0.014 mmol) HATU sowie 8 µl N,N-Diisopropylethylamin und anschließender Entschützung mit Zinkchlorid in Trifluorethanol wie in Intermediat F119 beschrieben hergestellt. Nach Reinigung durch präparative HPLC wurden 3.5 mg (33% d. Th. über 2 Stufen) der Titelverbindung erhalten.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.81 min; MS (ESIpos): m/z = 737 $(M+H)^+$.

Intermediat F193

N-{(2S)-2-Amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}-3-{[(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)acetyl]amino}-D-alanin -trifluoressigsäure (1:1)

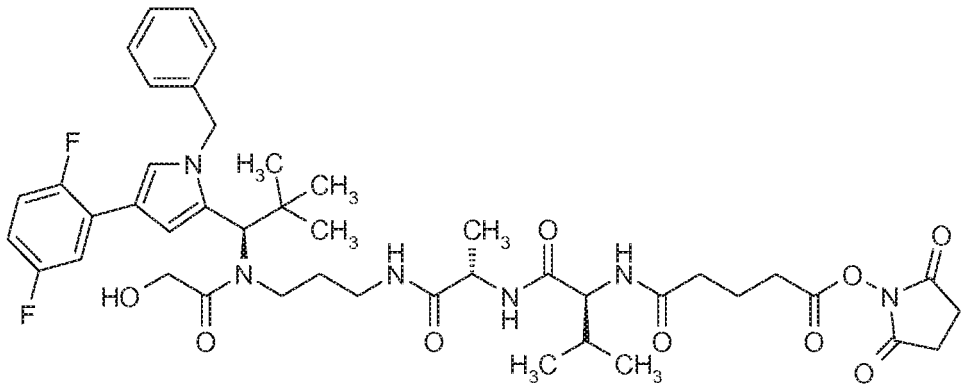


Die Synthese der Titelverbindung erfolgte in Analogie zu Intermediat F192 ausgehend von 3-{[(Benzyloxy)carbonyl]amino}-N-(tert-butoxycarbonyl)-D-alanin - N-cyclohexylcyclohexanamine (1:1).

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.87 min; MS (ESIpos): m/z = 737 $(M+H)^+$.

Intermediat F194

N-{5-[(2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl)oxy]-5-oxopentanoyl}-L-valyl-N-{3-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]propyl}-L-alaninamid



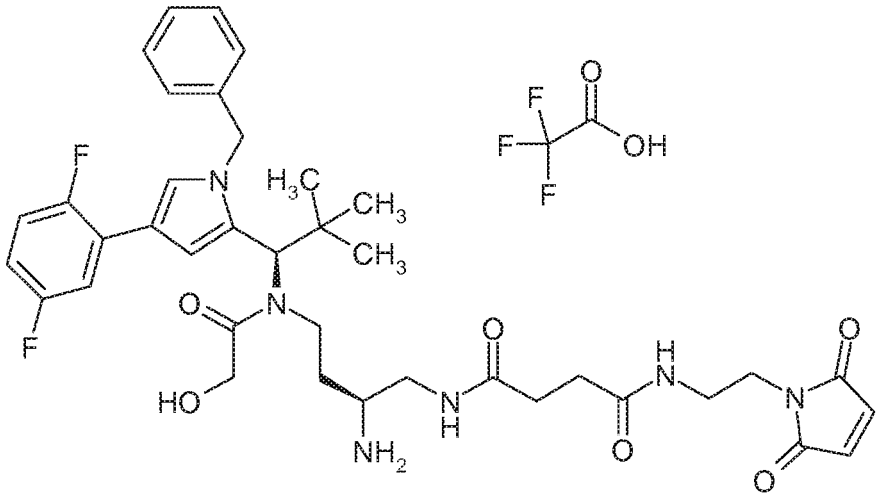
Die Titelverbindung wurde ausgehend von Beispiel 98 zunächst durch Kupplung mit N-[(Benzyloxy)carbonyl]-L-valyl-L-alanin in Gegenwart von HATU und N,N-Diisopropylethylamin hergestellt. Im nächsten Schritt wurde die Z-Schutzgruppe durch 1-stündige Hydrierung über 10%-igem

Palladium auf Aktivkohle bei RT unter Wasserstoff-Normaldruck entfernt und das entschützte Intermediat anschließend wie für Intermediat F58 beschrieben durch Umsetzung mit 1,1'-[(1,5-Dioxopentan-1,5-diyl)bis(oxy)] dipyrrolidin-2,5-dion in die Titelverbindung überführt.

LC-MS (Methode 1): R_t = 1.19 min; MS (ESIpos): m/z = 851 $[M+H]^+$.

Intermediat F195

Trifluoressigsäure --N-{(2S)-2-amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butyl}-N'-[2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)ethyl]succinamid (1:1)



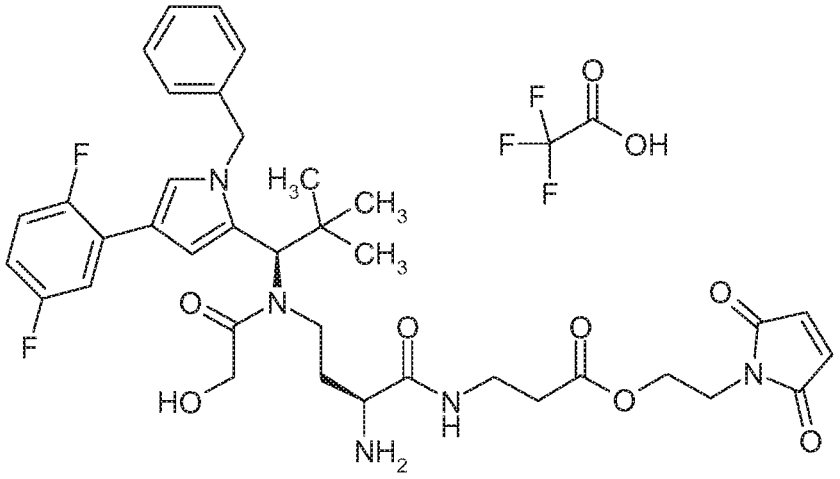
Die Titelverbindung wurde durch Kupplung von 26 mg (0.035 mmol) von Intermediat C65 mit 18 mg (0.07 mmol) von kommerziell erhältlichem Trifluoressigsäure --1-(2-aminoethyl)-1H-pyrrol-2,5-dion (1:1) in 8 ml DMF in Gegenwart von 40 mg (0.1054 mmol) HATU sowie 61 µl N,N-Diisopropylethylamin und anschließender Entschützung mit Zinkchlorid in Trifluorethanol wie in Intermediat F119 beschrieben hergestellt. Nach Reinigung durch präparative HPLC wurden 16 mg (43% d. Th. über 2 Stufen) der Titelverbindung erhalten.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.85 min; MS (ESIpos): m/z = 721 $(M+H)^+$.

^{1}H-NMR (500 MHz, DMSO-d_6): δ = 7.99 (t, 1H), 7.95 (t, 1H), 7.6-7.75 (m, 4H), 7.5 (s, 1H) 7.2-7.4 (m, 6H), 6.8-7.0 (m, 4H), 5.63 (s, 1H), 4.9 und 5.2 (2d, 2H), 4.26 und 4.0 (2d, 2H), 3.3-3.6 (m, 4H), 3.15-3.25 (m, 3H), 2.85-3.0 (m, 2H), 2.2-2.3 (m, 4H), 0.64 und 1,49 (2m, 2H), 0.81 (s, 9H).

Intermediat F196

Trifluoressigsäure --2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)ethyl-N-{(2S)-2-amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}-beta-alaninat (1:1)



Zunächst wurden 15 mg (0.023 mmol) Intermediat C58 in 4 ml DMF aufgenommen und mit 8.2 mg (0.025 mmol) Intermediat L67 in Gegenwart von 13.0 mg (0.034 mmol) HATU sowie 16 µl N,N-Diisopropylethylamin umgesetzt. Nach 30 min Rühren bei RT wurde eingeengt und der Rückstand durch präparative HPLC gereinigt. Nach Vereinigung der entsprechenden Fraktionen und Einengen des Lösungsmittels wurde der Rückstand aus Acetonitril/Wasser 1:1 lyophilisiert. Es wurden 4.3 mg (20% d. Th.) des geschützten Intermediats erhalten.

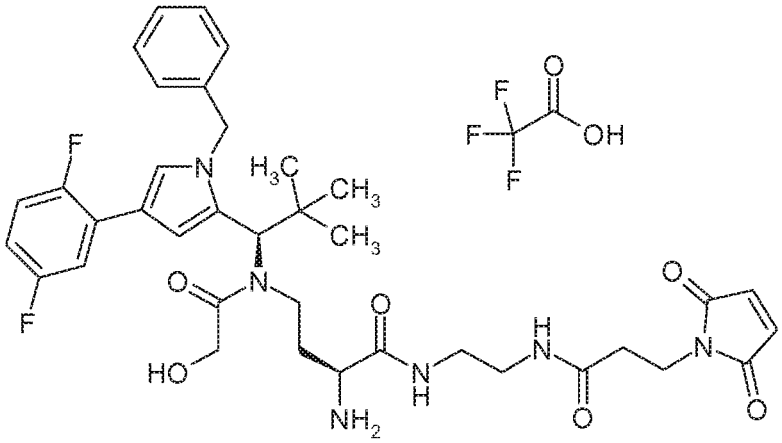
LC-MS (Methode 1): R_t = 1.35 min; MS (Elpos): m/z = 852 $[M+H]^+$.

4.3 mg (4.5 µmol) der Zwischenstufe wurden in 1 ml Trifluorethanol gelöst und wie für Intermediat F119 beschrieben mit 3.65 mg (27 µmol) Zinkchlorid entschützt. Nach Reinigung durch präparative HPLC wurde 1 mg (25% d. Th. über 2 Stufen) der Titelverbindung erhalten.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.88 min; MS (ESIpos): m/z = 708 $(M+H)^+$

Intermediat F204

Trifluoressigsäure --(2S)-2-amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]-N-(2-{[3-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)propanoyl]amino}ethyl)butanamid (1:1)



25 mg (0.038 mmol) von Intermediat C58 wurden zunächst mit 16.5 mg (75%-ig) (0.038 mmol) Intermediat L68 in Gegenwart von 17 mg (0.046 mmol) HATU sowie 20 µl N,N-Diisopropylethylamin umgesetzt. Nach 60 min Rühren bei RT wurde eingeengt und der Rückstand durch präparative HPLC gereinigt. Es wurden 18.3 mg (56% d. Th.) des geschützten Intermediats erhalten.

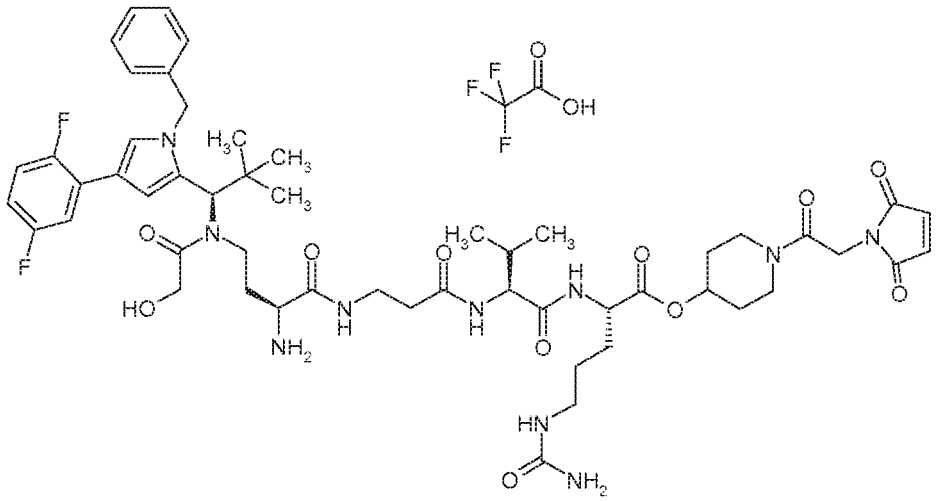
LC-MS (Methode 1): R_t = 1.32 min; MS (EIpos): m/z = 851 $[M+H]^+$.

Im zweiten Schritt wurde dieses Intermediat in 3 mL 2,2,2-Trifluorethanol gelöst. Es wurden 12 mg (0.086 mmol) Zinkchlorid zugegeben und der Ansatz 2 h bei 50°C gerührt. Anschließend wurden 25 mg (0.086 mmol) Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure sowie 2 mL einer 0.1%-igen wässrigen Trifluoressigsäurelösung zugesetzt. Der Ansatz wurde mittels präparativer HPLC gereinigt. Nach Einengen der entsprechenden Fraktionen und Lyophilisation des Rückstands aus Acetonitril/Wasser wurden 11 mg (62% d.Th.) der Titelverbindung erhalten.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.85 min; MS (ESIpos): m/z = 707 $(M+H)^+$.

Intermediat F205

Trifluoressigsäure--1-[(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)acetyl]piperidin-4-yl-N-{(2S)-2-amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}-beta-alanyl-L-valyl-N^5-carbamoyl-L-ornithinat (1:1)

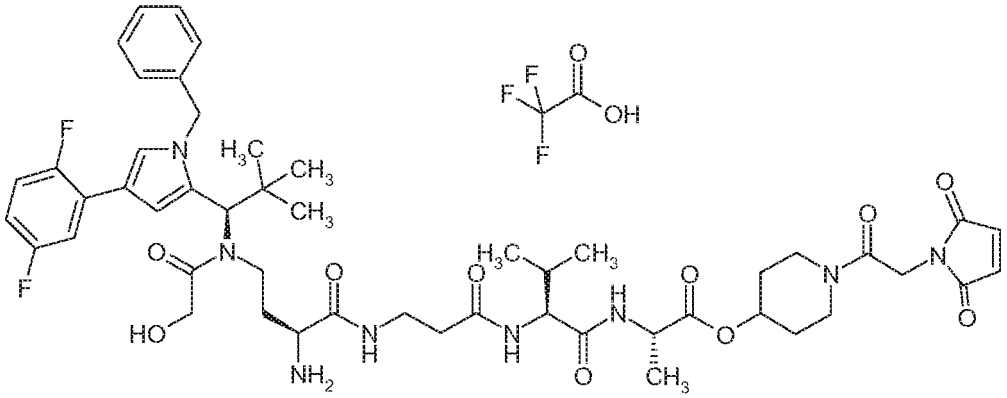


Die Synthese erfolgte durch Kupplung von 25 mg (0.034 mmol) Intermediat C61 und 29 mg (0.041 mmol) Intermediat L69 in Gegenwart von HATU und *N, N*-Diisopropylethylamin, anschließende Hydrierung mit Palladium auf Aktivkohle (10%ig) unter Normaldruck, dann folgende Kupplung mit (2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)essigsäure in Gegenwart von HATU und *N, N*-Diisopropylethylamin und abschließende Abspaltung der 2-(Trimethylsilyl)ethoxycarbonyl-Schutzgruppe mit Zinkchlorid. Nach HPLC Reinigung wurden 11mg (26 % d. Th. über 4 Stufen) erhalten.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.86 min; MS (ESIpos): m/z = 1061 $(M+H)^+$.

Intermediat F206

Trifluoressigsäure--1-[(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)acetyl]piperidin-4-yl-N-{(2S)-2-amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}-beta-alanyl-L-valyl-L-alaninat (1:1)

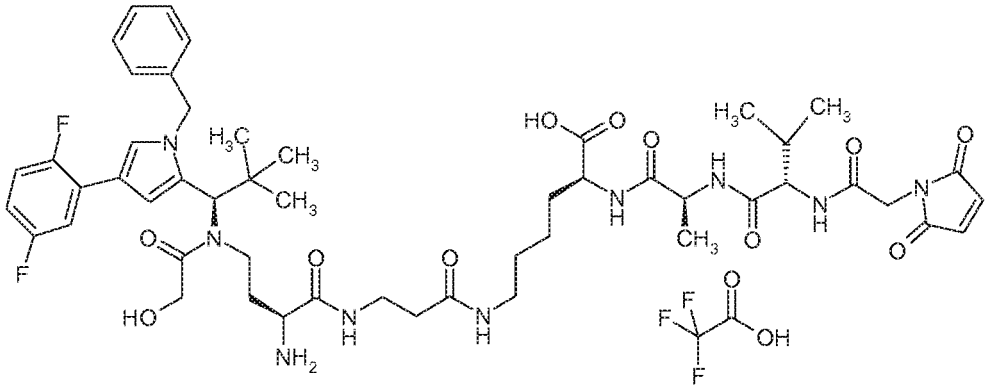


Die Synthese erfolgte in Analogie zu Intermediat F205.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.86 min; MS (ESIpos): m/z = 975 $(M+H)^+$.

Intermediat F207

N^6-(N-{(2S)-2-Amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}-beta-alanyl)-N^2-{N-[(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)acetyl]-L-valyl-L-alanyl}-L-lysin -trifluoressigsäure (1:1)

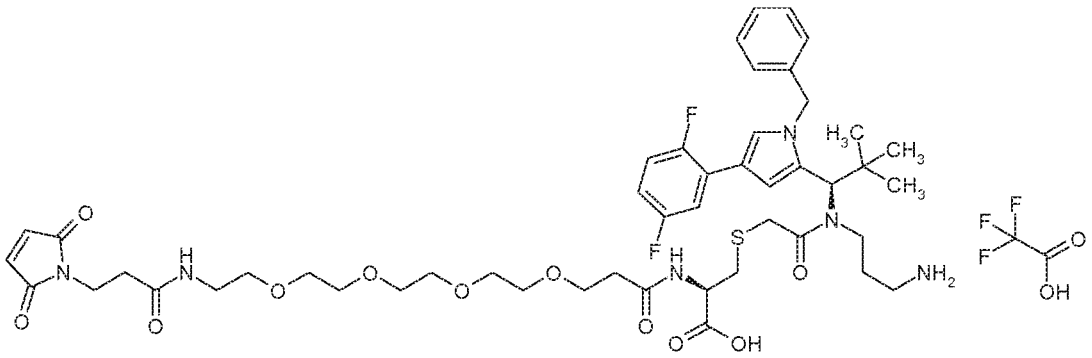


Die Titelverbindung wurde in Analogie zu Intermediat F155 hergestellt.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.81 min; MS (ESIpos): m/z = 1020 $(M+H)^+$.

Intermediat F209

R-{2-[(3-Aminopropyl){(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}amino]-2-oxoethyl}-N-[19-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-17-oxo-4,7,10,13-tetraoxa-16-azanonadecan-1-oyl]-L-cystein-trifluoressigsäure (1:1)



93.9 mg (0.78 mmol) L-Cystein wurden in einer Lösung aus 93.0 mg (1.11 mmol) Natriumhydrogencarbonat und 0.9 mL Wasser suspendiert. Es wurden 70.0 mg (0.11 mmol) 2-(Trimethylsilyl)ethyl-{3-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-

dimethylpropyl}(chloracetyl)amino]propyl}carbamat (Intermediat C70) gelöst in 6.0 mL *iso*-Propanol und 202.3 mg (1.33 mmol) 1,8-Diazabicyclo(5.4.0)undec-7-en zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde 90 min bei 50 °C gerührt. Der Ansatz wurde mit Wasser (0.1% TFA) versetzt und mittles präp. RP-HPLC gereinigt (Säule: Reprosil 125x30; 10µ, Fluss: 50 mL/min, MeCN/Wasser; 0.1% TFA). Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 53.9 mg (59 % d. Th.) der Verbindung R-(11-{(1R)-1-[1-Benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-2,2-dimethyl-6,12-dioxo-5-oxa-7,11-diaza-2-silatridecan-13-yl)-L-cystein-trifluoressigsäure (1:1).

LC-MS (Methode 1): R_t = 1.24 min; MS (ESIpos): m/z = 717 $(M+H)^+$.

86.0 mg (0.1 mmol) R-(11-{(1R)-1-[1-Benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-2,2-dimethyl-6,12-dioxo-5-oxa-7,11-diaza-2-silatridecan-13-yl)-L-cystein-trifluoressigsäure (1:1) und 58.5 mg (0.11 mmol) 3-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-N-{15-[(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)oxy]-15-oxo-3,6,9,12-tetraoxapentadec-1-yl}propanamid wurden in 4.0 mL DMF gelöst und mit 20.9 mg (0.21 mmol) 4-Methylmorpholin versetzt. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei RT gerührt. Es wurden 15.5 mg (0.26 mmol) HOAc zugegeben und die Reaktionsmischung wurde direkt mittels präp. RP-HPLC gereinigt (Säule: Reprosil 125x30; 10µ, Fluss: 50 mL/min, MeCN/Wasser; 0.1 % TFA). Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 68.6 mg (59 % d. Th.) der Verbindung R-(11-{(1R)-1-[1-Benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-2,2-dimethyl-6,12-dioxo-5-oxa-7,11-diaza-2-silatridecan-13-yl)-N-[19-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-17-oxo-4,7,10,13-tetraoxa-16-azanonadecan-1-oyl]-L-cystein.

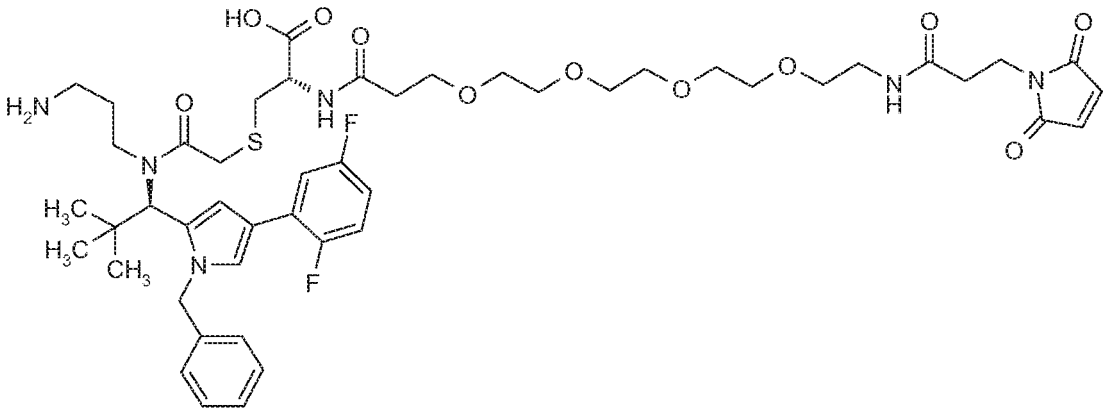
LC-MS (Methode 6): R_t = 2.88 min; MS (ESIpos): m/z = 1115 $(M+H)^+$.

46.4 mg (0.04 mmol) R-(11-{(1R)-1-[1-Benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-2,2-dimethyl-6,12-dioxo-5-oxa-7,11-diaza-2-silatridecan-13-yl)-N-[19-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-17-oxo-4,7,10,13-tetraoxa-16-azanonadecan-1-oyl]-L-cystein wurden in 2.0 mL Trifluorethanol gelöst und mit 17.0 mg (0.13 mmol) Zinkdichlorid versetzt. Die Reaktionsmischung rührte über Nacht bei 50 °C. Es wurden nochmals 8.5 mg (0.07 mmol) Zinkdichlorid zugegeben und über Nacht bei 50 °C gerührt. Die Reaktionsmischung wurde mit 36.5 mg (0.13 mmol) Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure versetzt, 10 min gerührt und dann mit Wasser (0.1% TFA) versetzt. Die Reinigung erfolgte direkt mittles präp. RP-HPLC (Säule: Reprosil 125x30; 10µ, Fluss: 50 mL/min, MeCN/Wasser, 0.1% TFA). Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 19.4 mg (43 % d. Th.) der Titelverbindung.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.94 min; MS (ESIpos): m/z = 971 $(M+H)^+$.

Intermediat F210

S-{2-[(3-Aminopropyl){(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}amino]-2-oxoethyl}-N-[19-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-17-oxo-4,7,10,13-tetraoxa-16-azanonadecan-1-oyl]-D-Cystein-trifluoressigsäure (1:1)

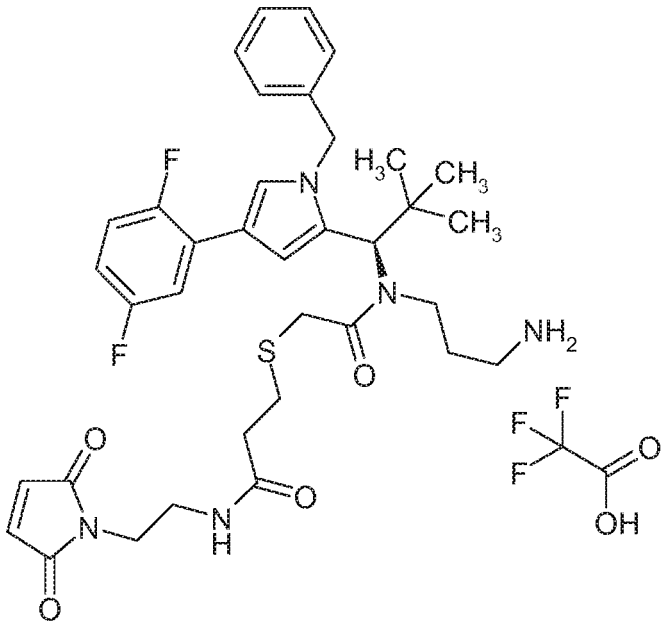


Die Titelverbindung wurde in Analogie zur Synthese des Intermediats F209 unter Verwendung von D-Cystein hergestellt.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.91 min; MS (ESIpos): m/z = 971 $(M+H)^+$.

Intermediat F211

Trifluoressigsäure--3-({2-[(3-aminopropyl){(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}amino]-2-oxoethyl}sulfanyl)-N-[2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)ethyl]propanamid (1:1)



30.0 mg (0.05 mmol) 2-(Trimethylsilyl)ethyl-{3-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(chloracetyl)amino]propyl}carbamat (Intermediat C70) wurden zusammen mit 5.5 mg (0.05 mmol) 3-Sulfanylpropansäure in 0.5 mL Methanol mit einem Tropfen Wasser vorgelegt. Dann wurden 23.0 mg (0.17 mmol) Kaliumcarbonat zugegeben und die Reaktionsmischung wurde 4 h bei 50 °C gerührt. Es wurde Ethylacetat zugesetzt und die org. Phase einmal mit Wasser und einmal mit ges. NaCl-Lösung gewaschen. Die org. Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösemittel im Vakuum verdampft. Der Rückstand wurde ohne weitere Aufreinigung in der nächsten Synthesestufe eingesetzt. Man erhielt 30.3 mg (86 % d. Th.) der Verbindung 11-{(1R)-1-[1-Benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-2,2-dimethyl-6,12-dioxo-5-oxa-14-thia-7,11-diaza-2-silaheptadecan-17-säure

LC-MS (Methode 1): R_t = 1.39 min; MS (ESIpos): m/z = 702 $(M+H)^+$.

30.0 mg (0.04 mol) 11-{(1R)-1-[1-Benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-2,2-dimethyl-6,12-dioxo-5-oxa-14-thia-7,11-diaza-2-silaheptadecan-17-säure und 9.8 mg (0.06 mmol) 1-(2-Aminoethyl)-1H-pyrrol-2,5-dionhydrochlorid (1:1) wurden in 2.0 mL Acetonitril vorgelegt und mit 44.2 mg (0.34 mmol) N,N-Diisopropylethylamin versetzt. Es wurden

35.4 mg (0.06 mmol) T3P (50 % in Ethylacetat) zugegeben und die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei RT gerührt. Es wurde Wasser zugegeben und die Reinigung erfolgte direkt mittles präp. RP-HPLC (Säule: Reprosil 125x30; 10µ, Fluss: 50 mL/min, MeCN/Wasser). Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 22.0 mg (63 % d. Th.) der Verbindung 2-(Trimethylsilyl)ethyl-[3-({(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-

2,2-dimethylpropyl}{[(3-{[2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)ethyl]amino}-3-oxopropyl)sulfanyl]acetyl}amino)propyl]carbamat.

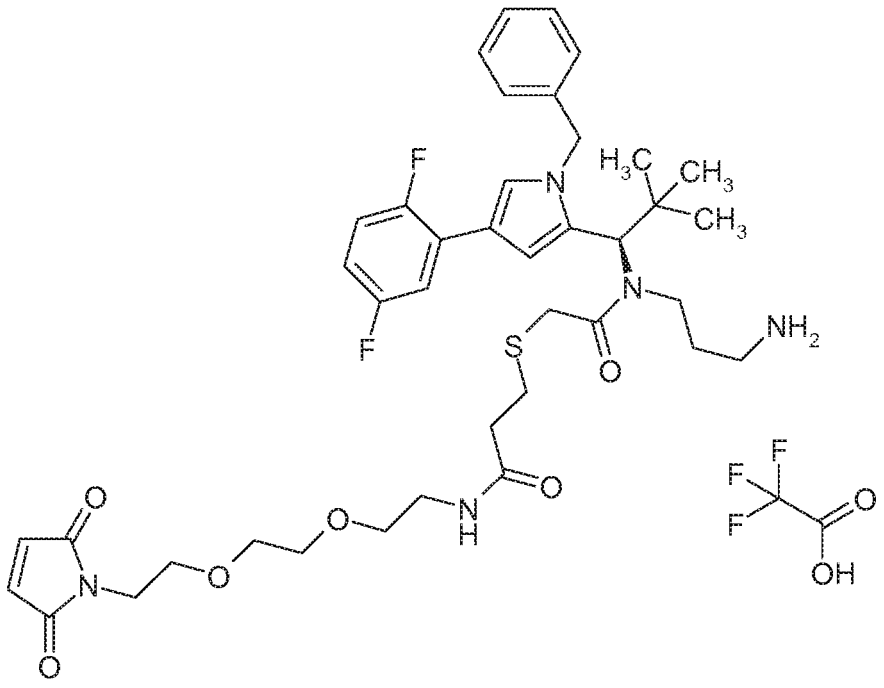
LC-MS (Methode 1): R_t = 1.41 min; MS (ESIpos): m/z = 824 $(M+H)^+$.

22.0 mg (0.03 mol) 2-(Trimethylsilyl)ethyl-[3-({(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}{[(3-{[2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)ethyl]amino}-3-oxopropyl)sulfanyl]acetyl}amino)propyl]carbamat wurden in 1.0 mL Trifluorethanol gelöst und mit 9.1 mg (0.07 mmol) Zinkdichlorid versetzt. Die Reaktionsmischung rührte 5 h bei 50 °C. Die Reaktionsmischung wurde mit 19.5 mg (0.07 mmol) Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure versetzt, 10 min gerührt und dann mit Wasser (0.1% TFA) versetzt. Die Reinigung erfolgte direkt mittles präp. RP-HPLC (Säule: Reprosil 125x30; 10µ, Fluss: 50 mL/min, MeCN/Wasser, 0.1% TFA). Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 15.0 mg (71 % d. Th.) der Titelverbindung.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.88 min; MS (ESIpos): m/z = 680 $(M+H)^+$.

Intermediat F212

Trifluoressigsäure--N-(3-aminopropyl)-N-{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-1-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-10-oxo-3,6-dioxa-13-thia-9-azapentadecan-15-amid (1:1)



28.8 mg (0.04 mmol) 11-{(1R)-1-[1-Benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-2,2-dimethyl-6,12-dioxo-5-oxa-14-thia-7,11-diaza-2-silaheptadecan-17-säure (Intermediat C69) wurden zusammen mit 18.3 mg (0.05 mmol) Trifluoressigsäure--1-{2-[2-(2-aminoethoxy)ethoxy]ethyl}-1H-pyrrol-2,5-dion (1:1) (Intermediat L59) in 1.9 mL Acetonitril vorgelegt. Dann wurden 42.4 mg (0.33 mmol) N,N-Diisopropylethylamin zugegeben und 33.9 mg (0.05 mmol) T3P (50 % in Ethylacetat) zugetropft. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei RT gerührt. Die Reaktionsmischung wurde direkt mittles präp. RP-HPLC (Säule: Reprosil 125x30; 10µ, Fluss: 50 mL/min, MeCN/Wasser) gereinigt. Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 10.7 mg (26 % d. Th.) der Verbindung 2-(Trimethylsilyl)ethyl-[16-{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-1-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-10,15-dioxo-3,6-dioxa-13-thia-9,16-diazanonadecan-19-yl]carbamat.

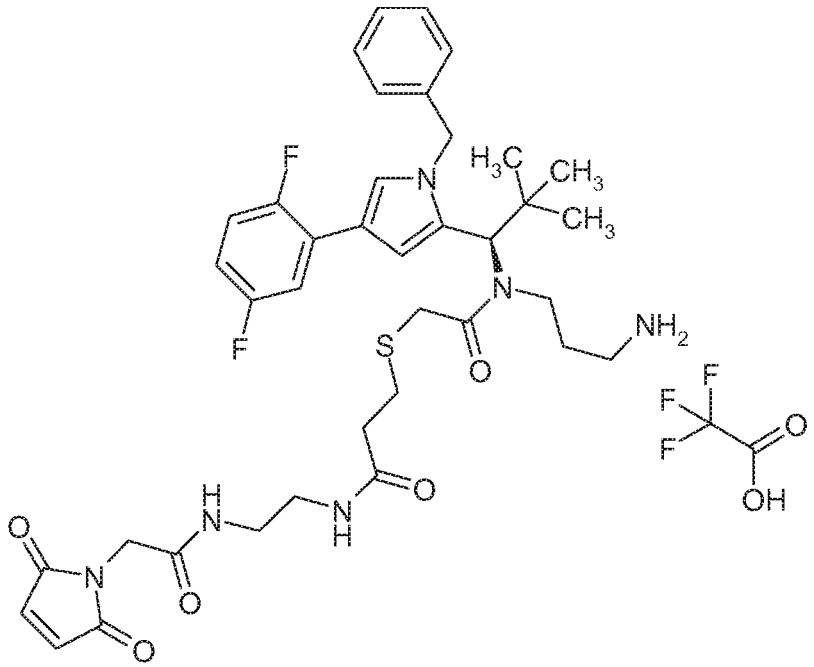
LC-MS (Methode 1): R_t = 1.44 min; MS (ESIpos): m/z = 812 $(M+H)^+$.

10.7 mg (0.01 mol) 2-(Trimethylsilyl)ethyl-[16-{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-1-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-10,15-dioxo-3,6-dioxa-13-thia-9,16-diazanonadecan-19-yl]carbamat wurden in 0.8 mL Trifluorethanol gelöst und mit 8.0 mg (0.06 mmol) Zinkdichlorid versetzt. Die Reaktionsmischung rührte 5 h bei 50 °C. Die Reaktionsmischung wurde mit 17.1 mg (0.06 mmol) Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure versetzt, 10 min gerührt und dann mit Wasser (0.1% TFA) versetzt. Die Reinigung erfolgte direkt mittles präp. RP-HPLC (Säule: Reprosil 125x30; 10µ, Fluss: 50 mL/min, MeCN/Wasser, 0.1% TFA). Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet.

LC-MS (Methode 1): R_t = 1.03 min; MS (ESIpos): m/z = 768 $(M+H)^+$.

Intermediat F213

Trifluoressigsäure--3-({2-[(3-aminopropyl){(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}amino]-2-oxoethyl}sulfanyl)-N-(2-{[(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)acetyl]amino}ethyl)propanamid (1:1)



27.5 mg (0.04 mmol) 11-{(1R)-1-[1-Benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-2,2-dimethyl-6,12-dioxo-5-oxa-14-thia-7,11-diaza-2-silaheptadecan-17-säure (Intermediat C69) wurden zusammen mit 15.9 mg (0.05 mmol) Trifluoressigsäure --N-(2-aminoethyl)-2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)acetamid (1:1) (Intermediat L1) in 1.8 mL Acetonitril vorgelegt. Dann wurden 32.4 mg (0.31 mmol) N,N-Diisopropylethylamin zugegeben und 32.4 mg (0.05 mmol) T3P (50 % in Ethylacetat) zugetropft. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei RT gerührt. Die Reaktionsmischung wurde direkt mittles präp. RP-HPLC (Säule: Reprosil 125x30; 10µ, Fluss: 50 mL/min, MeCN/Wasser). Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 11.9 mg (35 % d. Th.) der Verbindung 2-(Trimethylsilyl)ethyl-[13-{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-1-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-2,7,12-trioxo-10-thia-3,6,13-triazahexadecan-16-yl]carbamat.

LC-MS (Methode 1): R_t = 1.39 min; MS (ESIpos): m/z = 881 $(M+H)^+$.

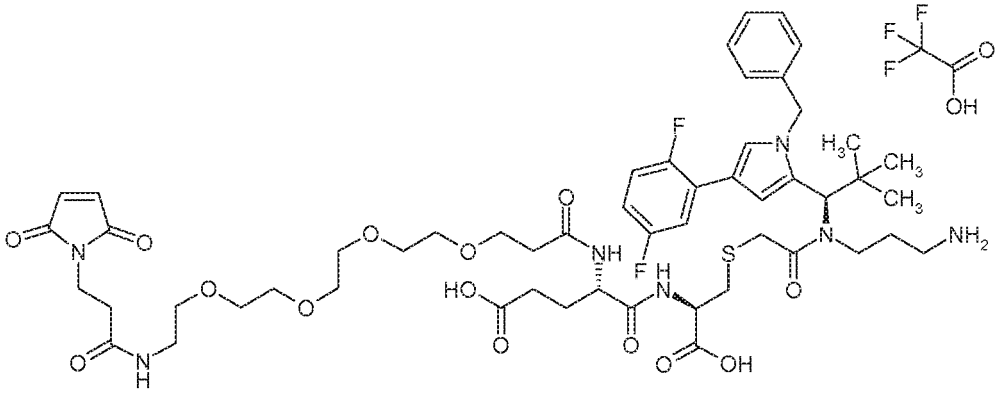
11.9 mg (0.01 mol) 2-(Trimethylsilyl)ethyl-[13-{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-1-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-2,7,12-trioxo-10-thia-3,6,13-triazahexadecan-16-yl]carbamat wurden in 1.0 mL Trifluorethanol gelöst und mit 5.5 mg (0.04 mmol) Zinkdichlorid versetzt. Die Reaktionsmischung rührte über Nacht bei 50 °C. Die Reaktionsmischung wurde mit 11.8 mg (0.04 mmol) Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure versetzt, 10 min gerührt und dann mit Wasser (0.1% TFA) versetzt. Die Reinigung erfolgte direkt mittles präp. RP-HPLC (Säule: Reprosil 125x30; 10µ, Fluss: 50 mL/min, MeCN/Wasser, 0.1% TFA). Die Lösemittel wurden im

Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 7.4 mg (60 % d. Th.) der Titelverbindung.

LC-MS (Methode 5): R_t = 2.75 min; MS (ESIpos): m/z = 737 $(M+H)^+$.

Intermediat F214

N-[19-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-17-oxo-4,7,10,13-tetraoxa-16-azanonadecan-1-oyl]-L-alpha-glutamyl-S-{2-[(3-aminopropyl){(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}amino]-2-oxoethyl}-L-cystein -trifluoressigsäure (1:1)



111.7 mg (0.30 mmol) (2S)-5-(Benzyloxy)-2-{[(benzyloxy)carbonyl]amino}-5-oxopentansäure wurden in 3.0 mL DMF vorgelegt und mit 46.1 (0.30 mmol) HOBt, 96.6 mg (0.30 mmol) TBTU und 38.9 mg (0.30 mmol) N,N-Diisopropylethylamin versetzt. Die Reaktionsmischung wurde 10 min bei RT gerührt. 250.0 mg (0.30 mmol) S-(11-{(1R)-1-[1-Benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-2,2-dimethyl-6,12-dioxo-5-oxa-7,11-diaza-2-silatridecan-13-yl)-L-cystein-trifluoressigsäure (1:1) (Intermediat C71) gelöst in 116.3 mg (0.9 mmol) N,N-Diisopropylethylamin und 3.0 mL DMF wurden dann zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei RT gerührt. Die Reaktionsmischung wurde direkt mittles präp. RP-HPLC (Säule: Reprosil 125x30; 10µ, Fluss: 50 mL/min, MeCN/Wasser). Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 257.0 mg (80 % d. Th.) der Verbindung (16R)-11-{(1R)-1-[1-Benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-16-{[(2S)-5-(benzyloxy)-2-{[(benzyloxy)carbonyl]amino}-5-oxopentanoyl]amino}-2,2-dimethyl-6,12-dioxo-5-oxa-14-thia-7,11-diaza-2-silaheptadecan-17-säure.

LC-MS (Methode 1): R_t = 1.55 min; MS (ESIpos): m/z = 1071 $(M+H)^+$.

Unter Argon wurden 24.6 mg (0.11 mmol) Palladium(II)acetat in 5.0 mL Dichlormethan vorgelegt und mit 33.2 mg (0.33 mmol) Triethylamin und 254.3 mg (2.19 mmol) Triethylsilan versetzt. Die

Reaktionsmischung wurde 5 min bei RT gerührt und mit 234.1 mg (0.22 mmol) (16R)-11-{(1R)-1-[1-Benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-16-{[(2S)-5-(benzyloxy)-2-{[(benzyloxy)carbonyl]amino}-5-oxopentanoyl]amino}-2,2-dimethyl-6,12-dioxo-5-oxa-14-thia-7,11-diaza-2-silaheptadecan-17-säure gelöst in 5.0 mL Dichlormethan versetzt. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei RT gerührt. Die Reaktionsmischung wurde über einen Pappfilter filtriert und der Filterkuchen mit Dichlormethan nachgewaschen. Das Lösemittel wurde im Vakuum ohne Erwärmen verdampft. Der Rückstand wurde mittles präp. RP-HPLC (Säule: Reprosil 250x30; 10µ, Fluss: 50 mL/min, MeCN/Wasser, 0.1% TFA) gereinigt. Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 177.5 mg (85 % d. Th.) der Verbindung L-alpha-Glutamyl-S-(11-{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-2,2-dimethyl-6,12-dioxo-5-oxa-7,11-diaza-2-silatridecan-13-yl)-L-cystein -trifluoressigsäure (1:1).
LC-MS (Methode 1): R_t = 1.07 min; MS (ESIpos): m/z = 846 $(M+H)^+$.

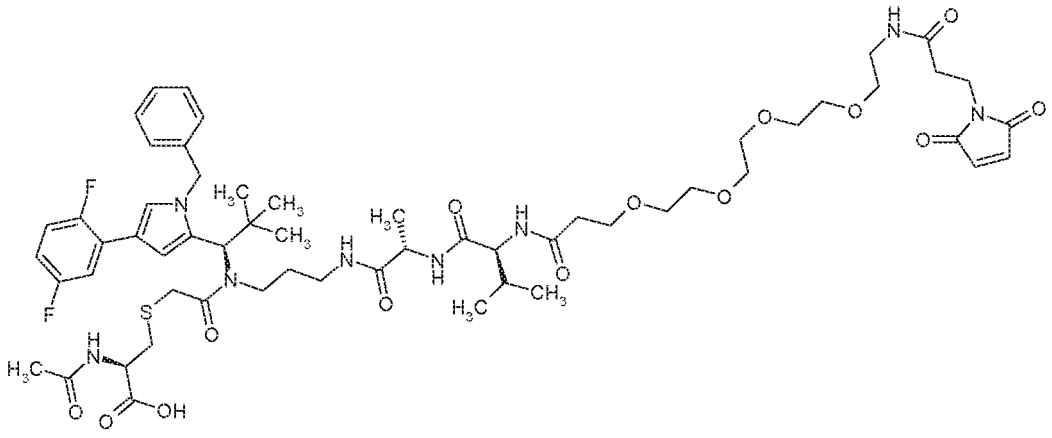
20.0 mg (20.83 µmol) L-alpha-Glutamyl-S-(11-{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-2,2-dimethyl-6,12-dioxo-5-oxa-7,11-diaza-2-silatridecan-13-yl)-L-cystein-trifluoressigsäure (1:1) wurden zusammen mit 11.8 mg (22.91 µmol) 3-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-N-{15-[(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)oxy]-15-oxo-3,6,9,12-tetraoxapentadec-1-yl}propanamid in 1.5 mL DMF vorgelegt und mit 6.3 mg (62.49 µmol) 4-Methylmorpholin versetzt. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei RT gerührt und dann mit 4.4 mg (0.07 mmol) Essigsäure versetzt. Die Reaktionsmischung wurde direkt mittles präp. RP-HPLC (Säule: Reprosil 250x30; 10µ, Fluss: 50 mL/min, MeCN/Wasser) gereinigt. Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 19.1 mg (74 % d. Th.) der Verbindung N-[19-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-17-oxo-4,7,10,13-tetraoxa-16-azanonadecan-1-oyl]-L-alpha-glutamyl-S-(11-{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-2,2-dimethyl-6,12-dioxo-5-oxa-7,11-diaza-2-silatridecan-13-yl)-L-cystein.
LC-MS (Methode 1): R_t = 1.24 min; MS (ESIpos): m/z = 1244 $(M+H)^+$.

17.5 mg (14.06 µmol) N-[19-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-17-oxo-4,7,10,13-tetraoxa-16-azanonadecan-1-oyl]-L-alpha-glutamyl-S-(11-{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-2,2-dimethyl-6,12-dioxo-5-oxa-7,11-diaza-2-silatridecan-13-yl)-L-cystein wurden in 1.5 mL Trifluorethanol gelöst und mit 11.5 mg (84.37 µmol) Zinkdichlorid versetzt. Die Reaktionsmischung rührte 4 h bei 50 °C. Die Reaktionsmischung wurde mit 24.7 mg (0.08 mmol) Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure versetzt, 10 min gerührt und dann mit Wasser (0.1% TFA) versetzt. Die Reinigung erfolgte direkt mittles präp. RP-HPLC (Säule: Reprosil 125x30; 10µ, Fluss: 50 mL/min, MeCN/Wasser, 0.1% TFA). Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 10.8 mg (63 % d. Th.) der Titelverbindung

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.89 min; MS (ESIpos): m/z = 1100 $(M+H)^+$.

Intermediat F215

N-[19-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-17-oxo-4,7,10,13-tetraoxa-16-azanonadecan-1-oyl]-L-valyl-N-{3-[({[(2R)-2-acetamido-2-carboxyethyl]sulfanyl}acetyl){(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}amino]propyl}-L-alaninamid



14.9 mg (0.02 mmol) N-Acetyl-S-[2-([3-(L-alanylamino)propyl]{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}amino)-2-oxoethyl]-L-cystein -trifluoressigsäure (1:1) (Beispiel 229) und 7.1 mg (0.02 mmol) 2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl-N-[(benzyloxy)carbonyl]-L-valinat wurden in 1.0 mL DMF vorgelegt und mit 5.7 mg (0.06 mmol) 4-Methylmorpholin versetzt. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei RT gerührt und dann mit 4.5 mg (0.08 mmol) Essigsäure versetzt. Die Reaktionsmischung wurde direkt mittles präp. RP-HPLC (Säule: Reprosil 250x30; 10µ, Fluss: 50 mL/min, MeCN/Wasser). Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 13.3 mg (78 % d. Th.) der Verbindung N-[(Benzyloxy)carbonyl]-L-valyl-N-{3-[({[(2R)-2-acetamido-2-carboxyethyl]sulfanyl}acetyl){(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}amino]propyl}-L-alaninamid.

LC-MS (Methode 1): R_t = 1.24 min; MS (ESIpos): m/z = 919 $(M+H)^+$.

11.1 mg (0.01 mmol) N-[(Benzyloxy)carbonyl]-L-valyl-N-{3-[({[(2R)-2-acetamido-2-carboxyethyl]sulfanyl}acetyl){(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}amino]propyl}-L-alaninamid wurden in 5.0 mL Ethanol gelöst, mit 1.0 mg Palladium auf Aktivkohle (10 %) versetzt und bei RT und Normaldruck über Nacht hydriert. Die Reaktionsmischung wurde über Celite filtriert und der Filterkuchen wurde mit einem Ethanol/THF/Wasser Gemisch nachgewaschen. Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft. Der

Rückstand wurde mittles präp. RP-HPLC (Säule: Reprosil 250x30; 10µ, Fluss: 50 mL/min, MeCN/Wasser, 0.1% TFA) gereinigt. Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand wurde lyophilisiert. Man erhielt 7.5 mg (69 % d. Th.) der Verbindung L-Valyl-N-{3-[({[(2R)-2-acetamido-2-carboxyethyl]sulfanyl}acetyl){(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}amino]propyl}-L-alaninamid-trifluoressigsäure (1:1).

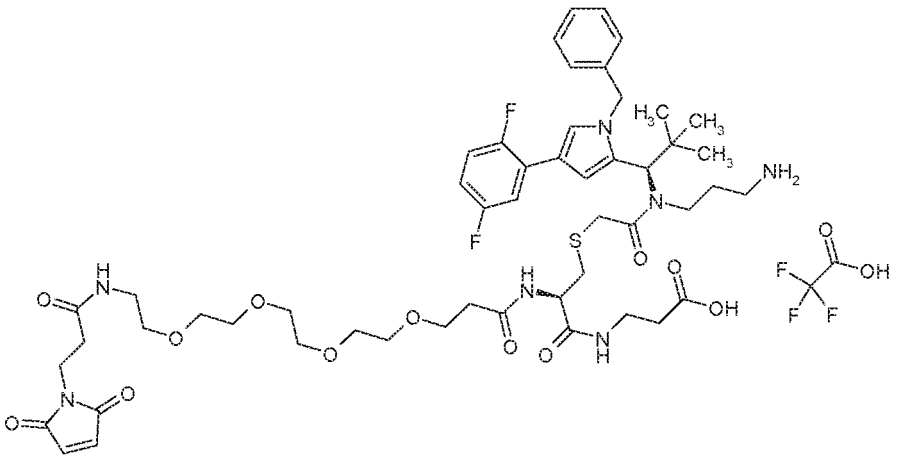
LC-MS (Methode 1): R_t = 0.86 min; MS (ESIpos): m/z = 785 $(M+H)^+$.

7.3 mg (8.12 µmol) L-Valyl-N-{3-[({[(2R)-2-acetamido-2-carboxyethyl]sulfanyl}acetyl){(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}amino]propyl}-L-alaninamid - trifluoressigsäure (1:1) wurden zusammen mit 4.6 mg (8.93 µmol) 3-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-N-{15-[(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)oxy]-15-oxo-3,6,9,12-tetraoxapentadec-1-yl}propanamid in 0.5 mL DMF vorgelegt und mit 2.5 mg (24.36 µmol) 4-Methylmorpholin versetzt. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei RT gerührt und dann mit 4.4 mg (0.03 mmol) Essigsäure versetzt. Die Reaktionsmischung wurde direkt mittles präp. RP-HPLC (Säule: Reprosil 250x30; 10µ, Fluss: 50 mL/min, MeCN/Wasser, 0.1% TFA) gereinigt. Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 4.9 mg (50 % d. Th.) der Titelverbindung.

LC-MS (Methode 1): R_t = 1.07 min; MS (ESIpos): m/z = 1183 $(M+H)^+$.

Intermediat F216

S-{2-[(3-Aminopropyl){(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}amino]-2-oxoethyl}-N-[19-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-17-oxo-4,7,10,13-tetraoxa-16-azanonadecan-1-oyl]-L-cysteinyl-beta-alanin -trifluoressigsäure (1:1)



Unter Argon wurden 30.2 mg (0.06 mmol) N,N'-Bis[(benzyloxy)carbonyl]-L-cystin in 2.0 mL Wasser und 2.0 mL *iso*-Propanol vorgelegt und mit 56.7 mg (0.20 mmol) TCEP versetzt. Die Reaktionsmischung wurde 30 min bei RT gerührt. Es wurden dann 50.0 mg (0.08 mmol) 2-

(Trimethylsilyl)ethyl-{3-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(chloracetyl)amino]propyl}carbamat (Intermediat C70) gelöst in 2.0 mL *iso*-Propanol und 122.2 mg (0.48 mmol) 1,8-Diazabicyclo(5.4.0)undec-7-en zugegeben und die Reaktionsmischung wurde 7 h bei 50 °C gerührt. Dann wurden nochmals 122.2 mg (0.48 mmol) 1,8-Diazabicyclo(5.4.0)undec-7-en zugegeben und die Reaktionsmischung wurde 1 h bei 50 °C gerührt. Es wurde mit Ethylacetat verdünnt und die organische Phase wurde mit Wasser und ges. Natriumhydrogencarbonat-Lsg. extrahiert und mit ges. NaCl-Lsg. gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösemittel im Vakuum verdampft. Der Rückstand wurde mittles präp. RP-HPLC (Säule: Reprosil 250x30; 10µ, Fluss: 50 mL/min, MeCN/Wasser, 0.1 % TFA) gereinigt. Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 43.1 mg (64 % d. Th.) der Verbindung S-(11-{(1R)-1-[1-Benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-2,2-dimethyl-6,12-dioxo-5-oxa-7,11-diaza-2-silatridecan-13-yl)-N-[(benzyloxy)carbonyl]-L-cystein.

LC-MS (Methode 1): R_t = 1.46 min; MS (ESIpos): m/z = 851 $(M+H)^+$.

16.5 mg (0.05 mmol) 4-Methylbenzolsulfonsäure-benzyl-beta-alaninat (1:1) wurden zusammen mit 14.0 mg (0.11 mmol) N,N-Diisopropylethylamin in 1.5 mL Acetonitril vorgelegt. Die Reaktionsmischung wurde 3 min bei RT gerührt und dann wurden 30.8 mg (0.04 mmol) S-(11-{(1R)-1-[1-Benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-2,2-dimethyl-6,12-dioxo-5-oxa-7,11-diaza-2-silatridecan-13-yl)-N-[(benzyloxy)carbonyl]-L-cystein gelöst in 1.5 mL Acetonitril, 23.4 mg (0.18 mmol) N,N-Diisopropylethylamin und 29.9 mg (0.05 mmol) T3P (50 % in Ethylacetat) zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei RT gerührt. Es wurde Wasser zugegeben und die Reaktionsmischung wurde direkt mittles präp. RP-HPLC (Säule: Reprosil 250x30; 10µ, Fluss: 50 mL/min, MeCN/Wasser, 0.1% TFA) gereinigt. Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Benzyl-S-(11-{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-2,2-dimethyl-6,12-dioxo-5-oxa-7,11-diaza-2-silatridecan-13-yl)-N-[(benzyloxy)carbonyl]-L-cysteinyl-beta-alaninat wurde als Verbindung erhalten.

LC-MS (Methode 1): R_t = 1.59 min; MS (ESIpos): m/z = 1012 $(M+H)^+$.

43.8 mg (43.3 µmol) Benzyl-S-(11-{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-2,2-dimethyl-6,12-dioxo-5-oxa-7,11-diaza-2-silatridecan-13-yl)-N-[(benzyloxy)carbonyl]-L-cysteinyl-beta-alaninat wurden in 8.0 mL Ethanol gelöst, mit 4.4 mg Palladium auf Aktivkohle (10%) versetzt und bei RT und Normaldruck über Nacht hydriert. Die Reaktionsmischung wurde über einen Pappfilter filtriert und der Filterkuchen wurde mit einem Ethanol nachgewaschen. Das Lösemittel wurden im Vakuum verdampft. Der Rückstand wurde noch zweimal wie soeben beschrieben behandelt. Der Rückstand wurde mittles präp. RP-HPLC (Säule: Reprosil

250x30; 10µ, Fluss: 50 mL/min, MeCN/Wasser, 0.1% TFA) gereinigt. Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 14.5 mg (37 % d. Th.) der Verbindung S-(11-{(1R)-1-[1-Benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-2,2-dimethyl-6,12-dioxo-5-oxa-7,11-diaza-2-silatridecan-13-yl)-L-cysteinyl-beta-alanin - trifluoressigsäure (1:1).

LC-MS (Methode 1): R_t = 1.08 min; MS (ESIpos): m/z = 788 $(M+H)^+$.

14.5 mg (16.1 µmol) S-(11-{(1R)-1-[1-Benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-2,2-dimethyl-6,12-dioxo-5-oxa-7,11-diaza-2-silatridecan-13-yl)-L-cysteinyl-beta-alanin-trifluoressigsäure (1:1) wurden zusammen mit 9.1 mg (17.7 µmol) 3-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-N-{15-[(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)oxy]-15-oxo-3,6,9,12-tetraoxapentadec-1-yl}propanamid in 1.0 mL DMF vorgelegt und mit 4.9 mg (48.2 µmol) 4-Methylmorpholin versetzt. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei RT gerührt und dann mit 3.4 mg (0.06 mmol) Essigsäure versetzt. Die Reaktionsmischung wurde direkt mittles präp. RP-HPLC (Säule: Reprosil 250x30; 10µ, Fluss: 50 mL/min, MeCN/Wasser, 0.1% TFA) gereinigt. Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 4.9 mg (50 % d. Th.) der Verbindung S-(11-{(1R)-1-[1-Benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-2,2-dimethyl-6,12-dioxo-5-oxa-7,11-diaza-2-silatridecan-13-yl)-L-cysteinyl-beta-alanin-trifluoressigsäure (1:1).

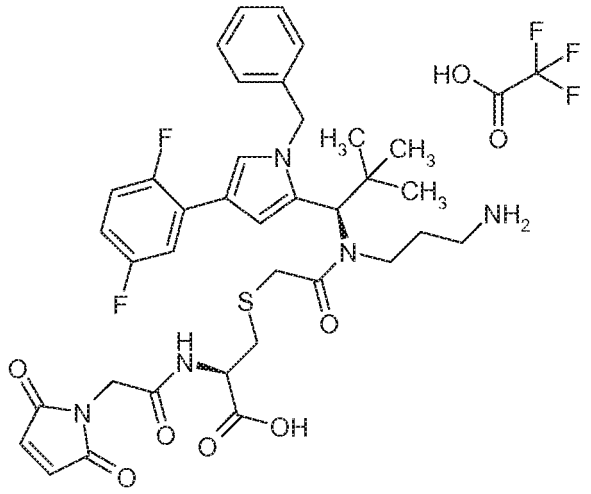
LC-MS (Methode 1): R_t = 1.28 min; MS (ESIpos): m/z = 1186 $(M+H)^+$.

14.1 mg (11.9 µmol) S-(11-{(1R)-1-[1-Benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-2,2-dimethyl-6,12-dioxo-5-oxa-7,11-diaza-2-silatridecan-13-yl)-N-[19-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-17-oxo-4,7,10,13-tetraoxa-16-azanonadecan-1-oyl]-L-cysteinyl-beta-alanin-trifluoressigsäure (1:1) wurden in 1.5 mL Trifluorethanol gelöst und mit 9.7 mg (71.3 µmol) Zinkdichlorid versetzt. Die Reaktionsmischung rührte 3 h bei 50 °C. Es wurden nochmals 9.7 mg (71.3 µmol) Zinkdichlorid zugegeben und die Reaktionsmischung rührte 3 h bei 50 °C. Es wurden nochmals 9.7 mg (71.3 µmol) Zinkdichlorid zugegeben und die Reaktionsmischung rührte 4 h bei 70 °C. Die Reaktionsmischung wurde mit 20.8 mg (0.07 mmol) Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure versetzt, 10 min gerührt und dann mit Wasser (0.1% TFA) versetzt. Die Reinigung erfolgte direkt mittles präp. RP-HPLC (Säule: Reprosil 125x30; 10µ, Fluss: 50 mL/min, MeCN/Wasser, 0.1% TFA). Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand wurde lyophilisiert. Man erhielt 6.2 mg (44 % d. Th.) der Titelverbindung.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.82 min; MS (ESIpos): m/z = 1042 $(M+H)^+$.

Intermediat F217

S-{2-[(3-Aminopropyl){(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}amino]-2-oxoethyl}-N-[(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)acetyl]-L-cystein - trifluoressigsäure (1:1)



Unter Argon wurden 7.5 mg (0.05 mmol) (2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)essigsäure in 1.5 mL DMF vorgelegt und mit 7.5 mg (0.05 mmol) HOBt, 15.5 mg (0.05 mmol) TBTU und 6.2 mg (0.05 mmol) N,N-Diisopropylethylamin versetzt. Die Reaktionsmischung wurde 10 min bei RT gerührt. Es wurden dann 40.0 mg (0.05 mmol) S-(11-{(1R)-1-[1-Benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-2,2-dimethyl-6,12-dioxo-5-oxa-7,11-diaza-2-silatridecan-13-yl)-L-cystein-trifluoressigsäure (1:1) (Intermediat C71) gelöst in 1.5 mL DMF und 18.7 mg (0.14 mmol) N,N-Diisopropylethylamin zugegeben und die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei RT gerührt. Die Reaktionsmischung wurde direkt mittles präp. RP-HPLC (Säule: Reprosil 250x30; 10µ, Fluss: 50 mL/min, MeCN/Wasser, 0.1 % TFA) gereinigt. Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 11.2 mg (25 % d. Th.) der Verbindung S-(11-{(1R)-1-[1-Benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-2,2-dimethyl-6,12-dioxo-5-oxa-7,11-diaza-2-silatridecan-13-yl)-N-[(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)acetyl]-L-cystein.

LC-MS (Methode 1): R_t = 1.37 min; MS (ESIpos): m/z = 854 $(M+H)^+$.

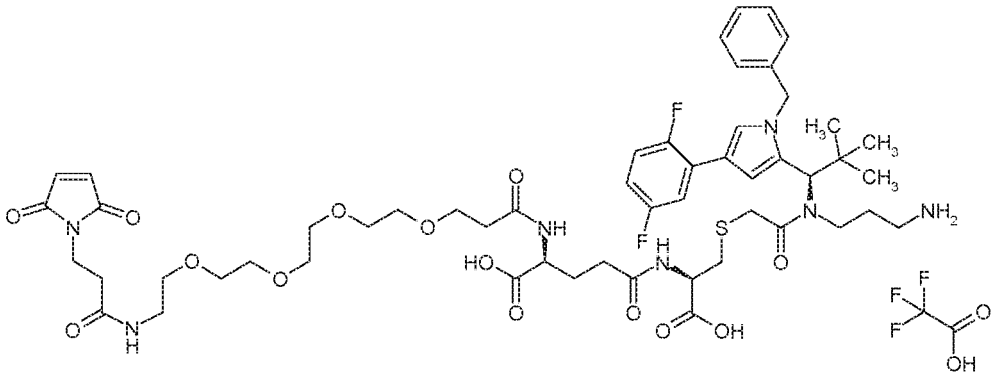
10.9 mg (12.8 µmol) S-(11-{(1R)-1-[1-Benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-2,2-dimethyl-6,12-dioxo-5-oxa-7,11-diaza-2-silatridecan-13-yl)-N-[(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)acetyl]-L-cystein wurden in 2.0 mL Trifluorethanol gelöst und mit 10.4 mg (76.6 µmol) Zinkdichlorid versetzt. Die Reaktionsmischung rührte 4 h bei 50 °C. Die Reaktionsmischung wurde mit 22.4 mg (0.08 mmol) Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure versetzt, 10 min gerührt und dann mit Wasser (0.1% TFA) versetzt. Die Reinigung erfolgte direkt mittles präp.

RP-HPLC (Säule: Reprosil 250x30; 10µ, Fluss: 50 mL/min, MeCN/Wasser, 0.1% TFA). Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand wurde lyophilisiert. Man erhielt 7.5 mg (65 % d. Th.) der Titelverbindung.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.92 min; MS (ESIpos): m/z = 710 $(M+H)^+$.

Intermediat F218

N-[19-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-17-oxo-4,7,10,13-tetraoxa-16-azanonadecan-1-oyl]-L-gamma-glutamyl-S-{2-[(3-aminopropyl){(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}amino]-2-oxoethyl}-L-cystein -trifluoressigsäure (1:1)



Unter Argon wurden 22.9 mg (0.06 mmol) (4S)-5-(Benzyloxy)-4-{[(benzyloxy)carbonyl]amino}-5-oxopentansäure in 2.0 mL DMF vorgelegt und mit 9.4 mg (0.05 mmol) HOBt, 19.8 mg (0.06 mmol) TBTU und 8.0 mg (0.06 mmol) N,N-Diisopropylethylamin versetzt. Die Reaktionsmischung wurde 10 min bei RT gerührt. Es wurden dann 51.2 mg (0.06 mmol) S-(11-{(1R)-1-[1-Benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-2,2-dimethyl-6,12-dioxo-5-oxa-7,11-diaza-2-silatridecan-13-yl)-L-cystein (Intermediat C71) gelöst in 1.0 mL DMF und 23.9 mg (0.19 mmol) N,N-Diisopropylethylamin zugegeben und die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei RT gerührt. Die Reaktionsmischung wurde direkt mittles präp. RP-HPLC (Säule: Reprosil 250x30; 10µ, Fluss: 50 mL/min, MeCN/Wasser, 0.1 % TFA) gereinigt. Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 11.2 mg (25 % d. Th.) der Verbindung (16R)-11-{(1R)-1-[1-Benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-16-{[(4S)-5-(benzyloxy)-4-{[(benzyloxy)carbonyl]amino}-5-oxopentanoyl]amino}-2,2-dimethyl-6,12-dioxo-5-oxa-14-thia-7,11-diaza-2-silaheptadecan-17-säure.

LC-MS (Methode 1): R_t = 1.52 min; MS (ESIpos): m/z = 1070 $(M+H)^+$.

Unter Argon wurden 3.9 mg (0.02 mmol) Palladium(II)acetat in 1.0 mL Dichlormethan vorgelegt und mit 5.3 mg (0.05 mmol) Triethylamin und 254.3 mg (2.19 mmol) Triethylsilan versetzt. Die Reaktionsmischung wurde 5 min bei RT gerührt und mit 18.6 mg (0.02 mmol) (16R)-11-{(1R)-1-[1-Benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-16-{[(4S)-5-(benzyloxy)-4-{[(benzyloxy)carbonyl]amino}-5-oxopentanoyl]amino}-2,2-dimethyl-6,12-dioxo-5-oxa-14-thia-7,11-diaza-2-silaheptadecan-17-säure gelöst in 1.0 mL Dichlormethan versetzt. Das Lösemittel wurde im Vakuum ohne Erwärmen verdampft. Der Rückstand wurde in Aceonitril aufgenommen, durch einen Spritzenfilter filtriert und mittles präp. RP-HPLC (Säule: Reprosil 250x30; 10µ, Fluss: 50 mL/min, MeCN/Wasser, 0.1% TFA) gereinigt. Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 11.0 mg (66 % d. Th.) der Verbindung L-gamma-Glutamyl-S-(11-{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-2,2-dimethyl-6,12-dioxo-5-oxa-7,11-diaza-2-silatridecan-13-yl)-L-cystein -trifluoressigsäure (1:1).

LC-MS (Methode 1): R_t = 1.14 min; MS (ESIpos): m/z = 846 $(M+H)^+$.

15.0 mg (15.6 µmol) L-gamma-Glutamyl-S-(11-{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-2,2-dimethyl-6,12-dioxo-5-oxa-7,11-diaza-2-silatridecan-13-yl)-L-cystein-trifluoressigsäure (1:1) wurden zusammen mit 8.8 mg (17.2 µmol) 3-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-N-{15-[(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)oxy]-15-oxo-3,6,9,12-tetraoxapentadec-1-yl}propanamid in 1.0 mL DMF vorgelegt und mit 4.7 mg (46.9 µmol) 4-Methylmorpholin versetzt. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei RT gerührt und dann mit 3.3 mg (0.06 mmol) Essigsäure versetzt. Die Reaktionsmischung wurde direkt mittles präp. RP-HPLC (Säule: Reprosil 250x30; 10µ, Fluss: 50 mL/min, MeCN/Wasser) gereinigt. Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 14.2 mg (70 % d. Th.) der Verbindung N-[19-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-17-oxo-4,7,10,13-tetraoxa-16-azanonadecan-1-oyl]-L-gamma-glutamyl-S-(11-{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-2,2-dimethyl-6,12-dioxo-5-oxa-7,11-diaza-2-silatridecan-13-yl)-L-cystein.

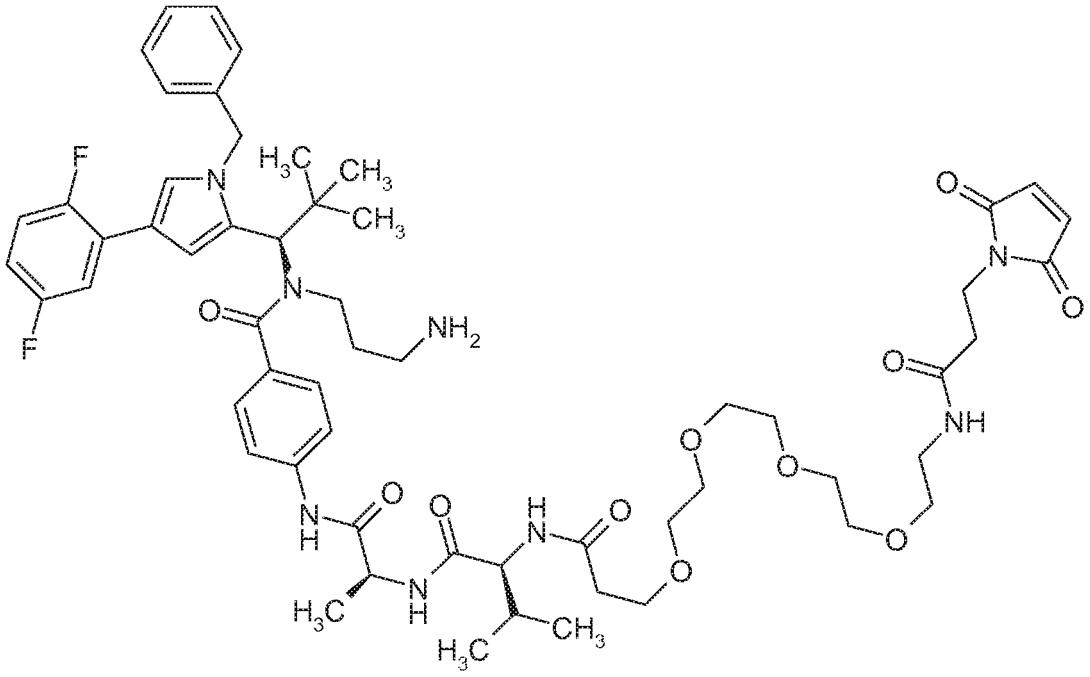
LC-MS (Methode 4) R_t = 1.24 min; MS (ESIpos): m/z = 1244 $(M+H)^+$.

13.8 mg (11.1 µmol) N-[19-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-17-oxo-4,7,10,13-tetraoxa-16-azanonadecan-1-oyl]-L-gamma-glutamyl-S-(11-{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-2,2-dimethyl-6,12-dioxo-5-oxa-7,11-diaza-2-silatridecan-13-yl)-L-cystein wurden in 2.0 mL Trifluorethanol gelöst und mit 9.1 mg (66.5 µmol) Zinkdichlorid versetzt. Die Reaktionsmischung rührte 4 h bei 50 °C. Die Reaktionsmischung wurde mit 19.4 mg (0.07 mmol) Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure versetzt, 10 min gerührt und dann mit Wasser (0.1% TFA) versetzt. Die Reinigung erfolgte direkt mittles präp. RP-HPLC (Säule: Reprosil 250x30; 10µ, Fluss: 50

mL/min, MeCN/Wasser, 0.1% TFA). Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 6.9 mg (50 % d. Th.) der Titelverbindung.
LC-MS (Methode 1): R_t = 0.89 min; MS (ESIpos): m/z = 1100 $(M+H)^+$.

Intermediat F235

Trifluoressigsäure--N-[19-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-17-oxo-4,7,10,13-tetraoxa-16-azanonadecan-1-oyl]-L-valyl-N-{4-[(3-aminopropyl){(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}carbamoyl]phenyl}-L-alaninamid (1:1)



120.0 mg (0.22 mmol) 2-(Trimethylsilyl)ethyl-[3-({(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}amino)propyl]carbamat (siehe Synthese Intermediat C11) und 52.1 mg (0.28 mmol) 4-Nitrobenzoylchlorid wurden in 8.0 mL Dichlormethan gelöst und mit 28.4 mg (0.28 mmol) Triethlyamin versetzt. Die Reaktionsmischung rührte über Nacht bei RT. Das Lösemittel wurde im Vakuum verdampft und der Rückstand wurde mittles präp. RP-HPLC (Säule: Reprosil 125x30; 10µ, Fluss: 50 mL/min, MeCN/Wasser, 0.1% TFA) gereinigt. Man erhielt 97.7 mg (64 % d. Th.) der Verbindung 2-(Trimethylsilyl)ethyl-{3-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(4-nitrobenzoyl)amino]propyl}carbamat.
LC-MS (Methode 1): R_t = 1.54 min; MS (ESIpos): m/z = 705 $(M+H)^+$.

97.0 mg (0.14 mmol) 2-(Trimethylsilyl)ethyl-{3-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(4-nitrobenzoyl)amino]propyl}carbamat wurden in 5.0 mL Ethanol gelöst, mit 9.7 mg Palladium auf Aktivkohle (10 %) versetzt und 5 h bei Normaldruck hydriert. Die Reaktionsmischung wurde über einen Papierfilter filtriert und der Filterkuchen wurde mit einem Ethanol nachgewaschen. Das Lösemittel wurde im Vakuum verdampft. Der Rückstand wurde ohne weitere Reinigung in der nächsten Synthesestufe eingesetzt. Man erhielt 87.4 mg (88 % d. Th.) der Verbindung 2-(Trimethylsilyl)ethyl-{3-[(4-aminobenzoyl){(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}amino]propyl}carbamat.

LC-MS (Methode 1): R_t = 1.47 min; MS (ESIpos): m/z = 675 $(M+H)^+$.

59.3 mg (0.09 mmol) 2-(Trimethylsilyl)ethyl-{3-[(4-aminobenzoyl){(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}amino]propyl}carbamat und 25.5 mg (0.11 mmol) N-[(Benzyloxy)carbonyl]-L-alanin wurden zusammen mit 68.1 mg (0.53 mmol) N,N-Diisopropylethylamin in 5.0 mL Acetonitril vorgelegt. Es wurde 72.7 mg (0.11 mmol) T3P (50 % in Ethylacetat) langsam zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei RT gerührt. Die Reaktionsmischung wurde direkt mittles präp. RP-HPLC (Säule: Reprosil 125x30; 10µ, Fluss: 50 mL/min, MeCN/Wasser, 0.1 % TFA) gereinigt. Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 52.2 mg (68 % d. Th.) der Verbindung Benzyl-[(2S)-1-{[4-({(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}[3-({[2-(trimethylsilyl)ethoxy]carbonyl}amino)propyl]carbamoyl)phenyl]amino}-1-oxopropan-2-yl]carbamat.

LC-MS (Methode 1): R_t = 1.48 min; MS (ESIpos): m/z = 880 $(M+H)^+$.

23.9 mg (0.03 mmol) Benzyl-[(2S)-1-{[4-({(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}[3-({[2-(trimethylsilyl)ethoxy]carbonyl}amino)propyl]carbamoyl)phenyl] amino}-1-oxopropan-2-yl]carbamat wurden in 3.0 mL Ethylacetat gelöst, mit 2.4 mg Palladium auf Aktivkohle (10 %) versetzt und 2 h bei Normaldruck hydriert. Die Reaktionsmischung wurde über einen Papierfilter filtriert und der Filterkuchen wurde mit Ethylacetat nachgewaschen. Das Lösemittel wurde im Vakuum verdampft. Der Rückstand wurde ohne weitere Reinigung in der nächsten Synthesestufe eingesetzt. Man erhielt 20.1 mg (90 % d. Th.) der Verbindung 2-(Trimethylsilyl)ethyl-[3-([4-(L-alanylamino)benzoyl]{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}amino)propyl]carbamat.

LC-MS (Methode 1): R_t = 1.13 min; MS (ESIpos): m/z = 746 $(M+H)^+$.

20.0 mg (0.03 mmol) 2-(Trimethylsilyl)ethyl-[3-([4-(L-alanylamino)benzoyl]{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}amino)propyl]carbamat wurden zusammen mit 14.9 mg (0.04 mmol) 2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl-N-[(benzyloxy)carbonyl]-L-valinat in 2.0 mL DMF vorgelegt

und mit 5.4 mg (0.05 mmol) 4-Methylmorpholin versetzt. Die Reaktionsmischung wurde direkt mittles präp. RP-HPLC (Säule: Reprosil 125x30; 10µ, Fluss: 50 mL/min, MeCN/Wasser) gereinigt. Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt die Verbindung N-[(Benzyloxy)carbonyl]-L-valyl-N-[4-({(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}[3-({[2-(trimethylsilyl)ethoxy]carbonyl}amino)propyl]carbamoyl)phenyl]-L-alaninamid.

LC-MS (Methode 1): R_t = 1.49 min; MS (ESIpos): m/z = 979 $(M+H)^+$.

17.0 mg (17.4 µmol) N-[(Benzyloxy)carbonyl]-L-valyl-N-[4-({(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}[3-({[2-(trimethylsilyl)ethoxy]carbonyl}amino)propyl]carbamoyl)phenyl]-L-alaninamid wurden in 2.5 mL Ethylacetat gelöst, mit 1.7 mg Palladium auf Aktivkohle (10 %) versetzt und über Nacht bei Normaldruck hydriert. Die Reaktionsmischung wurde über einen Papierfilter filtriert und der Filterkuchen wurde mit einem Ethylacetat nachgewaschen. Das Lösemittel wurde im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 15.3 mg (60 % d. Th.) der Verbindung L-Valyl-N-[4-({(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}[3-({[2-(trimethylsilyl)ethoxy]carbonyl}amino)propyl]carbamoyl)phenyl]-L-alaninamid.

LC-MS (Methode 1): R_t = 1.15 min; MS (ESIpos): m/z = 845 $(M+H)^+$.

15.3 mg (0.01 mmol) L-Valyl-N-[4-({(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}[3-({[2-(trimethylsilyl)ethoxy]carbonyl}amino)propyl]carbamoyl)phenyl]-L-alaninamid wurden zusammen mit 7.9 mg (0.02 mmol) 3-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-N-{15-[(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)oxy]-15-oxo-3,6,9,12-tetraoxapentadec-1-yl}propanamid in 2.4 mL DMF vorgelegt und mit 1.9 mg (0.02 mmol) 4-Methylmorpholin versetzt. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei RT gerührt und dann mit 1.4 mg (0.02 mmol) Essigsäure versetzt. Die Reaktionsmischung wurde direkt mittles präp. RP-HPLC (Säule: Reprosil 125x30; 10µ, Fluss: 50 mL/min, MeCN/Wasser) gereinigt. Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 11.7 mg (70 % d. Th.) der Verbindung N-[19-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-17-oxo-4,7,10,13-tetraoxa-16-azanonadecan-1-oyl]-L-valyl-N-[4-({(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}[3-({[2-(trimethylsilyl)ethoxy]carbonyl}amino)propyl]carbamoyl)phenyl]-L-alaninamid.

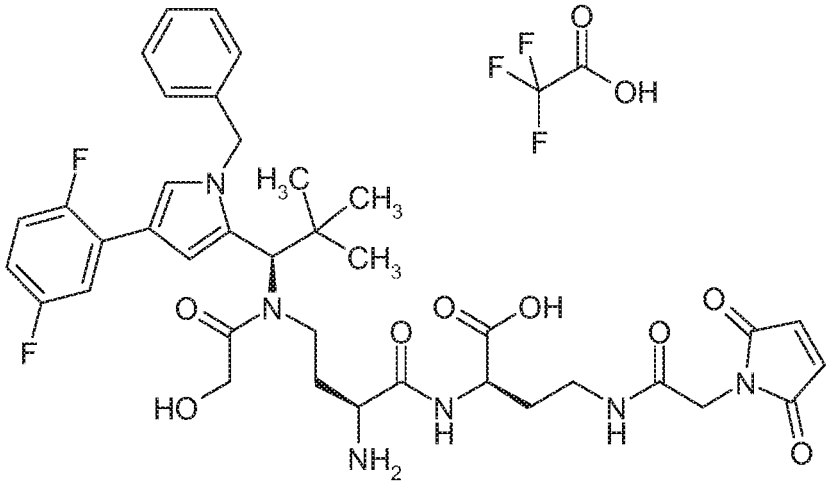
11.7 mg (0.01 mmol) N-[19-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-17-oxo-4,7,10,13-tetraoxa-16-azanonadecan-1-oyl]-L-gamma-glutamyl-S-(11-{(1R)-1-[1-N-[19-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-17-oxo-4,7,10,13-tetraoxa-16-azanonadecan-1-oyl]-L-valyl-N-[4-({(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-

difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}[3-({[2-(trimethylsilyl)ethoxy]carbonyl}amino)propyl]carbamoyl)phenyl]-L-alaninamid wurden in 2.0 mL Trifluorethanol gelöst und mit 3.9 mg (0.03 mmol) Zinkdichlorid versetzt. Die Reaktionsmischung rührte über Nacht bei 50 °C. Die Reaktionsmischung wurde mit 8.3 mg (0.03 mmol) Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure versetzt, 10 min gerührt und dann mit Wasser (0.1% TFA) versetzt. Die Reinigung erfolgte direkt mittles präp. RP-HPLC (Säule: Reprosil 125x30; 10µ, Fluss: 50 mL/min, MeCN/Wasser, 0.1% TFA). Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 5.4 mg (47 % d. Th.) der Titelverbindung.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.94 min; MS (ESIpos): m/z = 1100 $(M+H)^+$.

Intermediat F236

(2R)-2-({(2S)-2-Amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}amino)-4-{[(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)acetyl]amino}butansäure -trifluoressigsäure (1:1)

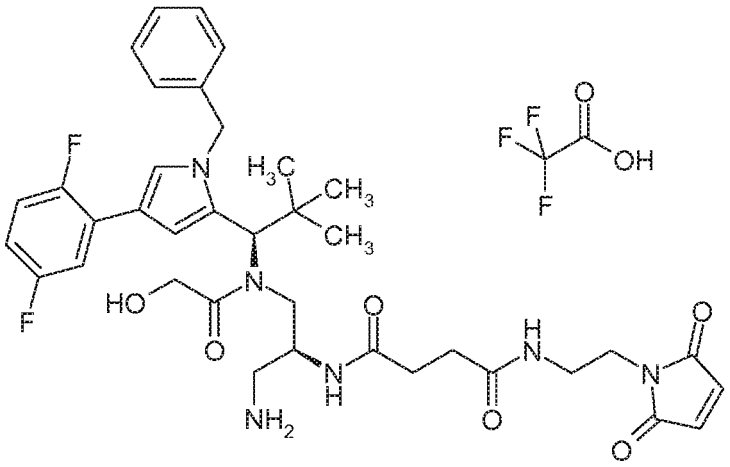


Die Synthese der Titelverbindung erfolgte in Analogie zu Intermediat F192 ausgehend von (2R)-4-{[(Benzyloxy)carbonyl]amino}-2-[(tert-butoxycarbonyl)amino]butansäure --N-cyclohexylcyclohexanamin (1:1).

LC-MS (Methode 4): R_t = 1.1 min; MS (ESIpos): m/z = 751 $(M+H)^+$.

Intermediat F238

Trifluoressigsäure --N-{(2S)-1-amino-3-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]propan-2-yl}-N'-[2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)ethyl]succinamid (1:1)



18 mg (0.025 mmol) von Intermediat C72 wurden in 6 ml DMF aufgenommen und mit 7.5 mg (0.03 mmol) von Trifluoressigsäure --1-(2-aminoethyl)-1H-pyrrol-2,5-dion (1:1) in Gegenwart von 11.3 mg (0.03 mmol) HATU und 22 µL *N,N*-Diisopropylethylamin gekuppelt. Nach 1 h Rühren bei RT wurde der Ansatz eingeengt und der Rückstand durch präparative HPLC gereinigt. Die entsprechenden Farktionen wurden eingeengt und der Rückstand aus Acetonitril/Wasser 1:1 lyophilisiert. Es wurden 15 mg (67% d. Th.) des Intermediats erhalten.

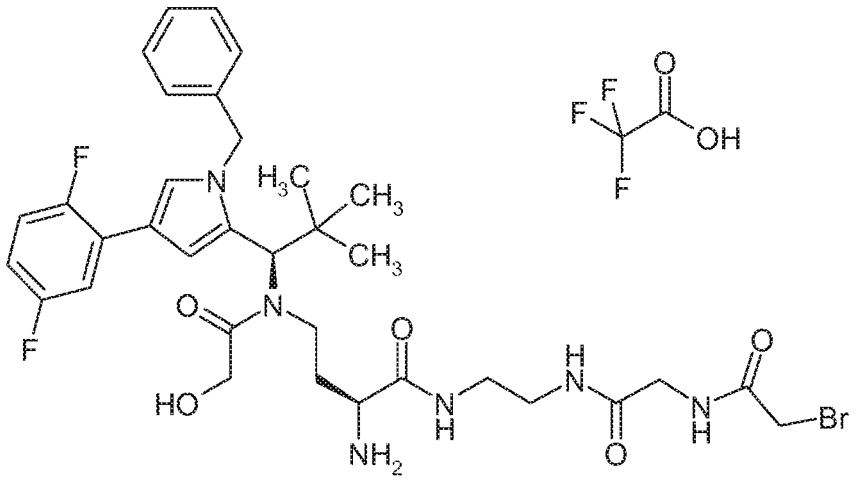
LC-MS (Methode 4): R_t = 1.71 min; MS (EIpos): m/z = 873 $[M+Na]^+$.

Die Titelverbindung wurde anschließend aus diesem Intermediat durch Entschützung mit Zinkchlorid in 4 ml Trifluorethanol wie in Intermediat F119 beschrieben hergestellt. Nach Reinigung durch präparative HPLC wurden 8.5 mg (63% d. Th.) der Titelverbindung erhalten.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.86 min; MS (ESIpos): m/z = 707 $(M+Na)^+$.

Intermediat F241

Trifluoressigsäure --(2S)-2-amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]-N-(2-{[N-(bromacetyl)glycyl]amino}ethyl)butanamid (1:1)

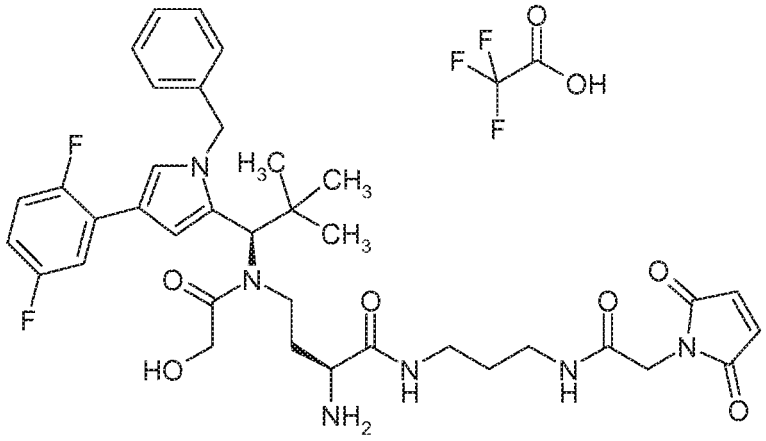


Die Titelverbindung wurde in Analogie aus Intermediat C66 durch Kupplung mit kommerziell erhältlichem 1-(2-Bromacetoxy)pyrrolidin-2,5-dion und anschließender Deblockierung mit Zinkclorid hergestellt.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.84 min; MS (EIpos): m/z = 733 und 735 $[M+H]^+$.

Intermediat F242

Trifluoressigsäure --(2S)-2-amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]-N-(3-{[(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)acetyl]amino}propyl)butanamid (1:1)

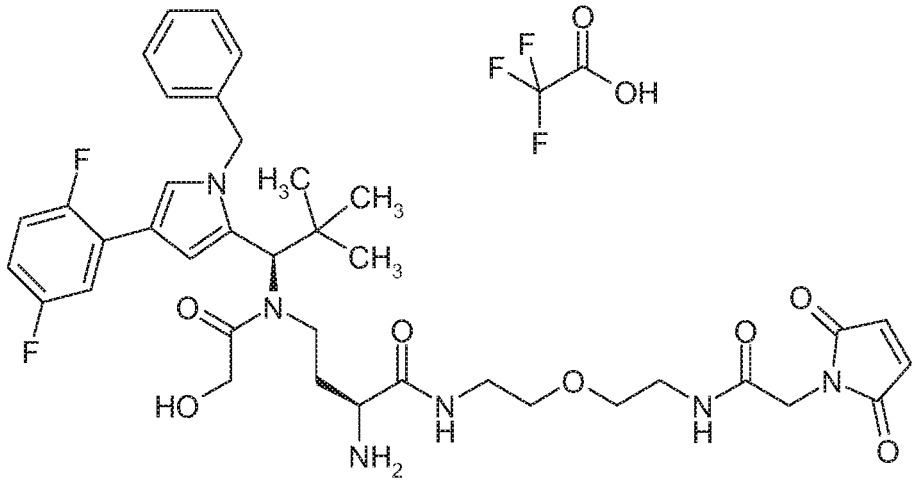


Die Synthese der Titelverbindung erfolgte in Analogie zu Intermediat F104.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.84 min; MS (ESIpos): m/z = 707 $(M+H)^+$.

Intermediat F243

Trifluoressigsäure --(2S)-2-amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]-N-[2-(2-{[(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)acetyl]amino}ethoxy)ethyl]butanamid (1:1)

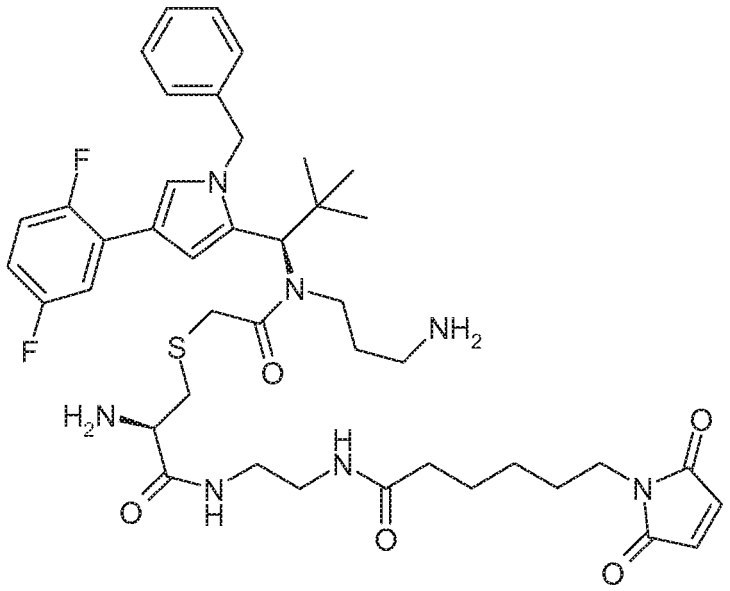


Die Synthese der Titelverbindung erfolgte in Analogie zu Intermediat F242.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.81 min; MS (ESIpos): m/z = 737 $(M+H)^+$.

Intermediat F244

N-{2-[(S-{2-[(3-Aminopropyl){(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}amino]-2-oxoethyl}-L-cysteinyl)amino]ethyl}-6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)hexanamid



100 mg (ca. 0.101 mmol) S-(11-{(1R)-1-[1-Benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-2,2-dimethyl-6,12-dioxo-5-oxa-7,11-diaza-2-silatridecan-13-yl)-N-[3-(trimethylsilyl)propanoyl]-L-cystein (Intermediat C 73) wurden in 88 ml Dimethylformamid vorgelegt und mit 107 mg (ca.0.15 mmol) N-(2-aminoethyl)-6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)hexanamide (Intermediat L73), 46 mg (0.12 mmol) HATU und 88 µl (0.50 mmol) versetzt. Die Reaktionsgemisch wurde 15 minuten bei RT gerührt. Das Gemisch wurde mit Wasser/Dichlormethan versetzt und dann die organische Phase wurde mit Wasser und Brine gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet, am Rotationsverdampfer eingeengt und im Hochvakuum getrocknet. Der Rückstand wurde ohne weitere Reinigung weiter eingesetzt. Man erhielt 92 mg (59%, Reinheit 72%) der Titelverbindung.

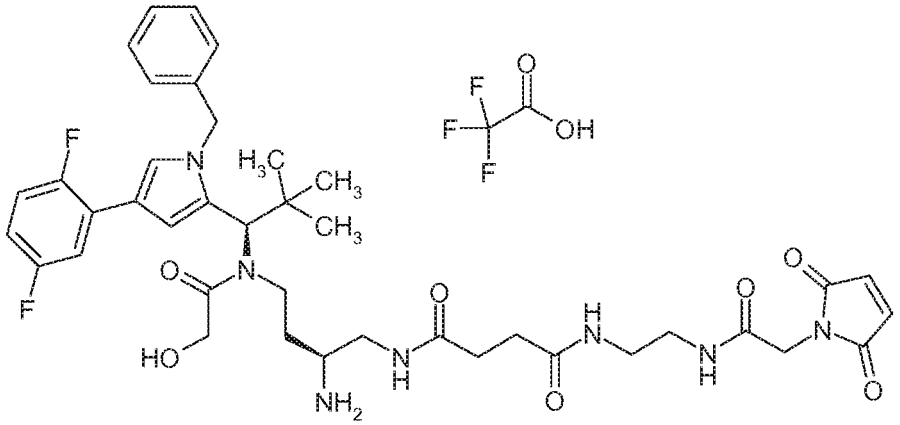
LC-MS (Methode 1): R_t = 1.59 min; MS (ESIpos): m/z = 1096 $(M+H)^+$.

Zu einer Lösung von 91 mg (ca. 0.06 mmol) 2-(Trimethylsilyl)ethyl-[(9R)-4-{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-20-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-5,10,15-trioxo-9-{[3-(trimethylsilyl)propanoyl]amino}-7-thia-4,11,14-triazaicos-1-yl]carbamat in 1.45 ml Trifluorethanol unter Argon wurden 40 mg (0.30 mmol) Zinkchlorid zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 2h bei 50 °C gerührt. Danach wurden 30 mg (0.22 mmol) Zinkchlorid zugegeben und das Gemisch wurde 1 h bei RT weiter gerührt. Das Gemisch wurde mit 52 mg (0.18 mmol) EDTA versetzt und nach 10 Minuten Rühren bei RT wurde mit Wasser/Acetonitril etwas vedünnt und mittels präparativer HPLC (Eluent: ACN/Wasser +0.1 %TFA, Gradient) gereinigt. Man erhielt 17 mg (31%) der Titelverbindung.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.80 min; MS (ESIpos): m/z = 808 $(M+H)^+$.

Intermediat F245

Trifluoressigsäure --N-{(2S)-2-amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butyl}-N'-(2-{[(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)acetyl]amino}ethyl)succinamid (1:1)

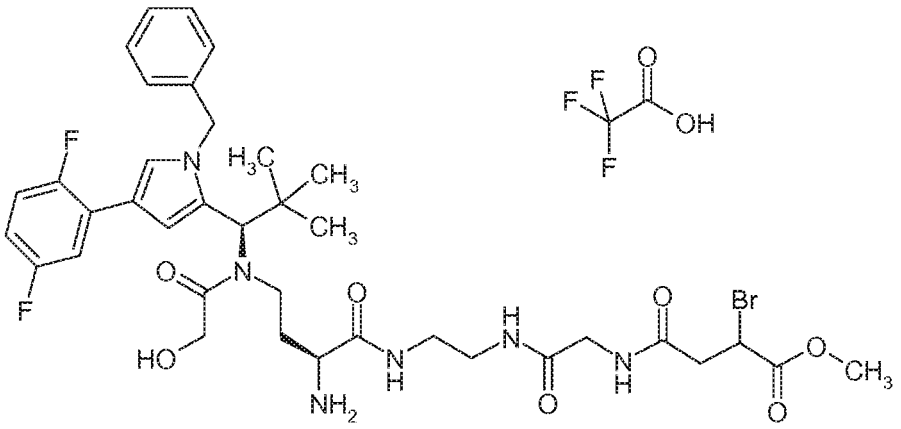


Die Titelverbindung wurde durch Kupplung von 10 mg (0.0135 mmol) von Intermediat C65 mit 8 mg (0.027 mmol) von Intermediat L1 in 8 ml DMF in Gegenwart von 15 mg (0.04 mmol) HATU sowie 9 µl N,N-Diisopropylethylamin und anschließender Entschützung mit Zinkchlorid in Trifluorethanol wie in Intermediat F119 beschrieben hergestellt. Nach Reinigung durch präparative HPLC wurden 8.8 mg (58% d. Th. über 2 Stufen) der Titelverbindung erhalten.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.84 min; MS (ESIpos): m/z = 778 $(M+H)^+$.

Intermediat F247

Trifluoressigsäure -methyl-4-[(2-{[2-({(2S)-2-amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}amino)ethyl]amino}-2-oxoethyl)amino]-2-brom-4-oxobutanoat (1:1)

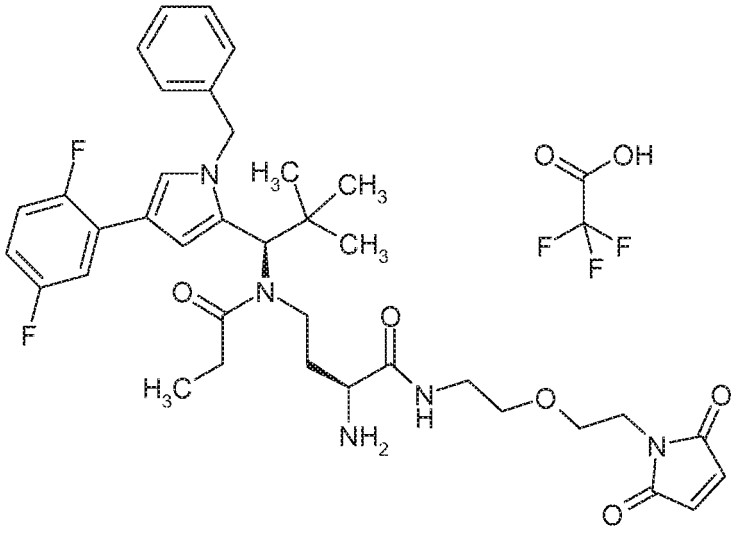


14 mg (0.018 mmol) von Intermediat C66 wurden in 14 mL DCM gelöst und mit 10.1 mg (0.037 mmol) 2-Brom-1-ethylpyridinium-Tetrafluoroborat (BEP) sowie portionsweise mit insgesamt 250 µl Pyridin versetzt, wobei der pH-Wert zwischen 5 und 6 gehalten wurde. Dann wurde mit Essigsäure ein pH-Wert von 4 eingestellt, der Ansatz eingeengt und der Rückstand durch präparative HPLC gereinigt. Nach Vereinigung der entsprechenden Fraktionen, Lyophilisation und Trocknung wurden 4 mg (21% d.Th.) der geschützten Zwischenstufe erhalten, die anschließend mit Zinkchlorid an der Aminofunktion entschützt wurde. Nach HPLC-Reinigung und Lyophilisation wurden 3 mg (72% d.Th.) der Titelverbindung als farbloser Schaum erhalten.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.88 min; MS (ESIpos): m/z = 805 und 807$(M+H)^+$.

Intermediat F248

Trifluoressigsäure --(2S)-2-amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]-N-{2-[2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)ethoxy]ethyl}butanamid (1:1)

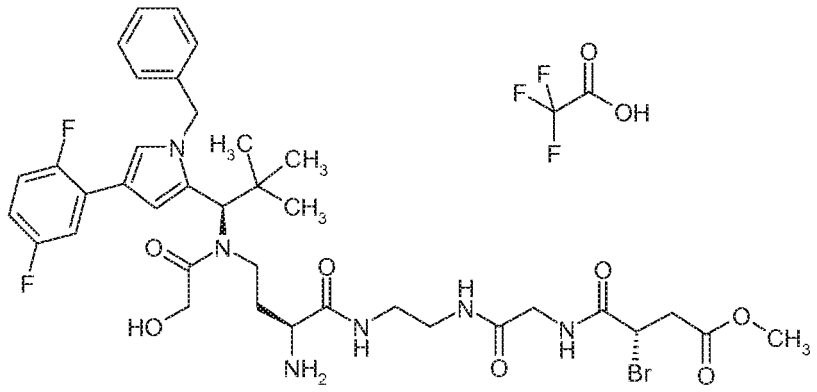


Die Titelverbindung wurde durch Kupplung von 10 mg (0.015 mmol) Intermediat C58 mit 5 mg (0.017 mmol) Intermediat L12 in Gegenwart von HATU und anschließende Entschützung mit Zinkchlorid hergestellt. Es wurden 6.5 mg (52% d.Th. über 2 Stufen) der Titelverbindung erhalten.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.91 min; MS (ESIpos): m/z = 680 $(M+H)^+$.

Intermediat F254

Trifluoressigsäure -methyl-(3S)-4-[(2-{[2-({(2S)-2-amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}amino)ethyl]amino}-2-oxoethyl)amino]-3-brom-4-oxobutanoat (1:1)



Die Titelverbindung wurde in Analogie zu Intermediat 247 durch Kupplung von 15 mg (0.02 mmol) Intermediat C66 mit 21 mg (0.099 mmol) (2S)-2-Brom-4-methoxy-4-oxobutansäure, die wie in (J.Org.Chem. 200, 65, 517-522) beschrieben aus (2S)-2-Amino-4-methoxy-4-oxobutansäurehydrochlorid (1:1) synthetisiert wurde, hergestellt.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.89 min; MS (ESIpos): m/z = 805 und 807$(M+H)^+$.

B: Herstellung von Antikörper-Wirkstoff-Konjugaten (ADC)

B-1. Allgemeines Verfahren zur Generierung von anti-TWEAKR Antikörpern

Die anti-TWEAKR-Antikörper wurden beispielsweise durch das Screening einer Phagen Display Bibliothek auf rekombinantem humanem TWEAKR SEQ ID NO: 138 und murinem TWEAKR SEQ ID NO: 137 generiert. Die so gewonnenen Antikörper wurden ins humane IgG1 Format reformatiert und für die hier beschriebenen Ausführungsbeispiele verwendet. Darüber hinaus sind dem Fachmann Antikörper, die an TWEAKR binden bekannt, siehe z.B. WO2009/020933(A2) oder WO2009140177 (A2).

SEQ ID NO:138 (Polypeptid):

EQAPGTAPCSRGSSWSADLDKCMDCASCRARPHSDFCLGCAAAPPAPFRLLWPRSDKTHT
CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE
PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF
LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:137 (Polypeptid):

EQAPGTSPCSSGSSWSADLDKCMDCASCPARPHSDFCLGCAAAPPAHFRLLWPRSDKTHT
CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE
PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF
LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

B-2. Allgemeines Verfahren zur Expression von anti-TWEAKR Antikörpern in Säugerzellen

Die Antikörper, zum Beispiel TPP-2090 wurden in transienten Säugerzellkulturen produziert, wie von Tom et al., Kapitel 12 in Methods Express: Expression Systems herausgegeben von Micheal R. Dyson and Yves Durocher, Scion Publishing Ltd, 2007 (siehe AK-Beispiel 1) beschrieben.

B-3. Allgemeines Verfahren zur Aufreinigung von Antikörpern aus Zellüberständen.

Die Antikörper, zum Beispiel TPP-2090 wurde aus den Zellkulturüberständen gewonnen. Die Zellüberstände wurden durch Zentrifugation von Zellen geklärt. Anschließend wurde der Zellüberstand durch Affinitätschromatographie auf einer MabSelect Sure (GE Healthcare) Chromatographiesäule gereinigt. Dazu wurde die Säule in DPBS pH 7.4 (Sigma/Aldrich) equillibriert, der Zellüberstand aufgtretragen und die Säule mit ca 10 Säulenvolumina DPBS pH 7.4 + 500 mM Natriumchlorid gewaschen. Die Antikörper wurden in 50 mM Natriumacetat pH 3.5 + 500 mM Natriumchlorid eluiert und anschliessend durch Gelfiltrationschromatographie auf einer Superdex 200 Säule (GE Helthcare) in DPBS pH 7.4 weiter gereinigt.

Der kommerziell erhältliche Antikörper Cetuximab (Handelsname Erbitux) wurde über standardmäßige chromatographische Methoden (Protein A, präparative SEC) aus dem Handelsprodukt aufgereinigt.

Der kommerziell erhältliche Antikörper Trastuzumab (Handelsname Herceptin) wurde über standardmäßige chromatographische Methoden (Protein A, präparative SEC) aus dem Handelsprodukt aufgereinigt.

Aus dem Handelsprodukt (Handelsname CIMAher) wurde der Antikörper Nimotuzumab über standardmäßige chromatographische Methoden (Protein A, präparative SEC) aufgereinigt.

Aus dem Handelsprodukt (Handelsname Vectibix) wurde der Antikörper Panitumumab über standardmäßige chromatographische Methoden (Protein A, präparative SEC) aufgereinigt

B-4. Allgemeines Verfahren zur Kupplung an Cystein-Seitenketten

In die Kupplungsreaktionen wurden folgende Antikörper eingesetzt:

Cetuximab (Anti EGFR AK)

Anti-TWEAKR AK 1 (TPP-2090)

Trastuzumab (Anti-Her2 AK)

Nimotuzumab (Anti-EGFR AK)

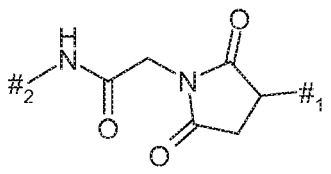
Panitumumab (Anti-EGFR AK)

Zu einer Lösung des entsprechenden Antikörpers in PBS-Puffer im Konzentrationsbereich zwischen 1 mg/mL und 20 mg/mL, bevorzugt im Bereich von ungefähr 10mg/ml bis 15 mg/ml wurden zwischen 2 und 5 Äquivalenten Tris(2-carboxyethyl)phosphin-Hydrochlorid (TCEP), gelöst in PBS-Puffer, gegeben

und 1h bei RT gerührt. Dazu kann die Lösung des jeweils eingesetzten Antikörpers in der in den Ausführungsbeispielen angegebenen Konzentration eingesetzt werden oder gegebenenfalls auch mit PBS Puffer bis etwa auf die Hälfte der angegebenen Startkonzentration verdünnt werden, um in den bevorzugten Konzentrationsbereich zu kommen. Anschließend wurden, je nach angestrebter Beladung, zwischen 2 und 12 Äquivalenten, bevorzugt etwa 5-10 Äquivalente der zu kuppelnden Maleinimid-Vorläufer-Verbindung oder Halogenid-Vorläufer-Verbindung als Lösung in DMSO hinzugefügt. Dabei sollte die Menge an DMSO 10% des Gesamtvolumens nicht überschreiten. Der Ansatz wurde bei Maleinimid-Precursern 60-240 min bei RT und bei Halogenid-Precursern zwischen 8 und 24 h bei RT gerührt und anschließend über in PBS equillibierte PD 10-Säulen (Sephadex® G-25, GE Healthcare) gegeben und mit PBS-Puffer eluiert. Üblicherweise wurden, wenn nicht anders angegeben, 5 mg des entsprechenden Antikörpers in PBS-Puffer zur Reduktion und der nachfolgenden Kupplung eingesetzt. Nach Aufreinigung über die PD10 Säule wurden so jeweils Lösungen des entsprechenden ADCs in 3.5 mL PBS-Puffer erhalten. Anschließend wurde eine Aufkonzentration mittels Ultrazentrifugation durchgeführt und die Probe ggf. mit PBS-Puffer zurückverdünnt. Falls notwendig wurde zur besseren Abtrennung niedermolekularer Bestandteile die Aufkonzentration mittels Ultrafiltration nach Rückverdünnung mit PBS Puffer wiederholt. Für biologische Testungen wurden je nach Bedarf in den finalen ADC Proben ggf. durch Rückverdünnung Konzentrationen im Bereich von 0.5-15 mg/mL eingestellt. Für die ADC Lösungen wurde die in den Ausführungsbeispielen jeweils angegebene Proteinkonzentration bestimmt. Weiterhin wurde die Beladung des Antikörpers (Drug/mAb Ratio) nach den unter B-7. beschriebenen Methoden ermittelt.

Wenn nicht anders angegeben wurden die in den Beispielen dargestellten Immunokonjugate nach diesem Verfahren hergestellt. Die in den Beispielen dargestellten ADCs können in Abhängigkeit vom Linker gegebenenfalls auch mehr oder weniger stark ausgeprägt in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit den Antikörpern verknüpft vorliegen.

Insbesondere die KSP-I-ADCs, die über die Linker-Substruktur



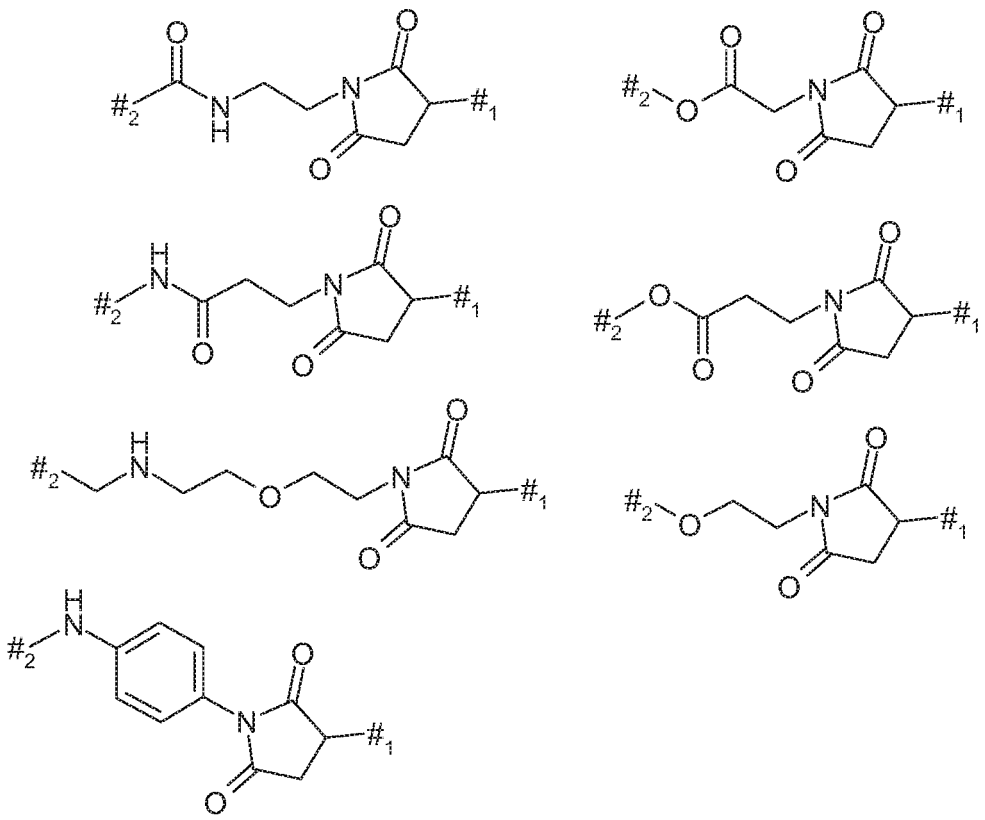
mit Thiolgruppen der Antikörper verknüpft sind, können auch ggf. durch Umpuffern im Anschluss an die Kupplung und ca. 20-stündiges Rühren bei pH 8 gemäß Schema 26 gezielt die über offenkettige Bersteinsäureamide verknüpften ADCs hergestellt werden.

#1 stellt die Schwefelbrücke zum Antikörper dar und #2die Verknüpfungsstelle zum modifizierten KSP-Inhibitor

Solche ADCs, bei denen der Linker über hydrolysierte offenkettige Bernsteinsäureamide mit den Antikörpern verknüpft vorliegt, können gegebenenfalls auch gezielt nach einer exemplarischen Vorschrift wie folgt dargestellt werden:

60 mg des betreffenden Antikörpers in 5 ml PBS-Puffer (c~12 mg/mL) wurden unter Argon mit einer Lösung aus 0,344mg TCEP in 100µl PBS-Puffer versetzt. Der Ansatz wurde 30min bei RT gerührt und anschließend wurden 0.003 mmol einer Maleinimid-Vorläuferverbindung gelöst in 600µl DMSO zugegeben. Nach weiteren 1.5h-2h Rühren bei RT wurde der Ansatz mit 1075µl PBS-Puffer, der zuvor auf pH 8 eingestellt wurde, verdünnt.
Diese Lösung wurde dann über mit PBS-Puffer pH8 equillibrierte PD 10-Säulen (Sephadex® G-25, GE Healthcare) gegeben und mit PBS-Puffer pH8 eluiert. Das Eluat wurde mit PBS-Puffer pH8 auf ein Gesamtvolumen von 14 ml verdünnt. Diese Lösung wurde über Nacht bei RT unter Argon gerührt. Dann erfolgte ggf. wieder ein Umpuffern auf pH 7.2. Die ADC-Lösung wurde durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert, rückverdünnt mit PBS-Puffer (pH7.2) und dann ggf. erneut bis auf eine Konzentration von etwa 10mg/mL aufkonzentriert.

Weitere potentiell hydrolyse-sensitive Thianylsuccinimid-Brücken zum Antikörper in den Ausführungsbeispielen enthalten folgende Linker-Substrukturen, wobei #1 die Thioetherverknüpfung zum Antikörper und #2 die Verknüpfungsstelle zum modifizierten KSP-Inhibitor darstellt:



Diese Linker-Substrukturen stellen die Verknüpfungseinheit zum Antikörper dar und haben (neben der weiteren Linkerzusammensetzung) einen signifikanten Einfluß auf die Struktur und das Profil der in Tumorzellen gebildeten Metabolite.

In den dargestellten Strukturformeln hat dabei AK_{1A}, AK_{1B},AK_{1E}, AK_{1I}, AK_{1H}, AK_{1K}, die Bedeutung

AK_{1A} = Cetuximab (partiell reduziert)- S§[1]

AK_{1B} = anti-TWEAKR AK-1 (partiell reduziert)- S§[1]

AK_{1E} = Trastuzumab (partiell reduziert)-S§[1]

AK_{1I} = Nimotuzumab (partiell reduziert)- S§[1]

AK_{1H} = Panitumumab (partiell reduziert)- S§[1]

wobei

§[1] die Verknüpfung mit der Succinimid-Gruppe oder mit ggf. daraus entstandenen isomeren hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamiden bzw. des Alkylenrestes bedeutet,

und

S für das Schwefelatom eines Cystein-Restes des partiell reduzierten Antikörpers steht.

B-5. Allgemeines Verfahren zur Kupplung an Lysin-Seitenketten

In die Kupplungsreaktionen wurden folgende Antikörper eingesetzt:

Cetuximab (Anti EGFR AK)

Anti-TWEAKR AK 1 (TPP-2090)

Trastuzumab (Anti-Her2 AK)

Nimotuzumab (Anti-EGFR AK)

Panitumumab (Anti-EGFR AK)

Zu einer Lösung des entsprechenden Antikörpers in PBS-Puffer im Konzentrationsbereich zwischen 1 mg/mL und 20 mg/mL, bevorzugt etwa 10 mg/mL, wurden, je nach angestrebter Beladung, zwischen 2 und 8 Äquivalente der zu kuppelnden Vorläufer-Verbindung als Lösung in DMSO gegeben. Nach 30 min bis 6 h Rühren bei RT wurde nochmals die gleiche Menge an Vorläufer-Verbindung in DMSO hinzugefügt. Dabei sollte die Menge an DMSO 10% des Gesamtvolumens nicht überschreiten. Nach weiteren 30 min bis 6 h Rühren bei RT wurde der Ansatz über in PBS equillibierte PD 10-Säulen (Sephadex® G-25, GE Healthcare) gegeben und mit PBS-Puffer eluiert. Üblicherweise wurden, wenn nicht anders angegeben, 5 mg des entsprechenden Antikörpers in PBS-Puffer zur Reduktion und der nachfolgenden Kupplung eingesetzt. Nach Aufreinigung über die PD10 Säule wurden so jeweils Lösungen des entsprechenden ADCs in 3.5 mL PBS-Puffer erhalten. Anschließend wurde eine Aufkonzentration mittels Ultrazentrifugation durchgeführt und die Probe ggf. mit PBS-Puffer zurückverdünnt. Falls notwendig wurde zur besseren Abtrennung niedermolekularer Bestandteile die Aufkonzentration mittels Ultrafiltration nach Rückverdünnung mit PBS Puffer wiederholt. Für biologische Testungen wurden je nach Bedarf in den finalen ADC Proben ggf. durch Rückverdünnung Konzentrationen im Bereich von 0.5-15 mg/mL eingestellt.

Für die ADC Lösungen wurde die in den Ausführungsbeispielen jeweils angegebene Proteinkonzentration bestimmt. Weiterhin wurde die Beladung des Antikörpers (Drug/mAb Ratio) nach den unter B-7. beschriebenen Methoden ermittelt.

In den dargestellten Strukturformeln hat dabei AK_{2A}, AK_{2B}, AK_{2G},AK_{2E}, AK_{2I}, AK_{2B}, AK_{2K}, die Bedeutung

AK_{2A} = Cetuximab (anti-EGFR AK)-NH§^{2}

AK_{2B} = anti-TWEAKR AK-1- NH§^{2}

AK_{2E} = Trastuzumab- NH§^{2}

AK_{2I} = Nimotuzumab-NH§^{2}

AK_{2H} = Panitumumab-NH§^{2}

wobei

§^{2} die Verknüpfung mit der Carbonylgruppe bedeutet,

und

NH für die Seitenketten-Aminogruppe eines Lysin-Restes des Antikörpers steht.

B-6a. Allgemeines Verfahren zur Herstellung von geschlossenen Succinimid-Cystein-Addukten:

In einer beispielhaften Ausführung wurden 10 µmol der oben beschriebenen Maleinimid-Vorläuferverbindungen wurden in 3-5 mL DMF aufgenommen und mit 2.1 mg (20 µmol) L-Cystein versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde zwischen 2h und 24 h bei RT gerührt, anschließend im Vakuum eingeengt und dann mittels präparativer HPLC gereinigt.

B-6aa. Allgemeines Verfahren zur Herstellung von isomeren geöffneten Bernsteinsäureamid-Cystein-Addukten:

In einer beispielhaften Ausführung wurden 68 µmol der oben beschriebenen Maleinimid-Vorläuferverbindungen in 15 mL DMF aufgenommen und mit 36 mg (136 µmol) N-{[2-(Trimethylsilyl)ethoxy]carbonyl}-L-cystein versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde ~20h bei RT gerührt, anschließend im Vakuum eingeengt und dann mittels präparativer HPLC gereinigt. Nach Vereinigung der entsprechenden Fraktionen und Abdampfen der Lösemittel im Vakuum wurde der Rückstand in 15 mL THF/Wasser 1:1 gelöst. Es wurden 131 µL einer 2M wässrigen Lithiumhydroxidlösung zugegeben und der Ansatz 1 h bei RT gerührt. Anschließend wurde der Ansatz mit einer 1M Salzsäure neutral gestellt, das Lösemittel im Vakuum abgedampft und der Rückstand durch präparative HPLC gereinigt. Es wurden ~50% d. Th. der regioisomeren geschützten Intermediate als farbloser Schaum erhalten.

Im letzten Schritt wurden 0.023 mmol von diesen regiosisomeren Hydrolyseprodukten in 3 mL 2,2,2-Trifluorethanol gelöst. Es wurden 12.5 mg (0.092 mmol) Zinkchlorid zugegeben und der Ansatz 4 h bei 50°C gerührt. Anschließend wurden 27 mg (0.092 mmol) Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure zugesetzt und das Lösemittel im Vakuum verdampft. Der Rückstand wurde mittels präparativer HPLC gereinigt. Nach Einengen der entsprechenden Fraktionen und Lyophilisation des Rückstands aus Acetonitril/Wasser wurden die hydrolysierten offenen Sulfanylbernsteinsäure-amide als Regioisomerengemisch erhalten.

B-6b. Allgemeines Verfahren zur Herstellung von Lysin-Addukten:

In einer beispielhaften Ausführung wurden 10 µmol der oben beschriebenen Aktivester-Vorläuferverbindungen wurden in 3-5 mL DMF aufgenommen und in Gegenwart von 30 µmol *N,N*-Diisopropylethylamin mit α-Amino-geschütztem L-Lysin versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde zwischen 2 h und 24 h bei RT gerührt, anschließend im Vakuum eingeengt und dann mittels präparativer HPLC gereinigt. Anschließend wurde die Schutzgruppe nach bekannten Methoden entfernt.

Weitere Aufreinigung und Charakterisierung der erfindungsgemäßen Konjugate

Nach erfolgter Umsetzung wurde in einigen Fällen das Reaktionsgemisch beispielsweise durch Ultrafiltration aufkonzentriert und anschließend mittels Chromatographie, beispielsweise mittels einer Sephadex® G-25, entsalzt und gereinigt. Die Elution erfolgte beispielsweise mit Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS). Anschließend wurde die Lösung sterilfiltriert und eingefroren. Alternativ kann das Konjugat lyophylisiert werden.

B-7. Bestimmung des Antikörpers, der Toxophorbeladung und des Anteils geöffneter Cystein-Addukte

Zur Protein-Identifizierung wurde neben der Molekulargewichtsbestimmung nach Deglykosilierung und/oder Denaturierung ein tryptischer Verdau durchgeführt, der nach Denaturierung, Reduktion und Derivatisierung die Identität des Proteins anhand der nachgewiesenen tryptischen Peptide bestätigt.

Von den erhaltenen Lösungen der in den Ausführungsbeispielen beschriebenen Konjugate in PBS Puffer wurde die Toxophorbeladung wie folgt bestimmt:

Die Bestimmung der Toxophor Beladung von Lysin-verknüpften ADCs erfolgte nach massenspektrometrischer Bestimmung der Molekulargewichte der einzelnen Konjugatspezies. Hierbei wurden vorab die Antikörperkonjugate mittels PNGaseF deglycosyliert, die Probe angesäuert und nach HPLC-Trennung/Entsalzung massenspektrometrisch mittels ESI-MicroTof$_Q$ (Bruker Daltonik) analysiert. Alle Spektren über das Signal im TIC (Total Ion Chromatogramm) wurden addiert und das

Molekulargewicht der verschiedenen Konjugatspezies auf Basis von MaxEnt Deconvolution kalkuliert. Nach Signal Integration der verschiedenen Spezies wurde dann die DAR (= Drug/Antibody Ratio) berechnet.

Die Bestimmung der Toxophorbeladung von Cystein-verknüpften Konjugaten wurde über Reversed-Phase-Chromatographie des reduzierten und denaturierten ADCs bestimmt. Zur ADC-Lösung (1mg/mL, 50µL) wurde Guanidinium-Hydrochlorid (GuHCl) (28.6 mg) und eine Lösung von DL-Dithiothreitol (DTT) (500mM, 3 µL) gegeben. Die Mischung wurde für eine Stunde bei 55 °C inkubiert und über HPLC analysiert.

Die HPLC-Analyse wurde auf einem Agilent 1260 HPLC-System mit Detektion bei 220 nm durchgeführt. Es wurde eine Polymer Laboratories PLRP-S Polymeric Reversed Phase Säule (Katalognummer PL1912-3802) (2.1 x150 mm, 8 µm particle size, 1000 Å) bei einer Flussrate von 1 mL/min mit folgendem Gradienten verwendet: 0 min, 25 %B; 3 min, 25 %B; 28 min, 50 %B. Laufmittel A bestand aus 0.05 % Trifluoressigsäure (TFA) in Wasser, Laufmittel B aus 0.05 % Trifluoressigsäure in Acetonitril.

Die detektierten Peaks wurden durch Retentionszeitvergleich mit der leichten Kette (L0) und der schweren Kette (H0) des nicht konjugierten Antikörpers zugeordnet. Peaks, die ausschließlich in der konjugierten Probe detektiert wurden, wurden der leichten Kette mit einem Toxophor (L1) und den schweren Ketten mit einem, zwei und drei Toxophoren (H1, H2, H3) zugeordnet.

Die durchschnittliche Beladung des Antikörpers mit Toxophoren wurde aus den durch Integration bestimmten Peakflächen als die zweifache Summe der Toxophor-Anzahl gewichteten Integrationsergebnisse aller Peaks geteilt durch die Summe der einfach gewichteten Integrationsergebnisse aller Peaks berechnet. In vereinzelten Fällen kann es vorkommen, dass die Toxophorbeladung aufgrund von Ko-Elutionen einiger Peaks nicht exakt möglich ist.

In den Fällen, in denen keine ausreichende HPLC-Trennung von leichter und schwerer Kette möglich war, erfolgte die Bestimmung der Toxophorbeladung von Cystein verknüpften Konjugaten mittels massenspektrometrischer Bestimmung der Molekulargewichte der einzelnen Konjugatspezies an leichter und schwerer Kette.

Zur ADC-Lösung (1mg/mL, 50µL) wurde Guanidinium-Hydrochlorid (GuHCl) (28.6 mg) und eine Lösung von DL-Dithiothreitol (DTT) (500mM, 3 µL) gegeben. Die Mischung wurde für eine Stunde bei 55 °C inkubiert und massenspektrometrisch nach online Entsaltzung mittels ESI-MicroTof$_Q$ (Bruker Daltonik) analysiert.

Zur DAR-Bestimmung wurden alle Spektren über das Signal im TIC (Total Ion Chromatogramm) addiert und das Molekulargewicht der verschiedenen Konjugatspezies an leichter und schwerer Kette auf Basis von MaxEnt Deconvolution berechnet. Die durchschnittliche Beladung des Antikörpers mit Toxophoren wurde aus den durch Integration bestimmten Molekulargewichtsflächen als die zweifache Summe der Toxophor-Anzahl gewichteten Integrationsergebnisse aller Peaks geteilt durch die Summe der einfach gewichteten Integrationsergebnisse aller Peaks berechnet.

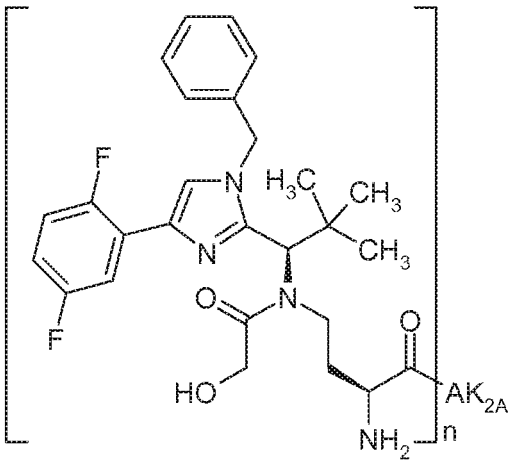
Zur Bestimmung des Anteils des geöffneten Cystein-Addukts wurde das Molekulargewichtsflächenverhältnis vom geschlossenen und offenen Cystein-Addukt (Molekulargewichtsdelta 18Dalton) aller einfach konjugierten leichten und schweren Kettenvarianten bestimmt. Der Mittelwert über alle Varianten ergab den Anteil des geöffneten Cystein-Addukts.

B-8. Überprüfung der Antigen-Bindung des ADCs

Die Bindefähigkeit des Binders an das Zielmolekül wurde nach erfolgter Kopplung überprüft. Dazu sind dem Fachmann vielfältige Methoden bekannt, beispielsweise kann die Affinität des Konjugats mittels ELISA-Technologie oder Oberflächenplasmonresonanzanalyse (BIAcore™ Messungen) überprüft werden. Die Konjugatkonzentration kann der Fachmann mit gängigen Methoden messen, beispielsweise für Antikörper-Konjugate mittels Proteinbestimmung. (siehe auch Doronina et al.; Nature Biotechnol. 2003; 21:778-784 und Polson et al., Blood 2007; 1102:616-623).

Ausführungsbeispiele ADCs

Beispiel 1A



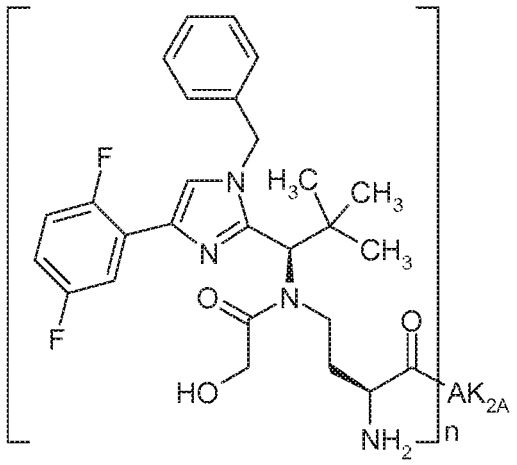
Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F1 70 mg Cetuximab in PBS (c=5.1 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert, rückverdünnt mit PBS und erneut aufkonzentriert.

Protein Konzentration: 10.8 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.6

Zwischenbemerkung

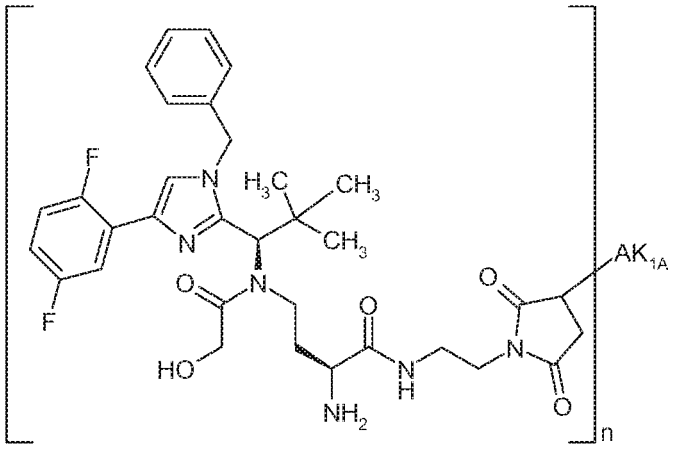
In Beispiel 1A wurde die Verbindung mit der Formel



mit n=2.6 und einem bestimmten Antikörper (Cetuximab) erhalten. Die Erfindung stellt jedoch nicht nur dieses Konjugat mit genau diesem Antikörper in diesem Wirkstoff-Antikörper-Verhältnis (drug/mAB Ratio) bereit, sondern auch andere Binder-Konjugate mit dieser Formel, also Konjugate, in denen Cetuximab durch einen anderen Antikörper bzw. Derivat hiervon (wie z.B. Cystein) und n=2.6 durch einen beliebigen Wert im Bereich von n=1 bis 20, vorzugsweise n=1-10 ersetzt ist.

Entsprechendes gilt in den folgenden Beispielen.

Beispiel 2A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F2 80 mg Cetuximab in PBS (c=5.1 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert, rückverdünnt mit PBS und erneut aufkonzentriert. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 11.0 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.5

Beispiel 2B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F2 50 mg anti-TWEAKR AK-1 in PBS (c=10.1 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert, rückverdünnt mit PBS und erneut aufkonzentriert. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 11.7 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.7

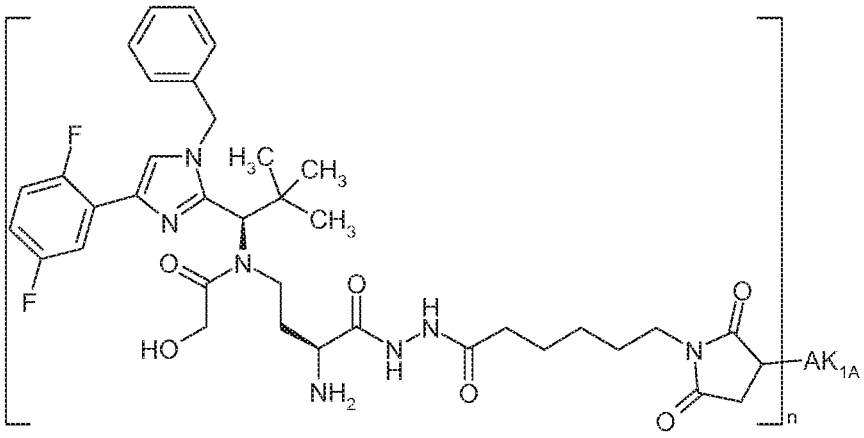
Beispiel 2E

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F2 5 mg Trastuzumab in PBS (c=13.4 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 2.77 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.6

Beispiel 3A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F3 5 mg Cetuximab in PBS (c=5.1 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS.

Protein Konzentration: 2.87 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.0

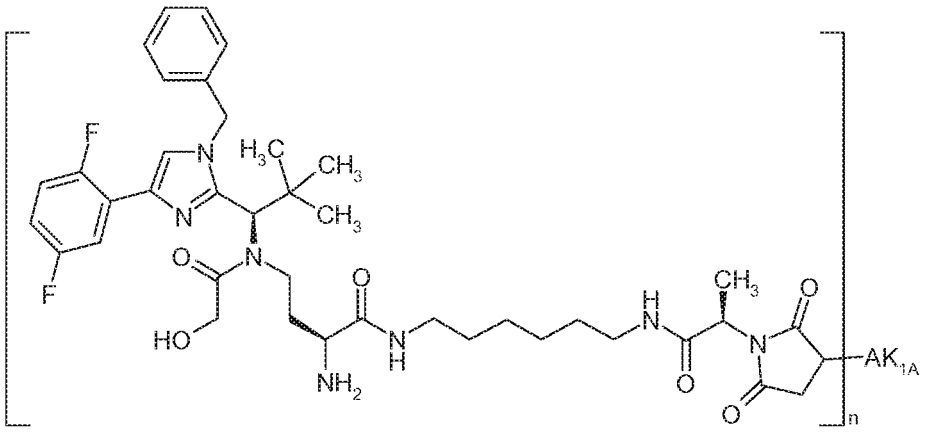
Beispiel 3B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F3 5 mg anti-TWEAKR AK-1 in PBS (c=16.5 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS.

Protein Konzentration: 2.13 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.1

Beispiel 4A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F4 5 mg Cetuximab in PBS (c=5.1 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS.

Protein Konzentration: 2.11 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.4

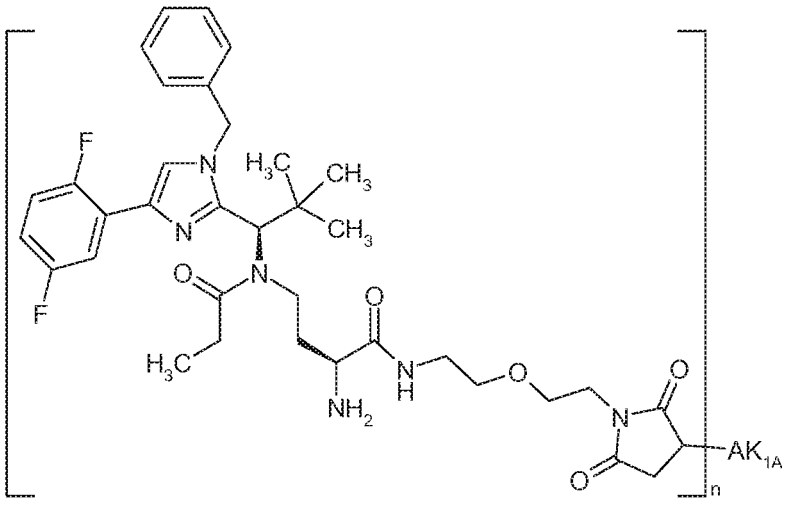
Beispiel 4B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F4 5 mg anti-TWEAKR AK-1 in PBS (c=16.5 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS.

Protein Konzentration: 1.69 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.9

Beispiel 5A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F5 5 mg Cetuximab in PBS (c=5.1 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 2.16 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.1

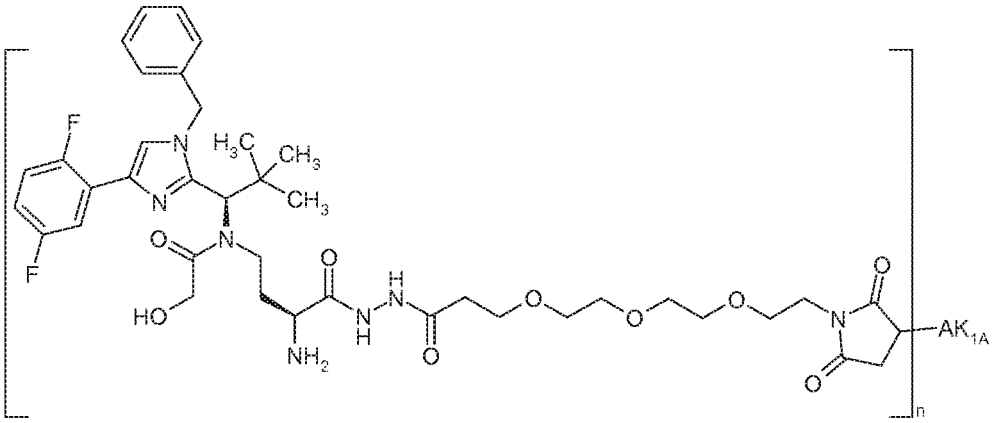
Beispiel 5B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F5 5 mg anti-TWEAKR AK-1 in PBS (c=16.5 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.5 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.6

Beispiel 6A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F6 5 mg Cetuximab in PBS (c=5.1 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 2.24 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.3

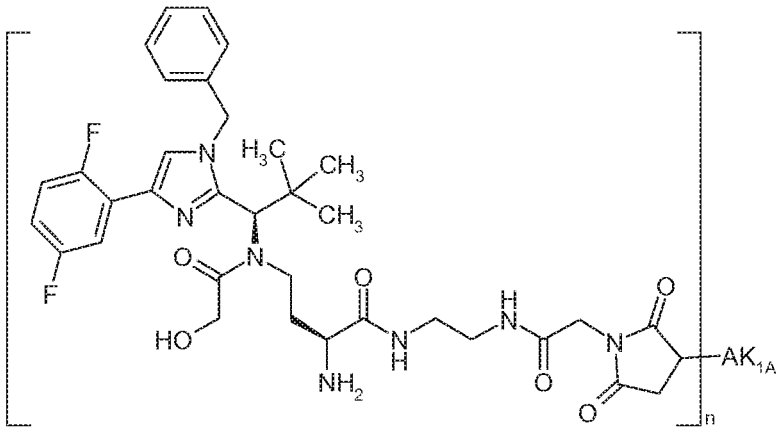
Beispiel 6B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F6 5 mg anti-TWEAKR AK-1 in PBS (c=16.5 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.88 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.1

Beispiel 7A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F7 5 mg Cetuximab in PBS (c=5.9 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 2.46 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.9

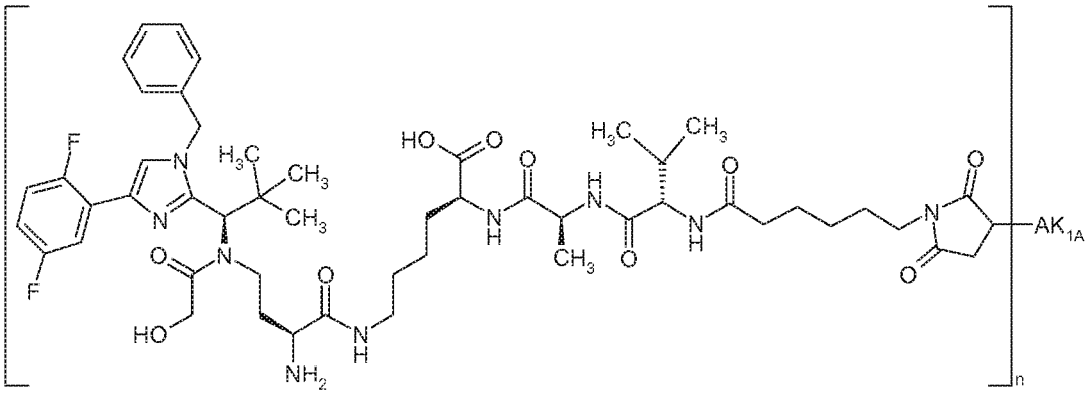
Beispiel 7B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F7 40 mg anti-TWEAKR AK-1 in PBS (c=12.9 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert, rückverdünnt mit PBS und erneut aufkonzentriert. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 11.27 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.0

Beispiel 8A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F8 5 mg Cetuximab in PBS (c=12.7 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS.

Protein Konzentration: 1.91 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.6

Beispiel 8B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F8 40 mg anti-TWEAKR AK-1 in PBS (c=12.9 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert, rückverdünnt mit PBS und erneut aufkonzentriert.

Protein Konzentration: 11.54 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.9

Beispiel 8E

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F8 5 mg Trastuzumab in PBS (c=13.4 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS.

Protein Konzentration: 1.97 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.5

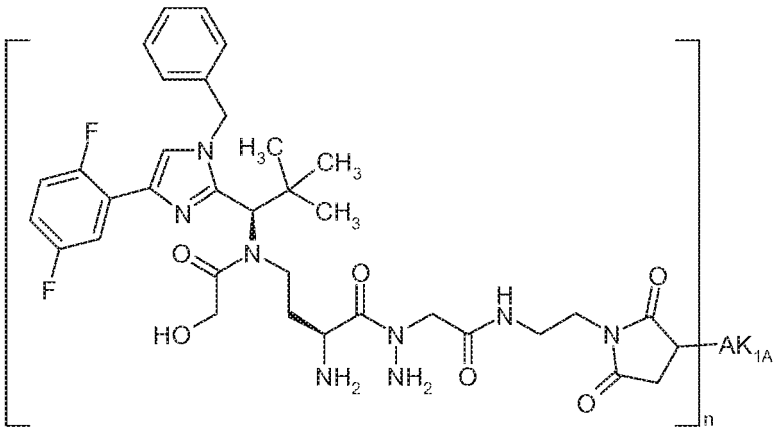
Beispiel 8H

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F8 5.0 mg Panitumumab in PBS (c = 10 mg/mL). Die Reduktionszeit mit TCEP wurde auf 4 h erhöht und die Rührzeit bei der ADC Kupplung auf 20 h erhöht. Anschließend wurde der Ansatz nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt.

Protein Konzentration: 1.79 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.4

Beispiel 9A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F9 5 mg Cetuximab in PBS (c=13.6 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 2.05 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.1

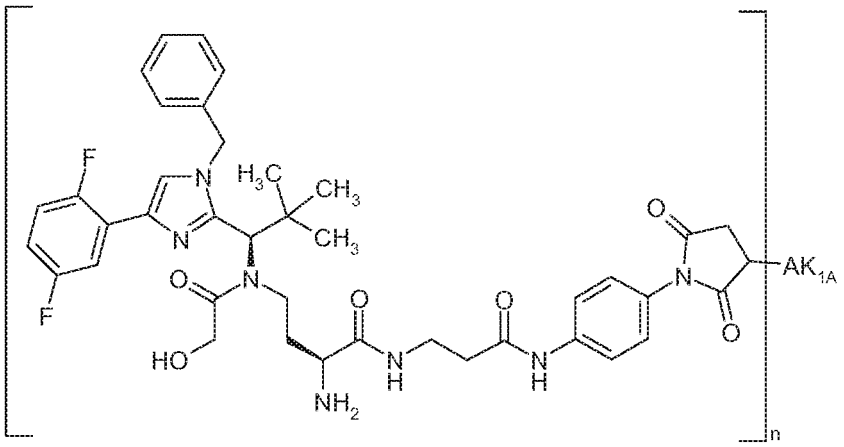
Beispiel 9B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F9 5 mg anti-TWEAKR AK-1 in PBS (c=12.2 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.84 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.1

Beispiel 10A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F10 5 mg Cetuximab in PBS (c=5.9 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 2.04 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 1.8

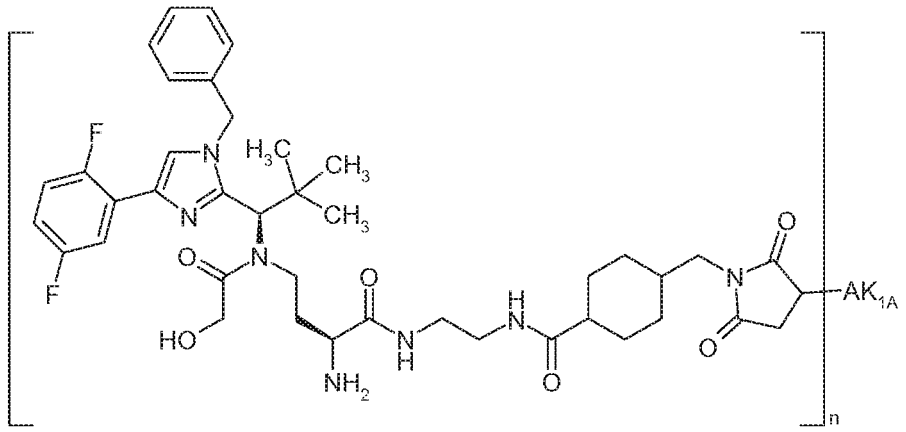
Beispiel 10B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F10 5 mg anti-TWEAKR AK-1 in PBS (c=12.2 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.83 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.2

Beispiel 11A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F11 5 mg Cetuximab in PBS (c=5.9 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS.

Protein Konzentration: 1.97 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.0

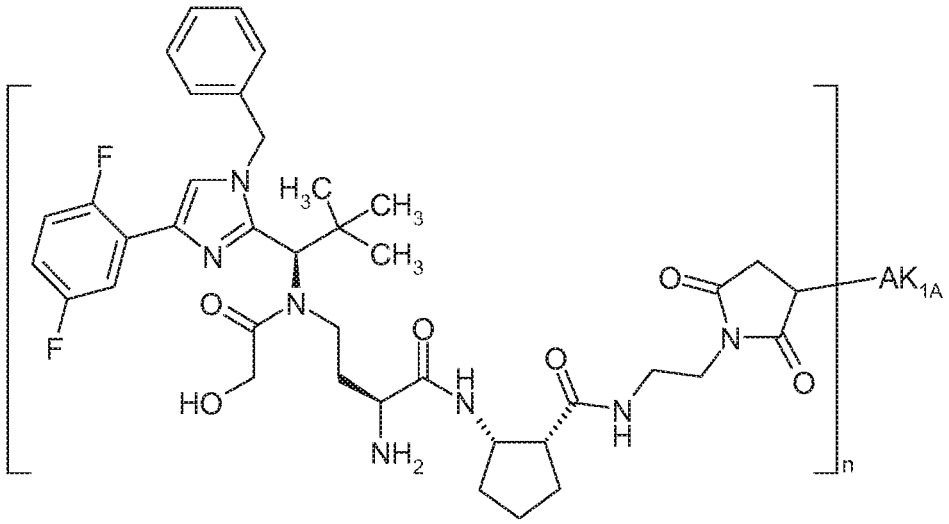
Beispiel 11B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F11 5 mg anti-TWEAKR AK-1 in PBS (c=12.2 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS.

Protein Konzentration: 1.86 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.0

Beispiel 12A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F12 5 mg Cetuximab in PBS (c=5.9 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.98 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 1.9

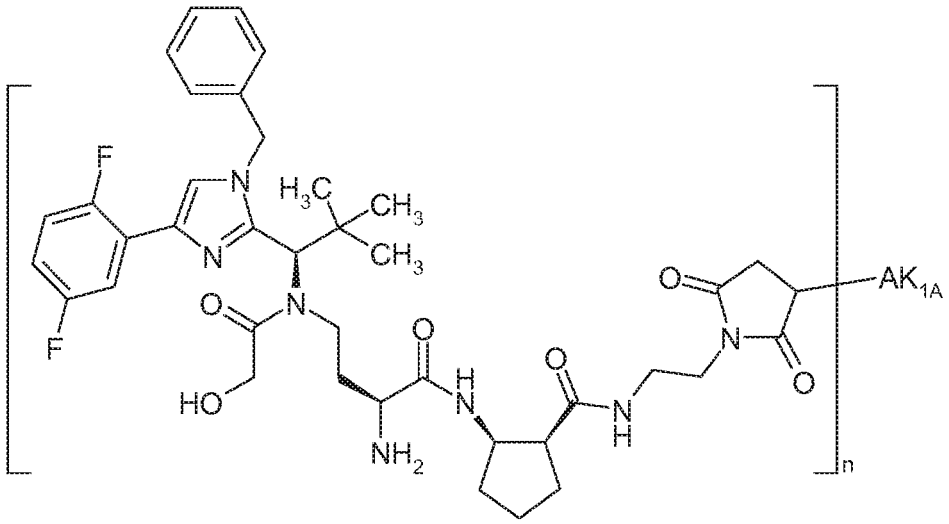
Beispiel 12B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F12 40 mg anti-TWEAKR AK-1 in PBS (c=12.9 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert, rückverdünnt mit PBS und erneut aufkonzentriert. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 9.9 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.5

Beispiel 13A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F13 5 mg Cetuximab in PBS (c=5.9 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.87 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.1

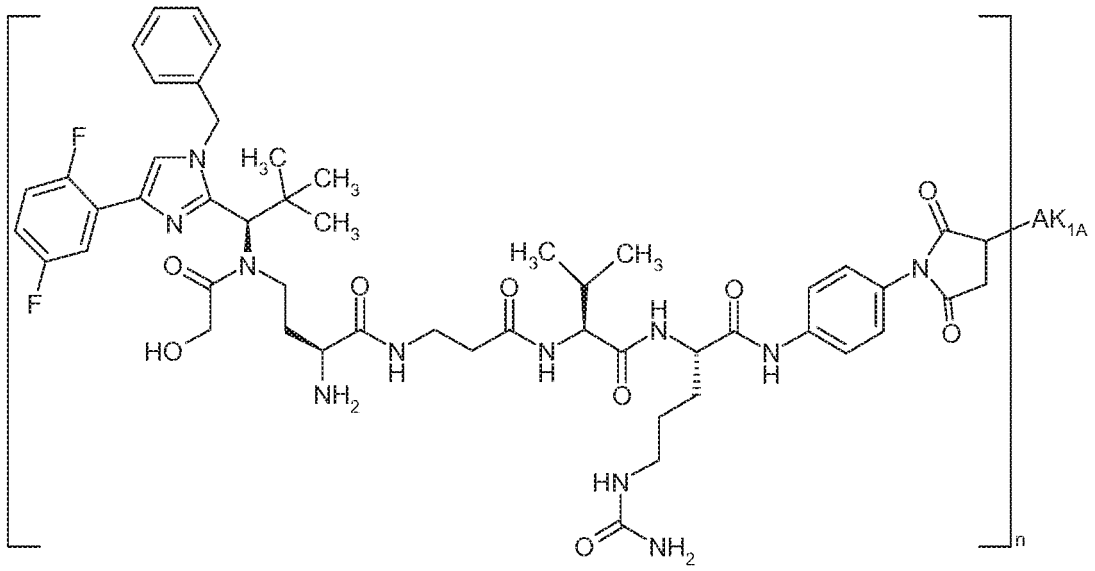
Beispiel 13B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F13 5 mg anti-TWEAKR AK-1 in PBS (c=12.2 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.84 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.2

Beispiel 14A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F14 5 mg Cetuximab in PBS (c=13.2 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 2.32 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.8

Beispiel 14B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F14 5 mg anti-TWEAKR AK-1 in PBS (c=12.2 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.23 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.1

Beispiel 14E

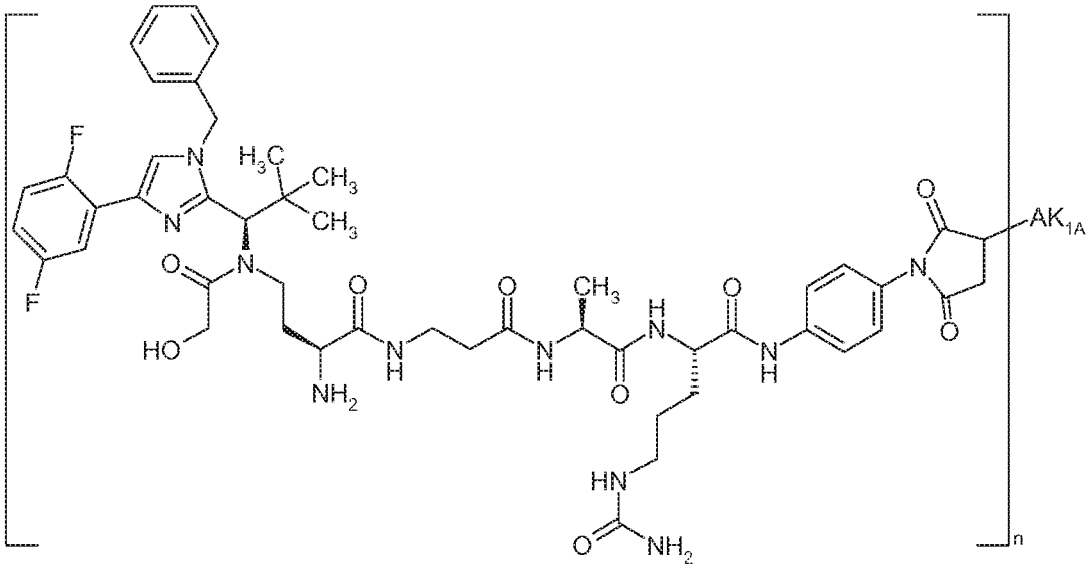
Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F14 5 mg Trastuzumab in PBS (c=13.4 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und

rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 2.21 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.6

Beispiel 15A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F15 5 mg Cetuximab in PBS (c=13.2 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 2.39 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.7

Beispiel 15B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F15 32 mg anti-TWEAKR AK-1 in PBS (c=10.1 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert, rückverdünnt mit PBS und erneut aufkonzentriert. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 11.82 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.7

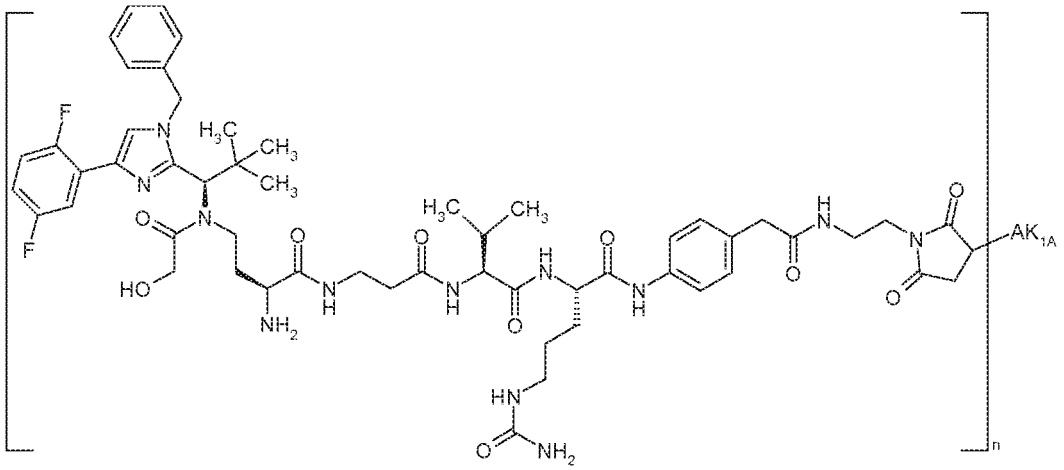
Beispiel 15E

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F15 5 mg Trastuzumab in PBS (c=13.4 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 2.57 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.0

Beispiel 16A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F16 5 mg Cetuximab in PBS (c=13.2 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 2.15 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.1

Beispiel 16B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F16 30 mg anti-TWEAKR AK-1 in PBS (c=12.9 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert,

rückverdünnt mit PBS und erneut aufkonzentriert. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 9.54 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.8

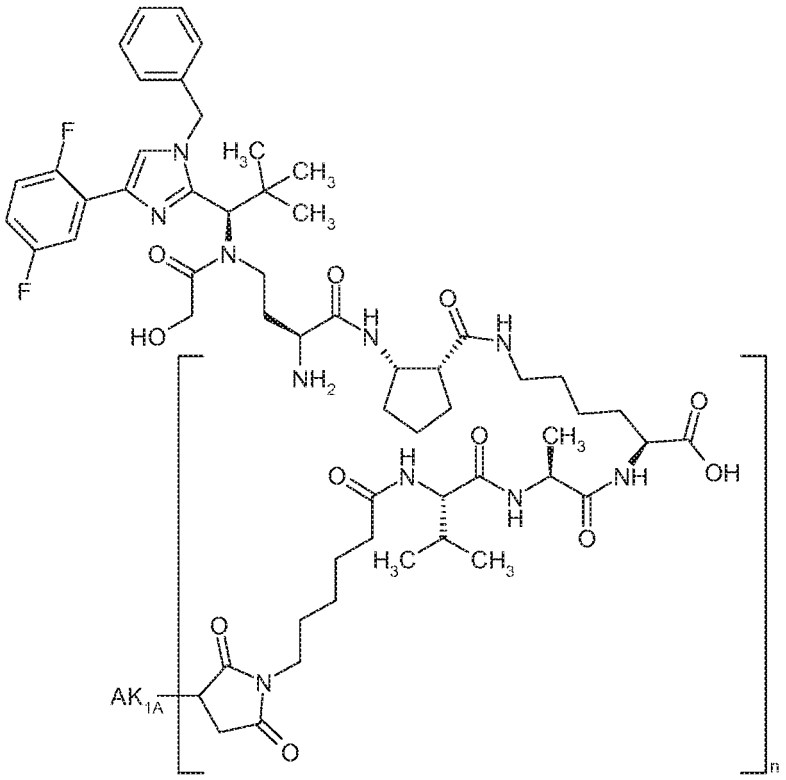
Beispiel 16E

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F16 5 mg Trastuzumab in PBS (c=13.4 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 2.26 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.4

Beispiel 17A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F17 5 mg Cetuximab in PBS (c=13.6 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS.

Protein Konzentration: 2.02 mg/mL

Drug/mAb Ratio: nd

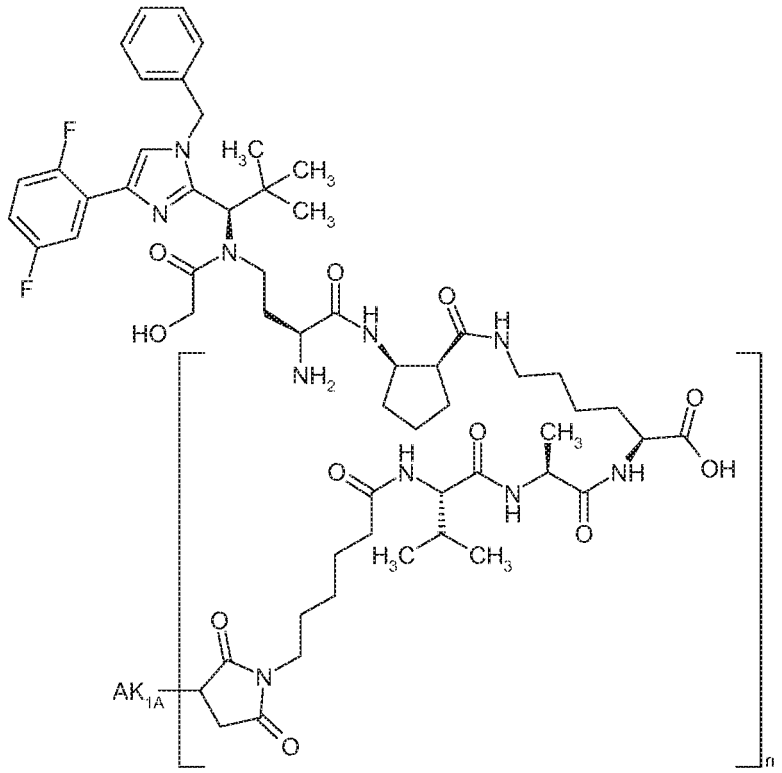
Beispiel 17B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F17 5 mg anti-TWEAKR AK-1 in PBS (c=12.2 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS.

Protein Konzentration: 1.64 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.9

Beispiel 18A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F18 5 mg Cetuximab in PBS (c=13.6 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS.

Protein Konzentration: 1.8 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.7

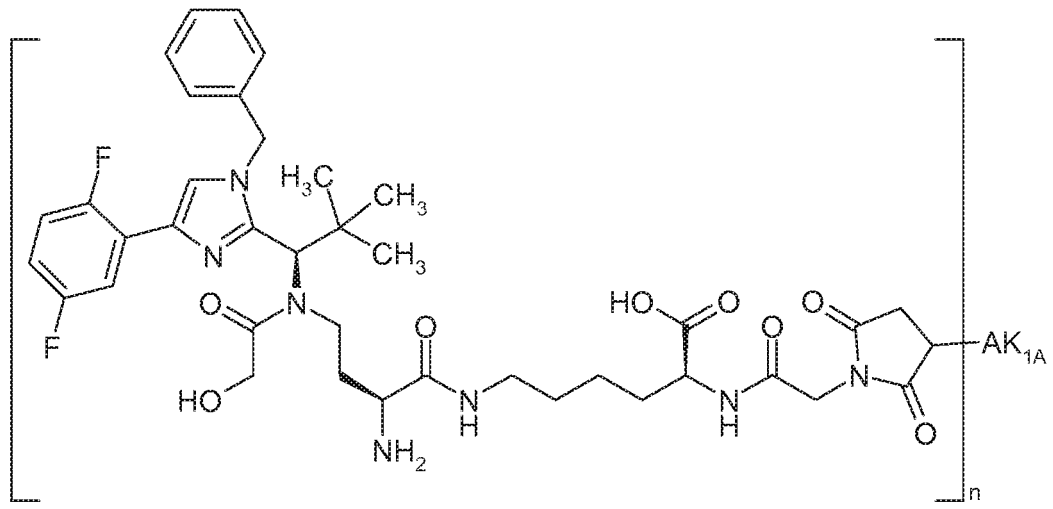
Beispiel 18B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F18 5 mg anti-TWEAKR AK-1 in PBS (c=12.2 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS.

Protein Konzentration: 1.74 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.7

Beispiel 19A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F19 5 mg Cetuximab in PBS (c=5.9 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.94 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.2

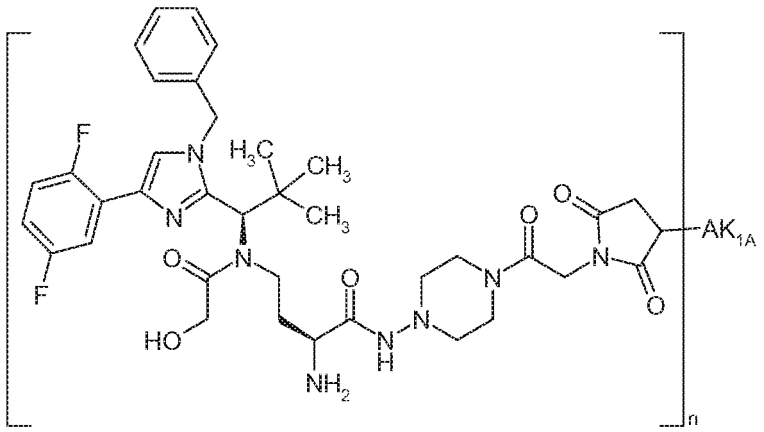
Beispiel 19B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F19 5 mg anti-TWEAKR AK-1 in PBS (c=12.2 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.9 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.8

Beispiel 20A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F20 5 mg Cetuximab in PBS (c=5.9 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.99 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.6

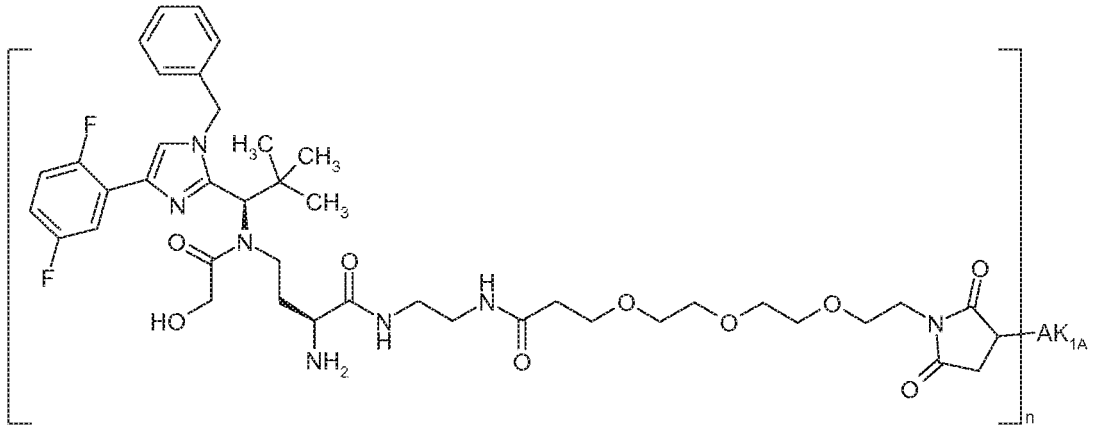
Beispiel 20B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F20 5 mg anti-TWEAKR AK-1 in PBS (c=10.1 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 2.03 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.5

Beispiel 21A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F21 5 mg Cetuximab in PBS (c=5.9 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.76 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.4

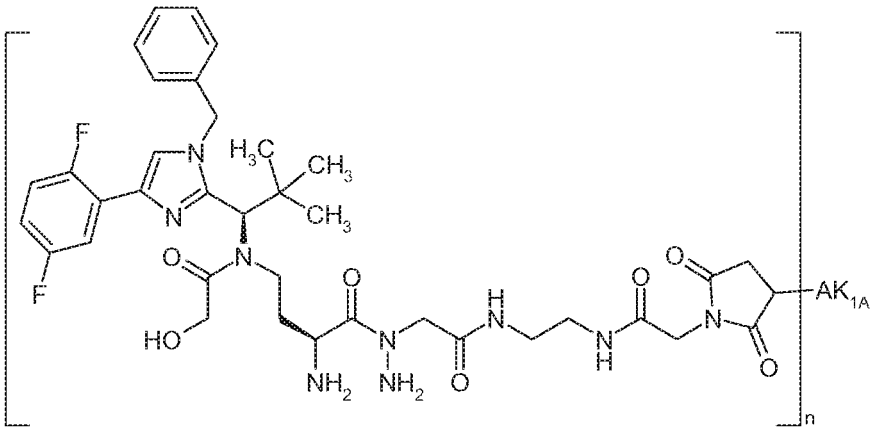
Beispiel 21B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F21 5 mg anti-TWEAKR AK-1 in PBS (c=10.1 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.8 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.3

Beispiel 22A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F22 5 mg Cetuximab in PBS (c=13.56 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.99 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.9

Beispiel 22B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F22 5 mg anti-TWEAKR AK-1 in PBS (c=12.9 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.77 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.0

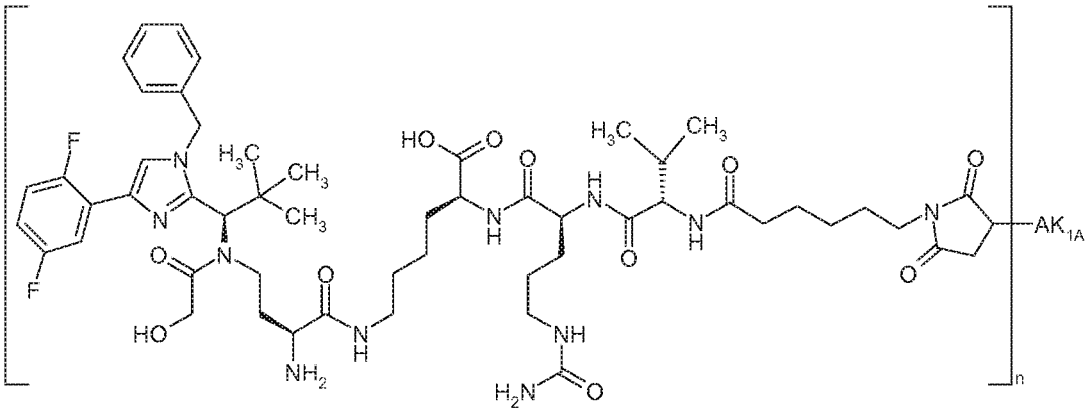
Beispiel 22E

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F22 5 mg Trastuzumab in PBS (c=13.4 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.89 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.0

Beispiel 23A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F23 5 mg Cetuximab in PBS (c=13.56 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt.

Protein Konzentration: 1.32 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.4

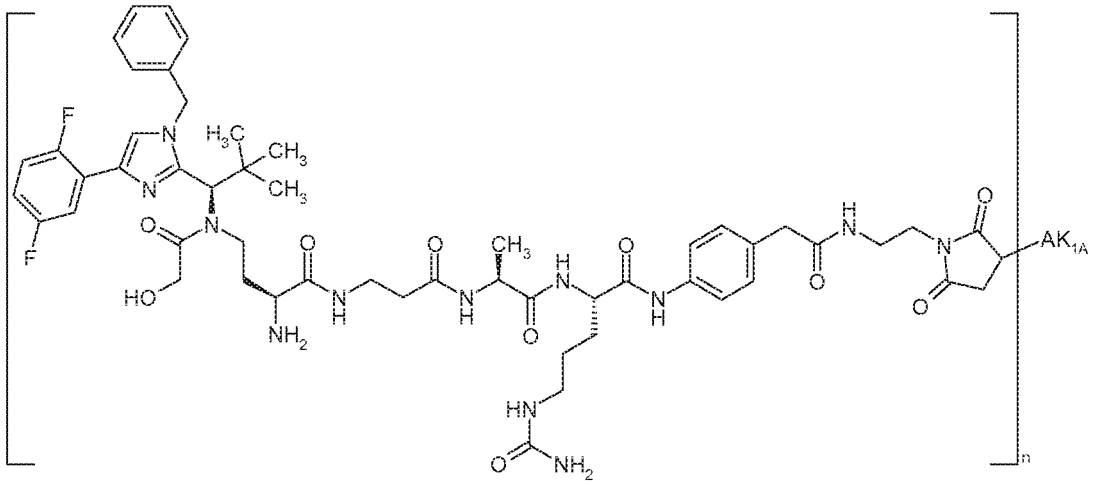
Beispiel 23B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F23 5 mg anti-TWEAKR AK-1 in PBS (c=12.9 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS.

Protein Konzentration: 1.83 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.7

Beispiel 24A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F24 5 mg Cetuximab in PBS (c=13.56 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.83 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.9

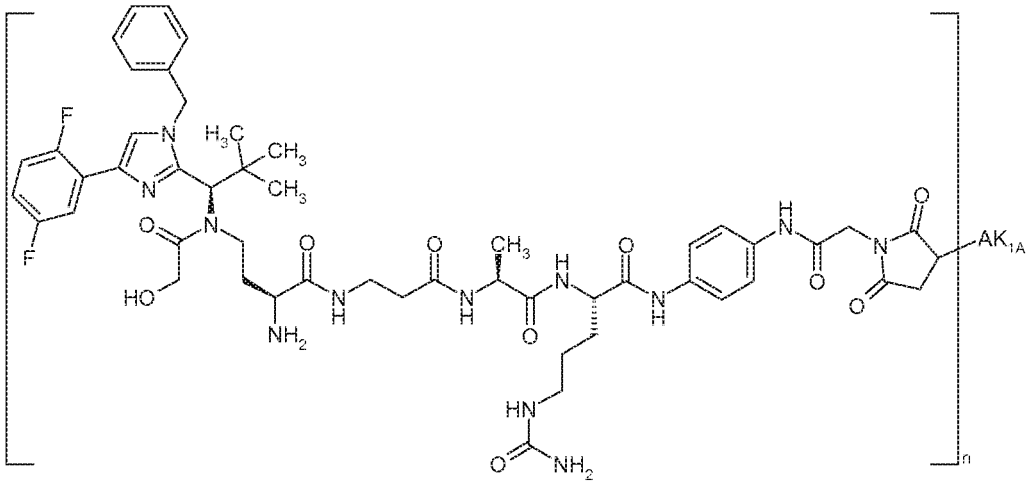
Beispiel 24B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F24 5 mg anti-TWEAKR AK-1 in PBS (c=10.1 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.83 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.9

Beispiel 25A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F25 5 mg Cetuximab in PBS (c=13.56 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 2.17 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.2

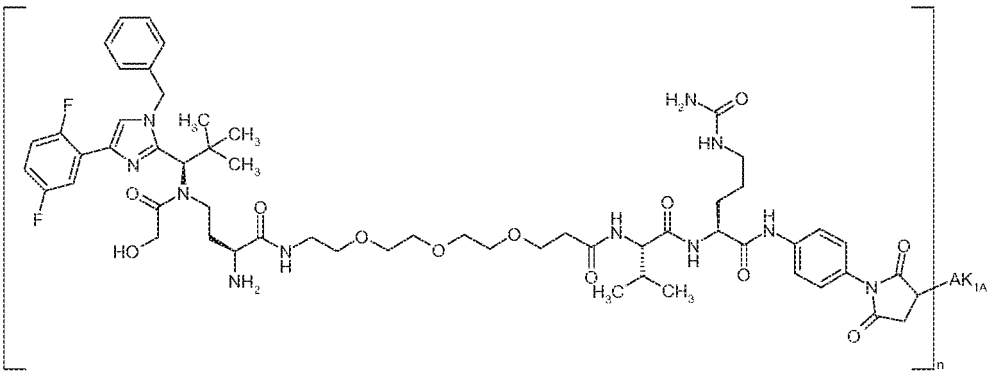
Beispiel 25B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F25 5 mg anti-TWEAKR AK-1 in PBS (c=10.1 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.78 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.2

Beispiel 26A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F26 5 mg Cetuximab in PBS (c=13.56 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.8 mg/mL

Drug/mAb Ratio: nd

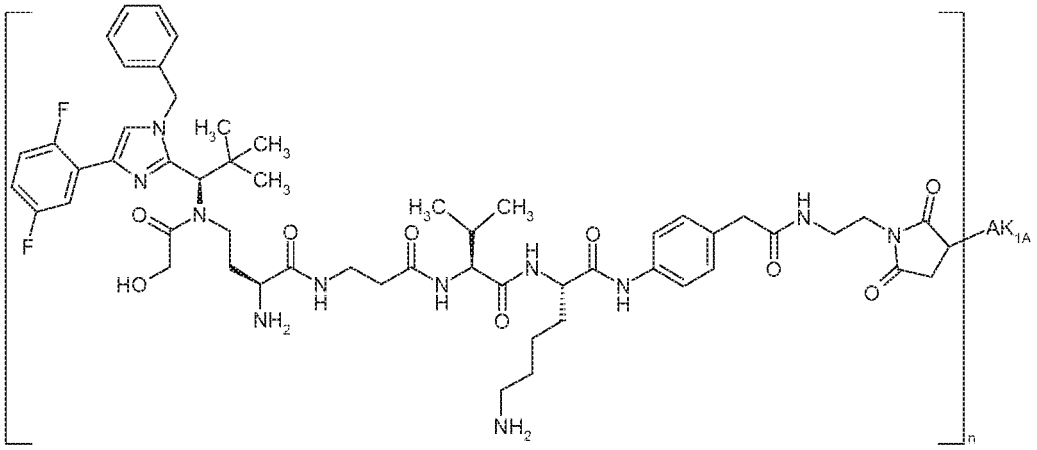
Beispiel 26B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F26 5 mg anti-TWEAKR AK-1 in PBS (c=12.9 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 2.02 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.7

Beispiel 27A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F27 5 mg Cetuximab in PBS (c=5.9 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.91 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.1

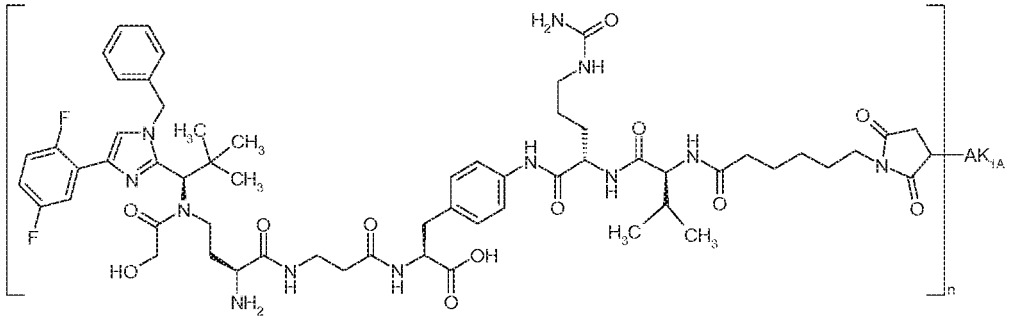
Beispiel 27B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F27 5 mg anti-TWEAKR AK-1 in PBS (c=10.1 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.83 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.1

Beispiel 28A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F28 5 mg Cetuximab in PBS (c=11.59 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS.

Protein Konzentration: 2.13 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.6

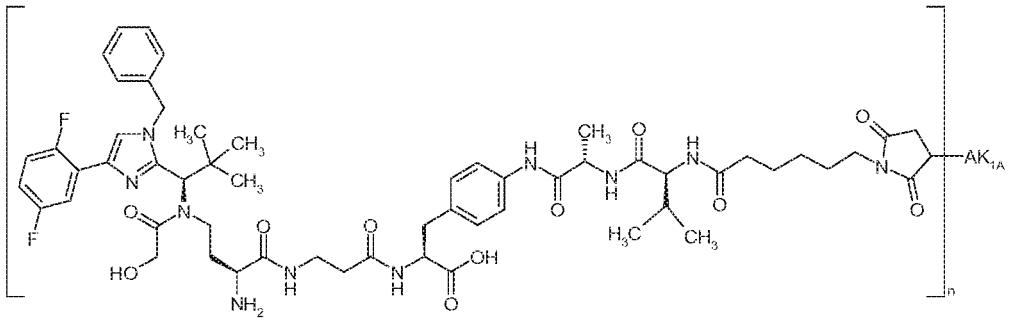
Beispiel 28B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F28 5 mg anti-TWEAKR AK-1 in PBS (c=10.1 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS.

Protein Konzentration: 1.95 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.5

Beispiel 29A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F29 5 mg Cetuximab in PBS (c=11.59 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS.

Protein Konzentration: 2.49 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.7

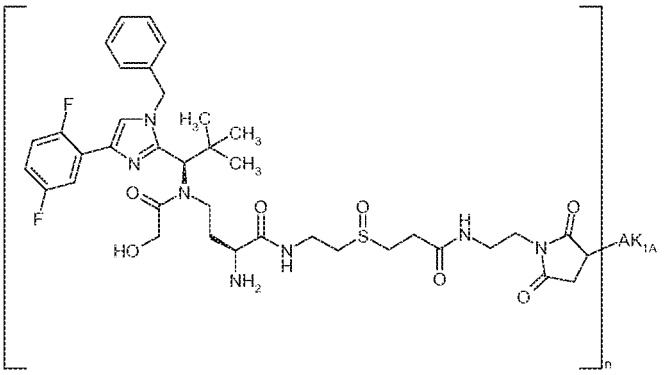
Beispiel 29B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F29 5 mg anti-TWEAKR AK-1 in PBS (c=10.1 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS.

Protein Konzentration: 1.82 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.1

Beispiel 30A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F30 5 mg Cetuximab in PBS (c=11.59 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 2.04 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.8

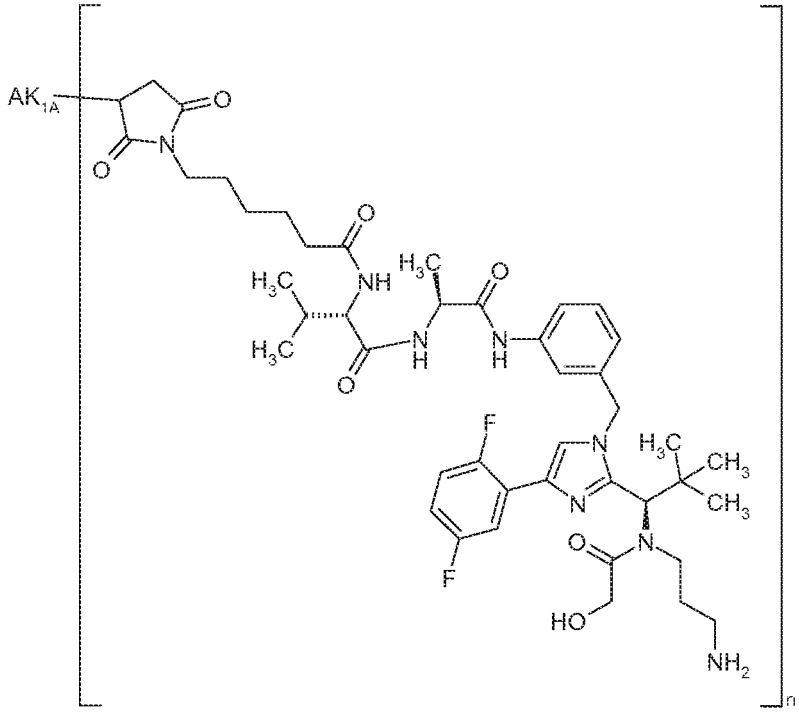
Beispiel 30B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F30 5 mg anti-TWEAKR AK-1 in PBS (c=10.1 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.85 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.9

Beispiel 31A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F31 5 mg Cetuximab in PBS (c=5.1 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS.

Protein Konzentration: 2.21 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.1

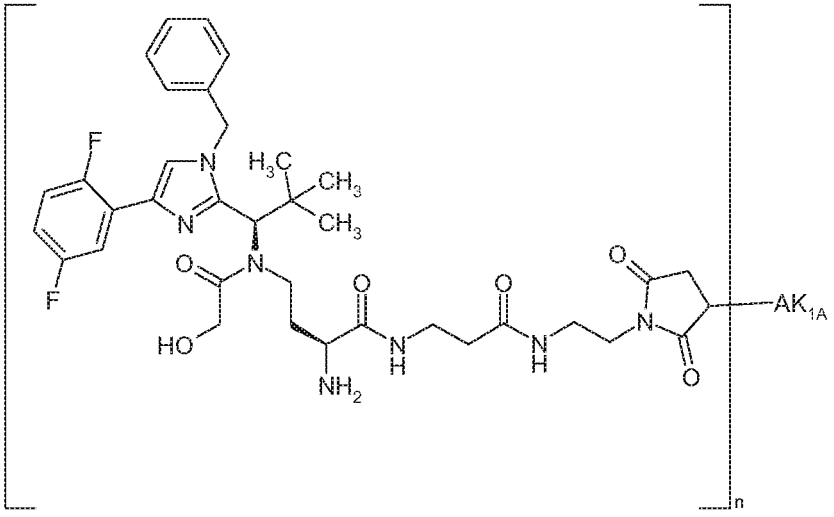
Beispiel 31B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F31 5 mg anti-TWEAKR AK-1 in PBS (c=16.54 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS.

Protein Konzentration: 1.59 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.4

Beispiel 32A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F32 5 mg Cetuximab in PBS (c=11.59 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.91 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.6

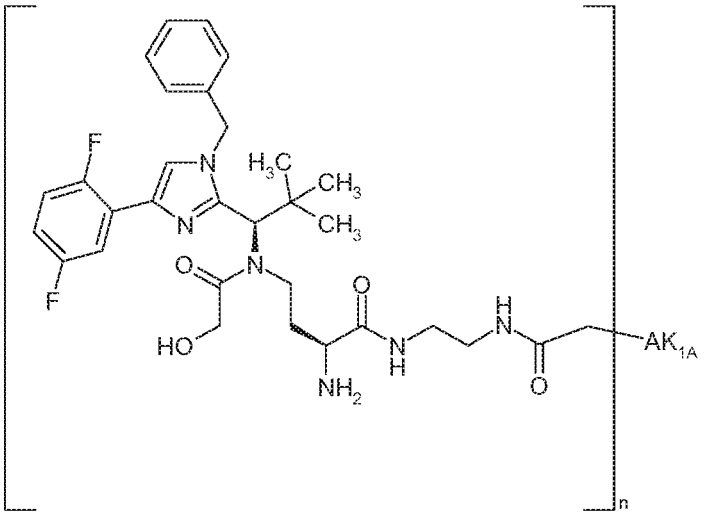
Beispiel 32B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F32 5 mg anti-TWEAKR AK-1 in PBS (c=10.1 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.78 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.6

Beispiel 33A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F33 5 mg Cetuximab in PBS (c=8.95 mg/mL). Die Kupplung mit dem Antikörper wurde nach der TCEP-Reduktion unter Rühren über Nacht durchgeführt bevor die weitere Aufarbeitung mittels Sephadex-Reinigung begann. Der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS.

Protein Konzentration: 1.78 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.3

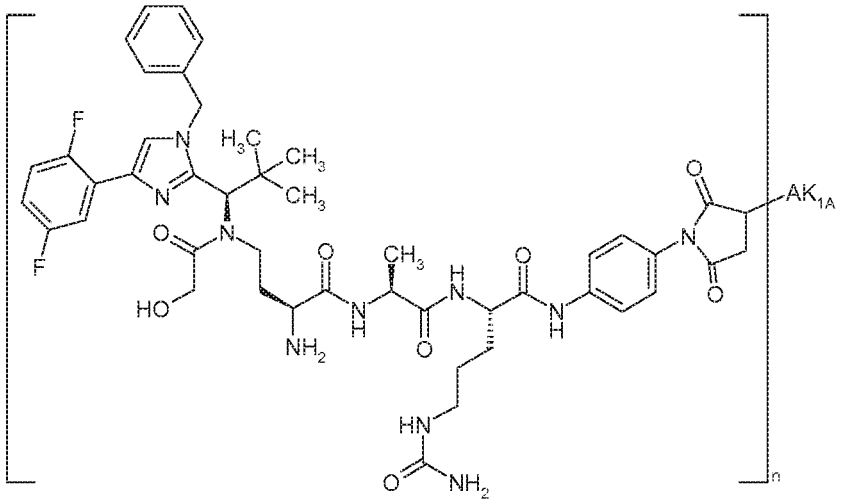
Beispiel 33B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F33 5 mg anti-TWEAKR AK-1 in PBS (c=12.87 mg/mL). Die Kupplung mit dem Antikörper wurde nach der TCEP-Reduktion unter Rühren über Nacht durchgeführt bevor die weitere Aufarbeitung mittels Sephadex-Reinigung begann. Der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS.

Protein Konzentration: 1.46 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.9

Beispiel 34A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F34 5 mg Cetuximab in PBS (c=8.95 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 2.21 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.5

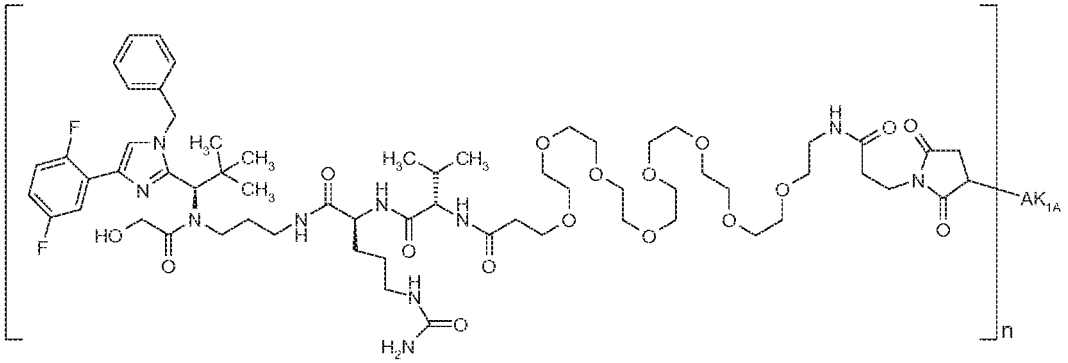
Beispiel 34B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F34 5 mg anti-TWEAKR AK-1 in PBS (c=12.87 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.4 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.3

Beispiel 35A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F35 5.0 mg Cetuximab in PBS (c = 5.90 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert, rückverdünnt mit PBS und erneut aufkonzentriert. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 14.30 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 1.4

Beispiel 35B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F35 5.0 mg anti-TWEAKR AK-1 Antikörper in PBS (c = 16.54 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 0.93 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.2

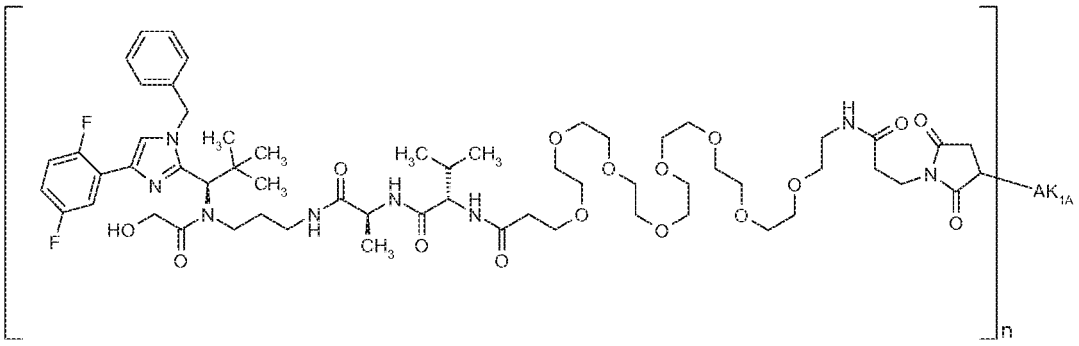
Beispiel 35E

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F35 5.0 mg Trastuzumab Antikörper in PBS (c = 8.23 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.61 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.1

Beispiel 36A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F36 5.0 mg Cetuximab in PBS (c = 5.9 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert, rückverdünnt mit PBS und erneut aufkonzentriert. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 13.86 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.9

Beispiel 36B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F36 5.0 mg anti-TWEAKR AK-1 Antikörper in PBS (c = 16.54 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.08 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.0

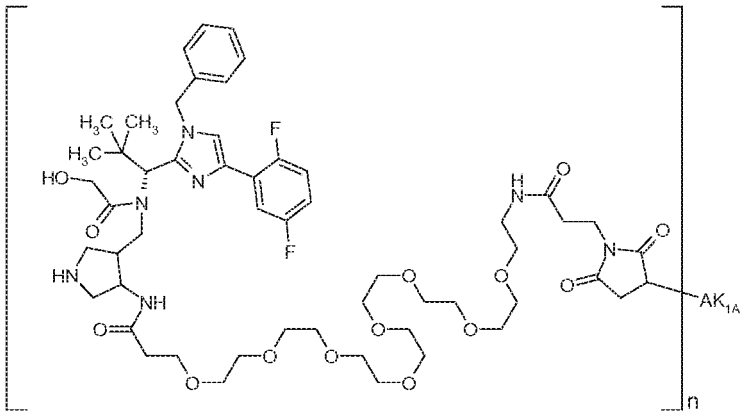
Beispiel 36E

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F36 5.0 mg Trastuzumab Antikörper in PBS (c = 8.23 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.98 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 1.9

Beispiel 37A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F37 5.0 mg Cetuximab in PBS (c = 5.08 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 2.52 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 1.5

Beispiel 37B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F37 5.0 mg anti-TWEAKR AK-1 Antikörper in PBS (c = 16.54 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.91 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.0

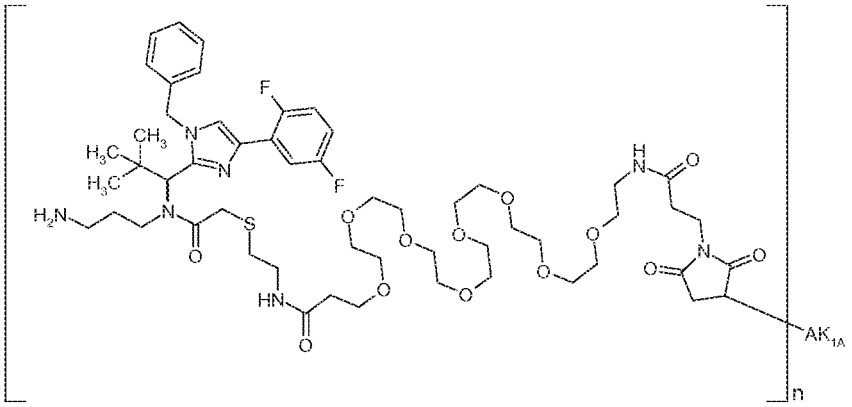
Beispiel 37E

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F37 5.0 mg Trastuzumab Antikörper in PBS (c = 8.23 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 2.23 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 1.5

Beispiel 38A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F38 5.0 mg Cetuximab in PBS (c = 5.08 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 2.45 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 1.9

Beispiel 38B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F38 5.0 mg anti-TWEAKR AK-1 Antikörper in PBS (c = 12.23 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.54 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.2

Beispiel 38E

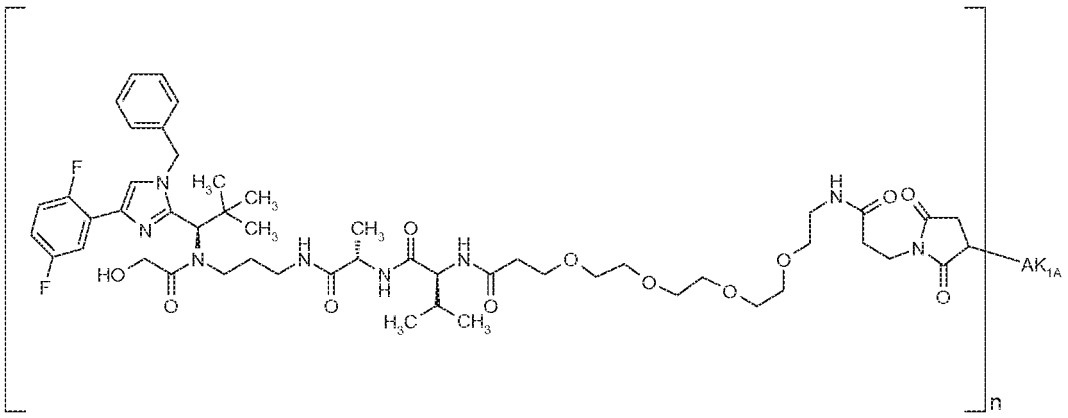
Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F38 5.0 mg Trastuzumab Antikörper in PBS (c = 13.39 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation

aufkonzentriert und rückverdünnt. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.90 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.4

Beispiel 39A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F39 5.0 mg Cetuximab in PBS (c = 5.90 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.98 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.0

Beispiel 39B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F39 5.0 mg anti-TWEAKR AK-1 Antikörper in PBS (c = 12.23 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.40 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 1.4

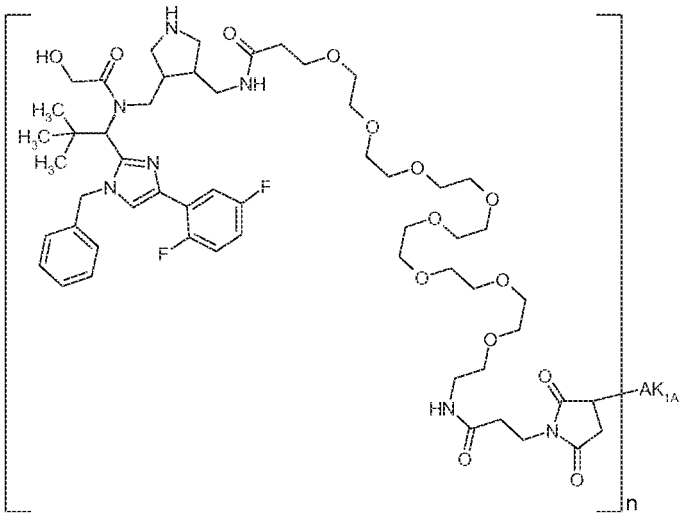
Beispiel 39E

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F39 5.0 mg Trastuzumab Antikörper in PBS (c = 13.39 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 2.04 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.1

Beispiel 40A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F40 5.0 mg Cetuximab in PBS (c = 5.90 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 2.0 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.5

Beispiel 40B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F40 5.0 mg anti-TWEAKR AK-1 Antikörper in PBS (c = 12.23 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.81 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.5

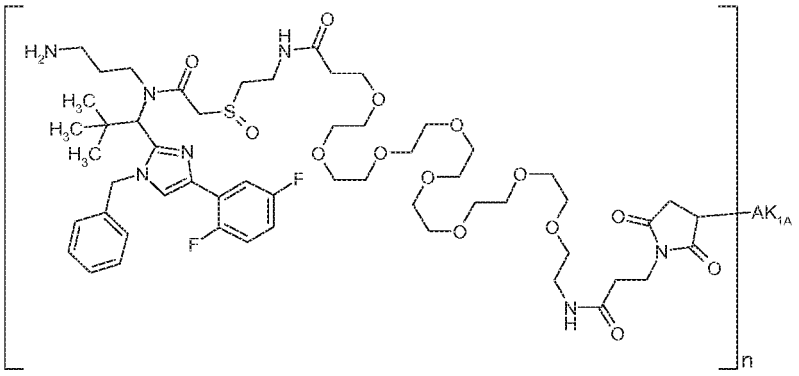
Beispiel 40E

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F40 5.0 mg Trastuzumab Antikörper in PBS (c = 13.39 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.98 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.3

Beispiel 41A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F41 5.0 mg Cetuximab in PBS (c = 5.08 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 2.53 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 1.9

Beispiel 41B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F41 5.0 mg anti-TWEAKR AK-1 Antikörper in PBS (c = 12.23 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.73 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.5

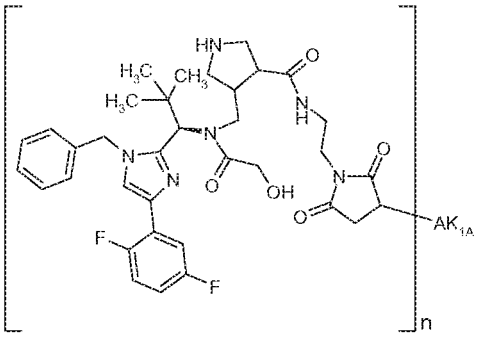
Beispiel 41E

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F39 5.0 mg Trastuzumab Antikörper in PBS (c = 13.39 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 2.09 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.5

Beispiel 42A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F42 5.0 mg Cetuximab in PBS (c = 5.90 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 2.05 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.1

Beispiel 42B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F42 5.0 mg anti-TWEAKR AK-1 Antikörper in PBS (c = 12.23 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.64 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.3

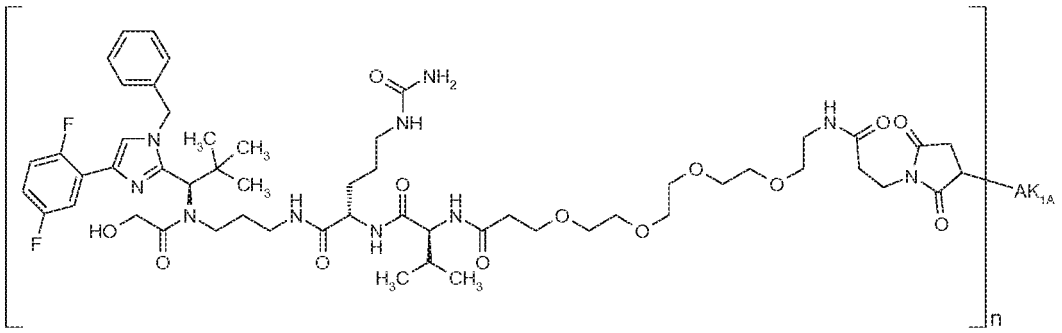
Beispiel 42E

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F42 5.0 mg Trastuzumab Antikörper in PBS (c = 13.39 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.80 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.0

Beispiel 43A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F43 5.0 mg Cetuximab in PBS (c = 5.90 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.90 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 1.3

Beispiel 43B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F43 5.0 mg anti-TWEAKR AK-1 Antikörper in PBS (c = 12.23 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen..

Protein Konzentration: 0.85 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 1.3

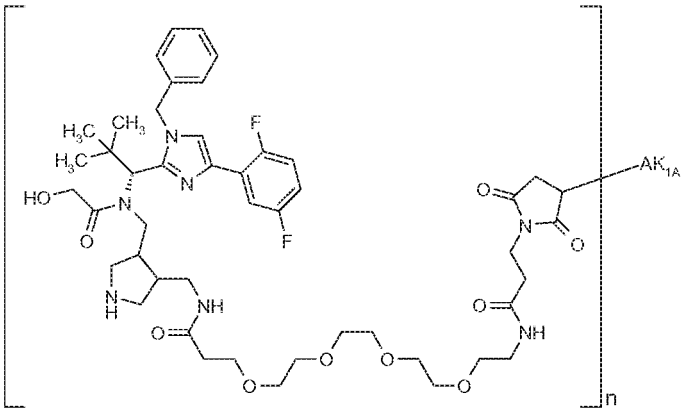
Beispiel 43E

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F43 5.0 mg Trastuzumab Antikörper in PBS (c = 13.39 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.97 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.1

Beispiel 44A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F44 5.0 mg Cetuximab in PBS (c = 5.90 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.99 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.5

Beispiel 44B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F44 5.0 mg anti-TWEAKR AK-1 Antikörper in PBS (c = 12.23 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation

aufkonzentriert und rückverdünnt. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.65 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.5

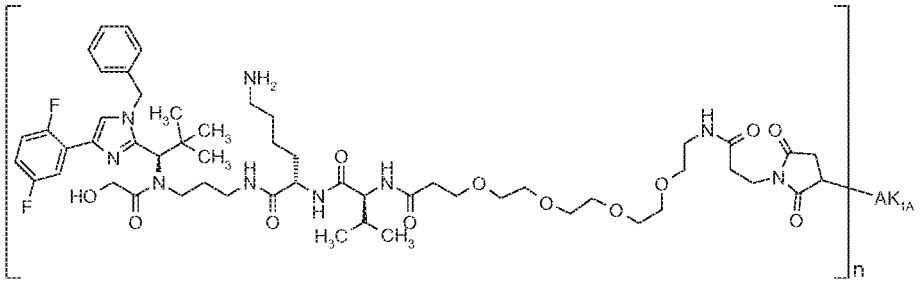
Beispiel 44E

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F44 5.0 mg Trastuzumab Antikörper in PBS (c = 13.39 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.95 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.4

Beispiel 45A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F45 5.0 mg Cetuximab in PBS (c = 5.90 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.92 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.3

Beispiel 45B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F45 5.0 mg anti-TWEAKR AK-1 Antikörper in PBS (c = 12.23 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation

aufkonzentriert und rückverdünnt. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.27 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 1.8

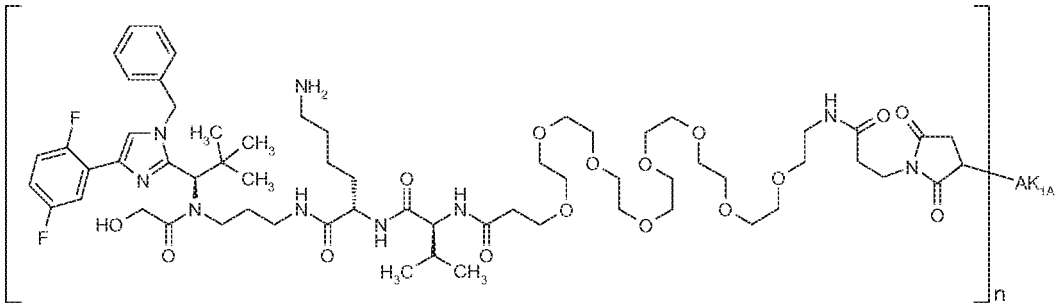
Beispiel 45E

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F45 5.0 mg Trastuzumab Antikörper in PBS (c = 13.39 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.91 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.1

Beispiel 46A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F46 5.0 mg Cetuximab in PBS (c = 5.90 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 2.0 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.2

Beispiel 46B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F46 5.0 mg anti-TWEAKR AK-1 Antikörper in PBS (c = 12.23 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation

aufkonzentriert, rückverdünnt mit PBS und erneut aufkonzentriert. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 11.21 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.1

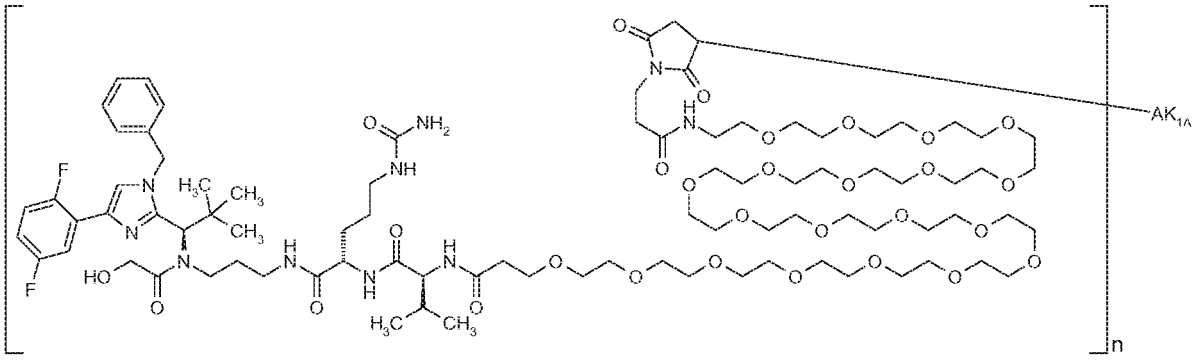
Beispiel 46E

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F46 5.0 mg Trastuzumab Antikörper in PBS (c = 13.39 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.84 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.4

Beispiel 47A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F47 5.0 mg Cetuximab in PBS (c = 5.90 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.51 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.1

Beispiel 47B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F47 5.0 mg anti-TWEAKR AK-1 Antikörper in PBS (c = 12.23 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 0.89 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 1.7

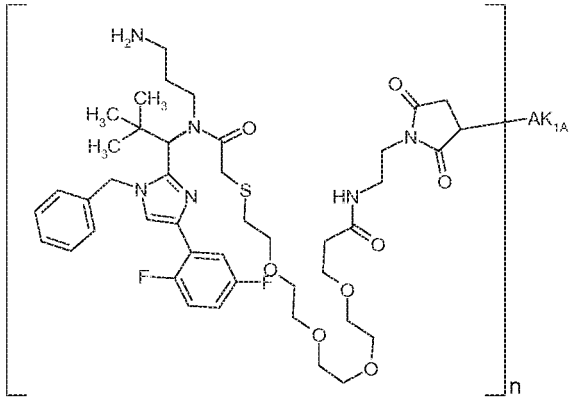
Beispiel 47E

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F47 5.0 mg Trastuzumab Antikörper in PBS (c = 13.39 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.97 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.9

Beispiel 48A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F48 5.0 mg Cetuximab in PBS (c = 5.90 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 2.10 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.4

Beispiel 48B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F48 5.0 mg anti-TWEAKR AK-1 Antikörper in PBS (c = 10.10 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.73 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 1.8

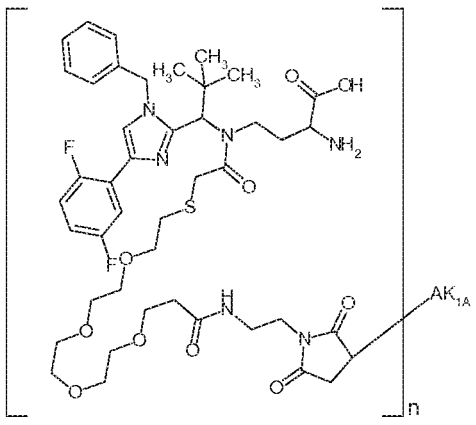
Beispiel 48E

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F48 5.0 mg Trastuzumab Antikörper in PBS (c = 13.39 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.95 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.7

Beispiel 49A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F49 5.0 mg Cetuximab in PBS (c = 5.90 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und

rückverdünnt. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 2.09 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.0

Beispiel 49B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F49 5.0 mg anti-TWEAKR AK-1 Antikörper in PBS (c = 12.87 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.95 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.1

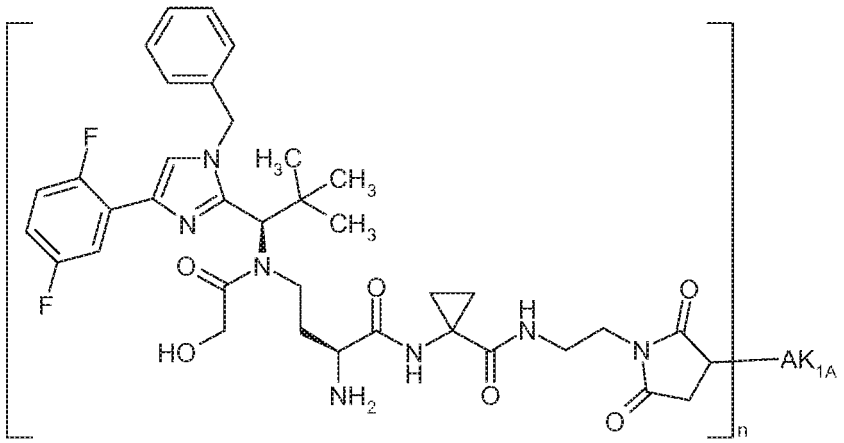
Beispiel 49E

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F49 5.0 mg Trastuzumab Antikörper in PBS (c = 13.5 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.96 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.4

Beispiel 50A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F50 5 mg Cetuximab in PBS (c=11.02 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.89 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.0

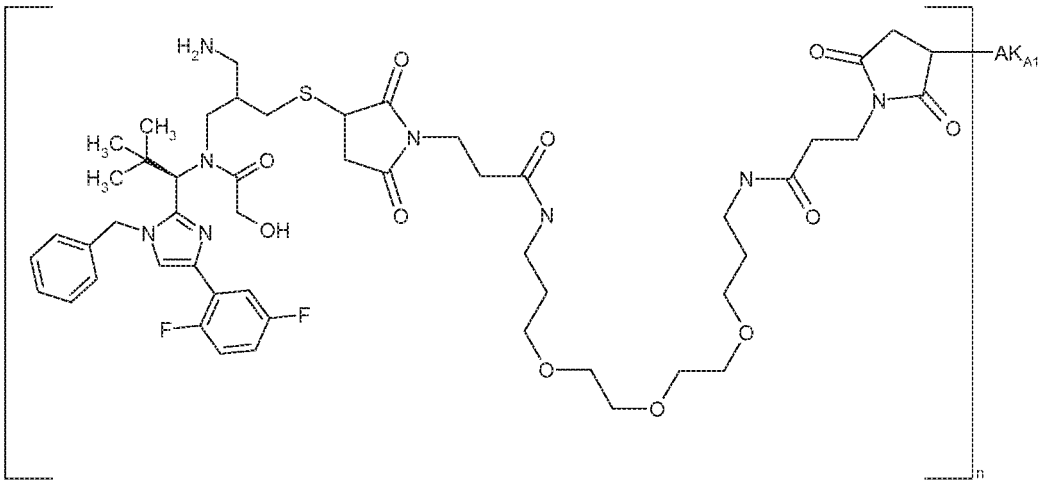
Beispiel 50B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F50 5 mg anti-TWEAKR AK-1 in PBS (c=12.87 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.82 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.9

Beispiel 51A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat 3-{3-[(3-Amino-2-{[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]methyl}propyl)sulfanyl]-2,5-dioxopyrrolidin-1-yl}-N-[17-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-15-oxo-4,7,10-trioxa-14-azaheptadec-1-yl]propanamid (Isomer 1) 5 mg Cetuximab in PBS (c=5.1 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 2.16 mg/mL

Beispiel 51B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat 3-{3-[(3-Amino-2-{[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]methyl}propyl)sulfanyl]-2,5-dioxopyrrolidin-1-yl}-N-[17-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-15-oxo-4,7,10-trioxa-14-azaheptadec-1-yl]propanamid (Isomer 1) 5 mg anti-TWEAKR AK-1 in PBS (c=16.5 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.74 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 1.7

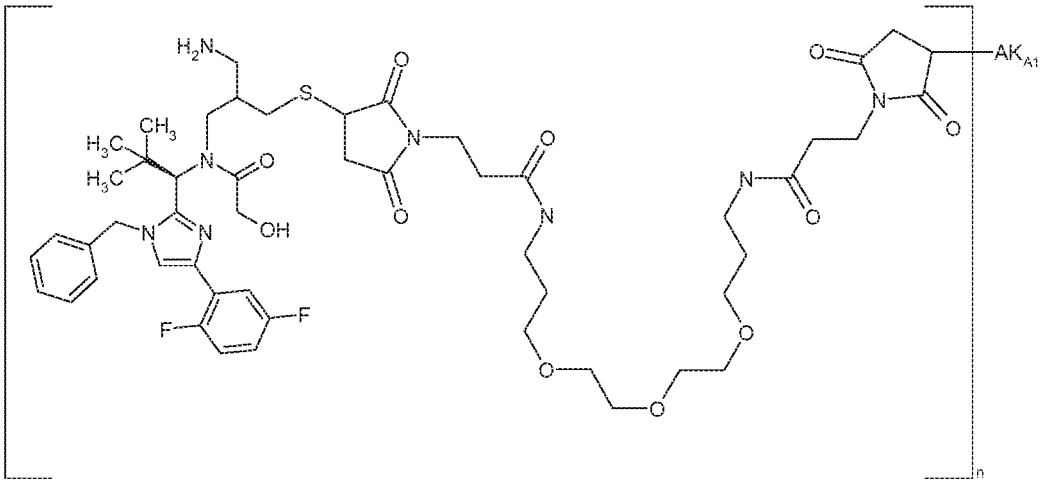
Beispiel 51E

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat 3-{3-[(3-Amino-2-{[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]methyl}propyl)sulfanyl]-2,5-dioxopyrrolidin-1-yl}-N-[17-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-15-oxo-4,7,10-trioxa-14-azaheptadec-1-yl]propanamid (Isomer 1) 5 mg Trastuzumab in PBS (c=8.2 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.67 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.4

Beispiel 52A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat 3-{3-[(3-Amino-2-{[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]methyl}propyl)sulfanyl]-2,5-dioxopyrrolidin-1-yl}-N-[17-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-15-oxo-4,7,10-trioxa-14-azaheptadec-1-yl]propanamid (Isomer 2) 5 mg Cetuximab in PBS (c=5.1 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 2.41 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.3

Beispiel 52B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat 3-{3-[(3-Amino-2-{[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]methyl}propyl)sulfanyl]-2,5-dioxopyrrolidin-1-yl}-N-[17-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-15-oxo-4,7,10-trioxa-14-azaheptadec-1-yl]propanamid (Isomer 2) 5 mg anti-TWEAKR AK-1 in PBS (c=16.5 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.34 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 1.6

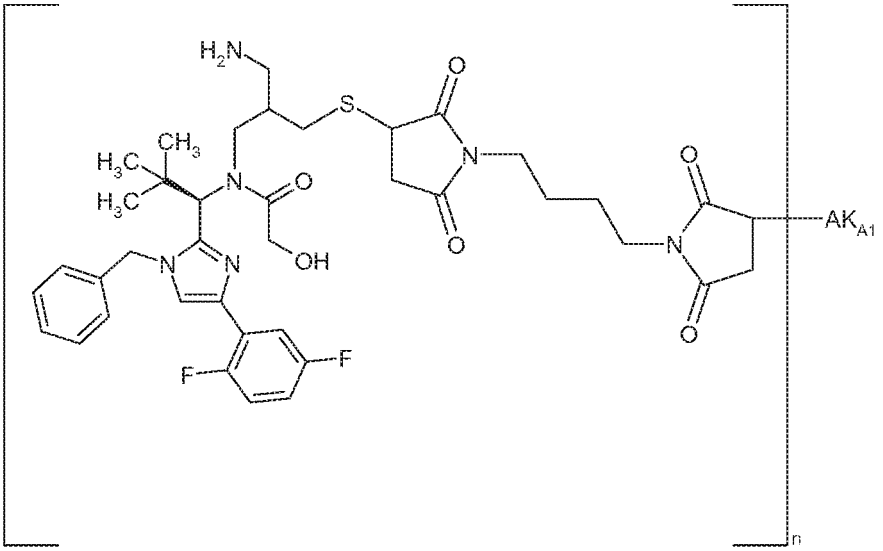
Beispiel 52E

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat 3-{3-[(3-Amino-2-{[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]methyl}propyl)sulfanyl]-2,5-dioxopyrrolidin-1-yl}-N-[17-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-15-oxo-4,7,10-trioxa-14-azaheptadec-1-yl]propanamid (Isomer 2) 5 mg Trastuzumab in PBS (c=8.2 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 2.16 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.6

Beispiel 53A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat N-{3-Amino-2-[({1-[4-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)butyl]-2,5-dioxopyrrolidin-3-yl}sulfanyl)methyl]propyl}-N-{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-2-hydroxyacetamid (Isomer 1) 5 mg Cetuximab in PBS (c=5.1 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS.

Protein Konzentration: 2.09 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.1

Beispiel 53B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat N-{3-Amino-2-[({1-[4-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)butyl]-2,5-dioxopyrrolidin-3-yl}sulfanyl)methyl]propyl}-N-{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-2-hydroxyacetamid (Isomer 1) 5 mg anti-TWEAKR AK-1 in PBS (c=16.5 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS.

Protein Konzentration: 1.95 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 1.8

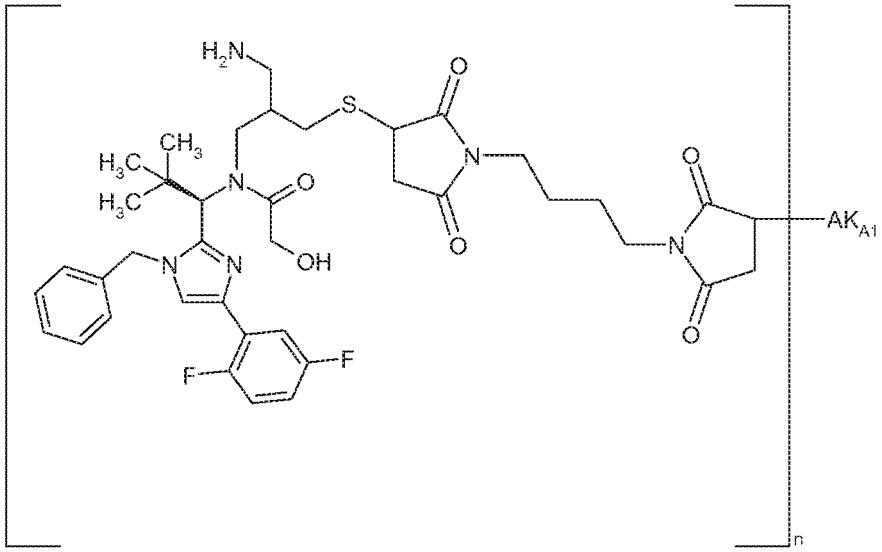
Beispiel 53E

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat N-{3-Amino-2-[({1-[4-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)butyl]-2,5-dioxopyrrolidin-3-yl}sulfanyl)methyl]propyl}-N-{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-2-hydroxyacetamid (Isomer 1) 5 mg Trastuzumab in PBS (c=8.2 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS.

Protein Konzentration: 2.15 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.4

Beispiel 54A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat N-{3-Amino-2-[({1-[4-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)butyl]-2,5-dioxopyrrolidin-3-yl}sulfanyl)methyl]propyl}-N-{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-2-hydroxyacetamid (Isomer 2) 5 mg Cetuximab in PBS (c=5.1 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS.

Protein Konzentration: 2.17 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 1.9

Beispiel 54B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat N-{3-Amino-2-[({1-[4-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)butyl]-2,5-dioxopyrrolidin-3-yl}sulfanyl)methyl]propyl}-N-{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-2-hydroxyacetamid (Isomer 2) 5 mg anti-TWEAKR AK-1 in PBS (c=16.5 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS.

Protein Konzentration: 1.95 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.0

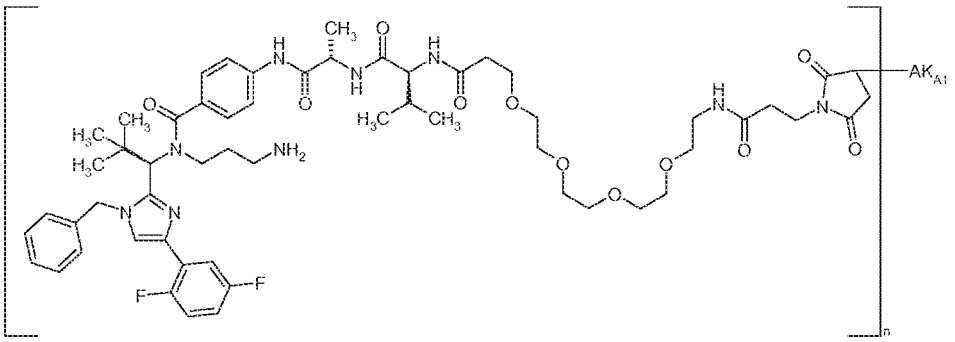
Beispiel 54E

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat N-{3-Amino-2-[({1-[4-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)butyl]-2,5-dioxopyrrolidin-3-yl}sulfanyl)methyl]propyl}-N-{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-2-hydroxyacetamid (Isomer 2) 5 mg Trastuzumab in PBS (c=8.2 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS.

Protein Konzentration: 1,90 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 1.8

Beispiel 55A

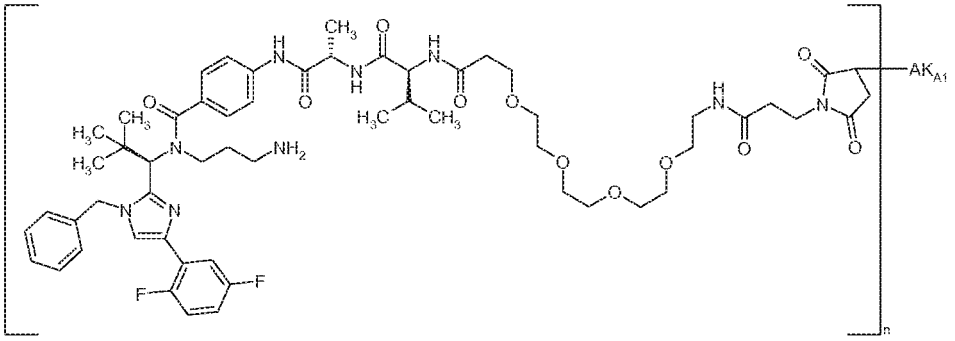


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat N-[19-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-17-oxo-4,7,10,13-tetraoxa-16-azanonadecan-1-oyl]-L-valyl-N-{4-[(3-aminopropyl){(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorophenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}carbamoyl]phenyl}-L-alaninamide 5 mg Cetuximab in PBS (c=5.1 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 0.47 mg/mL

Drug/mAb Ratio: nicht bestimmbar

Beispiel 55B

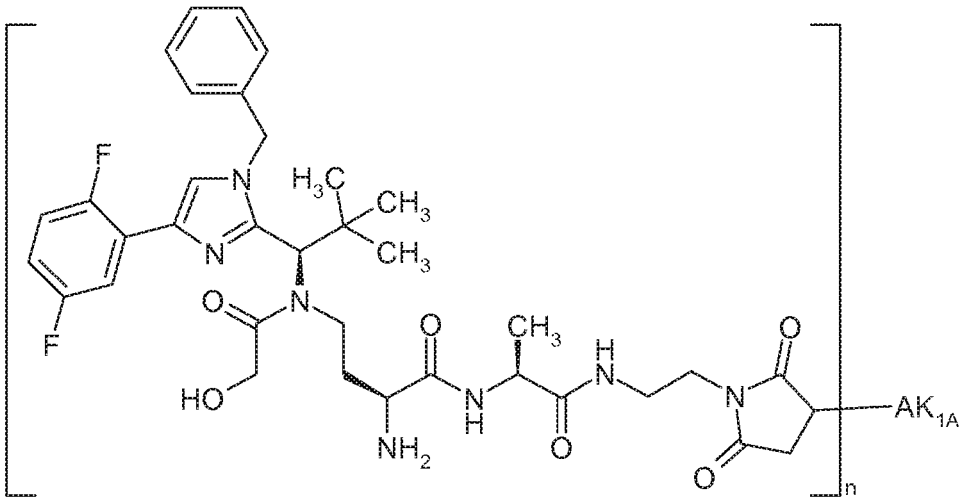


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat N-[19-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-17-oxo-4,7,10,13-tetraoxa-16-azanonadecan-1-oyl]-L-valyl-N-{4-[(3-aminopropyl){(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorophenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}carbamoyl]phenyl}-L-alaninamide 5 mg anti-TWEAKR AK-1 in PBS (c=12.2 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.26 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 1.8

Beispiel 56A



15

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F56 5 mg Cetuximab in PBS (c=15.33 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.74 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.8

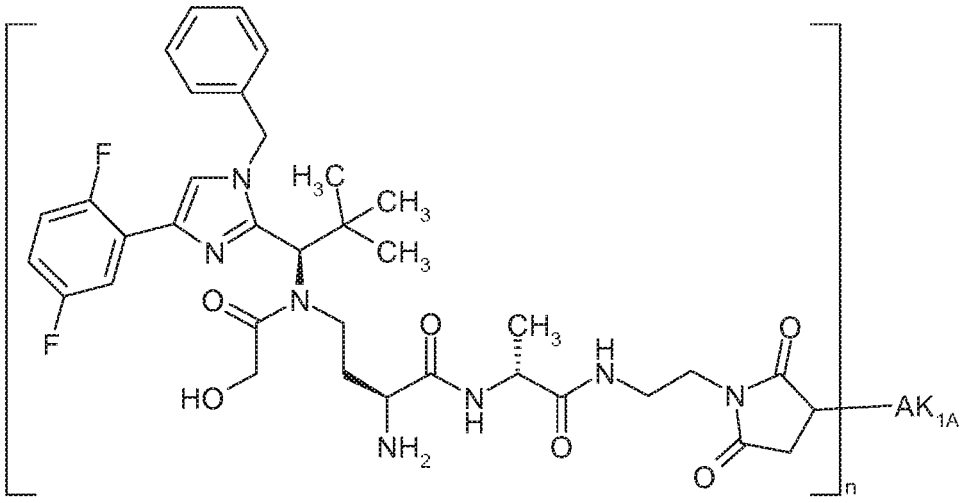
Beispiel 56B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F56 5 mg anti-TWEAKR AK-1 in PBS (c=12.87 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.92 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.8

Beispiel 57A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F57 5 mg Cetuximab in PBS (c=15.33 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 2.04 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.3

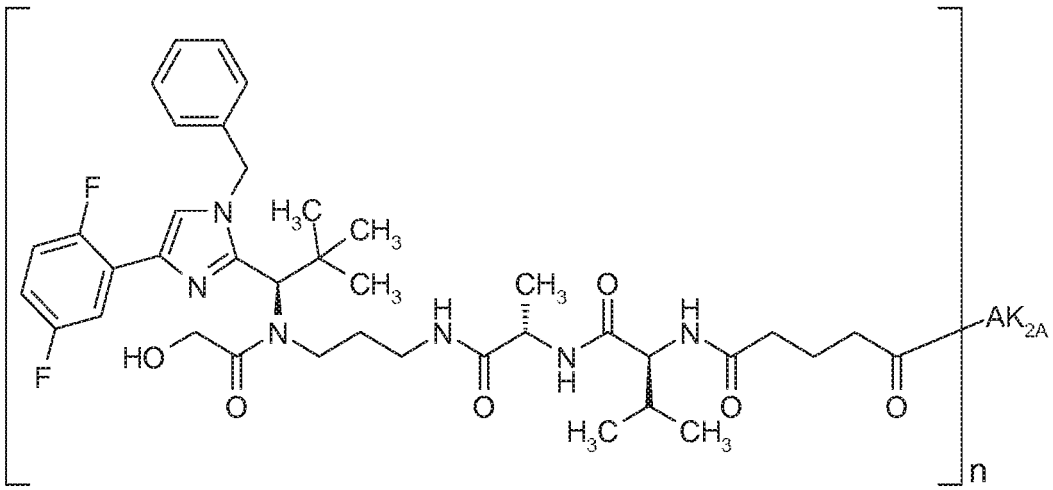
Beispiel 57B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F57 5 mg anti-TWEAKR AK-1 in PBS (c=12.87 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.93 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.3

Beispiel 58A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F58 20 mg Cetuximab in PBS (c = 21.32 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS.

Protein Konzentration: 1.33 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.0

Beispiel 58B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F58 20.0 mg anti-TWEAKR AK-1 Antikörper in PBS (c = 18.6 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS.

Protein Konzentration: 1.54 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 4.6

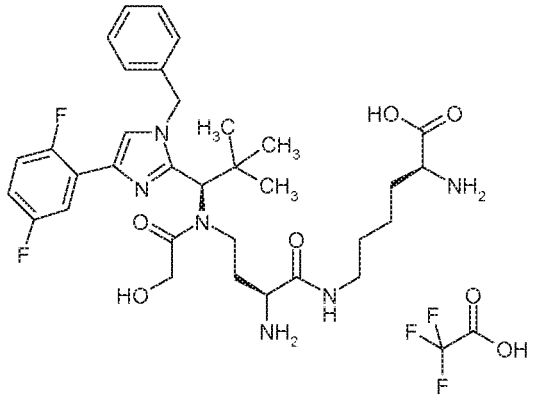
Beispiel 58E

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F58 5.0 mg Trastuzumab Antikörper in PBS (c = 13.5 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS.

Protein Konzentration: 1.15 mg/mL

Beispiel 59

N^6-{(2S)-2-Amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}-L-lysin-trifluoressigsäure(1:1)

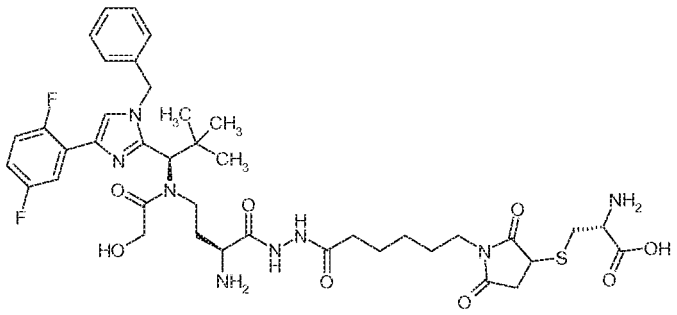


8 mg (15 µmol) von Intermediat F1 wurden in 1.7 mL DCM aufgenommen und mit 7.3 mg (30 µmol) N2-(tert-Butoxycarbonyl)-L-lysin sowie 13 µl *N,N*-Diisopropylethylamin versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 15 min bei RT gerührt, anschließend im Vakuum eingeengt und dann mittels präparativer HPLC gereinigt. Anschließend wurde das Zwischenprodukt in 1 mL DCM aufgenommen und mit 1 mL TFA entschützt. Der Ansatz wurde eingeengt und der Rückstand aus Acetonitril/Wasser 1:1 lyophilisiert.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.8 min; MS (ESIpos): m/z = 643 $(M+H)^+$.

Beispiel 60

S-{1-[6-(2-{(2S)-2-Amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}hydrazino)-6-oxohexyl]-2,5-dioxopyrrolidin-3-yl}-L-cystein

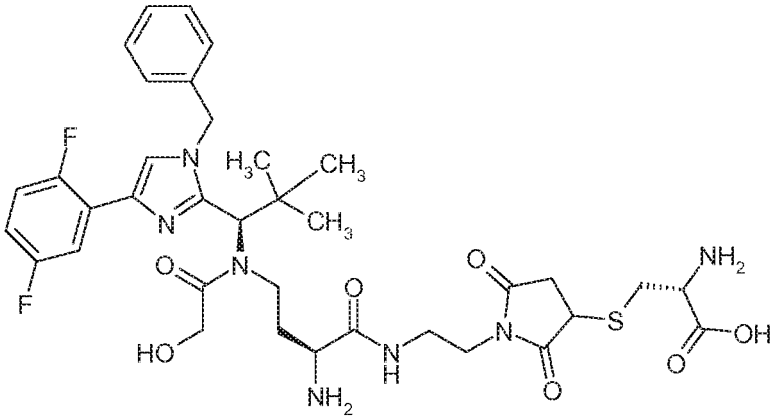


4 mg (5 µmol) von Intermediat F3 wurden in 1 mL DCM aufgenommen und mit 1.2 mg (10 µmol) L-Cystein versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 20h bei RT gerührt, anschließend im Vakuum eingeengt und dann mittels präparativer HPLC gereinigt.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.85 min; MS (ESIpos): m/z = 843 $(M+H)^+$.

Beispiel 61

S-{1-[2-({(2S)-2-Amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}amino)ethyl]-2,5-dioxopyrrolidin-3-yl}-L-cystein

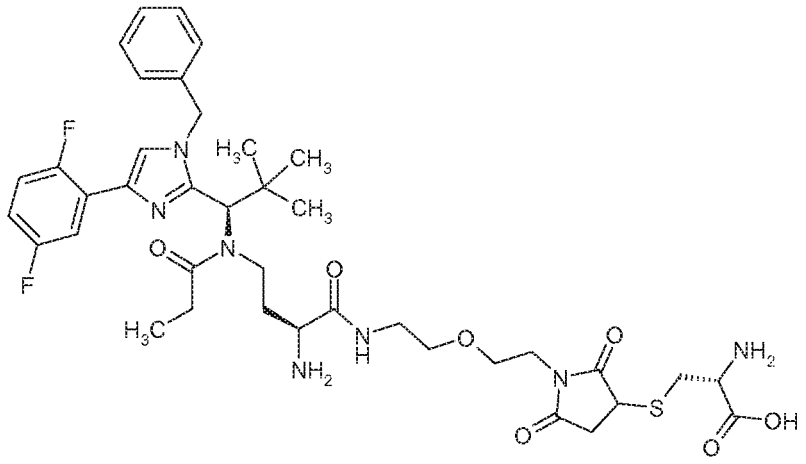


7 mg (9 µmol) von Intermediat F2 wurden in 1.75 mL DMF aufgenommen und mit 2.3 mg (19 µmol) L-Cystein versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 20h bei RT gerührt, anschließend im Vakuum eingeengt und dann mittels präparativer HPLC gereinigt.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.84 min; MS (ESIpos): m/z = 758 $(M+H)^+$.

Beispiel 62

S-(1-{2-[2-({(2S)-2-Amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(propionyl)amino]butanoyl}amino)ethoxy]ethyl}-2,5-dioxopyrrolidin-3-yl)-L-cystein

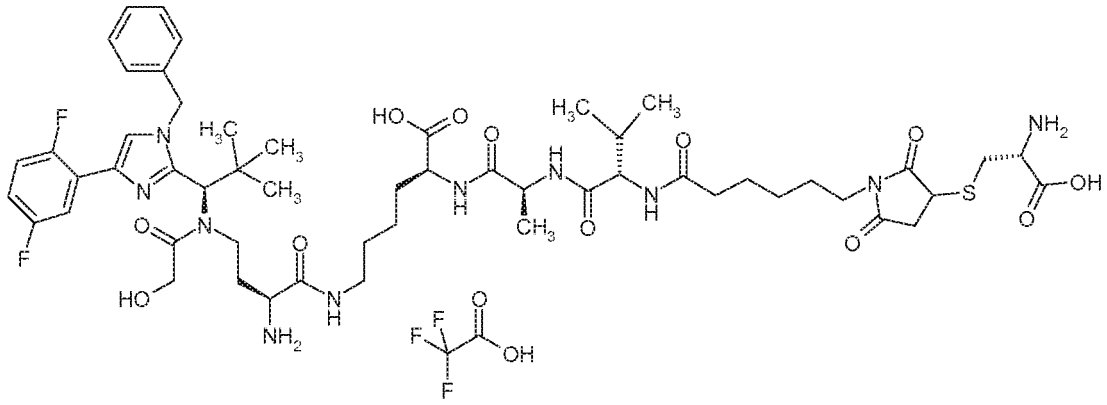


2.9 mg (3.6 µmol) von Intermediat F5 wurden in 1 mL DMF aufgenommen und mit 0.9 mg (7.3 µmol) L-Cystein versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 3d bei RT gerührt, anschließend wurde nochmals die gleiche Menge Cystein nachgesetzt. Nach weiteren 24 h Rühren bei RT wurde im Vakuum eingeengt und das Produkt mittels präparativer HPLC gereinigt.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.84 min; MS (ESIpos): m/z = 802 $(M+H)^+$.

Beispiel 63

N-[6-(3-{[(2R)-2-Amino-2-carboxyethyl]sulfanyl}-2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)hexanoyl]-L-valyl-L-alanyl-N^6-{(2S)-2-amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}-L-lysin-trifluoressigsäure(1:1)



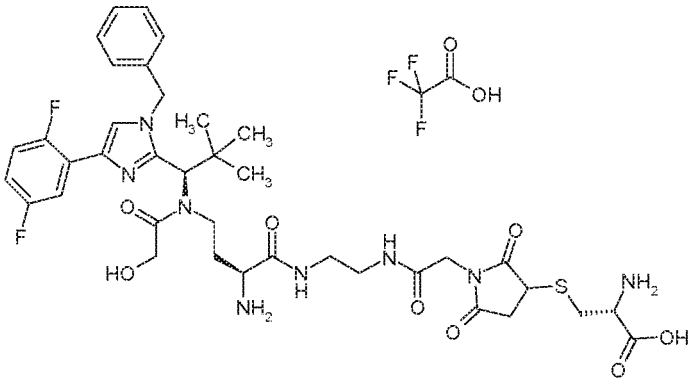
3 mg (3 µmol) von Intermediat F8 wurden in 2 mL DMF aufgenommen und mit 1 mg (8 µmol) L-Cystein versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 10 min bei RT gerührt, dann mit 500µl Wasser versetzt

und mit TFA auf pH 2 gebracht und anschließend im Vakuum eingeengt und dann mittels präparativer HPLC gereinigt.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.82 min; MS (ESIpos): m/z = 1127 $(M+H)^+$.

Beispiel 64

S-[1-(2-{[2-({(2S)-2-Amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}amino)ethyl]amino}-2-oxoethyl)-2,5-dioxopyrrolidin-3-yl]-L-cystein-trifluoressigsäure(1:1)

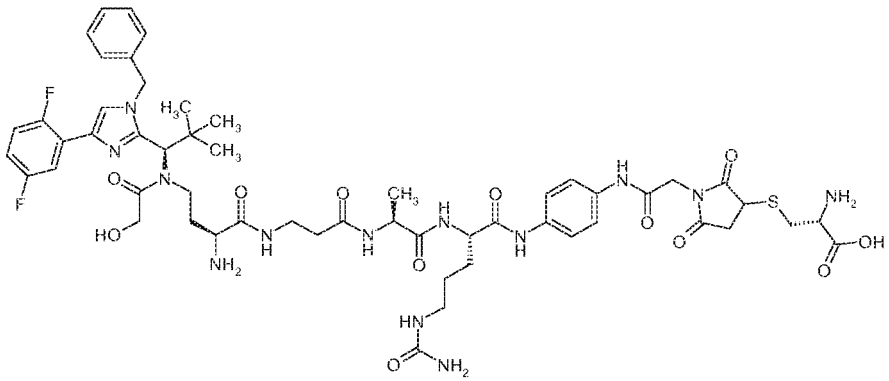


5.6 mg (7 µmol) von Intermediat F7 wurden in 1 mL DMF aufgenommen und mit 1.7 mg (14 µmol) L-Cystein versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 20 h bei RT gerührt, anschließend wurde im Vakuum eingeengt und das Produkt mittels präparativer HPLC gereinigt.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.81 min; MS (ESIpos): m/z = 815 $(M+H)^+$.

Beispiel 65

N-{(2S)-2-Amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}-beta-alanyl-L-alanyl-N-(4-{[(3-{[(2R)-2-amino-2-carboxyethyl]sulfanyl}-2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)acetyl]amino}phenyl)-N^5-carbamoyl-L-ornithinamid

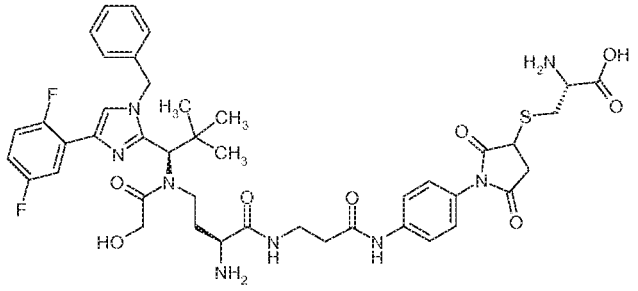


3 mg (3 µmol) von Intermediat F25 wurden in 2 mL DMF und 200 µl Wasser aufgenommen und mit 1 mg (8 µmol) L-Cystein versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 4 h bei RT gerührt, dann mit 500µl Wasser versetzt und mit TFA auf pH 2 gebracht und anschließend im Vakuum eingeengt und dann mittels präparativer HPLC gereinigt.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.76 min; MS (ESIpos): m/z = 1162 $(M+H)^+$.

Beispiel 66

S-(1-{4-[(N-{(2S)-2-Amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}-beta-alanyl)amino]phenyl}-2,5-dioxopyrrolidin-3-yl)-L-cystein

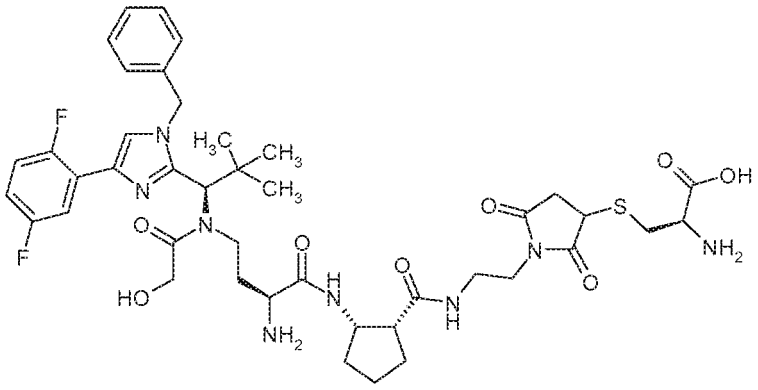


3.5 mg (3.8 µmol) von Intermediat F10 wurden in 1 mL DMF aufgenommen und mit 1.4 mg (11 µmol) L-Cystein versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 23 h bei RT gerührt, anschließend wurde nochmals die gleiche Menge Cystein nachgesetzt. Nach weiteren 24 h Rühren bei RT wurde im Vakuum eingeengt und das Produkt mittels präparativer HPLC gereinigt.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.82 min; MS (ESIpos): m/z = 877 $(M+H)^+$.

Beispiel 67

S-{1-[2-({[(1R,2S)-2-({(2S)-2-Amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}amino)cyclopentyl]carbonyl}amino)ethyl]-2,5-dioxopyrrolidin-3-yl}-L-cystein

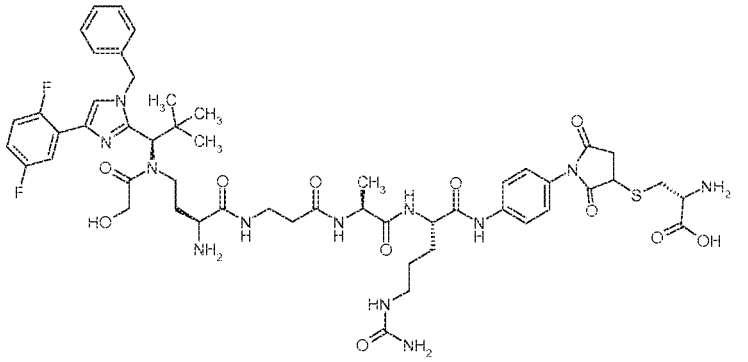


3.3 mg (4 µmol) von Intermediat F12 wurden in 1 mL DMF aufgenommen und mit 1.4 mg (11 µmol) L-Cystein versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 3 h bei RT gerührt. Anschließend wurde mit 500µl Wasser versetzt, dann im Vakuum eingeengt und das Produkt mittels präparativer HPLC gereinigt.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.82 min; MS (ESIpos): m/z = 869 $(M+H)^+$.

Beispiel 68

N-{(2S)-2-Amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}-beta-alanyl-L-alanyl-N-[4-(3-{[(2R)-2-amino-2-carboxyethyl]sulfanyl}-2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)phenyl]-N^5-carbamoyl-L-ornithinamid



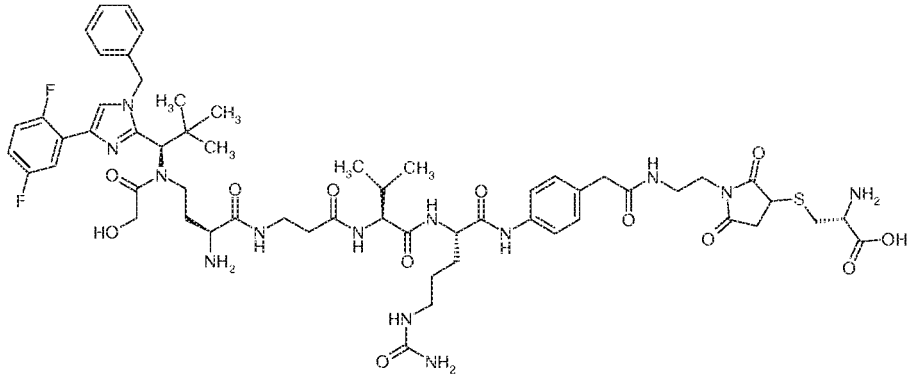
3 mg (3 µmol) von Intermediat F15 wurden in 2 mL DMF aufgenommen und mit 1 mg (8 µmol) L-Cystein versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 4 h bei RT gerührt. Anschließend wurde der Ansatz mit 500µl Wasser versetzt und mit TFA auf pH 2 gebracht. Dann wurde im Vakuum eingeengt und das Produkt mittels präparativer HPLC gereinigt.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.76 min; MS (ESIpos): m/z = 1105 $(M+H)^+$.

Beispiel 69

N-{(2S)-2-Amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}-beta-alanyl-L-valyl-N-[4-(2-{[2-(3-{[(2R)-2-amino-2-

carboxyethyl]sulfanyl}-2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)ethyl]amino}-2-oxoethyl)phenyl]-N^5-carbamoyl-L-ornithinamid

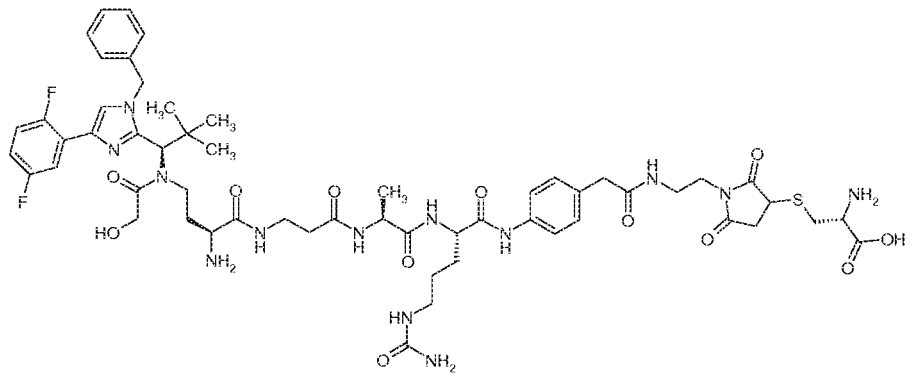


3 mg (2 µmol) von Intermediat F16 wurden in 2 mL DMF aufgenommen und mit 0.8 mg (7 µmol) L-Cystein versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 4 h bei RT gerührt. Anschließend wurde der Ansatz mit 500µl Wasser versetzt und mit TFA auf pH 2 gebracht. Dann wurde im Vakuum eingeengt und das Produkt mittels präparativer HPLC gereinigt.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.82 min; MS (ESIpos): m/z = 1218 $(M+H)^+$.

Beispiel 70

N-{(2S)-2-Amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}-beta-alanyl-L-alanyl-N-[4-(2-{[2-(3-{[(2R)-2-amino-2-carboxyethyl]sulfanyl}-2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)ethyl]amino}-2-oxoethyl)phenyl]-N^5-carbamoyl-L-ornithinamid

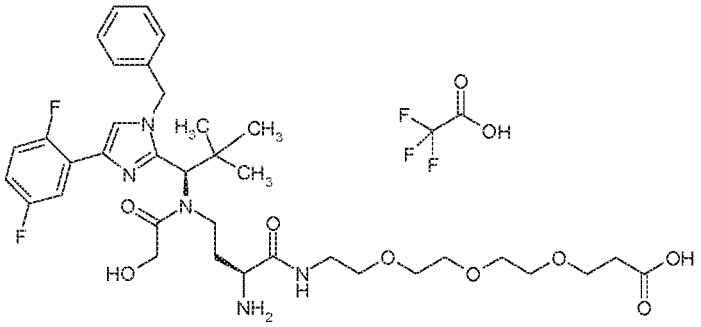


3 mg (3 µmol) von Intermediat F24 wurden in 2 mL DMF und 200 µl Wasser aufgenommen und mit 0.9 mg (8 µmol) L-Cystein versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 4 h bei RT gerührt. Anschließend wurde der Ansatz mit 500µl Wasser versetzt und mit TFA auf pH 2 gebracht. Dann wurde im Vakuum eingeengt und das Produkt mittels präparativer HPLC gereinigt.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.77 min; MS (ESIpos): m/z = 1190 $(M+H)^+$.

Beispiel 71

(15S,19R)-15-Amino-19-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-18-glycoloyl-20,20-dimethyl-14-oxo-4,7,10-trioxa-13,18-diazahenicosan-1-säure-trifluoressigsäure(1:1)



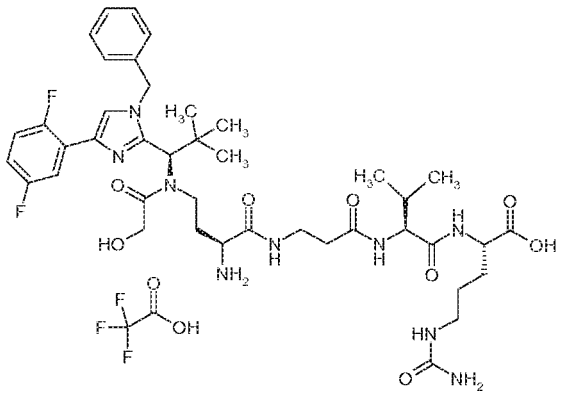
Im ersten Schritt wurden 70 mg (0.114 mmol) von Intermediat C5 mit 32 mg (0.114 mmol) tert-Butyl-3-{2-[2-(2-aminoethoxy)ethoxy]ethoxy}propanoat in 15 mL DMF in Gegenwart von 44 mg (0.228 mmol) 1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimid-Hydrochlorid, 35 mg (0.228 mmol) 1-Hydroxy-1*H*-benzotriazol-Hydrat und 60 µl *N,N*-Diisopropylethylamin gekuppelt.

Der Ansatz wurde über Nacht bei RT gerührt und das Produkt durch präparative HPLC gereinigt. Es wurden 33 mg (33% d.Th.) des geschützten Intermediats isoliert. Dieses wurde 1 h mit 1.1 mL Trifluoressigsäure in 11 mL Dichlormethan gerührt und nach Aufarbeitung wurden 26 mg (98%) der Titelverbindung erhalten.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.91 min; MS (ESIpos): m/z = 718 $(M+H)^+$.

Beispiel 72

N-{(2S)-2-Amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}-beta-alanyl-L-valyl-N^5-carbamoyl-L-ornithin-trifluoressigsäure(1:1)

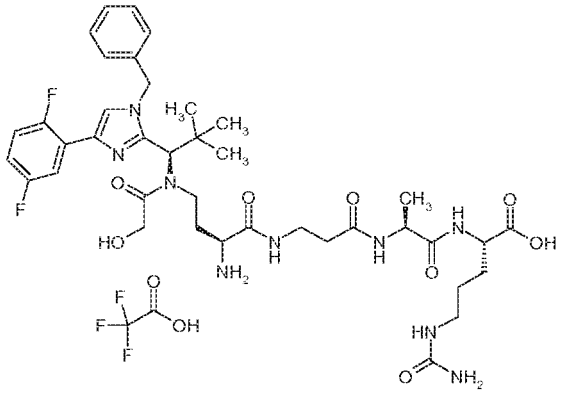


Die Titelverbindung wurde ausgehend von Intermediat C3 nach klassischen Methoden der Peptidchemie hergestellt.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.87 min; MS (ESIpos): m/z = 842 $(M+H)^+$.

Beispiel 73

N-{(2S)-2-Amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}-beta-alanyl-L-alanyl-N^5-carbamoyl-L-ornithin-trifluoressigsäure(1:1)

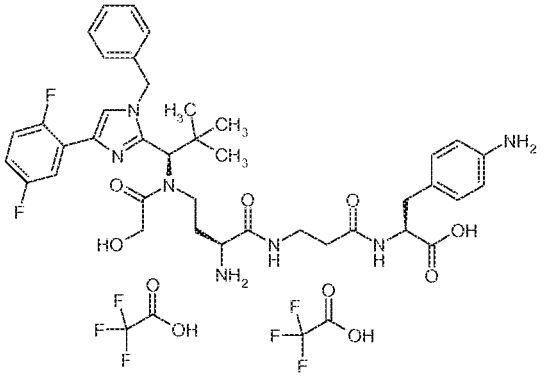


Die Titelverbindung wurde in Analogie zu Beispiel 72 ausgehend von Intermediat C3 nach klassischen Methoden der Peptidchemie hergestellt.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.82 min; MS (ESIpos): m/z = 814 $(M+H)^+$.

Beispiel 74

N-{(2S)-2-Amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}-beta-alanyl-4-amino-L-phenylalanin-trifluoressigsäure(1:2)

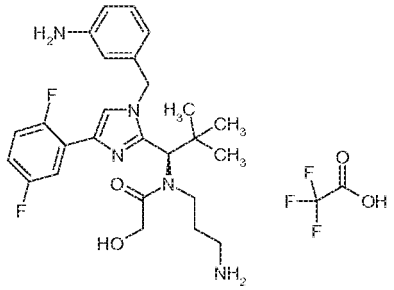


Die Titelverbindung wurde ausgehend von Intermediat C8 und Trifluoressigsäure-methyl-4-amino-L-phenylalaninat(1:1), welches nach klassischen Methoden der Peptidchemie aus kommerziell erhältlichem N-(tert-Butoxycarbonyl)-4-nitro-L-phenylalanin hergestellt wurde, synthetisiert.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.82 min; MS (ESIpos): m/z = 748 $(M+H)^+$.

Beispiel 75

Trifluoressigsäure--N-{(1R)-1-[1-(3-aminobenzyl)-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-N-(3-aminopropyl)-2-hydroxyacetamid(1:1)

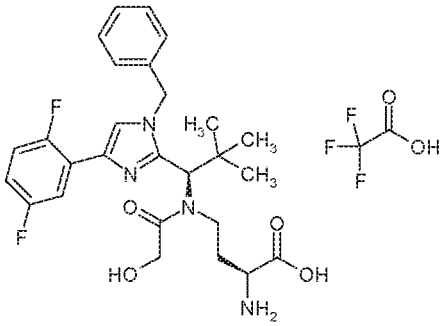


Die Titelverbindung wurde aus Intermediat C10 durch Entschützung mit Trifluoressigsäure hergestellt.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.81 min; MS (ESIpos): m/z = 486 $(M+H)^+$.

Beispiel 76

(2S)-2-Amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butansäure-trifluoressigsäure(1:1)

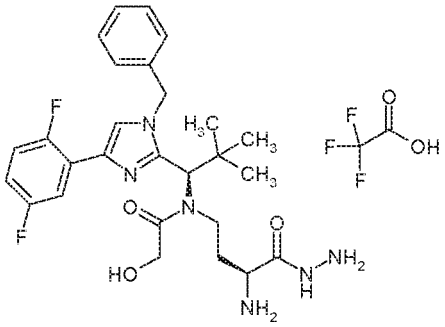


Die Titelverbindung wurde aus Intermediat C5 durch Entschützung mit Trifluoressigsäure hergestellt.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.93 min; MS (ESIpos): m/z = 515 $(M+H)^+$.

Beispiel 77

Trifluoressigsäure--N-[(3S)-3-amino-4-hydrazino-4-oxobutyl]-N-{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-2-hydroxyacetamid(1:1)

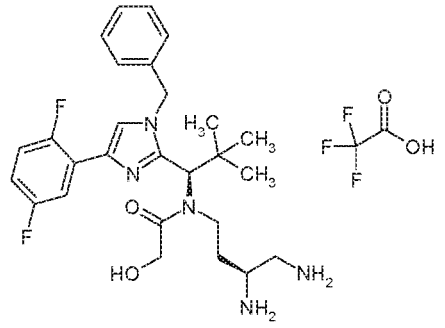


Die Titelverbindung wurde aus Intermediat C6 durch Entschützung mit Trifluoressigsäure hergestellt.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.88 min; MS (ESIpos): m/z = 529 $(M+H)^+$.

Beispiel 78

Trifluoressigsäure--N-{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-N-[(3S)-3,4-diaminobutyl]-2-hydroxyacetamid(1:1)



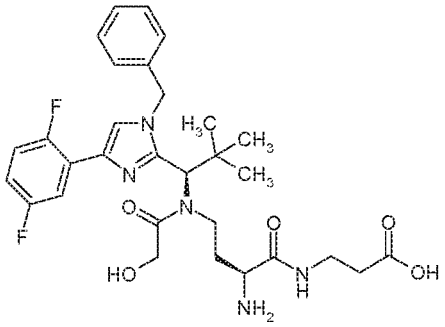
Im ersten Schritt wurde Intermediat C1 mit Benzyl-tert-butyl-[(2S)-4-oxobutan-1,2-diyl]biscarbamat in Analogie zu Intermediat C2 umgesetzt. Der hier eingesetzte Aldehyd wurde aus kommerziell erhältlicher (3S)-3-{[(Benzyloxy)carbonyl]amino}-4-[(tert-butoxycarbonyl) amino]butansäure durch Reduktion und anschließende Oxidation in Analogie zu Intermediat C2 hergestellt.

Im zweiten Schritt erfolgte dann die N-Acylierung in Analogie zu Intermediat C3 und schließlich die vollständige Entschützung zunächst mit 33%-iger Bromwasserstoffsäure in Eisessig und dann mit Lithiumhydroxid.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.78 min; MS (ESIpos): m/z = 500 $(M+H)^+$.

Beispiel 79

N-{(2S)-2-Amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}-beta-alanin

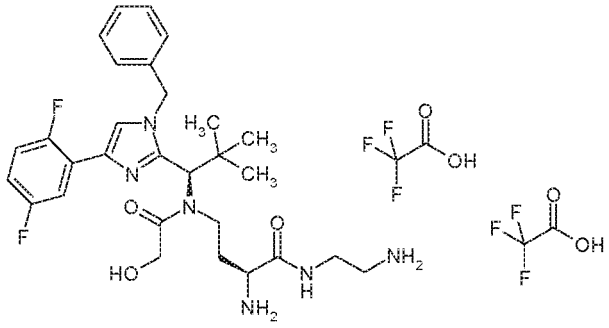


Die Titelverbindung wurde aus Intermediat C8 durch Entschützung mit Trifluoressigsäure hergestellt.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.84 min; MS (ESIpos): m/z = 586 $(M+H)^+$.

Beispiel 80

Trifluoressigsäure--(2S)-2-amino-N-(2-aminoethyl)-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanamid(2:1)

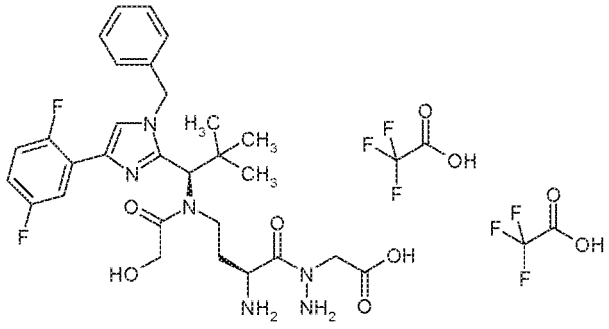


Die Titelverbindung wurde ausgehend von Intermediat C5 nach klassischen Methoden der Peptidchemie hergestellt.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.72 min; MS (ESIpos): m/z = 557 $(M+H)^+$.

Beispiel 81

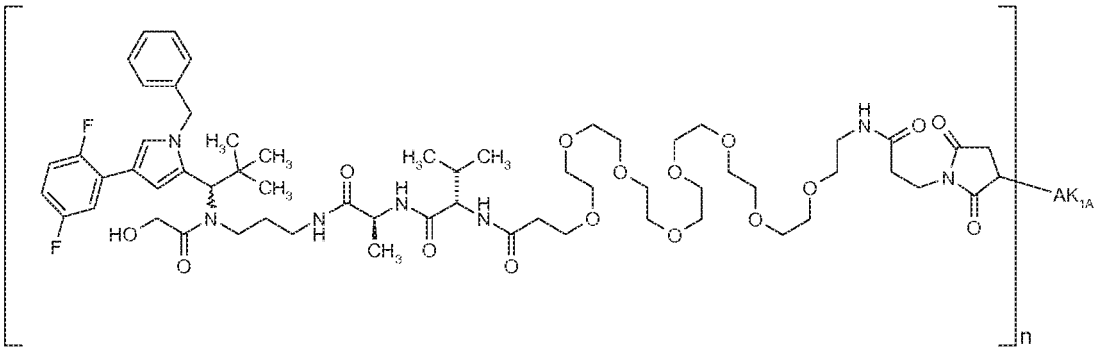
(1-{(2S)-2-Amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}hydrazino)essigsäure-trifluoressigsäure(1:2)



Die Titelverbindung wurde ausgehend von Intermediat C7 durch Entschützung mit Trifluoressigsäure hergestellt.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.89 min; MS (ESIpos): m/z = 587 $(M+H)^+$.

Beispiel 82A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F82 5.0 mg Cetuximab in PBS (c = 5.90 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.59 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.3

Beispiel 82B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F82 5.0 mg anti-TWEAKR AK-1 Antikörper in PBS (c = 10.10 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.59 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 1.8

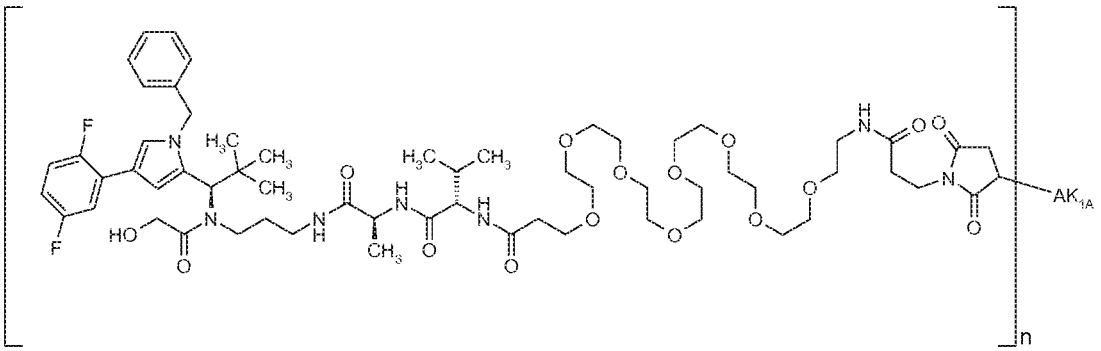
Beispiel 82E

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F82 5.0 mg Trastuzumab Antikörper in PBS (c = 11.50 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 2.15 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.7

Beispiel 83A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F83 5.0 mg Cetuximab in PBS (c = 5.90 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.77 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.0

Beispiel 83B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F83 5.0 mg anti-TWEAKR AK-1 Antikörper in PBS (c = 12.87 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.29 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 1.3

Beispiel 83E

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F83 5.0 mg Trastuzumab Antikörper in PBS (c = 13.50 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.91 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.1

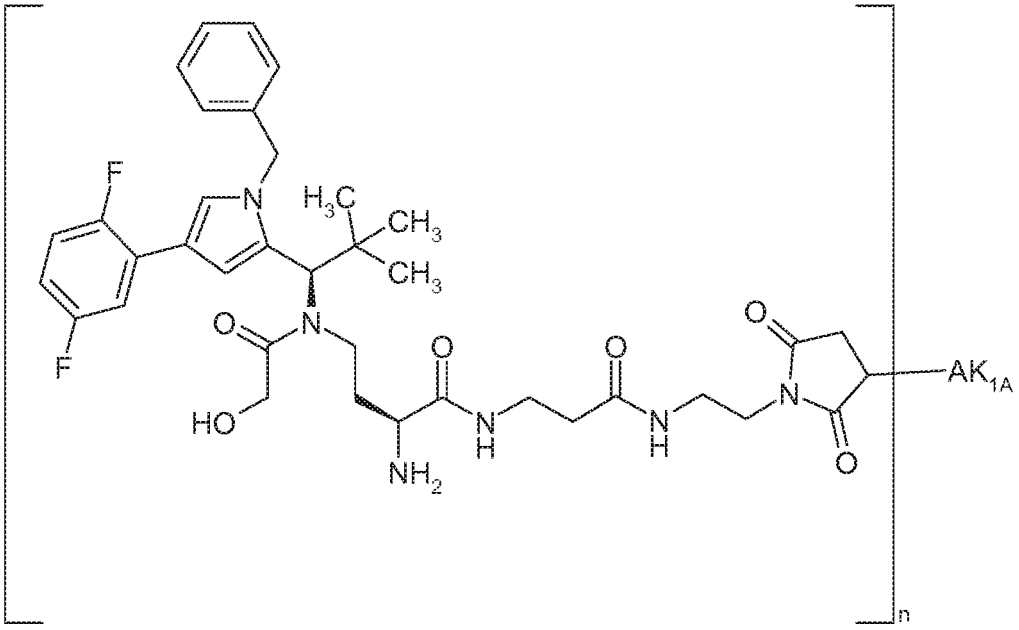
Beispiel 83H

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F83 5.0 mg Panitumumab in PBS (c = 10 mg/mL). Die Reduktionszeit mit TCEP wurde auf 4 h erhöht und die Rührzeit bei der ADC Kupplung auf 20 h erhöht. Anschließend wurde der Ansatz nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.57 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 0.9

Beispiel 84A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F84 5 mg Cetuximab in PBS (c=11.02 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.94 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.9

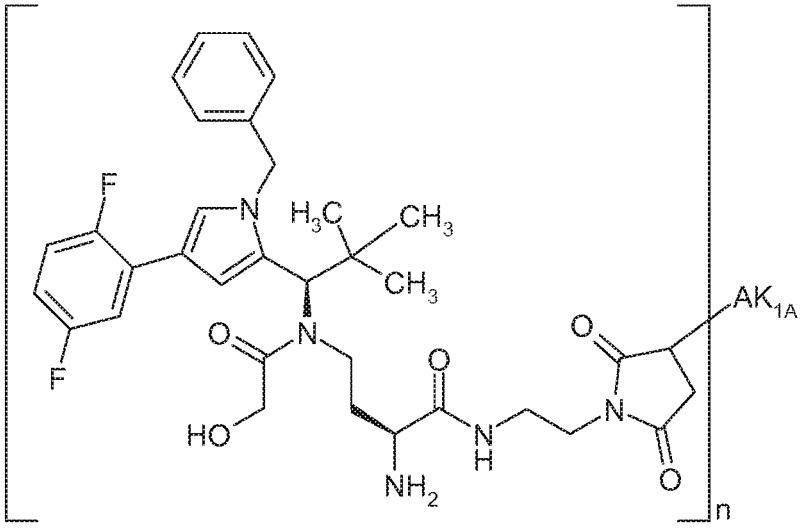
Beispiel 84B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F84 5 mg anti-TWEAKR AK-1 in PBS (c=12.9 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.77 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.0

Beispiel 85A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F85 5 mg Cetuximab in PBS (c=11.02 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 2.13 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.4

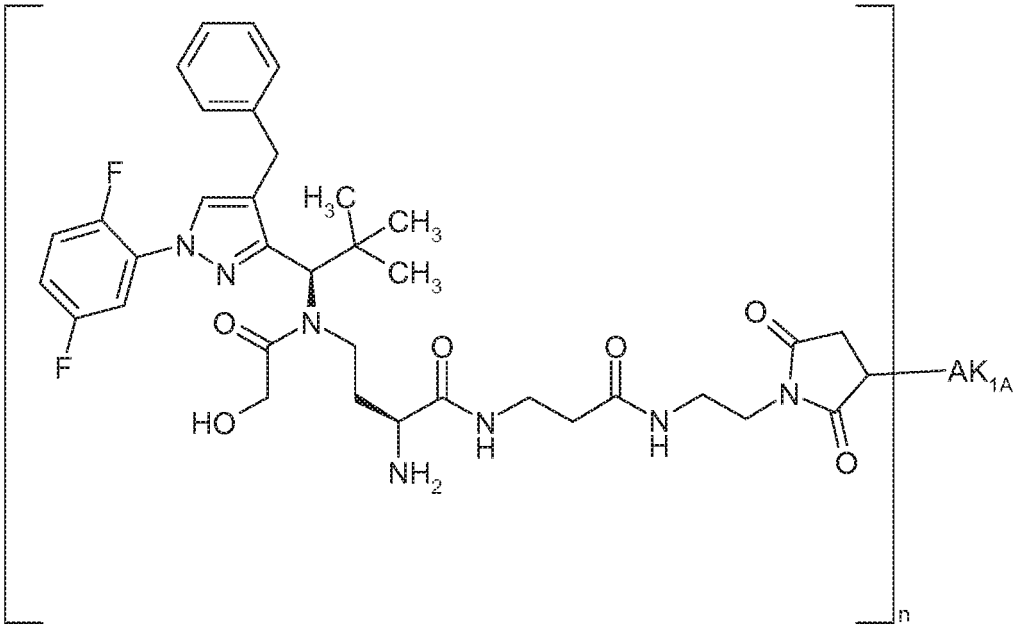
Beispiel 85B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F85 5 mg anti-TWEAKR AK-1 in PBS (c=12.9 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.63 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.2

Beispiel 86A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F86 5 mg Cetuximab in PBS (c=11.59 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.96 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.2

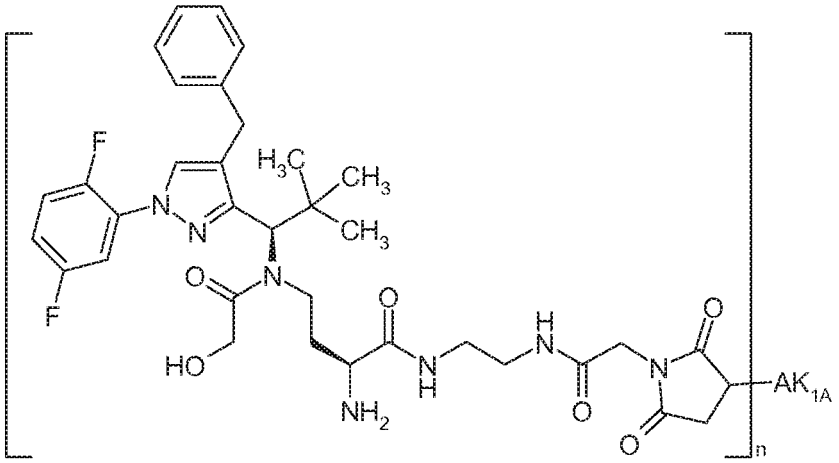
Beispiel 86B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F86 5 mg anti-TWEAKR AK-1 in PBS (c=12.9 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 2.55 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.8

Beispiel 87A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F87 5 mg Cetuximab in PBS (c=8.95 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 2.08 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.5

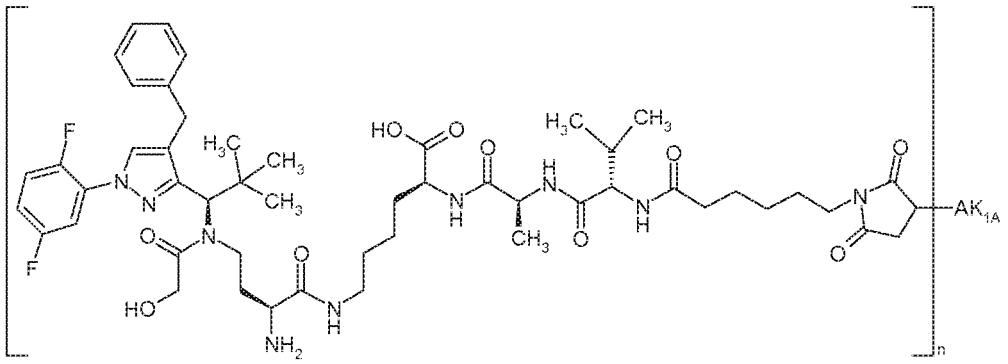
Beispiel 87B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F87 5 mg anti-TWEAKR AK-1 in PBS (c=12.9 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.93 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.2

Beispiel 88A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F88 5 mg Cetuximab in PBS (c=11.02 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS.

Protein Konzentration: 2.03 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.1

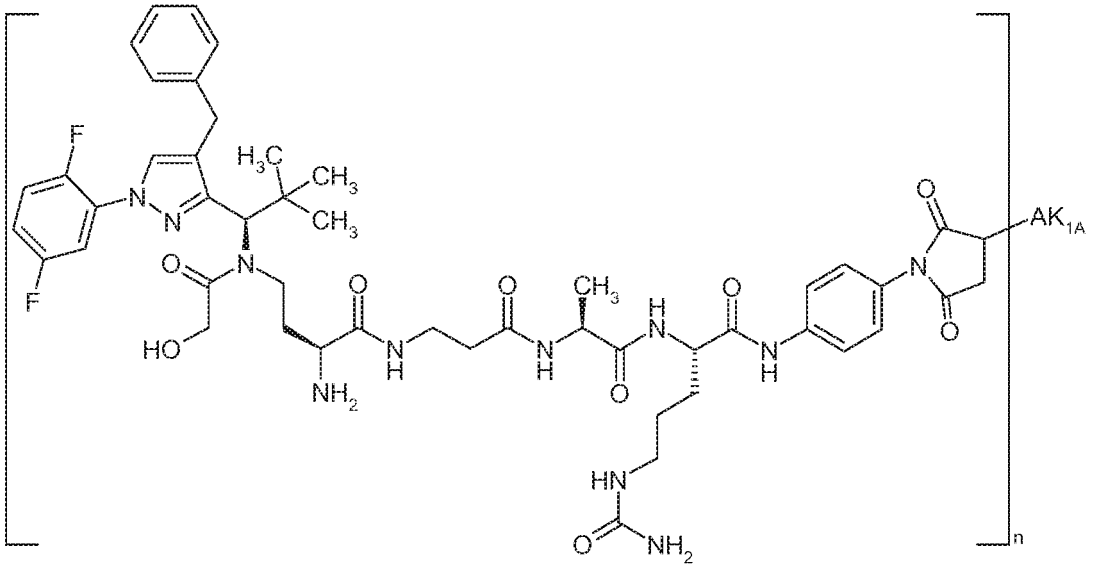
Beispiel 88B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F88 5 mg anti-TWEAKR AK-1 in PBS (c=12.9 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS.

Protein Konzentration: 1.9 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.3

Beispiel 89A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F89 5 mg Cetuximab in PBS (c=11.02 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 2.2 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.3

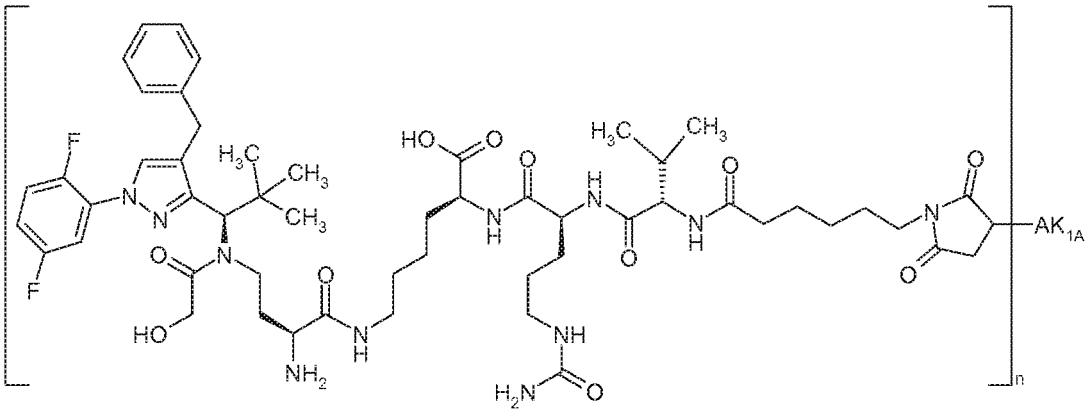
Beispiel 89B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F89 5 mg anti-TWEAKR AK-1 in PBS (c=12.9 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 2.03 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.4

Beispiel 90A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F90 5 mg Cetuximab in PBS (c=13.33 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt.

Protein Konzentration: 2.19 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.0

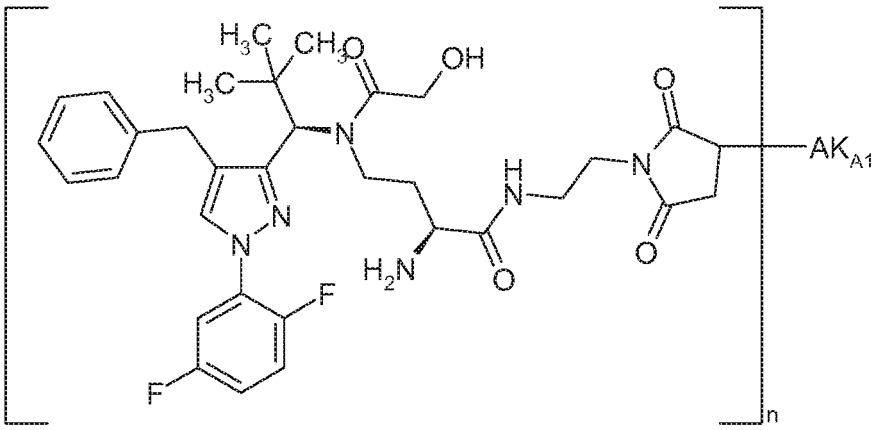
Beispiel 90B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F90 5 mg anti-TWEAKR AK-1 in PBS (c=12.9 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS.

Protein Konzentration: 1.97 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.9

Beispiel 91A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F91 80 mg Cetuximab in PBS (c=5.9 mg/ml) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert, rückverdünnt mit PBS und erneut aufkonzentriert. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 12.75 mg/ml

Drug/mAb Ratio: 3.7

Beispiel 91B

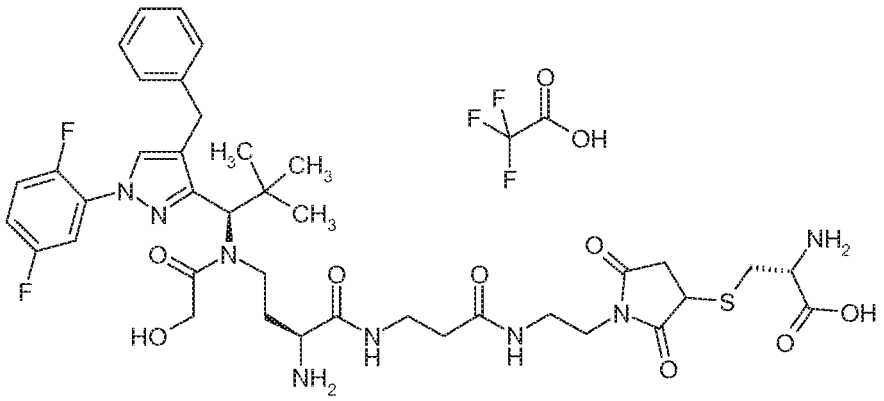
Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F91 5 mg anti-TWEAKR AK-1 in PBS (c=12.9 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 5.71 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 4.0

Beispiel 92

S-(1-{2-[(N-{(2S)-2-Amino-4-[{(1R)-1-[4-benzyl-1-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrazol-3-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}-beta-alanyl)amino]ethyl}-2,5-dioxopyrrolidin-3-yl)-L-cystein-trifluoressigsäure(1:1)

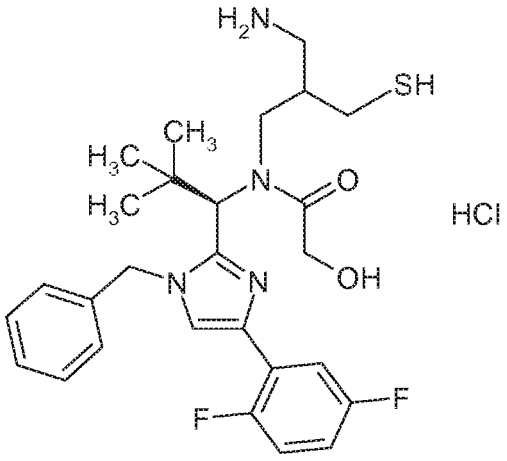


3 mg (4 µmol) von Intermediat F86 wurden in 3 ml DCM/Wasser 10:1 aufgenommen und mit 1.3 mg (11 µmol) L-Cystein versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 10 min bei RT gerührt, anschließend im Vakuum eingeengt und dann mittels präparativer HPLC gereinigt.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.77 min; MS (EIpos): m/z = 829 $[M+H]^+$.

Beispiel 93

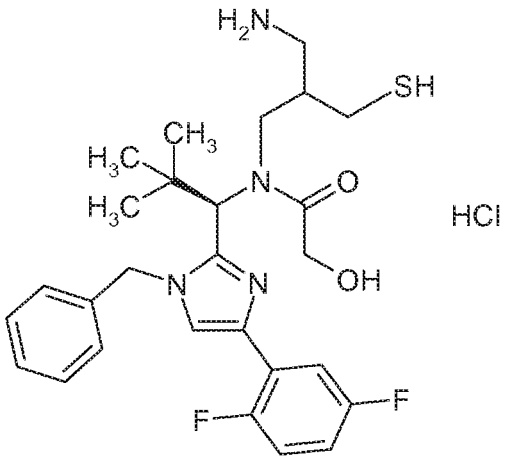
N-[3-Amino-2-(sulfanylmethyl)propyl]-N-{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-2-hydroxyacetamidhydrochlorid(1:1) (Isomer1)



Die Verbindung wurde gemäß Intermediat C32 (Isomer 1) erhalten.

Beispiel 94

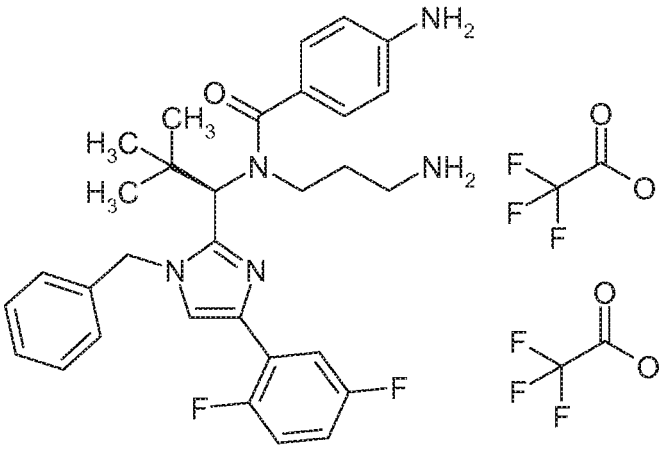
Intermediat C33 (Isomer 2) N-[3-Amino-2-(sulfanylmethyl)propyl]-N-{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-2-hydroxyacetamidhydrochlorid(1:1) (Isomer2)



Die Verbindung wurde gemäß Intermediat C33 (Isomer 2) erhalten.

Beispiel 95

Trifluoressigsäure--4-amino-N-(3-aminopropyl)-N-{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}benzamid(2:1)

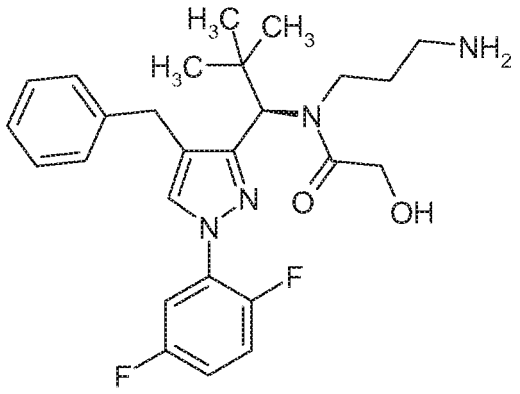


Die Titelverbindung wurde aus tert-Butyl-{3-[(4-aminobenzoyl){(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}amino]propyl}carbamat durch Entschützung mit Trifluoressigsäure hergestellt.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.93 min; MS (EIpos): m/z = 532 $[M+H]^+$.

Beispiel 96

N-(3-Aminopropyl)-N-{(1R)-1-[4-benzyl-1-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrazol-3-yl]-2,2-dimethylpropyl}-2-hydroxyacetamid

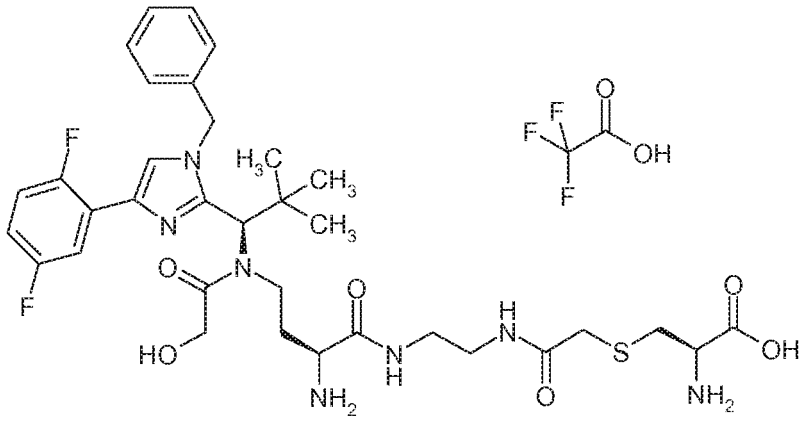


101 mg (0.16 mmol) 2-({(1R)-1-[4-Benzyl-1-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrazol-3-yl]-2,2-dimethylpropyl}[3-(1,3-dioxo-1,3-dihydro-2H-isoindol-2-yl)propyl]amino)-2-oxoethylacetat wurden in 2 ml absolutem Ethanol vorgelegt und mit 244 mg (3.14 mmol, 225 µl) einer 40%-igen Lösung von Methylamin in Wasser versetzt. Es wurde 1 h bei 50°C gerührt und anschließend erneut 244 mg (3.14 mmol, 225 µl) einer 40%-igen Lösung von Methylamin in Wasser zugesetzt und nach insgesamt 3.5 h direkt mittels präparativer HPLC (Eluent: ACN/Wasser + 1.0% NEt_3, Gradient) gereinigt. Es wurden 52 mg (70% d. Th.) der Zielverbindung erhalten.

LC-MS (Methode 3): R_t = 2.56 min; MS (EIpos): m/z = 471 $[M+H]^+$.

Beispiel 97

S-(2-{[2-({(2S)-2-Amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}amino)ethyl]amino}-2-oxoethyl)-L-cystein-trifluoressigsäure(1:1)

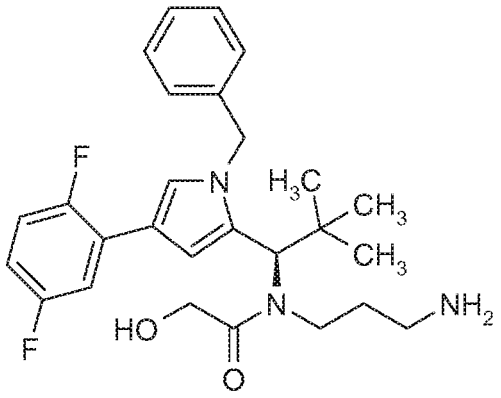


3 mg (4 µmol) von Intermediat F33 wurden in 2 mL DMF und 200 µl Wasser aufgenommen und mit 1.4 mg (12 µmol) L-Cystein versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 1 h bei RT gerührt. Anschließend wurde der Ansatz im Vakuum eingeengt und das Produkt mittels präparativer HPLC gereinigt.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.81 min; MS (ESIpos): m/z = 718 $(M+H)^+$.

Beispiel 98

N-(3-Aminopropyl)-N-{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-2-hydroxyacetamid



150.0 mg (0.42 mmol) (1R)-1-[1-Benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropan-1-amin (Intermediat C52) wurden in 2.0 mL Dichlormethan vorgelegt und mit 29.2 mg (0.49 mmol) HOAc und 125.6 mg (0.59 mmol) Natriumtriacetoxyborhydrid versetzt und 5 min bei RT gerührt. Es wurden 98.9 mg (0.49 mmol) 3-(1,3-Dioxo-1,3-dihydro-2H-isoindol-2-yl)propanal zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei RT gerührt. Die Reaktionsmischung wurde mit Ethylacetat verdünnt und die organische Phase zweimal mit ges. Natriumcarbonat-Lösung und einmal mit ges. NaCl-Lösung gewaschen. Nach der Trocknung über Magnesiumsulfat wurde das Lösemittel im Vakuum verdampft und der Rückstand mittels Kieselgel (Laufmittel: Dichlormethan/Methanol 100:1) gereinigt. Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 188.6 mg (74 %) der Verbindung 2-[3-({(1R)-1-[1-Benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}amino)propyl]-1H-isoindol-1,3(2H)-dion.

LC-MS (Methode 1): R_t = 1.00 min; MS (ESIpos): m/z = 541 $[M+H]^+$.

171.2 mg (0.32 mmol) 2-[3-({(1R)-1-[1-Benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}amino)propyl]-1H-isoindol-1,3(2H)-dion wurden in 5.0 mL Dichlormethan vorgelegt und mit 73.6 mg (0.73 mmol) Triethylamin versetzt. Bei 0 °C wurden 94.9 mg (0.70 mmol) Acetoxyessigsäurechlorid zugegeben und die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei RT gerührt. Die Reaktionsmischung wurde mit Ethylacetat verdünnt und die organische Phase zweimal mit ges.

Natriumhydrogencarbonat-Lösung und einmal mit ges. NaCl-Lösung gewaschen. Nach der Trocknung über Magnesiumsulfat wurde das Lösemittel im Vakuum verdampft und der Rückstand wurde mittels Biotage Isolera gereinigt (Kieselgel, Säule 10 g SNAP, Fluss 12 mL/min, Ethylacetat/Cyclohexan 1:3) gereinigt. Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 159.0 mg (77 %) der Verbindung 2-({(1R)-1-[1-Benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}[3-(1,3-dioxo-1,3-dihydro-2H-isoindol-2-yl)propyl]amino)-2-oxoethylacetat.

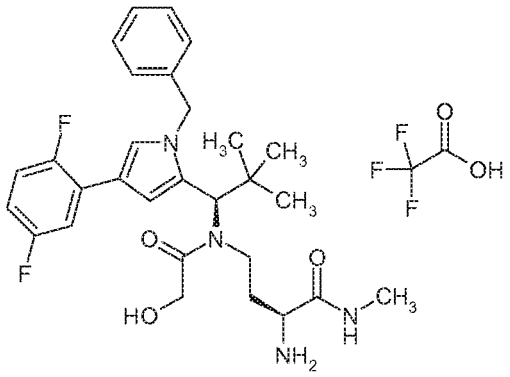
LC-MS (Methode 1): R_t = 1.35 min; MS (ESIpos): m/z = 642 $[M+H]^+$.

147.2 mg (0.23 mmol) 2-({(1R)-1-[1-Benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}[3-(1,3-dioxo-1,3-dihydro-2H-isoindol-2-yl)propyl]amino)-2-oxoethylacetat wurden in 4.0 mL Ethanol vorgelegt und mit 356.2 mg (4.59 mmol) Methanamin (40 % in Wasser) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei 50 °C gerührt. Das Lösemittel wurde im Vakuum verdampft und der Rückstand dreimal mit Toluol kodestilliert. Der Rückstand wurde mittels Kieselgel (Laufmittel: Dichlormethan/Methanol 10:1) gereinigt. Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 67.4 mg (63 %) der Titelverbindung.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.91 min; MS (ESIpos): m/z = 470 $[M+H]^+$.

Beispiel 99

Trifluoressigsäure--(2S)-2-amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]-N-methylbutanamid(1:1)



Zunächst wurde Intermediat C52 mit Benzyl-(2S)-2-{[(benzyloxy)carbonyl]amino}-4-oxobutanoat in Analogie zu Intermediat C2 reduktiv alkyliert. Anschließend wurde die sekundäre Aminogruppe mit 2-Chlor-2-oxoethylacetat wie in Intermediat C27 beschrieben acyliert.

190 mg (0.244 mmol) von dieser Zwischenstufe wurden in 7.5 ml Ethanol aufgenommen und mit 0.35 mL einer 40%-igen Methanaminlösung in Wasser versetzt. Der Ansatz wurde 3 h bei 50°C gerührt und

dann wurde nochmals die gleiche Menge Methanamin zugegeben. Nach weiteren 5 h Rühren bei 50°C wurde der Ansatz eingeengt und der Rückstand durch präparative HPLC gereinigt. Es wurden 78 mg (48% d.Th.) dieser Zwischenstufe erhaltenen.

LC-MS (Methode 1): R_t = 1.32 min; MS (Elpos): m/z = 661 $[M+H]^+$.

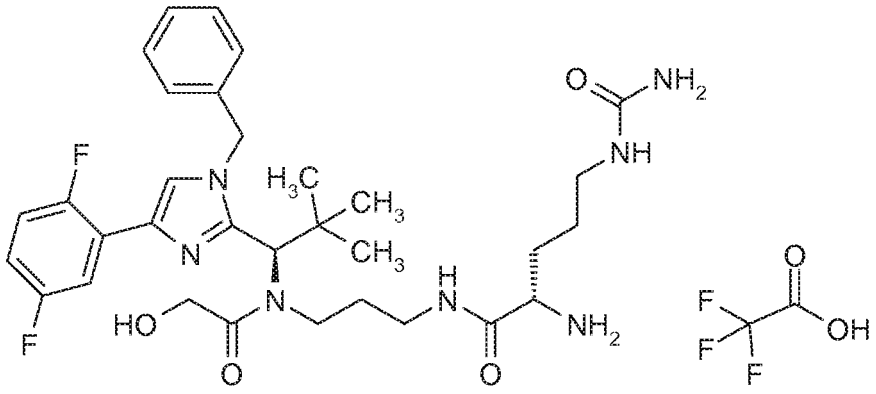
78 mg (0.118 mmol) dieser Zwischenstufe wurden in 8 mL Ethanol gelöst und nach Zugabe von 15 mg 10%-igem Palladium auf Aktivkohle 3 h lang bei RT unter Wasserstoff-Normaldruck hydriert. Der Katalysator wurde danach abfiltriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Produkt durch präparative HPLC gereinigt. Nach Lyophilisation aus Acetonitril/Wasser wurden 33 mg (44% d.Th.) der Titelverbindung erhalten.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.88 min; MS (ESIpos): m/z = 527 $(M+H)^+$.

^{1}H-NMR (500 MHz, DMSO-d_6): δ = 8.1 (m, 1H), 8.0 (m, 3H), 7.9 (m, 1H), 7.65 (m, 1H), 7.5 (s, 1H), 7.15-7.35 (m, 5H) 7.0 (m, 1H), 6.85 (m, 1H), 5.6 (s, 1H), 4.9 und 5.2 (2d, 2H), 4.02 und 4.22 (2d, 2H), 3.2-3.5 (m, 6H), 0.7 und 1.46 (2m, 2H), 0.8 (s, 9H).

Beispiel 100

Trifluoressigsäure--N-{3-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]propyl}-N5-carbamoyl-L-ornithinamid(1:1)



100.0 mg (0.21 mol) N-(3-Aminopropyl)-N-{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-2-hydroxyacetamid (Intermediat C40) und 109.8 mg (0.28 mmol) N5-Carbamoyl-N2-[(9H-fluoren-9-ylmethoxy)carbonyl]-L-ornithin wurden in 5.0 mL Acetonitril vorgelegt und mit 137.3 mg (1.06 mmol) N,N-Diisopropylethylamin und 175.8 mg (0.28 mmol) T3P versetzt. Die Reaktionsmischung rührte bei RT über Nacht. Die Reaktionsmischung wurde zwischen ges. Ammoniumchlorid -Lösung und Ethylacetat verteilt. Die organische Phase wurde zweimal mit Wasser

und einmal mit ges. NaCl-Lösung gewaschen. Nach der Trocknung über Magnesiumsulfat wurde das Lösemittel im Vakuum verdampft. Der Rückstand wurde mittles präp. RP-HPLC gereinigt (Säule: Reprosil 250x30; 10µ, Fluss: 50 mL/min, MeCN/Wasser). Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 118.9 mg (66 %) der Verbindung N-{3-[{(1R)-1-[1-Benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]propyl}-N5-carbamoyl-N2-[(9H-fluoren-9-ylmethoxy)carbonyl]-L-ornithinamid.

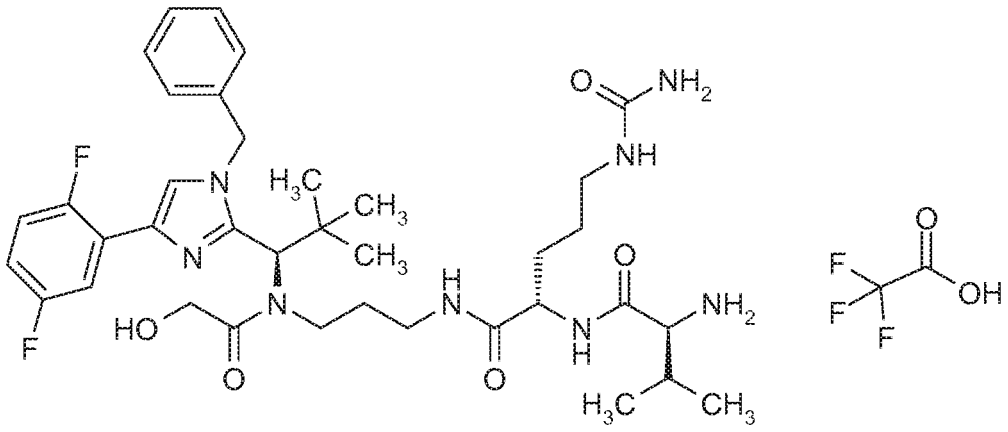
LC-MS (Methode 1): R_t = 1.31 min; MS (ESIpos): m/z = 850 $[M+H]^+$.

97.3 mg (0.11 mmol) N-{3-[{(1R)-1-[1-Benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]propyl}-N5-carbamoyl-N2-[(9H-fluoren-9-ylmethoxy)carbonyl]-L-ornithinamid wurden in 4.0 mL DMF vorgelegt und mit 194.9 mg (2.29 mmol) Piperidin versetzt. Die Reaktionsmischung rührte 2 h bei RT und wurde dann mit HOAc neutralisiert. Die Reaktionsmischung wurde direkt mittles präp. RP-HPLC gereinigt (Säule: Reprosil 250x30; 10µ, Fluss: 50 mL/min, MeCN/Wasser, 0.1 % TFA). Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 101.4 mg der Titelverbindung.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.87 min; MS (ESIpos): m/z = 628 $[M+H]^+$.

Beispiel 101

Trifluoressigsäure--L-valyl-N-{3-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]propyl}-N5-carbamoyl-L-ornithinamid(1:1)



96.2 mg (0.13 mmol) Trifluoressigsäure--N-{3-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]propyl}-N5-carbamoyl-L-ornithinamid(1:1) (Beispiel 100) und 40.8 mg (0.13 mmol) 2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl-N-(tert-butoxycarbonyl)-L-valinat wurden in 2.0 mL

DMF vorgelegt und mit 39.4 mg (0.39 mmol) 4-Methylmorpholin versetzt. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei RT gerührt. Es wurden nochmals 59.1 mg (0.59 mmol) 4-Methylmorpholin zugesetzt und über Nacht bei RT gerührt. Die Reaktionsmischung wurde zwischen Ethylacetat und ges. Ammoniumchlorid-Lösung verteilt. Die organische Phase wurde einmal mit ges. NaCl-Lösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösemittel wurde im Vakuum verdampft und der Rückstand wurde mittles präp. RP-HPLC gereinigt (Säule: Reprosil 250x30; 10µ, Fluss: 50 mL/min, MeCN/Wasser). Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 74.1 mg (69 %) der Verbindung N-(tert-Butoxycarbonyl)-L-valyl-N-{3-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]propyl}-N5-carbamoyl-L-ornithinamid.

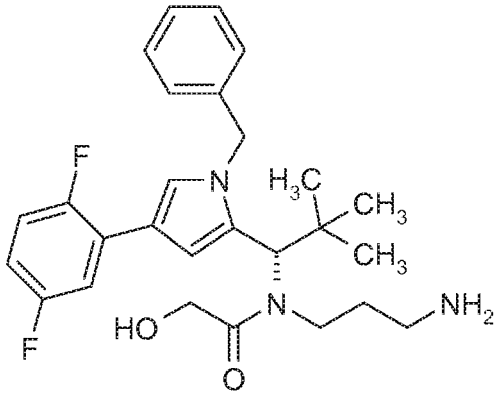
LC-MS (Methode 1): R_t = 1.27 min; MS (ESIpos): m/z = 827 $[M+H]^+$.

68.1 mg (0.08 mmol) N-(tert-Butoxycarbonyl)-L-valyl-N-{3-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]propyl}-N5-carbamoyl-L-ornithinamid wurden in 4.0 mL Dichlormethan gelöst und mit 187.8 mg (1.65 mmol) TFA versetzt. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei RT gerührt, nochmals mit 187.8 mg (1.65 mmol) TFA versetzt und wieder über Nacht bei RT gerührt. Das Lösemittel wurde im Vakuum verdampft und der Rückstand wurde mittles präp. RP-HPLC gereinigt (Säule: Reprosil 250x30; 10µ, Fluss: 50 mL/min, MeCN/Wasser, 0.1 % TFA). Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 67.2 mg (97%) der Titelverbindung.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.97 min; MS (ESIpos): m/z = 727 $[M+H]^+$.

Beispiel 102

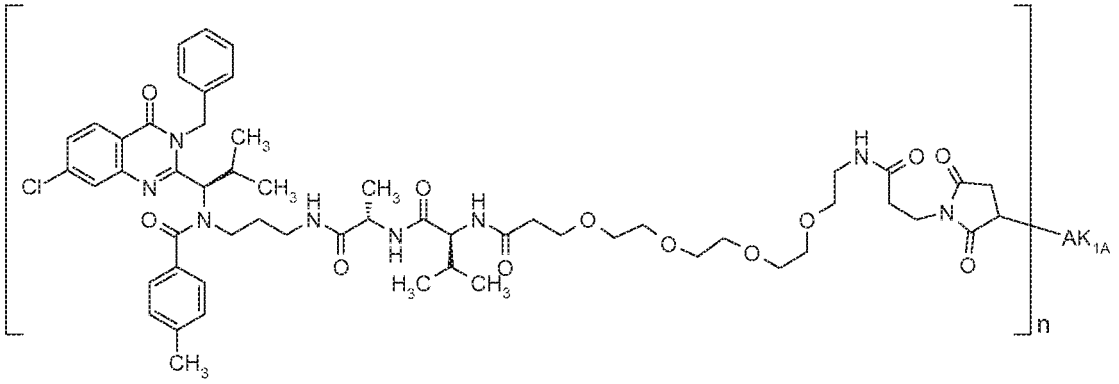
N-(3-Aminopropyl)-N-{(1S)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-2-hydroxyacetamid



Die Synthese erfolgte in Analogie zur Synthese der Verbindung Beispiel 98 unter Verwendung der entsprechenden S-Isomer Intermediate.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.92 min; MS (ESIpos): m/z = 470 $[M+H]^+$.

Beispiel 103A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F103 5.0 mg Cetuximab in PBS (c = 15.33 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 0.9 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.2

Beispiel 103B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F103 5 mg anti-TWEAKR AK-1 in PBS (c=12.9 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 0.95 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.0

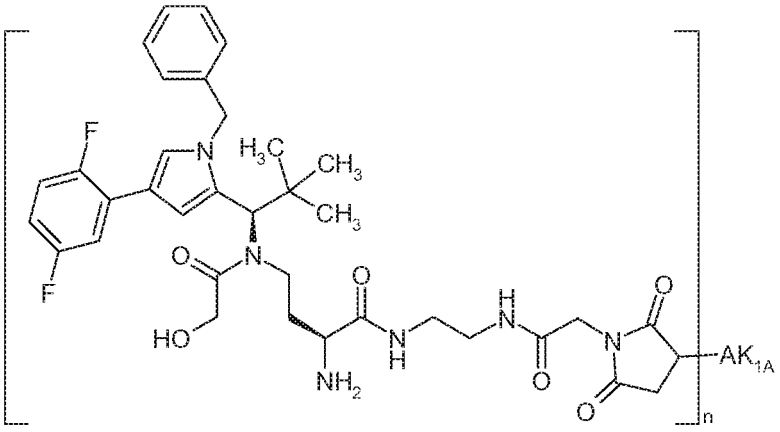
Beispiel 103E

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F103 5.0 mg Trastuzumab Antikörper in PBS (c = 8.23 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 2.05 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.7

Beispiel 104A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F104 5 mg Cetuximab in PBS (c=15.33 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.95 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.7

Beispiel 104B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F104 35 mg anti-TWEAKR AK-1 in PBS (c=12.9 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert, rückverdünnt mit PBS und erneut aufkonzentriert. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 10.93 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.2

Beispiel 104E

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F104 5.0 mg Trastuzumab Antikörper in PBS (c = 8.23 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation

aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 2.11 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.8

Beispiel 104I

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F104 5.0 mg Nimotuzumab in PBS (c = 13.1 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.89 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.5

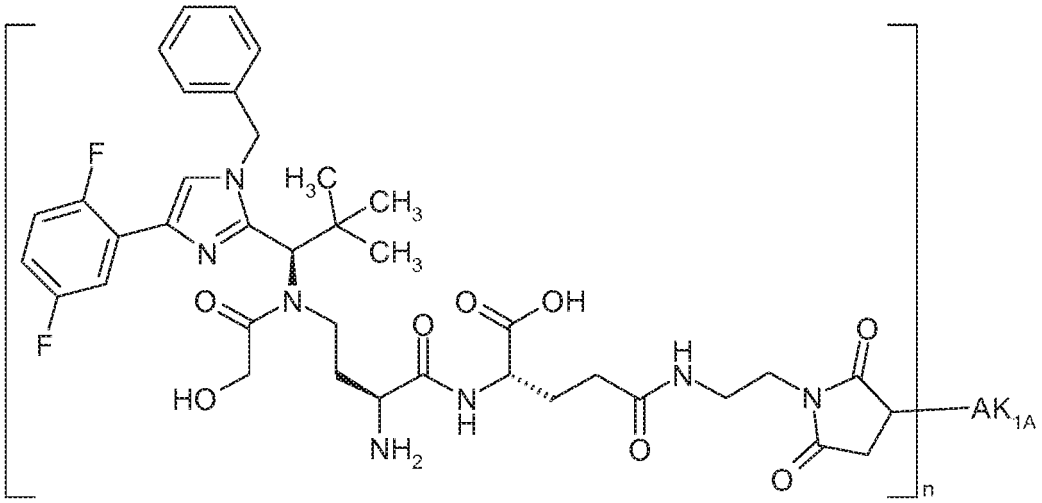
Beispiel 104H

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F104 5.0 mg Panitumumab in PBS (c = 12 mg/mL). Die Reduktionszeit mit TCEP wurde auf 4 h erhöht und die Rührzeit bei der ADC Kupplung auf 20 h erhöht. Anschließend wurde der Ansatz nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.79 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.2

Beispiel 105A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F105 5 mg Cetuximab in PBS (c=5.9 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.83 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.7

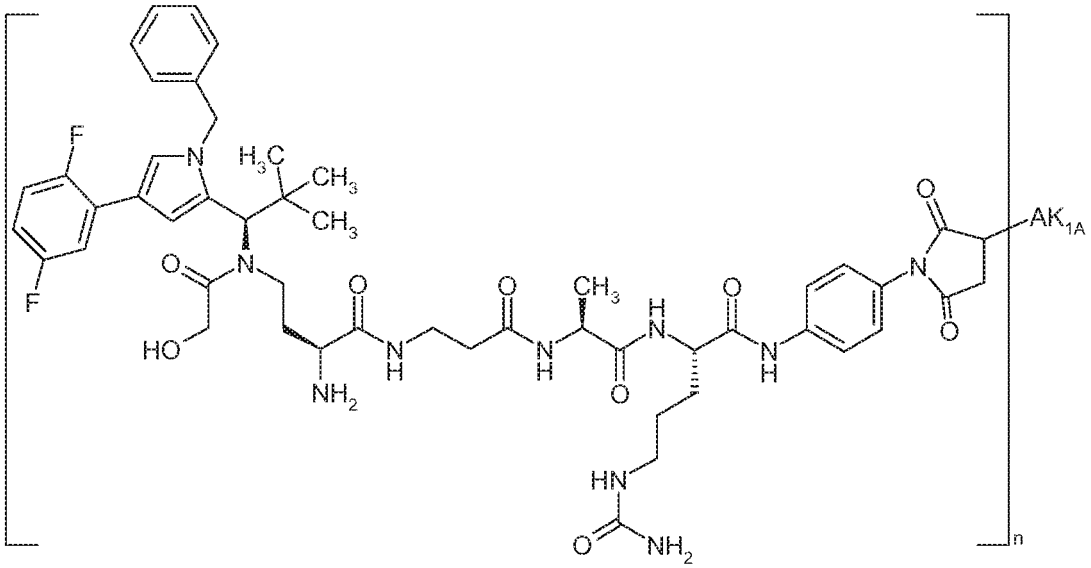
Beispiel 105B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F105 5 mg anti-TWEAKR AK-1 in PBS (c=12.23 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 2.01 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.6

Beispiel 106A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F106 5 mg Cetuximab in PBS (c=15.33 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.91 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.3

Beispiel 106B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F106 5 mg anti-TWEAKR AK-1 in PBS (c=12.87 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.76 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.0

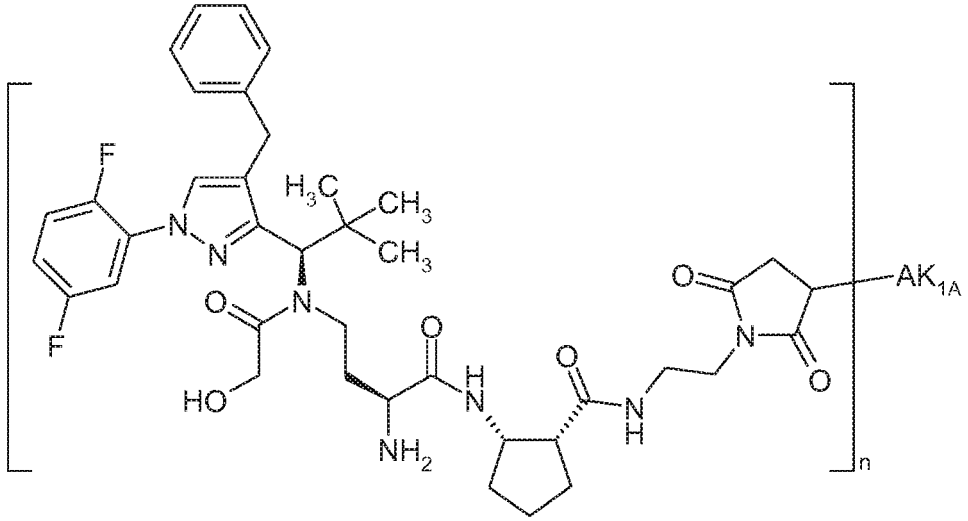
Beispiel 106E

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F106 5 mg Trastuzumab in PBS (c=8.23 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 2.5 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.4

Beispiel 107A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F107 5 mg Cetuximab in PBS (c=12.3 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 2.16 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.3

Beispiel 107B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F107 5 mg anti-TWEAKR AK-1 in PBS (c=12.9 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.9 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.1

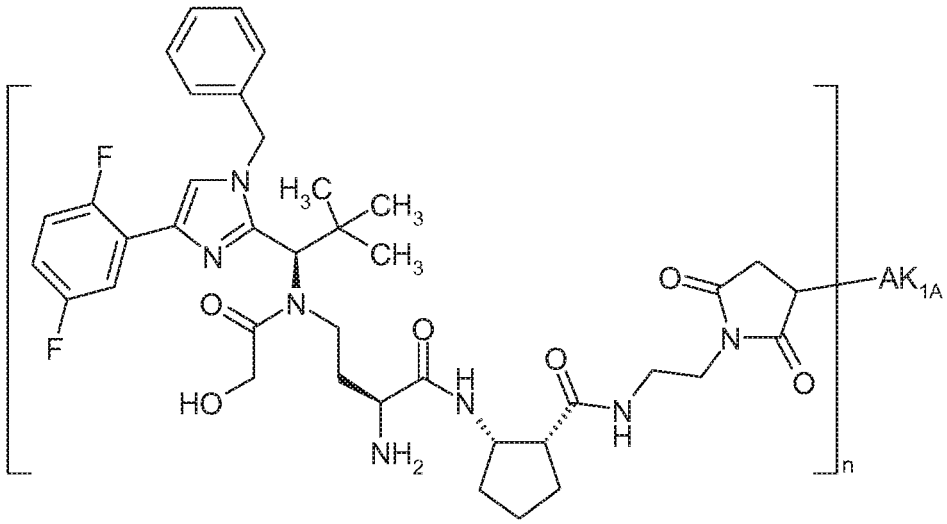
Beispiel 107E

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F107 5 mg Trastuzumab in PBS (c=8.23 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 2.48 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.9

Beispiel 108A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F108 5 mg Cetuximab in PBS (c=15.3 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.98 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.2

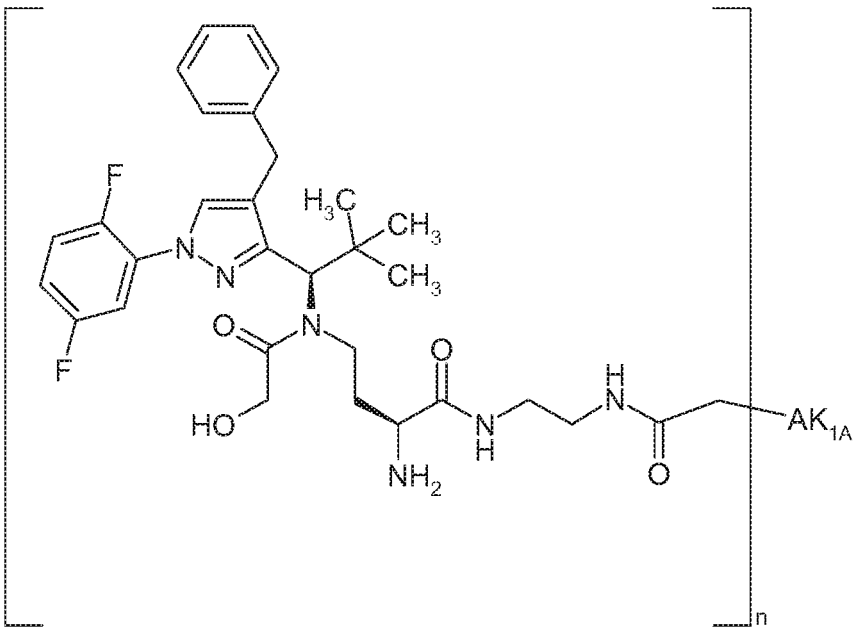
Beispiel 108B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F108 5 mg anti-TWEAKR AK-1 in PBS (c=12.9 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.22 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.1

Beispiel 109A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F109 5 mg Cetuximab in PBS (c=12.33 mg/mL). Die Kupplung mit dem Antikörper wurde nach der TCEP-Reduktion unter Rühren über Nacht durchgeführt bevor die weitere Aufarbeitung mittels Sephadex-Reinigung begann. Der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS.

Protein Konzentration: 2.1 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.1

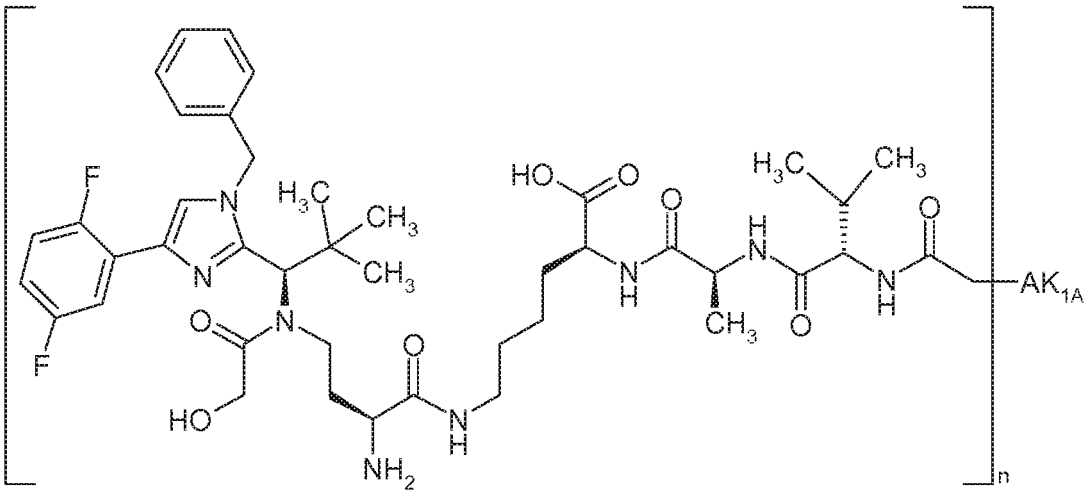
Beispiel 109B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F109 5 mg anti-TWEAKR AK-1 in PBS (c=34.4 mg/mL). Die Kupplung mit dem Antikörper wurde nach der TCEP-Reduktion unter Rühren über Nacht durchgeführt bevor die weitere Aufarbeitung mittels Sephadex-Reinigung begann. Der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS.

Protein Konzentration: 1.63 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.7

Beispiel 110A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F110 5 mg Cetuximab in PBS (c=15.33 mg/mL). Die Kupplung mit dem Antikörper wurde nach der TCEP-Reduktion unter Rühren über Nacht durchgeführt bevor die weitere Aufarbeitung mittels Sephadex-Reinigung begann. Der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS.

Protein Konzentration: 1.86 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.8

Beispiel 110B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F110 5 mg anti-TWEAKR AK-1 in PBS (c=12.9 mg/mL). Die Kupplung mit dem Antikörper wurde nach der TCEP-Reduktion unter Rühren über Nacht durchgeführt bevor die weitere Aufarbeitung mittels Sephadex-Reinigung begann. Der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS.

Protein Konzentration: 1.64 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.7

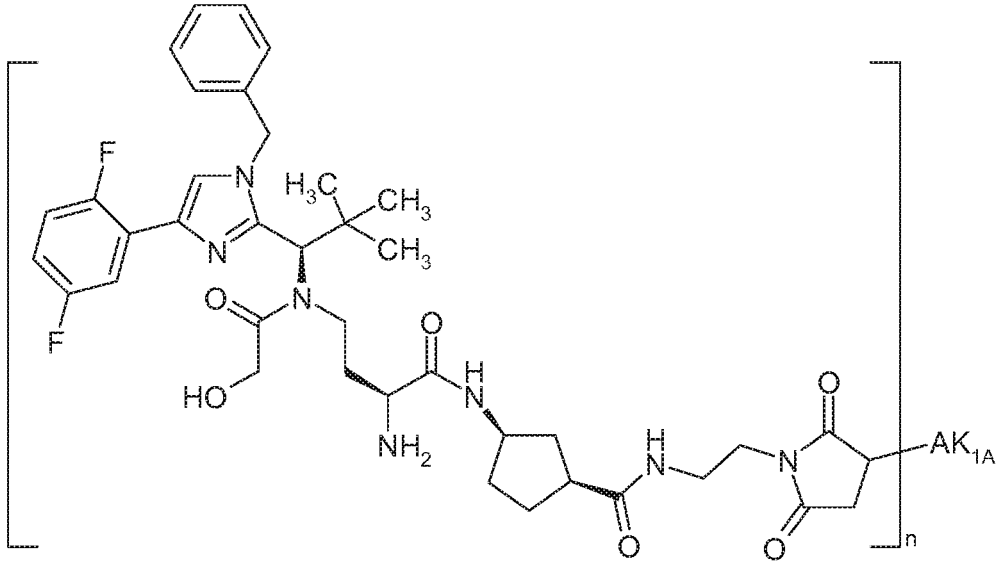
Beispiel 110E

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F110 5 mg Trastuzumab in PBS (c=8.23 mg/mL). Die Kupplung mit dem Antikörper wurde nach der TCEP-Reduktion unter Rühren über Nacht durchgeführt bevor die weitere Aufarbeitung mittels Sephadex-Reinigung begann. Der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS.

Protein Konzentration: 2.23 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.4

Beispiel 111A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F111 5 mg Cetuximab in PBS (c=12.33 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 2.4 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3

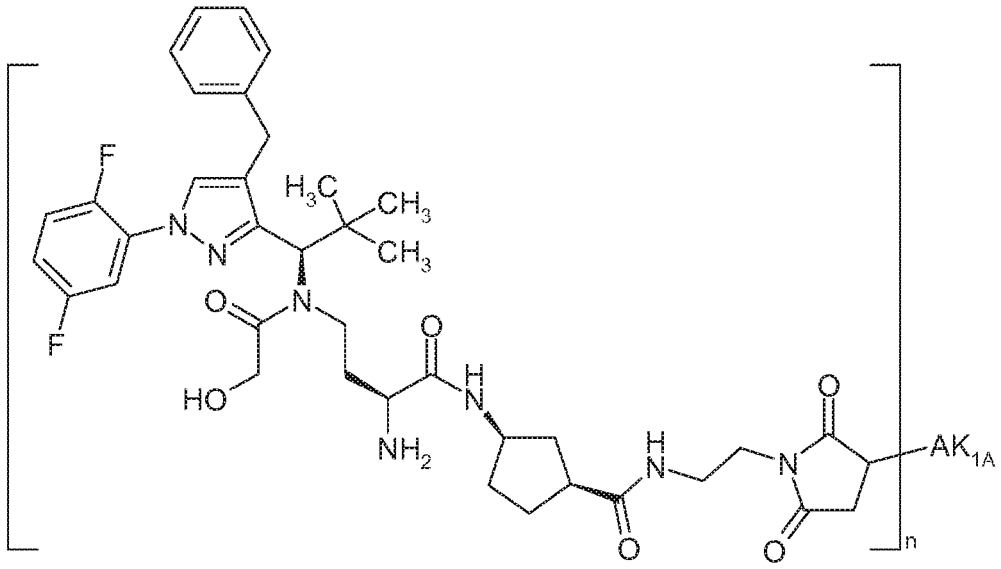
Beispiel 111B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F111 5 mg anti-TWEAKR AK-1 in PBS (c=34.4 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.71 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.5

Beispiel 112A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F112 5 mg Cetuximab in PBS (c=12.33 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 2.2 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3

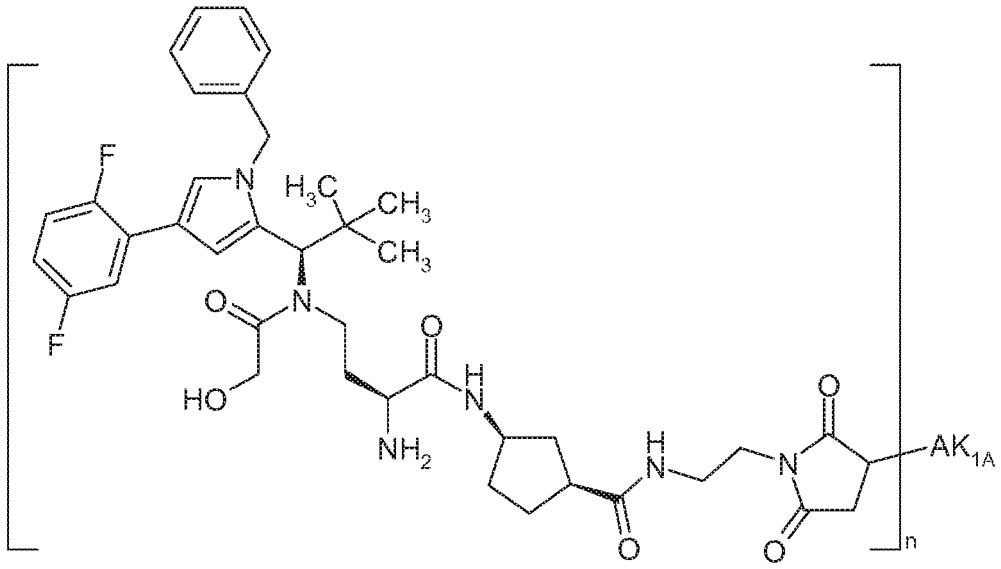
Beispiel 112B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F112 5 mg anti-TWEAKR AK-1 in PBS (c=34.4 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 2.39 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.1

Beispiel 113A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F113 5 mg Cetuximab in PBS (c=12.33 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.95 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.2

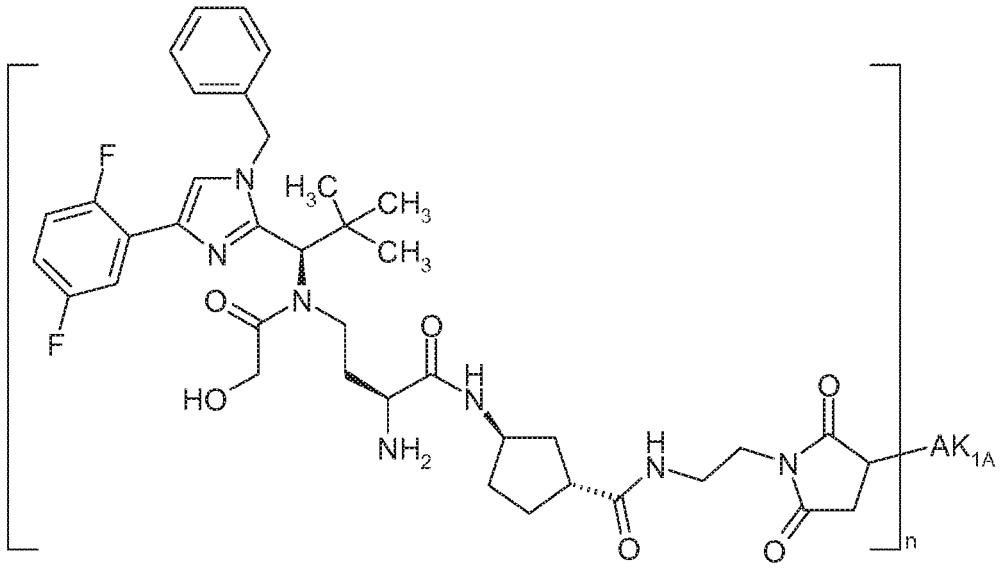
Beispiel 113B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F113 5 mg anti-TWEAKR AK-1 in PBS (c=34.4 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.8 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.2

Beispiel 114A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F114 5 mg Cetuximab in PBS (c=12.33 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 2.07 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.8

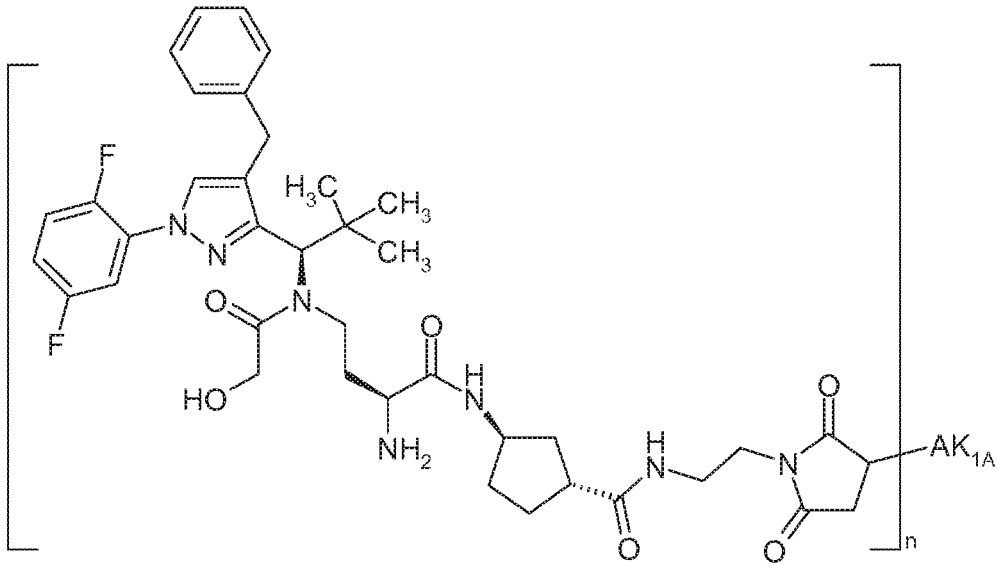
Beispiel 114B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F114 5 mg anti-TWEAKR AK-1 in PBS (c=34.4 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.9 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.4

Beispiel 115A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F115 5 mg Cetuximab in PBS (c=12.33 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 2.18 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.7

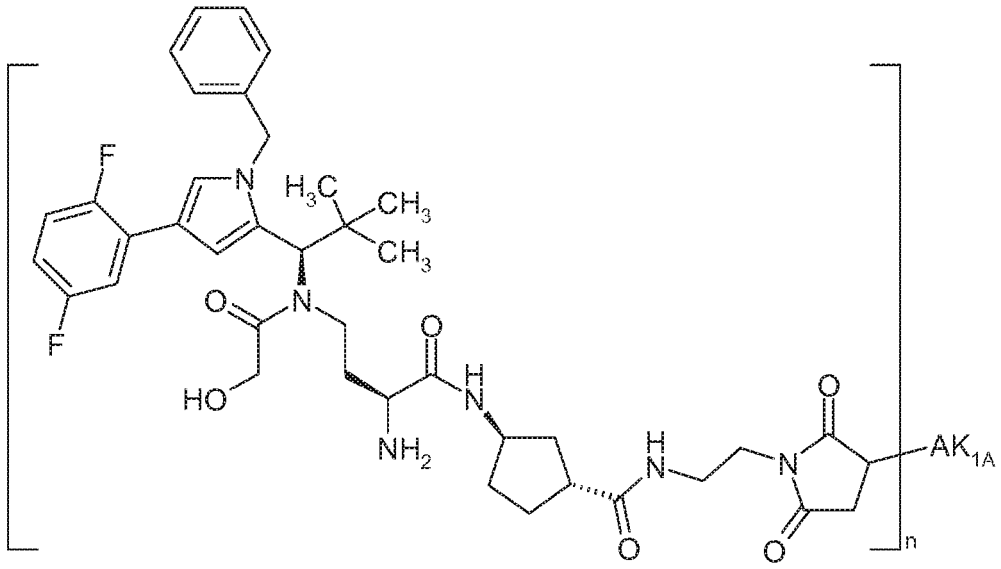
Beispiel 115B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F115 5 mg anti-TWEAKR AK-1 in PBS (c=34.4 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 2.0 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.0

Beispiel 116A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F116 5 mg Cetuximab in PBS (c=12.33 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 2.03 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 4.4

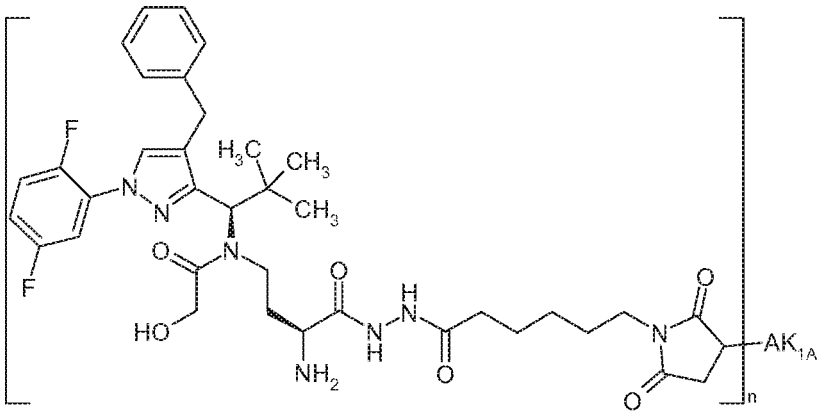
Beispiel 116B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F116 5 mg anti-TWEAKR AK-1 in PBS (c=34.4 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.96 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.9

Beispiel 117A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F117 5 mg Cetuximab in PBS (c=12.33 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS.

Protein Konzentration: 2.02 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.7

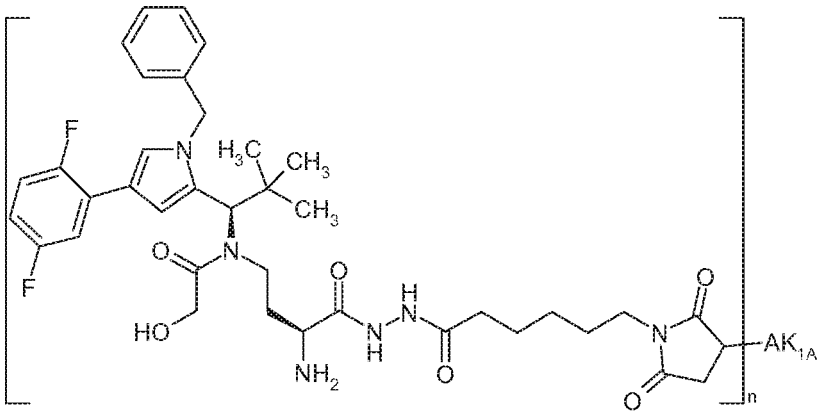
Beispiel 117B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F117 5 mg anti-TWEAKR AK-1 in PBS (c=34.4 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS.

Protein Konzentration: 1.77 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.7

Beispiel 118A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F118 5 mg Cetuximab in PBS (c=26.84 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS.

Protein Konzentration: 2.38 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.6

Beispiel 118B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F118 5 mg anti-TWEAKR AK-1 in PBS (c=12.87 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS.

Protein Konzentration: 1.14 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.9

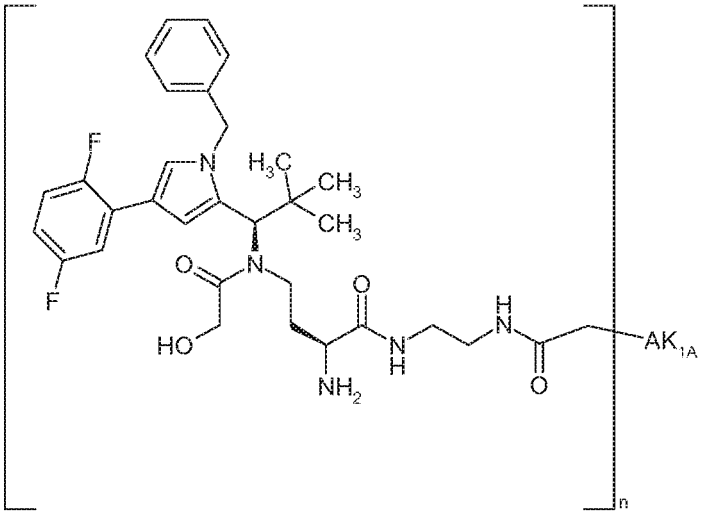
Beispiel 118E

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F118 5 mg Trastuzumab in PBS (c=8.23 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS.

Protein Konzentration: 2.27 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3

Beispiel 119A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F119 5 mg Cetuximab in PBS (c=26.8 mg/mL). Die Kupplung mit dem Antikörper wurde nach der TCEP-Reduktion unter Rühren über Nacht durchgeführt bevor die weitere Aufarbeitung mittels Sephadex-Reinigung begann. Der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS.

Protein Konzentration: 2.14 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.9

Beispiel 119B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F119 5 mg anti-TWEAKR AK-1 in PBS (c=12.87 mg/mL). Die Kupplung mit dem Antikörper wurde nach der TCEP-Reduktion unter Rühren über Nacht durchgeführt bevor die weitere Aufarbeitung mittels Sephadex-Reinigung begann. Der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS.

Protein Konzentration: 0.91 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 4.1

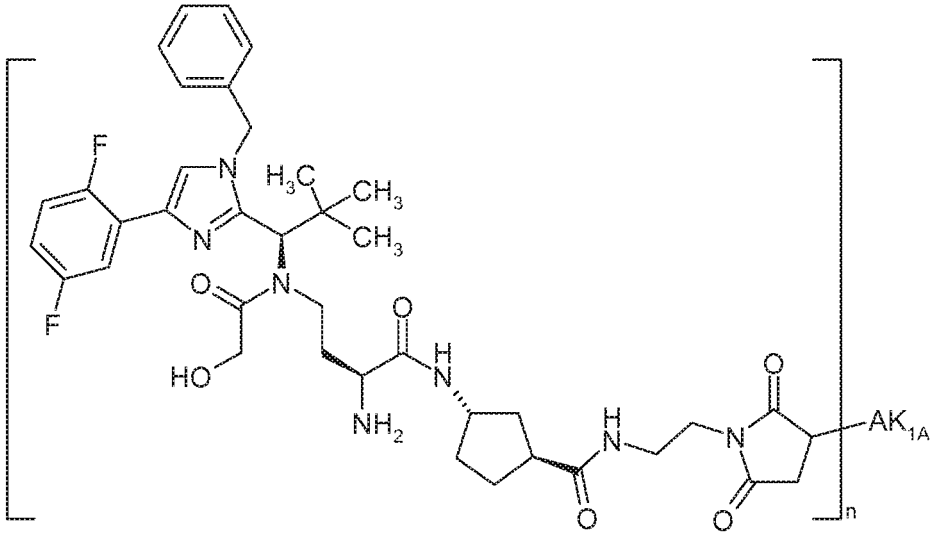
Beispiel 119E

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F119 5 mg Trastuzumab in PBS (c=13.5 mg/mL). Die Kupplung mit dem Antikörper wurde nach der TCEP-Reduktion unter Rühren über Nacht durchgeführt bevor die weitere Aufarbeitung mittels Sephadex-Reinigung begann. Der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS.

Protein Konzentration: 1.69 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 4.4

Beispiel 120A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F120 5 mg Cetuximab in PBS (c=26.84 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.95 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.4

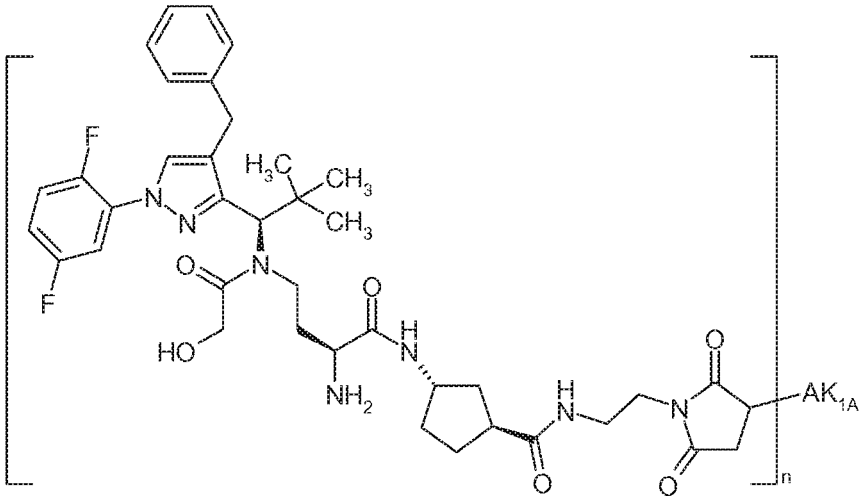
Beispiel 120B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F120 5 mg anti-TWEAKR AK-1 in PBS (c=12.87 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.71 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.3

Beispiel 121A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F121 5 mg Cetuximab in PBS (c=26.84 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 2.1 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.2

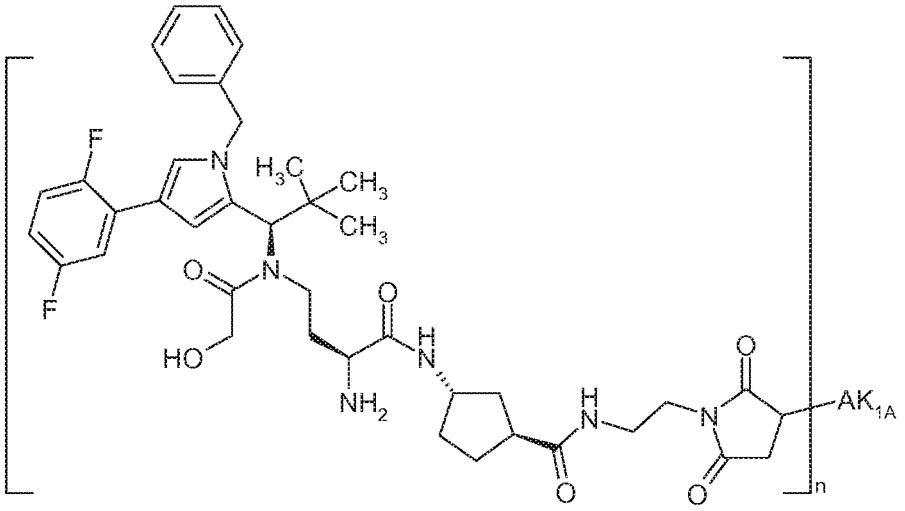
Beispiel 121B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F121 5 mg anti-TWEAKR AK-1 in PBS (c=12.87 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.88 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.4

Beispiel 122A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F122 5 mg Cetuximab in PBS (c=26.84 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.78 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.2

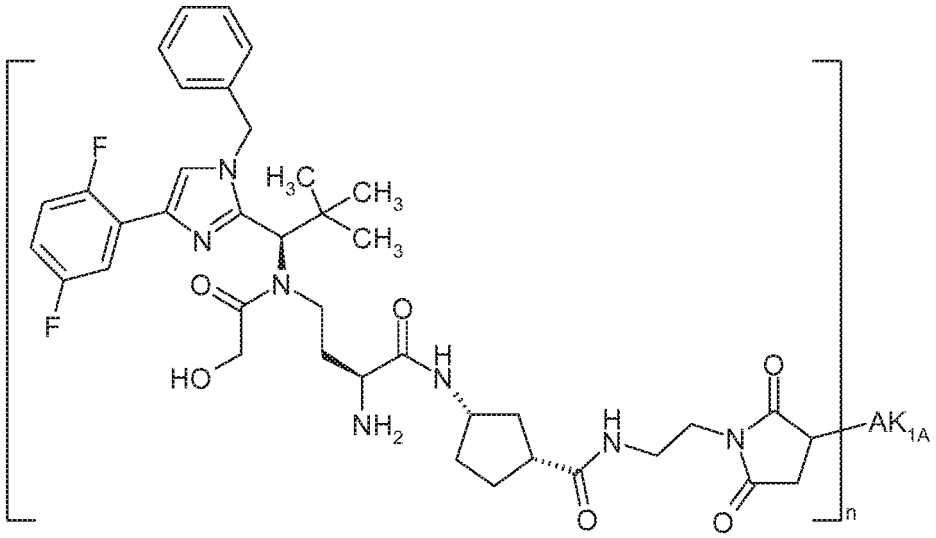
Beispiel 122B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F122 5 mg anti-TWEAKR AK-1 in PBS (c=12.87 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.64 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.4

Beispiel 123A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F123 5 mg Cetuximab in PBS (c=26.84 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS..Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.98 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.9

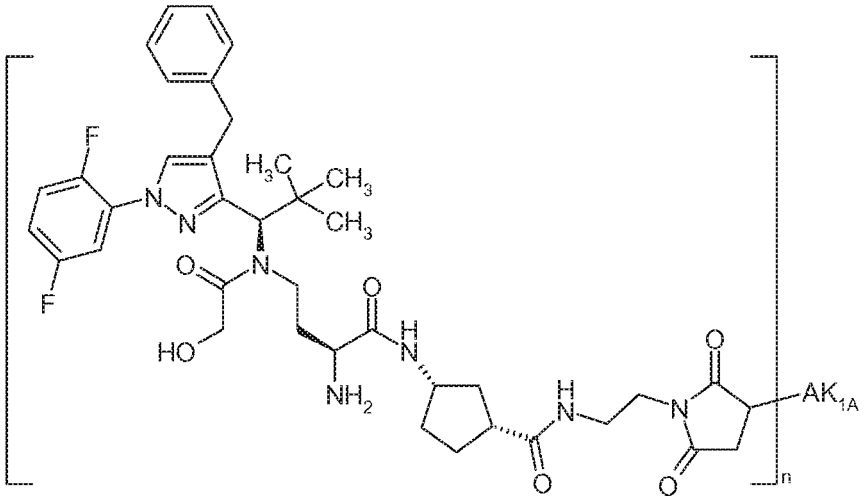
Beispiel 123B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F123 5 mg anti-TWEAKR AK-1 in PBS (c=12.87 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.84 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.0

Beispiel 124A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F124 5 mg Cetuximab in PBS (c=26.84 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.93 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.8

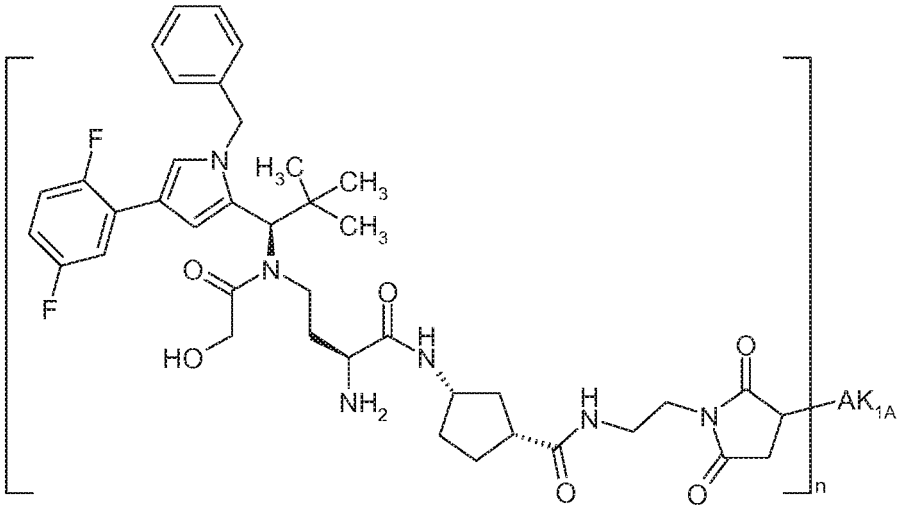
Beispiel 124B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F124 5 mg anti-TWEAKR AK-1 in PBS (c=12.87 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.84 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.0

Beispiel 125A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F125 5 mg Cetuximab in PBS (c=26.84 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 2.14 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.9

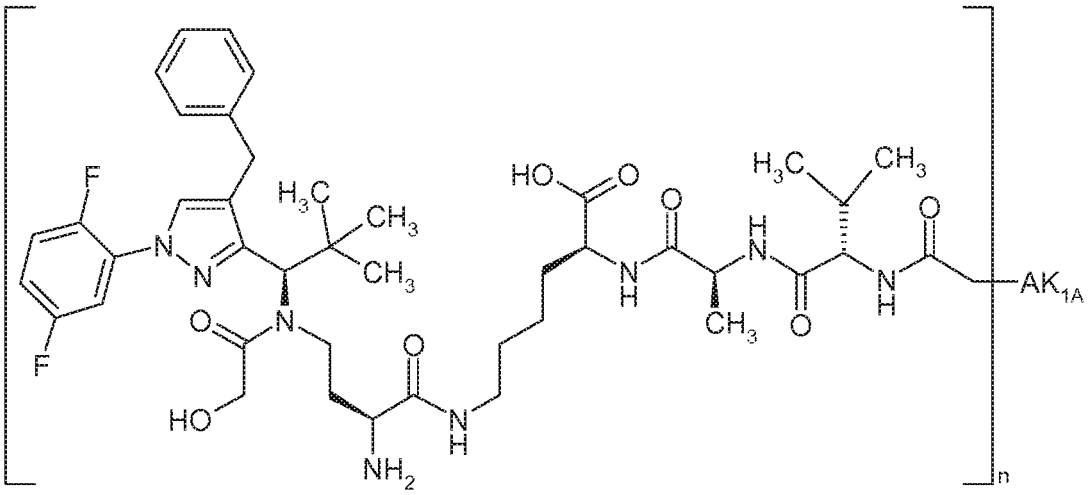
Beispiel 125B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F125 5 mg anti-TWEAKR AK-1 in PBS (c=12.87 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.83 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.3

Beispiel 126A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F126 5 mg Cetuximab in PBS (c=26.84 mg/mL). Die Kupplung mit dem Antikörper wurde nach der TCEP-Reduktion unter Rühren über Nacht durchgeführt bevor die weitere Aufarbeitung mittels Sephadex-Reinigung begann. Der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS.

Protein Konzentration: 1.89 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.5

Beispiel 126B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F126 5 mg anti-TWEAKR AK-1 in PBS (c=12.9 mg/mL). Die Kupplung mit dem Antikörper wurde nach der TCEP-Reduktion unter Rühren über Nacht durchgeführt bevor die weitere Aufarbeitung mittels Sephadex-Reinigung begann. Der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS.

Protein Konzentration: 1.62 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.8

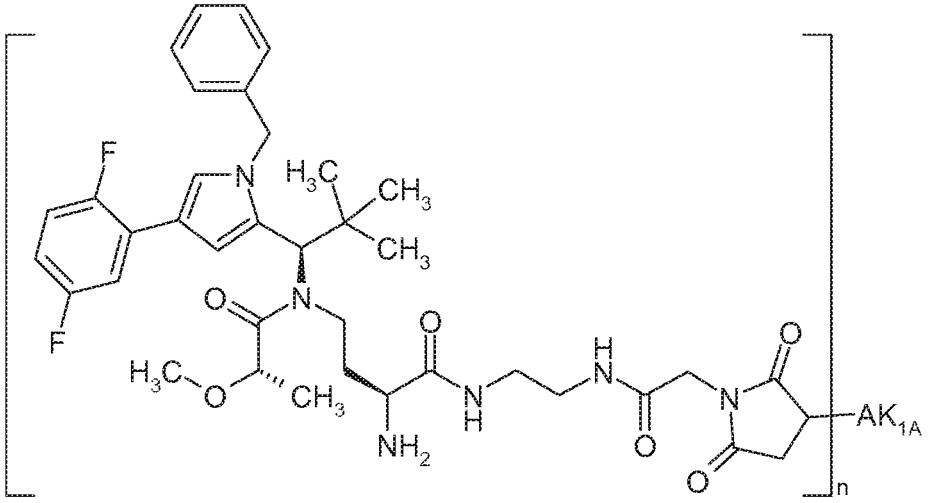
Beispiel 126E

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F126 5 mg Trastuzumab in PBS (c=8.23 mg/mL). Die Kupplung mit dem Antikörper wurde nach der TCEP-Reduktion unter Rühren über Nacht durchgeführt bevor die weitere Aufarbeitung mittels Sephadex-Reinigung begann. Der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS.

Protein Konzentration: 1.93 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 1.9

Beispiel 127A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F127 5 mg Cetuximab in PBS (c=26.84 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.54 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.3

Beispiel 127B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F127 5 mg anti-TWEAKR AK-1 in PBS (c=12.9 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.62 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.3

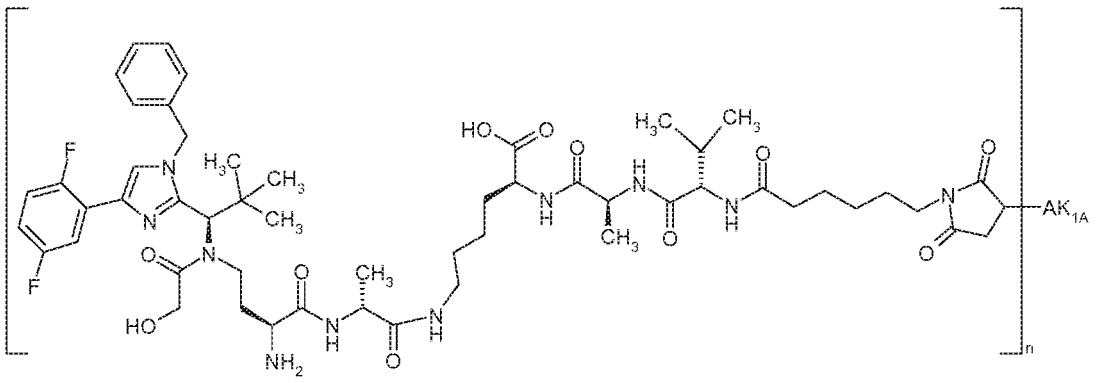
Beispiel 127E

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F127 5.0 mg Trastuzumab Antikörper in PBS (c = 13.5 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 2.07 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.6

Beispiel 128A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F128 5 mg Cetuximab in PBS (c=26.84 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS.

Protein Konzentration: 1.99 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.7

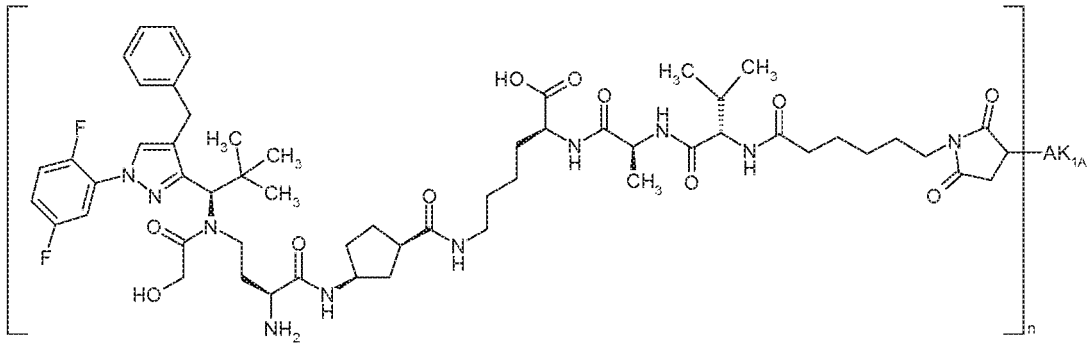
Beispiel 128B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F128 5 mg anti-TWEAKR AK-1 in PBS (c=12.9 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS.

Protein Konzentration: 1.99 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.4

Beispiel 129A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F129 5 mg Cetuximab in PBS (c=26.84 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS.

Protein Konzentration: 2.28 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.9

Beispiel 129B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F129 5 mg anti-TWEAKR AK-1 in PBS (c=12.9 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS.

Protein Konzentration: 2.06 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.2

Beispiel 129E

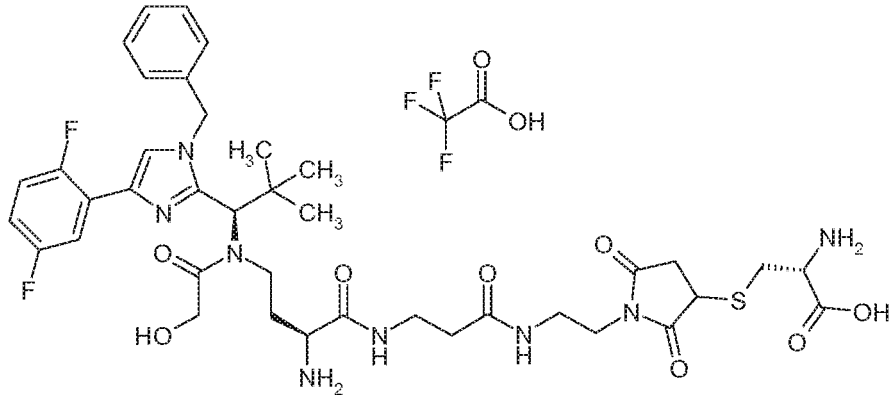
Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F129 5 mg Trastuzumab in PBS (c=13.5 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS.

Protein Konzentration: 2.0 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.4

Beispiel 130

S-(1-{2-[(N-{(2S)-2-Amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}-beta-alanyl)amino]ethyl}-2,5-dioxopyrrolidin-3-yl)-L-cystein -trifluoressigsäure (1:1)

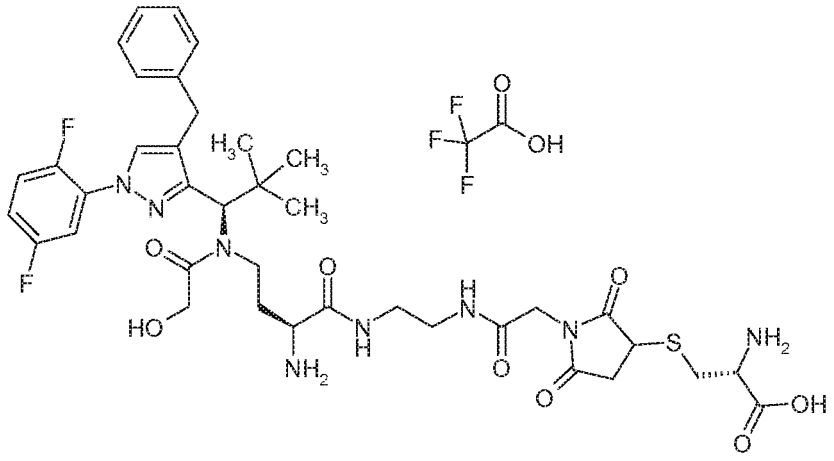


4.2 mg (5 µmol) von Intermediat F32 wurden in 2 ml DCM/Wasser 10:1 aufgenommen und mit 1.8 mg (15 µmol) L-Cystein versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 2 h bei RT gerührt, anschließend im Vakuum eingeengt und dann mittels präparativer HPLC gereinigt.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.8 min; MS (EIpos): m/z = 829 $[M+H]^+$.

Beispiel 131

S-[1-(2-{[2-({(2S)-2-Amino-4-[{(1R)-1-[4-benzyl-1-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrazol-3-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}amino)ethyl]amino}-2-oxoethyl)-2,5-dioxopyrrolidin-3-yl]-L-cystein -trifluoressigsäure (1:1)

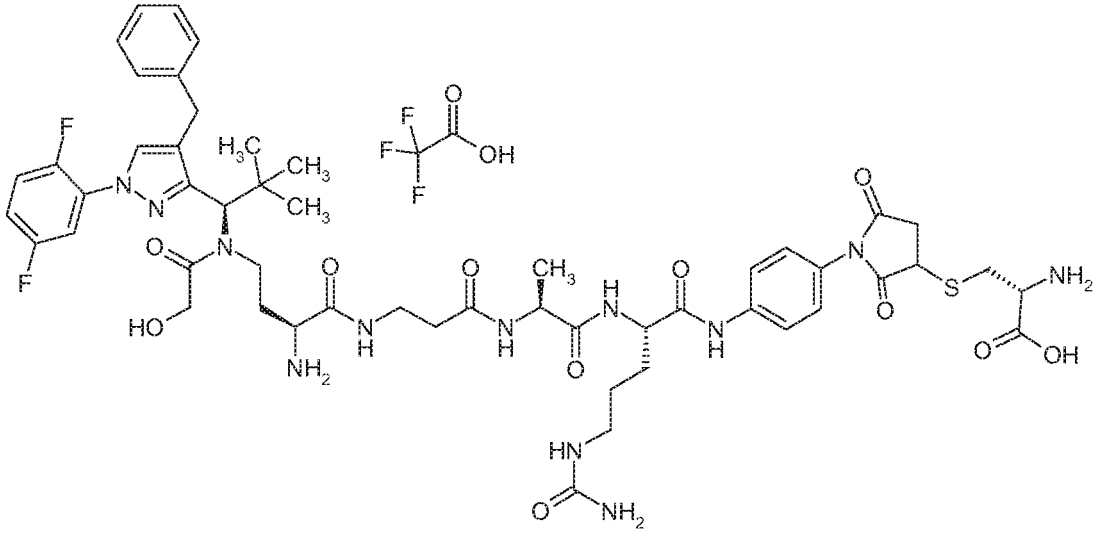


5 mg (6 µmol) von Intermediat F87 wurden in 1 ml DMF aufgenommen und mit 7.5 mg (62 µmol) L-Cystein versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 20 h bei RT gerührt, anschließend im Vakuum eingeengt und dann mittels präparativer HPLC gereinigt.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.81 min; MS (ElPos): m/z = 815 $[M+H]^+$.

Beispiel 132

N-{(2S)-2-Amino-4-[{(1R)-1-[4-benzyl-1-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrazol-3-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}-beta-alanyl-L-alanyl-N-[4-(3-{[(2R)-2-amino-2-carboxyethyl]sulfanyl}-2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)phenyl]-N^5-carbamoyl-L-ornithinamid - trifluoressigsäure (1:1)

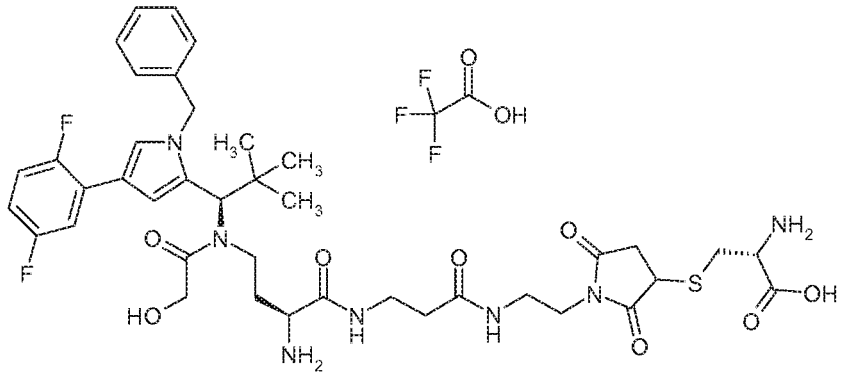


5 mg (5 µmol) von Intermediat F89 wurden in 2 ml DMF/Wasser 10:1 aufgenommen und mit 1.7 mg (14 µmol) L-Cystein versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 1 h bei RT gerührt und dann im Vakuum eingeengt. Der Rückstand wurde in Acetonitril/Wasser 1:1 aufgenommen, mit TFA auf pH 2 gebracht und anschließend im Vakuum eingeengt und dann mittels präparativer HPLC gereinigt. Die entsprechenden Fraktionen wurden eingeengt und nach Lyophilisation des Rückstands aus Acetonitril/Wasser verblieben 3 mg der Titelverbindung als weißer Schaum.

LC-MS (Methode 4): R_t = 0.93 min; MS (ElPos): m/z = 1105 $[M+H]^+$.

Beispiel 133

S-(1-{2-[(N-{(2S)-2-Amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}-beta-alanyl)amino]ethyl}-2,5-dioxopyrrolidin-3-yl)-L-cystein -trifluoressigsäure (1:1)

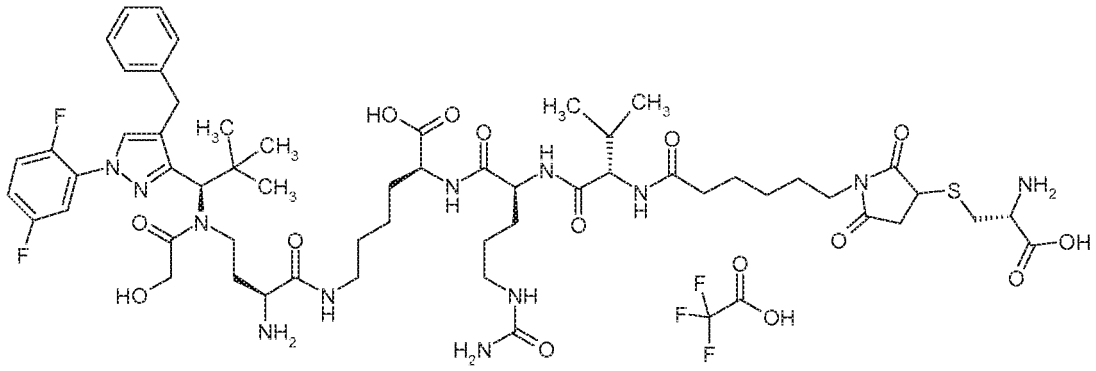


1.6 mg (2 µmol) von Intermediat F84 wurden in 1.5 ml DMF/Wasser 10:1 aufgenommen und mit 0.74 mg (6 µmol) L-Cystein versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 10 min bei RT gerührt und dann im Vakuum eingeengt. Der Rückstand wurde in Acetonitril/Wasser 1:1 aufgenommen, mit TFA auf pH 2 gebracht und anschließend im Vakuum eingeengt und dann mittels präparativer HPLC gereinigt. Die entsprechenden Fraktionen wurden eingeengt und nach Lyophilisation des Rückstands aus Acetonitril/Wasser verblieben 1.9 mg (89% d. Th.) der Titelverbindung als weißer Schaum.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.8 min; MS (EIpos): m/z = 828 $[M+H]^+$.

Beispiel 134

N-[6-(3-{[(2R)-2-Amino-2-carboxyethyl]sulfanyl}-2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)hexanoyl]-L-valyl-N^5-carbamoyl-L-ornithyl-N^6-{(2S)-2-amino-4-[{(1R)-1-[4-benzyl-1-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrazol-3-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}-L-lysin -trifluoressigsäure (1:1)



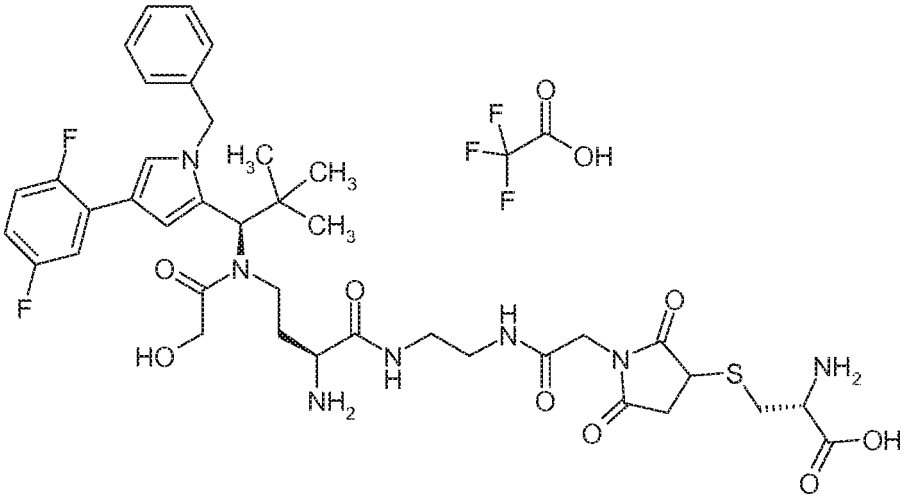
3.8 mg (3 µmol) von Intermediat F90 wurden in 1.5 ml DMF/Wasser 10:1 aufgenommen und mit 1.2 mg (9 µmol) L-Cystein versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 15 min bei RT gerührt und dann im Vakuum eingeengt. Der Rückstand wurde in Acetonitril/Wasser 1:1 aufgenommen, erneut eingeengt und dann mittels präparativer HPLC gereinigt. Die entsprechenden Fraktionen wurden eingeengt und

nach Lyophilisation des Rückstands aus Acetonitril/Wasser verblieben 2.3 mg (56% d. Th.) der Titelverbindung als weißer Schaum.

LC-MS (Methode 4): R_t = 1.0 min; MS (EIpos): m/z = 1213 $[M+H]^+$.

Beispiel 135

S-[1-(2-{[2-({(2S)-2-Amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}amino)ethyl]amino}-2-oxoethyl)-2,5-dioxopyrrolidin-3-yl]-L-cystein -trifluoressigsäure (1:1)

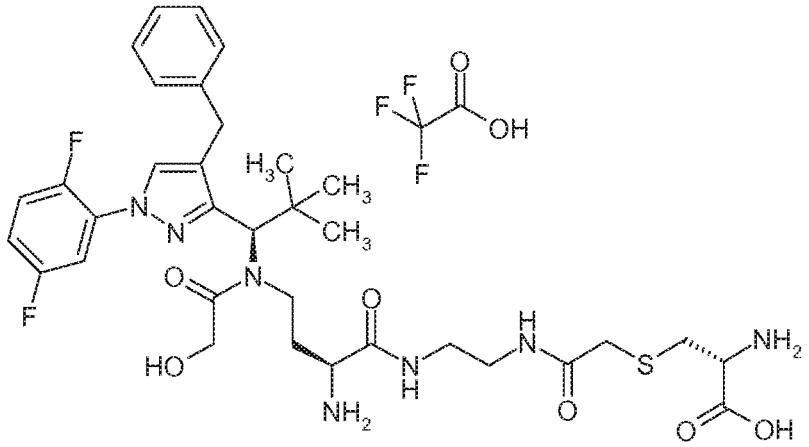


1.8 mg (2 µmol) von Intermediat F104 wurden in 1 ml DMF aufgenommen und mit 2.7 mg (22 µmol) L-Cystein versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 20 h bei RT gerührt, anschließend im Vakuum eingeengt und dann mittels präparativer HPLC gereinigt. Es verblieben 0.6 mg (26% d. Th.) der Titelverbindung als farbloser Schaum.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.80 min; MS (EIpos): m/z = 814 $[M+H]^+$.

Beispiel 136

S-(2-{[2-({(2S)-2-Amino-4-[{(1R)-1-[4-benzyl-1-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrazol-3-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}amino)ethyl]amino}-2-oxoethyl)-L-cystein-trifluoressigsäure (1:1)

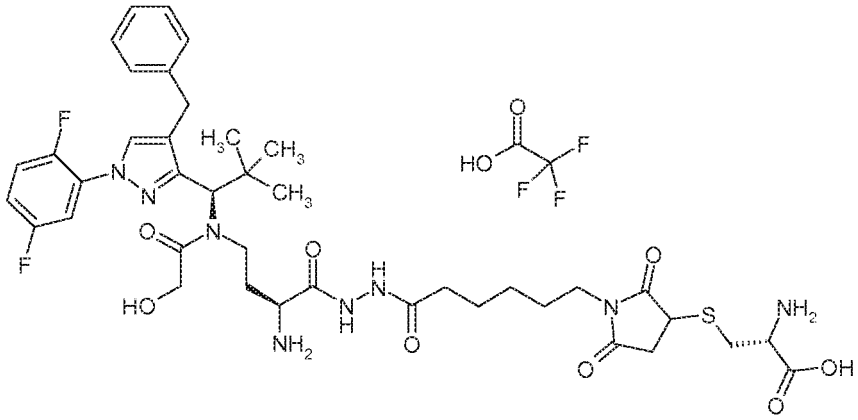


3.3 mg (4 µmol) von Intermediat F109 wurden in 2 ml DMF/Wasser 10:1 aufgenommen und mit 1.5 mg (13 µmol) L-Cystein versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 30 min bei RT gerührt und dann im Vakuum eingeengt. Der Rückstand wurde in Acetonitril/Wasser 1:1 aufgenommen, erneut eingeengt und dann mittels präparativer HPLC gereinigt. Die entsprechenden Fraktionen wurden eingeengt und nach Lyophilisation des Rückstands aus Acetonitril/Wasser verblieben 1.9 mg (55% d. Th.) der Titelverbindung als weißer Schaum.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.75 min; MS (ElPos): m/z = 718 $[M+H]^+$.

Beispiel 137

S-{1-[6-(2-{(2S)-2-Amino-4-[{(1R)-1-[4-benzyl-1-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrazol-3-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}hydrazino)-6-oxohexyl]-2,5-dioxopyrrolidin-3-yl}-L-cystein -trifluoressigsäure (1:1)



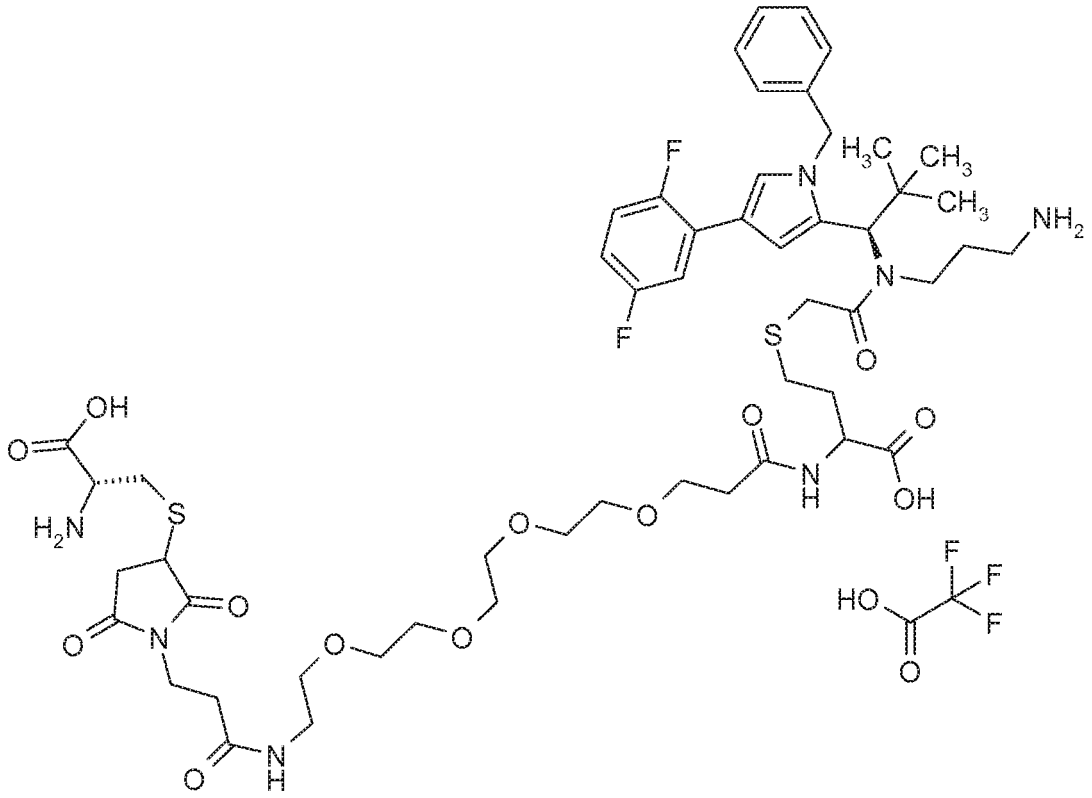
3.2 mg (4 µmol) von Intermediat F117 wurden in 2 ml DMF/Wasser 10:1 aufgenommen und mit 1.6 mg (13 µmol) L-Cystein versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 30 min bei RT gerührt und dann im Vakuum eingeengt. Der Rückstand wurde in Acetonitril/Wasser 1:1 aufgenommen, erneut eingeengt

und dann mittels präparativer HPLC gereinigt. Die entsprechenden Fraktionen wurden eingeengt und nach Lyophilisation des Rückstands aus Acetonitril/Wasser verblieben 2 mg (47% d. Th.) der Titelverbindung als weißer Schaum.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.76 min; MS (EIpos): m/z = 843 $[M+H]^+$.

Beispiel 138

N-[19-(3(R/S)-{[(2R)-2-Amino-2-carboxyethyl]sulfanyl}-2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)-17-oxo-4,7,10,13-tetraoxa-16-azanonadecan-1-oyl]-R/S-{2-[(3-aminopropyl){(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}amino]-2-oxoethyl}homocystein-trifluoressigsäure(1:1)



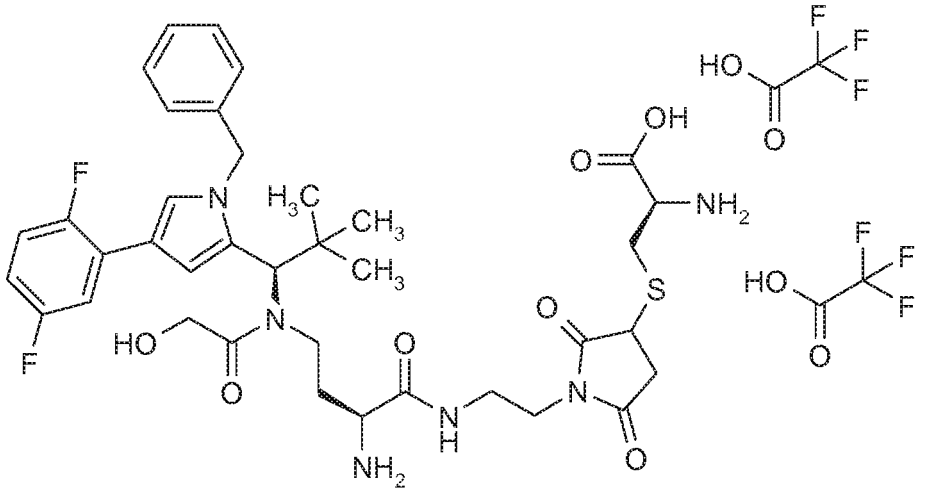
6.0 mg (0.01 mmol) R/S-{2-[(3-Aminopropyl){(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}amino]-2-oxoethyl}-N-[19-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-17-oxo-4,7,10,13-tetraoxa-16-azanonadecan-1-oyl]-homocystein-trifluoressigsäure (1:1) (Intermediat F146) wurden in 2.2 mL DMF/Wasser (10:1) vorgelegt und mit 2.0 mg (0.02 mmol) L-Cystein versetzt und 10 min bei RT gerührt. Die Reaktionsmischung wurde direkt mittles präp. RP-HPLC gereinigt (Säule: Reprosil 250x30; 10µ, Fluss: 50 mL/min, MeCN/Wasser, 0.1% TFA). Die Lösemittel wurden im

Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 5.5 mg (76 % d. Th.) der Titelverbindung.

LC-MS (Methode 4): R_t = 1.07 min; MS (ESIpos): m/z = 1106 $(M+H)^+$.

Beispiel 139

S-{(3R/S)-1-[2-({(2S)-2-Amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}amino)ethyl]-2,5-dioxopyrrolidin-3-yl}-L-cystein-trifluoressigsäure(1:2)



Die Synthese erfolgte in Analogie zur Synthese der Verbindung Beispiel 138.

6.0 mg (0.01 mmol) Trifluoressigsäure--(2S)-2-amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]-N-[2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)ethyl]butanamid(1:1).

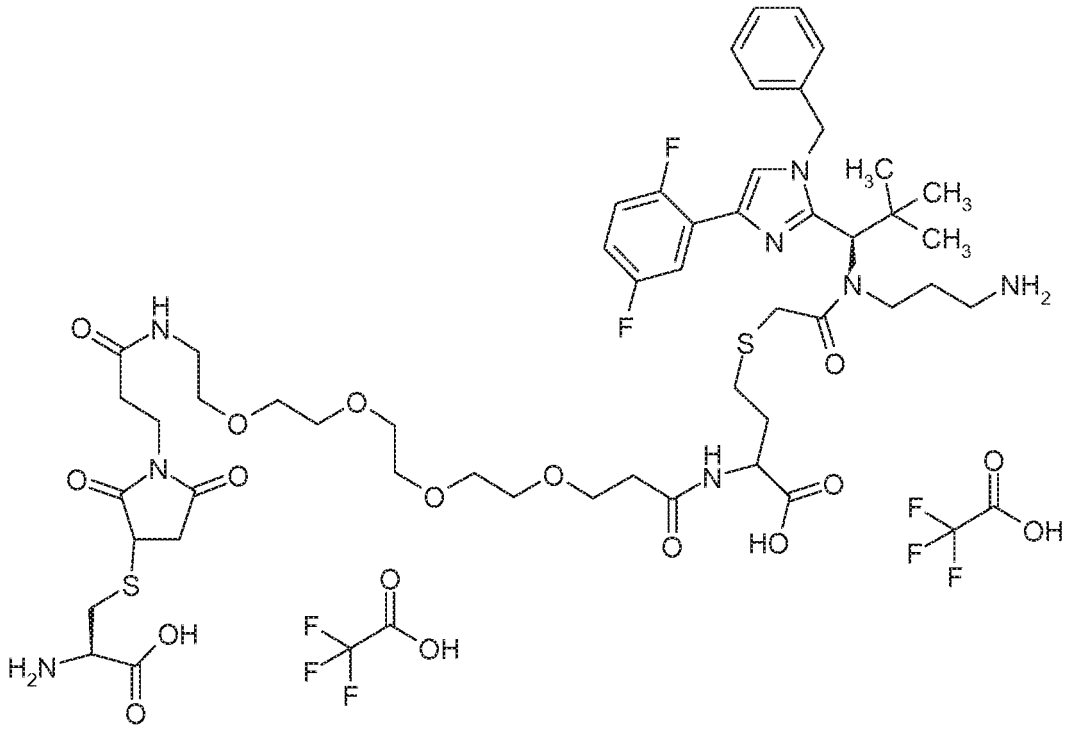
2.6 mg (0.02 mmol) L-Cystein.

Man erhielt 3.4 mg (43 % d. Th.) der Titelverbindung.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.82 min; MS (ESIpos): m/z = 757 $(M+H)^+$.

Beispiel 140

N-[19-(3(R/S)-{[(2R)-2-Amino-2-carboxyethyl]sulfanyl}-2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)-17-oxo-4,7,10,13-tetraoxa-16-azanonadecan-1-oyl]-R/S-{2-[(3-aminopropyl){(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}amino]-2-oxoethyl}homocystein-trifluoressigsäure(1:2)



Die Synthese erfolgte in Analogie zur Synthese der Verbindung Beispiel 138.

6.0 mg (0.01 mmol) Trifluoressigsäure--R/S-{2-[(3-aminopropyl){(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}amino]-2-oxoethyl}-N-[19-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-17-oxo-4,7,10,13-tetraoxa-16-azanonadecan-1-oyl]homocystein(1:1) (Intermediat F149)

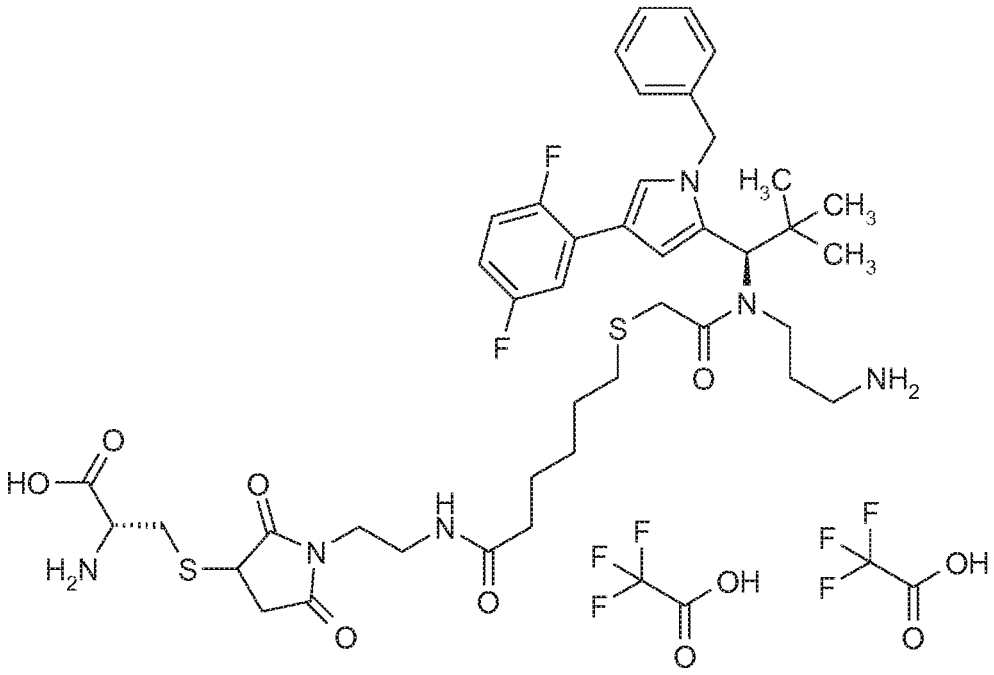
2.0 mg (0.02 mmol) L-Cystein.

Man erhielt 6.1 mg (84 % d. Th.) der Titelverbindung.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.85 min; MS (ESIpos): m/z = 1107 $(M+H)^+$.

Beispiel 141

S-[(3R/S)-1-(2-{[6-({2-[(3-Aminopropyl){(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}amino]-2-oxoethyl}sulfanyl)hexanoyl]amino}ethyl)-2,5-dioxopyrrolidin-3-yl]-L-cystein-trifluoressigsäure(1:2)



Die Synthese erfolgte in Analogie zur Synthese der Verbindung Beispiel 138.

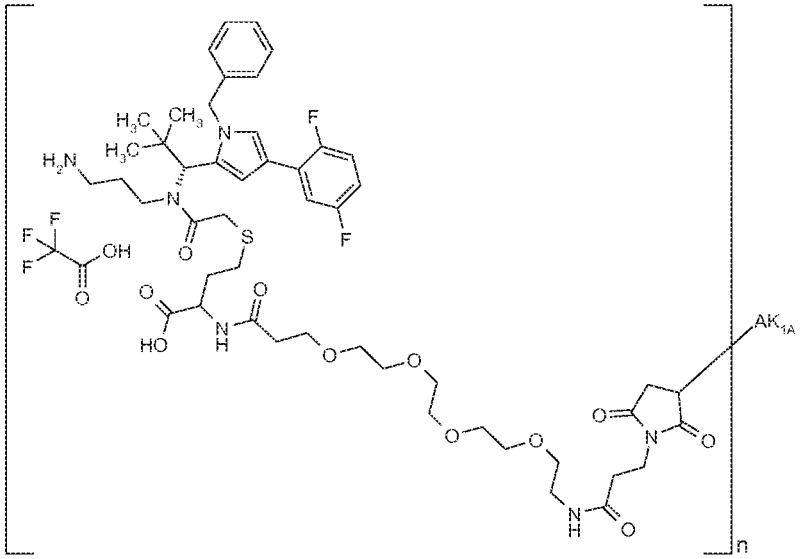
10.07 mg (0.01 mmol) Trifluoressigsäure--6-({2-[(3-aminopropyl){(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}amino]-2-oxoethyl}sulfanyl)-N-[2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)ethyl]hexanamid(1:1) (Intermediat F143).

9.3 mg (0.08 mmol) L-Cystein.

Man erhielt 9.2 mg (67 % d. Th.) der Titelverbindung.

LC-MS (Methode 4): R_t = 1.05 min; MS (ESIpos): m/z = 843 $(M+H)^+$.

Beispiel 142A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F142 5.0 mg Cetuximab in PBS (c = 12.33 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 2.08 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.1

Beispiel 142B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F1425.0 mg anti-TWEAKR AK-1 Antikörper in PBS (c = 34.42 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.84 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.0

Beispiel 142E

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F142 5.0 mg TrastuzumabAntikörper in PBS (c = 13.50 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation

aufkonzentriert und rückverdünnt. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.92 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.3

Beispiel 142I

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F142 5.0 mg Nimotuzumab in PBS (c = 13.8 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.92 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.5

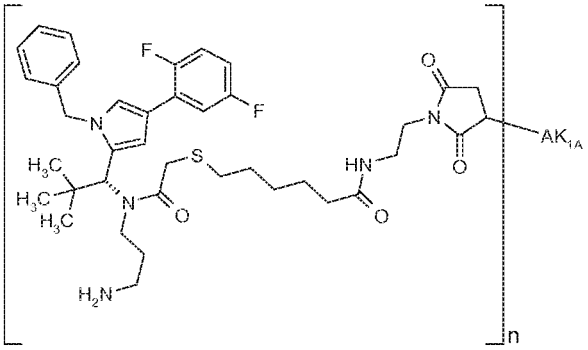
Beispiel 142H

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F142 5.0 mg Panitumumab in PBS (c = 2.1 mg/mL). Die Reduktionszeit mit TCEP betrug 1 h und die Rührzeit bei der ADC Kupplung betrug 1.5 h. Anschließend wurde der Ansatz nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.7 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.2

Beispiel 143A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F143 5.0 mg Cetuximab in PBS (c = 12.33 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.84 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.5

Beispiel 143B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F143 5.0 mg anti-TWEAKR AK-1 Antikörper in PBS (c = 34.42 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.05 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 1.6

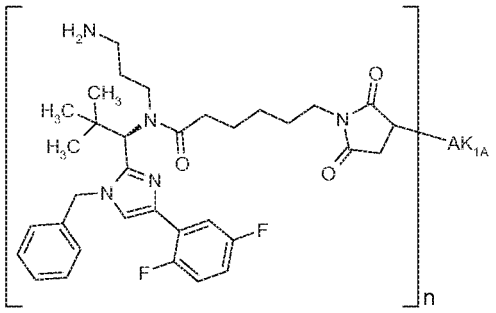
Beispiel 143E

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F143 5.0 mg Trastuzumab Antikörper in PBS (c = 13.50 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.95 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.3

Beispiel 144B

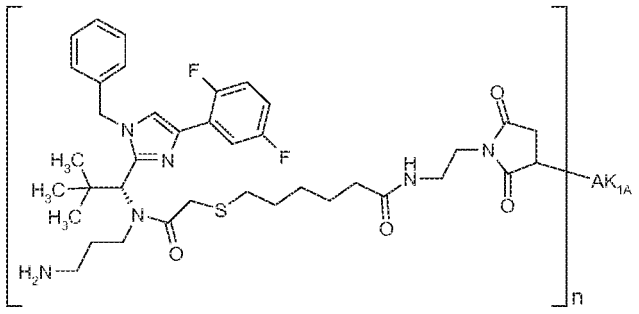


Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F144 5.0 mg anti-TWEAKR AK-1 Antikörper in PBS (c = 12.87 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt.

Protein Konzentration: 1.53 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.0

Beispiel 145A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F145 5.0 mg Cetuximab in PBS (c = 5.90 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 2.00 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.0

Beispiel 145B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F145 5.0 mg anti-TWEAKR AK-1 Antikörper in PBS (c = 12.87 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.54 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 1.9

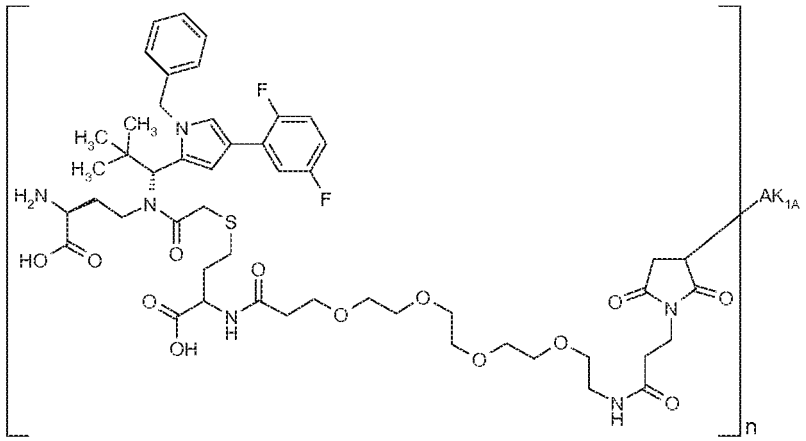
Beispiel 145E

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F145 5.0 mg TrastuzumabAntikörper in PBS (c = 13.50 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.86 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.4

Beispiel 146A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F146 5.0 mg Cetuximab in PBS (c = 12.33 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 2.02 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.4

Beispiel 146B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F146 5.0 mg anti-TWEAKR AK-1 Antikörper in PBS (c = 34.42 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.87 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.4

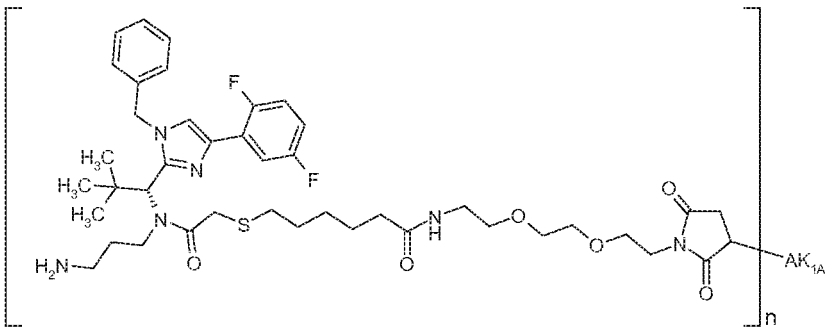
Beispiel 146E

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F146 5.0 mg Trastuzumab Antikörper in PBS (c = 13.50 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.92 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.5

Beispiel 147A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F147 5.0 mg Cetuximab in PBS (c = 5.90 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 2.04 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.2

Beispiel 147B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F147 5.0 mg anti-TWEAKR AK-1 Antikörper in PBS (c = 12.87 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.31 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 1.8

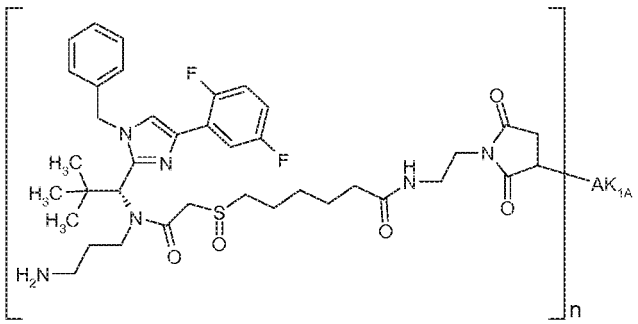
Beispiel 147E

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F147 5.0 mg Trastuzumab Antikörper in PBS (c = 13.50 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.86 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.6

Beispiel 148A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F148 5.0 mg Cetuximab in PBS (c = 5.90 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 2.11 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.3

Beispiel 148B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F148 5.0 mg anti-TWEAKR AK-1 Antikörper in PBS (c = 12.87 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.95 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.0

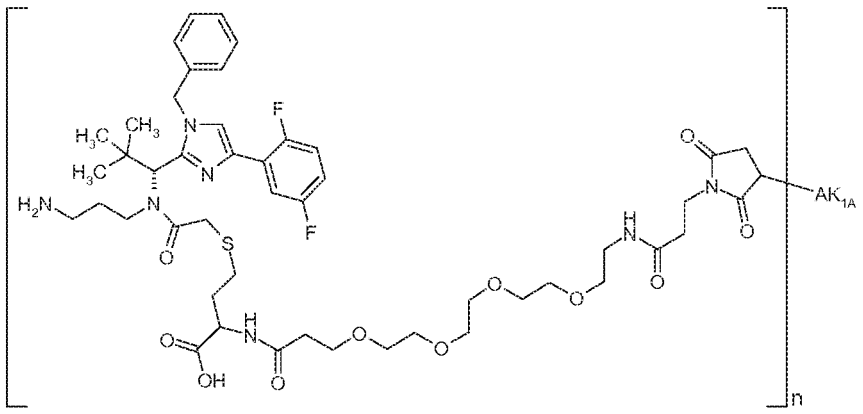
Beispiel 148E

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F148 5.0 mg Trastuzumab Antikörper in PBS (c = 13.50 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 2.62 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.5

Beispiel 149A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F149 5.0 mg Cetuximab in PBS (c = 5.90 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 2.09 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.3

Beispiel 149B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F149 40 mg anti-TWEAKR AK-1 in PBS (c = 34.42 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert, rückverdünnt mit PBS und erneut aufkonzentriert. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 9.61 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.6

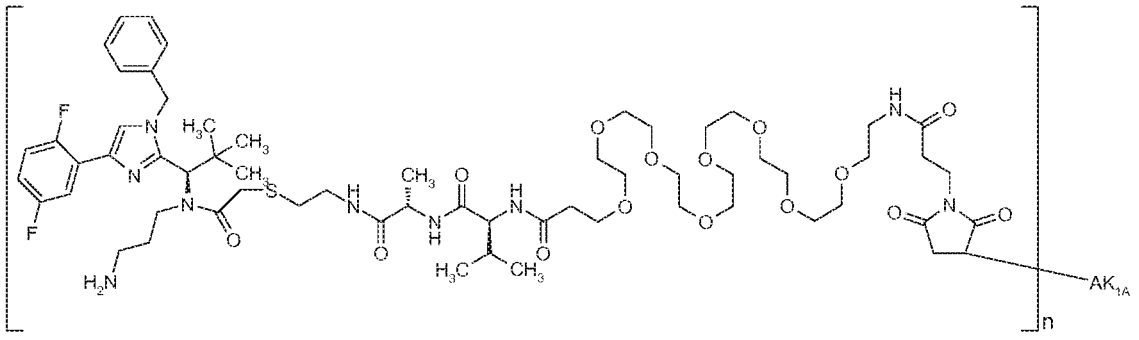
Beispiel 149E

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F149 5.0 mg TrastuzumabAntikörper in PBS (c = 13.50 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.93 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.7

Beispiel 150A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F150 5.0 mg Cetuximab in PBS (c = 15.33 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.91 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.1

Beispiel 150B Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F150 5.0 mg anti-TWEAKR AK-1 Antikörper in PBS (c = 12.87 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.81 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.1

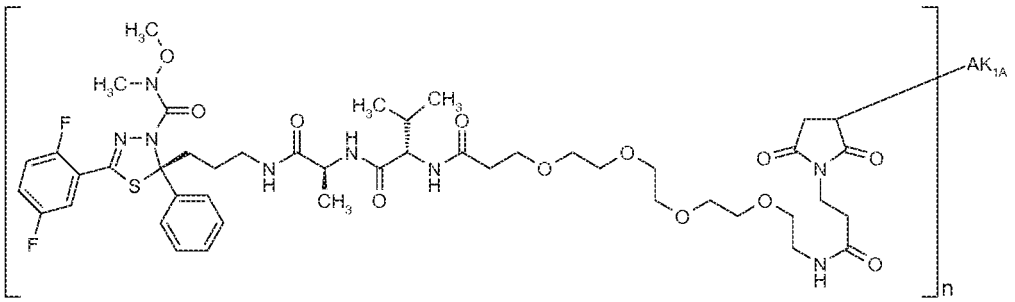
Beispiel 150E

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F150 5.0 mg TrastuzumabAntikörper in PBS (c = 13.50 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.84 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.6

Beispiel 151A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F151 5.0 mg Cetuximab in PBS (c = 16.90 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.86 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.3

Beispiel 151B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F151 5.0 mg anti-TWEAKR AK-1 Antikörper in PBS (c = 12.87 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.78 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.2

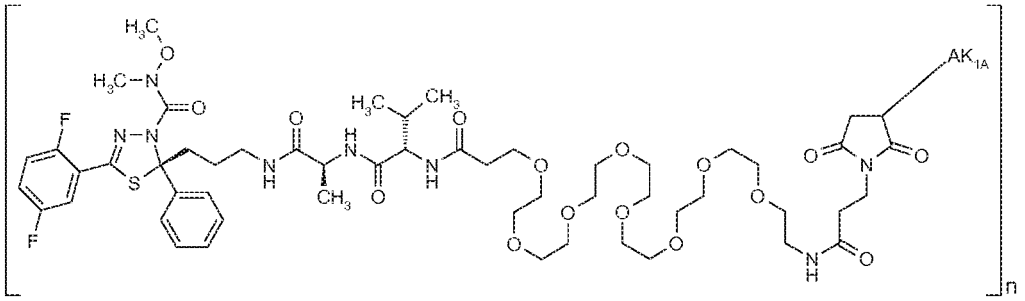
Beispiel 151E

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F151 5.0 mg Trastuzumab Antikörper in PBS (c = 16.90 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.74 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 1.9

Beispiel 152A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F152 5.0 mg Cetuximab in PBS (c = 16.90 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.80 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.3

Beispiel 152B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F152 5.0 mg anti-TWEAKR AK-1 Antikörper in PBS (c = 12.87 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.77 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.3

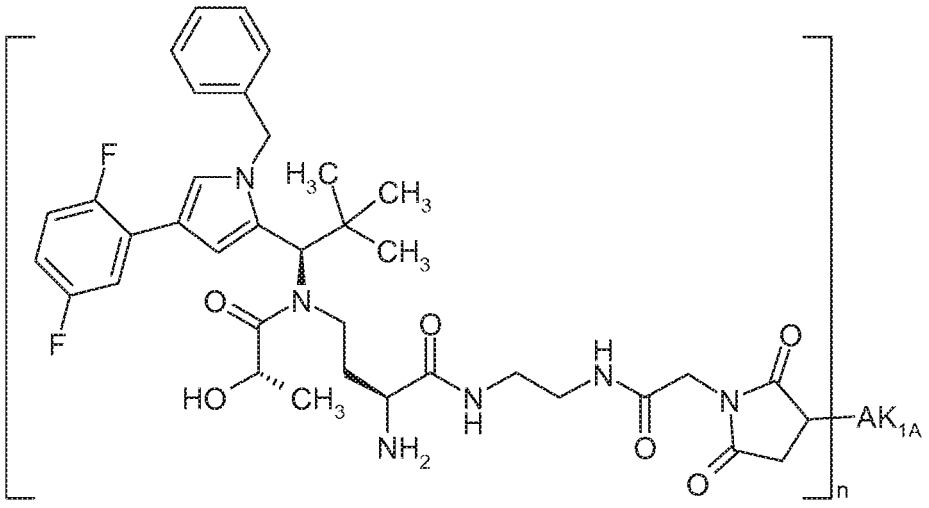
Beispiel 152E

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F152 5.0 mg Trastuzumab Antikörper in PBS (c = 16.90 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.69 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.9

Beispiel 153A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F153 5 mg Cetuximab in PBS (c=21.32 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.93 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.2

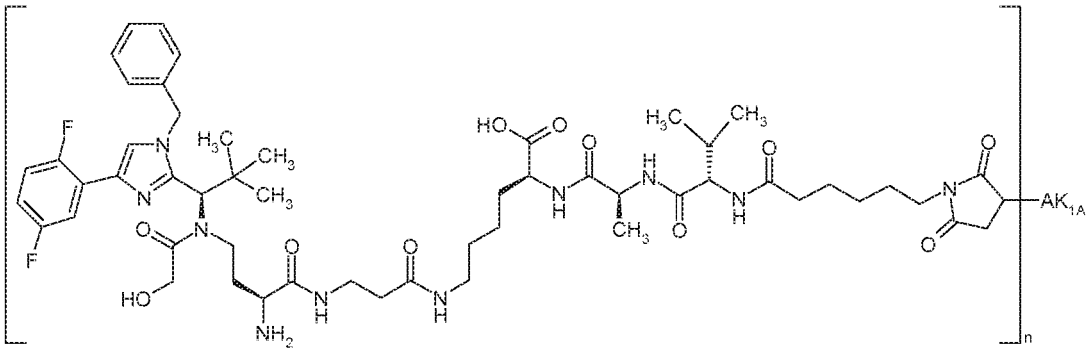
Beispiel 153B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F153 5 mg anti-TWEAKR AK-1 in PBS (c=18.6 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.71 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.8

Beispiel 154A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F154 5 mg Cetuximab in PBS (c=26.8 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS.

Protein Konzentration: 2.34 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.6

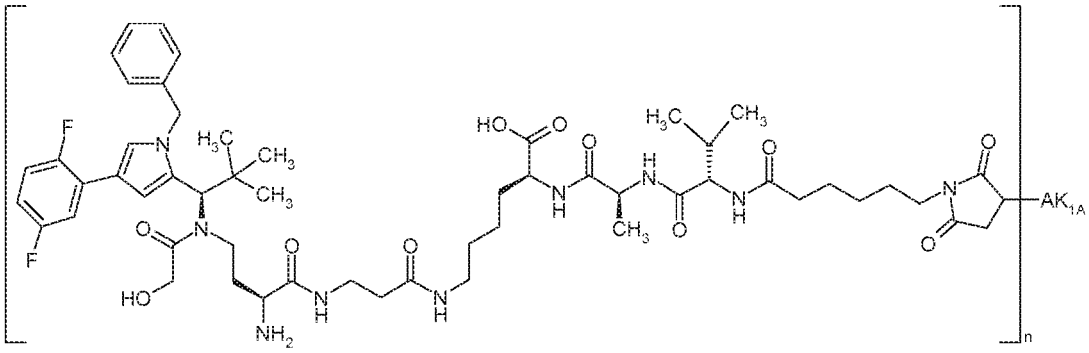
Beispiel 154B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F154 5 mg anti-TWEAKR AK-1 in PBS (c=12.9 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS.

Protein Konzentration: 1.83 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.8

Beispiel 155A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F155 50 mg Cetuximab in PBS (c=8.51 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert, rückverdünnt mit PBS und erneut aufkonzentriert.

Protein Konzentration: 14.85 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.5

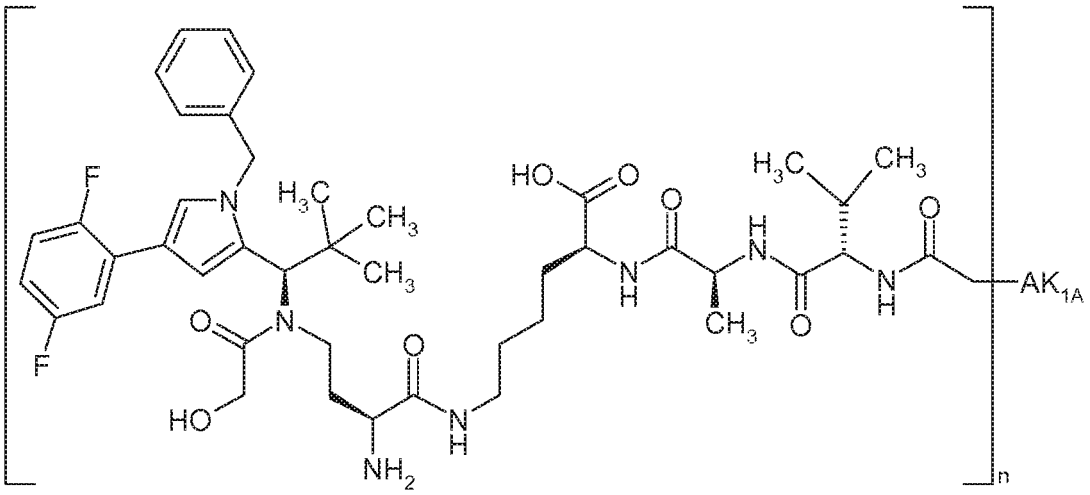
Beispiel 155B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F155 40 mg anti-TWEAKR AK-1 in PBS (c=18.6 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert, rückverdünnt mit PBS und erneut aufkonzentriert.

Protein Konzentration: 11.25 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.1

Beispiel 156A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F156 5 mg Cetuximab in PBS (c=21.3 mg/mL). Die Kupplung mit dem Antikörper wurde nach der TCEP-Reduktion unter Rühren über Nacht durchgeführt bevor die weitere Aufarbeitung mittels Sephadex-Reinigung begann. Der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS.

Protein Konzentration: 1.83 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.6

Beispiel 156B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F156 5 mg anti-TWEAKR AK-1 in PBS (c=18.6 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS.

Protein Konzentration: 1.79 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.9

Beispiel 156E

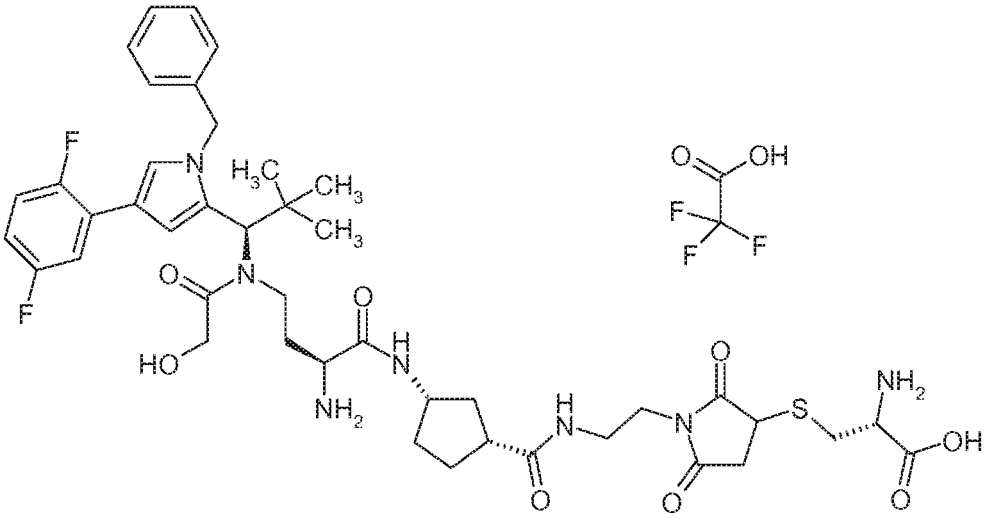
Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F156 5 mg Trastuzumab in PBS (c=13.5 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS.

Protein Konzentration: 1.91 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 4.2

Beispiel 157

S-{1-[2-({[(1R,3S)-3-({(2S)-2-Amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}amino)cyclopentyl]carbonyl}amino)ethyl]-2,5-dioxopyrrolidin-3-yl}-L-cystein -trifluoressigsäure (1:1)

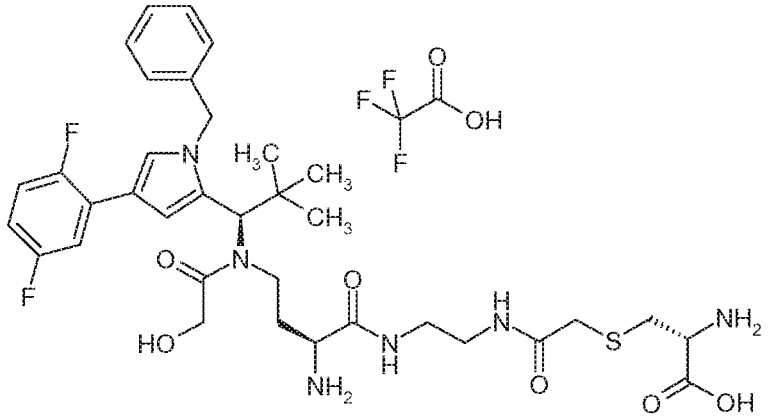


2 mg (2 µmol) von Intermediat F125 wurden in 2 ml DMF/Wasser 10:1 aufgenommen und mit 0.8 mg (6 µmol) L-Cystein versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 20 h bei RT gerührt, anschließend im Vakuum eingeengt und dann mittels präparativer HPLC gereinigt.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.81 min; MS (Elpos): m/z = 868 $[M+H]^+$.

Beispiel 158

S-(2-{[2-({(2S)-2-Amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}amino)ethyl]amino}-2-oxoethyl)-L-cystein - trifluoressigsäure (1:1)

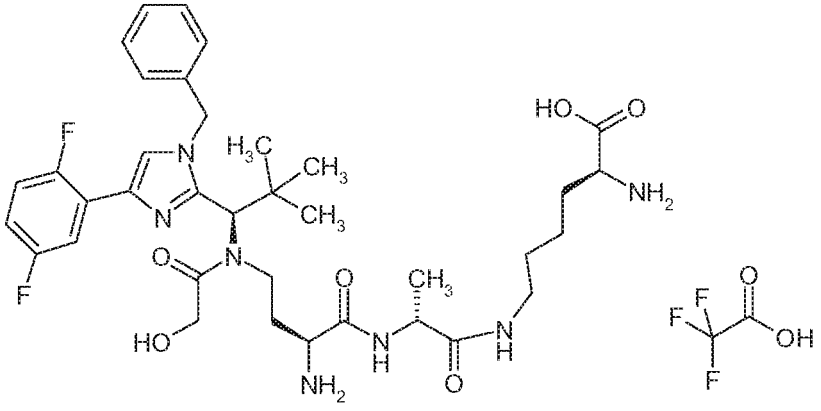


6 mg (8 µmol) von Intermediat F119 wurden in 3 mL DMF aufgenommen und mit 1.8 mg (15 µmol) L-Cystein versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 6 h bei RT gerührt und dann 3 Tage bei RT stehen gelassen. Anschließend wurde der Ansatz im Vakuum eingeengt und das Produkt mittels präparativer HPLC gereinigt.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.81 min; MS (ESIpos): m/z = 717 $(M+H)^+$.

Beispiel 159

N^6-(N-{(2S)-2-Amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}-D-alanyl)-L-lysin -trifluoressigsäure (1:1)



Zunächst wurde ausgehend von 2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl-N-[(benzyloxy)carbonyl]-D-alaninat und Methyl-N2-(tert-butoxycarbonyl)-L-lysinat nach klassischen Methoden der Peptidchemie Methyl-N6-D-alanyl-N2-(tert-butoxycarbonyl)-L-lysinat hergestellt.

Zur Synthese der Titelverbindung wurden 8.4 mg (0.022 mmol) von diesem Intermediat in 4 ml DMF aufgenommen, mit 10 mg (0.015 mmol) Intermediat C5 sowie mit 11 mg HATU und 13 µL N,N-Diisopropylethylamin versetzt. Nach 5 min Rühren bei RT wurde der Ansatz mittels präparativer HPLCC gereinigt. Nach Einengen der entsprechenden Fraktionen und Trocknen im Hochvakuum wurde

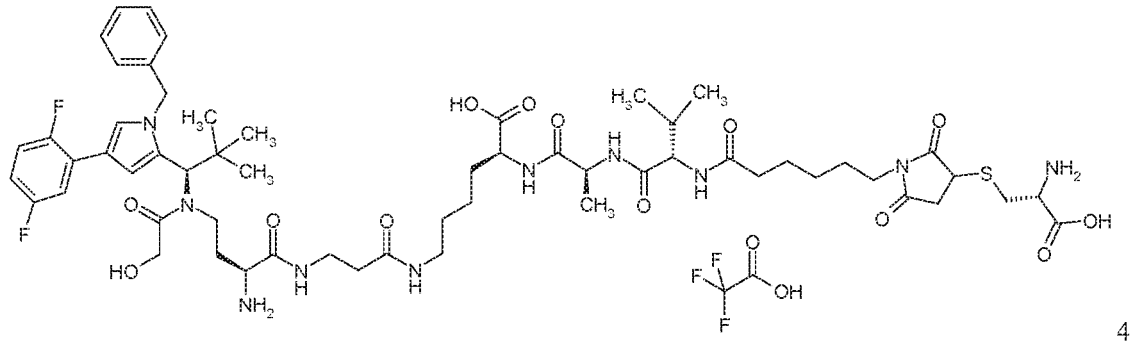
das erhaltene Intermediat in 4 mL Methanol gelöst, mit 83 µL einer 2M Lithiumhydroxidlösung versetzt und der Ansatz über Nacht bei RT gerührt. Dann wurden nochmals 167 µL der Lithiumhydroxidlösung zugegeben und weitere 4 h gerührt. Anschließend wurde mit Wasser verdünnt und mit 5%iger Zitronensäure auf pH 5 eingestellt. Nach Einengen erfolgte die Reinigung des Rückstandes durch präparative HPLC. Nach Einengen der entsprechenden Fraktionen und Lyophilisation des Rückstands aus Acetonitril/Wasser wurden 3.5 mg (26% d.Th.) des Boc-geschützten Intermediats erhalten. Daraus wurden 3 mg (95% d.Th.) der Titelverbindung durch Entschützung mit 1 ml Trifluoressigsäure in 2 ml DCM erhalten.

HPLC (Methode 11): R_t = 1.76 min;

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.75 min; MS (ESIpos): m/z = 714 $(M+H)^+$.

Beispiel 160

N^6-(N-{(2S)-2-Amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}-beta-alanyl)-N^2-{N-[6-(3-{[(2R)-2-amino-2-carboxyethyl]sulfanyl}-2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)hexanoyl]-L-valyl-L-alanyl}-L-lysin -trifluoressigsäure (1:1)



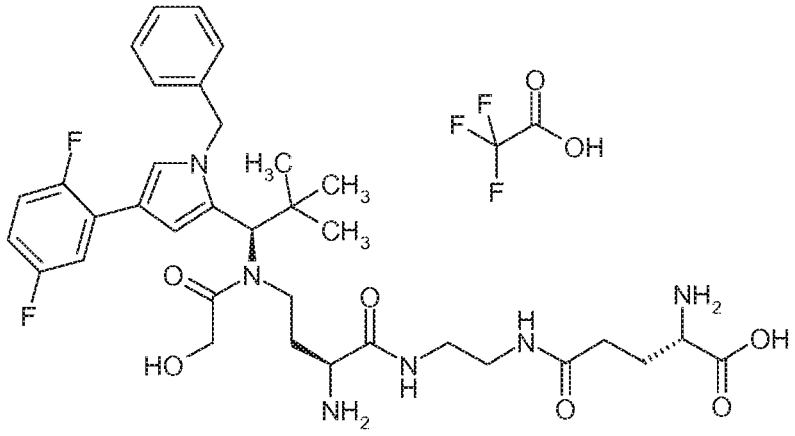
4

mg (3 µmol) von Intermediat F155 wurden in 2.5 ml DMF/Wasser 10:1 aufgenommen und mit 1.2 mg (10 µmol) L-Cystein versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 30 min bei RT gerührt, anschließend im Vakuum eingeengt und nach Aufnahme in Acetonitril/Wasser 1:1 mittels präparativer HPLC gereinigt.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.81 min; MS (EIpos): m/z = 1197 $[M+H]^+$.

Beispiel 161

N-[2-({(2S)-2-Amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}amino)ethyl]-L-glutamin -trifluoressigsäure (1:1)

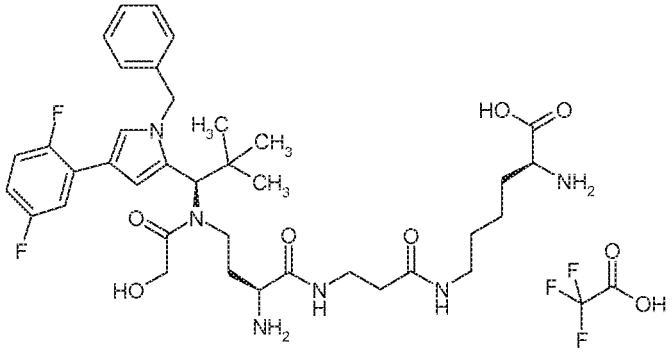


Zunächst wurde nach klassischen Methoden der Peptidchemie Trifluoressigsäure -benzyl-N-(2-aminoethyl)-N^2-[(benzyloxy)carbonyl]-L-glutaminat (1:1) hergestellt. Diese Intermediat wurde dann in Gegenwart von HATU mit Intermediat C58 gekuppelt. Anschließend wurde zunächst durch hydrogenolytische Spaltung die Benzyloxycarbonyl-Schutzgruppe sowie der Benzylester entfernt und anschließend mit Zinkchlorid die 2-(Trimethylsilyl)ethoxycarbonyl-Schutzgrupe.

LC-MS (Methode 6): R_t = 1.91 min; MS (EIpos): m/z = 685 $[M+H]^+$.

Beispiel 162

N^6-(N-{(2S)-2-Amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}-beta-alanyl)-L-lysin -trifluoressigsäure (1:1)

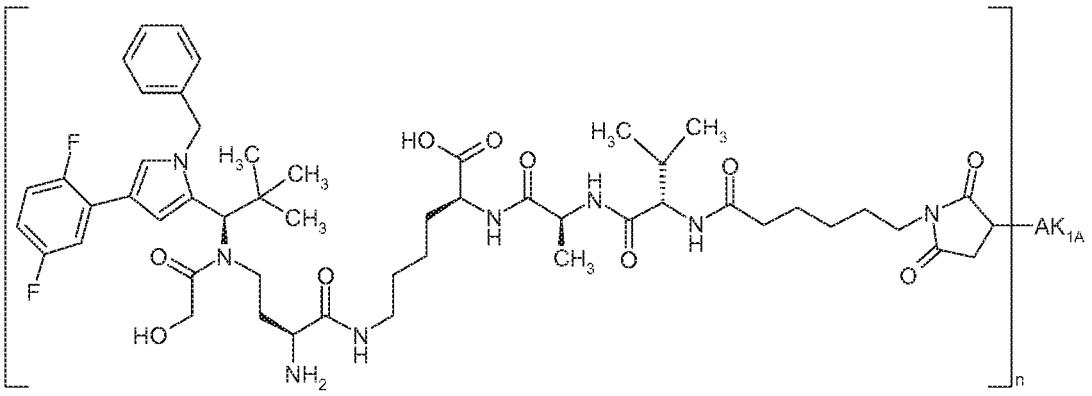


Zunächst wurde nach in der Peptidchemie bekannten klassischen Schutzgruppenoperationen Trifluoressigsäure --2-(trimethylsilyl)ethyl-N2-[(benzyloxy)carbonyl]-L-lysinat (1:1) hergestellt. Dieses Intermediat wurde dann in Gegenwart von HATU mit Intermediat C61 gekuppelt. Anschließend wurde zunächst mit Zinkchlorid die 2-(Trimethylsilyl)ethoxycarbonyl-Schutzgrupe sowie der 2-(Trimethylsilyl)ethylester gespalten. Schließlich wurde die Titelverbindung durch hydrogenolytische Spaltung der Benzyloxycarbonyl-Schutzgruppe und Reinigung durch präparative HPLC erhalten.

HPLC (Methode 11): R_t = 1.65 min;

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.76 min; MS (EIpos): m/z = 713 $[M+H]^+$.

Beispiel 163A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F163 5 mg Cetuximab in PBS (c=11.3 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS.

Protein Konzentration: 2.02 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.3

Beispiel 163B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F163 5 mg anti-TWEAKR AK-1 in PBS (c=12.9 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS.

Protein Konzentration: 1.76 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.5

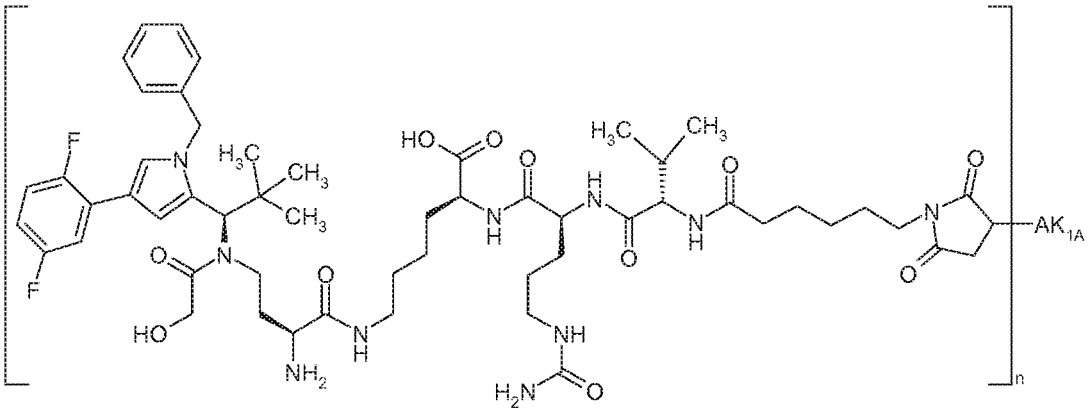
Beispiel 163H

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F163 5.0 mg Panitumumab in PBS (c = 10 mg/mL). Die Reduktionszeit mit TCEP betrug 30 min und die Rührzeit bei der ADC Kupplung betrug 2 h. Anschließend wurde der Ansatz nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS.

Protein Konzentration: 1.61mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.6

Beispiel 164A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F164 5 mg Cetuximab in PBS (c=16.9 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt.

Protein Konzentration: 2.15 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.5

Beispiel 164B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F164 30 mg anti-TWEAKR AK-1 in PBS (c=18.6 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert, rückverdünnt mit PBS und erneut aufkonzentriert.

Protein Konzentration: 14.8 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.8

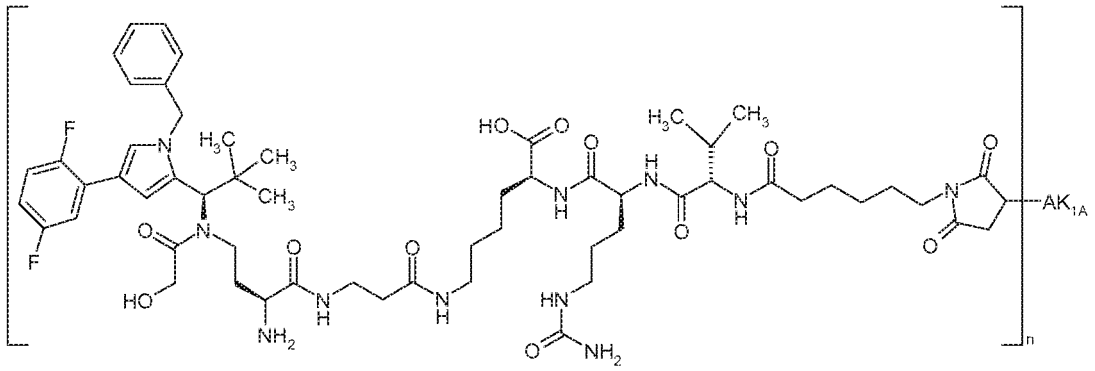
Beispiel 164E

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F164 5 mg Trastuzumab in PBS (c=13.5 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS.

Protein Konzentration: 2.11 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.8

Beispiel 165A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F165 5 mg Cetuximab in PBS (c=16.9 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS.

Protein Konzentration: 1.93 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.4

Beispiel 165B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F165 40 mg anti-TWEAKR AK-1 in PBS (c=12.9 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert, rückverdünnt mit PBS und erneut aufkonzentriert.

Protein Konzentration: 12.02 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.3

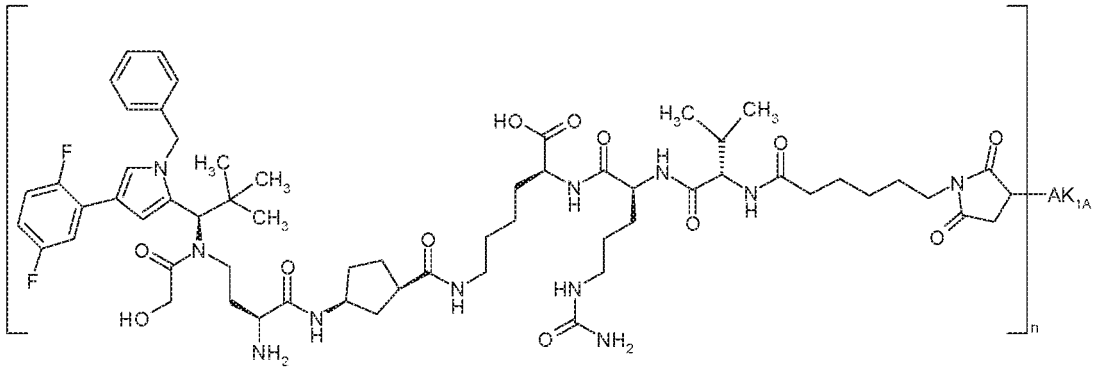
Beispiel 165E

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F165 5 mg Trastuzumab in PBS (c=13.5 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS.

Protein Konzentration: 1.94 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.5

Beispiel 166A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F166 5 mg Cetuximab in PBS (c=21.3 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS.

Protein Konzentration: 2.0 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.0

Beispiel 166B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F166 5 mg anti-TWEAKR AK-1 in PBS (c=18.6 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS.

Protein Konzentration: 1.76 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.4

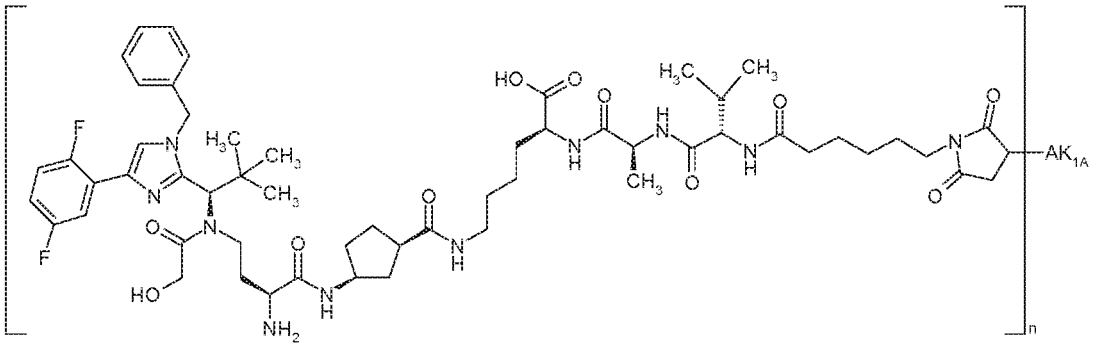
Beispiel 166E

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F166 5 mg Trastuzumab in PBS (c=13.5 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS.

Protein Konzentration: 2.01 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.6

Beispiel 167A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F167 5 mg Cetuximab in PBS (c=16.9 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS.

Protein Konzentration: 2.05 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.0

Beispiel 167B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F167 5 mg anti-TWEAKR AK-1 in PBS (c=12.9 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS.

Protein Konzentration: 1.76 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.9

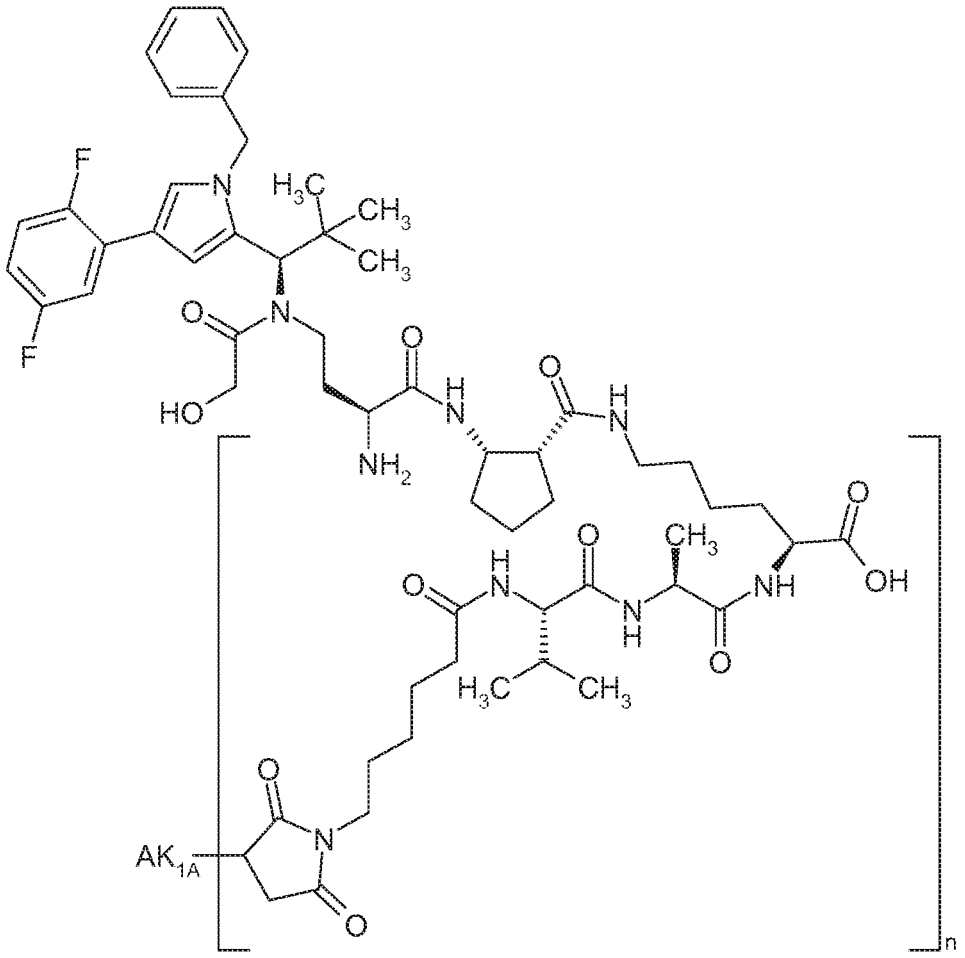
Beispiel 167E

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F167 5 mg Trastuzumab in PBS (c=13.5 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS.

Protein Konzentration: 1.9 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.6

Beispiel 168A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F168 5 mg Cetuximab in PBS (c=11.3 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS.

Protein Konzentration: 1.94 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.0

Beispiel 168B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F168 5 mg anti-TWEAKR AK-1 in PBS (c=12.9 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS.

Protein Konzentration: 1.33 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.8

Beispiel 168E

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F168 5 mg Trastuzumab in PBS (c=13.5 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS.

Protein Konzentration: 1.89 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.0

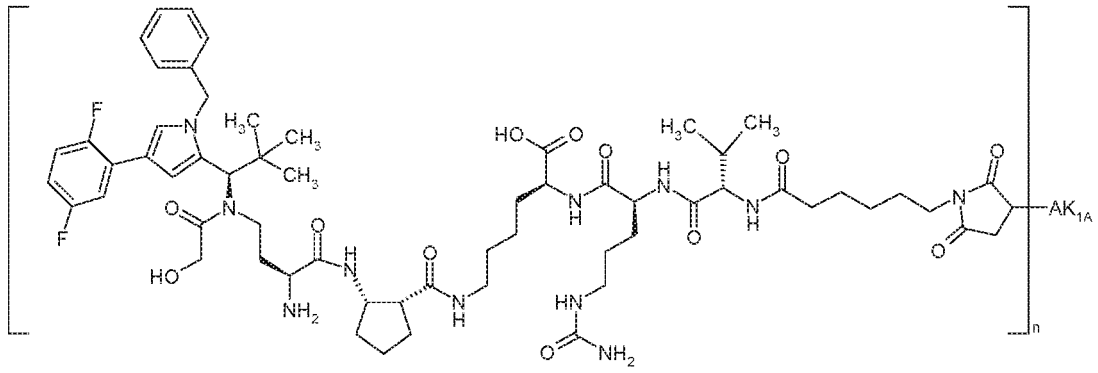
Beispiel 168H

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F168 5.0 mg Panitumumab in PBS (c = 10 mg/mL). Die Reduktionszeit mit TCEP betrug 4 h und die Rührzeit bei der ADC Kupplung betrug 20 h. Anschließend wurde der Ansatz nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS.

Protein Konzentration: 1.76mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.8

Beispiel 169A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F169 5 mg Cetuximab in PBS (c=16.9 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS.

Protein Konzentration: 1.98 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.4

Beispiel 169B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F169 40 mg anti-TWEAKR AK-1 in PBS (c=18.6 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert, rückverdünnt mit PBS und erneut aufkonzentriert.

Protein Konzentration: 11.2 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.4

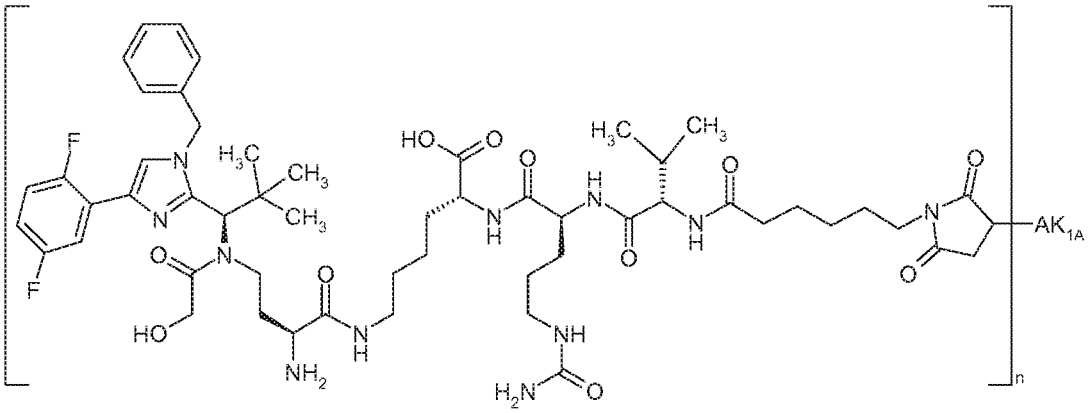
Beispiel 169E

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F169 5 mg Trastuzumab in PBS (c=13.5 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS.

Protein Konzentration: 1.95 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.7

Beispiel 170A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F170 5 mg Cetuximab in PBS (c=16.9 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt.

Protein Konzentration: 1.91 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.9

Beispiel 170B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F170 5 mg anti-TWEAKR AK-1 in PBS (c=12.9 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS.

Protein Konzentration: 1.72 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.07

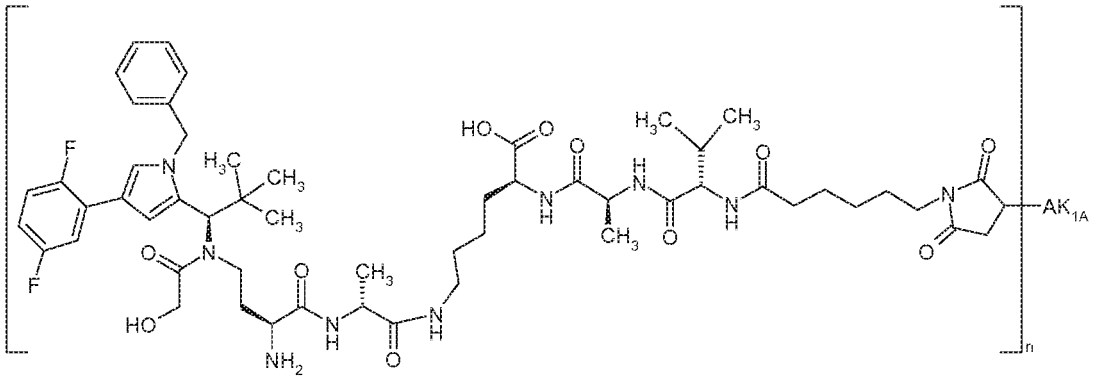
Beispiel 170E

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F170 5 mg Trastuzumab in PBS (c=13.5 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS.

Protein Konzentration: 1.84 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.3

Beispiel 171A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F171 5 mg Cetuximab in PBS (c=11.3 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS.

Protein Konzentration: 1.94 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.5

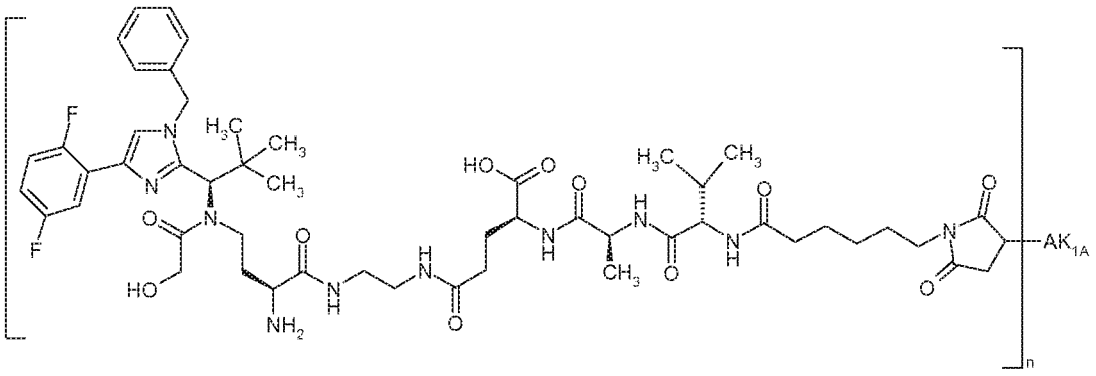
Beispiel 171B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F171 5 mg anti-TWEAKR AK-1 in PBS (c=12.9 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS.

Protein Konzentration: 1.58 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.7

Beispiel 172A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F172 5 mg Cetuximab in PBS (c=11.3 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS.

Protein Konzentration: 1.96 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.1

Beispiel 172B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F172 5 mg anti-TWEAKR AK-1 in PBS (c=18.6 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS.

Protein Konzentration: 1.85 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.1

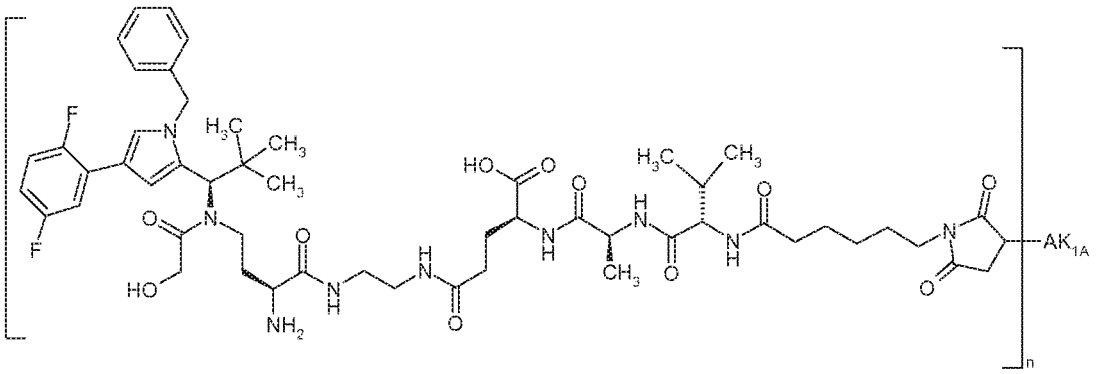
Beispiel 172E

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F172 5 mg Trastuzumab in PBS (c=13.5 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS.

Protein Konzentration: 1.92 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.3

Beispiel 173A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F173 5 mg Cetuximab in PBS (c=11.3 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS.

Protein Konzentration: 2.1 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.6

Beispiel 173B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F173 5 mg anti-TWEAKR AK-1 in PBS (c=18.6 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert, rückverdünnt mit PBS und erneut aufkonzentriert.

Protein Konzentration: 12.26 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.4

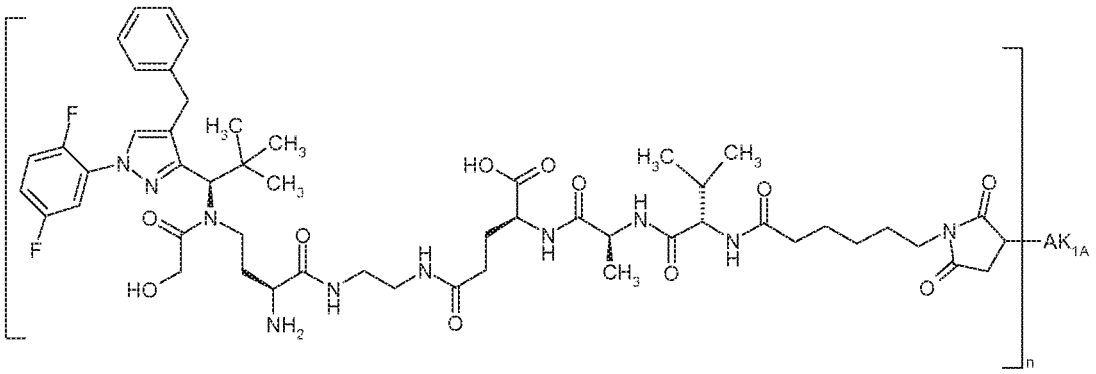
Beispiel 173E

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F173 5 mg Trastuzumab in PBS (c=13.5 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS.

Protein Konzentration: 2.33 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.9

Beispiel 174A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F174 5 mg Cetuximab in PBS (c=11.3 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS.

Protein Konzentration: 2.18 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.1

Beispiel 174B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F174 5 mg anti-TWEAKR AK-1 in PBS (c=18.6 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS.

Protein Konzentration: 1.99 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.1

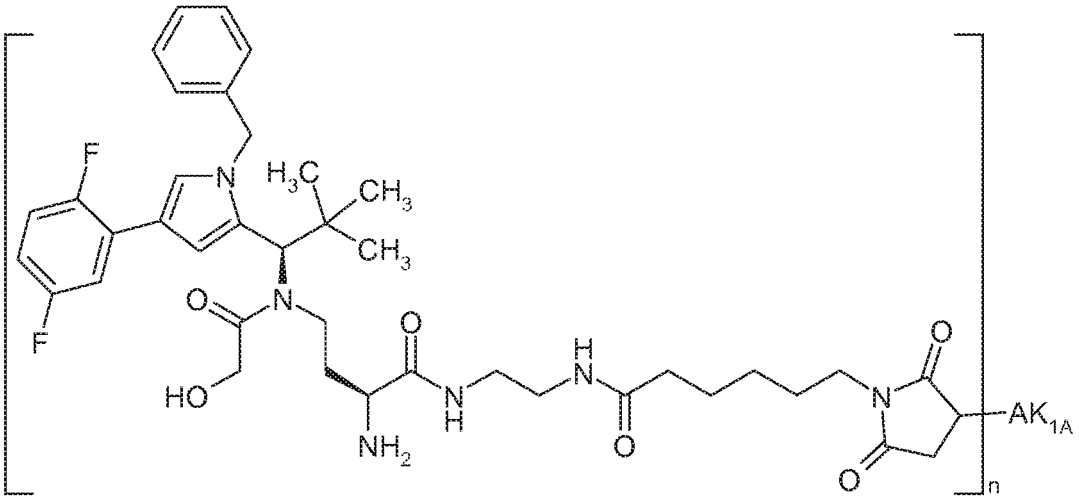
Beispiel 174E

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F174 5 mg Trastuzumab in PBS (c=13.5 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS.

Protein Konzentration: 2.03 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.5

Beispiel 175A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F175 5 mg Cetuximab in PBS (c=16.9 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS.

Protein Konzentration: 1.98 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.8

Beispiel 175B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F175 40 mg anti-TWEAKR AK-1 in PBS (c=18.6 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert, rückverdünnt mit PBS und erneut aufkonzentriert.

Protein Konzentration: 9.8 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.8

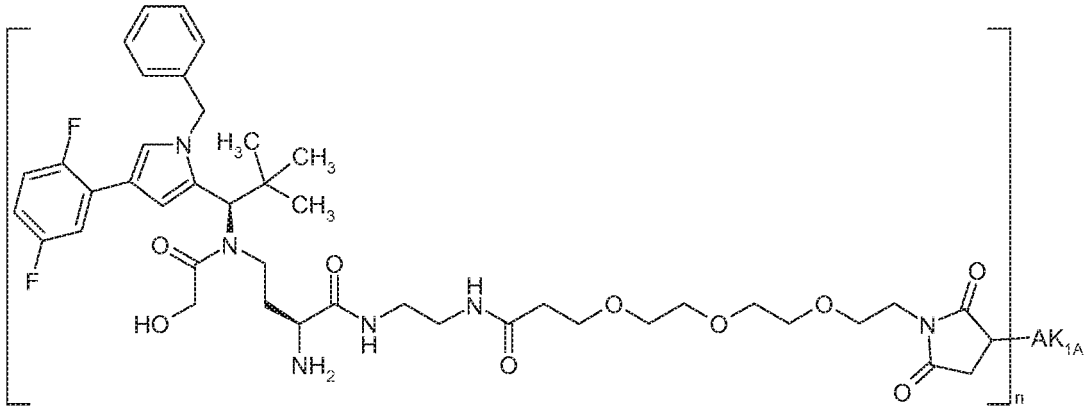
Beispiel 175E

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F175 5.0 mg Trastuzumab Antikörper in PBS (c = 13.5 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS.

Protein Konzentration: 1.97 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 4.2

Beispiel 176A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F176 5 mg Cetuximab in PBS (c=21.3 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.98 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.6

Beispiel 176B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F176 5 mg anti-TWEAKR AK-1 in PBS (c=18.6 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.93 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.8

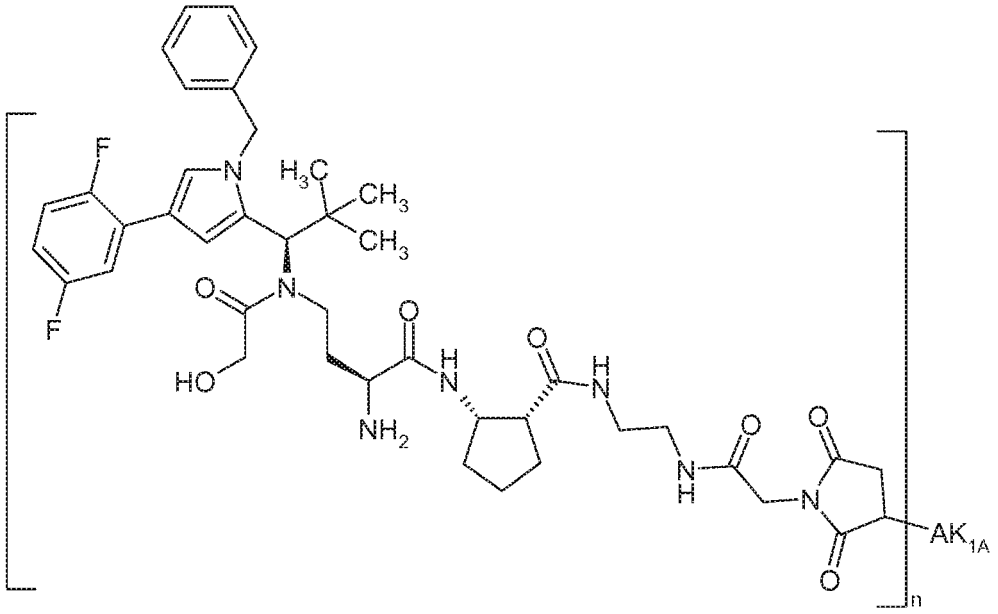
Beispiel 176E

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F176 5.0 mg Trastuzumab Antikörper in PBS (c = 13.5 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.85 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.3

Beispiel 177A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F177 5 mg Cetuximab in PBS (c=21.3 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.96 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.8

Beispiel 177B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F177 5 mg anti-TWEAKR AK-1 in PBS (c=18.6 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert

und rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.2 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.3

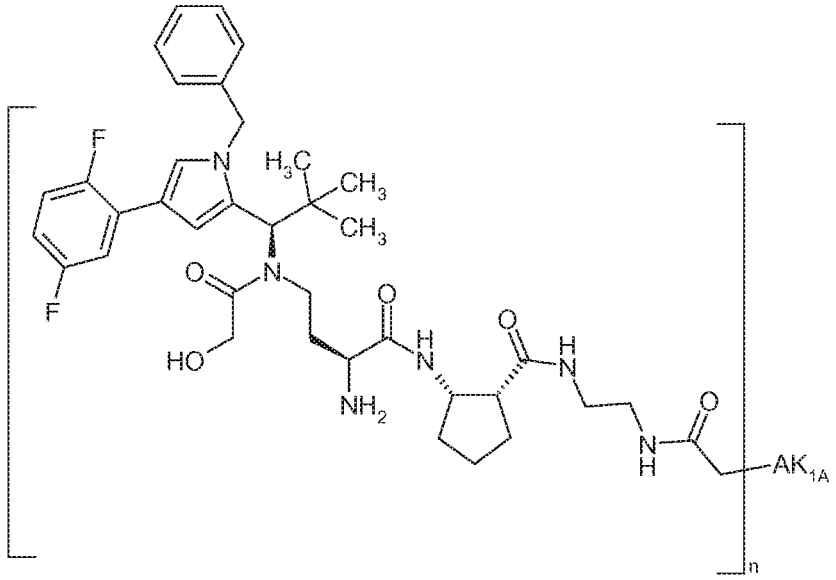
Beispiel 177E

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F177 5 mg Trastuzumab in PBS (c=13.5 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.83 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.1

Beispiel 178A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F178 5 mg Cetuximab in PBS (c=21.3 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS.

Protein Konzentration: 1.8 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.1

Beispiel 178B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F178 5 mg anti-TWEAKR AK-1 in PBS (c=18.6 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS.

Protein Konzentration: 1.45 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.4

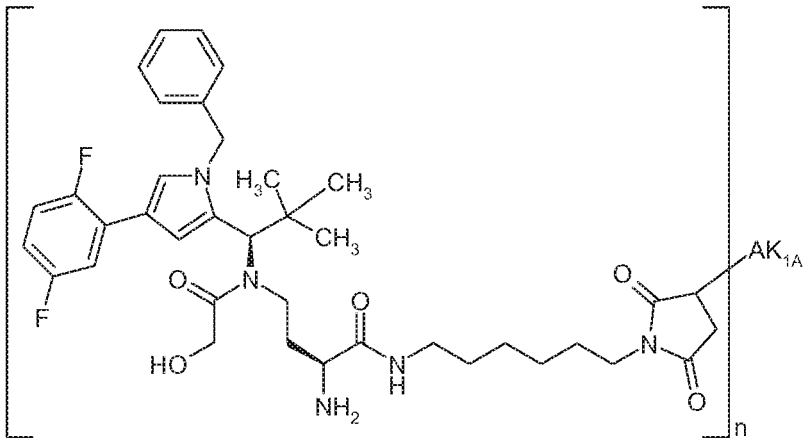
Beispiel 178E

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F178 5 mg Trastuzumab in PBS (c=13.5 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS.

Protein Konzentration: 1.8 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.6

Beispiel 179A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F179 5 mg Cetuximab in PBS (c=11.3 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS.

Protein Konzentration: 2.04 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.1

Beispiel 179B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F179 5 mg anti-TWEAKR AK-1 in PBS (c=18.6 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS.

Protein Konzentration: 1.65 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.1

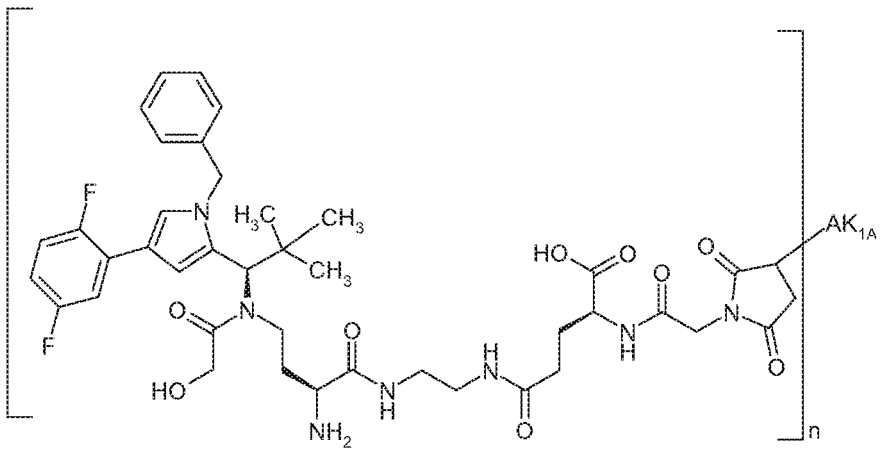
Beispiel 179E

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F179 5 mg Trastuzumab in PBS (c=13.5 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS.

Protein Konzentration: 1.89 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.3

Beispiel 180A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F180 5 mg Cetuximab in PBS (c=8.51 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.72 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.5

Beispiel 180B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F180 5 mg anti-TWEAKR AK-1 in PBS (c=18.6 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.82 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.4

Beispiel 180E

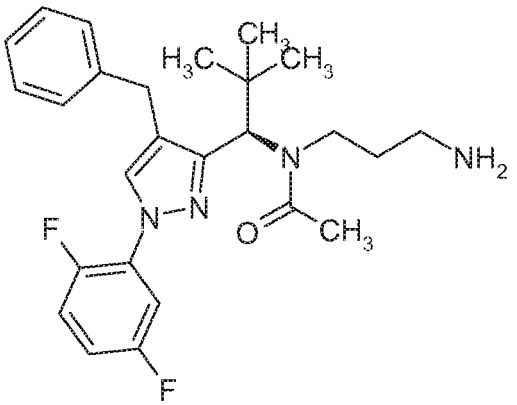
Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F180 5 mg Trastuzumab in PBS (c=13.5 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 2.01 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 4.7

Beispiel 181

N-(3-Aminopropyl)-N-{(1R)-1-[4-benzyl-1-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrazol-3-yl]-2,2-dimethylpropyl}acetamid



1.01 g (2.84 mmol) (1R)-1-[4-Benzyl-1-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrazol-3-yl]-2,2-dimethylpropan-1-amin wurden in 20 ml 1,2-Dichlormethan vorgelegt und mit 0.84 g (3.98 mmol) Natriumtriacetoxyborhydrid und 2.56 g (42.65 mmol) Essigsäure versetzt und 5 min bei RT gerührt. Danach wurde eine Lösung von 0.54 g (3.13 mmol) tert-Butyl (3-oxopropyl)carbamat in 5 ml 1,2-Dichlormethan zugegeben und die Reaktionsmischung über Nacht gerührt. Danach wurde vollständig eingedampft, der Rückstand in Essigsäureethylester aufgenommen, filtriert und das produkthaltige Filtrat vollständig eingedampft.

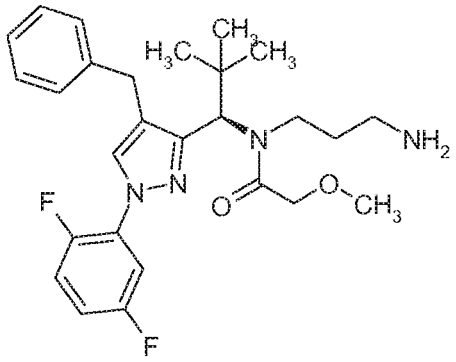
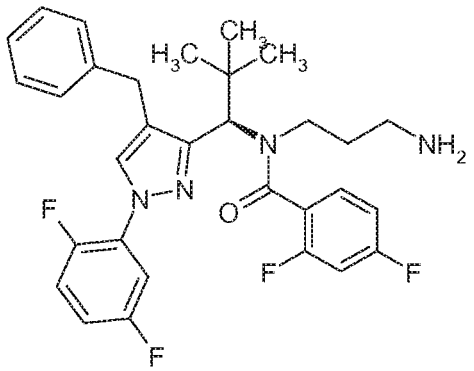
51.26 mg des Rückstandes wurden in 0.8 ml 1,2-Dichlormethan gelöst und zu 7.85 mg (0.1 mmol) Acetylchlorid auf einer 96er deep well Multititerplatte gegeben. Anschließend wurde mit 25.8 mg (0.2 mmol) N,N-Diisopropylethylamin versetzt und bei RT über Nacht geschüttelt. Dann wurde mittels Zentrifugaltrockner das Lösemittel vollständig entfernt und der Rückstand mit 0.4 ml 1,2-Dichlorethan und 0.4 ml Trifluoressigsäure versetzt und über Nacht geschüttelt. Dann wurde mittels Zentrifugaltrockner das Lösemittel vollständig entfernt und der Rückstand mit 0.8 ml DMF versetzt. Anschließend wurde filtriert und aus dem Filtrat die Zielverbindung per präparativer LC-MS (Methode 9):isoliert. Die produkthaltigen Fraktionen wurden mittels Zentrifugaltrockner im Vakuum eingeengt. Der Rückstand der Produktfraktionen wurde in je 0.6 ml DMSO gelöst. Diese wurden vereint und abschließend im Zentrifugaltrockner vom Lösemittel befreit. Es wurden 12.2 mg (27% d. Th.; Reinheit 100%) der Titelverbindung erhalten.

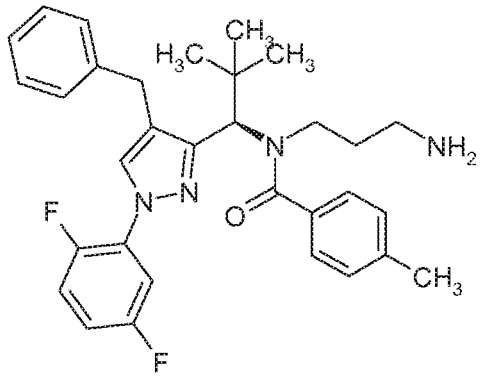
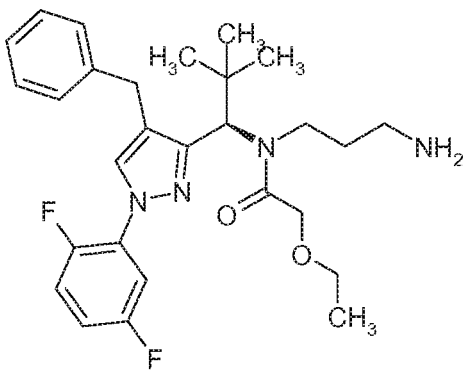
LC-MS (Methode 10): R_t = 0.95 min; MS (ESIpos): m/z = 455 $[M+H]^+$

In Analogie zu Beispiel 181 wurden die in Tabelle XA gezeigten Beispielverbindungen hergestellt.

Tabelle XA mit Beispielen 182-185

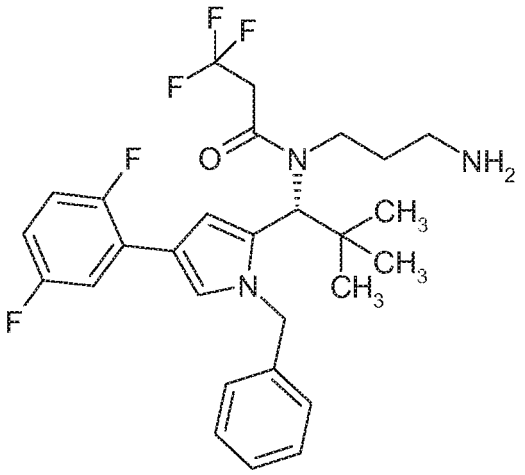
Beispiel	IUPAC-Name / Struktur (Ausbeute)	Analytische Daten

Beispiel	IUPAC-Name / Struktur (Ausbeute)	Analytische Daten
182	N-(3-Aminopropyl)-N-{(1R)-1-[4-benzyl-1-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrazol-3-yl]-2,2-dimethylpropyl}-2-methoxyacetamid  (14% d. Th.; Reinheit 98%)	LC-MS (Methode 10): R_t = 0.95 min MS (ESpos): m/z = 485 $(M+H)^+$
183	N-(3-Aminopropyl)-N-{(1R)-1-[4-benzyl-1-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrazol-3-yl]-2,2-dimethylpropyl}-2,4-difluorobenzamid  (20% d. Th.; Reinheit 100%)	LC-MS (Methode 10): R_t = 1.02 min MS (ESpos): m/z = 553 $(M+H)^+$

Beispiel	IUPAC-Name / Struktur (Ausbeute)	Analytische Daten
184	N-(3-Aminopropyl)-N-{(1R)-1-[4-benzyl-1-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrazol-3-yl]-2,2-dimethylpropyl}-4-methylbenzamid  (14% d. Th.; Reinheit 100%)	LC-MS (Methode 10): R_t = 1.04 min MS (ESpos): m/z = 531 $(M+H)^+$
185	N-(3-Aminopropyl)-N-{(1R)-1-[4-benzyl-1-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrazol-3-yl]-2,2-dimethylpropyl}-2-ethoxyacetamid  (3% d. Th.; Reinheit 83%)	LC-MS (Methode 10): R_t = 0.98 min MS (ESpos): m/z = 499 $(M+H)^+$

Beispiel 186

N-(3-Aminopropyl)-N-{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-3,3,3-trifluorpropanamid



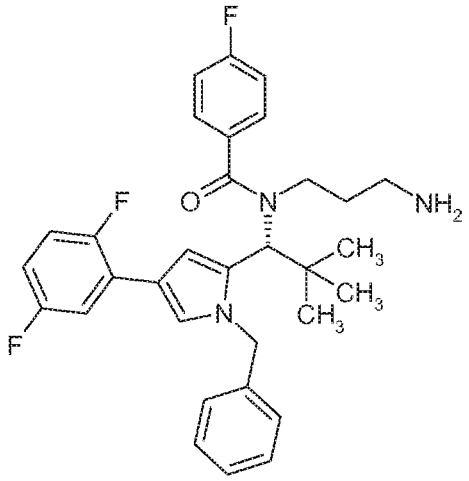
1.0 g (2.82 mmol) (1R)-1-[1-Benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropan-1-amin wurden in 20 ml 1,2-Dichlormethan vorgelegt und mit 1.4 g (3.95 mmol) Natriumtriacetoxyborhydrid und 2.54 g (42.32 mmol) Essigsäure versetzt und 5 min bei RT gerührt. Danach wurde eine Lösung von 0.54 g (3.10 mmol) tert-Butyl (3-oxopropyl)carbamat in 5 ml 1,2-Dichlormethan zugegeben und die Reaktionsmischung über Nacht gerührt. Danach wurde vollständig eingedampft, der Rückstand in Essigsäureethylester aufgenommen, filtriert und das produkthaltige Filtrat vollständig eingedampft.

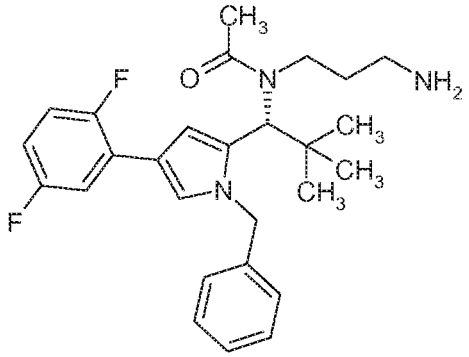
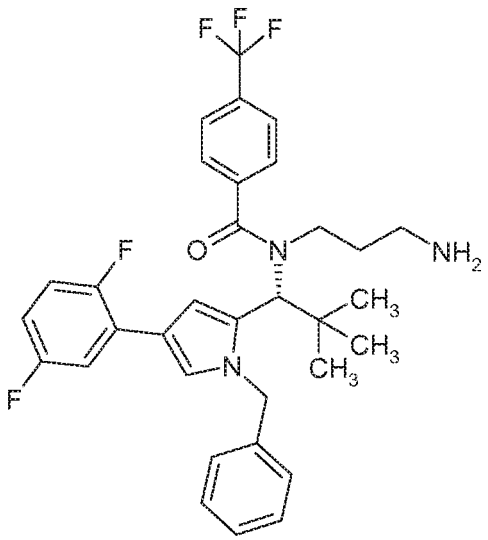
51.16 mg des Rückstandes wurden in 0.8 ml 1,2-Dichlormethan gelöst und zu 14.65 mg (0.1 mmol) 3,3,3-Trifluorpropanoylchlorid auf einer 96er deep well Multititerplatte gegeben. Anschließend wurde mit 25.8 mg (0.2 mmol) N,N-Diisopropylethylamin versetzt und bei RT über Nacht geschüttelt. Dann wurde mittels Zentrifugaltrockner das Lösemittel vollständig entfernt und der Rückstand mit 0.4 ml 1,2-Dichlorethan und 0.4 ml Trifluoressigsäure versetzt und über Nacht geschüttelt. Dann wurde mittels Zentrifugaltrockner das Lösemittel vollständig entfernt und der Rückstand mit 0.8 ml DMF versetzt. Anschließend wurde filtriert und aus dem Filtrat die Zielverbindung per präparativer LC-MS (Methode 9) isoliert. Die produkthaltigen Fraktionen wurden mittels Zentrifugaltrockner im Vakuum eingeengt. Der Rückstand der Produktfraktionen wurde in je 0.6 ml DMSO gelöst. Diese wurden vereint und abschließend im Zentrifugaltrockner vom Lösemittel befreit. Es wurden 1.0 mg (2% d. Th.; Reinheit 82%) der Titelverbindung erhalten.

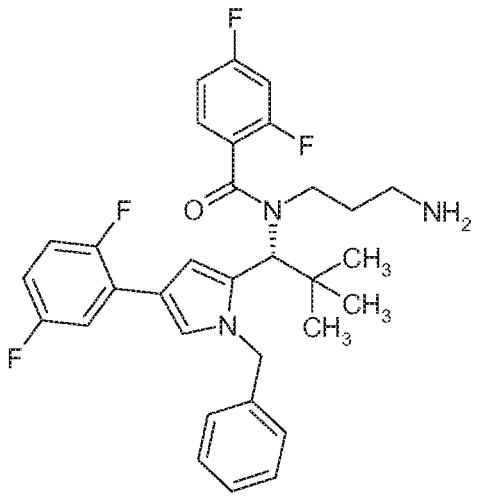
LC-MS (Methode 10): R_t = 1.01 min MS (ESIpos): m/z = 522 $[M+H]^+$

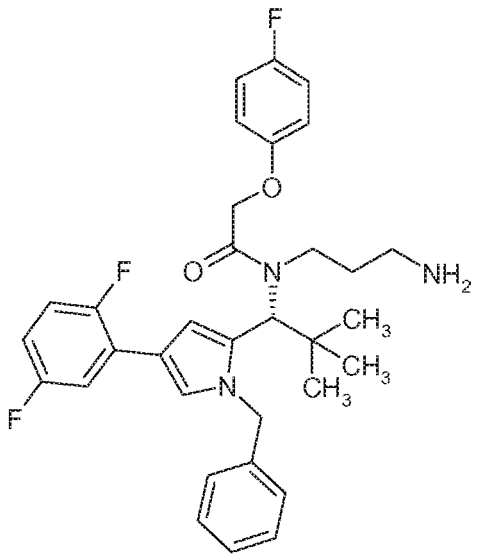
In Analogie zu Beispiel 186 wurden die in Tabelle XA1 gezeigten Beispielverbindungen hergestellt.

Tabelle XA1 mit Beispielen 187-191

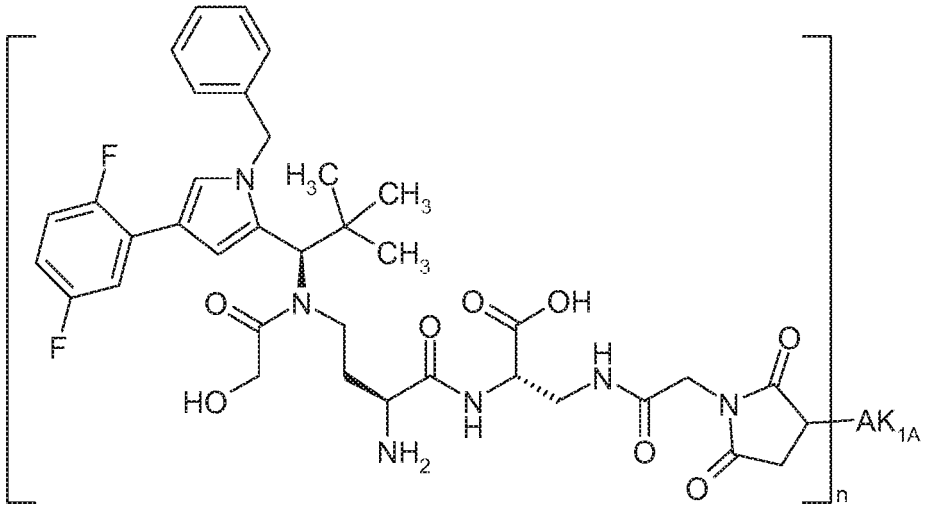
Beispiel	IUPAC-Name / Struktur (Ausbeute)	Analytische Daten
187	N-(3-Aminopropyl)-N-{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-4-fluorbenzamid  (3% d. Th.;Reinheit 83%)	LC-MS (Methode 10): R_t = 1.01 min MS (ESpos): m/z = 534 $(M+H)^+$

Beispiel	IUPAC-Name / Struktur (Ausbeute)	Analytische Daten
188	N-(3-Aminopropyl)-N-{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}acetamid  (2% d. Th.; Reinheit 87%)	LC-MS (Methode 10): R_t = 0.94 min MS (ESpos): m/z = 454 $(M+H)^+$
189	N-(3-Aminopropyl)-N-{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-4-(trifluoromethyl)benzamid  (6% d. Th.; Reinheit 90%)	LC-MS (Methode 10): R_t = 1.05 min MS (ESpos): m/z = 584 $(M+H)^+$

Beispiel	IUPAC-Name / Struktur (Ausbeute)	Analytische Daten
190	N-(3-Aminopropyl)-N-{(1R)-1-[4-benzyl-1-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrazol-3-yl]-2,2-dimethylpropyl}-2-ethoxyacetamid  (7% d. Th.; Reinheit 83%)	LC-MS (Methode 10): R_t = 0.98 min MS (ESpos): m/z = 552 $(M+H)^+$

Beispiel	IUPAC-Name / Struktur (Ausbeute)	Analytische Daten
191	N-(3-Aminopropyl)-N-{(1R)-1-[4-benzyl-1-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrazol-3-yl]-2,2-dimethylpropyl}-2-ethoxyacetamid  (13% d. Th.; Reinheit 98%)	LC-MS (Methode 10): R_t = 1.02 min MS (ESpos): m/z = 564 $(M+H)^+$

Beispiel 192A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F192 5 mg Cetuximab in PBS (c=21.3 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.968 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.9

Beispiel 192B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F192 5 mg anti-TWEAKR AK-1 in PBS (c=18.6 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.92 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.6

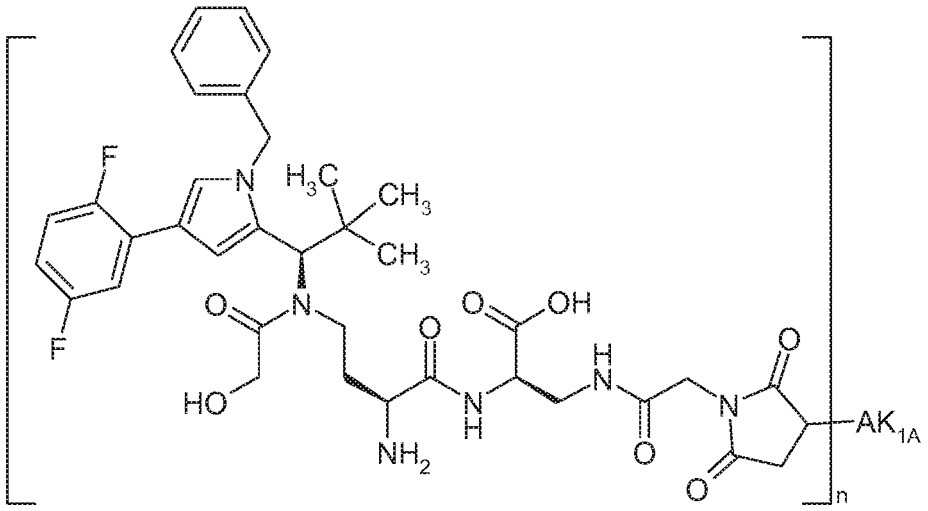
Beispiel 192E

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F192 5 mg Trastuzumab Antikörper in PBS (c = 13.5 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 2.04 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.3

Beispiel 193A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F193 5 mg Cetuximab in PBS (c=23.1 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.98 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.9

Beispiel 193B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F193 5 mg anti-TWEAKR AK-1 in PBS (c=18.6 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 2.03 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.2

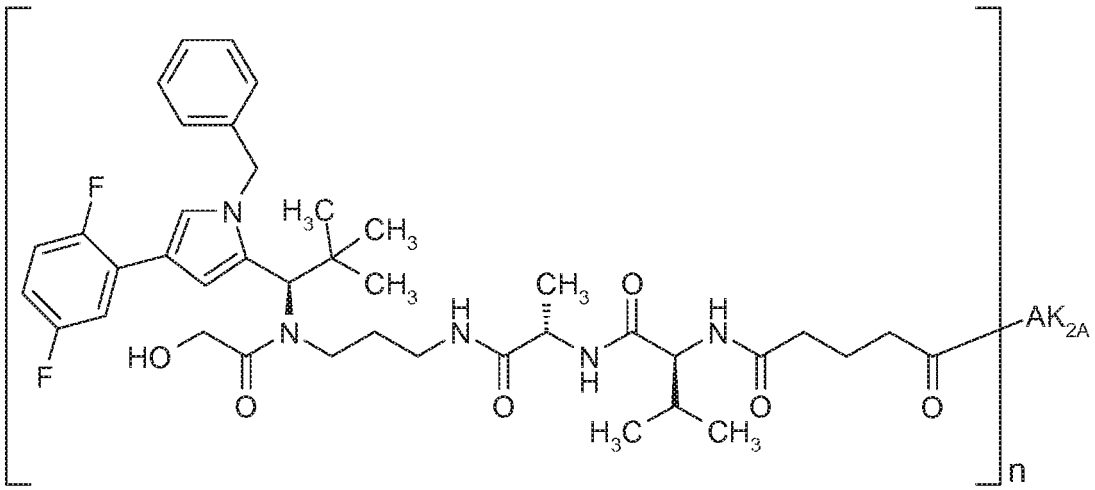
Beispiel 193E

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F193 5 mg Trastuzumab Antikörper in PBS (c = 13.5 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.61 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.3

Beispiel 194A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F194 5 mg Cetuximab in PBS (c = 23.1 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS.

Protein Konzentration: 1.67 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 1.9

Beispiel 194B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F194 5.0 mg anti-TWEAKR AK-1 Antikörper in PBS (c = 18.6 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS.

Protein Konzentration: 0.99 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.8

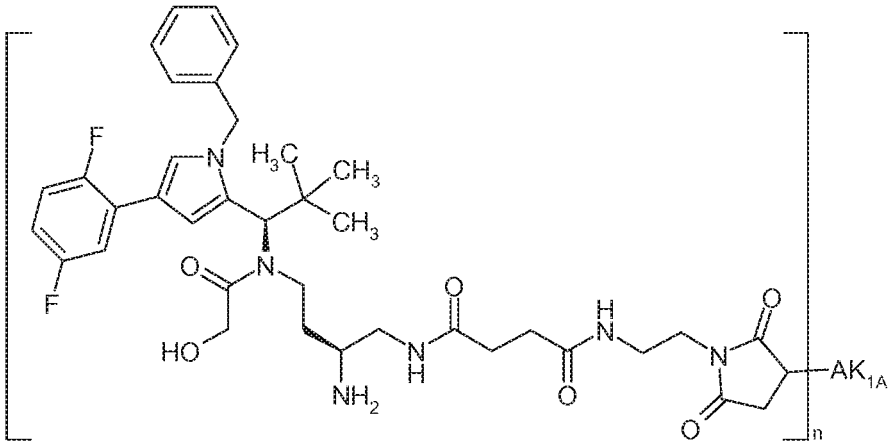
Beispiel 194E

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F194 5.0 mg Trastuzumab Antikörper in PBS (c = 13.5 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS.

Protein Konzentration: 1.39 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.4

Beispiel 195A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F195 5 mg Cetuximab in PBS (c=23.1 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.79 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.2

Beispiel 195B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F195 5 mg anti-TWEAKR AK-1 in PBS (c=18.6 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.53 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.3

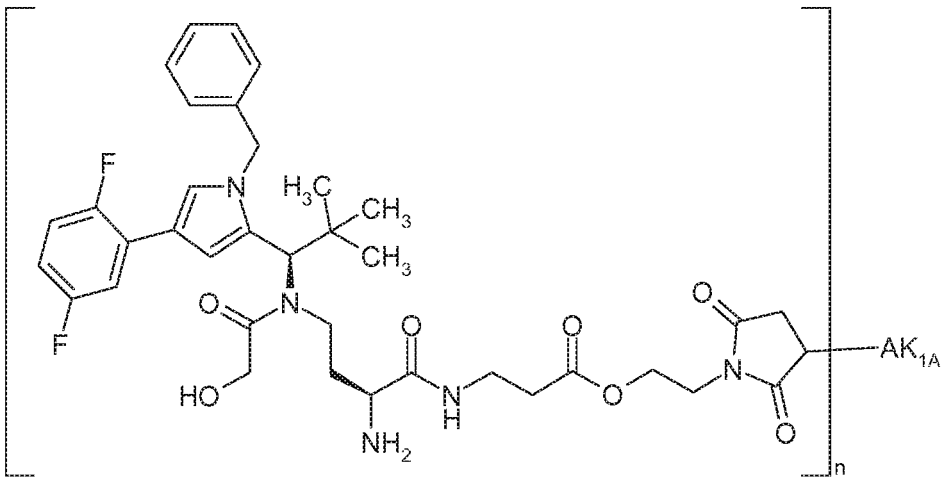
Beispiel 195E

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F195 5.0 mg Trastuzumab Antikörper in PBS (c = 13.5 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.91 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.4

Beispiel 196A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F196 5 mg Cetuximab in PBS (c=23.1 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.85 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.0

Beispiel 196B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F196 5 mg anti-TWEAKR AK-1 in PBS (c=18.6 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert

und rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.73 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.1

Beispiel 196E

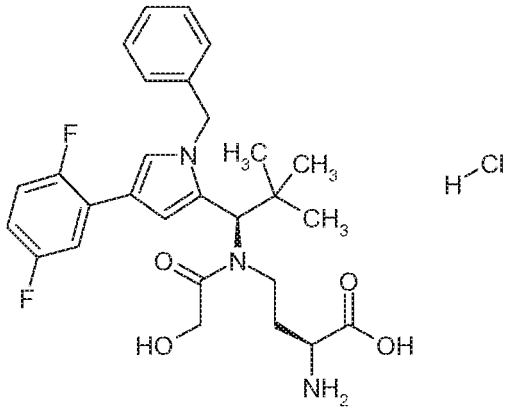
Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F196 5.0 mg Trastuzumab Antikörper in PBS (c = 13.5 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.86 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.4

Beispiel 197

(2S)-2-Amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butansäurehydrochlorid (1:1)

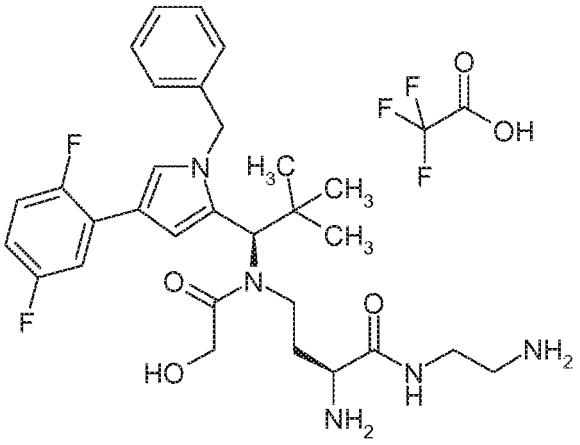


150 mg (0.2 mmol) von Intermediat C53 wurden in 15 mL DMF gelöst und mit 2.29 g (20.39 mmol) DABCO versetzt. Der Ansatz wurde 30 min im Ultraschallbad behandelt. Durch Zugabe von 1.17 ml Essigsäure wurde der Ansatz dann auf pH 3-4 gebracht und im Vakuum eingeengt. Der Rückstand wurde durch präparative HPLC gereinigt und die entsprechenden Fraktionen wurden bei RT im Vakuum eingeengt. Der Rückstand wurde in Acetonitril/Wasser 1:1 aufgenommen, mit 5 mL einer 4N Salzsäure versetzt und anschließend lyophilisiert. So wurden 81 mg (68% d. Th.) der Titelverbindung erhalten.

LC-MS (Methode 5): R_t = 2.69 min; MS (ElPos): m/z = 514 $[M+H]^+$.

Beispiel 198

Trifluoressigsäure --(2S)-2-amino-N-(2-aminoethyl)-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanamid (1:1)



15 mg (0.018 mmol) von Intermediat C64 wurden in 4 mL 2,2,2-Trifluorethanol gelöst. Es wurden 15 mg (0.110 mmol) Zinkchlorid zugegeben und der Ansatz 2 h bei 50°C gerührt. Anschließend wurden 32 mg (0.110 mmol) Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure zugesetzt und der Ansatz im Vakuum eingeengt. Der Rückstand wurde mittels präparativer HPLC gereinigt. Nach Einengen der entsprechenden Fraktionen und Lyophilisation des Rückstands aus Acetonitril/Wasser wurden 9.5 mg (77% d.Th.) der Titelverbindung erhalten.

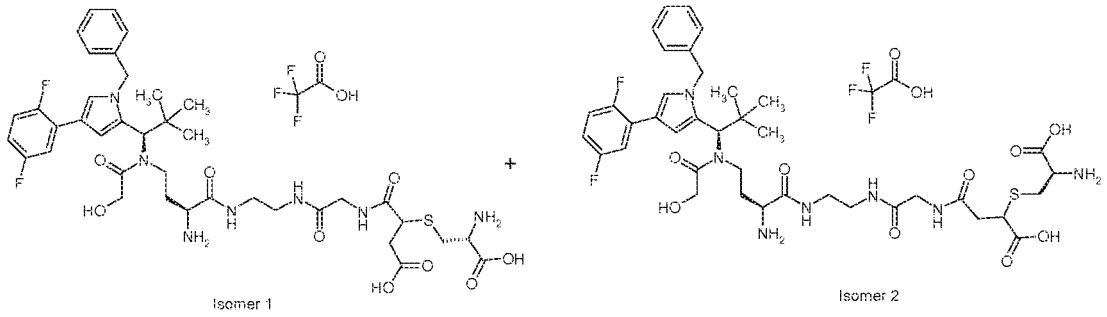
LC-MS (Methode 1): R_t = 0.68 min; MS (ESIpos): m/z = 556 $(M+H)^+$.

Beispiel 199

4-[(2-{[2-({(2S)-2-Amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}amino)ethyl]amino}-2-oxoethyl)amino]-3-{[(2R)-2-amino-2-carboxyethyl]sulfanyl}-4-oxobutansäure -trifluoressigsäure (1:1)

und

4-[(2-{[2-({(2S)-2-Amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}amino)ethyl]amino}-2-oxoethyl)amino]-2-{[(2R)-2-amino-2-carboxyethyl]sulfanyl}-4-oxobutansäure -trifluoressigsäure (1:1)



LC-MS (Methode 1): R_t = 0.80 min; MS (Elpos): m/z = 814 $[M+H]^+$.

Zunächst wurde L-Cystein mit 1-({[2-(Trimethylsilyl)ethoxy]carbonyl}oxy)pyrrolidine-2,5-dion in DMF in Gegenwart von *N,N*-Diisopropylethylamin in N-{[2-(Trimethylsilyl)ethoxy]carbonyl}-L-cystein überführt.

406 mg (1.53 mmol) N-{[2-(Trimethylsilyl)ethoxy]carbonyl}-L-cystein wurden in 10 ml DMF gelöst und mit 157.5 mg (1.606 mmol) Maleinsäureanhydrid versetzt und der Ansatz 1 Stunde bei RT gerührt. 130 µL dieser Lösung wurden mit 7.5 mg (0.01 mmol) von Intermediat C66 versetzt und der Ansatz 5 min bei RT gerührt. Anschließend wurde im Vakuum eingeengt und der Rückstand durch präparative HPLC gereinigt. Das Lösemeittel wurde im Vakuum abgedampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Es wurden 10 mg (89%) des geschützten Intermediats erhalten, wobei weder im HPLC noch im LC-MS die Regioisomere aufgetrennt werden konnten.

LC-MS (Methode 1): R_t = 1.38 min; MS (Elpos): m/z = 1120 $[M+H]^+$.

Im letzten Schritt wurden die 10 mg von diesem Intermediat in 2 mL 2,2,2-Trifluorethanol gelöst. Es wurden 12 mg (0.088 mmol) Zinkchlorid zugegeben und der Ansatz 30 min bei 50°C gerührt. Anschließend wurden 26 mg (0.088 mmol) Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure zugesetzt und das Lösemittel im Vakuum verdampft. Der Rückstand wurde mittels präparativer HPLC gereinigt. Nach Einengen der entsprechenden Fraktionen und Lyophilisation des Rückstands aus Acetonitril/Wasser wurden 8.3 mg (99% d. Th.) der Titelverbindung als Regioisomerengemisch imVerhältnis 87:13 erhalten.

LC-MS (Methode 5): R_t = 2.3 min und 2.43 min; MS (ESIpos): m/z = 832 $(M+H)^+$.

^{1}H-NMR Hauptregioisomer: (500 MHz, DMSO-d_6): δ = 8.7 (m, 1H), 8.5 (m, 2H), 8.1 (m, 1H), 7.6 (m, 1H), 7.5 (s, 1H) 7.4-7.15 (m, 6H), 6.9-7.0 (m, 1H), 6.85 (s, 1H), 5.61 (s, 1H), 4.9 und 5.2 (2d, 2H), 4.26 und 4.06 (2d, 2H), 3.5-3.8 (m, 5H), 3.0-3.4 (m, 5H), 2.75-3.0 (m, 3H), 2.58 und 2.57 (dd, 1H), 0.77 und 1,5 (2m, 2H), 0.81 (s, 9H).

Alternativ wurden die regioisomeren Titelverbindungen wie folgt hergestellt:

Zunächst wurde dazu L-Cystein mit 1-({[2-(Trimethylsilyl)ethoxy]carbonyl}oxy)pyrrolidine-2,5-dion in DMF in Gegenwart von *N,N*-Diisopropylethylamin in N-{[2-(Trimethylsilyl)ethoxy]carbonyl}-L-cystein überführt.

55 mg (0.068 mmol) von Intermediat F104 und 36 mg (0.136 mmol) N-{[2-(Trimethylsilyl) ethoxy]carbonyl}-L-cystein 15 ml DMF gelöst und der Ansatz 20 h bei RT gerührt. Anschließend wurde eingeengt und der Rückstand durch präparative HPLC gereinigt. Nach Vereinigung der entsprechenden Fraktionen und Abdampfen der Lösemittel im Vakuum wurde der Rückstand in 15 mL THF/Wasser 1:1 gelöst. Es wurden 131 µL einer 2M wässrigen Lithiumhydroxidlösung zugegeben und der Ansatz 1 h bei RT gerührt. Anschließend wurde der Ansatz mit einer 1M Salzsäure neutral gestellt, das Lösemittel im Vakuum abgedampft und der Rückstand durch präparative HPLC gereinigt. Es wurden 37 mg (50% d. Th.) der regioisomeren geschützten Intermediate als farbloser Schaum erhalten.

LC-MS (Methode 5): R_t = 3.33 min und 3.36 min; MS (ESIpos): m/z = 976 $(M+H)^+$.

Im letzten Schritt wurden 25 mg (0.023 mmol) von diesem Intermediat in 3 mL 2,2,2-Trifluorethanol gelöst. Es wurden 12.5 mg (0.092 mmol) Zinkchlorid zugegeben und der Ansatz 4 h bei 50°C gerührt. Anschließend wurden 27 mg (0.092 mmol) Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure zugesetzt und das Lösemittel im Vakuum verdampft. Der Rückstand wurde mittels präparativer HPLC gereinigt. Nach Einengen der entsprechenden Fraktionen und Lyophilisation des Rückstands aus Acetonitril/Wasser wurden 18.5 mg (85% d. Th.) der Titelverbindung als Regioisomerengemisch imVerhältnis 21:79 erhalten.

LC-MS (Methode 5): R_t = 2.37 min und 3.44 min; MS (ESIpos): m/z = 832 $(M+H)^+$.

Die gezielte Herstellung der einzelnen Regioisomere der Titelverbindungen erfolgte folgendermaßen:

Beispiel 199-2

4-[(2-{[2-({(2S)-2-Amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}amino)ethyl]amino}-2-oxoethyl)amino]-2-{[(2R)-2-amino-2-carboxyethyl]sulfanyl}-4-oxobutansäure -trifluoressigsäure (1:1)

Zunächst wurde dazu Methyl-L-Cysteinat mit 1-({[2-(Trimethylsilyl)ethoxy]carbonyl}oxy) pyrrolidine-2,5-dion in DMF in Gegenwart von *N,N*-Diisopropylethylamin in Methyl-N-{[2-(trimethylsilyl)ethoxy]carbonyl}-L-cysteinat überführt.

53 mg (0.251 mmol) von kommerziell erhältlicher 3-Brom-4-methoxy-4-oxobutansäure und 70 mg (0.251 mmol) Methyl-N-{[2-(trimethylsilyl)ethoxy]carbonyl}-L-cysteinat wurden in 5 ml DMF gelöst und unter pH Kontrolle mit wässriger Natriumhydrogencarbonatlösung versetzt. Nach 15 min Rühren bei RT wurde mit Essigsäure ein pH Wert von 4.3 eingestellt und der Ansatz eingeengt. Der Rückstand durch präparative HPLC gereinigt. Nach Vereinigung der entsprechenden Fraktionen und Abdampfen der Lösemittel im Vakuum wurde 72 mg (70% d. Th.) 4-Methoxy-3-{[(2R)-3-methoxy-3-oxo-2-({[2-(trimethylsilyl)ethoxy]carbonyl}amino)propyl] sulfanyl}-4-oxobutansäure erhalten.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.93 min; MS (ESIpos): m/z = 410 $(M+H)^+$.

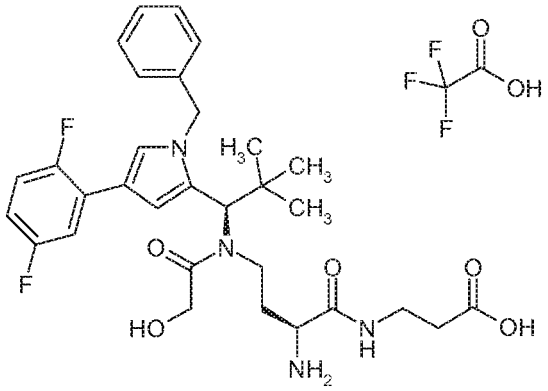
Dieses Intermediat wurde in Gegenwart von HATU mit Intermediat C66 gekuppelt und anschließend zunächst mit Lithiumhydroxid in Methanol und anschließend mit Zinkchlorid wie oben beschrieben vollständig entschützt. Der Rückstand wurde mittels präparativer HPLC gereinigt. Nach Einengen der entsprechenden Fraktionen und Lyophilisation des Rückstands aus Acetonitril/Wasser wurden 2mg der Titelverbindung erhalten.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.78 min; MS (ESIpos): m/z = 832 $(M+H)^+$.

In analoger Weise kann das Isomer 1 hergestellt werden.

Beispiel 200

N-{(2S)-2-Amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}-beta-alanin -trifluoressigsäure (1:1)

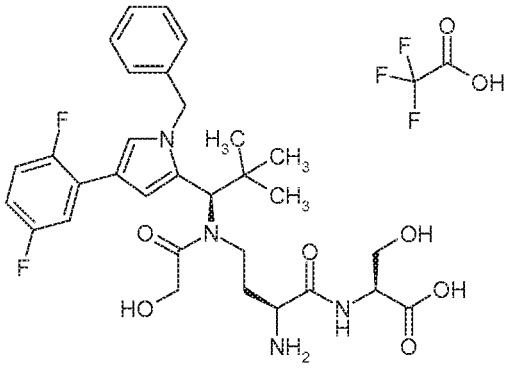


10 mg (0.014 mmol) Intermediat C61 in 3 mL 2,2,2-Trifluorethanol gelöst. Es wurden 11 mg (0.082 mmol) Zinkchlorid zugegeben und der Ansatz 30 min bei 50°C gerührt. Anschließend wurden 24 mg (0.082 mmol) Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure zugesetzt und das Lösemittel im Vakuum verdampft. Der Rückstand wurde mittels präparativer HPLC gereinigt. Nach Einengen der entsprechenden Fraktionen und Lyophilisation des Rückstands aus Acetonitril/Wasser wurden 4.2 mg (40% d. Th.) der Titelverbindung erhalten.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.79 min; MS (ESIpos): m/z = 585 $(M+H)^+$.

Beispiel 201

N-{(2S)-2-Amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}-L-serin -trifluoressigsäure (1:1)



20 mg (0.03 mmol) von Intermediat C58 sowie 8.5 mg (0.037 mmol) Benzyl L-serinate hydrochloride (1:1) wurden in 5 mL DMF aufgenommen und mit 17 mg (0.046 mmol) HATU und 21 µl N,N-Diisopropylethylamin versetzt. Nach 10 min Rühren bei RT wurde eingeengt und der Rückstand durch präparative HPLC gereinigt. Es wurden 12.5 mg (49% d. Th.) der Zwischenstufe erhalten. LC-MS (Methode 1): R_t = 1.42 min; MS (ESIpos): m/z = 835 $(M+H)^+$.

12.5 mg (0.015 mmol) dieser Zwischenstufe wurden in 10 ml Ethanol gelöst, mit Palladium auf Kohle (10%ig) versetzt und bei RT mit Wasserstoff unter Normaldruck 30 min hydriert. Der Katalysator wurde abfiltriert, die Lösemittel im Vakuum verdampft und nach Lyophilisation des Rückstandes aus Acetonitril/Wasser wurden 7.5 mg (67% d. Th.) der Zwischenstufe erhalten.

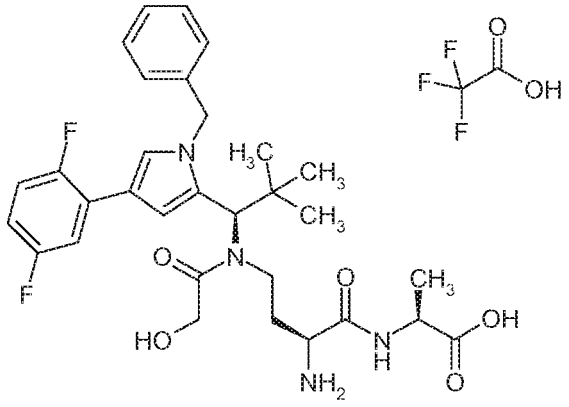
LC-MS (Methode 1): R_t = 1.28 min; MS (ESIpos): m/z = 745 $(M+H)^+$.

7.5 mg (0.01 mmol) dieses Intermediats wurden in 3 mL 2,2,2-Trifluorethanol gelöst. Es wurden 8 mg (0.06 mmol) Zinkchlorid zugegeben und der Ansatz 4.5 h bei 50°C gerührt. Anschließend wurden 17.7 mg (0.06 mmol) Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure zugesetzt und das Lösemittel im Vakuum verdampft. Der Rückstand wurde mittels präparativer HPLC gereinigt. Nach Einengen der entsprechenden Fraktionen und Lyophilisation des Rückstands aus Acetonitril/Wasser wurden 4.2 mg (58% d. Th.) der Titelverbindung erhalten.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.75 min; MS (ESIpos): m/z = 601 $(M+H)^+$.

Beispiel 202

N-{(2S)-2-Amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}-L-alanin -trifluoressigsäure (1:1)

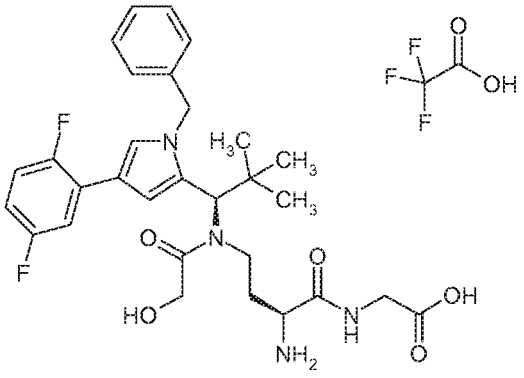


Die Herstellung der Titelverbindung erfolgte in Analogie zu Beispiel 201 ausgehend von Intermediat C58 und Benzyl L-alaninate hydrochloride (1:1).

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.82 min; MS (ESIpos): m/z = 585 $(M+H)^+$.

Beispiel 203

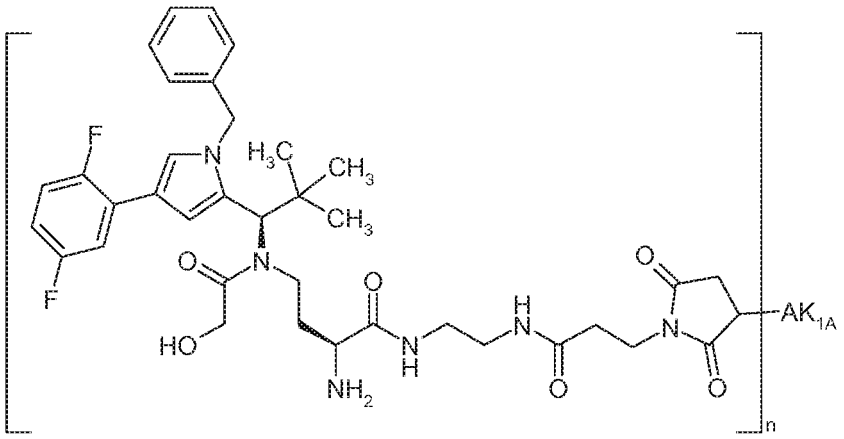
N-{(2S)-2-Amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}glycin -trifluoressigsäure (1:1)



Die Herstellung der Titelverbindung erfolgte in Analogie zu Beispiel 201 ausgehend von Intermediat C58 und Benzylglycinathydrochlorid (1:1).

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.82 min; MS (ESIpos): m/z = 571 $(M+H)^+$.

Beispiel 204A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F204 5 mg Cetuximab in PBS (c=23.1 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.88 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.6

Beispiel 204B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F204 50 mg anti-TWEAKR AK-1 in PBS (c=18.6 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert, rückverdünnt mit PBS und erneut aufkonzentriert. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 12.66 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.5

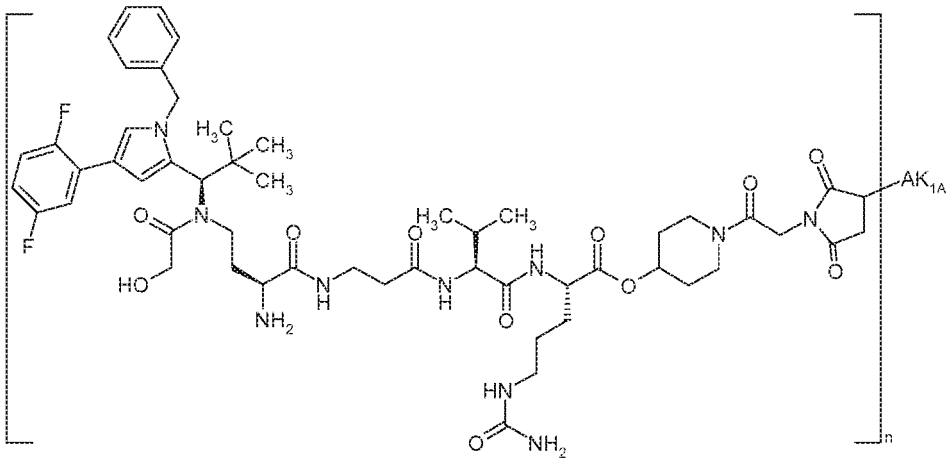
Beispiel 204E

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F204 5.0 mg Trastuzumab Antikörper in PBS (c = 13.5 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.65 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.5

Beispiel 205A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F205 5 mg Cetuximab in PBS (c=23.1 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.99 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.2

Beispiel 205B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F205 5 mg anti-TWEAKR AK-1 in PBS (c=18.6 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 0.96 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.6

Beispiel 205E

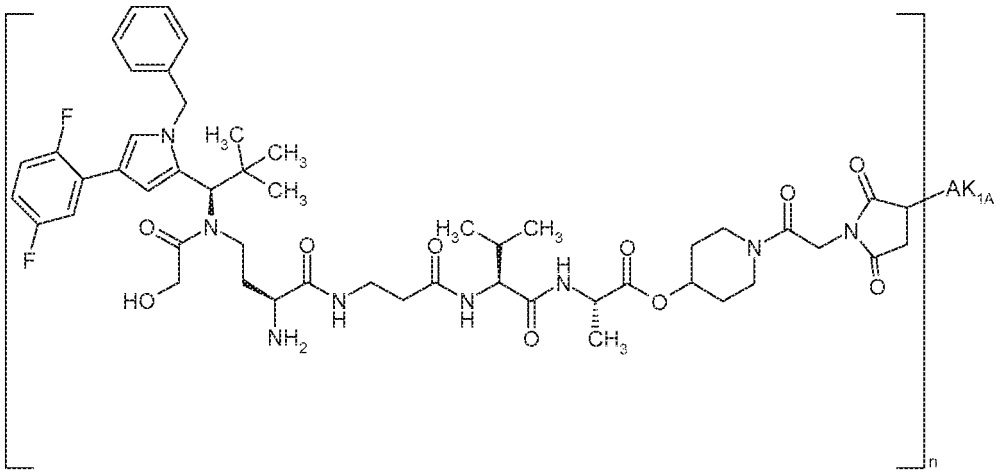
Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F205 5 mg Trastuzumab in PBS (c=13.5 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und

rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.94 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.6

Beispiel 206A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F206 5 mg Cetuximab in PBS (c=23.1 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.73 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.6

Beispiel 206B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F206 5 mg anti-TWEAKR AK-1 in PBS (c=18.6 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.21 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.0

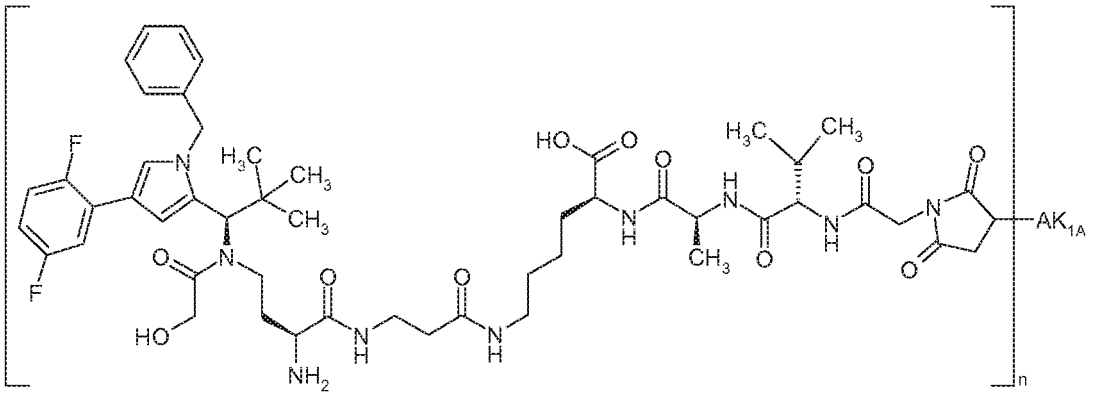
Beispiel 206E

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F206 5 mg Trastuzumab in PBS (c=13.5 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.84 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.8

Beispiel 207A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F207 5 mg Cetuximab in PBS (c=10 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.79 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.4

Beispiel 207B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F207 50 mg anti-TWEAKR AK-1 in PBS (c=18.6 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert, rückverdünnt mit PBS und erneut aufkonzentriert. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen. Bei dieser ADC-Präparation wurde unmittelbar nach der Synthese ein Anteil der ring-geöffneten Bernsteinsäureamid-Form von 19% ermittelt.

Protein Konzentration: 12.99 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 4.3

Beispiel 207E

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F207 5 mg Trastuzumab in PBS (c=13.5 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 2.39 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.8

Beispiel 207I

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F207 5.0 mg Nimotuzumab in PBS (c = 13.1 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.92 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.5

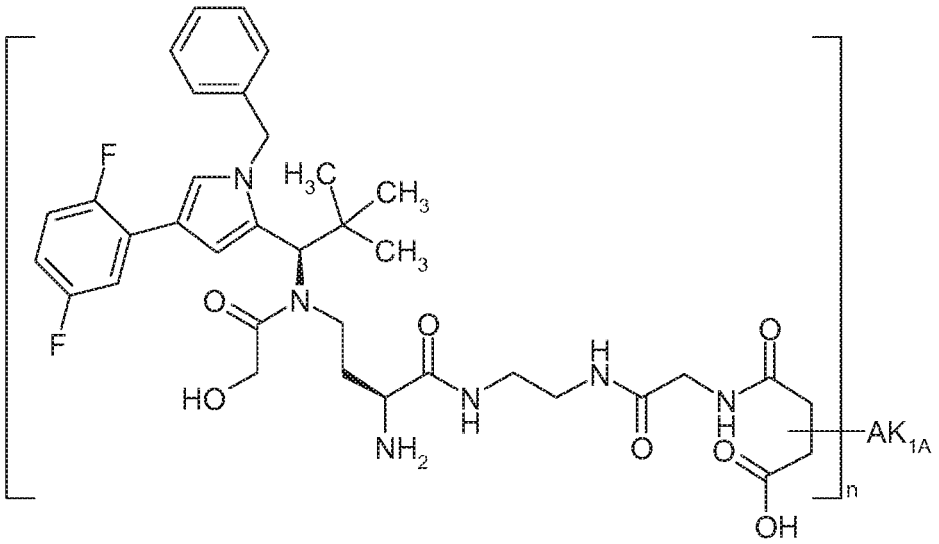
Beispiel 207H

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F207 5.0 mg Panitumumab in PBS (c = 13.6 mg/mL). Die Reduktionszeit mit TCEP betrug 4 h und die Rührzeit bei der ADC Kupplung betrug 20 h. Anschließend wurde der Ansatz nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 2.0 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 1.9

Beispiel 208A



60 mg Cetuximab in 5494 µL ml PBS (c=10.92 mg/mL) wurden unter Argon mit einer Lösung aus 0.344 mg TCEP in 100µl PBS-Puffer versetzt. Der Ansatz wurde 30min bei RT gerührt und anschließend wurden 2.582 mg (0.003 mmol) von Intermediat F104 gelöst in 600µl DMSO zugegeben. Nach weiteren 120 min Rühren bei RT wurde der Ansatz mit 1306 µl PBS-Puffer, der zuvor auf pH 8 eingestellt wurde, verdünnt.

Diese Lösung wurde dann über mit PBS-Puffer pH8 equillibrierte PD 10-Säulen (Sephadex® G-25, GE Healthcare) gegeben und mit PBS-Puffer pH8 eluiert. Das Eluat wurde mit PBS-Puffer pH8 auf ein Gesamtvolumen von 14 ml verdünnt. Diese Lösung wurde über Nacht bei RT unter Argon gerührt und anschließend durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert, rückverdünnt mit PBS-Puffer (pH 7.2) und erneut aufkonzentriert. Der erhaltene ADC batch wurde folgendermaßen charakterisiert:

Protein Konzentration: 13.36 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 1.8

Bei dieser ADC-Präparation wurde ein Anteil der ring-geöffneten Bernsteinsäureamid-Form von 94% ermittelt.

Beispiel 208B

60 mg anti-TWEAKR AK-1 in 3225 µL ml PBS (c=18.6 mg/mL) wurden unter Argon mit 775 µL PBS-Puffer verdünnt und dann mit einer Lösung aus 0.344 mg TCEP in 100µl PBS-Puffer versetzt. Der Ansatz wurde 30min bei RT gerührt und anschließend wurden 2.582 mg (0.003 mmol) von Intermediat F104 gelöst in 600µl DMSO zugegeben. Nach weiteren 120 min Rühren bei RT wurde der Ansatz mit 300 µl PBS-Puffer, der zuvor auf pH 8 eingestellt wurde, verdünnt.

Diese Lösung wurde dann über mit PBS-Puffer pH8 equillibrierte PD 10-Säulen (Sephadex® G-25, GE Healthcare) gegeben und mit PBS-Puffer pH8 eluiert. Das Eluat wurde mit PBS-Puffer pH8 auf ein Gesamtvolumen von 14 ml verdünnt. Diese Lösung wurde über Nacht bei RT unter Argon gerührt und anschließend durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert, rückverdünnt mit PBS-Puffer (pH 7.2) und erneut aufkonzentriert. Der erhaltene ADC batch wurde folgendermaßen charakterisiert:
Protein Konzentration: 14.95 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.2

Beispiel 208I

60 mg Nimotuzumab in 4587 µL ml PBS (c=13.1 mg/mL) wurden unter Argon mit einer Lösung aus 0.344 mg TCEP in 100 µl PBS-Puffer versetzt. Der Ansatz wurde 30min bei RT gerührt und anschließend wurden 2.582 mg (0.003 mmol) von Internediat F104 gelöst in 600µl DMSO zugegeben. Nach weiteren 120 min Rühren bei RT wurde der Ansatz mit 2213 µl PBS-Puffer, der zuvor auf pH 8 eingestellt wurde, verdünnt.
Diese Lösung wurde dann über mit PBS-Puffer pH8 equillibrierte PD 10-Säulen (Sephadex® G-25, GE Healthcare) gegeben und mit PBS-Puffer pH8 eluiert. Das Eluat wurde mit PBS-Puffer pH8 auf ein Gesamtvolumen von 14 ml verdünnt. Diese Lösung wurde über Nacht bei RT unter Argon gerührt und anschließend durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert, rückverdünnt mit PBS-Puffer (pH 7.2) und erneut aufkonzentriert. Der erhaltene ADC batch wurde folgendermaßen charakterisiert:
Protein Konzentration: 14.79 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.1

Bei dieser ADC-Präparation wurde ein Anteil der ring-geöffneten Bernsteinsäureamid-Form von 91% ermittelt.

Beispiel 208K

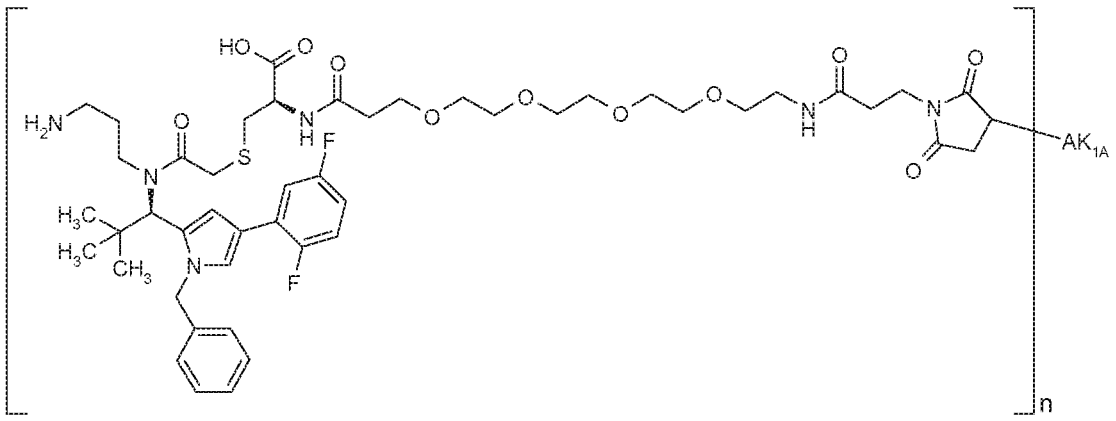
40 mg anti-TWEAKR AK-2 in 2759 µL ml PBS (c=14.5 mg/mL) wurden unter Argon mit einer Lösung aus 0.23 mg TCEP in 67µl PBS-Puffer versetzt. Der Ansatz wurde 30min bei RT gerührt und anschließend wurden 1.72 mg (0.002 mmol) von Intermediat F104 gelöst in 400 µl DMSO zugegeben. Nach weiteren 120 min Rühren bei RT wurde der Ansatz mit 1774 µl PBS-Puffer, der zuvor auf pH 8 eingestellt wurde, verdünnt.
Diese Lösung wurde dann über mit PBS-Puffer pH8 equillibrierte PD 10-Säulen (Sephadex® G-25, GE Healthcare) gegeben und mit PBS-Puffer pH8 eluiert. Das Eluat wurde mit PBS-Puffer pH8 auf ein Gesamtvolumen von 14 ml verdünnt. Diese Lösung wurde über Nacht bei RT unter Argon gerührt und

anschließend durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert, rückverdünnt mit PBS-Puffer (pH 7.2) und erneut aufkonzentriert. Der erhaltene ADC batch wurde folgendermaßen charakterisiert:

Protein Konzentration: 11.66 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.1

Beispiel 209A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F209 5.0 mg Cetuximab in PBS (c = 21.32 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.75 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.4

Beispiel 209B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F209 5.0 mg anti-TWEAKR AK-1 Antikörper in PBS (c = 18.60 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.30 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.1

Beispiel 209E

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F209 5.0 mg Trastuzumab Antikörper in PBS (c = 13.50 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 2.03 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.3

Beispiel 209H

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F209 5.0 mg Panitumumab Antikörper in PBS (c = 70.5 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.91 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 1.5

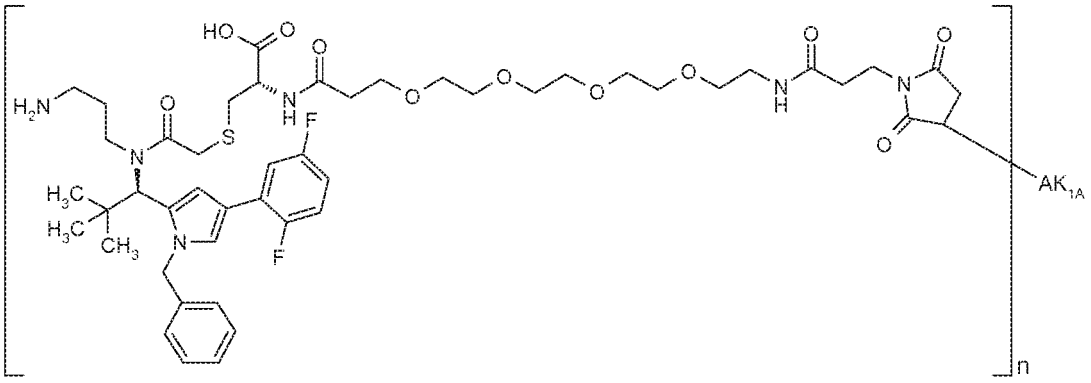
Beispiel 209I

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F209 5.0 mg Nimotuzumab Antikörper in PBS (c = 13.1 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.81 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.5

Beispiel 210A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F210 5.0 mg Cetuximab in PBS (c = 21.32 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.92 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.9

Beispiel 210B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F210 5.0 mg anti-TWEAKR AK-1 Antikörper in PBS (c = 18.60 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.41 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.5

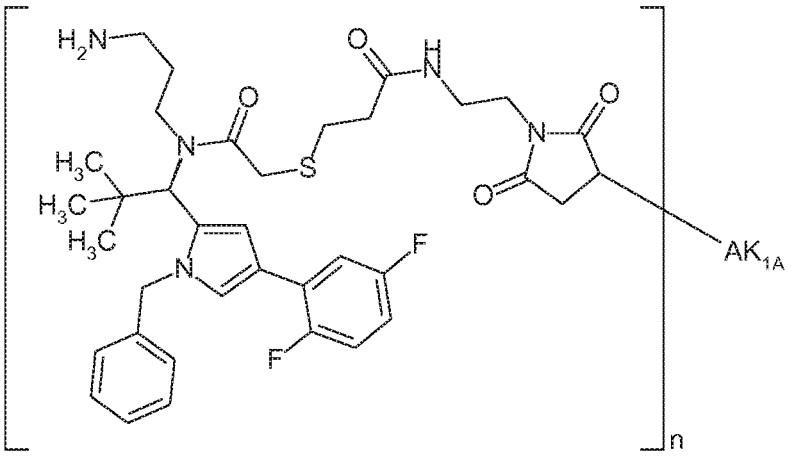
Beispiel 210E

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F210 5.0 mg Trastuzumab Antikörper in PBS (c = 13.50 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.79 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.8

Beispiel 211A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F211 5.0 mg Cetuximab in PBS (c = 12.33 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.82 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.0

Beispiel 211B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F211 5.0 mg anti-TWEAKR AK-1 Antikörper in PBS (c = 34.42 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.52 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.4

Beispiel 211E

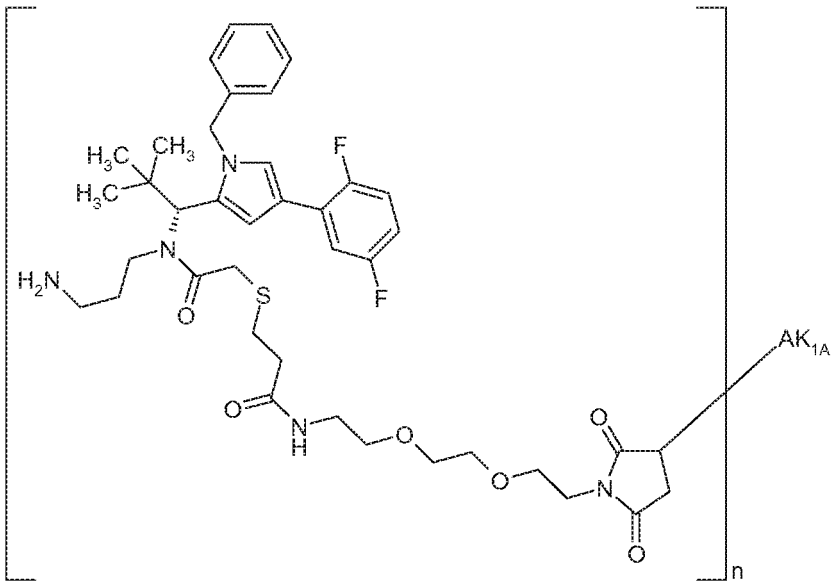
Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F211 5.0 mg Trastuzumab Antikörper in PBS (c = 13.50 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation

aufkonzentriert und rückverdünnt. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.84 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.4

Beispiel 212A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F212 5.0 mg Cetuximab in PBS (c = 11.3 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.94 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.3

Beispiel 212B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F212 5.0 mg anti-TWEAKR AK-1 Antikörper in PBS (c = 18.6 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 0.85 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.0

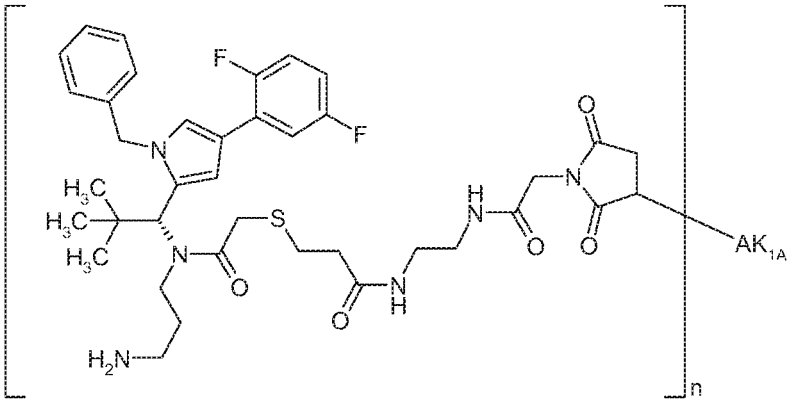
Beispiel 212E

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F212 5.0 mg Trastuzumab Antikörper in PBS (c = 13.50 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.55 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.0

Beispiel 213A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F213 5.0 mg Cetuximab in PBS (c = 21.32 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.83 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.4

Beispiel 213B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F213 5.0 mg anti-TWEAKR AK-1 Antikörper in PBS (c = 18.6 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.4 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.3

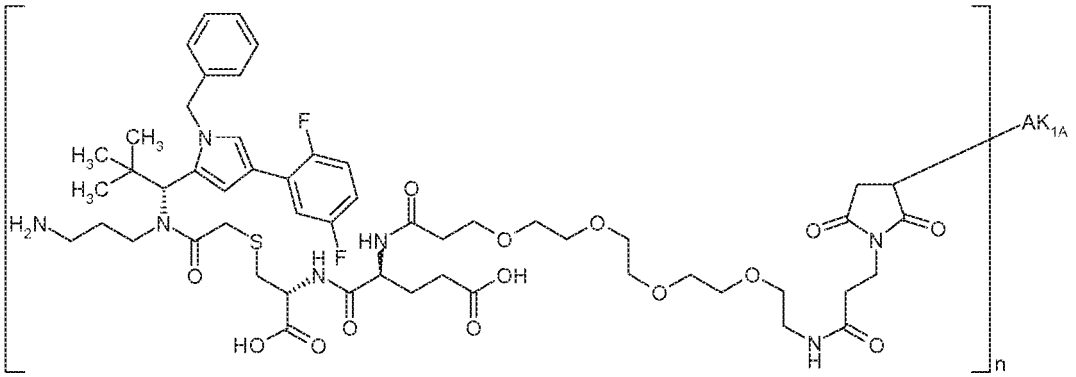
Beispiel 213E

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F213 5.0 mg Trastuzumab Antikörper in PBS (c = 13.50 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.94 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.5

Beispiel 214A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F214 5.0 mg Cetuximab in PBS (c = 15.21 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 2.00 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.6

Beispiel 214B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F214 5.0 mg anti-TWEAKR AK-1 Antikörper in PBS (c = 18.6 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 2.01 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.6

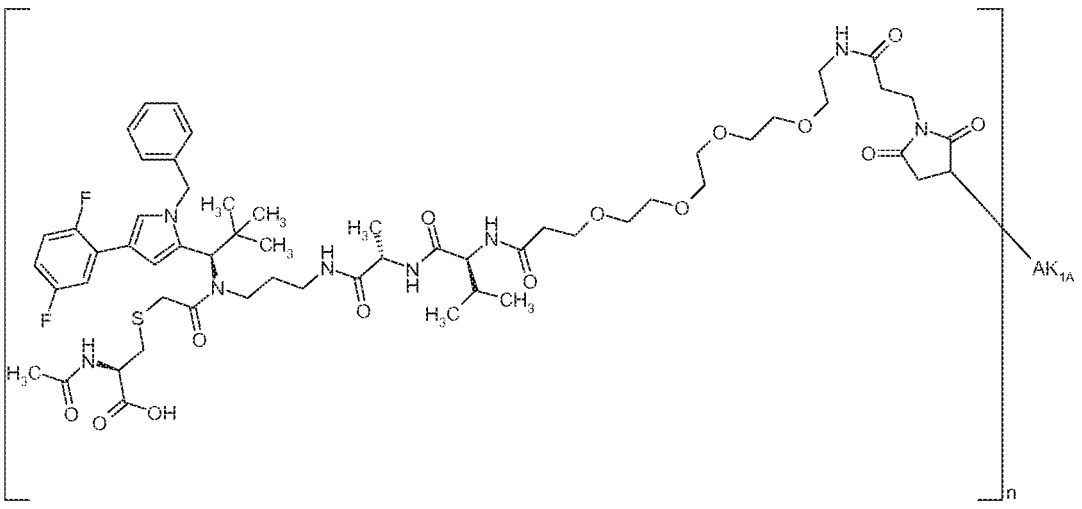
Beispiel 214E

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F214 5.0 mg Trastuzumab Antikörper in PBS (c = 13.50 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.86 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.7

Beispiel 215A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F215 5.0 mg Cetuximab in PBS (c = 15.21 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.99 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.7

Beispiel 215B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F215 5.0 mg anti-TWEAKR AK-1 Antikörper in PBS (c = 18.6 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.64 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.8

Beispiel 215E

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F215 5.0 mg Trastuzumab Antikörper in PBS (c = 13.50 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.84 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.8

Beispiel 215H

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F215 5.0 mg Panitumumab Antikörper in PBS (c = 70.5 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.86 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 1.4

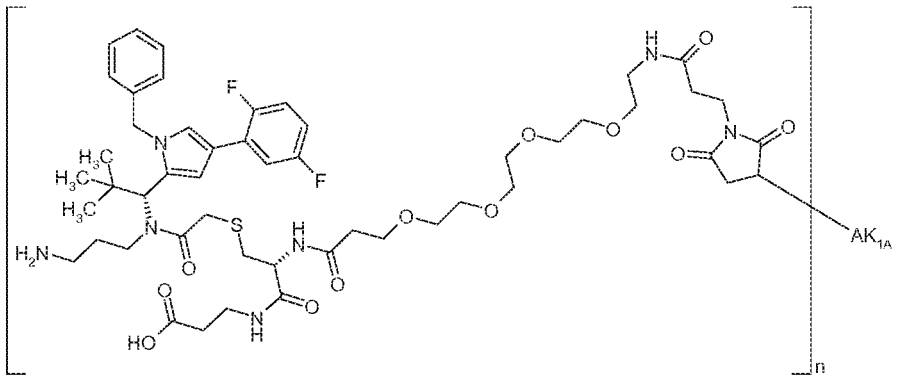
Beispiel 215I

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F215 5.0 mg Nimotuzumab in PBS (c = 13.1 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.83 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.6

Beispiel 216A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F216 5.0 mg Cetuximab in PBS (c = 15.21 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.97 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.8

Beispiel 216B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F216 5.0 mg anti-TWEAKR AK-1 Antikörper in PBS (c = 18.6 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.94 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.5

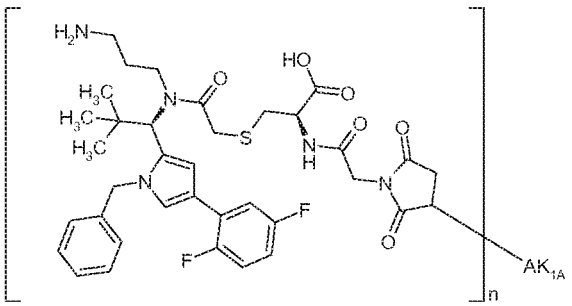
Beispiel 216E

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F216 5.0 mg Trastuzumab Antikörper in PBS (c = 13.50 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.90 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 1.7

Beispiel 217A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F217 5.0 mg Cetuximab in PBS (c = 15.21 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 2.05 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.7

Beispiel 217B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F217 5.0 mg anti-TWEAKR AK-1 Antikörper in PBS (c = 18.6 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation

aufkonzentriert und rückverdünnt. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.44 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.4

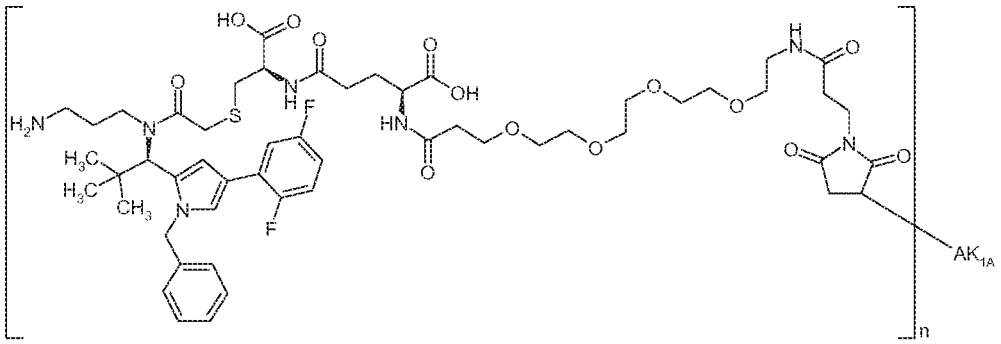
Beispiel 217E

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F217 5.0 mg Trastuzumab Antikörper in PBS (c = 13.50 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.85 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.8

Beispiel 218A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F218 5.0 mg Cetuximab in PBS (c = 15.21 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 2.05 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.0

Beispiel 218B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F218 5.0 mg anti-TWEAKR AK-1 Antikörper in PBS (c = 18.6 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.95 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.9

Beispiel 218E

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F218 5.0 mg Trastuzumab Antikörper in PBS (c = 13.50 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.84 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.7

Beispiel 218H

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F218 5.0 mg Panitumumab Antikörper in PBS (c = 20 mg/mL). Die Reduktionszeit mit TCEP wurde auf 4 h erhöht und die Rührzeit bei der ADC Kupplung auf 20 h erhöht. Der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.33 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 0.8

Beispiel 218I

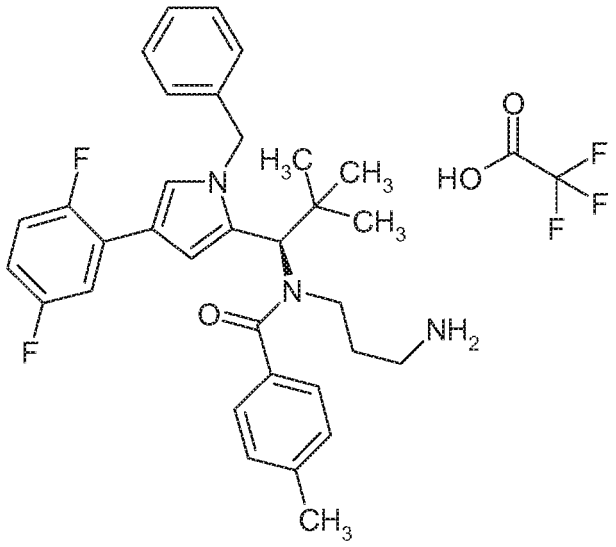
Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F218 5.0 mg Nimotuzumab Antikörper in PBS (c = 13.8 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt. Das ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.48 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.0

Beispiel 219

Trifluoressigsäure--N-(3-aminopropyl)-N-{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-4-methylbenzamid (1:1)



70.0 mg (0.09 mmol) 9H-Fluoren-9-ylmethyl-[3-({(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}amino)propyl]carbamat (Intermediat C67) wurden in 3.0 mL Dichlormethan vorgelegt mit 31.3 mg (0.31 mmol) Triethylamin und 31.8 mg (0.21 mmol) 4-Methylbenzoylchlorid versetzt. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei RT gerührt. Das Lösemittel wurde im Vakuum verdampft und der Rückstand wurde direkt mittles präp. RP-HPLC gereinigt (Säule: Reprosil 125x30; 10µ, Fluss: 50 mL/min, MeCN/Wasser). Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 33.4 mg (48 % d. Th.) der Verbindung 9H-Fluoren-9-ylmethyl-{3-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(4-methylbenzoyl)amino]propyl}carbamat.

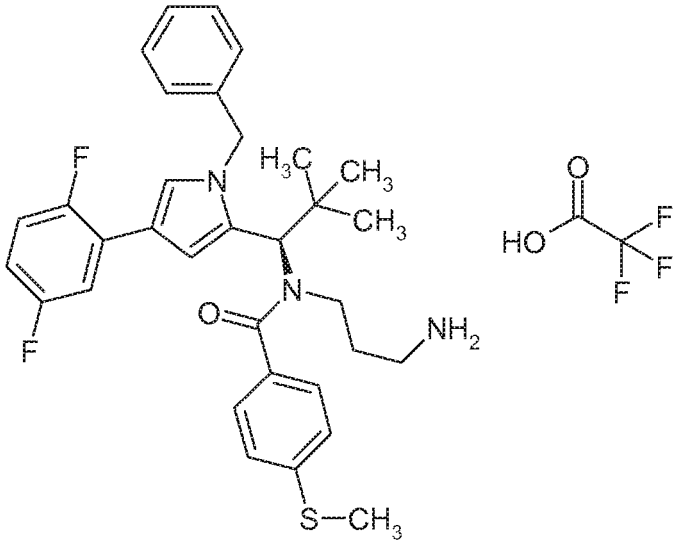
LC-MS (Methode 2): R_t = 11.91 min; MS (ESIpos): m/z = 774 $(M+Na)^+$.

33.0 mg (0.04 mmol) 9H-Fluoren-9-ylmethyl-{3-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(4-methylbenzoyl)amino]propyl}carbamat wurden über Nacht in 1.0 mL DMF mit 20.0 mg (0.23 mmol) Morpholin gerührt. Die Reaktionsmischung wurde direkt mittles präp. RP-HPLC gereinigt (Säule: Reprosil 125x30; 10µ, Fluss: 50 mL/min, MeCN/Wasser, 0.1 % TFA). Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 9.6 mg (34 % d. Th.) der Titelverbindung.

LC-MS (Methode 1): R_t = 1.01 min; MS (ESIpos): m/z = 530 $(M+H)^+$.

Beispiel 220

Trifluoressigsäure--N-(3-aminopropyl)-N-{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-4-(methylsulfanyl)benzamid (1:1)



50.0 mg (0.07 mmol) 9H-Fluoren-9-ylmethyl-[3-({(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}amino)propyl]carbamat (Intermediat C67) wurden in 2.0 mL Dichlormethan vorgelegt mit 22.3 mg (0.22 mmol) Triethylamin und 27.5 mg (0.15 mmol) 4-(Methylsulfanyl)benzoylchlorid versetzt. Die Reaktionsmischung wurde 4 h bei 40 °C gerührt und nochmals mit 10.2 mg (0.10 mmol) Triethylamin und 27.5 mg (0.15 mmol) 4-(Methylsulfanyl)benzoylchlorid versetzt und über Nacht bei RT gerührt. Dann wurden nochmals 14.9 mg (0.15 mmol) Triethylamin und 27.5 mg (0.15 mmol) 4-(Methylsulfanyl)benzoylchlorid zugegeben und 2 h bei 40 °C gerührt. Es wurde mit Ethylacetat verdünnt und die organische Phase dreimal mit Wasser und einmal mit ges. NaCl-Lösung gewaschen. Das Lösemittel wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und im Vakuum verdampft. Der Rückstand wurde mittles präp. RP-HPLC gereinigt (Säule: Reprosil 125x30; 10µ, Fluss: 50 mL/min, MeCN/Wasser) gereinigt. Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 39.8 mg (76 % d. Th.) der Verbindung 9H-Fluoren-9-ylmethyl-[3-({(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}[4-(methylsulfanyl)benzoyl]amino)propyl]carbamat.

LC-MS (Methode 1): R_t = 1.59 min; MS (ESIpos): m/z = 785 $(M+H)^+$.

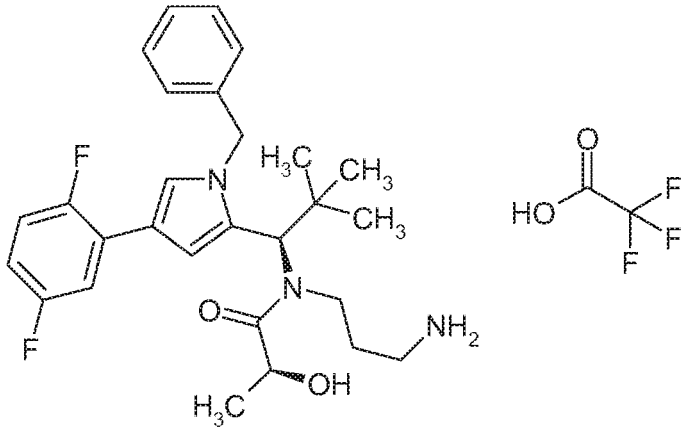
18.0 mg (0.02 mmol) 9H-Fluoren-9-ylmethyl-[3-({(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}[4-(methylsulfanyl)benzoyl]amino)propyl]carbamat wurden über Nacht in 1.0 mL DMF mit 10.0 mg (0.12 mmol) Morpholin gerührt. Die Reaktionsmischung wurde direkt mittles präp. RP-HPLC gereinigt (Säule: Reprosil 125x30; 10µ, Fluss: 50 mL/min, MeCN/Wasser, 0.1 % TFA).

Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 6.2 mg (40 % d. Th.) der Titelverbindung.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.99 min; MS (ESIpos): m/z = 562 $(M+H)^+$.

Beispiel 221

Trifluoressigsäure--(2S)-N-(3-aminopropyl)-N-{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-2-hydroxypropanamid (1:1)



40.0 mg (0.06 mmol) 9H-Fluoren-9-ylmethyl-[3-({(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}amino)propyl]carbamat (Intermediat C67) wurden in 2.0 mL Dichlormethan vorgelegt mit 9.6 mg (0.10 mmol) Triethylamin und 14.3 mg (0.10 mmol) (2S)-1-Chlor-1-oxopropan-2-yl-acetat versetzt. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei RT gerührt. Das Lösemittel wurde im Vakuum verdampft und der Rückstand wurde mittles präp. RP-HPLC gereinigt (Säule: Reprosil 125x30; 10µ, Fluss: 50 mL/min, MeCN/Wasser). Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 39.7 mg (84 % d. Th.) der Verbindung (2S)-1-[{(1R)-1-[1-Benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(3-{[(9H-fluoren-9-ylmethoxy)carbonyl]amino}propyl)amino]-1-oxopropan-2-yl-acetat.

LC-MS (Methode 1): R_t = 1.51 min; MS (ESIpos): m/z = 748 $(M+H)^+$.

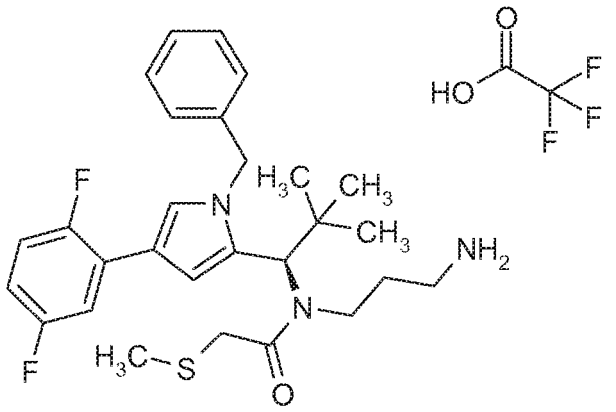
37.0 mg (0.05 mmol) (2S)-1-[{(1R)-1-[1-Benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(3-{[(9H-fluoren-9-ylmethoxy)carbonyl]amino}propyl)amino]-1-oxopropan-2-yl-acetat wurden in 1.0 mL DMF mit 0.1 mL Morpholin und 3 Tropfen Wasser 10 h bei 50 °C gerührt. Es wurden nochmals 0.1 mL Morpholin und 0.1 mL Wasser zugegeben und 10 h bei 50 °C gerührt. Nach der Zugabe von 20.5 mg (0.15 mmol) Kaliumcarbonat und 72 h Rühren bei RT wurden 0.1 mL 1N NaOH-Lösung zugegeben und über Nacht bei RT gerührt. Die Reaktionsmischung wurde direkt mittles präp.

RP-HPLC gereinigt (Säule: Reprosil 125x30; 10µ, Fluss: 50 mL/min, MeCN/Wasser, 0.1 % TFA). Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 20.5 mg (69 % d. Th.) der Titelverbindung.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.89 min; MS (ESIpos): m/z = 484 $(M+H)^+$.

Beispiel 222

Trifluoressigsäure--N-(3-aminopropyl)-N-{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-2-(methylsulfanyl)acetamid (1:1)



70.0 mg (0.11 mmol) 2-(Trimethylsilyl)ethyl-{3-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(chloracetyl)amino]propyl}carbamat (Intermediat C 70) wurden in 3.0 mL DMF vorgelegt. Es wurden 15.5 mg (0.22 mmol) Natriummethanthiolat

zugegeben und die Reaktionsmischung wurde 2 h bei 50 °C gerührt. Die Reaktionsmischung wurde direkt mittles präp. RP-HPLC gereinigt (Säule: Reprosil 125x30; 10µ, Fluss: 50 mL/min, MeCN/Wasser). Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 60.0 mg (84 % d. Th.) der Verbindung 2-(Trimethylsilyl)ethyl-[3-({(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}[(methylsulfanyl)acetyl]amino)propyl]carbamat.

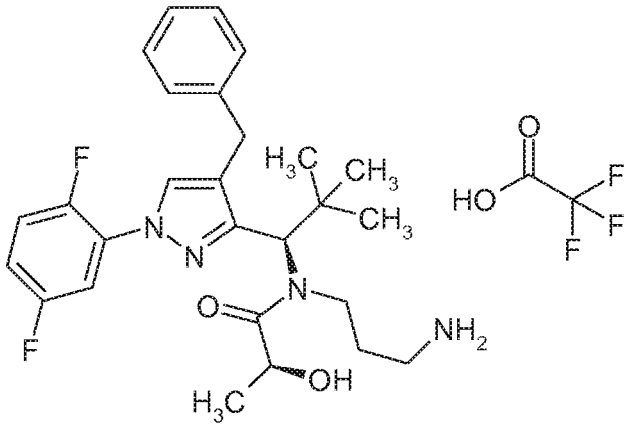
LC-MS (Methode 1): R_t = 1.50 min; MS (ESIpos): m/z = 644 $(M+H)^+$.

40.0 mg (0.06 mol) 2-(Trimethylsilyl)ethyl-[3-({(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}[(methylsulfanyl)acetyl]amino)propyl]carbamat wurden in 2.0 mL Trifluorethanol gelöst und mit 21.2 mg (0.16 mmol) Zinkdichlorid versetzt. Die Reaktionsmischung rührte über Nacht bei 50 °C. Die Reaktionsmischung wurde mit 45.4 mg (0.01 mmol) Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure versetzt, 10 min gerührt und dann mit Wasser (0.1% TFA) versetzt. Die Reinigung erfolgte direkt mittles präp. RP-HPLC (Säule: Reprosil 125x30; 10µ, Fluss: 50 mL/min, MeCN/Wasser, 0.1% TFA). Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 34.6 mg (91 % d. Th.) der Titelverbindung.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.92 min; MS (ESIpos): m/z = 500 $(M+H)^+$.

Beispiel 223

Trifluoressigsäure--(2S)-N-(3-aminopropyl)-N-{(1R)-1-[4-benzyl-1-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrazol-3-yl]-2,2-dimethylpropyl}-2-hydroxypropanamid (1:1)



40.0 mg (0.08 mmol) tert-Butyl-[3-({(1R)-1-[4-benzyl-1-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrazol-3-yl]-2,2-dimethylpropyl}amino)propyl]carbamat wurden in 2.0 mL Dichlormethan gelöst und mit 19.7 mg (0.20 mmol) Triethylamin und 29.4 mg (0.20 mmol) (2S)-1-Chlor-1-oxopropan-2-yl-acetat versetzt. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht gerührt. Das Lösemittel wurde im Vakuum verdampft und der Rückstand mittles präp. RP-HPLC gereinigt (Säule: Reprosil 125x30; 10µ, Fluss: 50 mL/min, MeCN/Wasser). Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 21.2 mg (43 % d. Th.) der Verbindung (2S)-1-({(1R)-1-[4-Benzyl-1-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrazol-3-yl]-2,2-dimethylpropyl}{3-[(tert-butoxycarbonyl)amino]propyl}amino)-1-oxopropan-2-yl-acetat.

LC-MS (Methode 1): R_t = 1.46 min; MS (ESIpos): m/z = 627 $(M+H)^+$.

21.2 mg (0.03 mmol) (2S)-1-({(1R)-1-[4-Benzyl-1-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrazol-3-yl]-2,2-dimethylpropyl}{3-[(tert-butoxycarbonyl)amino]propyl}amino)-1-oxopropan-2-yl-acetat wurden in 1.0 mL Dichlormethan gelöst, mit 77.1 mg (0.68 mmol) Trifluoressigsäure versetzt und 2 h bei RT gerührt. Es wurden noch jeweils zweimal 77.1 mg (0.68 mmol) Trifluoressigsäure zugegeben und jeweils über Nacht bei RT gerührt. Das Lösemittel wurde im Vakuum verdampft und der Rückstand mehrmals mit Dichlormethan kodestilliert und anschließend im Hochvakuum getrocknet. Der Rückstand mit der Substanz Trifluoressigsäure--(2S)-1-[(3-aminopropyl){(1R)-1-[4-benzyl-1-(2,5-difluorphenyl)-1H-

pyrazol-3-yl]-2,2-dimethylpropyl}amino]-1-oxopropan-2-yl-acetat (1:1) wurde ohne weitere Reinigung weiter umgesetzt.

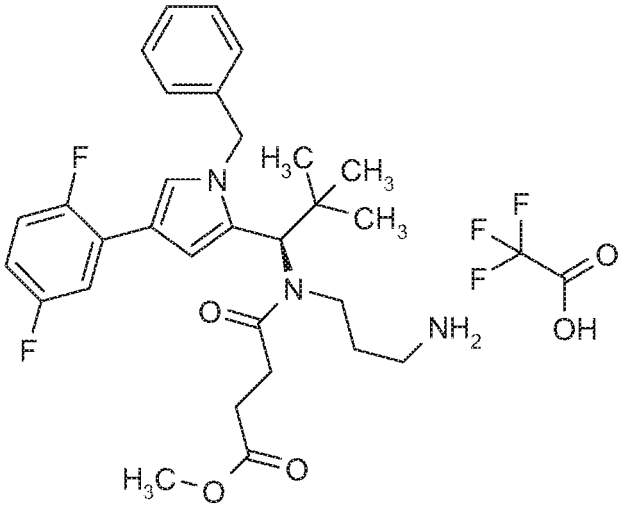
LC-MS (Methode 1): R_t = 0.92 min; MS (ESIpos): m/z = 527 $(M+H)^+$.

26.5 mg (0.04 mmol) Trifluoressigsäure--(2S)-1-[(3-aminopropyl){(1R)-1-[4-benzyl-1-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrazol-3-yl]-2,2-dimethylpropyl}amino]-1-oxopropan-2-yl-acetat (1:1) wurden in THF/Methanol/Wasser (1.0 mL/1.0 mL/0.05 mL) gelöst und mit 17.2 mg Kaliumcarbonat versetzt. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei RT gerührt. Die Reaktionsmischung wurde direkt mittles präp. RP-HPLC gereinigt (Säule: Reprosil 125x30; 10µ, Fluss: 50 mL/min, MeCN/Wasser; 0.1 % TFA). Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 17.3 mg (70 % d. Th.) der Titelverbindung.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.91 min; MS (ESIpos): m/z = 485 $(M+H)^+$.

Beispiel 224

Trifluoressigsäure-methyl-4-[(3-aminopropyl){(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}amino]-4-oxobutanoat (1:1)



60.0 mg (0.11 mmol) 2-(Trimethylsilyl)ethyl-[3-({(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}amino)propyl]carbamat (siehe Synthese von Intermediat C11) wurden in 1.0 mL Dichlormethan gelöst und mit 19.6 mg (0.25 mmol) Pyridin und 35.8 mg (0.24 mmol) Methyl-4-chlor-4-oxobutanoat versetzt. Die Reaktionsmischung rührte über Nacht bei 40 °C. Es wurden nochmals 19.6 mg (0.25 mmol) Pyridin und 35.8 mg (0.24 mmol) Methyl-4-chlor-4-oxobutanoat zugegeben und über Nacht bei 40 °C gerührt. Das Lösemittel wurde im Vakuum verdampft und der Rückstand mittels präp. RP-HPLC gereinigt (Säule: Reprosil 125x30; 10µ, Fluss: 50 mL/min, MeCN/Wasser). Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 16.1 mg (22

% d. Th.) der Verbindung Methyl-11-{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-2,2-dimethyl-6,12-dioxo-5-oxa-7,11-diaza-2-silapentadecan-15-oat.

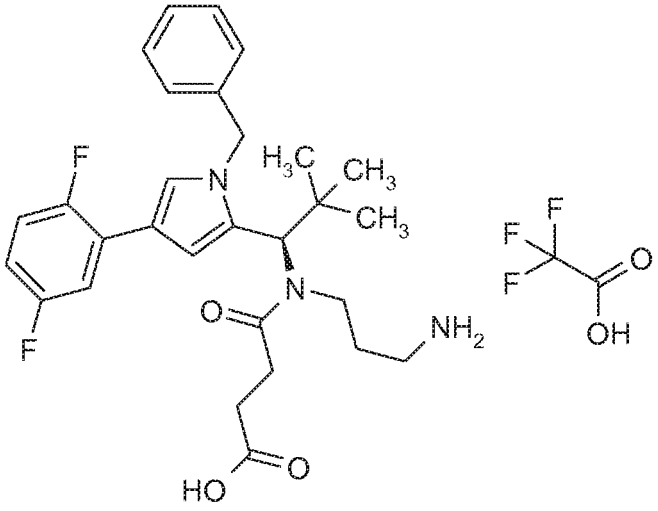
LC-MS (Methode 1): R_t = 1.52 min; MS (ESIpos): m/z = 670 $(M+H)^+$.

16.1 mg (0.02 mmol) Methyl-11-{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-2,2-dimethyl-6,12-dioxo-5-oxa-7,11-diaza-2-silapentadecan-15-oat wurden in 1.0 mL Trifluorethanol gelöst und mit 16.4 mg (0.12 mmol) Zinkdichlorid versetzt. Die Reaktionsmischung rührte 5 h bei 50 °C. Die Reaktionsmischung wurde mit 35.1 mg (0.12 mmol) Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure versetzt, 10 min gerührt und dann mit Wasser (0.1% TFA) versetzt. Die Reinigung erfolgte direkt mittles präp. RP-HPLC (Säule: Reprosil 125x30; 10µ, Fluss: 50 mL/min, MeCN/Wasser, 0.1% TFA). Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 11.1 mg (72 % d. Th.) der Titelverbindung.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.93 min; MS (ESIpos): m/z = 526 $(M+H)^+$.

Beispiel 225

4-[(3-Aminopropyl){(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}amino]-4-oxobutansäure-trifluoressigsäure (1:1)



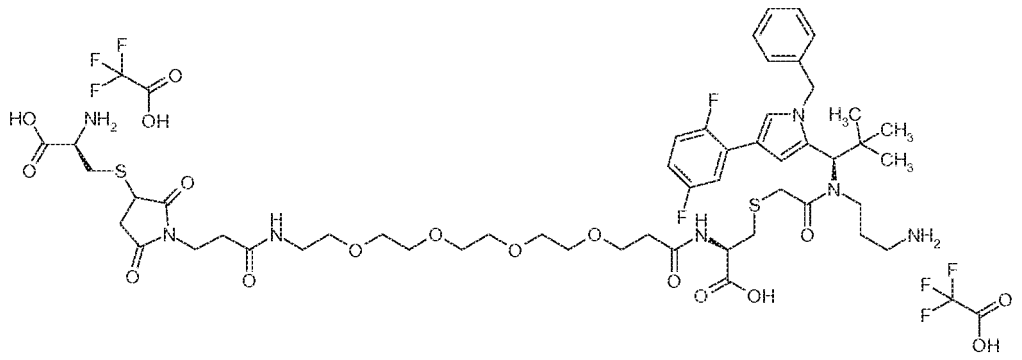
9.7 mg (0.02 mmol) Trifluoressigsäure-methyl-4-[(3-aminopropyl){(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}amino]-4-oxobutanoat (1:1) (Beispiel 224) wurden in THF/Methanol/Wasser (1.0 mL/0.2 mL/0.04 mL) vorgelegt und mit 1.3 mg (0.03 mmol) Lithiumhydroxid-Monohydrat versetzt. Die Reaktionsmischung rührte über Nacht bei RT. Es wurden nochmals 1.3 mg (0.03 mmol) Lithiumhydroxid-Monohydrat zugegeben und über Nacht bei RT gerührt. Es wurden 3.6 mg (0.06 mmol) HOAc zugegeben und die Reaktionsmischung wurde direkt mittles präp.

RP-HPLC gereinigt (Säule: Reprosil 125x30; 10µ, Fluss: 50 mL/min, MeCN/Wasser; 0.1% TFA). Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 5.4 mg (57 % d. Th.) der Titelverbindung.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.90 min; MS (ESIpos): m/z = 512 $(M+H)^+$.

Beispiel 226

(2R)-22-[(3R/S)-3-{[(2R)-2-Amino-2-carboxyethyl]sulfanyl}-2,5-dioxopyrrolidin-1-yl]-2-[({2-[(3-aminopropyl){(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}amino]-2-oxoethyl}sulfanyl)methyl]-4,20-dioxo-7,10,13,16-tetraoxa-3,19-diazadocosan-1-säure-trifluoressigsäure (1:2)

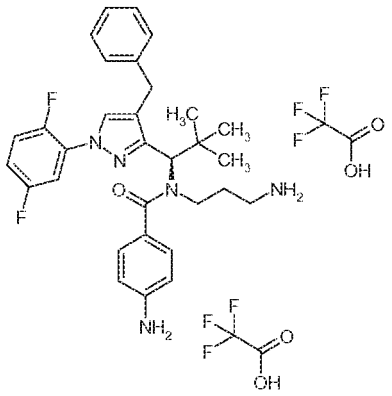


10.3 mg (mmol) R-{2-[(3-Aminopropyl){(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}amino]-2-oxoethyl}-N-[19-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-17-oxo-4,7,10,13-tetraoxa-16-azanonadecan-1-oyl]-L-cystein-trifluoressigsäure (1:1) (Intermediat F209) wurden in DMF/Wasser (2.0 mL/0.2 mL) mit L-Cystein versetzt und 10 min bei RT gerührt. Die Reaktionsmischung wurde mit Wasser versetzt und direkt mittles präp. RP-HPLC gereinigt (Säule: Reprosil 125x30; 10µ, Fluss: 50 mL/min, MeCN/Wasser; 0.1 % TFA). Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 10.3 mg (82 % d. Th.) der Titelverbindung.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.84 min; MS (ESIpos): m/z = 1092 $(M+H)^+$.

Beispiel 227

Trifluoressigsäure--4-amino-N-(3-aminopropyl)-N-{(1R)-1-[4-benzyl-1-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrazol-3-yl]-2,2-dimethylpropyl}benzamid (2:1)



50.0 mg (0.10 mol) tert-Butyl-[3-({(1R)-1-[4-benzyl-1-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrazol-3-yl]-2,2-dimethylpropyl}amino)propyl]carbamat (Intermediat C68) wurden in Dichlormethan vorgelegt und mit 54.9 mg (0.22 mmol) tert-Butyl-[4-(chlorcarbonyl)phenyl]carbamat (Intermediat L71) sowie 22.7 mg (0.22 mmol) Triethylamin versetzt. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei RT gerührt und nochmals mit 54.9 mg (0.22 mmol) tert-Butyl-[4-(chlorcarbonyl)phenyl]carbamat (Intermediat L71) sowie 22.7 mg (0.22 mmol) Triethylamin versetzt. Die Reaktionsmischung rührte über Nacht bei RT. Das Lösemittel wurde im Vakuum verdampft und der Rückstand mittles präp. RP-HPLC (Säule: Reprosil 250x40; 10µ, Fluss: 50 mL/min, MeCN/Wasser, 0.1% TFA). Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 26.2 mg (37 % d. Th.) der Verbindung.

tert-Butyl-[3-({(1R)-1-[4-benzyl-1-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrazol-3-yl]-2,2-dimethylpropyl}{4-[(tert-butoxycarbonyl)amino]benzoyl}amino)propyl]carbamat.

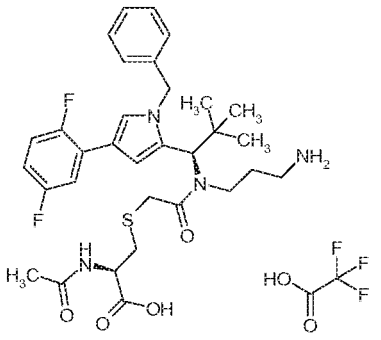
LC-MS (Methode 1): R_t = 5.34 min; MS (ESIpos): m/z = 732 $(M+H)^+$.

26.2 mg (0.04 mmol) tert-Butyl-[3-({(1R)-1-[4-benzyl-1-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrazol-3-yl]-2,2-dimethylpropyl}{4-[(tert-butoxycarbonyl)amino]benzoyl}amino)propyl]carbamat wurden in 2.0 mL Dichlormethan gelöst und mit 204.1 mg (1.79 mmol) TFA versetzt. Die Reaktionsmischung rührte über Nacht bei RT. Das Lösemittel wurde im Vakuum verdampft und der Rückstand wurde mittles präp. RP-HPLC (Säule: Reprosil 125x30; 10µ, Fluss: 50 mL/min, MeCN/Wasser, 0.1% TFA) gereinigt. Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 3.4 mg (13 % d. Th.) der Titelverbindung.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.92 min; MS (ESIpos): m/z = 532 $(M+H)^+$.

Beispiel 228

N-Acetyl-S-{2-[(3-aminopropyl){(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}amino]-2-oxoethyl}-L-cystein-trifluoressigsäure (1:1)



50.0 mg (0.08 mol) 2-(Trimethylsilyl)ethyl-{3-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(chloracetyl)amino]propyl}carbamat (Intermediat C70) wurden in 0.30 mL Wasser mit 66.43 mg Natriumhydrogencarbonat suspendiert. Die Suspension wurde mit einer Lösung von 144.47 (0.95 mmol) 1,8-Diazabicyclo(5.4.0)undec-7-en und 51.62 mg (0.32 mmol) N-Acetyl-L-cystein in 3.0 mL *iso*-Propanol versetzt. Die Reaktionsmischung wurde 2.5 h bei 50 °C gerührt. Die Reaktionsmischung wurde mit Wasser (0.1 % TFA) versetzt und direkt mittles präp. RP-HPLC (Säule: Reprosil 250x30; 10µ, Fluss: 50 mL/min, MeCN/Wasser, 0.1% TFA) gereinigt. Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 55.2 mg (92 % d. Th.) der Verbindung N-Acetyl-S-(11-{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-2,2-dimethyl-6,12-dioxo-5-oxa-7,11-diaza-2-silatridecan-13-yl)-L-cystein.

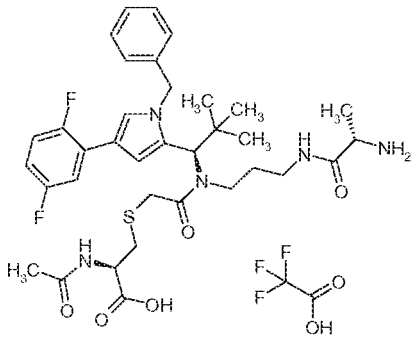
LC-MS (Methode 1): R_t = 1.41 min; MS (ESIpos): m/z = 759 $(M+H)^+$.

53.1 mg (69.96 µmol) N-Acetyl-S-(11-{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-2,2-dimethyl-6,12-dioxo-5-oxa-7,11-diaza-2-silatridecan-13-yl)-L-cystein wurden in 5.0 mL Trifluorethanol gelöst und mit 57.2 mg (419.76 µmol) Zinkdichlorid versetzt. Die Reaktionsmischung rührte 4 h bei 50 °C. Die Reaktionsmischung wurde mit 122.67 mg (0.42 mmol) Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure versetzt, 10 min gerührt und dann mit Wasser (0.1% TFA) versetzt. Die Reinigung erfolgte direkt mittles präp. RP-HPLC (Säule: Reprosil 125x30; 10µ, Fluss: 50 mL/min, MeCN/Wasser, 0.1% TFA). Man erhielt 32.5 mg (64 % d. Th.) der Titelverbindung.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.90 min; MS (ESIpos): m/z = 615 $(M+H)^+$.

Beispiel 229

N-Acetyl-S-[2-([3-(L-alanylamino)propyl]{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}amino)-2-oxoethyl]-L-cystein-trifluoressigsäure (1:1)



30.3 mg (41.58 µmol) N-Acetyl-S-{2-[(3-aminopropyl){(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}amino]-2-oxoethyl}-L-cystein-trifluoressigsäure (1:1) (Beispiel 228) wurden in 1.5 mL DMF gelöst und mit 8.4 mg (83.15 µmol) 4-Methylmorpholin und 14.65 mg (45.73 µmol) 2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl-N-[(benzyloxy)carbonyl]-L-alaninat versetzt. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei RT gerührt und dann wurden nochmals 8.4 mg (83.15 µmol) 4-Methylmorpholin zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde nochmals über Nacht bei RT gerührt. Es wurden 10.0 mg (0.17 mmol) Essigsäure zugegeben und die Reaktionsmischung wurde direkt mittles präp. RP-HPLC (Säule: Reprosil 250x30; 10µ, Fluss: 50 mL/min, MeCN/Wasser, 0.1% TFA) gereinigt. Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 31.2 mg (92 % d. Th.) der Verbindung N-Acetyl-S-[2-({(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}[3-({N-[(benzyloxy)carbonyl]-L-alanyl}amino)propyl]amino)-2-oxoethyl]-L-cystein.

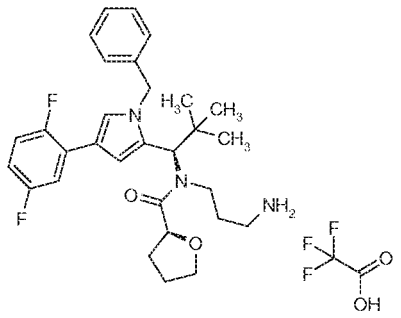
LC-MS (Methode 1): R_t = 1.22 min; MS (ESIpos): m/z = 820 $(M+H)^+$.

28.6 mg (0.04 mmol) N-Acetyl-S-[2-({(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}[3-({N-[(benzyloxy)carbonyl]-L-alanyl}amino)propyl]amino)-2-oxoethyl]-L-cystein wurden in 5.0 mL Ethanol gelöst und mit 2.9 mg Palladium auf Aktivkohle (10 %) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei Normaldruck und bei RT hydriert. Der Ansatz wurde über Celite filtriert und der Filterkuchen mit einem Gemisch aus Ethanol nachgewaschen. Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand mittles präp. RP-HPLC (Säule: Reprosil 250x30; 10µ, Fluss: 50 mL/min, MeCN/Wasser, 0.1% TFA) gereinigt. Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand wurde lyophilisert. Man erhielt 17.4 mg (62 % d. Th.) der Titelverbindung.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.85 min; MS (ESIpos): m/z = 686 $(M+H)^+$.

Beispiel 230

Trifluoressigsäure--(2S)-N-(3-aminopropyl)-N-{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}tetrahydrofuran-2-carboxamid (1:1)



100.0 mg (0.16 mmol) 9H-Fluoren-9-ylmethyl-[3-({(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}amino)propyl]carbamat (Intermediat C67) wurden in 5.0 mL Dichlormethan mit 71.9 mg (0.71 mmol) Triethylamin gelöst und zu einer Lösung aus frisch hergestelltem (2S)-Tetrahydrofuran-2-carbonylchlorid (Herstellung: 54.7 mg (0.39 mmol) (2S)-Tetrahydrofuran-2-carbonsäure wurden in 0.7 mL Toluol vorgelegt und mit 0.04 mL Thionylchlorid versetzt und 1 h bei 90 °C gerührt. Die Reaktionslösung wurde nach dem Abkühlen roh weiter umgesetzt) getropft. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei RT gerührt. Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand wurde mittles präp. RP-HPLC (Säule: Reprosil 125x30; 10µ, Fluss: 50 mL/min, MeCN/Wasser, 0.1% TFA) gereinigt. Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 44.3 mg (38 % d. Th.) der Verbindung 9H-Fluoren-9-ylmethyl-[3-({(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}[(2S)-tetrahydrofuran-2-ylcarbonyl]amino)propyl]carbamat.

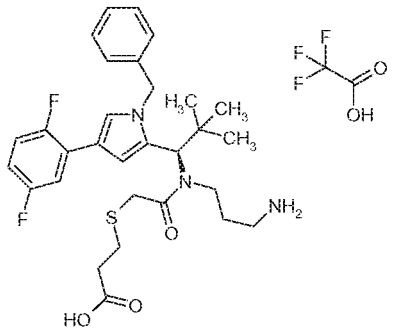
LC-MS (Methode 1): R_t = 1.52 min; MS (ESIpos): m/z = 776 $(M+HCOOH-H)^-$.

26.0 mg (0.04 mmol) 9H-Fluoren-9-ylmethyl-[3-({(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}[(2S)-tetrahydrofuran-2-ylcarbonyl]amino)propyl]carbamat wurden in 2.6 mL DMF gelöst und mit 0.26 mL Morpholin versetzt. Die Reaktionsmischung wurde 3 h bei RT gerührt. Die Reinigung erfolgte direkt mittles präp. RP-HPLC (Säule: Reprosil 125x30; 10µ, Fluss: 50 mL/min, MeCN/Wasser, 0.1% TFA). Man erhielt 11.7 mg (53 % d. Th.) der Titelverbindung.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.93 min; MS (ESIpos): m/z = 510 $(M+H)^+$.

Beispiel 231

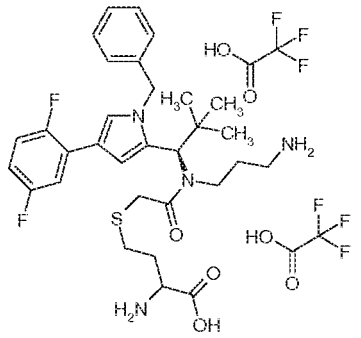
3-({2-[(3-Aminopropyl){(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}amino]-2-oxoethyl}sulfanyl)propansäure-trifluoressigsäure (1:1)



53.9 mg (0.08 mmol) 11-{(1R)-1-[1-Benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-2,2-dimethyl-6,12-dioxo-5-oxa-14-thia-7,11-diaza-2-silaheptadecan-17-säure (Intermediat C69) wurden in 4.0 mL Trifluorethanol gelöst und mit 31.4 mg (0.23 mmol) Zinkdichlorid versetzt. Die Reaktionsmischung rührte über Nacht bei 50 °C. Die Reaktionsmischung wurde mit 67.3 mg (0.23 mmol) Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure versetzt, 10 min gerührt und dann mit Wasser (0.1% TFA) versetzt. Die Reinigung erfolgte direkt mittles präp. RP-HPLC (Säule: Reprosil 125x30; 10µ, Fluss: 50 mL/min, MeCN/Wasser, 0.1% TFA). Man erhielt 34.2 mg (66 % d. Th.) der Titelverbindung.
LC-MS (Methode 1): R_t = 0.91 min; MS (ESIpos): m/z = 558 $(M+H)^+$.

Beispiel 232

S-{2-[(3-Aminopropyl){(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}amino]-2-oxoethyl}homocystein -trifluoressigsäure (1:2)

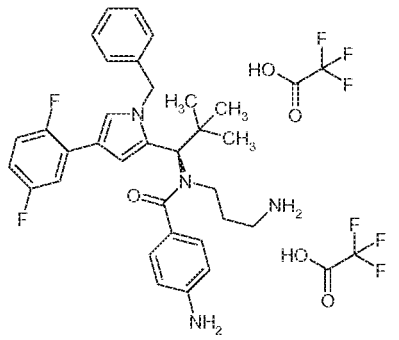


40.0 mg (47.3 µmol) S-(11-{(1R)-1-[1-Benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-2,2-dimethyl-6,12-dioxo-5-oxa-7,11-diaza-2-silatridecan-13-yl)homocystein (Intermediat C11) wurden in 3.0 mL Trifluorethanol gelöst und mit 38.7 mg (0.28 mmol) Zinkdichlorid versetzt. Die Reaktionsmischung rührte 6 h bei 50 °C. Die Reaktionsmischung wurde mit 83 mg (0.28 mmol) Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure versetzt, 10 min gerührt und dann mit Wasser (0.1%

TFA) versetzt. Die Reinigung erfolgte direkt mittles präp. RP-HPLC (Säule: Reprosil 125x30; 10µ, Fluss: 50 mL/min, MeCN/Wasser, 0.1% TFA). Man erhielt 32.4 mg (84 % d. Th.) der Titelverbindung.
LC-MS (Methode 1): R_t = 0.81 min; MS (ESIpos): m/z = 587 $(M+H)^+$.

Beispiel 233

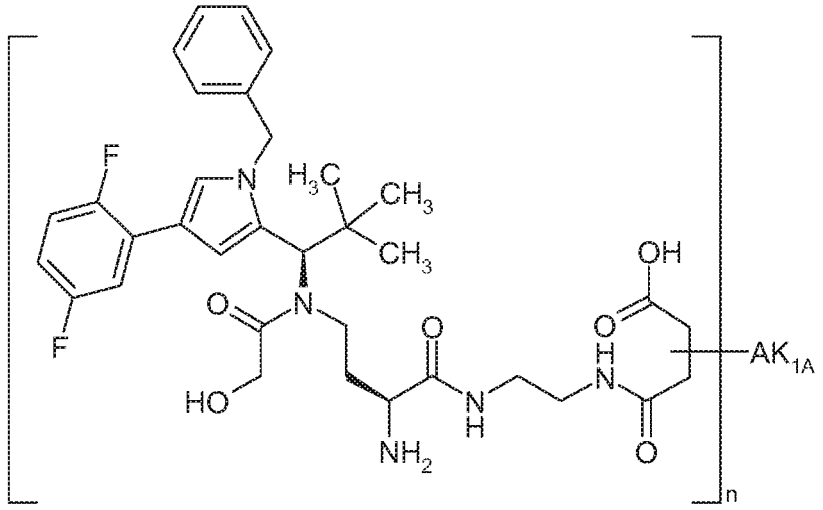
Trifluoressigsäure--4-amino-N-(3-aminopropyl)-N-{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}benzamid (2:1)



73.0 mg (0.12 mmol) 9H-Fluoren-9-ylmethyl-[3-({(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}amino)propyl]carbamat (Intermediat C67) und 27.8 mg (0.15 mmol) 4-Nitrobenzoylchlorid wurden in 2.0 mL Dichlormethan gelöst und mit 15.2 mg (0.15 mmol) Triethlyamin versetzt. Die Reaktionsmischung rührte über Nacht bei RT. Es wurden wurde nochmals die dieselbe Menge an 4-Nitrobenzoylchlorid und Triethylamin zugegeben und die Reaktionsmischung rührte über Nacht bei RT. Das Lösemittel wurde im Vakuum verdampft und der Rückstand wurde mittels präp. RP-HPLC (Säule: Reprosil 125x30; 10µ, Fluss: 50 mL/min, MeCN/Wasser, 0.1% TFA) gereinigt. Man erhielt 39.3 mg (44 % d. Th.) der Verbindung 9H-Fluoren-9-ylmethyl-{3-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(4-nitrobenzoyl)amino]propyl}carbamat.
LC-MS (Methode 1): R_t = 1.54 min; MS (ESIpos): m/z = 783 $(M+H)^+$.
39.3 mg (0.05 mmol) Fluoren-9-ylmethyl-{3-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(4-nitrobenzoyl)amino]propyl}carbamat wurden in 2.0 mL Ethanol gelöst, mit 3.9 mg Palladiumhydroxid auf Aktivkohle (20 %) versetzt und über Nacht bei Normaldruck hydriert. Die Reaktionsmischung wurde über einen Papierfilter filtriert und der Filterkuchen wurde mit Ethanol nachgewaschen. Das Lösemittel wurde im Vakuum verdampft. Der Rückstand wurde mittles präp. RP-HPLC (Säule: Reprosil 125x30; 10µ, Fluss: 50 mL/min, MeCN/Wasser, 0.1% TFA) gereinigt. Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Man erhielt

32.9 mg (86 % d. Th.) der Titelverbindung. LC-MS (Methode 1): R_t = 0.93 min; MS (ESIpos): m/z = 531 $(M+H)^+$.

Beispiel 234A



5 mg Cetuximab in 500 µL ml PBS (c= 10 mg/mL) wurden unter Argon mit einer Lösung aus 0,029 mg TCEP in 50µl PBS-Puffer versetzt. Der Ansatz wurde 30min bei RT gerührt und anschließend wurden 0.2 mg (0.00027 mmol) von Intermediat F85 gelöst in 50µl DMSO zugegeben. Nach weiteren 90 min Rühren bei RT wurde der Ansatz mit 1900 µl PBS-Puffer, der zuvor auf pH 8 eingestellt wurde, verdünnt.

Diese Lösung wurde dann über mit PBS-Puffer pH8 equillibrierte PD 10-Säulen (Sephadex® G-25, GE Healthcare) gegeben und mit PBS-Puffer pH8 eluiert. Das Eluat wurde über Nacht bei RT unter Argon gerührt und anschließend durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS-Puffer (pH 7.2). Ein Teil des ADCs kann unter diesen Bedingungen auch in der ring-geschlossenen Form vorliegen. Der erhaltene ADC batch wurde folgendermaßen charakterisiert:

Protein Konzentration: 1.68 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.8

Beispiel 234B

5 mg anti-TWEAKR AK-1 in 269 µL ml PBS (c=18.6 mg/mL) wurden unter Argon mit einer Lösung aus 0.029 mg TCEP in 50µl PBS-Puffer versetzt. Der Ansatz wurde 30min bei RT gerührt und anschließend wurden 0.2 mg (0.00027 mmol) von Intermediat F85 gelöst in 50µl DMSO zugegeben.

Nach weiteren 90 min Rühren bei RT wurde der Ansatz mit 2130 µl PBS-Puffer, der zuvor auf pH 8 eingestellt wurde, verdünnt.

Diese Lösung wurde dann über mit PBS-Puffer pH8 equillibrierte PD 10-Säulen (Sephadex® G-25, GE Healthcare) gegeben und mit PBS-Puffer pH8 eluiert. Das Eluat wurde über Nacht bei RT unter Argon gerührt und anschließend durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS-Puffer (pH 7.2). Ein Teil des ADCs kann unter diesen Bedingungen auch in der ring-geschlossenen Form vorliegen. Der erhaltene ADC batch wurde folgendermaßen charakterisiert:

Protein Konzentration: 1.57 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.7

Beispiel 234I

5 mg Nimotuzumab in 500 µL ml PBS (c=10 mg/mL) wurden unter Argon mit einer Lösung aus 0.029 mg TCEP in 50µl PBS-Puffer versetzt. Der Ansatz wurde 30min bei RT gerührt und anschließend wurden 0.2 mg (0.00027 mmol) von Intermediat F85 gelöst in 50µl DMSO zugegeben. Nach weiteren 90 min Rühren bei RT wurde der Ansatz mit 1900 µl PBS-Puffer, der zuvor auf pH 8 eingestellt wurde, verdünnt.

Diese Lösung wurde dann über mit PBS-Puffer pH8 equillibrierte PD 10-Säulen (Sephadex® G-25, GE Healthcare) gegeben und mit PBS-Puffer pH8 eluiert. Das Eluat über Nacht bei RT unter Argon gerührt und anschließend durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS-Puffer (pH 7.2). Ein Teil des ADCs kann unter diesen Bedingungen auch in der ring-geschlossenen Form vorliegen. Der erhaltene ADC batch wurde folgendermaßen charakterisiert:

Protein Konzentration: 1.93 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.6

Beispiel 234H

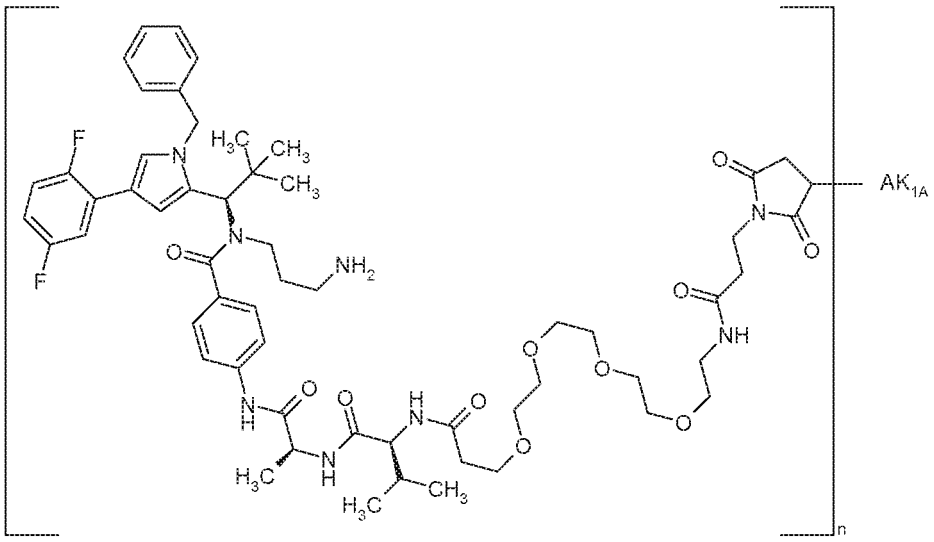
5 mg Panitumumab in 500 µL ml PBS (c=10 mg/mL) wurden unter Argon mit einer Lösung aus 0.029 mg TCEP in 50µl PBS-Puffer versetzt. Der Ansatz wurde 4 h bei RT gerührt und anschließend wurden 0.2 mg (0.00027 mmol) von Intermediat F85 gelöst in 50µl DMSO zugegeben. Nach weiteren 120 min Rühren bei RT wurde der Ansatz mit 1900 µl PBS-Puffer, der zuvor auf pH 8 eingestellt wurde, verdünnt.

Diese Lösung wurde dann über mit PBS-Puffer pH8 equillibrierte PD 10-Säulen (Sephadex® G-25, GE Healthcare) gegeben und mit PBS-Puffer pH8 eluiert. Das Eluat wurde über Nacht bei RT unter Argon gerührt und anschließend durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS-Puffer

(pH 7.2). Ein Teil des ADCs kann unter diesen Bedingungen auch in der ring-geschlossenen Form vorliegen. Der erhaltene ADC batch wurde folgendermaßen charakterisiert:
Protein Konzentration: 2.12 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 1.4

Beispiel 235A



5 mg Cetuximab in 329 µL ml PBS (c= 15.2 mg/mL) wurden unter Argon mit einer Lösung aus 0,029 mg TCEP in 50µl PBS-Puffer versetzt und dann mit 2021µL PBS Puffer, der zuvor auf pH 8 eingestellt wurde, verdünnt. Der Ansatz wurde 1 h bei RT gerührt und anschließend wurden 0.28 mg von Intermediat F235 gelöst in 50µl DMSO zugegeben. Nach weiteren 90 min Rühren bei RT wurde der Ansatz dann über mit PBS-Puffer pH8 equillibrierte PD 10-Säulen (Sephadex® G-25, GE Healthcare) gegeben und mit PBS-Puffer pH8 eluiert. Das Eluat wurde über Nacht bei RT unter Argon gerührt und anschließend durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS-Puffer (pH 7.2). Das so hergestellte ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen. Der erhaltene ADC batch wurde folgendermaßen charakterisiert:
Protein Konzentration: 1.5 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.4

Beispiel 235B

5 mg anti-TWEAKR AK-1 in 269 µL ml PBS (c=18.6 mg/mL) wurden in Analogie zu Beispiel 235a mit PBS-Puffer pH8 auf eine Konzentration von 2 mg/ml verdünnt und mit Intermediat F235 gekuppelt.

Das so hergestellte ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen. Der erhaltene ADC batch wurde folgendermaßen charakterisiert:
Protein Konzentration: 0.56 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 1.0

Beispiel 235E

5 mg Trastuzumab in 370 µL ml PBS (c=14.5 mg/mL) wurden in Analogie zu Beispiel 235a mit PBS-Puffer pH8 auf eine Konzentration von 2 mg/ml verdünnt und mit Intermediat F235 gekuppelt. Das so hergestellte ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen. Der erhaltene ADC batch wurde folgendermaßen charakterisiert:
Protein Konzentration: 1.67 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.9

Beispiel 235I

5 mg Nimotuzumab in 382 µL ml PBS (c=13.08 mg/mL) wurden in Analogie zu Beispiel 235a mit PBS-Puffer pH8 auf eine Konzentration von 2 mg/ml verdünnt und mit Intermediat F235 gekuppelt. Das so hergestellte ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen. Der erhaltene ADC batch wurde folgendermaßen charakterisiert:
Protein Konzentration: 1.81 mg/mL

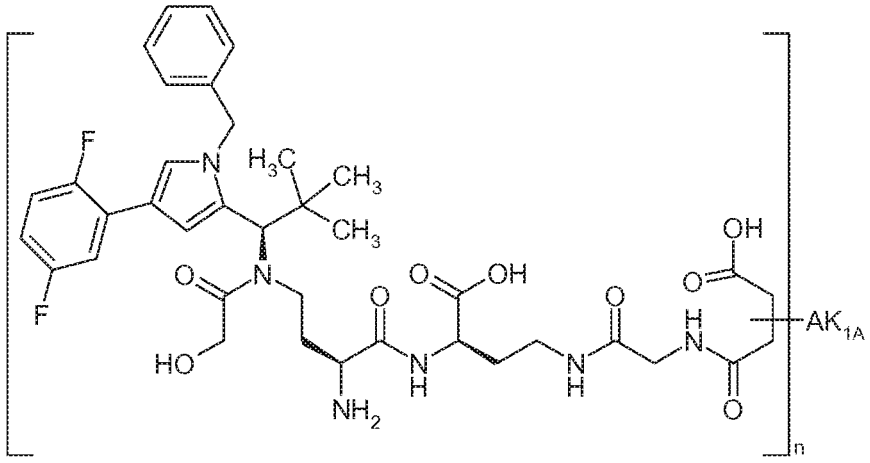
Drug/mAb Ratio: 2.8

Beispiel 235H

5 mg Panitumumab in 74 µL ml PBS (c=67.4 mg/mL) wurden in Analogie zu Beispiel 235a mit PBS-Puffer pH8 auf eine Konzentration von 2 mg/ml verdünnt und mit Intermediat F235 gekuppelt. Das so hergestellte ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen. Der erhaltene ADC batch wurde folgendermaßen charakterisiert:
Protein Konzentration: 1.14 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 0.9

Beispiel 236A



5 mg Cetuximab in 500 µL ml PBS (c= 10 mg/mL) wurden in Analogie zu Beispiel 234a mit Intermediat F236 gekuppelt. Ein Teil des ADCs kann unter diesen Bedingungen auch in der ring-geschlossenen Form vorliegen. Der erhaltene ADC batch wurde folgendermaßen charakterisiert:
Protein Konzentration: 1.85 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.6

Beispiel 236B

5 mg anti-TWEAKR AK-1 in 500 µL ml PBS (c=10 mg/mL) wurden in Analogie zu Beispiel 234a mit Intermediat F236 gekuppelt. Ein Teil des ADCs kann unter diesen Bedingungen auch in der ring-geschlossenen Form vorliegen. Der erhaltene ADC batch wurde folgendermaßen charakterisiert:
Protein Konzentration: 1.67 mg/mL

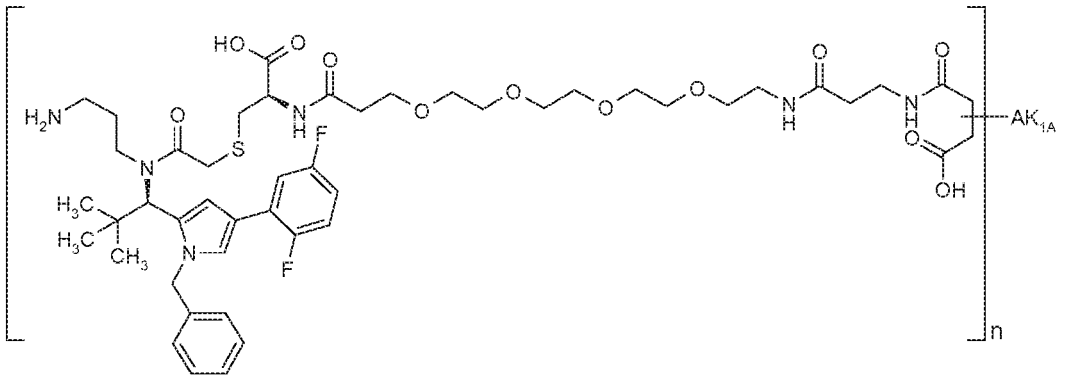
Drug/mAb Ratio: 3.5

Beispiel 236E

5 mg Trastuzumab in 500 µL ml PBS (c=10 mg/mL) wurden in Analogie zu Beispiel 234a mit Intermediat F236 gekuppelt. Ein Teil des ADCs kann unter diesen Bedingungen auch in der ring-geschlossenen Form vorliegen. Der erhaltene ADC batch wurde folgendermaßen charakterisiert:
Protein Konzentration: 1.67 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.9

Beispiel 237A



60 mg Cetuximab in 4000 µL ml PBS (c=15 mg/mL) wurden unter Argon mit einer Lösung aus 0.344 mg TCEP in 100µl PBS-Puffer versetzt. Der Ansatz wurde 1h bei RT gerührt und anschließend wurden 3.04 mg (0.003 mmol) von Intermediat F209 gelöst in 600µl DMSO zugegeben. Nach weiteren 90 min Rühren bei RT wurde der Ansatz mit PBS-Puffer, der zuvor auf pH 8 eingestellt wurde, auf 15 ml verdünnt.

Diese Lösung wurde dann über mit PBS-Puffer pH8 equillibrierte PD 10-Säulen (Sephadex® G-25, GE Healthcare) gegeben und mit PBS-Puffer pH8 eluiert. Diese Lösung wurde über Nacht bei RT unter Argon gerührt und anschließend durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert, rückverdünnt mit PBS-Puffer (pH 7.2) und erneut aufkonzentriert. Ein Teil des ADCs kann unter diesen Bedingungen auch in der ring-geschlossenen Form vorliegen. Der erhaltene ADC batch wurde folgendermaßen charakterisiert:

Protein Konzentration: 13.78 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 4.8

Beispiel 237B

50 mg anti-TWEAKR AK-1 in 2688 µL ml PBS (c=18.6 mg/mL) wurden unter Argon mit einer Lösung aus 0.287 mg TCEP in 500µl PBS-Puffer versetzt und mit 8812 µL PBS Puffer, der zuvor auf pH 8 eingestelt wurde, verdünnt. Der Ansatz wurde 1h bei RT gerührt und anschließend wurden 2.894 mg (0.003 mmol) von Intermediat F209 gelöst in 500µl DMSO zugegeben. Nach weiteren 90 min Rühren bei RT wurde der Ansatz dann über mit PBS-Puffer pH8 equillibrierte PD 10-Säulen (Sephadex® G-25, GE Healthcare) gegeben und mit PBS-Puffer pH8 eluiert. Diese Lösung wurde über Nacht bei RT unter Argon gerührt und anschließend durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert, rückverdünnt mit PBS-Puffer (pH 7.2) und erneut aufkonzentriert. Ein Teil des ADCs kann unter diesen Bedingungen auch in der ring-geschlossenen Form vorliegen. Der Anteil der ring-göffneten Form wurde bei diesem batch direkt nach der Synthese mit 23% bestimmt. Der erhaltene ADC batch wurde folgendermaßen charakterisiert:

Protein Konzentration: 11.1 mg/mL

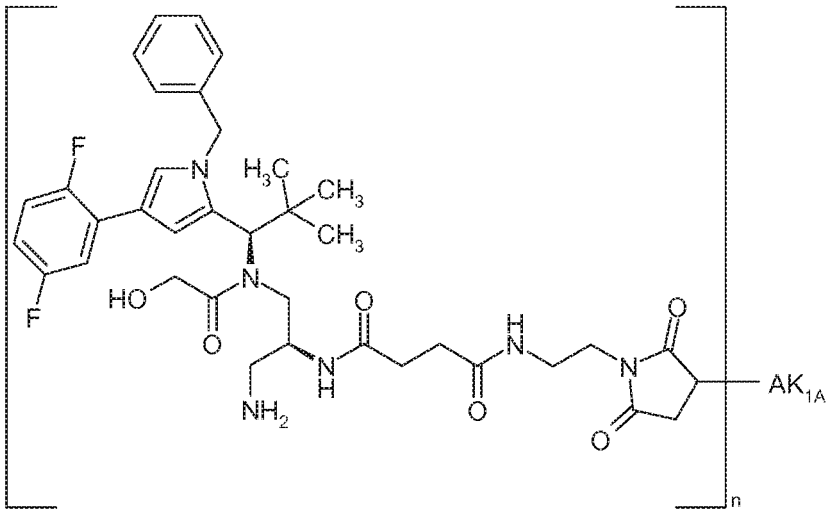
Drug/mAb Ratio: 3.3

Beispiel 237I

60 mg Nimotuzumab in 4587 µL ml PBS (c=13.08 mg/mL) wurden in Analogie zu Beispiel 237a mit Intermediat F209 gekuppelt. Ein Teil des ADCs kann unter diesen Bedingungen auch in der ring-geschlossenen Form vorliegen. Der erhaltene ADC batch wurde folgendermaßen charakterisiert:
Protein Konzentration: 15.88 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 4.0

Beispiel 238A



5 mg Cetuximab in 500 µL ml PBS (c= 10 mg/mL) wurden unter Argon mit einer Lösung aus 0,029 mg TCEP in 50µl PBS-Puffer versetzt. Der Ansatz wurde 30min bei RT gerührt und anschließend wurden 0.22 mg (0.00027 mmol) von Intermediat F238 gelöst in 50µl DMSO zugegeben. Nach weiteren 90 min Rühren bei RT wurde der Ansatz mit 1900 µl PBS-Puffer, der zuvor auf pH 8 eingestellt wurde, verdünnt.

Diese Lösung wurde dann über mit PBS-Puffer pH8 equillibrierte PD 10-Säulen (Sephadex® G-25, GE Healthcare) gegeben und mit PBS-Puffer pH8 eluiert. Das Eluat wurde über Nacht bei RT unter Argon gerührt und anschließend durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS-Puffer (pH 7.2). Das so hergestellte ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen. Der erhaltene ADC batch wurde folgendermaßen charakterisiert:

Protein Konzentration: 1.89 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.9

Beispiel 238B

5 mg anti-TWEAKR AK-1 in 500 µL ml PBS (c=10 mg/mL) wurden in Analogie zu Beispiel 238a mit Intermediat F238 gekuppelt. Das so hergestellte ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen. Der erhaltene ADC batch wurde folgendermaßen charakterisiert:

Protein Konzentration: 1.66 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.1

Unter diesen Kupplungsbedingungen lagen 26% des ADCs in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vor.

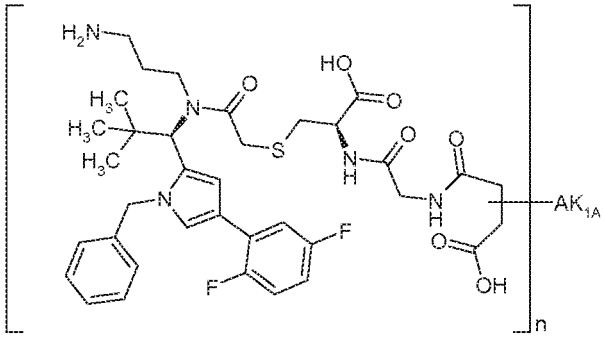
Beispiel 238E

5 mg Trastuzumab in 500 µL ml PBS (c=10 mg/mL) wurden in Analogie zu Beispiel 238a mit Intermediat F238 gekuppelt. Das so hergestellte ADC kann auch teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen. Der erhaltene ADC batch wurde folgendermaßen charakterisiert:

Protein Konzentration: 1.84 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.5

Beispiel 239A



5 mg Cetuximab in 458 µL ml PBS (c=10.92 mg/mL) wurden unter Argon mit einer Lösung aus 0.029 mg TCEP in 50µl PBS-Puffer versetzt. Der Ansatz wurde mit 1892 µl PBS-Puffer, der zuvor auf pH 8 eingestellt wurde, verdünnt und 1 h bei RT gerührt. Anschließend wurden 0.19 mg (0.00027 mmol) von Intermediat F217 gelöst in 100µl DMSO zugegeben. Nach weiteren 90 min Rühren bei RT wurde der

Ansatz über mit PBS-Puffer pH8 equillibrierte PD 10-Säulen (Sephadex® G-25, GE Healthcare) gegeben und mit PBS-Puffer pH8 eluiert. Das Eluat über Nacht bei RT unter Argon gerührt und anschließend durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS-Puffer (pH 7.2). Ein Teil des ADCs kann unter diesen Bedingungen auch in der ring-geschlossenen Form vorliegen. Der erhaltene ADC batch wurde folgendermaßen charakterisiert:
Protein Konzentration: 1.86 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.8

Beispiel 239B

5 mg anti-TWEAKR AK-1 in 269 µL ml PBS (c=18.6 mg/mL) wurden unter Argon mit einer Lösung aus 0.029 mg TCEP in 50µl PBS-Puffer versetzt. Der Ansatz wurde mit 2081 µl PBS-Puffer, der zuvor auf pH 8 eingestellt wurde, verdünnt und 1 h bei RT gerührt. Anschließend wurden 0.19 mg (0.00027 mmol) von Intermediat F217 gelöst in 100µl DMSO zugegeben. Nach weiteren 90 min Rühren bei RT wurde der Ansatz über mit PBS-Puffer pH8 equillibrierte PD 10-Säulen (Sephadex® G-25, GE Healthcare) gegeben und mit PBS-Puffer pH8 eluiert. Das Eluat über Nacht bei RT unter Argon gerührt und anschließend durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS-Puffer (pH 7.2). Ein Teil des ADCs kann unter diesen Bedingungen auch in der ring-geschlossenen Form vorliegen. Der erhaltene ADC batch wurde folgendermaßen charakterisiert:
Protein Konzentration: 1.28 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.6

Beispiel 239I

5 mg Nimotuzumab in 382 µL ml PBS (c=13.1 mg/mL) wurden unter Argon mit einer Lösung aus 0.029 mg TCEP in 50µl PBS-Puffer versetzt. Der Ansatz wurde mit 1968 µl PBS-Puffer, der zuvor auf pH 8 eingestellt wurde, verdünnt und 1 h bei RT gerührt. Anschließend wurden 0.19 mg (0.00027 mmol) von Intermediat F217 gelöst in 100µl DMSO zugegeben. Nach weiteren 90 min Rühren bei RT wurde der Ansatz über mit PBS-Puffer pH8 equillibrierte PD 10-Säulen (Sephadex® G-25, GE Healthcare) gegeben und mit PBS-Puffer pH8 eluiert. Das Eluat über Nacht bei RT unter Argon gerührt und anschließend durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS-Puffer (pH 7.2). Ein Teil des ADCs kann unter diesen Bedingungen auch in der ring-geschlossenen Form vorliegen. Der erhaltene ADC batch wurde folgendermaßen charakterisiert:
Protein Konzentration: 1.32 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.9

Bei dieser ADC-Präparation wurde ein Anteil der ring-geöffneten Bernsteinsäureamid-Form von 89% ermittelt.

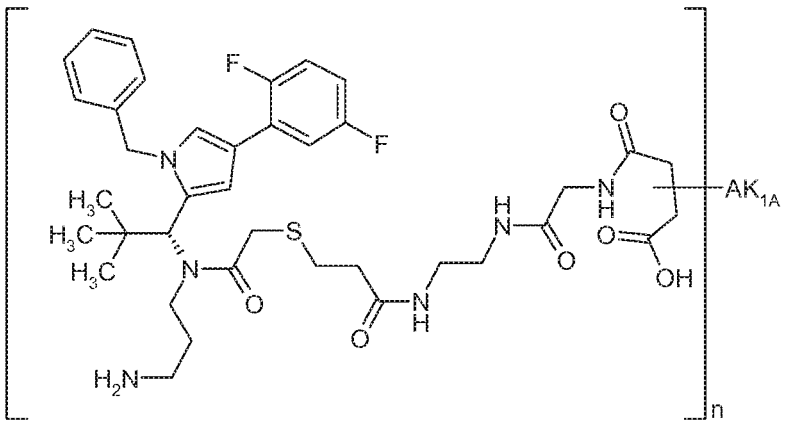
Beispiel 239H

5 mg Panitumumab in 74 µL ml PBS (c=67.5 mg/mL) wurden unter Argon mit einer Lösung aus 0.048 mg TCEP in 83µl PBS-Puffer versetzt. Der Ansatz wurde mit 2243 µl PBS-Puffer, der zuvor auf pH 8 eingestellt wurde, verdünnt und 4 h bei RT gerührt. Anschließend wurden 0.19 mg (0.00027 mmol) von Intermediat F217 gelöst in 100µl DMSO zugegeben. Der Ansatz wurde über Nacht bei RT gerührt. Die Lösung wurde dann über mit PBS-Puffer pH8 equillibrierte PD 10-Säulen (Sephadex® G-25, GE Healthcare) gegeben und mit PBS-Puffer pH8 eluiert. Das Eluat wurde über Nacht bei RT unter Argon gerührt und anschließend durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS-Puffer (pH 7.2). Ein Teil des ADCs kann unter diesen Bedingungen auch in der ring-geschlossenen Form vorliegen. Der erhaltene ADC batch wurde folgendermaßen charakterisiert:

Protein Konzentration: 1.33 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.1

Beispiel 240A



50 mg Cetuximab in 4579 µL ml PBS (c=10.92 mg/mL) wurden unter Argon mit einer Lösung aus 0.29 mg TCEP in 500µl PBS-Puffer versetzt. Der Ansatz wurde mit 7421 µl PBS-Puffer, der zuvor auf pH 8 eingestellt wurde, verdünnt und 1 h bei RT gerührt. Anschließend wurden 1.4 mg (0.0027 mmol) von Intermediat F213 gelöst in 500µl DMSO zugegeben. Nach weiteren 90 min Rühren bei RT wurde der Ansatz über mit PBS-Puffer pH8 equillibrierte PD 10-Säulen (Sephadex® G-25, GE Healthcare) gegeben und mit PBS-Puffer pH8 eluiert. Das Eluat über Nacht bei RT unter Argon gerührt und anschließend durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS-Puffer (pH 7.2). Ein

Teil des ADCs kann unter diesen Bedingungen auch in der ring-geschlossenen Form vorliegen. Der erhaltene ADC batch wurde folgendermaßen charakterisiert:
Protein Konzentration: 15.63 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.7

Beispiel 240B

5 mg anti-TWEAKR AK-1 in 500 µL ml PBS (c=10 mg/mL) wurden in Analogie zu Beispiel 239a mit Intermediat F213 gekuppelt. Ein Teil des ADCs kann unter diesen Bedingungen auch in der ring-geschlossenen Form vorliegen. Der erhaltene ADC batch wurde folgendermaßen charakterisiert:
Protein Konzentration: 0.9 mg/mL

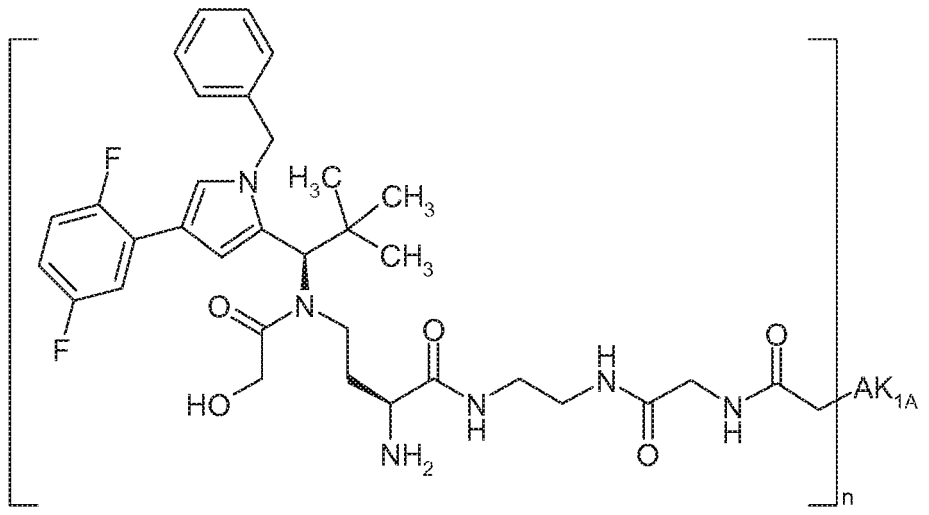
Drug/mAb Ratio: 2.0

Beispiel 240E

5 mg Trastuzumab in 500 µL ml PBS (c=10 mg/mL) wurden in Analogie zu Beispiel 239a mit Intermediat F213 gekuppelt. Ein Teil des ADCs kann unter diesen Bedingungen auch in der ring-geschlossenen Form vorliegen. Der erhaltene ADC batch wurde folgendermaßen charakterisiert:
Protein Konzentration: 1.4 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.1

Beispiel 241A



30 mg Cetuximab in 3 mL ml PBS (c=10 mg/mL) wurden unter Argon mit einer Lösung aus 0.172 mg TCEP in 300µl PBS-Puffer versetzt. Der Ansatz wurde 30min bei RT gerührt und anschließend wurden 1.36 mg (1.6 µmol) von Intermediat F241 gelöst in 330µl DMSO zugegeben. Nach 20h Rühren bei RT wurde der Ansatz mit 1.37 ml PBS Puffer verdünnt und über PD 10-Säulen (Sephadex® G-25, GE Healthcare) mit PBS-Puffer eluiert. Anschließend wurde durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert, rückverdünnt mit PBS-Puffer (pH 7.2) und erneut aufkonzentriert. Der erhaltene ADC batch wurde folgendermaßen charakterisiert:

Protein Konzentration: 9.98 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.3

Beispiel 241B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F241 5 mg anti-TWEAKR AK-1 in PBS (c=10 mg/mL). Die Kupplung mit dem Antikörper wurde nach der TCEP-Reduktion unter Rühren über Nacht durchgeführt bevor die weitere Aufarbeitung mittels Sephadex-Reinigung begann. Der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS.

Protein Konzentration: 1.39 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.9

Beispiel 241E

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F241 5 mg Trastuzumab in PBS (c=10 mg/mL). Die Kupplung mit dem Antikörper wurde nach der TCEP-Reduktion unter Rühren über Nacht durchgeführt bevor die weitere Aufarbeitung mittels Sephadex-Reinigung begann. Der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS.

Protein Konzentration: 1.83 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 4.7

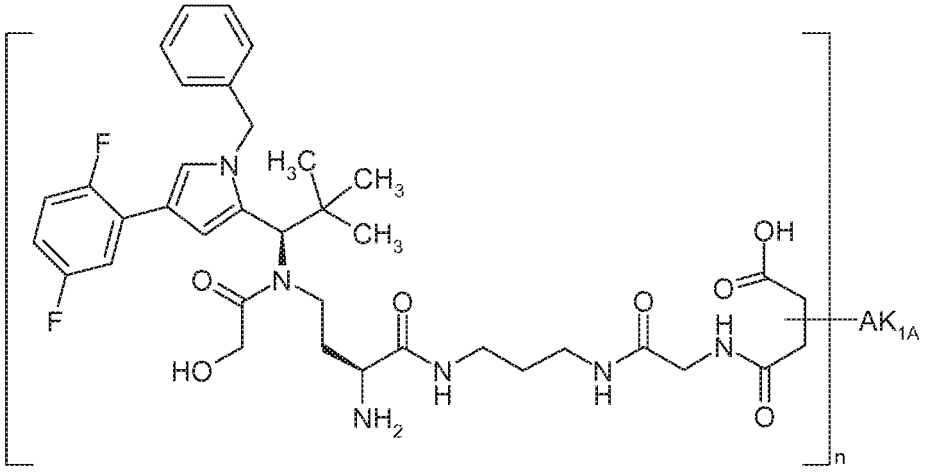
Beispiel 241I

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F241 5 mg Nimotuzumab in PBS (c=10 mg/mL). Die Kupplung mit dem Antikörper wurde nach der TCEP-Reduktion unter Rühren über Nacht durchgeführt bevor die weitere Aufarbeitung mittels Sephadex-Reinigung begann. Der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS.

Protein Konzentration: 1.6 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 4.0

Beispiel 242A



5 mg Cetuximab in 500 µL ml PBS (c= 10 mg/mL) wurden unter Argon mit einer Lösung aus 0,029 mg TCEP in 50µl PBS-Puffer versetzt. Der Ansatz wurde 30min bei RT gerührt und anschließend wurden 0.22 mg (0.00027 mmol) von Intermediat F242 gelöst in 50µl DMSO zugegeben. Nach weiteren 90 min Rühren bei RT wurde der Ansatz mit 1900 µl PBS-Puffer, der zuvor auf pH 8 eingestellt wurde, verdünnt.

Diese Lösung wurde dann über mit PBS-Puffer pH8 equillibrierte PD 10-Säulen (Sephadex® G-25, GE Healthcare) gegeben und mit PBS-Puffer pH8 eluiert. Das Eluat wurde über Nacht bei RT unter Argon gerührt und anschließend durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS-Puffer (pH 7.2). Ein Teil des ADCs kann unter diesen Bedingungen auch in der ring-geschlossenen Form vorliegen. Der erhaltene ADC batch wurde folgendermaßen charakterisiert:

Protein Konzentration: 1.92 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.7

Beispiel 242B

5 mg anti-TWEAKR AK-1 in 500 µL PBS (c=10 mg/mL) wurden wie unter Beispiel 242A beschrieben mit 0.22 mg von Intermediat F242 gekuppelt. Ein Teil des ADCs kann unter diesen Bedingungen auch in der ring-geschlossenen Form vorliegen. Der erhaltene ADC batch wurde folgendermaßen charakterisiert:

Protein Konzentration: 1.54 mg/mL

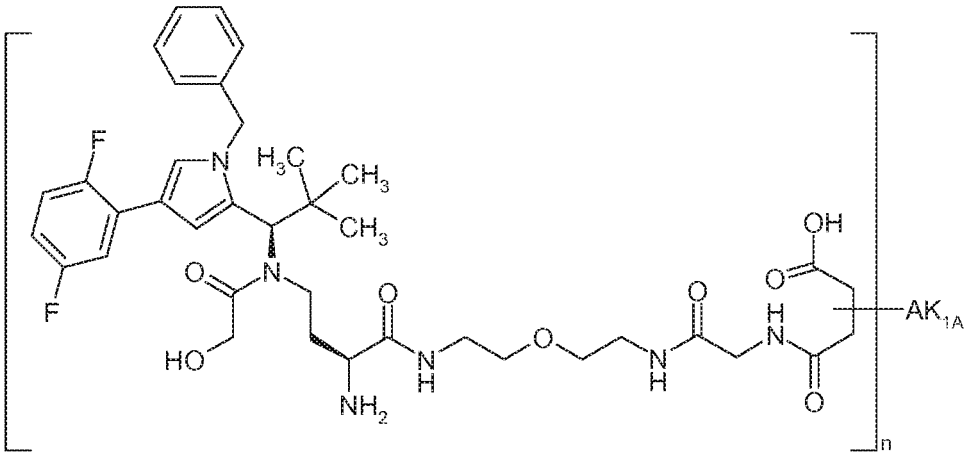
Drug/mAb Ratio: 3.1

Beispiel 242E

5 mg Trastuzumab in 500 µL PBS (c=10 mg/mL) wurden wie unter Beispiel 242A beschrieben mit 0.22 mg von Intermediat F242 gekuppelt. Ein Teil des ADCs kann unter diesen Bedingungen auch in der ring-geschlossenen Form vorliegen. Der erhaltene ADC batch wurde folgendermaßen charakterisiert:
Protein Konzentration: 1.76 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.6

Beispiel 243A



5 mg Cetuximab in 500 µL ml PBS (c= 10 mg/mL) wurden unter Argon mit einer Lösung aus 0,029 mg TCEP in 50µl PBS-Puffer versetzt. Der Ansatz wurde 30min bei RT gerührt und anschließend wurden 0.23 mg (0.00027 mmol) von Intermediat F243 gelöst in 50µl DMSO zugegeben. Nach weiteren 90 min Rühren bei RT wurde der Ansatz mit 1900 µl PBS-Puffer, der zuvor auf pH 8 eingestellt wurde, verdünnt.

Diese Lösung wurde dann über mit PBS-Puffer pH8 equillibrierte PD 10-Säulen (Sephadex® G-25, GE Healthcare) gegeben und mit PBS-Puffer pH8 eluiert. Das Eluat wurde über Nacht bei RT unter Argon gerührt und anschließend durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS-Puffer (pH 7.2). Ein Teil des ADCs kann unter diesen Bedingungen auch in der ring-geschlossenen Form vorliegen. Der erhaltene ADC batch wurde folgendermaßen charakterisiert:

Protein Konzentration: 1.92 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.9

Beispiel 243B

5 mg anti-TWEAKR AK-1 in 500 µL PBS (c=10 mg/mL) wurden wie unter Beispiel 243A beschrieben mit 0.23 mg von Intermediat F243 gekuppelt. Ein Teil des ADCs kann unter diesen Bedingungen auch in der ring-geschlossenen Form vorliegen. Der erhaltene ADC batch wurde folgendermaßen charakterisiert:
Protein Konzentration: 1.63 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.1

Beispiel 243E

5 mg Trastuzumab in 500 µL PBS (c=10 mg/mL) wurden wie unter Beispiel 243A beschrieben mit 0.23 mg von Intermediat F243 gekuppelt. Ein Teil des ADCs kann unter diesen Bedingungen auch in der ring-geschlossenen Form vorliegen. Der erhaltene ADC batch wurde folgendermaßen charakterisiert:
Protein Konzentration: 1.8 mg/mL

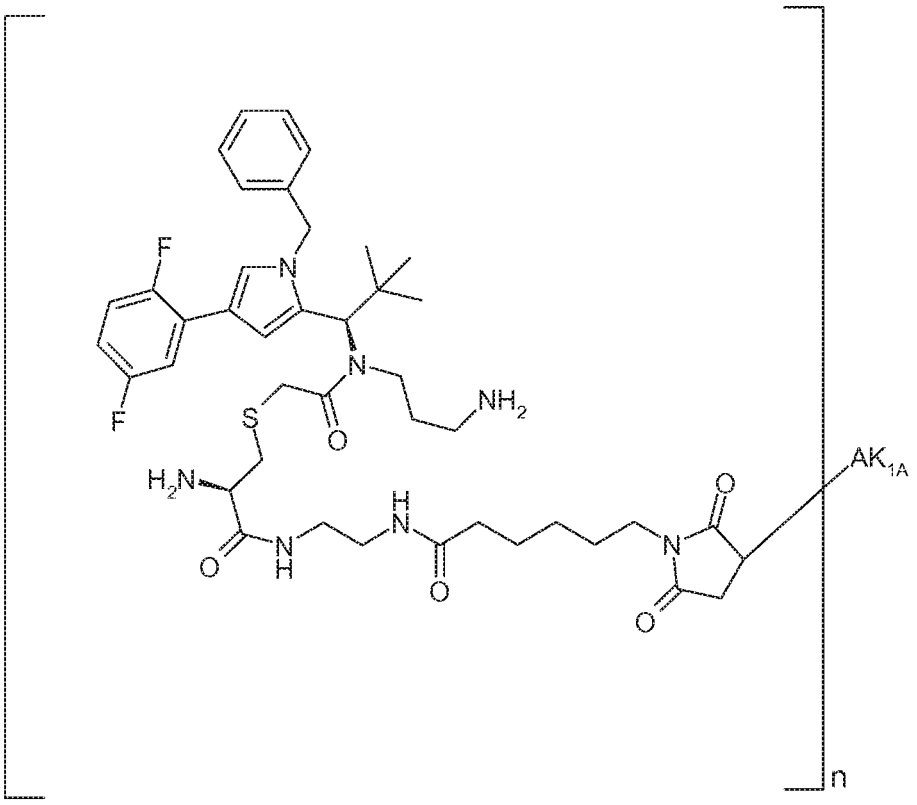
Drug/mAb Ratio: 3.5

Beispiel 243I

5 mg Nimotuzumab in 500 µL PBS (c=10 mg/mL) wurden wie unter Beispiel 243A beschrieben mit 0.23 mg von Intermediat F243 gekuppelt. Ein Teil des ADCs kann unter diesen Bedingungen auch in der ring-geschlossenen Form vorliegen. Der erhaltene ADC batch wurde folgendermaßen charakterisiert:
Protein Konzentration: 1.87 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.1

Beispiel 244A



Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F244 5.0 mg Cetuximab PBS (c = 23.10 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt.

Protein Konzentration: 2.12 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.5

Beispiel 244B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F244 5.0 mg anti-TWEAK AK-1 PBS (c = 18.60 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt.

Protein Konzentration: 1.65 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.5

Beispiel 244E

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F244 5.0 mg Trastuzumab in PBS (c = 13.50 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt.

Protein Konzentration: 1.91 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.5

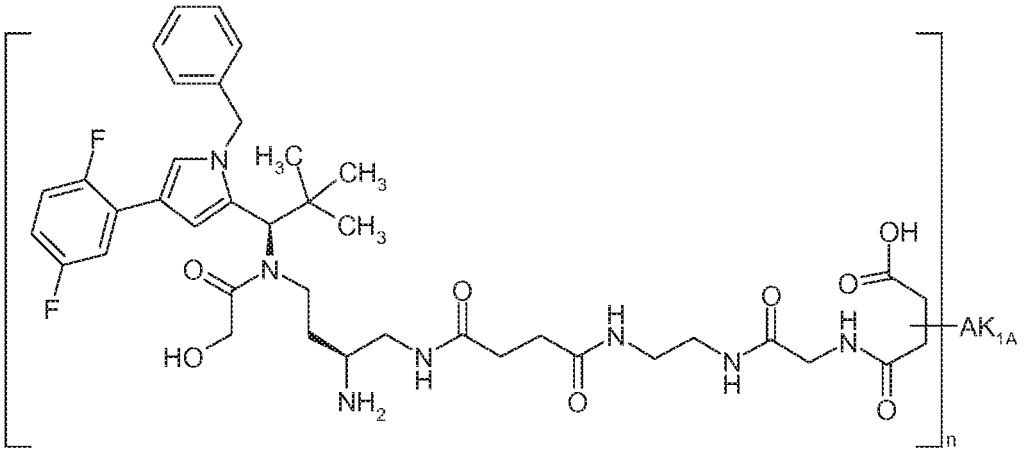
Beispiel 244I

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F244 5.0 mg Nimotuzumab in PBS (c = 13.08 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt.

Protein Konzentration: 1.91 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.9

Beispiel 245A



5 mg Cetuximab in 500 µL ml PBS (c= 10 mg/mL) wurden unter Argon mit einer Lösung aus 0,029 mg TCEP in 50µl PBS-Puffer versetzt. Der Ansatz wurde 30min bei RT gerührt und anschließend wurden 0.24 mg (0.00027 mmol) von Intermediat F245 gelöst in 50µl DMSO zugegeben. Nach weiteren 90 min Rühren bei RT wurde der Ansatz mit 1900 µl PBS-Puffer, der zuvor auf pH 8 eingestellt wurde, verdünnt.

Diese Lösung wurde dann über mit PBS-Puffer pH8 equillibrierte PD 10-Säulen (Sephadex® G-25, GE Healthcare) gegeben und mit PBS-Puffer pH8 eluiert. Das Eluat wurde über Nacht bei RT unter Argon gerührt und anschließend durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS-Puffer (pH 7.2). Ein Teil des ADCs kann unter diesen Bedingungen auch in der ring-geschlossenen Form vorliegen. Der erhaltene ADC batch wurde folgendermaßen charakterisiert:

Protein Konzentration: 1.69 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.4

Beispiel 245B

5 mg anti-TWEAKR AK-1 in 500 µL PBS (c=10 mg/mL) wurden wie unter Beispiel 245A beschrieben mit 0.24 mg von Intermediat F245 gekuppelt. Ein Teil des ADCs kann unter diesen Bedingungen auch in der ring-geschlossenen Form vorliegen. Der erhaltene ADC batch wurde folgendermaßen charakterisiert:
Protein Konzentration: 1.51 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.5

Beispiel 245E

5 mg Trastuzumab in 500 µL PBS (c=10 mg/mL) wurden wie unter Beispiel 245A beschrieben mit 0.24 mg von Intermediat F245 gekuppelt. Ein Teil des ADCs kann unter diesen Bedingungen auch in der ring-geschlossenen Form vorliegen. Der erhaltene ADC batch wurde folgendermaßen charakterisiert:
Protein Konzentration: 1.8 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.5

Beispiel 245I

5 mg Nimotuzumab in 500 µL PBS (c=10 mg/mL) wurden wie unter Beispiel 245A beschrieben mit 0.24 mg von Intermediat F245 gekuppelt. Ein Teil des ADCs kann unter diesen Bedingungen auch in der ring-geschlossenen Form vorliegen. Der erhaltene ADC batch wurde folgendermaßen charakterisiert:
Protein Konzentration: 1.65 mg/mL

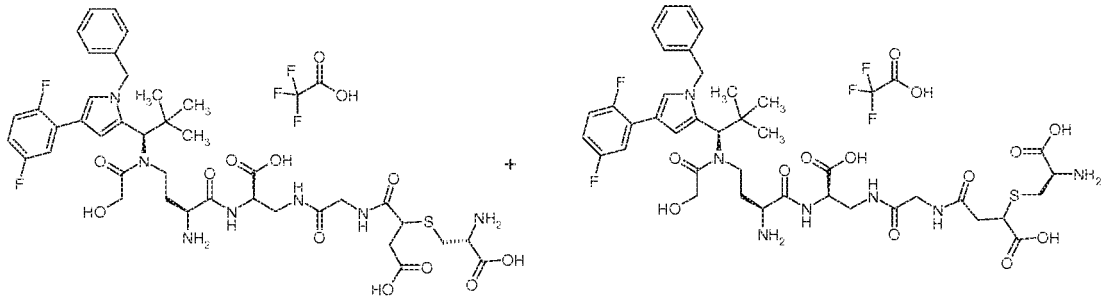
Drug/mAb Ratio: 2.3

Beispiel 246

4-[(2-{[(2R)-2-({(2S)-2-Amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}amino)-2-carboxyethyl]amino}-2-oxoethyl)amino]-3-{[(2R)-2-amino-2-carboxyethyl]sulfanyl}-4-oxobutansäure -trifluoressigsäure (1:1)

und

4-[(2-{[(2R)-2-({(2S)-2-Amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}amino)-2-carboxyethyl]amino}-2-oxoethyl)amino]-2-{[(2R)-2-amino-2-carboxyethyl]sulfanyl}-4-oxobutansäure -trifluoressigsäure (1:1)



Zunächst wurde L-Cystein mit 1-({[2-(Trimethylsilyl)ethoxy]carbonyl}oxy)pyrrolidine-2,5-dion in DMF in Gegenwart von *N,N*-Diisopropylethylamin in N-{[2-(Trimethylsilyl)ethoxy]carbonyl}-L-cystein überführt.

11 mg (0.013 mmol) von Intermediat F193 und 8 mg (0.016 mmol) N-{[2-(Trimethylsilyl) ethoxy]carbonyl}-L-cystein wurden 3 ml DMF gelöst und der Ansatz 20 h bei RT gerührt. Anschließend wurde eingeengt und der Rückstand durch präparative HPLC gereinigt.

Nach Vereinigung der entsprechenden Fraktionen und Abdampfen der Lösemittel im Vakuum wurde der Rückstand in 2 mL THF/Wasser 1:1 gelöst. Es wurden 19 µL einer 2M wässrigen Lithiumhydroxidlösung zugegeben und der Ansatz 1 h bei RT gerührt. Dann wurden nochmals 19 µL der 2M wässrigen Lithiumhydroxidlösung zugegeben und der Ansatz über Nacht bei RT gerührt. Anschließend wurde mit einer 1M Salzsäure neutral gestellt, das Lösemittel im Vakuum abgedampft und der Rückstand durch präparative HPLC gereinigt. Es wurden 4.1 mg (38% d. Th.) der regioisomeren geschützten Intermediate als farbloser Schaum erhalten.

LC-MS (Methode 1): R_t = 1.03 min (breit); MS (ESIpos): m/z = 1020 $(M+H)^+$.

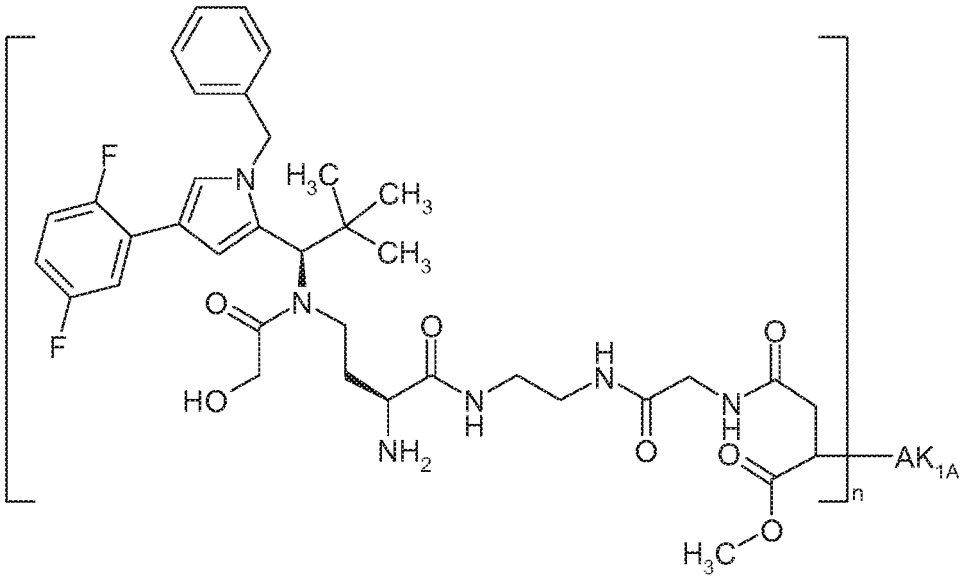
Im letzten Schritt wurden 4.1 mg (0.004 mmol) von diesem Intermediat in 3 mL 2,2,2-Trifluorethanol gelöst. Es wurden 3 mg (0.022 mmol) Zinkchlorid zugegeben und der Ansatz 1 h bei 50°C gerührt.

Anschließend wurden 6 mg (0.022 mmol) Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure und 2 ml einer 0.1%-igen wässrigen Trifluoressigsäure zugesetzt und das Lösemittel im Vakuum verdampft. Der Rückstand wurde mittels präparativer HPLC gereinigt. Nach Einengen der entsprechenden Fraktionen und Lyophilisation des Rückstands aus Acetonitril/Wasser wurden 5 mg (quant.) der Titelverbindung als Regioisomerengemisch imVerhältnis 20:80 erhalten.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.78 min (breit); MS (ESIpos): m/z = 876 $(M+H)^+$.

LC-MS (Methode 5): R_t = 2.36 min und 2.39 min; MS (ESIpos): m/z = 876 $(M+H)^+$.

Beispiel 247A



5 mg Cetuximab in 500 µL ml PBS (c=10 mg/mL) wurden unter Argon mit einer Lösung aus 0.029 mg TCEP in 50 µl PBS-Puffer versetzt. Der Ansatz wurde 30 min bei RT gerührt und anschließend wurden 0.264 mg (0.27 µmol) von Intermediat F247 gelöst in 50 µl DMSO zugegeben. Nach 20h Rühren bei RT wurde der Ansatz mit 1.9 ml PBS Puffer verdünnt und über PD 10-Säulen (Sephadex® G-25, GE Healthcare) mit PBS-Puffer eluiert. Anschließend wurde durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert, rückverdünnt mit PBS-Puffer (pH 7.2) und erneut aufkonzentriert. Der erhaltene ADC batch wurde folgendermaßen charakterisiert:

Protein Konzentration: 1.66 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.2

Beispiel 247B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F247 5 mg anti-TWEAKR AK-1 in PBS (c=10 mg/mL) und die Kupplung und Aufarbeitung wurde wie in Beispiel 247A beschrieben durchgeführt.

Protein Konzentration: 1.49 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.6

Beispiel 247E

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F247 5 mg Trastuzumab in PBS (c=10 mg/mL) und die Kupplung und Aufarbeitung wurde wie in Beispiel 247A beschrieben durchgeführt.

Protein Konzentration: 1.67 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.3

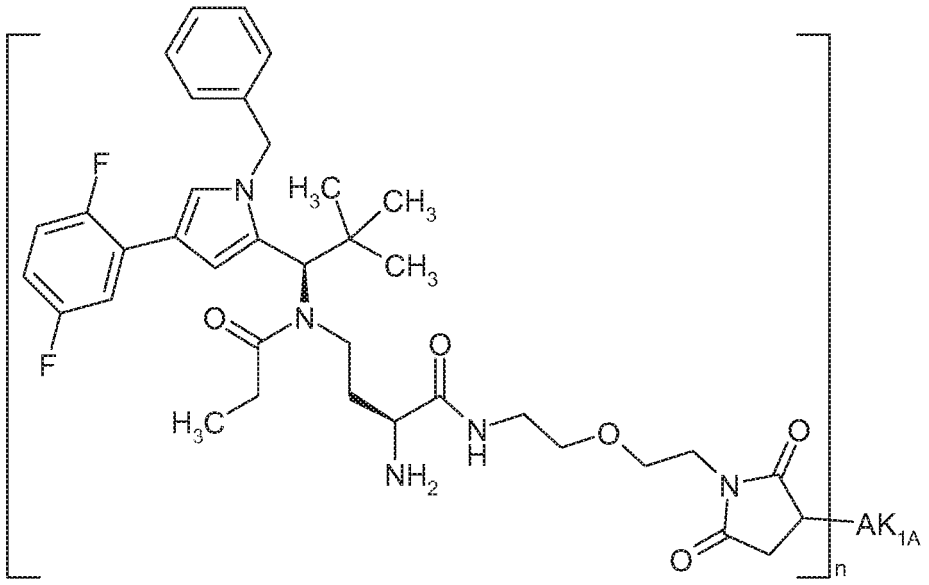
Beispiel 247I

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F247 5 mg Nimotuzumab in PBS (c=10 mg/mL) und die Kupplung und Aufarbeitung wurde wie in Beispiel 247A beschrieben durchgeführt.

Protein Konzentration: 1.62 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.4

Beispiel 248A



Eingesetzt wurden hier in Analogie zu Beispiel 5A zur Kupplung mit Intermediat F248 5 mg Cetuximab in PBS (c=10.92 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS. Ein Teil des so hergestellten ADCs kann in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 2.06 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 3.8

Beispiel 248B

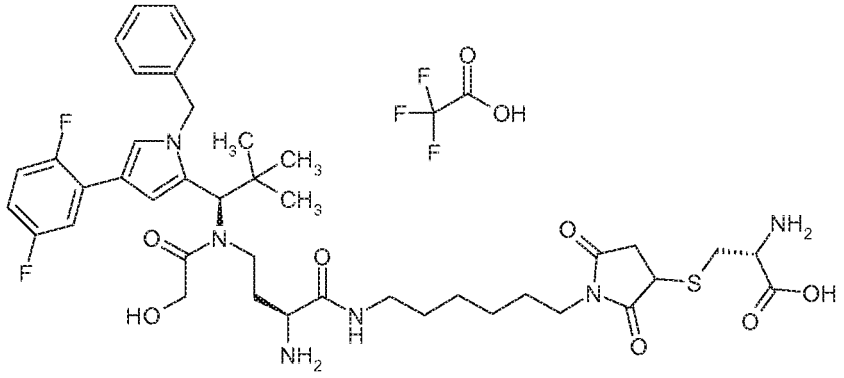
Eingesetzt wurden hier in Analogie zu Beispiel 5B zur Kupplung mit Intermediat F248 5 mg anti-TWEAKR AK-1 in PBS (c=18.6 mg/mL) und der Ansatz wurde nach der Sephadex-Reinigung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und rückverdünnt mit PBS. Ein Teil des so hergestellten ADCs kann in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen.

Protein Konzentration: 1.84 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 4.1

Beispiel 249

S-{1-[6-({(2S)-2-Amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}amino)hexyl]-2,5-dioxopyrrolidin-3-yl}-L-cystein - trifluoressigsäure (1:1)



11 mg (14 µmol) von Intermediat F179 wurden in 2.2 ml DMF aufgenommen und mit 3.3 mg (27 µmol) L-Cystein versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 3 h bei RT gerührt und dann im Vakuum eingeengt. Der Rückstand wurde mittels präparativer HPLC gereinigt. Die entsprechenden Fraktionen wurden eingeengt und nach Lyophilisation des Rückstands aus Acetonitril/Wasser verblieben 7.3 mg (58% d. Th.) der Titelverbindung als farbloser Schaum.

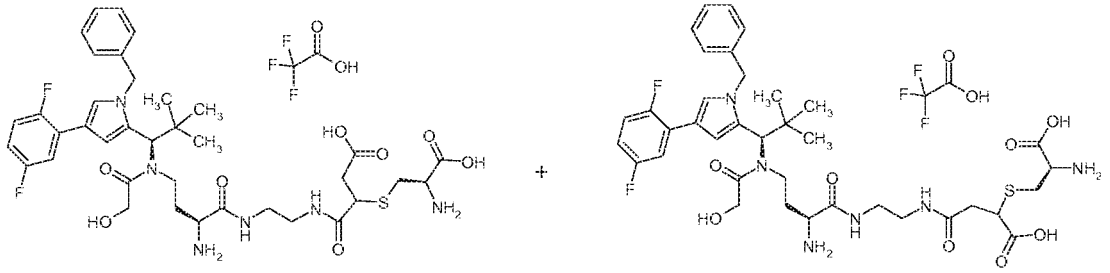
LC-MS (Methode 4): R_t = 1.04 min; MS (Elpos): m/z = 813 $[M+H]^+$.

Beispiel 250

4-{[2-({(2S)-2-Amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}amino)ethyl]amino}-3-{[(2R)-2-amino-2-carboxyethyl]sulfanyl}-4-oxobutansäure -trifluoressigsäure (1:1)

und

4-{[2-({(2S)-2-Amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}amino)ethyl]amino}-2-{[(2R)-2-amino-2-carboxyethyl]sulfanyl}-4-oxobutansäure -trifluoressigsäure (1:1)



10 mg (0.013 mmol) von Intermediat F85 und 5.3 mg (0.02 mmol) N-{[2-(Trimethylsilyl) ethoxy]carbonyl}-L-cystein 3 ml DMF gelöst und der Ansatz 3 Tage bei RT gerührt. Anschließend wurde eingeengt und der Rückstand durch präparative HPLC gereinigt. Nach Vereinigung der entsprechenden Fraktionen und Abdampfen der Lösemittel im Vakuum wurde der Rückstand in 2 mL THF/Wasser 1:1 gelöst. Es wurden 9 µL einer 2M wässrigen Lithiumhydroxidlösung zugegeben und der Ansatz 1 h bei RT gerührt. Anschließend wurde der Ansatz mit einer 1M Salzsäure auf einen pH-Wert von ~3 eingestellt, das Lösemittel im Vakuum abgedampft und der Rückstand durch präparative HPLC gereinigt. Es wurden 3 mg (24% d. Th. Über 2 Stufen) der regioisomeren geschützten Intermediate als farbloser Schaum erhalten.

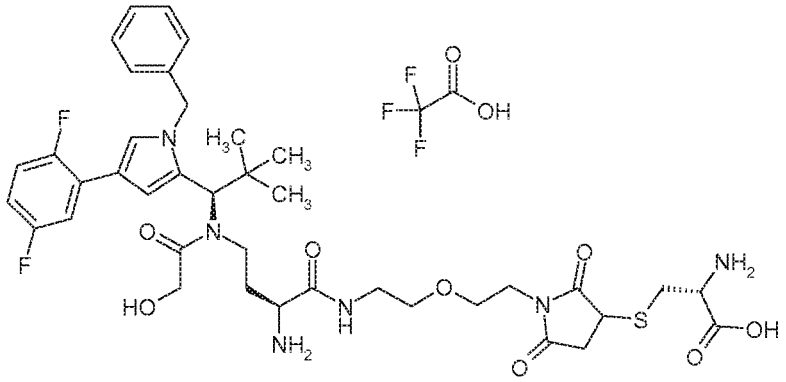
LC-MS (Methode 5): R_t = 3.39 min und 3.43 min; MS (ESIpos): m/z = 919 $(M+H)^+$.

Im letzten Schritt wurden 3 mg (0.0033 mmol) von diesem Intermediat in 3 mL 2,2,2-Trifluorethanol gelöst. Es wurden 2.2 mg (0.016 mmol) Zinkchlorid zugegeben und der Ansatz 3.5 h bei 50°C gerührt. Anschließend wurden 4.8 mg (0.016 mmol) Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure zugesetzt und das Lösemittel im Vakuum verdampft. Der Rückstand wurde mittels präparativer HPLC gereinigt. Nach Einengen der entsprechenden Fraktionen und Lyophilisation des Rückstands aus Acetonitril/Wasser wurden 1 mg (33% d. Th.) der Titelverbindung als Regioisomerengemisch imVerhältnis 43:34 erhalten. Ein weiteres Isomer war mit 23% im Isomerengemisch (RT = 2.51) vertreten.

LC-MS (Methode 5): R_t = 2.57 min und 2.62 min; MS (ESIpos): m/z = 775 $(M+H)^+$.

Beispiel 251

S-(1-{2-[2-({(2S)-2-Amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}amino)ethoxy]ethyl}-2,5-dioxopyrrolidin-3-yl)-L-cystein - trifluoressigsäure (1:1)



3 mg (4 µmol) von Intermediat F248 wurden in 2 ml DMF aufgenommen und mit 0.9 mg (8 µmol) L-Cystein versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 18 h bei RT gerührt und dann im Vakuum eingeengt.

Der Rückstand wurde mittels präparativer HPLC gereinigt. Die entsprechenden Fraktionen wurden eingeengt und nach Lyophilisation des Rückstands aus Acetonitril/Wasser verblieben 1.1 mg (32% d. Th.) der Titelverbindung als weißer Feststoff.

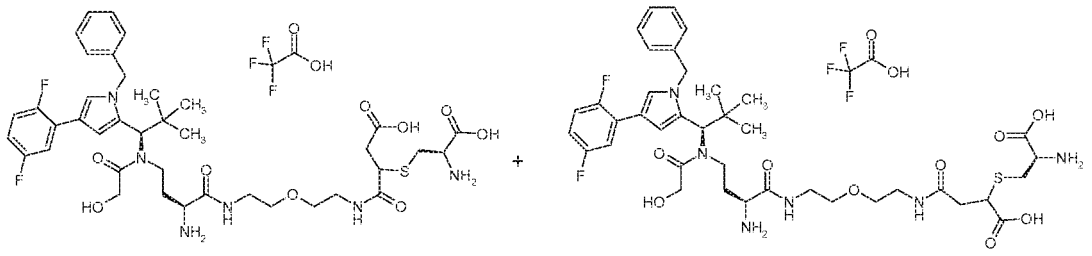
LC-MS (Methode 1): R_t = 0.78 min; MS (EIpos): m/z = 801 $[M+H]^+$.

Beispiel 252

(3R,7S)-7-Amino-17-{[(2R)-2-amino-2-carboxyethyl]sulfanyl}-3-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-4-glycoloyl-2,2-dimethyl-8,16-dioxo-12-oxa-4,9,15-triazanonadecan-19-säure - trifluoressigsäure (1:1)

und

(3R,7S)-7-Amino-18-{[(2R)-2-amino-2-carboxyethyl]sulfanyl}-3-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-4-glycoloyl-2,2-dimethyl-8,16-dioxo-12-oxa-4,9,15-triazanonadecan-19-säure - trifluoressigsäure (1:1)



8 mg (0.010 mmol) von der geschützten Zwischenstufe von Intermediat F248 und 5.1 mg (0.02 mmol) N-{[2-(Trimethylsilyl) ethoxy]carbonyl}-L-cystein 3 ml DMF gelöst und der Ansatz 18 h bei RT gerührt und anschließend 2 h im Ultraschallbad behandelt. Anschließend wurde eingeengt und der Rückstand durch präparative HPLC gereinigt. Nach Vereinigung der entsprechenden Fraktionen und Abdampfen der Lösemittel im Vakuum wurde der Rückstand in 2 mL THF/Wasser 1:1 gelöst. Es wurden 15 µL einer 2M wässrigen Lithiumhydroxidlösung zugegeben und der Ansatz 15 min bei RT gerührt. Anschließend wurde der Ansatz mit einer 1M Salzsäure auf einen pH-Wert von ~3 eingestellt, mit 20 ml Kochsalzlösung verdünnt und zweimal mit 20 ml Ethylacetat extrahiert. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet, eingeengt und der Rückstand aus Acetonitril/Wasser lyophilisiert. Es wurden 8.4 mg (78% d. Th. über 2 Stufen) der regioisomeren geschützten Intermediate als farbloser Schaum erhalten.

LC-MS (Methode 1): R_t = 1.44 min und 3.43 min; MS (ESIpos): m/z = 1107 $(M+H)^+$.

Im letzten Schritt wurden 8 mg (0.007 mmol) von diesem Intermediat in 5 mL 2,2,2-Trifluorethanol gelöst. Es wurden 9.8 mg (0.072 mmol) Zinkchlorid zugegeben und der Ansatz 1.5 h bei 50°C gerührt. Anschließend wurde Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure zugesetzt und das Lösemittel im Vakuum

verdampft. Der Rückstand wurde mittels präparativer HPLC gereinigt. Nach Einengen der entsprechenden Fraktionen und Lyophilisation des Rückstands aus Acetonitril/Wasser wurden 4 mg (59% d. Th.) der Titelverbindung als Regioisomerengemisch imVerhältnis 31:67 erhalten.

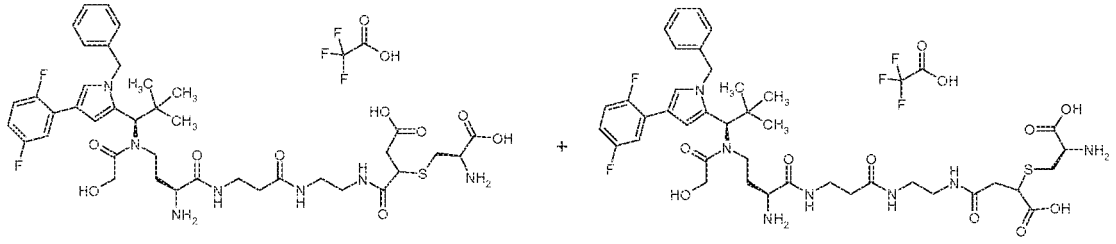
LC-MS (Methode 1): R_t = 0.79 min und 0.81 min; MS (ESIpos): m/z = 819 $(M+H)^+$.

Beispiel 253

4-({2-[(N-{(2S)-2-Amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}-beta-alanyl)amino]ethyl}amino)-3-{[(2R)-2-amino-2-carboxyethyl]sulfanyl}-4-oxobutansäure -trifluoressigsäure (1:1)

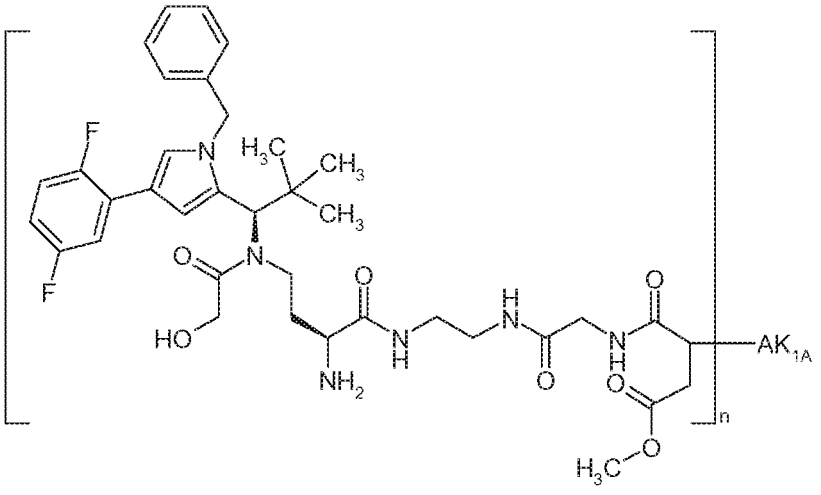
und

4-({2-[(N-{(2S)-2-Amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}-beta-alanyl)amino]ethyl}amino)-2-{[(2R)-2-amino-2-carboxyethyl]sulfanyl}-4-oxobutansäure -trifluoressigsäure (1:1)



Die isomeren Titelverbindungen wurden in Analogie zu Beispiel 250 aus Intermediat F84 und N-{[2-(Trimethylsilyl) ethoxy]carbonyl}-L-cystein hergestellt.

Beispiel 254A



5 mg Cetuximab in 500 µL ml PBS (c=10 mg/mL) wurden unter Argon mit einer Lösung aus 0.029 mg TCEP in 50 µl PBS-Puffer versetzt. Der Ansatz wurde 30 min bei RT gerührt und anschließend wurden 0.264 mg (0.27 µmol) von Intermediat F254 gelöst in 50 µl DMSO zugegeben. Nach 20h Rühren bei RT wurde der Ansatz mit 1.9 ml PBS Puffer verdünnt und über PD 10-Säulen (Sephadex® G-25, GE Healthcare) mit PBS-Puffer eluiert. Anschließend wurde durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert, rückverdünnt mit PBS-Puffer (pH 7.2) und erneut aufkonzentriert. Der erhaltene ADC batch wurde folgendermaßen charakterisiert:

Protein Konzentration: 1.74 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.2

Beispiel 254B

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F254 5 mg anti-TWEAKR AK-1 in PBS (c=10 mg/mL) und die Kupplung und Aufarbeitung wurde wie in Beispiel 254A beschrieben durchgeführt.

Protein Konzentration: 1.8 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.5

Beispiel 254E

Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F254 5 mg Trastuzumab in PBS (c=10 mg/mL) und die Kupplung und Aufarbeitung wurde wie in Beispiel 254A beschrieben durchgeführt.

Protein Konzentration: 1.74 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.4

Beispiel 254I

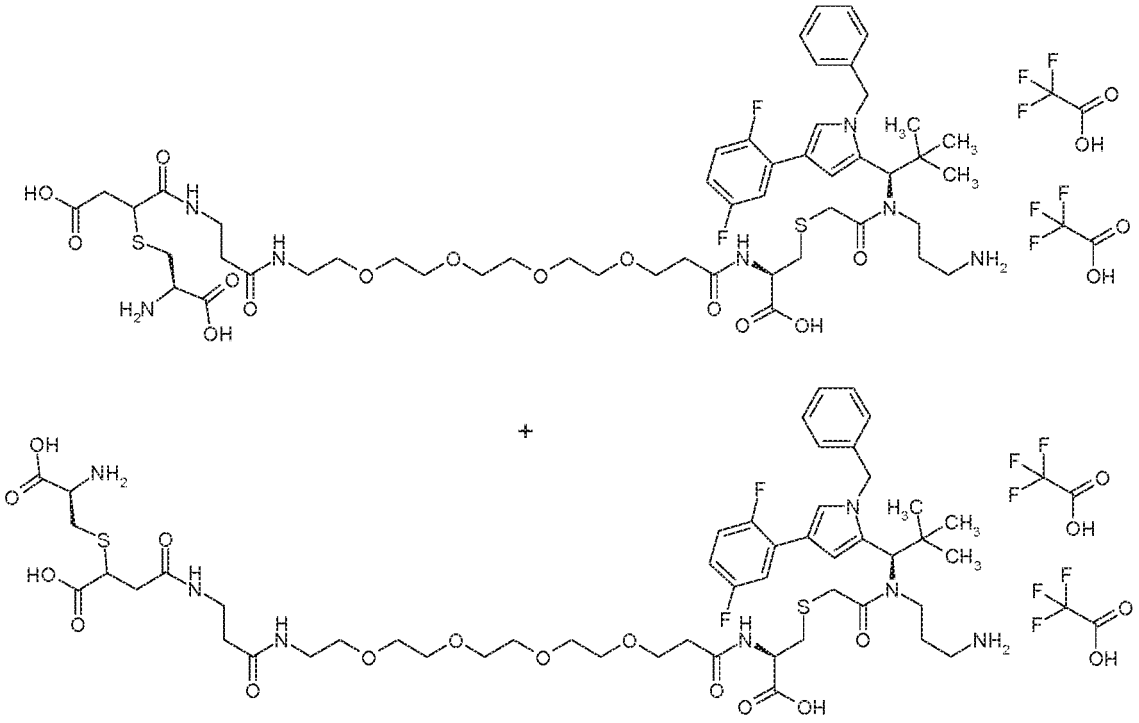
Eingesetzt wurden hier zur Kupplung mit Intermediat F254 5 mg Nimotuzumab in PBS (c=10 mg/mL) und die Kupplung und Aufarbeitung wurde wie in Beispiel 254A beschrieben durchgeführt.

Protein Konzentration: 1.73 mg/mL

Drug/mAb Ratio: 2.0

Beispiel 255

(2R,28R)-28-Amino-2-[({2-[(3-aminopropyl){(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}amino]-2-oxoethyl}sulfanyl)methyl]-25-(carboxymethyl)-4,20,24-trioxo-7,10,13,16-tetraoxa-26-thia-3,19,23-triazanonacosan-1,29-disäure -trifluoressigsäure (1:2) und (1R,28R,34R)-1-Amino-33-(3-aminopropyl)-34-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-35,35-dimethyl-6,10,26,32-tetraoxo-14,17,20,23-tetraoxa-3,30-dithia-7,11,27,33-tetraazahexatriacontan-1,4,28-tricarbonsäure -trifluoressigsäure (1:2)



20 mg (0.018 mmol) R-{2-[(3-Aminopropyl){(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}amino]-2-oxoethyl}-N-[19-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-17-oxo-4,7,10,13-tetraoxa-16-azanonadecan-1-oyl]-L-cystein-trifluoressigsäure (1:1) (Intermediat F209) und 9.78 mg (0.036 mmol) N-{[2-(Trimethylsilyl) ethoxy]carbonyl}-L-cystein wurden in 2 ml DMF gelöst und der Ansatz 18 h bei RT gerührt. Die Reaktionsmischung wurde im Vakuum verdampft. Der Rückstand (47.7 mg) wurde in 3 mL THF/Wasser 1:1 gelöst. Es wurden 0.08 mL einer 2M wässrigen Lithiumhydroxidlösung zugegeben und der Ansatz 1 Stunde bei RT gerührt. Anschließend wurde der Ansatz mit 9.26 mg (0.15 mmol) Essigsäure auf einen pH-Wert von ~7 eingestellt. Die Reaktionsmischung wurde direkt mittels präp. RP-HPLC gereinigt (Säule: Reprosil 125x30; 10µ, Fluss: 50 mL/min, MeCN/Wasser; 0.1 % TFA). Die Lösemittel wurden im Vakuum verdampft und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Es wurden 15.3 mg (29% über 2 Stufen) der regioisomeren geschützten Intermediate erhalten.

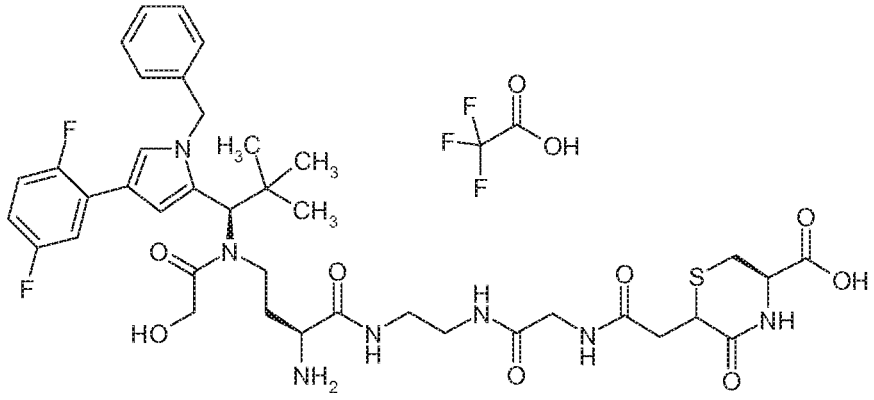
LC-MS (Methode 6): R_t = 12.26 min und 12.30min; MS (ESIpos): m/z = 1254 $(M+H)^+$.

Im letzten Schritt wurden 15.3 mg (0.01 mmol) von diesem Intermediat in 2 mL 2,2,2-Trifluorethanol gelöst. Es wurden 6.1 mg (0.05 mmol) Zinkchlorid zugegeben und der Ansatz 2 h bei 50°C gerührt. Anschließend wurde 13.1 mg (0.05 mmol) Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure zugesetzt und das Lösemitte wurde mittels präparativer HPLC gereinigt. Nach Einengen der entsprechenden Fraktionen und Lyophilisation des Rückstands aus Acetonitril/Wasser wurden 11.9 mg (79.5%) der Titelverbindung als Regioisomerengemisch erhalten.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.85 min; MS (ESIpos): m/z = 1110 $(M+H)^+$.

Beispiel 256

(3R)-6-{(11S,15R)-11-Amino-15-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-14-glycoloyl-16,16-dimethyl-2,5,10-trioxo-3,6,9,14-tetraazaheptadec-1-yl}-5-oxothiomorpholin-3-carbonsäure - trifluoressigsäure (1:1)



4 mg (0.004 mmol) der Verbindung aus Beispiel 135 wurden in 4 mL THF/Wasser gelöst und mit 48 µL einer 2molaren wässrigen Lithiumhydroxidlösung versetzt. Der Ansatz wurde 1 h bei RT gerührt und anschließend eingeengt und mittels präparativer HPLC gereinigt. Nach Vereinigung, Einengen und Lyophilisation aus Acetonitril/Wasser der entsprechenden Fraktionen wurden 2.4 mg (60% d. Th.) der Titelverbindung erhalten.

LC-MS (Methode 1): R_t = 0.86 min; MS (EIpos): m/z = 814 $[M+H]^+$.

C: **Bewertung der biologischen Wirksamkeit**

Die biologische Wirkung der erfindungsgemäßen Verbindungen kann durch die nachstehend beschriebenen Assays gezeigt werden:

m. C-1a Bestimmung der cytotoxischen Wirkung der gegen TWEAKR gerichteten ADCs

Die Analyse der cytototoxischen Wirkung der anti-TWEAKR-ADCs erfolgt auf verschiedenen Zelllinien:

NCI-H292: humane mukoepidermoide Lungenkarzinomzellen, ATCC-CRL-1848, Standardmedium: RPMI 1640 (Biochrom; #FG1215, stab. Glutamin) + 10% FCS (Biochrom; #S0415), TWEAKR-positiv, EGFR-positiv.

BxPC3: humane Bauchspeicheldrüsenkrebszellen, ATCC-CRL-1687, Standardmedium: RPMI 1640 (Biochrom; #FG1215, stab. Glutamin) + 10% FCS (Biochrom; #S0415), TWEAKR-positiv.

KPL4: humane Brustkrebszellen, Standardmedium: RPMI 1640 + GlutaMAX I + 10% FBS, Zellbank, Bayer Pharma AG (Identität am 19.7.2012 bei der DSMZ überprüft und bestätigt), Berlin, ERBB2-positiv.

Kultivierung der Zellen erfolgt nach StandardMethode, wie bei der American Tissue Culture Collection (ATCC) für die jeweiligen Zelllinien angegeben.

MTT-Assay

Zur Durchführung werden die Zellen mit einer Lösung von Accutase in PBS (Biochrom AG #L2143) abgelöst, pelletiert, in Kulturmedium resuspendiert, gezählt und in eine 96-Loch Kulturplatte mit weissem Boden (Costar #3610) ausgesät (1000-2000 Zellen in 100µl/ well abhängig von der verwendeten Zelle) und im Brutschrank bei 37°C und 5% Kohlendioxid inkubiert. Nach 48 h werden die Antikörper-Wirkstoffkonjugate in 10µl Kulturmedium in Konzentrationen von 10^{-5}M bis 10^{-13}M auf die Zellen gegeben (Triplikate) und im Brutschrank bei 37°C und 5% Kohlendioxid inkubiert. Nach 72 h erfolgt die Detektion der Proliferation mit Hilfe des MTT-Assays (ATCC, Manassas, Virginia, USA, Katalog-Nr. 30-1010K). Nach Ablauf der gewählten Inkubationszeit wird das MTT Reagens für 4h mit den Zellen inkubiert, bevor durch Zugabe des Detergenzes die Lyse der Zellen über Nacht erfolgt. Die Detektion des gebildeten Farbstoffs erfolgte bei 570nm. Die Proliferation ohne Testsubstanz, aber ansonsten identisch behandelten Zellen, wird als 100% Wert definiert.

CTG-Assay

Die Kultivierung der Zellen erfolgte nach StandardMethode, mit den unter C-1 angegebenen Wachstumsmedien. Zur Durchführung wurden die Zellen mit einer Lösung von Trypsin (0.05%) und EDTA (0.02%) in PBS (Biochrom AG #L2143) abgelöst, pelletiert, in Kulturmedium resuspendiert, gezählt und in eine 96-Loch Kulturplatte mit weissem Boden (Costar #3610) ausgesät (in 75µl/Loch, folgende Zellzahlen je Loch: NCI-H292: 2500 Zellen/ Loch, BxPC3 2500 Zellen / Loch) und im Brutschrank bei 37°C und 5% Kohlendioxid inkubiert. Nach 24h wurden die Antikörper-Wirkstoffkonjugate in 25µl Kulturmedium (vierfach konzentriert) auf die Zellen gegeben, so dass finale Konzentrationen der Antikörper-Wirkstoffkonjugate von 3 x 10^{-7} M bis 3 x 10^{-11} M auf den Zellen erreicht wurden (Triplikate). Anschließend wurden die Zellen im Brutschrank bei 37°C und 5% Kohlendioxid inkubiert. In einer parallelen Platte wurde die Zellvitalität zu Beginn der Wirkstoffbehandlung (Tag 0) mit dem Cell Titer Glow (CTG) Luminescent Cell Viability Assay (Promega #G7573 und #G7571) bestimmt. Dazu wurden pro Zellansatz 100µl des Substrats hinzugefügt, die Platten anschließend mit Alufolie abgedeckt, für 2 Minuten mit dem Plattenschüttler bei 180 rpm geschüttelt, für 8 Minuten auf der Laborbank stehen gelassen und dann mit einem Luminometer (Victor X2, Perkin Elmer) gemessen. Das Substrat detektiert den ATP-Gehalt in den lebenden Zellen, wobei ein Lumineszenz-Signal erzeugt wird, dessen Höhe direkt proportional zur Vitalität der Zellen ist. Nach 72h Inkubation mit den Antikörper-Wirkstoffkonjugaten wurde nun auch in diesen Zellen die Vitalität mit dem Cell Titer Glow Luminescent Cell Viability Assay wie oben beschrieben bestimmt. Aus den gemessenen Daten wurde die IC_{50} der Wachstumshemmung im Vergleich zum Tag 0 unter Verwendung des DRC (Dose Response Curve) Analysis Spreadsheets anhand einer 4-Parameter Anpassung berechnet. Das DRC Analysis Spreadsheet ist ein von Bayer Pharma AG und Bayer Business Services auf der Plattform IDBS E-WorkBook Suite entwickeltes Biobook Spreadsheet (IDBS: ID Business Solutions Ltd., Guildford, UK).

In den folgenden Tabellen 1a,1b und 1c sind die IC_{50}-Werte repräsentativer Ausführungsbeispiele mit dem anti-TWEAKR-Antikörper aus diesem Assay aufgeführt:

Tabelle 1a

Beispiel	**BxPC3 IC_{50} [M] CTG**	**NCI-H292 IC_{50} [M] CTG**	**Beispiel**	**BxPC3 IC_{50} [M] CTG**	**NCI-H292 IC_{50} [M] CTG**
02b	1.88E-09	5.41E-10	36b	1.83E-09	-
03b	1.92E-08	-	37b	-	-
05b	-	-	38b	1.41E-09	2.61E-10
06b	4.96E-08	-	39b	2.74E-09	-
07b	6.56E-10	3.06E-10	40b	3.76E-09	-
08b	1.20E-09	4.73E-10	41b	1.98E-09	-

Beispiel	BxPC3 IC_{50} [M] CTG	NCI-H292 IC_{50} [M] CTG	Beispiel	BxPC3 IC_{50} [M] CTG	NCI-H292 IC_{50} [M] CTG
09b	1.18E-08	1.05E-08	42b	5.53E-09	-
10b	1.43E-08	-	43b	-	-
11b	1.32E-08	-	44b	3.07E-09	1.44E-09
12b	1.32E-09	6.54E-10	45b	5.64E-09	-
13b	9.65E-09	-	46b	1.72E-09	2.57E-09
14b	1.96E-09	4.13E-07	47b	4.34E-09	-
15b	2.26E-09	6.00E-07	48b	2.90E-09	8.46E-10
16b	2.82E-09	6.00E-07	49b	9.76E-09	6.37E-08
17b	8.47E-10	3.52E-10	50b	2.39E-09	1.86E-07
18b	6.00E-07	6.00E-07	51b	-	-
19b	7.73E-08	-	52b	-	-
20b	-	-	53b	-	-
21b	1.11E-08	9.53E-09	54b	-	-
22b	6.89E-09	2.73E-09	55b	2.73E-08	2.59E-08
23b	8.43E-10	4.04E-10	56b	6.29E-09	6.00E-07
24b	2.26E-09	6.00E-07	57b	1.52E-09	5.02E-09
25b	1.76E-09	6.00E-07	58b	5.32E-09	5.76E-09
26b	1.08E-08	6.00E-07	82b	4.26E-09	6.00E-07
27b	2.75E-09	6.00E-07	83b	4.68E-09	1.97E-08
28b	5.15E-08	6.00E-07	84b	1.00E-09	8.58E-10
29b	2.06E-07	6.00E-07	85b	2.03E-09	8.84E-10
30b	2.05E-09	8.53E-10	86b	2.96E-09	8.68E-09
31b	-	-	87b	2.16E-09	1.33E-09
32b	3.04E-09	8.20E-10	88b	2.0E-08	8.34E-09
33b	1.01E-09	5.36E-10	89b	1.87E-09	6.00E-07
34b	5.43E-09	6.00E-07	90b	2.12E-08	8.49E-09
35b	9.27E-09	5.42E-09	91b	9.98E-09	3.07E-09

Tabelle 1b

Beispiel	BxPC3 IC_{50} [M] CTG	NCI-H292 IC_{50} [M] CTG	Beispiel	BxPC3 IC_{50} [M] CTG	NCI-H292 IC_{50} [M] CTG
103b	6.00E-07	6.00E-07	124b	6.00E-07	6.00E-07

104b	5.88E-10	1.44E-10	125b	2.99E-08	3.58E-09
			126b	6.00E-07	6.00E-07
105b	5.03E-09	-	127b	3.31E-08	1.94E-09
106b	2.43E-09	6.00E-07	128b	7.83E-09	1.02E-09
107b	4.19E-09	4.52E-09	129b	6.00E-07	6.00E-07
108b	2.38E-09	1.32E-09	142b	1.41E-09	6.92E-10
109b	9.26E-08	1.61E-07	143b	1.04E-07	4.33E-09
110b	1.32E-09	9.99E-10	144b	1.17E-08	8.29E-08
111b	1.92E-08	9.22E-08	145b	2.64E-09	3.24E-10
112b	6.00E-07	6.00E-07	146b	4.85E-08	1.05E-08
113b	2.48E-08	7.36E-08	147b	1.17E-09	2.26E-09
114b	1.61E-08	1.17E-08	148b	1.06E-09	2.05E-10
115b	2.43E-07	6.00E-07	149b	9.52E-10	3.74E-10
116b	1.01E-08	6.00E-07	150b	9.25E-09	6.00E-07
117b	6.00E-07	6.00E-07	151b	6.00E-07	6.00E-07
118b	6.00E-07	6.00E-07	152b	6.00E-07	6.00E-07
119b	8.90E-09	9.14E-10	153b	1.44E-09	1.17E-08
120b	3.78E-08	5.70E-09	154b	5.05E-09	5.77E-10
121b	6.00E-07	6.00E-07	155b	9.44E-10	5.09E-10
122b	6.00E-07	1.03E-08	156b	1.39E-09	6.00E-07
123b	6.90E-09	1.44E-09			

Tabelle 1c

Beispiel	**BxPC3 IC_{50} [M] CTG**	**NCI-H292 IC_{50} [M] CTG**	**Beispiel**	**BxPC3 IC_{50} [M] CTG**	**NCI-H292 IC_{50} [M] CTG**
163b	3.80E-09	1.21E-08	211b	5.94E-09	3.75E-09
164b	8.54E-09	4.10E-09	212b	3.65E-08	3.31E-08
165b	9.14E-10	8.95E-10	213b	6.02E-09	2.16E-09
166b	3.72E-09	9.27E-08	214b	3.86E-09	3.82E-09
167b	6.00E-07	3.40E-09	215b	1.14E-09	5.94E-09
168b	9.12E-10	5.78E-09	216b	7.15E-10	5.28E-10
169b	2.04E-09	3.19E-09	217b	5.60E-09	1.33E-08
170b	1.71E-09	1.29E-09	218b	9.73E-10	1.53E-09
171b	6.00E-07	4.25E-09	234b	8.17E-09	1.82E-09

172b	2.28E-09	5.46E-09	235b	1.31E-07	5.91E-08
173b	1.39E-09	1.07E-09	236b	1.93E-07	2.38E-07
174b	5.27E-09	6.00E-07	237b	1.05E-09	3.74E-10
175b	9.58E-09	6.00E-07	238b	6.00E-07	6.03E-08
176b	3.84E-09	6.00E-07	239b	2.52E-08	7.04E-09
177b	2.00E-08	5.11E-08	240b	1.13E-08	8.69E-09
178b	1.78E-08	3.78E-08	241b	1.10E-08	1.15E-09
179b	2.29E-08	6.00E-07	242b	8.54E-09	1.21E-09
180b	4.39E-09	2.34E-09	243b	9.99E-09	1.18E-09
192b	6.29E-09	6.00E-07	244b	4.63E-08	3.28E-08
193b	1.85E-09	8.98E-09	245b	1.05E-08	1.30E-09
194b	3.96E-09	2.92E-09	247b	6.19E-10	3.63E-10
195b	4.07E-09	2.95E-09	248b	1.53E-08	1.28E-09
196b	5.73E-09	1.58E-09	254b	3.46E-09	3.37E-10
204b	6.42E-09	1.25E-09			
205b	1.45E-09	5.17E-08			
206b	3.89E-09	3.01E-08			
207b	1.36E-09	3.33E-10			
208b	2.55E-09	6.98E-10			
209b	7.07E-10	1.42E-09			
210b	8.53E-10	1.89E-08			

Die angegebenen Wirkdaten beziehen sich auf die im vorliegenden experimentellen Teil beschriebenen Ausführungsbeispiele mit den angegebenen Drug/mAB-Ratios. Die Werte können bei anderen Drug/mAB-Ratios gegebenenfalls abweichen. Bei den IC50-Werten handelt es sich um Mittelwerte aus mehreren unabhängigen Exprimenten oder um Einfachwerte. Die Wirkung der TWEAKR- Antikörper-Wirkstoffkonjugate war selektiv versus der jeweiligen Isotypkontrolle, die den jeweils entsprechenden Linker und Toxophor enthielt.

In der folgenden Tabelle 2 sind die IC50-Werte repräsentativer Ausführungsbeispiele mit dem Cetuximab-Antikörper aus dem MTT-Assay aufgeführt:

Tabelle 2

Beispiel	NCI-H292 IC_{50} [M]	Beispiel	NCI-H292 IC_{50} [M]	Beispiel	NCI-H292 IC_{50} [M]

	MTT		MTT		MTT
1a	5.94E-10	113a	1,97E-10	193h	2.52E-10
2a	3.02E-10	114a	1.61E-10	194a	6.17E-11
3a	9.40E-11	115a	2.39E-10	195a	8.27E-10
4a	6.88E-09	116a	8.99E-11	196a	3.67E-09
5a	7.00E-09	117a	1.09E-10	197	7.35E-09
6a	1.09E-09	118a	8.33E-09	198	1.95E-08
7a	2.35E-10	119a	8.39E-10	199	3.23E-07
8a	2.30E-10	120a	1.94E-10	199-2	
9a	1.93E-10	121a	8.78E-11	200	1,40E-07
10a	4.70E-09	122a	2.01E-10	201	>5.00E-07
11a	4.50E-09	123a	1,00E-10	202	4.22E-07
12a	8.00E-10	124a	5.75E-11	203	>5.00E-07
13a	2.00E-09	125a	9.11E-11	204a	3.60E-09
14a	1.01E-09	126a	8.38E-09	205a	6.64E-10
15a	8.98E-10	127a	5.97E-10	206a	1.37E-09
16a	5.49E-10	128a	4.87E-10	207a	1.05E-10
17a	1.79E-11	129a	1.70E-09	207h	2.39E-09
18a	8.77E-10	130	1.78E-07	207i	6.87E-10
19a	1.80E-09	131	5.00E-07	208a	1.16E-08
20a	5.07E-10	132	5.00E-07	208i	8.22E-09
21a	5.05E-10	133	1.55E-07	209a	2.02E-11
22a	6.12E-11	134	5.00E-07	209h	1.35E-09
23a	5.95E-10	135	5.00E-07	209i	1.37E-09
24a	4.68E-09	136	5.00E-07	210a	1.30E-11
25a	7.52E-09	137	5.00E-07	211a	4.71E-10
26a	7.32E-09	138	5.00E-07	212a	4.43E-10
27a	1.76E-08	139	1.34E-07	213a	1.95E-11
28a	2.85E-09	140	5.00E-07	214a	6.83E-10
29a	4.25E-09	141	1.61E-08	215a	5.20E-10
30a	7.93E-09	142a	4.95E-11	215h	5.18E-10
31a	6.12E-10	142h	6.50E-10	215i	1.58E-08
32a	7.28E-10	142i	3.62E-09	216a	1.12E-10
33a	6.00E-10	143a	1.21E-10	217a	1.27E-09
34a	5.00E-09	145a	2.55E-09	218a	3.44E-10

35a	5.15E-09	146a	6.44E-11	218h	9.42E-10
36a	1.65E-10	147a	4.30E-09	218i	1.37E-08
37a	1.31E-10	148a	3.71E-09	219	3.48E-09
38a	1.70E-09	149a	8.31E-10	220	1.97E-10
39a	3.36E-10	150a	1.65E-09	221	1.00E-10
40a	2.45E-09	153a	2.40E-12	222	3.30E-09
41a	1.76E-08	154a	8.57E-11	223	7.70E-12
42a	3.97E-09	155a	7.34E-11	224	3.37E-12
43a	5.14E-10	156a	3.74E-11	225	1.51E-09
44a	4.31E-08	157	5.00E-07	226	2.22E-07
45a	5.45E-10	158	2.22E-08	227	1.82E-09
46a	3.81E-10	159	1.14E-07	228	5.36E-09
47a	2.69E-10	160	5.00E-07	229	5.00E-07
48a	3.49E-11	161	3.55E-08	230	1.21E-11
49a	1.27E-08	162	1.21E-07	231	9.18E-10
50a	4.00E-09	163a	7.24E-10	232	1.55E-08
51a	1.47E-09	163h	6.03E-10	233	9.63E-10
52a	4.19E-09	164a	1.29E-10	234a	2.10E-09
53a	9.88E-9	165a	3.26E-11	234h	7.28E-09
54a	6.30E-09	166a	1.08E-10	234i	6.97E-09
55a	1.98E-09	167a	4.99E-10	235a	4.6E-08
56a	2.11E-09	168a	1.23E-10	235h	3.04E-10
82a	4.37E-09	168h	1.57E-10	235i	1.45E-08
83a	1.07E-09	169a	1.86E-10	236a	5.98E-09
84a	9.43E-10	170a	7.39E-10	237a	1.51E-09
85a	3.40E-10	171a	5.05E-10	237i	5.94E-09
86a	1.05E-08	172a	3.57E-12	238a	3.49E-10
87a	4.34E-09	173a	3.16E-11	239a	7.78E-11
88a	1.32E-09	174a	5.41E-10	239h	1.65E-09
89a	3.78E-09	175a	4.72E-10	239i	6.48E-09
90a	2.35E-09	176a	2.19E-10	240a	3.66E-11
91a	1.45E-10	177a	1.87E-11	241a	5.91E-11
96	2.09E-09	178a	1.99E-10	241i	5.80E-10
98	1.65E-09	179a	1.51E-09	242a	8.26E-11
99	8.51E-10	180a	2.32E-10	243a	3.37E-10

102	3.29E-08	181	7.72E-09	243i	3.22E-09
103a	1.52E-09	182	1.20E-09	244a	3.70E-10
104a	1.85E-10	183	3.29E-08	244i	4.50E-09
104h	4.60E-10	184	2.78E-08	245a	5.30E-11
104i	1.47E-09	185	1.20E-08	245i	2.50E-08
105a	2.52E-07	186	9.29E-09	246	9.38E-09
106a	7.89E-11	187	1.98E-09	247a	<1.00E-10
107a	4.02E-11	188	9.28E-10	247i	1.53E-10
108a	1.04E-11	189	8.76E-09	248a	
109a	2.63E-10	190	5.42E-09	249	2.66E-08
110a	6.27E-12	191	9.36E-10	252	
111a	2.00E-09	192a	5,18E-10	254a	
112a	1.80E-10	193a	3.10E-10	254i	

Die angegebenen Wirkdaten beziehen sich auf die im vorliegenden experimentellen Teil beschriebenen Ausführungsbeispiele mit den angegebenen Drug/mAB-Ratios. Die Werte können bei anderen Drug/mAB-Ratios gegebenenfalls abweichen. Bei den IC50-Werten handelt es sich um Mittelwerte aus mehreren unabhängigen Exprimenten oder um Einfachwerte. Die Wirkung der Cetuximab-Antikörper-Wirkstoffkonjugate war selektiv versus der jeweiligen Isotypkontrolle, die den jeweils entsprechenden Linker und Toxophor enthielt.

In der nachstehenden Tabelle 3 sind die IC50-Werte repräsentativer Ausführungsbeispiele mit dem Trastuzumab-Antikörper aus dem MTT-Assay aufgeführt:

Tabelle 3

Beispiel	**KPL4 IC_{50} [M] MTT**	**Beispiel**	**KPL4 IC_{50} [M] MTT**
2e	2.00E-10	156e	5.00E-07
8e	1.49E-10	164e	5,85E-10
14e	5.00E-09	165e	7.44E-11
15e	1.45E-08	166e	5.00E-07
16e	3.41E-10	167e	1.00E-09
22e	4.99E-09	168e	3.50E-10

35e	2.00E-09	169e	6,27E-08
36e	2.89E-09	170e	3.59E-10
37e	1.99E-09	172e	3.08E-11
38e	1.87E-10	173e	8.07E-10
39e	3.40E-10	175e	5.00E-07
40e	9.84E-09	176e	2,55E-08
41e	7.99E-09	179e	1.21E-07
42e	3.10E-10	180e	4.13E-10
43e	5.33E-10	192e	5.00E-07
44e	4.49E-08	193e	1.23E-09
45e	4.78E-10	194e	1.55E-08
46e	2.91E-10	195e	7.27E-10
47e	3.89E-10	196e	5.49E-10
48e	5.64E-10	204e	1.66E-10
49e	3.02E-10	205e	3.24E-10
51e	1.00E-06	206e	1.13E-08
52e	4.76E-10	207e	1.55E-10
53e	5.0E-07	210e	5.00E-07
54e	1.50E-09	211e	1.06E-07
82e	9.53E-08	212e	5.03E-09
83e	5.81E-09	213e	5.00E-07
103e	4.16E-07	214e	8.48E-09
104e	2.09E-10	215e	1.89E-10
106e	5.00E-05	216e	9.64E-11
110e	5.00E-05	217e	1.47E-10
118e	5.0E-07	218e	1.67E-09
126e	5.0E-07	235e	8.0E-08
127e	1.22E-09	236e	8.40E-08
129e	5.0E-07	238e	2.30E-08
142e	1.53E-07	240e	1.90E-11
143e	5.0E-07	241e	1.90E-10
145e	1.00E-09	242e	6.288E-11
146e	5.0E-07	243e	2.92E-10
147e	3.38E-09	244e	8.30E-09
148e	5,89E-10	245e	4.48E-10

149e	3.02E-10	247e	1.43E-10
150e	2.71E-08	254e	1.09E-10

Die angegebenen Wirkdaten beziehen sich auf die im vorliegenden experimentellen Teil beschriebenen Ausführungsbeispiele mit den angegebenen Drug/mAB-Ratios. Die Werte können bei anderen Drug/mAB-Ratios gegebenenfalls abweichen. Bei den IC50-Werten handelt es sich um Mittelwerte aus mehreren unabhängigen Exprimenten oder um Einfachwerte. Die Wirkung der Trastuzumab-Antikörper-Wirkstoffkonjugate war selektiv versus der jeweiligen Isotypkontrolle, die den jeweils entsprechenden Linker und Toxophor enthielt.

C-1b Bestimmung der Inhibition des Kinesinspindelproteins KSP/ Eg5 durch ausgewählte Beispiele

Die Motordomäne des humanen Kinesinspindelproteins KSP /Eg5 (Fa. tebu-bio/ Cytoskeleton Inc, No. 027EG01-XL) wird in einer Konzentration von 10nM mit 50 µg/ml Taxol (Fa. Sigma No. T7191-5MG) stabilisierten Microtubuli (bovine or porcine, Fa. tebu-bio/ Cytoskeleton Inc) für 5 min bei RT in 15mM PIPES, pH 6,8 (5mM $MgCl_2$ und 10mM DTT, Fa. Sigma) inkubiert. Die frisch hergestellte Mischung wird auf eine 384 MTP aliquotiert. Es folgt die Zugabeder zu untersuchenden Inhibitoren in Konzentration von 1.0 x10-6M bis 1.0x 10-13 M und ATP (finale Konzentration 500µM, Fa. Sigma). Die Inkubation erfolgt über 2h bei RT. Die ATPase-Aktivität wird durch den Nachweis des entstehenden anorganischen Phosphats mit Malachit-Grün detektiert (Fa. Biomol). Nach der Zugabe des Reagenz erfolgt eine 50 minütige Inkubation bei RT, bevor die Detektion der Absorption bei einer Wellenlänge von 620nM erfolgt. Als Positivkontrolle werden Monastrol und Ispinesib (Fa. Adooq A10486) verwendet. Die Einzeldaten der Dosis-Wirkungskurve stellen achtfach Bestimmungen dar. Bei den IC50-Werten handelt es sich um Mittelwerte aus drei unabhängigen Exprimenten. Als 100% Kontrolle dient die nicht mit Inhibitoren behandelte Probe.

In der folgenden Tabelle 4 sind die IC50-Werte repräsentativer Ausführungsbeispiele aus dem beschriebenen Assay zusammengefasst: Sie belegen beispielhaft die hohe Potenz der beschriebenen Toxophore und ADC-Metabolite am Target.

Tabelle 4

Beispiele	**KSP-Assay IC_{50} [M]**	**Beispiele**	**KSP-Assay IC_{50} [M]**
59	4.27E-09	157	9.61E-09
60	n.a	158	6.20E-10
61	6.78E-09	159	3.11E-10
61	1.16E-09	160	6.81E-10

62	n.d.	161	5.17E-09
63	2.88E-09	162	2.58E-09
64	3.06E-09	181	7.90E-09
65	2.03E-09	182	1.04E-08
66	8.08E-09	183	6.21E-09
67	8.07E-09	184	1.43E-08
68	3.22E-09	185	1.80E-08
69	4.82E-09	186	2.53E-08
70	3.18E-09	187	1.41E-08
71	1.22E-09	188	1.01E-08
72	4.85E-09	189	1.12E-08
73	4.52E-09	190	9.61E-09
74	6.13E-09	191	1.26E-08
75	n.d	197	4.17E-09
76	2.33E-09	198	1.07E-08
77	n.d	199	6.00E-09
78	4.95E-09	199-2	9.09E-10
79	2.11E-09	200	1.08E-10
80	3.72E-09	201	1.79E-10
81	1.42E-09	202	2.56E-10
93	2.52E-09	203	2.30E-10
94	5.14E-09	219	1.13E-09
95	3.05E-09	220	1.45E-09
96	7.80E-09	221	1.12E-10
97	2.13E-09	222	1.58E-09
98	1.80E-09	223	2.89E-10
99	n.d.	224	1.96E-10
100	5.99E-09	225	4.25E-10
101	4.28E-09	226	1.49E-09
102	4.70E-09	227	1.78E-09
130	1.66E-09	228	3.07E-09
131	1.24E-09	229	4.44E-09
132	1.65E-09	230	3.41E-09
133	4.13E-09	231	1.67E-09
134	4.35E-09	232	2.20E-09

135	2.04E-09	233	3.88E-09
136	3.28E-10	246	2.69E-09
137	7.78E-10	249	9.15E-10
138	1.01E-9	250	3.26E-09
139	1.82E-09	251	2,71E-10
140	2.51E-09	252	4.57E-10
141	9.02E-10	256	1.64E-08

Die angegebenen Wirkdaten beziehen sich auf die im vorliegenden experimentellen Teil beschriebenen Ausführungsbeispiele.

C-2 Internalisierungsassay

Internalisierung ist der Schüsselprozess, um eine spezifische und effiziente Bereitstellung der zytotoxischen Payload in Antigen-exprimierenden Krebszellen durch Antikörper-Drug-Konjugate (ADC) zu ermöglichen. Dieser Prozess wird über Fluoreszenzmarkierung von spezifischen TWEAKR-Antikörpern und einen Isotyp-Kontrollantikörper (M014) verfolgt. Hierzu wird zunächst die Konjugation des Fluoreszenzfarbstoffes an Lysine des Antikörpers durchgeführt. Die Konjugation erfolgt mit zweifach molarem Überschuss von CypHer 5E mono NHS ester (Batch 357392, GE Healthcare) bei pH 8, 3. Nach erfolgter Kupplung wird die Reaktionsmischung über Nacht bei 4°C dialysiert (sSlide-A-Lyser Dialysis Cassettes MWCD 10kD, Fa. Pierce), um überschüssigen Farbstoff zu eliminieren sowie den pH-Wert zu adjustieren, bevor die Ankonzentrierung der Proteinlösung erfolgt (VIVASPIN 500, Fa Sartorius stedim biotec). Die Bestimmung der dye load des Antikörpers erfolgt mittels spektrophotometrischer Analyse (Fa. NanoDrop) und anschließender Berechnung (D: $P = A_{dye}\ \varepsilon_{protein}:(A_{280}-0{,}16A_{dye})\varepsilon_{dye}$). Die dye load des hier untersuchten TWEAKR-Antikörpers sowie der Isotyp-Kontrolle lagen in vergleichbarer Größenordnung. In Zellbindungs-Assays wird getestet, dass die Konjugation zu keiner Affinitätsänderung des Antikörpers führt.

Die markierten Antikörper werden im Internalisierungs-Assays eingesetzt. Vor dem Behandlungsstart werden Zellen ($2x10^4$/well) in 100µl Medium in einer 96-MTP ausgesät (fat, black, clear bottom No 4308776, Fa. Applied Biosystems). Nach 18h Inkubation bei 37°C/5%CO_2 wird das Medium gewechselt und markierte anti-TWEAKR-Antikörper in variierender Konzentration hinzugefügt (10, 5, 2.5, 1, 0.1µg/mL). Das gleiche Behandlungsschema erfolgt mit der markierten Isotyp-Kontrolle (negative control). Die gewählten Inkubationszeiten sind 0, 0,25h, 0,5h, 1h, 1,5h 2h, 3h, 6h and 24h. Die Fluoreszenz- Messung wird mit Hilfe des InCellAnalyzer 1000 (Fa. GE Healthcare)

durchgeführt. Es erfolgt eine kinetische Evaluierung über die Messung der Parameter granule counts/cell und totale granule intensity/cell.

TWEAKR-Antikörper wurden nach Bindung an den TWEAKR auf ihre Internalisierungsfähigkeit hin untersucht. Hierzu wurden Zellen mit verschiedenen Expressionsleveln des TWEAKR gewählt. Es konnte Target-vermittelte spezifische Internalisierung mit den TWEAKR-Antikörpern beobachtet werden, wohingegen die Isotyp-Kontrolle keine Internalisierung zeigte.

C-3 In vitro Tests zur Bestimmung der Zell-Permeabilität

Die Zell-Permeabilität einer Substanz kann mittels *in vitro*-Testung in einem Flux-Assay unter Verwendung von Caco-2-Zellen untersucht werden [M.D. Troutman und D.R. Thakker, *Pharm. Res.* 20 *(8)*, 1210-1224 (2003)]. Hierzu wurden die Zellen auf 24-Loch-Filterplatten für 15-16 Tage kultiviert. Zur Bestimmung der Permeation wurde die jeweilige Testsubstanz in einem HEPES-Puffer entweder apikal (A) oder basal (B) auf die Zellen gegeben und für 2 h inkubiert. Nach 0 h und nach 2 h wurden Proben aus den Cis- und Transkompartimenten entnommen. Die Proben wurden mittels HPLC (Agilent 1200, Böblingen, Deutschland) unter Verwendung von reverse phase-Säulen aufgetrennt. Das HPLC-System war über ein Turbo Ion Spray-Interface an ein Triple Quadropol-Massenspektrometer API 4000 (AB SCIEX Deutschland GmbH, Darmstadt, Deutschland) gekoppelt. Die Permeabilität wurde anhand eines P_{app}-Wertes bewertet, welcher mittels der von Schwab *et al.* publizierten Formel berechnet wurde [D. Schwab *et al.*, *J. Med. Chem.* 46, 1716-1725 (2003)]. Eine Substanz wurde als aktiv transportiert klassifiziert, wenn das Verhältnis von P_{app} (B-A) zu P_{app} (A-B) (efflux ratio) >2 oder <0.5 war.

Von entscheidender Bedeutung für Toxophore, die intrazellulär freigesetzt werden, sind die Permeabilität von B nach A [P_{app} (B-A)] und das Verhältnis von P_{app} (B-A) zu P_{app} (A-B) (efflux ratio): Je niedriger diese Permeabilität ist, desto langsamer sind die aktiven und passiven Transportvorgänge der Substanz durch die Monoschicht von Caco-2-Zellen. Gibt das efflux ratio zudem keine Hinweise auf aktiven Transport, kann die Substanz nach intrazellulärer Freisetzung länger in der Zelle verweilen. Damit steigt auch die Zeit, die für eine Interaktion mit dem biochemischen Target (hier: Kinesin-Spindelprotein, KSP / Eg5) zur Verfügung steht.

In der folgenden Tabelle 5 sind Permeabilitätsdaten repräsentativer Ausführungsbeispiele aus diesem Assay aufgeführt:

Tabelle 5a

Ausführungsbeispiel	**P_{app} (B-A) [nm/s]**	**Efflux ratio**

Ausführungsbeispiel	P_{app} (B-A) [nm/s]	Efflux ratio
59	22	4.8
61	44	7.4
62	50	6
63	0.98	1.1
64	10	2.8
65	1.2	2.3
66	27	12
67	25	15
68	1.8	1.9
69	1.5	2
70	1.6	1.9
71	280	280
72	2.5	2.1
73	4.6	2.7
74	26	15
76	55	27
77	480	47
78	140	44
79	58	16
80	200	22
92	4	3
96	285	16
97	5.6	2
98	213	16
99	303	8.7
130	10	6.7
131	9	10
132	1.6	1
133	4.3	6
134	2.9	0.5
135	7.8	4
136	9.1	8.5
137	17	19

Ausführungsbeispiel	P_{app} (B-A) [nm/s]	Efflux ratio
138	1.7	1.6
139	21	7.7
140	1.7	1
141	30	35
157	7.7	7.2
158	5.6	2.2
159	7	6.1
160	1.6	1
161	1.6	2
162	2	2.9
197	93	81
198	519	34
199	4.8	6.4
226	3	0.2
232	49	14
246	1.4	1.3
251	21	19
252	20	26

C-4 In vitro Tests zur Bestimmung der Substrateigenschaften für P-Glycoprotein (P-gp)

Viele Tumorzellen exprimieren Transporterproteine für Wirkstoffe, was häufig mit einer Resistenzentwicklung gegenüber Cytostatika einhergeht. Substanzen, die keine Substrate von solchen Transporterproteinen wie beispielsweise P-Glycoprotein (P-gp) oder BCRP sind, könnten somit ein verbessertes Wirkprofil aufzeigen.

Die Substrateigenschaften einer Substanz für P-gp (ABCB1) wurden mittels eines Flux-Assays unter Verwendung von LLC-PK1-Zellen, die P-gp überexprimieren (L-MDR1-Zellen), bestimmt [A.H. Schinkel *et al.*, *J. Clin. Invest.* 96, 1698-1705 (1995)]. Hierzu wurden die LLC-PK1- oder L-MDR1-Zellen auf 96-Loch-Filterplatten für 3-4 Tage kultiviert. Zur Bestimmung der Permeation wurde die jeweilige Testsubstanz allein oder in Gegenwart eines Inhibitors (wie z.B. Ivermectin oder Verapamil) in einem HEPES-Puffer entweder apikal (A) oder basal (B) auf die Zellen gegeben und für 2 h inkubiert. Nach 0 h und nach 2 h wurden Proben aus den Cis- und Transkompartimenten entnommen. Die Proben wurden mittels HPLC unter Verwendung von reverse phase-Säulen aufgetrennt. Das HPLC-System war

über ein Turbo Ion Spray-Interface an ein Triple Quadropol-Massenspektrometer API 3000 (Applied Biosystems Applera, Darmstadt, Deutschland) gekoppelt. Die Permeabilität wurde anhand eines P_{app}-Wertes bewertet, welcher mittels der von Schwab *et al.* publizierten Formel berechnet wurde [D. Schwab *et al.*, *J. Med. Chem.* 46, 1716-1725 (2003)]. Eine Substanz wurde als P-gp-Substrat klassifiziert, wenn das Efflux-Verhältnis P_{app} (B-A) zu P_{app} (A-B) >2 war.

Als weitere Kriterien zur Bewertung der P-gp-Substrateigenschaften können die Efflux-Verhältnisse in L-MDR1- und LLC-PK1-Zellen oder das Efflux-Verhältnis in An- oder Abwesenheit eines Inhibitors miteinander verglichen werden. Wenn sich diese Werte um mehr als einen Faktor 2 unterscheiden, so handelt es sich bei der betreffenden Substanz um ein P-gp-Substrat.

C-5 Pharmakokinetik

C5a: Identifizierung der ADC-Metabolite nach Internalisierung in vitro

Methodenbeschreibung:

Internalisierungsuntersuchungen mit Immunkonjugaten werden durchgeführt, um intrazellulär entstandene Metaboliten zu analysieren. Hierzu werden humane Lungentumorzellen NCI H292 ($3x10^5$/well) in 6-well Platten ausgesät und über Nacht inkubiert (37 °C, 5% CO_2). Es erfolgt eine Behandlung mit 10µg/mL des zu untersuchenden ADCs. Die Internalisierung wird bei 37°C und 5% CO_2 durchgeführt. Zu verschiedenen Zeitpunkten (0, 4, 24, 48, 72 h) werden Zellproben zur weiteren Analyse genommen. Zunächst werden die Überstände (ca. 5 mL) geerntet und nach erfolgter Zentrifugation (2 min, RT, 1000 rpm Heraeus Variofuge 3.0R) bei -80°C gelagert. Die Zellen werden mit PBS gewaschen, mit Accutase abgelöst und die Zellzahl bestimmt. Nach erneutem Waschen wird eine definierte Zellzahl ($2x10^5$) mit 100 µL Lysis Puffer (Mammalian Cell Lysis Kit (Sigma MCL1) versetzt und unter ständigem Schütteln (Thermomixer, 15 min, 4 °C, 650 rpm) in Protein LoBind tubes (eppendorf Cat.No. 0030 108.116) inkubiert. Nach der Inkubation wird das Lysat zentrifugiert (10 min, 4 °C, 12000 g, eppendorf 5415R) und der Überstand geerntet. Der gewonnene Überstand wird bei –80 °C gelagert. Alle Proben werden anschließend wie folgt analysiert.

Die Messung der Verbindungen im Kulturüberstand bzw. Zellysat erfolgt nach Fällung der Proteine mit Methanol oder Acetonitril durch eine Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC) gekoppelt an ein Triple-Quadrupol-Massenspektrometer (MS).

Zur Aufarbeitung von 50 µL Kulturüberstand/Zelllysat werden diese mit 150 µL Fällungsreagenz (in der Regel Acetonitril) versetzt und für 10 Sekunden geschüttelt. Das Fällungsreagenz enthält einen internen Standard (ISTD) in geeigneter Konzentration (in der Regel im Bereich 20-100 ng/mL). Nach dem

3minütigen Zentrifugieren bei 16000 g wird der Überstand in ein Autosampler-Vial überführt, mit 500 µL eines auf das Laufmittel abgestimmten Puffers aufgefüllt und erneut geschüttelt.

Die Messung beider Matrixproben erfolgt schließlich an dem mit einer HPLC gekoppelten Triple-Quadrupol-Massenspektrometer API6500 der Firma AB SCIEX Deutschland GmbH.

Zur Kalibrierung werden Plasmaproben mit Konzentrationen von 0.5–2000 µg/L versetzt. Die Nachweisgrenze (LOQ) liegt bei ca. 2 µg/L. Der lineare Bereich erstreckt sich von 2 bis 1000 µg/L.

Zur Kalibrierung der Tumorproben wird der Überstand unbehandelter Tumore mit Konzentrationen von 0.5–200 µg/L versetzt. Die Nachweisgrenze liegt bei 4 µg/L. Der lineare Bereich erstreckt sich von 4 bis 200 µg/L.

Qualitätskontrollen zur Gültigkeitsprüfung enthalten 5 und 50 µg/L.

NCI-H292-Zellen wurden mit je 10 µg/mL der ADCs aus den Beispielen 104b, 119b, 155b, 165b und 173b inkubiert. Nach 72 h wurden die Zellen mit PBS gewaschen, lysiert und tiefgefroren (-80 °C). Nach der oben beschriebenen Methode wurden die Zelllysate und Zellkultur-Überstände aufgearbeitet und nach Extraktion folgende Metabolite identifiziert und quantifiziert:

Inkubiertes ADC Beispiel	Isolierter Metabolit	Metabolit Konzentration im Zelllysat [µg/L]	Metabolit Konzentration im Überstand [µg/L]
104b	199	11.6	< 1
104b	198	< 2	< 2
104b	135	< 0.2	< 0.2
104b	197	< 1	< 1
104b	256	<0.2	<0.2
119b	158	14	< 0.2
155b	162	10	< 0.2
165b	162	8.8	< 0.2
173b	161	18	< 0.2

NCI-H292-Zellen wurden mit je 10 µg/mL der ADCs aus den Beispielen 179a, 226a, 85b und 208b inkubiert. Nach 72 h wurden die Zellen mit PBS gewaschen, lysiert und tiefgefroren (-80 °C). Nach der

oben beschriebenen Methode wurden die Zelllysate und Zellkultur-Überstände aufgearbeitet und nach Extraktion folgende Metabolite identifiziert und quantifiziert:

Inkubiertes ADC Beispiel	Isolierter Metabolit	Metabolit Konzentration im Zelllysat [µg/L]	Metabolit Konzentration im Überstand [µg/L]
179a	249	< 1	5.6
226a	226	<1	9.1
226a	255	<1	2.5
85b	139	1.5	3.2
85b	250	7.4	1.8
208b	199	13.5	2.3
208b	198	<1	<1

C5b: Identifizierung der ADC-Metabolite in vivo

Nach i.v. Applikation von 3-30 mg/kg verschiedener ADCs können die Plasma- und Tumorkonzentrationen des ADCs sowie potentiell auftretender Metaboliten gemessen und die pharmakokinetischen Parameter wie Clearance (CL), Fläche unter der Kurve (AUC) und Halbwertszeit ($t_{1/2}$) berechnet werden.

Analytik zur Quantifizierung der potentiell auftretenden Metabolite

Die Messung der Verbindungen in Plasma und Tumor erfolgt nach Fällung der Proteine mit Methanol oder Acetonitril durch eine Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC) gekoppelt an ein Triple-Quadrupol-Massenspektrometer (MS).

Zur Aufarbeitung von 50 µL Plasma werden diese mit 250 µL Fällungsreagenz (in der Regel Acetonitril) versetzt und für 10 Sekunden geschüttelt. Das Fällungsreagenz enthält einen internen Standard (ISTD) in geeigneter Konzentration (in der Regel im Bereich 20-100 ng/mL). Nach dem 3minütigen Zentrifugieren bei 16000 g wird der Überstand in ein Autosampler-Vial überführt, mit 500 µL eines auf das Laufmittel abgestimmten Puffers aufgefüllt und erneut geschüttelt.

Bei der Aufarbeitung eines Tumors wird dieser mit der 3fachen Menge an Extraktionspuffer versetzt. Der Extraktionspuffer enthält 50 mL Tissue Protein Extraction Reagent (Pierce, Rockford, IL), zwei Pellets Complete-Protease-Inhibitor-Cocktail (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) und Phenylmethylsulfonylfluorid (Sigma, St. Louis, MO) in einer finaler Konzentration von 1 mM. Im

Tissuelyser II (Qiagen) wird die Probe zweimal 20 Minuten bei maximaler Schlagzahl homogenisiert. 50 µL des Homogenats wird in ein Autosampler-Vial überführt und mit 150 µL Methanol inklusive ISTD aufgefüllt. Nach 3minütigem Zentrifugieren bei 16000 g werden 10 µL des Überstands mit 180 µl eines auf das Laufmittel abgestimmten Puffers aufgefüllt und erneut geschüttelt. Danach ist die Tumorprobe messfertig.

Die Messung beider Matrixproben erfolgt schließlich an dem mit einer HPLC gekoppelten Triple-Quadrupol-Massenspektrometer API6500 der Firma AB SCIEX Deutschland GmbH.

Zur Kalibrierung werden Plasmaproben mit Konzentrationen von 0.5 – 2000 µg/L versetzt. Die Nachweisgrenze (LOQ) liegt bei ca. 2 µg/L. Der lineare Bereich erstreckt sich von 2 bis 1000 µg/L.

Zur Kalibrierung der Tumorproben wird der Überstand unbehandelter Tumore mit Konzentrationen von 0.5 – 200 µg/L versetzt. Die Nachweisgrenze liegt bei 5 µg/L. Der lineare Bereich erstreckt sich von 5 bis 200 µg/L.

Qualitätskontrollen zur Gültigkeitsprüfung enthalten 5 und 50 µg/L, in Plasma zusätzlich 500 µg/L.

Nach Applikation von 10mg/kg von den ADCs aus den Beispielen 119b und 104b in die Kontrollgruppen aus den Xenograftmodellen mit NCI-H292 wurden nach 24h die Mäuse abgetötet, Blut entnommen und die Tumore isoliert. Nach der oben beschriebenen Methode wurden die Plasma- und Tumorproben aufgearbeitet und nach Extraktion folgende Metabolite identifiziert und quantifiziert:

Appliziertes ADC (Beispiel-Nummer)	Isolierter Metabolit (Beispiel-Nummer)	Metabolit Konzentration im Tumor [µg/L]	Metabolit Konzentration im Plasma [µg/L]
119b	158	155	< 5
104b	199	147	< 5
104b	198	27.4	< 5
104b	135	5.23	< 5
104b	197	7.75	< 5

Analytik zur Quantifizierung der verwendeten Antikörper

Der Antikörperteil der ADCs wurde mittels Liganden-Bindungs-Assay (ELISA) als Gesamt-IgG-Konzentration in Plasmaproben und Tumorlysaten bestimmt. Dabei wurde das Sandwich-ELISA-Format verwendet. Dieser ELISA war qualifiziert und validiert für die Bestimmung in Plasma- und Tumorproben. Die ELISA-Platten wurden mit anti-human-IgG-Fc-Antikörpern der Ziege beschichtet. Nach Inkubation mit der Probe wurden die Platten gewaschen und mit einem Detektor-Konjugat aus anti-human-IgG(H+L)-Antikörper des Affen und Meerrettichperoxidase (HRP) inkubiert. Nach einem weiteren Waschschritt wurde das HRP-Substrat OPD hinzugegeben und die Farbentwicklung über die Absorption bei 490 nm verfolgt. Standardproben mit bekannter IgG-Konzentration wurden mittels 4-Parameter-Gleichung gefittet. Innerhalb der unteren (LLOQ) und oberen (ULOQ) Quantifizierungsgrenzen wurden die unbekannten Konzentrationen über Interpolation ermittelt.

C-6 Wirksamkeitstest in vivo

Die Wirksamkeit der erfindungsgemäßen Konjugate wurde in vivo beispielsweise mittels Xenograft-Modellen getestet. Der Fachmann kennt Methoden im Stand der Technik, anhand derer die Wirksamkeit der erfindungsgemäßen Verbindungen getestet werden kann (siehe z.B. WO 2005/081711; Polson et al., Cancer Res. 2009 Mar 15;69(6):2358-64). Beispielsweise wurde hierzu Nagern (z.B. Mäusen) eine Tumorzelllinie, welche das Zielmolekül des Binders exprimiert, implantiert. Anschließend wurde den Implantat-Tieren entweder ein erfindungsgemäßes Konjugat, ein Isotyp-Antikörper-Kontrollkonjugate oder ein Kontrollantikörper oder isotonische Salzlösung appliziert. Die Applikation erfolgte einmalig oder öfter. Nach einer Inkubationszeit von mehreren Tagen wurde die Tumorgröße im Vergleich von Konjugat-behandelten Tieren und der Kontrollgruppe bestimmt. Die Konjugat-behandelten Tiere zeigten eine geringere Tumorgröße.

C-6a. Wachstumshemmung / Regression von experimentellen Tumoren in der Maus

Humane Tumorzellen, die das Antigen für das Antikörper-Wirkstoffkonjugat exprimieren, werden subkutan in die Flanke von immunsupprimierten Mäusen inokuliert, beispielsweise NMRi Nude- oder SCID-Mäuse. 1-10 Millionen Zellen werden aus der Zellkultur abgelöst, zentrifugiert und mit Medium oder Medium / Matrigel resuspendiert. Die Zellsuspension wird unter die Haut der Maus gespritzt.

Innerhalb von einigen Tagen wächst ein Tumor heran. Die Behandlung beginnt nach Etablierung des Tumors, ungefähr bei einer Tumorgröße von 40 mm². Um die Wirkung auf größere Tumoren zu untersuchen, kann die Behandlung auch erst bei einer Tumorgröße von 50-100 mm² begonnen werden.

Die Behandlung mit ADCs erfolgt über die intravenöse Route in die Schwanzvene der Maus. Das ADC wird mit einem Volumen von 5 mL / kg appliziert.

Das Behandlungsschema richtet sich nach der Pharmakokinetik des Antikörpers. Als Standard wird drei Mal in Folge jeden vierten Tag behandelt. Für eine zeitnahe Beurteilung kann sich auch ein Schema mit einer Einmalbehandlung eignen. Die Behandlung kann aber auch weiter fortgesetzt werden oder es kann sich zu einem späteren Zeitpunkt ein zweiter Zyklus mit drei Behandlungstagen anschließen.

Standardmäßig werden 8 Tiere pro Behandlungsgruppe eingesetzt. Neben den Gruppen, die die Wirksubstanzen bekommen, wird eine Gruppe als Kontrollgruppe nur mit dem Puffer nach dem gleichen Schema behandelt.

Im Verlauf des Experiments wird die Tumorfläche regelmäßig mit einer Schieblehre in zwei Dimensionen (Länge / Breite) gemessen. Die Tumorfläche wird mittels Länge x Breite bestimmt. Der Vergleich der mittleren Tumorfläche der Behandlungsgruppe mit der Kontrollgruppe wird als T/C area angegeben.

Werden alle Gruppen des Experimentes nach Behandlungsende gleichzeitig beendet, können die Tumore entnommen und gewogen werden. Der Vergleich der mittleren Tumorgewichte der Behandlungsgruppe mit der Kontrollgruppe wird als T/C weight angegeben.

C-6b. Wirksamkeit der anti-EGFR-Antikörper-Wirkstoffkonjugate im NCI-H292-Tumormodell bei Mehrfachbehandlung

1 Mio NCI-H292 Zellen werden subkutan in die Flanke von weiblichen NMRI-nude Mäusen (Janvier) inokuliert. Bei einer Tumorgröße von 35 mm² an Tag 7 beginnt die Behandlung intravenös mit einer Dosis von 3 bzw. 10 mg / kg (Tag 7, 11, 15). Im Anschluss an die Behandlung wird das Tumorwachstum bis Tag 105 verfolgt.

Die Behandlung mit den Antikörper-Wirkstoffkonjugaten gemäß den Beispielen 01a und 02a führt zu einer deutlichen Wachstumshemmung der Tumore im Vergleich zur Vehikel- und Isotyp-Kontrollgruppe. Zunächst dosisunabhängig kommt es zur Regression der meisten Tumore. Die Tabelle 6 gibt die T/C area Werte an ermittelt über die Tumorfläche am Tag 35. Eine Behandlung mit einem Kontrollkonjugat (Isotyp-Antikörper gegen irrelevantes Antigen) hat eine deutlich schwächere Tumorwachstumshemmende Wirkung. Die Behandlung mit dem unkonjugierten Antikörper führt ebenfalls zu einer Wachstumshemmung, die jedoch schwächer als beim Antikörper-Wirkstoffkonjugat ausfällt.

Tabelle 6:

Beispiel	**Dosis**	**T/C area**
01a	3 mg/kg	0,09
01a	10 mg/kg	0,11

Beispiel	Dosis	T/C area
Isotypkontrolle	10 mg/kg	0,87
02a	3 mg/kg	0,13
02a	10 mg/kg	0,13
Isotypkontrolle	10 mg/kg	1,01
Cetuximab	3 mg/kg	0,23

C-6c. Wirksamkeit der anti-EGFR-Antikörper-Wirkstoffkonjugate im NCI-H292-Tumormodell bei Einmalbehandlung

1 Mio NCI-H292 Zellen werden subkutan in die Flanke von weiblichen NMRI-nude Mäusen (Janvier) inokuliert. Bei einer Tumorgröße von ~37 mm² an Tag 9 wird einmalig intravenös mit einer Dosis von 3 mg/kg ADC bzw. 2,5 mg/kg Toxophor A (N-(3-Aminopropyl)-N-{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-2-hydroxyacetamid) bzw. Toxophor B (N-[(3R)-3-Amino-4-fluorbutyl]-N-{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-2-hydroxyacetamid) behandelt. Im Anschluss an die Behandlung wird das Tumorwachstum bis Tag 25 verfolgt.

Die Behandlung mit den Antikörper-Wirkstoffkonjugaten gemäß den Beispielen 35A und 02A führt zu einer deutlichen Wachstumshemmung der Tumore im Vergleich zur Kontrollgruppe. Bei der Behandlung mit 3 mg/kg kommt es zur Regression der meisten Tumore. Die Tabelle 7 gibt die T/C Werte ermittelt über die Tumorgewichte und Tumorfläche am Tag 25 an. Das Antikörper-Wirkstoffkonjugat 35A zeigt hier eine bessere Wirksamkeit als Cetuximab und als das Toxophor A oder das Toxophor B.

Tabelle 7:

Beispiel	Dosis	T/C weight	T/C area
35A	3 mg/kg	0,33	0,49
36A	3 mg/kg	0,77	0,84
52A	3 mg/kg	0,54	0,54
Isotypkontrolle zur 52A	3 mg/kg	0,55	0,79
02A	3 mg/kg	0,07	0,24
Toxophor A	2,5 mg/kg	0,82	0,87
Toxophor B	2,5 mg/kg	0,40	0,57
Cetuximab	3 mg/kg	0,47	0,54

C-6d. Wirksamkeit der anti-EGFR- und anti-TWEAKR Antikörper-Wirkstoffkonjugate im NCI-H292-Tumormodell bei Einmalbehandlung

1 Mio NCI-H292 Zellen werden subkutan in die Flanke von weiblichen NMRI-nude Mäusen (Janvier) inokuliert. Bei einer Tumorgröße von ~37 mm² an Tag 7 wird einmalig intravenös mit einer Dosis von 3 oder 10mg/kg Antikörper-Wirkstoffkonjugat behandelt. Im Anschluss an die Behandlung wird das Tumorwachstum bis Tag 24 verfolgt.

Die einmalige Behandlung mit dem anti-TWEAKR Antikörper-Wirkstoffkonjugat 02B führt zu einer deutlichen und lang anhaltenden Wachstumshemmung der Tumore im Vergleich zur Kontrollgruppe und dem unkonjugierten anti-TWEAKR Antikörper. Die Tabelle 8 gibt die T/C Werte an, ermittelt über die Tumorgewichte und Tumorfläche am Tag 24.

Tabelle 8:

Beispiel	**Dosis**	**T/C weight**	**T/C area**
Isotypkontrolle zu 02A	10mg/kg	1,06	0,96
02A	3mg/kg	n.d.	0,66
91A	3mg/kg	n.d.	0,78
02B	10mg/kg	0,08	0,27
Anti-TWEAKR Antikörper	10mg/kg	0,99	1,01
Cetuximab	3mg/kg	n.d.	0,67
Nimotuzumab	3mg/kg	n.d.	0.95
237i	3mg/kg	n.d.	0.47
208i	3mg/kg	n.d.	0.69

C-6e. Wirksamkeit der anti-TWEAKR-Antikörper-Wirkstoffkonjugate im BxPC3-Tumormodell bei Mehrfachbehandlung

2 Mio BxPC3-Zellen werden subkutan in die Flanke von weiblichen NMRI-nude Mäusen (Janvier) inokuliert. Bei einer Tumorgröße von 45 mm² an Tag 10 beginnt die Behandlung intravenös mit einer Dosis von 10 mg/kg (Tag 10, 14, 18). Im Anschluss an die Behandlung wird das Tumorwachstum bis Tag 42 verfolgt.

Die Behandlung mit den Antikörper-Wirkstoffkonjugaten gemäß den Beispielen 07B, 08B, 12B, 15B und 46B führt zu einer deutlichen Wachstumshemmung der Tumore im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Tabelle 9 gibt die T/C Werte ermittelt über die Tumorgewichte und Tumorfläche am Tag 42 an. Eine Behandlung mit dem jeweiligen Kontrollkonjugat (Isotyp-Antikörper gegen irrelevantes Antigen) hat eine deutlich schwächere Tumor-wachstumshemmende -Wirkung. Die Behandlung mit den

unkonjugierten Antikörpern führt ebenfalls zu einer teilweise schwächeren Wachstumshemmung der Tumore.

Tabelle 9:

Beispiel	Dosis	T/C weight	T/C area
07B	10 mg/kg	0,27	0,50
Isotypkontrolle zu 07B	10 mg/kg	0,77	0,84
08B	10 mg/kg	0,48	0,69
Isotypkontrolle zu 08B	10 mg/kg	0,61	0,81
12B	10 mg/kg	0,18	0,54
Isotypkontrolle zu 12B	10 mg/kg	0,64	0,74
15B	10 mg/kg	0,37	0,53
Isotypkontrolle zu 15B	10 mg/kg	0,95	0,89
46B	10 mg/kg	0,47	0,57
Isotypkontrolle zu 46B	10 mg/kg	0,87	0,93
Anti-TWEAKR Antikörper	10 mg/kg	0,50	0,55

C-6f. Wirksamkeit der anti-TWEAKR-Antikörper-Wirkstoffkonjugate im NCI-H292-Tumormodell bei Einmalbehandlung (2 unabhängige Versuche)

1 Mio NCI-H292 Zellen werden in beiden Versuchen subkutan in die Flanke von weiblichen NMRI-nude Mäusen (Janvier) inokuliert. Bei einer Tumorgröße von ~45 mm² an Tag 10 (Versuch 1) bzw. Tag 8 (Versuch 2) wird einmalig intravenös mit einer Dosis von 10mg/kg Antikörper-Wirkstoffkonjugat behandelt. Im Anschluss an die Behandlung wird das Tumorwachstum bis Tag 18 (Versuch 1) bzw. Tag 24 (Versuch 2) verfolgt.

Die einmalige Behandlung mit den anti-TWEAKR-Antikörper-Wirkstoffkonjugaten 02B, 07B und 08B führt im Versuch 1 zu einer deutlichen Wachstumshemmung der Tumore im Vergleich zur Kontrollgruppe und dem unkonjugierten anti-TWEAKR Antikörper. Die Tabelle 10 (Versuch 1) gibt die T/C Werte ermittelt über die Tumorgewichte und Tumorfläche am Tag 18 an. Die einmalige Behandlung mit den anti-TWEAKR-Antikörper-Wirkstoffkonjugaten 155B, 173B, 165B und 085B führt im Versuch 2 ebenfalls zu einer deutlichen Wachstumshemmung der Tumore im Vergleich zur Kontrollgruppe und den jeweiligen Isotypkontrollen (nicht aufgeführt). Die Tabelle 11 (Versuch 2) gibt die T/C Werte ermittelt über die Tumorfläche am Tag 24 an.

Tabelle 10:

Beispiel	Dosis	T/C weight	T/C area

Beispiel	Dosis	T/C weight	T/C area
02B	10 mg/kg	0,27	0,36
07B	10 mg/kg	0,26	0,38
08B	10 mg/kg	0,24	0,38
91B	10 mg/kg	0,52	0,58
Isotypkontrolle zu 07B	10 mg/kg	1,05	0,93
Anti-TWEAKR Antikörper	10 mg/kg	0,68	0,84

Tabelle 11:

Beispiel	Dosis	T/C weight	T/C area
155B	10 mg/kg	/	0,32
173B	10 mg/kg	/	0,32
165B	10 mg/kg	/	0,30
085B	10 mg/kg	/	0,24

C-6g. Wirksamkeit der anti-TWEAKR-Antikörper-Wirkstoffkonjugate im A375-Tumormodell bei Mehrfachbehandlung

5 Mio A375-(humane Melanom) Zellen werden subkutan in die Flanke von weiblichen NMRI-nude Mäusen (Janvier) inokuliert. Bei einer Tumorgröße von 41 mm² an Tag 10 beginnt die Behandlung intravenös mit einer Dosis von 10 mg/kg (Tag 10, 14, 18). Im Anschluss an die Behandlung wird das Tumorwachstum bis Tag 22 verfolgt.

Die Behandlung mit den Antikörper-Wirkstoffkonjugaten gemäß den Beispielen 38B und 104B führt zu einer deutlichen Wachstumshemmung der Tumore im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Tabelle 10 gibt die T/C Werte ermittelt über die Tumorgewichte und Tumorfläche am Tag 22 an. Eine Behandlung mit dem jeweiligen Kontrollkonjugat (Isotyp-Antikörper gegen irrelevantes Antigen) hat eine deutlich schwächere Tumor-wachstumshemmende-Wirkung. Die Behandlung mit den unkonjugierten Antikörpern führt ebenfalls zu einer teilweise schwächeren Wachstumshemmung der Tumore.

Tabelle 10:

Beispiel	Dosis	T/C weight	T/C area
Anti-TWEAKR Antikörper	10 mg/kg	0,32	0,52

Beispiel	Dosis	T/C weight	T/C area
Anti-TWEAKR Antikörper	10 mg/kg	0,32	0,52
Isotypkontrolle zu 104B	10 mg/kg	0,94	0,96
104B	10 mg/kg	0,14	0,29
Isotypkontrolle zu 38B	10 mg/kg	0,86	0,98
38B	10 mg/kg	0,31	0,58

C-6h. Wirksamkeit der anti-TWEAKR-Antikörper-Wirkstoffkonjugate im LoVo-Tumormodell bei Mehrfachbehandlung

5 Mio LoVo-(humane Kolonkarzinom) Zellen werden subkutan in die Flanke von weiblichen NMRI-nude Mäusen (Janvier) inokuliert. Bei einer Tumorgröße von 43 mm² an Tag 7 beginnt die Behandlung intravenös mit einer Dosis von 10 mg/kg (Tag 7, 11, 15). Im Anschluss an die Behandlung wird das Tumorwachstum bis Tag 45 verfolgt.

Die Behandlung mit den Antikörper-Wirkstoffkonjugaten gemäß der Beispiele 07B, 87B und 104B führt zu einer deutlichen Wachstumshemmung der Tumore im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Tabelle 11 gibt die T/C Werte ermittelt über die Tumorfläche am Tag 45 an. Eine Behandlung mit dem Kontrollkonjugat zur 07B (Isotyp-Antikörper gegen irrelevantes Antigen) hat eine deutlich schwächere Tumor-wachstumshemmende Wirkung.

Tabelle 11:

Beispiel	Dosis	T/C area
07B	10 mg/kg	0,40
Isotypkontrolle zu 07B	10 mg/kg	0,82
104B	10 mg/kg	0,43
87B	10 mg/kg	0,52

D. Ausführungsbeispiele für pharmazeutische Zusammensetzungen

Die erfindungsgemäßen Verbindungen können folgendermaßen in pharmazeutische Zubereitungen überführt werden:

i.v.-Lösung:

Die erfindungsgemäße Verbindung wird in einer Konzentration unterhalb der Sättigungslöslichkeit in einem physiologisch verträglichen Lösungsmittel (z.B. isotonische Kochsalzlösung, D-PBS, oder einer Formulierung mit Glycin und Natriumchlorid in Citratpuffer unter Zusatz von Polysorbat 80) gelöst. Die Lösung wird steril filtriert und in sterile und pyrogenfreie Injektionsbehältnisse abgefüllt.

i.v.-Lösung:

Die erfindungsgemäßen Verbindungen können in die angeführten Applikationsformen überführt werden. Dies kann in an sich bekannter Weise durch „Mischen mit" bzw. „Lösen in" inerten, nichttoxischen, pharmazeutisch geeigneten Hilfsstoffen (z.B. Puffersubstanzen, Stabilisatoren, Lösungsvermittler, Konservierungsmittel) geschehen. Z.B können enthalten sein: Aminosäuren (Glycin, Histidin, Methionin, Arginin, Lysin, Leucin, Isoleucin, Threonin, Glutaminsäure, Phenylalanin und weitere), Zucker und verwandte Stoffe (Glucose, Saccharose, Mannitol, Trehalose, Sucrose, Mannose, Lactose, Sorbitol), Glycerin, Natrium-, Kalium, Ammonium-, und Calciumsalze (z.B. Natriumchlorid, Kaliumchlorid oder Dinatriumhydrogenphosphat und v.a. mehr), Acetat/Essigsäure - Puffersysteme, Phosphatpuffersysteme, Zitronensäure u. Citratpuffersysteme, Trometamol (TRIS und TRIS-Salze), Polysorbate (z.B. Polysorbat 80 und Polysorbat 20), Poloxamere (z.B. Poloxamer 188 und Poloxamer 171), Macrogole (PEG-Derivate, z.B. 3350), Triton X-100, EDTA-Salze, Glutathion, Albumine (z.B. human), Harnstoff, Benzylalkohol, Phenol, Chlorocresol, Metacresol, Benzalkoniumchlorid und viele andere mehr.

Lyophilisat zur späteren Überführung in eine i.v., s.c. oder i.m.-Lösung:

Alternativ können die erfindungsgemäßen Verbindungen in ein stabiles Lyophilisat (e.v. durch Mithilfe von oben genannten Hilfstoffen) überführt werden und vor Applikation mit einem geeigneten Lösungsmittel (z.B. Wasser für Injektionszwecke, isoton. Kochsalzlösung) rekonstituiert und appliziert werden.

Ausführungsbeispiele für anti-TWEAKR-Antikörper

Alle Beispiele wurden unter Verwendung von Standardverfahren ausgeführt, die dem Fachmann bekannt sind, sofern sie nicht hier im Detail beschrieben werden. Routeine-Molekularbiologie-Verfahren der folgenden Beispiele können wie in Standardlaborbüchern beschrieben ausgeführt werden, wie Sambrook et al., Molecular Cloning: ein Laboratory Manual, 2 Auflage; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989.

AK-BEISPIEL 1: Antikörper-Herstellung mittels einer Antikörperbibliothek

Eine vollständig humane Phagendisplaybibliothek (Hoet RM et al, Nat Biotechnol 2005;23(3):344-8) wurde verwendet, um TWEAKR-spezifische, humane monoklonale Antikörper der vorliegenden Erfindung durch Protein Panning zu isolieren (Hoogenboom H.R., Nat Biotechnol 2005;23(3):1105-16), wobei dimere Fc-fusionierte extrazelluläre Domänen von humanem und murinem TWEAKR als Target immobilisiert wurden.

Tabelle AK-1: Liste rekombinanter Antigene, die für die Antikörper-Selektion verwendet wurden

Nomenklatur	Beschreibung	SEQ ID NO
TPP-599	HUMAN-TNFRSF12Aaa28-80-hIgG1-Fc	138
TPP-601	MURIN-TNFRSF12Aaa28-80-hIgG1-Fc	137

Die Antigene wurden unter Verwendung eines ca. 2-fachen molaren Überschusses von Biotin-LC-NHS (Pierce; Kat.-Nr. 21347) gemäß den Angaben des Herstellers biotinyliert und unter Verwendung von Zeba Entsalzungssäulen (Pierce; Kat.-Nr. 89889) entsalzt. Gewaschene Magnet-Beads (DynaBeads) wurden über Nacht mit 200 nM biotinyliertem humanen Antigen bei 4°C inkubiert und für 1h bei 4°C mit Blockierungspuffer (PBS mit 3% BSA, 0.05% Tween-20) blockiert. Die blockierte Fab-Phagenbibliothek wurde zu den blockierten TWEAKR-Beads (DynaBeads Streptavidin-M280 - Invitrogen 112-06D) hinzugegeben und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach stringentem Waschen (3 x in Blockierungspuffer und 9 x in PBS (150 mM NaCl; 8 mM Na_2HPO_4; 1.5 mM KH_2PO_4; eingestellt auf pH = 7.4-7.6) mit 0.05% Tween-20) wurden Fab-Phagen, die spezifisch an biotinylierte TWEAKR-Beads binden (DynaBeads Streptavidin- M280 - Invitrogen 112-06D) in PBS resuspendiert und zur Amplifikation direkt für die Infektion von *Escherichia coli*-Stamm TG1 verwendet. In der zweiten Selektionsrunde wurden zwei murine TWEAKR (200nM) verwendet, um für kreuzreaktive Binder zu selektieren, und in der dritten Selektionsrunde wurde die Konzentration von humanem TWEAKR vermindert (100nM), um den Selektionsdruck für hochaffine Binder zu erhöhen.

11 verschiedene Fab-Phagen wurden identifiziert und die entsprechenden Antikörper wurden in einen Säuger-IgG Expressionsvektor umkloniert, der die fehlenden CH2-CH3 Domänen bereit stellt, die im löslichen Fab nicht vorhanden sind. Die daraus hervorgehenden IgGs wurden transient in

Säugerzellen exprimiert, wie beschrieben in Tom et al., Kapitel 12 in Methods Express: Expression Systems herausgegeben von Micheal R. Dyson und Yves Durocher, Scion Publishing Ltd, 2007. Kurz gesagt wurde ein CMV-Promoter-basiertes Expressionsplasmid in HEK293-6E Zellen transfiziert und in Fernbach–Flaschen oder Wave-Bags inkubiert. Die Expression fand statt bei 37°C für 5 bis 6 Tage in F17-Medium (Invitrogen). 1% Ultra-Low IgG FCS (Invitrogen) und 0.5 mM Valproinsäure (Sigma) wurden 24 h nach der Transfektion ergänzend hinzugegeben. Die Antikörper wurden mittels Protein-A-Chromatographie gereinigt und mittels ihrer Bindungsaffinität für löslichen monomeren TWEAKR per ELISA- und BIAcore-Analyse weiter charakterisiert, wie in AK-Beispiel 2 beschrieben.

Tabelle AK-2: Liste von rekombinantem Antigen, das für die Affinitätsmessung verwendet wurde

Nomenklatur	Beschreibung	Origin	Kat.-Nr. (Fitzgerald Inc)	SEQ ID NO
TPP-2305	hTNFRSF12Aminosäuren a28-80	Human	30R-AT080	168

Um die Zellbindungscharakteristika von anti-TWEAKR Antikörper zu bestimmen, wurde die Bindung an eine Reihe von Zelllinien (HT29, HS68, HS578) mittels Durchflusszytometrie untersucht. Die Zellen wurden in Verdünnungen der Antikörper (5µg/ml) in FACS–Puffer suspendiert, und für 1h auf Eis inkubiert. Anschließend wurde ein Zweit-Antikörper (PE Ziegen-anti-humanes IgG, Dianova #109-115-098) hinzugegeben. Nach der Inkubation für 1h auf Eis wurden die Zellen mittels Durchflusszytometrie unter Verwendung eines FACS-Array (BD Biosciences) analysiert.

NF-kappaB -Reportergenassays wurden durchgeführt, um die agonistische Aktivität aller 11 identifizierter Antikörper (humanes IgG1) zu beurteilen. HEK293 Zellen wurden transient mit einem NF-kappaB-Reporterkonstrukt (BioCat, Kat.-Nr. LR-0051-PA) unter Verwendung von 293fectin gemäß Herstellerangabe transfiziert. Weiße Poly-Lysin-beschichtete 384-Loch-Platten (BD) wurden mit transfizierten Zellen in F17-Medien (serum-free; Invitrogen) bei 37C, 5% CO_2 angesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit gereinigten Antikörpern bei verschiedenen Konzentrationen für 6h stimuliert, und anschließend wurde ein Luciferase-Assay nach Standardverfahren durchgeführt.

Die Internalisierung wurde mittels Fluoreszenzmarkierung von anti-TWEAKR Antikörpern (CypHer 5E mono NHS ester; GE Healthcare) verfolgt. Vor der Behandlung wurden HT29-Zellen (2 x 10^4/Loch) in 100 µl Medium in 96-MTP-Platten (dick, schwarz, durchsichtiger Boden, Nr. 4308776, Angewandten Biosystems) angesät. Nach 18h Inkubation bei 37°C / 5% CO_2 wurde das Medium gewechselt, und markierte anti-TWEAKR Antikörper wurden in verschiedenen Konzentrationen (10, 5, 2.5, 1, 0.1 µg/ml) hinzugegeben. Die gewählte Inkubationszeit betrug 0, 0,25, 0,5, 1, 1,5, 2, 3, 6 und 24h. Die Fluoreszenzmessung wurde mit einem InCell-Analyzer 1000 (GE Healthcare) durchgeführt.

Der Antikörper mit der stärksten in vitro-Wirksamkeit (TPP-883) wurde für weitere Wirksamkeits- und Affinitätsreifung ausgewählt.

TPP-883

SEQ ID NO.71
AQDIQMTQSPATLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGV
PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSSPGITFGPGTKVEIKRTVAAPSVFI
FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSS
TLTLSKADYEKHKLYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO.72
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSPYPMMWVRQAPGKGLEWVSYISPSGGKTHY
ADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGDGYFDYFDYWGQGTLVTVSS
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE
MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Aminosäurenequenzen der leichten (SEQ ID NO.71) und schweren (SEQ ID NO.72) Ketten von TPP-883; CDRs sowohl der schweren als auch der leichten Kette sind unterstrichen.

Die Reifung wurde in einer ersten Mutationssammelrunde vorgenommen, gefolgt von der Rekombination derjenigen Aminosäure-Veränderungen, die Affinität und Wirksamkeit am meisten erhöhten. Für das Sammeln von Mutationen NNK (N = AGCT, K = G oder T) wurde an den nachfolgenden einzelnen Aminosäurepositionen mittels ortsgerichteter Mutagenese unter Verwendung synthetischer Oligonucleotide einschließlich NNK-Codon-Diversifizierung (kontinuierliche Aminosäure Nomenklatur, vergleiche Figur 25) randomisiert: S35, S36, Y37 und N39 in CDR-L1; A51, S53, S54, Q56 und S57 in CDR-L2; S92, Y93, S94, S95, G97 und I98 in CDR-L3; P31, Y32, P33, M34 und M35 in CDR-H1; Y50, S52, P53, S54, G56, K57 und H59 in CDR-H2; G99, G100, D101, G102, Y103, F104, D105 und Y106 in CDR-H3. Die DNA aller einzelner NNK Sättigungs-Mutagenesebibliotheken wurde in einen Säuger-IgG Expressionsvektor für Wirksamkeitsreifung, bzw. in einen Phagemid-Vektor für die Affinitätsreifung umkloniert. Die Affinitätsreifung wurde mittels Phage Panning durchgeführt. Gewaschene Magnet-Beads (DynaBeads) wurden über Nacht mit 10 nM, 1 nM, 100 pM und 10 pM biotinyliertem humanen Antigen bei 4°C inkubiert und für 1h bei 4°C mit Blockierungspuffer (PBS mit 3% BSA, 0.05% Tween-20) blockiert. Die blockierte Fab-Phagenbibliothek wurde mit 10000-fachem, 1000-fachem und 100-fachem Überschuss, verglichen mit der theoretischen Bibliothekskomplexität zu den blockierten TWEAKR-DynaBeads hinzugegeben und für 30min bei Raumtemperatur inkubiert. Also wurden insgesamt 12 Strategien verfolgt (4 Antigen-Konzentrationen x 3 Fab-Phage-Titer). Nach stringentem Waschen (3 x in Blockierungspuffer und 9 x in PBS mit 0.05% Tween-20) wurden Fab-Phagen, die spezifisch an biotinylierte TWEAKR-DynaBeads (DynaBeads Streptavidin- M280 - Invitrogen 112-06D) binden, in PBS resuspendiert und direkt zum Zwecke der Amplifikation für die Infektion von *Escherichia coli*-Stamm TG1 verwendet. In Selektionsrunde zwei wurde die Konzentration von humanem TWEAKR-Fc vermindert (1 nM, 100 pM,

10 pM und 1 pM), und der gleiche Fab-Phagen-Titer wurde für alle 12 Strategien verwendet (4.4×10^{11}). Für die löslichen Fab-Expression wurde der Phagemid-Vektor mit MluI verdaut, um die Gen-III-Membrananker---Sequenz zu entfernen, die für die für den Fab-Display auf dem Phagen erforderlich ist, und wieder ligiert. 96 Varianten von jeder der 12 Selektions-Pools wurden als lösliche Fabs exprimiert und in einem ELISA-Format untersucht. Dafür wurden 2,5 nM biotinyliertes TWEAKR-Fc Antigen-beschichtet, und die Bindung von löslichen Fabs wurde mittels Anti-c-Myc Antikörpern (Abcam ab62928) nachgewiesen. 7 Einzelsubstitutions-Varianten (fortlaufende Aminosäure Nomenklatur, vergleiche Figur 25) mit verbesserter Bindung an TWEAKR-Fc (Seq ID No 138) wurden nachgewiesen: S36G von CDR-L1, A51Q und S57K von CDR-L2, S94T und G97F von CDR-L3, M35I von CDR-H1 und G102T von CDR-H3. Für die Wirksamkeitsreifung wurden HEK293 Zellen mit einem NF-kappaB-Reporter (BioCat, Kat.-Nr. LR-0051-PA) transfiziert. Weiße Poly-Lysin-beschichtete 384-Loch-Platten (BD) wurden mit transfiziert Zellen in F17-Medien (serum-free; Invitrogen) angesät, und einzelne Varianten der NNK-diversifizierten Positions-Antikörper (humanes IgG1)bibliotheken wurden transient in Säugerzellen exprimiert. Am nächsten Tag wurden NF-kappaB-Reporterzellen mit den exprimierten Einzel-NNK-AntikörperVarianten für 6h stimuliert, und anschließend wurde ein Luciferase-Assay nach Standardverfahren durchgeführt. Es wurde 1 Einzelsubstitutionsvariante mit verbesserter agonistischer Aktivität nachgewiesen: G102T von CDR-H3. Diese Variante wurde ebenfalls durch Affinitätsreifung erhalten und zeigte auch dort die größte Affinitätsverstärkung. Nach Mutationssammlung mittels Affinitäts- und Wirksamkeits-Screening wurden alle 7 günstigen Einzelsubstitutionen (Bibliotheks-Komplexität: 128Varianten) in eine Rekombinationsbibliothek rekombiniert. Dafür wurden Oligonukleotide synthetisiert, um ausgewählte Mutationen oder die entsprechenden Wildtyp-Aminosäure bei jeder ausgewählten Position einzuführen. Die Bibliothek wurde unter Verwendung von aufeinanderfolgenden Runden von „overlap extension PCR" hergestellt. Das finale PCR Product wurde in einen bakteriellen löslichen Fab-Expressionsvektor ligiert, und 528 Varianten wurden zufällig ausgewählt (~ 4-facher Überschuss der Probennahme) für eine Gleichgewichts-ELISA-Screen mit löslichen Fabs, wie vorher beschrieben. Letztlich wurden 7 Varianten ausgewählt, basierend auf vergrößerter Affinität verglichen mit der besten Einzelsubstitutionsvariante, G102T. Die entsprechende DNA derselben wurde in einen Säuger-IgG Expressionsvektor umkloniert und im vorhergenannten NF-kappaB-Reporter-Zellassay auf funktionelle Aktivität untersucht. Letzlich wurden die erhaltenen Sequenzen verglichen mit humanen Keimbahn-Sequenzen, und Abweichungen ohne bedeutsamen Einfluss auf die Affinität und Wirksamkeit wurden angepasst. Antikörper mit den nachfolgenden Sequenzen wurden mittels Antikörper Bibliothek-Screening und mittels Affinitäts- und/oder Wirksamkeitsreifung erhalten:

TPP-2090

SEQ ID NO.1:
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISGYLNWYQQKPGKAPKLLIYQASSLQSGVPS
RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYTSPFITFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFP

PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTL
TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO.2:
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSPYPMIWVRQAPGKGLEWVSYISPSGGSTHY
ADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGDTYFDYFDYWGQGTLVTVSS
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE
LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Aminosäurenequenzen der leichten (SEQ ID NO.1) und schweren (SEQ ID NO.2) Ketten von TPP-2090; CDRs sowohl der schweren als auch der leichten Kette sind unterstrichen.

TPP-2149

SEQ ID NO.11
DIQMTQSPATLSASVGDRVTITCRASQSISGYLNWYQQKPGKAPKLLIYQASSLQSGVPS
RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYTSPFITFGPGTKVEIKRTVAAPSVFIFP
PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTL
TLSKADYEKHKLYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO.12
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSPYPMIWVRQAPGKGLEWVSYISPSGGKTHY
ADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGDTYFDYFDYWGQGTLVTVSS
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE
LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Aminosäurenequenzen der leichten (SEQ ID NO.11) und schweren (SEQ ID NO.12) Ketten von TPP-2149; CDRs sowohl der schweren als auch der leichten Kette sind unterstrichen.

TPP-2093

SEQ ID NO.21
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYQASSLQSGVPS
RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYTSPFITFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFP
PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTL
TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO.22
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSPYPMMWVRQAPGKGLEWVSYISPSGGSTHY
ADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGDTYFDYFDYWGQGTLVTVSS
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE
LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Aminosäurenequenzen der leichten (SEQ ID NO.21) und schweren (SEQ ID NO.22) Ketten von TPP-2093; CDRs sowohl der schweren als auch der leichten Kette sind unterstrichen.

TPP-2148

SEQ ID NO.31
DIQMTQSPATLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYQASSLQSGVPS
RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPFITFGPGTKVEIKRTVAAPSVFIFP
PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTL
TLSKADYEKHKLYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO.32
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSPYPMMWVRQAPGKGLEWVSYISPSGGKTHY
ADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGDTYFDYFDYWGQGTLVTVSS
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE
LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Aminosäurenequenzen der leichten (SEQ ID NO.31) und schweren (SEQ ID NO.32) Ketten von TPP-2148; CDRs sowohl der schweren als auch der leichten Kette sind unterstrichen.

TPP-2084

SEQ ID NO.41
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPS
RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPGITFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFP
PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTL
TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO.42
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSPYPMMWVRQAPGKGLEWVSYISPSGGSTHY
ADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGDTYFDYFDYWGQGTLVTVSS
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE
LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Aminosäurenequenzen der leichten (SEQ ID NO.41) und schweren (SEQ ID NO.42) Ketten von TPP-2084; CDRs sowohl der schweren als auch der leichten Kette sind unterstrichen.

TPP-2077

SEQ ID NO.51
DIQMTQSPATLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPS
RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSSPGITFGPGTKVEIKRTVAAPSVFIFP

PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTL
TLSKADYEKHKLYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO.52
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSPYPMMWVRQAPGKGLEWVSYISPSGGKTHY
ADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGDTYFDYFDYWGQGTLVTVSS
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE
LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Aminosäurenequenzen der leichten (SEQ ID NO.51) und schweren (SEQ ID NO.52) Ketten von TPP-2077; CDRs sowohl der schweren als auch der leichten Kette sind unterstrichen.

TPP-1538

SEQ ID NO.61
AQDIQMTQSPATLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGV
PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSSPGITFGPGTKVEIKRTVAAPSVFI
FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSS
TLTLSKADYEKHKLYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO.62
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSPYPMMWVRQAPGKGLEWVSYISPSGGKTHY
ADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGDTYFDYFDYWGQGTLVTVSS
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE
LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Aminosäurenequenzen der leichten (SEQ ID NO.61) und schweren (SEQ ID NO.62) Ketten von TPP-1538; CDRs sowohl der schweren als auch der leichten Kette sind unterstrichen.

TPP-1854

SEQ ID NO.81
AQDIQMTQSPATLSASVGDRVTITCRASQSISGYLNWYQQKPGKAPKLLIYNASSLQSGV
PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYTSPFITFGPGTKVEIKRTVAAPSVFI
FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSS
TLTLSKADYEKHKLYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO.82
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSPYPMIWVRQAPGKGLEWVSYISPSGGKTHY
ADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGDTYFDYFDYWGQGTLVTVSS
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE

LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Aminosäurenequenzen der leichten (SEQ ID NO.81) und schweren (SEQ ID NO.82) Ketten von TPP-1854; CDRs sowohl der schweren als auch der leichten Kette sind unterstrichen.

TPP-1853

SEQ ID NO.91
AQDIQMTQSPATLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYNASSLQSGV
PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYTSPGITFGPGTKVEIKRTVAAPSVFI
FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSS
TLTLSKADYEKHKLYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO.92
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSPYPMMWVRQAPGKGLEWVSYISPSGGKTHY
ADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGDTYFDYFDYWGQGTLVTVSS
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE
LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Aminosäurenequenzen der leichten (SEQ ID NO.91) und schweren (SEQ ID NO.92) Ketten von TPP-1853; CDRs sowohl der schweren als auch der leichten Kette sind unterstrichen.

TPP-1857

SEQ ID NO.101
AQDIQMTQSPATLSASVGDRVTITCRASQSISGYLNWYQQKPGKAPKLLIYNASSLQSGV
PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYTSPGITFGPGTKVEIKRTVAAPSVFI
FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSS
TLTLSKADYEKHKLYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO.102
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSPYPMMWVRQAPGKGLEWVSYISPSGGKTHY
ADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGDTYFDYFDYWGQGTLVTVSS
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE
LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Aminosäurenequenzen der leichten (SEQ ID NO.101) und schweren (SEQ ID NO.102) Ketten von TPP-1857; CDRs sowohl der schweren als auch der leichten Kette sind unterstrichen.

TPP-1858

SEQ ID NO.111
AQDIQMTQSPATLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYNASSLQSGV

PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYTSPFITFGPGTKVEIKRTVAAPSVFI
FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSS
TLTLSKADYEKHKLYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO.112
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSPYPMMWVRQAPGKGLEWVSYISPSGGKTHY
ADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGDTYFDYFDYWGQGTLVTVSS
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE
LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Aminosäurenequenzen der leichten (SEQ ID NO.111) und schweren (SEQ ID NO.112) Ketten von TPP-1858; CDRs sowohl der schweren als auch der leichten Kette sind unterstrichen.

BEISPIEL 2: Biochemische Charakteristika der Antikörper

Bestimmung von Bindungs-Affinitäten mittels Biacore-Analyse:

Bindungs-Affinitäten von anti-TWEAKR Antikörpern wurden mittels Oberflächenplasmonresonanz-Analyse auf einem Biacore T100-Gerät (GE Healthcare Biacore, Inc.) durchgeführt. Die Antikörper wurden auf einen CM5-Sensorchip über ein indirektes Erfassungsreagenz immobilisiert, anti-humanes IgG(Fc). Reagenzien des "Human Antibody Capture Kit" (BR-1008-39, GE Healthcare Biacore, Inc.) wurden wie vom Hersteller beschrieben verwendet. Anti-TWEAKR Antikörper wurden bei einer Konzentration von 10µg/ml bei 10µl/min für 10 sec injiziert.

Tabelle AK-3: Liste von rekombinantem Antigen (TWEAKR) verwendet für Affinitätsmessung

Nomenklatur	Beschreibung	Origin	Kat.-Nr. (Fitzgerald Inc)	SEQ ID NO
TPP-2305	hTNFRSF12Aminosäurena28-80	Human	30R-AT080	168

Tabelle AK-4: Liste von Antikörpern, die für die Affinitätsmessung verwendet wurden

Nomenklatur	Beschreibung	SEQ ID NO	
		Leichte Kette	Schwere Kette
P3G5(TPP-2195)	Murines IgG2a	121	122
P4A8(TPP-1324)	Humanes IgG1	125	126
P2D3(TPP-2196)	Murines IgG2a	131	132
136.1(TPP-2194)	Murines IgG2a	123	124
PDL-192(TPP-1104)	Humanes IgG1	127	128

18.3.3(TPP-2193)	Murines IgG2a	129	130
TPP-883	Humanes IgG1	71	72
TPP-1538	Humanes IgG1	61	62
TPP-2077	Humanes IgG1	51	52
TPP-2084	Humanes IgG1	41	42
TPP-2148	Humanes IgG1	31	32
TPP-2093	Humanes IgG1	21	22
TPP-2149	Humanes IgG1	11	12
TPP-2090	Humanes IgG1	1	2

Tabelle AK-5: Liste von gewerblich erhältlichen Antikörpern, die für die Affinitätsmessung verwendet wurden

Nomenklatur	**Beschreibung**	**Kat.-Nr. (Abcam)**
ITEM-1	Murines IgG1	ab21359
ITEM-4	Murines IgG1	ab21127

Verschiedene Konzentrationen (200 nM, 100 nM, 50 nM, 25 nM, 12,5 nM, 6,25 nM, 3,12 nM, 1,56nM) von gereinigtem rekombinantem humanem TWEAKR-Protein (TPP-2305, SEQ ID NO:168) wurden in HEPES-EP-Puffer (GE Healthcare Biacore, Inc.) über immobilisierte anti-TWEAKR Antikörper bei ein Durchflussrate von 60 µl/min für 3 Minuten injiziert, und die Dissoziationszeit betrug 5 Minuten. Sensorgramme wurden nach In-Line-Referenzzellkorrektur erstellt, gefolgt von Subtraktion der Puffer-Probe. Die Dissoziationsgleichgewichtskontante (K_D) wurde berechnet basierend auf dem Verhältnis von Assoziations- (k_{on}) und Dissoziations- (k_{off})-Konstanten, erhalten mittels Fitting-Sensorgrammen mit einem 1:1 Bindungsmodell der ersten Ordnung.

Tabelle AK-6: Monovalente K_D-Werte von anti-TWEAKR Antikörpern gemessen mittels Biacore mit TWEAKR-Protein (TPP-2305 (SEQ ID NO: 168)).

	ka (1/Ms)	kd (1/s)	K_D (nM)
TPP-883	4.40E+06	9.10E-01	205.9
TPP-1538	4.20E+06	1.10E-01	27.6
TPP-2077	3.00E+06	8.60E-02	28.9
TPP-2084	4.20E+06	1.10E-01	27.6
TPP-2148	5.10E+06	1.30E-01	24.5
TPP-2093	4.10E+06	9.00E-02	22.1
TPP-2149	8.40E+06	1.00E-01	12.1
TPP 2090	9.10E+06	1.10E-01	12.4
PDL-192(TPP-1104)	1.00E+07	3.80E-02	3.7
136.1(TPP-2194)	3.84E+07	3.24E-02	0.8

18.3.3(TPP-2193)	1.64E+07	2.85E-02	1.7
P4A8(TPP-1324)	1.20E+06	2.70E-03	2.3
P3G5(TPP-2195)	2.31E+06	1.22E-03	0.5
P2D3(TPP-2196)	1.32E+06	5.64E-04	0.4
ITEM-1	3.80E+06	1.10E-02	2.9
ITEM-4	2.80E+06	2.00E-03	0.7

Es wurde bestimmt, dass die Antikörper der Erfindung TWEAKR mit moderater Affinität (K_D 10 – 200 nM) binden, während einige Antikörper Vergleichsantikörper (e.g. PDL-192(TPP-1104), 136.1(TPP-2194), 18.3.3(TPP-2193), P4A8(TPP-1324), P3G5(TPP-2195), P2D3(TPP-2196), ITEM-1, ITEM-4) eine hochaffine Bindung zeigen (0.7 – 3.7 nM). Die Sequenzen der variable Domänen der Antikörper PDL-192, 136.1, 18.3.3, P4A8, P3G5 und P2D3 wurden aus der Patentliteratur WO2009/020933 und WO2009/140177 erhalten, und die Sequenzen, die konstante Region von humanem IgG1 und murinem IgG2 kodieren, wurden hinzugegeben, woraus Volllängen-IgGs PDL-192(TPP-1104), 136.1(TPP-2194), 18.3.3(TPP-2193), P4A8(TPP-1324), P3G5(TPP-2195), P2D3(TPP-2196) hervorgingen. Der Bereich der Affinitäten, die in dieser Studie gemessen wurde, stimmt gut mit veröffentlichten Daten überein: für PDL-192, 18.3.3 und 136.1, wurden K_D-Werte von 5.5, 0.2 und 0.7 nM veröffentlicht (WO2009/020933); für P4A8 2.6 nM (WO2009/140177). Zum Vergleich: der native Liganden TWEAK bindet TWEAKR mit ein K_D-Wert von 0.8 – 2.4 nM (Immunity. 2001 Nov;15(5):837-46; Biochem J. 2006 Jul 15;397(2):297-304; Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2003 Apr 1;23(4):594-600).

Als Ergebnis lässt sich festhalten, dass die Antikörper der Erfindung (TPP-883, TPP-1538, TPP-2077, TPP-2084, TPP-2148, TPP-2093, TPP-2149 und TPP-2090) TWEAKR mit moderater Affinität (K_D 10 – 200 nM) binden.

Charakterisierung des Bindungsepitops von TPP-2090 mittels N- und C-terminal verkürzten Varianten der TWEAKR-Ektodomäne:

Das Alignment der Cysteinreichen Domäne von TWEAKR (Aminosäuren 34-68) von verschiedenen Spezies (Figur 1-Alignment) zeigt, dass er in allen 6 analysierten Spezies gut konserviert ist. PDL-192 bindet abhängig von R56 (WO2009/020933: Figur 2B) und bindet deshalb nicht an Ratten-, Schweine- und Maus-TWEAKR. TPP-2090 bindet abhängig von der konservierten Aminosäure D47, und deshalb bindet an alle dargestellten Spezies.

In einem ersten Ansatz, um das Bindungsepitop der vorher genannten Antikörper zu charakterisieren, wurde eine N- und C-terminal verkürzte Mutante der TWEAKR-Ektodomäne erzeugt und auf ihre Fähigkeit untersucht, die verschiedenen anti-TWEAKR Antikörper zu binden. N-terminal wurden Aminosäuren 28 bis 33 und C-terminal wurden Aminosäuren 69 bis 80 deletiert, so dass die

cysteinreichen Domänen mit Disulfidbrücken zwischen Cys36-Cys49, Cys52-Cys67 und Cys55-Cys64 intakt blieben (vergleiche Figur 2). Beide Konstrukte, die volle Ektodomäne 28-80 einschließlich N- und C-Terminus und die verkürzte Ektodomäne 34-68, wurden als Fc-Fusionsproteine TPP-2202 bzw. TPP-2203 exprimiert und gereinigt.

Um die Bindung zu analysieren, wurde 1 µg/ml des entsprechenden dimeren TWEAKR-Fc-Konstrukts beschichtet, und 0,3 µg/ml und 0,08 µg/ml von biotinyliertem IgG wurden als löslicher Bindungspartner verwendet. Der Nachweis wurde mit Streptavidin-HRP und Amplex-Red Substrat vorgenommen. IgGs wurden unter Verwendung eines ca. 2-fachen molaren Überschusses von Biotin-LC-NHS (Pierce; Kat.-Nr. 21347) gemäß den Angaben des Herstellers biotinyliert und entsalzt unter Verwendung von Zeba Entsalzungssäulen (Pierce; Kat.-Nr. 89889). Bei allen angewandten Konzentrationen des löslichen Liganden zeigen die Antikörper der vorliegenden Erfindung eine gesättigte Bindung an beide Konstrukte, während Antikörper P4A8(TPP-1324), P3G5(TPP-2195) und Item-4 gesättigte Bindung lediglich an die Vollängen-Ektodomäne , aber eine verschlechterte Bindung an die N- und C-terminal verkürzten Konstrukte zeigen (Figur 3 & Figur 4). Dies zeigt an, dass sich das Bindungsepitop der Antikörper der vorliegenden Erfindung in der cysteinreichen Domäne zwischen Aminosäure 34-68 befindet. Um zu analysieren, ob der N-Terminus oder der C-Terminus der TWEAKR-Ektodomäne für P4A8(TPP-1324)- und P3G5(TPP-2195)-Bindung benötigt ist, wurde ein monomere Ektodomäne mit der C-terminalen Deletion von Aminosäuren 69 bis 80 erzeugt. Die Bindung von P4A8(TPP-1324) und P3G5(TPP-2195) an die C-terminal verkürzte TWEAKR - Ektodomäne ist ebenfalls verschlechtert, während die Antikörper der vorliegenden Erfindung eine gesättigte Bindung zeigen (Figur 5).

Tabelle AK-9: Liste rekombinanter Antigene, die im ELISA-Analyse für Epitop-Profiling verwendet wurden

Nomenklatur	Beschreibung	SEQ ID NO
TPP-2202	TWEAKR-ECD-28-80-hIgGFc-His	139
TPP-2203	TWEAKR-ECD-34-68-hIgGFc-His	140
TPP-1984	hTNFRSF12Aminosäurena28-68-CT-His	141

Tabelle AK-10: Liste der Antikörper, die im ELISA-Analyse für Epitop-Profiling verwendet wurden

Nomenklatur	Beschreibung	SEQ ID NO	
		Leichte Kette	Schwere Kette
P3G5(TPP-2195)	Murines IgG2a	121	122
P4A8(TPP-1324)	Humanes IgG1	125	126
136.1(TPP-2194)	Mmurines IgG2a	123	124
PDL-192(TPP-1104)	Humanes IgG1	127	128
TPP 2090	Humanes IgG1	1	2
TPP-2084	Humanes IgG1	41	42

Also ist das Bindungsepitop von TPP-2090, TPP-2084, PDL-192(TPP-1104) und 136.1(TPP-2194) in der cysteinreichen Domäne und das Bindungsepitop von P4A8(TPP-1324) und P3G5(TPP-2195) mindestens teilweise außerhalb der der cysteinreichen Domäne lokalisiert.

Wirkung von TWEAKR-Fc-Muteinen auf die Antikörper-Affinität:

Um die Bindungcharakteristika der Antikörper der Erfindung detaillierter zu untersuchen, wurden bestimmte-Muteine von TWEAKR, von denen vorgeschlagen worden ist, dass sie für die Wirkung bekannter agonistischer Antikörper relevant seien, wurden untersucht (WO2009/140177). Deshalb wurden die Vollängen-Ektodomäne (Aminosäuren 28-80) mit den nachfolgenden Einzel-Aminosäurenubstitutionen als Fc Fusions-Proteine exprimiert und gereinigt: T33Q; S40R; W42A; M50A; R56P; H60K; L65Q.

Tabelle AK-11: Liste von rekombinanten Proteinen, die in der ELISA-Analyse für Muteinbindung verwendet wurden

Nomenklatur	Beschreibung	SEQ ID NO
TPP-1990	hTNFRSF12Aminosäurena28-80-L65Q-hIgG1-Fc	142
TPP-1989	hTNFRSF12Aminosäurena28-80-H60K-hIgG1-Fc	143
TPP-2683	hTNFRSF12Aminosäurena28-80-R56P-hIgG1-Fc	144
TPP-1988	hTNFRSF12Aminosäurena28-80-M50A-hIgG1-Fc	145
TPP-1985	hTNFRSF12Aminosäurena28-80-W42A-hIgG1-Fc	146
TPP-1987	hTNFRSF12Aminosäurena28-80-S40R-hIgG1-Fc	147
TPP-1986	hTNFRSF12Aminosäurena28-80-T33Q-hIgG1-Fc	148
TPP-599	hTNFRSF12Aminosäurena28-80-hIgG1-Fc	138

Um Dosis-Reaktions-Daten zu erhalten, wurden die verschiedenen TWEAKR-Fc-Muteine mit einer niedrigen Konzentration (62 ng/ml) auf eine 384-Loch Maxisorb ELISA-Platte beschichtet, und eine serielle 2-fache Verdünnung von biotinyliertem IgG, beginnend mit einer Konzentration von 100 nM wurde als löslicher Bindungspartner verwendet. Der Nachweis wurde mit Streptavidin-HRP und Amplex Red vorgenommen. Die untersuchten IgGs waren TPP-2090 und TPP-2084 der vorliegenden Erfindung, PDL-192, 136.1 und 18.3.3 von WO2009/020933, P4A8 und P3G5 von WO2009/140177, und ITEM-1 und ITEM-4 von Nakayama et al [Biochem Biophys Res Com 306: 819-825].

Tabelle AK-12: Liste der Antikörper, die in der ELISA-Analyse für Muteinbindung verwendet wurden

Nomenklatur	Beschreibung	SEQ ID NO	
		Leichte Kette	Schwere Kette
P3G5(TPP-2195)	Murines IgG2a	121	122
P4A8(TPP-1324)	Humanes IgG1	125	126
136.1(TPP-2194)	Murines IgG2a	123	124
PDL-192(TPP-1104)	Humanes IgG1	127	128
18.3.3(TPP-2193)	Murines IgG2a	129	130

TPP 2090	Humanes IgG1	1	2
TPP-2084	Humanes IgG1	41	42

Tabelle AK-13: Liste von gewerblich erhältlichen Antikörpern, die im ELISA für Muteinbindung verwendet wurden

Nomenklatur	Beschreibung	Kat.-Nr. (Abcam)
ITEM-1	Murines IgG1	ab21359
ITEM-4	Murines IgG1	ab21127

IgGs wurden unter Verwendung von einem ca. 2-fachen molaren Überschuss von Biotin-LC-NHS (Pierce; Kat.-Nr. 21347) gemäß den Angaben des Herstellers biotinyliert und entsalzt unter Verwendung von Zeba Entsalzungssäulen (Pierce; Kat.-Nr. 89889). Die Dosis-Reaktions-Daten wurden gefittet und die IC50s bestimmt. Zur Veranschaulichung der Ergebnisse wurde eine Tabelle erstellt, "-" zeigt IC50s über 50 nM an, "+" zeigt IC50s im Bereich von 1 to 150 pM an.

Tabelle AK-14: Wirkung von Muteinen auf die Antikörperbindung

	T33Q	S40R	W42A	M50A	R56P	H60K	L65Q	WT
TPP-2084	+	+	-	+	+	+	+	+
TPP-2090	+	+	-	+	+	+	+	+
PDL-192(TPP-1104)	+	+	-	+	-	+	+	+
136.1(TPP-2194)	+	+	-	+	-	+	+	+
18.3.3(TPP-2193)	+	+	-	+	-	+	+	+
P4A8(TPP-1324)	+	+	-	+	+	+	+	+
P3G5(TPP-2195)	+	+	-	+	+	+	+	+
ITEM1	+	+	-	+	-	+	+	+
ITEM4	+	+	-	+	+	-	+	+

Wie bereits zuvor veröffentlicht, zeigt ITEM-4 verschlechterte Bindung an das H60K-Mutein [WO2009/140177: Figur 23F] und PDL-192 an das R56P-Mutein [WO2009/020933: Figur 22B]. Im Gegensatz zu veröffentlichten Daten, zeigt ITEM-1 eine verschlechterte Bindung an R56P, und alle Antikörper an W42A [WO2009/140177: Figur 23E, Figur 23F]. Diese Unterschiede können über die gewählten Methoden erklärt werden.

Im Gegensatz zu ITEM-1, ITEM-4, PDL-192, 136.1 und 18.3.3, binden die Antikörper der vorliegenden Erfindung unabhängig von allen Substitutionen außer W42A.

Alanin-Scan der Cysteinreichen Domäne:

Um die Bindungsstelle der Antikörper der Erfindung zu bestimmen, wurde ein Alanin-Scan der cysteinreichen Domäne (Aminosäuren 34-68) durchgeführt. In Figur 6 wird gezeigt, dass N- und C-terminal verkürzte Varianten der Vollängen-Ektodomäne von TWEAKR die Bindung der Antikörper der Erfindung nicht verschlechtern. Deshalb ist das Bindungsepitop in der cysteinreichen Domäne lokalisiert. Die nachfolgenden Substitutionen wurden in die TWEAKR(34-68)-Fc-Konstrukt eingeführt: S37A, R38A, S40A, S41A, W42A, S43A, D45A, D47A, K48A, D51A, S54A, R56A, R58A, P59A, H60A, S61A, D62A, F63A und L65A.

Tabelle AK-15: Liste von TWEAKR-Mutein Konstrukte für den Alanin-Scan der cysteinreichen Domäne

Nomenklatur	Beschreibung	SEQ ID NO
TPP-2203	TweakR-ECD-34-68-hIgGFc-His	140
TPP-2625	TweakR-ECD-34-68-hIgGFc-His-L65A	149
TPP-2624	TweakR-ECD-34-68-hIgGFc-His-F63A	150
TPP-2623	TweakR-ECD-34-68-hIgGFc-His-D62A	151
TPP-2622	TweakR-ECD-34-68-hIgGFc-His-S61A	152
TPP-2621	TweakR-ECD-34-68-hIgGFc-His-H60A	153
TPP-2620	TweakR-ECD-34-68-hIgGFc-His-P59A	154
TPP-2619	TweakR-ECD-34-68-hIgGFc-His-R58A	155
TPP-2618	TweakR-ECD-34-68-hIgGFc-His-R56A	156
TPP-2617	TweakR-ECD-34-68-hIgGFc-His-S54A	157
TPP-2616	TweakR-ECD-34-68-hIgGFc-His-D51A	158
TPP-2615	TweakR-ECD-34-68-hIgGFc-His-K48A	159
TPP-2614	TweakR-ECD-34-68-hIgGFc-His-D47A	160
TPP-2613	TweakR-ECD-34-68-hIgGFc-His-D45A	161
TPP-2612	TweakR-ECD-34-68-hIgGFc-His-S43A	162
TPP-2611	TweakR-ECD-34-68-hIgGFc-His-W42A	163
TPP-2610	TweakR-ECD-34-68-hIgGFc-His-S41A	164
TPP-2609	TweakR-ECD-34-68-hIgGFc-His-S40A	165
TPP-2608	TweakR-ECD-34-68-hIgGFc-His-R38A	166
TPP-2607	TweakR-ECD-34-68-hIgGFc-His-S37A	167

Diese TWEAKR(34-68)-Fc-Muteine wurden in HEK293 Zellen exprimiert. Um Dosis-Reaktions-Daten zu erhalten, wurden IgGs bei einer Konzentration von 1 µg/ml in eine 384-Loch Maxisorp ELISA-Platte beschichtet, und ein serielle 2-fache Verdünnung des TWEAKR-Mutein enthaltenden Überstands wurde als löslichen Bindungspartner verwendet. Der Nachweis wurde mit anti-HIS-HRP und Amplex Red vorgenommen. Die untersuchten IgGs waren TPP-2090 der vorliegenden Erfindung, PDL-192 von WO2009/020933 und P4A8 von WO2009/140177.

Tabelle AK-16: Liste von Antikörpern, die für den Alaninscan der cysteinreichen Domäne verwendet wurden

Nomenklatur	Beschreibung	SEQ ID NO	
		Leichte Kette	Schwere Kette
P4A8(TPP-1324)	Humanes IgG1	125	126

PDL-192(TPP-1104)	Humanes IgG1	127	128
TPP 2090	Humanes IgG1	1	2

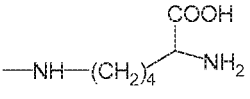
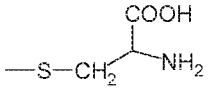
Um die Relevanz der TWEAKR-Mutein für Bindung an verschiedene IgGs zu beurteilen, wurde ein Korrelations-Blot bei einer bestimmten-Mutein Konzentration wurde vorbereitet. beispielhaft sind in Figur 6 die Korrelations-Blots für die 8-fach verdünnten Überstände der TWEAKR Expressionsbrühe gezeigt, mit PDL-192(TPP-1104) auf der X-Achse und TPP-2090 auf der Y-Achse. Die Blot zeigt, dass die Bindung von TPP-2090 verschlechtert mittels Substitution D47A, und die Bindung von PDL-192(TPP-1104) mittels Substitution R56A verschlechtert wurde. Für all Konstrukte konnte keine Bindung an P4A8(TPP-1324) nachgewiesen werden, was mit den vorher erhaltenen Ergebnissen (Figur 6) übereinstimmt. Also ist das P4A8-Epitop mindestens teilweise außerhalb der der cysteinreichen Domäne lokalisiert. Die identifizierten Abhängigkeiten von bestimmten TWEAKR-Aminosäuren für die Antikörperinteraktion korrelieren mit der agonistischen Aktivität, die für diese Antikörper bestimmt wurde. Der native Ligand TWEAK zeigt wirksame Aktivierung von TWEAKR und bindet abhängig von Leucin 46 an der cysteinreichen Domäne von TWEAKR (Pellegrini et al, FEBS 280:1818-1829). P4A8 zeigt sehr niedrige agonistische Aktivität und interagiert mindestens teilweise mit Domänen außerhalb der cysteinreichen Domäne von TWEAKR. PDL-192 zeigt moderate agonistische Aktivität und bindet abhängig von R56 an die cysteinreichen Domäne, aber gegenüber der TWEAK Ligandenstelle. TPP-2090 und TWEAK binden abhängig von D47 bzw. L46, und deshalb binden deshalb an eine ähnliche Bindungsstelle (Figur 7).

Es lässt sich schlussfolgern, dass die Antikörper der Erfindung (e.g. TPP-2090) an TWEAKR abhängig von D47 binden.

Die identifiziert Abhängigkeiten von bestimmten TWEAKR-Aminosäuren für die Antikörperinteraktion korrelieren mit der agonistischen Aktivität, die für diese Antikörper bestimmt worden ist. Der native Ligand TWEAK zeigt eine wirksame Aktivierung von TWEAKR und bindet abhängig von Leucin 46 an die cysteinreiche Domäne von TWEAKR (Pellegrini et al, FEBS 280:1818-1829). P4A8 zeigt sehr niedrige agonistische Aktivität und interagiert mindestens teilweise mit Domänen außerhalb der cysteinreichen Domäne von TWEAKR. PDL-192 zeigt moderate agonistische Aktivität und bindet abhängig von R56 an die cysteinreichen Domäne, aber gegenüber der TWEAK Ligandenstelle. Antikörper dieser Erfindung (Beispiel TPP-2090) binden abhängig von D47, und TWEAK bindet abhängig von L46, und bindet an eine ähnliche, aber unterscheidbare Bindungsstelle (Figur 7). Deshalb binden die Antikörper dieser Erfindung, die eine starke agonistische Aktivität zeigen, an ein neues Epitop (D47 abhängig) für Antikörper, das mit sehr starker agonistischer Aktivität verbunden ist. Interessanterweise gaben Michaelson et al (siehe Seite 369, linke Spalte in Michaelson JS et al, MAbs. 2011 Jul-Aug;3(4):362-75) eine Erklärung dafür, warum alle von ihnen untersuchten agonistischen Antikörper eine schwächere agonistische Aktivität verglichen mit dem natürlichen

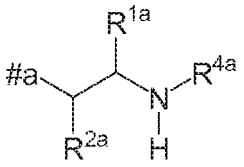
Liganden TWEAK haben. Ihre Schlussfolgerung ist, die verminderte Wirksamkeit könnte eine Funktion der dimeren Bindunginteraktion der Antikörper mit TWEAKR sein, wobei TWEAK wahrscheinlich eine eine trimere Interaktion eingeht. Deshalb ist es ein überraschendes Ergebnis, dass ein Antikörper der Erfindung, trotz einer dimeren Interaktion mit TWEAKR eine noch höhere agonistische Aktivität hat. Diese überraschende Wirkung ist an die spezifische Bindungseigenschaft der Antikörper der Erfindung geknüpft, also die spezifische Bindung an D47 von TWEAKR.

Weitere Ausführungsformen

1. Konjugat eines Binders oder Derivats hiervon mit einem oder mehreren Wirkstoffmolekülen, wobei das Wirkstoffmolekül ein Kinesin Spindel Protein-Inhibitor ist, das mit dem Binder über einen Linker L verbunden ist.
2. Konjugat nach Ziffer 1, wobei der Binder oder Derivat hiervon ein Binderpeptid oder –protein oder ein Derivat eines Binderpeptids oder –proteins ist.
3. Konjugat nach Ziffer 2, wobei jedes Wirkstoffmolekül an verschiedene Aminosäuren des Binderpeptids oder –proteins bzw. Derivats hiervon über den Linker gebunden ist.
4. Konjugat nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ziffern, wobei das Konjugat im Durchschnitt 1,2 bis 20 Wirkstoffmoleküle pro Binder aufweist.
5. Konjugat nach einem oder mehreren der Ziffern 2 bis 4, wobei das Binderpeptid oder –protein einen Antikörper bzw. das Derivat des Binderpeptids oder –proteins  oder  darstellt.
6. Konjugat nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ziffern, wobei der Binder an ein Krebs-Zielmolekül bindet.
7. Konjugat nach Ziffer 6, wobei der Binder an ein extrazelluläres Zielmolekül bindet.
8. Konjugat nach Ziffer 7, wobei der Binder nach Bindung an das extrazelluläre Zielmolekül von der das Zielmolekül exprimierenden Zelle internalisiert und intrazellulär (vorzugsweise lysosomal) prozessiert wird.
9. Konjugat nach einem oder mehreren der Ziffern 2 bis 8, wobei das Binderpeptid oder –protein ein humaner, humanisierter oder chimärer monoklonaler Antikörper oder ein Antigen-bindendes Fragment hiervon ist.
10. Konjugat nach Ziffer 9, wobei das Binderpeptid oder –protein ein anti-HER2-Antikörper, eine anti-EGFR-Antikörper, ein anti-TWEAKR-Antikörper, oder ein Antigen-bindendes Fragment hiervon ist.

11. Konjugat nach Ziffer 10, wobei der anti-TWEAKR-Antikörper spezifisch an die Aminosäure D in Position 47 (D47) von TWEAKR (SEQ ID NO:169) bindet, bevorzugt der anti-TWEAKR-Antikörper TPP-2090.

12. Konjugat nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ziffer, wobei der Kinesin Spindel Protein-Inhibitor die folgende Substruktur enthält wird:



wobei

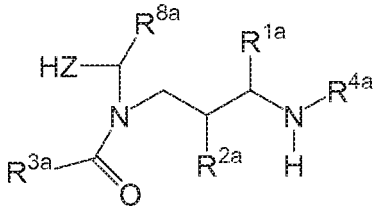
#a eine Bindung zum Restmolekül darstellt;

R^{1a} H oder $-(CH_2)_{0-3}Z$ darstellt, wobei Z -H, $-OY^3$, $-SY^3$, $-NHY^3$, Halogen, $-CO-NY^1Y^2$, oder $-CO-OY^3$ darstellt,
mit Y^1 und Y^2 unabhängig voneinander H, NH_2, $-(CH_2CH_2O)_{0-3}-(CH_2)_{0-3}Z'$, oder oder $-CH(CH_2W)Z'$ darstellen, und Y^3 H oder $-(CH_2)_{0-3}Z'$ darstellt, wobei Z' H, SO_3H, NH_2, COOH, $-NH-CO-CH_2-CH_2-CH(NH_2)COOH$ oder $-(CO-NH-CHY^4)_{1-3}COOH$ darstellt, wobei W H oder OH darstellt, wobei Y^4 unabhängig voneinander lineares oder verzweigtes, gegebenenfalls mit–$NHCONH_2$ substituiertes, C_{1-6} Alkyl oder gegebenenfalls mit $-NH_2$ substituiertes Aryl oder Benzyl darstellt;

R^{2a} und R^{4a} unabhängig voneinander H, $-CO-CHY^4-NHY^5$ oder $-(CH_2)_{0-3}Z$ darstellen, oder R^{2a} und R^{4a} gemeinsam (unter Bildung eines Pyrrolidinringes) $-CH_2-CHR^{10}-$ oder $-CHR^{10}-CH_2-$ darstellen, wobei R^{10} H, NH_2, COOH, SO_3H, SH, oder OH darstellt;
wobei Z -H, $-OY^3$, $-SY^3$, $-NHY^3$, $-CO-NY^1Y^2$, oder $-CO-OY^3$ darstellt,
wobei Y^1 und Y^2 unabhängig voneinander H, NH_2, oder $-(CH_2)_{0-3}Z'$ darstellen, und Y^3 H oder $-(CH_2)_{0-3}Z'$ darstellt, wobei Z' H, SO_3H, NH_2 oder COOH darstellt;
wobei Y^4 unabhängig voneinander lineares oder verzweigtes, gegebenenfalls mit–$NHCONH_2$ substituiertes, C_{1-6} Alkyl oder gegebenenfalls mit $-NH_2$ substituiertes Aryl oder Benzyl darstellt und Y^5 H oder $-CO-CHY^6-NH_2$ darstellt, wobei Y^6 lineares oder verzweigtes C_{1-6} Alkyl darstellt;

wobei der Kinesin Spindel Protein-Inhibitor durch Substitution eines H-Atoms an R^{1a}, R^{2a}, R^{4a} oder an dem durch R^{2a} und R^{4a} gebildeten Pyrrolidinring mit dem Linker verbunden ist,
sowie ihre Salze, Solvate und Salze der Solvate.

13. Konjugat nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ziffern, wobei der Kinesin Spindel Protein-Inhibitor durch die allgemeine Formel (I) dargestellt wird:



(I)

wobei

R^{1a} H oder $-(CH_2)_{0-3}Z$ darstellt, wobei Z -H, $-OY^3$, $-SY^3$, $-NHY^3$, Halogen, $-CO-NY^1Y^2$, oder $-CO-OY^3$ darstellt,

mit Y^1 und Y^2 unabhängig voneinander H, NH_2, $-(CH_2CH_2O)_{0-3}-(CH_2)_{0-3}Z'$, oder $-CH(CH_2W)Z'$ darstellen, und Y^3 H oder $-(CH_2)_{0-3}Z'$ darstellt, wobei Z' H, SO_3H, NH_2, COOH, -NH-CO-CH_2-CH_2-$CH(NH_2)COOH$ oder $-(CO-NH-CHY^4)_{1-3}COOH$ darstellt; wobei W H oder OH darstellt, wobei Y^4 unabhängig voneinander lineares oder verzweigtes, gegebenenfalls mit–$NHCONH_2$ substituiertes, C_{1-6} Alkyl oder gegebenenfalls mit $–NH_2$ substituiertes Aryl oder Benzyl darstellt;

R^{2a} und R^{4a} unabhängig voneinander H, $-CO-CHY^4-NHY^5$ oder $-(CH_2)_{0-3}Z$ darstellen, oder R^{2a} und R^{4a} gemeinsam (unter Bildung eines Pyrrolidinringes) $–CH_2-CHR^{10}-$ oder $-CHR^{10}-CH_2-$ darstellen, wobei R^{10} H, SO_3H, NH_2, COOH, SH, oder OH darstellt;
wobei Z -H, Halogen, $-OY^3$, $-SY^3$, $-NHY^3$, $-CO-NY^1Y^2$, oder $-CO-OY^3$ darstellt,
wobei Y^1 und Y^2 unabhängig voneinander H, NH_2, oder $-(CH_2)_{0-3}Z'$ darstellen, und Y^3 H oder $-(CH_2)_{0-3}Z'$ darstellt, wobei Z' H, SO_3H, NH_2 oder COOH darstellt;
wobei Y^4 unabhängig voneinander lineares oder verzweigtes, gegebenenfalls mit–$NHCONH_2$ substituiertes, C_{1-6} Alkyl oder gegebenenfalls mit $–NH_2$ substituiertes Aryl oder Benzyl darstellt und Y^5 H oder $–CO-CHY^6-NH_2$ darstellt, wobei Y^6 lineares oder verzweigtes C_{1-6} Alkyl darstellt;

R^{3a} eine gegebenenfalls substituierte Alkyl-, Aryl-, Heteroaryl- Heteroalkyl-, Heterocycloalkyl-Gruppe darstellt,

bevorzugt eine C_{1-10}-Alkyl-, C_{6-10}-Aryl- oder C_{6-10}-Aralkyl-, C_{5-10}-Heteroalkyl-, C_{1-10}-Alkyl-O-C_{6-10}-Aryl- oder C_{5-10}-Heterocycloalkyl-Gruppe,

die mit 1-3 –OH Gruppen, 1-3 Halogenatomen, 1-3 halogenierte Alkyl-Gruppen (die jeweils 1-3 Halogenatome aufweisen können), 1-3 O-Alkyl Gruppen, 1-3 –SH Gruppen, 1-3 -S-Alkyl Gruppen, 1-3 -O-CO-Alkyl Gruppen, 1-3 -O-CO-NH-Alkyl Gruppen, 1-3 -NH-CO-Alkyl Gruppen, 1-3 -NH-CO-NH-Alkyl Gruppen, 1-3 -$S(O)_n$-Alkyl Gruppen, 1-3 -SO_2-NH-Alkyl Gruppen, 1-3 -NH-Alkyl Gruppen, 1-3 -$N(Alkyl)_2$ Gruppen, 1-3 -NH_2 Gruppen oder 1-3 -$(CH_2)_{0-3}Z$ Gruppen, wobei Z -H, Halogen, -OY^3, -SY^3, -NHY^3, -CO-NY^1Y^2, oder -CO-OY^3 darstellt, mit Y^1 und Y^2 unabhängig voneinander H, NH_2, oder -$(CH_2)_{0-3}Z'$ darstellen, und Y^3 H, -$(CH_2)_{0-3}$-$CH(NHCOCH_3)Z'$,-$(CH_2)_{0-3}$-$CH(NH_2)Z'$, oder -$(CH_2)_{0-3}Z'$ darstellt, wobei Z' H, SO_3H, NH_2 oder COOH darstellt,

substituiert sein kann

(wobei „Alkyl" bevorzugt C_{1-10}-Alkyl bedeutet);

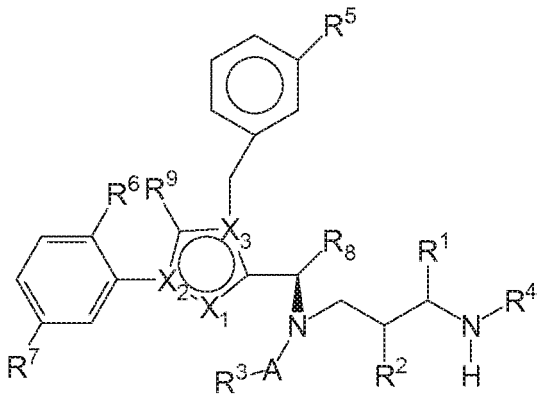
R^{8a} C1-10-Alkyl darstellt;

HZ ein mono- oder bicyclischer Heterozyklus ist, der mit einem oder mehreren Substituenten ausgewählt aus Halogen, C_{1-10}-Alkylgruppen, C_{6-10}-Arylgruppen oder C_{6-10}-Aralkylgruppen, die ggf. mit Halogen substituiert sein können, substituiert sein kann,

wobei der Kinesin Spindel Protein-Inhibitor durch Substitution eines H-Atoms an R^{1a}, R^{2a}, R^{3a}, R^{4a}, R^{8a} oder an dem durch R^{2a} und R^{4a} gebildeten Pyrrolidinring mit dem Linker verbunden ist,

sowie ihre Salze, Solvate und Salze der Solvate.

14. Konjugat nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ziffern, wobei Wirkstoffmolekül-Linker durch die allgemeine Formel (II) dargestellt wird:



(II)

wobei

X_1 N, X_2 N und X_3 C darstellt; oder

X_1 N, X_2 C und X_3 N darstellt; oder

X_1 CH, X_2 C und X_3 N darstellt; oder

X_1 NH, X_2 C und X_3 C darstellt; oder

X_1 CH, X_2 N und X_3 C darstellt;

R^1 H, –L-#1 oder $-(CH_2)_{0-3}Z$ darstellt, wobei Z -H, $-NHY^3$, $-OY^3$, $-SY^3$, Halogen, $-CO-NY^1Y^2$, oder $-CO-OY^3$ darstellt,

wobei Y^1 und Y^2 unabhängig voneinander H, NH_2, $-(CH_2CH_2O)_{0-3}-(CH_2)_{0-3}Z'$, oder oder $-CH(CH_2W)Z'$ darstellen, und Y^3 H oder $-(CH_2)_{0-3}Z'$ darstellt, wobei Z' H, NH_2, SO_3H, COOH, -NH-CO-CH_2-CH_2-CH(NH_2)COOH oder –$(CO-NH-CHY^4)_{1-3}$COOH darstellt, wobei W H oder OH darstellt; wobei Y^4 unabhängig voneinander lineares oder verzweigtes, gegebenenfalls mit–$NHCONH_2$ substituiertes, C_{1-6} Alkyl oder gegebenenfalls mit $–NH_2$ substituiertes Aryl oder Benzyl darstellt;

R^2 und R^4 unabhängig voneinander –L-#1, H, $-CO-CHY^4-NHY^5$ oder $-(CH_2)_{0-3}Z$ darstellen, oder R^2 und R^4 gemeinsam (unter Bildung eines Pyrrolidinringes) $–CH_2-CHR^{10}$- oder $-CHR^{10}-CH_2$- darstellen, wobei R^{10} L-#1, H, NH_2, SO_3H, COOH, SH, oder OH darstellt;

wobei Z -H, OY^3, $-SY^3$, Halogen, NHY^3, $-CO-NY^1Y^2$, oder $-CO-OY^3$ darstellt,

wobei Y^1 und Y^2 unabhängig voneinander H, NH_2, oder $-(CH_2)_{0-3}Z'$ darstellen, und Y^3 H oder $-(CH_2)_{0-3}Z'$ darstellt, wobei Z' H, SO_3H, NH_2 oder COOH darstellt;

wobei Y^4 unabhängig voneinander lineares oder verzweigtes, gegebenenfalls mit–$NHCONH_2$ substituiertes, C_{1-6} Alkyl oder gegebenenfalls mit $–NH_2$ substituiertes Aryl oder Benzyl darstellt und Y^5 H oder $–CO-CHY^6-NH_2$ darstellt, wobei Y^6 lineares oder verzweigtes C_{1-6} Alkyl darstellt;

A CO, SO, SO_2, SO_2NH oder CNNH darstellt;

R^3 –L-#1 oder eine gegebenenfalls substituierte Alkyl-, Aryl-, Heteroaryl- Heteroalkyl-, Heterocycloalkyl- Gruppe darstellt,

bevorzugt –L-#1 oder eine C_{1-10}-Alkyl-, C_{6-10}-Aryl-, C_{6-10}-Aralkyl-, C_{5-10}-Heteroalkyl-, C_{1-10}-Alkyl-O-C_{6-10}-Aryl- oder C_{5-10}-Heterocycloalkyl-Gruppe,

die mit 1-3 –OH Gruppen, 1-3 Halogenatomen, 1-3 halogenierte Alkyl-Gruppen (die jeweils 1-3 Halogenatome aufweisen können), 1-3 O-Alkyl Gruppen, 1-3 –SH Gruppen, 1-3 –S-Alkyl

Gruppen, 1-3 –O-CO-Alkyl Gruppen, 1-3 –O-CO-NH-Alkyl Gruppen, 1-3 –NH-CO-Alkyl Gruppen, 1-3 –NH-CO-NH-Alkyl Gruppen, 1-3 –$S(O)_n$-Alkyl Gruppen, 1-3 –SO_2-NH-Alkyl Gruppen, 1-3 –NH-Alkyl Gruppen, 1-3 –$N(Alkyl)_2$ Gruppen, 1-3 –NH_2 Gruppen oder 1-3 –$(CH_2)_{0-3}Z$ Gruppen, wobei Z –H, Halogen, $-OY^3$, $-SY^3$, $-NHY^3$, $-CO-NY^1Y^2$, oder $–CO-OY^3$ darstellt, mit Y^1 und Y^2 unabhängig voneinander H, NH_2, oder $–(CH_2)_{0-3}Z‘$ darstellen, und Y^3 H, $-(CH_2)_{0-3}-CH(NHCOCH_3)Z‘$,$-(CH_2)_{0-3}-CH(NH_2)Z‘$, oder $–(CH_2)_{0-3}Z‘$ darstellt, wobei Z‘ H, SO_3H, NH_2 oder COOH darstellt,
substituiert sein kann (wobei „Alkyl“ bevorzugt C_{1-10}-Alkyl bedeutet);

R^5 –L-#1, H, F, NH_2, NO_2, Halogen, SH oder $–(CH_2)_{0-3}Z$ darstellt, wobei Z –H, OY^3, $-SY^3$, Halogen, NHY^3, $-CO-NY^1Y^2$, oder $–CO-OY^3$ darstellt,
wobei Y^1 und Y^2 unabhängig voneinander H, NH_2, oder $–(CH_2)_{0-3}Z‘$ darstellen, und Y^3 H oder $–(CH_2)_{0-3}Z‘$ darstellt, wobei Z‘ H, SO_3H, NH_2 oder COOH darstellt;
darstellt,

wobei einer der Substituenten R^1, R^2, R^3, R^4 und R^5 –L-#1 darstellt,

L für den Linker steht und #1 für die Bindung zum Binder bzw. Derivat hiervon steht,

R^6 und R^7 unabhängig voneinander H, Cyano, (ggf. fluoriertes) C_{1-10}-Alkyl, (ggf. fluoriertes) C_{2-10}-Alkenyl, (ggf. fluoriertes) C_{2-10}-Alkinyl, Hydroxy oder Halogen darstellen,

R^8 (ggf. fluoriertes) C_{1-10}-Alkyl, (ggf. fluoriertes) C_{4-10}-Cycloalkyl oder optional substituiertes Oxetan darstellt; und

R^9 H, F, CH_3, CF_3, CH_2F oder CHF_2 darstellt;

sowie ihre Salze, Solvate und Salze der Solvate.

15. Konjugat nach Ziffer 14,
wobei R^1 –L-#1, H, $-(CH_2)_{0-3}Z$ darstellt, wobei Z –H, $-CO-NY^1Y^2$, NHY^3, OY^3, $-SY^3$, oder $–CO-OY^3$ darstellt,
mit Y^1 und Y^2 unabhängig voneinander H, NH_2, $-(CH_2CH_2O)_{0-3}-(CH_2)_{0-3}Z‘$, oder oder $–CH(CH_2W)Z‘$, und Y^3 H oder $–(CH_2)_{0-3}Z‘$ darstellt, wobei Z‘ H, NH_2, COOH, $-NH-CO-CH_2-CH_2-CH(NH_2)COOH$ oder $–(CO-NH-CHY^4)_{1-3}COOH$ darstellt; wobei W H oder OH darstellt, wobei Y^4 unabhängig voneinander lineares oder verzweigtes, gegebenenfalls mit–$NHCONH_2$

substituiertes, C_{1-6} Alkyl oder gegebenenfalls mit $-NH_2$ substituiertes Aryl oder Benzyl darstellt;

R^2 und R^4 unabhängig voneinander –L-#1, -CO-CHY^4-NHY^5 oder H oder R^2 und R^4 gemeinsam (unter Bildung eines Pyrrolidinringes) $-CH_2$-CHR^{10}- darstellen, wobei R^{10} H, –L-#1, NH_2, COOH, SH, OH oder SO_3H darstellt;

wobei Y^4 unabhängig voneinander lineares oder verzweigtes, gegebenenfalls mit–$NHCONH_2$ substituiertes, C_{1-6} Alkyl oder gegebenenfalls mit $-NH_2$ substituiertes Aryl oder Benzyl darstellt und Y^5 H oder –CO-CHY^6-NH_2 darstellt, wobei Y^6 lineares oder verzweigtes C_{1-6} Alkyl darstellt;

A CO darstellt,

R^3 –(CH_2)OH oder –L-#1 darstellt, und

R^5 –L-#1 oder H darstellt,

wobei einer der Substituenten R^1, R^2, R^3, R^4 und R^5 –L-#1 darstellt.

16. Konjugat nach Ziffer 14 oder 15,
wobei R^6 und R^7 unabhängig voneinander H, C_{1-3}-Alkyl oder Halogen darstellen.

17. Konjugat nach einem oder mehreren der Ziffern 14 bis 16,
wobei R^8 C_{1-4}-Alkyl (vorzugsweise tert-butyl) darstellt.

18. Konjugat nach einem oder mehreren der Ziffern 14 bis 17,
wobei R^9 H darstellt.

19. Konjugat nach einem oder mehreren der Ziffern 14 bis 18, wobei R^6 und R^7 F darstellen.

20. Konjugat nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ziffern, wobei der Linker –L- eine der folgenden Grundstrukturen (i) bis (iv) aufweist:

(i) $-(CO)_m$–SG1-L1-L2-

(ii) $-(CO)_m$ –L1-SG-L1-L2-

(iii)-$(CO)_m$ –L1-L2-

(iv) –$(CO)_m$ –L1-SG-L2

wobei m 0 oder 1 ist, SG und SG1 eine *in vivo* spaltbare Gruppe ist, L1 unabhängig voneinander für *in vivo* nicht spaltbare organische Gruppen stehen, und L2 für eine Kopplungsgruppe an den Binder steht.

21. Konjugat nach Ziffer 20, wobei die *in vivo* spaltbare Gruppe SG eine 2-8 Oligopeptidgruppe, bevorzugt eine Dipeptidgruppe oder ein Disulfid, ein Hydrazon, ein Acetal oder ein Aminal ist und SG1 eine 2-8 Oligopeptidgruppe, bevorzugt eine Dipeptidgruppe ist.

22. Konjugat nach einem oder mehreren der Ziffern 2 bis 21,
wobei der Linker an eine Cystein-Seitenkette bzw. Cysteinrest gebunden ist und die folgende Formel aufweist:

§-(CO)m-L1-L2-§§

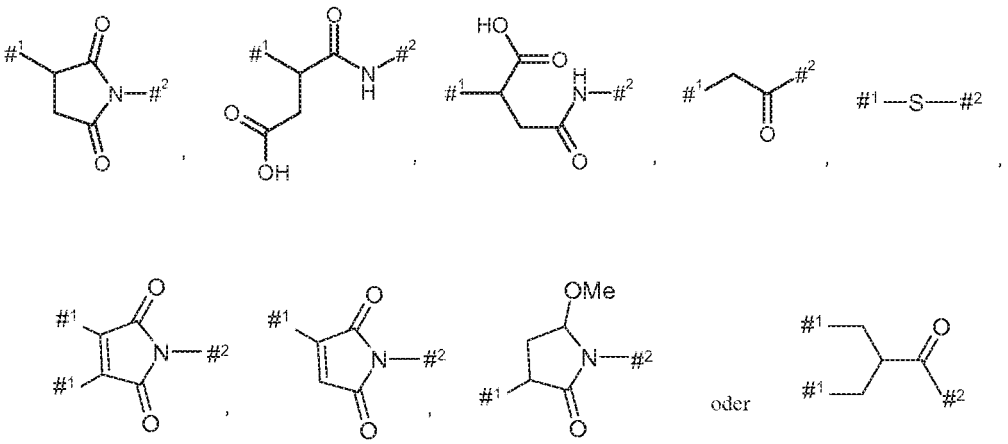
wobei

m 0 oder 1 ist;

§ die Bindung an das Wirkstoffmolekül darstellt und

§§ die Bindung an das Binderpeptid oder –protein darstellt, und

-L2- für



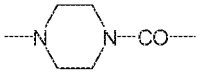
steht, wobei

#1 die Verknüpfungsstelle mit dem Schwefelatom des Binders kennzeichnet,

#2 die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe L^1 kennzeichnet,

L1 –(NR^{10})n-(G1)o-G2- darstellt,

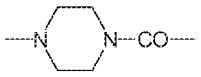
wobei R^{10} H, NH2 oder C1-C3-Alkyl darstellt;

G1 –NHCO- oder  darstellt;

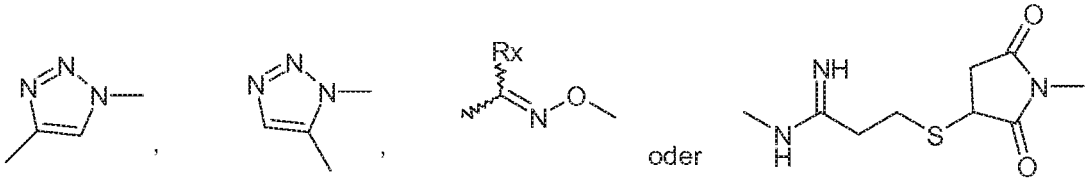
n 0 oder 1 ist;

o 0 oder 1 ist; und

G2 eine geradkettige oder verzweigte Kohlenwasserstoffkette mit 1 bis 100 Kohlenstoffatomen aus Arylengruppen und/oder geradkettigen und/oder verzweigten und/oder cyclischen Alkylengruppen ist, die einfach oder mehrfach durch eine oder mehrere der Gruppen –O-, -S-, , -SO-, SO_2, -NH-, -CO-, -Nme-, -NHNH-, -SO_2NHNH-,-NHCO-, -CONH-, -CONHNH- und einen 5 bis 10gliedriger, aromatischen oder nicht aromatischen Heterozyklus mit bis zu 4 Heteroatomen ausgewählt aus N, O und S, -SO-oder –SO2- unterbrochen sein kann

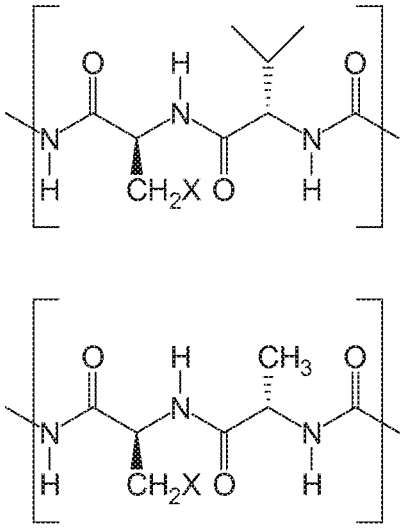
(vorzugsweise ), wobei die Seitenketten, sofern vorhanden, mit –NHCONH2, -COOH, -OH, $-NH_2$, $NH-CNNH_2$, Sulfonamid, Sulfon, Sulfoxid oder Sulfonsäure substituiert sein können,

oder eine der folgenden Gruppen darstellt:



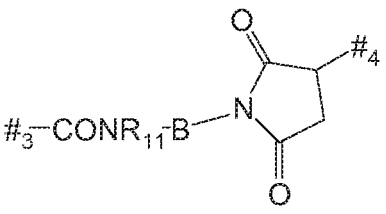
wobei Rx H, C_1-C_3-Alkyl oder Phenyl darstellt.

23. Konjugat nach Ziffer 22, wobei die Kohlenwasserstoffkette durch eine die folgenden Gruppen unterbrochen ist:



wobei X H, eine C_{1-10}-Alkylgruppe ist, die gegebenenfalls mit –$NHCONH_2$, -COOH, -OH, NH_2, $-NH-CNNH_2$, Sulfon, Sulfoxid oder Sulfonsäure substituiert sein kann.

24. Konjugat nach Ziffer 22, wobei der Linker die folgende Formel aufweist:



wobei

#3 die Bindung an das Wirkstoffmolekül darstellt,

#4 die Bindung an das Binderpeptid oder –protein darstellt,

R^{11} H oder NH_2 darstellt;

B $-[(CH_2)_x-(X^4)_y]_w-(CH_2)_z-$ darstellt,

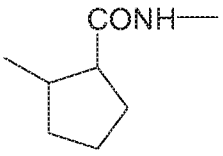
w = 0 bis 20 ist;

x = 0 bis 5 ist;

x = 0 bis 5 ist;

y = 0 oder 1 ist;

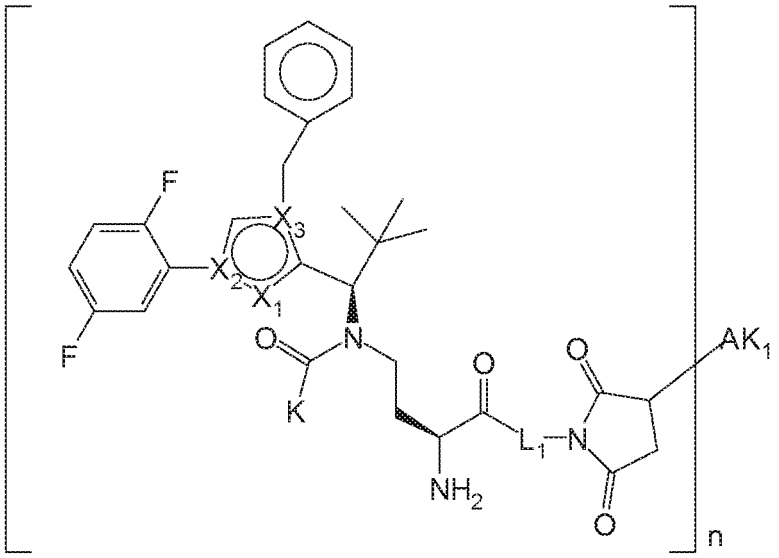
z = 0 bis 5 ist; und

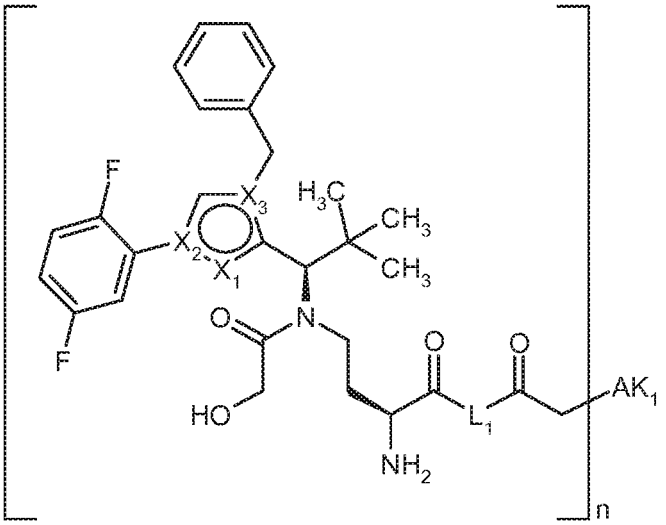
X^4 –O-, -CONH- oder –NHCO- 

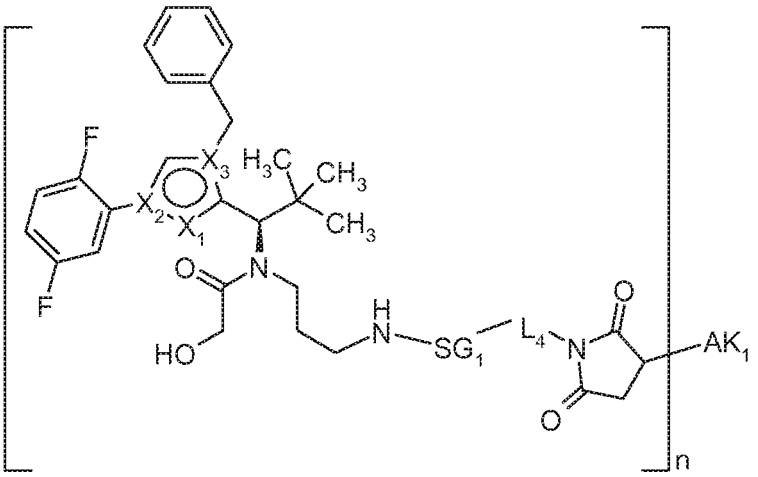
darstellt.

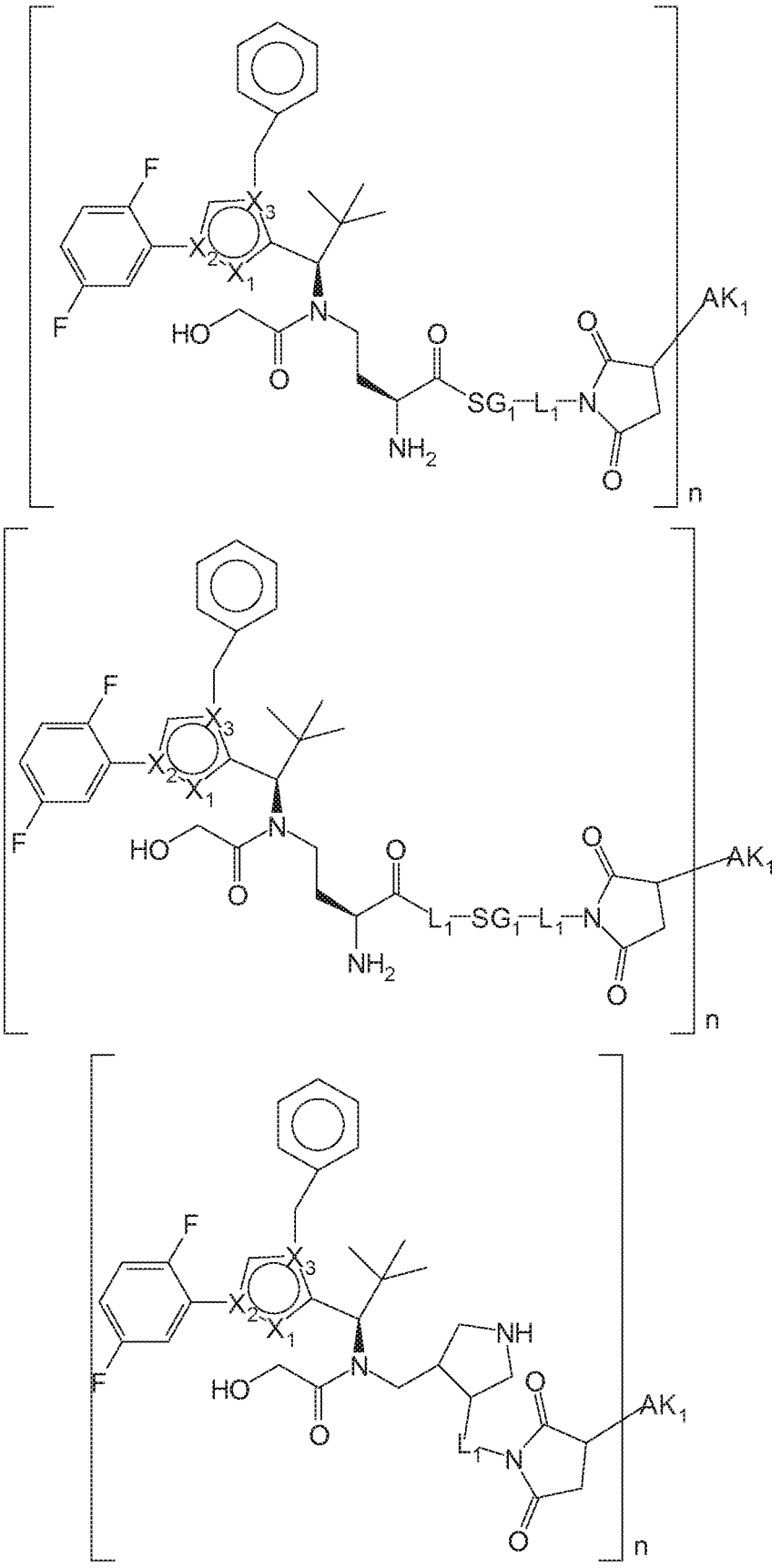
25. Konjugat nach Ziffer 24, wobei R^1 oder R^4 –L-#1 darstellt.

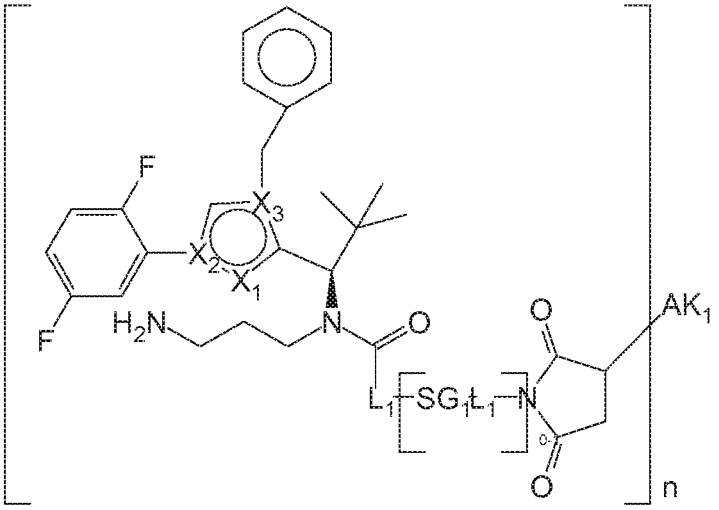
26. Konjugat nach einem oder mehreren der Ziffern 21 bis 25, wobei das Konjugat eine der folgenden Formeln aufweist:

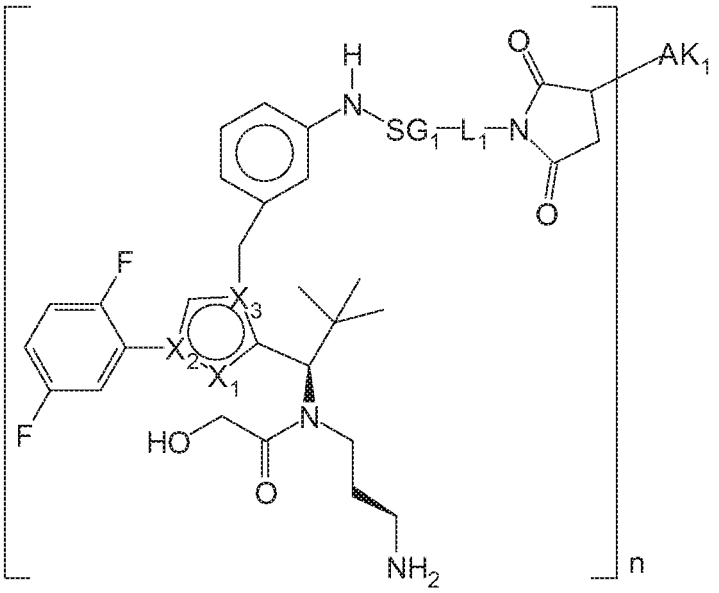








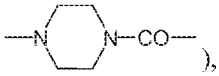




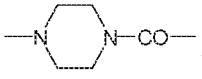
wobei

X_1, X_2 und X_3 die gleiche Bedeutung aufweisen wie in Ziffer 14,

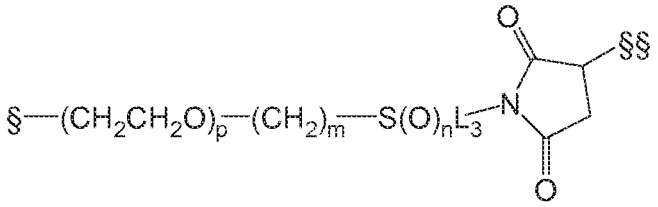
AK_1 ein Binderpeptid oder-protein darstellt, das über ein Schwefelatom des Binders gebunden ist; n eine Zahl von 1 bis 20 darstellt; und L1 eine gegebenenfalls verzweigte Kohlenwasserstoffgruppe mit 1 bis 70 Kohlenstoffatomen ist, die eine geradkettige oder verzweigte Kohlenwasserstoffkette mit 1 bis 100 Kohlenstoffatomen aus Arylengruppen und/oder geradkettigen und/oder verzweigten und/oder cyclischen Alkylengruppen ist, die einfach oder mehrfach durch eine oder mehrere der Gruppen –O-, -S-, , -SO-, SO_2, -NH-, -CO-,

-CONH-, -NHCO-, -Nme-, -NHNH-, -SO2NHNH-, -CONHNH- und einen 5 bis 10gliedriger, aromatischen oder nicht aromatischen Heterozyklus mit bis zu 4 Heteroatomen ausgewählt aus N, O und S, -SO- oder –SO2- unterbrochen sein kann (vorzugsweise ), wobei die Seitenketten, sofern vorhanden, mit –NHCONH2, -COOH, -OH, -NH_2, NH-$CNNH_2$, Sulfonamid, Sulfon, Sulfoxid oder Sulfonsäure substituiert sein können,

und SG1 ein 2-8 Oligopeptid, bevorzugt ein Dipeptid ist;

L4 eine Einfachbindung oder eine Gruppe –$(CO)_y$-G4- darstellt, wobei y 0 oder 1 darstellt, und G4 eine geradkettige oder verzweigte Kohlenwasserstoffkette mit 1 bis 100 Kohlenstoffatomen aus Arylengruppen und/oder geradkettigen und/oder verzweigten und/oder cyclischen Alkylengruppen ist, die einfach oder mehrfach durch eine oder mehrere der Gruppen –O-, -S-, -SO-, SO_2, -NH-, -CO-, -NHCO-, -CONH-, -Nme-, -NHNH-, -SO2NHNH-, -CONHNH- und einen 5 bis 10gliedriger, aromatischen oder nicht aromatischen Heterozyklus mit bis zu 4 Heteroatomen ausgewählt aus N, O und S, -SO-oder –SO2- unterbrochen sein kann (vorzugsweise ), wobei die Seitenketten, sofern vorhanden, mit –NHCONH2, -COOH, -OH, -NH_2, NH-$CNNH_2$, Sulfonamid, Sulfon, Sulfoxid oder Sulfonsäure substituiert sein können.

27. Konjugat nach einem oder mehreren der Ziffern 1 bis 21, wobei der Linker –L- an eine Cystein-Seitenkette bzw. Cysteinrest gebunden ist und die folgende Formel aufweist:



wobei

§ die Bindung an das Wirkstoffmolekül darstellt und

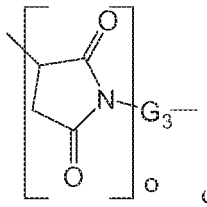
§§ die Bindung an das Binderpeptid oder –protein darstellt,

m 0, 1, 2, oder 3 ist;

n 0, 1 oder 2 ist;

p 0 bis 20 beträgt; und

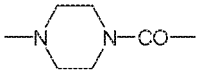
L3


darstellt;

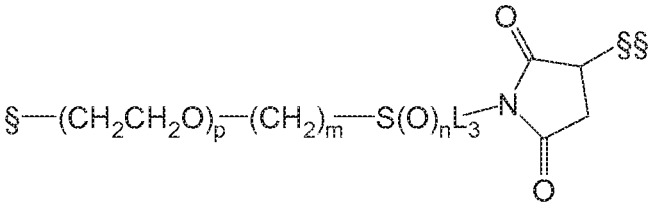
wobei

o 0 oder 1 ist;

und

G3 eine geradkettige oder verzweigte Kohlenwasserstoffkette mit 1 bis 100 Kohlenstoffatomen aus Arylengruppen und/oder geradkettigen und/oder verzweigten und/oder cyclischen Alkylengruppen ist, die einfach oder mehrfach durch eine oder mehrere der Gruppen -0-, -S-, -SO-, SO2, -NH-, -CO-, -NHCO, -CONH- und einen 5 bis 10gliedriger, aromatischen oder nicht aromatischen Heterozyklus mit bis zu 4 Heteroatomen ausgewählt aus N, O und S, -, -Nme-, -NHNH-, -SO2NHNH-, -CONHNH- -SO-oder –SO2- unterbrochen sein kann (vorzugsweise ), wobei die Seitenketten, sofern vorhanden, mit –NHCONH2, -COOH, -OH, Sulfon, Sulfoxid oder Sulfonsäure substituiert sein können.

28. Konjugat nach Ziffer 27, wobei der Linker –L- an eine Cystein-Seitenkette bzw. Cysteinrest gebunden ist und die folgende Formel aufweist:



wobei

§ die Bindung an das Wirkstoffmolekül darstellt und

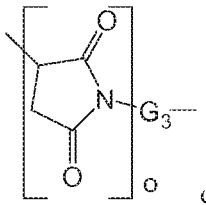
§§ die Bindung an das Binderpeptid oder –protein darstellt,

m 1 ist;

p 0 ist;

n 0 ist;

und L3



darstellt;

wobei

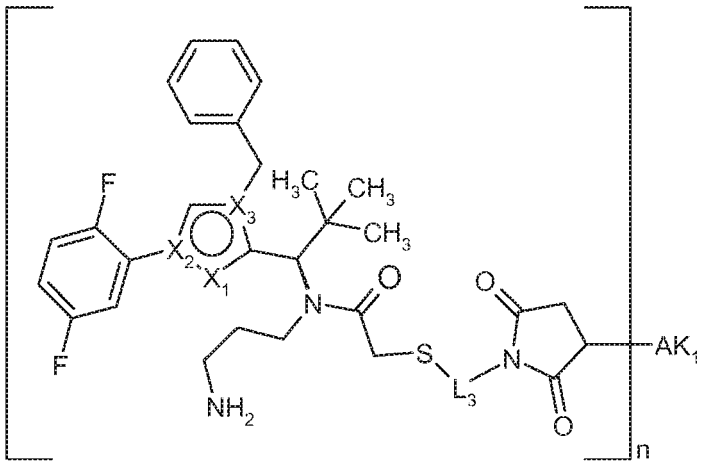
o 0 oder 1 ist; und

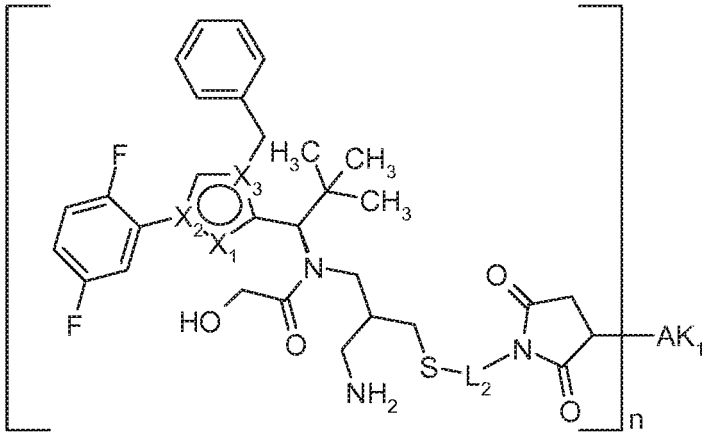
G3 –(CH2CH2O)$_s$(CH2)$_t$(CONH)$_u$ (CH2CH2O)$_v$(CH2)$_w$- darstellt, wobei

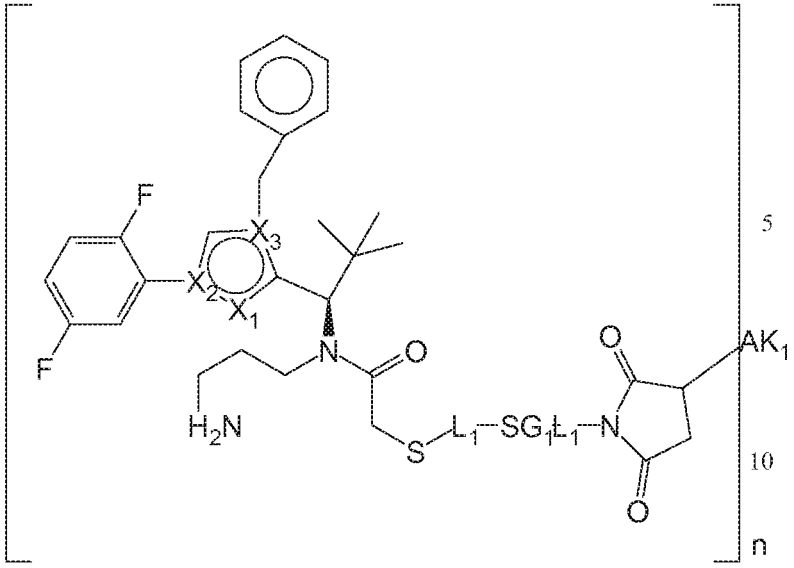
s, t, v und w jeweils unabhängig voneinander 0 bis 20 betragen, und u 0 oder 1 beträgt.

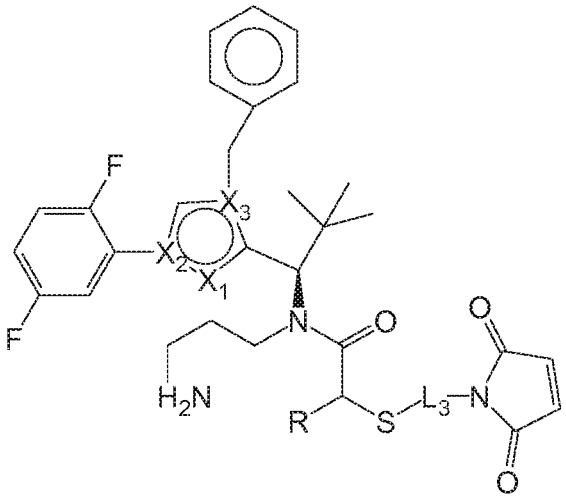
29. Konjugat nach Ziffer 27 oder 28, wobei R^2 oder R^3 –L-#1 darstellt.

30. Konjugat nach Ziffer 29, wobei das Konjugat eine der folgenden Formeln aufweist:

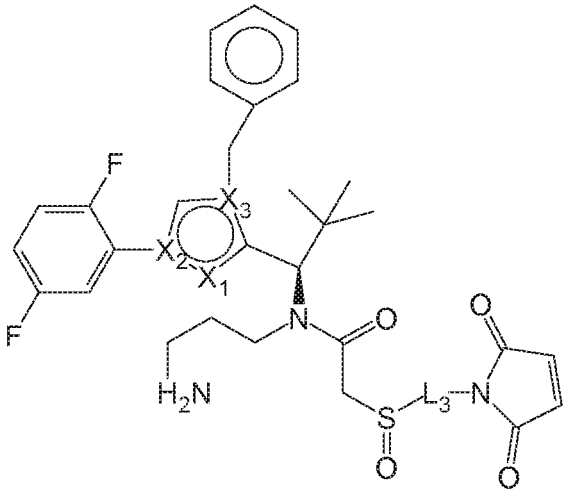




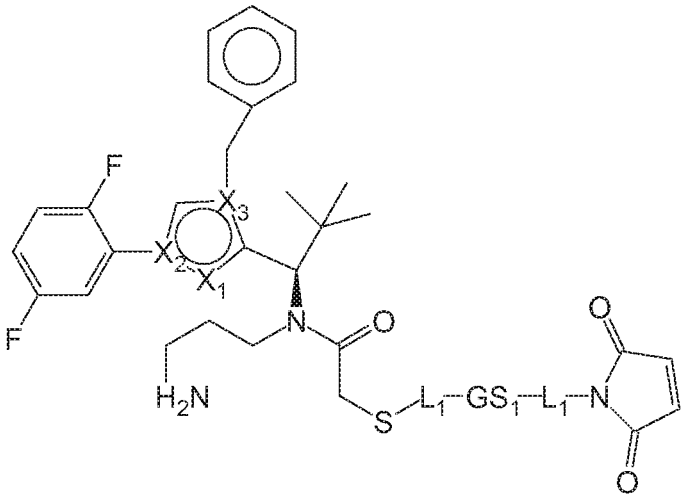




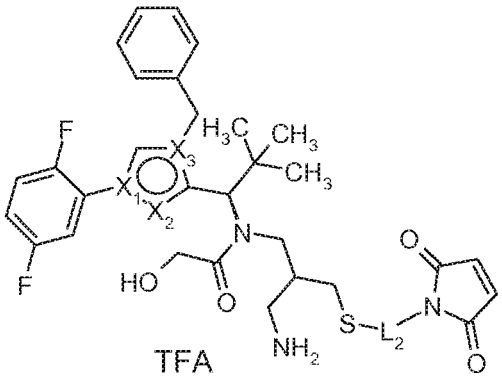
TFA



TFA



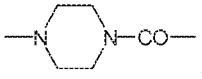
TFA



TFA

wobei

X_1, X_2 und X_3 die gleiche Bedeutung aufweisen wie in Ziffer 14,

AK_1 ein Binderpeptid oder-protein darstellt, das über ein Schwefelatom des Binders angebunden ist; n eine Zahl von 1 bis 20 darstellt; und L2 und L3 eine gegebenenfalls verzweigte geradkettige oder verzweigte Kohlenwasserstoffkette mit 1 bis 100 Kohlenstoffatomen aus Arylengruppen und/oder geradkettigen und/oder verzweigten und/oder cyclischen Alkylengruppen ist, die einfach oder mehrfach durch eine oder mehrere der Gruppen –O-, -S-, , -SO-, SO_2, -NH-, -CO-, -Nme-, -NHNH-, $-SO_2NHNH-$,-NHCO-, -CONH-, -CONHNH- und einen 5 bis 10gliedriger, aromatischen oder nicht aromatischen Heterozyklus mit bis zu 4 Heteroatomen ausgewählt aus N, O und S, -SO-oder –SO2- unterbrochen sein kann (vorzugsweise ), wobei die Seitenketten, sofern vorhanden, mit –NHCONH2, -COOH, -OH, $-NH_2$, NH-$CNNH_2$, Sulfonamid, Sulfon, Sulfoxid oder Sulfonsäure substituiert sein können.

31. Konjugat nach einem oder mehreren der Ziffern 1 bis 21, wobei der Linker –L- an eine Lysin-Seitenkette gebunden ist und die folgende Formel aufweist:

$$-\S-(SG)_x-L4-CO-\S\S,$$

wobei

§ die Bindung an das Wirkstoffmolekül darstellt und

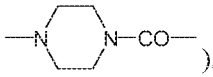
§§ die Bindung an das Binderpeptid oder –protein darstellt,

x 0 oder 1 darstellt,

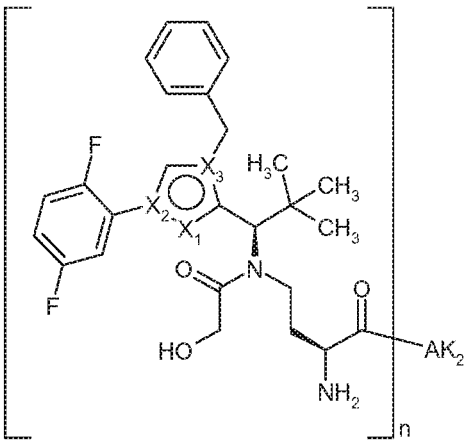
SG eine spaltbare Gruppe, vorzugsweise ein 2-8 Oligopeptid, besonders bevorzugt ein Dipeptid darstellt,

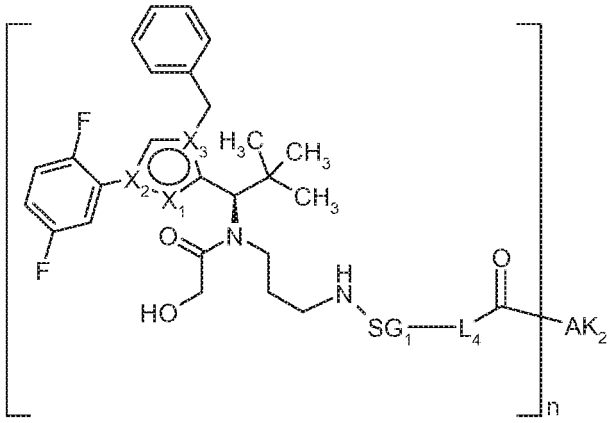
und

L4 eine Einfachbindung oder eine Gruppe $-(CO)_y$-G4- darstellt, wobei y 0 oder 1 darstellt, und G4 eine geradkettige oder verzweigte Kohlenwasserstoffkette mit 1 bis 100 Kohlenstoffatomen aus Arylengruppen und/oder geradkettigen und/oder verzweigten und/oder cyclischen Alkylengruppen ist, die einfach oder mehrfach durch eine oder mehrere der Gruppen –O-, -S-, -SO-, SO_2, -NH-, -CO-, -NHCO-, -CONH-, -Nme-, -NHNH-, -SO2NHNH-, -CONHNH- und einen 5 bis 10gliedriger, aromatischen oder nicht aromatischen Heterozyklus mit bis zu 4

Heteroatomen ausgewählt aus N, O und S, oder –SO- unterbrochen sein kann (vorzugsweise ), wobei die Seitenketten, sofern vorhanden, mit $-NHCONH_2$, -COOH, -OH, $-NH_2$, $NH\text{-}CNNH_2$, Sulfonamid, Sulfon, Sulfoxid oder Sulfonsäure substituiert sein können.

32. Konjugat eines Binderpeptids oder –proteins nach Ziffer 31, wobei das Konjugat eine der folgenden Formeln aufweist:

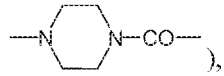




wobei

X_1, X_2 und X_3 die gleiche Bedeutung aufweisen wie in Ziffer 14,

AK_2 ein Binderpeptid oder-protein darstellt, das über ein Schwefelatom des Binders angebunden ist; n eine Zahl von 1 bis 20 darstellt; und L4 eine gegebenenfalls geradkettige oder verzweigte Kohlenwasserstoffkette mit 1 bis 100 Kohlenstoffatomen aus Arylengruppen und/oder geradkettigen und/oder verzweigten und/oder cyclischen Alkylengruppen ist, die einfach oder mehrfach durch eine oder mehrere der Gruppen –O-, -S-, , -SO-, SO_2, -NH-, -CO-, -Nme-, -

NHNH-, -SO_2NHNH-,-NHCO-, -CONH-, -CONHNH- und einen 5 bis 10gliedriger, aromatischen oder nicht aromatischen Heterozyklus mit bis zu 4 Heteroatomen ausgewählt aus N, O und S, -SO- oder –SO2- unterbrochen sein kann (vorzugsweise ), wobei die Seitenketten, sofern vorhanden, mit –NHCONH$_2$, -COOH, -OH, -NH_2, NH-CNNH$_2$, Sulfonamid, Sulfon, Sulfoxid oder Sulfonsäure substituiert sein können, und

SG1 eine spaltbare Gruppe, vorzugsweise ein 2-8 Oligopeptid, besonders bevorzugt ein Dipeptid darstellt.

33. Konjugat nach einem oder mehreren der Ziffern 10 bis 32, wobei der anti-TWEAKR-Antikörper ein agonistischer Antikörper ist.

34. Konjugat einem oder mehreren der Ziffern 10 bis 33, der umfasst:

eine variable schwere Kette umfassend:

a. eine CDR1 der schweren Kette, die von einer Aminosäuresequenz umfassend die Formel PYPMX (SEQ ID NO: 171) kodiert wird, wobei X I oder M ist;

b. eine CDR2 der schweren Kette, die von einer Aminosäuresequenz umfassend die Formel YISPSGGXTHYADSVKG (SEQ ID NO: 172) kodiert wird, wobei X S oder K ist; und

c. eine CDR3 der schweren Kette, die von einer Aminosäuresequenz umfassend die Formel GGDTYFDYFDY (SEQ ID NO: 173) kodiert wird;

und eine variable leichte Kette umfassend:

d. eine CDR1 der leichten Kette, die von einer Aminosäuresequenz umfassend die Formel RASQSISXYLN (SEQ ID NO: 174) kodiert wird, wobei X G oder S ist;

e. eine CDR2 der leichten Kette, die von einer Aminosäuresequenz umfassend die Formel XASSLQS (SEQ ID NO: 175) kodiert wird, wobei X Q , A oder N ist; und

f. eine CDR3 der leichten Kette, die von einer Aminosäuresequenz umfassend die Formel QQSYXXPXIT (SEQ ID NO: 176) kodiert wird, wobei X an der Position 5 T oder S ist, X an der Position 6 T oder S ist und X an der Position 8 G oder F ist.

35. Konjugat einem oder mehreren der Ziffern 10 bis 34, umfassend:

a. eine variable Sequenz der schweren Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:10 , sowie eine variable Sequenz der leichten Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:9 oder

b. eine variable Sequenz der schweren Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:20 , sowie eine variable Sequenz der leichten Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:19 oder

c. eine variable Sequenz der schweren Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:30 , sowie eine variable Sequenz der leichten Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:29 oder

d. eine variable Sequenz der schweren Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:40 , sowie eine variable Sequenz der leichten Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:39 oder

e. eine variable Sequenz der schweren Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:50 , sowie eine variable Sequenz der leichten Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:49 oder

f. eine variable Sequenz der schweren Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:60 , sowie eine variable Sequenz der leichten Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:59 oder

g. eine variable Sequenz der schweren Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:70 , sowie eine variable Sequenz der leichten Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:69 oder

h. eine variable Sequenz der schweren Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:80 , sowie eine variable Sequenz der leichten Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:79 oder

i. eine variable Sequenz der schweren Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:90 , sowie eine variable Sequenz der leichten Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:89 oder

j. eine variable Sequenz der schweren Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:100 , sowie eine variable Sequenz der leichten Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:99 oder

k. eine variable Sequenz der schweren Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:110 , sowie eine variable Sequenz der leichten Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:109 oder

l. eine variable Sequenz der schweren Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:120 , sowie eine variable Sequenz der leichten Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:119.

36. Konjugat einem oder mehreren der Ziffern 10 bis 35, wobei der Antikörper ein IgG Antikörper ist.

37. Konjugat einem oder mehreren der Ziffern 10 bis 36, umfassend:

a. eine Sequenz der schweren Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:2 , sowie eine Sequenz der leichten Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:1 oder

b. eine Sequenz der schweren Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:12, sowie eine Sequenz der leichten Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:11 oder

c. eine Sequenz der schweren Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:22, sowie eine Sequenz der leichten Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:21 oder

d. eine Sequenz der schweren Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:32, sowie eine Sequenz der leichten Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:31 oder

e. eine Sequenz der schweren Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:42, sowie eine Sequenz der leichten Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:41 oder

f. eine Sequenz der schweren Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:52, sowie eine Sequenz der leichten Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:51 oder

g. eine Sequenz der schweren Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:62, sowie eine Sequenz der leichten Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:61 oder

h. eine Sequenz der schweren Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:72, sowie eine Sequenz der leichten Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:71 oder

i. eine Sequenz der schweren Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:82, sowie eine Sequenz der leichten Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:81 oder

j. eine Sequenz der schweren Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:92, sowie eine Sequenz der leichten Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:91 oder

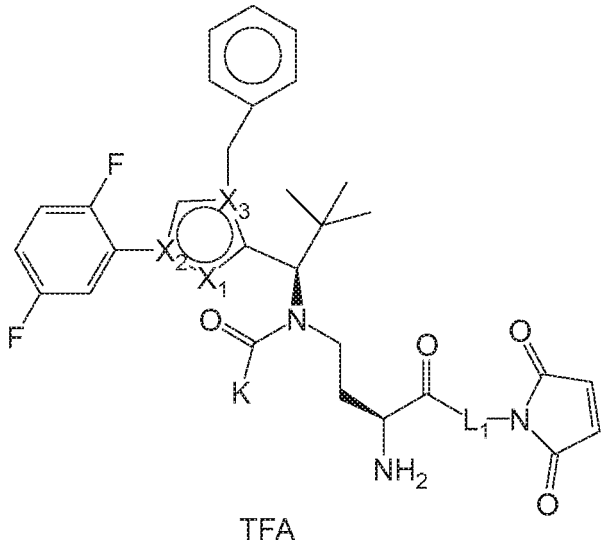
k. eine Sequenz der schweren Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:102, sowie eine Sequenz der leichten Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:101 oder

l. eine Sequenz der schweren Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:112, sowie eine Sequenz der leichten Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:111.

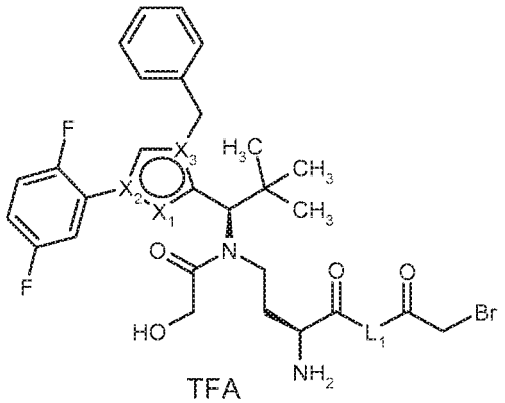
38. SpindelKonjugat nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ziffern, wobei das Konjugat 1 bis 10, vorzugsweise 2 bis 8, Wirkstoffmoleküle pro Binderpeptid oder –protein aufweist.

39. Verfahren zur Herstellung des Konjugats nach Ziffer 26 oder 30, wobei eine Verbindung einer der folgenden Formeln, vorzugsweise in Form ihres Trifluoressigsäuresalzes, an einen

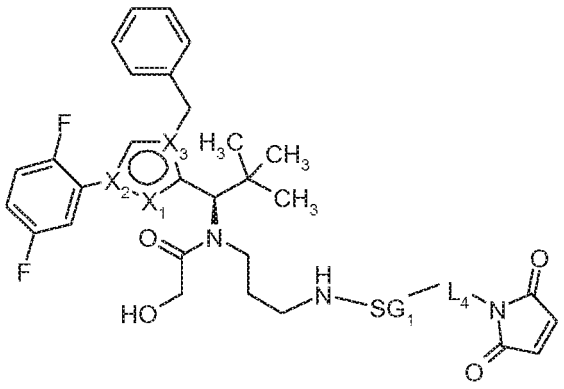
Cysteinrest eines zuvor ggf. partiell reduzierten Binderpeptids oder –proteins gebunden wird, wobei die Verbindung vorzugsweise in 2 bis 12 fachem molaren Überschuss gegenüber dem Binderpeptid- oder protein verwendet wird:

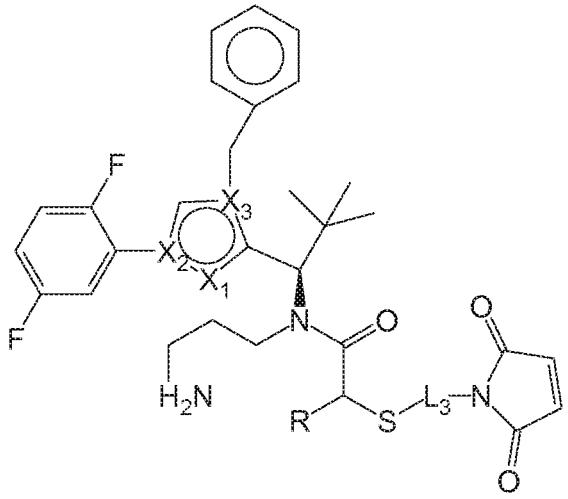


TFA

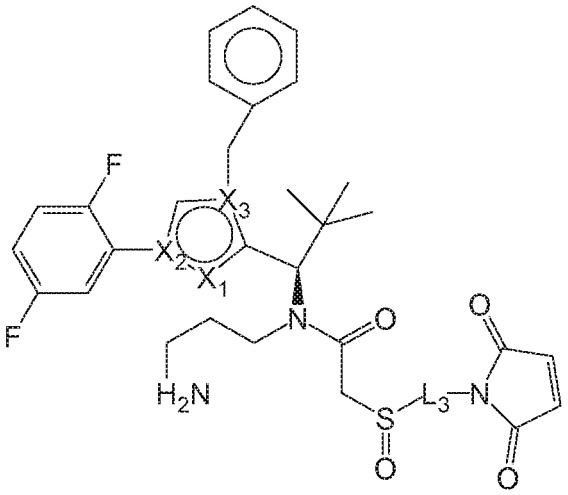


TFA

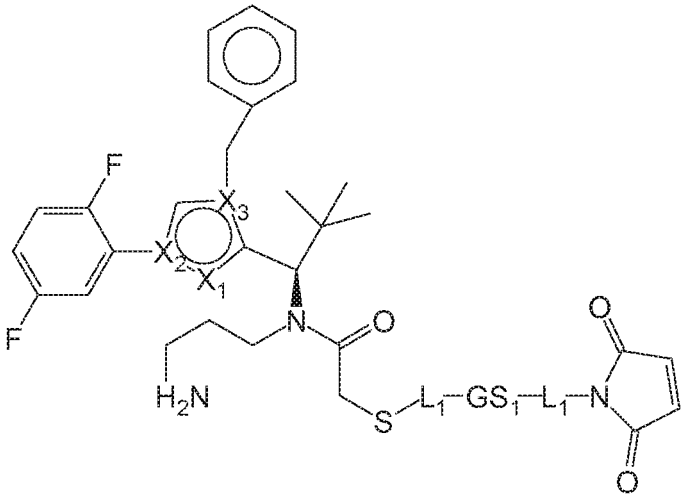




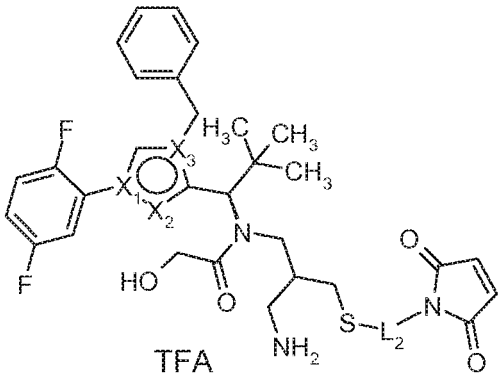
TFA



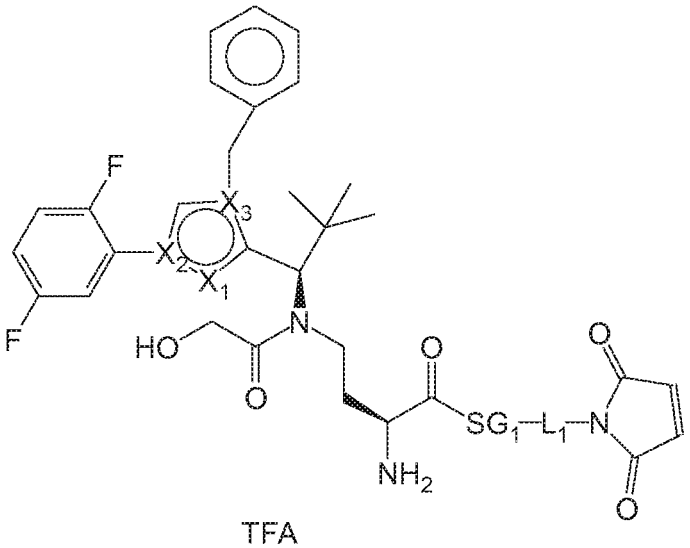
TFA



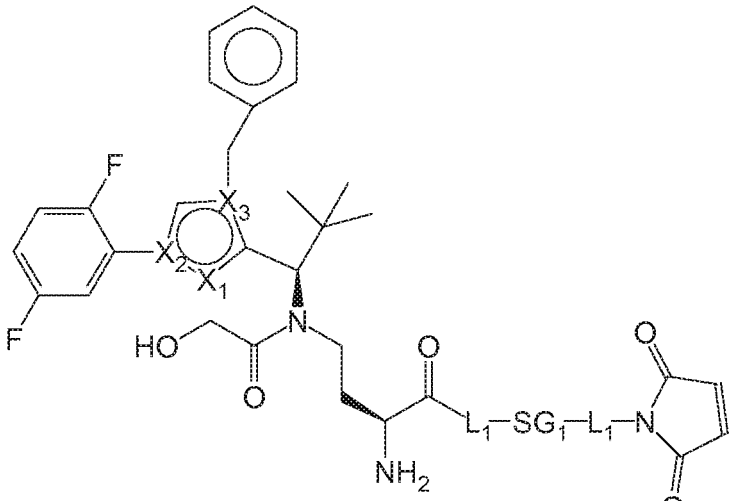
TFA



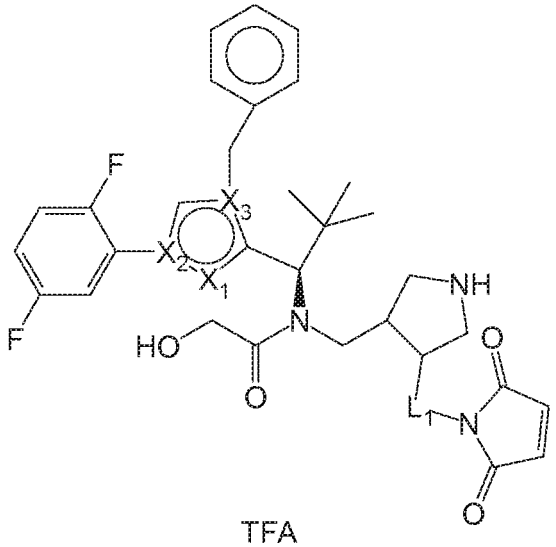
TFA



TFA

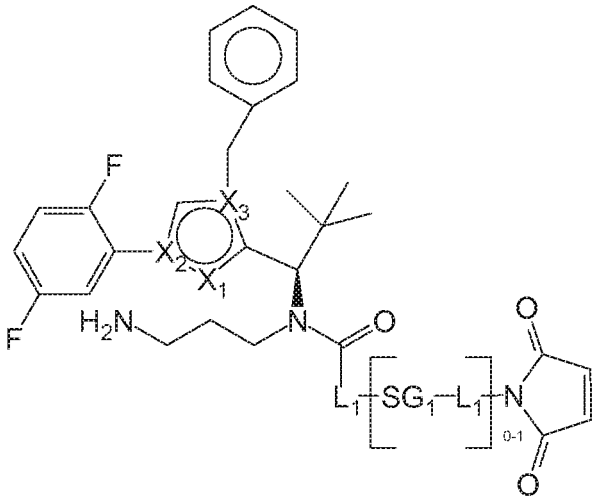


TFA

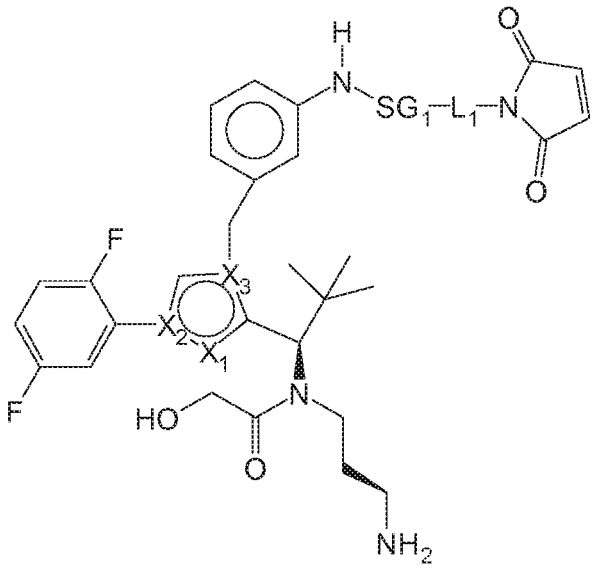


TFA

5



TFA



TFA

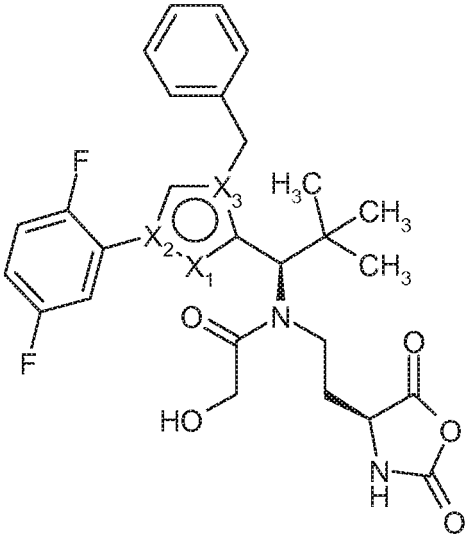
wobei R –H oder –COOH darstellt,

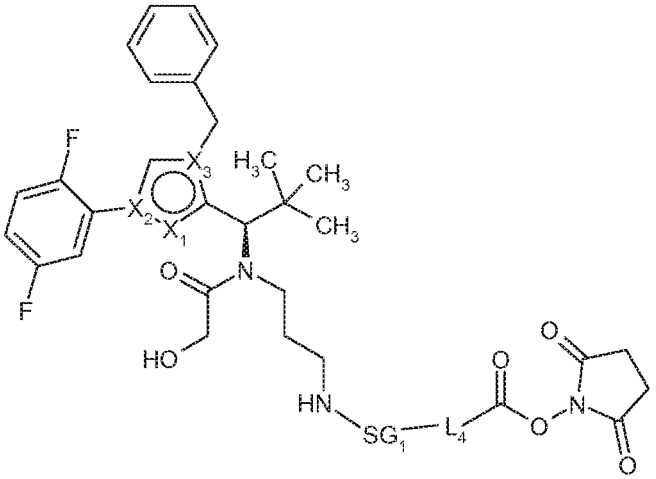
wobei K lineares oder verzweigtes gegebenenfalls substituiertes mit C_1-C_6 Alkoxy oder –OH C_1-C_6 Alkyl sarstellt, und

wobei X_1, X_2, X_3, SG1, L1, L2, L3 und L4 die gleiche Bedeutung haben wie in Anspruch 26, bzw. 30.

40. Verfahren zur Herstellung des Konjugats nach Ziffer 32, wobei eine Verbindung einer der folgenden Formeln, vorzugsweise in Form ihres Trifluoressigsäuresalzes, an einen Lysinrest

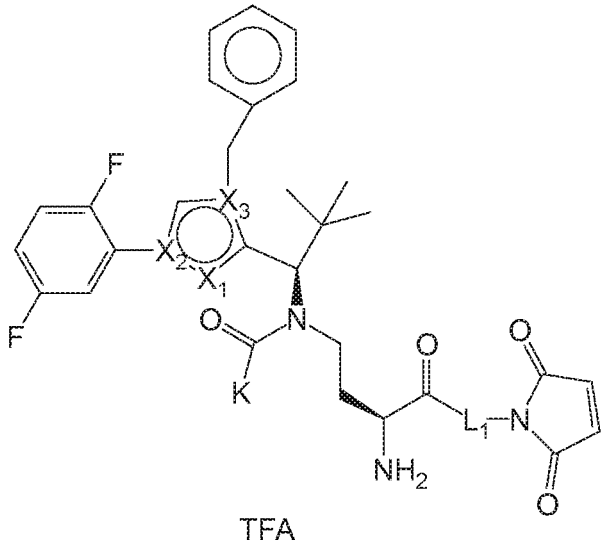
eines Binderpeptids oder –proteins gebunden wird, wobei die Verbindung vorzugsweise in 2 bis 12 fachem molaren Überschuss gegenüber dem Binderpeptid- oder protein verwendet wird:



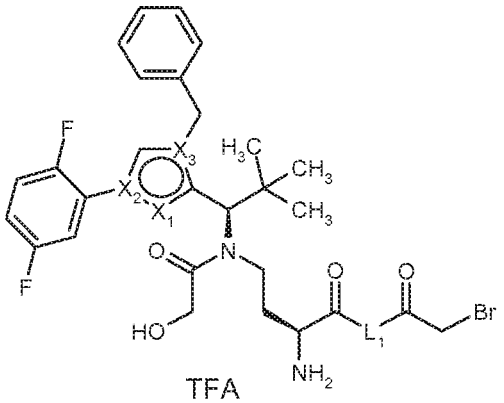


wobei X_1, X_2, X_3, SG1, und L4 die gleiche Bedeutung haben wie in Anspruch 32.

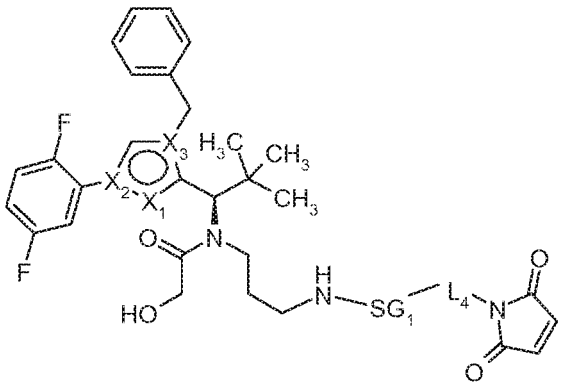
41. Verbindung einer der folgenden Formeln:

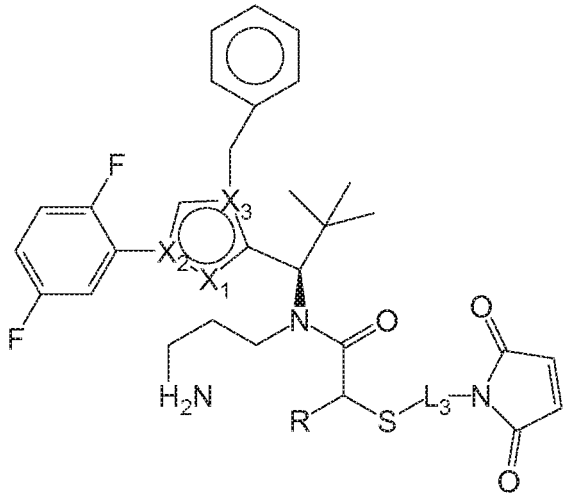


TFA

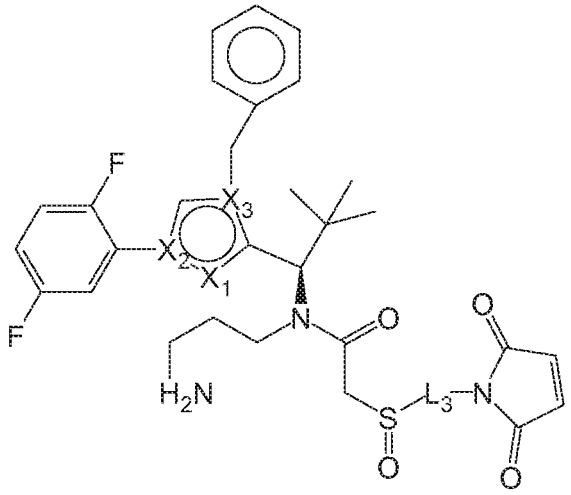


TFA

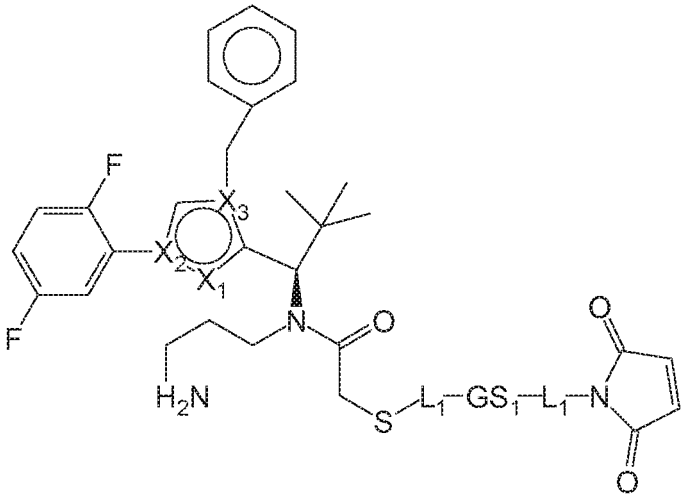




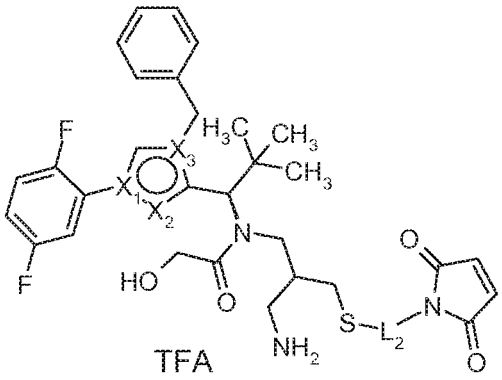
TFA



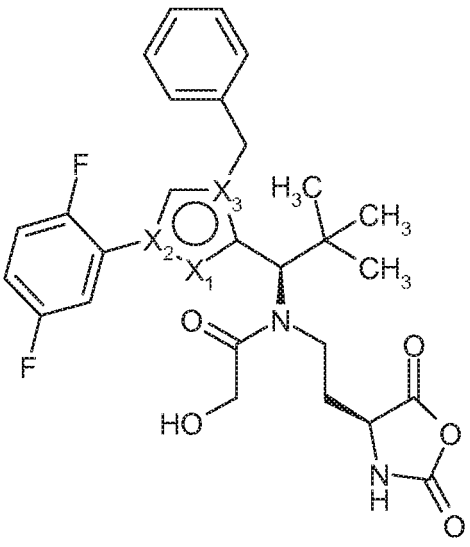
TFA



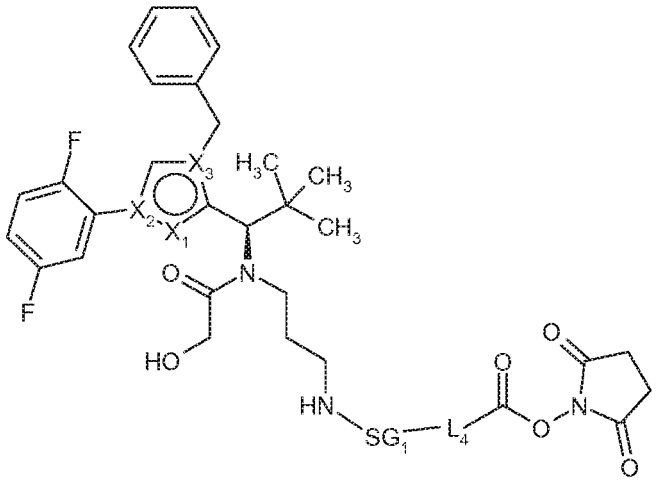
TFA

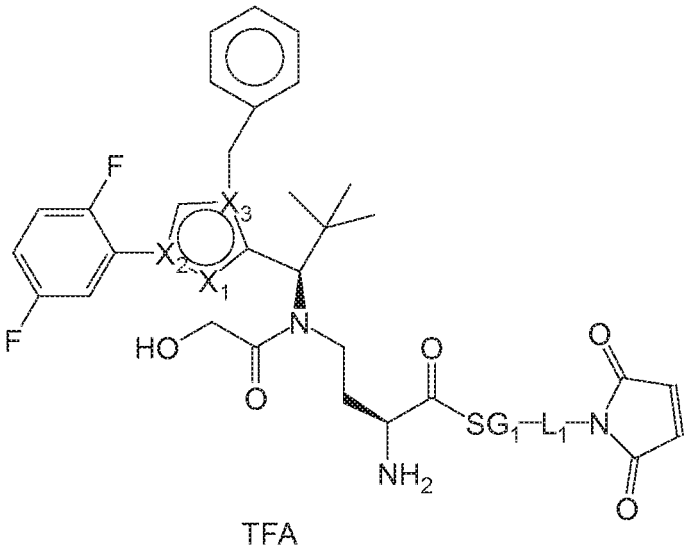


TFA

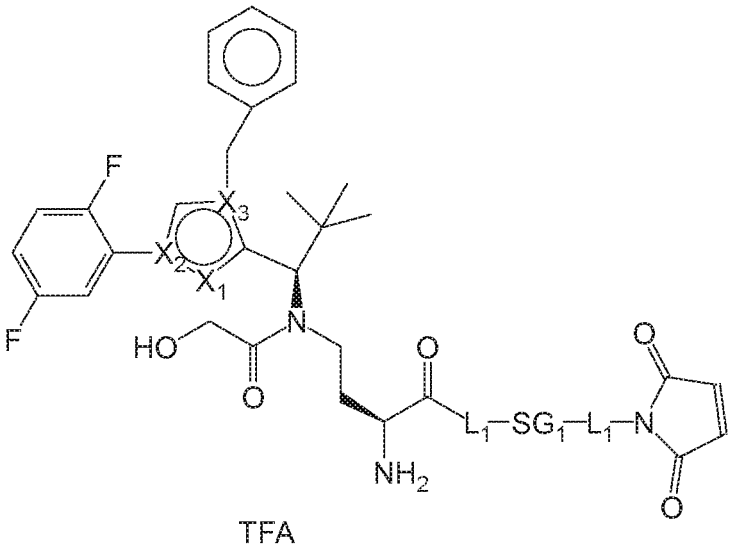


5

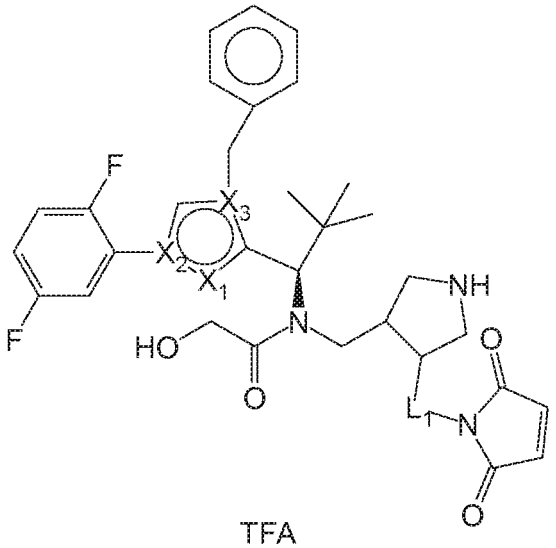




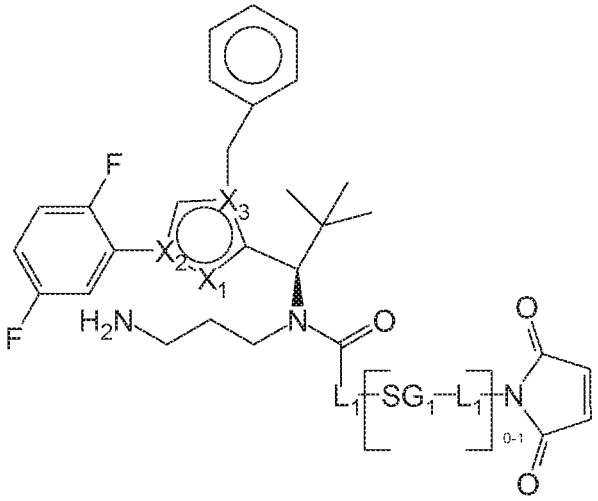
TFA



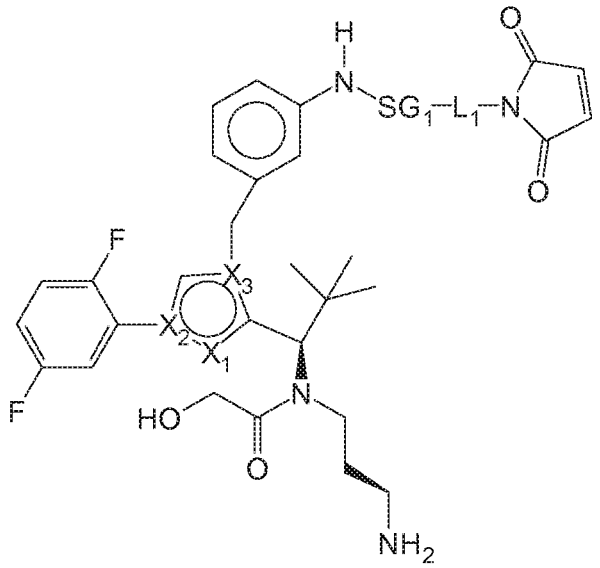
TFA



TFA



TFA



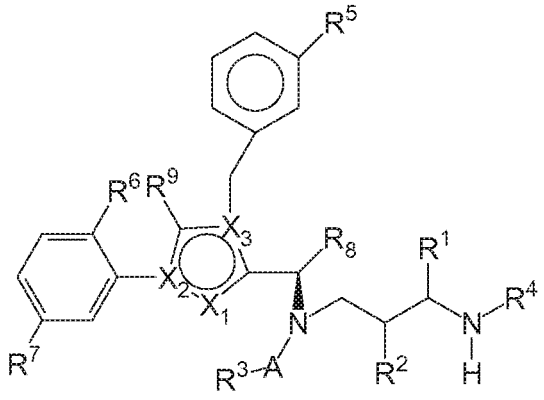
TFA

wobei R –H oder –COOH darstellt,

wobei K lineares oder verzweigtes gegebenenfalls substituiertes mit C_1-C_6 Alkoxy oder –OH C_1-C_6 Alkyl sarstellt, und

wobei X_1, X_2, X_3, SG1, L1, L2, L3 und L4 die gleiche Bedeutung haben wie in Ziffer 26, 30 bzw. 32.

42. Verbindungen der allgemeinen Formel (III):



(III)

wobei

X_1 N, X_2 N und X_3 C darstellt, oder X_1 CH, X_2 C und X_3 N darstellt oder X_1 NH, X_2 C und X_3 C darstellt, oder X_1 CH, X_2 N und X_3 C darstellt;

R^1 –L-BINDER, H, oder $-(CH_2)_{0-3}Z$ darstellt, wobei Z –H, $-NHY^3$, $-OY^3$, $-SY^3$, Halogen, $-CO-NY^1Y^2$, oder $-CO-OY^3$ darstellt,

wobei Y^1 und Y^2 unabhängig voneinander H, NH2, $-(CH_2CH_2O)_{0-3}-(CH_2)_{0-3}Z'$, oder $-CH(CH_2W)Z'$ darstellen, und Y^3 H oder $-(CH_2)_{0-3}Z'$ darstellt, wobei Z' H, NH_2, SO_3H, COOH, $-NH-CO-CH_2-CH_2-CH(NH_2)COOH$ oder $-(CO-NH-CHY^4)_{1-3}COOH$ darstellt, wobei W H oder OH darstellt;

wobei Y^4 unabhängig voneinander lineares oder verzweigtes, gegebenenfalls mit $-NHCONH_2$ substituiertes, C_{1-6} Alkyl oder gegebenenfalls mit $-NH_2$ substituiertes Aryl oder Benzyl darstellt;

R^2 und R^4 unabhängig voneinander –L-BINDER, H, $-CO-CHY^4-NHY^5$ oder $-(CH_2)_{0-3}Z$ darstellen, oder R^2 und R^4 gemeinsam (unter Bildung eines Pyrrolidinringes) $-CH_2-CHR^{10}-$ oder $-CHR^{10}-CH_2-$ darstellen, wobei R^{10} L-#1, H, NH_2, SO_3H, COOH, SH, oder OH darstellt;
wobei Z –H, Halogen, $-OY^3$, $-SY^3$, NHY^3, $-CO-NY^1Y^2$, oder $-CO-OY^3$ darstellt,
wobei Y^1 und Y^2 unabhängig voneinander H, NH_2, oder $-(CH_2)_{0-3}Z'$ darstellen, und Y^3 H oder $-(CH_2)_{0-3}Z'$ darstellt, wobei Z' H, SO_3H, NH_2 oder COOH darstellt;
wobei Y^4 unabhängig voneinander lineares oder verzweigtes, gegebenenfalls mit $-NHCONH_2$ substituiertes, C_{1-6} Alkyl oder gegebenenfalls mit $-NH_2$ substituiertes Aryl oder Benzyl darstellt und Y^5 H oder $-CO-CHY^6-NH_2$ darstellt, wobei Y^6 lineares oder verzweigtes C_{1-6} Alkyl darstellt;

A CO, SO, SO_2, SO_2NH oder CNNH darstellt;

R^3 –L-BINDER oder eine gegebenenfalls substituierte Alkyl-, Aryl-, Heteroaryl- Heteroalkyl-, Heterocycloalkyl- Gruppe darstellt, bevorzugt –L-#1 oder eine C_{1-10}-Alkyl-, C_{6-10}-Aryl- oder C_{6-10}-Aralkyl-, C_{5-10}-Heteroalkyl-, C_{1-10}-Alkyl-O-C_{6-10}-Aryl- oder C_{5-10}-Heterocycloalkyl-Gruppe, die mit 1-3 –OH Gruppen, 1-3 Halogenatomen, 1-3 halogenierten Alkylgruppen (die jeweils 1-3 Halogenatome aufweisen), 1-3 O-Alkyl Gruppen, 1-3 –SH Gruppen, 1-3 –S-Alkyl Gruppen, 1-3 –O-CO-Alkyl Gruppen, 1-3 –O-CO-NH-Alkyl Gruppen, 1-3 –NH-CO-Alkyl Gruppen, 1-3 –NH-CO-NH-Alkyl Gruppen, 1-3 $-S(O)_n$-Alkyl Gruppen, 1-3 $-SO_2$-NH-Alkyl Gruppen, 1-3 –NH-Alkyl Gruppen, 1-3 $-N(Alkyl)_2$ Gruppen, 1-3 $-NH_2$ Gruppen oder 1-3 $-(CH_2)_{0-3}Z$ Gruppen, wobei Z –H, Halogen, $-OY^3$, $-SY^3$, $-NHY^3$, $-CO-NY^1Y^2$, oder $-CO-OY^3$ darstellt, mit Y^1 und Y^2 unabhängig voneinander H, NH_2, oder $-(CH_2)_{0-3}Z'$ darstellen, und Y^3 H, $-(CH_2)_{0-3}-CH(NHCOCH_3)Z'$,$-(CH_2)_{0-3}-CH(NH_2)Z'$, oder $-(CH_2)_{0-3}Z'$ darstellt, wobei Z' H, SO_3H, NH_2 oder COOH darstellt,
substituiert sein kann (wobei „Alkyl“ bevorzugt C_{1-10}-Alkyl bedeutet);

R^5 –L-BINDER, H, F, NH_2, NO_2, Halogen, SH oder $-(CH_2)_{0-3}Z$ darstellt, wobei Z –H, Halogen, $-OY^3$, $-SY^3$, $-NHY^3$, $-CO-NY^1Y^2$, oder –CO-OY^3 darstellt,
wobei Y^1 und Y^2 unabhängig voneinander H, NH_2, oder $-(CH_2)_{0-3}Z'$ darstellen, und Y^3 H oder $-(CH_2)_{0-3}Z'$ darstellt, wobei Z' H, SO_3H, NH_2 oder COOH darstellt;
darstellt,

wobei L für einen Linker steht und BINDER für Binder bzw. Derivat hiervon steht, wobei der Binder ggf. an mehrere Wirkstoffmoleküle gebunden sein kann,

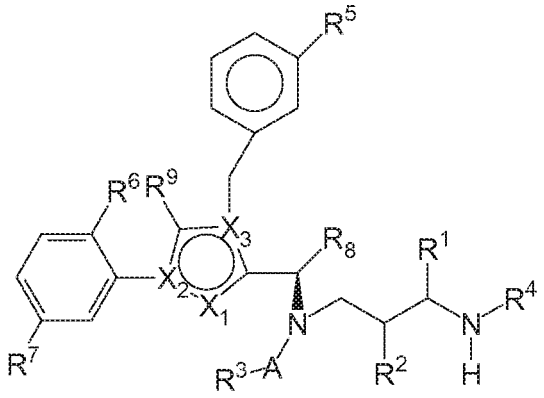
R^6 und R^7 unabhängig voneinander H, Cyano, (ggf. fluoriertes) C_{1-10}-Alkyl, (ggf. fluoriertes) C_{2-10}-Alkenyl, (ggf. fluoriertes) C_{2-10}-Alkinyl, Hydroxy oder Halogen darstellen,

R^8 (ggf. fluoriertes) C_{1-10}-Alkyl, (ggf. fluoriertes) C_{4-10}-Cycloalkyl oder optional substituiertes Oxetan darstellt; und

R^9 H, F, CH_3, CF_3, CH_2F oder CHF_2 darstellt;

sowie ihre Salze, Solvate und Salze der Solvate.

43. Verbindungen der allgemeinen Formel (IV):



(IV)

wobei
X_1 N, X_2 C und X_3 N darstellt;
R^1 –L-BINDER, H, oder $-(CH_2)_{0-3}Z$ darstellt, wobei Z –H, $-NHY^3$, $-OY^3$, $-SY^3$, Halogen, $-CO-NY^1Y^2$, oder –CO-OY^3 darstellt,
wobei Y^1 und Y^2 unabhängig voneinander H, NH2, $-(CH_2CH_2O)_{0-3}-(CH_2)_{0-3}Z'$, oder $-CH(CH_2W)Z'$ darstellen, und Y^3 H oder $-(CH_2)_{0-3}Z'$ darstellt, wobei Z' H, NH_2, SO_3H, COOH,

-NH-CO-CH_2-CH_2-CH(NH_2)COOH oder –(CO-NH-CHY^4)$_{1-3}$COOH darstellt; wobei W H oder OH darstellt;

wobei Y^4 unabhängig voneinander lineares oder verzweigtes, gegebenenfalls mit –$NHCONH_2$ substituiertes, C_{1-6} Alkyl oder gegebenenfalls mit –NH_2 substituiertes Aryl oder Benzyl darstellt;

R^2 und R^4 unabhängig voneinander –L-BINDER, H, -CO-CHY^4-NHY^5 oder –$(CH_2)_{0-3}Z$ darstellen, oder R^2 und R^4 gemeinsam (unter Bildung eines Pyrrolidinringes) –CH_2-CHR^{10}- oder –CHR^{10}-CH_2- darstellen, wobei R^{10} L-#1, H, NH_2, SO_3H, COOH, SH, oder OH darstellt;

wobei Z –H, Halogen, -OY^3, -SY^3, NHY^3, -CO-NY^1Y^2, oder –CO-OY^3 darstellt,

wobei Y^1 und Y^2 unabhängig voneinander H, NH_2, oder –$(CH_2)_{0-3}Z$‘ darstellen, und Y^3 H oder –$(CH_2)_{0-3}Z$‘ darstellt, wobei Z‘ H, SO_3H, NH_2 oder COOH darstellt;

wobei Y^4 unabhängig voneinander lineares oder verzweigtes, gegebenenfalls mit–$NHCONH_2$ substituiertes, C_{1-6} Alkyl oder gegebenenfalls mit –NH_2 substituiertes Aryl oder Benzyl darstellt und Y^5 H oder –CO-CHY^6-NH_2 darstellt, wobei Y^6 lineares oder verzweigtes C_{1-6} Alkyl darstellt;

A CO, SO, SO_2, SO_2NH oder CNNH darstellt;

R^3 –L-BINDER oder eine gegebenenfalls substituierte Alkyl-, Aryl-, Heteroaryl- Heteroalkyl-, Heterocycloalkyl- Gruppe darstellt,

bevorzugt –L-#1 oder eine C_{1-10}-Alkyl-, C_{6-10}-Aryl- oder C_{6-10}-Aralkyl-, C_{5-10}-Heteroalkyl-, C_{1-10}-Alkyl-O-C_{6-10}-Aryl- oder C_{5-10}-Heterocycloalkyl-Gruppe,

die mit 1-3 –OH Gruppen, 1-3 Halogenatomen, 1-3 halogenierten Alkylgruppen (die jeweils 1-3 Halogenatome aufweisen), 1-3 O-Alkyl Gruppen, 1-3 –SH Gruppen, 1-3 –S-Alkyl Gruppen, 1-3 –O-CO-Alkyl Gruppen, 1-3 –O-CO-NH-Alkyl Gruppen, 1-3 –NH-CO-Alkyl Gruppen, 1-3 –NH-CO-NH-Alkyl Gruppen, 1-3 –$S(O)_n$-Alkyl Gruppen, 1-3 –SO_2-NH-Alkyl Gruppen, 1-3 –NH-Alkyl Gruppen, 1-3 –$N(Alkyl)_2$ Gruppen, 1-3 –NH_2 Gruppen oder 1-3 –$(CH_2)_{0-3}Z$ Gruppen,

wobei Z –H, Halogen, -OY^3, -SY^3, -NHY^3, -CO-NY^1Y^2, oder –CO-OY^3 darstellt, wobei Y^1 und Y^2 unabhängig voneinander H, NH_2, oder –$(CH_2)_{0-3}Z$‘ darstellen, und Y^3 H, -$(CH_2)_{0-3}$-CH($NHCOCH_3$)Z‘, -$(CH_2)_{0-3}$-CH(NH_2)Z‘, oder –$(CH_2)_{0-3}Z$‘ darstellt, wobei Z‘ H, SO_3H, NH_2 oder COOH darstellt,

substituiert sein kann

(wobei „Alkyl“ bevorzugt C_{1-10}-Alkyl bedeutet);

R^5 –L-BINDER, H, F, NH_2, NO_2, Halogen, SH oder $-(CH_2)_{0-3}Z$ darstellt, wobei Z –H, Halogen, $-OY^3$, $-SY^3$, $-NHY^3$, $-CO-NY^1Y^2$, oder $-CO-OY^3$ darstellt,
wobei Y^1 und Y^2 unabhängig voneinander H, NH_2, oder $-(CH_2)_{0-3}Z'$ darstellen, und Y^3 H oder $-(CH_2)_{0-3}Z'$ darstellt, wobei Z' H, SO_3H, NH_2 oder COOH darstellt;
darstellt,

wobei L für einen Linker steht und BINDER für Binder bzw. Derivat hiervon steht, wobei der Binder ggf. an mehrere Wirkstoffmoleküle gebunden sein kann,

R^6 und R^7 unabhängig voneinander H, Cyano, (ggf. fluoriertes) C_{1-10}-Alkyl, (ggf. fluoriertes) C_{2-10}-Alkenyl, (ggf. fluoriertes) C_{2-10}-Alkinyl, Hydroxy oder Halogen darstellen,

R^8 (ggf. fluoriertes) C_{1-10}-Alkyl, (ggf. fluoriertes) C_{4-10}-Cycloalkyl oder optional substituiertes Oxetan darstellt; und

R^9 H, F, CH_3, CF_3, CH_2F oder CHF_2 darstellt;

sowie ihre Salze, Solvate und Salze der Solvate;
unter der Maßgabet, dass R^1, R^2 und R^4 nicht gleichzeitig H darstellen.

44. Verbindung nach Ziffer 43, wobei Z Cl oder Br darstellt.

45. Verbindung nach Ziffer 43, wobei R^1 $-(CH_2)_{0-3}Z$ darstellt, wobei Z $-CO-NY^1Y^2$ darstellt, wobei Y^2 $-(CH_2CH_2O)_{0-3}-(CH_2)_{0-3}Z'$ und Y^1 H, NH2, oder $-(CH_2CH_2O)_{0-3}-(CH_2)_{0-3}Z'$darstellt.

46. Verbindung nach einem oder mehreren der Ziffern 43-44 wobei Y^1 H darstellt, Y^2 $-(CH_2CH_2O)_3-CH_2CH_2Z'$ darstellt und Z' –COOH darstellt.

47. Verbindung nach einem oder mehreren der Ziffern 43-44, wobei Y^1 H darstellt, Y^2 $-CH_2CH_2Z'$ darstellt und Z' $-(CONHCHY^4)_2COOH$ stellt.

48. Verbindung nach dem Ziffer 47, wobei Y^4 lineares oder verzweigtes, gegebenenfalls mit $-NHCONH_2$ substituiertes, C_{1-6} Alkyl darstellt.

49. Verbindung nach dem Ziffer 48, wobei mindestens ein Vertreter von Y^4 ausgewählt wird aus *i*-propyl or $-CH_3$.

50. Verbindung nach einem oder mehreren der Ziffern 43 and 45, wobei Y^1 H darstellt, Y^2 – CH_2CH_2Z' darstellt, Z' –CONHCHY^{4}COOH darstellt und Y^4 gegebenenfalls mit $–NH_2$ substituiertes Aryl oder Benzyl darstellt.

51. Verbindung nach dem Ziffer 50, wobei Y^4 Aminobenzyl darstellt.

52. Verbindung nach dem Ziffer 43, wobei R^2 $–(CH_2)_{0-3}Z$ darstellt und Z $–SY^3$ darstellt.

53. Verbindung nach dem Ziffer 43, wobei R^4 –CO-CHY^4-NHY^5 darstellt und Y^5 H darstellt.

54. Verbindung nach dem Ziffer 43 wobei R^4 –CO-CHY^4-NHY^5 darstellt und Y^5–CO-CHY^6-NH_2 darstellt.

55. Verbindung nach einem oder mehreren der Ziffern 53 und 54, wobei Y^4 lineares oder verzweigtes, gegebenenfalls mit $–NHCONH_2$ substituiertes C_{1-6} Alkyl darstellt.

56. Verbindung nach eine oder mehrere Ziffern von 43 bis 55, wobei der Verbindung eine der folgende Formeln aufweist:

(15S,19R)-15-Amino-19-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-18-glycoloyl-20,20-dimethyl-14-oxo-4,7,10-trioxa-13,18-diazahenicosan-1-säure-;

N-{(2S)-2-Amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}-beta-alanyl-L-valyl-N^5-carbamoyl-L-ornithin;

N-{(2S)-2-Amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}-beta-alanyl-L-alanyl-N^5-carbamoyl-L-ornithin;

N-{(2S)-2-Amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}-beta-alanyl-4-amino-L-phenylalanin;

N-{(1R)-1-[1-(3-aminobenzyl)-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-N-(3-aminopropyl)-2-hydroxyacetamid(1:1);

(2S)-2-Amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butansäure;

N-[(3S)-3-amino-4-hydrazino-4-oxobutyl]-N-{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-2-hydroxyacetamid(1:1);

N-{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-N-[(3S)-3,4-diaminobutyl]-2-hydroxyacetamid(1:1);

N-{(2S)-2-Amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}-beta-alanin;
(2S)-2-amino-N-(2-aminoethyl)-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanamid(2:1);
(1-{(2S)-2-Amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}hydrazino)essigsäure;
N-[3-Amino-2-(sulfanylmethyl)propyl]-N-{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-2-hydroxyacetamidhydrochlorid(1:1);
4-amino-N-(3-aminopropyl)-N-{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}benzamid(2:1)
N-{3-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]propyl}-N5-carbamoyl-L-ornithinamid(1:1);
L-valyl-N-{3-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]propyl}-N5-carbamoyl-L-ornithinamid(1:1);
L-valyl-N-{3-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]propyl}-N5-carbamoyl-L-ornithinamid(1:1).

57. Pharmazeutische Zusammensetzung umfassend ein Konjugat nach einem oder mehreren der Ziffern 1 bis 38 oder eine Verbindung nach Anspruche 42-56 in Kombination mit einem inerten, nicht-toxischen, pharmazeutisch geeigneten Hilfsstoff.

58. Konjugat nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 38 oder Verbindung nach Ziffern 42-56 zur Verwendung in einem Verfahren Behandlung und/oder Prophylaxe von Krankheiten.

59. Konjugat nach einem oder mehreren der Ziffern 1 bis 38 oder Verbindung nach Anspruche 42-56 zur Verwendung zur Verwendung in einem Verfahren zur Behandlung von hyperproliferativen und/oder angiogenen Erkrankungen.

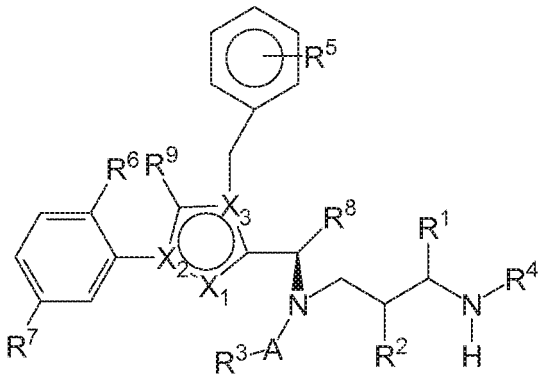
60. Konjugat nach einem oder mehreren der Ziffern 1 bis 38 oder Verbindung nach Anspruche 42-56, wobei R^{3a} bzw. R^3 –L-BINDER oder eine substituierte Alkyl-, Aryl- oder Heteroaryl-Gruppe darstellt,
bevorzugt –L-#1 oder eine C_{1-10}-Alkyl-, C_{6-10}-Aryl- oder C_{6-10}-Aralkyl-Gruppe oder C_{5-10}-Heteroalkyl-, die mit –OH, O-Alkyl, SH, S-Alkyl, O-CO-Alkyl, O-CO-NH-Alkyl, NH-CO-Alkyl, NH-CO-NH-Alkyl, $S(O)_n$-Alkyl, SO_2-NH-Alkyl, NH-Alkyl, $N(Alkyl)_2$, NH_2 oder -$(CH_2)_{0-3}Z$, wobei Z -H, Halogen, $-OY^3$, $-SY^3$, $-NHY^3$, $-CO-NY^1Y^2$, oder $-CO-OY^3$ darstellt, mit

Y^1 und Y^2 unabhängig voneinander H, NH_2, oder $-(CH_2)_{0-3}Z'$ darstellen, und Y^3 H oder $-(CH_2)_{0-3}Z'$ darstellt, wobei Z' H, SO_3H, NH_2 oder COOH darstellt,
substituiert sein kann (wobei „Alkyl" bevorzugt C_{1-10}-Alkyl bedeutet).

61. Verfahren zur Behandlung und/oder Prophylaxe von hyperproliferativen und/oder angiogenen Erkrankungen bei Menschen und Tieren unter Verwendung einer wirksamen Menge mindestens eines Konjugat nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 38 oder Verbindung nach Ziffern 42-56.

Patentansprüche

1. Konjugat eines Binders oder Derivats hiervon mit einem oder mehreren Wirkstoffmolekülen, wobei das Wirkstoffmolekül ein Kinesin Spindel Protein-Inhibitor ist, das mit dem Binder über einen Linker L verbunden ist, wobei der Kinesin Spindel Protein-Inhibitor die folgen Formel (IIa) aufweist:



(IIa)

wobei

X_1 N, X_2 N und X_3 C darstellt; oder

X_1 N, X_2 C und X_3 N darstellt; oder

X_1 CH oder CF, X_2 C und X_3 N darstellt; oder

X_1 NH, X_2 C und X_3 C darstellt; oder

X_1 CH, X_2 N und X_3 C darstellt;

(wobei X_1 CH, X_2 C und X_3 N bevorzugt ist);

R^1 H, –L-#1, –MOD oder $-(CH_2)_{0-3}Z$ darstellt, wobei Z -H, $-NHY^3$, $-OY^3$, $-SY^3$, Halogen, $-CO-NY^1Y^2$, oder $-CO-OY^3$ darstellt,

wobei Y^1 und Y^2 unabhängig voneinander H, NH_2, $-(CH_2CH_2O)_{0-3}-(CH_2)_{0-3}Z'$(z.B. $-(CH_2)_{0-3}Z'$), oder $-CH(CH_2W)Z'$ darstellen, und Y^3 H oder $-(CH_2)_{0-3}Z'$ darstellt, wobei Z' H, NH_2, SO_3H, COOH, $-NH-CO-CH_2-CH_2-CH(NH_2)COOH$ oder $-(CO-NH-CHY^4)_{1-3}COOH$ darstellt; wobei W H oder OH darstellt,

wobei Y^4 unabhängig voneinander lineares oder verzweigtes, gegebenenfalls mit $-NHCONH_2$ substituiertes, C_{1-6} Alkyl oder gegebenenfalls mit $-NH_2$ substituiertes Aryl oder Benzyl darstellt;

R^2 –L-#1, H, -MOD, -CO-CHY^4-NHY^5 oder -$(CH_2)_{0-3}$Z darstellt, oder R^2 und R^4 gemeinsam (unter Bildung eines Pyrrolidinringes) –CH_2-CHR^{10}- oder -CHR^{10}-CH_2- darstellen, wobei R^{10} L-#1, H, NH_2, SO_3H, COOH, SH, oder OH darstellt;
wobei Z -H, Halogen, -OY^3, -SY^3, NHY^3, -CO-NY^{1}Y^2, oder -CO-OY^3 darstellt,
wobei Y^1 und Y^2 unabhängig voneinander H, NH_2, oder -$(CH_2)_{0-3}$Z‘ darstellen, und Y^3 H oder -$(CH_2)_{0-3}$Z‘ darstellt, wobei Z‘ H, SO_3H, NH_2 oder COOH darstellt;
wobei Y^4 unabhängig voneinander lineares oder verzweigtes, gegebenenfalls mit–$NHCONH_2$ substituiertes, C_{1-6} Alkyl oder gegebenenfalls mit –NH_2 substituiertes Aryl oder Benzyl darstellt und Y^5 H oder –CO-CHY^6-NH_2 darstellt, wobei Y^6 lineares oder verzweigtes C_{1-6} Alkyl darstellt;

R^4 –L-#1, H, -CO-CHY^4-NHY^5 oder -$(CH_2)_{0-3}$Z darstellt,
wobei Z -H, Halogen, -OY^3, -SY^3, NHY^3, -CO-NY^{1}Y^2, oder -CO-OY^3 darstellt,
wobei Y^1 und Y^2 unabhängig voneinander H, NH_2, oder -$(CH_2)_{0-3}$Z‘ darstellen, und Y^3 H oder -$(CH_2)_{0-3}$Z‘ darstellt, wobei Z‘ H, SO_3H, NH_2 oder COOH darstellt;
wobei Y^4 unabhängig voneinander lineares oder verzweigtes, gegebenenfalls mit–$NHCONH_2$ substituiertes, C_{1-6} Alkyl oder gegebenenfalls mit –NH_2 substituiertes Aryl oder Benzyl darstellt und Y^5 H oder –CO-CHY^6-NH_2 darstellt, wobei Y^6 lineares oder verzweigtes C_{1-6} Alkyl darstellt;
oder R^2 und R^4 gemeinsam (unter Bildung eines Pyrrolidinringes) –CH_2-CHR^{10}- oder -CHR^{10}-CH_2- darstellen, wobei R^{10} L-#1, H, NH_2, SO_3H, COOH, SH, oder OH darstellt;

A CO, SO, SO_2, SO_2NH oder CNNH darstellt;

R^3 –L-#1, -MOD, oder eine gegebenenfalls substituierte Alkyl-, Cycloalkyl-, Aryl-, Heteroaryl-Heteroalkyl-, Heterocycloalkyl- Gruppe darstellt, bevorzugt –L-#1 oder eine C_{1-10}-Alkyl-, C_{6-10}-Aryl- oder C_{6-10}-Aralkyl-, C_{5-10}-Heteroalkyl-, C_{1-10}-Alkyl-O-C_{6-10}-Aryl- oder C_{5-10}-Heterocycloalkyl-Gruppe, die mit 1-3 –OH Gruppen, 1-3 Halogenatomen, 1-3 halogenierten Alkylgruppen (die jeweils 1-3 Halogenatome aufweisen), 1-3 O-Alkyl Gruppen, 1-3 –SH Gruppen, 1-3 -S-Alkyl Gruppen, 1-3 -O-CO-Alkyl Gruppen, 1-3 -O-CO-NH-Alkyl Gruppen, 1-3 -NH-CO-Alkyl Gruppen, 1-3 -NH-CO-NH-Alkyl Gruppen, 1-3 -$S(O)_n$-Alkyl Gruppen, 1-3 -SO_2-NH-Alkyl Gruppen, 1-3 -NH-Alkyl Gruppen, 1-3 -N(Alkyl)$_2$ Gruppen, 1-3 -NH_2 Gruppen oder 1-3 -$(CH_2)_{0-3}$Z Gruppen, wobei Z -H, Halogen, -OY^3, -SY^3, -NHY^3, -CO-NY^{1}Y^2, oder -CO-OY^3 darstellt, mit Y^1 und Y^2 unabhängig voneinander H, NH_2, oder -$(CH_2)_{0-3}$Z‘ darstellen, und Y^3 H, -$(CH_2)_{0-3}$-CH(NHCOCH$_3$)Z‘,-$(CH_2)_{0-3}$-CH(NH_2)Z‘, oder -$(CH_2)_{0-3}$Z‘ darstellt, wobei Z‘ H, SO_3H, NH_2 oder COOH darstellt,

substituiert sein kann (wobei „Alkyl" bevorzugt C_{1-10}-Alkyl bedeutet);

R^5 –L-#1, H, NH_2, NO_2, Halogen (insbesondere F, Cl, Br), -CN, CF_3, $-OCF_3$, $-CH_2F$, $-CH_2F$, SH oder $-(CH_2)_{0-3}Z$ darstellt, wobei Z -H, $-OY^3$, $-SY^3$, Halogen, NHY^3, $-CO-NY^1Y^2$, oder $-CO-OY^3$ darstellt,
wobei Y^1 und Y^2 unabhängig voneinander H, NH_2, oder $-(CH_2)_{0-3}Z^{\cdot}$ darstellen, und Y^3 H oder $-(CH_2)_{0-3}Z^{\cdot}$ darstellt, wobei $Z^{\cdot}$ H, SO_3H, NH_2 oder COOH darstellt;
darstellt,

R^6 und R^7 unabhängig voneinander H, Cyano, (ggf. fluoriertes) C_{1-10}-Alkyl, (ggf. fluoriertes) C_{2-10}-Alkenyl, (ggf. fluoriertes) C_{2-10}-Alkinyl, Hydroxy, NO_2, NH_2, COOH oder Halogen (insbesondere F, Cl, Br) darstellen,

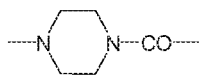
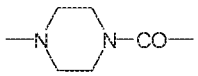
R^8 (ggf. fluoriertes) C_{1-10}-Alkyl, (ggf. fluoriertes) C_{2-10}-Alkenyl, (ggf. fluoriertes) C_{2-10}-Alkinyl, (ggf. fluoriertes) C_{4-10}-Cycloalkyl oder–$(CH_2)_{0-2}$-(HZ^2) darstellt, wobei HZ^2 ein 4 bis 7-gliedriger Heterocyclus mit bis zu zwei Heteroatomen ausgewählt aus N, O und S darstellt, wobei jede dieser Gruppen mit –OH, CO_2H or NH_2 oder –L-#1 substituiert sein kann;

wobei einer oder keiner der Substituenten R^1, R^2, R^3, R^4 R^5, R^8 und R^{10} –L-#1 darstellt bzw. (im Falle von R^8) aufweist,

L für den Linker steht und #1 für die Bindung zum Binder bzw. Derivat hiervon steht,

wobei –MOD –$(NR^{10})_n$-$(G1)_O$-G2-H darstellt, wobei

R^{10} H oder C_1-C_3-Alkyl darstellt;

G1 –NHCO- , -CONH- oder  darstellt (wobei wenn G1 –NHCO- oder  darstellt, R^{10} nicht NH_2 ist);
n 0 oder 1 ist;
o 0 oder 1 ist; und

G2 eine geradkettige und/oder verzweigte Kohlenwasserstoffgruppe mit 1 bis 10 Kohlenstoffatomen ist, die einfach oder mehrfach durch eine oder mehrere der Gruppen -O-

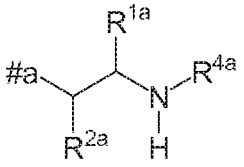
, -S-, -SO-, SO_2, -NR^y-, -NR^yCO-, $CONR^y$-, -NR^yNR^y-, -$SO2NR^yNR^y$-, -$CONR^yNR^y$-, (wobei R^y H, Phenyl, C_1-C_{10}-Alkyl, C_2-C_{10}-Alkenyl, oder C_2-C_{10}-Alkinyl darstellt, die jeweils mit $NHCONH_2$, -COOH, -OH, -NH_2, NH-$CNNH_2$, Sulfonamid, Sulfon, Sulfoxid, oder Sulfonsäure substituiert sein können), -CO-, -CR^x=N-O- (wobei Rx H, C_1-C_3-Alkyl oder Phenyl darstellt) unterbrochen sein kann, wobei die Kohlenwasserstoffkette einschließlich der Seitenketten, sofern vorhanden, mit –$NHCONH_2$, -COOH, -OH, -NH_2, NH-$CNNH_2$, Sulfonamid, Sulfon, Sulfoxid, oder Sulfonsäure substituiert sein kann, wobei die Gruppe –MOD vorzugsweise zumindest eine Gruppe –COOH aufweist;

sowie ihre Salze, Solvate und Salze der Solvate.

2. Konjugat nach Anspruch 1, wobei X_1 CH, X_2 C und X_3 N ist.

3. Konjugat nach Anspruch 1 oder 2, wobei der Substituent R^1 –L-#1 darstellt.

4. Konjugat eines Binders oder Derivats hiervon mit einem oder mehreren Wirkstoffmolekülen, wobei das Wirkstoffmolekül ein Kinesin Spindel Protein-Inhibitor ist, das mit dem Binder über einen Linker L verbunden ist, wobei der Kinesin Spindel Protein-Inhibitor die folgenSubstruktur aufweist:



wobei

#a eine Bindung zum Restmolekül darstellt;

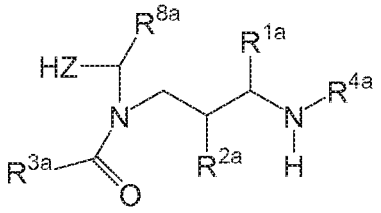
R^{1a} H oder -$(CH_2)_{0-3}$Z darstellt, wobei Z -H, -OY^3, -SY^3, -NHY^3, Halogen, -CO-NY^1Y^2, oder -CO-OY^3 darstellt,
mit Y^1 und Y^2 unabhängig voneinander H, NH_2, -$(CH_2CH_2O)_{0-3}$-$(CH_2)_{0-3}$Z‘, oder oder -$CH(CH_2W)$Z‘ darstellen, und Y^3 H oder -$(CH_2)_{0-3}$Z‘ darstellt, wobei Z‘ H, SO_3H, NH_2, COOH, -NH-CO-CH_2-CH_2-$CH(NH_2)$COOH oder -$(CO\text{-}NH\text{-}CHY^4)_{1-3}$COOH darstellt, wobei W H oder OH darstellt, wobei Y^4 unabhängig voneinander lineares oder verzweigtes,

gegebenenfalls mit–$NHCONH_2$ substituiertes, C_{1-6} Alkyl oder gegebenenfalls mit $–NH_2$ substituiertes Aryl oder Benzyl darstellt;

R^{2a} und R^{4a} unabhängig voneinander H, -CO-CHY^4-NHY^5 oder -$(CH_2)_{0-3}$Z darstellen, oder R^{2a} und R^{4a} gemeinsam (unter Bildung eines Pyrrolidinringes) –CH_2-CHR^{10}- oder -CHR^{10}-CH_2- darstellen, wobei R^{10} H, NH_2, COOH, SO_3H, SH, oder OH darstellt;
wobei Z -H, -OY^3, -SY^3, -NHY^3, -CO-NY^1Y^2, oder -CO-OY^3 darstellt,
wobei Y^1 und Y^2 unabhängig voneinander H, NH_2, oder -$(CH_2)_{0-3}$Z‘ darstellen, und Y^3 H oder -$(CH_2)_{0-3}$Z‘ darstellt, wobei Z‘ H, SO_3H, NH_2 oder COOH darstellt;
wobei Y^4 unabhängig voneinander lineares oder verzweigtes, gegebenenfalls mit–$NHCONH_2$ substituiertes, C_{1-6} Alkyl oder gegebenenfalls mit $–NH_2$ substituiertes Aryl oder Benzyl darstellt und Y^5 H oder –CO-CHY^6-NH_2 darstellt, wobei Y^6 lineares oder verzweigtes C_{1-6} Alkyl darstellt;

wobei der Kinesin Spindel Protein-Inhibitor durch Substitution eines H-Atoms an R^{1a}, R^{2a}, R^{4a} oder an dem durch R^{2a} und R^{4a} gebildeten Pyrrolidinring mit dem Linker verbunden ist,
sowie ihre Salze, Solvate und Salze der Solvate.

5. Konjugat nach Anspruch 4, wobei der Kinesin Spindel Protein-Inhibitor durch die allgemeine Formel (I) dargestellt wird:



(I)

wobei
R^{1a} H oder -$(CH_2)_{0-3}$Z darstellt, wobei Z -H, -OY^3, -SY^3, -NHY^3, Halogen, -CO-NY^1Y^2, oder -CO-OY^3 darstellt,
mit Y^1 und Y^2 unabhängig voneinander H, NH_2, -$(CH_2CH_2O)_{0-3}$-$(CH_2)_{0-3}$Z‘, oder -$CH(CH_2W)$Z‘ darstellen, und Y^3 H oder -$(CH_2)_{0-3}$Z‘ darstellt, wobei Z‘ H, SO_3H, NH_2, COOH, -NH-CO-CH_2-CH_2-$CH(NH_2)$COOH oder -$(CO\text{-}NH\text{-}CHY^4)_{1-3}$COOH darstellt; wobei W H oder OH darstellt,
wobei Y^4 unabhängig voneinander lineares oder verzweigtes, gegebenenfalls mit–$NHCONH_2$ substituiertes, C_{1-6} Alkyl oder gegebenenfalls mit $–NH_2$ substituiertes Aryl oder Benzyl darstellt;

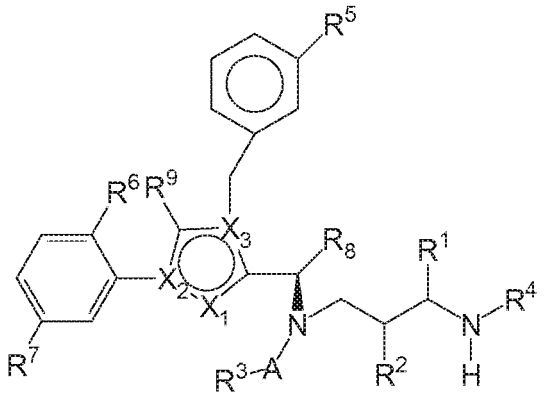
R^{2a} und R^{4a} unabhängig voneinander H, -CO-CHY^4-NHY^5 oder -$(CH_2)_{0-3}$Z darstellen, oder R^{2a} und R^{4a} gemeinsam (unter Bildung eines Pyrrolidinringes) –CH_2-CHR^{10}- oder -CHR^{10}-CH_2- darstellen, wobei R^{10} H, SO_3H, NH_2, COOH, SH, oder OH darstellt;
wobei Z -H, Halogen, -OY^3, -SY^3, -NHY^3, -CO-NY^{1}Y^2, oder -CO-OY^3 darstellt,
wobei Y^1 und Y^2 unabhängig voneinander H, NH_2, oder -$(CH_2)_{0-3}$Z' darstellen, und Y^3 H oder -$(CH_2)_{0-3}$Z' darstellt, wobei Z' H, SO_3H, NH_2 oder COOH darstellt;
wobei Y^4 unabhängig voneinander lineares oder verzweigtes, gegebenenfalls mit–$NHCONH_2$ substituiertes, C_{1-6} Alkyl oder gegebenenfalls mit –NH_2 substituiertes Aryl oder Benzyl darstellt und Y^5 H oder –CO-CHY^6-NH_2 darstellt, wobei Y^6 lineares oder verzweigtes C_{1-6} Alkyl darstellt;

R^{3a} eine gegebenenfalls substituierte Alkyl-, Aryl-, Heteroaryl- Heteroalkyl-, Heterocycloalkyl-Gruppe darstellt,
bevorzugt eine C_{1-10}-Alkyl-, C_{6-10}-Aryl- oder C_{6-10}-Aralkyl-, C_{5-10}-Heteroalkyl-, C_{1-10}-Alkyl-O-C_{6-10}-Aryl- oder C_{5-10}-Heterocycloalkyl-Gruppe,
die mit 1-3 –OH Gruppen, 1-3 Halogenatomen, 1-3 halogenierte Alkyl-Gruppen (die jeweils 1-3 Halogenatome aufweisen können), 1-3 O-Alkyl Gruppen, 1-3 –SH Gruppen, 1-3 -S-Alkyl Gruppen, 1-3 -O-CO-Alkyl Gruppen, 1-3 -O-CO-NH-Alkyl Gruppen, 1-3 -NH-CO-Alkyl Gruppen, 1-3 -NH-CO-NH-Alkyl Gruppen, 1-3 -$S(O)_n$-Alkyl Gruppen, 1-3 -SO_2-NH-Alkyl Gruppen, 1-3 -NH-Alkyl Gruppen, 1-3 -N(Alkyl)$_2$ Gruppen, 1-3 -NH_2 Gruppen oder 1-3 -$(CH_2)_{0-3}$Z Gruppen, wobei Z -H, Halogen, -OY^3, -SY^3, -NHY^3, -CO-NY^{1}Y^2, oder -CO-OY^3 darstellt, mit Y^1 und Y^2 unabhängig voneinander H, NH_2, oder -$(CH_2)_{0-3}$Z' darstellen, und Y^3 H, -$(CH_2)_{0-3}$-CH(NHCOCH$_3$)Z',-$(CH_2)_{0-3}$-CH(NH_2)Z', oder -$(CH_2)_{0-3}$Z' darstellt, wobei Z' H, SO_3H, NH_2 oder COOH darstellt,
substituiert sein kann
(wobei „Alkyl" bevorzugt C_{1-10}-Alkyl bedeutet);

R^{8a} C1-10-Alkyl darstellt;

HZ ein mono- oder bicyclischer Heterozyklus ist, der mit einem oder mehreren Substituenten ausgewählt aus Halogen, C_{1-10}-Alkylgruppen, C_{6-10}-Arylgruppen oder C_{6-10}-Aralkylgruppen, die ggf. mit Halogen substituiert sein können, substituiert sein kann,
wobei der Kinesin Spindel Protein-Inhibitor durch Substitution eines H-Atoms an R^{1a}, R^{2a}, R^{3a}, R^{4a}, R^{8a} oder an dem durch R^{2a} und R^{4a} gebildeten Pyrrolidinring mit dem Linker verbunden ist,
sowie ihre Salze, Solvate und Salze der Solvate.

6. Konjugat nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, wobei Wirkstoffmolekül-Linker durch die allgemeine Formel (II) dargestellt wird:



(II)

wobei

X_1 N, X_2 N und X_3 C darstellt; oder

X_1 N, X_2 C und X_3 N darstellt; oder

X_1 CH, X_2 C und X_3 N darstellt; oder

X_1 NH, X_2 C und X_3 C darstellt; oder

X_1 CH, X_2 N und X_3 C darstellt;

R^1 H, –L-#1 oder -$(CH_2)_{0-3}$Z darstellt, wobei Z -H, -NHY^3, -OY^3, -SY^3, Halogen, -CO-NY^1Y^2, oder -CO-OY^3 darstellt,

wobei Y^1 und Y^2 unabhängig voneinander H, NH_2, -$(CH_2CH_2O)_{0-3}$-$(CH_2)_{0-3}$Z‘, oder oder -$CH(CH_2W)$Z‘ darstellen, und Y^3 H oder -$(CH_2)_{0-3}$Z‘ darstellt, wobei Z‘ H, NH_2, SO_3H, COOH, -NH-CO-CH_2-CH_2-$CH(NH_2)$COOH oder –(CO-NH-CHY^4)$_{1-3}$COOH darstellt, wobei W H oder OH darstellt; wobei Y^4 unabhängig voneinander lineares oder verzweigtes, gegebenenfalls mit–$NHCONH_2$ substituiertes, C_{1-6} Alkyl oder gegebenenfalls mit –NH_2 substituiertes Aryl oder Benzyl darstellt;

R^2 und R^4 unabhängig voneinander –L-#1, H, -CO-CHY^4-NHY^5 oder -$(CH_2)_{0-3}$Z darstellen, oder R^2 und R^4 gemeinsam (unter Bildung eines Pyrrolidinringes) –CH_2-CHR^{10}- oder -CHR^{10}-CH_2- darstellen, wobei R^{10} L-#1, H, NH_2, SO_3H, COOH, SH, oder OH darstellt;

wobei Z -H, OY^3, -SY^3, Halogen, NHY^3, -CO-NY^1Y^2, oder -CO-OY^3 darstellt,

wobei Y^1 und Y^2 unabhängig voneinander H, NH_2, oder -$(CH_2)_{0-3}$Z‘ darstellen, und Y^3 H oder -$(CH_2)_{0-3}$Z‘ darstellt, wobei Z‘ H, SO_3H, NH_2 oder COOH darstellt;

wobei Y^4 unabhängig voneinander lineares oder verzweigtes, gegebenenfalls mit–$NHCONH_2$ substituiertes, C_{1-6} Alkyl oder gegebenenfalls mit –NH_2 substituiertes Aryl oder Benzyl darstellt

und Y^5 H oder –CO-CHY^6-NH_2 darstellt, wobei Y^6 lineares oder verzweigtes C_{1-6} Alkyl darstellt;

A CO, SO, SO_2, SO_2NH oder CNNH darstellt;

R^3 –L-#1 oder eine gegebenenfalls substituierte Alkyl-, Aryl-, Heteroaryl- Heteroalkyl-, Heterocycloalkyl- Gruppe darstellt,
bevorzugt –L-#1 oder eine C_{1-10}-Alkyl-, C_{6-10}-Aryl-, C_{6-10}-Aralkyl-, C_{5-10}-Heteroalkyl-, C_{1-10}-Alkyl-O-C_{6-10}-Aryl- oder C_{5-10}-Heterocycloalkyl-Gruppe,
die mit 1-3 –OH Gruppen, 1-3 Halogenatomen, 1-3 halogenierte Alkyl-Gruppen (die jeweils 1-3 Halogenatome aufweisen können), 1-3 O-Alkyl Gruppen, 1-3 –SH Gruppen, 1-3 –S-Alkyl Gruppen, 1-3 –O-CO-Alkyl Gruppen, 1-3 –O-CO-NH-Alkyl Gruppen, 1-3 –NH-CO-Alkyl Gruppen, 1-3 –NH-CO-NH-Alkyl Gruppen, 1-3 –$S(O)_n$-Alkyl Gruppen, 1-3 –SO_2-NH-Alkyl Gruppen, 1-3 –NH-Alkyl Gruppen, 1-3 –$N(Alkyl)_2$ Gruppen, 1-3 –NH_2 Gruppen oder 1-3 –$(CH_2)_{0-3}Z$ Gruppen, wobei Z –H, Halogen, -OY^3, -SY^3, -NHY^3, -CO-NY^1Y^2, oder –CO-OY^3 darstellt, mit Y^1 und Y^2 unabhängig voneinander H, NH_2, oder –$(CH_2)_{0-3}Z'$ darstellen, und Y^3 H, -$(CH_2)_{0-3}$-$CH(NHCOCH_3)Z'$,-$(CH_2)_{0-3}$-$CH(NH_2)Z'$, oder –$(CH_2)_{0-3}Z'$ darstellt, wobei Z' H, SO_3H, NH_2 oder COOH darstellt,
substituiert sein kann (wobei „Alkyl" bevorzugt C_{1-10}-Alkyl bedeutet);

R^5 –L-#1, H, F, NH_2, NO_2, Halogen, SH oder –$(CH_2)_{0-3}Z$ darstellt, wobei Z –H, OY^3, -SY^3, Halogen, NHY^3, -CO-NY^1Y^2, oder –CO-OY^3 darstellt,
wobei Y^1 und Y^2 unabhängig voneinander H, NH_2, oder –$(CH_2)_{0-3}Z'$ darstellen, und Y^3 H oder –$(CH_2)_{0-3}Z'$ darstellt, wobei Z' H, SO_3H, NH_2 oder COOH darstellt;
darstellt,

wobei einer der Substituenten R^1, R^2, R^3, R^4 und R^5 –L-#1 darstellt,

L für den Linker steht und #1 für die Bindung zum Binder bzw. Derivat hiervon steht,

R^6 und R^7 unabhängig voneinander H, Cyano, (ggf. fluoriertes) C_{1-10}-Alkyl, (ggf. fluoriertes) C_{2-10}-Alkenyl, (ggf. fluoriertes) C_{2-10}-Alkinyl, Hydroxy oder Halogen darstellen,

R^8 (ggf. fluoriertes) C_{1-10}-Alkyl, (ggf. fluoriertes) C_{4-10}-Cycloalkyl oder optional substituiertes Oxetan darstellt; und

R^9 H, F, CH_3, CF_3, CH_2F oder CHF_2 darstellt;

sowie ihre Salze, Solvate und Salze der Solvate.

7. Konjugat nach Anspruch 6,
wobei R^1 –L-#1, H, $-(CH_2)_{0-3}Z$ darstellt, wobei Z –H, $-CO-NY^1Y^2$, NHY^3, OY^3, $-SY^3$, oder $-CO-OY^3$ darstellt,
mit Y^1 und Y^2 unabhängig voneinander H, NH_2, $-(CH_2CH_2O)_{0-3}-(CH_2)_{0-3}Z'$, oder oder $-CH(CH_2W)Z'$, und Y^3 H oder $-(CH_2)_{0-3}Z'$ darstellt, wobei Z' H, NH_2, COOH, $-NH-CO-CH_2-CH_2-CH(NH_2)COOH$ oder $-(CO-NH-CHY^4)_{1-3}COOH$ darstellt; wobei W H oder OH darstellt, wobei Y^4 unabhängig voneinander lineares oder verzweigtes, gegebenenfalls mit $-NHCONH_2$ substituiertes, C_{1-6} Alkyl oder gegebenenfalls mit $-NH_2$ substituiertes Aryl oder Benzyl darstellt;

R^2 und R^4 unabhängig voneinander –L-#1, $-CO-CHY^4-NHY^5$ oder H oder R^2 und R^4 gemeinsam (unter Bildung eines Pyrrolidinringes) $-CH_2-CHR^{10}-$ darstellen, wobei R^{10} H, –L-#1, NH_2, COOH, SH, OH oder SO_3H darstellt;
wobei Y^4 unabhängig voneinander lineares oder verzweigtes, gegebenenfalls mit $-NHCONH_2$ substituiertes, C_{1-6} Alkyl oder gegebenenfalls mit $-NH_2$ substituiertes Aryl oder Benzyl darstellt und Y^5 H oder $-CO-CHY^6-NH_2$ darstellt, wobei Y^6 lineares oder verzweigtes C_{1-6} Alkyl darstellt;
A CO darstellt,
R^3 $-(CH_2)OH$ oder –L-#1 darstellt, und
R^5 –L-#1 oder H darstellt,
wobei einer der Substituenten R^1, R^2, R^3, R^4 und R^5 –L-#1 darstellt.

8. Konjugat nach Anspruch 6 oder 7, wobei R^6 und R^7 unabhängig voneinander H, C_{1-3}-Alkyl oder Halogen darstellen.

9. Konjugat nach einem oder mehreren der Ansprüche 6 bis 8, wobei R^8 C_{1-4}-Alkyl (vorzugsweise tert-butyl) darstellt.

10. Konjugat nach einem oder mehreren der Ansprüche 6 bis 9, wobei R^9 H darstellt.

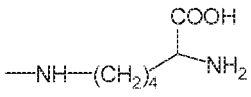
11. Konjugat nach einem oder mehreren der Ansprüche 6 bis 10, wobei R^6 und R^7 F darstellen.

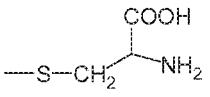
12. Konjugat nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, wobei der Binder oder Derivat hiervon ein Binderpeptid oder –protein oder ein Derivat eines Binderpeptids oder –proteins ist.

13. Konjugat nach Anspruch 12, wobei jedes Wirkstoffmolekül an verschiedene Aminosäuren des Binderpeptids oder –proteins bzw. Derivats hiervon über den Linker gebunden ist.

14. Konjugat nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Konjugat im Durchschnitt 1,2 bis 20 Wirkstoffmoleküle pro Binder aufweist.

15. Konjugat nach einem oder mehreren der Ansprüche 12 bis 14, wobei das Binderpeptid oder –protein einen Antikörper bzw. das Derivat des Binderpeptids oder –proteins



oder


darstellt.

16. Konjugat nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüchen, wobei der Binder an ein Krebs-Zielmolekül bindet.

17. Konjugat nach Anspruch 16, wobei der Binder an ein extrazelluläres Zielmolekül bindet.

18. Konjugat nach Anspruch 17, wobei der Binder nach Bindung an das extrazelluläre Zielmolekül von der das Zielmolekül exprimierenden Zelle internalisiert und intrazellulär (vorzugsweise lysosomal) prozessiert wird.

19. Konjugat nach einem oder mehreren der Ansprüche 12 bis 18, wobei das Binderpeptid oder –protein ein humaner, humanisierter oder chimärer monoklonaler Antikörper oder ein Antigen-bindendes Fragment hiervon ist.

20. Konjugat nach Anspruch 19, wobei das Binderpeptid oder –protein ein anti-HER2-Antikörper, ein anti-EGFR-Antikörper, ein anti-TWEAKR-Antikörper, oder ein Antigen-bindendes Fragment hiervon ist.

21. Konjugat nach Anspruch 20, wobei der anti-TWEAKR-Antikörper spezifisch an die Aminosäure D in Position 47 (D47) von TWEAKR (SEQ ID NO:169) bindet, bevorzugt der anti-TWEAKR-Antikörper TPP-2090.

22. Konjugat nach Anspruch 20, wobei das Binderpeptid oder –protein ein anti-EGFR-Antikörper ist und R3 –L-#1 darstellt.

23. Konjugat nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, wobei der Linker –L- eine der folgenden Grundstrukturen (i) bis (iv) aufweist:

1. $-(CO)_m$–SG1-L1-L2-

(ii) $-(CO)_m$ –L1-SG-L1-L2-

(iii)$-(CO)_m$ –L1-L2-

(iv) $-(CO)_m$ –L1-SG-L2

wobei m 0 oder 1 ist, SG und SG1 eine *in vivo* spaltbare Gruppe ist, L1 unabhängig voneinander für *in vivo* nicht spaltbare organische Gruppen stehen, und L2 für eine Kopplungsgruppe an den Binder steht.

24. Konjugat nach Anspruch 23, wobei die *in vivo* spaltbare Gruppe SG eine 2-8 Oligopeptidgruppe, bevorzugt eine Dipeptidgruppe oder ein Disulfid, ein Hydrazon, ein Acetal oder ein Aminal ist und SG1 eine 2-8 Oligopeptidgruppe, bevorzugt eine Dipeptidgruppe ist.

25. Konjugat nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche,
wobei der Linker an eine Cystein-Seitenkette bzw. Cysteinrest gebunden ist und die folgende Formel aufweist:

§-(CO)m-L1-L2-§§

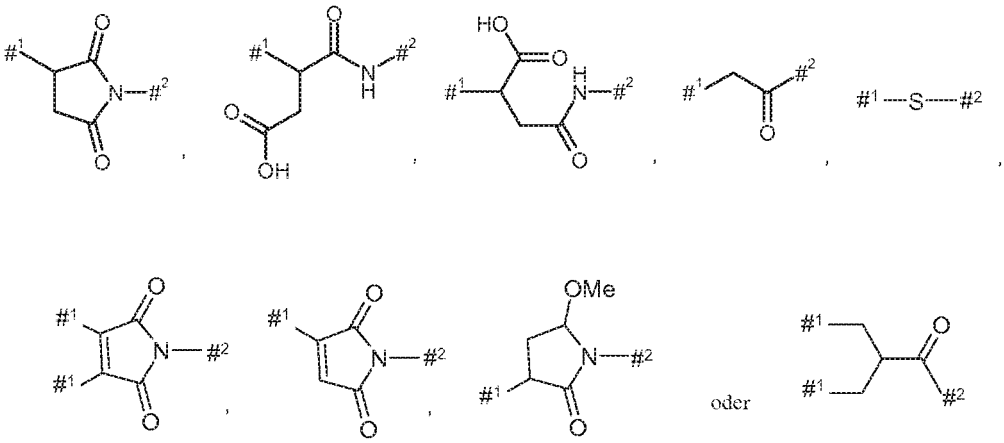
wobei

m 0 oder 1 ist;

§ die Bindung an das Wirkstoffmolekül darstellt und

§§ die Bindung an das Binderpeptid oder –protein darstellt, und

-L2- für



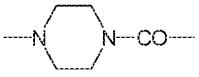
steht, wobei

$\#^1$ die Verknüpfungsstelle mit dem Schwefelatom des Binders kennzeichnet,

$\#^2$ die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe L^1 kennzeichnet,

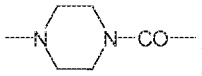
L1 $-(NR^{10})_n-(G1)_o-G2-$ darstellt,

wobei R^{10} H, NH2 oder C1-C3-Alkyl darstellt;

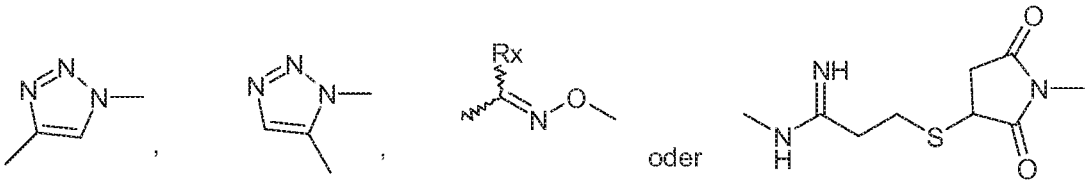
G1 –NHCO- oder  darstellt;

n 0 oder 1 ist;

o 0 oder 1 ist; und

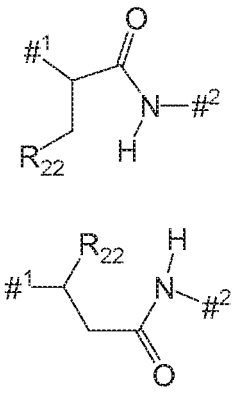
G2 eine geradkettige oder verzweigte Kohlenwasserstoffkette mit 1 bis 100 Kohlenstoffatomen aus Arylengruppen und/oder geradkettigen und/oder verzweigten und/oder cyclischen Alkylengruppen ist, die einfach oder mehrfach durch eine oder mehrere der Gruppen –O-, -S-, , -SO-, SO_2, -NH-, -CO-, -Nme-, -NHNH-, $-SO_2NHNH-$,-NHCO-, -CONH-, -CONHNH- und einen 5 bis 10gliedriger, aromatischen oder nicht aromatischen Heterozyklus mit bis zu 4 Heteroatomen ausgewählt aus N, O und S, -SO-oder –SO2- unterbrochen sein kann (vorzugsweise ), wobei die Seitenketten, sofern vorhanden, mit –NHCONH2, -COOH, -OH, $-NH_2$, NH-$CNNH_2$, Sulfonamid, Sulfon, Sulfoxid oder Sulfonsäure substituiert sein können,

oder eine der folgenden Gruppen darstellt:



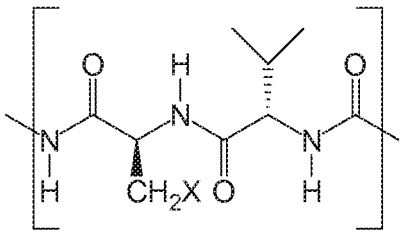
wobei Rx H, C_1-C_3-Alkyl oder Phenyl darstellt.

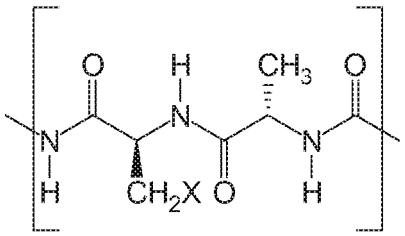
26. Konjugat nach Anspruch 25, wobei L2 dargestellt wird durch eine oder beide der folgenden Formeln:



wobei #1 die Verknüpfungsstelle mit dem Schwefelatom des Binders kennzeichnet, #2 die Verknüpfungsstelle mit der Gruppe L^1 kennzeichnet, R^{22} COOH darstellt, und die Bindungen an das Schwefelatom des Binders zu über 80 %, (bezogen auf die Gesamtanzahl von Bindungen des Linkers an den Binder) in einer dieser beiden Strukturen vorliegen.

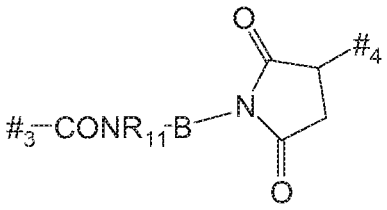
27. Konjugat nach Anspruch 25 oder 26, wobei die Kohlenwasserstoffkette durch eine die folgenden Gruppen unterbrochen ist:





wobei X H, eine C_{1-10}-Alkylgruppe ist, die gegebenenfalls mit $-NHCONH_2$, -COOH, -OH, NH_2, -NH-$CNNH_2$, Sulfon, Sulfoxid oder Sulfonsäure substituiert sein kann.

28. Konjugat nach Anspruch 25, wobei der Linker die folgende Formel aufweist:



wobei

#3 die Bindung an das Wirkstoffmolekül darstellt,

#4 die Bindung an das Binderpeptid oder –protein darstellt,

R^{11} H oder NH_2 darstellt;

B $-[(CH_2)_x-(X^4)_y]_w-(CH_2)_z-$ darstellt,

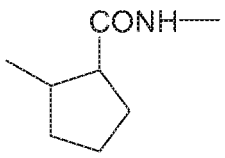
w = 0 bis 20 ist;

x = 0 bis 5 ist;

x = 0 bis 5 ist;

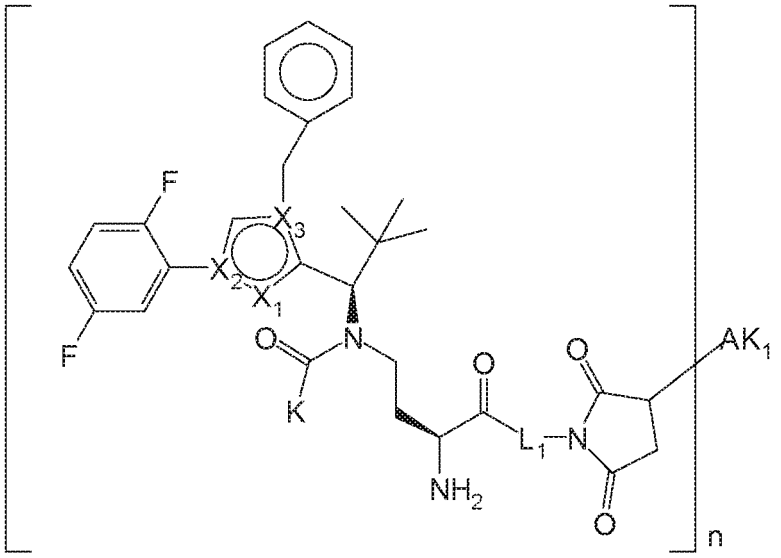
y = 0 oder 1 ist;

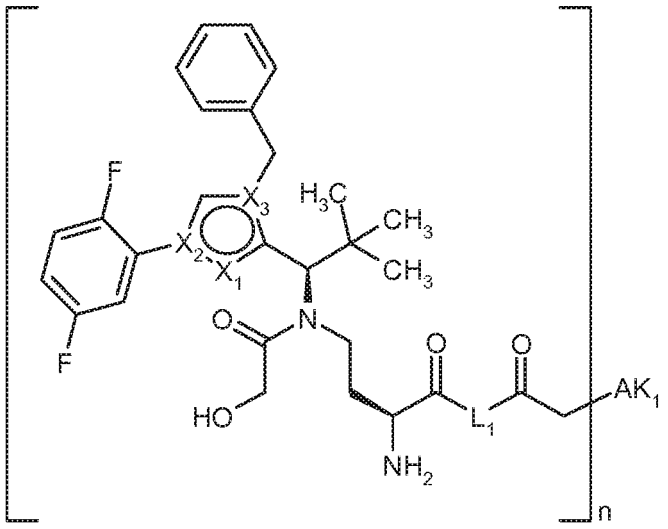
z = 0 bis 5 ist; und

X^4 –O-, -CONH- oder –NHCO-  darstellt.

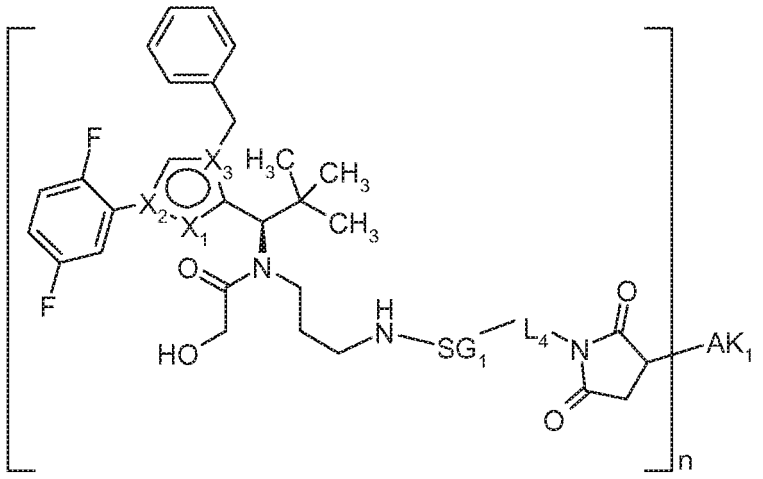
29. Konjugat nach Anspruch 25, wobei R^1 oder R^4 –L-#1 darstellt.

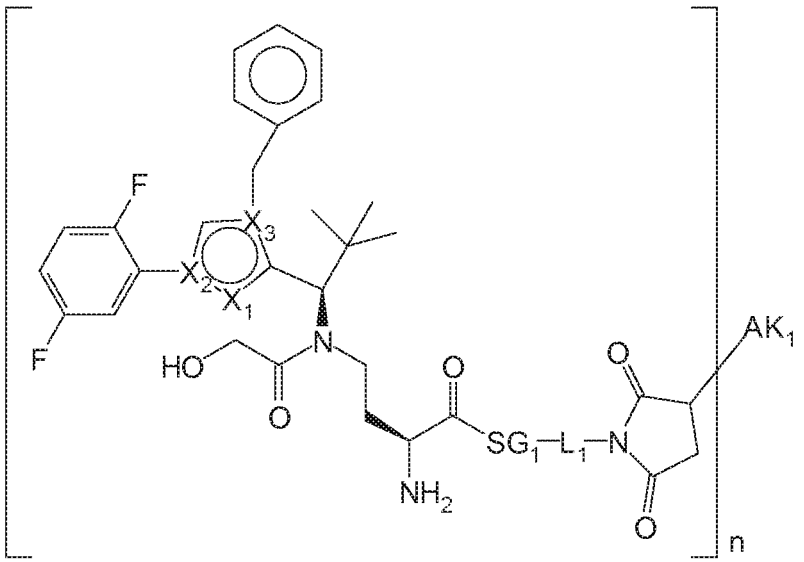
30. Konjugat nach einem oder mehreren der Ansprüche 25 bis 29, wobei das Konjugat eine der folgenden Formeln aufweist:

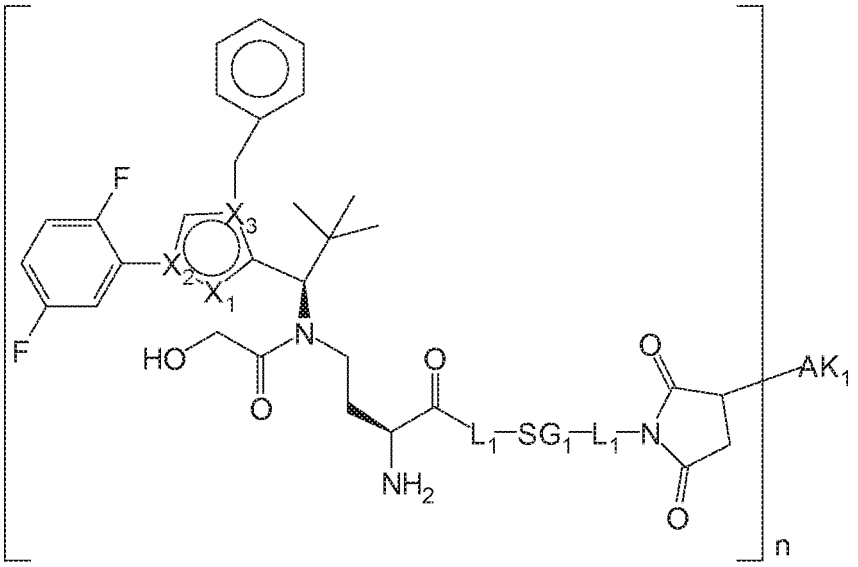


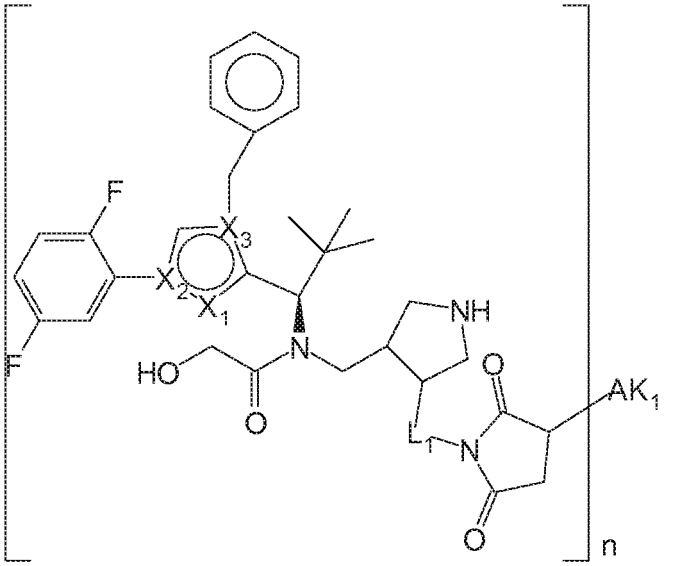


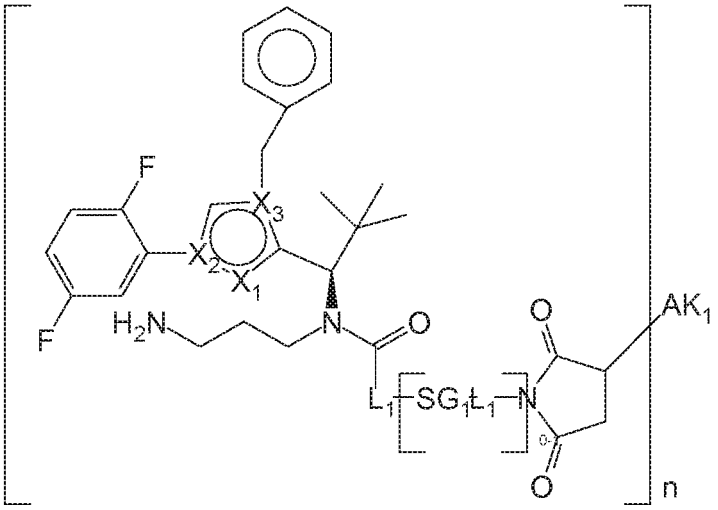
5

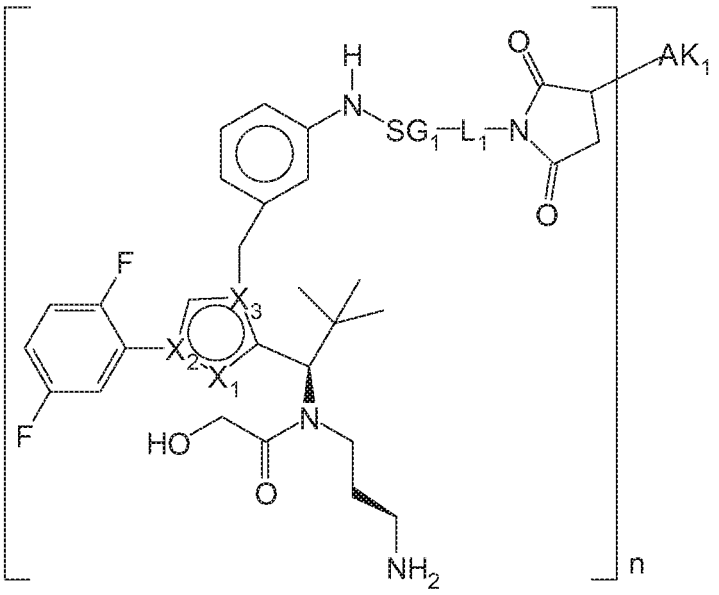






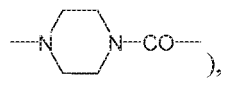






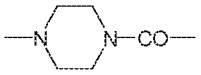
wobei

X_1, X_2 und X_3 die gleiche Bedeutung aufweisen wie in Anspruch 4,

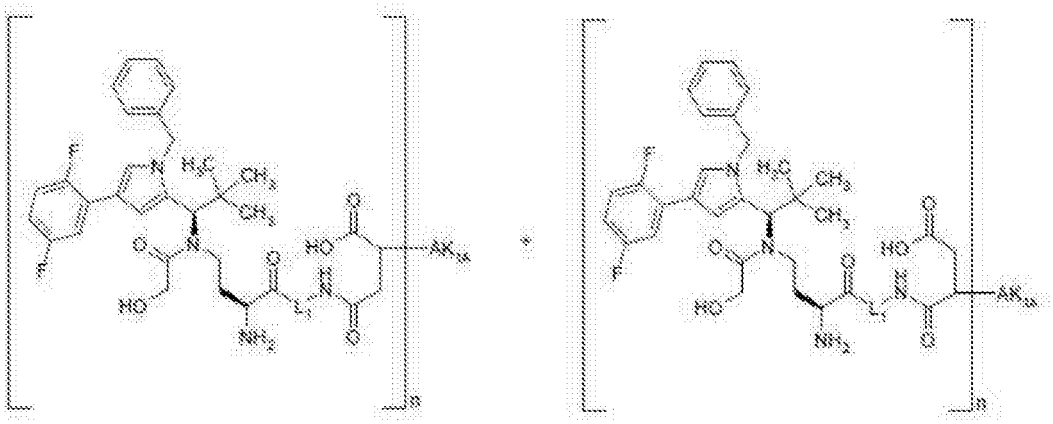
AK_1 ein Binderpeptid oder-protein darstellt, das über ein Schwefelatom des Binders gebunden ist; n eine Zahl von 1 bis 20 darstellt; und L1 eine gegebenenfalls verzweigte Kohlenwasserstoffgruppe mit 1 bis 70 Kohlenstoffatomen ist, die eine geradkettige oder verzweigte Kohlenwasserstoffkette mit 1 bis 100 Kohlenstoffatomen aus Arylengruppen und/oder geradkettigen und/oder verzweigten und/oder cyclischen Alkylengruppen ist, die einfach oder mehrfach durch eine oder mehrere der Gruppen –O-, -S-, , -SO-, SO_2, -NH-, -CO-, -CONH-, -NHCO-, -Nme-, -NHNH-, -SO2NHNH-, -CONHNH- und einen 5 bis 10gliedriger, aromatischen oder nicht aromatischen Heterozyklus mit bis zu 4 Heteroatomen ausgewählt aus N, O und S, -SO- oder –SO2- unterbrochen sein kann (vorzugsweise ), wobei die Seitenketten, sofern vorhanden, mit –NHCONH2, -COOH, -OH, $-NH_2$, NH-$CNNH_2$, Sulfonamid, Sulfon, Sulfoxid oder Sulfonsäure substituiert sein können,

und SG1 ein 2-8 Oligopeptid, bevorzugt ein Dipeptid ist;

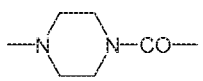
L4 eine Einfachbindung oder eine Gruppe –$(CO)_y$-G4- darstellt, wobei y 0 oder 1 darstellt, und G4 eine geradkettige oder verzweigte Kohlenwasserstoffkette mit 1 bis 100 Kohlenstoffatomen aus Arylengruppen und/oder geradkettigen und/oder verzweigten und/oder cyclischen Alkylengruppen ist, die einfach oder mehrfach durch eine oder mehrere der Gruppen –O-, -S-, -SO-, SO_2, -NH-, -CO-, -NHCO-, -CONH-, -Nme-, -NHNH-, -SO2NHNH-, -CONHNH- und einen 5 bis 10gliedriger, aromatischen oder nicht aromatischen Heterozyklus mit bis zu 4

Heteroatomen ausgewählt aus N, O und S, -SO-oder –SO2- unterbrochen sein kann (vorzugsweise ), wobei die Seitenketten, sofern vorhanden, mit –NHCONH2, -COOH, -OH, -NH_2, NH-$CNNH_2$, Sulfonamid, Sulfon, Sulfoxid oder Sulfonsäure substituiert sein können.

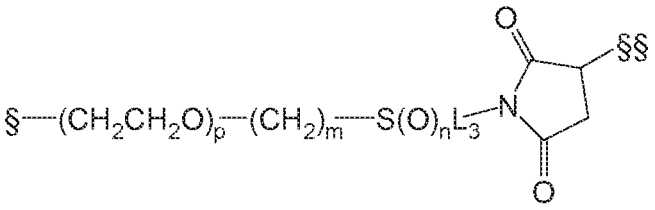
31. Konjugat eines Binders oder Derivats hiervon mit einem oder mehreren Wirkstoffmolekülen, das Konjugat eine oder beide der folgenden Formeln aufweist:



wobei

AK_{1A} ein Binderpeptid oder-protein darstellt, das über ein Schwefelatom des Binders gebunden ist; n eine Zahl von 1 bis 20 darstellt; und L1 eine geradkettige oder verzweigte Kohlenwasserstoffkette mit 1 bis 100 Kohlenstoffatomen aus Arylengruppen und/oder geradkettigen und/oder verzweigten und/oder cyclischen Alkylengruppen ist, die einfach oder mehrfach durch eine oder mehrere der Gruppen –O-, -S-, , -SO-, SO_2, -NH-, -CO-, -CONH-, -NHCO-, -NMe-, -NHNH-, -SO2NHNH-, -CONHNH- und einen 5 bis 10gliedriger, aromatischen oder nicht aromatischen Heterozyklus mit bis zu 4 Heteroatomen ausgewählt aus N, O und S, -SO- oder –SO2- unterbrochen sein kann (vorzugsweise ), wobei die Seitenketten, sofern vorhanden, mit –NHCONH2, -COOH, -OH, -NH_2, NH-$CNNH_2$, Sulfonamid, Sulfon, Sulfoxid oder Sulfonsäure substituiert sein können.

32. Konjugat nach einem oder mehreren der vorhergenden Ansprüche, wobei der Linker –L- an eine Cystein-Seitenkette bzw. Cysteinrest gebunden ist und die folgende Formel aufweist:



wobei

§ die Bindung an das Wirkstoffmolekül darstellt und

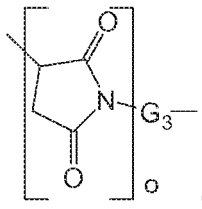
§§ die Bindung an das Binderpeptid oder –protein darstellt,

m 0, 1, 2, oder 3 ist;

n 0, 1 oder 2 ist;

p 0 bis 20 beträgt; und

L3



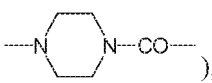
darstellt;

wobei

o 0 oder 1 ist;

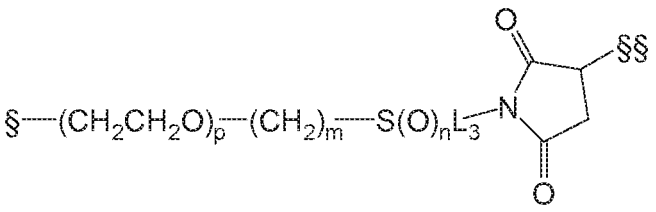
und

G3 eine geradkettige oder verzweigte Kohlenwasserstoffkette mit 1 bis 100 Kohlenstoffatomen aus Arylengruppen und/oder geradkettigen und/oder verzweigten und/oder cyclischen Alkylengruppen ist, die einfach oder mehrfach durch eine oder mehrere der Gruppen -0-, -S-, -SO-, SO2, -NH-, -CO-, -NHCO, -CONH- und einen 5 bis 10gliedriger, aromatischen oder nicht aromatischen Heterozyklus mit bis zu 4 Heteroatomen ausgewählt aus N, O und S, -, -Nme-, -NHNH-, -SO2NHNH-, -CONHNH- -SO-oder –SO2- unterbrochen sein kann (vorzugsweise



), wobei die Seitenketten, sofern vorhanden, mit –NHCONH2, -COOH, -OH, Sulfon, Sulfoxid oder Sulfonsäure substituiert sein können.

33. Konjugat nach Anspruch 32, wobei der Linker –L- an eine Cystein-Seitenkette bzw. Cysteinrest gebunden ist und die folgende Formel aufweist:



wobei

§ die Bindung an das Wirkstoffmolekül darstellt und

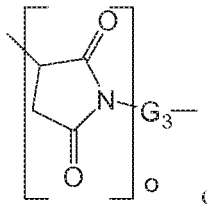
§§ die Bindung an das Binderpeptid oder –protein darstellt,

m 1 ist;

p 0 ist;

n 0 ist;

und L3



darstellt;

wobei

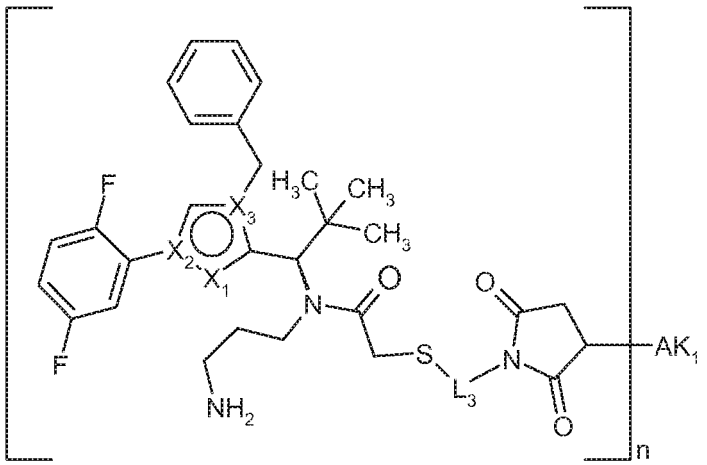
o 0 oder 1 ist; und

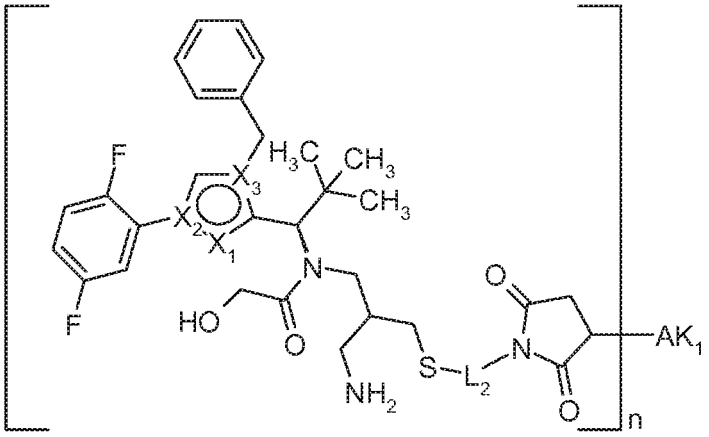
G3 –(CH2CH2O)$_s$(CH2)$_t$(CONH)$_u$ (CH2CH2O)$_v$(CH2)$_w$- darstellt, wobei

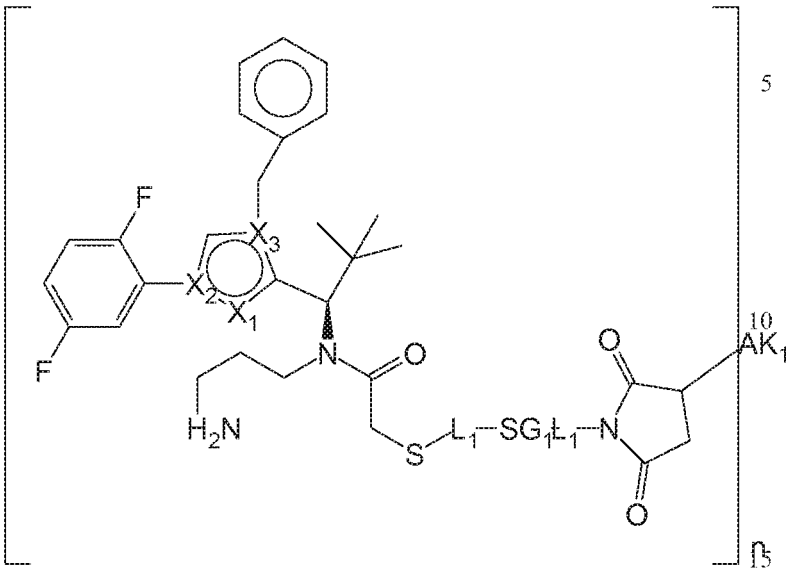
s, t, v und w jeweils unabhängig voneinander 0 bis 20 betragen, und u 0 oder 1 beträgt.

34. Konjugat nach Anspruch 32 oder 33, wobei R^2 oder R^3 –L-#1 darstellt.

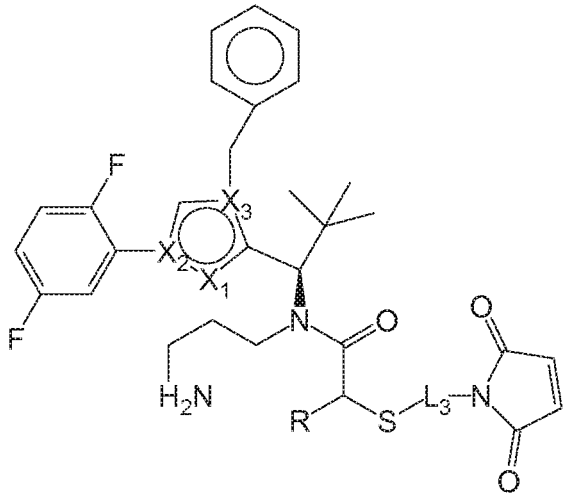
35. Konjugat nach Anspruch 34, wobei das Konjugat eine der folgenden Formeln aufweist:



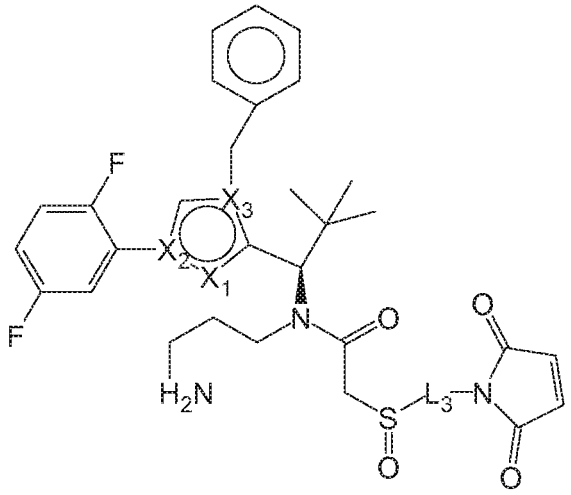




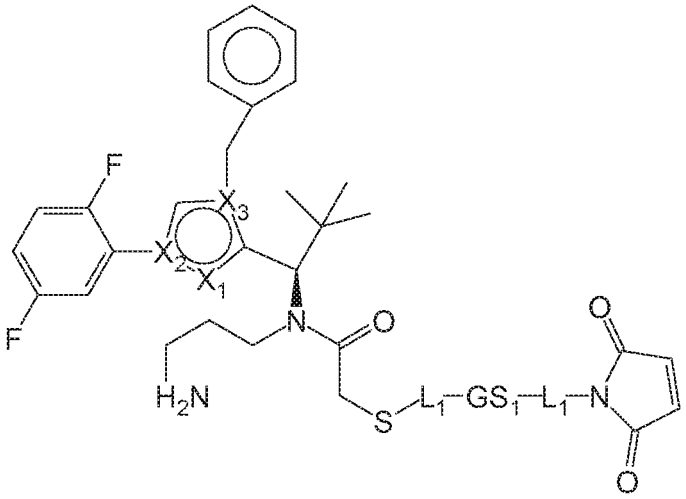
20



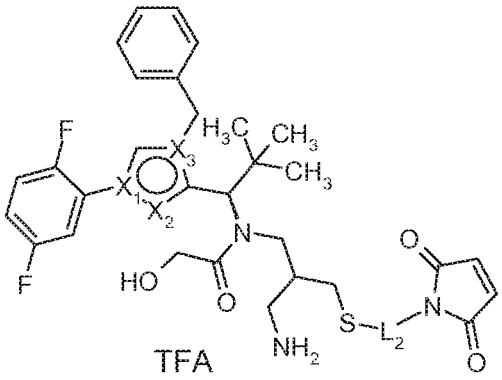
TFA



TFA



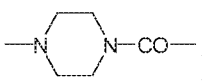
TFA



TFA

wobei

X_1, X_2 und X_3 die gleiche Bedeutung aufweisen wie in Anspruch 4,

AK_1 ein Binderpeptid oder-protein darstellt, das über ein Schwefelatom des Binders angebunden ist; n eine Zahl von 1 bis 20 darstellt; und L2 und L3 eine gegebenenfalls verzweigte geradkettige oder verzweigte Kohlenwasserstoffkette mit 1 bis 100 Kohlenstoffatomen aus Arylengruppen und/oder geradkettigen und/oder verzweigten und/oder cyclischen Alkylengruppen ist, die einfach oder mehrfach durch eine oder mehrere der Gruppen –O-, -S-, , -SO-, SO_2, -NH-, -CO-, -Nme-, -NHNH-, -SO_2NHNH-,-NHCO-, -CONH-, -CONHNH- und einen 5 bis 10gliedriger, aromatischen oder nicht aromatischen Heterozyklus mit bis zu 4 Heteroatomen ausgewählt aus N, O und S, -SO-oder –SO2- unterbrochen sein kann (vorzugsweise ), wobei die Seitenketten, sofern vorhanden, mit –NHCONH2,

-COOH, -OH, -NH_2, NH-$CNNH_2$, Sulfonamid, Sulfon, Sulfoxid oder Sulfonsäure substituiert sein können.

36. Konjugat nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 31, wobei der Linker –L- an eine Lysin-Seitenkette gebunden ist und die folgende Formel aufweist:

$$-\S-(SG)_x-L4-CO-\S\S,$$

wobei

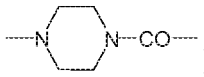
§ die Bindung an das Wirkstoffmolekül darstellt und

§§ die Bindung an das Binderpeptid oder –protein darstellt,

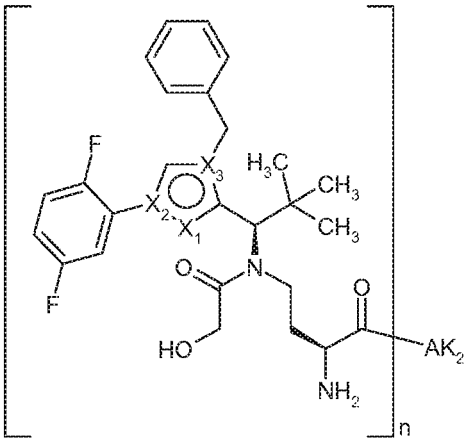
x 0 oder 1 darstellt,

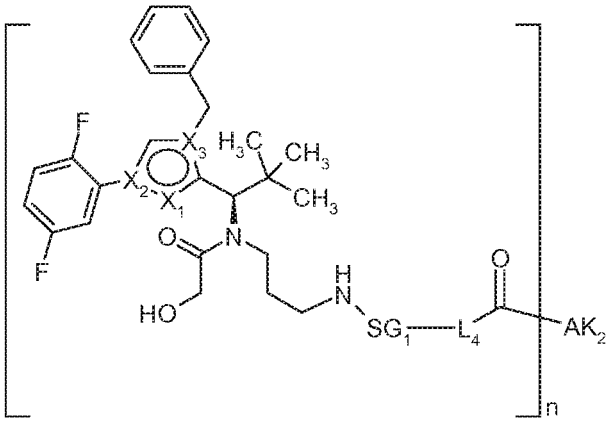
SG eine spaltbare Gruppe, vorzugsweise ein 2-8 Oligopeptid, besonders bevorzugt ein Dipeptid darstellt,

und

L4 eine Einfachbindung oder eine Gruppe –$(CO)_y$-G4- darstellt, wobei y 0 oder 1 darstellt, und G4 eine geradkettige oder verzweigte Kohlenwasserstoffkette mit 1 bis 100 Kohlenstoffatomen aus Arylengruppen und/oder geradkettigen und/oder verzweigten und/oder cyclischen Alkylengruppen ist, die einfach oder mehrfach durch eine oder mehrere der Gruppen –O-, -S-, -SO-, SO_2, -NH-, -CO-, -NHCO-, -CONH-, -Nme-, -NHNH-, -SO2NHNH-, -CONHNH- und einen 5 bis 10gliedriger, aromatischen oder nicht aromatischen Heterozyklus mit bis zu 4 Heteroatomen ausgewählt aus N, O und S, oder –SO- unterbrochen sein kann (vorzugsweise ), wobei die Seitenketten, sofern vorhanden, mit –$NHCONH_2$, -COOH, -OH, -NH_2, NH-$CNNH_2$, Sulfonamid, Sulfon, Sulfoxid oder Sulfonsäure substituiert sein können.

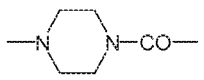
37. Konjugat eines Binderpeptids oder –proteins nach Anspruch 36, wobei das Konjugat eine der folgenden Formeln aufweist:





wobei

X_1, X_2 und X_3 die gleiche Bedeutung aufweisen wie in Anspruch 4,

AK_2 ein Binderpeptid oder-protein darstellt, das über ein Schwefelatom des Binders angebunden ist; n eine Zahl von 1 bis 20 darstellt; und L4 eine gegebenenfalls geradkettige oder verzweigte Kohlenwasserstoffkette mit 1 bis 100 Kohlenstoffatomen aus Arylengruppen und/oder geradkettigen und/oder verzweigten und/oder cyclischen Alkylengruppen ist, die einfach oder mehrfach durch eine oder mehrere der Gruppen –O-, -S-, , -SO-, SO_2, -NH-, -CO-, -Nme-, -NHNH-, $-SO_2NHNH-$,-NHCO-, -CONH-, -CONHNH- und einen 5 bis 10gliedriger, aromatischen oder nicht aromatischen Heterozyklus mit bis zu 4 Heteroatomen ausgewählt aus N, O und S, -SO- oder –SO2- unterbrochen sein kann (vorzugsweise ), wobei die Seitenketten, sofern vorhanden, mit $–NHCONH_2$, -COOH, -OH, $-NH_2$, $NH-CNNH_2$, Sulfonamid, Sulfon, Sulfoxid oder Sulfonsäure substituiert sein können, und

SG1 eine spaltbare Gruppe, vorzugsweise ein 2-8 Oligopeptid, besonders bevorzugt ein Dipeptid darstellt.

38. Konjugat nach einem oder mehreren der Ansprüche 20 bis 37, wobei der anti-TWEAKR-Antikörper ein agonistischer Antikörper ist.

39. Konjugat einem oder mehreren der Ansprüche 20 bis 38, der umfasst:

eine variable schwere Kette umfassend:

a. eine CDR1 der schweren Kette, die von einer Aminosäuresequenz umfassend die Formel PYPMX (SEQ ID NO: 171) kodiert wird, wobei X I oder M ist;

b. eine CDR2 der schweren Kette, die von einer Aminosäuresequenz umfassend die Formel YISPSGGXTHYADSVKG (SEQ ID NO: 172) kodiert wird, wobei X S oder K ist; und

c. eine CDR3 der schweren Kette, die von einer Aminosäuresequenz umfassend die Formel GGDTYFDYFDY (SEQ ID NO: 173) kodiert wird;

und eine variable leichte Kette umfassend:

d. eine CDR1 der leichten Kette, die von einer Aminosäuresequenz umfassend die Formel RASQSISXYLN (SEQ ID NO: 174) kodiert wird, wobei X G oder S ist;

e. eine CDR2 der leichten Kette, die von einer Aminosäuresequenz umfassend die Formel XASSLQS (SEQ ID NO: 175) kodiert wird, wobei X Q , A oder N ist; und

f. eine CDR3 der leichten Kette, die von einer Aminosäuresequenz umfassend die Formel QQSYXXPXIT (SEQ ID NO: 176) kodiert wird, wobei X an der Position 5 T oder S ist, X an der Position 6 T oder S ist und X an der Position 8 G oder F ist.

40. Konjugat einem oder mehreren der Ansprüche 20 bis 39, umfassend:

a. eine variable Sequenz der schweren Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:10 , sowie eine variable Sequenz der leichten Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:9 oder

b. eine variable Sequenz der schweren Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:20 , sowie eine variable Sequenz der leichten Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:19 oder

c. eine variable Sequenz der schweren Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:30 , sowie eine variable Sequenz der leichten Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:29 oder

d. eine variable Sequenz der schweren Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:40 , sowie eine variable Sequenz der leichten Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:39 oder

e. eine variable Sequenz der schweren Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:50 , sowie eine variable Sequenz der leichten Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:49 oder

f. eine variable Sequenz der schweren Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:60 , sowie eine variable Sequenz der leichten Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:59 oder

g. eine variable Sequenz der schweren Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:70 , sowie eine variable Sequenz der leichten Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:69 oder

h. eine variable Sequenz der schweren Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:80 , sowie eine variable Sequenz der leichten Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:79 oder

i. eine variable Sequenz der schweren Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:90 , sowie eine variable Sequenz der leichten Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:89 oder

j. eine variable Sequenz der schweren Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:100 , sowie eine variable Sequenz der leichten Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:99 oder

k. eine variable Sequenz der schweren Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:110 , sowie eine variable Sequenz der leichten Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:109 oder

l. eine variable Sequenz der schweren Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:120 , sowie eine variable Sequenz der leichten Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:119.

41. Konjugat einem oder mehreren der Ansprüche 20 bis 40, wobei der Antikörper ein IgG Antikörper ist.

42. Konjugat einem oder mehreren der Ansprüche 20 bis 41, umfassend:

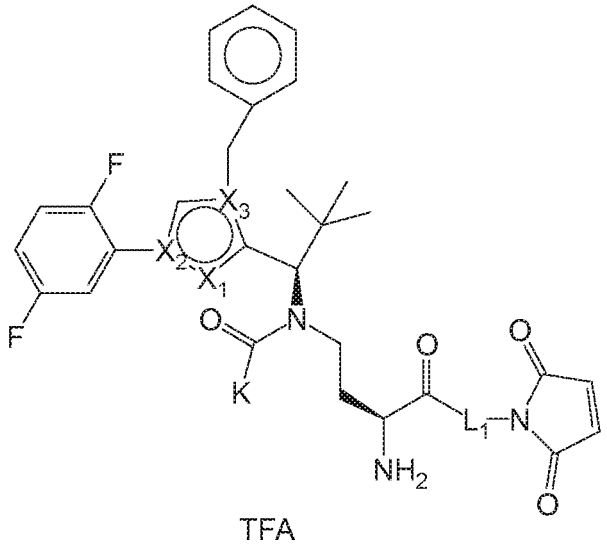
a. eine Sequenz der schweren Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:2 , sowie eine Sequenz der leichten Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:1 oder

b. eine Sequenz der schweren Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:12, sowie eine Sequenz der leichten Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:11 oder

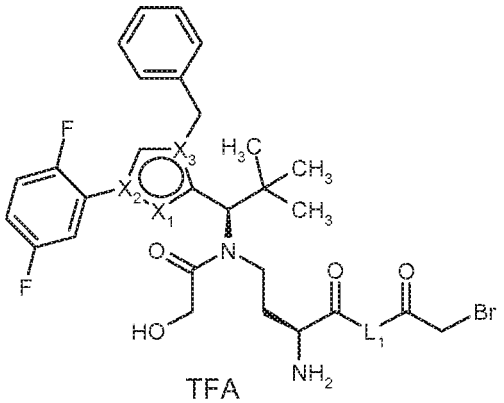
c. eine Sequenz der schweren Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:22, sowie eine Sequenz der leichten Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:21 oder
d. eine Sequenz der schweren Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:32, sowie eine Sequenz der leichten Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:31 oder
e. eine Sequenz der schweren Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:42, sowie eine Sequenz der leichten Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:41 oder
f. eine Sequenz der schweren Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:52, sowie eine Sequenz der leichten Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:51 oder
g. eine Sequenz der schweren Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:62, sowie eine Sequenz der leichten Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:61 oder
h. eine Sequenz der schweren Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:72, sowie eine Sequenz der leichten Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:71 oder
i. eine Sequenz der schweren Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:82, sowie eine Sequenz der leichten Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:81 oder
j. eine Sequenz der schweren Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:92, sowie eine Sequenz der leichten Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:91 oder
k. eine Sequenz der schweren Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:102, sowie eine Sequenz der leichten Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:101 oder
l. eine Sequenz der schweren Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:112, sowie eine Sequenz der leichten Kette, wie dargestellt durch SEQ ID NO:111.

43. Spindel-Konjugat nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Konjugat 1 bis 10, vorzugsweise 2 bis 8, Wirkstoffmoleküle pro Binderpeptid oder –protein aufweist.

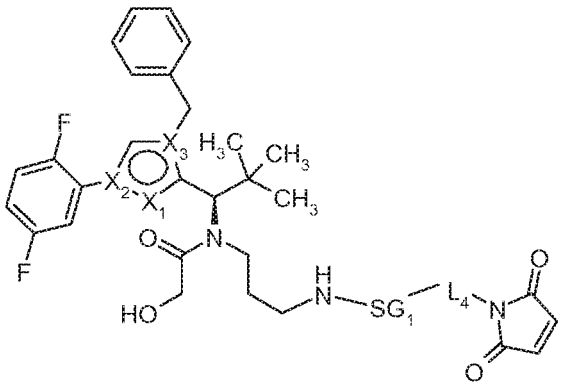
44. Verfahren zur Herstellung des Konjugats nach Anspruch 30 oder 34, wobei eine Verbindung einer der folgenden Formeln, vorzugsweise in Form ihres Trifluoressigsäuresalzes, an einen Cysteinrest eines zuvor ggf. partiell reduzierten Binderpeptids oder –proteins gebunden wird, wobei die Verbindung vorzugsweise in 2 bis 12 fachem molaren Überschuss gegenüber dem Binderpeptid- oder protein verwendet wird:

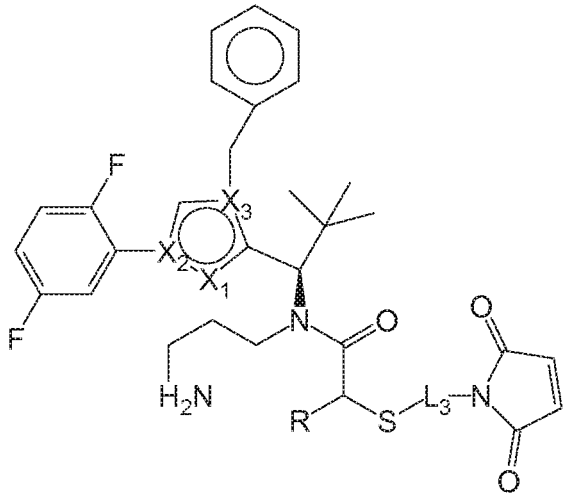


TFA

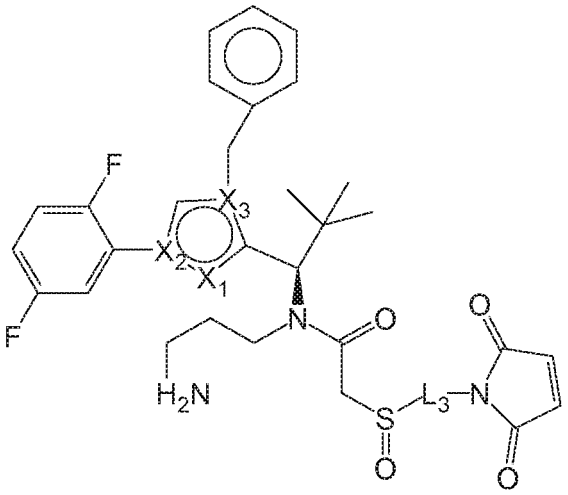


TFA

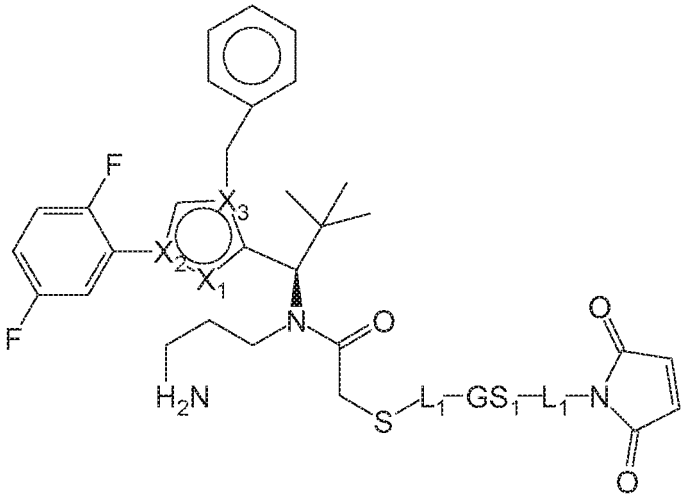




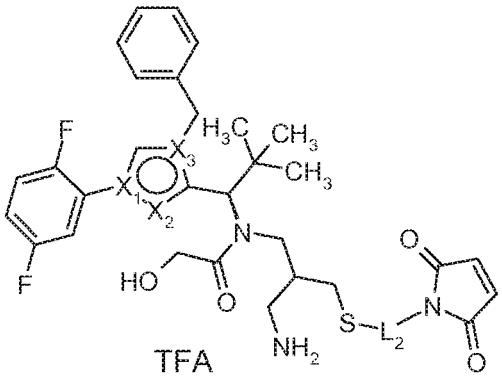
TFA



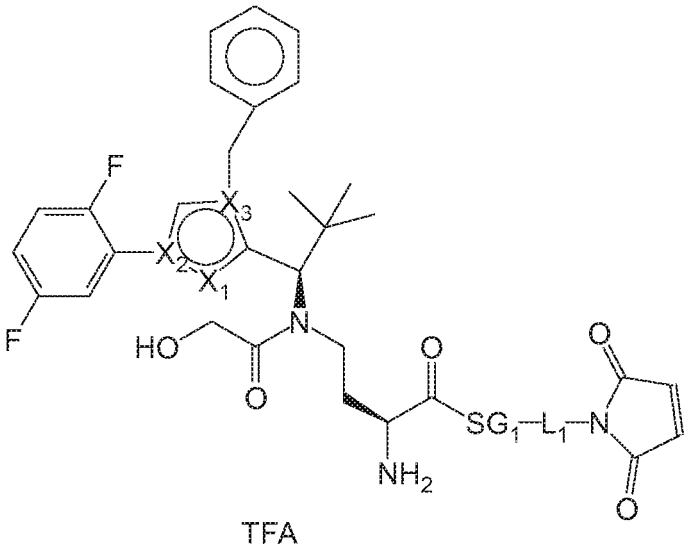
TFA



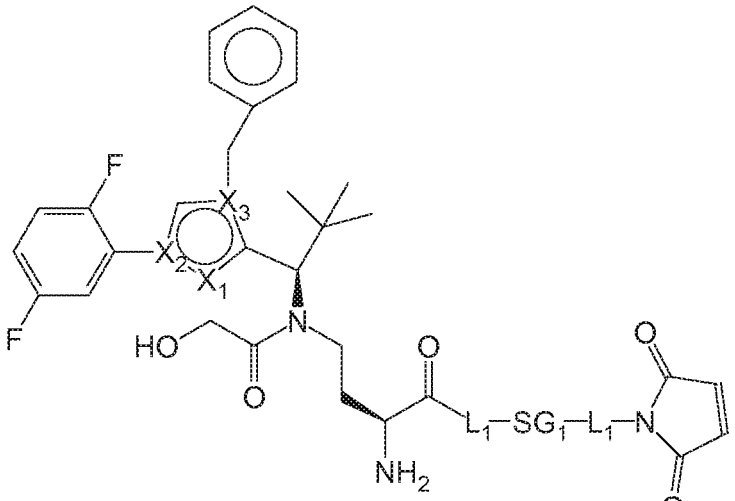
TFA



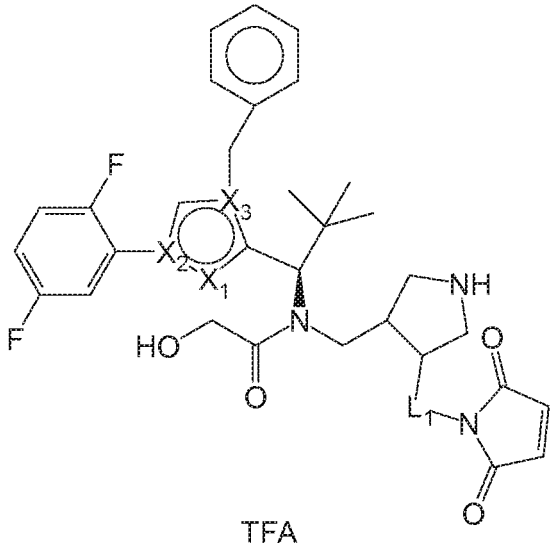
TFA



TFA

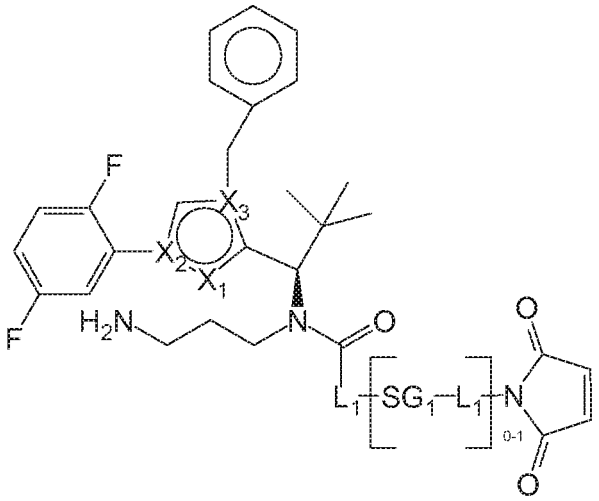


TFA

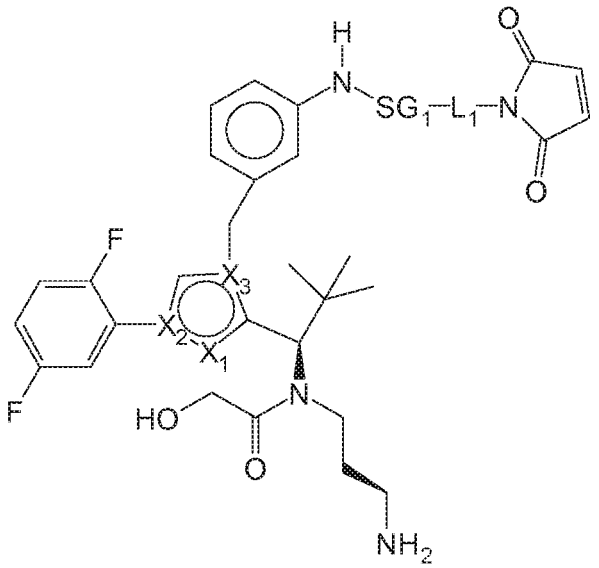


TFA

5



TFA



TFA

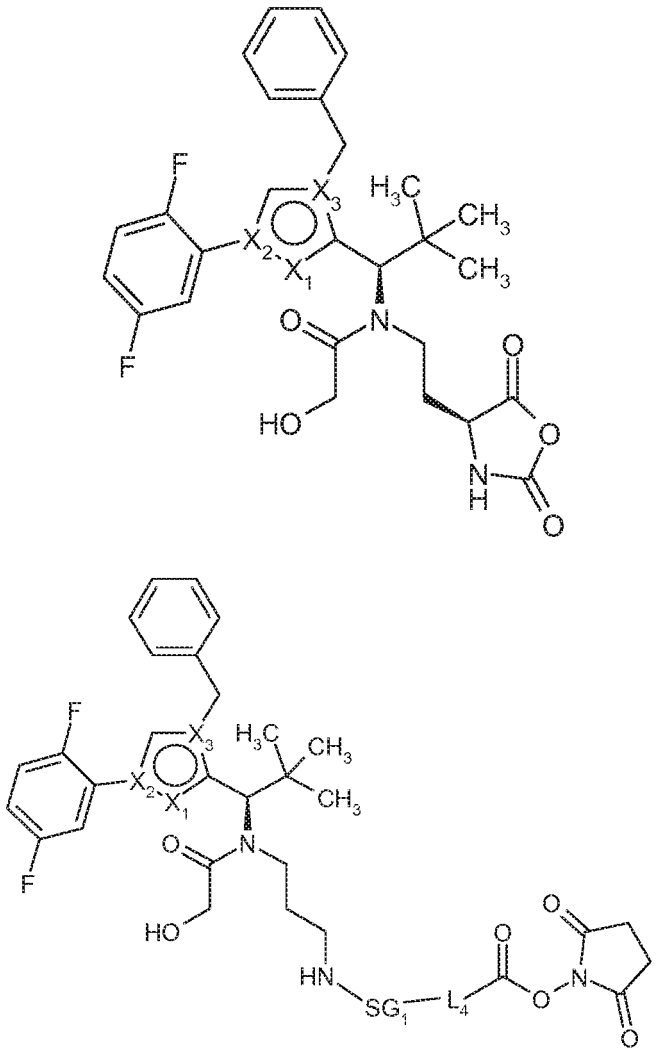
wobei R –H oder –COOH darstellt,

wobei K lineares oder verzweigtes gegebenenfalls substituiertes mit C_1-C_6 Alkoxy oder –OH C_1-C_6 Alkyl sarstellt, und

wobei X_1, X_2, X_3, SG1, L1, L2, L3 und L4 die gleiche Bedeutung haben wie in Anspruch 30, bzw. 34.

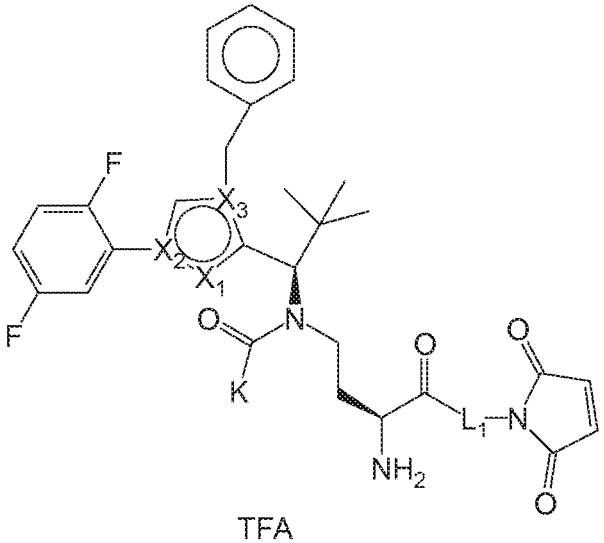
45. Verfahren zur Herstellung des Konjugats nach Anspruch 44, wobei eine Verbindung einer der folgenden Formeln, vorzugsweise in Form ihres Trifluoressigsäuresalzes, an einen Lysinrest

eines Binderpeptids oder –proteins gebunden wird, wobei die Verbindung vorzugsweise in 2 bis 12 fachem molaren Überschuss gegenüber dem Binderpeptid- oder protein verwendet wird:

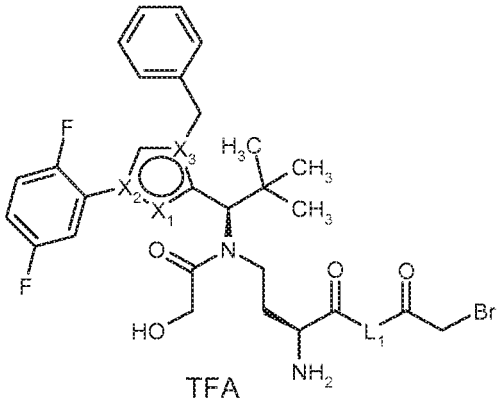


wobei X_1, X_2, X_3, SG1, und L4 die gleiche Bedeutung haben wie in Anspruch 36.

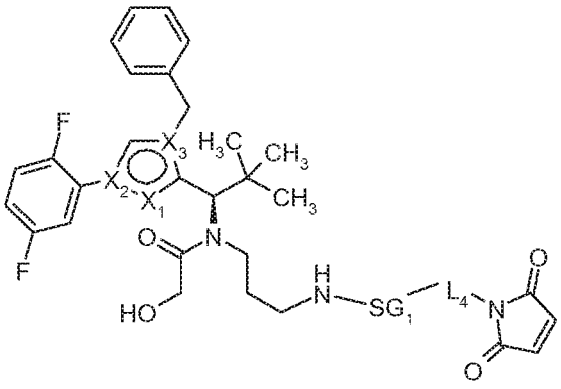
46. Verbindung einer der folgenden Formeln:

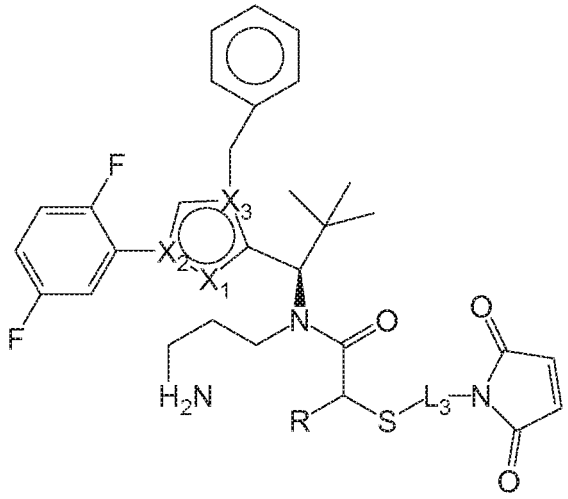


TFA

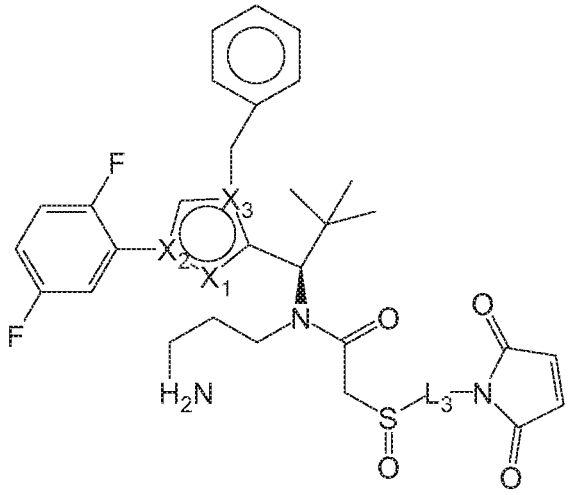


TFA

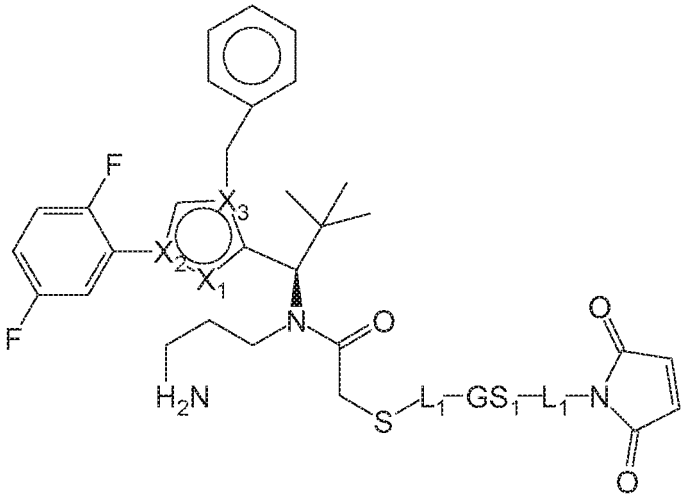




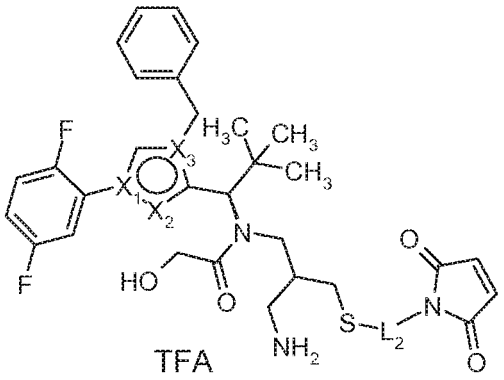
TFA



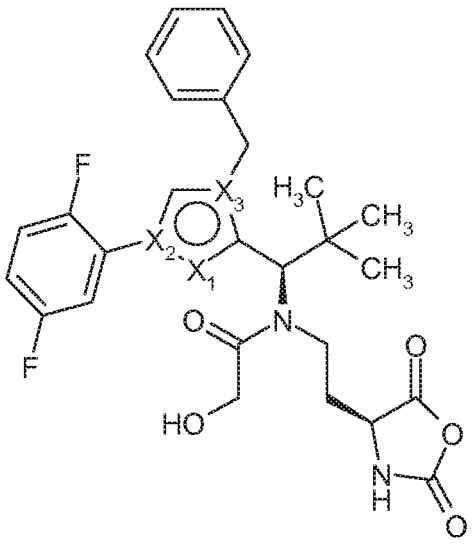
TFA

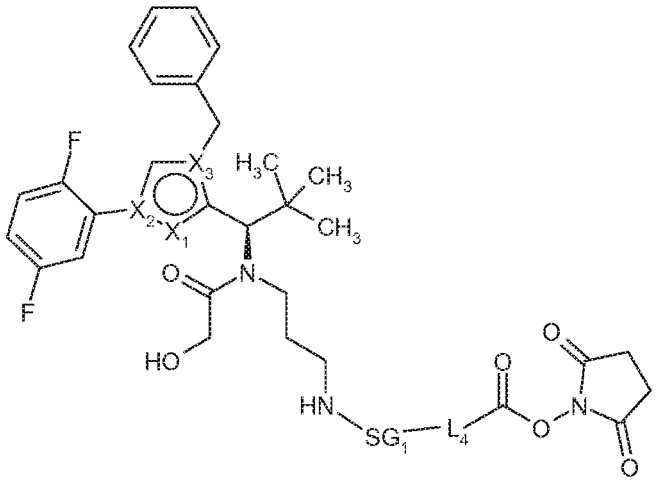


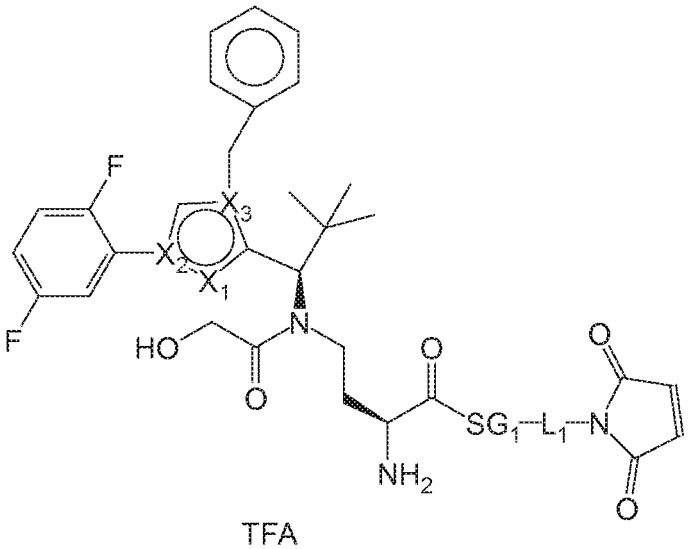
TFA



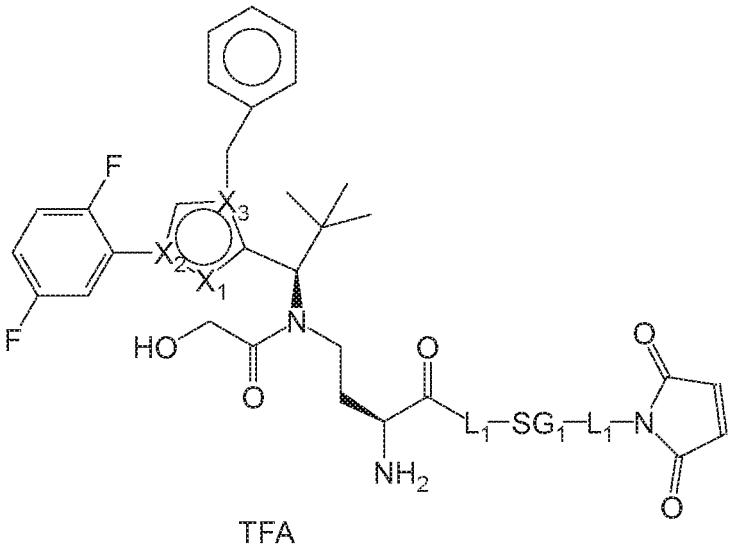
TFA



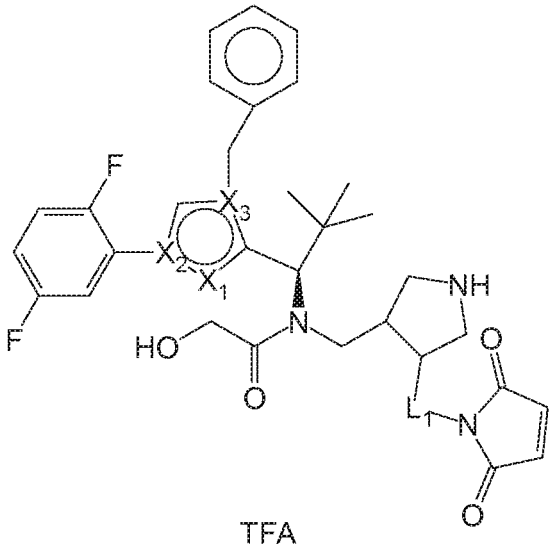




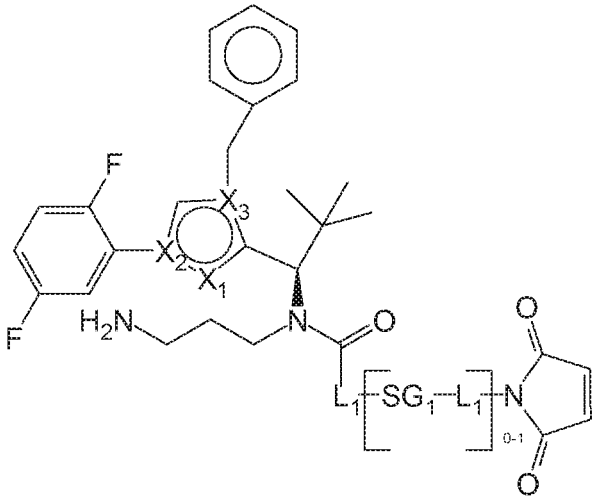
TFA



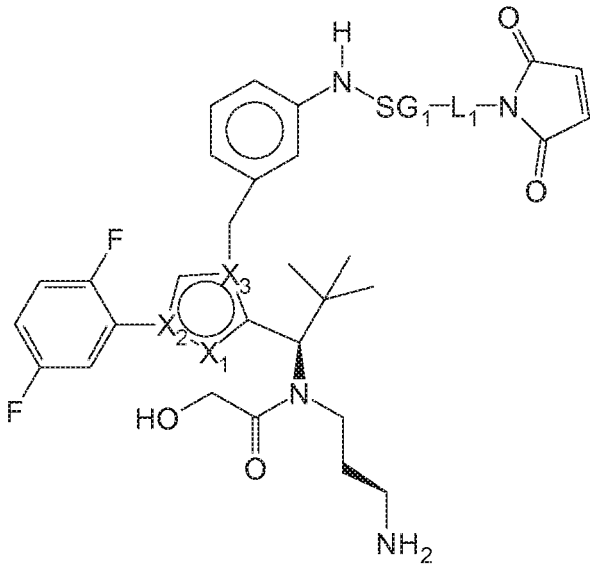
TFA



TFA



TFA



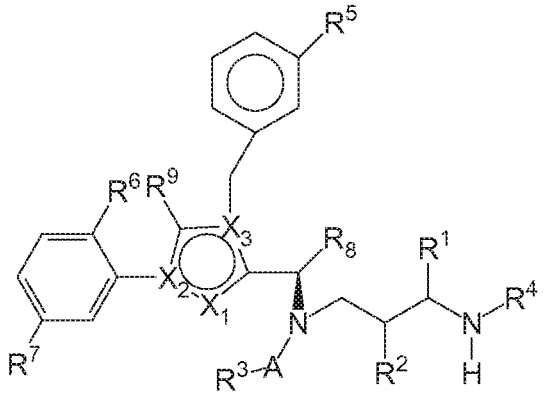
TFA

wobei R –H oder –COOH darstellt,

wobei K lineares oder verzweigtes gegebenenfalls substituiertes mit C_1-C_6 Alkoxy oder –OH C_1-C_6 Alkyl sarstellt, und

wobei X_1, X_2, X_3, SG1, L1, L2, L3 und L4 die gleiche Bedeutung haben wie in Anspruch 26, 30 bzw. 32.

47. Verbindungen der allgemeinen Formel (III):



(III)

wobei

X_1 N, X_2 N und X_3 C darstellt, oder X_1 CH, X_2 C und X_3 N darstellt oder X_1 NH, X_2 C und X_3 C darstellt, oder X_1 CH, X_2 N und X_3 C darstellt;

R^1 –L-BINDER, H, oder $-(CH_2)_{0-3}Z$ darstellt, wobei Z –H, $-NHY^3$, $-OY^3$, $-SY^3$, Halogen, $-CO-NY^1Y^2$, oder $-CO-OY^3$ darstellt,

wobei Y^1 und Y^2 unabhängig voneinander H, NH2, -$(CH_2CH_2O)_{0-3}$-$(CH_2)_{0-3}$Z', oder –$CH(CH_2W)Z'$ darstellen, und Y^3 H oder –$(CH_2)_{0-3}Z'$ darstellt, wobei Z' H, NH_2, SO_3H, COOH, -NH-CO-CH_2-CH_2-$CH(NH_2)$COOH oder –$(CO\text{-}NH\text{-}CHY^4)_{1-3}$COOH darstellt, wobei W H oder OH darstellt;

wobei Y^4 unabhängig voneinander lineares oder verzweigtes, gegebenenfalls mit–$NHCONH_2$ substituiertes, C_{1-6} Alkyl oder gegebenenfalls mit –NH_2 substituiertes Aryl oder Benzyl darstellt;

R^2 und R^4 unabhängig voneinander –L-BINDER, H, -CO-CHY^4-NHY^5 oder –$(CH_2)_{0-3}Z$ darstellen, oder R^2 und R^4 gemeinsam (unter Bildung eines Pyrrolidinringes) –CH_2-CHR^{10}- oder –CHR^{10}-CH_2- darstellen, wobei R^{10} L-#1, H, NH_2, SO_3H, COOH, SH, oder OH darstellt;
wobei Z –H, Halogen, -OY^3, -SY^3, NHY^3, -CO-NY^1Y^2, oder –CO-OY^3 darstellt,
wobei Y^1 und Y^2 unabhängig voneinander H, NH_2, oder –$(CH_2)_{0-3}Z'$ darstellen, und Y^3 H oder –$(CH_2)_{0-3}Z'$ darstellt, wobei Z' H, SO_3H, NH_2 oder COOH darstellt;
wobei Y^4 unabhängig voneinander lineares oder verzweigtes, gegebenenfalls mit–$NHCONH_2$ substituiertes, C_{1-6} Alkyl oder gegebenenfalls mit –NH_2 substituiertes Aryl oder Benzyl darstellt und Y^5 H oder –CO-CHY^6-NH_2 darstellt, wobei Y^6 lineares oder verzweigtes C_{1-6} Alkyl darstellt;

A CO, SO, SO_2, SO_2NH oder CNNH darstellt;

R^3 –L-BINDER oder eine gegebenenfalls substituierte Alkyl-, Aryl-, Heteroaryl- Heteroalkyl-, Heterocycloalkyl- Gruppe darstellt, bevorzugt –L-#1 oder eine C_{1-10}-Alkyl-, C_{6-10}-Aryl- oder C_{6-10}-Aralkyl-, C_{5-10}-Heteroalkyl-, C_{1-10}-Alkyl-O-C_{6-10}-Aryl- oder C_{5-10}-Heterocycloalkyl-Gruppe, die mit 1-3 –OH Gruppen, 1-3 Halogenatomen, 1-3 halogenierten Alkylgruppen (die jeweils 1-3 Halogenatome aufweisen), 1-3 O-Alkyl Gruppen, 1-3 –SH Gruppen, 1-3 –S-Alkyl Gruppen, 1-3 –O-CO-Alkyl Gruppen, 1-3 –O-CO-NH-Alkyl Gruppen, 1-3 –NH-CO-Alkyl Gruppen, 1-3 –NH-CO-NH-Alkyl Gruppen, 1-3 –$S(O)_n$-Alkyl Gruppen, 1-3 –SO_2-NH-Alkyl Gruppen, 1-3 –NH-Alkyl Gruppen, 1-3 –$N(Alkyl)_2$ Gruppen, 1-3 –NH_2 Gruppen oder 1-3 –$(CH_2)_{0-3}Z$ Gruppen, wobei Z –H, Halogen, -OY^3, -SY^3, NHY^3, -CO-NY^1Y^2, oder –CO-OY^3 darstellt, mit Y^1 und Y^2 unabhängig voneinander H, NH_2, oder –$(CH_2)_{0-3}Z'$ darstellen, und Y^3 H, -$(CH_2)_{0-3}$-$CH(NHCOCH_3)Z'$,-$(CH_2)_{0-3}$-$CH(NH_2)Z'$, oder –$(CH_2)_{0-3}Z'$ darstellt, wobei Z' H, SO_3H, NH_2 oder COOH darstellt,
substituiert sein kann (wobei „Alkyl" bevorzugt C_{1-10}-Alkyl bedeutet);

R^5 –L-BINDER, H, F, NH_2, NO_2, Halogen, SH oder $-(CH_2)_{0-3}Z$ darstellt, wobei Z –H, Halogen, $-OY^3$, $-SY^3$, $-NHY^3$, $-CO-NY^1Y^2$, oder –CO-OY^3 darstellt,
wobei Y^1 und Y^2 unabhängig voneinander H, NH_2, oder $-(CH_2)_{0-3}Z'$ darstellen, und Y^3 H oder $-(CH_2)_{0-3}Z'$ darstellt, wobei Z' H, SO_3H, NH_2 oder COOH darstellt;
darstellt,

wobei L für einen Linker steht und BINDER für Binder bzw. Derivat hiervon steht, wobei der Binder ggf. an mehrere Wirkstoffmoleküle gebunden sein kann,

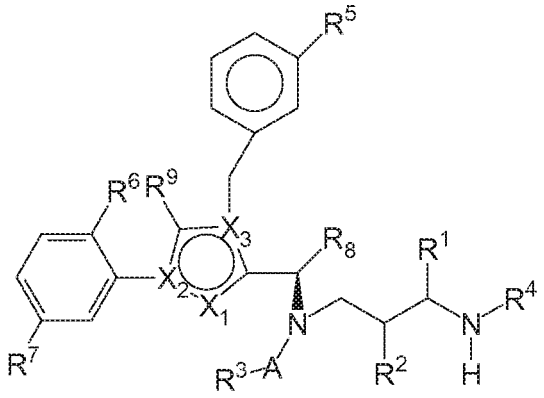
R^6 und R^7 unabhängig voneinander H, Cyano, (ggf. fluoriertes) C_{1-10}-Alkyl, (ggf. fluoriertes) C_{2-10}-Alkenyl, (ggf. fluoriertes) C_{2-10}-Alkinyl, Hydroxy oder Halogen darstellen,

R^8 (ggf. fluoriertes) C_{1-10}-Alkyl, (ggf. fluoriertes) C_{4-10}-Cycloalkyl oder optional substituiertes Oxetan darstellt; und

R^9 H, F, CH_3, CF_3, CH_2F oder CHF_2 darstellt;

sowie ihre Salze, Solvate und Salze der Solvate.

48. Verbindungen der allgemeinen Formel (IV):



(IV)

wobei
X_1 CH, X_2 C und X_3 N darstellt;
R^1 –L-BINDER, H, oder $-(CH_2)_{0-3}Z$ darstellt, wobei Z –H, $-NHY^3$, $-OY^3$, $-SY^3$, Halogen, $-CO-NY^1Y^2$, oder –CO-OY^3 darstellt,
wobei Y^1 und Y^2 unabhängig voneinander H, NH2, $-(CH_2CH_2O)_{0-3}-(CH_2)_{0-3}Z'$, oder $-CH(CH_2W)Z'$ darstellen, und Y^3 H oder $-(CH_2)_{0-3}Z'$ darstellt, wobei Z' H, NH_2, SO_3H, COOH,

-NH-CO-CH_2-CH_2-CH(NH_2)COOH oder –(CO-NH-CHY^4)$_{1-3}$COOH darstellt; wobei W H oder OH darstellt;

wobei Y^4 unabhängig voneinander lineares oder verzweigtes, gegebenenfalls mit –$NHCONH_2$ substituiertes, C_{1-6} Alkyl oder gegebenenfalls mit –NH_2 substituiertes Aryl oder Benzyl darstellt;

R^2 und R^4 unabhängig voneinander –L-BINDER, H, -CO-CHY^4-NHY^5 oder –$(CH_2)_{0-3}Z$ darstellen, oder R^2 und R^4 gemeinsam (unter Bildung eines Pyrrolidinringes) –CH_2-CHR^{10}- oder –CHR^{10}-CH_2- darstellen, wobei R^{10} L-#1, H, NH_2, SO_3H, COOH, SH, oder OH darstellt;

wobei Z –H, Halogen, -OY^3, -SY^3, NHY^3, -CO-NY^1Y^2, oder –CO-OY^3 darstellt,

wobei Y^1 und Y^2 unabhängig voneinander H, NH_2, oder –$(CH_2)_{0-3}Z'$ darstellen, und Y^3 H oder –$(CH_2)_{0-3}Z'$ darstellt, wobei Z' H, SO_3H, NH_2 oder COOH darstellt;

wobei Y^4 unabhängig voneinander lineares oder verzweigtes, gegebenenfalls mit–$NHCONH_2$ substituiertes, C_{1-6} Alkyl oder gegebenenfalls mit –NH_2 substituiertes Aryl oder Benzyl darstellt und Y^5 H oder –CO-CHY^6-NH_2 darstellt, wobei Y^6 lineares oder verzweigtes C_{1-6} Alkyl darstellt;

A CO, SO, SO_2, SO_2NH oder CNNH darstellt;

R^3 –L-BINDER oder eine gegebenenfalls substituierte Alkyl-, Aryl-, Heteroaryl- Heteroalkyl-, Heterocycloalkyl- Gruppe darstellt,

bevorzugt –L-#1 oder eine C_{1-10}-Alkyl-, C_{6-10}-Aryl- oder C_{6-10}-Aralkyl-, C_{5-10}-Heteroalkyl-, C_{1-10}-Alkyl-O-C_{6-10}-Aryl- oder C_{5-10}-Heterocycloalkyl-Gruppe,

die mit 1-3 –OH Gruppen, 1-3 Halogenatomen, 1-3 halogenierten Alkylgruppen (die jeweils 1-3 Halogenatome aufweisen), 1-3 O-Alkyl Gruppen, 1-3 –SH Gruppen, 1-3 –S-Alkyl Gruppen, 1-3 –O-CO-Alkyl Gruppen, 1-3 –O-CO-NH-Alkyl Gruppen, 1-3 –NH-CO-Alkyl Gruppen, 1-3 –NH-CO-NH-Alkyl Gruppen, 1-3 –$S(O)_n$-Alkyl Gruppen, 1-3 –SO_2-NH-Alkyl Gruppen, 1-3 –NH-Alkyl Gruppen, 1-3 –$N(Alkyl)_2$ Gruppen, 1-3 –NH_2 Gruppen oder 1-3 –$(CH_2)_{0-3}Z$ Gruppen, wobei Z –H, Halogen, -OY^3, -SY^3, -NHY^3, -CO-NY^1Y^2, oder –CO-OY^3 darstellt, wobei Y^1 und Y^2 unabhängig voneinander H, NH_2, oder –$(CH_2)_{0-3}Z'$ darstellen, und Y^3 H, -$(CH_2)_{0-3}$-CH($NHCOCH_3$)Z', -$(CH_2)_{0-3}$-CH(NH_2)Z', oder –$(CH_2)_{0-3}Z'$ darstellt, wobei Z' H, SO_3H, NH_2 oder COOH darstellt,

substituiert sein kann

(wobei „Alkyl" bevorzugt C_{1-10}-Alkyl bedeutet);

R^5 –L-BINDER, H, F, NH_2, NO_2, Halogen, SH oder $-(CH_2)_{0-3}Z$ darstellt, wobei Z –H, Halogen, $-OY^3$, $-SY^3$, $-NHY^3$, $-CO-NY^1Y^2$, oder $-CO-OY^3$ darstellt,
wobei Y^1 und Y^2 unabhängig voneinander H, NH_2, oder $-(CH_2)_{0-3}Z'$ darstellen, und Y^3 H oder $-(CH_2)_{0-3}Z'$ darstellt, wobei Z' H, SO_3H, NH_2 oder COOH darstellt;
darstellt,

wobei L für einen Linker steht und BINDER für Binder bzw. Derivat hiervon steht, wobei der Binder ggf. an mehrere Wirkstoffmoleküle gebunden sein kann,

R^6 und R^7 unabhängig voneinander H, Cyano, (ggf. fluoriertes) C_{1-10}-Alkyl, (ggf. fluoriertes) C_{2-10}-Alkenyl, (ggf. fluoriertes) C_{2-10}-Alkinyl, Hydroxy oder Halogen darstellen,

R^8 (ggf. fluoriertes) C_{1-10}-Alkyl, (ggf. fluoriertes) C_{4-10}-Cycloalkyl oder optional substituiertes Oxetan darstellt; und

R^9 H, F, CH_3, CF_3, CH_2F oder CHF_2 darstellt;

sowie ihre Salze, Solvate und Salze der Solvate.

49. Verbindung nach Anspruch 48, wobei Z Cl oder Br darstellt.

50. Verbindung nach Anspruch 48, wobei R^1 $-(CH_2)_{0-3}Z$ darstellt, wobei Z $-CO-NY^1Y^2$ darstellt, wobei Y^2 $-(CH_2CH_2O)_{0-3}-(CH_2)_{0-3}Z'$ und Y^1 H, NH2, oder $-(CH_2CH_2O)_{0-3}-(CH_2)_{0-3}Z'$darstellt.

51. Verbindung nach einem oder mehreren der Ansprüche 48-50 wobei Y^1 H darstellt, Y^2 $-(CH_2CH_2O)_3-CH_2CH_2Z'$ darstellt und Z' –COOH darstellt.

52. Verbindung nach einem oder mehreren der Ansprüche 48-50, wobei Y^1 H darstellt, Y^2 $-CH_2CH_2Z'$ darstellt und Z' $-(CONHCHY^4)_2COOH$ stellt.

53. Verbindung nach dem Anspruch 48, wobei Y^4 lineares oder verzweigtes, gegebenenfalls mit $-NHCONH_2$ substituiertes, C_{1-6} Alkyl darstellt.

54. Verbindung nach dem Anspruch 48, wobei mindestens ein Vertreter von Y^4 ausgewählt wird aus *i*-propyl or $-CH_3$.

55. Verbindung nach einem oder mehreren der Ansprüche 48 and 50, wobei Y^1 H darstellt, Y^2 – CH_2CH_2Z' darstellt, Z' –CONHCHY^{4}COOH darstellt und Y^4 gegebenenfalls mit $–NH_2$ substituiertes Aryl oder Benzyl darstellt.

56. Verbindung nach dem Anspruch 55, wobei Y^4 Aminobenzyl darstellt.

57. Verbindung nach dem Anspruch 48, wobei R^2 $–(CH_2)_{0-3}Z$ darstellt und Z $–SY^3$ darstellt.

58. Verbindung nach dem Anspruch 48, wobei R^4 –CO-CHY^4-NHY^5 darstellt und Y^5 H darstellt.

59. Verbindung nach dem Anspruch 48 wobei R^4 –CO-CHY^4-NHY^5 darstellt und Y^5–CO-CHY^6-NH_2 darstellt.

60. Verbindung nach einem oder mehreren der Ansprüche 58 und 59, wobei Y^4 lineares oder verzweigtes, gegebenenfalls mit $–NHCONH_2$ substituiertes C_{1-6} Alkyl darstellt.

61. Verbindung nach eine oder mehrere Anspruche von 48 bis 60, wobei der Verbindung eine der folgende Formeln aufweist:

N-(3-Aminopropyl)-N-{(1R)-1-[4-benzyl-1-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrazol-3-yl]-2,2-dimethylpropyl}-2-hydroxyacetamid;

N-(3-Aminopropyl)-N-{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-2-hydroxyacetamid;

(2S)-2-amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]-N-methylbutanamid(1:1);

N-(3-Aminopropyl)-N-{(1S)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2yl]-2,2-dimethylpropyl}acetamid.

(15S,19R)-15-Amino-19-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-18-glycoloyl-20,20-dimethyl-14-oxo-4,7,10-trioxa-13,18-diazabenicosan-1-säure;

N-{(2S)-2-Amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}-beta-alanyl-L-valyl-N^5-carbamoyl-L-ornithin;

N-{(2S)-2-Amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}-beta-alanyl-L-alanyl-N^5-carbamoyl-L-ornithin;

N-{(2S)-2-Amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}-beta-alanyl-4-amino-L-phenylalanin;

N-{(1R)-1-[1-(3-aminobenzyl)-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-N-(3-aminopropyl)-2-hydroxyacetamid(1:1);

(2S)-2-Amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butansäure;

N-[(3S)-3-amino-4-hydrazino-4-oxobutyl]-N-{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-2-hydroxyacetamid(1:1);

N-{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-N-[(3S)-3,4-diaminobutyl]-2-hydroxyacetamid(1:1);

N-{(2S)-2-Amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}-beta-alanin;

(2S)-2-amino-N-(2-aminoethyl)-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanamid(2:1);

(1-{(2S)-2-Amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}hydrazino)essigsäure;

N-[3-Amino-2-(sulfanylmethyl)propyl]-N-{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-2-hydroxyacetamidhydrochlorid(1:1);

4-amino-N-(3-aminopropyl)-N-{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}benzamid(2:1);

N-{3-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]propyl}-N5-carbamoyl-L-ornithinamid(1:1);

L-valyl-N-{3-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]propyl}-N5-carbamoyl-L-ornithinamid(1:1);

L-valyl-N-{3-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]propyl}-N5-carbamoyl-L-ornithinamid(1:1);

N-(3-Aminopropyl)-N-{(1S)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-2-hydroxyacetamid;

S-(1-{2-[(N-{(2S)-2-Amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}-beta-alanyl)amino]ethyl}-2,5-dioxopyrrolidin-3-yl)-L-cystein;

S-[1-(2-{[2-({(2S)-2-Amino-4-[{(1R)-1-[4-benzyl-1-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrazol-3-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}amino)ethyl]amino}-2-oxoethyl)-2,5-dioxopyrrolidin-3-yl]-L-cystein:

N-{(2S)-2-Amino-4-[{(1R)-1-[4-benzyl-1-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrazol-3-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}-beta-alanyl-L-alanyl-N-[4-(3-{[(2R)-2-amino-2-carboxyethyl]sulfanyl}-2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)phenyl]-N^5-carbamoyl-L-ornithinamid;

S-(1-{2-[(N-{(2S)-2-Amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}-beta-alanyl)amino]ethyl}-2,5-dioxopyrrolidin-3-yl)-L-cystein;

S-[1-(2-{[2-({(2S)-2-Amino-4-[{(1R)-1-[4-benzyl-1-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrazol-3-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}amino)ethyl]amino}-2-oxoethyl)-2,5-dioxopyrrolidin-3-yl]-L-cystein;N-{(2S)-2-Amino-4-[{(1R)-1-[4-benzyl-1-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrazol-3-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}-beta-alanyl-L-alanyl-N-[4-(3-{[(2R)-2-amino-2-carboxyethyl]sulfanyl}-2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)phenyl]-N^5-carbamoyl-L-ornithinamid;

S-(1-{2-[(N-{(2S)-2-Amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}-beta-alanyl)amino]ethyl}-2,5-dioxopyrrolidin-3-yl)-L-cystein;

N-[6-(3-{[(2R)-2-Amino-2-carboxyethyl]sulfanyl}-2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)hexanoyl]-L-valyl-N^5-carbamoyl-L-ornithyl-N^6-{(2S)-2-amino-4-[{(1R)-1-[4-benzyl-1-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrazol-3-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}-L-lysin;

S-[1-(2-{[2-({(2S)-2-Amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}amino)ethyl]amino}-2-oxoethyl)-2,5-dioxopyrrolidin-3-yl]-L-cystein;

S-(2-{[2-({(2S)-2-Amino-4-[{(1R)-1-[4-benzyl-1-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrazol-3-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}amino)ethyl]amino}-2-oxoethyl)-L-cystein;

S-{1-[6-(2-{(2S)-2-Amino-4-[{(1R)-1-[4-benzyl-1-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrazol-3-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}hydrazino)-6-oxohexyl]-2,5-dioxopyrrolidin-3-yl}-L-cystein;

N-[19-(3(R/S)-{[(2R)-2-Amino-2-carboxyethyl]sulfanyl}-2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)-17-oxo-4,7,10,13-tetraoxa-16-azanonadecan-1-oyl]-R/S-{2-[(3-aminopropyl){(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}amino]-2-oxoethyl}homocystein;

S-{(3R/S)-1-[2-({(2S)-2-Amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}amino)ethyl]-2,5-dioxopyrrolidin-3-yl}-L-cystein;

N-[19-(3(R/S)-{[(2R)-2-Amino-2-carboxyethyl]sulfanyl}-2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)-17-oxo-4,7,10,13-tetraoxa-16-azanonadecan-1-oyl]-R/S-{2-[(3-aminopropyl){(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}amino]-2-oxoethyl}homocystein;

S-[(3R/S)-1-(2-{[6-({2-[(3-Aminopropyl){(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}amino]-2-oxoethyl}sulfanyl)hexanoyl]amino}ethyl)-2,5-dioxopyrrolidin-3-yl]-L-cystein;

S-{1-[2-({[(1R,3S)-3-({(2S)-2-Amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}amino)cyclopentyl]carbonyl}amino)ethyl]-2,5-dioxopyrrolidin-3-yl}-L-cystein;

S-(2-{[2-({(2S)-2-Amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}amino)ethyl]amino}-2-oxoethyl)-L-cystein;

N^6-(N-{(2S)-2-Amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-imidazol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}-D-alanyl)-L-lysin;

N^6-(N-{(2S)-2-Amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}-beta-alanyl)-N^2-{N-[6-(3-{[(2R)-2-amino-2-carboxyethyl]sulfanyl}-2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)hexanoyl]-L-valyl-L-alanyl}-L-lysin;

N-[2-({(2S)-2-Amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}amino)ethyl]-L-glutamin;

N^6-(N-{(2S)-2-Amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}-beta-alanyl)-L-lysin;

N-(3-Aminopropyl)-N-{(1R)-1-[4-benzyl-1-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrazol-3-yl]-2,2-dimethylpropyl}acetamid;

N-(3-Aminopropyl)-N-{(1R)-1-[4-benzyl-1-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrazol-3-yl]-2,2-dimethylpropyl}-2-methoxyacetamid;

N-(3-Aminopropyl)-N-{(1R)-1-[4-benzyl-1-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrazol-3-yl]-2,2-dimethylpropyl}-2,4-difluorobenzamid;

N-(3-Aminopropyl)-N-{(1R)-1-[4-benzyl-1-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrazol-3-yl]-2,2-dimethylpropyl}-4-methylbenzamid;

N-(3-Aminopropyl)-N-{(1R)-1-[4-benzyl-1-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrazol-3-yl]-2,2-dimethylpropyl}-2-ethoxyacetamid;

N-(3-Aminopropyl)-N-{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-3,3,3-trifluorpropanamid;

N-(3-Aminopropyl)-N-{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-4-fluorbenzamid;

N-(3-Aminopropyl)-N-{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}acetamid;

N-(3-Aminopropyl)-N-{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-4-(trifluoromethyl)benzamid;

N-(3-Aminopropyl)-N-{(1R)-1-[4-benzyl-1-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrazol-3-yl]-2,2-dimethylpropyl}-2-ethoxyacetamid;

N-(3-Aminopropyl)-N-{(1R)-1-[4-benzyl-1-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrazol-3-yl]-2,2-dimethylpropyl}-2-ethoxyacetamid

(2S)-2-Amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butansäure;

(2S)-2-amino-N-(2-aminoethyl)-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanamid;

4-[(2-{[2-({(2S)-2-Amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}amino)ethyl]amino}-2-oxoethyl)amino]-3-{[(2R)-2-amino-2-carboxyethyl]sulfanyl}-4-oxobutansäure;

4-[(2-{[2-({(2S)-2-Amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}amino)ethyl]amino}-2-oxoethyl)amino]-2-{[(2R)-2-amino-2-carboxyethyl]sulfanyl}-4-oxobutansäure;

N-{(2S)-2-Amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}-beta-alanin;

N-{(2S)-2-Amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}-L-serin;

N-{(2S)-2-Amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}-L-alanin;

N-{(2S)-2-Amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}glycin;

N-(3-aminopropyl)-N-{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-4-methylbenzamid;

N-(3-aminopropyl)-N-{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-4-(methylsulfanyl)benzamid;

(2S)-N-(3-aminopropyl)-N-{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-2-hydroxypropanamid;

N-(3-aminopropyl)-N-{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}-2-(methylsulfanyl)acetamid;

(2S)-N-(3-aminopropyl)-N-{(1R)-1-[4-benzyl-1-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrazol-3-yl]-2,2-dimethylpropyl}-2-hydroxypropanamid;

Methyl-4-[(3-aminopropyl){(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}amino]-4-oxobutanoat;

4-[(3-Aminopropyl){(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}amino]-4-oxobutansäure;

(2R)-22-[(3R/S)-3-{[(2R)-2-Amino-2-carboxyethyl]sulfanyl}-2,5-dioxopyrrolidin-1-yl]-2-[({2-[(3-aminopropyl){(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}amino]-2-oxoethyl}sulfanyl)methyl]-4,20-dioxo-7,10,13,16-tetraoxa-3,19-diazadocosan-1-säure;

4-amino-N-(3-aminopropyl)-N-{(1R)-1-[4-benzyl-1-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrazol-3-yl]-2,2-dimethylpropyl}benzamid;

N-Acetyl-S-{2-[(3-aminopropyl){(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}amino]-2-oxoethyl}-L-cystein;

N-Acetyl-S-[2-([3-(L-alanylamino)propyl]{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}amino)-2-oxoethyl]-L-cystein;

(2S)-N-(3-aminopropyl)-N-{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}tetrahydrofuran-2-carboxamid;

3-({2-[(3-Aminopropyl){(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}amino]-2-oxoethyl}sulfanyl)propansäure;

S-{2-[(3-Aminopropyl){(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}amino]-2-oxoethyl}homocystein;

4-amino-N-(3-aminopropyl)-N-{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}benzamid;

4-[(2-{[(2R)-2-({(2S)-2-Amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}amino)-2-carboxyethyl]amino}-2-oxoethyl)amino]-3-{[(2R)-2-amino-2-carboxyethyl]sulfanyl}-4-oxobutansäure;

4-[(2-{[(2R)-2-({(2S)-2-Amino-4-[{(1R)-1-[1-benzyl-4-(2,5-difluorphenyl)-1H-pyrrol-2-yl]-2,2-dimethylpropyl}(glycoloyl)amino]butanoyl}amino)-2-carboxyethyl]amino}-2-oxoethyl)amino]-2-{[(2R)-2-amino-2-carboxyethyl]sulfanyl}-4-oxobutansäure.

62. Pharmazeutische Zusammensetzung umfassend ein Konjugat nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 43 oder eine Verbindung nach Anspruche 48-61 in Kombination mit einem inerten, nicht-toxischen, pharmazeutisch geeigneten Hilfsstoff.

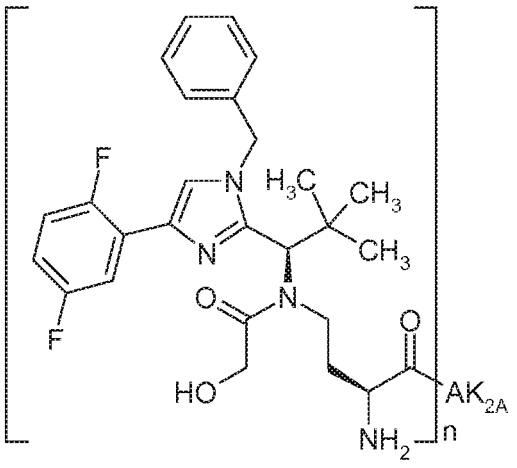
63. Konjugat nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 43 oder Verbindung nach Anspruche 48-61 zur Verwendung in einem Verfahren Behandlung und/oder Prophylaxe von Krankheiten.

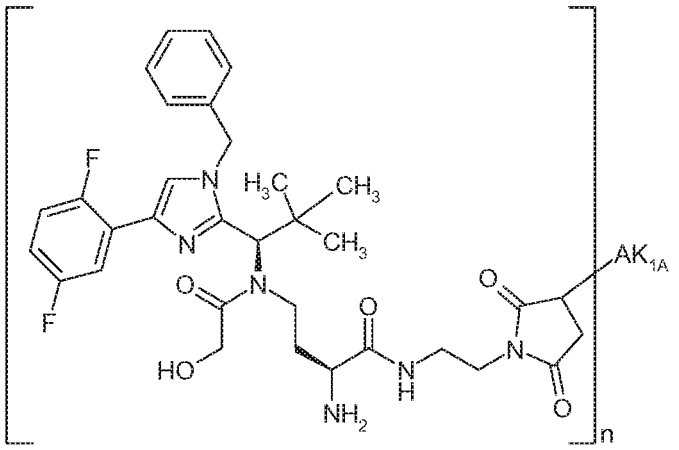
64. Konjugat nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 43 oder Verbindung nach Anspruche 48-61 zur Verwendung zur Verwendung in einem Verfahren zur Behandlung von hyperproliferativen und/oder angiogenen Erkrankungen.

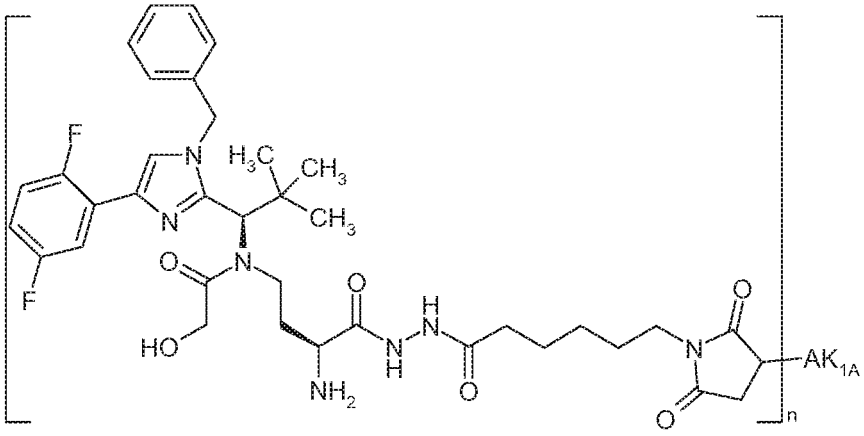
65. Konjugat nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 43 oder Verbindung nach Anspruche 48-61, wobei R^{3a} bzw. R^3 –L-BINDER oder eine substituierte Alkyl-, Aryl- oder Heteroaryl-Gruppe darstellt,
bevorzugt –L-#1 oder eine C_{1-10}-Alkyl-, C_{6-10}-Aryl- oder C_{6-10}-Aralkyl-Gruppe oder C_{5-10}-Heteroalkyl-, die mit –OH, O-Alkyl, SH, S-Alkyl, O-CO-Alkyl, O-CO-NH-Alkyl, NH-CO-Alkyl, NH-CO-NH-Alkyl, $S(O)_n$-Alkyl, SO_2-NH-Alkyl, NH-Alkyl, $N(Alkyl)_2$, NH_2 oder -$(CH_2)_{0-3}Z$, wobei Z -H, Halogen, $-OY^3$, $-SY^3$, $-NHY^3$, $-CO-NY^1Y^2$, oder $-CO-OY^3$ darstellt, mit Y^1 und Y^2 unabhängig voneinander H, NH_2, oder -$(CH_2)_{0-3}Z'$ darstellen, und Y^3 H oder -$(CH_2)_{0-3}Z'$ darstellt, wobei Z' H, SO_3H, NH_2 oder COOH darstellt,
substituiert sein kann (wobei „Alkyl" bevorzugt C_{1-10}-Alkyl bedeutet).

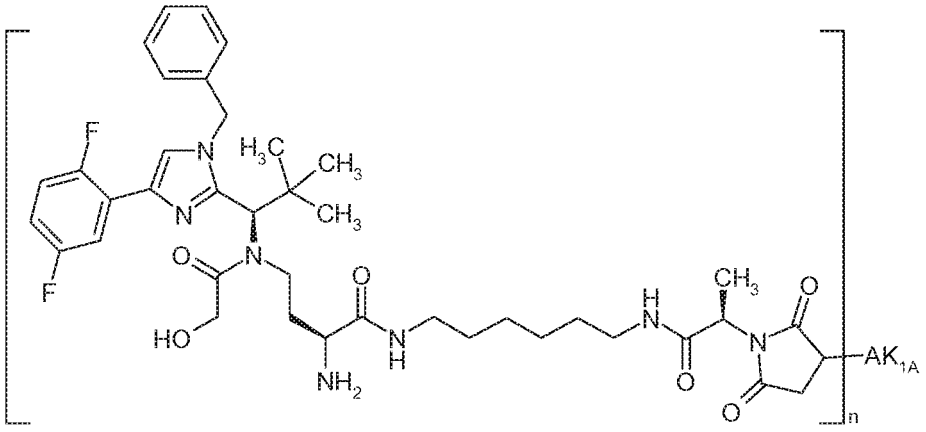
66. Verfahren zur Behandlung und/oder Prophylaxe von hyperproliferativen und/oder angiogenen Erkrankungen bei Menschen und Tieren unter Verwendung einer wirksamen Menge mindestens eines Konjugat nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 43 oder Verbindung nach Anspruche 48-61.

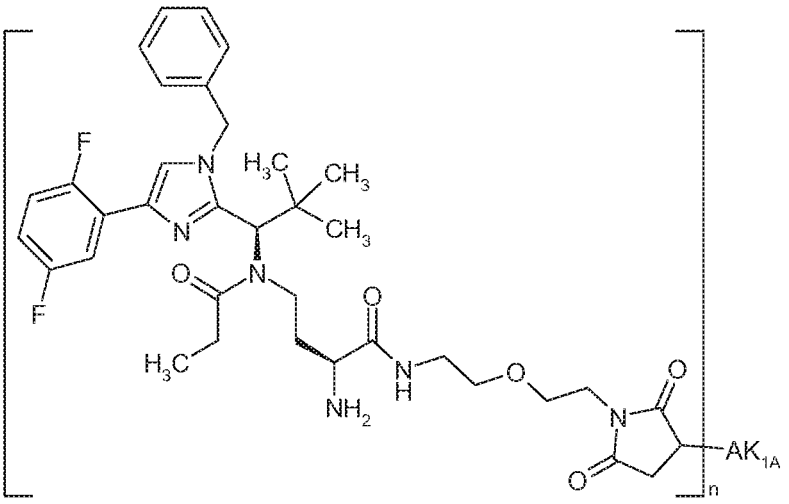
67. Antikörper-Konjugat gemäß einer der folgenden Formeln, wobei n eine Zahl von 1 bis 20 ist und AK1A bzsw. AK2A einen Antikörper darstellen:

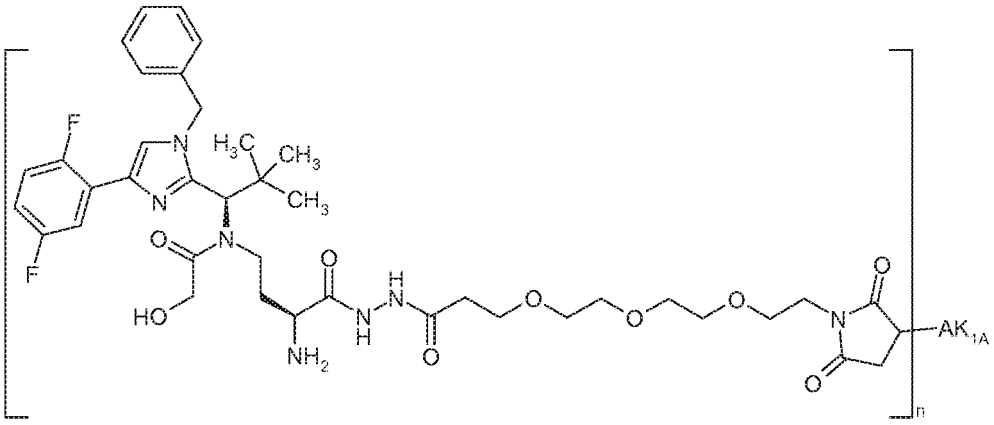




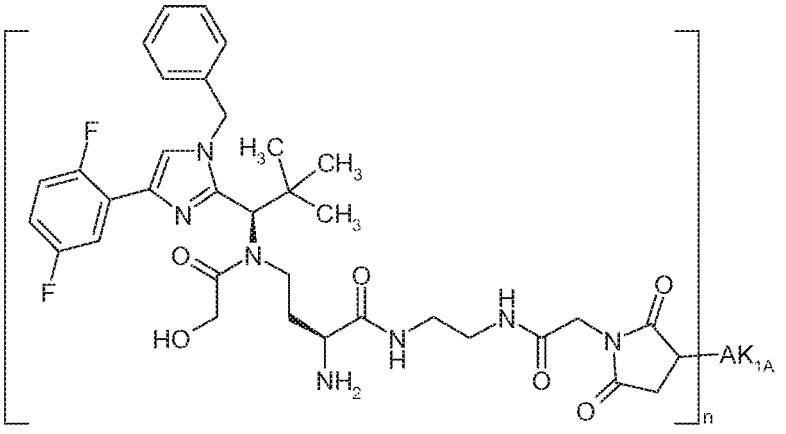


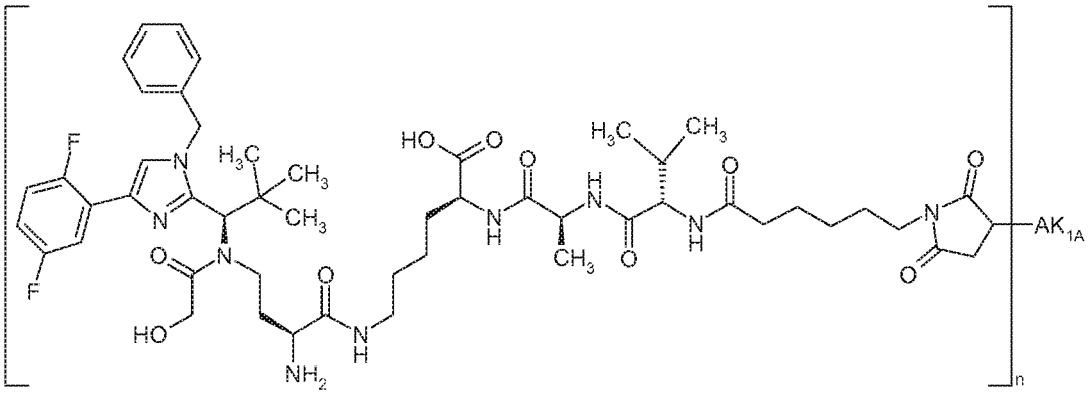


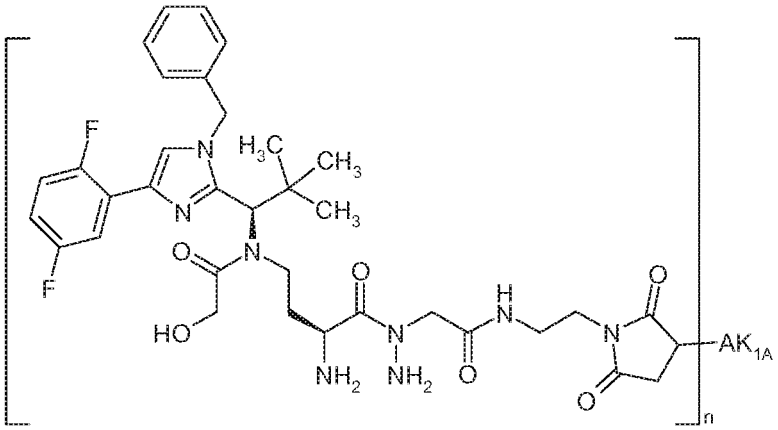


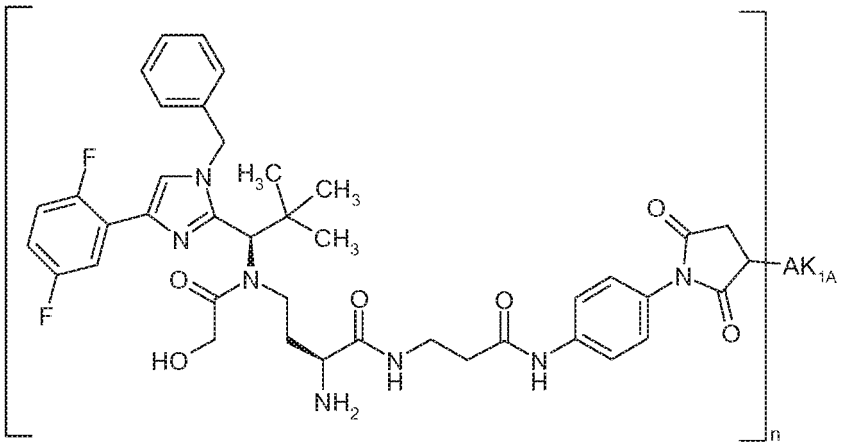


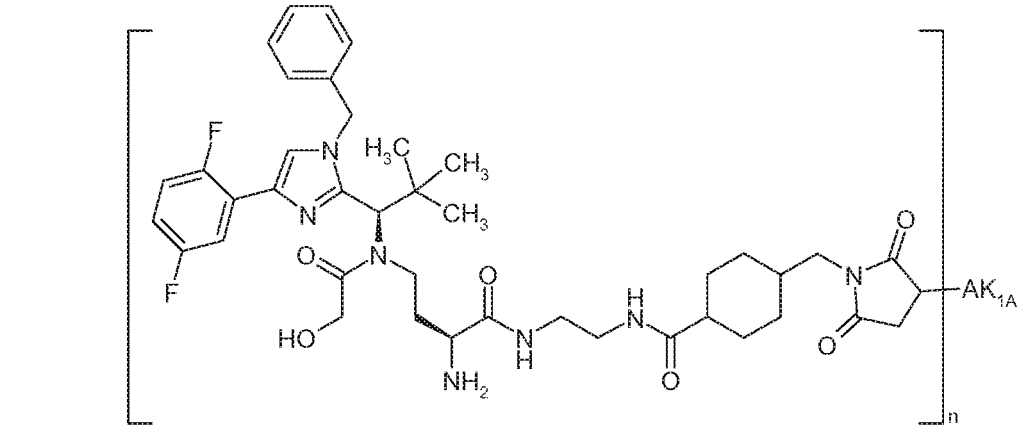
5

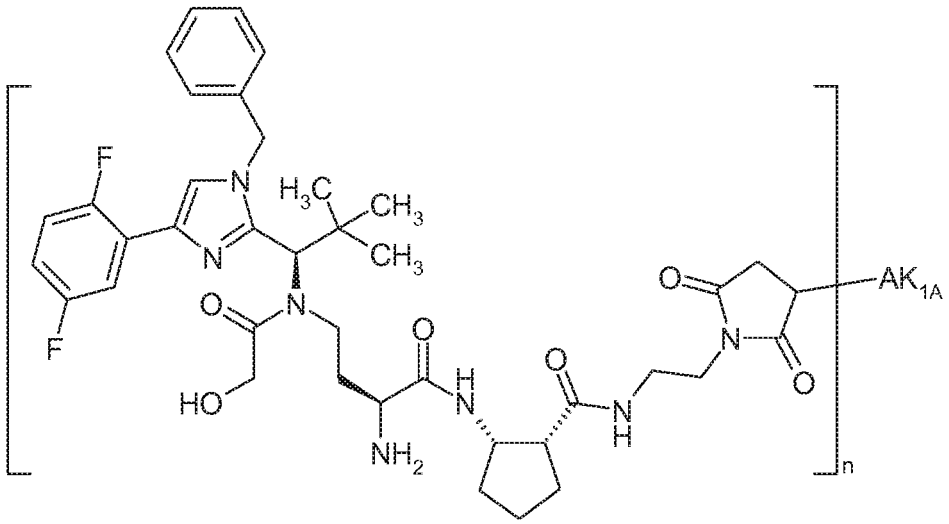


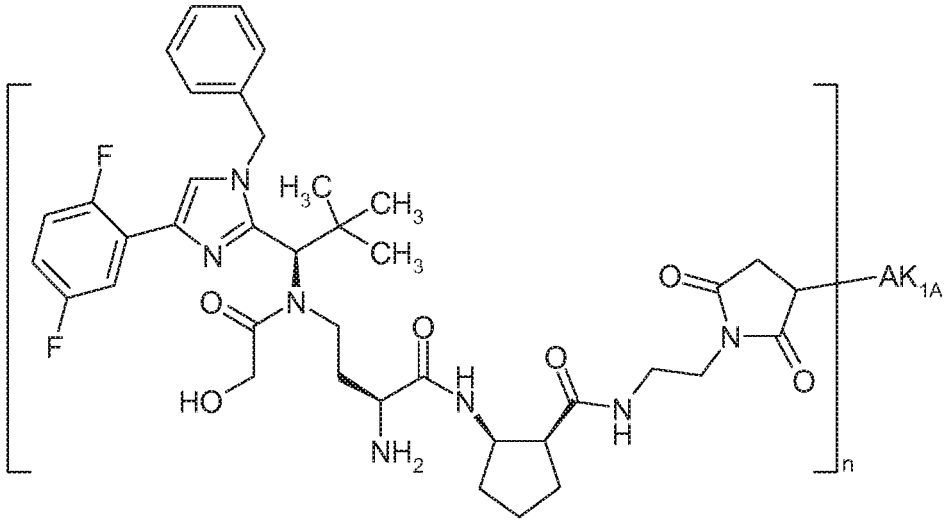


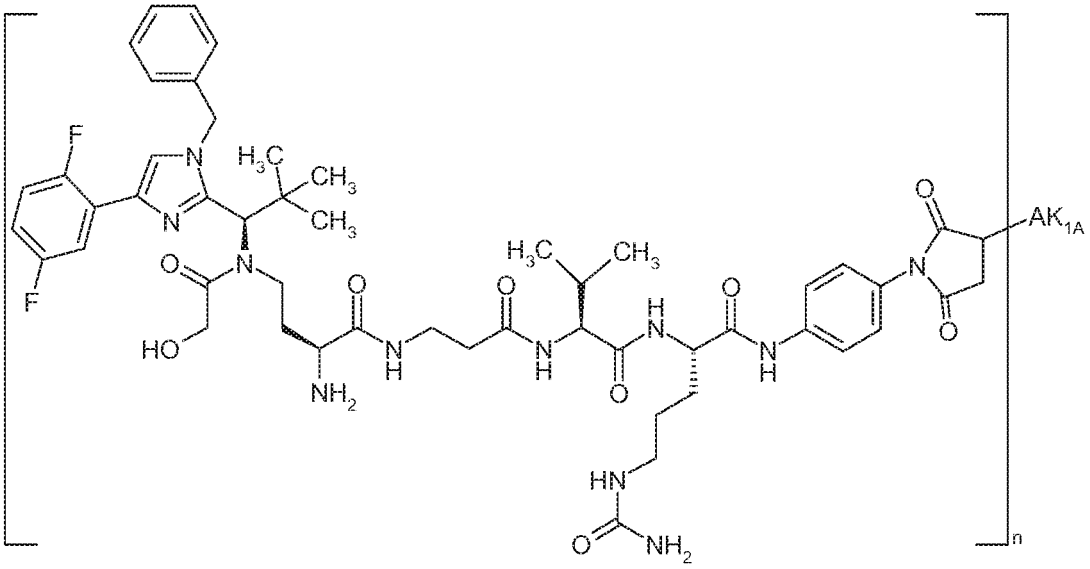


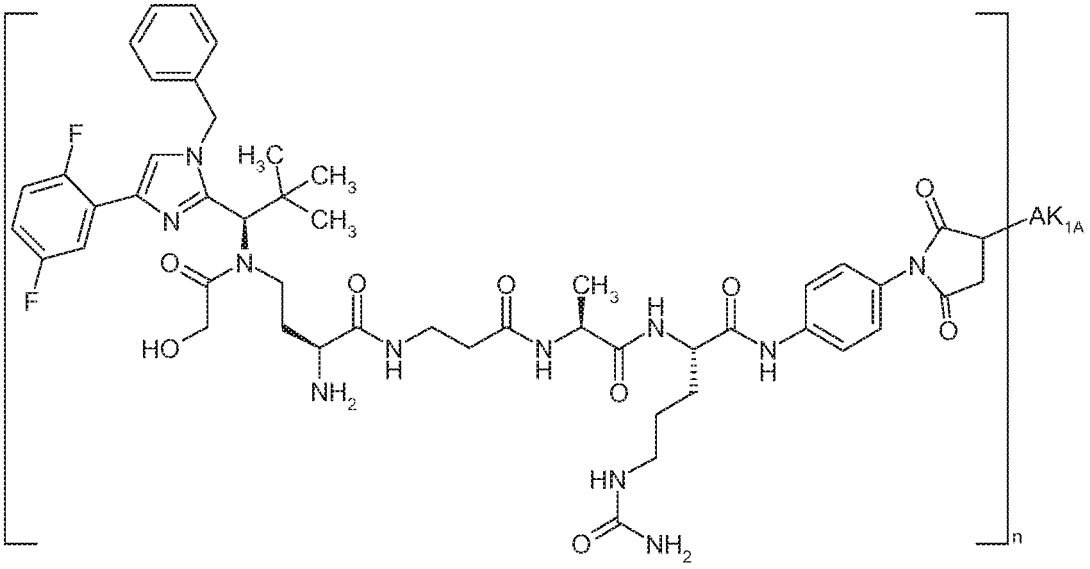


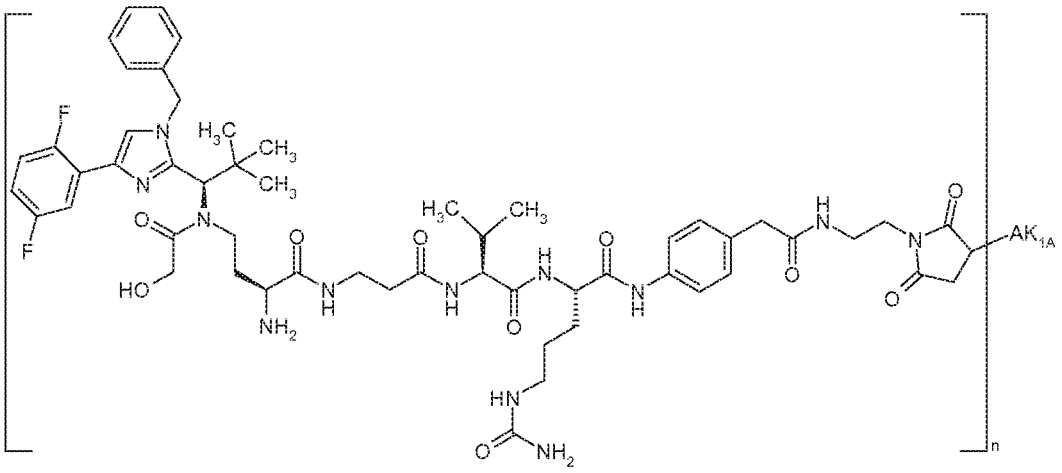


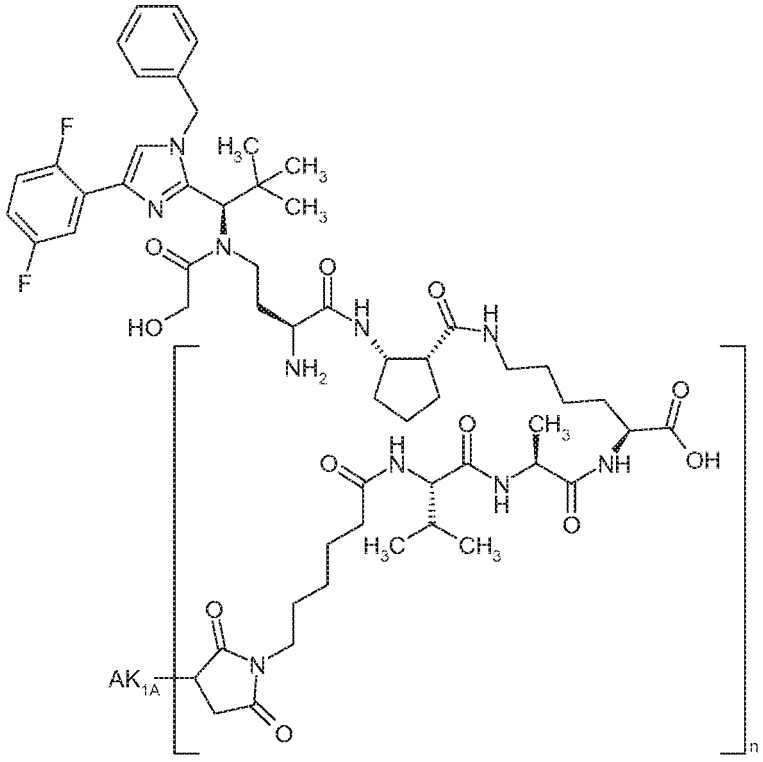


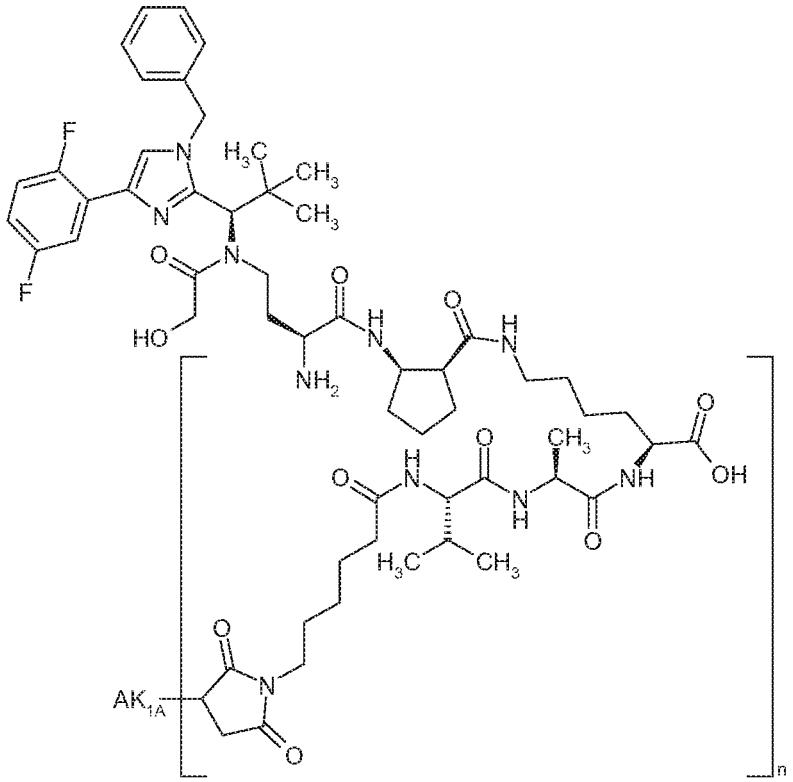


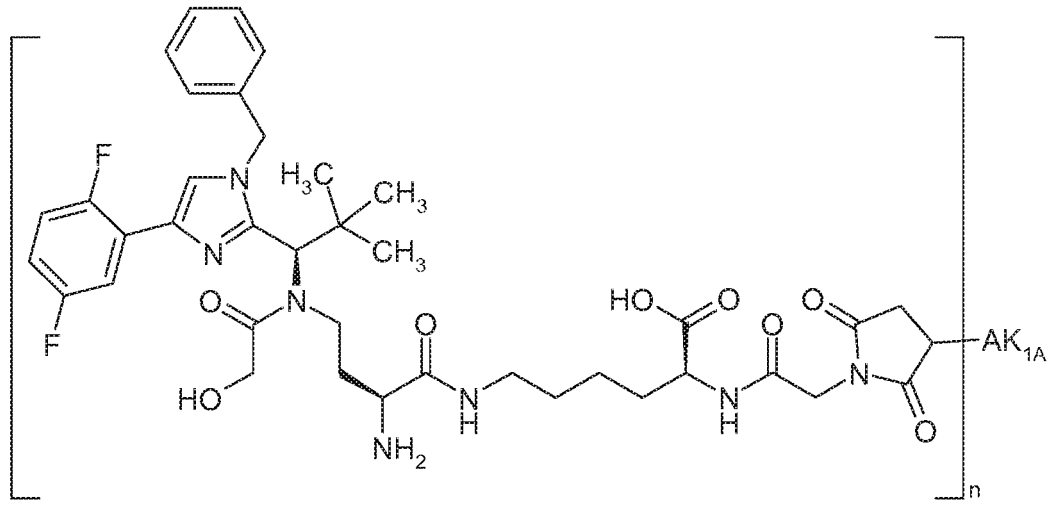




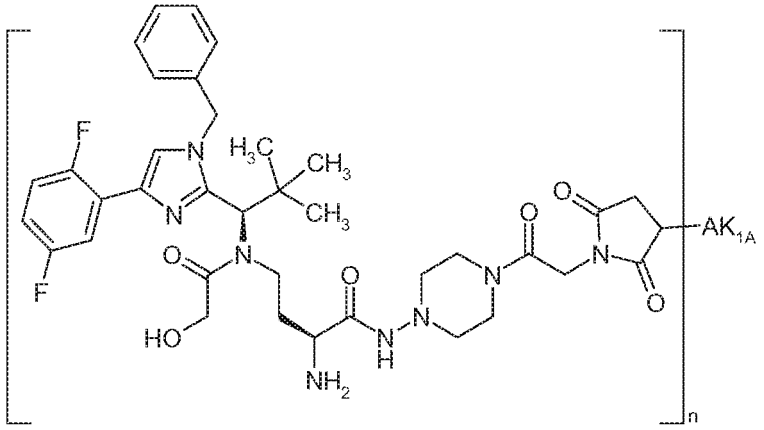


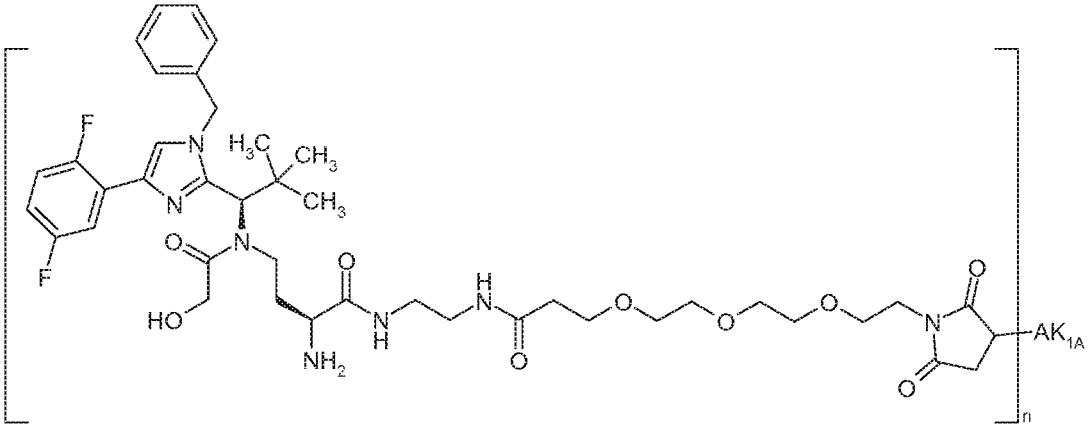


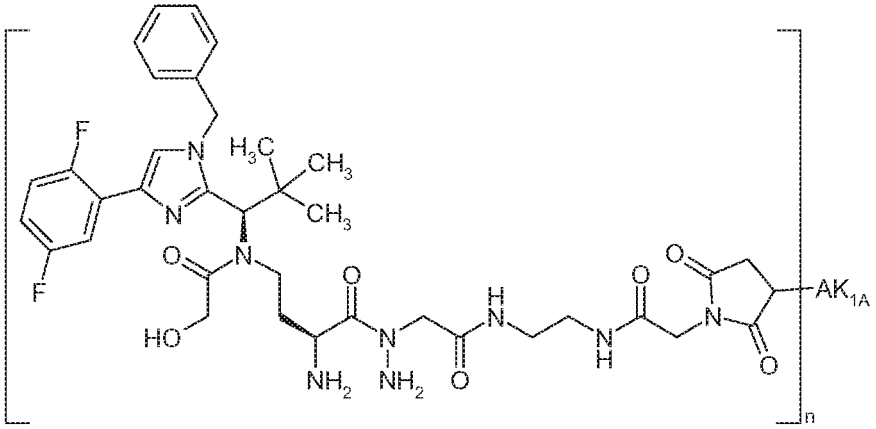


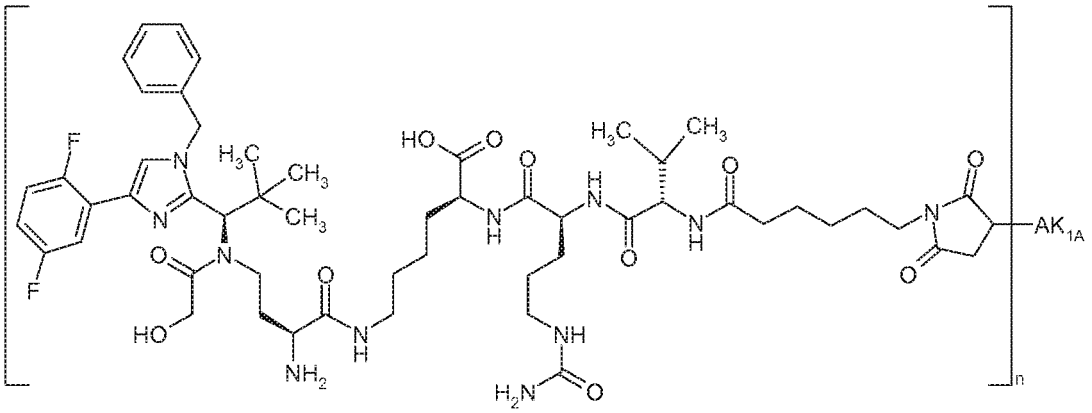


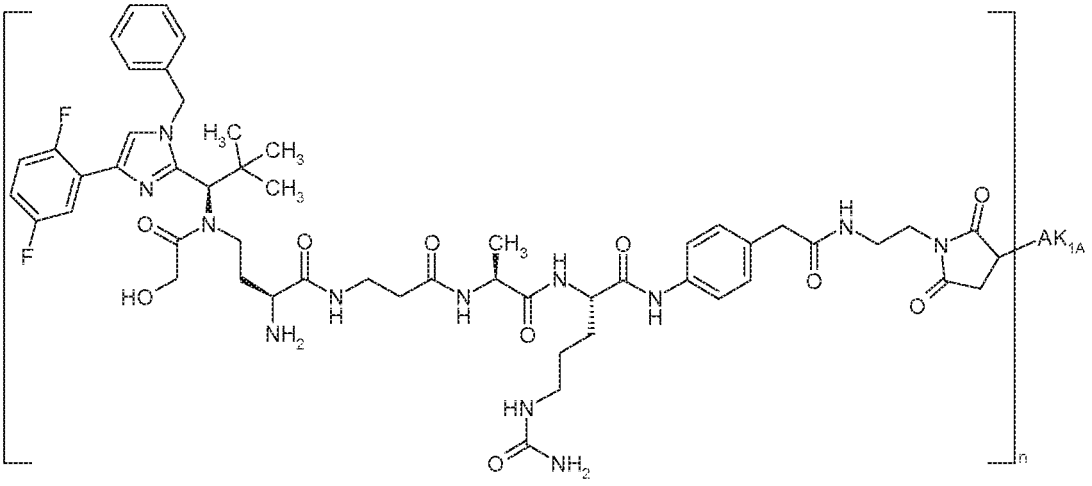
5



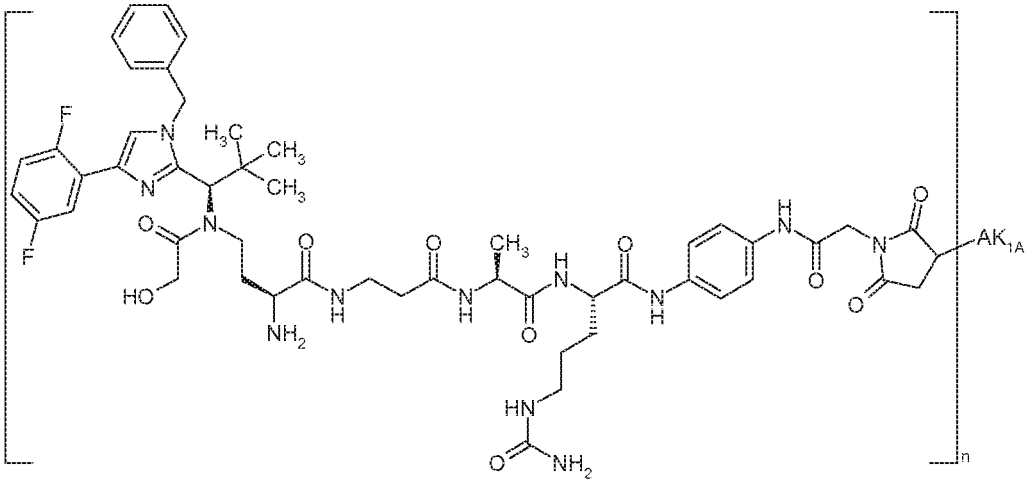


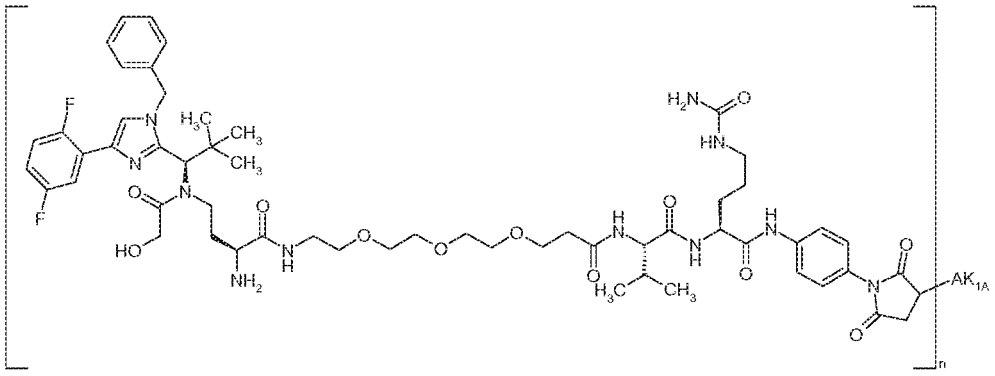


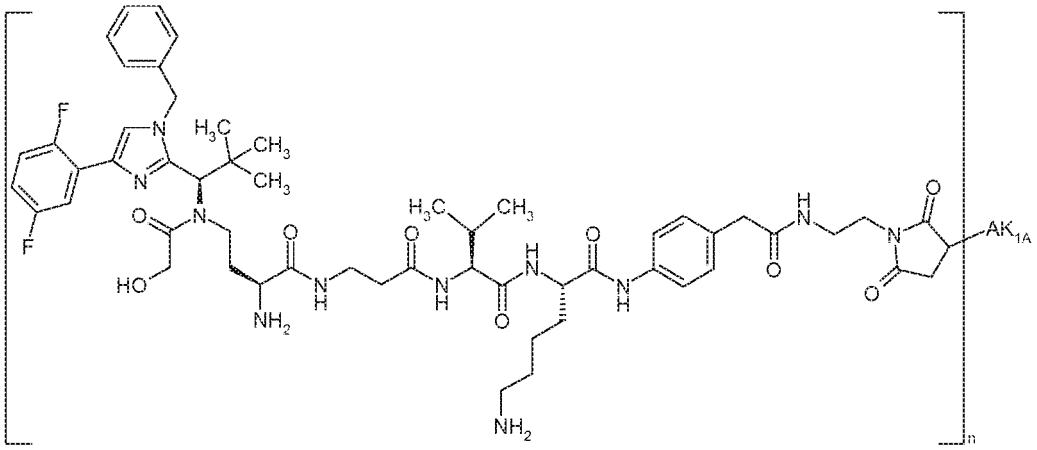


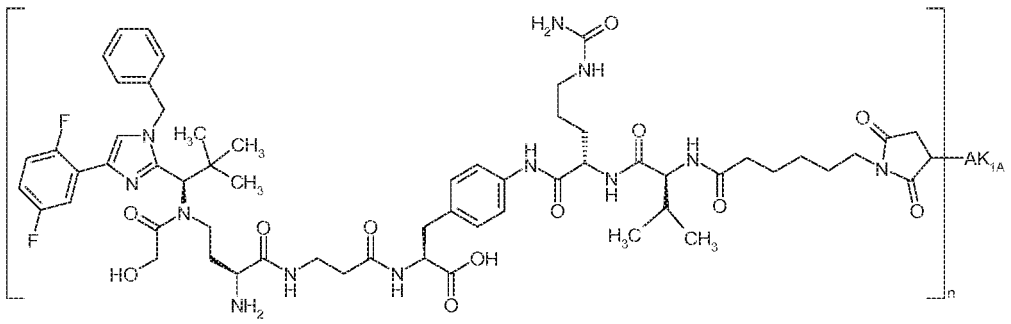


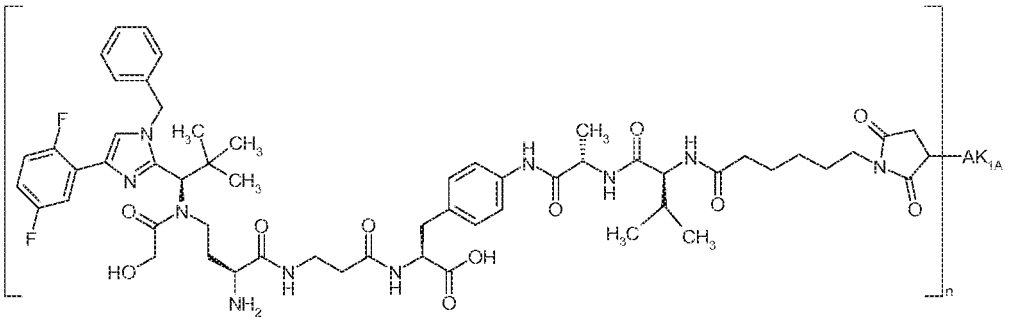
5

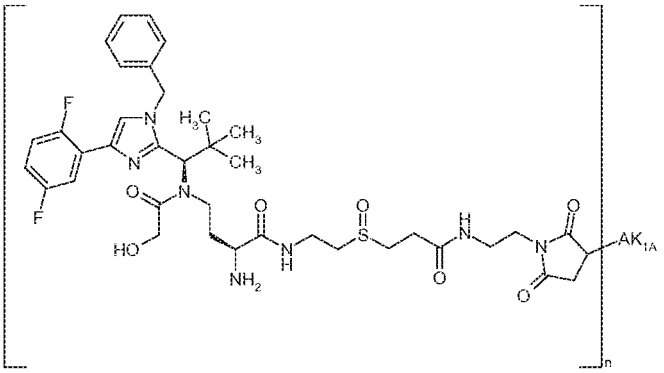




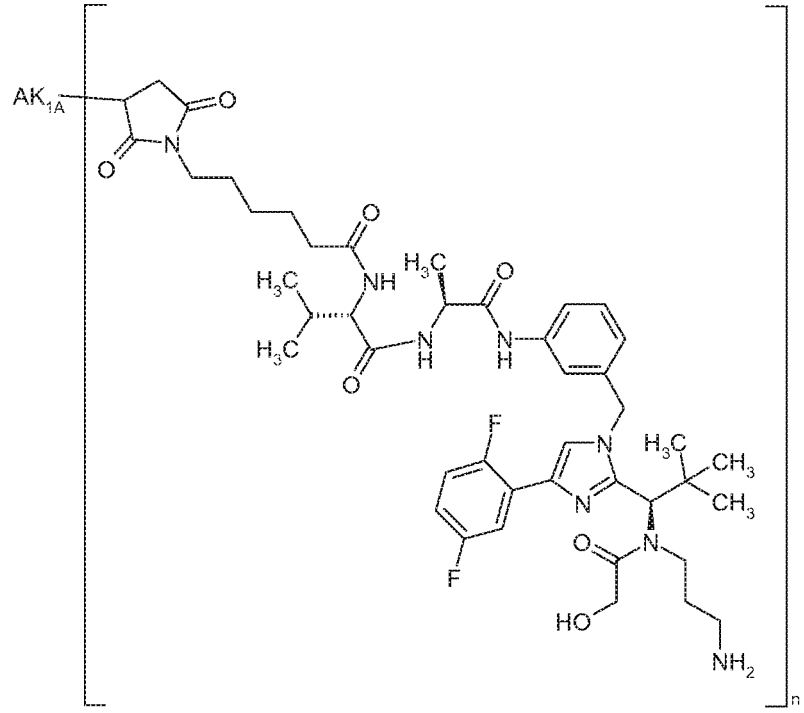




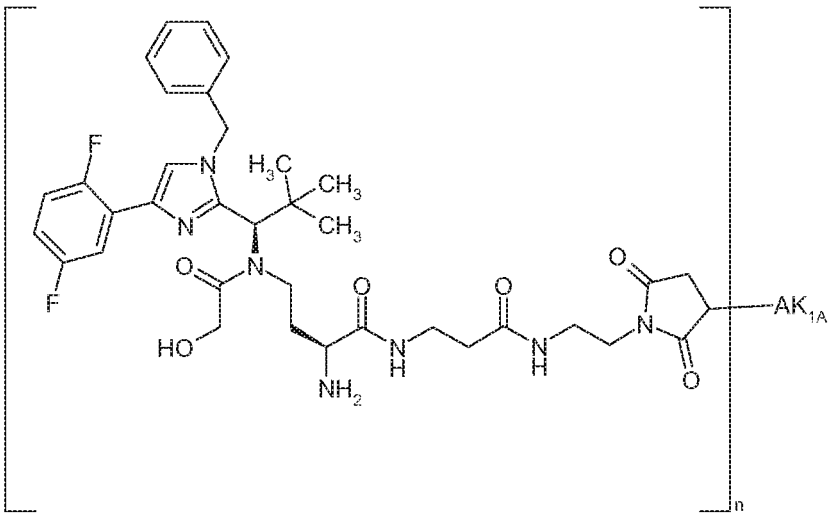


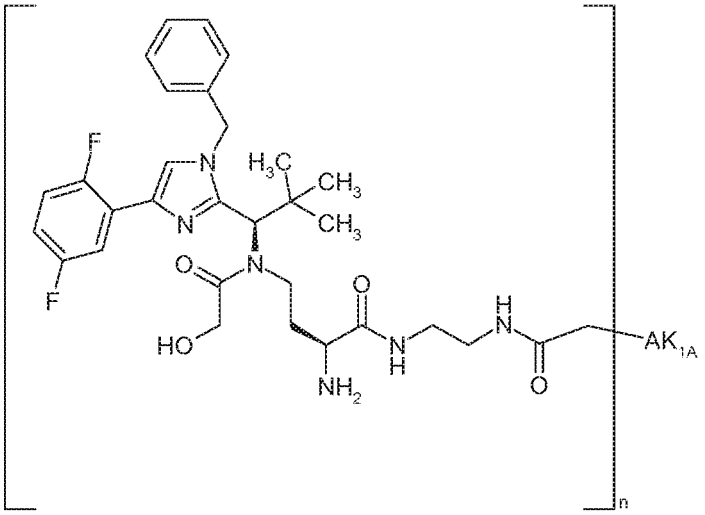


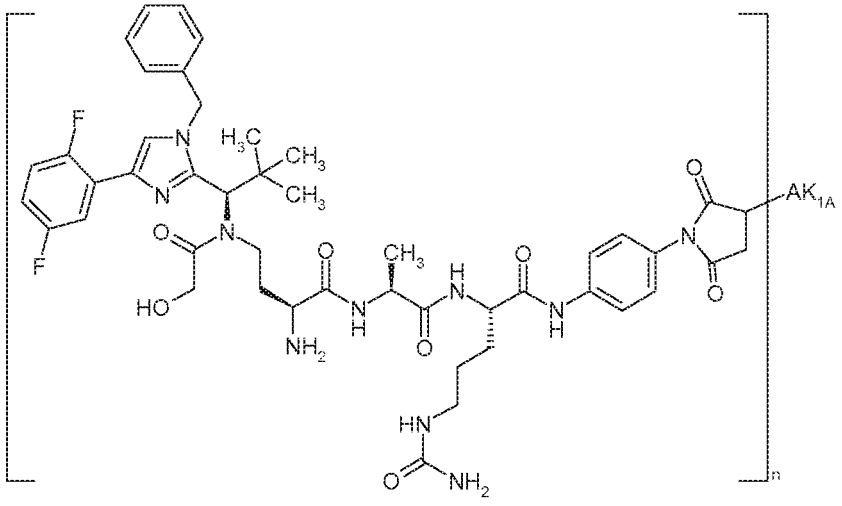
5

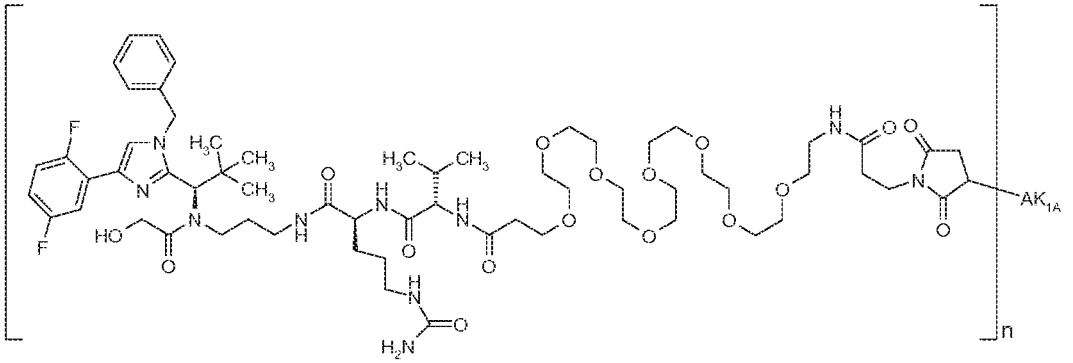


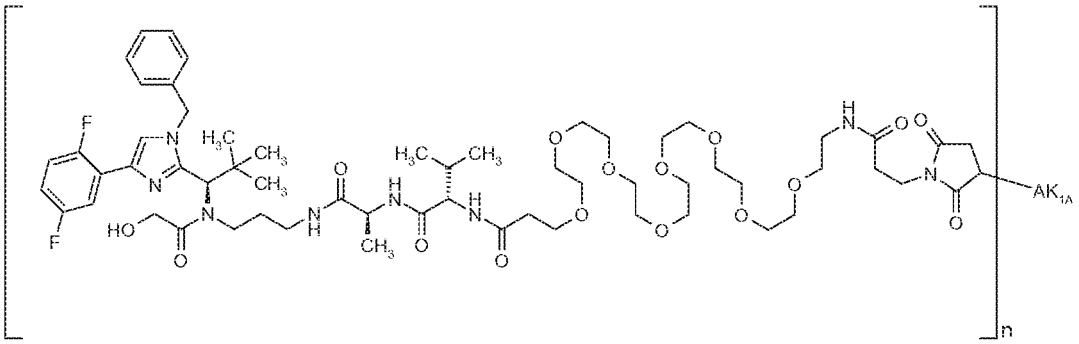
5



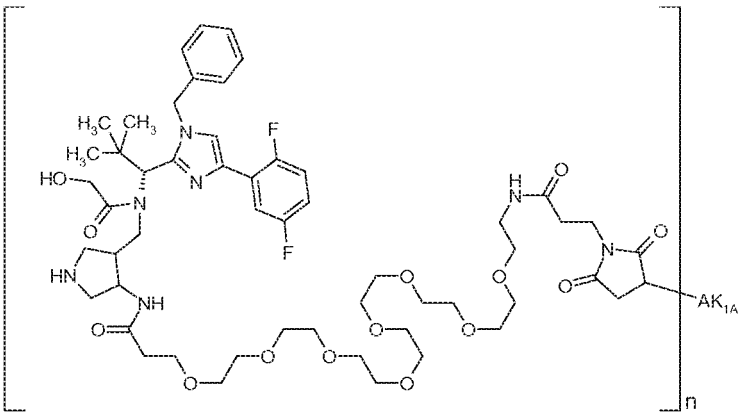


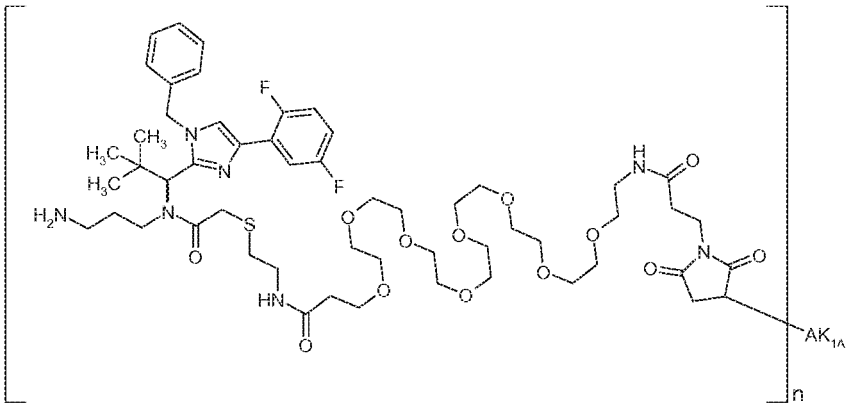


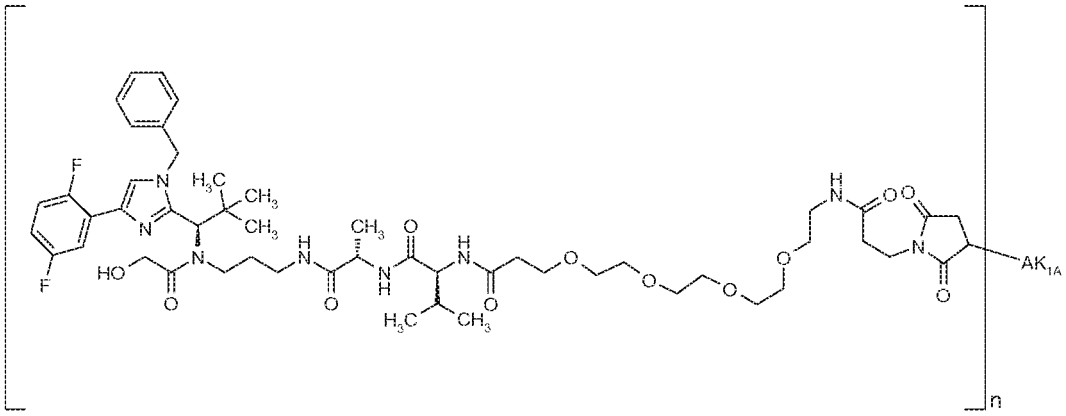


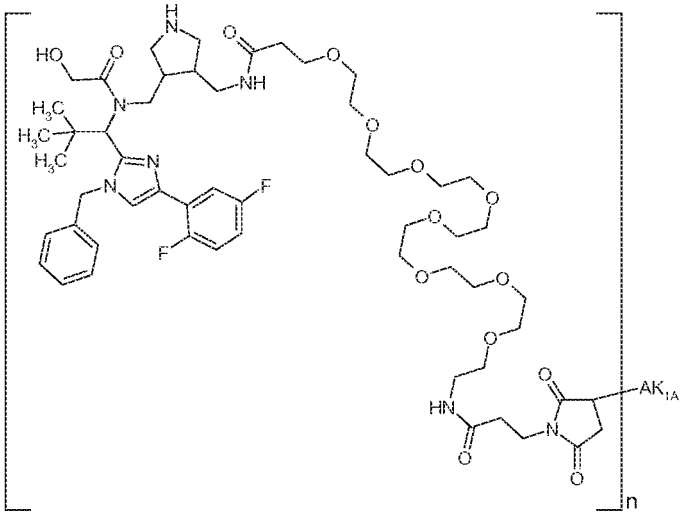


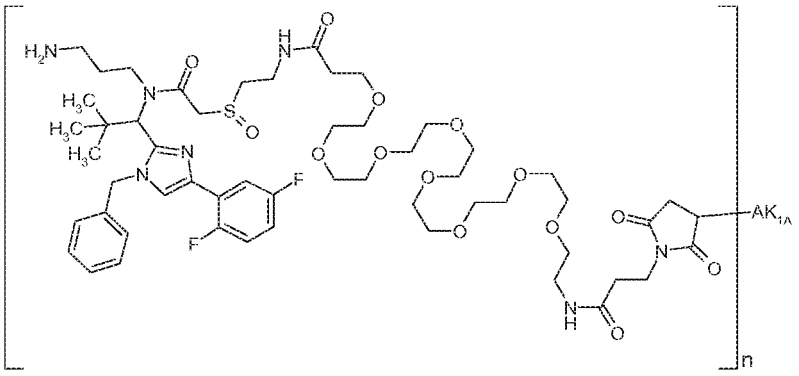
5

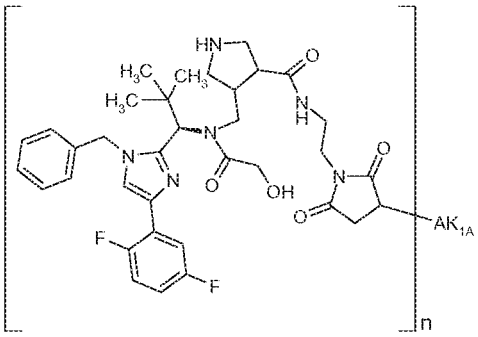


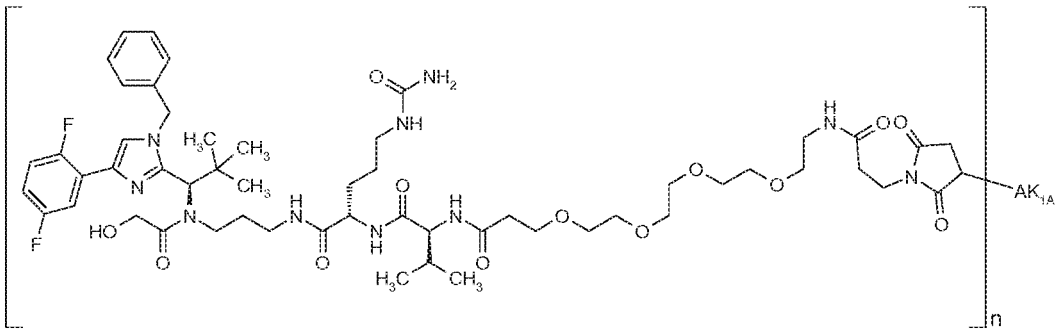


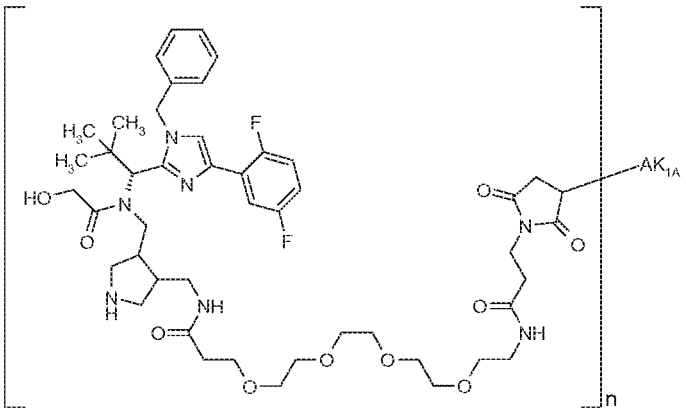


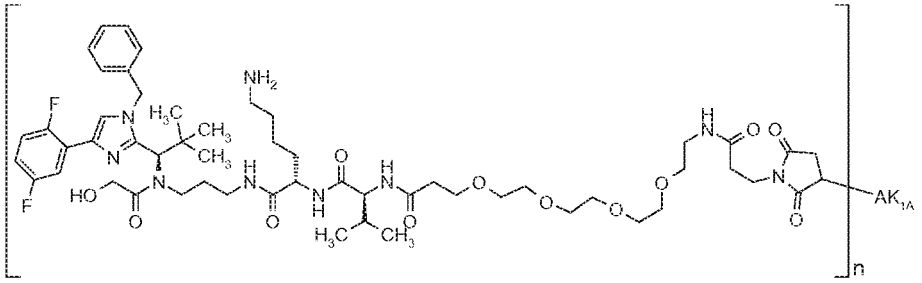


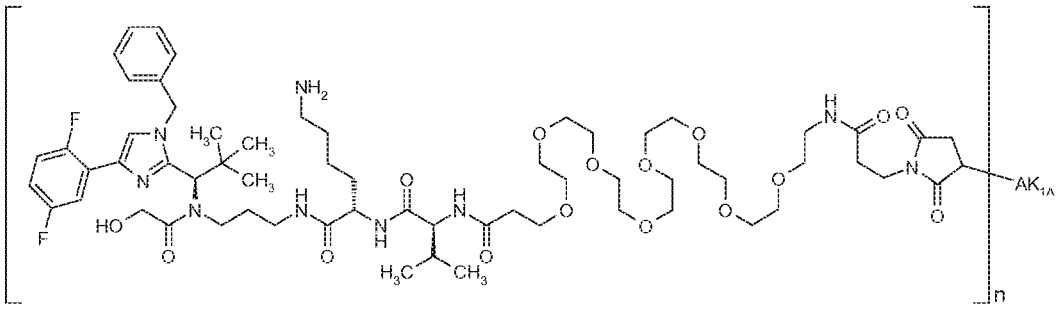




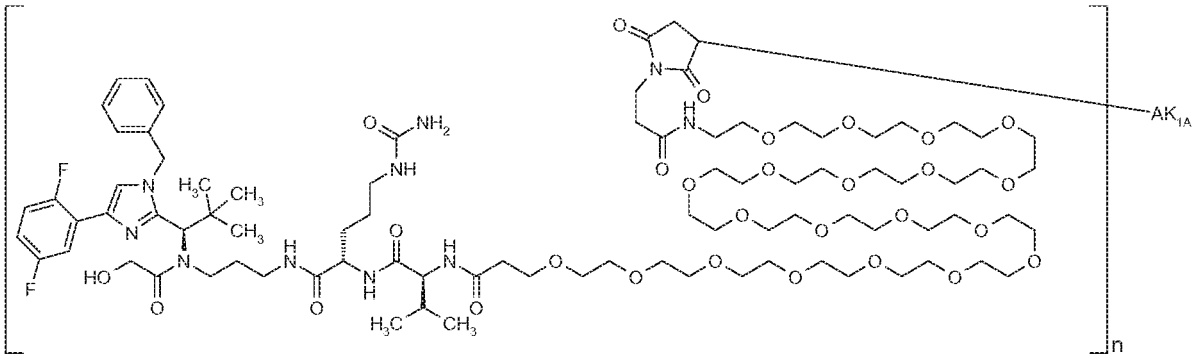


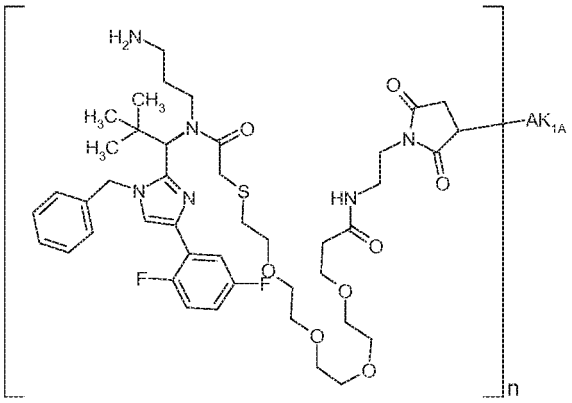


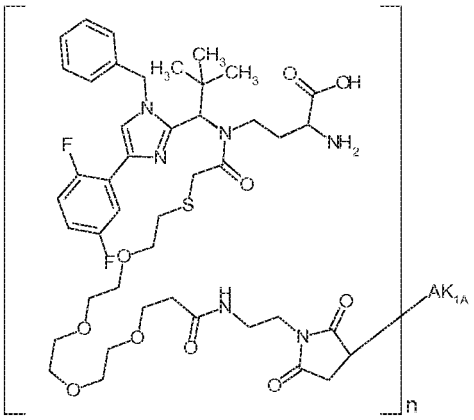


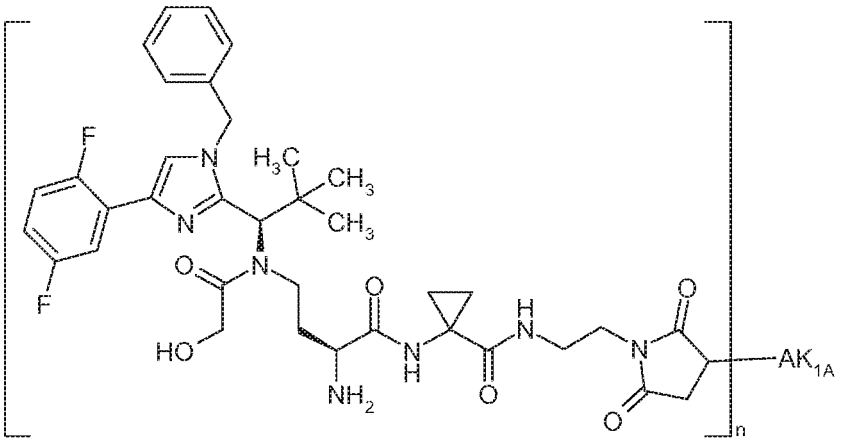


5

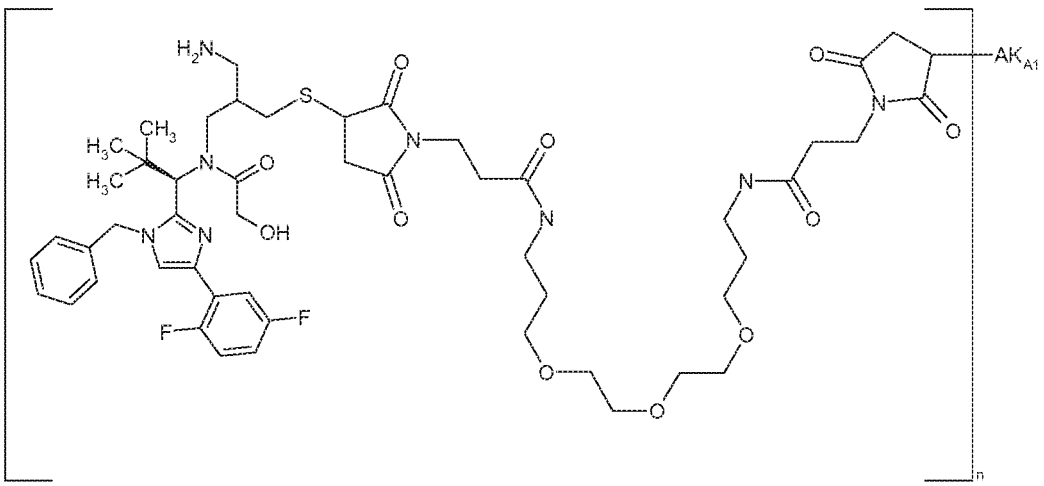


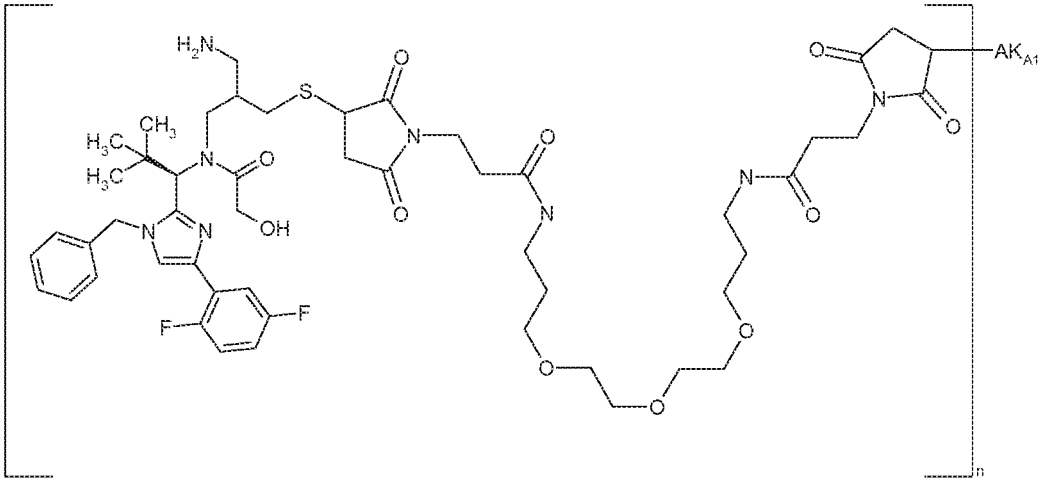


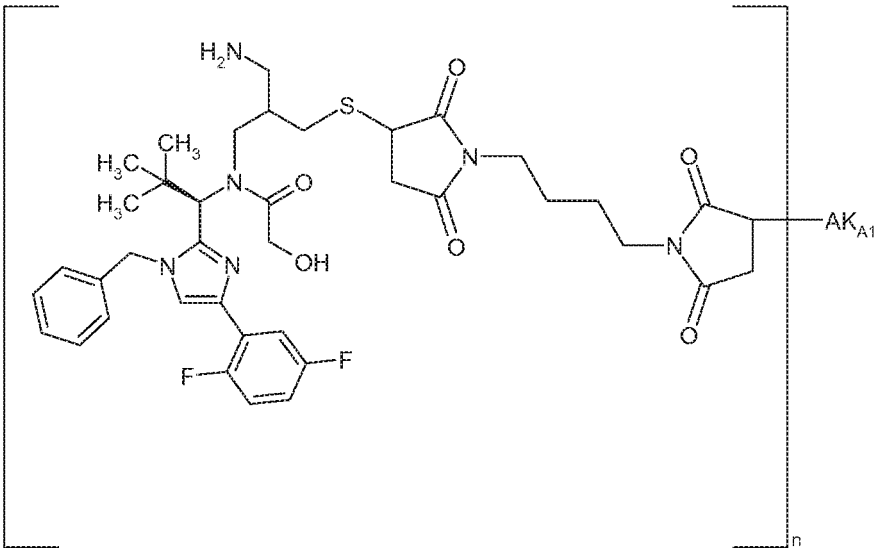


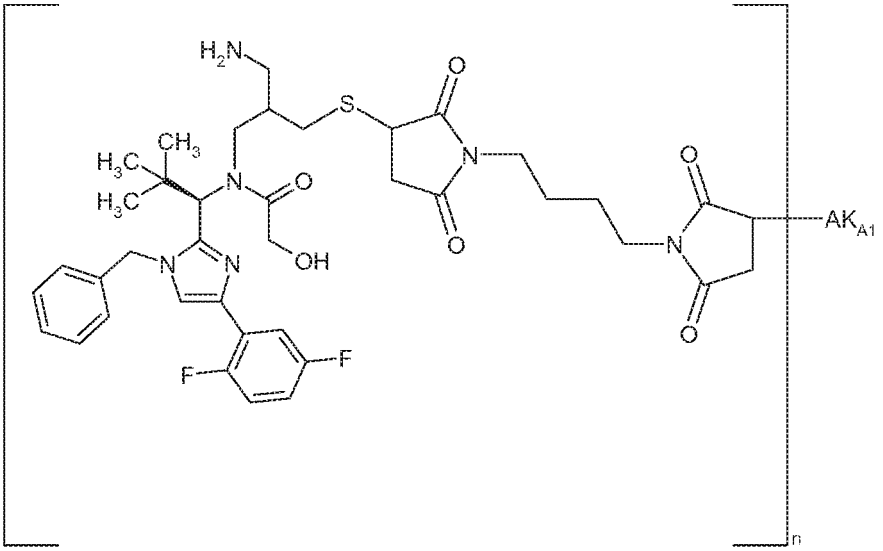


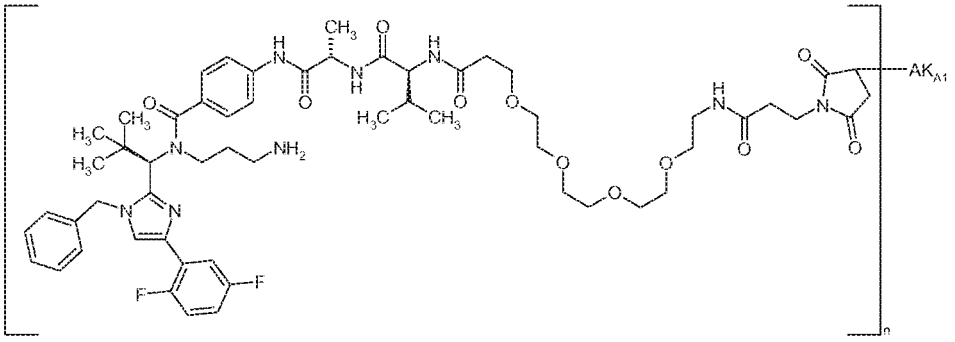
5



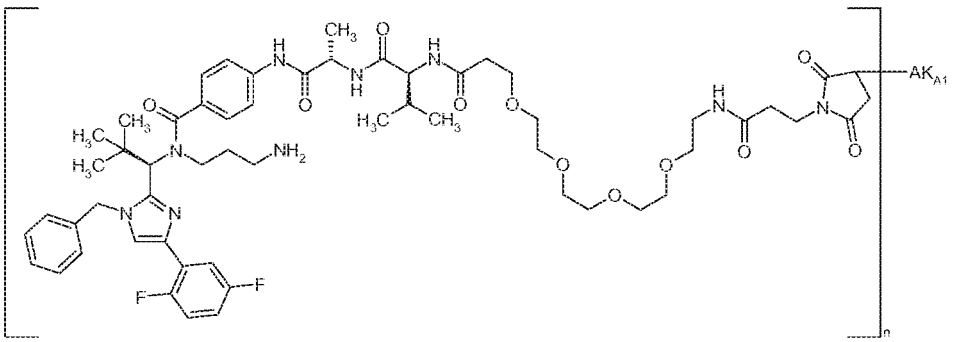


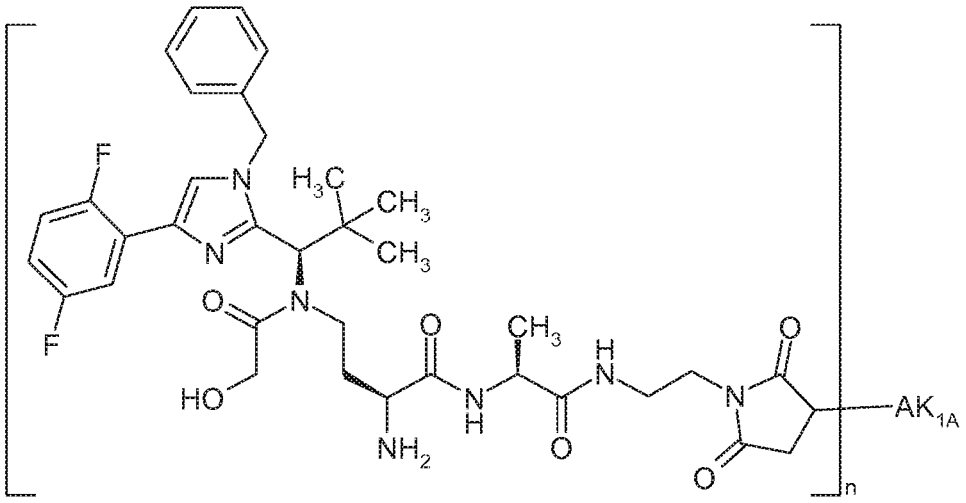


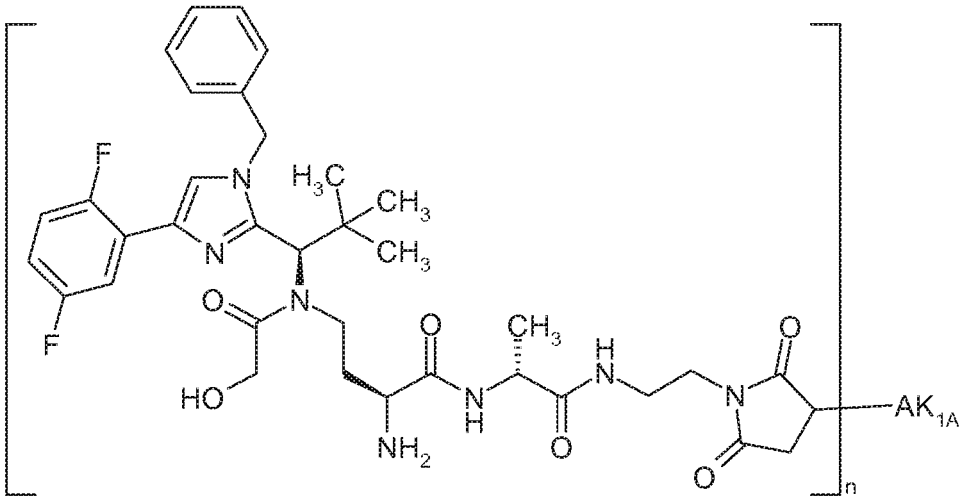




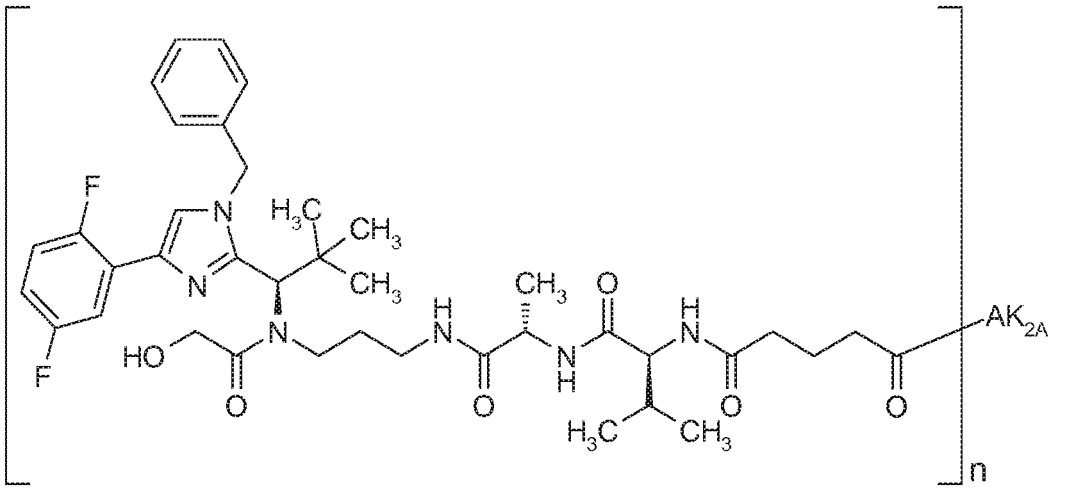
5

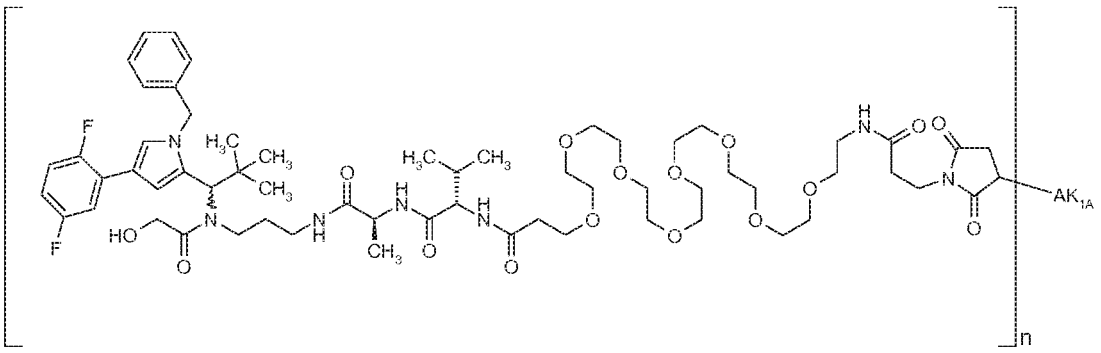




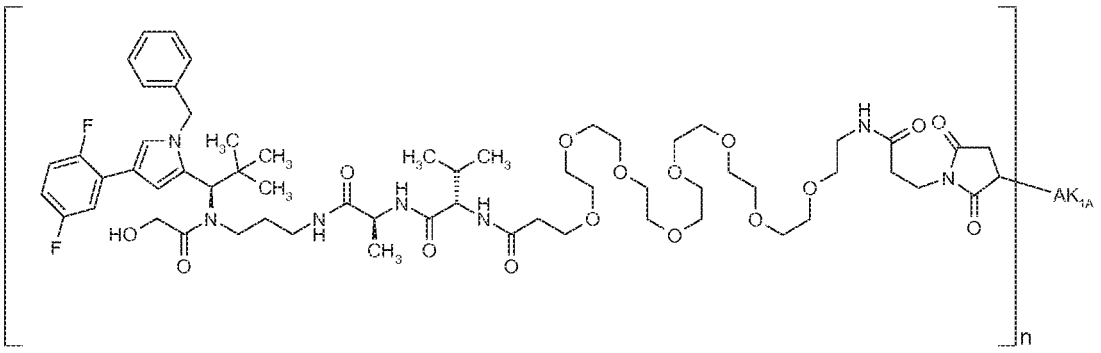


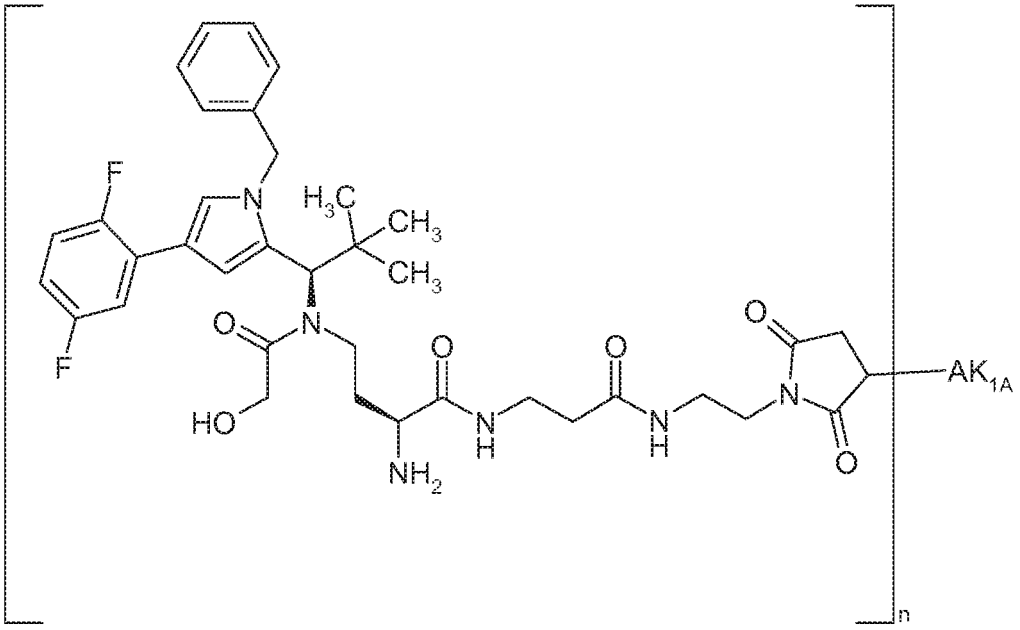
5

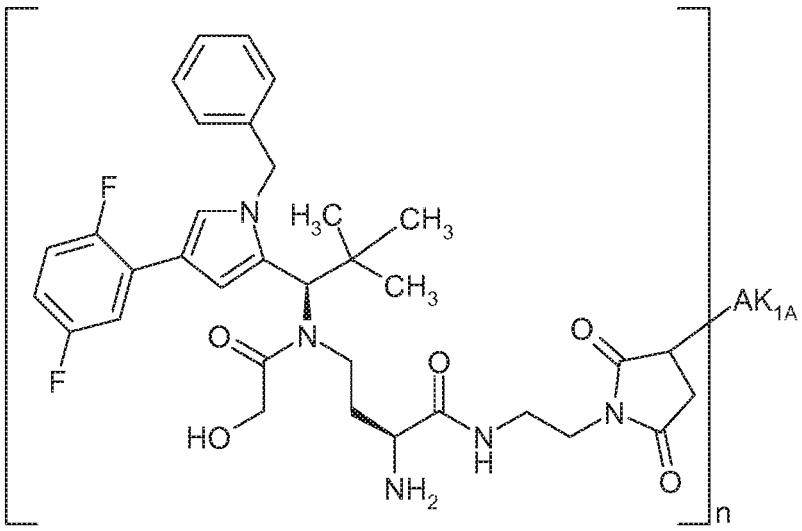


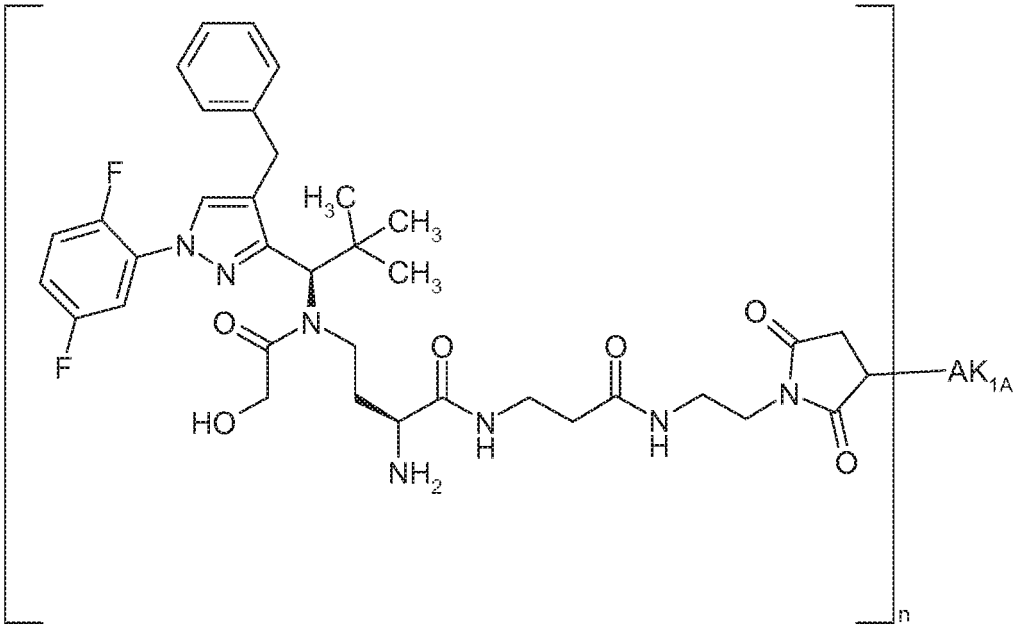


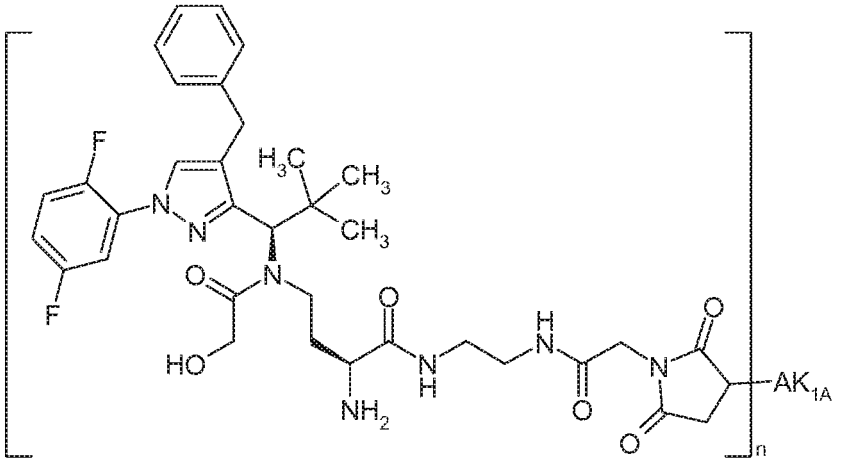
5

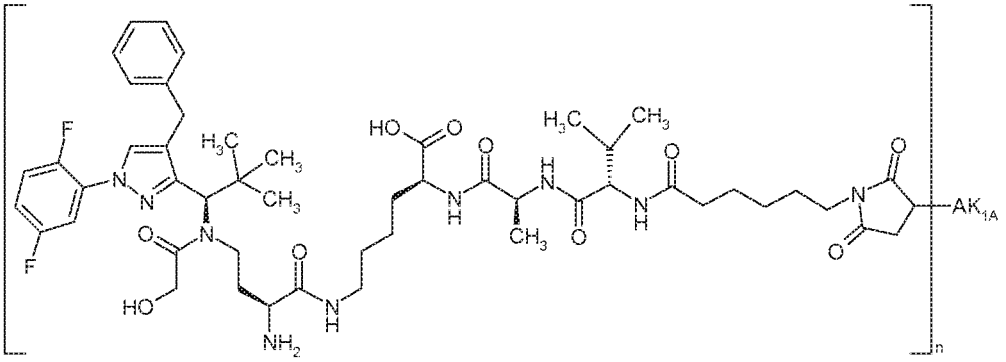


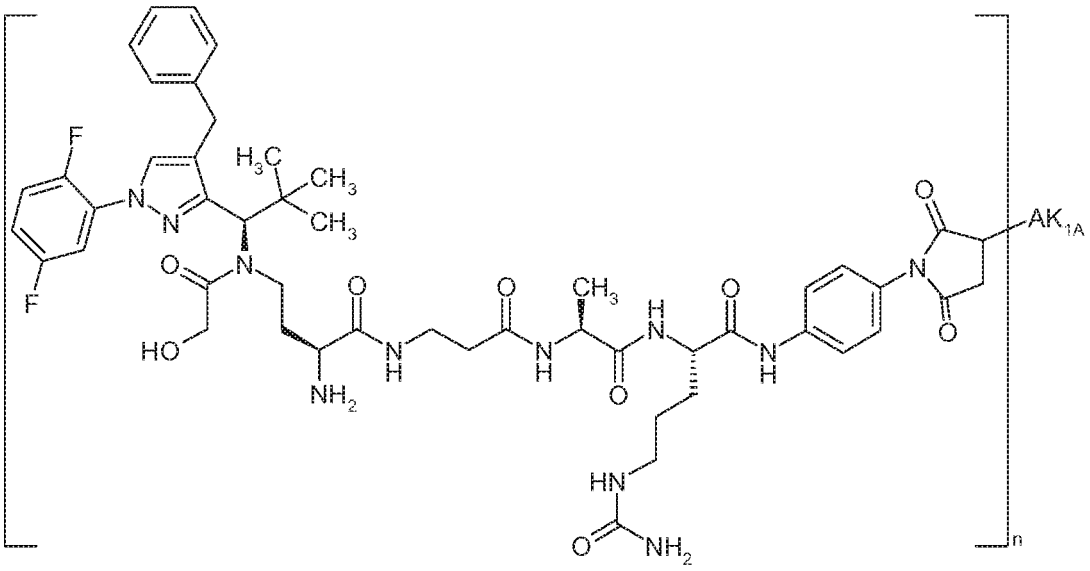


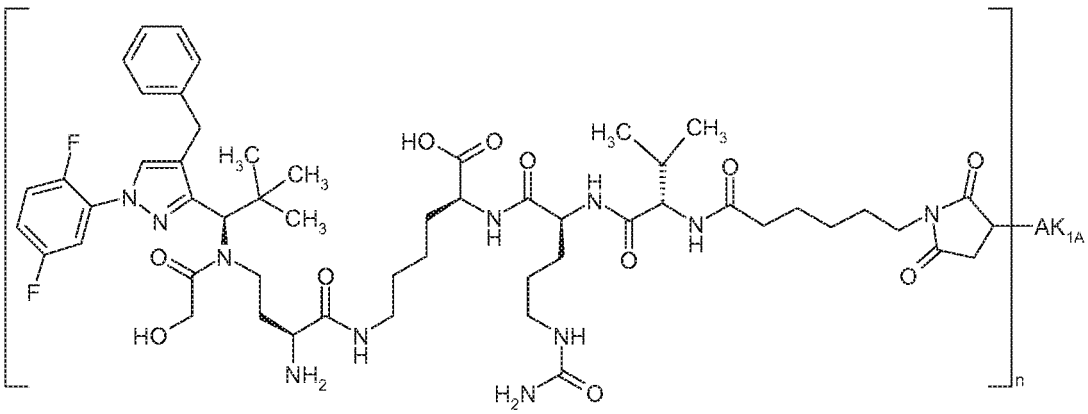


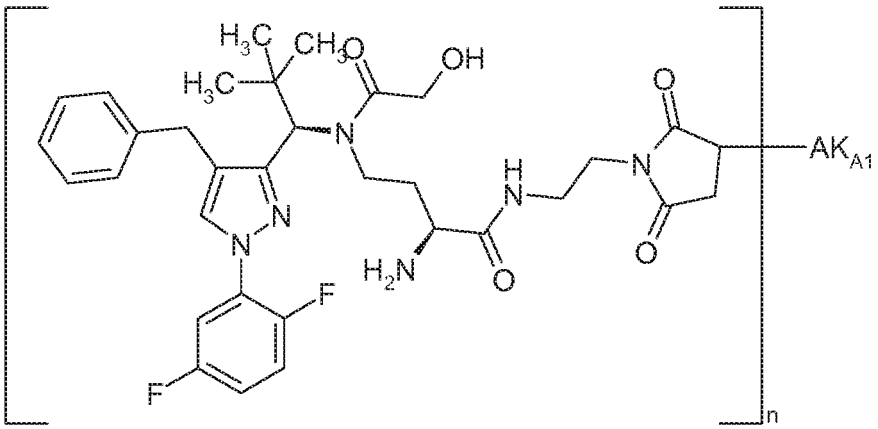


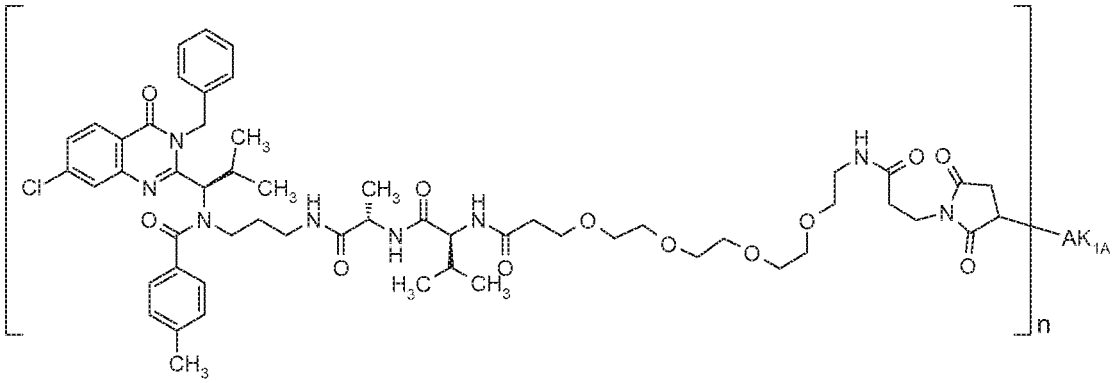




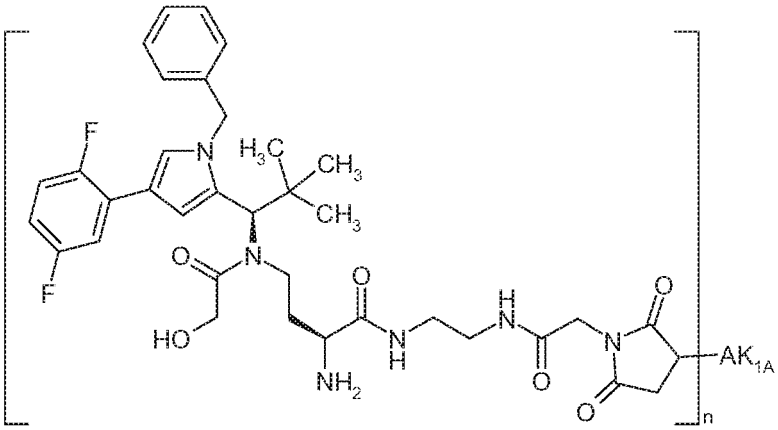


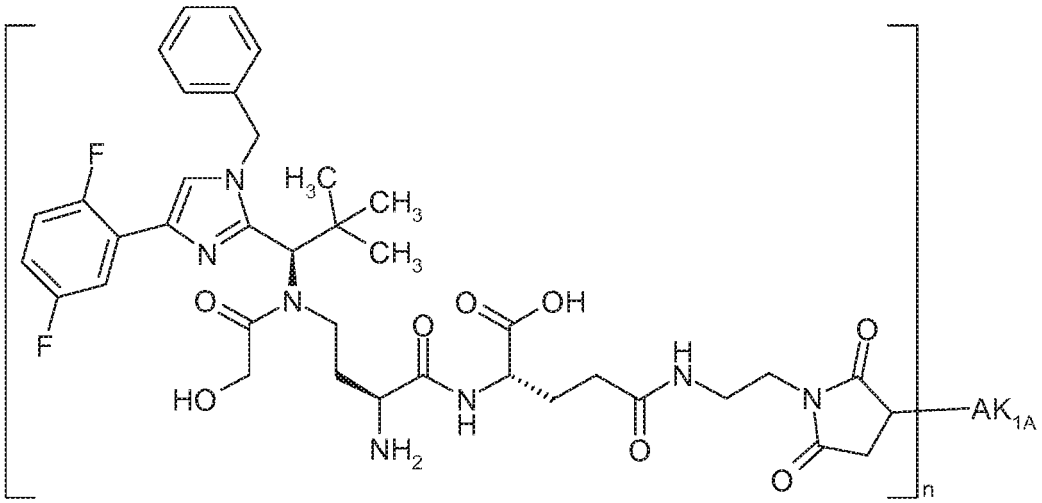


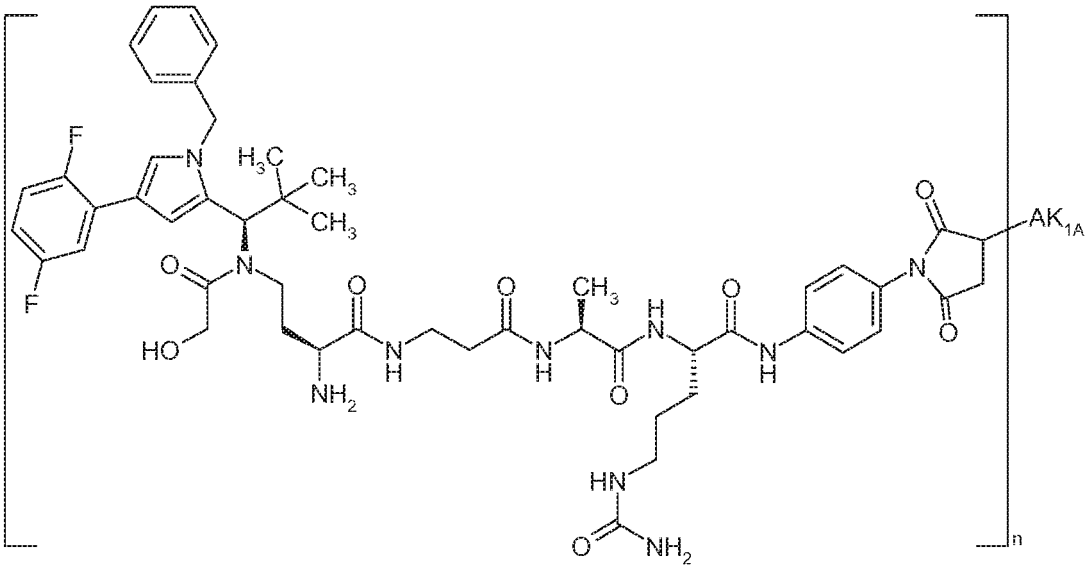


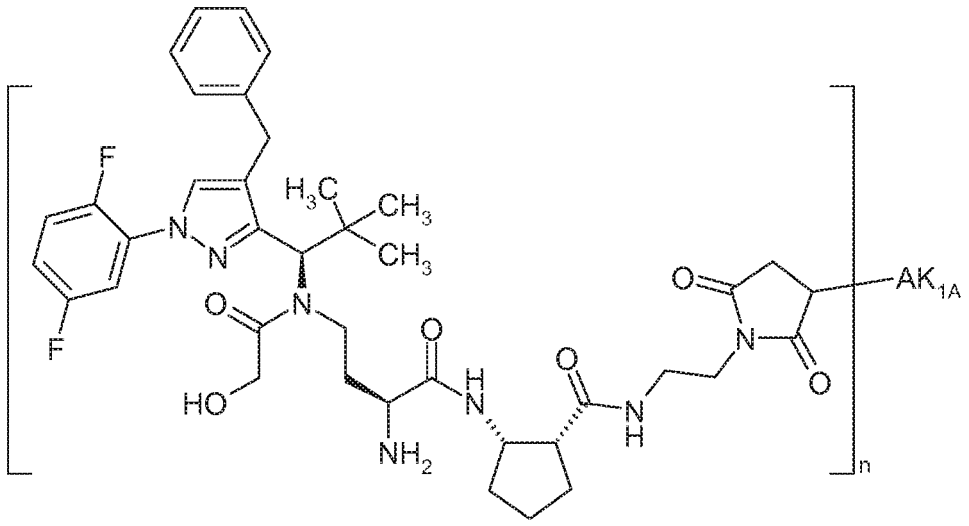


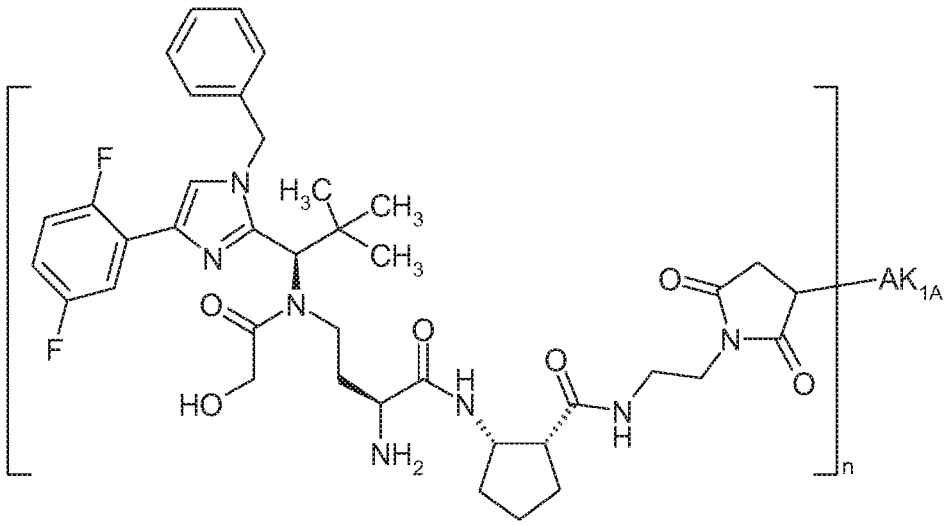
5

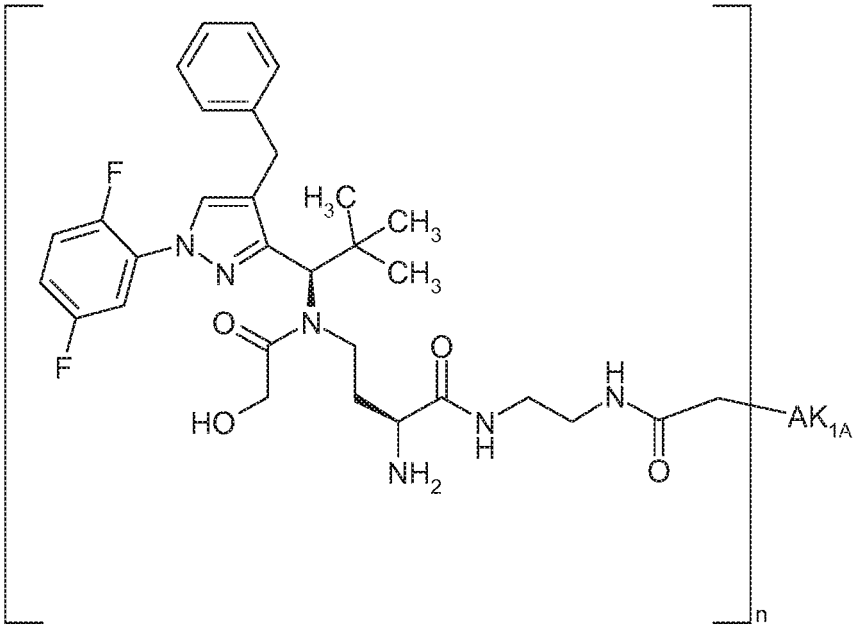


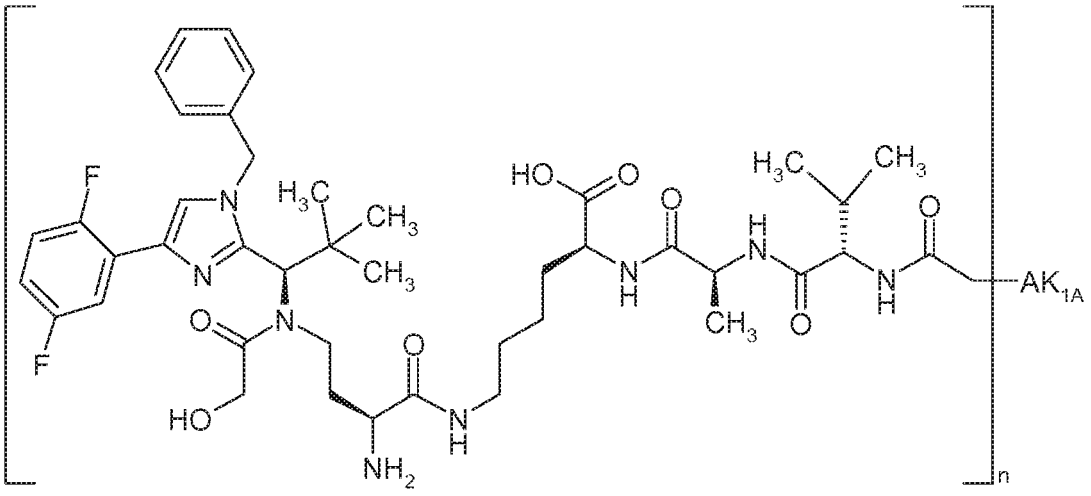


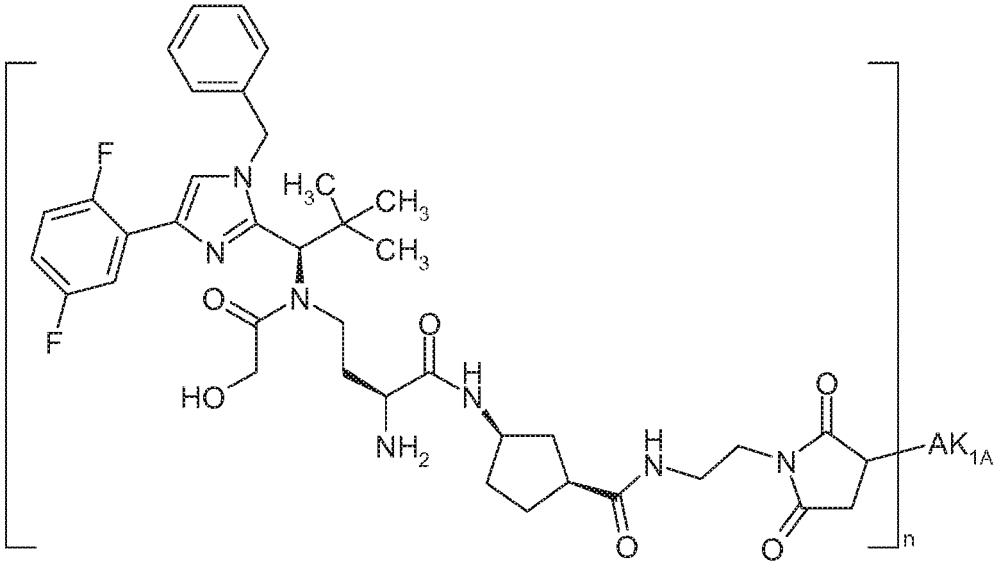


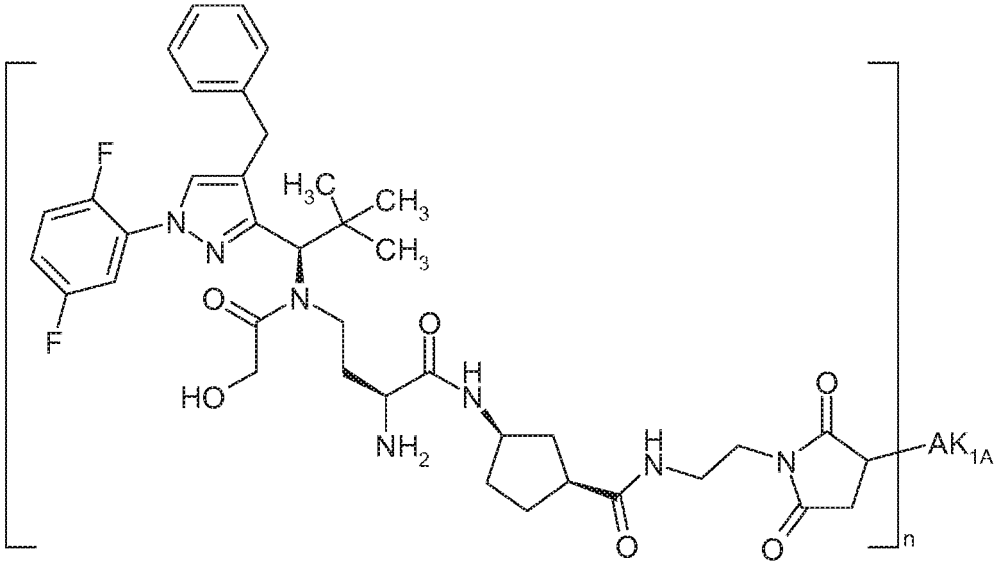


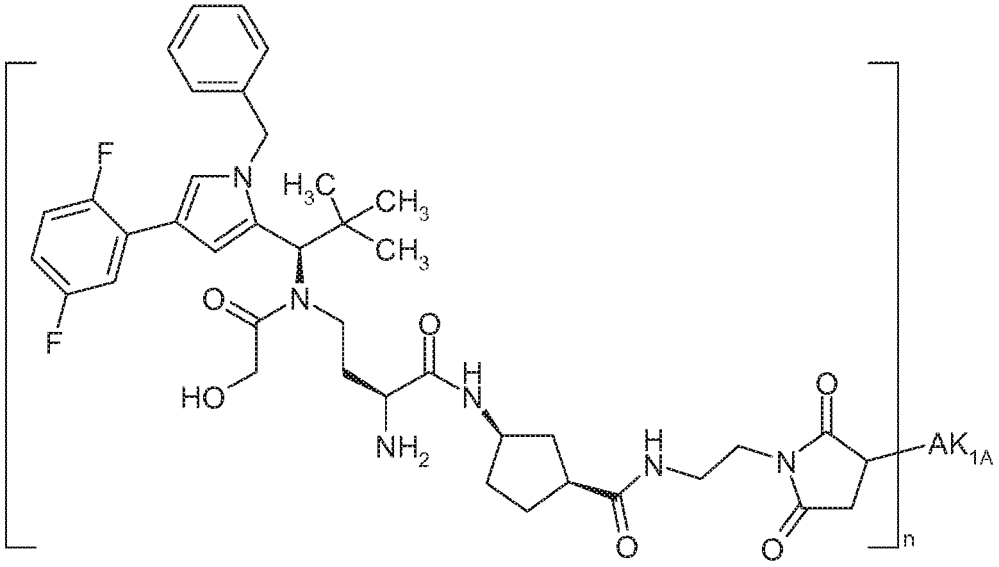


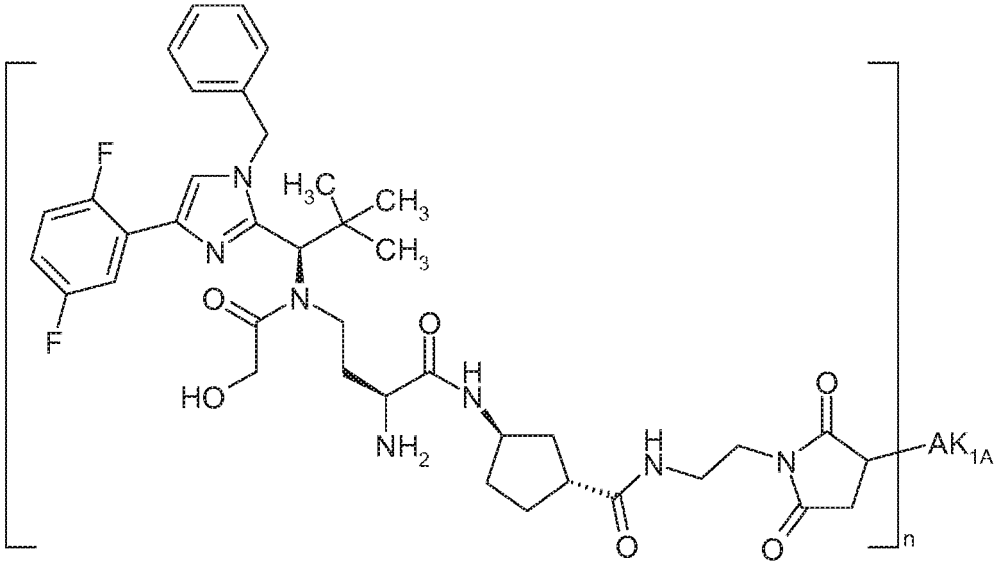

F
F
N
N
H3C
CH3
CH3
O
N
HO
O
N
H
NH2
N
H
O
AK1A
n

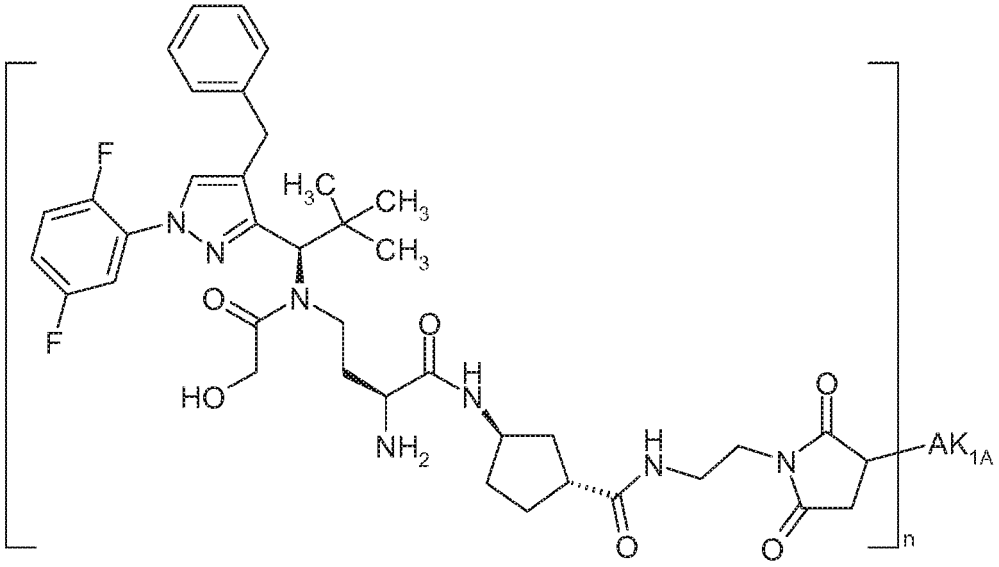

F
F
N
N
H3C
CH3
CH3
O
N
HO
O
NH2
HO
O
N
H
O
N
H
CH3
O
N
H
H3C
CH3
O
AK1A
n

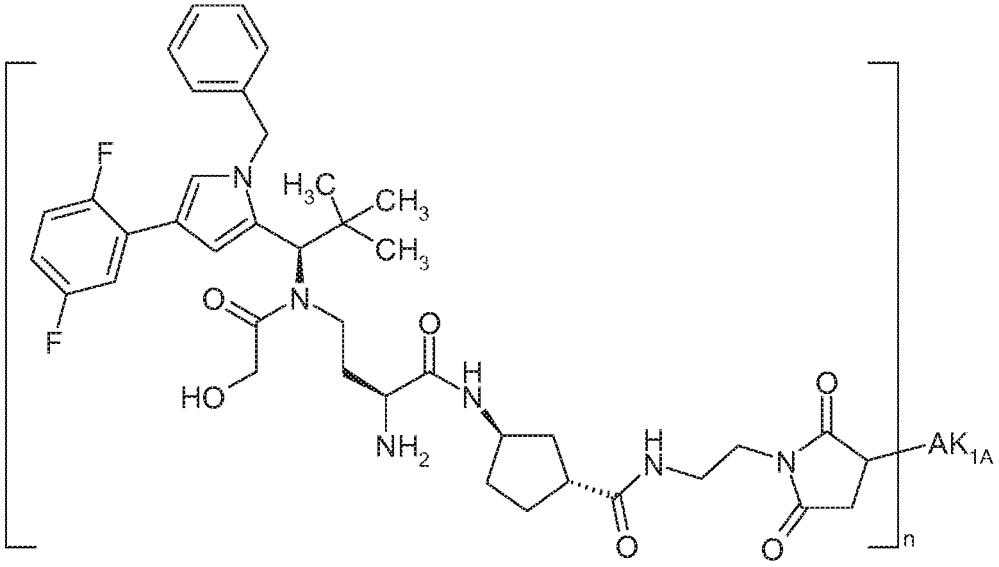


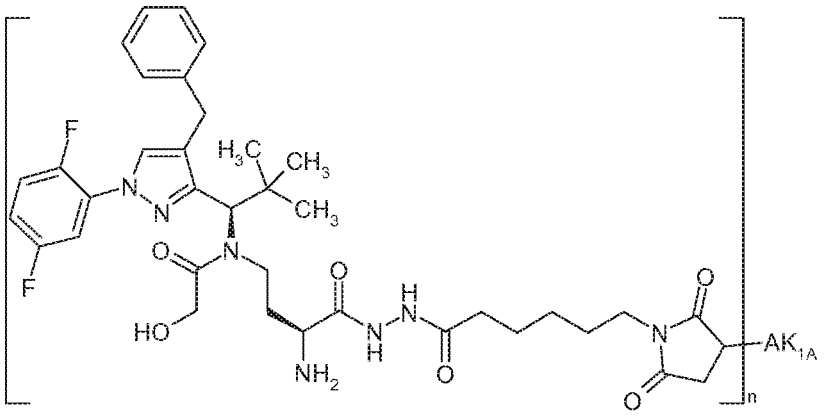


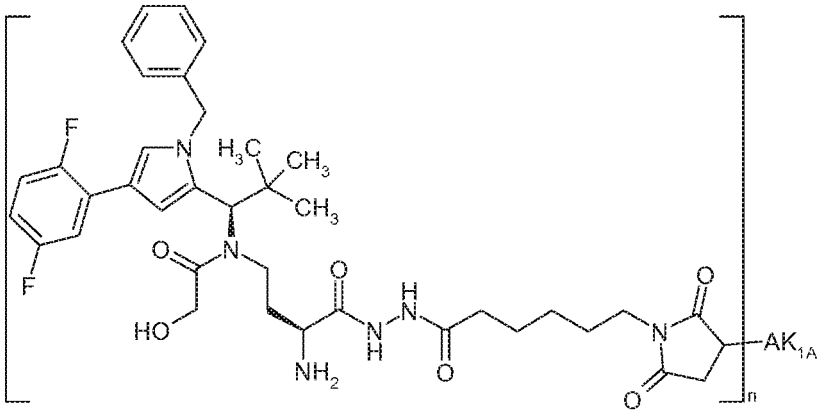


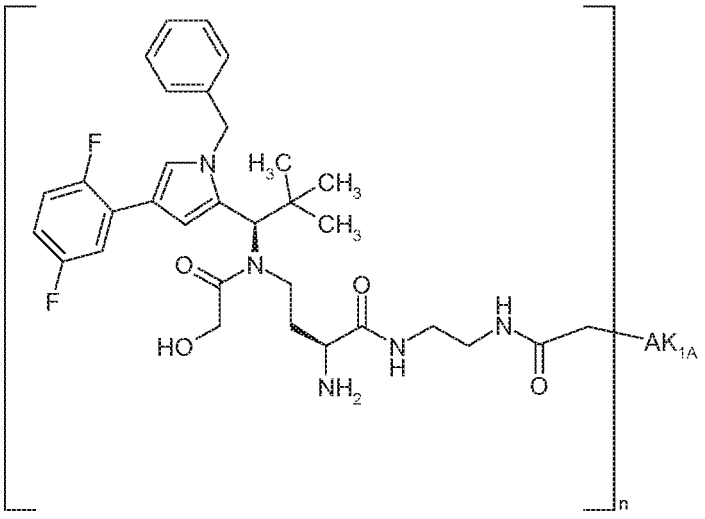


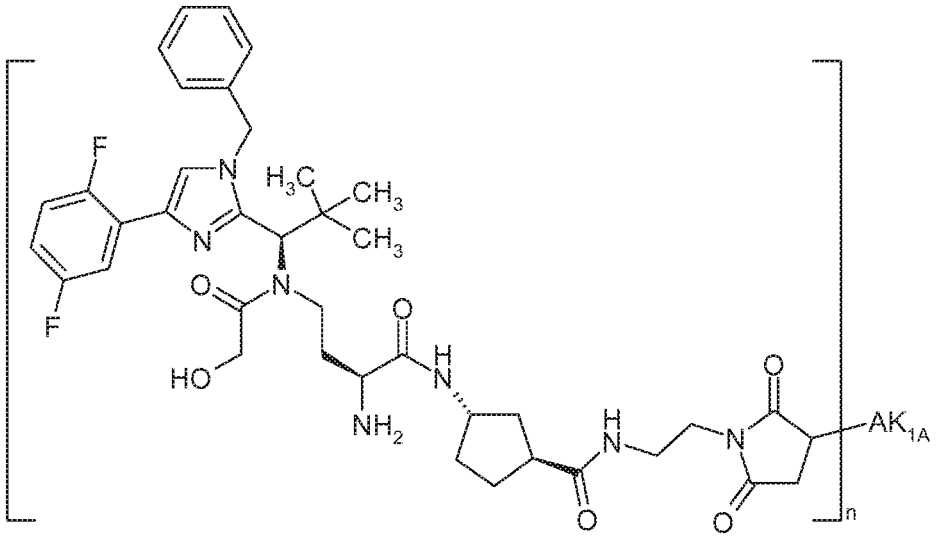


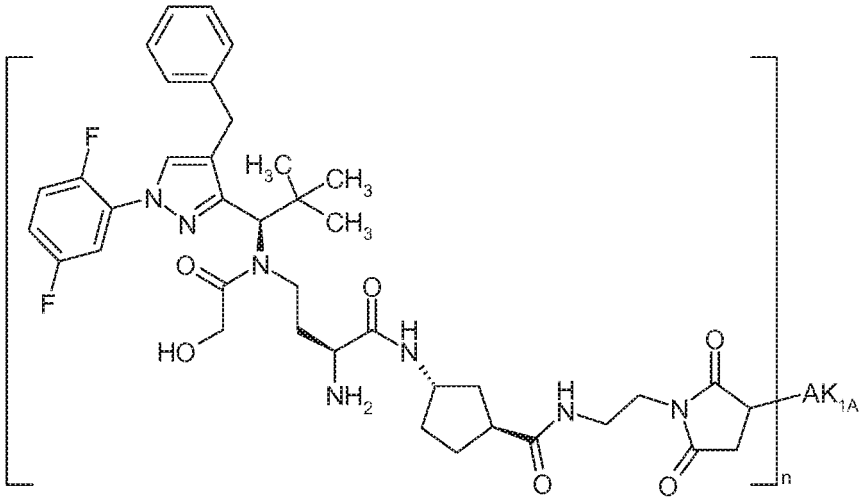


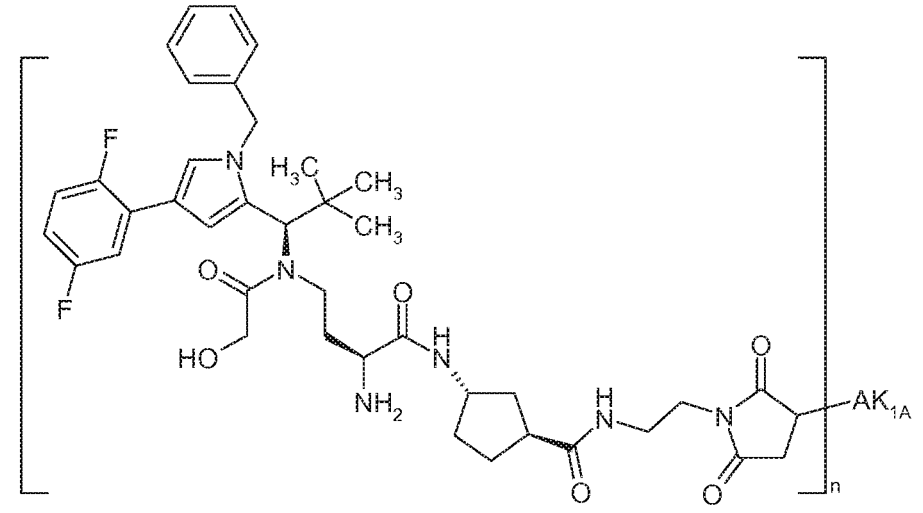


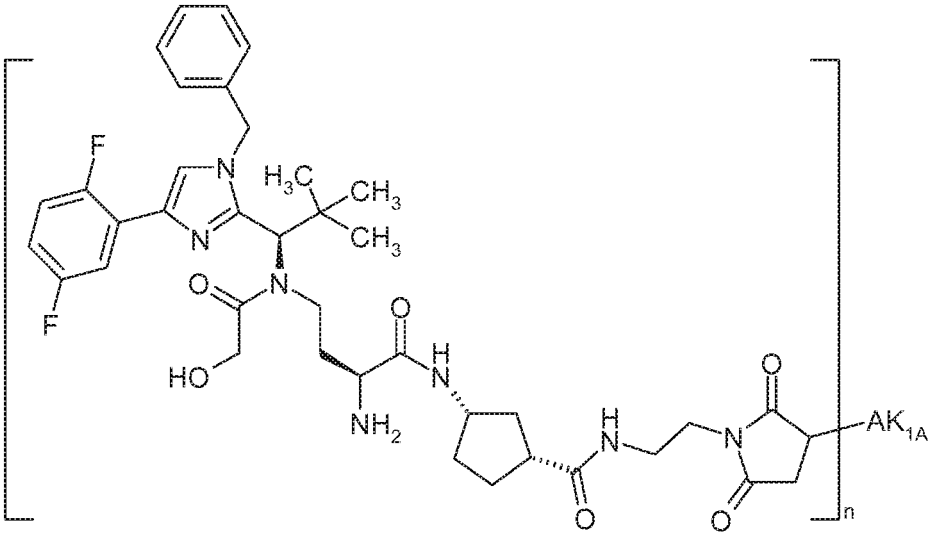


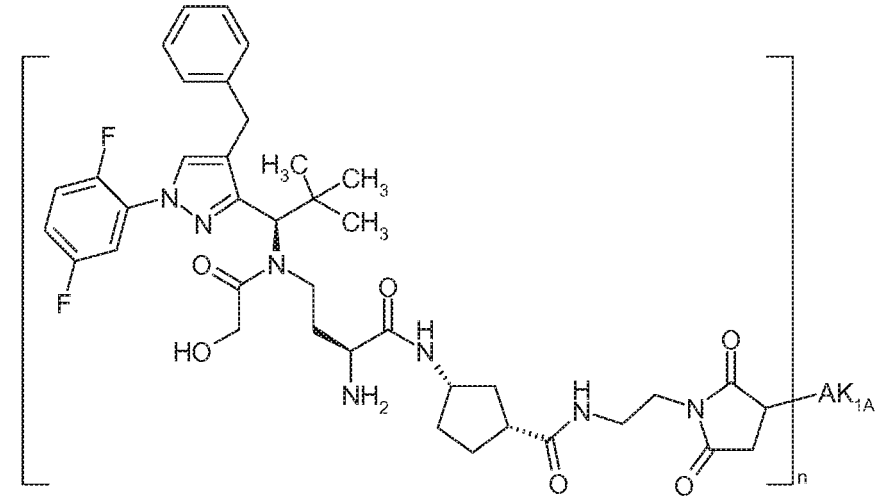


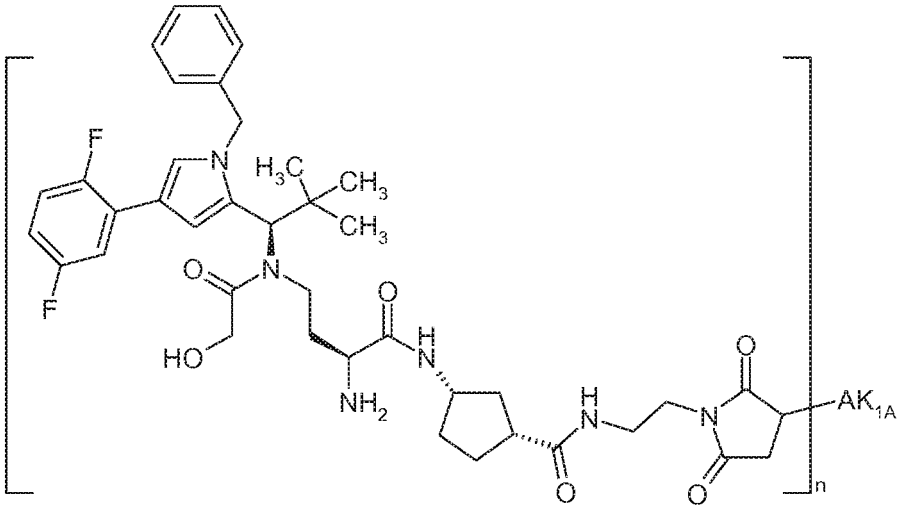


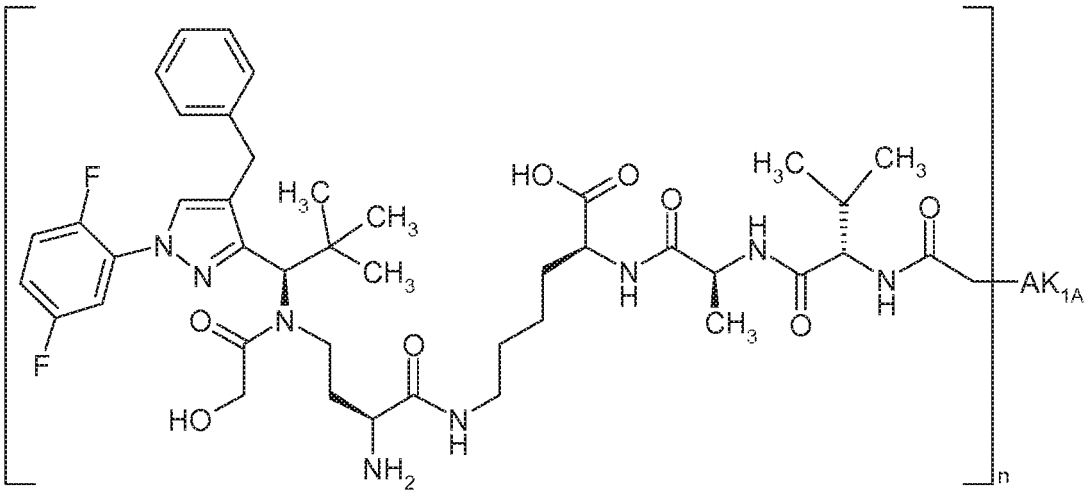


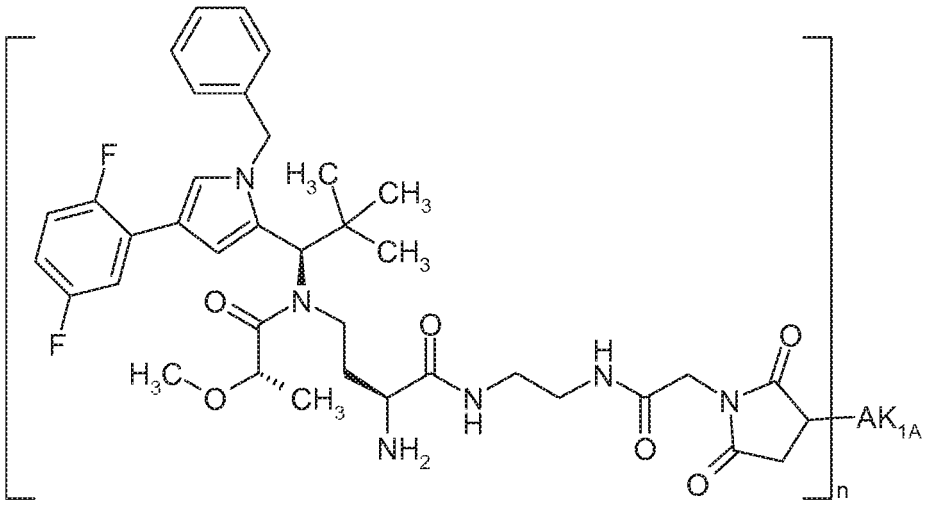

F
F
N
H3C
CH3
CH3
O
N
HO
O
H
N
NH2
H
N
O
O
N
O
AK1A
n

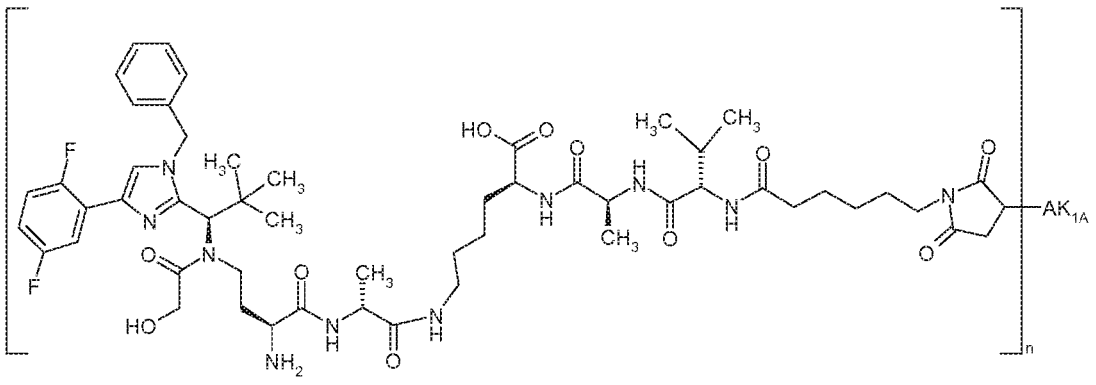

F
F
N
N
H3C
CH3
CH3
O
N
HO
O
H
N
NH2
H
N
O
O
N
O
AK1A
n

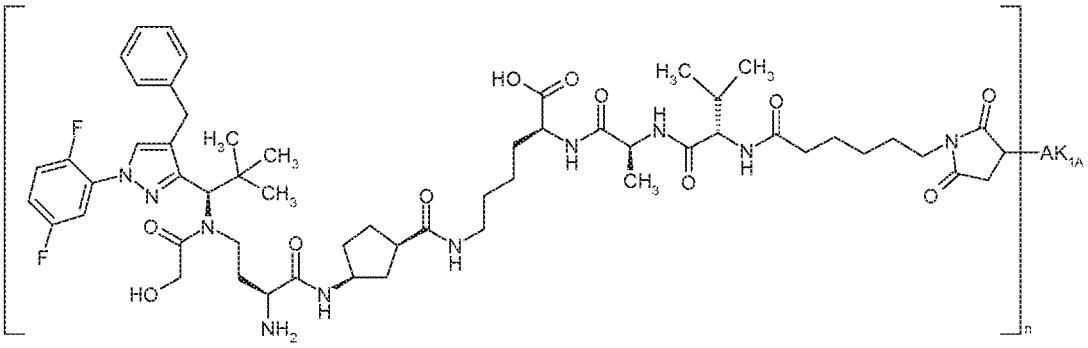


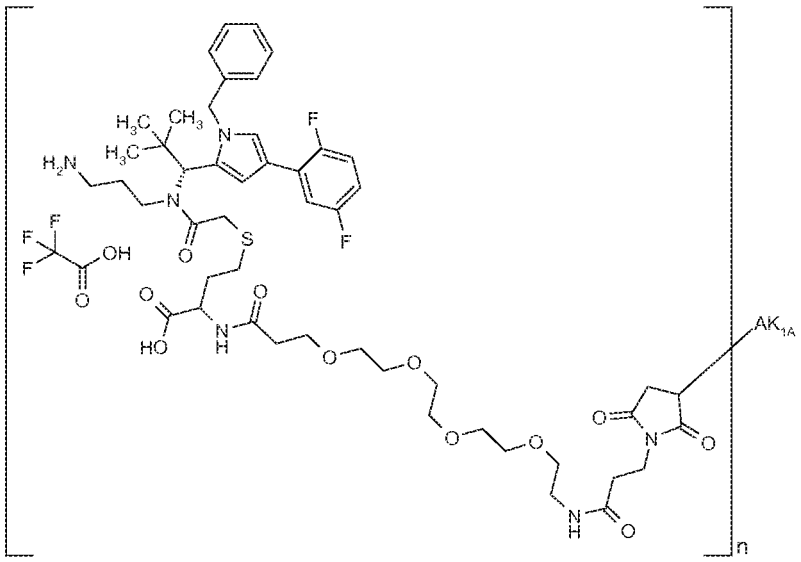


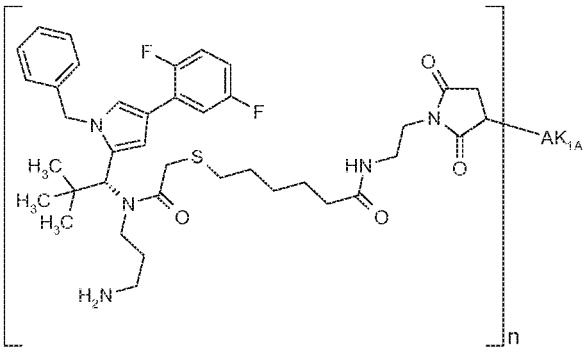


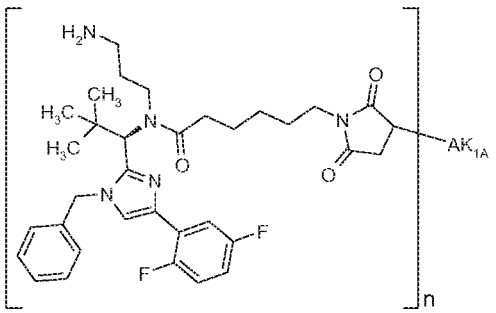


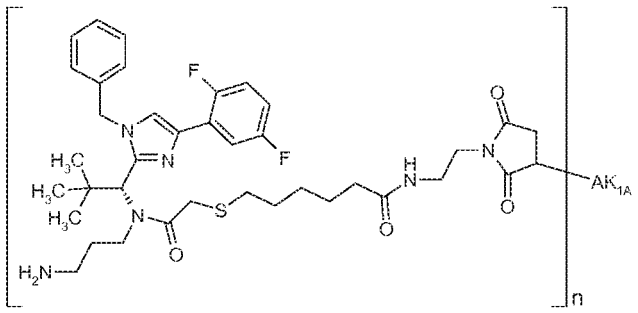




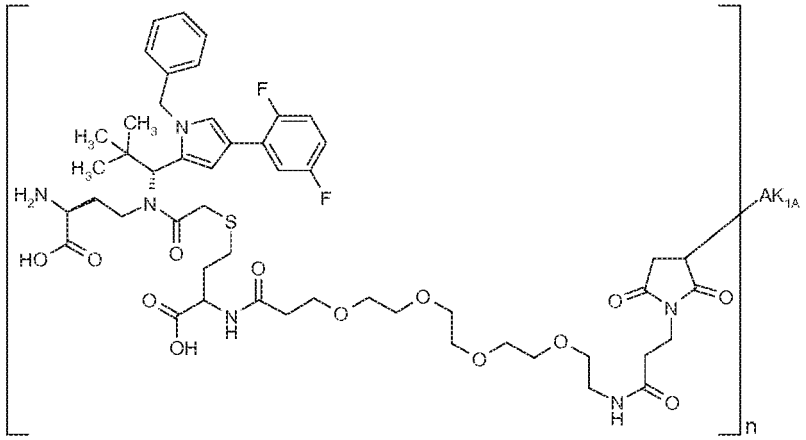


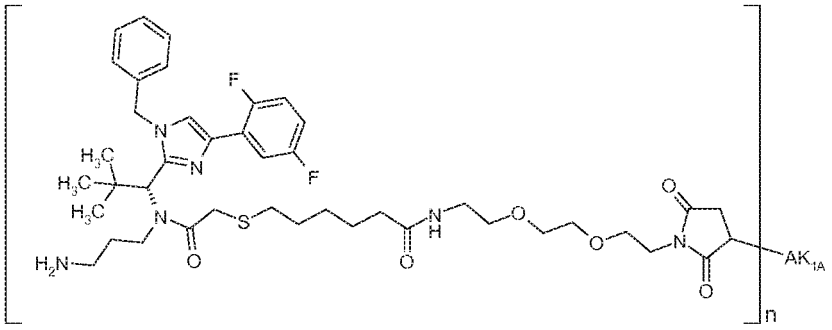


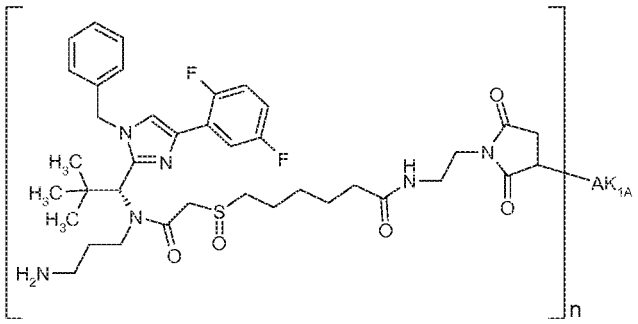




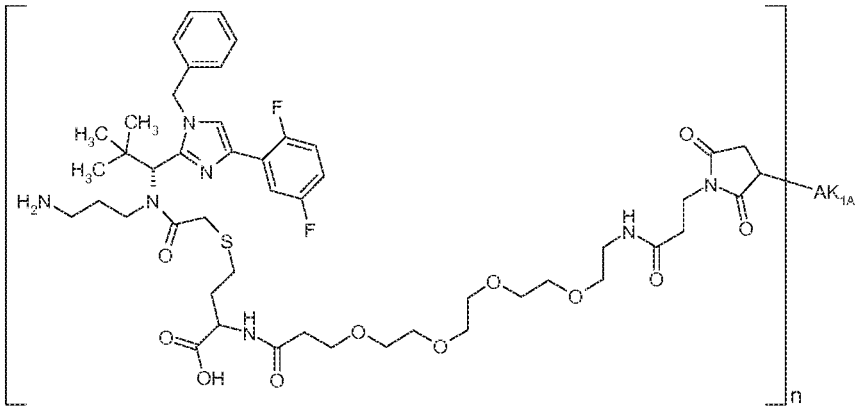
5

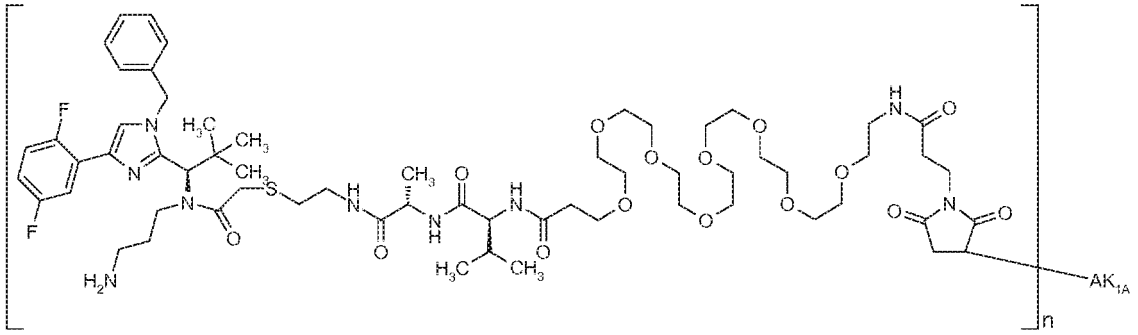


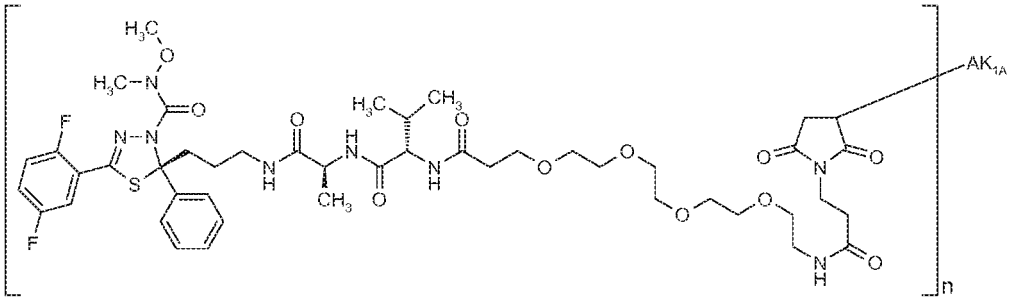


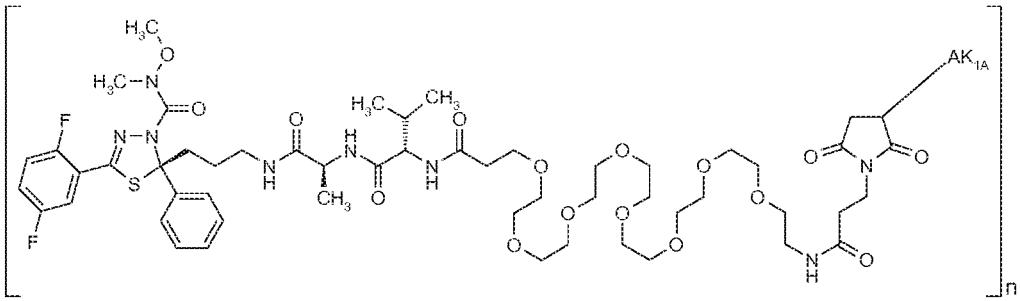


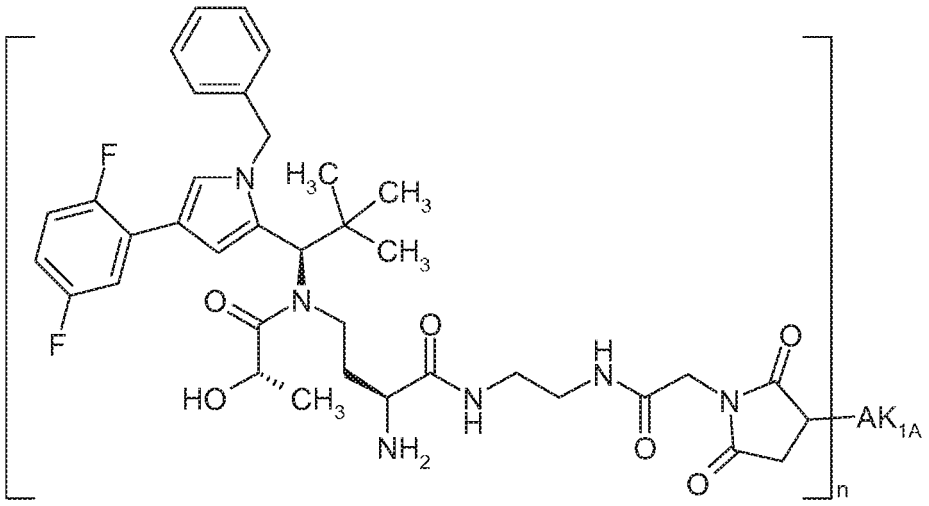
5

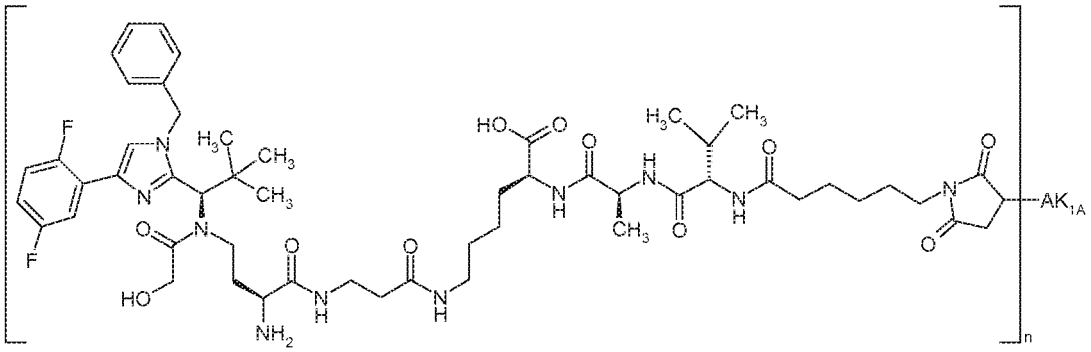


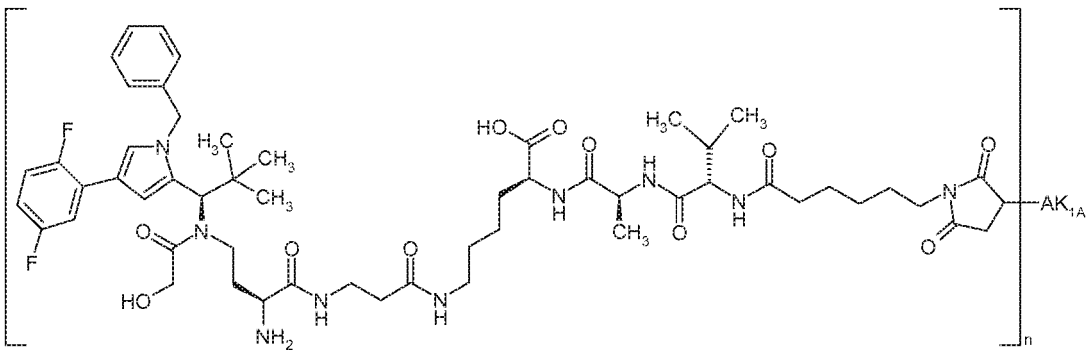


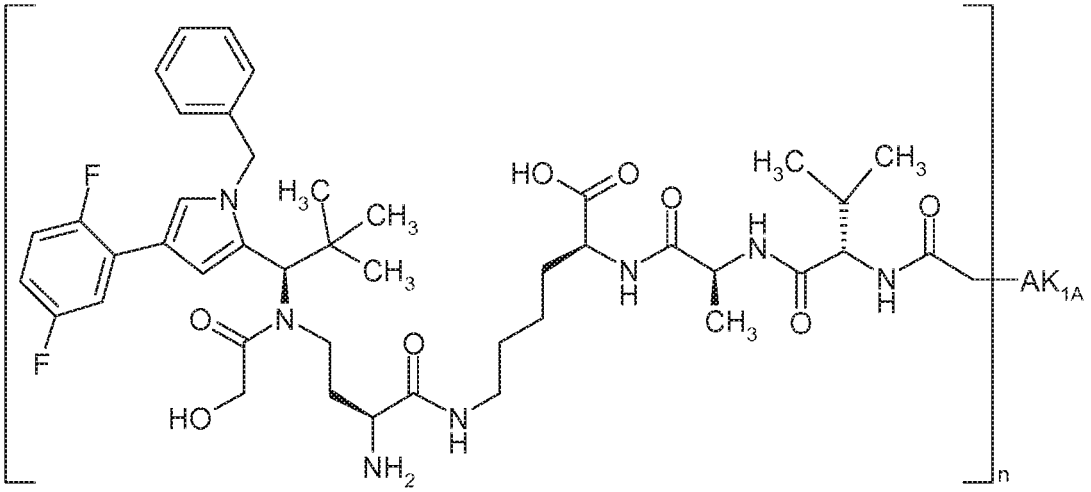


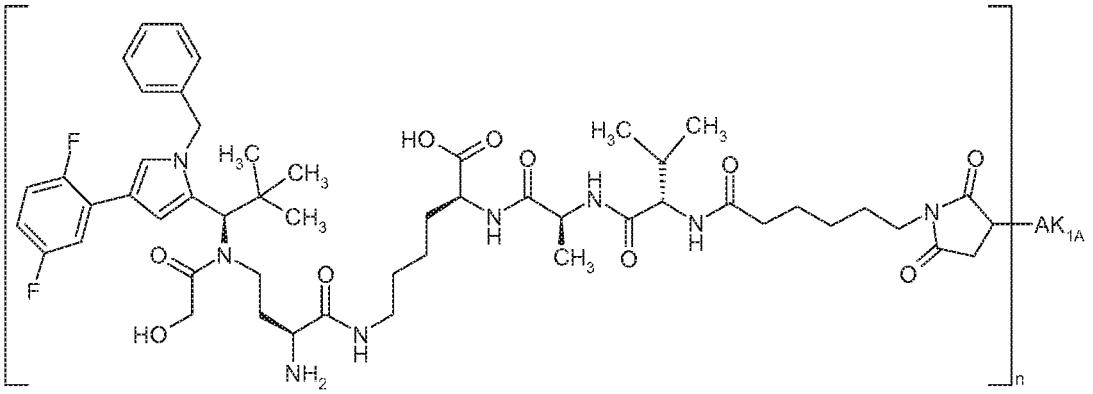


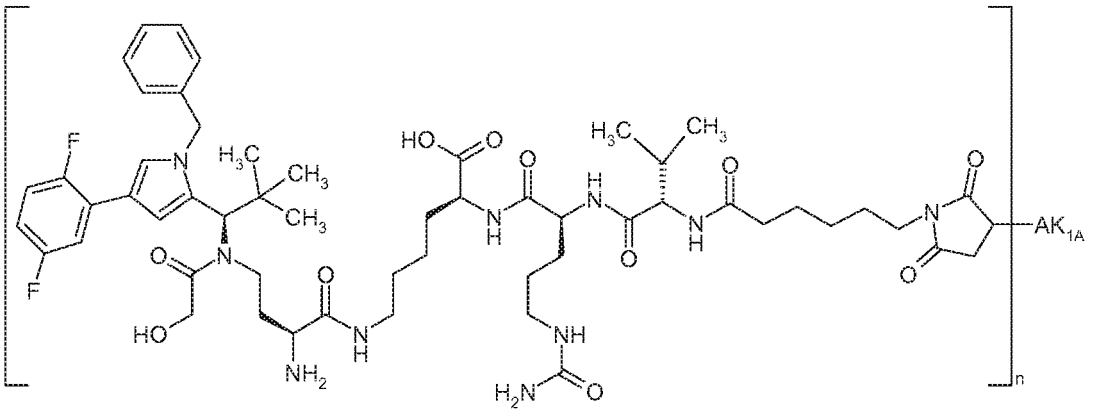


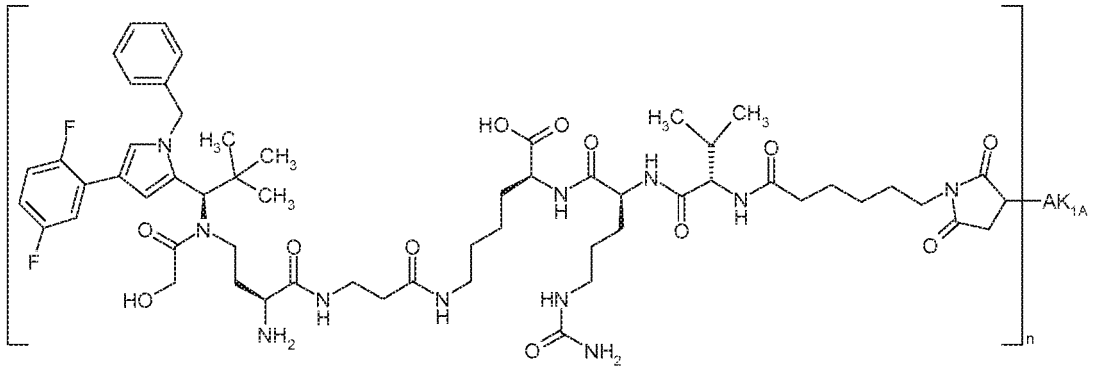


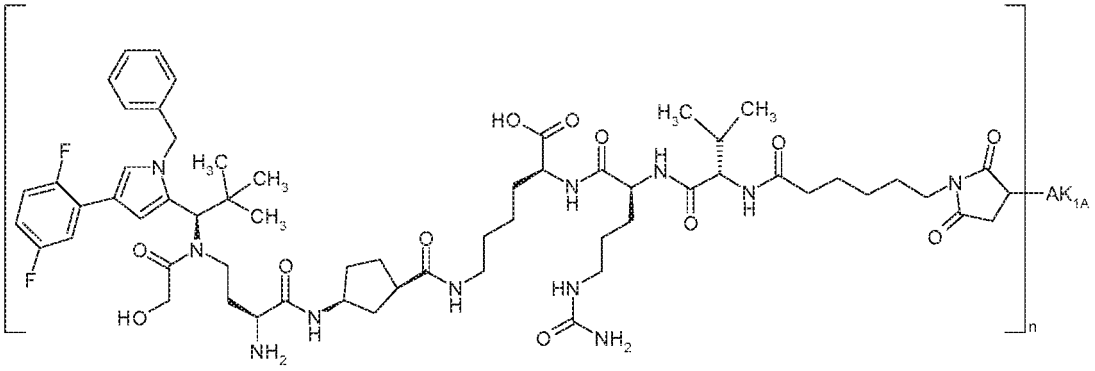


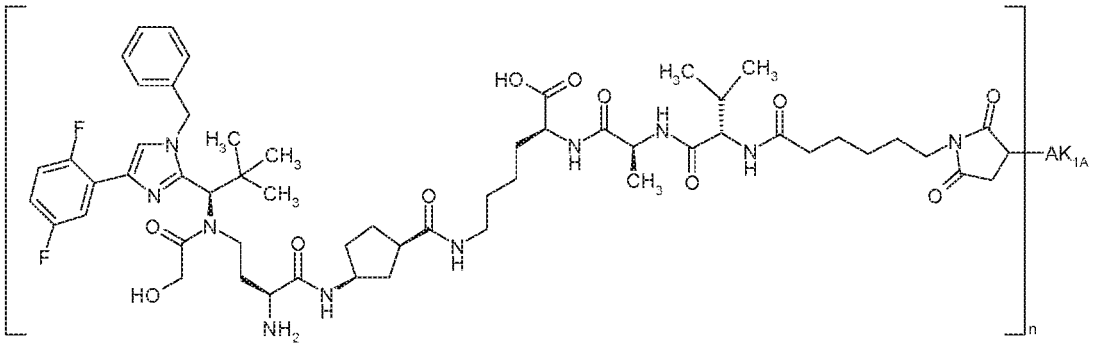


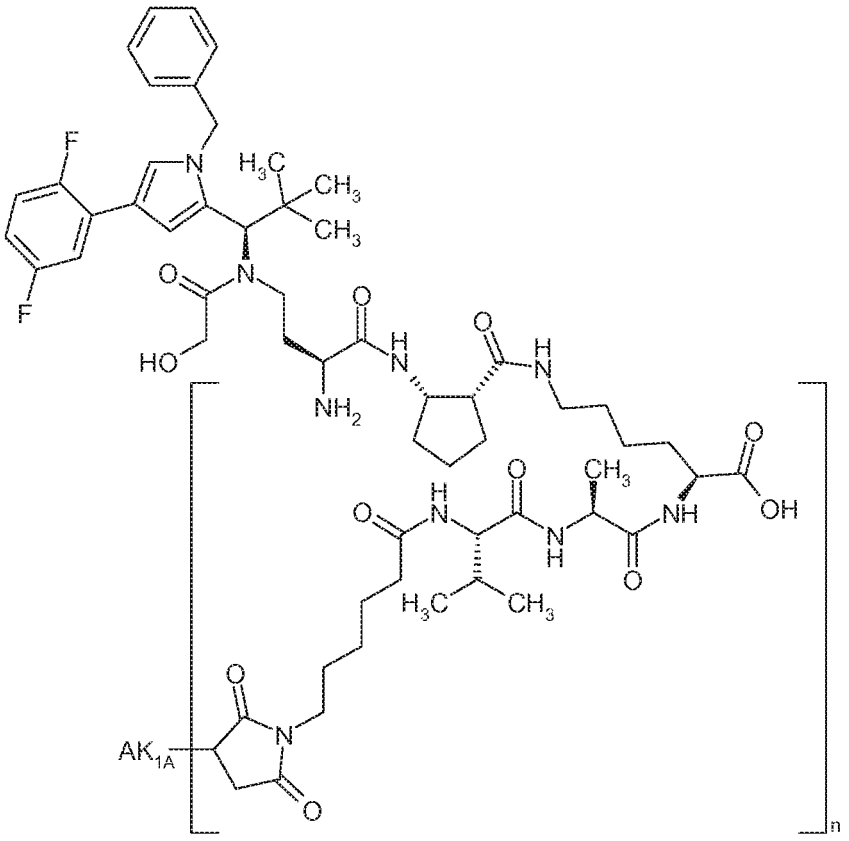


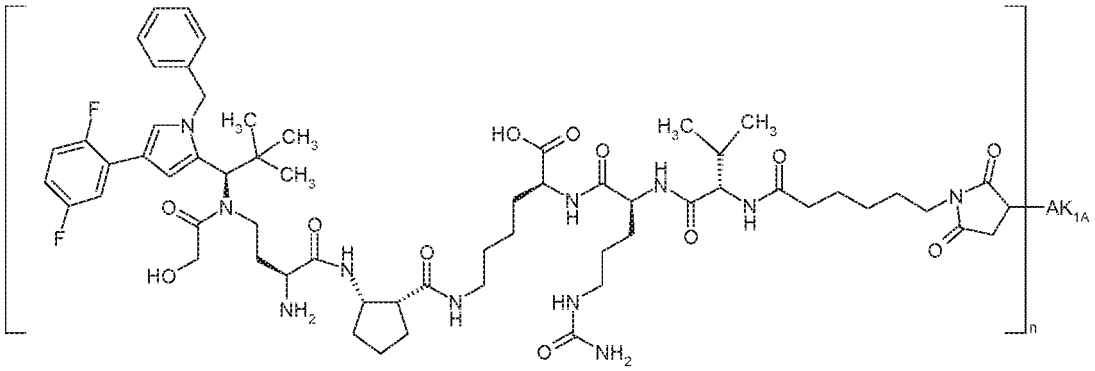


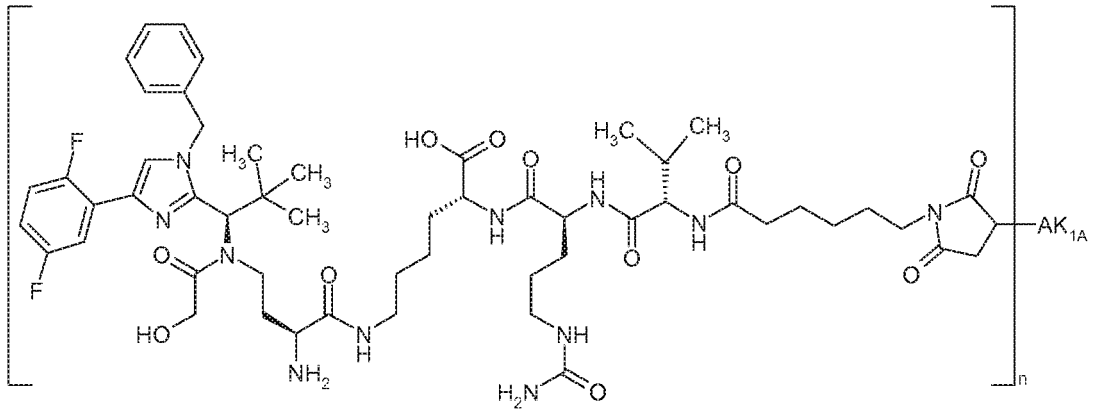


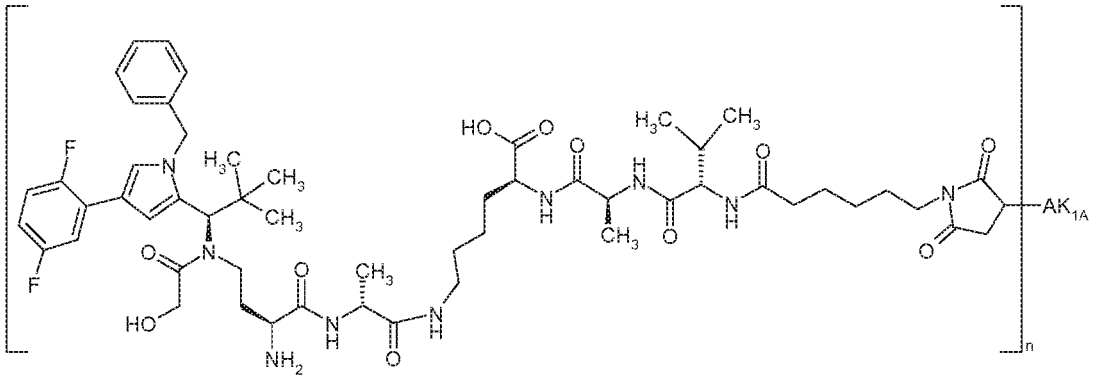




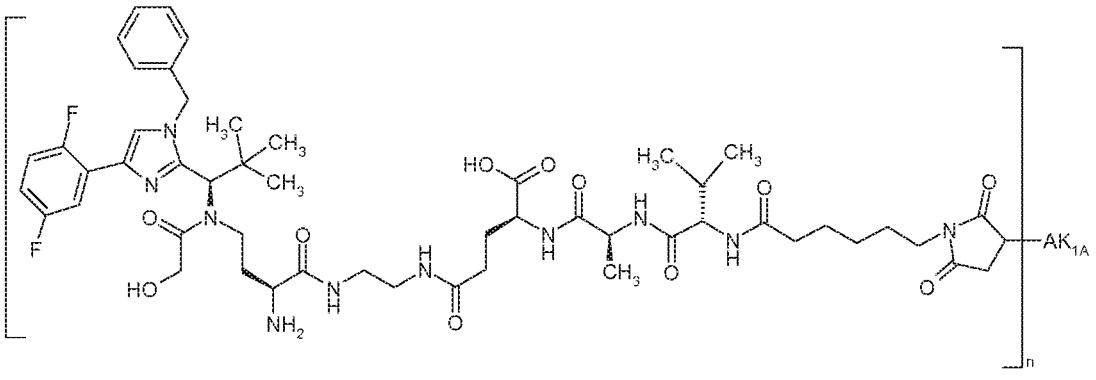


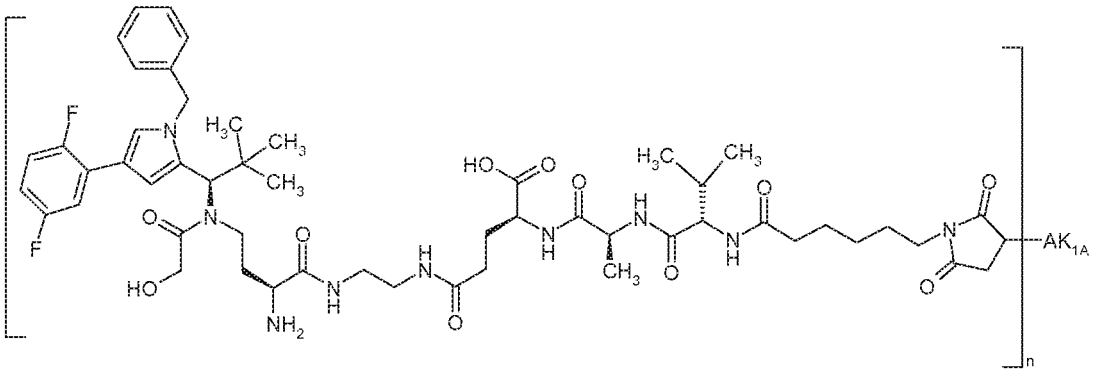


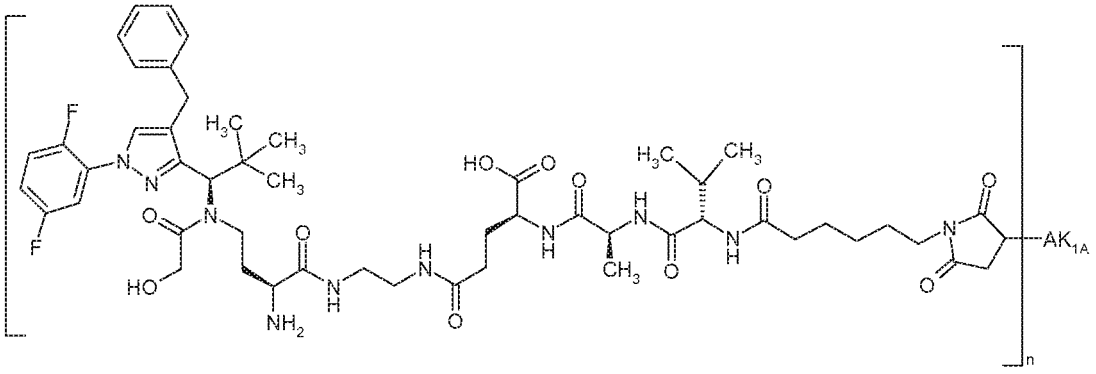


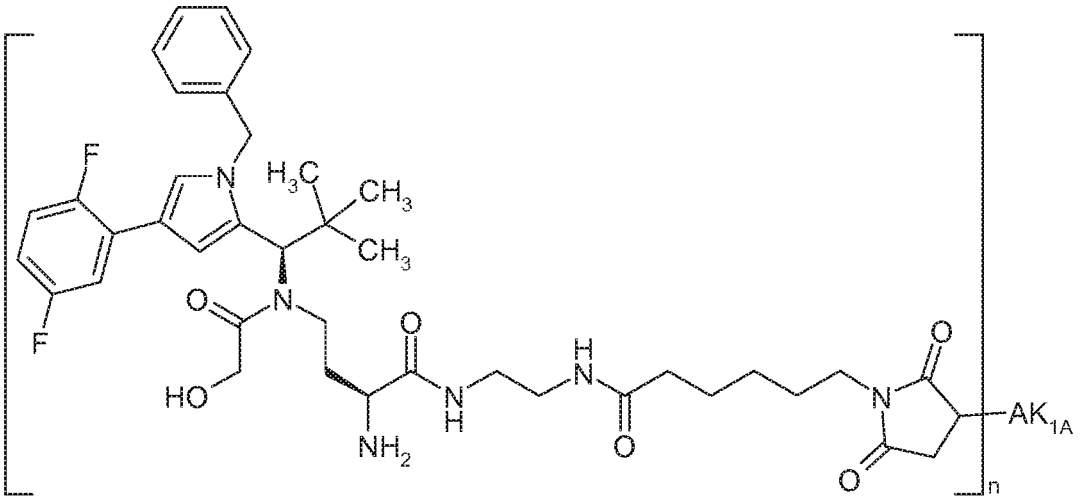


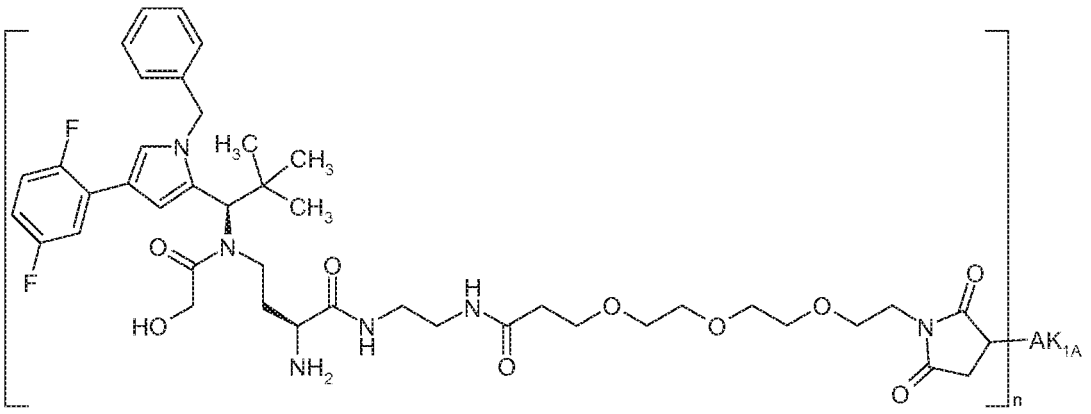
5

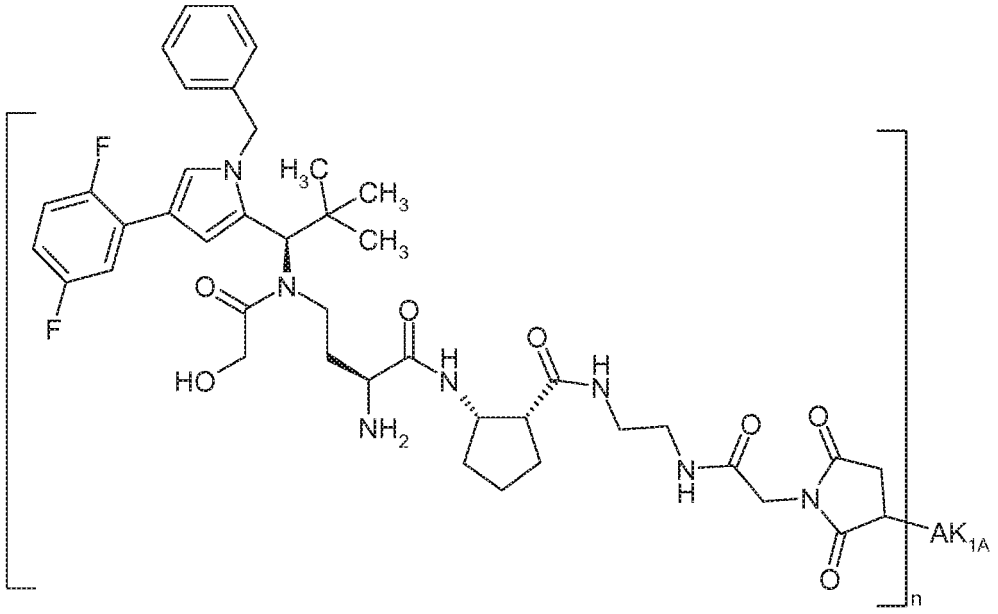


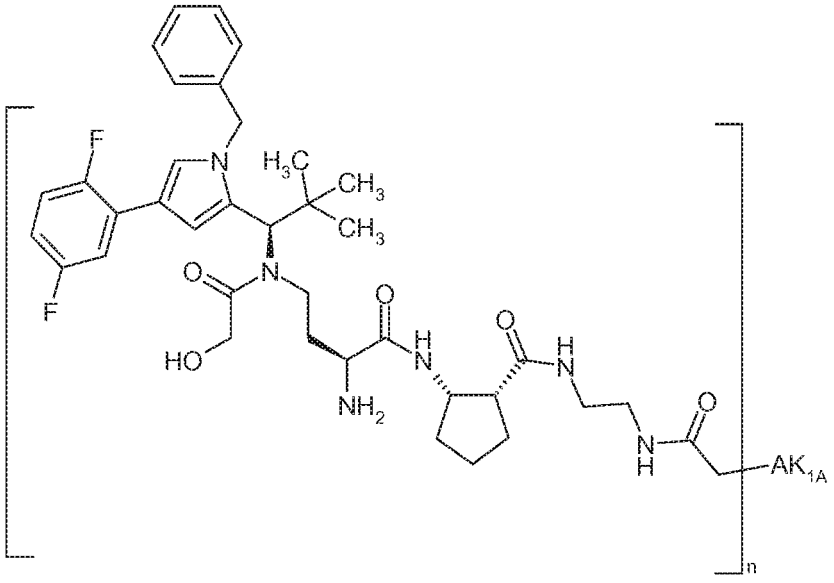


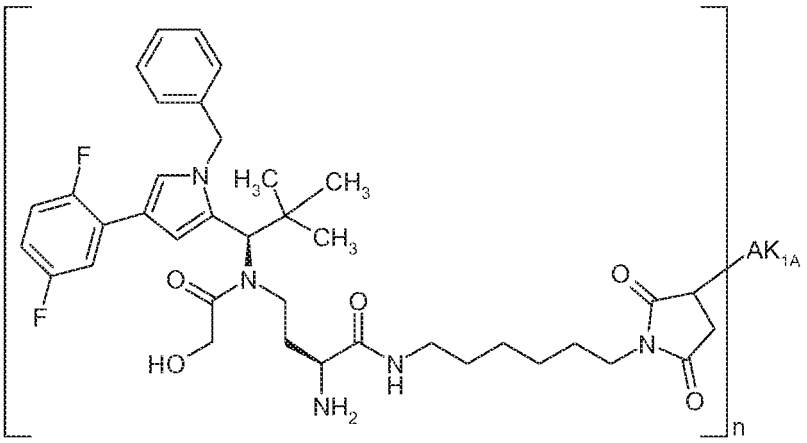


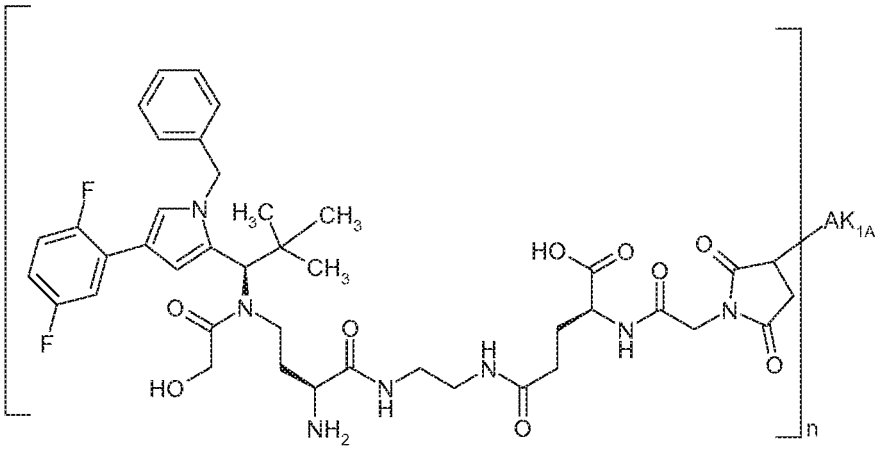


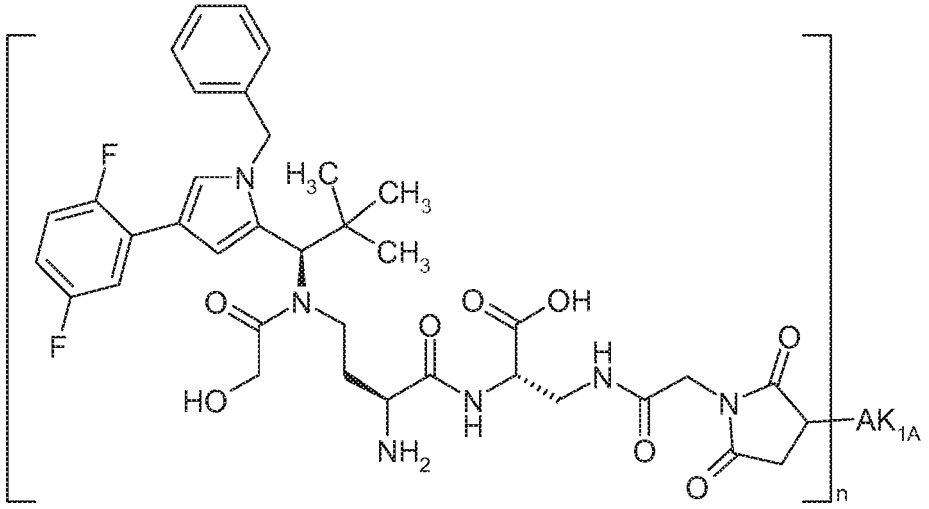


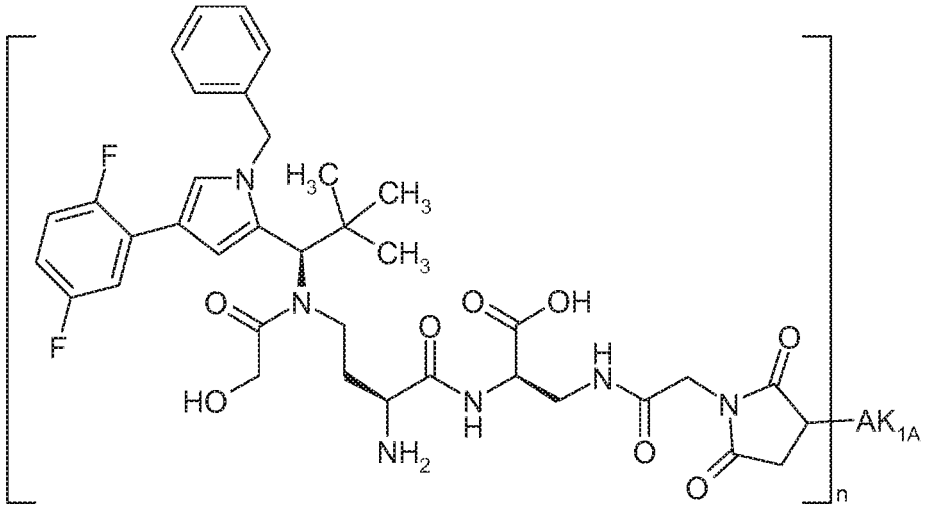


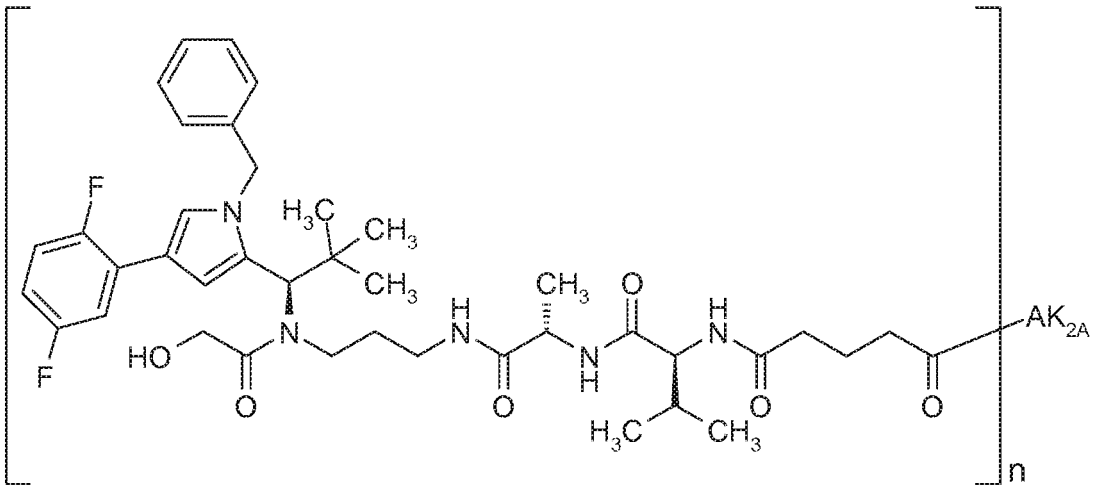


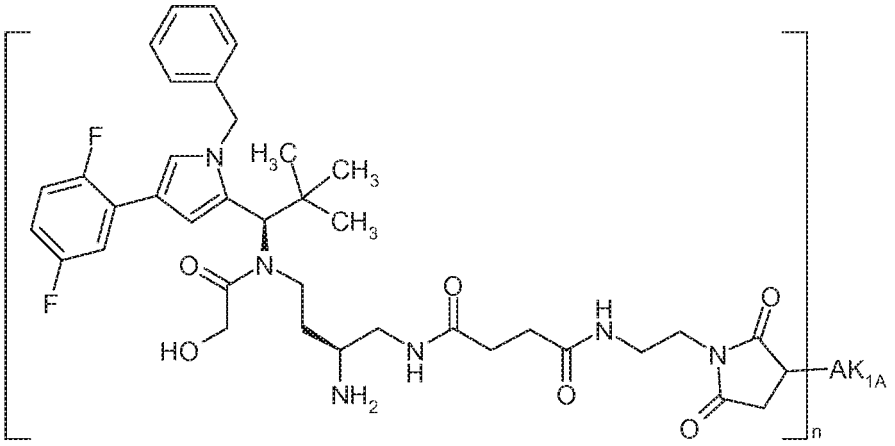

F
F
N
H3C
CH3
CH3
O
N
HO
O
NH2
N
H
O
O
N
O
AK1A
n

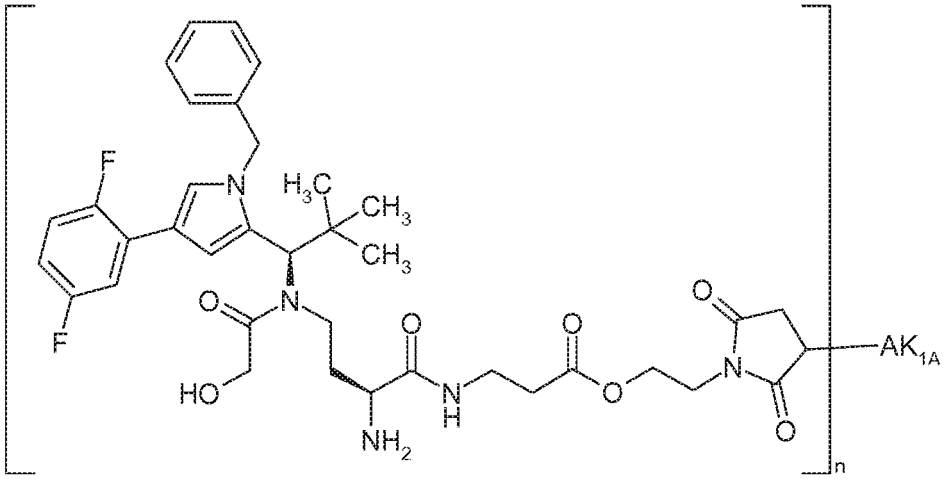

F
F
N
H3C
CH3
CH3
O
N
HO
O
NH2
N
H
O
H
N
O
HO
O
O
N
H
O
O
N
O
AK1A
n

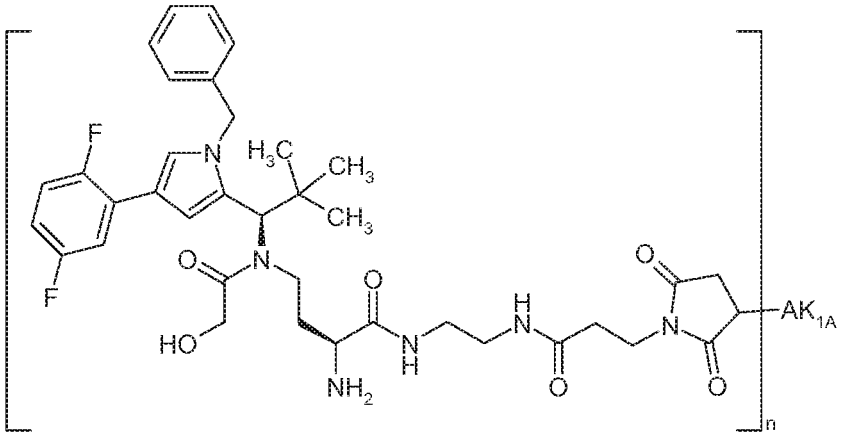


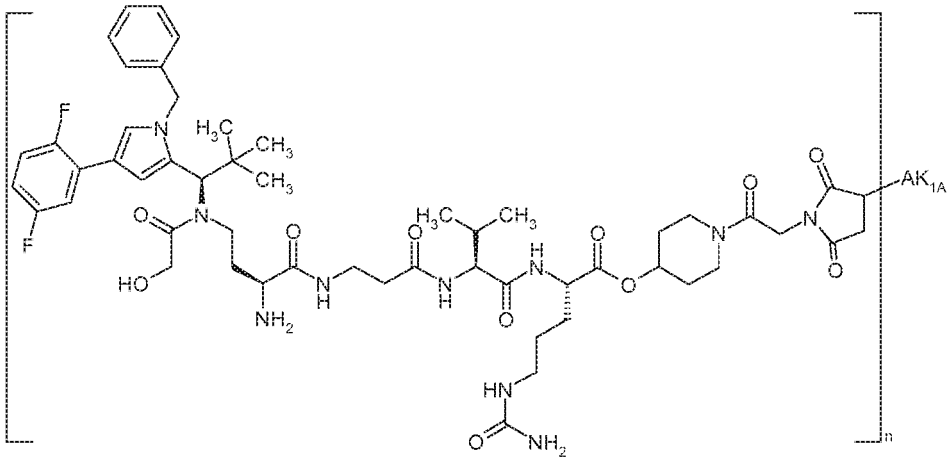




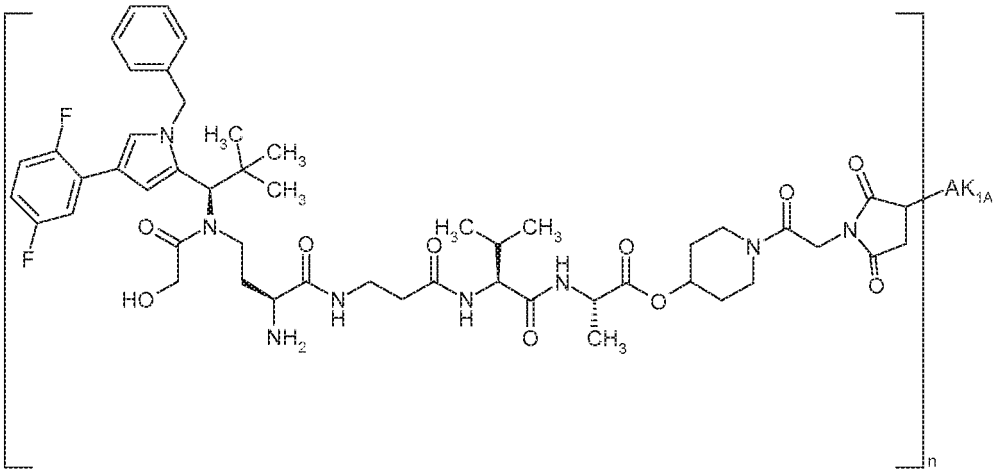


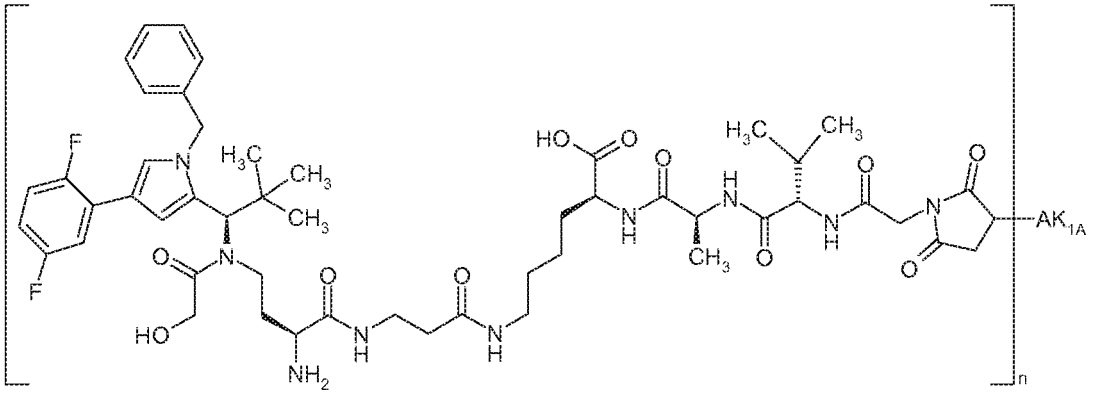


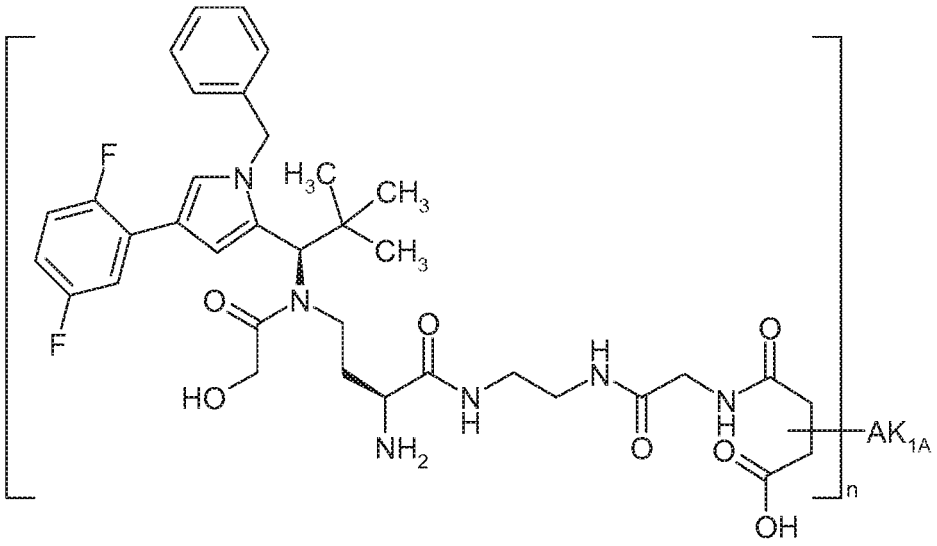




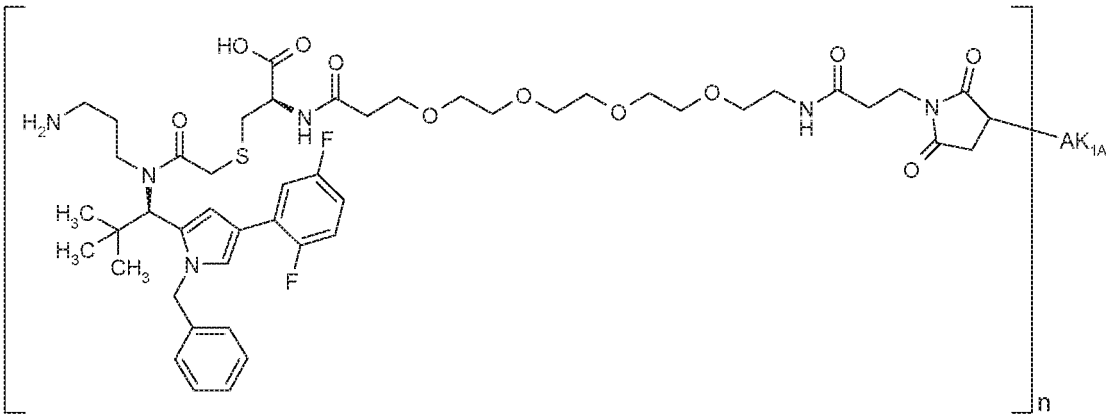
5

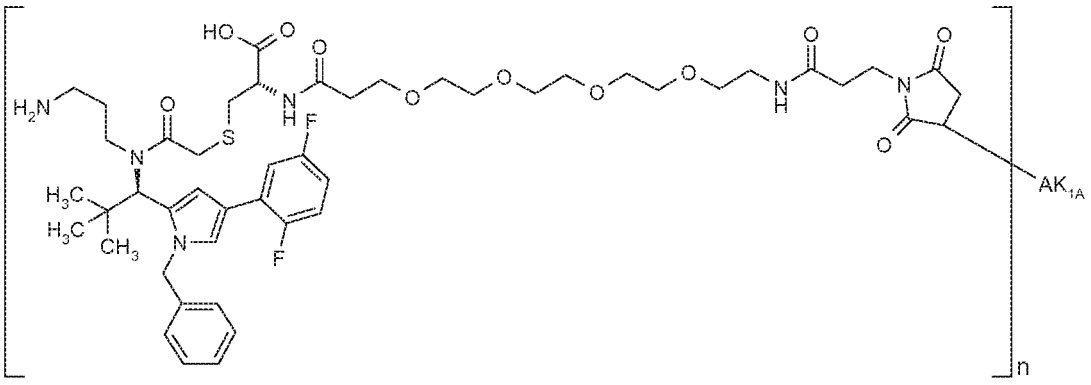


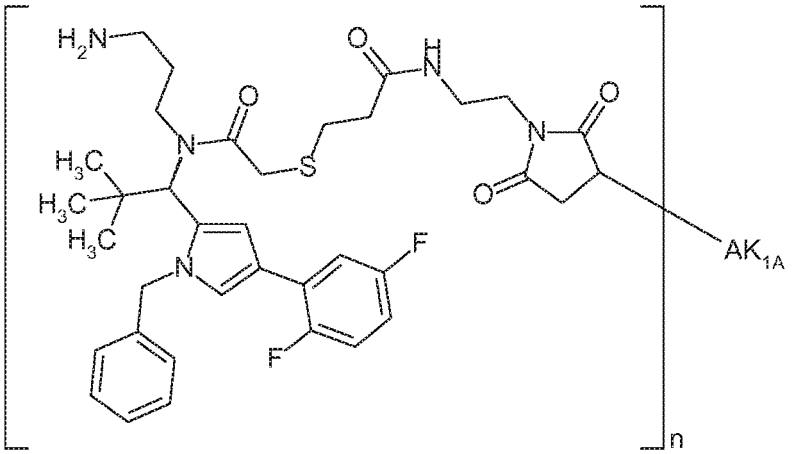


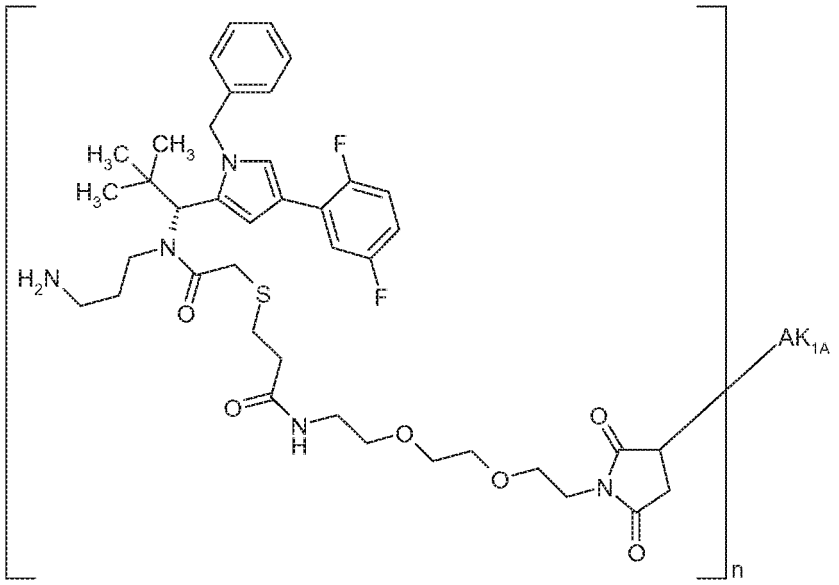


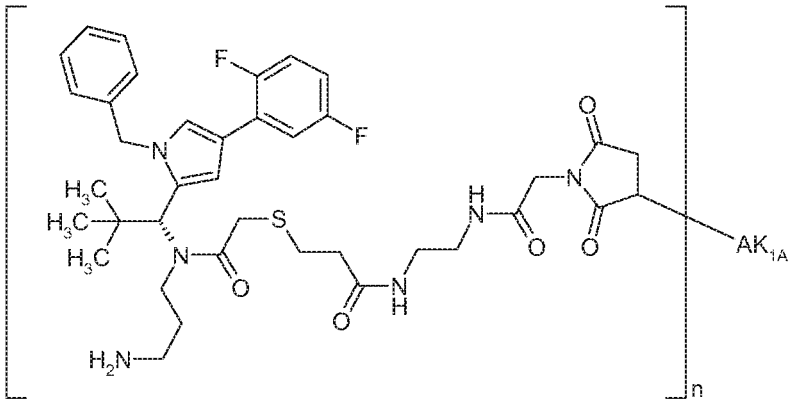
5

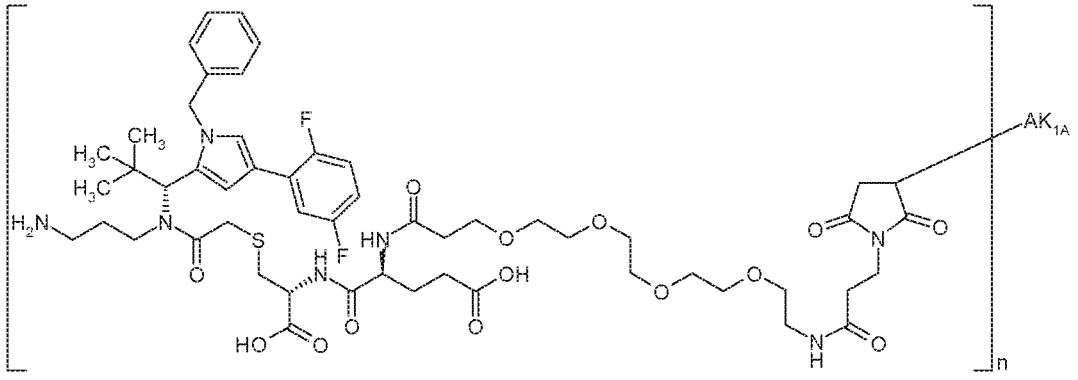


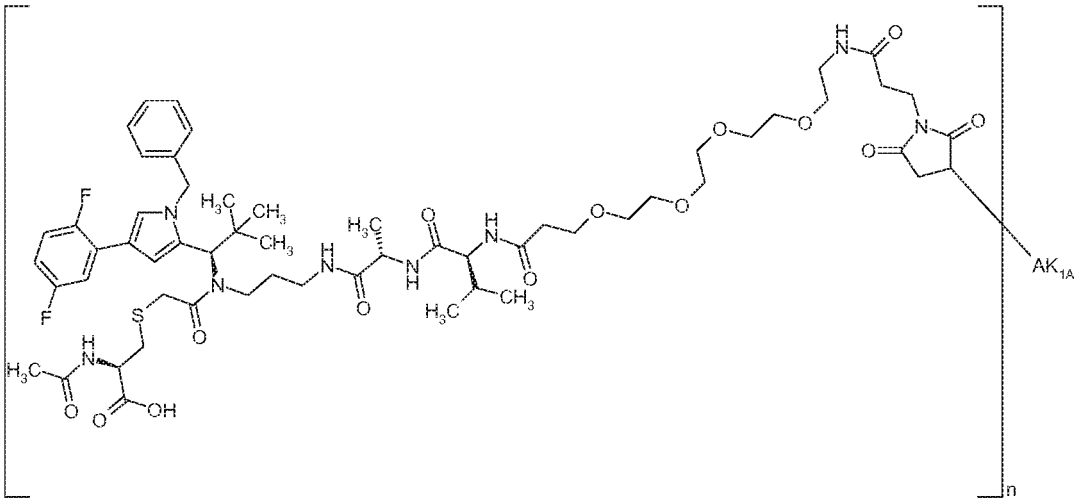


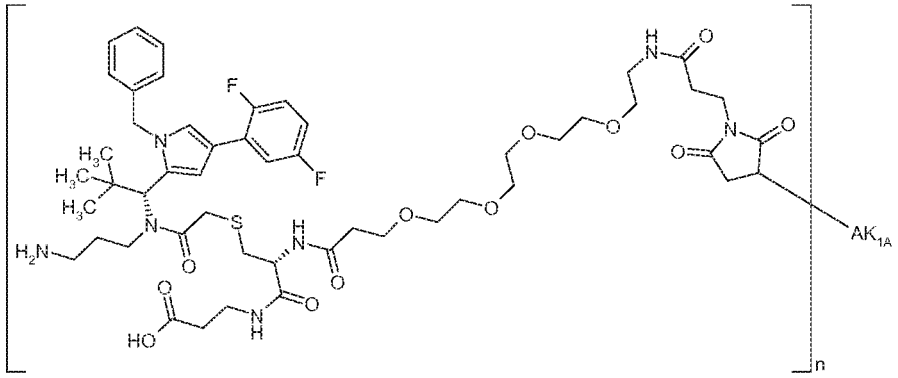


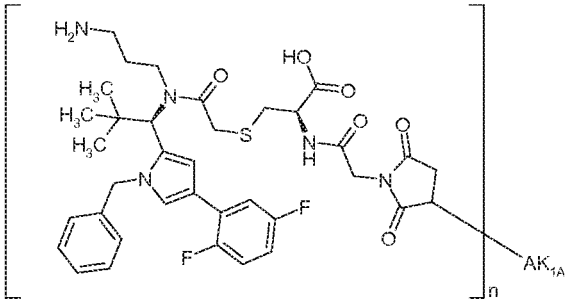


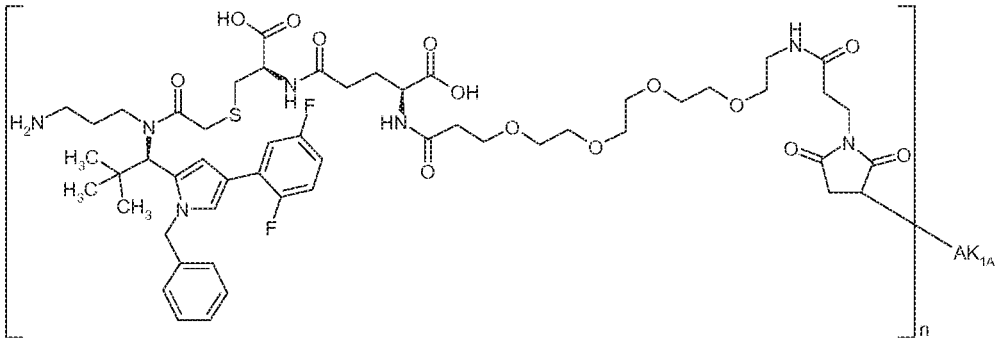


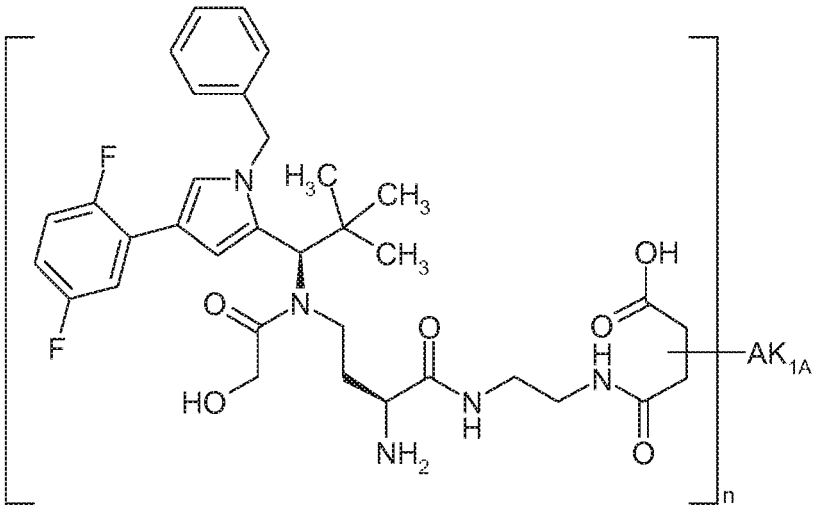


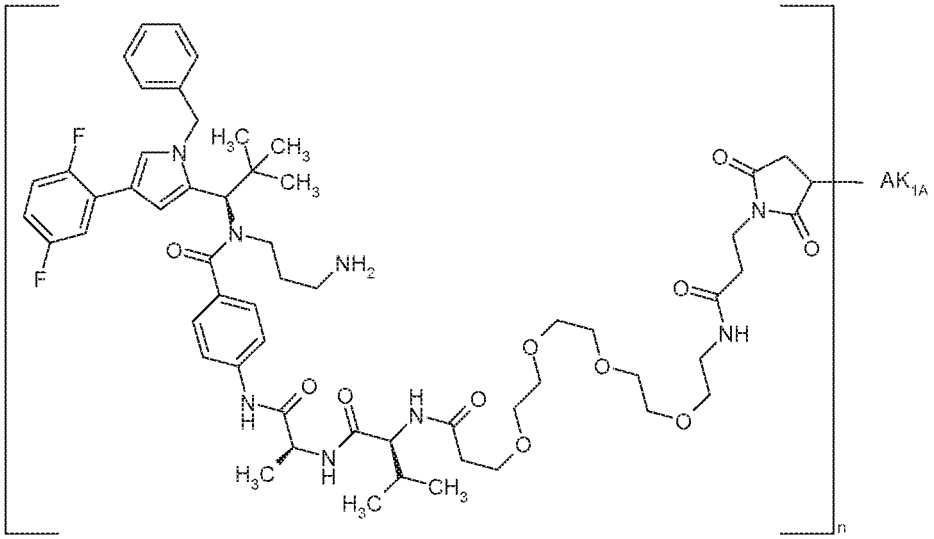


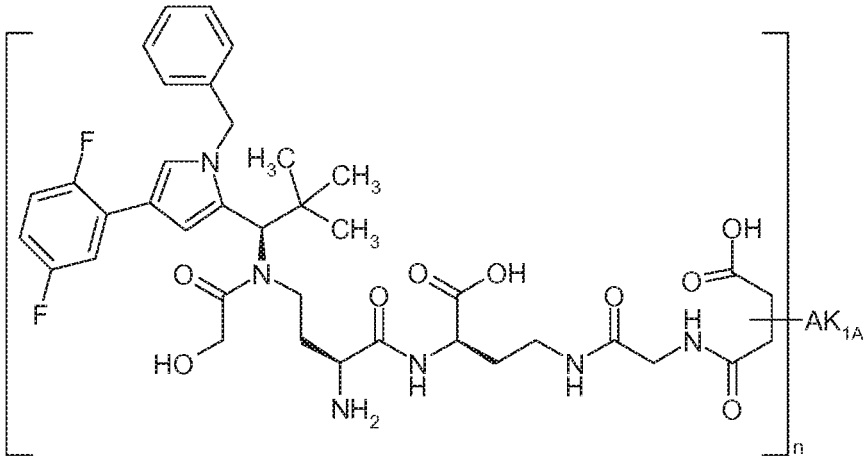


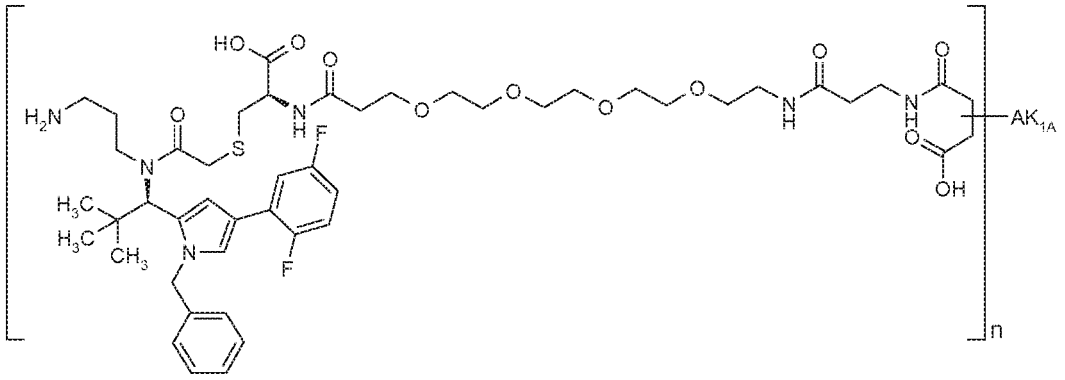


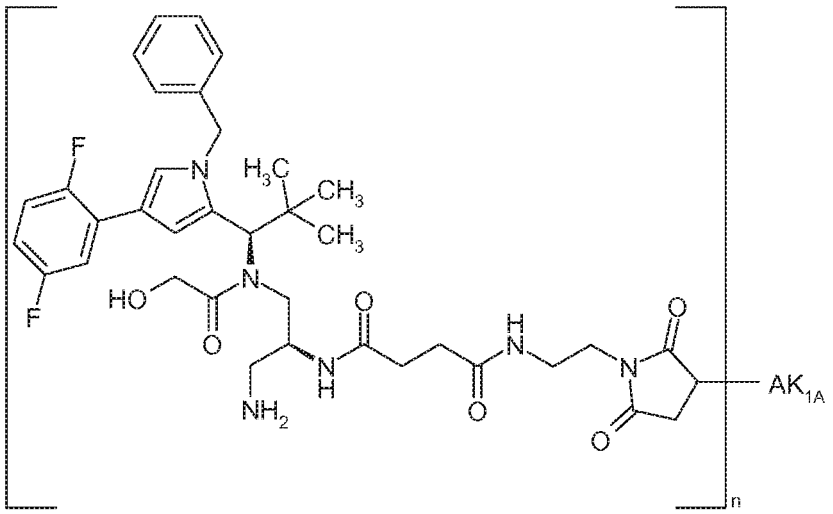


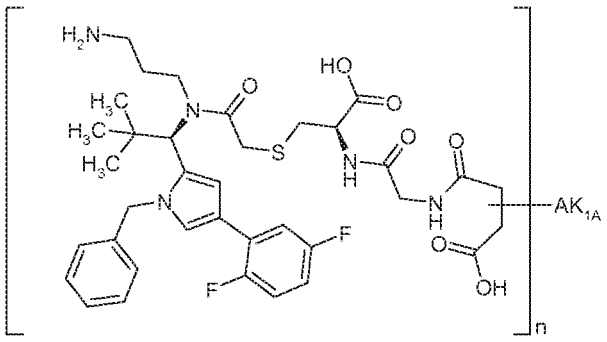


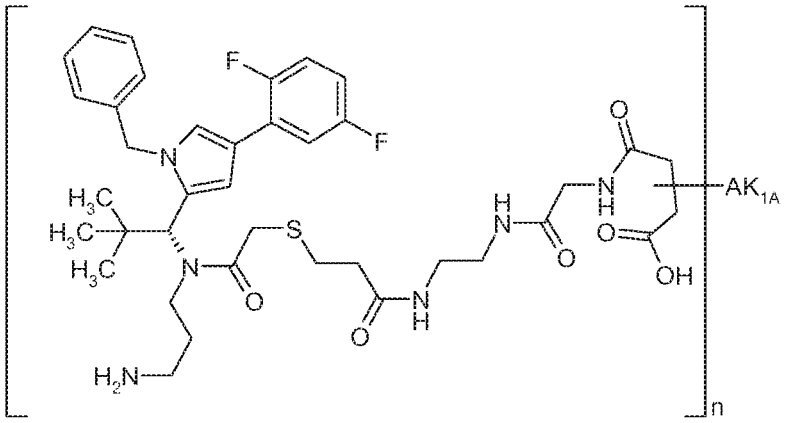


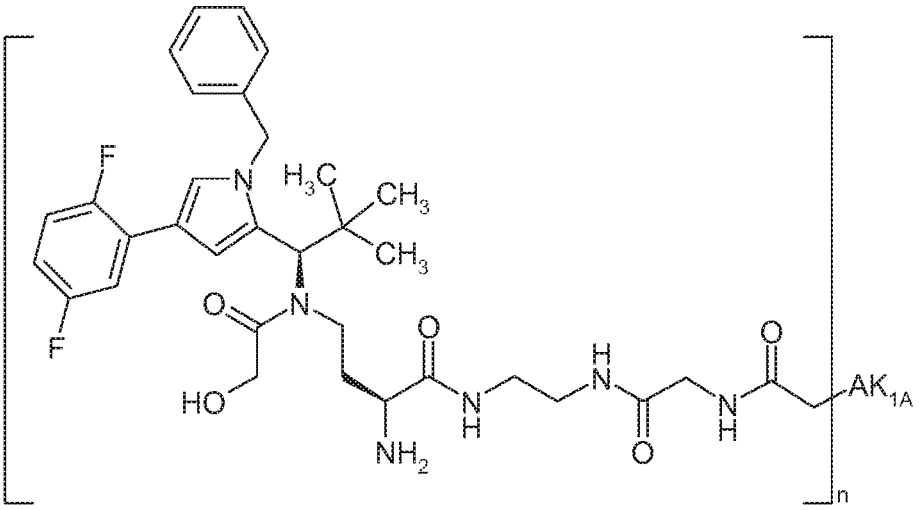


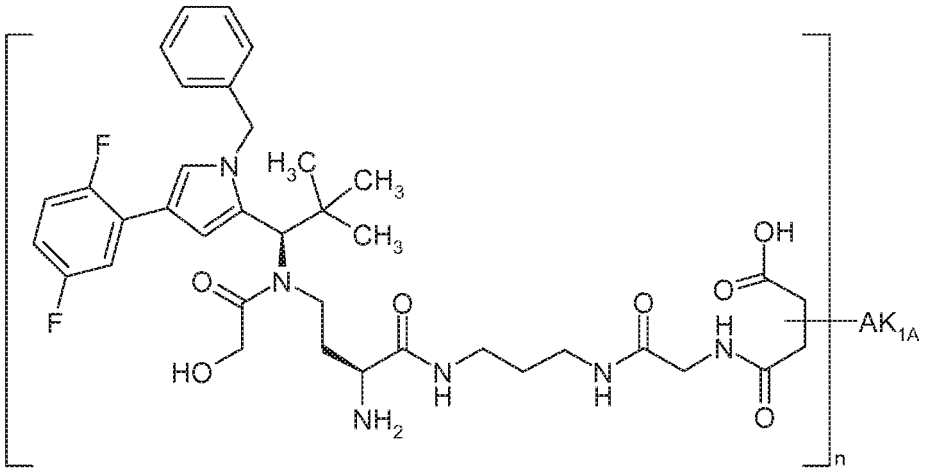


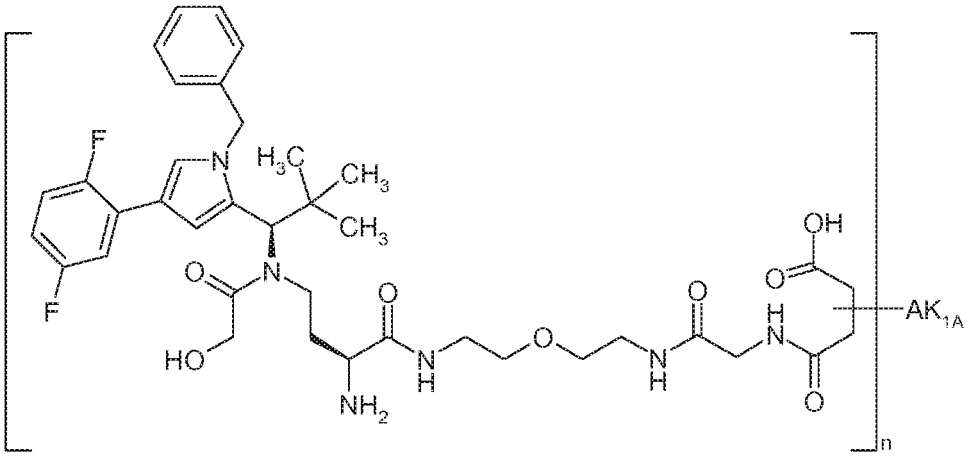


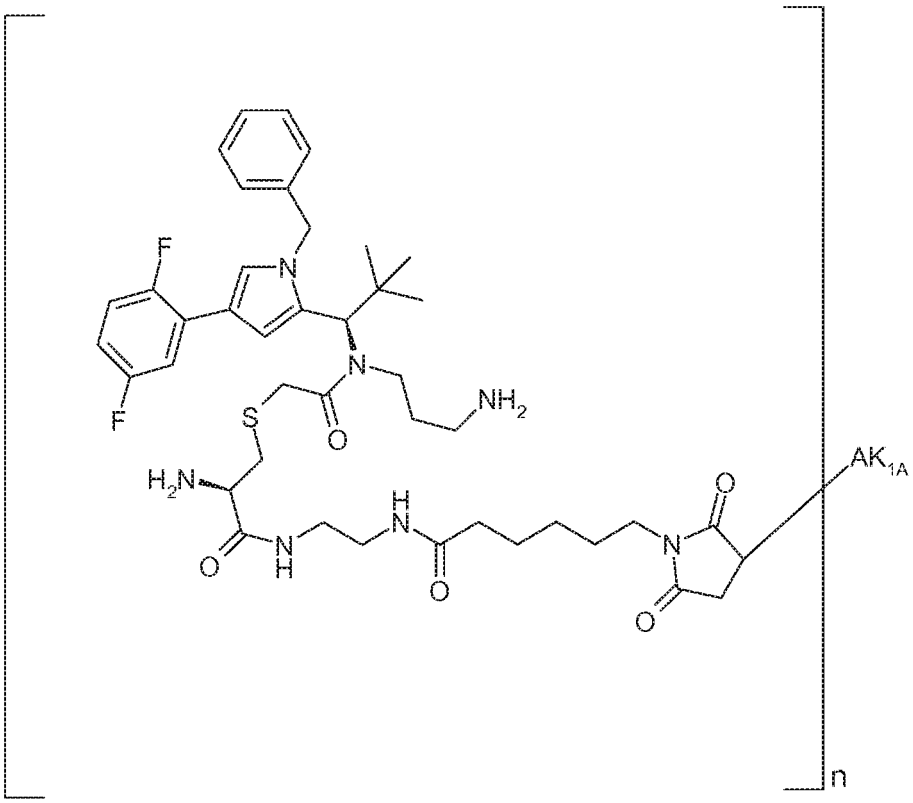


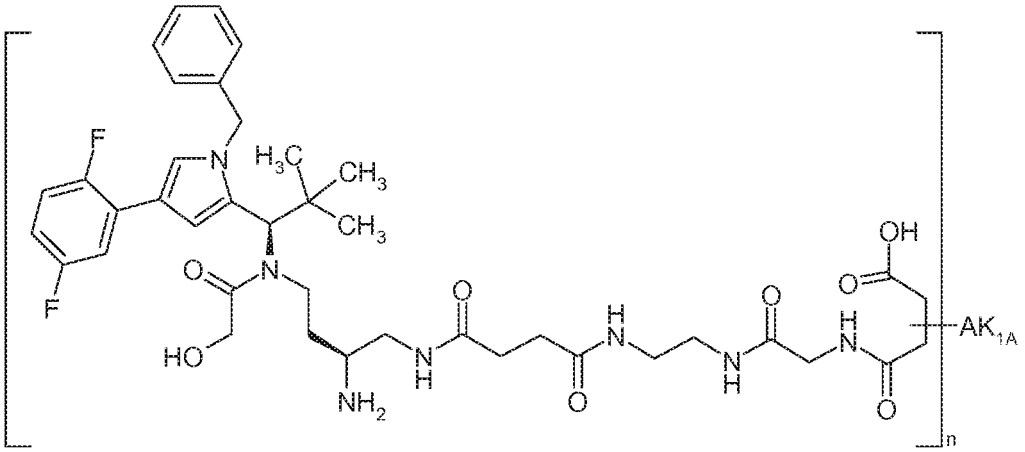


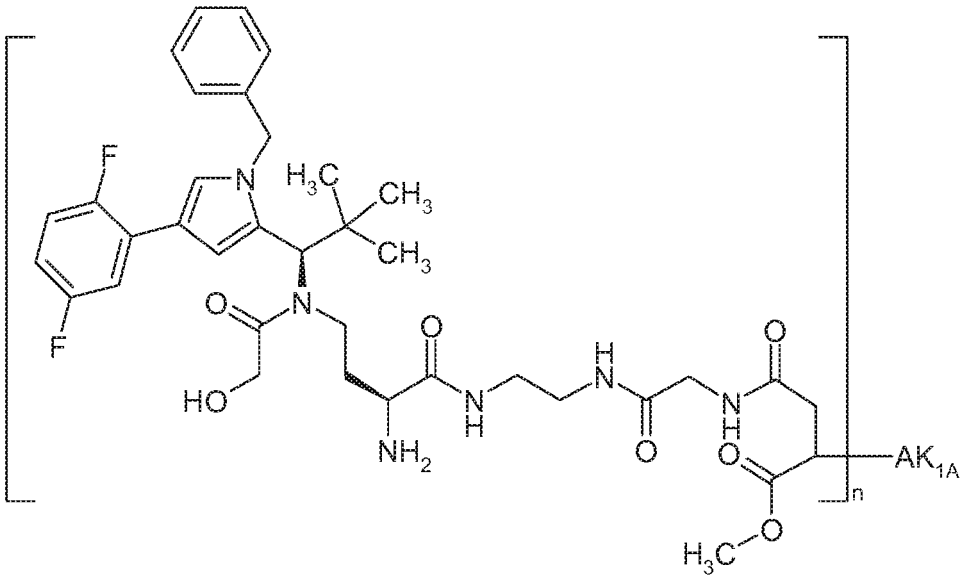


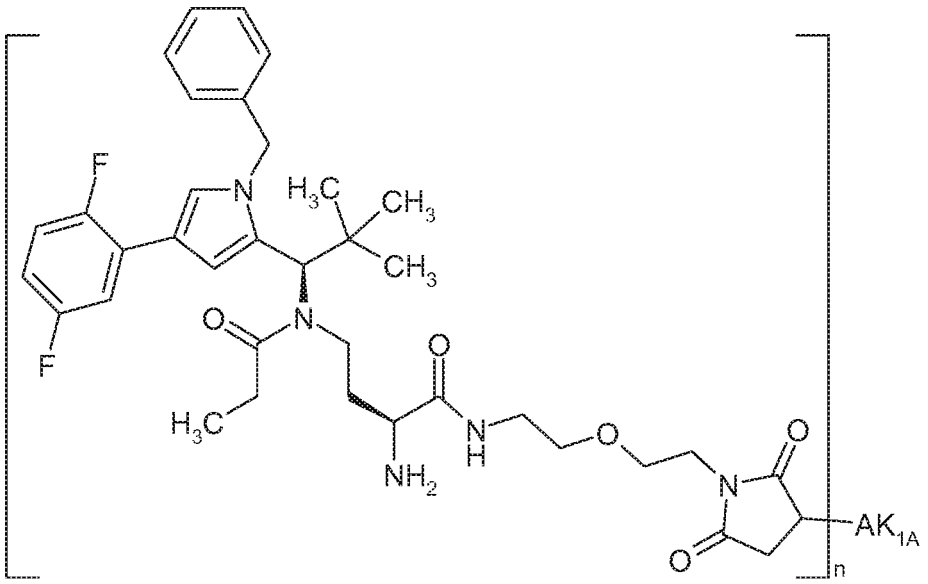


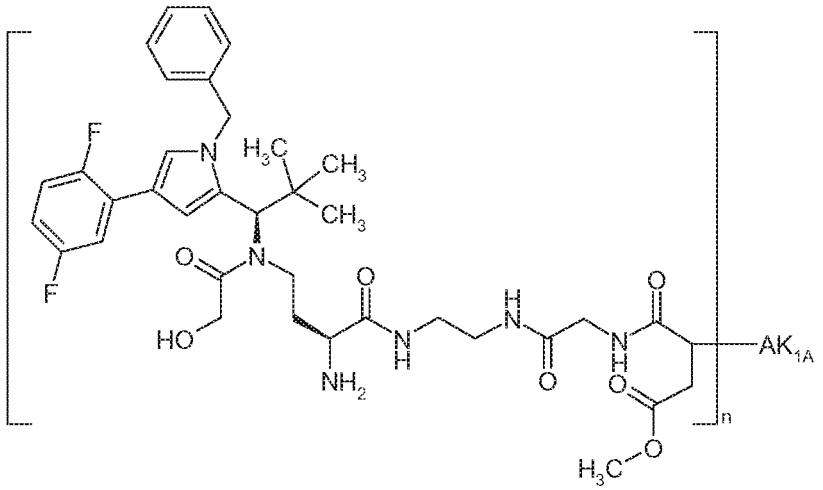


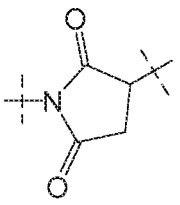








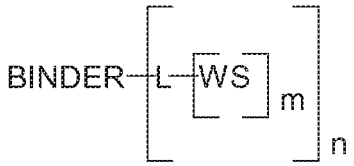




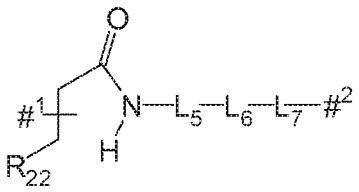
wobei das ADC, sofern es über eine Gruppe

mit dem Antikörper verbunden ist, statt dieser Gruppe auch zumindest teilweise in Form der hydrolysierten offenkettigen Bernsteinsäureamide mit dem Antikörper verknüpft vorliegen kann.

68. Binder-Wirkstoff der folgenden allgemeinen Formel bereit:



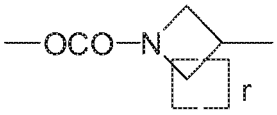
wobei BINDER für den Binder (bevorzugt: Antikörper) bzw. ein Derivat hiervon (bevorzugt: Cysteinrest), vorzugsweise einen Antikörper, L für den Linker, WS für den Wirkstoff, vorzugsweise einen KSP-Inhibitor, m für eine Zahl von 1 bis 2, n für eine Zahl von 1 bis 50, , wobei L eine der folgenden Strukturen aufweist:

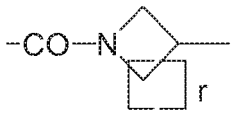


Formel A

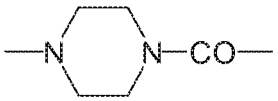
wobei #1 die Verknüpfungsstelle mit dem Schwefelatom des Binders kennzeichnet, #2 die Verknüpfungsstelle mit der dem Wirkstoff kennzeichnet, und R^{22} COOH, COOR, COR (mit R jeweils C1-3-Alkyl), CONH2, Br, vorzugsweise COOH darstellt;

L_5 ist eine Gruppe ausgewählt aus $-(CH_2)_m-(CHR^S)_n-(OCH_2CH_2)_o-(X)_p-(CH_2)_q-$, wobei m, n, o, p und q unabhängig voneinander die folgenden Werte aufweisen: m=0-10; n=0 oder 1; o=0-10; p=0 oder 1; und q=0-10, wobei m+n+o=1-15, vorzugsweise 1-6 ist. X stellt einen 5- oder 6-gliedrigen, aromatischen oder nicht-aromatischen Hetero- oder Homocyclus dar, vorzugsweise $-C_6H_4-$ oder $-C_6H_{10}-$. R^S stellt eine Säuregruppe, vorzugsweise –COOH oder SO_3H dar.

L_6 ist eine Gruppe ausgewählt aus –CONH-, -OCONH-, -NHCO-, -NHCOO-, 

oder 

wobei r 1, 2 oder 3 ist.

L_7 ist eine Einfachbindung oder eine Gruppe ausgewählt aus einer geradkettige oder verzweigten Kohlenwasserstoffkette mit 1 bis 100 (vorzugsweise 1 bis 10) Kohlenstoffatomen aus Arylengruppen und/oder geradkettigen und/oder verzweigten und/oder cyclischen Alkylengruppen ist, die einfach oder mehrfach durch eine oder mehrere der Gruppen -O-, -S-, -SO-, SO_2, -NR^y-, -NR^yCO-, -C(NH)NR^y-, -$CONR^y$-, -NR^yNR^y-, -SO2NR^yNR^y-, -$CONR^yNR^y$-, (wobei R^y H, Phenyl, C_1-C_{10}-Alkyl, C_2-C_{10}-Alkenyl, oder C_2-C_{10}-Alkinyl darstellt, die jeweils mit $NHCONH_2$, -COOH, -OH, $-NH_2$, NH-$CNNH_2$, Sulfonamid, Sulfon, Sulfoxid, oder Sulfonsäure substituiert sein können), -CO-, -CR^x=N-O- (wobei Rx H, C_1-C_3-Alkyl oder Phenyl darstellt) und/oder einen 3 bis 10-gliedriger, aromatischen oder nicht aromatischen Heterozyklus mit bis zu 4 Heteroatomen ausgewählt aus N, O und S, -SO- oder –SO2- unterbrochen sein kann (vorzugsweise ), wobei die Kohlenwasserstoffkette einschließlich der Seitenketten, sofern vorhanden, mit –$NHCONH_2$, -COOH, -OH, $-NH_2$, NH-$CNNH_2$, Sulfonamid, Sulfon, Sulfoxid, oder Sulfonsäure substituiert sein können.

69. Konjugat nach einem oder mehreren der Ansprüche 67 bis 68, wobei der Antikörper ein humaner, humanisierter oder chimärer monoklonaler Antikörper oder ein Antigen-bindendes Fragment hiervon ist.

70. Konjugat nach Anspruch 69, wobei der Antikörper ein anti-HER2-Antikörper, ein anti-EGFR-Antikörper, ein anti-TWEAKR-Antikörper, oder ein Antigen-bindendes Fragment hiervon ist.

71. Konjugat nach Anspruch 70, wobei der anti-TWEAKR-Antikörper spezifisch an die Aminosäure D in Position 47 (D47) von TWEAKR (SEQ ID NO:169) bindet, bevorzugt der anti-TWEAKR-Antikörper TPP-2090.